

## *Bacillus stearothermophilus* KJ16이 생산하는 Cyclodextrin Glucanotransferase의 정제와 효소특성

권현주 · 남수완 · 김광현 · 송승구\* · 윤종원\*\* · 김병우†

동의대학교 미생물학과  
\*부산대학교 화학공학과  
\*\*대구대학교 생물공학과

## Purification and Characterization of Cyclodextrin Glucanotransferase from *Bacillus stearothermophilus* KJ16

Hyun-Ju Kwon, Soo-Wan Nam, Kwang-Hyun Kim, Seong-Koo Song\*, Jong-Won Yun\*\* and Byung-Woo Kim†

Department of Microbiology, Dong-Eui University, Pusan 614-714, Korea  
\*Department of Chemical Engineering, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea  
\*\*Department of Biotechnology, Taegu University, Kyungbuk 712-714, Korea

### Abstract

Cyclodextrin glucanotransferase from *B. stearothermophilus* KJ16 that can produce both cyclodextrin glucanotransferase and cyclodextrinase was purified by ammonium sulfate precipitation, DEAE-cellulose chromatography, Sephadex G-100 chromatography, and FPLC. The molecular weight of the purified enzyme was about 65,000 dalton by SDS-PAGE. The optimal pH and temperature were 6.0 and 60°C, respectively. The enzyme was stable at 50°C for 1 hr and in the pH range of 5.5 and 8.5. Mercaptoethanol and dithiothreitol inhibited the enzyme activity strongly. The enzyme produced 60% cyclodextrin(CD) from 5% soluble starch with the  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -CD ratio of 42 : 46 : 12. Amylopectin was the most suitable substrate with 67% conversion to CD.

*Key words* : cyclodextrin glucanotransferase, *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. CD의 분자 외부는 친수성이고 분자 내부는 소

수성인 성질을 가지고 있어 동공 내에 각종 유기 및 무기 화합물을 포집하여 그 분자들의 물리화학적 성질을 변화시키는 성질을 가지며 이러한 특성을 이용하여 식품, 의약, 농약, 화장품 등의 산업에서 유효 성분의 안정화, 가용화 및 유효 등 물성 개선의 첨가제로 사용되고 있으며 그 수요는

† Corresponding author

매년 증가되고 있다.

CD는 미생물이 생산하는 cyclodextrin glucanotransferase(EC 2.4.1.19; 1,4- $\alpha$ -D-glucan-4- $\alpha$ -D-(1,4-glucano) transferase, cyclizing; CGTase)에 의하여 전분 및 그 관련 물질로부터 만들어진다. CGTase는 전분으로부터 CD를 합성하는 cyclization 반응과 CD를 개환하여 적당한 수용체에 당을 전이시키는 coupling 반응, 그리고 maltooligosaccharide에 작용하여 여러 가지 중합도의 oligosaccharide로 전환시키는 disproportionation 반응을 매개하는 다기능 효소이다. 그래서 많은 연구자들이 CGTase의 흥미로운 작용기작을 규명하기 위하여 *B. macerans*<sup>1)</sup>, *B. ohbensis*<sup>2)</sup>, *B. circulans*<sup>2,3)</sup>, *B. megaterium*<sup>4)</sup>, *B. stearothermophilus*<sup>4,5)</sup>, *B. coagulans*<sup>6)</sup>, *B. firmus*<sup>7)</sup>, *Klebsiella pneumoniae*<sup>8)</sup>, alkalophilic *Bacillus* sp.<sup>9-11)</sup> 등의 CGTase 생산균주를 분리하고 이들 세균이 생산하는 효소들은 정제하여 효소학적 특성을 규명하여 보고한 바 있다.

본 연구에서는 토양에서 분리한, CGTase와 cyclodextrinase(CDase)를 같이 생산하는 *B. stearothermophilus* KJ16<sup>12,13)</sup>의 CGTase를 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. stearothermophilus* KJ16<sup>12,13)</sup>을 사용하였다. 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>14)</sup>에 45℃에서 20시간 진탕배양한 후 배양 상등액을 효소 정제를 위한 조효소액으로 사용하였다.

### CGTase의 활성측정

CGTase의 활성은 Lejeune등<sup>15)</sup>에 의해 제안된 methyl orange법으로 측정하였다. 효소 반응은 5% soluble starch 용액(50mM 인산염 완충액, pH6.0)과 1mM methyl orange 용액(50mM 인산염 완충액, pH6.0)을 50mM 인산염 완충액(pH 6.0)과 잘 섞고 이 혼합액에 효소 용액을 가하여 60℃에서 10분간 반응시켰다. 반응 후 6N-HCl을

가하여 반응을 정지시키고 반응액을 16℃에서 30분간 방치한 후 505nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소활성은 위와 같은 조건에서 분당 1 $\mu$ mole의  $\alpha$ -CD를 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 최소량 가하여 녹인 후 같은 완충액으로 3회 투석하였다. 투석액은 50mM 인산염 완충액(pH6.0)으로 평형화시킨 DEAE-cellulose column(2×20cm)에 0.5ml/min의 유속으로 0.05M, 0.1M, 0.15M, 0.2M 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 목적 효소 단백질을 용출하였다. 활성분획은 PEG처리로 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>16)</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>17)</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.

### CD의 분석 및 정량

정제효소의 CD 생산능을 분석하기 위한 반응은 50mM의 인산완충액(pH 6.0)에 기질로 5% (w/v) soluble sta-

rch와 정제효소(2 units/ml)를 포함한 반응액을 60°C에서 반응시킨 후 생성된 CD를 HPLC로 분석하였다. HPLC (Waters사의 LC Module I) column은 TSKgel Amide-80 (Tosoh Co.)으로 acetonitrile : H<sub>2</sub>O = 60 : 40의 용매로 분당 1ml의 유속으로 용출하여 RI detector(Model 410, Waters)로 검정하였다.

### 결과 및 고찰

#### CGTase의 정제

본 실험의 공시균주인 *B. stearothermophilus* KJ16의 균체의 생육과 효소생산 특성은 전보<sup>12)</sup>에서 보고한대로 CS 배지에서 회분배양시 증식초기 약 20시간 전후에 CGTase가 가장 많이 생산된다. 이때의 배양상등액(170 units/1.79L)을 70% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 침전시키고 침전물을 13ml의 50mM 인산완충액(pH 6.0)에 녹인 후, DEAE-cellulose column에 흡착시키고 NaCl gradient로 용출시켰다. NaCl 농도 0.1-0.2M의 분획에서 CGTase의 활성을 나타내었으며, 이 활성분획을 농축하여 Sepadex G-100 column으로 다시 분리한 결과 분획 45-60에서 CGTase의 활성과 일치하는 단일 단백질 peak를 얻었다. 고순도 정제를 위하여 이 활성분획을 재농축하여 최종적으로 FPLC를 행하였다. 그 결과 Table 1에 나타낸 것처럼 수율 10%, 비활성 31.4 units/mg, 정제도 78.5배로 정제된 CGTase를 얻었으며 이 효소는 SDS-polyacrylamide gel 전기영동 상에서 단일 band를 보임으로써 순도 높은 단일 단백질을 알 수 있었다 (Fig. 1).

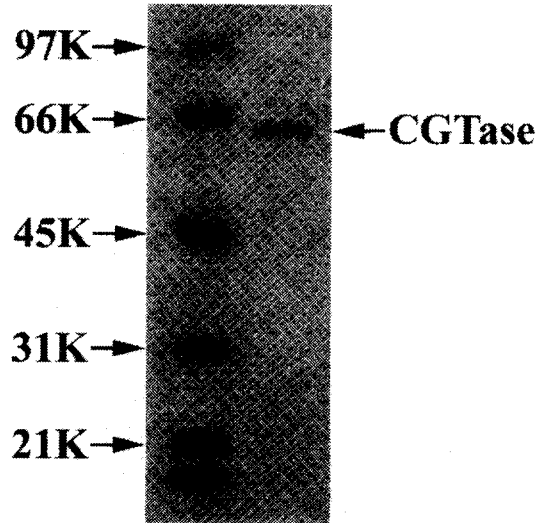


Fig. 1. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the purified CGTase from *B. stearothermophilus* KJ16. The sample was loaded on a 12% gel with the following standard markers; phosphorylase b (M.W. 97,400), bovine serum albumin (66,200), ovalbumin (45,000), carbonic anhydrase (31,000), and soybean trypsin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

#### 효소의 분자량

정제된 효소의 순수 분리여부와 분자량을 측정하기 위하여 SDS-PAGE를 행한 결과 Fig.1과 같이 단일 단백질 band가 얻어졌고 표준단백질로부터 구한 CGTase의 분자

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

Procedure	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg)	Purification fold	Yield (%)
Culture supernatant	383.4	170	0.4	1.0	100
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> precipitation	18.4	107.3	5.8	14.5	63
DEAE-cellulose	4.8	49.1	10.2	25.5	29
Sephadex G-100	0.97	22.8	23.5	58.8	13
FPLC	0.56	17.6	31.4	78.5	10

량은 65,000 dalton이었다. 이와 같은 결과는 기존에 보고된 *B. stearothermophilus* 유래 CGTase<sup>4,18)</sup>들의 분자량 75,000 dalton과는 큰 차이를 보이는 반면, Akimaru 등<sup>6)</sup>이 보고한 *B. coagulans* 유래 CGTase의 65,000 dalton과 유사하였다.

정제된 CGTase의 효소학적 특성

정제된 효소의 최적반응 pH와 pH 안정성, 최적반응 온도와 열안정성을 검토한 결과(Fig. 2와 Fig. 3) 최적반응 pH는 6.0이었으며, pH 5.5에서 pH 8.5의 범위에서 60°C, 1시간동안 전처리하여도 100%의 잔존활성을 보였고, 그 외의 범위에서는 점차적으로 감소하여 pH 4.0에서 54%, pH 10.0에서 60%의 잔존활성을 나타내었다. 반응 온도

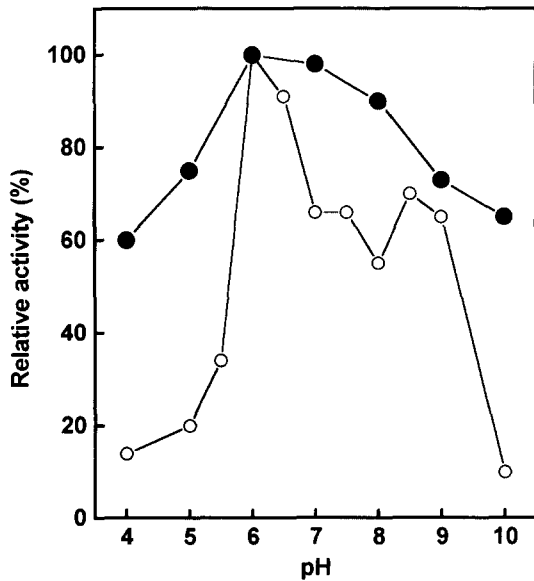


Fig. 2. Effect of pH on CGTase activity(○) and stability(●).

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.

는 60°C에서 최적활성을 나타내었으며, 40°C이하에서는 100% 안정성을 보이며 50°C-70°C범위에서는 시간이 경과함에 따라 잔존활성이 어느 정도 감소함을 보였지만 50°C

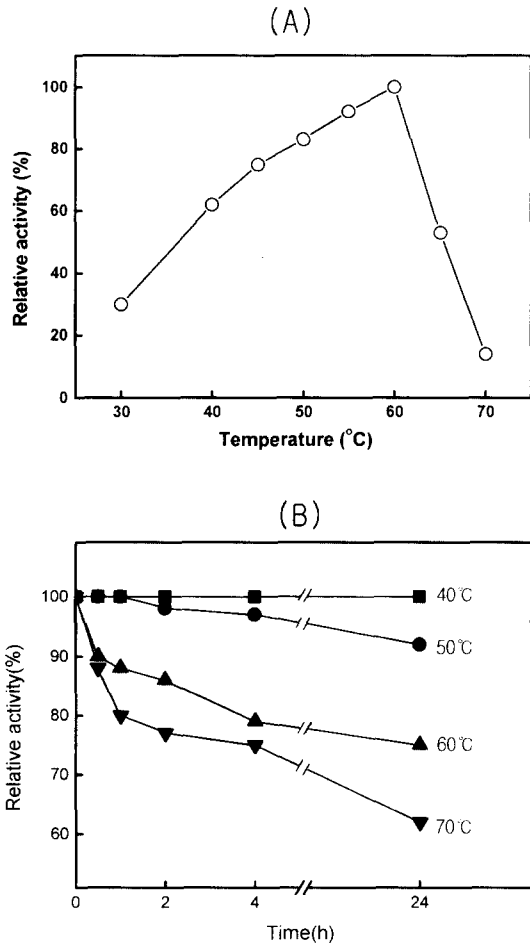


Fig. 3. Effect of temperature on CGTase activity(A) and stability(B).

(A) The enzyme activity assayed with 0.5% soluble starch(pH 6.0) for 30 min 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.

에서 1시간까지는 안정하였고, 70°C에서 24시간 전처리하여도 60% 이상의 잔존활성을 보이는 비교적 내열성이 높은 효소였다.

#### 각종 금속이온 및 chemicals의 영향

효소활성에 미치는 각종 금속 이온(10mM 농도)과 chemical(10mM 농도)에 의한 영향을 조사한 결과(Table 2) 효소활성은 Ca<sup>2+</sup>에 의해 다소 증가하고 Hg<sup>2+</sup>에 의해 강하게 저해되었으나 그 외의 이온에 의한 영향은 없었다. 또한 p-chloromercuribenzoate와 같은 thiol reagent나 N-bromosuccinimide와 같은 indole 산화제에 의한 영향이 없는 것으로 보아 효소활성 부위에 sulfhydryl이나 tryptophan 잔기가 관여하지 않는 것으로 추측된다. 그러나 mercaptoethanol이나 dithiothreitol과 같은 환원제에 의해서는 효소활성이 강하게 저해되어 disulfide bond가 효소의 구조에 크게 기여하고 있는 것으로 사료된다.

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

Metal ions or chemicals (10mM)	Relative activity (%)
None	100
MgSO <sub>4</sub>	105
FeSO <sub>4</sub>	98
NaCl	95
NaNO <sub>3</sub>	95
MgCl <sub>2</sub>	103
HgCl <sub>2</sub>	65
KCl	98
CuSO <sub>4</sub>	96
BaCl <sub>2</sub>	98
CaCl <sub>2</sub>	124
p-chloromercuribenzoate	96
N-bromosuccinimide	97
Mercaptoethanol	82
Dithiothreitol	76

정제된 CGTase의 CD 생성반응과 생성비율의 경시변화  
정제된 CGTase의 시간에 따른 CD 생성반응을 검토하기 위해서 5% soluble starch를 포함한 반응액 2ml(50mM 인산완충액, pH 6.0)에 정제효소 0.2ml(5 unit/ml)를 첨가하여 60°C에서 반응시키면서 시간에 따라 생성된 CD를 HPLC로 정량하였다. Fig. 4에 나타낸 것처럼 본 효소는 α-CD와 β-CD를 거의 동량 생산하는 α/β혼합형 CGTase였고, 24시간 반응 후 5%의 soluble starch로부터 총 60%의 CD를 생산하였다. 시간에 따른 각 CD의 생성 비율은 반응초기에는 β-CD의 생성량이 상대적으로 높았으나(50%) 24시간 후에는 α, β, γ-CD 생성비율이 42 : 46 : 12를 나타내어 α-CD의 생성비율이 상대적으로 약간 증가하였다. 이와같은 결과는 황 등<sup>18)</sup>과 Fujiwara 등<sup>14)</sup>이 보고한 *B. stearrowthermophilus*의 CGTase와 유사하였다.

#### 기질 특이성

기질에 대한 반응 특이성을 검토하기 위해서 각종 기질을 5% (w/v) 농도로 하여 pH 6.0, 60°C에서 24시간 반응시킨 후 생성된 CD를 HPLC로 측정하였다. 그 결과 Table 3과 같이 총 CD 전환율은 amylopectin을 기질로 하였을 때 67%로 가장 높았으며 amylose일 때 51%로 가장 낮았다. 이와 같은 결과는 CD 생산 최적 기질로 신 등<sup>3)</sup>의 alkalophilic *B. circulans* CGTase의 경우 sweet potato starch와 corn starch, Akimaru 등<sup>6)</sup>의 *Bacillus coagulans* 유래 CGTase의 potato starch와는 상이하였다. 또한, CD 생성 비율은 amylopectin을 기질로 하였을 때 49 : 43 : 8로 soluble starch(42 : 46 : 12)에 비해 α-CD의 생성비율이 상대적으로 증가하였으며 amylose일 때는 39 : 46 : 15로 γ-CD의 생성비율이 증가하였다. 이상의 결과로 본 효소는 amylopectin과 같이 분지도가 높을수록 CD 전환율이 높고 α-CD를 생산하기 쉬우며, amylose와 같은 직쇄상의 기질에서는 CD 전환율도 낮고 중합도가 큰 β-CD나 γ-CD를 생산하기 쉬운 효소임을 알 수 있었다.

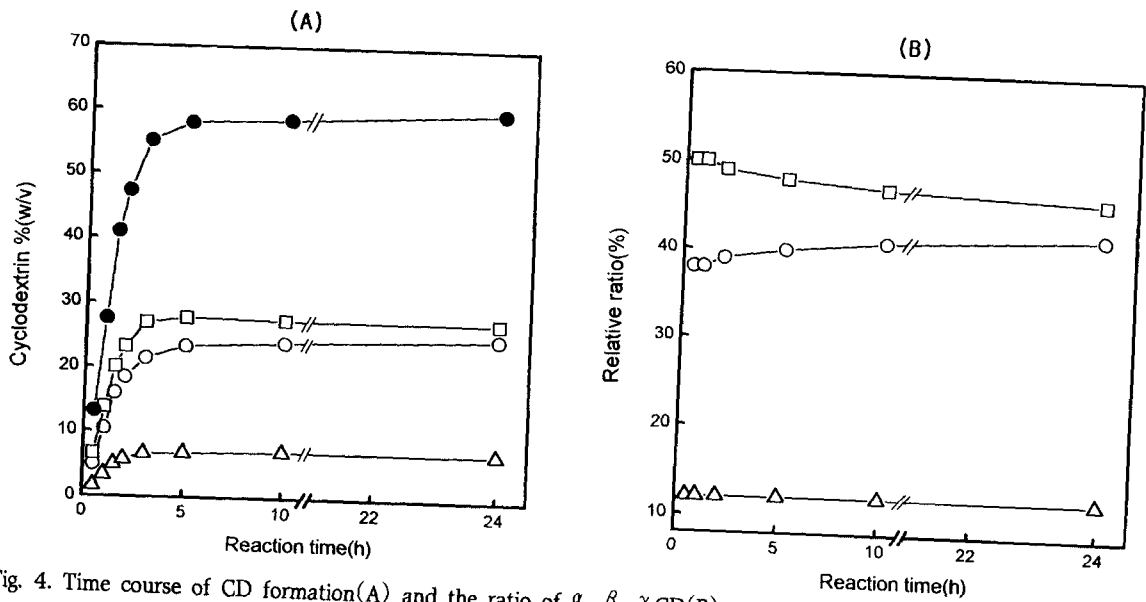


Fig. 4. Time course of CD formation(A) and the ratio of  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -CD(B). 5% soluble starch in 50 mM phosphate buffer(pH 6.0) was reacted with purified CGTase at 60°C. CDs formed were measured by HPLC. Symbols :  $\circ$ ,  $\alpha$ -CD ;  $\square$ ,  $\beta$ -CD ;  $\triangle$ ,  $\gamma$ -CD ;  $\bullet$ , total CD.

Table 3. Production of CDs from various substrates

Substrate	CD formed(%)			
	$\alpha$ -CD	$\beta$ -CD	$\gamma$ -CD	Total CD
Soluble starch	25(42) <sup>1</sup>	27.4(46)	7.1(12)	60
Potato starch	25.5(41)	29.3(47)	7.2(12)	62
Sweet potato starch	26(42)	29(47)	7(11)	62
Corn starch	30(48)	27(43)	6(10)	63
Amylose	20(39)	23.5(46)	7.5(15)	51
Amylopectin	32.5(49)	29(43)	5.5(8)	67

\* ( )<sup>1</sup> ; production ratio of CDs

Each substrates of 5% (w/v) in 50 mM phosphate buffer(pH 6.0) was reacted at 60°C for 24 hr.

### 요 약

CGTase와 CDase를 함께 분비·생산하는 *B. stearothermophilus* KJ16 균주의 CGTase를 ammonium sulfate 침전, DEAE-cellulose, Sephadex G-100 column chromatography, 및 FPLC로 정제하여 SDS-PAGE 상 단일 band를 얻었다. 정제된 CGTase의 분자량은 약 65,000 dalton 이었고 활성 최적 pH와 온도는 6.0와 60°C였다. pH 안정성

은 5.5-8.5의 범위에서 안정하였고, 온도 안정성은 50°C에서 1시간까지 안정하였고, 70°C에서 24시간 전처리하여도 60% 이상의 잔존활성을 나타내었다. 효소 활성은 mercaptoethanol이나 dithiothreitol과 같은 환원제에 의해서 효소 활성이 강하게 저해되었다. 5%의 soluble starch를 기질로 24시간 반응 시켰을 때 CD 생산량은 약 60%였고  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -CD 생성비율이 42 : 46 : 12를 나타내었다. 기질로 amylopectin을 사용하였을 때 CD 전환율은 67%로 가장

높았으며 amylose일 때는 51%로 가장 낮았다.

### 감사의 말씀

이 논문은 1996년도 한국과학재단의 연구비(KOSEF 96-0502-02-01-3)에 의하여 연구되었으며 연구비 지원에 감사드립니다.

### 참 고 문 헌

1. Tilden, E. B. and Hudson, C. S. : The conversion of starch to crystalline dextrin by the action of a new type of amylase separated from cultures of *Aeromonas macerans*. *J. Am. Chem. Soc.*, **61**, 2900(1939).
2. Yagi, Y., Sato, M., and Ishikura, T. : Comparative studies of CGTases from *Bacillus ohbensis*, *Bacillus macerans* and *Bacillus circulans* and production of cyclodextrin using those CGTase. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.*, **33**, 144(1986).
3. 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. Bioeng.*, **17**, 370(1989).
4. Kitahata, S. and Okada, S. : Comparison of action of cyclodextrin glucanotransferase from *B. megaterium*, *B. circulans*, *B. stearothermophilus* and *B. macerans*. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.*, **29**, 13(1982).
5. 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(1990).
6. Akimaru, K., Yagi, T. and Yamamoto, S. : Cyclomalto-dextrin glucanotransferase producing moderate thermophile, *Bacillus coagulans*. *J. Ferment. Bioeng.*, **71**, 63(1991).
7. Do, E. J., Park, J. B. and Lee, Y. H. : Screening of new alkalophilic strain for overproduction of cyclodextrin glucanotransferase. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **21**, 119(1993).
8. Bender, H. : Cyclodextrin glucanotransferase von *K. pneumoniae*. *Arch. Microbiol.*, **111**, 271(1977).
9. Nakamura, N. and Horikoshi, K. : Purification and properties of cyclodextrin glycosyltransferase of an alkalophilic *Bacillus* sp. *Agric. Biol. Chem.*, **40**, 935(1976).
10. 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(1989).
11. 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(1992).
12. 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).
13. 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).
14. Fujiwara, S., Kakiyama, H., Kim, B. W., Leu-jeune, A., Kanemoto, M., Sakaguchi, K. and Imanaka, T. : Cyclization characteristics of cyclodextrin glucanotransferase are conferred by the NH<sub>2</sub>-terminal region of the enzyme. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 4016(1992).
15. Lejeune, A., Sakaguchi, K. and Imanaka, T. : A spectrophotometric assay for the cyclization activity of cyclomaltohexaose glucanotransferase. *Anal. Biochem.*, **181**, 6(1989).
16. 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).
17. Laemmli, U. K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680(1970).
18. Hwang, J. B., Kim, S. H., Lee, T. K. and Yang, H. C. : Production of cyclomalto-dextrin from *Bacillus stearothermophilus*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **18**, 578(1990).