

Microbial Transglutaminase의 비연속 분리공정 최적화

우동진, 안용선, 신원선^{*}, 정용섭^{**}, 우건조이지바이오시스템 생물자원연구소, 한국식품개발연구원^{*}, 전북대학교 식품공학과^{**}

전화 (041) 585-2881, FAX (041)585-2887

Abstract

Membranes are widely used to separate target solute molecules such as proteins on the basis of their size in cell broth mixture to minimize the loss of target compounds. In this study, membrane separation system using ultrafilters of MWCO 100 K and 50 K, was operated for concentration and purification of microbial transglutaminase.

Fermentation broth containing MTGase was prefiltered by using pore size 1.6 and 0.7 μm pre-filter made of cellulose fiber and 0.45 μm microfilter made of cellulose acetate. The prefiltered solution was concentrated by 100 K and 50 K ultrafilter. The final enzyme concentration was 1.29 units/ml and enzyme specific activity was 0.2 units/mg protein. This specific activity were 3.7 times higher than that of initial cell broth mixture.

Membrane separation process of microfiltration and ultrafiltration was proved to be very economic, energy efficient and effective separation method used to concentrate MTGase.

서론

미생물 발효를 통한 MTGase의 산업화 기술은 생산 균주의 선별, 균주성장 및 발효를 위한 생물반응기 설계, 운전기술 확립, 분리정제 및 제제화 기술, 식품에의 이용 및 제품화 기술들로 상호 밀접하게 연관된 복합 첨단기술이다. 선진 외국의 경우 90년대 이후부터 미생물을 이용하여 대사산물 생산시 신개념의 생물공정을 개발하고자 연구하고 있다. 이중 전세계적으로 MTGase에 관한 연구의 75% 이상이 일본에서 수행되고 있으며 수산자원이 풍부한 일본은 MTGase를 적용한 수산가공식품(Surimi)의 고품위화 기술개발이 활발하다. 균주의 생리학적 특이성과 발효조건에 고려와 아울러 생산된 고부가가치의 생축매(미생물, 효소)를 분리 정제하는데 통상적으로 총 downstream processing cost가 약 70%를 차지하지만 이 분야에 있어서 막분리 기술 등 효율적인 분리정제 기술이 확보되어 있지 못한 실정이다. 이러한 분리정제 기술을 간결하게 처리하는 청정기술개념의 종합생물공정시스템 개발이 중요 연구가 되고있으며 고부가가치의 생물산업 제품의 생산기술 확보는 국내 식품가공산업의 국제 경쟁력 강화에 기여할 수 있다.

재료 및 방법

Streptovercillium mobaraense (ATCC 29032)를 30 L Fermenter(KFC, Korea)에서 초기 pH 7.0, 배양온도 30 $^{\circ}\text{C}$, 교반속도 200 rpm, 산소공급을 1 vvm으로 유지하여 배양한 후 얻어진 배양액을 3500 g에서 원심분리 하여 균체를 일차적으로 제거한 다음 MTGase를 함유

하는 부분정제 분리액을 다양한 미세여과(microfiltration, MF)시스템에서 pump speed에 따른 시료의 flux를 측정하여 최적 미세여과조건을 찾은 후 최적 한외여과 막을 선정하기 위하여 예비여과를 거친 용액을 한계분자량(Molecular weight cut-off, MWCO)이 각각 10,000, 30,000, 100,000으로 서로 다른 한외여과막을 이용하여 한외여과 하였다. Scale-up을 위한 최적 한외여과 조건을 선정하기 위하여 예비여과를 거친 용액을 가지고 MWCO 100,000과 50,000의 membrane (BIOMAX 100K, BIOMAX 50K, Millipore, USA)과 한외여과시스템(Pellicon XL, millipore, USA)을 이용하여 최적 막횡단압력(transmembrane pressure, TMP), 투입압력, VCR을 알아보았다. 분리된 MTGase의 효소활성은 J. E. Folk 방법을 보완해서 측정하였으며 분리액의 단백질 정량은 Lowry 방법을 이용하였다. 최종적으로 막분리 시 운용변수인 막횡단압력, pump speed, MTGase의 활성도를 변화시키지 않는 범주내에서 분리액의 pH, 운전시간, 분리액의 volume concentration ratio 등을 변수로 하여 최적 운용 조건을 구하였다.

결과 및 고찰

Table 1은 최적 MTGase 분리를 위한 미세여과실험의 결과를 나타내고 있다. 배양액을 원심분리 한 후 얻어진 여과액의 단백질 함량은 10.07 g/L로 미세 여과막을 순차적으로 통과 하면서 각 단계별로 감소했다. 반면 효소 농도는 원심분리액에서 2.24 unit/ml로 미세여과막을 순차적으로 통과하면서 소량 감소했다. 또한 각 시료의 비활성도는 원심 분리액의 경우 0.22 U/mg에서 미세여과막을 통과한 시료의 비활성도 0.20(2.7 μ m, 1.6 μ m)과 0.19(0.70 μ m, 0.45 μ m, 0.20 μ m)까지 예비여과막 및 미세여과막을 통과한 시료의 효소농도가 감소했음에도 불구하고 효소의 순도를 의미하는 비활성도(specific activity)가 감소하지 않았으며 그 이유는 단백질과 효소 농도의 감소 비율이 유사했기 때문이다.

Table 1. Protein, Enzyme concentration and specific activity of permeates obtained through different pore size

	Membrane pore size(μ m)						Pr>F
	Sup. ¹⁾	2.70	1.60	0.70	0.45	0.20	
Protein conc.(g/L)	10.07 ^a	9.84 ^a	9.52 ^b	9.33 ^{bc}	9.24 ^d	9.05 ^d	0.0001
Decrease rate(%)	0.00	2.30	5.52	7.35	8.27	10.11	
Enzyme conc.(units/ml)	2.24 ^a	2.01 ^b	1.88 ^c	1.81 ^{cd}	1.79 ^d	1.70 ^e	0.0001
Specific activity(units/mg protein)	0.22	0.20	0.20	0.19	0.19	0.19	

¹⁾ Supernatant of culture broth

²⁾ Means of 3 replication

abc Means in rows with the same letter are not significantly different by Duncan's multiple comparison at p<0.05

100K 한외여과막을 이용하여 target 물질인 MTGase를 통과시켜 분자량이 MTGase보다 큰 단백질들을 먼저 제거하는 1차 한외여과를 거치고 MWCO 50K 한외여과막을 사용하여 100K를 사용하여 1차분리된 분리액을 농축시키는 공정을 적용했다. 100K 한외여과막을 갖고 최적의 TMP를 선정하기 위해 조건 1(Pin 2, Pout 0)과 조건 2(Pin 2, Pout 0)를 비교한 결과 같은 TMP조건에서 높은 flux를 나타내는 조건 1을 최적 조건으로 선정하였다. Fig. 1과 Fig. 2에서처럼 초기 미세여과액 250ml를 MWCO 100K 한외여과막을 이용하여 5배 농축하는데 걸린 시간은 0.8hr이었다. 시간에 따른 Flux의 변화를 살펴보면 시간이 흐를수록, 농축이 진행될수록 flux가 저하되는 현상을 나타내었다. 평균 flux는 5 L/m²/hr로 측정되었다.

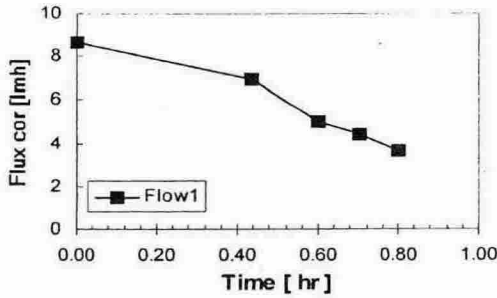


Fig. 1. Change of flux with concentration time.(MWCO 100K membrane)

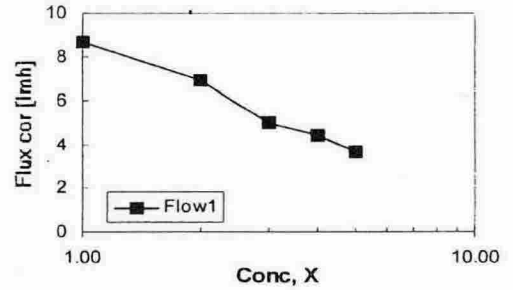


Fig. 2. Correlated flux at various concentration rate.(MWCO 100K membrane)

MWCO 100K 한외여과막에 의해 1차 분리된 permeate를 MWCO 50K 한외여과막으로 농축실험을 수행한 결과 100K 한외여과막보다 더 높은 flux를 나타내었고 5배 농축까지 걸리는 시간 역시 상당히 단축되었으며 평균 flux가 23.3 L/m²/hr로 2배 이상 측정되었다.(Fig. 3., Fig. 4.) 따라서 50K 한외여과막으로 분리된 retentate내로 protein이 농축된다는 사실을 간접적으로 나타낸다고 할 수 있다. 위의 결과로 각각 다른 MWCO 한외여과막을 사용함으로써 농축에서 분리까지 연속적인 막분리공정의 가능성을 알 수 있었다.

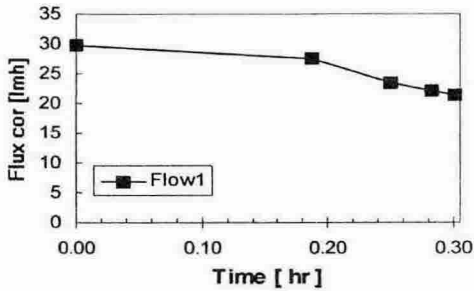


Fig. 3. Change of flux with concentration time. (MWCO 50K membrane)

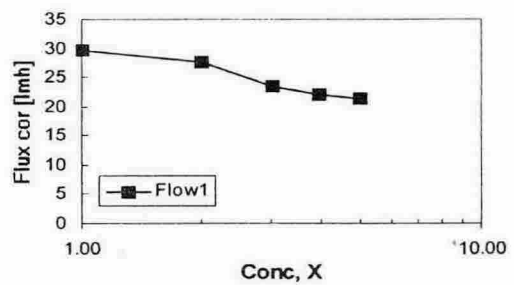


Fig. 4. Correlated flux at various concentration rate.(MWCO 50K membrane)

미세여과막에 의해 분리된 MTGase 조효소액을 한외여과막을 이용하여 분리 및 농축한 결과는 Table 2와 같다.

Table 2. Protein concentration, enzyme concentration and specific activity during ultrafiltration with MW 100K, 50K membrane

	Feed(ml) ¹⁾		Permeate(ml) ²⁾			VCR ³⁾				
	250	125	42	20.5	12.5	Feed ⁴⁾	2×	3×	4×	5×
Protein contents (g/L)	9.05	4.53	5.89	6.16	6.64	5.80	5.50	5.55	6.00	6.64
Enzyme conc. (units/ml)	1.70	1.07	1.15	1.23	1.29	1.17	1.20	1.24	1.30	1.48
Specific activity (units/mg protein)	0.19	0.24	0.20	0.20	0.19	0.20	0.21	0.22	0.22	0.22

¹⁾: Permeate solution from 0.2 μm membrane

²⁾: Permeate volume from 100K membrane

³⁾: Initial feed volume/Retentate volume

⁴⁾: Permeate solution from 100K membrane

시료의 초기 volume은 250 ml 이었으며, 연속적으로 2배, 3배, 4배, 5배로 농축하면서, MWCO 100K 한외여과막을 통과하는 시료의 단백질 함량과 효소 농도를 측정하였다. 미세여과막에 의해 분리된 시료의 단백질 함량은 9.05 g/L이었으나, MWCO 100K 한외 여과막

을 통과한 시료의 단백질 함량은 5.80 g/L로 감소하였다. 이는 분차량이 큰 단백질이 막을 통과하지 못했기 때문이며, 농축배수가 높아질수록 한외 여과막을 통과한 시료의 단백질 함량이 증가하는 이유는 한외 여과막 세공과 비슷한 크기를 가진 단백질들이 flux의 영향을 받아 조금씩 막을 통과했기 때문이다. 효소 농도는 미세여과막에 의해 분리된 시료의 경우 1.70 unit/ml이었으나, 한외 여과막을 통과한 시료의 효소 농도는 1.18 unit/ml로 감소하였으며, 단백질 함량과 마찬가지로 농축배수가 높아질수록 분리된 여과액의 효소 농도는 1.07(2VCR) unit/ml, 에서 1.29(5VCR) unit/ml까지 증가하는 추세를 보였다. 한외여과에 의해 분리된 시료의 효소농도는 미세여과막에 의해 분리된 시료보다 감소하였으나, 비활성도의 경우 초기 시료보다 오히려 높은 수치를 나타냈다. MWCO 100K 한외 여과막을 통해 분리된 시료는 MWCO 30K 한외여과막을 이용하여 농축한 결과 단백질 함량과 효소의 농도는 농축배수가 높아질수록 증가했으며, 효소의 활성 또한 증가하였다. MW 100K와 50K 한외여과막을 이용하여 분리 농축된 MTGase는 1.48 unit/ml로 높은 활성을 가지고 있으나, 0.20 μ m 미세여과막을 통과한 시료의 효소농도(1.70)보다 다소 떨어졌다. 이는 사용된 한외 여과막의 재질과 pH에 의한 영향으로 판단되며 연속분리공정을 위해 앞으로 좀더 다양한 재질의 한외여과막을 선정함과 동시에 효소의 활성을 유지시켜줄 수 있는 MTGase의 최적 분리조건을 개발한다면 더 높은 수율의 MTGase의 대량 연속분리도 가능하다.

요약

대량발효 후 미세여과막과 MWCO 100K, 50K의 한외여과막을 이용한 막분리시스템을 적용하여 MTGase를 분리한 결과 pore size 1.6, 0.7 μ m의 cellulose fiber 재질의 예비여과막과 0.45 μ m cellulose acetate재질의 미세여과막을 이용하여 얻어진 분리액을 MWCO 100K와 50K를이용하여 농축시킨 결과 enzyme의 농도가 1.29 units/ml, 효소 비활성도는 약 0.2 units/mg protein 으로 나타났으며 초기 배양액에 비해 3.7배의 농축효과를 보였다.

참고문헌

1. Hiroyasu Ando, Masae Acachi, Koichi Umeda, Masao Motoki, Akira matura, Masahiki Nonaka, Pyosuke Uchio, Haruo Tanaka (1989), Purification and Characteristics of Novel Transglutaminase Derived from Microorganism, *Agric. Biol. Chem.*, **53**(10), 2513.
2. Zhu, Y., Rinzema, A., Tramper, J., Bol, J (1996), Medium Design Based on Stoichiometric Analysis of Microbial Transglutaminase Production by *Streptovercillium mobaraense*, *Biotechnol. and Bioeng.*, **50**, 291.
3. Ulrike Gerber, Ute Jucknkschke, Sybille Putzien, Hans-Lothar Fuchsbaauer (1994), A Rapid and Simple Method for the Purification of Ttransglutaminase from *Streptovercillium mobaraense*, *Biol. Chem.*, **299**, 825.
4. Folk, J. E. (1970), Transglutaminase, in *Methods in Enzymology*, H. Tabor and C. W. Tabor(ED), 17:889-894, Academic press, New York.