

γ -Cyclodextrin Glycosyltransferase 생산균주의 분리, 동정 및 효소 생산조건

김명희 · 손천배* · 임영희¹ · 배경숙² · 오태광²

충남대학교 식품영양학과, ¹대전대학교 식품영양학과, ²생명공학연구소

초 록 : Cyclodextrin glycosyltransferase 생산균주를 토양으로부터 분리하여 형태학적, 생화학적 그리고 균주의 세포벽 지방산 조성분석에 의해 *Bacillus brevis*로 동정하였고, *Bacillus brevis* CD162로 명명하였다. 또한 배지조성에 따른 cyclodextrin glycosyltransferase의 최적생산조건을 검토한 결과, 2.0% soluble starch, 0.75% yeast extract, 0.5% bacto peptone, 0.2% K₂HPO₄, 0.05% MgSO₄ · 7H₂O, 1.5% Na₂CO₃ (pH 10.2)의 배지 조건에서 30°C에서 96시간 배양하였을 때 가장 높은 효소생산인 0.9 unit/ml을 얻을 수 있었다.(1997년 7월 10일 접수, 1997년 11월 21일 수리)

서 론

Cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase, EC 2.4.1.19)는 전분이나 α -1,4-글루칸으로부터 cyclodextrin (CD)를 생산하는 분자내 당전이화^{1,2)} (intramolecular transglycosylation), 전분이나 CD로부터 온 글루코스 잔기를 글루코스, 자일로스, 슈크로스 같은 적당한 수용체에 전이시키는 분자간 당전이화^{3,4)} (intermolecular transglycosylation), 그리고 전분과 CD에 대한 가수분해 작용^{5,6)}을 촉매하는 효소이다. 1939년 *Bacillus macerans*³⁾의 배양액에서 CGTase를 발견한 이래 다른 특성을 갖는 CGTase들이 *Bacillus circulans*,⁷⁾ *B. megaterium*,⁸⁾ *B. stearothermophilus*,⁹⁾ *Klebsiella pneumonia* M5al,¹⁰⁾ *B. coagulans*,¹¹⁾ 호알카리성 *Bacillus* sp.,¹²⁻¹⁵⁾ *B. subtilis* No. 313,¹⁶⁾ *B. ohbensis*,¹⁷⁾ *B. licheniformis*,¹⁸⁾ *Bacillus* sp. KC201,¹⁹⁾ *Bacillus* sp. E1²⁰⁾ 등의 미생물에서 발견되어 왔다. 일반적으로 CGTase는 생산된 cyclodextrin의 상대량에 따라서 세가지 종류로 분류된다. 즉, 6개의 글루코스로 구성된 α -CD를 주로 생산하는 α -CGTase, 7개의 글루코스로 구성된 β -CD를 주로 생산하는 β -CGTase, 8개의 글루코스로 구성된 γ -CD를 주로 생산하는 γ -CGTase로 구분할 수 있다.

CGTase에 의해 생산되는 CD는 도우넛모양의 독특한 구조를 이루어 수용액에서 CD 분자내 공동 (cavity)의 내부면은 소수성이고 외부면은 친수성이어서 그 공동내에 여러 유기 및 무기화합물질을 포접하는 성질을 갖고 있다.²¹⁾ 이러한 포접작용을 이용하여 각종 불성을 개선하는 분자캡슐로 주목되어 온 CD는 냄새가리움 (odour masking), 맛가리움 (taste masking), 및 고미제거, 휘발성물질의 안정화, 저칼로리 감미료의 감미증진 및 안정화, 광분해성물질 및 산화물질의 보호, 유화작용, 불안정한물질의 안정화, 난용성

물질의 가용화, 조해성·접착성물질의 분말화 등의 효과가 있어 식품, 의약품, 화장품, 수지제품 및 농약 등에 폭넓게 이용되고 있다.²²⁻²⁴⁾ 특히 CD 중 γ -CD는 α -, β -CD보다 내부공동이 훨씬 크기 때문에 내부에 포접할 수 있는 양이 많아 실용적인 면에서 가장 유리하다. 그러나, γ -CGTase 분비 미생물에 대한 보고는 지금까지 *B. subtilis* No. 313¹⁶⁾만이 있었으나, 전분으로부터 γ -CD 전환율이 2~3% 밖에 되지 않았고, 다른 미생물들의 CGTase들도 γ -CD의 낮은 전환율을 보였다.

따라서 γ -CD를 고수율로 생산하는 CGTase 분비 미생물의 확보가 중요한 관건으로 사료되므로 본 연구에서는 γ -CD 전환율이 높은 균주를 전국 각지의 토양을 시료로하여 검색하고, 이 중 γ -CD 전환율이 가장 높은 균주를 선정하여 동정하였으며, 또한 선정된 균주의 효소생산조건을 검토하였다.

재료 및 실험

Cyclodextrin glycosyltransferase 생산균주의 분리 및 선정

전국 여러지역에서 채취한 1,200 여점의 토양시료 1g을 5 ml의 멸균수에 현탁하고 일정시간 방치한 다음 상징액 0.1 ml을 평판배지에 도말하여 30°C에서 2~3일간 배양한 후 전분분해능이 우수한 균주 총 1,500 균주를 1차 선별하여 사면배지에 순수분리하였다. 다시 1차 선별한 균주들을 5 ml의 액체배지에 접종하여 30°C의 진탕배양기에서 72시간 배양한 후 배양액을 원심분리하고 상징액으로 CGTase 활성을 측정하여 우수균주를 최종선정하였다. 사용된 분리용 평판배지조성은 2.0% corn starch, 0.5% yeast extract, 0.5% bacto peptone, 0.1% K₂HPO₄, 0.02% MgSO₄

찾는말 : Cyclodextrin glycosyltransferase, cyclodextrin-producing bacteria, cyclodextrin

*연락처자

7H₂O, 1.0% Na₂CO₃, 2.0% agar를 녹인 후 최종 pH를 10.0으로 맞추었고, 액체배지조성은 2.0% soluble starch, 0.5% yeast extract, 0.5% bacto peptone, 0.1% K₂HPO₄, 0.02% MgSO₄ · 7H₂O, 1.0% Na₂CO₃으로 한 후 pH를 10.0으로 하였다.

균주의 동정

최종 분리선정된 균의 동정은 형태학적, 생화학적 제성질을 검토하여 "Biochemical tests for identification of medical bacteria",²⁵⁾ "Bergey's manual of systematic bacteriology"²⁶⁾ 및 "Manual for the identification of medical bacteria"²⁷⁾에 제시되어 있는 방법에 의해 수행하였으며, 균주의 세포벽 지방산조성을 GC-MS로 분석한 후 MIDI (Microbial Identification) system²⁸⁾의 자료와 비교하여 동정하였다.

Cyclodextrin glycosyltransferase의 활성도 측정

CGTase 활성측정은 Kato¹⁶⁾ 등에 의한 Bromocresol green (BCG)법을 일부 변형하여 측정하였다. 원심분리하여 균체를 제거한 상정액 0.1 ml에 10% soluble starch 0.5 ml와 0.1 M KH₂PO₄-0.2 M Na₂B₄O₇ 완충용액 (pH 8.0) 0.4 ml를 넣고 40°C에서 60분간 효소반응시키고, 이 반응액에 0.025 M BCG액 0.1 ml와 0.2 M citrate 완충용액 (pH 4.2) 4.0 ml를 가하여 630 nm에서 흡광도를 측정한 후 표준곡선에 의거하여, 생성된 γ -cyclodextrin량을 산출하였다. 이 때 효소활성 1단위는 1분동안 1 μ mol의 γ -cyclodextrin를 생성하는 효소의 양으로 하였다.

효소생산을 위한 배양조건의 검토

균주분리용 기본배지, 즉 2.0% soluble starch, 0.5% yeast extract, 0.5% bacto peptone, 0.1% K₂HPO₄, 0.02% MgSO₄ · 7H₂O, 1.0% Na₂CO₃, pH 10.0을 기초로 하여 각종 탄소원과 질소원에 따른 효소생산을 조사하였으며, 염류농도, Na₂CO₃를 조절제로 사용하여 초기배양pH, 배양온도 및 시간에 따른 효소생산을 조사하였다.

결과 및 고찰

Cyclodextrin glycosyltransferase 생산균주의 선정 및 동정

CGTase 생산균주는 선별배지상에서 전분 분해환이 우수한 균주를 선정하고, 이를 액체배양하여 BCG법으로 CGTase활성을 측정된 후 활성이 가장 높게 나타난 strain CD162를 최종적으로 선별하였다.

선별된 strain CD162는 Fig. 1과 같이 전분을 강하게 분해하였고, 형태학적 특성은 그람염색과 포자염색을 실시한 결과, 타원체의 포자를 형성하는 그람양성균으로 나타났으며, Fig. 2와 같이 전자현미경으로 형태를 관찰한 결과 세포의 크기가 0.4~0.5 \times 2 μ m인 간상형으로 관찰되어 *Bacillus* sp.가 갖는 형태학적 특징과 일치하였다. 생리학적 특성은 ca-

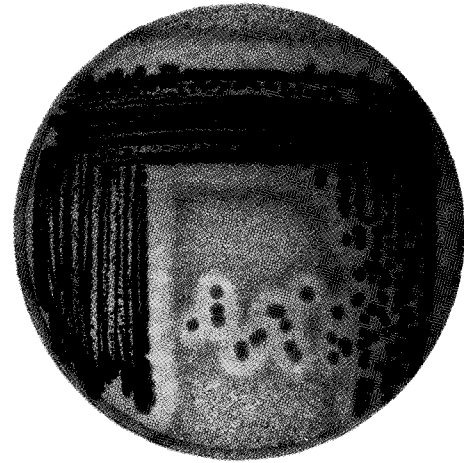


Fig. 1. Plate culture of *Bacillus brevis* CD162. The organism was cultured on agar plate containing 0.2% starch azure.

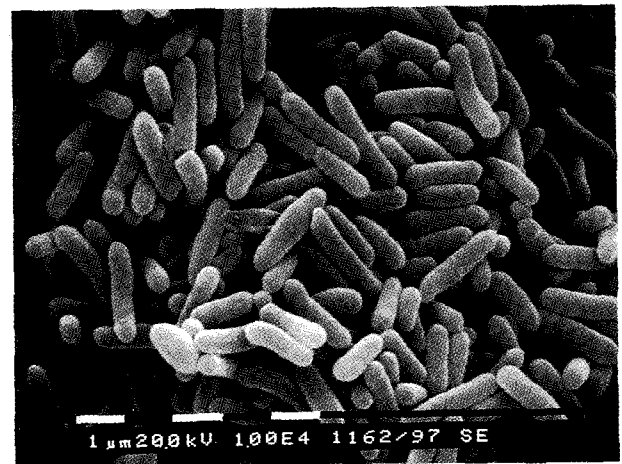


Fig. 2. Scanning electron micrograph of *Bacillus brevis* CD162. Bars indicate 1 μ m lengths.

talase는 양성반응을 보였으며 casein, gelatin, starch를 가수 분해하였다. 이상과 같은 특성분석에서 나타난 결과를 *Bacillus* sp.가 갖는 일반적인 특성을 기초로 하여 *Bacillus* species를 결정하기 위해서 Table 1에서와 같이 GC-MS를 사용하여 세포벽 지방산 (cellular fatty acid)조성을 관찰한 FAME profile을 조사한 결과로 MIDI system을 이용한 computer 분석결과와 당이용성을 조사하는 Biolog System을 이용한 대사의 다양성을 조사한 후 *Bacillus brevis*와 동일하여 분리된 균주를 *B. brevis*로 동정하였고 *B. brevis* CD 162로 명명하였다. 이런 결과들은 CGTase를 생산하는 호알카리성 *Bacillus* sp.¹²⁻¹⁵⁾의 동정결과와 부분적으로는 일치하였지만 완벽하게 동일한 동정결과를 갖는 *Bacillus* sp.는 찾기 어려웠다. 지금까지 보고된 CGTase 생산균주로는 *B. circulans*,⁷⁾ *B. megaterium*,⁸⁾ *B. stearothermophilus*,⁹⁾ *Klebsiella pneumonia* M5a1,¹⁰⁾ *B. coagulans*,¹¹⁾ 호알카리성 *Bacillus* sp.,¹²⁻¹⁵⁾ *B. subtilis* No. 313,¹⁶⁾ *B. ohbensis*,¹⁷⁾ *B. licheniformis*,¹⁸⁾ *Bacillus* sp. KC201,¹⁹⁾ *Bacillus* sp. E1²⁰⁾ 등으로 본 균주는 새로운 CGTase 생산균주였다.

Table 1. Morphological and biochemical characteristics of strain CD162

1. Morphology	
Gram staining	positive
Cell shape	rod-shaped, short rod(0.4~0.5×1.5~2μm)
Spore	ellipsoidal, central to terminal
Sporangium	swollen
2. Characteristics	
1) Fatty acid methyl esters(FAME) profile	
C14:0 iso 9.5%, C14:0 1.4%, C15:0 iso 56.7%, C15:0 anteiso 20.6%	
C16:0 iso 4.6%, C16:0 2.4%, C17:0 iso 2.2%, C17:0 anteiso 1.6%	
2) Metabolic versatility(Biolog GP)	
D-ribose	+
fructose-6-phosphate	+
D-psicose	v
D-tagatose	v
acetic acid	v
α-hydroxybutyric acid	v
D-lactic acid methyl ester	v
L-lactic acid	v
propionic acid	v
2,3-butanediol	v
3) Other characteristics	
Catalase	+
Parasporal crystals	-
Anaerobic growth	-
Hydrolysis of casein	+
gelatin	+
starch	+

v, variable; +, positive; -, negative.

효소생산을 위한 배양조건

(1) 탄소원

각 종 탄소원 2.0%를 함유하는 기본배지와, 탄소원의 농도를 달리한 기본배지에 균을 접종하고 30°C에서 72시간 진탕배양하여 탄소원의 종류와 농도차이에 의한 효소활성을 비교검토한 결과는 각각 Table 2, Fig. 3과 같다.

효소활성은 soluble starch를 첨가한 배지에서 가장 높게 나타났으며, dextrin, corn starch도 50% 이상의 활성을 보였다. 반면에 fructose, glucose, sucrose 등의 단당류와 이당류 첨가구에서는 10~20%로 매우 낮았다. 이 결과는 CGTase를 생산하는 균주들은 탄소원으로 dextrin, soluble starch 같은 다당류를 이용할 때가 단당류를 이용할 때보다 더 높은 효소생산을 보인다는 Nakamura 등¹²⁾의 연구 보고와 일치하였다. 한편 이들 다당류의 종류별 농도차이에 따른 효소활성을 비교한 결과에서는 각각 soluble starch 2%, dextrin 3%, corn starch 3% 첨가구 순에서 가장 높은 활성을 보였다.

(2) 질소원

최적탄소원인 2.0% soluble starch를 함유한 기본배지에 유기질소원의 배합농도를 달리하여 배지를 만든 후 균을 접종하고 30°C에서 72시간 배양하여 효소활성을 비교 검토했던 결과는 각각 Table 3, 4와 같다. Table 3에서 보는 바와 같이 질소원으로서 0.75% yeast extract, 0.5% peptone의 농도로 배합한 첨가구가 가장 높은 활성을 나타냈으며, 0.75% yeast extract, 1.0% peptone의 농도에서도 94%의

Table 2. Effect of carbon sources on the CGTase production by *Bacillus brevis* CD162

Carbon sources	Relative activity (%)
None	7
Fructose	10
Glucose	12
Maltose	20
Lactose	24
Sucrose	20
Dextrin	68
Soluble starch	100
Corn starch	50

B. brevis CD162 was cultured at 30°C for 72 hr in the medium containing 0.5% yeast extract, 0.5% bacto peptone, 0.1% K₂HPO₄ · 7H₂O, and 1.0% Na₂CO₃ with various carbon sources of 2.0% at initial pH 10.0.

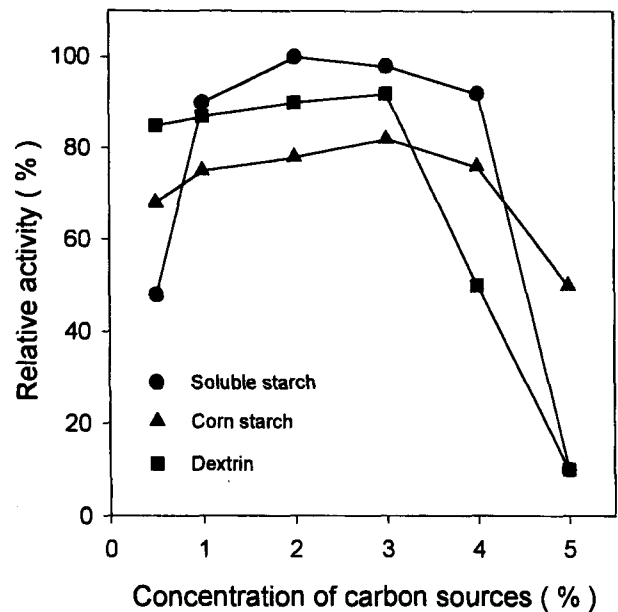


Fig. 3. Effects of concentration of carbon sources on the CGTase production by *Bacillus brevis* CD162. *B. brevis* CD162 was cultured at 30°C for 72 hr in the medium containing 0.5% yeast extract, 0.5% bacto peptone, 0.1% K₂HPO₄, 0.02% MgSO₄ · 7H₂O, and 1.0% Na₂CO₃ with carbon sources of various concentration (0.5~5%) at initial pH 10.0.

높은 활성을 보였고, 1.0% yeast extract, 1.0% peptone에 서도 82%의 비교적 높은 활성을 보였다. 그러나 질소원을 첨가하지 않은 실험구에서는 활성이 나타나지 않았다. 한편 밀기울로 탄소원과 질소원을 대체했을 경우 밀기울 2.5%, 5.0%, 7.5%, 10%를 첨가한 실험구중에서 5.0% 첨가한 실험구가 비교적 활성이 높았으나, 탄소원과 질소원을 첨가한 대조구에 비해서는 대체로 낮은 활성을 보였다 (Table 4).

(3) 염류의 농도

최적탄소원과 질소원이 함유된 기본배지에 염류의 농도를 달리하여 첨가하고 30°C에서 72시간 진탕배양하여 효소 활성을 비교검토했던 결과는 Table 5와 같다. 염을 첨가하지 않은 실험구와 NaCl을 단독으로 첨가한 실험구에서는 균의 생육이 없었으며, 효소활성은 0.2% K₂HPO₄, 0.05% MgSO₄

Table 3. Determination of yeast extract and peptone ratio for maximal CGTase production

Yeast extract(%) + peptone (%)		Relative activity (%)
0	0	0
0.25	0.25	50
0.5	0.5	54
0.75	0.75	74
1.0	1.0	82
0.75	0	60
0.75	0.25	70
0.75	0.5	100
0.75	1.0	94
0	0.75	75
0.25	0.75	70
0.5	0.75	74
1.0	0.75	76

B. brevis CD162 was cultured at 30°C for 72 hr in the medium containing 2.0% soluble starch, 0.1 K₂HPO₄, 0.02% MgSO₄ · 7H₂O, and 1.0% Na₂CO₃ with various concentration ratio of nitrogen sources at initial pH 10.0.

Table 4. Effect of wheat bran used as carbon and nitrogen source, on the CGTase production of *Bacillus brevis* CD162

Wheat bran concentration (%)	Relative activity (%)
0	0
2.5	50
5.0	86
7.5	70
10	60
SYB*	100

B. brevis CD162 was cultured at 30°C for 72 hr in the medium containing 0.1% K₂HPO₄, 0.02% MgSO₄ · 7H₂O, and 1.0% Na₂CO₃ with wheat bran of various concentrations and SYB at initial pH 10.0. SYB* was 2.0% soluble starch, 0.75% yeast extract, and 0.5% bacto peptone.

Table 5. Effect of inorganic salt sources on the CGTase production of *Bacillus brevis* CD162

Salt sources	Relative activity (%)
None	0
0.1% K ₂ HPO ₄ +0.02% MgSO ₄ · 7H ₂ O	85
0.2% K ₂ HPO ₄ +0.05% MgSO ₄ · 7H ₂ O	87
0.1% NaCl	0
0.2% NaCl	0
0.3% NaCl	0
0.5% Na ₂ CO ₃	80
0.5% Na ₂ CO ₃ +0.1% K ₂ HPO ₄ +0.02% MgSO ₄ · 7H ₂ O	85
0.5% Na ₂ CO ₃ +0.1% K ₂ HPO ₄ +0.05% MgSO ₄ · 7H ₂ O	90
0.5% Na ₂ CO ₃ +0.1% NaCl	75
0.5% Na ₂ CO ₃ +0.2% NaCl	74
0.5% Na ₂ CO ₃ +0.3% NaCl	70
1.0% Na ₂ CO ₃	65
1.0% Na ₂ CO ₃ +0.1% K ₂ HPO ₄ +0.02% MgSO ₄ · 7H ₂ O	72
1.0% Na ₂ CO ₃ +0.2% K ₂ HPO ₄ +0.05% MgSO ₄ · 7H ₂ O	100
1.0% Na ₂ CO ₃ +0.1% NaCl	74
1.0% Na ₂ CO ₃ +0.2% NaCl	67
1.0% Na ₂ CO ₃ +0.3% NaCl	65

B. brevis CD162 was cultured at 30°C for 72 hr in the medium containing 2.0% soluble starch, 0.75% yeast extract, and 0.5% bacto peptone with various concentrations of inorganic salt sources.

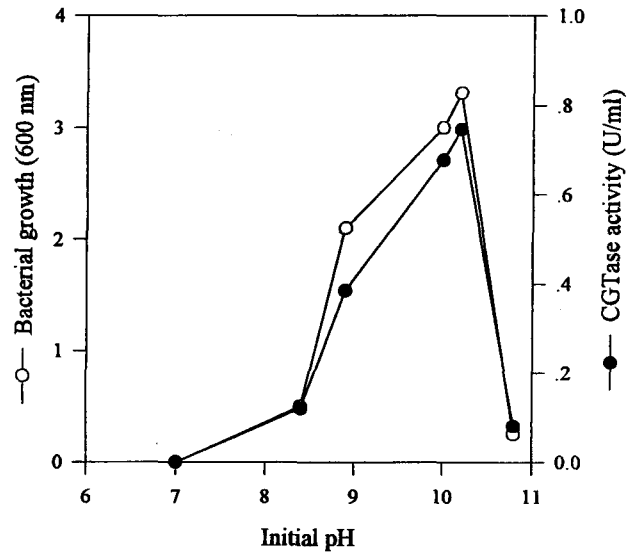


Fig. 4. Effects of initial pH on the CGTase production by *Bacillus brevis* CD162. *B. brevis* CD162 was cultured at 30°C for 72 hr in the medium containing 2.0% soluble starch, 0.75% yeast extract, 0.5% bacto peptone, 0.1% K₂HPO₄, 0.02% MgSO₄ · 7H₂O at various initial pHs.

· 7H₂O, 1.0% Na₂CO₃로 배합한 첨가구에서 가장 우수하게 나타났고, 0.1% K₂HPO₄, 0.05% MgSO₄ · 7H₂O, 0.5% Na₂CO₃ 첨가구에서는 90%의 활성을, 0.2% K₂HPO₄, 0.05% MgSO₄ · 7H₂O의 첨가구에서는 87%의 비교적 높은 활성을 보였다.

(4) 초기 pH, 배양온도 및 배양시간

배지의 초기 pH가 효소생산에 미치는 영향을 조사하기 위하여 Na₂CO₃를 제외한 기본배지에 Na₂CO₃의 첨가량을 달리하여 배양액의 pH를 7.0~10.8로 조정하고, 균을 접종하여 30°C에서 72시간 배양한 결과는 Fig. 4와 같다. pH

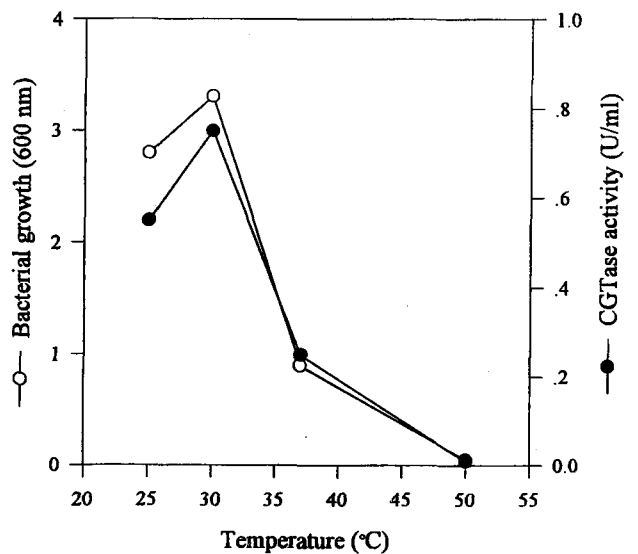


Fig. 5. Effects of temperature on the CGTase production by *B. brevis* CD162. *B. brevis* CD162 was cultured at various temperatures for 72 hr in the medium containing 2.0% soluble starch, 0.75% yeast extract, 0.5% bacto peptone, 0.2% K₂HPO₄, 0.05% MgSO₄ · 7H₂O, and 1.5% Na₂CO₃ at initial pH 10.2.

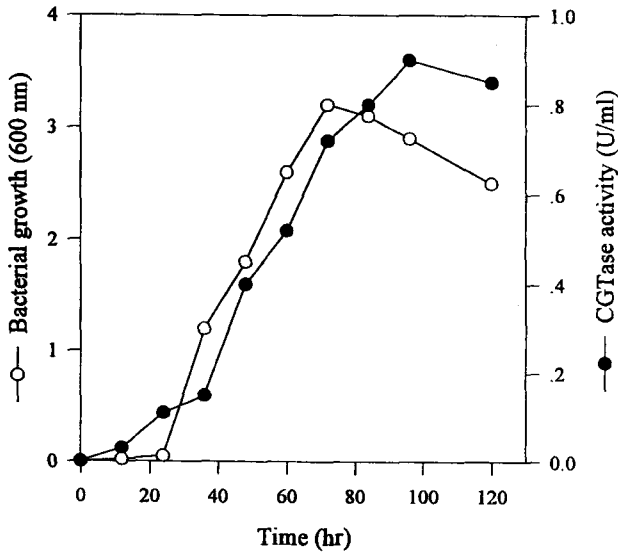


Fig. 6. Effects of incubation time on the CGTase production by *B. brevis* CD162. *B. brevis* CD162 was cultured at 30°C in the medium containing 2.0% soluble starch, 0.75% yeast extract, 0.5% bacto peptone, 0.2% K₂HPO₄, 0.05% MgSO₄ · 7H₂O, and 1.5% Na₂CO₃ at initial pH 10.2.

7에서는 균의 성장이 없었고, pH를 10.2로 하였을 때 균의 성장이 가장 좋았으며 또한 가장 우수한 활성을 나타냈다. 또한 pH 10.8에서는 활성이 매우 떨어지는 경향을 보였다. 초기 pH 7.5에서 pH 10.8까지 범위에서 본 미생물이 생육할 수 있다는 결과는 Nakamura¹²⁾의 호알카리성 *Bacillus* sp.가 pH 7.5~11의 범위에서 생육하고 pH 7.0 이하에서는 생육하지 않는다는 결과와 거의 일치한 결과이다.

배양온도에 따른 효소생산을 검토하기 위해 최적조성의 배지에 균을 접종하고, 25°C~50°C에서 72시간 배양한 결과는 Fig. 5와 같다. 효소생산에 효과적인 최적배양온도는 30°C로 나타났다. 또한 효소생산에 대한 배양시간을 검토한 결과, 30°C에서 24~120시간 배양하였을 때, 72시간부터 급격한 활성의 증가를 보였고, 96시간 배양시 가장 높은 효소생산 (0.9 unit/ml)을 보였다 (Fig. 6).

감사의 글

본 연구는 1994년도 한국학술진흥재단의 공모과제연구비에 의하여 수행되었으며 이에 감사를 드립니다.

참고문헌

- French, D., M. L. Levine, E. Norberg, P. Nordin, J. H. Pazur and G. M. Wild. (1954) Studies on the schardinger dextrins. VII. Co-substrate specificity in coupling reaction of *B. macerans* amylase. *J. Am. Chem. Soc.* **76**, 2387.
- Kitahata, S., S. Okada, and T. Fukui. (1978) Acceptor specificity of the transglycosylation catalyzed by cyclodextrin glycosyltransferase. *Agric. Biol. Chem.* **42**, 2369.
- Tilden, E. B. and C. S. Hudson. (1942) Preparation and

- properties of the amylases produced by *Bacillus macerans* and *Bacillus polymyxa*. *J. Bacteriol.* **34**, 527.
- Okada, S., N. Tsuyama and S. Kitahata. (1972) Amylase symposium. Japan. **7**, 61.
- Kitahata, S. and S. Okada. (1979) Abstracts of Papers. 44th Annual Meeting of Nippon Nogeikagakukai. 52.
- Kobayashi, S., K. Kainuma and S. Suzuki. (1978) Purification and some properties of *Bacillus macerans* cyclodextrin glycosyltransferase. *Carbohydr. Res.* **61**, 229.
- Pongsawasdi, P. and M. Yagisawa. (1988) Purification and some properties of cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus circulans*. *Agri. Biol. Chem.* **52**(5), 1099.
- Kitahata S. and S. Okada. (1974) Action of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus megaterium* strain No. 5 on starch. *Agric. Biol. Chem.* **3**, 2413.
- Kitahata S. and S. Okada. (1982) Purification and some properties of cyclodextrin glucotransferase from *Bacillus stearothermophilus* TC-60. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.* **9**, 7.
- Bender, H. (1977) Cyclodextrin glucanotransferase from *Klebsiella pneumoniae* M5al. *Arch. Microbiol.* **111**, 271.
- Akimura, K., T. Yagi and S. Yamamoto. (1991) Purification and properties of *Bacillus coagulans* cyclodextrin glycosyltransferase. *J. Ferment. Bioeng.* **71**, 322.
- Nakamura N. and K. Horikoshi. (1976) Characterization and some cultural conditions of a cyclodextrin glycosyltransferase-producing alkalophilic *Bacillus* sp.. *Agric. Biol. Chem.* **40**(4), 753.
- Nakamura, N. and K. Horikoshi. (1976) Purification and properties of cyclodextrin glycosyltransferase of an alkalophilic *Bacillus* sp.. *Agri. Biol. Chem.* **40**(5), 935.
- Nomoto, M., C. C. Chen and D. C. Sheu. (1986) Purification and characterization of cyclodextrin glucanotransferase from an alkalophilic bacterium of Taiwan. *Agri. Biol. Chem.* **50**(11), 2701.
- Mauri, M., P. Mattsson, M. E. Schinina and T. Korpela. (1988) Purification and properties of cyclomaltodextrin glucanotransferase from an alkalophilic *Bacillus*. *Biotech. Appl. Biochem.* **10**, 414.
- Kato, T., and K. Horikoshi. (1986) A new γ-cyclodextrin-forming enzyme produced by *Bacillus subtilis* No. 313. *Denpun Kagaku.* **33**(2), 137.
- Sin, K. A., A. Nakamura, K. Kobayashi, H. Masaki and T. Uozumi. (1991) Cloning and sequencing of cyclodextrin glucanotransferase gene from *Bacillus ohbensis* and its expression in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **35**, 600.
- Hill, D. E., R. Aldape, and J. D. Rozzell. (1990) Nucleotide sequence of a cyclodextrin glucosyltransferase gene, *cgtA*, from *Bacillus licheniformis*. *Nucleic acids Res.* **18**, 199.
- Kitamoto N., T. Kimura, Y. Kito and K. Ohmiya. (1992) Cloning and sequencing of the gene encoding cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus* sp. KC201. *J. Ferment. Bioeng.* **74**(6), 345.
- Yong, J. S., J. N. Choi, S. S. Park, C. S. Park, K. H. Park

- and Y. D. Choi. (1996) Secretion of heterologous CGTase of *Bacillus* sp. E1 from *E. coli*. *Biotechnol. Lett.* **18**(10), 1223.
21. Szejtli, J. (1990) The cyclodextrins and their applications in biotechnology. *Carbohydrate Polymers.* **12**, 375.
 22. Parrish, M. A. (1987) Cyclodextrin-a review. *Speciality Chemicals.* Dec., 369.
 23. Ito, K., K. Kikuchi, N. Okazaki and S. Kobayashi. (1988) Retention of aroma components in liquors with cyclodextrins. *Agric. Biol. Chem.* **52**(11), 2763.
 24. Kobayashi S., K. Nakashima and M. Arahira. (1991) Production and some properties of branched cyclodextrins. *Denpun Kagaku.* **38**(2), 197.
 25. Macfaddin, J. F. (1984) Biochemical tests for identification of medical bacteria. 2nd ed. Williams & Wilkins Co.
 26. Krieg, N. R. and J. G. Hat. (1984) Bergey's manual of systematic bacteriology. Williams & Wilkins Co.
 27. Cowan, S. T. Manual for the identification of medical bacteria. Cambridge university press. 8.
 28. Stages, C. E., and J. R. Davis. (1992) Automated systems for identification of microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* **5**, 302.

Isolation and Identification of γ -Cyclodextrin Glycosyltransferase-Producing Bacteria, and Its Production Conditions

Myung-Hee Kim, Cheon-Bae Sohn*, Young-Hee Lim,¹ Kyung-Sook Bae,² and Tae-Kwang Oh³ (*Department of Food & Nutrition, Chungnam National University, Taejon 301-764, Korea; ¹Department of Food & Human Nutrition, Taejon University, Taejon 300-716, Korea; ²Genetic Resources center, Korea Research Institute of Bioscience & Biotechnology, KIST, P.O.Box 115, Yuseong, Taejon, 305-600, Korea; ³Microbial Enzyme Research Unit, Korea Research Institute of Bioscience & Biotechnology, KIST, P.O.Box 115, Yuseong, Taejon, 305-600, Korea*)

Abstract : A cyclodextrin glycosyltransferase-producing bacterium was newly isolated from soil using alkaline pH medium containing 1% Na₂CO₃. The isolated strain was identified as *Bacillus brevis* by morphological and biochemical characteristics, and fatty acid composition and designated *Bacillus brevis* CD162. The strain showed the best enzyme production of 0.9 unit/ml after 96 hrs of culture at 30°C in a medium of 2.0% soluble starch, 0.75% yeast extract, 0.5% bacto peptone, 0.2% K₂HPO₄, 0.05% MgSO₄ · 7H₂O, and 1.5% Na₂CO₃ at initial pH 10.2.

Key words : Cyclodextrin glycoyltransferase, cyclodextrin-producing bacteria, cyclodextrin

*Corresponding author