

## Geniposide로부터 Genipin으로 생변환을 위한 $\beta$ -Glucosidase의 고정화

박성길 · 조만호 · 이윤형 · 한태룡 · 정인식

경희대학교 유전공학과

### Immobilization of $\beta$ -Glucosidase for Biotransformation of Geniposide into Genipin

Sung-Gil Park, Man-Ho Cho, Youn-Hyung Lee, Tae-Ryong Hahn and In-Sik Chung

Department of Genetic Engineering, Kyung Hee University, Korea

#### Abstract

Geniposide extracted from *Gardenia jasminoid* was converted into genipin using  $\beta$ -glucosidase. In hydrolysis of geniposide,  $\beta$ -glucosidase was immobilized onto CNBr-activated sepharose 4B resins with glutaraldehyde. Optimal enzyme immobilization was obtained, when 10 U of enzyme and 10% glutaraldehyde were used. The  $V_{max}$  of the immobilized enzyme and free enzyme were 320 mM/min and 500 mM/min, respectively. No significant differences in the kinetic constants,  $K_m$  and  $V_{max}$  values, were detected between the immobilized enzyme and the free enzyme: the  $K_m$  values of the immobilized enzyme and free enzyme were 81  $\mu$ M and 68  $\mu$ M, respectively. Furthermore, the enzyme activity and cross linking of the immobilized enzyme proved to be quite stable during operation.

Key words: geniposide, genipin,  $\beta$ -glucosidase, immobilization

## 서 론

식품, 화장품 및 의류 염색용으로 사용되어지고 있는 색소는 크게 자연에서 얻을 수 있는 천연색소와 화학적으로 합성되는 인공색소로 분리할 수 있다. 합성색소는 착색력이 높고 안정하며 가격이 저렴하여 19세기 이후 광범위하게 사용되어져 왔으나, 타르계 화합물의 발암성이나 환경오염문제로 인하여 그 사용이 제한되어지는 실정이다. 최근 소득의 증가로 인하여 색소의 안전성에 대한 인식과 더불어 인공적인 색조를 대체할 수 있는 천연색소에 대한 관심이 증대됨에 따라 천연색소의 개발이 더욱 필요하다. 더욱이 많은 천연색소들이 색깔을 나타내는 본래의 기능 외에 살균, 항염 등의 생리 활성을 갖는 장점을 가지고 있어 식품 및 화장품용으로 큰 잠재적 수요를 가지고 있다. 그러나 천연색소는 합성색소에 비해 가격이 비싸기 때문에 경제적으로 생산할 수 있

는 공정을 개발할 필요가 있다. 치자에는 주로 황색 소인 crocin 등이 함유되어 있으며 청색소 및 적색소는 무색인 geniposide(Fig. 1A)를 생물변환하여 생산할 수 있다. 치자 청색소는 치자열매 추출액에 함유된 배당체인 iridoid 화합물을 가수 분해 하여 glucose를 떼어낸 후(Fig. 1B), 1차 아민과 반응시켜 얻는데 이는 열이나 빛 기타 여러 용액상태에서 상당한 안정성을 보여 주고 있어, 식품이나 기타 음료의 첨가제로 그 응용범위가 넓을 것으로 평가되고 있다(Fujikawa *et al.*, 1987a; Djerassi *et al.*, 1961).

본 연구에서는 치자에서 geniposide를 추출하여, 고정화된  $\beta$ -glucosidase로 이를 가수분해하여 glucose를 떼어내고, amino acid와 반응시켜 청색소를 얻어내는 일련의 과정에서 경제성 제고의 여지가 있는  $\beta$ -glucosidase의 고정화 공정을 검토하였다(Fujikawa *et al.*, 1987b; Jeong과 Park, 1987). 본문에서는 효소 농도 및 glutaraldehyde가 고정화에 미치는 영향, 고정화 효소의 kinetics, 고정화 효소의 안정성 등에 관하여 조사하였다.

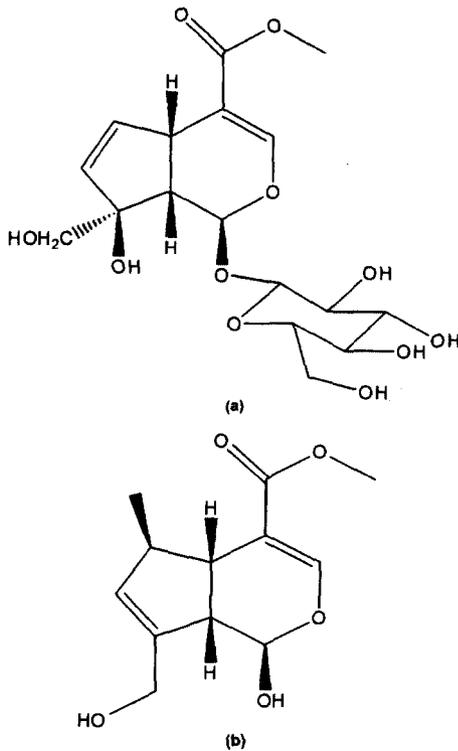


Fig. 1. Chemical structures of geniposide (A) and genipin (B).

## 재료 및 방법

### 재료 및 시약

실험 재료로 사용된 치자는 경동시장에서 국내산으로 구입하였다. 각종 효소, resin과 glutaraldehyde는 Sigma에서, ammonium sulfate는 Amresco에서, 그 외의 시약은 덕산제품의 특급시약을 사용하였다.

### Geniposide 추출

Geniposide는 치자 50 g을 파쇄한 후 chloroform 500 mL로 1 시간씩 3 회 추출하여 지방성분을 제거하였다. 남은 치자를 건조시킨 후 methanol 500 mL로 1 시간씩 3 회 추출하여 여액을 합하여 감압 건조기 (YAMATO, RE-46)로 감압건조한 후 물에 용해 시켰다. 이를 charcoal에 흡착시키고 증류수와 10% ethanol을 이용해 수 차례 세척하였다. Charcoal에 흡착된 geniposide는 methanol로 다시 용출해내고 감압 건조 후 acetate buffer (1 mM, pH 5.0)에 용해시켜 기질로 사용하였다(이재연 등, 1998; Endo와 Taguchi, 1973).

### 효소의 고정화

$\beta$ -glucosidase를 CNBr-activated sepharose 4B resin 에 고정화시키기 위해 먼저 수지, 0.01 g을 1 mM의 HCl로 10분간 swelling한 후 acetate buffer(1 M, pH 5.0)로 세척하였다. 여기에 glutaraldehyde를 10% 첨가하여 resin과 반응시킨 후(Cass와 Ligler, 1998) 이 수지에  $\beta$ -glucosidase의 양을 각각 1, 5, 10, 15, 20 U되게 첨가한 후 4°C에서 16 시간 고정화를 수행하였다(효소 1U는 pH 5.0, 37°C에서 1 분 동안 1  $\mu$ mole의 glucose를 생성하는 것으로 정의하였으며, mg당 2.4 U에 해당된다). 효소의 역가는 고정화된 효소에 geniposide를 동일한 양 첨가하여 효소와 반응시킨 후 5분 동안에 생성되는 glucose의 양을 환원당 정량법에 의해 측정하였다. 아울러, glutaraldehyde 농도에 의해 변화하는 효소의 고정화율을 알아보기 위해 수지에 반응시키는 glutaraldehyde의 농도를 각각 1, 5, 10, 15%로 수지 0.1 g과 반응시켰고 10 U의 효소를 첨가하여 고정화를 수행하였다. 각각의 고정화된 수지를 기질과 5 분 동안 반응시켰고, 이것을 다시 70°C에서 glycine과 반응시켜 청색소를 생산하였다. 이렇게 해서 생성된 청색소를 분광광도계(VARIAN, DMS 300)를 이용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하여 역가를 조사하였다.

### 고정화 효소 kinetic parameters

Geniposide 혼합물을 silica column chromatography를 통해 정제하였다. 이것을 자유효소에 반응시켜 시간에 따른 glucose의 양을 환원당 정량법으로 정량하여  $K_m$ 과  $V_{max}$  값을 조사하였다. 고정화 효소의 경우 효소를 고정화시킨 수지에 기질을 첨가하여 진탕시키면서 동일한 방법으로 정량하였다.

### 고정화 효소의 안정성 측정

고정화 효소의 안정성을 조사하기 위해 먼저 10%의 glutaraldehyde로 효소 10 U를 고정화시키고 기질과 반응시키기 전에 CNBr-activated sepharose 4B resin(수지)을 5 mL의 buffer로 세척하였다. 기질인 geniposide 50 mL을 미량펌프(EYELA, MP-3)를 이용하여 0.25 mL/min의 유속으로 일정하게 유지시키면서 고정화 효소와 반응시켰다. 이렇게 반응시킨 geniposide를 분획수집기(BIO-RAD, 2110)로 1 mL 씩 수집하였다. Genipin 생성량은 분광광도계를 이용하여 geniposide로부터 가수분해 되어진 glucose를 DNS 시약과 반응시켜 파장 550 nm에서 흡광도의 변화를 조사하여 측정하였다. 고정화 효소의 안정성을 조사하기 위하여 효

소 4.17 mg (10 U)을 0.1 g의 수지에 고정화시킨 후 sodium acetate buffer(pH 5.0, 0.1 M)를 연속적으로 흘려주었다. 수지를 통과한 buffer를 분취수집기를 이용하여 1 mL씩 21개의 분획을 얻었다. 각각의 분획에서 0.1 mL씩 시료를 채취하고 Lowry method를 이용하여 수지로부터 분리되어 나오는 효소의 양을 정량하였다.

**결과 및 고찰**

**효소 농도가 고정화에 미치는 영향**

CNBr-activated sepharose 4B resin(수지) 0.1 g에 대해 효소의 농도가 1, 5, 10, 15, 20 U되게 한 후 고정화에 미치는 영향을 조사하였다(Fig. 2). 효소의 농도가 1 U에서 10 U로 증가되었을 때 고정화 효소의 역가가 크게 증가하는 것을 볼 수 있었다. 그러나 10 U에서 20 U까지 농도를 증가시켜도 고정화 효소의 역가는 크게 변화하지 않았다. 첨가한 효소의 농도가 1, 5 U에서 고정화된 효소의 효율은 각각 5, 9.4%를 나타내었다. 첨가한 효소의 양이 10, 15, 20 U였을 경우

에 고정화된 효소는 각각 12.5, 8.5, 7.7%의 효율을 보여주었다. 따라서 CNBr-activated sepharose 4B resin (0.1 g)의 경우 10 U의 효소를 첨가하여 고정화하는 것이 효율적인 고정화방법인 것으로 보여진다.

**Glutaraldehyde 농도가 고정화에 미치는 영향**

고정화시 glutaraldehyde의 농도가 고정화에 미치는 영향을 조사하였다. Fig. 3은 glutaraldehyde의 농도가 10%일 때 고정화된 효소의 역가를 100으로 정하고 나머지 농도는 이에 대한 상대적인 값으로 나타낸 것인데, glutaraldehyde의 농도가 1, 5%인 경우에는 10%인 경우에 비해 30.2, 62.8%로 비교적 낮게 나타났는데 반하여 15%의 농도에서는 10% 농도에 비해 101.6%로 나타나 1.6% 증가하는데 그쳤다. 따라서 본 실험에서 사용할 고정화 시 glutaraldehyde의 농도는 10%로 결정하였다.

**고정화효소 kinetic parameters**

효소 고정화시 주변의 미시환경에 따른 효소의 특성변화를 알아보기 위해 고정화효소와 자유효소의

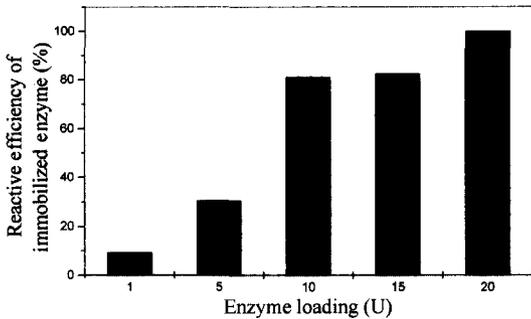


Fig. 2. Effect of the enzyme loading concentration on the immobilized enzyme activity.

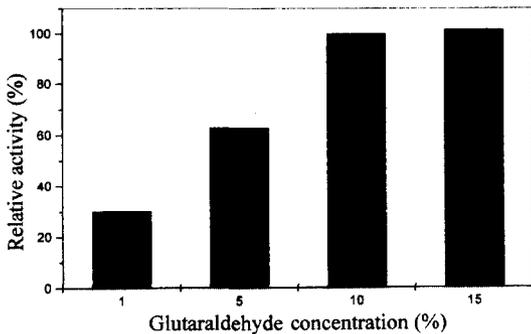


Fig. 3. Effect of glutaraldehyde concentration on the immobilized enzyme activity.

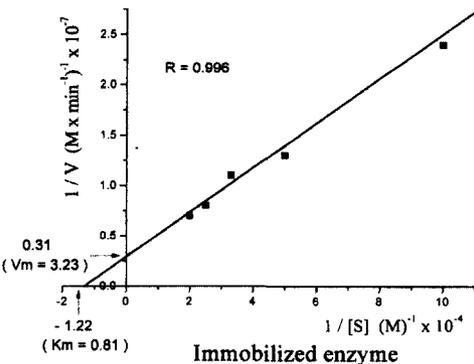
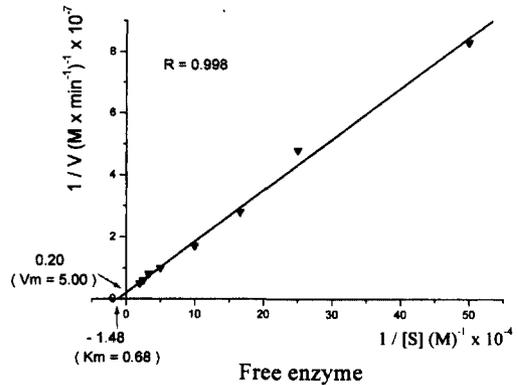


Fig. 4. Comparison of  $K_m$  and  $V_m$ .

kinetic parameters를 비교하였다. Fig. 4에서와 같이 고정화된 효소의 경우  $K_m$  값이 81  $\mu\text{M}$ 로 나타났고 자유효소는 68  $\mu\text{M}$ 로 나타났다. 이것은 기질에 대한 효소의 친화도가 고정화 효소에서 약간 변화한다는 것을 보여준다.  $V_{max}$ 의 경우 고정화한 효소의 경우 320  $\text{mM}/\text{min}$ 으로 나타났고 자유효소의 경우 500  $\text{mM}/\text{min}$ 으로 나타나서 그 값이 약간 감소한 것을 알 수 있다. 그렇지만 이 효소의 경우 다른 효소와는 달리 고정화를 수행한 후에도 그 특성이 크게 변화하지 않는 것으로 생각된다(Subramanian *et al.*, 1999).

**고정화 효소의 안정성**

고정화 효소의 활성은 Fig. 5에서 보듯이 반응의 횟수가 증가함에 따라 감소하는데 이것을 U 단위로 환산하면 초기 반응과 마지막 반응과의 차이는 약 0.04 U였다. 이것은 20 mL의 기질을 반응시켰을 경우 0.04 U가 감소하는 매우 안정적인 결과를 보여주었다(Fig. 5). 고정화 효소의 교차결합의 안정성을 측정해 본 실험에서는 처음 4개의 분획에서 상당히 많은 양의 단백질이 검출되었다(Fig. 6). 이것은 cross-linking되지 않은 효소들이 수지로부터 제거되어지는 것으로 보여진

다. 그 이후의 분획에서는 단백질의 농도가 대부분 4-12  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (6번, 11번 분획에서는 각각 41.8, 23.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )사이의 값을 보여주었다. 고정화 효율 YI를

$$YI(\%) = \frac{IE(\text{mg})}{AE(\text{mg})} \times 100$$

YI=고정화효율  
IE=고정화된 효소의 양  
AE=첨가한 효소의 양

으로 정의하면 초기 효소 농도에 대한 21번 분획의 YI는 65%의 값을 보여준다. 그러나 실제 고정화되었다고 생각되어지는 5번 분획에 대한 21번 분획의 YI는 94%로 6%정도 감소하였다. 이것은 고정화 효소의 교차결합의 안정성이 매우 안정하다는 것을 보여준다. (Subramanian *et al.*, 1999; Sadar *et al.*, 1997)

**요 약**

치자에서 청색소를 생산하기 위해서는 먼저 geniposide를 추출하고 genipin으로 생물변환 후 glycine을 처리하는데 이 과정을 공정화 하기 위해 고정화된 β-glucosidase를 사용하여 여러 가지 특성을 조사하였다. 먼저 효율적인 고정화 공정을 수행하기 위하여 수지의 양에 따른 효소의 양을 조사한 결과 수지 0.1 g 당 10 U의 효소 사용시 12.5%의 고정화 효율을 보여주었다. 또 glutaraldehyde의 농도에 따른 고정화율의 변화 조사 결과 10%의 glutaraldehyde를 사용하는 것이 적합하다는 것을 알 수 있었다. 고정화시 변화하는 효소의 kinetics는 고정화된 효소의 경우  $K_m$  값이 81  $\mu\text{M}$ ,  $V_{max}$  값이 320  $\text{mM}/\text{min}$ , 자유효소는  $K_m$  값이 68  $\mu\text{M}$ ,  $V_{max}$  값이 500  $\text{mM}/\text{min}$ 로 자유효소의 경우에 비해 큰 변화가 없는 것으로 관찰되었다. 그리고 고정화 효소의 안정성을 조사하기 위해 역가와 교차결합의 안정성을 검토해 본 결과 매우 안정하다는 것을 알 수 있었다.

**감사의 글**

본 연구는 농림수산부 첨단농업기술개발사업비(1999-2000)의 지원으로 수행되었음을 감사드립니다.

**문 헌**

이재연, 한태룡, 백영숙. 1998. 치자 genipin과 아미노산의

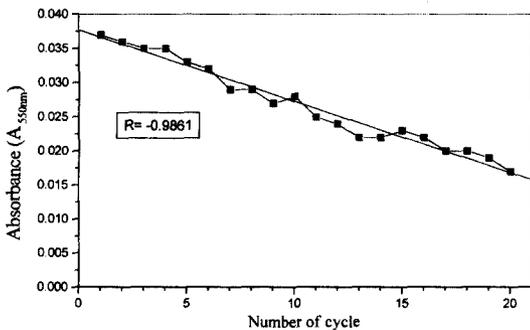


Fig. 5. The stability of the enzyme activity.

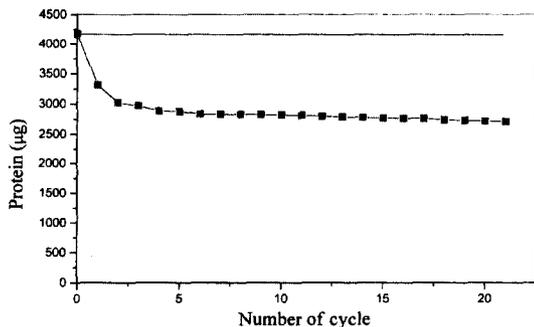


Fig. 6. The stability of cross linking bond of immobilization.

- 청색소 변환반응에 관한 물리 화학적 연구. 한국농화학회지 **41**(5): 399-404
- Cass T. and F.S. Ligler. 1998. *Immobilized Biomolecules in Analysis*. Oxford university press, New York, USA
- Djerassi, C., T. Nakano. A.N. James, L.H. Zalkow, E.J. Eisenbraun and J.N. Shoolery. 1961. Terpenoids. XLVII. The structure of genipin. *J. Org. Chem.* **26**: 1192-1206
- Endo, T. and H. Taguchi. 1973. The constituents of *Gardenia Jasminoides*: geniposide and genipin-gentiobioside. *Chem. Pharm. Bul.* **21**: 2684-2688
- Fujikawa, S., Y. Fukui, K. Koga and J. Kumada. 1987a. Brilliant skyblue pigment from gardenia fruits. *J. Ferment. Technol.* **65**: 419-424
- Fujikawa, S., S. Nakamura, K. Koga and J.I. Kumada. 1987b. Continuous blue pigment formation by gardenia fruit using immobilized growing cells. *J. Ferment. Technol.* **65**: 711-715
- Jeong, H.S. and K.H. Park. 1987. Characteristics of the conversion pigment from *Gardenia Jasminoides* yellow pigment. *Korean J. Food. Sci. Technol.* **65**: 711-715
- Sardar, M., R. Agarwal, A. Kumar and M.N. Gupta. 1997. Noncovalent immobilization of enzymes on an enteric polymer Eudragit S-100. *Enzyme Microb. Technol.* **20**: 361-367
- Subramanian, A., S.J. Kennel, P.I. Oden, K.B. Jacobson, J. Woodward and M.J. Doktycz. 1999. Comparison of techniques for enzyme immobilization on silicon supports. *Enzyme Microb. Technol.* **24**: 26-34