

*Bacillus stearothersophilus*의 Cyclomaltodextrin Glucanotransferase를 이용한 감자전분으로부터의 Cyclodextrin 생산

황진봉 · 김승호*
한국식품개발연구원

Cyclodextrin Production from Potato Starch with *Bacillus stearothersophilus* Cyclomaltodextrin Glucanotransferase

Hwang, Jin-Bong and Seung-Ho Kim*

Korea Food Research Institute, Songnam 462-420, Korea

Abstract — Simultaneous liquefaction and cyclodextrin (CD) production were conducted on potato starch using cyclomaltodextrin glucanotransferase (CGTase) from a mutant strain MNNG 8 of *Bacillus stearothersophilus* No. 239. A high concentration (30%) of potato starch was converted to cyclodextrins (CDs) with 29% yield in the conditions of pH 6.0, temperature 80°C, 4.3 mM CaCl₂, CGTase addition of 3.0 dextrinizing activity unit (DAU) at 40°C/g starch.

Cyclomaltodextrin glucanotransferase (EC 2.4.1.19; 1,4- α -glucan 4- α -D(1,4-glucano) transferase cyclizing: CGTase)의 작용으로 생성되는 cyclodextrin (CD)는 6~12개의 glucose 분자가 α -1,4-glucoside 결합에 의해 환상결합한 비환원성의 maltooligosaccharide 일종으로 공업적으로 이용되는 것은 glucose 분자 6, 7, 8개로 구성되고 있는 α -, β - 및 γ -CD이다 (1).

CD는 분자구조에 기인한 그 특징적인 포집성으로 보존성, 용해도의 향상, 안정성 그리고 각종 물성의 개선을 목적으로 식품, 농약, 의약품, 수지제품 및 화장품 등에 폭 넓게 응용되고 있다(2-5).

CD 제조공정은 CGTase의 열안정성과 밀접한 관련이 있다. *Bacillus macerans*가 생산하는 CGTase의 열안정성이 낮은 편이므로 높은 온도에서 전분을 액화할 수 없으므로 높은 전분농도에서는 CD 수율이 낮다(6). 따라서 이를 극복하기 위해 낮은 전분농도(5~8%)에 반응하면서 생성된 CD를 한외여과막으로 분리하는 연속공정(5)을 사용하거나 높은 농도(30% 정도)의 전분을 α -amylase로 부분 액화한 후 CG-

Tase를 첨가 CD 생산을 한다(7).

한편 *Thermoanaerobacter*가 생산하는 CGTase는 높은 온도(90°C)에서 전분을 액화한 후 CD를 생성하였다(8).

필자들은 *Bacillus stearothersophilus*의 CGTase를 이용하여 높은 농도(30%) 감자전분을 α -amylase로 부분액화하지 않고 동시에 액화, CD 생산을 할 수 있었으므로 그 제조조건 등의 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

사용균주 및 시약

본 연구에 사용한 균주는 전보(9)에 발표한 *Bacillus stearothersophilus* No. 239에 MNNG(N-methyl-N'-nitro-nitroguanidine, Sigma, Co.)를 5차에 걸쳐 순차적으로 처리하여 얻은 돌연변이주 MNNG 8를 사용하였다. 즉, 모균→MNNG 1→MNNG 2→MNNG 5→MNNG 7→MNNG 8이었다. MNNG 8은 모균에 비해 colony가 작았으며 CGTase 역가가 약 14배이었고, 성장속도가 늦었으며 최적배지가 달랐다. 또한 MNNG 8은 배지최적화 후, 모균에 비해 약 40배의 CGTase 역가를 보였으며 상세한 결과는 추후에 발

Key words: *Bacillus stearothersophilus*, cyclodextrin production

*Corresponding author

표할 예정이다. 표준물질 α -, β - 및 γ -CD는 sigma사 제품, 기질은 감자전분(potato starch, Kanto Chemical Co.)을 사용하였다.

조효소 조제 및 효소활성 측정

기본배지(초기 pH 7.0인 2% sucrose, 1% defatted soybean meal, 0.1% $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.015% $\text{CaCl}_2/100 \text{ ml}$)에서 55°C, 48시간 진탕배양한 배양액을 원심 분리하여 균체를 제거한 상등액을 조효소액(82.3 dextrinizing activity unit(DAU) at 40°C/ml)을 사용하였다. CGTase 활성측정은 전보(9)의 방법으로 측정하였고 반응온도는 40°C에서 측정하였다.

CD 제조 방법

Fig. 1의 기본 흐름공정도에 따라 CD를 제조하였으며 필요에 따라 반응변수를 변화시켰다. 즉, 감자전분 300g(건물기준)을 Fig. 2와 같은 장치(영광과학 Co.) 4l 반응조에 넣고 증류수 1l를 가하여 슬러리를 만든 뒤 4.3 mM CaCl_2 가 되도록 한 다음, 효소 10.8 ml(3DAU at 40°C/g starch)를 첨가하여 잘 저어준 후 1 N NaOH 용액을 유입하여 pH 6.0으로 조정하여 반응시켰다. 항온조에 의해 일정하게 유지되는 반응 온도 80°C에서 교반속도 100 rpm, 12시간 효소반응시키면서 2시간 간격으로 시료를 채취하여 100°C에서 20분간 가열하여 불활성화시킨 다음 냉각시킨 후 HPLC에 의해 생성된 CD를 정량하여 반응시간에 따른 CD 생성량을 조사하였다.

CD 정량 및 수율계산

전보(9)의 방법에 따라 HPLC로 측정하였으며 CD

수율(%)은 원래의 전분량에 대한 생성 CD량의 비에 근거하여 계산하였다.

결과 및 고찰

기질농도 변화에 따른 CD 생성변화를 관찰하기 위하여 감자전분농도 200, 300, 그리고 400g/l(w/w)에서 기본 흐름공정도(Fig. 1)에 따라 반응시켰으며, 반응시간에 따라 생성된 CD량은 HPLC로 측정된 결과는 Table 1과 같다. 전분농도 200과 300g/l에서의 CD 생성은 매우 흡사한 양상을 보였다. 즉, 반응 2~4시간에 이미 대부분의 반응이 진행되었고, 6~8시간에

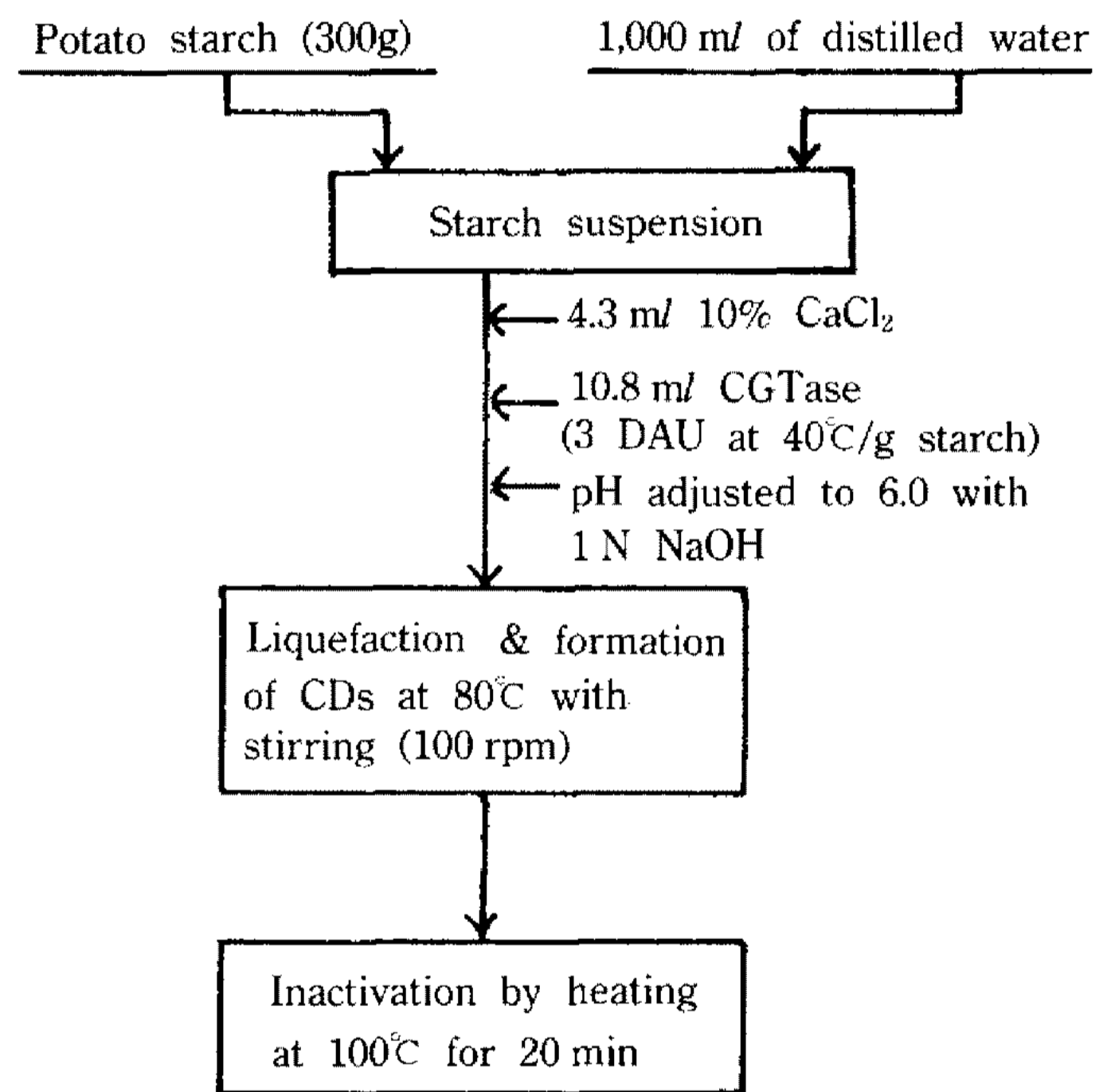


Fig. 1. Basic flow sheet of cyclodextrin production.

Table 1. Effect of potato starch concentration on the cyclodextrin yield (%)^{a,b}

Reaction time (hr)	Potato starch (g/l)							
	200				300			
	α -CD	β -CD	γ -CD	Total CD	α -CD	β -CD	γ -CD	Total CD
2	5.7	8.8	2.8	17.3	5.8	8.9	3.4	18.2
4	7.1	11.9	4.1	23.1	7.2	12.0	4.3	23.5
6	7.8	13.5	4.1	25.4	7.9	13.5	4.6	26.0
8	8.2	14.3	5.2	27.7	8.2	14.3	5.1	27.6
10	8.4	14.5	5.2	28.1	8.4	15.0	5.1	28.5
12	8.4	15.0	5.4	28.8	8.6	15.1	5.5	29.2

^aThe yield (%) was based on the ratio of CD produced to the original starch content. ^bThe CD production was by the basic flow sheet (Fig. 1) except for the starch content and the CD was measured by HPLC.

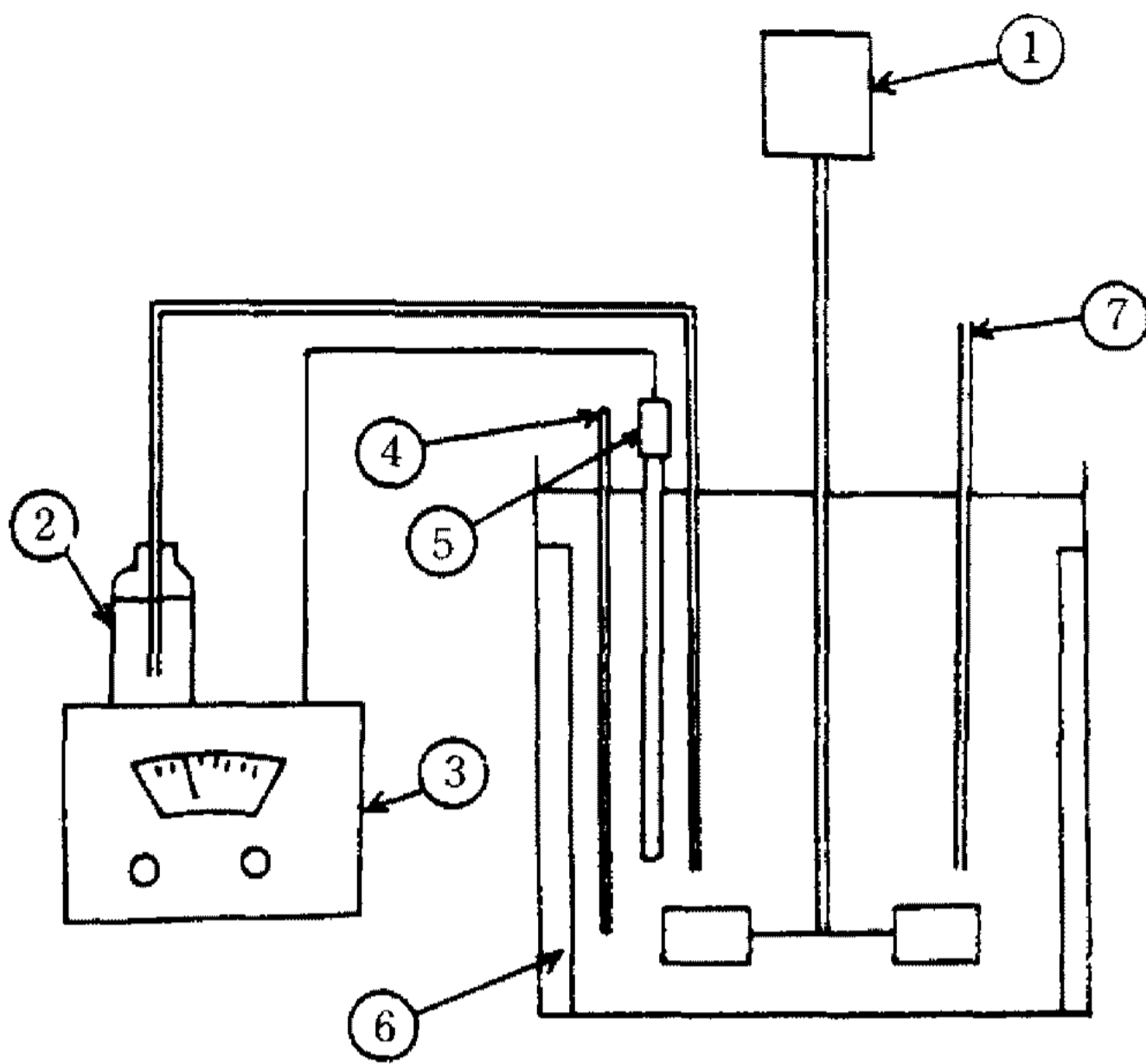


Fig. 2. Schematic diagram of reaction chamber.
 1: motor, 2: 1 N NaOH, 3: pH meter, 4: thermometer, 5: pH probe, 6: baffle, 7: enzyme inlet/product outlet.

거의 완료되어 10~12시간에서는 아주 약간의 수율 증가가 있었을 뿐이었으며 최종적으로 두 농도에서 공히 29%의 최종 수율을 보였다. 이는 *B. macerans*의 CGTase로 감자전분에서 CD를 생산했을 경우 감자전분의 농도를 1%에서 10%로 단계적으로 증가시키기에 따라 CD 수율이 62% 정도(효소량에 따라 정확한 값은 차이가 있음)에서 46% 정도로 단계적으로 감소하는 경향을 보인것(6)과 다르며 10% 이상의 전분농도에서는 사용한 효소의 열안정성이 낮아서 전분을 액화시킬 수 없었을 것으로 사료된다. *Thermoanaerobacter*의 CGTase로 25% Lintner 전분을 90%에서 반응시켰을 때 25%의 CD 수율을 얻었다는 보고가 있다(8). 본 연구에서 감자전분농도가 20%에서 30%로 증가함에도 불구하고 CD 수율은 감소하지 않고 일정하였는데 어느 전분농도(20%) 이상에서는 액화가 더 이상 CD 수율에 구별되게 영향을 주지 않는 것으로 추정된다. 한편 400g/l 농도에서는 CD 생성량을 측정 못했는데 이것은 반응온도 80°C까지 도달하는 사이에 점도가 급격히 증가하여 교반기가 작동 못한 결과로서 이와 같은 원인은 전분입자내에 수분이 흡수되어 자유수가 감소되어 그로 인해 기질과 효소간의 효소작용이 원활치 못해 심한 gel화 현상이 일어난 것으로 생각된다.

한편, 기본 흐름공정도(Fig. 1)에 따라서 70~90°C까지 5°C 간격으로 반응온도에 따른 CD 생성 경향을 살펴본 결과(Fig. 3), 반응온도 70, 75, 80°C에서는

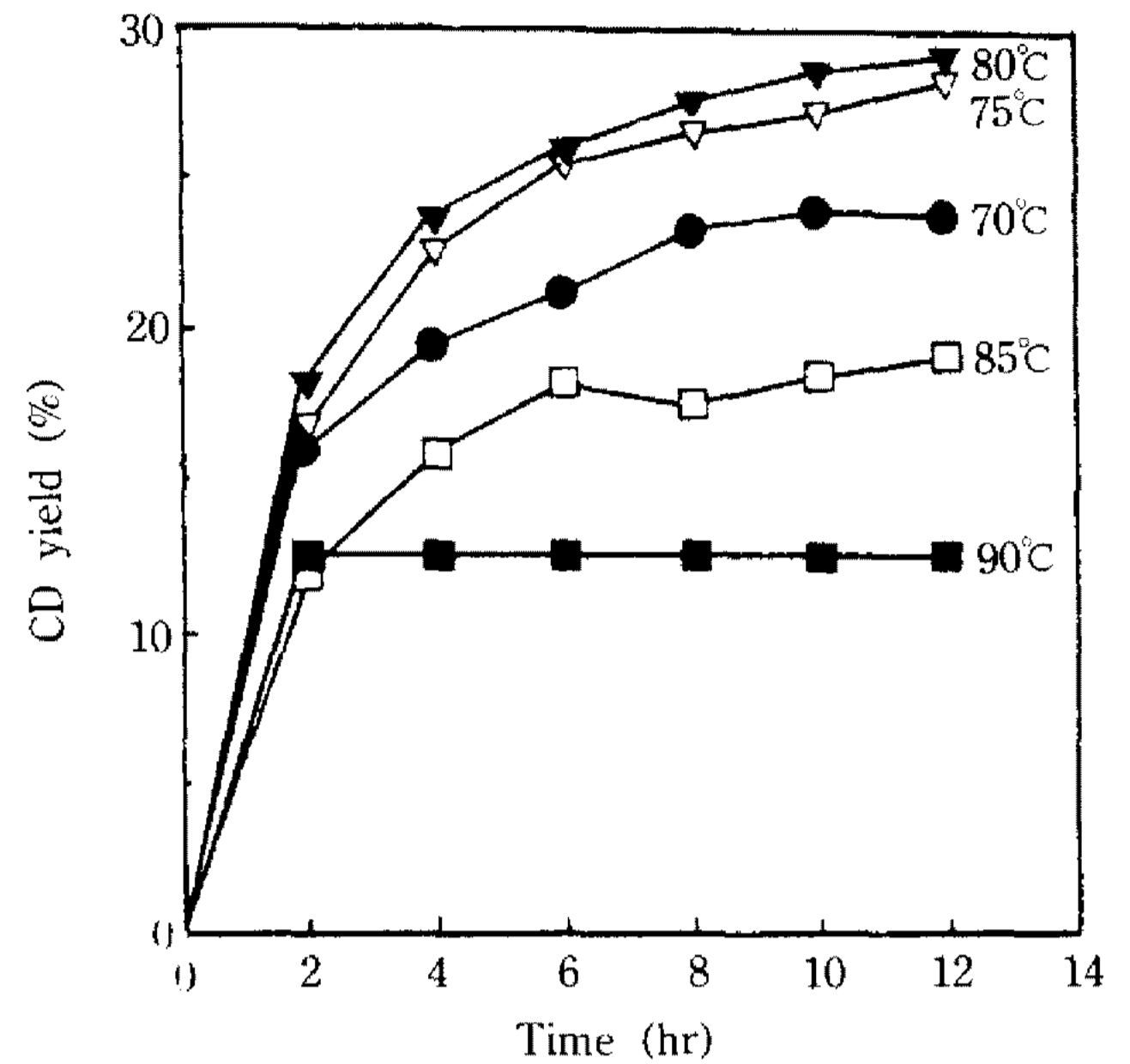


Fig. 3. Effect of temperature on cyclodextrin yield.
 All the other conditions are the same as in Fig. 1.

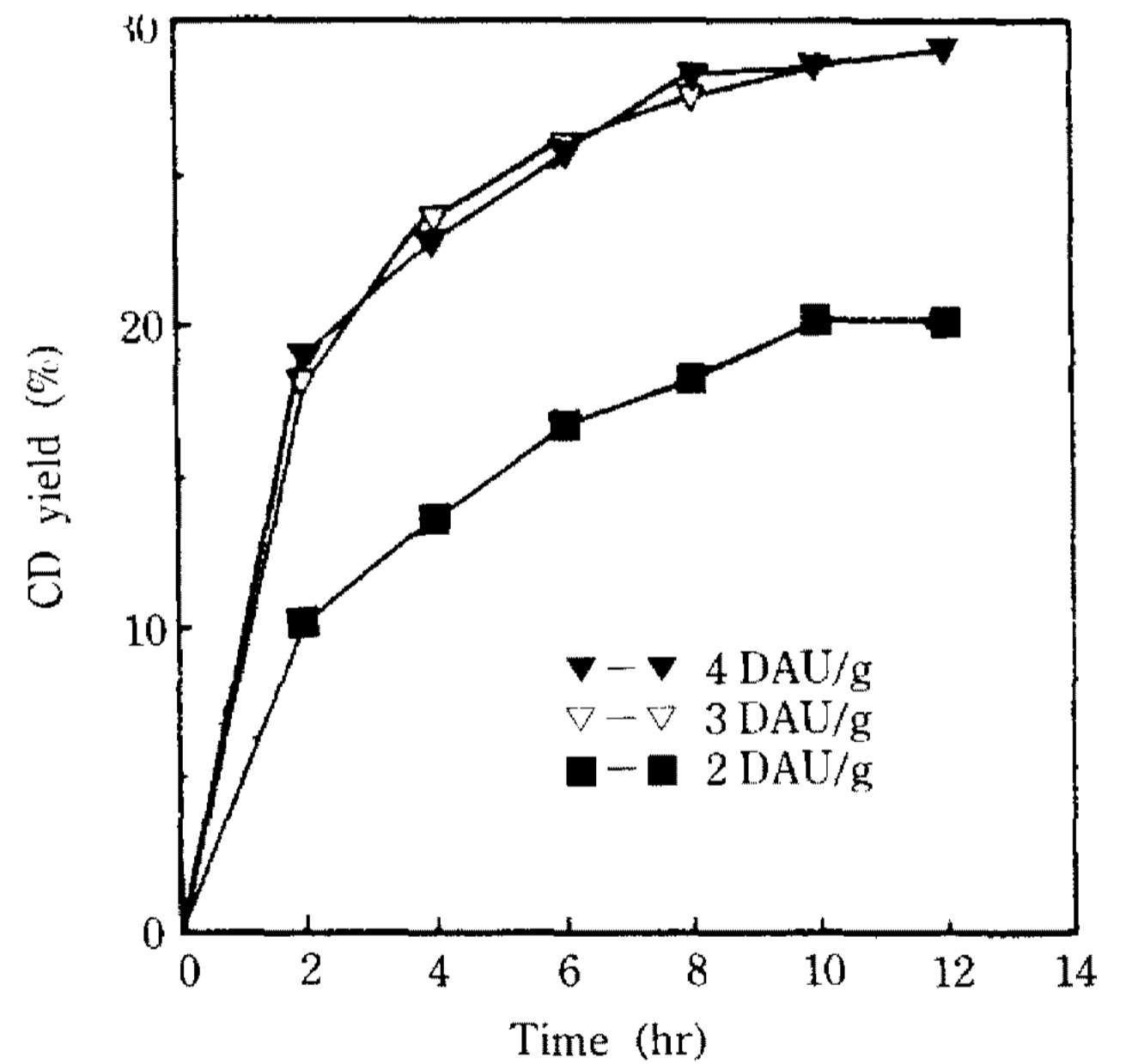


Fig. 4. Effect of CGTase concentration on cyclodextrin yield.
 All the other conditions are the same as in Fig. 1.

온도가 높을수록 CD 생성율이 증가하였는데 Hashimoto 등(6)과 Yagi 등(10)의 *B. ohbencis*, *B. macerans*, *B. circulans*들이 생산하는 CGTase의 CD 생성 최적온도보다 비교적 높은 것으로 나타났다. 그러나 반응온도 85, 90°C에서는 CD 생성이 저하되었는데 이는 온도가 상승함에 따라 효소의 불활성화로 기인된 것으로 유추된다.

한편, 기본 흐름공정(Fig. 1)에 따라서 2, 3, 4 DAU at 40°C/g starch를 첨가하여 효소량에 따른 CD 생

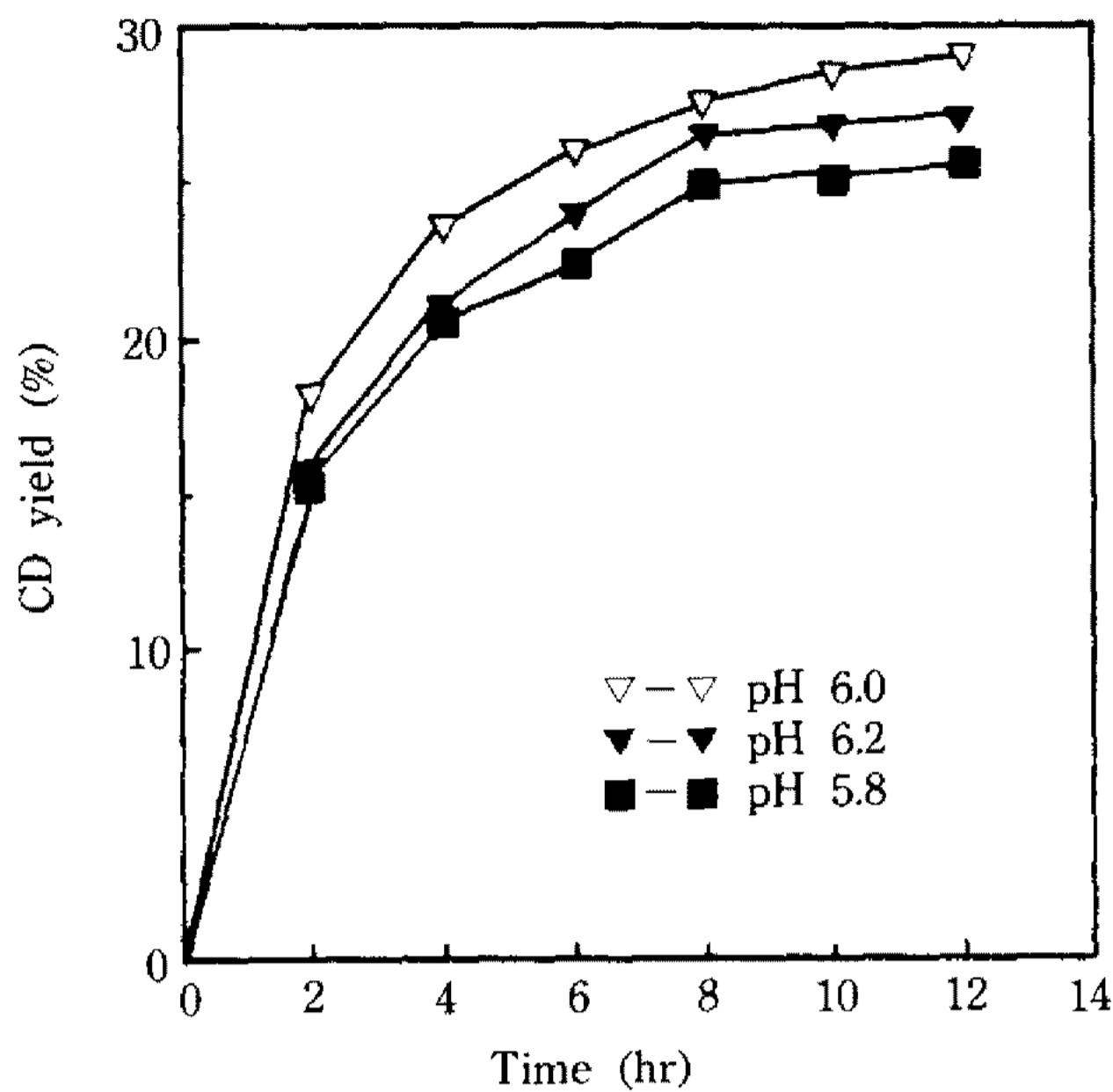


Fig. 5. Effect of pH on cyclodextrin yield. All the other conditions are the same as in Fig. 1.

성을 조사한 결과(Fig. 4), 2 DAU에서 보다 3 DAU에서 크게 CD 생성율이 증가하였으나 3 DAU와 4 DAU 간에는 별 차이가 없어 본 실험조건에서는 3 DAU가 적정 효소량으로 사료된다.

전보(11)에 의하면 본 효소의 최적 pH가 6.0이었으므로, 기본 흐름공정도(Fig. 1)에 따라서 pH가 CD 생성량에 미치는 영향을 pH 6.0 부근에서 자세히 살펴본 결과(Fig. 5), pH 5.8, 6.0, 6.2 중 pH 6.0에서 CD 생성이 가장 높았으며 CD 생성이 pH에 따라 민감한 변화를 보였다.

이상과 같은 본 연구결과, *B. stearothermophilus* 돌연변이주 MNNG 8이 생산하는 CGTase는 반응온도 80°C에서 최적 CD 생성조건을 가지고 있음으로 기질과 효소반응시 비교적 높은 열안정성으로 미생물의 오염을 방지할 수 있고 또한 높은 감자전분농도(30%)에서 동시 액화, CD 생성하여 비교적 짧은 시간에 고수율의 CD를 생성하므로 산업적으로 유용하게 쓰일 가능성이 높을 것으로 예상된다.

요 약

Bacillus stearothermophilus No. 239의 돌연변이주

MNNG 8이 생산하는 CGTase를 사용하여 감자전분을 동시 액화, cyclodextrin(CD) 생산을 하였다. 고농도(30%)의 감자전분이 29%의 수율로 CD로 전환되었으며 그 때의 조건은 pH 6.0, 80°C, 4.3 mM CaCl₂, 40°C에서 1g의 전분당 3.0 DAU의 CGTase를 첨가하는 것이다.

참고문헌

1. 한국유전협동조합. 1986. Cyclodextrin(유전공학자료), Pp. 3-15.
2. Misaki, M. 1984. Utilization of cyclodextrin for citrus fruit products. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.* 31: 98-106.
3. Minamite, Y., and Y. Katsuda. 1984. Present status and future aspects for pesticides included in cyclodextrin. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.* 31: 112-116.
4. Uekama, K. 1983. Pharmaceutical application of cyclodextrins. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.* 30: 247-254.
5. Hashimoto, H. 1989. Studies on the industrial production and application of cyclodextrins. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.* 36: 35-42.
6. Hashimoto, H., K. Hara, N. Kuwahara, and K. Arakawa. 1985. Effective conditions on cyclodextrins preparation. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.* 32: 299-306.
7. 野勝太郎, 宮内徹二, 日高秀昌. 1971. *Japan. Kokai Tokyo Koho PAT.* No. 71462380.
8. Nielsen, H.K. 1991. Novel bacteriolytic enzymes and cyclodextrin glycosyltransferase for the food industry. *Food Tech.* 45: 102-104.
9. 황진봉, 김승호, 이태경, 양한철. 1990. *Bacillus stearothermophilus*에 의한 cyclomalto-dextrin glucanotransferase의 생산. *산업미생물학회지* 18: 579-584.
10. Yagi, Y., M. Sato, and T. Ishikura. 1986. Comparative studies of CGTase from *Bacillus ohbensis*, *Bacillus macerans* and *Bacillus circulans* and production. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.* 33: 144-151.
11. 안중훈, 황진봉, 김승호. 1990. *Bacillus stearothermophilus*가 생산하는 cyclodextrin glucanotransferase: Affinity chromatography를 이용한 정제 및 성질. *산업미생물학회지* 18: 585-590.

(Received March 7, 1992)