

Bacillus brevis CD162 Cyclodextrin Glycosyltransferase의 정제 및 특성

김명희 · 손천배* · 임영희¹ · 오태광²

충남대학교 식품영양학과, ¹대전대학교 식품영양학과, ²생명공학연구소

초 록 : *Bacillus brevis* CD162가 생산하는 cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase)를 ammonium sulfate 침전, DEAE-Sephadex CL-6B 및 Sephadex G-150 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 분리정제하였다. 정제된 CGTase는 분자량이 약 74,000, 등전점은 약 6.3인 단백질이었고, 정제된 단백질을 SDS-PAGE한 후 변성된 단백질을 재활성시켜 zymogram을 수행한 결과 cyclodextrin glycosyltransferase임을 확인할 수 있었다. 이 효소의 최적활성 pH와 온도는 각각 8.0과 55°C이었으며, pH 5.5~9.0과 50°C까지 안정한 활성을 보였다. 또한, CGTase의 NH₂-말단 부위의 아미노산서열은 Ser-Val-Thr-Asn-Lys-Val-Asn-Tyr-Ser-Lys-Asp-Val-Ile-Tyr-Gln 이었으며, 전분으로부터 cyclodextrin으로의 전환률을 분석한 결과, α-cyclodextrin은 1.3%, β-cyclodextrin은 33.9%, γ-cyclodextrin은 9.7% 이었다.(1997년 7월 10일 접수, 1997년 9월 25일 수리)

서 론

Cyclodextrin(CD)는 cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase, EC 2.4.1.19)에 의해 전분, 아밀로스, 아밀로펙틴 등의 다당류로부터 효율적으로 생성되는 환상의 올리고당으로 잔기수에 따라 글루코스가 6개이면 α-CD, 글루코스가 7개이면 β-CD, 글루코스가 8개이면 γ-CD로 분류된다. CD는 분자내 공동 (cavity)의 내부면은 소수성이고 외부면은 친수성인 도넛 모양의 독특한 구조를 이루어 식품, 의약품, 화장품, 수지 제형 및 농약 등에 폭넓게 이용되고 있으며 매년 수요가 급진적으로 증가되고 있어 1995년도의 세계의 CD 사용량은 2,600톤 이상이었다는 보고가 있었다.¹⁻⁴⁾ 특히 γ-CD는 α-, β-CD에 비해 공동이 커서 포접량이 많아 용해도가 큰 특성을 갖고 있다. 반면에 γ-CD는 대량 생산하기가 어렵고 단가가 높기 때문에 실용화에 많은 제약을 받고 있는 실정이다.

CGTase는 1939년 *Bacillus marcerans*가 생산하는 CGTase에 관한 연구⁵⁾를 시발점으로 1970년대에 들어와서 본격적으로 CGTase 특성과 CD의 제조법 및 성질응용에 대한 연구⁶⁻⁹⁾가 이루어지기 시작하여 최근에는 유전자 클로닝과 염기서열분석 및 고발현에 관한 연구가 보고되고 있다.¹⁰⁻¹⁰⁾ 지금까지 보고된 CGTase는 대부분이 α-와 β-CD를 주로 생산하는 CGTase로 γ-CD의 생산수율이 낮은 것들이었다. 따라서 이용상 가장 유리한 특성을 지닌 γ-CD를 저렴한 가격으로 생산공급하기 위해서는 γ-CD를 고수율로 생산하는 CGTase를 대량 분비하는 우수균주의 분리와 CGTase 생산성향상에 관한 연구가 필요하다.

이에 본 연구에서는 전보²⁰⁾에서 분리한 *Bacillus brevis*

CD162의 CGTase를 정제하여 효소의 특성을 살펴보고 있으며, 또한 전분으로부터 CD 전환률을 분석하여 산업적 실용화의 가능성을 조사하였다.

재료 및 방법

사용 균주

전보²⁰⁾에서 분리, 동정한 *Bacillus brevis* CD162를 사용하였다.

Cyclodextrin glycosyltransferase의 정제

최종 선정된 균주 CD162를 전보²⁰⁾에서 검토한 효소생산물 액체배지 (2.0% soluble starch, 0.75% yeast extract, 0.5% bacto peptone, 0.2% K₂HPO₄, 0.05% MgSO₄ · 7H₂O, 1% Na₂CO₃, pH 10.2)로 30°C에서 4일간 진탕배양기에서 (160 rpm) 배양하였다. 배양액을 원심분리하여 균체를 제거한 후 4°C에서 ammonium sulfate를 75% 포화시켜 하루 방치하고 원심분리하여 단백질침전물을 얻었다. 단백질침전물은 소량의 10 mM potassium phosphate 완충용액(pH 7.0)에 현탁하고 동일 완충용액으로 4°C에서 투석후 원심분리하여 불용성물질을 제거하고 DEAE Sepharose CL-6B 컬럼에 주입하여 흡착시키고 0~0.5 M NaCl gradient를 수행하였다. CGTase 활성을 갖는 분획을 모아 Amicon PM 10 membrane을 사용해 한외여과하여 농축하였고, 농축용액을 같은 완충용액으로 투석한 후 Sephadex G-150 컬럼 크로마토그래피를 수행해 CGTase활성을 나타내는 분획을 모아 다시 한외여과하여 농축한 후 -20°C에 저장하였다. 정제도도는 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel elec-

찾는말 : *Bacillus brevis*, cyclodextrin glycosyltransferase, cyclodextrin

*연락처자

trophoresis (SDS-PAGE)에 의해 확인하였다.

CGTase 활성 측정

CGTase 활성 측정은 전보²⁰⁾에서와 같이 Kato 등²¹⁾의 방법을 약간 변형하여 측정하였다.

단백질정량

단백질정량은 bovine serum albumin을 표준물질로 protein assay kit (Bio-Lab., Richmond, CA, U.S.A.)를 사용하여 Bradford방법²²⁾에 따라 측정하였다.

전기영동 및 zymography

SDS-PAGE는 Laemmli²³⁾의 방법에 따라 Mighty Small II (Hoffer, San Francisco, CA, U.S.A.)로 수행하였다. 이때 10% 젤을 사용했고, 전기영동이 끝난 후 Coomassie brilliant blue R250으로 염색하고 H₂O : methanol : acetic acid [50 : 40 : 10 (v/v)]용액으로 탈색하였다.

또한 전기영동상에서 나타나는 단백질밴드가 CGTase인지를 확인하기 위해 zymogram²⁴⁾을 수행하였다. SDS-PAGE를 수행한 후 변성된 단백질을 50 mM phosphate 완충용액 (pH 7.0)에 4°C에서 하루 방치하여 재활성화시킨 후 1% soluble starch, 20 mM sodium acetate 완충용액 (pH 5.5), 1 mM CaCl₂의 반응액을 가해 50°C에서 30분간 반응시키고 I-KI (1% I₂/10% KI/50% ethanol)로 염색하여 단백질밴드와 비교하여 전분분해활성이 있어서 염색되지 않는 밴드를 효소활성을 가지는 것으로 판단하였다.

분자량 측정

분자량은 SDS-PAGE 수행 후 상대이동거리에 따라 표준곡선을 이용하여 측정하였다. 이때 표준단백질로는 Bio-rad Co.의 SDS-PAGE standards [phosphorylase B (M.W. 97,400), bovine serum albumin (M.W. 66,200), ovalbumin (M.W. 45,000), carbonic anhydrase (M.W. 31,000), trypsin inhibitor (M.W. 21,500)]를 사용하였다.

등전점 측정

정제한 효소의 등전점을 알아보기 위해 isoelectric focusing (IEF) 젤 전기영동을 수행하였다. 정확한 등전점 측정을 위해 먼저 ampholyte 3~10 pH 구배로 된 균질 polyacrylamide 젤을 사용하여 대략적인 등전점을 확인한 후 ampholyte 4~7 pH 구배로 된 균질 polyacrylamide 젤을 사용하여 등전점을 측정하였다.

N-말단 아미노산 분석

정제된 효소의 N-말단부위의 아미노산서열을 분석하기 위해 SDS-PAGE를 수행한 후, Trans-Blot kit (Bio-rad., Richmond, CA, U.S.A.)를 사용하여 젤의 단백질을 polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane에 전이시켰다. 전이된 단백질의 N-말단 아미노산 서열은 automated Edman degradation 방법에 의해 결정되었으며, 이 때 사용된

기기는 Applied Biosystems model 471A protein/peptide sequencer (Applied Biosystems Inc. CA, U.S.A.) 이었다.

효소적 성질 분석

(1) 최적 pH

효소반응의 최적 pH를 검토하기 위해 정제된 CGTase를 각 pH 완충용액에 가하여 40°C에서 60분간 반응시킨 후 효소활성을 측정하여 비교하였다. 사용한 완충용액은 pH 4.0~5.5는 0.2 M succinate-0.2 M Na₂B₄O₇ 완충용액, pH 6.0~9.0은 0.1 M KH₂PO₄-0.2 M Na₂B₄O₇ 완충용액, pH 9.5~11.0은 0.2 M Na₂CO₃-0.2 M Na₂B₄O₇ 완충용액, pH 11.5~12.0은 0.1 M Na₂HPO₄-0.1 M NaOH 완충용액을 사용하였다.

(2) 최적 온도

정제된 효소액 0.1 ml에 0.1 M KH₂PO₄-0.2 M Na₂B₄O₇ 완충용액 (pH 8.0) 0.4 ml와 10% soluble starch 0.5 ml를 가하여 25°C~75°C까지 5°C 간격으로 온도를 변화시키면서 60분간 반응시킨 다음 효소활성을 측정하여 비교하였다.

(3) pH안정성

정제된 효소액 0.05 ml에 pH별 완충용액 (pH 4.0~12.0) 0.2 ml를 가하여 40°C에서 30분간 보온처리한 후 1 M KH₂PO₄-0.2 M Na₂B₄O₇ 완충용액 (pH 8.0) 0.25 ml로 효소의 최적pH로 조정하여 잔존효소활성을 측정하였다.

(4) 열안정성

정제된 효소액 0.1 ml에 0.1 M KH₂PO₄-0.2 M Na₂B₄O₇ 완충용액 (pH 8.0) 0.5 ml를 가하여 25°C~75°C까지 5°C 간격으로 변화시키면서 각 온도에서 30분간 보온처리한 다음, 급냉하고 10% soluble starch 0.5 ml를 가하여 효소반응시켜 잔존효소활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

효소의 정제

Bacillus brevis CD162로부터 유래된 CGTase의 생리학적 특성들을 검토하기 위해 단백질정제를 수행하였다.

B. brevis CD162를 효소생산용 액체배지에 0.5% 접종하고 30°C에서 4일간 배양하였다. 원심분리하여 얻은 상정액을 75% ammonium sulfate로 염색하여 투석한 후 DEAE Sepharose CL-6B 컬럼 크로마토그래피를 수행하였다. Fig. 1에서와 같이 CGTase는 10 mM phosphate 완충용액 (pH 7.0)으로 세척하는 단계에서 용출되었고 NaCl gradient 분획에서 용출되지 않았다. 이러한 결과는 CM Sepharose CL-6B column chromatography의 수행에서도 마찬가지이었는데 이렇게 DEAE와 CM에서 흡착되지 않고 그대로 용출되는 것은 본 단백질의 독특한 어떤 구조적 특성때문일 것이라고 추정한다. CGTase 활성 분획인 fraction 7~12를 모아 Amicon PM 10 membrane을 사용해 농축한 후 Sephadex G-150 컬럼 크로마토그래피를 행하였다. Fig. 2에서와 같이 fraction 27~31에서 CGTase 활성을 확인하였고 이 정제된 CGTase는 SDS-PAGE상에서 단일

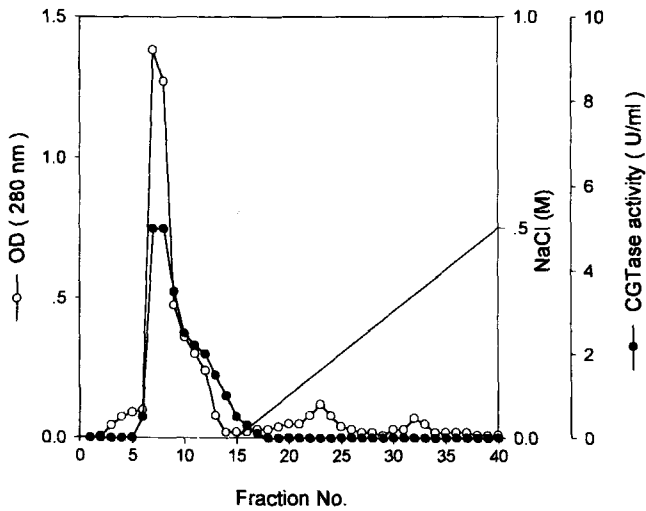


Fig. 1. DEAE Sepharose DL-6B column chromatography of the curde CGTase. The enzyme was eluted with a linear gradient of NaCl in 10 mM phosphate buffer (pH 7.0) at a flow rate of 60 ml/h. The volume of each fraction was 12 ml.

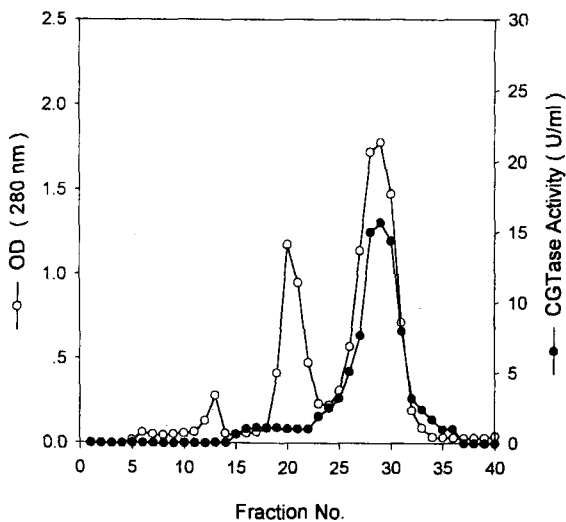


Fig. 2. Sephadex G-150 column chromatography of the partially purified CGTase. The enzyme was eluted with 10 mM phosphate buffer (pH 7.0) at a flow rate of 40 ml/h. The volume of each fraction was 3 ml.

밴드로 나타났다. 각 정제과정을 Table 1에 요약하였다. Table 1에 나타나듯이 각 단계, 특히 (NH₄)₂SO₄ 침전단계와 DEAE-Sepharose CL-6B column chromatography 단계 사이에서 많은 효소활성손실이 있었는데, 주 원인은 본 균주는 CGTase 이외에 protease도 생산하므로 (data not shown), 이 protease가 제거되지 않은 단계에서 정제를 진행하는 과정에서 protease에 의한 가수분해로 생긴 결과로 생각한다. 정제된 효소의 specific activity는 29.8 units/mg protein으로써 효소정제도가 43배 증가하였고 회수율은 13%이었다.

정제된 CGTase의 분자량은 약 74,000 (Fig. 3), 등전점은 약 6.3인 것으로 측정되었다 (Fig.4). 이 결과는 지금까

Table 1. Summary of purification of the CGTase from *Bacillus brevis* CD162

Steps	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg)	Purification (fold)	Recovery (%)
Culture supernatant	2040	1482	0.7	1	100
Ammonium sulfate precipitation	102	1017	10	14	69
DEAE-Sepharose CL-6B	8.8	240	27.3	39	16
Sephadex G-150	6.3	187.5	29.8	43	13

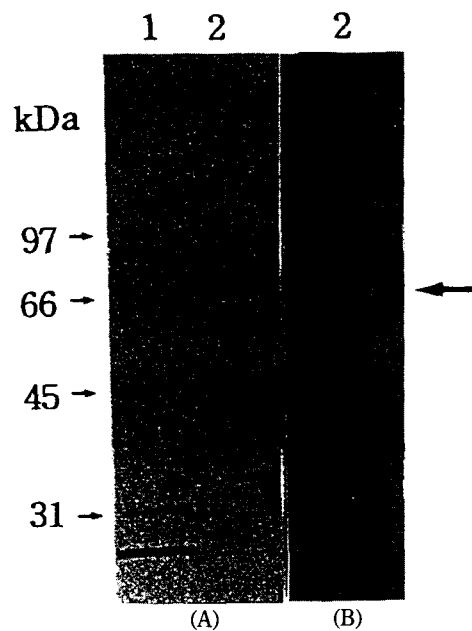


Fig. 3. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (A) and zymogram (B) of the purified CGTase. 1, *Bacillus brevis* CD162 CGTase; 2, Molecular weight markers.

지 밝혀진 CGTase로는 *B. macerans*²⁵⁾ 68,000, *B. subtilis* No. 313²¹⁾ 64,000, *B. circulans*²⁶⁾ 74,000, *Bacillus* sp. EI²⁶⁾ 81,000, 호알카리성 *Bacillus* 1-1²⁸⁾ 74,000, *Bacillus* sp. KC 201¹⁷⁾ 74,000, *B. ohbensis*²⁸⁾ 80,000, *Bacillus* sp. 1011¹³⁾ 75,000으로 보고되었는데 이 중 *B. circulans*, 호알카리성 *Bacillus* 1-1, *Bacillus* sp. KC201의 것과 거의 비슷한 분자량을 나타냈다.

Cyclodextrin glycosyltransferase의 N-말단부위의 아미노산 서열 분석

B. brevis CD162로 부터 정제한 CGTase의 NH₂-말단부위의 아미노산서열을 automated Edman degradation 방법으로 분석하였다. N-말단의 아미노산서열은 Ser-Val-Thr-Asn-Lys-Val-Asn-Tyr-Ser-Lys-Asp-Val-Ile-Tyr-Gln이었다.

Table 2는 *B. brevis* CD162 CGTase와 다른 세균이 생산

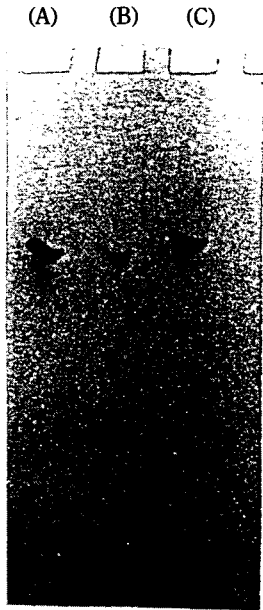


Fig. 4. Isoelectric focusing of the purified CGTase. A and C, pI standards (A; 5.9, C; 6.6); B, The purified CGTase.

Table 2. Comparison of the NH₂-terminal amino acid sequence of *Bacillus brevis* CD162 CGTase with 6 other bacterial CGTases

Strain	N-terminal sequence	Reference
<i>Bacillus brevis</i> CD162	NH ₂ -SVTNKVNYSKDVIYQ	
<i>Bacillus</i> sp. KC201	DVTNKVNYSKDVIYQ	17
<i>Bacillus</i> sp. 1-1	DVTNKVNYSKDVIYQ	28
<i>Bacillus ohbensis</i>	DVTNKVNYTRDVIYQ	29
<i>Bacillus macerans</i>	DVDNKNVNESTDVIYQ	10
<i>Bacillus licheniformis</i>	DVTNKQNESTDVIYQ	16
<i>Bacillus circulans</i>	SVSNKQNESTDVIYQ	26

The shadowed boxes represent non-consensus amino acids with those of *Bacillus brevis* CD162 CGTase sequences.

하는 CGTase의 N-말단 아미노산서열을 BlitzEMBL program을 이용해 SWISS-PROT Data Bank에서 비교한 자료이다. *B. brevis* CD162의 N-말단 아미노산서열 상동성은 *Bacillus* sp. KC201¹⁷⁾과 *Bacillus* sp. 1-1²⁸⁾과는 93%, *B. ohbensis*²⁹⁾와는 80%, *B. macerans*¹⁰⁾와는 73%, *B. licheniformis*¹⁶⁾와는 73%, *B. circulans*²⁶⁾와는 73%로 매우 높은 상동성을 보였다.

Cyclodextrin glycosyltransferase의 특성

(1) 온도의 영향

정제된 CGTase의 활성과 안정성에 대한 온도의 효과를 측정하였다. 25°C~75°C의 온도 범위에서 5°C 간격으로 온도를 변화시킨 다음 CGTase 활성을 측정하여 Fig. 5와 같다.

CGTase는 55°C에서 최적활성을 나타내다가 60°C에서는 88%의 활성을 보였고 65°C에서는 65%의 활성으로 급격한 감소를 보였다. 이러한 결과는 Kobayashi³⁰⁾ 등의 *B. macerans* CGTase는 60°C, Kato 등²¹⁾의 *B. subtilis* No. 313은

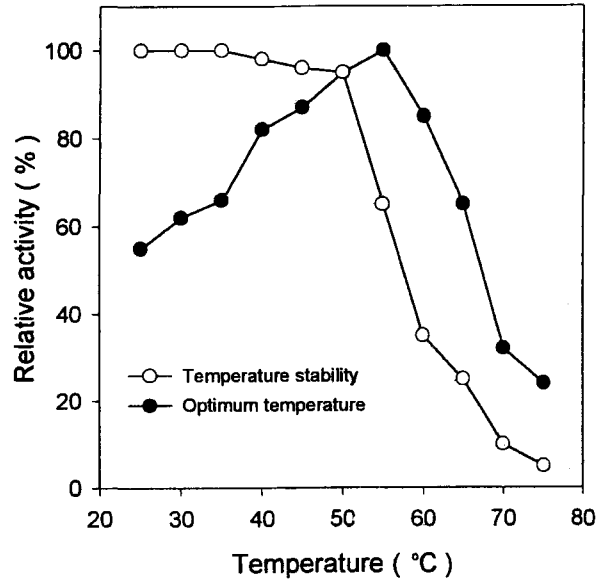


Fig. 5. Effects of temperature on the CGTase activity and stability. The enzyme was assayed at various temperatures for the measurement of enzyme activity and assayed after incubation at various temperatures for 30 min for the temperature stability.

65°C, Kitamoto¹⁷⁾등의 *Bacillus* sp. KC201은 60°C~65에서 최적활성을 보인 것과 비교해 볼 때 *B. brevis* CD162 CGTase도 비슷한 온도범위에서 최적활성을 나타낸 것으로 보였다.

또한 *B. brevis* CD162 CGTase는 50°C까지는 매우 안정하였으나 55°C 이상에서는 급격하게 활성이 감소하다가 60°C 이상에서는 거의 활성을 상실하는 열안정성을 나타냈다. 이는 고온에서 안정한 *B. stearothermophilus*³¹⁾를 제외한 다른 균종의 CGTase와 유사한 양상이었다.

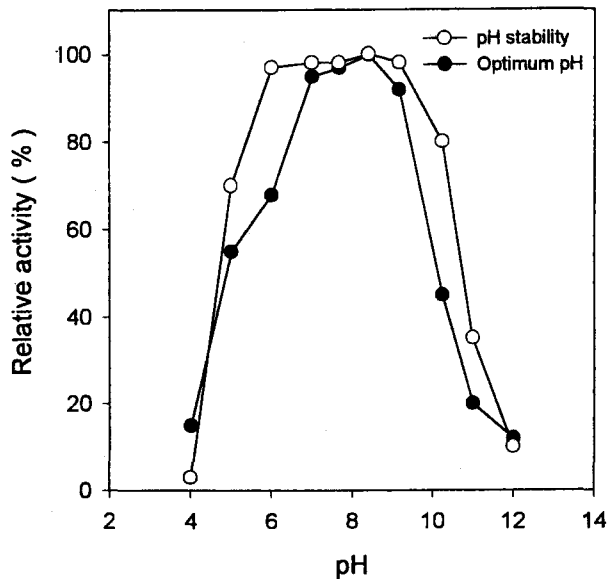


Fig. 6. Effects of pH on the CGTase activity and stability. The enzyme was assayed at various pHs and assayed for the measurement of enzyme activity after incubation at various pHs for 30 min for the pH stability

(2) pH의 영향

정제된 효소의 활성과 안정성에 대한 pH 영향에 대해 조사한 결과 Fig. 6과 같이 나타났다. 정제된 CGTase는 pH 8.0에서 최적활성을 나타냈으며, pH 7.0 부근에서도 높은 활성을 보였다. 또한 pH 5.5~9.0 범위에서 매우 안정한 활성을 나타냈고, pH 10에서 83%의 활성을 보이다가 pH 11에서는 급격히 감소하여 33%의 활성을 보이는 pH 안정성을 나타냈다.

다른 미생물로부터 생산된 CGTase의 pH 특성을 살펴 보면, Kato 등의²¹⁾ *B. subtilis* No. 313 CGTase의 최적 pH는 8.0, pH 안정성은 pH 6~8, Kitamoto 등¹⁷⁾의 *Bacillus* sp. KC201 CGTase의 최적활성은 pH 6.0, pH 안정성은 pH 6~10, *B. marcerans*²⁵⁾는 5.5~6.0, *B. megarterium*²⁵⁾은 5.0, 호알카리성 *Bacillus* sp.³²⁻³⁴⁾는 4.7~5.0, *B. stearothermophilus*²⁵⁾는 5.0, *B. ohbensis*²⁹⁾는 5.0의 pH에서 최적 활성을 보이므로, 본 CGTase는 이들과 다른 pH 특성을 보였다.

Cyclodextrin glycosyltransferase 반응생성물의 분석 및 정량

10% soluble starch 2.5 ml에 정제된 효소액 0.1 ml을 첨가하여 40°C에서 24시간 반응시키고 100°C에서 5분간 불활성화 시킨 후 glucoamylase로 처리하여 생성된 cyclodextrin 이외의 당을 완전히 glucose 또는 fructose로 가수분해 한 후 HPLC로 분석한 결과는 Fig. 7과 같다.

정제된 CGTase로부터 생성된 α-:β-:γ-cyclodextrin의 생성 비율은 0.2:4.1:1.0으로 나타났고 전분으로부터 cyclodextrin으로의 전환률은 α-cyclodextrin은 1.3%, β-cyclodextrin은 33.9%, γ-cyclodextrin은 9.7% 였다.

Sin 등²⁹⁾의 경우에는 전분에서 cyclodextrin의 전환률이 β-cyclodextrin은 25%, γ-cyclodextrin은 5%, Kitamoto 등¹⁷⁾의 경우에는 β와 γ-cyclodextrin의 생성 비율은 6.2:1.0이었으며, 전분으로부터 전체 cyclodextrin의 전

환률은 39.5%, γ-cyclodextrin 만을 생성하는 Kato 등²¹⁾의 CGTase인 경우 amylose로부터 cyclodextrin의 전환률은 5%, 전분으로부터 cyclodextrin의 전환률은 2~3% 이었다.

따라서 이들 CGTase가 생산하는 cyclodextrin의 전환률과 비교했을 때 *B. brevis* CD162 CGTase가 생산하는 cyclodextrin의 전환률이 훨씬 높았으며, 총생성 cyclodextrin에 대한 γ-cyclodextrin 생성비율도 높음을 알 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 1994년도 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 수행되었으며 이에 감사를 드립니다.

참고 문헌

- Parrish, M. A. (1987) Cyclodextrin-a review. *Speciality Chemicals*. Dec., 369.
- Ito, K., K. Kikuchi, N. Okazaki and S. Kobayashi. (1988) Retention of aroma components in liquors with cyclodextrins. *Agric. Biol. Chem.* **52**(11), 2763.
- Kobayashi S., K. Nakashima and M. Arahira. (1991) Production and some properties of branched cyclodextrins. *Denpun Kagaku.* **38**(2), 197.
- 日バイオ年鑑 96. (1996) Nikkei Biotechnology Annual Report. 614.
- Tilden, E. B. and C. S. Hudson. (1942) Preparation and properties of the amylases produced by *B. macerans* and *B. polymyxa*. *J. Bacteriol.* **34**, 527.
- Frederick C. Armbruster, Earl R. Kool and La Grange. (1969) Production of cyclodextrin. *U. S. Patent* 3425910. Feb., 4.
- Frederick C. Armbruster and La Grange. (1970) Method of preparing pure alpha-cyclodextrin. *U. S. Patent* 3541077. Nov., 17.
- Frederick C. Armbruster and La Grange. (1972) Procedure for production of alpha-cyclodextrin *U. S. Patent* 3640847. Feb., 8.
- Kitahata, S. and S. Okada. (1975) Transfer action of cyclodextrin glycosyltransferase on starch. *Agr. Biol. Chem.* **39**(11), 2185.
- Takano, T., M. Fukuda, M. Honma, S. Kobayashi, K. Kainuma and K. Yamane. (1986) Molecular cloning, DNA nucleotide sequencing and expression in *B. subtilis* cells of the *B. macerans* cyclodextrin glucanotransferase gene. *J. Bacteriol.* **166**, 118.
- Binder, F., O. Huber and A. Bock. (1986) Cyclodextrin glycosyltransferase from *Klebsiella pneumoniae* M5al: cloning, nucleotide sequence and expression. *Gene.* **47**, 269.
- Kimura K, T. Takano, and K. Yamane. (1987) Molecular cloning of the β-cyclodextrin synthetase gene from an alkalophilic *Bacillus* and its expression in *E. coli* and *B. subtilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26**, 149.
- Kimura, K., Y. Ishii, S. Kataoka, T. Takano and K.

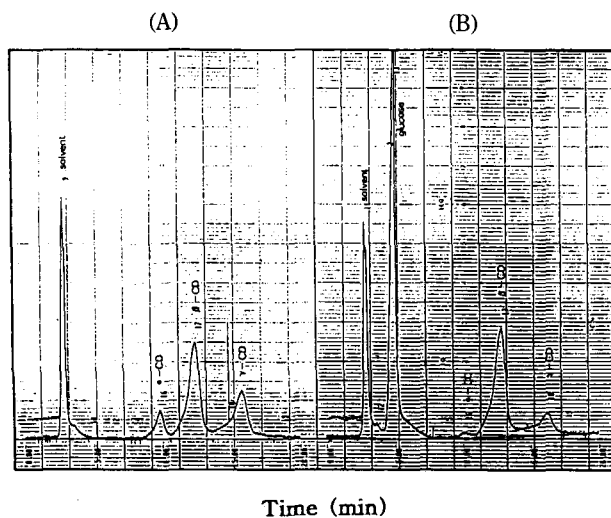


Fig. 7. Typical HPLC chromatogram of reaction products by the purified CGTase from *Bacillus brevis* CD162. Chromatogram A, Cyclodextrin standards of α-, β-, and γ-CD, respectively; Chromatogram B, Reaction products of *Bacillus brevis* CD162 CGTase.

- Yamane.. (1990) Expression of the β -cyclodextrin glucanotransferase gene of an alkalophilic *Bacillus* sp. # 1011 in *E. colicells* and characterization of the synthesized enzyme. *Agri. Biol. Chem.* **54**(3), 641.
14. Kaneko T, T. Hamamota, K. Horikoshi. (1988) Molecular cloning and nucleotide sequence of the cyclomaltodextrin glucanotransferase gene from the alkalophilic *Bacillus* sp. strain no 38-2. *J. Gen. Microbiol.* **134**, 97.
 15. Sakai, S., M. Kubota, K. Yamamoto, T. Nakada, K. Torigoe, O. Ando and T. Sugimoto. (1987) Cloning of cyclodextrin glucanotransferase genes from *B. stearothermophilus* and *B. macerans*. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.* **34**(2), 140.
 16. Hill, D. E., R. Aldape, and J. D. Rozzell. (1990) Nucleotide sequence of a cyclodextrin glucosyltransferase gene, *cgtA*, from *B. licheniformis*. *Nucleic acids Res.* **18**: 199.
 17. Kitamoto, N., T. Kimura, Y. Kito and K. Ohmiya. (1992) Cloning and sequencing of the gene encoding cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus* sp. KC201. *J. Fermentation and Bioengineering.* **74**(6), 345.
 18. Schmid, G. (1989) Cyclodextrin glycosyltransferase production: yield enhancement by overexpression of cloned genes. *TIBTECH Sep.* **7**, 244.
 19. Lee, C. S. P. and Tao, B. Y. (1994) High-level expression of cyclodextrin glycosyltransferase in *E. coli* using a T7 promoter expression system. *Starch.* **46**, 67.
 20. 김명희, 손천배, 임영희, 배경숙, 오태광 (1997) γ -Cyclodextrin glycosyltransferase 생산균주의 분리, 동정 및 효소생산조건. *한국농화학회지.* **40**(6), 495-464
 21. Kato, T., and K. Horikoshi. (1986) A new γ -cyclodextrin-forming enzyme produced by *B. subtilis* No. 313. *Denpun Kagaku.* **33**(2), 137.
 22. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248.
 23. Lammil, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* (London). **227**, 680.
 24. Kim C. H. (1994) Specific detection of pullulanase type I in polyacrylamide gels. *FEMS Microbiology Letters.* **116**, 327.
 25. Kitahata, S. and S. Okada. (1982) Comparison of Action of cyclodextrin glucanotransferase from *B. megaterium*, *B. circulans*, *B. stearothermophilus* and *B. macerans*. *J. Jap. Soc. Starch Sci.* **29**(1), 13.
 26. Nischte, L., K. Heeger, H. Bender, and G. E. Schulz. (1990) Molecular cloning, nucleotide sequence and expression in *E. coli* of the β -cyclodextrin glycosyltransferase gene from *B. circulans* No. 8. *Appl. Microbiol.* **33**, 542.
 27. Yong, J. S., J. N. Choi, S. S. Park, C. S. Park, K. H. Park and Y. D. Choi. (1996) Secretion of heterologous CGTase of *Bacillus* sp. E1 from *E. coli*. *Biotechnology letters.* **18**(10), 1223.
 28. Schmid, D. (1988) Cloning and nucleotide sequence of a cyclodextrin glycosyltransferase gene from the alkalophilic *Bacillus* 1-1. *Proc. Int. Symp. Cyclodextrin.* 4th., 71.
 29. Sin, K. A., A. Nakamura, K. Kobayashi, H. Masaki and T. Uozumi. (1991) Cloning and sequencing of cyclodextrin glucanotransferase gene from *B. ohbensis* and its expression in *E. coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **35**, 600.
 30. Kobayashi, S., K. Kainuma and S. Suzuki. (1978) Purification and some properties of *B. macerans* cyclodextrin glucanotransferase (cyclodextrin glucanotransferase). *Carbohydrate Research.* **61**, 229.
 31. Kitahata S. and S. Okada. (1982) Purification and some properties of cyclodextrin glucotransferase from *B. stearothermophilus* TC-60. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.* **9**, 7.
 32. Nakamura, N. and K. Horibkoshi. (1976) Purification and properties of cyclodextrin glycosyltransferase of an alkalophilic *Bacillus* sp.. *Agri. Biol. Chem.* **40**, 1785.
 33. Nomoto, M., C. C. Chen and D. C. Sheu. (1986) Purification and characterization of cyclodextrin glucanotransferase from an alkalophilic bacterium of Taiwan. *Agri. Biol. Chem.* **50**(11), 2701.
 34. Mauri, M., P. Mattsson, M. E. Schimina and T. Korpela. (1988) Purification and properties of cyclomaltodextrin glucanotransferase from an alkalophilic *Bacillus*. *Biotech. and Appl. Biochem.* **10**, 414.

Purification and Characterization of Cyclodextrin Glycosyltransferase from *Bacillus brevis* CD162

Myung-Hee Kim, Cheon-Bae Sohn* Young-Hee Lim¹ and Tae-Kwang Oh² (*Department of Food & Nutrition, Chungnam National University, Taejon 301-764, Korea; ¹Department of Food & Human Nutrition, Taejon University, Taejon 300-716, Korea; ²Microbial Enzyme Research Unit, Korea Research Institute of Bioscience & Biotechnology, KIST, P.O.Box 115, Yuseong, Taejon 305-600, Korea*)

Abstract : The cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase, EC 3.2.1.19) from *Bacillus brevis* CD162 was purified by precipitating with ammonium sulfate, DEAE-Sepharose CL-6B column chromatography and Sephadex G-150 column chromatography. The molecular mass and pI of the purified enzyme were estimated to be 74,000 and 6.3 by SDS-PAGE and isoelectric focusing, respectively. The purified enzyme was clearly identified as the CGTase by zymogram after SDS-PAGE. The optimum pH and temperature for the enzyme activity were 8.0 and 55°C, respectively. The enzyme was stable at the range of pH 5.5~9.0, and up to 50°C. The amino acid sequence from the NH₂-terminal of the purified CGTase was Ser-Val-Thr-Asn-Lys-Val-Asn-Tyr-Ser-Lys-Asp-Val-Ile-Tyr-Gln. The yields of the products from starch as the substrate were 1.3% for α -, 33.9% for β -, and 9.7% for γ -cyclodextrin.

Key words : *Bacillus brevis*, cyclodextrin glycosyltransferase, cyclodextrin

*Corresponding author