

## Purification and Immobilization of Cyclodextrin glucanotransferase from recombinant *Bacillus subtilis*

서효진, 김영화, 김성구

부경대학교 생물공학과 생물고분자공학 실험실

전화 (051)620-6188, FAX (051)620-6180

Cyclodextrin glucanotransferase(CGTase) derived from recombinant *Bacillus subtilis* was partial purified and concentrated by ultrafiltration. The prepared CGTase were immobilized on various matrices by ionic interaction or covalent bond. CGTase covalently bound on CNBr-activated sepharose 4B were identified to be the highest immobilization activity among various immobilization methods. The optimum conditions for CGTase immobilization were determined; 30°C, 60rpm, using 0.2g CNBr-activated sepharose 4B in pH 6.0 phosphate buffer and 9hr immobilization.

### 서론

Cyclodextrin glucanotransferase(CGTase)는 starch 또는 관련된 탄수화물 등의 기질을 이용하여 분자 내 또는 분자간의 당전이 반응을 촉매하는 효소이다.<sup>1)</sup> 산업적으로 CGTase는 주로 각각 glucose 6, 7, 8개로 구성된 원통형의  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -Cyclodextrin(CD)의 생산에 이용되고 있다. 원통구조의 CD는 내부는 소수성, 외부는 친수성의 성질을 가지며 내부의 공동(cavity)에 소수성 물질을 포집하여 복합체를 형성하므로써 그 용해도를 높이는 등의 기능을 수행한다. CD가 갖는 이러한 특징은 다양한 산업적 용도 즉, 식품첨가물, 화장품, 각종 용해제, 의약 분야 등에 널리 응용이 가능하다. 그러나 현재까지 CGTase 산업적 이용은 고가의 CGTase를 기질과 함께 soluble 상태로 반응시킨 후 산물을 정제하는 CGTase의 일회 사용 형태로 이루어져 왔으므로 이에 따른 경제적 손실의 개선 방법으로 반응 후 회수와 재사용 공정이 비교적 용이한 고정화 CGTase의 이용에 관한 연구가 진행 중에 있다.<sup>2)</sup> 이에 본 연구에서는 *Bacillus subtilis* NA1/pKB1이 생산한 free CGTase를 정제, 농축한 후 그 특징에 기초하여 몇몇 고정화 담체를 사용하여 최적 고정화 조건의 탐색을 위한 실험을 수행하였다.

### 재료 및 방법

사용균주 : CGTase 생산 균주는 *Bacillus stearothermophilus* NO2 유래의 CGTase를 구조 효소로서 생산하는 재조합 균주인 *Bacillus subtilis* NA1/pKB1을 사용하였

고, 생산된 효소의 활성은 Jeon 등이 사용한 Methyl orange method<sup>3)</sup>를 이용하여 측정하였다.

CGTase 정제 : 배양액으로부터 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 침전 후 pH 6.0의 phosphate buffer로 투석하여 부분 정제한 CGTase는 고정화 수율을 높이기 위해 ultrafiltration kit(amicon사 Pmax75psi, 5.3kg/cm<sup>2</sup>)와 pore size 10,000dalton인 ultrafiltration membrane(YM 10, Millipore. co.)으로 여과액과 농축액 비율을 1:1 정도로 농축하여 사용하였다. CGTase 1Unit는 시간당 1μmole의 α-CD를 생산하는 효소량으로 정의하였으며 정제 후 ultrafiltration을 통해 농축된 CGTase solution의 활성은 약 27.6 U/ml 정도였다.

고정화 담체의 선정과 활성화 : 고정화 담체의 종류와 특징은 Table. 1에 나타내었고, ion exchange resin인 Amberlite IRA-900, Amberlite IRA-96, Amberlite IRC-50, Amberlite 200과 covalent linkage에 사용된 CNBr-activated sepharose 4B는 각각 Sigma Chemical Co.(U.S.A)로부터, Diaion PA 418은 Supelco Co.(U.S.A.)로부터 구입하였다. 각각의 resin들은 ionic form에 따라 0.5N과 0.2N의 HCl과 NaOH를 이용하여 세척, 활성화 한 후 고정화 반응에서와 동일한 buffer내에서 평형화시킨 후 흡입플라스크를 이용하여 수분을 제거하고 사용하였다. CNBr-activated sepharose 4B는 1mM HCl을 이용하여 30분 내지 1시간 가량 활성화시킨 후 충분히 세척하여 사용하였다.<sup>4)</sup>

Classification		Type	Commercial name
Ionic binding	strongly anionic	macroreticular	Amberlite IRA-900
		macroreticular	Diaion PA 418
	weakly anionic	macroreticular	Amberlite IRA-96
	strongly cationic	macroreticular	Amberlite 200
	weakly cationic	macroreticular	Amberlite IRC-50
Covalent coupling		gel	CNBr-activated sepharose 4B

Table. 1 Classification of various immobilization matrices for CGTase

CGTase 고정화 조건 : 각각의 이온교환 수지 1g에 CGTase solution 1ml과 2ml의 buffer solution을 첨가한 후 37°C, 100rpm의 조건에서 3시간과 6시간 동안 고정화 하였으며, 반응 후의 고정화 수율은 여액의 CGTase 활성을 측정하여 초기 효소활성으로부터 감소한 효소의 활성을 담체에 고정화 된 양으로 간주하였다. CNBr-activated sepharose 4B에 의한 고정화의 경우 30°C, 60rpm의 조건으로 각각 6, 9, 12시간 동안 pH 6.0의 phosphate buffer하에서 반응시켜 여액에서 감소한 활성치를 고정화된 효소량으로 간주하였다.

## 결과 및 고찰

*Bacillus subtilis* NA1/pKB1은 배양 시간의 경과에 따라 Fig. 1과 같은 양상으로

성장하면서 CGTase를 생산하였으며, 배양 60시간 경과 후에 배양을 종료하였고,

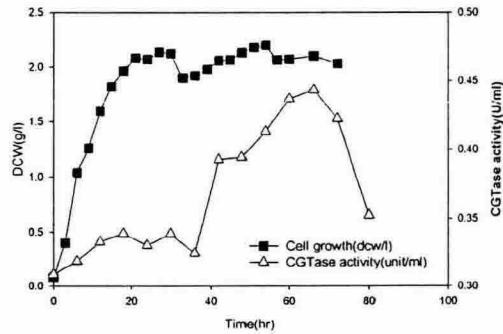


Fig. 1 Growth

curve and CGTase activity of *Bacillus subtilis* NA1/pKB1 in culture broth

4°C, 8,000rpm에서 20분간 원심분리를 통하여 cell을 제거하였다. 배양 상등액으로부터 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 침전과 투석, 그리고 ultrafiltration을 통해 부분 정제된 CGTase의 enzymatic property로서 pH 안정도와 온도 변화에 대한 안정도를 test한 결과는 각각 Fig. 2와 Fig. 3에 나타내었다.

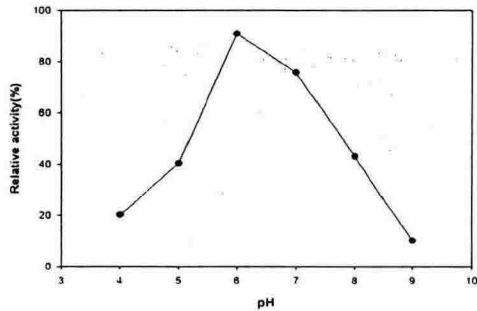


Fig. 2 The pH stability of free CGTase

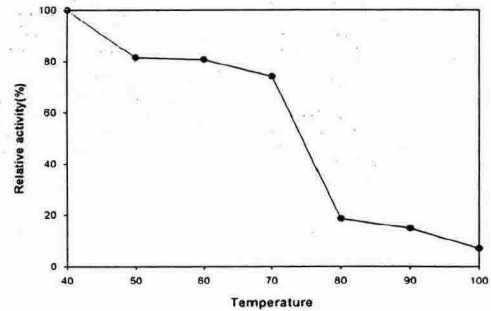


Fig. 3 The thermal stability of free CGTase

이러한 free CGTase의 특성을 바탕으로 다양한 고정화 담체를 이용하여 CGTase 고정화를 시도하였다.

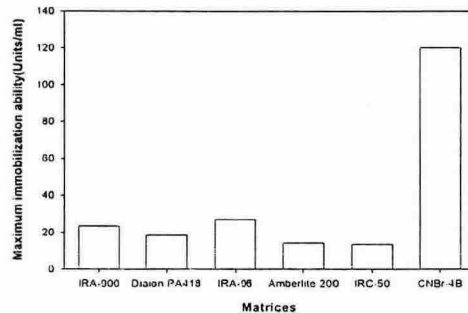


Fig. 4 Comparison of CGTase immobilization ability using various matrices

다양한 matrix를 이용한 고정화에 있어서 각각의 최적 고정화 조건으로부터 얻어진 최고의 고정화 수율을 비교하여 Fig. 4에 나타내었다. 위의 결과로부터 CGTase의 고정화를 위한 optimum method는 CNBr-activated sepharose 4B에 의한 enzyme간의 covalent linkage를 이용하는 것으로 결정되었으며, 이 때의 최적조건은 30℃, 60rpm, pH 6.0의 phosphate buffer하에서 9시간 동안 고정화하는 것이었다.

#### 요약

정제, 농축된 free CGTase는 pH 6.0 - 7.0의 범위에서 안정하였으며, 70℃ 정도의 고온에서도 안정한 특성을 가지고 있었으며, CGTase의 고정화를 위한 방법으로서 CNBr-activated sepharose 4B에 의한 고정화가 가장 높은 효율을 나타내는 것으로 결정되었다. 고정화의 최적조건은 30℃, 60rpm, pH 6.0의 phosphate buffer하에서 9시간 동안 고정화하는 것이었고, CNBr-activated sepharose 4B를 이용한 고정화의 경우 실험에 사용된 다른 모든 이온교환 수지에서 얻어진 효율에 비해 월등한 효과를 보였다.

#### 참고문헌

1. 오평수, 고성철, 서항원, "Bacillus sp.의 Cyclodextrin Glucanotransferase 생산 및 이용에 관한 연구"(1986), Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng. Vol. 14(6), 461-466.
2. P.S. Kim, H.D. Shin, J.K. Park, Y.H. Lee, "Immobilization of cyclodextrin glucanotransferase on Amberlite IRA-900 for biosynthesis of transglycosylated Xylitol"(2000), Biotechnol. Bioprocess Eng., Vol(5), 174-180.
3. Jeon, S.J, S.W. Nam, J.W. Yun, S.K. Song and B.W. Kim, "Effect of C- or D- domain deletion on enzymatic properties of cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus stearothermophilus* NO2"(1998), J. Microbiol. Biotechnol, Vol. 8(2), 152-157.
4. Lee, S.H, H.D. Shin, and Y.H. Lee, "Evaluation of immobilization methods for cyclodextrin glucanotransferase and characterization of its enzymatic Properties"(1991), J. Microbiol. Biotechnol, Vol. 1(1), 54-62.