

Chitosan 고정화 Aminoacylase 를 이용한 DL 아미노산의 광학적 분할에 관한 연구 : 고정화 Aminoacylase 의 성질 및 반응성

李尙炫 · 이영춘
중앙대학교 식품가공학과

Studies on the Optical Resolution of DL-Amino Acids by Aminoacylase Immobilized on Chitosan: Properties and Reactivity of Immobilized Aminoacylase

Sang-Hyun Lee and Young-Chun Lee

Department of Food Science and Technology, Chung-Ang University, Seoul

Abstract

Aminoacylase immobilized on chitosan was applied for optical resolution of DL-amino acids. Optimum pH's for hydrolysis of N-ac DL Met, N-ac DL Try and N-ac DL Phe by immobilized aminoacylase were 8.0, 7.0, and 7.5, respectively. The pH stability of immobilized aminoacylase was less than that of soluble enzyme, while there was no difference in thermostability between immobilized and soluble enzymes. The reaction rate of immobilized enzyme was maximum, when concentrations of N-ac DL Met, N-ac DL Try and N-ac DL Phe were 0.05, 0.03 and 0.05M, respectively. Continuous resolution of M/20 N-ac DL amino acids with immobilized aminoacylase packed in a column resulted in 100% hydrolysis upto space velocity 2.0 at 45°C, and the half-life of the column at space velocity 5.0 was about 25 days. The yield of L-Met, L-Try and L-Phe recovered from 2 liter of column effluent were 57%, 52% and 52%, respectively. Key words: immobilized aminoacylase, DL-amino acids, optical resolution, aminoacylase reactivity

서 론

현재 화학적인 합성에 의해 생산되고 있는 DL 아미노산은 aminoacylase 의 작용으로 광학적 분할 반응에 의해 L-아미노산이 생산되고 있으며⁽¹⁻²⁾, 특히 고정화 효소를 조제하여 사용함으로써, 연속반응 및 효소의 이용률 증대가 가능하며, 효소액에서 유래하는 불순물 및 효소 단백질의 혼입을 방지하여 L-아미노산의 순도를 높이고 있다.

Chitosan⁽³⁾은 chitin(poly β-1,4 acetyl glucosamine)의 탈 아세틸화된 형태의 천연 중합체로서, 주로 해양갑각류에서 얻고 있으며 중합체의 안정성이 인정되어 효소의 고정화⁽⁴⁻⁶⁾에도 이용되고 있다.

본 연구에서는 chitosan 을 고정화 담체로 하여 조제

한 고정화 aminoacylase 의 이용성을 검토하려고 시도하였다.

재료 및 방법

실험재료

Leuba 등⁽⁶⁾의 방법에 의하여 제조한 고정화 aminoacylase 를 실험에 사용하였으며, 반응기질로는 Sigma Co. 제품의 N-acetyl DL methionine(N-ac DL Met), N-acetyl DL tryptophane(N-ac DL Try) 및 N-acetyl DL phenylalanine(N-ac DL Phe)을 사용하였다.

고정화 aminoacylase 의 성질

pH 가 효소의 활성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 기질 0.1M N-ac DL amino acids 의 pH 를 4.0-9.5 로 조절하여 각 pH 에서의 활성을 측정하였다. 이를 위

Corresponding author: Young-Chun Lee, Department of Food Science and Technology, Chung-Ang University, 221, Heuksuk-dong, Dongjak-gu, Seoul 156-756

하여 pH 4.0-6.0은 acetate buffer, pH 6.0-8.5는 phosphate buffer, pH 8.5-9.5는 Veronal buffer 를 사용하였다.

가용성 및 고정화 aminoacylase 의 pH 에 대한 안정성 조사는 0.1M buffer 에 효소를 4°C 에서 24시간 방치한 뒤 0.1M N-ac DL Met 를 기질로 활성측정 조건에서 잔존활성을 측정하여 계산하였다. 그리고 온도가 aminoacylase 의 반응속도에 미치는 영향은 0.1M N-ac DL Met 을 사용하여 최적 pH 에서 반응온도를 37-80°C 까지 변화시키면서 효소 활성을 측정하여 조사하였다. Aminoacylase 의 열에 대한 안정성은 37-80°C 까지 각 온도에서 30분간 노출시킨 뒤 0.1M N-ac DL Met 을 기질로 37°C, 최적 pH 에서 잔존활성을 측정하여 표시하였다. 그리고 기질 농도가 반응속도에 미치는 영향은 최적 pH 에서 기질 농도를 0.005-0.15M 로 조정하면서 10분간 활성을 측정하여 초기반응 속도를 구하여 비교하였다.

고정화 aminoacylase 의 column 내 반응특성

Chitosan 담체 10g 으로 조제한 고정화 aminoacylase 7,200 units 로 내경 1.32cm, 높이 41cm 의 고정화 aminoacylase column 을 만들고, 이것을 magnetic stirrer 가 부착된 jacket 형 수욕내에서 45°C 로 유지시키면서 0.05M 기질을 공간속도 1.0-6.0 으로 pumping 하여 반응시켰다. 이때 유속은 연동펌프 (P-1, Pharmacia Fine Chemicals) 를 사용하여 조절하였고, 반응중 column 유출물의 L-amino acids 를 정량하여 가수분해율을 계산하였다. Immobilized aminoacylase column 의 연속반응은 앞의 조건으로 만든 column 에 0.05M 농도의 기질 2 liter 를 45°C, 공간속도 0.15 로 반응시켜 실시하였다.

고정화 aminoacylase 의 조작 안정성을 조사하기 위하여 내경 0.62cm, 높이 15cm 의 column 에 490 units 의 고정화 aminoacylase 를 충전하여, 0.05M N-ac DL Met (pH 8.0) 을 공간속도 5.0 으로 45°C 에서 10일간 연속반응 시켰다. 이때 column 유출물을 6시간 마다 취해 L-methionine 을 정량하여 column 의 활성변화를 조사하였으며, Weetall 등⁽⁷⁾ 의 방법으로 column 의 반감기를 계산하였다.

L-amino acids 및 N-ac D amino acids 의 분리

Aminoacylase 반응에서 얻는 L-amino acids 및 N-ac D amino acids 의 분리 및 결정화는 Chibata⁽¹⁾ 등,

田中⁽⁸⁾ 등, 工藤⁽⁹⁾ 등의 방법을 조합하여 행하였다. 즉, 반응액을 감압 농축한 뒤 4°C 로 냉각하여 용해도가 작은 L-amino acids 를 결정으로 석출시켰다.

L-amino acids 를 여과한 후 수세하여 재결정화 시켰고, 분리모액은 pH 를 1.5로 조절한 다음 ethyl acetate 로 4회 추출하고, ethyl acetate 층을 모아 감압농축하여 N-ac D amino acids 를 얻었다.

반응산물의 비선광도는 sodium D-line 을 광원으로 K-Fuji polarimeter (Japan) 로 25°C 에서 3회 반복 측정하였고, 용점은 Büchi 510 (Büchi Lab. Co., Switzerland) 용점 측정기를 사용하여 1°C/min 의 온도상승 속도에서 3회 반복 측정하였다.

결과 및 고찰

고정화 aminoacylase 의 성질

0.1M 의 N-ac DL Met, N-ac, DL Try, N-ac DL Phe 에 대한 고정화 aminoacylase 의 pH-활성 곡선은 Fig. 1과 같으며, 각 기질에 대한 고정화 aminoacylase 의 최적 pH 는 8.0, 7.0, 7.5 이었다. Tosa 등^(2,10-13) 및 Chibata⁽¹⁾ 등의 *Aspergillus oryzae* 로부터 얻은 가용성 aminoacylase 의 N-ac DL Met 에 대한 최적 pH 가 7.5 라는 보고와 본 실험에 사용한 solu-

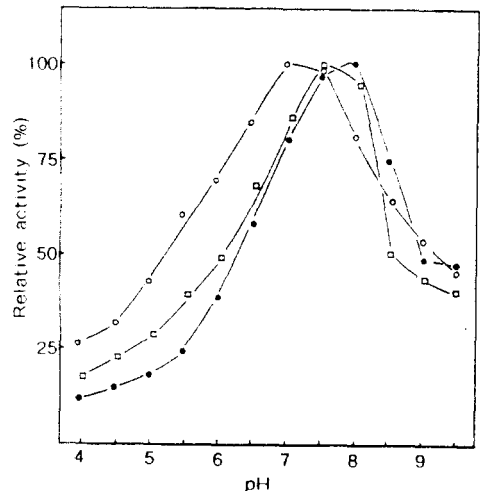


Fig. 1. Effect of pH on the activity of immobilized aminoacylase. N-ac DL methionine (●—●), N-ac tryptophan (○—○), N-ac DL phenylalanine (□—□)

ble enzyme의 이들 각 기질에 대한 최적 pH가 7.0, 6.0, 6.5임을 고려하면, 고정화 aminoacylase의 최적 pH가 알카리 쪽으로 약간 이동했음을 알 수 있었다.

가용성 및 고정화 aminoacylase에 대한 pH 안정성을 조사한 결과는 Fig. 2와 같다. 가용성 효소는 pH 6.0-7.5의 범위에서 안정하였으며, 가장 안정한 pH 7.0에서 본래 활성의 97.9%를 유지하고 있었다. 고정화 aminoacylase는 pH 6.5-7.5에서 안정하였고, 가장 안정한 pH 6.5-7.0에서 본래 활성의 67.5%만을 유지하고 있어 효소를 고정화 하므로서 pH 안정성이 오히려 저하되는 것으로 나타났다.

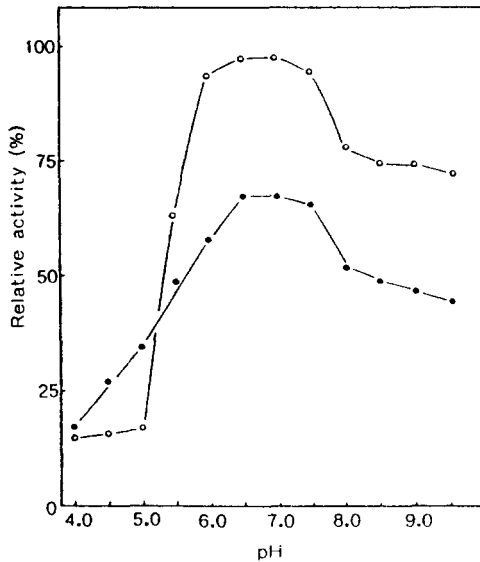


Fig. 2. pH-stability of soluble(○—○) & immobilized(●—●) aminoacylase.

온도가 aminoacylase의 반응성에 미치는 영향은 Fig. 3과 같다. 가용성 aminoacylase의 37°C에서의 반응속도를 100으로 하고, 각 온도에서의 반응속도를 이에 대한 상대치로 표시하면, 65°C까지 온도가 증가함에 따라 반응속도가 증가하였고 65°C 이상의 온도에서는 점차 감소하였다. 고정화 효소의 경우에도 가용성 효소와 비슷한 경향을 보였으며, 65°C에서 최고의 반응속도를 나타냈다. 이들 각 온도에서 얻은 반응속도를 Arrhenius plot으로 표시하면 Fig. 4와 같고, 겔보기 활성화 에너지는 가용성 효소가 3.3 Kcal/mole, 고정화 효소가 4.0 Kcal/mole로서 별 차이는 없었다. *Asp. oryzae*에

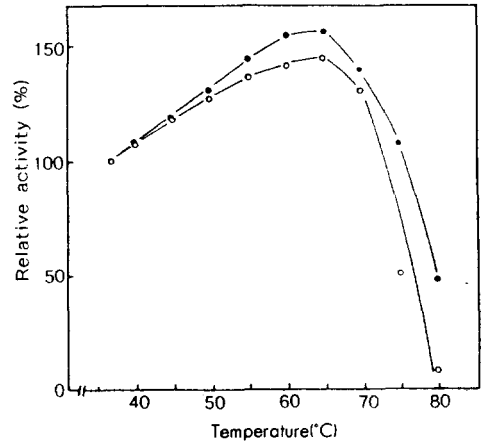


Fig. 3. Effect of temperature on the reaction rate of soluble(○—○) & immobilized(●—●) aminoacylase.

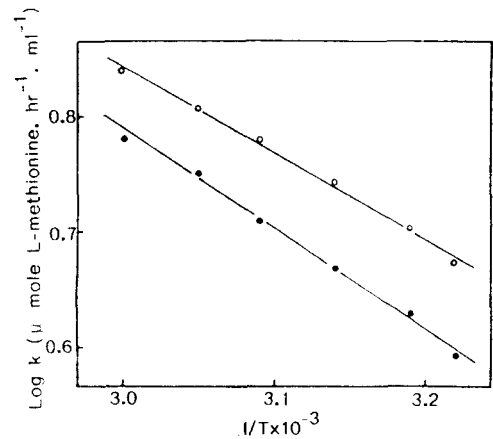


Fig. 4. Arrhenius-plot for the aminoacylase reaction. $E_a=3.3$ Kcal/mole; soluble $E_a=4.0$ Kcal/mole: immobilized

서 얻은 aminoacylase의 겔보기 활성화 에너지는 가용성이 6.7 Kcal/mole 이고(2,10-13), DEAE-sephadex에 고정된 것이 7.6 Kcal/mole(2,10-11), Polyacrylamide gel에 고정된 것이 5.7 Kcal/mole로(13) 고정화 효소의 담체에 따라 변화가 있었다. Aminoacylase의 열안정성은 가용성이나 고정화 효소 공히 45°C까지 본래의 활성을 유지했으며, 45°C 이상에서는 온도가 증가함에 따라 급격히 실활됨을 볼 수 있었다(Fig. 5). 따라서 고정화 효소 column의 연속반응은 45°C에서 실시하기로 결정하였다.

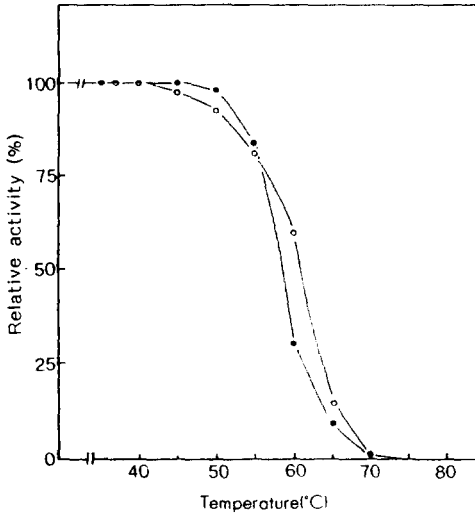


Fig. 5. Thermostability of soluble (○—○) & immobilized (●—●) aminoacylase.

기질농도가 고정화 aminoacylase의 반응속도에 미치는 영향은 Fig. 6과 같다. 즉, N-ac DL Met, N-ac DL Try 및 N-ac DL Phe에 대해 기질농도 0.05, 0.03 및 0.05M에서 반응속도가 최대였으며, 기질에 의한 효소활성의 저해는 없었다.

고정화 효소의 기질 특이성은 N-ac DL Met, N-ac DL Try 및 N-ac DL Phe에 대해 N-ac DL Met을 100으로 볼때 각각 100, 67.7 및 83.3이었다.

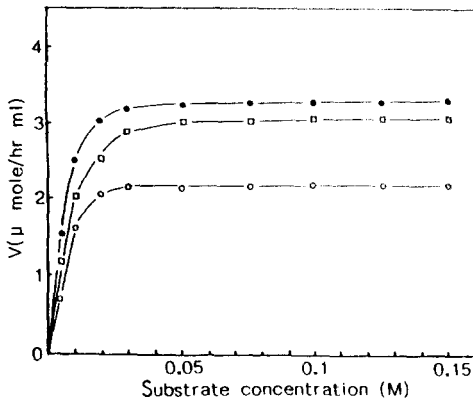


Fig. 6. Effect of substrate concentration on the initial reaction rate of immobilized aminoacylase. N-ac DL methionine (●—●), N-ac DL tryptophan (○—○), N-ac DL phenylalanine (□—□).

고정화 aminoacylase의 column내 반응특성

고정화 aminoacylase 7,200 units를 충전한 column에 M/20 기질을 pumping 하여 가수분해할 때 유속이 미치는 영향을 조사한 결과는 Fig. 7과 같다. N-ac DL Met, N-ac DL Try 및 N-ac DL Phe의 공간속도 2.0까지는 100% 가수분해율을 보이다가 공간속도가 증가함에 따라 가수분해율이 점점 감소했으며, 이런 감소는 특히 N-ac DL Phe에서 심하였다. 산업적인 이용면을 고려하면 aminoacylase 반응은 반드시 완전 가수분해를 요함으로, 이 실험조건에서는 공간속도를 2.0 이하로 유지하는 것이 좋을듯하다.

고정화 aminoacylase의 조작 안정성을 조사하기 위해 연속반응 시킨 결과는 Fig. 8과 같았다. 반응율이 시간 경과에 따라 직접 변화를 나타낼 수 있는 조건에서 고정화 효소 column은 최초로 0.05M N-ac DL Met을 74.4% 가수분해 시켰고, 시간 경과에 따라 서서히 활성이 감소하여, 10일 연속반응 시킨 후에는 54.4%의 가수분해율을 보였다.

이 연속반응의 data는 1차 반응식으로 표시할 수 있고, 여기서 구한 직선회귀식으로 부터 Weetall⁽⁷⁾ 등의 방법에 따라 반감기를 구한 결과 aminoacylase column의 반감기는 24.6일이었다. 그러나 column의 실제 운용은 보다 온화한 조건에서 될 것이므로 amino-

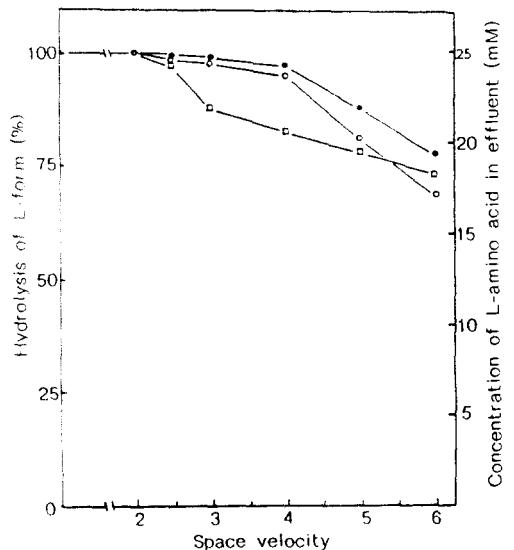


Fig. 7. Effect of flow rate on the hydrolysis of N-ac DL methionine (●—●), N-ac DL tryptophan (○—○), N-ac DL phenylalanine (□—□).

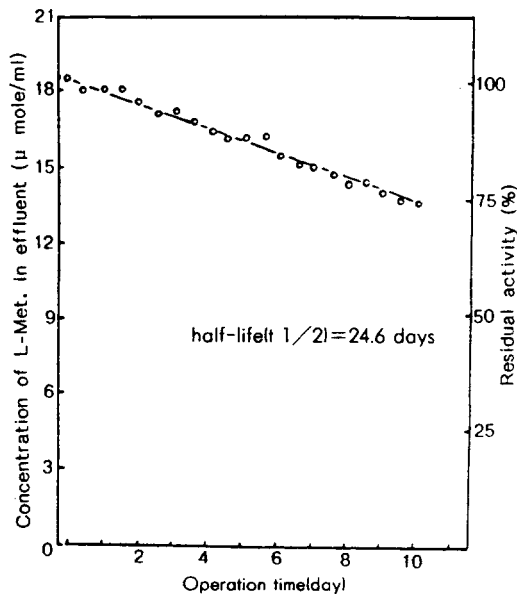


Fig. 8. Continuous operation of immobilized aminoacylase column.

acylase column의 반감기는 좀 더 연장될 것으로 생각된다.

L-amino acids 및 N-ac D amino acids의 분리

0.05M의 N-ac DL Met, N-ac DL Try 및 N-ac DL Phe 각각 2 liter를 45°C, 공간속도 1.5에서 연속 반응시켜 얻은 유출액을 농축 및 결정화 하여 분리한 각 아미노산의 수율은 다음과 같았다: L-methionine 57%, N-ac D methionine 59%, L-tryptophane 52%, N-ac D tryptophane 50%, L-phenylalanine 52%, N-ac D phenylalanine 54%. 반응산물의 수율이 낮은 것은 소량을 농축—분리하는 과정에서 손실이 많았기 때문으로 생각된다.

이와 같이 얻은 반응산물의 순도를 알아보기 위해 비선광도와 용점을 측정한 결과 Table 1과 같다. L-amino acids의 비선광도는 보고된 L-Met 23.9, L-Try -31.2 및 L-Phe -33.9⁽⁴⁾에 비해 그 절대치가 약간 작았다. 그리고 용점도 표준 아미노산의 용점⁽⁵⁾ (L-Met 280-282°C, L-Try 289°C, L-Phe 283°C)에 비해 다소 낮은 수치를 나타내었는데, 이는 분리 단계에서 완벽하지 못했던 것이 원인으로 생각된다.

Table 1. Specific rotation and melting point of the products.

Amino acids	$[\alpha]_D^{25}$	C.g/dl	Solvent	M.P.(°C)
L-Met	+23.0°	2	6N-HCl	279.5
N-ac D Met	+19.8	2	H ₂ O	101.1
L-Phe	-33.3	2	H ₂ O	282.2
N-ac D Phe	-50.7	1	absolute ethanol	168.7
L-Try	-29.7	1	H ₂ O	287.0
N-ac D Try	-25.8	1	methanol	188.9

요 약

고정화 aminoacylase의 N-ac D Met, N-ac DL Try 및 N-ac DL Phe에 대한 최적 pH는 각각 8.0, 7.0, 7.5이었고, pH 안정성은 가용성 효소에 비해 감소하였다. 고정화 효소의 열 안정성은 가용성 효소와 별 차이가 없었고, 최적온도는 45°C이었다. 그리고 고정화 효소는 N-ac DL Met, N-ac DL Try, N-ac DL Phe의 농도가 각각 0.05, 0.03 및 0.05M일 때 반응속도가 최대였으며, 기질에 의한 효소 활성의 저해는 없었다.

0.05M N-ac DL amino acids를 고정화 aminoacylase column에 연속반응 시킨 결과 공간속도 2.0까지는 100%의 가수분해율을 보였다. 그리고 고정화 효소 column의 조작 안정성을 조사한 결과 column의 반감기는 24.6일이었다.

연속반응의 유출물로부터 분리한 L-amino acids의 이온치에 대한 수율은 L-Met이 57%, L-Try이 52%, L-Phe이 52%이었고, 회수한 반응 산물의 비선광도와 용점은 표준 아미노산 보다 절대치가 약간 낮았다.

감사의 글

이 연구는 1986년도 문교부 자유과제 학술연구 조성비 지원에 의하여 수행되었으며, 이에 깊은 감사를 드립니다.

문 헌

1. Chibata, I., Tosa, T., Sato, T. and Mori, T.: Production of L-amino acids by aminoacylase adsorbed on DEAE-Sephadex. In *Methods in Enzymology*, Aca-

- demic Press, New York, Vol. 44, p.746(1976)
2. Tosa, T., Mori, T., Fuse, N. and Chibata, I. : Studies on continuous enzyme reactions. IV. Preparation of a DEAE-sephadex aminoacylase column and continuous optical resolution of acyl DL-amino acids. *Biotechnol. Bioeng.*, **9**, 603(1967)
 3. Knorr, D. ; Use of chitinous polymer in food. *Food Technology*, **38**(1), 85(1984)
 4. Kasumi, T., Tsuji, M., Hayashi, K. and Tsumura, N. : Preparation and some properties of chitosan bound enzymes. *Agric. Biol. Chem.*, **4**(10), 1865(1977)
 5. Leuba, J.L., Widmer, F. : Immobilization of proteinase on chitosan. *Biotechnology Letters*, **1**(3), 109(1979)
 6. Leuba, J.L., Widmer, F. and Magnolato, D. ; Purification and immobilization of a fungal lactase. *Enzyme Engineering* Vol. 4, Plenum Press, New York, p. 57(1978)
 7. Weetall, H. and Havewala, N.B. : Continuous production of dextrose from cornstarch. *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, No. 3, 241(1972)
 8. 田中正生, 中村信雄 : L-아미노산의 제조 방법. 日本特許公報, 昭 43-28286(1968)
 9. 工藤士郎, 久代活徳 : 아미노산의 광학적 분할법. 日本特許公報, 昭 43-15401(1968)
 10. Tosa, T., Mori, T. and Chibata, I. : Studies on continuous enzyme reactions. VI. Enzymatic properties of the DEAE-sephadex aminoacylase complex. *Agric. Biol. Chem.*, **33**(7), 1053(1969)
 11. Tosa, T., Mori, T. and Chibata, I. ; Studies on continuous enzyme reactions. VIII. Kinetics and pressure drop of aminoacylase column. *J. Ferment. Technol.*, **49**(6), 522(1971)
 12. Tosa, T., Mori, T., Sato, T. and Chibata, I. : Enzymatic properties of DEAE-cellulose aminoacylase complex. *Enzymologia*, **32**, 153(1967)
 13. Tosa, T., Mori, T., Sato, T. and Chibata, I. : Preparation and properties of aminoacylase entrapped into acrylamide gel lacttice. *Enzymologia*, **43**, 213(1972)
 14. Kaneko, T., Izumi, Y., Chibata, I. and Itoh, T. : Quality of amino acids. In *synthetic production and utilization of amino acid*, Kodansha, Tokyo, p. 233(1974)
 15. Martha, W. : *The Merck Index*, 10th ed., Merck & Co., Inc. Rahway, p.858, 1048 & 1399(1983)
(1988년 4월 15일 접수)