

호알칼리성 *Bacillus* sp. C-21에 의한 Cyclodextrin Glucanotransferase의 생산

강희정 · 채기수* · 선우양일

동아대학교 생물학과, *경남전문대학 식품영양과

Production of Cyclodextrin Glucanotransferase from Alkalophilic *Bacillus* sp. C-21

Hee-Joung Kang, Ki-Su Chae*, Yang-II Sunwoo

Department of Biology, Dong-A University, Pusan 604-714, Korea

* Department of Food and Nutrition, Kyung-Nam Junior College, Pusan 617-701, Korea

Abstract

A strain of alkalophilic *Bacillus* sp. C-21 has been isolated from soil. The strain was capable of producing large amount of cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase) in the high alkaline pH medium. The preferable medium composition was determined to be as follows: 1.0% soluble starch, 1.0% peptone, 0.5% yeast extract, 0.1% K_2HPO_4 , 0.02% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ and 1.0% Na_2CO_3 (pH 10.0). The highest enzyme production was observed after 30 hours of cultivation at 33°C. The optimum temperature and pH for the activity of crude enzyme were 60°C and 6.0, respectively. The enzyme was stable between pH 6.0 and 9.6, and up to 55°C.

Key words : alkalophilic *Bacillus* sp., cyclodextrin glucanotransferase.

서 론

Cyclodextrin glucanotransferase [EC 2.4.1.19 : 1,4- α -D-glucan 4- α -D-(1,4- α -D-glucano)-transferase (cyclizing); CGTase]는 전분에 작용하여 환상당 합성반응(cyclization), 폐환당 전이반응(coupling) 및 직쇄당분자간 당전이반응(disproportionation) 등 3가지 특징적 반응으로 6~8개의 glucose 단위가 α -1,4 결합으로 연결된 비환원성 환상당류인 α -, β - 및 γ -cyclodextrin을 합성하거나 합성된 cyclodextrin을 개환하여 적당한 수용체에 전이시키는 작용을 촉매하는 효소이다¹⁾. CGTase에 의해 생성된 cyclodextrin은 여러 가지 분자들을 동공내에 도입하여 포접화합물을 형성하는 특성으로 인하여 물질의 반응성 변화, 휘발성 물질의 불휘발화, 산화성 및 광분해성 물질의 안정화, 난용성 물질의 가용화 또는 유화 등

의 기능이 있기 때문에 식품, 의약품, 농약 및 화장품 등의 산업에서 점차 이용이 증가하고 있다²⁾.

현재 CGTase를 생성하는 미생물로는 *Bacillus macerans*³⁾, *B. circulans*⁴⁾, *B. megaterium*⁵⁾, *B. ohbensis*⁶⁾, *B. subtilis*⁷⁾, *Klebsiella pneumoniae*⁸⁾, *B. stearothermophilus*^{9, 10)}, *B. amyloliquefaciens*¹¹⁾, *B. acidocaldarius*¹²⁾, *B. firmus*¹³⁾, 호알칼리성 *Bacillus* sp.¹⁴⁻²¹⁾ 등이 있는 것으로 알려져 있다. 그러나 전분으로부터 합성되는 cyclodextrin의 생성비율과 그 효소적 특성은 미생물 종류마다 달라서 *B. macerans*, *B. stearothermophilus*, *K. pneumoniae*의 CGTase는 α -cyclodextrin, *B. megaterium*, *B. circulans*, *B. ohbensis*, *B. acidocaldarius*, *B. firmus* 및 호알칼리성 *Bacillus* 등은 β -cyclodextrin, *B. subtilis*는 γ -cyclodextrin을 주로 생성한다.

α -, β - 및 γ -cyclodextrin은 동공의 크기와 용해도가 달라 그 이용성에 차이가 있으며, 이 중에서 β -cyclodextrin은 포접화합물을 비교적 쉽게 형성하고

물에 대한 용해도가 낮아 α -cyclodextrin나 γ -cyclodextrin을 제조할 때에는 달리 용매를 사용하지 않고 제조할 수 있으므로 공업적인 효용성이 크게 증가하고 있다. 특히 호알칼리성 *Bacillus* sp.에 의한 CGTase 생산은 배양상의 특성이란지 효소의 작용에 있어서 거의 β -cyclodextrin만을 생성하고 안정성이 우수하다는 점 등에서 크게 주목받고 있다²²⁾.

따라서 β -cyclodextrin 생성 비율이 높은 CGTase를 생산하는 균주를 탐색하는 것은 산업적으로 유용할 것으로 생각되어 본 연구에서는 토양으로부터 β -cyclodextrin을 생성하는 CGTase의 생산성이 우수한 호알칼리성 *Bacillus* sp.을 분리하여 배양조건과 생산된 효소의 성질 일부를 검토하였다.

재료 및 방법

1. CGTase 생산 호알칼리성 균주의 선별

부산 및 경남 일원의 토양 시료 약 1g을 살균수에 적당히 희석하여 CGTase 생산균 선별배지²³⁾에 도달한 후 35℃에서 2일간 배양하여 황색 환을 보이는 colony들을 1차 선별하였다. 1차 선별된 colony들 중 안정성과 효소의 활성이 높은 균주를 확보하기 위해 동일 배지에서 5~6회 연속하여 계대배양하면서 효소 분비량에 비례하는 황색 환의 크기가 크고 또한 노란 환과 colony 크기와의 상대비가 큰 균주들을 선별하였다. 선별된 균주들을 Horikoshi의 alkaline basal medium II²⁴⁾에 접종한 다음 35℃에서 2일간 진탕배양하고 CGTase 활성을 측정하여 가장 우수한 균주를 최종 선별하였다.

2. CGTase 활성 측정방법

CGTase 활성 측정은 Kaneko²⁵⁾ 등의 phenolphthalein법을 사용하였다. 4% soluble starch를 50mM phosphate buffer (pH 6.5)에 녹인 것을 기질로 사용하였으며, 기질 1ml에 효소액 0.1ml을 첨가한 후 50℃에서 10분간 반응시킨 다음 30mM NaOH 3.5ml을 첨가하여 반응을 정지시키고, 0.02% phenolphthalein 발색액 0.5ml을 가하여 15분간 방치한 후 550nm에서 흡광도를 측정하여 감소되는 정도를 β -cyclodextrin으로 환산하여 효소 활성을 결정하였다.

효소 활성 1 unit는 1분당 1mg의 β -cyclodextrin을 생성하는 효소의 양으로 정하였다.

3. 균주의 배양 및 조효소의 조제

효소 생산용 배지조성은 1.0% soluble starch, 1.0% peptone, 0.5% yeast extract, 0.1% K_2HPO_4 , 0.02% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1.0% Na_2CO_3 이며 5l jar fermenter에서 배양액을 2l로 하여 통기량 1.0vvm, 배양 온도 33℃, 교반속도 300rpm, 초기 pH 10.0에서 2일간 배양하였다. 배양액을 원심분리하여 상등액에 3배량의 -20℃로 냉각된 acetone을 가하고 4℃에서 24시간 방치한 후 Whatmann filter paper No. 1으로 여과하여 얻은 침전물을 50mM phosphate buffer (pH 6.5)에 녹여 조효소액으로 하였다.

4. 균주의 동정

최종 선별된 균주는 "Alkaliphilic Microorganisms"²⁴⁾와 "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology"²⁶⁾에 제시된 방법에 따라 동정하였다.

결과 및 고찰

1. CGTase 생산 호알칼리성 균주의 선별 및 동정

CGTase 생산 균주 선별배지에서 황색 환을 형성하는 하는 균주를 다수 선별하였고, 이들을 진탕 배양하여 CGTase 활성을 측정된 후 가장 활성이 높게 나타나는 균주를 선별하여 형태학적, 배양학적 및 생화학적 특성을 조사한 결과는 Table 1과 같다. 선별된 균주는 Gram 양성의 간균으로 크기는 0.5~0.7 μ m×1.5~2.5 μ m이었으며 운동성이 있고 타원형의 포자가 관찰되었다. Colony는 황색으로 flat, entire smooth한 표면을 이루고 있었다. pH 7.0~12.0에서 생육할 수 있었고 최적 생육 pH는 10 부근이었으며 40℃ 이상에서는 생육하지 못했다. 한편 Horkoshi 등²⁴⁾이 분리한 비교 균주인 *Bacillus* sp. ATCC 21783은 5%의 NaCl에 의해 강하게 생육이 저해되는 것과는 달리 7% NaCl을 함유한 배지에서도 잘 생육하는 내염성을 보였다. 또 호기성으로 혐기적 조건에서 생육할 수 없었고 catalase 양성반응을 나타내었으며 Voges-Proskauer 시험과 indole 생성시험에서는 음성이었으며, 전

Table 1. Morphological, cultural and biochemical characteristics of alkalophilic *Bacillus* sp. C-21

1. Morphological characteristics	
Form	Rod
Gram stain	Positive
Size	(0.5~0.7 μ m) \times (1.5~2.5 μ m)
Spore formation	Positive
Spore shape	Ellipsoidal
Motility	Motile
2. Cultural characteristics	
Glucose-nutrient agar (pH 7.0)	+
Glucose-nutrient agar (pH 10.0)	++
Medium I (pH 10.3)	++
Medium II (pH 10.3)	++
Medium II containing 7% NaCl	+
Anaerobic growth	-
Pigment	Positive (yellow)
Growth at pH	pH 7~12
Temperature for growth	30~40 $^{\circ}$ C
Acid-fast test	Negative
3. Biochemical characteristics	
Voges-Proskauer test	Negative
Indole test	Negative
Catalase test	Positive
Utilization of citrate	Positive
Utilization of lactose	Positive
Utilization of fructose	Positive
Hydrolysis of casein	Positive
Hydrolysis of starch	Positive

분과 casein을 가수분해할 수 있었다. 이상의 특성을 종합하면 선별된 균주는 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology에 기술된 *Bacillus*와 특성이 일치하므로 *Bacillus* sp. C-21로 동정·명명하였다.

2. CGTase 생산을 위한 배양조건 검토

CGTase 생산에 적합한 배양 조건을 확립하기 위하여 alkaline basal medium II를 기본배지로 하여 초기 pH, 배양온도 및 배지조성 중의 각종 탄소원과 질

소원의 영향을 조사하였다.

30~40 $^{\circ}$ C에서 최적 배양 온도를 검토한 결과 Fig. 1에서와 같이 33 $^{\circ}$ C가 CGTase 생산에 가장 적당하였으며 생육은 35 $^{\circ}$ C에서 최대를 나타내었다. Na₂CO₃ 및 NaOH로 배지의 초기 pH를 7~12로 조절하여 최적 초기 pH를 검토한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 이 범

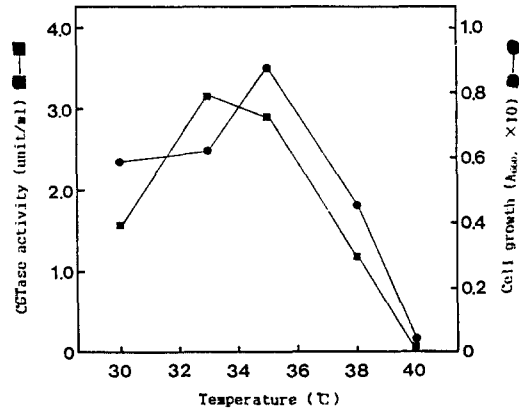


Fig. 1. Effect of temperature on the cell growth and CGTase production.

Alkalophilic *Bacillus* sp. C-21 was cultured at pH 9.5 for 48hrs in basal media.

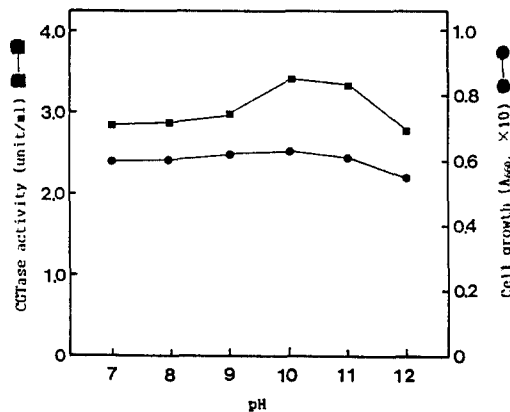


Fig. 2. Effect of initial pH on the cell growth and CGTase production.

Alkalophilic *Bacillus* sp. C-21 was cultured at 33 $^{\circ}$ C for 48 hrs in basal media of various pH.

Table 2. Effect of carbon sources on the growth and the CGTase production of alkalophilic *Bacillus* sp. C-21

Carbon source (1%)	Cell growth ($A_{660} \times 10$)	CGTase activity (unit/ml)
Glucose	0.70	0.16
Mannose	0.63	0.26
Sucrose	0.78	0.16
Maltose	0.76	0.15
Lactose	0.69	0.18
Soluble starch	0.61	3.31
Potato starch	0.72	0.46
Corn starch	0.69	0.30
Wheat flour	0.77	1.56
Rice powder	0.68	1.83
Glutinous rice powder	0.70	1.65

위의 pH에서 생육은 별다른 영향을 받지 않았으나 CGTase의 생산에는 pH 10이 가장 적당함을 알 수 있었다.

기본배지에 각종의 탄소원을 1.0% 첨가한 배지로 탄소원의 영향을 조사하여 Table 2에 나타내었다. 효소의 생산은 탄소원에 따라 큰 차이를 나타내었고 soluble starch가 효소생산에 가장 적합하였으며 균의 생육은 탄소원의 종류에 관계없이 양호하게 나타났다. 이러한 현상이 나타나는 것은 Kim 등¹³⁾의 경우와 같

이 본 균주가 CGTase의 생산에 있어서 catabolite repression을 받기 때문이라고 생각된다. 그리고 soluble starch를 기본배지에 0.5~5.0%까지 첨가하여 최적 농도를 알아 본 결과는 Fig. 3에서와 같이 1.0% 첨가할 때 가장 높은 효소생산을 나타내었다.

각종의 질소원을 단독으로 또는 yeast extract와 혼합하여 효소생산에 미치는 영향을 검토한 결과는 Table 3에서 보는 바와 같이 peptone과 yeast ex-

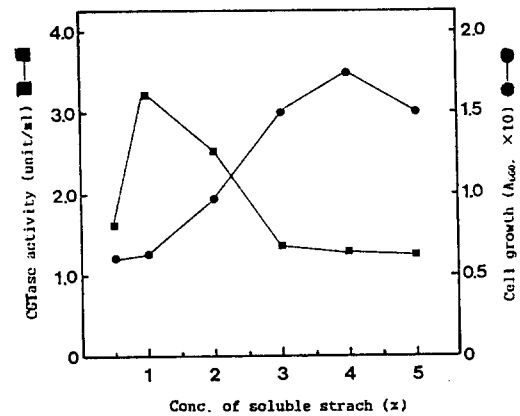


Fig. 3. Effect of soluble starch concentration on the cell growth and CGTase production.

Alkalophilic *Bacillus* sp. C-21 was cultured at 33°C and pH 9.5 for 48 hrs in basal medium contained various amounts of soluble starch.

Table 3. Effect of nitrogen sources on the growth and CGTase production of alkalophilic *Bacillus* sp. C-21

Nitrogen source	Cell growth ($A_{660} \times 10$)	CGTase activity (unit/ml)
Casamino acid 0.5%	0.45	0.59
Beef extract 0.5%	0.25	0.02
Tryptone 0.5%	0.43	1.13
Peptone 0.5%	0.45	1.93
Yeast extract 0.5%	0.34	0.09
(NH ₄) ₂ SO ₄ 0.5%	0.06	0.46
Casamino acid 0.5% + Yeast extract 0.5%	0.58	1.94
Beef extract 0.5% + Yeast extract 0.5%	0.38	1.18
Tryptone 0.5% + Yeast extract 0.5%	0.48	2.64
Peptone 0.5% + Yeast extract 0.5%	0.52	2.96
(NH ₄) ₂ SO ₄ 0.5% + Yeast extract 0.5%	0.11	0.15

Table 4. Effect of peptone and yeast extract concentration on the cell growth and CGTase production

Conc. of yeast extract (% w/v)	Conc. of peptone (% w/v)	Cell growth ($A_{660} \times 10$)	CGTase activity (unit/ml)
0	0.25	0.47	1.24
	0.5	0.53	2.68
	1.0	0.50	3.34
	2.0	0.69	4.07
0.5	0.25	0.49	3.45
	0.5	0.69	3.26
	1.0	1.14	4.53
	2.0	1.41	4.19
1.0	0.25	0.89	3.69
	0.5	1.15	3.37
	1.0	1.32	4.04
	2.0	1.38	4.17

tract를 각각 0.5%씩 혼합하였을 때가 가장 적합했다. 또한 peptone과 yeast extract를 어떤 농도로 첨가하는 것이 좋은지를 조사한 결과는 Table 4에서 보는 바와 같이 각각 1.0%와 0.5%의 농도로 첨가할 때 가장 효소의 생산성이 높다는 것을 알 수 있었다. 이상의 결과로부터 본 균주의 CGTase 생산에 있어서의 최적 배지조성을 1.0% soluble starch, 1.0% peptone, 0.5% yeast extract, 0.1% K_2HPO_4 , 0.02% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1.0% Na_2CO_3 로 결정하였다.

상기와 같은 조성의 배지를 사용하여 본 균주를 jar fermenter에서 배양하면서 균체의 증식도, 효소생산량 및 pH 변화를 측정하여 Fig. 4에 나타내었다. 균체의 증식과 효소의 생산은 시간의 경과와 함께 비례하여 증가하는 경향을 보여 배양 개시 30시간에서 최대의 증식도와 효소생산을 나타내었으며 이 때 생산된 효소량은 4.86unit/ml이었다. 배양액의 pH 변화는 초기 pH 10.0에서 약 12시간 후에 pH 8.5까지 감소하였다가 18시간 후부터 다시 상승하여 최종적으로 pH 9.2가 되었다.

본 균주의 이러한 배양특성을 다른 호알칼리성 *Bacillus* sp.과 비교할 때 생육 가능 pH나 배양 초기 pH, 그리고 최적 탄소원에서는 별다른 차이를 보이지 않았으나 최적 배양

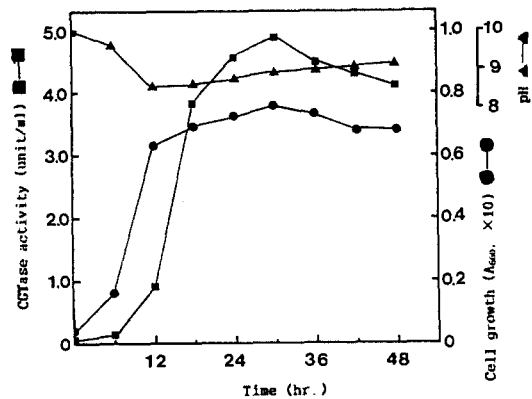


Fig. 4. Time course of the CGTase production by alkalophilic *Bacillus* sp. C-21.

The strain was cultured at 33°C for 48 hrs in the fermentation medium contained 1% soluble starch, 1% peptone, 0.5% yeast extract, 0.1% K_2HPO_4 , 0.02% $MgSO_4$, and 1% Na_2CO_3 ; initial pH was adjusted to pH 10.0.

온도는 유주현 등¹⁷⁾, 박천석 등¹⁹⁾ 및 도은주 등²⁰⁾이 분리한 균주의 37°C 보다는 낮고 신현동 등²⁸⁾이 분리한 균주의 30°C 보다는 높다. 그리고 질소원으로는 박천석 등¹⁹⁾ 및 도은주 등²⁰⁾이 분리한 균주와 마찬가지로 yeast extract와 peptone을 혼용했을 때 가장 좋은 결과를 나타내었다.

그리고 본 균주는 최적조건하에서 짧은 배양시간으로도 다량의 효소를 생산할 수 있는 특성을 가진 것으로 생각되는데 이것은 유주현 등¹⁷⁾의 호알칼리성 *Bacillus* 속은 48시간 배양으로, 박천석 등¹⁹⁾의 *Bacillus* sp. E1은 68시간 배양으로, 도은주 등²⁰⁾의 호알칼리성 세균 *Bacillus firmus* var. *alkalophilus*는 40시간 배양으로, 신현동 등²⁸⁾의 Alkalophilic *Bacillus circulans*는 72시간 배양으로 최대의 효소 생산량을 나타낸다는 것과 비교되는 특성이다.

3. 생산된 CGTase의 효소특성

배양 상등액으로부터 acetone 침전법으로 조제한 조효소액으로 본 균주가 생산하는 CGTase의 효소적 특성을 검토하였다. 최적 활성온도를 알아보기 위해 30~80°C에서 10°C 간격으로 효소 활성을 측정한 결과는 Fig. 5와 같으며 최적 활성온도는 60°C이었다. CGTase의 최적 활성온도는 *B. macerans*³⁾, *B. circulans*⁴⁾, *B. megaterium*⁵⁾의 경우 55°C, *B. ohbensis*⁶⁾와 *B. stearothermophilus*²⁷⁾의 경우 60°C,

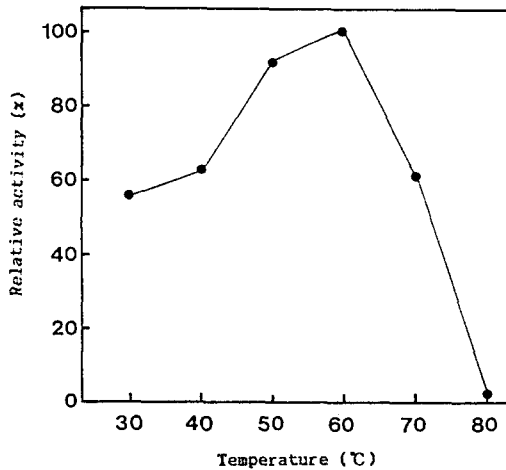


Fig. 5. Effect of temperature on the activity of the CGTase.

The reaction mixtures consisted of 0.1ml of the crude enzyme solution and 1ml of 4% soluble starch was incubated at the indicated temperature for 10min.

*B. subtilis*⁷⁾의 경우 65°C, *B. acidocaldarius*¹²⁾의 경우 90°C로 보고되어 있어 균주에 따라 다르다는 것을 알 수 있다. 한편 본 균주가 생산하는 CGTase의 최적 활성온도를 다른 호알칼리성 균주가 생산하는 CGTase의 최적 활성온도와 비교하면 Nakamura 등¹⁴⁾이 보고한 70°C 보다는 낮지만 유주현 등¹⁷⁾, Chung 등¹⁸⁾, 도은주 등²⁰⁾, Kometani 등²¹⁾, 신현동 등²⁸⁾이 보고한 50°C 보다는 높고 Nomoto 등¹⁶⁾과 박천석 등¹⁹⁾이 보고한 60°C와 비슷하다는 것을 알 수 있었다. 그리고 온도에 대한 안정성을 검토하기 위해 50mM phosphate buffer(pH 6.5)에 녹인 효소액을 30~80°C까지 5°C 간격으로 각 온도에서 30분간 처리한 다음 완전히 냉각시킨 후 잔존 효소 활성을 측정하였다. 그 결과는 Fig. 6에 나타낸 것처럼 55°C까지는 안정하였으나 그 이상의 온도에서는 급격히 실활하는 것으로 나타났다.

본 균주가 생산하는 CGTase의 최적 활성 pH를 검토한 결과는 Fig. 7에서 볼 수 있는 것처럼 pH 6.0으로 나타났으며 이미 보고되어 있는 다른 균주들이 생산하는 CGTase의 최적 활성 pH와 유사하다는 것을

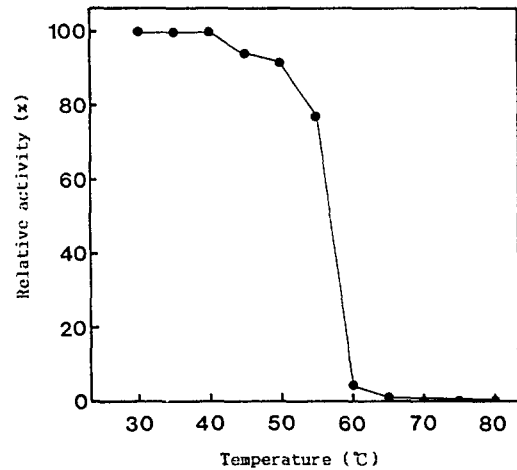


Fig. 6. Effect of temperature on stability of the CGTase.

After heat-treatment of the crude enzymes at various temperatures for 30min, the remaining activity was measured by reaction at 50°C for 10min and expressed as a percentage of the activity without heat treatment.

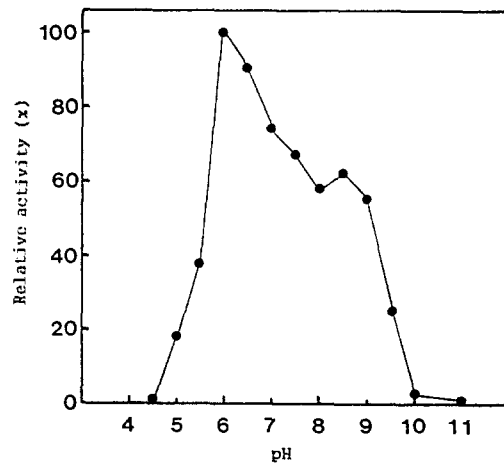


Fig. 7. Effect of pH on the activity of the CGTase.

The pH was adjusted with the following buffer systems; 50mM acetate buffer(pH 4.0~5.5), 50mM phosphate buffer(pH 6.0~8.0) and 50mM glycine-NaOH buffer(pH 8.5~10.6).

알 수 있었다. CGTase의 최적 활성 pH는 *B. macerans*³⁾와 *B. megaterium*⁵⁾의 경우 pH 5.2~5.7, *B. circulans*⁴⁾와 *B. stearothermophilus*²⁷⁾의 경우 pH 6.0, *B. ohbensis*⁶⁾의 경우 pH 5.5, *B. acidocaldarius*¹²⁾의 경우 pH 5.0~6.0으로 보고되어 있고 호알칼리성 *Bacillus* sp.들이 생산하는 CGTase의 최적 활성 pH도 대부분 pH 5.5~6.5로 보고되어 있다. pH에 대한 안정성을 조사하기 위해서 pH 4.0~10.6의 범위에서 효소액을 50℃에서 30분간 방치한 후 잔존 효소 활성을 측정된 결과를 Fig. 8에 나타내었다. 본 균주가 생산하는 CGTase는 pH 6.0~9.6의 비교적 넓은 범위에서 안정하다는 알 수 있었다. Nomoto 등¹⁶⁾에 의하면 호알칼리성 *Bacillus* sp.이 생산하는 대부분의 CGTase는 최적 pH가 pH 안정 범위와 일치하지 않아 사용 중 실활할 가능성이 높다고 하였으나 본 균주가 생산하는 CGTase의 최적 활성 pH는 효소의 pH 안정 범위에 있기 때문에 최적 활성 pH 조건에서 장시간 반응시켜도 비교적 효소 활성이 높게 유지될 수 있을 것으로 생각된다.

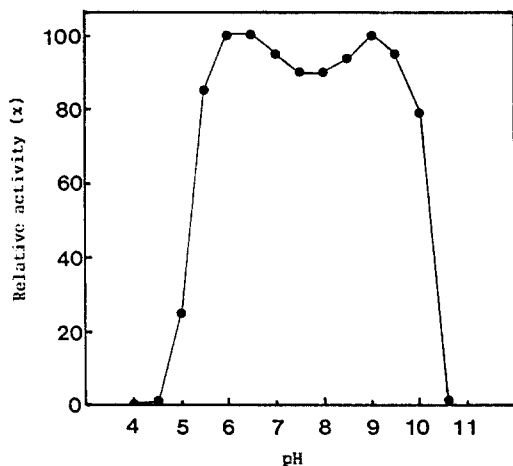


Fig. 8. Effect of pH on stability of the CGTase.

The enzyme was incubated for 30min at 50℃ in various pHs and the remaining activity was measured by reaction at 50℃ for 10min in 50mM phosphate buffer(pH 6.5) and expressed as a percentage of the activity without pH treatment.

요 약

Cyclodextrin glucanotransferase(CGTase) 생산 균주 선별배지를 사용하여 토양으로부터 CGTase 생산성이 우수한 균주를 분리하여 동정한 결과 pH 7.0~12.0에서 생육할 수 있는 호알칼리성 *Bacillus* sp.이었다. 이 균주는 1.0% soluble starch, 1.0% peptone, 0.5% yeast extract, 0.1% K_2HPO_4 , 0.02% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1.0% Na_2CO_3 의 조성을 가지는 배지에서 초기 pH 10.0, 배양온도 33℃로 하여 30시간 동안 jar fermentor에서 통기배양하였을 때 최대의 증식도와 효소 생산량을 나타내었으며 이 때 효소의 역가는 4.86unit/ml이었다.

배양 상등액으로부터 acetone 침전법으로 조제한 조효소액으로 효소적 특성을 살펴본 결과 최적 활성온도는 60℃이었고 온도 안정성은 50℃까지 안정함을 보였다. 그리고 최적 활성 pH는 6.0이었으며 pH 안정성은 pH 6.0~9.6의 범위에서 안정하였다.

참고문헌

- Whistler, R.L., Bemiller, J.N. and Paschall, E.F. : *Starch(Chemistry and Technology)*, 2nd ed., Academic Press, New York, p.143-149 (1984)
- 原耕三 : *フーズバイオテクノロジー事典*, 津村信藏, 板野徹 編, 産業調査會 事典出版センター, 東京, 107-109(1988)
- Kitahata, S., Tsuyama, N. and Okada, S. : Purification and some properties of cyclodextrin glucanotransferase from a strain of *Bacillus* sp., *Agric. Biol. Chem.*, **38**, 378(1974)
- Kitahata, S. and Okada, S. : Comparison of cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus megaterium*, *Bacillus circulans*, *Bacillus stearothermophilus* and *Bacillus macerans*, *J. Jpn. Soc. Starch Sci.*, **29**, 13(1982)
- Kitahata, S. and Okada, S. : Action of cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus*

- megaterium* strain No. 5 on starch, *Agri. Biol. Chem.*, **38**, 2413(1974)
6. Sato, M., Yagi, Y., Nagano, H., and Ishikura, T. : Determination of cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus ohbensis* and its optimum pH using HPLC, *Agri. Biol. Chem.*, **49**, 1189(1985)
 7. Kato, T. and Horikoshi, K. : A new gamma cyclodextrin forming enzyme produced by *Bacillus subtilis* No. 313, *J. Jpn. Soc. Starch Sci.*, **33**, 137(1986)
 8. Bender, H. : Cyclodextrin glucanotransferase von *Klebsiella pneumoniae* 1. Synthesis reinigung und eigenschaften des enzymes von *Klebsiella pneumoniae* M5al, *Arch. Microbiol.*, **111**, 271(1977)
 9. 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)
 10. 황진봉, 김승호, 이태경, 양한철 : *Bacillus stearothermophilus*에 의한 cyclomaltodextrin glucanotransferase의 생산, 한국산업미생물학회지, **18**, 578(1990)
 11. Ernest, K., Yu, C., Aoki, H. and Misawa, M. : Specific alpha-cyclodextrin production by a novel thermostable cyclodextrin glucanotransferase, *Appl. Microbiol. Biotech.*, **28**, 377(1988)
 12. 이진주 : *Bacillus acidocaldarius*가 생산하는 cyclodextrin glycosyltransferase의 특성, 한국산업미생물학회지, **21**, 256(1993)
 13. Kim, C., Shin, H.D. and Lee, Y.H. : Selection of the constitutive mutant of *Bacillus firmus* var. *alkalophilus* and its characteristics of cyclodextrin glucanotransferase production, *J. Microbiol. and Biotechnol.*, **5**, 61 (1995)
 14. Nakamura, N. and Horikoshi, K. : Purification and properties of neutral cyclodextrin glycosyltransferase of an alkalophilic *Bacillus* sp., *Agri. Biol. Chem.*, **40**, 753(1976)
 15. Dan, J., Dan, J.L., Wang, S.Z., Xu, G.Z. and Xu, C.X. : Studies on the conditions for cyclodextrin glucosyl transferase production by two types of alkalophilic bacteria and for enzymatic reaction, *Acta. Microbiologica Sinica.*, **24**, 80(1984)
 16. Nomoto, M., Chen, C.C. and Sheu, D.C. : Purification and characterization of cyclodextrin glucanotransferase from an alkalophilic bacterium of Taiwan, *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 2701(1986)
 17. 유주현, 정용준, 이정수 : Cyclodextrin glycosyltransferase를 생산하는 호알카리성 *Bacillus* 속 미생물, 한국산업미생물학회지, **17**, 148(1989)
 18. Chung, Y.J., Kong, I.S., Kang, Y.S. and Yu, J.H. : Purification and characterization of cyclodextrin glycosyltransferase from alkalophilic *Bacillus* sp., *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **18**, 44(1990)
 19. 박천석, 우의전, 국승국, 서병철, 박관화, 임훈 : *Bacillus* sp. E1이 생산하는 cyclodextrin glucanotransferase의 정제 및 특성, 한국산업미생물학회지, **20**, 156(1992)
 20. 도은주, 박종부, 이용현 : Cyclodextrin glucanotransferase 고생산성 호알카리성 세균의 탐색과 분비 효소의 특성, 한국산업미생물학회지, **21**, 119(1993)
 21. Kometani, T., Terada, Y., Nishimura, T., Takii, H. and Okada, S. : Purification and characterization of cyclodextrin glucanotransferase from an alkalophilic *Bacillus* species and transglycosylation at alkaline pHs, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **58**, 517(1994)
 22. 中村信之 : 好アルカリ性菌のデンプン分解酵素とその利用, *Bio Industry*, **6**, 15(1989)
 23. Park, C.S., Park, K.H. and Kim, S.H. : A Rapid screening method for alkaline β -cyclodextrin glucanotransferase using phen-

- olphthalein- methyl orange-containing-solid medium, *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 1167(1989)
24. Horikoshi, K. and Ariba, T. : *Alkalophilic Microorganisms*, 1st ed., Japan Scientific Societies Press, Tokyo, p.147-157(1982)
25. Kaneko, T., Kato, T., Nakamura, N. and Horikoshi, K. : Spectrophotometric determination of cyclization activity of β - cyclodextrin-forming cyclomaltodextrin glucanotransferase, *J. Jpn. Soc. Starch Sci.*, **34**, 45 (1987)
26. Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E., and Holt, J.G. : *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Williams and Wilkins, Baltimore, Vol. 2, p.1104-1139(1986)
27. Ahn, J.H., Hwang, J.B. and Kim, S.H. : Cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus stearothermophilus*: Purification by affinity chromatography and its properties, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **18**, 585(1990)
28. 신현동, 이상호, 이용현 : Alkalophilic *Bacillus circulans*가 생산하는 cyclodextrin glucanotransferase의 정제와 효소반응 특성, 한국산업미생물학회지, **17**, 370(1989)
-
- (1995년 9월 8일 수리)