

Klebsiella pneumoniae NFB-3200이 생산하는 Pullulanase를 이용한 전분당화

권재민 · 박경호¹ · 백운화¹ · 배동훈² · 유주현*
연세대학교 식품생물공학과, ¹두산기술원, ²단국대학교 식품공학과

Saccharification Using Pullulanase from *Klebsiella pneumoniae* NFB-320

Kwon, Jay-Min, Kyung-Ho Park¹, Un-Hwa Pek¹,
Dong-Hoon Bai² and Ju-Hyun Yu*

Department of Food and Biotechnology, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea

¹Doosan Technical Center, Yongin 449-840, Korea

²Department of Food Engineering, Dankook University, Chunan 330-180, Korea

Abstract— In order to convert starch to the fermentative sugar, the effect of pullulanase on the saccharification of starch and pullulanase was investigated. The optimum pH and temperature for the enzyme activity of the glucoamylase and the crude pullulanase from *Klebsiella pneumoniae* NFB-320 were shown to be identical as pH 6.0 and 60°C, respectively. The crude pullulanase was stable between pH 5.0~6.5, and up to 40°C, whereas the glucoamylase was stable between pH 4.0~6.5, and up to 40°C. When pullulanase and glucoamylase were engaged together in the saccharification of starch, saccharification yield was increased by 3.2% than the yield obtained by glucoamylase, alone. And the two enzymes produced sugar from pullulan 18 times much higher than the single use of pullulanase.

전분은 약 75~80%의 amylopectin을 함유하고 있으므로 식품, 화학, 세제, 의류 산업 등에 이용하기 위해서는 저당 syrup 형태로 전환해야 한다(1). 전분이 α -amylase에 의해 분해될 때 α -(1→6) glycosidic linkage를 가지고 있는 분기점은 α -amylase에 의해 분해되지 않을 뿐만 아니라 근접해 있는 α -(1→4) 결합의 분해에도 어느 정도 영향을 가지고 있어서 amylopectin에 α -amylase를 장시간 처리하였을 때에도 더 이상 분해되지 않는 α -limit dextrin이 생성되고, 또한 amylopectin을 β -amylase로 처리할 경우 α -(1→6) 분기점에 도달했을 때 분해가 중지되어 β -limit dextrin이 생성된다. 반면에 glucoamylase는 그 주된 작용이 exo형으로 α -(1→4) 결합과 더불어, α -(1→6) 결합도 분해할 수 있지만 그 반응속도가 상대적으로 느리므로(2) 이러한 경우에 debranching enzyme를 사용하면 많은 잇점을 얻을 수 있다(Fig. 1).

Amylase 중에서 α -(1→6) 결합만을 분해하는 효소

Key words: Saccharification, pullulanase, *Klebsiella pneumoniae*

*Corresponding author

로는 isoamylase(glycogen 6-glucohydrolase)와 pullulanase(pullulan 6-glucohydrolase, amylopectin 6-glucohydrolase) 등이 있다. Isoamylase는 amylopectin, glycogen 등의 α -(1→6) glycosidic linkage를 분해하여 amylose의 직쇄 다당류를 생성하는 효소이며(3), pullulanase는 amylopectin과 glycogen을 분해할 수 있을 뿐더러, maltotriose가 α -(1→6) 결합으로 이루어진 pullulan의 α -(1→6) 결합에 특이적으로 작용하여 최종적으로 maltotriose까지 분해시킨다(2).

Pullulanase는 glycogen, amylopectin 등을 분해함으로써 다당류의 구조를 밝히는데 이용되었고(2), 75~80%의 amylopectin을 함유하는 대부분의 전분을 β -amylase와 함께 작용시킴으로써, maltose syrup 생산성을 높이고 pullulan에 작용시켜 순도 높은 maltotriose를 생산함으로써, 전분공업에 매우 유용한 효소로 알려져 있으며(4), *Bacillus stearothermophilus*(5), *Aerobacter aerogenes*(6, 7) 등에서 두드러진 연구가 이루어져 왔다.

포도당 syrup의 제조에 있어서 amylopectin에 α -amylase가 작용해서 생성된 α -limit dextrin은 glu-

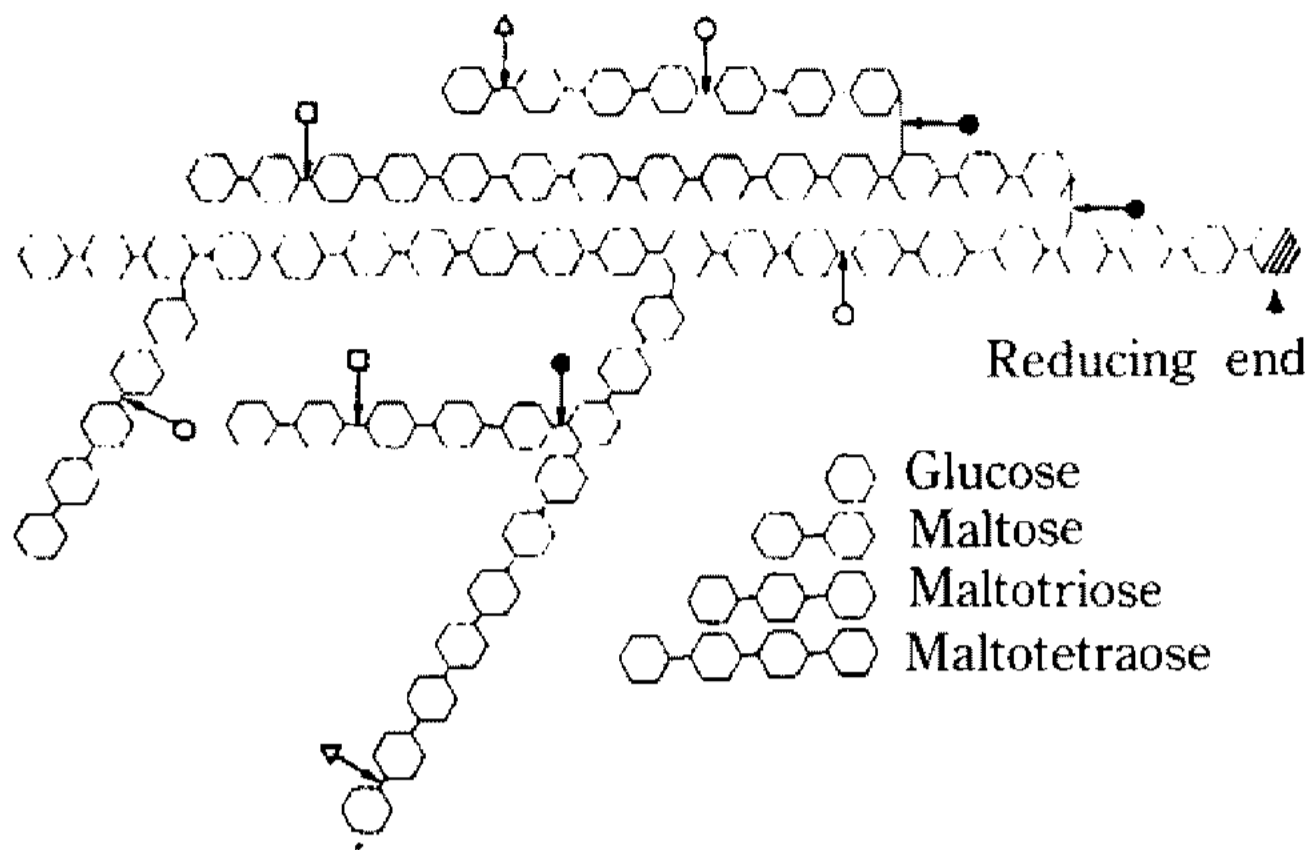


Fig. 1. Mechanism of starch hydrolysis by amylase. Point of enzyme reaction (\leftarrow); \circ ; α -amylase, \square ; β -amylase, \triangle ; Glucoamylase, \bullet ; Isoamylase or pullulanase

coamylase에 의해 느린 속도로 분해되나, 최근에는 glucoamylase와 pullulanase를 함께 작용시켰을 경우 포도당 생산량이 단독으로 사용한 경우보다 증가하며, 포도당 생산량이 최대에 이르는 반응 속도도 단독으로 사용했을 때보다 빠른 시간에 효율적으로 작용함이 보고되었다(8).

정 등(9)은 토양으로부터 질소고정균인 *Klebsiella pneumoniae* NFB-320을 분리하였고, 이 균주를 공여 균주로 하여 pullulanase 유전자를 포함하는 재조합 plasmid DNA를 제조하여 *E. coli*에 도입 검토한 바 있다(10).

본 연구에서는 *Klebsiella pneumoniae* NFB-320이 생산하는 pullulanase를 배양액으로부터 부분 정제하여 당화효소와 함께 전분원료의 당화에 이용함으로써 당화 수율을 높이기 위해 전분원료에 대한 효소들의 작용 조건과, 전분원료의 당화에 관하여 연구를 행하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 배지

본 연구에 사용한 균주와 배지는 Table 1에 나타내었다.

Table 1. Bacterial strain and medium used for the experiment

Strain	Medium		Comments
	Component	Amount (g/l)	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> NFB-320 (for pullulanase production)	Pullulan	10.0	Genetic marker <i>pul</i> ⁺ , <i>nif</i> ⁺ Chung <i>et al.</i> (9)(1985)
	Yeast extract	15.0	
	K ₂ HPO ₄	2.0	
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2	
	pH 5.5		

효소

액화효소로는 내열성 α -amylase인 Termamyl 120L (Novo Industry, Denmark)을 사용하였고, 당화효소로는 glucoamylase인 Glucozyme(Amano Pharmaceutical Co. Japan)을 사용하였다.

Debranching enzyme인 pullulanase는 *Klebsiella pneumoniae* NFB-320을 기본 배지에서 하룻밤 생육시킨 종배양액을 0.5%(v/v)가 되도록 본배양액에 접종하여 30°C에서 20시간 200 rpm으로 회전진탕배양하여 얻은 배양액으로부터 분리하여 사용하였다. X-flo™ Module(Bio-Recovery, Inc. N.J., USA)에 micro-filtration membrane을 장착하여 ibex pump(hastings sussex, England)를 회전속도 8,000 rpm으로 한 후, 15 psi의 back pressure를 가하여 배양액으로부터 균체를 제거하였다. 이 여액에 냉각한 acetone을 2배량 첨가하여 하룻밤 동안 4°C에서 침전시켰다. 이 침전액을 8,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 pullulanase를 얻었다. 실온에서 rotary evaporator를 사용하여 완전 건조시킨 뒤 50 mM sodium-acetate 완충액(pH 6.0)에 용해하여 조효소액으로 사용하였다.

효소의 활성 측정법

본 실험에 사용한 모든 효소의 활성은 Somogyi-Nelson 등(11, 12)의 방법을 이용하여 효소작용에 의해 생성되는 환원당의 양으로 결정하였다.

Pullulanase의 경우에는 pullulan 1% 용액(50 mM sodium-acetate 완충액, pH 6.0) 0.4 ml에 효소액 100 μ l를 첨가하여 40°C에서 30분간 반응시킨 후, alkaline copper reagent 0.4 ml를 첨가하여 100°C에서 20분간 가열하여 효소반응을 정지시켰다. 이 반응액을 찬물로 냉각시키고 0.4 ml의 Nelson's reagent를 가한 뒤 적당량의 증류수를 가하여 희석한 후, 생성된 환원당의 양을 520 nm에서 흡광도를 측정함으로써 정량하였다.

α -Amylase와 glucoamylase의 경우에도 위의 방법에 준하되 기질로써 가용전분을 1%가 되도록 50 mM sodium-acetate 완충액(pH 6.0)에 현탁시킨 후 microwave oven에서 적당시간 가열, 용해시켜 사용하였다.

효소 1 Unit은 주어진 조건에서 분당 1 μ mole의 환원당을 생성하는 효소의 양으로 정의하였다(13).

전분유의 액화

일정량의 가용성 전분을 증류수에 현탁한 후 전분 5 g에 1 KNU에 해당하는 α -amylase를 가하고 90°C oil bath에서 투명해질 때까지 30분~2시간 동안 반응시켜 액화시키고 -20°C에 냉동·보관하여 사용하였다.

당의 정량

당화시 포도당의 농도는 YSI 2365 glucose membrane kit를 사용하여 Industrial analyzer(YSI model 27, Yellow Spring Instrument Co.)로 측정하였으며, 포도당 농도의 표준물질은 YSI 2355(2.0 g 포도당/l)와 YSI 2356(5.0 g 포도당/l)를 사용하였다.

환원당의 농도는 Somogyi-Nelson 등(11, 12)의 방법을 사용하여 적당량 희석한 시료 0.4 ml에 동량의 alkaline-copper reagent를 가하여 10분간 끓는 물에서 가열하였다. 이를 흐르는 물로 냉각하고 Nelson's reagent를 0.4 ml 가한 뒤 적당량의 증류수로 희석하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도는 미리 포도당을 표준물질로 사용한 표준곡선을 이용하여 포도당량에 해당하는 환원당량을 계산하였다.

시료중의 총당의 양은 phenol-sulphuric acid 방법(14)을 사용하여 측정하였다. 적당히 희석된 시료 0.6 ml에 5%(w/v) phenol 0.6 ml를 첨가한 후 즉시 3 ml의 농황산을 첨가하였다. 10분간 방치한 후 고르게 혼합하고 30분 후 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준곡선은 포도당을 사용하여 작성하였다.

당화수율은 총당량에 대해 생성된 환원당량의 비를 %로 나타내었다.

Paper chromatography를 통한 기질의 분해산물의 확인

효소액과 기질 1% 용액을 20 U/ml의 비율로 혼합하여 40°C에서 충분시간 반응시켰다. 반응액에 2배의 methanol을 첨가하고 원심분리하여 분해되지 않은 거대분자를 제거한 후 진공 건조하였다. 농축액을 소량의 증류수에 녹이고 Whatmann chromatography paper(Whatmann 제, 1 Chr)를 사용하여 paper chromatography(P.C.)를 하였다. Paper 상의 반응산물은 n-butanol : pyridine : water(6 : 4 : 3, v/v/v)의 전개 용매를 사용하여 전개시킨 후 paper를 건조하고, spot은 diphenylamine-alanine-phosphoric acid 용액(15)을 분무한 후 100°C에서 10분간 발색시켰다.

결과 및 고찰

본 연구에서 debranching enzyme으로는 *Klebsiella pneumoniae* NFB-320이 생산하는 pullulanase를 배양상등액으로부터 분리하여 냉각 acetone으로 침전시킨 후 침전물을 sodium-acetate buffer(pH 6.0)에 현탁하여 조효소액으로 사용하였다. 당화효소로 사용한 glucoamylase와 pullulanase 조효소액을 단독으로 또는 함께 처리하는데 있어 효소반응에 미치는 pH 및 온도의 영향 등을 검토하였다.

Pullulanase의 활성에 미치는 pH의 영향과 pH 안정성

Pullulanase 조효소액의 반응 최적 pH를 알아보기 위해 50 mM sodium-acetate 완충액(pH 4~6)과 50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{NaOH}$ buffer(pH 6~8)를 사용하여 pullulan 1% 용액을 만든 뒤 효소액을 가하여 40°C에서 10분간 반응시키고 10분간 끓여 반응을 정지시킨 후 효소활성을 측정한 결과, pH 6.0에서 최대활성을 나타내었다(Fig. 2). Pullulanase 생산균으로 *Aerobacter aerogenes*의 경우 pH 6.5(6), *Bacillus acidopullulyticus*의 경우 pH 5.0(16), *Clostridium thermohydrosulfuricum*의 경우 pH 5.5으로 보고되어 있으므로(4), *Klebsiella pneumoniae* NFB-320가 생산한 pullulanase

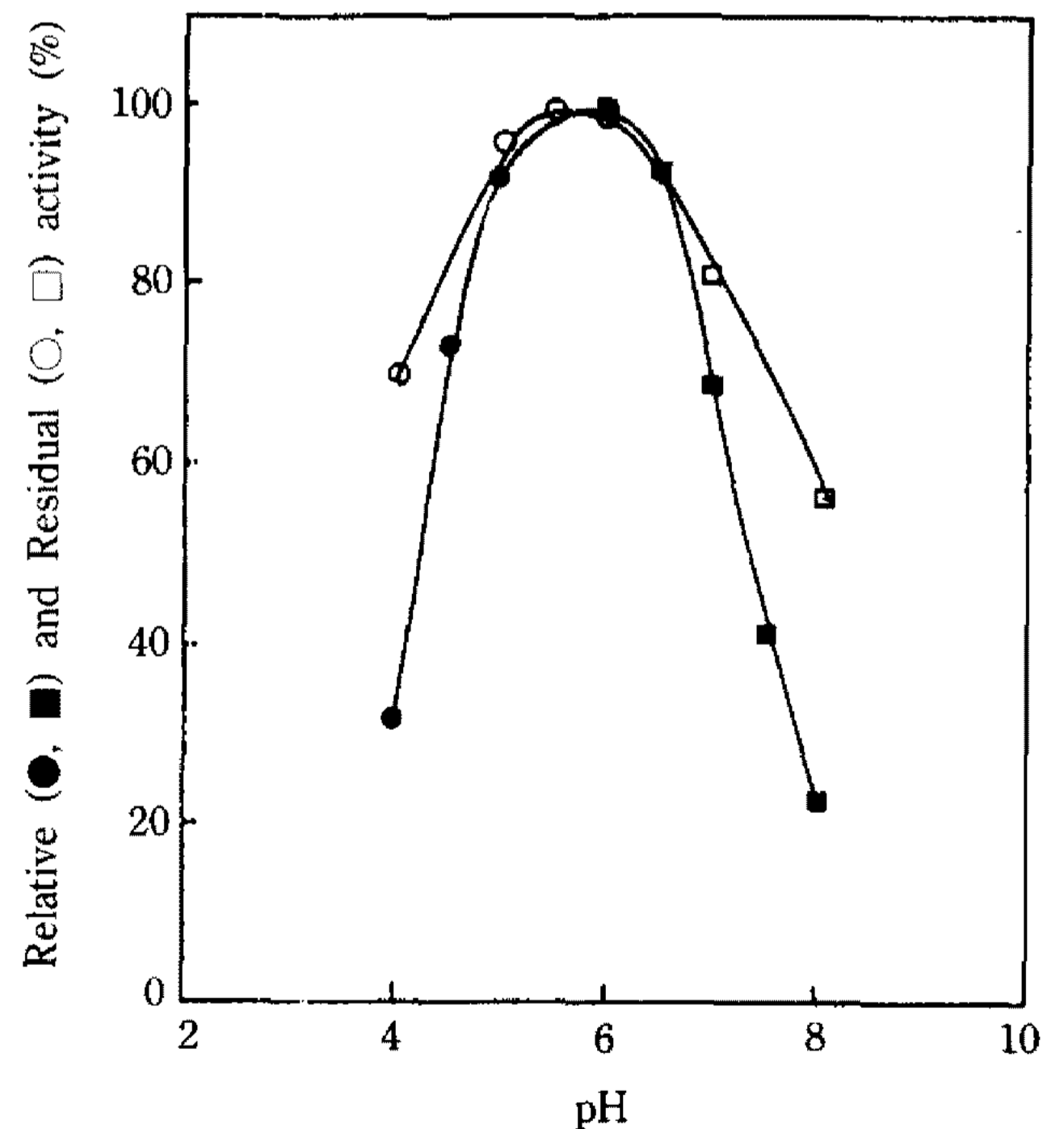


Fig. 2. Effect of pH on the activity (●, ■) and the stability (○, □) of pullulanase. ●, ○; Na-acetate buffer, ■, □; $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{NaOH}$ buffer, Substrate was 1% (w/v) pullulan solution.

조효소액의 효소활성의 최적 pH와는 차이가 있었다.

Pullulanase 조효소액의 pH 안정성을 검토하기 위해 각 pH 별로 조제한 완충액에 조효소액을 가하여 40°C 에서 30분간 방치한 후 효소의 잔존활성을 측정 한 결과, Fig. 2와 같이 pH 5.0~6.5 범위에서 안정 하게 유지되었다. 이는 *Aerobacter aerogenes*의 경우 pH 5.0~11.0(6), *Bacillus acidopullulyticus*의 경우 pH 4.0~9.0의 범위에서(16), *Clostridium thermohydro-sulfuricum*의 경우 pH 3.3~5.0으로 보고(4)되어 있으므로 *Klebsiella pneumonia* NFB-320가 생산한 pullulanase 조효소액의 pH 안정성과는 차이가 있었다.

Pullulanase의 활성에 미치는 온도의 영향과 열 안정성

Pullulanase 조효소액의 활성의 최적 온도를 검토 하기 위해 20~80°C 의 온도 범위에서 반응온도를 10 °C 간격으로 조절하여 효소 활성을 측정한 결과, 60 °C 에서 최대 활성을 보였으며, 65°C 이상의 온도에서 급격히 감소되었다(Fig. 3).

보고된 바에 의하면 pullulanase의 최적온도는 *Aerobacter aerogenes*의 경우 50°C (6), *Bacillus acidopul-lulyticus*의 경우 65°C (16), *Clostridium thermohydro-sulfuricum*의 경우 90°C 로(4), *Klebsiella pneumonia* NFB-320가 생산한 pullulanase 조효소액의 효소활성의 최적온도와는 차이가 있었다.

열 안정성을 조사하기 위해 각 온도에서 30분간 방치한 후 잔존 활성을 측정한 결과, 40°C까지는

100%의 잔존 활성을 유지하였으나, 50°C에서는 80%로 감소하였고, 70°C 이상에서는 17% 이하로 감소하였다. 이는 *Aerobacter aerogenes*의 경우의 열 안정성 경향과 유사하였으나(6) *Bacillus acidopullulyticus*의 경우 55°C 까지(16), *Clostridium thermohydro-sulfuricum*의 경우 90°C 까지 안정성이 유지된다는 보고(4)와는 상이하였다(Fig. 3).

당화효소의 활성에 미치는 pH의 영향과 pH 안정성

본 실험에 사용한 당화효소의 최적 pH를 알아보기 위해 50 mM sodium-acetate 완충액(pH 4.0~6.0)과 50 mM KH₂PO₄·NaOH 완충액(pH 6.0~8.0)에 가용성 전분을 가열 용해시켜 1% 기질 용액을 조제한 뒤, 효소액을 가하여 40°C 에서 10분간 반응시키고 10분간 끓여 반응을 정지시킨 후, 효소 활성을 측정한 결과, pH 6.0에서 최대 활성을 보였다(Fig. 4).

또한 당화효소의 pH 안정성을 검토하기 위하여 각 pH 별로 조제한 완충액에 당화효소액을 가하여 40°C 에서 30분간 방치한 후 효소의 잔존 활성을 측정한 결과, pH 4.0~6.5 범위에서 안정하였다. pH 7.0에서는 72%의 잔존 활성을 나타내었으며 pH 8.0에서는 약 40%의 잔존 활성이 있었다.

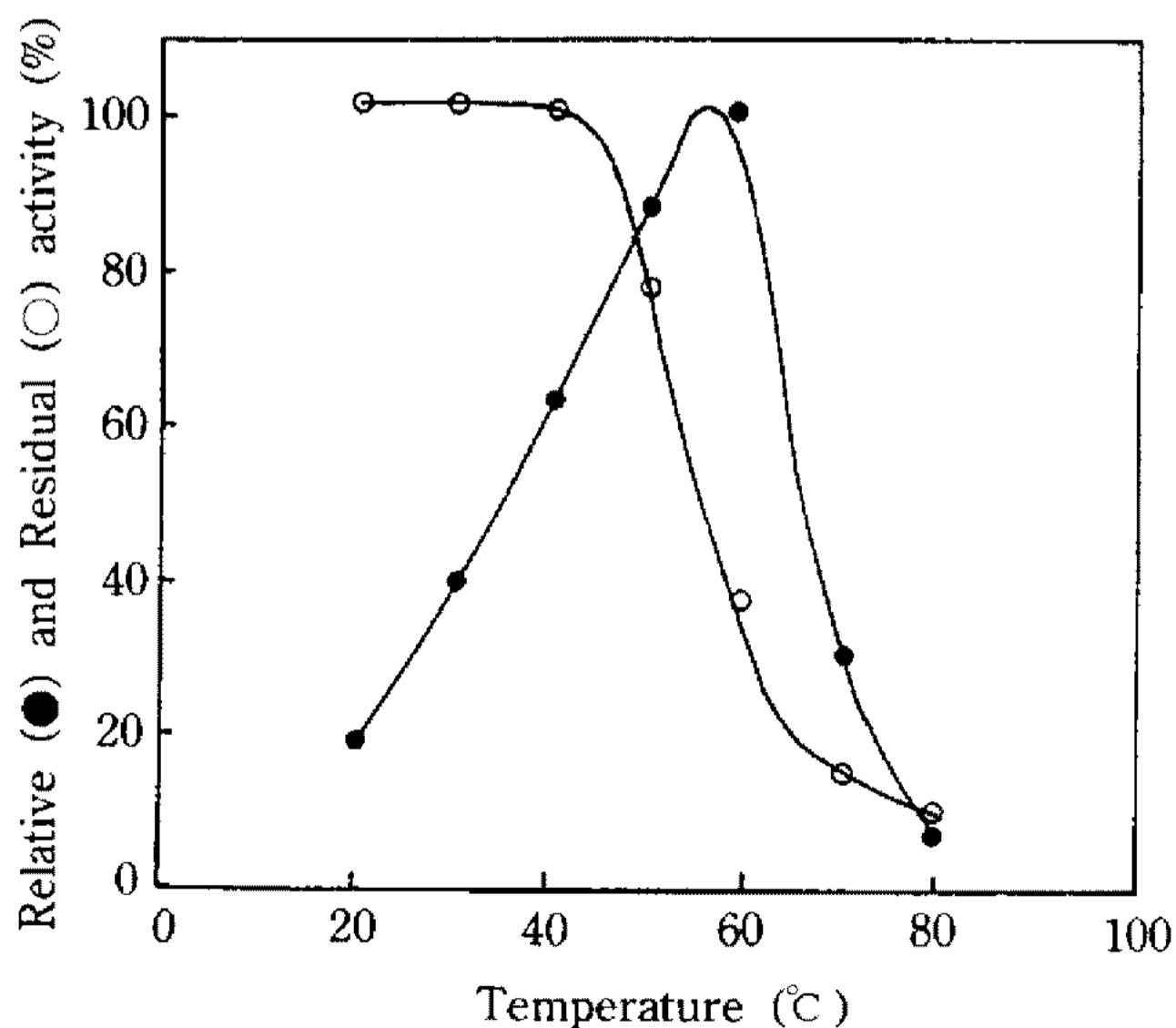


Fig. 3. Effect of temperature on the activity (●) and the stability (○) of pullulanase.

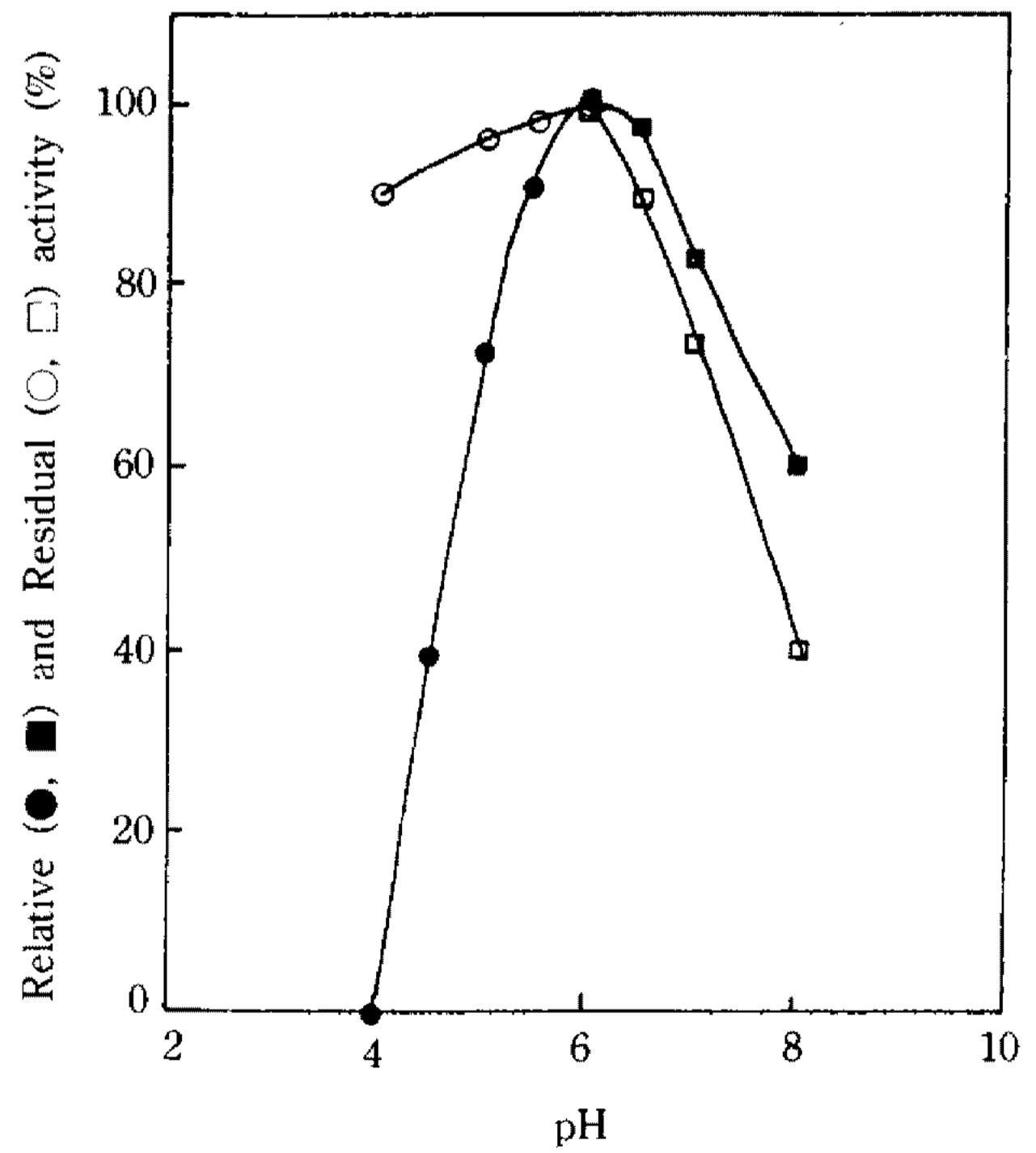


Fig. 4. Effect of pH on the activity (●, ■) and the stability (○, □) of glucoamylase. ●, ○; Na-acetate buffer, ■, □; KH₂PO₄·NaOH buffer, Substrate was 1% (w/v) soluble starch solution.

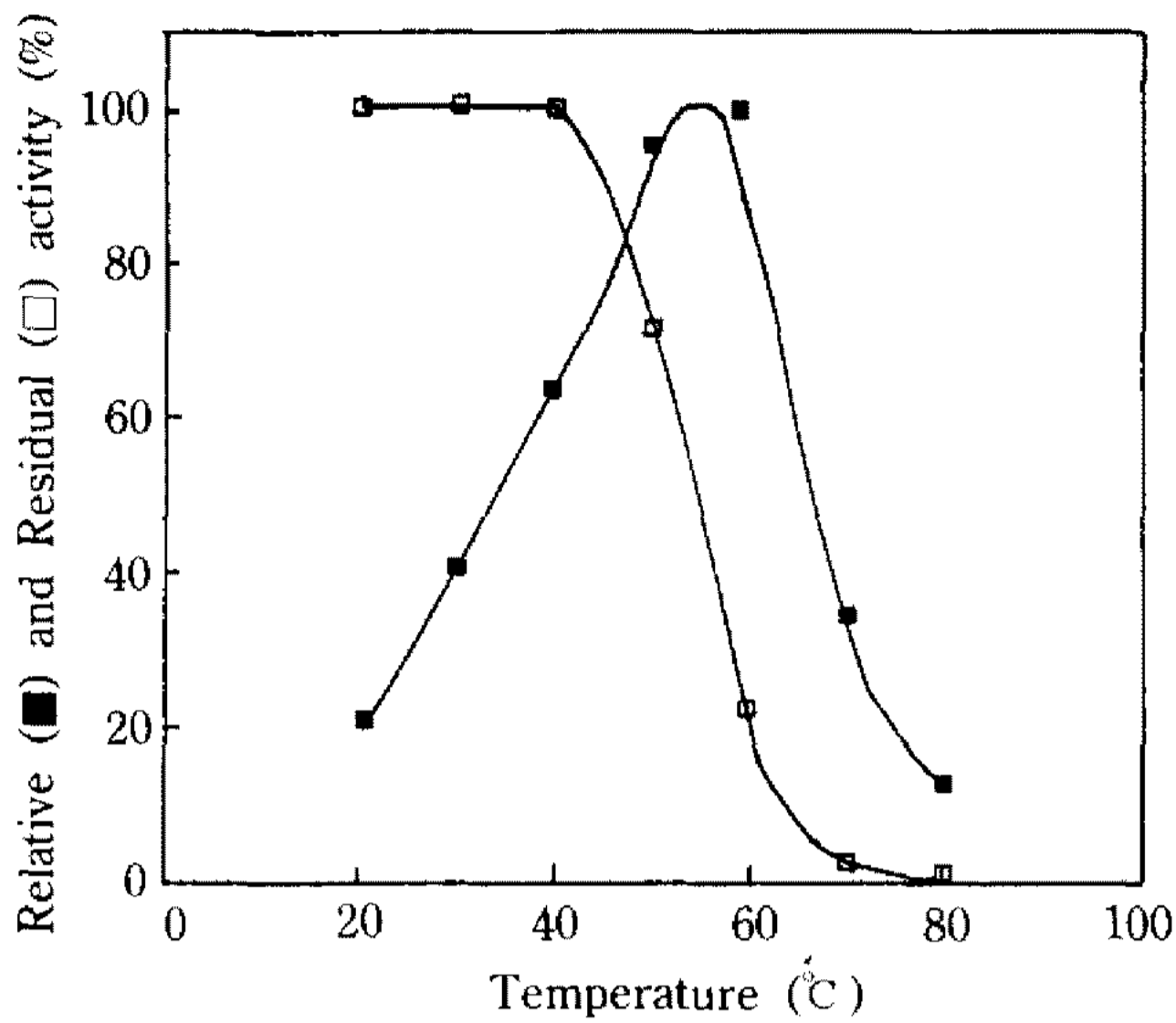


Fig. 5. Effect of temperature on the activity (■) and the stability (□) of glucoamylase.

당화효소의 활성화에 미치는 온도의 영향과 열 안정성

Glucoamylase 활성의 최적 온도를 살펴보기 위하여 가용성 전분을 기질로 20~80°C 범위의 각 온도에서 효소 활성을 측정된 결과, 60°C 에서 가장 높았으며 40°C 에서는 65%의 활성을 보였다(Fig. 5).

Glucoamylase의 열 안정성을 조사하기 위하여 각 온도별로 30분간 처리한 결과, 40°C 까지는 100%의 잔존 활성을 유지하였으나, 50°C 에서는 72%의 잔존 활성을 나타내었으며, 그 이상의 온도에서는 급격히 감소하였다.

효소 혼합액에 미치는 온도의 영향

Debranching enzyme인 pullulanase와 당화효소인 glucoamylase의 혼합 처리에 의한 당화하기에 앞서, 효소 혼합액의 활성화에 미치는 반응 온도의 영향을 pullulan 1%(Fig. 6)와 가용성 전분 1%(Fig. 7)를 기질로 조제하여 검토하였다. Pullulan을 기질로 30분간 반응시킨 경우 50°C 에서 최대 활성을 나타내었으며, 10분간 반응시킨 경우에는 60°C 에서 약간 높은 효소활성을 나타내었는데 반응시간에 따른 상대적인 활성의 차이는 60°C 의 온도에서는 효소 혼합액의 반응 속도가 초기에는 더 빠르지만 앞서의 열 안정성 결과에서 보았듯이 시간의 경과에 따라 불활성화되는 효소의 양이 증가하기 때문이라 생각된다. 가용성 전분 1% 용액을 기질로 사용하여 두 효소 혼합액의 활성화에 미치는 온도의 영향을 검토한 결과 pullulan을 기질로 사용한 경우와 같이 30분간 반응시킨 경우 50°C 에서 최대 활성을 나타내었으나 40°C 에서도 비슷한 정도의

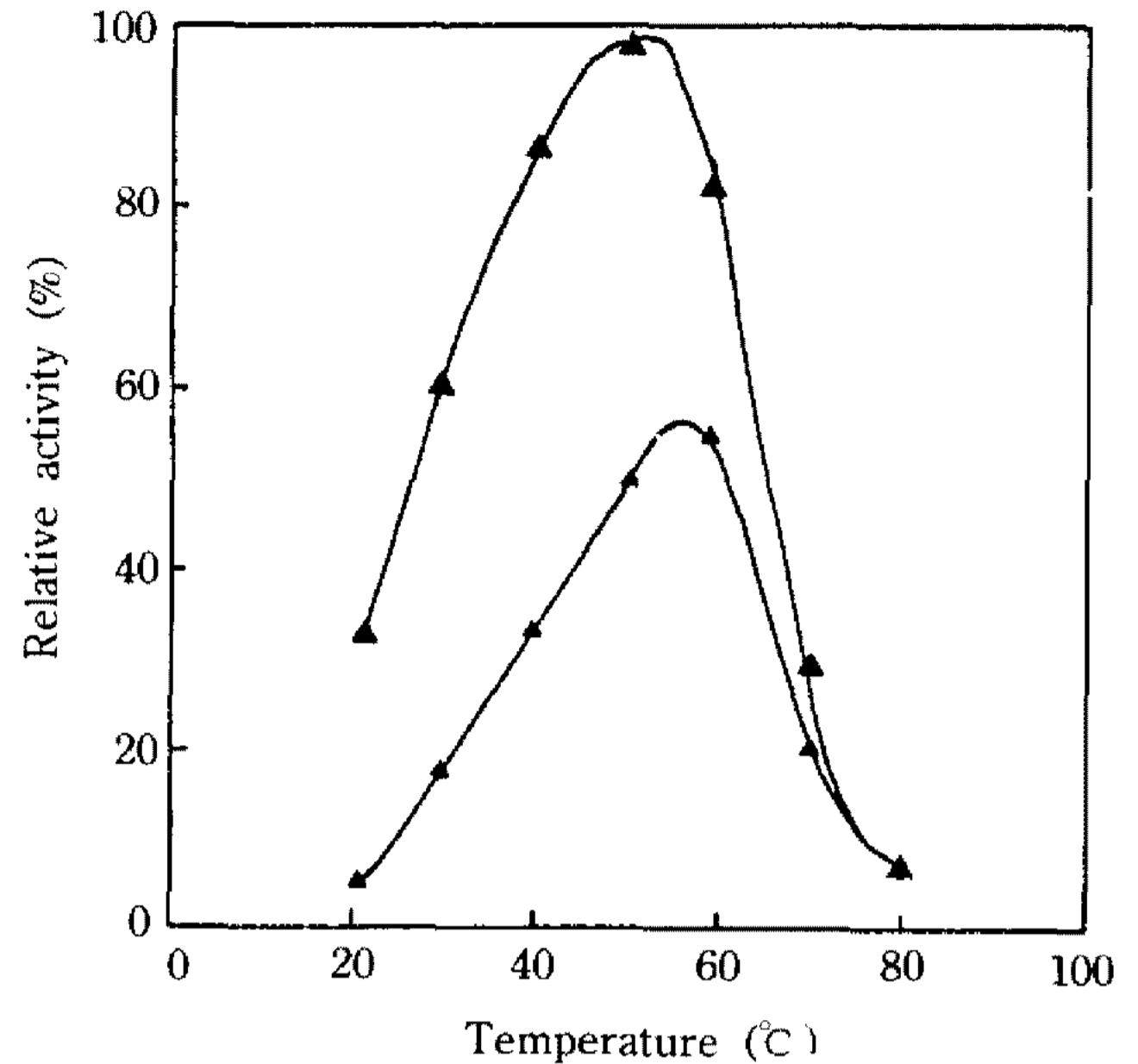


Fig. 6. Effect of temperature on the reaction of pullulanase and glucoamylase mixture on 1% pullulan. Reaction time: ▲; 10 min., △; 30 min.

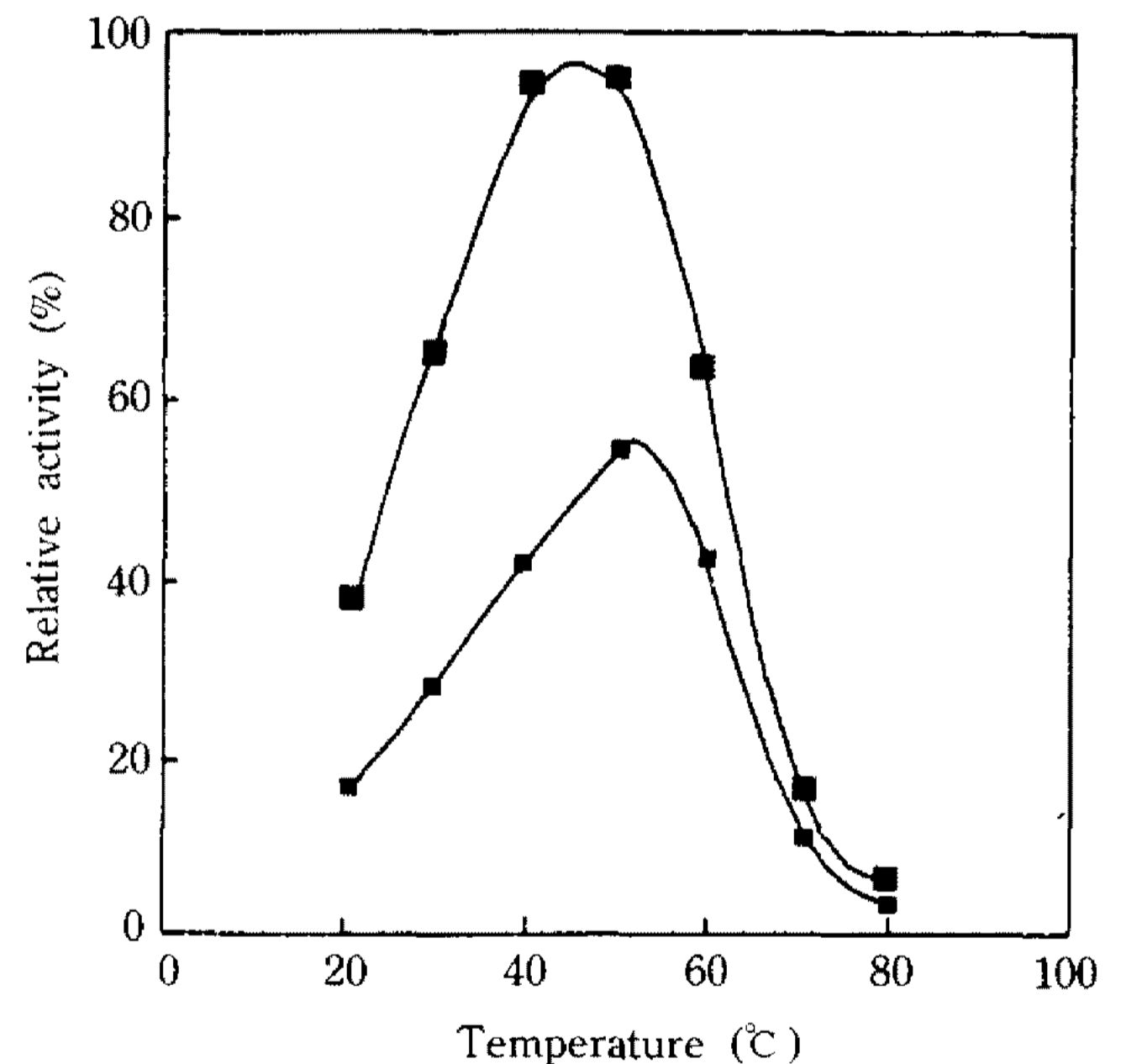


Fig. 7. Effect of temperature on the reaction of pullulanase and glucoamylase mixture on 1% soluble starch. Reaction time: ■; 10 min., □; 30 min.

활성을 나타내었으며, 10분간 반응시킨 경우에는 약 50°C 부근에서 최대활성을 나타내었다.

다당류의 효소적 당화

다당류로부터 효소적 당화를 통하여 얻어지는 환원당량을 조사한 결과를 Table 2에 나타내었다. 미리 α-amylase로 90°C 에서 액화시킨 여러가지 다당류

Table 2. Effect of pullulanase and glucoamylase on the saccharification of polysaccharides

Kind of polysaccharide ¹ 20% (w/v)	Reducing sugar produced by enzyme reaction ² (g/l)		
	Pullulanase ³	Glucoamylase ⁴	Both ⁵
Pullulan	6.2	3.2	110.5
Soluble starch	0.6	114.0	119.7
Corn starch	1.1	111.8	117.2
Flour	0.2	4.5	7.0

¹All the polysaccharides were liquified by α -amylase at 90°C, 1 hour before saccharification. ²Saccharification condition: pH 6.0, 40°C and 24 hours. ³Pullulanase(P): 20 U/ml. ⁴Glucoamylase(G): 20 U/ml. ⁵Both: P (20 U/ml) and G (20 U/ml) were mixed.

20%(w/v) 농도의 기질에 pullulanase(20 U/ml), glucoamylase(20 U/ml), 그리고 두 효소의 혼합액을 각각 가하여 pH 6.0, 40°C 에서 24시간 반응시켜 반응액의 환원당량을 측정하였다.

Pullulan의 경우, pullulanase에 의해서는 6.2 g/l, glucoamylase에 의해서는 3.2 g/l, 두 효소 혼합액에 의해서는 110.5 g/l의 환원당이 생성되었다. 두 효소 혼합에 의해 생성되어진 환원당 수율은 전체 총 당량의 61% 정도가 되었고, pullulanase와 glucoamylase를 따로 반응시킨 경우에 비해 각각 18배, 36배 정도 높았다.

가용성 전분의 경우, pullulanase와 glucoamylase를 각기 처리한 경우에는 0.6 g/l와 114.0 g/l의 환원당이 생성되었으나, 두 효소의 혼합 처리에 의해서는 119.7 g/l로서 glucoamylase로 처리한 경우보다 3.2%의 당화 수율이 증가되었다.

옥수수 전분의 경우, pullulanase와 glucoamylase를 각기 처리한 경우에는 각각 1.1 g/l와 111.8 g/l의 환원당이 생성되었으나, 두 효소의 혼합 처리로 117.2 g/l의 환원당이 생성되었으며 glucoamylase 만을 처리한 경우에 비해 3.0%의 당화 수율이 증가되었다.

당화효소에 의한 반응산물

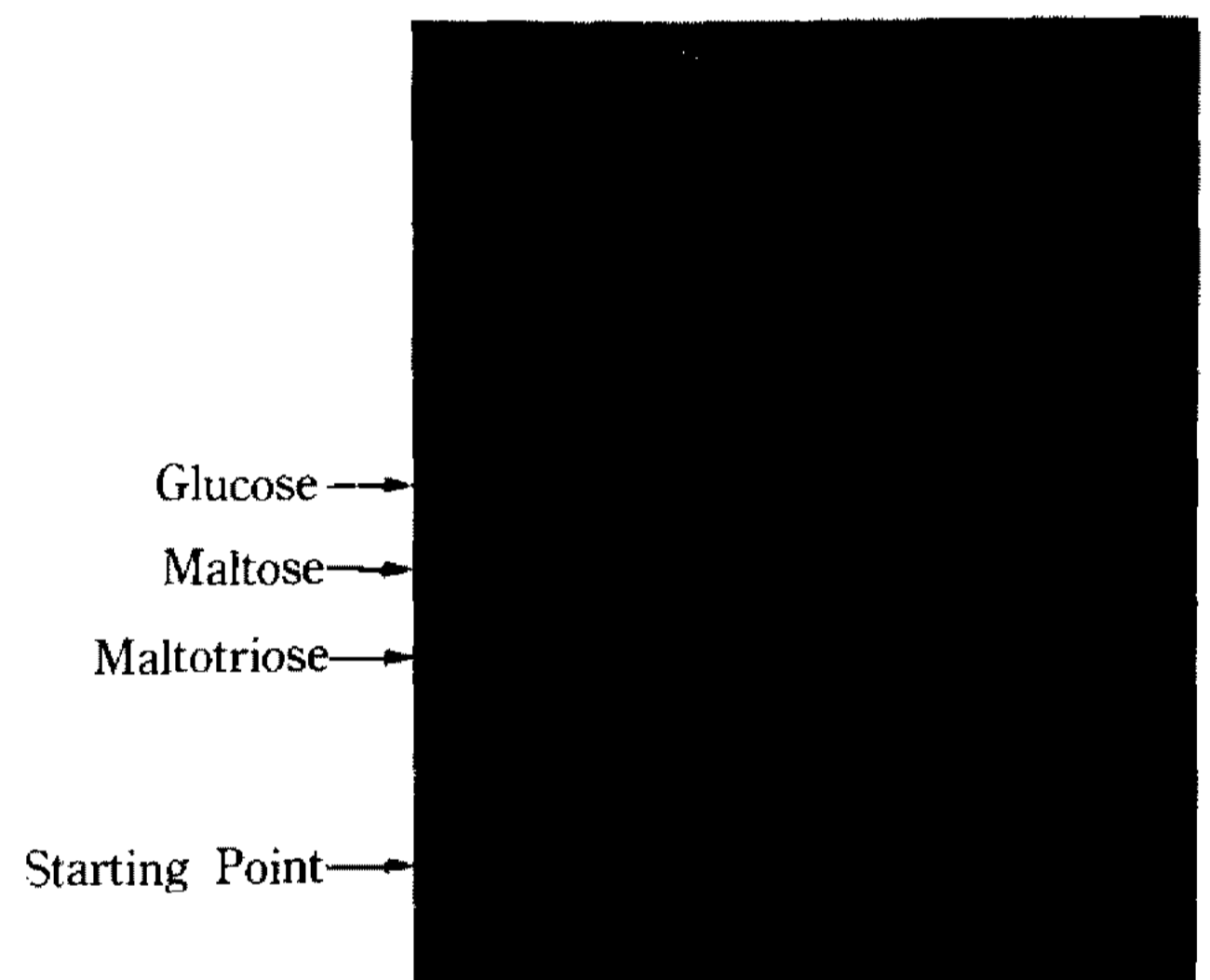
Glucoamylase가 α -(1→4)결합에 작용함에 있어서 효소가 작용할 수 있는 최소 단위를 조사하고자, maltose와 maltotriose 및 여러가지 다당류를 10 g/l 농도의 기질로 조제하고 효소를 20 U/ml의 농도로 첨가하여 pH 6.0, 40°C 에서 1시간 반응시킨 후 10분간 끓여 반응을 정지시키고, 생성된 포도당을 측정하였다 (Table 3).

생성된 포도당 농도와 가수분해도는 maltose의 경

Table 3. Glucose produced from some saccharides by glucoamylase¹

Kind of saccharide 1% (w/v)	Glucose concentration ² (g/l)	Degree of hydrolysis ³ (%)	Relative percentage (%)
Glucose	0.00	0	0.00
Maltose	6.21	69	78.40
Maltotriose	7.92	88	100.00
Pullulan	0.63	7	7.95
Soluble starch	6.21	69	78.40
Corn starch	5.58	62	70.45

¹Glucoamylase: 20 U/ml. ²Analyzed by glucose analyzer. ³Reaction conditions: pH 6.0, 40°C, 1 hour

**Fig. 8. Paper chromatogram of mono, di, and oligosaccharides produced from pullulan by enzymatic saccharification.**

A; standard, glucose, maltose, maltotriose mixture. B; blank, no enzyme. C; pullulanase. D; pullulanase and glucoamylase. E; glucoamylase

우 6.21 g/l, 69%였고 maltotriose의 경우 7.92 g/l, 88%였다. 이로써 실험에 사용한 glucoamylase가 삼당류, 이당류에도 반응하여 α -(1→4) 결합을 분해하는 활성을 가지고 있음을 확인하였다.

Glucoamylase가 pullulan에 작용하여 유리된 포도당 농도는 0.63 g/l로 가수분해도는 7%이었다. Glucoamylase는 α -(1→4) 결합을 쉽게 가수분해하나 α -(1→6) 결합은 쉽게 가수분해하지 못한다고 보고되어 있고(2), pullulan은 maltotriose가 α -(1→6) 결합으로 연결되어 있으므로, pullulan이 glucoamylase에 의해 가수분해된 정도는 가용성 전분의 가수분해도에 비교하여 10%에 불과하였다.

다당류에 효소를 가하여 당화할 때 생성되는 분해

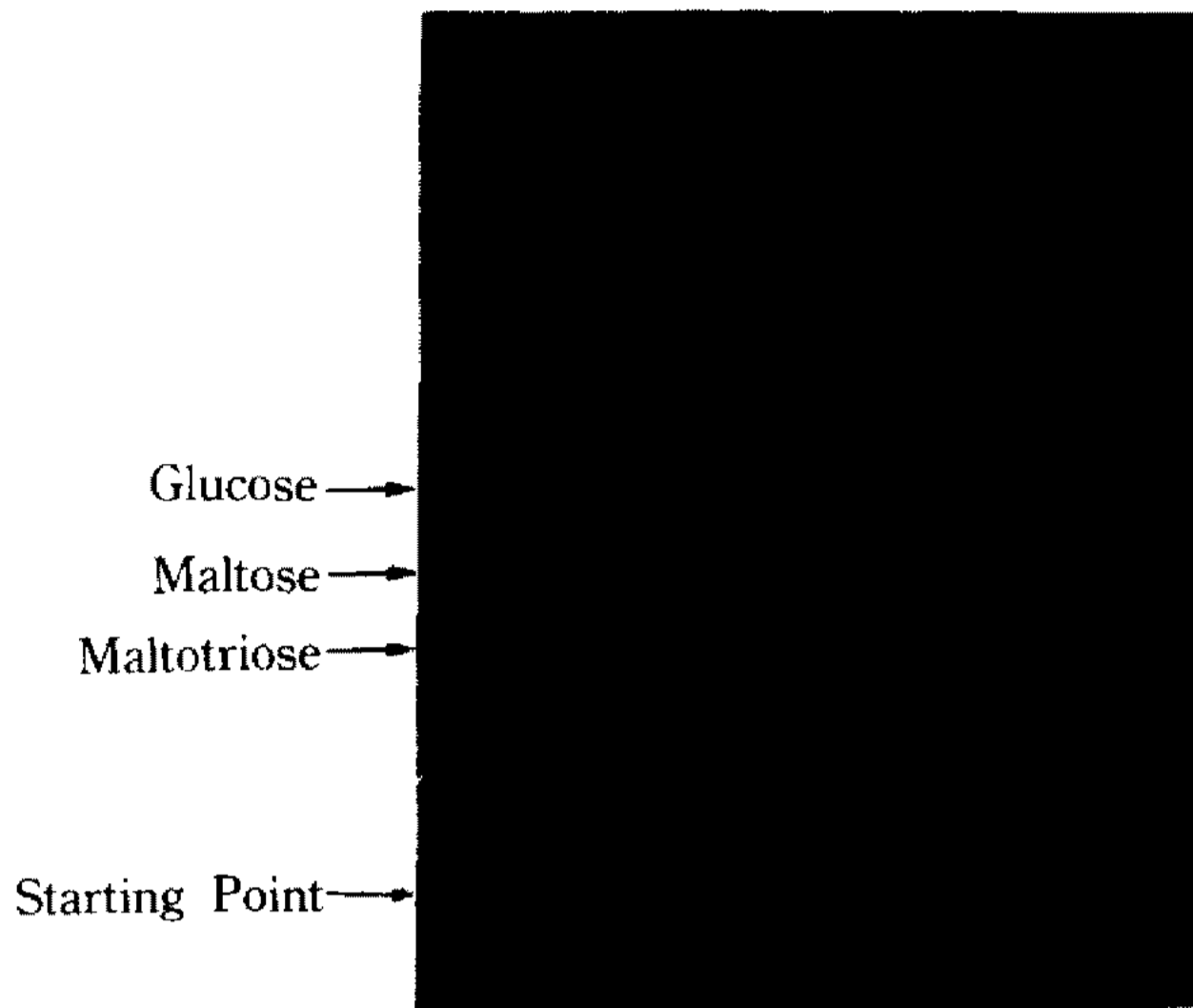


Fig. 9. Paper chromatogram of mono, di, and oligosaccharides produced from soluble starch by enzymatic saccharification.

A; standard, glucose, maltose, maltotriose mixture. B; blank, no enzyme. C; pullulanase. D; pullulanase and glucoamylase. E; glucoamylase

산물의 확인을 위해 pullulan과 가용성 전분에 pullulanase(20 U/ml)와 glucoamylase(20 U/ml) 두 효소의 조성을 달리하여 6시간 반응시킨 후 생성된 반응 산물을 paper chromatography로 확인하였다.

Pullulan에 pullulanase를 처리한 반응물의 경우에는 *Bacillus stearothermophilus*가 생산하는 pullulanase의 경우와 같이(13) maltotriose가 확인되었고, pullulanase와 glucoamylase를 함께 처리한 경우에는 maltotriose와 포도당이 확인되었다. Glucoamylase만을 처리한 경우에는 포도당만이 미약하게 나타나서 glucoamylase만 단독으로 pullulan에 작용할 경우 가수분해도가 낮다는 것을 보여 주었다(Fig. 8).

가용성 전분에 효소를 처리한 반응물의 paper chromatogram에서는 pullulanase 처리에 의한 생성물에는 삼당류나 사당류등의 생성물은 확인되지 않았으며 포도당 또한 나타나지 않았다. 두 효소의 혼합 처리에 의한 반응물(lane D)의 경우 두 효소의 작용에 따라 oligosaccharide가 포도당과 함께 생성되었으며, glucoamylase에 의한 경우에도 포도당이 확인되었다(Fig. 9).

요 약

본 연구실에서 토양으로부터 분리한 질소고정균인 *Klebsiella pneumoniae* NFB-320이 생산하는 효소인 pullulanase를 glucoamylase와 함께 이용한 전분류의 당화에 대하여 연구하였다.

Pullulanase 조효소액의 최적활성 pH와 온도는 각각 pH 6.0, 60°C 이었고, pH 안정성과 열안정성은 pH 5.0~6.5, 40°C 까지 안정하였다. 당화효소인 glucoamylase의 최적활성 pH와 온도는 각각 pH 6.0, 60°C 이었고, pH 안정성과 열안정성은 pH 4.0~6.5, 40°C 까지 안정성이 유지되었다. 가용성 전분의 당화에 pullulanase와 glucoamylase를 함께 이용했을 때 당화효소만을 사용한 경우보다 3.2% 정도 당화 수율이 증가하였고, pullulan의 당화에 두 효소를 함께 사용하므로 pullulanase만을 이용한 경우에 비해 18배의 환원당을 얻었다.

감사의 말

본 연구는 동력자원부 대체에너지 기술개발사업의 연구비 지원에 의하여 수행된 연구(911C201-349FG1)의 일부로 연구비 지원에 감사드립니다. 노보노딕스 코리아에서 Termamyl, AMG, Promozym 등 각종 효소를 지원해 주신데 대해 감사드립니다.

참고문헌

- Godfrey, T. and J. Reichelt. 1983. *Industrial Enzymology: The Application of Enzymes in Industry*, Pp. 375-396. 1st ed. The Nature Press. New York, NY.
- Whelan, W.J. 1971. Enzymic explorations of the structure of starch and glycogen. *Biochem. J.* **122**: 609-622.
- Ishizaki, Y., H. Taniguchi, and M. Nakamura. 1983. Debranching enzymes of potato tubers; I. purification and some properties of potato isomerase. *Agric. Biol. Chem.* **47**: 771-779.
- Saha, B.C., S.P. Mathupala, and J.G. Zeikus. 1988. Purification and characterization of a highly thermostable novel pullulanase from *Clostridium thermohydrosulfuricum*. *Biochem. J.* **252**: 343-348.
- Kuriki, T., J.H. Park, S. Okada, and T. Imanaka. 1988. Purification and characterization of thermostable pullulanase from *Bacillus stearothermophilus* and molecular cloning and expression of the gene in *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 2881-2883.
- Ueda, S. and R. Ohba. 1972. Purification, crystallization and some properties of extracellular pullulanase from *Aerobacter aerogenes*. *Agric. Biol. Chem.* **36**: 2381-2391.
- Michaelis, S., A.P. Pugsley, and M. Schwartz. 1985. Characterization and expression of the structural gene for pullulanase, a maltose-inducible

- ble secreted protein of *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **164**: 633-638.
8. Norman, B.E. 1983. A novel *Bacillus pullulanase*-its properties and application in the glucose syrups industry. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.* **30**: 200-211.
 9. 정건섭, 민태익, 변유량, 유주현. 1985. 벼뿌리 부근에 서식하는 질소 고정미생물에 관한 연구. *산업미생물학회지* **13**: 251-255.
 10. 유주현, 정건섭, 공인수, 이정기. 1987. *Klebsiella pneumoniae* NFB-320의 pullulanase 유전자의 cloning. *산업미생물학회지* **15**: 141-144.
 11. Somogji, M. 1945. A new reagent for the determination of sugars. *J. Biol. Chem.* **160**: 61-68.
 12. Nelson, N. 1944. A photometric adaptation of the somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* **153**: 375-380.
 13. Kuriki, S.O. and T. Imanaka. 1988. New type of pullulanase from *Bacillus stearothermophilus* and molecular cloning and expression of the gene in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **170**: 1554-1559.
 14. Dubois, M., K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers, and F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* **28**: 350-356.
 15. Schwimmer, S. and A. Bevenew. 1956. Reagent for differentiation of 1,4- and 1,6- linked glucosaccharides. *Science* **123**: 543-544.
 16. Kusano, S., N. Nagahata, and Y. Sakano. 1988. Purification and properties of *Bacillus acidopullulyticus* pullulanase. *Agric. Biol. Chem.* **52**: 2293-2298.

(Received June 17, 1994)