

DFA IV를 생산하는 levan fructotransferase의 포괄고정화

임 승 · 이 기 영

전남대학교 물질·생물화학공학과, 화학공학부

(062)530-0327, FAX (062)530-1849

Abstract

The condition of immobilization of the partially purified levan fructotransferase and the properties of the immobilized enzyme was investigated. Levan fructotransferase was immobilized on κ -carrageenan beads by entrapment method. The optimal κ -carrageenan concentration was obtained 2%(w/v) for the matrix. At that time, immobilized enzymes(0.81 units) have relative low activity compare with soluble enzyme(7.7 units). To immobilized and soluble enzyme, optimal activity temperature and pH were measured 55°C, 6.0 in sodium phosphate buffer 20mM solution.

If crosslinking agent was added, proper concentration was 0.5%(v/v). At 37°C, immobilized and soluble enzyme converted levan to oligofructose and DFA IV, and the conversion ratio was 32% and 61% at 60 hr.

서론

자연에서 대량으로 존재하는 폴리머 형태의 물질로부터 유용한 올리고당의 생산은 그들의 생리, 물리화학적 기능성 때문에 최근에 관심을 받고 있다¹⁾. Di-D-fructofuranose dianhydride 화합물(DFAs)은 levan(β -2,6 linked fructose polymer)과 inulin(β -2,1 linked fructose polymer)에서 효소적 또는 화학적인 반응에 의해서 만들어 질 수 있으며 감미료나 안정제등 식료품 산업이나 약학산업에 사용될 수 있는 가능성을 가진 물질로서 관심을 끈다²⁾. DFAs중의 하나인 DFA IV는 *Arthrobacter ureafaciens*에서 생산되는 levan fructotransferase가 levan을 기질로 사용해서 만드는 올리고당이라고 보고 되어있다³⁾. 다양한 산업분야에서 levan의 이용은 천연에서 드물게 존재하기 때문에 관심이 기울어지지 않았지만 최근에는 재조합 효소를 사용하여 levan의 대량생산이 가능해졌다⁴⁾. 분석 목적으로의 효소의 사용은 고 비용, 이용성, 그리고 재사용 등에 의해 제한되어 있기 때문에 장기간동안 재사용 될 수 있으며 반응 산물에서 쉽게 분리될 수 있는 고정화 효소가 주목된다. 효소 고정화에는 여러 가지가 사용되지만 물에 불용성 겔의 형성을 통한 효소의 포괄법은 많은 장점을 제공해준다⁵⁾.

이러한 배경을 바탕으로 이 논문은 DFA IV의 생산성 증대를 위해 levan fructotransferase를 κ -carrageenan bead를 이용하여 고정화, 반응특성에 관하여 조사하였다.

재료 및 방법

Levan fructotransferase와 levan은 생명공학연구소에서 구입하였으며 더 이상의 정제 과정을 거치지 않고 사용되었다.

고정화 효소의 제조

불용성 담체 비드로서는 κ -carrageenan(Korea carrageen co., korea)이 사용되었으며 2%(w/v)의 κ -carrageenan용액 9ml을 90°C로 가열하고 냉각하는 과정에서 levan fructotransferase용액 1ml(7.7unit)를 첨가하고 혼합한 후, 이 혼합액을 4.0%(w/v) KCl용액 50ml에 syringe를 사용하여 적하시켜 고정화 비드를 제조 4°C에 30분동안 경화시킨 후 실험에 사용하였다.

효소 활성 측정

Levan fructotransferase의 활성 측정은 37°C, pH6.0(20mM Sodium phosphate buffer)에서 행하여졌으며 반응은 100°C로 가열함으로써 중지시켰다. 정해진 조건에서 1분동안 1 μ mol의 DFA IV를 생산하는데 필요한 효소량을 1unit으로 결정하였다.

κ -carrageenan 비드에 고정화된 효소의 활성 측정

고정화 비드는 1%의 levan용액(20mM의 sodium-phosphate buffer, pH 6.0, 37°C)에서 30분 동안 교반, 반응시켜졌고 그 후 일정량의 샘플을 채취, 반응을 중지시키고 생산물을 분석하였다.

반응 생성물의 분석

효소 반응 산물의 분석에는 HPLC(Millipore, Waters, USA)를 이용 RI(Millipore, Waters, RI 401)detector를 사용하였다. 이때 컬럼의 온도는 90°C이며 이동상으로는 초순수를 사용하고 유속은 0.5m/min로 하였다.

결과 및 고찰

κ -carrageenan의 농도에 따른 고정화 효율

카라기난의 농도를 1~2.5%까지 증가시키면서 효소 고정화에 미치는 영향을 조사하였다.(Fig. 1). 카라기난의 농도가 증가함에 따라서 고정화율이 증가하였지만 2.5%보다는 2%에서 가장 높은 활성을 나타내었다.

효소의 활성에 미치는 온도의 영향

2%(w/v) κ -carrageenan 비드에 고정화된 효소와 soluble enzyme에 대한 온도의 영향을 조사하였다(Fig. 2). 그 결과, 고정화 효소와 soluble enzyme의 최대 활성온도는 55°C로 동일한 온도에서 나타났다.

효소의 활성에 미치는 pH의 영향

고정화 효소 및 soluble enzyme에 미치는 pH의 영향을 검토하였다(Fig. 3). 그 결과, 각각에 있어서 최적의 pH는 6.0으로 동일하였으며 고정화 효소는 pH 6.0이상에서 soluble

enzyme에 비해 약간 높은 활성을 나타내었다.

고정화 효소의 활성에 미치는 가교제의 영향

효소의 고정화시 안정성을 증가시키기 위해서 첨가되어지는 가교제인 glutaraldehyde의 농도에 따른 영향을 조사하였다(Fig. 4). 그림은 비드의 제조시 첨가되어지는 가교제의 농도가 높을수록 효소의 활성이 감소되어진다는 것을 보여주고 있다.

Fig.5는 고정화 효소와 soluble enzyme에 의한 DFA IV의 생산을 반응 시간별로 나타낸 그래프이다. 양쪽 효소모두 5시간 이후에는 DFA IV의 생산이 거의 되지 않음을 알 수 있다. 그리고 60시간에서 전환률 61%와 32%를 나타내었다.

요약

DFA IV를 생산하는 levan fructotransferase를 κ -carrageenan을 이용하여 고정화한 결과 카라기난의 농도가 2%일 때 가장 높은 활성을 나타내었다. 이 때에 고정화 담체에 포괄되어지는 효소의 활성도는 0.81 units으로서 soluble enzyme 7.7 units에 비해 상대적으로 낮은 활성을 보여주었다. 고정화 및 soluble enzyme의 최고 활성온도와 최적 pH는 동일하게 55°C, pH6.0 이었다. 가교제를 처리할 경우에 적당한 농도는 0.5%로 생각되어진다. 37°C에서 시간에 따른 고정화 및 soluble enzyme의 DFA IV 생산량을 HPLC로 분석한 결과 60시간 이후의 전환률이 각각 32%, 61%로 나타났다.

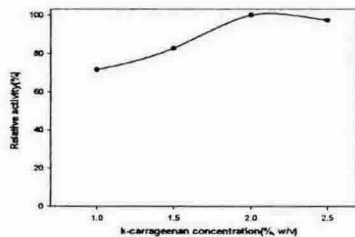


Fig. 1. Effect of matrix concentration on immobilized levan fructotransferase activity.

The used bead was formed in 4%(w/v) KCl solution and was reacted in 20mM sodium phosphate buffer pH 6.0, 1%(w/v) levan at 37°C.

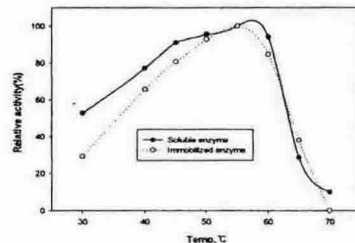


Fig. 2. Effect of temperature on the soluble and immobilized levan fructotransferase activity.

Enzyme reaction solution in 20mM sodium phosphate buffer pH 6.0 was incubated at various temperature.

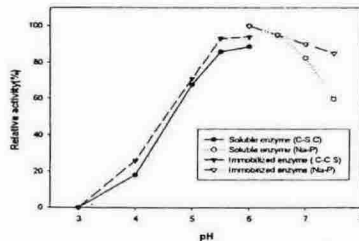


Fig. 3. Effect of pH on the soluble and immobilized levan fructotransferase activity.

Soluble and immobilized enzyme was incubated at 37°C and then relative activity was measured.

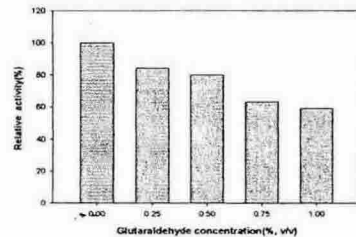


Fig. 4. Relative activity of immobilized enzyme treated with different concentration glutaraldehyde solution.

Enzyme reaction was carried out in 20mM sodium phosphate buffer, pH 6.0 and 1%(w/v) levan at 37°C.

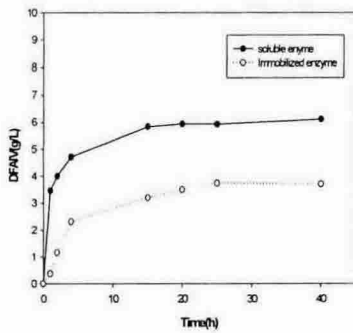


Fig. 5. Comparison of the DFAIV production between soluble and immobilized enzyme.

Enzyme reaction was carried out in 20mM sodium phosphate buffer, pH 6.0 and 1%(w/v) levan at 37 C

참고문헌

1. Kennedy JF, Cabalda VM, White CA. "Enzymatic starch utilization and genetic engineering"(1988). TIBTECH, 6 ,184-9.
2. Saito K, Goto H, Yokoda A, Tomita F. "Purification of levan fructotransferase from *Arthrobacter nicotinovorans* GS-9 and production of DFA IV from levan by the enzyme"(1997). Biosci Biotech Biochem, 61, 1705-9.
3. Tanaka, K., Kawaguchi, H., Ohno, K., & Shohji, K., (1981). J. Biochem, 90, 1545-1548.
4. Song KB, Joo HK, Rhee SK. Nucleotide sequence of levansucrase gene(levU) of *Zymomonas mobilis* ZM1(ATCC 10988)(1993). Biochim Biophys Acta, 1173, 320-4.
5. Nisson, K. and Mosbach, K. (1980). FEBS Lett, 118, 145-150.