

캡슐 고정화 전세포 CGTase를 이용한 Glucosyl-xylitol 생산

†박 중 곤 · 박 형 우 · †이 용 현
경북대학교 공과대학 화학공학과, †경북대학교 자연과학대학 유전공학과
(접수 : 2000. 1. 10., 게재승인 : 2000. 2. 21.)

Production of Glucosyl-xylitol Using Encapsulated Whole Cell CGTase

†Joong-Kon Park, Hyung-Woo Park, and †Yong-Hyun Lee
Dept. of Chemical Eng., Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea
†Dept. of Genetic Eng., Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea
(Received : 2000. 1. 10., Accepted : 2000. 2. 21.)

We tried to prepare encapsulated whole cell cyclodextrin glucanotransferase(CGTase) in order to produce glucosyl-xylitol using xylitol as glucosyl acceptor. The organic nitrogen source was more effective for the production of CGTase from *Bacillus macerans* IFO 3490 than the inorganic one. Most of the CGTase which had been produced during cultivation was excreted to the growth medium. *B. macerans* cells inoculated in the capsule failed to grow to the high cell density. Adsorbents such as activated charcoal, Sephadex and Amberlite resins could not adsorb efficiently the CGTase from the broth solution. We obtained successfully the encapsulated whole cell CGTase by immobilizing the concentrated broth solution in the calcium alginate capsules. The encapsulated whole cell CGTase carried out the transglycosylation reaction which converts xylitol into glucosyl-xylitol using dextrin as glucosyl donor.

Key Words : *Bacillus macerans*, transglycosylation, encapsulated whole cell CGTase, glucosyl-xylitol

서 론

당전이 반응은 glucose, fructose, galactose, xylose와 같은 단당류가 적절한 당수용체로 전이되어 이들 당이 결합된 이당류 이상의 당전이 산물을 생성하는 반응을 말한다. α 결합으로 glucosyl기를 전이하는 coupling 반응과 올리고당의 불균일화 반응(disproportionation)도 수행한다. 이러한 당전이 반응의 당수용체로 solbitol, mannitol, maltitol, xylitol, inositol과 같은 당알콜을 이용하여 각종 전이효소로 당분자를 전이, 결합하여 얻어지는 전이 당알콜은 당알콜이 가지는 저칼로리, 내충치성, 청량감 등의 물리화학적 특성에 더하여 장내 유용세균인 *Bifidobacterium*에 대한 증식효과가 있어 새로운 기능성 당으로 주목을 받고 있다(1-5). Sato 등은 cyclodextrin glucanotransferase(CGTase)를 이용하여 inositol에 당을 전이시켜 얻은 당전이 산물이 *Bifidobacterium*에 증식효과가 있음을 보고하였다(1,2). 또, Kitao 등은 glucose-1-phosphate를 이용한 당전이 xylitol이 충치균에 의한 glucan 생성을 억제하는 효과가 있음을 밝혔다(3). 최근 Kim 등(4,5)은 CGTase를 사용하여 xylitol을 당수용체로 하는 당전이 반응으로 glucosyl-xylitol을 생산하는데 성공하였으며, 이렇게 생산

된 glucosyl-xylitol이 *Bifidobacterium breve*에 대한 증식효과가 있음이 확인되었다. 전세포 효소(whole cell enzyme)를 고정화하기 위하여 현재까지 이용되고 있는 가장 보편적인 방법은 bead entrapment 법이다. 그러나 bead 내에 미생물을 고정화 할 경우 bead를 구성하는 고분자 물질의 기계적 강도로 인하여 미생물을 25% 이상 고정화하기 어렵다. 또한 bead entrapment 법의 경우 미생물을 집중하여 배양할 때 미생물이 bead 밖으로 새어나오고, bead 내부로의 물질 및 산소전달 문제로 인하여 미생물이 성장하지 못하는 영역이 생기게 된다(6). 이에 반하여 최근 개발된 캡슐 고정화법은 막의 두께가 0.2 mm 이하가 되는 직경 2 mm 정도의 캡슐내부에 많은 공간을 확보할 수 있고, bead의 경우와 달리 미생물이 캡슐벽과 떨어져 있어 자유용액에서와 거의 같은 상태를 유지할 수 있는 장점이 있어 고농도 배양 및 고정화가 용이하다. 이러한 이유로 최근 캡슐을 이용한 encapsulated whole cell enzyme에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 캡슐 제조시 효소를 생산할 수 있는 미생물을 캡슐내부에 집중하여 미생물을 고농도로 배양한 후 이 캡슐을 전세포고정화 캡슐로 사용할 수 있다(9,16). 본 연구실의 앞선 연구에서 L-lysine을 생산하는 *C. glutamicum*을 캡슐에 고정화 배양하는 경우 배지 조성에 따라 캡슐 내부에 미생물 건조중량이 200 g/L에 달하였으며, β -galactosidase를 생산하는 *E. coli*는 건조 중량 160 g/L의 미생물을 캡슐내부에 고정화 할 수 있었다(7-11).

고정화 전세포효소의 경우 단위부피당의 역가가 낮다는 단점이 있지만 효소를 분리정제하지 않고 사용할 수 있어 생산원가

† Corresponding Author : Dept. of Chemical Eng., Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea
Tel : 053-950-5621, Fax : 053-950-6615
E-mail : parkjk@kyungpook.ac.kr

를 줄일 수 있다는 장점이 있다 뿐만 아니라 캡슐내부에 전세포효소를 고정화하는 경우 보통의 고정화 방법에서와는 달리 고정화 전세포효소의 최고 반응속도 V_m 이 자유세포의 값을 유지한다는 장점이 있다(16) 본 연구에서는 CGTase를 생산하는 *Bacillus macerans* IFO 3490의 배양 특성 및 배지 성분에 따른 효소 활성 특성을 조사하였다. 또한 미생물로부터 효소를 분리 정제하는 과정을 생략하고 전세포효소를 고정화하는 연구는 많이 이루어지고 있지만 미생물로부터 생산되는 효소가 세포외 효소인 경우의 효과적인 전세포효소 고정화 방법은 거의 알려져 있지 않으므로, 상당 부분이 세포외 효소로 존재하는 CGTase를 전세포효소 형태로 캡슐 내부에 고정화하여 dextrin을 당공여체로 하고 xylitol을 당수용체로 하여 glucosyl-xylitol을 생산할 수 있는 방법을 조사하고자 하였다

재료 및 방법

균주 및 배지조성

본 연구에서는 *cyclo-dextrin* glucanotransferase(CGTase)를 생산하는 *Bacillus macerans* (IFO 3490)를 사용하였다. 사용한 배지는 액체 배양배지 2종류와 고형배지 1가지를 사용하였으며 배지의 성분은 Table 1에 나타낸 바와 같으며 유기질소원을 사용한 것과 무기질소원을 사용한 것이 큰 차이점이다. 균주는 2주에 1회 이상의 계대 배양을 실시하였으며, agar medium에 접종하여 1일간 배양한 뒤 5°C에서 냉장 보관하였다. 각 계대의 효소 생성을 확인하기 위하여 agar plate는 xylene cyanole 0.001%, congo red 0.01%를 첨가하여 사용하였다 배지 성분 중 $CaCl_2$ 는 캡슐 고정화 배양을 할 경우 캡슐의 용해와 평형을 막기 위하여 투입하였다(7). 각 배지는 같은 현상을 방지하기 위하여 soluble starch와 다른 성분을 분리하여 121°C에서 15분간 습식 멸균하였다. 멸균 후 충분히 식힌 다음 혼합하여 사용하였으며, 1M NaOH를 사용하여 배지의 pH를 조절하였다.

효소의 β -CD 합성에 대한 활성도 측정

Soluble starch의 농도는 Kitahata등(12)의 방법을 사용하였다 Sample을 0.4 mL 취한 다음 5 mL의 1M HCl 용액에 희석하여 효소에 의해 전분이 더 이상 분해되는 것을 정지시키고, 위에서 희석된 용액을 잘 섞어 다시 0.4 mL을 취한다. 이후 5 mL의 iodine(0.4% KI + 0.04% I_2)용액에 넣고 37°C에서 30분간 반응시켜 UV-spectrophotometer(Shimadzu UV-1201)를 이용하여 550 nm에서 투광도(transmittance)를 측정하여 농도로 환산하였다.

Bacillus macerans(IFO 3490)이 생산하는 CGTase의 β -CD 합성 활성은 50 mM Tris-malate-NaOH buffer 0.4 mL와 5%의 soluble starch나 dextrin 0.4 mL에 미생물배양액 0.1 mL을 넣어 50°C에서 30분간 반응시킨 후 phenolphthalein법으로 발색시킨 후 550 nm에서 투광도로 합성된 β -CD의 양을 측정하여 계산하였다 효소의 활성은 분당 1%의 투광도를 증가시키는 효소의 양을 1 unit로 정의하였다. 검량 곡선은 β -CD(MW 1135.0, Sigma Chemical Co., USA)를 이용하여 작성하였다.

고정화 방법

Calcium-alginate capsule의 제조방법은 Cheong의 방법(7)을 사용하였다. 먼저 성장배지를 autoclave(JISICO)에서 멸균한 후,

Table 1. Compositions of growth media for the *Bacillus macerans* (IFO 3490).

Composition	medium 1 (g/L)	medium 2 (g/L)	Agar medium (g/L)
Soluble Starch	20	20	10
Tryptone		10	10
NaCl		10	10
Yeast Extract		5	5
$CaCl_2$		5	
Agar			15
NH_4Cl	5		
K_2HPO_4	0.5		
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.25		
$CaCO_3$	5		

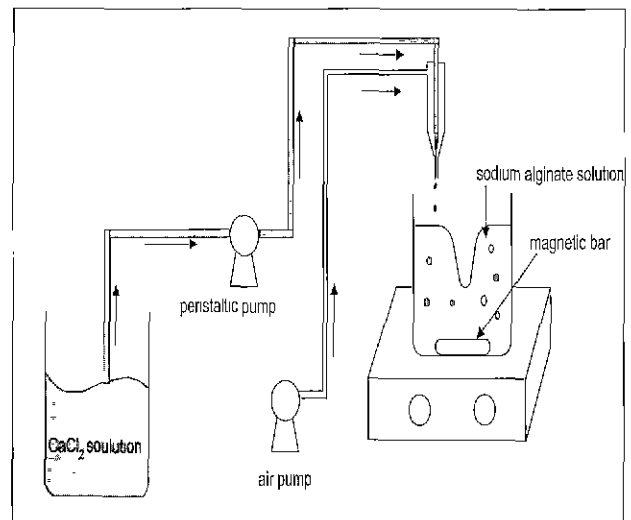


Figure 1. Schematic presentation of capsule formation system

laminar flow chamber에서 100 mL의 배지에 10(v/v)%의 균주를 접종하였다. 그 후 shaking incubator에서 37°C, 150 rpm의 조건으로 성장시킨 다음 배지 10 mL를 취한 후 3500 rpm으로 15분간 원심 분리하여 균주를 분리한다. 분리해 낸 균주를 100 mL의 $CaCl_2$ 용액($CaCl_2$ 16 g/L, xanthan gum 2.6 g/L)에 넣어 30분간 섞었다 250 mL 비이커 내에서 회전하고 있는 100 mL의 비이온성 계면활성제 nonoxynol이 첨가된 0.6(w/v)% sodium alginate 용액에 균주가 섞인 $CaCl_2$ 혼합용액을 방울 방울 떨어뜨려 미생물이 접종된 capsule을 Figure 1과 같이 제조하였다. 미생물의 준비 및 제조된 capsule의 배양과정을 Figure 2에 나타내었다. 미생물 고정화 캡슐의 배양은 batch culture와 캡슐막을 통한 산소전달 향상을 위한 airlift reactor에서의 배양을 병행하였다. 공급되는 공기는 air pump를 이용하였으며, 먼지와 외부균의 오염을 방지하기 위하여 여과하여 사용하였다

당전이 산물의 분석

본 연구에 사용된 당수용체는 당알코올인 xylitol(MW 152.1, Sigma Chemical Co., USA)을 이용하였으며, 당공여체로는 시중에 판매되는 dextrin(신동방 dex 150)을 구입하여 사용하였다. 당전이 반응의 측정에는 반응 전후의 당수용체(xylitol)의 농도를 high performance liquid chromatography(HPLC Model-305, Gilson Medical Electronics, Inc., France)를 사용하여 측정함으로써 이루어

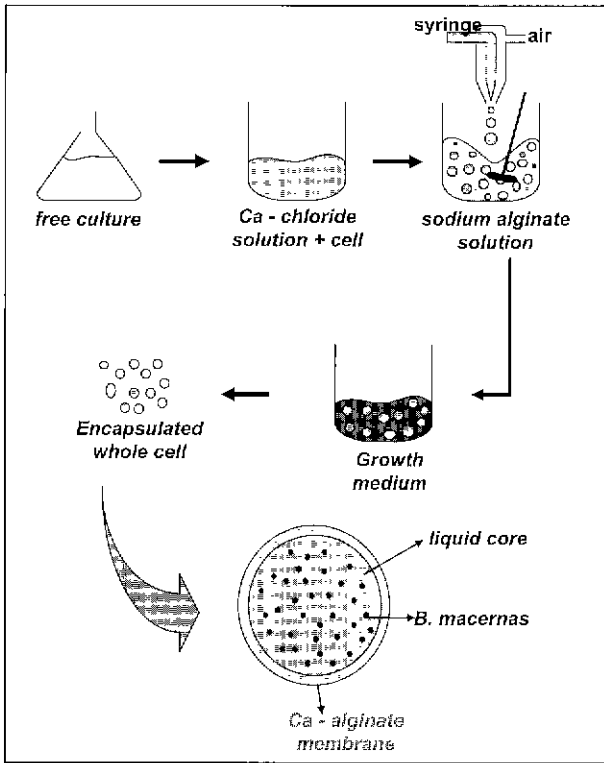


Figure 2. Schematic presentation for the in-situ preparation of the encapsulated whole cell CGTase

어졌다. Cosmosil 5NH₂ packed column(Nacalai Tesque, Inc., Japan)과 RI detector를 사용하였고, 용출 용매는 acetonitril과 H₂O(65 : 35)의 혼합용액이었으며 용출속도는 1.0 mL/min이었다. 용매와 측정용 sample은 0.22 μm filter를 이용하여 사용전 여과를 하였다.

배양액의 농축

농축은 rotary vacuum evaporator(EYELA, Japan)에서 실시하였다. 먼저 배양액을 1000 mL 용기에 500 mL 담고, 항온수조의 온도를 40℃로 맞춘 다음 진공을 걸어 분당 100회 정도의 속도로 회전하면서 농축하였다. 초기에 많이 생기는 거품을 제거하기 위하여 실리콘소포제(Dow Corning, DB-110a)를 0.1 mL 넣어 주었다.

결과 및 고찰

배양중의 starch 분해 및 미생물 성장

Cyclodextrin glucanotransferase(CGTase)는 *Bacillus macerans* 균주의 배양중에 생성되므로 배지의 조성이 미생물의 성장과 CGTase의 생산에 미치는 영향을 고찰하였다. 미생물의 배양은 500 mL의 flask에 배지 100 mL을 투입하고 10%(v/v) 점종을 하고 37℃, 200 rpm에서 배지의 초기 pH를 6.0로 하여 배양하였다. Alkaliphilic 균은 inorganic form의 질소원을 사용하면 CGTase를 생산하지 못하는 경우가 있다고 보고된(13) 바 있으므로 질소원의 형태가 CGTase 형성 및 미생물의 성장에 영향을 미칠 것으로 사료된다. 따라서 Table 1에 나타난 바와 같이 starch와 무기염들로 구성된 medium 1과 organic form의 질소원을 함유하는

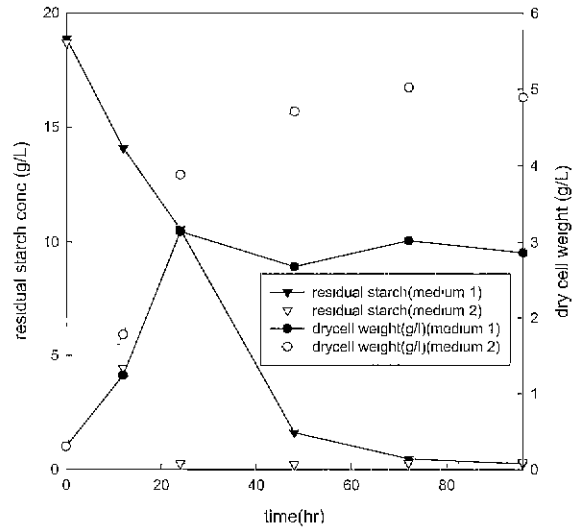


Figure 3. Effect of growth medium composition on the starch decomposition and cell growth in the shaking incubator.

LB배지에 starch가 첨가된 medium 2를 배지로 선정하였다. Medium 1과 medium 2를 사용하여 *B. macerans*를 배양하는 경우 starch의 분해와 미생물의 성장 양태를 Figure 3에 나타내었다. Medium 1으로 미생물을 배양하는 경우에는 medium 2에서 배양하는 경우에 비하여 starch의 분해속도가 느려 배양이 48시간 이상 경과하여야 starch의 대부분이 분해되었다. 특히 24시간 배양후 medium 2에서는 starch가 거의 100% 분해되었으나 medium 1에서는 50% 정도 밖에 분해되지 않았다. 그러나 이 기간 동안 medium 2에서 미생물의 성장량은 medium 1에서의 경우보다 20% 정도 밖에 많지 않다. Medium 1에서는 48시간 이후에 starch가 거의 100% 분해되었지만 미생물의 성장은 배양 24시간 이후부터는 멈춰진 상태이다. 반면 medium 2의 경우에는 24시간 배양이후 배양 48시간까지 약 20% 정도의 추가 성장이 관찰되었다.

CGTase는 starch를 분해하여 cyclodextrin을 형성하는 cyclization 반응, starch나 cyclodextrin을 분해하는 hydrolysis 반응, cyclodextrin을 개환하여 형성된 선형 malto-oligosaccharide를 다른 수용체에 부가하는 coupling 반응 및 선형 malto-oligosaccharide를 다른 수용체에 부가하는 disproportion 반응 등을 수행한다(13, 14) 따라서 Figure 3의 결과에서 배양 24시간까지 medium 1에서나 medium 2에서 미생물의 성장량은 거의 같지만 medium 2에서 분해된 당의 양이 많기 때문에 배양되는 동안 섭취된 당의 양은 거의 같지만 medium 2에서는 starch가 훨씬 많이 전환되었으므로 medium 2에서 생산된 CGTase의 양이 훨씬 많을 것으로 사료되며 이는 Figure 4와 5에서 확인될 수 있다. Figure 3에서 48시간 이후의 배양 결과 medium 1에서는 24시간 이후 건조중량의 증가가 나타나지 않으면서 72시간까지 starch의 소모가 계속되므로 분해된 starch가 미생물에 의해 직접 이용되지 못함을 나타내고 있지만 medium 2에서는 24시간만에 거의 모든 전분이 소모되었으나 미생물의 성장은 24시간 이후에도 계속 증가함을 나타내고 있다. 즉 medium 2에서는 24시간 동안 분해된 전분 분해산물들이 24시간 동안 모두 미생물에 의해 이용되지 못하고 배지 내에서 잔류하면서 그 분해 산물들이 24시간 이후에도 연속적으로 이용됨을 알 수 있다. 이것은 medium 1의 경우 soluble

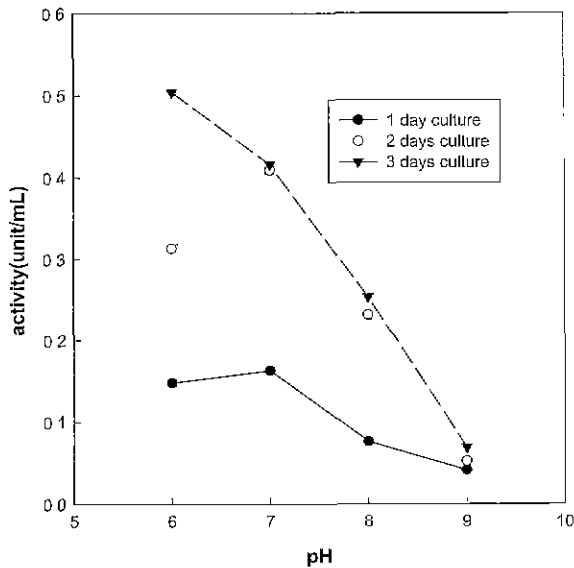


Figure 4. Effect of pH of the growth medium 1 on the production of the CGTase from *Bacillus macerans* IFO 3490 during cultivation.

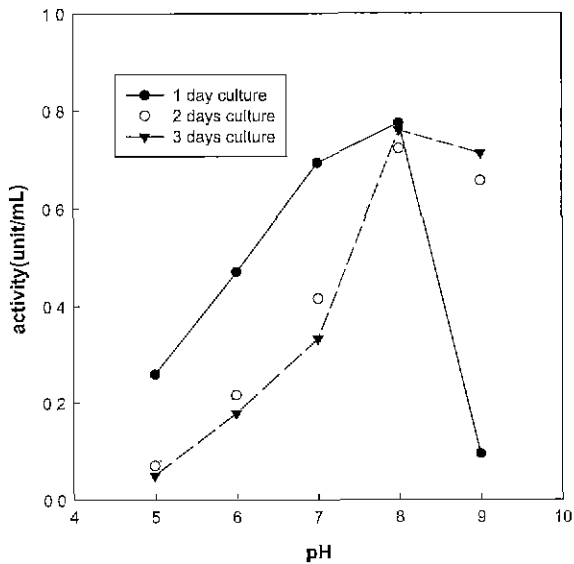


Figure 5. Effect of pH of the growth medium 2 on the production of the CGTase from *Bacillus macerans* IFO 3490 during cultivation.

starch를 제외하고는 모두 제한배지(defined media)로 구성된 반면, medium 2의 경우에는 NaCl을 제외한 배지가 모두 복합배지(complex media)로 구성되어 배지 내에 미생물에 필요한 성장인자(비타민, 호르몬, 아미노산), 미량원소, 효소의 생합성에 필요한 아미노산 등을 풍부하게 포함함으로써 24시간 이후에도 성장과 일부 대사산물의 합성을 촉진할 수 있는 조건을 갖추었기 때문으로 사료된다.

배양중의 CGTase 생산

배양 동안에 미생물의 성장 및 starch의 분해가 미생물 배지의 배양조성에 따라 큰 차이를 보이고 있음을 앞절에서 알 수 있었다. 따라서 미생물의 배양과정 중 CGTase 활성도 및 생산된 CGTase의 존재 위치를 조사할 필요가 있다. CGTase의 생성량을 측정하는 간접적 방법으로서 CGTase의 4가지 반응기능 중

starch를 분해하여 β -cyclodextrin(β -CD)을 형성하는 cyclization 반응에대한 효소활성을 측정하였다. 즉 실험 방법에서 기술한 바와 같이 미생물을 배양한 broth solution을 starch나 dextrin 용액에 투입하고 β -CD의 생성량을 측정하였다. 각각의 pH로 조정된 medium 1에서 배양한 경우에 배양액중의 CGTase가 생성한 β -CD의 양을 Figure 4에 나타내었다. 배양 1일째에도 효소의 활성이 측정 가능하기는 하였으나 2일째가 되어야 뚜렷하게 나타나며 배양 3일째의 효소활성은 배양 2일째보다 약간 증가하였다. 이는 Figure 3에서 배양 2~3일 동안 미생물의 성장은 없지만 starch가 꾸준히 감소하는 결과를 감안하면 starch가 감소되는 동안 CGTase도 합성이 계속되고 있다고 추론 가능하다. 또한 medium 1의 경우 배양하는 동안 배양용액의 pH에 따라 *B. macerans*이 CGTase를 생산하는 양이 크게 차이가 나는 것을 알 수 있다. 즉 pH 5의 배지에서 배양된 경우 β -CD 합성 활성이 측정되지 않았으며 pH 6-7의 경우에 최대 활성을 보였으며 배지의 pH가 더 이상 증가할수록 β -CD 합성 활성이 감소하였다. Medium 2에서 배양되는 경우 생성되는 CGTase의 β -CD 생산능은 Figure 5에 나타내었으며 이는 medium 1에서의 결과와 크게 다르다. 배양 1일째 생성된 CGTase의 β -CD 합성 활성이 가장 크게 나타나고 배양 2-3일째가 되면서 CGTase의 β -CD 합성활성이 감소하고 있다. 이를 Figure 3에서의 미생물 성장량과 starch 소모속도 결과와 결부시켜 보면, starch가 분해되는 배양 1일까지 CGTase의 생산량이 증가하며 starch가 완전히 고갈되던 배양 2~3일째부터는 미생물의 성장은 있지만 β -CD의 생성은 없으며 이미 생성된 CGTase도 일부 성장에 필요한 다른 물질로 전환되었을 것으로도 추론된다. 이로 미루어 배양중 생성되는 CGTase는 medium 1에서나 medium 2에서나 starch가 분해되는 경우에만 생성된다는 것이 추론 가능하다. 다만 medium 2의 경우 CGTase가 생성되는 배양액의 최적 pH가 8로 나타났으며 배양용액의 pH를 8로하여 배양하는 경우는 배양 2~3일 후에도 β -CD 합성 활성이 감소하지 않고 유지되었으며 pH9의 경우는 오히려 배양일수의 증가에 따라 CGTase의 합성능이 증가한 것으로 나타났으며 이는 효소의 pH stability에 관한 다른 연구 결과(13,14)와 유사하다.

당전이 효소는 대부분이 세포의 효소이라고 알려져 있으며 *Aureobasidium pullulans*를 배양하여 fructosyltransferase를 생산하는 경우 전체 효소 활성의 80%가 세포외 효소였다(17). 또한 fructosyltransferase를 생산하는 *Aureobasidium pullulans*(KFCC 10245)를 calcium alginate에 고정화하여 bead고정화 전세포효소를 제조하고 이를 충전층반응기에서 100일 이상 안정하게 조업한 바가 있다 이 경우 이 균주가 생산하는 효소는 균체내 효소가 50 unit/L이고 균체의 효소는 30 unit/L이었다(18). 따라서 *Bacillus macerans* 균주가 생산하는 CGTase의 세포내 효소와 세포외 효소의 역가비를 조사하기 위하여 자유 배양한 배양액을 원심분리한 다음, 침전된 cell을 같은 양의 증류수로 회석하고 초음파 처리기(Branson Model 8210)에서 20분간 초음파 처리하여 β -CD 합성 활성 측정법으로 측정하였다. Medium 1과 medium 2에서 3일간 배양한 배양액에 대하여 조사한 결과를 Table 2에 나타내었다. 배양중 배양액의 pH에 따라 정도의 차이는 있지만 세포내 효소는 10~20% 세포외효소는 80~90%를 이루는 것으로 나타났다.

Table 2. The excretion of CGTase from *B. macerans* during cultivation.

medium 1			medium 2		
pH	intracellular activity (unit/mL)	extracellular activity (unit/mL)	pH	intracellular activity (unit/mL)	extracellular activity (unit/mL)
5.0	-	-	5.0	0.055	0.050
6.0	0.065	0.504	6.0	0.052	0.178
7.0	0.063	0.416	7.0	0.062	0.333
8.0	0.059	0.253	8.0	0.075	0.760
9.0	0.052	0.069	9.0	0.070	0.713

미생물의 calcium alginate 캡슐내 접종 및 배양

캡슐 고정화 전세포 효소를 얻기 위하여 보고된 바(7-11,16)와 같이 *B. macerans*가 core에 접종된 캡슐을 배지 내에서 배양하였다. 배양 배지는 medium 2를 사용하였고 캡슐 제조 방법에 따라 미생물 접종 캡슐을 제조하여 100 mL의 배지에 400~500 개씩 넣은 다음, 37℃와 200 rpm의 조건으로 shaking incubator에서 배양하였다. 그러나 *E. coli*, *S. cerevisiae*, *C. glutamicum* 등(7-11)과는 달리 *Bacillus macerans*의 경우에는 미생물이 적절히 캡슐 내부에서 배양되지 않았다. 3일간의 배양을 거친 후에도 내부 건조중량은 증가하지 않았으며, 매 24시간마다 배지를 교환하여 주었을 경우에도 증가하지 않았다. 접종된 *B. macerans*이 캡슐내부에서 고농도로 배양되지 못하는 이유는 기질인 soluble starch의 분자가 거대하여 캡슐막을 통하여 캡슐 내부로 확산하여 들어가는 데 어려움이 있거나 호기성 균주인 *B. macerans*이 충분히 자랄 수 있을 만큼 산소전달이 용이하지 못하였기 때문일 수 있다.

막을 통한 starch의 확산이 접종된 *B. macerans*의 성장에 저해 요인이 되는 것을 검토하기 위하여 medium 1(LBS, LB + starch)의 starch(20 g/L) 대신 glucose(20 g/L)를 사용한 LBG(LB + glucose)와 dextrin(20 g/L)을 사용한 LBD(LB + dextrin) 배지를 이용하여 접종한 캡슐의 배양을 종전과 동일한 방법으로 수행하였다. 본 실험에 사용한 시중에서 판매되는 dextrin의 크기 분포는 Table 3에 나타낸 바와 같다. 모든 경우에 대하여 캡슐 내부에 접종된 미생물이 어느 정도 자라면 모두 캡슐로부터 배양액으로 새어 나와서 자라며 캡슐 내부에 미생물을 축적할 수 없었다. 또, 액화 전분을 사용한 경우와 LB 배지만을 사용한 경우에 대해서도 캡슐 고정화 배양을 시도하였다. 액화 전분의 준비는 soluble starch를 열에 안정한 amylase(Theramyl, Novo)를 이용하여 100 mL의 증류수에 soluble starch를 50 g씩 넣은 다음 amylase를 12.5, 25, 50 μ L 첨가하고, potato starch에는 25 μ L 첨가한 다음, 121℃에서 15분간 가열하여 액화 처리하였다. 그러나, 액화 전분과 LB 배지만을 사용한 경우에서도 캡슐 내에 미생물을 적절히 배양할 수 없었다. 따라서, *B. macerans*이 캡슐 내부에 배양되지 못하는 것은 기질의 크기가 큰 starch의 막을 통한 확산저항 때문이 아닌 것으로 판단된다.

CGTase를 생산할 수 있는 박테리아들은 *Bacillus macerans*를 비롯하여 *Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus*, *Bacillus ohbensis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus circulans*, *Thermoanaerobacterium thermosulfatigenes* 등(13,14)으로 알려져 있다. 이중 *T. thermosulfatigenes*만이 혐기성 미생물이므로 *Bacillus macerans*를 캡슐에 고정화하여 배양하기 위해서는 산소전달을 향상시키는 것이 필요하다. 본 연구실에서의 앞선 연구에서 *E.*

Table 3. The size distribution of the commercial dextrin used in this experiment.

unit	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	> G10	total
%	1.63	6.28	9.55	5.67	6.90	11.56	8.66	3.85	4.98	40.92	100%

coli(10)나 *S. cerevisiae*(7)의 경우, 이 두 미생물은 facultative 미생물로서 호기성 조건이나 혐기성 조건 모두에서 성장할 수 있는 능력을 가지고 있어 산소가 부족한 환경에서도 적응하여 자랄 수 있기 때문에 내부 건조중량이 100~300 g/L에까지 이를 수 있었고, *C. glutamicum*(15)의 경우에는 낮은 yeast extract 농도에서도 해바라기기름을 이용하여 산소전달을 향상시켜 약 45 g/L 정도까지 내부 건조중량을 얻을 수 있었다. 또한 물보다 산소와의 결합력이 우수한 해바라기기름을 사용하여 *E. coli*를 고정화 배양하여 캡슐막을 통한 산소전달계수 $k_L a$ 를 78% 증가시킬 수 있었다(10). 따라서 본 연구에서도 산소전달 향상을 목적으로 해바라기기름을 2(v/v)% 첨가한 캡슐을 제조하여 LBS(2% starch), LBG(2% glucose), LBD(dextrin 2, 5%), LB 배지를 사용하여 배양하였으나 미생물을 고농도로 고정화 배양할 수 없었다. 산소전달 향상을 위한 또 다른 방법으로 airlift reactor 내에서 *B. macerans*를 접종한 캡슐을 배양하였다. Airlift reactor를 사용할 경우 shaking incubator를 사용할 경우에 비해 용존 산소의 증가와 함께 캡슐의 움직임이 더 활발해 캡슐 주위의 외부저항이 감소되는 효과를 가질 수 있게 되어 캡슐 막을 통한 산소전달 뿐 아니라, 기질의 전달도 용이해 질 수 있게 된다. 본 연구실에서의 airlift reactor를 이용한 앞선 실험에서는 *E. coli*의 경우 β -galactosidase의 활성증가를 관찰할 수 있었고(10), *C. glutamicum*의 경우에서도 건조중량은 25%, L-lysine 생산은 58%의 증가를 보였었다(15). 그러나 본 실험에 사용된 *B. macerans*의 경우에는 캡슐 내부에 미생물이 축적되지 못하였다. *B. macerans* 균주는 호기성일 뿐만 아니라 starch를 이용하는 과정에서 CGTase 효소의 반응 mechanism이 hydrolysis, cyclization, coupling, disproportion 등으로 매우 복잡하게 이루어지며 이 때 분해된 기질을 섭취하는 과정도 매우 복잡할 것이므로 결국 간단하지 않은 여러 가지의 복합적 이유로 캡슐에 접종된 균주가 캡슐내부에서 고농도로 배양되지 못하는 것으로 사료된다. 한편, Ismail 등(14)은 Ca-alginate, agar, gelatin, polyacrylamide를 이용한 gel entrapment법으로 *B. macerans*를 고정화하여 배양하였는데 이들의 결과에서도 free culture처럼 높은 activity를 가지는 whole cell을 얻지 못하였을 뿐 아니라, gelatin의 경우 고정화된 cell에 의해 gelatin bead가 액화되기도 하여 *B. macerans* 균주의 고정화 배양은 매우 힘든 과정인 것으로 사료된다.

배양된 미생물의 캡슐 고정화

B. macerans 균주를 캡슐내에 접종하여 배양하기 어려우므로, 캡슐 고정화 전세포 효소를 제조하기 위하여 배양액에서 이미 배양된 미생물을 원심분리하여 캡슐내부에 고정화하고자 하였다. 고농도로 고정화하기 위하여 배양액 1 L(100 mL, 10 batch)를 원심분리하여 50 mL의 1.6(w/v)% CaCl₂ 용액에 넣고 교반하여 잘 섞은 다음, 미리 준비한 sodium alginate 0.6(w/v)% 용액에 방울로 떨어뜨려 capsule을 제조하였다. 이때 cell의 양이 많아 캡슐이 완전 구형을 유지하기 어렵지만 sodium alginate 용액에 첨가하는 non-ionic surfactant, nonoxynol의 농도를 0.5~1.0 g/L로

조절함으로써 완전 구형을 이룰 수 있다 제조한 캡슐을 반응용액 10 mL에 200개씩 넣고 β -CD 합성활성을 측정하였다. β -CD 합성 활성 측정을 위한 반응용액은 5 mL의 Tris-Malate-NaOH buffer(pH 6.0)에 5% dextrin과 soluble starch를 녹인 용액 5 mL를 섞어서 각각 준비하였다. 또한 cell을 고정화할 때 starch 7.5(w/v)%, yeast extract, tryptone 1.25(w/v)%를 함께 고정화 한 경우에 대해서 당전이 반응에 대해서도 조사하였다. 위 실험에서 캡슐에 고정화된 미생물은 β -CD 합성 활성 및 당전이 활성을 나타내지 않았다. Free-cell 실험에서 약 10~20%의 세포 내 효소 활성을 나타내었으나, capsule에 고정화된 경우 그 활성이 나타나지 않았다. 이와 같은 현상은 β -CD 합성활성에서 starch를 반응 용액으로 사용한 경우 starch가 capsule 내부로 확산하여 들어가지 못하기 때문이거나, dextrin의 경우 저분자량의 당류에서부터 starch에 가까운 분자량을 가지고 있으므로 일부 반응이 일어날 것으로 예상되지만 캡슐내부에서 형성된 β -CD의 입체 구조의 형태로 인하여 capsule 막 속의 pore를 쉽게 통과하여 막밖으로 나오지 못하는 것으로 추정된다. 확산 저항에 의한 현상은 반응성 뿐 아니라 capsule의 모양에도 영향을 주었는데, starch를 반응용액으로 한 경우 삼투압으로 인하여 캡슐이 찌그러졌으며, 작은 단위의 분자량을 상당량 가진 dextrin의 경우 모양을 그대로 유지하였다.

세포외 CGTase의 흡착

캡슐에 고정화된 *B. macerans*의 캡슐 고정화 배양이 어렵기 때문에 *B. macerans*가 생산한 CGTase를 흡착제에 흡착시키고 이를 캡슐에 고정화하고자 하였다. 활성탄, Amberite IRA 900, DEAE-Sephadex를 이용하여 효소의 흡착을 시도하였다. 0.1N HCl과 0.1N NaOH로 활성탄을 사용하였다. 배양액은 Tris-Malic-NaOH buffer(pH 7.0, 20 mM)를 이용하여 pH를 맞추고 0.2(w/v)% succinic anhydride를 이용하여 0°C에서 30분간 CGTase를 succinylation시킨 다음 배양액에 흡착제를 첨가하여 4°C에서 12시간 동안 효소의 흡착을 시도하였다. 배양액 중의 효소 흡착량을 알아보기 위하여 흡착 전과 후의 배양액으로 β -CD 합성활성으로 측정하였다. Amberite IRA 900, DEAE-Sephadex를 이용한 흡착도 활성탄과 동일한 activation 과정을 거쳐 실시하였다. 배양액 중에 남아 있는 CGTase의 β -CD 합성 활성을 흡착 실시 전후에 각각 측정하여 Table 4에 나타내었다. 그 결과를 보면, 효소의 succinylation 과정 중 활성 저하는 거의 없는 것으로 보이며 흡착제에 의한 효소의 선택적 흡착도 거의 이루어지지 않았다. 다만 Amberite IRA 900의 경우에만 20% 정도의 CGTase가 흡착되는 것으로 나타났다. 이는 배양액 내에 존재하는 다량의 이온성 물질들에 의한 방해 때문으로 사료되며, 효소를 제외한 다량의 다른 이온들의 제거 없이는 효소의 선택적 흡착은 어렵다고 판단된다.

농축 배양액의 캡슐고정화 및 당전이

배양액중의 미생물이나 CGTase를 흡착시켜 캡슐내부에 고정화하여 당전이 반응을 수행하려는 시도가 쉽게 이루어질 수 없었으므로 cell이 포함되어 있는 배양액을 농축하여 캡슐내부에 가둠으로써 캡슐고정화 전세포를 제조하고자 하였다. 이러한 방법은 가장 간편한 방법이기도 하지만 농축 배양액을 이용한 전세포 효소의 고정화에 대한 보고는 알려져 있지 않다. *B.*

Table 4. The production of β -CD by the CGTase which remains in the broth solution before and after the adsorption of CGTase on each adsorbent

Adsorbent	β -CD (mg/mL) before adsorption	β -CD (mg/mL) after adsorption
Activated charcoal	1.14	1.13
Amberite IRA 900	1.10	0.87
DEAE-SEPHADEX	0.82	0.82

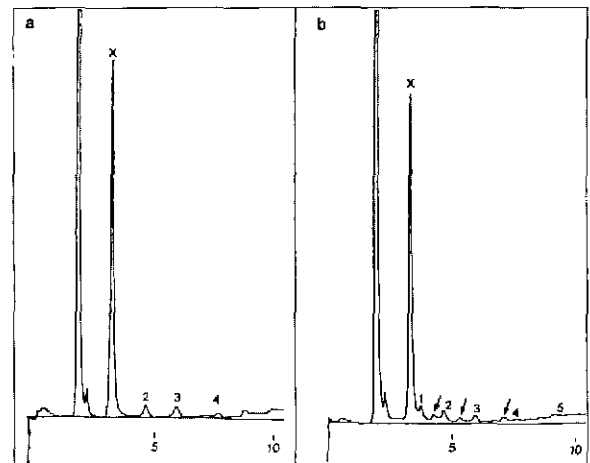


Figure 6. HPLC chromatogram of the product solution obtained by the transglycosylation reaction which was carried out using xylytol as glucosyl acceptor and dextrin as glucosyl donor by the capsules containing the concentrated broth solution. Reaction condition: pH 6.0, 50°C, 150 rpm, 100 mL rxn mixture/250 mL flask, 2.5(w/v)% dextrin, 5(w/v)% xylytol. frame a: before reaction, b: after 12 hours reaction. peak 1: dextrose, 2: maltose, 3: maltotriose, 4: maltotetraose, 5: maltopentaose, x: xylytol. ✓: glucosyl-xylytol(G1-X, G2-X, G3-X).

*macerans*를 배양하여 배양액 500 mL을 rotary vacuum evaporator의 1000 mL 용기에 담고 부피비로 10배 농축하였다.

캡슐 고정화를 위하여 농축액은 같은 부피의 CaCl_2 (3.2(w/v)%)와 xanthan gum (0.52(w/v)%)의 혼합 용액에 녹인 다음 전술된 바의 캡슐 고정화 방법에 따라 배양농축액을 이용한 전세포효소 고정화 capsule을 제조하였다. Tris-malate-NaOH buffer(pH 6.0, 20 mM) 용액에 당수용체인 xylytol 5(w/v)%와 당공여체인 dextrin을 2.5(w/v)% 농도로 250 mL flask에 녹여 100 mL의 당전이 반응 용액을 준비하였다. 캡슐 고정화 전세포효소를 당전이 반응에 사용하기 위하여 5 mL의 농축 배양액으로 제조한 캡슐 전체를 50°C로 예열된 100 mL의 당전이 반응용액에 투입하였다. 캡슐 고정화 전세포 효소를 사용하는 경우 캡슐막을 통한 확산 과정이 고려되어야 하므로 반응시간을 충분히 하고자 캡슐을 투입하고 12시간이 경과한 후 sample을 취하였으며, 효소 반응은 shaking incubator에서 50°C, 150 rpm의 조건으로 수행하였다. Sample은 여과를 거친 후 HPLC를 이용하여 측정하였으며 Figure 6에 그 결과가 나타나 있다. 당전이 반응이 진행되었으며 반응 전의 peak와 반응이 12시간 진행된 후의 peak 변화에서 glucosyl-xylytol의 생성을 뚜렷이 관찰할 수 있다. 반응전에는 지극히 미량의 G1(glucosyl unit 1: glucose)이 존재하였지만 반응이 진행된 후 G1의 양이 증가하여 뚜렷한 peak를 형성하고 있으며 glucosyl-xylytol(Gn-X, Gn: glucosyl unit, X: xylytol)은 G1-X,

G2-X, G3-X가 확인되었다. Xylitol의 peak 높이로 인한 분석(5)으로 xylitol이 6.6% 전환된 것을 알 수 있었다. 이로써 배양농축액을 이용한 캡슐고정화 전세포 CGTase가 hydrolysis와 coupling, disproportion 등의 intermolecular transglycosylation 반응을 원활히 수행함을 확인할 수 있었다. 추후 반응액의 농도나 반응시간의 변화, 캡슐고정화 전세포효소의 재사용 및 캡슐막을 통한 물질전달 저항의 영향 등이 연구되어야 할 필요가 있으며 현재 본 연구실에서 계속 연구가 되고 있다.

요 약

Xylitol을 당수용체로하여 당알콜 올리고당 glucosyl-xylitol을 생산하기 위하여 캡슐고정화 전세포 CGTase를 제조하고자 하였다. CGTase를 생산하기 위하여 *Bacillus macerans*를 배양하는 경우 organic form의 질소원을 사용하는 경우가 inorganic form의 질소원을 사용하는 경우보다 더 많은 CGTase를 생산하였고 배양도중 탄소원인 starch가 분해되는 동안 CGTase가 생성되었다. *B. macerans*에 의하여 생산되는 CGTase는 80% 이상이 extracellular enzyme이며 intracellular enzyme은 20% 이내이었다. *E. coli*, *C. glutamicum*, *S. cerevisiae* 등과 달리 캡슐내부에 *B. macerans*를 접종하고 캡슐내부에서 고농도로 배양할 수 없었다. 배양액속에 존재하는 CGTase는 다른 이온성 물질들로 인하여 활성탄, Ambolite, Sephadex 등의 흡착제에 흡착시킬 수 없었다. 미생물을 배양한 배양액 전체를 10배로 농축하여 캡슐내에 고정화함으로써 캡슐고정화 전세포 CGTase를 제조할 수 있었다. 농축배양액을 이용하여 제조된 캡슐고정화 전세포 CGTase는 hydrolysis, intermolecular transglycosylation을 수행하였으며 xylitol을 당수용체로 하고 dextrin을 당공여체로 하여 glucosyl-xylitol을 생산하였다.

감 사

본 연구는 학술진흥재단의 '98 과학기술기초중점연구비 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Sato M., K. Nakamura, H. Nagano, Y. Yagi and K. Koizumi (1992), Synthesis of Glucosyl-Inositol Using a CGTase, Isolation and Characterization of the Positional Isomers, and Assimilation properties for Intestinal Bacteria, *Biotechnol. Lett.*, 14, 659-664.
- Sato M., T. Matsuo, N. Orita and Y. Yagi (1991), Synthesis of Novel Sugars, Oligoglucosyl-Inositols, and Their Growth Stimulating Effect for *Bifidobacterium*, *Biotechnol. Lett.*, 13, 69-74.
- Kitao S. and H. Sekine (1992), Transglucosylation Catalyzed by Sucrose Phosphorylase from *Leuconostoc mesenteroides* and Production of Glucosyl-Xylitol, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56, 2011-2014.
- Kim T. W., D. C. Park and Y. H. Lee (1997), Synthesis of Glucosyl-Sugar Alcohols Using Glycosyltransferases and Structural Identification of Glucosyl-Maltitol, *J. Microbial. Biotechnol.*, 7, 310-317.
- Kim T. W., D. C. Park and Y. H. Lee (1998), Synthesis of transglucosylated xylitol using cyclodextrin glucanotransferase and its stimulating effect on the growth of *Bifidobacterium*, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 26, 442-449.
- Kurosawa H., N. Nomura and H. Tanaka (1989), Ethanol Production from Starch by Coimmobilized Mixed Culture System of *Aspergillus awamori* and *Saccharomyces cerevisiae*, *Biotechnol. Bioeng.*, 33, 716-723.
- Cheong S. H. J. K. Park, B. S. Kim and H. N. Chang (1993) Microencapsulation of Yeast Cells in the Calcium Alginate membrane, *Biothch Tech.*, 7, 879-884.
- Cheong S. H. T. J. Lee, J. K. Park and H. N. Chang (1995). L-Lysine Production Using Encapsulated *Corynebacterium glutamicum*, *J. KICChE*, 33, 105-112.
- Chang H. N. G. H. Seong, I. K. Yoo, J. K. Park and J. H. Seo (1996), Microencapsulation of Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* Cells with Invertase Activity in the Liquid Core Alginate Capsules. *Biotechnol. Bioeng.*, 51, 157-162.
- Lee B. H. and J. K. Park (1996), Encapsulation of Whole Cell β -Galactosidase of *Escherichia coli*, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, 11, 398-404.
- Park J. K., G. S. Jeong and H. N. Chang (1997), The Effect of Oxygen Transfer on the Activity of Encapsulated Whole Cell β -Galactosidase, *Bioproc Eng.*, 17, 197-202.
- Kitahata, S. and S. Okada (1979), Intermolecular transglycosylation of cyclodextrin glucanotransferase, *J. Jpn. Soc. Starch Sci.*, 26, 68-75.
- Tokova A. (1998), Bacterial cyclodextrin glucanotransferase, *Enzyme Microb. Technol.*, 22, 676-686
- Ismail A. S., U. I. Sobieh and A. F. Abdel-Fattah (1995), Biosynthesis of cyclodextrin glucoxytransferase and β -cyclodextrin by *Bacillus macerans* 314 and properties of the crude enzyme, *Chem Eng. J.*, 61, 247-253.
- Jeong G. S. (1995), The Effect of Oxygen Supply on the Activity of Microbial Cells, M. S. thesis, Kyungpook National University, Taegu
- Oh. C. Y. and J. K. Park (1998), The characteristics of encapsulated whole cell β -galactosidase, *Bioproc. Eng.*, 19, 419-425.
- Smith, J. A., D. Grove, S. J. Luenser and L. G. Park (1982), U.S. Patent 4,309,505.
- Yun, J. W. (1995), Enzyme production of oligosaccharides from *Aureobaculum pullulans*, PhD thesis, Pusan National University, Pusan, Korea