

## Dextranucrase에 의한 Dextran 생성기작에 관한 연구

윤명희 · 구윤모  
인하대학교 생물공학과

### Mechanism of Dextran Synthesis by Dextranucrase

Myung-Hee Yoon and Yoon-Mo Koo

Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Seoul

#### ABSTRACT

A qualitative study was made on the mechanism of dextran synthesis by dextranucrase. Enzymatic synthesis of dextran was experimentally studied with initial sucrose concentration from 50 g/l to 150 g/l. The molecular weight distribution of synthesized dextran was measured by using on-line gel permeation chromatographic system. Sucrose was observed not to work as a primer within the range of concentration tested. At the initial sucrose concentration of 50 g/l, dextran with molecular weight of medium range ( $10^4$ – $2 \times 10^6$ ) was synthesized due to the mass transfer limitation of sucrose. The amount of the dextran of medium range decreased with the initial sucrose concentration. Dextran was likely to be synthesized by radical chain polymerization mechanism since the dextran of medium range was not produced at higher sucrose concentrations.

#### 서론

1870년대에 발견되어 1970년도를 중심으로 활발한 용도 개발이 진행되고 있는 dextran은 균체의외로 분비되는 dextranucrase에 의해 생성되며  $\alpha$ -D-glucopyranose가  $\alpha$ -(1→6) glucosidic 결합으로 이루어져 있는 대표적인 생물고분자이다(Fig. 1) (1, 2). Dextran은 석유의 2차 회수, 종자의 표면처리, 종이나 섬유제품 및 가구의 접도, 경도 부여제 및 고착제, 화장품의 콜로이드 현탁제, 도료나 필름, 분자체, 크로마토그래피용 비드, 맥주의 향기와 포지성을 주는 첨가제와 음료, 시럽, 아이스크림, 젤리 등의 첨가제에 사용되며, 특히 의료용으로는 분자량 범위에 따라 혈장대체제(평균분자량  $7.5 \times 10^4 \pm 2.5 \times 10^4$ , Dextran T-70) 혹은 혈액흐름촉진제(평균분자량  $4 \times 10^4$ , Dextran T-40) 등으로 사용된다(3-5).

Dextranucrase[EC 2.4.1.5,  $\alpha$ -(1→6) D-glucan : D-fructose 2-glucosyl transferase]는 기질

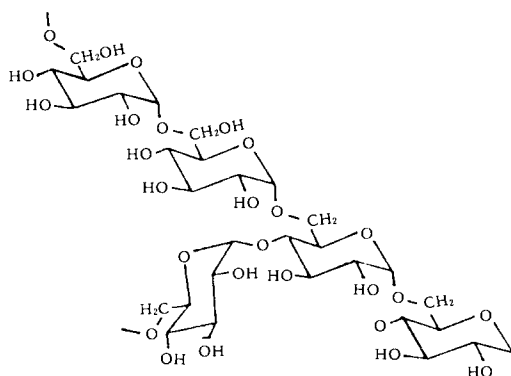


Fig 1. Structure of dextran.

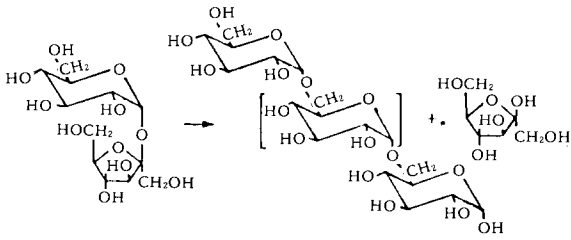


Fig. 2. Reaction of sucrose to give  $\alpha$ -(1→6) glucose and D-fructose by dextranase.

인 sucrose로부터 glucose 고분자인 dextran을 생성하는 중합반응효소이다( $n$  Sucrose → Dextran( $n$ -mer)+ $n$  Fructose: Fig. 2) (6-8). Sucrose의 glucose와 fructose 부분이 연결되는 acetal-ketal 결합의 비교적 높은 에너지(16.7~20.9kJ/mol)는 효소에 의해 주요 사슬의  $\alpha$ -(1→6)결합을 생성하는데 사용된다.

Dextranase에 의한 dextran 생성기작은 일반적으로 다음과 같은 insertion 기작으로 해석되고 있다. 이 해석은 효소의 활성부위에 2개의 친핵체가 있어 가수분해된 glucosyl unit이 첫번째 자리에서 두번째 자리로 intra-enzymatic transfer한다는 사실에 근거한다. Sucrose의 glucosyl unit은 dextranase와 공유적인 복합체를 이루어, 효소와 자라고 있는 dextran사슬의 reducing-end 사이에 위치하여 그 glucosyl unit의 C<sub>6</sub>-OH가 자라고 있는 dextran사슬의 C<sub>1</sub>을 친핵적으로 공격함으로써  $\alpha$ -(1→6) glucosidic bond를 형성하며 삽입된다. 효소의 활성부위에 있는 2개의 친핵체 중 또다른 하나는 sucrose를 공격하여 효소-glucosyl 복합체를 이루며 새로운 glucosyl unit의 C<sub>6</sub>-OH는 자라고 있는 dextran사슬의 C<sub>1</sub>에 대한 공격을 반복한다. Glucosyl unit와 자라고 있는 dextran사슬은 2개의 친핵체 사이를 왕복하며 reducing-end에서 성장한다. Sucrose존재시, dextran 사슬의 성장은 dextran이 효소로부터 방출될 때 정지되고, acceptor의 농도가 그들의 hydroxyl기가 dextran의 C<sub>1</sub>에 대한 친핵적인 공격에 의해 활성부위와 상호작용할 수 있을만큼 충분히 클 때 일어난다(Fig. 3)(9-12).

재래의 회분식 배양에서 처음에 maltose나 iso-maltose와 같은 저분자량의 당이나 저분자량 dextran을 같이 가해 주면 고분자량의 dextran 대신 비교적 중간분자량의 의료용 dextran을 생산할 수

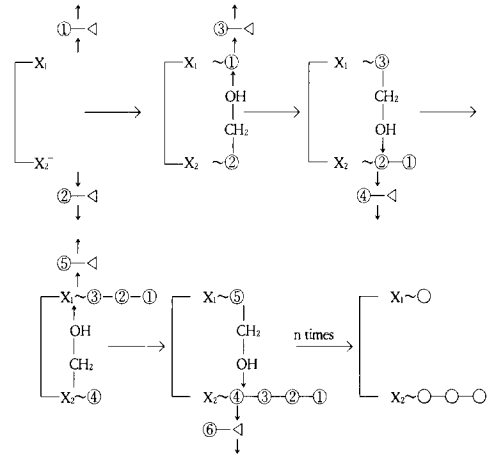


Fig. 3. Synthetic mechanism of  $\alpha$ -(1→6) glucan by dextranase (*Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512 F)-X<sub>1</sub> and X<sub>2</sub> represent nucleophiles at the active site. ○◁= sucrose, ○-CH<sub>2</sub>-OH=glucose, ▷=fructose, and ○-○=two glucose residues linked  $\alpha$ -(1→6).

있게 된다. 이 때 첨가된 저분자량의 당이나 저분자량 dextran을 primer라고 하며, 이것들은 효소-glucosyl 복합체에 반응하여 고분자량 dextran이 합성되기 전에 반응을 종결시켜 더 작은 분자량의 dextran이 합성되도록 한다.

중합반응에는 크게 라디칼 중합반응과 step 중합반응이 있다. 라디칼 중합반응은 반복단위를 사슬로 단번에 첨가하여 단위체가 순간적으로 고분자로 성장하는 중합반응을 말한다. 이 중합반응에서 단위체의 농도는 반응진행에 따라 감소되며, 단번에 고분자가 형성되기 때문에 그 분자량은 거의 변화가 없다. 따라서, 반응시간은 수율을 높일 뿐, 분자량에는 거의 영향을 주지 않는다. 반면에 step 중합반응은 분자량이 각각 다른 두 분자가 반응에 참여하게 되어, 단위체가 dimer로 dimer가 trimer로 반응이 진행되어 반응 초기에 단위체는 모두 쓰이고 반응이 진행됨에 따라 고분자가 형성되는 중합반응이다. 따라서 모든 반응단계에서 분자량이 다른 분자들이 모두 존재하는 중합반응이다(13). 그러므로 insertion 기작에 의한 dextran 합성은 라디칼 중합반응에 속하는 것으로 사료된다.

본 연구에서는 균주로부터 분비되는 dextranase의 효소반응으로부터 평균분자량이 약  $7 \times 10^6$

인 "native" dextran의 생성기작을 정성적으로 연구하고자 하였다. 이 연구결과는 부가가치가 높은 의료용 dextran을 분자량 조절에 의해 생산하는 등의 기초자료로 사용될 수 있을 것이다. 이러한 분석법은 pulullan, xanthan, 그리고 PHB(Poly Hydroxy Butyrate)같은 다른 생물고분자에도 적용할 수 있을 것이다.

## 재료 및 방법

### 사용균주 및 배양조건

본 실험에 사용한 균주는 ATCC에서 분양받은 *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512 F(ATCC 10830A)이다. 균주는 4°C에서 peptone 10g/l, yeast extract 5g/l, sucrose 100g/l, agar 20g/l의 한천 고체배지에 보관하였다. 배지로는 sucrose 15g/l, potassium phosphate 10g/l, yeast extract 2g/l, peptone 5g/l, salts solution 5ml/l (40g/l MgSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O+2g/l NaCl+2g/l FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O+2g/l MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O)을 사용하였다. 갈변현상과 침전물 형성을 막기 위해 각 성분별로 멸균한 뒤 혼합하여 사용하였다.

한천 고체배지상의 균주를 120ml의 배지가 들어 있는 250ml 플라스크에 접종시켜 진탕배양기(Vision Scientific Co.)에서 27°C, 150rpm으로 12시간 동안 전배양하였다. 배지 250ml가 들어 있는 500ml의 주발효 플라스크에 배지의 10%(v/v)에 해당하는 전배양된 발효액을 재접종시켜 전배양과 같은 조건에서 8시간 동안 배양하였다.

### Dextranucrase 조효소액의 제조

평균분자량이  $6.5 \times 10^4$  정도인 이 효소는 pH 6.7과 23°C의 발효조건에서 최대량 생산되는 것으로 보고되고 있으나(1, 2) 실제로는 27°C에서 150rpm으로 8시간 동안 진탕배양하였다. 발효액 250ml를 25°C, 8000rpm에서 5분간 원심분리하여 균체를 제거하였다. 원심분리 후 얻어진 상등액 100ml에 효소안정제인 5mM CaCl<sub>2</sub> 3ml를 첨가하였다. 0.1N NaOH용액을 사용하여 효소반응의 최적 pH인 pH 5.2로 조정하여 이것을 조효소액으로 사용하였다.

### Dextranucrase의 효소반응조건

효소반응의 최적조건은 pH 5.2와 30°C로서 최대의 활성을 나타낸다(14). 또한 CaCl<sub>2</sub>의 첨가로 효소가 안정화된다(15). 5mM CaCl<sub>2</sub> 10ml를 포함

하는 0.2M acetate 완충용액(pH 5.2)에 sucrose를 각각 50, 100, 150g/l의 농도가 되도록 효소반응용액을 준비하였다. 효소반응실험은 수조(Vision Scientific Co.)에서 진행하였으며, 효소반응의 최적온도는 30°C로 하였다. 효소반응용액 210ml가 들어 있는 500ml 플라스크는 30°C 수조에 저장하였다. 이 플라스크에 효소액 30ml를 첨가하여 정치상태로 효소반응실험을 수행하였다. Dextranucrase의 활성도는 DSU(Dextranucrase Activity Unit)로 정의되며 이것은 1시간 동안 1mg sucrose를 dextran으로 전환시키는 효소의 양을 의미한다. 이 때 사용한 효소액의 활성도는 0.3 DSU였으며, 활성도가 유지되는 동안 실험을 수행하였다.

### Dextranucrase의 활성 측정

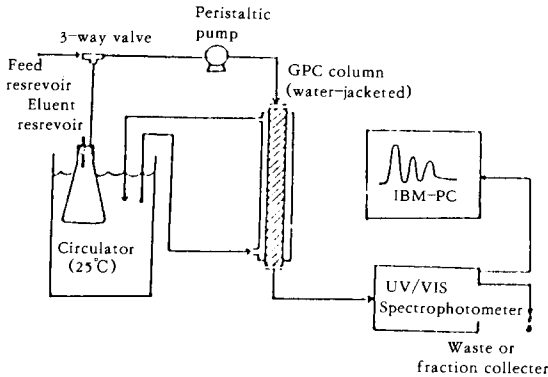
Dextranucrase는 1분자의 sucrose에 반응하여 dextran과 1분자의 fructose를 방출한다. 따라서 이 효소반응의 유일한 환원당인 fructose의 양을 측정함으로써 효소의 활성도를 알 수 있다. 가장 많이 사용되고 오차가 적은 환원당 측정법인 Miller에 의해 수정된 DNS법을 효소의 활성도 측정에 사용하였다(16). 실험방법은 다음과 같다. 1ml DNS 반응용액(0g/l NaOH+10g/l Dinitrosalicylic acid+1.6g/l phenol)에 1ml 시료를 넣고 10초간 교반한다. 80°C 수조에서 10분간 반응시키고 물(4°C)로 2분간 냉각시킨다. 5ml Rochelle salt용액을 첨가하여 황갈색을 안정시킨 후, 2.5ml 증류수를 첨가하여 575nm에서의 흡광도를 측정한다. DNS의 표준곡선을 얻기 위한 당으로 fructose를 사용하였다.

### 시료의 채취 및 분석

0.5~1.5시간마다 2ml의 시료를 채취하여, 시료 부피의 2배에 해당하는 methanol을 첨가하여, 4°C에서 8000rpm으로 20분간 원심분리하였다. 보다 정제된 dextran을 얻기 위하여, 위의 과정을 반복하였다. 과량의 상등액을 제거한 후 침전된 dextran을 증류수에 녹여 60°C에서 12시간 이상 건조시켰다. 건조된 dextran 분말을 사용하여 GPC분석용 1% 용액을 제조하여 시료로 사용하였다.

### 젤 투과 크로마토그래피(GPC System)

Dextran 시료의 분자량 분포도를 측정하기 위해



- 1) Eluent: D. W. 2) Operation condition ① flow rate: 0.45ml/min. ② temp.: 25°C ③ injection vol.: 0.45ml  
 3) Data processing: LOTUS 123 4) Gel: Sephacryl S-400 HR ① bead size: 25~75 $\mu$ m ② dextran MW range:  $2 \times 10^3 \sim 4 \times 10^5$  ③ globular protein MW range:  $1 \times 10^4 \sim 1.5 \times 10^6$

Fig 4. Schematic diagram for on-line GPC system.

여 GPC system을 사용하였고, 그 모식도를 Fig. 4에 나타내었다. 크로마토그래피관으로 내경이 1cm, 길이가 50cm인 Amicon관을 사용하였다. Water jacket으로 관 위에 아크릴관을 장착하여 크로마토그래피관의 온도를 25°C로 유지하였다. 사용한 gel은 크기 배제범위가 구형 단백질에 대하여 분자량  $2 \times 10^4 \sim 8 \times 10^6$ 이고, dextran에 대하여 분자량  $1 \times 10^4 \sim 2 \times 10^6$ 인 Sephacryl S-400 HR (Pharmacia LKB, Sweden)이었다. 이 gel은 상용되고 있는 크기 배제 크로마토그래피용 gel 중에서는 분리 분자량 범위가 가장 넓은 gel의 하나이다. 관의 상단부에 peristaltic pump와 three-way valve를 연결하여 시료와 용리액(3차 증류수)을 분당 약 0.45ml의 일정한 유속으로 공급하였다. 관의 하단부에는 flow-cell이 장착된 분광광도계(Spectronic 601, Milton Roy Co.)를 연결하여 197nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 on-line으로 연결된 컴퓨터에서 자료를 입력받았다. 자료는 LOTUS package를 사용하여 용리시간에 대한 UV흡광도를 용리곡선으로 나타내었다.

분자량 분포도를 얻기 위해 사용한 표준물질은 Dextran T-40(평균분자량 39, 100), Dextran T-70(평균분자량 66, 700)이었고, 관의 공극부피와 전체부피를 결정하기 위하여 사용한 물질은 Blue

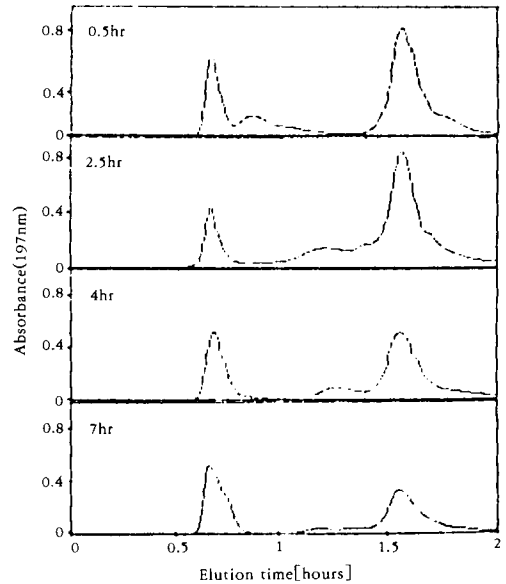


Fig 5. GPC chromatograms of dextran produced by dextransucrase with reaction time as a parameter at the initial sucrose concentration of 50g/l.

Dextran(평균분자량  $2 \times 10^6$ , Sigma Co.)과 nickel nitrate( $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 분자량 290.18)이었다. Blue Dextran과 nickel nitrate는 280nm에서 흡광도를 측정하였고, 나머지 표준 물질과 시료는 dextran 최대흡수파장인 197nm에서 측정하였다.

## 결과 및 고찰

초기 Sucrose 농도 50g/l에서의 Dextran 생성 초기 sucrose 농도가 50g/l일 경우 반응시간에 따른 용리곡선을 Fig. 5에 나타내었다. 반응이 진행됨에 따라 저분자량 dextran이 중간분자량 dextran을 거쳐 고분자량 dextran으로 이동됨을 알 수 있다. 본 실험에서 사용한 Sephacryl S-400HR gel의 분리 분자량 범위는  $10^4$ 에서  $2 \times 10^6$ 이므로, chromatogram에서 가장 먼저 용리되는 peak는 분자량이  $2 \times 10^6$  이상이고, 가장 늦게 용리되는 peak는 분자량이  $10^4$  이하의 dextran에 해당한다. 그 사이에 용리되는 peak는 분자량이  $2 \times 10^6$ 과  $10^4$  사이의 dextran이므로 분자크기에 따라 순서대로 용리된다.

중간분자량 dextran의 생성은 두 가지로 설명할

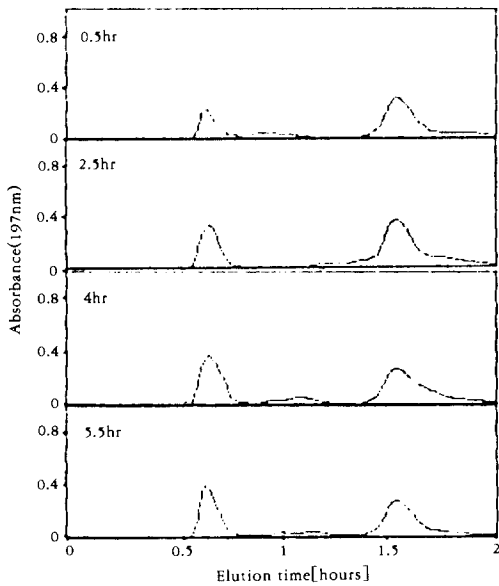


Fig 6. GPC chromatograms of dextran produced by dextransucrase with reaction time as a parameter at the initial sucrose concentration of 100 g/l.

수 있는데, 하나는 sucrose가 primer로 작용하는 경우이고, 다른 하나는 sucrose 농도가 작아서 dextransucrase로의 확산에 의한 sucrose 물질전달 속도가 중합속도에 미치지 못하여 중합속도를 감소시키는 경우이다. 문헌에 나와 있는 primer로서의 sucrose 농도는 100~200g/l 이므로(1), 실험한 50g/l의 sucrose 농도는 primer로서 작용하기에는 낮은 농도이다.

#### 초기 Sucrose 농도 100g/l에서의 Dextran 생성

Fig. 6은 초기 sucrose 농도가 100g/l 일 때 반응시간에 따른 용리곡선이다. 반응이 진행됨에 따라 50g/l 일 경우와 마찬가지로 저분자량 dextran이 중간분자량 dextran을 거쳐 고분자량 dextran으로 이동되었다. 그러나 50g/l의 경우와는 달리 중간분자량의 dextran에 해당하는 peak의 양이 작음을 알 수 있다. 또한 50g/l에 비해 peak의 높이, 특히 저분자량에 해당하는 peak의 높이가 현저하게 작음을 알 수 있다.

#### 초기 Sucrose 농도 150g/l에서의 Dextran 생성

초기 sucrose 농도가 150g/l에서의 반응시간에

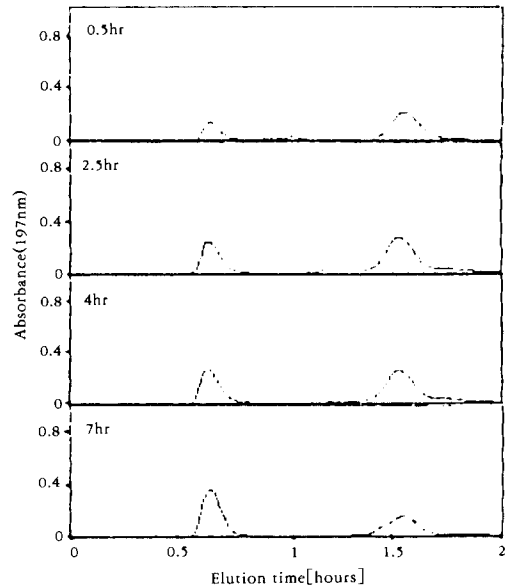


Fig 7. GPC chromatograms of dextran produced by dextransucrase with reaction time as a parameter at the initial sucrose concentration of 150g/l.

따른 용리곡선을 Fig. 7에 나타내었다. 반응이 진행됨에 따라 저분자량 dextran이 고분자량 dextran으로 이동되었다. 그러나 낮은 농도, 특히 50g/l의 경우에 비해 중간분자량의 dextran에 해당하는 peak가 나타나고 있지 않다.

Primer로서 작용할 수 있는 sucrose 농도(150g/l)인데도 0.5시간에서의 작은 peak를 제외한 모든 용리곡선에서 중간분자량 dextran이 나타나지 않았으므로 sucrose는 primer로 작용하지 않았다. 그러므로 50, 100g/l에서 나타난 중간분자량대의 peak는 primer에 의한 중간분자량의 dextran 생성이 아니라, 저농도 sucrose의 확산에 의한 물질전달속도의 제약으로 인한 것으로 해석하는 것이 적절할 것이다. 즉 150g/l 이상의 고농도 sucrose 용액에서는 확산에 의한 sucrose 전달속도가 dextran의 중합속도보다 빨라 중합이 급속도로 진행하여 중간분자량의 dextran이 생성되지 않는 반면, 그 이하의 sucrose 농도에서는 sucrose의 물질전달 속도가 중합속도를 따라가지 못해 중간분자량의 dextran이 생성되는 것이다. 또한 중간분자량 dextran의 생성이 없이 고분자량 dextran이 바로 나타나는 것으로부터 dextran 생성은 라디칼 중합

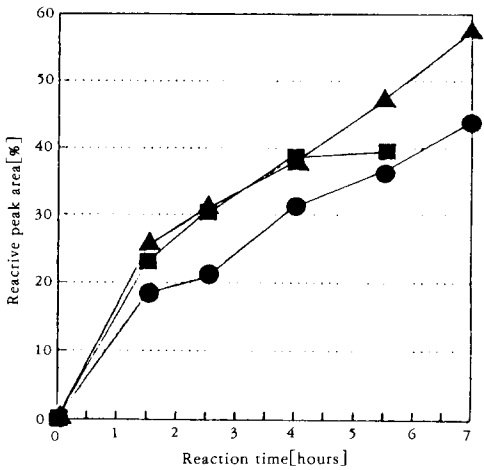


Fig. 8. Peak area fraction of high molecular weight ( $>2 \times 10^6$ ) dextran to the total peak area with sucrose concentration as a parameter: ●, 50g/l; ■, 100 g/l; ▲, 150g/l.

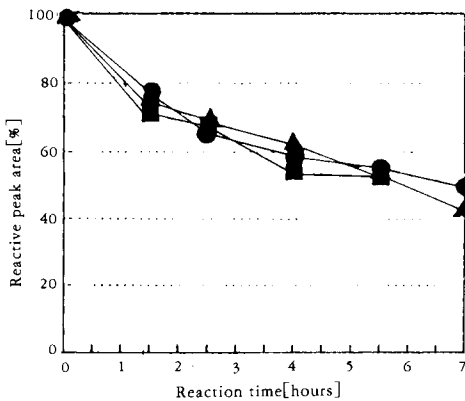


Fig. 9. Peak area fraction of low molecular weight ( $<10^4$ ) dextran to the total peak area with sucrose concentration as a parameter: ●, 50g/l; ■, 100 g/l; ▲, 150g/l.

합반응을 따른다는 결론을 얻을 수 있다. 이것은 dextran 생성이 만약 step 중합반응을 따른다면 모든 농도와 반응시간에 있어 중간분자량을 포함하는 모든 분자량 범위에 해당하는 넓은 범위의 GPC 용리곡선이 나타날 것이기 때문이다. 실제 물질전달 제약이 반응속도에 미치는 영향을 정확히 파악하기 위해서는 넓은 교반속도 범위에 있어서의 생성 dextran의 분자량 분포에 대한 실험적 연구가 요구

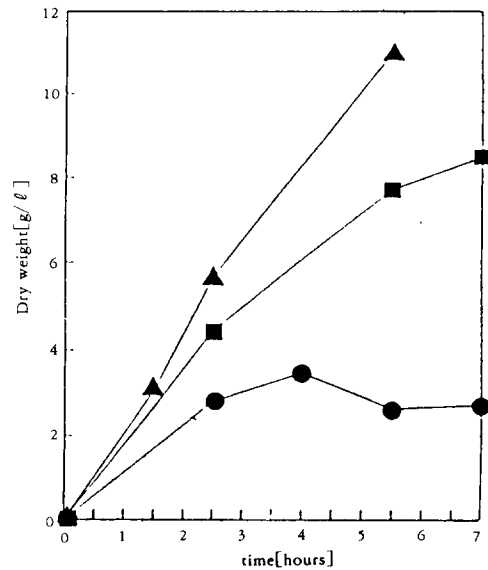


Fig. 10. Total dry weight of dextran produced by dextransucrase with sucrose concentration as a parameter: ●, 50g/l; ■, 100g/l; ▲, 150g/l.

된다.

Sucrose 농도에 따른 저분자량과 고분자량 dextran의 전 dextran 용리곡선에 대한 넓이의 비를 Fig. 8과 9에 각각 나타내었다. 반응시간 0에서의 저분자량 dextran의 넓이비를 100%로 하였다. 저분자량 dextran의 넓이비는 sucrose 농도에 따라 큰 차이를 보이고 있지 않지만, 고분자량 dextran에 있어서는 50g/l의 경우 다른 두 농도에 비해 작은 값을 보이고 있다. 이것은 낮은 농도의 sucrose 용액에서 sucrose의 물질전달 제약에 의한 저분자량과 중간분자량대에 걸친 dextran의 상대적인 양의 증가로 해석된다.

#### 반응시간에 따른 Dextran의 건조중량

Fig. 10은 초기 sucrose 농도가 50~150g/l에서의 반응시간에 대한 dextran의 총건조중량을 보여 주고 있다. 실험한 농도범위에서 생성된 dextran의 총건조중량이 sucrose 농도에 비례하는 것으로 나타났다. 고농도에서 GPC의 용리곡선이 낮아지는 것은 (Fig. 5~7 참조) 농도에 따라 중합반응의 진행방식이 달라진다는 것과, 많은 수의 저분자량 dextran보다 적은 수의 고분자량 dextran이 총

dextran 중량에 더 기여할 수 있다는 것으로 해석이 가능하다. 이 실험 결과에 기초하여, 더 많은 양의 dextran을 생성하기 위하여 한정된 범위에서 150g/l 이상의 sucrose를 사용할 수 있음을 알 수 있다. 그러나 필요한 분자량 범위의 dextran을 얻기 위해서는 primer의 종류 및 농도, 교반속도, 고농도 sucrose에서의 반응 등, 반응조건에 대한 최적화가 필요하고, 상업화의 경제성의 측면에서는 생산되는 dextran의 저, 중, 고, 각 분자량대의 상대적 비율에 대한 고려가 중요하게 된다.

### 요 약

본 연구에서는 dextransucrase의 효소반응에 의한 dextran 생성기작을 규명하고자 하였다. Dextransucrase에 의한 dextran 생성은 초기당농도 50~150 g/l에 대하여 수행하였고 생성된 dextran은 GPC를 사용하여 분자량 분포를 측정하였다. 이 연구에서 실험한 sucrose 농도범위에서는 sucrose가 primer로 작용하지 않은 것으로 추측된다. 또한 sucrose 농도가 50~100g/l의 범위에서 확산에 의한 sucrose의 물질전달 제약에 의한 중합속도의 감소로 먼저 중간분자량 dextran이 생성되었다가 고분자량 dextran이 생성된다는 것을 알 수 있었다. Sucrose 농도가 100~150g/l로 증가하면서 중간분자량 dextran이 현저히 감소되었다. 결론적으로, dextran 생성기작은 라디칼 중합반응을 따르나 낮은 sucrose 농도에서는 물질전달 제약에 의하여 중합반응속도가 감소되어 중간분자량의 dextran을 생성함을 알 수 있었다.

### 참고 문헌

1. M. Kobayashi and K. Matsuda(1980), *Biochemica et. Biophysica. Acta.*, **614**, 46.
2. A. Jeanes(1976), *A. A. S. Sympo. Ser.*, **45**, 284.
3. R. M. Alsop(1983), *Prog. Ind. Microbiol.*, **18**, 1.
4. J. E. Chang and J. T. Wong(1977), *Can. J. Biochem.*, **55**, 388.
5. H. Kaboli and P. J. Reilly(1980), *Biotech. Bioeng.*, **22**, 1055.
6. E. J. Hehre(1951), *Adv. Enzymol.*, **11**, 297.
7. J. F. Robyt and T. F. Walseth(1979), *Carbohydrate Research*, **68**, 95.
8. M. Kobayashi and K. Matsuda(1976), *J. Biochem. (Tokyo)*, **79**, 1301.
9. J. F. Robyt and H. Taniguchi(1976), *Arch. Biochem. Biophys.*, **174**, 129.
10. J. F. Robyt, B. K. Kimbie and T. F. Walseth (1976), *Arch. Biochem. Biophys.*, **174**, 129.
11. F. A. Bovey(1959), *J. Polymer Sci.*, **35**, 167.
12. F. A. Bovey(1959), *J. Polymer Sci.*, **35**, 191.
13. F. W. Billmeyer, Jr.(1970), *Textbook of Polymer Science*, 3rd Edition, p. 25, *John Wiley & Sons, Inc.*, New York.
14. M. Kobayashi, H. Utsugi and K. Matsuda (1986), *Agri. Biol. Chem.*, **50(4)**, 1051.
15. H. J. Koepell and H. M. Tsuchiya(1952), *J. Bacteriol.*, **64**, 521.
16. G. L. Miller(1959), *Analytical Chemistry*, **31**, 426.