

Bifidobacterium longum 유래 재조합 Sucrose Phosphorylase에 의한 Phenolic Compound 배당체 생산

권태연 · 이종훈*
경기대학교 식품생물공학과

Transglycosylation of Phenolic Compounds by the Recombinant Sucrose Phosphorylase Cloned from *Bifidobacterium longum*. Kwon, Taeyeon and Jong-Hoon Lee*. Department of Food Science and Biotechnology, Kyonggi University, Suwon 442-760, Korea – Transglycosylation from sucrose to phenolic compounds by the recombinant sucrose phosphorylase from *Bifidobacterium longum* was studied. HPLC analysis revealed that the enzyme transferred glucosyl residue of sucrose to 1,2-dihydroxybenzene, 1,4-dihydroxybenzene, 1,2,3-trihydroxybenzene, and 2-hydroxybenzyl alcohol. The enzyme could transfer the glucosyl moiety of sucrose to phenolic compounds which have phenolic OH or alcoholic (hydroxymethyl) OH group.

Key words: *Bifidobacterium longum*, sucrose phosphorylase, transglycosylation

Sucrose phosphorylase는 sucrose와 inorganic phosphate를 D-fructose와 α -D-glucose-1-phosphate (G-1-P)로 전환시키는 반응과 그 역반응에 관여하는 효소로 phosphorolysis와 더불어 transglycosylation을 촉매한다. 즉, sucrose와 inorganic phosphate의 존재 하에 sucrose의 glucose에 inorganic phosphate를 전이시킴으로써 G-1-P와 D-fructose를 형성하며, 그 역반응에서는 G-1-P의 glucose 부분을 D-fructose에 전이시켜 sucrose와 inorganic phosphate를 형성한다[11].

International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUB-MB)의 효소 명명에서는 촉매반응 종류와 기질 특이성에 근거하여 효소를 분류했으나, 이 분류법은 여러 종류의 기질에 반응하는 효소의 분류에는 적합하지 않을 뿐만 아니라 효소의 구조적 특성을 반영하지 않았기 때문에 효소의 진화적 측면 해석에 문제점을 가지고 있다. 따라서 1991년 Henrissat[2]는 IUB-MB 효소 명명법을 보완하여 새로운 분류법을 제안하였다. 아미노산 서열의 유사성에 근거를 둔 새로운 분류체계는 하나 이상의 기질에 대한 특이성을 보유한 효소들 사이의 진화적 관계와 역학적 정보를 유도하는데 있어서 유용한 방법으로 간주되고 있다. 새로운 분류법에 따르면 glycoside hydrolase는 91개의 family로 분류되어 있고, 이렇게 분류된 family 중, sucrose phosphorylase가 속하는 glycoside hydrolase family 13은 cyclodextrin glucanosyltransferase, α -amylase, α -glucosidase, cyclomalto-dextrinase 등의 매우 다양한 효소들로 이루어져 있으며, hydrolysis, cyclization, disproportionation 등의 반응뿐 아니

라 transglycosylation 활성화도 함께 지니는 것으로 보고되었다(<http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/>).

일반적으로 당전이는 하나의 특이적인 공여체(donor)로부터 다수의 구조적으로 다른 수용체(acceptor)로 진행된다. 전이반응은 공여체와 수용체 분자 사이의 glycosidic bond의 배열을 결정하는 효소의 종류에 의존적이며, 수용체의 구조 또한 glycosidic bond의 형성을 위한 전이 위치를 결정하는 것으로 보고되었다[1, 14]. 당전이에는 화학적 방법이 사용되기도 하지만 비특이적 반응산물의 생산 억제를 위해 glycosidic bond를 형성하는 OH기들에 대한 특이적 protection과 deprotection을 위한 과정이 필요하다. 반면, 효소적 방법의 경우에는 다수의 OH기가 존재하더라도 오직 하나 또는 두개의 OH기에만 특이적으로 반응하기 때문에 화학적 방법에서의 복잡한 여러 단계의 과정은 필요하지 않다. 즉, 반응 단계의 단축화, 정제 효율 증대 및 높은 수율을 이룰 수 있음을 의미한다[12]. 많은 종류의 올리고당들이 glucan-sucrases[12, 14], cyclodextrin glucanosyltransferase[12, 13], α -amylase[3, 16], neopullulanase[15], sialyltransferase[12] 등의 glycoside hydrolase가 보유하고 있는 당전이 활성화에 의해 합성되었다. 또한 rutin, stevioside, rubusoside, ascorbic acid 등과 같은 식품재료의 쓴맛을 줄이거나 식품에서의 용해성을 증진시키는 등, 식품원재료의 물리·화학적 특성 향상에 glycoside hydrolase가 이용 가능한 것으로 보고되었다[10].

Sucrose phosphorylase에 의한 glucose 전이반응에서는 sucrose, G-1-P, glucose-1-fluoride만이 공여체로써 작용할 수 있으나 수용체로는 여러 가지 당류와 당알코올류가 가능한 것으로 알려져 있으며, hydroxybenzene류, benzoic acid 류, benzyl alcohol류, 및 catechin류, 그리고 phenolic 혹은

*Corresponding author
Tel: 82-31-249-9656, Fax: 82-31-253-1165
E-mail: jhl@kyonggi.ac.kr

alcoholic compound의 OH기에도 sucrose로부터 glucose 부분을 전이시킬 수 있음이 보고되었다[5, 8]. *Leuconostoc mesenteroides* 유래 sucrose phosphorylase를 이용한 catechin-glucoside[7], glycosyl-xylitol[5], α -arbutin [6], (-)-epigallocatechin gallate-glucoside[8], 및 furanone glucoside [9]의 합성 등이 그 예이다.

Phenolic compound의 일종인 dihydroxybenzenes (DHBs)과 그 유도체들은 melanogenesis의 저해제로써 또한 항산화제로써 화장품산업에서 사용되고, 특히 1,4-DHB (hydroquinone)는 색소세포에서 melanogenesis 유발에 기여하는 tyrosinase에 대한 강한 저해 활성을 나타내어 색소침착증 치료제로 사용된다[6]. 하지만 DHBs는 피부를 자극하고 수용액상에서 쉽게 산화되어 갈변되므로 사용이 제한되고 있다. Kitao 등 [6]은 이러한 문제점을 보완하고자 *L. mesenteroides* 유래 sucrose phosphorylase를 이용한 phenolic compound의 당전이반응 연구를 수행하였다. 이 실험의 결과 만들어진 1,4-DHB의 반응산물인 arbutin (hydroquinone-*O*- β -D-glucopyranoside)은 피부에 부작용이 없으며 잠재적인 melanin 합성 억제제라고 보고하였다.

본 연구자들은 한국인의 분변에서 분리한 *Bifidobacterium longum* SJ32로부터 sucrose phosphorylase 유전자를 cloning하여 대장균에서 발현시키고, 발현된 재조합 효소의 특성을 규명하였다[4]. 본 연구에서는 *B. longum* 유래 재조합 sucrose phosphorylase의 식품산업에서의 이용 가능성 검토를 위하여 부분 정제한 재조합 효소의 당전이반응에 의한 phenolic compound 배당체 생산을 검토해 보았다.

전이반응의 수용체인 phenolic compound로는 1,2-DHB, 1,4-DHB, 1,2,3-trihydroxybenzene (1,2,3-THB), 2-hydroxybenzyl alcohol (2-HBAL)을 Sigma (U.S.A.)로부터 구입하여 사용하였다. 반응에 사용한 재조합 효소의 생산 및 부분 정제는 본 연구자들이 보고한 전보를 수정하여 수행하였다 [4]. *B. longum* SJ32 유래 sucrose phosphorylase가 cloning된 pUC18 vector를 보유한 재조합 *Escherichia coli* strain JM109을 50 mM 농도로 ampicillin이 첨가된 LB 배지에서

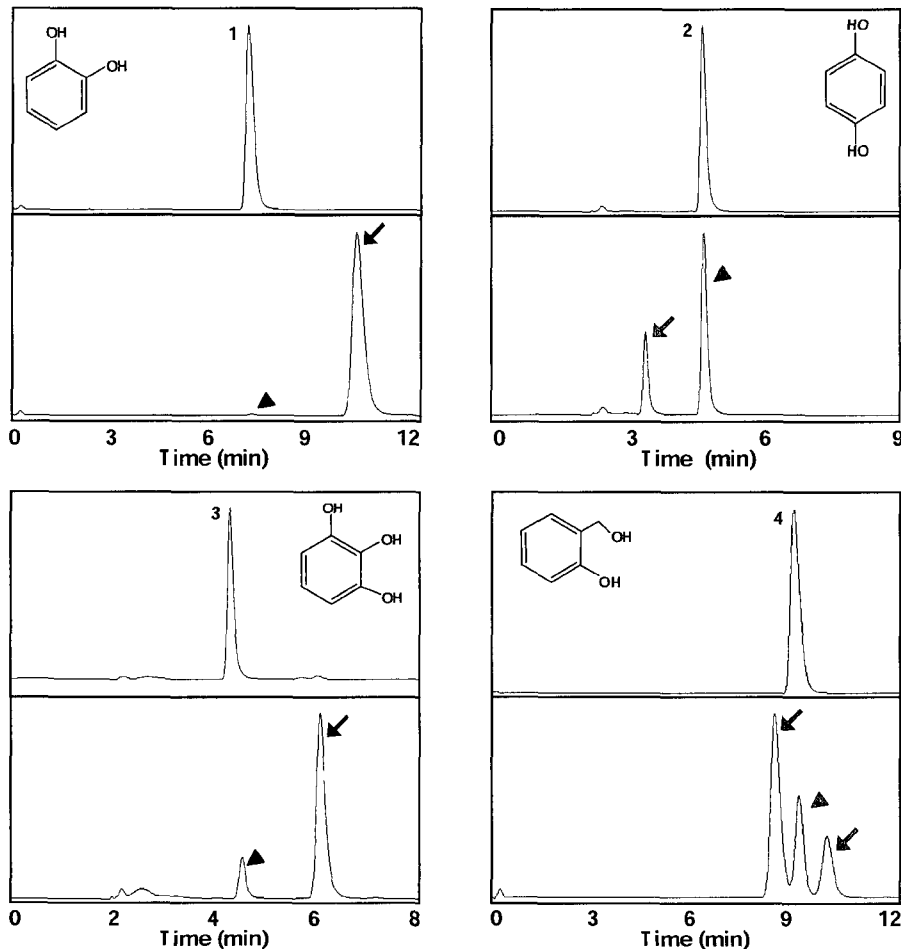


Fig. 1. HPLC of reaction products with recombinant sucrose phosphorylase from *B. longum* on the mixture of sucrose as a donor and phenolic compounds as acceptors. Acceptors used were: 1, 1,2-DHB; 2, 1,4-DHB; 3, 1,2,3-THB, 4, 2-HBAL. Arrows and triangles show the peaks that were considered to be the transfer products and acceptor phenolic compounds.

대수기까지 배양한 후, 최종농도가 1 mM이 되게 IPTG를 첨가하여 재조합 효소의 생산을 유도하였고, IPTG 첨가 후, 12 시간 배양하여 5,000 × g에서 10분간 원심분리하여 균체를 회수하였다. 회수한 균체는 50 mM potassium phosphate buffer (pH 6.4)로 2번 씻은 후, 같은 buffer에 현탁하여 Ultrasonic oscillator (Amplitude 50%, 123 Watts, 3분, Sonics & Materials Inc., U.S.A.)를 사용하여 세포를 파쇄하였고, 파쇄된 세포 추출액을 4°C, 12,000 × g에서 30분간 원심분리하여 상등액을 조효소액으로 사용하였다. 조효소액은 50 mM potassium phosphate buffer (pH 6.4)로 평형화시킨 DEAE-Sephacel column (2.6 × 10 cm, Amersham Pharmacia Biotech, Sweden)에 흡착시키고 동일 buffer로 씻어 비결합 단백질을 제거한 다음, NaCl의 농도구배 (0-0.7 M)를 이용하여 용출하였다. 용출은 2.5 ml/min의 속도로 5 ml씩 분획하였고, 분획 중의 단백질 함량은 280 nm에서의 흡광도로 결정하였다. 또한 각 분획의 sucrose phosphorylase 활성은 *p*-nitrophenyl α -D-glucopyranoside를 기질로 하여 측정하였고[4], 활성을 나타내는 분획은 VIVASPIN concentrator (Sartorius, Germany)를 이용하여 분자량 50,000 이상의 단백질을 농축한 다음, 탈염하여 반응에 사용하였다. 당전이반응의 반응액은 100 mM HEPES buffer (pH 7.5)에 sucrose가 50% (w/v)가 되도록, 각 수용체가 1% (w/v)가 되도록 첨가한 후, 적당량의 부분정제한 sucrose phosphorylase를 혼합하여 제조하였다. 37°C에서 15시간 반응한 후, Ultrafree-MC (10,000 NMWL, Millipore, U.S.A)를 사용하여 효소를 제거하고 반응산물을 HPLC로 분석하였다.

Table 1의 HPLC 분석조건에서 반응산물을 분석한 결과, 수용체의 peak와 구분이 가능한 생성물 peak들을 관찰할 수 있었고, 효소를 넣지 않은 모든 대조군에서는 수용체 peak만이 관찰되었다(Fig. 1). 반응산물의 검증을 위하여 Sigma에서 구입한 *L. mesenteroides* 유래 재조합 sucrose phosphorylase를 이용한 반응을 수행한 경우에서도 동일한 retention time에서 검출되는 반응산물 peak를 발견할 수 있었다. 따라서 실험에 사용한 모든 수용체에 glucose 전이반응이 일어난 것으로 추정된다. 1,2-DHB, 1,4-DHB, 1,2,3-THB와의 반응으로부터는 하나의 반응 산물만이 검출되었으나 2-HBAL의 경우에는 두개의 반응산물이 검출되어,

sucrose phosphorylase는 phenol기를 보유한 화합물의 phenolic OH기뿐만 아니라 alcoholic OH기에도 당전이가 가능한 것으로 나타났다. 본 연구의 결과, *B. longum* 유래 sucrose phosphorylase는 *L. mesenteroides*의 sucrose phosphorylase와 마찬가지로 phenolic compound로의 당전이 활성을 보유하고 있는 것으로 확인되었고, 수용체에 대한 기질특이성이 까다롭지 않은 것으로 나타남에 따라 phenol기를 보유한 다양한 화합물로의 sucrose phosphorylase를 이용한 당전이 반응이 가능할 것으로 추정된다.

그러나 두 미생물 유래 sucrose phosphorylase는 아미노산 수준에서 33%의 상동성을 가지고 있다[4]. *B. longum* 유래의 효소가 Gram 음성균인 *Pseudomonas saccharophila* 및 *Rizobium vitis* 유래의 효소와 50% 이상의 상동성을 보유하고 있다는 점을 고려한다면, *L. mesenteroides* 유래의 효소는 기질특이성 측면에서 *B. longum* 유래의 효소와 차이가 있을 것으로 추측된다. 앞으로 두 미생물 유래 sucrose phosphorylase에 대한 효소 구조 및 기질특이성의 차이에 대한 연구가 진행된다면 좋은 결과가 있을 것으로 사료된다.

REFERENCES

1. Aga, H., M. Yoneyama, S. Sakai, and I. Yamamoto. 1991. Synthesis of 2-O- α -D-glucopyranosyl L-ascorbic acid by cyclomaltodextrin glucanotransferase from *Bacillus stearothermophilus*. *Agric. Biol. Chem.* **55**: 1751-1756.
2. Henrissat, B. 1991. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* **280**: 309-316.
3. Kim, I. C., J. H. Cha, J. R. Kim, S. Y. Jang, B. C. Seo, T. K. Cheong, D. S. Lee, Y. D. Choi, and K. H. Park. 1992. Catalytic properties of the cloned amylase from *Bacillus licheniformis*. *J. Biol. Chem.* **267**: 22108-22114.
4. Kim, M., T. Kwon, H. J. Lee, K. H. Kim, D. K. Chung, G. E. Ji, E.-S. Byeon, and J.-H. Lee. 2003. Cloning and expression of sucrose phosphorylase gene from *Bifidobacterium longum* in *E. coli* and characterization of the recombinant enzyme. *Biotechnol. Lett.* **25**: 1211-1217.
5. Kitao, S. and H. Sekine. 1992. Transglycosylation catalyzed by sucrose phosphorylase from *Leuconostoc mesenteroides* and production of glucosyl-xylitol. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **56**: 2011-2014.
6. Kitao, S. and H. Sekine. 1994. α -D-Glucosyl transfer to phenolic compounds by sucrose phosphorylase from *Leuconostoc mesenteroides* and production of α -arbutin. *Biosci. Biotech. Biochem.* **58**: 38-42.
7. Kitao, S., T. Ariga, T. Matsudo, and H. Sekine. 1993. The syntheses of catechin-glucosides by transglycosylation with *Leuconostoc mesenteroides* sucrose phosphorylase. *Biosci. Biotech. Biochem.* **57**: 2010-2015.
8. Kitao, S., T. Matsudo, M. Saitoh, T. Horiuchi, and H. Sekine. 1995. Enzymatic syntheses of two stable (-)-epigallocate-

Table 1. Conditions for HPLC analysis of reaction products.

Detector	: UV
Wave length	: 275 nm
Column	: TSK-gel ODS-80Ts (TOSOH, Japan)
Mobile phase	: 20% methanol (pH 2.2 with phosphoric acid)
Flow rate	: 0.7 ml/min
Injection volume	: 10 μ l
Column temperature	: 25°C

- echin gallate-glucosides by sucrose phosphorylase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **59**: 2167-2169.
9. Kitao, S., T. Matsudo, T. Sasaki, T. Koga, and M. Kawamura. 2000. Enzymatic synthesis of stable, odorless, and powdered furanone glucosides by sucrose phosphorylase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64**: 134-141.
 10. Kometani, T., T. Nishimura, T. Nakae, H. Takii, and S. Okada. 1996. Synthesis of neohesperidin glycosides and naringin glycosides by cyclodextrin glucanotransferase from an alkalophilic *Bacillus* species. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **60**: 645-649.
 11. Mieyal, J. J. and R. H. Abeles. 1972. Disaccharide phosphorylase, pp. 515-532. In P. D. Boyer (ed.), *The enzymes*, vol. **7**, Academic Press, New York, USA
 12. Park, K. H., M. J. Kim, H. S. Lee, N. S. Han, D. Kim, and J. F. Robyt. 1998. Transglycosylation reactions of *Bacillus stearothermophilus* maltogenic amylase with acarbose and various acceptors. *Carbohydr. Res.* **313**: 235-246.
 13. Robyt, J. F. 1991. Biotechnology of amylopectin oligosaccharides, pp. 98-110. In R. B. Friedman (ed.), *ACS Symp. Ser.*, 458, Am. Chem. Soc., Washington DC, USA
 14. Robyt, J. F. 1995. Mechanisms in the glucanase synthesis of polysaccharides and oligosaccharides from sucrose. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **51**: 151-157.
 15. Takata, H., T. Kuriki, S. Okada, Y. Takesada, M. Iizuka, N. Minamiura, and T. Imanaka. 1992. Action of neopullulanase: neopullulanase catalyzes both hydrolysis and transglycosylation at α -(1 \rightarrow 4)- and α -(1 \rightarrow 6)-glucosidic linkages. *J. Biol. Chem.* **267**: 18447-18452.
 16. Tonozuka, T., H. Sakai, T. Ohta, and Y. Sakano. 1994. A convenient enzymatic synthesis of 4²- α -isomaltosylisomaltose using *Thermoactinomyces vulgaris* R-47 α -amylase II (TVA II). *Carbohydr. Res.* **261**: 157-162.

(Received Aug. 25, 2004/Accepted Sep. 9, 2004)