

생전분을 당공여체로 한 분쇄마찰매체 함유 효소반응계에서의 Stevioside의 당전이 반응 기작

백승걸 · 박동찬 · 허태린 · 이용현*
경북대학교 자연과학대학 유전공학과

Reaction Mechanism of Transglycosylation of Stevioside in the Attrition Coupled Reaction System Using Raw Starch as a Glycosyl Donor

Baek, Seung-Gul, Dong-Chan Park, Tae-Lin Huh and Yong-Hyun Lee*

Department of Genetic Engineering, College of Natural Sciences
Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea

Abstract — Transglycosylation of stevioside in the attrition coupled heterogeneous reaction system using raw starch as a glycosyl donor has significant advantages over conventional reaction systems using liquefied starch as a donor. The transglycosylation of stevioside under the presence of organic solvent showed that transglycosylation reaction occurs via two steps; initially from raw starch to cyclodextrin(CD), and then followed by transglycosylation of produced CD. Comparison of the transglycosylation efficiency of α -, β -, γ -CDs indicated that α -, β -CD are mainly utilized as a glycosyl donor for following reaction. The reaction mechanism of transglycosylation between stevioside and CD proceeded according to random sequential bireactant mechanism. The equilibrium constant of transglycosylation reaction of cyclodextrin glucanotransferase was also evaluated. The structure of transglycosylated stevioside was confirmed by TLC, and it was found that glycosyl group($G_1 \sim G_4$) was bounded on a glucose unit in stevioside molecule carbon 13, 19 positions by α -1,4-glycosidic bond.

Cyclodextrin glucanotransferase(EC 2.4.1.19 ; 1,4- α -glucan 4- α -D-(1,4 glucano) transferase, cyclizing : CGTase)의 당전이능을 이용하여 각종 유용 당전이 반응물을 생산하려는 연구가 널리 진행되고 있다(1-5). 본 연구실에서는 분쇄마찰매체 함유 불균일상 효소 반응계에서 생전분을 당공여체로 한 CGTase의 당전이 반응에 관한 연구 결과를 보고한 바 있다(1). 즉 stevioside를 당수용체로 한 당전이 반응은 액화전분을 당공여체로 하는 기존의 당전이 방법에 비하여 당전이 수율이 높고, 반응속도는 유사하며, 불필요한 malto-oligosaccharide의 축적이 낮고, 잔류 생전분의 분리가 용이하여 당전이 stevioside의 분리 정제가 용이한 점 등 많은 장점이 있어 산업적 활용이 기대됨을 보고한 바 있다.

당전이 반응 mechanism의 규명은 효소의 기본적

특성을 이해하는데 필요할 뿐만 아니라 고효율 당전이 반응기 및 반응계의 개발에도 필수적 과제이다. French 등(6)은 α -CD와 sucrose를 반응시킨 결과 α -CD fragmentation가 당수용체의 비환원성 말단에 전이됨을 밝혔으며, Vetter(7)는 α -CD와 maltose로부터 gluco-oligosaccharide를 합성하는 연구에서 일차 당전이 산물로 malto-octose가 주로 생성됨을 보고한 바 있다.

Bender(8)는 CGTase가 coupling 또는 disproportionation과 같은 반응을 촉매하기 위해서는 두 기질이 각각 결합할 수 있는 두개의 binding site를 가져야 하며, 당수용체가 결합하는 부위가 빌 경우에는 CD가 생성되고, 당공여체와 당수용체 둘 다 결합하였을 경우에는 coupling 또는 disproportionation 반응이 일어나며, 또한 cyclization 반응은 기질이 helical conformation 형태를 가져야 한다고 하였다.

Kobayashi(9)는 CGTase의 작용 mechanism을 설명하기 위하여 active site model를 제안하였고, maltotriose 크기로 당분자가 효소와 결합함을 제시하였으며, 기타 당전이 mechanism에 관한 수편의 연구

Key words: Transglycosylation of stevioside, cyclodextrin glucanotransferase, bioattritor, raw starch as donor, mechanism

*Corresponding author

(10-13)가 수행된 바 있다. 그러나 정확한 당전이 반응 mechanism은 물론 CGTase의 일반적인 작용 mechanism에 대한 연구는 미흡한 실정이다.

본 연구에서는 분쇄마찰매체 함유 불균일상 효소 반응계에서 생전분을 당공여체로 한 stevioside의 당전이 반응 mechanism을 규명하였다. 먼저 당전이 반응 중 전분 유래의 중간산물들의 변화를 관찰하였으며, 유기용매가 당전이 반응에 미치는 영향을 검토하였고, α -, β -, γ -CD를 당공여체로 한 당전이 반응의 양상을 관찰하였으며, CD와 stevioside간의 bi-reactants 당전이 반응의 mechanism을 규명하였으며, 또한 CGTase가 촉매하는 당전이 반응의 평형상수를 조사하였다.

재료 및 방법

당전이 효소

당전이 효소는 *Bacillus macerans* 유래의 산업용 CGTase(Amano Co., specific activity : 60 units/mg protein)로, 최적 pH와 온도는 각각 pH 6.0과 50°C였다. CGTase의 활성은 5%(w/v) 가용성 전분용액 (pH 6.0) 1.0 ml에 CGTase 0.02 ml (protein conc. : 2.5 mg/ml)을 첨가하여 50°C에서 30분간 반응시킨 후 생성된 CD량을 측정하여, 분당 1 mg의 CD를 생성시키는 효소의 양을 1 unit로 정하였다.

당공여체 및 당수용체

당공여체로는 옥수수 생전분(corn starch), cyclodextrin(α -, β -, γ -CD ; Sigma Co.), 그리고 gluco-oligosaccharide($G_1 \sim G_7$; Sigma Co.)를 사용하였다. 당수용체로는 배당체인 stevioside(M.W. 804.9, Sigma Co.)를 사용하였으며, 부분정제된 산업용 stevioside (국내 T사, stevioside 90%와 rebaudioside-A 10% 함유)도 사용하였다.

생전분을 당공여체로 하는 분쇄마찰매체 효소반응계에서의 당전이 반응

분쇄마찰매체 효소반응계에서 생전분을 이용한 당전이 반응은 당공여체인 옥수수 생전분 100 g을 20 mM Tris-maleic acid-NaOH buffer(pH 6.0) 1 l에 현탁하고, 여기에 당수용체 stevioside 0.1 M, CGTase 8.0 ml(1,200 units), 그리고 유리구(glass bead, 직경 3 mm, 비중 2.54) 400 g을 첨가하여 50°C에서 200 rpm으로 교반하면서 반응시켰다. 또한 유기용매의 영향을 조사하기 위해 isopropanol을 10% 첨가하여 동일한 조건에서 반응시켰다.

Cyclodextrins 및 gluco-oligosaccharides($G_1 \sim G_7$)을 당공여체로 하는 당전이 반응

당공여체로 α -, β -, γ -CD와 gluco-oligosaccharides ($G_1 \sim G_7$)를, 당수용체로는 stevioside를 각각 10 mM가 되도록 20 mM Tris-maleic acid-NaOH buffer(pH 6.0) 20 ml에 용해한 후 CGTase 0.032 ml를 첨가하여, 50°C에서 200 rpm으로 반응시켰다. 또한 CDs를 당공여체로 하는 반응에서 isopropanol 10%를 첨가하여 반응시켰다. 또한 CD 혼합물(α -CD : β -CD : γ -CD = 1.5 : 1 : 0.2)도 당공여체로 이용하였다.

Stevioside와 당전이 stevioside간의 평형상수의 측정

β -CD 20 g/l에 stevioside를 0.01~0.02 M 되도록 첨가한 후, 효소를 1,200 unit/l 첨가하여 50°C에서 24시간 반응시켜 평형상태에 도달한 후 stevioside의 농도를 측정하여 다음과 같은 식에 따라 평형상수를 계산하였다.

$$K_{eq} = \frac{[\text{당전이 Stevioside}]}{[\text{Stevioside}]}$$

Thin layer chromatography를 이용한 stevioside의 당전이 위치 확인

반응액을 silica gel 60 plate(20×20 cm, Merk Co.)에 spotting하고 chloroform : methanol : water(60 : 43 : 10)의 전개용매로 실온에서 상승법으로 1차 전개하였다. Plate를 건조한 후 glucoamylase 또는 β -amylase를 2000 units/l 녹인 용액을 분사하고 50°C에서 1시간 반응시킨 후 재건조하고 plate를 90도 회전시켜 동일한 용매로 상승법으로 전개시켰다. Sulfuric acid과 methanol을 1 : 1로 혼합한 용액을 plate에 분사한 후 풍건하고 110°C oven에서 20분간 방치하여 발색시켜 당을 확인하였다(13-15).

분석방법

각종 당수용체와 CD의 농도는 high performance liquid chromatography(HPLC, Model-305, Gilson Co.)를 사용하여 측정하였고, column은 Cosmosil 5 NH₂ packed column(Nacalai Co.), 용출용매는 acetonitril과 H₂O(65 : 35)의 혼합용액, 용출속도는 1.0 ml/min이었고, RI detector로 검정하였다.

결과 및 고찰

분쇄마찰매체 효소반응계에서 stevioside의 당전이 반응중 당공여체인 전분 유래 중간산물의 변화

분쇄마찰매체 효소반응계에서 생전분을 당공여체로 하는 stevioside로의 당전이 반응은 전분으로부터 stevioside에 glucose 분자가 직접 전달되는 direct transglycosylation 반응경로와 생전분으로부터 CD가 합성된 후 생성된 CD가 다시 개환하여 stevioside와 반응하는 indirect transglycosylation 반응경로가 유추된다.

당전이 반응 경로를 규명하기 위하여 본 효소반응계에서 당수용체인 stevioside를 첨가하지 않고 CD 생성반응을 수행한 군과 stevioside를 첨가하여 당전이 반응시킨 군의 잔류 생전분, CD, 당전이 반응에 관여한 전분의 당 환산량, 잔류 stevioside 양의 변화를 Fig. 1에 나타내었다.

Stevioside를 첨가하지 않은 경우(Fig. 1A) 생전분은 반응초기부터 계속적으로 감소하여 반응 8시간에는 55 g/l였고 24시간 경과 후에는 39 g/l이 잔류하였다(16, 17). 한편 CD 농도는 지속적으로 증가하여 24시간 후 47.5 g/l에 이르렀다. Stevioside를 첨가한 경우(Fig. 1B) 생전분은 반응 초기부터 보다 급격히 감소하여 8시간 후에는 45 g/l이었고 24시간 반응 후에는 28 g/l이 남았다. 또한 CD 농도는 8시간 후 최대농도인 27 g/l에 이르고 그 이후에는 점차 감소하여 24시간 후 21 g/l이 잔류하였다. 이와 같이 stevioside를 첨가할 경우 생전분의 분해가 촉진된 것은 생성된 CD가 당전이 반응에 소모되어 농도가 낮아져 product inhi-

bition 효과가 경감되기 때문으로 사료된다. 또한 stevioside를 첨가한 경우 반응 8시간 후 CD 농도의 변화가 감소하는 것은 생성된 CD가 당전이 반응에 계속적으로 이용되기 때문으로, CD 생성속도와 당전이 반응 속도간에는 밀접한 상관관계가 존재할 것으로 유추된다.

한편 당전이 반응에 사용된 당 환산량은 초기 생전분에서 잔류 생전분, CD, malto-oligosaccharide를 포함하는 수용성 당을 제한 값으로 전 기간에 걸쳐 계속 증가한 반면 당전이 수율은 반응 8시간 후 최대치인 82%에 근접하였다. 이러한 현상은 당전이 stevioside상의 당에 다른 당이 첨가되는 부가 전이반응과 binding site가 두개인 stevioside의 미결합 site에 첨가되는 반응이 지속적으로 일어나기 때문으로 당전이 stevioside의 분리에 의한 전이된 당의 결합 양상에 관한 규명이 요망된다.

생전분 및 CD를 당공여체로 하는 당전이 반응에 유기용매가 미치는 영향

일반적으로 *tert*-butanol, isopropanol, ethanol과 같은 유기용매를 첨가하면 CD 생산이 증가되는 것으로 알려져 있으며(18), 그 정확한 기작은 아직 알려져 있지 않지만 유기용매와 CD가 inclusion complex를 형성하여 CGTase에 대한 product inhibition 효과를 감소시키거나 또는 생성된 glucose, maltose와 CD간의 coupling 반응을 저해하므로 CD 합성이 향상될 것으로 추측된다.

Table 1은 생전분을 당공여체로 한 군과 CD를 당

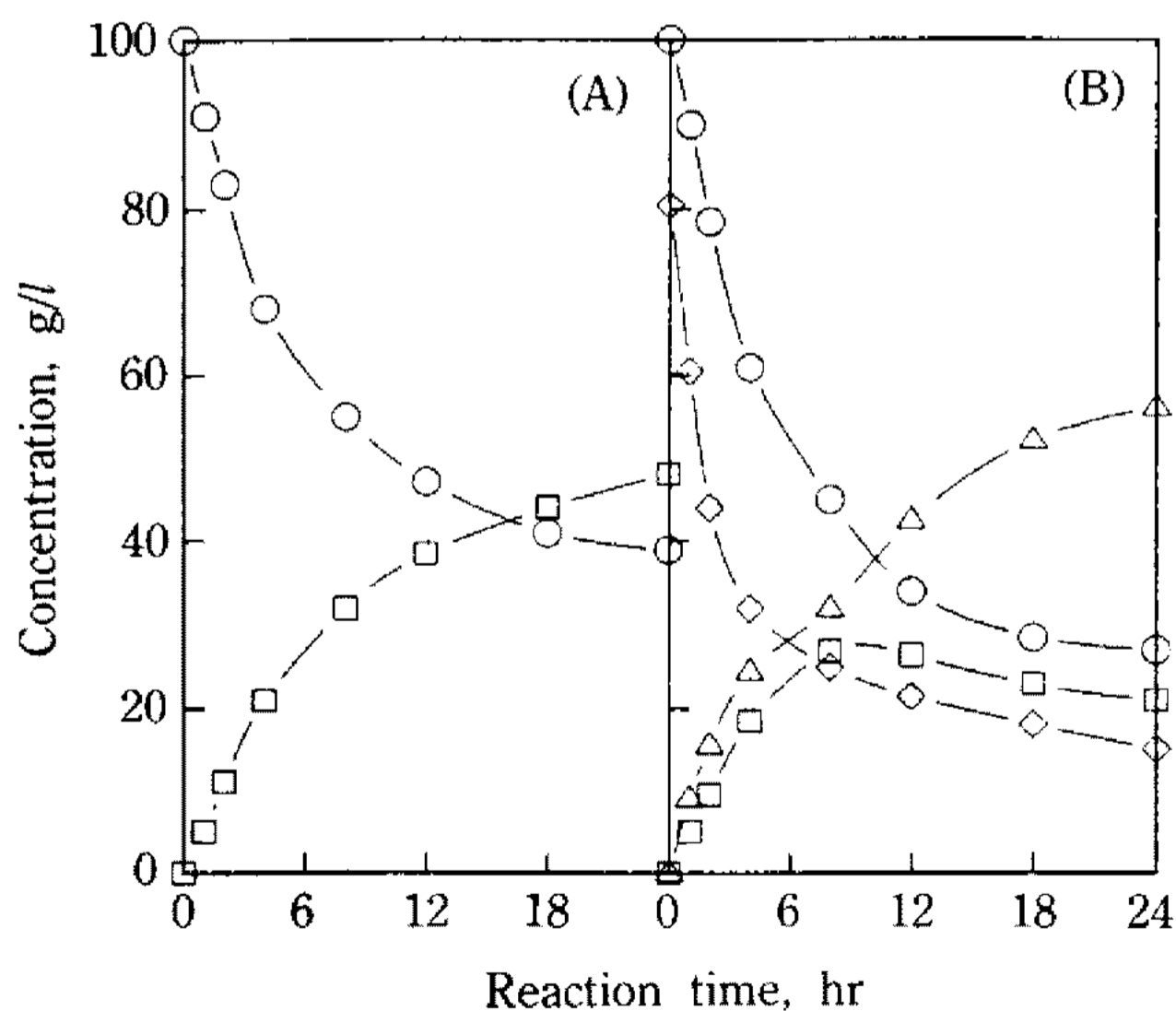


Fig. 1. Comparison of progresses of reaction in attrition coupled enzyme reaction system; without stevioside (A) and with stevioside (B).

100 g raw corn starch/l, 0.1 M stevioside/l, 1,200 units CGTase/l, pH 6.0, 50°C, and 400 g glass bead/l. Raw starch(○), cyclodextrin(□), transglycosylated sugar(▽), stevioside(◇)

Table 1. Transglycosylation of stevioside under the presence of organic solvent

Reaction	Transglycosylation yield		Cyclodextrin conc.	
	without OS*	with OS	without OS	with OS
Starch→CD ¹	—	—	4.5 g/l	5.7 g/l
CD+STV →G _n -STV ²	31%	8%	—	—
Starch+STV →G _n -STV ³	30%	11%	—	—

¹⁾ 100 g raw starch/l, 1,200 units CGTase/l, 400 g glass bead/l, pH 6.0, 50°C, 200 rpm, and 1 hr. ²⁾ 20 g cyclodextrins/l, 20 mM stevioside/l, 240 units CGTase/l, 80 g glass bead/l, pH 6.0, 50°C, 200 rpm, and 1 hr. ³⁾ 20 g raw starch/l, 20 mM stevioside/l, 240 units CGTase/l, 80 g glass bead/l, pH 6.0, 50°C, 200 rpm, and 1 hr. *OS; organic solvent, 10% isopropanol.

공여체로 한 군에 유기용매인 isopropanol을 첨가하여 유기용매가 당전이 수율에 미치는 영향을 검토한 결과이다. 생전분의 경우 10% isopropanol 첨가할 때 CD의 생성이 4.5 g/l에서 5.7 g/l로 향상되어 Mattsson 등(19)의 결과와 일치하였다.

생전분과 stevioside간의 당전이 수율은 30%에서 11%로, 또한 CD와 stevioside간의 수율도 31%에서 10%로 감소하여 유기용매가 매우 큰 영향을 보였다. 만일 생전분과 stevioside간의 당전이 반응이 직접 당을 전달하는 반응이라면, CD와 유기용매 사이에 형성되는 inclusion complex에 의하여 반응이 저해 받지 않을 것이다. 그러나 위에서와 같이 두 경우 모두 유기용매에 의하여 당전이 반응이 유사한 수준으로 영향받는 것으로 보아 분쇄마찰매체 효소반응계에서의 당전이 반응은 생전분으로부터 CD가 생성되고, 생성된 CD가 개환되어 stevioside에 당을 전이시키는 순서로 진행되는 것으로 유추된다.

α -, β -, γ -Cyclodextrin 및 gluco-oligosaccharides ($G_1 \sim G_7$)을 당공여체로 하는 당전이 반응

CGTase는 CD를 α -, β -, γ -형으로 생성하므로 각각의 CD에 따른 당전이능을 검토할 필요가 있다. Fig. 2는 α -, β -, 그리고 γ -CD를 당공여체로 할 경우와 gluco-oligosaccharides($G_1 \sim G_7$)를 이용할 경우의 반

응시간에 따른 미반응 stevioside의 농도 변화를 나타낸 것이다.

Fig. 2(A)에서와 같이 α -CD의 경우 반응 초기부터 stevioside의 농도가 급격히 감소하였으며, β -CD의 경우는 α -CD보다는 다소 느리게 농도가 감소되었다. 반면 γ -CD의 경우는 α - 및 β -CD에 비하여 농도 변화가 매우 적어 당공여체로 잘 이용되지 않음을 알았다. 이는 CGTase의 당공여체 binding site가 α - 또는 β -CD와 용이하게 결합하지만 γ -CD와 결합하기에 적합치 못하여 당공여체로 이용되기 어렵기 때문으로 유추된다.

Fig. 2(B)에서와 같이 당공여체로 $G_1 \sim G_3$ 를 이용할 경우 stevioside 농도 변화가 거의 없었고, $G_4 \sim G_7$ 의 경우 중합도가 증가함에 따라서 농도가 현저히 감소되어 당전이 반응이 촉진되었다. Kitahata 등(20)도 유사한 결과를 얻었는데, $G_4 \sim G_7$ 이 효소의 binding site와 결합하기 적당한 크기임을 알 수 있었다. 그러나 전보(1)에서와 같이 분쇄마찰매체 효소반응계내에서 생전분을 당공여체로 하는 stevioside의 당전이 반응은 gluco-oligosaccharide의 축적이 매우 적어, gluco-oligosaccharide가 미치는 영향은 미미하다고 판단된다.

Cyclodextrin과 stevioside간의 당전이 반응 Mechanism

기질인 CD와 stevioside간의 bireactants 당전이 효소반응 mechanism에 관한 연구는 생성된 산물이나 효소 구조적인 면을 중점적으로 다루었으나 효소 kinetics 관점에서는 연구된 바 없다. 일반적으로 bireactant간의 효소반응은 크게 sequential bireactant mechanism과 ping-pong bireactant mechanism으로 구분되며, sequential mechanism은 다시 random sequential mechanism과 ordered sequential mechanism으로 나뉘어진다.

Fig. 3은 CD와 stevioside간의 당전이 반응 mechanism를 규명하기 위하여 CD의 농도를 1.8, 3.6, 7.2, 9.6 g/l으로 고정하고, 각각의 경우 stevioside 농도를 1.61에서 9.66 g/l까지 변화시키면서 당전이 반응을 진행시킨 후 초기 당전이 반응속도를 측정하여 Lineweaver-Burk plot한 결과이다. 각각의 CD 농도에서 얻어진 직선들의 교차 양상으로 보아 CD와 stevioside의 당전이 반응은 random sequential bireactant mechanism으로 유추되며, kinetic equation은 다음과 같다(21).

$$v = \frac{V_{max} [CD][Stv]}{\alpha K_{CD} K_{Stv} + \alpha K_{CD} [Stv] + \alpha K_{Stv} [CD] + [CD][Stv]}$$

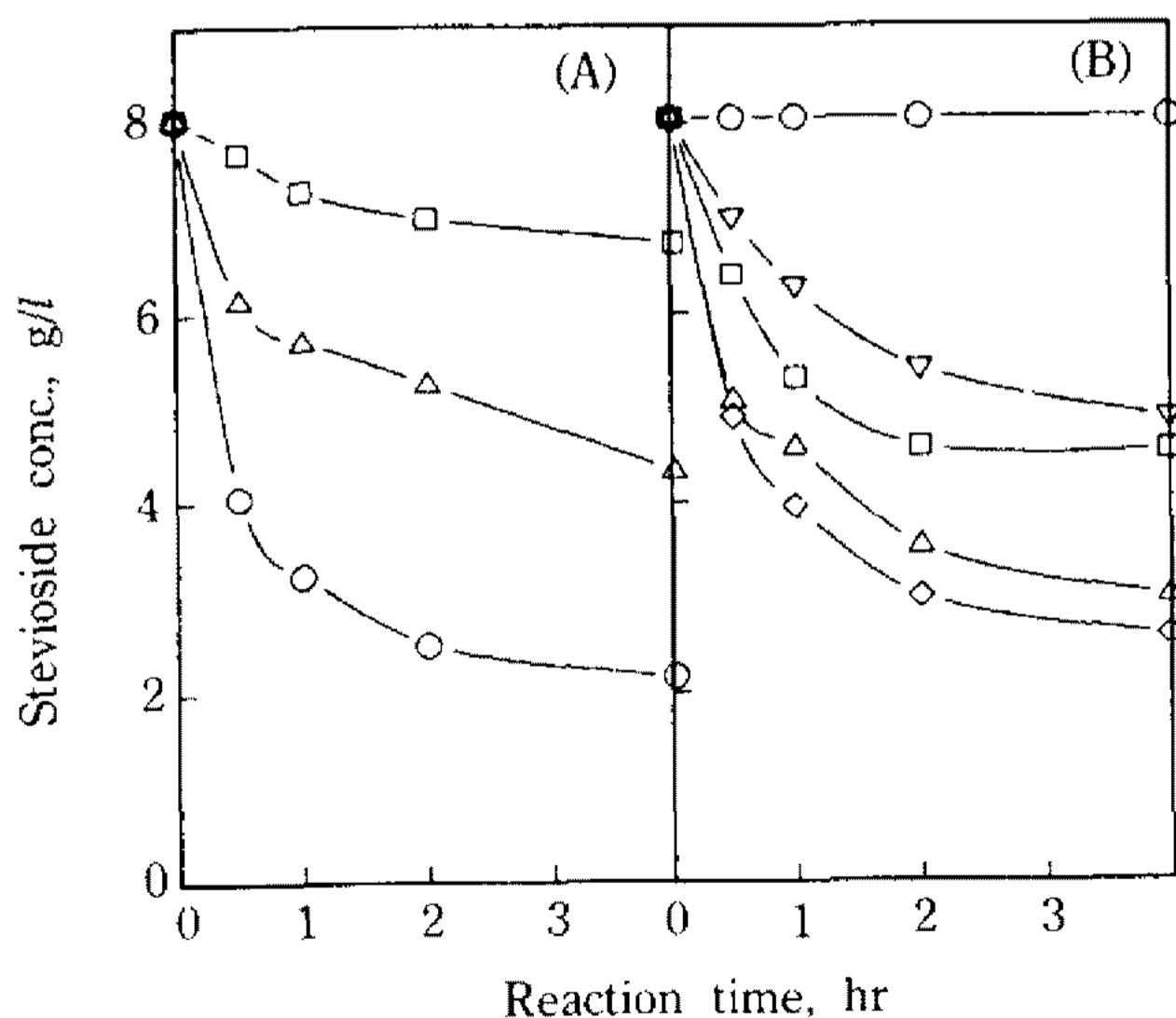


Fig. 2. Transglycoylation of stevioside using α -, β -, γ -cyclodextrins (A) and gluco-oligosaccharides($G_1 \sim G_7$) as a glycosyl donor.
 10 mM stevioside/l, 10 mM donor/l, 120 units CGTase/l, pH 6.0, and 50°C. (A) α -CD(\circ), β -CD(Δ), γ -CD(\square); (B) glucose, maltose, maltotriose(\circ), maltotetraose(∇), maltopentaose(\square), maltohexaose(Δ), and maltoheptaose(\diamond)

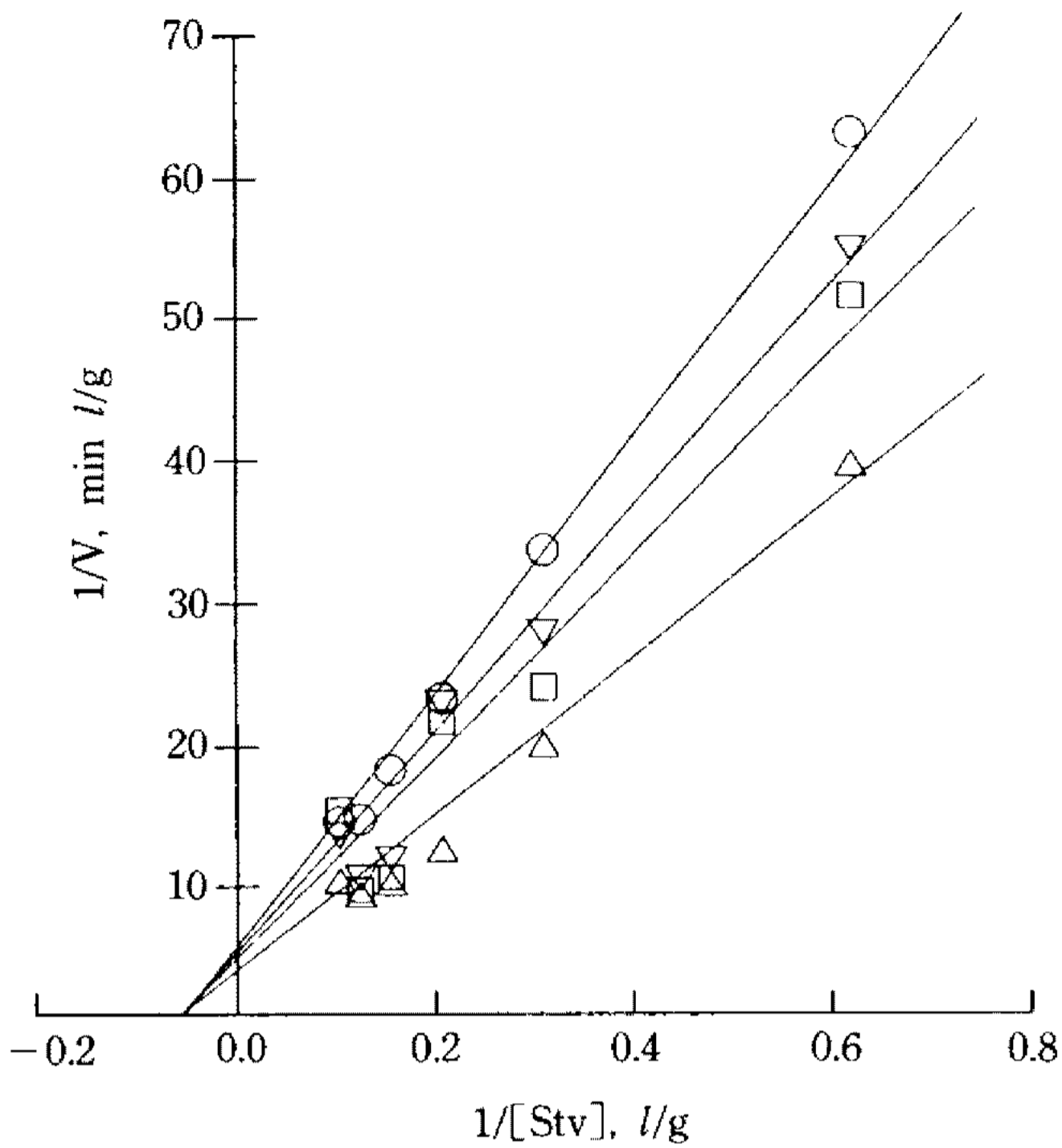


Fig. 3. Lineweaver-Burk plot of transglycosylation reaction of different amounts of stevioside under the various concentrations of cyclodextrin.

1.8~7.2 g cyclodextrins/l, 1.6~9.6 g stevioside/l, 120 units CGTase/l, pH 6.0, and 50°C. CD concentration; 1.8 g/l(○), 3.6 g/l(▽), 5.4 g/l(□), and 7.2 g/l(△)

여기서 v 는 당전이 반응 속도, V_{max} 는 당전이 반응의 최대 반응속도, K_{CD} 와 K_{Stv} 는 각각 효소-CD와 효소-stevioside 결합체의 해리상수, α 는 기질과 효소 결합에 의한 다른 기질의 효소결합력의 변화정도를 나타내는 상수, 그리고 $[CD]$, $[Stv]$ 는 각각 cyclodextrin 및 stevioside의 농도를 나타낸다.

Fig. 4는 CD 농도의 변화에 따라 위에서 얻은 기울기값(A)와 절편값(B)을 plotting한 결과로서, (A)와 (B)의 기울기 및 절편값으로부터 V_{max} , K_{CD} , K_{Stv} , 그리고 α 값을 계산한 결과 각각 0.579 g/l·min, 1.277 g/l, 31.765 g/l, 그리고 1.063을 얻었다.

Stevioside와 당전이 stevioside간의 평형상수

CD와 stevioside간의 당전이 반응을 장시간 동안 반응시켜도 어느 이상으로 당전이 반응이 진행되지 않았으며 이는 stevioside와 당전이 stevioside 사이에 평형상태가 존재하는 것으로 유추할 수 있다. Stevioside와 당전이 stevioside 간의 평형상수(K_{eq})를 구하기 위하여 β -cyclodextrin에 대한 stevioside의 혼합비율을 0.5에서 1.0 사이로 변화시키면서 과량의 효소 존재하에서 당전이 반응을 시킨 후 stevioside의 농도를 측정하여 평형상수를 측정된 결과는 Fig. 5와 같다.

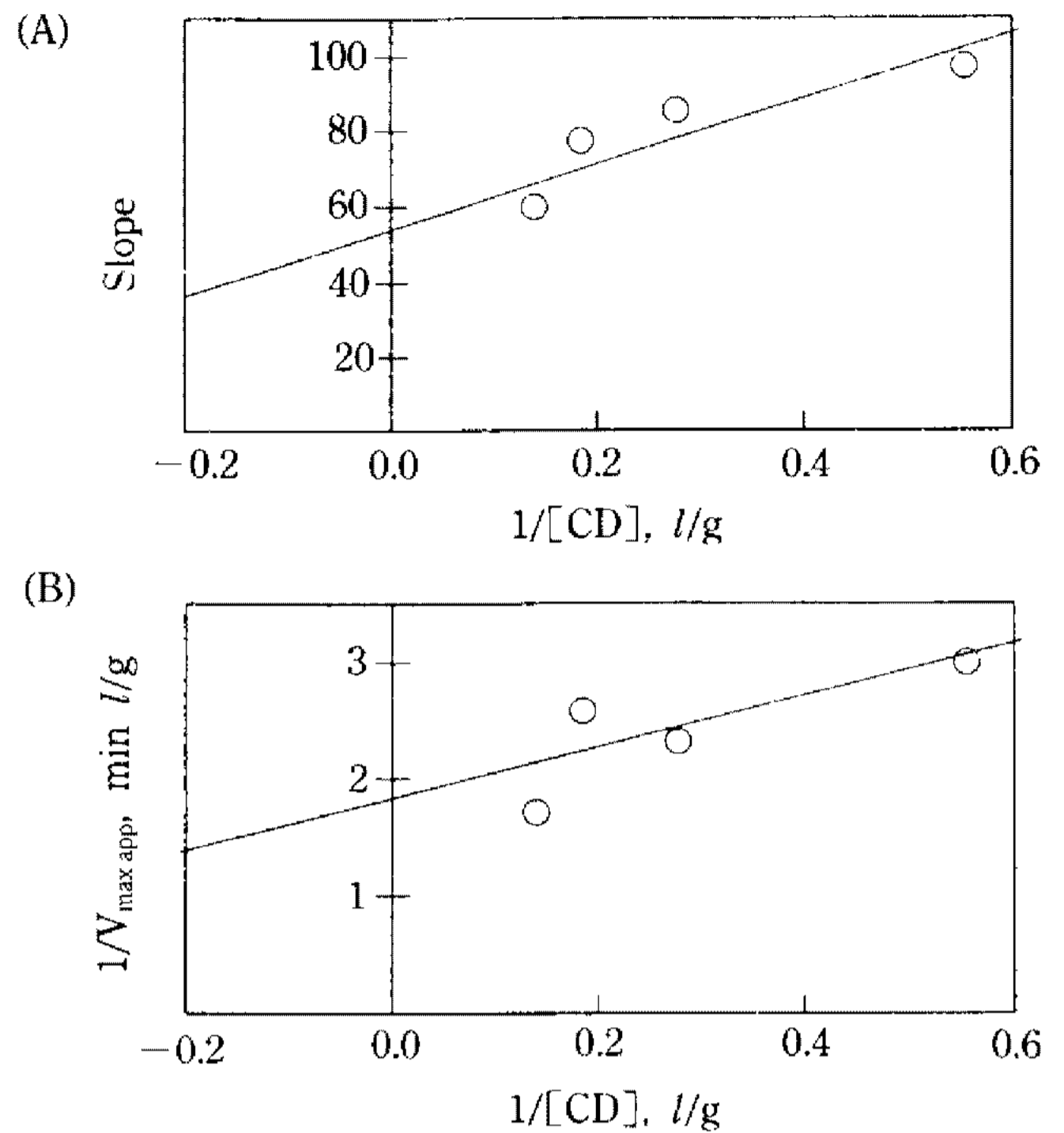


Fig. 4. Replots of data obtained from above Lineweaver-Burk plot.

(A); slopes versus 1/[CD], (B); $1/V_{max,app}$ versus 1/[CD]

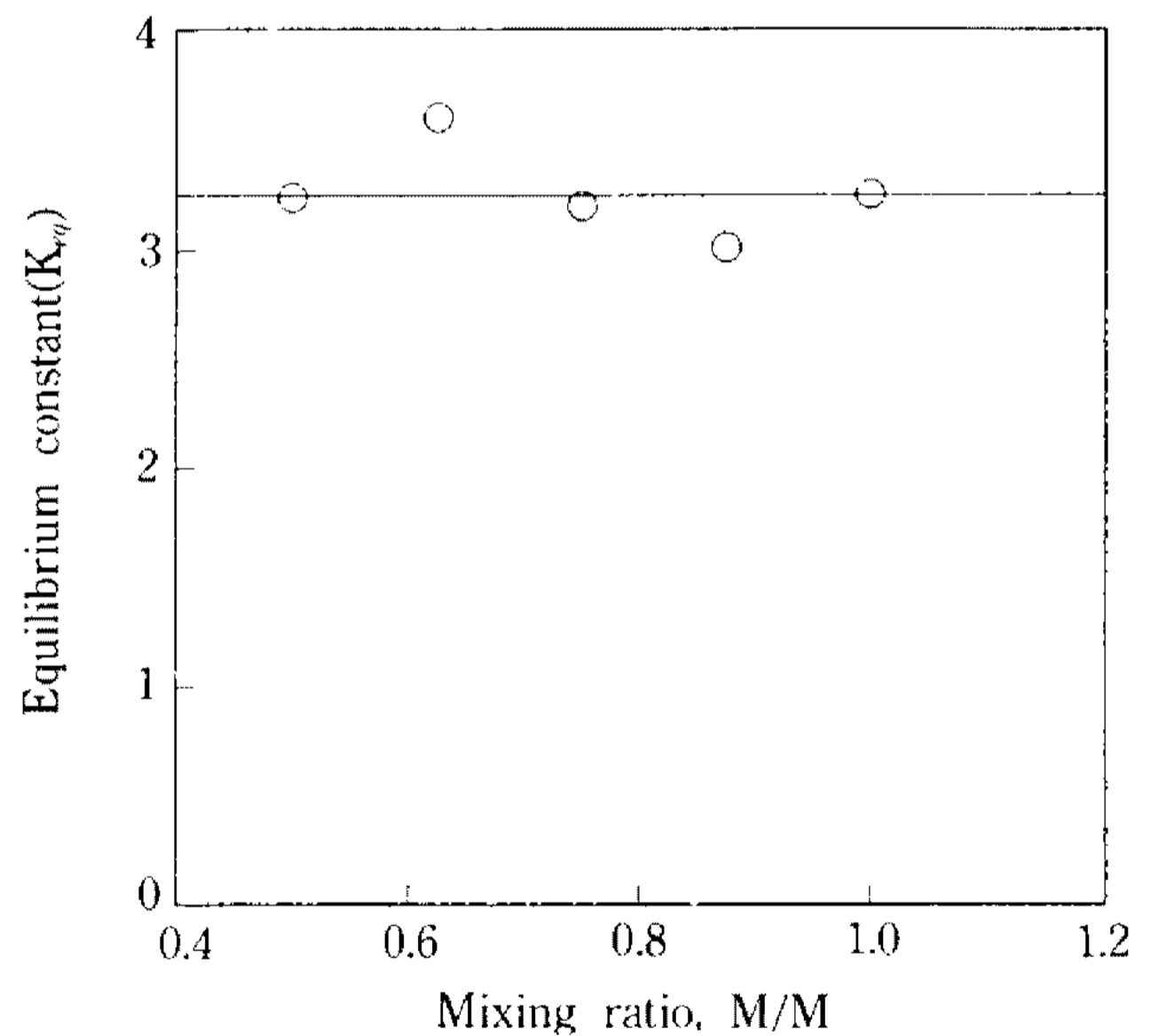


Fig. 5. Evaluation of equilibrium constant(K_{eq}) under the various mixing ratio of stevioside and β -cyclodextrin.

0.02 M β -cyclodextrin, 0.01~0.02 M stevioside, 1200 units CGTase/l, pH 6.0, and 50°C

혼합비율 0.5에서 1.0 사이의 평형상수는 3.22로 결정되었으며 보다 넓은 범위에서의 평형상태에 관한 규명이 요망된다.

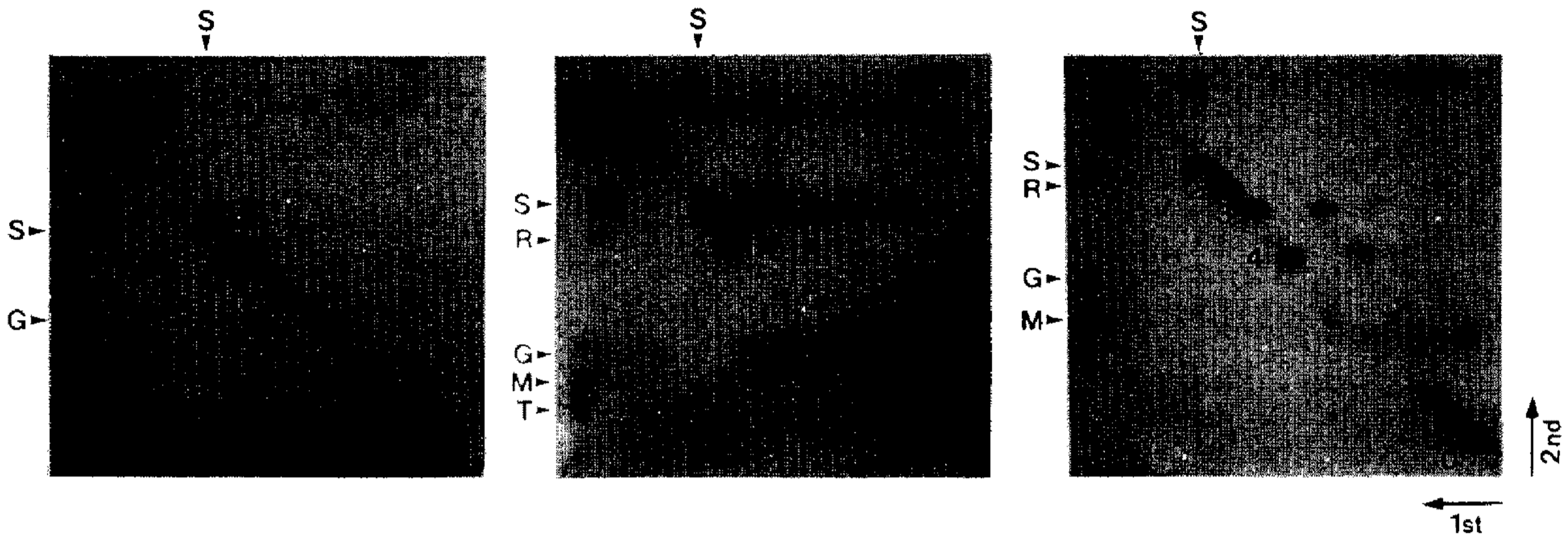


Fig. 6. Two-dimensional thin layer chromatogram of transglycosylated stevioside.

Reaction mixture was applied at the spot O, and the first development was carried out leftward(\leftarrow). The first developed plate was treated with no enzyme(A), glucoamylase(B), and β -amylase, and then the second development was carried out upward(\uparrow). S; stevioside, R; rebaudioside, G; glucose, M; maltose, T; maltotriose. 1; stevioside, 2; rebaudioside, 3; G_1 -stevioside, 4; G_2 -stevioside, 5; G_3 -stevioside, 6; G_4 -stevioside

Stevioside의 당전이 위치 확인

Fig. 6은 당전이 stevioside의 구조를 확인하기 위하여 24시간 반응액을 two dimension TLC에 전개시킨 결과로서, Fig. 6(A)는 일차 전개한 후 효소처리를 하지 않고 이차 전개한 것이며, Fig. 6(B)와 (C)는 반응액을 일차 전개한 후 각각 glucoamylase와 β -amylase를 함유하는 효소액으로 처리한 후 2차 전개한 것이다.

먼저 Fig. 6(A) 중의 spot 1은 stevioside, 2는 rebaudioside-A, 그리고 3, 4, 5, 6는 당전이 반응 후 생성된 각종 당전이 stevioside들이다. 생성된 각종 당전이 stevioside를 비환원성 말단기로부터 glucose 단위를 해리시키는 glucoamylase로 처리하면 Fig. 6(B)에서와 같이 생성된 당전이 stevioside인 spot 3, 4, 5, 6은 분해되어 stevioside(spot 1)와 glucose가 생성됨을 확인할 수 있었다. 따라서 이들 당전이 stevioside들은 stevioside에 수개의 glucose 분자가 결합하고 있는 구조임을 알 수 있으며, α -1,4-glucoside bond만을 절단하는 glucoamylase의 효소적 특성으로부터 stevioside에 전이된 glucose 분자들은 α -1,4-glucoside bond로 결합되었음을 간접적으로 확인할 수 있다.

또한 Fig. 6(C)에서와 같이 spot 3, 4는 β -amylase 처리 후에도 변화가 없어 각각 glucose, maltose 분자가 stevioside에 전이된 당전이 stevioside임을 확인할 있었으며, spot 5는 처리 후 spot 3와 maltose로 나뉘어 나타난 것으로 보아 stevioside에 maltotriose 분자가 전이된 구조임을 알 수 있었다. 또한 spot 6은 stevioside에 maltotetraose 분자가 전이된 것으로 유

추된다. 이러한 결과는 액화전분을 이용한 당전이 반응의 반응액을 유사한 방법으로 확인한 Miyake(15)의 결과와도 잘 일치하였다. 상기 결과로 보아 당전이 stevioside는 stevioside의 13 또는 19번 탄소에 존재하는 두 개의 결합 부위에 1~4개의 glucosyl 분자($G_1 \sim G_4$)가 α -1,4-glycosidic bond로 결합되어 있음을 유추할 수 있었다.

요 약

분쇄마찰매체함유 불균일상 효소반응계에서 생전분을 당공여체로 한 stevioside의 당전이 반응 mechanism를 규명하기 위한 연구를 수행하였다. 이를 위하여 stevioside의 첨가에 따른 생전분, CD, 수용성 당, 환산 당량, 그리고 stevioside의 농도 변화를 관찰하였다. 유기용매가 생전분과 CD를 당공여체로 하는 당전이 반응에 미치는 영향을 검토하여, 생전분으로부터 CD가 먼저 생성되고 생성된 CD가 개환되어 stevioside에 당이 전이되는 기작으로 진행됨을 밝혔다. α -, β -, γ -CD를 당공여체로 한 당전이 반응의 양상들을 조사한 결과 γ -CD는 당공여체로 이용되지 않음을 알았다. CD와 stevioside간의 bireactants 당전이 반응은 random sequential bireactant mechanism으로 설명될 수 있음을 알았다. 또한 stevioside와 당전이 stevioside간의 평형상수를 구하였으며, TLC를 이용하여 당전이 stevioside에서의 당결합 양상을 규명하여 glycosyl($G_1 \sim G_4$) 분자가 stevioside에 α -1,4-glycosidic bond로 결합되어 있음을 확인하였다.

감사의 말

본 연구는 한국과학재단 지원 농업생물신소재연구센터 1993년도 연구비로 수행되었으며, 연구비 지원에 감사드립니다.

참고문헌

- 이용현, 백승걸, 신현동, 박동찬. 1993. 분쇄마찰매체 불균일상 효소반응계를 활용한 생전분을 당공여체로 하는 cyclodextrin glucanotransferase의 당전이 반응. *산업미생물학회지* **21**: 461-467.
- Okada, S. 1987. Studies on cyclomaltodextrin glucanotransferase and coupling sugar. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.* **34**: 75-82.
- Sato, M., T. Matsuo, N. Orita, and Y. Yagi. 1991. Synthesis of novel sugars, oligoglucosyl-inositols, and their growth stimulating effect for *Bifidobacterium*. *Biotechnol. Letters* **13**: 69-74.
- Kitahata, S. and S. Okada. 1976. Studies on cyclodextrin glycosyl-transferase. IV. enzymatic synthesis of 3-O- α -D-glucopyranosyl-L-sorbose and 4-O- α -D-glucopyranosyl-D-xylose using cyclodextrin glycosyltransferase. *J. Biochem.* **79**: 641-648.
- Kitahata, S., K. Hara, K. Fujita, H. Nakano, N. Kuwahara, and K. Koizumi. 1992. Acceptor specificity of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus stearothermophilus* and synthesis of α -D-glucosyl O- β -D-galactosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucoside. *Biosci. Biotech. Biochem.* **56**: 1386-1391.
- French, D., M.L. Levine, E. Norbery, P. Nordin, J. Pazur, and G.W. Wild. 1954. Studies on the Schardinger dextrans. VII. co-substrate specificity in coupling reaction of *Macerans* amylase. *J. Am. Chem. Soc.* **76**: 2387-2390.
- Vetter, D. and W. Thorn. 1992. Directed enzymatic synthesis of linear and branched gluco-oligosaccharide, using cyclodextrin glucanosyl-transferase. *Carbohydr. Res.* **223**: 61-69.
- Bender, H. 1982. Effect of various acceptors on the rates 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.
- Kobayashi, S., H.R.L. Ashraf, P. Braun, and D. French. 1988. Coupling reaction of *Bacillus macerans* cyclodextrin glucanotransferase on glycosyl- α -cyclodextrin and glucose. *Starch* **40**: 112-116.
- Kitahata, S. and S. Okada. 1982. Comparison of action of cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus megaterium*, *B. circulans*, *B. stearothermophilus* and *B. macerans*. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.* **29**: 13-18.
- Bender, H. 1985. Studies of the inhibition by maltooligosaccharides of the cyclization reaction catalysed by the cyclodextrin glycosyltransferase from *Klebsiella pneumoniae* M5 al with glycogen. *Carbohydr. Res.* **135**: 291-302.
- Villette, J., S. Bouquetlet, J.B. Leleu, and P.J. Sillard. 1990. Isolation and mechanism of action of the cycloglucosyl-transferase from *Bacillus circulans*, Pp. 23. *Abstracts of 5th International Symposium on Cyclodextrins*, 28-30 March, Paris.
- Kusama, S., I. Kusakabe, Y. Nikamura, S. Eda, and K. Murakami. 1986. Transglycosylation into stevioside by the enzyme system from *Streptomyces* sp. *Agric. Biol. Chem.* **50**: 2445-2451.
- Kusakabe, I., S. Watanabe, R. Morita, M. Terahara, and K. Murakami. 1992. Formation of a transfer product from stevioside by the cultures of Actinomycete. *Biosci. Biotech. Biochem.* **56**: 233-237.
- Miyake, T. 1980. Process for producing a sweetener. *U.S. Patent 4219571*.
- 한일근, 이용현. 1991. 분쇄마찰매체 함유 효소반응계에서의 cyclodextrin의 생성과 cyclodextrin glucanotransferase의 작용 mechanism. *산업미생물학회지* **19**: 163-170.
- Lee, Y.H. and D.C. Park. 1992. Direct synthesis of cyclodextrin in a heterogeneous enzyme reaction system containing insoluble extruded starch. Pp. 127-129. In S. Furusaki, I. Endo, R. Matsuno (eds.), *Biochemical Engineering for 2001*, Springer-Verlag, Tokyo.
- Szejtli, Z. 1988. *Cyclodextrin Technology*, Pp. 1-78. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Mattsson, P., T. Korpela, S. Paavilainen, and M. Mäkelä. 1991. Enhanced conversion of starch to cyclodextrins in ethanolic solutions by *Bacillus circulans* var *alkalophilus* cyclomaltodextrin glucanotransferase. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **30**: 17-28.
- Kitahata, S. and S. Okada. 1979. Intermolecular transglycosylation of cyclodextrin glycosyltransferase. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.* **26**: 68-75.
- Segel, I.H., 1975. *Enzyme kinetics*, Pp. 273-345. John Wiley and Sons, Inc., New York.

(Received March 4, 1994)