

2단계 고정화 효소반응기를 활용한 Cyclodextrin의 연속생산

이용현* · 이상호 · 한일근
경북대학교 자연과학대학 유전공학과

Continuous Production of Cyclodextrin in Two-Stage Immobilized Enzyme Reactor Coupled with Ultrafiltration Recycle System

Lee, Yong-Hyun*, Sang-Ho Lee and Il-Keun Han

Department of Genetic Engineering, College of Natural Sciences,
Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea

Abstract — The two-stage enzyme reactor, packed with cyclodextrin glucanotransferase (CGTase) immobilized on Amberlite IRA 900, coupled with ultrafiltration membrane was investigated for continuous production of cyclodextrin (CD). 5% (w/v) of soluble starch was partially cyclized, in the 0.1 l first-stage immobilized enzyme reactor, up to CD conversion yield of 10% (w/w) at retention time of 0.56 hr and 1.5 units of immobilized CGTase/1 g of carrier. In the second-stage main immobilized enzyme reactor capacity of 1.5 l, the maximum CD conversion yield of 39% (w/w) was achieved at retention time of 2.8 hr and 0.47 unit of CGTase/1 g of carrier. Unreacted residual dextrin was fractionated with ultrafiltration membrane, and then, recycled into the second-stage main bioreactor to increase the CD conversion yield. The most suitable membrane size and the volume concentration ratio (concentrate: filtrate) for recycling of unreacted residual dextrin were found to be 5 K dalton and 4 : 6, respectively. CD conversion yield was increased about 3~4% upon co-immobilization of pullulanase along with CGTase. Spent Amberlite IRA 900 can be reutilized consecutively more than 3 times for immobilization of CGTase after regeneration.

서 론

Cyclodextrin(CD)이란 6~8개의 glucose 분자가 α -1,4 glucoside bond로 결합한 비환원성 malto-oligo당의 환상결합체이며, amylase 계통의 효소인 cyclodextrin glucanotransferase(EC 2.4.1.19; 1,4- α -glucan 4- α -D-(1,4 glucano) transferase cyclizing : CGTase)의 작용으로 생성된다(1). 환상구조를 갖춘 CD는 광범위한 물질 포집능력이 있어 의약, 농약, 식품 등에 폭넓게 응용 될 수 있다(2).

현재 사용되고 있는 CD 제조방법은 액화 amy-lase로 처리한 또는 액상 CGTase로 부분환화시킨

액화전분을 기질로 수용성 CGTase를 첨가시켜 CD를 합성시킨 후 ultrafiltration(UF), reverse osmosis (RO), 또는 chromatography 등 각종 회수공정을 거쳐 CD를 제조하고 있다(3-7). 이러한 기존의 수용성 CGTase를 이용한 CD생산공정은 고가인 CGTase의 일회사용으로 인한 대량소모와 또한, 생성된 CD 조성의 불균일성에 따른 분리정제의 어려움 등 많은 문제점이 있다.

반면 고정화 효소반응기를 이용한 CD생산은 효소의 효율적 반복사용이 가능하며, 반응조건의 조절이 용이하고 생성된 CD의 조성이 균일하여 분리정제가 간편하고, 또한 공정의 연속화가 용이한 점 등 많은 장점이 있어 수용성 CGTase를 이용하는 기존의 CD 생산공정의 결점을 개선시킬 수 있는 좋은 대안이 될 수 있다(8).

본 연구실에서는 *Bacillus macerans* 유래의 CGT-

Key words: Immobilized enzyme reactor, cyclodextrin glucanotransferase, cyclodextrin production, ultrafiltration membrane.

*Corresponding author

ase를 여러 가지 효소 고정화법으로 고정화하여 그 장단점을 비교 검토한 바 있으며, 또한 고정화된 CGTase의 효소특성을 규명한 바 있다(9). 또한 chitosan과 Amberite IRA 900에 고정화된 CGTase를 column형 효소반응기에 충전하여 그 적응성을 검토한 바 있다. 그 결과 수용성 CGTase의 최고 전환율인 47%와 거의 유사한 42% 수준의 CD 전환율을 얻을 수 있었으며, 고정화 담체 중 Amberite IRA 900이 chitosan에 비해 전환수율이 높고 견고하여 자체 하중에 대하여 안정 할 뿐만 아니라, 재생 후 반복사용이 가능한 등 장점이 있어 CGTase 고정화에 적절한 담체임을 보고한 바 있다(10).

본 연구에서는 CGTase를 succinylation시켜 Amberite IRA 900에 흡착시킨 고정화 효소를 충전한 효소반응기를 두 개 연결하여, 1단계 부분환화용 고정화 효소반응기에서 5%(w/v) 가용성 전분을 10% (w/w : g CD/g starch) CD를 함유하는 전분용액으로 부분환화시킨 후, 2단계 주 고정화 효소반응기에서 CD를 고효율로 생산 할 수 있도록 한 two-stage CD 연속 생산공정을 확립코져 연구하였다. 또한, ultrafiltration membrane으로 미반응 전분류를 분리하여 재순환시켜 CD 전환수율을 증대코져 시도하였다. 이와 같은 연구는 CD생산에 적합한 새로운 공정을 확립하는데 기초적인 자료가 되며, 고가인 CGTase의 연속 사용 생산반응조건 조절의 용이성, 정제공정의 간소화, 그리고 scale up의 용이 등을 가능케할 것이다.

재료 및 방법

효소

사용효소는 *B. macerans* 유래의 산업용(Amano, 280 unit/mg of protein)로써, 상기 조효소액을 10 mM Tris-HCl buffer(pH 9.0)로 투석한 후 같은 buffer로 평형화시킨 DEAE-Sephadex A-50 column(2.8×20 cm)에 흡착시킨 후 이를 0.3 M NaCl의 직선상의 농도 구배로 용출시키고, CGTase활성을 나타내는 분획을 ultrafiltration으로 농축하여, 부분정제한 효소를 고정화에 사용하였다. 정제된 CGTase의 specific activity는 3,500 unit/1 mg of protein으로써 조효소액보다 약 13배 증가하였다.

사용 효소의 최적 pH는 6.0, 최적 온도는 2시간까지 반응시켰을 때는 60°C 그 이상의 경우에는 55°C였다.

pH와 온도안정성은 각각 5.0~11.0와 50°C였다. 5% (w/v) 가용성 전분을 기질로 하여 50°C, pH 6.0에서 효소를 첨가하여 24시간 작용시킨 후 생성된 α -, β -, 그리고 γ -CD의 생성비율은 6 : 4 : 1이었다.

효소활성 측정

CGTase의 활성은 10%(w/v) 가용성 전분용액 2.5 ml와 20 mM maleic acid-Tris-NaOH buffer(pH 6.0) 2.5 ml의 혼합액에 각종 배율로 희석시킨 CGTase 0.1 ml를 첨가하여 50°C에서 1시간 반응시킨 후 HPLC로 생성된 α -CD를 측정 정량하여 결정하였다. CGTase의 효소활성은 시간당 1 mg α -CD를 생성시키는 효소의 양을 1 unit으로 정의하였다.

CD 분석방법

Cyclodextrin의 정량은 high performance liquid chromatography(Model-441, Waters Co.)를 사용하였고(11), 사용 column은 carbohydrate analysis column으로, 용출용매는 acetonitril과 H₂O(65 : 35)의 혼합용액으로, 용출속도는 2.0 ml/min이었고 RI detector로 검정하였다.

CGTase의 adsorption에 의한 고정화

Anionic exchange resin인 Amberite IRA 900에 대한 CGTase의 흡착력을 증대시키기 위해 succinylation시켜 효소표면의 (-)charge를 증가시켰다. 즉, 1M의 sodium bicarbonate buffer에 효소용액을 혼합한 후 pH 7.0인 succinic anhydride 용액을 첨가하여 0°C에서 30분간 succinylation시켰다(12). Amberite IRA 900을 0.5 N NaOH, 0.1 N HCl로 반복 세척하여 이를 활성화시키고 10 mM maleic acid-Tris-NaOH buffer(pH 6.0)로 평형화한 후 succinylation된 CGTase를 첨가하여 4°C에서 12시간 약하게 교반시키면서 효소를 흡착시켰다. 이 때 비흡착 성분은 동일 buffer로 세척 제거하였으며 자세한 방법은 전보(9, 10)에 기술한 바와 같다.

일단계 부분환화반응(First-stage partial cyclization reaction)

10% CD(w/w)를 포함하는 부분환화된 5%(w/w) 가용성 전분용액을 얻기 위한 1단계 부분환화 효소 반응은 0.1 l(1.5×33.0 cm) 그리고 1.5 l(7.2×70.0

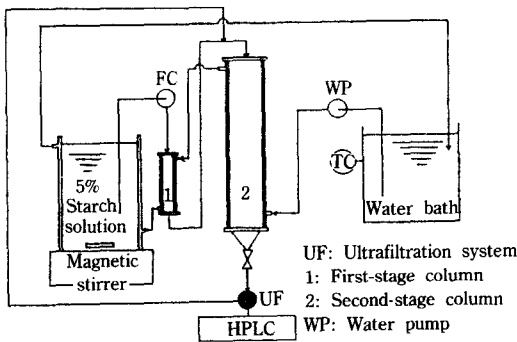


Fig. 1. Schematic diagram of two-stage immobilized CGTase reactor coupled with UF system for continuous production of CD.

cm)인 water-jacketted column형 반응기를 사용하였다. 반응액의 retention time과 고정화 효소량이 CD전환율에 미치는 영향을 조사하였다.

이단계 주 환화반응(Second-stage main cyclization reaction)

주 효소반응은 1.5l water-jacketted column형 반응기(7.2×70.0 cm)를 사용하였다. Succinylate시킨 CGTase 700 units를 흡착한 Amberite IRA 900 1.5 kg을 담체의 과다한 하중으로 인한 pressure-drop을 방지하기 위하여 2개의 보조 column(6×27 cm)에 나누어 충전하였다. 1단계 부분환화된 기질을 다양한 속도로 주입하면서 retention time과 고정화 효소량이 CD전환율에 미치는 영향을 검토하였다. CD의 연속 생산을 위한 2단계 고정화 효소반응기의 전체적인 모식도는 Fig. 1과 같다.

Ultrafiltration을 이용한 미반응 전분류의 분리

CD반응액을 molecular weight cut-off가 2, 5, 10, 그리고 20 K dalton인 4종류의 membrane을 사용하여 미반응 전분류를 주로 함유하는 농축액과 CD를 주로 함유하는 여과액으로 분획비 1 : 1로 분리한 후 농축액과 여과액에 존재하는 미반응 전분류와 CD의 농도를 각각 DNS법(13)과 HPLC로 분석하여 분리도를 측정하였다. 이 때 미반응 전분류는 α-amylase로 당화시킨 후 당농도를 측정하였다.

미반응 전분류의 재순환

반응액을 molecular weight cut-off가 5 K dalton

인 membrane을 사용하여 다양한 분획비(농축액 : 여과액)로 분획하고, 미반응 전분류를 다량 함유하는 농축액을 고정화 효소반응기로 재순환시켜 농축비율이 CD전환율에 미치는 영향을 검토하였다.

CGTase와 pullulanase의 Co-immobilization

350 units의 succinylated CGTase와 15 units의 succinylated pullulanase (*Enterobacter aerogenes*, Sigma Co.)를 Amberite IRA 900 50 g에 첨가하여 co-immobilization시킨 후 CD전환율을 측정하였다. Pullulanase 1 unit은 pH 5.0, 25°C에서 분당 pullulan으로 부터 maltotriose 1.0 μM을 생성시키는 효소량으로 하였다.

Amberite IRA 900의 regeneration

Succinylated된 CGTase를 50 g의 Amberite IRA 900에 고정화시켜(13.5 units/1 g of Amberite IRA 900) 반응기에 충전한 후 기질을 주입하면서 15일간 연속 반응시켰다. Buffer로 반응 잔류액을 세척 제거한 후, column의 온도를 90°C로 올려 고정화된 CGTase를 불활성화 시킨 후 buffer용액으로 불활성화 탈착된 효소를 세척하였다. 여기에 다시 succinylated된 CGTase 675 units을 첨가하여 *in situ*에서 30분간 재흡착시키고 효소반응시켰다. 이와 같은 과정을 수회 반복하면서 CD전환율과 효소 고정화 수율을 측정하였다.

결과 및 고찰

주 고정화 효소반응기의 조작조건에 따른 CD생산

전보(10)에서 보고한 바와 같이, 고정화 효소반응기에 주입할 5% 가용성 전분을 먼저 CGTase로 CD수율이 10%(w/w) 정도가 되도록 부분환화시켜 DE를 20 전후로 조절하여 사용함, 고정화 효소반응기에서 CD전환수율을 최대로 하는데 요망되었다. Table 1은 1.5l 용적의 column형 주 고정화 효소반응기(7.2×70.0 cm)에 기질인 부분환화된 5%(w/w) 가용성 전분을 유입하면서, 기질용액의 효소반응기 내에서의 retention time과 고정화된 효소의 양의 변화가 CD전환율에 미치는 영향을 나타내고 있다. 생성된 CD량은 반응기의 조작조건 변수인 retention time과 고정화된 효소량과 밀접한 상관관계에 있었다.

Table 1. Effect of operational variables on CD production at main immobilized enzyme reactor

Retention time(hr)	Amount of immobilized CGTase (units/g of carrier)	Conversion yield of CD % (w/w)
2.0	0.20	30
	0.47	35
	0.67	34
2.8	0.20	31
	0.47	39
	0.67	39
4.2	0.20	37
	0.47	39
	0.67	39
5.0	0.20	37
	0.47	36
	0.67	36

5% (w/v) of partially cyclized soluble starch (CD conversion yield 10%) was injected into the main column type immobilized CGTase bioreactor (6.0×54.0 cm, 1.5 l)

최대 CD 전환율인 39%는 고정화된 효소량이 0.47~0.67 unit/1 g Amberite IRA 900 범위이고 또한 retention time이 2.8~4.2 hr일 때 얻어졌다. 위에서 얻은 최대 전환율은 전보(10)에서 보고한 바 있는 소용량인 0.1 l 고정화 효소반응기(1.5×33.0 cm)에서 얻은 최대 CD 전환율인 42%보다 약간 낮은 수준임을 알 수 있다.

Fig. 2는 고정화 효소량을 0.47 unit/1 g Amberite IRA 900로 고정하고 기질의 retention time을 변화시키면서 생성된 CD량과 효소반응기의 productivity를 도시한 것이다. 생성된 CD의 농도는 기질용액의 retention time이 증가함에 따라 비례하여 급속히 증가하여 갔으나 2.8 hr 이상에서는 더 이상 증가하지 않고 일정한 최대 농도를 유지하였는데, 이는 Amberite IRA 900에 고정화된 CGTase로 얻을 수 있는 최대 CD 전환율인 39% 수준에 이르렀기 때문이라 사료된다.

한편, 1.5 l 주 고정화 효소반응기의 최대 productivity는 17 g/l·hr였으며, 이 때 기질의 retention time은 2.0 hr였고 이보다 증가할 때는 productivity는 점차적으로 감소하였는데, 이는 CD 농도는 증가하지 않는 반면 반응기 내에 잔류하는 시간인 retention time은 상대적으로 증가하기 때문이다. 위에서 얻은

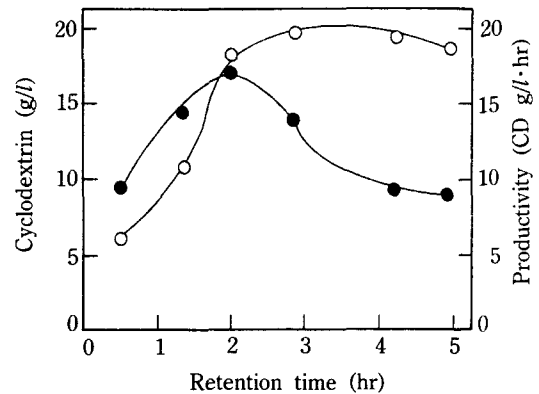


Fig. 2. Effect of substrate retention time on the CD formation and productivity of 1.5 l second-stage main immobilized CGTase bioreactor (0.47 unit/1 g of Amberite IRA 900).

(○: cyclodextrin; ●: productivity)

productivity는 전보(10)에 보고한 바 있는 0.1 l 소용량 고정화 효소반응기에서 얻은 최고 productivity인 17 g/l·hr와 유사한 수준임을 알 수 있었다. 위의 결과를 종합컨데 CD 생성에 적합한 효소반응기 내의 기질의 retention time은 2.0~2.8 hr의 범위내에 있다고 판단된다.

부분환화용 고정화 효소반응기의 용량별 조작조건

주 고정화 효소반응기에 주입하기 적합한 부분환화된 가용성 전분을 얻기 위하여, 용량이 0.1 그리고 1.5 l인 두 효소반응기 각각의 용량별 적정 고정화 효소량을 검토하였다. 이 때 기질의 retention time은 주 고정화 효소반응기(1.5 l)의 최적 retention time인 2.8 hr에 맞추어 기질을 공급 할 수 있도록 부분환화용 고정화 효소반응기의 retention time을 각각 0.56과 2.80 hr로 고정하고 실험하였다. Table 2는 각각의 용량에서 고정화된 효소량이 CD 전환율에 미치는 영향을 나타내고 있다. Table 2에서와 같이 주 고정화 효소반응기에 주입하기 적합한 10% (w/w) CD를 포함하는 부분환화된 5% (w/w) 가용성 전분을 얻기 위한 적정 효소량은, 0.1 l의 경우에는 1.5~1.6 units/1 g carrier인 반면 1.5 l의 경우에는 이보다 매우 적은 0.04~0.05 units/1 g carrier였다. 이와 같이 용적이 다른 효소반응기를 사용할 경우에도 기질의 retention time과 효소의 고정화량을 변화시킴으로써 원하는 수준의 부분환화된 가용성 전분용액을 쉽게 얻을 수

있었다. 따라서 고정화 담체의 사용량이 적고, 또한 조작이 간편하면서 주 효소반응기보다 용량이 적은 반응기가 1단계 부분산화용 고정화 효소반응기로 적합하다고 판단된다.

Ultrafiltration membrane을 이용한 생성 CD와 미반응 잔류 전분류의 분리

CD생산의 경제성을 제고시키기 위하여 효소반응기에서 유출되는 반응액 중에 포함된 CD와 미반응 전분류를 분리하여 CD를 회수하고, 미반응 전분류는 다시 효소반응기에 재순환 시킴이 요망된다. CD는 환상구조를 갖고 있고 분자량은 1 K dalton 전후이며,

쇄상구조의 미반응 전분류에 비해서 크기가 적으므로, 반응 혼합액을 molecular weight cut-off가 2, 5, 10, 그리고 20 K dalton인 네 종류의 ultrafiltration membrane을 사용하여 농축액과 여과액으로 분리하였다.

Table 3은 반응액을 각종 molecular weight cut-off membrane과 분획비(농축액 : 여과액)별로 분리하여 농축액(concentrate)과 여과액(filtrate)에 포함된 미반응 잔류 전분류 및 생성된 CD의 전체 총량의 분포를 나타내고 있다. 먼저 적절한 molecular weight cut-off membrane을 선정하기 위하여 분획비를 5 : 5로 고정시키고 분리한 결과는 Table 3과 같다. 미반응 전분류는 molecular weight cut-off 10 K dalton 이하인 membrane을 사용할 경우 농축액에 대부분 잔류하였다. 반면 생성된 CD는 molecular weight cut-off가 5 K dalton보다 큰 size에서는 농축액과 여과액에 각각 50 : 50 정도로 분리 되었다. 이로 미루어 생성된 CD를 여과액 중에 최대한 분리 회수할 수 있고, 또한 재순환시킬 미반응 전분류도 농축액 중에 최대한 잔류시킬 수 있는 5 K dalton이 가장 적절한 membrane으로 판단된다.

상기 membrane을 이용하여 CD와 미반응 전분류를 최대한 분리시킬 수 있는 적절한 분획비를 규명코저, 분획비에 따른 농축액과 여과액에 함유된 성분들을 정량한 결과, Table 3에서와 같이 분획비의 변화는 농축액 중의 미반응 전분류의 총량에는 큰 영향이 없었다. 반면 여과액의 분획비가 증가될 수록 여과

Table 2. Effect of the amount of CGTase immobilized on partial cyclization reaction at two different size (0.1 and 1.5 l) of first-stage bioreactors

Amount of immobilized CGTase (units)	Conversion yield of CD % (w/w)	
	0.1 l ^a	1.5 l ^b
50	4.0	6.4
60	5.8	10.1
70	9.0	13.2
75	10.1	14.7
80	12.9	15.8
90	13.3	16.4

^a : Retention time of 0.1 l bioreactor: 0.56 hr

^b : Retention time of 1.5 l bioreactor: 2.80 hr
5% (w/v) soluble starch was injected.

Table 3. Effect of membrane pore size and volume concentration ratio on fractionation of CD and unreacted residual dextrin

Molecular weight cut off (K dalton)	Volume ratio C : F	Dextrin (mg)		CD (mg)	
		C	F	C	F
2	5 : 5	580	30	351	39
5	5 : 5	570	40	200	190
10	5 : 5	514	96	197	193
20	5 : 5	360	250	185	205
5	8 : 2	600	10	360	30
5	7 : 3	590	20	330	60
5	5 : 5	570	40	200	190
5	3 : 7	537	73	160	230
5	2 : 8	500	110	110	280

C; concentrate, F; filtrate

20 ml of reaction mixture was filtrated as indicated volume concentration ratio (concentrate: filtrate). The reaction mixture before ultrafiltration contained 610 mg of dextrin and 390 mg of CDs in 20 ml.

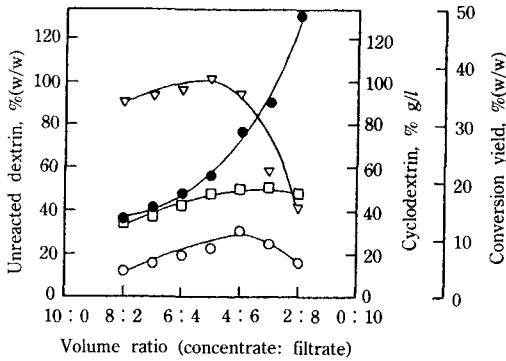


Fig. 3. Conversion of residual dextrin by recycling at main reactor after fractionation at different volume concentration ratio using 5 K dalton membrane.

(●: unreacted dextrin; ○: produced CD after recycling; ▽: CD conversion yield; □: total CD in reaction mixture after recycling)

액중의 CD총량은 계속적으로 증가하여 분획비가 2 : 8일때 분리회수되는 CD량은 72%에 이르렀다.

위에서와 같이 농축액에 잔류하는 미반응 전분량은 분획비가 달라져도 거의 변하지 않았으나 여과액에 분리회수되는 CD의 총량은 여과액의 분획비가 5 : 5 이상일 경우에 주로 분리회수되어 적절한 분획비는 5 : 5 이상이라고 판단된다.

고정화 효소반응기에의 미반응 전분류의 재순환

농축액과 여과액을 다양한 분획비로 분리한 후 미반응 전분류가 주로 포함된 농축액을 다시 주 고정화 효소반응기에 재순환 반응시켜 생성된 CD량과 전환 수율을 검토한 결과는 Fig. 3과 같다. 분획비를 달리 하면서 분리한 농축액을 주 고정화 효소반응기에 재순환 하였을 경우, CD의 생성량은 농축액의 분획비가 감소함에 따라 계속적으로 증가하였고, 4 : 6일 때 25 g/l로써 최대치를 보였으며, 그 이후에는 다시 감소하였다. 또한, Fig. 3은 재순환하여 새로 생산된 CD량과 재순환 농축액에 잔류해 있던 CD량을 합한 총량도 나타내었다.

CD전환율은 농축액의 분획비가 4 : 6이내 일때는 큰 변동이 없이 35~40%를 유지하였는데 이는 초기 기질에서 얻은 최대 CD전환율인 39%와 유사한 수준으로 미반응 전분류도 초기 기질과 같이 용이하게 CD로 전환 될 수 있음을 보여주고 있다. 그러나 위 범위를 초과할 때에는 CD전환율이 급격히 감소되었

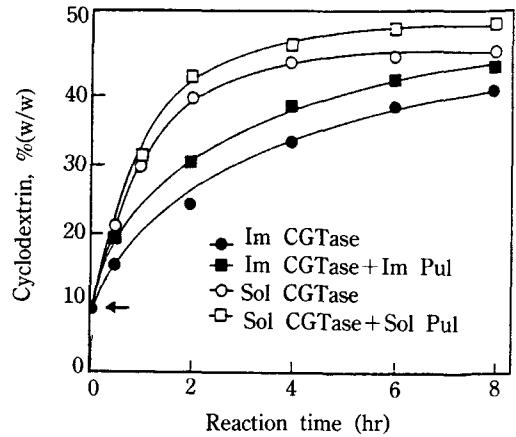


Fig. 4. Starch conversion by the simultaneous action of pullulanase and CGTase.

500 ml of 5% (w/v) partially cyclized soluble starch solutions were reacted with 350 units of immobilized and soluble CGTase in the presence or absence of pullulanase (15 units, *Enterobacter aerogenes*, Sigma Co.) at pH 6.0 and 50°C for various periods while stroking (120 strokes/min).

Im: Immobilized, Sol: Soluble, Pul: Pullulanase

는데, 이는 농축액 중의 미반응 전분량은 변동이 없으나 부피는 감소하여 미반응 전분류의 농도가 증가되어 고정화 효소반응기에 유입하기에 적합한 전분농도인 50~70 g/l를 초과하므로써, 점도가 증가되어 재순환 용액이 용이하게 고정화 효소반응기내에서의 흐르지 않기 때문이다. 따라서 적정분획비는 CD생성량과 전환율이 각각 25 g/l와 38%로 최대에 도달하는 4 : 6으로 판단된다.

CGTase와 pullulanase의 동시 고정화가 CD전환 수율에 미치는 영향

Debranching enzyme인 pullulanase의 첨가가 CD합성에 미치는 영향을 검토하기 위하여 10%(w/w) CD를 포함하는 부분환화된 5% 가용성 전분기질 500 ml 350 units의 CGTase를 50 g의 Amberite IRA 900에 고정화 한 균과 위와 같은 조건에 15 units의 pullulanase를 추가로 첨가하여 동시 고정화한 균의 CD전환율을 측정 비교한 결과 Fig. 4와 같다. 또한 비교를 목적으로 위와 같은 unit의 수용성 CGTase와 pullulanase를 첨가하여 대비 실험을 한 결과도 Fig. 4에 나타내었다. 8시간 반응 후 CGTase만을 고정화한 균과 수용성 CGTase만을 사용한 균의 경우 CD전환

율은 각각 40과 47%이며, 반면 pullulanase와 CGTase를 동시 고정화한 균과 수용성 CGTase와 pullulanase를 동시에 이용한 균의 CD전환율은 각각 44와 50%로 pullulanase를 보완하지 않은 균보다 모두 3~4% 높은 수율을 보였다. 이는 CGTase가 분해할 수 있는 전분질의 α -1,6-glucosidic bond를 pullulanase가 분해함으로써 CGTase가 적용할 수 있는 효소 작용 부위가 증가되었기 때문이라 사료된다. 앞으로 동시 고정화의 최적조건과 안정성 그리고 CD생산수율 등의 관점에서 후속 연구가 요망된다.

Amberite IRA 900의 반복사용성 검토

흡착에 의한 효소 고정화법은 고정화 담체를 장시간 사용한 후, 활성이 저하된 효소를 탈착제거하고 새로운 효소를 재고정화하여 여러 차례 반복 사용할 수 있는 장점이 있다(10). 담체인 Amberite IRA 900의 재사용성을 검토코저 CGTase를 고정화하여 15일간 효소반응기에서 연속 조작한 후 불순물을 buffer로 세척한 뒤, 다시 column의 온도를 90°C로 가열하여

효소를 불활성화시킨 후 탈착제거하고, 새로운 CGTase를 재고정화하는 횟수를 4회에 반복하였으며 각 단계에서의 고정화율과 CD전환율을 조사하여 Table 4에 나타내었다. 위에서와 같이 Amberite IRA 900을 연속적으로 3회 재생시켜 고정화시킨 후의 고정화율과 CD전환율은 각각 73~79%와 38~41%로써 처음 사용시의 77%와 39.3%와 큰 차이없이 우수한 결과를 나타내었다. 이로 미루어 CD의 산업적 대량생산의 경우 효소 고정화 비용을 절감할 수 있을 것이며 더 나아가 효소고정화 반응기의 설치 및 운영이 쉽고 용이한 점 등의 장점으로 작용하리라 본다.

연속공정의 조작조건과 물질수지

Fig. 5는 지금까지 검토한 CD연속 생산공정의 조작조건과 각 공정에 유입 또는 유출되는 가용성 전분과 생성된 CD의 물질수지를 종합하고 있다. 1단계 부분환화용 0.1l 효소반응기의 최적 retention time과 고정화 효소량은 각각 0.56 hr와 1.5 unit/1 g of carrier였고 기질인 50 g dextrin/l에서 5 g CD/l가 생산되어 10%(w/w)의 수율을 얻었다. 1.5l 용량의 2단계 주 반응기의 최적조건은 retention time과 고정화 효소량은 각각 2.8 hr와 0.47 unit/1 g of carrier였고, 45 g dextrin/l에서 14.5 g CD/l가 생산되어 32.2%(w/w)의 수율을 얻었다. 상기 반응액을 5 K dalton membrane으로 분획비 4 : 6으로 분리한 결과 생성된 CD의 64%를 여과액 중에 분리회수할 수 있었으며 CD농도는 21 g/l였다. 반면 미반응 전분류의 85%가 농축액에 잔류하였으며 농도는 66 g/l였다.

연구한 CD연속 제조공정은 반응액의 갈변현상이 없고, 불순물이 비교적 적어 CD의 순도가 높았으며, 아울러 고가인 CGTase를 재반복사용할 수 있는 장점이 관찰되었다. 반면 고농도의 기질을 사용하기 어려워 생성된 CD의 농도가 낮아 농축이 필요하고,

Table 4. Reutilization of amberite IRA 900 for re-immobilization of CGTase

Regeneration(times)	Amount of immobilized CGTase (units/g of carrier)	Yield of activity(%)	Conversion yield of CD%
0	10.4	77.0	39.3
1	10.7	79.3	41.0
2	10.1	74.8	39.1
3	9.9	73.3	38.4
4	8.3	61.5	30.5

Fresh solution of succinylated CGTase (13.5 units/g of carrier) was added and adsorbed on Amberite IRA 900. 5% of partially cyclized soluble starch (CD conversion yield 10%) was pumped through immobilized CGTase column bioreactor.

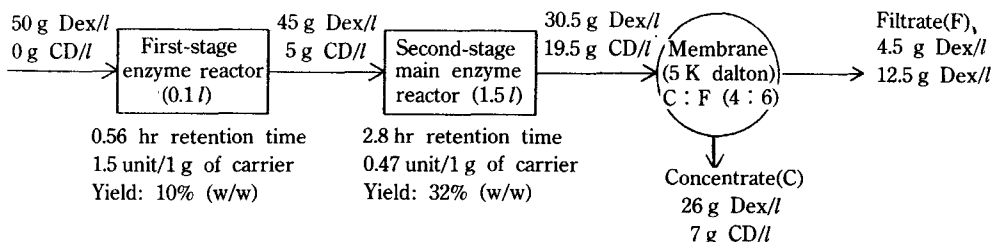


Fig. 5. Flow sheet, operational condition, and material balance of continuous CD production process. 5% (w/v) soluble starch was used as substrate

또한 CD전환수율이 다소 낮은 결점이 관찰되었다. 제안한 생산공정의 산업적 활용을 위해서는 고정화된 CGTase의 enzyme kinetics, reactor performance에 대한 평가, 그리고 UF system을 결합한 2단계 효소 반응공정의 최적화를 위한 후속 연구가 요망된다.

요 약

Amberite IRA 900에 흡착 고정화시킨 CGTase가 충전된 2단계 고정화 효소반응기를 활용한 CD의 연속생산에 적합한 공정을 확립코져 각 단계의 조작조건이 CD생산에 미치는 영향을 검토하였다. 1.5 l 주 고정화 효소반응기에서는 5%(w/v) 가용성 전분을 10%(w/w) CD를 포함하는 수준으로 부분환화시킨 용액을 기질로 하였으며, 고정화된 효소량이 0.47 unit/g carrier이고 retention time이 2.8~4.2 hr사이 일 때, 최대 CD전환율인 39%를 얻을 수 있었다. 1 단계 부분환화용 고정화 효소반응기의 용량, 고정화 효소 사용량, 그리고 반응액의 retention time을 변화 시킴으로써 주 고정화 효소반응기의 주입에 적절한 10%(w/w) CD를 포함하는 부분환화된 가용성 전분액을 얻을 수 있었다. 기질의 사용효율을 증가시키기 위하여 ultrafiltration membrane으로 미반응 전분류를 분획하여 주 고정화 효소반응기에 재순환시켰다. 분획에 적절한 membrane의 pore size는 5 K dalton이었고, 적정 분획비(농축액 : 여과액)는 4 : 6이었다. Debranching enzyme인 pullulanase를 CGTase와 동시 고정화 함으로써 CD전환율을 3~4% 증가시킬 수 있었다. 또한 Amberite IRA 900 담체는 3회까지 재생하여 CGTase의 고정화에 반복사용할 수 있었다.

감사의 말씀

본 연구는 과학기술처의 특정연구과제 연구비로

수행되었으며, 연구비 지원에 감사드립니다.

참고문헌

- Whistler, R.L., J.N. Bemiller and E.F. Paschall: *Starch-Chemistry and Technology*, 2nd ed., Academic Press, N.Y., 143 (1984)
- 한국유전공학연구소합: 특허정보자료집-Cyclodextrin(유전공학기술정보 53), 한국유전공학연구소합, 서울, p.3 (1988)
- Hitoshi, H., K. Hara, N. Kuwahara and K. Arakawa: *J. Jpn. Soc. Starch Sci.*, **32**, 299 (1985)
- Hitoshi, H., K. Hara, N. Kuwahara, T. Ohki and M. Ishikawa: *J. Jpn. Soc. Starch Sci.*, **32**, 307 (1985)
- Hitoshi, H., K. Hara, N. Kuwahara and K. Ito: *J. Jpn. Soc. Starch Sci.* **32**, 312 (1985)
- 한국유전공학연구소합: 특허정보자료집-Cyclodextrin(유전공학기술정보 53) 한국유전공학연구소합, 서울, p.48 (1988)
- Hitoshi, H., K. Hara, N. Kuwahara S. Sakai and N. Yamamoto: *J. Jpn. Soc. Starch Sci.*, **33**, 29 (1986)
- 이용현: *식품과학*, **20**, 44 (1987)
- Lee, S.H., H.D. Shin and Y.H. Lee: *J. Microbiol. Biotechnol.*, **1**, 48 (1991)
- Lee, Y.H., S.H. Lee and H.D. Shin: *J. Microbiol. Biotechnol.*, **1**, 57 (1991)
- Kitahata, S., S. Yoshikawa and S. Okada: *J. Jpn. Soc. Starch Sci.*, **25**, 19 (1978)
- Klotz, I.M.: *Methods in Enzymology*, **11**, 577 (1967)
- Miller, G.L.: *Anal. Chem.*, **31**, 426 (1959)
- Demain, A.L. and N.A. Solomon: *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*, American Society for Microbiology, Washington D.C., 232 (1986)

(Received February 3, 1991)