

## *Bacillus* sp. I-5 Cyclodextrin Glucanotransferase에 의한 Cyclodextrin의 영향

김성혁 · 최종수<sup>†</sup> · 정갑택<sup>†</sup> · 유영수<sup>†</sup> · 정동선 · 박관화\*

서울대학교 식품공학과 · 농업생물신소재연구센터

<sup>†</sup>미원식품주식회사 기술연구소

### Production of Cyclodextrin by *Bacillus* sp. I-5 Cyclodextrin Glucanotransferase

Soeng Hyuck Kim, Jong Soo Choi<sup>†</sup>, Kap Taek Chung<sup>†</sup>, Young Soo Yoo<sup>†</sup>,  
Dong Sun Jung and Kwan Hwa Park\*

Department of Food Science & Technology and Research Center for New Bio-Materials  
in Agriculture, Seoul National University, Suwon, 441-744 Korea

<sup>†</sup>Miwon Foods Company, Ltd.

#### Abstract

A cyclodextrin glucanotransferase(CGTase)-producing *Bacillus* sp. I-5 was isolated from soil and the enzyme exhibited the maximum reaction rate at pH 8.0 and 50°C. It was found that CGTase of I-5 produced  $\beta$ - and  $\gamma$ -CD mainly but the production ratio of cyclodextrins (CDs) was influenced by the buffer solution. Sodium acetate significantly stimulated the formation of  $\gamma$ -CD, increasing the content by 35%. The production of CDs was influenced by DE value of starch. The results indicated that DE value in the range of 3.5~6.0 were most effective for the CD formation. CGTase was immobilized on the reversibly soluble-insoluble carrier, hydroxypropyl methylcellulose acetate succinate. The immobilized CGTase was soluble at pH 7.5, and precipitated easily at pH 6.0. Enzyme reactor was designed to produce CD continuously. It was composed of three major stages-CD production by immobilized CGTase, conversion of the residual dextrin to glucose by amylase and glucoamylase and alcohol fermentation by yeasts to remove the glucose into alcohol. The yield of total CDs was 3.65g from 10g soluble starch.

Key words: *Bacillus* sp. I-5. Cyclodextrin glucanotransferase, Cyclodextrin, Immobilized CGTase

## 서 론

Cyclodextrin glucanotransferase(CGTase; 1,4- $\alpha$ -D-glucan 4- $\alpha$ -D-(1,4- $\alpha$ -D-glucano)-transferase; E.C. 2.4.1.19)는 전분이나 아밀로오스, 아밀로펙틴, 말토올리고당 등을 기질로 하여 직쇄상의 덱스트린을 생성하거나 전이 반응에 의해 cyclodextrin(CD) 혼합물을 생성하는 전이 효소로서 여러 종류의 효소 반응을 일으키는 다기능 효소이다<sup>(1,2)</sup>. CD는 주로 6, 7, 8개의 글루코오스 분자가 1,4- $\alpha$ -D-glucoside 결합으로 이루어진 왕관형의 환상 복합체로서 글루코오스 잔기의 개수에 따라  $\alpha$ -CD(cyclomaltohexaose),  $\beta$ -CD(cyclomaltoheptaose),  $\gamma$ -CD(cyclomaltooctaose)가 주로 알려져 있다<sup>(3, 5)</sup>.

CGTase를 분비하는 미생물로는 *Bacillus*속과 *Klebsiella*속이 보고되어 있으며<sup>(6)</sup> *Bacillus macerans*의 CG-

Tase는  $\alpha$ -:  $\beta$ -:  $\gamma$ -CD의 생성 비율이 2.7 : 1 : 1로서  $\alpha$ -CD를 주로 생성하며<sup>(7)</sup> *Bacillus megaterium*은 1 : 2.4 : 1로  $\beta$ -CD를 주로 생성하는 것으로 보고되고 있다<sup>(8)</sup>.  $\gamma$ -CD는 용해도, 생체 내에서의 분해성이 뛰어나며 분자내 동공이 가장 커서 여러 종류의 물질을 포접할 수 있을 것으로 기대되고 있는데  $\gamma$ -CD를 주산물로 하는 효소로는 *B. subtilis* No.313의 CGTase가 보고되고 있으나<sup>(9)</sup> 전분으로부터  $\gamma$ -CD의 수율이 5%에 불과하여 일반적으로는  $\gamma$ -CD는  $\alpha$ -,  $\beta$ -CD를 생산할 때의 부산물로서 소량 생산되는 것으로 알려져 있다.

그러나 이러한 산물의 조성비는 반응 조건에 따라서 변화될 수 있으며 SDS, Triton 등의 계면 활성체에 의해 CD의 조성이 달라지며<sup>(10)</sup> 1-decanol이나 hexane 등의 유기 용매도  $\alpha$ -CD 또는  $\beta$ -CD의 형성을 촉진시킨다고 보고되고 있다<sup>(11)</sup>. 또한 글루코오스의 평균 분자길이가 16인 glucopyranosyl chain을 기질로 하거나 낮은 농도의 maltose를 acceptor로 하여  $\alpha$ -CD와 coupling reaction을 유도하였으며 200 mM의 sodium acetate를 첨가하여  $\gamma$ -CD의 생성량이 증가하였다<sup>(12)</sup>.

Corresponding author: Kwan Hwa Park, Department of Food Science & Technology, Seoul National University, Suwon, 441-744 Korea

본 논문에서는 *Bacillus* sp. I-5가 생산하는 CGTase의 CD 생성 비율과 물리화학적 효소의 특성에 대하여 검토하고 효소를 고정화하여 연속적인 CD생산에 대하여 연구하였다.

## 재료 및 방법

### 배지조성과 배양조건

Gamma-cyclodextrin의 생성량이 비교적 많은 균주인 *Bacillus* sp. I-5를 토양으로부터 분리하고, 배양을 위한 배지는 soluble starch 2%(w/v), polypeptone 0.5%, yeast extract 0.5%,  $K_2HPO_4$  0.1%,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.02% 및  $NaCO_3$  1%이다. 이 중 pH 조절제로서 사용한  $NaCO_3$ 는 별도로 살균한 뒤 냉각 후 무균 상태에서 첨가하였다.

5리터 발효조(한국발효기(주))에 working volume을 2리터로 하여 통기량 2.0 vvm, 온도 37°C, 교반속도 600 rpm의 조건으로 배양하였다.

### 효소역가 측정

Phenolphthalein method<sup>(13)</sup>: 4% soluble starch(Sigma Chemicals Co., U.S.A.)를 0.1 M phosphate buffer (pH 6.0)에 녹여 기질로 사용하였고, 기질 1ml에 효소액 20  $\mu$ l를 첨가하여 60°C의 진탕수조에서 10분간 반응시킨 후 30 mM NaOH 3.5 ml을 가하여 반응을 중지시켰다. 이 효소 반응액에 0.02% phenolphthalein 용액(5 mM  $Na_2CO_3$  용액에 녹인 것) 0.5 ml을 첨가한 후 550 nm에서의 흡광도를 측정하여 색이 감소된 정도를  $\beta$ -CD 표준곡선과 비교하여  $\beta$ -CD 농도로 환산하였다. 효소역가 1 unit는 1분당 1 mg의  $\beta$ -CD를 생성시키는 효소농도로 정하였다.

HPLC method: 4% soluble starch를 0.1 M phosphate buffer(pH 6.0)에 녹인 기질용액 2 ml에 효소액 200  $\mu$ l를 가하여 55°C 진탕수조에서 1시간 반응시킨 후 5분간 끓여 반응을 중지시켰다. 이 효소 반응액과 동일한 부피의 acetonitrile을 섞어 원심분리하여 membrane filter(0.45  $\mu$ m)로 여과한 후 분석에 이용하였다.

HPLC(Waters 600E)의 용매는 acetonitrile : water(65 : 35, v/v)를 사용하였고 flow rate는 1.0 ml/min으로 하였다. Column은 Lichrosorb  $NH_2$ (10  $\mu$ m, 4 $\times$ 250 mm, Merck, Germany)를 사용하였고 검출기는 Waters differential refractometer를 사용하였다.

### CGTase의 분리

발효기로 72시간 배양한 배양액을 7,000 rpm으로 20분 동안 원심분리하고 상등액에 3배의 ethanol(-60°C)을 가하여 4°C에서 하룻밤 방치한 후 얻은 단백질 침전물을 100 mM phosphate buffer(pH 6.0)에 녹여 초효소액으로 하고 동결건조를 하여 분말상태로 사용하였다.

### pH 및 온도의 영향

Wide range buffer를 이용하여 pH 4.0에서 pH 12.0가

지 각각의 pH에서 역가 측정을 HPLC로 하였다. 또한 pH에 대한 안정성을 실험하기 위하여 pH 4.0에서 pH 12.0의 범위에서 각 pH의 buffer에 효소를 녹인 후 50°C에서 30분 방치한 후 각각의 효소역가를 측정하였다.

*Bacillus* sp. I-5 CGTase의 온도에 대한 안정성은 수조를 이용하여 30°C에서 80°C까지의 각각의 온도에서 30분간 방치한 후 60°C에서 phenolphthalein 방법으로 역가 측정하였다.

### 기질의 DE(dextrose equivalent) value에 따른 product 조성

전분을 가수분해하여 적당한 glucose unit를 가진 oligomer로 만들고 기질의 여러가지 DE value에 따라 생성되는 CD의 조성을 실험하였다. 100 mM phosphate buffer(pH 6.0)에 10% soluble starch를 녹이고 이 기질 용액에 내열성  $\alpha$ -amylase(Termamyl, Novo Co.)를 1  $\mu$ l/g starch 첨가하여 80°C의 진탕수조에서 가수분해를 시키고 시간에 따라 시료를 채취하여 DNS 방법으로 환원당량을 정량하였다. DE value는 아래의 식으로 계산하였다.

$$DE \text{ value} = \frac{\text{reducing sugar(g)}}{\text{total soluble starch(g)}} \times 100$$

$$= \frac{100}{\text{No. glucose unit}}$$

### 효소 고정화

Matrix인 hydroxypropyl methylcellulose acetate succinate(HPMCAS, AS-HF, Shin-Etsu Chemicals Co., Japan)를 pH 7.5의 phosphate buffer에 matrix 1%와 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide(EDC, Sigma Chem. Co., U.S.A.) 0.3% 첨가하여 반응시킨 후 효소 용액을 넣고 4°C에서 6시간동안 천천히 저어주며 고정화시켰다. 반응 후 고정화된 효소를 분리하기 위해 2 N phosphoric acid로 pH를 6.0으로 낮춘 뒤 침전물을 원심분리하였다. 이 침전물을 다시 pH 7.5 phosphate buffer에 녹여 고정화 효소로 사용하였다.

### 효모 고정화 및 효소 반응기

2.5%의 sodium alginate와 대수기에 이른 *Saccharomyces cerevisiae* 배양액 같은 부피를 섞은 다음 0.2 M  $CaCl_2$  용액에 주사바늘(No.24)을 통해 한방울씩 떨어뜨려 bead를 형성시켜 고정화하였다. 고정화된 효모 bead의 크기는 2~3 mm의 구형으로 형태가 거의 일정하였으며 reactor(4.5 $\times$ 47 cm, total vol. 3,000  $cm^3$ )에서 10%의 dextrose를 기질로 하여 27°C에서 3일간 발효한 결과에 탄올의 생성량은 5.9%로서 이론수율( $Y_{p/s}$ )의 78.5%에 해당하는 발효율을 보였다. 생성된 에탄올은 gas chromatography(Pye Unicam PU 4500, Philips, Netherland)를 이용하여 분석하였다.

Cyclodextrin을 연속적으로 생산하기 위한 효소 반응

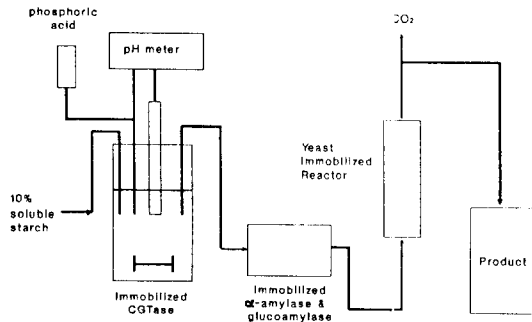


Fig. 1. Scheme for the immobilized CGTase reactor

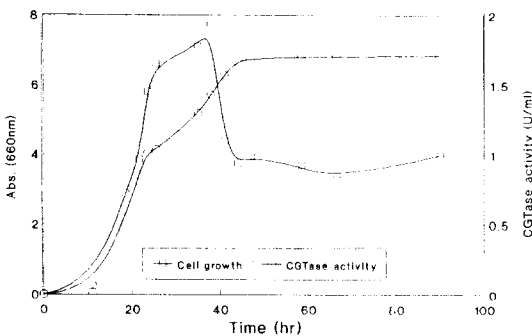


Fig. 2. Growth curve of *Bacillus* sp. I-5

기는 Fig.1과 같이 AS-HF에 고정화된 효소로 기질을 분해하여 CD를 생산하는 CD production reactor와  $\alpha$ -amylase와 glucoamylase를 이용하여 반응하지 않은 기질을 glucose와 maltose 단위까지 분해하는 glucose conversion reactor, 그리고 CD 이외의 산물을 에탄올로 발효시키는 immobilized yeast column의 세 부분으로 구성하였다. 기질은 10% soluble starch를 사용하였고 pH의 조절은 2 N phosphoric acid로 하였다.

결과 및 고찰

*Bacillus* sp. I-5의 생장곡선

*Bacillus* sp.의 생장곡선을 Fig.2에 나타내었다. 배양 후 24시간만에 정지기에 도달하였으며 40시간이 지나면서 cell density는 급격히 감소하였다. 균의 cell lysis가 비교적 빨리 일어나 소멸기에 들어간 것으로 생각된다. 효소의 생산은 40시간이 될 때까지 지속 증가하다가 소멸기에 들어가면서부터는 일정한 역할을 보였다.

$\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -CD의 생성비율

*Bacillus* sp. I-5가 생산하는 CGTase의 산물을 HPLC로 분석한 결과  $\alpha$ -:  $\beta$ -:  $\gamma$ -CD의 비가 0.7 : 3.3 : 1로서  $\gamma$ -CD 생성율이 비교적 높은 편이지만 주산물은  $\beta$ -CD

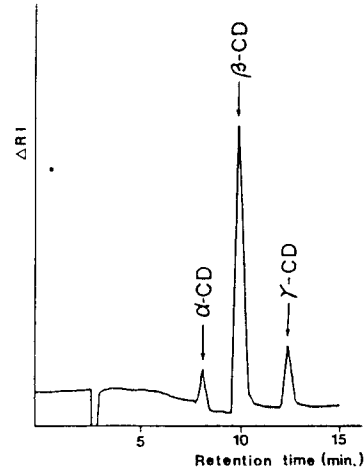


Fig. 3. HPLC analysis of the reaction products by I-5 CGTase

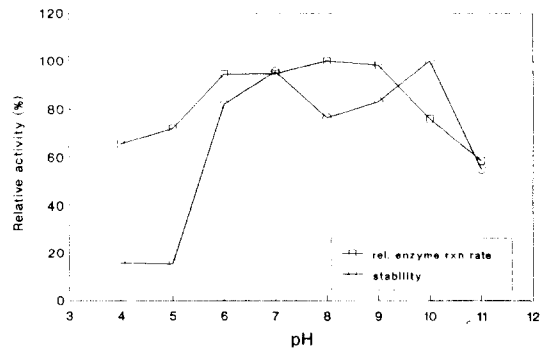


Fig. 4. Effect of pH on the enzyme reaction rate and stability of *Bacillus* sp. I-5 CGTase

였다(Fig.3). 이는 *Bacillus megaterium*<sup>(8)</sup>의 CGTase가 1 : 2.4 : 1의 생성비를 보이는 것과 유사하였다.

pH 및 온도에 의한 영향

Wide range buffer(pH 4~12)를 사용하여 pH에 따른 효소작용을 측정된 결과는 Fig.4와 같다. *Bacillus* sp. I-5가 생산하는 CGTase는 pH 8.0~9.0에서 최대의 역할을 나타냈으며 비교적 넓은 범위의 pH 6.0~9.0에서 최대 역할의 90% 이상을 보였다. 보고된 바에 의하면 *B. megaterium*의 최적 pH가 pH 5.2~6.1이며 *B. macerans*가 pH 5.0~6.0, *B. stearothermophilus*는 pH 5.0~5.5<sup>(14)</sup>로서 본 실험에 사용한 CGTase가 높은 pH에서 활성을 나타냄을 알 수 있고, 따라서 중성 CGTase로 분류할 수 있었다<sup>(5)</sup>. 또한 pH 6~10의 알칼리 범위에서 비교적 안정한 것으로 나타났고 pH 6 이하에서는 급격히 효소의 역할이 상실되었고 pH 10 이상에서도 역시 효소가 불활성화됨을 알 수 있었다.

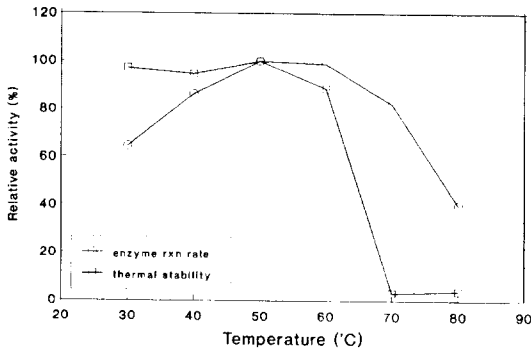


Fig. 5. Effect of temperature on the enzyme reaction rate and stability of *Bacillus* sp. I-5 CGTase

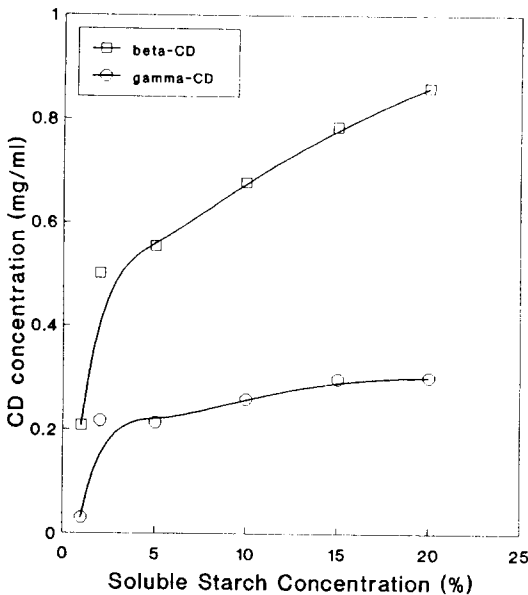


Fig. 6. Effect of substrate concentration on the production of CD by *Bacillus* sp. I-5 CGTase

pH 6에서 각 온도에 의한 영향을 측정한 결과 Fig. 5와 같고 최적 작용온도는 50°C로 나타났다. CGTase의 최적온도가 *B. stearothermophilus*가 75°C인 것을 제외하고는 *B. megaterium*은 55°C, *B. circulans*는 50°C, *B. macerans*는 55°C<sup>(14)</sup>로서 이 실험에 사용한 CGTase와 유사한 결과를 보였다. 온도에 대한 안정성을 측정하기 위하여 0.05 M phosphate buffer(pH 6.0)에 녹인 효소액을 각 온도에 30분간 방치한 후 각각의 효소여가를 측정한다. 결과 60°C까지 열에 대해 안정한 것으로 나타났다.

#### 기질농도에 대한 영향

Soluble starch의 농도를 각각 1, 2, 5, 10, 15, 20%로 하여 I-5 CGTase를 반응시킨 후 HPLC로 분석한 결과는

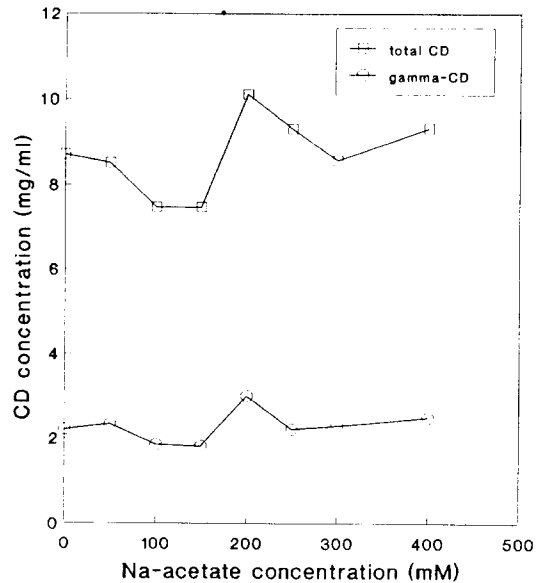


Fig. 7. Effect of sodium acetate on the CD production of *Bacillus* sp. I-5 CGTase

Fig. 6과 같다. 기질농도가 증가할수록 CD의 생성량이 증가하였는데  $\beta$ -CD의 생성은 5% 이상의 기질농도에서도 계속 증가하는 추세이었으나  $\gamma$ -CD는 5%에서 그 증가가 완만해짐을 알 수 있었다.  $\beta$ -CD 및  $\gamma$ -CD의 생성비율을 볼 때에는 2%의 농도일 때  $\gamma$ -CD의 비율이 가장 높았다.

#### Sodium acetate에 의한 영향

CD의 생성량에 대한 sodium acetate의 영향을 알아보기 위해 4%의 soluble starch에 sodium acetate를 400 mM까지 첨가하여 반응시키고 생성되는 CD의 양을 HPLC로 분석하였다(Fig. 7). Sodium acetate의 농도가 200 mM일 때 전체 CD의 생성량이 첨가하지 않은 것보다 15% 가량 증가했으며  $\gamma$ -CD의 경우는 35%의 높은 증가율을 보였다. 이는 Bender의 보고와 유사한 경향이었다<sup>(12)</sup>.

#### DE value와 생성된 CD의 조성

DE value에 따라 CD의 생성량을 알아보기 위하여 DE가 다른 액화 산물을 기질로 하여 CGTase를 첨가하여 반응시킨 결과는 Fig. 8과 같다. DE value가 3.5에서 6.0 정도일 때(glucose 중합도가 17에서 28 정도일 때) 전체 CD 생성량은 25% 정도가 증가함을 알 수 있다. DE value는  $\gamma$ -CD의 생성비에는 특별한 영향을 주고 있지 않았다.

#### CGTase의 고정화와 CD의 연속적 생산

CGTase를 hydroxypropyl methylcellulose acetate succinate에 공유결합으로 고정화하였다. 첨가한 CGTase

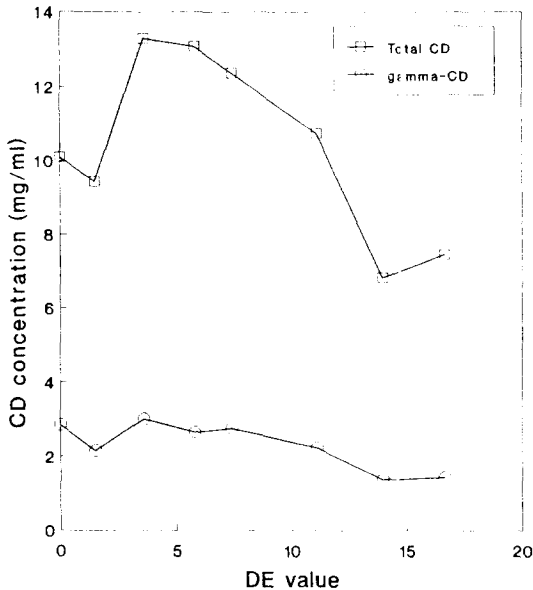


Fig. 8. Effect of the various DE values on the production of  $\gamma$ -cyclodextrin by *Bacillus* sp. 1-5 CGTase

Table 1. Yields of the immobilized CGTase on reversibly-soluble matrix, hydroxypropyl methylcellulose acetate succinate

Enzyme	yield(%)
Crude CGTase	100
Immobilized CGTase	43.4
Recycled CGTase	16.9

역가의 43.5%가 고정화되었으며 고정화된 CGTase를 다시 침전시킨 후 분리하여 재사용한 결과 고정화 효소의 38.9%가 회복되었다(Table 1). 이는 고정화된 CGTase가 pH가 변화되면서 역가가 상실되었기 때문으로 생각된다.

고정화된 CGTase를 이용하여 CD를 연속적으로 생산하기 위하여 10%의 가용성 전분을 기질로 하여 고정화 CGTase를 반응시켜 CD를 생산한 다음 반응되지 않은 기질을  $\alpha$ -amylase와 glucoamylase를 충분히 작용시켜 glucose와 maltose로 전환시키고 이어서 alginate에 고정화되어 있는 효모를 이용하여 알코올 발효시켜 최종 산물로서 CD 혼합물과 에탄올이 생성되도록 하였다. 10 g의 가용성 전분으로부터 3.65g의 CD 혼합물을 얻을 수 있었으며 고정화 CGTase를 재사용하여 다시 반응시킨 결과 1.99g의 CD를 얻었다.

요 약

토양에서 분리한 *Bacillus* sp. I-5의 cyclodextrin glucoamylase(CGTase)는  $\beta$ - 및  $\gamma$ -cyclodextrin(CD)를

주로 생성하는 효소로서 최적 반응조건은 pH 8.0, 50°C에서 최적 반응이었다.

생성되는 CD의 조성비는 buffer 용액에 따라 영향을 받았으며 sodium acetate의 농도를 200 mM로 하였을 때  $\gamma$ -CD의 생성은 35% 가량 증가하였다. 기질인 가용성 전분의 DE value에 따라 CD의 생성이 달라져 3.5~6.0 범위의 DE value의 전분을 기질로 사용하였을 때 CD가 가장 많이 생성되었다.

CD를 연속적으로 생산하기 위하여 CGTase를 가역적으로 용해-침전되는 담체인 hydroxypropyl methylcellulose acetate succinate에 고정화하였고 고정화된 CGTase는 pH 7.5에서 물에 용해되고 pH 6.0에서 쉽게 침전되는 특성을 나타내었다. CD의 연속적 생산은 고정화된 CGTase에 의한 CD의 생산, 반응하지 않은 기질을 glucose로 분해, glucose를 알코올로 발효시키는 단계로 하는 효소반응기를 개발하여 최종적으로 CD 혼합물과 에탄올이 생성되도록 하였다. 10g의 가용성 전분으로부터 생산된 전체 CD의 양은 3.65g이었다.

문 헌

- Whistler, R.L., Bemiller, J.N. and Paschall, E.F.: Starch: chemistry and technology. In *Starch oligosaccharides*, 2nd ed. Academic Press, Inc., U.S.A. p.143(1984)
- Starness, R.L.: Industrial potential of cyclodextrin glycosyl transferases. *Cereal Foods World*, **35**, 1094(1990)
- Korpela, T., Mattsson, P., Hellman, J., Paavilainen, S.: Cyclodextrins: production, properties and applications in food chemistry. *Food Biotechnology*, **2**, 199(1988)
- Szejtli, J.: The cyclodextrins and their applications in biotechnology. *Carbohydrate Polymers*, **12**, 375(1990)
- 小林昭一: Cyclodextrin의開發과 周邊技術. *食品工業*, **2**, 20(1988)
- Horikoshi, K.: Production and industrial application of  $\beta$ -cyclodextrin. *Process Biochemistry*, May, 26(1979)
- Kitahata, S., Tsuyama, N. and Okada, S.: Purification and some properties of cyclodextrin glucoamylase from a strain of *Bacillus* species. *Agric. Boil. Chem.*, **38**, 387(1974)
- Kitahata, S. and Okada, S.: Action of cyclodextrin glucoamylase from *Bacillus megaterium* strain No.5 on Starch. *Agric. Biol. Chem.*, **38**, 2413(1974)
- Kato, T. and Horikoshi, K.:  $\gamma$ -Cyclodextrin 合成酵素. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.*, **33**, 137(1986)
- Kobayashi, S., Kainuma, K. and French, D.: Effect of surfactants on cyclization of *Bacillus macerans* cyclodextrin glucoamylase. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.*, **30**, 62(1983)
- Ahn, J.H., Hwang, J.B. and Kim, S.H.: Effect of various additives and solvents on thermostability of cyclodextrin glucoamylase from *Bacillus stearothermophilus*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **19**, 368(1991)
- Bender, H.: An improved method for the preparation of cyclooctaamylose, using starches and the cyclodextrin glycosyltransferase of *Klebsiella pneumoniae* M 5 al. *Carbohydrate Research*, **124**, 225(1983)

13. Kaneko, T., Kato, T., Nakamura, N. and Horikoshi, K.: Spectrophotometric determination of cyclization activity of  $\beta$ -cyclodextrin forming cyclodextrin glucanotransferase. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.*, **34**, 45(1987)
14. 유주현, 정용준, 이정수: Cyclodextrin Glucanotrans-

ferase를 생산하는 호알칼리성 *Bacillus*속 미생물. 한국산업미생물학회지, **17**, 148(1989)

---

(1993년 8월 27일 접수)