

## Cyclodextrin분해효소의 정제 및 그 특성

김 용 휘 · 심 규 광\* · 문 영 희

전북대 농대, \*전주우석대

**초록** : *Bacillus stearothermophilus* KFCC 21203를 배양하여 cyclodextrin(CD)을 분해하는 효소를 분리, 정제하고 정제효소의 몇 가지 특성을 조사하였다. 배양액에서 얻은 조효소를 염석, DEAE-cellulose column chromatography, Ultro AcA 34 gel filtration등의 방법으로 15배 정제하였으며 회수율은 77.2%이었다. 정제효소의 specific activity는 12.30units/mg protein 이었고 분자량은 약 29,500정도였다. 이 효소의 작용최적 pH는 5.5, 작용최적온도는 55 °C였으며 40 °C이하의 온도와 pH 5.0~8.0의 범위에서 안정하였고  $\gamma$ -CD에 대한 Km치는  $3.78 \times 10^{-3}$  M이었다. 정제효소는  $\beta$ -CD에 대한 활성이 매우 낮았고  $\alpha$ -CD에는 거의 활성이 없었으나  $\gamma$ -CD에는 매우 높은 활성을 나타내었으며, 이의 분해산물로는 주로 glucose 및 maltose 그리고 소량의 maltotriose였다. 또한 amylose, potato starch, corn starch, amylopectin 및 maltooligomer등에는 높은 활성을, 그리고 glycogen, dextrin에도 비교적 높은 활성을 나타내었고 분해산물로는 주로 glucose와 maltose였다(1989년 11월 14일 접수, 1990년 2월 22일 수리).

Cyclodextrin(이하 CD)은 1890년대에 처음 발견된 이후 CD생산 균주의 검색과 동정, CD합성효소의 분리, 정제 및 특성, CD의 조제, 결정화, 구조, 이화학 성질, 정량, 이용개발 등 CD에 관한 많은 연구가 진행되었다.

한편 CD생산균주에 의하여 생성된 CD류혼합물중에서  $\gamma$ -CD는 생성수율이 낮고 용해도가 높기 때문에<sup>1,2)</sup>  $\alpha$ -CD나  $\beta$ -CD의 분리·정제시에 혼입하여 이를 제거하기가 어려우므로  $\gamma$ -CD만을 선택적으로 분해하는 효소를 사용하여 이를 분해 제거하면  $\alpha$ -CD나  $\beta$ -CD의 정제효율을 높일 수 있을 것이다. 그런데 CD류는 glucoamylase나  $\beta$ -amylase와 같은 exo type의 amylase로 가수분해를 받지 않으나 endo type의 amylase<sup>3)</sup>나 *Flavobacterium*의 glucoamylase<sup>4)</sup>로  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -CD가 모두 가수분해되어 각종 oligo당을 생성한다. 또한 *Aspergillus oryzae*<sup>5-7)</sup>와 *Pseudomonas*<sup>8)</sup>속의 균체내 amylase도  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -CD를 특히  $\alpha$ -CD를 특이적으로 잘 분해하며, pancreatic  $\alpha$ -amylase, salivary  $\alpha$ -amylase 및 taka amylase는 활성은 낮지만  $\alpha$ -CD를<sup>9)</sup>, *B. subtilis* var. liquefying amylase와 *B. subtilis* var. saccharifying amylase는 주로  $\beta$ -CD를<sup>10, 11)</sup>, *B. polymyxa*는 주로  $\beta$ ,  $\gamma$ -CD를<sup>12)</sup> 분해하고, *B. megaterium*, *B. macerans*, *B. circulans*, *B. stearothermophilus* TC-60등의 cyclodextrin glucanotransferase(CGTase)는 주로  $\alpha$ -CD를, 그리고 적은량의  $\beta$ ,  $\gamma$ -CD도 분해하며<sup>13)</sup>, *B. macerans*의 균체내 효소로서 CD를 분해하는 cyclodextrinase가 존재한다<sup>14)</sup>는 보고등이 있다.

이와 같이 CD분해효소들은 CD류에 대한 선택적인 분

해능이 낮으며, 또한 특정 CD만을 선택적으로 분해하는 효소에 관한 연구는 거의 없는 실정이다. 이에 따라 용해도가 특히 높은  $\gamma$ -CD만을 선택적으로 분해시켜  $\alpha$ -나  $\beta$ -CD의 분리, 정제효율을 높이는데 기여하고자 본 실험을 수행하였다.

CD합성효소나 또는 분해효소를 분비하는 것으로 알려진 *Bacillus*속 중에서 *B. macerans* KFCC 32408, *B. megaterium* KFCC 32320, *B. stearothermophilus* KFCC 21203를 선정, 배양하고 이의 배양액에서 추출한 조효소액을 일부 정제하여 CD류에 작용시켰는데 *B. macerans*와 *B. megaterium*의 효소는  $\gamma$ -CD뿐만 아니라  $\beta$ -CD도 함께 분해하였다. 그러나 *B. stearothermophilus*의 효소는  $\gamma$ -CD를 선택적으로 분해하였으므로 이 균주를 선정하여 균주가 생산하는 효소를 분리, 정제한 다음 몇가지 작용특성과 기질특성, 그리고 CD류와 전분류 및 oligo당에 대한 분해특성등을 조사하였기에 이에 보고하는 바이다.

### 재료 및 방법

#### 1. 공시균주

공시균주로는 *Bacillus stearothermophilus* KFCC 21203을 사용하였으며 한국종균협회에서 분양받았다.

#### 2. 균주의 배양 및 조효소액의 조제

공시균주를 nutrient borth배지에 접종하여 37 °C에서 24시간 진탕(100 rpm)배양한 후 배양액 1.4 ml를 취하여

곡식배지(wheat bran 10g, oat meal 1g, fresh potato 1g, polypeptone 1g, CaCO<sub>3</sub> 1g, 증류수 14 ml)에 가하고 37 °C에서 4일간 정치배양하였다. 배양기에 0.01M sodium phosphate 완충액(pH 6.0, 이하 동일) 200 ml를 가하여 30분간 교반하고 1시간 방치한 다음 거즈로 여과하고 여액을 원심분리하여 그 상등액을 조효소액으로 사용하였다.

3. 효소의 정제

조효소액은 다음과 같이 정제하였다. 즉 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>의 40-95 % 포화용액에서 생성된 조효소액의 침전물을 0.01 M sodium phosphate 완충액에 녹인 후 반투성막을 사용하여 같은 완충액으로 24시간 교반하면서 투석하였다. 이 효소액을 Work등<sup>6)</sup>의 방법에 따라 전처리한 DEAE-cellulose column에 주입하고 0.5 M NaCl을 함유한 0.01 M sodium phosphate 완충액을 gradient로 혼합, 주입하여 60 ml/hr의 유속으로 용출하면서 8 ml씩 분취하고 각 분취의 단백질 농도와 효소활성을 측정하였다. 활성부분을 모아 -40 °C에서 동결건조한 후 적당량의 완충액으로 녹인 다음 동일한 완충액으로 24시간 평형화시킨 Ultro AcA gel column에 주입하고 12 ml/hr의 유속으로 용출시키면서 4 ml씩 분취하고 이의 단백질농도와 효소활성을 측정하였으며 활성부분을 모아 정제효소로 사용하였다.

4. 정제효소의 정제도 및 분자량 측정

정제효소의 정제는 HPLC(column=protein pak-300 SW, solvent=0.1 M sodium acetate buffer pH 6.0+0.1 M NaCl)와 전기영동법으로 확인하였고, 전기영동은 Davis 법<sup>7)</sup>에 준하여 12.6 % acrylamide gel을 사용하였다.

정제효소의 분자량은 전기영동법으로 정제효소와 표준단백질의 log mol. wt.와의 상대이동도를 비교하여 측정하였으며, cytochrome C(12,400), carbonic anhydrase (29,000), bovine serum albumin(66,000)을 표준단백질로 사용하였다.

5. 효소활성 측정

효소활성은 0.5 % *r*-CD용액 1 ml에 0.1 M sodium phosphate 완충액 2 ml와 효소액 0.05 ml를 가하여 40 °C에서 10분간 반응시킨 후 3,5-dinitrosalicylic acid용액 3 ml를 가하고 끓는 물에 15분간 방치하여 발색시킨 다음 냉각하고 증류수 20 ml를 가한 후 575 nm에서 흡광도를 측정하고, 생성된 환원당을 비색법으로 정량(Miller법)<sup>8)</sup>하여 측정하였다. 효소활성 1 unit는 pH 6.0, 40 °C에서 분당 1 μM의 maltose를 생성하는 효소량으로 정하였다.

6. 단백질농도의 측정

효소정제 단계에서 각 분획별 단백질농도는 UV monitor로 280 nm에서 흡광도를 측정하여 비교하였으며, 효소액의 총 단백질농도는 bovine serum albumin을 표준물질로 사용, Lowry등<sup>9)</sup>의 방법으로 측정하였다.

7. 정제효소의 특성

1) 작용최적 pH 및 pH 안정성 : 작용최적 pH는 pH 2.5~pH 9.0의 Britten-Robinson 완충액 각 2 ml에 0.5 % *r*-CD용액 1 ml와 효소액 0.1 ml를 가하여 조사하였고, pH 안정성은 효소액 0.1 ml를 pH 3.0~pH 12.0의 동일 완충액에 가하여 40°C에 2시간 보존한 후 0.5M sodium phosphate 완충액 2 ml와 0.5 % *r*-CD용액 1 ml를 가하여 조사하였으며, 모두 40 °C에서 10분간 반응시킨 후 효소활성을 측정하였다.

2) 작용최적온도 : 0.5 % *r*-CD용액 1 ml에 0.01 M sodium phosphate 완충액 0.5 ml와 효소액 0.1 ml를 가하고 20 °C에서 90 °C까지 10 °C간격의 각 온도에서 10분간 반응시킨 후 효소활성을 측정하였다.

3) 열 안정성 : 0.01 M sodium phosphate 완충액 0.5 ml에 효소액 0.1 ml를 가하고 20 °C에서 85 °C까지 10 °C간격의 각 온도에 10분간 보존한 후 0.5 % *r*-CD용액 1 ml를 가하고 40 °C에서 10분간 반응시킨 다음 잔존하는 효소활성을 측정하였고, 한편 각 온도에 효소액을 30분간 보존하면서 경시적으로 효소활성을 측정하여 보존시간에 따른 활성도의 변화를 조사하였다.

4) 기질특이성 : 기질로는 amylose(from corn), amylopectin(from corn), glycogen(from oyster), potato starch, corn starch(이상 Sigma사), α-, β- (Nihon Shokuhin Kako 사), *r*-CD(일본 Wako사)의 각 2 % 용액을, 기질특이성을 비교하기 위한 기준 효소로는 Sigma사 제품인 α-amylase(from *Bacillus* species, 2,800 units/mg/5 ml, pH 6.9), β-amylase(from sweet potato, 750~1,000 units/mg/5ml, pH 4.8), glucoamylase(from *Rhizopus* genus mold, 12,100 units/g, 15 mg/5 ml, pH 4.5)를 사용하였다.

각 효소액 0.1 ml와 이에 해당하는 최적 pH(정제효소=pH 5.5)의 Britten-Robinson 완충액 2 ml를 각 기질용액 1 ml에 가하고 α-, β-amylase는 20 °C<sup>20)</sup>, 정제효소와 glucoamylase는 40 °C에서 10분간 반응시켜 효소활성을 측정하고 기질특이성을 상대활성으로 비교하였다.

5) 기질농도의 영향 : 0.08 mM~40 mM의 *r*-CD용액 3 ml에 정제효소액 0.125 ml를 가하고 40 °C에서 10분간 반응시킨 후 효소활성을 측정하여 기질농도의 영향을 조

사 하였고 Michaelis정수는 Lineweaver-Burk방법<sup>21)</sup>으로 plot하여 구하였다.

6) 정제효소의 분해특성 : 정제효소를 다음의 각종 기질에 24시간 반응시키면서 10분과 24시간의 반응으로 생성된 당을 HPLC(column =  $\mu$ Bondapak/carbohydrate, solvent = acetonitrile/H<sub>2</sub>O, 65 : 35)<sup>22)</sup>로 분별측정하여 분해상태를 조사하였으며 이를 기준 효소와 비교하였다.

Amylose, amylopectin, glycogen, dextrin은 이의 2% 용액 각 1ml에 효소액 0.1ml와 완충액 2ml를 가하여 반응시켰고, maltose에서 maltoheptose까지의 소당류는 이의 2% 용액 0.1ml에 효소액 0.02ml와 완충액 0.2ml를 가하여 반응시켰으며, CD류는 이의 2% 용액 1ml에 효소액 0.1ml와 완충액 2ml를 가하여 반응시켰다. 기준효소의 종류와 효소별 반응온도 및 완충액의 pH는 전기한 4)항과 같다.

결과 및 고찰

1. 효소정제 및 정제효소의 분자량

*Bacillus stearothermophilus*를 배양하여 얻은 조효소액을 염석, DEAE-cellulose column chromatography, gel filtration등의 과정을 통하여 정제한 결과 Table 1에서 보는 바와 같이 조효소액에 비하여 specific activity는 15배 증가하였고, 이의 회수율은 77.2%이었다.

김등<sup>23)</sup>은 *B. macerans* KFCC 32408의 CGTase를 염석, 전분흡착, DEAE-cellulose column chromatography, Sephadex G-100 gel filtration의 순으로 정제하여 465.7배(회수율 : 30.1%)정제하였고, Kitahata와 Okada<sup>24)</sup>는 *B. stearothermophilus* TC-60의 CGTase를 염석, 전분흡착, DEAE-cellulose column chromatography, Biogel P-150 gel filtration의 순으로 18.4 배(회수율 : 27%) 정제하였으며, Kitahata등<sup>25)</sup>은 *B. coagulans*의 cyclodextrinase를 염석, DEAE-sephadex와 hydroxyapatite column chromatography, Ultro AcA 44 gel filtration등의 방법으로 830배(회수율 : 24%) 정제하였다. 또한 De Pinto와 Comphell<sup>2)</sup>은 *B. macerans*의 cyclodextrinase를 염석, DEAE-

cellulose column chromatography, Sephadex G-200 gel filtration, 한외여과등으로 40.6배(회수율 : 29.9%) 정제하였고 Kato등<sup>8)</sup>도  $\alpha$ -amylase를 비슷한 방법으로 95 배(회수율 : 14%)정제하였다. 본 실험에서는 이들과 비교할 때 회수율은 상당히 높았으나 정제도는 낮은 경향이 있었다. 그러나 HPLC와 전기영동으로 정제도를 조사한 결과 Fig. 1에서와 같이 HPLC chromatogram상에 단일 peak를 나타내었고 polyacrylamide gel 전기영동에서도 단일 band를 나타냈으므로 거의 순수하게 정제된 것으로 생각된다.

한편 정제효소의 분자량은 polyacrylamide gel 전기영동방법으로 측정한 결과 Fig. 2에서 보는 바와 같이 약 29,500정도였다. SDS polyacrylamide gel 전기영동으로 측정한 분자량이 *B. stearothermophilus* TC-60의 CGTase<sup>24)</sup>는 68,000이었고, *B. coagulans*의 cyclodextrinase<sup>25)</sup>는 62,000이었으며, *Pseudomonas*의  $\alpha$ -amylase<sup>8)</sup>는 96,000이었다는 보고등에 비하면 정제효소의 분자량은 비교적 작은 경향이였다.

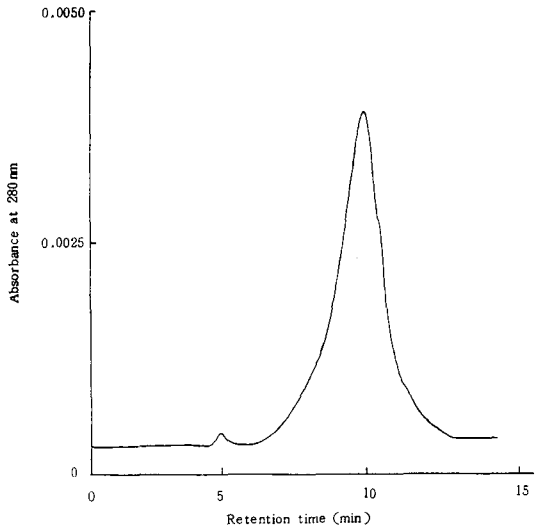


Fig. 1. HPLC chromatogram of the enzyme

Table 1. Purification of the enzyme obtained from *Bacillus stearothermophilus*

Purification step	Volume (ml)	Total activity (units)	Total protein (mg)	Specific activity (units/mgprotein)	Yield (%)	Purification (fold)
Crude extract	500	2,874.9	3,526.8	0.82	100.0	1.0
40~95%(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	68	2,674.3	1,118.9	2.39	93.0	2.9
DEAE-cellulose chromatography	340	2,422.9	480.4	5.04	84.3	6.1
Ultro AcA 34 gel filtration	61	2,219.3	180.4	12.30	77.2	15.0

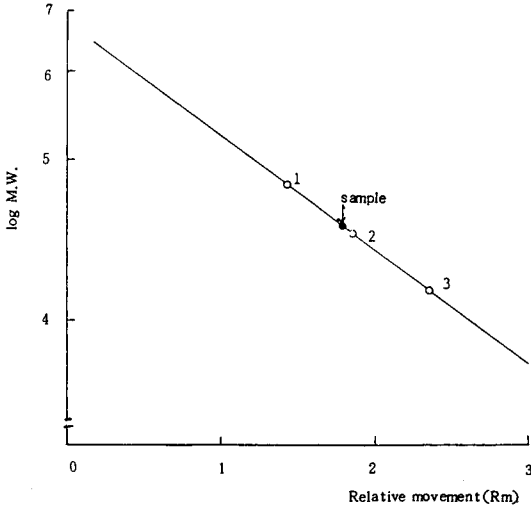


Fig. 2. Molecular weight determination of the purified enzyme by acrylamide gel electrophoresis.

The standard proteins :

1. Bovine serum albumin(M.W. 66,000)
2. Carbonic anhydrase(M.W. 29,000)
3. Cytochrome C(M.W. 12,400)

2 정제효소의 특성

1) 작용최적 pH 및 pH 안정성 : 정제효소는  $\gamma$ -CD를 분해할 때 pH 5.5에서 최대활성을 나타냈으며 pH 3.0에서와 pH 7.5에서 상대활성이 50%로 감소하였고 각 pH에 10분간 보존된 정제효소는 pH 5.0~8.0에서 안정하였으나 그 밖의 pH에서는 상대활성이 급속히 감소하였다.

이는 CD분해효소로 알려진 *B. macerans* CGTase<sup>23)</sup>, *B. megaterium* CGTase<sup>24)</sup>, *Pseudomonas*  $\alpha$ -amylase<sup>8)</sup>, *B. stearothermophilus* TC-60 CGTase<sup>24)</sup>, *B. coagulans* cyclodextrinase<sup>25)</sup> 등의 최적 pH는 각각 7.0, 5.2~6.2, 5.5, 6.0, 6.2 이고 pH 6.0~8.5, 7.0~10.0, 4.5~7.5, 7.0~9.0, 6.0~7.3에서 각각 안정하였다고 한 보고등과 유사한 경향이었으나 근소한 차이를 나타내고 있다.

2) 작용최적온도 : 정제효소는 20°C에서 부터 활성이 증가하여 55°C에서 최대의 상대활성을 나타냈으며 그 이상의 온도에서는 점차로 감소하였다. 이는 *B. coagulans* cyclodextrinase<sup>25)</sup>의 45°C보다는 높고, *Pseudomonas*의  $\alpha$ -amylase<sup>8)</sup>와 *B. megaterium* CGTase<sup>24)</sup>의 55°C와는 같으나 *B. macerans* CGTase<sup>24)</sup>의 60°C, *B. stearothermophilus* TC-60 CGTase<sup>24)</sup>의 70°C보다는 낮았다.

3) 열안정성 : 정제효소를 각 온도에 10분간 보존한 다음 잔존활성을 측정할 결과 20~40°C에서 안정하였으나 45°C에서 부터 점차로 활성이 감소되었고 85°C에 보존한

경우는 90% 이상이 실패되었다.

*B. stearothermophilus* TC-60 및 *B. megaterium*의 CGTase<sup>23)</sup>는 50°C와 55°C에서 안정하였고, *Pseudomonas*의  $\alpha$ -amylase<sup>8)</sup>와 *B. macerans*의 CGTase<sup>23)</sup>는 50°C이하에서 거의 안정하였다. 그러나 정제효소의 안정온도는 이들보다 낮았다.

4) 기질특이성 : CD류 및 전분류에 대한 정제효소의 기질특이성을 기존의  $\alpha$ -amylase,  $\beta$ -amylase, glucoamylase와 비교 조사한 결과는 Table 2와 같다. 효소를 10분간 반응시킬 때 정제효소의 각 기질에 대한 활성은 amylose, potato starch, corn starch,  $\gamma$ -CD, amylopectin, glycogen의 순으로 낮아졌다. 그리고  $\gamma$ -D에 대한 활성은 높았으나  $\beta$ -CD에 대해서는 매우 낮았고  $\alpha$ -CD에 대해서는 활성이 없었다. 한편  $\alpha$ -amylase,  $\beta$ -amylase, glucoamylase는 전분류에 대한 활성은 매우 높았으나 CD류에 대한 활성은 없었고 glucoamylase만이  $\gamma$ -CD에 대하여 낮은 활성을 나타냈을 뿐이다.

Table 2. Substrate specificity of the enzyme obtained from *Bacillus stearothermophilus*(G. L. Miller's method)

Substrate	Relative activity of enzyme(%)			Purified enzyme*
	$\alpha$ -Amylase	$\beta$ -Amylase	Glucoamy-lase	
Amylose	95.2	76.6	95.8	100.0
Amylopectin	77.3	98.6	78.2	80.5
Glycogen	60.1	59.4	44.1	58.9
Potato starch	100.0	83.8	100.0	97.5
Corn starch	49.1	100.0	95.3	96.3
$\alpha$ -Cyclodextrin	0.0	0.0	0.0	0.0
$\beta$ -Cyclodextrin	0.0	0.0	0.0	4.2
$\gamma$ -Cyclodextrin	0.0	0.0	21.9	90.3

\*Purified enzyme ; The purified enzyme of *Bacillus stearothermophilus*.

그런데 Suetsugu등<sup>26)</sup>은 Taka amylase에 의하여  $\gamma$ -CD,  $\beta$ -CD는 잘 분해되고  $\alpha$ -CD의 분해는 어렵다고 하였으나, Ben-Gerson<sup>7)</sup>은 Taka amylase에 의하여  $\beta$ -CD보다  $\alpha$ -CD가 더 잘 분해된다고 하였고, Kato등<sup>8)</sup>은 *Pseudomonas*  $\alpha$ -amylase가  $\beta$ -CD보다  $\alpha$ -CD를 더 잘 분해한다고 하였다. 또한 Marshall과 Miwa는<sup>9)</sup> Taka amylase에 의한 직쇄 oligo당의 가수분해속도를 100으로 할 때  $\gamma$ -CD는 50~30,  $\beta$ -CD는 0.4~0.25,  $\alpha$ -CD는 0.05~0.03이라 하였고, French<sup>26)</sup>는 타액  $\alpha$ -amylase가 starch분해를 100으로 할 때  $\alpha$ -CD에 대하여 1정도의 활성을 나타낸다고 하였으며, De-Pinto와 Comphell<sup>27)</sup>은 *B. macerans*의 cyclodextrinase

가 amylose, amylopectin, potato starch, glycogen 등에는 거의 작용을 하지 않으나  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD를 분해하였으며 특히  $\beta$ -CD에 대해서는 그 활성이 매우 높다고 하였다. 또 *Flavobacterium*의 glucoamylase<sup>26)</sup>는  $\alpha$ -CD의 가수분해를 100으로 할 때  $\beta$ -CD는 52,  $\gamma$ -CD는 62로 CD류에 대한 활성은 높았으나 maltose와 amylopectin에는 활성이 낮았다. 그러나 본 실험에 사용한 glucoamylase는 전분류에는 활성이 높았으나  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD에는 활성이 없었고  $\gamma$ -CD에만 약간의 활성을 나타내었다.

그런데 정제효소는  $\alpha$ -CD에는 전혀 활성이 없었고  $\beta$ -CD에는 아주 낮은 활성을 보였으나  $\gamma$ -CD에는 선택적으로 아주 높은 활성을 나타냈을 뿐만 아니라 amylose, potato starch, corn starch, amylopectin 등의 전분류에도 높은 활성을 나타냈다.

이와 같은 결과로 미루어 볼 때 정제효소는 상기 보고에 나타난 효소나 본 실험에 사용된 기존 효소와는 그 기질특이성에 차이가 있는 것으로 생각된다. 그리고 정제효소의 전분류에 대한 분해능이 amylose, amylopectin, glycogen의 순으로 낮아졌던 점으로 보아 본 효소는  $\alpha$ -1, 4결합을 분해시키는 효소로 생각된다.

5) 기질농도의 영향 : 효소활성에 미치는 기질농도의 영향을 조사한 결과는 Fig. 3과 같다.  $\gamma$ -CD의 농도가 0.37 mM까지 증가하는 동안에는 효소활성도 증가하였으나

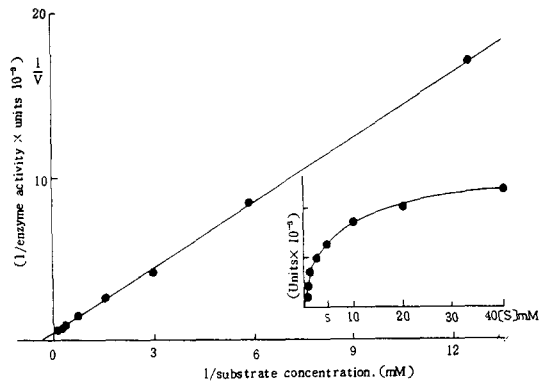


Fig. 3. Lineweaver-Burk plot of the purified enzyme obtained from *Bacillus stearothermophilus*

그 후는 매우 완만하게 증가하였으며  $K_m$ 치는  $3.78 \times 10^{-3}$  M이었다. 이는 전분류에 대한 분해능이 거의 없으나 CD류를 잘 분해하는 cyclodextrinase<sup>26)</sup>의  $\gamma$ -CD에 대한  $K_m$ 치  $0.47 \times 10^{-3}$  M에 비하여 다소 높은 값이라고 생각된다.

6) 기질에 대한 분해특성 : 정제효소는  $\gamma$ -CD뿐만 아니라 전분류에도 활성이 있었으므로 전분류와 소당류 및 CD류에 대한 효소의 분해생성물을 조사하여 그 특성을 알아 보았다.

정제효소와  $\alpha$ -,  $\beta$ -amylase, glucoamylase를 전분류에 24

Table 3. The ratio of sugar produced from substrates by various enzymes for 24 hr

Enzyme	Substrate*	Sugar produced (%)					
		G1	G2	G3	G4	G5	G6
$\alpha$ -Amylase	Amylose	0.0	54.6	45.4	0.0	0.0	0.0
	Amylopectin	0.0	15.8	17.8	0.1	27.9	38.4
	Glycogen	0.1	57.3	42.8	0.0	0.0	0.0
	Dextrin	0.1<	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
$\beta$ -Amylase	Amylose	0.0	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	Amylopectin	0.0	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	Glycogen	0.0	1.0<	0.0	0.0	0.0	0.0
	Dextrin	23.0	77.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Glucoamylase	Amylose	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	Amylopectin	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	Glycogen	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	Dextrin	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Purified enzyme**	Amylose	0.0	99.0	1.0<	0.0	0.0	0.0
	Amylopectin	37.9	62.1	0.0	0.0	0.0	0.0
	Glycogen	43.4	56.6	0.0	0.0	0.0	0.0
	Dextrin	25.3	74.7	0.0	0.0	0.0	0.0

Substrate\* ; G1 ; Glucose, G2 ; Maltose, G3 ; Maltotriose,

G4 ; Maltotetraose, G5 ; Maltopentaose, G6 ; Maltohexaose.

Purified enzyme\*\* ; The purified enzyme of *Bacillus stearothermophilus*.

Table 4. The ratio of sugar produced from maltooligomer by various enzymes for 10 min and 24 hr

Enzyme	Sub*	Sugar produced for 10 min(%)						Sugar produced for 24 hr(%)				
		G1	G2	G3	G4	G5	G6	G1	G2	G3	G4	G5
$\alpha$ -Amylase	G2	0.0	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	99.0	0.0	0.0	0.0
	G3	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0	8.7	91.3	0.0	0.0
	G4	0.0	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0	5.8	0.0	0.0	94.2	0.0
	G5	0.0	10.3	0.0	0.0	89.7	0.0	6.8	9.0	7.8	0.1	76.3
	G6	10.1	0.0	0.0	0.0	0.0	89.9	22.3	0.1	9.8	0.1	67.7
	G7	24.6	19.9	0.0	0.0	13.7	41.8	7.1	30.4	0.1	0.1	62.3
	$\beta$ -Amylase	G2	0.0	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0	5.3	94.7	0.0	0.0
G3		0.0	0.0	100.0	0.0	0.0	0.0	4.0	10.0	86.0	0.0	0.0
G4		0.0	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0	6.0	94.0	0.0	0.0	0.0
G5		0.0	40.6	59.4	0.0	0.0	0.0	7.4	38.0	54.6	0.0	0.0
G6		11.3	88.7	0.0	0.0	0.0	0.0	6.7	93.3	0.0	0.0	0.0
G7		6.7	51.4	41.9	0.0	0.0	0.0	4.4	56.5	39.1	0.0	0.0
Glucos- amylase		G2	18.3	81.7	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0	0.0
	G3	17.9	25.8	56.3	0.0	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	G4	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	G5	38.9	32.8	28.3	0.0	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	G6	42.0	28.8	29.2	0.0	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	G7	44.0	24.8	31.1	0.0	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	Purified enzyme**	G2	0.0	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0	56.5	43.5	0.0	0.0
G3		0.0	13.7	86.3	0.0	0.0	0.0	47.4	52.6	0.0	0.0	0.0
G4		38.5	61.5	0.0	0.0	0.0	0.0	47.0	53.0	0.0	0.0	0.0
G5		0.0	56.4	43.6	0.0	0.0	0.0	46.1	53.9	0.0	0.0	0.0
G6		14.6	46.7	38.7	0.0	0.0	0.0	50.3	49.7	0.0	0.0	0.0
G7		0.0	40.2	42.0	17.8	0.0	0.0	48.5	51.5	0.0	0.0	0.0

Sub\* ; Substrate, G1 ; Glucose, G2 ; Maltose, G3 ; Maltotriose, G4 ; Maltotetraose, G5 ; Maltopentaose, G6 ; Maltohexaose, G7 ; Maltoheptaose.

Purified enzyme\*\* ; The purified enzyme of *Bacillus stearothermophilus*.

시간, 그리고 oligo당에는 10분과 24시간 작용시켜 생성된 glucose에서 maltohexose까지를 HPLC로 조사한 결과는 Table 3, 4와 같다. 정제효소는 amylose에 작용하여 주로 maltose를 생성하였고 amylopectin, glycogen, dextrin에 작용하여 glucose와 maltose를 생성하였다. 또한 oligo당의 분해에서 정제효소는 반응시간 10분에 maltotriose이상은 쉽게 분해하여 glucose, maltose, maltotriose를 생성하였으나 반응시간 24시간에는 maltose까지도 분해하였다. 이와 같이 공시한 기준효소와는 그 분해생성물 및 분해시간이 달랐다. Kato등<sup>20</sup>은 *Pseudomonas*의  $\alpha$ -amylase가 maltose는 분해하지 못하나 maltotriose를 분해하여 glucose와 maltose를 생성하고 maltotetraose, maltopentaose, maltohexose를 분해하여 glucose, maltose, maltotriose를 생성한다고 하였는데 공시한  $\alpha$ -amylase는 이와 다른 경향을 나타내었다.

한편 정제효소 및  $\alpha$ ,  $\beta$ -amylase, glucoamylase를 CD

류에 작용시킨 결과는 Table 5, Fig. 4와 같다. 정제효소는 반응시간 10분에서는  $\gamma$ -CD를 분해하여 glucose와 maltose, 소량의 maltotriose를 생성하였고 분해되지 않은  $\gamma$ -CD가 상당량 잔존하였으나(Fig. 4) 반응시간 24시간에는 완전히 분해되었다. 한편  $\beta$ -CD에 대한 분해능은 매우 낮아 소량의 glucose와 maltose를 생성하였고  $\alpha$ -CD는 분해시키지 못하였다. 각 CD류에 대한 정제효소와 공시 효소의 반응생성물중 소량의 glucose가 검출(Table 5, Fig. 4)된 것은 각 CD류에 섞여 있는 불순물 때문인 것으로 판단되어 이를 무시하였다. 한편 공시한 glucoamylase는  $\gamma$ -CD에 대한 상대활성이 반응시간 10분에는 매우 낮았으나(Table 2) 24시간에서는  $\gamma$ -CD를 완전히 분해하여 glucose와 maltose를 생성하였다(Table 5).

Kitahata와 Okada<sup>20</sup>는 *B. megaterium*, *B. circulans*, *B. stearothermophilus*, *B. macerans*의 CGTase는  $\beta$ -CD,  $\gamma$ -CD보다  $\alpha$ -CD를 잘 분해하나 *B. megaterium*, *B. circulans*,

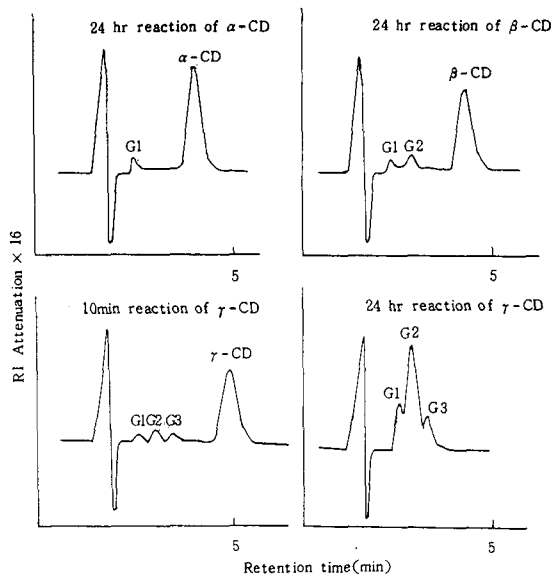


Fig. 4. HPLC chromatogram of produced sugar in decomposition of CD by the purified enzyme obtained from *Bacillus stearothermophilus* for 10min and 24 hr.

G1 ; Glucose, G2 ; Maltose, G3 ; Maltotriose,  
 $\alpha$ -CD ;  $\alpha$ -Cyclodextrin,  $\beta$ -CD ;  $\beta$ -Cyclodextrin,  
 $\gamma$ -CD ;  $\gamma$ -Cyclodextrin.

*B. macerans*의 CGTase는  $\gamma$ -CD보다  $\beta$ -CD를, *B. stearothermophilus*의 CGTase는  $\beta$ -CD보다  $\gamma$ -CD를 더 잘 분해한다고 하였고, Bender<sup>30)</sup>는 *Flavobacterium glucoamylase*의 CD류에 대한 분해능은  $\alpha$ -CD >  $\gamma$ -CD >  $\beta$ -CD의 순이었으며 반응초기부터 glucose가 생성된다고 하였다. 그의

Table 5. The ratio of sugar produced and residual cyclodextrin in decomposition of cyclodextrins by various enzymes for 24 hr

Enzyme	Substrate*	Sugar produced(%)			Residual cyclodextrin(%)
		G1	G2	G3	
$\alpha$ -Amylase	$\alpha$ -Cyclodextrin	3.8	0.0	0.0	96.2
	$\beta$ -Cyclodextrin	3.9	0.0	0.0	96.1
	$\gamma$ -Cyclodextrin	3.8	0.0	0.0	96.2
$\beta$ -Amylase	$\alpha$ -Cyclodextrin	3.5	0.0	0.0	96.5
	$\beta$ -Cyclodextrin	3.7	0.0	0.0	96.3
	$\gamma$ -Cyclodextrin	2.9	0.0	0.0	97.1
Glucoamylase	$\alpha$ -Cyclodextrin	3.9	0.0	0.0	96.1
	$\beta$ -Cyclodextrin	5.3	0.0	0.0	94.7
	$\gamma$ -Cyclodextrin	66.6	33.3	0.0	0.0

Purity of  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -CD were 98.5, 98.0, 97.0 %, respectively.

Substrate\* : G1 ; Glucose, G2 ; Maltose, G3 ; Maltotriose.

많은 연구에서는 효소의 작용으로 CD류가 분해될 때 먼저 CD환이 개열되어 maltohexose, maltoheptose, maltooctose가 된 다음 시간이 경과되면서 주로 glucose와 maltose를 생성하는 것으로 보고<sup>8, 25, 26, 31-33)</sup>하고 있다.

이상의 실험결과로 미루어 볼 때 정제효소는  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -CD중  $\gamma$ -CD를 주로 분해할 뿐만 아니라 전분류 및 oligo당도 분해할 수 있으며 그 분해특성도 공시한  $\alpha$ -amylase,  $\beta$ -amylase, glucoamylase와는 다른 효소로 판단된다.

참 고 문 헌

- 小林昭一, 具沼圭二 : J. Jap. Soc. Starch Sci., 28 (2) : 132(1981)
- Kitahata, S. and Okada, S. : J. Jap. Soc. Starch Sci., 29(1) : 13(1982)
- 小林昭一, 具沼圭二 : 化學と生物, 20(7) : 453(1982)
- Bender, H. : Eur. J. Biochem., 115 : 287(1981)
- Suetsugu, M., Koyama, S., Takeo, K. and Kuge, T. : J. Biochem., 76 : 57(1974)
- Hanrahan, V. M. and Caldwell, M. L. : J. of the American Chem. Soc., 75 : 2191(1953)
- Ben-Gershon, E. : Nature, 175 : 593(1955)
- Kato, K., Sugimoto, T., Amemura, A. and Harada, T. : Biochem. Biophys. Acta, 391 : 96(1975)
- Marshall, J. J. and Miwa, L. : Biochem. Biophys. Acta, 661 : 142(1981)
- Ohnishi, M. : J. Biochem., 69 : 181(1971)
- Moseley, M. H. and Keay, L. : Biotech. and Bioeng., 12 : 251(1970)
- De-Pinto, J. A. and Comphele, L. L. : Biochemistry, 7(1) : 121(1968)
- Kitahata, S. and Okata, S. : J. Jap. Soc. Starch Sci., 29(1) : 13(1982)
- De-Pinto, J. A. and Comphele, L. L. : Science, 175 : 593(1955) <化學と生物, 20(7) : 456(1982)>
- Scopes, R. K. : "Techniques in the life sciences", Vol B1/1, p7, Elsevier Biomedical, N. Y.(1978)
- Work, T. S. and Work, E. : "Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology", 2nd Ed., Vol. 2 : 228, North-Holland Publishing Com., Amsterdam(1980)
- Davis, B. J. : "Disk electrophoresis II, Method and application to human serum proteins", Ann. N. Y. Sci., 121 : 404(1964)
- Miller, G. L. : Analytical Chemistry, 31(3) : 426

(1959)

19. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. L. : J. Biol. Chem., 193 : 265 (1951)

20. Bernfeld, P. : Methods in Enzymol., 1 : 149(1955)

21. Lehninger, A. L. : "Biochemistry", Chap. 9, Worth Publishers, N. Y.(1975)

22. Kitahata, S., Yoshikawa, S. and Okata, S. : J. Jap. Soc. Starch Sci., 25(1) : 19(1978)

23. 김용휘, 김형수, 김명희, 오석홍 : 전북대농대 논문집 16 : 91(1985)

24. Kitahata, S. and Okada, S. : J. Jap. Soc. Starch Sci., 29(1) : 7(1982)

25. Kitahata, S., Taniguchi, M., Bertran, S. D., Sugimoto, T. and Okada, S. : Agric. Biol. Chem., 47(7) : 1441(1983)

27. De-Pinto, J. A. and Compbell, L. L. : Arch. Biochem. Biophys., 125 : 253(1968)

28. French, D., Pulley, A. O., Effenberger, J. A., Rougvie, M. A. and Abdullah, M. : Arch. Biochem. Biophys., 111 : 153(1965)

29. Kitahata, S. and Okata, S. : J. Jap. Soc. Starch Sci., 29(1) : 13(1982)

30. Bender, M. L. : Eur. J. Biochem., 115 : 287(1981)

31. Hanrahan, V. M. and Caldwell, M. L. : J. American Chem. Soc., 75 : 2191(1953)

32. Ohnishi, M. : J. Biochem., 69 : 181(1971)

33. Moseley, M. H. and Keay, L. : Biotech. and Bioeng., 12 : 251(1970)

Purification and Some Properties of Cyclodextrin Hydrolase

Yong-Hwi Kim, Kyu-Kwnag Shim\* and Young-Hee Moon(Chonbuk National Univ., and \*Chonju Woosuk Univ.)

Abstract : Cyclodextrin hydrolase from Bacillus stearothermophilus KFCC 21203 was purified and the properties of the purified enzyme were investigated. The enzyme was purified 15 folds with 77% recovery by ammonium sulfate fractionation, DEAE-cellulose chromatography, and Ultro Aca 34 gel filtration. The specific activity and the molecular weight of the enzyme were 1.30 units/mg protein and about 29,500, respectively. The maximum activity of the enzyme was shown at 55°C and pH 5.5. However, stable temperature and pH were 40°C and 5.0~8.0, respectively. The Km value for γ-cyclodextrin was 3.78 × 10<sup>-3</sup> M. The degradation activity of the enzyme was selectively high for γ-cyclodextrin, and very low for β-cyclodextrin, but not for α-cyclodextrin. The decomposed products of γ-cyclodextrin were mainly glucose and maltose, and a little maltotriose. The activity of the enzyme was very high for amylose, potato starch, corn starch, amylopectin and maltooligomer, and relatively high for glycogen and dextrin. The decomposed products of them were mainly glucose and maltose.