Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.
Vol. 23, No. 4, 416-424 (1995)

팽윤 전분을 기질로 한 Cyclodextrin Glucanotransferase의 Cyclodextrin 생성반응 기작

이용현* · 조명진 · 박동찬
경북대학교 자연과학대학 유전공학과

Reaction Mechanism of Cyclodextrin Formation from Swollen Extrusion Starch by Cyclodextrin Glucanotransferase

Yong-Hyun Lee*, Myung-Jin Cho and Dong-Chan Park
Department of Genetic Engineering, College of Natural Sciences
Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea

Abstract — Mechanism of the cyclodextrin (CD) production reaction by cyclodextrin glucanotransferase (CGTase) using swollen extrusion starch as substrate was investigated emphasizing the structural features of starch granule. The degree of gelatinization was identified to be the most representative structural characteristic of swollen starch. The most suitable degree of gelatinization of swollen starch for CD production was around 63.52%. The structural transformation of starch granule during enzyme reaction was also followed by measuring the changes of the degree of gelatinization, microcrystallinity, and accessible and inaccessible portion to CGTase action of residual swollen starch. The adsorption phenomenon of CGTase to swollen starch was also examined under various conditions. The inhibition mechanism of CGTase by various CDs was identified to be competitive, most severely by α-CD. The mechanism elucidated will be used for development of a kinetic model describes CD production reaction in heterogeneous enzyme reaction system utilizing swollen extrusion starch.

Cyclodextrin(CD)은 cyclodextrin glucanotransferase(EC 2.4.1.19 ; 1,4-α-glucan 4-α-D-(1,4 glucano) transferase cyclizing : CGTase)의 cyclization 반응에 의하여 생성되는, glucose 분자 6~8개가 α-1,4-glucoside 결합된 환상의 비환원성 maltooligosaccharide이다. 환상의 분자구조에서 유래하는 독특한 포접성으로 인하여 식품, 의약품, 화장품, 그리고 농약 분야 등에서 물성 개선, 안정성 유지등 여러 목적으로 광범위하게 응용되고 있다(1, 2).

현재 CD의 제조공정에는 amylase나 CGTase로 전분을 부분 액화 또는 환화시켜 수용성 전분으로 전환한 후 CGTase를 첨가하여 생산하는 2단계 균일상 효소반응계를 이용한 공정이 주로 사용되고 있다(3-6). 이 경우 CD 이외에도 glucose, maltose, 그리고 각종 maltooligosaccharide가 다량으로 생성되므로 CD 수율이 낮고, 또한 액화전분, 효소, 그리고 CD가 모두 수용상으로 혼합 용해되어 있어 반응 후 CD의 분리 정제가 어려운 결점이 있다.

이와같은 문제점을 해결하기 위하여 본 연구실에서는 불용성 전분을 이용한 불균일상 효소반응계에서의 CD 생성반응에 관한 연구들을 수행한 바 있다(7-10). 특히 전보(8)에서는 extrusion시켜 팽윤 α화시킨 현탁 전분 또는 전분질을 함유하는 불균일상 효소반응계를 이용한 CD 생성반응에 관한 연구 결과를 발표한 바 있으며, 기존의 방법과 비교하여 생성속도가 우수하고, 수율이 향상되며, 특히 반응 후 oligo당의 생성이 적고 반응 잔유전분은 원심분리로 쉽게 제거되어 CD의 분리정제가 매우 용이한 고효율 제조법임을 보고한 바 있다.

여기서는 팽윤 extrusion 전분을 기질로 한 불균일상 효소 반응계에서 CD 생성반응의 특징과 그 mechanism을 규명하였다. 이를 위하여 *Bacillus macerans* 유래의 α-type CGTase를 사용하여 CD 생성에 미치는 팽윤전분질의 구조적 특성을 호화도를 중심

Key words: Cyclodextrin, extrusion starch, cyclodextrin glucanotransferase, mechanism, heterogeneous enzyme reaction system
***Corresponding author**

으로 검토하였고, 미반응 잔유전분의 구조적 변화들을 관찰하였으며, CGTase의 흡착양상, 그리고 생성된 CD가 효소반응에 미치는 inhibition mechanism을 검토하였다. 이와같은 연구는 CD 생성반응기 및 반응공정을 최적화하기 위한 선결과제가 되는 kinetic model을 확립하기 위한 기초자료로 활용될 것이다.

재료 및 방법

사용효소

사용효소는 *Baccillus macerans* 유래의 산업용 CGTase(Amano Co., specific activity ; 60 units/mg of protein)를 사용하였으며, 최적 pH는 6.0, 최적 온도는 50℃였다. CGTase의 활성은 5%(w/v) 가용성 전분용액(pH 6.0) 1.0 m*l*에 CGTase 용액 0.02 m*l*(protein conc. ; 2.5 mg/m*l*)을 첨가하여 50℃에서 30분간 반응시킨 후 생성된 CD량을 측정하여 결정하였으며, 분당 1 mg의 CD를 생성시키는 효소의 양을 1 unit로 정하였다.

전분의 Extrusion 처리

전보(11)에서와 같이 옥수수 전분을 각각 수분함량 12, 15, 18, 20 그리고 25%로 평형화시킨 후 single screw extruder에서 screw와 사출구의 간격을 2.7 mm로 유지하고 원료를 300 g/min 속도로 사입하면서 extrusion시켰다. 경우에 따라 screw 회전속도를 150, 200, 250, 그리고 300 rpm으로 변환시켰으며, 얻어진 extrusion 전분을 건조한 후 분말화시켜 사용하였다.

전분의 호화도 측정

Wootton 등(12)의 방법에 따라 분말시료를 20 g/*l*로 현탁하여 3,000×g로 10분간 원심분리한 상등액을 100배 희석한 후, iodine 용액(4% KI, 1% I_2)을 1% (v/v) 첨가하여 600 nm에서 흡광도(A)를 측정하였다. 비교를 위하여 완전 호화된 시료를 0.5M KOH 용액에서 20 g/*l*가 되게 현탁하고 5분간 상온에서 방치하여 완전히 호화시킨 후, 원심분리한 상등액을 중화하여 위와 같은 조건으로 흡광도(A_0)를 측정하여 호화도(%, $A/A_0 \times 100$)를 계산하였다.

전분의 X-ray 회절 양상 측정

Extrusion 전분 및 잔류전분의 X-ray 회절양상은 X-ray diffractometer(Rigaku Geigerflex 2301)를 이용하여 powder method로 수행하였으며, 그 분석조건은 target Cu(Kα) Ni-filter, 30 KV, 20 mA, time constant range 1,000 cps, scanning speed 2° 2θ/min 이었고, 회절각도는 4~[illegible] 였다.

효소 흡착량의 측정

Extrusion 전분 100 g/*l*를 20 mM Tris-maleic acid-NaOH buffer에 현탁하여 50℃에서 1시간 방치한 후 적정량의 CGTase를 첨가하여 200 rpm으로 교반하면서 효소반응시킨 후 반응액을 3,000×g에서 10분간 원심분리하고, 상등액 중의 단백질양을 측정하여 전체 효소첨가량에서 상등액중의 효소량을 뺀 값으로부터 흡착량을 결정하였다.

팽윤 전분을 이용한 Cyclodextrin 생성반응

팽윤 extrusion 전분 10~100 g/*l*을 20 mM Tris-maleic acid-NaOH buffer에 현탁시키고 CGTase 0.1 unit/g starch를 첨가하여 50℃에서 200 rpm으로 교반하면서 반응시켰다. 경우에 따라 상기조건을 변화시켰다.

Cyclodextrin에 의한 Inhibition Mechanism과 상수의 평가

팽윤 extrusion 전분 5~50 g/*l*를 완충용액에 현탁하고 CGTase 0.1 unit/g starch를 첨가하고, α-, β-, 그리고 γ-CD를 각각의 전분농도에 대하여 0~40 g/*l* 까지 첨가하여 50℃에서 30분간 반응시킨 후 생성된 CD량을 측정하여 초기반응속도를 결정하고, Lineweaver-Burk plotting하여 product inhibition mechanism과 효소반응 상수를 결정하였다.

분석방법

Cyclodextrin은 high performance liquid chromatography(HPLC, Model-305, Gilson Co.)와 발색법을 병용하여 정량분석하였다. HPLC는 column ; Cosmosil 5NH_2 packed column(Nacalai Co.), 용출용매 ; acetonitrile/H_2O(65 : 35), 용출속도 ; 1.0 m*l*/min, 그리고 RI detector로 분석하였다. 발색법에 의한 CD 정량은 α-CD의 경우 starch-iodine complex의 변색법(13), β-CD의 경우 phenolphtalein 정색법(14), 그리고 γ-CD는 bromocresol green의 spectrum법(15)을 이용하였다. 가용성 단백질량은 Bradford법(16)으로 측정하였다.

결과 및 고찰

팽윤 전분을 기질로 한 Cyclodextrin Glucanotransferase의 Cyclodextrin 생성반응

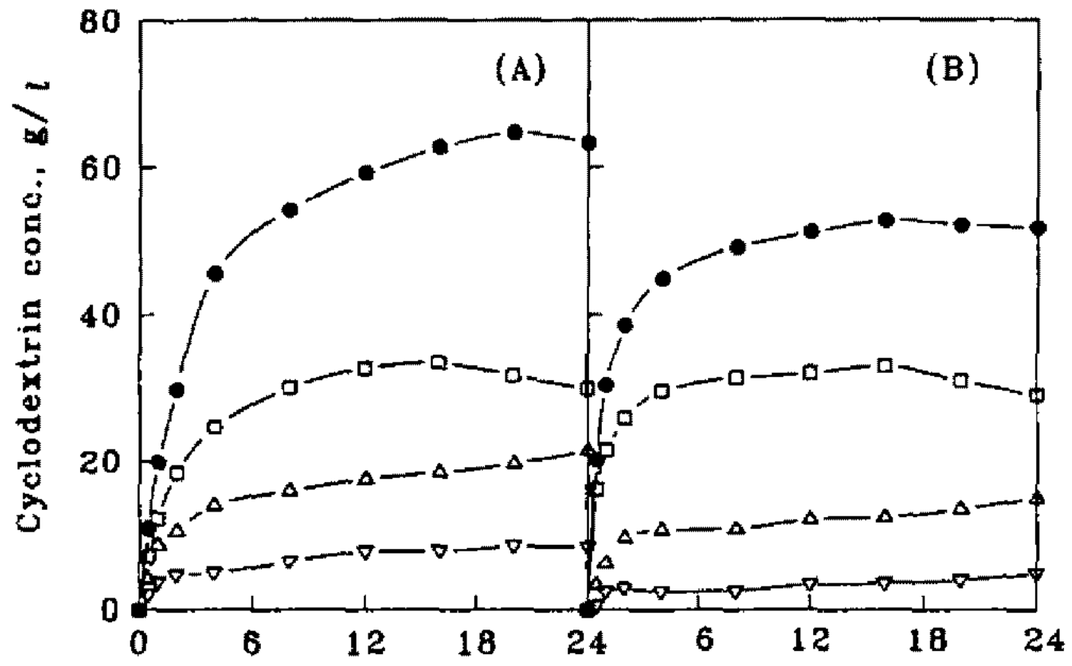

Fig. 1. Comparison of produced α-, β-, and γ-cyclodextrins from swollen extrusion (A) and liquefied starch (B).
100 g/*l* of starch, 0.1 unit of CGTase/g starch, pH 6.0, 50℃, and 200 rpm.
●; total CD, □; α-CD, △; β-CD, ▽; γ-CD

CD 생성반응 양상 Fig. 1은 팽윤 extrusion 전분 함유 불균일상 효소반응계에서의 CD 생성반응의 특성을 검토하기 위하여 생성된 α-, β-, 그리고 γ-CD의 양을 측정하여 증자액화시킨 수용성 전분을 이용한 경우(Fig. 1(B))와 비교한 결과이다. 전보(8)에서 관찰한 바와 같이 CD의 합성속도는 팽윤 전분을 사용할 경우 가용성 액화전분을 기질로 하는 경우에 비하여 반응초기에만 약간 느렸을 뿐 그후에는 곧 유사한 수준으로 올라갔고, 24시간 반응 후의 전 CD의 생성수율은 약 10% 전후 향상되었다.

α-, β-, 그리고 γ-CD의 종류별 생성양상은 두 효소반응계에서 큰 차이가 없이 α-CD는 반응초기에 주로 생성되었으며, 4시간 경과후에는 거의 일정한 수준을 유지하였고 12시간 반응 후 α-CD 생성량은 팽윤전분의 경우 33.58 g/*l*였다. 또한 β-CD의 경우는 반응초기부터 지속적으로 증가하는 경향을 나타냈고, γ-CD는 매우 소량 생성되었으며, 사용 CGTase는 대표적인 α-type 효소의 특성을 보였다.

팽윤 전분의 호화도와 CD 생성반응 Fig. 2는 팽윤전분의 호화도와 CD 생성반응과의 상관관계를 규명하기 위하여 각종 extrusion 조건에서 얻어진 호화도가 41.56에서 76.01%까지인 팽윤전분을 기질로 12시간 효소반응 후 생성된 CD 농도와 초기반응속도를 측정한 결과이다.

CD 생성량은 호화도가 커짐에 따라 점차적으로 증가하여 호화도 63.52%에서 최대 CD 생성량인 69.64 g/*l*를 나타내었으며, 그 이상의 호화도에서는 생성량이 오히려 감소하였다. 초기 CD 생성속도도 CD 생성량과 유사한 경향을 보였으나, 최대 속도는 호화

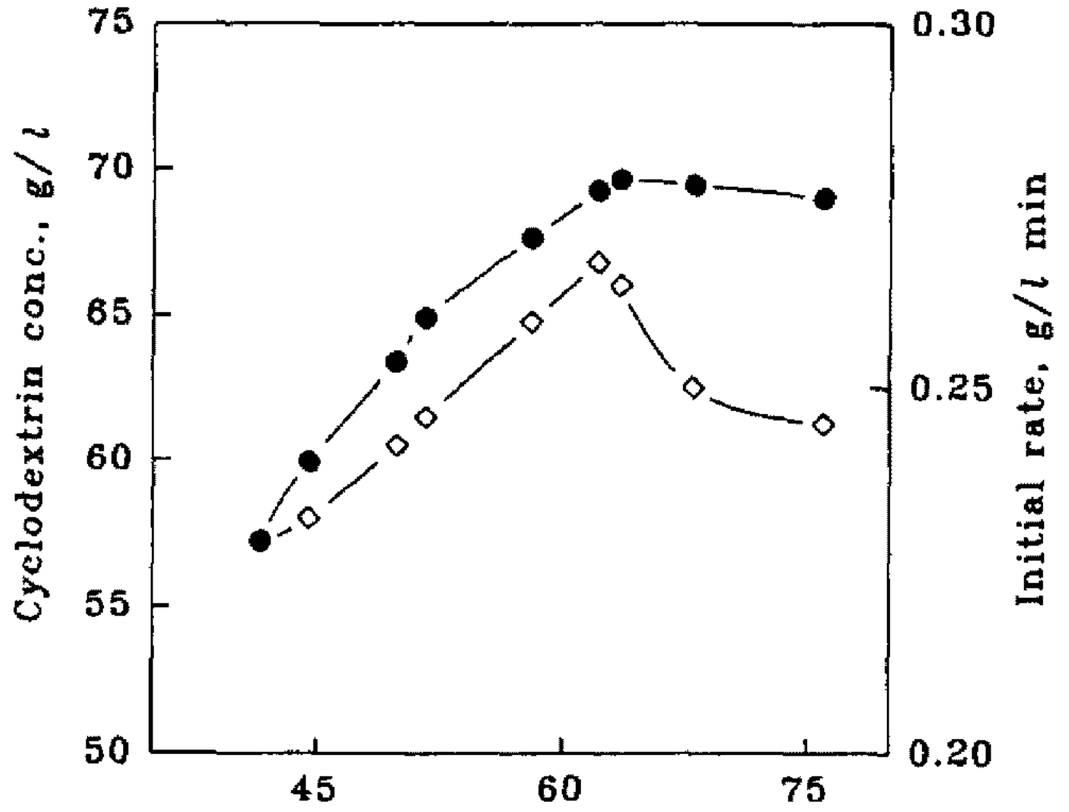

Fig. 2. Effect of the degree of gelatinization of swollen extrusion starch on cyclodextrin production and initial rate.
●; total CD, 100 g/*l* of starch, 0.1 unit of CGTase/g starch, after 12 hr
◇; initial rate of CD production

도가 약간 낮은 62.14%에서 얻어졌으며 그 값은 0.267 g/*l*·min였다.

이는 호화도의 증가는 extrusion 전분입자의 구조적 변형이 크므로 용이하게 효소 작용을 받을 수 있음을 의미한다. 반면 과다한 높은 호화도인 70% 이상에서는 CD 생성량 및 초기반응속도가 다소 감소되는데, 이는 과대 팽윤된 전분입자가 반응액 중의 수분을 다량으로 흡수하여 반응액의 점도가 효소작용에 어려운 상태로 변화되기 때문이다(17, 18). CD 생성반응에 적합한 extrusion 전분의 호화도는 63% 정도일 것으로 판단되며, 호화도는 팽윤 extrusion 전분의 구조적 특성을 대표하는 중요한 지표로 사용될 수 있음을 알았다. 따라서 팽윤 전분의 구조적 특성을 나타내는 호화도와 CD 합성반응 속도와의 상관관계를 수치적으로 해석해 볼 필요가 있다.

팽윤 전분의 구조적 특성과 효소 반응

Fig. 3은 호화도가 41.56~76.01%인 팽윤 extrusion 전분의 농도를 5~100 g/*l*까지 변화시키면서 반응시켜 얻어진 초기 반응속도를 Lineweaver-Burk plotting 하여 중요 효소반응 상수인 apparent Michaelis-Menten 상수(K''_m)와 최대반응속도(V''_{max})를 계산하여 요약한 결과를 나타내고 있다.

효소와의 친화성을 나타내는 상수인 K''_m 값은 호화도가 증가할수록 점차 감소하였으며, 이 수치의 감소는 팽윤전분과 효소와의 친화성의 향상을 의미한다. 반면 최대반응속도(V''_{max})는 호화도가 증가함

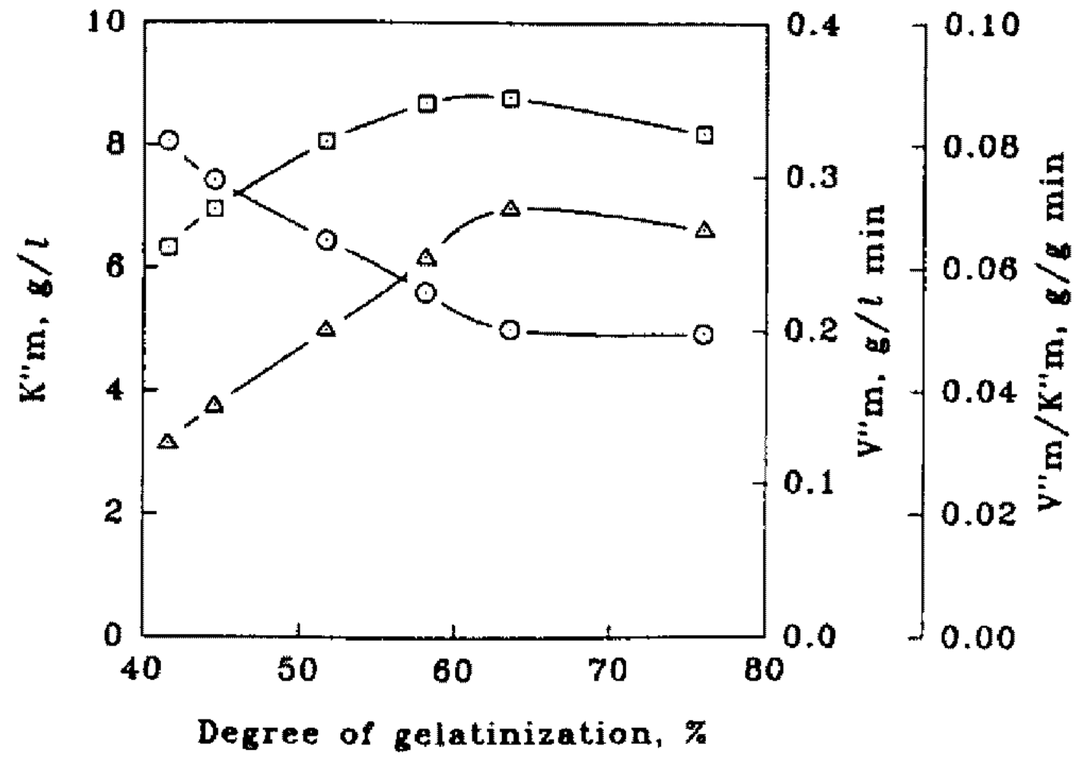

Fig. 3. Kinetic constants, K''_m and V''_{max} evaluated from swollen starch of different degree of gelatinization.
5, 10, 15, 20, 50, and 100 g/*l* of swollen starch with different degree of gelatinization, 0.1 unit of CGTase/g starch
⊙; apparent Michaelis-Menten constant (K''_m), ⊡; apparent maximum reaction rate (V''_{max}), △; V''_{max}/K''_m

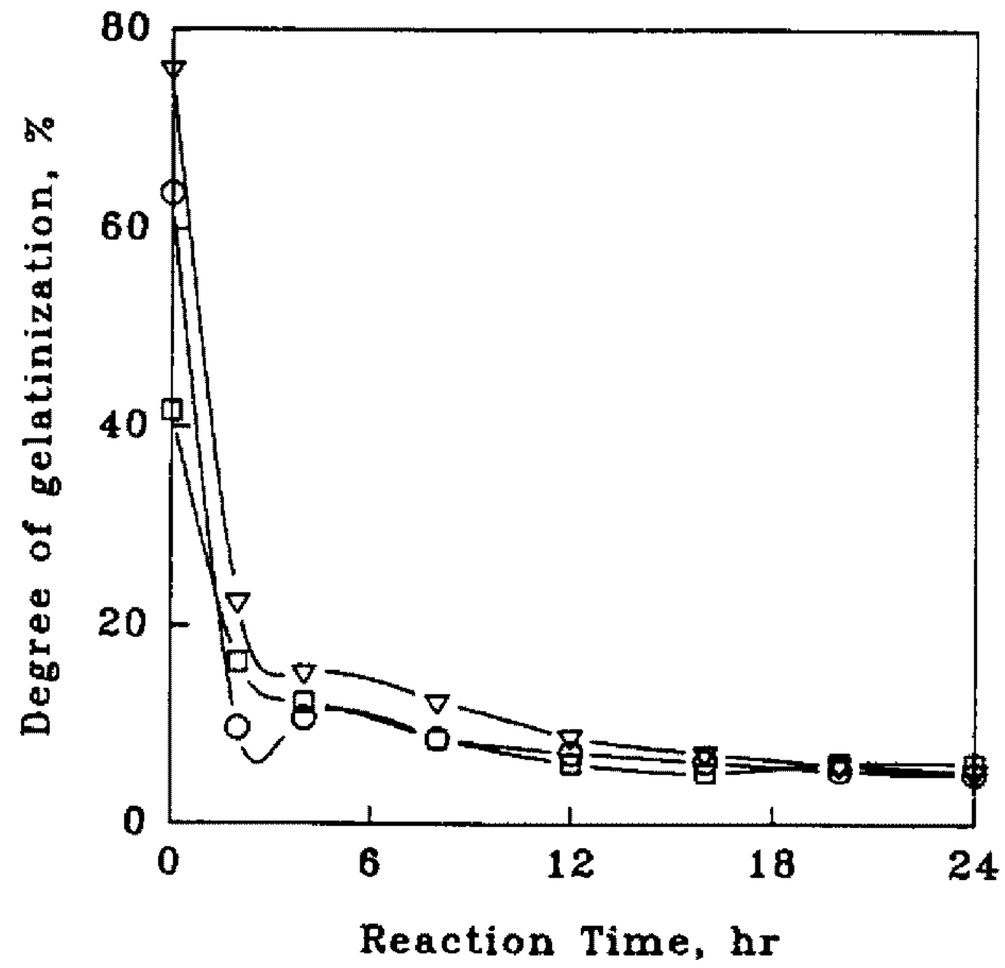

Fig. 4. Changes of the degree of gelatinization of residual swollen starch during CD production reaction.
Initial degree of gelatinization of swollen starch, □; 41.56%, ○; 63.52%, ▽; 76.01%

에 따라 꾸준히 증가하였으며, 63.52%에서 최고값인 0.351 g/*l*·min를 보였으며 그 이상의 호화도에서는 오히려 감소하였는데, 이는 위에서 관찰한 반응액 점도 증대에 의한 효소반응의 저해 때문이다. 얻어진 K''_m과 V''_{max} 값으로부터 효소반응의 적절 기질 선정 지표로 활용할 수 있는 V''_{max}/K''_m 값를 구한 결과 호화도 63% 전후에서 가장 높은 값을 얻었다.

팽윤 전분의 효소반응 중의 구조적 변환

호화도 Fig. 4는 호화도가 각각 41.56, 63.52, 그리고 76.01%인 extrusion 전분을 기질로 효소 반응시킨 후 미반응 잔류전분을 회수하여 그 호화도의 변화를 나타낸 것이다. 호화도는 반응초기 4시간까지 급속히 감소하였고 그 이후에는 큰 변화가 없었으며 12시간 후에는 5.5% 전후 정도로 일정하였다. 이와 같은 호화도의 감소는 CD 생성반응에 따라 extrusion 전분의 효소반응을 받을 수 있는 활성부위가 급속히 분해되기 때문이며, 4시간 이후의 잔류전분은 팽윤 전분 분획 중 효소작용을 받기 어려운 비활성 상태의 부분이거나, 팽윤전분의 표면의 말단부위가 α-1,6 결합과 같은 효소작용을 받기 어려운 구조로 변형된 비활성 부분으로 생각된다.

미세결정구조 Fig. 5는 extrusion 전분의 결정구조의 변화를 규명하기 위하여 잔류전분의 X-ray 회절양상을 관찰한 결과로서 전분의 결정도와 반비례관계인 B_b 값(19)을 나타낸 것이다. 초기 팽윤전분은 생전분입자와 비교하여 결정성이 현저히 감소되어 있었고, 또한 반응 후 잔류전분의 X-ray 회절양상도 호화도의 변화와 유사하게 반응 4시간까지 급격히 변화하였으나, 그 이후에는 변화가 거의 없어 효소가 더 이상 작용하기 어려운 비활성 부분이 존재함을 나타내고 있다.

잔류전분의 효소반응성 Fig. 6은 일정시간 효소반응 후 회수한 잔류전분을 다시 기질로 사용하여 CD 생성반응의 초기속도를 구한 결과이다. 반응 4시간까지의 잔류전분은 초기전분에 비하여 그 반응성이 현저히 감소하였으며, 그 이후에는 거의 반응이 일어나지 않았으며, 위에서 관찰한 4시간 이후의 CD 생성반응이 급속히 저하하는 현상과 잘 일치되었다.

팽윤 전분의 구조적 변환 상수

팽윤 전분은 효소반응이 진행됨에 따라 구조적으로 변환된다. 이와같은 변환현상은 kinetic equation을 유도하는데 중요한 요소가 된다. 따라서 팽윤 전분의 구조적 변환에 따른 CD 생성속도의 감소를 초기 팽윤전분의 분해속도($R_{1,CD}$)와 일정시간 반응 후 얻어진 잔류기질의 분해속도($R_{2,CD}$)의 비로 정의하여(20-22), 다음 Eq. (1)과 같이 **Φ**로 표시하였으며, 또한 X는 CD로의 전환율, n은 구조적 변환상수를 나타낸다.

$$\Phi = \frac{R_{2,CD}}{R_{1,CD}} = 1 - X^n = 1 - ([CD_t]/[S_o])^n = 1 - (1 - [S]/[S_o])^n \quad (1)$$

Fig. 7은 팽윤전분의 구조적 변환상수(n)를 구하기

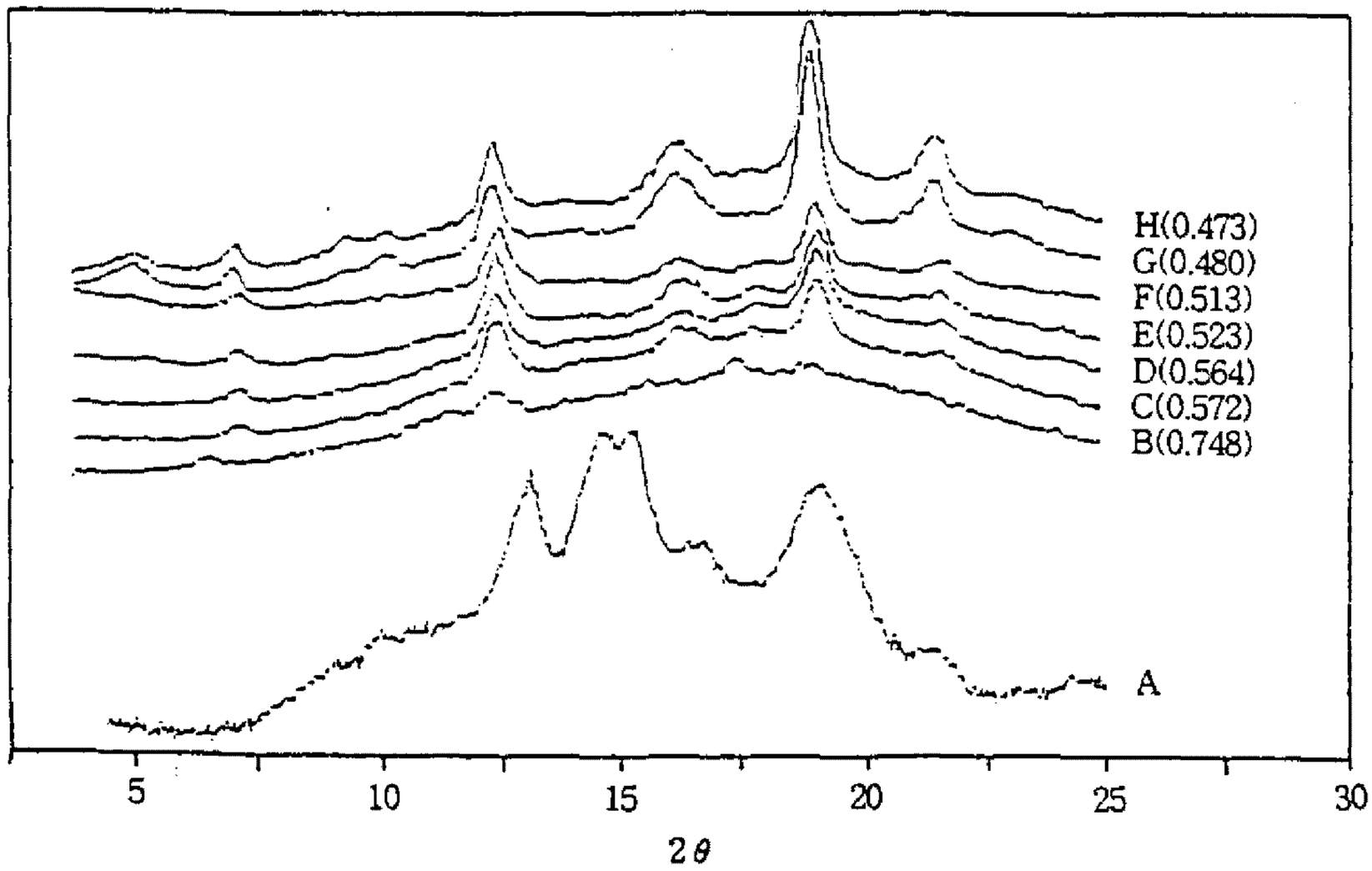

Fig. 5. Changes of X-ray diffraction patterns and broadening size (FWHM: B_b) of raw starch (A) and residual swollen starch after 0 (B), 0.5 (C), 1 (D), 2 (E), 4 (F), 12 (G) and 24 hr (H).

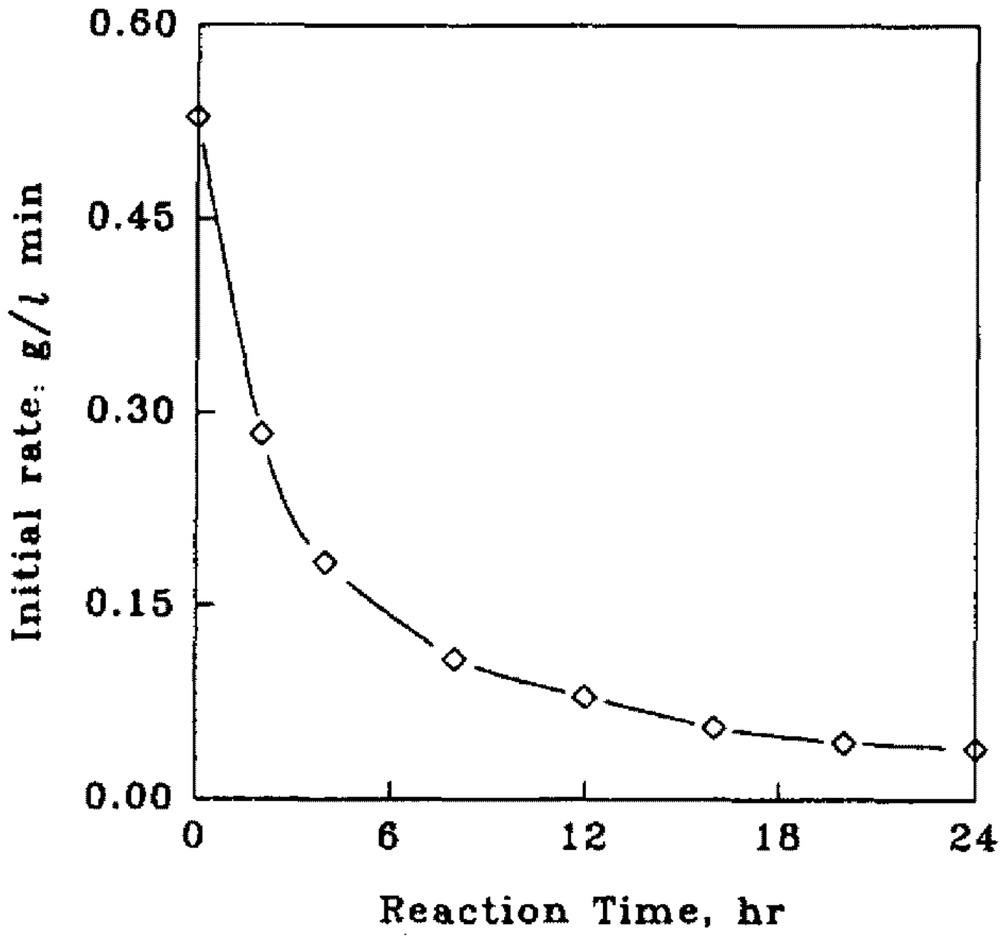

Fig. 6. Changes of initial reaction rates during CD production reaction evaluated by recovered residual starch as substrate.
100 g/*l* of residual starch, 0.1 unit of CGTase/g starch.

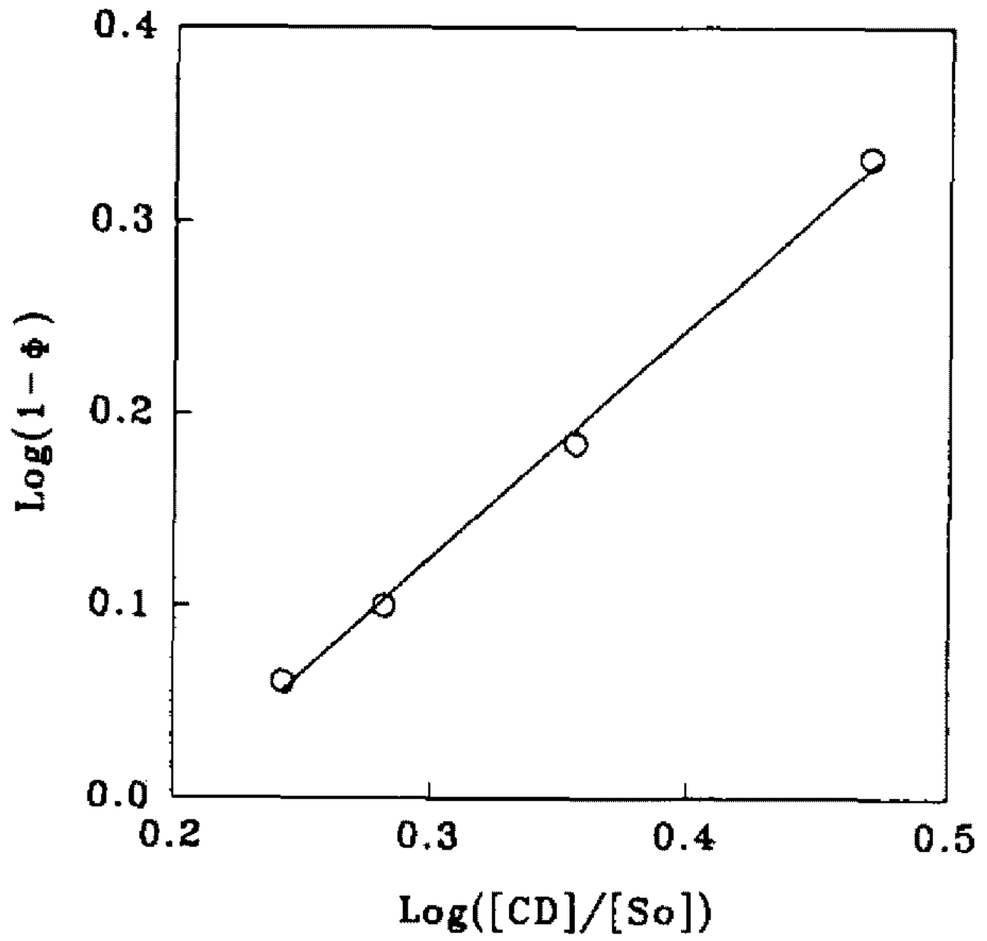

Fig. 7. Evaluation of structural transformation constant (n) of swollen starch.
100 g/*l* of residual starch, 0.1 unit of CGTase/g starch

위하여 Eq. (1)을 Eq. (2)로 변형시키고, 일정 시간 반응 후의 전환률과 (1-Φ) 값을 상용대수로 취하여 도시한 것이며, 그 결과 얻어진 n 값은 0.751이었다.

$$\log(1-\Phi)=n\times\log([CD]/[S_o]) \quad (2)$$

호화도와 비활성 전분과의 상관관계

팽윤전분을 기질로 한 CD 생성반응을 수치적으로 해석하기 위해서는 위에서 관찰한 비활성부분에 대한 해석이 필요하다. 이를 위하여 팽윤전분에 과량의 효소를 첨가하여 1시간 반응시킨 후 남는 잔류전분을 측정하여 이를 비활성 부분으로 정의하였다. Fig. 8은 팽윤 전분의 활성부분(S_a)과 비활성부분(S_i)의 구성 비율과 팽윤 전분의 초기 호화도와의 상관관계를 나타낸 것으로, 호화도는 활성부분과 비활성부분의 비

(S_a/S_i)와 비례관계를 보였다. 위의 비례관계인 초기 extrusion 전분의 호화도(Ω)와 활성부분과 비활성부분의 비(S_a/S_i)는 다음과 같은 관계식으로 표현할 수 있었으며, 여기서 π와 a는 양값간의 변환상수로 각각 2.53×10^{-2}와 15.51×10^{-2}이었다.

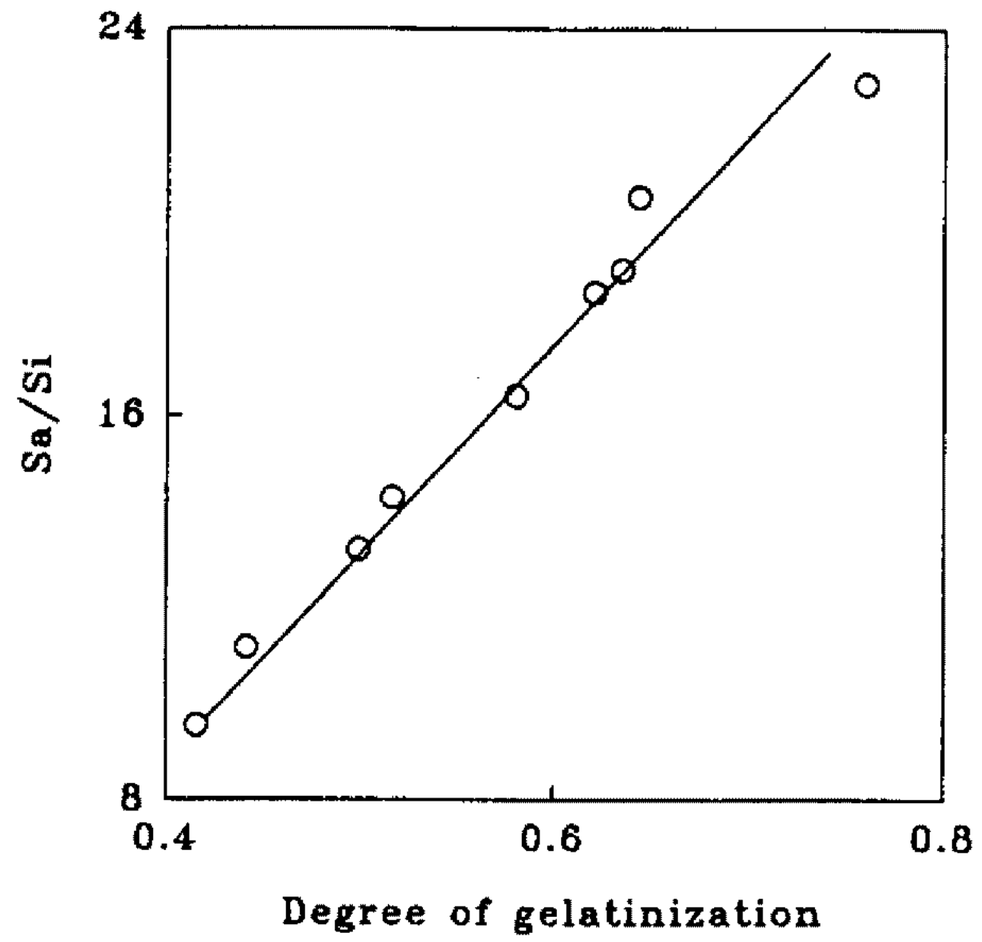

Fig. 8. Correlationship between ratio of accessible to inaccessible portions (S_a/S_i) and the degree of gelatinization of swollen starch.

$$\Omega = \frac{S_{a,o}}{S_{i,o}}\pi + a \quad (3)$$

CGTase의 팽윤 전분에의 흡착

팽윤 extrusion 전분과 같은 불용성 기질의 경우에는 효소 반응은 기질 표면에의 효소 흡착이 선행되어야 하며, 효소 반응은 흡착능과 밀접한 상관관계에 있다(20). Fig. 9(A)는 호화도와 효소의 흡착량의 상관관계를 규명코져 호화도가 41.56, 51.67, 63.52, 그리고 76.01%인 팽윤 전분의 농도를 50 g/*l*까지 변화시키면서 반응초기에 기질에 흡착된 효소량을 측정하여 비교한 결과이며, Fig. 9(B)는 일정시간 효소 반응 후 잔류 전분에 대한 효소의 흡착량을 나타낸 것이다.

CGTase의 흡착량은 팽윤전분의 호화도에는 큰 차이를 보이지 않았으며, 최대흡착량은 거의 일정하였다. 또한 잔류전분당 흡착된 CGTase량도 전 반응기간 중 거의 일정한 수준을 유지하였다. 따라서 CGTase의 팽윤 extrusion 전분으로의 흡착은 불용성 기질에 대한 효소흡착 kinetic modeling 연구를 수행한 Fan (20-22) 등과 Lee(23) 등이 관찰한 바와 같이 효소의 흡착정도는 기질의 상태에 상관없이 일정하다고 가정할 수 있으며, 이때 효소의 흡착상수 K(흡착된 단

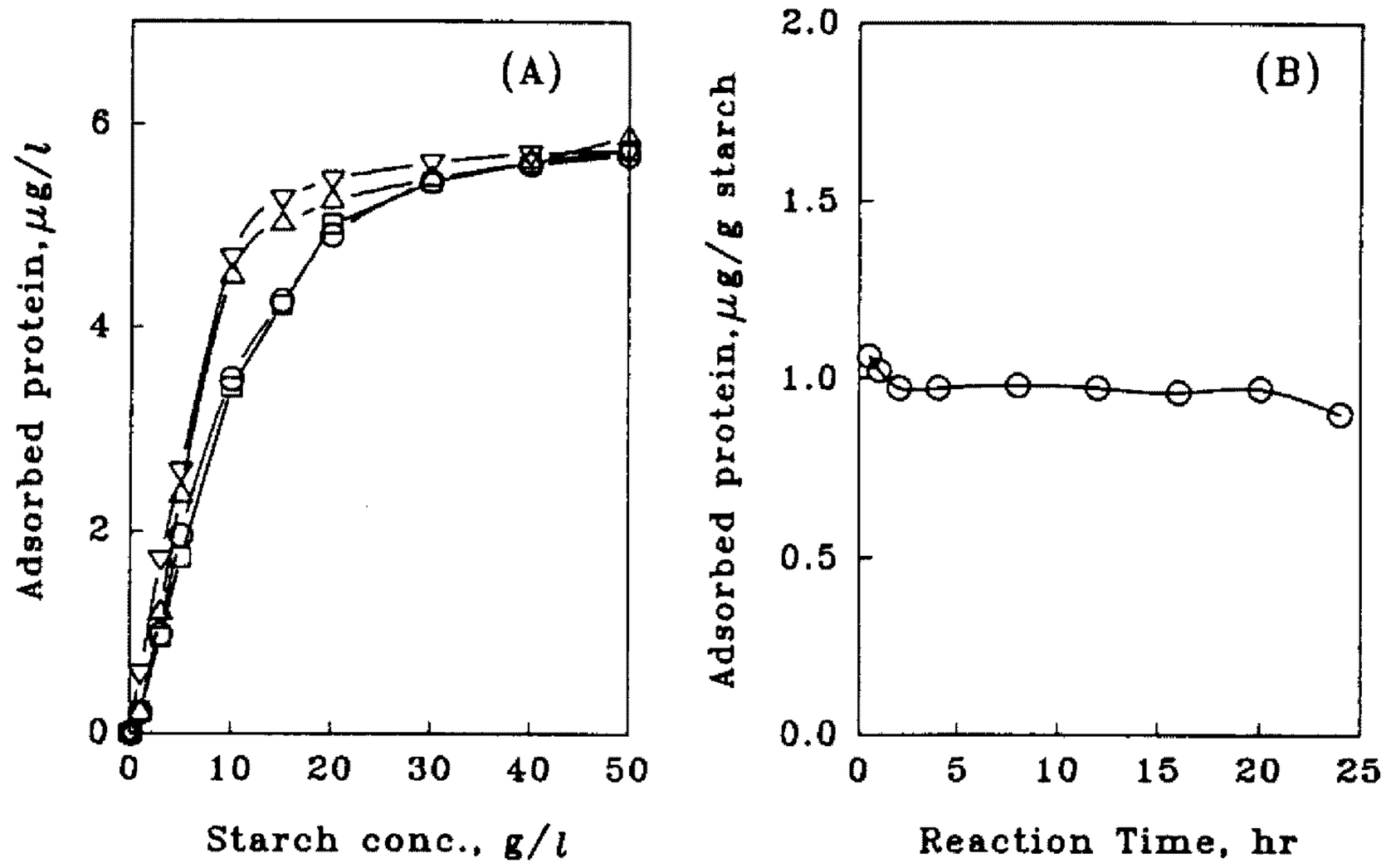

Fig. 9. Adsrobed CGTase on the swollen starch of different degree of gelatinization (A) and changes of specific CGTase adsorbed according to reaction time (B).
1.67 μg protein/g starch, 0.1 unit of CGTase/g starch
(A): adsorbe protein on the swollen starch of degree of gelatinization, □; 41.56%, ○; 51.67%, △; 63.52%, ▽; 76.01%
(B): amount of adsorbed protein on the residual starch

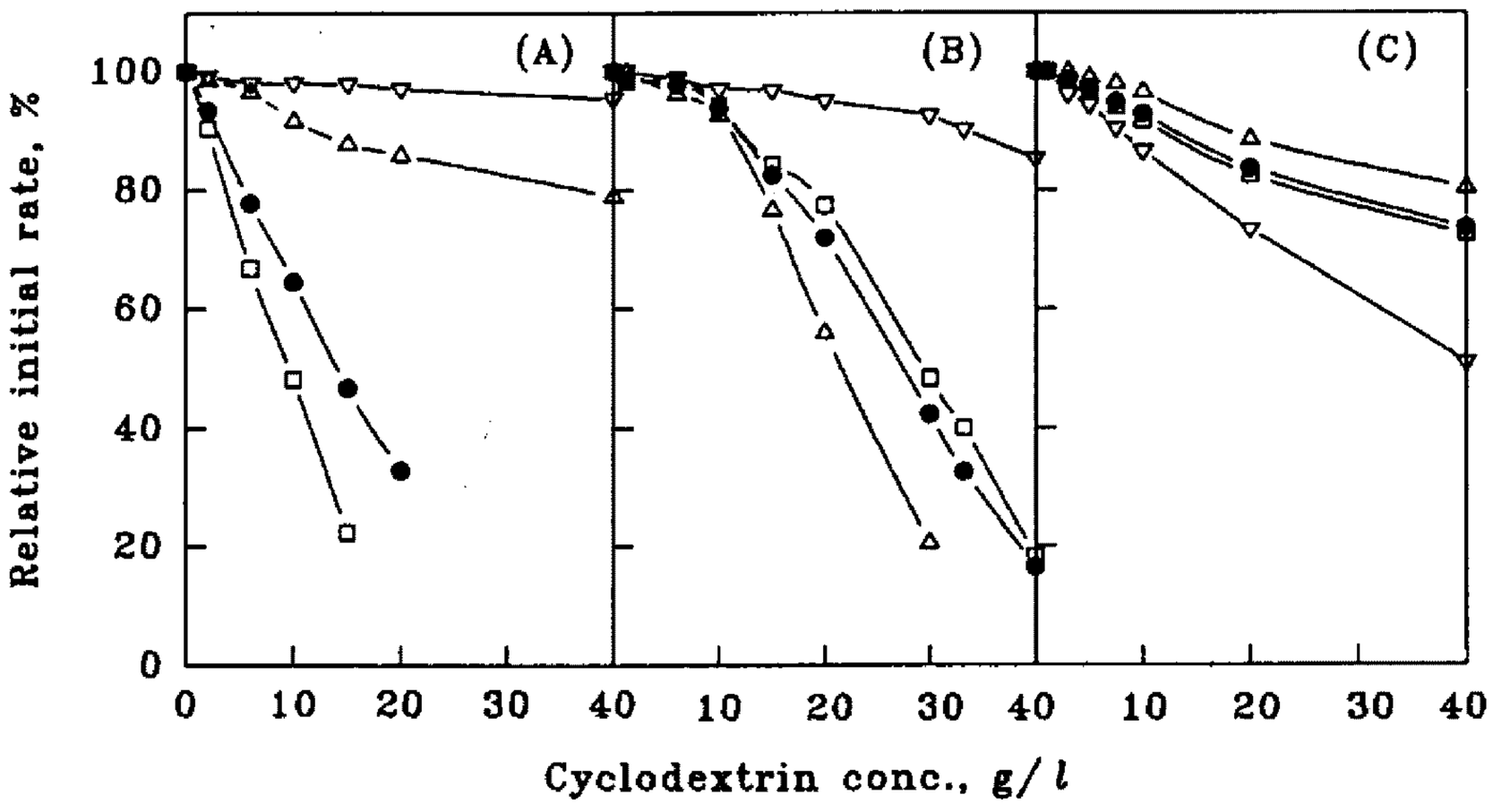

Fig. 10. Inhibitory effect of α-CD (A), β-CD (B), and γ-CD (C) on each CD production reactions.
50 g/*l* of starch, 0~40 g/*l* of each CD, 0.1 unit/g starch of CGTase
●; total CD, ■; α-CD, △; β-CD, ▽; γ-CD

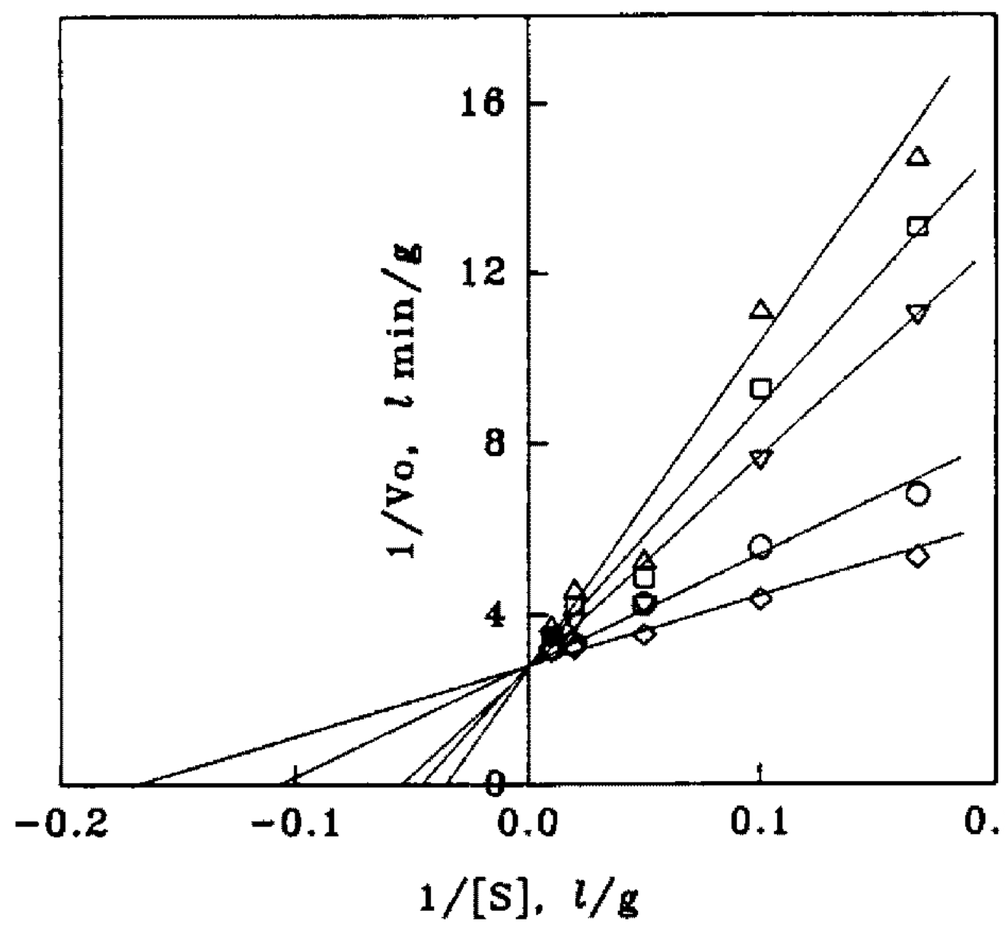

Fig. 11. Lineweaver-Burk plot of CGTase reaction inhibited by α-CD.
α-CD concentration: ◇; 0 g/*l*, ○; 3 g/*l*, ▽; 10 g/*l*, □; 15 g/*l*, △; 20 g/*l*

백질/가용성 단백질)는 1.39이였다.

CGTase의 Product Inhibition Mechanism

CGTase의 product inhibition mechanism과 inhibition constant를 평가하기 위하여 반응액에 산물인 α-, β- γ-CD를 농도별로 첨가하여 반응시킨 후 얻은 초기 반응속도를 Fig. 10에 비교였다. α-CD의 첨가는 α-CD 생성반응에 주로 product inhibition 작용을 하였고, β-CD는 β-CD 생성반응에 주로 저해 작용하였으며, γ-CD의 경우는 큰 영향을 미치지 않았다. 이는 효소의 촉매적 특성(24)으로 첨가된 CD의 종류에 따라 특이적으로 특정 CD의 생산을 저해하기 때문인 것으로 추정된다.

위의 Fig. 1에서와 같이 *Bacillus macerans* 유래의 CGTase는 α-형으로서, β-CD의 경우 최대생성량은 25 g/*l*로 α-CD의 41 g/*l*에 비하여 생성되는 양이 적고, 또한 저해작용도 α-CD보다 적어 kinetic equation의 유도에는 α-CD를 중심으로 한 inhibition mechanism을 주로 적용시킬 수 있는 가능성을 보여주고 있다.

Fig. 11은 α-CD의 inhibition mechanism을 규명하기 위해 α-CD를 0, 3, 10, 15, 그리고 20 g/*l*를 첨가하여 초기속도를 측정하여 Lineweaver-Burk plotting한 결과로서, α-CD는 CGTase에 대하여 competitive하게 효소 작용을 저해함을 알 수 있었으며, $K_{ipα}$ 값은 4.62 α-CD g/*l*였다.

위에서와 같이 팽윤 extrusion 전분을 기질로 한 불균일상 효소반응계에서의 CD 생성반응을 팽윤 전분의 구조적 특성을 가장 잘 나타낼 수 있는 호화도, 팽윤 전분 중의 활성 및 비활성부분의 구성비, 반응중의 잔류전분의 구조적 변환에 의한 반응속도의 감소, 팽윤 전분입자에의 CGTase 흡착, 그리고 α-CD에 의한 product inhibition mechanism의 각도에서 규명하였으며, 상기 반응을 기술할 수 있는 kinetic model의 유도에는 위에서 관찰한 효소반응 양상이 반영되어야 할 것으로 판단되었다.

요 약

팽윤 전분을 기질로 한 불균일상 효소반응계에서의 cyclodextrin glucanotransferase의 cyclodextrin 생성 반응 mechanism을 전분의 구조적 특성을 중심으로 검토하였다. 호화도는 팽윤전분의 구조적 특성을 나타내는 가장 중요한 지표로 사용될 수 있음을 알았으며, 호화도가 63.52%일 때 최대의 CD 생성량을 보였다. 효소반응 중 구조적 변환을 팽윤전분의 호화도, 미세결정구조, 그리고 잔류 전분의 효소반응성의 관점에서 관찰하였으며, 팽윤전분은 효소 작용을 받을 수 있는 활성부분과 비활성부분으로 존재하였으며, 효소반응이 진행됨으로써 팽윤 전분은 효소작용이 어려운 구조로 변환됨을 관찰하였다. 또한 CGTase의 팽윤전분에 대한 흡착양상을 여러 조건에서 검토하였다. CGTase는 각종 CD에 의하여 competitive product inhibition으로 저해받으며, α-CD에 의하여 가장 높은 저해를 받았다. 이는 또한 CD 생성 효소반응기 및 반응공정의 개발에 필수적인 kinetic model을 확립하기 위한 기초자료로 활용될 것이다.

감사의 말

본 연구는 한국과학재단 지원 농업생물신소재 연구센터 1995년도 연구비로 수행되었으며, 연구비 지원에 감사드립니다.

참고문헌

1. Szejtli, J. 1988. *Cyclodextrin Technology*, Pp. 1-78. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
2. Hara, K. and H. Hashimoto. 1986. Application of cyclodextrin. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.* **33**: 152-161.
3. Kobayashi, S., K. Kainuma, and S. Suzuki. 1975. A new preparation method of cyclodextrin. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.* **22**: 6-10.
4. Horikoshi, K. and N. Nakamura. 1979. Process for production of cyclodextrin. *US Patent.* 4,135,977.
5. Hashimoto, H., K. Hara, N. Kuwahara, and K. Arakawa. 1985. Effective conditions on cyclodextrin preparation. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.* **32**: 299-306.
6. Yagi, Y., M. Sato, and T. Ishikura. 1986. Comparative studies of CGTases from *Bacillus ohbensis, Bacillus macerans* and *Bacillus circulans* and production of cyclodextrins using those CGTases. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.* **33**: 144-151.
7. 한일근, 이용현. 1991. 분쇄마찰매체 함유 효소반응계에서의 cyclodextrin 생성과 cyclodextrin glucanotransferase의 작용 mechanism. 산업미생물학회지 **19**: 163-170.
8. 이용현, 박동찬. 1991. Extrusion 전분을 기질로 한 불균일상 효소반응계에서의 cyclodextrin 효소합성. 산업미생물학회지 **19**: 514-520.
9. Lee, Y.H. and D.C. Park. 1992. Direct synthesis of cyclodextrin in a heterogeneous enzyme reaction system containing insoluble extruded starch. *Biochemical Engineering for 2001.* S. Furusaki, I. Endo, R. Matsuno (eds). Pp. 127-129, Springer-Verlag, Tokyo.
10. 이용현, 박동찬. 1993. 구조변형시킨 불용성 전분(질)을 이용한 불균일상 효소반응계에서의 사이클로덱스트린 효소 합성방법. 특허공보 B1-3178. 대한민국 특허청.
11. 김동선, 박동찬, 조명진, 이용현. 1994. 팽윤 extrusion 전분을 기질로 한 불균일상 효소반응계에서의 maltose 생성 반응 특성. 산업미생물학회지 **22**: 283-289.
12. Wootton, K.W., C. Weeden, and N. Munk. 1971. A rapid method for the estimation of starch gelatinization in processed food. *Food Technol.* **23**: 613.
13. 서인영, 허철성, 황인규. 1990. Starch-iodine complex의 변색반응을 이용한 α-cyclodextrin의 정량. 한국식품과학회지 **22**: 802-804.
14. Kaneko, T., T. Nakamura, and K. Horikoshi. 1987. Spectrophotometric determination of cyclization activity of β-cyclodextrin forming cyclodextrin glucanotransferase. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.* **34**: 45-48.
15. Makela, M.J., T.K. Korpela, J. Puisto, and S.V. Laakso. 1988. Nonchromatographic cyclodextrin assays: Evaluation of sensitivity, specificity, and conversion mixture applications. *J. Agric. Food Chem.* **36**: 83-88.
16. Bradford, M.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**: 248-256.
17. 이용현, 김동선, 신현동, 박진서. 1994. Extrusion시켜 팽윤 전분을 기질로 한 새로운 maltose 생산법. 산업미생물학회지 **22**: 106-113.
18. Linko, P., Y.Y. Linko, and J. Olkku. 1986. Extrusin cooking and bioconversions. *J. Food Eng.* **2**: 243-249.
19. Skoog, D.A. 1987. *Principles of instrumental analysis*, Pp 456-485., 3rd ed. Saunders College Pub., Philadelphia.
20. Lee, Y.H. and L.T. Fan. 1982. Kinetic studies of enzymatic hydrolysis of insoluble cellulose; analysis of initial rate. *Biotechnol. Bioeng.* **24**: 2383-2406.
21. Lee, Y.H., M.M. Gharpuray, and L.T. Fan. 1982.

Economic optimization of reactors for the enzymatic hydrolysis of cellulose. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* **12**: 121-138.
22. Fan, L.T. and Y.H. Lee. 1983. Kinetic studies of enzymatic hydrolysis of insoluble cellulose; derivation of a mechanistic kinetic model. *Biotechnol. Bioeng.* **25**: 2707-2733.
23. Lee, S.B., H.S. Shin, Dewey D.Y. Ryu. 1982. Adsorption of cellulase on cellulose: Effect of physicochemiclal properties of cellulose on adsorption and rate of hydrolysis. *Biotechnol. Bioeng.* **26**: 2137-2153.
24. Kobayashi, S., K. Kainuma, and S. Suzuki. 1978. Purification and some properties of *Bacillus macerans* cycloamylose (cyclodextrin) glucanotransferase. *Carbohydr. Res.* **61**: 229-238.

(Received 9 December 1994)