

## 호알칼리성 *Bacillus firmus*가 생산하는 $\beta$ -Cyclodextrin Glucanotransferase의 정제 및 효소반응 특성

신현동 · 김 찬 · 이용현\*  
경북대학교 자연과학대학 유전공학과

**Purification and Characterization of  $\beta$ -Cyclodextrin Glucanotransferase Excreted by *Bacillus firmus* var. *alkalophilus*.** Shin, Hyun-Dong, Chan Kim, and Yong-Hyun Lee\*. Department of Genetic Engineering, College of Natural Sciences, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea - Cyclodextrin glucanotransferase (CGTase) was purified from the culture broth of the *Bacillus firmus* var. *alkalophilus*, using ultrafiltration, starch adsorption/desorption, ion-exchange chromatography on DEAE-cellulose and gel filtration on Sephacryl HR-100. The molecular weight of the purified enzyme was determined as 77,000 by SDS-PAGE. The optimum pH and temperature for the CD synthesis were 6.0 and 50°C, respectively. The activity of this enzyme was stably kept at the range of pH 6.0~9.5 and up to 50°C. However, in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$ , the optimum temperature for CD synthesis was shifted 55~60°C and this enzyme was stable up to 60°C because of the stabilizing effect of  $\text{Ca}^{2+}$ . The purified CGTase produced CDs with high conversion yields of 45~51% from sweet potato starch, corn starch and amylopectin as substrate, especially, and the product ratio of  $\beta$ -CD to  $\gamma$ -CD was obtained at range of from 5.8:1 to 8.4:1 according to the kind of substrate. The purified enzyme produced mainly  $\beta$ -CD without accumulation of  $\alpha$ -CD during enzyme reaction using various starches as the substrate, indicating that the purified enzyme is the typical  $\beta$ -CGTase. The purified CGTase produced 25 g/l of CDs from 5.0% (w/v) liquefied corn starch and the conversion yield of CDs was 50%, and the content of  $\beta$ -CD was 84% of total CDs after 8 hours under the optimum reaction condition.

**Key words:**  $\beta$ -cyclodextrin glucanotransferase, purification, characteristics, *Bacillus firmus* var. *alkalophilus*

Cyclodextrin glucanotransferase(CGTase, EC 2.4.1.19)는 전분이나  $\alpha$ -1,4-글루칸으로부터 cyclodextrin (CD)를 합성하는 분자내 당전이 반응(intramolecular transglycosylation), 전분이나 CD로부터 포도당 잔기를 포도당, 자일로스, 셀룰라오 같은 적당한 수용체에 전이시키는 분자간 당전이 반응(intermolecular transglycosylation), 그리고 전분과 CD에 대한 가수분해 반응, 그리고 말토올리고당을 불균일화 시키는 disproportionation 반응 등을 촉매하는 효소이다[23].

CGTase에 의해 생성되는 CD는 소수성의 공동(cavity)에 여러 유기 및 무기 화합물을 포접하는 성질을 갖고 있다. 이러한 포접작용을 이용하여 각종 화합물의 물성을 개선하는 분자캡슐로 주목되어 온 CD는 식품, 의약품, 화장품, 화학 및 농약 등에 광범위하게 이용되고 있다 [14, 23].

현재까지 알려져 있는 CGTase생산 균주들은 *Bacillus* 속이 거의 대부분으로 *Bacillus macerans*, *B. circulans*, *B. megaterium*, *B. coagulans*, *B. stearothermophilus*, *B.*

*licheniformis*등 중성 *Bacilli*[15] 뿐만 아니라 수종의 호알칼리성 *Bacillus* sp.[3, 7, 19], *B. brevis*[10], *Bacillus* sp. KC201[13], *Bacillus* sp. E1[21], *B. ohbensis*[24] 등 호알칼리성 *Bacillus* 속들도 다수 발견되었으며, *Klebsiella pneumonia* M5al[1] 그리고 *Klebsiella oxytoga* [18]와 같은 그람 음성균과 초고온성균인 *Thermoanaerobacter* sp.[20]도 알려져 있다.

현재까지 발견된 대부분의 CGTase들은  $\alpha$ -,  $\beta$ -, 그리고  $\gamma$ -CD 세 종류의 CD를 동시에 생성하기 때문에 이들을 순수분리하는데 많은 경비가 소요되고 있으며, 분리정제공정도 복잡하게 되는 문제점이 있다. 만약 이 세 종류의 CD들 중 한 종류 또는 두 종류의 CD만을 고효율로 생성하는 CGTase가 개발된다면 생산단가를 낮출 수 있으며, 이는 CD의 활용범위를 더욱 더 확대시킬 수 있는 계기가 될 수 있을 것이다. 이런 이유로 최근에 몇몇 연구자들에 의해  $\beta$ - 및  $\gamma$ -CD 만을 생성하는 CGTase를 분리하는 균주들[13, 21, 24]과  $\alpha$ - 및  $\beta$ -CD만을 생성하는 CGTase를 분리하는 균주[18]가 보고된 바 있다.

본 연구실에서는 이런 점을 고려하여 특정 CD를 높은 함량으로 합성하는 새로운 CGTase를 분리하는 미생물의 탐색을 목표로 연구를 수행하였으며,  $\beta$ -CD를 주로 합

\*Corresponding author  
Tel. 82-53-950-5384, Fax. 82-53-959-8314  
E-mail: leeyh@bh.kyungpook.ac.kr

성하고 소량의  $\gamma$ -CD를 생산하는 CGTase를 분리하는 새로운 호알칼리성 세균인 *Bacillus firmus* var. *alkalophilus*를 분리하여 그 특성을 규명한 바 있다 [6]. 또한 이 균주를 NTG를 이용한 돌연변이를 유발시켜 포도당에 대한 대사산물억제 해제 변이주 및 탄소원이 없는 상태에서도 CGTase를 상시 분비하는 constitutive 변이주를 선별하여 상당한 효소 생산량의 증대와 아울러 CGTase 생산 조절기작에 대한 연구도 수행한 바 있다 [5, 11].

본 연구의 목적은 위의 *Bacillus firmus* var. *alkalophilus*가 분비하는 CGTase를 분리정제하고 그 효소적 특성을 규명함에 있다. 이를 위하여 한외여과, 호화시킨 팽윤 전분을 이용한 흡착 및 탈착, 이온교환 크로마토그래피, 그리고 gel filtration을 이용하여 CGTase를 분리, 정제하였다. 정제된 CGTase의 분자량, 등전점, 기질 특이성, CD합성, 당전이, 불균일화 반응등 대표적인 CGTase가 촉매하는 효소반응의 kinetic constant등 효소반응 특성을 규명하였으며, 고순도  $\beta$ -CD생산을 위한 효소반응 조건을 검토하였다. 이는  $\beta$ -CD의 고순도, 고효율 생산을 위한 효소개발 및 반응시스템 개발의 기초자료로 활용될 것이다.

## 재료 및 방법

### 사용균주 및 효소생산

전보 [6]에서 분리, 동정한 *Bacillus firmus* var. *alkalophilus*를 탄소원으로 soluble starch를 포함한 alkaline basal medium[8]에서 이를 동안 37°C에서 현탁배양한 후, 원심분리하여 균체를 제거한 상등액을 CGTase 정제를 위한 조효소액으로 사용하였다.

### 호화 팽윤 감자전분의 제조

감자전분(Wako Chemical Co.) 200 g을 20%(w/v) ammonium sulfate 용액 1 l에 현탁한 후, 천천히 교반하면서 가열하여 호화시킨다. 현탁액의 온도가 88~92°C가 되면 가열을 중단하고 얼음에서 급속히 냉각시킨다. 호화시킨 팽윤감자전분 현탁액의 온도가 상온으로 내려가면 증류수로 3회 이상 세척한 후 현탁액을 여과한 후 냉장고에 보관하면서 효소정제에 사용하였다.

### Cyclodextrin glucanotransferase의 분리정제

배양상등액 3 l를 한외여과장치(Amincon Co., M.W. 20,000)를 이용하여 10배 농축 후 10 mM Tris-HCl 완충용액(pH 8.0)로 투석한다. 이 효소액에 ammonium sulfate를 20%(w/v)되게 용해시킨 후, 호화시킨 팽윤감자전분을 150~200 g을 첨가하여 현탁시킨 다음 4°C에서 1시간 동안 보관하면서 CGTase를 감자전분에 흡착

시킨다. 흡착된 감자전분을 여과하여 모아 20%(v/v)에 탄올용액으로 3회 반복하여 세척한 후,  $\beta$ -CD가 10 mg/ml 농도로 용해된 상기 완충용액에 현탁하여 50°C에서 1시간 동안 천천히 교반하면서 흡착된 CGTase를 탈착시킨다. 탈착시킨 효소액은 한외여과장치를 이용하여 농축한 후, 원심분리하여 침전물을 제거한 용액을 이온교환 크로마토그래피를 위한 효소액으로 사용하였다. 이온교환 크로마토그래피는 10 mM Tris-HCl 완충용액(pH 8.0)으로 평형화시킨 DEAE-cellulose column에 준비된 효소액을 주입하여 흡착시키고, 동일한 완충용액에서 0~0.5 M NaCl 농도구배를 수행하면서 분획하였다. 분획된 시료들 중 CGTase 활성을 갖는 분획을 모아 한외여과장치를 이용하여 다시 농축 및 투석을 실시한 후, Sephacryl HR-100 column 크로마토그래피를 수행해 CGTase활성을 갖는 분획을 모아 한외여과장치로 농축한 용액을 최종적으로 정제된 CGTase용액으로 사용하였다. 정제정도는 native polycarylamide gel 전기영동 및 sodium dodecyl sulfate gel 전기영동(SDS-PAGE)를 통해 검토하였다.

### CGTase 활성 측정

CGTase 효소활성의 측정은 Kaneko 등 [9]이 제안한 방법인 phenolphthalein법을 다소 변형시켜 사용하였다. 100  $\mu$ l의 효소액을 10%(w/v) soluble starch용액 500  $\mu$ l와 50 mM Tris-maleic acid-NaOH 완충용액(pH 6.0) 400  $\mu$ l를 혼합한 용액에 첨가한 후, 50°C에서 30분간 반응시킨다. 반응 후, 0.02% phenolphthalein용액 500  $\mu$ l와 1.0%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  용액 3.5 ml를 첨가하여 잘 혼합한 다음 550 nm에서 투과도를 측정하여 표준곡선으로부터  $\beta$ -CD농도를 환산한 후 효소 활성을 계산하였다. CGTase 활성 1 unit는 1분당 1 mg의  $\beta$ -CD를 생산하는데 필요한 효소량으로 결정하였다.

### 전기영동 및 분자량 결정

Native gel 전기영동은 Davis의 방법[4]에 따라 실시하였으며, sodium dodecyl sulfate gel 전기영동(SDS-PAGE)는 Lammler의 방법[17]에 따라 실시하였다. 정제된 단백질의 분자량 결정을 위해 사용한 표준단백질들은 Bio-Rad사의 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 이용하였다.

### 등전점의 결정

정제한 효소의 등전점을 알아보기 위해 isoelectric focusing(IEF) gel 전기영동을 수행하였다. ampholyte 3~10 pH 구배로 된 균질 polyacrylamide gel상에서 전

기영동을 실시하여 등전점을 확인하였다. IEF 표준곡선 작성을 위한 표준물질은 Sigma사의 IEF MIX 3.6-9.3를 사용하였다.

**단백질 정량**

용액 중의 단백질 정량은 Bradford법[2]에 따라 595 nm에서 흡광도를 측정하여 표준곡선으로부터 정량하였으며, 이때 표준물질은 bovine serum albumin을 사용하였다. 경우에 따라 280 nm에서 흡광도를 측정하였다.

**CD 및 기타 당 분석**

CD 및 기타 당류의 분석에는 HPLC(Gilson Co.)를 이용하였으며, 사용한 column은 Cosmosil 5-NH<sub>2</sub> column (Nacalai technique Co.)이고, 전개용매는 acetonitrile과 초순수를 65:35로 섞어 유속을 1.0 ml/min으로 하였다. 또한, 시료의 검출은 RI detector를 사용하였고, CD 및 당류의 표준시료들은 Sigma사의 것을 사용하였다.

**결과 및 고찰**

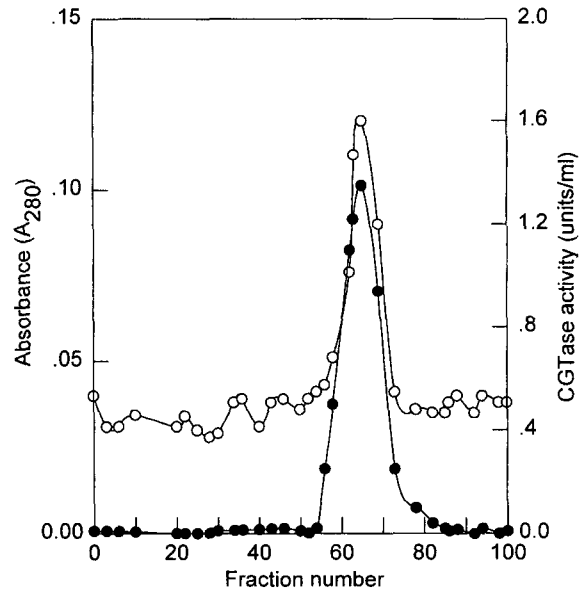
**Cyclodextrin glucanotransferase의 정제**

*Bacillus firmus* var. *alkalophilus*로부터 유래된 CGTase의 효소적 특성을 규명하기 위하여, 균주의 배양 상등액을 한외여과, 호화시킨 팥윤감자전분을 이용한 CGTase의 흡착과 탈착, DEAE-cellulose 이온교환 크로마토그래피, 그리고 Sephacryl HR-100 column 크로마토그래피를 이용하여 CGTase를 정제하였다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 분획 56~70에서 CGTase의 활성을 확인하였고, 이 분획을 native polyacrylamide gel 전기영동 및 SDS-PAGE를 실시한 결과 단일밴드임을 확인하였다.

Table 1은 정제과정을 요약한 것으로 감자전분을 이용한 CGTase의 흡착 및 탈착과정에서 specific activity가 약 12배 정도 증가하였다. 기질인 호화시킨 팥윤감자 전분을 이용한 효소의 흡착과 탈착과정은 매우 효과적인 정제방법임을 알 수 있었다. CGTase의 최종 회수율은 약 19%였다.

**정제된 cyclodextrin glucanotransferase의 분자량 및 등전점**

Fig. 2(A)는 정제된 CGTase의 SDS 전기영동 사진으로 분자량이 약 77,000 dalton인 단량체로 추정된다. 이는 지금까지 주로 β-CD를 생산하는 것으로 알려진 *B. circulans*[22], 호알칼리성 *Bacillus* sp. 1-1[15], *Bacillus* sp. KC201[13], 그리고 *Bacillus* sp. 1011[12]유래의 CGTase와 유사한 분자량이다. 또한 Fig. 2(B)은 정제된 CGTase를 isoelectrofocusing을 수행한 결과로서 정제된 CGTase의 등전점은 pH 6.2~6.3으로서, 위의 효소들



**Fig. 1. Sephacryl HR-100 column chromatography of the partially purified CGTase.**  
The enzyme was eluted with 100 mM Tris-HCl buffer (pH8.0) at a flow rate of 20 ml/h. The volume of each fraction was 3 ml. Symbols: ○; protein concentration, ●; CGTase activity.

**Table 1. Purification procedure of β-cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus firmus* var. *alkalophilus***

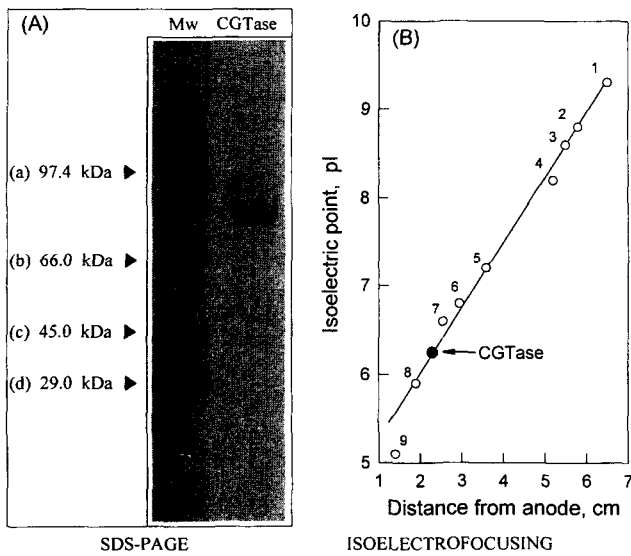
Purification step	Total activity (units)	Total protein (mg)	Specific activity (units/mg)	Yield (%)
Culture broth	6,030	162	37.2	100
Ultrafiltration	5,909	132.5	44.6	98
Starch adsorption and desorption	3,357	7.3	459.9	56
DEAE-cellulose ion-exchange chromatography	2,291	4.3	532.9	38
Sephacryl HR-100 gel filtration	1,126	1.8	625.4	19

포함한 대부분의 CGTase들이 4.0~5.5 사이인 것에 비해 다소 높은 값을 나타내었으나, *B. brevis* [10]의 CGTase와는 유사하였다.

**정제된 CGTase의 효소적 특성**

**온도 및 pH의 영향** Fig. 3(A)는 정제된 효소의 활성과 안정성에 대한 pH의 영향을 검토한 결과로서 정제된 CGTase는 pH 6.0에서 최적의 활성을 나타내었으며, pH 6.0~9.5 범위내에서 매우 안정하였으며, pH 4.5이하 및 pH 10이상에서는 효소활성이 급격히 감소하여 거의 실패되었다.

Fig. 3(B, C)은 온도에 대한 효소활성 변화와 열 안정성을 검토한 것으로 최적 반응온도는 Ca<sup>2+</sup>를 첨가하지

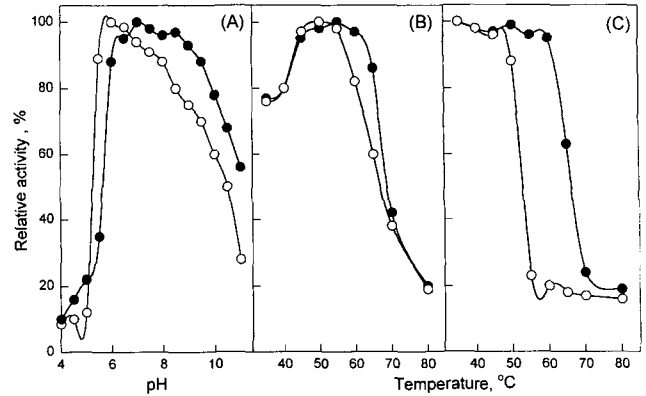


**Fig. 2. Molecular weight (A) and isoelectric pH (B) of  $\beta$ -CGTase determined by SDS-PAGE and isoelectrofocusing.**

The molecular weight of the purified CGTase was determined by SDS-PAGE and the molecular weight marker (Mw) was used as follows; (a) phosphorylase B (97.4 kDa), (b) bovine serum albumin (66.0 kDa), (c) egg albumin (45.0 kDa), and (d) carbonic anhydrase (29.0 kDa). The isoelectric point (pI) of the purified CGTase was determined by isoelectrofocusing using ampholine-polyacrylamide gel electrophoresis. The pI marker was used as follows; (1) trypsinogen from bovine pancreas (pI 9.3), (2)~(4) *Lens culinaris* lectins (pI 8.2, 8.6, and 8.8), (5)~(6) myoglobin from horse heart (pI 6.8 and 7.2), (7) carbonic anhydrase I from human erythrocytes (pI 6.6), (8) carbonic anhydrase II from human erythrocytes (pI 5.9), and (9)  $\beta$ -lactalbumin A from bivariate milk (pI 5.1).

않았을 경우는 50°C였으나, Ca<sup>2+</sup>를 첨가할 경우에는 55~60°C로 다소 높아 졌다. 또한 CGTase의 열 안정성에 대한 조사에서도 Ca<sup>2+</sup>를 첨가하지 않았을 경우에는 50°C이상에서는 급속히 실패되었으나, Ca<sup>2+</sup>를 첨가하였을 경우는 60°C에서도 1시간 이상 유지하여도 활성이 유지되었다. 이는 Ca<sup>2+</sup>이 CGTase의 열 안정성 유지에 매우 중요한 역할을 하는 것을 의미한다.

**기질 특이성 및 생성물의 분석** Table 2는 정제된 CGTase의 기질 특이성을 검토하기 위하여 여러 종류의 전분을 기질로 효소반응 후 그 생성물을 분석한 결과이다. 2.0%(w/v)의 기질을 50°C에서 24시간 반응시킨 후, 대부분의 기질에서 23~51%가 CD로 전환되었고, 생산된 CD는 주로  $\beta$ -CD였으며  $\gamma$ -CD는 소량 검출되었지만  $\alpha$ -CD는 거의 생산되지 않았다. 특히 corn starch, sweet potato starch, 그리고 amylopectin을 기질로 사용하였을 경우 CD전환율이 45~51%로서 높은 전환율을 보였으며,  $\beta$ -CD와  $\gamma$ -CD의 생성비는 대략 5.8~8.4:1 전후로  $\beta$ -CD가 매우 높은 비율로 생산되었다. 이상의 결과로 보아 정제된 CGTase는 전형적인  $\beta$ -type의 CGTase



**Fig. 3. Effects of pH (A) and temperature (B, C) on CGTase activity and stability.**

(A): Effect of pH on CGTase activity (○) and pH stability (●). The enzyme was assayed at various pHs. The enzyme in 0.1 M buffer containing 10 mM CaCl<sub>2</sub> which had various pH values was kept for 1 hour at 50°C and an aliquot was withdrawn for assay of the remaining activity. (B, C): Effect of temperature on CGTase activity and stability in the presence or absence of Ca<sup>2+</sup>. The enzyme was assayed with 5.0 % of soluble starch for 30 min at various temperatures in the presence of 10 mM CaCl<sub>2</sub> (●) or 10 mM EDTA (○). The enzyme in 50 mM Tris-maleic acid-NaOH buffer (pH 6.0) containing 10 mM CaCl<sub>2</sub> (●) or 10 mM EDTA (○) was incubated at the prescribed temperature for 1.0 hour and an aliquot was withdrawn for assay of remaining activity.

로 고순도의  $\beta$ -CD생산에 유리할 것으로 예상된다.

지금까지 발견된 대부분의 CGTase들은  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -CD를 모두 생성하는 것으로 알려져 있으며, 단지 *Bacillus* sp. E1[21], *Bacillus* sp. 1-1[15], *Bacillus* sp. KC 201 [13], 그리고 *B. ohbensis*[24]유래의 CGTase들이 *Bacillus firmus* var. *alkalophilus*유래의 본 효소와 같이  $\alpha$ -CD의 축적없이  $\beta$ -CD와  $\gamma$ -CD만을 생산하는 것으로 보고되고 있다.

**효소반응별 Kinetic Constant** 정제된 CGTase의 효소 반응별 kinetic constant들을 평가하기 위하여 CGTase

**Table 2. Substrate specificities of  $\beta$ -CGTase from *Bacillus firmus* var. *alkalophilus***

Kinds of starch	CD formed, g/l			Conversion yield (%)
	$\beta$ -CD	$\gamma$ -CD	Total CD	
Soluble starch	4.40	0.72	5.12	26
Corn starch	8.00	1.04	9.04	45
Potato starch	6.80	1.02	7.82	39
Sweet potato starch	9.20	1.09	10.29	51
Amylose	4.60	0.81	5.41	27
Amylopectin	7.80	1.34	9.14	46
Dextrin	4.00	0.66	4.66	23

2% (w/v) of starch in 0.1 M Tris-maleic acid-NaOH buffer (pH 6.0) containing 10 mM CaCl<sub>2</sub> was digested with CGTase (0.1 unit/ml) at 50°C for 24 hr.

**Table 3. Kinetic constants of CD synthesis, coupling and disproportionation reaction of β-CGTase from *Bacillus firmus* var. *alkalophilus***

Reaction	Substrate	K <sub>m</sub>	V <sub>max</sub> (mM of β-CD /min · mg of protein)
CD synthesis	soluble	12.40 mg/ml	5.82 × 10 <sup>5</sup>
Coupling	α-CD	16.45 mM	7.67 × 10 <sup>4</sup>
	β-CD	1.03 mM	1.20 × 10 <sup>8</sup>
	γ-CD	45.84 mM	1.75 × 10 <sup>7</sup>
Disproportionation	maltotriose	3759.76 mM	2.37 × 10 <sup>4</sup>

K<sub>m</sub> and V<sub>max</sub> of each reaction were analyzed by double reciprocal plot. The CD synthetic reaction was carried out at the condition of 2~50 g/l soluble starch, 0.1 unit/ml CGTase, pH 6.0 and 50°C for 10 min. The coupling reaction was carried out at the condition of 0.1~0.5 mM of CDs, 0.5 mM of maltose, 0.5 unit/ml CGTase, pH 6.0 and 50°C for 10 min. The disproportionation reaction was carried out at the condition of 10~50 mM maltotriose, 1.0 unit/ml CGTase, pH 6.0 and 50°C for 30 min. CDs and maltooligosaccharides were analyzed by HPLC.

가 촉매하는 각종 반응중 대표적인 반응인 CD합성 반응 (CD synthesis), 당전이 반응(coupling reaction), 그리고 불균일화 반응(disproportionation)에 대한 K<sub>m</sub> 및 V<sub>max</sub> 값을 double reciprocal plot을 이용하여 조사하여 그 결과를 Table 3에 요약하였다. Table 3에서 보는 바와 같이 CD합성 반응 및 당전이 반응에서의 K<sub>m</sub>값은 불균일화 반응의 수치보다 매우 낮았고 V<sub>max</sub>들은 불균일화 반응의 수치보다는 매우 높게 나타났다. 이는 본 효소가 불균일화 반응보다는 CD합성반응과 당전이 반응을 더 용이하게 촉매하는 것을 의미한다. 당전이 반응에서 가장 우수한 당공여체로는 β-CD로 이는 기질 특이성 및 생성물 분석에서의 결과와 일치하는 것으로 이 효소가 전형적인 β-type의 CGTase임을 나타낸 결과이다.

**당전이 반응에서의 당수용체 특이성** Table 4는 정제된 CGTase의 당전이 반응에서의 각 당수용체들에 대한 당전이 반응성을 검토한 것이다. Table 4에서 보는 바와 같이 maltose, maltitol, cellobiose, 그리고 stevioside가 비교적 높은 당전이 수율인 40~50%를 나타낸 반면, inositol, 포도당, 설탕과 같은 그외의 당수용체에는 그다지 당전이 수율이 높지 않았다. 이는 이 효소가 α-, β-, γ-CD를 모두 생성하는 다른 CGTase들에 비해 상당히 좁은 범위의 당수용체에만 반응성을 나타내는 것으로 이는 이 효소가 높은 수율로 고순도의 β-CD를 생성하는 특성과 연관이 있을 것으로 유추된다[15, 24].

**각종 금속이온 및 화학물질의 영향** Table 5는 정제된 CGTase의 각종 금속이온 및 화학물질의 효소활성에 미치는 영향을 검토한 것이다. Table 5에서 보는 바와 같이 amylase계열 효소의 열안정성 향상 및 활성화에 기여하는 것으로 알려진 2가 양이온인 Ca<sup>2+</sup>와 Mg<sup>2+</sup>에 의해 효

**Table 4. Acceptor specificity for transglycosylation reaction of β-CGTase from *Bacillus firmus* var. *alkalophilus***

Acceptor (5%, w/v)	Conversion yield (%)	Acceptor (5%, w/v)	Conversion yield (%)
glucose	4.90	xylitol	12.90
xylose	17.80	sorbitol	N.D.
fructose	N.D.	inositol	N.D.
sorbose	15.70	maltitol	44.70
maltose	50.88	manitol	N.D.
cellobiose	43.90	salicin	5.69
sucrose	8.16	stevioside	41.67

Reactions were carried out at 50 g/l of each acceptor, 50 g/l of soluble starch as glycosyl donor, pH 6.0, 50°C, and 10 units of CGTase/g of starch, for 12 hours. Degrees of transglycosylation were estimated by the decrease of each acceptor. N.D., not detected.

**Table 5. Effects of metal ions and chemical reagents on CD forming activity of β-CGTase from *Bacillus firmus* var. *alkalophilus***

Metal ions and chemicals (10 mM)	Relative activity (%)	Metal ions and chemicals (10 mM)	Relative activity (%)
None	100.0	CsCl	114.9
BaCl <sub>2</sub>	71.6	NaCl	114.9
NiSO <sub>4</sub>	100.0	FeSO <sub>4</sub>	63.5
CuCl <sub>2</sub>	45.9	p-CMB	21.6
MgSO <sub>4</sub>	128.4	DMSO	93.2
CaCl <sub>2</sub>	128.4	DTT	104.1
KCl	108.1	(CH <sub>3</sub> COO)Pb	100.0

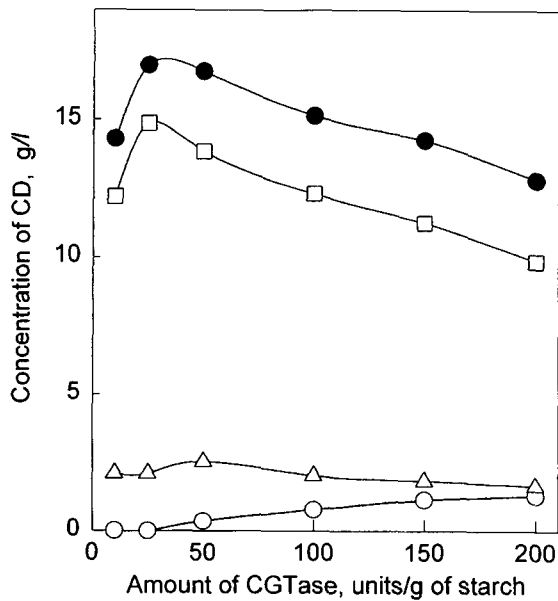
Reactions were carried out at 50 g/l of soluble starch, 10 mM of each metal ion or chemical, pH 6.0, 50°C, and 1 units of CGTase/g of starch, for 30 min.

Abbreviations; pCMBs (*para*-mercurobenzoic acid), DMSO (dimethylsulfoxide), DTT (1,4-dithiothreitol)

소활성이 28% 증가하였으며 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> 그리고 Cs<sup>+</sup>에 의해 약 10% 정도 증가하였다. 그리고 sulfhydryl기를 공격하는 것으로 알려진 *para*-mercurobenzoic acid(*p*-CMB)에 의해 효소활성이 강하게 저해받았으며 Ba<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>와 Fe<sup>2+</sup>가 존재할 경우 첨가하지 않았을 경우에 비해 45.9~71.6% 수준으로 다소 저해를 받는 것으로 나타났다.

**정제된 CGTase의 CD 생산 반응조건**

**효소첨가량의 영향** Fig. 4는 효소 첨가량의 변화에 대한 CD전환율을 조사한 것으로 기질 1 g당 CGTase 첨가량이 25 unit인 경우 가장 높은 CD 전환율을 나타내었다. 특히 효소 첨가량이 50 unit/g of starch 이상일 경우에는 전체 CD전환율에는 큰 변화는 없었으나, β-CD의 생성량이 상당량 감소하고 이보다 낮은 효소첨가량의 경우에는 검출되지 않았던 α-CD가 생성되기 시작하였으며 효소 첨가량이 증가할수록 α-CD가 상당량 생성되는 경



**Fig. 4. Effect of the amount of CGTase on CD synthesis reaction.**

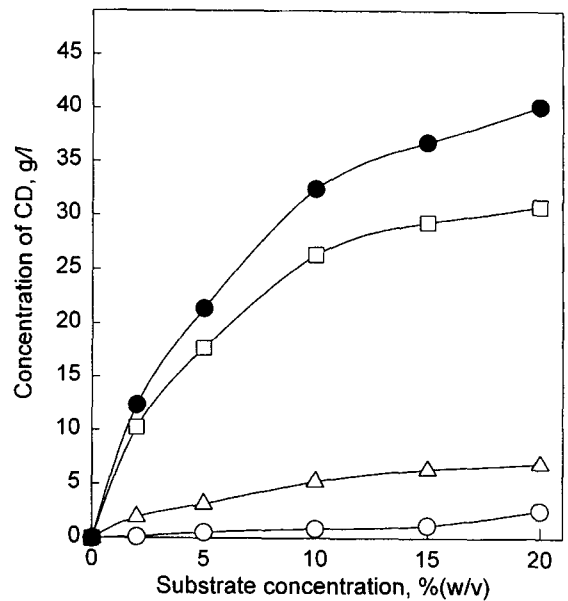
The reactions were carried out at the conditions of 10~200 units of CGTase/g of starch, 2.0% (w/v) corn starch (DE: 5~10), pH 6.0, and 50°C for 24 hours. Symbols: ○; α-CD, □; β-CD, △; γ-CD, ●; total CD.

향을 보였다.

이런 현상은 본 효소와 같은 β-type CGTase인 *B. ohbensis*[24] 유래의 효소에서도 관찰된 바 있는데 이는 본 효소에 대해 친화력이 높은 β-CD가 과량의 CGTase에 의해 CD 개환반응 및 재배열 반응등의 2차적인 반응을 쉽게 받아 α-CD로 전환되는데 기인하는 것으로 사료된다.

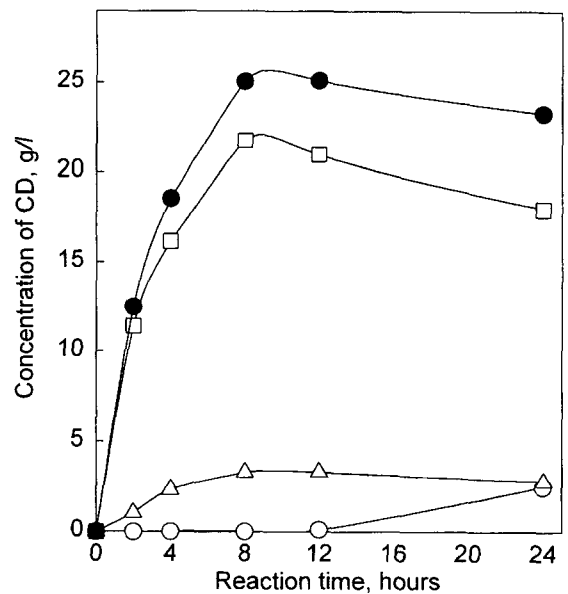
**기질농도의 영향** Fig. 5는 기질농도의 변화에 대한 CD전환율을 검토한 결과로서 전반적으로 기질농도가 증가할 수록 전체 CD 생성량은 증가하였으나, 반면 CD전환율은 감소하는 경향을 보였다. 이는 기질의 농도가 증가함에 따라 반응액의 점도증가등 유동성 감소로 효소반응이 저해받기 때문이다. 따라서 고수율의 CD를 얻기 위해서는 저농도의 기질 사용이 바람직하나, 반면 반응 후 회수 및 분리정제 과정에서 어려움이 있어 적절한 기질농도 선정이 필요하며, 본 효소의 경우 CD생성량 및 전환율을 고려할 때 전환율이 대략 35~47% 수준인 5~10%(w/v) 범위의 기질농도가 적절할 것으로 생각된다.

**CD생산의 경시적 관찰** Fig. 6은 위에서 조사한 최적의 CD 생산조건인 기질농도 5.0%(w/v) corn starch, 효소첨가량 25 unit/g of starch, 그리고 반응온도 및 pH 50°C와 6.0에서 24 시간동안 반응시키면서 시간대 별로 생성 CD를 HPLC로 분석한 결과이다. Fig. 6에서 보는 바와 같이 β-CD는 γ-CD보다는 우선적으로 생성되었고 반응 8시간 후에는 전체 CD량이 약 25 g/l에 도달하였으



**Fig. 5. Effect of substrate concentration on CD synthesis reaction.**

The reactions were carried out at the conditions of 2.0~20%(w/v) corn starch (DE: 5~10), 25 units of CGTase/g of starch, pH 6.0, and 50°C for 24 hours. Symbols: ○; α-CD, □; β-CD, △; γ-CD, ●; total CD.



**Fig. 6. Time course of CD production reaction from the liquefied corn starch.**

The reactions were carried out at the conditions of 5.0%(w/v) corn starch (DE: 5~10), 25 units of CGTase/g of starch, pH 6.0, and 50°C for 24 hours. Symbols: ○; α-CD, □; β-CD, △; γ-CD, ●; total CD.

며, 전체 CD전환율은 약 50%에 이르렀다. 그러나 최대 CD전환율에 도달하는 반응 8시간 후에는 전체 CD량이 다소 감소하여 24시간 후에는 약 23 g/l였다. 이는 주로

$\beta$ -CD량이 감소하여 나타난 결과였다.

한편  $\alpha$ -CD는 반응 12시간까지 검출되지 않았으며, 그 후에는 소량 생성되어 반응 24 시간 후에는 2.5 g/l였다. 이와 같은 장시간 반응시 대부분의 CGTase들에서 관찰되는 공통된 현상으로 특히 본 효소와 같은  $\beta$ -type CGTase인 *B. ohbensis*[24]의 경우에도 관찰된 바 있다. 이는 생성된 CD에 의한 product inhibition에 의해 전분으로부터 CD를 계속 합성되지 않고 생성된 CD의 개환 및 반응 중 축적된 말토올리고당으로의 당전이 반응과 같은 2차적인 반응이 일어나기 때문인 것으로 추정된다.

한편, *Bacillus* sp. E1[21] CGTase는 2.0%(w/v) 가용성 전분에 3.5 unit의 CGTase를 작용하였을 때 25시간 후 최대 25%의 CD전환율을 보였으며, *Bacillus* sp. AL-6[7] CGTase의 경우 4.4%(w/v) 가용성 전분에 30.3 unit의 CGTase를 작용시켰을 때 약 8시간 이후 최대 25%의 CD전환율을 보였다. 또한 *Bacillus autolyticus* 11149[25]유래의 CGTase 경우 10%(w/v) 호화 감자전분에 2.0 unit/ml의 CGTase를 작용시켰을 때 반응 12시간 후 최대 30%의 CD전환율을 보인다. 그리고 *Bacillus ohbensis*[24]의 경우 5.0%(w/v) 가용성 전분에 100 unit/g of starch 비율로 효소를 작용시켰을 때 반응 24시간 후 최대 25% CD전환율을 보였다. 이상의 보고들로 미루어 보아 본 효소와 직접적인 비교는 할 수 없었지만 CD전환율 면에서 기존의 효소들이 최대 25~30%인 것에 비해 본 효소는 최대 50%의 전환율을 보였으며 최대 반응수율에 도달하는 시간도 보통 12~24시간 전후로 본 효소가 8~12시간으로 다소 빠른 경향을 보였다. 따라서 본 효소는 기존의  $\beta$ -type CGTase에 비해 산업적 활용면에서 우수할 것으로 예상된다.

## 요 약

호알카리성 *Bacillus firmus* var. *alkalophilus*가 생산하는 cyclodextrin glucanotransferase(CGTase)를 호화시킨 팽윤감자전분을 이용한 흡착 및 탈착, 환외여과, DEAE-cellulose 이온교환 크로마토그래피, 그리고 Sephacryl HR-100을 이용한 gel filtration 등의 분리정제 과정을 통하여 정제하였다. 정제된 CGTase의 분자량은 약 77,000 Da이었으며, 등전점은 6.2~6.3이었다. 최적 효소반응 온도 및 pH는 각각 50°C와 6.0였고, 열 및 pH 안정성은 50°C까지와 pH 6.0~9.5 사이였다. 정제된 CGTase는  $\text{Ca}^{2+}$ 에 의하여 열 안정성이 크게 상당히 향상되었으며 최적 효소반응 온도와 열 안정성도 55~60°C와 60°C로 증가하였다. CGTase의 기질 특이성을 검토한 결과 여러 종류의 전분들로부터  $\beta$ -CD를 주로 생성하였으며,  $\gamma$ -CD도 소량 생성하였으나  $\alpha$ -CD는 거의 생성되지 않았다. Sweet potato starch, corn starch, 그리고

amylopectin을 기질로 할 때 높은 CD전환율을 보였으며  $\beta$ -CD와  $\gamma$ -CD의 생성비가 5.8~8.4:1로서  $\beta$ -CD를 고 수율로 생산하는 전형적인  $\beta$ -type의 CGTase였다. 또한 본 효소의 최적 CD 생산조건은 기질농도 5.0%(w/v) corn starch, 효소첨가량 25 unit/g of starch로서 반응 8시간 후의 전체 CD량도 약 25 g/l로서 전환율은 50%였고, 이때  $\beta$ -CD농도는 21 g/l로서 전체 CD 중 84%였다.

## 감사의 말

이 논문은 한국과학재단 지원 농업생물신소재연구센터 연구비에 의하여 수행되었으며 연구비지원에 감사드립니다.

## REFERENCES

- Bender, H. 1977. Cyclodextrin glucanotransferase von *Klebsiella pneumoniae*. I. Synthese, reinigung und eigenschaften des enzymes von *K. pneumoniae* M 5al. *Arch. Microbiol.* **111**: 271-282.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Chung, Y. J., I. S. Kong, Y. S. Kang, and J. H. Yu. 1990. Purification and characterization of cyclodextrin glycosyltransferase from alkalophilic *Bacillus* sp. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **18**(1): 44-48.
- Davis, B. J. 1964. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Ann. NY Acad. Sci.* **2**: 121-404.
- Do, E. J., H. D. Shin, C. Kim, and Y. H. Lee. 1993. Selection and characterization of catabolite repression resistant mutant of *Bacillus firmus* var. *alkalophilus* producing cyclodextrin glucanotransferase. *J. Microbiol. Biotechnol.* **3**(2): 78-85.
- 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**(2): 119-124.
- Fujita, Y., H. Tsubouchi, Y. Inagi, K. Tomita, A. Ozaki, and K. Nakanishi. 1990. Purification and properties of cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus* sp. Al-6. *J. Ferment. Bioeng.* **70**(3): 150-154.
- Horikoshi, K. and T. Akiba. 1982. Isolation and classification of alkalophilic microorganisms, pp. 9-26. In K. Horikoshi and T. Akiba (eds), *Alkalophilic Microorganisms-A New Microbial World*, Japan Scientific Societies Press, Tokyo.
- Kaneko, T., T. kato, N. Nakamura, and K. Horikoshi. 1987. Spectrophotometric determination of cyclization activity of beta-cyclodextrin-forming cyclodextrin gluco-

- transferase. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.* **34**: 45–48.
10. Kim, M. H., C. B. Sohn, Y. H. Lim, and T. K. Oh. 1997. Purification and characterization of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus brevis* CD162. *Agric. Chem. Biotechnol.* **40**(6): 465–471.
  11. Kim, C., H. D. Shin, and Y. H. Lee. 1995. Selection of the constitutive mutant of *Bacillus firmus* var. *alkalophilus* and its characteristics of cyclodextrin glucanotransferase production. *J. Microbiol. Biotechnol.* **5**(2): 61–67.
  12. Kimura, K., S. Kataoka, Y. Ishii, T. Takano, and K. Yamane. 1987. Nucleotide sequence of the  $\beta$ -cyclodextrin glucanotransferase gene of alkalophilic *Bacillus* sp. strain 1011 and similarity of its amino acid sequence to those of  $\alpha$ -amylases. *J. Bacteriol.* **169**: 4339–4402.
  13. Kitamoto, N., T. Kimura, Y. Kito, and K. Omiya. 1992. Cloning and sequencing of the gene encoding cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus* sp. KC201. *J. Ferment. Bioeng.* **74**(6): 345–351.
  14. Kobayashi, S. 1993. Fundamental study and application of cyclodextrin. *Denpun Kagaku* **40**(2): 103–116.
  15. Kobayashi, S. 1996. Cyclodextrin producing enzyme (CGTase), pp. 23–41. In K. H. Park, J.F. Robyt, and Y. D. Choi(eds), *Enzymes for Carbohydrate Engineering*, Elsevier Science B.V., Amsterdam.
  16. Kobayashi, S., K. Kainuma, and S. Suzuki. 1978. Purification and some properties of *Bacillus macerans* cyclodextrin (cyclodextrin) glucanotransferase. *Carbohydr. Res.* **61**: 229–239.
  17. Lamli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680–685.
  18. Lee, J. H., K. H. Choi, J. Y. Choi, Y. S. Lee, I. B. Kwon, and J. H. Yu. 1992. Enzymatic production of  $\alpha$ -cyclodextrin with the cyclomalto-dextrin glucanotransferase of *Klebsiella oxytoca* 19-1. *Enzyme Microbiol. Technol.* **14**: 1017–1020.
  19. Nakamura, N. and K. Horikoshi. 1976. Purification and properties of cyclodextrin glycosyltransferase of an alkalophilic *Bacillus* sp. *Agric. Biol. Chem.* **40**(5): 935–941.
  20. Norman, B. E. and S. T. Jorgensen. 1992. *Thermoanaerobacter* sp. CGTase: Its properties and application. *Denpun Kagaku* **39**: 101–108.
  21. 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 excreted from *Bacillus* sp. E1. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**(2): 156–163.
  22. Pongsawasdi, P. and M. Yagisawa 1988. Purification and some properties of cyclomalto-dextrin glucanotransferase from *Bacillus circulans*. *Agric. Biol. Chem.* **52**(2): 1099–1103.
  23. White, C. A. and J. F. Kennedy 1988. The carbohydrate-directed enzymes, pp. 343–377. In J. F. Kennedy (ed.), *Carbohydrate Chemistry*, Clarendon Press, Oxford.
  24. Yagi, Y., M. Sato, and T. Ishikura. 1986. Comparative studies of CGTase from *Bacillus ohbensis*, *Bacillus macerans* and *Bacillus circulans* and production of cyclodextrins using those CGTases. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.* **33**: 144–151.
  25. Tomita, K., M. Kaneda, K. Kawamura, and K. Nakanishi. 1993. Purification and properties of a cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus autolyticus* 11149 and selective formation of  $\beta$ -cyclodextrin. *J. Ferment. Bioeng.* **75**(2): 89–92.

(Received February 6, 1998)