

## Bacillus속이 생산하는 Cyclodextrin Glucanotransferase에 의한 Stevioside로의 당전이반응

조영제\* · 천성숙<sup>1</sup>

상주대학교 식품공학과, <sup>1</sup>영남대학교 식품가공학과

(2003년 10월 27일 접수, 2003년 12월 15일 수리)

Cyclodextrin glucanotransferase(CGTase)를 생성하는 *Bacillus* sp. 균주를 토양으로부터 분리하였으며, CGTase 생성을 위하여 0.1% albumin, 2% NH<sub>4</sub>Cl, 2% soluble starch, 0.2% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>를 효소생산매지에 첨가하여 37°C에서 72시간 배양 시 최대의 활성을 나타내었다. Sephadex G-100과 G-150을 사용한 gel filtration과 DEAE-cellulose를 이용한 이온 교환 크로마토그래피로 9.72배 정제하였으며, specific activity는 528.02 unit/mg이었다. CGTase의 효소학적 특성은 최적 pH, 최적 온도는 pH 8.0과 80°C였으며, pH 8.0~11.0과 60~80°C에서 안정하였다. 금속이온 중 Pb<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>와 Zn<sup>2+</sup>에서 효소활성이 억제되었다. CGTase의 첨가 효소량을 20.5~410 unit 까지 변화시키며 stevioside로의 당전이능을 조사한 결과 20.5 unit 및 41 unit 처리 시 당전이율은 74.9%와 75.7%로 높게 나타났으며, 205 unit 처리시에는 당전이율은 68.7%로 비슷하였으나 갈변화가 진행되었다. 효소의 농도를 높여 410 unit를 처리했을 때 당전이율은 57.9%로 더욱 떨어졌으며 역시 갈변화가 진행되어 제품의 물성을 나쁘게 하였고, 당전이 산물 중 pentaglycoside와 hexaglycoside가 검출되지 않아 필요이상의 효소사용량은 오히려 당전이 반응에 역효과가 나타났다.

**Key words:** *Bacillus*속, CGTase, Stevioside, 당전이

### 서 론

Cyclodextrin(CD)는 포도당이 6~8개가 α-1,4 결합에 의해 환상구조로 연결되어 있는 고리구조를 하고 있으며, 고리의 바깥쪽은 친수성이고 안쪽은 반대로 친유성이다. 고리 안의 친유성 부분은 여러 가지 분자나 반응기를 잡아넣어 물질을 안정화시키는 작용을 한다.<sup>1,2)</sup> 외부에서 소수성을 가진 물질이 첨가되면 CD는 이 소수성 물질을 고리내부에 포집하여 복합체(inclusion complex)를 형성하며, 이 복합체는 휘발성 물질의 불휘발화, 산화 및 광분해로부터의 보호, 색 또는 맛과 용해성의 변화, 반응성의 변화, 유화성부여 등의 작용을 한다.<sup>2)</sup> CD는 오래 전부터 알려져 왔으나 대량생산이 어려워 쓴맛의 의약품을 먹기 쉽게 할 목적으로 소량 사용되어 왔으나 1975년 일본에서 cyclodextrin glucanotransferase(CGTase)를 전분에 작용시키면, 값싼 가격으로 CD를 대량 제조할 수 있음이 발견된 이래 CGTase를 이용한 CD 생산방법이 개발되어 식품, 의약품, 화장품, 농약 등의 다양한 분야에 이용되고 있다.<sup>3-6)</sup> 이 효소의 생산균주로 *B. macerans*,<sup>1)</sup> *B. circulans*,<sup>7)</sup> *B. amylolique faciens*,<sup>8)</sup> *B. ohbensis*,<sup>9)</sup> *B. megaterium*,<sup>10)</sup> *B. stearothermophilus*<sup>11)</sup> 등의 *Bacillus*계통의 균주가 많이 알려져 있으며, 이러한 CD를 생산하는 고역가 CGTase 분비 균주 탐색에 관한 연구는 국내에서도 오 등,<sup>13)</sup> 안 등,<sup>14)</sup> 신 등,<sup>15)</sup> 유 등,<sup>16)</sup> 박 등<sup>17)</sup> 그리고 조와 김<sup>18)</sup> 등에 의해 수행된 바 있다. 또한 CGTase의 기능은 전분에

작용하여 cyclodextrin을 생성하는 것 외에도 식품에서 CGTase에 의하여 생성되는 당전이 스테비오사이드에 관한 연구 결과가 있으며,<sup>19)</sup> 스테비오사이드의 13번 탄소에 결합된 포도당 잔기에 포도당 1~3분자가 전이되면 감미도가 향상된다는 보고가 있다.<sup>19)</sup> 이때 사용되는 효소로는 CGTase가 대표적이며, 그 외에도 β-galactosidase,<sup>20)</sup> β-fructofuranosidase,<sup>21)</sup> α-galactosidase<sup>22)</sup> 등을 이용하는 방법이 보고되어 있다. CGTase는 포도당 4번 탄소의 -OH기에 선택성이 뛰어나 1,4-α-transglucosylation 반응을 효율적으로 촉매하는 것이 알려져 있으며,<sup>23)</sup> stevioside를 당수용체로 한 당전이 반응시, 높은 반응속도 및 수율, 그리고 낮은 maltooligo당의 축적이 관찰되었고, 잔류 생전분의 분리가 용이하여 전이된 stevioside의 분리 정제가 매우 용이하다고 하였다.<sup>19)</sup> 고역가를 가진 CGTase 분비 균주 탐색에 관한 연구는 국내에서도 많이 수행되어져 왔으나, 당전이 반응을 나타내는 효소에 대한 연구보고는 많지 않은 실정이다.

따라서 본 연구에서는 당전이 기능을 가지는 CGTase 개발의 일환으로 토양에서 CGTase를 생산하는 균주를 분리하여 효소 생산 최적조건을 규명하고 생산된 CGTase의 당전이 반응을 살펴보고자 하였다.

### 재료 및 방법

**시약 및 기기.** 본 연구에 사용된 시약은 soluble starch, trihydroxymethylamino methane, phenolphthalein, β-cyclodextrin, stevioside, dextrin, congo red(이상 Sigma Co. USA), polypeptone, yeast extract(이상 Difco, USA) 등이며 기타 시약은 분석용 등급의 시약을 사용하였으며, 기기는 spectrophoto-

\*연락처

Phone: 82-054-530-5265; Fax: 82-054-530-5269

E-mail: yjcho@sangju.ac.kr

meter(Helios alpha, England), ultrasonicator(Braun Biotech, USA), HPLC(Water Co., USA) 등을 사용하였다.

**CGTase 생산균주의 선별 및 동정.** 경북 북부지역의 토양과 부식토를 균원시료로 하여 생리식염수 10 ml에 약 1g의 토양 시료를 첨가하여 얻은 현탁액을 0.5% soluble starch, 1.0% polypeptone, 0.5% yeast extract, 0.1% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.02% MgSO<sub>4</sub>, 1.0% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 2.0% agar, 0.03% congo red로 조성된 분리용 배지에 도말하고 37°C에서 3일간 배양하였다. 이때 분리용 배지에서 균 주위에 투명한 환을 형성하는 균을 1차 선별하고,<sup>24)</sup> 선별된 균주는 분리용 배지에 agar와 congo red를 뺀 broth(효소생산배지)에 접종하여 37°C에서 3일간 배양하여 얻은 조효소액의 활성을 측정하여 CGTase 활성이 가장 높은 균을 최종 선별하여 1개월에 1회씩 계대 배양하고 보관하면서 본 실험에 사용하였다.

**균주의 배양 및 조효소의 조제.** 효소생산배지에 접종한 균주를 37°C에서 3일간 배양한 후 5T 표준 probe를 장착한 Braun-Sonic 2000 U ultrasonic generator(Braun Biotech, Allentown, PA, USA)를 이용하여 초음파 처리하였으며, 이때 ultrasonicator의 작동조건은 power setting +250, repeating duty cycle 0.3초, operation time 120초이었다. 초음파 처리 후 배양액은 4°C에서 2시간 150 rpm으로 shaking한 후 8000 rpm으로 20분간 원심분리하여 균체를 제거한 다음, Whatman No 1으로 여과한 여액을 조효소액으로 사용하였다.

**효소생산을 위한 최적배양조건의 검토.** 효소생산을 위한 최적조건은 유기질소원, 무기질소원, 무기염, 탄소원을 효소생산 배지에 첨가하여 37°C에서 배양시간별로 효소활성을 측정하여 최적조건을 조사하였다.

**정제효소의 조제.** 효소 생산을 위한 최적조건에서 3일간 배양하여 초음파 처리한 후 원심분리하여 얻은 조효소액은 70% 포화 황산암모늄으로 염석하고, 10 mM Tris-HCl buffer(pH 8.0)로 투석시킨 후 동일 buffer로 미리 평형화시켜둔 Sephadex G-100 column(5×45 cm)과 Sephadex G-150 column(3×70 cm)을 이용한 gel filtration과 DEAE-cellulose column(3×60 cm)을 이용한 anion exchange chromatography로 정제하였다.

**CGTase activity 측정.** CGTase activity의 측정은 Kaneko<sup>25)</sup> 등에 의해 제안된 phenolphthalein법을 사용하였다. 즉, 2% soluble starch를 10 mM Tris-HCl buffer(pH 8.0)에 녹인 기질 용액 2 ml에 효소액 0.1 ml를 첨가한 후 80°C에서 30분간 반응시켰다. 30 mM NaOH 3.5 ml를 첨가하여 반응을 중지시키고 0.02% phenolphthalein/5 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 용액 0.5 ml를 가한 후 550 nm에서의 흡광도를 측정하여 효소역가를 환산하였다. 효소 활성은 효소액 1 ml가 1분간에 1 μmol의 β-cyclodextrin을 생성하는 것을 1 unit로 정하였다. 이때 표준품으로는 β-cyclodextrin을 사용하여 표준곡선을 작성하여 사용하였으며, 모든 실험은 3회 3반복으로 실시하였다.

**Protein 정량.** 단백질 정량은 Lowry 등<sup>26)</sup>의 방법에 의하여 측정하였으며, bovine serum albumin을 사용한 표준곡선에 의하여 환산하였다.

**pH의 영향.** pH가 효소의 활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 효소용액(106 unit/200 μg protein)을 0.2 M HCl-

**Table 1. Condition of HPLC for transglucosylation analysis**

|                |                          |
|----------------|--------------------------|
| Mobile phase   | 70% acetonitrile         |
| Flow rate      | 0.8 ml/min               |
| Detector       | UV 210 nm                |
| Column         | TSK gel-amid-80          |
| Concentration  | 40 mg/5 ml               |
| Injection vol. | 20 μl                    |
| Oven temp.     | Room temp.               |
| Instrument     | Waters association, inc. |
| Time           | 50~60 min                |
| Software       | Autochro win             |

potassium chloride buffer(pH 2.0), 0.1 M citrate buffer(pH 3.0~5.0), 0.2 M sodium phosphate buffer(pH 6.0~8.0), 0.2 M boric acid-borax buffer (pH 9.0), 0.2 M borax-NaOH buffer (pH 10.0~12.0)까지 pH를 변화시키면서 효소활성을 측정하였다.

**pH 안정성.** 효소의 pH에 대한 안정성을 조사하기 위하여 효소(106 unit/200 μg protein)를 효소활성에 미치는 pH 영향 실험에 사용한 동일 완충용액에서 30°C에서 1시간동안 방치한 뒤 최적 pH로 조절하고 잔존활성을 측정하였다.

**온도에 의한 영향.** 효소활성에 미치는 온도의 영향을 조사하기 위하여 효소액 0.1 ml와 기질 1 ml를 혼합한 후 효소반응 온도를 30~90°C까지 변화시키면서 효소활성을 측정하였다.

**열 안정성.** CGTase의 열안정성을 조사하기 위하여 효소액 1 ml를 30~90°C의 범위에서 60분간 방치한 후 최적반응온도로 조절하고 잔존활성을 검사하였다.

**금속이온의 영향.** 금속이온이 효소활성에 미치는 영향을 검사하기 위하여 각종 금속염을 2 mM이 되게 용해시키고 금속 이온용액 0.1 ml와 효소액 0.1 ml를 혼합하고, 30°C에서 60분간 안정화시킨 후 기질 1 ml를 혼합하고 30°C에서 60분간 방치한 다음 80°C에서 30분 동안 반응시키고 효소활성을 조사하였다.

**Stevioside transglucosylation.** 정제된 10% stevioside 용액 (pH 8.0) 5 ml와 10 mM Tris-HCl buffer(pH 8.0)에 녹인 10% dextrin 5 ml를 혼합한 후 정제된 효소액 1 ml를 첨가하여 80°C에서 24시간 반응시킨 후 효소처리하지 않은 stevioside를 대조구로 하여 CGTase에 의한 당전이성을 HPLC로 분석, 조사하였다. HPLC의 조건은 Table 1과 같다.

**당전이율 계산.** HPLC에 의해 측정된 당전이 생성물의 peak 면적을 계산한 후 아래 식에 의해 당전이율을 계산하였다.

$$*\text{Transglucosylation rate (\%)} =$$

$$\frac{[\text{STG-1}+\text{STG-2}+\text{STG-3}+\text{STG-4}+\text{STG-5}+\text{STG-6의 면적}]}{[\text{STG-1}+\text{STG-2}+\text{STG-3}+\text{STG-4}+\text{STG-5}+\text{STG-6의 면적}+\text{미전이 ST peak면적}]} \times 100$$

ST: stevioside

STG-1: stevioside + monoglyceride

STG-2: stevioside + diglyceride

STG-3: stevioside + triglyceride

STG-4: stevioside + tetraglyceride

STG-5: stevioside + pentaglyceride

STG-6: stevioside + hexaglyceride

Table 2. Morphological and cultural characteristics of the isolated strain

| Factors                      | Characteristic |
|------------------------------|----------------|
| Gram staining                | +              |
| Spore                        | +              |
| Shape                        | Rod            |
| Motility                     | -              |
| Pigmentation                 | +              |
| Utilization of fructose      | ++             |
| glucose                      | ++             |
| galactose                    | +              |
| maltose                      | ++             |
| sucrose                      | ++             |
| mannitol                     | ++             |
| starch                       | ++             |
| sorbitol                     | ++             |
| xylose                       | d              |
| lactose                      | d              |
| raffinose                    | d              |
| Catalase activity            | +              |
| Oxygen requirement           | +              |
| Voges-Proskauer test         | +              |
| Hydrolysis of casein         | +              |
| gelatin                      | -              |
| starch                       | +              |
| Citrate utilization          | +              |
| Nitrate reduction            | +              |
| Indole production            | -              |
| H <sub>2</sub> S production  | -              |
| Methyl red reaction          | -              |
| Lipase (Tween 80 hydrolysis) | +              |
| NaCl tolerance 5%            | +              |
| 9%                           | +              |
| Urease production            | -              |
| Growth temperature (°C)      | 15-45          |
| Growth pH                    | 5-11           |

<sup>d</sup>Slightly, <sup>+</sup>Moderate, <sup>++</sup>Good

## 결과 및 고찰

**CGTase 생성 균주의 선발 및 동정.** CGTase 생성균주 선발 배지에서 투명환이 형성되는 균주를 1차 선발하였고, 이들을 효소생산배지에 배양하여 조효소액을 제조한 후 CGTase활성을 측정하여, 활성이 가장 높은 균주를 최종 균주로 선발하였다. 선발된 균의 생리 생화학특성은 Table 2에서 보는바와 같이 형태적 특성은 간균이고, 편모는 관찰되지 않았다. 편성 호기성으로, Gram 양성이었으며, 단당류, 이당류는 물론 당알코올과 전분 등을 잘 자화하여 광범위한 탄수화물의 이용특성을 나타내었다. 생리적 성질을 검토한 결과 15~45°C 및 pH 5~11에서 생육이 가능하며, 9% NaCl 첨가배지에서도 생육할 수 있었으며, V-P반응 및 catalase 반응에서 양성반응을 보였다. Cowan과 Steel<sup>27)</sup>의 검색표와 Smith 등<sup>28)</sup>의 보고에 따라, 본 균주는 gram 양성의 간균이며, catalase 양성이고 대부분 호기적 특성을 나타내고, 포자형성, 전분의 자화 및 V-P반응의 양성반응 등을 나타내므로, *Bacillus*속의 균주로 동정하였다.

**효소생산의 최적 조건.** 효소생산에 미치는 각종 유기질소원을 조사하기 위하여 각 성분을 효소생산배지에 0.1%씩 첨가하여 37°C에서 5일간 배양하여 효소생산을 검토한 결과 Table 3과 같이 대조구의 13.5 unit/m로 비해 albumin과 pepton이 각각 19.6과 17.2 unit/m로 145.6과 127.7%의 효소생산 증대가 관찰되어 가장 좋은 질소원으로 판단되었다. 효소생산에 미치는 각종 무기질소원의 영향을 조사하기 위해서 각 성분을 배지에 2.0%씩 첨가하여 37°C에서 3일간 배양하여 효소생산을 검토한 결과 Table 3과 같이 NH<sub>4</sub>Cl에 의해 18.1 unit/m로 효소생산성이 가장 우수하였다. 전 등<sup>29)</sup>은 *Bacillus*속 균주가 NH<sub>4</sub>Cl에 의해 효소생산이 높게 나타났다고 보고하였으며 본 실험 결과와 일치하였다. CGTase의 생산에 있어 탄소원이 미치는 영향은 매우 중요하다. CGTase 생산균주 대부분이 단당류 및 이당류에 비해 starch와 같은 다당류에서 높은 효소생산성을 보이는 것으로 알려져 있다.<sup>30)</sup> 본 실험에서도 각종 탄소원의 영향을 조사하기 위해 각 성분을 배지에 2.0%씩 첨가하여 37°C에서 3일간 배양하여 효소생산을 검토한 결과 Table 3과 같이 soluble starch와 lactose, maltose 등의 이당류 이상을 첨가했을 때 효소생산성이 높았다. 이러한 결과는 *Bacillus*속의 경우<sup>17,29,31)</sup> soluble starch에서 최대의 효소활성이 검출되었다는 보고와 유사하였고, *B. acidocaldarius*의 CGTase가 lactose첨가 시 최대의 효소생산량을 보이고,<sup>32)</sup> 오 등<sup>13)</sup>이 *Bacillus*속의 CGTase가 corn starch, soluble starch에서 최대 효소생산량을 나타낸다고 보고한 것과 유사하였다. 효소생산에 미치는 무기염의 영향을 검토하기 위해 각 성분을 배지에 각 0.2%씩 첨가하여 37°C에서 3일간 배양하여 검토한 결과 Table 3과 같이 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>와 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>에서 25.47과 25.85 unit/m로 최대의 효소생산량을 나타내었으며, 전 등<sup>29)</sup>의 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>에서 최대의 효소생산량을 나타낸 것과 유사하였다. 효소생산에 미치는 배양 시간을 알아보기 위하여 효소생산 배지에 0.1% albumin, 2% NH<sub>4</sub>Cl, 2% soluble starch 및 0.2% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>를 첨가하여 37°C에서 0~120시간까지 배양 시간별로 검토한 결과 Fig. 1과 같이 배양 시작 후 72시간째 효소생산이 최대였다. 박 등<sup>21)</sup>은 세균의 CGTase가 68시간 배양 후 최대 생산량을 나타내었다고 보고하였으며, 본 실험결과와 유사하였다.

**CGTase의 정제.** 효소생산배지에 0.1% albumin, 2% NH<sub>4</sub>Cl, 2% soluble starch 및 0.2% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>를 첨가하여 37°C에서 3일간 균을 배양하여 조제한 조효소액에 황산암모늄을 70% 포화시켜 4°C에서 12시간 정치한 후, 효소단백질을 응집, 침전시킨 다음 8000 rpm으로 15분간 원심분리하여 침전물을 회수하였다. 분리된 침전물은 모아 10 mM Tris-HCl buffer(pH 8.0)로 용해시킨 다음 동일 완충액으로 투석시키고 농축시켰다. 농축된 효소액은 10 mM Tris-HCl buffer(pH 8.0)로 미리 평형화시킨 Sephadex G-100 column(5×45 cm)에 주입하여 0.55 ml/min의 유속으로 3.5 ml/tube씩 분획하였으며, 효소활성을 나타내는 분획을 모아서 농축하였다. 농축된 효소액은 다시 DEAE-cellulose column(3×60 cm)에 주입한 다음 흡착된 단백질을 0~1 M NaCl의 linear salt gradient의 방식으로 0.7 ml/min의 유속으로 12 ml/tube씩 분획하였으며, 활성분획은 10 mM Tris-HCl buffer(pH 8.0)로 24시간 투석한 후 농축하였다. 농축

Table 3. Effect of organic nitrogen sources in culture medium on the cyclodextrin glucanotransferase activity of *Bacillus* sp.

| Source                    | Component   | Activity (unit/ml) | Relative activity (%) |
|---------------------------|---|--------------------|-----------------------|
| Control                   | -   | 13.5               | 100.0                 |
| Organic nitrogen (0.1%)   | Urea  | 6.5                | 48.5                  |
|                           | Peptone   | 17.2               | 127.7                 |
|                           | Albumin   | 19.6               | 145.6                 |
|                           | Glycine   | 11.3               | 83.7                  |
| Inorganic nitrogen (2.0%) | NaNO <sub>2</sub>   | 6.3                | 46.6                  |
|                           | NH <sub>4</sub> Cl  | 18.1               | 134.4                 |
|                           | (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>               | 12.3               | 91.2                  |
|                           | (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub> | 14.2               | 105.5                 |
|                           | KNO <sub>3</sub>  | 10.6               | 79.1                  |
|                           | (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> C <sub>2</sub> O <sub>4</sub> | 11.5               | 85.7                  |
|                           | Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>                             | 15.4               | 114.2                 |
| Carbon (2.0%)             | Soluble Starch  | 26.1               | 194.4                 |
|                           | Galactose   | 14.6               | 108.2                 |
|                           | Glucose   | 14.7               | 109.1                 |
|                           | Glycerol  | 11.5               | 85.8                  |
|                           | Lactose   | 17.3               | 128.4                 |
|                           | Maltose   | 16.2               | 120.1                 |
| Inorganic salt (0.2%)     | NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                              | 25.5               | 189.4                 |
|                           | MnSO <sub>4</sub>   | 8.7                | 64.3                  |
|                           | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                              | 22.9               | 97.7                  |
|                           | CaCl <sub>2</sub>   | 12.9               | 95.8                  |
|                           | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                               | 25.9               | 192.2                 |
|                           | FeSO <sub>4</sub>   | 7.3                | 54.1                  |
|                           | NaCl  | 13.7               | 102.2                 |
|                           | MgCl  | 11.1               | 82.2                  |
|                           | CuSO <sub>4</sub>   | 14.6               | 108.3                 |

\*Broth was cultured at 37°C for 3 days and CGTase was reacted at 50°C for 30 min.

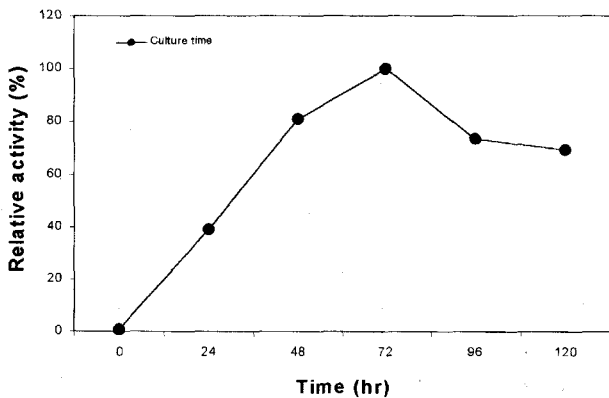


Fig. 1. Effect of culture time on the cyclodextrin glucanotransferase activity of *Bacillus* sp.

시킨 활성 분획은 10 mM Tris-HCl buffer(pH 8.0)로 평형화시킨 Sephadex G-150 column(3×70 cm)에 주입한 후 0.25 ml/min의 유속으로 6 ml/tube씩 분획하였으며, 그 결과 Table 4와 같이 정제도 9.7배, 수율은 37.7%, 비활성도 528.02 unit/mg인 효소를 얻을 수 있었다.

**최적 pH.** 본 효소의 pH에 의한 영향을 알아보기 위해서 pH를 2~12로 조절된 기질 1 ml와 효소액 0.1 ml를 혼합한 후 80°C에서 30분간 반응시키고 효소활성을 측정하여 Fig. 2A

와 같이 pH 8.0에서 최적 pH를 나타내었다. 손 등,<sup>33)</sup> 김 등<sup>34)</sup>이 *Bacillus* sp. 등 세균의 CGTase가 pH 8.0~9.0 부근에서 최적의 효소활성을 나타내었다고 보고한 것과 Kato와 Horikoshi<sup>35)</sup>의 *Bacillus subtilis* No. 313의 최적 pH인 8.0과 유사하였다.

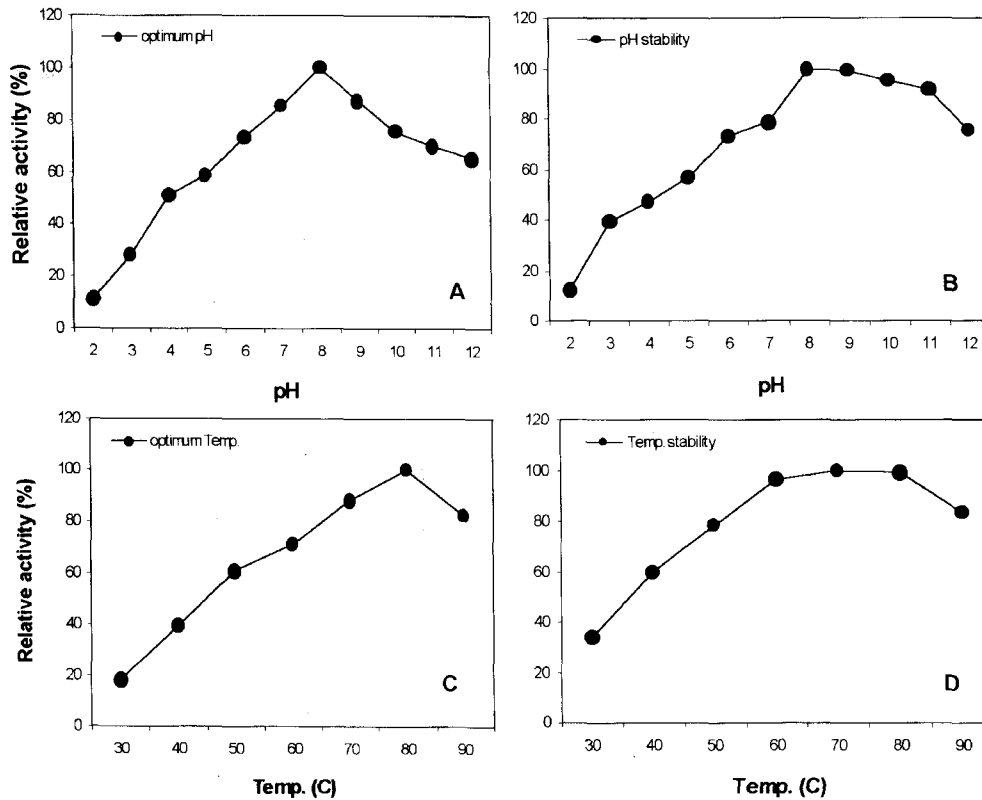
**pH 안정성.** 효소의 pH 안정성을 조사하기 위해서 pH 2~12로 조절된 기질용액 1 ml와 효소액 0.1 ml를 혼합하고, 30°C에서 60분간 전처리한 후, 최적 pH인 8.0으로 정확히 조정하고 30°C에서 60분간 안정시킨 후 잔존 효소활성을 측정하여 Fig. 2B와 같이 pH 8.0~11.0사이의 pH 영역에서 80%이상 안정한 것으로 나타났으며 이는 박 등<sup>17)</sup>이 *Bacillus*의 CGTase가 pH 7~11의 범위에서 안정하다고 보고한 것과 유사하였다.

**온도에 의한 영향 및 열 안정성.** 효소활성에 미치는 온도의 영향을 살펴본 결과 Fig. 2C와 같이 80°C에서 효소활성이 최대로 나타났다. 이<sup>32)</sup>는 *Bacillus acidocaldarius*의 효소가 90°C에서 최적온도를 나타내었다고 보고하였으며, 본 효소의 최적 효소반응온도가 다소 낮았다. 열 안정성은 Fig. 2D와 같이 60~80°C에서 잔존 효소활성이 90% 이상으로 열에 안정하였다. 따라서 본 CGTase는 높은 열 안정성으로 효소 공정 시 잡균 오염을 방지할 수 있어 산업적으로 유용하게 쓰일 가능성이 높은 것으로 판단되었다.

**금속이온에 의한 영향.** 효소활성에 미치는 각종 금속이온의 영향을 검토한 결과 Table 5와 같이 첨가한 각종 금속이온에서

**Table 4. Purification of cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus* sp.**

| Step  | Total activity (units) | Total protein (mg) | Specific activity (unit/mg) | Yield (%) | Purification (fold) |
|---|------------------------|--------------------|-----------------------------|-----------|---------------------|
| Crude enzyme solution                           | 522,28                 | 962.3              | 54.3                        | 100.0     | 1.0                 |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 40,78                  | 234.7              | 173.7                       | 78.0      | 3.2                 |
| Sephadex G-100                                  | 29,36                  | 96.2               | 305.2                       | 56.2      | 5.6                 |
| DEAE-cellulose                                  | 25,25                  | 49.1               | 514.2                       | 48.3      | 9.5                 |
| Sephadex G-150                                  | 19,70                  | 37.3               | 528.0                       | 37.7      | 9.7                 |



**Fig. 2. Characteristics of the cyclodextrin glucanotransferase activity from *Bacillus* sp.** A: Effect of pH B: pH stability C: Effect of temperature D: Temperature stability.

**Table 5. Effect of metal ion on the cyclodextrin glucanotransferase activity of *Bacillus* sp.**

| Ion (2 mM)        | Metal  | Activity (unit/ml) | Relative activity (%) |
|-------------------|--|--------------------|-----------------------|
| -                 | Control  | 13.8               | 100.0                 |
| Ca <sup>++</sup>  | CaCO <sub>3</sub>  | 14.7               | 105.9                 |
| Mn <sup>++</sup>  | MnSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O                    | 11.2               | 81.0                  |
| Ag <sup>+</sup>   | AgNO <sub>3</sub>  | 11.3               | 81.9                  |
| Mg <sup>++</sup>  | MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O                    | 13.6               | 98.2                  |
| Pb <sup>++</sup>  | Pb(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> · 3H <sub>2</sub> O | 6.1                | 44.3                  |
| Ba <sup>++</sup>  | BaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O                    | 14.1               | 101.6                 |
| Na <sup>+</sup>   | Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>                          | 14.0               | 101.0                 |
| K <sup>+</sup>    | K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>                           | 16.5               | 119.0                 |
| Fe <sup>+++</sup> | FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O                    | 15.9               | 115.2                 |
| Hg <sup>++</sup>  | HgCl <sub>2</sub>  | 4.5                | 32.7                  |
| Zn <sup>++</sup>  | ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O                    | 9.6                | 69.4                  |
| Fe <sup>++</sup>  | FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O                    | 14.7               | 106.4                 |
| Cu <sup>++</sup>  | CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O                    | 15.1               | 109.3                 |

\*Enzyme activity was represented as unit and relative value against the highest activity.

큰 폭의 증가는 관찰되지 않았지만, Pb<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>에서 각각 55.7, 67.3, 30.6%의 저해가 관찰되었다. 박 등<sup>17)</sup>은 *Bacillus*속의 CGTase가 Hg<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, Zn<sup>2+</sup>와 Cu<sup>2+</sup>에서 저해가 일어났다고 보고한 것과는 매우 유사하였다.

**Stevioside transglucosylation.** 정제된 stevioside에 dextrin을 가하고 CGTase를 첨가하여 stevioside로의 당전이성을 HPLC로 조사한 결과 Table 6과 같이 효소반응에 의해 생성된 총product의 양을 각 생성물질별 area백분율(%)로 표시하였다. 대조구의 경우 retention time(RT) 5.928에서 stevioside의 fraction이 검출되었다. 또한 본 균주가 생산하는 CGTase를 작용시킨 후 당전이성을 분석한 결과 대조구에서는 발견되지 않은 많은 종류의 배당체가 검출되어 CGTase에 의해 dextrin에서 떨어져 나온 여러 종류의 당들이 stevioside에 결합하여 stevioside + monoglyceride, stevioside + diglyceride, stevioside + triglyceride, stevioside + tetraglyceride, stevioside + pentaglyceride, stevioside + hexaglyceride 등<sup>36)</sup> 다양한 종류의 당전이이 stevioside glyceride fraction이 검출되었다.

**Table 6. HPLC analysis of stevioside on transglycosylation by Cyclodextrin glucanotransferase concentration**

|       | Enzyme concentration (units) |          |          |          |          |          |          |          |          |          |
|-------|------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
|       | 0                            |          | 20.5     |          | 41       |          | 205      |          | 410      |          |
|       | RT (min)                     | Area (%) | RT (min) | Area (%) | RT (min) | Area (%) | RT (min) | Area (%) | RT (min) | Area (%) |
| ST    | 5.928                        | 70.907   | 5.930    | 18.693   | 5.923    | 18.865   | 5.790    | 22.654   | 5.937    | 31.764   |
| STG-1 | -                            | -        | 7.968    | 19.525   | 7.955    | 20.517   | 7.823    | 21.394   | 7.953    | 24.273   |
| STG-2 | -                            | -        | 10.992   | 15.777   | 10.977   | 16.548   | 10.840   | 14.785   | 10.963   | 13.415   |
| STG-3 | -                            | -        | 15.363   | 10.940   | 15.347   | 11.792   | 15.217   | 8.567    | 15.370   | 5.163    |
| STG-4 | -                            | -        | 21.372   | 3.718    | 21.372   | 3.560    | 21.200   | 2.179    | 21.303   | 0.513    |
| STG-5 | -                            | -        | 30.608   | 3.872    | 30.650   | 4.417    | 30.463   | 1.792    | -        | -        |
| STG-6 | -                            | -        | 43.862   | 1.837    | 43.913   | 1.855    | 43.672   | 1.002    | -        | -        |

RT: Retention time

ST: stevioside

STG-1: stevioside+monoglyceride

STG-2: stevioside+diglyceride

STG-3: stevioside+triglyceride

STG-4: stevioside+tetraglyceride

STG-5: stevioside+pentaglyceride

STG-6: stevioside+hexaglyceride

**Table 7. Change of transglucosylation rate and browning effect by Cyclodextrin glucanotransferase concentration**

| Enzyme concentration (Unit) | Transglucosylation (%) | Product                                  | Browning effect |
|-----------------------------|------------------------|--|-----------------|
| Control                     | -                      | STG-1, STG-2, STG-3, STG-4, STG-5, STG-6 | White           |
| 20.5                        | 74.9                   | STG-1, STG-2, STG-3, STG-4, STG-5, STG-6 | White           |
| 41.0                        | 75.7                   | STG-1, STG-2, STG-3, STG-4, STG-5, STG-6 | White           |
| 205                         | 68.7                   | STG-1, STG-2, STG-3, STG-4               | Browning        |
| 410                         | 57.9                   | STG-1, STG-2, STG-3, STG-4, STG-5, STG-6 | Browning        |

\*Transglucosylation was reacted with 10% dextrin, 10% stevioside and enzyme 1 ml at 80°C for 24 hr.

STG-1: stevioside+monoglyceride

STG-2: stevioside+diglyceride

STG-3: stevioside+triglyceride

STG-4: stevioside+tetraglyceride

STG-5: stevioside+pentaglyceride

STG-6: stevioside+hexaglyceride

당전이 반응에 미치는 효소농도의 영향. Stevioside 당전이 반응에 미치는 효소농도의 영향을 살펴보기 위하여 첨가 효소량을 20.5~410 unit까지 변화시키며 당전이시켜 본 결과 Table 7에서와 같이 20.5 unit 및 41.0 unit 처리 시 당전이율이 74.9%와 75.7%로 높게 나타났으며 205 unit 처리 시에는 당전이율이 68.7%로 다소 낮아졌으며, 처리당액의 갈변화가 진행되어 제품의 물성을 나쁘게 하였고, 410 unit를 처리한 경우 당전이율은 57.9%로 더욱 떨어졌으며 역시 갈변화가 진행되었다. 또한 410 unit처리시에는 당전이 산물 중 stevioside + pentaglyceride, stevioside + hexaglyceride가 검출이 되지 않아 과도한 양의 효소사용은 오히려 당전이 반응에서 역효과가 나는 것으로 판단되었다. 본 CGTase는 높은 열안정성으로 효소 반응 시 잡균 오염을 방지할 수 있고, 소량의 효소처리로 높은 당전이율을 얻을 수 있어 산업적으로 이용 가치가 높은 것으로 판단되었다.

### 참고문헌

- Kitahata, S., Tsuyama, N. and Okada, S. (1974) Purification and some properties of cyclodextrin glycosyltransferase from a strain of *Bacillus* species. *Agric. Biol. Chem.* **38**, 387-394.
- Kim, M. H. and Son, C. B. (1988) Enzyme and biological translation (II). Cyclodextrin (CD) synthetase. *Biol. Ind.* **11**, 14-18.
- Misaki, M. (1984) Utilization of cyclodextrin for citrus fruitproducts. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.* **31**, 98-106.
- Minamite, Y. and Katsuda, Y. (1984) Present status and future aspects for pesticides included in cyclodextrin. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.* **31**, 112-116.
- Uekama, K. (1983) Pharmaceutical application of cyclodextrins. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.* **30**, 247-254.
- Hashimoto, H. (1989) Studies on the industrial production and application of cyclodextrins. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.* **36**, 35-42.
- Yang, Y., Sato, M. and Ishikura, T. (1986) Comparative studies of cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus ohbensis*, *Bacillus macerans* and *Bacillus circulans* and production of cyclodextrins using those cyclodextrin glucanotransferase. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.* **33**, 144-151.
- Ernest, K., Yu, C., Aoki, H. and Misawa, M. (1988) Specific alpha-cyclodextrin production by a novel thermostable cyclodextrin glucanotransferase. *Appl. Microbiol. Biot.* **28**, 377-379.

9. Sato, M., Yagi, H., Nagano, H. and Ishikura, T. (1985) Determination of cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus ohbensis* and its optimum pH using HPLC. *Agri. Biol. Chem.* **49**, 1189-1191.
10. Kitahata, S. and Okada, S. (1974) Action of cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus megaterium* strain No. 5 on starch. *Agri. Biol. Chem.* **38**, 2413-2417.
11. Kitahata, S. and Okada, S. (1982) Purification and some properties of cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus stearothermophilus* TC-60. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.* **29**, 7-12.
12. Horikoshi, K. and Ariba, T. (1982) In *Alkalophilic microorganisms* (1st ed.) Japan Scientific Societies Press, Tokyo. pp. 147-157.
13. Oh, P. S., Koh, S. C. and Suh, H. W. (1986) The production of cyclodextrin glucanotransferase by *Bacillus* sp. and its utilization. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **14**, 461-466.
14. Ahn, J. H., Hwang, J. B. and Kim, S. H. (1990) Cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus stearothermophilus*; Purification by affinity chromatography and its properties. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **18**, 585-590.
15. Shin, H. D., Lee, S. H. and Lee, Y. H. (1989) Purification and characterization of cyclodextrin glucanotransferase excreted from newly isolated alkalophilic *Bacillus circulans*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **17**, 370-378.
16. Yu, J. H., Chung, Y. J. and Lee, J. S. (1989) Isolation and characterization of cyclodextrin glycosyltransferase producing alkalophilic *Bacillus* sp. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **17**, 148-153.
17. Park, C. S., Woo, E. J., Kuk, S. U., Seo, B. C., Park, K. H. and Lim, H. (1992) Purification and characterization of cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus* sp. E1. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**, 156-163.
18. Cho, Y. J. and Kim, M. U. (2000) Production and characterization of cyclodextrin glucanotransferase from *Aspergillus* sp. CC-2-1. *Kor. J. Food. Sci. Tech.* **32**, 1158-1167.
19. Mizutani, K., Miyata, T., Kasai, R., Tanaka, O., Ogawa, S. and Doi, S. (1989) Study on improvement of sweetness of steviol bioglycosides. Selective enzymic transglucosylation of the 13-O-glycosyl moiety. *Agri. Biol. Chem.* **53**, 395-398.
20. Kitahata, S., Ishikawa, H., Miyata, T. and Tanaka, O. (1989) Production of rubusoside derivatives by transgalactosylation of various  $\beta$ -galactosidases. *Agri. Biol. Chem.* **53**, 2923-2928.
21. Ishikawa, H., Kitahata, S., Ohtani, K., Ikuhara, C. and Tanaka, O. (1990) Production of stevioside and rubusoside derivatives by transfructosylation of  $\beta$ -fructofuranosidase. *Agri. Biol. Chem.* **54**, 3137-3143.
22. Kitahata, S., Ishikawa, H., Miyata, T. and Tanaka, O. (1989) Production of rubusoside derivatives by transgalactosylation of various  $\alpha$ -galactosidase. *Agri. Biol. Chem.* **53**, 2929-2934.
23. Kobayashi, S., Kainuma, K. and Suzuki, S. (1978) Purification and some properties of *Bacillus macerans* cyclodextrin glucanotransferase. *Carbohydr. Res.* **61**, 229-238.
24. Park, C. S., Park, K. H. and Kim, S. H. (1989) A rapid screening method for alkaline cyclodextrin glucanotransferase using phenolphthalein methyl orange containing solid medium. *Agri. Biol. Chem.* **53**, 1167-1173.
25. Kaneko, T., Kato, T., Nakamura, N. and Horikoshi, K. (1987) Spectrophotometric determination of cyclization activity of  $\beta$ -cyclodextrin-forming cyclodextrin glucanotransferase. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.* **34**, 45-52.
26. Lowry, C. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-273.
27. Cowan, N. R. and Steel, K. J. (1965) In *Manual of Identification of Medical Bacteria*. Cambridge Univ. Press, London. p. 215.
28. Smith, N. R., Gordon, R. E. and Clark, F. E. (1952) *Aerobic Spore forming bacteria*. No. 16, p. 3, U.S.D.A., Agricultural Monograph.
29. Jun, H. K., Jo, Y. B., Kim, S. J. and Bae, K. M. (1998) Some properties and optimal culture conditions of cyclodextrin glucanotransferase of *Bacillus* sp. S-6 isolated from Kimchi. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **27**, 609-617.
30. Tonkova, A. (1998) Bacterial cyclodextrin glucanotransferase. *Enzyme Microb. Tech.* **22**, 678-686.
31. Hwang, J. B. and Kim, S. H. (1992) Cyclodextrin production from potato starch with *Bacillus stearothermophilus* cyclomaltodextrin glucanotransferase. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**, 344-347.
32. Lee, K. J. (1993) Characteristic of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus acidocaldarius*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **21**, 256-262.
33. Sohn, C. B., Kim, S. A., Park, Y. A. and Kim, M. H. (1997) Purification and characterization of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus firmus*. *Kor. J. Soc. Food Sci. Nutr.* **26**, 351-357.
34. Kim, S. H., Choi, J. S., Chung, K. T., Yoo, Y. S., Jung, D. S. and Park, K. H. (1994) Production of cyclodextrin by *Bacillus* sp. I-5 cyclodextrin glucanotransferase. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **26**, 2-11.
35. Kato, T. and Horikoshi, K. (1986) A new  $\gamma$ -cyclodextrin forming enzyme produced by *Bacillus subtilis* No. 313. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.* **33**, 137-142.
36. Kasai, R., Kaneda, N., Tanaka, O., Yamasaki, K., Kitahara, S. and Furukawa, H. (1981) Sweet diterpene-glycosides of leaves of stevia rebaudiana Bertoni. Synthesis and structure sweetness relationship of Rebaudiosides-A, -D, -E and their related glycosides. *J. Jpn. Chem. Soc.* **5**, 726-735.

---

**Transglucosylation to Stevioside by Cyclodextrin Glucanotransferase from *Bacillus* sp.**

Young-Je Cho\* and Sung-Sook Chun<sup>1</sup> (*Department of Food Engineering, Sangju National University, Sangju 742-711, Korea; <sup>1</sup>Department of Food Science & Technology, Yeungnam University, Gyeongsan 712-749, Korea*)

**Abstract:** Cyclodextrin glucanotransferase (CGTase) of *Bacillus* sp. isolated from soil was purified and its enzymological characteristics were investigated. It was found that the production of CGTase reached to the maximum when the strain was cultured in the broth containing 0.1% albumin, 2% NH<sub>4</sub>Cl, 2% soluble starch and 0.2% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> for 72 hrs at 37°C. The purity of CGTase was increased by 9.7 folds through purification procedures by the following column chromatography DEAE-cellulose ion exchange chromatography and Sephadex G-100, G-150 gel filtration and its specific activity was 528.0 unit/mg. The optimum pH and temperature for the CGTase activity were 8.0 and 80°C, respectively. The enzyme was stable in pH 8.0~11.0 at 60~80°C. The activity of purified enzyme was inhibited by Pb<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup>. When CGTase was treated with each 20.5 unit, 41 unit, 205 unit and 410 unit to investigate the transglucosylation to stevioside by purified cyclodextrin glucanotransferase, transglucosylation rate to stevioside was 74.9%, 75.7%, 68.7% and 57.9%. Brown effect was observed above the concentration amounting to 205 unit of our CGTase.

---

Key words: *Bacillus* sp., CGTase, Stevioside, transglucosylation

\*Corresponding author