

Paenibacillus sp. JB-13의 Cyclodextrin glucanotransferase에 의한 2-O- α -D-Glucopyranosyl L-Ascorbic acid 생산

배경미 · 강 용 · 전홍기*
부산대학교 자연과학대학 생명과학부

Production of 2-O- α -D-Glucopyranosyl L-Ascorbic Acid by Cyclodextrin Glucanotransferase from *Paenibacillus* sp. JB-13. Bae, Kyung-Mi, Yong Kang, and Hong-Ki Jun*. Division of Biological Sciences, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea - *Paenibacillus* sp. JB-13 producing the cyclodextrin glucanotransferase (CGTase) [EC 2.4.1.19] that glucosylated ascorbic acid (AA) at the C-2 position was isolated from soil and the optimal conditions for the production of 2-O- α -D-Glucopyranosyl L-Ascorbic acid (AA-2G) with CGTase were investigated. CGTase produced AA-2G efficiently using dextrin as a substrate and AA as an acceptor. Several AA-2-oiligosaccharides (AA-2Gs) were also produced in this reaction mixture, and these were efficiently hydrolyzed to AA-2G and glucose by the treatment with glucoamylase. The optimal temperature for AA-2G production was 37°C and the optimal pH was around 6.5. CGTase also utilized α -, β -, γ -CDs, soluble starch, corn starch, diastatic solution from rice and diastatic solution from malt as substrate, but not glucose. The reaction mixture for the maximal production of AA-2G was following; 15% total substrate concentration, 2,500 units/ml of CGTase and a mixing ratio of 3 : 2(g of AA : g of dextrin). Under this condition, 56 mM of AA-2G, which corresponded to 12.4% yield based on AA, was produced after incubation for 44 hrs at 37°C and pH 6.5.

Key words: 2-O- α -D-glucopyranosyl L-ascorbic acid, cyclodextrin glucanotransferase, *Paenibacillus* sp. JB-13, transglucosylation

2-O- α -D-Glucopyranosyl L-ascorbic acid(AA-2G)는 포유동물[11] 및 버섯자[12] α -glucosidase 그리고 *Bacillus stearothermophilus*[1]가 생산하는 CGTase의 부위특이적 당전이반응을 통하여 합성되는 안정형 L-ascorbic acid (AA) 유도체이다. AA의 불안전성이 보완된 AA 유도체에는 AA-2G 이외에도 L-ascorbic acid 2-sulfate(AA-2S), L-ascorbic acid 2-phosphate(AA-2P) 및 L-ascorbic acid 2-methylester(AA-2M) 등이 알려져 있다[4,8,9,10]. 이들은 모두 AA의 2번 위치의 수산기가 sulfate, phosphate 및 methylester로 치환된 구조를 가지고 있으며, 각각에 의해 AA의 수산기가 보호되고 있어 이들 유도체의 안정성이 유지되는 것으로 알려져 있다. 하지만 이들은 대부분 유기화학합성법에 의존해 있으며, 반응이 복잡하고 수율이 낮으며, 정제 또한 곤란해서 생산단가가 높아 실용에는 적합하지 않다. 뿐만 아니라 AA-2S 및 AA-2M은 AA의 가장 중요한 생리활성인 항괴혈작용 및 콜라겐합성 촉진작용에 대한 활성이 없다. AA-2P의 경우는 앞에 언급한 두가지 생리활성을 모두 가지고 있을 뿐만 아니라 효소적 생산에 관해서도 다수의 보문이 보고되고 있다[3,6]. 하지만 AA-

2P는 생체 투여시 phosphatase에 의해 급속히 가수분해되어 AA-2G에 비해 세포내에서 AA의 활성을 지속적으로 유지시키지 못하는 결점을 가지고 있다[7]. 이와는 달리 AA-2G는 세포내에 존재하는 α -glucosidase에 의해 분해되어 AA의 생리활성을 나타내며 AA-2P에 비해 지속적으로 AA활성을 유지한다[7,14]. 이러한 특징 이외에도 AA-2G는 넓은 pH의 수용액 상태에서 안정하며, 열, 빛 그리고 ascorbate oxidase에 대해서도 탁월한 안정성을 발휘한다[15].

한편, AA-2G의 합성에 있어 화학적 합성법을 사용할 경우에는 상기에서 언급한 문제점 이외에도 glucose와 AA의 결합이 α -configuration이 아닌 β -configuration으로 합성되어 생체 투여시 α -glucosidase에 의해 분해되지 못하여 AA 활성을 충분히 나타내지 못하는 단점을 가지고 있다. 따라서 AA-2G의 효소적 합성은 필수적이며 특히 미생물기원 효소인 cyclodextrin glucanotransferase(CGTase, EC 2.4.1.19)가 AA-2G를 효율적으로 생산한다는 보고[1,13]가 있어 이를 통한 AA-2G의 대량생산이 요망된다. Starch를 cyclodextrin으로 전환할 수 있는 활성을 가진 CGTase는 이러한 cyclization activity뿐만 아니라 coupling, disproportionation 및 hydrolysis activity도 가지고 있는 multiple enzyme이다. 특히, 최근 들어서 AA-2G와 같이 CGTase의 coupling activity를 이용한 당전이물질의 생산에 관해 많은 연구가 이루어지고 있다.

본 실험실에서는 AA-2G의 효율적인 효소적 합성을 위해

*Corresponding author
Tel. 82-051-510-2270, Fax. 82-051-513-4532
E-mail: hkjun@hyowon.cc.pusan.ac.kr

AA의 2번 위치의 수산기에 부위특이적 활성을 갖는 CGTase를 분리하고자 노력한 끝에 토양으로부터 *Paenibacillus* sp. JB-13을 분리·동정하였다. 따라서, 본 연구에서는 *Paenibacillus* sp. JB-13이 생산하는 CGTase를 효소원으로 하여 AA와 당공여체로부터 AA-2G를 생산하기 위한 최적반응조건을 검토하였다.

재료 및 방법

균주의 배양 및 조효소액의 생산

토양으로부터 분리, 동정한 *Paenibacillus* sp. JB-13을 1.0% soluble starch, 1.0% yeast extract, 1.0% Na₂CO₃, 0.1% K₂HPO₄, 0.02% MgSO₄·7H₂O(pH 7.0)에서 48시간 동안 진탕배양한 후 얻어진 배양액을 4°C에서 원심분리(15,000×g, 20 min)한 후 상등액을 50%(NH₄)₂SO₄로 염석하고 투석하여 AA-2G 생산을 위한 조효소액으로 사용하였다.

CGTase의 활성측정

CGTase 활성은 전보[5]에서의 동일한 방법으로 측정하였으며, CGTase 1 unit는 45°C에서 1분 동안 1 μmole의 glucose를 생성하는 효소의 양으로 정의하였다.

AA-2G의 분석방법 및 시약

AA-2G 표준품은 일본 Kinki 대학 식품과학과의 Sakai 교수로부터 공급받아 사용하였으며, CGTase를 이용한 당질이 반응산물에 의해 합성된 AA-2G의 농도는 HPLC (Model-515, Waters)를 사용하여 결정하였다. Column은 μ Bondapack C₁₈ column(Waters), 용출용매는 0.1M potassium phosphate-phosphoric acid(pH 2.0), 용출속도는 0.5 ml/min 이었으며, UV detector(Model-2487, Waters)로 검정하였다. AA-2G 생산에 적합한 당공여체 검토실험에서 사용된 potato starch(PS)와 corn starch(CS)는 호화시킨 후 사용하였고 starch(S)는 Sigma사에서 시판되는 hydrolyzed potato starch를 사용하였다. Glucoamylase는 Sigma사(St. Louis, USA)의 *Rhizopus* mold 유래의 시판 효소를 사용하였다.

AA-2G 최적생산조건 검토

AA-2G 최적생산조건을 검토하기 위해 당수용체인 AA, 당공여체인 dextrin 그리고 *Paenibacillus* sp. JB-13이 생산하는 CGTase의 조효소액으로 구성된 혼합물을 기본반응물로 하여 반응온도 및 pH, 반응시간, 기질농도비 및 기질농도, buffer 종류 그리고 효소농도에 따른 영향을 검토하였다.

결과 및 고찰

Paenibacillus sp. JB-13 유래 CGTase의 AA-2G 생산에 적합한 당공여체의 검토

AA-2G 생산에 미치는 당공여체의 영향을 검토하기 위해, 3%의 AA, 7%의 다양한 당공여체 및 2,000 units/ml의 CGTase로 구성된 반응혼합액을 45°C, pH 6.0, 24시간 동안 반응하여 AA-2G 생성량을 조사하였다. 그 결과는 Fig. 1에 나타난 바와 같다. Dextrin, corn starch, soluble starch 및 starch를 사용하였을 때 AA-2G 생산수율이 높았으며, 특히 dextrin을 당공여체로 사용하였을 때 3.25 mM로 가장 많은 AA-2G를 합성하였다. Aga 등[3]이 보고한 *B. stearothermophilus* 유래 CGTase의 경우는 CDs에 의한 AA-2G 합성수율이 높은 반면 본 균주가 생산하는 CGTase의 경우는 cyclodextrins(CDs)보다 starch 종류가 더 높은 AA-2G 생산수율을 나타내었다. 하지만 maltose 및 maltotriose 등 중합도가 낮은 당공여체를 사용했을 경우 AA-2G 생산수율이 매우 낮은 것과 glucose 사용시 AA-2G가 합성되지 않은 결과는 *B. stearothermophilus* 유래 CGTase와 동일한 결과를 나타내었다. 결과적으로 *Paenibacillus* sp. JB-13 유래 CGTase는 AA-2G 합성시 중합도가 높은 당공여체를 효율적으로 이용한다는 것을 알 수 있었다. 특히 식혜제조폐액인 밥당화액과 엿당화액을 당공여체로 사용하였을 경우도 AA-2G가 생성됨을 확인하였다. 이러한 폐액의 이용은 AA-2G의 대량생산시 단가절감에 기여할 것으로 판단된다.

한편, AA-2G 생산시 CGTase의 반응산물로 생성된 AA-2-oligoglucosides(AA-2Gs)를 분해하여 AA-2G로 전환하기 위해 glucoamylase를 처리하였다. Fig. 1에서 볼 수 있듯이 모든 당공여체에서 glucoamylase를 처리하였을 때

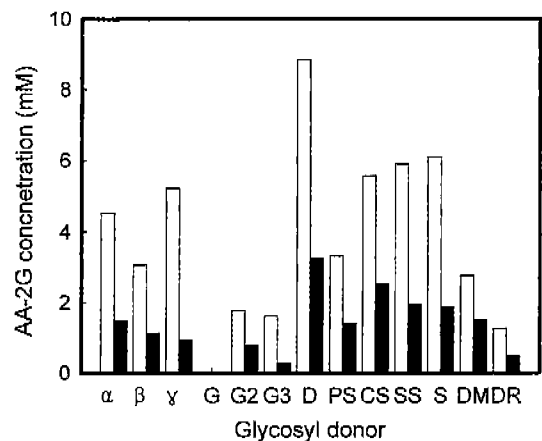


Fig. 1. Glycosyl donor specificity for 2-O- α -D-glucopyranosyl L-ascorbic acid production.

Reaction mixture consisting of 3.0%(w/v) of ascorbic acid, 7.0% (w/v) of glycosyl donors, and 2,000 units/ml of CGTase was incubated at 45°C, pH 6.0, for 24 hrs. AA-2Gs were hydrolyzed by 20 units of glucoamylase, and HPLC analysis was done with μ Bondapack C₁₈ column. α, α-CD; β, β-CD; γ, γ-CD; G, glucose; G2, maltose; G3, maltotriose; D, dextrin; PS, gelatinized potato starch; CS, gelatinized corn starch; SS, soluble starch; S, hydrolyzed starch; DM, diastatic solution from malt; DR, diastatic solution from rice. □, only CGTase; ■, glucoamylase treatment.

AA-2G 생산수율이 2배정도 증가되었으며, 이는 glucoamylase의 처리에 의해 AA-2Gs가 효과적으로 AA-2G로 전환될 수 있음을 나타낸다.

**CGTase를 이용한 당전이 AA-2G의 최적생산조건 검토
AA-2G 생산에 미치는 pH의 영향**

AA-2G 생산에 미치는 반응혼합액의 pH 영향을 검토하기 위해, 3% AA, 7% dextrin 및 2,000 units/ml의 CG Tase로 구성된 반응혼합액의 pH를 3.0부터 12.0까지 변화시켜 45°C에서 24시간 동안 반응하고, AA-2Gs의 분해를 위해 20 units의 glucoamylase를 55°C, 24시간 동안 처리한 후 AA-2G 생성량을 비교 검토하였다. 그 결과 Fig. 2에 나타난 바와 같이, AA-2G 생산량은 pH 6.5에서 11.9 mM로 최대를 나타내었으며, 이 범위를 벗어난 알칼리 영역에서는 산성영역에 비해 급격히 감소되는 경향을 보였다. *B. sterothermophilus* 및 본 실험실에서 김치로부터 분리한 *Bacillus* sp. JK-43[2]의 경우는 pH 5.0과 pH 5.5에서 각각 AA-2G 최대생산량을 나타내었다. 따라서, AA-2G는 약 산성 pH영역에서 높은 생산수율을 나타냄을 알 수 있다.

AA-2G 생산에 미치는 기질비 및 기질농도의 영향

AA-2G 생산에 미치는 기질비의 영향을 알아보기 위해 AA와 dextrin의 전체농도를 10%로 고정시킨 후 AA와 dextrin의 농도비를 Fig. 3에 나타난 바와 같이 3:7, 4:1, 2:3, 3:2, 7:3, 1:1 및 1:4로 변화시켜 45°C, pH 6.5에서 24시간동안 반응하였다. 상기와 마찬가지로 AA-2Gs의 분해를 위해서 glucoamylase(20 units)를 55°C에서 동 시간 반응하였다. 그 결과 Fig. 3에서 볼 수 있듯이 AA:dextrin이 3:2일 때 AA-2G의 생산량이 11.0 mM로

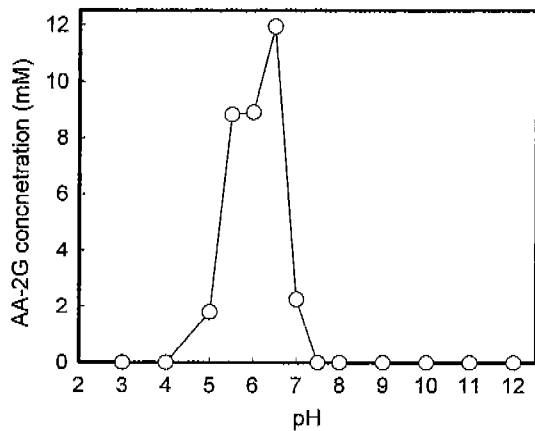


Fig. 2. Effect of pH on the production of 2-O- α -D-glucopyranosyl L-ascorbic acid by CGTase from *Paenibacillus* sp. JB-13. Reaction was carried out for 24 hrs at 45°C and various pHs in the reaction mixture containing 7% (w/v) of dextrin, 3% (w/v) of AA and 2,000 units/ml of CGTase. AA-2Gs were hydrolyzed by 20 units of glucoamylase for 24 hrs at 55°C.

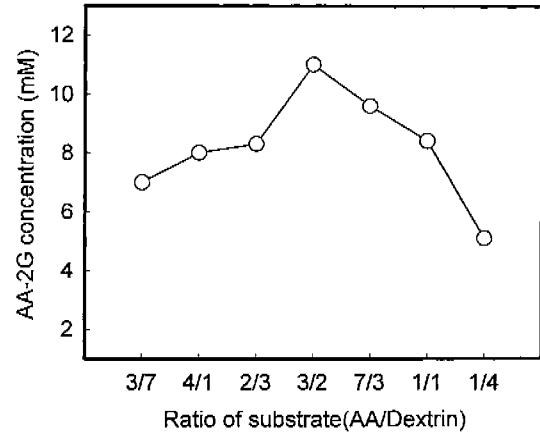


Fig. 3. Effect of substrate ratio on the transglucosylation to L-ascorbic acid. Reaction mixture was consisted of 10% (w/v) substrate.

AA and dextrin were incubated with 2,000 units/ml of CGTase at 45°C, pH 6.5, for 24 hrs. AA-2Gs were hydrolyzed by 20 units of glucoamylase for 24 hrs at 55°C.

최대가 되었으며 대체적으로 AA의 농도비가 dextrin의 농도비보다 높은 경우가 그 반대의 경우보다 AA-2G 생산수율이 증가됨을 알 수 있었다. 이와는 달리 *B. sterothermophilus*와 *Bacillus* sp. JK-43의 경우는 AA : 당공여체의비가 1:1, 2:3일 때 각각 AA-2G 생산량이 최대를 나타내었다.

한편, AA:dextrin의 최적농도비인 3:2에서 최대기질농도를 조사하기 위해 상기의 반응조건에서 기질전체농도를 2.5%에서 60% 까지 변화시켜 AA-2G 생산량을 검토하였다. 그 결과 Fig. 4에 나타난 바와 같이 AA-2G 생산량은 기질농도가 증가함에 따라 비례적으로 증가하여 45%에서

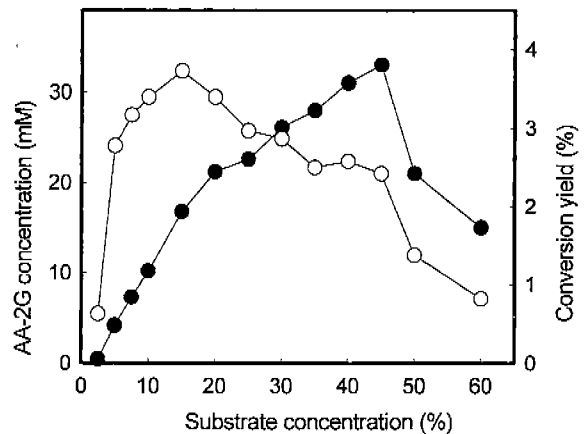


Fig. 4. Effect of the substrate concentration on the transglucosylation yield and production of 2-O- α -D-glucopyranosyl L-ascorbic acid in the CGTase reaction system.

●: AA-2G concentration; ○: conversion yield
The reaction was performed under the same conditions as Fig. 4 except for the substrate concentration. The mixing ratio of AA to dextrin was fixed as 3:2 (w/w).

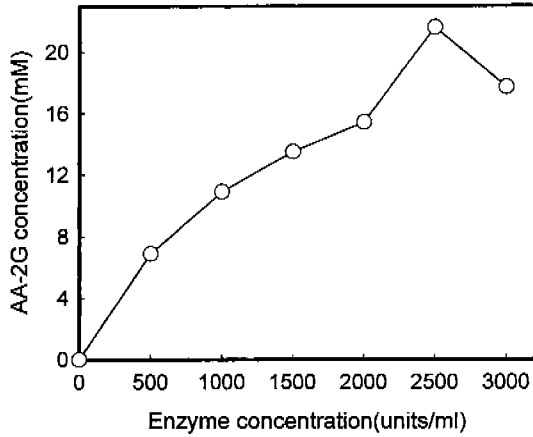


Fig. 5. Effect of enzyme concentrations on the production of 2-O- α -D-Glucopyranosyl L-ascorbic acid by CGTase from *Paenibacillus* sp. JB-13.

Reaction was carried out for 24 hrs at 45°C in the reaction mixture containing 2,000 units/ml of CGTase, 90 mg of AA and 60mg of dextrin (pH 6.5). AA-2Gs were hydrolyzed by 20 units of glucoamylase at 55°C for 24 hrs.

33 mM로 최대를 나타내었으며, 이 이후에는 substrate inhibition 현상에 의해 오히려 AA-2G 생산량이 감소함을 알 수 있었다. 절대적인 AA-2G 생산량은 45%의 기질농도에서 최대를 나타내었으나 AA-2G의 전환율을 조사한 결과 AA-2G 전환율은 15%의 기질농도에서 AA에 대한 이론적 mole비를 기준으로 하였을 때 3.73%로 최대수율을 나타내었다. 따라서 이하의 실험에서는 AA : dextrin을 3 : 2로 전체기질농도는 15%로 고정하였다.

AA-2G 생산에 미치는 효소농도의 영향

AA-2G 생산에 미치는 효소농도의 영향을 검토하기 위해 9% AA, 6% dextrin으로 구성된 혼합액에 효소농도를 500 units/ml에서 3,000 units/ml까지 변화시켜 45°C(pH 6.5)에서 24시간 동안 반응하였다. Fig. 5의 결과와 같이, 효소농도가 2,500 units/ml에 이를 때까지는 AA-2G 생산량도 효소농도의 증가와 함께 증가하였으나, 그 이상의 농도에서는 포화되는 경향을 나타내었다. 따라서 AA-2G를 생산하기 위한 최적 효소농도는 2,500 units/ml로서 이때의 AA-2G 생산량은 21.6 mM이었다. *Bacillus* sp. JK-43이 생산하는 CGTase의 경우는 최적효소농도 1,400 units/ml에서 1.76 mM의 AA-2G 생산량을 나타내었으며, 이는 *Paenibacillus* sp. JB-13의 CGTase가 생산한 AA-2G 양의 1/12에 해당하는 양이다. 이러한 생산량의 차이는 전자의 경우, 보고한 바[2]와 같이 AA-2G뿐만 아니라 AA-6G로 추정되는 물질을 동시에 생산하는 반면, 본 효소는 AA의 2번 위치의 수산기에 부위 특이적 활성을 갖고 있기 때문이다.

AA-2G 생산에 미치는 반응온도 및 완충용액의 영향

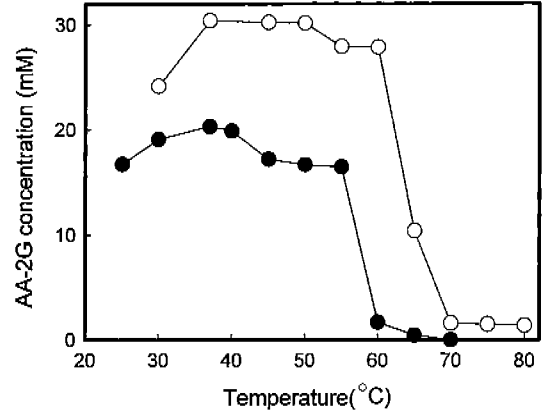


Fig. 6. Effect of temperature on 2-O- α -D-glucopyranosyl L-ascorbic acid production on the absence and the presence of 15 mM CaCl₂.

Reaction mixtures containing 90 mg of AA, 60 mg of dextrin, 2,500 units/ml of CGTase were incubated at various temperatures for 24 hrs in the presence (○) and absence (●) of CaCl₂. AA-2Gs were hydrolyzed by 20 units of glucoamylase at 55°C for 24 hrs.

AA-2G 생산시 반응온도가 미치는 영향을 조사하기 위하여 상기의 반응조건에서 반응온도를 25°C에서 70°C까지 5°C 간격으로 변화시켜 AA-2G 생산량을 검토하였다. 그 결과 Fig. 6에서 보는 바와 같이 AA-2G 생산량은 37°C일 때 20.3 mM로 가장 좋았으며, 그 이상의 온도에서는 AA-2G 생산량이 점차 감소되어 60°C이상에서는 AA-2G가 생산되지 않았다. 한편, *Paenibacillus* sp. JB-13이 생산하는 CGTase가 CaCl₂에 의해 AA-2G 생산량이 증가하는지의 여부를 검토하기 위해 다양한 농도의 CaCl₂에 대한 CGTase의 효소활성을 조사한 결과 최적농도로 확인된 15 mM의 CaCl₂을 첨가하여 각각의 온도에서 AA-2G 생산량을 조사하였다. 그 결과 Fig. 6에서 볼 수 있듯이, CaCl₂이 첨가된 경우 AA-2G 생산량이 약 1.5배 정도 증가되었으며, 대조구에서는 AA-2G가 생산되지 않았던 60°C에서도 10.4 mM의 AA-2G를 생산하여 CaCl₂가 *Paenibacillus* sp. JB-13유래 CGTase의 AA-2G 생산량을 증가시키는데 효과적이라는 것이 확인되었다. 이러한 이유는 CaCl₂가 CGTase의 열안정성을 향상시키기 때문인 것으로 판단된다.

또한, AA로부터 AA-2G의 전환시 반응액에 사용되는 서로 다른 완충용액에 따른 영향을 조사하기 위하여 중류수, sodium succinate, sodium acetate, sodium citrate 및 phosphate buffer를 pH 6.5로 조정 한 용액에 9%의 AA, 6%의 dextrin 그리고 2,500 units/ml의 CGTase를 혼합하여 37°C, 24시간동안 반응하였다. 그 결과 Fig. 7에서 보는 바와 같이 AA-2G 생산에는 sodium citrate 완충용액을 사용하였을 때 27.2 mM로 가장 많은 AA-2G 생산량을 보였다.

AA-2G 생산의 경시적 변화

Fig. 8은 반응시간에 따른 AA-2G 생산의 경시적 변화를

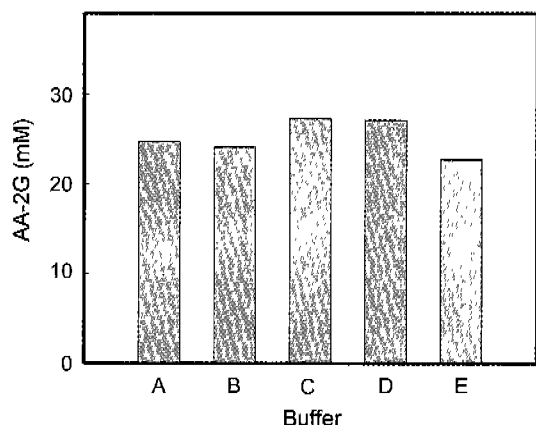


Fig. 7. Effect of various buffers on the production of 2-O- α -D-glucopyranosyl L-ascorbic acid by CGTase from *Paenibacillus* sp. JB-13.

Reaction was carried out for 24 hrs at 37°C in reaction mixture (pH 6.5) containing 15% (w/v) of substrate concentration, 9% (w/v) of AA, 6% (w/v) of dextrin, 2,500 units/ml CGTase and 15 mM CaCl₂. A, Distilled water; B, Sodium acetate buffer; C, Sodium citrate buffer; D, Sodium succinate buffer; E, Phosphate buffer.

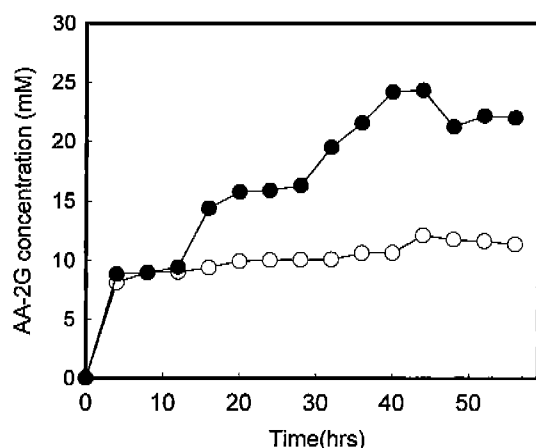


Fig. 8. Time course of 2-O- α -D-glucopyranosyl L-ascorbic acid production with the CGTase from *Paenibacillus* sp. JB-13. Reaction was carried out at 37°C in reaction mixture containing 9% (w/v) of AA, 6% of dextrin, 15 mM CaCl₂ and 2,500 units/ml of CGTase (pH 6.5). AA-2Gs were hydrolyzed by glucoamylase at 55°C for 24 hrs. Symbols are the same as Fig. 6.

나타낸 것이다. Fig. 8에서 볼 수 있듯이, glucoamylase를 처리하지 않은 경우 반응 8시간정도에 AA-2G 생산이 최대 생산량의 70% 이상이었고 그 이후에는 매우 소량씩 증가하여 반응 44시간에 12.1 mM로 최대를 나타내었다. 한편, 각각의 반응시간별로 채취한 반응혼합액을 glucoamylase로 처리한 경우 12시간 이후부터 glucoamylase를 처리하지 않은 것과 AA-2G 생산량의 큰 차이를 보이기 시작하여 반응 44시간째에 24.3 mM로 최대 생산량을 나타내었다. 이는 CGTase만 반응하였을 경우 생산되는 AA-2Gs가 glucoamylase에 의해 효과적으로 분해되기 때문이다. 이를 통해

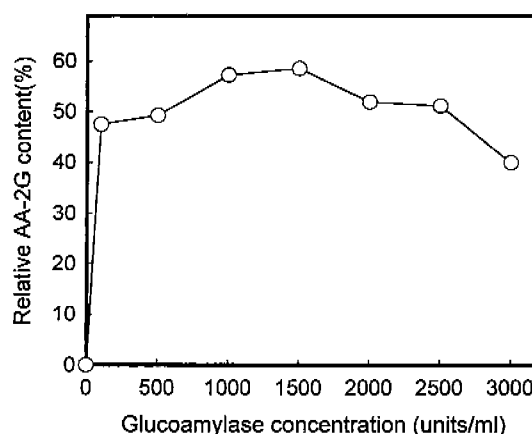


Fig. 9. Effect of the use of commercial glucoamylase from *Rhizopus* mold for 2-O- α -D-glucopyranosyl L-ascorbic acid production.

Reaction was carried out for 24 hr at 37°C in the reaction mixture containing 9% (w/v) of AA, 6% (w/v) of dextrin, 2,500 units/ml of CGTase and 15 mM CaCl₂ (pH 6.5). AA-2Gs were hydrolyzed by various concentrations of glucoamylases at 55°C for 24 hrs.

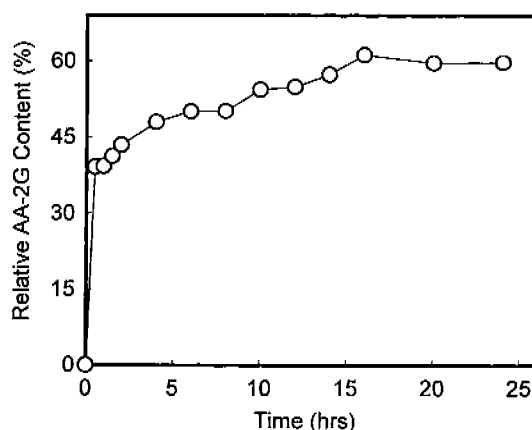


Fig. 10. Time course of commercial glucoamylase from *Rhizopus* mold for the production of 2-O- α -D-glucopyranosyl L-ascorbic acid.

Reaction was carried out at 37°C for 24 hr in the reaction mixture containing 9% (w/v) of AA, 6% (w/v) of dextrin, 2,500 units/ml of CGTase and 15 mM CaCl₂. AA-2Gs were hydrolyzed by glucoamylase from *Rhizopus* mold at 55°C and analyzed by HPLC with μ Bondapak C₁₈ column.

AA-2G 자체는 CGTase의 hydrolysis 활성과 gluco-amylase 활성에 의해서는 분해되지 않으며, AA-2G 생산은 glucoamylase를 첨가함으로써 약 2배 정도까지 효율적으로 증가됨을 확인할 수 있었다.

AA-2G 생산에 미치는 glucoamylase의 영향

CGTase를 이용한 AA-2G 생산반응에서는 AA-2G이외에 AA-2Gs가 다량생산되며 이는 glucoamylase에 의해 효과적으로 AA-2G로 전환될 수 있다[1]. 우선, AA-2Gs의 분해에 미치는 glucoamylase 농도의 영향을 조사하기 위해 9%

의 AA, 6%의 dextrin 및 2,500 units/ml의 CGTase로 구성된 반응혼합액을 37°C(pH 6.5)에서 44시간 동안 반응한 후 glucoamylase의 농도를 100 units에서 3,000 units까지 변화시켜 55°C에서 24시간동안 반응하여 AA-2G 생산량을 검토하였다. 그 결과 Fig. 9에서 보는 바와 같이 1,500 units에서 AA-2G 생산량이 최대를 나타내었다. 또한 AA-2G 생산에 미치는 glucoamylase 반응시간의 영향을 조사하기 위해 상기의 조건에서 반응시간에 따른 AA-2G 생산의 경시적인 변화를 검토하였다. 그 결과 Fig. 10에서 보는 바와 같이, 반응 15시간까지는 계속 증가하나 그 이후에는 일정하게 유지되었다. 따라서 AA-2Gs를 분해하여 AA-2G를 생산하는 glucoamylase의 최적반응시간은 15시간임이 확인되었다.

상기의 실험결과를 통해 결정된 AA-2G 최적생산조건에서 AA-2G 생산반응을 통해 얻어진 AA-2G의 최대생산량은 56 mM이었으며, 전환율은 AA에 대한 이론적 mole 비로 12.4%에 해당하는 결과였다. 이러한 결과는 김치로부터 분리된 *Bacillus* sp. JK-43 유래[2] CGTase를 이용하여 AA-2G를 생산한 경우의 전환율인 2.53%보다는 월등히 증가된 것이나, *B. stearothermophilus*가[13] 생산하는 CGTase의 18.9%에 비해서는 낮은 결과였다.

요 약

AA의 2번 위치의 수산기에 부위특이적 활성을 갖는 *Paenibacillus* sp. JB-13 유래 CGTase의 AA-2G 생산최적조건을 검토하였다. AA-2G 생산에 효율적인 당공여체를 조사하기 위해 다양한 포도당 중합체를 당공여체로 사용하여 AA-2G 생산성을 검토한 결과 dextrin이 가장 높은 AA-2G 생산성을 나타내었으며, 대체적으로 중합도가 높은 당을 효율적으로 이용하였다. 최적 당공여체인 dextrin을 사용하여 AA-2G 생산최적조건을 검토한 결과 반응 혼합액을 2,500 units/ml의 CGTase, 기질농도 15%, 기질농도비(AA-g/dextrin-g) 3:2으로 조성하여, 37°C, pH 6.5에서 44시간 반응시킨 후, 1,500 units/ml의 glucoamylase를 55°C에서 15시간 반응시켰을 때 AA-2G의 생산이 최대를 나타내었다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단 특정기초연구비(1999-2-211-001-3)에 의한 연구결과의 일부로서, 지원하여 주심에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Aga, H., Y. Masaru, S. Shuzo, and I. Yamamoto. 1991. Synthesis of 2-O- α -D-glucopyranosyl L-ascorbic acid by cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus stearothermophilus*. *Agric. Biol. Chem.*, **55**: 1751-1756.
2. Bae, K. M., Y. H. Kim, S. K. Kim, and H. K. Jun. 2000. Production of 2-O- α -D-glucopyranosyl L-ascorbic acid by cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus* sp. JK-43. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **29**: 41-48.
3. Choi, H. I., S. H. Lee, and W. G. Bang. 1996. Enzymatic production of ascorbic acid-2-phosphate from ascorbic acid pyrophosphate. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**: 613-618.
4. Hata, R. and H. Senoo. 1989. L-Ascorbic acid 2-phosphate stimulates collagen accumulation, cell proliferation, and formation of a three-dimensional tissue-like substance by skin fibroblasts. *J. Cell. Physiol.* **138**: 8-16.
5. Jun, H. K., Jo, Y. B. Jo, Kim, S. J., and Bae, K. M. 1998. Some properties and optimal culture conditions of cyclodextrin glucanotransferase of *Bacillus* sp. S-6 isolated from Kimchi. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **27**: 609-617.
6. Kwon, K. S., S. H. Lee, and W. G. Bang. 2000. Production of ascorbic acid 2-phosphate from ascorbic acid by *Pseudomonas* sp. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **28**: 33-38.
7. Kunano, Y., T. Sakamoto, M. Egawa, M. Tanaka, and I. Yamamoto. 1998. Enhancing effect 2-O- α -D-glucopyranosyl L-ascorbic acid, a stable ascorbic acid derivative, on collagen synthesis. *Biol. Pharm. Bull.* **21**: 662-666.
8. Kuenzing, W., R. Avenia, and J. J. Kamm. 1974. Studies on the antiscorbutic activity of ascorbate 2-sulfate in the guinea pig. *J. Nutr.* **104**: 952-956.
9. Machlin, L. J., F. Garcia, C. B. Richter, H. E. Spiegel, and M. Brin. 1976. Lack of antiscorbutic activity of ascorbate 2-sulfate in the rhesus monkey. *Am. J. Clin. Nutr.* **29**: 825-831.
10. Machlin, L. J., F. Garcia, W. Kuenzig, and M. Brin. 1979. Antiscorbutic activity of ascorbic acid phosphate in the rhesus monkey and guinea pig. *Ann. J. Clin. Nutr.* **32**: 325-331.
11. Muto, N., T. Nakamura, and I. Yamamoto. 1990. Enzymatic formation of a nonreducing L-ascorbic acid α -glucoside: purification and properties of α -glucosidase catalyzing site-specific transglucosylation from rat small intestine. *J. Biochem.*, **107**: 222-227.
12. Muto, N., S. Suga, Y. Mitoh, M. Tanaka, and I. Yamamoto. 1990. Formation of a stable ascorbic acid 2-glucoside by specific transglucosylation with rice seed α -glucosidase. *Agric. Biol. Chem.*, **54**: 1697-1703.
13. Tanaka, M., N. Muto, and I. Yamamoto. 1991. Characterization of *Bacillus stearothermophilus* cyclodextrin glucanotransferase in ascorbic acid 2-O- α -glucoside formation. *Biochem. Biophys. Acta.*, **1078**: 127-132.
14. Yoshimaru, K., T. Sakamoto, M. Egawa, I. Iwai, M. Tanaka, and I. Yamamoto. 1998. *In vitro* and *in vivo* prolonged biological activities of a novel vitamin C derivative, 2-O- α -D-glucopyranosyl L-Ascorbic acid(AA-2G), in cosmetic fields. *J. Nutr. Sci. Vit.* **44**: 345-359.
15. Yamamoto, I., N. Muto, K. Murakami, S. Suga, and H. Yamaguchi. 1990. L-ascorbic acid α -glucoside formed by regioselective transglycosylation with rat intestinal and rice seed α -glucosidases: its improved stability and structure determination. *Chem. Pharm. Bull.* **38**: 3020-3023.

(Received Nov. 24, 2000/Accepted Jan. 16, 2001)