

## Cyclodextrin Glucanotransferase를 이용한 아밀로펙틴 클러스터의 생산

이혜원 · 전해연 · 최혜정 · 심재훈

한림대학교 식품영양학과

### Enzymatic Production of Amylopectin Cluster Using Cyclodextrin Glucanotransferase

Hye-Won Lee, Hye-Yeon Jeon, Hyejeong Choi, and Jae-Hoon Shim

Department of Food Science and Nutrition, Hallym University

**ABSTRACT** To enzymatically prepare amylopectin cluster (APC), cyclodextrin glucanotransferase (CGTase I-5) and its mutant enzyme from alkalophilic *Bacillus* sp. I-5 were employed, after which the hydrolysis patterns of CGTase wild-type and its mutant enzyme toward amylopectin were investigated using multi-angle laser light scattering. CGTase wild-type dramatically reduced the molecular weight of waxy rice starch at the initial reaction, whereas the mutant enzyme degraded waxy rice starch relatively slowly. Based on the results, the molecular weight of one cluster of amylopectin could be about  $10^4 \sim 10^5$  g/mol. To determine production of cyclic glucans from amylopectin, matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry was performed. CGTase I-5 produced various types of cyclic maltooligosaccharides from amylopectin, whereas the mutant enzyme hardly produced any.

**Key words:** cyclodextrin glucanotransferase, amylopectin cluster, amylopectin, starch, hydrolysis

## 서 론

전분은 일반적으로 고등식물의 세포에 존재하는 결정형의 물질로 일종의 저장성 탄수화물이며 쌀, 보리, 밀 등의 곡류와 감자, 고구마 등 서류의 주성분으로 동·식물의 주요 에너지원이다(1,2). 전분은 다수의 포도당 분자가  $\alpha$ -1,4 또는  $\alpha$ -1,6의 glycosidic linkage를 형성하는 천연 고분자 물질로써  $\alpha$ -1,4 결합에 의해 연결된 직쇄의 중간 중간에 다른 포도당 분자가  $\alpha$ -1,6 결합의 가치를 지닌 아밀로펙틴과  $\alpha$ -1,4 결합으로  $\alpha$ -helical form의 입체구조를 지닌 아밀로오스로 나뉜다. 이 중 아밀로펙틴은 24~30개의 포도당 unit마다  $\alpha$ -1,6 결합을 지니며 이로 인해 아밀로오스에 비하여 물에 비교적 잘 녹으며 상대적으로 많은 비환원성 말단 부위를 지니게 되어 소화효소의 작용에 유리하다(2). 전분 입자의 크기는 전분이 유래하는 식물의 종에 따라 다르며 형태 또한 원형, 타원형, 렌즈형, 다각형 등으로 식물의 종류에 따라 다양하다. 하지만 대부분의 전분은 결정화 구조에서 결정성 층과 무정형 층을 나타내며 아밀로펙틴은 클러스터 단위체 형태로 결정성 층에 밀집되어 존재한다(3).

비록 전분이 생명체의 주 에너지원이며 인간 역시 탄수화

물을 주된 영양원으로 하고 있으나 과도한 탄수화물 섭취는 비만과 당뇨를 야기한다(4,5). 이러한 문제점들은 섭취하는 탄수화물의 구조를 변형함으로써 소화속도를 늦추고 혈당의 급격한 증가를 억제함으로써 개선될 수 있다(6). 따라서 많은 연구가 전분의 구조를 물리적, 화학적 그리고 효소적 방법을 활용하여 진행되어 왔으며 이 중 효소적 방법은 물리적, 화학적인 방법에 비하여 공정상 부담이 적으며 에너지 소모가 적고 구조를 특이적으로 조절할 수 있는 장점이 있다(6,7).

최근까지 전분의 구조를 변형하기 위한 많은 효소적 방법이 시도되었으며 그 대표적인 예로는 4- $\alpha$ -glucanotransferase(4- $\alpha$ -GTase), maltogenic amylase(MAase), branching enzyme(BE), cyclodextrin glucanotransferase(CGTase) 등이 있다(1,6-10). 이들 연구의 대부분은 전분 관련 식품에 탄수화물 관련 효소를 첨가하여 빵, 떡 등 완제품의 전분 노화를 억제하거나 물성을 개선시키는 연구들이었다. 흥미롭게도 이 중 Lee 등(6)의 연구는 4- $\alpha$ -GTase를 이용하여 저분자의 아밀로펙틴 클러스터를 생산하고 이를 지소화성 기능성 탄수화물 소재로 개발한 바 있다.

CGTase는 4- $\alpha$ -GTase와는 달리 세포 외 분비 효소이며, starch binding domain을 지니고 있어 효소의 발현 및 정제가 용이하고 *Bacillus subtilis* 등의 GRAS(generally regarded as safe) 균주에서 생산되어 산업적 활용도가 높은 효소이다. 일반적으로 CGTase는 cyclization activity를 지니므로 전분으로부터 cyclodextrin 생산에 사용되고 있

Received 21 April 2014; Accepted 5 June 2014

Corresponding author: Jae-Hoon Shim, Department of Food Science and Nutrition, Hallym University, Chuncheon, Gangwon 200-702, Korea  
E-mail: jhshim@hallym.ac.kr, Phone: +82-33-248-2137

으나, 분자 진화적 기술을 활용하여 전분 노화 억제효소 및 제빵효모 개발에 활용된 바 있다(8-10). 본 연구에서는 선행연구에서 얻어진 CGTase와 이의 mutant를 이용하여 효과적인 아밀로펙틴 클러스터를 생산하는 방법을 개발하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 재료

본 실험에 사용한 Bacto-tryptone, yeast extract, NaCl은 BD(Sparks, MD, USA), soluble starch는 Showa(Tokyo, Japan)를 사용하였고, rice starch 유래의 amylopectin 및 각종 시약은 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)를 사용하였다.

### 효소의 생산 및 정제 방법

CGTase wild-type과 CGTase mutant는 각각 선행연구에서 얻은 유전자(pR<sub>2</sub>CGT1-5와 pR<sub>2</sub>CGT3-18)를 이용하여 발현하였다(9). 각각의 유전자는 CaCl<sub>2</sub> 처리된 *E. coli* MC1061 competent cell[F<sup>±</sup>, *araD139*, *recA13*, D(*ara-ABC*leu) 7696, *galU*, *galK*, *DlacX74*, *rpsL*, *thi*, *hsdR2*, *mcxB*]에 형질전환 하였다. 형질전환 된 균주는 kanamycin이 selection marker로 들어있는 2 L의 LB 배지[1%(w/v) Bacto-tryptone, 0.5%(w/v) yeast extract, 1%(w/v) NaCl]에서 24시간 shaking incubator(37°C, 200 rpm)를 이용하여 각각 배양하였고 원심분리기(7,000×g, 10 min, 4°C)를 이용하여 균체를 회수하였다. 회수된 균체는 50 mM의 sodium acetate buffer(pH 6.0)에 resuspension 한 뒤 초음파분쇄기(VC-600, Sonics & Materials Inc., Newtown, CT, USA; output 4~5 min×3 times, 60% duty)를 이용하여 파쇄하였다. 세포 파쇄 후 원심분리기(9,000×g, 20 min, 4°C)를 이용하여 soluble 한 crude enzyme를 얻었고 이를 다시 β-CD column chromatography를 이용하여 정제하였다(11). 단백질 농도는 Bradford법을 이용하여 측정하였고(12), 정제된 효소는 10%의 sodium-dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)를 통하여 확인하였다(13).

### 효소의 역가 측정법

CGTase wild-type과 mutant의 역가 측정을 위하여 DNS(3,5-dinitrosalicylic acid) 환원당 정량법을 사용하였다(14). 1% soluble starch를 sodium acetate buffer(50 mM, pH 6.0)에 녹여 효소액과 1:1(v/v) 비율로 반응하였다. 효소가 들어가지 않은 용액을 대조구로 하여 반응을 비교하였고, 10분간 반응 후 3배의 DNS 용액(3,5-dinitrosalicylic acid 10.6 g, NaOH 19.8 g, Na, K-tartrate 306 g, phenol 7.6 mL, Na-metabisulfite 8.3 g, 증류수 1,416 mL)을 넣어 반응을 정지시킨 후 5분간 끓여 발색하였다. 570 nm에서

흡광도를 측정하였으며 포도당 용액을 이용하여 표준곡선을 잡았다. 1 unit(U)은 1분간 1 μmol의 glycosidic bond를 가수분해하는 효소의 양으로 정의하였다.

### 아밀로펙틴 클러스터 제조

아밀로펙틴 클러스터의 제조 방법은 Lee 등(6)의 방법을 따랐다. 200 mL의 5% waxy rice starch를 50 mM sodium phosphate buffer(pH 6.0)에 넣고 100°C에서 1시간 동안 호화시켰다. 호화전분을 냉각 후 100 U(1 g 기질당 10 unit)의 효소를 넣어 각 효소의 최적온도에서 반응하였다. 생산된 아밀로펙틴 클러스터를 회수하기 위하여 반응액 2배 부피의 ethanol을 첨가하여 침전시킨 후 침전된 물질을 원심분리기(7,000×g, 20 min, 4°C)로 회수 후 건조하였다.

### SEC-MALLS-RI 분석법

효소적 처리된 아밀로펙틴의 평균 분자량을 측정하기 위하여 MALLS(multiangle laser light scattering, Dawn DSP, Wyatt Technology, Santa Barbara, CA, USA)를 이용하였고, 이때 size-exclusion chromatography(SEC)와 refractive index(RI) detector(Waters 410, Waters Co., Milford, MA, USA)를 활용하였다. SUGAR KS-804와 KS-806 columns(8×300 mm; Shodex, Kawasaki, Japan)을 연결하여 상온에서 분석하였으며 이동상(0.15 M NaNO<sub>3</sub>, 0.02% NaN<sub>3</sub>)은 0.4 mL/min의 속도로 이동하였다. 분석시료는 이동상에 녹인 후 autoclave(121°C, 20 min)를 이용하여 호화시켰다. 시료의 평균 분자량은 ASTRA(ver. 4.90.07, Wyatt Technology) 프로그램에서 Berry extrapolation법으로 계산하였고 dn/dc 값은 0.146 mL/g으로 하였다(6,7).

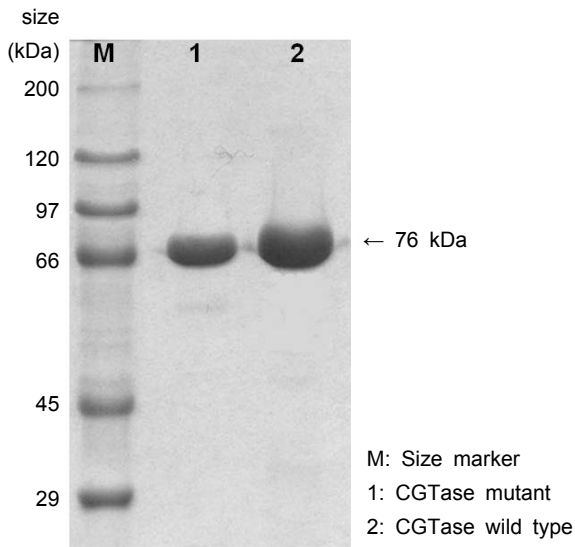
### MALDI-TOF 분석법

시료의 분자량 측정을 위하여 MALDI-TOF MS(Voyager TM-DE Perceptive Biosystems, Framingham, MA, USA)를 사용하였고, 분석은 linear mode에서 수행하였다. 7 mg/mL 시료를 2,5-dihydroxybenzoic acid(1 mg/mL)가 포함된 acetonitrile 용액과 동일한 비율로 혼합하여 2 μL 가량 stainless still plate에 loading 후 건조시켜 분석을 수행하였다(15).

## 결과 및 고찰

### 제조합 CGTase wild-type 및 CGTase mutant 효소의 발현 및 정제

아밀로펙틴 클러스터 제조를 위한 효소를 생산하기 위하여 선행연구에서 개발된 CGTase wild-type과 mutant 효소를 coding 하는 유전자를 *E. coli*에 형질전환 후 발현하였다(9). 발현된 단백질을 β-CD column을 사용하여 정제한 결과 고순도의 제조합 효소를 얻었다(Fig. 1). 정제된 두 종

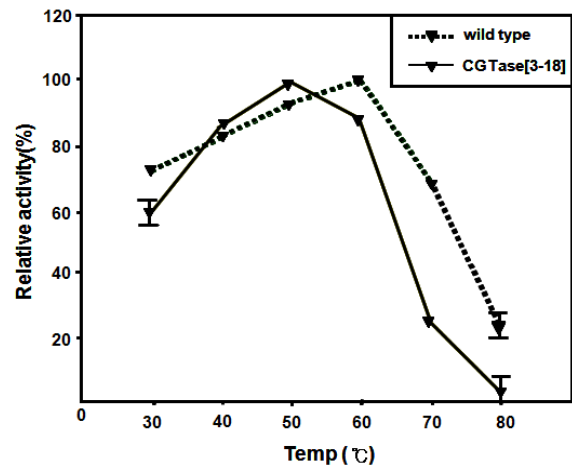


**Fig. 1.** SDS-PAGE analysis of CGTase wild-type and CGTase mutant. Lane M, size marker; lane 1, CGTase wild-type; lane 2, CGTase mutant.

류의 효소를 DNS 환원당 정량을 통하여 각각의 역가를 확인하였고 단백질 정량을 통하여 각각의 효소의 specific activity와 정제수율을 확인하였다(Table 1). 정제 table에서 보이는 바와 같이 2 L 배양에서 CGTase wild-type의 경우 15.1 mg의 효소를 얻었으며 mutant는 이보다 다소 적은 양(12.7 mg)이었다. Mutant 효소가 적은 양임에도 불구하고 현저히 높은 total activity(800.3 U)를 보이는 것은 선행 연구에서 개발한 CGTase mutant가 3개의 mutation site (M234T, F259I, V591A)를 지니며 이로 인하여 가수분해 능력이 현저히 높아졌기 때문이다(9). 실제로 두 효소의 mg당 역가를 나타내는 specific activity는 wild-type과 mutant 효소가 각각 4.1 U/mg과 62.9 U/mg이었다. 이는 CGTase mutant가 동일한 조건의 실험에서 wild-type에 비하여 15 배가량 적은 양을 사용하여도 유사한 가수분해능을 지님을 의미한다.

#### 효소의 temperature profile 분석

발현된 두 효소의 최적온도를 확인하고자 30~80°C 범위의 다양한 온도에서 효소들의 가수분해능이 측정되었다. 두 효소의 temperature profile은 아밀로펙틴 클러스터의 효율적인 생산뿐 아니라 제조공정 시 효소반응의 조절을 위하여 매우 중요한 정보를 제공한다. Fig. 2와 같이 CGTase



**Fig. 2.** Temperature profiles of CGTase wild-type and CGTase mutant.

wild-type과 mutant 효소는 각각 60°C와 50°C에서 최적의 반응온도를 나타내며 40~60°C 범위에서 80%의 활성을 보임을 알 수 있다. 선행연구에서 얻은 CGTase mutant가 wild-type에 비하여 다소 낮은 최적온도를 지니는 것은 mutation에 의하여 효소의 열안정성이 다소 낮아진 것으로 생각된다.

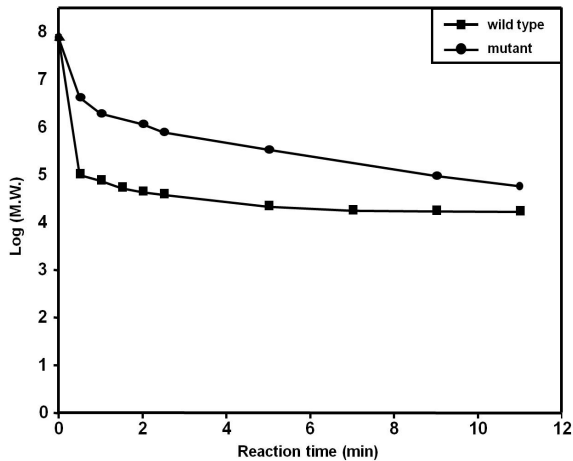
Lee 등(6)의 연구에서 고분자 아밀로펙틴 클러스터 제조 시 아밀로펙틴 클러스터의 고분자화를 위하여 아밀로펙틴 클러스터에 바실러스 유래 maltogenic amylase(BSMA)를 사용하였는데(6), 이때 사용한 BSMA의 최적 조건(pH 6.0, 60°C)과 본 실험에서 사용하는 CGTase 및 CGTase mutant의 조건이 매우 유사하므로 차후 두 효소를 동시에 처리하여 클러스터 제조공정과 고분자화 공정을 단일화할 수 있는 장점이 있다. 또한 Fig. 2에 나타난 바와 같이 CGTase mutant 효소의 경우 80°C에서 역가를 거의 상실하므로 아밀로펙틴 클러스터 생산 시 발생할 수 있는 과도한 가수분해 반응을 산/염기 첨가 없이 열처리로 제어할 수 있다.

#### 아밀로펙틴 클러스터의 생산 및 반응 산물의 평균 분자량 분석

호화된 waxy rice starch에 CGTase wild-type과 mutant 효소를 각각 반응시켜 반응시간 동안 시료의 평균 분자량의 변화를 살펴보았다. 불투명하던 시료는 2분 이후 투명하게 변하는 것을 육안으로 관찰할 수 있었으며 점도도 낮아짐을 확인하였다(data not shown). 구체적인 관찰을 위하여

**Table 1.** Purification of CGTase I-5 and CGTase mutant

Enzymes	Purification step	Total volume (mL)	Total activity (U)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Yield (%)	Purification fold
CGTase I-5	Cell extract	190	232.6	290.8	0.8	100	1.0
	$\beta$ -CD affinity column	16	61.9	15.1	4.1	26.6	5.1
CGTase mutant	Cell extract	190	4,396	472.0	9.3	100	1.0
	$\beta$ -CD affinity column	12	800.3	12.7	62.9	18.2	6.8



**Fig. 3.** Change in molecular weight (g/mol) of waxy rice starch treated with enzymes.

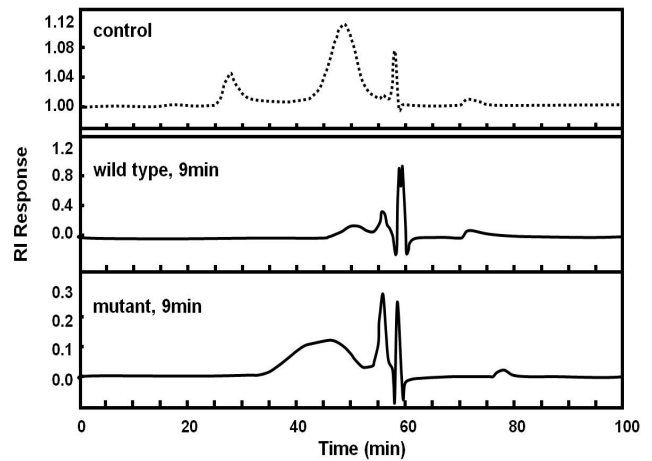
시료를 시간대별로 sampling 하여 100°C에서 5분간 처리하여 효소반응을 정지하였고 각각의 시료를 SEC-MALLS-RI 분석법으로 평균 분자량을 확인하였다(Table 2). 효소반응 전 waxy rice starch의 평균 분자량은 약  $10^8$  Da이었으나, 5분가량의 효소반응으로 두 반응 모두 평균 분자량은  $10^4 \sim 10^5$  Da으로 급격히 감소하였음을 알 수 있었고 5분 이후의 반응에서는 분자량의 감소 진행이 현저히 줄었다(Fig. 3). 흥미롭게도 급격한 분자량의 감소에도 불구하고 DNS법을 이용한 시료의 환원성 말단의 생성량도 낮았으며(100  $\mu$ mol 미만) MALLS graph 상에서도 거대분자의 peak 이동은 확인되었으나 소당류의 증가는 미미하였다(Fig. 4). 이는 효소의 가수분해 반응이 아밀로펙틴의 클러스터 단위로 작용하였으며, 클러스터 가수분해 이후 반응이 매우 더디게 일어났음을 의미한다.

#### 효소반응 저분자 물질 분석

재료 및 방법에서 언급한 바와 같이 DNS법을 사용한 가수분해 역가 기준으로 동일한 unit의 효소를 사용하였음에도 불구하고 CGTase wild-type과 mutant 효소의 waxy rice starch에 대한 반응 양상에는 차이가 있었다. Wild-type의 경우 mutant에 비하여 시료의 평균 분자량 감소가 상대적으로 빠르게 진행되었음을 알 수 있다(Table 2). 따라

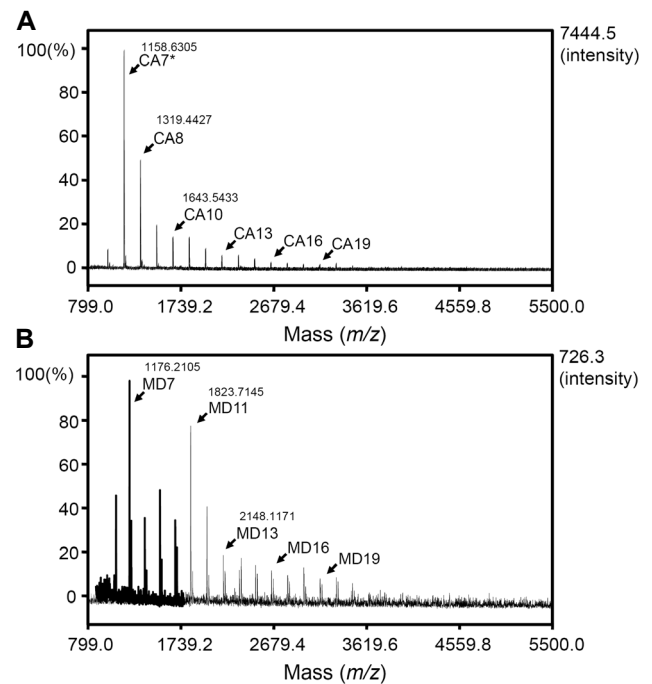
**Table 2.** SEC-MALLS analysis of amylopectin treated with enzymes

Reaction time (min)	Molecular weight of amylopectin (g/mol)	
	CGTase wild type	CGTase mutant
0.0	$7.6 \times 10^7$	$7.6 \times 10^7$
0.5	$1.0 \times 10^5$	$4.2 \times 10^6$
1.0	$7.5 \times 10^4$	$1.9 \times 10^6$
2.0	$4.3 \times 10^4$	$1.2 \times 10^6$
2.5	$3.8 \times 10^4$	$7.8 \times 10^5$
5.0	$2.1 \times 10^4$	$3.4 \times 10^5$
9.0	$1.8 \times 10^4$	$9.5 \times 10^4$
11.0	$1.7 \times 10^4$	$5.8 \times 10^4$



**Fig. 4.** SEC-MALLS-RI chromatogram of the CGTase and CGTase mutant treated waxy rice starch.

서 보다 명확한 설명과 반응액의 정확한 분석을 위하여 효소반응 후 생성된 저분자 물질들에 대하여 MALDI-TOF/MS 분석을 수행하였다. CGTase wild-type과 mutant 효소반응액을 MALDI-TOF/MS 분석한 결과 wild-type에서는  $m/z$  1158( $M + Na^+$ ), 1319, 1643 등 다양한 종류의 cyclic 형태의 cyclodextrin 및 cycloamylose들의 이온형에 대응하는 peak들이 검출되었으며, mutant 처리구에서는 linear 형태의 maltodextrin이 검출되었다(Fig. 5). 선행연구에서 CGTase mutant는 cyclodextrin(CD)을 생산하는 cyclization activity가 크게 감소하였는데, 이로 인하여 본 실험



**Fig. 5.** MALDI-TOF MS analysis of reaction mixture produced by CGTase wild-type (A) and CGTase mutant (B). CA, cycloamylose; MD, maltodextrin; \*Numbers mean degree of polymerization.

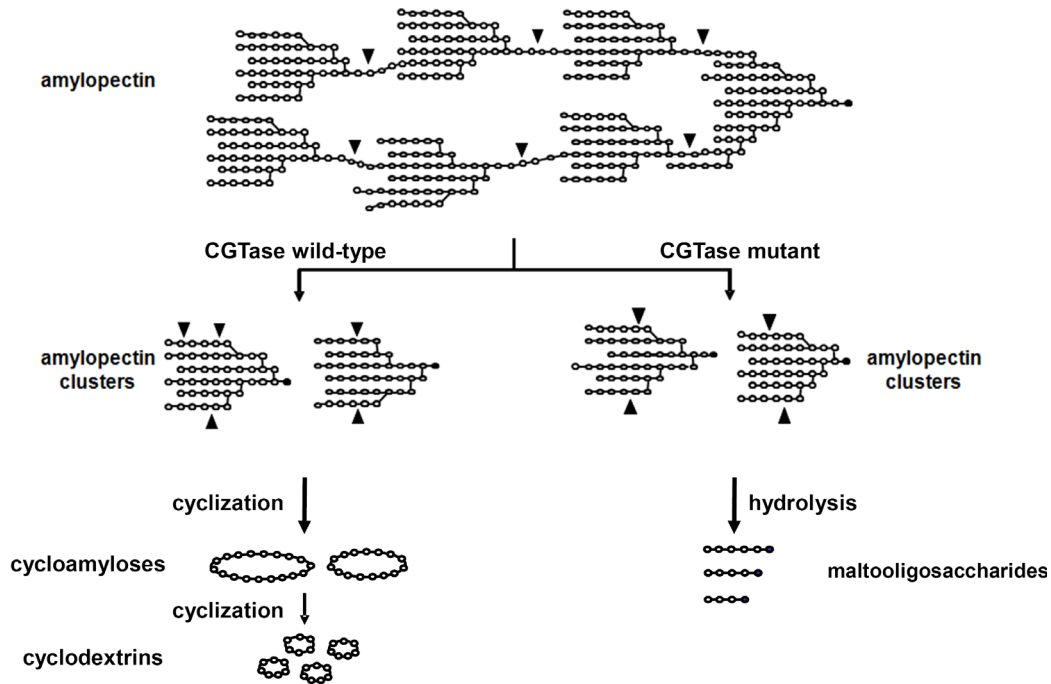


Fig. 6. Hydrolysis patterns of CGTase and CGTase mutant toward amylopectin.

에서도 cyclic 한 형태의 maltodextrin을 생산하지 않고 환원성 말단을 지닌 linear 형태의 maltooligosaccharide들을 생산한 것으로 생각된다(Fig. 6). 반면 wild-type은 환원성 말단이 없는 형태의 cyclic form의 maltooligosaccharide들을 주로 생산하여 환원당 정량인 DNS 역가 측정에 검출되지 않아 CGTase wild-type이 전분기질에 대하여 상대적으로 약하게 작용하는 것과 같은 현상을 나타낸다. 그러므로 본 실험에서 CGTase wild-type 효소가 다소 높은 반응속도를 보이는 것처럼 나타났으나, 효소량을 기준으로 CGTase mutant가 wild-type에 비해 15배가량 적은 양을 사용하여 비슷한 수준의 결과를 보였으므로 더욱 경쟁력 있는 것으로 생각된다. 또한 유럽연합 국가들에서는 cyclodextrin이 식품의 첨가물로 인정되지 않으므로(9) CGTase mutant를 사용하는 것이 바람직하다.

기존연구에서는 아밀로펙틴 클러스터 생산을 위하여 4- $\alpha$ -GTase를 사용하였으며, 이때 사용되는 효소의 양은 일반 CGTase의 10배 이상이며 반응시간도 1시간 이상이 소요된다(6,7). 본 연구에서는 분자량별로 다양한 식품 소재가 될 수 있는 아밀로펙틴 클러스터의 효율적인 생산법을 제시하였고 이 결과들은 식품 및 전분 소재 산업에서 기초자료로 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

## 요 약

선행연구에서 얻은 alkalophilic *Bacillus* I-5 유래의 CGTase wild-type과 가수분해능이 강화된 mutant 효소를 활용하여 waxy rice starch로부터 아밀로펙틴 클러스터를 제조하

였다. SEC-MALLS-RI 분석법으로 CGTase wild-type과 mutant 효소가 처리된 시료의 평균 분자량을 확인한 결과 10분가량의 효소반응으로 두 반응 모두 평균 분자량은  $10^4 \sim 10^5$  Da으로 급격히 감소하였음을 확인하였으며, 일정 반응 시간이 경과한 이후에는 더 이상 분자량의 감소가 일어나지 않음으로 미루어 시료가 아밀로펙틴 클러스터 단위로 분해되었으며 그 분자량은  $10^4 \sim 10^5$  Da 정도임을 알 수 있다. 또한 MALDI-TOF/MS 분석을 통하여 CGTase wild-type은 다양한 종류의 cyclic 형태의 maltodextrin을 생성하고 있으며 mutant 효소는 주로 소량의 maltooligosaccharide들을 생산함을 확인하였다.

## 감사의 글

본 연구는 중소기업청 산학연도약기술개발사업(C0123302) 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## REFERENCES

1. Park JH, Kim HJ, Kim YH, Cha HJ, Kim YW, Kim TJ, Kim YR, Park KH. 2007. The action mode of *Thermus aquaticus* YT-1 4- $\alpha$ -glucanotransferase and its chimeric enzymes introduced with starch-binding domain on amylose and amylopectin. *Carbohydr Polym* 67: 164-173.
2. Kim BK, Kim HI, Moon TW, Choi SJ. 2014. Branch chain elongation by amylsucrase: production of waxy corn starch with a slow digestion property. *Food Chem* 152: 113-120.
3. Myers AM, Morell MK, James MG, Ball SG. 2000. Recent progress toward understanding biosynthesis of the amylopectin crystal. *Plant Physiol* 122: 989-998.

4. Grundy SM. 1998. Multifactorial causation of obesity: implications for prevention. *Am J Clin Nutr* 67: 563S-572S.
5. Abbott WG, Swinburn B, Ruotolo G, Hara H, Patti L, Harper I, Grundy SM, Howard BV. 1990. Effect of a high-carbohydrate, low-saturated-fat diet on apolipoprotein B and triglyceride metabolism in Pima Indians. *J Clin Invest* 86: 642-650.
6. Lee CK, Le QT, Kim YH, Shim JH, Lee SJ, Park JH, Lee KP, Song SH, Auh JH, Lee SJ, Park KH. 2008. Enzymatic synthesis and properties of highly branched rice starch amylose and amylopectin cluster. *J Agric Food Chem* 56: 126-131.
7. Seo NS, Roh SA, Auh JH, Park JH, Kim YR, Park KH. 2007. Structural characterization of rice starch in rice cake modified by *Thermus scotoductus* 4- $\alpha$ -glucanotransferase (TS $\alpha$ GTase). *J Food Sci* 72: C331-C336.
8. Shim JH, Seo NS, Roh SA, Kim JW, Cha HJ, Park KH. 2007. Improved bread-baking process using *Saccharomyces cerevisiae* displayed with engineered cyclodextrin glucanotransferase. *J Agric Food Chem* 55: 4735-4740.
9. Shim JH, Kim YW, Kim TJ, Chae HY, Park JH, Cha HJ, Kim JW, Kim YR, Schaefer T, Spender T, Moon TW, Park KH. 2004. Improvement of cyclodextrin glucanotransferase as an antistaling enzyme by error-prone PCR. *Protein Eng Des Sel* 17: 205-211.
10. Lee SH, Kim YW, Lee SY, Auh JH, Yoo SS, Kim TJ, Kim JW, Kim ST, Rho HJ, Choi JH, Kim YB, Park KH. 2002. Modulation of cyclizing activity and thermostability of cyclodextrin glucanotransferase and its application as an antistaling enzyme. *J Agric Food Chem* 50: 1411-1415.
11. Chung HJ, Yoon SH, Lee MJ, Kim MJ, Kweon KS, Lee IW, Kim JW, Oh BH, Lee HS, Spiridonova VA, Park KH. 1998. Characterization of a thermostable cyclodextrin glucanotransferase isolated from *Bacillus stearothermophilus* ET1. *J Agric Food Chem* 46: 952-959.
12. Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
13. Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
14. Miller GL. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination by reducing sugar. *Anal Chem* 31: 426-428.
15. Yong HW, Kim SM, Shim JH. 2012. Enzymatic production of alkyl  $\beta$ -glucoside based on transglycosylation activity of celluclast. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41: 1417-1422.