

Lactococcus lactis subsp. *lactis* 유래 cyclomaltodextrinase 유전자의 대장균 내 발현 및 효소 특성

장명운^{1†}, 강혜정^{2†}, 정창구^{3†}, 박정미², 이아름¹, 강정현¹, 이소원¹, 김태집^{1*}

¹충북대학교 식품공학과

²충청북도농업기술원 친환경연구과

³(주)에이피테크놀로지

Received: December 6, 2013 / Revised: December 11, 2013 / Accepted: December 11, 2013

Enzymatic Characterization of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Cyclomaltodextrinase Expressed in *E. coli*. Jang, Myoung-Uoon^{1†}, Hye-Jeong Kang^{2†}, Chang-Ku Jeong^{3†}, Jung-Mi Park², Ah-Rum Yi¹, Jung-Hyun Kang¹, So-Won Lee¹, and Tae-Jip Kim^{1*}. ¹Department of Food Science and Technology, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea, ²Chungcheongbuk-do Agricultural Research and Extension Services, Cheongwon 363-883, Korea, ³Advanced Protein Technologies Co., Suwon 443-813, Korea

A putative cyclomaltodextrinase (LLCD) gene was cloned from the genome of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KCTC 3769 (ATCC 19435), which encodes 584 amino acids with the predicted molecular mass of 68.7 kDa. KCTC 3769 shares approximately 40% of amino acid sequence identity with the CDase-family of enzymes. The dimeric enzyme with C-terminal six-histidines was heterologously expressed and purified from recombinant *E. coli*. LLCD showed the highest activity against β -cyclodextrin (CD) at pH 7.0 and 37°C. In particular, LLCD exhibited extremely low activity against starch and pullulan, while its CD-hydrolyzing activity was about 80 times higher than starch. Due to its much higher activity on CD over starch, LLCD has been identified as a member of CDases. However, LLCD can be distinguished from the other common CDases on the basis of its extremely low hydrolyzing activity against starch, pullulan, and acarbose.

Keywords: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, cyclomaltodextrinase, gene cloning, heterologous expression, substrate specificity

서론

자연계에 존재하는 대부분의 생명체는 탄수화물을 영양소로 이용하기 위한 다양한 가수분해 효소를 생산한다. 이러한 효소들은 1차 구조와 효소 특성에 따라 다양한 glycoside hydrolase family (GH)로 분류된다[4]. 이 중에서 GH13에 속하는 cyclomaltodextrinase (CDase) 계열의 효소들은 starch 뿐 아니라 pullulan과 cyclodextrin (CD) 등의 다양한 기질에 활성을 나타내므로, α -amylase와 구별된다[19]. 이 계열의 효소들은 CDase (EC 3.2.1.54) 외에도 maltogenic

amylase (MAase, 3.2.1.133)와 neopullulanase (NPase, EC 3.2.1.135) 등의 다양한 이름으로 연구되었다[19, 23]. 이들 효소는 공통적으로 약 130개의 아미노산으로 구성된 N-말단을 가지고 있으며, dimer 이상의 입체구조를 형성하여 기질 특이성에 영향을 미치는 것으로 알려졌다[2, 16]. 특히 CDase 계열 효소들의 독특한 가수분해 및 당전이 활성은 기능성 식품과 의약품 생산을 위한 천연 화합물의 전환에 이용될 수 있다[1, 20]. 따라서, *Thermoactinomyces* [26], *Thermus* [14], *Bacillus* [6, 15], *Paenibacillus* [12], *Lactobacillus* [21] 등의 다양한 미생물로부터 이들 효소의 유전자를 분리하고, 그 효소 특성을 연구하는 노력이 계속되고 있다.

한편, 유산균에서 유래한 starch 분해 효소들은 대부분 세포 외로 분비되어 작용하며, *Bacillus* 속 유래의 효소들에 비해 큰 분자량을 나타내었다[9, 24]. 이 효소들은 amylose, amylopectin, glycogen 등에 대해서는 활성을 보였지만,

*Corresponding author

Tel: +82-43-261-3354, Fax: +82-43-271-4412

E-mail: tjkim@cbnu.ac.kr

[†]These authors contributed equally to this work.

© 2013, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

pullulan과 CD에는 작용하지 못하는 전형적인 α -amylase의 특성을 나타내는 경우가 일반적이었다[25]. 특히 유산균의 기능성에 대한 관심이 높아지면서, 이들의 탄수화물 대사와 관련된 다양한 유전자 및 효소 단백질에 대한 연구가 지속적으로 수행되고 있다[17]. 그러나, *Lactobacillus gasseri* ATCC 33323에서 유래한 MAase에 대한 연구[21]를 제외하면, 지금까지 유산균 유래의 CDase 계열 효소에 대한 연구는 매우 부족한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 산업적으로 이용 가능성이 높은 CDase 계열 효소 유전자를 유산균으로부터 발굴하고자 연구를 진행하였다. 이를 위해 유전체의 크기가 작고, 대사과정이 단순하여 당 대사 관련 유산균 연구의 모델로 널리 알려진 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* [7] 유전체로부터 CDase 유전자를 클로닝하고, 대장균 내에서 발현하였으며, 효소 특성을 구명하였다.

재료 및 방법

시약 및 재료

본 연구에 사용한 일반 시약과 기질 및 미생물 배지는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)와 Duchefa Biochemie (Haarlem, The Netherlands)에서 구입하여 사용하였다. 유전자 실험을 위한 제한효소 및 DNA ligase 등은 Roche Applied Science (Mannheim, Germany)에서 구입하였으며, 각종 PCR 및 sequencing primer는 Bioneer (Daejeon, Korea)에서 합성하여 사용하였다. 단백질 정제에 사용한 Ni-NTA는 Qiagen (Hilden, Germany)에서 구입하였다.

유전자 및 미생물

Lactococcus lactis subsp. *lactis* KCTC 3769 (ATCC 19435) 균주의 염색체 DNA는 한국생명공학연구원 미생물 프론티어사업단으로부터 제공받았다. 대장균 내 항시 발현을 위한 플라스미드 벡터는 pHCEII/*Nde*I (BioLeaders Co., Daejeon, Korea)를 변형시킨 pHCXHD [11]를 사용하였다. 유전자 클로닝 및 발현을 위한 숙주로는 *E. coli* MC1061를 사용하였다.

유전자의 증폭 및 클로닝

L. lactis 염색체 DNA를 주형으로 하고, LLCD-N (5'-TTTTGGATCCCATATGAACAAAGCTGCAATTTATC-3') 및 LLCD-C (5'-TTTTCTCGAGTTTATAGATTACAAAACCATATTG-3') primer를 사용하여 유전자를 증폭하였다. PCR 반응은 *Taq* DNA polymerase (Roche Applied Science)와 Px2 thermal cycler (Thermo Hybaid, Middlesex, UK)를 사용하여 94°C에서 1분, 55°C에서 30초, 72°C에서 1분 30초

로 30회 반복하고, 최종적으로 72°C에서 5분간 추가로 증폭하였다. 유전자의 염기서열 분석은 서울대학교 유전체지원센터에서 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 이용하여 수행하였다.

재조합 효소 유전자의 발현 및 정제

재조합 *E. coli* MC1061를 LBA (1% bacto-tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl, 0.1 g/ml ampicillin) 액체배지에 접종하여 37°C에서 12시간 동안 배양하였다. 원심분리로 회수한 균체를 ultrasonicator (VCX750, Sonics & Materials, Inc., Newtown, CT, USA)로 파쇄한 후, HisTrap-FF column (GE Healthcare, Uppsala, Sweden)과 AKTA Prime system을 이용하여 정제하였다. 최종적으로 elution buffer [20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 500 mM NaCl, 500 mM imidazole]를 1 ml/min으로 흘려 효소를 회수하였으며, 정제된 효소는 농축 후 최적 buffer로 투석하여 실험에 사용하였다.

단백질 정량 및 분자량 분석

정제된 재조합 단백질의 정제도는 Mini-protean II (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용한 12% SDS-PAGE로 확인하였다. 단백질의 분자량은 gel permeation chromatography (GPC)로 결정하였으며, Superdex 200 column (10×300 mm, GE Healthcare) 및 0.5 ml/min 유속의 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0)를 이용하여 분석하였다. 효소 단백질의 농도 측정은 BCATM protein assay kit (Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL, USA)를 이용하였다.

효소 활성 측정

LLCD의 활성을 측정하기 위해 1%의 β -CD, pullulan, 수용성 전분을 각각 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0)에 녹인 후, 적당량의 효소를 첨가하여 최종 100 μ l로 반응하였다. 37°C에서 10분 동안 효소반응을 통해 생성된 maltose의 양을 DNS (dinitrosalicylic acid) 방법으로 측정하였다[11]. Maltotriose와 acarbose를 기질로 한 경우, 효소 반응으로 생성된 glucose의 양을 AceChem Glucose kit (YD Diagnostics Co., Yongin, Korea)로 측정하였다. LLCD의 활성 1 unit는 1분 당 1 μ mol의 maltose 또는 glucose를 생성하는 효소의 양으로 정의하였다.

반응 산물 분석

효소반응으로 생성된 가수분해산물의 분석은 thin layer chromatography (TLC)를 이용하였다. Silica gel 60F₂₅₄ TLC plate (Merck, Darmstadt, Germany)에 1 μ l의 시료를 spotting하고, isopropanol, ethylacetate, 물을 3 : 1 : 1의 부

피비로 혼합한 전개용매로 분리하였다. TLC plate를 발색시약(3 g N-(1-naphthyl)-ethylene-diamine, 50 ml H₂SO₄, 950 ml methanol)에 담근 후, 건조하여 110°C에서 10분간 발색하여 분석하였다.

결과 및 고찰

LLCD 유전자의 클로닝 및 발현

CDase 계열 효소들은 *Bacillus* 속을 포함한 다양한 미생물들로부터 발견되었으며, 특히 각종 미생물의 유전체 분석 및 유전자 검출 연구를 통해서도 이들 효소 유전자가 폭 넓게 분포하고 있음이 확인되었다[22]. 하지만 유산균 유래 CDase의 특성과 세포 내 역할에 대한 연구는 아직 크게 부족한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 National Center for Biotechnology Information (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)의 GenBank 데이터베이스 검색을 통해 *L. lactis* subsp. *lactis* 유전체[3]로부터 CDase로 예상되는 유전자 (Accession No. NC_002662)를 확인하였다. 또한 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) 분석을 통해 다른 미생물 유래 CDase 계열 효소들과의 비교적 높은 상동성을 확인하였다.

PCR을 통해 증폭한 약 1.7 kb의 LLCD 유전자 단편을 *Nde* I과 *Xho* I으로 처리한 후, pHCXHD 발현벡터에 삽입하여 pHCXLLCD로 명명하였다. 이 유전자는 총 584개의 아미노산을 암호화하는 1,752 bp의 염기로 구성되어 있으며, 염기서열 분석 결과, 기존 데이터베이스 상의 서열과 정확히 일치하였다. 플라스미드 pHCXLLCD를 *E. coli* MC1061에

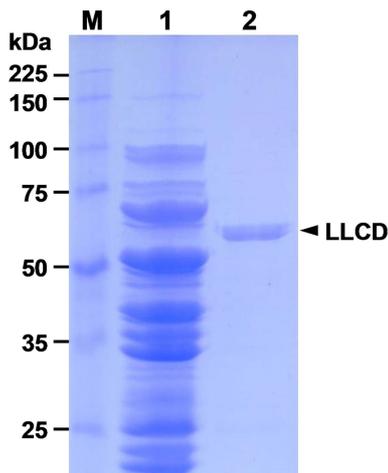


Fig. 1. Gene expression and purification of LLCD. SDS-PAGE analysis showed the expression level and the purity of recombinant LLCD. Lane M, protein molecular weight markers; lane 1, crude extract from *E. coli* harboring pHCXLLCD; lane 2, LLCD purified by HisTrap-FF column chromatography.

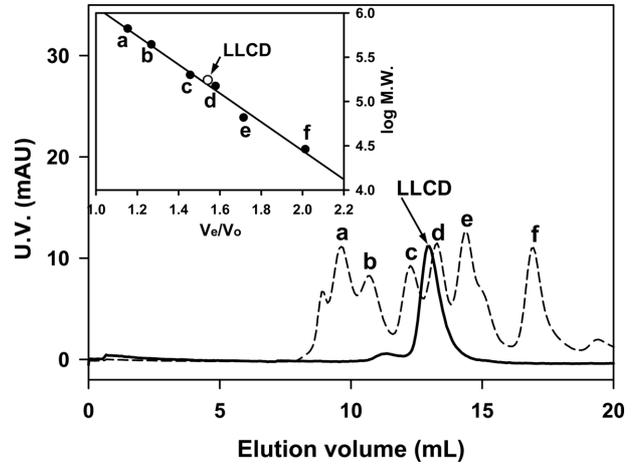


Fig. 2. Determination of oligomeric state of LLCD.

Molecular weight of LLCD was estimated by comparing the ratio of V_e/V_0 (V_e , the elution volume; V_0 , the void volume) using Superdex-200 gel permeation chromatography. The purified LLCD was drawn as a solid line, and the molecular weight markers (a dashed line) were used as the mixture of six proteins: a, thyroglobulin (669 kDa); b, apoferritin (443 kDa); c, α -amylase (200 kDa); d, alcohol dehydrogenase (150 kDa); e, bovine serum albumin (66 kDa); f, carbonic anhydrase (29 kDa).

형질전환하여 재조합 대장균을 얻었으며, 이를 배양하여 재조합 LLCD 효소를 생산하였다. 정제된 효소를 SDS-PAGE로 분석한 결과, 염기서열로부터 예상한 바와 같이 약 69 kDa의 단백질 밴드를 얻었다(Fig. 1). 한편, GPC 분석 결과로부터 재조합 효소가 약 175 kDa의 분자량을 가지는 것으로 나타났으며, 이는 LLCD가 수용액 상에서 homo-dimer의 형태로 존재함을 의미한다(Fig. 2). 기존의 CDase 계열 효소들 중 tetramer 구조를 가지는 *Lactobacillus gasseri* MAase (LGMA) [21]나 dodecamer 형태인 호알칼리성 *Bacillus* sp. CDase [19] 등을 제외하면 대부분 homo-dimer [8, 10, 13]의 형태를 가지는 것으로 알려졌다. 특히, 이들 효소에서 공통으로 존재하는 N-말단 도메인이 oligomer 구조 형성에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며[16], LLCD 또한 이와 유사하게 N-말단의 아미노산 잔기를 가지고 있으므로, 이를 통해 dimer 구조를 형성하는 것으로 예상하였다.

LLCD의 1차 구조 분석

LLCD 유전자로부터 추정된 아미노산 서열(Protein ID, NP267838)은 다른 미생물 유래 CDase들과 대략 40% 전후의 상동성을 나타내었다. 특히 유산균인 *Lactobacillus gasseri* MAase (LGMA) [21]와는 45.6%의 상동성을 나타내었으며, 이 외에도 *Bacillus halodurans* CDase (BHCD) [11]와 46.5%, *B. stearothermophilus* NPase (BSNP) [18]와 46.0%, *B. stearothermophilus* MAase (BSMA) [5]와

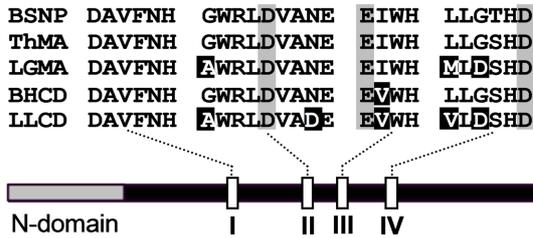


Fig. 3. Comparison of conserved amino acid sequences among CDase-family enzymes.

Abbreviations of LLCD, *Lactococcus lactis* CDase; BHCD, *Bacillus halodurans* CDase; LGMA, *Lactobacillus gasseri* MAase; BSNP, *B. stearothermophilus* NPase; ThMA, *Thermus* MAase. Catalytic amino acid residues are shown in gray boxes.

45.2%, *B. subtilis* MAase (BBMA) [6]와 44.4%, 호알칼리성 *Bacillus* CDase (BCD) [15]와 37.4%의 상동성을 보였다. 한편 *Thermus* MAase (ThMA) [14]와 46.5%, 호알칼리성 *Paenibacillus* CDase (PCD) [12]와 41.9%, *Thermoactinomyces vulgaris* amylase II (TVAIL) [26]와 39.1%의 서열 상동성을 가짐을 확인하였다.

LLCD는 대부분 CD 기질에 대한 높은 활성을 보이는 CDase 계열 효소들과 50% 미만의 높지 않은 아미노산 서열 상동성을 가지나, 주요 활성 잔기와 기질 결합부위를 포함하는 상동부위의 아미노산 서열을 대부분 공유하는 것으로 나타났다(Fig. 3). 특히, CDase 계열 효소들의 1차 구조에서 일반적으로 존재하는 특징적인 N-말단 이외에도 상동 부위 I (DAVFNH), II (GWRLDVANE), III (EIWH), IV (LLGSHD)와 유사성 또한 매우 높았다.

LLCD의 효소 특성

효소의 최적 반응조건을 결정하기 위해 온도와 pH에 따른 효소활성의 변화 및 안정성을 측정하였다. 재조합 LLCD는 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0)에서 가장 높은 β-CD 가수분해 활성을 보였으나(Fig. 4A), 최적 조건인 pH 7.0 이외의 산성 또는 염기성 조건에서는 비교적 낮은 활성을 나타내었다. 한편, 염기성 조건에서는 효소의 안정성이 유지되어 pH 9.0에서도 80% 이상의 잔존 효소활성을 나타내었으나, pH 5.0 이하의 산성 조건에서는 급격한 활성 감소가 발생하였다(Fig. 4B). LLCD의 최적 효소반응 온도는 37°C였으나(Fig. 5A), 40°C에서도 불안정하여 약 13분의 짧은 활성 반감기를 나타내는 것으로 보아 효소의 열안정성은 매우 낮은 편이었다(Fig. 5B). 유산균 유래 효소인 LGMA [21]가 55°C, pH 5.0에서 최적 활성을 나타낸 것에 비하면, 상대적으로 낮은 반응 온도와 내열성을 가짐을 알 수 있었다. 그러나, 대부분의 증온성 미생물 유래 CDase 계열 효소들의 최적 활성조건이 40~60°C와 pH 5.5~8.0 범위인 것을

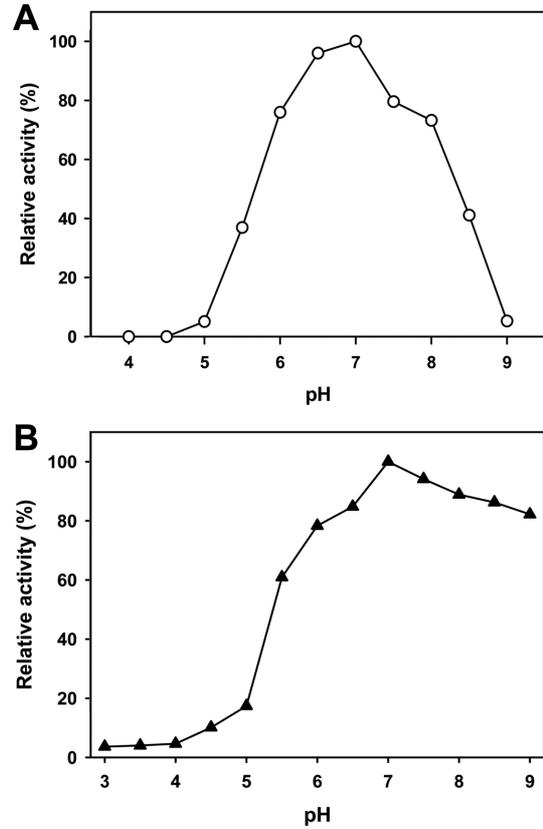


Fig. 4. Effects of reaction pH on the enzymatic activity (A) and stability (B) of LLCD.

(A) Optimal reaction pH of LLCD was determined on the basis of its hydrolyzing activity on β-CD. A variety of reaction buffers were tested as follows: sodium acetate (pH 4.0-6.0); sodium phosphate (pH 6.0-7.5); Tris-HCl (pH 7.5-8.0); borate-NaOH (pH 8.0-9.0). (B) The pH stability was determined by measuring the residual activities after incubation for 12 h at 4°C in various pH ranges.

감안할 때[23], 저온에서 생육하는 유산균의 특성 상 효소의 활성이 낮은 온도에서 최적화된 것으로 예상하였다.

LLCD의 기질특이성

일반적으로 CDase 계열 효소들은 β-CD, pullulan, starch 등의 다양한 기질에 대해 가수분해 활성을 가지는 것으로 알려져 있다. 그러나, 기질의 종류에 따라 효소활성 측정방법이 상이하고, 기존 연구결과와의 직접적인 비교가 어려운 점을 고려하여, 본 연구팀이 보유한 ThMA [14]와 BHCD [11] 효소를 대조군으로 동일하게 측정하여 기질특이성을 상호 비교하였다(Table 1). LLCD는 대부분의 기질에 대해 ThMA 및 BHCD에 비하여 낮은 가수분해 활성을 나타내었며, 특히 pullulan 및 starch와 같은 고분자 기질들에 대해 극히 낮은 활성을 보였다. 그러나, starch 대비 약 80배 이상의 매우 높은 β-CD 분해활성을 보였으며, ThMA나 BHCD의 β-CD에

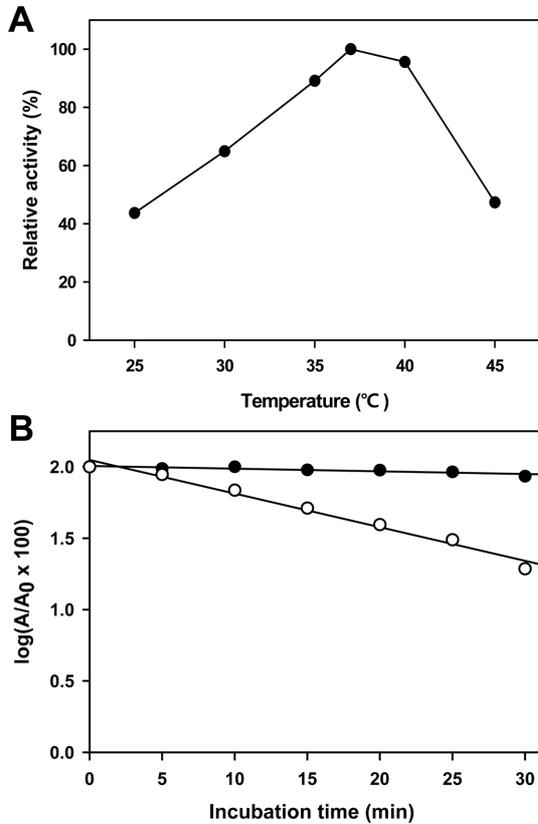


Fig. 5. Effect of temperature on the enzymatic activity and stability of LLCD.

(A) Optimal reaction temperature of LLCD was determined on the basis of its hydrolyzing activity on β-CD. (B) Its thermal stability was also examined by measuring the residual activities after pre-incubation for 30 min at 35°C (closed circles) and 40°C (open circles), respectively.

대한 활성이 starch에 비해 각각 14.8배 및 4.7배 높은 수준임을 고려할 때, 매우 특징적인 것으로 판단하였다. 또한 starch 분해 활성에 비해 maltotriose에 대한 활성은 40배 이상 높았으며, 따라서 LLCD는 고분자 기질보다 소당류의 기

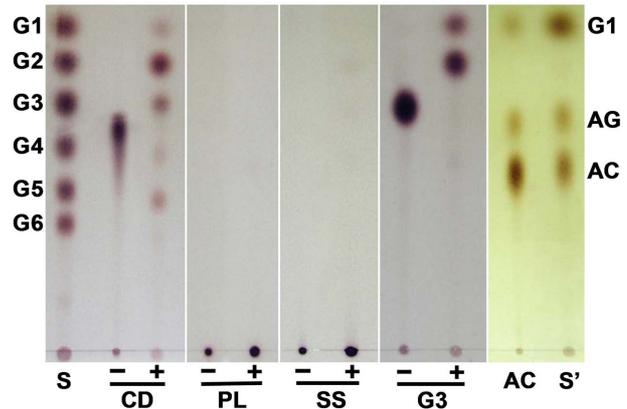


Fig. 6. Hydrolysis patterns of LLCD on various substrates. LLCD was reacted with 1% of each substrate. CD, β-CD; PL, pullulan; SS, soluble starch; G3, maltotriose; AC, acarbose; AG, acarviosine-glucose; S and S', standards for oligosaccharides and acarbose derivatives, respectively; reaction products with (+) or without (-) LLCD.

질에 대한 활성이 특히 높음을 확인하였다. 이러한 결과를 통해 중합체 기질에 대한 선호도를 나타낸 BHCD와 효소특성에 차별화됨을 알 수 있다[11]. 또한, α-glucosidase 저해제로 작용하여 당뇨병 치료제로 사용되는 acarbose는 ThMA와 BHCD 등의 CDase 계열 효소에 의해 glucose와 acarviosine-glucose로 분해되나[14], LLCD의 경우 acarbose에 대한 비활성은 ThMA와 BHCD에 비해 약 0.3% 및 33% 수준에 불과하였다. 그러나, acarbose 대비 maltotriose에 대한 가수분해 활성의 비율은 LLCD에서 크게 높은 것으로 나타났다. 유산균 유래 LGMA 또한 극히 낮은 acarbose 가수분해 활성을 가지는 것으로 알려졌다[21]. 또한 선행연구에서 대표적인 CDase 계열 효소인 ThMA의 기질 결합에 관여하는 잔기 중 Val329~Glu332에 대한 돌연변이를 통해 기질특이성 및 acarbose 가수분해 패턴이 변화되는 것으로 보고되었다[21]. 따라서 이를 토대로 CDase 계열 효소 간의 핵심 아미노산 잔기를 비교하고, 이를 치환하여 효소의 기질 특이성을 변화시키는 연구가 가능할 것으로 기대한다.

Table 1. Multi-substrate specificity of LLCD in comparison with other CDase-family enzymes.

Enzyme ^a	Specific activity (U/mg) ^b					Activity ratio ^c			
	β-CD	Pullulan	Starch	Maltotriose	Acarbose	C/S	P/S	M/S	M/A
ThMA	65.2 ± 0.9	5.0 ± 0.1	4.4 ± 0.1	48.9 ± 0.3	27.3 ± 0.3	14.8	1.1	11.1	1.8
BHCD	52.9 ± 0.3	22.8 ± 0.5	11.2 ± 0.1	17.9 ± 0.1	3.0 ± 0.1	4.7	2.0	1.6	6.0
LLCD	16.5 ± 0.9	0.8 ± 0.0	0.2 ± 0.0	8.5 ± 0.1	0.1 ± 0.0	82.5	4.0	42.5	85.0

^aAbbreviations: ThMA, *Thermus* MAase; BHCD, alkalophilic *Bacillus* CDase; LLCD, *Lactococcus lactis* CDase

^bEach hydrolyzing activity on β-CD, pullulan, or starch was determined by DNS reducing sugar assay, whereas the activity against maltotriose or acarbose was measured by GOD-POD method

^cThe abbreviations for the activity ratios between substrates were used as follows: C, β-CD; P, pullulan; S, soluble starch; M, maltotriose; A, acarbose

각각의 기질로부터 생성된 반응산물 분석을 통해 LLCD의 가수분해 패턴을 비교하였다(Fig. 6). LLCD는 β -CD의 고리 구조를 절단하여 7개의 glucose로 구성된 직쇄형의 올리고당 형태로 전환된 후, 가수분해 작용을 통해 주로 maltose를 최종 산물로 생성하였다. 반면에 pullulan과 starch에 대한 가수분해 활성이 매우 낮아 동일한 반응조건에서는 반응산물을 확인하기 어려웠다. Maltotriose의 분해산물은 반응기질이 완전히 분해되어 최종 산물로 glucose와 maltose를 생성하였다. Acarbose의 경우에는 낮은 효소활성으로 인해 기질이 불완전하게 분해되어 소량의 glucose와 acarviosine-glucose를 최종 산물로 생성하였다. 전반적인 가수분해 패턴은 기존에 알려진 CDase 계열 효소들과 매우 유사하였으나, 각 기질에 대한 활성의 차이에 따라 분해도의 차이를 나타내었다.

결과적으로 LLCD는 CDase 계열 효소에 속하며, pullulan 및 starch와 같은 큰 분자량의 중합체 기질 보다 β -CD, maltotriose와 같은 소당류를 기질로 선호하며, 전분분해 효소의 저해제인 acarbose에 대한 분해 활성이 극히 낮은 특징을 나타낸다. 비록 LLCD는 대부분의 탄수화물 기질에 대한 낮은 비활성을 가지는 효소이므로 현재의 산업적 활용 가치는 다소 부족하지만, 식품소재 생산에 활용 가능한 유산균 유래의 효소로서 장점을 가진다. 또한 기존 CDase 계열 효소들과 차별화되는 고유의 기질 특이성 및 상동 부위 잔기들의 차별성에 주목하여 효소 구조 및 기능의 상관관계에 대한 구체적인 연구가 이루어진다면, 유산균 내 탄수화물 대사에 관련된 이들 효소의 역할 구명 또는 탄수화물 효소들의 특성 개선을 위한 단백질 공학적 연구에 좋은 모델로 활용될 수 있을 것으로 기대한다.

요 약

본 연구에서 584개의 아미노산(68.7 kDa)으로 구성된 cyclomaltodextrinase (LLCD)의 유전자를 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KCTC 3769 (ATCC 19435)로부터 클로닝하였다. LLCD는 일반적인 CDase 계열 효소들과 약 40% 전후의 아미노산 서열 상동성을 나타내었다. C-말단에 6개의 히스티딘 잔기를 가진 재조합 효소는 dimer의 형태로 대장균에서 발현되고 정제되었다. LLCD는 pH 7.0 및 37°C에서 최대의 β -CD 가수분해 활성을 나타내었다. 특히, 이 효소는 starch 및 pullulan에 대해 극히 낮은 활성을 보였으나, 반면에 CD에 대한 가수분해 활성은 starch에 비해 약 80배 이상 높았다. 이처럼 높은 CD에 대한 활성을 근거로 LLCD는 CDase 계열 효소로 분류될 수 있으나, starch, pullulan, 그리고 acarbose에 대한 매우 낮은 활성은 다른 유사효소와 비교하여 차별화되는 특징이다.

Acknowledgments

This work was supported by the research grant of the Chungbuk National University in 2011.

References

- Auh JH, Chae HY, Kim YR, Shim KH, Yoo SH, Park KH. 2006. Modification of rice starch by selective degradation of amylose using alkalophilic *Bacillus cyclomaltodextrinase*. *J. Agric. Food Chem.* **54**: 2314-2319.
- Baek JS, Kim TJ, Kim YW, Cha HJ, Kim JW, Kim YR, et al. 2008. Role of dipeptide at extra sugar-binding space of *Thermus maltogenic* amylase in transglycosylation activity. *J. Microbiol. Biotechnol.* **13**: 969-975.
- Bolotin A, Wincker P, Mauger S, Jaillon O, Malarome K, Weisenbach J, et al. 2001. The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome Res.* **11**: 731-753.
- Cantarel BL, Coutinho PM, Rancurel C, Bernard T, Lombard V, Henrissat B. 2009. The carbohydrate-active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Res.* **37**: D233-D238.
- Cha HJ, Yoon HG, Kim YW, Lee HS, Kim JW, Kweon KS, et al. 1998. Molecular and enzymatic characterization of a maltogenic amylase that hydrolyzes and transglycosylates acarbose. *Eur. J. Biochem.* **253**: 251-262.
- Cho HY, Kim YW, Kim TJ, Lee HS, Kim DY, Kim JW, et al. 2000. Molecular characterization of a dimeric intracellular maltogenic amylase of *Bacillus subtilis* SUH4-2. *Biochim. Biophys. Acta.* **1478**: 333-340.
- de Vos WM, Hugenholtz J. 2004. Engineering metabolic highways in *Lactococci* and other lactic acid bacteria. *Trends Biotechnol.* **22**: 72-79.
- Hondoh H, Kuriki T, Matsuura Y. 2003. Three-dimensional structure and substrate binding of *Bacillus stearothermophilus* neopullulanase. *J. Mol. Biol.* **326**: 177-188.
- Imam S, Burgess-Cassler A, Cote G, Gordon S, Baker F. 1991. A study of cornstarch granule digestion by an unusually high molecular weight alpha-amylase secreted by *Lactobacillus amylovorus*. *Curr. Microbiol.* **22**: 365-370.
- Kamitori S, Kondo S, Okuyama K, Yokota T, Shimura Y, Tonozuka T, et al. 1999. Crystal structure of *Thermoactinomyces vulgaris* R-47 alpha-amylase II (TVAII) hydrolyzing cyclodextrins and pullulan at 2.6 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **287**: 907-921.
- Kang HJ, Jeong CK, Jang MU, Choi SH, Kim TJ, Kim MH, et al. 2009. Expression of cyclomaltodextrinase gene from *Bacillus halodurans* C-125 and characterization of its multisubstrate specificity. *Food Sci. Biotechnol.* **18**: 776-781.
- Kaulpiboon J, Pongsawadi P. 2004. Expression of cyclodextrinase gene from *Paenibacillus* sp. A11 in *Escherichia coli* and characterization of the purified cyclodextrinase. *J. Biochem.*

- Mol. Biol.* **37**: 408-415.
13. Kim JS, Cha SS, Kim HJ, Kim TJ, Ha NC, Oh ST, *et al.* 1999. Crystal structure of a maltogenic amylase provides insights into a catalytic versatility. *J. Biol. Chem.* **274**: 26279-26286.
 14. Kim TJ, Kim MJ, Kim BC, Kim JC, Cheong TK, Kim JW, *et al.* 1999. Modes of action of acarbose hydrolysis and transglycosylation catalyzed by a thermostable maltogenic amylase, the gene for which was cloned from a *Thermus* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 1644-1651.
 15. Kim TJ, Shin JH, Oh JH, Kim MJ, Lee SB, Ryu S, *et al.* 1998. Analysis of the gene encoding cyclomaltodextrinase from alkalophilic *Bacillus* sp. I-5 and characterization of enzymatic properties. *Arch. Biochem. Biophys.* **353**: 221-227.
 16. Kim TJ, Nguyen VD, Lee HS, Kim MJ, Cho HY, Kim YW, *et al.* 2001. Modulation of the multisubstrate specificity of *Thermus* maltogenic amylase by truncation of the N-terminal domain and by a salt-induced shift of the monomer/dimer equilibrium. *Biochemistry* **40**: 14182-14190.
 17. Kowalczyk M, Bardowski J. 2007. Regulation of sugar catabolism in *Lactococcus lactis*. *Crit. Rev. Microbiol.* **33**: 1-13.
 18. Kuriki T, Imanaka T. 1989. Nucleotide sequence of the neopullulanase gene from *Bacillus stearothermophilus*. *J. Gen. Microbiol.* **135**: 1521-1528.
 19. Lee HS, Kim MS, Cho HS, Kim JI, Kim TJ, Choi JH, *et al.* 2002. Cyclomaltodextrinase, neopullulanase, and maltogenic amylase are nearly indistinguishable from each other. *J. Biol. Chem.* **277**: 21891-21897.
 20. Li D, Park SH, Shim JH, Lee HS, Tang SY, Park CS, *et al.* 2004. In vitro enzymatic modification of puerarin to puerarin glycosides by maltogenic amylase. *Carbohydr. Res.* **339**: 2789-2797.
 21. Oh KW, Kim MJ, Kim HY, Kim BY, Baik MY, Auh JH, *et al.* 2005. Enzymatic characterization of a maltogenic amylase from *Lactobacillus gasserii* ATCC 33323 expressed in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **252**: 175-181.
 22. Oh SW, Jang MU, Jeong CK, Yuk JB, Park JM, Park KH. 2006. Development of detection method for cyclomaltodextrinase family genes using degenerate PCR primers. *Food Sci. Biotechnol.* **15**: 967-974.
 23. Park KH, Kim TJ, Cheong TK, Kim JW, Oh BH, Svensson B. 2000. Structure, specificity and function of cyclomaltodextrinase, a multispecific enzyme of the alpha-amylase family. *Biochim. Biophys. Acta.* **1478**: 165-185.
 24. Pompeyo C, Gómez M, Gasparian S, Morlon-Guyot J. 1993. Comparison of amylolytic properties of *Lactobacillus amylovorus* and of *Lactobacillus amylophilus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **40**: 266-269.
 25. Rodriguez Sanoja R, Morlon-Guyot J, Jore J, Pintado J, Juge N, Guyot JP. 2000. Comparative characterization of complete and truncated forms of *Lactobacillus amylovorus* alpha-amylase and role of the C-terminal direct repeats in raw-starch binding. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 3350-3356.
 26. Tonozuka T, Ohtsuka M, Mogi S, Sakai H, Ohta T, Sakano Y. 1993. A neopullulanase-type alpha-amylase gene from *Thermoactinomyces vulgaris* R-47. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **57**: 395-401.