

Cyclodextrin (CD) 합성 효소

김명희 · 손천배

충남대학교 가정대학 식품영양학과

Cyclodextrin glucanotransferase(CGTase, E.C. 2.4.1.19)는 전분, 아밀로스, 아밀로펙틴 등 다당류의 α-1,4-glucan에 작용하여 분자내 전이반응으로 환상화된 텍스트린(cyclodextrin, CD)를 생산하는 효소이다. CGTase에 의한 CD합성반응에 대한 연구는 1939년 Tilden과 Hudson의 *Bacillus macerans* 효소에서 시작되었다. 그 후, 생산균의 탐색과 효소정제에 많은 연구자들의 결과가 발표되었다[1]. CGTase는 CD합성작용(cyclization) 이외에 적당한 수용체가 있으면 글루코실기를 전이하는 반응(coupling), 그리고 올리고당의 불균화반응(disproportionation)을 한다. 즉, CGTase는 대부분 CD합성반응에 이용되고 있지만 coupling반응을 이용하면 각종의 전이생산물을 제조할 수도 있다. 현재까지 알려진 CD합성효소로는 Table 1에 나타냈듯이 *Klebsiella pneumonia*를 제외하고 대부분이 그람 양성인 *Bacillus*에서 유래되었으며 각각의 효소작용성이 다르게 보고되었다. 최근 유전자 조작법의 발전으로 여러가지 CGTase 유전자가 클로닝되고 염기배열이 결정되었다. 아미노산 배열상의 상동성 분석에서 CGTase는 α-amylase 활성영역의 아미노산 배열과 상동함이 밝혀졌으며, 구조-기능면에서 유사함이 알려졌다. 그 상동영역에는 *Aspergillus oryzae*나 돼지 α-amylase의 촉매잔기 또는 기질결합잔기가 존재하고 있었다[1]. CGTase와 α-amylase는 구조와 기능은 유사하지만 CGTase는 주로 당전이반응으로 CD를 합성하고, α-amylase는 주로 가수

분해 반응을 촉매하는 반응 기구상의 차이가 있다.

한편, CD에는 일반적으로, 공업적으로 생산이 가능하고 유용한 것으로 글루코스 6개의 환상올리고당인 α-CD, 글루코스 7개인 β-CD, 글루코스 8개인 γ-CD 3종이 있다. CD는 환상구조의 중심에 분자공동을 가지고 있어 각종 유기화합물을 포접할 수 있는 성질을 나타내어 포접된 유기화합물에 휘발성 물질의 불휘발화, 산화·광분해로부터의 보호, 용해성·색·맛 등의 변화, 반응성의 변화, 유성물질의 유화성부여 등의 작용을 하기 때문에 식품, 의약품, 화장품, 환경등에 많이 응용되고 있다. CD에는 위의 3종 이외에도 글루코실-CD등 분지된 것이 있는데 제조 방법이 매우 어렵고 결정도 얻어지지 않으며 성질도 보통의 CD와는 크게 다르게 나타난다. Fig. 1에는 지금까지 제조된 CD를 분류해 놓았는데 이외에도 가지부분에 글루코실 이외에 갈락토실, 당알콜 등을 갖는 특수한 것들도 있다.

이상과 같이 산업적으로 매우 중요한 위치를 차지하고 있는 CD는 Bio-product로서 산업적인면 뿐만이 아니라 환경적인면에서도 많은 이용가능성이 높기 때문에 미래산업에 꼭 필요한 기능성소재이기도 하다. 따라서 본고에서는 CD의 수요동향, 연구동향 및 전망에 대해서 간략하게 소개하고자 한다.

CD의 수요동향

CD의 기능은 ① 휘발성 물질의 안정화, ② 산화방지, ③ 특이취제거, ④ 고미의 억제, ⑤ 유화작용, ⑥ 조해성물질의 안정화 등으로 많은분야에서 이용되고 있다. 용도분야별 수요량 비율은 식품용 75~80%, 의약품 15~20%, 그외 5~10%는 화장품, 농약용, 공업용으로 사용하고 있다. 이중 식품용에 많이 사용되고 있는 α, β, γ-CD 혼합액 상품의 수요가 가장 높다[12].

식품

햄·소시지와 생선어묵 등의 특이취를 억제, 감귤류 분말주스의 고미억제, 겨자등의 향신료의 향기보유, 분말식품(분말장류, 분말주스, 분말상품, 분말추출물등)의 기본재료, 마요네즈, 소스등의 유화조제, 캔디의 끈적임 방지 등에 사용되고 있다.

Table 1. Cyclodextrin glycosyltransferase-producing microorganisms

Producing strains	Major type of the produced CD	Reference
<i>Bacillus macerans</i>	α	1
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> AL 35	α	2
<i>Klebsiella pneumoniae</i> M5a1	α	3
<i>Alkalophilic Bacillus</i> sp.	α	4
<i>Bacillus megaterium</i>	β	5
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	β	5
<i>Bacillus circulans</i>	β	6
<i>Bacillus coagulans</i>	β	7
<i>Bacillus ohbensis</i>	β	8
<i>Bacillus subtilis</i> No. 313	γ	9
<i>Bacillus</i> sp. KC 201	β	10
<i>Bacillus brevis</i> CD162	β	11

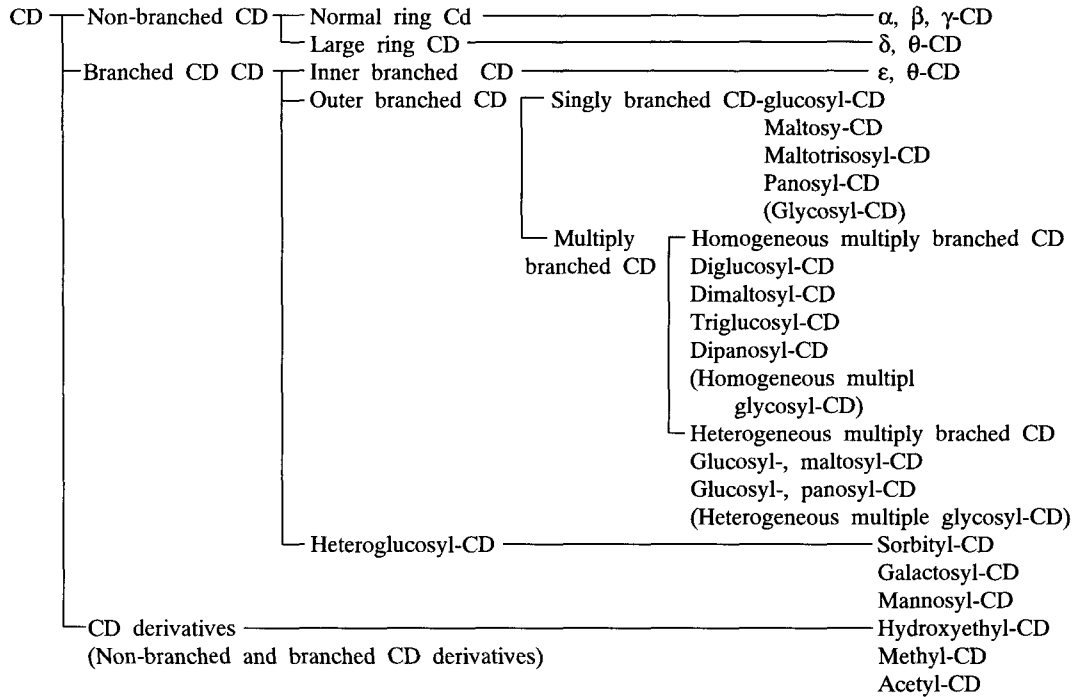


Fig. 1. Classification of various kinds of CDs.

의약품

비타민 A, D, prostaglandin, nitroglycerine 등의 제제에 안정화, 산화방지 등의 기능을 이용하여 사용되고 있다. 그의 수난 용성 항생물질 스테로이드의 액제화를 위한 유화제로도 사용되고 있다.

기타

화장품에 식품, 의약품과 비슷한 사용예가 있다. 농약에는 불안정원체의 안정화와 제방성화의 시도, 화학반응으로 일부기를 보호하는 특정반응을 선택적으로 수행하는 등의 시도가 있지만 아직 본격적으로 실용화는 되지 않고 있다.

유도체

β-CD의 용해성을 증가시키기 위해 메칠기와 히드록실프로필기를 도입한 것이 수년전부터 시범적으로 출하되어 의약품, 화장품의 가용성화를 시험하고 있다. 또한 말토오스를 붙인 말토실 CD와 글루코스를 붙인 글루코실 CD는 물과 유기용매에 가용성을 비약적으로 향상시켜 의약품, 화장품 등의 이용에 시험되고 있다.

연구동향

CGTase에 의한 CD합성연구는 과거 CGTase 생산균의 탐색과 개발, 그리고 효소학적·분자생물학적 연구를 주로 수행하여 산업적으로 사용되는 효소들을 개발하였다. 그러나, 여전히

새로운 형태의 CD를 합성하기 위해 CGTase의 반응기전에 대한 효소반응 기구해석 연구가 학계, 연구계, 산업계에서 활발히 이루어지고 있다. 그 이유는 현재까지 수행한 연구대상은 α-, β-, γ-CD가 주로서 8개 이상의 당잔기를 갖는 CD의 생성이 어렵기 때문이다. 즉, γ-CD가 이용 가능한 최대 크기이지만 더 큰 CD를 합성하기 위해서는 역시 반응기구의 해석이 이루어져야 분자설계가 가능할 것이다.

현재까지 연구된 CGTase의 촉매기구를 보면, 각종 기질을 이용한 실험에서 -1,4-글루칸이 효소 활성 부위의 반응부위에 나선구조로 결합하여 비환원 말단으로부터 환상화하여 CD가 합성되는 것으로 생각되고 있다. CGTase에는 주로 α-CD를 합성하기 쉬운 타입인 α-CGTase와 β-CD를 합성하기 쉬운 타입인 β-CGTase 그리고 γ-CD를 합성하기 쉬운 타입인 γ-CGTase 등이 있다. 이들의 CD생성에 있어서 특이성은 활성 부위안의 환상화하기 쉬운 글루코스 잔기수에 의존하며 환상화의 차이는 효소의 cleft 구조에 기인한다. *B. stearothermophilus*(α-CD 타입)과 *B. circulans* (β-CD 타입)의 CGTase에 대해서 비교해 보면 cleft를 구성하는 34개의 아미노산 잔기중 8잔기에 치환이 보인다. 치환의 대부분이 Ser-85 부근의 loop 구조(3잔기 치환)과 Glu-260부근의 loop구조(3잔기 치환)에 집중하고 있으며 또한, *B. circulans* 효소의 Ser-85 부근에는 역평행 β-sheet를 형성하며 *B. stearothermophilus* 효소와는 다른 2차 구조를 가지고 있다. 이들 2가지 loop는 만곡한 cleft의 각각 양단 부분에 위치하며 그부분의 cleft 구조가 기질의 환상화 양식에 영향을 주는 것으로 알려져 있다.

현재, CD 합성 반응 모델로는 ① 우선 기질인 α -1,4-글루칸 사슬이 만족한 활성 cleft를 따라 결합하여 비환원 말단측에서 나선형 환구조를 형성한다. Cleft 폭을 고려하면 나선형 환구조는 1회 감긴것에 상당한다. 이때 비환원 말단은 수용체 결합 부위에 결합을 한다. ② Cleft 바닥부분의 촉매 잔기에 의해 기질의 α -1,4-결합이 절단되고 글루칸사슬의 환원 말단측은 cleft에서 유리되며 비환원 말단측은 반응 중간체로서 환구조를 유지한 상태로 cleft에 남는다. ③ 환원 말단측의 유리화 더불어 수용체 결합부위에 결합하고 있던 비환원 말단은 촉매부위로 이동하고 중간체 자신의 환원 말단과 결합함으로써 환상 올리고당의 CD가 생성된다.

이 반응모델은 CGTase가 글루코스 잔기수가 다른 CD를 동시에 생성하는 현상을 합리적으로 설명한다. 즉, 글루칸 사슬이 환구조를 형성하여 결합할 때 환구조의 일부는 cleft 상부로 부터 밀려 나가게 되어 이 부분의 글루코스 잔기는 효소에 의해 인식되지 않는다. 이 때문에 환상화하는 글루코스 잔기수는 엄밀하게 결정되지 못하는 것으로 생각된다. Cleft상부에서 밀려나온 글루코스 잔기수가 많을수록 고분자의 CD가 생성하며 적을수록 저분자의 CD가 생성하게 된다.

이상과 같이 CGTase의 구조와 기능 발현기구 및 CD합성모델은 연구자들의 노력으로 대부분 밝혀졌지만, 앞으로 효소활성과 cleft 구조와의 상관 관계를 상세하게 해석하여 이용면에서 훨씬더 유리한 글루코스 잔기수가 8개 이상인 CD생산을 위해 더 많은 연구가 필요하다고 사료된다.

CGTase의 산업적 이용을 위한 연구

CGTase를 이용한 Coupling sugar 합성

CGTase의 전이 작용을 사용하여 제조한 최초의 물질은 설탕에 글루코실기를 α -1,4-글루코시드 결합시킨 coupling sugar이다. 이 당질은 충치 원인균인 *Streptococcus mutans*가 이용하기 어려운 당질로 동물 실험 결과 충치 예방 효과가 커 각종 식품에 응용되고 있다.

Hesperidin dihydrochalcon의 가용화

Hesperidin은 rhamnose와 glucose를 함유하는 flavonoid 배당체의 일종으로 무미한 물질이지만 알칼리 개환시켜 수소를 첨가시킨 뒤 rhamnose를 제거시킨 Hesperetin dihydrochalcon glucoside(HDCG)는 강한 감미를 나타낸다. Hesperidin은 밀감이나 과일 껍질 등에 다량으로 존재하므로 추출 가능하여 감미제로서 각광을 받고 있다. 그러나 이 물질은 감미는 강하지만 물에 녹기 어려워 실용화에 문제점이 있는데 CGTase의 전이 작용으로 glycosyl기를 부가시켜 용해도를 상승시킬 수 있다.

Stevioside의 개량

생물산업

Stevia는 남미 파라구아이 원산으로 동남아 등지에서도 재배되며 감미 물질인 steviol 골격의 배당체이다. 그중에서 3개의 글루코스 분자를 갖는 stevioside가 주성분이며 3개당을 갖는 경우도 있다. Stevioside에는 식품 안전성의 문제가 있어 CGTase의 글루코실 전이반응으로 감미와 미질을 향상시킬 수 있다.

Glycosyl-Xylose 합성

CGTase의 당전이 작용의 유효 수용체로는 글루코스, 말토오스, 슈크로스이외에 글루코스를 함유하는 배당체가 있으나 자일로스, 소르보스도 수용체가 될 수 있다. 자일로스는 5탄당에 속하며 반응성도 높기 때문에 식품가공시 가열 공정에 사용하여 향기성분의 개량에 사용되고 있다. 그러나 반응성이 너무 높아 약한 향기를 필요로 할 때는 사용하기가 어려웠는데 전분-자일로스 혼합액에 CGTase를 작용시켜 생산한 자일로올리고당은 이러한 결점이 보완되므로 현재 초코렛이나 쌀과자 등의 품질개량에 사용되고 있다[13].

Rutin의 가용화

Rutin은 플라보노이드 배당체로서 글루코실기가 부가되면 쉽게 녹게된다. 이 물질은 천연색소, 항산화제로서 이용되는 이외에 안토시아닌계 색소의 안정제로서 용도가 넓다. 전이위치는 rutin구조중 글루코스 분자의 4위치이다[14]. 이 경우 6번 위치에 람노스가 존재하므로 *Bacillus macerans*등이 생산하는 CGTase에 의해서는 전이반응이 어려우나 *B. stearothermophilus*의 CGTase에서는 전이가 일어난다. 그러나 아직 수용체와 효소 반응성에 대한 충분한 연구는 미진하다.

L-Ascorbic acid의 당부가 합성

L-ascorbic acid는 의약품, 식품에 방대한 용도를 가지고 있는데 일부 CGTase가 환원성 위치인 2번위치의 OH기에 글루코실기를 전이시켜 안정형 ascorbic acid를 합성한다. CGTase는 지금까지 글루코실 내지는 배당체의 글루코실 잔기의 4번 위치에 있는 OH기에 글루코실기를 특이적으로 전이하며 글루코스 이외에도 여러 가지 당류를 전이시키는 특이성을 가지고 있다[1].

화장품에 이용

CD의 향료 포접성을 이용하여 화장품의 향기성분의 유지기능을 향상시킨 제품들이 출시되고 있다. 일본의 資生堂化粧品(株)의 경우, 2-hydroxypropyl-CD 2-5% 첨가로 약 10배 이상의 효과를 얻고 있으며, 특히 계면활성화제를 사용할 때 발생하는 거품발생에 의한 상품성의 저하방지 효과가 대단히 크다. 또한, 이렇게 복합화된 향료 성분이 천천히 방출되는 능력면에서도 효과적이다. 한편, 복합화된 향료의 피부 흡수성면에

서도 안전성이 높으며 지속성이 훌륭한 화장품 재료로서 응용이 기대되고 있다[15].

비타민류의 배당화 반응

기존의 riboflavin(B2) 배당체는 모두 5'-글루코시드이며 2', 3' 또는 4'-글루코시드는 아직 알려져 있지 않다. 그런데 글루코스의 C-4위치의 OH기에 선택적으로 당전이 활성화와 2-*o*- α -glucosyl-L-ascorbic acid 생성능을 가진 CGTase가 B₂의 C-5' 위치 이외의 OH기에 당전이 반응을 하는 사실이 밝혀졌다. 덱스트린과 B₂ (50 mg%)를 혼합 용액에 CGTase를 작용시킨 뒤, glucoamylase를 작용시키면 B₂-5'- α -glucoside만이 합성된다. 특히, *Sporobolomyces singularis*의 CGTase가 강한 활성을 보유하여 일반 비타민류의 체내 흡수성, 용해도 증대 및 의약품과의 상승작용화에 응용이 크게 기대된다[16].

기타 생리활성 물질에 대한 배당화 및 인지질화 반응

농약으로서 실용화되어 있는 아미노 배당체 항생물질인 kasugamycin은 약물독이 없으며 인체에도 무해하지만 내성균의 출현이 보고되고 있다. 아미노 배당체군 항생물질에 대한 내성화는 OH기의 인산화나 아데닐화에 기인하는데 이 분자 내 OH기를 당으로 보호하게 되면 내성화를 저지할 수 있게 된다. 그런데 *B. macerans*가 생산하는 CGTase는 강한 배당화 활성을 보유하여 항균력을 상승시키는 효과를 준다. 상기 이외에 현재까지 ginsenoside에 대한 -글루코실화 반응, 프락토스의 배당화반응, 알킬알콜의 배당화, 페놀류의 배당화, 티아민(비타민 B1)의 배당화, 수용성 비타민의 인지질화, tyrosinase저해물의 인지질화, genipin의 인지질화, dihydroxyacetone의 인지질화, 방향족 히드록실화합물의 인지질화 등의 반응으로 새로운 기능을 부가하여 부가가치를 높이는 장점이 보고되고 있다[16].

결론 및 전망

미생물이 생산하는 환상 올리고당은 현재 글루코스 6~8개 분자가 α -1,4-결합으로 연결한 CD, 글루코스 17-24 분자 β -1,2 결합한 cyclosoforaose, 그리고 프락토스 6-8개 분자가 β -결합으로 연결한 cycloinulo 올리고당(CF) 등이 알려져 있다. 이들 환상 올리고당은 모두 효소반응에 의해 생산되는 것들로 CD는 cyclodextrin glucanotransferase(CGTase) 작용으로 전분으로부터, cyclosoforaose는 환상 β -1,2glucan 합성효소(cyclic β -1,2glucan synthetase)작용으로 UDP-glucose와 ATP로부터, 그리고 CF는 CF fructanotransferase(CFTase)의 작용으로 inulin으로부터 생성된다. 이들 환상체는 그 환상 구조 특성에 의해 직선 올리고당과는 다른 물리·화학적 성질을 나타낸다. 예를 들어서 CD는 소수성 저분자와 포접 화합물을 형성하며

CF는 금속이온과 포접 화합물을 만들수가 있다. 그리고 이런 성질을 이용한 의약, 식품, 화장품 등의 분야에서 응용연구가 활발히 진행되고 있다.

이상에서 설명하였듯이 가장 일반적인 CD의 산업적 응용연구는 식품, 환경, 의약등 폭넓은 분야에 응용을 목표로 진행되고 있으며, 점점 그 수요도 증가하고 있다. 따라서, CD합성효소 연구에 대해서는 효소 단백질 자체를 변화시켜 작용 변화와 기질 구조를 변화시킴으로서 작용 형식 변환의 방향으로 연구가 진행되어야 할 것이며, 기질도 효소도 반응 환경에 의해 다양하게 변화하는 것으로 생각되며 환경 변화에 의한 작용 양식의 해석 연구를 통하여 지금까지 알려져 있지 않은 효소 작용성의 창출이 기대된다. 또한, CD의 생산에 대해서는 대환상 CD, 분지CD 등의 특수한 CD의 성질이 해명됨과 동시에 수요가 증가할 것으로 보인다. 한편, 학술적으로는 환상의 성질이 가지 부분에 의해 어떻게 변화되어 어떠한 기능을 나타낼까 하는 연구등, 앞으로 더욱 CD연구가 왕성하게 되어 그 성과가 당질과학의 진보와 산업에 지대한 공헌을 할 것으로 전망된다.

참고문헌

- Okaga, S., Kitahata, S., Shiosaka, M., Bunya, H., Kubota, M., Sakai, S. and Tsujisaka, Y. 1991. Application of cyclodextrin glucanotransferase. Denpun Kagaku **38**, 211-215.
- Yu, E. K. C., Aoki, H. and Misawa, M. 1988. Specific α -cyclodextrin production by a novel thermostable cyclodextrin glycosyltransferase. Appl. Microbiol. Biotechnol. **28**, 377-382.
- Bender, H. 1977. Cyclodextrin glucanotransferase from *Klebsiella pneumoniae* M5al. Arch. Microbiol. **111**, 271-282.
- Nakamura, N. and Horibkoshi, K. 1976. Purification and properties of cyclodextrin glycosyltransferase of an alkalophilic *Bacillus sp.* Agri. Biol. Chem. **40**(5), 935-941.
- Kitahata, S. and Okada, S. 1982. Comparison of action of cyclodextrin glucanotransferase from *B. megaterium*, *B. circulans*, *B. stearothermophilus* and *B. macerans*. J. Jap. Soc. Starch Sci. **29**(1), 13-18.
- Pongsawasdi, P. and Yagisawa, M. 1988. Purification and some properties of cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus circulans*. Agri. Biol. Chem. **52**(5), 1099-1103.
- Akimura, K., Yagi, T. and Yamamoto, S. 1991. Purification and properties of *Bacillus coagulans* cyclodextrin glucanotransferase. J. Ferment. Bioeng. **71**, 322-328.
- Sin, K. A., Nakamura, A., Kobayashi, K., Masaki, H. and T. Uozumi. 1991. Cloning and sequencing of cyclodextrin glucanotransferase gene from *Bacillus ohbensis* and its expression in *Escherichia coli*. Appl. Microbiol. Biotechnol. **35**, 600-605.
- Kato, T. and Horikoshi, K. 1986. A new γ -cyclodextrin-

- forming enzyme produced by *Bacillus subtilis* No. 313. Denpun Kagaku. **33**(2), 137-143.
10. Kitamoto N., Kimura, T., Kito, Y. and Ohmiya, K. 1992. Cloning and sequencing of the gene encoding cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus* sp, KC201. J. Fermentation and Bioengineering. **74**(6), 345~351.
 11. 김명희, 손천배, 임영희, 오태광. 1997. *Bacillus brevis* CD 162 cyclodextrin glycosyltransferase 의 정제 및 특성. 한국농화학회지. **40**(6), 465-471.
 12. 1993. Bioproduct; Cyclodextrin. Bio Industry. **10**(6), 46-48.
 13. Kitahata, S. and Okada, S. 1976. Studies on cyclodextrin glycosyltransferase. J. Biochem. **79**, 641-648.
 14. Suzuki, Y. and Suzuki, K. 1991. Enzymatic formation of 4'- α -D-glucopyranosyl- rutin. Agric. Biol. Chem. **55**, 181-187.
 15. Kometani, T., Terada, Y., Nishimura, T., Takai, H. and Okada, S. 1994. Purification and characterization of cyclodextrin glucanotransferase from an alkalophilic *Bacillus* species and transglycosylation at alkaline pHs. Biosci. Biotech. Biochem. **58**, 517-522.
 16. Suzuki, Y., Kim, Y.H., Uchida, K. and Takami, M. 1996. Enzymatic synthesis of glycosylated and phosphatidylated biologically active compounds. J. Appl. Glycosci. **43**, 273-282.