

## 효소 (CGTase : Cyclodextrin glucanotransferase)의 반응 조건이 산물 (CD : Cyclodextrin)의 특이성에 미치는 영향

† 최 희 옥 · <sup>1</sup>홍 순 강

† 전북대학교 자연과학대학 과학기술학부 화학과, <sup>1</sup>초당대학교 공과대학 환경공학과  
(접수 : 2004. 3. 3., 게재승인 : 2004. 4. 25.)

### The Effects of CD-product Specificity upon the Enzyme (CGTase) Reaction Condition

Hui-Woog Cho<sup>†</sup> and Soon Kang Hong<sup>1</sup>

<sup>†</sup> Department of chemistry, College of Natural Science, Chonbuk National University, 561-756 Chonju, Korea

<sup>1</sup>Department of environmental engineering, College of Technology Chodang University, 534-701 Muan, Korea

(Received : 2004. 3. 3., Accepted : 2004. 4. 25.)

Cyclodextrin glucanotransferase (EC 2.4.1.19, abbreviated as CGTase) is one of the most applied industrial enzymes that produces cyclodextrins from starch and related  $\alpha$ -1,4-glucans by intramolecular transglycosylation reaction upon  $\text{Ca}^{2+}$  dependent manner. The reaction of CLEC,  $\alpha$ -CGTases from *Bacillus macerans* with the soluble starch as a substrate reveals that the surfactants (SDS, N-octyl- $\beta$ -D-glucoside) significantly affect not only the overall products of CDs but also their selectivity. The surfactants (SDS, Lubrol PX) trigger the increase of  $\alpha$ -CD production, but Triton x-100 and Tween 80 suppress  $\alpha$ -CD specificity. Organic solvents (dimethyl sulfoxide, formamide, 2-methyl-2,4-pentandiol, and ethylene glycol) also cause changes of total product and product selectivity.

**Key Words** : CGTase, cyclodextrin, CLEC, surfactant, organic solvent

### 서 론

대부분의 박테리아와 진균류는 탄수화물의 흡수를 용이하게 하기 위해 효소, 싸이클로덱스트린 글루카노트란스퍼라제 (cyclodextrin glucanotransferase; CGTase)를 이용하여 녹말을 분해한다. 이 효소들은 분자내 glucose 전이반응을 통하여 녹말을  $\alpha$ -에서  $\beta$ - 사이클로덱스트린 이라 불리는 환형의 화합물 (cGx)로 전환시키며 이 때,  $x = 6 - 8$ 이다. 환형화의 반응에 의한 주 생성물에서 환으로 연결된  $\alpha$ -(1-4)-glycosidic 의 단위체의 수에 따라(1, 2) 이 효소들은  $\alpha$ - $\beta$  그리고  $\beta$ -CGTase 라 각각 분류된다(3 - 5).

싸이클로덱스트린 (cyclodextrin; CD)는 많은 유기, 무기 분자와 포접 화합물을 형성하는 능력을 가지고 있고 포접화에 따라 포접된 화합물의 물리적, 화학적 성질이 달라지게 된다.

CD는 실험실이나 산업체에서 촉매로써 사용될 뿐만 아니라 식품이나 화장품 그리고 의약품에 불안정하지만 활성이 있고 방향성을 지닌 미세한 캡슐 화에도 쓰여지고 있다.

효소 CGTase는 그람-양성 균인 *Bacillus*균과 *Klebsiella pneumoniae* 균에서 발견된다. *Bacillus*균에서 발견되는 CGTase는 그 균이 어떤 종류의 CD를 생성시키느냐에 따라 두 유형으로 분류되어 진다. 한 종류는  $\beta$ -CD를 주로 생성하는 *Bacillus macerans* CGTase이고 다른 또 하나의 유형은 *Bacillus megaterium*, *Bacillus circulans* 그리고 *Alkalophilic bacilli* 에서 발견되는  $\alpha$ -CGTase 그리고  $\beta$ -CD 와  $\alpha$ -CD를 구분되지 않게 생성하는 *Bacillus stearothermophilus* CGTase는 두 종류의 중간체로 여겨지고 있다(6).

몇몇 유기 용매나 CGTase의 유전자를 변형시켜 전체의 CD의 수율을 높이거나 CD의 특이성을 증대하려는 연구들이 보고되어졌다(7-12).

최근에는 유기 용매에 저항성 있는 CGTase의 분리와 CD를 생성하기 위한 CGTase의 고정화에 대한 연구가 보고 되어 있다(13-15). 본 논문에서는 *Bacillus macerans*에서 정제한 CLEC CGTase를 이용하여 계면 활성제가 존재하는 조건에서 반응시킨 CD의 전체 수율과 생성물의 특이성에 관한 결과를 보고하

† Corresponding Author : Department of chemistry, College of Natural Science, Chonbuk National University, 561-756 Chonju, Korea

Tel : +82-063-270-3418, Fax : +82-063-270-3408

E-mail : hwchoe@chonbuk.ac.kr

고자 한다.

## 재료 및 방법

### 시약

계면 활성제 (SDS, CTAB, Tween 80, Triton x 100, Lubrol PX, 와 N-octyl-β-D-glucoside) 와 유기 용매 (2-butanol, ethylene glycol, DMSO, MPD, 그리고 acetonitrile)는 Sigma사에서 구입 사용하였다.

### CGTase의 정제

효소, CGTase는 *B. macerans* 균주 IFO 3490으로부터 Stavn, Granum(16)과 Choe 등(17)의 방법에 의해 분리 정제하였다. Crude extract는 *B. macerans*의 배양액을 35-60%의 포화 황산 암모늄으로 침전시킨 다음 원심분리 (20,000 rpm, 10분, 4°C)하여 제조하였다. 얻어진 pellet은 10 mM의 Na, K-phosphate 완충 용액에 녹이고 여러 번 동일한 완충 용액에 투석시킨 다음 DEAE-cellulose column (2.6 × 25 cm)을 건다. 효소는 KCl의 gradient를 걸어서 용출시키고 활성을 띠는 분획을 모아 5 mM CaCl<sub>2</sub>를 포함하고 있는 10 mM Tris-HCl 완충용액 (pH 7.2)에 철저히 투석시킨다. 이 시료를 sephardex G-200 column (1.6 × 95 cm)을 걸어서 활성 분획을 모은다. CGTase의 정제도와 활성도는 각각 SDS-PAGE와 HPLC를 이용하여 측정한다.

### 결정화

결정화의 목적으로 정제된 효소를 150 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>를 함유하는 0.1 M PIPES 완충 용액 (pH 7.0)에 철저히 투석시킨 다음 YM 30 (Amicon)을 이용하여 ultrafiltration에 의해 20 mg/ml 까지 농축시킨다. 처음의 결정화 조건을 찾기 위한 screen은 Jancarik과 Kim(18)에 의해 기술된 sparse matrix를 사용하였다. CGTase의 결정은 실온에서 150 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>를 포함한 0.1 M PIPES 완충 용액 (pH 7.0)에서 20-25% (w/v) PEG 6,000을 침전제로 사용하여 sitting drop vapor diffusion법으로 Choe 등(17)에 의해 보고된 것과 같이 하여 결정화 하였다.

### CLEC CGTase의 제조

8-10 개의 결정 (0.2 × 0.2 × 0.3 mm)을 0.5%의 glutaraldehyde를 포함하는 1 ml의 결정화 완충 용액 (0.1 M PIPES, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 20-25% PEG 6,000, pH 7.0)과 섞어서 1 시간 동안 20°C에 incubation시켰다. 그런 다음 20 mM NaOAc와 2 mM CaOAc의 완충용액 (pH 5.5)으로 여러 번 씻어서 사용 전까지 4°C에 보관하였다.

### 생성물의 분석

CLEC CGTase들을 0.5% (w/v)의 계면활성제나 또는 15-40% (w/v) 유기 용매가 포함된 500 μl의 5% 용해된 녹말 용액 (20 mM NaOAc, 2 mM CaOAc, pH 5.5)에 30분 동안 thermomixer (Eppendorf)에서 incubation 시킨 후에 CLEC CGTase들은 여과 (Amicon YM 30)에 의해 제거하였고 쇄상의 올리고당들은 methanol 침전 (1 : 1, v/v)에 의해 분리하였다. 여과액을 원심분리한 후에 HPLC (waters, μ-Bodapak/탄수화물 분리 column; 30 ×

7.5 cm, 유속: 0.8 ml/min)를 사용하여 생성된 CD들을 분석하였다. 이 때 유동 상으로는 30% acetonitrile을 용매로 사용하였다.

## 결과 및 고찰

일반적으로 CD 생성물의 특이성은 서로 다른 *Bacillus* 균이나 *Klebsiella pneumonia*에 의해 생성된 CGTase에 의존된다. *B. macerans*에서 분리한 CGTase는 가장 일찍 알려진 α-CGTase이고 생화학적으로 잘 연구되어져 있다(19). *B. macerans*에서 CGTase는 음이온 교환 column (DEAE-cellulose)과 gelfiltration (superdex G-200)을 이용하여 순수하게 정제하였다. 정제된 CGTase는 상온에서 침전제로써 20-25%의 PEG 6,000을 써서 sitting drop vapor diffusion법을 사용하여 결정화 시켰다(Fig. 1).



Figure 1. Crystals for preparing the CLEC CGTase from *B. macerans*.

이 결정들을 0.5% glutaraldehyde로 처리하여 CLEC (재료 및 방법 참조)로 만들었다. 이런 CLEC화된 CGTase들은 CD를 생산하기 위한 실험에 사용되어졌다. CD 생성의 특이성은 반응물의 pH에 의존하는 것으로 알려져 있다. *B. macerans*의 CLEC CGTase의 α-CD 특이성은 반응물의 pH가 6 이하이거나 9.5를 초과할 때 최대치를 보였다(자료 미공개). 본 연구에서는 이 점을 고려하여 모든 실험의 pH를 5.5로 고정하여 실험하였다.

CLEC CGTase는 계면활성제가 이온을 띄거나 이온을 가지지 않은 용액에서 모두 다 안정하였다. 또한 CLEC CGTase는 활성도를 감소시키지 않고 반복하여 사용할 수 있었다. 여러 계면 활성제 (Triton X-100, Tween 80, SDS, CTAB, Lubrol PX and N-octyl-β-D-glucoside) 가 들어 있는 상태에서 CLEC CGTase와 반응시켜 얻어진 CD의 수율은 Fig. 2a에 나타낸 바와 같다.

실험 전반에 걸쳐 반응물에 계면 활성제 (0.5%, v/v)의 첨가하면 CD의 수율이 증가하는 결과를 보였다. 이온을 띄지 않는 계면 활성제들 Triton x-100 (0.5% v/v) 와 Tween 80 (0.5% v/v)에서는 β-CD의 수율을 증가시켜서 실험 조건에서 α-와 β-CD의 수율에 차이를 거의 볼 수 없었다. 그러나 이온을 띄는 계면 활성제 SDS 와 이온을 띄지 않는 N-octyl-β-D-glucoside의 첨가는 α-CD의 수율이 눈에 띈 정도로 증가하는 현상을 보였다. 반응물에 여러 유기 용매(25%, v/v)들 (2-butanol, ethylene glycol, DMSO, formamide, MPD, 와 acetonitrile)의 첨가는 아주 유사한 증가 현상(Fig. 2b)을 보였고, 이는 CLEC CGTase가 아닌 용액 상태의

CGTase를 사용하여 연구 보고한 생성물의 수율이나 생성물의 특이성의 연구 결과와 일치하는 결과를 보였다(7-10).

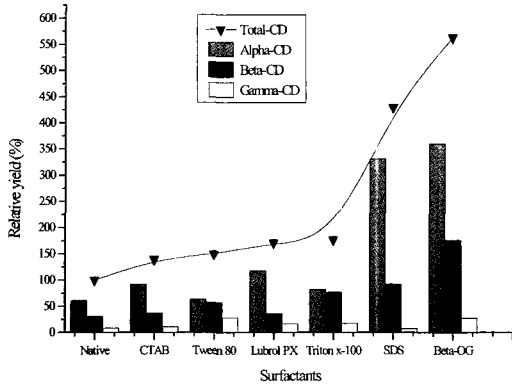


Figure 2a. The effect of surfactants on the product specificity and the total yields of CDs.

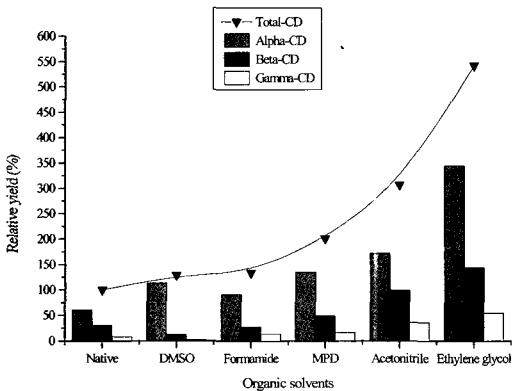


Figure 2b. The effects of organic solvents on the total yields of CDs and their product selectivities.

이런 연구 결과는 계면 활성제나 유기 용매의 첨가가 기질의 용해도를 증가시키거나 효소 CGTase의 활성 부위의 구조 변화를 야기하는 데 기여하지 않을 가함을 시사해 주고 있다. 결론적으로 CLEC CGTase는 극한의 반응 조건에서도 효소의 활성도의 손실이 없이 CD의 수율이나 생성물의 특이성을 증가시킬 수 있는 생물 공학적인 연구에 사용할 수 있으리라 기대한다.

요약

효소인 사이클로덱스트린글루카노트랜스퍼라제 (CGTase)는 효소의 활성도에 칼슘이 관련된 분자내 당 전이반응에 의해 녹말과 그에 관련된 α-1,4-glucan의 기질을 사이클로덱스트린으로 생성시키는 산업적으로 가장 많이 응용되는 효소 중에 하나이다. 수용성 녹말을 기질로 하여 CLEC화한 *Bacillus macerans* α-CGTase 효소를 극한의 반응 조건인 계면활성제나 유기 용매가 혼합된 반응조건에서 실험한 결과, 이들 조건이 사이클로덱스트린의 생산을 증가시키는 영향을 초래하였고 특히, 계면활성제인 SDS와 β-OG는 전체 사이클로덱스트린의 생성을 증가시켰고 이 중에서 SDS와 Lubrol PX는 알파사이클로덱스트린의 생성의 특이성의

결과를, 반면에 Triton x-100과 Tween 80은 알파사이클로덱스트린의 생성을 억제하는 결과를 보였다. 유기용매인 DMSO, formamide, MPD, ethylene glycol 또한 사이클로덱스트린의 전체 수율과 특이성에 영향을 미치는 효력을 보였다.

감사

본 연구는 2003년도 한국 학술진흥재단 사업 지방대학 육성지원과제 (과제번호 KRF-2003-002-C00122)의 지원으로 수행하였음을 명시하며 학술진흥재단에 감사드린다.

Abbreviations

- CDs : Cyclodextrins
- CLEC : Cross linked enzyme crystal
- CTAB : Cetyltrimethylammonium bromide
- DMSO : Dimethyl sulfoxide
- MPD : 2-methyl-2,4-pentandiol
- PIPES : Piperazine-N,N'-bis (2-ethanesulfonic acid; 1,4-Piperazinediethanesulfonic acid)
- SDS : Sodium dodecyl sulfate
- β-OG : N-octyl-β -D-glucoside

REFERENCES

1. Saenger, W. (1980), Cyclodextrin inclusion compounds in research and industry, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **19**, 344-362.
2. Li, S. and W. C. Purdy, (1991), Liquid chromatographic separation of phenothiazines and structurally-related drugs using a beta-cyclodextrin bonded phase column, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **9**, 409-415.
3. Depinto, J. A. and L. L. Campbell (1968), Purification and properties of the cyclodextrinase of *Bacillus macerans*, *Biochem.* **7**, 121-125.
4. Kobayashi, S., K. Kainuma, and S. Suzuki, (1978), Purification and some properties of *Bacillus macerans* cyclodextrinase (cyclodextrin) glucanotransferase, *Carbohydr. Res.* **61**, 229-238.
5. Bender, H. (1977), Cyclodextrin glucanotransferase from *Klebsiella pneumoniae*. Significance of the enzyme for the metabolism of cyclodextrins by *Klebsiella pneumoniae* M 5 al, *Arch. Microbiol.* **113**, 49-56.
6. Kitahata, S. and S. Okada, (1982), Comparison of action of CGTase from *Bacillus megaterium*, *B. circulans*, *B. steirerensis* and *B. macerans*, *J. Jpn. Soc. Starch. Sci.* **29**, 13-18.
7. Aleksey, Z. and M. K. Alexander, (1988), Enzymatic catalysis in nonaqueous solvent, *J. Biol. Chem.* **263**, 3194-3201.
8. Morita, T., N. Yoshida, and I. Karube, (1996), A novel synthesis method for cyclodextrins from maltose in water-organic solvent systems, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **56**, 311-324.
9. Blackwood, A. D. and C. Bucke, (2000), Addition of polar organic solvents can improve the product selectivity of cyclodextrin glucosyltransferase. Solvent effects of cgtase, *Enzyme Micro. Technol.* **27**, 704-708.
10. Ishii, N., K. Haga, K. Yamane, and K. I. Harata, (2000), Crystal structure of alkalophilic asparagine 233-replaced cyclodextrin glucanotransferase complexed with an inhibitor, acarbose, at 2.0 Å resolution, *J. Biochem. (Tokyo)* **127**, 383-91.

11. Strokopytov, B, R. M. A. Knegtel, D. Penninga, G. J. Rozeboom, K. H. Kalk, L. Dijkhuizen, B. W. Dijkstra (1996), Structure of cyclodextrin glucosyltransferase complexed with a maltonaose inhibitor at 2.6Å resolution. Implications for product specificity, *Biochem.* **35**, 4241-4249.
12. Knegtel, R. M. A., B. Strokopytov, D. Penninga, O. G. Faber, H. J. Rozeboom, K. G. Kalk, L. Dijkhuizen and B. W. Dijkstra (1995), Crystallographic studies of the interaction of cyclodextrin glucosyltransferase from *Bacillus circulans* strain 251 with natural substrates and products, *J. Biol. Chem.* **270**, 29256-29264.
13. Doukyu, N., H. Kuwahara and R. Aono (2003), Isolation of *Paenibacillus illinoisensis* that produces cyclodextrin glucanotransferase resistant to organic solvents, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **67**, 334-240.
14. Lyer, J. L., P. Shetty, and J. S. Pai (2003), Immobilisation of cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus circulans* ATCC 21783 on purified seassand, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **30**, 47-51.
15. Sobral, K., R. Rodrigues, R. Oliveira, J. Olivo, P. De Moraes and G. Zanin (2003), Evaluation of supports and methods for immobilization of enzyme cyclodextrin glycosyltransferase, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **108**, 809-820.
16. Stavn, A., and P. E. Granum (1979), Purification and physicochemical properties of an extracellular cycloamylose (cyclodextrin) glucanotransferase from *Bacillus macerans*, *Carbohydr. Res.* **75**, 243-250.
17. Choe, H.-W., K. S. Park, J. Labahn, J. Granzin, C.-J. Kim, and G. Bueldt (2003), Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of  $\alpha$ -cyclodextrin glucanotransferase isolated from *Bacillus macerans*, *Acta Cryst.* **D59**, 348-349.
18. Jancarik, J. and S.-H. Kim (1991), Sparse matrix sampling : A screening method for crystallization of proteins, *J. Acta Crystallogr.* **24**, 409-411.
19. Bender, H. (1983), An improved method for the preparation of cyclo-octaamylose, using starches and the cyclodextrin glycosyltransferase of *Klebsiella pneumoniae* M 5a1, *Carbohydrate research* **124**, 225-233.