

## Pullulanase를 생산하는 *Bacillus* 속 세균의 분리와 효소의 최적 생산조건 및 특성

정희경 · 김병우†

동의대학교 미생물학과

### Isolation of *Bacillus* sp. Producing Pullulanase and Culture Conditions for Production and Properties of the Enzyme

Hee-Kyung Jung and Byung-Woo Kim†

Department of Microbiology, Donggwi University, Pusan 614-714, Korea

#### Abstract

A bacterium producing pullulanase was isolated from soil, and was identified *Bacillus cereus* and named as *Bacillus cereus* JK36. The optimal culture conditions for the efficient production of pullulanase from *B. cereus* JK36 was obtained by cultivating with the medium composed of 1% pullulan, 1% yeast extract, 1% bactopectone, 0.1%  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.02%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  at 40°C, initial pH 6.5 for 70 hours. Using the culture supernatant as crude enzyme, the optimal pH and temperature of the pullulanase of this strain were 6.5 and 50°C. In effect of pH and temperature on the stability of the enzyme, the enzyme was stable in the range of pH 6.0~9.5 and up to 40°C, respectively. The hydrolysis product on pullulan was mainly maltotriose.

#### 서 론

Pullulan은 maltotriose를 기본단위로하여  $\alpha(1 \rightarrow 4)$ ,  $\alpha(1 \rightarrow 6)$ 결합으로 구성된 일종의  $\alpha$ -glucan으로 *Aureobasidium pullulans* 등의 미생물에 의해 세포외로 생산되는 다당류이다. Pullulan은 미생물이 분비하는 pullulan 분해효소에 의해 maltotriose, panose, isopanose, maltose 등의 올리고당과 glucose로 분해된다. 지금까지 보고된 pullulan 분해효소는 그 작용기작에 따라 크게 다음과 같이 4가지로 분류할 수 있다. 첫째는 glucoamylase (glucan 1,4- $\alpha$ -glucosidase ;

EC 3.2.1.3)로 이 효소는 pullulan의 비환원성 말단에 작용하여 포도당을 생성하는 효소이다.<sup>1)</sup> 둘째는 *Klebsiella pneumoniae*<sup>2)</sup>, *Bacillus cereus*<sup>3)</sup>, *Clostridium thermohydrosulfuricum*<sup>4)</sup>, *Thermus aquatius*<sup>5)</sup>, *Aerobacter aerogenes*<sup>6)</sup>등이 생산하는 pullulanase ( $\alpha$ -dextrin endo 1,6- $\alpha$ -glucosidase ; EC 3.2.1.41)로 pullulan의  $\alpha$ -1,6-glycosidic bond를 분해하여 주로 maltotriose를 생성한다. 세번째는 *Aspergillus niger*<sup>7)</sup>가 생산하는 isopullulanase (EC. 3.2.1.57)로 pullulan의  $\alpha$ -1,4-glycosidic bond를 분해하여 isopanose (6-D- $\alpha$ -maltosyl glucose)를 생성한다. 네번째는 *B. stearo-*

† Corresponding author

*thermophilus*<sup>8)</sup>가 생산하는 neopullulanase로 pullulan의  $\alpha$ -1,4-glycosidic bond를 분해하여 panose(6<sup>2</sup>-O- $\alpha$ -glucosyl-maltose)를 생성한다. Pullulanase는 pullulan을 분해하여 maltotriose를 생성할 뿐아니라 starch, glycogen 및 amylopectin 등의  $\alpha$ -1,6-glycosidic bond에 작용하여 glucose, maltose, maltotriose 및 oligosaccharide를 생성한다. 최근 전분공업에서는 통상의  $\alpha$ -amylase,  $\beta$ -amylase, glucoamylase를 이용한 당화과정에서 문제로 남는 limit-dextrin을 분해하기 위해서  $\alpha$ -1,4-glycosidic bond를 효율적으로 분해하는 debranching enzyme에 대해 관심이 모아지고 있다. 이러한 관점에서 pullulanase는 공업적으로 이용가능성이 높은 효소이나 다른 amylolytic enzyme에 비해서 비교적 그 연구가 미진한 실정이다.

따라서 본 연구는 토양으로부터 pullulanase를 생산하는 균주를 분리·동정하고 분리균주의 효소 생산의 최적화 및 효소의 특성 등을 검토하였기에 그 결과를 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### Pullulanase 생산균주의 분리

Pullulanase 생산균을 분리하기 위해 부산, 경남일대에서 채취한 퇴비 및 토양을 1g씩 멸균증류수에 희석하여 분리용 평판배지(PLL고체배지-pullulan 1%, yeast extract 0.5%, polypeptone 0.5%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1%, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.02%, agar 1.5%)에 도말하고 40°C에 1일간 배양 후 생성된 colony를 다시 PLL고체배지에 replica하여 40°C에서 1일간 배양한 후 replica 배지에 ethanol 10ml를 가하여 2~5시간 상온에 방치시켜 halo를 형성하는 균주를 pullulanase 생산 균주로 선별하였다<sup>9)</sup>.

### 배양 방법

PLL액체배지 20ml를 100ml 삼각플라스크에 넣고 40°C에서 진탕하면서 24시간 전배양 하였다. 본배양은 PLL액체배지 100ml를 500ml 삼각플라스크에 넣고 121°C에서 15분간 멸균한 다음 전배양액 1ml를 접종하여 40°C에서 진탕배양(180 rpm)하였다.

### 조효소액 조제

조효소액은 효소 최적 생산배지에서 40°C, 70시간 진탕 배양(180 rpm)한 배양액을 12,000rpm에서 10분간 원심 분리한 후 그 상등액을 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 염석하고 50mM 인

산완충액으로 투석한 후 조효소액으로 사용하였다.

### 균주의 동정

분리균주를 전자현미경과 위상차현미경으로 형태학적 특성을 관찰하고 생리 및 생화학적 특성은 “Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology”<sup>10)</sup>에 준하여 동정하였다.

### Paper Chromatography

효소의 반응 생성물의 확인은 paper chromatography로 행하였다<sup>11)</sup>. 2% pullulan과 20mM CaCl<sub>2</sub>가 함유된 50 mM phosphate buffer (pH 6.5)반응액 100 $\mu$ l에 조효소액 100 $\mu$ l를 넣고 50°C에서 일정한 시간 반응시킨 후 그 반응액 10 $\mu$ l를 Whatman No.1 filter paper에 점적한 후 60°C에서 상승법으로 3회다중 전개시켰다. 전개 용매는 n-butanol : pyridine : H<sub>2</sub>O (6 : 4 : 3 v/v)을 사용하였으며 전개후 환원당 발색은 silver nitrate법<sup>11)</sup>으로 하였다. 당표준물질은 glucose(G<sub>1</sub>), maltose(G<sub>2</sub>), maltotriose(G<sub>3</sub>), maltotetraose(G<sub>4</sub>), maltopentaose(G<sub>5</sub>), maltohexaose(G<sub>6</sub>), maltoheptaose(G<sub>7</sub>), maltooctaose(G<sub>8</sub>)을 사용하였으며 모두 Sigma사제를 사용하였다.

### Pullulanase 활성 측정

효소의 활성측정은 2% pullulan과 20mM CaCl<sub>2</sub>가 함유된 50mM phosphate buffer (pH 6.5)반응액 100 $\mu$ l에 조효소액 100 $\mu$ l를 넣고 (최종 1% pullulan과 10mM CaCl<sub>2</sub>) 50°C에서 30분간 반응시킨 후 생성된 환원당을 Somogyi-Nelson법<sup>12)</sup>으로 정량하였다. 효소의 단위는 위와 같은 조건에서 glucose를 표준으로 하여 1 mole의 maltotriose를 생성시키는 효소량을 1 unit로 하였다.

## 결과 및 고찰

### Pullulanase 생산균의 분리

부산, 경남일원의 토양 및 퇴비를 채집하여 1% soluble starch가 함유된 증류수에서 3~5일간 방치한 후 0.25% starch azure가 함유된 Caz배지<sup>13)</sup>를 사용하여 평판희석 배양법으로 40°C에서 150균주를 분리하였다. Caz배지는 starch azure에 의해 청색을 나타내지만 전분분해능이 있는 균주의 colony주위에는 투명환이 생기게 되어 전분분해효소 생산균주의 분리가 용이하다. 일차적으로 선별된 균주들을 PLL고체배지에 replica하여 40°C에서 1일 배양후 replica

plate에 10ml ethanol을 부어서 2~5시간 실온에 방치해서 halo가 생기는 15균주를 분리하여 이를 pullulanase 생산 균주로 하였다(Fig. 1). 분리된 15개의 균주를 PLL액체 배지에서 40°C, 40시간 진탕배양한 후 배양상등액을 조효소액으로하여 pullulan을 기질로 효소반응을 시키고 반응생성물을 paper chromatography로 검색하여 그 중 maltotriose를 많이 생성하는 JK36 균주를 pullulanase 생산능이 우수한 균주로 판단하고 이를 후보균주로 선별하였다.

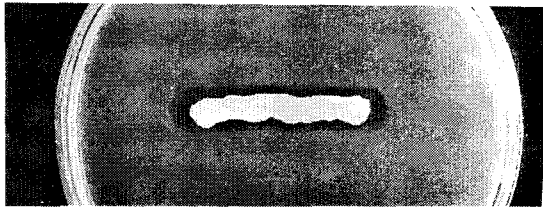


Fig. 1 Fig. 1. Pullulanase producing isolated strain JK36 with halo on PLL agar.

#### 선별균주의 동정

선별된 균주 JK36은 Gram양성의 간균으로 그 크기는  $0.5 \sim 0.7 \mu\text{m} \times 1.3 \sim 1.8 \mu\text{m}$  였으며 운동성이 있고 호기성이며 내생포자를 형성하였다(Fig. 2). 생리·생화학적 특성은 Table 1과 같으며 최적 배양온도는 40°C였으나 30°C에서 45°C까지 생육이 가능한 전형적인 중온성 세균이었다. 생육이 가능한 pH의 범위는 5.5~9.0이었으나 최적 생육 pH는 6.5~7.0인 중성세균이었다. 당 발효실험에서는 40°C에서 7일간 배양후 glucose가 첨가된 배지에서는 산을 생성하였으나 gas 발생은 하지 않았다. 그 외 mannitol, lactose, xylose, sucrose, cellobiose, glycerol에서는 산을 생성하지 않았으며 gas 생성도 하지 않았다. NaCl 생육한계농도는 2%였으며 lysozyme 존재하에서도 생육할 수 있었다. 이와같은 선별균주 JK36의 형태학적 생리, 생화학적 특성을 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology와 비교 분석해본 결과 *Bacillus cereus*와 citrate 이용능만 다를뿐 거의 일치하였으므로 이 균주를 *B. cereus*로 동정하고 *B. cereus* JK36 으로 명명하였다. *B. cereus*가 pullulanase를 생산한다는 것은 정 등<sup>3,14)</sup>과 Takasaki 등<sup>15)</sup>이 보고 한 바 있으나 이들 세균은 10~35°C에서 생육이 가능하고 효소 생산의 최적온도도 15°C인 반면 분리균주 JK36은 30°C이하에서는 생육할 수 없고 pullulanase 생산 최적 온도도 40

°C인 점이 정 등의 *B. cereus* subsp. *mycoides*와는 큰 차이를 보였다.

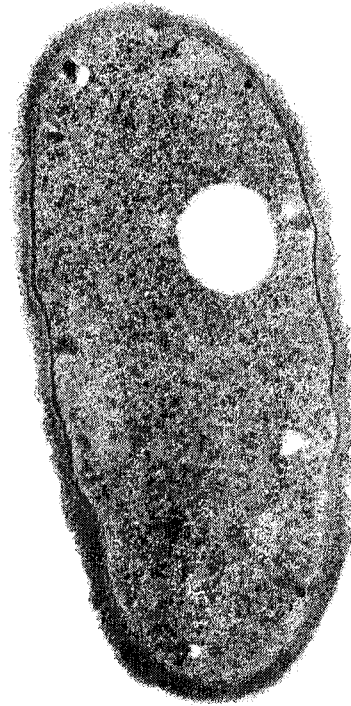


Fig. 2. Transmission electron micrograph of isolated stain JK36.

Bar : 200nm, magnification :  $\times 25\text{K}$

#### Pullulanase 생산 조건

##### 배양온도, pH 및 시간

PLL액체배지에 선별균주 JK36을 접종하고 배양온도 30~45°C, pH 4.0~11.0 범위에서 각각 조절하여 100시간 배양한 결과 40°C, pH 6.5에서 균체의 생육과 효소의 생산이 가장 좋았다(자료는 제시하지 않았음). PLL액체배지에 40°C, pH 6.5에서 시간에 따른 균체의 생육과 효소의 생산은 Fig. 3에서와 같이 배양 80시간에 최대 생육치(OD 660, 9.35)를 나타내었으며 pullulanase는 배양 70시간에 9.66 U/ml로 최대활성을 보였다. 따라서 *B. cereus* JK36은 대수증식 후기에서 증식 정지기에 걸쳐 최고의 효소 생산

Table 1. Characterizations of isolated strain JK-36

Characteristics	Isolated strain JK36	<i>Bacillus cereus</i>
Gram staining	(+) rods	(+) rods
Spore formation	+	+
Catalase	+	+
Voges-Proskauer test	+	+
Acid from glucose	+	+
Mannitol	-	-
Lactose	-	-
Xylose	-	-
Sucrose	-	-
Cellobiose	-	-
Glycerol	-	-
Gas from glucose	-	-
Hydrolysis of		
Casein	+	+
Gelatin	+	+
Starch	+	+
Utilization of citrate	-	+
Degradation of tyrosine	+	+
Deamination of		
phenylalanine	-	-
Egg-yolk lecithinase	+	+
Formation of Indole	-	-
Dihydroxyacetone	-	ND
Growth at pH 6.8		
nutrient broth	+	+
Growth in NaCl		
2 %	+	ND
5 %	-	ND
7 %	-	d
10 %	-	ND
Growth at		
5°C	-	-
10°C	-	d
30°C	+	+
40°C	+	d
50°C	-	-
55°C	-	-
65°C	-	-
Growth with lysozyme		
present	+	+

을 나타냄을 알 수 있었다. 이와같은 결과는 Takahashi 등<sup>15)</sup>이 보고한 *B. cereus* subsp. *mycoides*의 pullulanase 최적 생산조건인 30°C, 25시간과 정 등<sup>3)</sup>의 15°C, 72시간과는 큰 차이를 보였다.

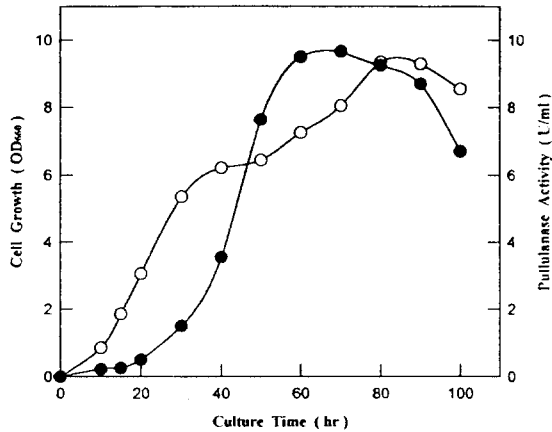


Fig. 3. Time course of cell growth and pullulanase production by *B. cereus* JK36 at 45°C. Symbols : cell growth(○) ; pullulanase activity(●).

#### 탄소원의 영향

PLL액체배지에서 pullulan을 제거하고 각종 탄소원을 1%씩 첨가하여 40°C에서 70시간 배양후 배양 상등액의 pullulanase 활성을 검토한 결과 Table 2와 같았다. Glucose, fructose, sucrose, maltose와 같은 단당류나 이당류가 첨가된 경우에는 균의 생육이 저조하고 pullulanase활성도 0.1 U/ml 이하로 효소가 거의 생산되지 않았다. 그에 반해 amylose, amylopectin, soluble starch, 및 pullulan과 같은 다당류를 첨가한 경우에는 대조구에 비해 균체의 생육이 촉진 될 뿐 아니라 pullulanase 생산도 증가되어 4.48~9.66 U/ml 정도의 활성을 나타내었다. 그 중에서 pullulan이 첨가된 경우가 균의 생육이 OD660 9.482로 가장 좋았고 효소활성도 9.66 U/ml로 가장 높았다. 이상의 결과에서 *B. cereus* JK36은 쉽게 대사될 수 있는 단당류가 존재할 때 효소의 생산이 억제되고 다당류가 존재할 때 이들 기질에 의해 pullulanase의 생산이 유도되어지는 것으로 보여진다.

#### 질소원의 영향

1% pullulan을 함유한 PLL액체배지에서 yeast extract와 polypepton을 제거하고 각종 유기·무기질소원을 0.5%씩 각각 첨가하여 40°C, 70시간 배양후 배양상등액의 효소 활

Table 2. Effects of carbon sources on the production of pullulanase

Carbon Sources (1.0%)	Cell Growth (OD <sub>660</sub> )	Pullulanase Activity (U/ml)
None	2.596	0.1
Glucose	2.365	0.1
Fructose	4.081	0.1
Sucrose	3.201	0.1
Maltose	3.520	0.1
Amylose	8.360	4.48
Amylopectin	8.888	8.32
Soluble starch	6.303	5.44
Pullulan	9.482	9.66

Table 3. Effects on nitrogen sources on the production of pullulanase

Nitrogen Sources (%)	Cell Growth (OD <sub>660</sub> )	Pullulanase Activity (U/ml)
None	0.162	0.82
0.5 Yeast extract	8.556	5.66
0.5 Bactopeptone	9.772	8.57
0.5 Polypeptone	9.119	4.13
0.5 Casamino acid	5.016	4.75
0.5 Casein	5.126	3.75
0.5 Tryptone	7.326	4.16
0.5 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.099	0.48
0.5 KNO <sub>3</sub>	0.153	0.71
0.5 KaNO <sub>3</sub>	0.140	0.83
0.5 NH <sub>4</sub> Cl	0.189	0.65
0.5 NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0.070	0.62
0.5 YE+0.5 BP	9.117	8.92
0.5 YE+1 BP	9.184	9.22
1 YE+0.5 BP	9.030	9.43
1 YE+1 BP	9.564	9.95

성을 검토하였다(Table 3). 무기질소원인 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, KNO<sub>3</sub>, NaNO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>Cl, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>를 첨가했을 때는 균의 생육이 아주 저조하였고 pullulanase 활성도 0.4~0.8 U/ml로 매우 낮았다. 반면 yeast extract, bactopeptone 등의 유기질소원을 첨가했을 때 균의 생육과 효소 생산이 증가

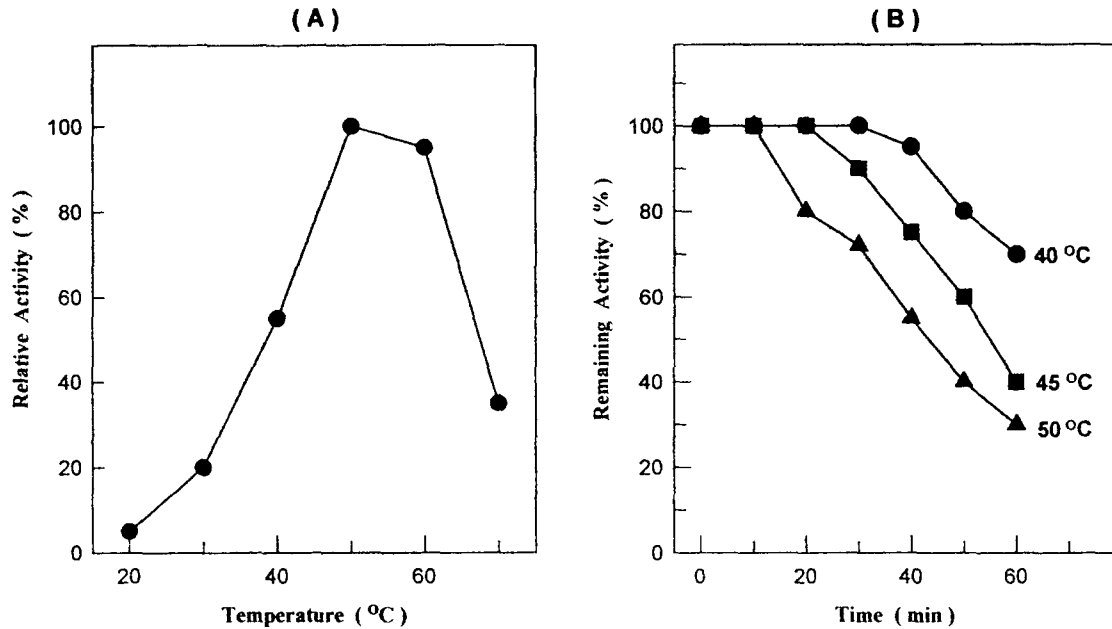


Fig. 4. Effect of temperature on the activity and stability of the pullulanase from *Bacillus cereus* JK36. (A) Effect of temperature on the activity of the pullulanase. The reaction was carried out for 30min at various temperature in 50mM phosphate buffer(pH 6.5). (B) Effect of temperature on the stability of the pullulanase. After heat treatment of the enzyme at various temperatures for each intervals, the remaining activity was measured by reaction at 50°C for 30min in 50mM phosphate buffer(pH 6.5).

되었으며 그 중에서 1% yeast extract와 1% bactopectone를 혼합 첨가하였을 때 pullulanase 활성이 9.95 U/ml로 가장 높았다.

#### 기타 무기염의 영향

1% pullulan과 1% yeast extract 및 1% bactopectone 함유된 배지에 각종 인산염과 각종 무기염을 첨가하여 효소의 생산성을 검토한 결과 0.1%  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 와 0.02%  $\text{MgSO}_4$ 를 첨가하였을 때 효소의 생산이 증가되었다(자료는 제시하지 않았음).

이상의 결과로 *B. cereus* JK36의 pullulanase 생산 최적 조건은 1% pullulan, 0.5% yeast extract, 0.5% bactopectone, 0.1%  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 와 0.02%  $\text{MgSO}_4$ 가 함유된 배지로 초기 pH 6.5에서 40°C, 70시간 배양이었다.

#### Pullulanase의 특성

##### 최적 활성 온도와 열안정성

전항에서 서술한 효소 최적 생산배지로 40°C, 70시간

진탕배양한 배양액을  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 로 염석하고 50mM 인산 완충액으로 투석한 조효소액으로 20°C~70°C 범위에서 효소 활성을 측정된 결과 Fig. 4에서와 같이 활성의 최적온도는 50°C였다. 또 효소액을 일정한 온도에서 시간별로 처리한 후 잔존활성을 측정된 결과 40°C, 30분 정도에서는 100%의 잔존활성을 나타내었으나 그 이후로는 점차 활성이 감소하였으며 최적활성 온도인 50°C에서는 10분까지는 안정하였으나 그 후 활성이 급격히 감소하여 50°C, 60분에는 약 30%의 잔존 활성을 나타내어 온도에 매우 민감한 효소인 것으로 나타났다. 본 효소는 *A. aerogenes*<sup>6)</sup>와 *B. cereus* var. *mycoides*<sup>15)</sup>의 pullulanase와는 최적온도는 유사하였으나 열안정성에서는 *A. aerogenes*의 50°C, *B. cereus* var. *mycoides*의 45°C보다 내열성이 약한 것으로 나타났다.

##### 최적 활성 pH와 pH 안정성

pH 4.0~5.5는 50mM acetate buffer, pH 6.0~7.5는 50mM phosphate buffer, pH 8.0~9.0은 50mM Tris-HCl buffer, pH 10.0~11.0은 50mM glycine/NaOH bu-

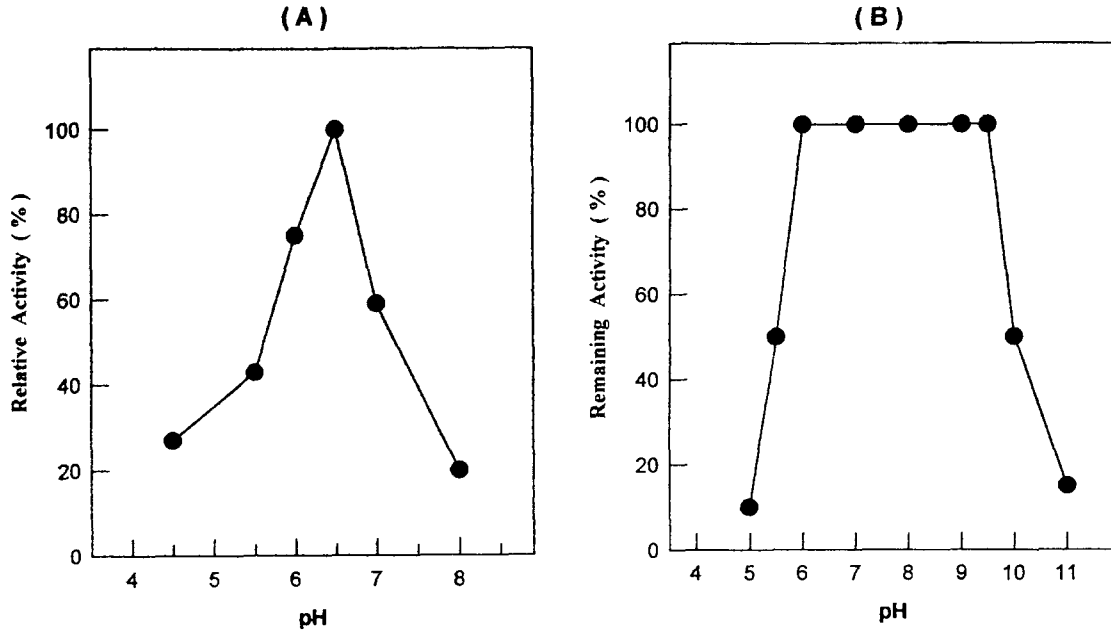


Fig. 5. Effect of pH on the activity and stability of the pullulanase from *Bacillus cereus* JK36. (A) Effect of pH on the activity of the pullulanase. The reaction was carried out for 30min at 50°C in various buffer. (B) Effect of pH on the stability of the pullulanase. The enzyme solution were kept at various pH for 30min, the remaining activity was measured at pH 6.5, 50°C. Buffer used : pH 4.0~5.5, 50mM acetate buffer ; pH 6.0~7.5, 50mM phosphate buffer ; pH 8.0~9.0, 50mM Tris-HCl buffer ; pH 10.0~11.0, 50mM glycine/NaOH buffer.

ffer를 사용하여 pH에 따른 활성을 측정된 결과 최적 활성 pH는 6.5이었다(Fig. 5A). pH 안정성은 효소액을 각각의 pH에서 30분간 방치한후 pH를 6.5로 조절하여 잔존활성을 측정하였으며 그 결과 Fig. 5B에서와 같이 pH 6.0에서 9.5까지는 100%의 잔존활성을 나타내어 안정하였고 그외의 범위에서는 효소의 안정성이 급격히 감소하여 pH 5.5와 pH 10.0에서는 약 50%의 잔존 활성을 나타내었다. *A. aerogenes*<sup>6)</sup>와 *B. cereus* var. *mycoides*<sup>15)</sup> pullulanase의 최적 pH는 6.0~6.5이고, pH 안정범위는 *A. aerogenes*는 5.0~11.0이고, *B. cereus* var. *mycoides*는 6.0~9.0으로 본 균주는 *A. aerogenes*보다는 pH 안정성이 낮았으나 *B. cereus* var. *mycoides*와는 최적 pH와 pH 안정성이 유사하였다.

#### Pullulan에 대한 분해산물

2% pullulan과 20mM CaCl<sub>2</sub>가 함유된 50mM phosphate buffer(pH 6.5) 반응액 100μl에 조효소액 100μl를 넣고 50°C에서 일정시간별 반응시킨 후 분해산물을 paper chromatography로 검출한 결과는 Fig. 6과 같다. 반응 2시

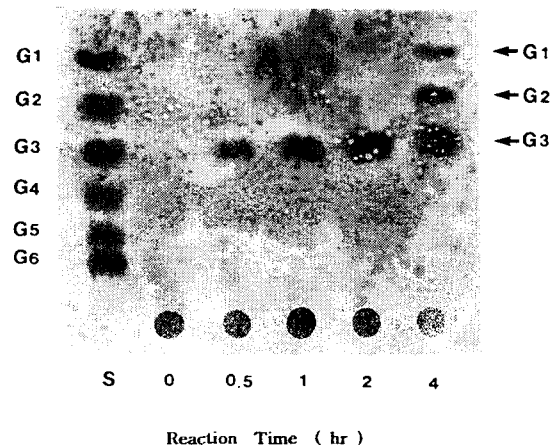


Fig. 6. Paper chromatography of hydrolysis products on the pullulan. Abbreviations : G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, G<sub>3</sub>, G<sub>4</sub>, G<sub>5</sub> and G<sub>6</sub>, glucose, maltose, maltotriose, maltotetraose, maltopentaose, and maltohexose, respectively ; S, standard mixture of oligosaccharides.

간까지의 분해산물은 주로 maltotriose였으며 4시간 이후에는 소량의 glucose와 maltose가 검출되었다. 따라서 *B. cereus* JK36의 pullulanase는 pullulan의  $\alpha$ -1,6-glycosidic bond를 분해하여 glucose와 maltose를 생성하거나 pullulan의  $\alpha$ -1,4-glycosidic bond를 분해하여 glucose와 maltotriose의  $\alpha$ -1,4-glycosidic bond의 분해에 의한 것인 pullulan의  $\alpha$ -1,4-glycosidic bond의 분해에 의해 생성된 것인지는 본 효소의 작용기작을 규명하는데 매우 중요한 자료로 차후 좀더 확실히 검토되어야 하리라 사료된다.

## 요 약

토양으로부터 Pullulanase 생산균주를 분리하였으며, 동정결과 Gram양성의 간균으로 호기성이며 내생포자를 형성하는 전형적인 중온성 *Bacillus*속 세균으로 이 균주를 *B. cereus*로 동정하고 *B. cereus* JK36으로 명명하였다. *B. cereus* JK36의 pullulanase 생산 최적조건은 1% pullulan, 0.5% yeast extract, 0.5% bactopectone, 0.1%  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 와 0.02%  $\text{MgSO}_4$ 가 함유된 배지로 초기 pH 6.5, 40°C에서 배양할 때 생장의 정지기에 들어가는 70시간대에 최고의 효소생산을 나타내었다. *B. cereus* JK36이 생산하는 pullulanase는 50°C, pH 6.5에서 최적 활성을 나타내었으며 온도 안정성과 pH 안정성은 각각 40°C이하, pH 6.0~9.5이었다. 본 효소는 pullulan의  $\alpha$ -1,6-glycosidic bond를 분해하여 주로 maltotriose를 생성하였다.

## 감사의 말

본 연구는 95년도 동의대학교 자체 연구조성비 일반공모과제의 연구비로 수행되었으며 연구비 지원에 감사 드립니다.

## 참 고 문 헌

1. Ueda, S., Fujita, K., Komatsu, K., and Nakashima, N. : Polysaccharide produced by the genus *Pullularia*. I. Production of polysaccharide by growing cells. *Appl. Microbiol.*, **11**, 211-215(1963).
2. Bender, H., Wallenfels, K. : Untersuchungen an pullulan. II. Spezifischer Abbau durch ein Bacterielles Enzyme. *Biochem. Z.*, **334**, 79-95(1961).
3. Chung, M. J., Lim, G. S., Woo, J. S., and Cho, D. S. : Production and characteristics of pullulanase from *Bacillus cereus*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **20**, 409-416(1992).
4. Hyun, H. H., and Zeikus, J. G. : General biochemical characterization of thermostable pullulanase and glucoamylase from *Clostridium thermohydrosulfuricum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **49**, 1169-1173(1985).
5. Plant, R. A., Morgan, H. W., and Daniel, R. M. : A highly stable pullulanase. *Arch Biochem. Biophys.*, **137**, 483-493(1986).
6. Ueda, S., and Ohba, R. : Purification, crystallization and some properties of extracellular pullulanase from *Aerobacter aerogenes*. *Agr. Biol. Chem.*, **36**, 2381-2391(1972).
7. Sakano, Y., Masuda, N., and Kobayashi, T. : Hydrolysis of pullulan by a novel enzyme from *Aspergillus niger*. *Agr. Biol. Chem.*, **35**, 971-973(1971).
8. Kuriki, T., and Imanaka, T. : Nucleotide sequence of the neopullulanase gene from *Bacillus sterothromophilus*. *J. Gen. Microbiol.*, **135**, 1521-1528(1989).
9. Morgan, F. J., Adaams, K. R., and Priest, F. G. : A cultural method for the detection of pullulan-degrading enzyme in bacteria and its application to the Genus *Bacillus*. *J. Appl. Bacteriol.*, **46**, 291-194(1978).
10. Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E., and Holt, J. G. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2, Williams and Wilkins, Baltimore(1984).
11. Trevelyan, W. E., Procter, D. P., and Harrison, J. S. : Detection of sugars on paper chromatograms. *Nature*, **166**, 441-445(1950).
12. Nelson, N. : A photometric adaption of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.*, **166**, 441-445(1950).
13. Fujiwara, S., Kakiwara, H., Kim, B. W., Lejeune, A., Kanemoto, M., Sakaguchi, K., and Imanaka, T. : Cyclization characteristics of cyclodextrin glucanotransferase are conferred by the  $\text{NH}_2$ -Terminal Region of the Enzyme. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 4016-4025(1992).
14. Chung, M. J., Lim, G. S., Woo, J. S., Cho, D. S., Lee, M. Y., and Park, N. K. : Purification and characteristics of pullulanase from *Bacillus cereus* subsp. *mycoides*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **22**, 73-79(1994).
15. Takasaki, Y. : Purification and enzymatic properties of  $\beta$ -amylase and pullulanase from *Bacillus cereus* subsp. *mycoides*. *Agri. Biol. Chem.*, **40**, 1523-1530(1976).