

## 호열성 *Geobacillus thermosacchalyticus*가 생산하는 $\alpha$ -Cyclodextrin Glucanotransferase의 분리정제와 당전이 반응 특성

이미숙<sup>1</sup> · 신현동<sup>2</sup> · 김태권<sup>1</sup> · 이용현<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>경북대학교 자연과학대학 유전공학과, <sup>2</sup>이엔지바이오(주)

**Purification of  $\alpha$ -Cyclodextrin Glucanotransferase Excreted from Thermophilic *Geobacillus thermosacchalyticus* and Characterization of Transglycosylation Reaction of Glucosides.** Lee, Mi-Suk<sup>1</sup>, Hyun-Dong Shin<sup>2</sup>, Tae-Kwon Kim<sup>1</sup>, and Yong-Hyun Lee<sup>1,2\*</sup>. <sup>1</sup>Department of Genetic Engineering, College of Natural Sciences, Kyungpook National University, <sup>2</sup>ENZBio Ltd. Co., Daegu 702-701, Korea –  $\alpha$ -Cyclodextrin glucanotransferase excreted from a newly isolated thermophilic *Geobacillus thermosacchalyticus* was purified through the ultrafiltration, hydrophobic Sepharose CD-4B affinity chromatography, and gel filtration on Sephadex G-75, respectively. The molecular weight of the purified CGTase was 69 kDa and its N-terminal amino acid sequence was determined to be Asn-Leu-Asn-Lys-Val-Asn-Phe-Val-Ser-Asp-Val-Val-Val-Gln-Ile. The optimum pH and temperature were pH 6.0 and 60°C, respectively, and stably at the pH range of 6.0~8.0 and 60°C in the presence of Ca<sup>++</sup>. The excreted CGTase from the thermophilic *G. thermosacchalyticus* was  $\alpha$ -type showing a high coupling activity for the transglycosylation on various glucosides. The coupling reaction was carried out according to the random ternary complex mechanism.

**Key words:** *Geobacillus thermosacchalyticus*,  $\alpha$ -cyclodextrin glucanotransferase, thermophiles, disproportionation reaction, glucosides

Cyclodextrin glucanotransferase(CGTase, EC 2.4.1.19)는 cyclodextrin(CD)를 합성하는 cyclization reaction, 당 분자간 전이시키는 disproportionation reaction, 그리고 CD를 가수분해 시키는 hydrolysis reaction을 촉매하는 기능성 효소로서, 산업적으로 널리 활용되는 효소이다[27,29]. 생산 균주의 대부분은 *Bacillus* sp.로서 *Bacillus macerans*, *B. circulans*, *B. megaterium*, *B. coagulans*, *B. stearotherophilus*, 그리고 *B. licheniformis*과 같은 중성균[19], *Bacillus* sp.[3], *E. brevis*[8], *Bacillus* sp. KC201, *Bacillus* sp. E1, *B. ohbensis* 등 다수의 호알칼리성 균이 보고되었으며, 또한 *Klebsiella pneumonia* M5al 그리고 *Klebsiella oxytoga* [13]와 같은 그람 음성균과 초고온성 균인 *Thermoanaerobacter* sp.[17]도 알려져 있다.

CGTase는 생산 균주의 종류에 따라 분자량이 35,000~88,000 Da 범위이며, 일반적으로 온도는 40~55°C에서, 그리고 pH는 5.5~6.5인 중성 부근에서 높은 활성을 갖는다. 그러나 alkalophilic *Bacillus* sp.[6]나 *B. firmus* var. *alkalophilus* [4] 유래의 pH 10 이상에서도 높은 활성을 가지는 호알칼리성 CGTase가 알려져 있고, *Thermoanaerobacter* sp.[16]와 같은 호열성 미생물이 생산하는 내열성 효소도 보고되고 있다.

CGTase가 촉매하는 disproportionation 반응은 전분, CD, 또는 maltooligosaccharide와 같은 당 공여체 중의 말단 당 분자를 당 수용체인 단당류[28] 또는 이당류, inositol과 같은 당 알콜류, 그리고 stevioside과 같은 각종 배당체[22, 25]에 전이시키는 효소반응이다. 당 분자가 전이된 각종 당전이 생성물은 감미의 향상, 용해성 증가, 장내 유용세균 증식 효과, 화학안정성의 증가 등 기능성이 부가되는 것으로 알려져 있다. 이와 같은 CGTase의 높은 당 전이능이 알려지면서 이를 다양한 기능성 탄수화물소재 및 신규 당류 개발에 활용하려는 연구가 활발히 진행되고 있다. 특히 산업적 활용을 고려할 때 당 전이능이 높고 내열성을 갖춘 CGTase의 확보가 요구되고 있다.

본 연구에서는 토양으로부터 당 전이능이 높고 내열성을 갖춘 CGTase를 분비하는 호열성 세균을 새로이 분리하였다. 분리된 균주의 생리적, 생화학적 특성을 검토하였고 phylogenetic analysis를 통하여 균주를 분류 동정하였다. 분리된 호열성 세균이 생산하는 CGTase를 분리정제 하여 효소적 특성을 규명하였다. 분리 정제된 CGTase가 촉매하는 cyclization과 disproportionation 반응특성을 검토하였으며, 이를 각종 당공여체와 당수용체를 이용한 당전이 반응에 활용하여 기질특이성을 관찰하였다.

\*Corresponding author  
Tel: 82-53-950-5384, Fax: 82-53-959-8314  
E-mail: leeyh@knu.ac.kr

## 재료 및 방법

### 생산 균주

토양으로부터 새로이 분리한 호열성 세균인 *Geobacillus thermosacchalyticus*를 CGTase 생산 균주로 사용하였다. CGTase 생산 배지로는 2% corn starch, 1% corn steep liquor, 0.5% CaCl<sub>2</sub>, 0.5% NaCl, 0.05% FeCl<sub>3</sub>(pH 6.5)를 사용하였으며, 56°C에서 24시간 진탕 배양하였다.

### 균주의 생리 생화학적 특성 및 phylogenetic analysis

균주의 분리동정을 위하여 'Bergey's Manual of Systematic Bacteriology'에 따라 생리적, 생화학적 특성을 조사하였다. 또한 분리한 균주의 genomic DNA를 추출하여 알려진 *E. coli*의 16S ribosomal DNA의 homology를 고려하여 primer를 제작하여 PCR을 수행한 후 16S ribosomal DNA의 염기서열을 결정하였다. 이를 NCBI의 BLAST의 database에서 유사성이 높은 *Bacillus*속 균주를 선별하고, Genebee의 PHYIP(www.gene.mus.su)을 이용하여 계통분류 하였다.

### Cyclodextrin glucanotransferase의 효소활성 측정

CGTase의 활성은 starch 가수분해능을 비교한 Kitahata 등 [9]의 방법에 따라 1%(w/v) 가용성 전분 용액(pH 6.0) 1 ml과 효소액 10 µl을 50°C에서 10분간 반응시킨 후 8 ml의 iodine 용액(0.02% I<sub>2</sub>, 0.2% KI)으로 발색시킨 후 550 nm에서 투광도를 측정하여 결정하였으며, 분당 1%의 투광도를 증가시키는 효소의 양을 1 unit로 하였다.

### CGTase 분리정제

조효소액을 한외여과장치(M.W. 50,000)로 농축하고 10 mM Tris-HCl 완충용액(pH 7.0)으로 5회 투석하였다. 투석된 조효소액을 소수성 Phenyl Sepharose CL-4B(Sigma Chemical Co., U.S.A.) 크로마토그래피로 처리하여 효소를 흡착시키고 1 M Tris-maleic acid-NaOH 완충용액(pH 6.5)으로 세척한 후, 흡착된 효소를 25%(w/v) ethylene glycol로 용출시켰다. 용출된 효소액을 10 mM Tris-HCl 완충용액(pH 7.0)으로 한외여과 하여 농축시킨 후 단백질 양과 효소 활성을 측정하였다. 농축된 용액을 다시 Sephadex-75 column에 흡착시킨 후, 50 mM Tris-maleic acid-NaOH 완충용액(pH 6.5)으로 용출시켜 효소를 분획하였으며, 정제 여부를 native-PAGE로 확인하였다.

### 효소의 정량, 분자량 측정 및 N-terminal amino sequence 결정

효소는 Lowry 방법으로 정량하였고, 분자량은 Laemmli [11]의 방법에 따라 10% Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)를 수행한 후 Coomassie brilliant blue R-250(Sigma Chemical Co., U.S.A.)

용액으로 염색하여 확인하였다.

SDS-PAGE를 수행한 gel 단편을 blotting 완충용액(10 mM CAPS in 10% methanol, pH 11.0)에 침지한 후 Mini Trans-Blot Cell(Bio-Rad laboratories, Inc., U.S.A.)을 사용하여 90V에서 50분 동안 PVDF membrane에 transfer 시켰다. 이를 0.1%(w/v) Coomassie Blue R-250와 50%(w/v) methanol 혼합용액으로 2분간 염색하고, 50%(w/v) methanol과 10%(w/v) acetic acid 혼합용액에서 탈색시켰다. 염색된 단백질 band를 오려내어 N-말단 아미노산 서열 결정에 사용하였다. Edman 분해방법으로 아미노산 단위로 분해시킨 후, Procise LC protein sequence(Applied Biosystems Inc., U.S.A.)를 이용하여 N-말단 아미노산 서열을 분석하였다.

### 온도, pH 및 기질농도의 영향

최적 온도는 CGTase 0.3 units/ml를 1% 전분기질과 혼합하여 30~90°C에서 30분간 반응시킨 후 전분 가수분해 잔존 활성을 측정하여, 열 안정성은 50 mM CaCl<sub>2</sub>를 첨가하여 6시간 반응시킨 후 잔존활성을 측정하여 결정하였다. 최적 pH는 같은 조건에서 50°C에서 반응시킨 후 NaCO<sub>3</sub> 용액으로 pH 8.8로 조절한 후 잔존활성을 측정하였으며, 완충용액으로는 pH 3~pH 5는 100 mM citric acid buffer, pH 5~pH 8는 100 mM phosphate buffer, 그리고 pH 8~pH 10는 100 mM glycine buffer를 이용하였다. pH 안정성은 4°C에서 6시간 반응시켜 결정하였다.

### 당공여체, 당수용체 그리고 당전이 효소반응

당전이 효소반응은 당공여체 50 g/l와 당수용체 50 g/l를 각각 40 mM Tris-Maleic acid-NaOH(pH 6.0) 완충용액에 현탁하고 분리 정제된 CGTase 0.3 units/ml를 첨가하여 50°C에서 200 rpm로 교반하여 반응시킨 후 반응하지 않은 당수용체의 농도를 측정하였다. 당수용체로는 glucose와 같은 단당류, sucrose와 같은 이당류, xylitol과 같은 알콜류, 그리고 stevioside와 같은 배당체류를, 당공여체로는 maltooligosaccharides(G<sub>3</sub>-G<sub>7</sub>, Sigma Chemical Co., U.S.A.), α-, β-, γ-CD(CycloLab, Ltd., Hungary), 가용성 전분, 그리고 dextrin을 사용하였다.

당전이 반응 수율은 반응 전후의 당수용체의 농도를 측정하여 다음과 같이 구하였다.

$$\text{당전이 반응 수율 (\%)} = \left(1 - \frac{\text{반응 후 당수용체의 농도}}{\text{반응 전 당수용체의 농도}}\right) \times 100$$

### 효소 반응상수의 결정

CD를 당공여체로 하는 coupling 반응 상수는 0.05~5 mM γ-CD를 당공여체로, 0.2~5 mM p-nitrophenyl-α-D-glucopyranose (Glc<sub>1</sub>NP)를 당수용체로 하여 CGTase 0.3 units/ml를 첨가하여 50°C에서 10분간 반응시킨 후 미반응 Glc<sub>1</sub>NP의 양을 측

경하여 초기 반응 속도를 결정하였다. 이를 기질 농도별로 double reciprocal plot으로  $K_{m,app}$  값과  $V_{m,app}$  값을 구하였다. CD 합성 cyclization 반응 상수는 1~40 g/l(w/v) 가용성전분에 CGTase 0.3 units/ml를 첨가하여 50°C에서 10분간 반응시켜 생성된  $\alpha$ -,  $\beta$ -, 그리고  $\gamma$ -CD의 양을 HPLC(Gilson Medical Electronics, Inc., France)로 분석하여, 초기 반응속도를 구한 후 같은 방법으로  $K_{m,app}$  값과  $V_{m,app}$  값을 구하였다.

**분석 방법**

각종 당수용체와 CD의 농도는 HPLC를 사용하여 결정하였으며, column은 Cosmosil 5NH<sub>2</sub> packed column(RStech Co., Korea), 용출용매는 acetonitrile과 H<sub>2</sub>O(65 : 35)의 혼합용액, 용출속도는 0.5 ml/min이었고, RI detector와 UV detector로 검정하였다.

**결과 및 고찰**

**고당전이성 CGTase를 생산하는 호열성 세균의 분리 및 동정**

토양에서 새로이 분리한 당 전이능이 높은 호열성 균주는 Fig. 1에서와 같이 크기가 0.8~1.0×2.5~3.3  $\mu$ m의 매우 긴 rod 형 태를 보였다. 고온인 50~65°C에서 높은 성장률을 보였으며, 운동성이 있고, Gram 양성, catalase, dihydroxyacetone에 대해 양성반응, urease에 대해서는 음성반응을 보였다. Casein, gelatin, starch에 대한 분해능, indole과 H<sub>2</sub>S의 형성능, 그리고 glucose, galactose, maltose, mannose, mannitol 등 다양한 당 이용능을 갖고 있었다.

16S ribosomal DNA 염기서열을 분석하여 Genebee의 PHYLIP(www.gene.mu.su) program으로 phylogenetic analysis를 수행한 결과, 분리 균주는 Bacillus 속으로 분류되며, *Saccharococcus thermophilus*(ATCC43125)[20], *Bacillus*

sp. H1, *Geobacillus thermophilus* DSM 6866[24], 그리고 *Bacillus thermoterrestris* TS24A 등과 다소 유사한 DNA 염기서열을 보였으나, 이들 균주들과는 다른 계통경로를 이루었다(data not shown). 이와 같은 형태 및 생리적 특성과 phylogenetic analysis를 근거로, 토양에서 유래되었고, 호열성이며, 또한 전분 이용능이 있는 점을 고려하여 *Bacillus* 속의 속하는 새로운 균주인 *Geobacillus thermosacchalyticus* 로 동정하였다.

**호열성 *G. thermosacchalyticus*를 이용한 CGTase의 생산**

*G. thermosacchalyticus*를 CGTase 생산배지에서 24시간 진탕 배양하면서 배양시간에 따른 균체량, 분비된 protein 총량과 CGTase 효소활성의 변화를 관찰하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 균체량, 분비된 soluble protein량, CGTase 효소활성은 배양 18시간까지 급격히 상승하여 최고 값인 1.2 units/ml에 달하였으며 이후 stationary phase로 접어들었다.

**생산된 CGTase의 분리정제 및 분자량 측정**

상등액 중에 분비된 CGTase를 UF membrane(M.W. 50,000)을 이용한 한외여과, 소수성 Phenyl Sepharose CL-4B을 이용한 affinity 크로마토그래피, 그리고 Sephadex G-75를 이용한 gel filtration 과정을 통하여 분리 정제하였다.

Fig. 3에서와 같이 최종 gel filtration 결과 세 개의 단백질, F-I, F-II, 그리고 F-III로 분획되었으며, CGTase 활성을 확인한 결과, F-II 분획에서만 활성이 확인되었으며 이분획을 native-PAGE로 확인한 결과 단일 밴드로 관찰되었다.

Table 1은 각 분리정제과정에서 얻어진 CGTase의 활성, soluble protein량, 그리고 specific activity를 정리한 결과로 최종적으로 28.2배의 정제도, 12.2%의 수율, 4952.5 units/mg protein의 CGTase를 얻을 수 있었다.

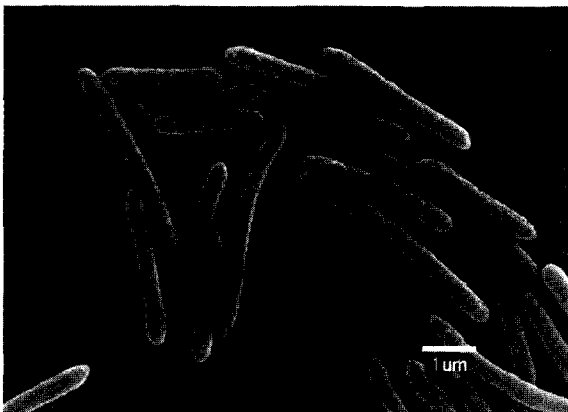


Fig. 1. SEM of a thermophilic strain *G. thermosacchalyticus* ( $\times 10,000$ ). Cultivated in the liquid medium containing 2% corn starch, 1% corn steep liquor, 0.5% CaCl<sub>2</sub>, 0.5% NaCl, 0.05% FeCl<sub>3</sub>, pH 6.5, and 56°C for 24 hr.

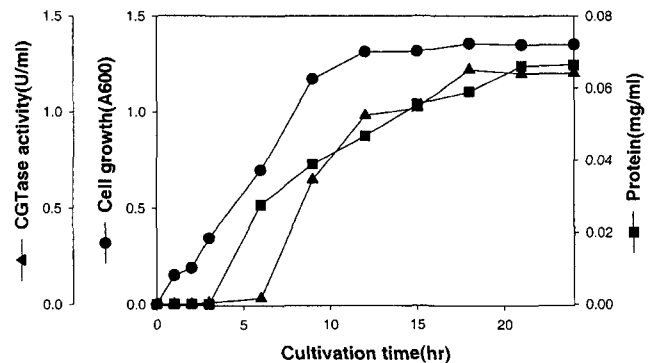
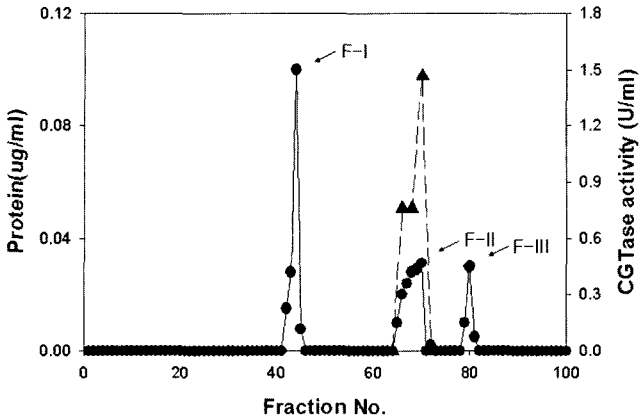
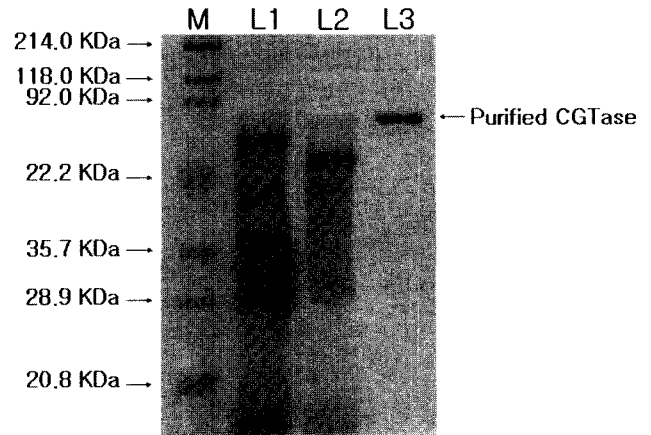


Fig. 2. Changes of cell concentration, CGTase activity and soluble protein during the batch cultivation of a thermophilic *G. thermosacchalyticus*. Cultivated in the optimum medium containing 2%(w/v) corn starch, 1%(w/v) corn steep liquor, 0.5%(w/v) NaCl, 0.5%(w/v) CaCl<sub>2</sub>, 0.025%(w/v) FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O, pH 6.5, and 56°C for 24 hr.



**Fig. 3.** Fractionation of the CGTase from a thermophilic *G. thermosacchalyticus* using Sephadex G-75 gel filtration. 5 ml of condensed CGTase solution treated by the hydrophobic Phenyl Sepharose CL-4B chromatography was loaded in column (2 cm × 150 cm) and eluted by a 50 mM Tris-maleic acid-NaOH buffer (pH 6.5) with the flow rate of 16 ml/hr. Symbol : protein (●), CGTase activity (▲).

분리정제된 CGTase의 분자량을 측정하기 위해서 한외여과 농축액(L1), 소수성 Phenyl Sepharose CL-4B 크로마토그래피 농축액(L2), 그리고 gel filtration으로 얻은 F-II 분획액(L3)을 SDS-PAGE로 전기영동 한 결과는 Fig. 4와 같으며, L3에서 최종적으로 순수 분리된 CGTase를 단일 단백질로 관찰할 수 있었다. Fig. 4에서와 같이 최종 분리된 L3분획액 중의 CGTase의 분자량은 69 kDa으로 측정되었다. 지금까지 보고되고 있는 대부분의 CGTase 분자량은 64,000~



**Fig. 4.** SDS-PAGE of the purified CGTase from a thermophilic *G. thermosacchalyticus*. M: Molecular mass marker (broad range marker, Bio-Rad, U.S.A.); Lane 1: Crude CGTase; Lane 2: After affinity chromatography (Phenyl Sepharose CL-4B, Sigma, U.S.A.); Lane 3: After gel filtration (Sephadex G-75, Sigma, U.S.A.).

75,000 Da사이인 것으로 알려져 있는데, 분리정제된 CGTase도 이들과 유사한 분자량을 보였다.

**분리 정제된 CGTase의 N-terminal amino sequence 분석 및 반응조건 검토**

분리 정제된 CGTase의 N-terminal amino sequence을 Procise LC protein sequence를 이용하여 분석한 결과 amino acid 서열은 Asn-Leu-Asn-Lys-Val-Asn-Phe-Val-

**Table 1.** Purification of the CGTase excreted from a thermophilic *G. thermosacchalyticus*.

Purification step	Total volume (ml)	Total activity (units) <sup>a)</sup>	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Yield (%)	Purification fold
Crude enzyme	1,000	21,072	119.0	176	100.0	1.0
Ultrafiltration	180	7,340	60.0	123	34.8	0.7
Phenyl Sepharose CL-4B	100	3,103	6.8	456	14.7	2.6
Gel Filtration	27	2,575	0.5	4,953	12.2	28.2

Yield\*=(Total activity of purified fraction)×100/(Total activity of culture broth)

<sup>a)</sup> Starch hydrolysis activity.

**Table 2.** Comparison of the N-terminal amino acid sequences of the purified CGTase from a thermophilic *G. thermosacchalyticus*.

Strains	N-Terminal Sequences	References
<i>Geobacillus thermosacchalyticus</i>	N-L-N-K-V-N-F-T-S-N-V-V-Y-Q-I	this work
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> ET1	N-L-N-K-V-N-F-T-S-D-V-V-Y-Q-I	[2]
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> No.2	N-L-N-K-V-N-F-T-S-D-I-V-Y-Q-I	[5]
<i>Panibacillus macerans</i> 1B7	V-D-N-K-V-N-F-S-T-D-V-I-Y-Q-I	[1]
<i>Brevibacillus brevis</i> CD 162	V-T-N-K-V-N-Y-S-K-D-V-I-Y-Q-I	[7]
<i>Bacillus agaradhaerens</i> DSM 9948	R-S-N-S-V-N-Y-S-T-D-G-I-Y-Q-I	[14]
<i>Bacillus clarkii</i> 7364	D-L-S-N-V-N-Y-A-E-E-V-I-Y-H-I	[25]
<i>Bacillus ohbensis</i>	V-T-N-K-V-N-Y-T-R-D-V-I-Y-Q-I	[22]
<i>Bacillus</i> sp. KC201	V-T-N-K-V-N-Y-S-K-D-V-I-Y-Q-I	[10]
<i>Bacillus circulans</i> 251	V-S-N-K-Q-N-F-S-T-D-V-I-Y-Q-I	[18]

Ser-Asp-Val-Val-Val-Gln-Ile이었다. Table 2는 위의 N-terminal amino sequence를 지금까지 보고된 *Bacillus* 속이 생산하는 다른 CGTase들과 비교한 결과이다. 호열성 *G. thermosacchalyticus*가 생산하는 CGTase는 호열성 *G. stearothermophilus* ET1[2]가 생산하는 내열성 CGTase와 53%, 그리고 호열성 *G. stearothermophilus* No.2[5]가 생산하는 내열성 CGTase와 87%의 homology를 보였으며, 호알칼리성 *B. clarkii* 7364[26]와 분자량이 110,000 Da인 고분자 CGTase를 생산하는 *B. agaradhaerens* DSM 9948[14]과는 40%의 다소 낮은 유사성을 보였다.

분리정제된 CGTase의 최적 pH 및 온도, 그리고 안정성을 검토한 결과는 Fig. 5와 같으며 최적 pH는 6이었고, pH 6~8 범위 내에서 높은 안정성을 보인 반면 pH 4이하 및 pH 10 이상에서는 효소가 급격히 실패되었다. 최적반응 온도는 50°C였고 60°C까지 안정적으로 활성을 유지하는 내열성 효

소로 판명되었다.

**호열성 *G. thermosacchalyticus*가 생산하는 내열성 CGTase의 효소반응별 kinetic constant의 평가**

생산된 CGTase의 cyclization과 coupling 반응특성을 규명하기 위하여 반응별  $K_m$  및  $V_{max}$  값을 측정된 결과는 Table 3와 같다.  $\alpha$ -,  $\beta$ -, 그리고  $\gamma$ -CD를 생산하는 cyclization 반응의  $K_m$  값은 51.93 g/l로 고정되는 반면,  $V_{max}$  값은 CD의 종류에 따라 각각 0.250( $\alpha$ -CD mM/min), 0.083( $\beta$ -CD mM/min), 0.033( $\gamma$ -CD mM/min)로서  $\alpha$ -CD가 다른 CD보다 높은 반응속도로 생성되어 *G. thermosacchalyticus*가 생산하는 CGTase는  $\alpha$ -type CGTase로 판명되었다.

당 분자를 전이시키는 coupling 반응의 경우 0.05~5 mM Glc<sub>1</sub>NP를 당공여체로 그리고 0.2~5 mM  $\gamma$ -CD를 당수용체로 하여  $K_m$  및  $V_{max}$  값을 측정하였다. Table 3에서와 같이 당공여체인 Glc<sub>1</sub>NP에 대한  $K_m$  값은 8.08(mM),  $V_{max}$  값은 각각 83.33(mM/min)이었으며, 당수용체인  $\gamma$ -CD에 대한  $K_m$  값은 3.77(mM),  $V_{max}$  값은 66.67(mM/min)으로 각각 평가되었다. 위의 cyclization과 coupling 반응상수들을 비교할 때 coupling 반응의  $V_{max}$  값이 매우 큰 반면  $K_m$  값은 매우 낮아, 본 효소는 cyclization 반응보다는 coupling 반응을 용이하게 촉매 하는 고 당전이성 효소로 판단된다.

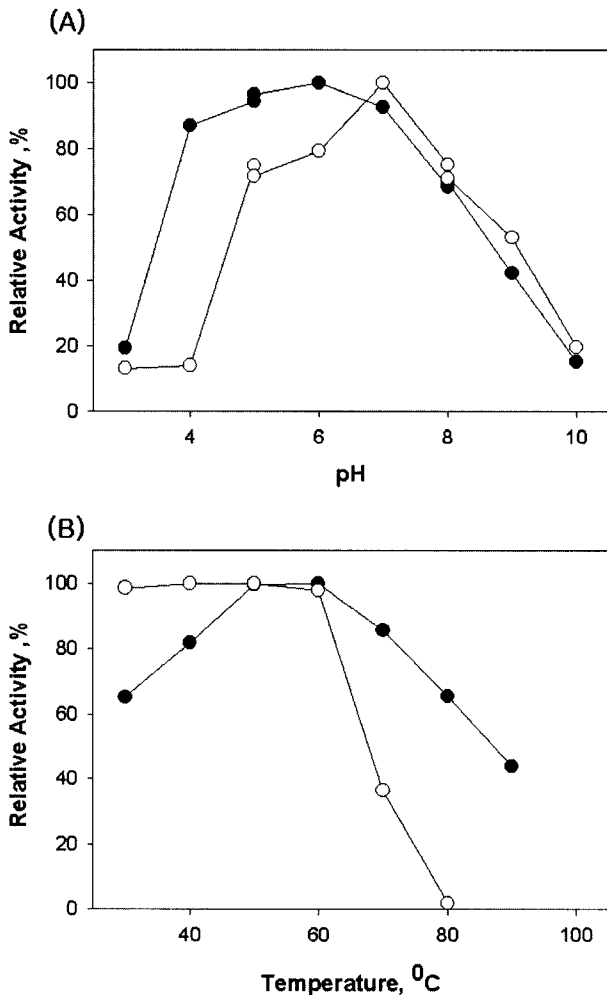
**고 당전이성 CGTase의 당공여체 및 당수용체에 대한 기질 특이성**

고 당전이성 CGTase의 당공여체에 대한 기질 특이성을 검토하기 위하여 당수용체를 maltose로 하고 maltooligosaccharides, cyclodextrin, soluble starch 및 각종 전분을 당공여체로 하여 관찰한 결과는 Table 4와 같다. Cyclodextrin들이 가장 높은 전환 수율을 보였고, 전분류도 비교적 높은 수율을 보였다. Maltooligosaccharides에 대한 전환 수율은 다소 낮은 반면, dextrin은 당공여체로 거의 이용되지 않았다. Cyclodextrin 중에서는  $\gamma$ -CD가 60.4%로서  $\beta$ -, 및  $\alpha$ -CD에 비해 다소 높은 수율을 나타내었으며, maltooligosaccharides

**Table 3. The kinetic constants evaluated from the cyclization and coupling reactions of the purified CGTase from a thermophilic *G. thermosacchalyticus*.**

Reaction	Substrate	$K_m$	$V_{max}$
Cyclization	soluble starch	51.93 g/L	0.250 ( $\alpha$ -CD mM/min)
	"	"	0.083 ( $\beta$ -CD mM/min)
	"	"	0.033 ( $\gamma$ -CD mM/min)
Coupling	$\beta$ -CD (donor)	3.77 mM	66.670 (mM/min)
	Glc <sub>1</sub> NP (acceptor)	8.08 mM	83.330 (mM/min)

The cyclization reaction was carried out at 1~40 g/L soluble starch as a substrate, 0.3 unit/ml CGTase, pH 6.0 and 50°C for 10 min. The coupling reaction was carried out at 0.25 mM of  $\gamma$ -CD as a glycosyl donor, 0.05~5 mM of Glc<sub>1</sub>NP as a glycosyl acceptor, 0.3 unit/ml CGTase, pH 6.0 and 50°C for 10 min.



**Fig. 5. Effects of the temperature and pH on the activity and on stability of CGTase from a thermophilic *G. thermosacchalyticus*.** (A): Effect of pH on CGTase activity after 30 min (●) and stability after 6 hr (○). (B): Effect of temperature on CGTase activity after 30 min (●) and stability after 6 hr (○).

**Table 4. The glycosyl donor specificity of the transglycosylation reaction of the CGTase from a thermophilic *G. thermosacchalyticus*.**

Glycosyl donors	Transglycosylation yield (%)
Maltotriose (G <sub>3</sub> )	26.5
Maltotetraose (G <sub>4</sub> )	33.0
Maltohexaose (G <sub>6</sub> )	35.0
Matoheptaose (G <sub>7</sub> )	37.0
$\alpha$ -Cyclodextrin	57.3
$\beta$ -Cyclodextrin	60.0
$\gamma$ -Cyclodextrin	60.4
Dextrin	11.7
Soluble starch	41.8
Extrusion starch	41.2
Corn starch	40.8
Potato starch	40.1

The coupling reaction was carried out using 50 g/L of each glycosyl donors, 50 g/L of maltose as a glycosyl acceptor, 0.3 units/ml of CGTase, pH 6.0, and 50°C for 24 hr.

N.D. : Not detected.

는 중합도가 높아질수록 증가하는 경향을 보였다. 비록 CD 류가 가장 높은 당전이 수율을 보였으나 경제성 및 물에 대한 용해도 등을 고려할 때, 가용성 전분이 당공여체로 가장 적합하다고 사료된다.

당수용체에 대한 기질특이성을 soluble starch을 당공여체로 하고 각종 단당류, 이당류, 당알콜류, 그리고 배당체를 당수용체로 사용하여 검토한 결과는 Table 5와 같다. 단당류보다는 이당류에서 높은 당전이 수율을 보였으며 maltose의 경

**Table 5. The glycosyl acceptor specificity of the transglycosylation reaction of the CGTase from a thermophilic *G. thermosacchalyticus*.**

Glycosyl acceptors	Transglycosylation yield(%)
Glucose	49
Xylose	23
Galactose	N.D.
Maltose	67
Sucrose	55
Cellobiose	34
Lactose	N.D.
Maltitol	N.D.
Sorbitol	3
Inositol	45
Stevioside	75
Hesperidin	N.D.
Naringin	9
Ascorbic acid	N.D.

The coupling reaction was carried out using 50 g/L of each glycosyl acceptors, 50 g/L of soluble starch as a glycosyl acceptor, 0.3 units/ml of CGTase, pH 6.0, and 50°C for 24 hr.

N.D. : Not detected.

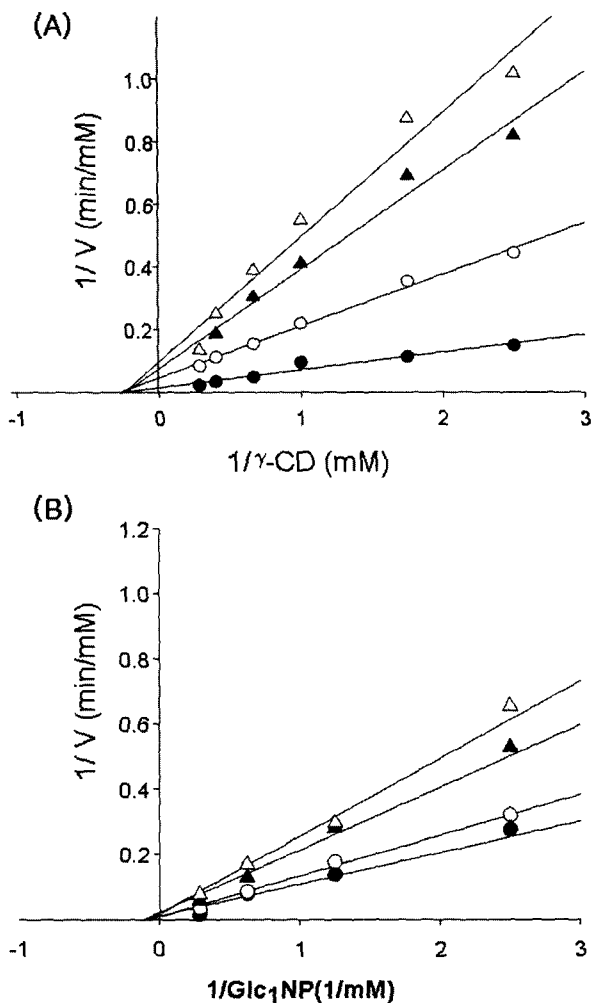
우 67%로서 가장 높았다. Nakamura 등[15]은 CGTase의 당전이 반응에 있어서 glucose보다는 maltose가 당수용체로서 더 높은 친화성과 반응성을 나타낸다고 보고한 바 있는데, 이는 CGTase의 acceptor 결합부위의 구조가 단당류보다는 이당류와 더 높은 친화성을 가지는 형태로 존재하기 때문인 것으로 추측되며, 단당류의 경우 glucose만이 49%로 비교적 높은 당전이를 보였다.

당알콜류에 대한 당전이 수율은 종류에 따라 변화가 심하였으며 inositol이 45%의 다소 높은 수율을 보인 반면 sorbitol과 maltitol은 당수용체로 거의 이용되지 않았다. 각종 배당체에 대한 수율도 종류에 따라 변화가 심하였으며, stevioside가 75%로 가장 높은 전환 수율을 보였고, naringin의 경우 9%였고, hesperidin과 ascorbic acid에서는 전혀 일어나지 않았다. 호열성 *G. thermosacchalyticus*가 생산하는 내열성 고 당전이  $\alpha$ -CGTase는 stevioside에 대해 높은 당전이성을 보여, 최근 대체감미료로 주목받고 있는 당전이 stevioside의 제조에 활용될 수 있으리라 사료된다.

#### *G. thermosacchalyticus*가 생산하는 당전이성 CGTase의 반응기작

당전이 반응기작을 검출이 용이한 p-nitrophenyl-D-glucopyranose(Glc<sub>1</sub>NP)를 당수용체로,  $\gamma$ -CD를 당공여체로 하여 규명하였다. 먼저 미반응 Glc<sub>1</sub>NP의 양을 측정하여 초기 반응속도를 구한 후, 이를 Glc<sub>1</sub>NP와  $\gamma$ -CD의 농도별로 double reciprocal plotting하였다. Fig. 6(A)는 당공여체인  $\gamma$ -CD의 농도를 각각 0.2 mM, 0.5 mM, 1 mM, 그리고 2.5 mM로 고정시키고 Glc<sub>1</sub>NP의 농도를 0.4 mM, 0.8 mM, 1.6 mM, 그리고 5 mM로 변화시킨 결과로서, 1/[ $\gamma$ -CD]축상의 절편값(K<sub>m</sub>)은 동일한 반면 1/V축의 절편값(V<sub>max</sub>)은 다른 값을 보였다.

또한 당공여체인 Glc<sub>1</sub>NP를 농도별로 고정하고  $\gamma$ -CD를 변화시킨 결과는 Fig. 6(B)와 같으며, 1/Glc<sub>1</sub>NP축의 절편값(K<sub>m</sub>)은 동일한 반면 1/[Glc<sub>1</sub>NP]축상의 절편값(V<sub>max</sub>)은 변화하였다. 이와 같은 반응양상은 두 가지의 기질이 무작위로 효소와 결합하여 반응이 진행되는 random ternary complex mechanism으로 해석할 수 있다[21]. 최근 Leemhuis 등[12]이 현재 당전이 효소로 시판되고 있는 *T. thermosulfurigenes* 유래 고 당전이성 산업용 CGTase의 당전이 반응기작을 CD와 methyl- $\alpha$ -glucopyranoside(M $\alpha$ DG<sup>2</sup>)를 이용하여 규명한 결과 두 가지의 기질이 무작위로 효소와 결합하여 반응이 진행되는 random ternary complex mechanism으로 반응함을 보고한 바 있었다. 하지만 상대적으로 당전이 활성이 낮은 *B. macerans* 유래 CGTase의 당전이 반응기작을  $\alpha$ -CD와 Glc<sub>1</sub>NP를 이용하여 규명한 결과는 두 기질이 순차적으로 효소와 결합하여 반응이 진행되는 ordered bi-uni reaction mechanism임을 따르는 것으로 Park 등[18]이 보고한 바 있어 본 연구결과와는 차이가 있음을 알 수 있었다.



**Fig. 6.** The double reciprocal plot of  $1/v$  versus  $1/\gamma\text{-CD}$  at the different  $\text{Glc}_1\text{NP}$  concentration (A) and  $1/v$  versus  $1/\text{Glc}_1\text{NP}$  at the different  $\gamma\text{-CD}$  concentration (B) for the coupling reaction of the CGTase from a thermophilic *G. thermosacchalyticus*. The coupling reaction was carried out using different concentrations of  $\gamma\text{-CD}$  as a glycosyl donors and  $1/\text{Glc}_1\text{NP}$  as a glycosyl acceptor, 0.3 units/ml of CGTase, pH 6.0, and  $50^\circ\text{C}$  for 24 hr. (A)  $\text{Glc}_1\text{NP}$  concentrations were fixed at 0.2 mM (●), 0.4 mM (○), 1.6 mM (▲), and 3.5 mM (△). (B)  $\gamma\text{-CD}$  concentrations were fixed at 0.4 mM (●), 0.8 mM (○), 1.6 mM (▲), and 3.5 mM (△).

**요 약**

토양으로부터 CGTase를 생산하는 새로운 호열성 세균을 분리하였으며, 형태 및 생리적 특성과 16S ribosomal DNA의 염기서열을 분석한 결과 *Geobacillus thermosacchalyticus*로 동정하였다. 호열성 *G. thermosacchalyticus*가 분비하는 CGTase를 한외여과, 소수성 Phenyl Sephadex CL-4B 크로마토그래피, 그리고 gel filtration의 순서로 분리 정제하여 정제도 28.2배, 정제수율 12.2%, 그리고 specific activity가 4952.5 units/mg인 CGTase를 얻을 수 있었다. 정제된 CGTase

의 분자량은 69,000 dalton이었고, N-terminal amino sequence는 Asn-Leu-Asn-Lys-Val-Asn-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Val-Tyr-Gln-Ile이었다. 최적 pH 및 온도는 각각 pH 6와  $50^\circ\text{C}$ 였고, pH 6~8과  $60^\circ\text{C}$ 에서 장기간 보존할 수 있는 중성 pH의 내열성 효소임을 알 수 있었다. 내열성 CGTase의 cyclization과 coupling 반응의 특징을 검토한 결과 *G. thermosacchalyticus*가 생산하는 내열성 효소는  $\alpha$ -type CGTase이었고, cyclization 반응보다는 coupling 반응에 적합한 당전이성이 높은 효소임을 알 수 있었다. 당전이 반응에서 기질 특이성을 검토한 결과 당공여체로는 가용성 전분 그리고 당수용체로는 배당체인 stevioside에 대해 높은 기질 특이성을 보였다. 당전이 반응은 당수용체와 당공여체가 효소와 무작위로 결합하여 진행되는 random ternary complex mechanism으로 반응이 수행되었다.

**감사의 글**

본 연구는 2003년도 중소기업청지원 중소기업기술혁신개발사업비로 수행되었으며, 연구비 지원에 감사드립니다.

**REFERENCES**

1. Bae, K.-M., Y. Kang, and H.-K. Jun. 2001. Production of 2-O- $\alpha$ -D-glucopyranosyl L-ascorbic acid by cyclodextrin glucanotransferase from *Paenibacillus* sp. JB-13. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **29**: 31-36.
2. Chung, H. C., S. H. Yoon, M. J. Lee, M. J. Kim, K. Kwon, I. W. Lee, J. W. Kim, B. H. Oh, H. S. Lee, V. A. Spiridonova, and K. H. Park. 1998. Characterization of a thermostable cyclodextrin glucanotransferase isolated from *Bacillus stearothermophilus* ET1. *J. Agric. Food Chem.* **46**: 952-959.
3. Chung, Y. J., I. S. Kong, Y. S. Kang, and J. H. Yu. 1990. Purification and characterization of cyclodextrin glycosyltransferase from alkalophilic *Bacillus* sp. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **18**: 44-48.
4. Do, E. J., H. D. Shin, C. Kim, and Y. H. Lee. 1993. Selection and characterization of catabolite repression resistant mutant of *Bacillus firmus* var. alkalophilus producing cyclodextrin glucanotransferase. *J. Microbiol. Biotechnol.* **3**: 78-85.
5. Fujiwara, S., H. Kakihara, K. Sakaguchi, and T. Imanaka. 1992. Analysis of mutations in cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus stearothermophilus* which affect cyclization characteristics and thermostability. *J. Bacteriol.* **174**: 7478-7481.
6. Fujita, Y., H. Tsubouchi, Y. Inagi, K. Tomita, A. Ozaki, and K. Nakanishi. 1990. Purification and properties of cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus* sp. AL-6. *J. Ferment. Bioeng.* **70**: 150-154.
7. Kim, M. H., C. B. Sohn, and T. K. Oh. 1998. Cloning and sequencing of a cyclodextrin glucanotransferase gene from

- Brevibacillus brevis* CD 162 and its expression in *Escherichia coli*, *FEMS Microbiol. Lett.* **164**: 411-418.
8. Kim, M. H., C. B. Sohn, Y. H. Lim, and T. K. Oh. 1997. Purification and characterization of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus brevis* CD162. *Agric. Chem. Biotechnol.* **40**: 465-471.
  9. Kitahata, S. and S. Okada. 1976. Studies on cyclodextrin glycosyltransferase?. Enzymatic synthesis of 3-O- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-D-sorbose and 4-O- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-D-xylose using cyclodextrin glycosyltransferase. *J. Biochem.* **79**: 641-648.
  10. Kitamoto, N., T. Kimura, Y. Kito, and K. Ohmiya. 1992. Cloning and sequencing of the gene encoding cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus* sp. KC201. *J. Ferment. Bioeng.* **74**: 345-351.
  11. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
  12. Leemhuis, H., B. W. Dijkstra, and L. Dijkhuizen. 2003. *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* cyclodextrin glycosyltransferase. *Eur. J. Biochem.* **270**: 155-162.
  13. Lee, J. H., K. H. Choi, J. Y. Choi, Y. S. Lee, I. B. Kwon, and J. H. Yu. 1992. Enzymatic production of  $\alpha$ -cyclodextrin with the cyclodextrin glucanotransferase of *Klebsiella oxytoca* 19-1. *Enzyme Microbiol. Technol.* **14**: 1017-1020.
  14. Martins, R. F. and R. H. Kaul. 2002. A new cyclodextrin glucanotransferase from an alkaliphilic *Bacillus agaradhaerens* isolate: purification and characterization. *Enzyme. Microb. Technol.* **30**: 116-124.
  15. Nakamura, A., K. Haga, and K. Yamane. 1994. The transglycosylation reaction of cyclodextrin glucanotransferase is operated by a ping-pong mechanism. *FEBS Letters.* **337**: 66-70.
  16. Norman, B. E., F. Fritsch, and T. Maniatis. 1992. *Thermoanaerobacter* sp. CGTase: Its properties and application. *Denpun Kagaku*, **39**: 101-108.
  17. Norman, B. E. and Jorgensen, S. T. 1992. *Thermoanaerobacter* sp. CGTase : its properties and application. *Denpun Kagaku*, **39**: 101-108.
  18. Park, D. C., T. K. Kim, and Y. H. Lee. 1997. Intermolecular transglycosylation reaction of cyclodextrin glucanotransferase in the heterogeneous enzyme reaction system. pp. 197-200. In Proc. of International Symposium and 1997 Fall Scientific Meeting of KSAM, The Korean Society for Applied Microbiology, Seoul.
  19. Penninga, D., B. Strokopytov, H. J. Rozeboom, C. L. Lawson, B. W. Dijkstra, J. Bergsma, and L. Dijkhuizen. 1995. Site-directed mutation in tyrosine 195 of cyclodextrin glucanotransferase of *Bacillus circulans* strain 251 affect activity and product specificity. *Biochemistry.* **34**: 3368-3376.
  20. Rainey, F. A. and E. Stackebrandt. 1993. Phylogenetic evidence for the relationship of *Saccharococcus thermophilus* to *Bacillus thermoglucosidaisus*, *Bacillus kaustophilus* and *Bacillus sterothermophilus*. *Syst. Appl. Microbiol.* **16**: 414-421.
  21. Segal, I. H. 1975. *Enzyme Kinetics*, pp. 273-344. John Wiley Sons, Inc., New York, U.S.A.
  22. Shibuya, T., Y. Miwa, M. Nakano, T. Yamauchi, H. Chaen, S. Sakai, and M. Kurimoto. 1993. Enzymatic synthesis of novel trisaccharide, glucosyl lactoside. *Biosci. Biotech. Biochem.* **57**: 56-60.
  23. Sin, K. A., A. Nakamura, K. Kobayashi, H. Masaki, and T. Uozumi. 1991. Cloning and sequencing of cyclodextrin glucanotransferase gene from *Bacillus ohbensis* and its expression in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **35**: 600-605.
  24. Studholme, D. J., R. A. Jackson, and D. J. Leak. 1999. Phylogenetic analysis of transformable strains of thermophilic *Bacillus* species. *FEMS Microbiol. Lett.* **172**: 85-90.
  25. Suzuki, Y. and K. Suzuki. 1991. Enzymatic formation of 4G- $\alpha$ -glucopyranosyl-rutin. *Agric. Biol. Chem.* **55**: 181-187.
  26. Takada, M., Y. Nakagawa, and M. Tamamoto. 2003. Biochemical and genetic analysis of a novel  $\alpha$ -cyclodextrin glucanotransferase from an alkaliphilic *Bacillus clarkii* 7364. *J. Biochem.* **133**: 317-324.
  27. van der Veen, B. A., J. C. M. Uitdehaag, B. W. Kijkstra, and L. Dijkhuizen. 2000. Engineering of cyclodextrin glycosyltransferase reaction and product specificity. *Biochim. Biophys. Acta.* **1543**: 336-360.
  28. Vetter, D., W. Thorn, H. Brunner, and W. A. Knig. 1992. Directed enzymatic synthesis of linear and branched glucooligosaccharides using cyclodextrin glucosyltransferase. *Carbohydr. Res.* **223**: 61-69.
  29. Uitdehaag, J. C. M., G. W. M. Alebeek, B. A. Veen, L. Dijkhuizen, and B. W. Dijkstra. 2000. Structures of maltohexaose and maltoheptaose bound at the donor sites of cyclodextrin glycosyltransferase give insight into mechanism of transglycosylation activity and cyclodextrin size specificity. *Biochemistry*, **39**: 7772-7780.

(Received Sep. 26, 2003/Accepted Mar. 5, 2004)