

Bacillus stearothermophilus KY-126가 생산하는 Cyclodextrin glycosyltransferase의 정제 및 특성

강상모 · 유시형
건국대학교 미생물공학과

Purification and Properties of Cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus stearothermophilus* KY-126

Sang-Mo Kang and Si-Hyung Yoo

Department of Microbial Engineering, Konkuk University

Abstract

A bacterial strain No. KY-126, which produced extracellular cyclodextrin glycosyltransferase(CGTase), was isolated from soil and identified as *Bacillus stearothermophilus* KY-126. The enzyme was purified by the treatments of ammonium sulfate precipitation, DEAE-Sephadex, Sephadex G-100 column chromatography. The optimal pH and temperature for the enzyme activity were pH 5.5 and 65°C, respectively. And the enzyme was stable at pH values from 6.0 to 11.0 at 55°C for 30 min and stable up to 60°C for 30 min. The enzyme was inhibited by HgCl₂. The molecular weight of the enzyme was estimated to be 67,000 by using SDS-PAGE. The maximum conversion from starch to cyclodextrin (CD) by CGTase was 43% and obtained at 6 hr reaction and the ratio of α -, β -, γ -, CD production at this time was 2.9 : 2.1 : 1.0.

Key words: *Bacillus stearothermophilus*, Cyclodextrin glycosyltransferase

서 론

Cyclodextrin Glycosyltransferase(EC 2.4.1.19, 1,4- α -D-Glucan 4 α -D-(1,4 glucano) transferase, cyclizing; CGTase)는 전분을 분해하여 6~8개의 glucose 분자가 α -, 4-glucoside 결합으로 환상 결합한 α -, β -, γ -, cyclodextrin (CD)를 생성하며, 합성된 CD를 개환 또는 적당한 수용체에 전이시키는 효소이다⁽¹⁾.

CGTase에 대한 연구는 1904년 Schardinger에 의해서 *Bacillus macerans*가 생산하는 CGTase에 관한 연구가 시작되었으며, 1970년대에 들어와서 비로소 CGTase 효소성질과 CD의 제조법에 관한 연구가 이루어지기 시작하였고⁽²⁾, 최근에는 유전 공학적 방법에 의한 효소의 기능개선 등에 관한 연구가 보고되고 있다⁽³⁾.

CGTase를 생산하는 균주로는 *Bacillus macerans*⁽⁴⁾, *Bacillus megaterium*⁽⁵⁾, *Bacillus circulans*⁽⁶⁾, *Bacillus stearothermophilus*⁽⁷⁾, *Bacillus ohbensis*⁽⁸⁾, *Bacillus amyloliquefaciens*⁽⁹⁾, *Bacillus* sp.(alkalophilic)⁽¹⁰⁾ 등이 있다. 그런데, 이들 균주로부터 분리하는 효소들은 전분으로부터

합성된 CD의 생성 비율과 효소적 특성이 각각 다른 것으로 알려져 있다. 국내에도 CGTase 특성에 관한 연구가 활발하여 박 등⁽¹¹⁾이 *Bacillus* sp. E1, 유 등⁽¹²⁾이 alkalophilic *Bacillus* sp., 안 등⁽¹³⁾이 *B. stearothermophilus*, 신 등⁽¹⁴⁾이 alkalophilic *B. circulans*에 대한 보고가 있다.

CD는 분자 내부에 특장적인 소수성 영역을 가지고 있다. 이 성질로 인하여 각 종 분자들을 끌어들여 포접 화합물을 형성함으로써 그 물리, 화학적 성질을 변화시켜 휘발성 물질의 안정화, 광분해성 물질의 보호, 색조의 개선 및 특이취의 마스킹(masking), 난용성 물질의 유효화 등 여러 가지 물성 개선 효과가 있다. 따라서, 식품, 의약품, 농약 그리고 화장품 등에 사용되고 있으며 그 응용 범위가 넓어지고 있다⁽¹⁾.

CD 제조공정에서는 먼저, 전분을 끓여 호화시킨 후, 효소의 열안정성 온도까지 냉각을 시켜야 한다. 이때 냉각된 온도가 높을수록 호화된 전분의 노화현상은 방지될 수 있다. 또한, 고온일수록 고농도의 호화된 전분을 기질로 이용할 수 있으므로 수율면에서 유리하다. 따라서, CD 생산성을 높이기 위해서는 CD 생산수율이 높을 뿐만 아니라, 열안정성이 높은 CGTase가 요구되어 지고 있다. 본 연구에서는 토양으로부터 열안정성이 높은 CGTase를 생산하는 호열성 균주를 분리한 후, CGTase의

Corresponding author: Sang-Mo Kang, Department of Microbial Engineering, Konkuk University, Seoul 133-701, Korea

정제 및 효소학적 특성을 조사하였다.

실험재료 및 방법

실험 재료

본 실험에서는 Showa Chemical의 soluble starch를 사용하였으며, Pharmacia사의 DEAE-Sephadex와 Sephadex G-100을 사용하였다. 표준시료로서 α -CD, β -CD, γ -CD는 Wako Pure Chemical Industries Co.으로부터 구입하였다. 그 외의 일반 시약은 분석용을 사용하였다.

CGTase 생산균주 선별 및 동정

생리 식염수 10 ml에 약 1g의 토양 시료를 첨가하여 얻은 현탁액을 80°C에서 10분간 열처리함으로써, 포자 형성 능력이 없는 균들을 사멸시키고, 분리용 배지(soluble starch 1%, trypton 0.2%, yeast extract 0.2%, NaCl 0.2%, methyl orange 0.01%, agar 1.5%, pH 7.3)에 도말하여 60°C에서 24시간 배양하였다. 그 후, agar배지에 0.06% phenolphthalein solution(0.125 N NaOH(pH 12.6)에 녹인 것)을 8 ml 분주해서 약 30분 방치 후, 균 주위에 노란환이 있는 것을 분리하였다. 이 방법은 호알칼리성 균을 분리하기 위하여 배지성분으로 methyl orange와 phenolphthalein을 첨가하는 방법⁽¹⁵⁾을 응용한 것이며, 중성 pH 조건 하에서 배양 후, phenolphthalein solution을 첨가하여 균 주위에 노란환을 형성한 균을 1차 선별한 것이다. 1차 선별한 균주들을 액체배양하여 그 중에서 CD 형성 활성이 가장 높은 균주를 최종적으로 선별하였다.

균의 동정 실험은 "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology"⁽¹⁶⁾와 Cowan과 Steel의 "Manual for the Identification of Medical Bacteria"⁽¹⁷⁾에 준하여 동정하였다.

효소 활성측정

CGTase 활성 측정방법은 Kaneko 등⁽¹⁸⁾에 의해 제안된 phenolphthalein법으로 550 nm에서 흡광도를 측정하여 결정하였다. 효소 역가 1 unit는 1분당 1 μ mol의 β -CD를 생성하는 것으로 정하였다.

균의 배양 및 조효소의 조제

효소 생산조건을 조사하기 위하여 L-배지(trypton 1%, yeast extract 0.5%, NaCl 0.5%, pH 7.3)를 100 ml Erlenmeyer flask에 20 ml 넣고 121°C에서 15분간 가압살균 후 시험균주를 1백금이 접종하여 55°C에서 14시간 전 배양하고, 그 배양액을 효소생산용 배지에 1% 접종하여 55°C에서 24시간 진탕배양하였다.

조효소액은 효소 생산배지에서 55°C로 24시간 배양한 후, 배양액을 원심분리하여 상층액으로 사용하였다.

단백질 정량

Bovine serum albumin(Sigma Chem. Co.)를 표준시료로 하여 Lowry의 방법⁽¹⁹⁾으로 측정하였으며, 효소 정제과정 중의 단백질 농도는 Spectrophotometer를 이용하여 280 nm에서 그 흡광도를 측정하였다.

효소의 정제

효소의 정제 과정은 다음과 같은 방법으로 정제하였다. 즉, 대량배양하여 얻은 조효소액을 ammonium sulfate (30~80%)로 침전시키고, 조효소액을 4°C에서 12시간 정제한 후, 원심분리(12,000 rpm, 15 min)하여 얻은 침전물을 20 mM Tris-HCl buffer(pH 7.5, 23°C)에 녹여 24시간 동안 투석하였다. 그 후 같은 buffer로 미리 평형화 시켜둔, DEAE-Sephadex A-50 column(2.5×15 cm)에 흡착시켰다. 비흡착 성분은 동일 buffer로 씻어낸 후, 흡착 성분은 0~0.3 M NaCl의 단계별 농도 구배로써 용출시켰다. CGTase의 활성을 나타내는 분획을 PEG 20,000으로 농축시킨 다음, 농축된 시료를 0.1 M NaCl을 함유한 20 mM Tris-HCl buffer(pH 7.5)로 투석하고, 미리 동일 완충용액으로 평형화시킨 Sephadex G-100(1×82 cm)에 주입하여 tube당 2 ml씩 시간당 8 ml의 유속으로 용출시켰다. 이 중 활성이 있는 부분을 다시 PEG 20,000으로 농축한 후, 동일 column에 동일 buffer로 tube당 2 ml씩 시간당 5 ml의 유속으로 분획하였다.

단일성 확인 및 분자량 결정

단일성 확인 및 분자량 결정은 Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)를 사용하였으며 SDS-PAGE는 Laemmli 방법⁽²⁰⁾에 따랐고, gel의 acrylamide 함량은 7.5%를 사용하였다. 분자량 측정을 위한 표준 단백질은 SDS-PAGE standard high molecular weight marker(Bio Rad Co.)를 사용하였다. SDS-PAGE를 통해 CGTase의 정제를 확인하였으며, 표준 단백질과 Rf치를 비교하여 분자량을 결정하였다.

Cyclodextrin의 분석 및 정량

분석 시료의 조제는 2%의 soluble starch를 기질로 하여 효소 반응시킨 반응액을 100°C에서 15분간 끓여 효소를 실험시킨 후, Sep-pak(cartridge, Millipore제)로 여과하여 불순물을 제거하고 시료량은 20 μ l씩 주입하였다. HPLC에 의한 당류 분석은 Sugar-PAK(6.5×300 mm, Waters제)을 사용하였다. 용매로는 3차 deionized water를 사용하였으며 유속은 분당 0.2 ml로 하고 93°C 조건 하에서 실시하였다. Detector는 RI(Gilson사)를 사용하여 표준 CD의 용출 시간을 비교하여 시료를 분석하였다.

결과 및 고찰

CGTase 생산 균주의 분리 및 동정

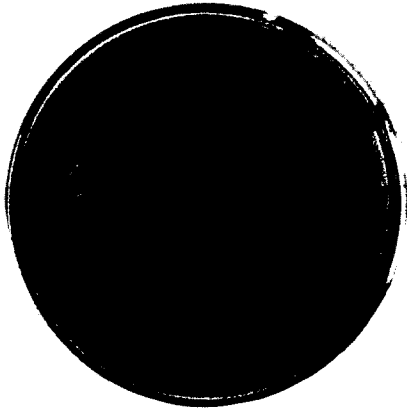


Fig. 1. Formation of clear zone on isolation medium

Table 1. Characteristics of selected strain

Characteristics	Strain <i>B. stearothersophilus</i>	
	KY-126	ATCC 1665
Morphological characteristics		
Form	Rod	Rod
Motility	+	+
Gram stain	+	+
Spore	+	+
Biological characteristics		
Anaerobic test	-	-
Voges-Proskauer test	-	-
Acid from glucose	+	+
Gas from glucose	-	-
Formation of H ₂ S	+	+
Oxidase	+	+
Catalase	+	+
Methyl Red test	-	-
Hydrolysis of gelatin	+	+
Hydrolysis of starch	+	+
Growth at 40-65°C	+	+
Growth at pH 6.8, nutrient broth	+	+
Growth at pH 5.7, nutrient broth	-	-

전국 각지에서 채집한 토양시료 300점 중 노란환(Fig. 1)을 형성하는 균주들 중 액체배지에서 배양하여 CGTase 활성이 가장 높은 KY-126 균주를 분리하였다. 선정된 KY-126은 호기성이며 포자를 형성하고, Table 1과 같이 Gram 양성이며 rod형으로 *Bacillus* 속의 전형적인 특성을 나타내었다.

본 균주는 glucose로부터 산과 gas를 생성하였으며, oxidase와 catalase를 생산하였다. 그리고, *Bacillus stearothersophilus*의 가장 큰 특징인 생육 온도가 40~65°C 이었다. 본 균주의 동정 결과는 Table 1과 같았으며, 비교 균주인 *B. stearothersophilus* ATCC 1665와 종합

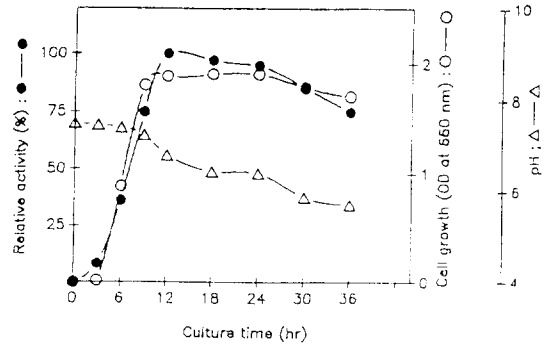


Fig. 2. Time course of the CGTase production

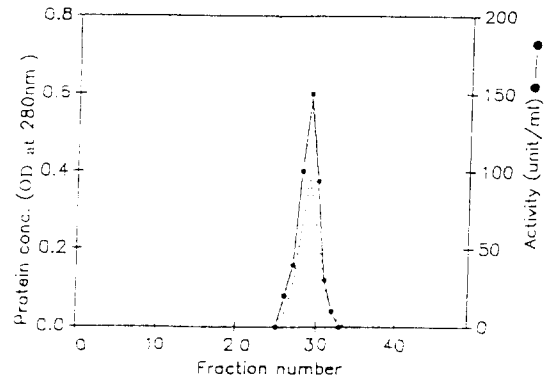


Fig. 3. Sephadex G-100 column chromatography of CGTase

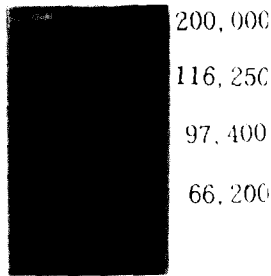
비교해 본 결과 *B. stearothersophilus*로 사료된다.

효소의 생산조건 검토

CGTase 생산에 적합한 배양 조건을 결정하기 위해 배양 온도, 초기 배지 pH, 배지조성의 영향을 검토하였다. 최적 배양 온도는 55°C, 초기 배지 pH는 7.5로 조절하였을 때 가장 높은 결과를 얻었다. 적합한 배지조성은 soluble starch 2%, yeast extract 0.5%, KH₂PO₄ 0.1%, FeCl₃·6H₂O 0.005%이었다. 최적 조건하에서 분리균 KY-126을 55°C에서 배양하여 그 배양 시간에 따른 효소 생산, 균체 증식, 배지 pH의 변화를 Fig.2와 같이 나타내었다. 효소 생산은 6시간부터 급격히 증가하여 배양 후 12시간에 최대가 되었다. 보통 CGTase 최대 생산까지는 도 등⁽²¹⁾의 *Bacillus firmus*가 40시간, 유 등⁽¹²⁾의 alkalophilic *Bacillus* sp.가 48~60시간 등이나, Ernest 등⁽⁹⁾의 *B. amyloliquefaciens*가 12~16시간에, 안 등⁽¹³⁾의 *B. stearothersophilus*가 12시간에 최대 효소 생산량에 이르는 것과 비슷한 양상이었다. 균체 생산은 12시간까지 최대였으며, 그 이후에는 서서히 감소되었다. 사멸기에 이르면서 균체가 서서히 감소하였으나, 효소 생산은 상대적으로 급격히 감소되었다. 한편, 배지의 pH 변화는

Table 2. Purification steps of the CGTase from *Bacillus stearothersophilus* KY-126

Step	Total activity(U)	Total protein(mg)	Specific activity(U/mg)	Recovery (%)
Culture broth	31,250	737.5	42.4	100
Ammonium sulfate	16,187	191.1	84.7	51.8
DEAE-Sephadex A-50	8,830	50.2	175.0	28.3
Sephadex G-100(1st)	2,974	11.2	410.0	9.5
Sephadex G-100(2nd)	1,067	2.3	456.0	3.4

**Fig. 4. SDS-PAGE of CGTase from *Bacillus stearothersophilus* KY-126**

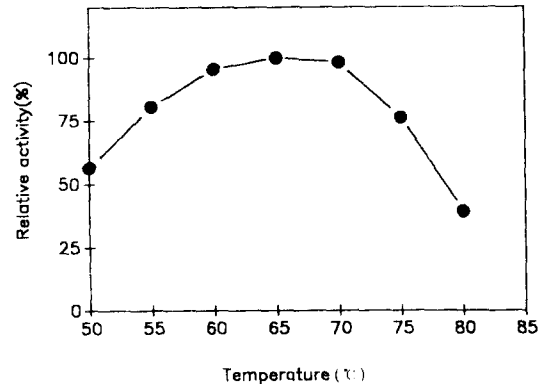
정지기로 가면서 pH 6.2로 떨어졌고, 사멸기로 접어들면서 pH 5.8로 떨어졌다.

효소의 정제

CGTase를 정제하기 위하여 배양액을 ammonium sulfate로 농축시키고 이를 DEAE-Sephadex A-50 column에 흡착시킨 후, 각각 0.0~0.3 M NaCl을 포함한 Tris-HCl buffer(pH 7.5)로 단계적 농도구배에 의해 용출시킨 결과, 0.2 M NaCl 분획에서 CGTase 활성을 나타내는 단백질 peak를 확인하였다. 이를 농축하여 Sephadex G-100 column에서 분리시킨 결과 단백질 peak와 활성 peak가 일치하지 않아 활성이 있는 부분을 다시 농축한 뒤 동일 column의 동일 buffer로 분획하였다. 그 결과는 Fig. 3과 같으며 그림과 같이 본 효소는 단백질 peak와 효소 활성 peak가 일치하였으므로 정제가 되었을 것으로 추측된다. 각 정제 과정을 Table 2에 요약하였으며, 정제된 효소의 회수율은 3.4%였고, 비활성은 456 unit/mg protein으로서 효소 활성이 약 10배 증가하였다.

효소의 단일성 및 분자량

Sephadex G-100을 사용하여 정제한 CGTase의 단일성 및 분자량 측정을 위하여 gel filtration에서 얻어진 CGTase를 SDS-PAGE한 결과 Fig. 4와 같이 단일 band를 보이므로 정제되었음을 확인하였다. 또한, 본 효소의 subunit 분자량은 표준 단백질과 Rf치를 비교해 본 결과 약 67,000 정도였다. 박 등⁽¹¹⁾의 *Bacillus* sp. E1이 140,000, Nakamura와 Horikoshi⁽²⁾의 alkalophilic *Bacillus* sp.이 85,000~88,000, 유 등⁽¹²⁾의 *Bacillus* sp.가 75,000,

**Fig. 5. Effect of temperature on the CGTase activity**

안 등⁽¹³⁾의 *B. stearothersophilus*가 78,000인 것 보다는 작으며, *B. macerans*⁽⁴⁾, *B. megaterium*⁽⁵⁾, *B. stearothersophilus*⁽⁷⁾의 분자량이 각각 65,000, 66,000, 68,000인 것과 유사하였다.

정제된 CGTase의 효소 특성

최적 온도 및 온도 안정성: Fig. 5에서 나타내듯이 정제된 효소의 최적 온도는 65°C 이었다. 이는 β -CD를 주로 합성하는 균주인 도 등⁽²¹⁾과 Tomita 등⁽²²⁾이 발표한 CGTase 최적 온도인 50, 60°C와 *B. megaterium*⁽⁵⁾의 55°C, 안 등⁽¹³⁾의 *B. stearothersophilus*와 *B. ohbensis*⁽⁸⁾의 60°C 보다 높았다. 반면, Kitahata 등이 발표한 *B. stearothersophilus* TC-60⁽⁷⁾의 70°C의 최적 온도에 비해 다소 낮은 편이었다.

본 균주가 생산하는 CGTase의 열에 대한 안정성을 조사하기 위하여 40°C에서 80°C까지 5°C의 간격으로 각각의 온도에서 30분간 열처리 후, 그 잔존 활성을 조사한 결과는 Fig. 6과 같이 55°C까지 안정하였으며 60°C에서부터는 활성이 급격히 감소하였다. 또한, 각 온도에서 CaCl₂를 10 mM 되게 첨가하여 열에 대한 안정성을 조사하였다. *B. stearothersophilus* TC-60⁽⁷⁾의 CGTase는 10분간 열처리후, 그 잔존 활성 결과 50°C에서부터 급격히 떨어지며, 상대 활성도가 60°C에서 40%인 것에 비하면 본 균주가 생산하는 효소는 60°C까지 80%로 열에 안정하였다. 따라서, 본 CGTase는 높은 열안정성으로

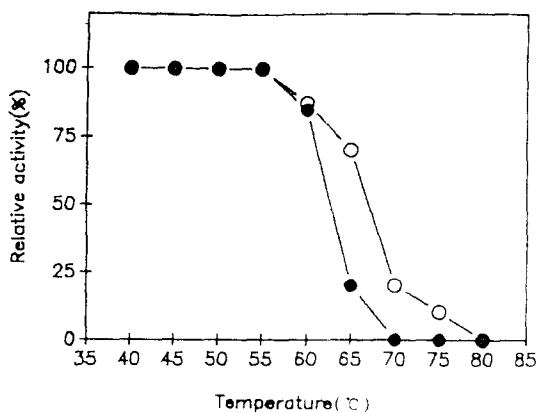


Fig. 6. Effect of thermal stability of the CGTase activity

Symbol: 10 mM CaCl₂ addition (○), No addition (●)

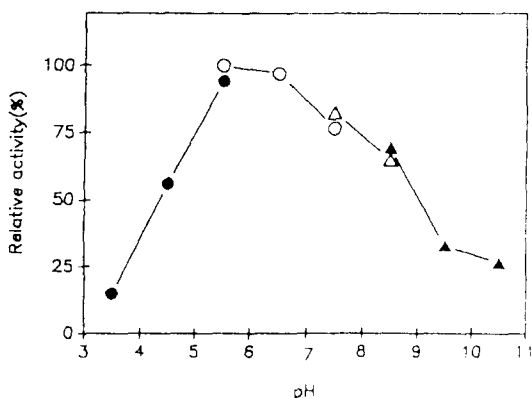


Fig. 7. Effect of pH on the CGTase activity

Symbol: 50 mM Sodium acetate buffer (●), 50 mM Na₂HPO₄·KH₂PO₄ buffer (○), 50 mM Tris-HCl buffer (△), 50 mM Glycin-NaOH buffer (▲)

효소공정시 잡균 오염을 방지할 수 있어 산업적으로 유용하게 쓰일 가능성이 높은 것으로 판단된다.

최적 pH 및 pH 안정성 : Fig. 7은 CGTase의 활성에 미치는 pH의 영향을 나타내며 최적 pH는 5.5으로서 지금까지 알려진 대부분의 CGTase 최적 pH인 4.5~6.5의 약산성 범위와 일치하고 있다.^(2,5,6,7,13)

본 균주가 생산하는 CGTase의 pH에 대한 안정성을 조사하기 위하여 pH 3.5에서 pH 10.5까지 각각 pH가 다른 buffer에서 55°C에서 30분간 전처리 후에 잔존 활성을 측정된 결과는 Fig. 8과 같았다. 그림에서와 같이 pH 5.5부터 알칼리성 영역까지 넓은 범위에서 안정하였다. 대부분의 CGTase는 pH 10 정도까지 안정하나, 그 이후에는 급격히 안정성이 떨어지는 반면^(2,4,5,6,10), 본 효소는 pH 10.5에서도 안정성이 유지되었다.

금속 이온에 대한 영향 : 본 효소의 활성에 미치는

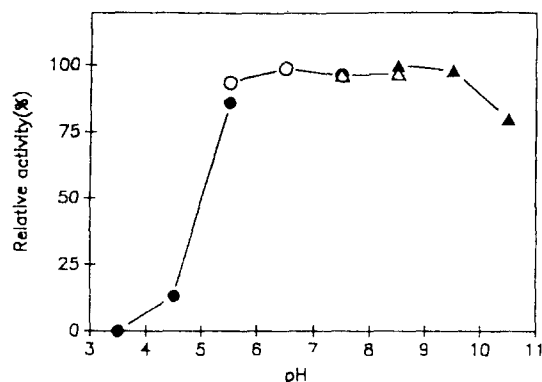


Fig. 8. Effect of pH stability of the CGTase activity

Symbol: 50 mM Sodium acetate buffer (●), 50 mM Na₂HPO₄·KH₂PO₄ buffer (○), 50 mM Tris-HCl buffer (△), 50 mM Glycin-NaOH buffer (▲)

Table 3. Effects of metal ions on the CGTase activity

Metal and inhibitor	Relative activity(%)
None	100.0
Pb(NO ₃)	100.0
CaCl ₂	100.0
Al ₂ (SO ₄)·24H ₂ O	98.82
MnCl ₂ ·4H ₂ O	94.11
HgCl ₂	0
ZnSO ₄	100.0
MgSO ₄	76.47
KCl	94.70
CuSO ₄ ·5H ₂ O	91.17
FeSO ₄ ·7H ₂ O	84.11
FeCl ₃ ·6H ₂ O	92.94

금속 이온의 영향을 조사하기 위하여 금속 이온을 최종 농도가 2 mM되게 첨가하여 30°C에서 30분간 전처리 후에 잔존 활성을 측정하였다. Table 3에 나타낸 것처럼 HgCl₂에서는 완전히 저해를 받았으며, MgSO₄, FeSO₄·7H₂O 등에서는 약간 저해를 받았다. 이는 Fujita와 Nakanishi⁽²³⁾와 박 등⁽¹¹⁾이 보고한 Fe³⁺, Zn²⁺, Cu²⁺에 의해 저해된다는 것과는 상이하였으나 Tomita 등⁽²²⁾이 보고한 CGTase와 비슷한 성질을 보였다.

Cyclodextrin 생성의 경시적 관찰

2% soluble starch 각각 2.5 ml에 정제한 효소액 0.5 ml을 첨가하여 pH 6.0, 55°C에서 반응시킨 후 시간별로 시료를 채취하여 100°C에서 15분간 효소를 불활성화시킨 다음, 반응시간에 따른 CD생성 양상을 HPLC로 관찰하였다.

Fig. 9의 A는 standard이며, B는 CGTase의 기질 반응 1시간 후의 CD생성 혼합물을 나타낸 것이다. Fig. 9에서

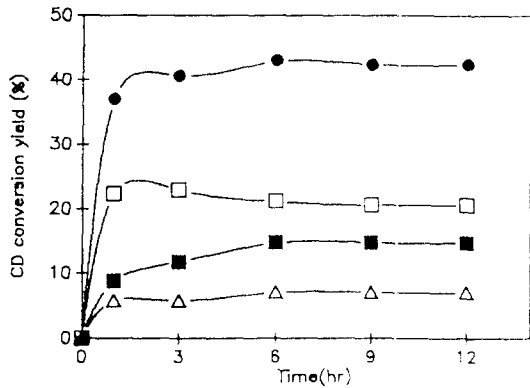
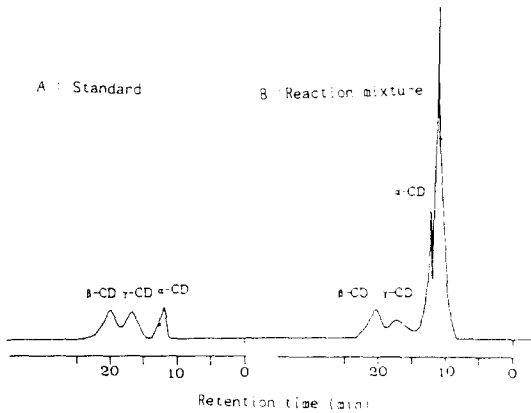


Fig. 9. High performance liquid chromatography of the cyclodextrin produced after 1hr of incubation(upper) and time course of cyclodextrin formation (lower)
 Symbol: total CD (●), α-CD (□), β-CD (■), γ-CD (△)

처럼 반응 초기에는 α-CD를 우선적으로 생성하였고, β-CD는 반응 후 6시간까지 완만히 증가하였다.

반응 시간이 6시간 경과했을 때, 총 CD 전환율은 약 43%였고, α- β- γ-CD의 비율은 2.9:2.1:1이었다. 이는 alkalophilic *Bacillus* sp.⁽²⁾의 α- β- γ-CD의 생산비율이 23.5:1.0:1.0, *Bacillus circulans*⁽⁶⁾가 2:5:1, *Bacillus megaterium*⁽⁵⁾이 2:5:1, *Bacillus stearothermophilus*⁽⁷⁾가 5.5:8:1 등과 다른 비율을 보이고 있으며, 비교적 γ-CD 생산 비율이 다른 균주들에 비해 높은 것으로 나타났다.

이상과 같이 본 균주가 생산하는 CGTase는 최적생산 온도가 높을 뿐만 아니라, 높은 열안정성으로 잡균 오염 방지, 기질인 starch의 노화 방지, 고농도의 기질 이용성 등으로 볼 때, 생산 공정시 유리할 것으로 판단된다. 한편, 고온, 강알칼리 등의 조건하에서도 안정성이 유지되므로, 효소 고정화의 응용성이 기대된다.

요 약

토양을 대상으로 하여 CGTase를 생산하는 균주를

분리, 선별하여 *Bacillus stearothermophilus* KY-126을 얻었다. CGTase의 정제는 ammonium sulfate precipitation, ion exchange chromatography, gel filtration의 과정을 통해 분리 정제하여 단일 효소를 얻었으며, 분자량은 약 67,000이었다. 효소 반응의 최적 온도는 65°C였으며, 55°C에서 30분간 열처리에도 비교적 열에 안정하였다. 최적 활성 pH는 5.5였고 pH 5.5에서 10.5까지 비교적 안정하였다. HgCl₂에 의해 저해를 받았으며, 그 외의 금속 이온에는 저해를 받지 않았다. Soluble starch로부터 CD의 전환율은 43%이었으며, α- β- γ-CD의 생성 비율은 2.9:2.1:1이었다.

문 헌

- Horikoshi, K.: Production and industrial applications of β-cyclodextrin. *Process Biochemistry*, May, 23(1979)
- Nakamura, N and Horikoshi, K.: Purification and properties of cyclodextrin glycosyltransferase of an alkalophilic *Bacillus* sp. *Agric. Biol. Chem.*, 40, 935(1976)
- Kaneko, T., Hamamoto, T. and Horikoshi, K.: Molecular cloning and nucleotide sequence of the cyclodextrin glucanotransferase gene from the alkalophilic *Bacillus* sp. strain No.38-2. *J. Gen. Microbiol.*, 134, 97(1988)
- Kitahata, S., Tsuyama, N. and Okada, S.: Purification and some properties of cyclodextrin glycosyltransferase from a strain of *Bacillus* species. *Agric. Biol. Chem.*, 38, 387(1974)
- Kitahata, S. and Okada, S.: Action of cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus megaterium* strain No.5 on starch. *Agric. Biol. Chem.*, 38, 2413(1974)
- 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)
- Kitahata, S. and Okada, S.: Purification and some properties of cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus stearothermophilus* TC-60. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.*, 29, 7(1982)
- Sato, M., Yagi, Y., Magano, H. and Ishikura, T.: Determination of cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus ohbensis* and its optimum pH using HPLC. *Agric. Biol. Chem.*, 49, 1189(1985)
- Ernest, K., Yu, C., Aoki, H. and Miawa, M.: Specific alpha-cyclodextrin production by a novel thermostable cyclodextrin glycosyltransferase. *Appl. Microbiol. Biotech.*, 28, 377(1988)
- Nakamura, N. and Horikoshi, K.: Characterization of acid-cyclodextrin glucanotransferase of an alkalophilic *Bacillus* sp. *Agric. Biol. Chem.*, 40, 1647(1976)
- 박천석, 우의선, 국승욱, 서병철, 박관화, 임 훈: *Bacillus* sp. E1이 생산하는 cyclodextrin glucanotransferase의 정제 및 특성. *산업미생물학회지*, 20, 156(1992)
- 유주현, 정용준, 이정수: Cyclodextrin glycosyltransferase를 생산하는 호알칼리성 *Bacillus* 속 미생물. *산업미생물학회지*, 17, 148(1989)

13. 안중훈, 황진봉, 김승호 : *Bacillus stearotherophilus*가 생산하는 Cyclodextrin glucanotransferase : Affinity chromatography를 이용한 정제 및 성질. 산업미생물학회지, 18, 585(1990)
14. 신현동, 이상호, 이용현 : *Alkalophilic Bacillus circulans*가 생산하는 cyclodextrin glucanotransferase의 정제와 효소반응 특성. 산업미생물학회지, 17, 370(1989)
15. Park, C.S., Park, K.H. and Kim, S.H.: A rapid screening method for alkaline-cyclodextrin glucanotransferase using phenolphthalein methyl orange containing solid medium. *Agric. Biol. Chem.*, 53, 1167(1989)
16. Krieh, J.G. Halt.: Bergey's manual of systematic bacteriology. the William Wilkins Co., Baltimore(1974)
17. Cowan and Steel.: Manual for the identification of medical bacteria (2nd ed.), Cambridge University Press(1974)
18. Kaneko, T., Kato, T., Nakamura, N. and Horikoshi, K.: Spectrophotometric determination of cyclization activity of beta-cyclodextrin-forming cyclodextrin glucanotransferase. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.*, 4, 45(1987)
19. Lowry, O.H., Posebrough, N.J., Farr, L.H. and Randal, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265(1951)
20. Laemmli, U.K.: SDS-PAGE gel electrophoresis. *Nature*, 227, 680(1970)
21. 도은주, 박종부, 이용현 : Cyclodextrin glucanotransferase 고생산 호알칼리성 세균의 탐색과 분비 효소의 특성. 산업미생물학회지, 21, 119(1993)
22. Tomita, K., Kaneda, M., Kawamura, K. and Nakamishi, K.: Purification and properties of a cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus autolyticus* 11149 and selective formation of β -cyclodextrin. *J. Fermt. Bioeng.*, 75, 89(1993)
23. Fujita, Y. and Nakanishi, K.: Purification and properties of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus* sp. AL-6. *J. fermt. Bioeng.*, 3, 150(1990)
24. Nakamura, N. and Horikoshi, K.: Characterization and some cultural conditions of a cyclodextrin glycosyltransferase producing alkalophilic *Bacillus* sp. *Agric. Biol. Chem.*, 40, 753(1976)

(1994년 2월 21일 접수)