

## Alkalophilic *Bacillus circulans* 가 생산하는 Cyclodextrin Glucanotransferase 의 정제와 효소반응특성

신현동 · 이상호 · 이용현\*

경북대학교 자연과학대학 유전공학과

### Purification and Characterization of Cyclodextrin Glucanotransferase Excreted from Newly Isolated Alkalophilic *Bacillus circulans*

Shin, Hyun-Dong, Sang-Ho Lee and Yong-Hyun Lee\*

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

An alkalophilic *Bacillus circulans* that can produce significant amount of cyclodextrin glucanotransferase (CGTase) was newly isolated from soil. The culture filtrate was successively purified by  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  precipitation, DEAE-Sephadex column chromatography, and Sephadex G-100 column chromatography. The enzymatic properties, including molecular weight, optimal pH and temperature, stability, and kinetic parameters, were determined. The cyclodextrin synthesis reaction catalyzed by the purified CGTase was also studied. The sweet potato and corn starch were found to be the most suitable substrates with 60% conversion to cyclodextrin. The highest conversion was achieved at the CGTase concentration of 900-1,100 units/g of soluble starch. The purified CGTase could also catalyze the transglycosylation on stevioside.

Cyclodextrin glucanotransferase (EC 2.4.1.19; 1,4- $\alpha$ -D-Glucan 4- $\alpha$ -D-(1,4 glucano)-transferase, cyclizing; CGTase)는 전분을 분해하여 glucose 분자 6-8개로 구성되는 비환원성 환상구조의 cyclodextrin 분자를 합성하거나 또는 합성된 cyclodextrin을 개환하여 적당한 수용체에 전이시키는 작용을 하는 효소이다. Cyclodextrin은 각종 분자들과 포접화합물을 형성하여 그 물리적·화학적 성질을 변화시키는 능력이 있어 식품, 의약품, 화장품, 농약 등의 안정화, 불휘발화, 유화, 가용화 등에 사용되고 있으며 그 실용화가 매년 확대되고 있다(1).

CGTase에 대한 연구는 1900년대에 (2) *Bacillus macerans*의 배양액에 CGTase가 존재함을 확인한 것이 그 시발점이었으나(1), 1970년대에 들어와서

본격적으로 CGTase에 대한 특성규명과 아울러 cyclodextrin의 제조법과 성질 및 용도에 대한 연구가 이루어지기 시작하였고 *Bacillus macerans* 유래의 CGTase가 중심이 되었다(3-5). 또한 최근에는 *Bacillus stearothermophilus*, *B. megaterium*, *B. circulans*, *B. licheniformis*, *B. ohbensis*, Alkaline *Bacillus* sp., *Klebsiella pneumoniae* 등이 분비하는 CGTase가 알려져 있다(6). 그러나 전분으로부터 합성되는 cyclodextrin의 생성비율과 그 효소적 특성은 균종마다 다른 것으로 밝혀져 있다.

특히 Horikoshi 등(7)에 의해 선별된 alkalophilic *Bacillus* sp. 유래의 CGTase는 주 생성물로 포접체 제조가 비교적 용이하고 수용액에서 용해도가 낮은  $\beta$ -cyclodextrin을 주로 합성하기 때문에 무용매법으로  $\beta$ -cyclodextrin을 쉽게 제조할 수 있는 장점이

Key words: Alkalophilic *Bacillus*, cyclodextrin glucanotransferase, purification, enzymatic properties, cyclodextrin formation

\*Corresponding author

있다. Alkalophilic *Bacillus* sp. 유래의 CGTase에 대한 연구는 주로 Nakamura와 Horikoshi(7-9)에 의해 연구되어졌으며 그 결과 3가지 종류의 CGTase가 확인되었고, 최근 CGTase gene이 cloning된 바 있다(10). 한편 국내의 CGTase에 대한 연구는 오평수 등(11)이 CGTase를 분비하는 중성 *Bacillus* sp.를 선별하여 기본적인 효소성질을 검토한 바 있으며 최근에는 유주현 등(12)에 의해 발표된 CGTase 생성능이 있는 호알칼리성 *Bacillus* sp. 선별에 관한 연구가 보고되어 있을 뿐이다.

본 연구에서는 CGTase 생성능이 우수한 alkalophilic *Bacillus*를 토양으로부터 분리하였고 *Bacillus circulans*로 동정하였으며 이 균주가 분비하는 CGTase를 분리·정제하여 그 효소적 특성을 검토하였고 또한 CD의 합성특성을 조사하였기에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 호알칼리성 CGTase 생산균주의 선별 및 동정

선별배지는 alkaline basal medium II로 (13) phenolphthalein과 methyl orange를 각각 0.02%와 0.01% 첨가하였다. phenolphthalein은 alkaline pH에서는 붉은색을 나타내지만  $\beta$ -cyclodextrin과 포접체를 형성하면 그 색깔이 무색으로 변하게 되며,  $\beta$ -cyclodextrin을 합성하는 알칼리성 균주는 colony 주위에 붉은색 바탕에 노란환을 형성하게 되어 (14) CGTase 생산균주 선별이 용이하였다. 균주의 선별은 agar plate 상에 도말하여 37°C에서 3일간 배양한 후 노란환을 형성하는 colony를 선별하여 현탁 배양한 후 CGTase activity를 측정 선별하였다. 균주는 "Alkalophilic microorganism"(13)과 "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology"(15)에 제시된 방법에 따라 동정하였다.

### CGTase activity 측정

CGTase activity의 측정은 Kaneko 등(16)에 의해 제안된 phenolphthalein법으로 흡광도는 550 nm에서의 흡광도를 측정하여 결정하였다.

### Cyclodextrin의 분석 및 정량

Cyclodextrin의 분석과 정량은 high pressure liquid chromatography (Model-441, Waters Co., U.S.A.)를 활용하였고 사용 column은 carbohydrate analysis column으로 용출용매는 acetonitrile

과 H<sub>2</sub>O로 그 혼합비율을 65 : 35로 하였으며 RI detector로 검정하였다.

### 효소생산을 위한 배양조건의 검토

Horikoshi(13)의 alkaline basal medium을 기본배지로 하여 각종 탄소원과 질소원의 영향을 조사하였으며, pH 조절제로 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>를 사용하였다. 초기배지 pH와 배양온도의 영향도 검토하였다.

### 균주의 배양 및 조효소의 조제

효소생산용 배지조성은 1% soluble starch, 0.5% casamino acid, 0.5% yeast extract, 0.1% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.02% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>로 2.5l jar fermenter에 통기량 1.0 vvm, 배양온도 30°C, 교반속도 300 rpm, 초기배지 pH 10.3에서 3일간 배양하였다. 배양액은 ammonium sulfate를 80% 포화되게 첨가하여 4°C에서 overnight 한 다음 원심분리하여 얻은 침전물을 10 mM Tris-HCl buffer (pH 9.0) 25 ml에 용해시켜 농축시켰다.

### Chromatography에 의한 효소의 분리·정제

조효소 농축액 25 ml을 10 mM Tris-HCl buffer (pH 9.0)로 투석시킨 후 같은 buffer로 미리 평형화 시켜둔 DEAE-Sephadex A-50 column (2.8×20 cm)에 흡착시켰다. 비흡착성분은 동일 buffer로 씻어낸 후 흡착성분은 0.3 M NaCl이 함유된 동일 buffer로 0-0.3 M NaCl의 직선상의 농도구배로써 용출시켰다. CGTase activity를 나타내는 분획을 ultrafiltration으로 농축시킨 다음 농축된 시료를 Sephadex G-100 column (3.2×98 cm)에 주입한 후 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.5)로 gel filtration을 행하였다.

### Protein의 정량

Protein을 정량하기 위해서 Bradford 법(17)을 사용하였고 경우에 따라 280 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### Polyacrylamide gel 전기영동

Davis 법(18)에 따라 7% polyacrylamide gel을 사용하였으며, tracking dye로는 bromophenol blue를 단백질염색은 coomassie brilliant blue R-250으로 하였다. SDS 존재하에 polyacrylamide gel 전기영동은 Laemmli(19)의 방법에 따라 10% acrylamide gel로 사용하였으며 분자량 측정을 위한 표준단백질은 SDS-PAGE standard low molecular weight marker

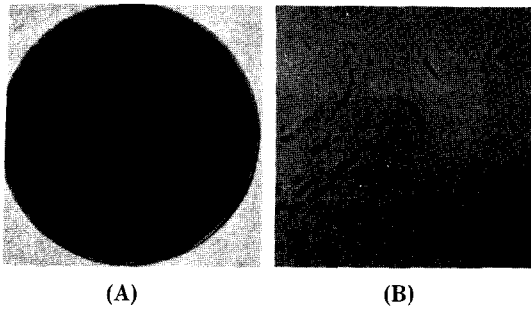


Fig. 1. Photograph (A) and photomicrograph (B) of CGTase producing alkalophilic *Bacillus circulans*.

(Bio Rad Co.)를 사용하였다.

#### 정제된 CGTase 에 의한 cyclodextrin 합성

CD 생성의 경시적 관찰은 5 ml 의 2.5% soluble starch 를 기질로 하여 정제된 효소액 0.2 ml (10 units/ml) 을 첨가시켜 pH 6.0, 50°C 의 조건으로 반응시키면서 시간별로 생성된 CD 를 HPLC 로 정량하였고 기질농도의 변화에 대한 CD 전환율 조사는 기질 농도를 1-20% 로 변화시키면서 앞에서와 같은 반응 조건으로 행하였다. 또한 CD 생성에 미치는 효소첨가량의 영향은 기질농도 5% 를 사용하여 효소첨가량을 400-4,000 unit/g of substrate 로 변화시키면서 조사하였다.

#### Stevioside transglycosylation 작용

정제된 stevioside (Sigma Co.) 10% 용액 (pH 6.0) 1 ml 과 동일 buffer 에 녹인 10% soluble starch 1 ml 을 혼합한 후 정제된 효소액을 0.2 ml (2 units) 첨가하여 50°C 에서 24 시간 반응시킨 후 HPLC 로 분석하였다. 그리고 glucose, maltose, maltotriose, maltotetraose, sucrose 등을 같은 농도로 첨가하여 stevioside 에로의 당전이성을 조사하였다.

#### 결과 및 고찰

##### 호알칼리성 CGTase 생산 균주의 선별 및 동정과 배양조건 검토

생산 균주의 선별 및 동정 : 호알칼리성 CGTase 생산 균주는 alkaline basal medium II 에 phenolphthalein 과 methyl orange 를 첨가한 선별배지에서 노란환을 형성하는 균주를 선별하고 이를 액체 배양하여 활성이 가장 높은 한 균주를 최종적으로 선별하였다. 선별된 균주는 간균으로 운동성이 있고 호기성인 gram 양성균으로 나타났으며 포자가

Table 1. Morphological, cultural and biochemical characteristics of the CGTase producing alkalophilic microorganism.

1. Morphological characteristics	
Form	Rods
Size	0.53 $\mu$ m $\times$ 2.1-3.2 $\mu$ m
Motility	Motile
Gram stain	Positive
Spore	Central
2. Cultural characteristics	
Nutrient broth	+
Glucose nutrient broth	++
Anaerobic growth	+
Medium I and II	++
Glucose-asparagine agar	+
Medium I containing 10% NaCl	++
3. Biochemical characteristics	
Hydrolysis of gelatin and casein	Positive
Hydrolysis of starch	Positive
Utilization of citrate	Utilized
Catalase test	Positive
Nitrate reduction	Reduced
Voges-Proskauer test	Negative
4. pH and temperature	
pH for growth in medium II	pH 7.5-11.0
Temperature for growth in medium II (pH 10.3)	up to 45°C

관찰되었다.

선별된 균주의 배양학적, 생화학적 특성을 조사한 결과는 Table 1 과 같으며 중성 pH 에서는 생육을 거의 하지 못하는 전형적인 호알칼리성이었으며, 45°C 까지 생육하였다. 가수분해활성면에서도 전분 뿐만 아니라 skim milk 에 포함된 casein 도 빠르게 분해하여 단백질분해능도 강함을 알 수 있었다. 선별균주는 CGTase 생산균주로 널리 알려진 *Bacillus circulans* ATCC 21783 과 매우 유사한 배양학적, 생리적 특성을 갖고 있었으며 (7, 13), alkalophilic *Bacillus circulans* 로 동정하였다. 그러나 대조균인 *Bacillus circulans* ATCC 21783 이 5% 이상의 NaCl 농도에서 생육에 큰 저해를 받는 것으로 보고되고 있으나 (7, 13), 본 균주는 7% NaCl 에서도 전혀 생육에 저해현상이 없었으며 10% 농도에서도 약간의 저해작용만이 관찰되어 NaCl 에 대한 저항성이 더 큰 차이점이 있었다.

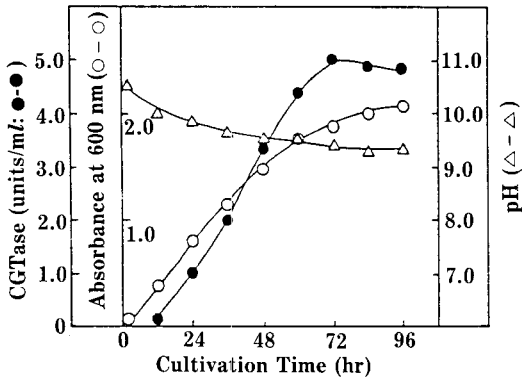


Fig. 2. Time course of CGTase production by *Bacillus circulans* in 2.5L jar fermentor; 30°C, 300 rpm, 1.0 vvm.

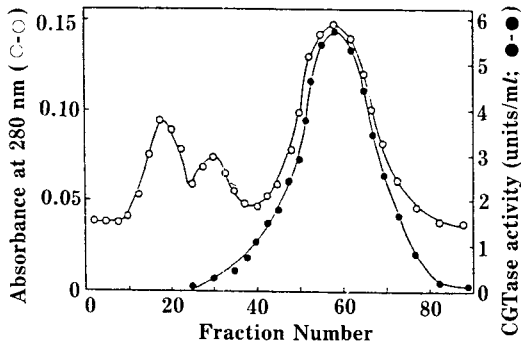


Fig. 3. Gel filtration of CGTase on a Sephadex G-100 column (3.2 x 98 cm); 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.5), 18 mL/hr.

**CGTase 생산을 위한 배양조건 검토 :** CGTase 생산에 적합한 배양조건을 결정하기 위해 배양 온도, 초기배지 pH, 배지조성 중 탄소원과 질소원의 영향을 검토하였다. 최적 배양온도는 30°C 초기배지 pH는 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>를 1% 첨가하여 pH 10.3-10.5로 조절하였을 때 가장 좋은 결과를 얻었으며, 적합한 최적 탄소원은 soluble starch(1%)였으며, 질소원으로는 yeast extract(0.5%)와 casamino acid(0.5%)를 혼용하였을 때 가장 좋은 결과를 보였

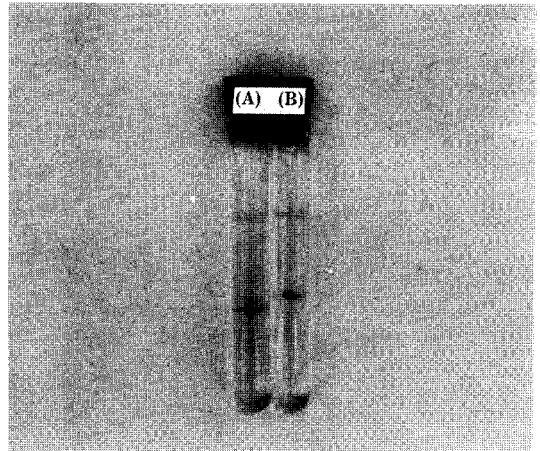


Fig. 4. Polyacrylamide gel electrophoresis patterns of the crude enzyme (A) and the purified CGTase (B).

다. 따라서 본 균주의 CGTase 생산에 적합한 배지조성은 1% soluble starch, 0.5% yeast extract, 0.5% casamino acid, 0.1% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.02% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>로 결정하였으며 최적 배양온도는 30°C였다.

상기 균주를 2.5l jar fermentor 에서 배양하면서 생육곡선과 효소생산 profile 을 조사하였으며 그 결과는 Fig.2 와 같다. 효소생산은 cell 이 log phase 에 도달한 후부터 시작하여 72 시간 배양 후 최대 생산량에 도달하였으며 배양액의 pH 변화는 초기 pH 10.3 에서 지속적으로 감소하여 최종적으로 pH 가 9.2 로 조정되었다.

**배양액 중의 CGTase 의 분리정제**

CGTase 를 정제하기 위하여 배양액을 ammonium sulfate 로 농축시키고 이를 DEAE-Sephadex A-50 column 에 흡착시킨 후 NaCl gradient 로 용출시킨 결과 NaCl 농도가 0.1-0.25 M 인 분획에서 CGTase 활성을 나타내는 단백질 peak 를 확인하였고, 이를 농축하여 다시 Sephadex G-100 column 에서 분리시킨 결과 Fig.3 과 같이 fraction

Table 2. Purification of the CGTase of alkaliphilic *Bacillus circulans*.

Purification step	Total activity (units)	Total protein (mg)	Specific activity (units/mg)	Purification fold	Yield of activity (%)
Crude enzyme	1105	93.5	11.8	1.0	100
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> precipitation	975	21.0	46.0	4.0	88
DEAE-Sephadex A-50	390	3.5	111.0	9.6	35
Sephadex G-100	299	0.9	332.2	28.1	30

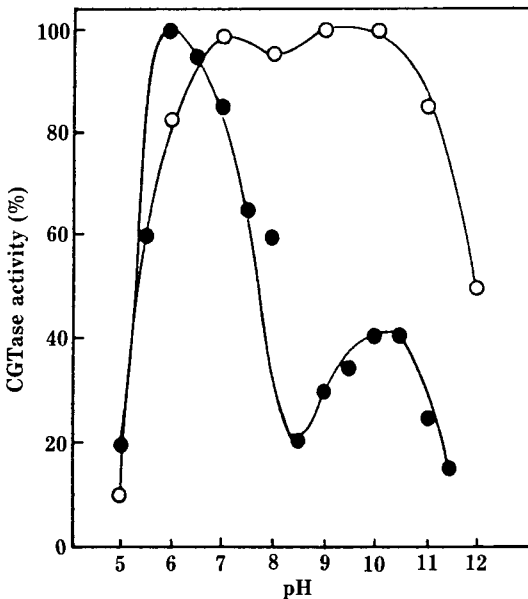


Fig. 5. Effect of pH on the activity (●-●) and stability (○-○) of the CGTase.

number 50-65에서 CGTase 활성이 강하게 나타나는 단일 단백질 peak를 얻었다.

각 정제과정을 Table 2에 요약하였으며, 정제된 효소의 회수율은 30%였고 specific activity는 332 unit/mg protein으로서 효소활성이 28배 증가하였다.

정제된 효소의 순수분리여부를 조사하기 위해 PAGE한 결과 Fig.4와 같이 단일단백질 band가 얻어졌고 아울러 SDS-PAGE에 의해서도 역시 단일 band가 얻어져 본 효소는 monomer인 순수한 단일 단백질이라고 생각된다. 한편, 측정된 분자량은 약 93,000이었다.

이와같은 분자량은  $\beta$ -CD를 우선적으로 합성하는 균주인 alkaline *Bacillus* sp.인 *B. circulans* ATCC 21783 유래 CGTase 분자량인 85,000-88,000, 68,000(8, 9)에 비해 약간 큰 편이며 중성균인 *B. circulans* 유래 CGTase의 103,000(20)에 비하여 다소 적어 여기서 정제된 CGTase는 지금까지 발표된 것과는 다른 효소인 것으로 사료된다.

**정제된 CGTase의 효소특성**

**최적 pH 및 pH 안정성** : Fig.5는 CGTase의 활성에 미치는 pH의 영향을 나타내며 최적 pH는 6.0으로서 지금까지 알려진 대부분의 CGTase 최적 pH인 4.5-6.5의 약산성 범위와 일치하고 있다.

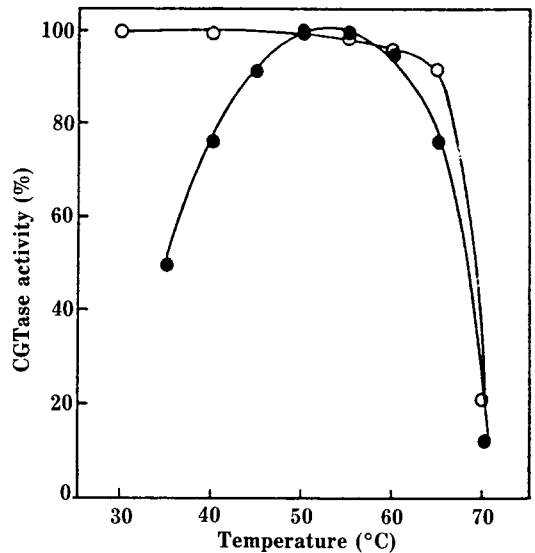


Fig. 6. Effect of temperature on the activity (●-●) and stability (○-○) of the CGTase.

pH 안정성을 조사하기 위하여 정제된 CGTase 0.5 unit를 포함한 20 mM buffer 용액 100  $\mu$ l를 50°C에서 30분간 유지한 후 잔존 활성도를 측정하였으며 pH 안정성은 5.5-11로서 비교적 산·알칼리의 넓은 pH 영역에서 안정하였다. 이것은 Masao 등(21)이 분리한 alkaline *Bacillus* sp.의 CGTase를 제외한 발표된 대부분의 CGTase 최적 pH가 pH 안정범위와 일치하지 않아 사용 중 실활의 위험이 있으나 본 효소의 최적 pH 활성인 pH 6.0은 효소의 pH 안정범위에 속하여 최적 활성 pH 조건에서 장시간 반응시켜도 비교적 효소활성이 높게 유지될 수 있으리라 예상된다.

**최적 온도 및 온도안정성** : Fig.6에서 관찰되듯이 정제된 효소의 최적 온도는 50°C로서  $\beta$ -CD를 주로 합성하는 균주인 Piamsook 등(20)과 Okada 등(22)이 발표한 *B. circulans*의 CGTase 최적 온도인 55, 60°C와 *B. megaterium*의 55°C, *B. ohbensis*의 60°C(23)에 비해 낮았다. 또한  $\alpha$ -CD를 주로 합성하는 균주인 *B. macerans*(3, 4)의 50, 60°C, *B. stearothermophilus*(24)의 70°C 등의 최적 온도에 비해서도 다소 낮은 편이었다. 한편 온도안정성을 검토하기 위해 정제된 CGTase 0.5 unit를 각 온도에서 60분간 유지한 후 잔존효소활성을 측정하였는데 온도안정성은 65°C까지였고, 그 이상에서는 효소활성이 급격히 떨어지는 양상을 보였는데 이는 고온에 안정한 *B. stearothermophilus* 유래의 CGTase를 제

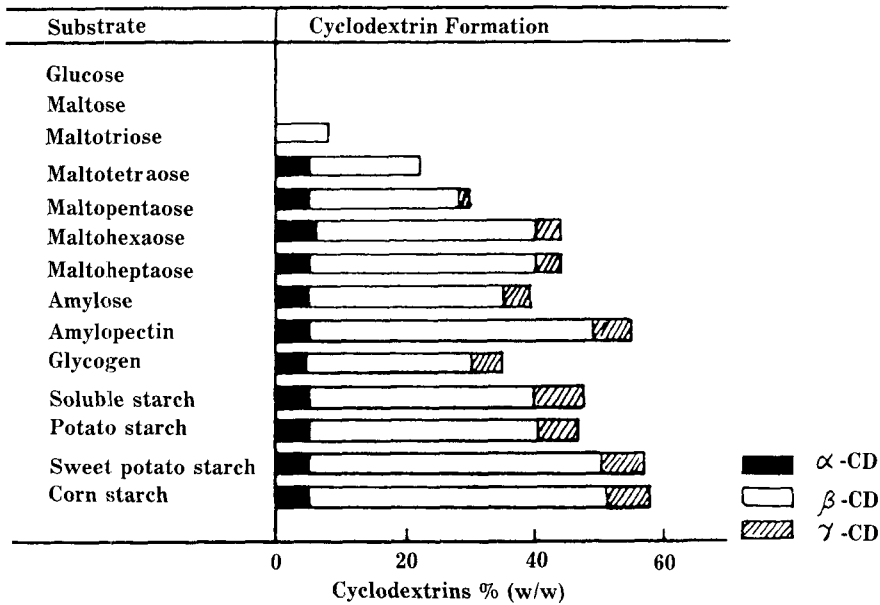


Fig. 7. Substrate specificity of CGTase for cyclodextrin formation; substrate concentration 1.0% (w/v), pH 6.0, 50°C, 24 hr.

외한 다른 균종 유래의 CGTase와 유사한 성질이  
다.

**각종 이온 및 chemicals의 영향**: 효소활성에 미  
치는 각종 금속이온과 chemical에 의한 영향을 조  
사한 결과 정제된 CGTase의 활성은 10 mM Mg<sup>++</sup>  
ion에 의해 다소 증가하였으나 Hg<sup>++</sup>, Pb<sup>++</sup> 등의  
중금속에 의해 강하게 저해되었으며 Ca<sup>++</sup>의 영향  
은 없었다. 한편, DTT나 cystein-HCl과 같은 환  
원제에 의하여서는 효소활성이 저해되었고 sulfhy-  
dryl기와 mercaptide를 형성하는 p-CMB는 영향  
이 없었다.

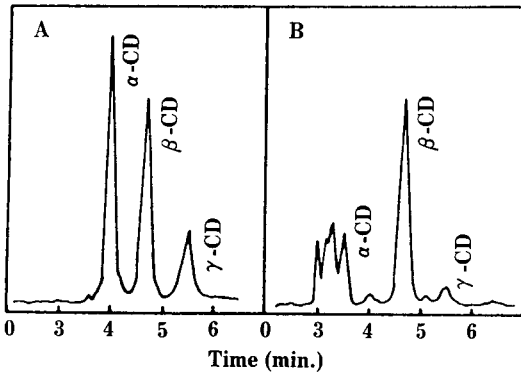
**Kinetics 특성**: 정제된 CGTase의 kinetic 특성을  
Lineweaver-Burk plot에 의하여 결정한 결과 solu-  
ble starch에 대한 K<sub>m</sub>값은 14.3mg soluble starch/  
ml이었으며 V<sub>max</sub>는 0.16 μmole β-CD/min이었다.

**기질 특이성**: 기질에 대한 정제된 CGTase의  
특이성은 Fig.7과 같이 glucose와 maltose에 대해  
서는 CD 합성반응이 관찰되지 않았고 maltooligo  
당의 사슬이 길어질수록 CD 전환율이 증가하였으  
며, sweet potato starch와 corn starch의 경우 가  
장 높은 CD 전환율을 보였다. 이는 Horikoshi 등  
(9)이 분리한 β-CD를 우선적으로 합성되는 alka-  
line *Bacillus* sp. 유래의 CGTase 경우 maltose에  
대해 약간의 CD 합성작용이 있고 또한 amylose, po-  
tato starch에 대해서 가장 높은 CD 전환율을 가지고

있는 것과는 상이한 특성이다. 한편 알려진 대부분  
의 CGTase가 분기사슬(α-1, 6)을 함유하는  
amylopectin보다는 분기사슬이 없는 amylose에 대  
해서 CD 합성반응이 높은 것으로 알려져 있는 반면  
정제된 CGTase는 amylose보다 amylopectin에 대  
한 CD 합성반응이 월등히 높은 아주 독특한 성질을  
갖고 있음을 알 수 있다.

**정제된 CGTase의 cyclodextrin 생성 반응조건의  
검토**

**CD 생성의 경시적 관찰**: 시간에 따른 CD 생성의  
양상을 조사하기 위해 5ml의 2.5% soluble starch  
를 기질로 하여 정제된 효소액 0.2ml(10 units/  
ml)을 첨가시켜 pH 6.0, 50°C의 조건으로 반응시키  
면서 시간별로 생성 CD를 HPLC로 정량한 결과  
Fig.8과 같다. Fig.8의 chromatogram A는  
standard CD 혼합물을 나타내고 chromatogram B  
는 CGTase의 기질반응 24시간 후의 생성 CD 혼  
합물을 나타내었다. 시간별로 생성되는 CD의 양  
상은 반응초기부터 β-CD는 α-, γ-CD보다 우선  
적으로 생성되었고 24시간 반응 후의 α- : β- :  
γ-CD의 생성비율은 1 : 8.1 : 1.9였다. 한편 α-CD  
는 반응 6시간까지 생성되지 않았으며 그 이후부  
터 아주 느린 속도로 합성됨을 알 수 있었는데  
Horikoshi 등이 분리한 alkaline *Bacillus* sp.의



Chromatogram A; Cyclodextrin standard  
Chromatogram B; Reaction products

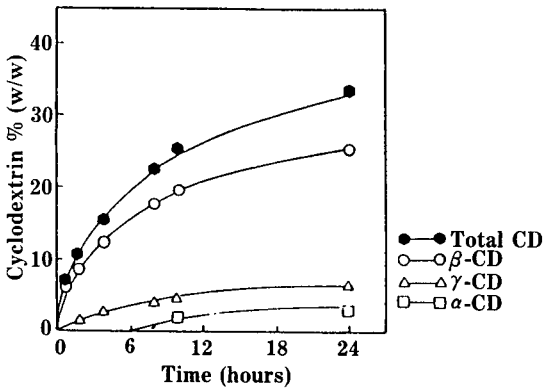


Fig. 8. High performance liquid chromatography of the cyclodextrins produced after 24 hr of incubation (upper) and time course of cyclodextrin formation (lower); soluble starch 2.5% (w/v), pH 6.0, 50°C.

CGTase 가 반응초기부터  $\beta$ -CD 를 우선적으로 합성하는 동시에  $\alpha$ -CD 도 느린 속도로 합성하는 것과 *B. ohbensis* 유래의 CGTase 가  $\alpha$ -CD 를 전혀 합성하지 않고  $\beta$ -,  $\gamma$ -CD 만을 합성하는 특성과는 다를 수 있다(23).

**기질농도의 영향:** 기질농도의 변화에 대한 CD 전환율을 조사한 결과 1% soluble starch 의 기질농도에서 54%의 전환율을 보였고, 5, 10, 20%의 기질농도에서 각각 28, 21, 16%의 CD 전환율을 나타내었다. 이것은 Fig.9 와 같이 기질농도의 상승에 따라 기질에 대한 CD 전환율이 감소하는 경향임을 알 수 있으며 이와같은 결과는 대부분의 CGTase 에 있어 기질농도 증가에 따른 CD 전환율 저하현상과 비슷하였다. 따라서 높은 수율의 CD 를 얻기 위해서는 저농도의 기질사용이 바람직하나 이 경우 저농도의 CD 로 인한 CD 회수공정시의 어려움이 따르므로 CD 생

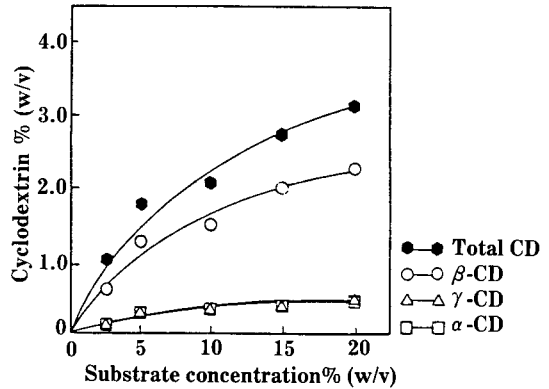


Fig. 9. Effect of substrate concentration on cyclodextrin formation; soluble starch, pH 6.0, 50°C, 24 hr.

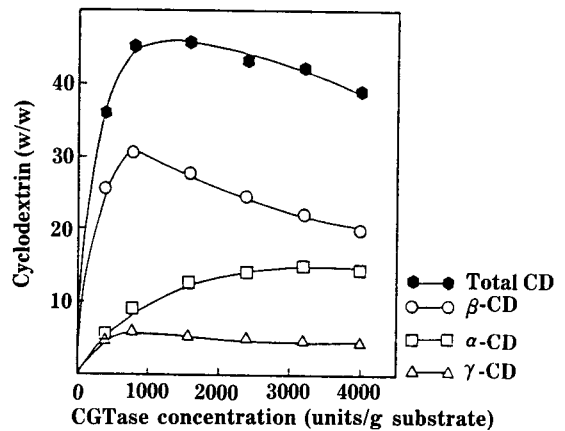
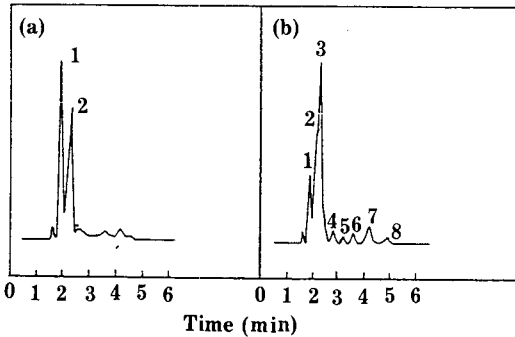


Fig. 10. Effect of CGTase concentration on cyclodextrin formation; soluble starch 5% (w/v), pH 6.0, 50°C, 24 hr.

산성이 낮아지게 된다. 따라서 CD 생산성을 높이기 위해서는 CD 전환율이 낮더라도 어느 정도 고농도의 기질을 사용하되, CD 전환율을 높일 수 있는 방법으로 CGTase 첨가량의 증가, 기질의 fed-batch 식 첨가와 같은 보조적인 방법을 병행해야 할 것으로 사료된다.

**효소첨가량의 영향:** Fig.10 과 같이 기질 g 당 CGTase 첨가량이 900-1100 unit 인 경우 가장 높은 CD 전환율을 보였으며 효소첨가량에 따라  $\alpha$ -CD 와  $\beta$ -CD 의 합성비율이 큰 변화를 보였다. 특히 기질 g 당 효소 1000 unit 이상을 첨가하였을 경우 효소농도 증가에 따라  $\beta$ -CD 와  $\gamma$ -CD 생성량이 서서히 줄고  $\alpha$ -CD 의 생성이 급격히 증가하는 양상을 보였다. 위의 결과는  $\beta$ -CD 를 우선적으로 합성하는 *B. circulans* 의 경우 효소량이 변화하여도  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -CD 의 비율이 변함이 없는 것과는 다른 성질인 반면,



**Fig. 11. High performance liquid chromatography of the transglycosylated steviosides without CGTase (A) and with 2units of CGTase (B) from alkalophilic *Bacillus circulans*; Peak 1, stevioside; Peak 2, rebaudioside; Peak 3, glucose; Peak 4, 5, 6, 7 and 8, the transglycosylated steviosides.**

마찬가지로  $\beta$ -CD 생성균인 *B. ohbensis* 의 경우 반응 후반까지도 전혀 생성되지 않던  $\alpha$ -CD 가 효소의 과다첨가에 의해서 빠른 속도로 증가하는 것과는 유사한 양상이고 이는 CGTase 에 대하여 친화력이 높은  $\beta$ -CD 가 CGTase 과잉존재하에서 재배열 등의 반응을 쉽게 받아  $\alpha$ -CD 가 증가하는 것으로 사료된다.

**CGTase 의 transglycosylation 작용**

정제된 CGTase 의 당전이성을 stevioside 를 이용하여 검토하였다. Stevioside 는 화학구조상 2 가지의 당 결합부위를 가지고 있어 전분가수분해물, 당류 등을 donor 로 하고 stevioside 를 acceptor 로 하여 본 효소를 작용시키면 각각의 결합부위( $\alpha$ -1, 4)에 glycosidic 결합으로 당전이가 생기게 된다. Fig.11 은 정제된 CGTase 를 soluble starch 를 donor 로 하여 stevioside 로 당전이시킨 것을 HPLC 로 확인한 것이다. 그 결과 stevioside 및 rebaudioside A (chromatogram A 의 peak 1 및 2)가 당전이 steviosides (chromatogram B 의 peak 4-8)로 전이된 모습이 나타났는데 오펜수 등(11)도 중성균 *Bacillus* sp. 유래의 CGTase 를 사용하여 유사한 stevioside 당전이성을 관찰한 바 있다.

한편 donor 를 soluble starch 대신 여러가지 당으로 사용하였을 경우 Table 3 과 같이 정제된 CGTase 는 glucose 와 maltose 에는 stevioside 에로의 당전이 작용이 없었고 maltotriose, maltotetraose 에는 soluble starch 에 조금 못미치는 당전이작용이 있었으며 sucrose 에도 약간의 당전이작용이 관찰되었다.

이러한 결과로 보아 본 효소는 glucose unit 이

**Table 3. Transglycosylation of stevia from various donors to stevia as an acceptor (A; stevioside, B; rebaudioside).**

Donor	Concentration (mg/ml)	Degree of conversion (A)	Degree of conversion (B)
None	0	0	0
Soluble starch	50	88	25
Glucose	50	0	0
Maltose	50	0	0
Maltotriose	50	75	13
Maltotetraose	50	75	44
Sucrose	50	22	13

(Stevia concentration; 50 mg/ml)

짧은 사슬의 당보다는 긴 사슬의 다당류일수록 당전이작용이 양호함을 알 수 있었다.

**요 약**

토양으로부터 역가높은 CGTase 를 분리하는 호알칼리성 미생물을 분리하였으며, 동정 결과 *Bacillus circulans* 로 판정되었다. 배양액 중의 CGTase 를 ammonium sulfate 침전, DEAE-Sephadex 그리고 Sephadex G-100 column chromatography 로 분리, 정제하여 단일 단백질 band 를 얻었다. 정제된 CGTase 의 분자량은 약 93,000, 최적 pH 와 온도는 6.0, 50°C 였으며, pH 와 온도안정성은 5.5-11, 65°C 까지였다. Soluble starch 를 기질로 할 때의  $V_{max}$  와  $K_m$  값은 각각 0.16  $\mu$ mole  $\beta$ -CD/min, 14.3 mg soluble starch/ml 이었고 24 시간 반응액의  $\alpha$ -:  $\beta$ -:  $\gamma$ -CD 의 생성비율은 1 : 8.1 : 1.9 로서  $\beta$ -CD 를 우선적으로 합성하였다. 기질로 glucose 와 maltose 를 사용하였을 때 CD 합성작용이 없었으며, sweet potato 그리고 corn starch 를 사용하였을 때 가장 높은 CD 합성작용을 보였다. 어느 수준 이상의 과다한 CGTase 첨가경우에는  $\alpha$ -CD 생성이 급격히 증가하였다. 또한 정제된 CGTase 는 stevioside 에로의 당전이성을 갖고 있었다.

**참고문헌**

1. 한국유전공학연구조합, Cyclodextrin (유전공학 자료 64), 1986.
2. Tilden, E.B. and C.S. Hudson: *J. Bacteriol.*, **43**, 527 (1942).



3. Depinto, J.A. and L.L. Cambell: *Biochemistry*, **7**, 114 (1968).
4. Kobayashi, S., K. Kainuma and S. Suzuki: *Carbohydrate Res.*, **61**, 229 (1978).
5. Kitahata, S. and S. Okata: *Agri. Biol. Chem.*, **38**, 387 (1974).
6. Whistler, R.L., J.N. Bemiller and E.F. Paschall: *Starch-chemistry and Technology*, second ed., Academic Press, 143 (1984).
7. Nakamura, N. and K. Horikoshi: *Agri. Biol. Chem.*, **40**, 753 (1976).
8. Nakamura, N. and K. Horikoshi: *Agri. Biol. Chem.*, **40**, 935 (1976).
9. Nakamura, N. and K. Horikoshi: *Agri. Biol. Chem.*, **40**, 1785 (1976).
10. Hamamoto, T., T. Kaneko and K. Horikoshi: *Agri. Biol. Chem.*, **51**, 2019 (1987).
11. 오평수, 고성철, 서항원, 산업미생물학회지, **14** (6), 461 (1986).
12. 유주현, 정용준, 이정수, 산업미생물학회지, **17** (2), 148 (1989).
13. Horikoshi, K. and T. Akiba: *Alkalophilic microorganisms*, Japan Scientific Societies Press, 9 (1982).
14. Park, C.S., K.H. Park and S.H. Kim: *Agri. Biol. Chem.*, **53**, 1167 (1989).
15. Krieg, N.R. and J.G. Holt: *Bergey's Manual Systematic Bacteriology*, Vol. 1, Williams and Wilkins, Baltimore, (1984).
16. Kaneko, T., T. Kato, N. Nakamura and K. Horikoshi: *J. Jpn. Soc. Starch Sci.*, **34**, 45 (1987).
17. Bradford, M.M.: *Anal. Biochem.*, **72**, 248 (1976).
18. Davis, B.J. and N.Y. Ann: *Acad. Sci.*, **121**, 404 (1964).
19. Laemmli, U.K.: *Nature* (London), **227**, 680 (1970).
20. Pongsawasdi, P. and M. Yagisawa: *Agri. Biol. Chem.*, **52**, 1099 (1988).
21. Masao, N., C.C. Chen and D.C. Shew: *Agri. Biol. Chem.*, **50**, 2701 (1986).
22. Okada, S. and S. Kitahata: *Proc. Sym. Amylases (Osaka)*, **8**, 21 (1973).
23. Sato, M., Y. Yagi, H. Nagano and T. Ishikura: *Agri. Biol. Chem.*, **49**, 1189 (1985).
24. Kitahato, S. and S. Okada: *J. Jpn. Soc. Starch Sci.*, **9**, 7 (1982).

(Received June 14, 1989)