

Spiral-Wound Type Membrane에 의한 Cyclodextrin Glucanotransferase 분리

김진현 · 홍승서 · 이현수
(주)삼양제넥스 생명공학연구소

Separation of Cyclodextrin Glucanotransferase by Spiral-Wound Type Membrane

Jin-Hyun Kim, Seung-Suh Hong and Hyun Soo Lee
Samyang Genex Biotech Research Institute

Abstract

In separating cells from CGTase fermentation broths, high recovery (98.7%) was obtained by diafiltration using spiral-wound type membrane. The flux was increased effectively by increasing the flow rate, temperature, and molecular cut-off size for the recovery of CGTase. On the other hand, the flux was decreased by increasing the protein concentration and pH. In a batchwise operation, the system suffered from a severe fouling problem, which was relieved drastically by applying diafiltration and backflushing technique, although the technique increased the permeate volume. By starting diafiltration after concentrating the broth to specific concentration, the minimum level of permeate volume was achieved.

Key words: spiral-wound type membrane, CGTase, separation, diafiltration, backflushing

서 론

Cyclodextrin glucanotransferase(EC 2.4.1.19: 1,4- α -glucan 4-(-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(Dalmia et al., 1995; Yamamoto et al., 2000). 또한 미생물을 이용한 CGTase 효소 생산을 위해서는 세포 외 효소(extracellular enzyme)인 CGTase를 효율적이고 경제적인 방법으로 분리/회수하는 것이 매우 중요하며 이를 통하여 정제된 CGTase는 CD 생산에 사용되어진다(Yamamoto et al., 2000).

발효배양액으로부터 균체 분리 및 효소 회수 시 전 통적으로 원심분리나 일반여과기술이 많이 사용되고 있으나 이들은 분리효율이 낮거나 연속작업이 어려우며 aerosol, filter cake 등이 형성되는 단점이 있다(Jeong et al., 1989). 이러한 문제점들을 해결하기 위하여 최근에는 조업이 간단하고, 높은 분리 성능과 에너지 비용이 낮다는 장점과 환경에 민감한 생물학적 제품의 분리 및 회수에 유리한 막분리 기술에 의한 균체분리 및 효소회수 방법이 활발히 연구되고 있다. 또한 이의 산업적인 적용은 막 주변의 sublayer 형성 및 fouling 현상으로 인한 급격한 flux의 감소로 인하여 많은 제약을 받아왔다(Jeong et al., 1989; Kim과 Chung, 1989). 그러나 최근 새로운 재질의 막 개발과 cross-flow filtration 기술의 적용으로 flux 감소 문제를 상당히 해결하여 그 응용범위가 급속히 확장되고 있다(Chen, 1997; Voigt et al., 1999; Lee et al., 2000; Lee et al., 2000a). 막의 fouling 현상은 여과압력, 유입액의 유속, 온도 등의 운전조건에 상당한 영향을 받으므로 이러한 운전 조건의 조정으로 최소화 시킬 수 있다(Jeong et al., 1989; Strathmann, 1985; Bowen, 1933; Patel et al., 1987; Kuo와 Cheryan, 1983). 효과적인 균체

Corresponding author: Jin-Hyun Kim, Samyang Genex Biotech Research Institute, 63-2 Hwaam-Dong, Yusung-Gu, Taejeon 305-348, Korea

분리를 위하여 막분리에 적용시킬수 있는 다른 방법은 diafiltration이다(Cheryan,1998). Diafiltration은 permeation되는 양만큼의 물을 retentate (concentrate)에 공급하여 줌으로써 fouling을 최소화 시키는 동시에 발효산물의 회수율을 높여주는 방법이다. 그러나 이 방법은 추가된 물에 의하여 막 및 추후 정제공정의 부하가 늘어나는 단점을 가지고 있다.

본 연구에서는 CGTase 발효 배양액으로부터 균체 제거 및 효소 분리 시 막의 fouling 현상에 대한 영향 인자에 대하여 조사하여 diafiltration에 의한 균체 제거 방법의 정립과 한외여과에 의한 CGTase 분리 방법의 정립에 그 목적이 있다.

재료 및 방법

균주

100 여종의 토양샘플로부터 CGTase 생산균주를 페놀프탈레인 및 전분함유 agar plate 상에서의 clear zone 형성능을 비교하여 1차 선별한 후 삼각플라스크 배양을 통해 각 분리균주의 역가를 비교하여 36주를 2차 선별하였다. 2차 선별된 균주를 5 L 발효조에서 배양한 뒤, 효소를 정제하여 효소의 반응특성 (pH, 온도, 내열성, CD 조성 등) 및 발효 특성을 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 수행하였다. 탄소원, 질소원, 무기염류의 농도 별 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, 교반속도, 통기량, 배양온도 조건을 설정하였다. 최적 조건으로는 pH 8.0, 배양온도 30°C, 교반속도 400 rpm, 통기량 1 vvm 이었다. 5 L 발효 최적화 조건을 기초로 30 L 발효조에서 효소생산을 수행하여 막 분리 실험에 이용하였다. 효소의 활성은 50°C에서 Kitahata와 Okada 방법(1974)에 의하여 측정하였다.

Membrane module

실험에 사용된 module 은 미국 Koch Membrane System INC.사의 spiral-wound type module(Model:

PROTO-SEP IV)이며 막 표면적은 0.23 m² 이었다. 균체 제거를 위한 microfiltration의 경우 0.2 μm filter (polysulfone)를 사용하였으며 세포의 효소인 CGTase 회수의 경우 molecular cut-off size(재질: polysulfone) 10,000(10 K)과 30,000(30 K)의 두 가지를 사용하였다. 또한 flux는 시간과 한외여과기의 단위면적에 대한 permeate 부피로 계산되었다(L/h·m²). 모든 실험은 3회에 걸쳐 실시한 결과의 평균값을 취하였다.

결과 및 고찰

Microfiltration에 의한 균체 분리

발효배양액으로부터 균체 제거를 위한 막분리 시 순환액 (retentate)에 물의 공급 없이 지속적으로 농축을 하는 회분식의 경우에는 농축액의 점도 증가 및 fouling에 의하여 flux가 급격히 감소하게 된다. 이를 막기 위한 방법으로 diafiltration을 적용할 경우 flux의 증가로 막의 이용 효율은 높아지나 물의 추가로 인하여 동일한 효소 회수율에 도달하는데 필요한 여액의 양은 증가하므로 추후의 정제 공정의 부하가 증가하게 된다 (Scott, 1988; Mahenc *et al.*, 1986). 따라서 여액의 증가를 최소화 시키면서 높은 flux를 유지하는 방법으로 회분식 막분리와 diafiltration을 결합한 공정(Fig. 1)을 사용하였다. 회분식 막분리와 3회의 diafiltration한 결과 각 단계에서의 flux 변화 및 효소 회수율 Fig. 2와

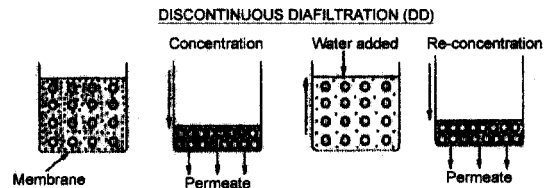


Fig. 1. Schematic illustration of discontinuous diafiltration.

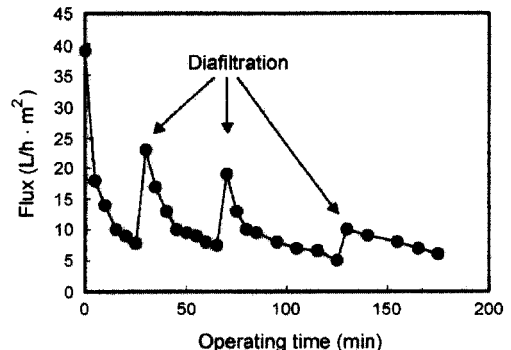


Fig. 2. Flux profiles of different operating modes in microfiltration.

Fig. 3에 각각 나타내었다. 세포의 효소인 CGTase 회수의 경우 회분식 막분리에 의한 균체 제거 결과 52.7% 효소 회수율을 얻었으며 1회, 2회, 3회에 걸쳐 diafiltration한 결과 각각 75.3, 88.5, 98.7% 효소 회수율을 얻어 3회에 걸친 diafiltration 결과 대부분의 효소를 균체로부터 분리하여 회수할 수 있었다. 또한 flux 변화는 전형적인 gel polarization limited behavior를 보여 초기 조업시간 동안에 급격히 감소하여 어느 시점에 도달하면 일정하게 유지되는데 diafiltration 시점은 여액의 유속이 일정하게 유지되는 시점에서 시작하였다.

한외여과에 의한 효소 분리시 flux에 대한 영향인자

Transmembrane pressure

Permeate flux에 대한 transmembrane pressure(TMP)의 영향을 알아보기 위해서 TMB 변화에 따른 flux를 측정하였다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 단백질이 존재하지 않은 경우(중류수)에는 flux는 TMP 증가에 비례하여 증가하여 gel polarization 현상이 보이지 않은 반면 단백질(2.3 mg/mL)이 존재하는 경우 전형적인 gel

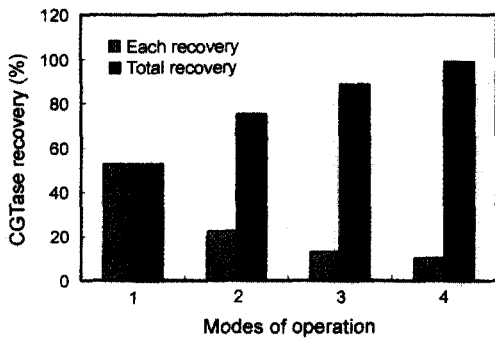


Fig. 3. CGTase recovery of different operating modes in microfiltration. 1: batch, 2: one times diafiltration, 3: two times diafiltration, 4: three times diafiltration.

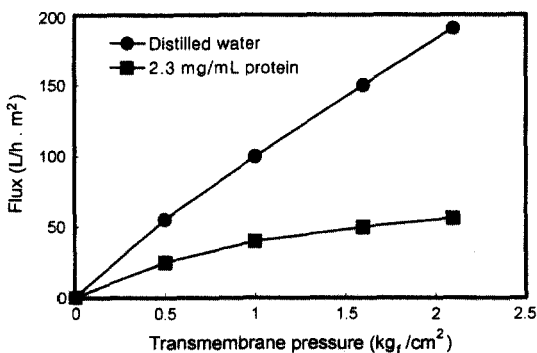


Fig. 4. Effect of transmembrane pressure on the flux.

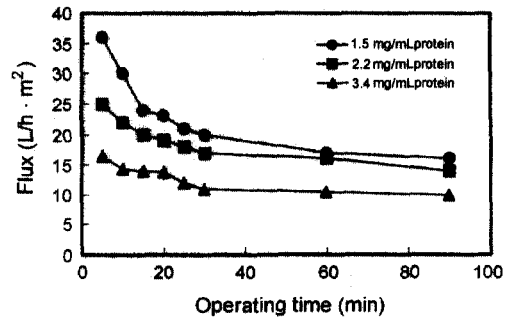


Fig. 5. Effect of protein concentration on the flux.

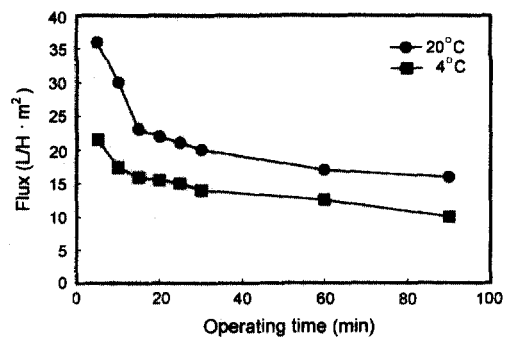


Fig. 6. Effect of temperature on the flux.

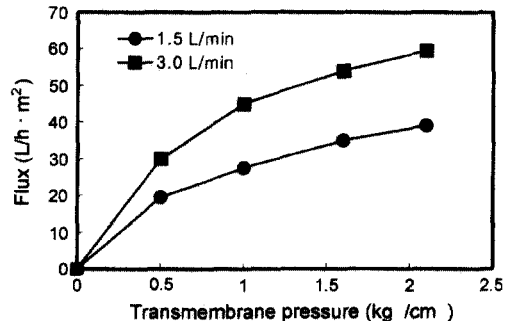


Fig. 7. Effect of flow rate on the flux.

polarization 현상을 보였다. 즉, 낮은 TMP 영역에서는 압력증가에 따른 flux의 증가가 관측되었으나 그 이상의 영역에서는 flux의 증가는 거의 없었다. 결국, TMP 0.5 kgf/cm² 이상에서는 여액의 유속증가 효과는 거의 없었다. 또한 Fig. 5에서 보는 바와 같이 단백질의 농도가 증가할수록 조업시간에 따른 flux는 점점 감소하여 한외여과 시 유입되는 용액 내 단백질 함량이 flux에 많은 영향을 줄 수 있었다.

온도 및 pH

Fig. 6에서 보는 바와 같이 온도상승에 따라 flux는 증가했으며 이와 같은 현상은 Kuo와 Cheryan(1983)

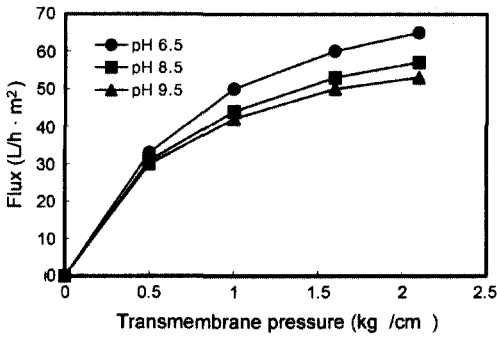


Fig. 8. Effect of pH on the flux.

이 보고한 결과와 같이 온도상승에 따른 점도의 감소에 기인한 것으로 추정된다. 본 연구의 경우 4°C에 비하여 상온(20°C)에서 조업할 경우 flux 측면에서 42% 증가를 보였다. 따라서 효소의 열 안정성을 고려하여 가능한 높은 온도에서 막분리를 실시하는 것이 유리할 것으로 판단된다. pH는 Fig. 8에서 보는 바와 같이 용액의 pH가 감소할수록 flux는 오히려 증가함을 알 수 있었다. 이러한 현상은 pH 변화에 따른 용액 내 여러가지 염들의 용해도 차이에 기인하는 것으로 알려져 있다(Cheryan과 Merin, 1981; Kuo와 Cheryan, 1983). 이들에 의하면 용액의 pH가 증가하면 용액 내

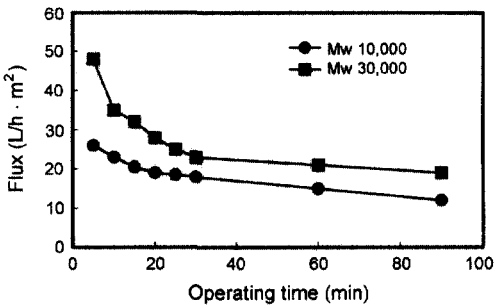


Fig. 9. Effect of molecular cut-off size on the flux.

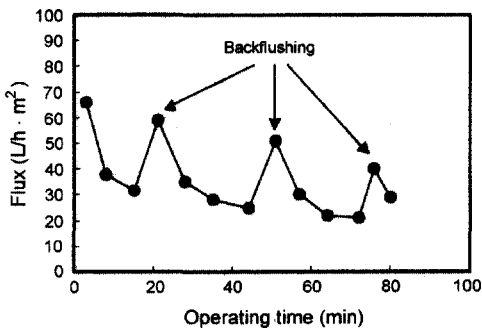


Fig. 10. Effect of backflushing on the flux.

염(특히 calcium phosphate)들의 용해도가 감소하여 insoluble 형태로 막 표면에 흡착되어 flux를 감소시키는 역할을 하게 된다. 본 연구에서는 potassium phosphate의 용해도 감소에 기인하는 것으로 판단되며, 특히 Cheryan과 Merin(1981)는 막 표면의 x-ray 분석을 통하여 이를 설명하였다.

유입속도

유입속도는 cross-flow filtration에서 중요한 역할을 하는 변수로(Kuo 와 Cheryan, 1983; Jeong *et al.*, 1989), 유입속도 증가에 따라 뚜렷한 flux 증가 효과를 Fig. 7에서 볼 수 있었다. 한외여과 시 gel polarization이 생긴 이후에는 유입속도의 증가에 의하여 flux를 증가시킬 수 있는데 이는 유입속도가 concentration polarization이나 membrane fouling 을 경감시키는데 관계가 있다(Kim과 Chung, 1989).

Molecular cut-off size

막의 molecular cut-off size 는 한외여과시 사용되는 막의 molecular cut-off size가 증가할수록 Fig. 9에서 보는 바와 같이 flux는 증가하였다. Molecular cut-off size 10,000에 비하여 molecular cut-off size 30,000의 경우 flux는 대략 35% 증가한 반면, 여액으로의 효소 손실도 5-10% 정도 증가하였다.

Backflushing

막 표면에서 주로 fouling 문제로 flux가 감소되므로 막을 backflushing 함으로써 flux를 회복할 수 있을 것으로 판단되어(Kim과 Chung, 1989) 규칙적인 backflushing으로 막의 fouling 문제를 해결하고자 하였다. 그래서 15분 동안 조업하다가 막을 통과한 여과액을 사용해서 3분 동안 backflushing하는 것을 반복하여 3 주기(cycle)에 걸쳐 실시하였다. 이때 여과압력, TMP는 0.4 kgf/cm², 그리고 backflushing 부피는 2.7 L 이었다. Fig. 10에서 보는 바와 같이 3 주기 (cycle)를 통해서 flux는 전체적으로 약간씩 감소되는 경향을 보여 주기는 하지만 짧은 구간에서의 backflushing의 효과를 본 실험을 통하여 확인할 수 있었다.

요 약

세포의 효소인 CGTase 회수의 경우 회분식 막 분리에 의한 균체 제거 결과 52.7% 회수율을 얻었으며 1회, 2회, 3회에 걸쳐 diafiltration한 결과 각각 75.3%, 88.5%, 98.7% 회수율을 얻어 3회에 걸친 diafiltration 결과 대부분의 효소를 균체로부터 분리하여 회수할 수 있었다. 효소회수를 위한 한외여과의 경우 높은 유속, 높은 온도, 큰 molecular cut-off size, 낮은 pH에서 높

은 flux를 보여 주었으며 fouling 정도는 protein 농도가 높을수록 또한 유속이 낮을수록 심각한 것으로 나타났다. 이러한 fouling 현상에 의한 flux 감소는 diafiltration과 backflushing의 적용으로 현저히 완화시킬 수 있었다. Diafiltration과 backflushing에 의한 효소 회수 시 초기부터 적용하는 것보다는 특정 농도까지 농축시킨 후 적용하는 경우에 작업시간과 여액의 부피를 최소화할 수 있었다.

문 헌

- Bowen, R. 1993. Understanding flux patterns in membrane processing of protein solutions and suspensions. *Trends in Biotechnol.* **11**: 451-460
- Chen, M.N. 1997. Removal of copper(II) chelates of EDTA and NTA from dilute aqueous solutions by membrane filtration. *Ind. Eng. Chem. Res.* **36**: 179-186
- Cheryan, M. 1998. Ultrafiltration and microfiltration handbook. Technomic Publishing Corporation, Pennsylvania, USA
- Cheryan, M. and U. Merin. 1981. The effect of protein-mineral-membrane interactions on the fouling of ultrafiltration membranes. In "Fundamentals and Applications of Surface Phenomenon Associated with Fouling and Cleaning in Food Processing,"(Ed.) B. Hallstrom, D.B. Lund, and C. Tragardh, Lund University Press, Sweden, pp204-206
- 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
- Jeong, S.C., J.W. Yun, Y.J. Jeon, Y.J. Cho and J.H. Lee. 1989. Separation of antibiotics-producing mycelia by cross-flow filtration. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **4**: 177-184
- Kim, H. and I.S. Chung. 1989. Cross flow filtration of *Pichia stipitis* by a hollow fiber membrane. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **4**: 57-61
- Kitahata, S. and S. Okada. 1974. Action of cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus megaterium* strain No.5 on starch. *Agri. Biol. Chem.* **38**: 2413-2417
- Kuo, K.P. and M. Cheryan. 1983. Ultrafiltration of acid whey in a spiral-wound unit: Effect of operating parameters on membrane fouling. *J. Food Sci.* **48**: 1113-1118
- Lee, J.D., S.H. Lee, M.H. Jo, P.K. Park, C.H. Lee and J.W. Kwak. 2000. Effect of coagulation conditions on membrane filtration characteristics in coagulation microfiltration process for waste treatment. *Environ. Sci. Technol.* **34**: 3780-3788
- Lee, W.G., B.G. Park, Y.K. Chang, H.N. Chang, J.S. Lee and S.C. Park. 2000a. Continuous ethanol production from concentrated wood hydrolysates in an internal membrane-filtration bioreactor. *Biotechnol. Prog.* **16**: 302-304
- Mahenc, J., J.P. Lafaille and V. Sanchez. 1986. Estimation of the performance of hollow-fiber ultrafiltration modules. *Int. Chem. Eng.* **26**: 660-670
- Patel, P.N., M.A. Mehaia and M. Cheryan. 1987. Cross-flow membrane filtration of yeast suspensions. *J. Biotechnol.* **5**: 1-16
- Strathmann, H. 1985. Membranes and membrane processes in biotechnology. *Trends in Biotechnol.* **3**: 112-118
- Scott, J.A. 1988. Application of cross-flow filtration to cider fermentations. *Process Biochem.* **23**: 146-148
- Voigt, A., H. Lichtenfeld, G.B. Sukhorukov, H. Zastrow, E. Donath, H. Baumler and H. Mohwald. 1999. Membrane filtration for microencapsulation and microcapsules fabrication by layer-by-layer polyelectrolyte adsorption. *Ind. Eng. Chem. Res.* **38**: 4037-4043
- 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