

## Cyclodextrin의 분자구조적 특성 및 산업적 생산과 활용

이용현 · 신현동  
경북대학교 유전공학과

### 서론

Cyclodextrin(CD)은 전분이나 아밀로오즈, 아밀로펙틴, dextrin, glycogen, long-chain maltooligosaccharide등을 기질로 하여 cyclodextrin glucanotransferase(CGTase)에 의해 생성되는 포도당분자가  $\alpha$ -1,4-glycosidic 결합으로 연결된 환상형의 비환원성 maltooligosaccharide으로 약 100년 전 A. Villiers에 의해 전분의 세균 분해물에서 결정상 텍스트린으로 발견되었고, 그 후 1903년에 Schardinger에 의해 이 물질이 환상 구조를 이루고 있으며 주로 *Bacillus macerans*가 생산하는 것으로 밝혀졌다(1).

1950년대에 이르러 Cramer 등에 의해 CD의 색소에 대한 포접능에 대한 보고가 이루어진 후 그 활용성이 확인되면서 CD 생성 효소 생산 균주의 개량 및 CD의 분리 정제에 관한 연구가 활발히 진행되었고, 1970년대에 이르러 일본에서 산업화에 성공하기에 이르렀다(1). 또한 CD활용에 관한 연구도 활발히 진행되어 CD의 특징인 포접능을 식품, 의약품, 화장품 등 여러 분야에 다양하게 점차적으로 확대되고 있다. 국내에서의 CD활용은 1984년에  $\beta$ -CD가 수입되면서 시작되었고, 1986년부터 제약 및 식품 회사를 중심으로 본격적으로 활용되기 시작하여 현재 그 활용은 점차 확대되어가고 있는 실정이다.

본고에서는 CD의 구조 및 특징과 그 유도체들에 대해 살펴보고, CGTase의 효소반응특징과 산업용 효소로의 개발에 관하여 정리하였다. 또한 CD생산 공정의 개발 동향과 의약품, 식품, 그리고 생물 공정 분야에서의 활용에관하여 연구 동향을 살펴보았다.

### CD의 구조 및 특징

CD는 결정형의 비흡수성 물질로 현재 세 가지 종류가 산업적으로 대량생산되어 널리 활용되고 있으며, 그 구조는 Fig. 1에서 보는 바와 같이 포도당분자가 각각 6개, 7개, 8개가 환상형으로 연결된 도넛 모양으로 그 수에 따라  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD, 그리고  $\gamma$ -CD로 불리고 있다.

Table 1은 CD의 구조적 특성을 요약한 것으로, 그 중  $\beta$ -CD는 그 화학적 구조가 다른 종류에 비하여 열역학적으로 안정

하며 많은 균주가 이 CD를 생산하는 효소를 분비하여 산업적으로 가장 경제성 있는 CD로 알려져 있으나, 물에 대한 용해도가 낮은 결점이 있다(2).

CD는 Fig. 2과 같은 환상의 고리구조로 인해 안쪽에 공동(cavity)을 갖고 있으며, 각 포도당의 외부로 노출되어 있는 C6 위치의 hydroxyl group이 친수성을 나타내는 반면, 내부는 수소 결합과 ether 결합으로 인하여 소수성을 띠게 된다(3-6). 따라서 외부에서 소수성을 가진 물질이 첨가되면 Fig. 3에서 보는 바와 같이 CD는 host로 작용하여 외부 물질을 공동에 포접하여 복합체(inclusion complex)를 형성하게 되며, 이러한 특성에 따라 포접된 guest 물질을 보호하고 안정화시키는 역할을 하여 결국 포접된 물질의 물리적, 화학적 성질을 변화시

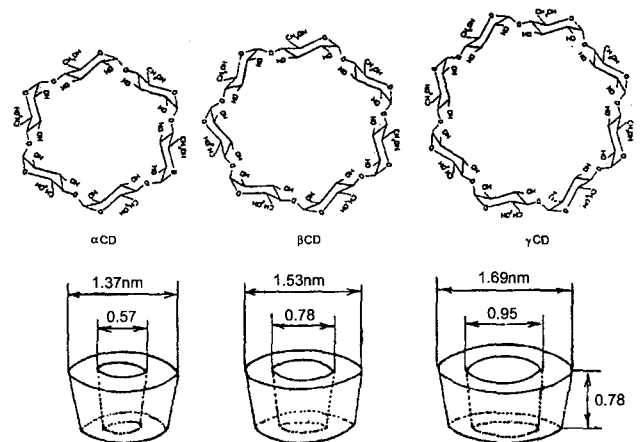


Fig. 1. Structure and molecular dimensions of  $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\gamma$ -cyclodextrins.

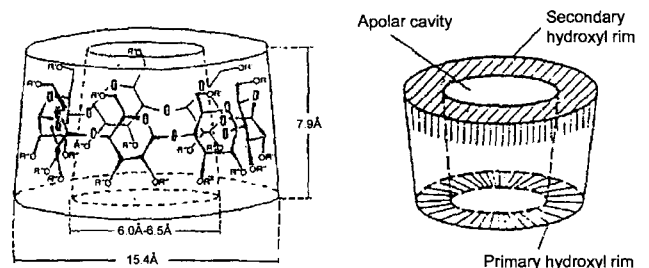
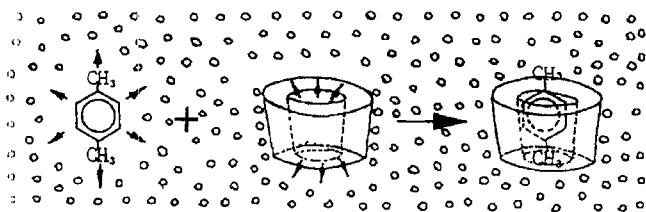


Fig. 2. Functional arrangement and structural scheme of cyclodextrin.

**Table 1.** Characteristics of  $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\gamma$ -cyclodextrins.

	$\alpha$ -CD	$\beta$ -CD	$\gamma$ -CD
Number of glucose units	6	7	8
Molecular weight(Da)	973	1,135	1,297
Cavity diameter(Å)	4.7-5.3	6.0-6.5	7.5-8.3
Height of torus(Å)	7.9±0.1	7.9±0.1	7.9±0.1
Diameter of outer periphery(Å)	14.6±0.4	15.4±0.4	17.5±0.4
Approximate volume of cavity(Å <sup>3</sup> )	174	262	427
( $\alpha$ - <sup>20</sup> D(H <sub>2</sub> O, 1%))	+150.5°	+162.5°	+177.4°
Solubility(g/100ml H <sub>2</sub> O, 25°C)	14.5	1.85	23.2
pKa(by potentiometry) at 25°C	12.332	12.202	12.081
Crystal form(from water)	hexagonal plates	monoclinic parallelograms	quadratic prisms
Hydrolysis by <i>A. oryzae</i> $\alpha$ -amylase	negligible	low	rapid

**Fig. 3.** Schematic representation of cyclodextrin inclusion complex formation. p-Xylene is the guest molecule and the small circles represent the water molecules.

할 수 있다.

CD가 복합체를 형성하는데 영향을 미치는 가장 큰 요인은 guest 분자의 입체 구조적 특성이다. 즉  $\alpha$ -,  $\beta$ -, 그리고  $\gamma$ -CD의 공동의 내경이 다르므로 Table 2와 같이 각각의 공동에 적합한 분자 구조의 화합물이 특이적으로 포접하게 된다(3). 또한 guest 분자의 극성, 전하, 온도, 그리고 이온 강도와 같은 외부 환경 조건도 중요한 요인으로 작용하고 있다. 복합체 형성의 결합력은 현재까지 잘 규명되어 있지 않고 있으나, hydrophobic 효과, Van der Waals 결합, 수소 결합, CD 공동내의 고 에너지 분자의 방출에 의한 에너지 감소, 그리고 ligand의 결합에 의한 CD의 환상 구조에 존재하는 strain energy의 방출 등으

**Table 2.** Complex forming ability of cyclodextrins with various guest molecules.

		$\alpha$ -CD	$\beta$ -CD	$\gamma$ -CD
Propionic acid	CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -COOH	+	-	-
Butyric acid	CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -COOH	+	+	-
Biphenyl		+	+	+
Cyclohexane		+	+	+
Naphthalene		-	+	+
Anthracene		-	-	+
C <sub>60</sub>		+	-	-
B <sub>10</sub>		+	+	-
I <sub>2</sub>		+	+	+

로 유추되고 있다(3, 7, 8).

CD는 각종 ligand 화합물의 포접 특성 이외에도 효소와 같은 촉매작용을 유도하기도 하는데, 주로 ester, amide 결합 등을 분해하는 활성을 가지는 것으로 알려졌다(9). 이 경우 비극성 공동은 기질에 대하여 매우 특이적이며, CD내의 hydroxyl기가 nucleophilic한 반응을 촉매 하는 것으로 유추된다. 현재 이를 이용하여 인공 효소(artificial enzyme)를 설계하고자 하는 연구가 진행되고 있다.

CD는 직쇄상의 dextrin보다는 산에 2~5배정도 안정하며, 일반적인 전분 분해 효소에 비교적 안정한 특성을 가지고 있다. 이는 exo형 효소의 작용이 일어나는 비환원성 말단이 존재하지 않기 때문에  $\beta$ -amylase에 의해서는 전혀 분해되지 않으며, endo형 효소인  $\alpha$ -amylase에 의하여 매우 서서히 분해된다. 따라서 CD는 일반적으로 효소에 의해 이용되지 않는 비발효성 당이라 할 수 있다. 또한 CD는 발암성, 변이원성 등의 독성을 전혀 유발하지 않고, 포유 동물, 인체 내에서 쉽게 흡수 대사 된다. 전분의 경우 소장에서 분해되는 것과는 달리 CD는 위나 소장에서 소량 흡수되며, 대부분 결장(colon)내의 미생물 군에 의하여 분해되어 이산화탄소와 물로 배출된다(10).

## CD 유도체의 종류와 특징

$\alpha$ -,  $\beta$ -, 그리고  $\gamma$ -CD는 제 1 세대 CD(또는 parent CD)이라 할 수 있으며, 실제로 parent CD의 활용 범주가 확대되면서 이러한 CD의 특성보다는 보다 더 특수한 형태와 기능을 가진 CD가 요구되어졌다. 이러한 CD를 제 2 세대 CD 또는 CD유도체라 할 수 있는데 효소적(11-17) 또는 화학적(18, 24) 방법을 통하여 parent CD에 다양한 종류의 치환기를 결합시킨 형태이다. CD 유도체는 크게 분지 CD(branched CD), 화학적 변환 CD 유도체, 그리고 CD polymer등으로 구분할 수 있으며, 대부분의 유도체들은 천연 상태의 CD보다 포접능, 용해도 등의 특성이 향상되며, 주로 의약품, 화학 촉매용, 크로마토그래피 담체용 등 특수목적으로 활용되고 있다.

**(1) 분지 CD**

주로 효소적 방법으로 생산되는 branched CD는 크게 glucose, maltose, maltotriose 등 동일한 당류가 가지를 형성하고 있는 homogeneous branched CD와 galactose, mannose 등 다른 종류의 당류가 parent CD에 결합하고 있는 heterogeneous branched CD로 크게 구분할 수 있다(20).

Homogeneous branched CD는 *Bacillus macerans* 유래의 CGTase의 효소 반응시 sodium dodesyl sulfate를 첨가하여 여러 종류의 branched-CD를 합성하는 방법(18)과 debranching enzyme인 pullulanase나 isoamylase의 역반응을 통하여 중합 반응에 의해 생성된다(13, 14).

Hashimoto 등은 lactose를 공여체로 하고, homogeneous branched CDs를 수용체로 사용하여 *Bacillus circulans* 유래의  $\beta$ -galactosidase를 이용하여 galactosyl branched CD를 얻었다. 또한 *Aspergillus oryzae*, *Penicillium multicolor* 유래의  $\beta$ -galactosidase, 커피 열매 유래의  $\alpha$ -galactosidase 등을 이용한 branched CD 합성에 관한 연구도 보고된 바 있다. Hara 등은 jack bean 유래의  $\alpha$ -mannosidase의 전이 작용을 활용하여 공여체인 methyl  $\alpha$ -mannoside와 수용체인 glucosyl- $\alpha$ -CD, maltosyl- $\alpha$ -CD, 그리고 maltosyl- $\beta$ -CD 등을 수용체로 하여 mannosyl branched CD를 합성한 바 있다(20).

위와 같이 얻어진 branched CD는 용해도가 parent CD에 비하여 현저히 증가하며, 포접물의 안정성이 증가할 뿐만 아니

라 화학적 안정성과 효소분해에 대한 안정성이 크게 향상되는 것으로 알려져 있다. 예를 들어 maltosyl- $\beta$ -CD의 경우 원래의  $\beta$ -CD보다 용해도가 90배 이상 증가하고, 각종 지용성 물질을 다른  $\alpha$ -,  $\beta$ -, 그리고  $\gamma$ -CD보다 우수하게 포접하며, 향기 성분의 포접 안정성 증가 및 물성의 개선 등 여러 잇점을 가지는 것으로 보고되고 있다(3, 20). 앞으로 효과적인 산업적 생산법이 개발되어 가격이 낮아지게 되면 높은 용해도, 물성, 그리고 다른 유용한 특성을 가진 branched CD는 식품, 의약품, 그리고 분리 정제 분야에서 매우 중요한 역할을 할 수 있을 것으로 전망된다.

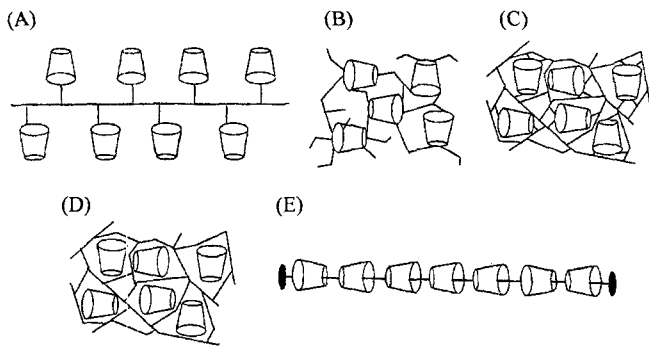
**(2) CD의 화학적 유도체**

화학적 수식에 의해 얻어진 CD유도체의 종류는 약 2천 여종에 이를 정도로 매우 다양한데, 이는 한 종류의 화학 반응이라 하더라도 중합도, 치환도가 다른 여러 종류의 CD 유도체가 얻어질 수 있기 때문이다. 따라서 이러한 CD 유도체를 정확히 구분하기는 매우 어려우나, 화학 반응의 유형에 따라 크게 deuterated CDs, esters, ethers, deoxy derivatives, glucopyranose-ring modified CDs, 그리고 cyclic oligosaccharides로 나눌 수 있다(20). 이중 대표적인 화학적 수식에 의한 CD 유도체의 종류와 그 용도를 Table 3에 나타내었다(19).

이와 같은 화학적 방법에 의하여 얻어진 CD 유도체들도 parent CD에 비하여 각종 특성이 향상되는데, methylation시

**Table 3.** Application of chemically modified cyclodextrin derivatives.

Derivatives	Application
<b>Amination</b>	
Imidazol alkylamino derivatives	Catalyst(model for chymotrypsin)
CD-(OC <sub>2</sub> H <sub>4</sub> NH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub>	Paper sizing
Amino-deoxy-CD	Pharmaceuticals(serum cholesterol level depressant)
Amino-CD	Intermediate for futher CD derivatives
<b>Esterification</b>	
CD-(OH) <sub>21-x</sub> (ONO <sub>2</sub> ) <sub>x</sub>	Molecular weight determination
CD-(OH) <sub>21-x</sub> (ONO <sub>3</sub> ) <sub>x</sub>	Pharmaceuticals(serum cholesterol level depressant)
CD-(OH) <sub>21-x</sub> (OPO <sub>3</sub> H <sub>2</sub> ) <sub>x</sub>	Structure studies
CD-(OH) <sub>21-x</sub> (OCOC <sub>6</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>x</sub>	Structure studies
CD-(OH) <sub>21-x</sub> (OCOR) <sub>x</sub>	Gas chromatography, detergent, plasticizer
CD-O-C(=O)-COOH	Plasticizer
<b>Etherification</b>	
CD-(OCH <sub>3</sub> ) <sub>x</sub>	Molecular weight determination
-NH	Catalyst
$\begin{array}{c} \text{N} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{---} \end{array} \text{-(CH}_2\text{-O)}_7\text{(OH)}_{14}\text{-CD}$	
CD-OCH <sub>2</sub> -CHOH-CH <sub>2</sub> -OH	Cross-linking, sizing
CD-O-(CH <sub>2</sub> -CH-O) <sub>n</sub> R	Surface treatment
CD-O-SO <sub>3</sub>	Treatment of sewage



**Fig. 4.** Scheme of the main types of cyclodextrin polymers. (A) Linear polymers, (B) cross-linked polymers, (C) cyclodextrins immobilized by chemical bonding in/to macromolecular support, (D) cyclodextrins immobilized by physical bonding in/to macromolecular support, and (E) necklace type cyclodextrin polymers.

킬 경우 소수성 물질과의 복합체의 용해성 및 안정성이 증가되고, tosylation과 mesitylation시킬 경우는 적절한 nucleophiles과의 반응으로 여러 가지 유도체를 생산할 수 있는 것으로 알려져 있다. 이러한 특성을 이용하여 화학적 수식된 CD 유도체들은 주로 의약, 촉매, 구조 분석 및 분자량 측정 등의 기초 연구 용도로 쓰이고 있다(19, 20).

### (3) CD dimer 및 polymer

화학적 방법에 의한 CD 유도체 이외에도 여러 가지 CD dimer들과 polymer들이 화학적으로 합성되어 이용 가능성이 보고되고 있는데(20), 중합형태에 따라 크게 Fig. 4와 같이 분류할 수 있다. Linear polymer는 CD의 vinyl 유도체로부터 합성되며, 단백질과 ligand 복합체의 model연구 등에 활용되고

있다. Cross-linked CD polymer는 diepoxides, diisocyanates와 같은 cross-linking agent를 이용하여 CD를 상호 결합시킨 것으로 수용성이며, 주로 의약품의 용해성 증가, bioavailability의 향상, 그리고 저독성 등의 목적으로 활용되고 있다. 불용성 담체에 고정화시킨 대부분의 CD polymer는 크로마토그래피의 고정상으로 inclusion되는 정도에 따라 물질을 분리하는데 주로 이용되고 있다.

## CD의 산업적 활용

위에서 설명한 CD의 복합체 형성능은 식품, 의약품, 화장품 및 농약 등 많은 분야에서 안전성 개선, 반응성 변화, 물성개선 등을 목적으로 이용되고 있는데, 이를 세부적으로 살펴보면 다음과 같다.

### (1) 의약 분야

의약품 분야의 경우 CD의 용도는 운반체, 용해제, 그리고 유도체 등의 보조제등으로 쓰일 수 있다. CD와 복합체를 형성한 의약품은 보통 약품에 비하여 수용 상태로 매우 빠르게 위장으로 운반되며, 위장내에서 해리되어 흡수된다. 의약분야의 복합체 형성능은 본래의 물리적, 화학적 성질을 변화시키는데 주로 hormone류, vitamin류, 항암제 등 각종 의약품과 CD의 포접에 대한 연구가 수행되었으며(4) 구체적으로 그 잇점은 다음과 같다(24, 29-32).

먼저 경구 투여용 약의 경우 결정형 의약 조제에 적합하도록 수용액 상태의 물질을 결정 상태로 바꾸어 주며, 의약 자체의 나쁜 냄새 또는 맛이 복합체 형성으로 제거될 수 있다. 또한 한 가지 또는 그 이상의 반응성이 있는 의약품과 잘 섞이도

**Table 4.** Approved and marketed pharmaceutical preparations using CD.

Component	Trade name	Formulation	Indication	Company
PGE1- $\alpha$ -CD	Prostandin	Intraarterial infusion	Chronic arterial occlusive disease	Ono, Japan
PGE2- $\beta$ -CD	Prostarmon-E		Induction of labor	Ono, Japan
OP-1206- $\alpha$ -CD	Opalmon	Tablet	Buerger's disease	Ono, Japan
Eiroxicam- $\beta$ -CD	Brexin Cicladol	Tablet and suppository	Analgesic,	Chiesi, Italy
Garlic oil- $\beta$ -CD	Xund, Tegra Allidex	Dragees	Antiatherosclerotic	Bipharm Hermes,
Eenexate- $\beta$ -CD	Ulgut Lomiel	Capsules	Antiulcerant	Teikoku, Japan Shionogi, Japan
Iodine- $\beta$ -CD	Mena-Gargle	Gargling	Throat disinfectant	Kyushin, Japan
Dexamethasone, Glyteer- $\beta$ -CD	Glymesason ointment	Ointment	Analgesic	Fujinaga, Japan
Nitroglycerin- $\beta$ -CD	Nitropen	Sublingual tablet	Coronary dilator	Nippon Kayaku, Japan
Cefotiam hexetil hydrochloride- $\alpha$ -CD	Pansporin T	Tablet	Antibiotic	Takeda, Japan
New oral Cephalosporin (ME1207)- $\beta$ -CD	Meiact	Tablet	Antibiotic	Meiji Seika, Japan

**Table 5.** Application of cyclodextrins for foodstuffs.

	Guest	Applications
Stabilization	Spices, flavors, vitamins, color pigments	Japanese horse radish, garlic, ginger, ginseng, menthol, peppermint, cakes, juices, nuts
Reduction of bad odors and tastes		Soy milk, proteins, rice, hard candy, fresh water, chewing gum, fish and meat pastes
Emulsification	Oil and fats, eggs	Seasoning oil, ham and sausage, cakes, omelets, canned foods, margarine, whipping creams, mayonnaise
Elimination of hygroscopicity	Extracts, vegetables	Freeze- and Spray-dried foods, sugar, soy sauce, yeast extract, tea, coffee, soups, noodles
Others		Ethanol(antiseptic), royal jelly

록 해주며, CD에 의한 복합체는 흡습성에 강하게 된다.

액상 의약품의 경우 휘발성이 있는 물질은 증발에 대해 안정하게 되며, 산화되기 쉬운 의약품의 CD복합체는 공기에 의한 산화를 막아준다. 또한 분해, 불균형화, 중합, 자가 촉매 반응 등을 감소시키며, 빛과 위산 등에 대한 민감성을 감소시킨다. 그리고 난용성의 의약품의 물에 대한 용해와 용해속도를 증가시켜, 유기용매의 사용 없이 녹일 수 있게 된다. 난용성의 의약품의 경구 투여시 CD와의 복합체 형성으로 혈중에 더 많이 용해되게 할 수 있어, 이에 따른 과잉 투여를 막을 수 있다. CD 복합체 형성을 통해 의약품의 소수성을 감소시켜, 직장을 통한 흡수를 가능하게 하며, 의약품에 의한 부작용의 방지와 국소 자극성의 경감의 효과가 있다. Table 4는 현재 사용이 승인되어 판매되고 있는 CD활용 의약품의 대표적인 예를 정리한 것이다(32).

## (2) 식품 및 화장품 분야

식품이나 화장품 등에서는 주로 천연향이나 향료의 경우에 CD의 포접능을 이용할 수 있는데 일반적으로 이러한 향들을 직접 채취하거나 공정에서 응용할 때 많은 번거로움과 비용이 들며, 미생물에 의한 오염의 우려, 휘발성이 있는 물질은 손실될 수도 있으며, 더욱이 물질 자체가 보존 상의 문제나 온도, 기후 등의 영향에 따른 문제에 직면하기 쉽게 된다. 이러한 문제를 CD의 사용으로 극복할 수 있는데, 그 잇점을 살펴보면, 산화, 빛에 의한 반응, 열에 의한 파괴, 증발 등으로부터의 보존, 악취, 미생물에 의한 오염, 다른 유해 성분을 제거하거나 감소, 그리고 제조공정상에서의 향이나 색소등의 안정성 강화, 분말화하기 어려운 지방 함유 물질의 포접에 의한 분말화의 용이, 보존의 용이성 등을 들 수 있다(28). 이러한 특징들을 이용하여 Table 5에서와 같이 차 또는 커피의 쓴맛 성분, caffeine, 수산가공품의 악취, 그리고 콜레스테롤 등의 유해 성분 제거 등에 관한 연구가 수행되어 각종 식품의 품질향상 효과를 얻을 수 있었으며, 화장품 분야에서는 본래의 향료 성분과의 포접으로 향 자체의 보존, 화장품내의 악취유발물질의 제거, 또는 신체, 냉장고, 화장실 등의 악취 제거 등에 응용이 되고 있다(30-35).

생물산업

## (3) 생물 공정 분야

CD의 포접능을 생물 공정 분야에 활용한 예는 CD를 함유한 용매 상에서의 생물 전환, 미생물 및 동·식물 세포 배양, 그리고 항생 물질 또는 toxin의 생산을 위한 발효 등을 들 수 있다(36). 생물 전환의 경우 CD를 첨가하여 소수성 유기 화합물의 수용성을 증가시키고, 기질이나 산물의 저해를 감소시킬 수 있으며, 효소의 친화성이 증가되는 효과가 있다. Table 6은 CD를 포함하는 용매 하에서의 생물전환의 예와 그 효과를 정리한 것이다.

또한 CD는 입체 특이적 포접물 형성능이 있어 steroid nucleus의 특정한 탄소의 수산화와 같은 regiospecific bioconversion에 응용할 수 있으며, 기체 성분의 기질을 이용하는 생물 전환, 그리고 유기용매 이상계 효소반응계와 같은 phase transfer 생물 전환 등에도 유용하게 활용할 수 있을 것이다.

## (4) 기타 응용 분야

농약의 살충제 및 살균제 성분 등도 CD의 포접능을 이용하여 난용성 살충성분의 용해도 증가, 휘발성이 강한 살충, 살균성분의 안정화, 산소, 열등의 분해로부터의 보호 등 의약 분야에서 얻을 수 있는 잇점들을 가진 것으로 판명되었으며(37, 38), 각종 공해 유발 물질, 유기 용매 등에 대한 CD 포접 특성이 연구되었고, 각종 반응성의 변화 효과를 얻을 수 있음이 알려지고 있다. 그 외에도 단백질, 방향성 화합물 등 많은 종류의 화합물과의 포접특성에 관하여 발표되었다(39, 41)

## CGTase의 생명공학적 연구와 대량생산

### (1) CGTase의 효소반응

전분이나 다른 alpha 1,4-glucan에 CGTase(EC 2.4.1.19, 1,4- $\alpha$ -D-glucan, 4- $\alpha$ -D(1,4- $\alpha$ -D-glucano)-transferase(cyclizing), CGTase)를 작용시킬 경우 쉽게 CD를 효소적으로 합성할 수 있다. 또한 CGTase는 Fig. 5에 보는 바와 같이 다른 종류의 효소반응들도 촉매할 수 있다. Cyclization reaction은 기질의 비환원성 말단에 CGTase가 exo-형으로 작용하여 일어나게 되

**Table 6.** Bioconversion of organic substrates in CD-containing media and CD-induced effects.

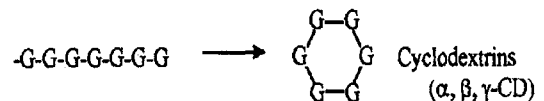
Substrate	Product	Biocatalyst	CD-induced effect
Hydrocortison and other steroids	Prednisolone and other steroid products	<i>Arthrobacter, Flavobacterium, Streptomyces, Curvalaria, Ophiolobus</i> and <i>Mycobacterium</i> sp.	Faster conversion, more homogeneous product
Olive oil, triolein	Fatty acids and glycerol	Lipase	Faster reaction
Cholesterol, cholest-4-en-3-one, sitosterol	Androst-4-en-3,17-dione	<i>Mycobacterium</i> sp.	Higher conversion, reduced degradation of steroid nucleus
Benzaldehyde, vanillin	Benzyl alcohol, vanillyl alcohol	<i>S. cerevisiae</i>	Reduced toxicity, faster and higher conversion
Benzaldehyde	L-Phenylacetyl-carbinol	<i>S. cerevisiae</i>	Reduced toxicity, higher yield
17 $\beta$ -Oestradiol	4-Hydroxyoestradiol	Phenol oxidase from plant cells	Conversion of only complexed substrate
Androst-4-en-3,17-dione	Testosterone	<i>S. cerevisiae</i> faster conversion	Higher solubility,
Deacetyllanatoside A	Digitoxin	$\beta$ -Glucosidase	Higher solubility
Adenosine diphosphate	Adenosine triphosphate	Adenylate kinase	Enhanced reaction
Vitamin D	Hydroxyvitamin D compounds	<i>N. autotrophica</i>	Larger conversion
$\alpha,\beta$ -Unsaturated esters	$\beta$ -Amino acid esters	<i>S. cerevisiae</i>	Improved enantioselectivity
p-Nitrophenol butyrate and caprylate	p-Nitrophenol butyric and caproic acids	Lipase, esterase	Faster conversion of larger substrate loadings
Cholesterol	cholest-4-en-3-one	<i>R. erythropolis</i>	Faster conversion of larger substrate loadings

는데 dextrose equivalent(DE) <20이하의 긴 사슬의 기질을 사용할 경우 효과적으로 일어난다. Bender에 의하면 16에서 30개의 포도당 잔기로 구성된 1,4- $\alpha$ -D-glycopyranosyl chain에서 최적의 cyclization 속도를 유도할 수 있으며 포도당 8개 이상의 사슬에서는 직접적으로 cyclization이 일어난다고 한다(42, 49).

또한, CGTase는 coupling이라는 cyclization reaction의 역반응도 촉매하는데, 이 반응은 전분으로부터 CD로의 전환과정 중에 반응시간에 따른 CD 산물들의 변환과정이라고 볼 수 있다. 예를 들면, Fig. 5에서 보는 바와 같이  $\alpha$ -CGTase의 효소 반응중 초기에 다량 생성된  $\alpha$ -CD가 coupling-cyclization equilibrium과정을 거쳐 상당한 양이  $\beta$ -CD로 전환되어진다. Reverse coupling reaction은 고 농도의 maltooligosaccharide가 존재할 경우 쉽게 유도되는데 현재 이를 이용하여 coupled sugar나 당전이 stevioside와 같은 대체 감미료의 생산에 활용되고 있다(49, 50).

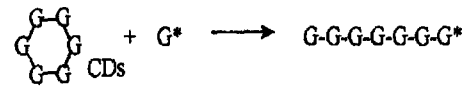
그리고 disproportionation reaction은 좀더 긴 사슬의 전분 기질들이 사용될 경우 CGTase 반응 초기에 주로 일어난다. 이 반응은 기질의 점도를 신속하고 현격하게 감소시키는 효과가 있으며 CD합성반응에는 그다지 영향을 주지 않는 것으로

### 1. Intramolecular Transglycosylation(Cyclizing)



### 2. Intermolecular Transglycosylation

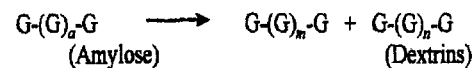
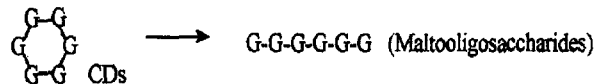
#### • Coupling



#### • Disproportionation



### 3. Hydrolysis

**Fig. 5.** Various catalytic reactions of CGTase.

**Table 7.** Microorganisms producing cyclodextrin glucanotransferase(CGTase).

Main product from starch	Microorganisms
$\alpha$ -CD	<i>Bacillus marcerans</i> , <i>B. stearothermophilus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Thermoanaerobacter</i> sp.
$\beta$ -CD	<i>B. circulans</i> , <i>B. ohbensis</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>Alkalophilic Bacillus</i> sp. <i>B. firmus</i> var. <i>alkalophilus</i>
$\gamma$ -CD	<i>Bacillus</i> sp. AL6, <i>B. subtilis</i> No. 313, <i>Brevibacterium</i> sp. No.9605

보여진다. Cyclization reaction과disproportionation의 차이는 cyclization reaction의 경우 하나의 기질을 이용하는 것이고 disproportionation reaction의 경우는 두 개의 기질을 이용하는 것이다(49).

## (2) CGTase 종류 및 생산 균주

CGTase는 크게 반응초기에 합성되는 CD의 종류에 따라  $\alpha$ ,  $\beta$ , 그리고  $\gamma$ 세 가지 종류로 분류할 수 있으나 효소반응이 계속 진행됨에 따라 다른 두 종류의 CD들도 역시 같이 합성되어진다. 그래서 반응이 평형에 도달할 때는 거의 대개  $\alpha$ -나  $\gamma$ -CD보다 열역학적으로 더 안정한  $\beta$ -CD가 주요 최종산물이 된다.

Table 7은 다양한 유래의 CGTase를  $\alpha$ ,  $\beta$ , 그리고  $\gamma$ -CGTase로 구분하여 나타낸 것이다.  $\alpha$ -CGTases는 반응초기에 주로  $\alpha$ -CD를 합성하는데 이 종류에 속하는 CGTase는 *B. macerans*, *B. stearothermophilus*, *Thermoanaerobacter* sp., 그리고 *Klebsiella oxytoca* M5al 유래의 CGTase들이다.  $\beta$ -CGTase는 주로 *B. circulans*와 여러 종류의 alkalophilic bacteria에 의해 주로 생산되어지고 있다. 예를 들면, alkalophilic 균주인 *B. ohbensis*, *Bacillus* 1-1, 그리고 *B. firmus* var. *alkalophilus* 유래의 CGTase들이다. 특히 이 종류 모두는 다량의  $\beta$ -CD와 소량의  $\gamma$ -CD만을 생산하고  $\alpha$ -CD는 거의 축적하지 않는 특징을 가지고 있다(42-

50).

## (3) CGTase의 생화학 및 유전학적 특징

Table 8에서 볼 수 있는 바와 같이 CGTase는 대개 분자량이 70에서 75 kDa 사이로 45에서 55 kDa사이의 분자량을 갖는  $\alpha$ -amylase들 보다 상당히 큰 효소로 대부분이 효소활성과 열안정성 유지를 위해  $Ca^{2+}$ 을 요구한다. 그리고 pH 5에서 pH 10사이의 상당히 넓은 pH 범위에서 강한 활성을 보이며 mesophilic enzyme의 열안정성은 약 60°C까지가 한계이나 예외적으로 *Thermoanaerobacter* sp. 유래의 CGTase는 95°C에서도 강한 효소활성을 유지한다.

현재 약 20여종의 CGTase 유전자가 *Escherichia coli*에 cloning되어 그 염기서열이 밝혀져 있으며 *Bacillus* sp. CGTase들 사이에는 50-70%의 상당히 높은 염기서열 및 아미노산 서열상의 상동성을 갖고 있으나, gram-negative bacterium인 *K. oxytoca*M5al 유래의 CGTase와는 단지 약 30%정도의 상동성을 갖고있다. 흥미롭게도, CGTase들과 여러 종류의  $\alpha$ -amylase들 사이에는 대략 15-25%의 서열사이의 상동성을 갖고 있으나, 4개의 매우 상동성이 높은 conserved region들이 CGTase뿐만 아니라  $\alpha$ -amylase에서도 발견할 수 있다. 게다가, 이 4개의 아미노산 서열 motif는 다른 amylase 계열 효소들 즉, neopullulanase, cyclodextrinase, 그리고 amyloamylase에서도 발견되었다. 하지만,  $\beta$ -Amylase와 glucoamylase에서는 이들 sequence motif가 존재하지 않는 것으로 보고되고 있다 (49).

## (4) CGTase의 구조 및 활성부위

Crystallography에 의한 구조분석 결과는 이 4개의 conserved region이 기질결합 및 효소반응을 촉매하는 효소 활성부위와  $Ca^{2+}$ -ion 결합부위에 밀접한 관련이 있다고 예시하고 있다.

$\alpha$ -amylase와 CGTase사이에 매우 낮은 상동성에도 불구하고 그들은 전체적인 단백질 folding pattern과 활성구조는 매

**Table 8.** Bacterial sources and enzymatic properties of CGTases.

Enzyme source	M. W.	CGTase type	Opt. pH	pH stability	T. S.	Gene cloned
<i>Bacillus megaterium</i>	75,000	$\beta$ -type	5.2-6.2	7.0-10.0	<55°C	-
<i>Bacillus circulans</i>	-	$\beta$ -type	5.2-5.7	7.0-9.0	<55°C	+
<i>B. stearothermophilus</i>	68,000	$\alpha$ -type	6.0	8.0-10.0	<50°C	+
<i>Bacillus macerans</i>	75,000	$\alpha$ -type	5.2-5.7	8.0-10.0	<55°C	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	$\alpha$ -type	5.2	5.0-7.5	-	+
Alkalophilic <i>Bacillus</i> sp. 38-2	88,000	$\beta$ -type	4.5-4.7	6.0-10.0	<65°C	+
<i>B. firmus</i> var. <i>alkalophilus</i>	75,000	$\beta$ -type	6.0	5.5-10.0	<60°C	+
<i>Bacillus ohbensis</i>	35,000	$\beta$ -type	5.5	6.5-9.5	<55°C	-
<i>Bacillus</i> sp. AL6	45,000	$\gamma$ -type	7.0	6.0-10.7	<55°C	-
<i>Bacillus subtilis</i>	64,000	$\gamma$ -type	8.0	6.0-8.0	<50°C	+
<i>Thermoanaerobacter</i> sp.	75,291	$\alpha$ -type	6.0	5.0-6.7	100°C	+
<i>Brevibacterium</i> sp.	75,000	$\gamma$ -type	10.0	6.0-8.0	<50°C	-

M.W.: molecular weight, T.S.: temperature stability.

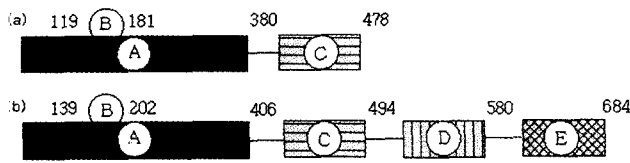


Fig. 6. Schematic protein domain arrangement of(a) taka-amylase and(b) CGTase.

우 유사한 것으로 알려져 있다. 즉, 두 효소들 모두 amino-terminal domain(A)는 8개의 inner, parallel  $\beta$ -sheet들과 8개의  $\alpha$ -helix들로 둘러싸인 구조인( $\beta/\alpha$ )8-barrel의 TIM barrel 구조를 갖고 있다. 이와 같은 결정구조는 현재 약 21개의 단백질에 알려져 있다.  $\alpha$ -amylase family의 특징은 활성부위( $\beta/\alpha$ )8 fold의  $\beta$ -strand 3과 helix 3사이의 작은 격리된 domain(B-domain)에 존재하는 것으로 알려져 있는데 B-domain은  $\alpha$ -amylase family의 효소들의 기능적인 다양성을 부여하는 부분으로 여겨진다.

C-domain은( $\beta/\alpha$ )8 barrel에 연이어 위치하고 있으며, 약 100개의 아미노산 잔기들이 Geek key topology에서 8개의 parallel  $\beta$ -sheet로 folding되어있는 구조이다.  $\alpha$ -amylase의 경우 C-domain의 돌연변이 유발 실험을 통해 효소활성에 필수적인 부분이라고 알려져 있으나 CGTase C-domain의 기능에 대해서는 알려진 바가 없다.

$\alpha$ -amylase와는 달리, CGTase는 Fig. 6에서 보는 바와 같이 단백질의 C-terminal에 anti-parallel  $\beta$ -sheet들로 이루어진 두 개의 부가적인 D-와 E-domain을 갖고 있어  $\alpha$ -amylase에 비해 약 25kDa 더 큰 분자량을 갖고 있다. C-domain에 연결된 D-domain은 immunoglobulin과 유사한 topology를 갖고 있으나 현재로서는 기능이 알려져 있지 않으며 놀랍게도 *K. oxytoca* M5al 유래의  $\alpha$ -CGTase는 이 D-domain이 존재하지 않는다. E-domain은 CGTase의 4차구조상에서 발견되어 있는데 raw starch binding site이며 glucoamylase에서 생전분입자와 결합하는 것으로 알려진 부분과 높은 유사성을 보이는 부분이다(51).

(5) 유전자 재조합 균주를 이용한 CGTase의 대량생산

CD의 산업적 생산을 위해서는 CGTase의 대량생산이 필수적이다. 하지만, *B. macerans*를 비롯한 대부분의 야생균주로부터 생산되는 CGTase의 양은 매우 낮아 보통의 발효공정으로는 대개 몇 일 내지 수 주일이 필요하게 된다. Depinto와 Campbell는 250g의 균체로부터 단지 23.3mg의 CGTase를 얻었으며 Stavn과 Granum, Hale과 Rawlins은 각각 5 mg/l의 CGTase를 생산하였다고 보고한 바 있다. 그리고 재조합 균주를 이용하여 CGTase를 생산할 경우 *lac*, *tac*, *trp* 그리고 *pL* promoter등을 이용하여 대장균에서 과량의 단백질을 생산하지 단 대부분의 경우 소량만이 체외로 분비되는 단점을 보였다.

그러나, *B. circulans* var. *alkalophilus* 유래의 CGTase 유전

자를 *lac* promoter 조절 하에 돕으로서 대장균에서 CGTase를 140~300 mg/l 수준으로 생산하였다고 보고된 바 있다. 그리고 *K. pneumoniae* M5al 유래의 CGTase 유전자를 *tac* promoter 조절 하에서 2mg/l의 CGTase를 생산·분비하였다는 보고도 있다. 또한, 이 재조합 균주는 단계적 MNNG 돌연변이 법에 의해 세포 외로 CGTase를 220~240mg/l 및 400~500mg/l 수준으로 분비하였다고 보고하였다. Paloheimo 등도 *B. circulans* var. *alkalophilus* ATCC 21783 유래의 CGTase의 생산에 관한 연구를 수행한 바 있다. 그들은 *B. subtilis*에서 충분한 양의 CGTase를 생산하지 못하였으나, 이 유전자를 *B. amyloliquefaciens* 유래의  $\alpha$ -amylase 유전자 promoter 조절 하에 돕으로서 shake flask 배양에서 170mg/l의 CGTase를 생산하였으며 10L 발효조에서는 1.2g/l의 CGTase를 생산한 바 있다(43, 51).

CD의 산업적 생산공정

현재 활용되고 있는 CD의 제조 공정은 전분 또는 전분질 원료를 액화형 amylase로 증자 액화하여 DE 10-20 정도로 가공화시킨 전분 또는 CGTase로 부분 환화시켜 수용성 전분으로 전환한 후 CD를 생산하는 2단계 균일상 효소반응계를 이용한 공정이 주로 사용되고 있다(52). 또한 효소 반응액에 계면활성제, 유기용매, 그리고 PEG등 여러 종류의 첨가물을 CD포접체로 첨가하여 CD 합성 수율과 반응 속도를 향상시키는 유기용매법(53, 54)도 1960년대 후반에 Corn Products사와 US-based food사에 의해 알려졌다. Fig. 7은 대표적인 유기용매법

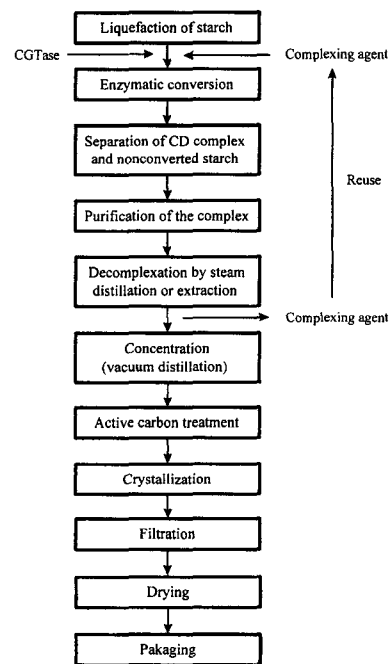


Fig. 7. Solvent process for production of cyclodextrins.



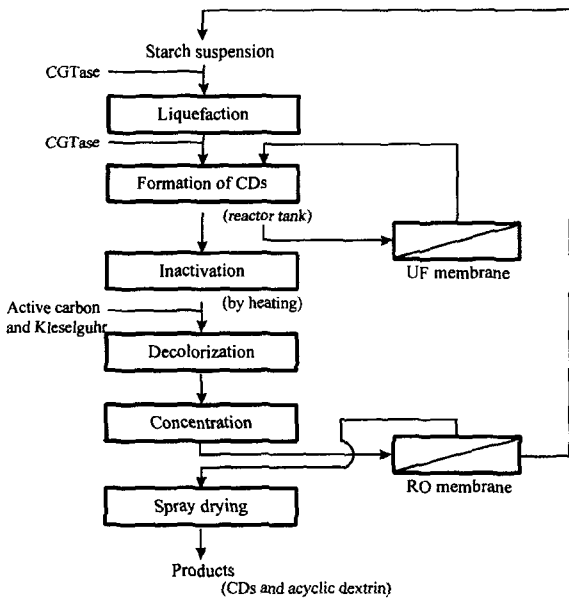


Fig. 8. Manufacturing procedure for cyclodextrin using ultrafiltration and reverse osmosis membrane.

에 의한 CD생산공정을 나타낸 것이다.

그러나 이와 같은 유기 용매의 첨가는 안정성에 문제가 있을 뿐만 아니라 공정이 매우 복잡하고, 또한 이 방법으로 만들어진 CD는 유기 용매 분자가 이미 포접하고 있는 경우도 있어 얻어진 CD의 활용에도 다소 문제가 되고 있다. 이러한 단점을 개선하기 위하여 chromatography법을 도입한 무용매법이 개발되었으며(53, 54), 특히 일본의 Ensuiko사는 Fig. 8에서 보는 바와 같이 한외여과 및 역삼투막을 이용한 제조방법을 활용하고 있다(55). 또한 고정화 CGTase를 이용한 CD 생산법에 관한 연구 결과도 다수 발표되고 있으나, 이는 아직 실용화되지는 않고 있는 실정이다.

위와 같은 수용성 액화 전분-CGTase로 구성되는 균일상 효소반응계의 경우 액화과정중에 glucose, maltose, 그리고 각종 maltooligosaccharide 등 환원성 당류가 다량 생산되어 이들 부산물이 CD 합성 반응을 저해함으로써 최종 CD 생성수율이 낮게 된다. 또한 액화 전분, 효소, 그리고 CD가 모두 수용상으로 혼합 용해되어 있어 반응 후 CD의 분리 정제가 어려운 근본적인 결점이 있다.

이러한 여러 가지 단점을 극복하기 위해서는 전분질을 증자 액화하지 않고 불용성인 생전분을 그대로 사용하는 것이 바람직할 것으로 사료된다. 이러한 경우 증자로 인한 불순물인 oligo당의 생성을 억제하고, 불용성 전분을 쉽게 분리·회수할 수 있어 수용액상으로 존재하는 CD의 분리·정제가 용이한 점 등의 여러 가지 잇점이 예상된다. 또한 사용된 CGTase를 생전분질에 흡착 회수하여 재활용할 수 있는 장점이 예상된다. 그러나 생전분 입자는 amylose와 amylopectin 성분이 매우 조밀하게 배열되어 있는 결정 구조를 가지고 있으므로, CGTase

생물산업

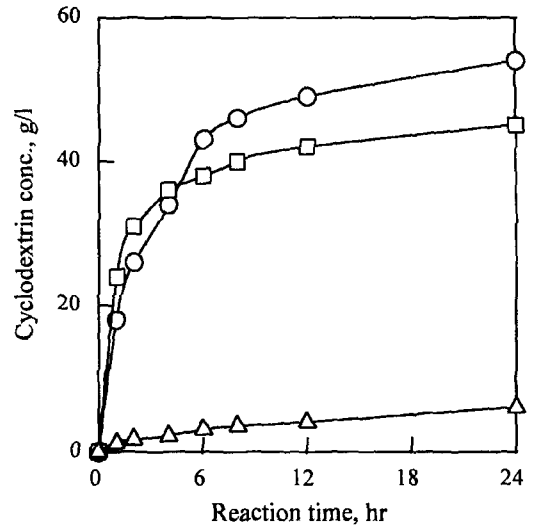


Fig. 9. Comparison of cyclodextrin produced from extrusion (○), liquefied(□)and raw(△) starch. 100 g/l of corn starch, 900 units of CGTae/l, 200 rpm, pH 6.0, and 50°C.

의 효소작용이 어려워 CD의 생성속도 및 수율이 낮아 실제로 활용하기에는 많은 문제점을 가지고 있다.

본 연구실에서는 전분을 증자 액화하지 않고 불용성 상태의 전분을 이용한 고효율의 CD 합성법으로 분쇄마찰매체 효소반응계와 팽윤 extrusion 전분을 기질로 하는 불균일상 효소반응계에 관한 연구를 수행한 바 있다(56-69).

Fig. 9는 기존의 증자액화법과 분쇄마찰매체 효소반응계와 extrusion 전분 함유 불균일상 효소반응계에서의 CD량을 비교한 것으로 분쇄마찰매체 효소반응계와 extrusion 전분 함유 불균일상 효소반응계에서의 CD 합성 농도는 각각 48, 54g/l로 액화전분의 45g/l보다는 더 높은 전환 수율을 얻을 수 있었으며, 반응 속도는 거의 유사하였다.

Fig. 10에서 보는 바와 같이 팽윤된 extrusion 전분의 경우,

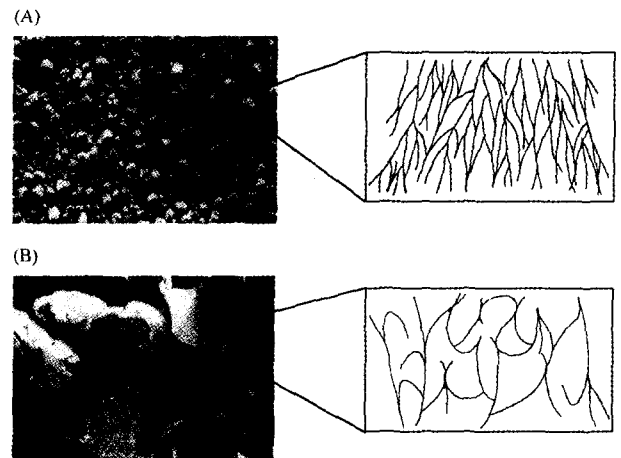


Fig. 10. Scanning electron microscopic photograms and hypothetical micellar structures of raw and extrusion starch.(A) Raw starch,(B) extrusion starch.

extrusion 후 전분입자는 거의 단편화(fragmentation)되지 않고 팽윤되기 때문에 팽윤전분의 비환원성 말단으로부터 CGTase의 작용에 의해 CD가 합성되기 때문에 maltooligosaccharide를 거의 축적하지 않고 CD를 주로 생산할 수 있는 특징을 가지고 있다.

또한 팽윤전분은 불용성상태를 유지하고 있기 때문에 반응 후 미반응 잔류 전분은 액화 전분의 경우는 거의 분리되지 않았으나, 불용성 전분을 사용한 경우는 거의 전량 원심분리하여 회수할 수 있었다. 또한 반응계내에 축적되는 glucose와 maltooligosaccharides는 1 g/l 미만으로 액화 전분에 비하여 현저히 감소하였다. 이로 미루어 불균일상 효소반응계는 높은 CD 합성 농도 및 반응 속도를 얻을 수 있으며, 반응계내의 환원당의 축적이 거의 없고 미반응 잔류 전분의 분리가 용이하여 CD의 분리정제 공정을 단순화할 수 있는 산업적 활용이 가능한 고효율 효소반응계라 할 수 있으며, 도출된 새로운 공정의 산업적 활용을 기대하고 있다

Table 9는 기존의 증자액화법과 팽윤된 extrusion 전분 함유 불균일상 효소반응계에서 당전이 stevioside 생산에 적용하였을 경우 각종 reaction parameter들을 비교한 것으로, 당공여체로 extrusion 전분을 사용하였을 경우 기존의 증자액화법보다 많은 점에서 장점을 갖고 있는 것으로 판단된다. 따라서 coupling sugar나 당전이 stevioside와 같은 기능성 oligosaccharide들을 산업적으로 대량생산하는 공정으로도 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

## 결론

현재 CD의 용도가 증가함에 따라 시장 규모도 확대되는 추세인데, 세계 시장 현황은 매년 50~100%의 증가를 보이고 있고, 앞으로 농약에의 이용 방법이 개발될 경우 년 10,000톤 시장 형성이 가능할 것으로 기대된다. 1990년도 세계시장규모는

약 1000톤(결정형, 비결정형, 전환 혼합물 포함)으로 제품가격은  $\beta$ -CD는 7~25 \$/Kg,  $\alpha$ -CD는 16~40 \$/Kg,  $\gamma$ -CD는 600~1,200 \$/Kg으로 보고되고 있다(70). 향후 CD 시장은 2001년에는 1989년보다 세계시장이 10배 정도로 성장할 것으로 추정되고 있으며, 국내의 경우 계속적인 수요증가와 생산기술의 발달 및 생산량 증가로 시장규모가 약 20배 정도로 성장할 것으로 기대된다. CD는 현재 주로 의약품과 식품을 중심으로 활용처가 개발되고 있으나, 앞으로 특이한 생물 전환, 분리정제 분야, 정밀 화학 분야 등 고부가 첨가 산업 분야에도 활용될 수 있을 것이며, 이와같은 무공해 생물신소재인 CD의 활용 기술 개발은 CD의 생산 방법의 개발과 더불어 중요한 연구 과제가 되고 있다.

## 참고문헌

1. Szejtli, J.(1997) "Historical Background" in *Comprehensive Supramolecular Chemistry vol.3 Cyclodextrins*(J. Szejtli and T. Osa eds), pp.1-3.
2. 한국유전공학연구조합(1986) "Cyclodextrin(유전공학자료 60)" 한국유전공학연구조합, 서울, pp.2-40.
3. Szejtli, J.(1988) "Cyclodextrin Technology" Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 1-78.
4. Szejtli, J.(1988) "Cyclodextrin in Pharmacy" Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 1-18.
5. Pajington, J. S.(1987) " $\beta$ -Cyclodextrin: The Success of Mmolecular Inclusion" *Chemistry in Britain* May: 455-458.
6. Pszczola, D. E.(1988) "Production and Potential Food Applications of Cyclodextrins" *Food Technol.* 96-100.
7. Eftink, M. R. and Harrison, J. C.(1981) "Calorimetric Studies of p-Nitrophenol Binding to  $\alpha$ - and  $\beta$ -Cyclodextrin" *Bioorganic Chemistry* 10: 388-398.

**Table 9.** Comparison of the main performance variables of convention process and heterogeneous enzyme reaction systems for cyclodextrin production.

	Conventional process	Heterogeneous enzyme reaction system	
		Bioatritor	Extrusion starch
Starch concentration(g/l)	100	100	100
Cyclodextrin concentration(g/l)	45	48	54
Yield of cyclodextrin	0.45	0.48	0.54
Half reaction time(hr)*	2.0	6.2	3.2
Separable residual starch(g/l)	-	51	43
Purity of total cyclodextrin(%)	65	>95	>95
Glucose concentration(g/l)	16	<1	<1
Maltooligosaccharides concentration(g/l)		8	<1 <1
$\alpha$ -CD: $\beta$ -CD: $\gamma$ -CD ratio	1.9:2.6:1.0	1.6:3.9:1.0	1.9:4.3:1.0
Separation of residual maltooligosaccharides	Required	Not required	Not required
Separation of residual starch	Difficult	Easy	Easy
Separation and purification of cyclodextrin	Difficult	Easy	Easy

\*Time required for half of the maximum transglycosylation yield.

8. Bergeron, R. J., Pillor, D. M. and Roberts, W. P.(1978) "Thermodynamics of Cycloamylose-Substrate Complexation" *Bioorganic Chemistry* **7**: 264-271.
9. 유연우(1992) "Artificial 효소" '92 RCNBMA Workshop 생물신소재 개발과 효소공학 pp. 105-132.
10. Szejtli, J.(1997) "Chemistry, Physical and Biological Properties of Cyclodextrins" In *Comprehensive Supramolecular Chemistry Vol.3 Cyclodextrins*(J. Szejtli and T. Osa eds). pp.5-40.
11. Hizukuri, S., Kawano, S., Abe, J., Koizumi, K., and Tanimoto, T.(1989) "Production of Branched Cyclomaltooctaoses through the Reverse Action of *Klebsiella aerogens Pullulanases*" *J. Jpn. Biotechnol. Applied Biochem.* **11**: 60-73.
12. Shiraish, T., Kusano, S., Tsumuraya, Y., and Sakano, Y.(1989) "Synthesis of Maltosyl( $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 6) Cyclodextrins through the Reverse Reaction of Thermostable *Bacillus acidopulluliticus* Pullulanase" *J. Agric. Biol. Chem.* **53**: 2181-2188.
13. Yoshimura, Y., Kitahata, S., Okada, S., Satomura, Y., and Hujita, K.(1989) "Structure of Di-o- $\alpha$ -Maltosyl Cyclodextrins Produced from  $\alpha$ -Maltosyl-Fluoride and Cyclodextrins" *J. Agric. Biol. Chem.* **54**: 2585-2591.
14. Kobayashi, S. and Kainuma, K.(1986) "Multiple Glucosyl Branched-Cyclodextrin" *UK Patent Application* 2,165,549.
15. Kobayashi, S., Monma, M and Takano, T.(1988) "Branched Cyclodextrin" *UK Patent Application* 2,193,943.
16. Koizumi, K. and Utamura, T.(1986) "Isolation and Characterization of Branched Cyclodextrins" *Carbohydrate Res.* **153**: 55-67.
17. Sakano, Y., Sano, M. and Kobayashi, T.(1985) "Preparation and Enzymatic Hydrolysis of Maltosyl- $\alpha$ -Cyclodextrin" *J. Agric. Biol. Chem.* **49**: 3391-3398.
18. Casu, B. and Reggiani, M.(1979) "Methylated Cycloamyloses and Their Inclusion Properties" *Carbohydrate Res.* **76**: 59.
19. Bender, H.(1987) "Production, Characterization, and Application of Cyclodextrins" In *Advances in Biotechnological Processes, Vol 6*,(A. Mizrashi ed.), Alan R.Liss, Inc, New York.
20. Croft, A. and Bartsch, R.(1983) "Synthesis of Chemically Modified Cyclodextrins" *Tetrahedron Report* **3**: 1417-1425.
21. Jicsinszky, L., Fenyvesi, E., Hashimoto, H. and Ueno, A.(1997) "Cyclodextrin Derivatives" in *Comprehensive Supramolecular Chemistry Vol.3 Cyclodextrins*(Josef Szejtli and Tetsuo Osa eds). pp.57-188.
22. Kobayashi, S., Maruyama, K and Kainuma, K.(1983) "Some Properties and Application of Branched-cyclodextrins" *J. Jpn. Soc. Starch Sci.* **30**: 231-239.
23. Mischnick, P.(1990) "Characterization of Cyclodextrin Derivatives" *Proceedings of 5th International Symposium on Cyclodextrins* Paris, p.75.
24. Yamamoto, M., Aritomi, H., Irie, T., Hirayama, f. and Uekama, K.(1990) "Paramaceutical Evaluation of Branched- $\beta$ -Cyclodextrins as Parenteral Drug Carrier" *Proceedings of 5th International Symposium on Cyclodextrins* Paris, p.135.
25. Breslow, R., Halfon, S., and Zhang. B.(1995) "Molecular Recognition of Cyclodextrin Dimers" *Tetrahedron* **51**: 377.
26. Suzuki, M. and Satoh, A.(1983) "Nutritional Consequences of  $\alpha$ -Cyclodextrin" *J. Jpn. Soc. Starch Sci.* **30**: 240-246.
27. Misaki, M.(1984) "Utilization of Cyclodextrin for Citrus Fruit Products" *J. Jpn. Soc. Starch Sci.* **31**: 98-106.
28. Hara, K. and Hashimoto, H.(1986) "Application of Cyclodextrin" *J. Jpn. Soc. Starch Sci.* **3**: 152-161.
29. Uekama, K.(1983) "Pharmaceutical Application of Cyclodextrins" *J. Jpn. Soc. Starch Sci.* **30**: 247-254.
30. Song, S. H., Lee, H. J., Chang, S. J. and Woo, G. J.(1993) "Microencapsulation of Garlic Oil with  $\beta$ -Cyclodextrin" *Foods Biotechnol.* **2**: 132-135.
31. Nagai, T. and Ueda, H.(1997) "Aspects of Drug Formulation with Cyclodextrins" In *Comprehensive Supramolecular Chemistry vol.3 Cyclodextrins*(J. Szejtli and T. Osa eds). pp.441-450.
32. Uekama, K. and Irie, T.(1997) "Pharmaceutical Use of Cyclodextrins in Various Drug Formulations" In *Comprehensive Supramolecular Chemistry vol.3 Cyclodextrins*(J. Szejtli and T. Osa eds). pp.451-481.
33. Hashimoto, H.(1997) "Cyclodextrins in Foods, Cosmetics, and Toiletries" In *Comprehensive Supramolecular Chemistry vol.3 Cyclodextrins*(J. Szejtli and T. Osa eds). pp.483-502.
34. Yu, E. K. C.(1988) "Novel Decaffeination Process using Cyclodextrin" *App. Microbiol. Biotechnol.* **28**: 546-552.
35. Szente, L. and Szejtli, J.(1986) "Molecular Encapsulation of Natural and Synthetic Coffee Flavor with  $\beta$ -Cyclodextrin" *J. Food Sci.* **51**: 1024-1027.
36. Vokk, R., Menert, A., Saar, E. K.(1991) "Biotechnology of  $\beta$ -Cyclodextrin" *BFE* **8**: 510-516.
37. Szente, L. and Szejtli, J.(1997) "Cyclodextrins in Pesticides" In *Comprehensive Supramolecular Chemistry vol.3 Cyclodextrins*(J. Szejtli and T. Osa eds). pp.503-514.
38. Minamite, Y. and Katsuda, Y.(1984) "Present status and Future Aspects for Pesticides included in Cyclodextrin" *J. Jpn. Soc. Starch Sci.* **31**: 112-116.
39. Otero, C., Cruzado, C. and Ballesteros(1991) "Use of cyclodextrins in Enzymology to Enhance the Solubility of Hydrophobic Compounds in Water" *Appl. Biochem, Biotechnol.* **27**: 185-194.
40. Cooper, A.(1992) "Effects of Cyclodextrins on Thermal Stability of Globular Proteins" *J. Am. Chem. Soc.* **114**: 9208-9209.
41. Kamihira, M., Asai, T., Yamagata, Y., Taniguchi, M. and Kobayashi, T.(1990) "Formation of Inclusion Complexes and Aromatic Compounds under Pressuried Carbon

- Dioxide" *J. Ferment. Bioeng.* **69**: 350-353.
42. Kitahata, S. and Okada, S.(1982) "Comparison of Action of Cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus megatrium*, *B. circulans*, *B. stearothermophilus* and *B. macerans*" *J. Jpn. Soc. Starch Sci.* **29**: 13-18.
  43. Schmid, G.(1989) "Cyclodextrin glucanotransferase Production: Yield Enhancement by Overexpression of Cloned Genes" *Tibtech.* **7**: 244-248.
  44. Fujita, Y., Tsubouchi, H., Inagi, Y., Tomita, K., Ozaki, A., and Nakanishi, K.(1990) "Purification and Properties of Cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus* sp. AL-6" *J. Ferment. Bioeng.* **70**: 150-154.
  45. Do, E.J., Shin, H.D., Kim, C., and Lee, Y.H. "Selection and Characterization of Catabolite Repression Resistant mutant of *Bacillus firmus* var. *alkalophilus* Producing Cyclodextrin glucanotransferase" *J. Microbiol. Biotechnol.* **3**: 78-85.
  46. Bender, H.(1982) "Effect of Varioux Acceptors on the Rate of the Cyclization and Chain-shortening of Amylose Catalyzed by the Cyclodextrin Glycosyltransferase from *Klebsiella pneumoniae* M5 al. Improvement of new Photometric Assay Methods" *Carbohydr. Res.* **101**: 279-285.
  47. Norman, B.E. and Jørgensen, S.T.(1992) "*Thermoanaerobacter* sp. CGTase: Its Properties and Application" *Denpun Kagaku* **39**: 101-108.
  48. Mori, S., Hirose, S., Oya, T., and Kitahata, S.(1994) "Purification and Properties of Cyclodextrin glucanotransferase from *Brevibacterium* sp. No. 9605" *Biosci. Biotech. Biochem.* **58**: 1968-1972.
  49. Kobayashi, S.(1996) Cyclodextrin Producing Enzyme (CGTase). In *Enzymes for Carbohydrate Engineering* (K.H. Park, J.F. Robyt, and Y.D.Choi, eds), Elsevier Science B.V., Amsterdam. pp. 23-41.
  50. Kobayashi, S., Watanabe, N., Nakashima, K., Shiota, M., and Yatake, T.(1995) "Action of Cyclodextrin Producing Enzyme(CGTase) and Diglycosyl-cyclodextrins" *Oyo Toshitsu Kagaaku* **42**: 203-210.
  51. Schmid, G.(1997) "Enzymology of cyclodextrins" In *Comprehensive Supramolecular Chemistry vol.3 Cyclodextrins* (J. Szejtli and T. Osa eds). pp.615-626.
  52. Kobayashi, S., Kainuma, K. and Suzuki, S.(1975) "Cyclodextrin-Production and Utilization of  $\alpha$ -Cyclodextrin" *J. Jpn. Soc. Starch Sci.* **28**: 132-141.
  53. Kobayashi, S., Kainuma, K. and Suzuki, S.(1975) "A New Preparation Method of Cyclodextrin" *J. Jpn. Soc. Starch Sci.* **22**: 6-10.
  54. Schmid, G.(1997) "Preparation and Industrial Production of Cyclodextrins" In *Comprehensive Supramolecular Chemistry vol.3 Cyclodextrins*(J. Szejtli and T. Osa eds). pp.41-57.
  55. Hashimoto, H.(1989) "Studies on the Industrial Production and Application of Cyclodextrins" *Denpun Kagaku* **36**: 35-41.
  56. 한일근, 이용현(1991) "분쇄마찰매체 함유 효소반응계에서의 Cyclodextrin 생성과 Cyclodextrin Glucanotransferase의 작용 Mechanism" *산업미생물학회지* **19**: 163-170.
  57. 이용현, 박동찬(1991) "Extrusion 전분을 기질로 한 불균일상 효소반응계에서의 Cyclodextrin 효소합성" *산업미생물학회지* **19**: 514-520.
  58. Lee, Y.H.(1992) "A novel process for production of cyclodextrin in the heterogeneous enzyme reaction system" *Proceedings of the First International Symposium on the Development of Natural Resources and Environmental Preservation*, Korea University, Seoul, p.104(1992)
  59. 이용현, 박동찬(1993) "구조변형시킨 불용성 전분질을 이용한 불균일상 효소반응계에서의 사이클로덱스트린 효소합성 방법" 특허공보 B1-3178. 대한민국특허청.
  60. 李龍賢, 朴東贊(1996) "シクロデキストリンの製造方法" 特許公報 B2-特公平7-32715. 日本特許廳.
  61. Lee, Y.H. and Park, D.C.(1992) "Direct Synthesis of Cyclodextrin in a Heterogeneous Enzyme Reaction System Containing Insoluble Extruded Starch" In *Biochemical Engineering for 2001*(Furusaki, S., Endo, I. and Matsuno, R., eds.), Springer-Verlag, Tokyo, pp.127-129.
  62. Lee, Y.H.(1994) "A novel Enzyme reaction system for enzymatic production of cyclodextrin" *Proceedings of the Second Korea-China Biotechnology Symposium*, Seoul, 42-56.
  63. Lee, Y.H.(1991) "Mechano-enzyme reaction engineering" *Proceedings of the Second Korea-US Joint Seminar on Bioprocess Technology*, KOSEF/NSF, Seoul, 91-95.
  64. 이용현, 백승걸, 신현동, 박동찬(1992) "분쇄마찰매체 불균일상 효소반응계에서의 cyclodextrin glucanotransferase의 당전이 반응" *산업미생물학회지*, **21**: 461-467.
  65. Lee, Y.H. and Park, D.C.(1996) "Characteristics of Carbohydrase Reactions in Heterogeneous Enzyme Reaction System Utilizing Swollen Extrusion Starch as a Substrate" In *Enzymes for Carbohydrate Engineering* (Park, K.H., Robyt, J.F. and Choi, Y.D., eds.) Elsevier Science B.V., Amsterdam, pp.171-188.
  66. 이용현, 김동선, 신현동, 박진서(1994) "Extrusion시킨 팽윤 전분을 기질로한 새로운 maltose 생산법" *산업미생물학회지*, **22**: 106-113.
  67. 김동선, 박동찬, 조명진, 이용현(1994) "팽윤 extrusion 전분을 기질로한 분균일상 효소반응계에서의 maltose 생성반응 특성" *산업미생물학회지*, **22**: 283-289.
  68. 이용현, 조명진, 박동찬(1995) "팽윤 전분을 기질로 한 cyclodextrin glucanotransferase의 cyclodextrin 생성반응 기작" *산업미생물학회지*, **23**: 416-424.
  69. 조명진, 박동찬, 이용현(1995) "팽윤 extrusion 전분을 기질로 한 불균일상 효소반응계에서 cyclodextrin 생성반응의 수치적 해석" *산업미생물학회지*, **23**, 425-431.
  70. Anonymous(1990) "CD Approvals and Market Situation" *Cyclodextrin News* pp. 136-137.