

Cyclodextrin Glucanotransferase의 열안정성 증가

†김 진 현 · †홍 승 서 · †이 현 수

공주대학교 화학공학과, ¹(주) 삼양제넥스 생명공학연구소

(접수 : 2000. 9. 21., 게재승인 : 2001. 4. 3.)

Increase of the Thermostability of Cyclodextrin Glucanotransferase

Jin-Hyun Kim[†], Seung-Suh Hong[†], and Hyun-Soo Lee[†]

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.)

The effect of various additives on the thermostability of *Bacillus sp.* cyclodextrin glucanotransferase (CGTase) was investigated. CaCl_2 , starch, and glycerol had a positive effect on the thermostability of the CGTase, which was very stable for 6 months with added starch (5%, w/v) and CaCl_2 (0.05 M) at 30°C.

Key Words : cyclodextrin glucanotransferase(CGTase), additive, thermostability

서 론

효소의 산업적인 이용에 있어서 높은 온도에서 효소의 열 안정성은 매우 중요하다. 이러한 높은 온도범위에서는 생산성이 향상되고 미생물의 오염문제를 줄일 수 있다(1,2). 따라서 효소의 열안정성에 관한 연구는 열에 대한 효소의 비활성화 기작(mechanism)과 열안정성(thermo-stability) 향상에 대한 합리적인 전략 등을 포함하여 많이 진행되고 있다(3-7).

여러 첨가물을 이용한 *Bacillus licheniformis*의 α -amylase 열안정성 향상에 관한 연구는 많이 보고되고 있다(8). 효소의 열안정성 향상에 있어 환경적인 요인이 매우 중요한 역할을 하는데 특히 물의 존재에 대해서 많은 영향을 받는 것으로 알려져 있다(9). 물의 조직을 변화시키거나 단백질 분자들에 대한 hydrophobic interaction을 강화시켜주는 첨가물들이 안정제로 알려져 있으며 이러한 효소의 안정제로는 당, 염, 유기용매 등이 많이 이용되고 있다(10). 그리고 일반적인 경우에 높은 농도에서 기질, 생산물, 저해제의 첨가에 의하여 효소의 열안정성을 높일 수 있는 것으로 알려져 있다(11).

본 연구에서는 *Bacillus sp.*에서 생산된 cyclodextrin glucanotransferase (CGTase)의 열안정성에 미치는 여러 종류의 첨가물 영향에 관하여 조사하였다.

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 역ガ를 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. 이 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(14)에 의하여 측정하였으며 실험에 사용된 효소의 역기는 205 U/mL이었다.

열안정성 실험

효소의 열안정화 실험에서 효소 안정화에 영향을 미치는

*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

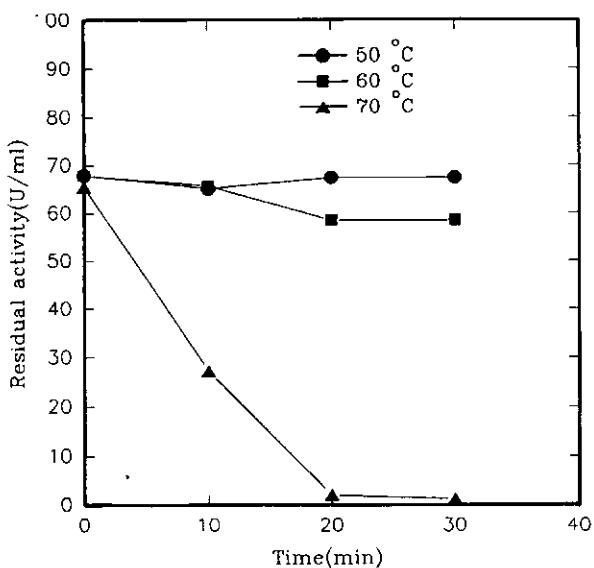


Figure 1. Effect of temperature on CGTase thermostability in the absence of any additive.

기질과 염 등의 영향을 제거하기 위하여 실험 전에 이들을 제거하여 주어야 한다. 본 연구에서는 발효 배지에 이러한 성분이 없으므로 발효를 거친 발효액에서 균체를 제거한 후 여러 첨가제를 첨가하여 pH 7.5로 맞추어 여러 온도 범위에서 반응을 수행하였다.

결과 및 고찰

여러 첨가제 영향

CGTase의 열안정성을 검토하기 위하여 효소액에 첨가제를 첨가하지 않은 경우 온도변화에 따른 효소의 활성을 조사하여 Figure 1에 나타내었다. 효소액을 50°C와 60°C에서 반응시켰을 경우에는 효소의 활성에 영향이 없으나 70°C에서 반응시켰을 경우 20분 경과 후에 초기 효소활성의 대부분이 비활성화 되었다. 따라서 70°C에서 효소액에 여러 첨가제를 첨가하여 효소의 열안정성을 조사한 결과를 Table 1에 나타내었다. 여러 첨가물 중에서 염의 경우에는 CaCl_2 , 기질(substrate)의 경우에는 전분(starch), polyhydric alcohol의 경우에는 glycerol이 CGTase의 열안정성에 효과가 있었다. 그외의 여러 가지 염과 기질, polyhydric alcohol, 방부제, solvent, PEG, amino acid는 효소의 열안정성에 영향이 없었다. 물론 기질 중에서 lactose, maltose, sucrose의 경우에는 5 M (90%) 이상의 높은 농도에서는 Figure 2에서 보는 바와 같이 CGTase의 열안정성이 효과가 있으나 너무 고농도 범위이기 때문에 본 연구에서는 제외하였다.

Starch, Glycerol, CaCl_2 영향

여러 첨가물 중에서 CGTase의 열안정성에 효과가 있는 starch, glycerol, CaCl_2 에 대하여 여러 농도 범위에서 그 효과를 조사하였다. 여러 농도 범위에서 이를 첨가물을 첨가한 후에 70°C에서 30분 동안 반응시킨 후에 남아있는 효소의 활성을 조사하였다. 효소액에 첨가물이 첨가되지 않은 경우에는 70°C에서 30분 동안 반응시킬 경우 효소는 완전히 비활성화된다.

Table 1. Effect of various additives on the thermostability of cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus sp.* at 70°C.

Additive	Concentration ^a	Effect ^b
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.1 M	X
CaCl_2	0.1 M	O
MgSO_4	0.1 M	X
CoCl_2	0.1 M	X
MnCl_2	0.1 M	X
FeCl_2	0.1 M	X
NaCl	0.1 M	X
Na_2SO_4	0.1 M	X
Starch	1.0%	O
Lactose	1.0%	X
Maltose	1.0%	X
Sucrose	1.0%	X
Sorbitol	1.0%	X
Tween 80	10.0%	X
Triton X-100	10.0%	X
Glycerol	5.0%	O
Ethanol	10.0%	X
Ethylene glycol	20.0%	X
Polyethylene glycol(PEG)	0-20.0%	X
PEG35000		
PEG8000		
PEG4000		
Dextran	2.0%	X
Dextran T40		
Dextran T70		
Dextran T2000		
Glutaraldehyde	0.05%	X
Citric acid	0.1%	X
Acetic acid	0.2%	X
Sodium benzoate	0.2%	X
Cysteine	0.1 M	X
Ammonium sulfate	10.0%	X

^aM : Mole, % : w/v

^bO : Positive effect, X : No positive effect

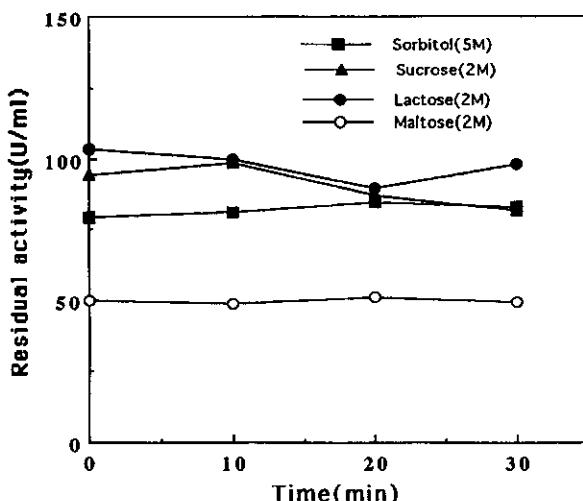


Figure 2. Effect of sorbitol, sucrose, lactose, and maltose on CGTase thermostability at 70°C.

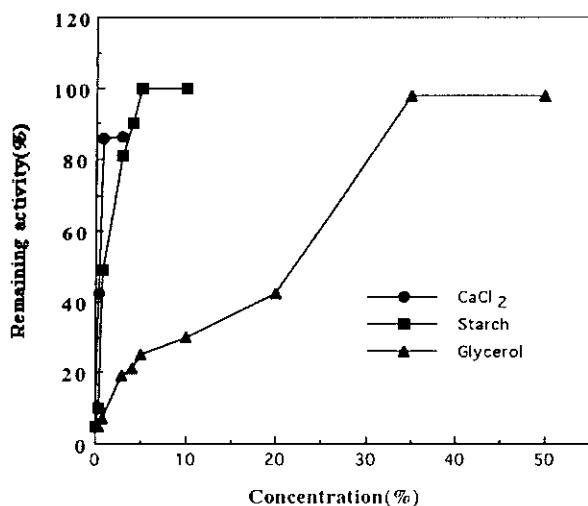


Figure 3. Effect of CaCl_2 , starch, and glycerol on CGTase thermostability at 70°C and 30 min reaction.

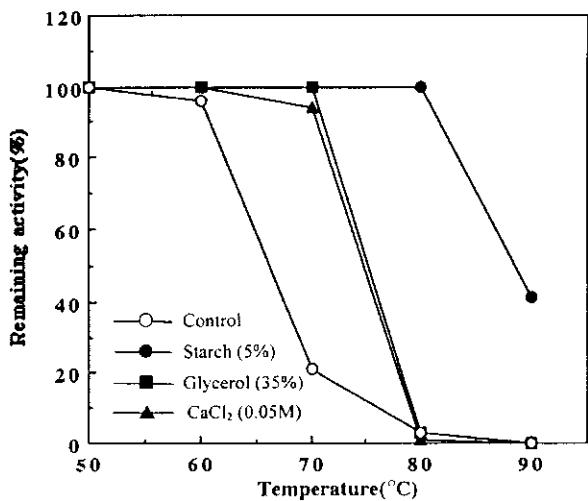


Figure 4. Effect of temperature on CGTase thermostability in the presence of additives.

화되는 반면 효소액에 starch, glycerol, CaCl_2 를 첨가한 경우에는 Figure 3에서 보는 바와 같이 CGTase의 열안정성에 효과 있었다. 첨가물의 농도가 증가할수록 CGTase의 열안정성은 증가하였으며 5% starch와 35% glycerol을 첨가하였을 경우에는 효소의 비활성화가 생기지 않았으며 0.74% CaCl_2 를 첨가하였을 경우에는 초기 효소 활성의 87%를 유지하였다.

효소액에 5% starch, 35% glycerol, 0.74% CaCl_2 를 첨가하였을 경우에 여러 온도범위에서의 CGTase의 열안정성을 조사하여 Figure 4에 나타내었다. CGTase활성은 35% glycerol과 0.74% CaCl_2 를 첨가하였을 경우 70°C , 5% starch를 첨가하였을 경우에는 80°C 까지 효소가 안정하였다. 90°C 에서 30분 동안 반응시킨 결과 35% glycerol과 0.74% CaCl_2 의 경우에는 초기 효소활성이 완전히 비활성화되는 반면 5% starch의 경우에는 초기 효소활성의 42% 정도 유지하였다. 35% glycerol과 0.74% CaCl_2 를 첨가한 경우에는 80°C 에서 반응시킬 경우 초기 효소활성이 완전히 비활성화되었다. 5% starch의 경우에는 CGTase 열안정성에 가장 효과적임을 알 수 있었다. 또한

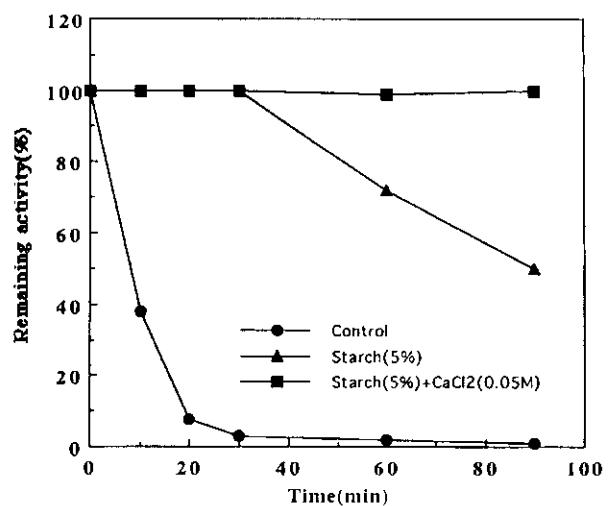


Figure 5. The CGTase thermostability in the presence of starch and CaCl_2 as a function of time at 70°C .

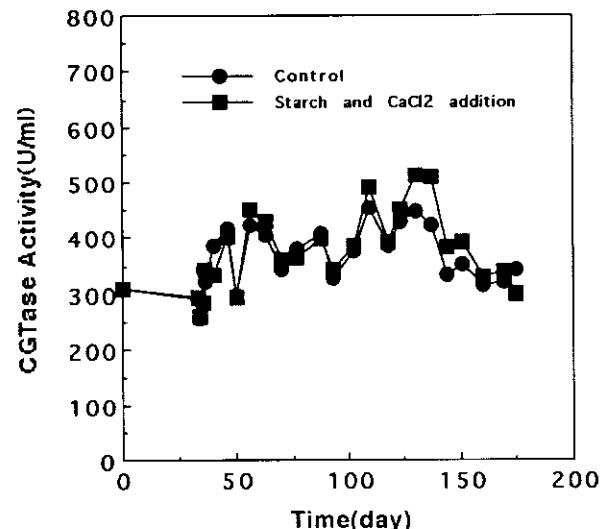


Figure 6. The CGTase thermostability in the presence of starch (5%, w/v) and CaCl_2 (0.05 M) as a function of time at 4°C .

5% starch의 경우에는 Figure 5에서 보는 바와 같이 70°C 에서 90분 동안 반응시킨 후에 초기 효소활성이 50% 정도 남아 있었으며 5% (w/v) starch와 0.05 M CaCl_2 를 동시에 첨가하였을 경우에는 초기 효소활성이 완전히 유지되어 안정화에 상당히 효과적임을 알 수 있었다. 또한 이들 첨가제 (5% starch, 0.05 M CaCl_2)를 이용하여 4°C 와 30°C 에서 장기 보관에 의한 효소 안정성을 조사하여 Figure 6과 7에 나타내었다. 4°C 에서는 6개월간 안정제 첨가 유무에 관계 없이 안정한 반면 30°C 에서는 안정제를 첨가하지 않을 경우 3개월 이후에 효소의 역가가 급격히 감소하나 5% (w/v) starch와 0.05 M CaCl_2 첨가에 의하여 30°C 에서 6개월간 안정함을 알 수 있었다.

여러 첨가물에 의한 효소 안정화는 *Bacillus licheniformis*의 α -amylase (8)와 *Aspergillus oryzae*의 α -amylase (12)에서 많은 연구가 이루어졌다. 이러한 첨가물의 농도가 증가할수록 효소의 안정화에 효과적이며 sorbitol의 경우에는 α -amylase

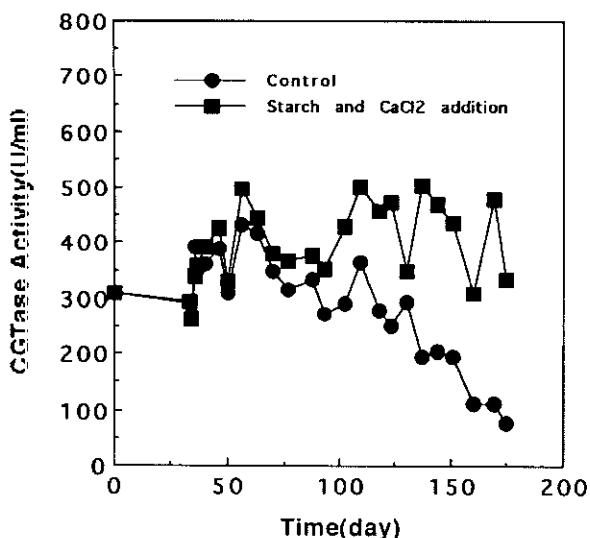


Figure 7. The CGTase thermostability in the presence of starch (5%, w/v) and CaCl_2 (0.05 M) as a function of time at 30°C.

의 안정화에 효과적이었다. 그러나 glucose oxidase (13)의 경우에는 다른 결과를 얻었다. 그러므로 안정화 효과의 정도와 효과적인 첨가물의 특성은 효소의 종류에 의존하며 절대적이나 효과는 아님을 알 수 있었다(12). α -Amylase의 경우에 있어서 sugar와 polyhydric alcohol에 의한 단백질의 열안정성에 대한 기작은 이들이 물에 미치는 영향, 즉 hydrophobic interaction의 정도에 의하여 설명되기도 하며(14), 단백질 표면 (protein surface)과의 solute exclusion^o나 solute interaction으로 안정화나 비활성화의 기작을 설명하기도 한다(6,15).

요약

Cyclodextrin glucanotransferase (CGTase)의 열안정성에 미치는 여러 종류의 첨가물 영향에 관하여 조사하였다. 여러 첨가물 중에서 염의 경우에는 CaCl_2 , 기질의 경우에는 전분, polyhydric alcohol의 경우에는 glycerol이 CGTase의 열안정성에 상당히 효과가 있음을 알 수 있었다. 안정제로 5% (w/v) starch와 0.05 M CaCl_2 를 첨가하여 30°C에서 6개월간 안정함을 확인하였다.

REFERENCES

- Arnold, F. H. and J. C. Moore (1997), Optimizing Industrial Enzymes by Directed Evolution, *Adv. in Biochem. Eng.* **58**, 1-14.
- Miyazaki, K., P. L. Wintrode, R. A. Grayling, D. N. Rubingh, and F. H. Arnold (2000), Directed evolution study of temperature adaptation in a psychrophilic enzyme, *J. Molecular Biology*, **297**, 1015-1026.
- Zaks, A. and A. J. Russell (1988), Enzymes in Organic Solvents : Properties and Applications, *J. Biotechnol.* **8**, 259-270.
- Ayala, G., M. T. Gomez-Puyou, A. Gomez-Puyou, and A. Darszon (1986), Thermostability of Membrane Enzymes in Organic Solvents, *FEBS*, **203**, 41-43.
- Park, K. H. (1998), Characterization of a Thermostable Cyclodextrin Glucanotransferase Isolated from *Bacillus stearothermophilus* ET1, *J. Agri. Food Chem.* **46**, 952-959.
- Ahn, J. H., J. B. Hwang, and S. H. Kim (1991), Effect of Various Additives and Solvents on Thermostability of Cyclodextrin Glucanotransferase from *Bacillus stearothermophilus*, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **19**, 368-371.
- 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.
- Asther, M. and J. Meunier (1990), Increased Thermal Stability of *Bacillus licheniformis* -Amylase in the Presence of Various Additives, *Enzyme Microb. Technol.* **12**, 902-905.
- Zaks, A. and A. M. Klibanov (1984), Enzymatic Catalysis in Organic Media at 100°C, *Science*, **224**, 1249-1251.
- Ye, W. N., D. Combes, and P. Monsan (1988), Influence of Additives on the Thermostability of Glucose Oxidase, *Enzyme Microb. Technol.* **10**, 498-502.
- Violet, M. and J. C. Meunier (1989), Kinetic Study of the Irreversible Thermal Denaturation of *Bacillus licheniformis* -Amylase, *Biochem. J.* **263**, 665-670.
- Kitahata, S. and S. Okada (1974), Action of Cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus megaterium* Strain No.5 on Starch, *Agri. Biol. Chem.* **38**, 2413-2417.
- Graber, M. and D. Combes (1989), Effect of Polyols on Fungal -Amylase Thermostability, *Enzyme Micro. Technol.* **11**, 673-677.
- Zaks, A. and A. M. Klibanov (1988), Enzymatic Catalysis in Nonaqueous Solvents, *J. Biol. Chem.* **263**, 3194-3201.
- Arakawa, T. and S. N. Timasheff (1989), Stabilization of Protein Structure by Sugars, *Biochemistry*, **21**, 6536-6544.