

Paenibacillus sp. JB-13 Cyclodextrin Glucanotransferase 유전자의 *E. coli* 에서의 발현 및 최적 생산

김해윤¹ · 이상현² · 김해남³ · 민복기⁴ · 백형석^{1*} · 전홍기¹

¹부산대학교 생명과학부, ²신라대학교 생명공학과, ³미산대학 뷰티케어과,

⁴을지의과대학교 임상병리학과

L-ascorbic acid (AA)의 2번 위치의 수산기에 부위 특이적 활성을 갖는 *Paenibacillus* sp. JB-13 유래의 cyclodextrin glucanotransferase (CGTase, EC 2.4.1.19) 유전자(*cgt* gene)를 pEXP7 발현 vector에 클로닝하여 재조합 균주를 구축하였다. 재조합 균주의 CGTase 생산 최적 조건을 검토하여 본 결과 LB 배지에 0.5% glucose, 3.0% polypeptone, 0.3% K₂HPO₄, 0.5% NaCl이 되도록 추가하고, 초기 pH 7.0, 접종량 2%, 통기량 0.1 vvm, 배양 온도 37°C, 배양 시간 14시간의 조건에서 최대 활성을 나타내었다. 재조합 균주와 기존 균주의 CGTase 활성을 비교한 결과 재조합 균주는 배양 14시간째 640 units/ml의 활성을 가져 기존 균주에 비해 70%의 활성을 나타내지만 배양 시간을 1/4로 단축시킬 수 있다는 이점이 있음을 확인하였다. 재조합 균주가 생산한 CGTase를 AA-2G 합성에 적용하여 AA-2G를 합성하고 HPLC로 분석한 결과 단일 peak를 확인할 수 있었고 α -glucosidase를 처리하여 확인한 결과 AA와 glucose로 분리됨을 확인할 수 있었다.

Key words □ AA-2G, CGTase, cyclodextrin glucanotransferase, *Paenibacillus* sp. JB-13, transglucosylation

비타민 C라고도 알려진 L-ascorbic acid (AA)는 인간이나 동물의 생체에서 필수 영양소로 작용하며, 최근에는 의약품, 건강 보조 식품, 화장품, 식품 첨가제 및 보존제 등의 다양한 용도로 널리 사용되고 있다. 생리적 필요량보다 많은 AA를 섭취할 경우 항산화작용 등의 약리 효과도 기대되고 있다(5, 24). 이러한 유용성에도 불구하고 열이나 자동 산화에 아주 민감하여 쉽게 분해되므로 제품 중에 필요량 이상을 첨가해야 하며 보존 및 취급에도 그 만큼 주의가 요구되는 단점이 있다. 이를 해결하기 위해 많은 과학자들이 열과 산화에 안정하며 투여 시 AA와 같은 기능을 가질 수 있는 여러 가지의 유도체를 연구해 왔다. 그러나 대부분은 유기 화학 합성법에 의존해 왔으며, 반응이 복잡하고 정제 또한 곤란해서 실용화에는 적합하지 않았다. 또한 투여 후 생체 내에서 AA로서 생리 활성을 발휘하는 provitamin의 기능을 가진 것은 거의 없었다.

이러한 문제점 해결을 위해 많은 노력을 기울인 결과 마침내 1990년 일본의 Mandai 등이 2-O- α -D-glucopyranosyl L-ascorbic acid (AA-2G)라고 하는 신규 유도체를 발견하였다(14). 이 물질은 AA의 2번 위치의 수산기가 glucose 1분자로 α -치환된 것으로 열 및 산화와 같은 radical 반응을 받기 어려운 구조여서 산화 및 수용액 중에서 안정하다. 특히 AA-2G는 AA와 달리 Fe²⁺ 혹은 Cu²⁺의 존재 하에서도 안정하며 ascorbate oxidase에 대해서

도 저항성을 갖는다(23). 또한 AA에 비해서 내열성과 내광성(耐光性)이 크게 증대되어 100°C, 30분 동안의 가열에도 분해되지 않고 또한 직접적인 환원 활성을 가지고 있지는 않지만 세포라든지 생체에 투여되면 그 곳에 존재하는 α -glucosidase에 의해서 환원형 AA와 glucose로 분해되어 AA와 마찬가지로 항괴혈병 작용(24)이라든지 collagen의 합성 촉진(22), 백내장 예방 작용, 면역 촉진 작용(25) 등의 생리 활성을 발휘하며 AA에서는 발견되지 않았던 항체 생산 증강 작용이 있다는 것도 밝혀졌다. 뿐만 아니라 AA-2G는 중성 용액 중에서 안정하기 때문에 주사제의 조제 및 세포 내에서의 AA의 생리적 기능 연구도 가능하다.

AA-2G에 대한 흥미로운 연구 결과 중의 하나는 *Bacillus* 속이 생산하는 당전이 효소인 cyclodextrin glucanotransferase (CGTase, EC 2.4.1.19)에 의해 합성이 가능하다는 것이다(6, 7). CGTase는 starch나 amylose, amylopectin, maltooligosaccharide 등의 기질에 작용하여 cyclodextrin (CD)을 합성하는 분자 내 당전이 반응인 cyclization 반응(16)과 분자간 당전이 반응인 coupling 반응(21) 및 disproportionation 반응을 매개하는 다기능 효소이다(4). 하지만 CGTase의 주작용은 CD 합성 반응으로 starch로부터 glucose 6-8개가 α -1,4-glucosidic 결합으로 환상 연결된 비환원성의 α , β , γ -CD를 생산한다. CGTase는 *Bacillus macerans* (1), *B. circulans* (15), *B. obhensis*, *B. megaterium*, *B. coagulans*, *B. firmus* (11), *B. stearothermophilus* (2, 19), alkalophilic *Bacillus* sp. (20) 등의 주로 *Bacillus* 속 세균이 생산하는 것으로 알려져 있으나 생산 효율이 그리 높지 못한 실정이다.

최근 본 연구팀이 분리하여 동정한 *Paenibacillus* sp. JB-13이

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 82-51-510-2271, Fax: 82-51-514-1778
E-mail: hsubaik@pusan.ac.kr

기존에 보고된 *Bacillus* 속 균주의 CGTase보다 AA-2G 생산 활성이 높은 것을 확인하고(3, 9) 유전 공학적 기법을 사용하여 CGTase 유전자를 재조합하여 효소의 대량 생산을 시도하였다. 또한 AA-2G 합성에 CGTase를 사용함으로써 이미 구축되어 있는 AA-2G 합성·정제 시스템을 통한 AA-2G 대량 생산 가능성을 확인하였다.

재료 및 방법

cgf 유전자 클로닝 및 서열 결정

cgf gene의 DNA 단편을 획득하기 위한 PCR 반응은 본 연구팀에서 분리하여 동정한 *Paenibacillus* sp. JB-13 (3, 9)의 genomic DNA를 template로 하고, forward primer (CGTase-F2; GGA GGT ATA GTA TGA AAA GA) 및 reverse primer (CGTase-R-PstI; CTG CAG TTA AGG CTG CCA GTT CAC ATT C)를 사용하여 pre-denaturation 94°C 5분 수행 후, denaturation 94°C 20초, annealing 58°C 20초, extension 72°C 1분 과정을 30회 반복하여 수행하였다. 획득한 DNA 산물은 pGEM-T Easy vector (Promega, USA)에 클로닝하여 DNA 염기서열을 결정하였으며, 그 크기는 2,142 bp로 713개의 아미노산을 암호화하였다(GenBank accession No. EU572721). 이 중 N-말단 부위의 27개 아미노산은 signal sequence로 알려져 있었으며(18), *E. coli*에서 발현시키기 위해 이를 제외한 부분을 forward primer (CGTase-F-SalI; GTC GAC ATG GCG CCG GAT ACC TC) 및 reverse primer (CGTase-R-PstI)를 사용하여 위 PCR 조건으로 DNA 산물을 획득하였다. PstI, SalI 제한효소를 사용하여 cgf gene을 발현 vector인 pEXP7 vector (13)에 클로닝하고 *E. coli* DH5 α (Promega, USA)에 형질전환하여(8) CGTase를 생산하는 재조합 *E. coli* 균주를 구축하였다.

CGTase 활성 측정

cgf gene의 발현을 확인하기 위해 야생형 *E. coli*와 재조합 *E. coli* 균주 그리고 분리 균주인 *Paenibacillus* sp. JB-13을 각각 배양하여 다음과 같은 방법으로 CGTase 활성을 측정하였다.

먼저 기존 균주인 *Paenibacillus* sp. JB-13 배양 상등액과 재조합 균주의 배양 상등액, 배양액 파쇄액을 각각의 조효소액으로 설정하여 실험에 사용하였으며 측정 방법은 다음과 같다. Sample에 기질 [5 mM α -cyclodextrin (Korea food materials Co., Korea), 25 mM sucrose, pH 7.0] 300 μ l를 넣은 후 45°C에서 한 시간 동안 반응하였다. 100°C에서 5분간 가열하여 반응을 정지시킨 후 glucoamylase solution [99.5 mg glucoamylase (Sigma Co., USA) in 0.5 M acetic acid 200 ml, pH 5.0] 500 μ l를 첨가하여 55°C에서 30분 동안 반응시켰다. 반응액을 Somogyi-Nelson법(17)을 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하여 유리된 환원당을 측정하였다. 효소의 활성은 units/ml로 표시하고, 1 unit은 1분에 1 μ M의 환원당을 생성하는 효소량으로 정의하였으며, 다음의 식으로 계산하였다.

$$\frac{(\text{Sample 흡광도 값} - \text{Blank 흡광도 값}) \times 49.96}{1.477} \times \text{희석 배수}$$

CGTase 최적 생산 조건 검토

배지 성분 및 생육 조건을 최적화함으로써 CGTase의 최적 생산 조건을 검토하였다. 배지 성분으로는 각각의 탄소원, 질소원, 인산염 및 염(NaCl)의 농도를 달리하여 첨가한 후 37°C에서 진탕 배양하여 균 생육도와 균 배양액의 pH 및 효소 활성을 측정하였다. 생육 조건으로는 초기 pH와 통기량, 접종량을 달리하여 37°C에서 진탕 배양한 후 균 생육도와 균 배양액의 pH 및 효소 활성을 측정하였다.

CGTase의 정제 및 AA-2G 생산

구축된 재조합 *E. coli* 균주를 설정된 최적 조건에서 진탕배양한 후 얻어진 배양액을 4°C에서 원심분리(15,000 \times g, 20 min)한 후 상등액을 50% (NH₄)₂SO₄로 염석하고 투석하여 AA-2G 생산을 위한 조효소액으로 사용하였다. 재조합 균주인 *E. coli*가 생산하는 CGTase에 의한 AA-2G 생산 최적 조건은 이미 보고된 AA-2G 합성 조건(12)을 이용하였다. 생산된 AA-2G의 분석은 HPLC를 사용하여 수행하였으며, 그 조건은 다음과 같다. Pump: Waters 515, Detector: Waters 2487 (UV 238 nm), Mobile phase: 0.1 M potassium phosphate; phosphoric acid (pH 2.0), Column: Capcellpak C₁₈ (Shiseido Co., Japan), Injection volume: 20 μ l, Flow rate: 0.5 ml/min. AA-2G 표준품은 일본 Kinki 대학 식품과학과의 Sakai 교수로부터 공급받아 사용하였다(9).

결과 및 고찰

cgf Gene 염기 서열 결정

확보된 cgf gene의 염기서열은 GenBank (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)에 수록되어 있는 CGTase 생산 *Bacillus* 속 균주의 cgf gene과 최대 98%의 상동성을 나타내었다(결과 미제시).

CGTase 생산 확인

LB broth에 CGTase를 생산하는 재조합 *E. coli* 균주를 접종하여 37°C에서 9시간 진탕배양하였다. 배양액을 원심분리하여 상등액과 균체로 분리하여 CGTase 활성 측정 결과 상등액에서는 활성이 나타나지 않았으며 균체 파쇄액에 활성이 확인되어 본 균주가 생산하는 CGTase는 세포 내 효소로 판단되었다.

CGTase 최적 생산 조건 검토

재조합 *E. coli* 균주의 CGTase 생산 최적 조건을 설정하기 위하여 탄소원, 질소원, 인산염, 염의 영향 및 각각의 농도를 달리하여 배양 시간 경과에 따른 균의 증식 및 효소 생산성을 다음과 같이 검토하였다.

(1) 탄소원의 영향

기본 배지인 LB 배지에 각종 탄소원을 1.0% 첨가한 후 37°C에서 진탕 배양하여 전술한 방법에 따라 효소 활성 및 균 생육도를 측정하였다. 그 결과 탄소원으로는 glucose를 사용하였을 때 가장 높은 활성을 나타내었다(Table 1). 탄소원 농도별 영향은 glucose를 0.5%에서 2.0%까지 첨가하여 효소 활성을 측정하였다. 그 결과 0.5% 농도일 때 가장 높은 활성을 나타내었다(Fig. 1A).

(2) 질소원의 영향

LB 배지에서 1.0% tryptone과 0.5% yeast extract 대신 각종 질소원을 1.0%씩 첨가하여 측정하였다. 그 결과 1.0% polypeptone에서 가장 높은 활성을 나타내었다(Table 2). 질소원 농도별 영향은 glucose를 0.5% 첨가한 배지에 polypeptone을 1.0%에서 5.0%까지 첨가하여 효소 활성을 측정하였다. 그 결과 5.0% 농도일 때 가장 높은 활성을 나타내었으나 3.0%, 4.0%의 결과와 비교하여 볼 때 그 차이가 미미하므로 3.0%의 polypeptone을 최적 질소원으로 설정하였다(Fig. 1B).

(3) 인산염의 영향

0.5% glucose와 3.0% polypeptone이 함유된 배지에 각종 인산염을 0.1% 첨가하여 측정하였다. 0.1% K₂HPO₄에서 가장 높은

활성을 나타내었다(Table 3). 인산염의 농도별 영향은 glucose 0.5%와 polypeptone 3.0%를 첨가한 배지에 K₂HPO₄를 0.1%에서 0.5%까지 첨가하여 측정하였다. 그 결과 0.5%일 때 가장 높은 활성을 나타내었으나 0.3%에서 0.5%까지의 차이가 미미하므로 0.3%를 최적 농도로 결정하였다(Fig. 1C).

(4) 염(NaCl)의 영향

0.5% Glucose, 2.0% polypeptone 및 0.3% K₂HPO₄이 함유된 배지에 NaCl을 각각 다른 농도로 첨가하여 측정하였다. 그 결과 0.5% 농도일 때 가장 높은 활성을 나타내었다(Fig. 1D).

최적 조건을 토대로 재조합 균주와 기존 균주의 균 생육도 및 CGTase 활성을 확인한 결과는 Fig. 2와 같았다. 재조합 균주와 기존 균주의 CGTase 활성을 비교한 결과 재조합 균주는 배양

Table 1. Effects of various carbon sources on the cell growth and CGTase production

Carbon sources (1.0%)	Cell growth (OD 660)	Final pH	CGTase activity (units/ml)
None	0.43	7.59	84.6
Glucose	2.60	4.97	216.5
Fructose	2.15	5.86	100.5
Maltose	1.96	6.98	89.6
Galactose	2.29	5.37	128.5
Soluble starch	1.86	7.08	100.2
Corn starch	1.67	7.22	86.2
Potato starch	1.59	7.23	88.6
Trehalose	1.57	7.22	89.6
Inulin	1.44	7.32	92.3
Arabinose	1.47	7.33	91.4
Raffinose	1.46	7.36	92.3
Sucrose	1.99	7.25	103.6
Inositol	1.33	7.44	98.4
Lactose	2.21	5.40	103.6
Xylose	1.99	7.22	88.4
Mannitol	1.62	7.33	87.3
Dextran	1.52	7.36	90.1
Dextrin	2.25	7.19	131.9
Melibiose	1.86	7.06	99.1

Table 2. Effects of various nitrogen sources on cell the growth and CGTase production

Nitrogen sources (1.0%)	Cell growth (OD 660)	Final pH	CGTase activity (units/ml)
None	1.54	6.22	100.6
LB media	3.15	4.92	250.9
Beef extract	2.67	4.94	190.8
Yeast extract	3.09	4.97	256.9
Tryptone	3.14	4.84	260.4
Peptone	2.98	5.23	124.3
Corn steep liquor	2.44	5.33	122.3
Polypeptone	3.29	4.96	286.7
Casamino acid	2.12	5.12	110.8
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.66	6.01	104.7
KNO ₃	1.75	6.11	94.3
NaNO ₃	1.50	6.10	98.7
NH ₄ NO ₃	1.51	6.17	100.4
NH ₄ Cl	1.62	6.20	100.6
CH ₃ COONH ₄	1.53	6.19	99.3

Table 3. Effects of various phosphorous sources on the cell growth and CGTase production

Phosphorous sources (0.1%)	Cell growth (OD 660)	Final pH	CGTase activity (units/ml)
None	2.53	5.67	270.8
K ₂ HPO ₄	3.06	6.33	329.3
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	2.64	5.14	280.7
NH ₄ H ₂ PO ₄	2.59	5.10	281.5
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	2.77	5.22	296.2
KH ₂ PO ₄	2.44	5.18	248.0
(NH ₄) ₂ HPO ₄	2.02	5.14	226.3

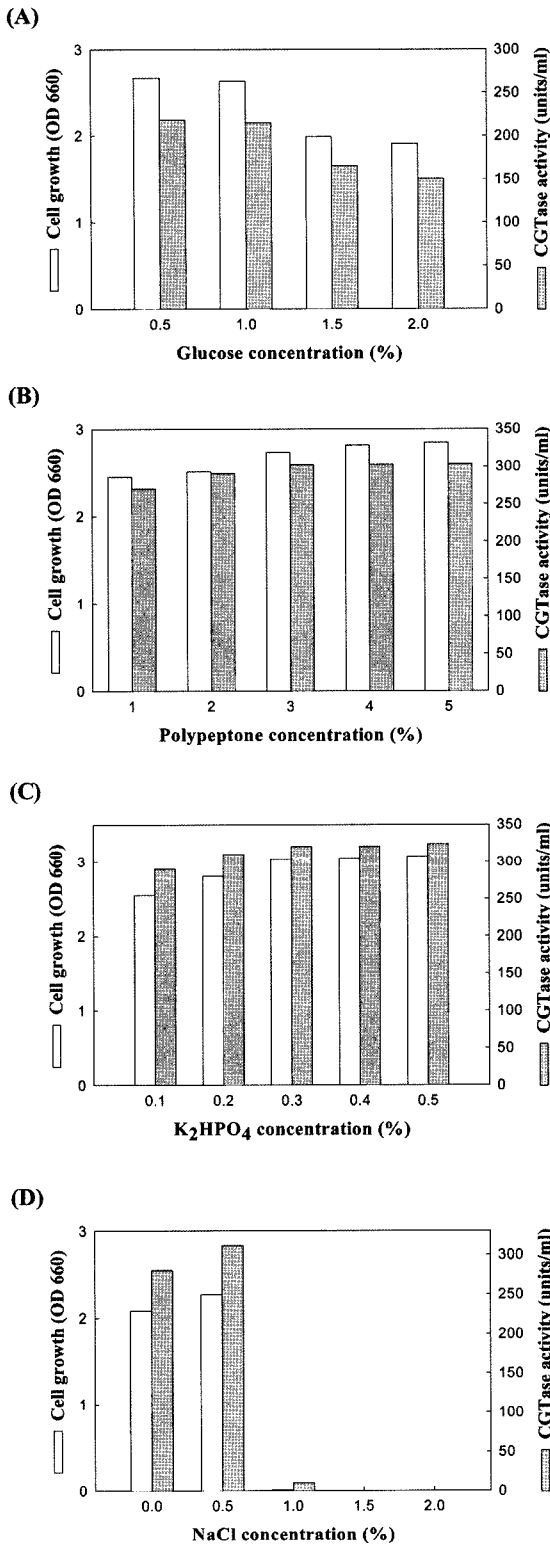


Fig. 1. Effects of various concentration on the CGTase production and cell growth. Reaction was carried out for 9 hr at 37°C in Luria-Bertani medium supplemented with various materials. Optimal conditions for the CGTase production by recombinant *E. coli* was as follows : 0.5% glucose (A), 3.0% polypeptone (B), 0.3% K₂HPO₄(C), 0.5% NaCl (D).

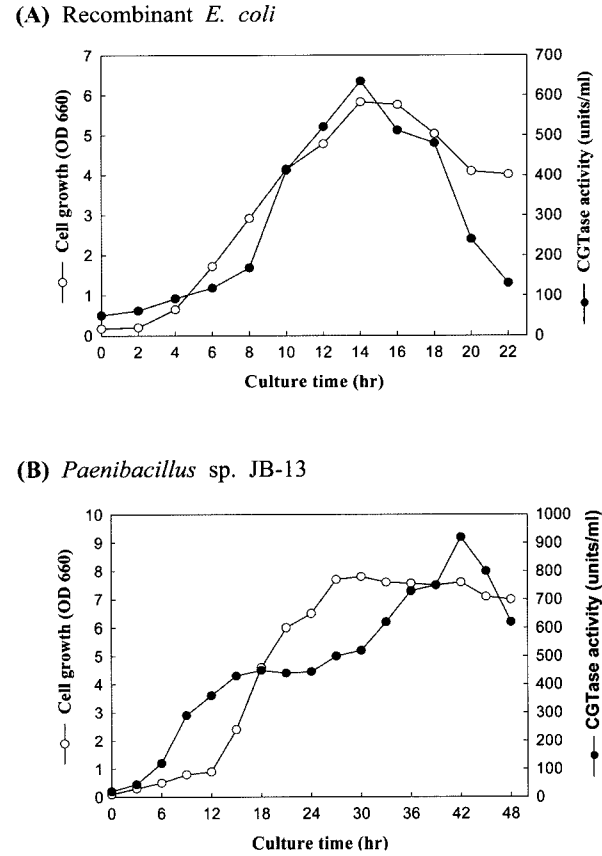


Fig. 2. Time course of CGTase production and cell growth on optimum culture condition. Reaction was carried out at 37°C in LB medium with 0.5% glucose, 3.0% polypeptone, 0.3% K₂HPO₄, 0.5% NaCl.

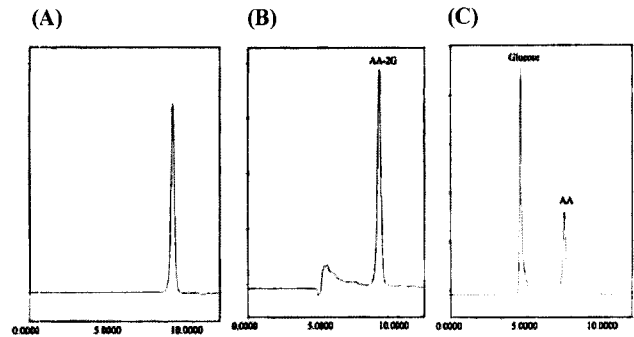


Fig. 3. HPLC chromatograms of the AA-2G purified from reaction mixture produced by recombinant *E. coli* CGTase. AA-2G were analyzed by HPLC with Capcellpak C₁₈ column. (A) Standard AA-2G, (B) Purified AA-2G by recombinant *E. coli* CGTase treatment, (C) Product of α -glucosidase treatment (1 unit, 37°C, 20 min).

14시간째 640 units/ml의 활성을 가져 기존 균주에 비해 70%의 활성을 나타내었다. 확보된 *cgt* gene을 directed evolution 전략 (10)으로 추가적인 연구를 통해 그 기능을 개선할 수 있는 기초를 마련하였다고 사료된다.

AA-2G 생산 및 분석

재조합 균주에서 정제된 CGTase를 AA-2G 생산 조건에 적용하여 AA-2G를 생산하고 HPLC를 사용하여 분석한 결과 AA-2G 표준품과 합성된 AA-2G는 동일한 peak를 나타내었다(Fig. 3). 또한 생산된 AA-2G 반응 산물 20 μ l에 1 unit α -glucosidase를 처리하여 AA와 glucose로 분리됨을 확인할 수 있었다. 이는 AA-2G가 생체 내에 존재하는 α -glucosidase에 의해 AA와 glucose로 분리되어 AA의 생리적 기능을 나타냄을 반증하는 결과이다.

감사의 말

본 연구에 참여한 연구자의 일부는 (2단계 BK21 사업)의 지원을 받았으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Abe, S., Y. Nagamine, K. Omichi, and T. Ikenaka. 1991. Investigation of the active site of *Bacillus macerans* cyclodextrin glucanotransferase by use of modified maltooligosaccharides. *J. Biochem.* 110, 756-761.
2. Ahn, J.H., J.B. Hwang, and S.H. Kim. 1990. Cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus stearothermophilus*: Purification by affinity chromatography and its properties. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 18, 585-590.
3. Bae, K.M., Y. Kang, and H.K. Jun. 2001. Production of 2-O- α -D-glucopyranosyl L-ascorbic acid by cyclomaltodextrin glucanotransferase from *Paenibacillus* sp. JB-13. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 29, 31-36.
4. Bovetto, L.J., D.P. Backer, J.R. Vilette, P.J. Sicard, and S.J. Bouquet. 1992. Cyclomaltodextrin glucanotransferase from *Bacillus circulans* E 192. 1. Purification and characterization of the enzyme. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 15, 48-58.
5. Frei, B., L. England, and B.N. Ames. 1998. Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 6377-6381.
6. Gawande, B.N., A. Goel, A.Y. Patkar, and S.N. Nene. 1999. Purification and properties of a novel raw starch degrading cyclomaltodextrin glucanotransferase from *Bacillus firmus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51, 504-509.
7. Hajime, A., Y. Masaru, S. Shuzo, and Y. Itaru. 1991. Synthesis of 2-O- α -D-glucopyranosyl L-ascorbic acid by cyclomaltodextrin glucanotransferase from *Bacillus stearothermophilus*. *Agric. Biol. Chem.* 55, 1751-1756.
8. Inoue, H., H. Nojima, and H. Okayama. 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96, 23-28.
9. Jun, H.K., K.M. Bae, and S.K. Kim. 2001. Production of 2-O- α -D-glucopyranosyl L-ascorbic acid using cyclodextrin glucanotransferase from *Paenibacillus* sp. *Biotechnol. Lett.* 23, 1793-1797.
10. Kelly, R.M., H. Leemhuis, and L. Dijkhuizen. 2007. Conversion of a cyclodextrin glucanotransferase into an alpha-amylase: assessment of directed evolution strategies. *Biochem.* 46, 11216-11222.
11. Kitahata, S. and S. Okada. 1982. Comparison of action of cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus megaterium*, *B. circulans*, *B. stearothermophilus* and *B. macerans*. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.* 29, 13-18.
12. Lee, Y.H., S.H. Lee, and H.D. Shin. 1991. Evaluation of immobilization methods for cyclodextrin glucanotransferase and characterization of its enzymatic properties. *J. Microbiol. Biotechnol.* 1, 54-62.
13. Makoto, O., M. Hiroshi, and O. Takahisa. 1990. Nucleotide sequence and characteristics of the gene for L-lactate dehydrogenase of *Thermus aquaticus* YT-1 and the deduced amino acid sequence of the enzyme. *J. Biochem.* 107, 21-26.
14. Mandai, T., M. Yoneyama, S. Sakai, N. Muto, and I. Yamamoto. 1992. The crystal structure and physicochemical properties of L-ascorbic acid 2-glucoside. *Carbohydr. Res.* 232, 197-205.
15. Marechal, L.R., A.M. Rosso, M.A. Marechal, N. Krymkiewicz, and S.A. Ferrarotti. 1996. Some properties of a cyclomaltodextrin glucanotransferase from *Bacillus circulans* DF 9 R type. *Cell Mol. Biol.* 42, 659-664.
16. Nakamura, A. and K. Yamane. 1994. Four aromatic residues in the active center of cyclodextrin glycanotransferase from an alkalophilic *Bacillus* sp. 1011. Effect of the replacement on substrate binding and cyclization characteristics. *Biochemistry* 33, 929-936.
17. Nelson, N. 1950. A photometric adaption of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* 166, 444-449.
18. Rimphanitchayakit, V., T. Takashi, and S. Yoshiyuki. 2005. Construction of chimeric cyclodextrin glucanotransferases from *Bacillus circulans* A11 and *Paenibacillus macerans* IAM1243 and analysis of their product specificity. *Carbohydr. Res.* 340, 2279-2289.
19. Tanaka, M., N. Muto, and I. Yamamoto. 1991. Characterization of *Bacillus stearothermophilus* cyclodextrin glucanotransferase in ascorbic acid 2-O- α -glucoside formation. *Biochem. Biophys. Acta.* 1078, 127-132.
20. Turnes, R.E. and S. Bahar. 1996. Production of cyclomaltodextrin glucanotransferase from an alkalophilic *Bacillus* sp. in rice and corn flakes. *Acta. Cient. Venez.* 47, 133-137.
21. Vetter, D. and W. Thorn. 1992. Directed enzymatic synthesis of linear and branched glucooligosaccharide, using cyclodextrin glucanotransferase. *Carbohydrate Res.* 223, 61-69.
22. Yamamoto, I., N. Muto, K. Murakami, and J. Akiyama. 1992. Collagen synthesis in human skin fibroblasts is stimulated by a stable form of ascorbate, 2-O- α -D-glucopyranosyl L-ascorbic acid. *J. Nutr.* 122, 871-877.
23. Yamamoto, I., N. Muto, E. Nagato, T. Nakamura, and Y. Suzuki. 1990. Formation of a stable L-ascorbic acid α -glucoside by mammalian α -glucosidase catalyzed transglucosylation. *Biophys. Acta.* 1035, 44-51.
24. Yamamoto, I., S. Suga, Y. Mitoch, M. Tanaka, and N. Muto. 1990. Antiscorbutic activity of L-ascorbic acid 2-glucoside and its availability as a vitamin C supplement in normal rats and guinea pigs. *J. Pharmacobiodyn.* 13, 688-695.
25. Yamamoto, I., M. Tanaka, and N. Muto. 1993. Enhancement of *in vitro* antibody production of murine splenocytes by ascorbic acid 2-O- α -glucoside. *Int. J. Immunopharmacol.* 15, 319-325.

(Received January 10, 2008/Accepted March 24, 2008)

ABSTRACT : Expression and Optimum Production of Cyclodextrin Glucanotransferase Gene of *Paenibacillus* sp. JB-13 in *E. coli*

Hae-Yun Kim¹, Sang Hyeon Lee², Hae-Nam Kim³, Bokkee Min⁴, Hyung Suk Baik^{1*}, and Hong-Ki Jun¹ (¹Division of Biological Science, Pusan National University, Busan 609-735, Republic of Korea, ²Department of Bioscience and Biotechnology, Silla University, Busan 617-736, Republic of Korea, ³Department of Beauty Care, Masan College, Masan 630-729, Republic of Korea, ⁴Department of Biomedical Laboratory Science, Eulji University, 143-5, Yongdoo-dong, Joong-gu, Daejeon 301-832, Republic of Korea)

The purpose of this study is to clone *cgt* gene from *Paenibacillus* sp. JB-13 and to overexpress the protein in *E. coli*. For this purpose, the *cgt* gene was amplified from *Paenibacillus* sp. JB-13 genomic DNA by PCR using degenerate oligonucleotide primers. The sequence analysis results showed that the *cgt* gene from *Paenibacillus* sp. JB-13 has 98% homology with the *cgt* gene of *Bacillus* sp. To overexpress the protein, the *cgt* gene was cloned into pEXP7 expression vector and transformed into *E. coli*. The production of CGTase by recombinant *E. coli* was optimized under following conditions: 0.5% glucose, 3.0% polypeptone, 0.3% K₂HPO₄, 0.5% NaCl, and 7.0 of initial pH, 2.0% of inoculum, 37°C of culture temperature for 14 hr. And the optimal agitation was found at 0.1 vvm. The synthesis of 2-O- α -D-Glucopyransyl L-Ascorbic acid (AA-2G) using the CGTase expressed in *E. coli* was identified as AA-2G by HPLC and HPLC confirmed that treating AA-2G made by cloned CGTase with α -glucosidase substantially produced AA and glucose.