

## 김치 분리균인 *Bacillus* sp. JK-43이 생산하는 Cyclodextrin Glucanotransferase의 생산 및 특성

전홍기<sup>†</sup> · 배경미 · 김영희 · 백형석

부산대학교 생명과학부

### Production and Characterization of Cyclodextrin Glucanotransferase from *Bacillus* sp. JK-43 Isolated from *Kimchi*

Hong-Ki Jun<sup>†</sup>, Kyung-Mi Bae, Young-Hee Kim and Hyung-Suk Baik

Division of Biological Sciences, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

#### Abstract

A bacterial strain, designated as JK-43, producing extracellular cyclodextrin glucanotransferase (CGTase)[EC 2.4.1.19] was isolated from *kimchi*. The CGTase from isolated strain JK-43 showed the transglucosylation activity from soluble starch to L-ascorbic acid (AA) compared to those obtained from other strains. A main product formed by this reaction was identified as 2-O- $\alpha$ -glucopyranosyl L-ascorbic acid (AA-2G) by testing its susceptibility to  $\alpha$ -glucosidase hydrolysis, the HPLC profiles, and through the elementary analysis. The  $\beta$ -CD,  $\gamma$ -CD, potato starch and corn starch were identified to be suitable glucosyl donor for transglucosylation reaction on AA by CGTase. Acceptor specificity on AA-2G production was examined by use of AA, Iso-AA and AA-2P. Transglucosylation was observed toward AA-2P as well as AA and Iso-AA. The microorganism isolated from *kimchi* was identified as a strain of *Bacillus* sp. JK-43 based on the morphological, cultural, biochemical characteristics and partial 16SrDNA sequence analysis. The maximal CGTase production was observed in a medium containing 1.0% soluble starch, 1.0% yeast extract, 1.0% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.1% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, and 0.02% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O with initial pH 7.0. The strain was cultured at 37°C for 26 hrs with reciprocal shaking.

**Key words:** cyclodextrin glucanotransferase (CGTase), *kimchi*, *Bacillus* sp. JK-43, 2-O- $\alpha$ -D-glucopyranosyl L-ascorbic acid (AA-2G)

#### 서 론

김치는 한국인의 식생활에 중요한 전통발효식품으로서 비타민 C, carotenoids와 Ca, Fe, K 등이 풍부하여 오래 전부터 비타민과 무기질의 좋은 공급원으로 이용되어 왔다(1,2). 이밖에도 당과 지방질 함량이 낮고 콜레스테롤의 흡수를 저하시켜 당뇨병 및 혈관 질환에 관련된 성인병 예방에도 효과적이며 유산균에 의한 정장작용 및 식이섬유, 유기산에 의한 변비 및 대장암 예방에도 중요한 역할을 한다(3-7). 뿐만 아니라 본 연구실에 의해 김치내에 인정형 비타민 C로 알려져 있는 2-O- $\alpha$ -D-glucopyranosyl L-ascorbic acid(AA-2G)가 존재한다는 것이 밝혀짐으로 인해 김치의 식품학적 및 영양학적 가치는 더욱 높아졌다(8,9).

L-Ascorbic acid(AA)는 의약품, 식품 및 화장품 등의 분야에서 매우 광범위하게 사용되나(10), 열이나 산화적 분해 그리고 정상세포상태(중성 pH, 37°C)에서 매우 불

안정하다는 것이 결점으로 되어 있는데(11) 이들 결점을 보완하기 위해 지금까지 L-ascorbic acid 2-phosphate(AA-2P)(12,13), L-ascorbic acid 2-sulfate(AA-2S)(14) 및 L-ascorbic acid 2-methyl ether(AA-2M)(15)를 포함한 많은 안정한 유도체들이 연구되어 왔다. 하지만 AA-2S 및 AA-2M은 항괴혈작용과 선유아세포 콜라겐 합성 촉진작용 등의 AA 생리활성을 발휘하지 못하는 단점이 있으며, 또한 AA-2P는 상기 두가지의 생리활성은 보유하고 있는 반면 생체내에서 효소적 탈인산화 반응에 의해 매우 빠른 속도로 분해되어 AA 활성이 세포내에서 지속적으로 유지되기가 어려운 결점을 가지고 있다. 이와는 달리 AA-2G는 AA의 2위치의 OH기가 glucose 1분자에 의해  $\alpha$ -치환된 구조로서 수용액상태에서 열과 산화에 매우 안정하며(16) 항괴혈형 작용, 선유아세포 콜라겐 합성 촉진작용, 백내장예방작용 및 면역촉진작용 등의 AA와 동일한 생리활성을 나타내는 안정형 유도체이다(17-20). 뿐만 아니라 생체투여시  $\alpha$ -glucosidase에 의해 특이적

<sup>†</sup>To whom all correspondence should be addressed

로 AA와 glucose로 분해(21)되므로 AA-2P보다 지속적인 AA 생리활성을 세포내에서 유지(22)할 수 있는 장점을 가지고 있다.

지금까지 밝혀진 연구결과를 통해 AA-2G의 합성이 가능한 효소로 밝혀진 것으로는 포유동물 기원의  $\alpha$ -glucosidase(23), 벼종자 기원의  $\alpha$ -glucosidase[EC 3.2.1.20,  $\alpha$ -D-glucosylhydrolase](16) 그리고 *Bacillus stearothermophilus* 유래 cyclodextrin glucanotransferase[EC 2.4.1.19](24)가 있다. AA-2G를 합성하는 미생물기원 효소인 CGTase는 cyclization 반응, coupling과 disproportionation 반응 그리고 cyclodextrin(CD) 분해반응 등 여러 가지 촉매작용을 동시에 일으키는 효소로서 이들의 대부분은 *Bacillus*속에 의해 생산된다. 지금까지 CGTase에 관한 대부분의 연구는 CD생산에 초점이 맞추어져 있었으나 최근 들어 CGTase의 coupling과 disproportionation 반응, 즉, 전분, CD, maltooligo당 등 당공여체의 말단 당분자를 각종 당수용체에 전이시키는 분자간 당전이 반응을 이용하여 새로운 기능성을 가진 유용 당전이 반응산물을 생산하려는 연구가 활발히 진행되고 있다. CGTase의 당전이 반응을 이용한 산업적 연구에는 coupling sugar의 합성, hesperidin dihydrochalcon의 가용화, glycosyl-xylose의 합성 및 rutin의 가용화 등이 있다.

본 연구실에서는 김치내에 존재하는 AA-2G의 합성에 관여하는 미생물 탐색을 목표로 연구를 수행하여 왔으며, 그 결과 AA-2G 합성능력이 있는 CGTase를 분리하는 *Bacillus*속 세균들을 김치로부터 분리하였다. 전보(25)에서 본 연구자들은 이들 중 *Bacillus* sp S-6이 생산하는 CGTase가 AA-2G를 합성함을 확인하였고, CGTase의 특성과 최적생산조건을 검토하였다. 특히, *Bacillus* sp. S-6이 분리하는 CGTase가  $\alpha$ -CD 뿐만 아니라 soluble starch를 당공여체로 이용하여 AA-2G를 생산할 수 있음을 확인하였다. 전보의 이러한 결과와 AA-2G가 전분이 첨가된 김치에서만 생산되는 연구결과(8)를 종합하면 김치환경내에서의 AA-2G 생산은 전분을 당공여체로 이용한 CGTase 작용에 의한 결과라고 추정된다.

본고에서는 *Bacillus* sp. S-6에 비해 AA-2G를 높은 수율로 합성하는 CGTase 생산균주를 김치로부터 분리 동정하고, 여러 가지 당공여체 및 당수용체에 대한 CGTase의 작용 그리고 CGTase 최적생산조건을 검토하였다. 이러한 연구는 전통적인 자연발효인 김치발효에 관여하는 *Bacillus*속의 구체적인 역할 규명의 기초자료로 이용될 수 있을 것이다.

## 재료 및 방법

### CGTase 생산균주의 분리 및 선정

김치시료를 증류수에 현탁하여 전보(25)와 동일한 분

리용배지에 희석평판법으로 도말한 다음 37°C 항온 배양기에서 2일간 배양시킨 후 노란환을 형성한 colony를 분리하였다. 분리 colony 중 동일 매지에 연속하여 계대배양하면서, 효소 분비량에 비례하는 노란환의 크기가 크고 또한 노란환과 colony의 크기와의 상대비가 큰 균주를 일차적으로 선별하였다.

### 활성확인법

상기의 분리용 배지에서 congo red, methyl orange 및 agar를 제외한 균주분리용 기본배지에 선별된 균주를 배양한 후 3% AA(Junsei Chemical Co)와 7% soluble starch(Yakuri pure chemicals Co)에 1 mL의 배양상등액을 가하여 55°C에서 24시간 동안 반응한 후 30 units glucoamylase(*Rhizopus* mold, Sigma Chemical Co., USA)를 동일 온도에서 24시간 동안 처리하여 L-ascorbic acid 2-O- $\alpha$ -D-oligoglucosides(AA-2Gn)를 분해한 후 AA-2G 생성 유무를 high performance liquid chromatography (HPLC)를 통해 분석하였다. AA-2G standard와 동일한 retention time을 나타내는 peak의 존재여부를 통해 일차적으로 AA-2G임을 확인한 후, AA-2G가 열 및 산화에 안정하고  $\alpha$ -glucosidase에 의해 AA와 glucose로 분해되는 특징을 기반으로 AA-2G임을 검증하였다.

즉, retention time을 통해 AA-2G의 존재가 일차적으로 확인된 반응액에 5 units의 ascorbate oxidase(Sigma Chemical Co., USA)를 첨가하여 25°C, 20분 동안 반응한 후 ascorbate oxidase에 대한 저항성과 100°C, 30분 동안 가열을 통해 열에 대한 안정성을 조사하였다. 또한  $\alpha$ -glucosidase (rice seed, Sigma Chemical Co., USA) 1 unit를 첨가하여 37°C, 30분 동안 반응한 후 분해여부를 조사하였다. HPLC에 의한 반응산물의 분석은 전보(25)에서와 동일한 조건하에서 행하였다.

### 분리균주의 동정

분리균주를 전자현미경으로 형태학적 특성을 관찰하고 각종 매지에서의 배양상의 특성과 생리학적 및 생화학적 특성을 조사하였으며, 분리균주의 16S-rDNA sequence를 조사하여 Gen bank database와 비교분석하였다. 얻어진 실험결과들을 토대로 하여 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 제9판과 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol 2에 따라 균의 동정을 실시하였다.

### CGTase의 활성측정

CGTase 활성은 전보(25)에서와 동일한 방법으로 측정하였으며, CGTase 1 unit는 55°C에서 1분 동안 1  $\mu$ mol의 glucose를 생성하는 효소의 양으로 정의하였다.

균주의 배양 및 조효소액의 조제

효소생산을 위한 배지로는 1.0% soluble starch, 1.0% yeast extract, 1.0% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.1% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.02% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O(pH 7.0)을 사용하였다. 기본배지에서 하룻밤 배양한 분리균주의 종배양액을 1%(v/v)되게 본 배양액에 접종하여 37°C에서 26시간 진탕배양하였다. 배양 후 얻어진 배양액을 4°C에서 원심분리(15,000×g, 20 min)한 후 상층액을 50% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 염석하고 투석하여 사용하였다.

결과 및 고찰

CGTase 생산균주의 분리 및 선정

CGTase 생산균주 선별배지에서 노란색 환이 크게 보이는 균주를 다수 선별하였고, 이들을 액체배양하여 CGTase 역가를 측정된 후 활성이 높은 균주를 선별하여 각각의 분리균주가 생산하는 CGTase의 AA-2G 합성능을 조사하였다. 이들 중 AA-2G 합성 수율이 가장 높은 균주 JK-43을 최종적으로 선별하였다. Fig. 1은 AA, soluble starch 그리고 JK-43균주가 생산하는 CGTase의 혼합반응을 통해 얻어진 반응산물의 HPLC chromatogram이다. JK-43균주는 Fig. 1(a)에서 보는바와 같이 AA-2G standard와

동일한 retention time을 갖는 물질을 생산하였으며, 이로 JK-43균주의 AA-2G 합성능을 일차적으로 확인하였다. 동일한 retention time을 갖는 peak가 AA-2G인 것을 검증하기 위해 자동산화되지 않으며 열에 안정한 AA-2G의 특징적 성질(16)을 기반으로 ascorbate oxidase 및 열에 대한 안정성을 확인하였다. Fig. 1(b)는 (a)에 ascorbate oxidase를 처리한 결과인데, 예상과는 달리 peak의 크기가 (a)보다 감소되었다. (b)의 사라지지 않고 남아 있는 peak는 ascorbate oxidase의 농도 및 반응시간을 증가시킨 경우에도 여전히 저항성을 나타내었으며, (b)의 반응산물은 100°C, 30분 동안 가열한 경우에도 마찬가지로 peak의 크기에 변화가 없음을 알 수 있었다(Fig. 1(c)). 또한 Fig. 1(d)에서 보는 바와 같이 (b)의 반응산물이 α-glucosidase에 의해 glucose와 AA로 분해되는 것을 통해 (b)의 잔존 peak가 AA-2G임을 확인되었다. 이상과 같은 결과를 토대로 JK-43균주가 생산하는 CGTase는 AA-2G를 생산함과 동시에 ascorbate oxidase에 의해 쉽게 산화되는 것으로 보아 AA-6G로 추정되는 물질을 동시에 생산함을 알 수 있었다. AA-6G는 Suzuki 등에 의해 처음으로 *Aspergillus niger* 유래 α-glucosidase의 당전이반응으로 생산되는 것이 보고(26,27)되었으며 정확한 구조동정은 1989년(28)에 이루어졌으나, AA-2G와는 달리 AA의 불안정한 성질이 개선되지 않아 산업적 유용 유도체로서 이용되지 못하였다. AA-2G를 산업적으로 대량생산하기 위해서는 JK-43균주와는 달리 AA의 2번 위치의 OH기에만 특이적 당전이활성을 갖는 CGTase 생산균주의 스크리닝이 요구되며 현재 본 실험실에서 지속적인 균주 탐색이 이루어지고 있다.

분리균주의 동정

분리균주의 형태학적, 배양학적 및 생화학적적 제반 특성은 Table 1과 같다. JK-43은 Gram 양성균의 간균으로 그 크기는 0.6~0.7 μm×2.2~3.1 μm였으며 운동성이 있고 호기성이며 내생포자를 형성하였다(Fig. 2) 고체배지에서의 colony는 미황색으로 둥근형이었고 wetted하며 중앙부가 볼록한 convex형이었다. 또한 catalase, oxidase 양성을 나타내었으며, nitrate를 환원시키지 않는 것으로 보아 혐기성 호흡이 불가능함을 알 수 있었다. 한편, indole test, voges-proskauer test 및 urease test 등은 음성반응을 나타내었다. JK-43균주는 상기의 *Bacillus*속의 특징을 가지고 있었으며, 그 외 배양학적, 생화학적인 여러 가지 특성을 조사하여 Bergey의 Systematic Bacteriology Manual Vol.2 및 Bergey의 Determinative Bacteriology Manual 제9판과 비교 검토하고, JK-43균주의 16S-rDNA sequence를 Gen bank database와 비교한 결과 *Bacillus pumilus*와 90% 이상의 상동성을 보임으로 본 실험의 분리균주인 JK-43을 *Bacillus*속으로 동정하였다.

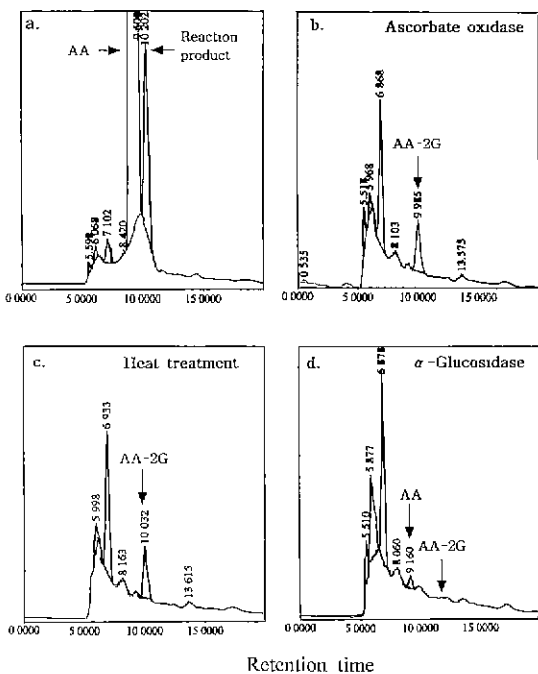


Fig. 1. HPLC profiles of transglucosylation products to AA by CGTase from isolated strain JK-43. AA-2G production was done for 24 hrs as described in Materials and Methods. Then, 30 units of glucoamylase was added to a reaction mixture and incubated overnight at 55°C a No treatment, b. Oxidation by ascorbate oxidase, c. Heat treatment at 100°C for 30 min, d α-Glucosidase hydrolysis

**Table 1. Taxonomical characteristics of the isolated strain JK-43**

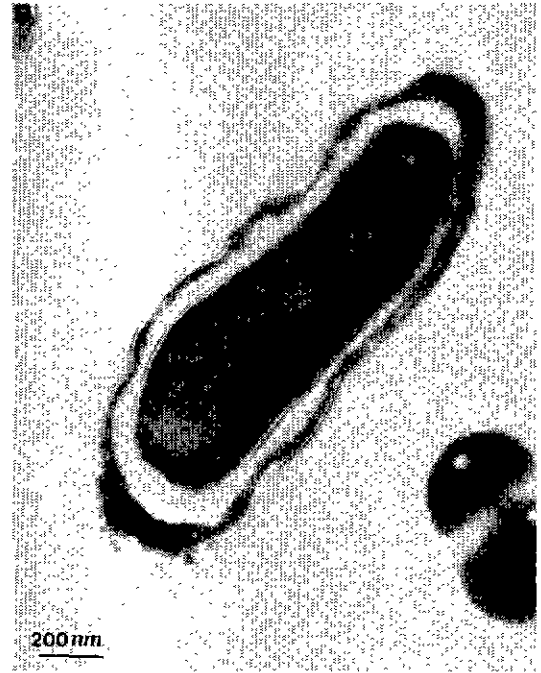
1. Morphological characteristics	
Shape	rod
Cell size (µm)	0.6~0.7×2.2~3.1
Motility	motile
Gram stain	+
Spore formation	endospore forming
2. Cultural characteristics	
Colonies	circular, convex, wetted
Colony surface	entire
Colony color	ivory color
Colony opacity	opaque
3. Biochemical characteristics	
Indole test	-
Voges-Proskauer test	-
Urease test	-
Catalase test	+
Oxidase test	+
Citrate utilization	-
Gelatin hydrolysis	+
Starch hydrolysis	+
Esculine hydrolysis	+
Production of H <sub>2</sub> S	-
Utilization of malonate	-
Utilization of acetamide	-
ONPG	+
Arginine decarboxylase test	-
Lysine decarboxylase test	-
Ornithin decarboxylase test	-
Growth on 0.2% <i>p</i> -coumaric	-
Growth on 0.03% DP300	-
Growth on 0.02% plant indican	-
Oxidation fermentation test	+
Formation of poly-β-hydroxybutyrate	-
Nitrate reduction to nitrite	-

JK-43균주가 전보(25)에서 분리된 *Bacillus* sp. S-6과 동일한 *Bacillus*속 세균임이 확인됨으로서 김치내에서의 AA-2G 생산은 *Bacillus*속 세균이 주로 생산하는 CGTase의 역할 때문인 것으로 추정된다.

#### CGTase 최적생산 조건

##### 탄소원의 영향

CGTase의 생산에 있어 탄소원이 미치는 영향은 매우 중요하다. CGTase 생산균주의 대부분이 단당류 및 이당류에 비해 starch와 같은 다당류에서 높은 효소생산성을 보이는 것으로 알려져 있다(29). 하지만 *B. cereus* NCIMB 13123이 생산하는 CGTase의 경우는 이와는 달리 starch보다 xylose와 glucose에서 높은 효소생산성을 보였다(30). 각종 탄소원 10%를 함유하는 기본배지를 이용, 탄소원의 종류에 따른 JK-43균주의 효소생산량을 비교 검토한 결과 Table 2와 같이 soluble starch에서 가장 높은 효소생산을 보인 반면, glucose, sucrose, xylose 및 maltose와 같은 단당류 및 이당류에서는 전혀 효소를 생산하지 못하였다. 이와 같은 결과는 *B. lentus* 및 *B. circulans*

**Fig. 2. Electron micrographic of the isolated strain JK-43**  
Indicator bar represents 200 nm.**Table 2. Effect of carbon sources on cell growth and CGTase production**

Carbon sources (10%)	CGTase activity (units/mL)	Growth OD <sub>690</sub>
Glucose	0	2.1
Fructose	11.5	0.7
Raffinose	18.0	1.1
Sorbitol	7.5	0.9
Sucrose	0	2.6
Soluble starch	379.3	2.0
Lactose	8.9	2.4
Xylose	0	2.3
Mannitol	8.6	1.5
Tryptone	9.2	2.4
Mannose	5.3	1.5
Maltose	0	2.3
Dextrin	43.8	1.5
Inositol	7.2	2.3

var *alkalophilus* ATCC 21783의 CGTase가 단당류 및 이당류보다 starch에서 높은 효소생산성을 나타낸 결과(31)와는 일치한 반면 전보(25)의 *Bacillus* sp. S-6균주가 soluble starch 뿐만 아니라 단당류인 glucose에서도 높은 효소생산성을 나타낸 것과는 상이한 결과이다.

한편, soluble starch 농도에 따른 효소 생산은 *Bacillus* sp. S-6이 0.5%에서 최적농도를 나타낸 것과는 달리 1% 일 때 445 unit/mL로 가장 높은 효소생산을 보였다.

##### 질소원의 영향

10%의 soluble starch가 들어있는 기본배지에 무기질

소원  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{KNO}_3$  및  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 과 유기질소원(bactopeptone, bactotryptone, peptone, polypeptone, yeast extract 및 beef extract)의 CGTase 생산에 미치는 효과를 조사한 결과 대체로 유기질소원이 무기질소원에 비해 높은 생산량을 보였으며, 특히 yeast extract가 332.1 units/mL로 다른 질소원에 비해 월등한 효소생산성을 보였다 (Table 3). Yeast extract의 농도를 0.2~2.0%까지 0.2% 간격으로 농도를 조절하여 효소 생산성을 검토한 결과 *Bacillus* sp. S-6(25)과 마찬가지로 1.0% 농도에서 514.2 units/mL로 가장 높은 결과를 보였다.

무기염의 농도에 따른 영향

CGTase 생산을 위한  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  및  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 의 농도의 영향은 1.0% soluble starch와 1.0% yeast extract가 함유된 효소생산매지에  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 와  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 의 농도를 각각 0.0~1.2%, 0.0~0.15%로 조절하여 37°C에서 24시간 진탕배양하여 조사하였다 그 결과 1.0%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 0.1%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 에서 각각 590.2 units/mL, 449.1 units/mL로 가장 좋았다. CGTase를 생산하는 호알칼리성 세균의 경우는  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$  그리고  $\text{CaCO}_3$  등과 같은 탄산염이 CGTase 생산에 필수적인 것으로 보고되어 있다(32-34). JK-43은 호알칼리성은 아니지만  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 가 첨가되었을 때 월등히 높은 효소생산성을 보였다

한편,  $\text{MgSO}_4$ 의 농도를 0.01~0.06%까지 조절하여 효소생산성을 검토한 결과 0.02%의 농도에서 효소생산량이 488.4 units/mL로 최대를 나타내었다.

pH 및 배양온도의 영향

효소생산 최적배지의 초기 pH가 효소생산량에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 4와 같으며 세포생육 및 효소생산량이 모두 pH 7.0에서 가장 높았다 pH 7.0을 제외한 나머지 pH에서의 효소생산은 현저하게 감소하였다. 이러한 결과는 *B. macerans* ATCC 8514(35), *B. megaterium* No.5(36) 및 *B. cereus* NCIMB 13123(30)이 pH 7.0에서 최고의 효소생산을 보인 것과는 일치하는 반면, *Bacillus* sp S-6(25)이 pH 7.0 뿐만 아니라 pH 8.0 및 9.0에

Table 3. Effect of nitrogen sources on CGTase production

Nitrogen sources (1.0%)	CGTase activity (units/mL)	Growth (OD <sub>660</sub> )
Bacto tryptone	556	1.5
Bacto peptone	124.4	1.9
Peptone	81.8	1.8
Polypeptone	137.8	2.0
Yeast extract	332.1	2.2
Beef extract	0	0.6
Polypeptone+Beef extract	9.2	0.9
Beef extract+Yeast extract	51.5	0.9
Yeast extract+Polypeptone	132.6	1.3
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	84.7	1.3
$\text{KNO}_3$	19.5	1.4
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	52.4	0.8

Table 4 Effect of initial pH of medium on CGTase production

Initial pH	CGTase activity (units/mL)	Growth (OD <sub>660</sub> )
5	15.4	0.5
6	23.5	0.7
7	561.2	2.3
8	66.2	0.9
9	38.1	0.7
10	24.6	0.5

서 높은 효소 생산성을 보인 것과는 상이한 결과이다. 한편, 배양온도에 따른 효소생산량은 Table 5에 나타난 바와 같이 *Bacillus* sp. S-6, *B. macerans* IFO 3490(36) 및 *B. halophilus* INMMIA 3849(37)와 동일하게 37°C에서 최고의 효소 생산량을 보였다

배양시간에 따른 효소 생산성

Fig. 3은 효소생산용 최적배지에서의 균체의 증식, CGTase 생산 그리고 배양액의 pH 변화를 나타낸 것이다. 균체의 증식은 접종후 수시간 후부터 차츰 증가하기 시작하여 26시간에 최대생장을 보였으며 그 이후에 정지기로 들어갔다 CGTase 생산균주들 중 다수가 starch를 탄소원으로 하였을 때 40~50시간 이후인 정지기에 주로 최대 효소생산성을 보이는 것(29)과는 달리 JK-43의 CGTase는 12시간부터 26시간까지 효소 생산이 급격히 증가하였으며, 26시간에 균체의 증식과 마찬가지로 최대 효

Table 5. Effect of temperature on CGTase activity production

Temperature (°C)	CGTase activity (units/mL)	Growth (OD <sub>660</sub> )
25	23.6	0.8
30	65.3	1.5
37	566.8	1.8
40	278.4	1.2
50	112.7	1.0

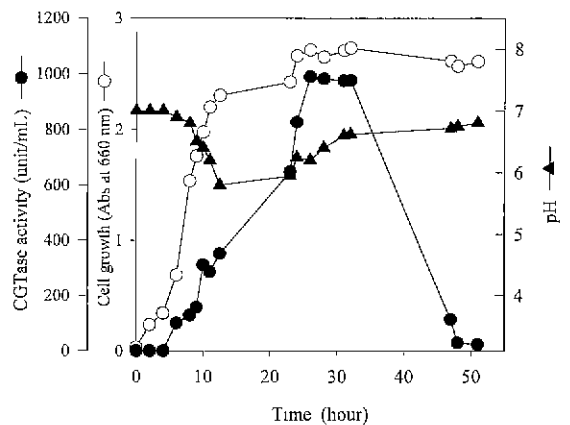


Fig. 3. Time courses of CGTase production and cell growth by *Bacillus* sp. JK-43 at optimum culture condition.

소생산성을 보였다. 한편, pH의 변화는 대수증식기때 감소하다가 정지기 이후 점차 증가하여 이후에는 거의 일정하였다.

#### 통기량의 변화에 따른 영향

CGTase 생산을 위한 최적조건을 설정하기 위하여 500 mL shaking flask에 배지를 50~300 mL까지 첨가하여 37 °C에서 26시간 배양하여 균의 생육도와 CGTase 활성을 측정하여 통기량의 영향을 검토하였다. 그 결과 배양배지는 50 mL 첨가하였을 때 592.2 units/mL로 가장 높은 효소 생산성을 보여 aeration이 잘 될수록 *Bacillus* sp. JK-43이 보다 효율적으로 CGTase를 생산함을 알 수 있었다. 이상의 배양조건을 검토한 결과 CGTase 생산을 위한 최적 배양 조건을 Table 6과 같이 설정하였다

#### 각종 당공여체에 따른 AA-2G 생산성 검토

JK-43이 생산하는 CGTase의 다양한 당공여체에 대한 AA-2G 생산성을 조사하였다 그 결과 Fig. 4에 나타난 바와 같이  $\beta$ -CD,  $\gamma$ -CD, potato starch 그리고 corn starch에서 높은 AA-2G 생산성을 보였으며, glucose 및 maltose와 같은 단·이당류에서도 비교적 AA-2G 생산수율이 높았다 이러한 결과는  $\alpha$ -CD에서 최대 생산량을 보인 반면 glucose에서는 전혀 AA-2G를 생산하지 못한 *B. stearothermophilus*의 CGTase와는 상이한 결과이다(24, 38). 특히, JK-43은 식혜제조폐액인 엿기름 당화액(diastatic solution from malt, hexose 농도 : 74 mg/mL) 및 밥 당화액(diastatic solution from rice, hexose 농도 : 26 mg/mL)에서도 비교적 높은 AA-2G 생산성을 보여 AA-2G의 대량생산시에 식혜제조폐액을 이용할 수 있는 가능성이 확인되었다. 이러한 식혜제조폐액의 이용은 AA-2G의 대량생산에 있어 원료의 단가절감에 크게 기여할 것이다.

한편, AA, Iso-AA 및 AA-2P를 사용하여 AA-2G 생산에 대한 당수용체 특이성을 조사하였다(Table 7). JK-43의 CGTase는 AA와 Iso-AA에서 뿐만 아니라 AA-2P에서도 당전이 반응을 촉매하였으며, 이러한 결과는 JK-43이 AA의 2번 위치 이외의 다른 부위에도 당전이 활성을 가지고 있음을 시사한다.

Table 6. The optimum culture condition for CGTase production

Medium (g/L)	
Soluble starch	10.0
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> · 7H <sub>2</sub> O	0.2
pH	7.0
Other conditions	
Temperature	37°C
Culture time	26 hrs
Agitation	120 Rev. × 6 cm stroke, 50 mL of medium per 500 mL flask

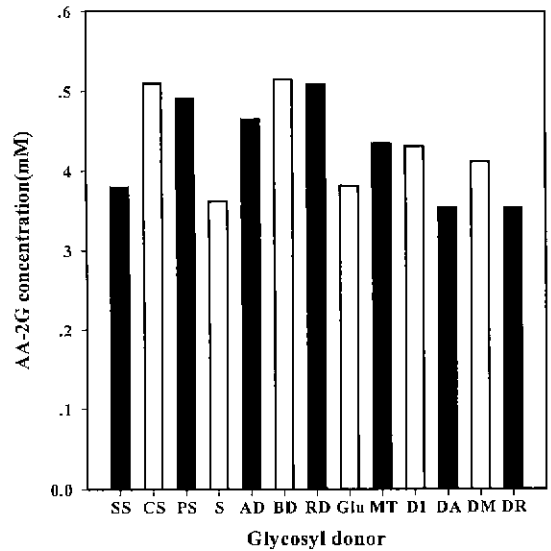


Fig. 4. Glycosyl donor specificity for AA-2G production. 2 mL of reaction mixture consisting of 3% of AA, 7% of glycosyl donor and 244 units of CGTase was incubated at 55°C, pH 5.5, for 24 hrs. AA-2Gs were hydrolyzed by glucoamylase, and HPLC analysis was done with the  $\mu$ Bondapak C<sub>18</sub> column. SS, Soluble starch; CS, Corn starch; PS, Potato starch; S, Starch; AD,  $\alpha$ -Cyclodextrin; BD,  $\beta$ -Cyclodextrin; RD,  $\gamma$ -Cyclodextrin; Glu, Glucose; MT, Maltose; DI, Dextrin; DA, Dextran; DM, Diastatic solution from malt; DR, Diastatic solution from rice

Table 7. Acceptor specificity of CGTase on AA-2G production

Acceptor	Retention time <sup>1)</sup> of acceptor (min)	Retention time <sup>1)</sup> of new product (min)	Amount of new product
AA	7.230	7.782	36.9 mg%
Iso-AA	7.438	7.785	89.8 mg%
AA-2P	6.820	7.223	72.2 mg%

2 mL of reaction mixture consisting of 7% of soluble starch, 3% of glycosyl acceptor and 244 units of CGTase was incubated at 55°C, pH 5.5, for 24 hrs. Then, 30 units of glucoamylase was added to a reaction mixture and incubated at 55°C for 24 hrs.

<sup>1)</sup>Retention time on HPLC.

#### 당전이 반응에서의 당수용체의 특이성

Table 8은 soluble starch를 당공여체로 하였을 때 당전이 반응에서의 JK-43의 당수용체들에 대한 당전이 반응성을 검토한 것이다. Table 8에서 보는 바와 같이 sucrose, inositol 그리고 mannitol에서 매우 높은 당전이 수율이 70~90%를 나타낸 반면 glucose, xylose, sorbose 및 ribose의 당수용체에는 그다지 당전이수율이 높지 않았다. 특히, fructose, maltose, sorbitol 그리고 lactose에서는 전혀 당전이 반응이 일어나지 않아 JK-43이 생산하는 CGTase는 이러한 당들을 당수용체로 이용하지 못함을 알 수 있었다. 이러한 결과는 *B. firmus*의  $\beta$ -CGTase가 maltose에서 50.88%정도의 비교적 높은 당전이 수율

**Table 8. Acceptor specificity for transglycosylation reaction of CGTase from *Bacillus* sp. JK-43**

Acceptor (5%, w/v)	Conversion yield (%)	Acceptor (5%, w/v)	Conversion yield (%)
Glucose	15.1	Inositol	88.9
Xylose	5.0	Mannitol	77.1
Fructose	N.D	Mannose	44.2
Sorbose	3.7	Arabinose	22.2
Maltose	N.D	Lactose	ND
Sucrose	71.1	Raffinose	52.8
Sorbitol	N.D	Ribose	14.8

Reactions were carried out at 50 g/L of each acceptor, 50 g/L of soluble starch as glycosyl donor, pH 7.0, 55°C, for 2 hours. Degrees of transglycosylation were estimated by the decrease of each acceptor. N.D., not detected.

을 보인 반면 inositol 및 sucrose에서 매우 낮은 당전이 수율을 보인 것(39)과는 상이한 결과이다.

**요 약**

김치 시료로부터 자동산화되지 않으며 열 및 중성 pH에서 안정한 AA 유도체인 AA-2G를 생산할 수 있는 당전이활성을 가진 CGTase 생산균주를 분리하였고, 분리균주의 형태학적, 배양학적, 생리학적 성질 및 16s-rDNA sequences를 조사한 결과 그람 양성균의 간균으로 호기성이며 내생포자를 형성하는 전형적인 중온성 *Bacillus* sp. JK-43으로 동정되었다. *Bacillus* sp. JK-43의 CGTase는 AA-2G 뿐만 아니라 AA-6G로 추정되는 물질을 함께 생산하였으며, 효소 최적생산조건은 1.0% soluble starch, 1.0% yeast extract, 1.0% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.1% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 그리고 0.02% MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O가 함유된 배지에서 pH 7.0, 37°C에서 26시간 동안 진탕배양하였을 때였다. 각종 당공여체에 따른 *Bacillus* sp JK-43의 AA-2G 생산성을 조사한 결과 β-CD에서 가장 높은 AA-2G 생산성을 보였으며, 식해제조페락틴 엿기름 및 발당화액에서도 비교적 높은 AA-2G 생산성을 보였다. 또한 여러 가지 당수용체에 대한 JK-43의 CGTase의 당전이 반응을 검토한 결과 sucrose, mannitol 및 inositol에서 높은 당전이 수율인 70~90%를 나타내었다.

**감사의 글**

본 연구는(1998)년 한국학술진흥재단의 학술 연구비와 한국과학재단 특정기초연구비(1999-2-211-001-3)에 의한 연구결과의 일부로서 지원하여 주심에 감사드립니다.

**문 헌**

1. Cheigh, H.S. and Park, K.Y. : Biochemical, microbiological, and nutritional aspects of *kimchi* (Korean fermented vegetable products). *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*,

342, 175-203 (1994)

2. Lee, S.W. and Woo, S.J. : Effect of some materials on the content of nitrate, nitrite and vitamin C in *kimchi* during fermentation. *Korean J. Diet. Cult.*, 4, 161-168 (1989)

3. 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. *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 20, 102-109 (1992)

4. 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, 121-128 (1997)

5. Park, K.Y. : The nutritional evaluation and antimutagenic and anticancer effects of *kimchi*. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, 24, 169-182 (1995)

6. 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, 563-568 (1997)

7. Lee, K.I., Jung, K.O., Rhee, S.H., Suh, M.J. and Park, K.Y. : A study on buchu (*Leek, Allium odorum*) *kimchi* - Changes in chemical, microbial, sensory properties, and antimutagenicity of buchu *kimchi* during fermentation. *J. Food. Soc. Nutr.*, 1, 23-29 (1996)

8. Jun, H.K., Bae, K.M., Kim, Y.H. and Cheigh, H.S. : Formation of a L-ascorbic acid 2-O-α-glucoside during *Kimchi* fermentation. *J. Food. Sci. Nutr.*, 3, 225-229 (1998)

9. Jun, H.K., Bae, K.M. and Kim, Y.H. : Identification of L-ascorbic acid 2-O-α-glucoside, a stable form of ascorbic acid, in *kimchi*. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 8, 710-713 (1998)

10. Lyons, B.L. and Schwarz, R.J. : Ascorbate stimulation of PAT cells causes an increase in transcription rates and a decrease in degradation rates of procollagen mRNA. *Nucleic Acids Res.*, 12, 2569-2579 (1984)

11. Tolbert, B.M., Downing, M., Carlson, R.W., Knight, M.K. and Baker, E.M. : Chemistry and metabolism of ascorbic acid and ascorbate sulfate. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 258, 48-69 (1975)

12. Cnatl, J., Cinatl, J., Weber, B., Rabenau, H., Gumbel, H.O., Chenot, J.F., Scholz, M., Encke, A. and Doerr, H.W. : *In vitro* inhibition of human cytomegalovirus replication in human foreskin fibroblasts and endothelial cells by ascorbic acid 2-phosphate. *Antiviral. Res.*, 27, 405-418 (1995)

13. Mima, H., Nomura, H., Imai, Y. and Takashima, H. : Chemistry and application of ascorbic acid phosphate. *Vitamin*, 41, 387-398 (1970)

14. Mead, C.G. and Finamore, F.J. : The occurrence of ascorbic acid sulfate in brine shrimp, *Artemia salina*. *Biochemistry*, 8, 2652-2655 (1996)

15. Lu, P.W., Lillard, Jr. D.W., Seib, P.A., Kramer, K.J. and Liang, Y.T. : Synthesis of the 2-methylether of L-ascorbic acid : stability, vitamin activity, and carbon-13 nuclear magnetic resonance spectrum compared to those of the 1- and 3-methyl ethers. *J. Agric. Food Chem.*, 32, 21-28 (1984)

16. Yamamoto, L., Muto, N., Murakami, K., Suga, S. and Yamaguchi, H. : L-Ascorbic acid α-glucoside formed

- by resioselective transglucosylation with rat intestinal and rice seed  $\alpha$ -glucosidase. its improved stability and structure determination *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 3020-3023 (1990)
17. 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**, 2191-2197 (1992)
  18. 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**, 235-245 (1992)
  19. 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**, 871-877 (1992)
  20. Yamamoto, I., Suga, S., Mitoh, Y., Tanaka, M. and Muto, N. : Antiscorbatic activity of L-ascorbic acid 2-glucoside and its availability as a vitamin C supplement in normal rats and guinea pigs. *J. Pharmacobiodyn.*, **13**, 688-695 (1990)
  21. Muto, N., Nakamura, T. and Yamamoto, I. : Enzymatic formation of a non-reducing L-ascorbic acid  $\alpha$ -glucoside : purification and properties of  $\alpha$ -glucosidase catalyzing site-specific transglucosylation from rat small intestine. *J. Biochem.*, **107**, 222-227 (1990)
  22. Muto, N., Terasawa, K. and Yamamoto, I. : Evaluation of ascorbic acid 2-O- $\alpha$ -glucoside as vitamin C source : Mode of intestinal hydrolysis and absorption following oral administration. *Int. J. Vit. Nutr. Res.*, **62**, 318-323 (1992)
  23. Yamamoto, I., Muto, N., Nagata, E., Nakamura, T. and Suzuki, Y. : Formation of a stable L-ascorbic acid  $\alpha$ -glucoside by mammalian  $\alpha$ -glucosidase-catalyzed transglucosylation. *Biochem. Biophys. Acta*, **1035**, 44-50 (1990)
  24. Hajime, A., Masaru, Y., Shuzo, S. and Itaru, Y. : Synthesis of 2-O- $\alpha$ -D-glucopyranosyl L-ascorbic acid by cyclomaltodextrin glucanotransferase from *Bacillus stearothermophilus*. *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 1751-1756 (1991)
  25. Jun, H.K., Jo, Y.B., Kim, S.J. and Bae, K.M. : Some properties and optimal culture conditions of cyclodextrin glucanotransferase of *Bacillus* sp. S-6 isolated from *kimchi* *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **27**, 609-617 (1998)
  26. Miyake, T. and Suzuki, Y. : Enzymatic formation of new L-ascorbic acid glucosidase (in Japanese). *Vitamins*, **43**, 205-209 (1971)
  27. Suzuka, Y., Miyake, T., Uchida, K. and Mino, A. : Biosynthesis of ascorbic acid glucoside (in Japanese). *Vitamins*, **47**, 259-267 (1973)
  28. Suzuki, Y. and Uchida, K. : Enzymatic formation of L-glucosylascorbic acid (in Japanese) *Vitamins*, **63**, 5-197 (1989)
  29. Tonkova, A. : Bacterial cyclodextrin glucanotransferase. *Enzyme Microb. Technol.*, **22**, 678-686 (1998)
  30. Jamuna, R., Saswatbi, N., Sbeela, R. and Ramakrishna, S.V. : Synthesis of cyclodextrin glucosyltransferase by *Bacillus cereus* for the production of cyclodextrins *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **43**, 163-176 (1993)
  31. Paloheimo, M., Haglund, D., Aho, S. and Korhola, M. : Production of cyclodextrin glucanotransferase of *Bacillus circulans* var *alkalophilus* ATCC21783 in *B. subtilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **36**, 584-591 (1992)
  32. Fujita, Y., Tsubouchi, H., Lnagi, Y., Tamita, K., Ozaki, A. and Nakanishi, K. : Purification and properties of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus* sp. AL-6 *J. Ferment. Bioeng.*, **70**, 150-154 (1990)
  33. Nakamura, N. and Horikoshi, K. : Characterization and some cultural conditions of a cyclodextrin glycosyltransferase-producing alkalophilic *Bacillus* sp. *Agric. Biol. Chem.*, **40**, 753-757 (1976)
  34. Nakamura, N. and Horikoshi, K. : Production of Schar-dinger  $\beta$ -dextrin by soluble and immobilized cyclodextrin glycosyltransferase of an alkalophilic *Bacillus* sp. *Biotechnol. Bioeng.*, **19**, 87-99 (1977)
  35. DePinto, J.A. and Campbell, L.I. : Purification and properties of the amylase of *Bacillus macerans* *Biochemistry*, **7**, 114-120 (1968)
  36. Kitakata, S., Tsuyama, N. and Okada, S. : Purification and some properties of cyclodextrin glycosyltransferase from a strain of *Bacillus* species *Agric. Biol. Chem.*, **38**, 387-393 (1974)
  37. Abehan, V.A., Adamian, M.O., Abehan, L.A., Balayan, A.M. and Alrikian, E.K. : A new cyclomaltodextrin glucanotransferase from halophilic *Bacillus* (in Russian). *Biokhimiya*, **60**, 891-897 (1995)
  38. Mari, T., Norio, M. and Itaru, Y. : Characterization of *Bacillus stearothermophilus* cyclodextrin glucanotransferase in ascorbic acid 2-O- $\alpha$ -glucoside formation *Biokhimiya. Biophysica Acta*, **1078**, 127-132 (1991)
  39. Shin, H.D., Chan, K. and Lee, Y.H. : Purification and characterization of  $\beta$ -cyclodextrin glucanotransferase excreted by *Bacillus firmus* var. *alkalophilus* *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **26**, 323-330 (1998)

(1999년 11월 13일 접수)