

## Cyclodextrin Glucanotransferase와 Cyclodextrinase를 생산하는 *Bacillus* 속 세균의 분리와 그 효소들의 특성

권현주 · 남수완 · 김광현 · 곽영규<sup>1</sup> · 김병우\*  
동의대학교 미생물학과, <sup>1</sup>동의공업전문대학 환경공학과

**Isolation of a *Bacillus* sp. Producing both Cyclodextrin Glucanotransferase and Cyclodextrinase and Characterization of the Enzymes.** Hyun-Ju Kwon, Soo-Wan Nam, Kwang-Hyun Kim, Young-Gyu Kwak<sup>1</sup> and Byung-Woo Kim\*. Department of Microbiology, Donggeui University, Pusan 614-714, Korea and <sup>1</sup>Department of Environmental Engineering, Donggeui Technical Junior College, Pusan 614-715, Korea – A bacterium producing Cyclodextrin Glucanotransferase (CGTase) and Cyclodextrinase (CDase) was isolated from soil, and named as *Bacillus stearothersophilus* KJ16. The growth of the isolated strain occurred in two steps, and syntheses of CGTase and CDase were dependent on the growth cycle of the cell. CGTase was constitutively synthesized during the 1st growing phase, while CDase was synthesized inducibly during the 2nd growing phase. When the medium pH was controlled at 7.0, the maximum enzyme activities of CGTase and CDase were increased by 12-fold (1300 mU/ml) and 2-fold (225 mU/ml), respectively, compared with the pH-uncontrolled batch culture. The CGTase of the isolate converted soluble starch to CDs with the ratio of  $\alpha$ -CD: $\beta$ -CD: $\gamma$ -CD=42:46:12 at 55°C. The optimal pH and temperature of CGTase were 6.0 and 60°C, respectively and the optimal pH and temperature of CDase were 6.0 and 55°C. The molecular weights of the purified CGTase and CDase were estimated to be 65,000 and 68,000 dalton, respectively. Among several substrates,  $\gamma$ -CD was most rapidly hydrolyzed by the purified CDase.

Cyclodextrin(CD)은 포도당 6~7개가  $\alpha$ -1,4 결합으로 연결된 환상의 당류로 구성 포도당 수에 따라  $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ -CD로 불린다. CD는 환상 분자로서 분자 외부는 친수성이고 분자 내부는 소수성인 성질을 가지고 있어 동공 내에 각종 유기 및 무기화합물을 포접하여 그 분자들의 물리화학적 성질을 변화시키는 성질을 가지며 이러한 특성을 이용하여 식품, 의약, 농약, 화장품 등의 산업에서 유효 성분의 안정화, 가용화 및 유화등 물성 개선의 첨가제로 이용되고 있다.

CD는 미생물이 생산하는 Cyclodextrin glucanotransferase(EC 2.4.1.19 ; 1,4- $\alpha$ -D-glucan-4- $\alpha$ -D-(1,4-glucano) transferase, cyclizing ; CGTase)에 의하여 전분 및 그 관련 물질로부터 만들어진다. CGTase는 CD를 합성하는 cyclization 반응과 합성된 CD를 개환하여 적당한 수용체에 당을 전이시키는 작용을 가지는 효소이다. 지금까지 보고된 CGTase 생산균주로는 *B. macerans*(1), *B. ohbensis*(2), *B. circulans*(2, 3), *B. megaterium*(4), *B. stearothersophilus*(4, 5), *B. coagulans*(6), *B. firmus*(7), *Klebsiella pneumoniae*(8), alkalophilic *Bacillus* sp.(9-11) 등이 있으며 이들 세균이 생산하는 효소들은 정제되어 그 특성이 잘 알려져 있다.

한편 CD는 말단잔기를 가지지 않는 비환원성 당류

로 통상의 amylase에는 잘 분해되지 않고 Cyclodextrinase(EC 3.2.1.54 ; cyclomaltodextrin hydrolase, decycling ; CDase)에 의해서 분해되어진다. CDase는 CD를 분해하여 maltohexaose, maltoheptaose, maltooctaose와 같은 올리고당을 생성시키며, 역반응을 이용하면 maltose등으로부터 CD를 선택적으로 합성할 수 있다는 가능성 때문에 최근 관심이 모아지고 있는 효소이다(12). CGTase나 다른 amylase에 관해서는 연구가 많이 진행되어 있으나 CDase에 관한 연구는 비교적 적어 지금까지 보고된 CDase 생산 균주로는 *B. macerans*(13), *B. coagulans*(14), *B. sphaericus*(15), *Clostridium thermohydrosulfuricum*(16), 사람의 대장내 세균(17)등이 보고되어 있다. 그외에도 *B. subtilis*(18), *Pseudomonas* sp.(19), *Flabobacterium* sp.(20) 등의 amylase가 CD를 분해하나 이들 효소의 CD 분해속도는 전분 분해속도보다 느린 것으로 알려져 있다.

CGTase와 CDase를 같이 생산하는 균주로는 1968년 Depinto등(13)의 *Bacillus macerans* ATCC8514가 유일하게 보고되어 있으나 이들 효소의 생산이 균주에 미치는 생리학적 영향이나 효소 생합성 조절에 관한 보고는 없는 실정이다.

본 연구실에서는 CGTase 생산균주를 탐색해 오던 중 CGTase와 CDase를 같이 생산하는 호열성 *Bacillus* 속의 균주를 토양으로부터 새로이 분리하여 동정하였으며 그 효소적 특성을 규명하였기에 이에 보고하는

\*Corresponding author.

Key words: *Bacillus stearothersophilus* KJ16, Cyclodextrin glucanotransferase, Cyclodextrinase

바이다.

## 재료 및 방법

### 균주의 분리

호열성 CGTase 생산균주를 분리할 목적으로 부산과 경남일원의 토양 및 퇴비를 채집하여 1% soluble starch 용액에서 80°C, 3~5일간 열처리한 후 0.25% starch azure가 함유된 Caz 배지(21)를 사용하여 평판희석 배양법으로 55°C에서 배양하여 균주를 분리하였다. Caz 배지는 starch azure에 의해 청색을 나타내지만 전분 분해능이 있는 균주의 colony 주위에는 투명환이 생기게 되어 전분분해효소 생산균주의 분리가 용이하다.

### 활성확인법

일차적으로 선별된 균주는 CS 액체배지(21)에 55°C에서 5일간 플라스크 진탕배양하면서 2% soluble starch 용액(50 mM 인산완충액, pH 6.0) 1 ml에 배양상등액 1 ml를 가하여 55°C에서 2시간 반응시킨 후 반응액 10 µl를 slide glass 위에 도말하고 0.1M I<sub>2</sub>-KI 용액 10 µl를 가하여 방치건조후 현미경으로 α-CD의 특징적인 청녹색 침상결정이나 육각판상결정을 확인함으로써 CD의 생성유무를 판별하였다(1). 최종확인용 위조건과 동일조건으로 효소반응시킨 반응액을 paper chromatography로 반응생성물을 확인하였다. Paper chromatography는 반응액 10 µl를 Whatman No.1 filter paper에 점적하고 전개용매로 n-butanol : pyridine : water = 6 : 4 : 3(v/v%)를 사용하여 60°C에서 3회 전개시켰다. 전개후 CD의 검출은 1% I<sub>2</sub> 메탄올 용액으로 발색시켰으며(22) 환원당의 검출은 silver nitrate dip 법(23)으로 발색시켰다.

### 균주의 동정

분리균주를 전자현미경과 위상차현미경으로 형태학적 특성을 관찰하고 생리 및 생화학적 특성을 조사하여 "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology"(24)에 준하여 동정하였다.

### CGTase 및 CDase의 활성측정

CGTase의 활성은 Leujeune등(25)에 의해 제안된 methyl orange 법으로 측정하였다.

반응은 5% soluble starch 용액(50 mM 인산염 완충액, pH 6.0)과 1 mM methyl orange 용액(50 mM 인산염 완충액, pH 6.0)을 50 mM 인산염 완충액(pH 6.0)과 잘 섞고 이 혼합액에 효소 용액을 가하여 55°C에서 10분간 반응시켰다. 반응 후 6N HCl을 가하여 반응을 정지시키고 반응액을 16°C에서 30분간 방치한 후 505 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소활성은 위와같은 조건에서 분당 1 µmole의 α-CD를 생성하는 효소량을 1 unit로

정의하였다.

CDase의 활성측정은 0.5% γ-CD를 포함한 50 mM 인산염 완충액(pH 6.0)에 효소액을 가하고 55°C에서 60분간 반응시켰다. 반응 후 유리 환원당을 Somogyi-Nelson 법(26)으로 정량하였다. 효소활성은 55°C에서 분당 1 µmole의 환원당을 생성하는 효소량을 1 unit로 정의하였다.

### 균주의 배양 및 조효소액의 조제

효소생산을 위한 배지로는 0.5% yeast extract, 0.5% polypeptone, 0.1% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.02% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, pH 7.0의 기본배지에 필요에 따라 각종 탄소원을 첨가하여 사용하였다. 배양은 사용배지에 45°C에서 1일 전배양한 후 본배양액에 1%(v/v) 접종하여 배양하였다. 배양조건은 Erlenmeyer 플라스크를 사용하여 45°C에서 7일간 진탕배양하거나 jar fermenter(Bioflo III, New Brunswick Scientific Co., U.S.A.)를 사용하여 배양하였다. 배양후 배양상등액을 70% ammonium sulfate로 염석하고 투석하여 조효소액으로 사용하였다.

### HPLC에 의한 CD의 분석 및 정량

CD의 분석 및 정량은 HPLC(LC Module 1, Waters Co., U.S.A.)를 사용하였고 column은 TSKgel Amide-80 (Tosoh Co., Japan)으로 acetonitrile : H<sub>2</sub>O = 60 : 40의 용매로 분당 1 ml의 유속으로 용출하여 RI detector (Model 410, Waters)로 검정하였다.

### SDS polyacrylamide gel 전기영동

SDS polyacrylamide gel 전기영동은 Laemmli(27)의 방법에 따라 12% acrylamide gel을 사용하였으며 단백질 염색은 Coomassie brilliant blue R-250으로 하였다. 분자량 측정을 위한 표준단백질은 Bio-Rad사의 분자량측정 시약을 사용하였다.

### Paper Chromatography에 의한 CDase 반응 생성물의 분석

CDase의 반응 생성물은 paper chromatography로 분석하였다(28). 효소반응은 0.6%의 각종 기질용액(50 mM 인산염 완충액, pH 6.0)에 효소액을 가하여 55°C에서 4시간 반응시켰다. 반응액은 비등수에서 5분간 열처리 한 후 각각의 반응액 10 µl씩을 filter paper (Whatman No.1)에 점적한 후 Butanol : pyridine : water(6 : 4 : 3, v/v)을 전개용매로 3회 전개하였다. 생성된 환원당은 알칼리 silver nitrate 용액으로 발색시켰다.

## 결과 및 고찰

### 균주의 분리·선별

내열성 CGTase 생산균주를 분리할 목적으로 토양

시료를 80°C의 1% soluble starch 용액에서 3일간 열처리한 후 Caz 배지에서 평판회석 배양법으로 55°C 이상에서 생육하며 투명환을 형성하는 colony를 선별하였다. 일차적으로 선별된 균주를 1% soluble starch가 함유된 액체기본배지에서 3일간 배양하여 그 배양상등액을 조효소액으로 하여 1% soluble starch 용액을 효소반응시킨 후 Tilden-Hudson 법(1)과 paper chromatography로 확인하여 CD를 생성시키는 균주를 선별하였다. 그 중 KJ16 균주는 CD 합성능에 비해 Caz 배지에서 투명환이 매우 커서 CGTase 외에 또 다른 전분분해효소를 분비할 가능성이 예측되어 이 균주를 1% soluble starch가 함유된 배지에서 7일간 배양하면서 시간별로 배양상등액을 취하여 CGTase 활성과 각종 기질에 대한 분해능을 검토한 결과 배양후기에 CD를 가장 빠르게 분해하는 CDase를 분비하는 것으로 확인되어 이 균주를 최종적으로 선별하였다.

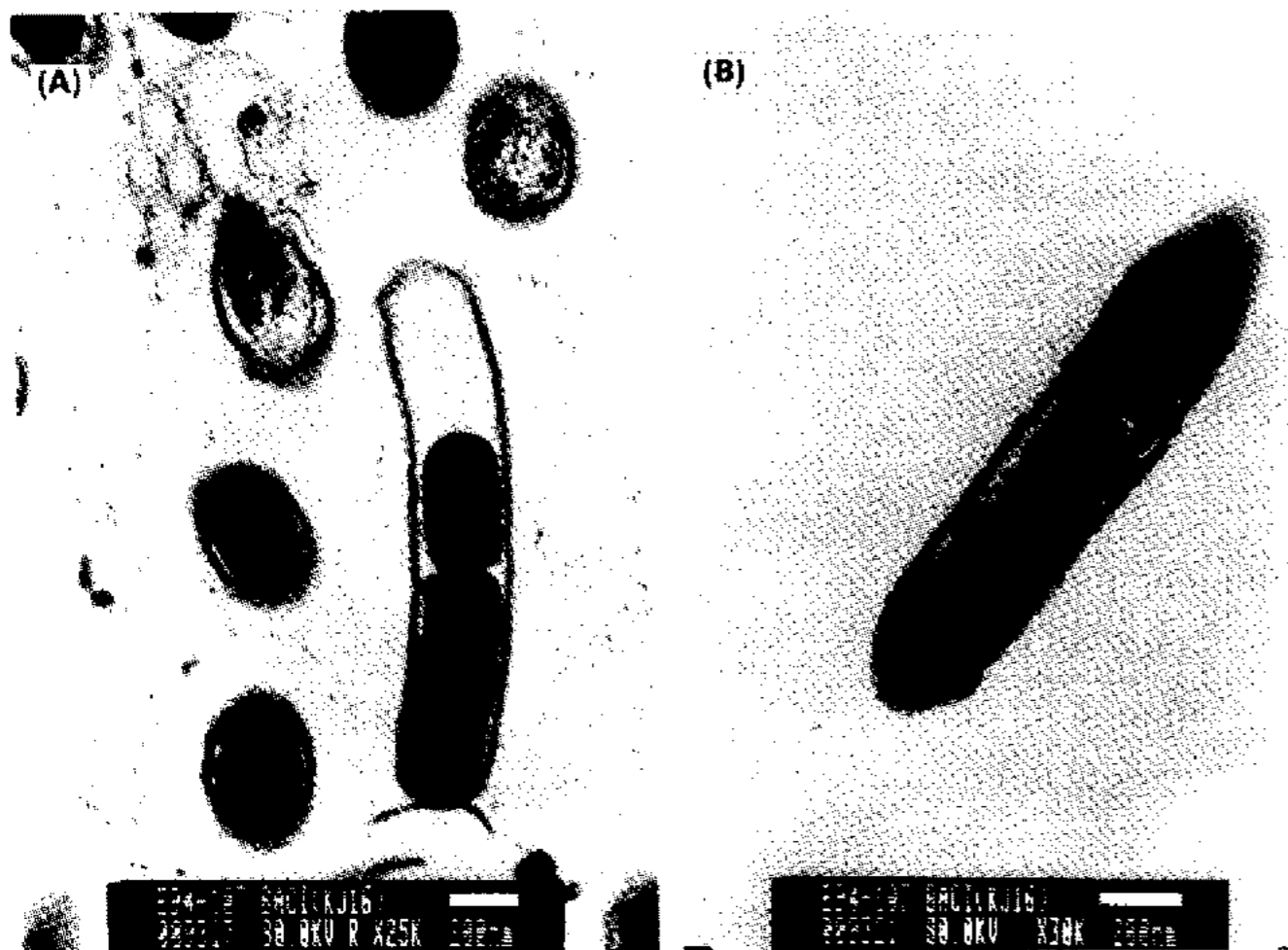
**선별균주의 동정**

선별된 균주 KJ16은 Gram 양성의 간균으로 그 크기는 0.3~0.5 µm×1.3~2.5 µm였으며 운동성이 있고 호기성이며 내생포자를 형성하였다(Fig. 1). LB나 CS 고체배지에서의 colony는 흰색으로 pin point colony (직경 1 mm 이하)를 형성하였다. 생리·생화학적 특성은 Table 1과 같으며 최적 배양온도는 45°C였으나 30°C에서 65°C까지 생육이 가능한 전형적인 호열성 세균이었다. 생육이 가능한 pH의 범위는 5.5~10.0이었으나 최적 생육 pH는 7.0인 중성세균이었다. Hugh-Leifson 배지에 45°C에서 7일간 배양후 glucose, glycerol, mannose, fructose, ribose, raffinose, arabinose, trehalose, xylose, maltose, cellobiose, lactose, sucrose, starch, sorbitol 등에서는 산을 생성하는 반면 adonitol, dulcitol, inositol, rhamnose, sorbose, cellulose, inulin 등에서는

산을 생성하지 않았다. 이와같은 특성은 CGTase 생산 균주로 호열성 세균인 *B. stearotherophilus* ATCC12980과 유사하였으므로(6) 분리균주는 *B. stearotherophilus*로 동정하고 *B. stearotherophilus* KJ16으로 명명하였다. 그러나 분리균주 KJ16은 가수분해활성면에서 전분은 분해하나 casein이나 gelatin은 분해하지 못하고, 50°C에서 혐기성 성장이 가능하며 lysozyme 존재하에서 성장이 가능하다는 점과 CGTase와 CDase 를 함께 생산한다는 점이 대조균인 *B. stearotherophilus* ATCC12980과는 큰 차이를 보였다. 지금까지 CGTase와 CDase를 함께 생산하는 균주는 *B. mace-rans* 만이 유일하게 보고되어 있었다(27). 따라서 본 연구에서 분

**Table 1. Physiological properties of the isolated strain KJ16**

Characteristics	The isolated strain KJ16
Cell size (µm)	0.3~0.5×1.3~2.5
Spore position	terminal
Spore shape	ellipsoidal
Sporangium swollon	+
Motilty	+
Catalase	+
Anaerobic growth	+
Voges-proskauer test	+
pH in V-P broth	<6
Degradation of starch	+
Degradation of casein	-
Liquefaction of gelatin	-
Utilization of citrate	-
Utilization of propionate	-
Degradation of tyrosine	-
Deamination of phenylalanin	-
Nitrate reduced to nitrite	+
Formation of indole	-
Formation of dihydroxyacetone	-
Growth on nutrient broth at pH 5.7	+
Acid from Glucose	+
Arabinose	+
Xylose	+
Mannitol	+
Gas from glucose	-
Growth in NaCl 2%	+
5%	-
10%	-
Growth at 10°C	-
30°C	+
50°C	+
60°C	+
65°C	+
Growth with lysozyme present	+
Growth in the presence of 0.02% Sodium azide	-



**Fig. 1. Transmission electron micrograph of the isolated strain KJ16.**  
A: 20 hr cultivated cell, B: 60 hr cultivated cell

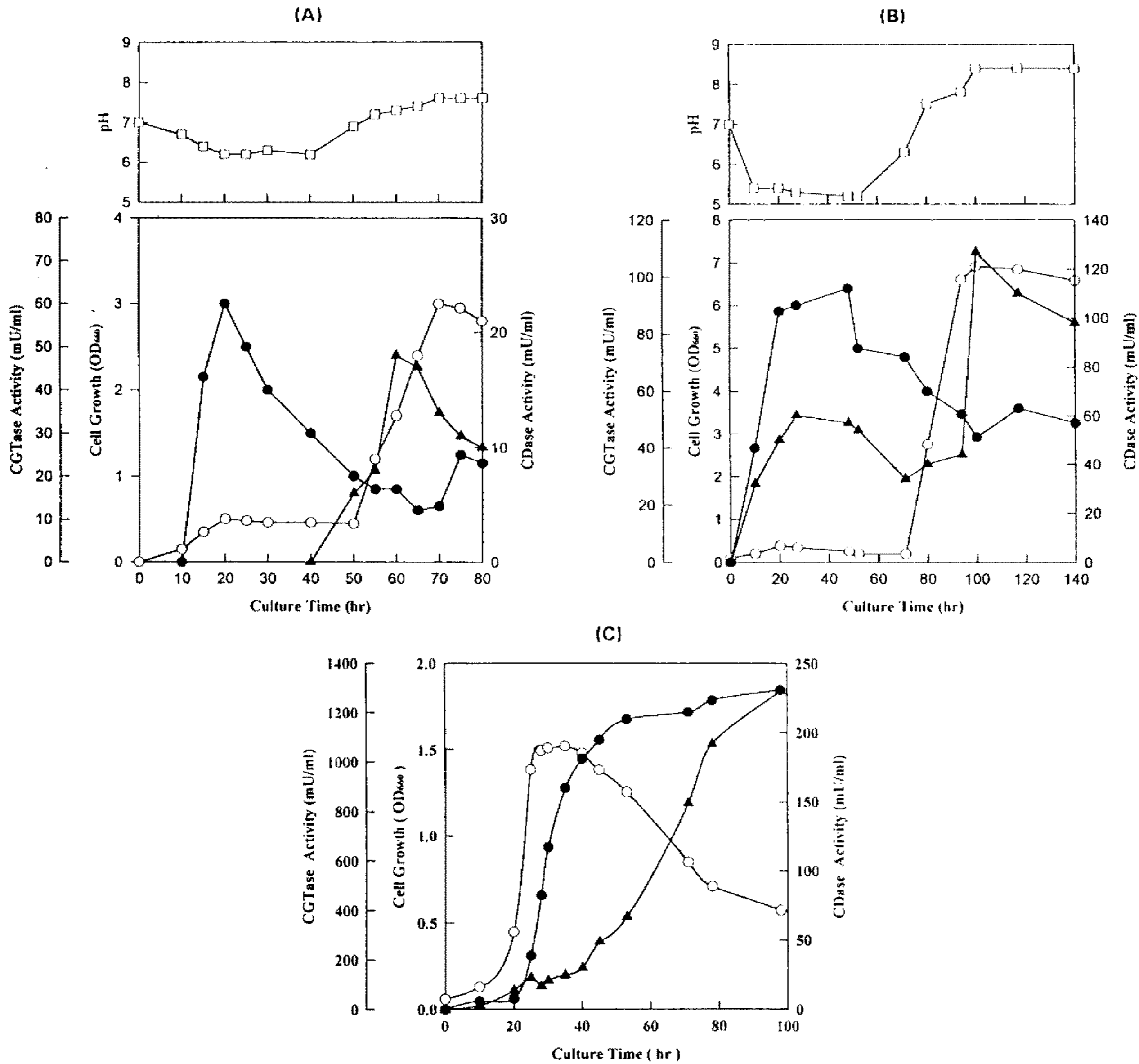


Fig. 2. Time courses of the cell growth, pH change and extracellular production of CGTase and CDase by *B. stearothermophilus* sp. KJ16 in 2L jar fermentor at 45°C, 200 rpm.

(A) pH uncontrolled cultivation in the basal medium

(B) pH uncontrolled cultivation in the basal medium supplemented with 1% amylopectin

(C) pH 7.0 controlled cultivation in the basal medium supplemented with 1% amylopectin

Symbols are: ○, cell concentration; ●, CGTase; ▲, CDase; □, pH

리한 KJ16은 지금까지 보고된 CGTase나 CDase 생산 균주와는 다른 새로운 균주로 사료된다.

#### 생육과 효소생산특성

분리균주 KJ16의 생육과 효소생산 특성 및 배양액의 pH 변화를 경시적으로 측정하여 Fig. 2에 나타내었다. 별도 탄소원이 첨가되지 않은 기초배지로 45°C에서 회분배양하였을 때 균의 생육은 접종후 약 20시간까지 천천히 증가하여 일차 정지기에 들어갔으며(OD<sub>660</sub> 약 0.5) 그후 배양 50시간까지 생육이 지연되었다가 50시간부터 이차증식을 시작하여 70시간(OD<sub>660</sub> 약 3.0)까지

급격히 증식하였다(Fig. 2A). 배지의 pH는 초기 7.0으로부터 점차 저하되어 20시간에 6.2까지 저하되어 그대로 유지되다가 50시간부터 다시 상승하여 60시간 이후는 pH 7.6을 나타내었다. 이에 따른 효소생산은 일차증식기인 배양 10시간부터 배양상등액에 CGTase의 활성이 나타나 20시간에 최고 60 mU/ml를 나타내었고 그 후 차차 감소되었다. 반면 CDase는 배양 40시간부터 활성이 나타나기 시작해 60시간에 최고 18 mU/ml를 나타내었다. 배양상의 특징은 일차 증식기에는 응집되어 증식하다가 20시간을 전후해서 대부분의 균은 원형질막 분리가 일어나거나(Fig. 1A) 포자를 형

성하며 증식이 지연되다가 이차 증식에 들어가서야 전형적인 간균의 형태(Fig. 1B)로 활발하게 증식하였다.

전보(29)에서 본 균주의 CGTase와 CDase 생산은 glucose와 같은 당당류에 의해서 catabolite repression 받으며 amylopectin과 같은 다당류에 의해서 유도되는 것으로 보고한 바 있다. 따라서 탄소원에 의한 생육과 pH의 변화, 효소생산과의 상관관계를 검토하기 위하여 효소생산의 최고 유도기질인 1% amylopectin을 첨가하여 회분배양하였다. 그 결과 Fig. 2B에 나타낸 것처럼 pH는 5.2에서 8.4까지 더 큰 변화가 있었으며 균의 형태도 응집현상이 심화되고 지연기간이 연장되었으며 최대증식치(OD<sub>660</sub> 약 6.9)에도 큰 차이를 보였다. 효소생산은 CGTase의 경우 기초배지에서와 마찬가지로 이단계 증식의 일차 증식기에 생산되어 점차 감소하였으나 CDase는 일차 증식기에 일단 생산되어 감소하다가 이차 증식기에 다시 생산되었다. 또 효소의 절대생산량은 두 효소 모두 크게 증가되었다. 이와같은 결과로 본 균주는 탄소원으로 다당류가 존재할 때 먼저 CGTase를 생산하여 CD를 합성한 후 CDase가 유도되어 CD를 분해하며 증식하는 것으로 사료되어진다. 한편 균주의 생육과 효소생산은 대사에 의해 생성된 대사물질에 의한 pH의 변화에 크게 영향을 받는 것으로 보여져 이를 확인하기 위해서 상기 균주를 1% amylopectin이 첨가된 기본배지로 pH 7.0을 유지하면서 배양하여 균의 증식과 효소 생산성을 검토하여 보았다. Fig. 2C에 나타낸 것처럼 pH를 7.0으로 조절하면서 배양하면 회분배양과는 달리 이단계증식은 일어나지 않으나 최대증식치가 저하(OD<sub>660</sub> 약 1.6)되었다. 효소 생산에 있어서도 CGTase는 균의 증식에 따라 꾸준히 증가하여 pH 비조절 회분배양에 비해 최대 12배까지 생산되었으며 CDase는 2배 정도 증가되나 CGTase보다 뒤에 생산되는 현상은 그대로 유지되었다. 따라서 KJ16 균주는 증식과 동시에 CGTase를 분비하여 탄소원을 이용하면서 생육하나 미지의 산성대사산물에 의하여 증식과 효소생산이 억제되다가 CGTase에 의해서 합성된 CD에 의해서 CDase가 유도되면서 다시 증식을 시작하는 것으로 보여진다. 한편 pH의 변화를 야기시키는 대사산물은 이들 효소 유전자의 발현에 영향을 미치는 인자로 작용하거나 균의 재성장 촉진인자로 작용할 가능성이 높아 대사산물들의 종류와 역할을 규명중에 있다.

### 조효소의 최적반응 조건 및 분자량

실험재료 및 방법에서 기술한 바와 같이 조효소액을 조제하여 효소반응의 최적활성 pH와 온도를 검토하였다(Fig. 3). 최적반응 pH는 CGTase와 CDase 모두 6.0에서 최적활성을 보였으며, 최적반응 온도는 CGTase는 60°C, CDase는 55°C였다. 유사균주인 *B. stearothermophilus* ATCC12980이 생산하는 CGTase의 경우 최적 pH와 온도는 5.0, 75°C이므로(6) 본 균주의 CGTase와는

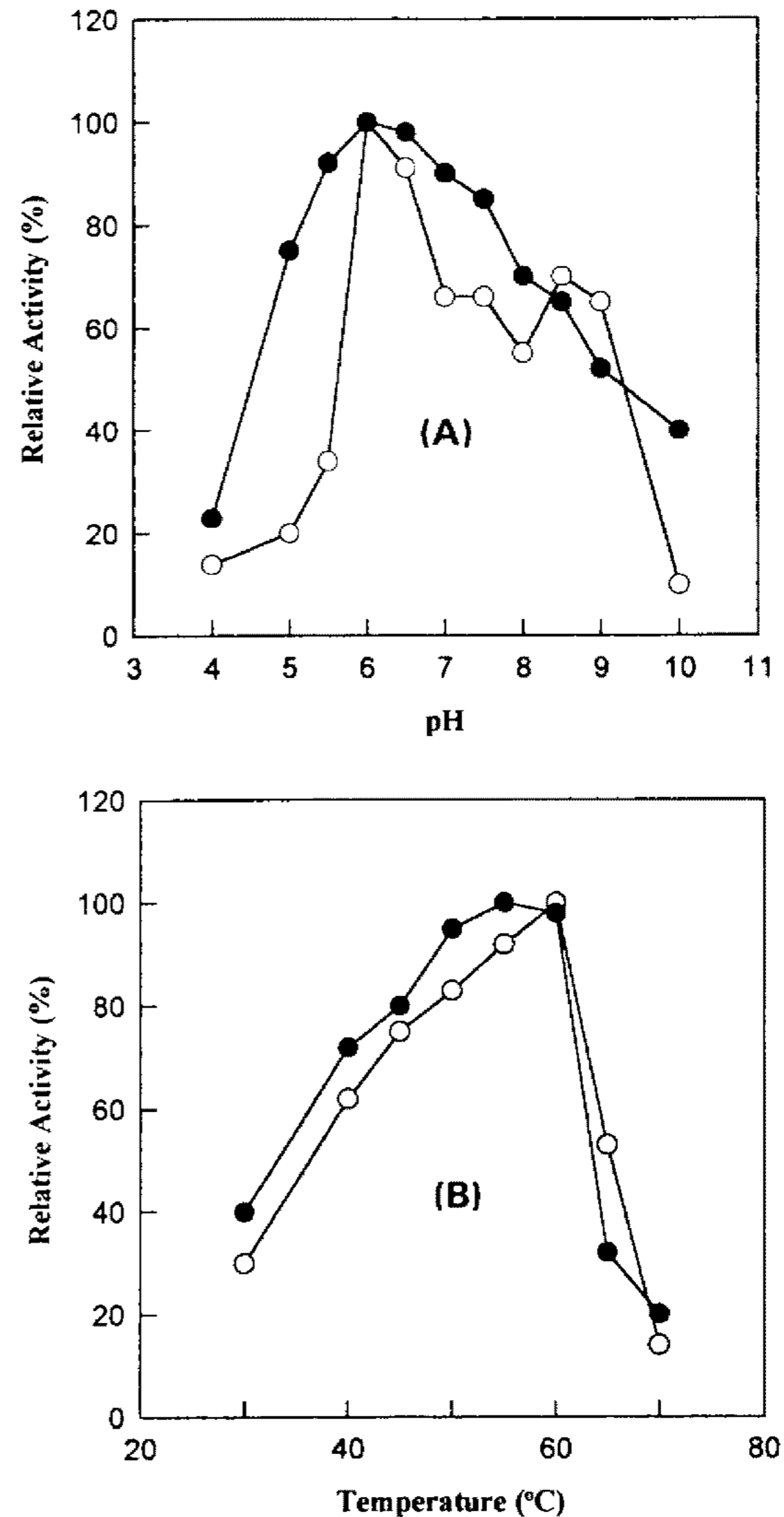
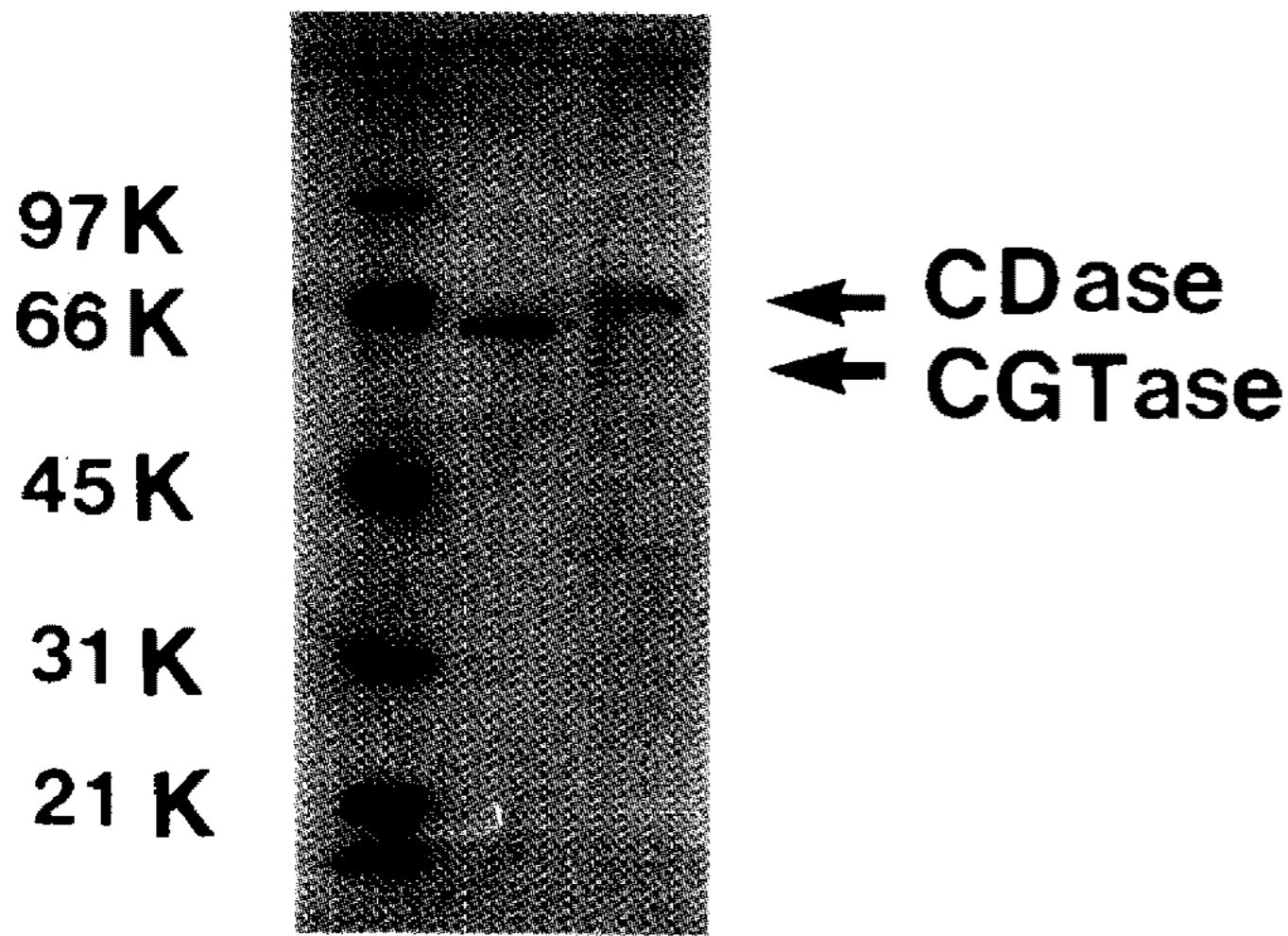


Fig. 3. Effects of pH (A) and temperature (B) on activity of the CGTase (●) and CDase (○).

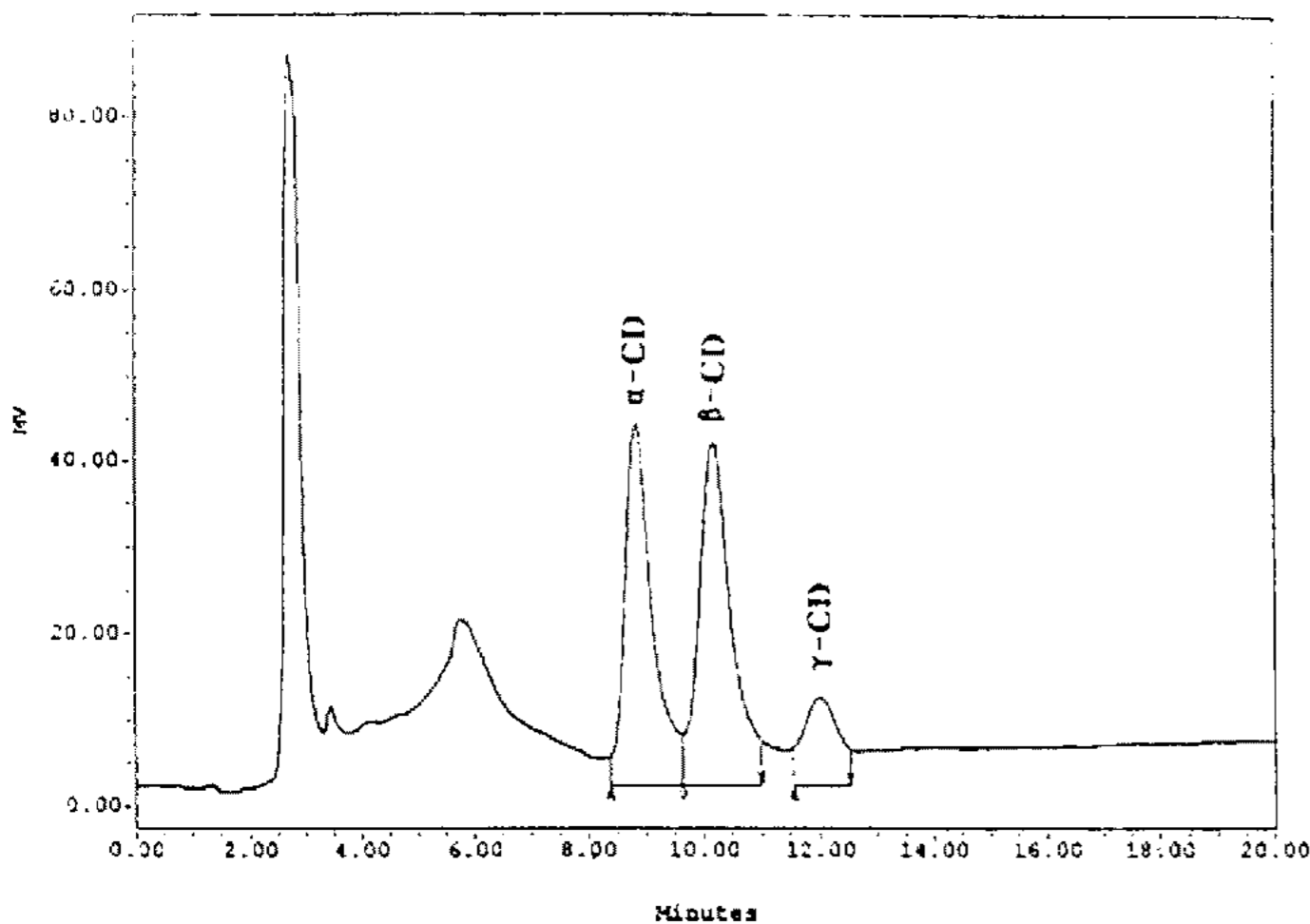
The buffers used are 0.05M acetate buffer (pH 4.0~5.5), 0.05M Na-phosphate buffer (pH 6.0~8.0), and 0.05M glycine-NaOH buffer (pH 8.5~10.0).

특성의 차이를 보였다.

*B. stearothermophilus* KJ16이 생산하는 CGTase와 CDase의 분자량을 알아보기 위해 1% amylopectin이 첨가된 배지에 2L jar fermenter로 45°C에서 pH 7.0으로 조절하면서 100시간 배양한(Fig. 2C) 배양상등액을 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 염석, Sephadex G-100 gel filtration, DE-AE-cellulose anion exchange column chromatography, FPLC 등의 과정을 거쳐 정제하였다. 정제된 효소의 분자량은 SDS-PAGE로 측정하였다(Fig. 4). 전기영동 결과 CGTase의 분자량은 65,000 dalton이었고 CDase의 분자량은 68,000 dalton이었다. 기존에 보고된 황등(30)이나 Fujiwara등(21)의 *B. stearothermophilus* 유래 CGTase는 분자량이 75,000 dalton 이상인 반면 본 균주는 65,000 dalton으로 큰 차이를 보였고 이것은 Kitahata등(4)의 68,000 dalton과는 유사하였다.



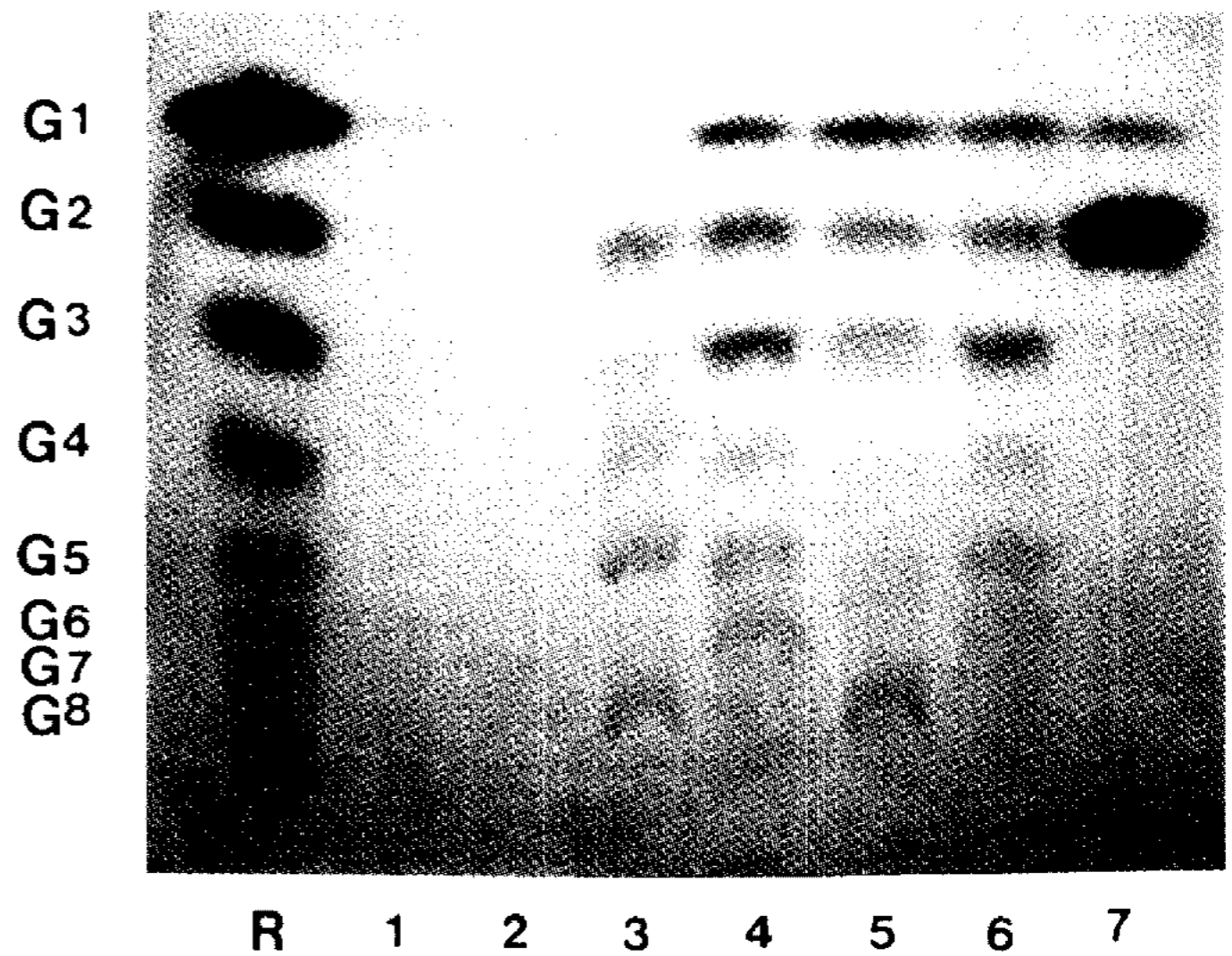
**Fig. 4.** SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the purified CGTase and CDase from *B. stearothersophilus* KJ16. Molecular weight markers: phosphorylase b (M.W. 97,400), Bovine serum albumin (66,200), ovalbumin (45,000), carbonic anhydrase (31,000), and soybean trypsin inhibitor (21,500).



**Fig. 5.** HPLC analysis of the CD produced after 24 hr incubation with the purified CGTase of *B. stearothersophilus* KJ16.

**정제된 CGTase의 반응 생성물의 HPLC 분석**

지금까지 보고된 CGTase들은 생산균주에 따라 전분으로부터 CD의 생성비율이 각각 달라서 주로 합성되는 CD에 따라  $\alpha$ - $\beta$ - $\gamma$ -CGTase 또는  $\alpha/\beta$  혼합형 CGTase등으로 분류한다. 따라서 5%의 전분기질을 55°C에서 24시간 효소반응 시킨후 효소반응액을 HPLC로 분석하여 CD의 생성비율을 검토한 결과 Fig. 5와 같다. 본 효소의  $\alpha$ - $\beta$ - $\gamma$ -CD 생성비율은 42 : 46 : 12로 확인되었으며 따라서 이 효소는  $\alpha$ 와  $\beta$ -CD를 거의 동량 합성하는  $\alpha/\beta$  혼합형 CGTase로 판명되었다. 이와같은 CD 생성비율은 황등(30)이 분리한 *B. stearothersophilus* No.239(1.0 : 1.3 : 0.4)나 Fujiwara등(21)의 *B. stearothersophilus* No.2(42 : 44 : 14)의 CGTase와는 유사



**Fig. 6.** Paper chromatogram of hydrolysates of several substrates with CDase from *B. stearothersophilus* KJ16. Lanes: R; standard mixture of  $G_1 \sim G_8$ , 1;  $\alpha$ -CD, 2;  $\beta$ -CD, 3;  $\gamma$ -CD, 4; soluble starch, 5; amylopectin, 6; amylose, 7; maltose.

하였으나 Kitahata등(4)의 *B. stearothersophilus* TC-60 (1 : 1.6 : 0.2)과는 차이를 보였다.

**정제된 CDase의 기질특이성**

정제된 CDase의 각종 기질에 대한 반응 특이성을 검토하기 위하여 0.5% 기질용액에 55°C에서 4시간 반응시킨후 효소반응액을 paper chromatography로 분석하였다. Fig. 6의 결과에서 본 균주의 CDase는 세종류의 CD중  $\gamma$ -CD를 가장 잘 분해하였으며 4시간 반응시킨후의 주산물은 maltose였다. 그 외에 soluble starch나 amylose, amylopectin등의 기질도 잘 분해하나 이들의 분해속도는  $\gamma$ -CD에 비해서는 늦었다(자세한 자료는 제시하지 않았음). 반면 maltose는 거의 분해하지 않았다.

**요 약**

토양으로부터 CGTase와 CDase를 함께 분리·생산하는 내열성 세균을 분리하였으며, 동정결과 *Bacillus stearothersophilus*로 판명되어 KJ16으로 명명하였다. *B. stearothersophilus* KJ16 균주는 회분배양할 경우 2단계 성장을 하며 일차증식기에 CGTase를 생산하고 이차증식기에 CDase를 생산하는 양상을 보였다. 배지 pH를 7.0으로 조절하면서 배양할 경우, CGTase는 균의 증식에 따라 증가하고 CDase는 CGTase보다 뒤에 생산되었다. 그 생산량은 pH 비조절 배양에 비해 CGTase는 최대 12배(1300 mU/ml)까지, CDase는 2배(225 mU/ml) 정도 증가되었다. 분리균주가 생산하는 CGTase는 분자량이 65,000 dalton으로 pH 6.0, 60°C에서 최적활성을

보이며 HPLC 분석을 통해  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -CD를 42 : 46 : 12의 비율로 생산하는  $\alpha/\beta$  혼합형 CGTase였다. 또한 CD-ase는 분자량이 68,000 dalton으로 pH 6.0, 55°C에서 최적활성을 보이며 최적기질은  $\gamma$ -CD였다.

### 감사의 말

이 논문은 1994년도 학술진흥재단의 자유공모과제(지방대육성) 연구비에 의하여 연구되었으며 연구비 지원에 감사드립니다.

### 참고문헌

- Tilden, E.B. and C.S. Hudson. 1939. The conversion of starch to crystalline dextrin by the action of a new type of amylase separated from cultures of *Aeromonas macerans*. *J. Am. Chem. Soc.* **61**: 2900-2902.
- Yagi, Y., M. Sato and T. Ishikura. 1986. Comparative studies of CGTases from *Bacillus ohbensis*, *Bacillus macerans* and *Bacillus circulans* and production of cyclodextrin using those CGTase. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.* **33**: 144-151.
- Shin, H.D., S.H. Lee and Y.H. Lee. 1989. Purification and Characterization of cyclodextrin glucanotransferase excreted from newly isolated alkalophilic *Bacillus circulans*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **17**: 370-378.
- Kitahata, S. and S. Okada. 1982. Comparison of action of cyclodextrin glucanotransferase from *B. megaterium*, *B. circulans*, *B. stearothermophilus* and *B. macerans*. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.* **29**: 13-18.
- 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.
- Akimaru, K., T. Yagi and S. Yamamoto. 1991. Cyclomalto-dextrin glucanotransferase producing moderate thermophile, *Bacillus coagulans*. *J. Ferment. Bioeng.* **71**: 63-65.
- Do, E.J., J.B. Park and Y.H. Lee. 1993. Screening of new alkalophilic strain for overproduction of cyclodextrin glucanotransferase. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **21**: 119-124.
- Bender, H. 1977. Cyclodextrin glucanotransferase von *K. pneumoniae*. *Arch. Microbiol.* **111**: 271-282.
- Nakamura, N. and K. Horikoshi. 1976. Purification and properties of cyclodextrin glycosyltransferase of an alkalophilic *Bacillus* sp. *Agric. Biol. Chem.* **40**: 935-941.
- Yu, J.H., Y.J. Chung and J.S. Lee. 1989. Isolation and characterization of cyclodextrin glycosyltransferase producing alkalophilic *Bacillus* sp. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **17**: 148-153.
- Park, C.S., E.J. Woo, S.U. Kuk, B.C. Seo, K.H. Park and H. Lim. 1992. Purification and characterization of cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus* sp. E1. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**: 156-163.
- Oguma, T., M. Kikuchi and K. Mizusawa. 1991. Some culture conditions for the production of cyclodextrin-hydrolyzing enzyme from *Bacillus sphaericus*. *Agric. Biol. Chem.* **55**: 1661-1662.
- Depinto, J.A. and Campbell, L.L. 1968. Purification and properties of the cyclodextrinase of *Bacillus macerans*. *Biochemistry.* **7**: 121-125.
- Kitahata, S., M. Taniguchi, S.O. Beltran, T. Sugimoto and S. Okada. 1983. Purification and properties of the cyclodextrinase from *Bacillus coagulans*. *Agric. Biol. Chem.* **47**: 1441-1447.
- Nakamura, A., K. Haga, S. Ogawa, K. Kuwano, K. Kimura and K. Yamane. 1992. Functional relationships between cyclodextrin glucanotransferase from an alkalophilic *Bacillus* and  $\alpha$ -amylase. *FEBS Lett.* **296**: 37-40.
- Saha, B.C. and J.K. Zeikus. 1988. Purification and characterization of a highly thermostable novel pullulanase from *Clostridium thermohydrosulfuricum* 39E. *Biochem. J.* **252**: 343-348.
- Antenucci, R.N. and J.K. Palmer. 1984. Enzymatic degradation of  $\alpha$ - and  $\beta$ -cyclodextrin by bacteriorides of the human colon. *J. Agric. Food. Chem.* **32**: 1316-1321.
- Moseley, M.H. and L. Keay. 1970. Purification and characterization of the amylase of *Bacillus subtilis* NRRL-B3411. *Biotechnol. Bioeng.* **12**: 251-271.
- Kato, K., T. Sugimoto, A. Amemura and T. Harada. *Pseudomonas* intracellular amylase with high activity on maltodextrins and cyclodextrin. *Biochim. Biophys. Acta.* **391**: 96-108.
- Bender, H. 1981. A bacterial glucoamylase degrading cyclodextrins. Partial purification and properties of the enzyme from *Flavobacterium* species. *Eur. J. Biochem.* **115**: 287-291.
- Fujiwara, S., H. Kakihara, B.W. Kim, A. Leujeune, M. Kanemoto, K. Sakaguchi and T. Imanaka. 1992. Cyclization characteristics of cyclodextrin glucanotransferase are conferred by the NH<sub>2</sub>-terminal region of the enzyme. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 4016-4025.
- Abdullah, M. and D. French. 1970. Substrate specificity of pullulanase. *Arch. Biochem. Biophys.* **137**: 483-493.
- Robyt, J. and D. French. 1963. Action pattern and specificity of an amylase from *Bacillus subtilis*. *Arch. Biochem. Biophys.* **100**: 451-467.
- Sneath, P.H.A., N.S. Mair, M.E. Sharpe and J.G. Holt. 1984. Bergy's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 2, Williams and Wilkins, Baltimore.
- Lejeune, A., K. Sakaguchi and T. Imanaka. 1989. A spectrophotometric assay for the cyclization activity of cyclomaltohexaose glucanotransferase. *Anal. Biochem.* **181**: 6-11.
- Nelson, N. 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* **153**: 375-380.

27. Depinto, J.A. and L.L. Campbell. 1964. Formation and degradation of cyclic dextrans by intracellular enzyme of *Bacillus macerans*. *Science* **146**: 1064-1066.
28. Yoshida A., Y. Iwasaki, T. Akiba and K. Horikoshi. 1991. Purification and properties of Cyclomaltodextrinase from alkalophilic *Bacillus* sp. *J. Ferment. Bioeng.* **71**: 226-229.
29. Kim, B.W., H.J. Kwon and K.H. Lee. 1996. Catabolite repression of cyclodextrin glucanotransferase and cyclodextrinase syntheses in *Bacillus* sp. KJ16. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**: 137-142.
30. Hwang, J.B., S.H. Kim, T.K. Lee and H.C. Yang. 1990. Production of cyclomaltodextrin from *Bacillus stearothermophilus*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **18**: 578-584.

(Received 20 February 1996)