

시금치종자의 α -glucosidase에 의한 L-ascorbic acid로부터 ascorbic acid-2-glucoside의 생산

정지윤 · 송희상 · 방원기*

고려대학교 생명환경과학대학 농화학과

(2004년 1월 19일 접수, 2004년 3월 22일 수리)

Ascorbic acid로부터 2-O- α -D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid(ascorbic acid-2-glucoside, AA-2G)를 생산하기 위하여, transglucosylation 활성을 가지는 시금치 종자의 α -glucosidase를 효소원으로 이용하였다. 시금치 종자로 사용한 *Spinachia oleracea* L. WooSung의 조효소액의 α -glucosidase 활성은 발아 후 3일 째에 가장 높게 나타났으며, AA-2G의 생산은 2일 키운 시금치의 조효소액을 이용하였을 때, 생산량이 1.053 mM로 가장 높았다. 조효소액을 이용한 AA-2G 생산에 있어서 glucose 공여체로는 maltose가 가장 좋았으며, maltose와 ascorbic acid의 최적 농도는 각각 225 mM과 175 mM이었다. α -glucosidase는 60 unit를 사용했을 때 생산량이 가장 좋았다. 효과적인 반응완충용액은 sodium acetate 완충액이었으며, 최적 농도는 175 mM이었다. 최적 pH 및 반응온도는 각각 5.0과 65°C였고, 최적 반응조건 하에서 50분 반응 후에 ascorbic acid로부터 2.30 mM의 AA-2G가 생산되었다.

Key words: L-ascorbic acid, 시금치, ascorbic acid-2-glucoside, α -glucosidase

서 론

Ascorbic acid는 1920년대 후반 Szent-Gyorgyi에 의해 처음 결정으로 분리된 물질로서 대부분의 동·식물에서는 glucuronic acid pathway를 통해 D-glucose나 D-galactose로부터 합성되지만, 인간을 비롯한 일부 고등동물에서는 합성되지 못한다.^{1,2)} Ascorbic acid는 항산화 활성, 세포 생육 및 항체 형성과 백혈구 식균 활성에 대한 촉진 효과 등^{3,5)}이 있다고 알려져 있어 의약품, 식품, 화장품 등에 광범위하게 이용될 수 있다. 그러나, ascorbic acid는 수용액 상태에서는 매우 불안정하여 dehydroascorbic acid로 빠르게 산화되므로, 주사나 경구 투약과 같은 의학분야에서 응용하기 어려울 뿐 아니라 산업적 이용에도 많은 제한을 받는다.⁶⁾ 따라서, 여러 가지 성분이 포함되어 있는 액체 의약품, 식품, 화장품에서 ascorbic acid의 안정성을 높이기 위해 ascorbic acid-2-sulfate, ascorbic acid-2-phosphate 등과 같은 여러 가지 유도체들을 생산하는 화학적, 효소적 방법이 개발되었는데,^{7,8)} ascorbic acid의 glucose 유도체인 2-O- α -D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid(ascorbic acid-2-glucoside, 이하 AA-2G로 略記)는 1990년 Norio 등⁹⁾에 의해 쥐 소장의 α -glucosidase를 통해 처음 생산되었다. AA-2G는 수용액 상태에서 열, 산소, 금속이온의 작용, ascorbate oxidase에 의한 산화적 분해에 매우 안정하고 생리학적 활성이 매우 높다.⁹⁾ AA-2G는 ascorbic acid와 마찬가지로 항산화 활성, 인간의 피부 섬유아세포에서 collagen 합성과 섬유아세포 증식, 항체 생산 증진을 촉진할 뿐만 아니라,¹⁰⁾ 인간의 상피세포가 태양 빛에 자연

노출됨으로써 자외선에 의해 손상되는 것에 대해 광보호 효과가 있다.¹¹⁾

AA-2G의 생산법으로는 화학합성법과 효소를 이용한 방법이 있다. 그러나 화학합성법의 경우 복잡한 과정과 장시간이 소요되므로,¹²⁾ 이를 극복하기 위해 효소를 이용한 방법들이 연구되었다. 현재 AA-2G를 생산한다고 보고된 효소로는 cyclomaltodextrin glucanotransferase[EC 2.4.1.19]와 α -glucosidase[EC 3.2.1.20]가 있다. 이들 중 α -glucosidase는 말단의 비환원성 α -1,4-결합의 α -D-glucose 단위를 가수분해하는 효소로 반응조건에 따라 AA-2G 합성뿐 아니라 가수분해함으로써 생리적 활성을 가질 수 있도록 한다.^{9,13)}

본 연구에서는 AA-2G를 생산하기 위하여, 시금치의 종자를 발아시켜 α -glucosidase의 활성을 지니는 조효소액을 추출하고, 부분 정제한 조효소액을 효소원으로 하여 ascorbic acid와 glucose 공여체로부터 AA-2G를 생산하기 위한 최적 반응조건을 검토하였다.

재료 및 방법

시금치종자. 대농종묘에서 구입한 우성 시금치(*Spinachia oleracea* L. Woosung)의 종자를 이용하였다.

시약. 본 실험에 사용한 L-ascorbic acid, metaphosphoric acid는 Showa Chemical사의 특급시약을 사용하였으며, maltose는 Junsei사의 시약을 사용하였다. 조효소액 추출을 위한 Triton X-100, 2-mercaptoethanol은 Merck사로부터 구입하였고, α -glucosidase 활성 측정을 위한 시약인 p-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside(PNPG), p-nitrophenol(PNP)은 모두 Sigma Chemical사의 특급시약이었다. AA-2G는 일본 Okayama University로부터 제공받아 사용하였으며, 그 밖의 일반시약은

*연락처

Phone: 82-2-3290-3022; Fax: 82-2-923-8183

E-mail: agrchem@korea.ac.kr

모두 Showa Chemical 및 Kanto Chemical사, Sigma Chemical사의 특급 및 일급 시약을 사용하였다.

시금치의 발아 및 조효소액의 추출. 시금치 종자를 물에 충분히 세척한 후 수분을 함유하고 있는 거름종이를 칸 평판에 종자를 뿌리고 3일 동안 종자가 마르지 않도록 매일 수분을 공급해주면서 25°C의 암소에서 발아시켰다.⁹⁾ 발아한 시금치 종자로부터 α -glucosidase의 활성이 높은 조효소액을 추출하기 위하여 유화제를 이용하는 방법¹⁴⁾을 사용하였다. 유화제를 이용한 조효소액의 추출은 발아한 시금치종자를 파쇄한 후, 종자 1g에 유화제 추출 혼합액(50 mM sodium carbonate buffer, pH 9.0, 1 M NaCl, 2 mM 2-mercaptoethanol, 1% Triton X-100) 5 ml를 첨가하여 추출하였다. 각 추출액을 원심분리(10,000×g, 20분)한 후 상등액을 취하여 Amicon XM50 membrane을 이용하여 탈염한 후 100 mM sodium acetate buffer (pH 5.3) 1 ml를 첨가하여 회수하였다.

α -Glucosidase 활성 측정. α -Glucosidase의 활성을 측정하기 위하여 Tibbot^{14,15)} 등의 방법에 따라 반응 혼합액을 50 mM sodium succinate buffer(pH 4.2)에 *p*-nitrophenol- α -D-glucopyranoside (PNPG)를 용해시켜 1 mg/ml의 농도로 만들었다. 반응혼합액 1ml과 효소액 100 μ l를 혼합하여 37°C에서 30분 동안 반응시킨 후 1 N NaOH 100 μ l를 첨가하여 발색시켰다. 이때 생성된 *p*-nitrophenol(PNP)은 400 nm에서 spectrophotometer를 이용하여 측정하였으며,¹⁵⁾ 그 양은 표준물질 *p*-nitrophenol로부터 작성한 표준곡선으로부터 구하였다. α -Glucosidase의 1 unit는 pH 4.2, 37°C에서 분당 1 μ mol *p*-nitrophenol로 전환하는데 요구되는 효소량으로 정의하였다. 비활성은 1 mg의 단백질당 효소 활성의 unit 수로 정의하였다.

발아한 시금치종자의 조효소액의 AA-2G 생산. 시금치종자 조효소액에 대한 AA-2G 생산을 확인하기 위하여, Norio⁹⁾ 등의 방법에 따라 10 unit의 조효소액을 100 mM L-ascorbic acid, 100 mM maltose, 100 mM sodium acetate buffer(pH 5.3)에 1 ml가 되도록 첨가한 후, 60°C의 암소에서 1시간동안 반응시킨 후 AA-2G를 분석하였다.

AA-2G 정성 및 정량분석. AA-2G의 정성 및 정량분석을 위하여 Norio⁹⁾ 등의 방법에 따라 high performance liquid chromatography(HPLC)를 이용하여 분석하였다. 상기 반응액 중 200 μ l을 취하여 4 vol의 1.06% metaphosphoric acid를 첨가한 후 12,000×g 에서 15분 동안 원심분리하여 그 상등액을 분석용 시료로 사용하였다. 시료의 분석은 LUNA C18 컬럼(250 mm×4.6 mm, Phenomenex Corporation)을 이용하였으며, TSP HPLC system(TSP사)를 사용하여 분석하였다. 이동상은 0.1 M KH₂PO₄-phosphoric acid(pH 2.0)를 사용하였으며, flow rate는 0.7 ml/min 으로 하였고 240 nm에서 UV detector로 분석하였다. 생산된 AA-2G의 양은 표준물질 AA-2G로부터 작성한 표준곡선으로부터 구하였다.

단백질 정량. 단백질은 bicinchoninic acid(BCA) method¹⁶⁾로 562 nm에서의 흡광도를 측정하여 정량하였다. 단백질의 양은 표준 단백질 bovine serum albumin을 사용하여 구한 표준곡선을 이용하여 계산하였다.

결과 및 고찰

α -Glucosidase의 추출. 발아한 시금치종자의 α -glucosidase를 이용한 AA-2G의 생산을 위해, 단백질양이 많은 조효소액의 추출방법을 조사하였다. 25°C에서 수분을 포함한 평판에서 발아한 후 3일이 지난 시금치종자를 수확하여 각 acetate buffer와 Na₂CO₃/NaHCO₃ buffer를 이용하여 얻은 조효소액과 유화제인 Triton X-100, Tween 60, SDS를 첨가하여 얻은 각 조효소액의 전체 단백질 양을 비교하였다. 그 결과 유화제인 1% Triton X-100을 함유한 원충용액으로 추출한 조효소액의 전체 단백질양이 1 mg/spinach seed g으로서 다른 방법에 의해 추출한 조효소액의 전체 단백질의 양에 비해 가장 많았다(자료 미제시). 따라서 본 실험에서 발아한 시금치종자로부터 얻은 α -glucosidase의 활성을 지닌 조효소액은 유화제인 Triton X-100을 사용하여 추출하였다.

AA-2G의 정성적 확인. 본 실험에서 시금치종자로부터 추출한 조효소액에 의해 생성된 AA-2G는 LUNA C18 컬럼을 이용한 HPLC에 의해 정성적으로 확인하였다. Fig. 1에서 보듯이 AA-2G 표준시료와 같은 잔류시간을 나타내어 생성물이 AA-2G임을 확인할 수 있었다.

발아기간에 따른 AA-2G 생산량의 변화. 발아기간에 따라 AA-2G 생성 비활성을 비교하였다. Fig. 2에서도 알 수 있듯이 AA-2G 생산은 발아 2일 후의 시금치 조효소액을 사용했을 때, 최대치인 1.05 mM에 도달하였다. 따라서 이후 실험에서는 AA-2G 생성 비활성이 가장 높은 발아 2일된 시금치종자를 수확하여 ascorbic acid에서 AA-2G 생산을 위한 효소원으로 사용하였다.

Glucose 공여체에 따른 AA-2G의 생산. AA-2G의 생산에 미치는 여러 가지 glucose 공여체들을 조사하였다. 그 결과 Table 1에서와 같이 maltose가 43.13 μ M 으로 생산량이 가장 높았고, 다음으로 starch(30.96 μ M)와 dextrin(23.92 μ M) 순이었으며, glucose 공여체로 trehalose, cellobiose, sucrose, lactose

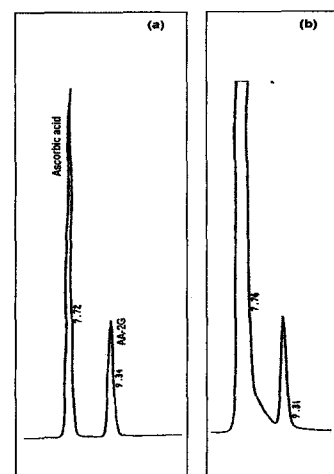


Fig. 1. HPLC chromatogram of ascorbic acid and AA-2G in reaction mixture. (a) Standard ascorbic acid and AA-2G (b) Reaction mixture.

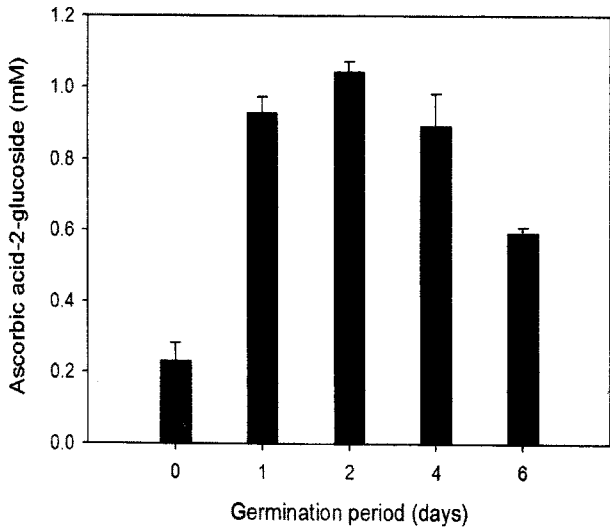


Fig. 2. Effect of different germination period on AA-2G production.

를 이용할 경우에는 AA-2G가 생산되지 않았다. 따라서 이후의 실험에서는 glucose 공여체로 AA-2G 생산량이 가장 많은 maltose를 사용하였다.

Table 1. Effect of different glucose donors on AA-2G production

Glucose donors	AA-2G (μ M)
Maltose	43.1 \pm 4.17
Starch	30.9 \pm 2.23
Dextrin	23.9 \pm 3.14
Sucrose	-

Reactions were carried out for 60 min at 60°C in the reaction mixture containing 10 unit of α -glucosidase, 1% of glucose donor, 175 mM L-Ascorbic acid, and 100 mM of sodium acetate buffer (pH 5.3).

AA-2G 생산에 미치는 ascorbic acid 농도의 영향. AA-2G 생산에 기질로 이용되는 ascorbic acid 농도를 50 mM에서 275 mM까지 변화시키면서 ascorbic acid의 농도 변화가 AA-2G 생산에 미치는 영향을 관찰하였다. Fig. 3(A)에서와 같이 175 mM까지 ascorbic acid가 증가할수록 AA-2G의 생산량은 증가하여 175 mM에서 1.12 mM에 이른 후, 그 이상의 농도에서는 더 이상 증가하지 않고 거의 일정하게 유지되었다. 따라서, ascorbic acid의 농도는 175 mM로 결정하였다.

AA-2G 생산에 미치는 maltose 농도의 영향. 본 실험에서는 ascorbic acid 농도를 175 mM로 고정하고, AA-2G의 glucose 공여체인 maltose 농도 변화가 AA-2G 생산에 미치는

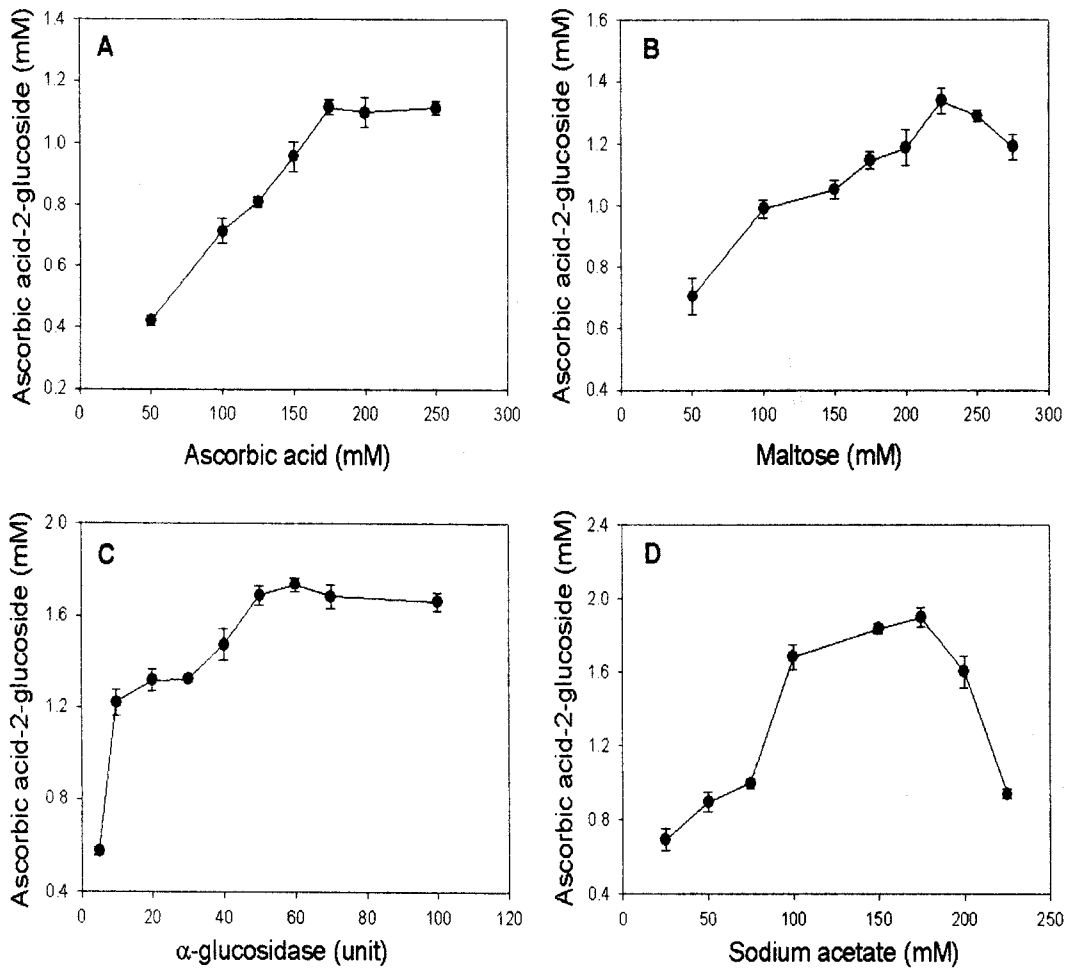


Fig. 3. Effect of ascorbic acid (A), maltose (B), α -glucosidase (C), and Buffer concentration (D) on AA-2G production.

Table 2. Effect of different buffers on AA-2G production

Buffers	AA-2G (mM)
Sodium acetate	1.7±0.21
Sodium citrate	1.3±0.38
Sodium succinate	1.46±0.17
Citrate-phosphate	1.04±0.33

Reactions were carried out for 60 min at 60°C in the reaction mixture containing 60 unit of α -glucosidase, 225 mM of maltose, 175 mM of L-ascorbic acid, and 100 mM of various buffers (pH 5.3). All buffers were adjusted to pH 5.3.

효과를 조사하였다. 그 결과 Fig. 3(B)에서와 같이 AA-2G의 생산량은 maltose 농도가 225 mM에 이르기까지는 1.34 mM로 증가하였으며, 그 이상에서는 소량 감소하는 결과를 보였다. 따라서, 이후의 실험에서는 maltose의 농도를 225 mM로 고정하여 사용하였다.

AA-2G 생산에 미치는 조효소액 농도의 영향. 본 실험에서는 ascorbic acid와 maltose의 농도를 각각 175 mM, 225 mM로 고정하고, 발아한 시금치종자로부터 추출한 조효소액의 양을 5에서 100 unit까지 변화시켰다. Fig. 3(C)에서 보듯이 60 단위까지는 생산량이 계속 증가하여 1.74 mM에 이른 후 조금씩 감소하였다. 따라서, 이후에 반응에 사용하는 조효소액의 농도를 60 unit로 결정하였다.

AA-2G 생산에 미치는 서로 다른 완충용액의 영향. Ascorbic acid로부터 AA-2G로 전환시 반응액에 사용되는 서로 다른 완충용액에 따른 영향을 조사하기 위해 산성조건에서 사용되는 4종류 완충용액을 사용하여 반응을 수행하였다. Table 2에서와 같이 sodium acetate 완충용액을 이용할 경우 1.74 mM로 가장 높았다. 따라서 반응액의 완충용액으로 sodium acetate로 정하였다.

AA-2G 생산에 미치는 완충용액의 농도의 영향. 본 실험에서는 반응에 사용되는 sodium acetate의 농도 변화가 AA-2G의 생산에 미치는 영향을 조사하였다. Fig. 3(D)에서 보는 바와 같이 AA-2G의 생산은 sodium acetate 농도가 175 mM일 때 1.90 mM로 가장 높았다. 따라서 이후의 반응액에 사용하는 sodium acetate의 농도를 175 mM로 고정하였다.

AA-2G 생산에 미치는 완충용액 pH의 영향. Ascorbic acid로부터 AA-2G로 전환시 사용되는 반응액의 sodium acetate 완충용액의 pH 변화에 따른 AA-2G 생산에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과 Fig. 4(A)에서와 같이 pH 5.0에서 AA-2G 생산량이 1.99 mM로 가장 높았고, 그 이후에는 소량 감소하였다. 따라서 이후의 실험은 pH를 5.0으로 고정시켜 사용하였다.

AA-2G 생산에 미치는 반응온도의 영향. 본 실험에서는 반응온도가 AA-2G 생산에 미치는 영향을 알아보기 위하여 반응온도를 20°C부터 75°C까지 변화시켜 가면서 AA-2G 생산의 변화를 관찰하였다. Fig. 4(B)에서 보듯이 65°C까지는 온도가 증가할수록 생산량이 증가하여 65°C에서 2.14 mM로 최고치를 나타내었으며, 이후에는 온도가 증가할수록 생산량이 감소하였다. 따라서 반응온도는 65°C로 고정하였다.

AA-2G 생산의 경시적 변화. 상기의 실험결과들로부터 얻어진 최적 조건하에서 시금치 종자의 조효소액에 의한 175 mM

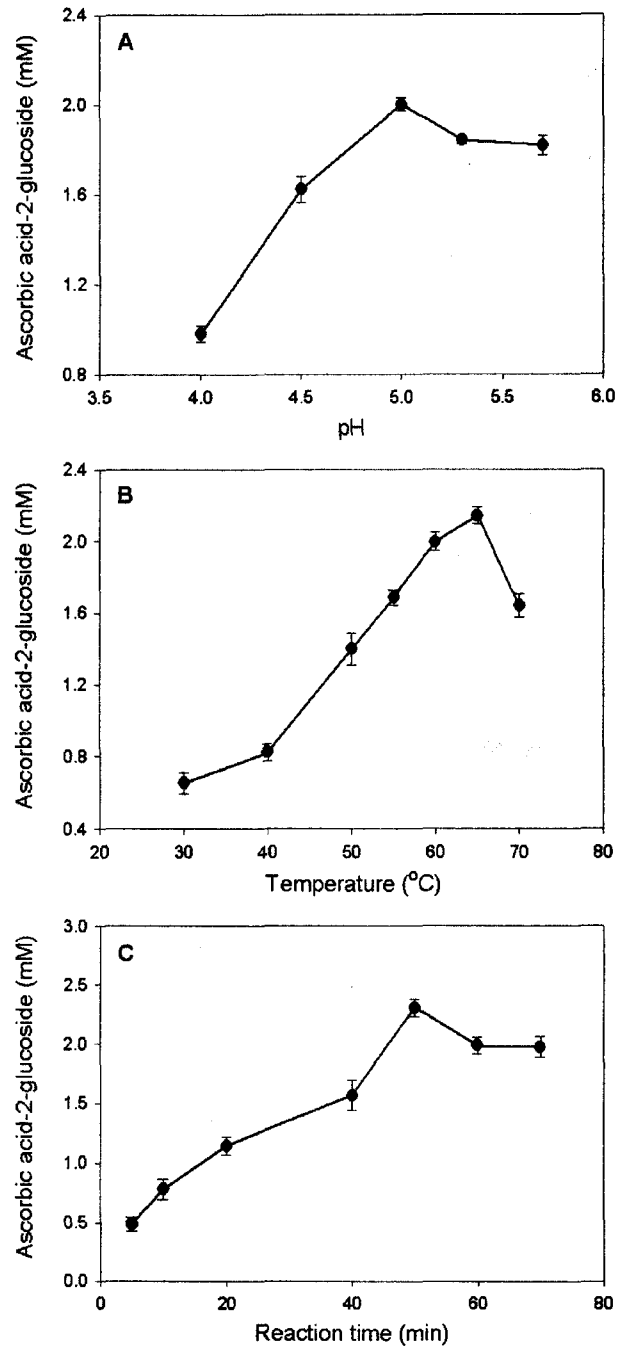


Fig. 4. Effect of pH of acetate buffer (A) and temperature (B) on AA-2G production and time course of AA-2G production under optimal conditions (C).

의 ascorbic acid와 225 mM의 maltose로부터 AA-2G 생산의 경시적 변화를 Fig. 4(C)에 나타내었다. 생산량이 반응시간 50 분까지 빠르게 증가하였으며, 이후 미세한 감소를 보이며 유지되는 경향을 보였다. 반응 50분 후에 생산량이 2.30 mM으로 최대값을 나타내었다.

본 실험에서 우리는 시금치 종자의 α -glucosidase가 수용액에서 안정한 ascorbic acid의 유도체인 AA-2G를 특이적으로 생산할 수 있는 효소원으로서 매우 효과적임을 입증하였다. 이 효소원을 분리, 정제하여 AA-2G의 대량생산을 이루어낼 수 있도

록 연구가 더 필요할 것이라 생각된다. 또한, 대량생산을 통해 우리는 향후 의약품이나 식품 첨가제로서 상업적인 이용성을 더욱 증대시킬 수 있을 것이다.

참고문헌

1. Mark, L. and Morita, K. (1985) Ascorbic acid in endocrine systems. *Vitam. Horm.* **42**, 2-64.
2. Gabor, B., Braun, L., Csala, M., Puskas, F. and Mandl, J. (1997) Ascorbate metabolism and its regulation in animals. *Free Radic. Biol. Med.* **23**(5), 793-803.
3. Lawrence, J. M. (1984) Handbook of Vitamins. Marcel Dekker. USA pp. 199-244.
4. Marks, J. (1985) In *A Guide to the Vitamins. Their Role in Health and Disease*. (2nd ed.), Medical and Technical Publishing Co. Ltd., Great Britain, pp. 137-144.
5. Burn, J. J., Rivers, J. M. and Machlin, L. J., (1987) Third Conference on Vitamin C. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **498**, 1-533.
6. Kiyoko, T. and Ito, M. (1977) Effects of metal ions and flavonoids on the oxidation of ascorbic acid. *Chem. Pharm. Bull.* **25**, 3218-3225.
7. Paul, A. S., Liang, Y. T., Lee, C. H., Hosoney, R. C. and Deyo, C. W. (1974) Synthesis and stability of L-ascorbic 2-sulfate. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1220-1224.
8. Fugio, T., Maruyama, A. and Koizumi, S. (1989) Enzymatic preparation of ascorbic acid-2-phosphate. *Eur. Pat. Appl.* EP 319130.
9. Norio, M., Suga, S., Fujii, K., Goto, K. and Yamamoto, I. (1990) Formation of a stable ascorbic acid 2-glucoside by specific transglucosylation with rice seed α -glucosidase. *Agric. Biol. Chem.* **54**(7), 1697-1703.
10. Itaru, Y. and Norio, M. (1992) Bioavailability and Biological Activity of L-Ascorbic acid 2-O- α -glucoside. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 161-164.
11. Miyai, E., Yanagida, M., Akiyama, J. and Yamamoto, I. (1996) ascorbic acid 2-O- α -glucoside, a stable form of ascorbic acid, rescues human keratinocyte cell line, SCC, from cytotoxicity of ultraviolet light B. *Biol. Pharm. Bull.* **19**, 984-987.
12. Itaru, Y., Muto, N., Nagata, E., Nakamura, T. and Suzuki, Y. (1990) Formation of stable L-ascorbic acid α -glucoside by mammalian α -glucosidase-catalyzed transglucosylation. *Biochim. Biophys. Acta.* **1035**, 44-50.
13. Norio, M., Ban, Y., Akiba, M. and Yamamoto, I. (1991) Evidence for the in vivo formation of ascorbic acid 2-O- α -glucoside in guinea pigs and rats. *Biochem. Pharmacol.* **42**, 625-631.
14. Tibbot, B. K. and Skadsen, R. W. (1996) Molecular cloning and characterization of a gibberellin-inducible, putative α -glucosidase gene from barley. *Plant Mol. Biol.* **30**, 229-241.
15. Sun, Z. and Henson, C. A. (1990) Degradation of native starch granules by barley α -glucosidases. *Plant Physiol.* **94**, 320-327.
16. Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H. and Provenzano, M. D. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**, 76-85.

Production of Ascorbic acid-2-glucoside from L-Ascorbic acid with Spinach α -Glucosidase

Ji-Youn Chung, Heesang Song and Won-Gi Bang* (*College of Life and Environmental Sciences, Korea University, Seoul 136-701*)

Abstract: For the production of 2-O- α -D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid (ascorbic acid-2-glucoside, AA-2G) from ascorbic acid, the usability of spinach seed as the source of α -glucosidase having transglucosylation activity was studied. The optimum conditions for the production of AA-2G from ascorbic acid and glucose donor were investigated by using crude extract of *Spinachia oleracea* L. Woosung, the selected source of enzyme. The production of AA-2G was the highest with 1.053 mM when spinach seeds were grown for 2 days after germination. Maltose was the most effective glucose donor, and the optimum concentration of ascorbic acid and maltose were 175 mM and 225 mM, respectively. The optimum concentration of α -glucosidase was 60 units. The most effective buffer was sodium acetate and its optimum concentration was 175 mM. The optimum pH and temperature were 5.0 and 65°C, respectively. Under the optimum condition, 2.14 mM of AA-2G was produced from ascorbic acid after 50 minutes of reaction.

Key words: L-ascorbic acid, spinach, ascorbic acid-2-glucoside, α -glucosidase

*Corresponding author