

수성2상계를 이용한 Cyclodextrin Glucanotransferase 분리 및 회수

†김진현·홍승서·이현수
(주)삼양제넥스 생명공학연구소
(접수 : 2000. 8. 2., 게재승인 : 2000. 11. 2.)

Separation and Recovery of Cyclodextrin Glucanotransferase Using Aqueous Two-Phase Systems

Jin-Hyun Kim†, Seung-Suh Hong, and Hyun-Soo Lee
Samyang Genex Biotech Research Institute, Taejeon 305-348, Korea
(Received : 2000. 8. 2., Accepted : 2000. 11. 2.)

Cyclodextrin Glucanotransferase(EC 2.4.1.19 : 1,4- α -glucan 4- α -D-(1,4-glucano) transferase, cyclizing; CGTase) can be separated and recovered in an aqueous two-phase system composed of poly(ethylene glycol)(PEG)/dextran and PEG/salt. In an aqueous two-phase system consisting of PEG 35000 (5%) and dextran T2000 (7%), all cell and debris were collected at the interphase. CGTase partitioned to the denser dextran phase at a yield of 83.4%. On the other hand, in an aqueous two-phase system consisting of PEG 35000 (10%) and sodium phosphate (15%), CGTase partitioned to the denser salt phase at a yield of 95.5%. In order to recover CGTase using an aqueous two-phase system, the PEG/salt system proved to be more efficient than the PEG/dextran system in terms of yield and cost.

Key Words : cyclodextrin glucanotransferase, aqueous two-phase system, recovery, separation

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 trasglycosylation 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). 또한 미생물을 이용한 CGTase 효소 생산을 위해서는 세포외 효소 (extracellular enzyme)인 CGTase를 효율적이고 경제적인 방법으로 분리/회수하는 것이 매우 중요하며 이를 통하여 정제된 CGTase는 CD 생산에 사용되어 진다(2).

전통적인 화학공정에서 혼합물의 분리는 보통 분리되어야 할 물질의 분자성질에 따라 추출, 결정, 증류, 투석, 건조 등 여러가지 조작을 거친다. 추출의 경우 유기용매와 물을 혼합하여 원하는 생산물을 두 상중에서 한 상에 농축시켜 회수하

고 불순물과 다른 생산물은 다른 상에 농축시켜 분리한다. 그러나 생리활성 물질 및 효소 등 단백질 물질을 다루는 생물공학 부분에서는 유기용매와의 접촉에 의한 생리활성의 저하로 특별한 경우에만 사용된다. 따라서 생물분자들이 안정화되고 변성됨이 없이 산업적으로 회수, 분리, 정제 하기 위한 여러가지 방법들이 연구되고 있다.

수성2상계란 두가지의 고분자 물질 (poly(ethylene glycol) (PEG)/dextran) 또는 고분자 (PEG)와 적당한 염들 (potassium phosphate, ammonium sulfate) 사이의 비상용성 (incompatibility)으로 인하여 형성되는 상 분리를 말하는 것으로 효소나 단백질의 회수와 세포 및 세포조각의 제거 등에 이용되어 왔다 (3-9). 1958년 Albertsson (10)에 의해 수성2상계의 이론적 배경과 선택된 몇가지 고분자 물질의 각 상에서의 조성분배 형태가 연구되었다. 1971년 Albertsson (11)은 기존의 수성2상계에 대한 실험적 결과와 이론을 집대성하여 분자들의 분배에 관한 이론과 실험적 고찰, 연속적 분리를 위한 다단분배 이론, 고분자 물질로부터 생성물의 분리 등을 체계적으로 종합 정리하였다. 1982년 Mattiasson 등(12)은 *Clostridium acetobutylicum*으로부터 아세트산과 부탄올의 생산에서 미생물에 대한 저해현상을 제거할 목적으로 수성2상계를 적용하여 높은 수율의 생산물을 얻었다. 1983년 Veide 등(13)은 *E. coli*로부터 β -galactosidase의 분리공정에 대하여 연구하였다. 1985년 Tjereld 등(14)에 의하여 셀룰로오스의 당화와 enzymatic bioconversion에 수성2상계가 적용되었으며 Menge 등(15)은

†Corresponding Author : Samyang Genex Biotech Research Institute, 63-2 Hwaam-Dong, Yusung-Gu, Taejeon 305-348, Korea
Tel : +82-42-865-8392, Fax : +82-42-865-8399
E-mail : jhkim@genex.co.kr

수성2상계를 적용하여 인터페론을 분리하였다. 1985년 Andersson 등(16)은 α -amylase를 생산하는 균주로 *Bacillus subtilis*를 사용하여 수성2상계에서 배양 함으로서 세포를 고정시킨 것과 같은 효과를 얻었으며 동시에 효소의 생성이 증가하는 것을 관찰하였다. 이와 같이 수성2상계에 관한 연구는 많이 수행되고 있으나 CGTase 분리 및 회수공정에의 응용은 전무한 실정이다.

본 연구의 목적은 scale-up이 용이하며 투자비가 적게 소요되는 수성2상계를 CGTase 분리 및 회수 공정에 적용하여 효율적이고 경제적인 분리공정의 개발에 있다.

재료 및 방법

균 주

100여종의 토양샘플로부터 CGTase 생산균주를 페놀프탈레인 및 전분함유 agar plate 상에서의 clear zone 형성능을 비교하여 1차 선별한 후, 삼각 플라스크 배양을 통해 각 분리균주의 역가 (activity)를 비교하여 36주를 2차 선별하였다. 2차 선별된 균주를 5 L 발효조에 배양한 뒤, 효소를 정제하여 효소의 반응특성 (pH, 온도, 내열성, CD조성 등) 및 발효특성을 조사하였으며, 이들을 고려하여 산업화 가능성이 있는 *Bacillus sp.* 계통의 균주를 선별하였다. 이 균주는 β -CD의 생산성이 높고, 발효 역가가 높은 특징이 있다.

배양방법 및 효소생산

5 L 발효조를 이용하여 배지 및 배양 조건 최적화 실험을 수행하였다. 탄소원, 질소원, 무기염류의 농도별 적정조건을 설정하였다. 최적조건으로 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, 교반속도, 통기량, 배양온도 조건을 설정하였다. 최적 조건은 각각 pH 8.0, 30℃, 400 rpm, 1 vvm이었다. 5 L 발효 최적화 조건으로 기조로 30 L 발효조에서 효소생산을 수행하여 수성2상계 실험에 이용하였다. 효소의 활성은 50℃ 에서 Kitahata & Okada 방법 (17)에 의하여 측정하였으며 단백질 함량은 Lowry 방법(18)에 의하여 측정하였다.

건조 세포 밀도 측정

세포 밀도는 분광 광도계 (Bausch Lomb Spectronic 20)을 사용하여 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. 건조 세포 질량은 배양액으로부터 취한 시료를 원심분리기에서 10분간 10,000 rpm으로 원심분리하고 증류수로 씻어 건조기에서 90℃로 하루 건조하여 무게를 측정하였다.

상 분리 실험방법

Albertsson (10)이 제시한 여러가지 수성2상계에 대한 상도표를 이용하였다. PEG/dextran 계와 PEG/salt 계에 대하여는 같은 tie-line상의 여러 점을 선택하여 그 조성에서 CGTase의 분배 실험을 수행하였다. 발효배양액에 PEG와 dextran 또는 PEG와 salt를 첨가하여 교반 후에 정제 시키면 상 분리가 일어나며, 상 분리가 생기면 상부와 하부에서 각각 CGTase역

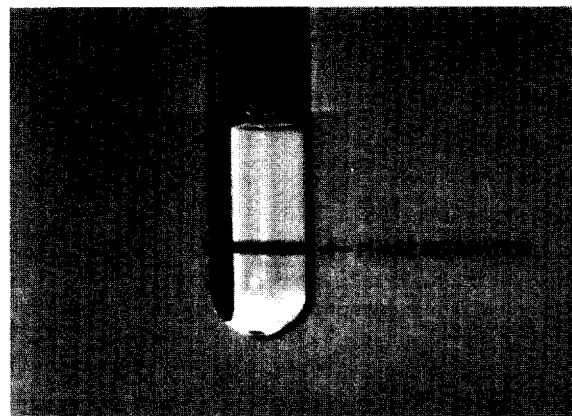


Figure 1. Aqueous two-phase system composed of PEG 8000 (5%)-dextran T70 (7%).

Table 1. Partitioning of CGTase in PEG/Dextran system.

Content		PEG6000 (5%)	PEG8000 (5%)	PEG35000 (5%)
Dextran T40 (7%)	CGTase in Top(%)	41.9	31.8	15.6
	Protein in Top(%)	65.5	55.1	34.1
	CGTase in Bottom(%)	58.1	68.2	80.8
	Protein in Bottom(%)	34.4	44.9	65.9
	Volume ratio ^a	2.00	1.60	1.50
Partition coefficient ^b		0.72	0.47	0.19
Dextran T70 (7%)	CGTase in Top(%)	32.7	31.2	18.9
	Protein in Top(%)	63.0	57.3	42.8
	CGTase in Bottom(%)	67.3	68.8	81.1
	Protein in Bottom(%)	37.0	42.7	57.2
	Volume ratio	1.80	1.54	1.33
Partition coefficient		0.49	0.45	0.23
Dextran T2000 (7%)	CGTase in Top(%)	32.3	28.3	16.5
	Protein in Top(%)	56.6	58.3	50.9
	CGTase in Bottom(%)	67.7	71.7	83.4
	Protein in Bottom(%)	43.4	41.7	49.1
	Volume ratio	1.25	1.60	1.50
Partition coefficient		0.48	0.39	0.20

^a Volume ratio = volume in top phase/volume in bottom phase

^b Partition coefficient = CGTase concentration in top phase/CGTase concentration in bottom phase

가, 부피, 총 단백질 양 등을 측정하여 효소의 분리/회수 및 specific activity를 측정하였다.

결과 및 고찰

PEG/Dextran계를 이용한 분배실험

수성2상계에서 가장 많이 쓰이고 있는 PEG와 dextran을 사용하여 상 분리의 형태와 CGTase의 분배 형태를 조사하였다. 발효배양액에 PEG 8000 (5%) 와 dextran T70 (7%)를 첨가하고 상 분리 현상을 조사하여 Figure 1에 나타내었다. PEG-rich인 상층과 dextran-rich인 하층으로 상이 깨끗하게 분리되었으며 배양액 내의 세포는 상층과 하층의 중간에 형성되어 상 분리와 동시에 세포의 효율적인 제거가 가능하였다. 상층과 하층에서의 세포 제거율은 각각 98.3%와 97.5%를 나타내어 수성2상계는 세포 제거에도 상당히 효과적임을 알 수 있었다. PEG와 dextran의 분자량 변화에 따른 CGTase의 분배 형태를 조사하여 Table 1에 나타내었다. PEG 분자량이

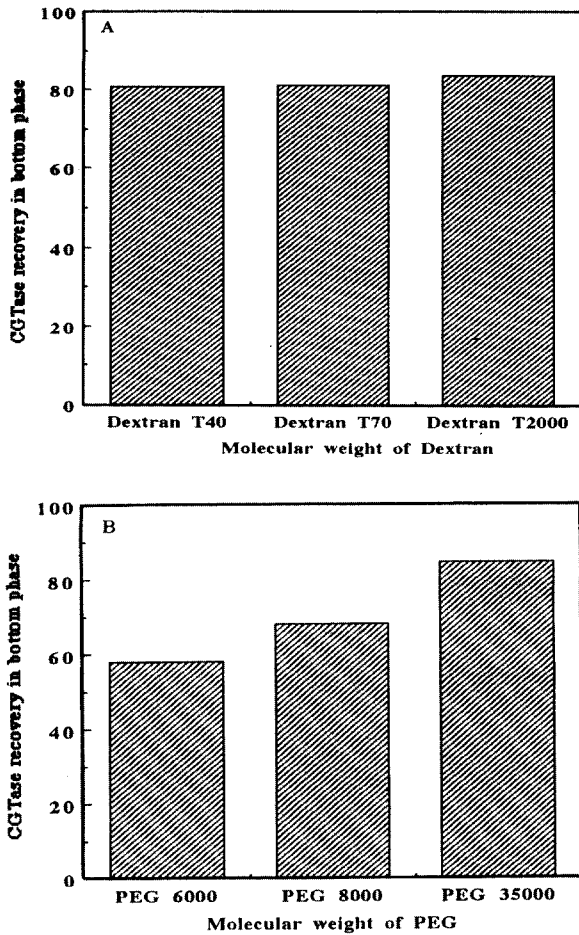


Figure 2. CGTase recovery in aqueous two-phase system composed of PEG dextran (A, effect of molecular weight of dextran on CGTase recovery in PEG 35000 (5%)/dextran (7%) system; B, effect of molecular weight of PEG on CGTase recovery in PEG (5%)/dextran T40 (7%) system).

4000이하에서는 수성2상계의 상 분리가 형성되지 않았다. PEG의 분자량이 클수록 부피비 (상층 부피/하층 부피)와 분배계수 (상층 CGTase 농도/하층 CGTase 농도)는 감소하였다. 즉, 하층에서의 CGTase 회수율이 증가하면서 부피도 증가하였다. Figure 2에서 보는 바와 같이 분배계수 (하층에서의 CGTase 회수율)의 경우 dextran의 분자량에는 거의 영향이 없는 반면 PEG의 분자량에 상당히 영향을 받음을 알 수 있으며 PEG 분자량이 클수록 분배계수에는 효과적이었다. 결국 PEG 35000과 dextran T2000계에서 하층에서의 CGTase 회수율이 83.4%로 가장 효과적이었다. 이때 부피비 (상층 부피/하층 부피)와 분배계수 (상층 CGTase 농도/하층 CGTase 농도)는 각각 1.5와 0.2를 나타내었으며 하층에서의 specific activity는 1.7배 증가하였다. 또한 PEG 35000과 dextran T2000 계에 미량의 sodium sulfate (0.3M)를 첨가할 경우 하층에서의 CGTase 회수율은 85.8%로 증가함을 알 수 있었다.

PEG/Salt 계를 이용한 분배실험

PEG와 salt를 사용하여 상 분리의 형태와 CGTase의 분배 형태를 조사하였다. 발효배양액에 PEG와 salt를 첨가할 경우 PEG-rich인 상층과 salt-rich인 하층으로 상이 분리되었다. PEG

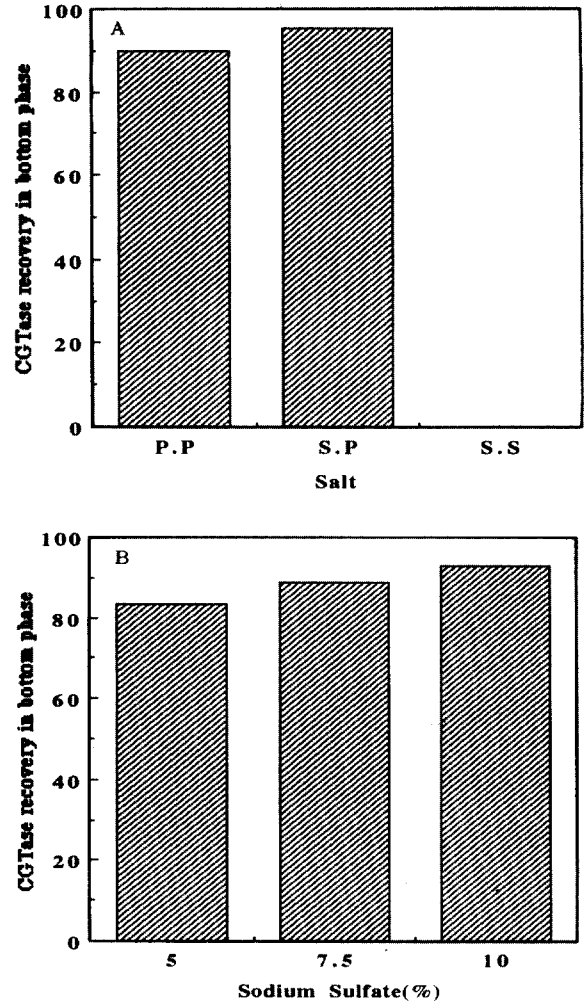


Figure 3. CGTase recovery in aqueous two-phase system composed of PEG salt (A, effect of salt on CGTase recovery in PEG 35000 (10%)/salt (15%) system; B, effect of concentration of sodium sulfate on CGTase recovery in PEG 35000 (10%)/sodium sulfate system; P.P, potassium phosphate; S.P, sodium phosphate; S.S, sodium sulfate).

와 salt 종류에 따른 CGTase의 분배 형태를 조사하여 Figure 3에 나타내었다. PEG-rich인 상층과 salt-rich인 하층으로 상이 깨끗하게 분리되었으며 배양액 내의 세포는 상층과 하층의 중간에 형성되어 상 분리와 동시에 세포의 효율적인 제거가 가능하였다. Veide 등(13)에 의하면 수성 2상계를 이용한 *E. coli* 배양에 의한 β -galactosidase 분리의 경우에는 세포 및 세포 조각들이 salt-rich인 하층으로 회수 된다는 보고와는 차이를 보였다. PEG 35000 (10%)-potassium phosphate (15%)계에서는 하층에서의 CGTase 회수율 90%이었으며 PEG 35000 (10%)-sodium phosphate (15%)계에서는 하층에서의 CGTase 회수율 95.5%이었다. 또한 PEG 35000 (10%)-sodium sulfate (10%)계에서는 하층에서의 CGTase 회수율 93.2%이었으며 sodium sulfate 10% 이상의 농도에서는 상 분리가 형성되지 않았다. Hustedt 등(4)에 의하면 PEG/salt 계에서 hydrophobic한 물질은 PEG-rich한 상층으로 분리되고 hydrophilic한 물질은 salt-rich한 하층으로 분리되는 것으로 알려져 있다. 결론적으로 수성2상계를 이용한 CGTase 분리 및 회수의 경우 PEG-dextran계보다는 PEG-salt계가 회수율과 비용 측면에서

더 효과적이었으며 특히 PEG35000(10%)-sodium phosphate (15%)계에서 가장 효과적이었다.

요 약

발효배양액에 PEG 8000 (5%) 와 dextran T70 (7%)를 첨가하고 상 분리 현상을 조사하였다. PEG-rich인 상층과 dextran-rich인 하층으로 상이 깨끗하게 분리되었으며 배양액 내의 세포는 상층과 하층의 중간에 형성되어 상 분리와 동시에 세포를 효율적으로 제거가 가능하였다. PEG 35000과 dextran T2000계에서 하층에서의 CGTase 회수율이 83.4%로 가장 효과적이었다. PEG 35000(10%)-potassium phosphate(15%)계에서는 하층에서의 CGTase 회수율 90%이었으며 PEG 35000(10%)-sodium phosphate (15%)계에서는 하층에서의 CGTase 회수율 95.5%이었다. 또한 PEG 35000(10%)-sodium sulfate(10%)계에서는 하층에서의 CGTase 회수율 93.2%이었으며 sodium sulfate 10% 이상의 농도에서는 상분리가 형성되지 않았다. 수성2상계를 이용한 CGTase 분리 및 회수의 경우 PEG-dextran계보다는 PEG-salt계가 회수율과 비용 측면에서 더 효과적이었으며 특히 PEG35000 (10%)-sodium phosphate(15%)계에서 가장 효과적이었다.

REFERENCES

- 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.
- 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.
- Kroner, K. H., H. Hustedt, and M. R. Kula (1982), Evaluation of Crude Dextran as Phase-Forming Polymer for the Extraction of Enzymes in Aqueous Two-Phase Systems in Large Scale, *Biotechnol. Bioeng.* **24**, 1015-1045.
- Hustedt, H., K. H. Kroner, U. Menge, and M. R. Kula (1985), Protein Recovery Using Two-Phase Systems, *Trends in Biotechnol.* **3**, 139-144.
- Fisher, D. (1981), Separation of Cells and Organelles by Partitioning in Two-Polymer Aqueous Phase, *Biochem. J.* **196**, 1-10.
- Tramper, J. (1996), Hybridoma and CHO Cell Partitioning in Aqueous Two-Phase Systems, *Biotechnol. Prog.* **12**, 363-370.
- Ramsch, C., L. B. Kleinelanghorst, E. A. Knieps, J. Thommes, and M. R. Kula (1999), Aqueous Two-Phase Systems Containing Urea : Influence on Phase Separation and Stabilization of Protein Conformation by Phase Components, *Biotechnol. Prog.* **15**, 493-499.
- Mei, L. H. (1997), Partitioning of Amino Acids by Aqueous Two-Phase Systems Combined with Temperature-Induced Phase Formation, *Biotechnol. Prog.* **13**, 105-108.
- Maurer, G. (1997), Partitioning of Some Amino Acids and Low Molecular Mass Peptides in Aqueous Two-Phase Systems of Poly(ethylene glycol) and Dextran in the Presence of Small Amounts of K_2HPO_4/KH_2PO_4 -Buffer at 293K : Experimental Results and Correlation, *J. Chem. Eng. Data*, **42**, 975-984.
- Albertsson, P. A. (1958), Particle Fractionation in Liquid Two-Phase Systems, *Biochem. Biophys. Acta.* **27**, 378-395.
- Albertsson, P. A. (1971), Partition of Cell Particles and Macromolecules, Wiley Interscience, New York.
- Mattiasson, B., M. Suominen, E. Andersson, L. Haggstrom, P. A. Albertsson, and H. Hagerdal (1982), Solvent Production by *Clostridium acetobutylicum* in Aqueous Two-Phase System, *Biotechnol. Bioeng.* **7**, 355-366.
- Veide, A., A. L. Smeds, and S. O. Enfors (1983), A Process for Large-Scale Isolation of β -Galactosidase from *E. coli* in an Aqueous Two-Phase System, *Biotechnol. Bioeng.* **25**, 1789-1800.
- Tjerneld, F., I. Persson, P. A. Albertsson, and B. Hahn-Hagerdal (1985), Enzymatic Hydrolysis of Cellulose in Aqueous Two-Phase System. I. Partition of Celluloses from *Trichoderma reesei*, *Biotechnol. Bioeng.* **27**, 1036-1043.
- Menge, U., M. Morr, and M. R. Kula (1983), Purification of Human Fibroblast Interferon by Extraction in Aqueous Two-Phase Systems, *J. Appl. Biochem.* **5**, 75-90.
- Andersson, E., J. Christin, and H. Hagerdal (1985), α -Amylase Production in Aqueous Two-Phase Systems with *Bacillus subtilis*, *Enzyme Microb. Technol.* **7**, 333-338.
- Kitahata, S. and S. Okada (1974), Action of Cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus megaterium* Strain No.5 on Starch, *Agri. Biol. Chem.* **38**, 2413-2417.
- Scopes, R. K. (1987), Protein Purification : Principles and Practice, 2nd ed., p.280, Springer-Verlag, New York.