

Chitosan 고정화 Aminoacylase 를 이용한 DL - 아미노산의 광학적 분할에 관한 연구 : Aminoacylase 의 고정화

李尙炫 · 이영춘
중앙대학교 식품가공학과

Studies on the Optical Resolution of DL-Amino Acids by Aminoacylase Immobilized on Chitosan: Immobilization of Aminoacylase

Sang-Hyun Lee and Young-Chun Lee

Department of Food Science & Technol., Chung-Ang University, Seoul

Abstract

Optimum conditions for immobilization of aminoacylase on chitosan were investigated, and the results are summarized as follows: Optimum conditions for activation of chitosan were pH 6.0, 0.2% of glutaraldehyde, and 120 minutes of reaction time. Enzyme concentration and reaction time for immobilization of aminoacylase on the activated chitosan were 80mg/20ml, and 90 minutes, respectively, and the yield of activity of the immobilized enzyme was 42.6%.

Key words : aminoacylase, immobilization, DL-amino acids, optical resolution

서 론

아미노산은 식품, 의약품 및 사료의 이용율을 높이는 데 그 이용성이 점차 증대되고 있으며, 현재 발효법, 효소법, 화학합성법에 의해 공업적으로 생산되고 있다⁽¹⁻⁷⁾. 발효법이나 효소법 등으로 얻어지는 아미노산은 광학활성을 가진 L-형인데 비해 화학적 합성법으로 얻어지는 아미노산은 L-형과 비천연형인 D-형 아미노산의 등량 혼합물인 racemic mixture로서 광학적으로 불활성체이다. 따라서 생물체에서 이용되는 L-아미노산을 얻기 위해서는 광학적 분할을 해야 한다⁽⁶⁻⁸⁾. 이러한 단점에도 불구하고 화학합성법은 값이 저렴하고 적용 아미노산의 종류가 많아 아미노산 생산의 주류를 이루고 있으며^(1,7), 광학적 분할이 부수적으로 시도되고 있다.

DL-아미노산의 광학적 분할은 물리적 방법^(6,7,9), 화학적 방법^(6,8), 효소적 방법⁽⁶⁻⁸⁾ 및 생물학적 방법^(6,8) 등이 있다. 이중 효소적인 방법은 효소의 광학적 특이성을 이용하는데 기초를 두고 있으며, 이를 위하여 이용되는 효소는 papain, bromelin, ficin, amino acid esterase, aminoacylase 등이 있으며, aminoacylase 이용법⁽¹⁰⁻¹⁵⁾

이 널리 사용되고 있다.

Aminoacylase는 아미노산의 아미노기에 결합된 acyl기를 가수분해하는 효소로 L-aminoacylase를 N-acyl DL amino acids에 반응시키면 L-amino acids와 N-acyl D amino acids를 얻을 수 있으며, N-acyl D amino acids는 racemization 과정을 거쳐 N-acyl DL amino acids로 전환되어 다시 optical resolution의 기질로 사용된다. 그리고 최근에는 사상균 aminoacylase의 생산량이 많아지고, 이 aminoacylase는 넓은 기질특이성을 갖고 있어 DL-amino acids의 분할에 공업적으로 이용되고 있다.

효소반응을 batch process로 시행할 경우 단점이 많으며, 효소를 고정화하여 이를 보완할 수 있다. Aminoacylase를 고정화 하는데 이용되는 방법으로 DEAE-sephadex 등을 이용한 이온결합법⁽¹⁶⁻¹⁸⁾, polyacrylamide gel에 의한 포괄법⁽¹⁹⁾, 균체 고정화법 등⁽²⁰⁾이 보고되었으며, DEAE-sephadex에 이온결합시킨 aminoacylase가 일본에서 공업적으로 실용화되고 있다.

Chitosan은 분자량이 45,000-120,000 정도이며, chitin의 acetyl기가 50-80% 가수분해된 천연 중합체로⁽²¹⁾, 효소의 고정화에 이용된 보고가 있다⁽²²⁻²³⁾. 본 연구에서는 고정화 효소의 담체로 새롭게 이용성이 인정되

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

고 있는 chitosan 을 담체로하여 고정화 aminoacylase 를 조제하고, DL-amino acids 의 광학적 분할반응에 적용하여 이용성을 검토하려 시도하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용된 효소는 *Aspergillus* genus 에서 추출한 aminoacylase 로서 (Tokyo Kasei Co., Japan), 활성은 21,200 units/g, 단백질함량 15.6%이며 -20°C 이하의 냉동실에 보관 사용하였다. 기질로써 N-acetyl DL methionine(N-ac DL Met), N-acetyl DL tryptophane(N-ac DL Try), N-acetyl DL phenylalanine(N-ac DL Phe)을 사용했으며, 담체용 chitosan(Tokyo Kasei Co., Japan) 및 기타 실험에 사용한 시약은 특급 또는 일급이었다.

Aminoacylase 의 활성측정

Aminoacylase 의 활성측정은 Tosa 등⁽²⁴⁾의 방법을 응용하였다. 가용성 aminoacylase 의 경우 0.1M N-ac DL amino acids 1m/ 0.1M 완충액 1m/ 을 시험관에 취해 효소액 1m/ 과 37°C에서 30분간 반응시킨 후 생성된 L-amino acids 는 Weetall 등⁽²⁵⁾의 Ninhydrin 비색법으로 흡광도를 측정하였다. Aminoacylase 의 1 unit 는 37°C에서 1시간에 1 μ mole 의 L-methionine 을 생산하는 활성으로 정하였다.

고정화 aminoacylase 의 활성측정은 반응 후 반응액을 Whatman No. 1 여지로 여과해 반응을 정지시키고, 여액중의 L-amino acids 함량을 가용성 효소와 같은 방법으로 측정하였다.

담체의 조제

실험에 사용한 고정화용 담체는 Leuba 등⁽²⁶⁾의 방법을 응용하였다. Chitosan 30g 을 2% acetic acid 800m/ 에 1일간 용해시키고, 면포로 여과하여 gel 상태의 chitosan 을 0.01M-NaOH 용액에 주입하여 얻은 백색 침전물을 세척한 다음 85°C에서 건조하여 분쇄하였다. 분말을 표준체로 사별하여 50-100 mesh 사이의 입자를 실험에 사용하였다.

Aminoacylase 의 고정화

Chitosan 담체에 aminoacylase 를 고정화시키는데 Leuba 등⁽²⁶⁾의 방법을 이용하였다. 즉, chitosan 을 0.

05M 완충액에 37°C에서 30분간 팽윤시키고 가교제 glutaraldehyde 를 가하여 담체를 활성화 시키고, 증류수로 세척한 뒤 활성화된 chitosan 에 효소액을 25°C에서 일정시간 반응시키고 증류수로 다시 세척하여 고정화 aminoacylase 를 조제하였다.

Aminoacylase 고정화 조건의 optimization

Aminoacylase 를 고정화하는데 chitosan 의 팽윤 및 glutaraldehyde 처리 pH 가 어떠한 영향을 주는지 조사하기 위해 pH 5.5-8.5의 0.05M 완충액을 사용하여 고정화 방법에 따라 고정화 효소를 조제하였다. 고정화 효소의 활성수율(yield of activity)은 고정화된 효소의 활성과 고정화에 사용한 가용성 효소의 total activity 로부터 계산했다. 그리고 고정화된 효소 단백질량은 고정화 반응 후 세척수의 단백질함량을 Lowry 등⁽²⁷⁾의 방법으로 정량하여 고정화에 사용된 총 효소단백질량의 차이로부터 계산하였다.

Glutaraldehyde 농도가 효소단백질의 결합량과 aminoacylase 활성수율에 미치는 영향을 조사하기 위해 앞에서 설명한 고정화 반응조건에서 glutaraldehyde 농도를 0.1-5%로 변화시키면서 실험하였다. 그리고 glutaraldehyde 처리시간이 효소단백질의 결합과 효소의 활성수율에 미치는 영향을 알아보기 위해 처리시간을 5-180분 변경시키면서 조사하였다.

효소농도가 효소단백질의 결합량과 활성수율에 미치는 영향의 조사는 효소농도를 20-240mg 으로 변경시키면서 실시하였다. 이때 효소량은 시판품의 무게로 표시하였고, 비활성(specific activity)은 효소단백질 1mg 의 활성으로 표시하였다.

결과 및 고찰

Aminoacylase 고정화와 pH

Aminoacylase 를 chitosan 담체에 고정화하는데 있어서 chitosan 의 팽윤 및 chitosan 과 glutaraldehyde 의 반응에 미치는 pH 의 영향을 조사한 결과는 Fig. 1과 같다. 고정화 효소의 활성수율은 pH 6.0에서 가장 높았으며, pH 7.0이상에서 급격히 감소하였다. 또한 결합된 효소단백질의 양도 pH 가 알카리쪽으로 갈수록 점차 감소하였다. 그리고 pH 에 따른 팽윤후 chitosan 의 체적을 조사한 결과 pH 가 7.0에서 산성쪽으로 이동하면서 chitosan 의 체적이 증가함을 볼 수 있었으며, pH 가 5.5이하로 떨어지면 담체가 용해되기 시작하였다. 이 고정

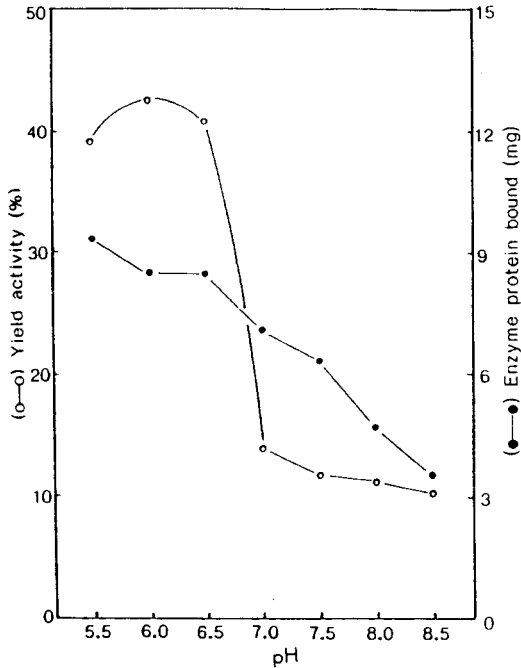


Fig. 1. Effect of activation pH on the immobilization of aminoacylase.

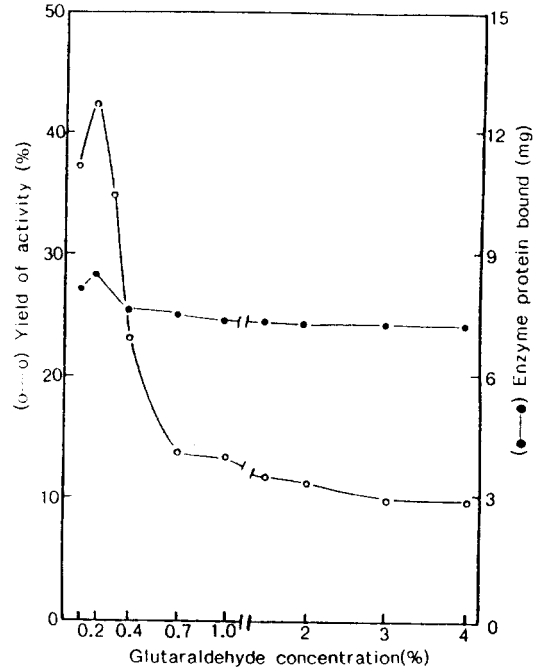


Fig. 2. Effect of glutaraldehyde concentration on the immobilization of aminoacylase.

화 방법은 효소를 담체의 표면에 결합시키는 양식이므로 표면적이 클수록 효소를 보다 많이 결합시킬 수 있고 따라서 결합된 효소단백질의 양 및 활성수율이 높아지는 것으로 생각된다.

Glutaraldehyde의 농도

Glutaraldehyde 농도가 효소단백질의 결합량과 aminoacylase의 활성수율에 미치는 영향을 조사한 결과는 Fig. 2와 같다. 고정화 효소의 활성수율은 glutaraldehyde의 농도가 0.2%일 때 최고였으며, 농도가 증가함에 따라 급격히 감소하여 0.7%이상에서 완전한 감소를 보였다. 그리고 효소단백질의 결합량은 0.2%에서 약간 높을뿐 큰 변화는 없었다.

Glutaraldehyde는 효소와 담체를 연결시키는 다리역할을 하며 이의 결합수는 효소의 활성수율 뿐 아니라, 안정성에 영향을 준다. Klivanov 등⁽²⁸⁾은 효소와 담체사이의 multi-point binding이 고정화 효소의 안정화에 기여한다고 하였다. Fig. 2에서 glutaraldehyde 농도가 0.2%일 때 효소단백질의 결합량이 많은 것으로 보아 glutaraldehyde 0.2%가 담체의 표면에 효소단백질을

포화시키면서 결합시키기에 충분한 농도임을 알 수 있었다.

Activation time

Glutaraldehyde 처리시간이 aminoacylase 고정화에 미치는 영향을 Fig 3과 같다. 처리시간이 연장됨에 따라 활성수율이 서서히 증가하여 120분에서 최고의 활성수율을 보였으며, 120분 이후에는 약간 감소하는 경향을 나타내었다. 따라서 aminoacylase의 고정화에 가장 적합한 activation time은 120분으로 정하였다.

효소농도

Aminoacylase의 농도가 고정화 반응에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 1과 같다. 가용성 효소의 농도가 증가함에 따라 고정화 효소의 total activity는 증가하였으나, yield of activity는 가용성 효소농도가 40mg일 때 가장 높았으며, specific activity도 이때 가장 높았다. 가용성 효소농도가 80mg일 때는 40mg일 때 보다 yield of activity나 specific activity가 약간 낮았으나 고정화 효소의 g당 unit, 고정화 효소 column 등

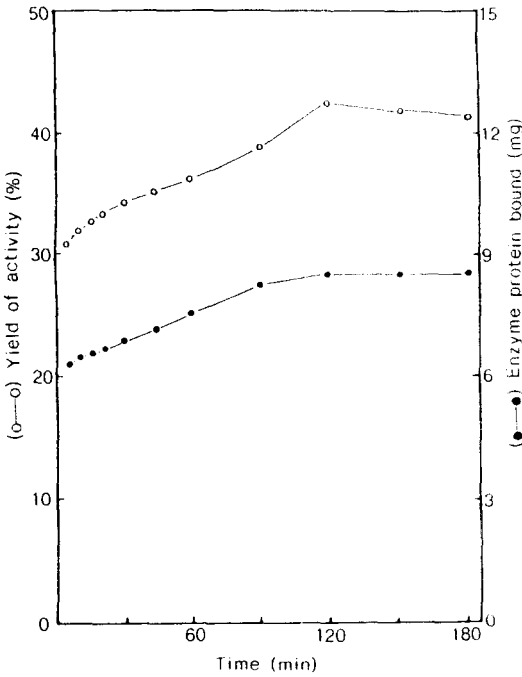


Fig. 3. Effect of activation time on the immobilization of aminoacylase.

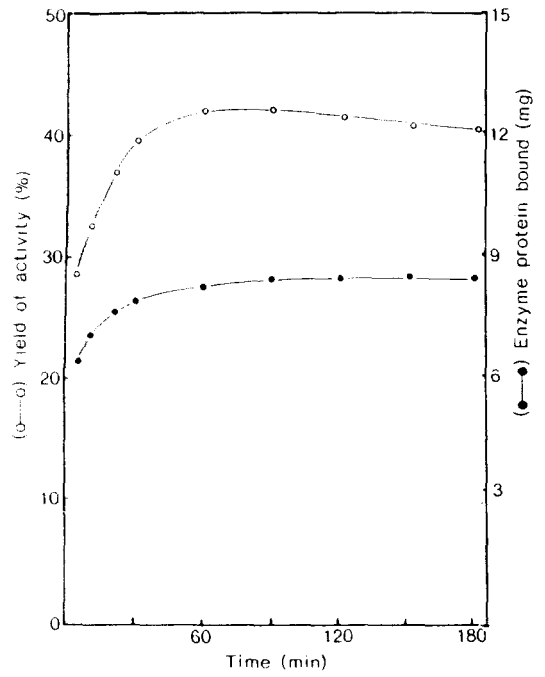


Fig. 4. Effect of coupling time on the immobilization of aminoacylase.

사용면을 고려하여 80mg 을 고정화 최적조건으로 결정 하였다.

Coupling time

활성화된 담체와 aminoacylase 사이의 최적 반응시

Table 1. Relationship between the amount of aminoacylase used and the activity of immobilized enzyme

Soluble aminoacylase			Immobilized aminoacylase			
Weight (mg)	Protein (mg)	Unit	Enzyme protein bound (%)	Total activity (unit)	Yield of* activity (%)	Specific** activity
20	3.12	424	71.7	173.2	40.8	77.3
40	6.24	848	67.5	368	43.4	89.4
80	12.68	1696	68.3	722.8	42.6	84.8
120	18.72	2544	61.3	896	35.2	78.0
160	24.94	3392	56.0	1051	31.0	75.6
200	31.20	4240	50.8	924.3	21.8	58.3
240	37.40	5088	48.1	890.4	17.5	49.4

* Yield of activity(%)=(activity in total immobilized enzyme)×100/(total activity of soluble enzyme used for immobilization)–(total activity of soluble enzyme) solution after removal of immobilized enzyme

** Specific activity=total activity of immobilized enzyme/mg of immobilized enzyme protein

간을 조사한 결과는 Fig. 4와 같다. Coupling time 이 연장됨에 따라 활성수율이 급격히 증가하다가 90분 이후에는 증가율에 별 변화가 없었다. 따라서 aminoacylase 를 chitosan 에 고정화 하는데 적합한 coupling time 은 90분으로 정하였다.

요 약

Chitosan 을 담체로 이용하여 aminoacylase 를 고정화하는 조건을 연구한 결과는 다음과 같다.

담체의 최적 activation 조건은 pH 6.0, glutaraldehyde 0.2%, 반응시간 120분이었다. 그리고 activated chitosan 에 aminoacylase 를 고정화하는데 가장 적당한 효소농도는 80mg/20ml 이었고, 이때 coupling time 은 90분이 가장 적절하였다.

감사의 글

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

문 헌

1. Kaneko, T., Izumi, Y., Chibata, I. and Itoh, T. : Quality of amino acids. In *Synthetic Production and Utilization of Amino Acids*, Kodansha, Tokyo, p. 233(1974)
2. Hirose, Y. and Okada, H. : Microbial production of amino acids. In *Microbial Technology*, 2nd ed., Academic Press, New York, Vol. 1, p.211(1979)
3. Bernard, J.A. : Preparation of pharmaceutical compounds by immobilized enzymes and cells. In *Advances in Applied Microbiology*, Academic Press, New York, Vol. 20 p.203(1976)
4. 清水 昌, 山田秀明 : 효소반응을 이용한 유기합성의 전망, *有機合成化學*, 39(6) 467(1981)
5. 野本正雄 : 효소에 의한 유용물질의 새로운 제조법, *化學と生物*, 20(7), 401(1982)
6. Kaneko, T., Izumi, Y., Chibata, I. and Itoh, T. : Optical resolution of DL-amino acids. In *Synthetic Production and Utilization of Amino Acids*, Kodansha, Tokyo, p.17(1974)
7. Barret, G.C. : Synthesis of amino acids. In *Chemistry and Biochemistry of Amino Acids*, Chapman & Hall, New York, p.246(1985)
8. Greenstein, J.P. and Winitz, M. : Resolution of amino acids. In *Chemistry of Amino Acids*, John Wiley & Sons, New York, Vol. 1, p.75(1961)
9. Yamada, S., Yamamoto, M. and Chibata, I. : Optical resolution of DL-amino acids by preferential crystallization procedure. *J. Org. Chem.*, 38(26), 4408(1973)
10. Sugie, M.H. and Suzuki, H. : Optical resolution of DL-amino acids with D-aminoacylase of *Streptomyces*. *Agric. Biol. Chem.*, 44(5), 1089(1980)
11. Chibata, I., Ishikawa, T. and Yamada, S. : Studies on the enzymatic resolution.(VI). A survey of the acylase in molds. *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, 21(5), 300(1957)
12. Birnbaum, S.M., Levintow, L., Kingsley, R.B. and Greenstein, J.P. : Specificity of amino acid acylase. *J. Biol. Chem.*, 194, 455(1952)
13. Rao, K.R., Birnbaum, S.M., Kingsley, R.B. and Greenstein, J.P. : Enzymatic susceptibility of corresponding chloroacetyl- and glycyl-L-amino acids. *J. Biol. Chem.*, 198, 507(1952)
14. Fones, W.S. and Lee, M. : Hydrolysis of N-acetyl derivatives of alanine and phenylalanine by acylase I and carboxypeptidase. *J. Biol. Chem.*, 201, 847(1953)
15. Morikawa, Y., Tezuka, T., Teransishi, M., Kimura, K., Fujimoto, Y. and Samejima, H. : Dichloro-S-triazinyl resin as a carrier of immobilized enzyme. *Agric. Biol. Chem.*, 40(6), 1137(1976)
16. Chibata, I., Tosa, T., Sato, T. and Mori, T. : Production of L-amino acids by aminoacylase adsorbed on DEAE-Sephadex. In *Methods in Enzymology*, Academic Press, New York, Vol. 44, p.746(1976)
17. 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)
18. 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)

19. Tosa, T., Mori, T., Sato, T. and Chibata, I. : Preparation and properties of aminoacylase entrapped into acrylamide gel lacttice. *Enzymologia*, **43**, 213(1972)
20. Hirose, K., Karube, I. and Suzuki, S. : Aminoacylase pellet. *Biotechnol. Bioeng.*, **16**, 311(1977)
21. Muzzarelli, R.A.A. : *Chitin*, Pergamon Press, Oxford, p.81(1977)
22. Kazumi, T., Tsuji, M., Hayashi, K. and Tsumura, N. : Preparation and some propertics of chitosan bound enzymes. *Agric. Biol. Chem.*, **41**(10), 1865(1977)
23. Muzzarelli, R.A.A., Barontini, G. and Rocchetti, R. : Immobilized enzymes on chitosan column : α -chymotrypsin and acid phosphatase. *Biotechnol. Bioeng.*, **16**, 1445(1976)
24. Tosa, T., Mori, T., Sato, T. and Chibata, I. : Enzymatic properties of DEAE-cellulose aminoacylase complex. *Enzmologia*, **32**, 153(1967)
25. Weetall, H.H. and Detar, C.C. : Studies on aminoacylase immobilized on porous ceramic carriers. *Biotechnol. Bioeng.*, **14**, 1537(1974)
26. Leuba, J.L., Widmer, F. : Immobilization of proteinase on chitosan. *Biotechnology Letters*, **1**(3), 109(1979)
27. 中尾順子, 中尾眞 : 酵素研究法(上), 東京化學同人, 東京, p. 27(1975) [*J. Biol. Chem.*, 193 265(1951)]
28. Klivanov, A.M. : Enzyme Stabilization *Analytical Biochemistry*, **93**(1), 1(1978)

(1988년 4월 15일 접수)