

Aeromonas caviae No. S-76이 생산하는 Pullulanase의 정제, 특성 및 Maltosyl- β -Cyclodextrin의 합성

손천배* · 김명희 · 이명자
충남대학교 식품영양학과

Purification, Characterization of Pullulanase Produced by *Aeromonas caviae* No. S-76 and Synthesis of Maltosyl- β -Cyclodextrin

Sohn, Cheon-Bae*, Myung-Hee Kim and Myung-Ja Lee

Department of Food and Nutrition, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

Abstract — The crude enzyme solution obtained by shaking culture of *Aeromonas caviae* No. S-76 isolated from soil as pullulanase producing bacterium was purified by 50 folds with 21% yield by salting out with ammonium sulfate and column chromatography using DEAE-Sephadex A-50 and Sephadex G-150. The purified pullulanase had a molecular weight of 118,000 approximately by SDS-polyacrylamide slab gel electrophoresis and pI of 4.3 by isoelectric focusing. And optimum reaction temperature and pH for pullulanase were 50°C and 8.0, respectively. The purified enzyme was relatively stable at pH 6.0~9.0 and below 45°C. This enzyme synthesized maltosyl- β -cyclodextrin from mixture of β -cyclodextrin and maltose.

Pullulanase(pullulan glucanhydrolase E.C. 3.2.1.41)는 pullulan, amylopectin, glycogen의 α -1,6-glycoside 결합을 절단하는 효소로서, 1961년 Bender와 Wallenfalls(1)에 의하여 *Aerobacter aerogenes*에서 최초로 발견된 이래 여러 종류의 세균(2-10), 방선균(11) 등에서 생선되어진다. 이 효소는 glucoamylase, α -amylase, β -amylase 등의 몇가지 amylase와 조합하여 사용하므로써 glucose, maltose 및 관련있는 전분전화당들을 효과적으로 생산하는데 이용된다. 최근에 와서는 cyclodextrin(CD)과 maltooligosaccharides을 pullulanase의 작용으로 결합시켜 branched-cyclodextrin을 생산(12, 13)하는데, CD은 도우넛 모양의 환상구조로서 각종 물질의 포접성이 있으며, 이 성질을 이용하여 불안정 물질의 안정화, 휘발성 물질의 保持, 이취의 masking, 난용성 물질의 가용화, 조해성 점착성 물질의 분말화 등으로 쓰이나, 물에

대한 용해도가 낮고 포접체가 침전되는 결점이 있다(13, 14). 이 결점을 개선한 것이 Branched-CD로서 물, 유기용매에 잘 녹아 용해도가 10~100배 향상되고 CD복합체도 침전되지 않는다. Branched-CD는 그 용도가 매우 커 식품, 의약품(15), 화장품, 농약 등에 크게 이용될 수 있어 크게 주목되는 물질이다. 이와 같이 pullulanase는 중요한 여러 물질의 생산에 이용되며 시판되고 있으나 매우 고가이므로 pullulanase의 생산성 향상에 관한 연구가 필요하다. 전보(16)에서 pullulanase 생산능이 우수한 *Aeromonas caviae* No. S-76를 분리하여 효소생산조건 등을 검토하였으며, 본보에서는 이 효소를 정제하여 효소적 특성과 이를 이용한 maltosyl- β -CD의 합성에 관하여 검토하였기에 그 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

균의 배양 및 효소액의 제조

500 ml용 둥근 flask에 1% soluble starch, 0.5% yeast extract, 0.5% peptone, pH 9.0의 조성으로 만든

Key words: *Aeromonas caviae* No. S-76, pullulanase purification, branched-cyclodextrin, maltosyl- β -cyclodextrin

*Corresponding author

배지 150 ml씩을 넣어 살균한 배지에 *Aeromonas caviae* No. S-76 배양액 1 ml씩을 접종하여 32°C에서 2일간 진탕배양하여 얻은 조효소액 1000 ml를 원심 분리하여 균체를 제거하고, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 80%로 포화시켜 4°C에서 20시간 방치한 후, 침전단백질을 원심분리하였다. 분리된 단백질을 반투막에 넣어 4°C에서 0.01 M-phosphate buffer(pH 6.5)로 2일간 투석하여 탈염시켰다.

효소활성 측정

1% pullulan 용액 0.35 ml에 배양조효소액 0.05 ml를 가하여 40°C에서 30분간 반응시켜 DNS 시약 0.5 ml를 가하고, 비등수 중에서 5분간 가열한 후 증류수 4 ml를 가하여 spectrophotometer로 535 nm에서 흡광도를 측정하여 생성당을 측정하였다. 1 unit는 위 조건에서 1분당 pullulan에서 1 μmol 의 환원당 (maltotriose)이 생성되는 효소의 양으로 정하였다.

단백질 정량

단백질 정량은 Lowry 등(17)의 방법에 따라 bovine serum albumin(Sigma Co.)을 표준단백질로 사용하여 660 nm에서 흡광도를 측정하여 산출하였다.

DEAE-Sephadex A-50 column chromatography

탈염한 효소액을 DEAE-Sephadex A-50 column (1.6×50 cm)에 주입하고 0.01 M-phosphate buffer (pH 6.5)와 0.4 M NaCl을 함유한 0.01 M-phosphate buffer(pH 6.5)로 gradient elution시켜 5 ml씩 분획하였다. 각 분획의 protein 농도는 spectrophotometer로 280 nm에서의 흡광도로 측정하고 효소활성을 측정하였다.

Sephadex G-150 column chromatography

효소활성을 나타내는 분획을 모아 polyethylene glycol(M.W. 6000)으로 농축시키고 0.02 M-phosphate buffer(pH 7.0)로 평형시킨 Sephadex G-150 column에 주입하고 동일한 buffer로 용출시켜 분획하고 protein 농도 및 효소활성을 측정하였다.

SDS polyacrylamide slab gel 전기영동과 분자량 측정

Laemmli(18)의 방법에 의해 8.5%의 acrylamide

gel을 사용하고 0.1% SDS 존재하에서 pH 8.3의 Tris 완충액계에서 전기영동을 실시하였으며, 전기영동 후 0.1%의 Brilliant Blue R250에서 염색한 후 10% acetic acid와 100% methanol에서 탈색하였다. 전개 후 상대이동거리에 따라 표준곡선을 이용하여 분자량을 측정하였다. 이때 표준단백질로는 Sigma Co.의 SDS-6H를 사용하였다.

등전점 측정

Phast system(Pharmacia Co.)의 IEF-Gel을 사용하여 전기영동을 실시하였으며, 표준단백질은 Sigma Co.의 Isoelectric focusing marker Kit 시약으로서 amyloglucosidase(pI 3.6), Trypsin inhibitor(pI 4.6), β -Lactoglobulin A(pI 5.1), Carbonic Anhydrase I(pI 6.6)을 사용하였으며 상대이동거리와 표준단백질의 pI값을 plot하여 pullulanase의 pI를 구하였다.

Pullulan의 효소분해생성물의 Thin layer chromatography

1% pullulan 1 ml에 효소액 0.1 ml를 40°C에서 반응시키면서 경시적으로 취하여 TLC용 Silica gel plate에 15 μl 씩 spotting하여 n-butanol : n-propanol : water(3 : 5 : 4)의 용매로 4회 전개한 후 풍건하고, Ethyl alcohol : H_2SO_4 (9 : 1)액에 침지한 후 풍건하여 110°C에서 5분간 두어 발색, 동정하였다. 표준당으로는 Sigma Co.의 glucose, maltose, maltotriose를 사용하였다.

Maltosyl- β -cyclodextrin의 합성

Microfuge tube에 β -cyclodextrin 20 mg과 maltose 100 mg에 효소 100 unit/g·CD, 물 200 μl 를 가하고 45°C에서 4일간 반응시킨 후 TLC용 Silica gel plate에 spotting하였으며 앞에서와 같이 전개, 발색시켰다. β -CD, maltose는 Sigma Co.의 제품을 사용하였고, maltosyl- β -CD는 일본 오사카 시립대의 飯塚勝 박사로부터 분양받았다.

결과 및 고찰

DEAE-Sephadex A-50 column chromatography 1% soluble starch, 0.5% yeast extract, 0.5% peptone의 액체배지(pH 9.0)에 선정균을 접종하여 32°C

에서 2일간 배양하여 얻은 효소액 1000 ml를 (NH₄)₂SO₄ 염석, 탈염한 후 DEAE-Sephadex A-50 column chromatography한 결과는 Fig. 1과 같았으며 Fraction No. 39~48에서 pullulanase 활성을 보였다.

Sephadex G-150 column chromatography

Fig. 1에서의 효소활성 구획을 모아 탈수, 농축하고 Sephadex G-150 column chromatography한 결과는 Fig. 2와 같았다. Fraction No. 20~27에서 효소활성을 나타내었다.

한편 정제과정 중의 효소활성을 요약하면 Table 1과 같았으며 약 50배 정제되었고 수율은 약 21%이

었다.

정제효소의 특성

분자량 : Sephadex G-150 column chromatography한 정제효소를 SDS-polyacrylamide slab gel 전기영동에 의해 분자량을 측정된 결과는 Fig. 3과 같으며 118,000으로 추정되었다.

등전점 : Phast system의 IEF-Gel electrophoresis에 의하여 Sephadex G-150 column chromatogra-

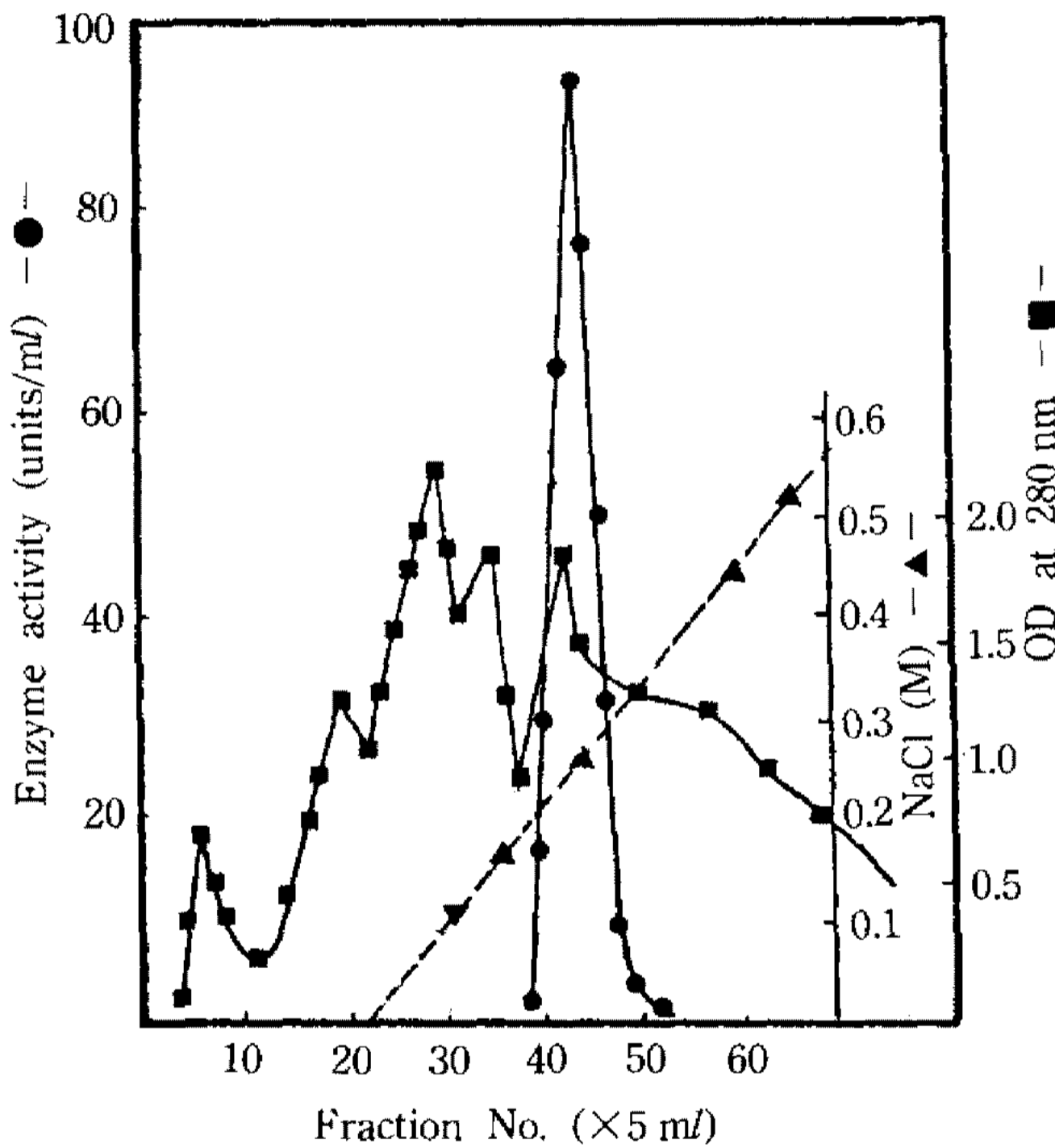


Fig. 1. Column chromatography on DEAE-Sephadex A-50 of crude enzyme(Column: 1.6×50 cm, Flow rate: 25 ml/hr).

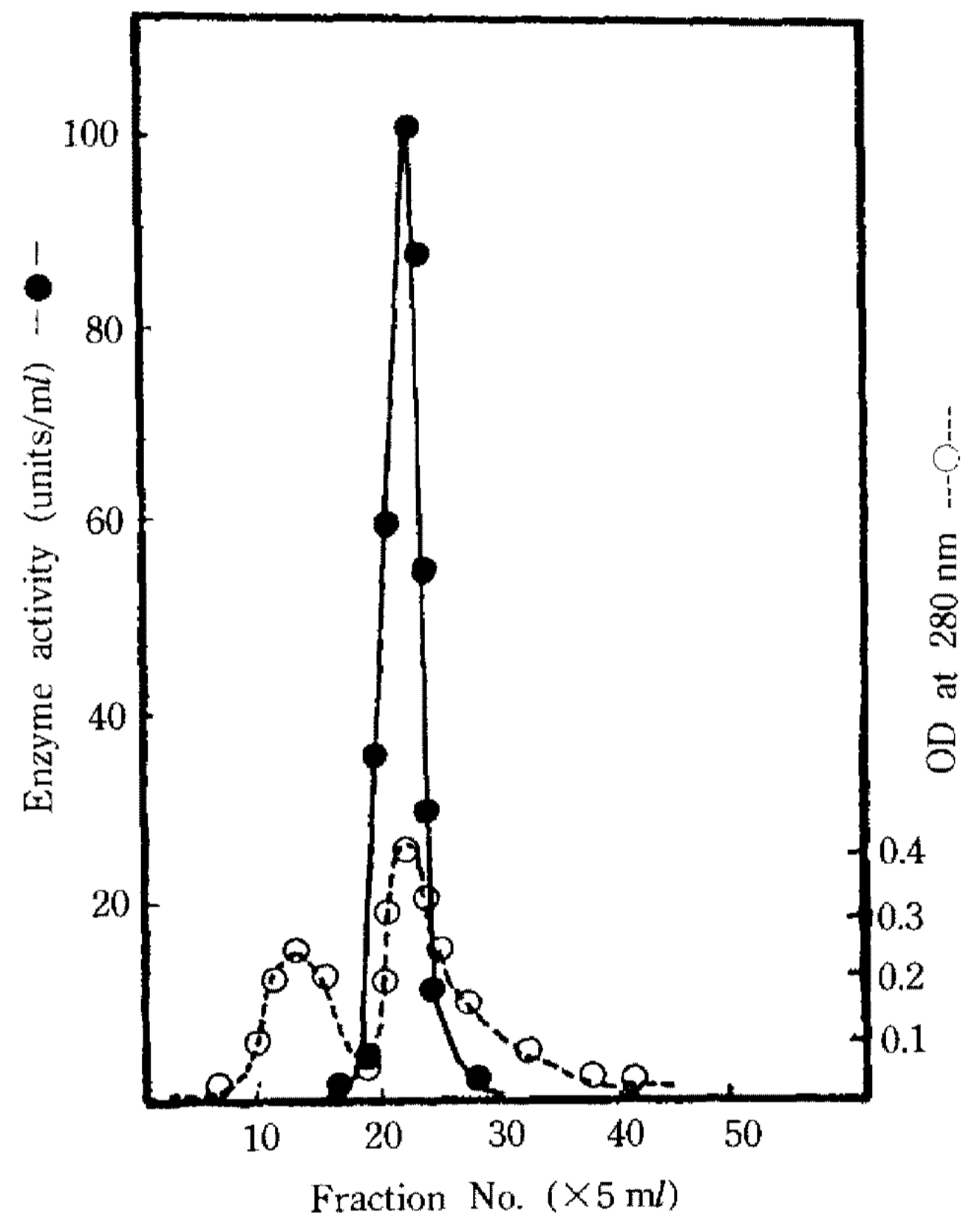


Fig. 2. Column chromatography on Sephadex G-150 of partially purified enzyme (Column: 1.6×100 cm, Flow rate: 25 ml/hr).

Table 1. Purification of pullulanase produced by *Aeromonas caviae* No. S-76.

Purification step	Total activity (units)	Total protein (mg)	Specific activity (units/mg protein)	Yield (%)	Purification (folds)
Culture enzyme solution	8020	4720	1.7	100	1
80% saturated ammonium sulfate precipitate	4860	1510	3.2	60	1.8
DEAE-Sephadex A-50 column chromatography	1850	30	61.6	23	36
Sephadex G-150 column chromatography	1680	20	84.1	21	50

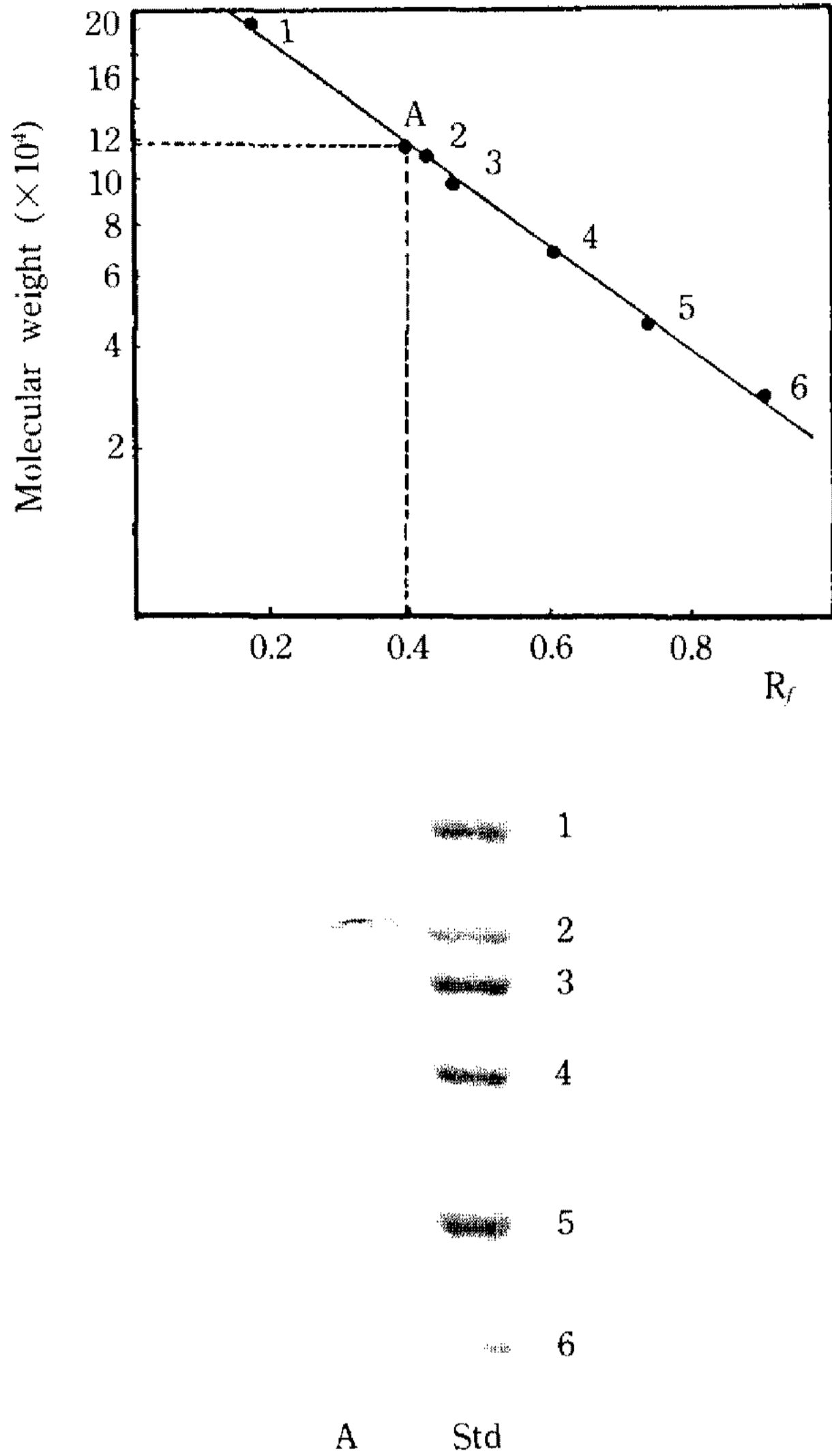


Fig. 3. Electrophoresis of pullulanase produced by *Aeromonas caviae* No. S-76.

A: pullulanase of *Aeromonas caviae* No. S-76
 Std: Standard proteins

- 1: Myosin, M.W. 205,000
- 2: β -Galactosidase, M.W. 116,000
- 3: Phosphorylase B, M.W. 97,000
- 4: Albumin (bovine plasma), M.W. 66,000
- 5: Albumin (egg), M.W. 45,000
- 6: Carbonic anhydrase, M.W. 29,000

phy한 정제효소를 표준단백질과 함께 전기영동한 결과는 Fig. 4와 같으며 등전점은 4.3이었다.

최적 반응온도 : 1% pullulan 0.7 ml/(pH 8.0)에 효소액 0.1 ml를 가하여 각 온도에서 30분 반응시켜 30~70°C의 각 온도에서 반응시키고, DNS법으로 환원당을 측정하여 pullulanase 활성을 측정한 결과는 Fig. 5와 같았으며, 최적 반응온도는 50°C이었다.

최적 반응 pH : pH 4~10의 범위에서 각 pH의 1% pullulan 용액 0.7 ml에 효소액 0.1 ml를 가하여 효소

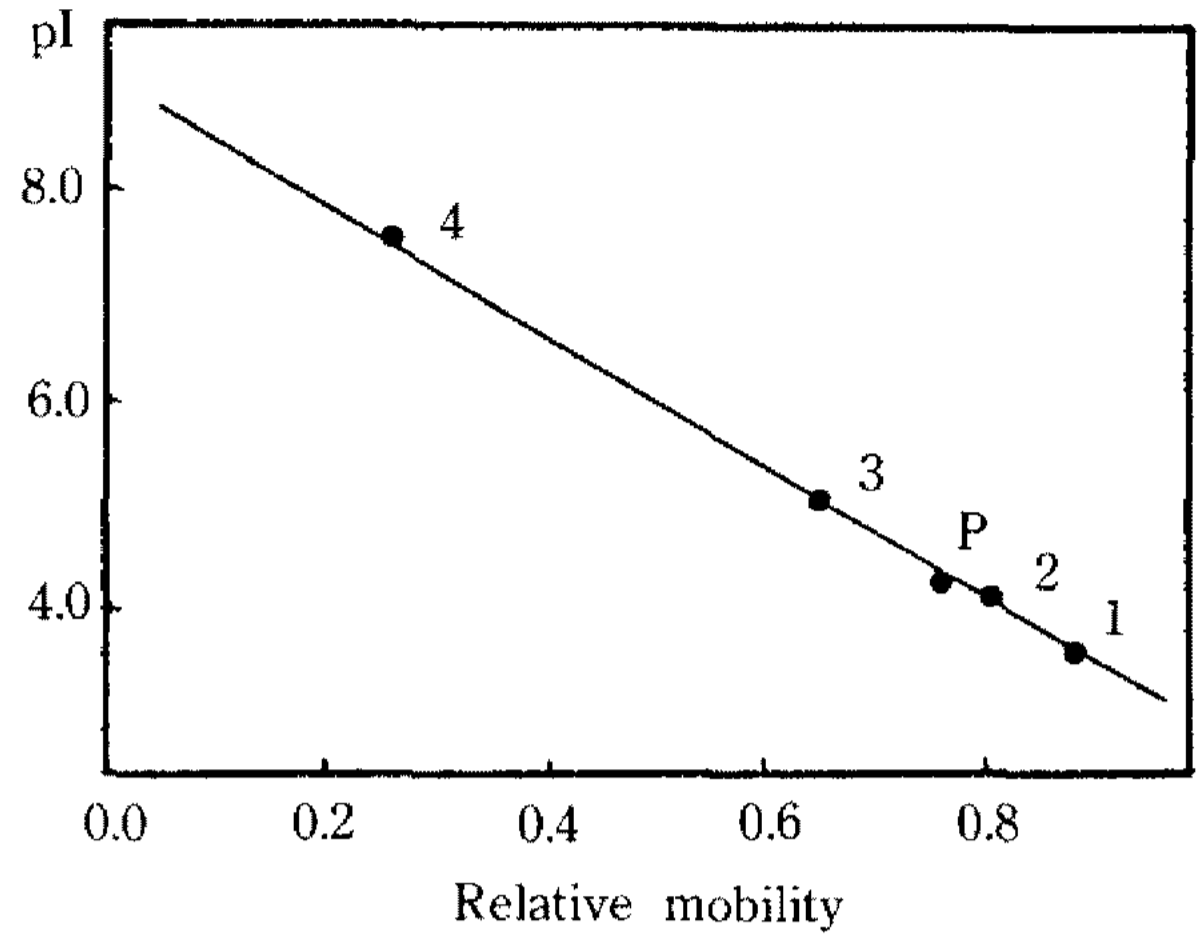


Fig. 4. IEF electrophoresis of pullulanase by *Aeromonas caviae* No. S-76.

- 1: Amyloglucosidase (pI 3.6)
- 2: Trypsin inhibitor (pI 4.6)
- 3: β -lactoglobulin A (pI 5.1)
- 4: Carbonic Anhydrase I (pI 6.6)
- P: Pullulanase

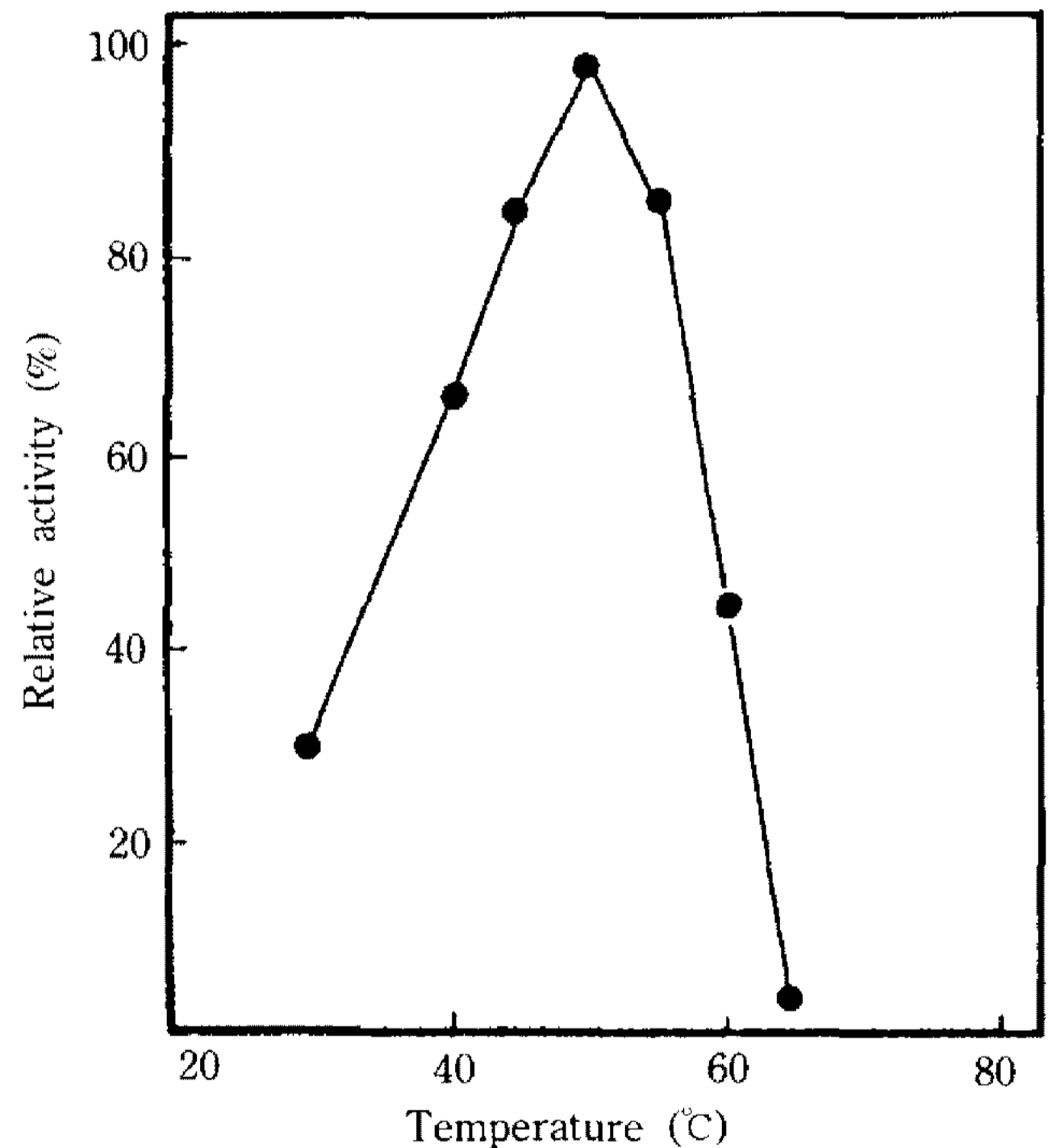


Fig. 5. Effect of temperature on activity of the pullulanase by *Aeromonas caviae* No. S-76.

반응을 시키고 환원당을 정량하여 효소활성을 측정한 결과는 Fig. 6과 같았으며, pH 8.0 부근에서 최적 활성을 나타내었다. 이때 사용한 buffer는 McIlvaine buffer(pH 4~8), 0.05 M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7\text{-HCl}$ (pH 8~10) buffer를 사용하였다.

열안정성 : 효소액을 30~70°C의 각 온도에서 30분간 보온한 후 급냉하고 효소반응을 시켜 잔존 효소

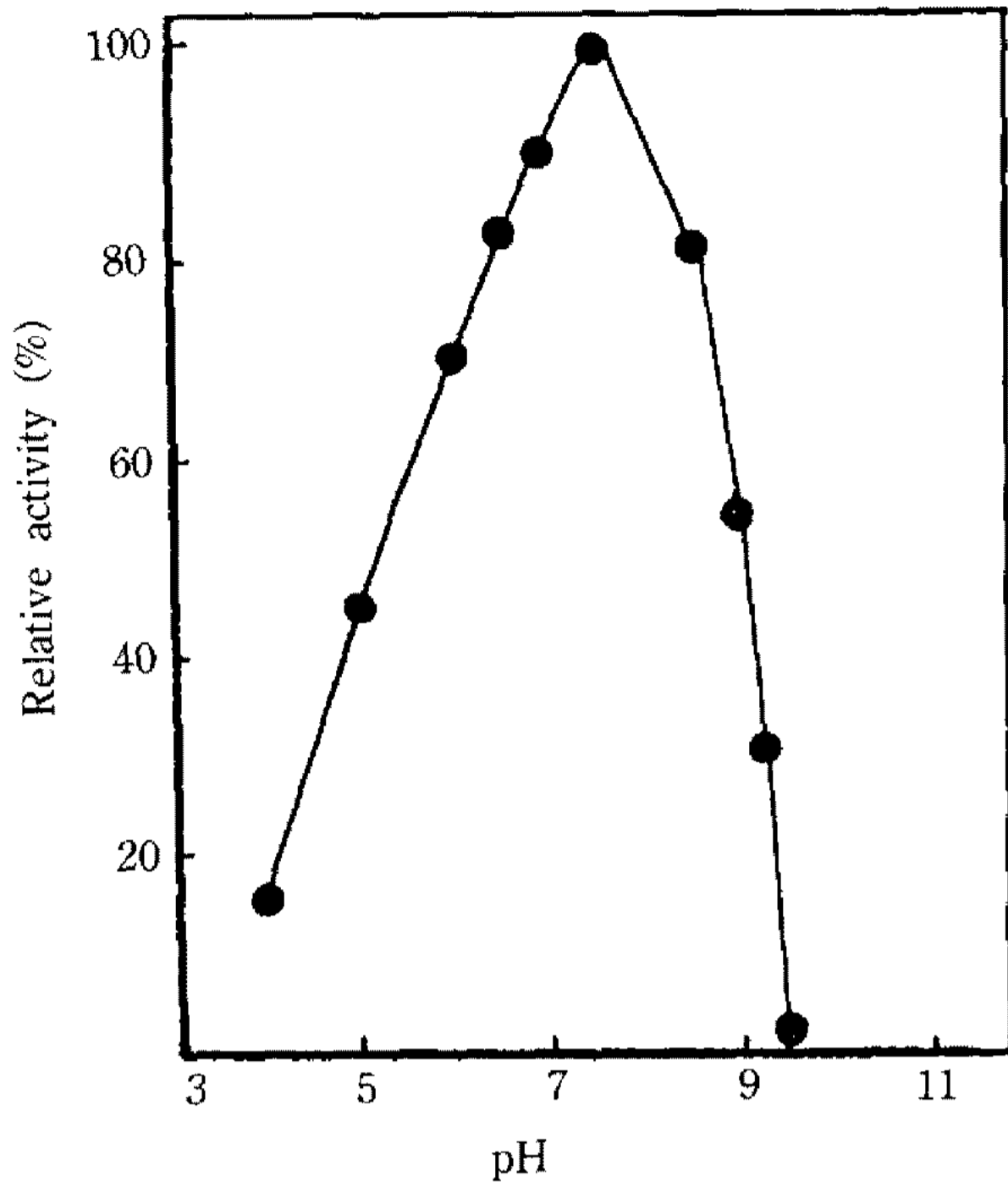


Fig. 6. Effect of pH on activity of pullulanase by *Aeromonas caviae* No. S-76.

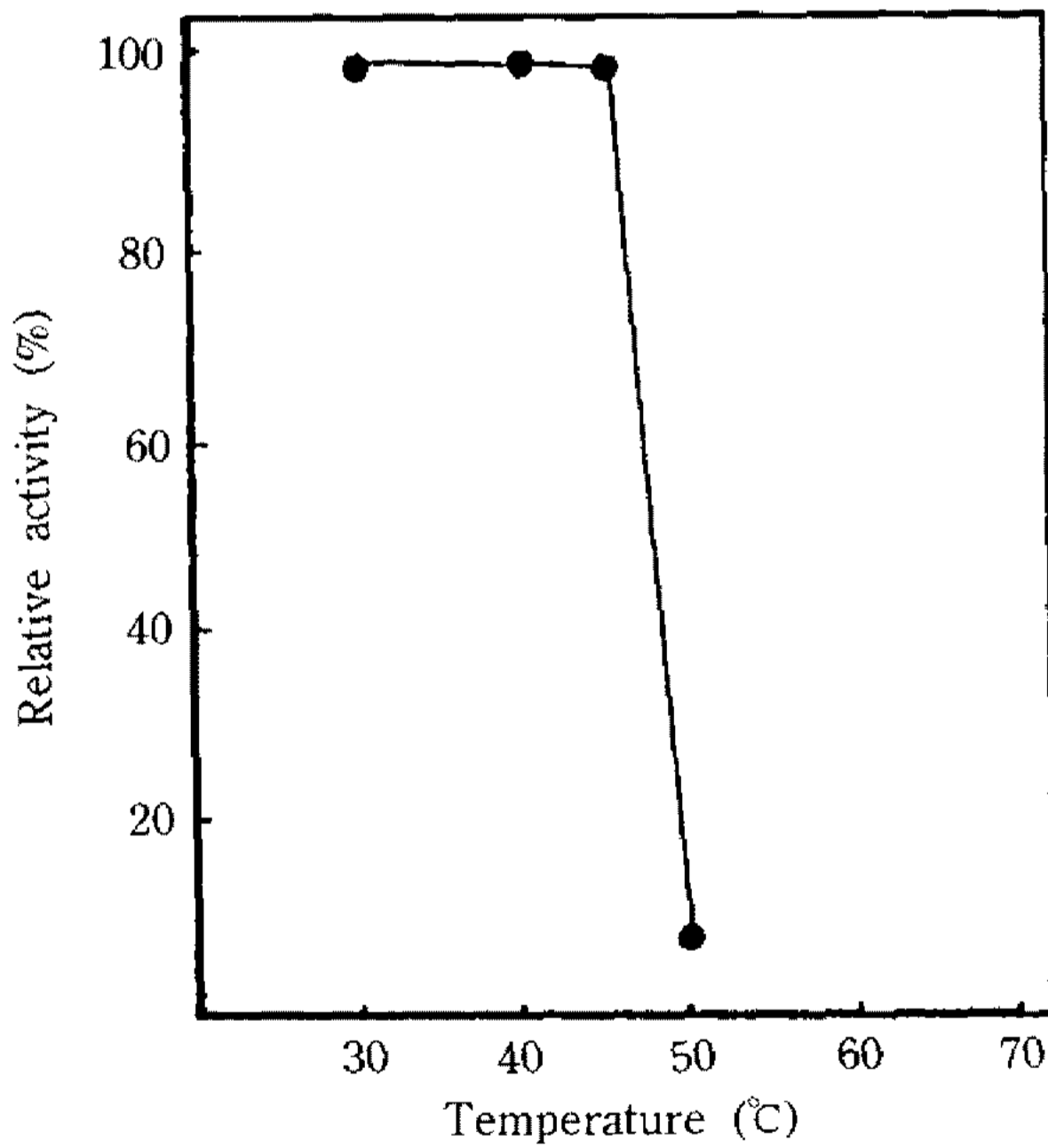


Fig. 7. Thermal stability of pullulanase by *Aeromonas caviae* No. S-76.

활성을 측정된 결과는 Fig. 7과 같았으며 45°C까지는 안정하였으나 50°C에서는 크게 실활되었다.

pH안정성 : 각 pH의 buffer액 0.9 ml에 효소액 0.1 ml를 가하여 45°C에 15분간 보온한 후 pH 8.0으로 동일하게 조정하고 잔존 효소활성을 측정하였다. 그 결과는 Fig. 8과 같았으며 pH 6.0~9.0에서는 안정하였다.

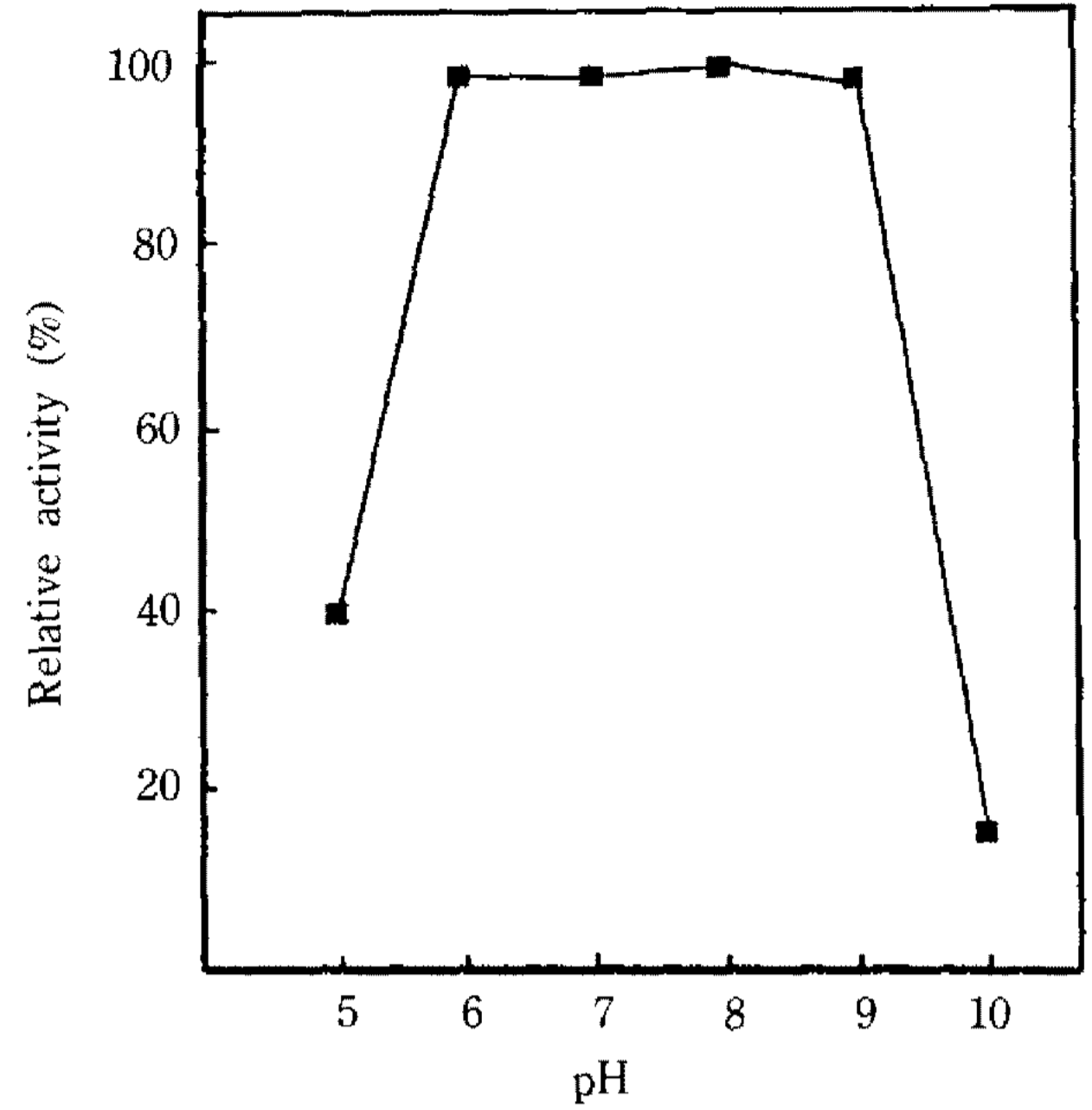


Fig. 8. pH stability of pullulanase produced by *Aeromonas caviae* No. S-76.

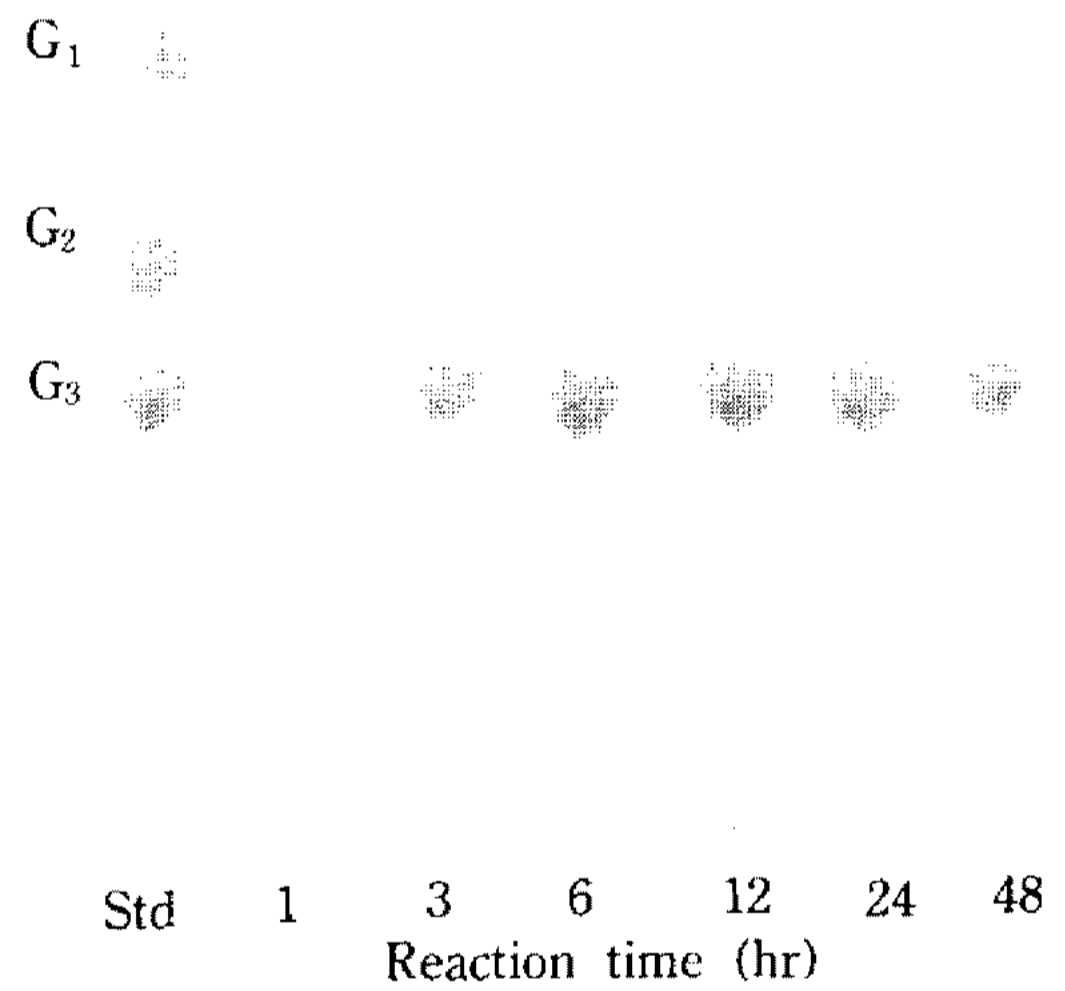


Fig. 9. Thin layer chromatography of reaction products by pullulanase of *Aeromonas caviae* No. S-76.

Std: Standard mixture

G₁: glucose, G₂: maltose, G₃: maltotriose

Pullulan의 가수분해 생성물

1% pullulan 용액(pH 8.0) 1 ml에 효소액 10 μl를 가하여 반응시키면서 경시적으로 취하여 TLC하여 반응생성물을 조사한 결과는 Fig. 9와 같이 maltotriose만이 생성되었으며, 본 효소는 pullulan의 α-1,6 결합을 절단하는 pullulanase임을 알 수 있었다.

Maltosyl β-cyclodextrin의 합성

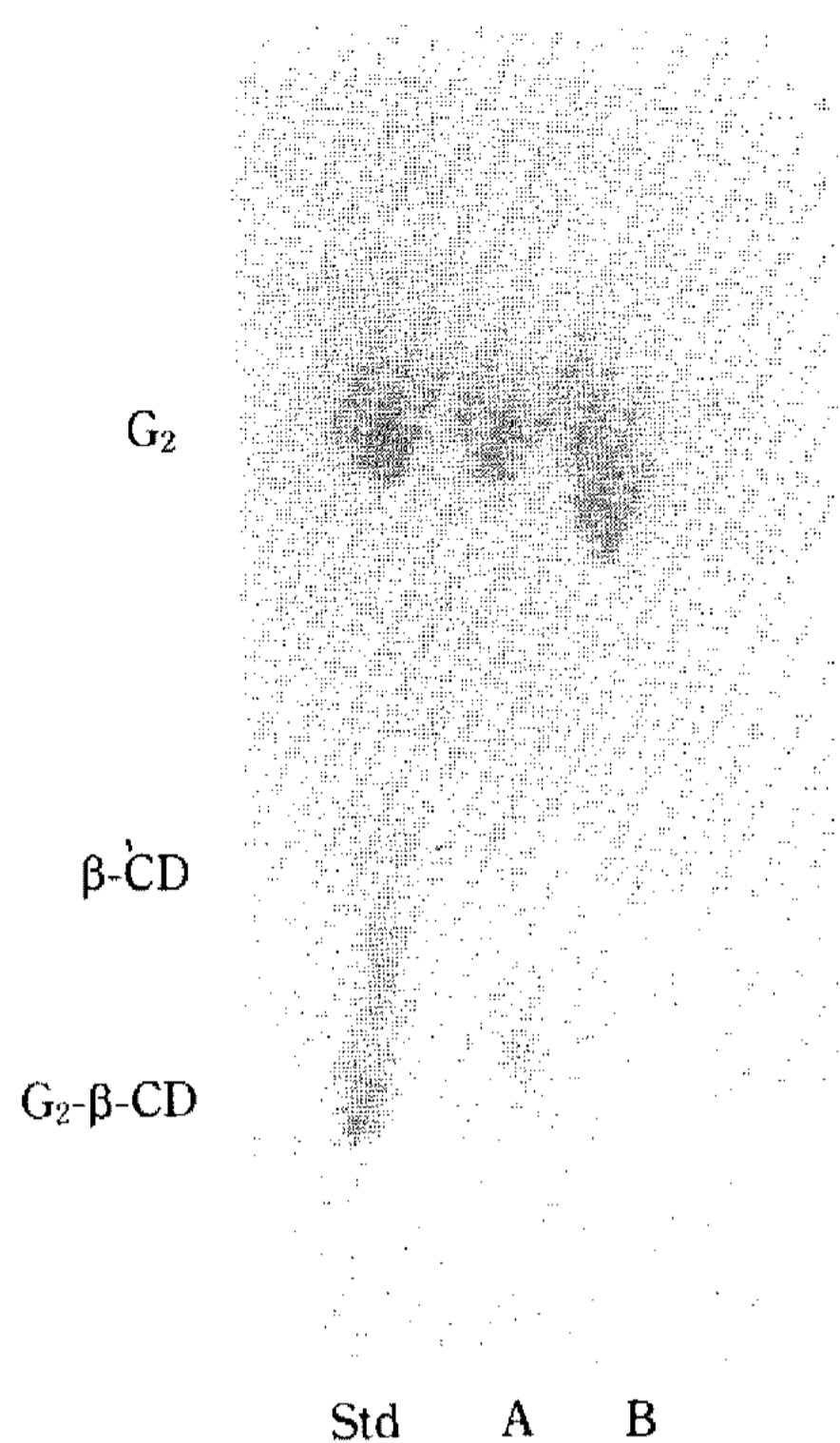


Fig. 10. TLC of maltosyl-β-cyclodextrin synthesized from maltose and β-cyclodextrin using pullulanase of *Aeromonas caviae* No. S-76.

A: reaction products

B: blank solution

Std: standard mixture

G₂: maltose

β-CD: β-cyclodextrin

G₂-β-CD: maltosyl-β-cyclodextrin

정제된 pullulanase를 β-CD와 maltose의 혼합액에 작용시켜 그 반응생성물을 TLC에 의하여 조사한 결과는 Fig. 10과 같았으며, pullulanase의 작용으로 maltosyl-β-cyclodextrin이 합성되었음을 알 수 있었다.

요 약

Pullulanase 생산균으로서 토양으로부터 분리한 *Aeromonas caviae* No. S-76을 진탕배양하여 얻은 조효소액을 ammonium sulfate 침전, DEAE Sephadex A-50 column chromatography, Sephadex G-150 column chromatography에 의하여 정제하였다. 이때 수율은 21%이었고 50배의 정제도를 가진 효소단백질을 얻었다. 정제효소는 SDS-polyacrylamide slab gel 전기영동에 의하여 분자량 118,000의 단일단백질

이었고, 등전점은 4.3, 작용 최적온도는 50°C, 작용 최적 pH는 8.0이었다. 또한 이 효소는 45°C 이하, pH 6.0~9.0 범위에서 안정성을 나타내었다. 이 효소를 β-cyclodextrin과 maltose의 고농도 혼합액에 작용시켜 maltosyl-β-cyclodextrin을 합성하였다.

감사의 말

본 연구는 미원문화재단의 지원에 의해 수행되었으며, 연구비 지원에 감사드립니다.

참고문헌

1. Bender, H., K. Walenfalls: *Biochem. Z.*, **334**, 79 (1961)
2. Ueda, S., N. Nanri: *Appl. Microbiol.*, **15**, 492 (1967)
3. Walker, G.J.: *Biochem. J.*, **108**, 33 (1968)
4. 堺修造: *澱粉科學*, **28**, 72 (1981)
5. Griffin, P.J. and W.M. Forgarty: *Biochem. Soc. Trans.*, **1**, 397 (1973)
6. Takasaki, Y.: *Agric. Biol. Chem.*, **40**, 1515 (1976)
7. Nakamura, N., K. Watanabe and K. Horikoshi: *Biochem. Biophys. Acta.*, **397**, 188 (1975)
8. Wöber, B.: *Hoppe Seyleis Z. Physiol. Chem.*, **354**, 115 (1973)
9. Nakamura, N. and N. Sashihara: *Jpn. Soc. Starch Sci.*, **34**, 38 (1987)
10. Manners, D.J. and K.L. Rowe: *Carbohydr. Res.*, **9**, 107 (1969)
11. Yagisawa, M., K. Kato, Y. Koba and S. Ueda: *J. Ferment. Technol.*, **50**, 572 (1972)
12. 白石遵憲, 坂野好幸, 丹谷陽一: *日本農藝化學會講演要旨集*, 646 (1986)
13. 白石遵憲, 坂野好幸, 丹谷陽一: *日本農藝化學會講演要旨集*, 82 (1987)
14. 小林昭一, 丸山一男, 貝沼佳二: *澱粉科學*, **30**, 231 (1983)
15. 小泉京子, 岡田安代, 窪田洋子, 檜作進: *第5回 シクロデキストリンシンポジウム* (1986)
16. 손천배, 김명희, 이명자: *한국산업미생물학회지*, **19**, 315 (1991)
17. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.R. Farr and R.J. Randall: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951)
18. Laemmli, U.K.: *Nature*, **227**, 680 (1970)

(Received May 9, 1991)