

## Water-Activity Depressor가 Pullulanase의 역반응에 의한 Maltosyl- $\beta$ -Cyclodextrin의 합성에 미치는 영향

이용현\* · 한일근

경북대학교 자연과학대학 유전공학과

### Effect of Water-Activity Depressor on the Enzymatic Synthesis of Maltosyl- $\beta$ -Cyclodextrin through the Reverse Reaction of Pullulanase

Lee, Yong-Hyun\* and Il-Keun Han

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

**Abstract** — The effect of various water-activity depressors, such as polyols, sugars, and polymers, on the conversion yields of the enzymatic synthesis of maltosyl- $\beta$ -cyclodextrin from  $\beta$ -cyclodextrin and maltose through reverse reaction of pullulanase was investigated. PEG 6000 of concentration of 10% (w/w) was found to be the most acceptable water-activity depressor resulting for increment of conversion yield from 43.0% to 55.9%, corresponding maltosyl- $\beta$ -cyclodextrin concentration of 3.02 g/100 ml H<sub>2</sub>O. Water activity was changed from initial 0.966 to 0.914 upon addition of 20% (w/w) of PEG 6000. The conversion yields were inversely proportional to the water activities, and the increased conversion yield was caused by water activity depression which inhibited the hydrolysis reaction of maltosyl- $\beta$ -CD to maltose and  $\beta$ -cyclodextrin. The changes of enthalpy ( $\Delta H^\circ$ ), entropy ( $\Delta S^\circ$ ), and Gibbs free energy ( $\Delta G^\circ$ ) were calculated to be 36.788 kJ/mole, 0.067 kJ/mole K, and 14.433 kJ/mole, respectively. The synthesis of maltosyl- $\beta$ -CD could be increased substantially by the intermittent feeding of  $\beta$ -cyclodextrin. PEG 6000 could be separated effectively from reaction mixture using ultrafiltration membrane for reutilization.

Maltosyl- $\beta$ -cyclodextrin(G<sub>2</sub>- $\beta$ -CD)는  $\beta$ -cyclodextrin(CD)의 glycosyl residue(s)의 C-6 position에 maltose가  $\alpha$ -1,6 glycoside bond로 결합된 분자 환상결합체로서 pullulanase(EC 3.2.1.68 ; glycogen-6-glucano-hydrolase)나 iso-amylase의 역반응(중합반응)을 이용하여  $\beta$ -CD와 maltose로부터 합성된다(1-3).

G<sub>2</sub>- $\beta$ -CD는  $\beta$ -CD에 비해 물에 대한 용해도가 90배 이상 크며, 물과 유기용매의 혼합용매(50 : 50)에 대한 용해도도 100배 이상 증가된다. 또한 유기용매에 대한 용해도도 15배 이상 증가된다. 뿐만 아니라 G<sub>2</sub>- $\beta$ -CD는 포집능과 포집안정성이  $\beta$ -CD보다 향상되고, 물성의 개선과 기능성이 증대되어 의약, 농약, 식품,

그리고 화장품 등에 응용시 그 범위를 확대시킬 수 있다(4-6). 위와 같은 각종 branched-CD의 합성법에 대해서는 전보(7)에서 기술한 바 있다.

가수분해 효소의 hydrolysis reaction 활성화는 water activity(A<sub>w</sub>)가 높을수록 일반적으로 증가한다. 따라서 가수분해효소의 역반응을 이용한 축합반응(condensation reaction)의 경우는 효소안정성에 영향을 주지 않는 범위내에서 유기용매 및 고분자물질과 같은 A<sub>w</sub>-depressor를 첨가하여 줌으로써, 효소반응제내의 물분자의 작용을 억제(preferential dehydration)시키고, 효소의 기질친화성에 변화를 주어, 이로 인해 반응축합 환경의 변화가 수반되도록 함으로써 효소에 의한 축합반응 수율을 증가시킬 수 있다(8). 이와 같은 water activity를 감소시킬 수 있는 A<sub>w</sub>-depressor로는 polyols, sugars, 그리고 salts 등이 알려져 있다(9).

**Key words:** Maltosyl- $\beta$ -cyclodextrin, water-activity depressor, reverse reaction of pullulanase

\*Corresponding author

본 연구실에서는 cyclodextrin glucanotransferase (CGTase) 고생산성 alkalophilic 생산균주의 screening과 변이주를 이용한 효소생산(10), CGTase의 고정화와 고정화 효소반응기의 특성 및 조작조건(11-13), 분쇄마찰효소 반응계를 이용한 생전분에서 직접 CD를 생산하는 공정(14), 그리고 압출전분에서 직접 CD를 합성하는 공정에 관한 연구(15)를 수행한 바 있다. 특히 전보(7)에서는 *Bacillus* sp. 유래의 pullulanase의 역반응을 통한 축합반응을 이용하여  $G_2\text{-}\beta\text{-CD}$ 를 합성하는 연구결과를 발표한 바 있다(7).

여기서는  $G_2\text{-}\beta\text{-CD}$ 의 효소축합반응의 합성수율을 증대시키기 위하여 glycol, dextran, 그리고 sugar류와 같은 각종 Aw-depressor의 영향을 검토하였으며, 이의 작용양상을 규명하였고, water activity와  $G_2\text{-}\beta\text{-CD}$ 의 수율과의 상관관계도 검토하였다. 또한 온도가 condensation reaction의 equilibrium constant에 미치는 영향을 검토하여 각종 thermodynamic constant를 평가하였다. 또한  $\beta\text{-CD}$ 의 intermittent feeding에 의한  $G_2\text{-}\beta\text{-CD}$ 의 생성량 증대와 ultrafiltration membrane을 활용한 Aw-depressor의 재사용을 위한 연구를 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 사용효소 및 효소활성 측정

사용효소는 *Bacillus* sp.가 생산하는 산업용 pullulanase(Promozyme 200 L; Novo Co.)였다. 효소의 역가는 1.0%(w/v) pullulan 용액(20 mM maleic acid-Tris-NaOH buffer; pH 6.0) 5.0 ml에 pullulanase 0.1 ml를 첨가하여 50°C에서 10분간 반응시킨 후 생성된 maltotriose의 양을 HPLC로 정량하여, 분당 1  $\mu\text{mole}$ 의 maltotriose equivalent를 생성시키는 효소의 양을 1 unit로 하였다. 사용효소의 specific activity는 4.4 units/mg, 최적 pH는 4.9, 최적온도는 60°C, 그리고 pH와 온도안정성은 각각 4.3~7.0과 60°C까지였다.

### 기질 및 maltosyl- $\beta\text{-cyclodextrin}$ 의 표준물질

기질인  $\beta\text{-CD}$ 와 maltose( $G_2$ )는 Sigma Co.의 것을 사용하였으며,  $G_2\text{-}\beta\text{-CD}$  표준물질은 Ensuiko Sugar Refining Co.(Japan)의 것을 사용하였다.

### Maltosyl- $\beta\text{-cyclodextrin}$ 의 효소적 합성

Maltose와  $\beta\text{-CD}$ 의 비율이 12.7이 되도록 혼합한

기질 70 g을 50 mM sodium-acetate buffer(pH 4.9) 100 ml에 현탁하고 pullulanase 350 units를 첨가하여 60°C에서 반응시켰다. 경우에 따라 상반응조건을 변화시켰다.

### Water activity-depressor 존재하에서의 maltosyl- $\beta\text{-cyclodextrin}$ 합성

Aw-depressor인 각종 분자량의 PEGs, dextran, sucrose, fructose, sorbitol, 그리고 glycerol 등을 5~40%(w/w)의 농도로 효소반응액에 첨가하여 100 rpm에서 24시간 반응시켜 각 물질이  $G_2\text{-}\beta\text{-CD}$  합성에 미치는 영향을 검토하였다.

### Water activity-depressor 존재하에서의 pullulan의 hydrolysis reaction

Pullulanase 350 units를 1.0%(w/v) pullulan 용액(citrate-NaOH buffer, pH 4.9) 100 ml에 첨가하여 60°C, 100 rpm에서 10분간 반응시켰다. 이 때 각종 분자량의 PEG를 5~40%(w/w)의 농도로 첨가하였고, 생성된 maltotriose량을 측정하여 Aw-depressor가 pullulanase의 가수분해에 미치는 영향을 검토하였다.

### Water activity의 측정

Water activity(Aw)는 효소반응액에 Aw-depressor인 PEG 6000을 0~20%(w/w) 농도로 첨가한 후 25°C에서 Hygrometer(HI 8064, Hanna)를 이용하여 측정하였다. 또한 이론적인 water activity 값은 Raoult의 법칙에 의하여 계산하였다(16).

### Maltosyl- $\beta\text{-cyclodextrin}$ 의 분석

각종 maltosyl- $\beta\text{-cyclodextrin}$ 과 maltotriose의 정량은 HPLC(Gilson)로 행하였고, column은  $\mu\text{-Bondapak-NH}_2$  column(Waters Co.), 용출용매는 acetonitrile과  $\text{H}_2\text{O}$ (65:35)의 혼합용액, 용출속도는 1.0 ml/min이었고, RI detector로 검정하였다.

### 반응온도에 따른 평형상수의 평가와 Gibbs free energy의 변화값( $\Delta G$ )의 계산

반응평형상수는 온도 20~70°C 범위내에서 24시간 효소반응시킨 equilibrium 상태에서 생성된  $G_2\text{-}\beta\text{-CD}$ 를 측정하여 구하였다.  $\Delta S^\circ$ ,  $\Delta H^\circ$ , 그리고  $\Delta G^\circ$ 값은 위에서 구한 평형상수를 van't Hoff's equation에 대입하여 25°C에서 구하였다(17).

### Ultrafiltration membrane을 응용한 polyethylene glycol의 분리회수

반응액을 3 K dalton membrane을 이용하여 PEG 6000과 G<sub>2</sub>-β-CD를 분리한 후 농축액과 여과액에 존재하는 PEG 6000은 Larsson법(18)으로, G<sub>2</sub>-β-CD의 농도는 HPLC로 정량하였다.

## 결과 및 고찰

### Maltosyl-β-cyclodextrin의 효소합성에 미치는 각종 water activity-depressors의 영향

Pullulanase의 역반응을 이용한 G<sub>2</sub>-β-CD의 축합반응은 반응후기에 그 합성속도가 급격히 감소되는데 (7), 이는 생성된 G<sub>2</sub>-β-CD가 다시 β-CD와 maltose로 분해되는 pullulanase의 정반응인 hydrolysis reaction이 활발히 일어나 평형상태가 성립되기 때문이다. 따라서 전환수율을 향상시키기 위해서는 water activity에 영향을 주는 각종 Aw-depressor를 첨가하여 효소의 촉매환경에 변화를 줌으로서 물분자의 접근 빈도를 감소시켜 hydrolysis reaction을 억제함이 요구된다.

Table 1은 G<sub>2</sub>-β-CD의 전환수율을 증가시킬 수 있는 적절한 Aw-depressor를 선별하기 위하여 dextran, sucrose, fructose, sorbitol, glycerol, 그리고 PEG 6000을 반응초기에 5~40%(w/v) 농도로 첨가한 후 24시간 반응후의 G<sub>2</sub>-β-CD 생성량을 나타낸 것이다.

Aw-depressor를 첨가하지 않을 경우 G<sub>2</sub>-β-CD 생성량은 2.31 g/100 ml H<sub>2</sub>O였다. 당류인 sucrose와 fructose를 5~30%(w/v) 농도로 첨가할 때의 생성량은 2.5 g/100 ml H<sub>2</sub>O로서 약간 증가하였다. 또한 dextran, sorbitol, 그리고 glycerol을 첨가할 경우도

5~20%(w/w) 범위내에서 약간 증가하였으나, 높은 농도에서는 오히려 감소하였다. 반면 PEG 6000을 5~30%(w/w) 농도로 첨가할 경우에는 G<sub>2</sub>-β-CD 생성량과 전환율이 각각 3.0 g/100 ml H<sub>2</sub>O와 53.5%(w/w)로서 약 1.3배 정도 증가하였으며, 사용 Aw-depressor 중 가장 효과적임을 알 수 있었다.

### Maltosyl-β-cyclodextrin 합성에 미치는 PEG의 분자량과 첨가농도의 영향

적절한 분자량의 PEG를 선별코져 분자량이 각각 500, 1500, 4000, 6000, 그리고 10000인 PEG를 반응초기에 5~40%(w/w)의 농도로 첨가하여 24시간 효소반응시킨 후 생성되는 G<sub>2</sub>-β-CD 생성량을 측정된 결과는 Table 2와 같다. 저분자량인 경우 소량 첨가시에는 생성량이 약간 증가한 반면, 20%(w/w) 이상 첨가시에는 오히려 감소하였는데, 이는 저분자의 PEG는 물분자의 포집량이 적어 dehydration 효과가 충분하지 못할 뿐만 아니라 분자의 크기가 작아 pul-

**Table 2. Effect of molecular weight and concentration of PEGs on the condensation reaction of pullulanase for maltosyl-β-CD synthesis**

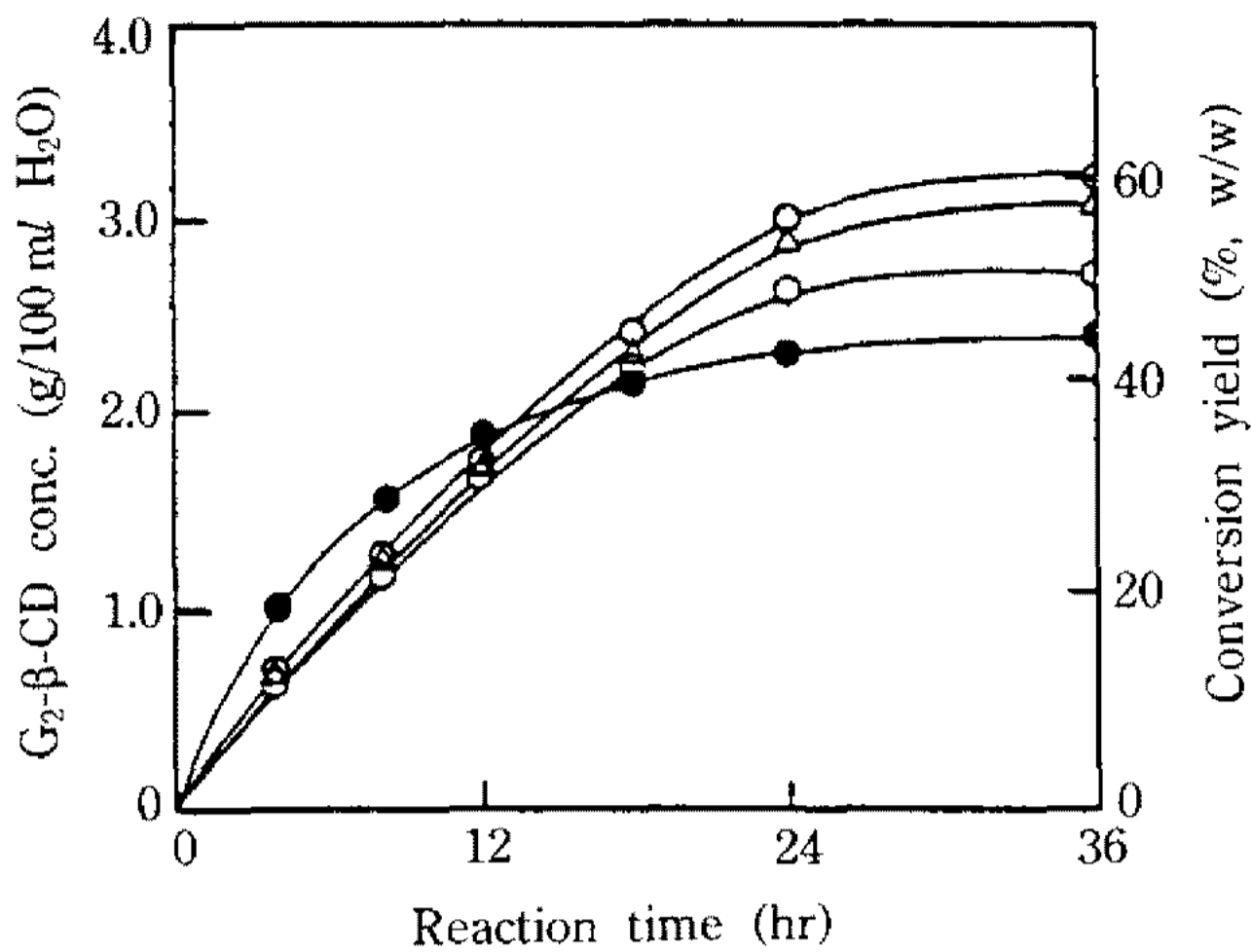
PEG concentration % (w/w)	Amount of maltosyl-β-CD g/100 ml H <sub>2</sub> O				
	500	1500	4000	6000	10000
0	2.3*	2.3	2.3	2.3	2.3
5	2.5	2.5	2.5	2.8	2.8
10	2.3	2.5	2.8	3.0	3.0
20	2.1	2.1	2.8	3.0	3.0
30	1.8	2.1	2.5	3.0	2.8
40	1.8	2.1	2.3	2.8	2.8

Maltose/β-CD=12.7, mixed substrate 70% (w/w), 350 units pullulanase/100 ml, pH 4.9, 60°C, after 24h.

**Table 1. Effect of various water activity depressor on the condensation reaction of pullulanase for maltosyl-β-cyclodextrin synthesis**

Aw-depressor concentration % (w/w)	Amount of maltosyl-β-cyclodextrin g/100 ml H <sub>2</sub> O					
	Dextran	Sucrose	Fructose	Sorbitol	Glycerol	PEG 6000
0	2.3	2.3	2.3	2.3	2.3	2.3
5	2.5	2.3	2.5	2.5	2.5	3.0
10	2.5	2.5	2.5	2.3	2.3	3.0
20	2.3	2.3	2.5	2.3	2.3	3.0
30	2.3	2.3	2.3	2.3	2.3	3.0
40	2.1	2.3	1.0	2.1	1.8	2.8

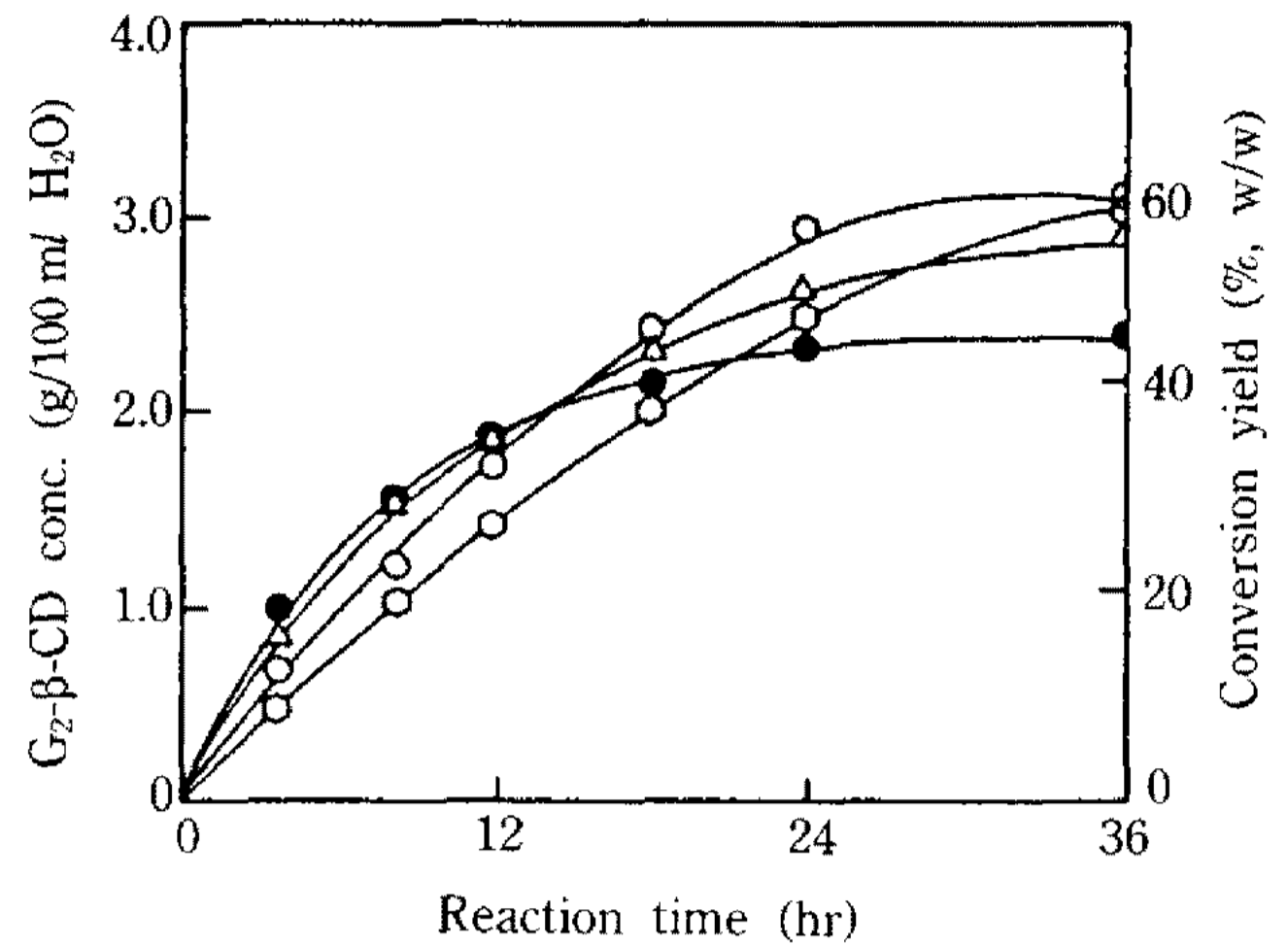
Maltose/β-CD=12.7, mixed substrate 70% (w/w), 350 units pullulanase/100 ml, pH 4.9, 60°C, after 24h.



**Fig. 1. Effect of molecular weight of PEG on progress of maltosyl-β-cyclodextrin synthesis.**

●: without PEG, ○: PEG 4000, ○: PEG 6000, △: PEG 10000.

Maltose/β-CD=12.7, mixed substrate 70% (w/w), 350 units pullulanase/100 ml, pH 4.9, 60°C, PEG 10% (w/w).



**Fig. 2. Effect of 6000 concentration on the synthesis of maltosyl-β-cyclodextrin.**

●: 0% (w/w), △: 5% (w/w), ○: 10% (w/w), ○: 20% (w/w).

Maltose/β-CD=12.7, mixed substrate 70% (w/w), 350 units pullulanase/100 ml, pH 4.9, 60°C.

lulanase의 촉매환경에 접근하는 물분자를 적절히 차단시키지 못하기 때문인 것으로 사료된다(19).

반면 고분자인 PEG 4000, 6000, 그리고 10000는 첨가농도가 20%(w/w)에 이를 때까지 G<sub>2</sub>-β-CD 생성량과 전환율이 급격히 증가하였으며, 24시간 효소반응 후 PEG 4000의 경우는 각각 2.8 g/100 ml H<sub>2</sub>O, 51.0%(w/w), PEG 6000과 10000의 경우는 유사하여 각각 3.0, 53.5로서 PEG를 첨가하지 않았을 경우에 비하여 현저히 증가되었다. 그러나 그 이상의 농도에서는 생성량이 감소되었는데, 이는 반응액의 점도가 증가되어 효소반응액이 적절히 혼합되지 못함에 기인하는 것으로 사료된다.

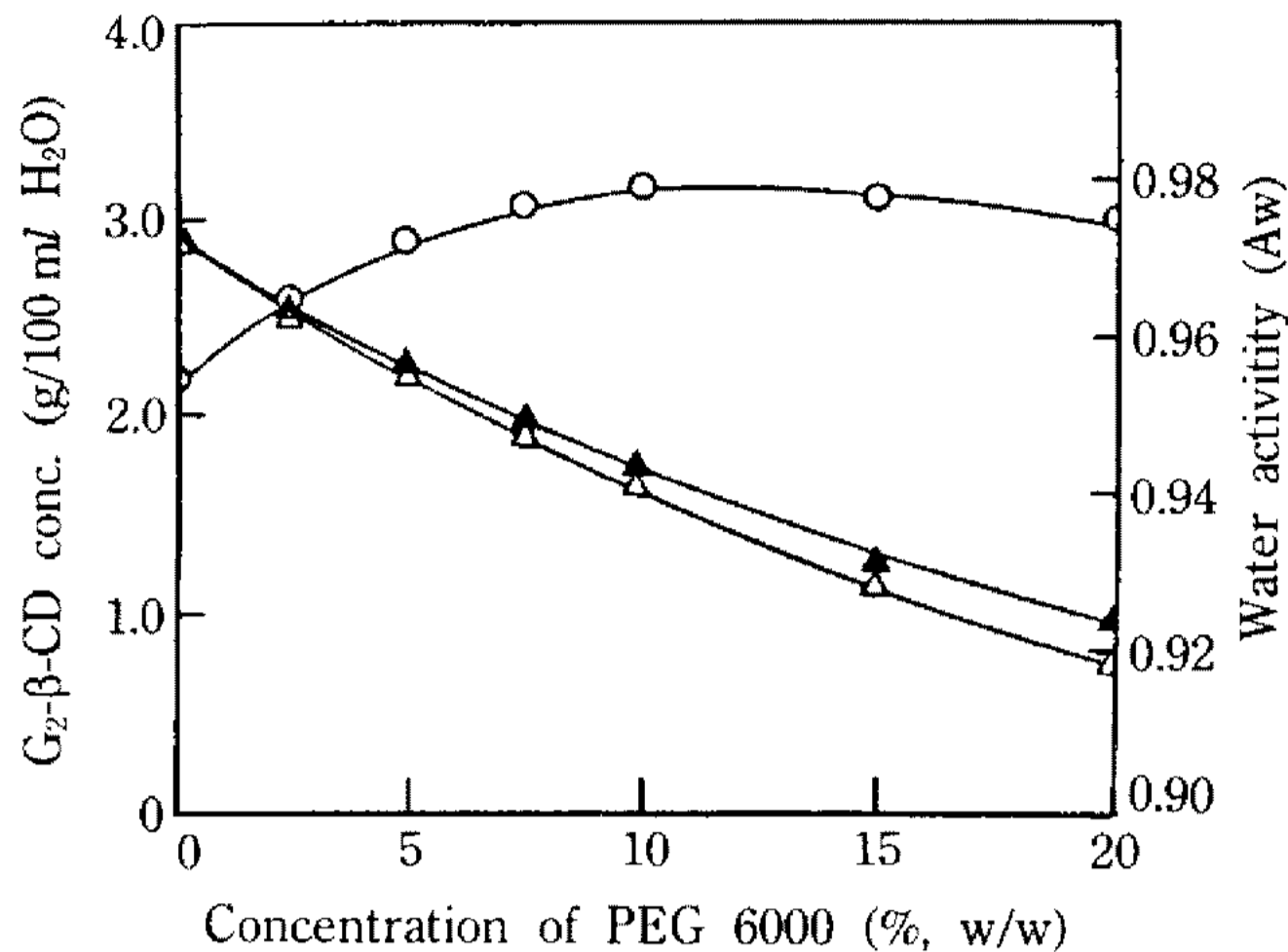
**Maltosyl-β-cyclodextrin 생성량 및 수율의 경시적 변화**

**PEG 분자량의 영향**: Fig. 1은 PEG 분자량에 따른 G<sub>2</sub>-β-CD 합성양상의 변화를 검토하기 위하여 PEG 4000, 6000, 그리고 10000을 같은 농도인 10%(w/w)를 첨가한 군과 첨가하지 않은 군의 G<sub>2</sub>-β-CD의 생성량과 전환율의 변화를 경시적으로 관찰한 결과이다. PEG 4000, 6000, 그리고 10000을 첨가한 군은 PEG를 첨가하지 않은 경우에 비해 반응초기인 12시간까지 생성율이 다소 느렸다. 이는 첨가된 PEG로 인하여 효소반응액의 점도가 증가되어 기질인 maltose, β-CD와 촉매인 pullulanase 간의 접촉이 방해받아 반응효율이 감소하기 때문인 것으로 추측된다.

반면 12시간 경과 후부터는 PEG를 첨가한 군의 G<sub>2</sub>-β-CD 생성율이 현저히 증가하여 갔는데, 이는 반응후기에 다량 생성된 G<sub>2</sub>-β-CD의 가수분해반응이, 첨가한 PEG가 물분자를 다량 포집하여 dehydration effect를 주게 됨에 따라, 억제되기 때문인 것으로 사료된다. 위에서와 같이 PEG 6000은 다른 PEG에 비해서 초기의 G<sub>2</sub>-β-CD 생성율이 빠를 뿐만 아니라, 또한 최종 G<sub>2</sub>-β-CD 생성량도 높아 가장 적절한 분자량의 PEG임을 알 수 있었다.

**PEG 6000의 첨가농도의 영향**: Fig. 2는 적정첨가량을 검토하기 위하여 PEG 농도를 0, 10, 그리고 20%(w/w)로 변화시키면서 축합효소반응시킨 결과를 나타낸 것이다. 36시간 반응 후 G<sub>2</sub>-β-CD 생성량과 전환율은 5%의 경우 각각 2.9 g/100 ml H<sub>2</sub>O와 54%(w/w), 10%의 경우 3.2와 59, 그리고 20%의 경우 3.2와 59였다. 한편 G<sub>2</sub>-β-CD의 합성속도는 5%(w/w)에서는 첨가하지 않은 군과 유사하였으나, 10%(w/w) 이상일 경우에는 초기 14시간까지 생성율이 오히려 감소하였는데, 이는 농도증가에 따른 점도증가로 기질의 운동성이 감소하는 것에 기인하는 것으로 추측된다(5). 따라서 G<sub>2</sub>-β-CD 생성량이 가장 높고 또한 생성율도 첨가하지 않은 군과 유사한 수준을 얻을 수 있는 10%(w/w)가 가장 적합한 농도로 사료된다.

**Maltosyl-β-cyclodextrin의 축합 효소반응에 미치는 PEG 6000의 작용기작**



**Fig. 3. Relationship of PEG 6000 concentration and water activity on the synthesis of maltosyl- $\beta$ -cyclodextrin.**

○: the amount of maltosyl- $\beta$ -cyclodextrin,  $\Delta$ : theoretical water activity,  $\blacktriangle$ : experimental water activity. Maltose/ $\beta$ -CD=12.7, mixed substrate 70% (w/w), 350 units pullulanase/100 ml, pH 4.9, 60°C, amount of PEG 6000: 0~20% (w/w).

Fig. 3는 PEG 6000의 농도를 5~20%(w/w)로 변화시키면서 각 농도에서 측정된 water-activity(Aw), 이론적으로 계산한 water-activity(Aw), 그리고 24시간 반응후의 G<sub>2</sub>- $\beta$ -CD 생성량을 도시하고 있다.

PEG를 첨가하지 않은 반응액의 water activity 측정값은 첨가한  $\beta$ -CD와 maltose의 영향으로 0.966이었고, 20%를 첨가하였을 경우에는 0.914로 감소하였으며, 이론값도 측정값과 유사하였다. PEG 첨가농도가 5~10%(w/w) 범위일 때는 G<sub>2</sub>- $\beta$ -CD 생성량이 water activity와 반비례하여 증가하였고, 10%에서 3.04 g/100 ml H<sub>2</sub>O로 최대에 이르렀다. 그러나 그 이상에서는 water activity에 관계없이 오히려 감소하였는데 그 이유는 앞에서 기술한 바 있다.

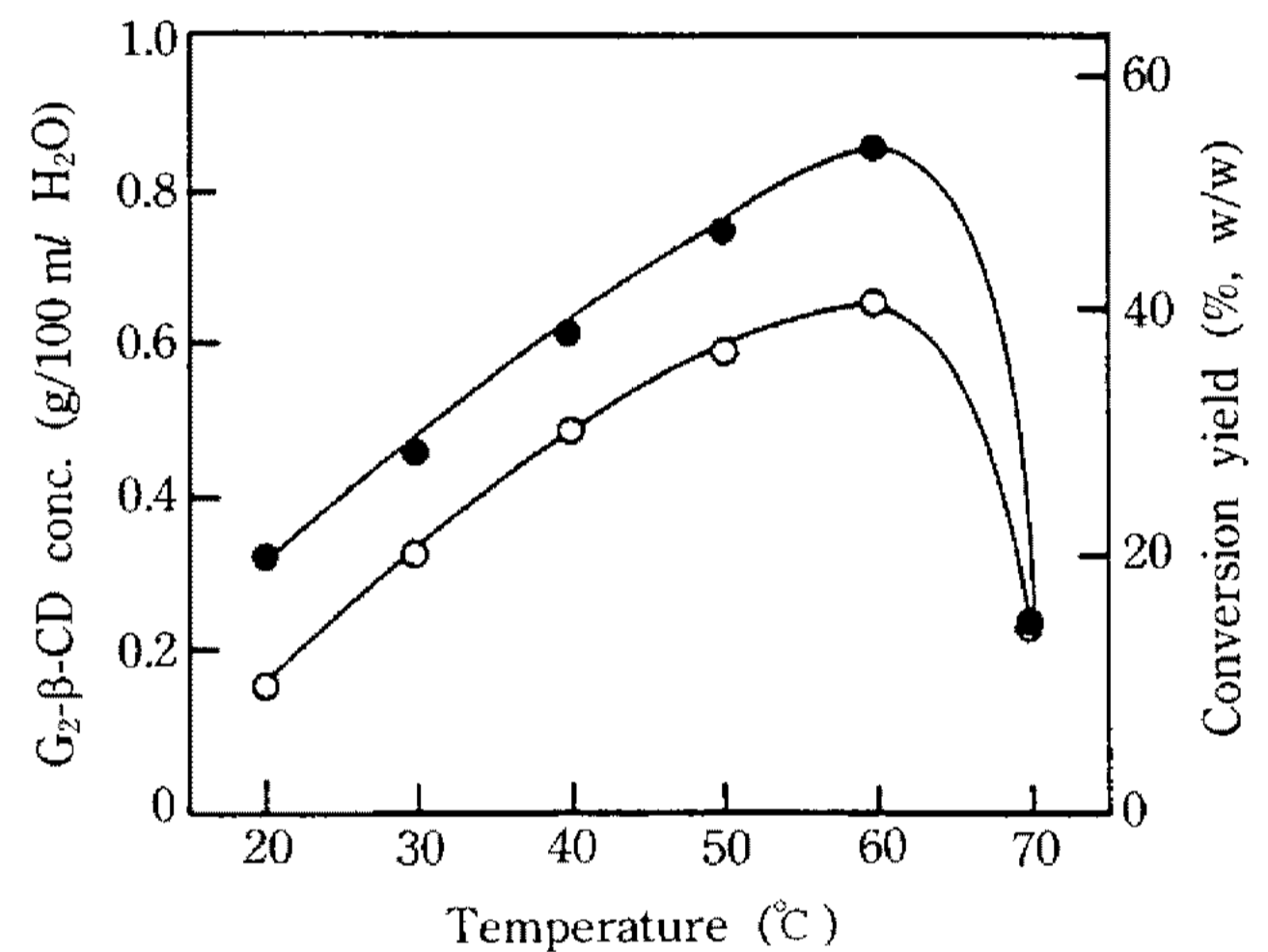
한편 Aw-depressor가 pullulanase의 정반응인 hydrolysis reaction에 미치는 영향을 검토하기 위하여 pullulan을 기질로 하여 각종 분자량의 PEG를 5~40%(w/w)의 농도로 첨가하여 24시간 후 생성되는 maltotriose량을 측정하여 이를 첨가하지 않은 군과 비교하여 Table 3에 나타내었다. Hydrolysis reaction은 PEG의 분자량보다는 첨가량에 큰 영향을 받았으며, 첨가량이 증가함에 따라 반응속도가 급속히 감소하였다.

특히 PEG 6000의 경우는 첨가농도가 10%(w/w)일 때 maltotriose 생성량은 0.14 g/100 ml H<sub>2</sub>O로서 급속히 감소되었으며, 다른 분자량의 PEG보다 hydroly-

**Table 3. Effect of molecular weight and concentration of PEGs on the hydrolysis reaction of pullulanase**

PEG concentration % (w/w)	Amount of maltotriose g/100 ml H <sub>2</sub> O				
	500	1500	4000	6000	10000
0	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60
5	0.42	0.48	0.48	0.42	0.36
10	0.40	0.42	0.45	0.14	0.30
20	0.36	0.18	0.21	0.13	0.20
30	0.13	0.18	0.20	0.12	0.18
40	0.12	0.17	0.12	0.12	0.17

Pullulanase 350 units/100 ml, pH 4.9, 60°C, 100 rpm and pullulan 1.0% (w/w), after 10 min.



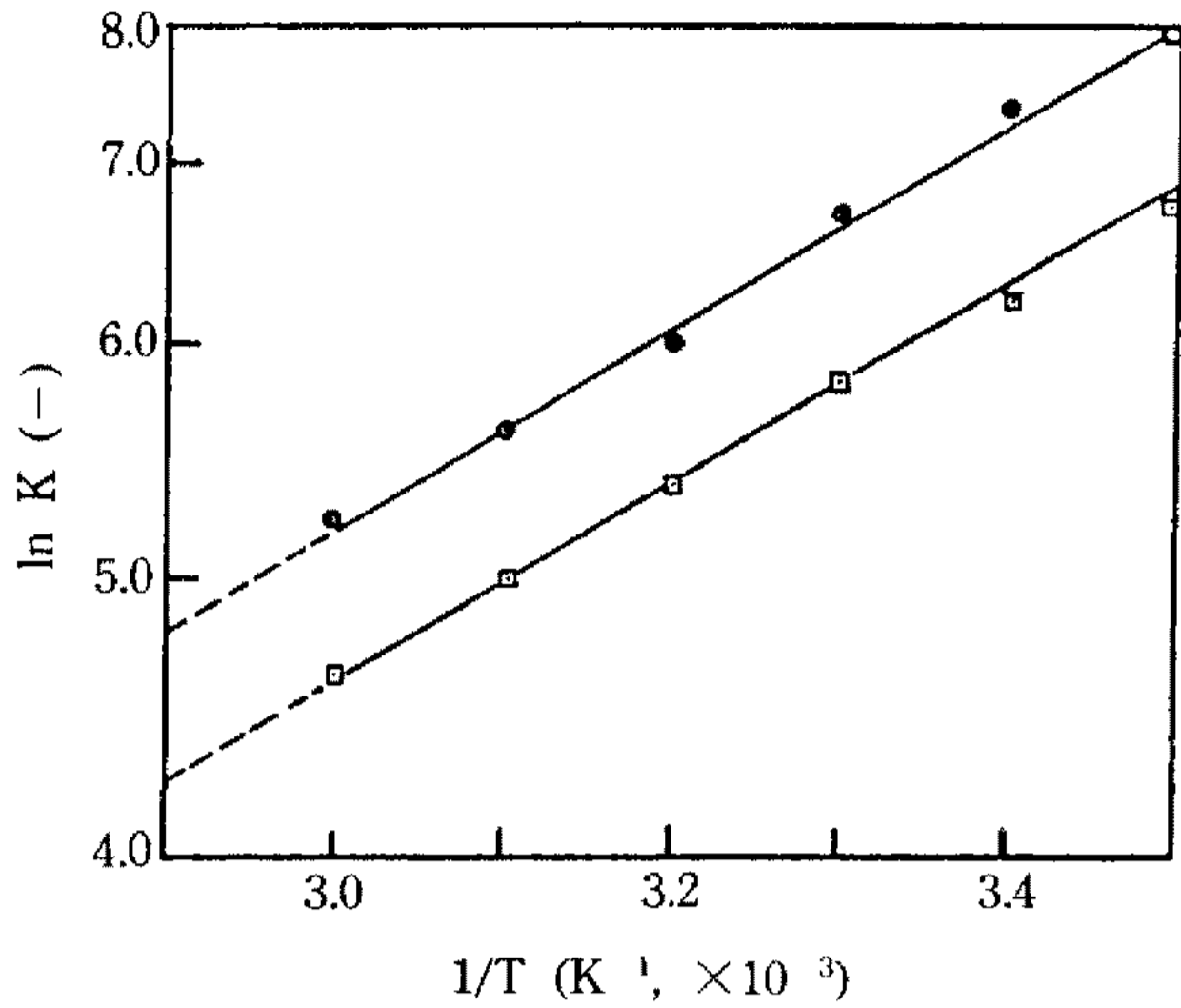
**Fig. 4. Effect of temperature on synthesis of maltosyl- $\beta$ -cyclodextrin with and without PEG 6000.**

○: without PEG 6000, ●: with PEG 6000. Maltose/ $\beta$ -CD=12.7, mixed substrate 70% (w/w), 350 units pullulanase/100 ml, pH 4.9, 60°C, PEG 10% (w/w).

sis reaction을 심하게 저해함을 알 수 있었다. 위에서 기술한 바와 같이 PEG 6000은 water activity를 감소시키며, pullulanase에 직접 작용하여 기질과의 반응성을 변화시킬 뿐만 아니라, 물과의 접촉을 최대할 억제시킬 수 있는 가장 적절한 분자구조를 가진 것으로 사료된다(19).

#### 반응평형상수와 각종 thermodynamic constants의 평가

Fig. 4는 Aw-depressor의 첨가없이 반응온도를 20~70°C로 변화시키면서 24시간 축합효소반응시킨 후 각 반응온도에서 생성된 G<sub>2</sub>- $\beta$ -CD량과 전환율을 측정된 결과이며, 또한 PEG 6000을 10%(w/w) 농



**Fig. 5.** Arrhenius plot for the temperature dependence of the equilibrium constant for synthesis of maltosyl-β-CD with and without PEG 6000.

○: without PEG 6000, □: with PEG 6000.

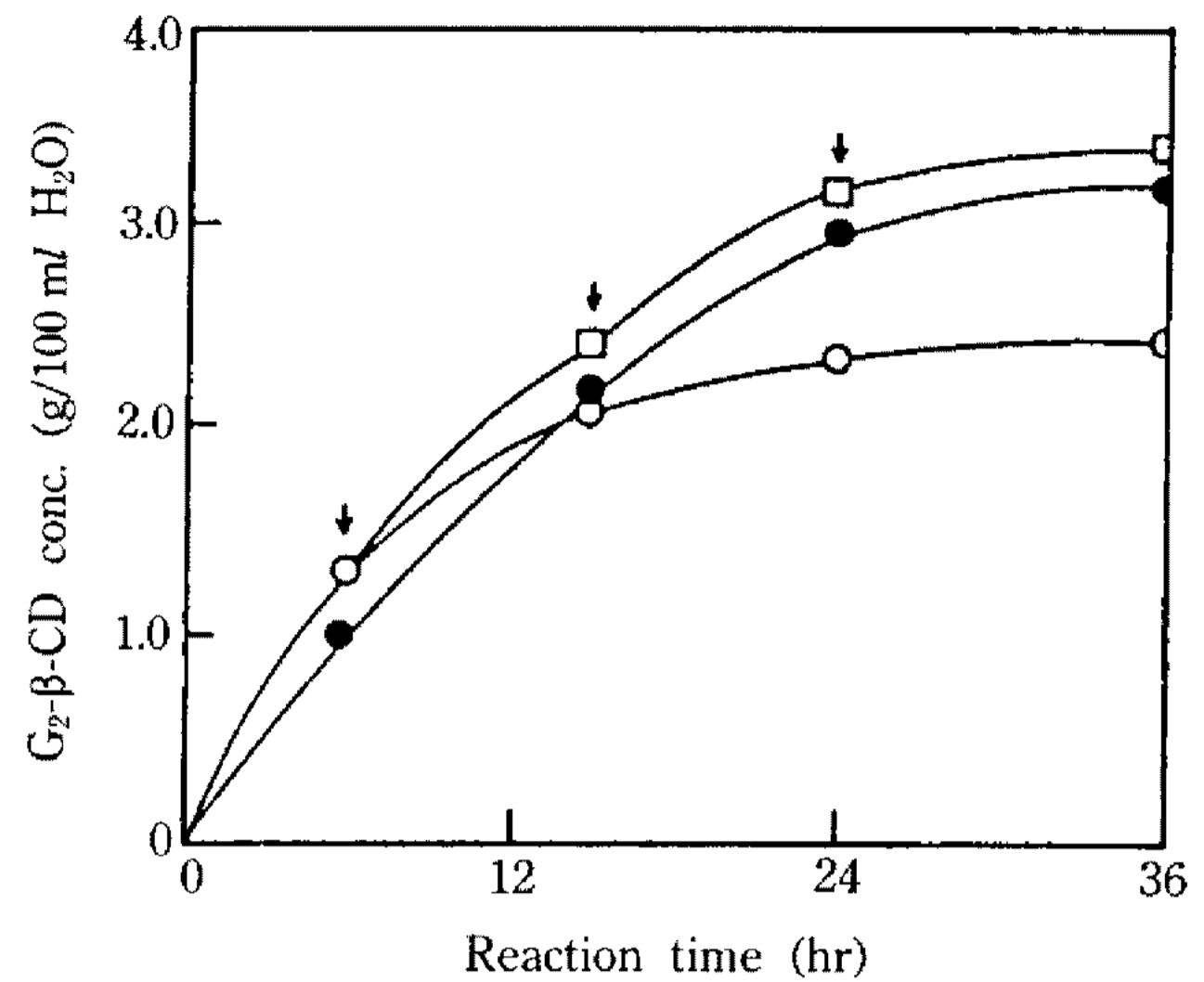
도로 첨가한 균의 결과도 나타내었다. 두 균 공히 60 °C까지는 G<sub>2</sub>-β-CD로의 합성수율이 증가하였으나, 70 °C 이상에서는 급격히 감소하였는데 이는 효소 실향에 기인하는 것으로 판단된다.

Fig. 5은 상기 결과를 토대로 온도변화에 따른 반응평형상수의 변화값을 산출한 후 thermodynamic constants를 평가하기 위하여 van't Hoff's equation (17)을 적용하여 Arrhenius plotting한 결과이며, 또한 PEG 6000을 10%(w/w)의 농도로 첨가한 균의 경우도 아울러 나타내었다. 상기 G<sub>2</sub>-β-CD의 합성반응이 enthalpy(ΔH°)는 36.788 kJ/mole, entropy (ΔS°)는 0.067 kJ/mole K였고, Gibbs free energy의 변화값(ΔG°)은 14.433 kJ/mole이었다. 위에서와 같이 pullulanase의 역반응을 이용한 β-CD와 maltose로부터 G<sub>2</sub>-β-CD를 합성하는 축합반응은 흡열반응으로, entropy는 증가하였고, ΔG°값은 축합반응을 나타내는 positive(+)값을 보였다.

반면 PEG 6000을 첨가한 균의 ΔH°는 33.256 kJ/mole, ΔS°는 0.0725 kJ/mole K였고, Gibbs free energy의 변화값 ΔG°는 12.644 kJ/mole으로서, entropy (ΔS°)는 0.0055 kJ/mole K 증가한 반면, ΔG°는 1.789 kJ/mole 감소하였다.

**Maltosyl-β-cyclodextrin 합성수율 증가를 위한 공정개발**

β-CD의 intermittent feeding : Aw-depressor의 첨가없이 반응수율을 증가시킬 수 있는 방법을 모색하기



**Fig. 6.** The progress of maltosyl-β-CD synthesized at intermittent feeding of β-cyclodextrin and with PEG 6000.

○: without PEG 6000, ●: with PEG 6000, □: intermittent feeding of 1.0 g β-CD at 6, 15, 24 hr reaction time, respectively.

위하여, 정상적인 효소반응 도중 β-CD를 1.0 g씩 반응개시 6, 12, 그리고 24시간 경과 후 간헐적(intermittent feeding)으로 추가로 첨가하여 평형상태에 영향을 주어 G<sub>2</sub>-β-CD 합성수율의 증가를 유도한 균과 PEG 6000을 첨가하여 반응시킨 균의 G<sub>2</sub>-β-CD 생성량을 경시적으로 비교한 결과는 Fig. 6과 같다.

β-CD를 간헐적으로 첨가한 균의 경우 36시간 경과 후의 G<sub>2</sub>-β-CD 생성량과 전환율은 각각 3.4 g/100 ml H<sub>2</sub>O와 40%(w/w)가 얻어져 반응초기에 PEG 6000을 첨가한 균의 경우 36시간 효소반응후의 G<sub>2</sub>-β-CD 생성량과 전환율인 3.2 g/100 ml H<sub>2</sub>O와 59.3%(w/w)로서 전환율이 매우 높았다. 따라서 β-CD를 간헐적으로 다량 첨가하여 수율 증대를 도모하는 것보다는 Aw-depressor를 첨가하여 G<sub>2</sub>-β-CD 생성량과 전환율을 증가시키는 것이 보다 효율적인 방법으로 판단된다.

**Ultrafiltration membrane을 이용한 PEG의 분리 회수 :** 경제성 제고를 위하여 첨가 PEG를 축합반응 후 분리회수하여 재사용함이 필요하다. 이를 위하여 3K dalton인 ultrafiltration membrane을 이용하여 PEG 6000과 G<sub>2</sub>-β-CD를 최대한 분리코져 적절한 분획비(농축액 : 여과액)를 검토하였다. Table 4는 분획비를 1.0 : 9.0에서 9.0 : 1.0으로 변화시키면서 농축액과 여과액에 함유된 PEG와 G<sub>2</sub>-β-CD의 양을 정량한 결과이다.

농축액과 여과액의 분획비가 증가될수록 농축액

**Table 4. Recovery of PEG 6000 and maltosyl- $\beta$ -CD using ultrafiltration system with membrane of molecular weight cut-off 3000**

Volume ratio C : F	PEG 6000 (10 g)		G <sub>2</sub> - $\beta$ -CD (2.31 g)	
	C	F	C	F
9 : 1	9.9	0.1	2.21	0.10
7 : 3	9.8	0.2	1.72	0.59
5 : 5	9.3	0.7	1.26	1.05
3 : 7	8.8	1.2	0.79	1.52
1 : 9	8.6	1.4	0.15	2.16

C: concentrate, F: filtrate. 20 ml of reaction mixture was filtrate as indicated volume concentration ratio (concentrate : filtrate). The reaction mixture before ultrafiltration contained 10 g of dextrin and 2.31 g of G<sub>2</sub>- $\beta$ -CD in 100 ml.

중의 PEG양과 여과액 중의 G<sub>2</sub>- $\beta$ -CD양이 비례하여 증가하였다. 특히 분획비가 1.0 : 9.0일 때 농축액 중의 PEG량은 전체량의 86%이상, 여과액 중의 G<sub>2</sub>- $\beta$ -CD의 양은 전체량의 94%에 이르는 가장 좋은 분리결과를 보였다. 일부 분리되지 않은 PEG 6000은 보다 분자량이 균일한 고순도의 PEG를 이용함으로써 감소시킬 수 있을 것으로 기대된다.

## 요 약

Maltosyl- $\beta$ -cyclodextrin은  $\beta$ -cyclodextrin에 maltose가  $\alpha$ -1,6 glycosidic bond로 결합된 분지환상결합체로서 pullulanase의 역반응(축합반응)을 이용하여  $\beta$ -cyclodextrin과 maltose로부터 합성된다. Maltosyl- $\beta$ -cyclodextrin의 합성수율을 증가시키기 위하여 각종 water activity depressor인 각종 polyol, sugar, 그리고 polyethylene glycol(PEG) 등의 첨가의 영향을 검토하였다. 가장 적절한 water activity depressor는 PEG 6000로서, 첨가량 10%(w/w)의 경우 maltosyl- $\beta$ -cyclodextrin 생성량과 합성수율은 크게 증가하여 3.02 g/100 ml H<sub>2</sub>O와 55.9%(w/w)로서, 첨가하지 않았을 경우보다 약 1.3배 증가하였다. Water activity는 PEG 6000을 20%(w/w) 첨가할 때 원래의 0.966에서 0.914로 감소하였으며, maltosyl- $\beta$ -cyclodextrin 합성수율은 water activity에 반비례하여 증가하였다. Pullulanase의 역반응을 이용한 maltosyl- $\beta$ -cyclodextrin 합성반응의 각종 열역학적 상수를 평가하였으며,  $\Delta H^\circ$ 는 36.788 kJ/mole,  $\Delta S^\circ$ 는 0.067 kJ/moleK, 그리고  $\Delta G^\circ$ 는 14.433 kJ/mole이었다. PEG

6000의 분리회수에 적절한 ultrafiltration membrane의 pore size는 3 K dalton이었으며, 여과액과 농축액의 적정 분획비는 1.0 : 9.0였다. Maltosyl- $\beta$ -cyclodextrin 합성수율의 증가는 첨가한 PEG가 water activity를 감소시켜 합성된 maltosyl- $\beta$ -cyclodextrin이 재분해되는 pullulanase의 정반응인 hydrolysis reaction을 억제하여 equilibrium state에 변화를 주기 때문인 것으로 유추된다.

## 감사의 말

본 연구는 한국과학재단지원 농업생물신소재연구센터 1992년도 연구비지원에 의한 것으로 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

- Hizukuri, S., S. Kawano, J. Abe, K. Koizumi and T. Tanimoto. 1989. Production of branched cyclomaltooctaoses through the reverse action of *Klebsiella aerogens* pullulanases. *J. Jpn. Biotechnol. Appl. Biochem.* **11**: 60-73.
- Shiraish, T., S. Kusano, Y. Tsumuraya and Y. Sakano. 1989. Synthesis of maltosyl ( $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 6) cyclodextrins through the reverse reaction of thermostable *Bacillus acidopullulyticus* pullulanase. *Agric. Biol. Chem.*, **53**: 2181-2188.
- Yoshimura, Y., S. Kitahata, S. Okada, Y. Satomura and K. Hujita. Structure of di-o- $\alpha$ -maltosyl cyclodextrins produced from  $\alpha$ -maltosyl-fluoride and cyclodextrins. *Agric. Biol. Chem.* **41**: 2585-2591.
- 小暮靖夫, 増山. 特集 第二世代のサイクロデキストリン. 月刊 フトケミカル **5**: 9-20.
- Davis, J.E.D. 1988. *Cyclodextrin Technology*, pp. 48-65. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Mischnick, P. 1990. Characterization of cyclodextrin derivatives. *Proceedings of the 5th International Symposium on Cyclodextrins*, Paris, p. 75.
- 한일근, 이용현. 1991. Pullulanase의 reverse reaction을 이용한 maltosyl- $\beta$ -cyclodextrin의 합성. *산업미생물학회지* **19**: 444-449.
- Cassel, J.M. and P.J. Halling. 1988. Effect of thermodynamic water activity on thermolysin-catalyzed peptide synthesis in organic two-phase system. *Enzyme Microb. Technol.* **10**: 486-491.
- 박장우, 이철. 1991. Water-sorbitol system의 수분활성도에 미치는 sodium lactate 및 sodium chloride의 영향. *한국식품과학회지* **23**: 330-335.
- 신현동, 이상호, 이용현. 1989. Alkalophilic *Bacillus*

- circulans*가 생산하는 cyclodextrin glucanotransferase의 정제와 효소반응 특성. 산업미생물학회지 **17**: 370-378.
11. Lee, S.H., H.D. Shin and Y.H. Lee. 1991. Evaluation of immobilization methods for cyclodextrin glucanotransferase and characterization of its enzymatic properties. *J. Microbiol. Biotechnol.* **1**: 54-62.
  12. Lee, Y.H., S.H. Lee and H.D. Shin. 1991. Performance of column type bioreactor packed with immobilized cyclodextrin glucanotransferase for cyclodextrin production. *J. Microbiol. Biotechnol.* **1**: 63-69.
  13. 이용현, 이상호, 한일근. 1991. 2단계 고정화효소반응기를 활용한 cyclodextrin의 연속생산. 산업미생물학회지 **19**: 171-178.
  14. 한일근, 이용현. 1991. 분쇄마찰매체 함유 효소반응계에서의 cyclodextrin 생성과 cyclodextrin glucanotransferase의 작용 mechanism. 산업미생물학회지 **19**: 163-170.
  15. 이용현, 박동찬. 1991. Extrusion 전분을 기질로 한 불균일상 효소반응계에서의 cyclodextrin 효소합성. 산업미생물학회지 **19**: 514-520.
  16. Caurie, M. 1975. Raoult's law, water activity in solutions of mixed solutes. *J. Food Technol.* **9**: 26-30.
  17. Sybesma, C. 1989. *Biophysics: An Introduction*. pp. 304-308. Kluwer Academic Publishers, London.
  18. Larsson, M., V. Arasaratnam and B. Mattiasson. 1989. Integration of bioconversion and downstream processing: starch hydrolysis in an aqueous two-phase system. *Biotechnol. Bioeng.* **33**: 758-765.
  19. Chen, J.P. and C.H. Wang. 1991. Lactose hydrolysis by  $\beta$ -galactosidase in aqueous two-phase system. *J. Ferment. Bioeng.* **71**: 168-174.

(Received April 6, 1992)