

## *Aspergillus* sp. CC-2-1에 의해 생산되는 Cyclodextrin Glucanotransferase의 생산 및 특성

조영제 · 김명욱  
상주대학교 식품공학과

### Production of Cyclodextrin Glucanotransferase from *Aspergillus* sp. CC-2-1 and its Characterization

Young-Je Cho and Myoung-Uk Kim  
Department of Food Engineering, Sangju National University

#### Abstract

To produce  $\beta$ -cyclodextrin( $\beta$ -CD), a cyclodextrin glucanotransferase(CGTase) producing *Aspergillus* sp. CC-2-1 was isolated from soil. The enzyme was purified and its enzymological characteristics were investigated. It was found that production of CGTase reached to the maximum when the wheat bran medium containing 0.1% albumin, 2%  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ , 2% soluble starch and 0.2%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  was cultured for 5 days at 37°C. The purity of CGTase was increased by 13.14 folds after DEAE-cellulose ion exchange chromatography and Sephadex G-100, G-150 gel filtration and the specific activity was 172.14 unit/mg. Purified enzyme was confirmed as a single band by the polyacrylamide gel electrophoresis. The molecular weight of CGTase was estimated to be 27,800 by Sephadex G-100 gel filtration and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The optimum pH and temperature for the CGTase activity were 9.0 and 80°C, respectively. The enzyme was stable in pH 8.0~11.0 at 60~80°C. The activity of purified enzyme was activated by  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$ . The activity of the CGTase was inhibited by the treatment with 2,4-dinitrophenol and iodine. The result suggests that the purified enzyme has phenolic hydroxyl group of tyrosine, histidine imidazole group and terminal amino group at active site. The reaction of this enzyme followed typical Michaelis-Menten kinetics with the  $K_m$  value of 18.182 g/L with the  $V_{max}$  of 188.68  $\mu\text{mole}/\text{min}$ . The activation energy for the CGTase was calculated by Arrhenius equation was 1.548 kcal/mol.

Key words : *Aspergillus* sp., cyclodextrin glucanotransferase, optimum culture condition, characteristics.

## 서 론

Cyclodextrin(CD)는 Villiers에 의해 결정상 엑스트린으로 발견된 이후 Schardinger에 의해 환상의 구조를 하고 있음이 밝혀졌다<sup>(1)</sup>. CD는 포도당이 6~8개가  $\alpha$ -1,4 결합에 의해 환상구조로 연결되어 있는 고리구조를 하고 있으며, 고리의 바깥쪽은 친수성이고 안쪽은 반대로 친유성이다. 고리 안의 친유성 부분은 여러 가지 분자나 반응기를 잡아넣어 물질을 안정화시키는 작용을 한다<sup>(2)</sup>. 외부에서 소수성을 가진 물질이 첨가되면

CD는 이 소수성 물질을 고리내부에 포집하여 복합체(inclusion complex)를 형성한다. 이 복합체는 휘발성 물질의 불휘발화·산화, 광분해로부터의 보호·용해성, 색, 맛 등의 변화·반응성의 변화·유화성부여 등의 작용을 한다<sup>(2)</sup>. CD는 오래 전부터 알려져 왔으나 대량생산이 어려워 쓴맛의 의약품을 먹기 쉽게 할 목적으로 소량 사용되어 왔으나 1975년 일본에서 *Bacillus macerans*<sup>(1)</sup>등의 세균이 생성하는 CD생성 효소를 전분에 작용시키면, 값싼 가격으로 CD를 대량 제조할 수 있음이 발견된 이래 효소를 이용한 CD 생산방법이 개발되어 식품, 의약품, 화장품, 농약 등의 다양한 분야에 이용되고 있다<sup>(3-6)</sup>.

Cyclodextrin glucanotransferase(CGTase)는 전분에 작용하여 cyclization, coupling 반응, CD hydrolysis 같은 반응을 촉매하는 amylase계통의 다기능 효소이다<sup>(7-10)</sup>.

Corresponding author : Young-Je Cho, Department of Food Engineering, Sangju National University, 386, Gajangdong, Sangju, Kyungbook 742-711, Korea  
Tel : 82-54-530-5265  
Fax : 82-54-535-7251  
E-mail : yjjo@sangju.ac.kr

이 효소의 생산균주로 *B. macerans*<sup>(1)</sup>, *B. circulans*<sup>(11)</sup>, *B. amylolique faciens*<sup>(12)</sup>, *B. ohbensis*<sup>(13)</sup>, *B. megaterium*<sup>(14)</sup>, *B. stearothermophilus*<sup>(15)</sup> 등의 *Bacillus*계통과 *Klebsiella pneumoniae*<sup>(16)</sup> 등이 CGTase를 생산하는 것으로 밝혀져 있다. *B. macerans*는  $\alpha$ -CD를 주로 생성하며 *B. megaterium*의 경우는  $\beta$ -CD를 다량 생성하는 것으로 알려져 있다<sup>(10)</sup>. 이러한 CD를 생산하는 고역가 CGTase 분비 균주 탐색에 관한 연구는 국내외에서 많이 수행되어져 왔으며, 특히 국내에서는 오 등<sup>(17)</sup>, 안 등<sup>(18)</sup>, 신 등<sup>(19)</sup>, 유 등<sup>(20)</sup>, 그리고 박 등<sup>(21)</sup>이 CGTase 생산 균주의 탐색에 관한 연구를 수행한 바 있다. 그러나 CD를 생성하는 곰팡이 효소에 대한 연구보고는 거의 없는 실정이다. 또한  $\beta$ -CD는 그 화학적 구조가  $\alpha$ -CD,  $\gamma$ -CD에 비해 열에 안정하며, 비교적 쉽게 제조할 수 있어<sup>(17)</sup> 식품이나 의약품에 응용할 수 있는  $\beta$ -CD 생성을 위한 CGTase의 높은 활성도를 가지는 곰팡이 균주 개발과 효율적인 효소분리 정제방안을 검토해야 할 필요성이 있다.

따라서 본 연구에서는 이미 활용되고 있는 효소들보다 활성이 강하며 특성이 우수한 효소를 생산하는 곰팡이를 토양으로부터 탐색, 개발하고 이들이 생산하는 효소를 분리 정제하여 특성을 살펴보았다.

## 재료 및 방법

### CGTase 생산균주의 선별 및 동정

경북 북부지역의 토양과 부식토를 균원시료로 하여 생리식염수 10 mL에 약 1 g의 토양 시료를 첨가하여 얻은 현탁액을 0.5% soluble starch, 1.0% polypeptone, 0.5% yeast extract, 0.1%  $K_2HPO_4$ , 0.02%  $MgSO_4$ , 1.0%  $Na_2CO_3$ , 2.0% agar, 0.03% congo red 로 조성된 분리용 배지에 도말하고 37°C에서 3일간 배양하였다. 이때 분리용 배지에서 균 주위에 투명한 환을 형성하는 균을 1차 선별하고<sup>(22)</sup>, 선별된 곰팡이를 밀기울배지에 접종하고 37°C에서 5일간 배양하여 얻은 조효소액의 활성을 측정하여 CGTase 활성이 가장 높은 균을 최종 선별하여 1개월에 1회씩 계대 배양하고 보관하면서 본 실험에 사용하였다.

### 균주의 배양 및 조효소의 조제

밀기울 배지에 접종한 곰팡이를 37°C에서 5일간 배양한 후 10배의 10 mM Tris-HCl buffer(pH 9.0) 용액을 첨가하여 4°C에서 24시간 150 rpm으로 shaking한 후 8000 rpm으로 20분간 원심분리하여 균체를 제거한 다

음, whatman No 1.으로 여과한 여액을 조효소액으로 사용하였다.

### CGTase activity 측정

CGTase activity의 측정은 Kaneko<sup>(23)</sup> 등에 의해 제안된 phenolphthalein법을 사용하였다. 즉, 2% soluble starch를 10 mM Tris-HCl buffer(pH 9.0)에 녹인 기질 용액 2 mL에 효소액 0.1 mL를 첨가한 후 80°C에서 30 분간 반응시켰다. 30 mM NaOH 3.5 mL를 첨가하여 반응을 중지시키고 0.02% phenolphthalein/5 mM  $Na_2CO_3$  용액 0.5 mL를 가한 후 550 nm에서의 흡광도를 측정하여 효소역가를 환산하였다. 효소활성은 효소액 1 mL가 1분간에 1  $\mu$ mol의  $\beta$ -cyclodextrin을 생성하는 것을 1 unit로 정하였다. 이때 표준품으로는  $\beta$ -cyclodextrin을 사용하여 표준곡선을 작성하여 사용하였다.

### Protein의 정량

단백질 정량은 Lowry 등<sup>(24)</sup>의 방법에 의하여 측정하였으며, bovine serum albumin을 사용한 표준곡선에 의하여 환산하였다.

### 효소생산을 위한 배양조건 검토

효소생산을 위한 최적조건은 유기질소원, 무기질소원, 무기염, 탄소원을 밀기울배지에 첨가하여 37°C에서 배양시간별로 효소활성을 측정하여 최적조건을 조사하였다.

### 효소의 정제 및 전기영동에 의한 순도검정

조효소액을 70% 포화 황산암모늄으로 염석하고, 10 mM Tris-HCl buffer(pH 9.0)로 투석시킨 후 동일 buffer로 미리 평형화시켜둔 Sephadex G-100 column(5 × 45 cm)과 G-150 column(3 × 70 cm)으로 gel filtration 하였으며, 효소활성을 나타내는 분획은 모아서 동결 건조 하였다. 동결 건조한 효소는 DEAE-cellulose column(3 × 60 cm)을 이용한 ion exchange chromatography로 0~1 M NaCl의 linear salt gradient로 용출시킨 다음 CGTase activity를 나타내는 분획을 모아서 동결 건조하였으며, 정제가 끝난 시료는 Davis법<sup>(25)</sup>에 의하여 polyacrylamide gel disc 전기영동으로 순도 검정하였다. 즉 7.5% polyacrylamide gel 칼럼에 시료를 주입하고 실온에서 3 mA/tube로 약 4시간동안 전기영동 하였다. 전기영동이 끝난 gel은 1% amino black 10-B 용액으로 3시간 염색한 다음 7% acetic acid 용액으로 탈색하였다.

### 분자량 측정

**SDS-polyacrylamide gel electrophoresis에 의한 분자량 측정:** 정제 CGTase의 분자량은 Weber와 Osborn의 방법<sup>(26)</sup>에 의하여 SDS-polyacrylamide 전기영동으로 실시하였다. 정제된 효소를 1% SDS, 1% 2-mercaptoethanol을 함유한 10 mM phosphate buffer(pH 7.0)로 용해하여 37°C에서 4시간동안 전기영동 시킨 후, Rm 값에 따라 표준곡선을 이용하여 분자량을 측정하였다. 이때 표준품으로는 bovine serum albumin(M.W.: 66,000), egg albumin(M.W.: 45,000), pepsin(M.W.: 34,700), trypsinogen(M.W.: 24,000),  $\beta$ -lactoglobulin(M.W.: 18,400), lysozyme(M.W.: 14,300)을 사용하였다.

**Gel filtration에 의한 분자량 측정:** Gel filtration에 의한 분자량 측정은 Andrew의 방법<sup>(27)</sup>에 따라 Sephadex G-100 column(3×70 cm)을 사용하였다. 이때의 유속은 0.26 mL/min이었으며 6.8 mL/tube씩 분획하였다. 표준품으로는  $\beta$ -amylase(M.W.: 200,000), alcohol dehydrogenase(M.W.: 150,000), bovine serum albumin(M.W.: 66,000), carbonic anhydrase(M.W.: 29,000), cytochrome C(M.W.: 12,400)을 사용하였다.

### 효소학적 특성

**pH에 의한 영향:** pH가 효소의 활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 0.2 M hydrochloric acid potassium chloride buffer(pH 2.0), 0.1 M citrate buffer(pH 3.0~5.0), 0.2 M phosphate buffer(pH 6.0~8.0), 0.2 M boric acid-borax buffer(pH 9.0), 0.2 M borax-NaOH buffer(pH 10.0~11.0)까지의 pH 영역에서 효소활성을 측정하였다.

**pH 안정성:** 효소의 pH에 대한 안정성을 조사하기 위하여 효소를 0.2 M hydrochloric acid potassium chloride buffer(pH 2.0), 0.1 M citrate buffer(pH 3.0~5.0), 0.2 M phosphate buffer(pH 6.0~8.0), 0.2 M boric acid-borax buffer(pH 9.0), 0.2 M borax-NaOH buffer(pH 10.0~11.0)에서 30°C에서 1시간동안 방치한 뒤 최적 pH로 조절하고 잔존활성을 측정하였다.

**온도에 의한 영향:** 효소활성에 미치는 온도의 영향을 조사하기 위하여 효소액 0.1 mL와 기질 1 mL를 혼합한 후 효소반응 온도를 30~100°C까지 변화시키면서 효소활성을 측정하였다.

**열 안정성:** CGTase의 열안정성을 조사하기 위하여 효소액 1 mL를 30~100°C의 범위에서 60분간 방치한 후 최적반응온도로 조절하고 잔존활성을 검사하였다.

**금속이온의 영향:** 금속이온이 효소활성에 미치는 영향을 검사하기 위하여 각종 금속염을 2 mM이 되게 용

해시키고 금속이온용액 0.1 mL와 효소액 0.1 mL를 혼합하고, 30°C에서 60분간 안정화시킨 후 기질 1 mL를 혼합하고 30°C에서 60분간 방치한 다음 80°C에서 30분 동안 반응시키고 효소활성을 조사하였다.

**저해제의 영향:** 효소활성에 영향을 미치는 화학적 저해 중 SH기의 저해제로서 쓰이는 p-chloromercuribenzoic acid(PCMB)가 본 효소에 미치는 영향을 조사하기 위해 에탄올 98 mL에 10% NaOH 2 mL를 가한 EtOH-NaOH용액에 PCMB를 2 mM 농도가 되게 용해시켜 저해용액을 조제하고, 금속과 결합하여 chelate를 형성하는 EDTA, 효소분자의 말단 아미노기와 친화력이 강하여 이 말단 아미노기가 효소 활성단인 경우, 효소활성을 저해하게 되는 DNP, 효소 활성단인 histidine의 imidazole기인 경우 그 활성단을 저해하는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, tyrosine의 phenolic hydroxyl group과 histidine의 imidazole group을 저해하는 iodine 및 효소분자중의 SH기와 alkyl화되어 불가역적으로 저해하는 bromoacetic acid 등을 선정하여 10 mM Tris-HCl buffer(pH 9.0)에 2 mM 농도로 용해시켜 제조한 저해용액 0.1 mL와 효소액 0.1 mL를 혼합하여 30°C에서 60분간 전처리 시키고 80°C에서 30분 동안 반응 후 잔존활성을 측정하였다.

**K<sub>m</sub>, V<sub>max</sub> 및 활성화에너지 측정:** 정제효소의 K<sub>m</sub>, V<sub>max</sub> 및 활성화에너지 측정은 Lineweaver-Burk plot 및 arrenius plot로 측정하였다.

### 통계처리

실험 결과를 t분포표에 의하여 통계처리하여 95% 또는 99%수준에서 유의성 여부를 판단하였으며, 평균값 사이의 유의차는 ANOVA test를 이용하여 Duncan's multiple range test<sup>(28)</sup>로 95% 수준에서 유의성을 검정하였다.

## 결과 및 고찰

### CGTase 생성 균주의 분리, 선별 및 동정

CGTase 생성균주 선별배지에서 무명환이 형성되는 균주를 1차 선별하였고, 이들을 밀기를 배지에 배양하여 조효소를 제조한 후 CGTase활성을 측정하여, 활성이 가장 높은 균주를 최종 균주로 선별하였다. 선별된 곰팡이를 potato dextrose agar에 slide culture하면서 현미경으로 관찰한 결과 Fig. 1과 같이 colony는 가균이 없으며 균사에는 격벽이 있고 foot cell에서 분지된 conidiophore의 선단은 비대하여 vesicle이 되고 그 끝에 타원형의 conidia가 달려있었다. 이러한 결과로 이

하였다.

효소생산의 최적 조건

효소생산에 미치는 각종 유기질소원을 조사하기 위하여 각 성분을 배지에 0.1%씩 첨가하여 37°C에서 5일간 배양하여 효소생산을 검토한 결과 Table 1과 같이 albumin에서 39.85±8.62 unit/mL로 최대 효소생산을 나타내어 가장 좋은 질소원으로 판단되었다. 효소생산에 미치는 각종 무기질소원의 영향을 조사하기 위해서 각 성분을 배지에 2.0%씩 첨가하여 37°C에서 5일간 배양하여 효소생산을 검토한 결과 Table 1과 같이 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>에 의해 134.15±9.04 unit/mL로 효소생산성이 가장 우수하였다. 전 등<sup>(29)</sup>은 *Bacillus*속 균주가 NH<sub>4</sub>Cl에 의해 효소생산이 높게 나타났다고 보고하였으며 본 실험 결과와는 차이가 있었다. CGTase의 생산에 있어 탄소원이 미치는 영향은 매우 중요하다. CGTase 생산균주 대부분이 단당류 및 이당류에 비해 starch와 같은 다당류에서 높은 효소생산성을 보이는 것으로 알려져 있다<sup>(30)</sup>. 본 실험에서도 각종 탄소원의

Fig. 1. Morphology of *Aspergillus* sp. CC-2-1.

균주는 *Aspergillus* sp.으로 추정되어 *Aspergillus* sp. CC-2-1로 명명하였으며, 본 실험에 공시 균주로 사용

Table 1. Effect of various sources in culture medium on the cyclodextrin glucanotransferase activity of *Aspergillus* sp. CC-2-1

Source	Component	Activity (unit/mL)	Relative activity (%)
Control	-	24.10±3.91	100.00
Organic nitrogen (0.1%)	Urea	8.25±9.58	34.23
	Peptone	18.50±4.13	76.76
	Albumin	39.85±8.62*	165.35*
	Glycine	37.75±5.11*	156.64*
Inorganic nitrogen (2.0%)	NaNO <sub>2</sub>	8.05±7.76	33.40
	NH <sub>4</sub> Cl	28.70±11.48	119.08
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	26.85±25.18	111.41
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	54.15±9.04**	224.69**
	KNO <sub>3</sub>	20.00±10.13	82.99
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> C <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	23.20±3.29	96.27
	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	40.30±4.31**	167.22**
Carbon (2.0%)	Soluble Starch	60.05±9.49**	249.17**
	Galactose	51.08±7.37**	211.96**
	Glucose	22.60±7.80	93.78
	Glycerol	43.15±8.85*	179.05*
	Lactose	51.30±7.14**	212.86**
	Maltose	5.95±5.26	66.18
Inorganic salt (0.2%)	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	69.15±8.06**	286.93**
	MnSO <sub>4</sub>	9.10±9.47	37.76
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	51.10±14.51*	212.03*
	CaCl <sub>2</sub>	23.70±10.56	98.34
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	72.15±8.25**	299.38**
	FeSO <sub>4</sub>	10.11±3.25	41.93
	NaCl	19.40±5.28	80.50
	MgCl	23.15±10.03	96.06
	CuSO <sub>4</sub>	35.25±1.82*	146.27*

Wheat bran medium was cultured at 37°C for 3 days and CGTase was reacted at 50°C for 30 min.

\*\*P<0.01, \*P<0.05.

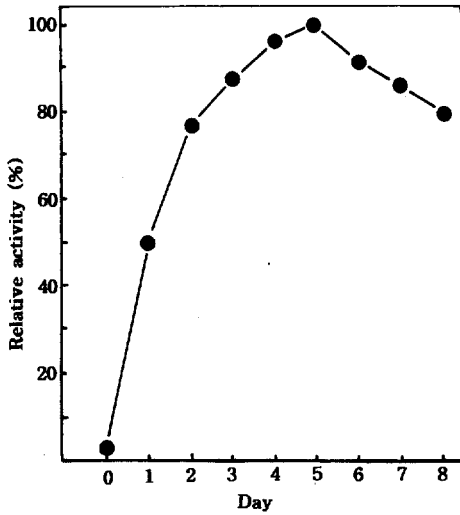


Fig. 2. Effect of culture time on the cyclodextrin glucanotransferase activity of *Aspergillus* sp. CC-2-1.

영향을 조사하기 위해 각 성분을 배지에 2.0%씩 첨가하여 37°C에서 5일간 배양하여 효소생산을 검토한 결과 Table 1과 같이 soluble starch와 lactose를 첨가했을 때 각각  $60.05 \pm 9.49$ ,  $51.30 \pm 7.14$  unit/mL로 효소생산성이 높았다. 이 결과 *Bacillus*의 경우<sup>(21,29,31)</sup> soluble starch에서 최대의 효소활성이 검출된 것과 유사하였고, 이<sup>(32)</sup>가 *B. acidocaldarius*의 CGTase가 lactose첨가시 최대의 효소생산량을 보이고, 오 등<sup>(17)</sup>이 *Bacillus*속의 CGTase가 corn starch, soluble starch에서 최대 효소생산량을 나타낸다고 보고한 것과 유사하였다. 효소생산에 미치는 무기염의 영향을 검토하기 위해 각 성분을 배지에 각 0.2%씩 첨가하여 37°C에서 5일간 배양하여 검토한 결과 Table 1과 같이  $KH_2PO_4$ 에서  $72.15 \pm 8.25$  unit/mL로 최대의 효소생산량을 나타내었으며, 전 등<sup>(29)</sup>의  $KH_2PO_4$ 에서 최대의 효소생산량을 나타낸 것과 일치하였다. 효소생산에 미치는 배양 시간을 알아보기 위하여 밀기울 배지에 0.1% albumin, 2%  $(NH_4)_2S_2O_8$ , 2% soluble starch 및 0.2%  $KH_2PO_4$ 를 첨가하여 37°C에서 0~8일까지 배양 시간별로 검토한 결과 Fig. 2와 같이 배양 시작 후 5일째 효소생산이 최대였다. 박 등<sup>(21)</sup>은 세균의 CGTase가 68시간 배양 후 최대 생산량을 나타내었다고 보고하였으며, 곰팡이의 경우 세균보다 generation time이 길어 배양시간이 길어진 것으로 추측되었다.

CGTase의 정제 및 전기영동에 의한 순도검정

밀기울 배지에 0.1% albumin, 2%  $(NH_4)_2S_2O_8$ , 2%

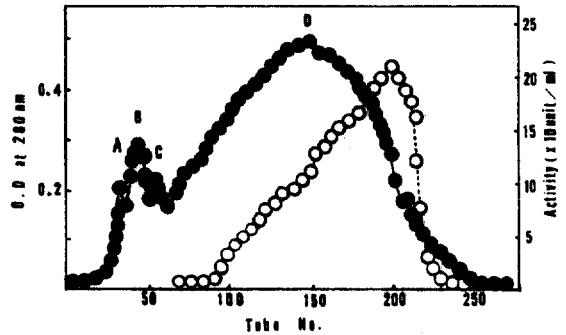


Fig. 3. Sephadex G-100 gel filtration of cyclodextrin glucanotransferase from *Aspergillus* sp. CC-2-1. ● - ●, Protein; ○ - ○, Activity.

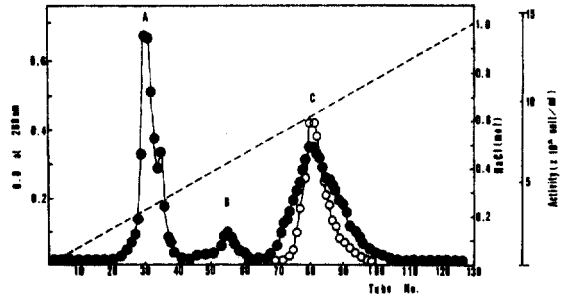


Fig. 4. DEAE-cellulose column chromatography of cyclodextrin glucanotransferase from *Aspergillus* sp. CC-2-1. ● - ●, Protein; ○ - ○, Activity.

soluble starch 및 0.2%  $KH_2PO_4$ 를 첨가하여 37°C에서 5일간 균을 배양하여 조제한 조효소액에 황산암모늄을 70% 포화시켜 12시간 정지하여 효소단백질을 응집, 침전시킨 다음 8000 rpm로 15분간 원심분리하여 침전물을 회수하였다. 분리된 침전물은 모아 10 mM Tris-HCl buffer(pH 9.0)로 용해시킨 다음 동일 완충액으로 투석시키고 농축시켰다. 농축한 효소액은 10 mM Tris-HCl buffer(pH 9.0)로 미리 평형화시켜준 Sephadex G-100 column(5×45 cm)에 주입하여 0.6 mL/min의 유속으로 2.9 mL/tube씩 분획하였으며(Fig. 3), 효소활성을 나타내는 분획을 모아서 농축하였다. 농축된 효소액은 다시 DEAE-cellulose column(3×60 cm)에 주입한 다음 흡착된 단백질을 0~1 M NaCl의 linear salt gradient의 방식으로 0.6 mL/min의 유속으로 12 mL/tube씩 분획하였으며(Fig. 4), 활성분획은 10 mM Tris-HCl buffer(pH 9.0)로 24시간 투석한 후 농축하였다. 농축시킨 활성분획은 10 mM Tris-HCl buffer(pH 9.0)로 평형화시킨 Sephadex G-150 column(3×70 cm)에 주입한 후 0.26 mL/min의 유속으로 6.8 mL/tube씩 분획하였으며(Fig.

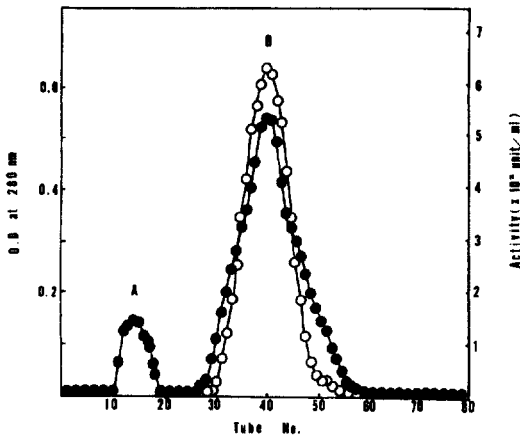


Fig. 5. Sephadex G-150 gel filtration of cyclodextrin glucanotransferase from *Aspergillus* sp. CC-2-1. ● - ●, Protein; ○ - ○, Activity.

5), 그 결과 Table 2와 같이 정제도 13.14배, 수율은 52.95%, 비활성도 172.14 unit/mg인 효소를 얻을 수 있었다. 정제된 효소단백질을 Davis법<sup>(25)</sup>에 따라 7.5% polyacrylamide gel로써 disc gel electrophoresis행하여 본 결과 Fig. 6에서와 같이 단일밴드로 나타났다.

분자량 측정

정제효소의 분자량은 Weber와 Osborn의 방법<sup>(26)</sup>에 의한 SDS-polyacrylamide전기영동과 Andrew의 방법<sup>(27)</sup>에 따른 Sephadex G-100 gel filtration에 의해 측정하였으며, 결과는 Fig. 7에서 나타난 바와 같이 약 27,800으로 측정되었으며, 강과 유<sup>(33)</sup>의 *Bacillus stearothermophilus* CGTase의 분자량 67,000 보다 작았다. 이러한 결과로 볼 때 본 균주가 생산하는 효소는 monomeric상태로 존재하는 것으로 판단되었다.

효소의 특성

**최적 pH:** 본 효소의 pH에 의한 영향을 알아보기 위해서 pH를 2~11로 조절한 기질 1 mL와 효소액 0.1 mL를 혼합한 후 80°C에서 30분간 반응시키고 효소활성을 측정한 결과 Fig. 8-A와 같이 pH 9.0에서 최적

Fig. 6. Polyacrylamide electrophoresis of purified cyclodextrin glucanotransferase from *Aspergillus* sp. CC-2-1.

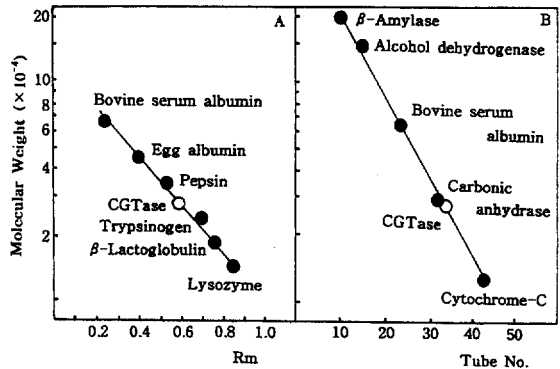
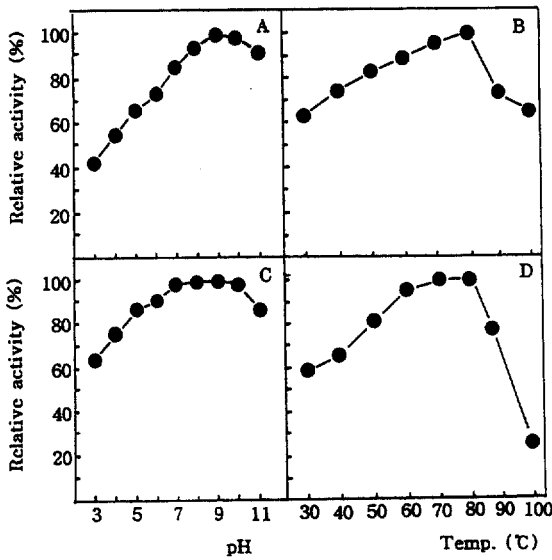


Fig. 7. The calibration curve for the determination of molecular weight of cyclodextrin glucanotransferase. A: by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, B: by Sephadex G-100 gel filtration.

pH를 나타내었다. 손 등<sup>(34)</sup>, 김 등<sup>(35)</sup>이 *Bacillus* sp. 등 세균의 CGTase가 pH 8.0~9.0 부근에서 최적의 효소활

Table 2. Purification of cyclodextrin glucanotransferase from *Aspergillus* sp. CC-2-1

Step	Total activity (units)	Total protein (mg)	Specific activity (unit/mg)	Yield (%)	Purification (fold)
Crude enzyme solution	27,405	2092.0	13.10	100.00	1.00
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	20,828	556.2	37.45	76.00	2.86
Sephadex G-100	18,120	284.1	63.78	66.12	4.87
DEAE-cellulose	15,946	114.5	139.27	58.19	10.63
Sephadex G-150	14,511	84.3	172.14	52.95	13.14



**Fig. 8. Characteristics of the cyclodextrin glucanotransferase activity from *Aspergillus* sp. CC-2-1.**  
 A: Effect of pH, B: Effect of temperature, C: pH stability, D: Temperature stability.

성을 나타내었다고 보고한 것과 Kato와 Horikoshi<sup>(36)</sup>의 *Bacillus subtilis* No. 313의 최적 pH인 8.0과 유사하였다.

**pH 안정성:** 효소의 pH 안정성을 조사하기 위해서 pH 2~11로 조절한 기질용액 1 mL와 효소액 0.1 mL를 혼합하고, 30°C에서 60분간 전처리한 후, 최적 pH인 9.0으로 정확히 조정하고 30°C에서 60분간 안정시킨 후 잔존 효소활성을 측정된 결과는 Fig. 8-C와 같이 pH 8.0~11.0사이의 pH 영역에서 80%이상 안정한 것으로 나타났으며 이는 박 등<sup>(21)</sup>이 *Bacillus*의 CGTase가

pH 7~11의 범위에서 안정하다고 보고한 것과 유사하였다.

**온도에 의한 영향 및 열 안정성:** 효소활성에 미치는 온도의 영향을 살펴본 결과 Fig. 8-B와 같이 80°C에서 효소활성이 최대로 나타났다. 이<sup>(32)</sup>는 *Bacillus acidocaldarius*의 효소가 90°C에서 최적온도를 나타내었다고 보고하였으며 본 실험 결과와 비슷하였다. 본 효소의 열안정성은 Fig. 8-D와 같이 60~80°C에서 잔존 효소활성이 90% 이상으로 열에 안정하였다. 따라서 본 CGTase는 높은 열 안정성으로 효소 공정 시 잡균 오염을 방지할 수 있어 산업적으로 유용하게 쓰일 가능성이 높은 것으로 판단되었다.

**금속이온에 의한 영향:** 효소활성에 미치는 각종 금속이온의 영향을 검토한 결과 Table. 3과 같이 첨가한 각종 금속이온에서 전반적으로 증가했지만 특히 K<sup>+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>에서 각각 59.21±5.35\*\*, 57.37±3.73\*\*, 54.91±12.72\*\* unit/mL로 효소활성이 높게 나타났다. 손 등<sup>(37)</sup>은 *Aeromonas caviae*의 CGTase와 박 등<sup>(21)</sup>의 *Bacillus*속의 CGTase가 각각 Hg<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>와, Fe<sup>3+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>에서 저해가 일어났다고 보고한 것과는 다소 차이가 있었다.

**저해제에 의한 영향:** 효소활성에 영향을 미치는 화학적 저해 중 PCMB, EDTA, DNP, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, iodine 및 bromoacetic acid를 2 mM 용액으로 제조하여 저해용액 0.1 mL와 효소액 0.1 mL를 혼합하여 30°C에서 60분간 전처리 시킨 후 잔존 효소활성을 측정하였다. 그 결과 Table 4와 같이 iodine과 DNP에 의해서 저해가 관찰되었으며, 이러한 결과로 볼 때 본 효소분자의 tyrosine의 phenolic hydroxyl group 및 histidine의 imidazole group과 말단아미노기가 효소의 활성 중심에 다소 관

**Table 3. Effect of metal ion on the cyclodextrin glucanotransferase activity of *Aspergillus* sp. CC-2-1**

Ion (2 mM)	Metal	Activity(unit/mL)	Relative activity (%)
-	Control	22.32±13.44	100.00
Ca <sup>++</sup>	CaCO <sub>3</sub>	48.56±19.50*	217.55*
Mn <sup>++</sup>	MnSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	22.91±3.03	102.66
Ag <sup>+</sup>	AgNO <sub>3</sub>	31.49±7.18	141.09
Mg <sup>++</sup>	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	41.76±7.66*	187.10*
Pb <sup>++</sup>	Pb(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> · 3H <sub>2</sub> O	45.50±2.24**	203.86**
Ba <sup>++</sup>	BaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	37.43±6.07*	167.69*
Na <sup>+</sup>	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	47.43±6.89**	212.50**
K <sup>+</sup>	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	59.21±5.35**	265.29**
Fe <sup>+++</sup>	FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	39.71±2.23*	177.93*
Hg <sup>++</sup>	HgCl <sub>2</sub>	40.25±3.97**	180.32**
Zn <sup>++</sup>	ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	54.91±12.72**	246.01**
Fe <sup>++</sup>	FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	47.73±10.15*	213.83*
Cu <sup>++</sup>	CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	57.37±3.73**	257.05**

Enzyme activity was represented as unit and relative value against the highest activity.

\*\*P<0.01, \*P<0.05.

Table 4. Effect of various inhibitors on the cyclodextrin glucanotransferase activity of *Aspergillus* sp. CC-2-1

Inhibitor(2 mM)	Activity (unit/mL)	Relative activity (%)
Control	23.69 ± 7.03	100.00
2,4-Dinitrophenol	14.34 ± 5.32*	60.53*
Iodine	11.84 ± 2.18**	50.00**
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	25.76 ± 5.35	108.77
Bromoacetic acid	46.54 ± 4.64**	196.49**
Ethylenediaminetetraacetate	26.33 ± 7.12	111.15
p-chloromercuribenzoic acid	39.27 ± 8.39**	165.79**

Enzyme activity was represented as unit and relative value against the highest activity.

\*\*P<0.01, \*P<0.05.

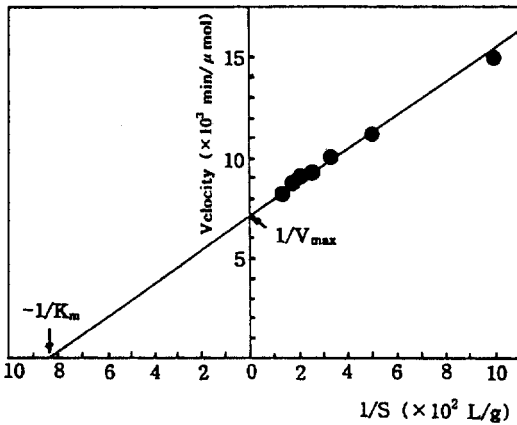


Fig. 9. Lineweaver-Burk plot for the hydrolysis of soluble starch by the purified cyclodextrin glucanotransferase from *Aspergillus* sp. CC-2-1.

여한다고 판단되었다.

**효소반응 속도론:** CGTase의 기질에 대한 친화력을 조사하기 위하여 Lineweaver-Burk plot<sup>(39)</sup>로  $K_m$ 치와  $V_{max}$ 를 측정된 결과는 Fig. 9와 같다. CGTase의  $K_m$ 치는 18.182 g/L였으며,  $V_{max}$ 는 188.68  $\mu\text{mol}/\text{min}$ 이었다. 한과 이<sup>(39)</sup>가 *Bacillus marcerans* CGTase의  $K_m$ 이 5.83 g/L이라고 한 것과는 다소 차이가 있었다.

**활성화에너지:** CGTase의 활성화 에너지를 측정하기 위하여 10°C~45°C의 범위에서 온도변화에 따른 효소 활성을 arrhenius 방정식에 의해 plot한 결과<sup>(38)</sup>는 Fig. 10과 같이 활성화에너지는 1.548 kcal/mol이었다.

## 요 약

$\beta$ -CD를 생산하기 위하여 CGTase를 생성하는 *Aspergillus* sp. CC-2-1 균주를 토양으로부터 분리하였으며, CGTase생성을 위하여 0.1% albumin, 2% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>, 2% soluble starch, 0.2% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>를 밀기를 배지에 첨가하여 37°C에서 5일간 배양 시 최대의

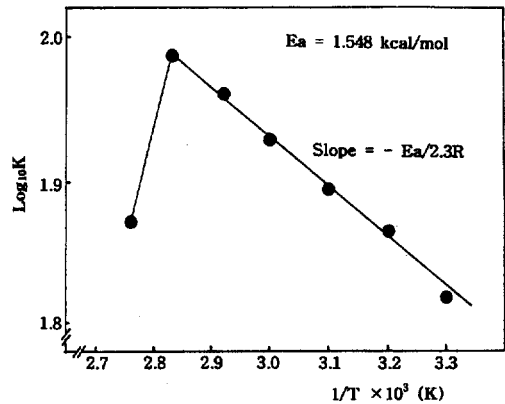


Fig. 10. Arrhenius plot of cyclodextrin glucanotransferase reaction.

활성을 나타내었다. Sephadex G-100과 G-150을 사용한 gel filtration과 DEAE-cellulose를 이용한 이온 교환 크로마토그래피로 13.14배 정제하였으며, specific activity는 172.14 unit/mg이었다. 정제효소는 polyacrylamide gel 전기영동에 의하여 단일밴드로 확인되었으며, 분자량은 gel filtration과 SDS-polyacryl amide 전기영동으로 측정된 결과 27,800정도로 측정되었다. CGTase의 효소학적 특성은 최적 pH, 최적 온도는 pH 9.0과 80°C였으며, pH 8.0~11.0과 60~80°C에서 안정하였다. 금속이온 중 K<sup>+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>에서 효소활성이 증대하였고, 효소활성 저해제 중 iodine과 DNP에 의해서 저해가 나타나 효소분자 중 tyrosine의 phenolic hydroxyl group과 histidine imidazole group과 말단아미노기가 효소구조에서 활성중심에 존재한다고 판단되었다. 효소의  $K_m$ 값과  $V_{max}$ 값은 18.182 g/L, 188.68  $\mu\text{mol}/\text{min}$ 이며, 활성화 에너지는 1.548 kcal/mol이었다.

## 문 헌

1. Kitahata, S., Tsuyama, N. and Okada, S. Purification



- and some properties of cyclodextrin glycosyltransferase from a strain of *Bacillus* species. Agric. Biol. Chem. 38: 387-394 (1974)
2. Kim, M.H. and Son, C.B. Enzyme and biological translation(II). Cyclodextrin(CD) Synthetase. Biological Ind. 11: 14-18 (1988).
  3. Misaki, M. Utilization of cyclodextrin for citrus fruit-products. J. Jpn. Soc. Starch Sci. 31: 98-106 (1984)
  4. Minamite, Y. and Katsuda, Y. Present status and future aspects for pesticides included in cyclodextrin. J. Jpn. Soc. Starch Sci. 31: 112-116 (1984)
  5. Uekama, K. Pharmaceutical application of cyclodextrins. J. Jpn. Soc. Starch Sci. 30: 247-254 (1983)
  6. Hashimoto, H. Studies on the industrial production and application of cyclodextrins. J. Jpn. Soc. Starch Sci. 36: 35-42 (1989)
  7. Szejtli, Z. Cyclodextrin technology. pp. 1-78. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht (1988).
  8. Kitahata, S. and Okada, S. Transfer action of cyclodextrin glycosyltransferase on starch. Agric. Biol. Chem. 39: 2185-2191 (1975)
  9. Kobayashi, S., Ashraf, H.R.L., Braun, P. and French, D. Coupling reaction of *Bacillus macerans* cyclodextrin glucanotransferase on glycosyl- $\alpha$ -cyclo dextrin and glucose. Starch. 40: 112-116 (1988)
  10. Kitahata, S. and Okada, S. Comparison of action of cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus megaterium*, *B. circulans*, *B. stearothermophilus* and *B. macerans*. J. Jpn. Soc. Starch Sci. 29: 13-18 (1982)
  11. Yang, Y., Sato, M. and Ishikura, T. Comparative studies of cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus ohbensis*, *Bacillus macerans* and *Bacillus circulans* and production of cyclodextrins using those cyclodextrin glucanotransferase. J. Jpn. Soc. Starch. Sci. 33: 144-151 (1986)
  12. Ernest, K., Yu, C., Aoki, H. and Misawa, M. Specific alpha-cyclodextrin production by a novel thermostable cyclodextrin glucanotransferase. Appl. Microbiol. Biotech. 28: 377-379 (1988)
  13. Sato, M., Yagi, H., Nagano, H. and Ishikura, T. Determination of cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus ohbensis* and its optimum pH using HPLC. Agri. Biol. Chem. 49: 1189-1191 (1985)
  14. Kitahata, S. and Okada, S. Action of cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus megaterium* strain No. 5 on starch. Agri. Biol. Chem. 38: 2413- 2417 (1974)
  15. Kitahata, S. and Okada, S. Purification and some properties of cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus stearothermophilus* TC-60. J. Jpn. Soc. Starch Sci. 29: 7-12 (1982)
  16. Horikoshi, K. and Ariba, T. Alkalophilic microorganisms. pp. 147-157. 1st ed. Japan Scientific Societies Press, Tokyo (1982)
  17. Oh, P.S., Koh, S.C. and Suh, H.W. The production of cyclodextrin glucanotransferase by *Bacillus* sp. and its utilization. Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng. 14: 461-466 (1986)
  18. Ahn, J.H., Hwang, J.B. and Kim, S.H. Cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus stearothermophilus*; Purification by affinity chromatography and its properties. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 18: 585-590 (1990)
  19. Shin, H.D., Lee, S.H. and Lee, Y.H. Purification and characterization of cyclodextrin glucanotransferase excreted from newly isolated alkalophilic *Bacillus circulans*. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 17: 370-378 (1989)
  20. Yu, J.H., Chung, Y.J. and Lee, J.S. Isolation and characterization of cyclodextrin glycosyltransferase producing alkalophilic *Bacillus* sp. Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng. 17: 148-153 (1989)
  21. Park, C.S., Woo, E.J., Kuk, S.U., Seo, B.C., Park, K.H. and Lim, H. Purification and characterization of cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus* sp. E1. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 20: 156-163 (1992)
  22. Park, C.S., Park, K.H. and Kim, S.H. A rapid screening method for alkaline cyclodextrin glucanotransferase using phenolphthalein methyl orange containing solid medium. Agric. Biol. Chem. 53: 1167-1173 (1989)
  23. Kaneko, T., Kato, T., Nakamura, N. and Horikoshi, K. Spectrophotometric determination of cyclization activity of  $\beta$ -cyclodextrin forming cyclodextrin glucanotransferase. J. Jpn. Soc. Starch Sci. 34: 45-52 (1987)
  24. Lowry, C.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. Protein measurement with folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-273 (1951)
  25. Davis, B.J. Disc electrophoresis II. Method and application of human serum protein. Ann. New York Acad. Sci. 121: 404-427 (1964)
  26. Weber, K. and Osborn, M. The reliability of molecular weight determination by sodium dodesyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. J. Biol. Chem. 244: 4406-4413 (1969)
  27. Andrew, P. Molecular weight determination by gelfiltration. J. Biol Chem. 91: 222-229 (1964)
  28. Cho, J.S. and Lee, K.J. Biological experimental statistics. pp. 188, Seonjin Press, Seoul (1996)
  29. Jun, H.K., Jo, Y.B., Kim, S.J. and Bae, K.M. Some properties and optimal culture conditions of cyclodextrin glucanotransferase of *Bacillus* sp. S-6 isolated from Kimchi. J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr. 27: 609-617 (1998)
  30. Tonkova, A. Bacterial cyclodextrin glucanotransferase. Enzyme Microb. Technol. 22: 678-686 (1998)
  31. Hwang, J.B. and Kim, S.H. Cyclodextrin production from potato starch with *Bacillus stearothermophilus* cyclomaltodextrin glucanotransferase. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 20: 344-347 (1992)
  32. Lee, K.J. Characteristic of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus acidocaldorus*. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 21: 256-262 (1993)
  33. Kang, S.M. and Yoo, S.H. Purification and properties of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus stearothermophilus* KY-126. Korean J. Food Sci. Technol. 26: 375-381 (1994)
  34. Sohn, C.B., Kim, S.A., Park, Y.A. and Kim, M.H. Purification and characterization of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus firmus*. Kor. J. Soc. Food.

- Sci. Nutr. 26: 351-357 (1997)
35. Kim, S.H., Choi, J.S., Chung, K.T., Yoo, Y.S., Jung, D.S. and Park, K.H. Production of cyclodextrin by *Bacillus* sp. I-5 cyclodextrin glucanotransferase. Kor. J. Food Sci. Technol. 26: 2-11 (1994)
36. Kato, T. and Horikoshi, K. A new  $\gamma$ -cyclodextrin forming enzyme produced by *Bacillus subtilis* No. 313. J. Jpn. Soc. Starch Sci. 33: 137-142 (1986)
37. Sohn, C.B., Kim, M.H. and Lee, M.J. Purification, characterization of pullulanase produced by *Aeromonas caviae* No. S-76 and synthesis of maltosyl- $\beta$ -cyclodextrin. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 19: 362- 367 (1991)
38. Whitaker, J.R. Principles of enzymology for the food sciences. Marcel Dekker Inc., New York (1972)
39. Han, I.K. and Lee, Y.H. Production of cyclodextrin from raw starch in the agitated bead reaction system and its reaction mechanism. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 19: 163-170 (1991)

---

(2000년 7월 7일 접수)