

Bacillus firmus Cyclodextrin Glycosyltransferase의 정제 및 특성

손천배[†] · 김성애 · 박영아 · 김명희 · 문숙경 · 장순애 · 이명선

충남대학교 식품영양학과

Purification and Characterization of Cyclodextrin Glycosyltransferase from *Bacillus firmus*

Cheon-Bae Sohn[†], Seong-Ai Kim, Young-A Park, Myung-Hee Kim
Sook-Kyung Moon, Sun-Ae Jang and Myung-Sun Lee

Dept. of Food and Nutrition, Chungnam National University, Taejeon 301-764, Korea

Abstract

The cyclodextrin glycosyltransferase(EC 3.2.1.19) from *Bacillus firmus* was purified by precipitating with ammonium sulfate followed by, DEAE-Sephadex A-50 column chromatography and Sephadex G-100 column chromatography. In this way, we were able to obtain the single band protein on SDS-PAGE with a yield of 12%, whose purity was 49 fold. The purified CGTase was identified as a protein having molecular weight of approximately 80,000 dalton and isoelectric point of 9.6. The optimum pH and temperature for the enzyme activity were 8.0 and 65°C, respectively. The enzyme was stable at between pH 5.5 and 9.0 and up to 50°C. After 24hr of enzyme reaction using soluble starch as substrate, the ratio of α -, β - and γ -cyclodextrin production was 0.01 : 2.90 : 1.00, respectively. And this CGTase produced mainly β - and γ -cyclodextrin.

Key words: *Bacillus firmus*, cyclodextrin glycosyltransferase, cyclodextrin

서 론

Cyclodextrin glycosyltransferase(EC 3.2.1.19, α -1,4-glucan 4-glycosyltransferase, cyclizing; CGTase)는 전분을 분해하여 각각 6, 7, 8개의 glucose 분자로 구성되는 비환원성 환상구조의 α -, β -, γ -cyclodextrin(CD) 분자를 합성하거나 또는 합성된 CD를 개환하여 적당한 수용체에 전이시키는 작용을 하는 효소이다. CD는 도우넛 모양의 독특한 구조를 이루는 oligosaccharide로 CD분자내 공동(cavity)의 내부면은 소수성이고 외부면은 친수성이어서 그 공동내에 여러 유기 및 무기화합물질을 포접하는 성질을 갖고 있다. 이러한 포접작용을 이용하여 각종 물성을 개선하는 분자 capsule로 주목되어 온 CD는 odor masking, taste masking 및 debittering, 휘발성 물질의 안정화, 저칼로리 감미료의 감미증진 및 안정화, 광분해성 물질 및 산화물질의 보호, 유화작용, 불안정한 물질의 안정화, 난용성 물질의 가용화, 조해성 접착성 물질의 분말화 등의 효과가 있어 식품, 의약

품, 화장품, 수지제품 및 농약 등에 폭넓게 이용되고 있다(1-3). CGTase를 생성하는 균주는 전분으로부터 합성되는 CD의 생성비율과 그 효소적 특성이 균종마다 다른 것으로 알려져 있다. 현재까지 밝혀진 CD를 생성하는 균주(4-21)는 생성 CD에 따라 세가지 유형으로 분류할 수 있는데, *Bacillus marcerans*, *Klebsilla pneumoniae*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis* 등의 α -CD 생성형과, *Bacillus megaterium*, *Bacillus circulans*, *Bacillus ohbensis*, 호알칼리성 *Bacillus* sp. 등의 β -CD 생성형이 대부분이며 γ -CD 생성형 CGTase는 *Bacillus subtilis* No. 313에 관한 연구(21)만이 보고되어 있을 뿐이다. CD 중 8개의 glucose 분자로 구성되는 γ -CD는 glucose분자가 각각 6, 7개인 α -, β -CD에 비하여 비교적 공동이 커서 포접량이 많으며 용해도가 크므로 이용상 가장 유리하나 가격이 높아서 실용화에 많은 제한을 받고 있는 실정이다. 따라서 γ -CD 생성형 CGTase를 고수율로 생산하는 우수균주의 분리과 CGTase 생산성 향상에 관한 연구가 이루어져야 한다.

[†]To whom all correspondence should be addressed

이에 본 연구에서는 분리, 보존하고 있는 세균 *Bacillus firmus*(22)의 γ -CD 생산형 CGTase를 정제하여 효소의 특성을 검토하였기에 그 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

사용균주

전보(22)에서 분리, 보고한 바 있는 호알칼리성 세균 *Bacillus firmus*를 사용하였다.

균의 배양 및 조효소액의 조제

효소생산용 액체배지조성은 soluble starch 2%, yeast extract 0.5%, bacto peptone 0.5%, K_2HPO_4 0.2%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%, Na_2CO_3 1%(별도로 살균 후 혼합), pH 10.0으로 하여 조제하고, 1L 삼각플라스크 4개에 600ml씩을 넣어 121°C, 20분간 가압살균한 다음, 선정한 균주를 접종하여 배양온도 30°C에서 4일간 배양하였다. 배양하여 얻은 효소액을 원심분리(7,000×g, 15min, 4°C)하여 균체를 제거한 다음 ammonium sulfate를 75% 포화되도록 가하여 4°C에서 약 20시간 방치한 다음 침전된 단백질을 원심분리하였다(23). 원심분리하여 얻은 단백질 침전물을 모아 소량의 물에 용해시켜 투석, 탈염한 후 polyethylene glycol(M.W. 6,000)로 0°C에서 2일간 농축하여 정제용 조효소액으로 사용하였다.

CGTase activity 측정

CGTase 활성측정은 Kato와 Horikoshi(21)에 의해 제안된 Bromo cresol green(BCG)법을 일부 변형하여 측정하였다. 즉, 원심분리하여 균체를 제거한 상징액 0.1ml에 10% soluble starch 0.5ml와 0.1M KH_2PO_4 -0.2M $Na_2B_4O_7$ buffer(pH 8.0) 0.4ml를 넣고 40°C water bath에서 60분간 반응시킨 다음 이 반응액에 0.025M BCG액 0.1ml와 0.2M citrate buffer(pH 4.2) 4.0ml를 가하여 630nm에서 흡광도를 측정한 후 표준곡선에 의거하여 생성된 γ -CD량을 산출하였다. 이 때 효소활성 1unit는 1분 동안 1 μ mole의 γ -CD를 생성하는 효소량으로 하였다.

DEAE-Sephadex A-50 column chromatography

4°C의 항온실에서 탈염, 농축한 효소액을 0.02M NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 buffer(pH 6.0)로 미리 평형화시켜둔 DEAE-Sephadex A-50 column(1.6×50cm)에 주입하여 흡착시키고 동일한 buffer 250ml와 0.5M NaCl이 함유된 동일 buffer 250ml의 염농도 구배차로 용출시켰

다. 이때의 용출속도는 25ml/hr이었으며 한 tube당 7ml씩 분획하였다. 각 분획의 protein 흡광도를 280nm에서 측정하고 CGTase 활성을 측정하였다.

Sephadex G-100 column chromatography

DEAE-Sephadex A-50 column을 통하여 용출된 효소액 중에서 CGTase활성을 나타내는 분획을 모아 polyethylene glycol(M.W. 6,000)로 농축시킨 다음, 0.02M NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 buffer(pH 6.0)로 미리 평형화시켜둔 Sephadex G-100 column(1.6×90cm)에 주입하여 흡착시킨 후 동일 buffer 250ml로 gel filtration을 용출속도 25ml/hr.로 행하였다. 280nm에서 각 분획의 protein 흡광도를 측정하고 630nm에서 CGTase 활성을 측정하여 효소활성을 나타내는 분획을 모았다.

단백질 정량

단백질은 Lowry 등의 방법(24)에 따라 bovine serum albumin(Sigma Co.)을 표준물질로 사용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

SDS-polyacrylamide gel 전기영동과 분자량 측정

Phast system(Pharmacia Co.)의 0.1% SDS를 포함한 7.5% polyacrylamide gel을 사용하여 pH 8.1의 Tris 완충액계에서 Phast system을 이용하여 전기영동을 실시하였으며 전기영동 후 0.4% silver nitrate에서 염색한 후 2.5% sodium thiosulfate와 3.75% Tris-HCl로 탈색하였다. 전개한 후 상대이동거리에 따라 표준곡선을 이용하여 분자량을 측정하였다. 이때 표준단백질로는 Bio-Rad사의 SDS-PAGE standard molecular weight marker인 myosine(M.W. 200,000), β -galactosidase(M.W. 116,000), phosphorylase B(M.W. 97,400), bovine serum albumin(M.W. 66,200), ovalbumin(M.W. 42,700)을 사용하였다.

등전점 측정

Phast system의 IEF-Gel을 사용하여 전기영동을 실시하였으며, 표준단백질은 isoelectric focusing marker kit(Sigma Co.)시약으로서 amyloglucosidase(pI 3.6), trypsin inhibitor(pI 4.6), β -lactoglobulin A(pI 5.1), carbonic anhydrase B(pI 6.6), myoglobin(pI 7.2), L-lactic dehydrogenase(pI 8.6), trypsinogen(pI 9.3)을 사용하여 상대이동거리와 pI값을 plot하여 CGTase의 pI를 구하였다.

효소반응의 특성 검토

최적 pH

효소반응의 최적 pH를 검토하기 위하여 정제된 CGTase를 다음의 완충액을 사용하여 40°C에서 60분간 반응시킨 후 효소활성을 측정하여 비교하였다. 사용한 완충액은 pH 4.0~5.5는 0.2M succinate-0.2M Na₂B₄O₇ buffer, pH 6.0~9.0은 0.1M KH₂PO₄-0.2M Na₂B₄O₇ buffer, pH 9.5~11.0은 0.2M Na₂CO₃-0.2M Na₂B₄O₇ buffer, pH 11.5~12.0은 0.1M Na₂HPO₄-0.1M NaOH buffer를 사용하였다.

최적온도

정제한 효소액 0.1ml에 0.1M KH₂PO₄-0.2M Na₂B₄O₇ buffer(pH 8.0) 0.4ml, 10% soluble starch 0.5ml를 가하여 30~75°C까지 5°C 간격으로 온도를 변화시키면서 60분간 반응시킨 다음 효소활성을 측정하여 비교하였다.

pH 안정성

정제된 효소액 0.05ml에 각종 pH의 buffer액(pH 4.0~12.0) 0.2ml를 가하여 40°C에서 30분간 방치 후 1M KH₂PO₄-0.2M Na₂B₄O₇ buffer액(pH 8.0) 0.25ml로 pH를 일정하게 조정하여 잔존효소활성을 측정하였다.

열 안정성

정제된 효소액 0.1ml을 넣은 0.1M KH₂PO₄-0.2M Na₂B₄O₇ buffer액(pH 8.0)을 30~75°C까지 5°C 간격으로 변화시키면서 각 온도에서 30분간 보온처리한 다음 급냉하고 10% soluble starch 0.5ml를 가하여 효소반응시킨 후 잔존효소활성을 측정하였다.

CGTase 반응 생성물의 thin layer chromatography

10% soluble starch 0.5ml와 0.1M KH₂PO₄-0.2M Na₂B₄O₇ buffer액(pH 8.0) 0.4ml에 효소액 0.1ml를 가하여 40°C water bath에서 반응시키면서 경시적으로 취하여 Silicagel 60 F₂₅₄ Plate(Merck Co.)에 5μ씩을 spotting하였으며, 이때 표준물질로는 1%의 α-, β-, γ- CD액(Sigma Co.)을 5μ씩 spotting 하였다. 이것을 n-butanol : n-propanol : water=3 : 5 : 4의 전개용매로 실온에서 전개시킨 후 풍건하고 5% iodine/acetone액을 분무하여 발색시켰다(25).

Cyclodextrin의 분석 및 정량

Cyclodextrin의 표준액은 α-CD 0.25%, β-CD 1%, γ-CD 2%의 수용액으로 하여 Kitahata 등(26)의 방법에

따라 HPLC로 분석하여 calibration curve를 작성하고 효소반응액의 CD를 분리, 정량하였다. HPLC는 model 6,000A, Waters Co.(U.S.A)를 사용하였고, column은 carbohydrate analysis column(Ø4.0×250mm), 용출용매는 acetonitrile : H₂O=65 : 35로 하였으며, injector와 detector는 각각 7125 Rheodyne injector, Differential refractometer model(R-400)을 사용하여 검정하였다.

결과 및 고찰

DEAE-Sephadex A-50 column chromatography

선정균을 액체배지(soluble starch 2.0%, yeast extract 0.5%, bacto peptone 0.5%, K₂HPO₄ 0.2%, MgSO₄·7H₂O 0.05%, Na₂CO₃ 1.0%, pH 10.0)에 접종하고 30°C에서 4일간 배양하여 얻은 효소액 2,170ml를 75% ammonium sulfate로 염석, 탈염하고 그 농축액을 DEAE-Sephadex A-50 column에 흡착시킨 후 0.5M NaCl 염농도 구배차로 용출시킨 결과(Fig. 1), 세번째 단백질 peak인 43~60번 분획에서 CGTase 활성을 갖는 효소액이 용출되었으며 이때 효소의 specific activity는 2.8units/mg protein 이었다.

Sephadex G-100 column chromatography

DEAE-Sephadex A-50 column을 통하여 얻은 CGTase 활성구획인 43~60번 분획을 모아 반투막 tube에 넣고 탈수, 농축한 것을 다시 0.02M NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ buffer액(pH 6.0)으로 평형화시킨 Sephadex G-100 column에서 동일 buffer로 용출, 분리시킨 결과(Fig. 2), 두번째 단백질 peak인 21~29번 분획에서 CGTase활성을 갖는 효소액이 용출되었다. 정제된 효소의 specific activi-

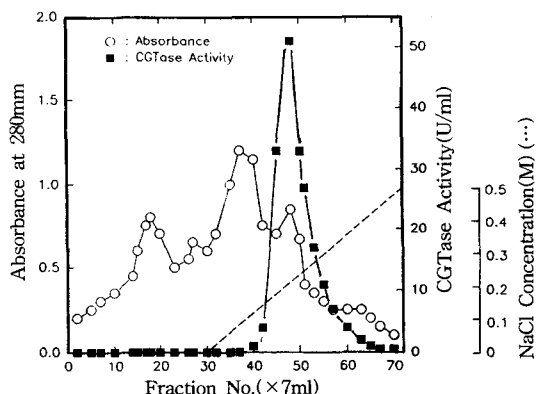


Fig. 1. Column chromatography on DEAE-Sephadex A-50 of the crude CGTase. Column: 1.6×50cm, Flow rate: 25ml/hr

Table 1. Purification summary of the CGTase from *Bacillus firmus*

Purification step	Total activity (units)	Total protein (mg)	Specific activity (unit/mg)	Yield (%)	Purification (fold)
Culture supernatant	381.7	3,300	0.1	100	1
Ammonium sulfate precipitation	286.2	179.2	1.6	75	16
DEAE-Sephadex A-50 column chromatography	100.9	35.7	2.8	26	28
Sephadex G-100 column chromatography	47.0	9.5	4.9	12	49

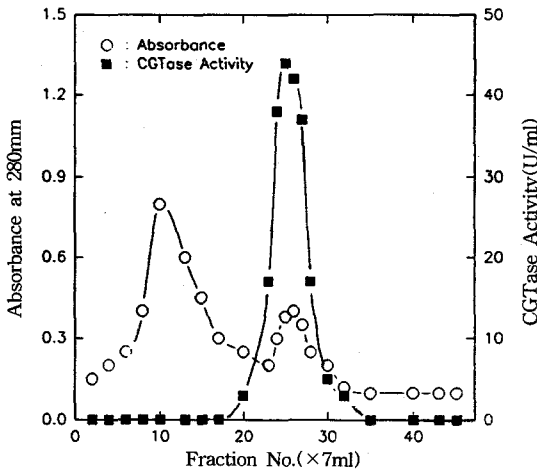


Fig. 2. Column chromatography on Sephadex G-100 of the partially purified CGTase.

Column: 1.6×100cm, Flow rate: 25ml/hr

ty는 4.9units/mg protein으로서 효소활성은 49배 증가하였고 회수율은 12%이었다(Table 1).

정제효소의 특성

분자량

정제효소의 분자량을 결정하기 위하여 7.5% polyacrylamide gel을 사용하여 SDS-PAGE를 수행하였다. 전기영동한 결과(Fig. 3), CGTase의 분자량은 80,000 dalton으로 추정되었다. 이는 *Bacillus macerans*(10), *Bacillus subtilis* No. 313(21)의 분자량이 각각 65,000, 64,000인 것에 비하여 약간 큰편이며, *Bacillus circulans* (14), *Bacillus* sp. E1(19)의 분자량이 각각 93,000, 114,000인 것에 비하여는 작았다.

등전점

정제효소의 등전점을 알기 위하여 Phast system의 IEF-Gel을 사용하여 표준단백질과 함께 CGTase를 전기영동한 결과, 효소의 등전점은 9.6인 것으로 추정되었다(data not shown). *Bacillus subtilis* No. 313(21)의 γ -CD생성효소는 등전점 7.1로서 본 효소와는 차이를 보였다.

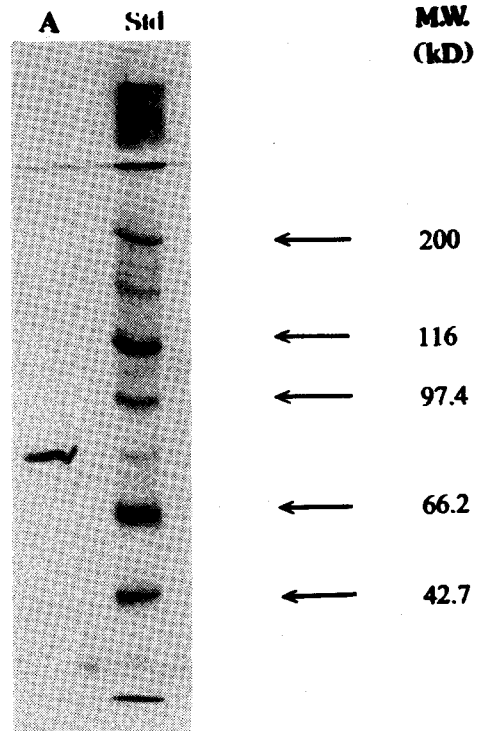


Fig. 3. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the purified CGTase.

A: CGTase, STD: Standard molecular weight marker

최적 반응 온도 및 열안정성

0.1M KH_2PO_4 -0.2M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ buffer(8.0)를 함유한 soluble starch액을 기질로 하여 30~75°C에서 5°C 간격으로 효소반응을 시켜 CGTase 활성을 측정한 결과 65°C에서 가장 활성이 높았다(Fig. 4). 이러한 결과는 이 등(14)에 의해서 보고된 *Bacillus circulans*와 정 등(15)의 *Bacillus* sp. YC-335 유래 CGTase의 최적 온도가 50°C이고 Kobayashi 등(10)의 *Bacillus macerans*가 60°C인 것에 비하면 다소 높았다. 그러나 Kato와 Horikoshi(21)의 *Bacillus subtilis* No. 313은 65°C가 최적 온도로 보고되어 본 효소와 일치하였다.

또한 정제된 효소액을 0.1M KH_2PO_4 -0.2M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ buffer(pH 8.0)를 사용하여 30~75°C에서 5°C 간격으로 각 온도에서 30분간 방치한 다음 soluble starch를 기

질로 하여 효소반응시킨 후 잔존효소활성을 측정한 결과 (Fig. 4), 이 CGTase는 50°C까지는 매우 안정하였으나 55°C 이상에서는 55% 정도의 활성을 나타내었고 그 후 급격히 떨어져 65°C 이상의 온도에서는 활성을 상실하였다. 이는 *Bacillus* sp. YC-335(15)와 *Bacillus subtilis* No. 313(21) 유래 CGTase의 열안정성이 50°C까지인 것으로 보고되어 유사한 성질을 보였다.

최적 반응 pH 및 pH 안정성

정제된 효소액을 pH 4.0~12.0인 완충용액에 가하여 soluble starch를 기질로 하여 반응시킨 다음 CGTase

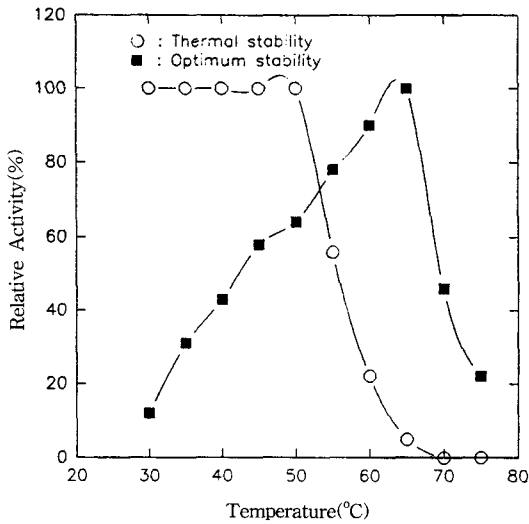


Fig. 4. Optimal temperature and thermostability on the activity of the CGTase.

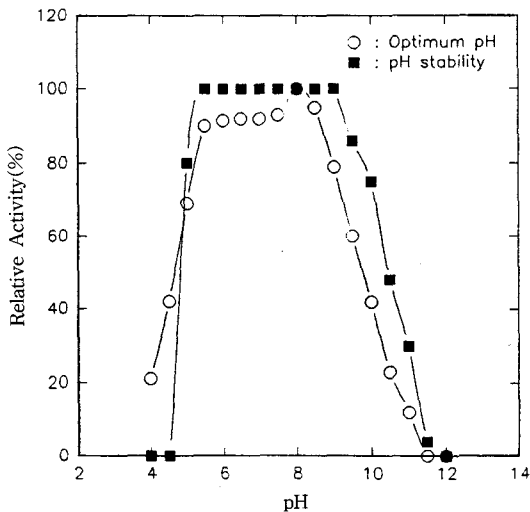


Fig. 5. Optimal pH and pH stability on the activity of the CGTase.

활성을 측정한 결과 (Fig. 5), pH 6.5에서도 경미한 peak가 관찰되었으나 pH 8.0에서 가장 높았다. 이러한 결과는 Kato와 Horikoshi(21)의 *Bacillus subtilis* No.313의 최적 pH인 8.0과 동일하였다.

또한 각종 pH의 완충액(pH 4.0~12.0)에 정제된 효소액을 가하여 50°C에 30분간 방치 후 1M KH₂PO₄-0.2M Na₂B₄O₇ buffer액(pH 8.0)으로 pH를 동일하게 조정하여 잔존효소활성을 측정한 결과 (Fig. 5), 효소활성은 pH 5.5~9.0에서는 매우 안정하였고 pH 10.0에서도 75%의 잔존효소활성을 보였다. 이는 *Bacillus subtilis* No. 313(21)의 pH안정성이 pH 6.0~8.0인 것과는 달리 강알칼리성에서도 상당히 안정한 효소임을 알수 있었다.

CGTase 반응 생성물의 thin layer chromatography

0.1M KH₂PO₄-0.2M Na₂B₄O₇ buffer액(pH 8.0) 0.4ml에 0.1ml의 효소액과 10% soluble starch 0.5ml를 가하여 40°C에서 24시간 동안 반응시키면서 경시적으로 취하여 silicagel plate에 spotting하여 전개, 발색하여 반응 생성물을 조사한 결과 (Fig. 6), 배양액인 조효소는 α-CD는 검출되지 않았으며, 주로 β-CD와 γ-CD만이 검출되었다. 정제하여 농축된 효소를 장시간 반응시킬 때 비로소 α-CD가 소량 검출되었으며 본 효소는 주로 β-, γ-CD를 생산하는 효소임을 알수 있었다.

생성 cyclodextrin의 분석 및 정량

10% soluble starch 2.5ml에 정제된 효소액 0.1ml를 첨가하여 40°C에서 24시간 반응시키고 100°C에서 5분간 불활성화시켜서 glucoamylase로 처리한 후 생성된

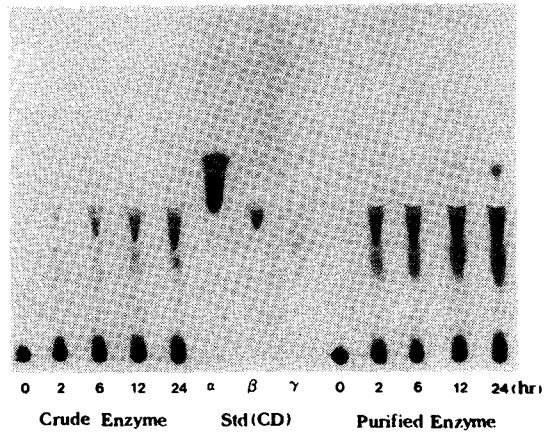


Fig. 6. Thin layer chromatography of reaction products by CGTase of *Bacillus firmus*.

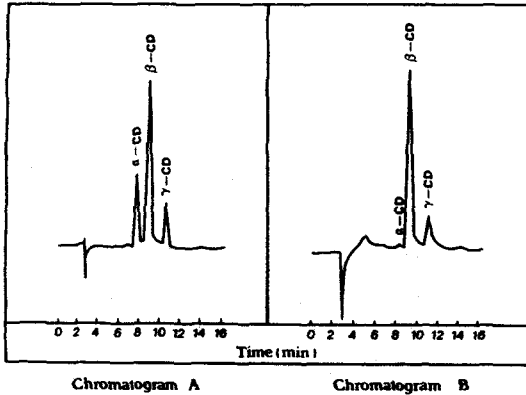


Fig. 7. Typical HPLC chromatogram of reaction mixture by CGTase of *Bacillus firmus*.

A: Standard CD, B: Reaction products

CD를 HPLC로 정량한 결과(Fig. 7), 반응시간이 24시간 경과했을 때의 α - β - γ -CD의 생성비율은 0.01 : 2.90 : 1.00이었다. *Bacillus macerans*(10)의 CD 생성비율이 α : β : γ = 2.7 : 1 : 1, *Bacillus stearothermophilus*(18)가 1 : 1.3 : 0.4인 것과 비교하였을 때 본 균주가 생산하는 CGTase는 총 생성CD에 대한 γ -CD의 생성비율이 높았다. 그러나 *Bacillus subtilis* No. 313(21)의 CGTase가 γ -CD를 주로 생산한다는 것과는 차이를 보였다.

요 약

*Bacillus firmus*가 생산하는 cyclodextrin glycosyltransferase(CGTase)를 ammonium sulfate 침전, DEAE-Sephadex A-50 및 Sephadex G-100 column chromatography로 분리, 정제하였다. 이 방법으로 수율은 12%, 정제도는 49배인 SDS-PAGE 상에서 단일 band의 효소 단백질을 얻을 수 있었다. 정제된 CGTase는 Phast system의 SDS-polyacrylamide gel 전기영동에 의하여 분자량은 80,000dalton, isoelectric focusing으로 등전점은 9.6으로 추정되는 단백질이었다. 이 효소의 최적 활성 pH와 온도는 8.0, 65°C이었으며, pH와 열안정성은 pH 5.5~9.0, 50°C이었다. Soluble starch를 기질로 하여 24시간 효소반응한 액의 α - β - γ -cyclodextrin의 생성비율은 0.01 : 2.90 : 1.00으로 β - 및 γ -cyclodextrin을 주로 생산하였다.

감사의 글

이 논문은 1996년도 충남대학교 학술진흥재단 연구비에 의하여 연구되었으며 이에 감사를 드립니다.

문 헌

1. 한국유전공학연구조합 : Cyclodextrin(유전공학자료 64) (1988)
2. Ito, K., Kikuchi, K., Okazaki, N. and Kobayashi, S. : Retention of aroma components in liquors with cyclodextrins. *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 2763(1988)
3. Kobayashi, S., Nakashima, K. and Arahira, M. : Production and some properties of branched cyclodextrins. *Denpun Kagaku*, **38**, 197(1991)
4. 황진봉, 김승호 : *Bacillus stearothermophilus*의 cyclomaltodextrin glucanotransferase를 이용한 감자전분으로부터의 cyclodextrin 생산. *산업미생물학회지*, **20**, 344 (1992)
5. Kitahata, S., Tsuyama, N. and Okada, S. : Purification and some properties of cyclodextrin glycosyltransferase from a strain of *Bacillus* sp. *Agric. Biol. Chem.*, **38**, 387 (1974)
6. Kitahata, S. and Okada, S. : Action of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus megaterium* strain No. 5 on starch. *Agric. Biol. Chem.*, **3**, 2413(1974)
7. Nakamura, N. and Horikoshi, K. : Purification and properties of cyclodextrin glycosyltransferase of an alkalophilic *Bacillus* sp. *Agric. Biol. Chem.*, **40**, 935(1976)
8. Nakamura, N. and Horikoshi, K. : Characterization and some cultural conditions of a cyclodextrin glycosyltransferase-producing alkalophilic *Bacillus* sp.. *Agric. Biol. Chem.*, **40**, 753(1976)
9. Bender, H. : Cyclodextrin glycosyltransferase from *Klebsiella pneumoniae* M 5 and *Bacillus macerans* : Quantitative analysis by high performance liquid chromatography of the (1-4)- α -D-glucopyranosyl transfer products from some linear and cyclic substrates. *Carbohydrate Research*, **117**, 1(1983)
10. Kobayashi, S., Kainuma, K. and Suzuki, S. : Purification and some properties of *Bacillus macerans* cyclomaltase (cyclodextrin glucotransferase). *Carbohydrate Research*, **61**, 229(1978)
11. Kitahata, S. and Okada, S. : Purification and some properties of cyclodextrin glucotransferase from *Bacillus stearothermophilus* TC-60. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.*, **9**, 7(1982)
12. Yagi, Y., Sato, M. and Ishikura, T. : Comparative studies of cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus ohbensis*, *Bacillus macerans* and *Bacillus circulans* and production of cyclodextrins using those cyclodextrin glucanotransferase. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.*, **33**, 144(1986)
13. 유주현, 정용준, 이정수 : Cyclodextrin glycosyltransferase를 생산하는 호알카리성 *Bacillus*속 미생물. *산업미생물학회지*, **17**, 148(1989)
14. 이용현, 신현동, 이상호 : Alkalophilic *Bacillus circulans*가 생산하는 cyclodextrin glucanotransferase의 정제와 효소반응특성. *산업미생물학회지*, **17**, 370(1989)
15. 정용준, 공인수, 강윤수, 유주현 : 호알카리성 *Bacillus* sp.의 cyclodextrin glucanotransferase의 정제와 특성. *산업미생물학회지*, **18**, 44(1990)
16. 손천배, 문숙경, 이근희 : Cyclodextrin glycosyltransferase를 생산하는 호 알카리성 *Bacillus* sp. No. 4의 특성과 배양조건. *충남생활과학연구지*, **3**, 67(1990)

17. 손천배, 문숙경, 이근희 : 호alkali성 *Bacillus* sp. No. 4가 생산하는 cyclodextrin glycosyltransferase의 정제와 특성. *충남생활과학연구지*, **3**, 77(1990)

18. 황진봉, 이태경, 양한철 : *Bacillus stearothermophilus*에 의한 cyclodextrin glucanotransferase의 생산. *산업미생물학회지*, **18**, 578(1990)

19. 박천석, 우의전, 국승욱, 서병철, 박관화, 임훈 : *Bacillus* sp. E1이 생산하는 cyclodextrin glucanotransferase의 정제와 특성. *산업미생물학회지*, **20**, 156(1992)

20. Pongsawasdi, P. and Yagisawa, M. : Purification and some properties of cyclomaltodextrin glucanotransferase from *Bacillus circulans*. *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 1099 S(1988)

21. Kato, T. and Horikoshi, K. : A new γ -cyclodextrin forming enzyme produced by *Bacillus subtilis* No. 313. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.*, **33**, 137(1986)

22. 손천배, 박영아, 김명희, 문숙경, 김철호, 이근희 : γ -Cyclodextrin 생산성균주의 분리 및 cyclodextrin glycosyltransferase의 생산. *충남생활과학연구지*, **8**, 15(1995)

23. 東京化學同人 : 生化學實驗講座 5, 酵素研究法(上). p.203 (1975)

24. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. T. : Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265(1951)

25. Koizumi, K. : Analysis of oligo- and poly-saccharides of low molecular weight by high performance liquid and thin layer chromatography. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.*, **34**, 308(1987)

26. Kitahata, S., Yoshikawa, S. and Okada, S. : Determination of α , β and γ -cyclodextrins by high performance liquid chromatography. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.*, **25**, 19(1978)

(1997년 1월 23일 접수)