

Bacillus sp. 의 Cyclodextrin Glucanotransferase 生産 및 利用에 관한 연구

吳平洙 · 高星澈 · 徐恒源

太平洋化学(株) 技術研究所 醱酵研究室
(1986년 9월 9일 수리)

The Production of Cyclodextrin Glucanotransferase by *Bacillus* sp. and Its Utilization

Pyong-Su O, Sung-Cheol Koh and Hang-Won Suh

Fermentation Laboratory, R & D Center, Pacific Chemical Ind. Co., Ltd., Suweon Korea
(Received September 9, 1986)

A highly cyclodextrin glucanotransferase producing strain of *Bacillus* sp. was isolated from soil, and basic studies on the characteristics of the strain and its enzyme, conditions for the enzyme production, and the enzyme utilization were carried out. The isolated strain was aerobic, motile, endospore-forming and rod-shaped bacterium. Optimum pH and temperature for the enzyme action were 6.0 and 45°C, and the enzyme was stable within 50°C, and between pH 6.0 and 10.0. The highest yield of the enzyme was obtained using the medium containing 2% corn starch as a carbon source, and 5% corn steep liquor, 0.1% urea and 0.25% ammonium sulfate as nitrogen sources. The fermentation conditions for the enzyme production in a jar fermentor were determined to be 30°C, 200 rpm, 0.6 vvm and 60 hr cultural period. Stevioside transglycosylation catalyzed by this enzyme was identified by high performance liquid chromatography.

Cyclodextrin Glucanotransferase (EC 2, 4, 1, 19; 1, 4- α -D-Glucan 4- α -D-(1, 4 glucano)-transferase, cyclizing; CGTase)는 전분에 작용하여 glucose 6~8 개로부터 cyclodextrin을 합성하거나 또한 이 cyclodextrin을 開環하여 적당한 受容체에 轉移시키는 作用을 하는 酵素이다. Cyclodextrin에 대한 연구는 1800년대 말에 시작되었으나 1900년대에 들어와서 *Bacillus macerans*에 의해 생산되는 C-GTase의 연구가 시작되었는데⁽¹⁾ 주로 cyclodextrin 自体의 物理·化學的 性質에 관한 것이 대부분이었다. 그 후 1970년대에 들어와서 비로소 cyclodextrin의 造製法^(2, 3, 4, 5)과 그것의 성질 및 용도에 관한 연구가 시작되었으나 효소의 精製, 作用特性 및

利用에 관한 연구는 *Bacillus macerans*를 제외하면 별로 이루어지지 않고 있다. 최근에는 새로운 CGTase 생산균주로서 *Bacillus megaterium*⁽⁶⁾, *Bacillus circulans*⁽⁷⁾, *Bacillus stearothermophilus*⁽⁸⁾, *Klebsiella pneumoniae*⁽⁹⁾, 好alkali性 *Bacillus* sp.^(10, 11) 및 *Bacillus coagulans*⁽¹²⁾ 등이 알려져 있다. CGTase의 分泌條件에 관한 연구는 *Bacillus macerans*를 중심으로 진행되어 왔는데⁽¹³⁾,⁽¹⁴⁾ 대체로 이 효소는 배양중의 停滯期나 衰退期에 이른 菌體의 自家分解에 기인하는 것으로 알려져 왔다. 그러나 菌體外 효소인지에 대해서는 명확한 근거가 없어 Lane 및 Pirt 등은⁽¹⁵⁾ 효소생산의 生理的 性質에 대해 조사한 결과 배지내 澱粉이 소모

될 때 급격히 나타나는 菌体外 효소로 규정하였다. 그리고 Nakamura 및 Horikoshi는¹⁶⁾ 好alkali性 *Bacillus* sp.에 의한 CGTase의 생산배지 성분으로서 5% corn steep liquor와 1% soluble starch를 동시에 첨가하는 것이 効果的임을 밝혔다. CGTase의 作用特性은 전분에 작용하여 cyclodextrin을 합성하는 작용, cyclodextrin을 開環하여 受容체에 轉移하는 작용 및 oligosaccharide를 不均化하는 작용으로 나누어 지는데 이러한 성질은 효소의 利用의인 측면에서도 활발히 논의되고 있다^{17, 18)} 특히 최근에는 각종 CGTase에 의한 cyclodextrin의 大量生産을 위한 기초연구로서 膜에 의한 分離 연구가^{19, 20)} 수행되었고, cyclodextrin의 選別生産 條件에 대한 검토도 이루어지고 있다²¹⁾. Cyclodextrin 자체는 다른 물질을 包接하는 能力이 있으므로 不安定性 물질의 安定化, 他物質의 物理的 性質의 改良 등에 이용될 수 있어서 医薬品の 安定劑²²⁾, 食品의 加工劑²³⁾, 및 農藥의 安定劑²⁴⁾, 등으로 使用하기 위한 연구도 수행되고 있다. 또한 이 효소의 轉移作用을 利用한 糖轉移製品에 관한 연구도^{25, 26)} 이루어지고 있다.

본 연구에서는 CGTase 생산균주를 自然界에서 분리하여 酵素生産條件 및 酵素의 特性을 조사하고 이 효소를 이용하여 실제로 stevioside의 糖轉移反應에 適用함으로써 그 産業的 利用 可能性을 檢討하였다.

實驗材料 및 方法

CGTase 생산균주의 분리

분리에 사용된 培地는 Horikoshi¹⁷⁾의 方法을 변형하여 사용하였는데 그 造成은 다음과 같다: glucose 10g, polypeptone 5g, Difco yeast extract 5g, K₂HPO₄ 1g, MgSO₄·7H₂O 0.2g, CaCO₃ 10g, 銜 15g 및 증류수 1l (pH 7.0). 이 중 CaCO₃는 별도로 멸균하여 첨가하였다. 균주의 분리방법은 우선 각 지역에서 채취된 토양 5g을 500ml 멸균수에 현탁시키고 이를 적당한 농도로 희석하여 상기의 배지에 도달한 후 37°C에서 24~48시간 保存하였다. 300개 가량의 콜로니가 나타난 배지에서 각 토양표본별로 수 개씩 순수분리 하였다. 분리된 90여 종의 *Bacillus* sp.를 수분 100%의 5g 밀기울 고체배지에서 48~72시간 배양한 후 50ml의 증류수를 가해 실온에서 2시간 추출하고 원심분리시켜 상등액을 효소액으로 하여 Tilden-Hudson 방법¹³⁾에 따라 cyclodextrin을 形成시키고 이를 trichloroethylene으로 확인하였다. Cyclodextrin형성능력이 가

장 우수한 *Bacillus* sp.-37을 CGTase 생산균주로 선별하였다. 효소생산균주 *Bacillus* sp.-37의 微生物學的 特性은 "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th ed. (1974)"에 준하여 조사하였다.

CGTase力價測定

Nakamura 및 Horikoshi의 方法을¹¹⁾ 변형시켜 측정하였다. 5mM α -cyclodextrin (Sigma Chemical Co., U. S. A.), 25mM sucrose, Somogyi變法¹²⁾에 의한 5 units의 glucoamylase (*Aspergillus usami* 분비) 및 Wohlgemuth改變法¹⁹⁾에 의한 20 units의 α -amylase (*Bacillus subtilis* 분비)를 녹인 0.5ml의 0.2M phosphate buffer (pH 7.0)에 20 μ l의 효소액을 가한 후 45°C에서 20분 동안 반응시켜 포도당을 유리시켰다. 반응 후 5배 희석된 2ml의 3,5-dinitrosalicylic acid 용액¹³⁾으로 반응을 정지시키고 5분간 끓는 물에서 중탕하고 3ml의 물로 채운 다음 510nm에서 흡광도를 측정하였다. 포도당으로 檢量曲線을 작성하고 上記의 조건에서 1분 동안에 포도당 1 μ mole을 생성할 때 효소力價를 1 단위 (unit)로 하였다.

효소생산을 위한 배지조성의 결정

효소생산을 위한 배지의 炭素源을 결정하기 위해 기본배지로서 soybean meal 1%, corn steep liquor 1%, yeast extract 0.5%, ammonium sulfate 0.25%, urea 0.1% 및 calcium carbonate 1%를 사용하였고, 窒素源을 결정하기 위한 기본배지로서는 corn starch 2%, wheat bran 1% 및 calcium carbonate 1%를 사용하였다.

Fermentor 배양

種菌배양 및 fermentor 배양에 사용된 배지 조성은 다음과 같다: corn starch 2%, 밀기울 1%, 대두박 1%, corn steep liquor 5%, yeast extract 0.5%, ammonium sulfate 0.25%, 요소 0.1%, calcium carbonate 1%; pH 7.3. 우선 potato dextrose agar 斜面培地에서 30°C, 48시간 배양된 *Bacillus* sp.-37을 250ml의 액체배지가 든 1l의 삼각플라스크에 접종하여 80 rpm 진탕배양기에서 30°C, 24시간 배양하였다. 이것을 30l의 jar fermentor (Marubishi Co., Ltd., Japan)에 접종하여 배양액 용량은 20l, 배양온도는 30°C, 교반속도는 200 rpm, 通氣量은 0.6 vvm의 조건에서 약 80시간 정도 배양하였다.

粗酵素的 造製

上記의 fermentor 배양조건에서 배양 후 얻은 배양액을 원심분리시켜 고형분을 제거한 다음 상등액의 3배에 해당하는 냉각에탄올을 가해 저온실에

서 하루 동안 방치하였다. 형성된 침전물을 원심분리에 의해 회수하고 이를 냉각야세톤으로 탈수시킨 진공건조기에서 건조하였다.

CGTase에 의한 stevioside의 糖轉移反應

*Stevia (Stevia rebaudiana Bertonii)*의 葉에서 抽出 精製된 stevioside 1g에 20ml의 10% 酒精(Hayashi Pure Chem. Ind., Ltd., Japan) 加水分解物을 가하고 攪고루 혼합하였다. 이 때 酒精가수분해물은 10% 酒精懸濁액(pH 6.0)에 α -amylase(Termamyl 120L; Novo Industri, Denmark)를 酒精의 0.3% (v/w)되게 첨가한 후 90°C에서 30분간 反應시켰었다. 그 다음 121°C에서 10분간 滅菌하고 실온으로 냉각한 다음 0.2%와 0.4%의 CGTase분말을 각각 첨가하여 45°C에서 24시간 反應시킨 후 反應액을 HPLC로 분석하였다. HPLC는 反應액의 0.1% 용액 20 μ l를 Liquid Chromatograph (Model-441, Waters Co., USA)에 注入하여 분석하였다. 이 분석에서는 Carbohydrate Analysis Column (Waters Co., USA)을 사용하였고, 용매는 acetonitrile과 H₂O의 비율을 8:2로 하여 1.5 ml/min의 속도로 流出시켰다. 그리고 214nm에서 RI detector로 糖 質을 측정하였다.

結果 및 考察

CGTase 생산균주의 특성

Table 1. Morphological, cultural and physiological characteristics of the CGTase producing strain, *Bacillus sp.* - 37.

Test for characterization	Identification
Cell morphology	rods
Gram reaction	+
Spore formation	+
Motility	+
Catalase	+
Indole	-
Voges-Proskauer	-
Hydrolysis of starch	+
Hydrolysis of gelatin	+
Gas and acid formation from:	
arabinose	G-/A+*
mannitol	G-/A+
xylose	G-/A+

*G-/A+ indicates acid formation without gas production.



Fig. 1. The phase contrast micrograph of the CGTase producing strain, *Bacillus sp.* - 37 after Gram staining. One scale indicates 1.0 μ m.

분리된 효소생산균주는 好氣性의 胞子 形成能이 우수한 桿狀양성 細菌으로서 운동성이 양호하였고 크기는 0.9~1.0 \times 4~5 μ 였다. 포자는 0.7~1.0 \times 1.1~1.3 μ 크기의 卵形으로 세포의 중앙부에 형성되었다. 이와 같은 사실로 보아 생산균주는 *Bacillus sp.*에 해당되는 것으로 밝혀졌으며 약알칼리성(pH 7.2~8.5)의 배지에서 생장이 양호하였다. 효소생산균주의 형태적, 배양적 및 생리적 특성은 Table 1 및 Fig. 1에 나타난 바와 같다.

CGTase 생산을 위한 배양조건

탄산염(CaCO₃)을 1% 수준으로 처리하여 멸균한 후 배지의 pH를 7.3~7.5로 조정된 뒤 탄소원 및 질소원의 종류가 CGTase 생산에 어떠한 영향을 미치는지를 검토하였다. 탄소원의 종류에 따른

Table 2. Effect of carbon source on the CGTase production by *Bacillus sp.* - 37.

Carbon source*	CGTase (units/ml)
Glucose	-
Sucrose	-
Lactose	-
Maltose	1.5
Dextrin	9.5
Soluble starch	10.0
Corn starch	11.0
None	-

*: Each carbon source was added at 1% level. The basal medium includes 1% soybean meal, 1% corn steep liquor, 0.5% yeast extract, 0.1% urea, 0.25% ammonium sulfate, and 1% calcium carbonate.

- : Not detected.

Table 3. Effect of nitrogen source on the CGTase production by *Bacillus* sp. - 37.*

Nitrogen source	Concentration (%)	CGTase (units/ml)
Yeast extract	2.0	3.0
Poly peptone	2.0	2.0
Casein	2.0	1.4
Defatted soybean meal	2.0	2.5
Corn steep liquor	5.0	12.0
Urea	0.1	3.2
Ammonium sulfate	0.25	4.5
Combination of:		16.7
Corn steep liquor	5.0	
Urea	0.1	
Ammonium sulfate	0.25	
None		0.5

* : The basal medium includes 2% corn starch, 1% wheat bran, and 1% calcium carbonate.

CGTase 생성 정도는 corn starch, soluble starch 및 dextrin 이 가장 양호한 것으로 나타났으나 단당류 또는 이당류는 매우 미약하였다 (Table 2). 이것은 Nakamura 및 Horikoshi가⁽¹⁶⁾ 보고한 결과와 대체로 일치하는 경향이였다. 그리고 균주의 생육 상태는 탄소원 無添加區에 비해 비교적 양호하게 나타났다. Table 3은 Table 2에서 선정된 탄소원을 최적 수준으로 처리하였을 경우 질소원의 종류에 따른 CGTase 생성 정도를 본 것이다. 질소원으로는 단독 처리의 경우 corn steep liquid 5%가 가장 높게 나타났으며 有機 또는 無機 질소원의 단독 처리에 비해서 混用 처리가 효소의 생성 촉진 효과가 있어서 corn steep liquor 5%, 요소 0.1%, 유산 0.25%

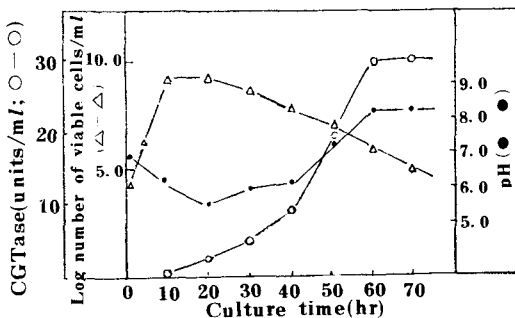


Fig. 2. Time course of CGTase production by *Bacillus* sp. - 37 using 30L jar fermentor. The fermentation was carried out at 30°C, agitation speed, 200 rpm and aeration rate, 0.6 vvm.

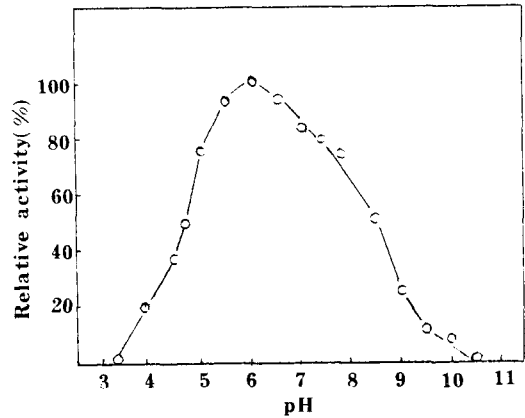


Fig. 3. Effect of pH levels on CGTase activity.

The enzyme and the substrate were suspended in the buffers as following; acetate buffer (pH 3.5-5.5), phosphate buffer (pH 6.0-8.0), and glycine-NaOH buffer (pH 8.5-10.5).

를 동시에 처리한 경우가 16.7 units/ml 로서 가장 역가가 높게 나타났다.

Jar fermentor를 이용한 CGTase 생산

앞에서 결정된 배지 조건 즉 corn starch 2%, 밀기울 1%, corn steep liquor 5%, 요소 0.1% 유산 0.25%, yeast extract 0.5% 및 calcium carbonate 1% (pH 7.3으로 조성)를 사용하여 30l jar fermentor 배양 (working volume, 20l)에서 효소 생산 과정을 조사하였다 (Fig. 2). 균체의 생장은 배양 시작 후 약 15시간이 되면서 최대에 이르렀으며 배양 20시간 이후부터 死滅期로 접어들었다. 배양

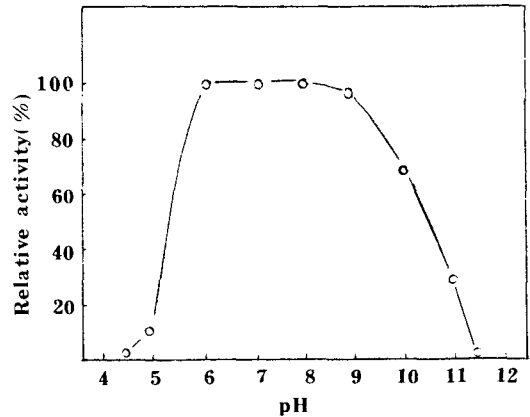


Fig. 4. pH stability of the CGTase expressed as a relative enzyme activity.

The enzyme suspended in the various buffers was incubated at 50°C for 30min and each residual activity was measured at 45°C using phosphate buffer (pH 6.0).

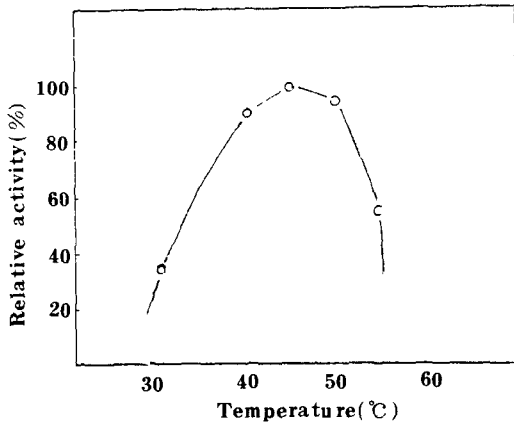


Fig. 5. Effect of reaction temperature on the CGTase activity.

액중의 효소의 역가는 배양 10시간 이후부터 나타나기 시작하여 사멸기인 63시간에서 최대값, 약 30 units/ml를 나타냈는데 이것은 삼각플라스크 진탕 배양에 비해 거의 2 배에 가까운 것이었다. 그리고 이 때의 배양액의 pH는 8.2로서 알칼리성을 나타냈다. 여기서 이 효소는 Lane 및 Pirt가 (15) 보고한 *Bacillus macerans* CGTase와 마찬가지로 처수期에서 약하게 나타났고 死滅期로 갈수록 증가하는 현상을 나타냈다.

효소작용에 대한 pH 및 온도의 영향

효소의 산업적 이용가능성을 검토하고자 30l jar fermentor를 이용하여 얻은 생산균주의 배양액을

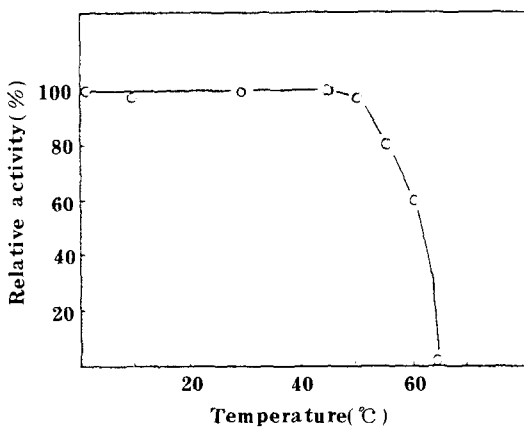


Fig. 6. Thermal stability of the CGTase expressed as a relative enzyme activity.

The enzyme suspended in phosphate buffer (pH 6.0) was incubated at various temperatures for 10min and its residual activity was measured at 45°C.

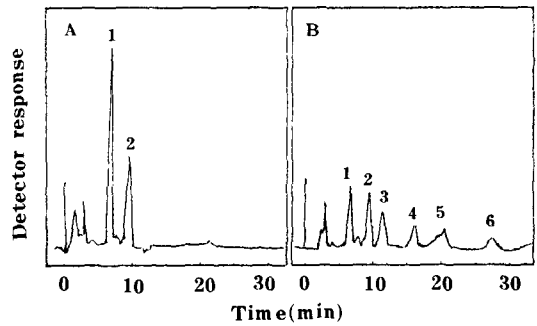


Fig. 7. High performance liquid chromatography of the transfer products obtained after incubation at 45°C for 24 hr of stevioside without the CGTase(A) and with 0.2% CGTase(B) from *Bacillus* sp. - 37: Peak 1, stevioside; 2, rebaudioside A; 3, 4, 5 and 6, the transglycosylated steviosides.

원심분리, 에탄올 침전 후 아세톤으로 건조하여 粗酵素를 얻었다. 이 효소의 최적작용 pH, pH 안정성, 최적작용온도 및 열안정성을 검토한 결과는 다음과 같다.

효소의 최적작용 pH 및 pH 안정성: α-cyclodextrin을 기질로 하여 pH에 따른 상대역가를 측정하였을 경우 pH 6 부근에서 가장 높은 역가를 나타내었다(Fig. 3). 또한 본 효소는 pH 6~10 범위에서 대체로 안정한 것으로 나타났다(Fig. 4).

효소의 최적작용 온도 및 열안정성: 본 효소의 최적작용온도는 45°C 부근으로 나타났으며(Fig. 5), 열안정성을 조사한 결과 50°C까지는 안정한 것으로 나타났다(Fig. 6).

이상의 최적작용조건으로 미루어 보아 본 효소는 中性 CGTase로 생각되는데 이는 Nakamura 및 Horikoshi (16)의 中性 CGTase의 성질과 대체로 일치하는 것으로 나타났다.

CGTase에 의한 stevioside의 糖轉移反應

본 CGTase의 산업적 이용가능성을 검토하고자 본 연구에서는 stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni)의 葉에서 추출·정제한 stevioside의 甘味度 개선을 위한 기초실험을 진행하였다. Stevioside는 化學構造上 2가지의 糖結合部位를 가지고 있다. 따라서 全분加水分解物이나 dextrin등을 donor로 하고 精製된 stevioside를 acceptor로 하여 본 효소를 처리하면 각각의 結合部位에 (α-1,4) glycosidic 결합으로 糖轉移가 일어날 수 있다. Fig. 7은 본 효소 0.2%를 사용하여 stevioside를 10% 全분加水分解物로 당전이 시킨 것을 HPLC로 확인한 것이다. 여기에서는 stevioside 및 rebaudioside A(ch-

romatogram A의 peak 1 및 2)가 糖轉移 steviosides(chromatogram B의 peak 3,4,5 및 6)로 轉移된 모습이 나타나 있다.

要 約

본 연구에서는 CGTase 생산성이 높은 균주인 *Bacillus* sp.를 자연계에서 분리하였고 이 균주의 특성, 분비효소의 특성, 효소의 생산조건 및 효소 이용 가능성에 대한 기초연구를 실시하였다. 분리 균주는 운동성이 있는 内生孢子형성 桿菌이었고 분비효소의 最適作用條件은 pH 6.0, 45°C이며 pH 6~10 범위에서 安定하였다. 효소생산조건은 炭素源으로 corn starch 1%, 窒素源으로서 corn steep liquor 5%, urea 0.1%, ammonium sulfate 0.25%를 동시에 첨가하는 것이 가장 양호하였으며 본 생산균을 30l jar fermentor로 30°C, 200 rpm, 0.6v/v-m에서 60시간 정도 배양하였을 때 최대의 효소 생산력을 나타내었다. 또한 본 효소를 이용하여 stevioside를 acceptor로 하고 澱粉加水分解物을 donor로 하여 糖轉移反應을 실시한 결과 상당한 전이효과가 나타났으므로 기타 轉移製品 및 cyclodextrin 생산에 應用이 가능할 것으로 기대된다.

参考文献

- French, D. : *Adv. Carbohydrate Chem.*, **12**, 189(1957).
- 小林昭一, 貝沼圭二, 鈴木繁男: *澱粉科学*, **21**, 131(1974).
- 小林昭一, 貝沼圭二, 鈴木繁男: *澱粉科学*, **22**, 6(1975).
- 小林昭一, 貝沼圭二, 鈴木繁男: *日農化誌*, **51**, 691(1977).
- Kobayashi, S., K. Kainuma and S. Suzuki: *Carbohydrate Res.*, **61**, 229(1978).
- 岡山茂孝, 津山直人, 北畑寿美雄: *アミラーゼシンポジウム*, **7**, 61(1972).
- 岡山茂孝, 北畑寿美雄: *アミラーゼシンポジウム*, **8**, 21(1974).
- 塩坂誠, 文屋秀雄: *アミラーゼシンポジウム*, **8**, 43(1974).
- Bender, H.: *Arch. Microbiol.*, **111**, 271(1977).
- Nakamura, N. and K. Horikoshi: *Agric. Biol. Chem.*, **40**, 935(1976).
- Nakamura, N. and K. Horikoshi: *Agric. Biol. Chem.*, **40**, 1785(1976).
- Kitahata, S., M. Taniguchi, S.D. Beltran, T. Sugimoto and S. Okada: *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 1441(1983).
- Tilden, E.B. and C.S. Hudson: *J. Bact.*, **43**, 527(1942).
- De Pinto, J.A. and L.L. Campbell: *Biochemistry*, **7**, 114(1968).
- Lane, A.G. and S.J. Pirt: *J. Appl. Chem. Biotechnol.*, **21**, 330(1971).
- Nakamura, N. and K. Horikoshi: *Agric. Biol. Chem.*, **40**, 753(1976).
- 岡山茂孝: *醸酵工学*, **57**, 396(1979).
- 小林昭一, 貝沼圭二: *化学と生物*, **20**, 453(1982).
- 橋本仁, 原耕三, 桑原宣洋, 伊藤嘉吉: *澱粉科学*, **32**, 307(1985).
- 橋本仁, 原耕三, 桑原宣洋, 大木琢二, 石川正樹: *澱粉科学*, **32**, 312(1985).
- 橋本仁, 原耕三, 桑原宣洋, 荒川勝隆: *澱粉科学*, **32**, 299(1985).
- 稲葉光治: *澱粉科学*, **31**, 107(1984).
- 三崎勝: *澱粉科学*, **31**, 98(1984).
- 南手良裕, 勝田純郎: *澱粉科学*, **31**, 112(1984).
- 岡田茂孝, 北畑寿美雄: *日食工誌*, **22**, 420(1975).
- 笠井, 金田, 山崎, 田中, 岡田, 北畑, 古川: *天然薬物の開発と応用シンポジウム要旨集*, **4**(1978).
- Horikoshi, K.: *Agric. Biol. Chem.*, **35**, 1407(1971).
- 小林, 田淵: *日農化誌*, **38**, 171(1954).
- Hagihara, B.: *Ann. Rep. Sci. Osaka Univ.*, **2**, 35(1954).
- Miller, G. L., R. Blum, W. E. Glennon, and A. L. Burton: *Anal. Biochem.*, **2**, 127(1960).