

Bacillus stearothersophilus 에 의한 Cyclomaltodextrin Glucanotransferase 의 생산

황진봉 · 김승호 · 이태경¹ · 양한철^{1*}

한국식품개발연구원, ¹고려대학교 생물공학연구소

Production of Cyclomaltodextrin from *Bacillus stearothersophilus*

Hwang. Jin-Bong, Seung-Ho Kim, Tae-Kyung Lee¹ and Han-Chul Yang^{1*}

Korea Food Research Institute, ¹Institute of Biotechnology,
Korea University, Seoul 136-791, Korea

A microorganism capable of producing high level of extracellular cyclomaltodextrin glucanotransferase (EC 2.4.1.19; CGTase) was isolated from soil. The isolated strain No. 239 was identified as *Bacillus stearothersophilus*. The maximal CGTase production (about 7.0 units/ml) was observed in medium containing 2% soluble starch, 0.5% defatted soybean meal, 0.1% $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ and 0.015% CaCl_2 with initial pH 7.0. The strain was cultured at 55°C for 48 hr with reciprocal shaking. At 0.83% substrated concentration potato starch was the optimum substrate with 50.1% conversion to cyclodextrin (CD) after the reaction at 65°C for 24 hr (CGTase 10 unit/g starch). Using soluble starch as substrate (5% substrate concentration, CGTase 10 unit/g starch), the maximum conversion of 40% was obtained at 11 hr reaction, and the ratio of α -, β - and γ -CD production at this time were 1.0:1.3:0.4, respectively.

Cyclomaltodextrin Glucanotransferase (EC 2.4.1.19, 1,4- α -D-Glucan 4- α -D-(1,4 glucano)-transferase, cyclizing; CGTase)는 전분을 분해하여 6-12 개의 glucose 분자가 α -1,4-glucoside 결합으로 환상결합한 왕관형태의 (1) cyclodextrin (CD) 중에서 glucose 분자 6, 7, 8 개로 구성되어 있는 α -, β - 및 γ -CD를 생성하며 합성된 CD를 개환 또는 적당한 수용체에 전이시키는 효소이다(2). CD에 대한 연구는 1904년 Schardinger에 의해 보고된 이후 1939년 Tilden-Hudson 등(3)에 의해서 *Bacillus macerans*가 생산하는 CGTase에 관한 연구가 시작되었으며 1970년대에 들어와서 비로소 CGTase 효소특성과 CD 제조법, 성질응용에 관한 연구가 이루어지기 시작하였고(4-6) 최근에는 gene cloning과 sequence에 관한 연구가 보고되고 있다(7-9).

CGTase를 생산하는 균주로는 *B. macerans*, *B. me-*

gaterium(10), *B. circulans*(11), *B. stearothersophilus*(12, 13), *B. ohbensis*(14), *Klebsilla pneumoniae*(15), *B. coagulans* 등(16)이 있으며 이들 균주로부터 분비하는 효소들은 전분을 기질로하여 합성된 CD의 생성 비율과 효소적 성질이 균종마다 각각 다른 것으로 알려져 있다(13, 17, 18). 국내의 경우 CGTase에 관한 연구는 오 등(19)이 *Bacillus* sp., 김(20)의 *B. macerans* IFO 3490, 유 등(21)의 호알카리성 *Bacillus* sp., 이 등(22)의 alkalophilic *B. circulans*가 보고되고 있다.

CGTase에 의해서 생성된 CD는 분자내에 특징적인 소수성 영역을 가지고 있어 그 공동내에 많은 유기 및 무기화합물을 끌어들이어 포접화합물을 형성함으로써 화학적, 물리적 및 생리적 성질을 변화시키는 특이한 성질을 갖고 있다(23, 24). 이와 같은 포접작용에 의하여 CD는 휘발성물질의 안정화, 산화·광분해성 물질의 보호, 물리·화학적 성질의 개선, 유효작용 등 여러 가지 물성개선 효과가 있어 식품, 의약품, 농약 그리고 화장품 등에 사용되고 있으며 수요가 매년 증가되고 있다(18, 25,

Key words: *Bacillus* sp., cyclomaltodextrin glucanotransferase

*Corresponding author

26).

그러나 아직 그 용도가 제한을 받고 있으며 그 주요 원인의 하나는 CD의 가격이 높다는 점이다. 따라서 CD의 시장확대를 위해서는 그 가격인하가 필요하며 이를 달성하기 위해서는 우수한 CGTase의 개발이 그 관건이라 할 수 있겠다. 현재 CD의 일반제조 공정은 전분을 호화시킨 후 냉각한 다음 효소반응시키기 때문에 (27) 낮은 온도로 냉각할수록 반응시간이 길어지며 노화되기 쉬워 이를 방지하기 위해 호화시 α -amylase로 첨가하면 CD 생산수율이 낮아지므로 열안정성이 높은 CGTase가 요구되고 있다.

본 연구에서는 토양으로부터 열안정성이 높은 CGTase를 생산하는 호열성 균주를 분리한 후 그 형태학적, 배양학적 및 생화학특성에 의해 동정하고 그 CGTase의 생산에 대한 최적 배양조건을 연구 검토하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 시약

본 연구에 사용한 균주는 전국 각지에서 채취한 토양 시료로부터 선별하였다. 표준물질 α -, β -, γ -CD는 Sigma사 제품을 사용하였다.

CGTase 생산균주의 분리 및 동정

생리식염수 10m/에 약 1g의 토양시료를 첨가하여 얻은 현탁액을 80°C에서 10분간 활성화시킨 다음 alkaline medium(18)의 pH를 7.0으로 바꾼 액체배지에 1% 접종하여 55°C에서 24시간 진탕배양하였다(100 rpm). 균주의 선별은 이 배양액을 agar 배지에 도말하여 55°C에서 24시간 배양하였다.

이 때 agar 배지에는 congo red 0.03%를 첨가하여 중성에서 CGTase 활성이 있는 균은 균주위에 노란환을 형성하게 하였으며 이는 알카리성에서 phenolphthalein을 사용한 것(28)에 착안하여 변형한 것이며 노란환을 형성한 균주를 1차 선별하였다(Fig.1 참조). 1차 선별된 균주들은 액체배양하여 CGTase 활성이 높은 것을 최종 선별하였다.

최종 분리균의 동정은 Manual of methods for general bacteriology(29)와 Bergey's manual of systematic bacteriology(30)에 수록되어 있는 일반세균 동정법에 따라 실시하였다.

조효소액 조제 및 CGTase 활성측정(10)

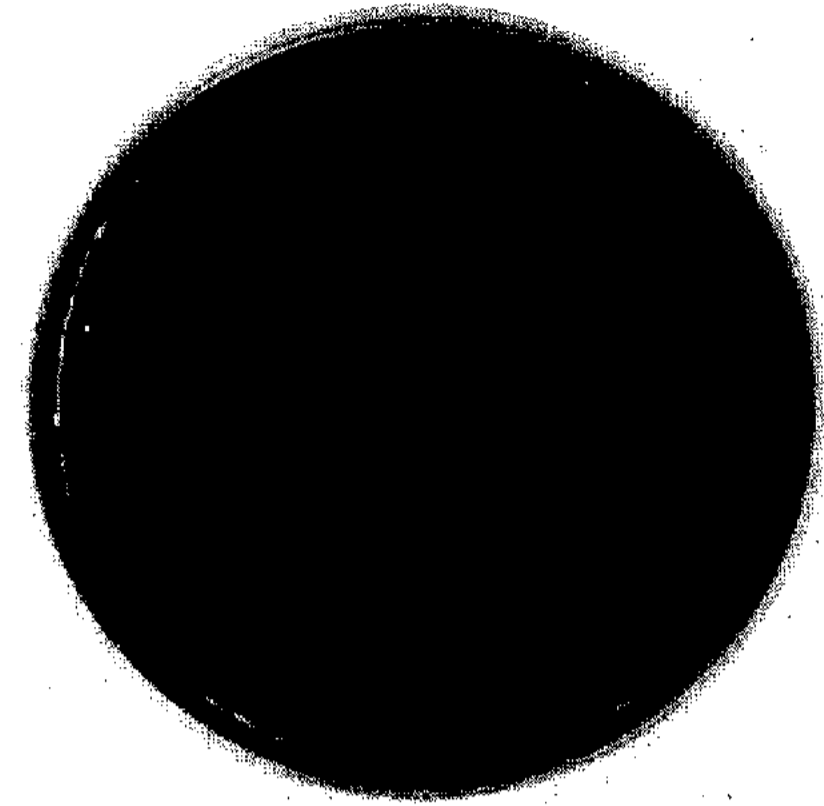


Fig. 1. Photograph of clear zone formed around colonies of *Bacillus stearotheophilus* producing CGTase.

균주분리용 기본배지에서 55°C, 24시간 진탕배양한 배양액을 원심분리(10,000 rpm, 10분)하여 균체를 제거한 상등액을 조효소액으로 사용하였다. CGTase 활성측정은 dextrinizing activity(D.A.)를 표시하였으며, D.A.는 Kitahata와 Okada(10)의 방법을 이용하여 반응온도 55°C에서 측정하였다. 즉, 조효소액 0.5m/를 가용성 전분 0.55% (0.5 M acetate buffer, pH5.95) 용액 4.5m/에 넣어 55°C에서 10분간 반응시킨 다음 이 반응액 0.5m/를 취하여 0.01 M iodine (0.25 M KI) 용액 4m/에 첨가한 후 증류수 20m/로 희석하여 660nm에서 투광률을 측정하였다.

이 때 효소활성 1단위는 55°C에서 분당 1% 투광률의 직선적 증가를 보이는 효소량으로 하였다.

단백질 정량

단백질은 bovine serum albumin을 표준물질로 하여 Lowry법(31)에 따라 측정하였다.

Cyclodextrin 분석 및 정량

HPLC를 사용하였으며 이 때 사용한 column은 μ -Bondapak NH₂ column(3.9×300 mm), 용출용매는 acetonitrile과 H₂O로 그 혼합비율은 65:35로 하였으며 유속은 분당 1.5m/로 하고 detector는 RI(R401)를 사용하였다.

결과 및 고찰

CGTase 생산균주의 분리

전국 각지에서 채집한 토양시료 300점 중 노란환(Fig.

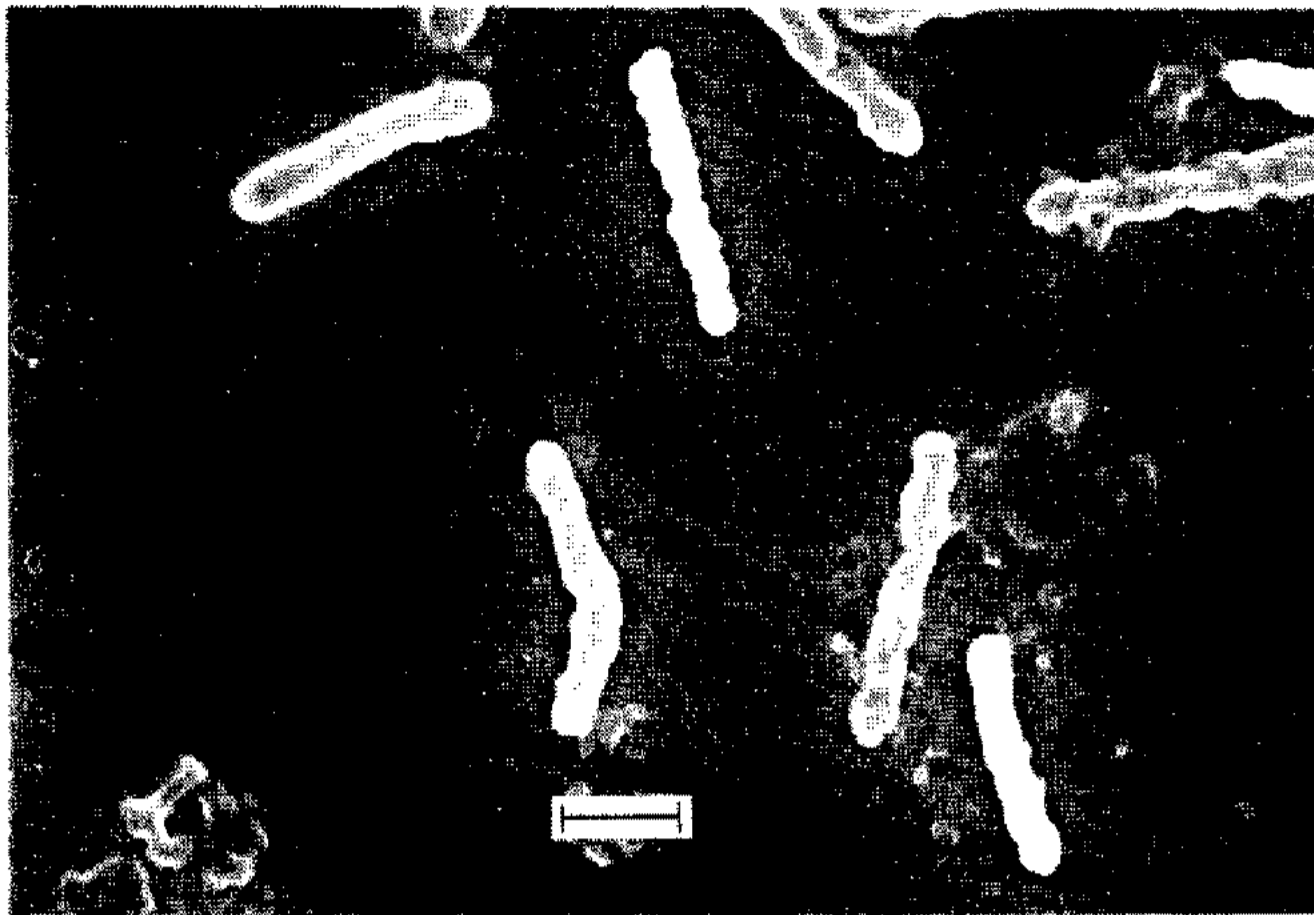


Fig. 2. Electron photomicrograph of strain No. 239 Bar: 1.25 μm . (ISE CS 130, $\times 8,000$)

Table 1. Morphological and biochemical characteristics of strain No. 239.

1. Morphological properties	
Form	Rods
Size	0.37-0.5 μm \times 2.6-4.0 μm
Motility	Motile
Gram staining	Positive
Spore	Terminal
2. Biochemical properties	
Nutrient broth	Positive
Glucose broth	Negative
Anaerobic growth	Negative
Growth temperature	45-65 $^{\circ}\text{C}$
Growth NaCl	Negative
Growth pH	7.0
Catalase test	Positive
Voges-Proskauer test	Negative
Hydrolysis of starch	Positive
casein	Positive
gelatin	Positive
Degradation of tyrosine	Negative
Formation of indol	Negative

1)을 형성하는 균주들 중 액체배지에 배양하여 dextrinizing activity (D.A.)가 3.0 unit/ml로 가장 높은 No. 239 균주를 선별하였다. No. 239 분리균은 0.5 \times 4.0 μm 의 크기를 가진 간균으로서 (Fig. 2) Table 1에 표시되어 있는 형태적 내지는 생리적 특성을 나타내었다. 특히, 본 분리균이 나타내는 Gram 양성, 포자는 Terminal,

Table 2. Effect of carbon sources on the production of CGTase.

Carbon sources (2.0%)	Cell growth (O.D. at 660 nm)	CGTase activity (U/ml)	Protein (mg/ml)	Specific activity (U/mg)
Soluble starch	5.34	2.84	3.08	0.92
Potato starch	4.85	1.32	3.37	0.39
Corn starch	4.56	1.13	3.42	0.33
Lactose	4.69	1.35	3.96	0.34
Sucrose	5.21	0.60	3.27	0.18
Dextrose	2.09	ND	4.60	ND
Glycerol	4.11	0.32	3.34	0.10
Sorbitol	4.87	0.36	3.56	0.10
Maltose	4.92	ND	4.43	ND

Cultivation was carried out for 8 hr at 55 $^{\circ}\text{C}$ in basal medium containing 0.5% bactopectone, 0.5% yeast extract, 0.1% K_2HPO_4 and 0.02% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ with initial pH 7.0. ND: not detected

운동성 그리고 65 $^{\circ}\text{C}$ 에서의 생육 등 *Bacillus stearothermophilus* ATCC 12980 과 비교 종합분석한 결과 No. 239 균주를 *Bacillus stearothermophilus* 로 추정할 수 있었다.

CGTase 생산을 위한 배양조건

탄소원의 영향 : 각종 탄소원 2% 를 함유하는 기본배지 이용, 탄소원의 종류에 따른 효소생산량을 비교 검토한 결과 Table 2와 같이 soluble starch, lactose, potato starch 순으로 효소생산을 보였으며 dextrose, maltose 는 전혀 효소를 생산하지 못하였다. 이와 같은 결과는 CGTase 를 생산하는 균주들은 탄당류보다는 대부분 다당류에서 높은 생산량을 보인 오 등(19)의 보고와 일치하였다. 한편, soluble starch 농도에 따른 효소생산은 2%, 12 시간 배양하였을 때 3.27 unit/ml로 가장 높은 효소생산량을 보였다.

질소원의 영향 : 탄소원으로 soluble starch 2% 가 들어있는 기본배지에 무기 및 유기질소원의 CGTase 생산에 미치는 효과를 조사해본 결과 (Table 3) 대체로 유기질소원이 무기질소원에 비해 높은 생산량을 보였으며 특히 defatted soybean meal 은 다른 질소원에 비해 월등한 효과를 보였다.

인산염의 영향 : 최적 탄소원과 최적 질소원을 첨가한 배지에 각종 인산염을 0.1% 첨가하고 55 $^{\circ}\text{C}$ 에서 12 시간 진탕배양하여 효소생산에 미치는 인산염의 효과를 검토

해 본 결과 Table 4와 같으며, Potassium과 Sodium 계통의 인산염이 매우 효과적이었으며 그 중에서 특히 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 를 첨가하였을 때 가장 높은 효소생산을 하였다.

금속염의 영향 : Soluble starch 2%, defatted soybean meal 0.5%, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1% 그리고 각종 금속염을 0.02% 첨가하고 효소생산량을 조사해본 결과 비효소활성은 Ca^{2+} , Mg^{2+} 순으로 각각 5.71 unit/mg, 5.55 unit/mg으로 CaCl_2 가 가장 높은 비효소활성을 보

Table 3. Effect of nitrogen sources on the production of CGTase.

Nitrogen sources (0.5%)	Cell growth (O.D. at 660 nm)	CGTase activity (U/ml)	Protein (mg/ml)	Specific activity (U/mg)
None	0.20	0.05	0.05	1.00
Yeast extract	6.28	3.36	1.18	2.85
Bacto peptone	5.30	3.21	3.22	1.00
Soytone	5.63	3.60	1.64	2.20
Casamino acid	2.05	1.04	0.67	1.55
C.S.L.	5.40	3.31	1.01	3.28
Defatted soybean meal	6.53	5.97	1.41	4.23
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2.70	2.18	3.70	0.59
KNO_3	3.96	3.35	3.64	0.92
NaNO_3	6.04	3.24	3.34	0.97
NH_4NO_3	4.23	2.41	3.56	0.68
NH_4Cl	5.19	2.77	3.49	0.79

Cultivation was carried out for 12 hr at 55°C in basal medium containing 2.0% soluble starch, 0.1% K_2HPO_4 and 0.02% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ with initial pH 7.0.

Table 4. Effect of phosphorous sources on the production of CGTase

Phosphorous sources (0.1%)	Cell growth (O.D. at 660 nm)	CGTase activity (U/ml)	Protein (mg/ml)	Specific activity (U/mg)
None	5.13	2.56	1.15	2.23
K_2HPO_4	6.05	6.12	1.31	4.67
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	5.96	6.16	1.14	5.40
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	1.52	2.06	1.61	1.28
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	6.14	6.34	1.15	5.51
KH_2PO_4	5.06	6.10	1.25	4.88
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	2.24	1.40	1.42	0.99

Cultivation was carried out for 12 hr at 55°C in basal medium containing 2.0% soluble starch, 0.5% defatted soybean meal and 0.02% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ with initial pH 7.0.

였는데 (Table 5) 0.015% 첨가한 경우 가장 높은 효소생산을 보였으며 (자료제공은 하지 않았음) 그 이상의 농도에서는 균체중식은 물론 효소생산도 급격하게 감소했다. 이와 같은 결과는 枝廣和信 등(32)이 보고한 *B. stearothermophilus*의 CGTase 생산연구에서의 Ca^{2+} 이온 첨가시 높은 효과를 나타낸 결과와 일치하였다.

pH 및 배양온도의 영향 : 효소생산 최적 배지의 초기 pH가 효소생산량에 미치는 영향을 살펴본 결과 Table 6과 같으며 세포생육은 pH6-7.5에서 그리고 효소생산량은 pH7.0에서 가장 높았다. 따라서 배양액의 pH 조절 역시 CGTase 생산에 매우 큰 영향을 줄 수 있는 요인임을 알 수 있었다. 또, 배양온도에 따른 효소생산량은 55°C에서 최고의 효소생산량을 보였다 (Table 7).

Flask 배양에 의한 효소생산

Soluble starch 2%, defatted soybean meal 0.5%, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1%, CaCl_2 0.015%, 초기 pH7.0의 최적 배양조건하에서 분리균 No.239을 55°C에서 배양하여 그 배양시간에 따른 효소생산, 균체중식, 배지 pH의 변화를 관찰하였던 바 (Fig. 3) 효소생산은 6시간부터 12시간까지는 급격히 증가하였으나 18시간 이후 완만한 증가를 보였으며 균체중식은 18시간을 전후하여 서서히 감소하는 사멸기로 들어갔다. 한편, pH의 변화는 16시간까지는 pH5.6까지 떨어졌으나 24시간을 전후하여 다소 올라가는 경향을 보이다가 다시 서서히 떨어지는 양상을 보였는데 이와 같은 pH의 변화는 오 등(19)의 *Bacillus* sp.와 김(20)의 *B. macerance* IFO 3490과는 차이를 보였으나 이 등(22)의 alkalophilic *B. circulans*와는 유사하였다.

Table 5. Effect of mineral salts on the production of CGTase

Mineral salts (0.02%)	Cell growth (O.D. at 660 nm)	CGTase activity (U/ml)	Protein (mg/ml)	Specific activity (U/mg)
None	5.47	4.93	1.38	3.57
MgSO ₄ ·7H ₂ O	6.10	6.55	1.18	5.55
CuSO ₄ ·7H ₂ O	0.37	ND	1.65	ND
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.67	ND	1.67	ND
CaCl ₂	7.16	6.45	1.13	5.71
KCl	4.24	6.13	1.50	4.09
FeCl ₃	5.25	0.80	1.39	3.75

Cultivation was carried out for 12 hr at 55°C in basal medium containing 2.0% soluble starch, 0.5% defatted soybean meal and 0.1% NaH₂PO₄·2H₂O with initial pH 7.0.

ND: not detected

Table 6. Effect of initial pH on the production of CGTase

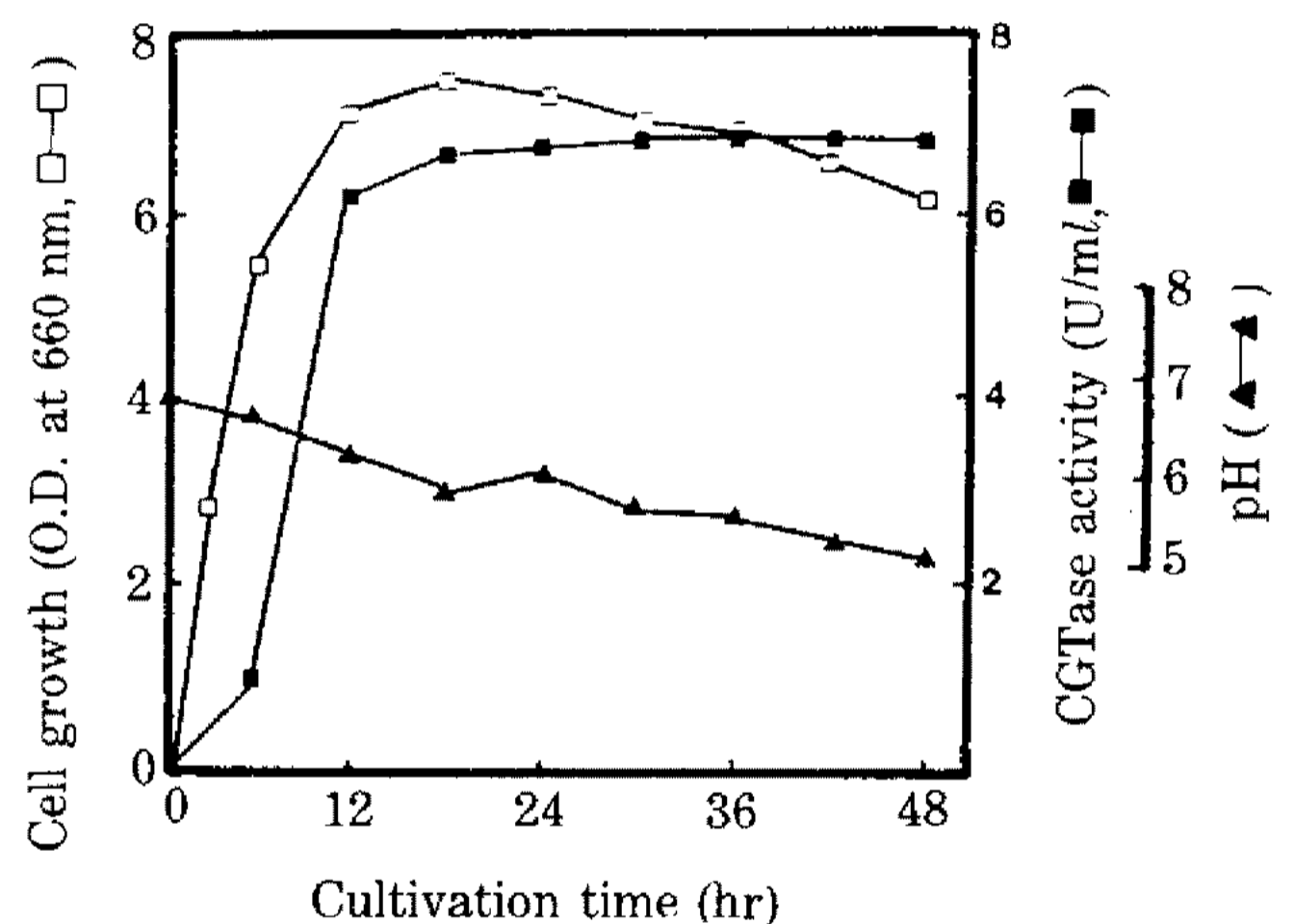
Initial pH	Cell growth (O.D. at 660 nm)	CGTase activity (U/ml)	Protein (mg/ml)	Specific activity (U/mg)
6.0	6.99	3.85	1.02	3.77
6.5	7.02	4.92	1.04	4.73
7.0	7.21	6.35	1.11	5.72
7.5	7.08	5.74	1.33	4.32
8.0	6.63	4.16	1.66	2.51

Cultivation was carried out for 12 hr at 55°C in basal medium containing 2.0% soluble starch, 0.5% defatted soybean meal, and 0.1% NaH₂PO₄·2H₂O and 0.015% CaCl₂. The initial pH of the medium was adjusted with 1 N HCl solution or 1 N NaOH solution.

Table 7. Effect of temperature on the production of CGTase

Temperature (°C)	Cell growth (O.D. at 660 nm)	CGTase activity (U/ml)	Protein (mg/ml)	Specific activity (U/mg)
45	2.65	0.14	1.72	0.08
50	6.18	4.06	1.78	2.28
55	7.48	6.45	1.12	5.79
60	7.20	6.38	1.15	5.55
65	1.65	1.18	1.34	0.08

Cultivation was carried out for 12 hr at various temperatures. The basal medium was consisted of 2.0% soluble starch, 0.5% defatted soybean meal, 0.1% NaH₂PO₄·2H₂O and 0.015% CaCl₂ with initial pH 7.0.

**Fig. 3. Changes in cell growth, CGTase activity and pH during the culture period of strain No. 239.**

Cultivation was carried out for 2 days 55°C in the optimum medium as described in Table 8.

조효소액의 기질특이성

1%의 기질 2.5 ml (starch 최종농도 0.83%)에 조효소액 0.5 ml (10 D.A. unit at 55°C/g starch)을 첨가하여 65°C에서 24 시간 반응시킨 후 HPLC로 분석한 결과는 Table 9와 같다. 분리균 No.239에서 생산하는 효소의 기질특이성은 potato starch, corn starch, soluble starch의 순으로 potato starch가 가장 많은 CD 전환율을 보였는데 이와 같은 결과는 malto-oligo 당의 사슬이 길어질수록 CD 전환율이 증가한다는 이 등(22)의 결과와 일치하였다.

CD 생성의 경시적 고찰

6% soluble starch 각각 2.5 ml (soluble starch 최종

Table 8. The optimal culture conditions for the production of CGTase by strain No. 239.

Soluble starch	2%
Defatted soybean meal	0.5%
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0.1%
CaCl ₂	0.015%
Initial pH	7.0
Temperature	55°C

Table 9. Substrate specificity of CGTase for cyclodextrin formation. (conversion, %)

Substrate	α -CD	β -CD	γ -CD	Total CD
Corn starch	21.1	18.0	3.9	43.0
Potato starch	24.9	20.2	5.0	50.1
Soluble starch	22.4	16.3	4.0	42.7

2.5 ml 1% (w/v) starch solutions (in 100 mM phosphate buffer, pH 6.0) were put into 0.5 ml (10 D.A. unit at 55°C/g starch, 0.83% final starch concentrations) of CGTase and reacted at 65°C for 24 hr. The reaction mixtures were heated at 100°C for 10 min to inactivate the enzyme for subsequent CD analysis.

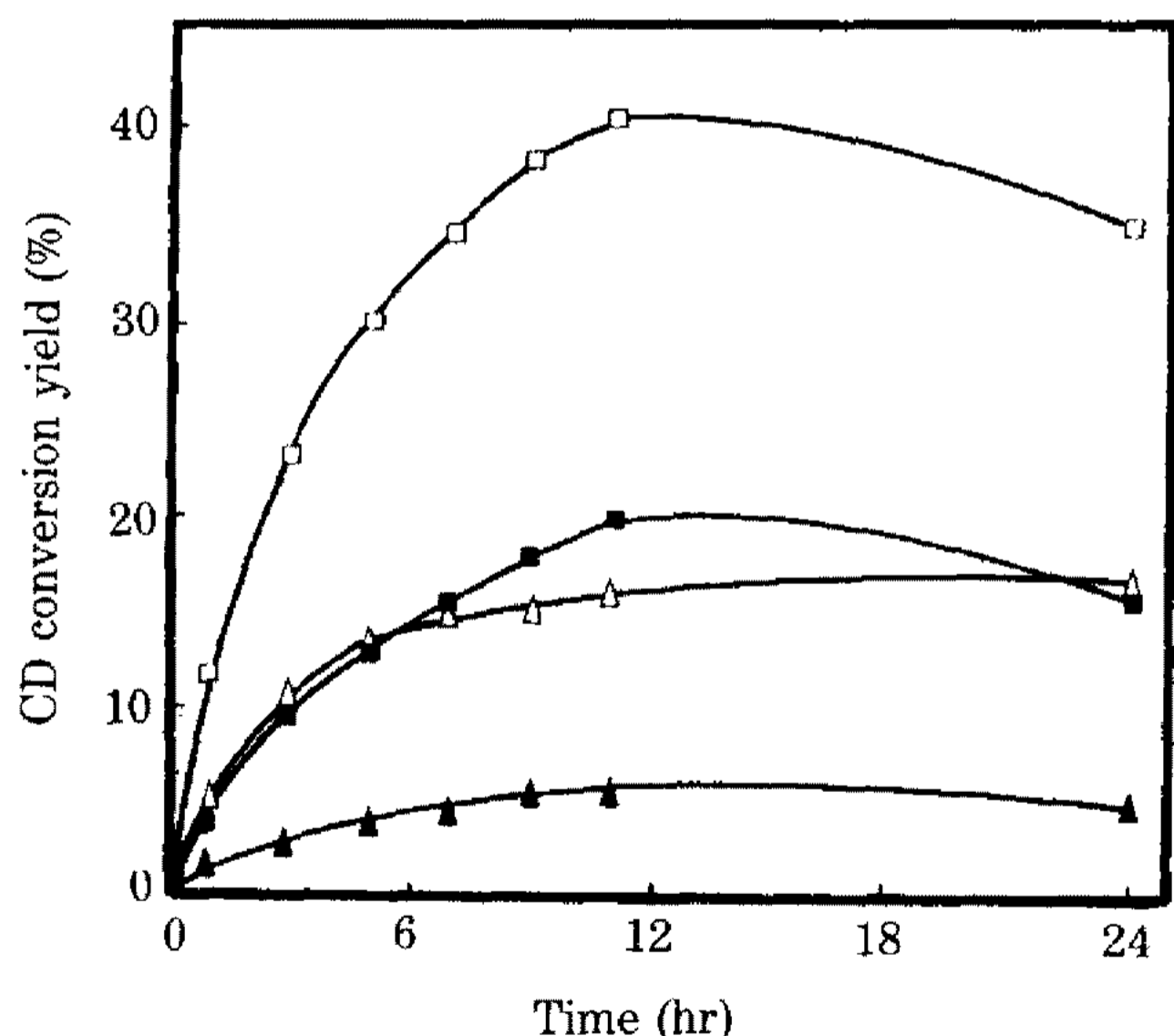


Fig. 4. Time course of α -, β - and γ -CD formation by CGTase from strain No. 239.

2.5 ml 6% (w/v) soluble starch solution (in 100 mM phosphate buffer, pH 6.0) was reacted with 0.5 ml (10 D.A. unit at 55°C/g starch, 5.0% final soluble starch concentration) of crude CGTase at 65°C. The reaction mixture was heated at 100°C for 10 min to inactivate the enzyme for subsequent CD analysis.

□-□; Total CD, Δ - Δ ; α -CD, ■-■; β -CD, ▲-▲; γ -CD

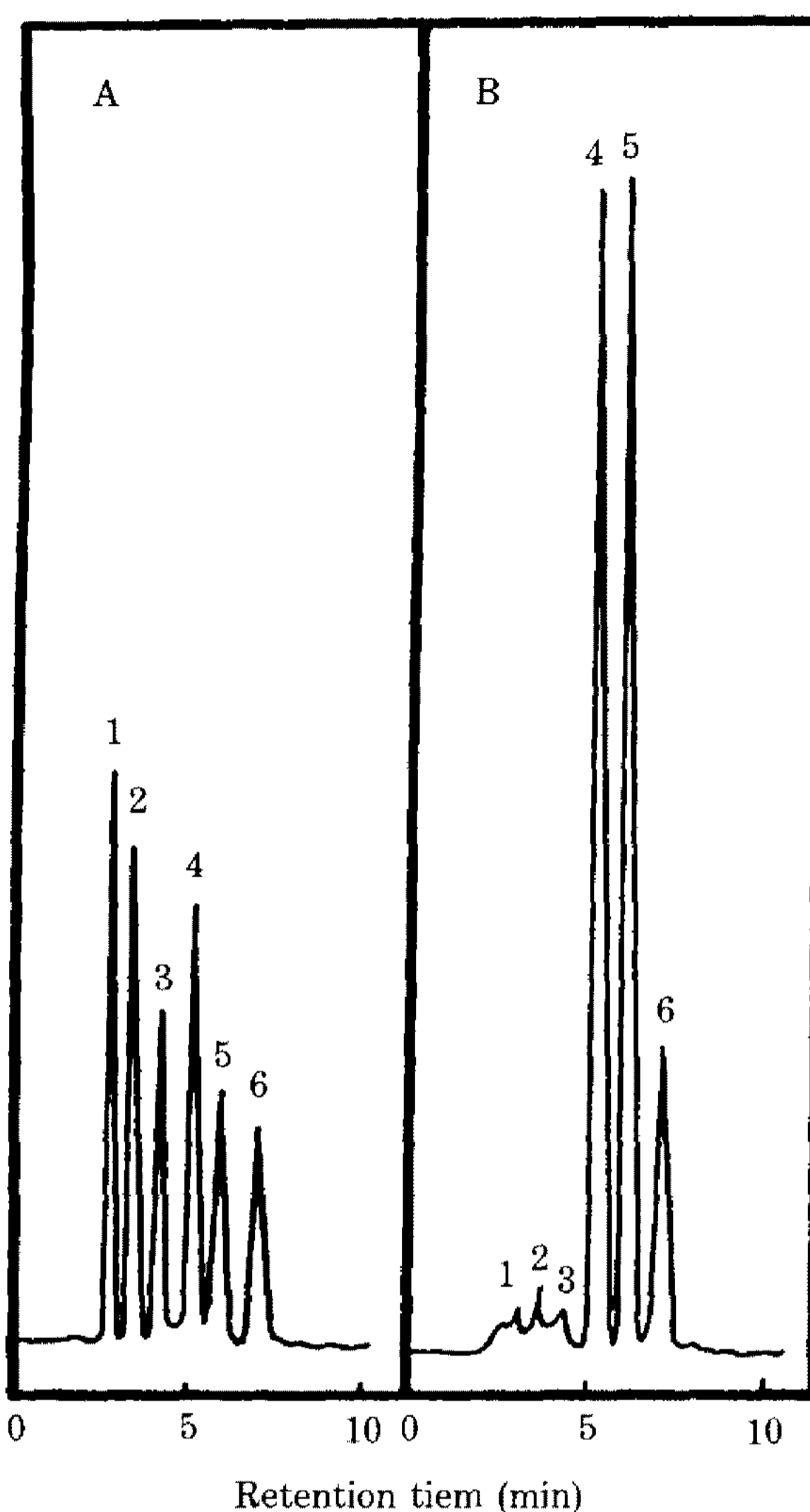


Fig. 5. A typical HPLC chromatogram of reaction mixture.

A: Standard, B: Reaction

1: glucose, 2: maltose, 3: maltotriose, 4: α -CD, 5: β -CD, 6: γ -CD

농도 5%)에 조효소액 0.5 ml를 첨가하여 65°C에서 반응시킨 후 시간별로 시료를 채취하여 100°C에서 10분간 불활성화시킨 다음 반응시간에 따른 CD 생성 양상을 경시적으로 관찰한 결과 Fig. 4와 같다.

Fig. 5의 A는 standard이며, B는 CGTase의 기질 반응 11시간 후의 CD 생성 혼합물을 나타내었다. 반응 초기에는 α -CD가 우선적으로 생성되었으나 시간이 경과함에 따라 β -CD으로의 전환율이 높은 것으로 나타났다. 그리고 반응시간이 11시간 경과했을 때 총 CD 전환율은 40%였고, α -: β -: γ -CD의 비율은 1.0: 1.3: 0.4이었다. 그러나 24시간 반응 후의 CD 전환율은 35.8%로 감소하는 경향을 보였는데 이와 같은 실험 결과는 Kitahata 등(10)의 보고와 유사하며, 즉 CGTase 작

용특성인 개환작용에 기인한 것으로 사료된다. Fig. 5B에 나타난 바와 같이 CD 이외의 단당류와 과당류가 거의 없는 것으로 보아 본 조효소는 amylolytic activity는 없는 것으로 추측된다. 따라서 본 연구결과 *B. stearothermophilus*로 동정된 No.239 토양 분리균은 실제 산업적으로 가장 유리한 온도라고 보고되어 있는 55°C의 최적 효소생산 온도(33)를 가지고 있을 뿐만 아니라 그 CGTase의 높은 열안정성으로 효소공정시 잡균 오염을 방지할 수 있으며 amylolytic activity가 대체적으로 없는 점으로 미루어 볼 때 본 균주는 앞으로 산업적으로 유용하게 쓰일 가능성이 높을 것으로 판단된다.

요 약

토양시료로부터 CGTase를 생산하는 중성의 호열성 미생물을 congo red가 포함된 배지를 이용하여 분리하고, 분리균주의 형태학적, 생리학적 성질을 조사한 결과 *Bacillus stearothermophilus* No.239로 동정되었다. 초기 pH가 7.0인 soluble starch 2%, defatted soybean meal 0.5%, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1% 및 CaCl_2 0.015%를 지닌 배지에서 55°C, 48시간 진탕 배양하였을 때 배양액 1ml당 약 7.0unit로 가장 높은 효소생산량을 보였다. 0.83%의 기질농도에서 CGTase(10unit/g starch)를 65°C에서 24시간 반응시켰을 때 cyclodextrin 전환율은 potato starch가 50.1%로 가장 높았으며 시간에 따른 cyclodextrin 생성은 soluble starch(기질농도 5%, CGTase 10unit/g starch)에 11시간 반응시켰을 경우 cyclodextrin 전환율은 40%였으며 α - : β - : γ -cyclodextrin의 생성비율은 1.0 : 1.3 : 0.4이었다.

참고문헌

1. Pszczola, D.E.: *Food Technology*, **42**, 96 (1988).
2. Chiba, S., S. Okada, S. Kitahata and T. Shimomura: *Agr. Biol. Chem.* **39**, 2353 (1975).
3. Tilden, E.B. and C.S. Hudson: *J. Am. Chem. Soc.* **63**, 2900 (1939).
4. 小林昭一, 具沼圭二, 鈴木繁男: 澱粉科學, **21**, 131(1974).
5. 小林昭一, 具沼圭二, 鈴木繁男: 澱粉科學, **22**, 6(1975).
6. Kobayashi, S., K. Kainuma and S. Suzuki: *Carbohydrate Res.* **61**, 229 (1978).
7. Takahiro, K., T. Hamamoto and K. Horikoshi: *J. Gen. Microbiol.* **134**, 97 (1988).
8. Hamamoto, T., K. Takahiro and K. Horikoshi: *Agric. Biol. Chem.* **51**, 2019 (1987).
9. Akira, T., K. Kimura and K. Yamane: Jpn. Kokai Tokyo Koho PAT NO 88219381 (1988).
10. Kitahata, S., N. Tsuyama and S. Okada: *Agr. Biol. Chem.* **38**, 387 (1974).
11. Kitahata, S. and S. Okada: *J. Jap. Soc. Starch Sci.* **29**, 13 (1982).
12. Kitahata, S. and S. Okada: *J. Jap. Soc. Starch Sci.* **29**, 7 (1982).
13. Sakai, S., M. Kubota, K. Yamanoto, T. Nekada, K. Torigoe, O. Ando and T. Sugimoto: *J. Jap. Soc. Starch Sci.* **34**, 140 (1987).
14. Sato, M., Y. Yagi, H. Nagano and T. Ishikura: *Agr. Biol. Chem.* **49**, 1189 (1985).
15. Bender, H.: *Arch. Microbiol.* **11**, 271 (1977).
16. Kitahata, S., M. Taniguchi, S. Beltran, T. Sugimoto and S. Okada: *Agr. Biol. Chem.* **47**, 1441 (1983).
17. 小林昭一, 具沼圭二: 發酵工業, **36**, 176(1978).
18. Horikoshi, K.: *Process Biochemistry*, May, 26 (1979).
19. 오평수, 고성철, 서향원: 산업미생물학회지, **14**, 461(1986).
20. 김영호: 한국과학기술원 석사학위논문(1988).
21. 유주현, 정용준, 이정수: 산업미생물학회지, **17**, 148(1989).
22. 이용현, 신현동, 이상호: 산업미생물학회지, **17**, 370(1989).
23. Cramer, F., W. Saenger and H. Spatz: *J. Am. Chem. Soc.* January, **14** (1967).
24. Otagiri, M., K. Uekama and K. Ikeda: *Chem. Pharm. Bull.* **23**, 188 (1975).
25. 한국유전공학연구조합: Cyclodextrin(유전공학자료 64), (1986).
26. 中村隆, 高木正一: 食品工業(日本), **4**, 81(1982).
27. Cappuccino, J.G. and N. Sherman: *Microbiology a Laboratory Manual*, Addison Wesley Co., 51 (1983).
28. Park, C.S., S.H. Kim and K.H. Park: *Agr. Biol. Chem.* **53**, 1167 (1989).
29. Gerhardt, P., Murray, G.E., G. Gostilow, F.W. Nester, A.W. Wood, N.R. Krig and G.B. Phillips: *Manual of Methods for General bacteriology*, American Society for Microbiology, Washington, (1981).
30. Krieg, N.R. and J.G. Holt: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Williams and Willkins Co. Baltimore (1984).
31. Lowry, O.H., N.J. Posebrough, L.A. Farr and R.J. Randal: *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951).
32. 枝廣和新, 鹽飽裕道, 鈴木清: Jpn. Kokai Tokyo Koho 85120984(1985).
33. Grootwassink, J.W.D. and S.E. Fleming: *Enzyme Microb. Technol.* **2**, 45 (1980).

(Received September 20, 1990)