

## Cyclodextrin glycosyltransferase 를 생산하는 호알칼리성 *Bacillus* 속 미생물

유주현\*·정용준·이정수

연세대학교 식품공학과

### Isolation and Characterization of Cyclodextrin Glycosyl Transferase Producing Alkalophilic *Bacillus* sp.

Yu, Ju-Hyun\*, Yong-Joon Chung and Jung-Soo Lee

Department of Food Engineering, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea

**A strain of alkalophilic *Bacillus* sp. YC-335 has been isolated from soil. The strain was capable of producing large amount of cyclodextrin glycosyl transferase (CGTase) in the culture broth. The preferable medium composition has been determined to be as follows: 1.5% soluble starch, 5% corn steep liquor, 0.1%  $K_2HPO_4$ , 0.02%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 1%  $CaCO_3$  and 1%  $Na_2CO_3$  (pH 10.3). The highest enzyme production was observed after 48 hours of cultivation at 37°C. The optimum pH and temperature for the activity of crude enzyme were 6.0 and 50°C, respectively. The enzyme was stable between pH 5 and 9, and upto 50°C. The enzyme converted starch into  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -CD in the relative amounts of 1:10:1.5, respectively.**

Cyclodextrin(CD)은 전분에 CD 생성효소(EC 2.4.1.19., cyclodextrin glycosyltransferase, CGTase)가 작용하여 생성되는 산물로서 6 개 이상의 glucose가  $\alpha$ -1,4 결합으로 연결된 환상형 당류이다(1, 2).

CD는 각종 분자들과 포접화합물을 형성함으로써 그 분자들이 가지고 있는 물리화학적 성질을 변화시키는 능력을 가지며 이러한 독특한 특성을 이용하여 의약, 식품, 농약, 화장품 등에 있어서 유효성분의 안정화, 가용화, 유효 등에 현재 널리 실용화되고 있다(3). CD는 1891년 Villier(4)가 처음으로 그 존재를 보고하고 1904년 Schardinger(5, 6)가 CD의 분리 및 구조에 대해 연구한 이래 1939년 Tilden과 Hudson(7)이 CD 생성효소인 *Bacillus macerans*의 amylase를 발견하여 CGTase의 조제 및 정제가 진행됨과 동시에 효소작용에 대한 연구가 시작되어 CGTase는 glycosyl기의 전이작용에 의한 cyclization, coupling, disproportionation 반응 등 세가지 특정적 반응을 가지는 복합기능의 효소로 밝혀지게 되었다. 이제까지 보고된 CGTase를 생산하는 미생

물로는 *B. macerans*, *B. circulans*(9), *B. megaterium*(10), *B. stearothermophilus*(11), *K. pneumoniae*(12), *B. ohbensis*(13), alkalophilic *Bacillus* sp.(14) 등이 알려지고 있으며 전분으로부터 CD의 생성비율과 효소적 특성이 각기 다르다.  $\beta$ -CD는 포접화합물의 제조가 비교적 쉽고 수용액에서의 낮은 용해도로 인해  $\alpha$ -CD나  $\gamma$ -CD를 제조할 때와는 달리 용매를 사용하지 않고 제조할 수 있으므로 식품이나 의약품에 응용이 가능하다(15).

따라서  $\beta$ -CD의 생성비율이 높은 효소생산 균주를 탐색하는 것은 산업적으로 유용할 것으로 생각되어 본 연구에서는 토양으로부터  $\beta$ -CD 생성효소의 생산성이 우수한 미생물을 분리하고 효소의 일반적 성질을 검토하였다.

#### 실험재료 및 방법

##### 균주의 분리

CGTase 생산균주의 분리를 목적으로 전국 각지의

**Key words:** Cyclodextrin glycosyltransferase, alkalophilic *Bacillus* sp.

\* Corresponding author

토양을 채집하여 알칼리조건의 기본배지를 사용하여, 37°C, 3~5일간 평판희석 배양법에 의해 균주를 분리하였다. 기본배지 조성은 1% soluble starch, 0.5% polypeptone, 0.5% yeast extract, 0.1% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.02% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 2% agar(pH 10.3)로 하였다.

#### 활성확인법

알칼리조건(pH 10.3)에서 생육된 균주들은 1차적으로 1% soluble starch가 함유된 평판배지에 2~3일간 배양한 후 요오드 용액(0.02% I<sub>2</sub>, 0.2% KI)을 가해 colony 주위에 생기는 clear zone으로 전분 분해능을 확인하고 선별된 균주를 2차적으로 동일조성의 액체배지에 37°C에서 3일간 시험관 진탕배양한 후 3% soluble starch 용액(pH 7.0) 2ml에 0.5ml의 배양상정액을 가하여 37°C에서 2~6시간 반응시킨 후 0.5ml의 trichloroethylene(TCE)을 가해 강하게 vortex mixing시켜 방치한 후 생성되는 백색의 침전을 확인함으로써 CD의 생성유무를 판별하였다. 최종 확인을 위해 TCE 침전법과 동일조건으로 효소반응시킨 후 반응액 5μl를 DC-Plastikfolien Kieselgel 60F<sub>254</sub>(Merck 제)에 spot하고 용매로서 1-butanol : ethanol : water = 4 : 3 : 3을 사용하여 전개시켰다. 전개 후 1% methanolic iodine을 분무하여 α-, β-, γ-CD의 위치를 표준시료와 Rf치를 비교하여 확인하였다.

#### 효소활성 측정

CGTase 활성의 측정에는 Nakamura 등(14)의 glucoamylase 법을 변형하여 사용하였다. 기질로서 5mM α-CD와 25mM sucrose를 사용하여 40°C에서 10분간 효소반응시킨 후 10분간 끓여 반응정지시킨다. 여기에 9.3 units의 glucoamylase를 첨가하여 20분간 더 반응시킨 후 생성된 환원당의 양을 dim-nitro salicylic acid(DNS)법에 의해 O.D.<sub>510</sub>에서 측정하였다. 이때 효소 1 unit는 주어진 조건에서 1분간에 1 μmole의 glucose를 생성시키는 효소의 양으로 정의하였다.

#### 균주의 동정

분리균주에 대한 전자현미경 관찰을 통한 형태적 특성 및 각종 배지에서의 배양상의 특성을 검토하고 균주의 생리적 및 생화학적 특성을 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology에 준하여 동정하였다.

#### 균주의 배양 및 조효소액의 조제

효소생산을 위한 배지로는 1.5% soluble starch, 5% corn steep liquor, 0.1% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.02% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1% CaCO<sub>3</sub>, 1% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 10.3을 사용하였다. 기본배지에서 하룻밤 배양한 분리균주의 증배양액을 1%(v/v)되게 본 배양액에 접종하여 37°C에서 48~60시간 회전 진탕배양하여 배양상정액을 얻은 후 냉각 ethanol을 3배 가량 첨가하여 하룻밤 저온에 방치하고 얻어진 단백질을 침전물을 완충액(pH 6.0)에 용해하여 조효소액으로 사용하였다.

#### 활성염색

효소단백질의 gel 상의 위치를 확인하기 위해 SDS가 함유되지 않는 polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE)를 행한 후 한쪽 gel은 Coomassie Brilliant Blue R-250으로 염색하여 band를 확인하고 다른 한쪽은 잘라내어 3%(w/v) soluble starch 용액에서 40°C, 20분간 반응시킨 후 증류수로 세척하고 0.2% KI, 0.02% I<sub>2</sub> 용액으로 염색하여 clear zone이 나타난 활성위치를 확인하였다.

#### HPLC에 의한 분석

분석시료의 조제는 5% starch를 기질로 하여 일정시간 효소반응시킨 반응액을 15분간 끓인 후 15,000 rpm으로 15분간 원심분리, Sep-pak(C<sub>18</sub> cartridge, millipore 제) 및 0.45 μm pore size로 여과하여 불순물의 전처리를 하고 20 μl 시료량씩 주입하였다. HPLC(Waters 402)에 의한 당류분석은 Carbohydrate analysis column(3.9 mm×30 cm, waters 제)을 사용하여 실시하였다. 용매로는 acetonitrile : water(65 : 35)를 사용하였으며 유속은 분당 1ml로 하고 detector는 RI(R 401)를 사용하여 표준 CD 및 당류의 용출시간을 비교하여 분석하였다.

#### 결과 및 고찰

##### 균주의 분리 및 동정

토양으로부터 평판희석 배양법에 의해 알칼리(pH 10.3) 조건하에서 생육하는 미생물을 500주 분리한 다음 그중 amylase 활성을 가진 150주를 선별하고 각각 액체배양하여 3% starch 기질용액에 배양상정액을 반응시켜 trichloroethylene에 의해 백색의 침전을 형성시키는 58주를 분리하였다. 선정된 58주에 대한 TLC를 통해 β-CD 위치에 가장 강한 spot



Fig. 1. Transmission electron micrograph of the strain No. 335.

A: vegetative cell

B: sporangium

을 나타내는 1 주를 선정하였다.

분리균주는 형태적·생리적 특성을 검토한 결과 간균이며 운동성이 있고 호기성이며 Gram 염색양성의 세균이었으며 전자현미경상에서 포자를 형성하는 것으로 관찰되어 *Bacillus* sp.에 속하는 미생물로 추정되었다(Fig. 1).

Table 1에서와 같이 분리균주는 중성에서 생육하지 않고 pH 7.5~11.0의 범위에서 생육하는 절대호알칼리성 이었다. 따라서 현재  $\beta$ -CD의 공업적 생산균주로 알려진 호알칼리성 *Bacillus* sp. ATCC 21783을 대조균으로 하여 비교하여 보면 본 균주는 glucose-nutrient 배지 (pH 7.0)에서 전혀 생육하지 않는 반면 대조균의 경우 약간의 생육을 보이며, 7% NaCl이 함유된 기본배지에서 본 균주는 정상적 생육을 보이는 반면 대조균으로 전혀 생육하지 않았다. 최고 생육온도에 있어서 대조균은 45°C까지 생육을 보이나 본 균주를 전혀 생육하지 않고 42°C까지만 생육을 보였다. 가수분해활성에 있어서 대조균의 경우 skim milk가 5% 함유된 평판배지상에서 casein을 빠르게 분해하는 반면 본 균주는 매우 서서히 가수분해하여 단백질 분해력이 매우 미약함을 알 수 있었으며 carboxymethyl cellulose (CMC)와 gelatin에 대해서도 대조균은 분해활성이 있으나 본 균주는 분해하지 못하는 차이를 보여주었다. 이상의 균주 동정결과를 바탕으로 본 균주는 이미 보고된 기존의 CGTase 생산균주와 서로 상이한 특성을 가지는 호알칼리성 *Bacillus* sp.로 동정하고 *Bacillus* sp. YC-335로 명명하였다.

#### 효소 생산조건

앞서 기술한 배지를 사용하여 분리균주의 생육과

Table 1. Characteristics of the strain No. 335.

1. Morphological characteristics	
Form	rods, 0.4~0.5 $\mu$ $\times$ 2.0~3.0 $\mu$
Motility	positive
Gram stain	positive
Spores	positive, oval, 0.3~0.4 $\mu$ $\times$ 0.8~1.0 $\mu$
2. Cultural characteristics	
Nutrient agar (pH 7.0)	-
(pH 10.0)	$\pm$
Glucose nutrient agar (pH 7.0)	-
(pH 10.0)	+
Medium I (pH 10.3)	+
Medium II (pH 10.3)	++
Medium II containing 7% NaCl	+
Growth at pH	pH 7.5~11.0
Growth temperature	upto 42°C
3. Biochemical characteristics	
Hydrolysis of starch	; quickly hydrolyzed
Hydrolysis of casein	; slowly hydrolyzed
Hydrolysis of gelatin	; not hydrolyzed
Hydrolysis of CMC	; not hydrolyzed
Hydrolysis of xylan	; hydrolyzed
Hydrolysis of pectin	; hydrolyzed
Hydrolysis of pullulan	; not hydrolyzed
$\alpha$ -Galactosidase activity	; positive
$\beta$ -Galactosidase activity	; positive
VP test	; positive
Indol test	; negative
Catalase	; positive
Nitrate reduction	; positive
Oxidase	; positive

-, indicates no growth;  $\pm$ , poor growth; +, normal growth; ++, abundant growth

효소생산 및 pH의 변화를 경시적으로 관찰한 결과 Fig. 2와 같았다.

균의 생육은 접종 36 시간까지 증가하여 정지기에 들어갔으며 36 시간이 지나면서 점차 감소하였다. 배지 pH는 최초 10.0으로부터 점차 감소하기 시작하여 24 시간을 전후로 하여 다시 pH가 증가하여 48~60 시간 후에는 pH 9.4가 되었다. 효소생산은 배양 12 시간부터 점차 증가하기 시작하여 48~60 시간에서 최대의 활성을 보였다.

#### 조효소의 특성

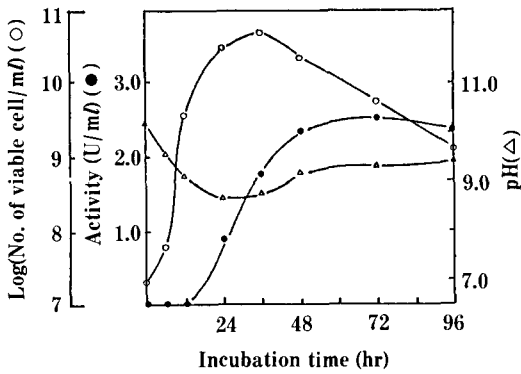


Fig. 2. Time course of the CGTase production.

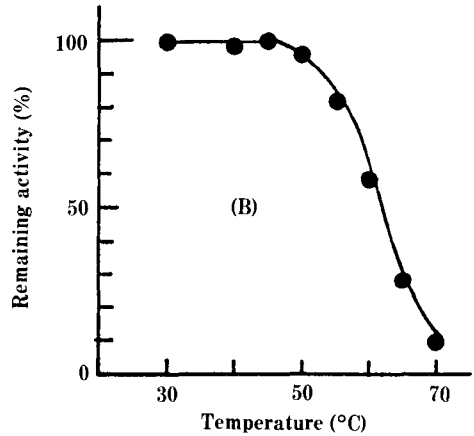
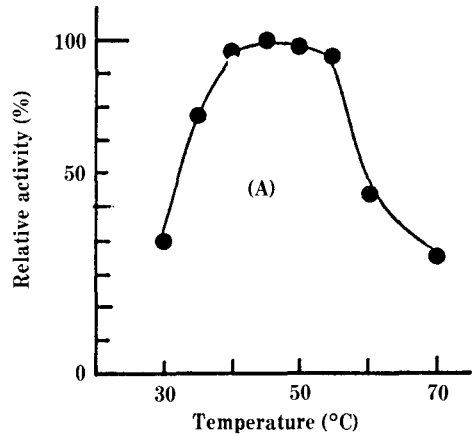


Fig. 4. Effect of temperature on the activity (A) and stability (B) of the CGTase.

(A) The reaction was carried out at various temperatures for 10 min.

(B) After heat-treatment of the enzymes at various temperatures for 30 min, the remaining activity was measured by reaction at 40°C for 10 min and expressed as a percentage of the activity without heat treatment.

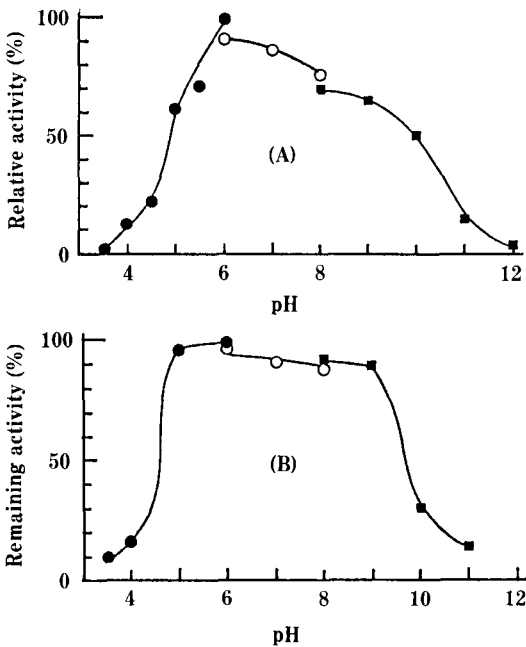


Fig. 3. Effect of pH on the activity (A) and stability (B) of the CGTase.

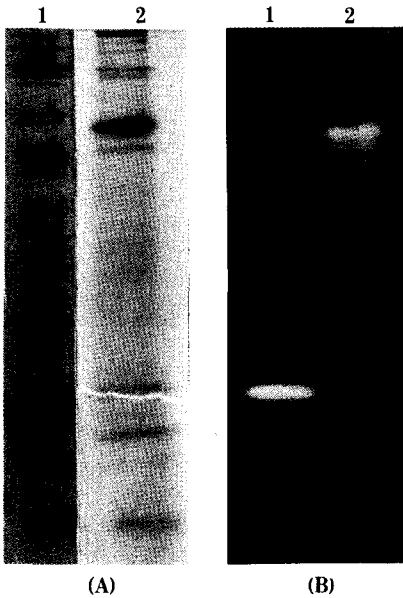
- ; 0.05M acetate buffer
- ; 0.05M phosphate buffer
- ; 0.05M glycine-NaOH buffer

(A) The reaction was carried out at various pHs  
 (B) The enzyme was incubated for 30 min at 50°C at various pHs and the remaining activity was measured by reaction at 40°C for 10 min in 0.05M acetate buffer (pH 6.0) and expressed as a percentage of the activity without pH treatment

앞서 기술한 배지 및 배양조건하에서 *Bacillus* sp. YC-335를 배양한 후 배양액으로부터 실험재료 및 방법에서 기술한 방법에 의해 조효소액을 조제하여 최적활성 pH 및 온도를 검토한 결과는 Fig. 3과 같

았다. 효소반응에 있어서 최적 pH를 알아보기 위해 각 pH에서 활성을 측정하고 결과 본 효소는 pH 6.0에서 최적의 활성을 보였고 pH 9.0에서도 50% 이상의 활성을 나타내었으며 pH 5~9까지 90% 이상의 안정성을 보여주었다.

$\beta$ -CD 생성효소 생산균으로서 *Bacillus* sp. ATCC 21783의 경우(14) acid, neutral, alkaline CGTase의 3종류의 효소를 동시에 생산하는 것으로 알려져 있으며 이들 각각의 최적 pH는 4.6, 7.0, 8.5 부근으로 보고되고 있고, *B. megaterium*의 경우(10), pH 5.0~5.7, *B. circulans*의 경우(9) pH 5.2~6.1이며  $\alpha$ 형으로 *B. macerans*가 pH 5.0~6.0(7,8), *B. stearothermophilus*의 경우(11) pH 5.0~5.5로 알



**Fig. 5.** Activity staining of the CGTase prepared from the culture supernatant of *Bacillus* sp. YC-335 (1) and the culture supernatant of *Bacillus* sp. ATCC 21738 (2).  
A: Coomassie Brilliant Blue R-250 staining  
B: Activity staining

려져 있다. 따라서 본 효소는 이들 효소와 최적 pH에 있어서 차이를 보였다.

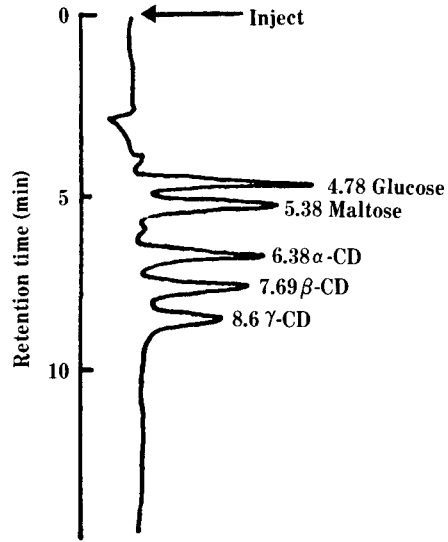
효소의 최적활성 온도를 알아보기 위해 30~85°C까지 각 온도별로 효소활성을 측정 한 결과 Fig. 4에 나타낸 것처럼 최적온도는 50°C이었으며 50°C까지 90% 이상의 안정성을 보였다.

CGTase의 최적온도는 *Bacillus* sp. ATCC 21783의 acid CGTase가 45°C, neutral CGTase가 50°C로 보고되고 있으며(14, 17) *B. megaterium*의 경우 55°C(10), *B. circulans*의 경우(9) 50°C, *B. macerans*의 경우(7, 8) 55°C이며 *B. stearothermophilus*의 경우(11) 75°C로 보고되고 있다.

**효소단백질의 활성염색**

Polyacrylamide gel 상에서의 효소단백질의 위치를 확인하기 위하여 polyacrylamide gel 전기영동을 행한 후 한쪽 gel은 Coomassie Brilliant Blue R-250에 염색을 시켜 band를 확인하고(Fig. 4, A) 다른 한쪽 gel을 잘라내어 3% starch 용액에서 반응시킨 후 염색하여 효소단백질의 위치를 확인하였다(Fig. 4, B).

그 결과 본 균주의 배양상정액은 아래 부분에 하나의 단일 band를 나타내었으나 대조균인 *Bacillus* sp. ATCC 21783의 배양상정액의 경우는 그보다 위



**Fig. 6.** Separation of  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ -CD, glucose and maltose by HPLC.

Conditions; column : Carbohydrate analysis column  
solvent : H<sub>2</sub>O/CH<sub>2</sub>CN = 35/65  
flow rate : 1 ml/min  
detector : RI  
injection volume : 25  $\mu$ l

의 위치에 3개 가량의 활성 band를 가짐으로써 이는 이 균주가 생산하는 3종류의 효소 즉 acid, neutral, alkaline CGTase로 생각되며 이로써 *Bacillus* sp. YC-335의 CGTase는 *Bacillus* sp. ATCC 21783의 효소와 비교시 효소단백질 자체의 성상 및 분자량, 전하가 상이함을 확인할 수 있었다.

**효소반응 생성물의 HPLC 분석**

이제까지 보고된 CGTase는 효소적 특성 외에 전분으로부터 CD의 생성비율이 각각 다르며 각 효소에 따라 glycosyl 전이 활성에도 차이가 있는 것으로 알려지고 있다. 5% 전분기질용액의 효소반응액을 HPLC로 분석하여 각 CD의 생성비율을 검토하였다. CD의 정량분석을 위해 HPLC의 Carbohydrate analysis column(waters 제)을 이용하여 분석조건을 결정하였으며 표준시료로는  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -, CD 및 glucose, maltose 등을 사용하여 얻어진 용출시간과 비교하여 분석하였고 CD 정량은 각 CD의 시료량에 대한 peak의 높이와의 관계로부터 산출하였다(Fig. 6).

*Bacillus* sp. YC-335의 배양상정액으로부터 조제한 CGTase의 반응액을 분석한 결과 본 효소는  $\beta$ -CD를 우선적으로 생성하는  $\beta$ -형 CGTase로 확인하였으며  $\alpha : \beta : \gamma$ 의 생성비율은 1 : 10 : 1.5이었던

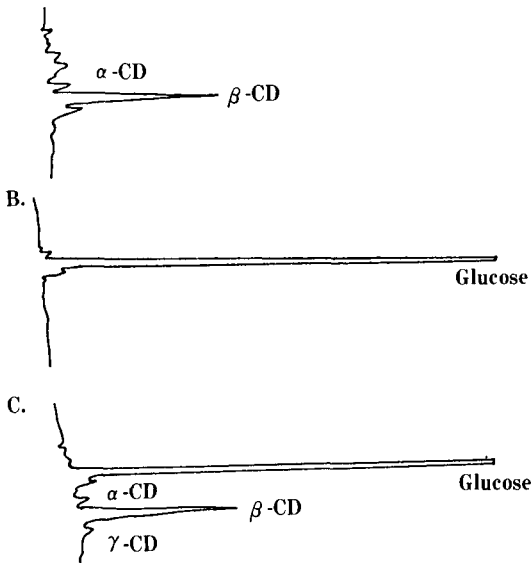


Fig. 7. Cyclization reaction of the CGTase produced by *Bacillus* sp. YC-335.

A: incubated for 20 hr without treatment of glucoamylase  
 B: starch solution treated with glucoamylase  
 C: CGTase reaction mixture treated with glucoamylase

다(Fig. 7, A). 한편 본 효소를 처리하지 않은 starch glucoamylase 처리에 의해 완전히 단당류 즉 glucose로 분해되었으나(Fig. 7, B) 효소반응에 의해 생성된 CD는 glucoamylase에 의해 가수분해되지 않았으며 CD를 제외한 나머지 전분 가수분해물만이 glucoamylase에 의해 단당류로 분해됨을 볼 때 본 효소는 CGTase의 특징적 반응인 전분으로부터 cyclization 반응을 가지고 있는 것으로 확인하였다(Fig. 7, A).

요 약

Cyclodextrin(CD) 생성효소(CGTase)를 생산하는 미생물을 토양으로부터 알칼리(pH 10.3)조건하에서 1주 분리하여 동정한 결과, pH 7.5~11.0까지 생육하는 절대 호알칼리성 *Bacillus* sp. 이었다. 분리균주가 생산하는 효소는 전분으로부터 β-CD를 우선적으로 생성하는 효소임을 HPLC를 통해 분석하였으며, 이때의 α-, β-, γ-CD의 생성비율은 1:10:1.5이었으나 분리균주의 효소생산 조건은 1% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>가 탄소원으로, 5% corn steep liquor를 질소원으로 하여 호기적 조건에서 37°C, 48~60시간 진탕배양하였을 때 배양상징액으로부터 최대 효소생산을

얻었다. Ethanol 침전방법을 이용하여 얻은 조효소액의 효소적 특성에 있어서 본 효소의 최적활성 pH는 6.0이었으며 pH 안정성은 pH 5~9까지 안정하였다. 최적활성 온도는 50°C이었으며 열안정은 50°C까지 안정함을 보였다. 본 효소의 활성염색 전기영동 결과, 대조균인 호알칼리성 *Bacillus* sp. ATCC 21783의 효소와 비교시 단백질의 성상에 있어서 차이점을 확인할 수 있었다.

참고문헌

1. French, D.: *Adv. Carbohydr. Chem.*, **12**, 189 (1957).
2. Thoma, J.A. and L. Stewart: "Starch Chemistry and Technology", vol I, Academic Press, New York and London, 209 (1965).
3. Hara, K. and H. Hashimoto: *J. Jpn. Soc. Starch Sci.*, **33**, 152 (1986).
4. Villiers, A.: *Compt. Rend.*, **112**, 536 (1891).
5. Schardinger, F.: *Wien Klin. Wochschr.*, **17**, 207 (1904).
6. Schardinger, F.: *Z. Untersuch. Nahr. U. Genussm.*, **6**, 865 (1903).
7. Tilden, E.B. and C.S. Hudson: *J. Am. Chem. Soc.*, **61**, 2900 (1939).
8. DePinto, J.A. and I.I. Compbell: *Biochem.*, **7**, 114 (1948).
9. Okada, S. and S. Kitahata: *Proc. Sym. Amylases* (Osaka), **8**, 21 (1973).
10. Kitahata, S. and S. Okada: *Agric. Biol. Chem.*, **38**, 2413 (1974).
11. Shiosaka, M.: U.S. Patent 3988206, Oct. 26 (1976).
12. Bender, H.: *Ach. Microbiol.*, **111**, 271 (1977).
13. Sato, M., Y. Yagi, H. Nagano and T. Ishikura: *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 1189 (1985).
14. Nakamura, N. and K. Horikoshi: *Agric. Biol. Chem.*, **40**, 753 (1976).
15. Horikoshi, K.: *Process Biochemistry*, May, **26** (1979).
16. Krieg, N.R. and J.G. Holt: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol 1., Williams & Wilkins, Baltimore (1984).
17. Horikoshi, K. and T. Akiba: "Alkalophilic Microorganisms", Japan Scientific Societies Press (1982).

(Received March 6, 1989)