

전분흡착에 의한 Cyclodextrin Glucanotransferase 의 회수

†김진현 · 홍승서 · 이현수
공주대학교 화학공학과, ¹(주) 삼양제넥스 생명공학연구소
(접수 : 2000. 9. 21., 게재승인 : 2001. 4. 3.)

Recovery of Cyclodextrin Glucanotransferase by Adsorption to Starch

Jin-Hyun Kim[†], Seung-Suh Hong¹, and Hyun-Soo Lee¹
Department of Chemical Engineering, Kongju National University, Kongju 314-701, Korea,
¹Samyang Genex Biotech Research Institute, Taejeon 305-348, Korea
(Received : 2000. 9. 21., Accepted : 2001. 4. 3.)

Cyclodextrin glucanotransferase (EC 2.4.1.19 : 1,4- α -glucan 4- α -D-(1,4-glucano) transferase, cyclizing; CGTase) was recovered by starch adsorption. The adsorption and desorption of CGTase to starch was studied as a function of pH, temperature, and starch type. The optimal pH, temperature, and starch for adsorption were, 8.0, 4°C, and 1% (w/v) corn starch, respectively, per 205 U/mL enzyme activity in the presence of 25% (w/v) ammonium sulfate. The maximum adsorption ratio was 95%. On the other hand, the optimal pH, temperature, and starch type for desorption were 8.0 (tris-buffer), 50°C, and oxidized starch, respectively. The maximum desorption ratio was 98% by tris-buffer solution at pH 8.0. The efficiency of adsorption and desorption were affected slightly by the removal of cells from the fermentation broth.

Key Words : cyclodextrin glucanotransferase, adsorption, starch, recovery

서론

Cyclodextrin glucanotransferase (EC 2.4.1.19 : 1,4- α -glucan 4- α -D-(1,4-glucano) transferase, cyclizing; CGTase)는 전분을 기질로 하여 cyclodextrin(CD)을 생산하는 intramolecular transglycosylation 반응(cyclization), CD와 다른 당류와의 intermolecular glycosylation 반응(coupling) 및 CD 및 당류의 가수분해 반응 등을 촉매하는 효소로서 *Bacillus circulans*, *B. macerans*, *B. megaterium*, *B. ohbensis*, *B. stearothermophilus*, *B. subtilis*, *Klebsiella oxytoga*, *Micrococcus sp.*, *Thermoanaerobacter sp.* 등의 미생물에 의하여 생산된다(1,2). 이들 미생물에 의하여 생산된 효소는 주생산 CD가 α -CD (포도당 6개의 환상 모양을 이룬 maltodextrin), β -CD (포도당 7개의 환상 모양을 이룬 maltodextrin), γ -CD (포도당 8개의 환상 모양을 이룬 maltodextrin)로 서로 다르며 이것은 각 효소의 독특한 특징이다. *B. macerans*와 *K. oxytoga*는 β -CD 주생산 미생물이며, *B. circulans*와 *B. megaterium*은 β -CD 주생산 미생물이며, *B. subtilis*는 γ -CD 주생산 미생물이다. α -CD 주생산 형태

의 경우 전환율이 낮은 초기에는 α -CD가 60-80% 정도 되거나 반응이 경과할수록 β -CD가 증가되어 산업적 생산조건에서는 α -CD가 40-50% 정도가 된다. γ -CD 주생산의 형태의 경우 전환율 및 효소 역가가 낮은 것이 문제점이다. 전환 CD중 β -CD의 비율이 높을수록 결정 수율이 높아지므로 β -CD 순수결정을 생산하기 위해서는 β -CD 주생산 CGTase의 확보가 필요하다. 또한 미생물을 이용한 CGTase 효소 생산을 위해서는 세포의 효소(extracellular enzyme)인 CGTase를 효율적이고 경제적인 방법으로 분리, 정제하는 것이 매우 중요하다.

전분에 효소를 특이적으로 흡착 시킨 후 탈착하여 효소를 분리/정제하는 방법은 Hale와 Rawlins에 의하여 도입되었으며 *B. macerans*에 의하여 생산된 효소 정제를 위하여 전분흡착 기술을 이용하였다(3). Dalmia와 Nikolov (4)는 glucoamylase의 전분흡착 특성에 대하여 연구하는 등 많은 연구가 수행되었으나(5-12) CGTase정제를 위한 전분흡착 기술에 있어서 온도, pH, 전분의 종류 등과 같은 전분 흡착 및 탈착 조건의 최적화에 관한 체계적인 연구는 아직 미흡한 실정에 있으며 이로 인하여 정제과정에서는 효소 회수율이 매우 낮은 실정이다.

본 연구에서는 전분 흡착 및 탈착 조건을 최적화하여 CGTase의 회수율을 증가시켰다. 이러한 전분흡착에 의한 효소 회수법은 공정이 간단하고 효소에 대한 특이성 때문에 효율적이고 경제적인 기술로 효소의 분리/정제가 가능하다.

†Corresponding Author : Department of Chemical Engineering,
Kongju National University, Kongju 314-701, Korea
Tel : +82-41-850-8642, Fax : +82-41-858-2575
E-mail : jinhyun@knu.kongju.ac.kr

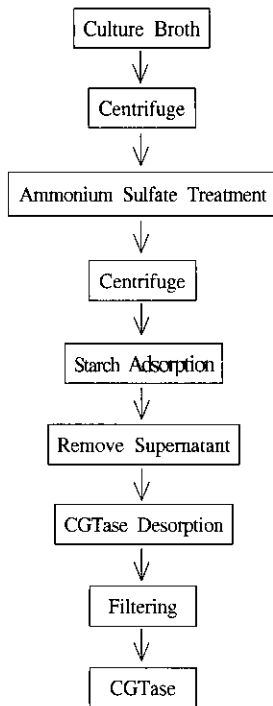


Figure 1. The protocol of starch adsorption and desorption.

재료 및 방법

균 주

100여종의 토양 샘플로부터 CGTase 생산 균주를 페놀프탈레인 및 전분함유 agar plate 상에서의 clear zone 형성능을 비교하여 1차 선별한 후, 삼각 플라스크 배양을 통해 각 분리 균주의 역가를 비교하여 36주를 2차 선별하였다. 2차 선별된 균주를 5 L 발효조에서 배양한 뒤, 효소를 정제하여 효소의 반응특성 (pH, 온도, 내열성, CD 조성 등) 및 발효특성을 조사 하였으며, 이들을 고려하여 산업화 가능성이 있는 *Bacillus sp.* 계통의 균주를 선별하였다. 이들 균주는 β-CD의 생산성이 높고, 발효 역가가 높은 특징이 있다.

배양방법 및 효소생산

5 L 발효조를 이용하여 배지 및 배양 조건 최적화 실험을 수행하여 탄소원, 질소원, 무기염류의 농도별 적정조건을 설정하였다. 최적 조건으로 0.6% soluble starch, 0.6% yeast extract, 0.6% Bacto peptone, 0.16% ammonium chloride, 0.2% potassium phosphate dibasic, 0.01% antifoam B emulsion이 선정되었다. 배양조건 최적화를 위해 배양 pH, 교반 속도, 통기량, 배양온도 조건을 설정하였다. 최적 조건으로 pH 8.0, 30°C, 400 rpm, 1 vvm이었다. 5 L 발효조 최적화 조건을 기초로 30 L 발효조에서 효소생산을 수행하여 전분 흡착 및 탈착 실험에 이용하였다. 효소의 역가는 50°C에서 Kitahata & Okada 방법(13)에 의하여 측정하였으며 실험에 사용된 효소의 역가는 205 U/mL이었다.

전분 흡착 및 탈착 방법

본 연구에서 사용한 전분 흡착 및 탈착 방법은 Figure 1에 나타내었다. 세포배양액으로부터 균체를 제거한 후에 전분과

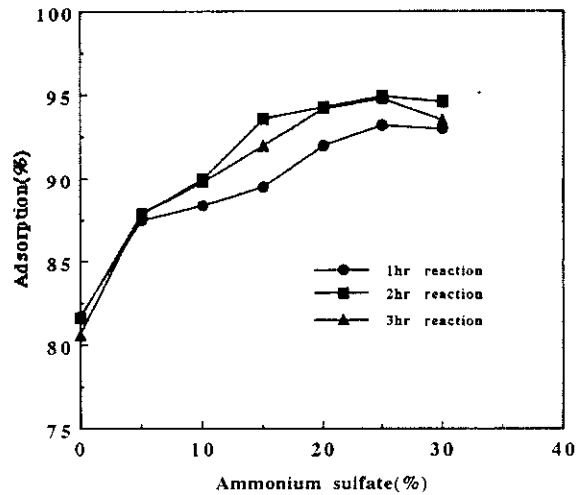


Figure 2. Influence of the reaction time on the CGTase adsorption at 4°C.

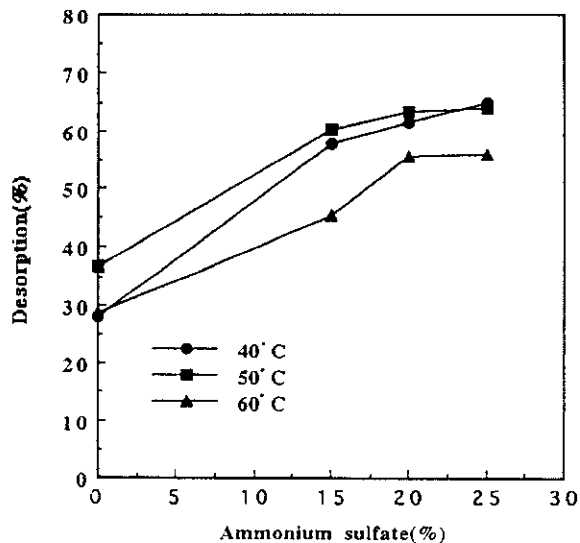


Figure 3. Influence of the temperature on the CGTase desorption (30 min reaction).

의 흡착성을 증가시켜 주기 위하여 ammonium sulfate 처리를 하였다. 여러가지 조건하에서 효소를 흡착시킨 후 탈착하여 효소를 분리/정제 하였다.

결과 및 고찰

Ammonium Sulfate 농도와 반응시간

배양액으로부터 균체를 제거한 후에 전분과의 흡착성을 증가시켜주기 위하여 ammonium sulfate 처리를 하여 주는데, 이때 ammonium sulfate 처리농도와 시간을 조사하여 Figure 2에 나타내었다. Ammonium sulfate 25% (w/v), 반응 2시간 정도면 95% 이상의 효소가 전분 (일반전분 1%, w/v)에 흡착됨을 알 수 있었다. Dalmia와 Nikolov (4)에 의하면 glucoamylase의 전분 흡착공정에서 85% (w/v)의 ammonium sulfate 처리가 효과적인 보고와는 많은 차이를 보였다. 탈착의 경우 Figure 3에서 보는 바와 같이 50°C 에서 30분간 반응시키는

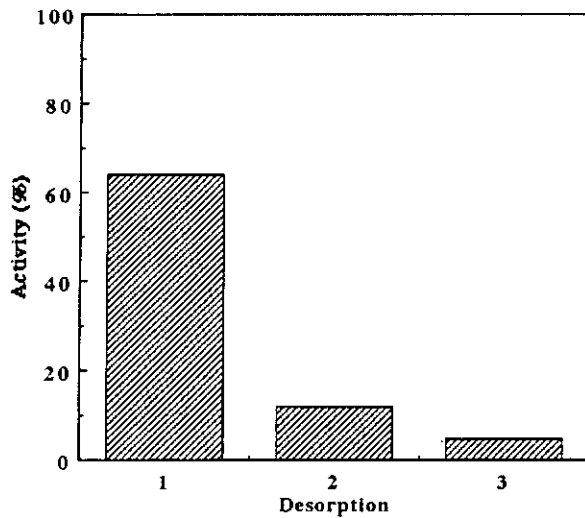


Figure 4. Relation between the number of desorption treatments and recovered activity; 1-3:activity desorbed at each treatment. Activity is expressed as the percentage of the initially applied activity.

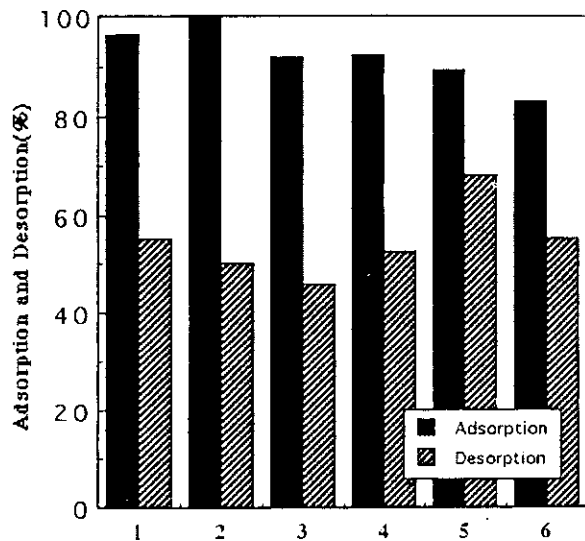


Figure 5. Influence of the various starch on the CGTase adsorption and desorption (Desorption conditions : 50°C, 30 min with distilled water). 1 : Soluble starch, 2 : Corn starch, 3 : Cationic starch, 4 : Acid-treatment starch, 5 : Oxidized starch, 6 : Tapioca starch.

것이 적당하며 증류수로 탈착할 경우 1회 65% 정도의 탈착율을 보였다. 탈착 횟수에 따른 효소의 탈착율(탈착용액 : 증류수)은 Figure 4에서 보는 바와 같이 1회 탈착의 경우 65% 탈착율을 보였으며 2회, 3회에서는 각각 14%, 6% 탈착율을 보여 3회 탈착으로 전체 85%의 효소가 탈착 되었다.

전분종류에 따른 영향

여러종류의 전분(1%, w/v)을 사용하여 효소의 흡착 및 탈착 실험을 수행하여 Figure 5에 나타내었다. 효소 흡착의 경우 일반전분(옥수수 전분)이 흡착율 95% 이상으로 가장 효과적이며 탈착의 경우에는 산화전분이 1회 68%로 가장 효과적 이었다. 이러한 결과는 일반전분을 사용하여 90% 흡착율을 보인 Kobayashi 등(3)의 보고에 비하여 높은 흡착율을 보

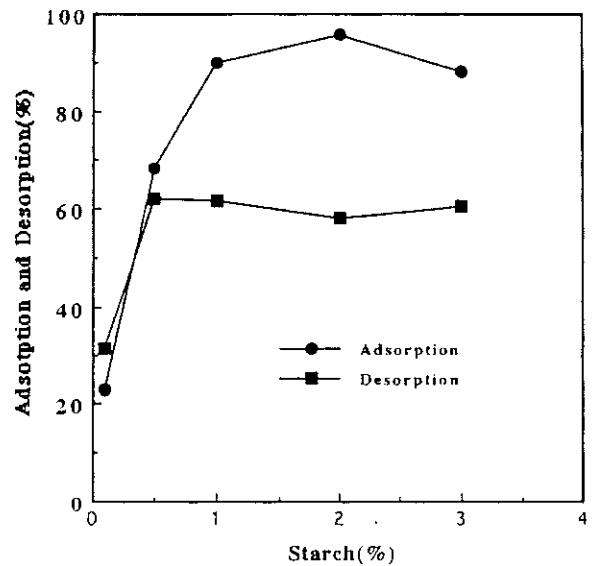


Figure 6. Influence of the starch concentration on the CGTase adsorption and desorption (Desorption conditions : 50°C, 30 min with distilled water).

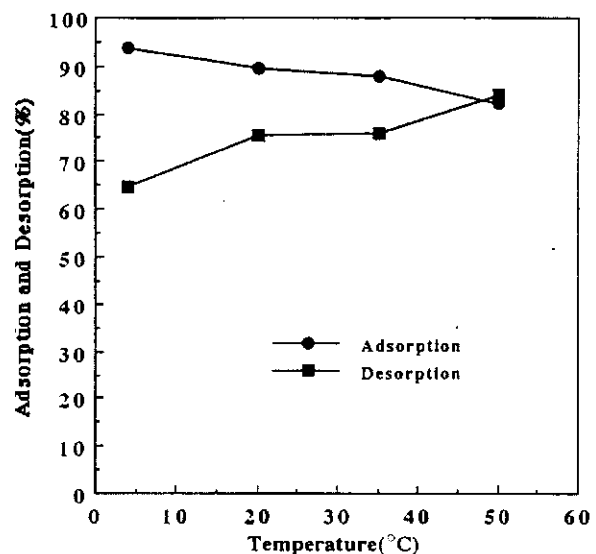


Figure 7. Influence of the temperature on the CGTase adsorption and desorption (Adsorption : 20% ammonium sulfate and 3 h, Desorption : 50°C, 30 min with distilled water).

였다. 또한 효소의 흡착 및 탈착에 사용되는 전분(일반전분)의 농도는 Figure 6에서 보는 바와 같이 효소역가 205 U/mL 기준으로 1% (w/v) 정도면 효소의 흡착 및 탈착에 적당하였다.

온도와 pH 영향

효소의 흡착 및 탈착에 미치는 온도의 영향을 Figure 7에 나타내었다. 효소 흡착의 경우 4°C 정도에서, 탈착의 경우 50°C에서 효과적이었다. 50°C 이상에서는 반응시간 경과에 따른 효소의 deactivation 현상 때문에 효소의 탈착 조건으로 적합하지 못한 것으로 판단된다. 이러한 결과는 Kobayashi 등(3)의 보고와 일치함을 알 수 있었다. 50°C에서 30분 동안

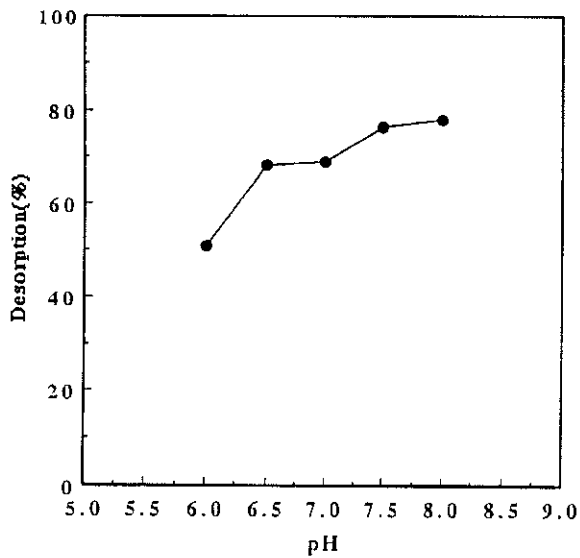


Figure 8. Influence of the pH on the CGTase desorption at 50°C and 30 min reaction with phosphate buffer.

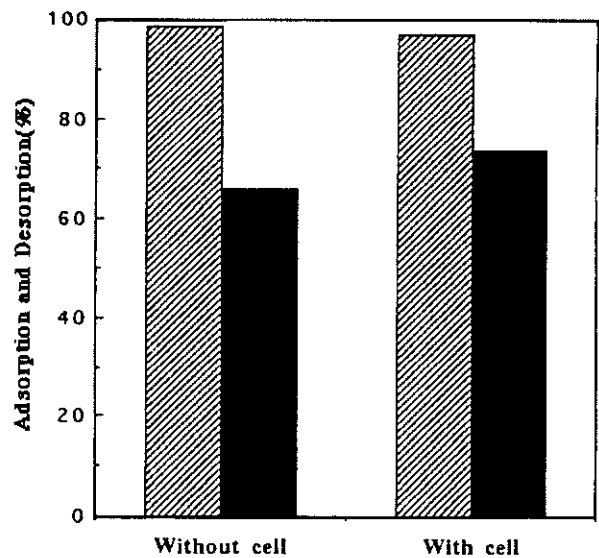


Figure 10. Influence of the cell on the CGTase adsorption and desorption (▨ : Adsorption at 1% starch, 4°C, and 3 h; ■ : Desorption at 50°C, 30 min with pH 8.0 of distilled water).

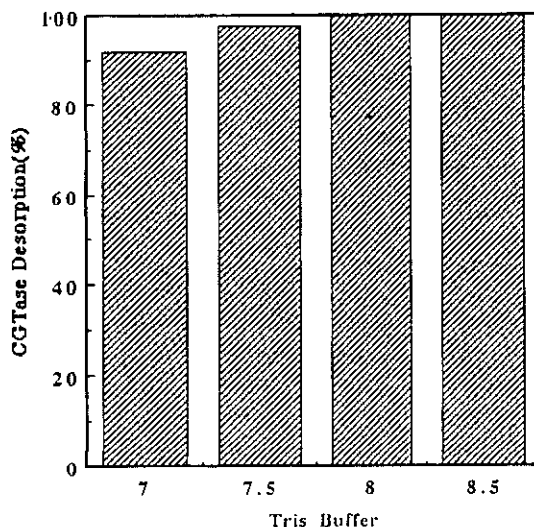
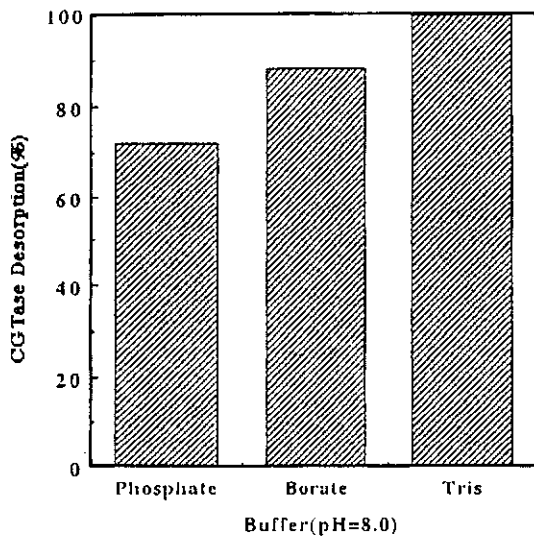


Figure 9. Influence of the various buffer on the CGTase adsorption and desorption at 50°C and 30 min reaction.

반응시켜 효소를 탈착할 경우 탈착에 사용되는 용액의 pH 영향을 Figure 8에 나타내었다. 탈착용액으로 phosphate buffer를 사용하여 용액의 pH를 6.0에서 8.0으로 변화시켜 효소의 탈착 실험을 수행한 결과 pH가 증가함에 따라 효소의 탈착율도 증가하여 pH 8.0 근처에서 탈착을 80%로 최대치를 보였다. 탈착용액의 pH를 8.0으로 하여 여러종류의 buffer에서 탈착 실험을 수행하여 Figure 9에 나타내었다. 탈착용액으로 증류수를 사용하였을 경우 1회 탈착율은 대략 65% 정도 이나 phosphate, borate, tris-buffer (PH=8.0) 사용시 탈착율에 상당히 차이가 있음을 알 수 있었으며 tris-buffer의 경우 대부분의 CGTase가 탈착됨을 알 수 있었다.

균체 존재 유무의 영향

발효배양액으로부터 균체 제거 단계의 유무에 따른 전분과의 흡착 및 탈착을 비교하여 Figure 10에 나타내었다. 발효배양액으로부터 균체의 제거단계의 유무에 관계없이 전분의 흡착 및 탈착은 유사하였다. 따라서 전분 흡착 및 탈착에 의하여 효소를 분리/정제할 경우 발효배양액으로부터 반드시 균체를 제거할 필요는 없으며 다만 균체를 제거할 경우 전분 흡착율은 조금 증가하는 반면 탈착율은 오히려 감소함을 알 수 있었다.

요 약

발효 배양액으로부터 균체를 제거한 후에 전분과의 흡착성을 증가시켜주기 위하여 ammonium sulfate 25% (w/v), 반응 2시간 정도면 95% 이상의 효소가 전분(일반전분 1%, w/v)에 흡착됨을 알 수 있었다. 효소 흡착의 경우 일반전분(옥수수 전분)이 흡착을 95% 이상으로 가장 효과적이며 탈착의 경우 (탈착용액 : 증류수)에는 산화전분이 1회 68%로 가장 효과적이었다. 또한 효소의 흡착 및 탈착에 사용되는 전분의 농도는 효소 역가 205 U/mL 기준으로 1% (w/v) 정도면 효소의

흡착 및 탈착에 적당하였다. 효소 흡착의 경우 4℃ 정도에서, 탈착의 경우 온도 50℃와 pH 8.0에서 효과적이었다. 탈착 용액으로 tris-buffer가 탈착율 98%로 가장 효과적이었다. 또한 발효배양액으로부터 균체의 제거단계의 유무에 관계없이 전분의 흡착율과 탈착율은 유사하였다.

REFERENCES

1. Dalmia, B. K., K. Schutte, and Z. L. Nikolov (1995), Domain E of *Bacillus macerans* Cyclodextrin Glucanotransferase : An Independent Starch-Binding Domain, *Biotech. Bioeng.* **47**, 575-584.
2. Yamamoto, K., Z. Z. Zhang, and S. Kobayashi (2000), Cycloamylose (Cyclodextrin) Glucanotransferase Degrades Intact Granules of Potato Raw Starch, *J. Agri. Food Chem.* **48**, 962-966.
3. Kobayashi, S., K. Kainuma, and S. Suzuki (1978), Purification and Some Properties of *Bacillus macerans* Cycloamylose (Cyclodextrin) Glucano-transferase, *Carbohydr. Res.* **61**, 229-238.
4. Dalmia, B. K. and Z. L. Nikolov (1991), Characterization of Glucoamylase Adsorption to Raw Starch, *Enzyme Microb. Technol.* **13**, 982-990.
5. Kyriacou, A., R. J. Neufeld, and C. R. MacKenzie (1988), Effect of Physical Parameters on the Adsorption Characteristics of Fractionated *Trichoderma reesei* Cellulase Components, *Enzyme Microb. Technol.* **10**, 675-681.
6. Ueda, S. and B. C. Saha (1983), Behaviour of *Endomycopsis fibuligera* Glucoamylase Towards Raw Starch, *Enzyme Microb. Technol.* **5**, 196-198.
7. Takahashi, T., K. Kato, Y. Ikegami, and M. Irie (1985), Different Behavior Towards Raw Starch of Three Forms of Glucoamylase from a *Rhizopus Sp.*, *J. Biochem.* **98**, 663-671.
8. Hayashida, S., K. Nakahara, W. Kanlayakrit, T. Hara, and Y. Teramoto (1989), Characteristics and Function of Raw-Starch-Affinity Site on *Aspergillus awamori* var. *kawachi* Glucoamylase I Molecule, *Agri. Biol. Chem.* **53**, 143-149.
9. Norde, W. and J. Lyklema (1978), The Adsorption of Human Plasma Albumin and Bovine Pancreas Ribonuclease at Negatively Charged Polystyrene Surface, *J. Colloid Interface Sci.* **66**, 257-265.
10. Fang, T. Y., L. L. Lin, and W. H. Hsu (1994), Recovery of Isoamylase from *Pseudomonas amyloclavata* by Adsorption-Elution on Raw Starch, *Enzyme Microb. Technol.* **16**, 247-252.
11. Chen, L., C. Ford, P. Coutinho, and Z. L. Nikolov (1995), Deletion Analysis of the Starch-Binding Domain of *Aspergillus* Glucoamylase-I, *Protein Eng.* **8**, 1049-1055.
12. DePinto, J. A. and L. L. Campbell (1968), Purification and Properties of the Amylase of *Bacillus macerans*, *Biochemistry*, **7**, 114-120.
13. Kitahata, S. and S. Okada (1974), Action of Cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus megaterium* Strain No.5 on Starch, *Agri. Biol. Chem.* **38**, 2413-2417.