

Leuconostoc mesenteroids NRRL B-512F 유래 효소인 Dextranucrase를 이용한 비타민 C 유도체(AA2G) 합성

김은서*, 복하림*, 강수진*, 김준수**, 이우일*

*건양대학교 의료신소재학과

** (주)케이프로텍

e-mail: lee0519@konyang.ac.kr

Synthesis of L-Ascorbic Acid-2-O-Glucoside(AA2G) using Dextranucrase from *Leuconostoc mesenteroids* NRRL B-512F.

Eun-Seo Kim*, Ha-Rim Bok*, Su-Jin Kang*, Jun-Soo Kim**, Woo-Yeul Lee*

*Dept. of Biomedical Materials, Konyang University

**Kprotec Inc.

요약

L-아스코르빈산(AsA/Vitamin C)은 대표적인 항산화 효과 성분으로 그 밖에도 많은 효능을 가지고 있다. 그러나 다양한 외부 요인에 의해 빠르게 산화되어 본래의 기능과 효능을 잃어 체내에서 제대로 기능하지 못하는 문제점이 있다. 이를 해결하기 위해 *Leuconostoc mesenteroids* NRRL B-512F 균주로부터 dextranucrase 효소를 얻은 후 효소 반응을 수행하여 AA2G 합성을 진행하였다. 효소 활성은 DNS 방법으로 측정하였고, AA2G의 합성 분석은 HPLC로 수행하였다. 그 결과, 완충액 조성의 변화, 생산 순서의 변화, 효소 반응 온도의 상승에 따라 AA2G의 합성 속도가 증가함을 확인하였다. 이후 합성된 AA2G는 화장품, 의료용 바이오소재(필러 등) 등 다양한 분야에서 활용 가능성이 높은 것으로 확인됐다.

1. 서론

비타민 C로 잘 알려진 L-ascorbic acid (AsA)는 세포 내에서 항산화 효과를 중심으로 자외선으로 인해 발생하는 활성 산소를 소거하여 염증을 방지하고, 노화를 방지하며, 인체 내 콜라겐 합성에 관여하는 등 다양한 생리 활성을 나타내는 필수 영양소 중 하나이다 [1].

그러나 AsA는 불안정한 구조로 인해 빛이나 공기, 금속 이온 등에 노출되면 쉽게 산화되어 기존의 생리 활성 기능을 잃어버리는 단점이 존재한다. 이러한 AsA의 구조적 안정성을 극복하기 위한 대안으로 AsA의 활성화 부위인 2번 탄소에 다른 화학적 그룹을 결합시킴으로써 자발적 공명 현상이 상쇄되는 AsA 유도체(L-ascorbic acid derivative)에 관한 연구가 진행되고 있다 [2].

AsA 유도체는 특정 효소의 작용으로 가수분해되어 환원된 형태의 AsA로 유리된다. L-ascorbic acid-2-O-glucoside (2-O- α -D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid, AA2G)는 AsA 유도체 중 하나로, AsA의 활성화 부위에 glucose가 결합한 물질이다. AA2G는 포유류에 존재하는 α -glucosidase에 의

해 가수분해되기 때문에 사람의 세포와 조직 내에서 AsA와 동일한 생리적 활성을 띠게 될 뿐만 아니라 수용액 또는 낮은 pH 조건에서 높은 안정성이 유지되는 장점을 가지고 있다. 또한 인체 내에서 가수분해된 AsA의 활성이 오래 지속되기 때문에 화장품과 의약품 분야에서 폭넓게 적용되고 있다 [3].

현재 AA2G는 대부분 화학적으로 합성되고 있다. 그러나 이러한 방식으로 합성된 AA2G는 높은 가격으로 형성되고 공정 과정에서 부산물이 발생한다는 문제점이 있다. 이를 보완하기 위한 대안으로 효소 반응을 이용해 AA2G를 합성하였다. 사용된 효소는 *Leuconostoc Mesenteroids* NRRL B-512F 유래 dextranucrase (glucosyltransferase, EC 2.4.1.5)로, sucrose에서 dextran으로 glucosyl residues의 이동을 촉매하고 fructose를 유리시키는 효소이다. AA2G는 dextranucrase를 이용해 sucrose에서 유리된 glucose를 AsA에 결합하여 합성하였다 [4].

따라서 본 연구에서는 *Leuconostoc Mesenteroids* NRRL B-512F 유래 효소 dextranucrase를 이용한 효소 반응을 통해 반응 온도, 반응 조건을 최적화한 AA2G 합성에 연구 목적을 두고 있다.

2. 실험 방법

2.1 시약 및 재료

본 연구에서는 dextransucrase (EC 2.4.1.5)를 추출하기 위한 균주로 *Leuconostoc Mesenteroids NRRL B-512F*를 사용하였으며, AA2G를 합성하기 위해 L-ascorbic Acid(Mw: 176.13 g/mol, 99.5 %, Samchun Chemicals)(AsA)를 사용하였다. 그밖에 사용된 시약들은 모두 일급 내지 이에 준하는 등급들로 구매하여 사용하였다.

2.2 균주 배양 및 효소 생산

MRS 배지에 배양된 colony를 취하여 dextransucrase 생산 배지(pH 7.0, 단위 g/L, Sucrose 20, Yeast extract 20, K₂HPO₄ 20, MgSO₄·7H₂O 0.2, FeSO₄·7H₂O 0.01, CaCl₂·2H₂O 0.01, NaCl 0.01)에서 26 °C, 175 rpm의 조건 하에 밤새 배양하였다. 원심분리기를 이용하여 12,000 rpm의 조건 하에 1분간 상등액으로부터 dextransucrase를 추출한다.

2.3 효소 활성 확인

효소 반응을 이용한 AA2G 합성 활성도를 확인하기 위해 isomalto-oligosaccharides를 합성하였다. TLC(Thin-Layer Chromatography)를 사용하여 sucrose와 maltose를 대조하여 분석하였다. isomalto-oligosaccharides는 균주를 dextransucrase 생산 배지에서 23 °C와 36 °C, 175 rpm의 조건 하에 밤새 배양한 후, 추출한 dextransucrase 0.5 mL와 100 mM Sodium acetate buffer (pH 5.5), 10% sucrose, 10% maltose의 조성으로 30 °C, 30 rpm 조건 하에 밤새 효소 반응하여 합성하였다.

AA2G의 효소 활성도를 측정하기 위해 DNS Method를 이용해 측정하였다. 우선 glucose 농도별(0.3125, 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10) 각각 standard 제조를 하고 DNS Solution과 효소 반응물 및 glucose standard를 5:3 비율(v/v)로 혼합한다. 98 °C, 5분간 PCR 기기 이용하여 반응시키고 UV spectrometer 이용하여 540 nm에서 흡광도 측정하였다.

[표 1] Composition of DNS Method

Concentration (mg/mL)	Optical density (540 nm)
10	1.639
5	0.89
2.5	0.488
1.25	0.283
0.625	0.196
0.3125	0.141

2.3 AA2G 합성 실험

AA2G를 합성하기 위해 반응물로 AsA와 sucrose를 사용했으며, 합성 분석은 HPLC를 통해 진행하였다 (표 2). 균주 *Leuconostoc mesenteroids NRRL B-512F*를 26 °C에서, 20~24 h 동안 170 rpm으로 밤새 배양하였다. Preculture 이후 배양한 균주를 생산배지와 1:10(v/v) 비율로 26 °C에서 170 rpm으로 6시간 동안 본 배양을 하고 main culture 균주에서 효소 dextransucrase를 1분 동안 16,000 rpm으로 원심분리기를 이용해 추출하였다. 그리고 L-AsA와 sucrose, 효소 dextransucrase를 반응시켜 AA2G(L-ascorbic acid-2-O-α-glucoside)를 각각 23 °C와 30 °C 온도로 24 h 동안 30 rpm으로 합성하였다. 50 mM sodium acetate trihydrate, 10% sucrose, 1 % L-AsA, 0.5 mM CaCl₂·2H₂O를 혼합한 반응 버퍼를 통해 반응하였다. 그 후, 9:1(v/v)의 비율로 추출한 dextransucrase와 반응 조성을 하였다.

[표 2] Condition of HPLC

Flow rate	1.0 mL/min
Maximum Absorption Peak	254 nm
Column	C18 column
Detector	UV-vis detector
Solvent	100mM potassium phosphate buffer (pH2.5)

3. 결과 및 고찰

3.1 TLC를 통한 효소 활성도 확인

Leuconostoc mesenteroids NRRL B-512F 내 dextransucrase의 존재 및 활성을 확인하기 위해 TLC를 이용하여 정성 분석하였다. TLC 결과 사진의 실험군 R1-R4 spot에 대조군인 maltose와 sucrose spot 이외에 다른 spot들이 증합도에 따라 분리된 것을 확인할 수 있었다. dextransucrase를 이용한 효소 반응에서 접합된 glucose의 개수가 증가할수록 spot이 아래쪽으로 나타나게 되고, 전개도 느리게 진행되었다. 전개 용매 I을 사용한 TLC의 경우 (그림 1), 끌림 현상이 있었으나 전반적으로 spot들을 대조해봤을 때, 새로운 3탄당과 그 이상의 당들이 합성됨이 관찰되기에 isomalto-oligosaccharides가 합성되었음을 확인하였다. 따라서 이 실험을 통해 *Leuconostoc Mesenteroids NRRL B-512F* 내에 dextransucrase가 존재함을 알 수 있었고, 또한 효소의 활성도를 눈으로 확

인할 수 있었다.

[표 3] Composition of R1, R2, R3, R4

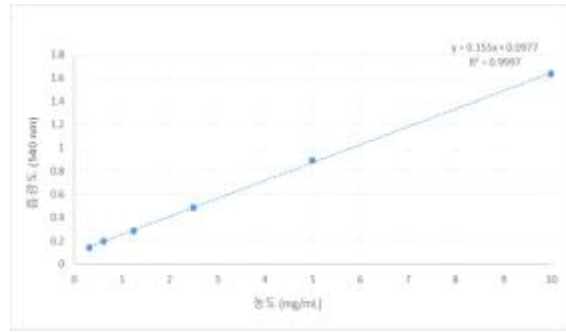
R1	Buffer 700, E1 50, M 0.5%, S 2%
R2	Buffer 500, E1 50, M 0.5%, S 4%,
R3	Buffer 700, E2 50, M 0.5%, S 2%,
R4	Buffer 500, E2 50, M 0.5%, S 4%)



[그림 1] Results of an experiment to confirm the enzyme activity of dextransucrase via TLC. (* M: maltose, S: sucrose, * E1 strain culture temperature: 23 °C; E2 strain culture temperature: 36 °C)

3.2 DNS Method를 통한 효소 활성도 측정

효소 반응을 시킨 sample의 glucose 흡광도에서 효소 반응 전 시약의 흡광도 값을 빼서 Standard curve 식에 대입하여 효소 활성도 즉, 새로 합성된 glucose의 농도를 확인하였다. 새로 합성된 glucose의 농도가 2.85 mg/mL로 나타났음을 확인할 수 있었고, 본 실험에 사용한 균주 내에 dextransucrase가 존재하며 이는 효소 활성을 띠고 있는 것을 알 수 있었다. 이 실험을 통해 실제 합성한 AA2G의 농도가 2.85 mg/mL로 나타났음을 확인하였다.



[그림 2] Glucose standard curve.



[그림 3] DNS Method results.

3.3 HPLC를 통한 AA2G 합성 확인

HPLC로 standard sample과 효소반응물을 분석한 결과, 비교군인 AsA(그림 3)는 약 2.8분의 retention time에서 peak가 나타났고, AA2G(그림 4)는 약 3.5분의 retention time에서 peak가 나타났다. 30 °C(그림 5)와 23 °C (그림 6)의 효소 반응물은 약 2.8-2.9분의 retention time에서 AsA peak가 나타났고, 약 3.4-3.5분의 retention time에서 AA2G가 나타났다. 따라서 30 °C와 23 °C 효소반응물 모두 비교군 AsA와 AA2G의 피크 위치가 비슷하게 나타났다. 즉, 성공적으로 AA2G가 합성되었음을 확인하였다.

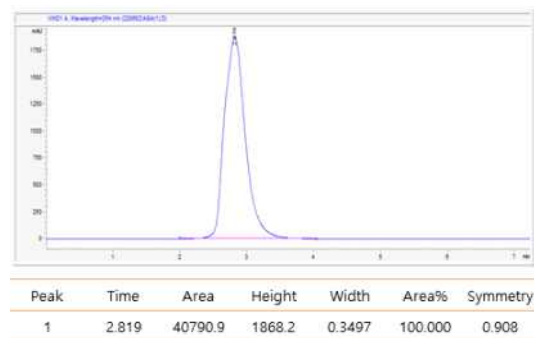


Figure 4. HPLC results of comparison group AsA.

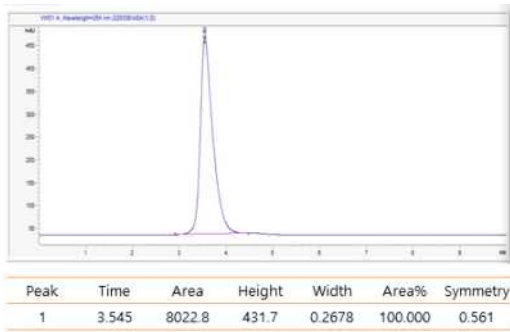


Figure 5. HPLC results of comparison group AA2G.

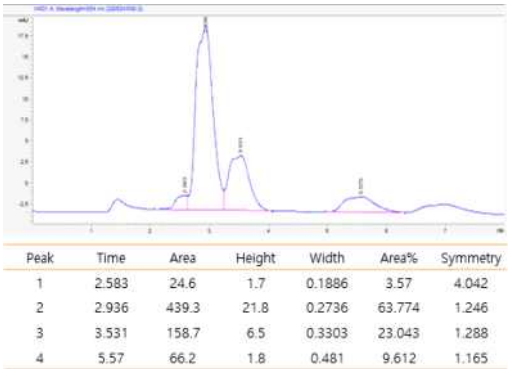


Figure 6. HPLC results of synthetic AA2G (30 ° C).

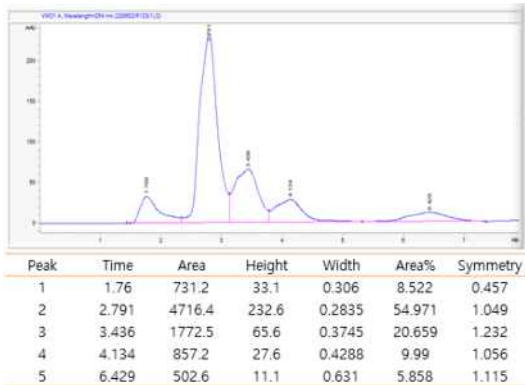


Figure 7. HPLC results of synthetic AA2G (23 ° C).

4. 결 론

본 연구에서는 균주 *Leuconostoc mesteroids* NRRL B-512F 유래 효소 dextransucrase를 이용해 효소 반응을 진행하여 제조 공정 비용을 절감하고, 친환경적이며, 체내 부작용을 줄일 수 있는 AA2G를 합성 및 개발하는데 목적을 두고 진행하였다. *Leuconostoc mesteroids* NRRL B-512F 내 dextransucrase의 존재 및 활성 확인을 하기 위해 TLC 측정을 하였고 DNS Method를 통해 효소의 활성도를 측정하였다. 이후 HPL

C를 통해 AA2G가 성공적으로 합성되었는지 분석하였다. 이러한 과정을 거쳐 비타민 C 유도체인 AA2G가 성공적으로 합성되었음을 확인할 수 있었다. 본 연구를 통해 합성된 AA2G를 화장품이나 의료용 생체재료 등과 같은 다양한 분야에 접목하여 제품화를 진행할 가능성이 있을 것으로 전망된다.

참고문헌

- [1] S. Englard, & S. Seifter. (1986). The biochemical functions of ascorbic acid. Annual Review of Nutrition, 6, 365-406.
- [2] Z. Li, B. Li, Z. Gu, G. Du, J. Wu, & J. Chen. (2009). Mutations of lysine 47 in cyclodextrin glycosyltransferase from *Paenibacillus macerans* enhance β -cyclodextrin specificity. J. Agric.Food. Chem. 57, 8386-8391.
- [3] H. Nomura, T. Ishiguro, & S. Morimoto. (1969). Studies on L-ascorbic acid derivatives: III. Bis(L-ascorbic acid -3,3') phosphate and L-ascorbic acid 2-phosphate. Chem. Pharm. Bull., 17, 387-393.
- [4] Y. Toyoda-ono, M. Maeda, M. Nakao, M. Yoshimura, N. Sugiura-Tomimori, & H. Fukami. (2004). 2-O-(beta-D-Glucopyranosyl) ascorbic acid, a novel ascorbic acid analogue isolated from lycium fruit. Agricultural and Food Chemistry, 52, 2092-2096.