

## *Bacillus stearothermophilus* KJ16이 생산하는 Cyclodextrinase의 정제와 효소특성

권현주 · 유동주 · 김병우†

동의대학교 미생물학과

### Purification and Characterization of Cyclodextrinase from *Bacillus stearothermophilus* KJ16

Hyun-Ju Kwon, Dong-Ju You, and Byung-Woo Kim†

Department of Microbiology, Dong-Eui University, Pusan 614-714, Korea

#### Abstract

Cyclodextrinase from *B. stearothermophilus* KJ16 that can produce both cyclodextrin(CD) glucanotransferase and cyclodextrinase was purified 87.6-fold with 7% yield by ammonium sulfate precipitation, DEAE-cellulose chromatography, Sephadex G-100 chromatography, and FPLC. The molecular weight of the purified enzyme was about 68,000 dalton by SDS-PAGE. The optimal pH and temperature were 6.0 and 55°C, respectively. The enzyme was stable at 50°C for 2 hr in the pH range of 5.5 and 8.5. The enzyme activity was inhibited strongly by mercaptoethanol, dithiothreitol, p-chloromercuribenzoate, N-bromosuccinimide, Cu<sup>+2</sup> and Hg<sup>+2</sup>. The purified enzyme hydrolyzed CDs with  $\gamma$ -CD >  $\beta$ -CD >  $\alpha$ -CD. The enzyme also hydrolyzed linear maltodextrins and polysaccharides, but the rates of hydrolysis for such substrates were slow as compared to that for  $\gamma$ -CD. The final degradation products with all substrates were maltose and glucose. Maltose was not further hydrolyzed.

*Key words* : cyclodextrinase, *B. stearothermophilus*, purification, enzymatic properties.

#### 서 론

Cyclodextrin(CD)은 포도당 6-8개가  $\alpha$ -1,4 결합으로 연결된 환상의 dextrin으로 구성 포도당 수에 따라  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -CD로 불린다. CD는 분자 구조상 환상의 소수성 동공 내에 각종 유기 및 무기화합물을 포접하여 그 분자들의 물리화학적 성질을 변화시키는 성질을 가지며 이러한 특성을 이

용하여 식품, 의약, 농약, 화장품 등의 산업에서 유효 성분의 안정화, 가용화 및 유회 등 물성 개선의 첨가제로 사용되고 있다.

CD는 말단잔기를 가지지 않는 비환원성 당류로 통상의 amylase에는 잘 분해되지 않고 cyclodextrinase(EC 3.2.1.54; cyclomaltodextrin hydrolase, decycling; CDase)에 의해서 분해되어진다. CDase는 CD를 분해하여 maltohe-

† Corresponding author

xaose, maltoheptaose, maltooctaose와 같은 올리고당을 생성시키며, 역반응을 이용하면 maltose등으로부터 CD를 선택적으로 합성할 수 있다는 가능성 때문에 최근 관심이 모아지고 있는 효소이다<sup>1)</sup>. 그러나 CD 합성효소인 cyclodextrin glucanotransferase(CGTase)나 다른 amylase에 관해서는 연구가 많이 진행되어 있으나 CDase에 관한 연구는 비교적 적어 지금까지 보고된 CDase 생산균주로는 *B. macerans*<sup>2)</sup>, *B. coagulans*<sup>3)</sup>, *B. sphaericus*<sup>4)</sup>, *Clostridium thermohydrosulfuricum*<sup>5)</sup>, 사람의 대장내 세균<sup>6)</sup>등이 보고되어 있다. 그 외에도 *B. subtilis*<sup>7)</sup>, *Pseudomonas* sp.<sup>8)</sup>, *Flavobacterium* sp.<sup>9)</sup> 등의 amylase가 CD를 분해할 수 있으나 이들 효소의 CD분해속도는 전분분해속도보다 느린 것으로 알려져 있다.

CGTase와 CDase를 같이 생산하는 균주로는 1968년 Depinto등<sup>2)</sup>의 *B. macerans* ATCC8514가 유일하게 보고되어 있다.

본 연구에서는 토양에서 분리한 CGTase와 CDase를 같이 생산하는 *B. stearothersophilus* KJ16<sup>10,11)</sup>의 CDase를 정제하고 그 효소학적 특성을 검토하였기에 보고하는 바이다.

## 실험재료 및 방법

### 사용균주 및 효소의 생산

본 실험에 사용한 균주는 토양에서 분리한 CGTase와 CDase를 같이 생산하는 *B. stearothersophilus* KJ16<sup>10,11)</sup>을 사용하였다. *B. stearothersophilus* KJ16의 효소생산은 1% soluble starch, 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, pH7.0을 함유한 CS배지<sup>10)</sup>에서 배양초기 약 15시간부터 20시간에 걸쳐서 CGTase가 생산되며 그 이후 CGTase 생산은 점진적으로 감소되고, 배양 40시간부터 균의 후기 증식기에 CGTase에 의해 생산된 CD에 의해 유도되어 CDase가 생산된다<sup>11)</sup>. 이런 효소생산 특성으로 인하여 CDase정제를 위해서는 기초배지에서 40시간 배양 후 유도기질로 0.5%  $\gamma$ -CD를 첨가하여 45°C, 40시간 진탕 배양한 후 배양 상등액을 효소 정제를 위한 조효소액으로 사용하였다.

### CDase의 활성측정

CDase의 활성측정은 0.5%  $\gamma$ -CD를 포함한 50mM 인산

염 완충액 (pH 6.0)에 효소액을 가하고 55°C에서 60분간 반응시켰다. 반응 후 유리 환원당을 Somogyi-Nelson법<sup>12)</sup>으로 정량하였다. 효소활성은 55°C에서 분당 1 $\mu$ mole의 환원당을 생성하는 효소량을 1 unit로 정의하였다.

### 균체의 효소의 정제

배양상등액에 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 70% 농도가 되도록 가하고 하루 방치한 후 원심분리하여 상등액을 제거하고, 침전물에 50mM 인산염 완충액(pH6.0)을 가하여 녹인 후 같은 완충액으로 3회 투석하였다. 투석액은 50mM 인산염 완충액(pH6.0)으로 평형화시킨 DEAE-cellulose column(2×20 cm)에 0.5ml/min의 유속으로 0.05M, 0.1M, 0.15M, 0.2 M NaCl 농도로 단계별로 용출시켰다. 효소의 활성 분획은 polyethylenglycol 20,000(PEG) 처리로 농축하였다. 농축액을 50mM 인산염 완충액(pH6.0)으로 평형화시킨 Sephadex G-100 column(2×45cm)에 0.2ml/min의 유속으로 각각 목적 효소 단백질을 용출하였다. 활성분획은 PEG 처리로 재농축한 후 최종적으로 FPLC를 행하였다. FPLC는 FPLC system(Pharmacia Biotech. Co.)을 사용하였으며, column은 Superose 12HR을 사용하여 0.15M NaCl이 포함된 50mM 인산염 완충액(pH 7.0)으로 0.4ml/min의 유속으로 용출하였다.

### 단백질 정량

단백질량의 측정은 Smith등<sup>13)</sup>의 방법을 응용한 BCA(bicinchoninic acid) 단백질 정량 kit (Pierce Co.)로 bovine serum albumin을 표준으로 정량하였다. 정제시 column 분획의 단백질량은 280nm에서 흡광도로 측정하였다.

### SDS polyacrylamide gel 전기영동

SDS-polyacrylamide gel 전기영동(SDS-PAGE)은 Laemmli<sup>14)</sup>의 방법에 따라 12% acrylamide gel을 사용하였으며 단백질 염색은 Coomassie brilliant blue R-250으로 하였다. 분자량 측정을 위한 표준단백질은 분자량 marker(Bio-Rad Co.)를 사용하였다.

### CDase 반응 생성물의 분석

CDase의 반응 생성물은 paper chromatography와 HPLC로 분석하였다<sup>15)</sup>. Paper chromatography 분석을 위

한 효소반응은 각종 기질용액(50mM 인산염 완충액, pH6.0)에 효소액을 가하여 55°C에서 반응시켰다. 반응액은 비등수에서 5분간 열처리 한 후 각각의 반응액 10 $\mu$ l씩을 filter paper(Whatman No.1)에 점적 한 후 Butanol : pyridine : water (6 : 4 : 3, v/v)을 전개용매로 3회 전개하였다. 생성된 환원당은 silver nitrate 법<sup>16)</sup>으로 발색시켰다. HPLC 분석은 위와같은 조건으로 반응시킨 반응액을 Waters사의 Alliance2690(Alliance2690, Waters Co. U.S.A.)으로 분석하였으며, column은 Aminex HPX-42C(Aminex HPX-42C, 300 $\times$ 7.8mm, BIORAD Co. U.S.A)으로 칼럼온도는 80°C, 용매는 물로 분당 0.6ml의 유속으로 용출하여 RI detector(Model 410, Waters)로 검정하였다.

### 결과 및 고찰

#### CDase의 정제

본 실험의 공시균주인 *B. stearothermophilus* KJ16의 CDase 생산은 CS배지에서 회분배양시 배양초기에 CGTase가 생산되며 균의 후기 증식기에 CGTase에 의해 생산된 CD에 의해 유도되어 CDase가 생산된다. 따라서 정제를 위한 대량의 효소를 생산하기 위해 CS배지에서 40시간 배양 후 유도기질로 0.5%  $\gamma$ -CD를 첨가하여 45°C, 40시간 추가 배양한 후 그 배양상등액(389 units/1.08L)을 70% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 침전시키고 침전물을 50mM 인산완충액(pH 6.0)에 녹인 후, DEAE-cellulose column에 흡착시키고 NaCl gradient로 용출시켰다. NaCl 농도 0.1~0.2M의 분획에서 CDase의 활성을 나타내었으며, 이 활성분획을 농축하여 Sephadex G-100 column으로 다시 분리한 결과 분획 38~50에서 CDase의 활성과 일치하는 단일 단백질 peak를 얻었다. 고순도 정제를 위하여 이 활성분획을 제농

축하여 최종적으로 FPLC를 행하였다. 그 결과 Table 1에 나타난 것처럼 수율 7%, 비활성 12.4 units/mg, 정제도 87.6배로 정제된 CDase를 얻었으며 이 효소는 SDS-polyacrylamide gel 전기영동 상에서 단일 밴드를 보임으로써 순도 높은 단일 단백질임을 알 수 있었다 (Fig. 1).

#### 효소의 분자량

정제된 효소의 순수 분리여부와 분자량을 측정하기 위하여 SDS-PAGE를 행한 결과 Fig. 1과 같이 단일 단백질 band가 얻어졌고 표준단백질로부터 구한 CDase의 분자량은 68,000 dalton이었다. 이와 같은 결과는 기존에 보고된 Podkovrov등<sup>17)</sup>의 *Clostridium thermohydrosulfuricum* 39E 유래의 monomer 66,000 dalton과는 비슷하였으나 Yoshida등<sup>15)</sup>에 의하여 보고된 Alkalophilic *Bacillus* sp. 유래 CDase의 126,000 dalton과는 큰 차이를 보였다. 그러나 Alkalophilic *Bacillus* sp.의 CDase는 dimer로 구성되어 있으며 그 subunit는 67,000 dalton으로 본 실험균주와 비슷하였다.

#### 정제된 CDase의 효소학적 특성

정제된 효소의 최적반응 pH와 pH 안정성, 최적반응 온도와 열안정성을 검토한 결과, Fig. 2에 나타난 것처럼 최적반응 pH는 6.0이었으며, 이는 지금까지 보고된 대부분의 균주들과 일치하였고 다만 *Pseudomonas*<sup>8)</sup>의 5.5와는 다소 차이를 보였다. pH 안정성은 pH 5.5에서 pH 8.5의 범위에서 약 85% 이상의 잔존활성을 나타내었으며 그 외의 범위에서는 점차적으로 감소하여 pH 4.0에서 50%, pH 10.0에서 55%의 잔존활성을 나타내었다. 최적 반응 온도는 55°C로 이는 *B. coagulans*<sup>3)</sup>, *Pseudomonas* sp.<sup>8)</sup>, Alkalophilic *Bacillus* sp.<sup>15)</sup>, 등의 50°C보다는 높았고 *Cl. thermohydrosu-*

Table 1. Purification of the cyclodextrinase from *B. stearothermophilus* KJ16

Procedure	Total volume(ml)	Total protein(mg)	Total activity(U)	Specific activity(U/mg)	Purify fold	yield (%)
Culture supernatant	1080	2749.4	389	0.141	0	100
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> fraction	16.2	301.6	205.7	0.68	4.8	52.9
DEAE-cellulose	20.8	24.2	83	3.43	24.3	21.3
Sephadex G-100	19.6	4.7	49.8	10.6	75.2	12.8
FPLC	9.5	2.2	27.2	12.36	87.6	7

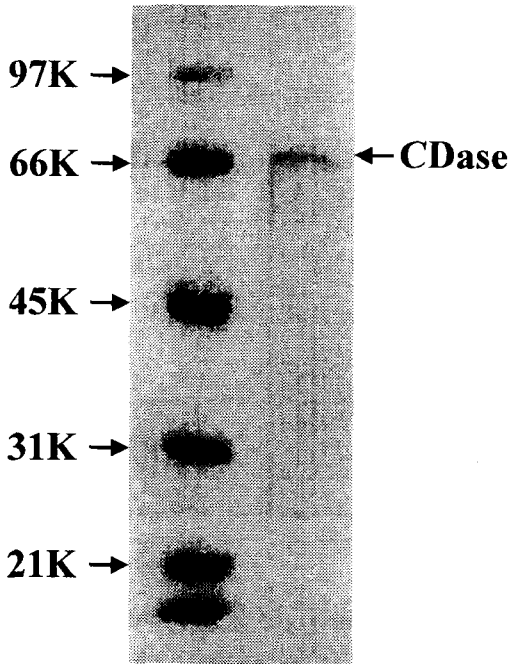


Fig. 1. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the purified CDase from *B. stearothermophilus* KJ16. The sample was loaded on a 12% gel with the following standard markers; phosphorylase b (M.W. 97,400), bovine serum albumin (66,200), ovalbumin (45,000), carbonic anhydrase (31,000), and soybean trypsin inhibitor (21,500). After electrophoresis, the gel was stained with Coomassie brilliant blue R-250.

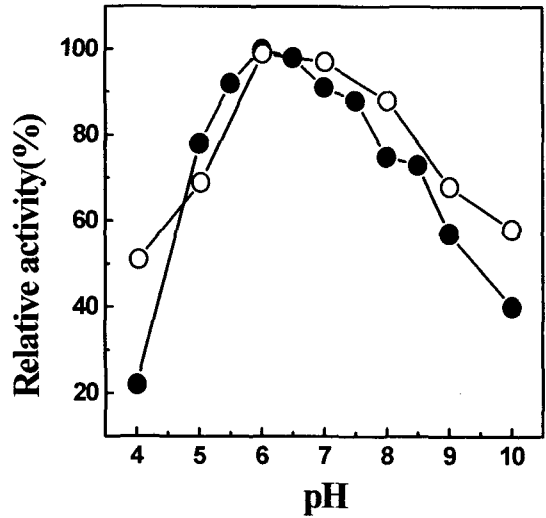


Fig. 2. Effect of pH on CDase activity (●) and stability (○).

The buffers used are 0.05M sodium acetate buffer (pH4.0-5.5), 0.05M sodium phosphate buffer (pH6.0-8.0), and 0.05M glycine-NaOH buffer (pH8.5-10.0). To determine the pH stability, the enzyme was preincubated at various pHs for 1 hr and the remaining activity was assayed.

Table 2. Effects of metal ions and chemicals on enzyme activity of cyclodextrinase

Metal ions or chemicals (10mM)	Relative activity (%)
None	100
MgSO <sub>4</sub>	98
FeSO <sub>4</sub>	95
NaCl	99
NaNO <sub>3</sub>	95
HgCl <sub>2</sub>	35
KCl	98
CuSO <sub>4</sub>	54
BaCl <sub>2</sub>	90
CaCl <sub>2</sub>	99
p-chloromercuribenzoate	>1
N-bromosuccinimide	>1
Mercaptoethanol	>1
Dithiothreitol	>1

lfuricum<sup>5)</sup>의 65°C 보다는 낮았다(Fig. 3A). 열안정성은 50°C 이하에서는 2시간 열처리하여도 100% 안정성을 보이며 50°C 이상의 범위에서는 시간이 경과함에 따라 잔존활성이 어느정도 감소함을 보였지만 70°C에서 1시간 전처리하여도 80% 이상의 잔존활성을 보이는 비교적 내열성이 높은 효소였다(Fig. 3B).

각종 금속이온 및 chemicals의 영향

효소활성에 미치는 각종 금속 이온(10mM 농도)과 chemical(10mM 농도)에 의한 영향을 조사한 결과(Table 2) 효소활성은 Cu<sup>2+</sup>와 Hg<sup>2+</sup>에 의해 강하게 저해되었으나 그 외의 금속이온에 의한 영향은 없었다. 또한 p-chloromercuribenzoate와 같은 thiol reagent나 N-bromosuccinimide와

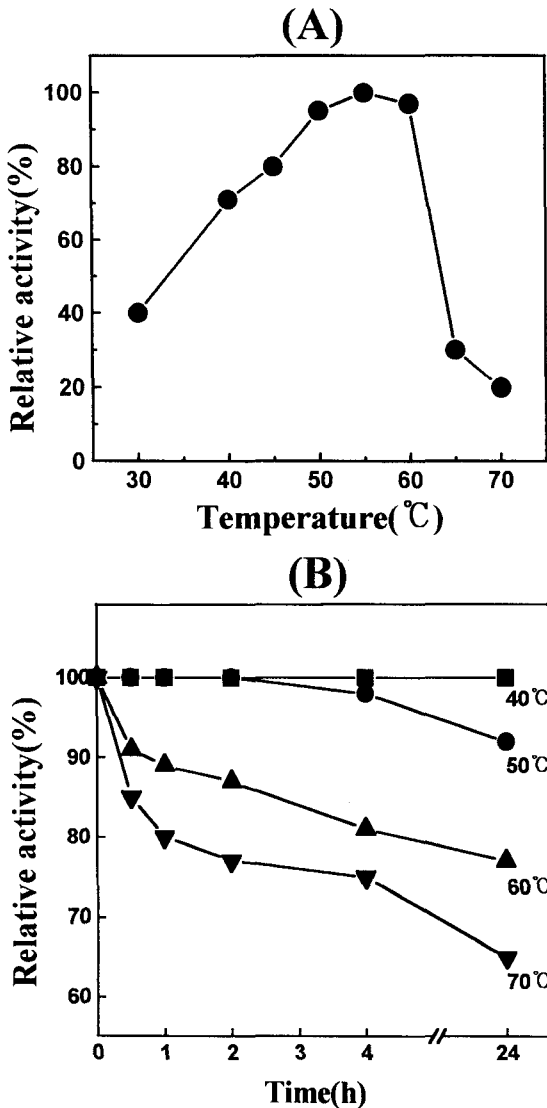


Fig. 3. Effect of temperature on CDase activity(A) and stability(B).

(A) The enzyme activity was assayed with 0.5 %  $\gamma$ -CD(pH 6.0) for 1hr at various temperatures. (B) The enzyme in 50 mM sodium phosphate buffer was incubated at indicated temperature, and at appropriate time intervals, an aliquot was withdrawn for assay of the remaining activity.

같은 indole 산화제에 의해서 효소활성이 강하게 저해되는

것으로 보아 효소활성 부위에 sulfydryl기나 tryptophan 잔기가 관여하는 것으로 추측된다. 또한 mercaptoethanol이나 dithiothreitol과 같은 환원제에 의해서도 효소활성이 강하게 저해되어 disulfide bond가 효소의 구조에 크게 기여하고 있는 것으로 사료된다.

기질 특이성

기질에 대한 반응 특이성을 검토하기 위해서 각종 기질을 pH 6.0, 55°C에서 30분간 반응시킨 후 생성된 환원력을 측정하였다. 그 결과 Table 3과 같이 본 효소는 세종류의 CD중  $\gamma$ -CD를 가장 잘 분해하였으며, 올리고당의 경우 중합도가 증가할수록 분해속도가 증가하였다. 그 외에 soluble starch나 amylose, amylopectin 등의 기질도 잘 분해하나 이들의 분해속도는  $\gamma$ -CD에 비해서는 늦었다. 반면 maltose는 거의 분해하지 않았다. 또  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -CD를 pH 6.0, 55°C 5분간 처리하였을 때 효소반응의 주산물은 각 CD의 중합도에 해당하는 maltohexaose(G6), maltoheptaose

Table 3. Initial velocities of hydrolysis of various substrates by cyclodextrinase from *B. stearothermophilus* KJ16

Substrate	Concentration	Relative initial velocity(%)
$\gamma$ -CD	2mM	100
$\alpha$ CD	2mM	54
$\beta$ CD	2mM	60
Maltose	2mM	5
Maltotriose	2mM	12
Maltotetraose	2mM	15
Maltopentaose	2mM	30
Maltohexaose	2mM	55
Maltoheptaose	2mM	68
Amylose	0.2%	92
Amylopectin	0.2%	84
Soluble starch	0.2%	98

\*Substrates were prepared in 50mM phosphate buffer (pH6.0) at final concentrations of 2mM or 0.2%. A suitable amount of enzyme was added to produce a linear increase in reducing powers during the first 30 min of reaction.

(G7), maltooxaose(G8)였으며, 세종류의 CD와 linear-maltodextrin류(G2-G7), 및 polysaccharide(amylose, amylopectin, 및 soluble starch)를 pH 6.0, 55°C에서 24 시간 반응 시켰을 때 분해 최종산물은 maltose와 glucose였다. 이와 같은 결과로 본 효소는 우선 CD에 작용하여 단일 분해 반응에 의해 CD를 개환하고 생성된 linear maltodextrin을 이차적으로 저분자당으로 분해시키는 CD 분해 양식을 가진 것으로 보여진다.

## 요 약

CGTase와 CDase를 함께 분비·생산하는 *B. stearothermophilus* KJ16 균주의 CDase를 ammonium sulfate 침전, DEAE-cellulose, Sephadex G-100 column chromatography, 및 FPLC로 수율 7%, 비활성 12.4 units/mg, 정제도 87.6배로 정제된 CDase를 얻었으며 SDS-PAGE 상 단일 band를 확인하였다. 정제된 CDase의 분자량은 약 68,000 dalton 이었고 활성 최적 pH와 온도는 6.0와 55°C였다. pH 안정성은 5.5~8.5의 범위에서 비교적 안정하였으며, 온도 안정성은 50°C에서 2시간까지는 안정하였고, 70°C에서 1 시간 전처리하여도 80% 이상의 잔존활성을 나타내었다. 효소 활성은  $\text{Cu}^{+2}$ 와  $\text{Hg}^{+2}$ 와 같은 금속이온과 p-chloromercuribenzoate, N-bromosuccinimide, mercaptoethanol, dithiothreitol에 의해서 효소활성이 강하게 저해되었다. 기질에 대한 반응 특이성은  $\gamma$ -CD를 가장 잘 분해하였으며, 그 외에 soluble starch나 amylose, amylopectin 등의 기질도 잘 분해하나 이들의 분해속도는  $\gamma$ -CD에 비해서는 늦었다. 이들 기질의 최종 분해산물은 maltose였으며, maltose는 거의 분해되지 않았다.

## 감사의 말씀

이 논문은 1998년도 동의대학교 학술연구비 자유공모과 제에 의하여 연구되었으며 연구비 지원에 감사드립니다.

## 참 고 문 헌

1. Oguma, T., Kikuchi, M. and Mizusawa, K. : Some culture conditions for the production of cyclodextrin-

hydrolyzing enzyme from *Bacillus sphaericus*. *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 1661(1991).

2. Depinto, T. A. and Campbell, L. L. : Purification and properties of the cyclodextrinase of *Bacillus macerans*. *Biochem.*, **7**, 121(1968).

3. Akimaru, K., Yagi, T. and Yamamoto, S. : Cyclomalto-dextrin glucanotransferase producing moderate thermophile, *Bacillus coagulans*. *J. Ferment. Bioeng.*, **71**, 63(1991).

4. Nakamura, A., Haga, K., Ogawa, S., Kuwano, K., Kimura, K., and Yamane, K. : Functional relationships between cyclodextrin glucanotransferase from an alkalophilic *Bacillus* and  $\alpha$ -amylase. *FEBS Lett.*, **296**, 37(1992).

5. Saha, B. C. and Zeikus, J. K. : Purification and characterization of a highly thermostable novel pullulanase from *Clostridium thermohydrosulfuricum* 39E. *Biochem. J.*, **252**, 343(1988).

6. Antenucci, R.N. and Palmer, J.K. : Enzymatic degradation of  $\alpha$ - and  $\beta$ -cyclodextrin by bacteriorides of the human colon. *J. Agric. Food. Chem.*, **32**, 1316(1984).

7. Moseley, M.H. and Keay, L. : Purification and characterization of the amylase of *Bacillus subtilis* NRRL-B3411. *Biotechnol. Bioeng.*, **12**, 251(1970).

8. Kato, K., Sugimoto, T., Amemura, A. and harada, T. : *Pseudomonas* intracellular amylase with high activity on maltodextrins and cyclodextrin. *Biochem. Biophys. Acta.*, **391**, 96(1975).

9. Bender, H. : A bacterial glucoamylase degrading cyclodextrins. Partial purification and properties of the enzyme from *Flavobacterium* species. *Eur. J. Biochem.*, **115**, 287(1981).

10. Kwon, H. J., Nam, S. W., Kim, K. H., Kwak, Y. G. and Kim, B. W. : Isolation of a *Bacillus* sp. producing both cyclodextrin glucanotransferase and cyclodextrinase and characterization of the enzymes. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **24**, 274(1996).

11. Kim, B. W., Kwon, H. J. and Lee, K. H. : Catabolite repression of cyclodextrin glucanotransferase and cyclodextrinase syntheses in *Bacillus* sp. KJ16. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **24**, 137(1996).

12. Nelson, N. : A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.*, **153**, 375(1944).

13. Smith, P. K., Hrohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. and Klenk, D. C. : Measurement of protein using bicinchoninic acid.

- Anal. Biochem.*, 150, 76(1985).
14. Laemmli, U. K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227, 680(1970)
  15. Yoshida A., Iwasaki, Y., Akiba, T. and Horikoshi, K. : Purification and properties of Cyclomaltodextrinase from alkalophilic *Bacillus* sp., *J. Ferment. Bioeng.*, 71, 226(1991).
  16. Robyt, J. and French, D. : Action pattern and specificity of an amylase from *Bacillus subtilis*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 100, 451(1963).
  17. Podkovyrov, S. M. and Zeikus, J. G. : Structure of the gene encoding cyclomaltodextrinase from *Clostridium thermohydrosulfuricum* 39E and characterization of the enzyme purified from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 174, 5400(1992).