

Enhancement of enzymatic activity of β -cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus firmus* var. *alkalophilus* by site-directed mutagenesis

이광우, 신현동, 이용현

경북대학교 유전공학과 생물공학연구소

전화 (053) 950-5384, FAX (053) 959-8314

Abstract

Cyclodextrin glucanotransferase (CGTase) (EC 2.4.1.19) use starch to produce cyclic maltooligosaccharides (cyclodextrins, CDs) which are of interest in various applications. To obtain a novel CGTase having high CD-forming activity, β -cyclodextrin glucanotransferase (β -CGTase) from *Bacillus firmus* var. *alkalophilus* was modified through site-directed mutagenesis and constructed five mutants, H59T, H59Q, Y96M, 90-PPI-93, and $\Delta(148-154)$ D, respectively. Y96M and $\Delta(148-154)$ D showed much higher level of conversion yields of starch into CDs from 28.6% to about 39% compared to wild-type β -CGTase, respectively, but 90-PPI-93 maintained similar conversion yields of starch to CDs. And their β -CD ratios to total CDs were not changed and maintained, and conversion yields to linear maltooligosaccharides of all mutants were not changed significantly. These results indicates that five mutations of β -CGTase from *Bacillus firmus* var. *alkalophilus* appears to be important roles for increase of overall CD production rather than change of its product specificity, especially.

서론

환상형 구조를 지닌 글루코스로 연결된 CD은 그들의 소수성 공동내부에 여러 가지 유기 및 무기 화합물을 포접함으로써 다양한 포접체를 형성하는 능력을 갖고 있는데 CD의 이와 같은 특성을 이용하여 농업, 식품산업, 의약품 등 여러 분야에 활용되고 있다. 이러한 산업적으로 유용한 CD을 생성하는 CGTase는 세포의 효소의 형태로 생산되며 주로 α -와 β -CD 그리고 소량의 γ -CD를 생산한다. 특히, γ -CD를 효과적으로 생산할 수 있는 효소가 없기 때문에 γ -CD는 아주 높은 비용으로 생산되고 있다. 본 연구실에서도 주 생성물로 β -CD를 합성하면서 소량의 γ -CD만을 합성하는 새로운 호 알칼리성 세균을 선별하고 *Bacillus firmus* var. *alkalophilus*로 동정하였다. 따라서 본 연구에서는 이러한 산업적으로 유용한 CD의 생산량을 증가시키기 위해 부위 특이적 돌연변이법을 이용하여 CD의 기질결합부위에 있어 중요한 영향을 미치는 것으로 보고된 5가지의 변이효소를 구축하였고, 구축된 변이 β -CGTase 유진

자들을 재조합 대장균에서 각각 발현시켜 변이효소들을 생산하고 이를 정제하여 변이 효소들의 변화된 효소활성을 조사하고 효소반응에 대한 기능을 추정하였다. [2, 3, 5, 6]

재료 및 방법

균주와 배양조건 본 실험에서 사용한 균주는 *B. firmus* var. *alkalophilus* 유래의 β -CGTase가 pET20b(+)^내에 함유된 pECGT를 지닌 *E. coli* BL21(DE3)pLysS로 Terrific Broth (1.2% tryptone, 2.4% yeast extract, 0.231% KH_2PO_4 , 1.254% K_2HPO_4 , 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ampicillin · chloramphenicol)에 0.5% soluble starch를 첨가한 배지에서 초기배양(30 $^\circ\text{C}$)하여 OD₆₀₀ 0.7~0.8 부근에서 0.4mM IPTG induction 후 계속해서 25 $^\circ\text{C}$, 7h 동안 배양하였다.

Megaprimer를 이용한 부위특이적 돌연변이 Megaprimer를 이용한 부위특이적 돌연변이는 Griffin의 방법을 다소 변형하여 다음과 같이 실시하였다 (Griffin and Griffin, 1994) [1]. PCR법으로 부위특이적 돌연변이를 유발시키기 위하여 먼저 각 돌연변이 유발용 primer와 3'-primer를 사용하여 PCR로 megaprimer를 합성하였다. 합성된 megaprimer를 이용하여 β -CGTase 유전자 전체를 증폭한 후 전기영동을 실시하였다. 2.2 kb 부근의 band를 절단하여 정제한 후, 제한효소 *Hind* III로 절단하였다. 절단된 DNA는 동일효소로 절단한 pET20b(+)^에 연결하여 *E. coli* BL21(DE3)pLysS에 형질 전환한 후 재조합 균주를 선별하였다.

효소의 정제 배양상등액을 적당량의 β -CD polymer와 4 $^\circ\text{C}$ 에서 18~21시간동안 교반하여 침전되도록 한다. 침전된 고형물을 원심분리하여 모은 다음, 증류수와 1M NaCl을 이용하여 조심스럽게 세척한 후, 수용성 0.5M NaCl을 포함하는 5mM β -CD에 현탁하여 3시간 동안 상온에서 흡착된 효소를 탈착시켰다. 탈착시킨 효소액은 농축 및 투석한 후 사용하였다.

효소 활성 측정 β -CGTase활성은 Kaneko 등이 제시한 방법인 phenolphthalein 법으로 측정하였으며 [4], 효소 1 unit는 분당 1mg의 β -CD를 생성하는데 필요한 효소의 양으로 정의하였다. Coupling 반응의 활성은 당공여체로 1.0%의 가용성 전분을 당수용체로 1.0%의 maltose를 사용하여 pH 6.0, 50 $^\circ\text{C}$ 에서 10분간 반응시킨 후 감소한 maltose 양을 HPLC로 측정하여 결정하였으며, 1분간 1 mg의 maltose를 감소시키는데 필요한 효소의 양을 1 unit으로 정의하였다. 전분분해 활성은 일반적으로 활용되고 있는 환원당 정량법 (Miller, 1959)에 따라 1% (w/v) 가용성 전분을 기질로 하여 생성된 당의 양을 측정하여 결정하였다. 1분간 1 mg의 환원당을 생성하는 효소의 양을 1unit로 정의하였다. Disproportionation 활성은 10mM maltotriose · maltotetraose를 pH 6.0, 50 $^\circ\text{C}$ 에서 10min간 반응시킨 후 생성된 maltopentaose의 양을 HPLC로 측정하여 결정하였으며, 1분간 1 μmol 를

maltopentaose를 생성시키는데 필요한 효소의 양을 1 unit으로 정의하였다.

결과 및 고찰

부위특이적 돌연변이주의 구축 본 *Bacillus firmus* var. *alkalophilus* 유래의 β -CGTase의 CD 생산능을 증가시키고자 CD의 기질결합 부위에 있어 산물결정 특이성을 나타낸다고 보고된 다음의 5가지 H59T, H59Q, Y96M, 90-PPI-93 and Δ (148-154)D 변이주를 megaprimer PCR법을 이용하여 여러 가지 변이 β -CGTase 유전자 함유 재조합 대장균을 구축하였다. 일부 연구자들의 보고에 따르면 위의 변이주들은 특이적으로 γ -CD합성을 증가시킨다는 결과도 있고, 또한 그렇지 않다는 보고도 있었다. Wild-type과 각 변이주로부터 생산된 β -CGTase는 β -CD polymer를 이용하여 순수하게 정제하였으며 SDS-PAGE를 통하여 단일 밴드로 확인하였다.

CD 및 maltooligosaccharides로의 전환능 각 변이주의 돌연변이가 전분에 대한 CGTase의 효소전환에 미치는 영향을 조사하기 위하여 wild-type 및 5개의 변이 β -CGTase를 5.0% (w/v) 수용성 전분에 반응시켜 25시간 후의 반응 산물을 분석하였다. Table 1에서 보는 바와 같이 Y96M, Δ (148-154)D β -CGTase가 wild-type의 28.6%보다 약 10%가량 높은 약 39%의 CD 전환율을 보였고, 또한 H59T, H59Q의 경우도 4%의 증가를 보였다. 하지만 90-PPI-93의 경우는 28%로 wild-type과 거의 유사한 CD 전환율을 보였다. 그리고 전체 CD에 대한 β -CD의 함량도 거의 변화되지 않은 84~86%의 수준을 유지하였다. 한편, maltooligosaccharides로의 전환율은 각 변이 효소들은 wild-type과 비교하여 그다지 큰 변화를 보이지 않고 약간의 감소를 보였으며, 90-PPI-93과 Δ (148-154)D는 maltooligosaccharides로의 전환이 거의 나타나지 않았다. 이 사실을 요약하면 90-PPI-93를 제외한 나머지 4가지의 부위 특이적 돌연변이주는 일부의 다른 연구자들의 보고와는 달리 본 *Bacillus firmus* var. *alkalophilus* 유래의 β -CGTase의 효소활성에 있어서 특정한 CD의 합성능을 증가시키기보다는 전체적인 CD합성능의 증가를 유도시키는 것을 알 수 있었다.

참고문헌

1. Tao, L. B. and K.-C. Lee. Mutagenesis by PCR In Griffin, H. G. and A. M. Griffin eds. *PCR Technology-Current Innovations*, Boca Raton, CRC Press (1994), PP. 69-83.
2. Shin, H. D., C. Kim, and Y. H. Lee, The roles of tryptophan and histidine residues in the catalytic activities of β -cyclodextrin glucanotransferase from *B. firmus* var. *alkalophilus* (1999). *J. Microbiol. Biotechnol.*, **9**, 62-69.
3. Wind, R. D., R. M. Buitelaar and L. Dijkhuizen. Engineering of factors

- determining α -amylase and cyclodextrin glycosyltransferase specificity in the cyclodextrin glycosyltransferases from *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* EM 1 (1998), *Eur. J. Biochem.*, **253**, 598-605.
4. Kaneko, T., T. Kato, N. Nakamura and K. Horikoshi. Spectrophotometric determination of cyclization activity of beta-cyclodextrin-forming cyclodextrin glucanotransferase. (1987). *J. Jpn. Soc. Starch Sci.* **34**, 45-48.
 5. Penninga D, van der Veen BA, Knegtel RMA, van Hijum SAFT, Romeboom HJ, Kalk KH, Dijkstra BW, Dijkhuizen L, The raw starch-binding domain of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* strain 251 (1996), *J. Biol. Chem.*, **271**, 32777-32784.
 6. G. Parsiegla, A. K. Schmidt, G. E. Schulz, Substrate binding to a cyclodextrin glycosyltransferase and mutations increasing the γ -cyclodextrin production (1998), *Eur. J. Biochem*, **225**, 710-717

Table 1. Starch conversion and product specificity of *B. firmus* var. *alkalophilus* wild-type and mutant β -CGTase

β -CGTase	Conversion yield of starch into CD (%)	Product ratio (%)			Conversion yield of starch into linear maltooligosaccharides (%)
		α	β	γ	
Wild-type	28.64	0	86.95	13.05	4.00
H59T	32.05	0	85.45	14.55	4.64
H59Q	32.21	0	85.53	14.47	1.60
Y96M	38.89	0.97	84.66	14.36	0.70
90-PPI-93	28.01	1.35	84.56	14.09	0
Δ (148-154)D	38.68	0.98	84.58	14.44	0

5.0%(w/v) of soluble starch in 50 mM Tris-maleic acid-NaOH buffer (pH 6.0) was digested with β -CGTase (0.1 unit/ml) at 50°C for 25hr.