

Cyclomaltodextrinase를 생산하는 Alkalophilic *Bacillus* sp. KJ-133의 분리와 효소생산 조건

정혜진 · 권호정*
세종대학교 생명공학과

Isolation of Alkalophilic *Bacillus* sp. KJ-133 Producing Cyclomaltodextrinase and Its Enzyme Production.
Jung, Hye-Jin and Ho Jeong Kwon*, Department of Bioscience and Biotechnology, Sejong University, Seoul 143-747, Korea – To produce and utilize microbial cyclomaltodextrinase being industrially useful, we isolated an alkalophilic *Bacillus* strain from soil which was capable of degrading cyclodextrins. The newly isolated strain was aerobic, gram-positive, spore-forming, motile, rod shape (0.2~0.4 × 1.4~4.4 μm), and 35.8 mol% of DNA base composition. Based on its morphological, physiological, and biochemical properties, it was identified as alkalophilic *Bacillus* sp. KJ-133 and cultivated well in the ranges of 30~40°C and pH8.0~9.0. The cyclomaltodextrinase of the strain showed maximal production after 48 h of cultivation at 37°C, and the activity was inhibited by Ag²⁺, Hg²⁺, Cu²⁺, and *p*-chloromercuribenzoate.

Key words: cyclomaltodextrinase(CDase), β-cyclodextrin, alkalophilic *Bacillus* sp.

Cyclodextrin(CD)은 포도당 분자가 α-1,4-glucosidic 결합으로 연결된 환상형의 비환원성 maltooligosaccharide로서 [1], 환상의 고리구조로 인해 안쪽에 공동(cavity)을 갖고 있으며, 각 포도당의 외부로 노출되어 있는 C6위치의 hydroxyl group이 친수성을 나타내는 반면 내부는 수소결합과 ether결합으로 인하여 소수성을 띄고 있다[2-5]. 따라서 외부에서 소수성 물질이 첨가되면 CD는 host로 작용하여 외부물질을 공동에 포접하여 복합체(inclusion complex)를 형성하게 되며, 이러한 특성에 따라 포접된 guest물질을 보호하고 안정화시키는 역할을 하여 결국 포접된 물질의 물리적, 화학적 성질을 변화시킬 수 있다. 이러한 CD의 복합체 형성능은 식품, 의약품, 화장품 및 농약 등 많은 분야에서 안전성 개선, 반응성 변화, 물성 개선 등을 목적으로 이용되고 있다[3,6-10].

복합체를 형성했던 CD는 이용 목적에 따라 분해됨으로써, 포접되어 있던 소수성 물질을 다시 회수할 수 있다. 예를 들면, 크림 · 우유 · 치즈 등의 유제품으로부터 β-CD를 이용하여 제거된 cholesterol은 다시 β-CD를 분해함으로써 분리 · 회수될 수 있다. 이렇게 하여 얻어진 cholesterol은 steroid 합성의 전구물질 등 생리활성물질로 재사용할 수 있다. Cholesterol뿐만 아니라 β-CD와 결합하는 성질을 보이는 지질계 색소화합물(phenolphthalein 등)도 β-CD를 분해함으로써 저분자 생리활성물질의 효율적 분리 · 정제에도

β-CD의 포접 성질이 활용될 수 있다.

또한 β-CD에 흡착되어 제거된 소수성 물질들을 다시 회수하여 재활용하기 위해서는 β-CD를 분해하는 효소인 cyclomaltodextrinase(CDase)가 필요하다. CDase는 CD를 가수분해하여 α-1,4 결합의 linear maltooligosaccharide를 형성하도록 촉매하는 작용을 하는 효소이다[11]. 즉, 환원 말단이나 비환원 말단의 어느 것도 가지고 있지 않은 CD는 전분분해효소(amyolytic enzyme)에 의해서는 분해되지 않고 CDase의 작용에 의해 분해된다[11].

그러나 전분분해효소에 관한 광범위한 정보와는 달리, CDase에 관한 연구는 몇몇 미생물에 한정되어 있다. 지금까지 *Bacillus macerans*[12,13]와 *Bacillus coagulans*[14]의 오직 두 균주만이 이 효소를 생산하는 것으로 알려져 있다. *Pseudomonas* sp.[15]와 *Flavobacterium* sp.[16]가 생산한 amylase는 amylose나 amylopectin 이외에 CD에 대해서도 활성을 나타낸다고 보고되어 있다.

따라서 본 연구는 β-CD에 흡착되어 제거된 생리활성물질들을 다시 회수하여 재사용하기 위해, 산업적으로 유용한 미생물 유래 CDase를 생산하는 균주를 분리하여 동정하고 배양특성과 CDase 효소 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

균주의 분리원 및 screening 배지

국내 20여 곳에서 채취한 토양 샘플을 균원 시료로 사용하였다. 이때 호알칼리성의 CDase 생산균주를 분리하기 위한 배지성분은 0.5% β-cyclodextrin, 0.002% phenolphtha-

*Corresponding author
Tel. 02-3408-3640, Fax. 02-3408-3569
E-mail: kwonhj@sejong.ac.kr

lein, 0.5% yeast extract, 0.5% polypepton, 0.1% KH_2PO_4 , 0.02% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2% agar이고, 알칼리성 상태를 만들기 위해 습열멸균 후 별도로 멸균한 1.5% Na_2CO_3 를 배지에 첨가하여 pH를 10.6으로 조절하였다.

호일칼리성 CDase 생산균주의 분리

통풍이 잘되는 그늘에서 하루동안 건조시킨 각각의 토양 샘플 1g을 5ml의 멸균수에 현탁한 후, 단계적으로 희석하였다. 각 희석액 100 μl 를 screening 배지에 접종하여 37°C에서 24-36시간 동안 배양하였다. screening 배지상에 나타난 bacteria colony들 중, β -CD 분자내에 내포된 phenolphthalein을 유리시킴으로써 colony 주위를 붉은색으로 착색한 colony를 호일칼리성 CDase 생산균주로 선정하였다.

공시균주의 동정

공시균주를 동정하기 위하여 형태학적, 생리 및 생화학적 특성을 조사한 후 Bergey's manual of systematic bacteriology[17]를 근거로 동정하였다.

균주의 배양

분리균주의 배양 특성을 조사하기 위하여 최대 21 배양 용량의 삼각플라스크를 사용하여, 500 ml의 액체 배지에 10 ml 종균을 접종한 후 37°C, 250rpm조건으로 shaking incubator (Vison Co. K. M. C.-8480SFN)에서 배양을 하였다. 배양배지는 screening 배지에 사용된 β -CD와 phenolphthalein 대신 1.0% soluble starch를 포함한 배지를 사용하였다.

균체량 및 pH 측정

균의 생육도는 1 ml의 균배양액을 취하여 spectrophotometer로 600 nm에서 흡광도(OD)를 측정하였고, pH는 10 ml의 균배양액을 취하여 pH meter에 의해 측정하였다.

CDase의 효소 활성도 측정

CDase는 균체내에 존재하므로 삼각플라스크에서 배양하는 동안 배양액 20 ml의 표본을 취하여 7000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 균체만을 회수하여 4°C에서 0.05M Na-phosphate buffer(pH6.0)로 두 번 세척하였다. 그 다음 다시 2 ml의 0.05 M Na-phosphate buffer를 혼합하여 sonication(15sec/30sec, 5회 반복)함으로써 균체를 파쇄하였다. 7000 rpm에서 10분 동안 원심분리한 후, CDase가 존재하는 상등액 부분을 회수하여 본 활성도 측정시 조효소원으로 사용하였다. 준비된 조효소액 0.3 ml을 기질용액 1.7 ml과 40°C, 30분간 반응시킨 다음 1.3 ml의 0.1M Na_2CO_3 를 첨가하여 반응을 중단시킨 후 spectrophotometer에 의해 phenolphthalein의 최대흡수파장인 550 nm에서 CDase의 활성도를 측정하였다. 기질 용액은 0.5% β -CD, 0.002% phenolphthalein 및 0.05M Na-phosphate buffer를 혼합한 것이다.

금속이온과 저해제 첨가에 따른 CDase 활성도 측정

금속이온과 저해제의 첨가에 따른 효소 활성은 기질로서 PNPM(p-nitrophenyl- α -D-maltoside)을 사용하여 분석하였다. 1 mM PNPM을 0.1M Na-phosphate buffer(pH6.0)에 녹인 용액 1 ml과 조효소액 0.1 ml를 혼합하여 40°C에서 5분간 반응시킨 후 1.9 ml의 0.1 M Na_2CO_3 를 첨가하여 반응을 종결시켰다. spectrophotometer로 400 nm에서 반응 혼합액의 흡광도를 측정하였고, 효소의 활성 단위는 분당 1 μmol 의 p-nitrophenol을 유리시키는 효소의 양을 1unit로 정하였다.

결과 및 고찰

CDase 생산균주의 분리

국내 20여곳에서 채취한 균원시료를 screening 배지에 접종하여 37°C에서 24-36시간 동안 배양하여 호일칼리성 CDase 생산균주를 선발, 순수분리하였다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 호일칼리성 CDase 생산균주는 β -CD 분자내에 내포되어 있던 phenolphthalein을 유리시켜 colony 주위를 붉은색으로 착색한다.

균주의 동정

형태학적 및 배양적 특징. 선발 균주의 형태학적 특징을 관찰하여 그 결과를 Table 1에 나타내었다. 분리균주는 호기성, Gram 양성이고, 간균(0.2~0.4 \times 1.4~4.4 μm)의 형태를 하고 있으며, peritrichous형의 편모를 가지고 있어 운동성을 나타내었다. 또한 구형의 포자를 형성하고, colony의 형태는 smooth한 flat form이었으며, 색깔은 황갈색을 띄었다.

생리·생화학적 특성. 균주의 생리·생화학적 특성은 Table 2와 같다. 본 균주는 catalase 및 oxidase의 양성반응을 보였고, urease에 대해서는 음성 반응을 보였다. 그리고 nitrate의 환원성과 starch, casein, 및 gelatin 가수분해는 양성을 나타내었고, H_2S 및 indole의 생성과 citrate의 이용성은 음성을 나타내었다. 당의 발효성 시험에서는 glucose, arabinose, xylose, mannose 및 sucrose 등으로부터 산을 생성하였다. NaCl 내성에 대해서는 10% 이하에서

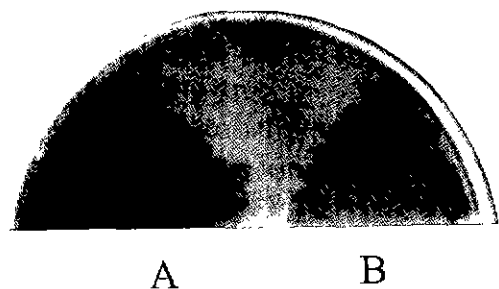


Fig. 1. Cyclomaltodextrinase production of alkalophilic *Bacillus* KJ-133 strain. A: alkalophilic *Bacillus* KJ-133, B: alkalophilic *Bacillus* sp.

Table 1. Morphological and cultural characteristics of the strain isolated

Characteristics	Strain
Gram stain	+
O ₂ utility	aerobic
Cell shape	rod
Motility	+
Flagella	peritrichous
Colony	flat form
Size	0.2~0.4 × 1.4~4.4 μm
Color	yellow-brown
Spore	spherical, terminal, sporangium distinctly swollen

+: positive, -: negative.

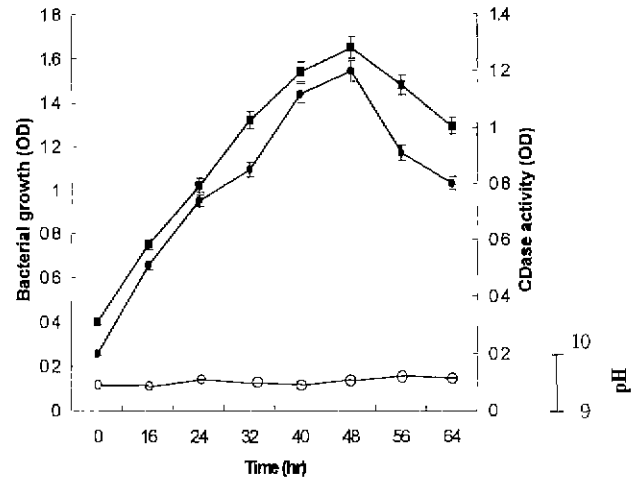
Table 2. Physiological and biochemical characteristics of the strain isolated

Characteristics	Strain
Catalase	+
Oxidase	+
Gelatin liquefaction	+
Hydrolysis of starch	+
Hydrolysis of casein	+
Urease	-
Reduction of nitrate to nitrite	+
Production of H ₂ S	-
Production of indole	-
Acid but no gas from:	
glucose	+
arabinose	+
xylose	+
mannose	+
fructose	+
maltose	+
sucrose	+
lactose	+
trehalose	+
D-mannitol	+
starch	+
NaCl tolerance	growth up to 10%
pH range for growth	7.5-11.0, optimum pH8.0-9.0
Temperature range for growth	optimum 30-40°C, no growth at 45°C

+: positive, -: negative.

생장할 수 있었으며, 생장을 위한 pH와 온도 범위는 각각 7.5~11.0 및 30~40°C였다. 또한 생화학적 특성으로 DNA의 GC함량은 35.8mol%이었다.

이상과 같이 형태학적, 생리 및 생화학적 특성을 검토하여 본 결과, CDase 생산성을 갖는 본 균주는 전형적인 *Bacillus*속 이었으며, pH 7이 아닌 pH 9 이상의 alkaline media에서 잘 생육한다는 것을 제외하고는 *Bacillus circulans*와 매우 유사하였다. 그리하여 동정된 본 균주를

**Fig. 2. Cultural characteristics and CDase production pattern of alkaliphilic *Bacillus* sp. KJ-133.**

-■- Bacterial growth(OD_{600nm}), -●- CDase activity(OD_{550nm}), -○- pH

alkaliphilic *Bacillus* sp. KJ-133으로 명명하였다(생명공학 연구소 미생물기탁 KCTC 18013p).

균체량, pH 및 CDase 활성에 대한 배양 시간의 영향

배양시간별 균체량, pH, CDase 활성은 Fig. 2에 나타내었다. 균체량(OD_{600nm})은 16, 24, 32, 40, 48, 56, 64시간 후에 각각 0.75, 1.02, 1.32, 1.54, 1.65, 1.48, 1.29로 나타나 48시간 후가 가장 높았고, CDase 활성(OD_{550nm})은 각각 0.51, 0.74, 0.85, 1.12, 1.20, 0.91, 0.80로 나타나 균농도와 마찬가지로 48시간 후가 가장 높았다. pH는 9.61, 9.65, 9.50, 9.44, 9.66, 9.70, 9.68로 거의 변화가 없어 KJ-133의 생육에 적절한 알칼리성 상태를 잘 유지하고 있음을 알 수 있다.

CDase 활성에 미치는 금속이온과 저해제의 영향

CDase 활성에 미치는 금속이온과 저해제의 영향은 Table 3에 나타내었다. 효소는 Hg²⁺, Ag²⁺, Cu²⁺ 및 *p*-chloro-mercuribenzoate(PCMB)와 같은 thiol reagents에 의해 저해되었는데, 이는 sulfhydryl group이 효소의 active site에 존재할 수 있음을 알 수 있었다. 반면 다른 금속 이온은 별 영향을 미치지 않았다. 또한 0.1% SDS와 dodecylbenzenesulfonate(DBS)는 저해 효과를 나타내었다.

이와같이 본 균주는 CDase를 효율적으로 생산하였고, 분리·정제된 CDase는 CD에 포집되어 있던 재이용 가치가 높은 저분자 생리활성물질을 회수하는데 사용되어질 수 있다. 또한 발효조를 이용한 대량배양 system의 생산체계 구축, 효소의 안정성 증대와 장기간 반복 사용을 위한 고정화 기술 및 recombinant DNA techniques의 방법으로 CDase 생산균주와 CDase를 개발한다면 산업적 측면에서 매우 유용하게 사용될 것으로 사료된다.

Table 3. Effects of metal ions and chemicals on CDase activity of KJ-133

Inhibitors (mM)		Remaining activity (%)
None		100
Mn ²⁺	1	99
Co ²⁺	1	97
Ba ²⁺	1	96
Ni ²⁺	1	94
Mg ²⁺	1	92
Zn ²⁺	1	77
Cu ²⁺	1	8
Ag ⁺	1	1
Hg ²⁺	0.1	1
EDTA	1	102
ICH ₂ COOH	1	93
PCMB	0.1	2
SDS	0.1%	1
DBS	0.1%	1

요 약

산업적으로 유용한 미생물 유래 CDase를 생산, 이용하기 위해 전국 20여곳에서 채취한 토양 샘플로부터 균주를 분리하였다. 분리균은 호기성, Gram 양성이고, 간균(0.2~0.4 × 1.4~4.4 μm)의 형태를 하고 있으며, 편모를 가지고 있어 운동성을 보이고, 구형의 포자를 형성하였다. 또한 DNA 염기조성(G+C) 함량은 35.8 mol%이었으며, 생장을 위한 pH와 온도 범위는 각각 7.5~11.0 및 30~40°C였다. 이러한 형태학적, 생리·생화학적 특성의 결과에 따라 본 균주는 alkaliphilic *Bacillus* sp. KJ-133으로 동정되었다. KJ-133의 배양시간동안 CDase 활성을 검토하고자 21 배양용량의 삼각플라스크에 균주를 접종하여 37°C, 250 rpm에서 배양을 하였다. 그 결과 배양 48시간 후의 효소활성이 가장 높았다. 또한 효소는 Hg²⁺, Ag²⁺, Cu²⁺ 및 p-chloromercuribenzoate(PCMB)와 같은 thiol reagents에 의해 저해되었다.

감사의 글

본 연구는 1999년도 과학기술부 선도기술개발사업의 지원으로 수행된 연구결과의 일부이며 이에 감사드립니다. 아울러 CDase생산 공시균주를 제공하여 주신 T. Akiba 박사님께 감사드립니다.

REFERENCES

- Szejtli, J. 1997 Historical background, pp. 1-3. In J. Szejtli and T. Osa (eds.), *Cyclodextrins in Comprehensive Supramolecular Chemistry*, vol. 3.
- Szejtli, J. 1988. *Cyclodextrin Technology*, pp. 1-78. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Szejtli, J. 1988. Cyclodextrin in *Pharmacy*, pp. 1-18. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Pagington, J. S. 1987 β-Cyclodextrin: The success of molecular inclusion, pp. 455-458. *Chemistry in Britain*.
- Pszczola, D. E. 1988. Production and potential food applications of cyclodextrins. *Food Technol.* 96-100.
- Yamamoto, M., H. Aritomi, T. Irie, F. Hirayama, and K. Uekama 1990. Paramaceutical evaluation of branched-β-cyclodextrins as parenteral drug carrier. *Proceedings of 5th International Symposium on Cyclodextrins Paris*. pp 135.
- Nagai, T. and H. Ueda. 1997. Aspects of drug formulation with cyclodextrins, pp. 441-450. In J. Szejtli and T. Osa (eds.), *Cyclodextrins in Comprehensive Supramolecular Chemistry*, vol. 3.
- Uekama, K. and T. Irie. 1997. Pharmaceutical use of cyclodextrins in various drug formulations, pp. 451-481. In J. Szejtli and T. Osa (eds.), *Cyclodextrins in Comprehensive Supramolecular Chemistry*, vol. 3.
- Hashimoto, H. 1997 Cyclodextrins in foods, cosmetics, and toiletries, pp. 483-502. In J. Szejtli and T. Osa (eds.), *Cyclodextrins in Comprehensive Supramolecular Chemistry*, vol. 3.
- Szente, L. and J. Szejtli 1986. Molecular encapsulation of natural and synthetic coffee flavor with β-cyclodextrin. *J. Food Sci.* 51: 1024-1027.
- Atunori Yoshida, Yuji Iwasaki, Teruhiko Akiba, and Koki Horikoshi. 1991. Purification and properties of cyclomalto-dextrinase from alkaliphilic *Bacillus* sp. *J. Ferment. Bioeng.* 71: 226-229.
- Depinto, J. A. and L. L. Campbell. 1964. Formation and degradation of cyclic dextrans by intracellular enzyme of *Bacillus macerans*. *Science* 146: 1064-1066
- Depinto, J. A. and L. L. Campbell. 1968. Purification and properties of the cyclodextrinase of *Bacillus macerans*. *Biochemistry* 7: 121-125.
- Kitahata, S., M. Taniguchi, S. D. Beltran, T. Sugimoto, and S. Okada. 1983 Purification and some properties of cyclodextrinase from *Bacillus coagulans* *Agric. Biol. Chem.* 47: 1441-1447.
- Kato, K., T. Sugimoto, A. Amemura, and T. Harada. 1975. A *Pseudomonas* intracellular amylase with high activity on maltodextrins and cyclodextrins. *Biochem. Biophys. Acta.* 391: 96-108.
- Bender, H. A 1981. Bacterial glucoamylase degrading cyclodextrins. Partial purification and properties of the enzyme from a *Flavobacterium* species. *Eur. J Biochem.* 115: 287-291.
- Krieg, N. R. and J. G. Holt 1984. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. The William & Willkins Co., Baltimore.

(Received July 3, 2000)