

Cyclodextrin Glucanotransferase 고생산 호알칼리성 세균의 탐색과 분비 효소의 특성

도은주 · 박종부 · 이용현*
경북대학교 자연과학대학 유전공학과

Screening of Alkalophilic *Bacillus* sp. for Overproduction of Cyclodextrin Glucanotransferase and Its Enzymatic Properties

Do, Eun-Ju, Jong-Bu Park and Yong-Hyun Lee*

Department of Genetic Engineering, College of Natural Sciences
Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea

Abstract — An alkalophilic microorganism for overproduction of cyclodextrin glucanotransferase (CGTase) was newly isolated from hot-water spring soil, and identified as *Bacillus firmus* var. *alkalophilus* H609. The strain maintained stability during preservation and cultivation for the enzyme production, and produced significant amount of CGTase corresponding to the volumetric activity of 75 units/mL at 37°C, initial pH of 11.2, and after 40 hours. The strain excreted several different proteins showing CGTase activity that catalyzed the formation of mainly β - and γ -type cyclodextrin (ratio of 7:1) from soluble starch without accumulation of α -type. Other enzymatic properties were also investigated.

Cyclodextrin glucanotransferase (EC 2.4.1.19 ; 1,4- α -D-glucan-4- α -D-(1,4-glucano) transferase, cyclizing ; CGTase)는 전분에 작용하여 6개 이상의 glucose가 α -1,4 결합으로 연결된 비환원성 환상당류인 cyclodextrin(CD)을 합성하거나 또는 합성된 CD를 개환하여 적당한 수용체에 전이시키는 작용을 촉매하는 효소이다. 생산균주로는 *Bacillus macerans*, *B. circulans*, *B. megaterium*, *B. ohbensis*, *B. licheniformis*, *B. stearothermophilus*, *Klebsiella pneumonia*와 같은 중성세균과, 주로 *Bacillus*속인 호알칼리성 세균등이 보고되고 있으며(1, 2), 호알칼리성 *Bacillus*속 세균이 생산하는 CGTase는 주로 β -CD를 합성하는 것으로 알려져 있다(3).

고역가 CGTase 분비 균주 탐색에 관한 연구는 국내외에서 많이 수행되어져 왔고, 특히 국내에서는 오평수 등(4)과 안중훈 등(5)이 중성 또는 중성 호열성

세균, 이용현 등(6), 유주현 등(7), 그리고 박천석 등(8)이 호알칼리성 CGTase 생산 균주의 탐색에 관한 연구를 수행한 바 있다.

본 연구실에서는 호알칼리성 균주의 탐색(6), 분쇄 마찰매체함유 효소반응기를 이용한 CD의 생산(9), extruded 전분을 이용한 불균일상 효소반응계를 이용한 CD의 직접생산(10), 고정화 CGTase를 이용한 CD 생산(11), 그리고 maltosyl- β -CD의 생산에 관한 연구(12) 등 CD의 산업적 생산을 위한 일련의 연구를 수행해 오고 있다. CD의 산업적 생산을 위해서는 CGTase의 생산능이 높고 또한 안정성이 우수한 생산균주의 확보가 요망된다.

본 연구실에서는 균주탐색에 관한 연구를 전보(6)에 이어 계속하여 수행해 왔고, 최근 CGTase 생산성과 안정성이 뛰어난 산업적 활용 가능성이 큰 신규 호알칼리성 *Bacillus*속의 균주를 새로이 탐색·동정하였으며, 그 효소적 특성을 규명하였기에 이에 보고하는 바이다.

Key word: Screening, alkalophilic *Bacillus* sp., cyclodextrin glucanotransferase, β -cyclodextrin.

*Corresponding author

호알칼리성 균주의 분리·선별

온천 지역의 토양 시료를 증류수에 현탁하여 phenolphthalein과 methyl orange를 함유하는 선별 배지(13)에서 1일간 배양한 후 노란환을 형성한 colony를 선별하였다. 전보(6)와는 달리 선별 colony 중 안정성과 효소의 역가가 높은 균주를 확보하기 위해 동일 배지에 7~8회 연속하여 계대배양하면서, 효소 분비량에 비례하는 노란환의 크기가 크고 또한 노란환과 colony의 크기와의 상대비가 큰 500여 주를 선별하였다. 선별된 균주를 soluble starch를 탄소원으로 하는 알칼리성 액체배지에 접종하여 진탕배양한 후 CGTase 활성이 가장 우수한 호알칼리성 세균 H609를 최종적으로 선별하였다.

선별균주의 동정

선별된 균주는 Alkalophilic Microorganism(14)과 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology(15)에 제시된 방법에 따라 형태학적, 배양학적, 생리·생화학 특성 및 DNA 염기 조성등을 조사·검토하였으며 그 결과는 Table 1과 같다.

형태학적 특성: 분리 균주는 Fig. 1에서와 같이 Gram 양성의 막대모양으로 그 크기는 $0.6 \mu\text{m} \times 2.5 \sim 3.0 \mu\text{m}$ 였고, 여러개의 극편모를 가지고 있었으며, 운동성이 있었고, 또한 내생포자를 형성하였다. Colony는 미황색으로 raised, entire smooth한 표면을 이루고 있었다.

배양학적 특성: 분리 균주는 초기 배지 pH 7.0에서 12.0까지의 넓은 pH 영역에서 생육 가능하였으나 pH 7.0 미만에서는 생육하지 않았다. 최적 생육 pH는 pH 조절제로 사용하는 Na_2CO_3 1%에 해당하는 pH인 10.0~11.0 사이였고, 최적 배양온도는 37°C 였으나 30°C 와 45°C 에서도 잘 생육하였다. 또한 Horikoshi 등(14)이 선별한 비교 균주인 *Bacillus* sp. ATCC 21783이 5%의 NaCl에 의해 생육의 저해를 강하게 받는 것과는 달리 11%의 NaCl이 포함된 배지에서도 생육의 저해를 전혀 받지 않는 강한 내염성을 보였다. 균체의 대수증식기에서 mass doubling time은 3.28 시간이었다.



Fig. 1. Scanning electron microscopic photograph of the alkalophilic *Bacillus* sp. H609.

Table 1. The morphological, cultural and biochemical characteristics of the alkalophilic *Bacillus* sp. H609

1. Morphological characteristics			
Form	Rod	Gram stain	+
Size	$(0.55-0.65 \mu\text{m}) \times (2.5-3.0 \mu\text{m})$	Spore formation	+
Motility	Motile		
2. Cultural characteristics			
Strictly aerobic		Glucose-nutrient broth	+
Pigment	+	Glucose-nutrient agar	+
pH for growth	pH 7~12.0	Glucose-asparagine agar	+
Temperature for growth	$30 \sim 40^\circ\text{C}$	Acid-fast test	-
NaCl tolerance	<11%		
3. Biochemical characteristics			
Voges-Proskauer test	-		
Utilization of citrate	+	Utilization of glycine	+
Utilization of glycerin	+	Utilization of cellobiose	+
Utilization of lactose	+/-	Utilization of fructose	+
Hydrolysis of casein	+	Hydrolysis of starch	+
4. G+C molar %			
	44%		

생리 및 생화학적 특성 : 분리 균주는 절대 호기성 으로서 catalase 양성반응을 나타내었으며, nitrate를 환원시키지 않는 것으로 보아 혐기성 호흡이 불가능함을 알 수 있었다. 한편 Voges-Proskauer 시험에는 음성, Indole 생성, glucose로부터 gas의 생성능은 관찰되지 않았으나, starch와 casein의 분해능은 있었다.

DNA 염기 조성 : 분리균주의 DNA 염기조성은 Tamaoka 등(16)의 방법을 따라 조사한 결과 G+C content는 44(G+C)mol%였다.

위에서 관찰한 균주의 특성을 종합한 결과 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology(14)에 제시된 *Bacillus firmus*와 성장 최적 pH는 달랐으나 이를 제외한 형태적, 생리적 특성, G+C content 및 기타 특성이 거의 일치하였으므로 *Bacillus firmus* var. *alkalophilus* H609로 동정·명명하였다.

*Bacillus firmus*에 관해서는 균체의 성장 및 알칼리성 pH에 대한 항상성의 유지와 이를 위한 Na⁺의 요구성에 관한 보고(17) 등이 있다. 그러나 지금까지 이 균주가 CGTase를 생산한다는 보고는 없어 CGTase를 생산하는 새로운 호알칼리성 *Bacillus firmus* 종으로 사료된다.

선별균주의 효소 생성양상과 생산 효소의 특성

선별균주의 효소 생성양상 : 각종 탄소원과 질소원이 효소 생성양상에 미치는 영향을 검토한 결과 탄소원으로는 soluble starch, 질소원으로는 polypepton과 yeast extract를 혼용했을 때 CGTase의 생산성이 가장 좋았다.

Fig. 2은 균체의 증식, CGTase의 생산, 그리고 배양액의 pH의 변화 양상을 나타내고 있다. 균체의

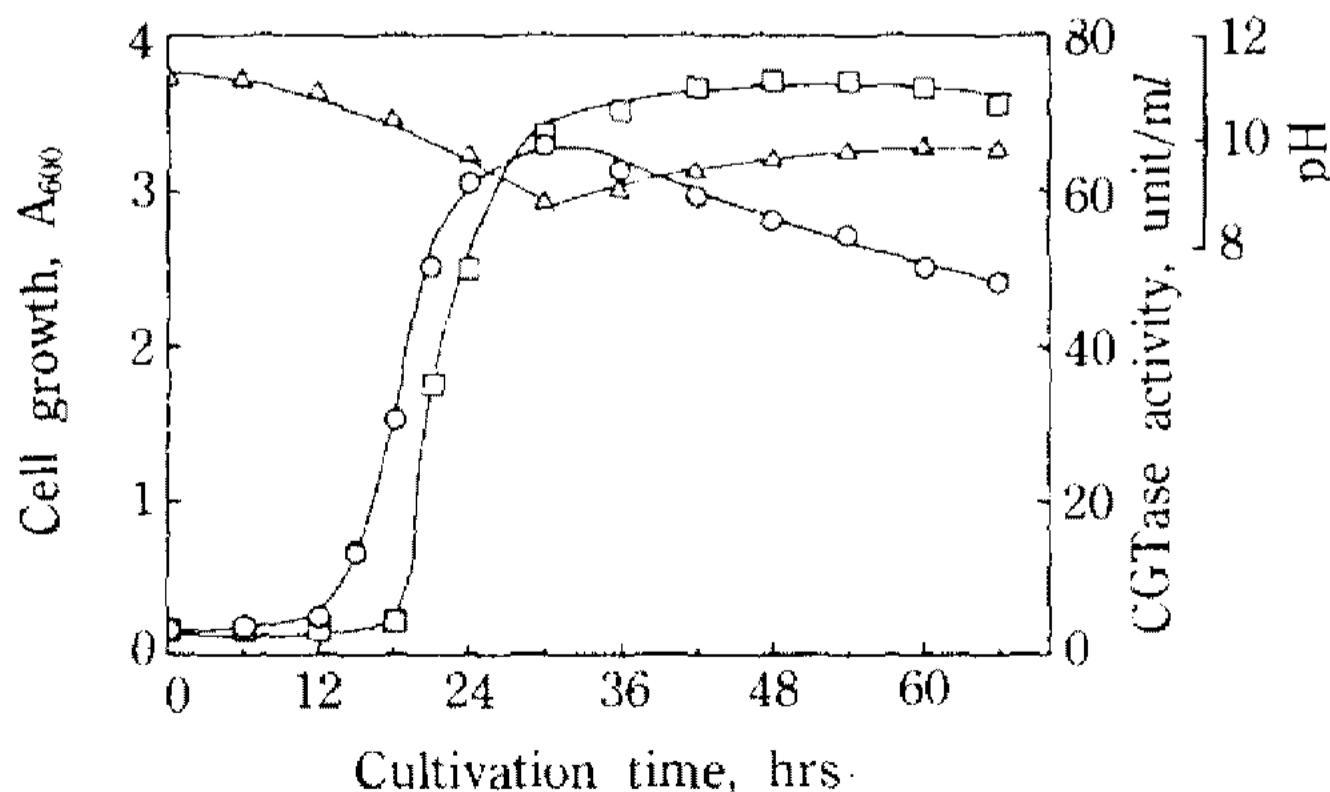


Fig. 2. Cell growth and CGTase production pattern of *Bacillus firmus* var. *alkalophilus* H609.

○: cell growth, □: CGTase activity, △: pH.

증식은 접종 후 12시간부터 증가하여 30시간 후에 최대성장을 보였고, 36시간 이후에는 상당히 감소되었다. CGTase는 대수증식기 후반부터 생성되기 시작하였고, 최대의 효소생산은 약 40시간에 관찰되었으며, 이때의 최대 생산 효소량은 75 Units/ml였다. 이는 비교 균주인 *Bacillus circulans* var. *alkalophilus* ATCC 21783의 최대 생산 효소량에 비하여 volumetric activity는 약 2배, specific activity는 약 3.3배에 해당되는 양이다.

CGTase의 활성은 Kaneko 등의 방법(18)에 따라 측정하였으며, 시간당 1 mg의 β-CD를 합성하는 효소량을 1 unit으로 정의하였다. 배양액의 pH는 초기 11.2에서 지속적으로 저하되어 약 30시간 후에 8.7까지 떨어졌다가 36시간부터 다시 상승하여 최종적으로 9.7이 되었다.

생산된 CGTase의 특성 : 48시간 배양액을 원심분리한 상등액을 조효소액으로 사용하여 CGTase의 특성을 검토한 결과, CD 합성반응의 최적온도와 pH는 각각 50°C 와 pH 6.0이었고, pH에 대한 안정성은 pH 4로부터 12에 이르는 넓은 범위에서, 온도에 대해서는 55°C 까지 안정하였다(별도 자료제공은 하지 않았음).

Fig. 3은 CGTase의 1시간 및 24시간 반응생성물의 HPLC 분석 결과이다. 반응생성물의 조성비는 1시간 동안 반응시켰을 때 α-CD : β-CD : γ-CD=0 : 29.7 :

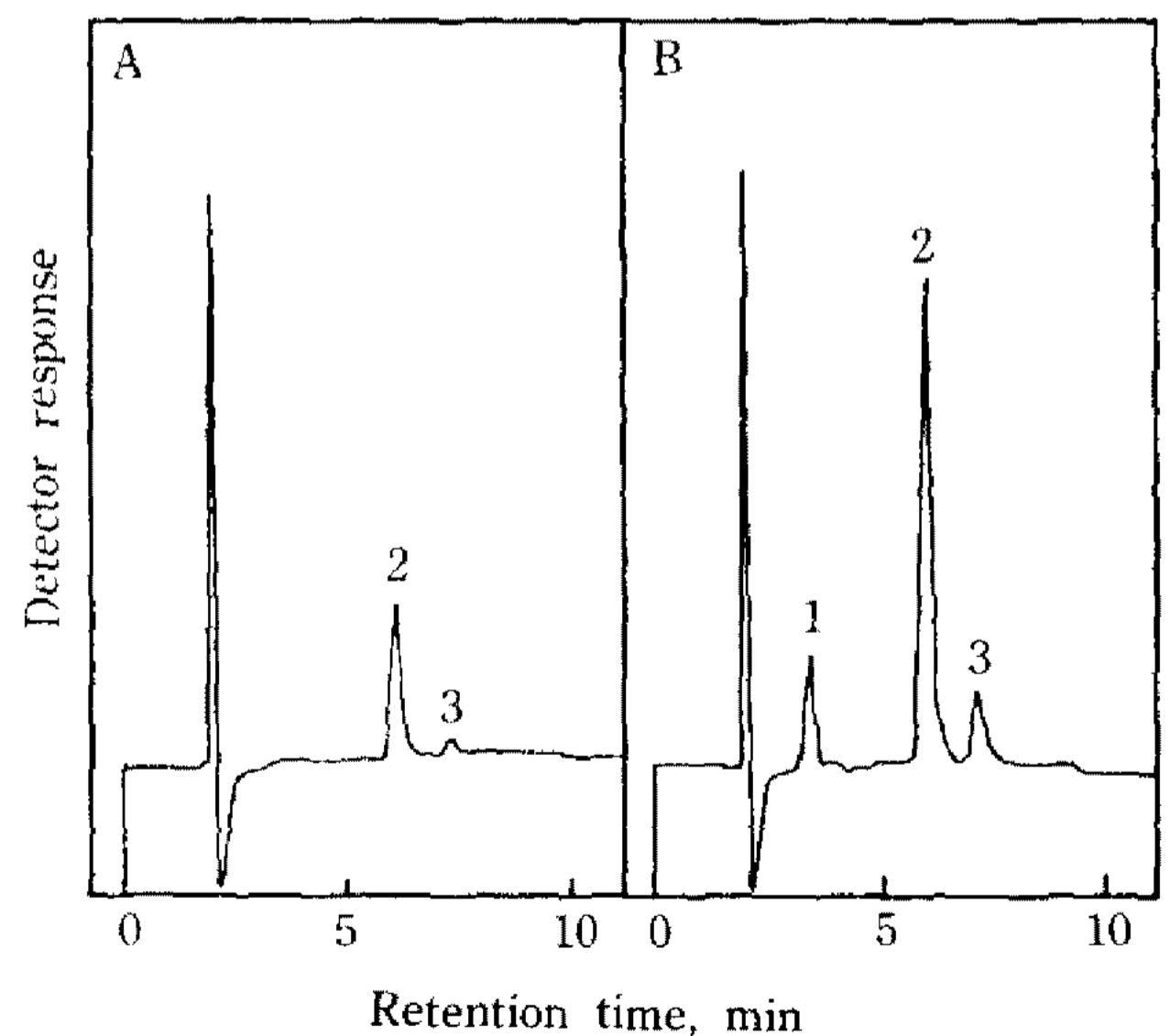


Fig. 3. Cyclodextrin synthesis using the CGTase of *Bacillus firmus* var. *alkalophilus* H609.

Reaction conditions; 5% (w/v) soluble starch, 7 units of CGTase/ml, pH 6.0, and 50°C.

A: 1 h reaction, B: 24 h reaction, 1: Glucose(G₁), 2: β-CD, 3: γ-CD

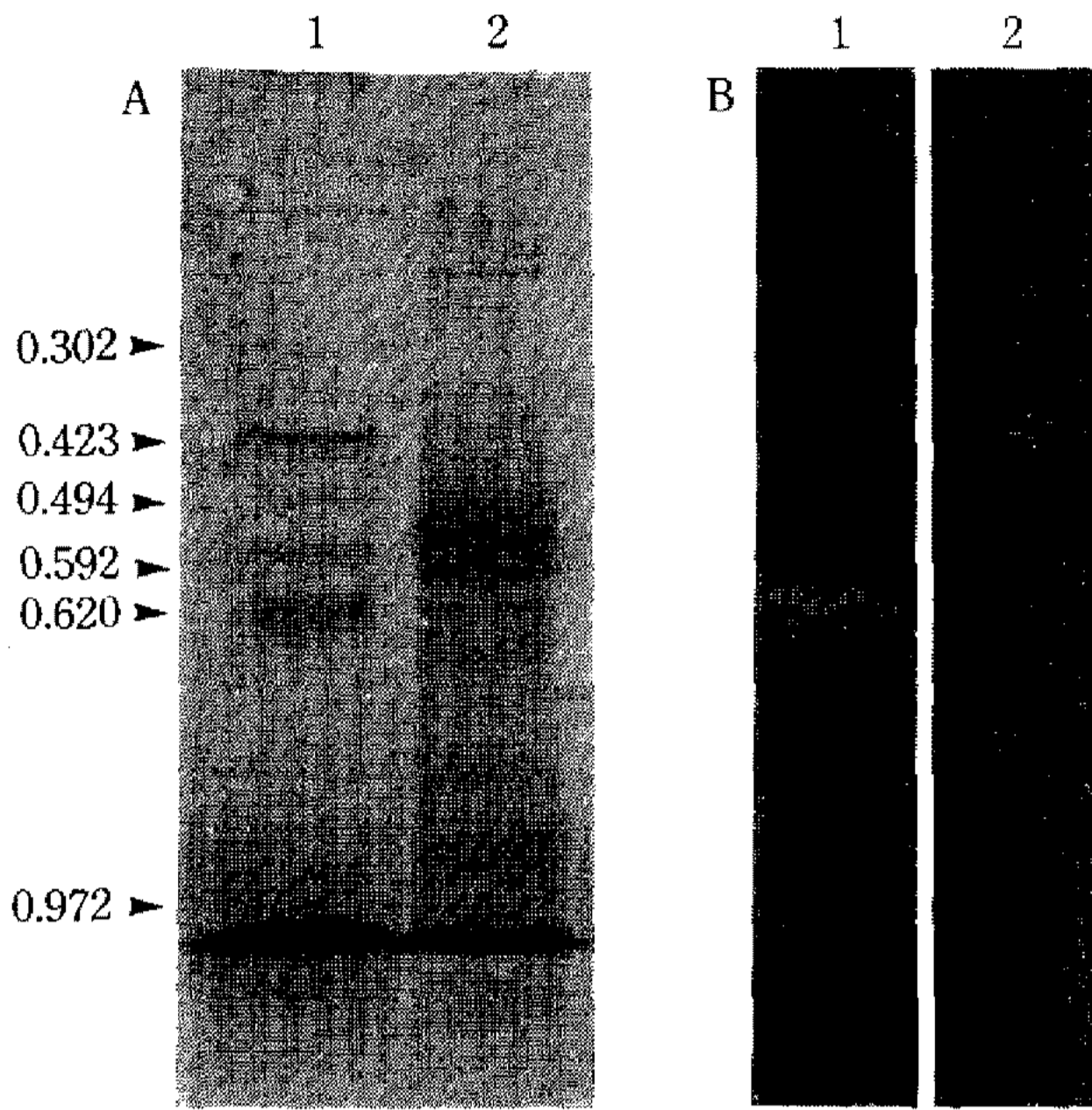


Fig. 4. Activity staining of the CGTase prepared from the culture filtrate of *Bacillus firmus* var. *alkalophilus* H609 (Lane 1) and that of *Bacillus circulans* var. *alkalophilus* ATCC 21783 (Lane 2).

A: Polyacrylamide gel stained by coomassie brilliant blue R250 after electrophoresis.
 B: Polyacrylamide gel stained by KI-I solution after-reaction for 15 min in 5% soluble starch.

1이고, 24시간 반응후는 0 : 6.8 : 1로 일반적으로 알려져 있는 대부분의 중성 또는 호알칼리성 세균이 분비하는 CGTase와는 달리 α-CD를 전혀 합성하지 않고 β-CD를 주로 합성하였다. 위와같은 특성을 가진 CGTase를 분비하는 미생물은 *Bacillus ohbensis*(19)와 alkalophilic *Bacillus* sp. E1(8)의 2종만이 알려져 있다. 본 균주가 생산하는 CGTase는 β-CD를 비교적 높은 순도로 생산하므로, 현재 산업계에서 주로 생산하는 β-CD의 생산에 적합한 특성을 가져 산업적 활용 가능성이 클 것으로 예상된다.

배양액중의 단백질의 구성양상과 효소활성 분석

선별균주의 배양액내의 단백질의 구성양상과 구성 단백질중 CGTase 활성을 갖는 부분을 확인하기 위하여 polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE)로 분획하였다. 이를 위하여 48시간 배양 상등액을 감압 농축하고, 이를 Davis(20)의 방법에 따라 7.5% gel에서 전기영동하였다. Gel의 절반은 Coomassie brilliant blue R250으로 염색하여 각 단백질들의 위치를 확인하였고, 나머지 절반은 5% soluble starch가 함유된 40 mM tris-maleic-NaOH buffer(pH 6.0)에 담그어

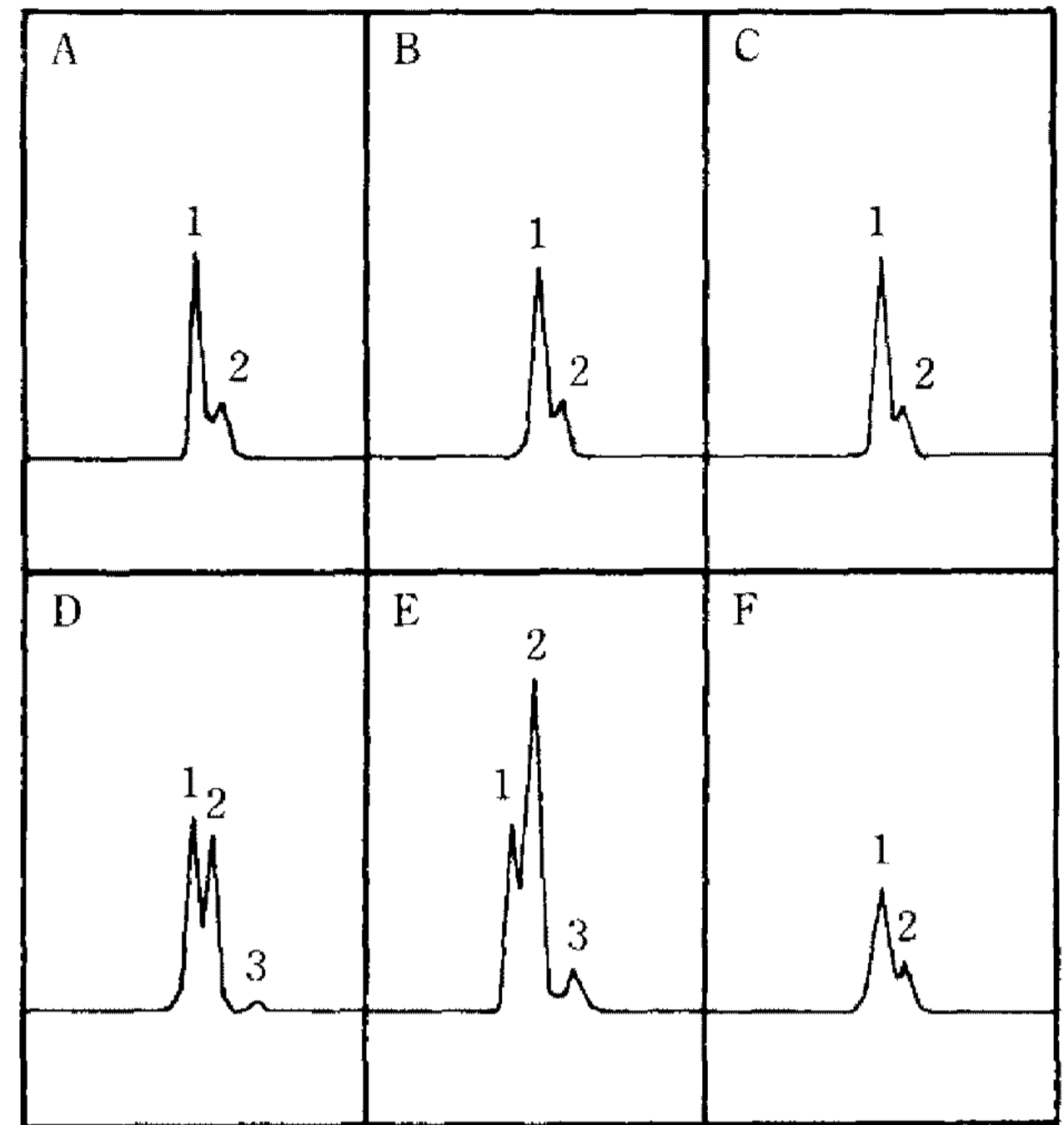


Fig. 5. HPLC chromatogram of the reaction mixtures catalyzed by proteins extracted from PAGE segments of different R_f values.

R_f value range
 A: 0.301~0.303, B: 0.422~0.424, C: 0.493~0.495,
 D: 0.591~0.593, E: 0.619~0.621, F: 0.971~0.973.
 1: Maltopentaose(G₅), 2: β-CD, 3: γ-CD

15분간 반응후 요오드 염색(4.9% KI/1.0% I₂ 용액)을 하여 CGTase는 dextrinizing activity도 가지고 있으므로 dextrinizing activity를 가지는 band의 위치로 CGTase의 위치를 확인하였다.

Fig. 4는 *Bacillus firmus* var. *alkalophilus* H609와 비교 균주인 *Bacillus circulans* var. *alkalophilus* ATCC 21783의 배양농축액을 전기영동한 gel상의 dextrinizing activity를 가지는 단백질의 위치를 비교하고 있다. 전기영동 결과 본 균주는 공시균주보다 세포외 단백질의 구성이 매우 단순함을 알 수 있었다. 또한 본 균주는 한 개의 band만이 dextrinizing activity를 나타낸 반면, 비교 균주의 경우는 세 개의 band가 관찰되었다. 유사한 실험을 수행한 유주현 등(7)은 분리 균주인 alkaliphilic *Bacillus* sp. YC-335에서는 하나의 band를, 그리고 비교 균주인 *Bacillus circulans* var. *alkalophilus* ATCC 21783에서는 세 개의 band를 관찰한 바가 있다.

위에서 관찰한 dextrinizing activity를 가지는 band가 CGTase의 활성을 갖고 있는지, 또는 다른 단백질 bands도 CGTase 역가를 갖고 있는지에 관한 규명이 필요하다. 비교 균주인 *Bacillus circulans* var.

alkalophilus ATCC 21783의 CGTase 경우는 6종 이상의 isozymes 형태로 존재하는 것으로 알려져 있다 (21).

Fig. 5는 분획된 단백질의 CD 생성 여부를 규명하고자 전기영동 gel을 각 단백질 band의 Rf값에 해당하는 부분을 잘라내어 5% soluble starch 용액(pH 6.0)과 50°C에서 24시간 동안 반응시킨 후 HPLC로 생성된 CD의 양을 분석한 결과이다. 그 중 여섯 부분에서 CGTase activity가 관찰되었으며, HPLC상의 CD의 조성으로 보아 작용 양상은 $G_5 : \beta : \gamma = 4.5 : 1 : 0$ 인 균(Fig. 5(A), (B), (C)); $G_5 : \beta : \gamma = 1 : 1 : 0$ 인 균(Fig. 5(D)); $G_5 : \beta : \gamma = 0.5 : 1 : 0.07$ 인 균(Fig. 5(E)); 그리고 $G_5 : \beta : \gamma = 3 : 1 : 0$ 인 균(Fig. 5(F))의 네가지로 나눌 수 있었다. 이로 미루어 분리한 *Bacillus firmus* var. *alkalophilus* H609가 분비하는 CGTase는 단일 효소가 아닌 여러 종류의 isozyme으로 구성된 것으로 추정된다. 그러나 Fig. 3의 결과와는 달리 전기영동에 의해 분획한 단백질을 이용하여 soluble starch로 부터 CD를 합성하였을 경우 G5가 많이 생성되어 상이한 결과를 보였다. 이는 조효소의 경우 여러종의 CGTase들이 상호보완적으로 분자내 또는 분자의 transglycosylation 작용이 일어나 G5의 축적없이 CD를 생성하는 것으로 추측된다.

감사의 말

본 연구는 한국과학재단 지원 농업생물신소재 연구센터 1992년도 연구비 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Szejtli, J. 1988. Cyclodextrin Technology, p. 1-78. 1st ed. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Kitahata, S. and S. Okada. 1982. Comparison of cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus megaterium*, *Bacillus circulans*, *Bacillus stearothermophil* and *Bacillus mecerans*. *J. Jpn. Soc. Starch. Sci.* **29**: 13-18.
- Nakamura, N. and K. Horikoshi. 1976. Purification and properties of neutral cyclodextrin glycosyltransferase of an alkalophilic *Bacillus* sp. *Agr. Biol. Chem.* **40**: 1785-1791.
- 오평수, 고성철, 서향원. 1986. *Bacillus* sp.의 cyclodextrin glucanotransferase 생산 및 이용에 관한 연구. *산업미생물학회지* **14**: 461-466.
- Ahn, J.H., J.B. Hwang and S.H. Kim. 1990. Cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus Stearothermophilus*: Purification by affinity chromatography and its properties. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **18**: 585-590.
- 이용현, 신현동, 이상호. 1989. Alkalophilic *Bacillus circulans*가 생산하는 cyclodextrin glucanotransferase의 정제와 효소반응특성. *산업미생물학회지* **17**: 370-378.
- 유주현, 정용준, 이정수. 1989. Cyclodextrin glucanotransferase를 생산하는 호알칼리성 *Bacillus*속 미생물. *산업미생물학회지* **17**: 148-153.
- 박천석, 우의전, 국승욱, 서병철, 박관화, 임 훈. 1992. *Bacillus* sp. E1이 생성하는 cyclodextrin glucanotransferase의 정제 및 특성. *산업미생물학회지* **20**: 156-163.
- 한일근, 이용현. 1991. 분쇄마찰매체함유 효소반응계에서의 Cyclodextrin의 생성과 cyclodextrin glucanotransferase의 작용 mechanism. *산업미생물학회지* **19**: 163-170.
- 이용현, 박동찬. 1991. Extrusion 전분을 기질로 한 불균일상 효소반응계에서의 Cyclodextrin 효소합성. *산업미생물학회지* **19**: 514-520.
- Lee, Y.H., S.H. Lee and H.D. Shin. 1991. Performance of column type bioreactor packed with immobilized cyclodextrin glucanotransferase for cyclodextrin production. *J. Microbiol. Biotechnol.* **1**: 63-69.
- 한일근, 이용현. 1991. Pullulanase의 reverse reaction을 이용한 maltosyl- β -cyclodextrin의 합성. *산업미생물학회지* **19**: 444-449.
- Park, C.H., K.W. Park and S.H. Kim. 1989. A rapid screening method for alkaline β -cyclodextrin glucanotransferase using phenolphthalein-methyl orange-containing solid medium. *Agric. Biol. Chem.* **53**: 1167-1169.
- Horikoshi, K. 1982. *Alkalophilic Microorganism*, p. 9-46. Japan Sci. Soc., Tokyo.
- Krieg, N.R. and J.G. Holt. 1984. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, p. 1104-1207, Vol.2. Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- Tamaoka, J. and K. Komagata. 1984. Determination of DNA base composition by reversed-phase high performance liquid chromatography. *FEMS Microbiol. Lett.* **21**: 125-128.
- Krulwich, T., A. Guffanti, R. Bornstein and J. Hoffstein. 1982. A sodium requirement for growth, solute transport, and pH homeostasis in *Bacillus firmus* RAB. *J. Biol. Chem.* **257**: 1885-1889.
- Kaneko, T., T. Nakamura, and K. Horikoshi. 1987. Spectrophotometric determination of cycli-

- zation activity of β -cyclodextrin forming cyclodextrin glucanotransferase. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.* **34**: 45-48.
19. Sin, K.A., A. Nakamura, K. Kobayashi, H. Masaki and T. Uozumi. 1991. Cloning and sequencing of a cyclodextrin glucanotransferase gene from *Bacillus ohbensis* and its expression in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **35**: 600-605.
20. Davis, B.J. 1964. Disc electrophoresis. 2. method and application to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **121**: 404-427.
21. Mattsson, P., S. Meklin and T. Korpela. 1989. Analysis of cyclodextrin glucanotransferase isozymes by isoelectric focusing in immobilized pH gradients. *J. Biochem. Biophys. Methods* **13**: 1-10.

(Received March 28, 1993)