

호알칼리성 *Bacillus* sp. No. 4의 Cyclodextrin Glycosyltransferase에 의한 Glycosyl Sucrose의 생산과 저충치성 당으로서의 응용

손천배 · 유미경 · 김명희 · 문숙경
충남대학교 식품영양학과

Production of Glycosyl Sucrose by Cyclodextrin Glycosyltransferase of Alkalophilic *Bacillus* sp. No. 4 and Its Application for Low-Cariogenic Sugar

Cheon-Bae Sohn, Mi-Kyeong You, Myung-Hee Kim and Suk-Keung Moon
Department of Food and Nutrition, Chungnam National University

Abstract

Action of a cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase) produced from alkalophilic *Bacillus* sp. No. 4 was studied in a solution containing starch and sucrose to prepare glycosyl sucrose syrup with good sweetness and antidecaying properties of teeth. In the initial stage of the reaction the CGTase produced cyclodextrin, however, the cyclodextrin disappeared and glycosyl sucrose was formed with the lapse of reaction time. The best proportion of sucrose to starch for production of glycosyl sucrose was about 1 : 1. The optimum pH and temperature of the coupling reaction was pH 6.0 and 60°C, respectively. Main composition of glycosyl sucrose syrup prepared with 20% starch and 20% sucrose was sucrose 18%, glucoyl sucrose (G₂F) 15.3% and maltosyl sucrose (G₃F) 11.3%. And glucose, maltose and maltotriose were produced very little. Smaller amounts of acid and insoluble glucan were formed in the syrup by *Streptococcus mutans* OMZ176 than in the sucrose. Therefore, the prepared glycosyl sucrose sucrose syrup is expected to prevent teeth from decaying.

Key words: alkalophilic *Bacillus* sp., cyclodextrin glycosyltransferase, glycosyl sucrose, coupling reaction, low-cariogenic sugar, insoluble glucan

서 론

Cyclodextrin glycosyltransferase(α -1,4-glucan-4-glycosyltransferase, E.C 2.4.1.19, CGTase)는 *Bacillus macerans*⁽¹⁻⁴⁾, *B. megaterium*⁽⁵⁾, *K. pneumoniae*⁽⁶⁻⁸⁾, *B. amyloliquefaciens*⁽⁹⁾, *B. licheniformis*⁽¹⁰⁾, *B. circulans*⁽¹¹⁾, *B. ohbensis*⁽¹²⁾, *B. subtilis*⁽¹³⁾, *B. stearothermophilus*^(14,15), *alkalophilic Bacillus* sp.⁽¹⁶⁻²¹⁾ 등의 세균에서 생산되어지는 효소로서, cyclization, coupling reaction, disproportionation의 3가지 작용을 촉매한다.

이중 coupling 반응은 분자간 전이작용으로써 전분에 glucose, maltose, maltotriose, sucrose 등의 수용체를 넣은 혼합액에 CGTase를 작용시키면 먼저 생성된 cyclodextrin이 개환되어 수용체 분자에 glycosyl기를 전이시킨 전이 생성물을 합성하므로, 중합도가 다른 여러가지 당이 생성된다⁽²²⁾. 이러한 전이작용은 *B. macerans*보다 *B. megaterium* No. 5의 CGTase가 더 우수하였다는

Kitahata 등⁽²³⁾의 보고와 같이 균종에 따라 CGTase의 작용특이성이나 전이 능력은 다르다. 岡田 등^(24,25)은 *Bacillus megaterium* No. 5의 CGTase를 전분과 설탕의 혼합액에 작용시켜 coupling 반응으로 물엿상의 glycosyl sucrose syrup을 제조하였으며, 현재 coupling sugar란 상품명으로 시판되고 있다.

이 syrup은 천연의 당질로서 안정성이 있고, 설탕의 50~55%의 감미를 갖고 있으며 미질이 우수하고, 환원당 함량이 적으므로 단백질과 가열해도 갈변하지 않는 특성을 갖고 있다. 또한 구강내의 충치균인 *Streptococcus mutans*가 작용하여도 불용성 glucan의 생성이 거의 없고 발효성(산생성)도 적다⁽²⁶⁾. 따라서 충치발생억제 효과가 있는 저우식성의 기능성 당질 감미료로 인정되어 일본 후생성 인가의 JSD 식품으로서 캔디, 잼, 젤리, 쿠키 등의 제조에 쓰이며, 특히 유아용의 식품에 적합하다. 또한 설탕에서 생기는 결정방지 효과도 있어 설탕의 일부를 대체하는 등 많은 식품에 이용되고 있다^(27,28). 이와 같이 근년 미생물 효소의 개발과 이용 기술의 발전에 따라 설탕이 갖는 못한 물성과 기능을 부여한 새로운 당질이 개발되어지고 있다⁽²⁹⁾.

본 연구실에서는 β -cyclodextrin을 주로 생성하는 CG-

Corresponding author: Cheon-Bae Sohn, Department of Food and Nutrition, Chungnam National University, 220 Gung-dong, Yuseung-gu, Daejeon 305-764, Korea

Tase 생산균으로 호알칼리성 *Bacillus* sp. No. 4의 균을 분리하고, 효소의 정제와 성질에 대하여 보고하였다^(20,21).

본 논문에서는 이 효소의 coupling 반응의 최적조건을 검토하여 glycosyl sucrose(malto-oligosyl sucrose)를 생산하고 충치균 *S. mutans*에 대한 저우식성 당으로서의 적용성을 검토하였기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

표준당

Sucrose, soluble starch는 日本 和光(株)에서, 분석에 사용한 glucose, maltose, maltotriose는 Sigma Chemical Co.로부터 구입하였으며 glucosyl sucrose(G₂F), malto-syl sucrose(G₂F)는 日本 大板市立大의 飯塚勝 박사로부터 분양받아 사용하였다.

CGTase의 조제

500 ml들이 플라스크에 dextrin 1%, yeast extract 0.1 %, MgSO₄·7H₂O 0.02%, Na₂CO₃ 1% 조성의 배지를 100 ml씩 넣어 120°C, 20분간 살균하고 호알칼리성 *Bacillus* sp. No. 4를 접종하여 30°C에서 2일간 진탕배양하였다. 배양액의 균체를 원심분리하여 제거한 후 80%(NH₄)₂SO₄ 염석, DEAE-Sephadex A-50 column chromatography 및 Sephadex G-100 column chromatography에 의하여 정제한 효소(350 units/mg)를 사용하였다⁽²¹⁾.

전분 분해 활성측정

전분 분해 활성은 50°C에서 일정시간 반응시킨 반응액을 0.5 ml 취하여 0.02 N-HCl 4.3 ml가 들어있는 시험관에 넣어 반응을 정지시키고 0.01 N-I₂ 0.2 ml를 가하여 혼합한 후 spectrophotometer로 660 nm에서의 흡광도를 측정하여 값으로 나타내었다(Iodine staining power).

총당 정량

Phenol-H₂SO₄법^(30,31)에 의하여 정량하였다. 시료 1.0 ml와 5% phenol 1.0 ml를 취하고 진한 황산 5 ml를 액면에 직접 닿도록 적하시켜 10분간 그대로 방치한 후 잘 혼합하고 10~20분 후에 490 nm에서 흡광도를 측정하고 soluble starch의 표준곡선에 의하여 총당을 구하였다.

환원당 정량

中村 등이 개량한 DNS 변법⁽³²⁾에 의하여 정량하였다. 즉, 반응액 0.5 ml에 DNS(3,5-dinitrosalicylic acid) 시약 1.0 ml를 끓는 물 중에서 5분간 가열하고 수도수로 냉각한 뒤 증류수 4.5 ml를 가하여 535 nm에서 흡광도를 측정하고 glucose의 표준곡선에 의하여 생성당을 구하였다.

Thin layer chromatography

Silicagel 60 F₂₅₄ plate(Merk Co.)에 당액을 spotting

하고 n-butanol : n-propanol : water = 3 : 5 : 4의 전개용매로 실온에서 상층법으로 4중 전개하였다. 발색은 c-H₂SO₄/EtOH(1/9)의 용액에 plate를 침지한 후 풍건하고 110°C oven에서 5~10분간 두어 발색시켰다.

HPLC

KNAUER RI detector, Pump ICI(LC-1100 HPLC pump)를 사용하고, 시료는 30% H₂O/CH₃CN 용액에 용해하여 사용하였고 eluent : 32% H₂O/CH₃CN, flow rate : 2.0 ml/min, column : NH₂, 7 μ, 7×250 mm이었다.

Cyclodextrin(CD) 생성의 확인 및 정량

CD생성은 반응액 4 ml에 동량의 trichloroethylene (TCE)을 가하여 vortex mixer로 1분간 진동시킨 후 생성되는 CD-TCE의 침전으로 확인하였고, CD의 정량은 phenolphthalein 정색법⁽²³⁾에 의하여 정량하였다.

Coupling reaction의 확인

전분과 설탕의 혼합액에 CGTase를 반응시킨 반응액을 소량 취하여 위에서와 같이하여 CD-TCE 침전이 생성하지 않는 것으로 확인하였다.

발효성

pH 6.8의 brain heart infusion media(Difco Co.)에 1%가 되도록 각종 당을 가하여 membrane filter로 제균한 배지 5 ml에 구강세균인 *S. mutans* OMZ 176를 접종하고 37°C에서 24시간 및 48시간 배양하였다. 이들 배양액을 Spectrophotometer로 660 nm에서 흡광도를 측정하여 균의 생육정도를 나타냈으며 pH meter에 의한 pH 측정 및 0.1 N-NaOH 용액으로 적정하여 산도를 측정하고 젖산량으로 표시하였다.

불용성 glucan 정량

시험관에 glycosyl sucrose와 sucrose를 각각 1% 되게 조제한 nutrient broth 배지 5 ml에 *S. mutans* OMZ 176를 접종하여 시험관을 경사시켜 37°C에서 24시간 배양한 후 조심스럽게 딸아내고 다시 새로운 동일한 배지를 부어 교체하면서 5일간 배양하였다. 시험관에 부착된 glucan을 3회 수세한 후 건조하고 0.5 N-NaOH 1 ml에 용해하여 phenol-H₂SO₄법^(30,31)으로 정량하였다.

결과 및 고찰

전분, 설탕 혼합액에서 CGTase의 작용

2%의 가용성 전분액에 sucrose를 0~2% 넣은 용액에 CGTase를 가하여 50°C에 작용시키면서 경시적으로 전분분해속도 및 cyclodextrin의 생성과 소실되어짐을 조사한 결과는 Fig. 1과 같았다.

Fig. 1에서 전분만의 경우 (A)에서는 전분의 분해와

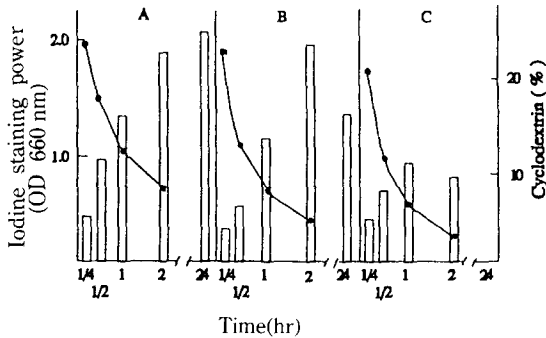


Fig. 1. Action of cyclodextrin glycosyltransferase of various concentrations of sucrose as acceptor
 —●—; decrease in iodine-staining power (OD at 660 nm), □; amounts of cyclodextrin precipitated with trichloroethylene, A; 2% soluble strach only, B; 2% soluble starch, 1%, sucrose, C; 2% soluble starch, 2% sucrose

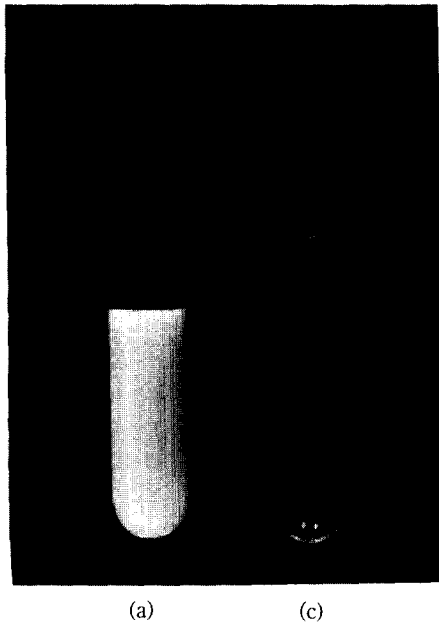


Fig. 2. Cyclodextrin formation and coupling reaction by CGTase

a; ppt of cyclodextrin formed (strach only), c; disappearance of cyclodextrin by coupling reaction (strach : sucrose = 1 : 1)

더불어 점차 CD생성량도 증가되었으나 sucrose를 첨가한 경우 (B, C)에서는 반응 초기에는 CD가 생성되었지만 반응시간의 경과에 따라 생성된 CD가 다시 분해되어 점차 소실되었으며, 전분과 설탕의 비율이 1 : 1의 경우인 (C)의 coupling reaction이 1 : 0.5인 경우(B)보다 빠르게 진행되어 CD의 침전이 24시간 후에는 전혀 없었다.

Fig. 2는 24시간 반응시킨 A, C의 시험관에 같은량의

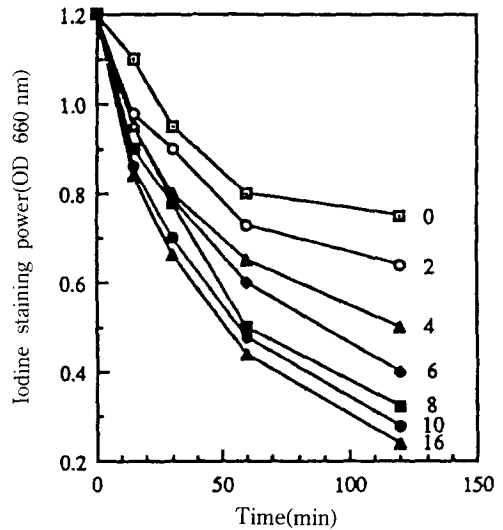


Fig. 3. Action of CGTase on soluble starch with various amounts of sucrose

Mixtures consisted of the enzyme solution (0.5 ml, 5 unit) and 10% soluble starch containing various amounts of sucrose were incubated at 50°C and the decreases iodine color were measured. The numbers in the figure refer to the concentration (%) of sucrose.

trichloroethylene을 가하여 CD-TCE 반응을 비교한 것으로 A에서는 CD-TCE의 침전이 나타났으나 C에서는 침전이 전혀없이 투명하였다.

이 반응의 기작은 cyclization 반응으로 생성된 cyclodextrin이 다시 개환되어 분해되면서 생성된 1~수개의 glucose가 sucrose 분자에 결합되는 분자간의 coupling reaction으로 중합도가 다른 여러가지 malto oligo당이 생성된 것이며 이것은 CGTase가 반응조건에 따라 cyclization 또는 coupling reaction을 촉매할 수 있는 작용 특이성에 기인된다⁽²²⁾.

전분, 설탕의 혼합비율

10% soluble starch 10 ml에 설탕을 여러가지 농도로 첨가하여 용해시킨 후, 효소를 가하여 50°C에서 반응시키면서 전분의 분해속도를 비교한 결과는 Fig. 3과 같으며 첨가한 설탕의 비율이 증가됨에 따라 전분 분해속도는 점차 증가하였다.

또한 24시간 반응시킨 용액에 trichloroethylene을 가하여 TCE-CD 침전을 비교해 본 결과 전분과 설탕의 비율이 1 : 0.8 이상의 경우에는 CD가 검출되지 않았으나 1 : 0.5 이하인 경우는 CD가 검출되었으며, 설탕의 비율이 적을수록 잔존 CD량이 많았다. 이러한 경향은 岡田 등⁽²⁴⁾의 *B. megaterium*의 CGTase에서와 같았다.

환편 고농도의 syrup을 생산하기 위하여 soluble starch 2g을 넣은 시험관에 sucrose을 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 g을 각각 혼합, 용해하여 전량을 10 ml로 하고 효소액

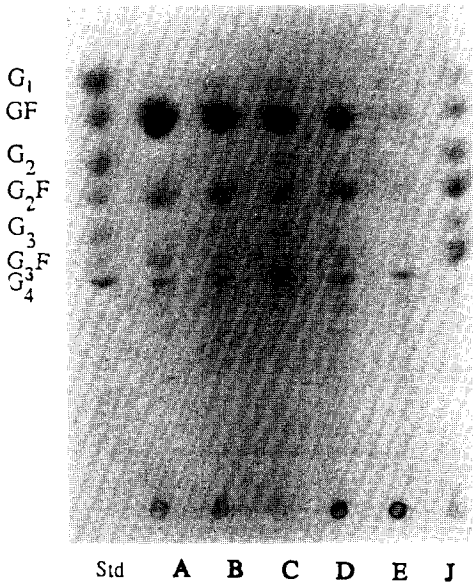


Fig. 4. Thin layer chromatography of glycosyl sucrose syrup produced by soluble starch with various amounts of sucrose and commercial coupling sugar

Std; Standard materials (G_1 ; glucose, GF; sucrose, G_2F ; glucosyl sucrose, G_3 ; maltotriose, G_3F ; maltosyl sucrose, G_4 ; maltotetraose)

- A; Concentration of soluble starch 20%, sucrose 25%
- B; Concentration of soluble starch 20%, sucrose 20%
- C; Concentration of soluble starch 20%, sucrose 15%
- D; Concentration of soluble starch 20%, sucrose 10%
- E; Concentration of soluble starch 20%, sucrose 5%
- J; Commercial coupling sugar (Harada Co. Japan)

0.5 ml를 가하여 50°C에서 5일간 coupling reaction을 시킨 후 TLC에 의하여 효소반응물의 생성량 조성을 비교한 결과 어느 경우이든 주로 glucosyl sucrose(G_2F), maltosyl sucrose(G_3F)가 생성되었으며, glucose(G_1), maltose(G_2), maltotriose(G_3)는 전분과 설탕의 비율이 20 : 15의 경우에서 약간의 흔적이 나타날 뿐 그 이외의 경우에는 거의 나타나지 않았다. 이에 비하여 일본 제품에서는 G_1 , G_2 , G_3 도 비슷한 크기로 나타났다(Fig. 4). 따라서 본 효소는 일본 제품에 비해서 G_2F 나 G_3F 의 생성량이 많은 특성있는 당을 합성하는 CGTase라고 생각된다.

Coupling reaction의 최적 pH

10% 가용성 전분용액 10 ml에 설탕을 10% 첨가한 용액의 pH를 4~11로 하고 CGTase를 50°C, 15분간 작용시켜 전분 분해의 정도를 Iodine 정색법으로 측정하였다. Fig. 5에서 보는 바와 같이 pH 6.0 부근이 활성이 높았으나, pH 10에서도 80% 정도의 높은 활성을 보였다.

이 결과는 전보⁽²¹⁾에서 본 효소의 cyclodextrin 생성의 최적 pH가 9.0이었던 것과는 달랐으며, 이는 기질이 서로 다르기 때문으로 생각된다.

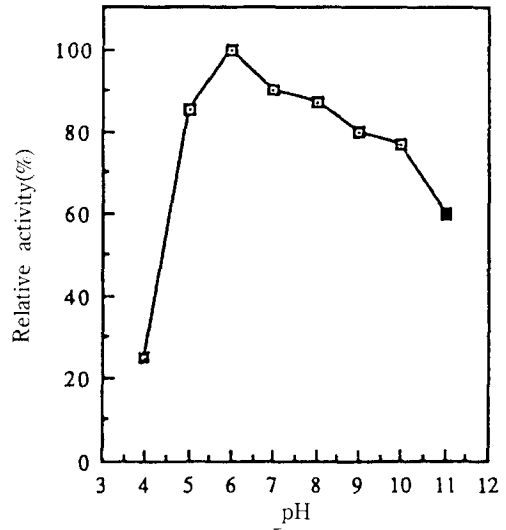


Fig. 5. pH-activity curves of coupling reaction by cyclodextrin glycosyltransferase

Reaction mixtures consisted of 2.0 ml of 10% soluble starch containing 10% sucrose, 1 ml of buffer (pH 4~8; McIlvaine buffer, pH 9~11; Glycine-NaOH buffer) and 1 ml of enzyme solution were incubated at 50°C for 15 min

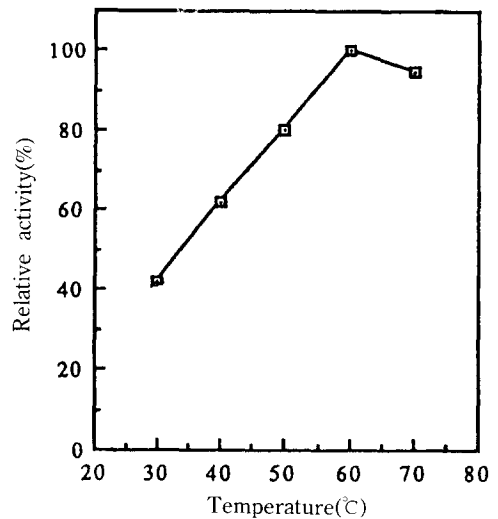


Fig. 6. Temperature-activity curves of coupling reaction by cyclodextrin glycosyltransferase

Reaction mixtures consisted of 2 ml of 10% soluble starch containing 10% sucrose, 1 ml of 0.1 M phosphate buffer (pH 6.0). 1 ml of enzyme were incubated for 15 min at various temperatures

Coupling reaction의 최적 온도

pH 6.0으로 한 위의 반응액을 작용 온도를 달리하여 각 온도에서 15분간 반응시켜 전분가수분해 정도를 Io-

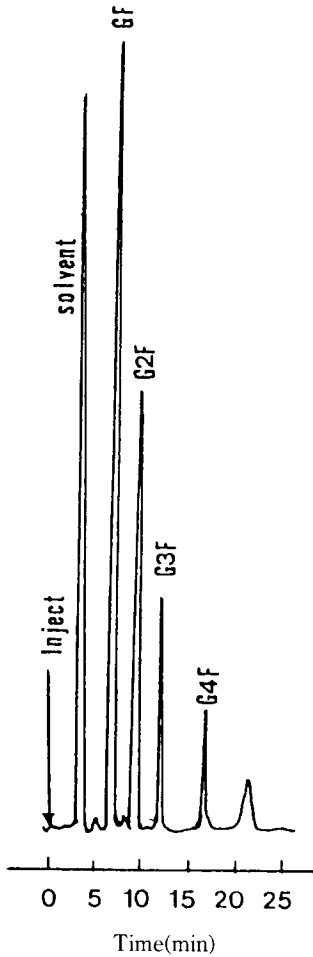


Fig. 7. High Performance Liquid Chromatography of glycosyl sucrose syrup

GF; sucrose, G₂F; glucosyl sucrose, G₃F; maltosyl sucrose, G₄F; maltotriosyl sucrose
 Condition: column; NH₂, 7 μ (7×250 mm), solvent; H₂O/CH₃CN=32/68, flow rate; 2 ml/min, detector; KNAUER RI detector, pump; ICI (LC-1100 HPLC pump)

Table 1. Sugar composition in glycosyl sucrose syrup

Sugar	% (d.w.)
Fructose (F)	0
Glucose (G ₁)	0.5
Sucrose (GF)	18.0
Maltose (G ₂)	0.2
Glucosyl sucrose (G ₂ F)	15.3
Maltotriose (G ₃)	0.2
Maltosyl sucrose (G ₃ F)	11.3
Maltotetraose (G ₄) ≤	54.5

dine 정색법으로 측정하는 결과는 Fig. 6과 같았으며 60°C 부근이 최적이었다.

Glycosyl sucrose의 시험제조와 그 조성

실제적인 견지에서 다량의 glycosyl sucrose syrup을 제조하기 위하여 3 liter들이 삼각 플라스크에 soluble starch 500g, sucrose 500g을 넣고 물을 가하여 가열 용해한 후 2.5 liter로 조정하고 pH 6.0으로 하여 CGTase 용액 10 ml를 가하여 50°C에서 5일간 반응시켰다. 이 당액을 소량 취하여 trichloroethylene test에 의하여 CD-TCE의 침전이 생성되지 않음을 확인한 후 이온교환수지 (Dowex 4B) column에 통과시켜 효소반응 중 약간 착색된 황갈색을 탈색하였다.

본 syrup의 당조성을 알기 위하여 HPLC로 분석한 결과는 Fig. 7과 같았으며, 고형분 중의 당의 조성 비율은 Table 1과 같았다. 이 결과는 앞에서의 TLC와 같은 경향으로서 주성분은 sucrose 18%, glucosyl sucrose(G₂F) 15.3%, maltosyl sucrose(G₃F)가 11.3%이었고, glucose, maltose, maltotriose는 거의 생성되지 않았다.

구강세균에 의한 산 발효에 미치는 영향

배양액의 생육 정도와 산생성량을 조사한 결과는 Table 2와 같다.

위 결과에서 균의 생육도와 pH 저하와는 상관관계가 없었으며, 산생성에 있어서 glycosyl sucrose는 glucose,

Table 2. Acid fermentation of various sugars by *Streptococcus mutans* OMZ 176

Substrates	24 hr			48 hr		
	Growth (O.D. 660)	pH	Acidity as lactic acid mg/ml(%)	Growth (O.D. 660)	pH	Acidity as lactic acid mg/ml(%)
Glucose	1.12	5.35	0.32 (100)	1.20	5.29	0.34 (100)
Sucrose	1.10	5.44	0.30 (94)	1.10	5.33	0.33 (97)
Maltose	1.12	5.39	0.31 (97)	1.10	5.32	0.33 (97)
G.S.	1.40	5.94	0.18 (56)	1.48	5.87	0.20 (59)
C.G.S.	1.33	5.64	0.25 (78)	1.35	5.53	0.27 (79)
G ₂ F	1.24	6.84	0	1.30	7.04	0
G ₃ F	1.24	6.72	0	1.30	6.73	0

G.S.; glycosyl sucrose syrup, C.C.S.; commercial coupling sugar, G₂F; glucosyl sucrose, G₃F; maltosyl sucrose

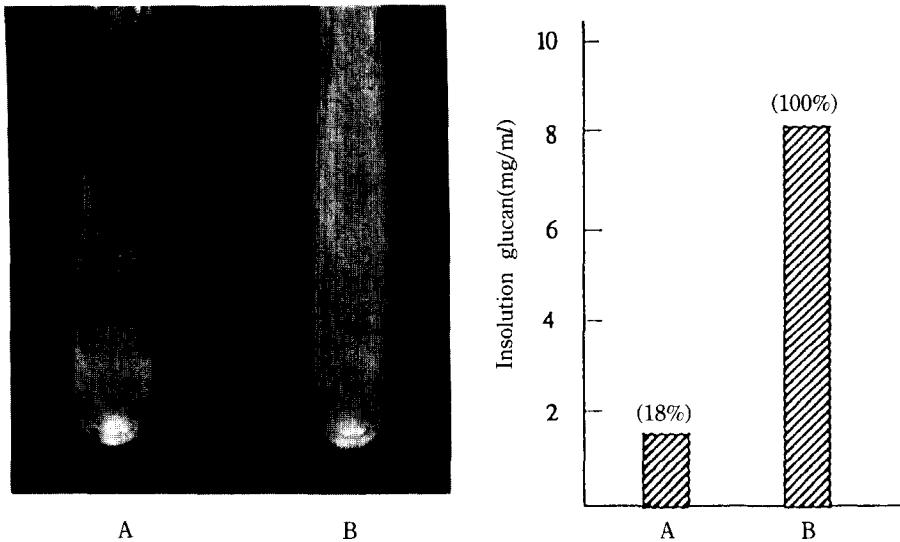


Fig. 8. Formation of adhered insoluble glucan from glycosyl-sucrose and sucrose by *Streptococcus mutans* OMZ 176

A; glycosyl-sucrose syrup, B; sucrose

sucrose, maltose 및 commercial coupling sugar에 비할 때 산생성이 약간 적게 나타났으나, G₂F(glucosyl sucrose), G₃F(maltose sucrose)만의 경우는 산생성이 전혀 없었다. 이것은 glycosyl sucrose syrup 중에는 sucrose가 일부 함유되어 있기 때문에 산이 생성된 것이며, G₂F나 G₃F의 당이 많이 함유될수록 산생선량이 적은 것으로 사료된다. 이러한 결과는 山田⁽³⁴⁾ 등의 *Streptococcus mutans* FIL의 젖산 생성량이 G₂F, G₃F에서 전혀 없었다는 보고와도 일치되었다.

불용성 glucan 생성에 미치는 영향

시험관에 부착되어진 불용성 glucan을 비교할 때(Fig. 8) 설탕에 비하여 glycosyl sucrose의 경우 부착된 양이 18% 정도로서 상당히 적음을 알 수 있었으며, 치석 형성에 예방에 효과가 있는 syrup임이 확인되었다. 이러한 결과는 池田⁽³⁵⁾의 보고에서 *Streptococcus mutans* 6715의 CGTase(glycosyltransferase)에 의한 불용성 glucan 생성 시험에서 sucrose로부터 생성된 glucan 양을 100으로 할 때 coupling sugar는 13% 생성량을 보인 결과와 유사하였다.

요 약

Strach와 sucrose의 혼합액에 호알칼리성 *Bacillus* sp. No. 4가 생산하는 cyclodextrin glycosyltransferase(CG-Tase)를 작용시켜 감미가 우수하고 항우식성이 있는 glycosyl sucrose syrup을 만들기 위한 조건을 검토하였다. 설탕과 전분의 혼합액에 CGTase를 작용시키면 반응

초기에는 cyclodextrin을 생성하지만 반응시간의 경과에 따라 점차 cyclodextrin은 소실되고 glycosyl sucrose가 생성되었다. 이 반응은 설탕과 전분의 비율이 1 : 1 부근이 좋았으며, pH 6.0, 온도 60°C가 최적이었다. 20% starch와 20% sucrose의 혼합액으로부터 제조된 glycosyl sucrose syrup의 주성분은 sucrose 18%, glucosyl sucrose(G₂F) 15.3%, maltosyl sucrose(G₃F) 11.3%이었으며 glucose, maltose, maltotriose는 거의 생성되지 않았다. 제조된 syrup은 sucrose에 비하여 충치균 *Streptococcus mutans* OMZ 176에 의한 산생선량이 적고 불용성 glucan의 생성량도 적어 충치 예방효과가 기대되었다.

감사의 말

본 연구는 1988년도 문교부 학술연구 조성비 지원에 의하여 수행되었으며, 이에 감사를 드립니다.

문 헌

1. French, D. : *Advanced in Carbohydrate Chemistry*, Vol. 12, 189, Academic Press, New York(1957)
2. Fredrick, C.A., Earl, R.K. and La Grange : Production of cyclodextrin. *U.S. Patent* 3,425,910(1969)
3. Fredrick, C.A. and La Grange : Method of preparing pure α -cyclodextrin. *U.S. Patent* 3,541,077(1970), 3,640,847(1972)
4. 矢野勝太郎, 宮内徹二, 日高参昌 : サイクロデキストリン의 製造法. 日特公昭 46-2380(1971)
5. Kitahata, S. and Okada, S. : Action of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus megaterium* strain No. 5

- on starch. *Agric Biol. Chem.*, **38**, 2413(1974)
6. Bender, H. : Cyclodextrin glucanotransferase von *Klebsiella pneumoniae* synthese, *Reinigung und Eigenschaften des enzymes von K. pneumoniae*. *Arch. Microbiol.*, **111**, 271(1977)
 7. Bender, H. : Bedeutung des enzymes fur den mltabolism der cyclodextrin bei *K. pneumoniae* M 5al. *Arch. Microbiol.*, **113**, 49(1977)
 8. Bender, H. : Cyclodextrin glycosyltransferase from *Klebsiella pneumoniae* M 5al and *Bacillus macerans*. *Carbohydr. Res.*, **117**, 1(1983)
 9. Ernst, K.C. Yu, Aoki, H. and Misawa, M. : Specific alpha-cyclodextrin production by a novel thermostable cyclodextrin glycosyltransferase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **28**, 377(1988)
 10. 小林昭一 : 사이클로덱스트린의開發とその周邊技術. *食品工業*, **31**, 20(1988)
 11. 岡田茂孝, 津山直人 : β -사이클로덱스트린의 製法. 日特公昭, **52-33195**(1977)
 12. 八木佳明, 左藤充實, 石倉知之 : α -미라-세신보시움. **19**, 144(1986)
 13. 加藤 卓, 堀越弘毅 : γ -cyclodextrin을 合成す의 酵素. *澱粉科學*, **33**, 137(1986)
 14. Kitahata, S. and Okada, S. : Purification and some properties of cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus stearothermophilus* TC-60. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.*, **29**, 7 (1975)
 15. Kitahata, S. and Okada, S. : Comparison of action of cyclodextrin glucanotransferase from *B. megaterium*, *B. circulans*, *B. stearothermophilus* and *B. macerans*. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.*, **29**, 13(1982)
 16. Nakamura, N. and Horikoshi, K. : Characterization and some cultural conditions of a cyclodextrin glycosyltransferase producing alkalophilic *Bacillus* sp. *Agr. Biol. Chem.*, **40**, 753(1976)
 17. Nakamura, N. and Horikoshi, K. : Purification and properties of cyclodextrin glycosyltransferase of an alkalophilic *Bacillus* sp. *Agr. Biol. Chem.*, **40**, 935 (1976)
 18. 유주현, 정용준, 이정수 : Cyclodextrin glycosyltransferase를 생성하는 호 알칼리성 *Bacillus*속 미생물. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **17**, 148(1989)
 19. 정용준, 공인수, 강윤숙, 유주현 : Purification and characterization of cyclodextrin glycosyltransferase from alkalophilic *Bacillus* sp. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **18**, 44(1990)
 20. 손천배, 문숙경, 이근희 : Cyclodextrin glycosyltransferase를 생산하는 호 알칼리성 *Bacillus* sp. No. 4의 특성과 배양조건. *충남대 생활과학연구지*, **3**, 67(1990)
 21. 손천배, 문숙경, 이근희 : 호 알칼리성 *Bacillus* sp. No. 4가 생산하는 cyclodextrin glycosyltransferase의 정제와 특성. *충남대 생활과학연구지*, **3**, 77(1990)
 22. French, D., Levine, M.L., Norbery, E., Nordin, P., Pazur, J. and Wild, G.W. : studies on the schardinger dextrans. VII. Co-substrate specificity in coupling reaction of Macerans amylase. *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 2387(1954)
 23. Kitahata, S. and Okada, S. : Transfer action of cyclodextrin glycosyltransferase on starch. *Agr. Biol. Chem.*, **39**, 2185(1975)
 24. 岡田茂孝, 北畑壽美雄 : 蔗糖를結合した 水飴의 製造とその 性質. *日本食品工業會誌*, **22**, 420(1975)
 25. 岡田茂孝 : 사이클로덱스트린合成酵素と カップリングシュガー에 關する 研究. *澱粉科學*, **34**, 75(1987)
 26. 内藤二佐男 : 컵프링그슈가. *食品産業事典*, 日本食糧新聞社, 東京, p.177(1982)
 27. 市川富夫 : 營養面から 見た いわゆる 機能性糖質의 評價. *澱粉科學*, **37**, 51(1990)
 28. 齊藤典行 : 最近의 糖質と その機能. *食品工業*, **31**, 17 (1988)
 29. 北畑壽美雄 : 微生物酵素による 有用オリゴ 糖의 合成. *澱粉科學*, **37**, 59(1990)
 30. Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, T.K., Robers, P.A. and Smith, F. : Colorimetric method for determination sugars and relate substances. *Anal. Chem.*, **28**, 350 (1956)
 31. 中村道德, 貝沼佳二 : 澱粉關聯糖質實驗法. 學會出版 센터, 東京, p.45(1986).
 32. 中村道德, 鈴木繁男 : 澱粉科學ハンドブック. 朝倉書店, 東京, p.188(1980)
 33. Kaneko, T., Kato, T., Nakamura, N. and Horikoshi, K. : Spectrophotometric determination of cyclization activity of β -cyclodextrin forming cyclomaltotrioxtrin glucanotransferase. *J. Jpn. Starch Sci.*, **34**, 45(1987)
 34. 山田 正, 佐藤節子, 荒谷眞平 : coupling sugar의 醱酵性について, 蟲齒と coupling sugar. 第2回 研究會議報告書, p.17(1976)
 35. 池田 正 : 컵프링그슈가의 氣質としての 腐蝕原性, 컵프링그슈가與 蟲齒. 荒谷眞平, 竹内光春編, 光琳, 東京, p.140(1981).

(1991년 8월 5일 접수)