

## 호알카리성 *Bacillus* sp. 유래의 Cyclodextrin Glycosyltransferase에 의한 $\beta$ -Cyclodextrin의 생산

김기홍 · 임형권 · 서진호\*

서울대학교 식품공학과 및 농업생물신소재연구센터

### Production of $\beta$ -Cyclodextrin from Starch by Cyclodextrin Glycosyltransferase from Alkalophilic *Bacillus* sp.

Kee-Hong Kim, Hyung-Guen Lim and Jin-Ho Seo\*

Department of Food Science and Technology

\*Research Center for New Biomaterials in Agriculture, Seoul National University

#### Abstract

Production of cyclodextrin (CD) by cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase) isolated from alkalophilic *Bacillus* sp. was carried out to determine optimal reaction conditions. The maximum initial rate of CD production from amylose was obtained at dextrose equivalent 10.5. The CD production yield showed inverse proportionality to DE values over the range from 0.5 to 37.7. Even though the deactivation constant of CGTase at 60°C was higher than those at lower temperatures, the production rate and yield at 60°C were still higher. These results suggest thermal stabilization of CGTase by binding with starch.

Key words: cyclodextrin, alkalophilic *Bacillus*, CGTase, starch, DE

#### 서 론

전분을 활용한 고부가가치 탄수화물 소재개발은 최근 활발히 연구되는 분야이다. 전분에서부터 생산되는 대표적인 소재는 환상고리형 구조를 갖는 cyclodextrin(CD)이다. CD는 CGTase 효소에 의해 생산되며 여섯개에서 여덟개의 포도당이  $\alpha$ -1,4-D-glycosidic 결합을 하고 있다. 이 중 포도당 일곱개로 이루어진  $\beta$ -CD가 열역학적으로 가장 안정한 형태로 알려져 있으며, 많은 균주가  $\beta$ -CD를 주산물로 만드는  $\beta$ -형의 CGTase를 생산한다<sup>(1)</sup>.

수용액상에서 CD는 hydroxyl기의 공간적 위치에 따라 내부는 소수성을 가지고 외부는 친수성을 가진다. 따라서 적당한 크기의 유기물질을 광범위하게 그 내부로 받아들일 수 있다.  $\beta$ -CD의 경우 일반적으로 aliphatic hydrocarbon과 결합하여 inclusion complex를 형성하거나 에틸렌, 이산화탄소와 결합한다.  $\beta$ -CD는 naphthol, steroid 등의 분자와 결합하며,  $\gamma$ -CD는 vitamin D2와 같은 큰 분자를 수용할 수 있다. CD는 전분에서 유래된 물질이므로 독성이 거의 없다. 이러한 특성들로 인하여 식품, 의약품, 화학공업 분야에 널리 이용되고 있다<sup>(2-4)</sup>.

CD를 생산하는 효소인 CGTase의 작용기작은 크게 세 가지로 나눌 수 있다<sup>(1,5,6)</sup>. 첫번째는 cyclization으로서 전분의 비환원성 말단에 작용하여 cyclodextrin과 malto-oligosaccharide를 생산하는 기능이다. 높은 농도의 malto-oligosaccharide가 존재할 때에는 역반응인 coupling 반응이 일어난다. 세번째로는 disproportionation 반응으로서 효소반응 초기에 전분의 긴 사슬을 끊어 짧으므로 기질의 접도를 낮추는 역할을 하는 반응이다.

현재까지 CGTase를 생산하는 균주는 대부분 *Bacillus*속으로 알려져 있으며 Gram 음성균으로 유일하게  $\alpha$ -CGTase를 분비하는 *Klebsiella oxytoca* M5al이 있다.

유래가 다른 균주로부터 CGTase 효소의 유전자를 클로닝 하였다. 유전공학 기법을 이용하여 대장균에서의 재조합 CGTase 생산성을 야생 균주보다 400배 이상 증가시켰음을 보고하였다<sup>(1,7)</sup>. 1988년 Yu<sup>(8)</sup> 등은 *Bacillus amyloliquefacience*로부터 95% 이상의  $\alpha$ -CD만 특이적으로 생산해내는 효소를 분리하였다<sup>(9)</sup>.

CD 생산성을 향상시키기 위한 반응공학적 연구도 활발히 이루어졌다. 환외여과(ultrafiltration)를 이용하여 반응액으로부터 연속적으로 CD를 제거하여 CD에 의한 제품저해효과를 감소시켜 생산수율을 향상시키는 방법이 제안되었다<sup>(10)</sup>. 그러나 여과막을 통하여 나오는 액중의 낮은 제품농도로 인하여 실제 적용에 어려움이 있다. 경제적인 생산을 위한 다른 방법으로 CGTase 효소의

Corresponding author: Jin-Ho Seo, Department of Food Science and Technology, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea

고정화 방법이 있다<sup>(12,13,16)</sup>. 이 방법의 장점은 높은 역가의 CGTase를 고정화 시킬 경우 CD의 수율이 증대되며 연속공정의 적용이 가능하다는 것이다<sup>(14)</sup>.

본 연구에서는 호알카리성 *Bacillus* 균주에서 유래한 CGTase의 CD 생산특성을 살펴보았다. 특히 기질로 사용된 전분의 dextrose equivalent(DE)와 반응온도에 따른 CD 생산속도와 수율을 측정하였다.

## 재료 및 방법

### 배지조성 및 배양조건

호알카리성 *Bacillus* sp.를 배양하기 위한 배지로는 Horikoshi's Medium II를 기초로 하여 가용성 전분 1%, polypeptone 0.5%, yeast extract 0.5%,  $K_2HPO_4$  1%,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.02%,  $Na_2CO_3$  1%를 사용하였다<sup>(8)</sup>. 연구에 사용된 CGTase는 토양에서 분리한 호알카리성 *Bacillus* sp. 유래의 효소이다. 물리적 특성은 pI가 4.3이며, 분자량은 114 kD이다. 이 효소는 가용성 전분을 기질로 하였을 때  $\beta$ -CD와  $\gamma$ -CD를 약 7 : 1의 비율로  $\beta$ -CD를 주 생산물로 하는 CGTase이며  $\alpha$ -CD는 거의 생성하지 않는다<sup>(16)</sup>.

전배양은 균주 보관용 agar slant에서 백금으로 5 ml 액체배지에 접종하여 37°C 진탕배양기에서 실시하였으며, 중간배양은 삼각플라스크에서 200 ml 부피로 48시간 실시하였다. 본 배양은 5 l 발효기(한국발효기)를 사용하였으며 온도는 37°C, 초기 pH가 10인 조건에서 배양하였다.

### 기질의 종류 및 전처리

효소반응에 사용된 기질은 가용성전분(Hayashi Pure Chemical Ind. Ltd.) 및 쌀분말이다. Dextrose equivalent (DE)값이 효소반응에 미치는 영향을 알아보기 위하여 아밀로스(Sigma Chem. Co., U.S.A.)를 사용하였다. 쌀분말은 1986년도에 국내에서 생산된 통일벼로서 농업진흥청 곡물시험장에서 분양받았다. 실험에 사용하기 위하여 분양받은 쌀을 cyclon mill로 분쇄하여 미세한 쌀분말로 만들었다.

기질인 전분을 호화와 동시에 액화를 시키기 위하여 80°C에서 열안정성  $\alpha$ -amylase(NOVO, Thermamyl)로 처리하였다.

### CGTase 분리 및 회수

CGTase는 유기용매침전법으로 얻었다. 본 실험에서 사용한 균주는 CGTase를 세포밖으로 분비하므로 발효액에 존재한다. 균체를 원심분리로 제거한 후 배양액을 -60°C, 3 volume의 cold acetone으로 처리하였다. 이때 급격한 상의 변화를 막기 위하여 acetone을 peristaltic pump를 이용하여 시간당 1l가 들어가는 속도로 주입하였다. 최종적으로 침전물을 원심분리로 회수한 다음 buffer(50 mM imidazole buffer, pH 7.0)에 안정화시킨

후 2°C에 보관하였다. 분리한 CGTase에 의한 CD생산은 본 실험실에서 직접 제작한 500 ml 반응기에서 실시하였고, 보조장치로 교반기(Cole-Parmer, U.S.A.)와 온도조절을 위한 순환기(Isotemp Immersion Circulator Model 730, Fisher Scientific Co.)를 사용하였다.

### Cyclodextrin 분석

Phenolphthalein은  $\beta$ -CD와 inclusion complex를 형성하면 색깔을 잃어 550 nm에서의 흡광도가 감소한다. 효소반응액 중의  $\beta$ -CD의 농도는 희석한 시료 1 ml에 3.5 ml의 30 mM NaOH를 넣어 반응을 정지시킨 후 0.02%의 phenolphthalein 용액을 5 mM  $Na_2CO_3$ 에 녹여 550 nm에서의 흡광도 감소를 표준곡선과 비교하여 측정하였다<sup>(17)</sup>.

효소반응에 의하여 생성된 CD를 종류별로 농도를 측정하기 위하여 HPLC 방법도 이용하였다<sup>(18-20)</sup>. 1 ml의 시료에 같은 부피의 acetonitrile(HPLC grade)을 첨가하여 효소의 반응을 중단시키고 단백질 및 분자량이 매우 큰 전분을 침전시키고 상등액을 0.22  $\mu$ m 여과막으로 여과시킨 후 이 중 15  $\mu$ l를 HPLC에 주입하였다. 사용한 column은 Merk Hibar pre-Packed Column RT 250-4 LiChrosorb  $NH_2$ (5  $\mu$ m)이다. 사용한 용매로는 acetonitrile과 3차 증류수를 65 : 35(v/v) 비율로 섞었고 용매는 진공 펌프로 기체를 제거하였다. 유량은 1.0 ml/min으로 조정하였으며 감지기는 PyeUnicam RI detector를 사용하였다.

### CGTase의 역가 측정

적당히 희석한 효소액 0.1 ml에 기질 1 ml(4% 가용성 전분을 40 mM pH 6.8 imidazole buffer에 용해시켜 사용)를 첨가하여 60°C에서 반응을 10분간 진행시킨 후 30 mM NaOH 3.5 ml를 첨가하여 반응을 정지시켰다. CGTase의 역가 1 unit는 4% 가용성 전분을 기질로 하였을 때 60°C, pH 7.0에서 1분당 1 mg의  $\beta$ -CD를 생산해 내는 효소의 양으로 정의하였다.

## 결과 및 고찰

### CGTase역가 측정조건의 결정

호알카리성 *Bacillus* sp.로부터 유기용매 침전법으로 얻은 조효소액의 최적 활성도를 나타내는 온도를 알아보기 위하여 여러 온도에서 기질인 4% 가용성 전분과 15분간 반응시킨 후 역가를 비교하였다. 그 결과 Fig. 1과 같이 최적효소활성온도는 60°C까지 완만한 증가를 보였으며 그 이상의 온도에서는 급격한 감소를 보였다.

효소의 첨가농도를 5, 12.5, 18.6 U/g-기질로 변화시키면서  $\beta$ -CD의 생성량을 각 반응별로 알아보았다. Fig. 2에서 알 수 있듯이 효소첨가량은 12.5 U/g-기질 범위까지, 반응시간은 10분까지 직선관계를 보였다. 따라서 최적 활성도를 나타내는 온도를 60°C로 결정하였고, 효소의 역가측정시 희석 효소액의 반응시간을 10분으로 결정하

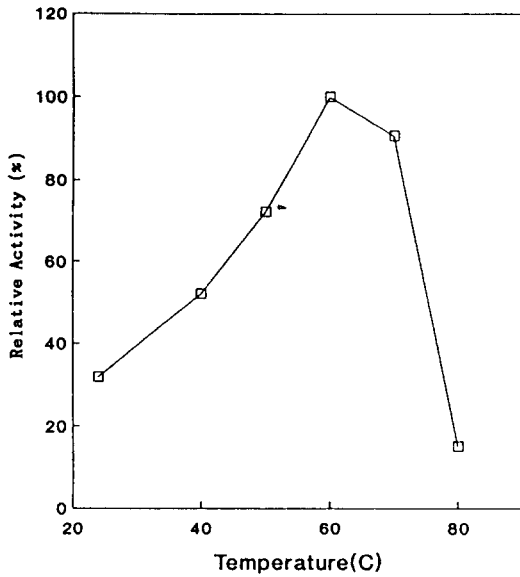


Fig. 1. Determination of an optimum temperature for measurement of CGTase activity

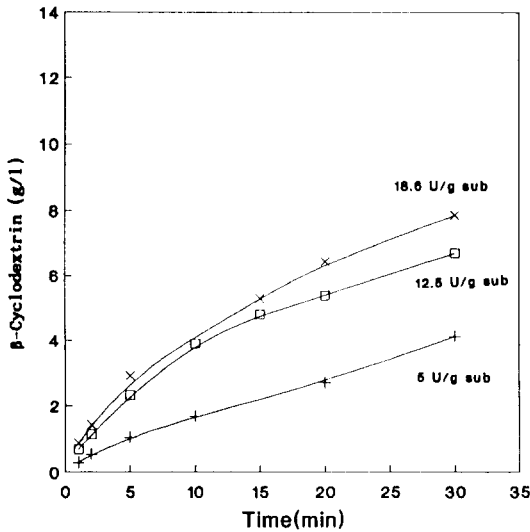


Fig. 2. Effect of reaction time and enzyme concentration on CD production for assay of CGTase activity

여 이후 실험을 진행하였다.

기질의 평균사슬 길이에 따른 CD 생성수율 및 초기생성속도

전분의 평균사슬 길이가 CD 생성수율과 초기생성속도에 미치는 영향을 살펴보았다. 기질로는 아밀로스를 사용하였고, 기질사슬의 길이는 dextrose equivalent 값으로 조절하였다. DE는 총가용성전분에 대한 환원당의

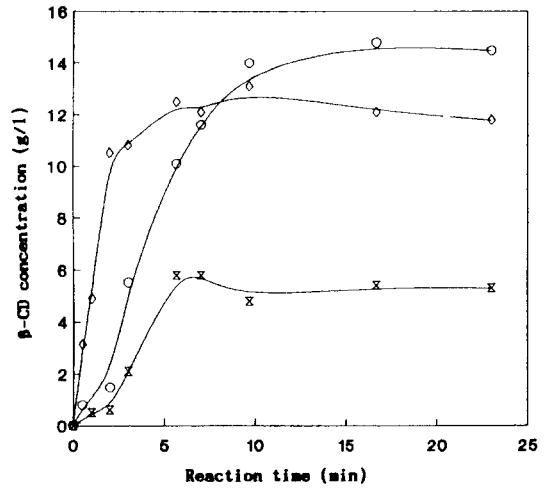


Fig. 3. Time profile of  $\beta$ -CD concentration at different dextrose equivalent (D.E.) values of amylose at 60°C, pH 6.8

○—○: D.E. 0.5, ◇—◇: D.E. 10.5, ×—×: D.E. 37.7

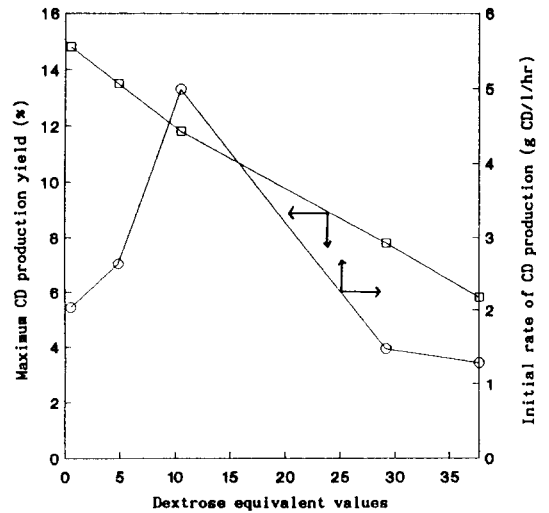


Fig. 4. Effect of DE values of substrate on maximum product yield and initial production rate

□—□: CD production yield, ○—○: initial rate of CD production

비로 정의된다. 직선형인 아밀로스의 DE는 아밀로스 사슬의 길이에 비례하므로 DE값이 클수록 사슬의 길이는 짧아진다. 아밀로스의 DE는 아밀라제의 첨가량과 처리시간을 조절하여 결정하였고, DE값은 DNS(3,5-dinitrosalicylic acid) 방법으로 측정하였다. 아밀라제를 처리하였을 경우 길이가 다른 아밀로스가 생성되지만 측정된 DE는 그러한 복합물의 평균값을 나타낸다. DE값을 0.5에서 37.7까지 조절한 아밀로스 10%에 CGTase 4 U

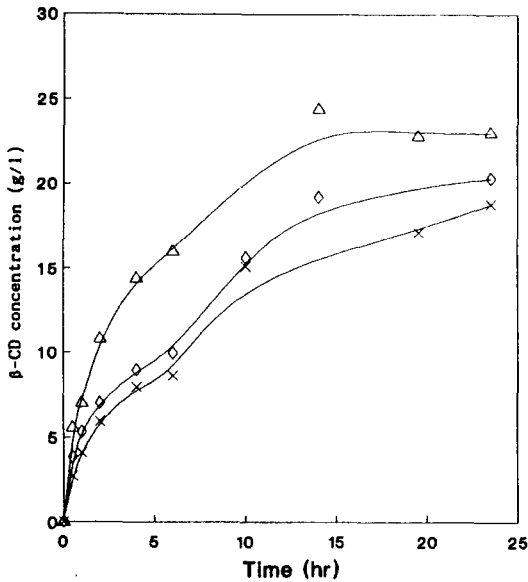


Fig. 5. Effect of reaction temperature on production of  $\beta$ -CD

×—×; 40°C, ◇—◇; 50°C, △—△; 60°C

Table 1. Characteristics for  $\beta$ -CD production at different temperatures

	Temperature		
	40°C	50°C	60°C
Max. Yield (%)	16	19	23
Initial Rate (g/l·hr)	2.97	3.50	5.4
CGTase Deactivation* Constant (kd:hr <sup>-1</sup> )	0.016	0.017	0.033

\*별도실험으로 측정

/g-아밀로스를 첨가하고 60°C, pH 6.8에서 총 24시간 동안 반응을 진행시켰다. 각 시간에 따른 CD의 생성수율과 초기생성속도를 Fig. 3과 4에 나타내었다. Fig. 3에는 대표적인 DE값에 대하여 시간에 따른 CD 생성을 나타내었다. Fig. 4에는 초기 CD 생성속도와 생성수율을 DE값 함수로 표시하였다.

생성수율은 DE값이 낮을수록 증가하여 DE값이 0.5일 때 최고수율인 15%를 나타내었다. 초기 생성속도는 DE값이 10.5일 때 최고의 값을 보였다. DE값이 10.5일 때의 초기생성속도는 DE가 0.5인 경우에 비하여 2.4배 정도 빨랐다. 아울러 생성된 CD농도도 12.0 g/l로 상대적으로 높은 값을 나타내었다. 아밀로스의 길이가 너무 짧은 경우 (DE값이 클 경우) CD 생산속도와 수율은 모두 낮은 값을 보여주었다. 아밀라제로 처리하지 않은 아밀로스 (DE값이 0.5)는 CD를 15% 정도의 수율로 생산하지만 환원말단수가 너무 적어 초기생성속도는 1.9 gCD/l/hr 정도로 DE 10.5일 때의 5.5 gCD/l/hr보다 낮은 값을

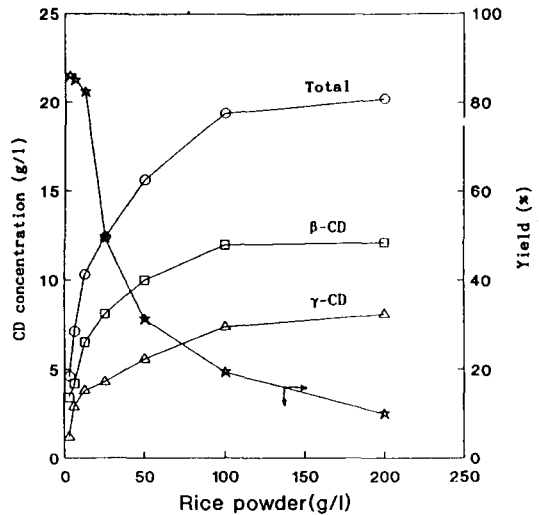


Fig. 6. Effect of rice powder concentration on production of cyclodextrins at 60°C, pH 6.8

나타내었다. DE값이 10.5일 경우 반응은 5시간만에 완결되었으나, DE가 0.5인 경우 10시간까지 CD 생성이 이루어졌다.

CD 생산에 미치는 반응온도의 영향

가용성전분 10%에 효소를 4 U/g 기질로 첨가한 후 온도를 40°C, 50°C, 60°C로 달리하였을 때 시간별로  $\beta$ -CD의 농도를 측정하였다(Fig. 5). 온도가 증가할수록 초기생성속도가 빨라서 60°C의 경우 40°C에 비해 2.2배 증가하였다. 60°C에서 초기의 빠른 속도에도 불구하고 24시간 동안 충분히 반응을 진행시키면  $\beta$ -CD 생산수율이 23%로 40°C의 19%, 50°C의 20%와 비슷한 값을 보였다. 이는 반응과정중 효소의 비활성화가 낮은 온도일 때 보다 빨리 일어났기 때문인 것으로 여겨진다(Table 1). 온도에 따른 CGTase의 비활성도는 각 온도에서 효소액을 방치한 후 일정한 시간간격으로 효소활성도를 측정하여 식 (1)에서 구하였다.

$$E(t) = E_0 \cdot \exp(-k_d t) \tag{1}$$

$E_0$ : 초기 효소활성도

$E(t)$ : 시간 t에서의 효소활성도

$k_d$ : 비활성화 상수, t: 시간

60°C에서의 비활성상수( $k_d$ )는 0.033 hr<sup>-1</sup>로 1시간 이내에 효소역가의 90% 정도가 감소하였다. 이 값은 50°C의 0.017 hr<sup>-1</sup>, 40°C의 0.016 hr<sup>-1</sup>에 비하여 높은 값이다. 그러나 60°C에서 CGTase의 높은 비활성상수값에도 불구하고 반응이 10시간 동안 진행되는 이유는 효소반응과정에서 효소가 기질인 전분과 결합하여 안정화되기 때문인 것으로 추정된다. 효소가 기질과 결합하여 안정

화된다는 연구결과는 다른 효소의 경우에 보고되었다<sup>(24)</sup>. 40℃, 50℃의 경우 5시간째에 생성속도가 다소 감소하였지만 이에 대한 이유는 분명하지 않다.

### 쌀분말농도의 영향

쌀분말의 농도가 CD의 생산에 미치는 영향을 살펴 보았다. 반응온도 60℃ pH 6.8인 조건에서 기질인 쌀분말을 이용하여 CD를 생산하기 위하여 농도를 1 g/l에서 200 g/l까지 변화시킨 반응액에 25 U의 CGTase를 첨가하여 5시간 후 형성된 CD농도와 기질전환율(Yield : %)을 구하였다(Fig. 6). 쌀분말의 양이 100 g/l 이하일 때는 쌀분말농도에 비례하여 생성된 CD농도가 증가하였으며 100 g/l 이상일 때는 더 이상의 CD농도의 증가를 보이지 않았다. 수율은 기질농도가 증가할수록 급격하게 감소함을 볼 수 있었다. 이는 CGTase가 CD에 의해 저해효과를 받았기 때문인 것으로 생각된다. 쌀전분을 사용하였을 경우 생성된 β와 γ-CD의 비율이 1.9 : 1로 가용성 전분(7 : 1)<sup>(16)</sup>에 비하여 상대적으로 많은 γ-CD가 생성되었다. 이에 대한 이유는 분명하지 않으나 기질에 따른 CGTase의 선택도가 달라졌기 때문일 것으로 추정된다.

## 요 약

본 실험에서는 토양에서 분리한 호알카리성 *Bacillus* sp. 유래의 cyclodextrin glycosyltransferase(CGTase)를 이용하여 전분을 기질로 하였을 때 CD의 생산에 미치는 여러 조건을 고찰하였다.

CD의 초기생성속도를 최대로 하는 기질의 최적 dextrose equivalent(DE)값은 10.5이었고 이로부터 CD 생산 반응인 cyclization에 필요한 기질의 최적 DE값이 존재함을 알았다. 온도가 증가할수록 CGTase의 활성도는 급격히 감소하였지만 CD 생산속도와 수율은 온도에 따라 증가하였다. 이는 CD 생산반응중 CGTase는 기질과 결합하여 열에 대해 안정성이 증가하기 때문인 것으로 생각된다.

## 감사의 글

본 연구는 한국과학재단의 지원으로 이루어진 결과로 이에 감사를 드립니다.

## 문 헌

- Gerhard, S.: Cyclodextrin glycosyltransferase production Yield enhancement by overexpression of cloned genes. *TIBTECH*, September, 7, 244(1989)
- Szejtli, J.: Cyclodextrins and their inclusion complexes. Akademiai Kiado, Budapest (1982)
- Szejtli, J.: Inclusion Compounds. vol.III, Academic press, 331(1984)
- Bender, M.L. and Komiyama, M.: Cyclodextrin chemistry. Springer Verlag(1978)
- Ronald, J.C., John, H.C. and Stephen, F.L.: Advanced in carbohydrate chemistry and biochemistry. **46**, 205 (1988)
- Chiba, S., Okada, S., Kitahara, S. and Shimomura, T.: A new trisaccharide, 2-α-maltosyl-glucose, synthesized by the transglycosylation reaction of cyclodextrin glycosyltransferase. *Agri. Biol. Chem.*, **39**, 2353(1975)
- Brosius, J.: Plasmid vectors for the selection of promoters. *Gene*, **27**, 151(1984)
- Michikatsu, S., Yagi, Y., Nagano, H. and Ishikara, T.: Determination of CGTase from *Bacillus ohbenius* and its optimum pH using HPLC. *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 1189(1985)
- Yu, E.K.C., Aoki, H. and Misawa, M.: Specific alpha-cyclodextrin production by a novel thermostable cyclodextrin glycosyltransferase. *Appl. Microbiol. Biotech.* **28**, 377(1988)
- Kim, T.J., Lee, Y.D. and Kim, H.S.: Enzymatic production of cyclodextrins from milled corn starch in an ultrafiltration membrane bioreactor. *Biotech. Bioeng.* **41**, 88(1993)
- Nakamura, N. and Horikoshi, K.: Production of Schar-dinger β-dextrin by soluble and immobilized cyclodextrin glycosyltransferase of an alkalophilic *Bacillus*. *Biotech. Bioeng.*, **19**, 87(1977)
- Su, C.S. and Yang, C.P.: A novel method for continuous production of cyclodextrins using an immobilized enzyme system. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **48**, 313(1990)
- Hashimoto, H., Hara, K., Kawahara, S.S. and Yamamoto, N.: The continuous reaction of cyclodextrins Formation by the column method using the immobilized enzyme on ion exchange resins. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.*, **33**, 29(1986)
- 이용현, 이상호, 한일근: 2단계 고정화 효소반응기를 활용한 Cyclodextrin의 연속생산. 산업미생물학회지, **19**, 171(1991)
- Horikoshi, K. and Ariba, T.: Alkalophilic microorganisms A new microbial world. Japan Scientific Societies Press, Tokyo(1982)
- Woo, E.J.: Characterization of cyclodextrin glucanotransferase from alkalophilic *Bacillus* sp. E1 and application of cyclodextrin. M.S. Thesis, Seoul National University, Korea(1992)
- Kato, T., Sakaguchi, K. and Imanaka, T.: A spectrophotometric assay for the cyclization activity of cyclomaltohexaose (α-Cyclodextrin) glycosyltransferase. *Anal. Biochem.*, **181**, 6(1989)
- Hokse, H.: Analysis of cyclodextrins by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **189**, 98 (1980)
- Sato, M., Yagi, Y., Nagano, H. and Ishikura, T.: Determination of CGTase from *Bacillus ohbensis* and its optimum pH using HPLC. *Agri. Biol. Chem.*, **49**, 1189 (1985)
- Depinto, J.A. and Champbell, L.L.: Formation and degradation of cyclic dextrins by intracellular enzymes of *Bacillus macerans*. *Science*, **146**, 1064(1964)
- Chiba, S., Okada, S., Kitahara, S. and Shimomura, T.:

- A new trisaccharide, 2- $\alpha$ -maltosyl-glucose, synthesized by the transglycosylation reaction of cyclodextrin glycosyltransferase. *Agri. Biol. Chem.*, **39**, 1353(1975)
22. Kitahara, S., Okada, S. and Fukui, T.: Acceptor specificity of the transglycosylation catalyzed by cyclodextrin glycosyltransferase. *Agri. Biol. Chem.*, **42**, 1369(1978)
23. Wiseman, A.: Stabilization of enzymes' in: *Topics in enzyme and fermentation technology*. Wiseman, A. (ed.), vol.2, pp.280-303, Ellis Horwood Ltd. (1978)
- 

(1993년 6월 24일 접수)