

## Bacillus sp. E10이 생성하는 Cyclodextrin Glucanotransferase의 정제 및 특성

박천석 · 우의전 · 국승욱 · 서병철 · 박관화\* · 임 훈<sup>1</sup>

서울대학교 농과대학 식품공학과 농업생물신소재연구센터, <sup>1</sup>미원식품(주) 기술연구소

### Purification and Characterization of Cyclodextrin Glucanotransferase from *Bacillus* sp. E1

Park, Cheon-Seok, Eui-Jeon Woo, Seung-Uk Kuk  
Byung-Cheol Seo, Kwan-Hwa Park\* and Hoon Lim<sup>1</sup>

Department of Food Science and Technology and Research Center for New Bio-materials  
in Agriculture, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea

<sup>1</sup>Miwon Foods Co., R&D Div., Seoul 157-200, Korea

**Abstract** — *Bacillus* sp. was isolated from soil for its strong activity of cyclodextrin glucanotransferase (CGTase, EC 2.4.1.19). The enzyme was purified by gel filtration and anion exchange column chromatography using FPLC. The purified enzyme exhibited its maximum CGTase activity in the pH range of 6~8 and the temperature range of 50~70°C. The molecular weight was estimated as 114,000 by SDS-PAGE. The isoelectric point of the enzyme was 4.3. The CGTase of *Bacillus* sp. E1 produced  $\beta$ -cyclodextrin mainly and did not produce  $\alpha$ -cyclodextrin. The product ratio of  $\beta$ -cyclodextrin to  $\gamma$ -cyclodextrin was 7:1.

Cyclodextrin glucanotransferase(EC 2.4.1.19, CGTase)는 전분이나 아밀로스, 아밀로펙틴, 말토올리고당을 분해하여 glucose 단위가 6~8로 이루어진 왕관형 환상 복합체인 cyclodextrin을 생성하는 효소이다(1). 이 물질은 소수성의 유기화합물을 분자내 동공에 취하여 포접화합물을 형성하는 특성(2)을 갖기 때문에 휘발성 화합물을 포집하여 불휘발성화하거나, 산화 및 광분해성 물질의 안정화, 반응성의 변화기능, 유효기능 등을 갖고 있기 때문에 식품, 의약품, 농약, 화장품 등의 산업에서 이용성이 증가하고 있다(3).

CGTase를 분리하는 미생물로는 *Bacillus macerans* (5), *B. circulans*(6), *B. ohbensis*(7), *B. megaterium* (8), *B. amyloliquefaciens*(9), *B. stearothermophilus* (10), *Bacillus* sp.(*alkalophilic*)(11-14) 등의 *Bacillus* 계통과 *Klebsiella pneumoniae*(15) 등이 밝혀져 있다. *B. macerans*는  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -cyclodextrin의 생성비율이

2.7 : 1 : 1로서  $\alpha$ -cyclodextrin을 주로 생성하며 *B. megaterium*의 경우는 1 : 2.4 : 1로  $\beta$ -cyclodextrin을 다량 생성하는 것으로 알려져 있다. 또한 *Bacillus* sp. (*alkalophilic*)의 경우 한 균주에서 acidic, neutral, alkaline CGTase의 세가지 효소가 동시에 분비되고 cyclodextrin의 생성량도 1 : 11.5 : 1.5로  $\beta$ -cyclodextrin의 생성이 우수한 것으로 보고되었다(3). 이 이외에도 CGTase에 관한 연구가 활발하여 CGTase를 생성하는 호알칼리성 균주로서 유 등(16)의 *Bacillus* sp., 이 등(17)의 *B. circulans*와 양 등(18)에 의해 내열성 CGTase를 분리하는 *B. stearothermophilus* 등이 보고되어 있다.

$\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -cyclodextrin은 각각의 동공크기와 용해도의 차이로 인하여 그 이용성에 차이가 있다(3). 특히  $\beta$ -cyclodextrin의 경우 포접 화합물이 쉽게 형성되고, 물에 대한 용해도가 낮아 분리가 쉬운 이유로 인해서 공업적인 효용성이 크게 증가하고 있다(4). 또한 기존의 CGTase 생성균주로부터 생산되는 cyclodextrin의 경우  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -cyclodextrin이 동시에 혼

**Key words:** Cyclodextrin glucanotransferase, phenolphthalein

\*Corresponding author

함되어 생산되기 때문에 특정 cyclodextrin을 순수하게 얻기 위해서는 복잡한 정제과정이 필수적이다(3). 그러므로 단일 cyclodextrin을 생산할 수 있는 CGTase를 분리하는 미생물의 분리가 중요하다고 볼 수 있다.

따라서 본 연구에서는 우리나라 토양으로부터  $\beta$ -cyclodextrin의 생산력이 우수한 균주를 분리하고 이 균주가 생산하는 CGTase를 정제하여 그 특성을 살펴보았다.

## 재료 및 방법

### CGTase 생성균의 선별 및 배양

균주선발은 수원, 목포, 용인, 김포 등 경기도, 충청도, 전라도일원의 토양을 살균수에 적당히 희석시켜서 cyclodextrin 생성효소 선별배지(19)에 도말한 후, 37°C에서 2일간 배양하여 노란색 환을 보이는 균들을 1차 선별하였다. 일차 선별된 균주들을 액체 배양하여 CGTase 역가를 측정된 후 가장 우수한 균을 최종 선별하였다. 효소 생산용 배지로는 Horikoshi의 alkaline medium II(2)를 사용하였고, 배양은 shaking incubator에서 37°C로 2~3일간 하였다. 균주의 동정은 "Alkalophilic Microorganisms"(3)과 "Manual of Systematic Bacteriology"에 제시된 방법에 따라 행하였다.

### 효소의 역가 측정방법

CGTase 역가 측정방법은 Kaneko(20)에 의해 제안된 phenolphthalein법을 사용하였으며, 기질로는 4% soluble starch를 0.05 M phosphate buffer(pH 6.5)에 녹여 사용하였고, 효소액 0.1 ml를 첨가한 후 50°C에서 10분간 반응시켰다. 30 mM NaOH 3.5 ml를 첨가하여 반응을 중지시키고 0.02% phenolphthalein 용액(5 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 용액에 녹인 것) 0.5 ml를 가한 후 550 nm에서 흡광도를 측정하여 감소되는 정도를 cyclodextrin으로 환산한 후 효소역가를 정하였다. 효소역가 1 unit는 1분당 1 mg의 cyclodextrin을 생성하는 것으로 정하였다.

### 분자량과 등전점의 측정

정제된 CGTase의 분자량과 등전점은 Phast system(pharmacia)를 사용하였다. 사용한 gel은 분자량

의 경우 PhastGel(Gradient 8~25)을, 등전점의 경우 PhastGel(IEF 4~6.5)을 사용하였다. 분자량측정의 경우  $\alpha$ -lactalbumin(MW 14,400), soy bean trypsin inhibitor(MW 20,100), carbonic anhydrase(MW 30,000), ovalbumin(MW 43,000), bovine serum albumin(MW 67,000), phosphorylase(MW 94,000) 등을 표준단백질로 사용하였다.

### Cyclodextrin의 분석 및 정량

Cyclodextrin의 분석은 HPLC(Pye Unicam)를 사용하였으며, column은 nucleosil 10-NH<sub>2</sub>(4.6×300 mm), 용매는 acetonitrile과 water를 65:35(v/v)로 섞어 flow rate를 1.0 ml/min로 하였다. 검출기는 refractive index detector(Pye Unicam PU 4023)를 사용하였다.

### 균주의 배양 및 acetone 분획

5l 발효조에서 배양액을 2l로 하여 통기량 2.0 vvm, 온도 37°C, 교반속도 280 rpm, 초기 pH 10.9에서 3일간 배양하였다. 배양액을 원심분리하여 상등액에 -20°C에서 냉각된 3배의 acetone을 가하고 4°C에서 약 16시간 방치한 후 Whatmann filter paper No.1으로 여과하여 얻은 침전물을 50 mM phosphate buffer(pH 6.5)에 녹인 후 농축하여 조효소액으로 하였다.

### Fast Protein Liquid Chromatography(FPLC)를 이용한 효소의 정제

0.1 M NaCl을 포함한 20 mM phosphate buffer(pH 6.0)로 미리 평형시켜 둔 Superose 12 gel column(Superose 12 HR 10/30, Pharmacia)에 조효소액을 400  $\mu$ l loading하여 gel filtration을 행하였다. 1.0 ml/min의 유속으로 buffer를 흘려 주었으며, 280 nm에서 UV detector로 단백질량을 측정하였다. 역가가 확인된 분획을 모아 ultrafiltration으로 농축하고 미리 20 mM Tris-HCl(pH 7.5)로 평형시켜둔 anion exchange column(Mono Q HR 5/5, Pharmacia)에 200  $\mu$ l loading하였고 유속 1.0 ml/min, gradient는 0.5 M NaCl이 가해진 동일 buffer를 이용하여 stage gradient를 걸어주어 효소를 정제, 분리하였다.

## 결과 및 고찰

### CGTase 생성균주의 선별 및 동정

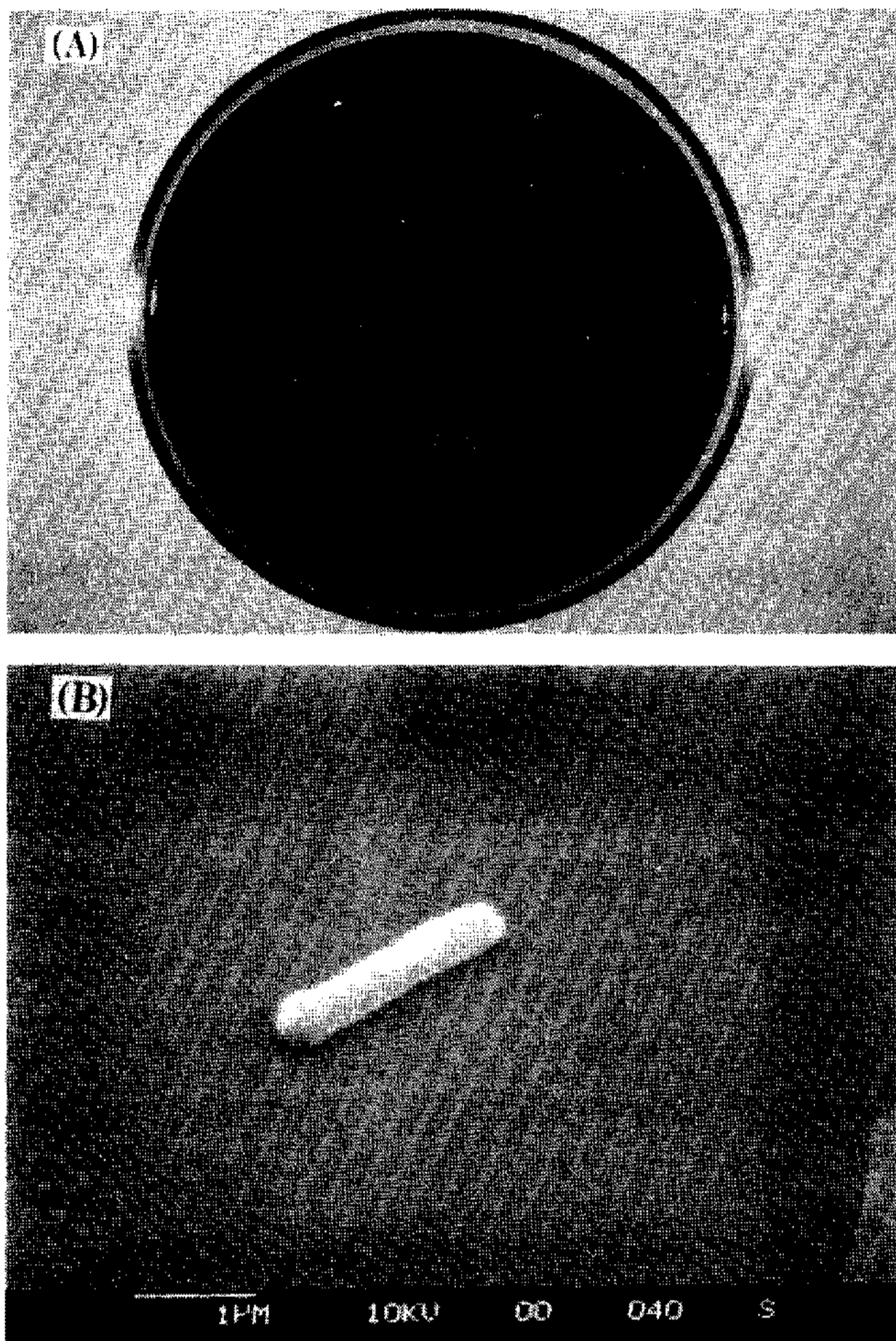


Fig. 1. (a) Screening of CGTase-producing bacteria from soil sample on the solid medium containing phenolphthalein and methyl orange. (b) Electromicrophotograph of the isolated *Bacillus* sp. E1.

CGTase 생성균주 선발배지에서 노란색 환이 크게 보인 균주를 다수 선발하였고, 이들을 액체배양하여 CGTase 역가를 측정된 후 가장 활성이 높은 균주를 최종 균주로 선발하였다(Fig. 1). 선발된 균주는 간균으로서 운동성이 매우 활발하였고, Gram 양성균에 포자가 관찰되었다. 선발된 균주의 형태학적, 배양학적 특징은 Table 1과 같으며 "Bergey's manual of Determinative Bacteriology"에 의하여 *Bacillus*로 동정하여 *Bacillus* sp. E1으로 명명하였다.

#### CGTase 생성을 위한 배양조건

분리한 균주의 CGTase 생산에 적합한 배양조건을 결정하기 위해 배양온도, 초기 pH, 배지 조성 중의 탄소원과 질소원의 영향을 검토하였다. 배양온도는 37°C, 초기 배지 pH는 10.3~10.5로 조절했을 때 CGT-

Table 1. Characteristics of *Bacillus* sp. E1

Morphological characteristics	Form	Rods
	Size	0.45 μm × 1.5~2.5 μm
	Motility	Motile
	Gram Staining	Positive
	Spore	Terminal
	Spore size	0.7 μm × 0.8 μm
Cultural characteristics	Nutrient broth	Good
	Glucose nutrient broth	Good
	Medium I <sup>3)</sup>	Very Good
	Medium I+5% NaCl	Good
	Medium II <sup>3)</sup>	Good
Biochemical characteristics	Hydrolysis of Gelatin	Positive
	Hydrolysis of Starch	Positive
	Hydrolysis of Casein	Positive
	Catalase test	Positive
	Indole test	Negative
	Voges-Proskauer	Negative

ase가 가장 많이 생성되었다. 배지조성에 따른 효소 역가는 탄소원으로 soluble starch(2%)를 질소원으로는 yeast extract와 poly peptone을 혼용했을 때 가장 좋은 결과를 보여주었다(Table 2). 이상의 결과로 CGTase 생성에 적합한 배지조성이 Horikoshi alkaline medium II와 일치함을 알 수 있었다. CGTase 생성을 위해 본 균주를 5% 발효조에 배양하면서 생육곡선과 효소생산 profile을 조사하였으며, 그 결과는 Fig. 2와 같다. 효소역가는 생육곡선이 stationary phase에 들어간 이후에도 계속 증가하여 68시간 배양 후 최대 역가에 도달했으며 배양액의 pH변화는 초기 10.9에서 지속적으로 감소하여 최종적으로 pH가 8.7로 되었다.

#### CGTase 정제

농축된 조효소액을 gel filtration한 결과 3개의 주 protein peak를 얻었다(Fig. 3(A)). 그 중 CGTase 역가가 나타난 peak의 fraction을 농축하여 anion exchange column을 통과시키고, 0.5 M의 NaCl에서 효소가 용출되어 단일 protein peak가 나타났고 이 peak에서 CGTase activity가 나타났다(Fig. 3(B)). SDS-PAGE(Fig. 4)와 isoelectric focusing 전기영동을 한 결과 단일 band로 나타나 효소가 고도로 정제되었음을 알 수 있었다.

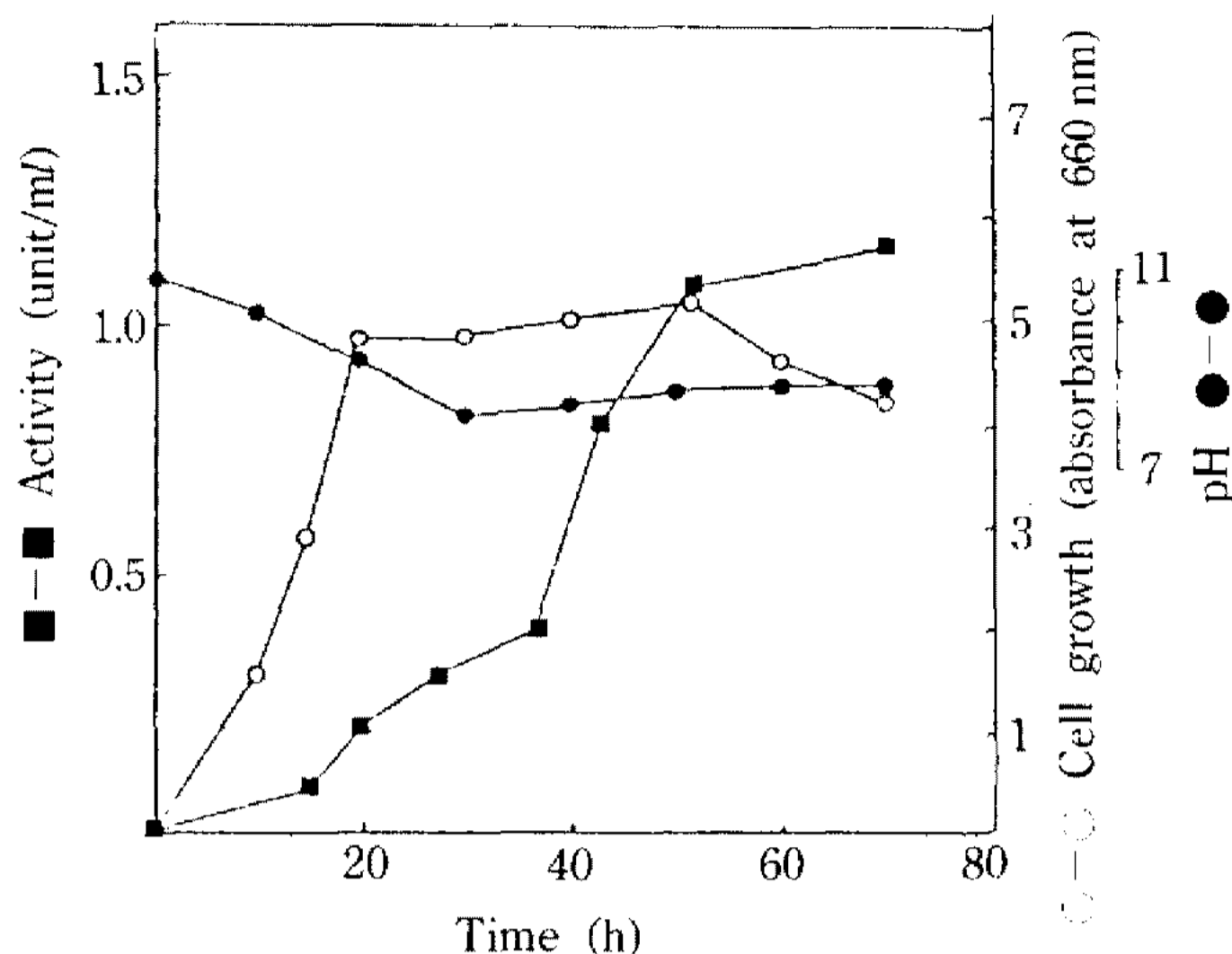
**Table 2. Effect of various C-(A) and N-sources (B) for the CGTase production**

(A)	
Carbon source (2%)	Enzyme activity (U/ml)
Glucose	0.06
Fructose	0.03
Maltose	0.03
Dextrin	0.86
Sucrose	0.36
Lactose	0.07
Sorbitol	0.06
Mannitol	0.06
β-Cyclodextrin	0.92
Amylose	0.07
Soluble starch	1.05
Potato starch	0.95
Corn starch	0.90
Rice starch	0.60

(B)	
Nitrogen source	Enzyme activity (U/ml)
Bactotryptone 1%	0.40
Bactpeptone 1%	0.12
Casamino acid 1%	0.20
Casamino acid 2%	0.22
Beef extract 1%	0.14
Beef extract 2%	0.43
Yeast extract 1%	0.91
Polypeptone 1%	0.90
Corn steep liquor 2%	0.89
Corn steep liquor 3%	0.97
Corn steep liquor 4%	0.73
Yeast extract 0.5% + Polypeptone 0.5%	0.97

**CGTase의 특성**

**CGTase의 분자량과 등전점** : 정제된 CGTase의 분자량 측정을 위해 SDS-PAGE를 한 결과 분자량이 114,000으로 측정되었다(Fig. 4). *B. macerans*(5), *B. megaterium*(8), *B. stearothermophilus*(10)의 분자량이 각각 65,000, 66,000, 68,000인 것에 비하여 훨씬 클 뿐만 아니라 호알칼리성 미생물인 *Bacillus* sp. 21783의 acid, neutral, alkaline CGTase(11)의 분자량이 85,000~88,000인 것과 유 등(16)의 *Bacillus* sp.



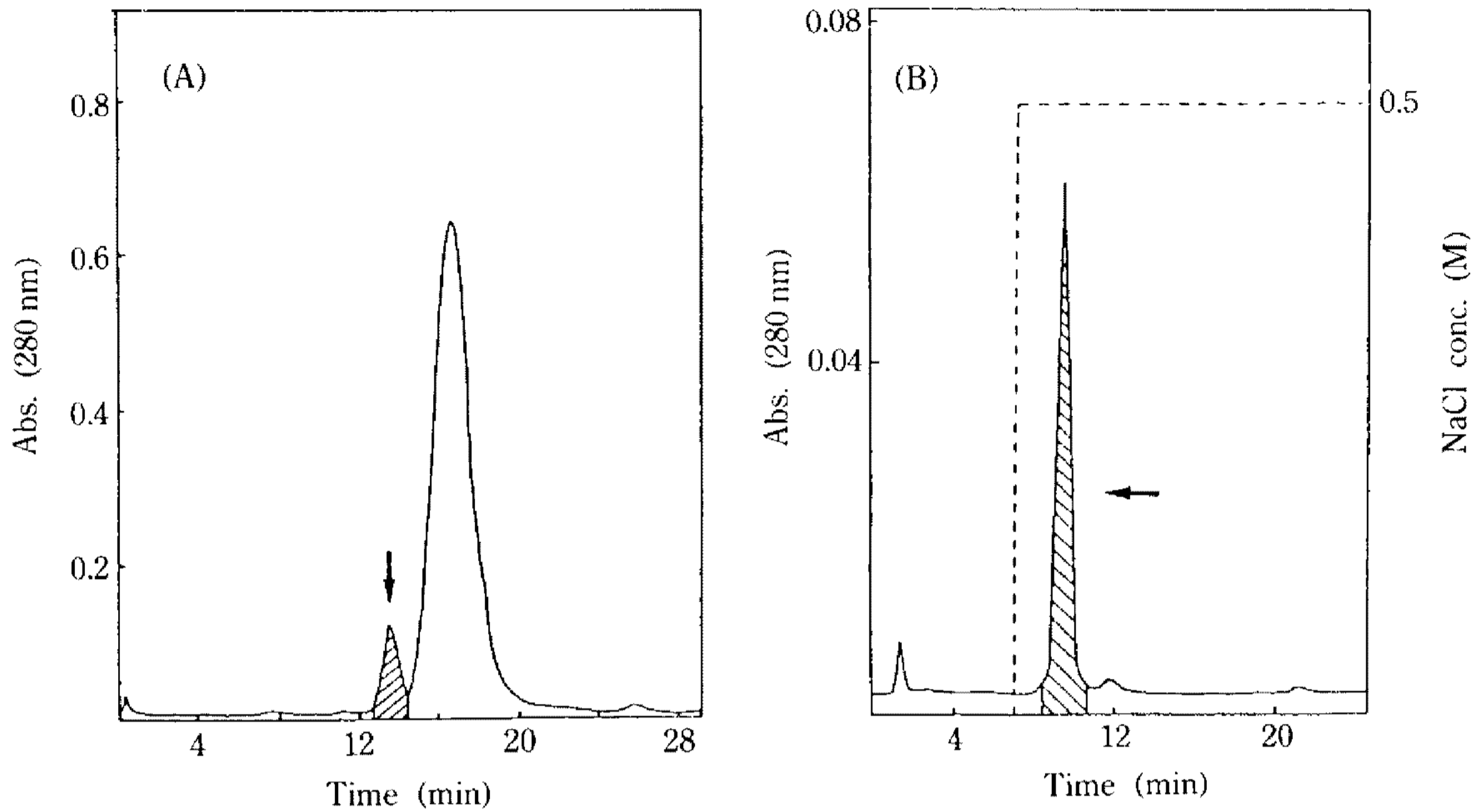
**Fig. 2. Time course of CGTase production by *Bacillus* sp. E1.**

의 분자량이 75,000인 것보다도 *Bacillus* sp. E1의 분자량이 큰 값을 보여주고 있다. IEF GEL(pH 4~6.5) Phast System을 사용하여 CGTase의 isoelectric point를 측정한 결과 pI는 4.3이었다(Fig. 5).

**pH 및 온도의 영향** : CGTase는 pH 6~8 사이에서 높은 역가를 보였고 pH 7에서 최대의 역가를 나타냈다(Fig. 6). pH에 대한 안정성을 측정하기 위하여 pH 4~12의 범위에서 효소를 50°C에서 30분간 방치한 후 효소역가를 측정한 결과 CGTase는 pH 7~11의 범위에서 안정한 것으로 나타났다. pH 6에서 각 온도에 의한 영향을 측정한 결과 최적 작용 온도는 60°C로 나타났다(Fig. 7). 온도에 대한 안정성을 측정하기 위하여 0.05 M phosphate buffer(pH 6)에 녹인 효소액을 각 온도에서 30분간 방치한 후 효소역가를 측정한 결과 50°C까지 열에 대한 안정한 것으로 나타났다.

**금속이온에 의한 영향** : 여러 금속이온을 0.1 M acetate buffer(pH 6.0)에 녹여 그 최종 농도가 5, 10, 20 mM이 되도록 반응액에 첨가하여 효소활성을 측정하였다. Table 3에서 보는 바와 같이 Fe<sup>3+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>는 강력한 저해작용을 보였으며 Mg<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup>은 별다른 영향이 없는 것으로 나타났다.

**CaCl<sub>2</sub>이 열안정성에 미치는 영향** : CaCl<sub>2</sub>가 효소의 열안정성에 미치는 영향을 조사하였다. 효소를 70°C의 5, 20 mM의 CaCl<sub>2</sub>(0.1 M acetate buffer pH 6.0) 용액에서 열불활성시킨 후 남아있는 효소의 역가를 측정하였다. 100분 후에 잔존하는 효소의 역가는 대조구에서는 20%, 5 mM CaCl<sub>2</sub> 존재시에는 35%, 10 mM



**Fig. 3. (A) Gel chromatography of the crude enzyme using FPLC.**

Column: Superose 12 HR 10/30

Eluent: 20 mM phosphate buffer, pH 6.0, 0.1 M NaCl

Flow rate: 1.0 ml/min

Detector: UV 280 nm, 1.0 AU

Injection: 400  $\mu$ l crude enzyme solution (0.424 mg/ml)

**(B) Ion exchange chromatography of the crude enzyme using FPLC.**

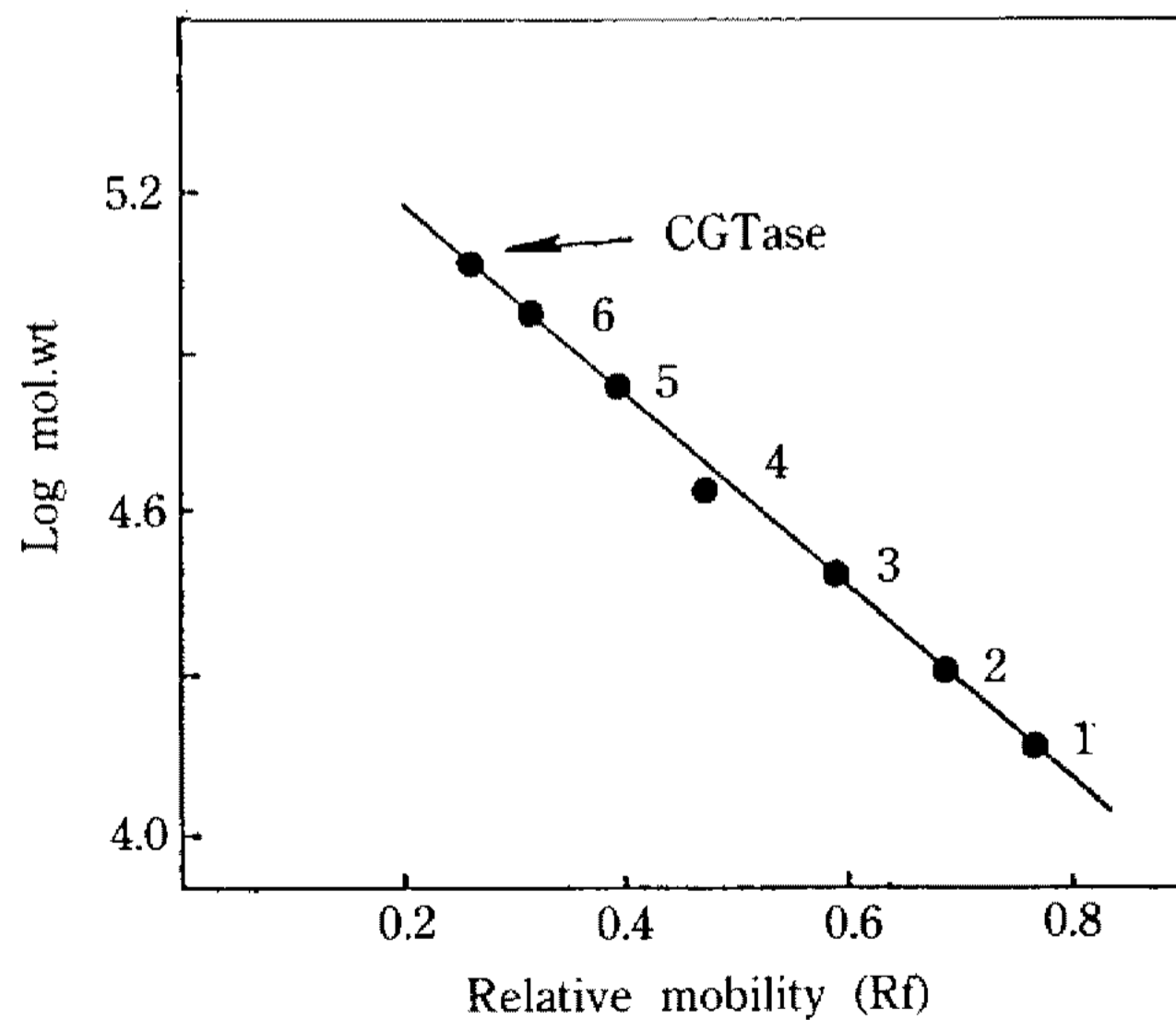
Column: Mono Q HR 5/5

Eluent: 20 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5

Salt gradient: 0.5 M NaCl

Flow rate: 1.0 ml/min

Detector: UV 280 nm, 0.2 AU



**Fig. 4. Determination of the molecular weight using Phast system.**

1.  $\alpha$ -Lactalbumin (MW 14,400)
2. Soybean trypsin inhibitor (MW 20,100)
3. Carbonic anhydrase (MW 30,000)
4. Ovalbumin (MW 43,000)
5. BSA (MW 67,000)
6. Phosphorylase (MW 94,000)

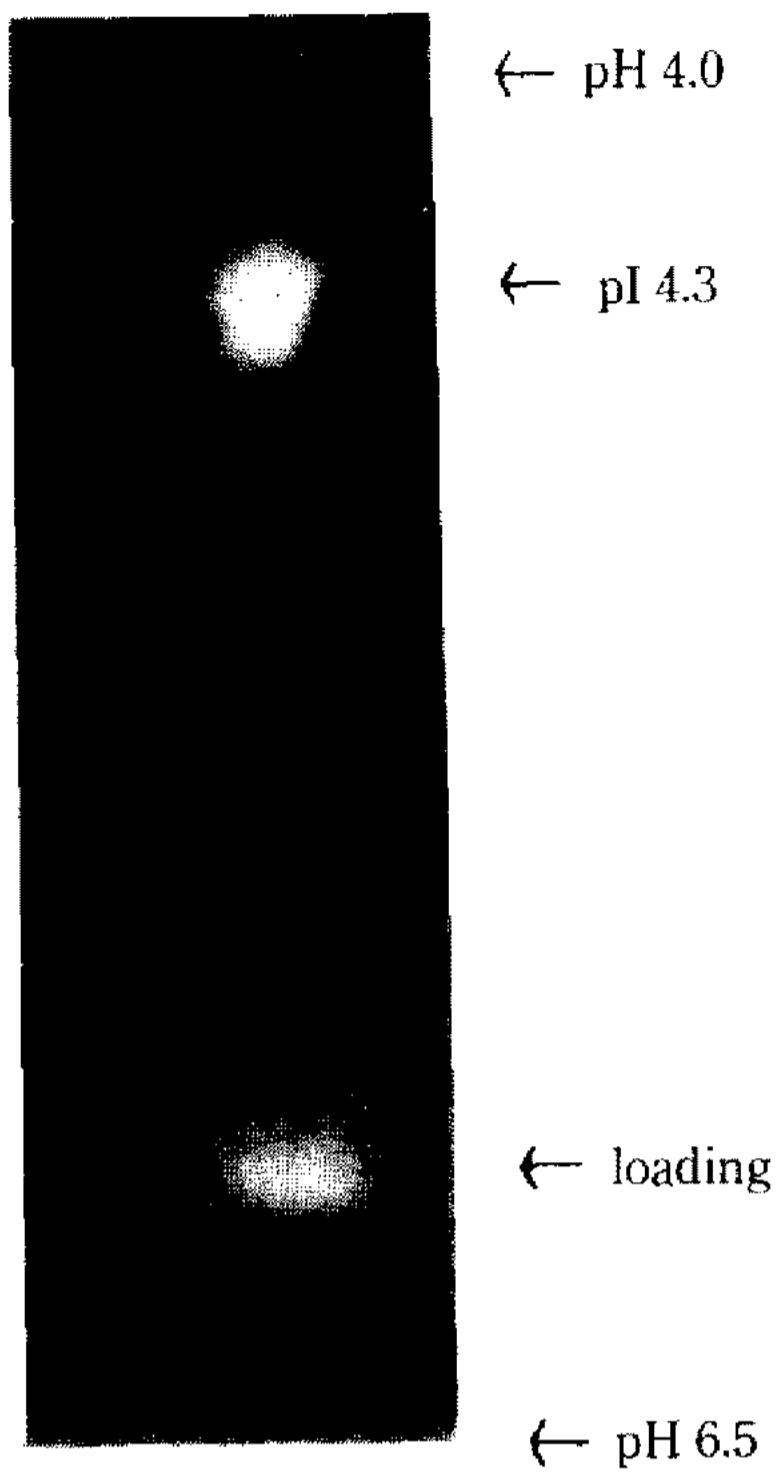


Fig. 5. Isoelectric focusing of the CGTase using Phast system.

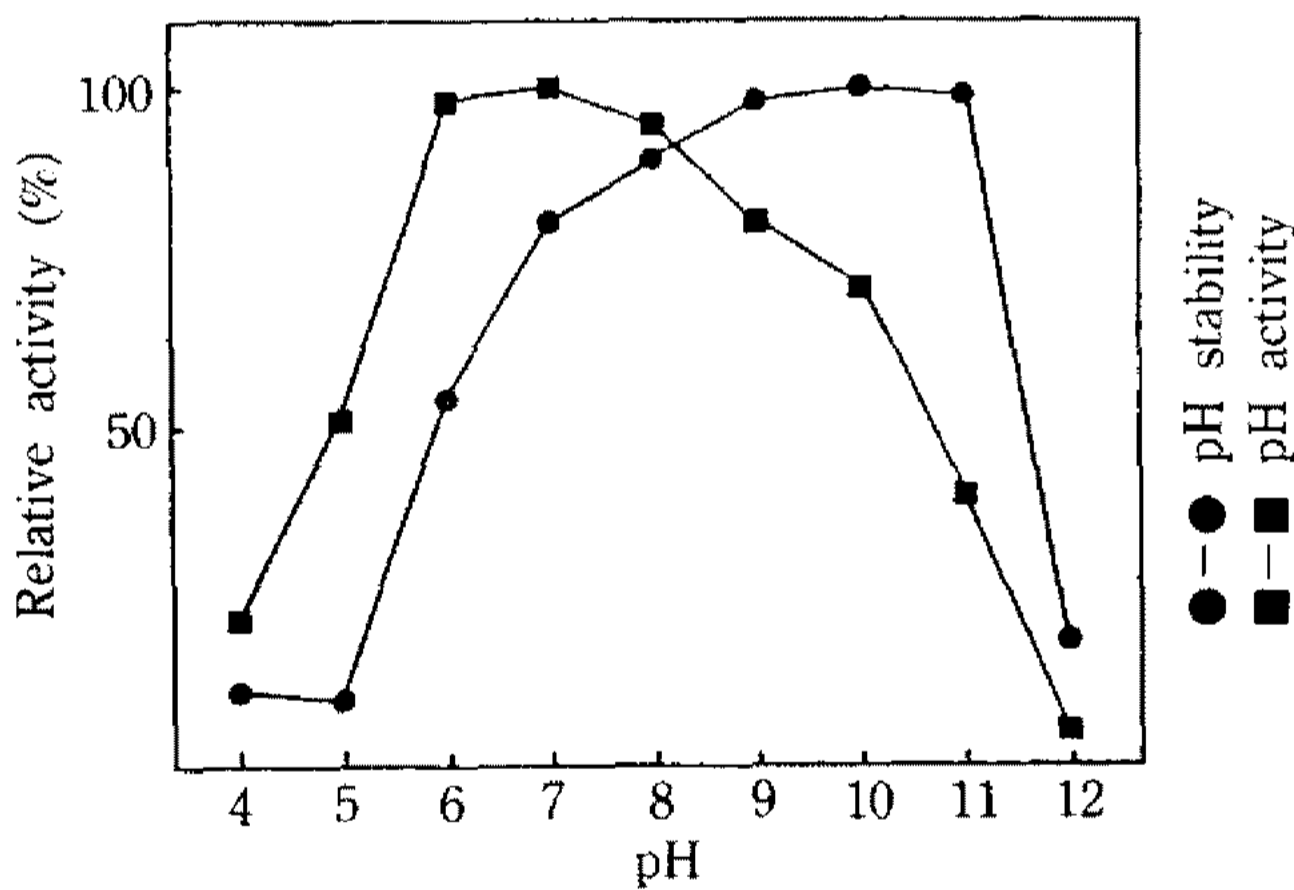


Fig. 6. Effect of pH on the activity and stability of the CGTase.

For the stability of the enzyme, the enzyme activity was measured after incubation of 30 min at 50°C. Wide range buffer (20) was used for the range of pH 4~12.

CaCl<sub>2</sub> 존재시에는 50%이었다. 즉 CGTase의 열에 대한 안정성은 CaCl<sub>2</sub> 존재하에서 약간 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 8).

생성물의 분석

2%의 가용성 전분용액(0.05 M phosphate buffer, pH 6.5)에 CGTase 3.5 U를 가하여 50°C에서 48시간 반응시키는 동안 시간에 따라 생성된 cyclodextrin을

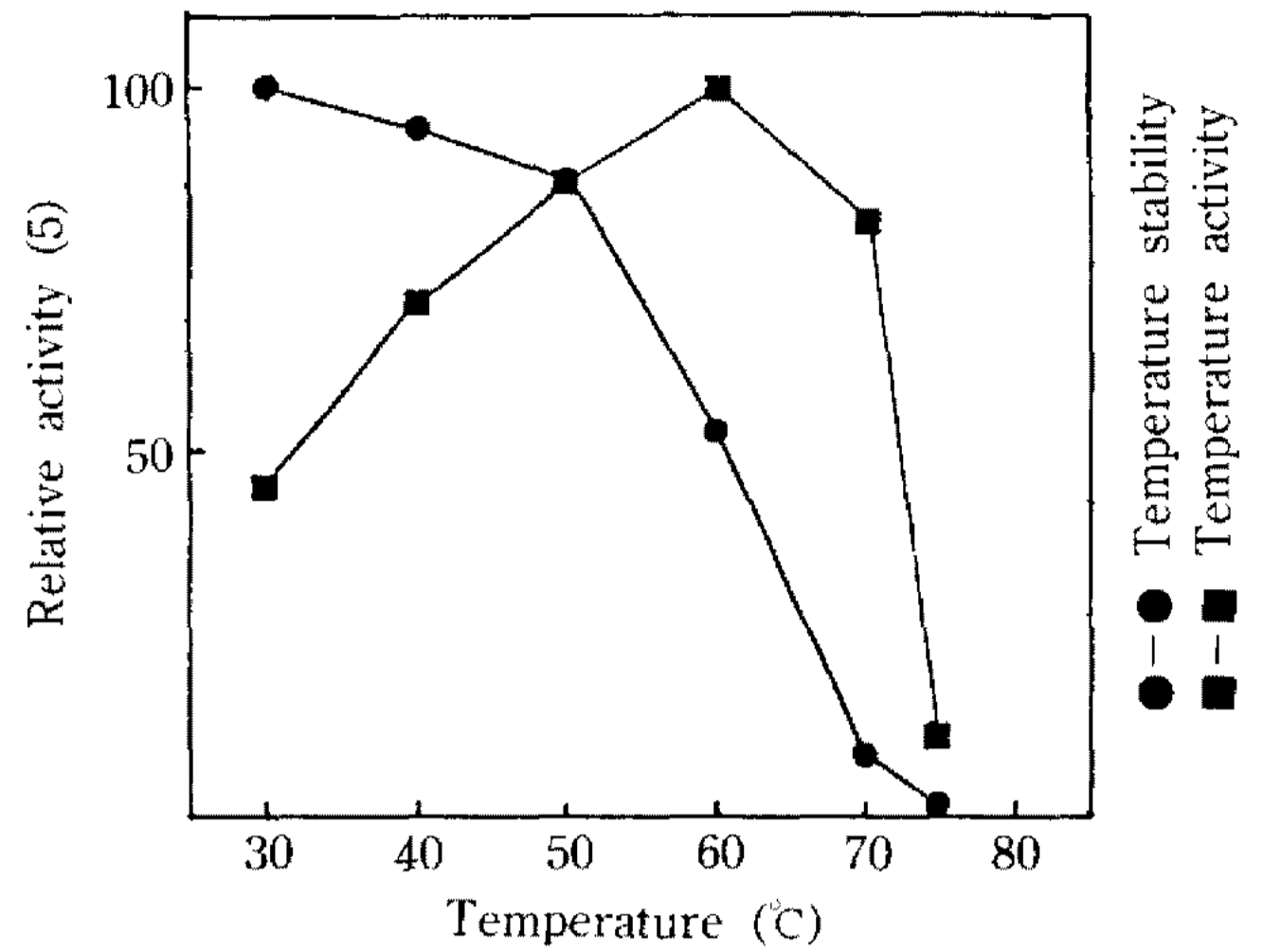


Fig. 7. Effect of the temperature on the activity and stability of the CGTase.

For the stability measurement, the enzyme was incubated for 30 min at pH 6.0.

Table 3. Effect of metal ion on the CGTase activity

Mineral Rel. Conc. act.	ZnSO <sub>4</sub>	MgSO <sub>4</sub>	CuSO <sub>4</sub>	KCl	FeCl <sub>3</sub>
	None	100	100	100	100
5 mM	5.1	103	0	93	0
10 mM	8.7	110	0	102	11
20 mM	0	102	0	102	1

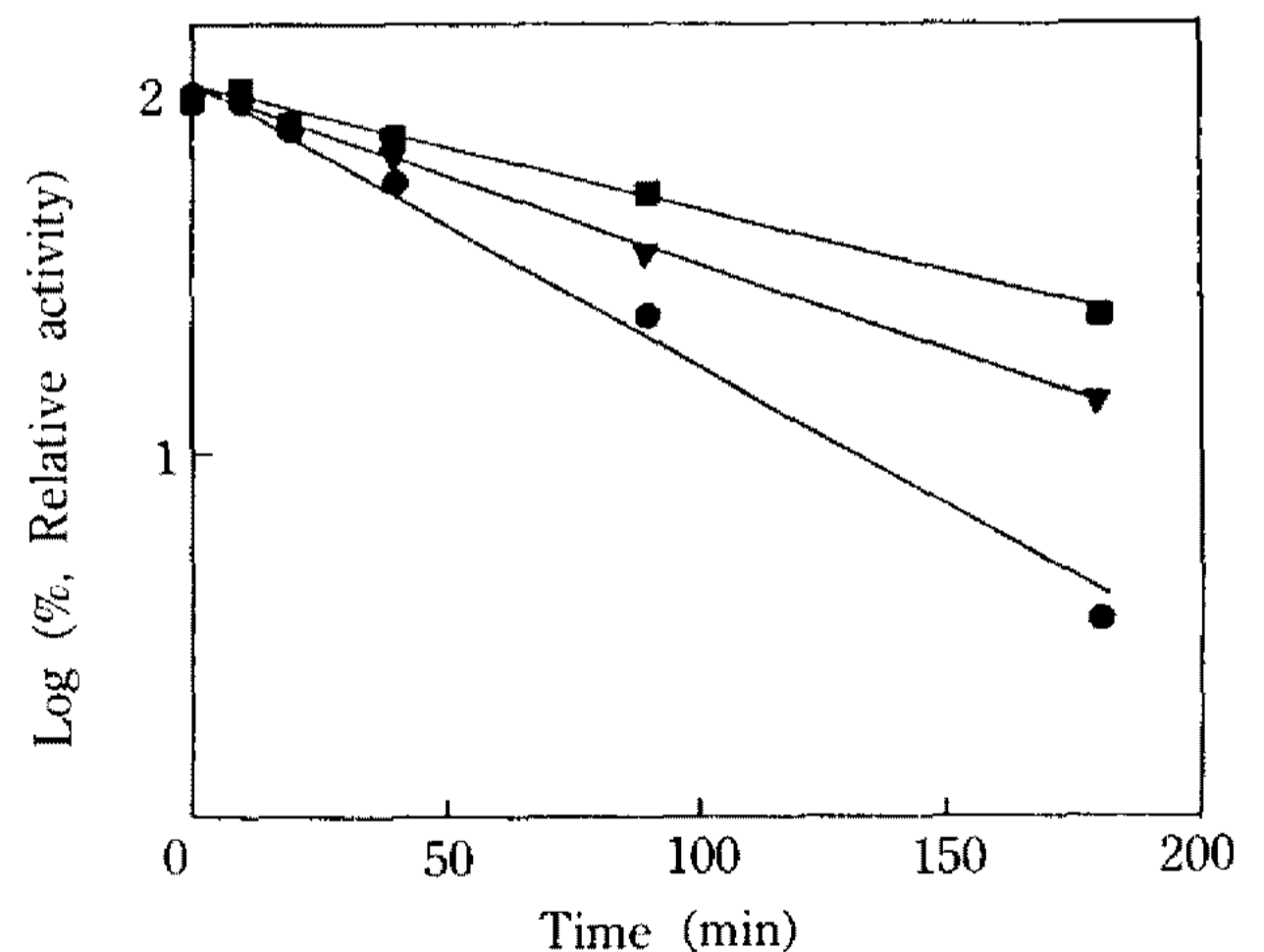


Fig. 8. Effect of CaCl<sub>2</sub> on the thermal stability of the CGTase at 70°C.

—●— Control, —▼— 5 mM CaCl<sub>2</sub>, —■— 20 mM CaCl<sub>2</sub>

HPLC로 측정하였다(Fig. 9). 생성된 cyclodextrin은 β-cyclodextrin과 γ-cyclodextrin이고 그 생성비율은 7:1로서 β-cyclodextrin을 우선적으로 합성하였다. 이때 α-cyclodextrin은 검출되지 않았다. 25시간 반응

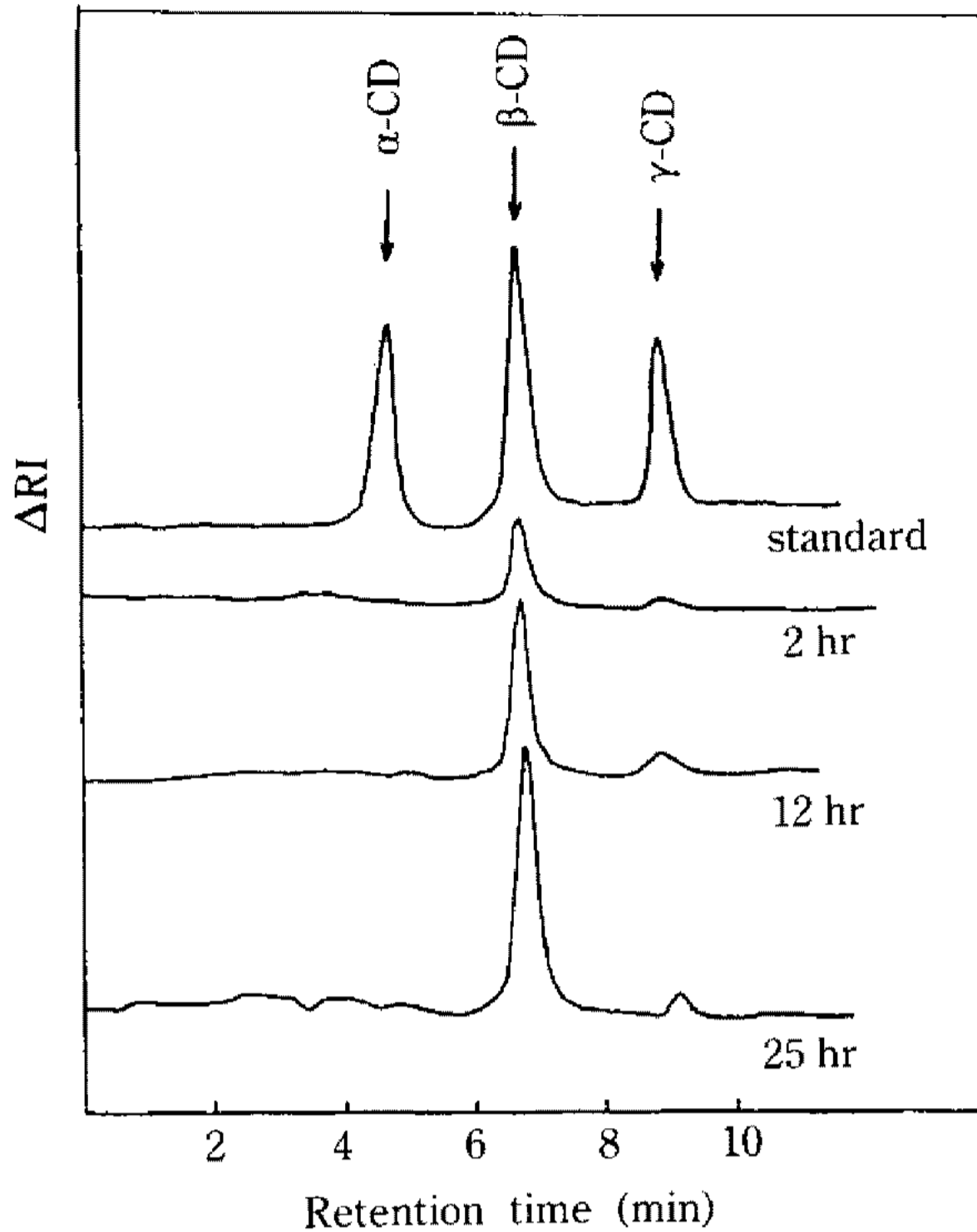


Fig. 9. HPLC analysis of the reaction products produced by the CGTase.

후에 최대량의  $\beta$ -cyclodextrin을 생산하였고 이때 생성된 양은 200 mg으로 약 25%의 수율을 나타냈으며 그 후로 점차 분해하는 경향을 나타냈다. *B. macerans* (5)의 cyclodextrin 생산비율이 2.7 : 1 : 1로  $\alpha$ -cyclodextrin을 주로 생산하고, *B. megaterium* (8)은 1 : 2.4 : 1로서  $\beta$ -cyclodextrin을 주로 생성하는데 반하여, *B. circulans* (6)는 2.8 : 4.2 : 1로  $\alpha$ -와  $\beta$ -cyclodextrin을 비슷한 양으로 생산한다고 보고되었다. 이처럼 CGTase는 일반적으로  $\alpha$ -,  $\beta$ - 및  $\gamma$ -cyclodextrin을 동시에 생성하는데 비하여 본 *Bacillus* sp. E1은  $\alpha$ -cyclodextrin을 생성하지 않았다. 또한  $\gamma$ -cyclodextrin의 생성도 다른 균주들과 비교하여 상대적으로 작았다. 따라서 본 효소가 생성하는 생성물부터  $\beta$ -cyclodextrin을 순수하게 분리하는데 타 효소를 사용하는 것에 비하여 유리할 것으로 판단된다.

## 요 약

Cyclodextrin glucanotransferase 생성균주 선발배지를 이용하여 국내 토양으로부터 CGTase 활성이 우수한 *Bacillus* sp. E1 균주를 분리하였다. FPLC를 이용하여 gel filtration과 anion exchange column chromatography를 한 결과 순수 정제된 단일 단백

질을 얻을 수 있었으며, 정제된 효소의 최적 작용 pH 범위는 6에서 8까지였고, 온도는 60°C에서 최적을 나타냈다. 정제된 단백질의 분자량은 114,000, 등전점은 4.3이었다. 생성된 cyclodextrin은  $\beta$ -와  $\gamma$ -cyclodextrin이 주였으며, 특이하게도  $\alpha$ -cyclodextrin은 거의 생성되지 않았다. 작용 후 25시간 후 최대의  $\beta$ -cyclodextrin이 생성되었으며, 이때  $\beta$ -cyclodextrin과  $\gamma$ -cyclodextrin의 생성비율은 7 : 1이었다.

## 감사의 말

이 논문은 한국과학재단과 미원식품(주) 연구비에 의하여 연구되었으며 연구비 지원에 감사를 드립니다.

## 참고문헌

- Whistler, R.L., J.N. Bemiller, and E.F. Paschall. 1984. *Starch (Chemistry and technology)*, Pp. 143-149. 2nd ed. Academic Press, New York.
- Szejtli, J. 1990. The cyclodextrins and their applications in biotechnology. *Carbohydrate Polymers* 12: 375-392.
- Horikoshi, K., and T. Ariba. 1982. *Alkalophilic Microorganisms*. Pp. 147-157. 1st ed. Japan Scientific Societies Press, Tokyo.
- Pongsawasdi, P., and M. Yagisawa. 1987. Screening and identification of cyclomalto-dextrin glucanotransferase-producing bacteria. *J. Ferment. Technol.* 65: 463-467.
- Kitahata, S., N. Tsuyama, and S. Okada. 1974. Purification and some properties of cyclodextrin glucanotransferase from a strain of *Bacillus* sp. *Agri. Biol. Chem.* 38: 387-393.
- Yang, Y., M. Sato, and T. Ishikura. 1986. Comparative studies of cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus ohbensis*, *Bacillus macerans* and *Bacillus circulans* and production of cyclodextrins using those cyclodextrin glucanotransferase. *J. Jpn. Soc. Starch. Sci.* 33: 144-151.
- Sato, M., Y. Yagi, H. Nagano, and T. Ishikura. 1985. Determination of cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus ohbensis* and its Optimum pH using HPLC. *Agri. Biol. Chem.* 49: 1189-1191.
- Kitahata, S., and S. Okada. 1974. Action of cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus megaterium* strain No. 5 on starch. *Agri. Biol. Chem.* 38: 2413-2417.
- Ernest, K., C. Yu, H. Aoki, and M. Misawa. 1988. Specific alpha-cyclodextrin production by a novel

- thermostable cyclodextrin glucanotransferase. *Appl. Microbiol. Biotech.* **28**: 377-379.
10. Kitahata, S., and S. Okada. 1982. Purification and some properties of cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus stearothermophilus* TC-60. *J. Jpn. Soc. Starch. Sci.* **29**: 7-12.
  11. Nakamura, N., and K. Horikoshi. 1976. Purification and properties of cyclodextrin glucanotransferase of an alkalophilic *Bacillus* sp. *Agri. Biol. Chem.* **40**: 935-941.
  12. Nakamura, N., and K. Horikoshi. 1976. Characterization of acid-cyclodextrin glucanotransferase of an alkalophilic *Bacillus* sp. *Agri. Biol. Chem.* **40**: 1647-1648.
  13. Nakamura, N., and K. Horikoshi. 1976. Purification and properties of neutral-cyclodextrin glucanotransferase of an alkalophilic *Bacillus* sp. *Agri. Biol. Chem.* **40**: 1785-1791.
  14. Bender, H. 1977. Cyclodextrin glucanotransferase von *Klebsiella pneumoniae* 1. Synthesen, reinigung und eigenschaften des enzymes von *Klebsiella pneumoniae* M5a1. *Arch. Microbiol.* **111**: 271-282.
  15. 정용준, 공인수, 강윤숙, 유주현. 1990. 호알카리성 *Bacillus* sp.의 cyclodextrin glucanotransferase의 정제와 특성. *산업미생물학회지* **18**: 44-48.
  16. 이용현, 신현동, 이상호. 1989. Alkalophilic *Bacillus circulans*가 생산하는 cyclodextrin glucanotransferase의 정제와 효소반응 특성. *산업미생물학회지* **17**: 370-378.
  17. 황진봉, 김승호, 이태경, 양한철. 1990. *Bacillus stearothermophilus*에 의한 cyclodextrin glucanotransferase의 생산. *산업미생물학회지* **18**: 578-584.
  18. Park, C.S., K.H. Park, and S.H. Kim. 1989. A Rapid screening method for alkalophilic  $\beta$ -cyclodextrin glucanotransferase using phenolphthalein-methylorange containing solid medium. *Agri. Biol. Chem.* **53**: 1167-1169.
  19. Kaneko, T., T. Kato, N. Nakamura, and K. Horikoshi. 1987. Spectrophotometric determination of cyclization activity of beta-cyclodextrin-forming cyclodextrin glucanotransferase. *J. Jpn. Soc. Starch. Sci.* **34**: 45-48.
  20. Perrin, D.D. and B. Dempsey. 1974. Buffers for pH and metal ion control. Pp. 154. Haisted Press. U.S.A.

(Received December 19, 1991)