

## 김치에서 분리한 *Bacillus* sp. S-6의 Cyclodextrin Glucanotransferase의 특성과 최적생산조건

전흥기<sup>\*</sup> · 조영배 · 김수진 · 배경미

부산대학교 미생물학과

### Some Properties and Optimal Culture Conditions of Cyclodextrin Glucanotransferase of *Bacillus* sp. S-6 Isolated from Kimchi

Hong-Ki Jun<sup>\*</sup>, Young-Bae Jo, Soo-Jin Kim and Kyung-Mi Bae

Dept. of Microbiology, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

#### Abstract

A microorganism capable of producing high level of extracellular cyclodextrin glucanotransferase (EC 2.4.1.19 ; CGTase) was isolated from Kimchi. 2-O- $\alpha$ -D-glucopyranosyl L-ascorbic acid(AA-2G) was synthesized by transglycosylation reaction of CGTase using starch as a donor and L-ascorbic acid as an acceptor. The isolated strain S-6 was identified as *Bacillus* sp. S-6. The maximal CGTase production was observed in a medium containing 0.5% soluble starch, 1% yeast extract, 1% NaCO<sub>3</sub>, 0.1% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, and 0.02% MgSO<sub>4</sub> with initial pH 8.0. The strain was cultured at 37°C for 40 hr with reciprocal shaking. Using the culture supernatant as crude enzyme, the optimal pH and temperature of the CGTase activity of this strain were 7.0 and 40°C. In the effects of pH and temperature on the stability of the enzyme, the enzyme was stable in the range of pH 6.0~10.0 and up to 45°C, respectively.

**Key words:** Cyclodextrin glucanotransferase(CGTase), Kimchi, *Bacillus* sp. S-6, 2-O- $\alpha$ -D-glucopyranosyl L-ascorbic acid(AA-2G)

#### 서 론

최근 김치는 그 식품학적 및 영양학적 중요성이 입증되어감에 따라 점차 세계적 식품으로서의 위치를 굳혀가고 있다(1-3). 독특한 맛과 다양한 재료에서 유래하는 각종 영양성분, 살아있는 효소와 젖산균은 김치의 가치를 입증할 수 있는 주요 요소이다(4-6). 즉 김치는 각종 채소류의 모습음식이자 젖산발효를 거친 살아있는 저장식품이며 섬유질이 풍부해 변비 뿐 아니라 성인병 예방, 체중조절에도 효과가 있는 보약 중의 보약이다. 특히 김치에는 각종 향신료가 들어있어 식욕을 증진시키고 강장작용과 신진대사를 촉진하며(7), 채소류에 풍부하게 들어있는 항산화인자가 노화를 방지하고 항암기능까지 한다는 것도 잘 알려진 사실이다(8,9). 본 실험실에서는 김치의 임상 영양학적 측면의 과학적 확립을 위해 김치성분 중 특히 L-ascorbic acid(AsA)와 그의 유도체(2-O- $\alpha$ -D-glucopyranosyl L-ascorbic acid

(10-13), 6-O- $\alpha$ -D-glucopyranosyl L-ascorbic acid(14), L-ascorbic acid 2-O-phosphate(15-17), L-ascorbic acid 2-O-sulfate(18) 그리고 L-ascorbic acid 2-O-methyl ether(19) 등) 및 이들의 생산과 관련된 미생물에 관해서 오랫동안 연구를 수행해 왔다. 이 가운데 특히 2-O- $\alpha$ -D-glucopyranosyl L-ascorbic acid(AA-2G)는 AsA의 2위치의 수산기가 glucose 1분자에 의해  $\alpha$ -치환된 구조로 AsA와는 달리 2위치가 glucose 1분자에 의해 가리워져 있기 때문에 직접적인 환원활성을 나타내지 않으므로, 열반응과 산화반응 및 radical반응을 받기 어려워 공기산화 및 수용액 중에서도 안정하다. 또한 ascorbic acid oxidase에 대해 저항성을 가지며 세포나 생체에 투여되면 그곳에 존재하는  $\alpha$ -glucosidase에 의해서 환원형 AsA와 glucose로 분해되어 항괴혈병작용, 선유아세포 collagen 합성촉진작용, 백내장예방작용 및 면역촉진작용 등의 AsA와 동일한 생리활성을 발휘하는 유도체이다(20-25).

<sup>\*</sup>To whom all correspondence should be addressed

AA-2G는 일부 CGTase가 환원성 위치인 2번위치의 OH기에 글루코실기를 전이시킴으로 합성된다. CGTase는 전분을 분해하여 6~12개의 glucose분자가  $\alpha$ -1,4-glucoside 결합으로 환상결합한 왕관형태(26)의 cyclodextrin(CD) 중에서 glucose 6, 7, 8개로 구성되어 있는  $\alpha$ -,  $\beta$ -, 및  $\gamma$ -CD를 생성하며, 합성된 CD를 개환 또는 적당한 수용체에 전이시키는 효소이다. 즉 CGTase는 크게 cyclization, coupling과 disproportionation, 그리고 hydrolysis의 세가지 작용을 촉매하는 것으로 알려져 있다(26-29). 특히 AA-2G의 합성과 관계되는 coupling reaction은 전분에서 합성된 CD를 개환하고 그 분해 생성물을 당수용체에 전이시키는 분자간 당전이반응(intramolecular transglycosylation reaction)을 의미한다. 당수용체로는 당당류, 이당류 그리고 배당체와 같은 각종 당이 이용되며, CGTase의 coupling reaction을 이용하면 중합도가 다른 각종 당전이 생성물을 합성할 수 있다(30-34).

본 연구는 AA-2G의 김치에서의 생성관계를 조사하기 위하여 김치로부터 AA-2G의 합성능이 있는 CGTase 생산균주를 분리 동정하고, CGTase의 최적생산조건 및 특성을 검토하였다. 뿐만 아니라 AA-2G의 산업적 실용화의 경우 저가 기질의 사용이 필수적이므로 starch에 대한 CGTase의 glycosyl donor specificity를 조사하였다.

## 재료 및 방법

### CGTase 생산균주의 분리 및 선정

김치시료를 증류수에 현탁하여 1% soluble starch, 0.5% yeast extract, 0.5% polypeptone, 0.1%  $K_2HPO_4$ , 0.02%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.02% congo red, 0.01% methyl orange, 1%  $Na_2CO_3$  그리고 1.5% agar가 포함된 분리용배지(35)에 희석평판법으로 도말한 다음 37°C 항온 배양기에서 2일간 배양시킨 후 노란환을 형성한 colony를 분리하였다.

분리 colony 중 동일 배지에 연속하여 계대배양하면서, 효소 분비량에 비례하는 노란환의 크기가 크고 또한 노란환과 colony의 크기와의 상대비가 큰 균주를 일차적으로 선별한 후 25mM AsA(Junsei Chemical Co.)와 5mM  $\alpha$ -CD(Sigma Co.)를 기질로 하여 AA-2G 합성능을 HPLC로 확인하였다. 노란환을 형성하고 동시에 AA-2G 합성능이 있는 균주를 분리용배지에서 congo red와 methyl orange가 제외된 효소 생산용배지 5ml에 48시간 액체배양한 후 CGTase 활성이 가장 우수한 균주를 최종적으로 선별하였다.

### AA-2G의 합성 및 분석

당수용체로는 25mM AsA(Junsei Chemical Co.)를, 기질로는  $\alpha$ -CD(Sigma Co.)와 starch(Yakuri pure chemicals Co.)를 각각 5mM의 농도로 100mM phosphate buffer(pH 7.0)에 녹인 후 사용하였다. 이들 각 기질용액 300 $\mu$ l와 효소액 50 $\mu$ l를 40°C에서 1시간 반응시킨 뒤 0.5M acetate buffer(pH 5.0)에 10 unit/ml가 되게 녹인 glucoamylase(Sigma Co., from *Rhizopus* mold)를 500  $\mu$ l 첨가하여 55°C에서 30분간 반응시켜 AA-2G를 합성하였으며 합성산물은 Table 1의 조건하에서 HPLC로 분석하였다.

### 분리균주의 동정

분리균주를 광학현미경으로 형태학적 특성을 관찰하고 각종 배지에서의 배양상의 특성을 검토하여, 균주의 생리학적 및 생화학적 특성을 Bergey의 Determinative Bacteriology Manual 제9판과 Bergey의 Systematic Bacteriology Manual Vol.2에 준하여 동정하였다.

### CGTase의 활성측정

CGTase의 활성측정은 100mM phosphate buffer(pH 7.0)에 5mM  $\alpha$ -CD와 25mM sucrose를 녹인 300 $\mu$ l의 기질용액과 효소액 50 $\mu$ l를 40°C에서 1시간 반응시킨 후 0.5M acetate buffer(pH 5.0)에 10 unit/ml가 되게 녹인 glucoamylase를 500 $\mu$ l 첨가하여 55°C에서 30분간 반응시켰다. 이 반응액을 Nelson-Somogy법(36)으로 유리된 환원당을 측정하여 CGTase 활성을 나타내었다. 1 unit는 55°C에서 1분 동안 1 $\mu$ mol의 glucose를 생성하는 효소의 양으로 하였다.

### 생산균주의 생육도 측정

순수분리된 CGTase 생산균주의 전배양액을 1% 농도로 50ml의 배지를 넣은 500ml shaking flask에 접종

Table 1. Conditions for high performance liquid chromatography(HPLC)

Pump	Waters 510(isocratic)
Detector	Waters 484(UV 254nm)
Integrator	Waters 746 data module
Mobile phase	0.1M potassium phosphate -phosphoric acid(pH 2.0)
Column	$\mu$ Bondapak C <sub>18</sub>
Column temperature	Room temperature
Injection volume	10 $\mu$ l
Flow rate	0.5ml/min
Attenuation	32
Chart speed	5.0

하여 37°C에서 진탕배양하면서 일정시간 간격으로 생육도를 측정하였다. 생육도는 spectrophotometer를 사용하여 660nm에서 흡광도를 측정하여 표시하였다.

조효소액의 조제

조효소액은 효소 최적생산배지에서 37°C, 40시간 진탕배양(120Rev.×6cm stroke)한 배양액을 4°C에서 원심분리(10,000rpm, 20min)한 후 그 상등액을 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 염석하고 50mM Tris-HCl완충액(pH 9.0)으로 투석한 후 조효소액으로 사용하였다.

결과 및 고찰

CGTase 생산균의 분리 및 선정

김치시료를 congo red와 methyl orange가 포함된 분리용 평판배지에 도말하여 37°C, 2일간 배양한 후 노란환을 형성하는 colony를 일차적으로 선별하였다. 선별 colony 중 안정성과 효소의 역가가 높은 균주를 확보하기 위해 동일 배지에 7~8회 연속하여 계대배양하면서, 효소 분비량에 비례하는 노란환의 크기가 크고 또한 노란환과 colony의 크기와의 상대비가 큰 균주를 선별하였다(Fig. 1). 선별된 균주를 soluble starch를 탄소원으로 하는 액체배지에 접종하여 진탕배양한 후 CGTase 활성을 검토했고, AsA와 α-CD을 기질로 하여 AA-2G 합성여부를 HPLC를 통해 확인하였다. 검토했던 여러 균주들 가운데 AA-2G의 합성능이 있는 CGTase의 활성이 가장 우수한 균을 최종적으로 선별하여 편의상 S-6이라 명명하고, 이를 본 실험의 공시균주로 선정하였다.

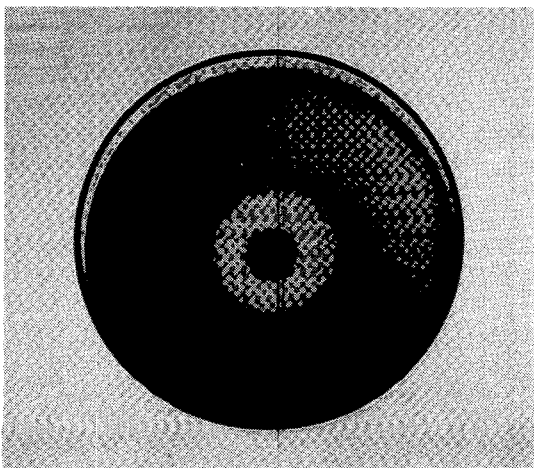


Fig. 1. Photograph of clear zone of CGTase-producing isolated strain S-6 from basal medium containing congo red and methylorange.

공시균주의 동정

공시균주의 형태학적, 배양학적 및 생화학적 제반 특성은 Table 2와 같다. 공시균 S-6은 Gram 양성의 막대모양으로 그 크기는 0.6~0.8×1.4~2.0μm였고, 운동성이 있었으며 TSA 배지상에서 배양후 포자염색하여 관찰한 광학현미경상(Fig. 2)에서 내생포자를 형성하였다. Colony는 둥근형이었고 wetted하며 중앙부가 볼록한 convex형이었으며, 색깔은 아이보리색이었다. 또한 catalase양성을 나타내었으며, nitrate를 환원시키지 않는 것으로 보아 혐기성 호흡이 불가능함을 알 수 있었다. 한편, Voges-Proskauer test, indole test 및 urease test에는 음성을 나타내었으나, starch 분해능은 있었다. 공시균의 이와 같은 결과를 종합하여 Bergey의 Systematic Bacteriology Manual Vol.2 및 Bergey의 Determinative Bacteriology Manual 제9판과 비교 검토한 결과 본 공시균주는 *Bacillus*속에 해당되는 것으로 판단되었다. CD의 합성효소로 널리 알려져 있는 CGTase는 *Klebsiella pneumonia*(37)를 제외하고 대부분이 그람양성인 *Bacillus*에서 유래되었다.

Table 2. Taxonomical characteristics of the isolated strain S-6

1. Morphological characteristics	
Shape	rod
Cell size(um)	0.6~0.8×1.4~2.0
Motility	motile
Gram stain	+
2. Cultural characteristics	
Colonies	circular, convex, wetted
Colony surface	entire
Colony color	ivory color
Colony opacity	opaque
3. Biochemical characteristics	
Indole test	-
Voges-Proskauer test	-
Urease test	-
Citrate utilization	-
Gelatin hydrolysis	-
Starch hydrolysis	+
Salicin test	-
Production of H <sub>2</sub> S	-
Albutin test	-
Tetrazolium red	-
Potassium thiocyanate test	-
Arginine decarboxylase test	+
Lysine decarboxylase test	-
Ornithin decarboxylase test	-
Mendelic acid	+
Oleandomycin	-
2-Keto-gluconate test	-
Gluconate	-
5-Keto-gluconate test	-
N-Acetyl-glucosamine	-
Nitrate reduction	-

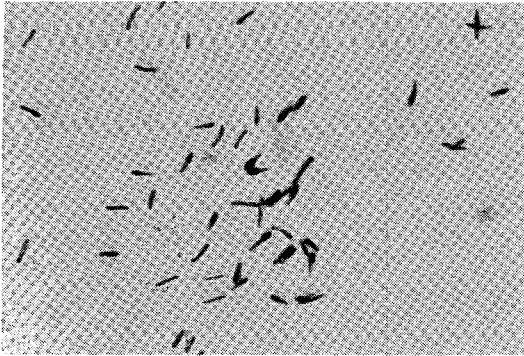


Fig. 2. Photomicrograph of spore staining of the isolated strain, S-6.

이들 중 AA-2G 합성능이 있는 CGTase를 생산하는 균주로는 *B. stearotherophilus*, *B. circulans* 및 *B. macerans* 3균주가 알려져 있다(38). 본 공시균주의 동정 결과 김치에서의 AA-2G의 합성 또한 *Bacillus*속 균주에 의해 생산되는 CGTase가 관계할 것으로 예상된다.

#### CGTase의 당전이반응에 의한 AA-2G의 합성

AA-2G의 합성에 관여하는 당공여체로 알려진 것에는  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD,  $\gamma$ -CD, maltose, maltooligosaccharides(maltotriose, maltotetraose, maltopentose, maltohexose, 및 maltoheptaose), amylose 그리고 dextrin 등이 있다(39). *Bacillus* sp. S-6이 생산하는 CGTase의 glycosyl donor specificity를 Fig. 3의 standard peak와 비교하여 조사한 결과  $\alpha$ -CD와 starch에서 AA-2G 합성수율이 가장 높았다. 이로써 *Bacillus* sp. S-6은  $\alpha$ -CD와 starch를 효율적인 당공여체로 이용함을 알 수 있었다. 일반적으로  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -CD는 AA-2G 합성에 가장 효율 좋은 당공여체로 알려져 있는데 S-6 균주에서도 마찬가지로  $\alpha$ -CD에서 AA-2G의 합성이 우수하였다(Fig. 4(a)). *Bacillus* sp. S-6은  $\alpha$ -CD 뿐만 아니라 starch에서도 뛰어난 AA-2G 합성능을 보였다(Fig. 4(b)). 근소한 차이지만 Fig. 3의 AsA 및 AA-2G의 standard peak와 비교분석하여 볼 때  $\alpha$ -CD에서보다 starch에서의 AA-2G 합성량이 약간 많았으며 이러한 결과는 AA-2G의 공업적 대량생산에 있어 기질로서  $\alpha$ -CD 대신 저가인 starch를 이용할 수 있는 가능성을 의미한다.

#### CGTase 최적생산조건

##### 탄소원의 영향

CGTase 생산균주의 분리용 배지중 soluble starch 대신 각종 탄소원(glucose, fructose, arabinose, raffinose, sorbitol, sucrose, inositol, galactose, lactose, xylose,

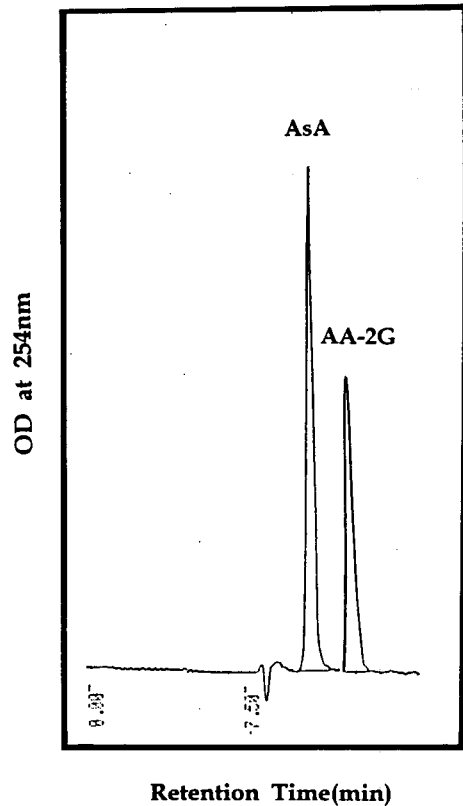


Fig. 3. HPLC chromatogram of AsA and AA-2G standard mixture.

AsA and AA-2G standards were measured with HPLC combined with UV detector at 254nm.  $\mu$ Bondapak C<sub>18</sub> column and mobile phase which consisted of 0.1M potassium phosphate-phosphoric acid(pH 2.0) were used.

mannitol, rhamnose, mannose, dextran, 그리고 potato starch)을 1%씩 첨가하여 37°C에서 48시간 진탕배양 후, 앞에서 설명한 측정법에 따라 균의 생육도 및 효소활성을 측정하였다. 그 결과 탄소원으로 raffinose, sorbitol, inositol 및 xylose가 첨가된 경우에는 균생육도에 비해 CGTase 활성은 30 unit/ml이하로 효소의 생산이 저조하였다. 이에 반해 glucose, dextran, potato starch 및 soluble starch를 탄소원으로 사용했을 경우에는 대조군에 비해 균체의 생육이 촉진될 뿐만 아니라 CGTase 생산도 증가되어 100~200 unit/ml 정도의 활성을 나타내었다. 이 중 CGTase 생산의 최적 탄소원은 soluble starch로서 이때의 최대 효소 생산량은 199 unit/ml였고 균의 생육 OD값은 0.93였다. O 등(40)의 보고에 의하면 CGTase를 생산하는 균주들은 단당류보다는 대부분 다당류에서 높은 생산량을 보이는 것으로 알려져 있는데 S-6균주는 단당류인 glucose에서도 104 unit/

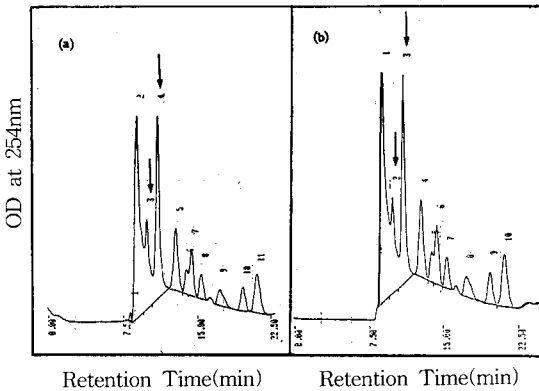


Fig. 4. HPLC chromatogram of transglycosylation products to AsA by CGTase.

A reaction mixture of CGTase was analyzed by HPLC combined with UV detector at 254nm.  $\mu$ Bondapak C<sub>18</sub> column and mobile phase which consisted of 0.1M potassium phosphate-phosphoric acid (pH 2.0) were used. (a) Glycosyl donor:  $\alpha$ -CD, AsA (glycosyl acceptor): 3, AA-2G (transglycosylation product): 4 (b) Glycosyl donor: starch, AsA (glycosyl acceptor): 2, AA-2G (transglycosylation product): 3.

ml 정도의 높은 효소 생산량을 보여 이와는 상이한 결과를 보였다.

한편, soluble starch 농도에 따른 효소 생산은 0.5% 일 때 594 unit/ml로 가장 높은 효소 생산을 보였는데 이러한 결과는 *B. stearothermophilus* No.239의 CGTase (41)가 soluble starch의 2% 농도에서 최고 생산성을 보인다는 보고와 약간의 차이를 보였다.

질소원의 영향

분리용 배지에 탄소원으로 0.5% soluble starch를 첨가하고 배지 중 질소원인 yeast extract와 polypeptone 대신에 각종 유기 질소원 (tryptone, bactopectone, peptone, 및 beef extract) 및 무기 질소원 (NaNO<sub>3</sub>, KNO<sub>3</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 및 NH<sub>4</sub>Cl)을 1% 되게 첨가하여 37°C에서 48시간 진탕배양한 후 이 때의 균의 생육도와 CGTase 활성을 측정하였다. 그 결과 무기 질소원에서는 KNO<sub>3</sub>와 NH<sub>4</sub>Cl에서 균의 생육도와 CGTase 활성이 비교적 우수하게 나타났으며, 그 중 높은 CGTase 활성을 보이는 무기 질소원은 NH<sub>4</sub>Cl으로서 이 때의 효소 생산량은 511 unit/ml이었다. 실험에 사용한 유기 질소원 중에서는 bactopectone, polypeptone, yeast extract, beef extract 등의 경우가 비교적 활성이 높게 나타났으며 그 중에서 yeast extract가 832 unit/ml로 최대의 효소 생산량을 보여 가장 좋은 질소원으로 판단되었다. Yeast extract의 농도를 다양하게 조절하여 효소 생산성을 조사한 결과 1.0~1.5% 농도에서 206.7~206.5 unit/ml로 가장 좋았다.

무기염의 농도에 따른 영향

CGTase 생산을 위한 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 및 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>의 농도의 영향은 0.5% soluble starch와 1% yeast extract가 함유된 효소 생산배지에 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>와 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>의 농도를 각각 0.2~1.8%, 0.02~0.12%로 조절하여 37°C에서 48시간 진탕배양하여 조사하였다. 그 결과 1% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.1% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>에서 각각 453 unit/ml, 244 unit/ml로 가장 좋았다. 또한 MgSO<sub>4</sub>의 농도를 0.01~0.06%까지 조절하여 균의 생육도 및 CGTase 활성을 측정하였을 경우에는 0.02%의 농도에서 효소 생산량이 152 unit/ml로 최대를 나타냈다.

배양초기 pH의 영향

이상의 결과로 알게된 0.5% soluble starch, 1% yeast extract, 1% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.1% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.02% MgSO<sub>4</sub> 조성의 효소생산용 최적배지를 pH 5.0~10.0 범위로 조절하여 50시간 배양한 결과, Table 3에서 보는 바와 같이 균체생육은 pH 7.0에서 효소생산은 pH 8.0에서 가장 좋았다. pH 5, 6, 10에서는 거의 효소를 생산하지 못하였다. 따라서 배양액의 pH 조절은 CGTase 생산에 매우 큰 영향을 줄 수 있는 요인임을 알 수 있었다.

배양온도의 영향

상기의 효소생산용 최적배지의 pH를 pH 8.0으로 조정 한 다음 20~50°C 범위로 50시간 배양한 결과 효소생산성 및 균체 생육은 37°C에서 가장 높은 것으로 나타났다 (Table 4). 이러한 결과는 *B. stearothermophilus*

Table 3. Effect of initial pH on the production of CGTase

Initial pH	Final pH	CGTase activity (unit/ml)	Growth (O.D. <sub>660</sub> )
5	5.0	0	0.05
6	5.8	3.1	0.03
7	6.2	692	1.24
8	7.6	746	0.68
9	8.0	625	0.19
10	9.0	0	0

Table 4. Effect of temperature on the production of CGTase

Temperature (°C)	Final pH	CGTase activity (unit/ml)	Growth (O.D. <sub>660</sub> )
20	7.8	13.2	0.68
30	7.6	19	1.16
37	7.4	692	1.23
40	7.2	203	0.91
50	7.8	0	0.10

No.239의 CGTase(41)가 55°C에서 최고생산성을 보인다는 보고와는 상이하였다.

#### 배양시간에 따른 효소생산성

효소 생산용 최적배지 50ml가 들어 있는 500ml shaking flask에 전배양한 종균을 1% 접종하여 37°C, pH 8.0에서 경시적으로 배양한 후 이 때의 균의 생육도와 pH 및 CGTase 활성을 측정하였다. 그 결과 Fig. 5에서 보는 바와 같이 효소생산성은 40시간에 가장 높았다. 따라서 *Bacillus* sp. S-6은 증식 정지기에서 최고의 효소 생산을 나타냄을 알 수 있다. 이러한 결과는 alkalophilic *Bacillus* sp. YC-335(42)의 CGTase가 배양 12시간부터 점차 증가하기 시작하여 48~60시간에서 최대의 활성을 보인 점과는 유사하였으나, *B. stearothermophilus* No.239의 CGTase(41)가 6시간부터 12시간까지는 급격히 증가하였으나 18시간 이후 완만한 증가를 보인 점과는 많이 달랐다.

#### 통기량의 변화에 따른 영향

CGTase 생산을 위한 최적의 조건을 설정하기 위하여 500ml shaking flask에 배지를 50~300ml까지 첨가하여 37°C에서 48시간 배양하여 균의 생육도와 CGTase 활성을 측정하여 통기량의 영향을 검토하였다. 그 결과 Table 5에서 보는 바와 같이 배양 배지는 50ml 첨가하였을 때 최대의 활성을 보여 aeration이 잘 될수록

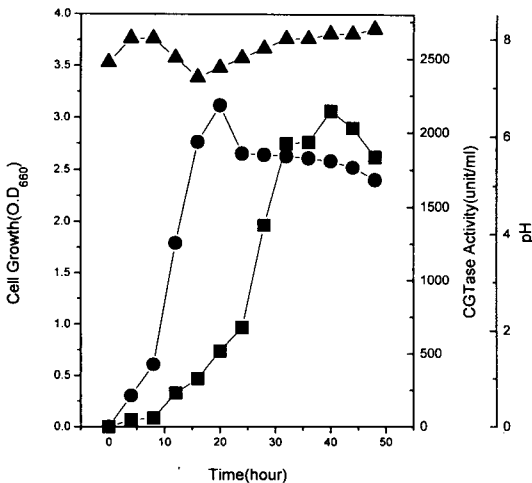


Fig. 5. Time courses of CGTase production and cell growth by *Bacillus* sp. S-6 at optimum culture condition.

The strain was cultured at 37°C for 55 hrs on circular shaker.

—●—, Growth; —■—, CGTase; —▲—, pH

Table 5. Effect of aeration on the production of CGTase

Volume of medium(ml)	Final pH	CGTase activity (unit/ml)	Growth (O.D. <sub>660</sub> )
50	7.2	690	1.29
100	7.2	607	1.18
150	7.4	488	1.06
200	7.4	454	1.10
250	7.4	121	0.57
300	8.0	108	0.56

Table 6. The optimum culture condition for CGTase production by *Bacillus* sp. S-6

Medium(g/L)	
Soluble starch	5.0
Yeast extract	10.0
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	10.0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.0
MgSO <sub>4</sub>	0.2
pH	8.0
Other conditions	
Temperature	37°C
Culture time	40hrs
Agitation	120Rev. × 6cm stroke, 50ml of medium per 500ml flask

*Bacillus* sp. S-6이 보다 효율적으로 CGTase를 생산함을 알 수 있었다.

이상의 배양 조건을 검토한 결과 CGTase 생산을 위한 최적 배양 조건을 Table 6과 같이 설정하였다.

#### CGTase 활성최적 pH 및 pH 안정성

*Bacillus* sp. S-6이 생산하는 CGTase의 활성에 대한 pH의 영향을 알아보기 위해 pH 3.0에서 12.0까지의 완충액에 기질인 α-CD과 sucrose를 녹인 다음, 40°C에서 활성을 측정한 결과를 Fig. 6에 나타내었으며, 그 결과 pH 7.0 phosphate buffer에서 최고의 활성을 나타내었다.

또한 생산효소의 pH 안정성을 조사하기 위하여 0.1 ml의 조효소액을 0.9ml의 pH 3.0~12.0에 이르는 100 mM 여러 완충액과 섞은 다음 20°C에서 24시간 방치 후 100mM phosphate buffer(pH 7.0)으로 5배 희석한 후 잔존활성을 측정하였다. 그 결과 Fig. 7에서 보는 바와 같이 pH 6.0~10.0까지는 안정하였으나 pH 10 이상과 pH 6 이하에서는 감소되어 pH 11과 pH 4에서는 실패되었다. 특히 100mM glycine-NaOH buffer의 pH 9.0에서 가장 안정한 것으로 나타났다.

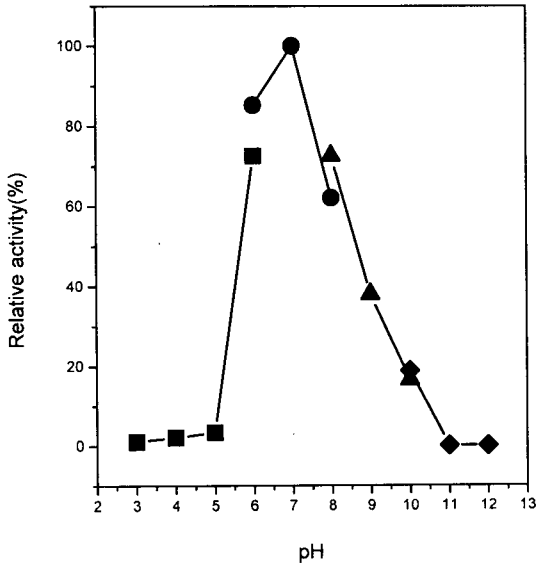


Fig. 6. Effect of pH on the CGTase activity. The activity was measured from pH 3.0 to pH 12.0. —■—, citrate buffer; —●—, phosphate buffer; —▲—, glycine-NaOH buffer; —◆—, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaOH buffer.

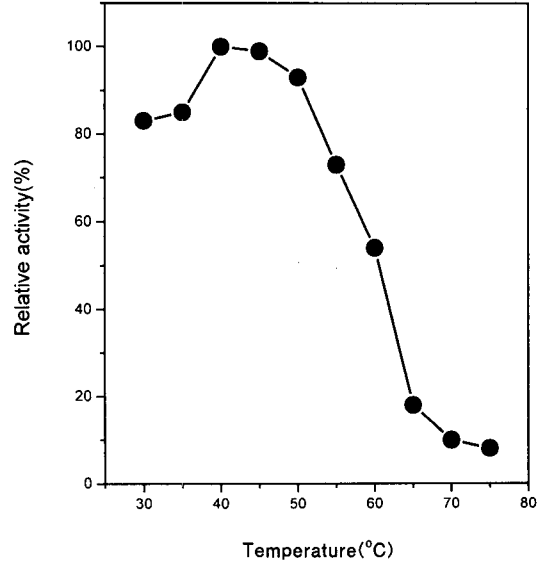


Fig. 8. Effect of temperature on the CGTase activity.

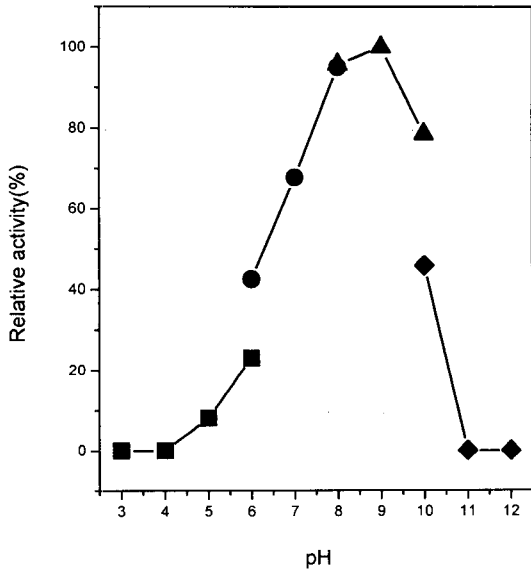


Fig. 7. pH stability of the CGTase activity. —■—, citrate buffer; —●—, phosphate buffer; —▲—, glycine-NaOH buffer; —◆—, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaOH buffer.

CGTase 활성최적온도 및 열안정성

생산효소의 활성에 대한 온도의 영향을 알아보기 위해 100mM glycine-NaOH(pH 9.0)에 효소를 녹인 후 30~75°C에 이르는 온도에서 활성을 측정된 결과를 Fig.

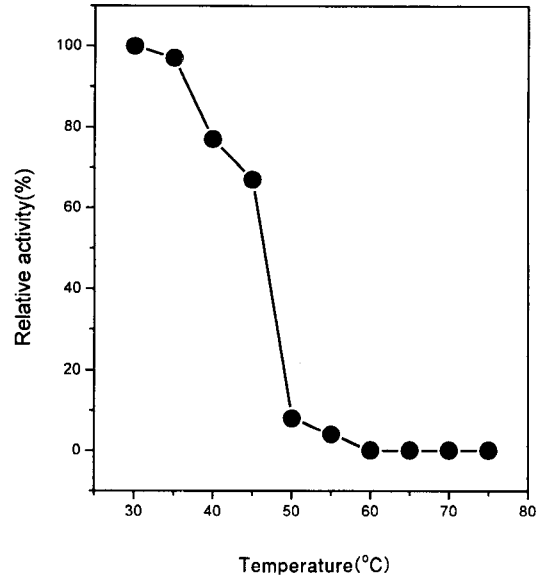


Fig. 9. Thermal stability of the CGTase.

8에 나타내었으며, 그 결과 40°C에서 최고의 활성을 나타내었다.

생산효소의 온도 안정성을 조사하기 위해 100mM glycine-NaOH buffer(pH 9.0)에 효소를 녹인 후 30~75°C에 이르는 각 온도에서 30분 방치 후 잔존활성을 100mM phosphate buffer(pH 7.0)에서 측정하였다. 그 결과 Fig. 9에서 보는 바와 같이 45°C까지는 효소가 어느 정도 안정하였으나 50°C 이상에서는 효소활성이 급

격히 감소하는 경향을 보였다.

## 요 약

김치 시료로부터 AsA의 결점이 보완된 신규 안정형 유도체인 AA-2G를 합성할 수 있는 당전이활성을 가진 CGTase 생산균주를 congo red와 methyl orange가 포함된 배지를 이용하여 분리하였고, 분리균주의 형태학적, 배양학적 및 생리학적 성질을 조사한 결과 그람 양성균의 간균으로 호기성이며 내생포자를 형성하는 전형적인 중온성 *Bacillus* sp. S-6으로 동정되었다. *Bacillus* sp. S-6의 CGTase 최적생산조건은 0.5% soluble starch, 1% yeast extract, 1% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.1% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.02% MgSO<sub>4</sub>가 함유된 배지에 pH 8.0, 37°C에서 진탕 배양하였을 때 생장의 정지기에 들어가는 40시간대에 최고의 효소생산을 나타내었다. *Bacillus* sp. S-6의 AA-2G 합성에 있어서의 기질특이성을 조사한 결과 α-CD와 starch를 가장 효율적인 당공여체로 이용하였다. 또한 *Bacillus* sp. S-6이 생산하는 CGTase는 40°C, pH 7.0에서 최대 활성을 나타내었으며, 온도 안정성과 pH 안정성은 각각 45°C이하, pH 6.0~10.0이었다.

## 감사의 글

본 연구는 1997년도 기초과학연구소 학술연구조성비(과제번호 : BSRI-97-4410)에 의한 연구결과의 일부로서 지원하여 주심에 감사드립니다.

## 문 헌

- Shin, D. W. and Koo, Y. J. : Status and perspective of Kimchi industry. *Food Sci.*, **21**, 4(1988)
- Cheigh, H. S. and Park, K. Y. : Biochemical, microbiological, and nutritional aspects of kimchi(Korean fermented vegetable products). *Crit. Rev. in Food Sci. Nutr.*, **342**, 175(1994)
- Park, K. Y., Baik, K. A., Rhee, S. H. and Cheigh, H. S. : Antimutagenic effect of kimchi. *Foods Biotech.*, **4**, 141(1995)
- Park, K. Y. and Jun, Y. S. : Studies on the contents of nitrate, nitrite and nitrosamine during Kimchi fermentation. *The Research Reports of Miwon Research Institute of Korean Food and Dietary Culture*, p.337 (1993)
- Jo, Y. B., Choi, H. J., Baik, H. S. and Jun, H. K. : Evaluation of optimum conditions for the electrofusion between *Lactobacillus* sp. JC-7 isolated from Kimchi and *Lactobacillus acidophilus* 88. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **25**, 121(1997)
- Lee, C. W., Ko, C. Y. and Ha, D. M. : Microfloral changes of the lactic acid bacteria during Kimchi fermentation and identification of the isolates. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **20**, 102(1992)
- Cheigh, H. S. and Lee, J. M. : Classification and review of the literatures on Kimchi. *Res. Bull. Coll. Home Econ. Pusan Natl. Univ.*, **17**, 11(1991)
- Song, E. S., Jeon, Y. S. and Cheigh, H. S. : Changes in chlorophylls and carotenoids of mustard leaf Kimchi during fermentation and their antioxidative activities on the lipid oxidation. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **26**, 563(1997)
- Park, K. Y. : The nutritional evaluation and antimutagenic and anticancer effects of Kimchi. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **24**, 169(1995)
- Yamamoto, I., Muto, N., Murakami, K., Suga, S. and Yamaguchi, H. : L-Ascorbic acid α-glucoside formed by regioselective transglucosylation with rat intestinal and rice seed α-glucosidases: Its improved stability and structure determination. *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 3020(1990)
- Muto, N., Suga, S., Fujii, K., Goto, K. and Yamamoto, I. : Formation of a stable ascorbic acid 2-glucoside by specific transglucosylation with rice seed α-glucosidase. *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 1697(1990)
- Aga, H., Yoneyama, M., Sakai, S. and Yamamoto, I. : Synthesis of 2-O-α-glucopyranosyl L-ascorbic acid by cyclomaltodextrin glucanotransferase from *Bacillus stearothermophilus*. *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 1751(1991)
- Muto, N., Nakamura, T. and Yamamoto, I. : Enzymatic formation of a nonreducing L-ascorbic acid α-glucoside: purification and properties of α-glucosidase catalyzing site-specific transglucosylation from rat small intestine. *J. Biochem.*, **107**, 222(1990)
- Yamamoto, I., Muto, N., Nagata, E., Nakamura, T. and Suzuki, Y. : Formation of a stable L-ascorbic acid α-glucoside by mammalian α-glucosidase-catalyzed transglycosylation. *Biochem. Biophys. Acta.*, **1035**, 44 (1990)
- Cinatl, J. : *In vitro* inhibition of human cytomegalovirus replication in human foreskin fibroblasts and endothelial cells by ascorbic acid 2-phosphate. *Antiviral Res.*, **27**, 405(1995)
- Torii, Y. : L-ascorbic acid 2-phosphate promotes osteoblastic differentiation of MC3T3-E1 mediated by accumulation of type I collagen. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **40**, 229(1994)
- Mitsumoto, Y. : A long-lasting vitamin C derivative, ascorbic acid 2-phosphate, increases myogenin gene expression and promotes differentiation in L6 muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **199**, 394(1994)
- Pillai, G. R. : Role of exogenous ascorbic acid in tissue status of ascorbic acid-2-sulfate in guinea pigs. *Indian J. Exp. Biol.*, **29**, 1127(1991)
- Blaschke, E. and Hertting, G. : Enzymatic methylation of L-ascorbic acid by catechol O-methyltransferase. *Biochem Pharmacol.*, **20**, 1363(1971)
- Wakamiya, H., Suzuki, E., Yamamoto, I., Akiba, M. and Arakawa, N. : *In situ* intestinal absorption of 2-O-α-D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid in guinea pigs.



- J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **41**, 265(1995)
21. Murakami, K., Muto, N., Fukazawa, K. and Yamamoto, I. : Comparison of ascorbic acid and ascorbic acid 2-O- $\alpha$ -glucoside on the cytotoxicity and bioavailability to low density cultures of fibroblasts. *Biochem. Pharmacol.*, **44**, 2191(1992)
  22. Wakamiya, H., Suzuki, E., Yamamoto, I., Akiba, M., Otsuka, M. and Arakawa, N. : Vitamin C activity of 2-O- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid in guinea pig. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **38**, 235(1992)
  23. Yamamoto, I., Muto, N., Murakami, K. and Akiyama, J. : Collagen synthesis in human skin fibroblasts is stimulated by a stable form of ascorbate, 2-O- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid. *J. Nutr.*, **122**, 871(1992)
  24. Yamamoto, I., Suga, S., Mitoh, Y., Tanaka, M. and Muto, N. : Antiscorbutic activity of L-ascorbic acid 2-glucoside and its availability as a vitamin C supplement in normal rats and guinea pigs. *J. Pharmacobiodyn.*, **13**, 688(1990)
  25. Muto, N., Ban, Y., Akiba, M. and Yamamoto, I. : Evidence for the *in vivo* formation of ascorbic acid 2-O- $\alpha$ -glucoside in guinea pigs and rats. *Biochem. Pharmacol.*, **42**, 625(1991)
  26. Szejtli, Z. : *Cyclodextrin technology*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht., p.1(1988)
  27. Kitahata, S. and Okada, S. : Transfer action of cyclodextrin glycosyltransferase on starch. *Agric. Biol. Chem.*, **39**, 2185(1975)
  28. Kobayashi, S., Ashraf, H. R. L., Braun, P. and French, D. : Coupling reaction of *Bacillus macerans* cyclodextrin glucanotransferase on glycosyl- $\alpha$ -cyclodextrin and glucose. *Starch*, **40**, 112(1988)
  29. Kitahata, S. and Okada, S. : Comparison of action of cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus megaterium*, *B. circulans*, *B. stearothermophilus* and *B. macerans*. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.*, **29**, 13(1982)
  30. Bender, H. : Branched saccharides formed by the action of His-modified cyclodextrin glycosyltransferase from *Klebsiella pneumonia* M 5 al on starch. *Carbohydr. Res.*, **222**, 239(1991)
  31. Kitahata, S. and Okada, S. : Intermolecular transglycosylation of cyclodextrin glycosyltransferase. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.*, **26**, 68(1979)
  32. Sato, M., Matsuo, T., Orita, N. and Yagi, Y. : Synthesis of novel sugars, oligoglucosyl-inositols, and their growth stimulating effect for *Bifidobacterium*. *Biotechnol. Letters*, **13**, 69(1991)
  33. Vetter, D. and Thorn, W. : Directed enzymatic synthesis of linear and branched glucooigosaccharide, using cyclodextrin glucanotransferase. *Carbohydrate Res.*, **223**, 61(1992)
  34. Okada, S. : Studies on cyclomaltodextrin glucanotransferase and coupling sugar. *J. Jpn. Soc., Starch Sci.*, **34**, 75(1987)
  35. 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)
  36. Nelson, N. : A photometric adaption of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.*, **166**, 441(1950)
  37. Bender, H. : Cyclodextrin glucanotransferase from *Klebsiella pneumoniae* 1. Formation, purification and properties of the enzyme from *Klebsiella pneumoniae* M 5 al. *Arch. Microbiol.*, **111**, 271(1977)
  38. Tanaka, M., Muto, N. and Yamamoto, I. : Characterization of *Bacillus stearothermophilus* cyclodextrin glucanotransferase in ascorbic acid 2-O- $\alpha$ -glucoside formation. *Biochem. Biophys. Acta.*, **1078**, 127(1991)
  39. Aga, H., Yoneyama, M., Sakai, S. and Yamamoto, I. : Synthesis of 2-O- $\alpha$ -D-glucopyranosyl L-ascorbic acid by cyclomaltodextrin glucanotransferase from *Bacillus stearothermophilus*. *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 1751(1991)
  40. O, P. S., Koh, S. C. and Suh, H. W. : The production of cyclodextrin glucanotransferase by *Bacillus* sp. and its utilization. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **14**, 461(1986)
  41. Hwang, J. B., Kim, S. H., Lee, T. K. and Yang, H. C. : Production of cyclomaltodextrin from *Bacillus stearothermophilus*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech.*, **19**, 578(1990)
  42. Yu, J. H., Chung, Y. J. and Lee, J. S. : Isolation and characterization of cyclodextrin glycosyl transferase producing alkalophilic *Bacillus* sp. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **17**, 148(1989)

(1998년 4월 30일 접수)