

## 밀기울배지를 이용한 *Bacillus macerans*의 Cyclodextrin Glucanotransferase 생산과 효소특성

선우양일·안 태 진·김 동 환·박 인 호·\*채 기 수·\*\*김 광

동아대학교 생물학과  
\*경남전문대학교 식품영양학과  
\*\*동아대학교 화학공학과

### Purification and Enzymatic Properties of Cyclodextrin Glucanotransferase from *Bacillus macerans* Cultivated in Wheat-bran Medium

Yang-Il Sunwoo, Tae-Jin Ahn, Dong-Hong Kim, In-Ho Park,  
\*Ki-Su Chae and \*\*Kwang Kim

Department of Biology, Dong-A University, Pusan 604-714, Korea

\*Department of Food Science and Nutrition, Kyung-Nam Junior Collage, Pusan 616-012, Korea

\*\*Department of Chemical Engineering, Dong-A University, Pusan 604-714, Korea

#### ABSTRACT

*Bacillus macerans* cyclodextrin glucanotransferase(EC 2.4.1.19: 1, 4- $\alpha$ -D-Glucan 4- $\alpha$ -D(1, 4- $\alpha$ -glucano)-transferase, CGTase) was purified by the technique of starch adsorption and DEAE-cellulose column chromatography. The molecular weight of the enzyme was 67,000, consisting of a subunit. The enzyme converted starch into  $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\gamma$ -CD in the relative amounts of 1:1.68:0.32, respectively. In the early reaction period, maltohexose was formed mainly by the coupling reaction of  $\alpha$ -CD with D-glucose and then other oligosaccharides. Maltotetrose was formed mainly from  $\alpha$ -CD in the initial stage of hydrolysis of the enzyme and then small amount of other oligosaccharides. Maltotriose was a good substrate for the enzyme and maltosyl or D-glucopyranosyl group can be transferred from this sugar. In this work, D-glucosyl transfer was preferred.

#### 서 론

Cyclodextrin glucanotransferase(EC.2.4.1.19:1, 4- $\alpha$ -D-Glucan 4- $\alpha$ -D(1, 4- $\alpha$ -glucano)-transferase, CGTase)는 전분과 그 유사기질을 분해하여 6~12개의 glucose unit를  $\alpha$ -1, 4배당결합으로 연결한 비환원성 환상당류인 cyclodextrin(CD)를 형성하는 반응을 촉매하는 효소이다. CD분자는 여러 종

류의 무기물질이나 유기물질과 결합하여 포접화합물을 형성하기 때문에 휘발성 물질의 불휘발화, 산화 및 광분해의 안정화, 물리·화학적 성질의 변화 및 유효화가 가능하기 때문에 식품, 의약품, 농약 분야에 도입되어 그 실용화가 확대되고 있다(1, 2).

미생물 발효법으로 생성되는 CD에는 6개의 glucose단위로 구성된  $\alpha$ -CD와 7개인  $\beta$ -CD 및 8개인  $\gamma$ -CD의 3종류가 잘 알려져 있고, 이들 CD의 합성

을 촉매하는 효소인 CGTase는 coupling reaction (3, 4), disproportionation(5),  $\alpha$ -CD를  $\beta$ -CD로 전환하는 반응(6) 등의 효소작용기작이 집중적으로 연구되어 이 효소는 cyclization과 coupling과 disproportionation의 3가지 반응을 촉매하기 때문에 효소 작용이 복잡한 것으로 생각되어 왔다(7).

Tilden과 Hudson(8)이 *Bacillus macerans*의 배양액에 CGTase가 존재함을 확인한 후 Rawlins(9)이 *Bacillus macerans* enzyme (BME)의 정제에 전분흡착법을 적용하였고, Schwimmer와 Garibaldi (10, 11)가 ethanol로 단백질을 침전하여 초원심분리 기법상에서 효소의 단일 밴드를 확인하였고, De-Pinte와 Campbell(12)은 magnesium chloride와 ammonium sulfate 함께 처리하여 단백질을 침전시킨 후 칼럼 크로마토그래피로 효소를 정제하여 전기영동상에서 단일 밴드를 나타내는 정제된 효소를 얻었다. 또한 Kitahata와 Okada(13)는 전분흡착 후, 겔 여과 크로마토그래피를 실시하여 효소를 정제한 후, disc-gel 전기영동상에서 단일 밴드를 나타내는 것을 확인하였다. 위와 같이 다양한 기법으로 CGTase를 정제하는 방법들이 보고되어 왔으나, 이들 분리방법은 효소 이외의 단백질들을 제거하기 위해 여러 단계의 분리과정을 거치기 때문에 많은 양의 효소를 순수 분리하는데 어려운 점이 많다.

본 연구에서는 경제적으로 값싸게 다량의 효소를 분리 정제하기 위해서 *B. macerans*를 밀기울을 탄소원으로 사용한 배지에서 회분배양하여 crude enzyme액을 취한 후 효소를 전분흡착법과 DEAE-cellulose 크로마토그래피법으로 효소를 정제하였다. 또한 효소에 대한 특이성을 조사하고, CD의 합성 특성을 조사하였기에 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 균주 및 배지 조성

*B. macerans*(IFO 3490)는 한국과학기술원 유전자은행에서 분양받았다. 접종용 균주의 배양은 500ml 삼각 flask에 glutamate-citrate 배지(0.1% glucose, 0.3% citric acid · H<sub>2</sub>O, 0.6% Na<sub>3</sub>-citrate, 0.8% Na-glutamate, 1% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, 0.05% MgSO<sub>4</sub>, 0.15% KCl, 0.01% CaCl<sub>2</sub>, 1% ethyl alcohol, 0.2% yeast extract, 10<sup>-4</sup>% Zn<sup>++</sup>(as sulfate), 2×10<sup>-5</sup>% Fe<sup>++</sup>(as chloride), 10<sup>-5</sup>% Cu<sup>++</sup>(as sulfate), 10<sup>-6</sup>% Mo<sup>++</sup>(as ammonium molybdate), 2×10<sup>-6</sup>% Mn<sup>++</sup>(as chloride): pH 7.0)에서 37°C에서 2일간 배양

한 다음 100ml의 밀기울배지(3% 밀기울, 0.5% CaCO<sub>3</sub>, 0.5% ammonium sulfate를 수도물에 녹임)가 함유된 500ml flask에 접종하여 37°C에서 2일간 배양하였다. 배양 완료된 2l의 *B. macerans* broth를 원심분리하여 상층액을 crude emzyme-용액으로 사용하였다.

### 배양액 중의 CGTase의 분리정제

전분흡착은 3~5°C에서 crude enzyme-용액에 ammonium sulfate를 첨가하여 3%(W/V)의 농도로 맞추었고, 액화활성 2000unit당 전분 1g 비율로 전분을 첨가하였으며, pH 7.5~8.5로 조정된 후 하루 동안 교반시켜서 효소를 전분에 흡착시켰다. 효소를 전분에 흡착시키기 위해서 옥수수 전분을 120°C에서 20분 동안 heat-moisture처리하였다. 효소가 흡착된 전분을 원심분리하여 모아서 차가운 33% ethanol로 4회 세척한 후 4°C에서 15분간 7000 rpm으로 원심분리하여 전분을 모은 후, 증류수를 첨가하여 50°C에서 15분간 진탕교반하여 효소를 전분으로부터 탈착시켜 부분정제된 효소용액을 취했다.

50mM Tris-HCl buffer(pH 7.0)으로 미리 평형화시킨 DEAE-cellulose 칼럼(1.7×35cm)에 상기 효소용액을 주입하고, 비흡착된 성분은 1mM CaCl<sub>2</sub>가 함유된 50mM Tris-HCl buffer(pH 7.0)로 세척하였고, 흡착성분은 0.5M NaCl이 함유된 동일 buffer로 0~0.5M NaCl의 직선상의 농도구배로써 용출시켰다. 효소활성이 있고 전기영동상에서 단일 밴드를 나타내는 분획들을 모아서 1mM CaCl<sub>2</sub>가 함유된 6mM Tris-HCl buffer(pH 7.0)에서 투석하여 효소를 정제하였다.

### 액화활성 측정 및 단백질 정량

액화활성 측정은 blue value method(14)에 따른다. 0.2%(W/V) soluble starch와 1mM CaCO<sub>3</sub>가 포함된 20mM glycerophosphate-HCl buffer(pH 6.0) 200  $\mu$ l의 기질용액에 효소액 100  $\mu$ l를 첨가하여 40°C에서 10분간 반응시킨 후 발색시켜 660nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소 1unit는 같은 조건에서 1분간에 0.1mg의 soluble starch를 가수분해할 수 있는 효소량으로 정의하였다. 단백질 정량은 Lowry법(15)에 따라 750nm에서 흡광도를 측정하여 산출하였고 표준단백질은 소혈청 알부민을 사용하였다.

### 전기영동

Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel el

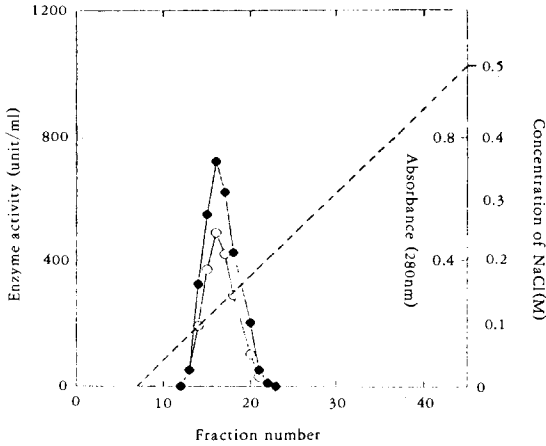


Fig. 1. Elution profile of cyclodextrin glucanotransferase from *B. macerans* on DEAE-cellulose. ○:protein, ●:enzyme activity.

electrophoresis(SDS-PAGE)는 Laemmli법(16)을 따랐다. 전기영동에는 10% polyacrylamide gel을 사용하였고, 분자량 측정을 위한 표준단백질은 SDS-PAGE standard high molecular weight marker (Sigma Co.)를 사용하였다.

Cyclodextrin의 분석 및 정량

CD 및 기타 당들의 분석은 high pressure liquid chromatography(Model U6KM510, Waters Co. U.S.A, HPLC)을 이용하였고, 칼럼은 carbohydrate analysis column, 용출용매는 acetonitrile과 H<sub>2</sub>O로 그 혼합비율은 65:35로 하였으며, RI detector로 검정하였다.

결과 및 고찰

배양액 중의 CGTase의 정제

Crude enzyme용액 중의 효소를 전분에 흡착시킨 후, 냉각된 ethanol로 세척하여 전분에 부착되지 않은 불순물을 제거하고, 전분으로부터 효소를 탈착시킨 후 황산암모늄으로 침전시켜서 투석한 다음, DEAE-cellulose 칼럼 크로마토그래피(Fig. 1)하여 효소를 정제하였다. 정제과정과 효소의 역가와의 관계를 Table 1에 나타내었다. Crude enzyme용액 중의 비활성도는 9.05unit/mg protein이었고, 전분에 흡착시킨 후 탈착시킴으로써 비활성도가 371.8 unit/mg protein으로 41배가 증가되었으며, 황산암모늄

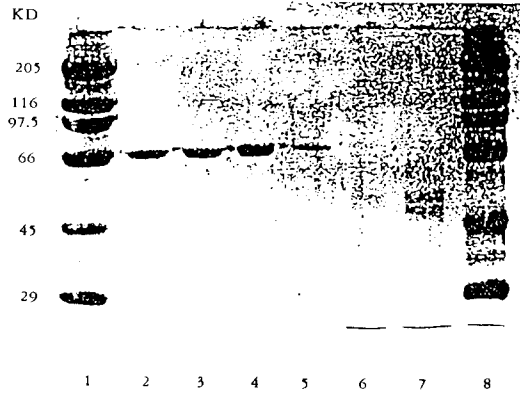


Fig. 2. Purification of cyclodextrin glucanotransferase from *B. macerans*. Samples from each step of the purification procedure were separated on a 10% SDS-polyacrylamide gel with was stained with Coomassie Blue. Lane 1 and 8, molecular weight of standard protein; lane 2 and 3, purified enzyme; lane 4, ammonium sulfate precipitate after treatment of starch desorption; lane 5, starch desorption; lane 6, a supernatant solution of starch adsorption step; lane 7, a supernatant solution of cell culture broth after centrifugation.

침전에 의해 비활성도가 1235.3unit/mg protein으로 137배가 증가되었으며, DEAE-cellulose 칼럼 크로마토그래피에서는 비활성도가 1486.5unit/mg protein이므로 163배 증가하였다.

CGTase가 heat-mositure처리된 옥수수 전분에 흡착될 때 Kobayashi 등(17)은 황산암모늄을 첨가하면 흡착을 방해한다고 했으나, 본 연구 결과에서는 3%의 황산암모늄을 첨가해야 효소가 전분에 흡착되었다. 또한 정제된 효소의 비활성도가 163배 증가된 결과는 다른 연구자들의 35배(17), 135배(18)로 증가된 보고보다 높았다.

정제된 효소의 순수분리 여부를 조사하기 위해 SDS-PAGE한 결과 Fig. 2와 같이 단일 단백질 밴드가 얻어졌고 분자량은 67,000으로 추정되었다. 정제된 효소의 subunit 존재 여부를 확인하기 위해서 SDS 단독 또는 SDS와 2-mercaptoethanol을 함께 처리한 후 SDS-polyacrylamide gel 전기영동한 결과, 모두 단일 밴드를 나타내었으므로 정제된 효소

Table 1. Purification of cyclodextrin glucanotransferase from *B. macerans*.

Purification step	Volume (ml)	Protein (mg/ml)	Total activity	Specific activity (U/mg)	Factor (fold)	Yield (%)
Crude enzyme	1500	5.3	72000	9.06	1	100
Starch adsorption	311	0.39	45095	371.8	41	62.6
Salting out	25.5	0.66	20790	1235.3	137	28.9
DETA-cellulose	24	0.37	13200	1486.5	163	18.3



Fig. 3. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis pattern of purified cyclodextrin glucanotransferase from *B. macerans*. Lane 1, reference (no addition); lane 2, 1% of SDS and 5% of 2-mercaptoethanol; lane 3, 1% of SDS and 20% of 2-mercaptoethanol; lane 4, 1% SDS. The reagents were added to the enzyme solution that had been buffered in 25% of 10mM glycerol-phosphate buffer (pH 7.0). The mixtures were treated for 2h at 50°C. Gels were stained with Coomassie Blue.

는 monomer로 존재하고 있음이 시사되었다. Kobayashi 등(7)이 정제한 BME의 분자량이 145,000 이었고, 이 효소는 분자량 74,000인 2개의 subunit로 되어 있으며, 각 subunit 단독으로는 효소활성이 없다고 보고했으나, 본 연구의 결과와 서로 다른 것은 사용된 균주가 다르기 때문인 것으로 추정된다.

#### 정제된 CGTase의 효소 특성

효소활성에 미치는 온도 및 pH 영향: Fig. 4는 CGTase의 활성에 미치는 pH의 영향을 나타내며 최적 pH는 6.0으로서 지금까지 알려진 대부분의 CGTase가 최적 pH인 4.5~6.5의 약산성 범위와 일치하

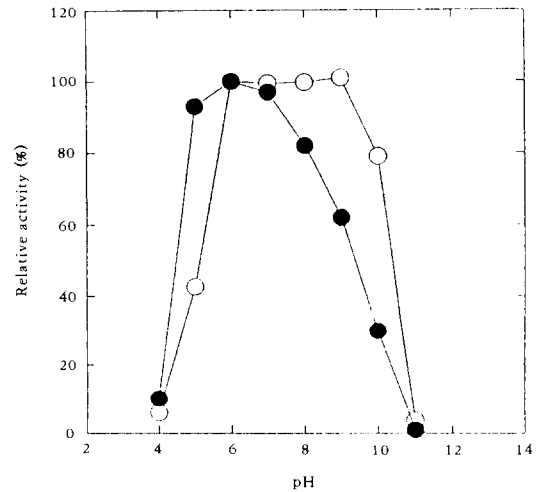


Fig. 4. Effect of pH on the enzyme activity (●) and stability (○-○).

고 있다(2). pH안정성을 조사하기 위해서 정제된 CGTase를 50mM buffer용액에서 40°C, 30분간 유지시킨 후 잔존 활성도를 측정된 결과, pH 안정성은 6.0~9.0으로서 지금까지 발표된 대부분의 CGTase의 최적 pH와 pH 안정성 범위가 일치하였다(7, 13). Fig. 5는 CGTase의 활성에 미치는 온도의 영향을 나타내며 정제된 효소의 최적온도는 60°C로서 다른 연구자들(7, 12)의 결과와 비슷했다. 또한 온도 안정성을 검토하기 위해 정제된 CGTase를 20mM  $\beta$ -glycerophosphate buffer용액(pH 6.0)에 희석하여 각 온도에서 30분간 유지시킨 후 잔존 활성도를 측정된 결과, 온도 안정성은 45°C 이하에서는 안정성이 유지되었으나 그 이상에서는 효소활성이 급격히 떨어졌다.

#### CGTase의 작용 특이성

CGTase의 cyclization반응: 시간에 따른 CD생

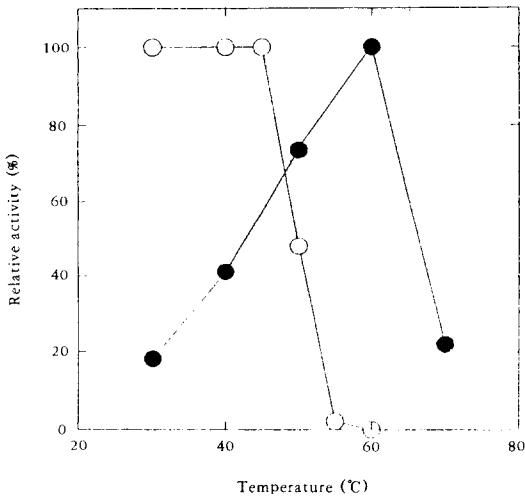


Fig. 5. Effect of temperature on the enzyme activity (●-●) and stability (○-○).

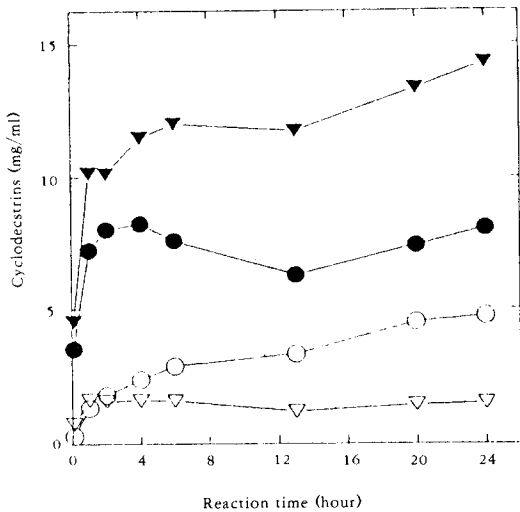


Fig. 6. Time course of cyclodextrin production. ○:α-CD, ●:β-CD, ▽:γ-CD, ▼:total CD.

성의 양상을 조사하기 위해 2% soluble starch 1ml 을 기질로 하여 정제된 효소액 100unit를 첨가하여 pH 6.0(1mM CaCl<sub>2</sub>가 함유된 20mM β-glycerophosphate buffer), 40°C의 조건으로 반응시키면서 시간별로 시료를 채취하여 HPLC로 정량한 결과를 Fig. 6에 나타내었다. CD 생성은 반응시작 후 3시간까지 급격히 증가하였으나 그 이후는 서서히 증가

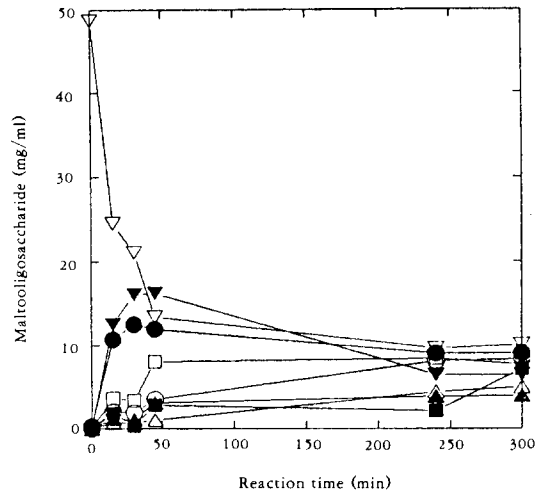


Fig. 7. Coupling pattern of cyclodextrin treated with CGTase. ○:G1, ●:G2, ▽:G3, ▼:G4, □:G5, ■:G6, △:α-CD, ▲:β-CD, ◇:γ-CD.

되어 21시간 동안 합성량은 15% 증가되었다. CD 생성 양상은 반응 초기부터 β-CD가 α-, γ-CD보다 많이 생성되었고 24시간 반응 후의 α-:β-:γ-CD의 생성비율이 1:1.68:0.32였다. 미생물에 의해 생성되는 CD에 대한 α-:β-:γ-CD 합성 비율은 *B. macerans*는 2.7:1:1(7, 12), *B. magaterium*은 1:2.4:1(19), alkalophilic *Bacillus sp.*는 1:11.5:1.5(20) 등으로 보고되어 미생물 종에 따라 다양하다.

CGTase의 coupling반응: Fig. 7은 시간 경과에 따른 CGTase의 coupling반응을 나타낸 것이다. coupling반응을 조사하기 위해 1mM CaCl<sub>2</sub>가 함유된 20mM β-glycerophosphate buffer용액(pH 6.0)에 6% α-CD와 1% D-glucose의 농도로 녹인 기질용액 1ml에 100unit의 효소를 첨가하여 40°C에서 반응시켜 시간별로 시료를 채취하여 HPLC로 정량하였다. 반응 초기에는 α-CD가 분해되어 급격히 감소되어 3시간 이후에는 잔유량이 25%를 유지하다가 20시간 후에는 빠르게 감소되어 22시간에는 미량이 남게 되었고, D-glucose(G1)도 반응 후 3시간까지 빠르게 감소되어 40% 정도의 수준이 유지되었다. 한편 반응 3시간 이후에는 maltohexose(G6)와 β-CD합성이 현저히 증가하였고 소량의 oligosaccharide들인 maltose(G2), maltotriose(G3), maltotetrose(G4), maltopentose(G5)들이 생성되었고, γ-CD도 미량으로 합성되었다. Kobayashi 등(21)

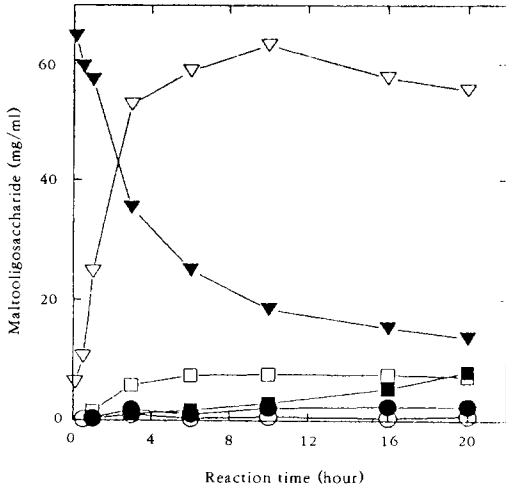


Fig. 8. Cyclodextrin hydrolysis pattern treated with CGTase, ○:G1, ●:G2, ▽:G4, ▼:α-CD, ■:β-CD, □:G6.

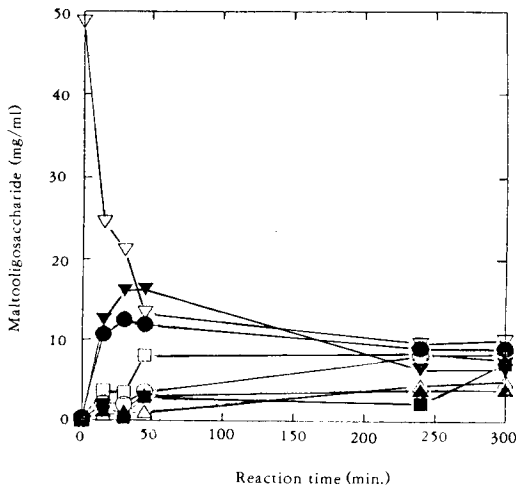


Fig. 9. Disproportionation pattern of maltotrios treated with CGTase. ○:G1, ●:G2, ▽:G3, ▼:G4, □:G5, ■:G6, △:α-CD, ▲:β-CD.

은 CD와 <sup>14</sup>C으로 표지된 glucose(G1)를 기질로 하여 CGTase를 첨가시켜 반응시킨 결과 <sup>14</sup>C으로 표지된 새로운 oligosaccharide가 생성됨을 확인하여 CGTase가 생성한 반응생성물들은 CGTase의 coupling반응 촉매작용으로 생성된 것임을 시사한 바 있다.

**CGTase의 hydrosys pattern :** CGTase의 α-CD 가수분해반응 양상을 Fig. 8에 나타내었다. 6%의 α-CD농도로 상기의 β-glycerophosphate buffer 용액에 녹인 기질용액 1ml에 100unit의 CGTase를 첨가하여 반응시켜 시간별로 시료를 채취하여 HPLC로 정량하였다. 반응 초기에는 α-CD가 분해되어 급격히 감소됨에 따라 주 반응생성물인 maltotetrose (G4)의 양이 빠르게 증가하였고 4시간 이후에는 소량의 G6가 일정 수준으로 생성되었으며, 10시간 이후에는 극소량의 G1, G2, β-CD가 생성되었다. Schwimmer와 Garibaldi(10)는 starch adsorption단계에서 가수분해활성이 소실된다고 하였으나, Kobayashi 등(17)은 BME에는 가수분해활성이 유지된다는 보고와 본 연구결과는 일치하였다.

**CGTase의 disproportionation pattern :** Fig. 9에 표시된 것 같이 CGTase의 disproportionation pattern을 조사하기 위해 상기의 β-glycerophosphate buffer에 6%의 G3가 함유된 기질용액 1ml에 100unit의 효소를 첨가하여 40℃에서 반응시켜 시간별로 시료를 채취하여 HPLC로 정량하였다. G3는 CGTase의 좋은 기질로 반응하여 반응 초기에는 maltosyl group(2G3 → G5 + G1) 또는 D-glucopyranosyl group(2G3 → G4 + G2)으로 전이될 수 있다(22). 50분 이후의 반응에서는 G1, G2, G4, G5가 생성되므로 D-glucopyranosyl전이가 우세한 disproportionation이 일어난 결과이다(22).

감 사

본 연구는 동아대학교 기초과학 연구소의 연구비 지원에 의해 수행되었음을 감사드립니다.

요 약

*Bacillus macerans* cyclodextrin glucanotransferase(CGTase)를 전분흡착법과 DEAE-cellulose 칼럼 크로마토그래피로 정제하였다. 효소의 분자량은 67,000이었고 monomer였다. 정제된 효소는 전분을 α-, β-, γ-CD로 전환시켰으며, CD생성비율은 각각 1:1.68:0.32였다. α-CD와 D-glucose의 coupling반응 초기에는 maltohexose가 주로 생성되었고, 그 후에 다른 oligosaccharide들이 생성되었다. α-CD의 가수분해반응 초기에는 주로 maltotetrose가 생성되었고 그 이후에는 소량의 다른 oligosaccharide들이 생성되었다. 정제된 효소의 좋은 기질

인 maltotriose로부터 maltosyl이나 D-glucopyranosyl group이 전이될 수 있는데, 본 연구에서는 D-glucosyl transfer가 우세하였다.

### 참고 문헌

1. 한국유전공학 연구조합(1986), Cyclodextrin (유전공학 자료 64).
2. 신현동, 이상호, 이용현(1989), 한국산업미생물학회지, **17**(1), 370.
3. D. French, J. Pazur, M. N. Levine and E. Norberg (1948), *J. Am. Chem. Soc.*, **70**, 3145.
4. D. French, M. L. Levine, E. Norberg, P. Nordin, J. H. Pazur and G. M. Wild (1954), *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 2387.
5. E. Norberg and D. French (1950), *J. Am. Chem. Soc.*, **72**, 1202.
6. M. L. Levine (1947), Ph. D. Thesis, Iowa State College.
7. S. Kobayashi, K. Kainuma and S. Suzuki (1978), *Carbohydrate Res.*, **61**, 229.
8. E. B. Tilden and C. S. Hudson (1942), *J. Bacteriol.*, **43**, 527.
9. W. S. Hale and L. C. Rawlins (1951), *Cereal Chem.*, **28**, 49.
10. S. Schwimmer and J. A. Garibaldi (1952), *Cereal Chem.*, **29**, 108.
11. S. Schwimmer (1953), *Arch. Biochem. Biophys.*, **43**, 108.
12. J. A. DePinto and L. L. Cambell (1968), *Biochemistry*, **7**, 114.
13. S. Kitahata, N. Tsuyama and S. Okada (1974), *Agric. Biol. Chem.*, **38**, 387.
14. H. J. Fuwa (1954), *Biochem.* (Tokyo), **41**, 580.
15. O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall (1951), *J. Biol. Chem.*, **193**, 265.
16. U. K. Laemmli (1970), *Nature* (London), **227**, 680.
17. S. Kobayashi, K. Kainuma and S. Suzuki (1978), *Carbohydrate Res.*, **61**, 229.
18. S. Kitahata, N. Tsuyama and S. Okada (1974), *Agric. Biol. Chem.*, **38**, 387.
19. S. Kitahata and S. Okada (1974), *Agric. Biol. Chem.*, **38**, 2413.
20. P. Pongsawasdi and M. Yagisawa (1987), *J. Ferment. Technol.*, **65** (4), 463.
21. S. Kobayash, H. R. L. Ashraf, P. Braun and D. French (1988), *Carbohydrate Res.*, **173**, 324.
22. H. Bender (1983), *Carbohydrate Res.*, **117**, 1.