

## *Bacillus acidocaldarius*가 생산하는 Cyclodextrin Glycosyltransferase의 특성

이 건 주\*

안동대학교 생물학과

### Characterization of the Cyclodextrin Glycosyltransferase Produced by *Bacillus acidocaldarius*

Lee, Kon Joo

Dept. of Biology, AnDong National University, AnDong, Kyungbuk 760-600, Korea

**Abstract** — Nine novel cyclodextrin glycosyltransferase-producing bacteria were isolated from soil in a low acidic pH (3~4) medium at high temperature (45~60°C). The isolated acidophilic bacteria were identified as *Bacillus acidocaldarius*. Highest yield of enzyme was obtained by using the following medium: 4% raw potato, 1% peptone, 0.1% yeast extract, 0.02% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.05% MgSO<sub>4</sub>, 0.02% CaCl<sub>2</sub>, 0.3% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. The crude enzyme showed a very broad pH-activity curve and had two optimum pH ranges at 3.0 and 5.0~6.0. The crude enzyme was most active at 90°C.

Cyclodextrin은 cyclodextrin glucanotransferase (EC 2.4.1.19, CGTase)에 의하여 전분, 아밀로스, 아밀로펙틴등의 탄수화물에서 전환되는 당유도체이다. 이 물질은 6~12개의 포도당이 환상형으로 결합되어 있으며 여러 종류의 유기화합물이나 무기물과 결합하여 포접화합물을 형성함으로써 인하여 용해도, 휘발성 등 물리적인 성질을 변화시키기 때문에 이 성질을 이용하여 유기합성, 의약품, 식품, 농약, 화장품, 고농도의 독성물질의 폐수처리 등의 산업에 이용되고 있다 (1-4).

CGTase를 생산하는 균주는 생육 최적조건에 따라 중성 pH 및 30~40°C 에서 *Bacillus*(이하 *B.*) *macerans* (5), *B. circulans*(6), *B. megaterium*(7), *B. ohbensis*(6)와 *Klebsiella*(*K.*) *pneumoniae*(8), *B. subtilis*(9) 등이 있고, 중성 pH, 50°C 이상에서 *B. stearothermophilus* (10, 12), *B. amyloliquefaciens*(11)가 있고, 중온의 알카리영역에 호알카리성 *Bacillus* sp.(13-17)가 있다. α-, β-, γ-cyclodextrin(CD)의 생성비율은 반응조건과 반응시간에 따라 차이가 나나, 세균이 생산하는 효소에 따라 다르다. 주생산물물은 *B. macerans*, *B. stearother-*

*mophilus*, *Klebsiella pneumoniae*는 α-CD고, *B. megaterium*, *B. circulans*, *B. ohbensis*, alkalophilic *Bacillus*는 β-CD고, *B. subtilis*는 γ-CD이다(5-17).

생산목적에 따라 사용균주를 바꿀 수 있으나 실제 생산현장에서 이용되는 균주는 수율, 효소역가, 효소의 안정성 등에 따라 제한되어진다. 특히 CD생산은 전분을 원료로 하기 때문 효소가 내열성이고 산성에서 안정한 효소가 유리하리라 본다.

본 연구에서는 전분반응에 적합한 새로운 영역의 CGTase 생산균주를 찾는 목적으로 우리나라 토양으로부터 내산성, 내열성 균주를 분리하여 이들 균주에서 CD전환능이 있는 균주를 분리하고 이 균주의 일부특성을 조사하였다.

### 재료 및 방법

#### CGTase 생성균의 분리 및 배양

균주분리용 토양은 안동, 영주, 봉화 등 경북 북부 지역의 경작지, 하천 주변, 산지에서 채취하였다. 토양 약 1g에 Table 1의 분리용 배지에서 한천을 제외한 액체배지 10 ml을 넣어 30, 37, 45, 50, 60°C에서 24시간 집식배양하였다. 배양한 후 Table 1의 분리용 배지에 도말하였다. 집식배양과 동일온도에서 24시간

**Key words:** *Bacillus acidocaldarius*, acidophilic, thermostable CGTase

\*Corresponding author

**Table 1. Isolation medium for starch hydrolysis bacteria**

| Part A  |        | Part B        |        |
|---|--------|---------------|--------|
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 0.2 g  | corn starch   | 10 g   |
| MgSO <sub>4</sub>                               | 0.5 g  | peptone       | 10 g   |
| CaCl <sub>2</sub>                               | 0.2 g  | yeast extract | 1 g    |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                 | 3.0 g  | agar          | 18 g   |
| Dist. Water                                     | 500 ml | dist. Water   | 500 ml |
| pH 2.5~4.5                                      |        |               |        |

Part A and B are sterilized separately at 121°C for 15 min and then combined together.

배양한 후 투명한을 형성한 집락을 집식 배양용 배지에 접종하여 48시간 배양 후 배양액과 0.1 N-iodine 액을 혼합하여 현미경으로 관찰하여 침상의 결정이나 육각형의 결정을 형성하는 균주를 선발하였다(1). 배지는 Darland와 Brock(19)의 배지를 일부 변형시켜 사용하였으며 배지 조성은 Table 1과 같다. 효소 생산은 왕복형 진탕배양기에서 100 rpm으로 60°C에서 2-3일간 하였다. 균주의 동정은 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology에 따랐다.

#### 조효소액의 조제

진탕배양한 배양액을 3000 rpm으로 10분간 원심분리시킨 후 상징액에 냉 acetone(-20°C)을 배양액의 5배 용량이 되도록 가한 후 4°C에서 4시간 방치하였다. 이 액을 4°C에서 3000 rpm으로 10분간 원심분리하여 상징액을 제거하고 10 mM CaCl<sub>2</sub> 용액에 녹여서 조효소액으로 하였다. 조효소액은 냉장고에 보관하며 실험에 사용하였다.

#### 효소의 활성도 측정방법

CGTase의 활성 측정방법은 Nakamura 등(13)과 Kato 등(9)의 dextrinizing activity 측정법을 써서 간접 측정하였다. 즉 기질로 0.5% 가용성 전분을 10 mM CaCl<sub>2</sub>에 녹인 다음 일정량에 조효소액을 첨가하여 70°C에서 10분간 반응시킨 후 iodine 용액을 가하여 반응을 정지시킨 후 700 nm에서 청색감소율을 측정하였다. 반응액 조성은 기질 900 µl에 효소액 100 µl 비율로 하고, 1 unit(이하 U)는 상기 조건에서 10분간 청색의 농도가 10% 감소하는 양으로 하였다.

#### 효소생산에 미치는 탄소원의 영향

효소생산에 적합한 배양조건을 확립하기 위하여

단당류, 이당류, 다당류에 대하여 효소생산에 미치는 영향을 조사하였다. 무기염은 분리용 배지(part A)에 따라 만들고, 별도로 질소원과 당류를 멸균하여 무균적으로 합하여 사용하였다. 질소원은 효모추출물은 0.1%, 효모추출물 0.1%와 펩톤 0.5%를 사용하였고, 감자는 껍질을 벗긴 후 sliced하여 사용하였다. 배양 조건은 50°C에서 48시간 진탕배양하였다.

#### 금속이온에 의한 영향

Ca 이온이 포함되지 않은 조효소액 100 µl에 금속이온이 5, 10, 20 mM되게 첨가하여 실온에서 30분간 방치한 후 효소활성을 측정하였다. 대조는 금속이온 대신 동량의 증류수를 첨가하여 반응시켰다.

#### 효소활성에 미치는 온도, pH의 영향

0.5% 전분용액 900 µl에 조효소액 100 µl를 넣고 각 온도에서 10분간 반응 후 청색감소율을 측정하였고, 이때 pH는 1, 2(KCl-HCl buffer), 3, 4(glycine-HCl buffer), 4, 5(acetic acid-sod. acetate buffer), 6, 7, 8(phosphate buffer), 9, 10(glycine-NaOH buffer)를 사용하였다. 각 완충액에 0.5%되게 전분액을 만들고, 이 900 µl에 조효소액 100 µl를 가한 후 70°C에서 10분간 반응시킨 후 청색감소율을 측정하였다.

#### Cyclodextrin의 분석 및 정량

전분 최종농도가 3% 및 5%(pH 4.0)되게 조효소액을 가한 후 70°C에서 24시간 반응시켜 정량하였다. Cyclodextrin의 정량은 HPLC(RL 401, Waters)를 사용하였으며, 컬럼은 carbohydrate analysis, 용매는 acetonitrile과 물을 65 : 35(v/v)로 섞어 사용하였다.

#### SDS-polyacrylamide gel 전기영동실험

조효소를 Laemmli 방법(20)에 따라 9~14%의 gradient polyacrylamide gel을 사용하여 전기영동을 시켰으며 분리된 단백질 band는 0.1% Coomassie brilliant blue R250으로 염색하였다. 분자량 측정용 표준물질로 Bio-Rad사의 분자량측정 시약을 사용하였다.

## 결 과

#### CGTase 생성 균주의 선발 및 동정

400여점의 토양으로부터 분리용 배지에서 투명한을 형성한 전분 분해균을 집식배양용 배지에 배양하여

배양액과 iodine 시액을 혼합하여 현미경 하에서 관찰할 때 육각형을 형성하는 균주를 선발하였다. pH 4 부근의 산성조건 하에서, 45~60°C 에서 분리된 전분 분해 균주중 9균주의 CGTase 생성균주를 분리하였다. 분리된 균주는 Gram 양성 간균이며 포자를 형성하며 생리 생화학적 특징은 Table 2와 같으며 *Bacillus acidocaldarius*로 동정하였다. 9균주 중 9번 균주가 효소생성이 가장 양호하여 선발하였고 10번과 11번은 대조로 사용하였다.

#### CGTase 생성을 위한 배양조건

9번 균주에 대하여 배양조건을 조사하기 위하여 분리용 배지(part A)에 탄소원을 각각 첨가하여 탄소원에 따른 효소생산의 영향을 조사하였다. 초기 pH는 3.8~4.2로 하고 배양온도는 50°C 로 하였다. Table 3에서와 같이 감자를 넣은 것에서 높게 나오고, lactose를 탄소원으로 사용한 경우도 효소생산이 양호하였다.

**Table 2. Characteristics of the isolated strains**

| Characteristics  | Strains No. |     |     |     |     |     |     |     |     |             |
|------------------|-------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-------------|
|                  | 1           | 4   | 5   | 6   | 7   | 8   | 9   | 10  | 11  | <i>B.a.</i> |
| Gram stains      | +           | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +           |
| Cell form        | rod         | rod | rod | rod | rod | rod | rod | rod | rod | rod         |
| Hydrolysis of    |             |     |     |     |     |     |     |     |     |             |
| Casein           | -           | +   | -   | +   | +   | +   | +   | +   | -   | ND          |
| Starch           | +           | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +           |
| Anaerobic growth | -           | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -           |
| Growth at pH     |             |     |     |     |     |     |     |     |     |             |
| 2.5              | -           | +   | -   | -   | +   | -   | +   | +   | +   |             |
| 3.0              | -           | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   |             |
| 3.5              | +           | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   |             |
| 6.0              | +           | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   |             |
| Growth at °C     |             |     |     |     |     |     |     |     |     |             |
| 30               | -           | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -           |
| 40               | -           | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -           |
| 50               | +           | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +           |
| 65               | +           | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +           |

*B.a.* = *Bacillus acidocaldarius* ND=no data

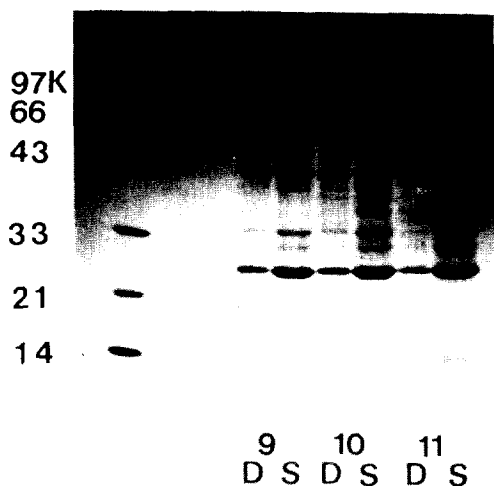
**Table 3. Effect of carbon sources on the enzyme production**

| Nitrogen sources(organic)            | Carbon sources    | CGTase(U/ml) |
|--------------------------------------|-------------------|--------------|
| None                                 | Glucose 2%        | trace        |
| None                                 | Maltose 2%        | trace        |
| None                                 | Sucrose 2%        | trace        |
| None                                 | Lactose 2%        | trace        |
| None                                 | Soluble starch 1% | trace        |
| Yeast extract <sup>(a)</sup>         | Glucose 2%        | trace        |
| Yeast extract                        | Lactose           | 0.8          |
| Yeast extract                        | Soluble starch 1% | 0.4          |
| Yeast extract+Peptone <sup>(b)</sup> | Lactose 2%        | 1.8          |
| Yeast extract+Peptone                | Soluble starch 1% | 1.2          |
| Yeast extract+Peptone                | Potato 4%         | 3.6          |

<sup>(a)</sup> 1 g/l yeast extract, <sup>(b)</sup> 1 g/l yeast extract + 5 g/l peptone

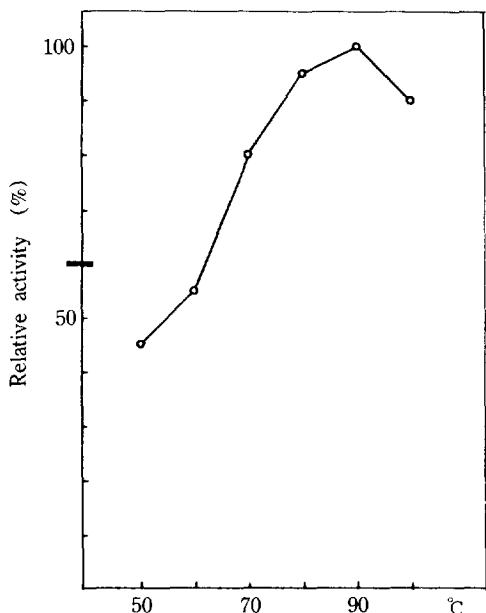
**Table 4. Effect of metal ion on the CGTases (Relative activity %)**

| Conc. | Mineral | ZnSO <sub>4</sub> | MgSO <sub>4</sub> | MnSO <sub>4</sub> | CaCl <sub>2</sub> | FeCl <sub>3</sub> |
|-------|---------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| None  |         | 100               | 100               | 100               | 100               | 100               |
| 5 mM  |         | 58.5              | 98.8              | 99.2              | 100               | 12.4              |
| 10 mM |         | 9.7               | 100.2             | 89.5              | 99.7              | 0                 |
| 20 mM |         | 0                 | 100.1             | 68.0              | 100.3             | 0                 |

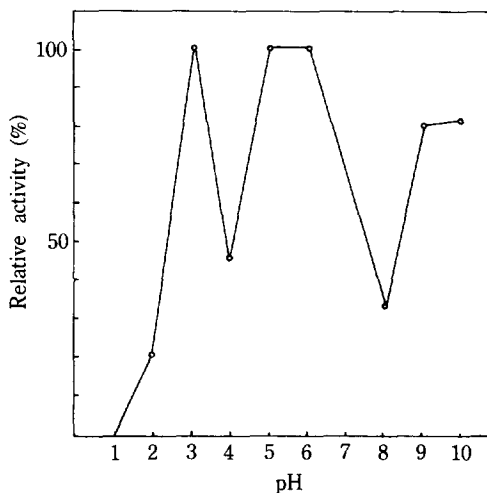


**Fig. 1. SDS-PAGE of extracellular enzymes from *B. acidocaldarius*.**

D=dextrose, S=soluble starch



**Fig. 2. Effect of temperature on the CGTases.**



**Fig. 3. Effect of pH on the CGTases.**

The pH was adjusted with the following buffer systems: KCl-HCl (1-2), glycine-HCl (3-4), acetate (5), phosphate (6-8) and glycine-NaOH (9-10).

**금속이온의 영향**

금속이온에 의한 영향은 Table 4와 같다. 표에서와 같이 Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>는 효소활성에 영향을 미치지 않았으며, Zn<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>는 효소활성을 저해시켰으며 그농도가 높아질수록 심하게 나타났다.

**효소활성에 미치는 온도, pH의 영향 및 단백질 조성**

50°C에서 100°C까지 10°C 간격으로 효소활성을 측정된 결과 Fig.2에서와 같이 90°C에서 최적으로 나타났고, 효소활성에 미치는 pH의 영향은 Fig.3에서와 같이 3.0과 5.0~6.0 부근에서 최대 활성을 나타냈고, pH9 부근에서도 높은 활성을 나타냈다. 단백질 조성은 Fig.1과 같다. 전분첨가시 몇종의 단백질에서 양이 증가되는 것을 볼 수 있다.

**반응물의 분석**

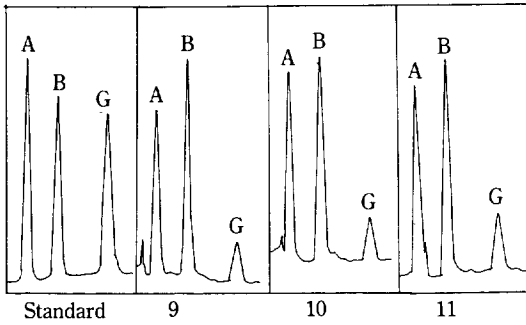


Fig. 4. HPLC analysis of the reaction products produced by the CGTases.

A =  $\alpha$ -cyclodextrin, B =  $\beta$ -cyclodextrin, G =  $\gamma$ -cyclodextrin

5%의 가용성 전분용액의 반응 결과 생성된 CD의 양을 HPLC로 측정하였다. Cyclodextrin의 생성비율은  $\alpha$ -CD :  $\beta$ -CD :  $\gamma$ -CD가 1.0 : 1.33~1.71 : 0.2~0.4로 나타났고, cyclodextrin의 총 전환율은 30~63%로 나타났다(Fig. 4).

### 고찰

현재까지 보고된 CGTase 생산균주는 Table 5에서와 같이 증식온도와 pH에 의하여 3 group으로 대별할 수 있다. 즉 *Bacillus macerans*(5), *B. megaterium*(7), *B. circulans*(6), *B. ohbebsis*(6), *B. subtilis*(9), *Klebsiella pneumoniae*(8) 등은 중성, 중온균에 속한다. Alkalophilic *Bacillus*(13-16)는 중온성으로, pH 10 근처에서 증식되는 균이며, alkalophilic *B. circulans*(17)도 여기에 넣을 수 있다. 다른 한 종류가 *B. amyloliquefaciens*(11), *B. stearothermophilus*(10, 12)로 중성 pH영역에서 50~60°C 에서 증식하는 고온성 균이다.

본 연구에서 분리된 균은 pH 4 부근이며 증식온

도도 50~60°C 로 현재까지 보고된 균과는 전혀 다른 새로운 영역의 CGTase 생산균으로 생각된다. 산성 영역에 고온에서는 단백질의 변성이 가속되어 이 영역에서 생산되는 효소는 특히 산과 열에 안정한 구조를 가질 것으로 본다. 분리균주는 형태, 그람염색, 증식 pH, 증식온도로 보아 *B. acidocaldarius*로 동정되었다. 즉 변성이 잘 일어나는 조건에서 최적 증식 조건을 가지는 특이한 균이다. Table 2에서와 같이 37°C 이하에서는 증식이 안되고 증식 pH 범위는 1 균주(No. 1)가 3.5~6.0 범위에서, 3균주(No. 5, 6, 8)가 3.0~6.0 범위에서, 5균주(No. 4, 7, 9, 10, 11)가 2.5~6.0 에서였다. CGTase 생산은 No.1 균주만이 3.5~6.0 사이에서 생산되었고, 나머지 균주는 3.0~6.0에서 생산되었다. Bergey's manual에 의하면 *B. acidocaldarius* 15균주의 pH 증식영역을 보면 11균주가 3~4, 2균주가 3 이하, 2균주가 5~6으로 보고되어 있는 것과 유사하다. 분리시 pH를 4.0 부근으로 하여 5~6 쪽의 균주는 제외된 것으로 본다. pH 6까지만 실험하여 그 이상 pH에서 효소생산은 조사하지 않았다.

균 분리시 30~40°C 에서도 분리를 시도하였으나 이 온도 영역에서 증식하는 전분분해균이나 CGTase 생산균은 발견하지 못하였다.

효소생산에 미치는 탄소원의 영향은 감자를 L당 40 g 공급한 경우 생산량이 급증한 것은 Yano 등(1)이 *B. macerans* 배양용 배지로 보고한 것과 유사하며, 특이한 것은 lactose가 비교적 효소 생산량이 높은 점이다. 효소 생산 조건에서 질소원과 비율이나 질소원의 종류가 영향이 큼으로 계속 연구하고 있다.

CGTase는 생산균주에 따라 효소의 성질이 다르다. Table 6에서와 같이 최적 pH 경우 *B. ohbebsis*, *B. megaterium*와 *B. macerans* IAM 1227는 5.5이며, *B. stearothermophilus*는 5.0, *B. circulans* IFO 3329는 6.0, *B. subtilis*는 8.0, alkalophilic *Bacillus*는 pH 4.5~9

Table 5. Cultural conditions of the CGTase producing *Bacillus* sp.

| Temp.(°C) | pH                       |   |  |
|-----------|--------------------------|---|--|
|           | 2~5                      | 5.5~8   | 9~11   |
| 30~40     |                          | <i>B. macerans</i><br><i>B. circulans</i><br><i>B. megaterium</i><br><i>B. ohbebsis</i><br><i>B. subtilis</i> | Alkalophilic <i>Bacillus</i> sp.<br>Alkalophilic <i>B. circulans</i> |
| 45~60     | <i>B. acidocaldarius</i> | <i>B. amyloliquefaciens</i><br><i>B. stearothermophilus</i>   |  |

Table 6. Comparison of various CGTases from *Bacillus* sp.

|                                  | Opt. pH      | Opt. temp.(°C) | Main CD  | Other CD |          |
|----------------------------------|--------------|----------------|----------|----------|----------|
| <i>B. macerans</i>               | 5.2~5.7      | 55             | $\alpha$ | $\beta$  | $\gamma$ |
| <i>B. ohbensis</i>               | 5.5          | 60             | $\beta$  | $\gamma$ | $\alpha$ |
| <i>B. circulans</i>              | 6.0          | 55             | $\beta$  | $\alpha$ | $\gamma$ |
| <i>B. megaterium</i>             | 5.2~5.7      | 55             | $\beta$  | $\alpha$ | $\gamma$ |
| <i>B. subtilis</i>               | 8.0          | 65             | $\gamma$ | none     |          |
| <i>B. stearotherophilus</i>      | 5.0          | 70             | $\alpha$ | $\beta$  | $\gamma$ |
| Alkalophilic <i>Bacillus</i> sp. | 9.0          | 70             | $\beta$  | $\alpha$ | $\gamma$ |
| <i>Bacillus</i> sp. E.1          | 6~8          | 60             | $\beta$  | $\gamma$ |          |
| Alkalophilic <i>B. circulans</i> | 6.0          | 50             | $\beta$  | $\alpha$ | $\gamma$ |
| <i>B. acidocaldarius</i>         | 3.0, 5.0~6.0 | 90             | $\beta$  | $\alpha$ | $\gamma$ |

까지 넓은 영역에서 작용하며 최적 pH는 9.0이다.

본 연구에서 조사한 No. 9가 생산하는 CGTase는 매우 넓은 pH영역에서 작용하며, pH 3 부근과 pH 5~6의 2영역에서 최적 pH를 나타내고 있으며 pH 9~10에서도 최적 pH의 80%내외의 활성을 나타냈다. Nakamura와 Horikoshi(13)는 alkalophilic *Bacillus* ATCC 21783에서 산성, 중성, 알칼리성 효소가 동일 배양액에 존재하리라 추정하고 효소를 정제하여 pH 7과 pH 4.5~5.0에서 활성인 두 종류의 CGTase를 분리하여 보고한 바 있다. 본 연구에서 실험한 균주들도 산성조건에서 증식하지만 효소는 alkalophilic *Bacillus* (13, 14)와 유사하게 산성, 중성, 알칼리성에서 작용하는 3종류의 전분효소가 생산되는 것으로 추정된다. Fig. 1에서는 전분에 의하여 유도되는 효소를 조사하였으나 몇개의 단백질이 증가되어 효소의 정제 및 특성을 계속 연구하고 있다.

반응 최적온도도 효소의 중요한 성질의 하나이다. 이미 보고된 CGTase의 반응 최적온도는 50~70°C로 보고되어 있다. *B. acidocaldarius* No. 9가 생산하는 CGTase는 90°C 부근에서 최적온도를 나타내 기존에 보고된 효소에 비하여 강한 내열성 효소로 밝혀졌다.

금속이온의 영향은  $\text{Ca}^{2+}$ 와  $\text{Mg}^{2+}$ 는 안정제의 역할을 하고,  $\text{Zn}^{2+}$ 과  $\text{Fe}^{3+}$ 은 억제제의 역할을 한다.

반응 생성물의 조성도 중요한 차이점의 하나이다. 일반적으로 효소량, pH 등 효소 반응 조건에 따라 조성이 다를 수 있다. *B. acidocaldarius*는 *B. circulans*와 비슷한 조성을 나타낸다.

## 요 약

Cyclodextrin glucanotransferase를 생산하는 새로

운 영역의 균주를 분리하였다. 이 균주는 *B. acidocaldarius*로 동정되었다. 이 균주는 pH 2.5~6.0, 온도 45~60°C에서 증식하는 내산성, 고온성 균주였다. 효소 생산 배지로 L당 감자 40g, 펩톤 5g, 효모추출물 1g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.2g,  $\text{MgSO}_4$  0.5g,  $\text{CaCl}_2$  0.2g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3.0g이 우수하였다. 이 효소는 최적 pH 3.0과 5.0~6.0의 두 곳이며, 최적 온도는 90°C였다.  $\text{Ca}^{2+}$ 과  $\text{Mg}^{2+}$ 은 영향이 없었으며,  $\text{Fe}^{3+}$ 과  $\text{Zn}^{2+}$ 은 억제제로 작용하였다. 효소의 반응 생성물의 조성은  $\alpha$ -CD가 1.0,  $\beta$ -CD가 1.3~1.7,  $\gamma$ -CD는 0.2~0.4였다.

## 감사의 말

이 논문은 1991년도 교육부 지원 지방대학 육성 과제 학술 조성비에 의하여 연구된 일부이며, 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

1. Szejtli, J. 1982. Cyclodextrins and their inclusion complexes. Budapest.
2. Whistler, R.L., J.N. Bemiller and E.F. Paschall. 1984. Starch(Chemistry and Technology). pp. 143-149. 2nd ed. Academic Press. New York.
3. 橋本 仁. 1984. Cyclodextrin의 製法發展と 利用諸技術의 現狀. 食品工業. 25-30.
4. Szejtli, J. 1990. The cyclodextrins and their applications in biotechnology. *Carbohydrate Polymers* 12: 375-392.
5. Kitahata, S., N. Tsuyama and S. Okada. 1974. Purification and some properties of cyclodextrin glucanotransferase producing bacteria. *J. Ferment. Technol.* 65: 463-467.

6. Yagi, Y., M. Sato and T. Ishikura. 1986. Comparative Studies of CGTases from *Bacillus ohbensis*, *Bacillus macerans* and *Bacillus circulans* and production of cyclodextrins using those CGTases. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.* **33**: 144-151.
7. Kitahata, S. and S. Okada. 1974. Action of cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus megaterium* strain No. 5 on starch. *Agri. Biol. Chem.* **38**: 2413-2417.
8. Bender, H. 1977. Cyclodextrin glucanotransferase von *Klebsiella pneumoniae* 1. Synthesen, reinigung und eigenschaften des enzymes von *Klebsiella pneumoniae* M5a1. *Arch. Microbiol.* **111**: 271-282.
9. Kato, T. and K. Horikoshi. 1986. A new gamma-cyclodextrin forming enzyme produced by *Bacillus subtilis* No. 313. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.* **33**: 137-143.
10. Kitahata, S. and S. Okada. 1982. Purification and some properties of cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus stearothermophilus* TC-60. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.* **29**: 7-12.
11. 황진봉, 김승호, 이태경, 양한철. 1990. *Bacillus stearothermophilus*에 의한 cyclodextrin glucanotransferase의 생산. *산업미생물학회지* **18**: 578-584.
12. Ernest, K., C. Yu, H. Aoki and M. Misawa. 1988. Specific alpha-cyclodextrin production by a novel thermostable cyclodextrin glucanotransferase. *Appl. Microbiol. Biotech.* **28**: 377-379.
13. Nakamura, N. and K. Horikoshi. 1976. Characterization and some cultural conditions of a cyclodextrin glycosyltransferase-producing Alkalophilic *Bacillus* sp. *Agri. Biol. Chem.* **40**: 753-757.
14. Nakamura, N. and K. Horikoshi. 1976. Purification and properties of cyclodextrin glycosyltransferase of an alkalophilic *Bacillus* sp. *Ibid.* 935-941.
15. Dan, J., Dan, J.L., S. Z. Wang, G.Z. Xu and C.X. Xu. 1984. Studies on the conditions for cyclodextrin glucosyl transferase production by two types of alkaliphilic bacteria and for enzymic reaction. *Acta. Microbiologica Sinica.* **24**: 80-85.
16. Nomoto, M., C.C. Chen and D.C. Shew. 1986. Purification and characterization of cyclodextrin glucanotransferase from an alkaliphilic bacterium of Taiwan. *Agri. Biol. Chem.* **50**: 2701-2707.
17. 이용현, 신현동, 이상호. 1989. Alkalophilic *Bacillus circulans*가 생산하는 cyclodextrin glucanotransferase의 정제와 효소반응의 특성. *산업미생물학회지*, **17**: 370-378.
18. 정용준, 공인수, 강윤숙, 유주현. 1990. 호알카리성 *Bacillus* sp.의 cyclodextrin glucanotransferase의 정제와 특성. *산업미생물학회지*, **18**: 44-48.
19. Darland, G. and T.D. Brock. 1971. *Bacillus acidocaldarius* sp. nov. an acidophilic thermophilic spore-forming bacterium. *J. Gen. Microbiol.* **67**: 9-15.
20. Laemmi, U.K. 1970. Cleavages of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**: 680-685.

(Received March 17, 1993)