

Cyclomaltodextrin Glucanotransferase의 생산을 위한 *Bacillus stearothermophilus* 균주의 돌연변이

황진봉 · 김승호*
한국식품개발연구원

Mutation of a *Bacillus stearothermophilus* Strain for Over-production of Cyclomaltodextrin Glucanotransferase

Hwang, Jin-Bong and Seung-Ho Kim*

Korea Food Research Institute, Songnam 462-420, Korea

Abstract — *Bacillus stearothermophilus* No. 239 isolated from soil was mutated with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) to yield a series of mutants with increasing levels of cyclomaltodextrin glucanotransferase (EC 2.4.1.19; CGTase) production. After five consecutive mutation steps, a mutant MNNG 8 with about 14 times of CGTase activity than the parent strain was obtained. The mutant had a smaller colony size and the growth rate was slower. It also had different optimum cultural conditions from those of the parent strain with sucrose, a cheap carbon source, replacing soluble starch as the best carbon source, for example. The overall enhancement of the CGTase production after optimization of the cultural conditions was about forty times so that the mutant produced a culture broth with about 80 dextrinizing activity unit (DAU) at 40°C/ml.

Cyclomaltodextrin glucanotransferase(EC 2.4.1.19; 1,4- α -glucan 4- α -D-(1,4-glucano) transferase, cyclizing : CGTase)는 전분에 작용하여 cyclodextrin (CD)를 합성하는 작용(cyclization)과 CD를 개환 또는 적당한 수용체에 전이시키는 작용(coupling) 그리고 oligosaccharide를 불균화시키는 작용(disproportionation) 등을 하는 효소로 알려져 있다.

CGTase의 합성작용에 의해 생성된 CD는 화학적, 물리적, 생리적 성질을 변화시키는 독특한 특성을 가지고 있어 식품, 의약품, 농약, 화장품 그리고 폐수처리 등 광범위하게 이용되고 있을 뿐만 아니라(1-4) CGTase의 전이작용을 이용한 기능성 제품에 관한 연구도 활발히 이루어지고 있다(5-8).

본 연구에서는 토양에서 분리한 *Bacillus stearothermophilus* No. 239(9)을 MNNG을 사용하여 돌연변이시켜 CGTase를 과량생산하는 일련의 돌연변이주들을

얻었으며 이들 중 가장 CGTase를 과량으로 생산하는 돌연변이주의 최적 배양조건을 검토하였기에 그 결과를 발표하고자 한다.

사용 시약

N-methyl-N'-nitrosoguanidine(MNNG), soybean flour type II : roasted는 Sigma사 제품, sucrose는 제일제당의 백설편 설탕, 기타 일반시약은 분석용 시약이었다.

배양방법

효소생산 최적배지(9) 100 ml(500 ml erlemeyer flask)에 종균 1%를 접종하여 55°C 에서 24시간 진탕 배양하였다(100 rpm).

효소활성 측정

CGTase 활성 측정은 전보(9)의 방법으로 하였고 반응온도는 40°C 에서 측정하였으며 DAU(dextrinizing activity unit) at 40°C 로 표시하였다.

Key words: *Bacillus stearothermophilus*, cyclomaltodextrin glucanotransferase, mutation

*Corresponding author

MNNG에 의한 돌연변이주 선발방법 및 균주보관 방법

돌연변이주의 분리는 Gerhardt 등(10)의 방법을 변형하여 사용하였다. 즉, 대수기 중기(5시간)까지 배양한 균체를 원심분리(5,000 rpm×10분)하여 수거한 뒤 0.1 M Tris-malate buffer(pH 7.0)로 세척한 후 동일 완충용액으로 현탁시킨 다음 MNNG를 첨가하여 55°C에서 적정시간 반응시킨 후 0.1 M phosphate buffer(pH 7.0)로 2회 세척한 다음 평판배지당 10~15 colony가 되도록 희석하여 alkaline medium(11)의 pH를 7.0으로 바꾼 agar 배지에 congo red 0.03% 첨가하여 정확히 20 ml씩 옮겨 제조된 petri-dish(87×150 mm) 100개에 도달하여 55°C에서 24시간 배양하였다.

돌연변이주의 1차 균주선발은 visual inspection (view box) 장치에서 Vernier caliper를 이용 colony 크기와 hollow zone 길이를 각각 측정하여 이들의 비가 큰 것을 10% 선별하였으며 2차 균주선발은 1차 선별된 균주를 전보(9)에 보고한 최적배지에서 24시간 배양한 상등액을 취하여 효소활성이 높은 돌연변이주를 2차 선발하였다.

한편, 최종선발은 2차 선별된 돌연변이주를 일주일 간격으로 3회 반복배양하여 효소활성이 일정히 유지

되는 돌연변이주를 냉동건조 ampule로 제조, 보관하였다.

MNNG에 의한 돌연변이주 선발

5차에 걸친 일련의 돌연변이 결과는 Fig. 1과 같다. 돌연변이주 선발에 있어 생존율을 주로 5~30%로 높은 범위를 선택하였다. MNNG에 대한 내성은 돌연변이가 진행됨에 따라 낮아지는 경향이였다. 즉 모균은 MNNG 농도 300 µg/ml에서 30분, 40분, 70분 처리구에서 각각 생존률 29.2%, 11.5%, 0.9%이었으나 돌연변이주들은 순차적으로 낮은 MNNG 농도를 사용하여야 원하는 생존률 범위를 얻을 수 있었다. 가장 CGTase 활성이 높은 MNNG 8은 모균에 비해 colony가 작았고 성장속도가 늦었으며 효소활성이 약 14배이었고 이 돌연변이주의 배지최적화를 아래에서 검토하였다.

배지의 최적화

각종 탄소원 2%를 함유하는 기본배지를 이용 탄소원에 따른 효소생산량을 비교 검토한 결과(Table 1) sucrose, soluble starch, corn starch, potato starch 등의 순으로 sucrose가 가장 우수하였다. 이와같은 결과는 CGTase를 생산하는 균주들은 단당류보다는 다당류에서 높은 생산량을 보인 Lane 등(12)과 유 등(13)의 보고와 다른 양상을 보였으며 또한 모균의 경우(9) soluble starch가 가장 우수한 탄소원이었던 바와도 달랐다. 한편, sucrose 농도에 따른 효소생산을 살펴본 결과, 2%에서 가장 높은 효소활성을 보였다 (자료 제공은 하지 않았음).

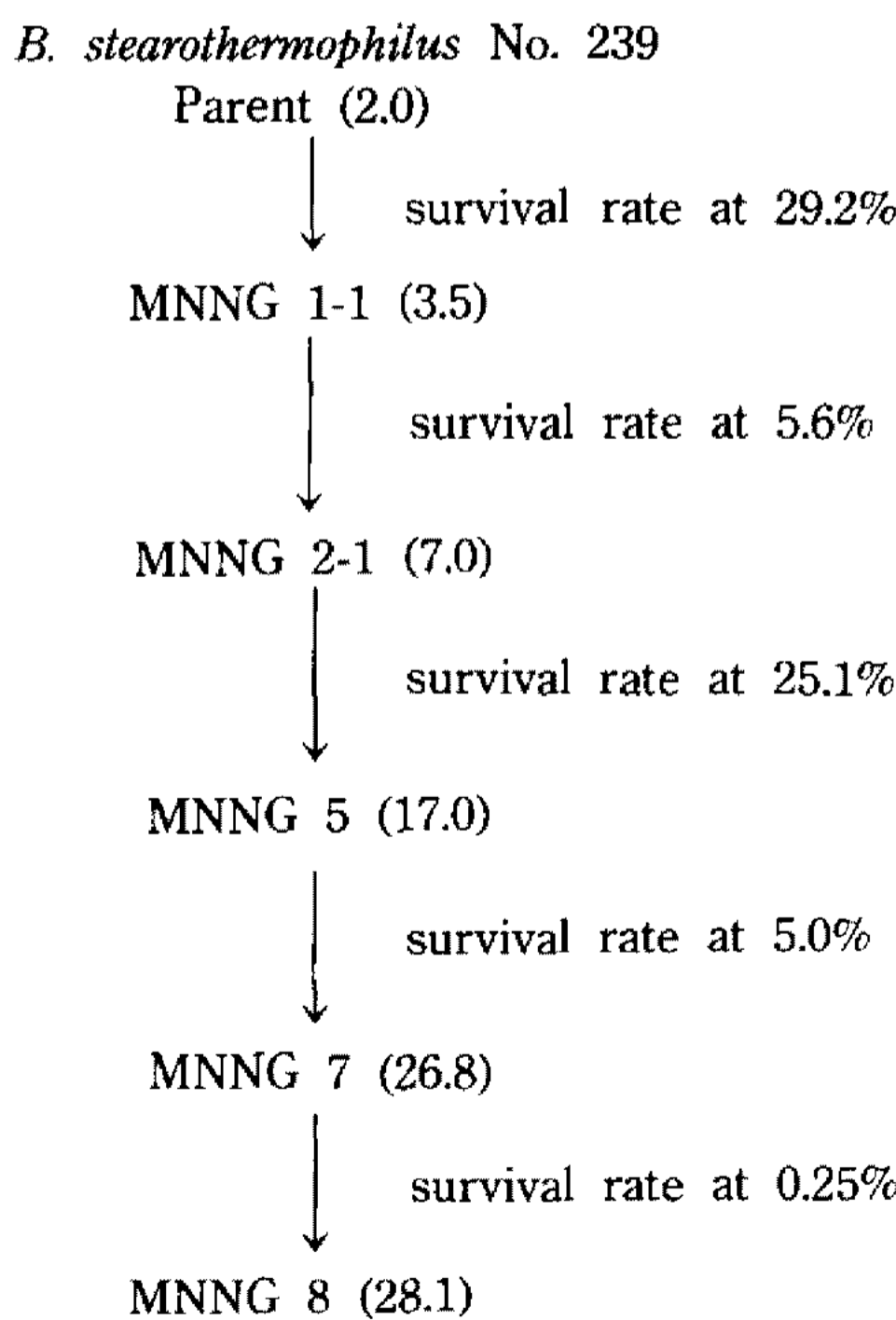


Fig. 1. The genealogy of CGTase-producing mutants (induced by MNNG) of *Bacillus stearothermophilus* (numbers in parentheses are DAU at 40°C/ml of the culture broth).

Table 1. Effect of carbon sources on the production of CGTase by *Bacillus stearothermophilus* MNNG 8

Carbon sources (2%)	CGTase activity (DAU at 40°C/ml)
None	4.79
Sorbitol	2.75
Potato starch	24.7
Corn starch	25.6
Dextrin	21.2
Casein	6.81
Soluble starch	25.9
Sucrose	32.5

Cultivation was carried out for 48 hrs at 55°C in basal medium containing 0.5% soybean flour, 0.1% NaH₂PO₄·2H₂O and 0.015% CaCl₂ with initial pH 7.0.

Table 2. Effect of organic nitrogen sources on the production of CGTase by *Bacillus stearothermophilus* MNNG 8

Organic nitrogen Sources (0.5%)	CGTase activity (DAU at 40°C /ml)
None	3.2
Yeast extract	6.8
Trypton	5.7
Bacto-peptone	6.1
Soybean flour	32.9
Corn steep liquor	12.1

Cultivation was carried out for 48 hrs at 55°C in basal medium containing 2% sucrose, 0.1% NaH₂PO₄·2H₂O and 0.015% CaCl₂ with initial pH 7.0.

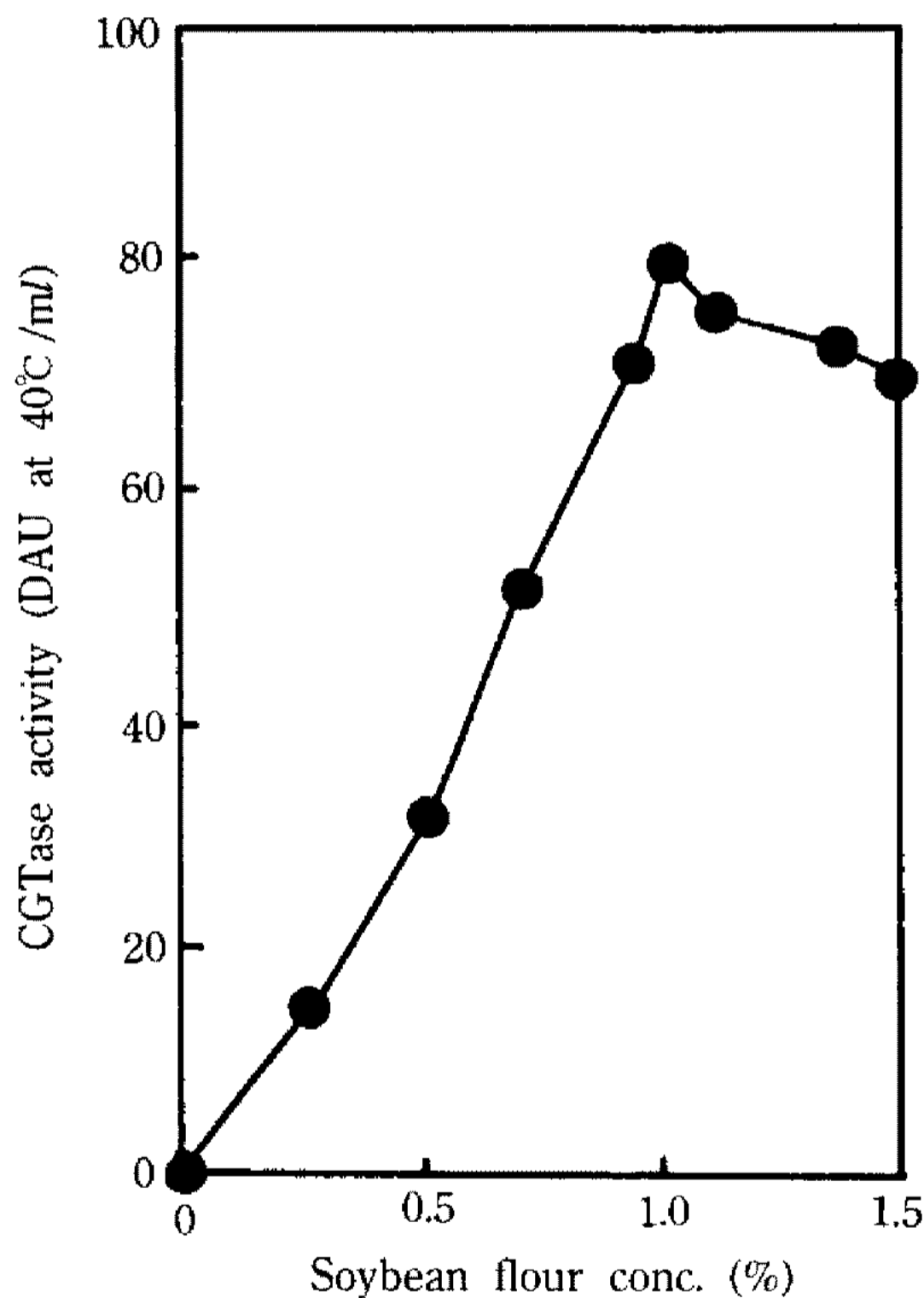


Fig. 2. Effect of soybean flour concentrations on the production of CGTase by *Bacillus stearothermophilus* MNNG 8.

탄소원으로 sucrose 2%가 들어있는 기본배지에서 유기질소원이 CGTase 생산에 미치는 영향을 조사해 본 결과(Table 2) soybean flour이 다른 질소원에 비해 월등한 효과가 있었으며 soybean flour의 농도에 따른 효소생산은 1%에서 최대치를 보였다(Fig. 2). 이는 모균의 경우 soybean flour의 농도 0.5%에서 최대의 효소생산을 보인 것(9)과 달랐다. 이와같은 사실로 미루어 볼 때 soybean flour의 농도 조절이 CGTase

Table 3. The optimal conditions of cultivation for the production of CGTase by *Bacillus stearothermophilus* MNNG 8

Sucrose	2%
Soybean flour	1%
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0.1%
CaCl ₂	0.015%
Initial pH	7.0
Temperature	55°C

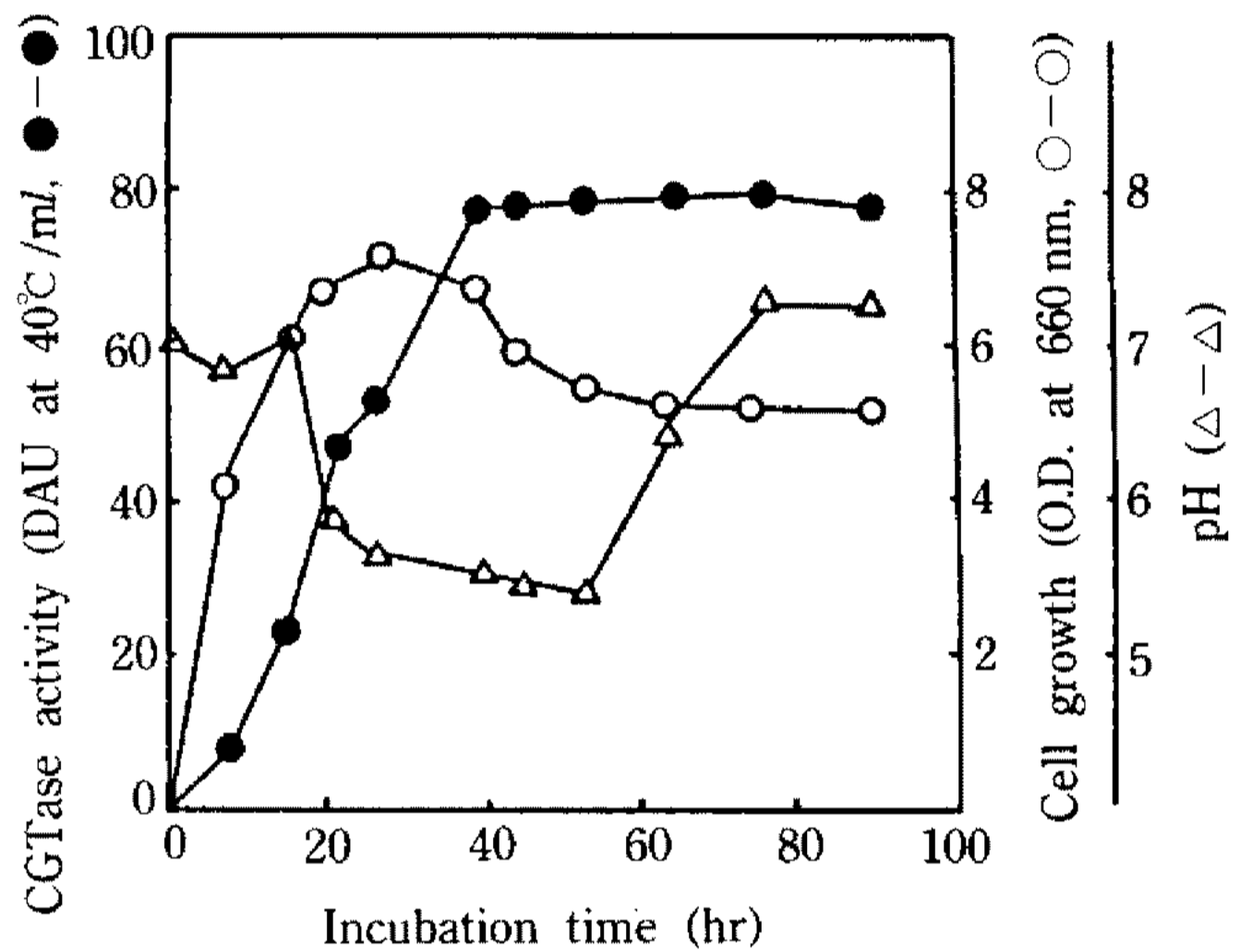


Fig. 3. Time course of CGTase production by *Bacillus stearothermophilus* MNNG 8 in 4.5l jar fermentor: 55 °C, 600 rpm, 3 vvm.

생산에 매우 중요한 인자로 작용한다는 것을 관찰할 수 있었다.

한편 인산염, 금속염의 영향 등을 살펴본 결과(자료 제공은 하지 않았음) 인산염에 따른 효소생산은 NaH₂PO₄·2H₂O 0.1%, 금속염에 따른 효소생산은 CaCl₂ 0.015%일 때 가장 높은 효소생산을 하였다. 이상과 같은 효소생산 최적배지에서 초기 pH가 효소생산에 미치는 효과는 중성부분에서 높았으며 특히 pH 7.0에서 효소생산이 가장 높았다(자료 제공하지 않았음). 또한 배양온도에 따른 효소생산은 55°C일 때 최고의 효소생산을 하였다(자료 제공은 하지 않았음). 이상의 결과와 같이 변이주 MNNG 8은 탄소원, 질소원의 경우는 모균과 달랐으나 기타 배양조건은 모균의 경우와 동일한 최적조건을 가지고 있었다(9).

Fermentor에 의한 경시적 효소생산

이상의 결과를 토대로 한 최적 배지 및 배양조건 하에서(Table 3), New Brunswick사의 BiofloIIc fer-

mentor(working Vol. 2l)를 이용하여(impeller speed와 aeration rate는 최적화 하지 않음), 돌연변이주 MNNG 8을 배양하여 그 배양시간에 따른 효소생산, 균체증식, 배지 pH의 변화를 관찰하였던 바(Fig. 3), 효소생산은 6시간부터 38시간까지는 급격히 증가하였으나 40시간 이후 일정히 유지되었으며 균체증식은 30시간을 전후하여 서서히 감소하는 사멸기로 들어갔다.

한편, pH의 변화는 초기부터 지속적으로 떨어졌으나 사멸기 중기에서 다시 올라가는 유형을 보였으며 효소생산 최대점과 pH 최저점을 일치하였는데 이와 같은 결과는 전보(9)와 다른 양상을 보였으나 김(14)의 *B. macerans* IFO 3490의 결과와는 유사하였다.

참고문헌

- Misaki, M. 1984. Utilization of cyclodextrin for citrus fruit products. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.* **31**: 98-106.
- Minamite, Y., and Y. Katsuda. 1984. Present status and future aspects for pesticides included in cyclodextrin. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.* **31**: 112-116.
- Uekama, K. 1983. Pharmaceutical application of cyclodextrins. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.* **30**: 247-254.
- Szeitli, J. 1990. The cyclodextrin and their application in biotechnology. *Carbohydrate Polymers* **12**: 375-392.
- Okada, S. 1987. Studies on cyclomaltodextrin glucanotransferase and coupling sugar. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.* **34**: 75-82.
- Kitahata, S., and S. Okada. 1976. Studies on cyclodextrin glycosyltransferase. *J. Biochem.* **79**: 641-648.
- Okada, S., S. Kitahata, M. Shiosaka, H. Bunya, M. Kubota, S. Sakai, and Y. Tsujisaka. 1991. Application of cyclodextrin glucanotransferase. *Denpun Kagaku* **38**: 211-215.
- Kobayashi, S., and K. Nakashima. 1991. Action of cyclodextrin glucanotransferase on dimaltosyl- and diglucosyl- α -cyclodextrins. *J. Carbohydrate Chemistry* **10**: 701-709.
- 황진봉, 김승호, 이태경, 양한철. 1990. *Bacillus stearothermophilus*에 의한 cyclomaltodextrin glucanotransferase의 생산. *산업미생물학회지* **18**: 578-584.
- Gerhardt, P., G.E. Murray, G. Gostilow, F.W. Nester, A.W. Wood, N.R. Krig, and G.B. Phillips. 1981. *Manual of Methods for General Bacteriology*, Pp. 222-242. American Society for Microbiology, Washington.
- Horikoshi, K. 1979. Production and industrial applications of β -cyclodextrin. *Process Biochem.* **May**: 26-30.
- Lane, A.G., and S.J. Pirt. 1971. Production of cyclodextrin glycosyltransferase by *Bacillus macerans* in batch culture. *J. Appl. Chem. Biotechnol.* **21**: 330-333.
- 유주현, 정용준, 이정수. 1989. Cyclodextrin glycosyltransferase를 생산하는 호알카리성 *Bacillus*속 미생물. *산업미생물학회지* **17**: 148-153.
- 김영호. 1988. *Bacillus macerans* IFO 3490의 사이클로덱스트린 글리코실 트랜스퍼라제의 발효최적화. 석사학위논문. 한국과학기술원.

(Received November 23, 1992)