

# 다양한 기질 특이성을 갖는 $\alpha$ -Amylase 계열 Cyclomaltodextrin 분해효소들의 구조와 기능간의 관계 (Relationship between Structure and Function of Cyclomaltodextrinases in Their Multispecificity)

김정완\* · 조희연 · 김영배+ · 박관화\*\*

\*\*서울대학교 식품공학과, \*인천대학교 생물학과, +고려대학교 생명공학원

## 초 록

Cyclomaltodextrinase(CDase, EC 3.2.1.54), maltogenic amylase(EC 3.2.1.133), neopullulanase(EC 3.2.1.135)는 cyclomaltodextrin(CD), pullulan 및 전분을 가수분해하는 효소들이다. 이 효소들은  $\alpha$ -1,4-O-glycosidic 결합에 작용하여 CD와 전분을 말토오스로, pullulan을 panose로 가수분해할 뿐만 아니라 올리고당들을 다양한 당 수용체 분자들의 C-3, C-4, C-6 수산기로 전이시키는 활성도 갖고 있다. 이러한 특성들은 기존의  $\alpha$ -amylase를 비롯한 탄수화물 분해효소들과 뚜렷이 구별되는 것으로 전분 분해효소들의 분류체계에 새로운 기준점을 제시한다고 하겠다. 본 총설에서는 CDase, maltogenic amylase, neopullulanase처럼 pullulan이나 전분보다 CD를 훨씬 더 잘 분해하는 효소들과 *Thermoactinomyces vulgaris* amylase II(TVA II)처럼 CD를 분해하기는 하나 pullulan을 더 잘 분해하는 효소들의 생화학적, 효소적, 구조적 특성들을 종합하여 소개하고자 하였다. 이 효소들은 40~60% 정도로 아미노산 서열이 동일하고, 세포 내에 존재하며, 분자량이 62~90 kDa로  $\alpha$ -amylase보다 다소 크다. 아미노산 서열 비교분석 및 maltogenic amylase와 TVA II 등의 3차구조 분석 결과, 이 효소들은 아미노 말단에 보통  $\alpha$ -amylase에는 존재하지 않는 약 130개 아미노산으로 된 영역을 갖고 있어 이를 매개로 이합체를 형성할 수 있는 것으로 나타났다. 이합체-단위체 평형은 염 농도, 효소 농도, 산도 등에 의해 조절되고 단위체와 이합체 모두 효소활성을 갖고 있으나, 기질 특이성이 다르며 단위체는 전분을, 이합체는 CD를 선호하는데 이는 이합체 형성 시 활성부위의 구조적 변화에 따른 것으로 분석되었다. 본 총설에서는 CD 분해효소들의 다양한 기질 특이성을 올리고며 형성 등의 구조적 특성과 관련하여 논함으로써 관련 효소들의 분류체계를 보다 명확히 할 수 있는 자료를 제공하고자 하였으며, 이러한 효소들의 생리적 기능 및 산업적 이용에 대해 제안하고자 하였다.

## 1. 서 론

전분산업에서 널리 사용되고 있는  $\alpha$ -amylase 계열의 효소군

(glycoside hydrolase family 13)은 전분의  $\alpha$ -1,4- 및  $\alpha$ -1,6-O-glycosidic 결합을 가수분해하는 5개의 전분 가수분해 효소군 중 하나이다. 이 효소군에 속하는 효소들은 대체로 8개의  $\alpha$ -helix와 8개의  $\beta$ -strand가 번갈아 연결된  $(\beta/\alpha)_8$  원통구조를 기본골격으로 갖고 있으며(Fig. 1), 이 기본골격 외의 부위에서 발견되는 다양한 변이에 의해 이들의 기질 특이성이 달라지게 된다(1, 2). Amylase 계열 효소들의 해당 유전자들이 분리되고 그들의 염기서열이 결정되어 그로부터 유추된 아미노산 서열을 비교할 수 있게 되면서 이 효소들의 구조와 기질 특이성을 비롯한 효소 특성간의 관계를 이해하게 되었다(3,4).

기질 특이성에 따라 이 효소군에는 cyclodextrin(CD), pullulan 및 가용성 전분(이하 전분)을 쉽게 분해하는 cyclomaltodextrinase(CDase, EC 3.2.1.54), maltogenic amylase(EC 3.2.1.133)와 neopullulanase(EC 3.2.1.135)가 포함된다. 반면에  $\alpha$ -amylase는 매우 느리게 CD를 가수분해한다는 보고가 일부 있으나 대체로 전분만을 분해하는 것으로 알려져 있다. 특히

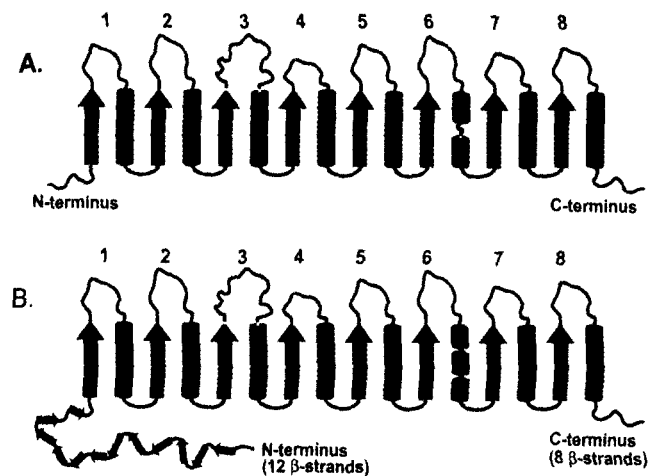


Fig. 1. Diagrams of the secondary structures of  $\alpha$ -amylases (A) and CD/pullulan hydrolyzing enzymes (B) with a core  $(\beta/\alpha)_8$  barrel structure.  $\beta$ -strands were represented in arrows and  $\alpha$ -helices in cylinders.

전분은 CD를 분해하는 효소들에게 그다지 좋은 기질이 아닌 것으로 분석되어, 이러한 점은 새로운 탄수화물 분해 효소군을 결정짓는 특성으로 사용될 수 있다(5). 또한 이들 효소군은 가수분해능 외에도 상당한 당 전이능을 갖고 있다는 점에서 다른 amylase 계열 효소들과 구분되며 이러한 특성 때문에 각종 분지올리고당 생산에 응용된다. 이 효소들의 해당 유전자들은 amylase 계열 효소에서 공통적으로 관찰되는  $(\beta/\alpha)_8$  원통구조를 구성하는 4 곳의 보존부위를 갖고 있으나 그 밖의 부위에는 변이가 많다. CDase, neopullulanase, maltogenic amylase들은 대체로 amylase family 13군에 속하는 다른 효소들과 아미노산 서열이 40~60% 정도 동일하나, 이들과 구분되는 매우 독특한 기질 특이성을 갖고 있다. 특히 이들은 다른 amylase 계열 효소들에서는 관찰되지 않는 약 130개 아미노산의 아미노말단 영역(domain)을 갖고 있는 점에서 뚜렷이 구별된다. 같은 군에 속하는 isoamylase와 pullulanase 같은 분지효소들은 이들과는 다른 아미노말단 영역을 갖고 있고 cyclodextrin glucanotransferase(CGTase; EC 2.4.1.19)와 maltotetrahydrolase(G4-amylase)는 카르복시 말단에 추가로 별도 영역을 갖고 있다.

이러한 효소의 구조와 그 기능간의 관계는 최근 *Thermus*에서 분리된 maltogenic amylase(ThMA)와 *Thermoactinomyces vulgaris* R-47에서 분리된 CD와 pullulan을 분해하는 amylase(TVA II)의 결정구조가 밝혀지면서 보다 자세히 이해할 수 있게 되었다. Kim 등(6)은 이러한 새로운 특성을 갖고 있는 maltogenic amylase의 분자생물학적, 효소적 특성을 요약하고 maltogenic amylase와 neopullulanase처럼 CD와 pullulan을 분해하는 효소들(이하 CD/pullulan 분해효소)에 대한 최근 연구 동향을 소개한 바 있다. Kuriki와 Imanaka(7)는  $\alpha$ -amylase 효소군에 대한 개념을 효소의 구조와 작용기작의 관점에서 정리한 바 있다. 최근 이들 효소에 대한 3차 구조가 밝혀지면서 효소의 구조와 기능과의 관계 및 효소 분류체계를 재고하게 되었다. Jespersen 등(8)은 amylase 계열 효소군 family 13에 속하는 효소들이 매우 넓은 범위의 기질 특이성을 갖고 있기 때문에 새로운 효소의 분류에 매우 신중한 검토가 필요하다고 강조하였다. 이러한 효소들을 분류하는데 있어서의 문제점은 특히 다음과 같이 다양한 특성을 갖고 있는 pullulan 분해효소들의 경우에 많이 제기된다. 이들의 예로는 i)  $\alpha$ -1,6-glycosidic 결합만 분해하는 pullulanase, ii)  $\alpha$ -1,4 및  $\alpha$ -1,6 결합에 작용하는 neopullulanases, iii)  $\alpha$ -1,3,  $\alpha$ -1,4, 및  $\alpha$ -1,6 결합에 작용하는 maltogenic amylase, iv) pullulan보다는 CD에 대해 매우 높은 활성을 보이는 CDase 등을 들 수 있다. Jespersen 등(9)은 아미노산 서열의 유사성에 근거하여 CDase를 amylase 효소군 family 13으로 분류한 바 있다. 최근 유전체 염기서열 분석이 완료되면서 glycoside hydrolase와 유사한 open reading frame들이 많이 보고되고 있어, 아미노산 서열 정보로부터 해당 효소의 기능을 밝혀낼 필요가 증대되고 있다(2).

CD/pullulan 분해효소들은 작용 특성과 아미노산 서열이 비

슷한데도 불구하고 neopullulanase, CDase, 그리고 maltogenic amylase와 같이 다른 이름으로 분류되고 있는 경우가 많다. 따라서 본 총설에서는 위의 효소들을 분류하고 정의하는데 필요한 보다 정확한 자료를 제시하기 위하여 이들의 생화학적 효소특성 및 이들의 생리적 기능, 그리고 분자수준의 구조적 특성을 종합하여 소개하고자 한다.

## 2. CD 분해효소

CD/pullulan 분해효소들은 대부분 기질 특이성과 1차구조가 서로 매우 비슷하나 기질 선호도는 조금씩 다르다. 본 총설의 목적은 CD 분해효소들을 CD에 대한 선호도에 따라 분류할 수 있도록 다양한 자료를 제시하는 데 있다. 이러한 관점에서 CD를 분해하는 효소들은 i) CDase, maltogenic amylase, neopullulanases 등과 같이 pullulan이나 가용성 전분보다 CD를 훨씬 빠르게 분해하는 효소들과 ii) *Thermoactinomyces vulgaris*의 amylase와 같이 CD보다는 pullulan을 더 잘 분해하는 효소로 나눌 수 있다.

### 2-1. Cyclomaltodextrinase(EC 3.2.1.54; CDase)

$\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -CD들은 각각 6~8개의 D-glucopyranosyl 잔기가 환상으로 연결된 화합물이다. 이들은 선형 말토올리고당들 보다 화학적으로 안정하며, CDase, maltogenic amylase, neopullulanase, 그리고 TVA에 의해 쉽게 분해된다. CD 분해효소들의 경우 CD고리의 크기가 효소활성에 큰 영향을 미치기 때문에  $\alpha$ -,  $\beta$ -, 그리고  $\gamma$ -CD에 대해 특이적으로 다른 반응속도를 보인다(10).  $\alpha$ -,  $\beta$ -CD는 침샘에서 분비되는  $\alpha$ -amylase와 일부 포유류의  $\alpha$ -amylase들 외의 보통  $\alpha$ -amylase들에 의해 분해되지 않는다(11). 뱃장에서 분비되는  $\alpha$ -amylase는 CD를 매우 느리게 분해한다고 알려져 있다(12). *Aspergillus oryzae*의 Taka-amylase A(13)와 *Penicillium africanum*(14), *Bacillus polymyxa*(15), *Pseudomonas* 속 세균(16)의 amylase들도 매우 느린 속도로 환형 올리고당을 분해한다고 보고된 바 있다. 이에 반하여 비교적 크기가 큰  $\gamma$ -CD는  $\alpha$ -amylase에 의해 일반적으로 분해된다(12).

CD를 분해하는 CDase는 전분보다 더 빠르게 CD를 분해하며, 이러한 기질 선호도로 인해  $\alpha$ -amylase들과 뚜렷이 구분된다(17). 또한 CDase는 전분을 분해하여 CD를 만들고 CD를 가수분해하기도 하는 CGTase와는 달리 CD 합성은 하지 않는다(18).

*Bacillus macerans*에서 처음으로 CDase가 발견된 이래(19), *B. coagulans*(20), *Clostridium thermohydrosulfuricum*(21), 호알칼리성 *Bacillus* sp.(22), *B. sphaericus* E-244(23, 24), *Bacillus* sp. I-5(25), *Flavobacterium* sp.(4), *B. sphaericus* ATCC7055(26) 등 다양한 세균에서 CDase들이 보고된 바 있다. 이들 대부분은 최적온도가 대체로 45~50°C 근처이고 CD를 주로 말토오스로 분해하며, 분자량이 62~90 kDa 정도로  $\alpha$ -amylase들 보다 크다. *Flavobacterium* sp.과 *B. sphaericus*에서 분리된 CDase는 pullulan을 분해하는 반면, *Xanthomonas campestris*

K-11151의 CDase는  $\alpha$ -amylase와 CD 및 pullulan을 분해하는 효소의 특성을 동시에 갖는 새로운  $\alpha$ -amylase라고 할 수 있다(27). 이 효소는 CD, 전분, pullulan, amylose에 대해 높은 활성을 보이는데 이 중 CD를 가장 잘 분해한다. *Flavobacterium*의 CDase는 선형 maltohexaose, maltoheptaose, maltooctaose를 같은 분자량의 CD보다 더 잘 분해하며 상당히 높은 당 전이 활성도 갖고 있다(5). *Bacillus* sp. I-5의 CDase는 CD, pullulan, 전분 및 pseudotetrascaccharide, 또는 glucosidase의 강력한 억제제인 acarbose를 분해하며, 뚜렷한 당 전이 활성을 보인다(25, 28). 이런 효소들은 다양한 기질에 대해 상대적으로 다른 가수분해 속도를 보여, 대체로 CD, 말토올리고당, 전분, pullulan의 차례로 빠르게 반응한다.

초고온균인 *Thermotoga maritima* MSB8의 유전체 분석결과에 따르면, 탄수화물의 분해는 매우 많은 경로를 통해 일어나는 것으로 나타난다(29). 흥미롭게도 CDase를 지정하는 것으로 분석된 유전자가 CD/pullulan 분해효소들의 특징인 아미노 말단 영역을 갖고있지 않다는 것이었다. Kim 등(30)은 이 유전자를 대장균에서 발현시켜 그 특성을 분석하였는데, 이 재조합 유전자 산물은 CD, 전분, pullulan을 모두 분해하는 효소로, 최고활성 온도는 85°C였다.

## 2-2. Maltogenic amylases

CD와 전분을 주로 말토오스로 분해하고, pullulan을 panose로 분해하는 maltogenic amylase는 *B. licheniformis*(BLMA)에서 처음으로 발견되어 그 유전자가 분리된 바 있다(31). 이외에도 maltogenic amylase는 *B. stearothermophilus*(BSMA), *B. subtilis*(BBMA), 호알칼리성 *Bacillus* sp. 등 그람 양성균에서 유사한 효소 및 해당 유전자들이 분리되었다(32, 33). 이러한 효소들은 i) 세포 내에 존재하고, ii) 전분이나 pullulan 보다는 CD를 기질로 선호하고, iii) 가수분해능 및 당전이능을 모두 갖고 있다는 점에서 보통  $\alpha$ -amylase들과 다르다. Kim 등(34)은 그람 음성균이며 고온균인 *Thermus* 균주에서 최적온도가 55°C 혹은 그 이하인 다른 세균들이 생산하는 maltogenic amylase보다 열안정성이 높은(60°C) maltogenic amylase(ThMA)를 분리하여 그 물리·화학적 특성을 연구한 바 있다. 이 효소들은 분자량이 평균 68 kDa으로 크기가 서로 비슷하였다. Maltogenic amylase들은 CD, pullulan, 전분, acarbose를 분해하고, 그 분해산물을 다양한 당 수용체(acceptor)로 전이시키는 활성을 갖고 있다(35). CD, pullulan, 전분, acarbose에 대한 가수분해 속도 비율은 1200 : 100 : 80 : 50 이었다.

## 2-3. Neopullulanases

Kuriki 등(36)은 1981년에 pullulan을 가수분해하는 효소를 분리하여 neopullulanase(EC 3.2.1.135)라고 명명하였으며, 이 효소가  $\alpha$ -1,4- 및  $\alpha$ -1,6-glycosidic 결합을 분해할 뿐만 아니라 당 전이능을 갖고 있어서  $\alpha$ -1,4- 및  $\alpha$ -1,6-glycosidic 결합을 형

성시킨다고 보고하였다(37). 그들은 이 효소에 의해 pullulan이 전분보다 더 잘 분해된다고 분석하였으나, CD 분해능에 대해서는 언급하지 않았다. 이 효소의 유전자는 588개의 아미노산에 대한 정보를 가지며, 위의 CDase나 maltogenic amylase 효소들의 크기와 비슷하였다. 최근 Cheong 등(38)은 *B. stearothermophilus* IMA6503 균주에서 neopullulanase를 분리하여, neopullulanase도 CD 뿐만 아니라 acarbose도 분해하고, 그 분해산물을 당 수용체에 전이한다는 것을 밝힌 바 있다. 이 효소의 경우 maltogenic amylase와는 달리 기질 선호도가 CD, 전분, pullulan의 순서였다. Igarashi 등(39)이 보고한 호알칼리성 *Bacillus* 균의 neopullulanase는 pullulan을 전분보다 세 배 정도 빨리 가수분해하였고, 해당 유전자는 583개의 아미노산으로 구성된 효소에 대한 정보를 갖고 있었다. *Bacteroides thetaiotaomicron* 95-1이 생산하는 70 kDa 크기의 효소는 pullulan의  $\alpha$ -1,4-glycosidic 결합을 분해하여 panose를 생성시키고(40),  $\beta$ -CD를 분해한다고 보고된 바 있으며, 최근 neopullulanase 유전자가 *B. polymyxa* CECT155에서도 분리되었다(41).

## 2-4. *Thermoactinomyces vulgaris* amylases

Neopullulanase와 비슷하여 pullulan을 panose로 분해하는 2종의  $\alpha$ -amylase가 *Thermoactinomyces vulgaris* R-47에서 발견되어 해당 유전자들이 분리된 바 있다. *T. vulgaris*  $\alpha$ -amylase I(TVA I)과 *T. vulgaris*  $\alpha$ -amylase II(TVA II)는 각각 582개와 585개의 아미노산으로 되어있으며(42-45), TVA II가 전분보다 pullulan에 대해 높은 활성을 보이는데 비하여 TVA I은 전분을 더 잘 분해하였다(44). TVA I과 TVA II는 여러 기질의  $\alpha$ -1,4- 및  $\alpha$ -1,6-glycosidic 결합을 분해하며 비교적 활성이 낮기는 하나 CD를 분해하기도 하였다.

## 2-5. 기타 Pullulan 분해효소

Pullulan은 maltotriose가  $\alpha$ -1,6-glycosidic 결합에 의해 연결된 선형 다당류이다. 이러한 독특한 구조 때문에, pullulan은 amylase 계열 효소들의 특이성을 밝히는데 많이 이용되어왔다. Pullulan을 분해하는 효소들은 다음과 같이 네 종류로 분류할 수 있다(36). 즉, i)  $\beta$ -D-glucose를 비환원성 말단으로부터 잘라내는 glucoamylase, ii) maltotriose가 생성되도록  $\alpha$ -1,6-glycosidic 결합을 분해하는 pullulanase, iii) isopanose(6<sup>1</sup>-O-maltosyl glucose)가 생성되도록 pullulan의  $\alpha$ -1,4-glycosidic 결합 중 하나를 분해하는 isopullulanase, iv) panose(6<sup>2</sup>-O-maltosyl glucose)가 생성되도록 다른  $\alpha$ -1,4-glycosidic 결합을 분해하는 neopullulanase 등이다. Isopullulanase는 전분을 분해할 수 없고, neopullulanase는 전분에 대한 활성이 비교적 낮다. 이들 외에도 세균이 생산하는 maltogenic amylase(31-34), TVA II(44, 45), 및 *B. sphaericus*(26), *Bacillus* sp. I-5(25), *Flavobacterium* sp.(5) 등이 생산하는 CDase는 neopullulanase처럼 pullulan을 가수분해하여 panose를 생성시키는 효소들이다.

### 3. 기질 특이성과 작용기작

CD/pullulan 분해효소들은 CD, pullulan 및 전분에 대한 폭넓은 기질 특이성 때문에 일반적인  $\alpha$ -amylase들과 구별된다. 이 효소들은  $\alpha$ -1,4- 및  $\alpha$ -1,6-glycosidic 결합을 분해하며 말토오스나 panose 등 분해산물을 다양한 당 수용체에 전이시켜 일련의 분지올리고당을 생성시키는 활성을 갖고 있다. Maltogenic amylase, CDase, neopullulanase 및 기타 관련효소의 특성은 Table 1에 보인 바와 같이 다양한 세균들에 의해 생산되는 효소들이 작용하는 결합 종류나 기질의 종류 등이 서로 비슷하다는 것을 알 수 있다. 최근 Park 등(34, 35)은 ThMA가  $\alpha$ -amylase의 억제

제인 acarbose를 가수분해하고 그 분해산물을 수용체 역할을 하는 다른 당 분자에  $\alpha$ -1,3-,  $\alpha$ -1,4-, 혹은  $\alpha$ -1,6-glycosidic 결합을 형성하도록 전이시킨다는 것을 밝힌 바 있다(Fig. 2). Neopullulanase는 동일한 활성부위에서  $\alpha$ -1,4- 및  $\alpha$ -1,6-glycosidic 결합을 분해하거나 형성시키는 것으로 분석되었다(55). 최근 Cheong 등(38)은 neopullulanase가 말토오스를 포도당으로 분해하고, 생성된 포도당을 다른 당 수용체로 전이시키는 것을 관찰한 바 있다. 또한 말토오스의 농도가 높을 경우에는 neopullulanase에 의해 축합반응이 일어나는 것도 관찰되었다. *Flavobacterium* sp.의 CDase는 pullulan에 작용해서 상당히 많

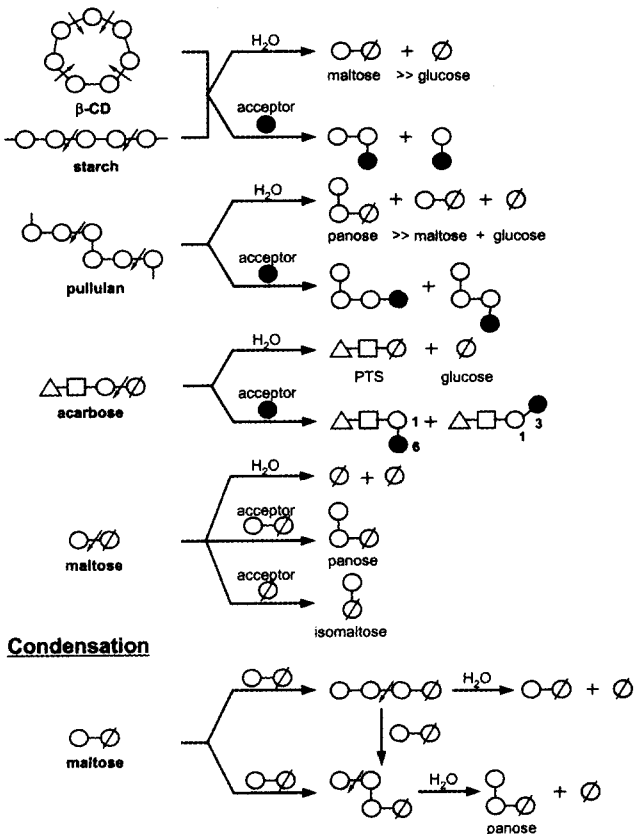
**Table 1.** Characteristics of CD/pullulan hydrolyzing enzymes.

Enzymes	Origin	Molecular mass (Da, monomer)	Optimum		Substrate specificity	Bonds cleaved	Transferring activity (bonds formed)	Reference
			Temp.(°C)	pH				
CDase	<i>B. sphaericus</i> ATCC7055	91,200-95,000	40	6.0-6.5	CD>>MD>SS>PL	$\alpha$ -1,4	N.D.	[26]
	<i>B. sphaericus</i> E-244	72,000	25	8.0	CD>MD>>PL $\cong$ SS	$\alpha$ -1,4	N.D.	[23,24,93]
	<i>B. stearothermophilus</i> K-12481	67,000	60	6.5	MD $\cong$ CD>>SS=PL	$\alpha$ -1,4	N.D.	[46]
	<i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i> 39E	66,000	65	5.9	CD>MD>>PL=SS	$\alpha$ -1,4	N.D.	[21,47]
	<i>Alkalophilic Bacillus</i> sp.	67,000	50	6.0	MD $\geq$ CD	$\alpha$ -1,4	N.D.	[22]
	<i>B. coagulans</i>	62,000	50	6.2	CD>MD>>SS	$\alpha$ -1,4, $\alpha$ -1,6	N.D.	[20]
	<i>Flavobacterium</i> sp.	62,000	N.D.	6.0-7.5	MD $\geq$ CD>>SS>PL	$\alpha$ -1,4>> $\alpha$ -1,6	$\alpha$ -1,4, $\alpha$ -1,6	[5]
	<i>Bacteroides ovatus</i> <sup>a)</sup>	N.D.	42	7.0	CD	N.D.	N.D.	[48]
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	69,000	N.D.	N.D.	CD	N.D.	N.D.	[49]
	<i>Alkalophilic Bacillus</i> I-5	65,000	45	6.5	CD>>SS>>PL	$\alpha$ -1,4>> $\alpha$ -1,6	$\alpha$ -1,3, $\alpha$ -1,4, $\alpha$ -1,6	[25]
	<i>Xanthomonas campestris</i> K-11151	55,000	55	4.5	CD $\cong$ SS $\cong$ PL	$\alpha$ -1,4	N.D.	[27]
<i>Escherichia coli</i>	66,000	N.D.	N.D.	MD=CD	N.D.	N.D.	[50]	
<i>Thermotoga maritima</i>	55,000	85	6.5	MD>>CD>>SS	$\alpha$ -1,4	N.D.	[29,30]	
Maltogenic Amylase	<i>B. licheniformis</i>	64,000	50	6.8	CD=MD>>PL $\geq$ SS	$\alpha$ -1,4>> $\alpha$ -1,6	$\alpha$ -1,4, $\alpha$ -1,6	[31]
	<i>B. stearothermophilus</i> ET1	68,000	55	6.0	CD=MD>>PL $\geq$ SS	$\alpha$ -1,4 >> $\alpha$ -1,3>> $\alpha$ -1,6	$\alpha$ -1,3, $\alpha$ -1,4, $\alpha$ -1,6	[32]
	<i>Thermus</i> sp. IM6501	68,000	60	6.0	CD=MD>>PL $\geq$ SS	$\alpha$ -1,4>> $\alpha$ -1,3>> $\alpha$ -1,6	$\alpha$ -1,3, $\alpha$ -1,4, $\alpha$ -1,6	[34]
	<i>Bacillus subtilis</i> SUH 4-2	68,000	40	6.0	CD=MD>>SS $\geq$ PL	$\alpha$ -1,4>> $\alpha$ -1,6	$\alpha$ -1,3, $\alpha$ -1,4, $\alpha$ -1,6	[33]
TVA II	<i>T. vulgaris</i> R-47	69,000	40	5.5-6.0	PL>SS>>CD	$\alpha$ -1,4>> $\alpha$ -1,6	$\alpha$ -1,4, $\alpha$ -1,6	[43]
TVA I	<i>T. vulgaris</i> R-47	72,000	40	6.0	SS>>PL= $\gamma$ -CD>>CD	$\alpha$ -1,4>> $\alpha$ -1,6	N.D.	[43]
Neopullulanase	<i>B. stearothermophilus</i>	62,000	60	6.0	PL>>SS	$\alpha$ -1,4>> $\alpha$ -1,6	$\alpha$ -1,4, $\alpha$ -1,6	[36,37]
	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> 95-1	70,000	N.D.	N.D.	PL>>CD	$\alpha$ -1,4	N.D.	[43,51]
	<i>K. pneumoniae</i>	66,000	N.D.	N.D.	SS, PL, CD	N.D.	N.D.	[52]
	<i>Alkalophilic Bacillus</i> sp. KSM-1876	68,600	40	7.5	PL>SS	N.D.	N.D.	[39]
	<i>Bacillus polymyxa</i>	58,000	N.D.	N.D.	SS>PL	$\alpha$ -1,4	N.D.	[41]
Amylase (BMA)	<i>B. megaterium</i>	55,000	75	5.5	SS=PL=CD	$\alpha$ -1,4	$\alpha$ -1,4	[53]
Amylopullulanase	<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i>	150,000	65	5.0-5.5	SS $\cong$ PL	N.D.	N.D.	[54]

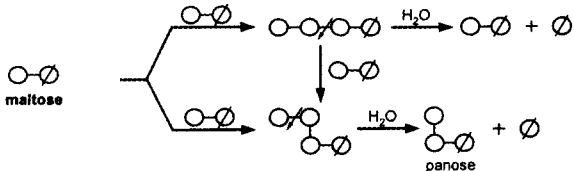
CD = cyclodextrin, referring to the  $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\gamma$ -CD; MD = maltodextrin; SS = soluble starch; PL = pullulan; N.D. = no data.

<sup>a)</sup>crude extract was used.

**Hydrolysis and Transglycosylation**



**Condensation**

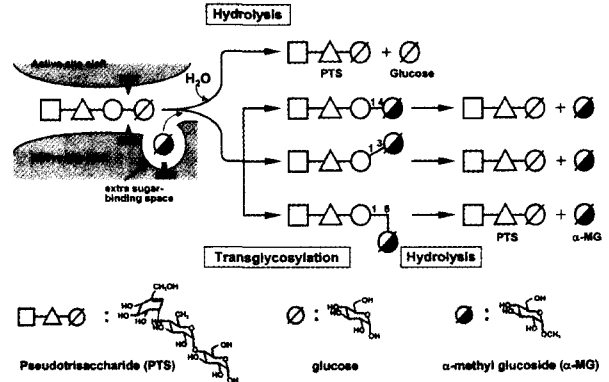


**Fig. 2.** A proposed action mode of CD/pullulan hydrolyzing enzymes.  $\circ$  denotes non-reducing glucopyranosyl residue;  $\phi$ , reducing glucose residues;  $\Delta$ - $\square$ , O-4,6- dideoxy-4-[[4,5,6-trihydroxy-3(hydroxymethyl)-2-cyclohexen-1-yl]amino]- $\alpha$ -D-glucopyranosyl moiety from acarbose. Horizontal lines and vertical lines connecting sugar symbols denote  $\alpha$ -1,4 and  $\alpha$ -1,6 linkages, respectively.

은 양의 분지 4당류(branched tetrasaccharides)를 생성시키는 것으로 보고되었다(56).

BSMA의 전분 가수분해 및 당 전이 동시반응은 산업적으로 액화전분에서 분지올리고당을 생산하는 공정에 효과적으로 이용되고 있으며(57-61), 매우 다양한 올리고당들이 시험관에서 효소의 당 전이 반응으로 합성된 바 있다. Park 등(35)과 Kim 등(62)은 BSMA나 ThMA로 acarbose를 분해하여 그 산물을 여러 종류의 당 수용체에 전이시키면 특이성이 높은 탄수화물 분해효소 억제제가 생성됨을 보고하였다(Fig. 3). Maltogenic amylase는 acarbose의 첫 번째 glycosidic 결합에 작용하여 포도당과 pseudotrisaccharide(PTS)로 분해시키고 PTS를 다시 포도당 분자의 C-6에 전이시켜 isoacarbose를 생성시켰다. 이와 같은 방법으로 다른 수용체에 대해 당 전이반응을 일으켜 더욱 amylase 억제능이 큰 반응산물을 얻을 수 있었다(62).

CD와 pullulan을 분해하는 효소의 가수분해 및 당 전이 반응은  $\alpha$ -amylase, CGTase, debranching 효소들과 마찬가지로 이중대체반응(double-displacement reaction)(63-65)에 의해 일



**Fig. 3.** Hydrolysis and transglycosylation of acarbose at the active site cleft of ThMA with water or  $\alpha$ -methyl glucoside ( $\alpha$ -MG) as an acceptor. Acarbose is hydrolyzed to PTS and glucose with water as an acceptor, while turned into acarbose transfer products with  $\alpha$ -MG.

어난다. 이러한 반응에는 세 개의 카르복시 잔기가 연관되어 있다고 알려진 바 있다(66, 67). Taka-amylase A(TAA)의 아미노산 서열과 비교해 보면, *B. stearotherophilus* neopullulanase의 Asp328은 TAA의 Asp206에 해당되고, Glu357은 TAA의 Glu230, 그리고 Asp424는 TAA의 Asp297에 해당되는 활성부위로 나타났다(55).

3차구조 분석결과를 토대로 Kamitori 등(67)은 TVA II의 Asp325, Glu354 및 Asp421 등의 활성부위로서의 역할을 설명하였다. Kim 등(64)은 ThMA에  $\beta$ -CD가 결합된 구조를 분석하여 활성부위의 기능을 제시하였다. Asp328(TAA의 Asp206)은 활성 친핵이고 Glu357(TAA의 Glu230)은 활성 산염기로 작용한다. Asp424(TAA의 Asp297)는 활성 산염기의 양성자화를 유지하고 기질결합 C-1 부위의 포도당 고리를 뒤틀거나 친핵성 공격에 관여한다. 이러한 가정은 기질이나 반응 중간산물이 공유 결합된 CGTase 복합체의 X-ray 구조분석 결과에 의해 뒷받침된 바 있다(65).

ThMA의 활성부위가 이루는 깊은 골 아랫부분은 한 단위체의 아미노말단 영역과 다른 단위체의  $(\beta/\alpha)_8$  원통구조가 접해있어 별도의 공간을 이루는 것으로 분석되었다(64). 이 공간(extra sugar-binding space)은 이당류(disaccharide)를 수용할 수 있으며, 이 공간에 위치하는 이당류나 단당류(monosaccharide)는 물분자와 경쟁하여 기질 중간체를 공격하는 수용체로 작용한다. 이미 알려진 바와 같이, 위에서 제시된 수용체와 수소결합을 이룰 수 있는 거리에 있는 Glu332가 CDase, maltogenic amylase, 그리고 neopullulanase 등의 효소에서는 모두 보존되어 있으나 glycoside hydrolase family 13의 다른 효소들에서는 보존되어 있지 않다(Table 2). 따라서 Glu332는 올리고당 수용체와 결합하는 역할을 하는 것으로 사료되며(Fig. 3), BSMA의 Glu332를 His로 치환시켰을 때 당 전이 활성이 50%정도 감소한 결과에 의해 뒷받침되었다(32). Neopullulanase의 활성부위에 위치하는 Glu과 Asp를 각각 His과 Glu로 치환했을 때  $\alpha$ -

**Table 2.** Comparison of amino acid residues in the conserved regions of CD hydrolyzing and related amyloytic enzymes.

Enzymes	Conserved regions								reference
	I		II		III		IV		
Maltogenic amylase									
<i>Thermus</i> strain IM6501(ThMA)	242	DAVFNH <sup>○</sup>	324	GWRLDVANE <sup>○ ○○</sup>	357	EIWH <sup>●</sup>	419	LLGSHD <sup>○○</sup>	[34]
<i>B. stearothermophilus</i> (BSMA)	242	DAVFNH	324	GWRLDVANE	357	EIWH	419	LLGSHD	[32]
<i>B. licheniformis</i> (BLMA)	245	DAVFNH	324	GWRLDVANE	357	EIWH	419	LLGSHD	[31]
<i>B. subtilis</i> (BBMA)	245	DAVFNH	324	GWRLDVANE	357	EIWH	419	LLGSHD	[33]
Neopullulanase									
<i>B. stearothermophilus</i>	242	DAVFNH	324	GWRLDVANE	357	EIWH	419	LLGSHD	[38]
<i>Bacillus</i> sp. KSM-1876	241	DAVFNH	323	GWRLDVANE	356	EIWH	418	LLGSHD	[39]
Neopullulanase-type $\alpha$ -amylase									
<i>T. vulgaris</i> (TVA I)	262	DAVFNH	352	GWRLDVANE	396	EIWH	467	LLGSHD	[43]
<i>T. vulgaris</i> (TVA II)	239	DAVFNH	321	GWRLDVANE	354	EIWH	416	LLGSHD	[43]
CDase									
<i>Bacillus</i> sp. I-5	238	DAVFNH	321	GWRLDVANE	354	EIWH	416	LLGSHD	[25]
<i>B. sphaericus</i>	240	DAVFNH	323	GWRLDVANE	356	EIWH	416	LLGSHD	[24]
<i>C. thermohydrosulfuricum</i>	238	DAVFNH	321	GWRLDVANE	354	EIWH	416	LLGSHD	[68]
$\alpha$ -amylase									
<i>A. oryzae</i>	117	DAVFNH	202	GLRIDTVKH	230	EVLD	292	FVENHD	[110]
CGTase									
<i>K. pneumoniae</i>	130	DAVFNH	219	GLRIDTVKH	257	EVLD	328	FVENHD	[110]

●: catalytic site, ○: substrate binding site

1,4- 와  $\alpha$ -1,6-glycosidic 결합을 가수분해하는 활성이 모두 사라졌다. 이 효소의 기질결합 부위에 있는 아미노산들을 치환시키면(His247Glu, His423Glu, Glu332His)  $\alpha$ -1,4- 및  $\alpha$ -1,6-glycosidic 결합에 대한 선호도가 변화되어(54) 다른 올리고당이 생성되는 양상을 나타냈다. 세 번째와 네 번째 보존부위의 아미노산을 치환시켜 이 부위의 소수성을 증가시키면(Asn381Leu, Gly382Ala, Thr383Val) wild type 보다  $\beta$ -CD에 대한 친화성이 1.5-4배정도 증가하였다(32).

*Thermoanaerobacter ethanolicus* 39E CDase의 활성부위를 이루는 Asp325, Glu354 및 Asp421를 각각 치환시키면 이 효소는 완전히 불활성되어 이들 잔기가 효소활성에 중요하다는 것이 입증되었다(47). CDase I-5(25)의 세 번째와 네 번째 보존부위 사이에 위치하는 Val380과 Ile388을 각각 Thr과 Glu으로 치환시켜 소수성을 감소시키면 CD 분해능이 감소되고 전분 분해능이 증가되었다.  $\alpha$ -amylase 효소군의 다른 효소들에 대한 단백질 공학적 연구는 Svensson(1)에 의해 자세히 소개된 바 있다.

#### 4. CDase의 구조

##### 4-1. 1차 및 2차 구조

전분 분해효소군(family 13) 및 관련효소의 아미노산 서열을 비교하면 대체로 4곳의 보존부위가 나타난다. CDase, malto-

genic amylase, neopullulanase(Table 2)를 TAA에 대하여 비교하면 Asp328, Glu357와 Asp424(ThMA 서열기준) 등이 활성부위를 이루도록 보존되어 있는 것을 알 수 있다. 이 효소들의 아미노 말단에 있는 약 130개 아미노산 잔기와 카르복시 말단의 약 30개 정도의 아미노산 잔기에 해당되는 부위가 TAA에는 존재하지 않는다. CD/pullulan 분해효소들에는 이렇게 잘 알려진 보존부위 외에도 ( $\beta$ )<sub>8</sub> 원통형의 기본골격이 시작되는 곳과 첫 번째 보존부위 사이에 두 곳이 잘 보존되어 있다. 또한 세 번째와 네 번째 보존부위 사이에도 또 다른 보존부위가 있으며 이 곳은 CD가 결합하는 부위인 것으로 제안된 바 있다(25,68). CD 분해효소들의 2차구조는 대체로 아미노산 서열로부터 예측된 구조와 잘 일치하나, 결정구조 분석결과에 따르면 5 번째와 7 번째  $\alpha$ -helix 사이의 2차구조에 변이가 있고 family 13에 속하는 다른 효소들과 달리  $\alpha$ -helix가 하나 더 존재하였다. 바로 이것이 CD 분해효소의 활성부위 구조를 보완해서 이 효소들로 하여금 독특한 기질 특이성을 갖게 하는 것으로 사료되었다.

CD 분해효소들은 예측된 아미노산 서열수준에서 비교하면 서로 40~60% 정도 동일한데 이는 family 13 효소군의 다른 효소들에 비하면 월등히 높은 수치이다(Table 3). CDase 그룹은 41.4%, maltogenic amylase 그룹은 56.8%, neopullulanase 그룹은 33.6%가 서로 동일한데 이는 이들 효소군들을 비교한 값

**Table 3.** Protein sequence identity among CD/pullulan hydrolyzing enzymes.

Enzyme	MA2	MA3	MA4	MA5	TVAII	CD1	CD2	CD3	CD4	CD5	CD6	CD7	NPL1	NPL2	NPL3	NPL4	NPL5
MA1	70	53	53	58	48	54	59	52	49	47	45	33	86	57	37	30	31
MA2		50	53	59	47	54	63	51	48	47	42	32	69	61	35	29	30
MA3			76	48	45	45	49	45	45	46	40	33	52	48	33	28	30
MA4				48	43	46	49	45	44	46	40	33	52	48	34	28	30
MA5					44	51	53	50	46	44	40	33	58	58	35	29	30
TVAII						48	46	47	49	43	45	35	48	44	37	30	30
CD1							51	57	48	44	41	34	53	51	37	28	29
CD2								50	45	47	40	32	59	59	35	28	31
CD3									44	44	41	33	51	50	35	30	31
CD4										43	39	33	50	48	36	29	31
CD5											39	31	47	46	33	28	31
CD6												34	45	40	37	30	29
CD7													33	32	32	32	27
NPL1														58	37	30	30
NPL2															34	29	30
NPL3																31	29
NPL4																	28

MA1 represents maltogenic amylase from *Thermus* sp.[34]; MA2, *B. stearothermophilus* [32]; MA3, *B. licheniformis* [31]; MA4, *B. subtilis* [33]; MA5, *B. acidopullulyticus* [109]; TVAII, amylase from *Thermoactinomyces vulgaris* [44]; CD1, cyclomaltodextrinase (CDase) from alkalophilic *Bacillus* I-5 [25]; CD2, alkalophilic *Bacillus* [22]; CD3, *B. sphaericus* [24]; CD4, *Thermoanaerobacter ethanolicus* [21]; CD5, *Klebsiella oxytoca* [49,109]; CD6, *Alicyclobacillus acidocaldarius* [109]; NPL1, neopullulanase from *B. stearothermophilus* [37]; NPL2, alkalophilic *Bacillus* [39]; TAA, Taka-amylase from *Aspergillus oryzae* [110]; CD7, *Thermotoga maritima* [29,30]; NPL3, neopullulanase from *Synechocystis* sp. [69]; NPL4, *Bacillus polymyxa* [41]; NPL5, *Bacteroides thetaiotaomicron* [51]. The pairwise sequence comparison was made by amino acid maximum homology of PROSIS (Hitachi, Japan). The similarity was evaluated for segments corresponding in length. In the box the average of similarity within and inter-subgroups are compared. \*: the subgroup of TVA II was single-membered, no comparison was made.

과 크게 다르지 않다. 즉, maltogenic amylase와 CDase는 45.7%, maltogenic amylase와 neopullulanase는 42.3%, CDase와 neopullulanase는 37.8% 정도가 동일하다. 따라서, CDase, maltogenic amylase, neopullulanase로 효소들을 분류할 때에는 이들의 아미노산 서열 유사성이 반영되지 않았음을 알 수 있다.

#### 4-2. 3차구조

Glycoside hydrolase 효소군 family 13에서 최초로 3차구조가 결정된 것은 TAA이다(66). 뒤이어 여러 endo- 혹은 exo-amylase들과 당전이 효소들의 3차구조가 결정되어(70-85), 이들이 공통적인  $(\beta/\alpha)_8$  원통구조를 갖고 있으며  $\beta$ -strand의 카르복시 말단에 활성부위가 위치한다는 것이 밝혀졌다(Fig. 1). 아미노산 염기서열을 비교하여 배열하므로써 CD 분해효소의 3차구조도 다른  $\alpha$ -amylase와 비슷하다는 것을 알 수 있었다. 그러나 ThMA와 TVA II의 3차구조를 분석한 결과(64,67) 이들이 갖고 있는 독특한 약 130 개의 아미노산으로 된 아미노 말단 영역이 이 효소가 기타 amylase들과 다른 기질 특이성을 갖도록 활성부위를 어떻게 보완하는 지를 이해할 수 있게 되었다. ThMA는  $\beta$ -strand로 된 1~124의 아미노 말단 영역, 중심에 위치하는  $(\beta/\alpha)_8$  영역, 그리고 8개의  $\beta$ -strand로 된 카르복시 말단 영역(505~588) 등 세 부위로 이루어져 있다(Fig. 1). ThMA와 TAA의 3차구조를 겹쳐보면 가운데  $(\beta/\alpha)_8$  영역과 카르복시 말

단 영역은 일치하나, TAA에는 ThMA가 갖고 있는 아미노 말단 영역이 없는 것을 알 수 있다.

TVA II와 ThMA는 전체적으로 아미노산 서열이 48% 동일하고, 3차구조 면에서도 거의 동일한 구조를 갖고 있다. TVA II의 활성부위는  $\alpha$ -amylase의 활성부위보다 더 넓고 깊은 골을 이룬다(길이 12 Å, 폭 12 Å, 깊이 14 Å)(67). ThMA 결정구조 결과에 의해 Kim 등(64)은 이 효소가 액체 상에서 homodimer(동일이합체)를 이룰 수 있으며, 한 단위체의 아미노 말단 영역이 다른 단위체의  $(\beta/\alpha)_8$  원통구조 윗부분을 부분적으로 덮고 있는 것으로 설명하였다. 그 결과  $\alpha$ -amylase와는 달리 두 단위체 사이  $(\beta/\alpha)_8$  원통구조 위쪽으로 좁고 깊은 골이 형성되는 것이다. 따라서 이러한 구조는 분자의 폭이 좁은 CD(<7.9 Å)나 pullulan(>7.9 Å)이 전분(amylose; 12.1~15.0 Å) 보다 활성부위에 결합하기가 적합하여 쉽게 분해되는 특성을 나타내는 것으로 사료된다(86).

활성부위의 아랫부분에 형성되는 여분의 공간은 말토오스와 같은 이당류가 접근하기에 적당하다. Kim 등(64)은 이와 같은 여분의 당 결합 공간으로 인해 ThMA가 당전이 활성을 갖게 된다고 설명하였다. 이곳에 위치하는 당분자는 물분자와 경쟁적으로 효소-기질 반응 중간물을 공격하는 수용체로 작용할 수 있다.

CD 분해효소와  $\alpha$ -amylase, isoamylase, oligo-1,6-glucosidase, 그리고 CGTase 등 기타 관련 효소들의 구조를 비교해

**Table 4.** Oligomeric state of CD/pullulan hydrolyzing and related enzymes.

	Origin	Molecular mass (Da, monomer)	Major oligomeric state	Preferred substrates	Amino acids in N-terminal segment	Reference
CDase	<i>B. sphaericus</i> E-244	72,000	Dimer	MD, CDs	120~130 <sup>b)</sup>	[23,24,93]
	<i>B. stearothermophilus</i> K-12481	67,000	Dimer	MD, CDs	120~130 <sup>b)</sup>	[46]
	<i>Alkalophilic Bacillus</i> sp.	67,000	Dimer	MD, CDs	120~130 <sup>b)</sup>	[22]
	<i>Alkalophilic Bacillus</i> sp. I-5	65,000	Dodecamer	MD, CDs	120~130 <sup>b)</sup>	[25,88]
Maltogenic amylase	<i>B. stearothermophilus</i> ET1	69,000	Dimer	MD, CDs	121 <sup>a)</sup>	[32,88]
	<i>B. licheniformis</i>	67,000	Dimer	MD, CDs	121 <sup>b)</sup>	[31,88]
	<i>B. subtilis</i> SUH4-2	69,000	Dimer	MD, CDs	121 <sup>b)</sup>	[33,88]
	<i>Thermus</i> sp. IM6501	68,000	Dimer	MD, CDs	124 <sup>a)</sup>	[34,64]
TVA II	<i>Thermoactinomyces vulgaris</i> R-47	71,000	Dimer	MD, CDs	121 <sup>a)</sup>	[67]
$\alpha$ -glucosidase	<i>B. thermoamylolyquefaciens</i>	90,000	Hexamer	MD	None <sup>b)</sup>	[89]
Oligo-1,6-glucosidase	<i>B. flavocaldarius</i> KP1228	64,000	Dimer	PNDG, Isomaltotriose	None <sup>b)</sup>	[90]
Maltase	<i>Sulfolobus solfataricus</i>	80,000	Pentamer	Maltose	None <sup>b)</sup>	[91]

MD, oligomaltodextrin; CDs,  $\alpha$ ,  $\beta$ -, and  $\gamma$ -cyclodextrins; PNDG, *p*-Nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside.

<sup>a)</sup> determined from the crystal structure, <sup>b)</sup> estimated approximately on the basis of domain-level comparison [9]

보면 활성부위 구조와 아미노 말단 부위를 제외하고는 매우 비슷한 구조를 갖고 있음을 알 수 있다. CD 분해효소의 아미노 말단 영역이 중심에 위치하는 ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> 원통구조 위쪽에 드리워져 있는 것에 비해 isoamylase의 아미노 말단 영역은 약 160개의 아미노산이 6개의  $\beta$ -strand와 6개의 짧은  $\alpha$ -helix로 되어 있어 크기가 크므로 ThMA의 아미노 말단 영역과는 다른 위상과 위치를 갖고 있다. Isoamylase는 amylopectin과 분지올리고당의  $\alpha$ -1,6-glycosidic 결합을 가수분해하며, ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> 원통구조를 갖고 있으나 5 번째와 6 번째  $\beta$ -strand사이의  $\alpha$ -helix가 없는 독특한 구조를 갖고 있다(87). 이러한 구조적 차이가 CD 분해효소와 isoamylase들의 기질 특이성에 관련이 있는 것으로 사료된다.

최근 Novamyl이라는 *Bacillus stearothermophilus* maltogenic amylase의 3차구조가 보고된 바 있다(83). 그러나, maltogenic amylase라는 이름에도 불구하고 이 효소의 구조는 5개의 영역으로 구성된 CGTase의 구조에 더 가까웠다.

### 4-3. Oligomerization of CDase

CD 분해효소들의 단위체는 대체로 62~90 kDa으로  $\alpha$ -amylase들 보다 크다(Table 4). 이들 효소들은 액상에서 이합체(dimer) 혹은 그 이상의 올리고머로 존재한다. *B. stearothermophilus* K12481의 CDase(46)는 단위체(monomer)의 분자량이 67 kDa인 이합체이고, 호알칼리성 세균인 *Bacillus* sp.(92)와 *B. sphaericus* (93) CDase 및 ThMA도 모두 이합체들로 밝혀졌다(64). 결정구조 분석결과, ThMA와 TVA II의 아미노 말단 영역이 이합체를 형성하는데 중요한 역할을 하는 것으로 나타났으며(64, 67), 이러한 아미노 말단 영역의 역할은 특히 ThMA의 아미노 말단 영역을 제거했을 때에 효소가 모두 단위체로 존

재하여 더욱 확실하게 증명되었다(94,95). 반면에 *Flavobacterium* sp.과 *Thermoanaerobacter ethanolicus* 39E의 CDase(5, 47) 들은 각각 62와 66 kDa의 단위체인 것으로 분석되었다.

최근 ThMA의 단위체-이합체 평형을 분석용 초고속원심분리로 분석하여 이전의 결정구조 분석과 size exclusion chromatography 결과와 마찬가지로(64), 이 효소가 sodium acetate 완충용액(pH 6.0)에서 대부분 이합체로 존재하는 것을 밝혀낸 바 있다(88). 지금까지의 연구결과에 의하면 대부분의 CD/pullulan 분해효소들은 액상에서 이합체나 사합체로 존재하는데 반해(Table 3), 호알칼리성 세균인 *Bacillus* I-5의 CDase는 12합체로 존재하는 것으로 분석되었다(88). 따라서 이 효소들의 기질 특이성 양상이나 당 전이능은 동일이합체가 이루는 활성부위의 기하학적 구조로 가장 잘 설명된다고 하겠다.

이러한 효소들이 올리고머화 되는 정도는 염 농도, 단백질의 농도, 그리고 수용액의 산도 등에 의해 결정되는 것으로 최근 분석되었다(96). ThMA와 BBMA는 효소 반응액에 KCl 혹은 sodium phosphate를 0.0~1.0 M의 범위에서 0.1 M씩 증가시키면서 반응시켰을 때, 염이 없는 상태에서 대부분 혹은 전부 이합체로 존재하였으나 염의 농도가 증가함에 따라 약 50~100%가 단위체로 분리되었으며, 이러한 현상과 함께  $\beta$ -CD에 대한 전분 가수분해능이 증가하였다. ThMA와 BBMA 모두 88 nM~450 nM 범위에서 반응시켰을 때 효소의 농도가 증가할수록 이합체의 비율이 높아지면서  $\beta$ -CD에 비해 활성이 높아졌다. 또한 BBMA와 CDase I-5 모두 pH 6에서는 단위체의 비율이 50% 이상으로 컸으나, pH 7~10의 범위에서는 점점 이합체의 비율이 높아졌으며, 따라서  $\beta$ -CD에 비해 활성이 함께 증가하였다. 이합체 형성은 maltogenic amylase의 열안정성 향상과도 관계



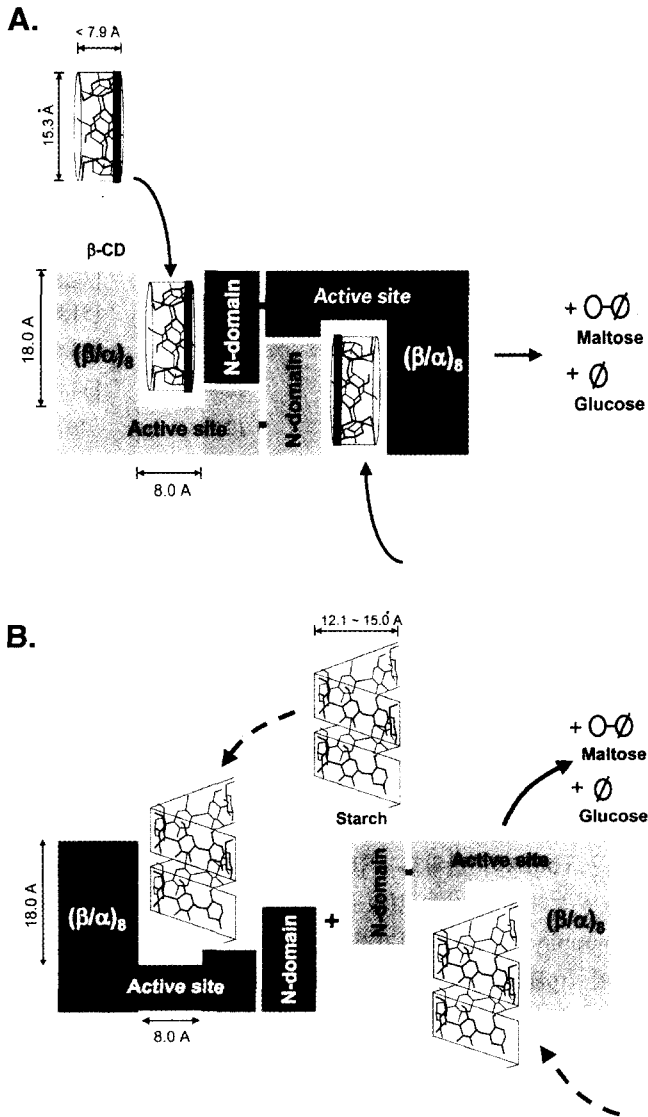


Fig. 4. Schematics on monomeric/dimeric state and substrate specificity of CD/pullulan hydrolyzing enzymes. One of the subunits is depicted in light-grey boxes and the other in dark-grey boxes.

있는 것으로 분석되었다. 이렇게 다양한 인자들이 효소들의 올리고머 형성 정도에 영향을 미치므로 CD/pullulan 분해효소의 단위체-이합체 평형은 적절한 완충용액에서 분석되어야 한다. 아밀로펙틴이나 전분처럼 큰 기질은  $\alpha$ -amylase들이나 CDase 단위체처럼 넓고 얇은 활성부위에만 접근할 수 있을 것이고, 말토 올리고당이나 CD처럼 작고 납작한 기질들은 이합체 CDase의 깊고 좁은 활성부위에도 끼어 들어갈 수 있을 것으로 사료된다(64). 이러한 자료들을 종합하여 우리는 CDase들의 크기가 다른 다양한 기질에 대한 특이성이 단위체-이합체 평형에 의해 결정적으로 조절된다고 제안하고자 한다(Fig. 4).

이와 비슷한 현상은 올리고 형태를 갖는 다른 amylase 계열 효소들에서도 관찰할 수 있다. *B. thermoamyloliquefaciens* KP 1071의  $\alpha$ -glucosidase II(89), *B. flavocaldarius* KP1228의

oligo-1,6-glucosidase(90), 그리고 *Sulfolobus solfataricus*의 maltase(91)와 같이 초고온성 세균들의 효소들도 올리고 상태로 존재한다고 알려져 있다. *Bacillus flavocaldarius* KP1228의 oligo-1,6-glucosidase는 p-nitro-phenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside, panose, isomaltose, nigerose, kojibiose,  $\alpha$ -limit dextrin과 같은 당들을 분해하여 포도당을 생성시키는 등 매우 넓은 기질 특이성을 갖고 있다. 또한 *B. thermoamyloliquefaciens* KP1071의  $\alpha$ -glucosidase II는 oligo-1,6-glucosidase와 exo- $\alpha$ -1,4-glucosidase의 두 가지 활성을 보인다. 그러므로 올리고 상태가 될 수 있는 효소들은 CD 분해효소들처럼 더 확장된 기질 특이성을 갖게 되는 것으로 생각된다.  $\alpha$ -glucosidase와 oligo-1,6-glucosidase는 본 총설의 목적에 벗어나는 효소들이기는 하나 CD/pullulan 분해효소의 다양한 기질 특이성과 올리고 상태간의 관계를 상세히 분석하는 데에 중요한 기초자료가 되었기 때문에 간단히 언급하였다.

### 5. 생리적 기능

#### 5-1. CDase의 세포 내 기능

*Klebsiella pneumoniae* M5a1은 전분이 분해되어 형성된  $\alpha$ -나  $\beta$ -CD를 이용할 수 있다고 알려졌으나(97), 이 화합물이 대장균의 말토오스 수송체처럼 배지나 periplasm에서 다시 선형화 된 다음 세포질로 수송되는지 혹은 특정 수송체계를 통해 세포질로 수송된 다음 세포질에서 선형화 되는 지는 밝혀지지 않았다. *K. pneumoniae* M5a1에서 분리된 14.3 kb의 DNA 단편은 세포질 내 CDase 유전자를 포함한 10개의 유전자를 갖고 있고(49), 염기서열 및 돌연변이 연구 결과 이들이 CD의 수송체계를 이루는 것으로 분석되었다. 즉 말토오스나 기타 말토덱스트린의 수송체계와는 별도로 특이적인 결합단백질을 통한 CD 수송체계가 존재한다. 세포막 바깥쪽에서 전분은 CGTase에 의해 분해되어 CD로 전환되고, CymE라는 CD-결합 단백질에 결합하여 세포외막을 통과하며, cym 오페론 산물인 CymD, CymF과 CymG에 의해 세포막을 지나 수송된다. CD는 cymH 산물인 CDase에 의해 세포질에서 말토올리고당으로 분해되어 maltodextrin phosphorylase와 amyloamylase 등의 효소에 의해 더 분해된다(49).

CD는 쥐에 [ $^{14}$ C]- $\beta$ -CD를 경구투여 했을 때 체내에서 대사 되는 것으로 분석되었다(98). 뿐만 아니라, 사람 대장에서 분리된 30 종의 *Bacteroides* 균주들 중 24 균주가 시험관 내에서 CD를 분해할 수 있었다(48). CDase는 대장과 같은 환경조건(pH 7.0, 37°C) 하에서 안정하므로 사람 대장에서 CD가 CDase에 의해 분해될 것으로 생각된다. CD는 대체로 포도당과 말토 올리고당으로 분해되어 장내 혐기성 세균에 의해 쉽게 발효되어 지방산과 기타 가스를 생성시킬 것이다.

Tonozuka 등(44)은 TVA II가 세포 내 효소로 올리고당 대사에 관련되어 소량의 세포내 말토올리고당을 분해한다고 보고

하였다. 말토오스 수송 및 이용체계는 일련의 *mal* 유전자들로 이루어져 있다(52, 99). TVA II 유전자는 대장균에서 말토오스 이용체계의 한 구성원으로 말토오스와 말토올리고당의 이용에 관여하는 *malZ* 유전자와 비슷하였다(100).

5-2. Maltogenic amyalse의 세포 내 기능

Maltogenic amyalse의 세포 내 기능연구는 유전학적 연구체계가 잘 개발되어 있는 *B. subtilis* 균주에서 해당 효소가 발견되면서 가능하게 되었다. *B. subtilis* SUH 4-2에서 분리된 maltogenic amyalse의 유전자인 *bbma*는 유전체 분석이 완료된 *B. subtilis* 168 염색체 304도에 위치하는 *yvdF* 유전자와 DNA 염기서열과 아미노산 서열이 모두 99% 동일한 상동유전자로 밝혀졌다(101, 102). 유전자 *yvdF*는 그 기능이 밝혀져 있지 않지만, 말토오스/말토덱스트린 이용에 관련된 것으로 알려진 일련의 유전자군과 동일한 염색체 부위에 위치하여 이들과 함께 탄수화물 대사경로에 관련된 것으로 생각된다. 최근 이 부위의 *yvdE*와 *yvdF* 유전자에 Campbell-type recombination을 통해 돌연변이를 유발시켜 그 특성을 분석한 결과, 두 유전자 모두 CD 분해활성(maltogenic amyalse 활성)이 현저히 감소하였고  $\beta$ -CD나 maltose를 탄소원으로 공급했을 때 wild type에 비하여 생장이 저하되어 이들이 세균의  $\beta$ -CD나 maltose의 이용에 직접적으로 관여하는 것을 알 수 있었다(103). 또한 maltogenic amyalse 유전자인 *yvdF*의 promoter-*lacZ* 결합체를 형성시켜 *B. subtilis* 염색체상의 *amyE* 유전자 부위에 유전자대체를 일으켜

삽입시킨 뒤  $\beta$ -galactosidase 활성을 추적함으로써 *yvdF* 유전자 발현양상을 분석하였을 때 포도당, 과당, 저당, 글리세롤이 탄소원일 경우 발현이 억제되고, 전분,  $\beta$ -CD, 말토오스가 탄소원일 경우 발현이 유도되었다. 이 결과도 역시 포도당 등 쉽게 이용할 수 있는 탄소원이 제한될 경우 기타 탄수화물을 이용하는 경로에 관여하는 것으로서 maltogenic amyalse의 생리적 기능을 설명한다고 할 수 있다(104).

한편, *yvdE*와 *yvdF* 유전자의 돌연변이주들은 wild type 균주에 비하여 같은 배양조건 하에서 2 배정도 많은 내생포자를 형성하였다. 이는 maltogenic amyalse 활성이 내생포자 형성에 관련된 조절유전자인 *spoOA* 혹은 *spollAC* 돌연변이 균주에서 wild type에 비해 활성이 현저히 감소하는 것과 함께 이들 유전자가 내생포자 형성에 관련된 어떤 생리적 기능을 갖는 것을 의미하는 것으로 사료되었다(104).

CD/pullulan 분해효소들은 CD를 비롯한 작은 올리고당 대사에 관여하여 포도당 등 쉽게 이용할 수 있는 에너지원이 부족할 때 에너지를 얻게 하는 것으로 생각된다. 그러나 세포나 올리고당의 농도가 높을 경우에는 이러한 당들이  $\alpha$ -D-(1,6)-glycosidic 결합을 이루도록 전이되고, 그 결과 형성된 분지올리고당들은 세포 내 삼투압, 세포질의 점도, 수분활성도 등을 조절하는 역할을 할 수 있을 것이다. CD 합성효소(CGTase)와 CD 분해효소(CDase)를 함께 갖고 있는 생물체로는 세균과 고세균(Archae)만 알려져 있다(29). CGTase와 CDase는 상호 작용하여 진핵세포 생물의 탄수화물 이용에 중요한 역할을 하며, CD와 pullulan 등 특수전분들을 이용할 수 있게 하여 세균들의 생존가능 범위를 넓히는데 기여한다고 할 수 있다.

위의 자료들을 종합하여 세균에서만 발견되는 새로운 탄수화물 대사체계를 다음과 같이 제안하고자 한다(Fig. 5). 즉, i) 전분이 세포 밖에서  $\alpha$ -amylase나 pullulanase에 의해 올리고당으로 분해되고, ii) 생성된 말토올리고당이 세포 밖 효소인 CGTase에 의해  $\alpha$ -,  $\beta$ -, 혹은  $\gamma$ -CD로 변환되거나 외부로부터 공급된 CD가 특유의 얇은 구조(폭, 7Å)로 인해 특이적 수송체계에 의해 세포막을 통과한다(49), iii) 세포질로 들어온 CD는 세포 내 CDase에 의해 말토오스와 포도당으로 분해되며, 세포 내 올리고당의 농도가 높을 경우에는 CDase에 의해 전이되어 분지올리고당으로 변환된다. 이렇게 형성된 분지올리고당에 의해 세포 내 삼투압, 점도, 수분활성도가 조절되며(105), 특히 수분활성도가 낮아져 내생포자 형성이 저지된다.

6. 산업적 응용

$\alpha$ -amylase의 가수분해능 및 관련 효소들의 당 전이능은 다양한 올리고당을 산업적으로 생산하는데 이용되어 왔다. Maltogenic amyalse와 neopullulanase는 전분과 pullulan을 각각 말토오스와 panose로 분해하고 동시에  $\alpha$ -1,3-,  $\alpha$ -1,4-,  $\alpha$ -1,6-glycosidic 결합을 이루도록 전이시킨다. 또한 올리고당 혹은 분지올리고당의 생산물들에 대해 가수분해와 당 전이가 평형에 이를 때까지

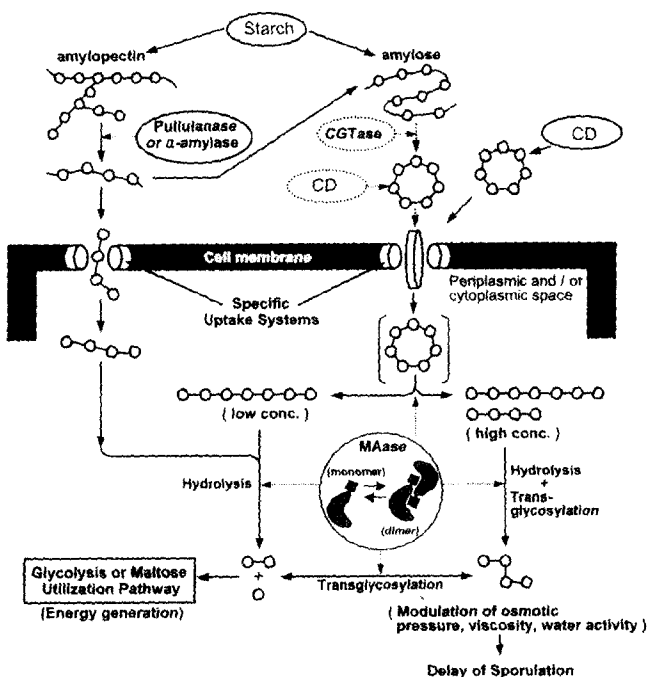


Fig. 5. A proposed starch/CD/pullulan utilization pathway in bacteria including the activities of  $\alpha$ -amylase, pullulanase, CGTase, and CDase.

계속해서 일어나기 때문에 전분의 농도와 반응시간을 조절하여 특정 분지올리고당의 함량이 높은 산물을 얻도록 유도할 수 있다. 이러한 *B. stearothermophilus*의 가수분해 및 당 전이 활성은  $\alpha$ -glucosidase와  $\alpha$ -amylase를 사용하는 기존의 공정보다 더 간단하고 빠르며, 효율적으로 액화 전분에서 분지올리고당을 생산하는데 사용되고 있다(56-60). 분지올리고당은 단맛이 덜 강하고, 칼로리가 낮으며, 점도가 낮고, 보습성이 높으며, 수분활성도가 낮기 때문에 식품의 풍미를 증진시키고, 미생물의 생장을 억제하여 식품의 저장성을 높이는 등 식품산업에서 응용하기에 적합한 특성들을 많이 갖고 있다(105, 106). 이외에도 분지올리고당은 장내 비피더스균의 생장을 촉진시키는 것으로 알려져 있다(107).

또한 maltogenic amylase를 비롯한 CD 분해효소들의 당 전이 반응을 이용하여 시험관에서 특이적 탄수화물 분해효소에 대한 저해제로서의 기능을 갖는 올리고당을 합성할 수 있다. Park 등(35)은 BSMA의 당 전이능으로 acarbose와 다양한 수용체로부터 특이적 탄수화물 분해효소 저해제를 합성하였다. Maltogenic amylase는 acarbose의 첫 번째 glycosidic 결합에 작용하여 포도당과 pseudotrisaccharide(PTS)로 분해하고 또 다른 포도당의 C-6에 전이시켜 isoacarbose를 생성시켰다. 이렇게 형성된 glucosyl-PTS는 maltogenic amylase에 대하여 acarbose보다 6,660 배의 억제능을 보였고,  $\beta$ -amylase에 대해서는 억제능이 없었으며, 쥐 대장의 sucrase와 돼지체장의  $\alpha$ -amylase에 대하여는 약 50% 정도의 억제능을 보였다(108). 이와 같은 방법으로 여러 가지 단당류 혹은 알코올 당 등 다양한 수용체들을 사용함으로써  $\alpha$ -amylase를 비롯한 관련효소들에 대하여 특이적이며, 저해도가 높은 화합물을 생산할 수 있을 것으로 기대된다(103).

## 7. 결론

본 총설에서는 CD/pullulan 분해효소들을 기질 특이성, 효소 활성, 염기서열, 효소구조 등을 중심으로 비교하여 살펴보았다. CDase, maltogenic amylase, neopullulanase 등의 세 가지 효소들은 비슷한 효소활성과 구조를 갖고 있다. 아미노산 서열이 46% 정도로 동일한 ThMA와 TVA II는 3차구조가 거의 동일하였다. IUBMB에 의하면 효소분류에서 가장 널리 사용되는 기준은 기질 특이성이다. 그러나 이 기준은 CD/pullulan 분해효소가 다양한 기질들의  $\alpha$ -1,4-,  $\alpha$ -1,6- 그리고  $\alpha$ -1,3-glycosidic 결합들을 가수분해할 뿐만 아니라 당 전이 결합도 일으키기 때문에 이들을 적절하게 분류하는데 사용될 수 없었다. 이 효소들이 처리할 수 있는 다양한 glycosidic 결합, 기질의 크기 및 여러 종류의 반응들은 이들의 단위체들이 올리고머를 형성하면서 이루어지는 활성부위의 구조와 직접적인 연관이 있는 것으로 추정된다. 그러나 이외에도 기질이 활성부위에 접근하는 것을 조절하는 다른 방법이 있을 가능성도 배제할 수 없다.

( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> 원통구조에 위치하는 네 곳의 보존부위 외에도 glycoside 분해효소 family 13은 CDase를 정의하는 특징이 될 수

있는 세 곳의 보존부위를 갖고 있다. 이들 효소들에서 발견되는 일곱 군데의 보존부위와 서로 비슷한 구조, 다양한 기질 특이성들 간의 상호관계를 규명하는데 많은 관심이 요구된다.

## 알리는 글

본 총설에 제시된 일부 연구결과는 학술진흥재단의 유전공학 연구과제(98-G00030)의 일원으로 지원되었으며 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

1. Svensson, B. 1994. Protein engineering in the  $\alpha$ -amylase family: Catalytic mechanism, substrate specificity, and stability. *Plant Mol. Biol.* **25**, 141-157.
2. Henrissat, B. A. 1991. Classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities, *Biochem. J.* **280**, 309-316.
3. Svensson, B., K. S. Bak-Jensen, M. T. Jensen, J. Sauer, T. E. Gottschalk, K. W. Rodenburg. 1999. Studies on structure, function, and protein engineering of starch-degrading enzymes. *J. Appl. Glycosci.* **46**, 49-63.
4. Vihinen, M. and P. Mäntsäälä. 1989. Microbial amylolytic enzymes. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **24**, 329-418.
5. Bender, H. 1993. Purification and characterization of a cyclodextrin-degrading enzyme from *Flavobacterium* sp. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **39**, 714-719.
6. Kim, J. W., H. J. Cha, T. K. Cheong, and K. H. Park. 1997. Molecular and enzymatic properties of novel maltogenic amylases capable of producing branched oligosaccharides. *Foods Biotech.* **6**, 67-73.
7. Kuriki, T. and T. Imanaka. 1999. The concept of the  $\alpha$ -amylase family: Structural similarity and common catalytic mechanism. *J. Biosci. Bioeng.* **87**, 557-565.
8. Jespersen, H. M., E. A. MacGregor, B. Henrissat, M. R. Sierks, and B. Svensson. 1993. Starch-and glycogen-debranching and branching enzymes: Prediction of structural features of the catalytic ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub>-barrel domain and evolutionary relationship to other amylolytic enzymes. *J. Prot. Chem.* **12**, 791-805.
9. Jespersen, H. M., E. A. MacGregor, M. R. Sierks, and B. Svensson. 1991. Comparison of the domain-level organization of starch hydrolases and related enzymes. *Biochem. J.* **280**, 51-55.
10. Saha, B. C. and J. G. Zeikus. 1992. Cyclodextrin degrading enzymes. *Starch.* **44**, 312-315.
11. French, D. In *Advances in Carbohydrate Chemistry*(M. W. Walfrom and R. S. Tipson, Eds) Vol. 12, pp 189-

- 260, Acad. Press, New York.
12. Marshall, J. J. and I. Miwa. 1981. Kinetic difference between hydrolysis of  $\beta$ -cyclodextrin by human salivary and pancreatic  $\alpha$ -amylases. *Biochem. Biophys. Acta.* **661**, 142-147.
  13. Jodal, I., L. Kandra, J. Harangi, P. Nanasi, and J. Szejtli. 1984. Hydrolysis of cyclodextrin by *Aspergillus oryzae*  $\alpha$ -amylase. *Starch.* **36**, 140-143.
  14. Ben-Gershon, E. and J. Leibowitz 1958. Enzymic degradation of the Schardinger dextrans. *Enzymologia.* **20**, 133-147.
  15. Robyt, J. and D. French. 1964. Purification and action pattern of an amylase from *Bacillus polymyxa*. *Arch. Biochem. Biophys.* **104**, 338-345.
  16. Kato, K., T. Sugimoto, A. Amemura, and T. Harada. 1975. A *Pseudomonas* intracellular amylase with high activity on maltodextrins and cyclodextrins, *Biochim. Biophys. Acta.* **391**, 96-108.
  17. Bender, H. 1986. Production, characterization, and application of cyclodextrins. *Adv. Biotechnol. Proc.* **6**, 31-71.
  18. Kitahata, S. 1995. Cyclomaltodextrin glucanotransferase, in: The Amylase research society of Japan(Ed.), Enzyme chemistry and molecular biology of amylases and related enzymes, CRC Press, Tokyo, pp. 617.
  19. De Pinto, J. A. and L. L. Campbell. 1968. Purification and properties of the cyclodextrinase of *Bacillus macerans*. *Biochemistry.* **17**, 121-125.
  20. Kitahata, S., M. Taniguchi, S. S. Beltran, T. Sugimoto, and S. Okada. 1983. Purification and some properties of cyclodextrinase from *Bacillus coagulans*. *Agric. Biol. Chem.* **47**, 1441-1447.
  21. Saha, B. and G. Zeikus. 1990. Characterization of thermostable cyclodextrinase from *Clostridium thermohydrosulfuricum* 39E. *Appl. Environ. Microbiol.* **9**, 2941-2943.
  22. Yoshida, A., Y. Iwasaki, T. Akiba, and K. Horikoshi. 1991. Purification and properties of cyclomaltodextrinase from alkalophilic *Bacillus sp.* *J. Ferment. Bioeng.* **71**, 226-229.
  23. Oguma, T., M. Kikuchi, and K. Mizusawa. 1990. Purification and some properties of cyclodextrin-hydrolyzing enzyme from *Bacillus sphaericus*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1036**, 1-5.
  24. Oguma, T., A. Matsuyama, M. Kikuchi, and E. Nakano. 1993. Cloning and sequence analysis of the cyclomaltodextrinase gene from *Bacillus sphaericus* and expression in *Escherichia coli* cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **39**, 197-203.
  25. Kim, T. J., J. H. Shin, J. H. Oh, M. J. Kim, S. B. Lee, S. R. Ryu, K. S. Kwon, J. W. Kim, E. H. Choi, J. F. Robyt, and K. H. Park. 1998. Analysis of the gene encoding cyclomaltodextrinase from alkalophilic *Bacillus sp.* I-5 and characterization of enzymatic properties. *Arch. Biochem. Biophys.* **353**, 221-227.
  26. Galvin, N. M., C. T. Kelly, and W. M. Fogarty. 1994. Purification and properties of the cyclodextrinase of *Bacillus sphaericus* ATCC7055. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **42**, 46-50.
  27. Abe, J., N. Onitsuka, T. Nakano, Y. Shibata, S. Hizukuri, and E. Entani. 1994. Purification and characterization of periplasmic  $\alpha$ -amylase from *Xanthomonas campestris* K-11151. *J. Bacteriol.* **176**, 3584-3588.
  28. Kim, M. J., W. S. Park, H. S. Lee, T. J. Kim, J. H. Shin, S. H. Yoo, T. K. Cheong, S. R. Ryu, J. C. Kim, J. W. Kim, T. W. Moon, J. F. Robyt, and K. H. Park. 2000. Kinetics and inhibition of cyclomaltodextrinase from Alkalophilic *Bacillus sp.* I-5. *Arch. Biochem. Biophys.* **373**, 110-115.
  29. Nelson, K. E. R. C. Clayton, S. R. Gill, M. L. Gwinn, R. J. Dodson, D. H. Haft, E. K. Hickey, J. D. Peterson, W. C. Nelson, K. A. Ketchum, L. McDonald, T. R. Utterback, J. A. Malek, K. D. Linher, M. M. Garrett, A. M. Stewart, M. D. Cotton, M. S. Pratt, C. A. Phillips, D. Richardson, J. Heidelberg, G. G. Sutton, R. D. Fleishmann, J. A. Eisen, O. White, S. L. Salzberg, H. O. Smith, J. C. Venter, and C. M. Fraser. 1999. Evidence for lateral gene transfer between Archaea and Bacteria from genome sequence of *Thermotoga maritima*. *Nature.* **399**, 323-329.
  30. Kim, T. J., Y. W. Kim, and K. H. Park: unpublished data.
  31. Kim, I. C., J. H. Cha, J. R. Kim, S. Y. Jang, B. C. Seo, T. K. Cheong, D. S. Lee, Y. D. Choi, and K. H. Park. 1992. Catalytic properties of the cloned amylase from *Bacillus licheniformis*. *J. Biol. Chem.* **267**, 22108-22114.
  32. Cha, H. J., H. G. Yoon, Y. W. Kim, H. S. Lee, J. W. Kim, K. S. Kweon, B. H. Oh, and K. H. Park. 1998. Molecular and enzymatic characterization of a maltogenic amylase that hydrolyzes and transglycosylates acarbose. *Eur. J. Biochem.* **253**, 251-262.
  33. Cho, H. Y., Y. W. Kim, T. J. Kim, D. Y. Kim, J. W. Kim, Y. W. Lee, and K. H. Park. 2000. Molecular cha-

- racterization of a dimeric intracellular maltogenic amylase of *Bacillus subtilis* *Biochim. Biophys. Acta.* **1478**, 333-340.
34. Kim, T. J., M. J. Kim, B. C. Kim, J. C. Kim, T. K. Cheong, J. W. Kim, and K. H. Park. 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.
  35. Park, K. H., M. J. Kim, H. S. Lee, N. S. Han, D. M. Kim, and J. F. Robyt. 1998. Transglycosylation reactions of *Bacillus stearothermophilus* maltogenic amylase with acarbose and various acceptors. *Carbohydr. Res.* **313**, 235-246.
  36. Kuriki, T., S. Okada, and T. Imanaka. 1988. New type of pullulanase from *Bacillus stearothermophilus* and molecular cloning and expression of the gene in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **170**, 1554-1559.
  37. Takata, H., T. Kuriki, S. Okada, Y. Takesada, M. Iizuka, N. Minamiura, and T. Imanaka. 1992. Action of neopullulanase: neopullulanase catalyzes both hydrolysis and transglycosylation at  $\alpha$ -(1,4)- and  $\alpha$ -(1,6)-glycosidic linkages. *J. Biol. Chem.* **267**, 18447-18452.
  38. Cheong, K. A., T. J. Kim, J. H. Yoon, T. S. Lee, K. H. Park, and J. W. Kim. Catalytic Activities of Intracellular Dimeric Neopullulanase on Cyclodextrin, Acarbose, and Maltose (submitted to *Biotech. Appl. Biochem.*)
  39. Igarashi, K., K. Ara, K. Saeki, K. Ozaki, S. Kawai, and S. Ito. 1992. Nucleotide sequence of the gene that encodes a neopullulanase from an alkalophilic *Bacillus*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **56**, 514-516.
  40. Smith, K. A. and A. A. Salyers. 1991. Characterization of a neopullulanase and an  $\alpha$ -glucosidase from *Bacteroides thetaiotaomicron* 95-1. *J. Bacteriol.* **173**, 2962-2968.
  41. Yebra, M. J., A. Blasco, and P. Sanz. 1999. Expression and secretion of *Bacillus polymyxa* neopullulanase in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **170**, 41-49.
  42. Shimizu, M., M. Kanno, M. Tamura, and M. Suekane. 1978. Purification and some properties of a novel  $\alpha$ -amylase of *Thermoactinomyces vulgaris*. *Agric. Biol. Chem.* **42**, 1681-1688.
  43. Tonozuka, T., M. Ohtsuka, S. Mogi, H. Sakai, T. Ohta, and Y. Sakano. 1993. A neopullulanase-type  $\alpha$ -amylase gene from *Thermoactinomyces vulgaris* R-47. *Biosci. Biotech. Biochem.* **57**, 395-401.
  44. Tonozuka, T., S. Mogi, Y. Shimura, A. Ibuka, H. Sakai, H. Matsuzawa, Y. Sakano, and T. Ohta. 1995. Comparison of primary structures and specificities of two pullulan-hydrolyzing  $\alpha$ -amylases, TVA I and TVA II from *Thermoactinomyces vulgaris* R-47. *Biochim. Biophys. Acta.* **1252**, 35-42.
  45. Sakano, Y., S. Hiraiwa, J. Fukushima, and T. Kobayashi. 1982. Enzymatic properties and action pattern of *Thermoactinomyces vulgaris*  $\alpha$ -amylase. *Agric. Biol. Chem.* **46**, 1121-1129.
  46. Abe, J., O. Nakazono, and S. Hizukuri. 1996. Characterization of cyclodextrinase from *Bacillus stearothermophilus* K-12481. *J. Appl. Glycosci.* **43**, 155-159.
  47. Podkovyrov, S. M., D. Burdette, and J. G. Zeikus. 1993. Analysis of the catalytic center of cyclomaltodextrinase from *Thermoanaerobacter ethanolicus* 39E. *FEBS Lett.* **317**, 259-262.
  48. Antenucci, R. N. and J. K. Palmer. 1984. Enzymatic degradation of  $\alpha$ - and  $\beta$ -cyclodextrins by *Bacteroides* of the human colon. *J. Agric. Food Chem.* **32**, 1316-1321.
  49. Fiedler, G., M. Pajatsch, and A. B. ck. 1996. Genetics of a novel starch utilization pathway present in *Klebsiella oxytoca*. *J. Mol. Biol.* **256**, 279-291.
  50. Freundlieb, S. and W. Boos. 1986.  $\alpha$ -amylase of *Escherichia coli*, mapping and cloning of the structural gene, *malS*, and identification of its products as a periplasmic protein. *J. Biol. Chem.* **261**, 2946-2953.
  51. Delia, J. N. and A. A. Salyers. 1996. Contribution of a neopullulanase, a pullulanase, and an  $\alpha$ -glucosidase to growth of *Bacteroides thetaiotaomicron* on starch. *J. Bacteriol.* **178**, 7173-7179.
  52. Bloch, M. A. and O. Raiband. 1986. Comparison of the *malA* regions of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **168**, 1220-1227.
  53. David, M. H., H. G nther, and H. R per. 1987. Catalytic properties of *Bacillus megaterium* amylase. *Starch.* **39**, 436-440.
  54. Ganghofner, D., J. Kellermann, W. L. Staudenbauer, and K. Bronnenmeier. 1998. Purification and properties of an amylopullulanase, a glucoamylase, and an  $\alpha$ -glucosidase in the amylolytic enzyme system of *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**, 302-308.
  55. Kuriki, T., H. Takata, S. Okada, and T. Imanaka. 1991. Analysis of active center of *Bacillus stearothermophilus* neopullulanase. *J. Bacteriol.* **173**, 6147-6152.
  56. Bender, H. 1994. Studies of the degradation of pullulan by the decycling maltodextrinase of *Flavobacterium*

- sp. *Carbohydr. Res.* **260**, 119-130.
57. Kang, G. J., M. J. Kim, J. W. Kim, and K. H. Park. 1997. Immobilization of thermostable maltogenic amylase from *Bacillus stearothermophilus* for continuous production of branched oligosaccharides. *J. Agr. Food Chem.* **45**, 4168-4172.
  58. Lee, S. J., S. H. Yoo, M. J. Kim, J. W. Kim, H. M. Seok, and K. H. Park. 1995. Production and characterization of branched oligosaccharides from liquefied starch by the action of *B. licheniformis* amylase. *Starch.* **47**, 127-134.
  59. Yoo, S. H., M. R. Kweon, M. J. Kim, J. H. Auh, D. S. Jung, J. R. Kim, C. Yook, J. W. Kim, and K. H. Park. 1995. Branched oligosaccharides concentrated by yeast fermentation and effectiveness as a low sweetness humectant. *J. Food Sci.* **60**, 516-519.
  60. Kim, I. C., S. H. Yoo, S. J. Lee, B. H. Oh, J. W. Kim, and K. H. Park. 1994. Synthesis of branched oligosaccharides from starch by two amylases cloned from *Bacillus licheniformis*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **58**, 416-418.
  61. Kuriki, T., M. Yanase, H. Takata, Y. Takesada, T. Imanaka, and S. Okada. 1993. A new way of producing isomaltooligosaccharide syrup by using the transglycosylation reaction of neopullulanase. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 953-959.
  62. Kim, M. J., S. B. Lee, H. S. Lee, S. Y. Lee, J. S. Baek, D. Kim, T. W. Moon, J. F. Robyt, and K. H. Park. 1999. Comparative study of the inhibition of  $\alpha$ -glucosidase,  $\alpha$ -amylase, and cyclomalto-dextrin glucanotransferase by acarbose, isoaccharose, and acarviosine-glucose. *Arch. Biochem. Biophys.* **371**, 277-283.
  63. Tao, B. Y., P. J. Reilly, and J. F. Robyt. 1989. Detection of a covalent intermediate in the mechanism of action of porcine pancreatic  $\alpha$ -amylase by using  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance. *Biochim. Biophys. Acta.* **995**, 214-220.
  64. Kim, J. S., S. S. Cha, H. J. Kim, T. J. Kim, N. C. Ha, S. T. Oh, H. S. Cho, M. J. Cho, M. J. Kim, H. S. Lee, J. W. Kim, K. Y. Choi, K. H. Park, and B. H. Oh. 1999. Crystal structure of a maltogenic amylase provides insights into a catalytic versatility. *J. Biol. Chem.* **274**, 26279-26286.
  65. Uitdehaag, J. C. M., R. Mosi, K. H. Kalk, B. A. Vander Veen, L. Dijkhuizen, S. G. Withers, and B. W. Dijkstra. 1999. X-ray structures along the reaction pathway of cyclodextrin glycosyltransferase elucidate catalysis in the  $\alpha$ -amylase family. *Nature Struct. Biol.* **6**, 432-436.
  66. Matsuura, Y., M. Kusunoki, W. Harada, and M. Kakudo. 1984. Structure and possible catalytic residues of Taka-amylase A. *J. Biochem.* **95**, 697-702.
  67. Kamitori, S., S. Kondo, K. Okuyama, T. Yokota, Y. Shimura, T. Tono-zuka, and Y. Sakano. 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.
  68. Podkovyrov, S. M. and J. G. Zeikus. 1992. Structure of the gene encoding cyclomalto-dextrinase from *Clostridium thermohydrosulfuricum* 39E and characterization of the enzyme purified from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **174**, 5400-5405.
  69. Kaneko, T., S. Sato, H. Kotani, A. Tanaka, E. Asamizu, Y. Nakamura, N. Miyajima, M. Hirosawa, M. Sugiura, S. Sasamoto, T. Kimura, T. Hosouchi, A. Matsuno, A. Muraki, N. Nakazaki, K. Naruo, S. Okumura, S. Shimpo, C. Takeuchi, T. Wada, A. Watanabe, M. Yamada, M. Yasuda, and S. Tabata. 1996. Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein coding regions. *DNA Res.* **3**, 109-136.
  70. Boel, E., L. Brady, A. M. Brzozowski, Z. Derewenda, G. G. Dodson, V. J. Jensen, S. B. Petersen, H. Swift, L. Thim, and H. F. Woldike. 1990. Calcium binding in  $\alpha$ -amylases : an X-ray diffraction study at 2.1 Å resolution of two enzymes from *Aspergillus*. *Biochemistry.* **29**, 6244-6249.
  71. Qian, M., R. Haser, and F. Payan. 1993. Structure and molecular model refinement of pig pancreatic  $\alpha$ -amylase at 2.1 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **231**, 785-799.
  72. Kadziola, A., J. Abe, B. Svensson, and R. Haser. 1994. Crystal and molecular structure of barley  $\alpha$ -amylase. *J. Mol. Biol.* **239**, 104-121.
  73. Kadziola, A., M. Søgaard, B. Svensson, and R. Haser. 1998. Molecular structure of a barley  $\alpha$ -amylase-inhibitor complex : implications for starch binding and catalysis. *J. Mol. Biol.* **278**, 205-217.
  74. Fujimoto, Z., K. Takase, N. Doui, M. Momma, T. Matsumoto, and H. Mizuno. 1998. Crystal structure of catalytic-site mutant  $\alpha$ -amylase from *Bacillus subtilis* complexed with maltopentaose. *J. Mol. Biol.* **277**, 393-407.
  75. Larson, S. B., A. Greenwood, D. Cascio, J. Day, and A. McPherson. 1994. Refined molecular structure of pig

- pancreatic  $\alpha$ -amylase at 2.1 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **235**, 1560-1584.
76. Machius, M., G. Wiegand, and R. Huber. 1995. Crystal structure of calcium-depleted *Bacillus licheniformis*  $\alpha$ -amylase at 2.2 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **246**, 545-559.
77. Morishita, Y., K. Hasegawa, Y. Matsuura, Y. Katsube, M. Kubota, and S. Sakai. 1997. Crystal structure of a maltotetraose-forming exo-amylase from *Pseudomonas stutzeri*. *J. Mol. Biol.* **267**, 661-672.
78. Aghajari, N., G. Feller, C. Gerday, and R. Haser. 1998. Crystal structures of the psychrophilic  $\alpha$ -amylase from *Alteromonas haloplantidis* in its native form and complexed with an inhibitor. *Protein Sci.* **7**, 564-572.
79. Strobl, S., K. Maskos, M. Betz, G. Wiegand, R. Huber, Gomis-R th, and R. Glockshuber. 1998. Crystal structure of yellow meal worm  $\alpha$ -amylase at 1.64 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **278**, 617-628.
80. Wiegand, G., O. Epp, and R. Huber. 1995. The crystal structure of porcine pancreatic  $\alpha$ -amylase in complex with the microbial inhibitor tendamistat. *J. Mol. Biol.* **247**, 99-110.
81. Brzozowski, A. M. and G. J. Davies. 1997. Structure of the *Aspergillus oryzae*  $\alpha$ -amylase complexed, with the inhibitor acarbose at 2.0 Å resolution. *Biochemistry.* **36**, 10837-10845.
82. Hwang, K. Y., H. K. Song, C. Chang, J. Lee, S. Y. Lee, K. K. Kim, S. Choe, R. M. Sweet, and S. W. Suh. 1997. Crystal structure of thermostable  $\alpha$ -amylase from *Bacillus licheniformis* refined at 1.7 Å resolution. *Mol. Cells.* **7**, 251-258.
83. Dauter, Z., M. Dauter, A. M. Brzozowski, S. Christensen, T. V. Borchert, L. Beier, K. S. Wilson, and G. J. Davies. 1999. X-ray structure of novamyl, the five-domain maltogenic  $\alpha$ -amylase from *Bacillus stearothermophilus*: maltose and acarbose complexes at 1.7 Å resolution. *Biochemistry.* **38**, 8385-8392.
84. Klein, C. and G. E. Schulz. 1991. Structure of cyclodextrin glycosyltransferase refined at 2.0 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **217**, 737-750.
85. Watanabe, K., Y. Hata, H. Kizaki, Y. Katsube, and Y. Suzuki. 1997. The refined crystal structure of *Bacillus cereus* oligo-1,6-glucosidase at 2.0 Å resolution: structural characterization of proline-substitution sites for protein thermostabilization. *J. Mol. Biol.* **269**, 142-153.
86. Bender, H. 1986. Production, characterization, and application of cyclodextrins. *Adv. Biotechnol. Process.* **6**, 31-71.
87. Katsuya, Y., Y. Mezaki, M. Kubota, and Y. Matsuura. 1998. Three-dimensional structure of *Pseudomonas* isoamylase at 2.2 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **281**, 885-897.
88. Lee, H. S., T. J. Kim, and K. H. Park: unpublished data.
89. Suzuki, Y., M. Nobiki, M. Matsuda, and T. Sawai. 1997. *Bacillus thermoamyloliquefaciens* KP1071  $\alpha$ -glucosidase II is a thermostable Mr 540,000 homohexameric  $\alpha$ -glucosidase with both exo- $\alpha$ -1,4-glucosidase and oligo-1,6-glucosidase activities. *Eur. J. Biochem.* **245**, 129-136.
90. Suzuki, Y., H. Fujii, H. Uemura, and M. Suzuki. 1987. Purification and characterization of extremely thermostable exo-oligo-1,6-glucosidase from a caldoactive *Bacillus* sp. KP1228. *Starch.* **39**, 17-23.
91. Rolfsmeier, M. and P. Blum. 1995. Purification and characterization of a maltase from the extremely thermophilic Crenarchaeote *Sulfolobus solfataricus*. *J. Bacteriol.* **177**, 482-485.
92. Yoshida, A., Y. Iwasaki, T. Akiba, and K. Horikoshi. 1991. Purification and properties of cyclomaltodextrinase from alkalophilic *Bacillus* sp. *J. Fermt. Bioeng.* **71**, 226-229.
93. Oguma, T., M. Kikuchi, and K. Mizusawa. 1990. Cyclodextrinase of *Bacillus sphaericus* E-244. *Biochim. Biophys. Acta.* **1036**, 1-5.
94. Kim, T. J., H. S. Lee, N. Van Dao, M. J. Kim, H. Y. Cho, S. T. Oh, J. W. Kim, B. H. Oh, S. B. Lee, C. S. Park, B. Svensson, and K. H. Park. Modulation of the Multisubstrate Specificity of *Thermus* Maltogenic Amylase by Salt-Induced Shift of the Monomer/Dimer dissociation Equilibrium and by Truncation of the N-terminal Domain(submitted to *Biochemistry*).
95. Yokota, T., T. Tonozuka, S. Kamitori, and Y. Sakano. 2001. The Deletion of Amino-Terminal Domain in *Thermoactinomyces vulgaris* R-47  $\alpha$ -Amylases : Effects of domain N on Activity, Specificity, Stability and Dimerization. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **65**, 401-408.
96. Cho, H. Y. and K. H. Park : unpublished data
97. Bender, H. 1977. Cyclodextrin glucanotransferase von *Klebsiella pneumoniae*: 2. Bedeutung des Enzymes für den Metabolismus der Cyclodextrine bei *Klebsiella pneumoniae* M5a1. *Arch. Microbiol.* **113**, 49-66.
98. Szejtli, J. and G. Sebestyén. 1979. Resorption, metabolism and toxicity studies on the peroral application of  $\beta$ -cyclodextrin. *Starch.* **31**, 385-389.
99. Schuman, H. A. 1982. Active transport of maltose in *Escherichia coli* K12. *J. Biol. Chem.* **257**, 5455-5461.
100. Decker, K., R. Peist, J. Reidl, M. Kossmann, B. Brand.

and W. Boss. 1993. Maltose and maltotriose can be formed endogenously in *Escherichia coli* from glucose and glucose-1-phosphate independently of enzymes of the maltose system. *J. Bacteriol.* **175**, 5655-5665.

101. SubtiList. 1997. Data release R 14.2. In I. Mozer, A. Danchin(ed.), <http://www.pasteur.fr/bio/subtilist.html>, Institut Pasteur, Paris.

102. Schonert, S., T. Buder, and M. K. Dahl. 1998. Identification and enzymatic characterization of the maltose-inducible alpha-glucosidase MalL(sucrase- isomaltase-maltase) of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **180**, 2574-2578.

103. Cha, C. H., D. Y. Kim, and J. W. Kim : unpublished data

104. D. Y. Kim and J. W. Kim : unpublished data

105. Kwon, K. S., J. H. Auh, S. K. Choi, G. J. Kang, J. W. Kim, and K. H. Park. 1999. Characterization of branched oligosaccharides produced by *Bacillus licheniformis* maltogenic amylase. *J. Food Sci.* **64**, 258-261.

106. Oku, T. 1994. in : I. Goldberg(Ed.), Functional foods, Chapman & Hill, New York, London, pp. 202-218.

107. Auh, J. H., H. G. Lee, J. W. Kim, J. C. Kim, H. S. Yoon, and K. H. Park. 1999. Highly concentrated branched oligosaccharides as a cryoprotectant for surimi products. *J. Food. Sci.* **64**, 418-422.

108. Kim, M. J. PhD. Thesis submitted to Seoul National

University(2000).

109. GeneBank database, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, the National Center for Biotechnology Infromation, USA.

110. Tada, S., Y. Iimura, K. Gomi, K. Takahashi, S. Hara, and K. Yoshizawa. 1989. Cloning and nucleotide sequence of the genomic Taka-amylase A gene of *Aspergillus oryzae*. *Agric. Biol. Chem.* **53**, 593-599.



김 정 완

1977-1981년 고려대학교 식품공학과 (농학사)

1982-1990년 일리노이 주립대학교 생물학과(이학박사)

1990-1991년 일리노이 주립대학교 생물학과(박사후 연수)

1992-1994년 서울대학교 농업생물신소재 연구소(Brain-Pool 초빙교수)

1994-현재 인천대학교 생물학과 (전임강사, 조교수, 부교수)