

## *Bacillus* sp. KJ16에서 Cyclodextrin Glucanotransferase와 Cyclodextrinase 생산의 Catabolite Repression

김병우\* · 권현주 · 이경희<sup>1</sup>

동의대학교 미생물학과, <sup>1</sup>부산대학교 약학과

**Catabolite Repression of Cyclodextrin Glucanotransferase and Cyclodextrinase Syntheses in *Bacillus* sp. KJ16.** Byung-Woo Kim\*, Hyun-Ju Kwon and Kyung-Hee Lee<sup>1</sup>. Department of Microbiology, Donggeui University, Pusan 614-714, Korea, <sup>1</sup>Department of Pharmacy, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea - The biosynthesis and catabolite repression of cyclodextrin glucanotransferase(CGTase) and cyclodextrinase(CDase) were studied in *Bacillus* sp. KJ16. In accompanying to the cell growth, CGTase was synthesized during early growth phase (20h culture) and CDase was synthesized during late growth phase (60h culture). Synthesis of CGTase was rather constitutive than that of CDase in the absence or presence of carbon source. Production of CDase was strongly stimulated by amylopectin and  $\gamma$ -CD medium (about 6 times), but CGTase synthesis was slightly increased (about 1.3 times). Easily metabolizable carbohydrates such as D-glucose, D-fructose and D-mannose completely repressed the expression of CDase, whereas their repressive effect to CGTase synthesis was relatively negligible. By addition of 10 mM cAMP, any significant effect on the synthesis of the two enzymes was not observed. Hardly metabolizable glucose analogues such as 2-deoxy-D-glucose and 3-O-methyl-D-glucopyranose also did not show any repression on the syntheses of CGTase and CDase. This indicates that D-glucose has to be metabolized to exert its repressive effect. With these results, it seems likely that the biosynthesis of CGTase and CDase are regulated by the catabolite repression due to unknown metabolite(s) of EM pathway.

Cyclodextrin glucanotransferase(CGTase : EC 2.4.1.19)는 분자내 당전이 반응인 cyclization 반응과 coupling 반응 및 분자간 당전이 반응인 disproportionation 반응을 매개하는 다기능 효소로 주로 starch나  $\alpha$ -1,4-glucan에 작용하여 cyclodextrin(CD)을 합성하는 효소이다. 1939년 *Bacillus macerans*의 CGTase가 Tilden과 Hudson(1)에 의해 최초로 보고된 이후, *B. circulans*(2), *B. megaterium*(3), *B. ohbensis*(2), *B. coagulans*(4), *B. stearothermophilus*, alkalophilic *Bacillus*(5, 6) 및 *B. firmus*(7)등, 대부분 *Bacillus*속 세균이 CGTase를 생산하는 것으로 보고되어 있다.

반면 cyclodextrinase(CDase : EC 3.2.1.54)는 CD나 직쇄상의 maltodextrin을 분해하는 효소로 *B. macerans*(8), *B. coagulans*(9), *B. sphaericus*(10) 및 *Clostridium thermohydrosulfuricum*(11)등의 세균이 생산하는 것으로 보고되어 있다. CD는 말단잔기가 존재하지 않으므로 통상의 amylase에는 잘 분해되지 않는다. 따라서 CD를 분해하는 CDase나 다기능 효소인 CGTase의 작용기작은 매우 흥미로운 것으로 이들 효소의 작용기작을 밝히는데 많은 연구가 집중되어 왔다. 그러나 이들 효소의 생합성 조절기작에 관한 연구는 비교적 적다. Naka-

mura와 Horikoshi(12)는 alkalophilic *Bacillus*에 있어서 CGTase의 생합성은 starch나 dextrin, amylopectin과 같은 다당류에 의해서 유도되고 glucose와 같은 쉽게 대사될 수 있는 단당류에 의해서 억제되는 것으로 보고한 바 있다. 이(13)등은 glucose에 의해 효소 생합성이 억제되지 않는 catabolite repression resistant mutant를 만들어 *B. firmus* var. alkalophilus CGTase의 대량생산을 시도한 바 있다. 하지만 CDase에 관해서는 아직까지 정확한 생합성 기작이 알려져 있지 않다. 주로 *E. coli* 세균에 있어서 효소생합성의 catabolite repression은 전사 초기과정에 cAMP에 의해서 조절되는 것으로 밝혀져 있으나(14-17) *Bacillus*속 세균에 있어서는 아직 그러한 조절기작이 알려져 있지 않다. Stewart등(18)은 Gram 양성세균의 catabolite repression은 catabolite가 repressor로 작용하여 전사를 억제하는 것으로 보고한 바 있으며, Lopez와 Thoms(19)는 *B. subtilis*에서 phosphorylated sugar가 전사억제물질로 작용한다고 보고하였고, Henkin등(20)이 *Bacillus subtilis*에서 이러한 catabolite repressor의 target 서열과 catabolite control protein A(CcpA)의 존재를 확인 보고한 바 있다.

본 연구에서는 토양으로부터 CGTase와 CDase를 생산하는 *Bacillus*속 세균에 있어서 이들 두 효소의 유도 및 catabolite repression에 관해 조사하였다.

\*Corresponding author.

Key words: Cyclodextrin glucanotransferase, cyclodextrinase, *Bacillus*, catabolite repression

## 재료 및 방법

### 사용균주 및 배지

본 실험에 사용한 균주는 본 연구실에서 분리한 CGTase와 CDase 생산균주로 본 연구실에서 분리하여 동정한 결과 Gram 양성 간균이고 내생포자를 생성하며, catalase 양성 호기성 세균으로 *Bacillus*속 세균으로 판명되어 *Bacillus* sp. KJ16으로 명명하고 이 후 실험에 사용하였다. 사용배지는 0.5% yeast extract, 0.5% polypeptone, 0.1%  $K_2HPO_4$  및 0.02%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 를 함유한 기초배지(pH 7.0)에 필요에 따라 탄소원으로 여러가지 당을 첨가하여 사용하였다. 배양은 배지 100 ml를 함유한 500 ml flask로 45°C에서 배양하였으며 균체 증식은 660 nm에서 탁도(OD<sub>660</sub>)로 측정하였다.

### CGTase의 활성측정

CGTase의 활성은  $\alpha$ -CD 반응 특이성이 있는 methyl orange법(21)으로 측정하였다.

반응은 5% soluble starch 용액 600  $\mu$ l와 1 mM methyl orange 용액 105  $\mu$ l를 50 mM 인산염 완충액(pH 6.0) 2845  $\mu$ l와 잘 섞고 이 혼합액에 효소 용액 50  $\mu$ l를 가하여 55°C에서 10분간 반응시켰다. 반응 후 6N HCl 150  $\mu$ l를 가하여 반응을 정지시키고 반응액을 16°C에서 30분간 방치한 후 505 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소활성은 55°C에서 분당 1  $\mu$ mole의  $\alpha$ -CD를 생성하는 효소량을 1 unit라 정의하였다.

### CDase의 활성측정

CDase의 활성측정은 0.5%  $\gamma$ -CD를 포함한 50 mM 인산염 완충액(pH 6.0) 1 ml에 효소액 100  $\mu$ l를 가하고 55°C에서 60분간 반응시켰다. 반응 후 유리 환원당을 Somogyi-Nelson법(22)으로 정량하였다. 효소활성은 55°C

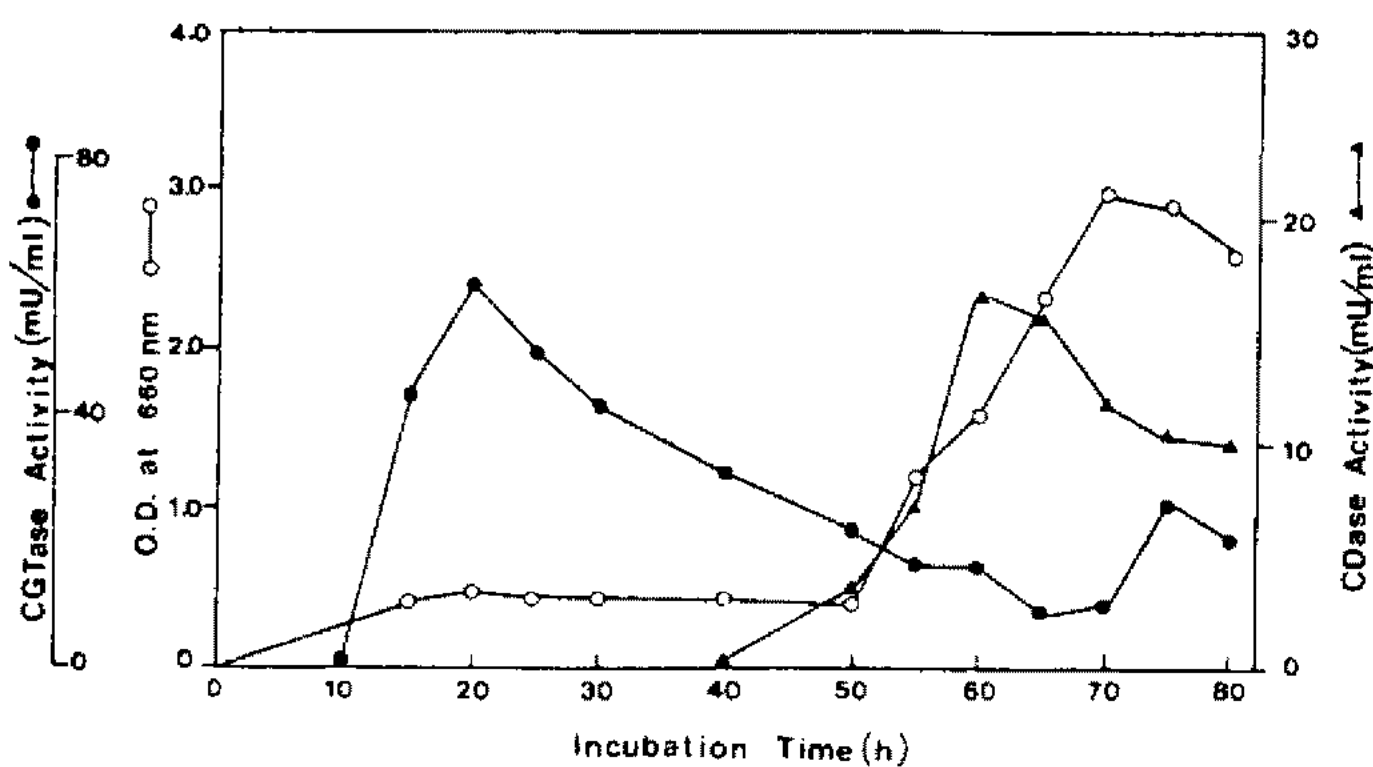


Fig. 1. Time courses of the cell growth and extracellular production of CGTase and CDase by *Bacillus* sp. KJ16.

The cell was grown in the basal medium consisting of 0.5% yeast extract, 0.5% polypeptone, 0.1%  $K_2HPO_4$ , and 0.02%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  at 45°C. The culture was centrifuged at 10,000 g for 10 min at 4°C and supernatant was used as the crude enzyme solution.

에서 분당 1  $\mu$ mole의 환원당을 생성하는 효소량을 1 unit로 정의하였다.

## 결과 및 고찰

### 배양시간에 따른 효소의 생산

시간에 따른 효소의 생산성을 검토하기 위하여 *Bacillus* sp. KJ16을 45°C 기초배지에서 배양하면서 균의 생육과 효소 생산량을 조사하였다. 그 결과 Fig. 1에 나타낸 바와 같이 diauxic 증식을 보이며 배양초기 20 시간에 약 0.5 OD<sub>660</sub>까지 증식하다가 그 이후 40시간 까지 증식이 거의 정지되었으며 40시간 이후 부터 다시 왕성히 증식하여 70시간에 최대 증식(약 3.0 OD<sub>660</sub>)을 나타내었다. 이에 따른 효소 생산은 배양초기 약 15시간부터 CGTase가 생산되어 20시간에 약 60 mU/ml로 가장 높았으며, 그 이후 점진적으로 감소하였다. 반면 CDase는 배양초기에는 거의 생산되지 않다가 배양 40시간 부터 균의 후기 증식에 따라 생산되어 배양 60시간에 약 18 mU/ml로 최대치를 보였다.

### 효소 생산에 미치는 탄소원의 영향

탄소원에 의한 효소생산의 유도 또는 억제효과를 검토하기 위하여 기초배지에 각종 탄소원을 1% 농도가 되게 첨가하여 배양하면서 CGTase와 CDase 활성을 측정하였다(Table 1). CGTase의 경우 soluble starch, amylopectin, maltose, lactose 및 sucrose에 의해서 생

Table 1. Effects of carbon sources on the production of CGTase and CDase by *Bacillus* sp. KJ16

Carbon source (1%)	at 20 h culture		at 60 h culture	
	Cell Growth (OD <sub>660</sub> )	CGTase activity (mU/ml)	Cell Growth (OD <sub>660</sub> )	CDase activity (mU/ml)
None	0.343	60	1.953	18
Glucose	0.103	52	1.977	0
Fructose	0.223	55	2.043	0
Mannose	0.252	58	2.002	0
Maltose	0.298	72	1.962	70
Lactose	0.238	75	1.957	56
Sucrose	0.237	70	2.143	60
$\alpha$ -CD	0.074	57	1.990	42
$\beta$ -CD	0.068	43	2.349	52
$\gamma$ -CD	0.513	60	2.584	106
Soluble starch	0.447	70	1.950	70
Potato starch	0.150	50	1.560	26
Amylose	0.120	50	1.808	26
Amylopectin	0.298	78	1.789	111

*Bacillus* sp. KJ16 cell was grown at 45°C on basal medium supplemented with 1% carbon source. Activities were measured with the culture supernatant.

산이 증가되었으며, glucose, fructose, mannose,  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD, potato starch 및 amylose에 의해서는 생산이 억제되었다. 그러나, 이들의 유도/억제 효과는 최대 30% 이하로 매우 낮았다. 반면 CDase는 기초배지에서 60 시간 배양한 배양 상등액에서 약 18 mU/ml의 효소활성을 보였으나 glucose, fructose 및 mannose와 같은 다당류에서는 효소활성이 전혀 나타나지 않았고, 이당류 이상의 탄소원에서는 효소생산이 증가됨을 알 수 있었다. 특히,  $\gamma$ -CD와 amylopectin이 CDase의 생산에 가장 효과적인 유도기질로 작용하여 각각 106 mU/ml와 111 mU/ml의 효소활성을 나타내었으며 이것은 탄소원이 첨가되지 않은 기초배지에 비해 약 6배 정도의 유도 효과가 있음을 알 수 있었다.

이상의 결과로 CGTase는 탄소원의 유무에 크게 관계 없이 구성적으로 생산되는 효소인 반면 CDase는 다당류와 같은 유도기질이 존재할 때 강하게 유도되는 부분적 유도효소로 판단된다. 두 효소의 생합성은 모두 glucose와 같이 쉽게 대사될 수 있는 탄소원이 존재할 때 catabolite repression 받음을 알 수 있었다. 또 균의 증식과 관련하여서도 배양초기에는 CGTase를 생산하고 배양후기에는 CDase를 분비하는 점으로 보아 본 연구에 사용한 *Bacillus* sp. KJ16 균주는 탄소원을 확보하기 위해 통상의 amylase와 같은 강력한 분해효소를 가지지 못하는 대신 CGTase로 전분과 같은 다당류로부터 CD를 합성하고 이를 CDase로 분해하여 탄소원으로 이용하는 것으로 사료된다. 이것은  $\gamma$ -CD가 효과적인 CDase 유도기질일 뿐만 아니라 CDase의 반응 기질로서도 가장 효과적인 점(제시하지 않은 자료)이 이를 뒷받침한다.

Table 2. Effects of glucose and starch on the growth and syntheses of CGTase and CDase of *Bacillus* sp. KJ16

Carbon source (% w/v)		at 20 h culture		at 60 h culture	
Glucose	Starch	Growth (OD <sub>660</sub> )	CGTase activity (mU/ml)	Growth (OD <sub>660</sub> )	CGTase activity (mU/ml)
0	0	0.453	72	1.657	20
0.2	0	0.408	70	1.923	12
0.4	0	0.410	70	1.888	8
0.6	0	0.328	58	1.674	0
0.8	0	0.432	60	1.752	0
1	0	0.443	55	1.862	0
0	1	0.353	88	1.950	78
0.2	1	0.387	70	1.944	56
0.4	1	0.374	62	1.713	45
0.6	1	0.403	62	1.870	24
0.8	1	0.425	60	1.914	0
1	1	0.423	58	1.984	0

\*The culture conditions are the same as in Table 1

Glucose 농도에 따른 효소생산 억제효과

CGTase는 비교적 구성적으로 생산되는데 비해 CDase는 glucose와 같은 다당류에 의해서 효소의 생산이 완전히 억제되므로 CDase의 발현을 억제하는 glucose의 농도를 검토하기 위해서 glucose를 농도별로 첨가하여 그 활성을 측정하였다(Table 2). Glucose만을 첨가하였을 때는 0.6%에서 CDase 생산이 완전히 억제되었고 유도기질인 soluble starch가 1% 함유된 배지에서는 0.8% glucose에서 완전히 억제되었다.

한편, CGTase는 구성적으로 생산되는 효소이나 배양초기부터 glucose를 첨가하면 어느 정도 효소의 생산이 억제되는 것으로 보아 CGTase 합성도 어느 정도 catabolite repression 받음을 알 수 있었다. 따라서 이를 확인하기 위하여 기초배지에서 15시간 배양한 후 glucose를 농도별로 첨가하여 효소생산이 억제되는 정도를 검토하였다(Fig. 2). 대조구에 비해 glucose 농도를 높일수록 CGTase 생산이 억제되었으며 1% glucose 농도일 때 최대 33% 까지 억제되었다.

유도기질에 의한 효소생산 유도효과

유도기질에 의한 CDase 생산 유도효과를 조사하기 위해서 기초배지에서 40시간 배양한 후 유도효과가 가장 좋은 amylopectin을 농도별로 첨가하여 효소 활성을 측정하였다(Fig. 3). Amylopectin을 첨가했을 때가 첨가하지 않은 대조구에 비해 효소의 생산량이 크게

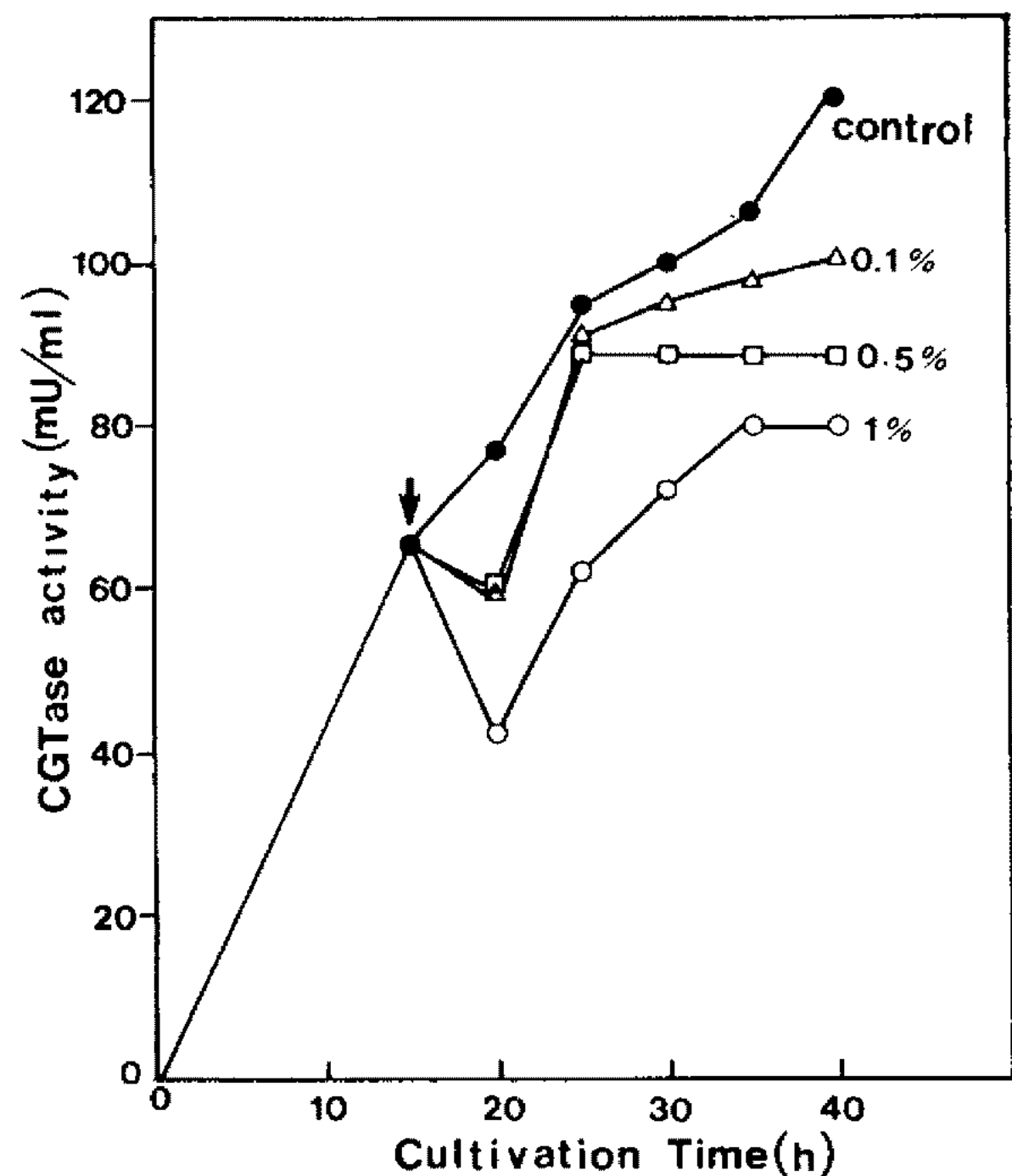
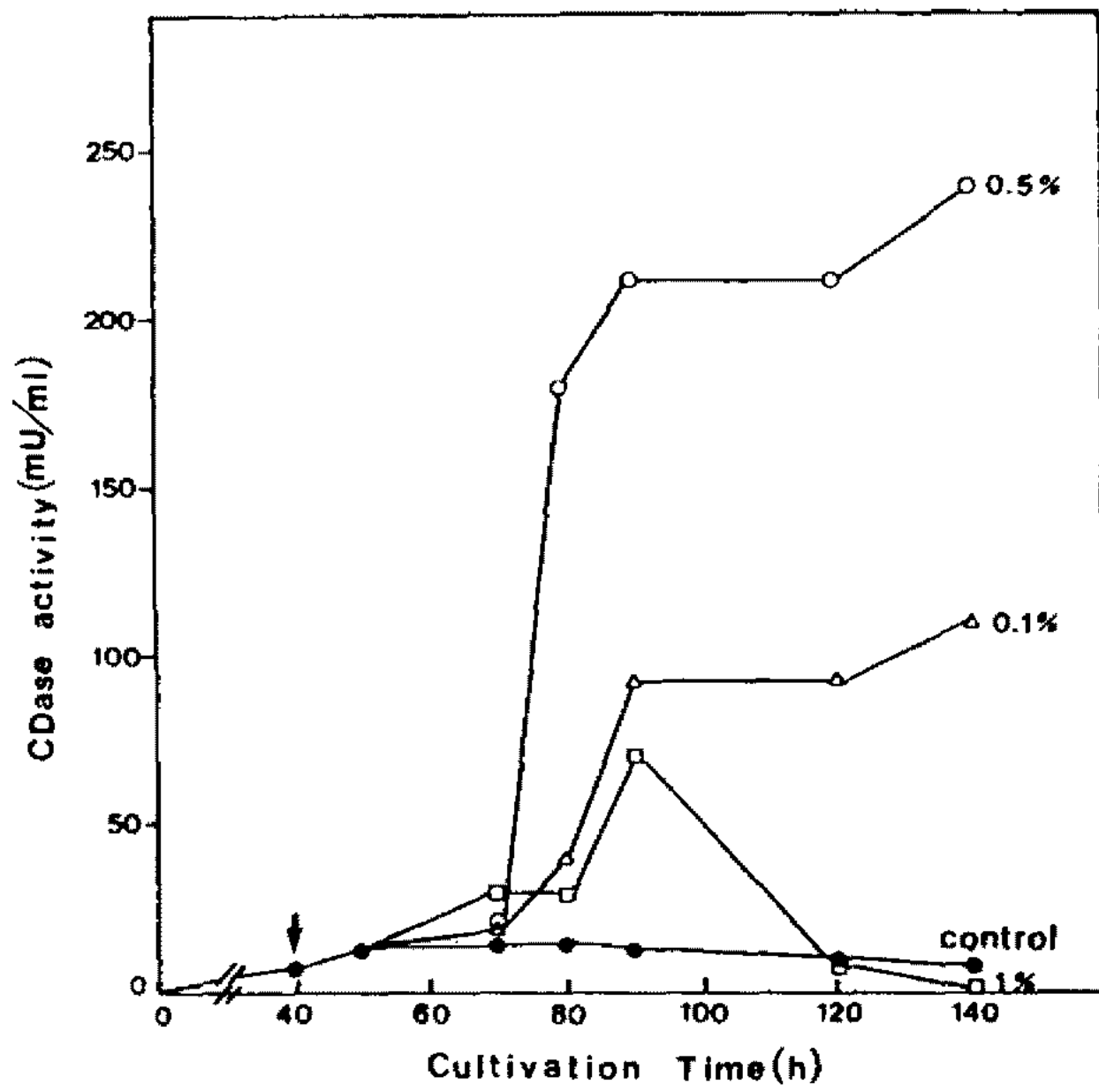


Fig. 2. Effect of glucose concentration on the CGTase synthesis by *Bacillus* sp. KJ16.

Cells were pregrown on basal medium for 15 h at 45°C and glucose was added (arrow) to the concentration indicated. At time intervals, CGTase activity was assayed in culture filterates.

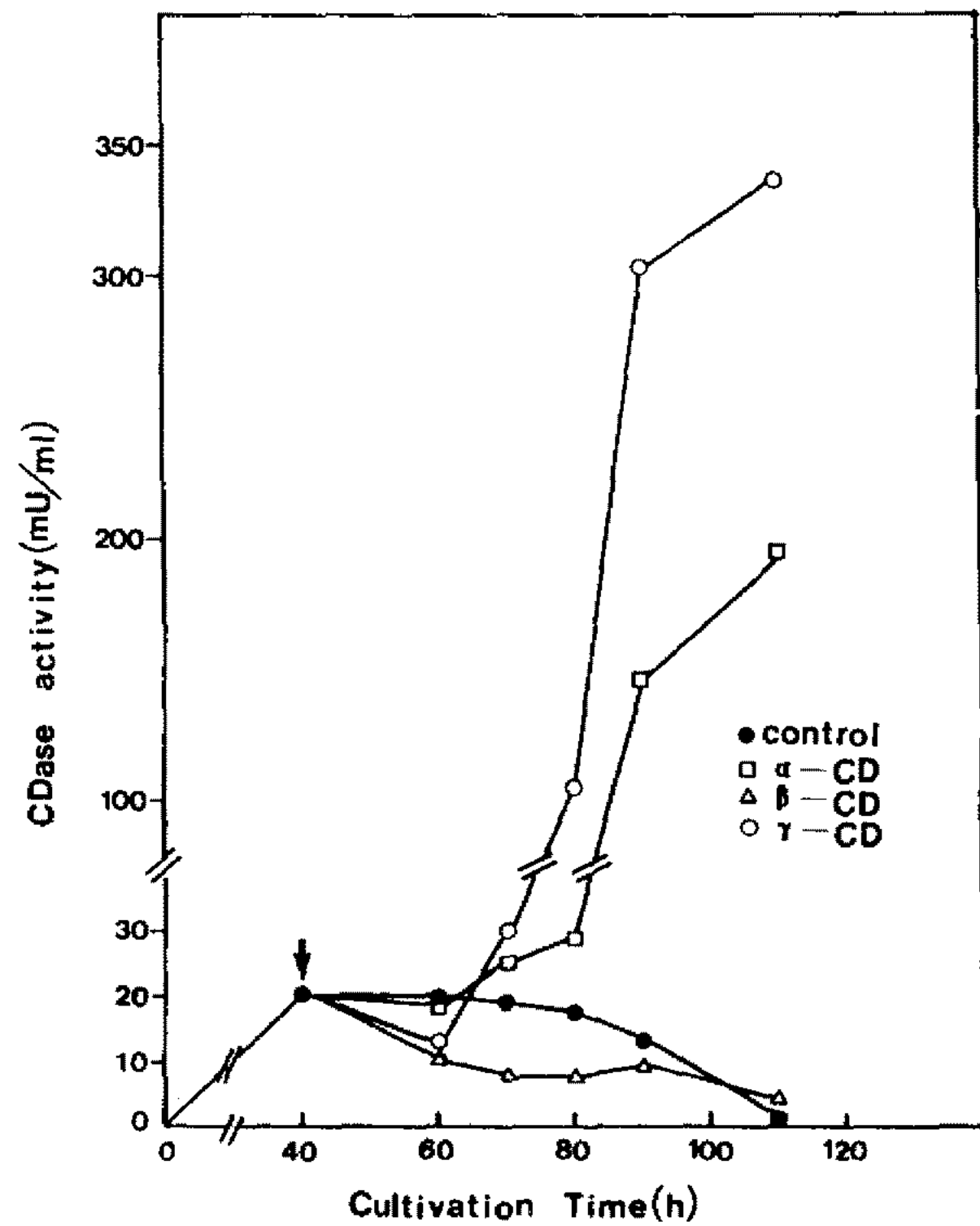


**Fig. 3. Effect of amylopectin concentration on the CDase synthesis by *Bacillus* sp. KJ16.**  
Cells were pregrown on basal medium for 40 h at 45°C and Amylopectin was added (arrow) to the concentration indicated. At time intervals, CDase activity was assayed in culture filterates.

증대되었고, amylopectin 0.5%일 때 효소량은 약 250 mU/ml로 대조구에 비해 약 14배 정도의 가장 높은 유도효과가 있었다. Amylopectin 1%의 경우에는 첨가 후 90시간까지는 CDase의 생산이 촉진되다가 그 후에는 활성이 점차 감소되어 대조구와 비슷한 수준을 보였는데 이것은 분비된 CDase에 의해 다량의 glucose가 생성되어 이것이 효소의 발현을 억제하는 것으로 보여진다. 한편, *Bacillus* sp. KJ16은 일단 CGTase를 분비하여 CD를 합성하고 생성된 CD(특히  $\gamma$ -CD)가 유도기질로 작용하여 CDase를 분비하는 것으로 추정되어 CD에 의한 CGTase의 유도효과를 검토하였다(Fig. 4). 기초배지에서 40시간 배양 후 0.5%  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -CD를 각각 첨가하고 효소의 활성을 측정된 결과  $\gamma$ -CD를 첨가했을 때의 효소활성이 약 350 mU/ml로 가장 높았으며 그 다음으로  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD의 순이었다. 이와 같은 결과는 Table 1에 제시한 결과와 CDase의 기질특이성( $\gamma$ -CD specific)과 잘 일치하는 것으로 *Bacillus* sp. KJ16에 있어서 탄소원을 확보하기 위한 수단으로서의 CGTase와 CDase의 생리학적 역할을 규명할 수 있는 흥미로운 결과라고 사료된다.

**효소생산에 미치는 cAMP의 영향**

많은 세균들에 있어서 catabolite repression은 세포내 cAMP 농도에 의해서 조절되는 것으로 보고되어 있으나 (14-16) *Bacillus*속 세균의 경우에는 cAMP에 의한 조절기작이 드물고 다만 *B. megaterium*의  $\beta$ -galactosidase 생합성은 cAMP에 의해서 영향을 받는 것으로 보고되어



**Fig. 4. Effects of CDs on the CDase synthesis by *Bacillus* sp. KJ16.**  
Cells were pregrown on basal medium for 40h at 45°C and CDs were then added (arrow) at 0.5% concentration. At time intervals, CDase activity was assayed in culture filterates.

**Table 3. Effect of cAMP on the production of CGTase and CDase**

Carbon source	Additive <sup>1)</sup>	CGTase <sup>2)</sup> (mU/ml)	CDase <sup>2)</sup> (mU/ml)
None	—	71	18
	cAMP	28	18
	AMP	16	20
Glucose (1%)	—	43	<1
	cAMP	30	<1
	AMP	19	<1

<sup>1)</sup>cAMP and AMP were added at 10 mM concentration.  
<sup>2)</sup>The activities of CGTase and CDase were assayed with the culture supernatant after 20 h and 60 h cultivation, respectively.  
\*The culture conditions are the same as in Table 1.

있다(17). 따라서 cAMP에 의한 CGTase와 CDase의 생합성 영향을 검토하기 위해서 기초배지와 glucose 첨가배지에 cAMP를 각각 10 mM의 농도가 되게 첨가하여 효소활성을 측정하였다. 이때, cAMP를 첨가한 후 배지의 pH는 7.0으로 조절하였으며 45°C에서 배양하면서 20시간, 60시간째 CGTase와 CDase 활성을 측정하였다. Table 3에 나타낸 것과 같이 cAMP는 CGTase와 CDase의 발현유도에 전혀 영향을 미치지 않는 것으로



**Table 4. Effects of glucose analogues on the production of CGTase and CDase**

Addition <sup>1)</sup>	at 20 h culture		at 60 h culture	
	Growth (OD <sub>660</sub> )	CGTase activity <sup>2)</sup> (mU/ml)	Growth (OD <sub>660</sub> )	CDase activity <sup>2)</sup> (mU/ml)
Basal	0.385	70	2.233	18
2-Deoxy-D-glucose	0.429	70	2.563	33
3-O-Methyl-D-glucopyranose	0.397	69	2.517	23

<sup>1)</sup>Glucose analogues were added at 10 mM concentration.

<sup>2)</sup>The activities of CGTase and CDase were assayed with the culture supernatant after 20 h and 60 h cultivation, respectively.

\*The culture conditions are the same as in Table 1.

나타났고, 오히려 CGTase의 경우 cAMP의 첨가로 효소의 활성(생산량)이 감소되었다. 대조구로 AMP를 첨가한 배양에서도 이들 효소의 생산량이 감소되었다. 따라서, 이들 효소의 생합성은 cAMP 관련 catabolite repression에 의해 조절되지 않음을 알 수 있다. 다만 cAMP와 AMP를 첨가한 배양에서의 이들 효소의 활성감소는 배양액의 pH 저하에 기인하는 것으로 판단된다. 본 실험균주의 배양시간에 따른 pH의 변화와 효소 생산은 특이한 양상을 나타내는데 탄소원이 첨가되지 않은 기초배지에서는 배양 후 약 20시간내에 일차증식이 일어나며 이때의 배양액의 pH는 6.2까지 저하하고 이후 약 40~50시간 배양후부터 pH가 상승하면서 이차증식이 일어났다. 탄소원을 첨가할 경우에는 탄소원의 종류에 따라 이와같은 현상이 더욱 두드러져, 특히 glucose를 첨가할 때 pH는 5.4까지 저하하며 효소의 생산도 억제되었다. cAMP 첨가시 배양 20시간 후 배양액의 pH는 4.9까지 저하되며 이러한 pH의 저하가 효소 생산을 억제하는 것으로 사료된다. 하지만 탄소원의 종류에 따른 pH와 효소의 생산관계는 좀 더 검토되어야 하고 현재 이와같은 실험을 진행중에 있다.

**효소생산에 미치는 glucose analogue의 영향**

전항에서 서술한 것처럼 CGTase와 CDase의 생산 또는 발현조절에 cAMP가 관여하지 않는다면 glucose 대사의 phosphorylated metabolite 중의 하나가 repressor로 작용하여 조절할 가능성이 크므로 이를 확인하기 위해서 glucose 대신 glucose analogue를 첨가하여 배양한 후 효소의 발현정도를 검토하여 보았다. 그 결과 Table 4에 나타낸 것처럼 2-deoxy-D-glucose나 3-O-methyl-D-glucopyranose를 첨가하였을 때 CGTase나 CDase의 발현이 전혀 억제되지 않았고 오히려 CDase의 활성은 약간 증가함을 알 수 있었다. 이와 같은 결과는

glucose 대사경로인 EM 경로중의 어떤 대사산물이 이들 효소의 발현을 억제하고 있다는 것을 강하게 시사해 주고 있다. 따라서 이들 대사산물중 repressor 작용을 하는 물질을 현재 조사중이며 이것이 밝혀지면 CGTase와 CDase의 발현조절기작을 이해하는데 많은 도움을 줄 수 있으리라 사료된다.

**요 약**

토양에서 분리한 CGTase와 CDase 생산균주 *Bacillus* sp. KJ16에서 이들 효소 생합성의 catabolite repression에 관해 조사하였다. 두 효소는 유도기질인 탄소원의 유무에 관계없이 균의 증식시기에 따라 생산되었으며, CGTase는 주로 배양초기 약 20시간 정도에 최대 생산되고(약 60 mU/ml) CDase는 배양후 약 60시간에 최대치(약 18 mU/ml)를 나타내었다. 효소유도기질로는 amylopectin이 가장 좋았으며 기초배지에 첨가하였을 때 CDase의 생산은 약 6배 정도 증가하였으나 CGTase의 생산은 약 1.3배 정도의 증가에 그쳤다. 또 glucose와 같은 당당류에 의해서는 CGTase의 생산은 약간 억제를 받았으나 CDase의 생산은 완전히 억제되었다. Glucose에 의한 CDase 생산 억제효과는 glucose 농도에 비례하였으며 0.6% 이상에서는 완전히 효소생산이 억제되었다. Amylopectin의 농도별 CDase 유도효과는 0.5%에서 약 14배로 가장 높았다. 또한, 10 mM cAMP를 첨가한 배지에서 두 효소의 생산량은 증가하지 않았으며 2-deoxy-D-glucose와 3-O-methyl-D-glucopyranose와 같은 glucose analogue도 효소의 생산에는 영향을 미치지 않았다.

**감사의 말**

본 연구는 1994년도 교육부 학술연구조성비(유전공학)로 수행되었으며 연구비 지원에 감사드립니다.

**참고문헌**

1. Tilden, E.B. and C.S. Hudson. 1939. The conversion of starch to crystalline dextrin by the action of a new type of amylose seperated from cultures of *Aeromonas macerans*. *J. Am. Chem. Soc.* **61**: 2900-2902.
2. Yagi, Y., M. Sato, and T. Ishikura. 1986. Comparative studies of CGTases from *Bacillus ohbensis*, *Bacillus macerans* and *Bacillus circulans* and production of cyclodextrin using those CGTase. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.* **33**: 144-151.
3. Kitahata, S. and S. Okada. 1982. Comparison of action of cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus megaterium*, *B. circulans*, *B. stearothermophilus* and *B. macerans*. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.* **29**: 13-18.
4. Akimaru, K., T. Yagi, and S. Yamamoto. 1991. Cyclo-

- maltodextrin glucanotransferase producing moderate thermophile, *Bacillus coagulans*. *J. Ferment. Bioeng.* **71**: 63-65.
5. Nakamura, N. and K. Horikoshi. 1976. Purification and properties of cyclodextrin glycosyltransferase of an alkalophilic *Bacillus* sp. *Agric. Biol. Chem.* **40**: 935-941.
  6. Yu, J.H., Y.J. Chung and J.S. Lee. 1989. Isolation and characterization of cyclodextrin glycosyltransferase producing alkalophilic *Bacillus* sp. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **17**: 148-153.
  7. Do, E.J., J.B. Park and Y.H. Lee. 1993. Screening of new alkalophilic strain for overproduction of cyclodextrin glucanotransferase. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **21**: 119-124.
  8. Depinto, T.A. and L.L. Campbell. 1968. Purification and properties of the cyclodextrinase of *Bacillus mace-rans*. *Biochemistry* **7**: 121-125.
  9. Kitahata, S., M. Taniguchi, S.O. Beltran, T. Sugimoto and S. Okada. 1983. Purification and some properties of cyclodextrinase from *Bacillus coagulans*. *Agric. Biol. Chem.* **47**: 1441-1447.
  10. Nakamura, A., K. Haga, S. Ogawa, K. Kuwano, K. Kimura and K. Yamane. 1992. Functional relationships between cyclodextrin glucanotransferase from an alkalophilic *Bacillus* and  $\alpha$ -amylase. *FEBS Lett.* **296**: 37-40.
  11. Saha, B.C. and J.K. Zeikus. 1988. Purification and characterization of a highly thermostable novel pullulanase from *Clostridium thermohydrosulfuricum* 39E. *Biochem. J.* **252**: 343-348.
  12. Nakamura, R.S. and K. Horikoshi. 1976. Characterization and some cultural conditions of cyclodextrin glycosyltransferase producing alkalophilic *Bacillus* sp. *Agric. Biol. Chem.* **40**: 753-757.
  13. Do, E.J., H.D. Shin, C. Kim and Y.H. Lee. 1993. Selection and characterization of catabolite repression resistant mutant of *Bacillus firmus* var. alkalophilus producing cyclodextrin glucanotransferase. *J. Microbiol. Biotechnol.* **3**: 78-85.
  14. Makman, R.S. and E.W. Sutherland. 1965. Adenosine 3', 5'-phosphate in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **240**: 1309-1314.
  15. Liberman, E., P. Reddy, C. Gadar and A. Peterkofsky. 1985. The *Escherichia coli* adenylate cyclase complex. Stimulation by potassium and phosphate. *J. Biol. Chem.* **260**: 4075-4081.
  16. Castro, L., B.U. Feucht, M.L. Morse and M.H. Saier. 1976. Regulation of carbohydrate permeases and adenylate cyclase in *E. coli*. *J. Biol. Chem.* **251**: 5522-5527.
  17. Ullmann, A. 1974. Are cyclic AMP effects related to real physiological phenomena? *Biochem. Biophys. Res. Com.* **57**: 348-352.
  18. Stewart, G.C. 1993. Catabolite repression in the gram positive bacteria: generation of negative regulators of transcription. *J. Cell. Biochem.* **51**: 25-28.
  19. Lopez, J.M. and B. Thoms. 1977. Role of sugar uptake and metabolic intermediates on catabolite repression in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **129**: 217-224.
  20. Henkin, T.M., F.J. Grundy, W.L. Nicholson and G.H. Chambliss. 1991. Catabolite repression of alpha amylase gene expression in *Bacillus subtilis* involves a trans-acting gene product homologous to the *Escherichia coli* *lacI* and *galR* repressors. *Mol. Microbiol.* **5**: 575-584.
  21. Lejeune, A., K. Sakaguchi and T. Imanaka. 1989. A spectrophotometric assay for the cyclization activity of cyclomaltohexaose glucanotransferase. *Anal. Biochem.* **181**: 6-11.
  22. Nelson, N. 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* **153**: 375-380.

(Received 30 September 1995)