

Glucansucrases를 이용한 새로운 올리고당의 합성

백진숙 · 김도만^{1*} · 이진하 · 장판식² · 한남수³ · John F. Robyt³

전남대학교 생물화학공학과, ¹촉매연구소, ²서울산업대학교 식품공학과,

³Department of Biochemistry and Biophysics, Iowa State University

Enzymatic Synthesis of New Oligosaccharides Using Glucansucrases. Baek, Jin Sook, Doman Kim

^{1*}, Jin Ha Lee, Pahn Shick Chang², Nam Soo Han³, and John F. Robyt³. ¹Department of Biochemical Engineering, ¹Institute for Catalysis, Chonnam National University, Kwangju, 500-757,

²Department of Food Science & Technology, Seoul National Polytechnic University, Seoul 139-747, Korea, ³Department of Biochemistry and Biophysics, Iowa State University, Ames, IA, 50011, USA – Dextransucrase hyper-producing *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMC and dextransucrase

constitutive mutants B-742CB and B-1355C catalyzed the transfer of glucose from sucrose to other carbohydrates which were present or were added to the reaction digests. When the acceptor was a maltose, gentiobiose, lactose or raffinose, there was produced a series of oligosaccharide acceptor products or single product based on the kinds of enzymes and reaction conditions. To obtain the quantitative information about the yield and the distribution of acceptor products and dextran two experimental parameters were studied: a) the ratio of acceptor to sucrose and b) the amount of enzyme at constant carbohydrate concentration (100 mM). As the amount of enzyme increased, the synthesis of acceptor products (of maltose or gentiobiose) increased, and the formation of dextran decreased. As the ratio of acceptor to sucrose increased, the amount of dextran and the number of acceptor-products decreased and the amount of acceptor-products increased. When maltose or gentiobiose was an acceptor, the glucose from sucrose was transferred to the C-6 hydroxyl group of the nonreducing-end glucose residue of acceptors to give a homologous series of isomaltosyl dextrans. In case of lactose or raffinose, there was produced only one acceptor product from B-512FMC dextransucrase reaction. In the lactose acceptor reaction, the glucose from sucrose was transferred to the C-2 hydroxyl of the reducing end glucose residue of lactose. To get a series of oligosaccharides from lactose or raffinose acceptor reaction we used B-742CB dextransucrase or B-1355C alternansucrase with 500 mM sucrose in reaction digest.

Key words: *Leuconostoc mesenteroides*, dextransucrase, alternansucrase, acceptor, acceptor reaction, acceptor product, oligosaccharide

올리고당은 기존의 간미료로서의 이용외에도 안정제나 응집제 및 소장 내 유용균주의 생장촉진 효과로 식품 산업에 이용되고 있다[12]. 이의 산업적 생산을 위해 식물에서의 추출 및 식물성이나 미생물성 탄수화물 고분자의 산 또는 효소의 가수분해방법이 쓰이고 있다[7]. 또한 올리고당의 효소적 합성방법으로서 dextransucrase를 이용할 수 있다. *Leuconostoc mesenteroides*에서 얻어지는 dextransucrase는 산업적으로 텍스트란을 합성하는 효소로서 합성된 텍스트란은 주쇄에 glucose단위가 α 1-6으로 연결된 다당으로서 dextransucrase의 종류에 따라 가지결합의 종류(예; α 1-2, α 1-3, 및 α 1-4), 비율 및 길이가 각각 달라진다[6]. 대부분의 *L. mesenteroides* dextransucrase는 효소 생산 배지내에 설정을 넣어주어

효소의 생산을 유도하여 주어야 함에따라 상징액중에 텍스트란이 생성되고 따라서, 배지 상징액중의 효소가 텍스트란과 결합된 상태에 있으므로 효소정제시 텍스트란 제거를 위해 dextranase를 처리해야하는 문제점을 가진다. Kim과 Robyt은 *L. mesenteroides* B-742, B-1355, B-1299 및 B-512FM 등으로부터 dextransucrase를 생산하는 배지에 설정이 필요하지 않은 constitutive mutants를 얻었다[1, 3]. 또한 최근에 Kim등은 진공자외선 조사자를 통하여 *L. mesenteroides* B-512FMC로부터 dextransucrase 고생산성 돌연변이균주인 B-512FMC를 얻었다[4]. B-512FMC dextransucrase로부터 생합성된 텍스트란은 95%의 α 1-6결합에 5%의 α 1-3 가지구조를 가진다[11]. 또한 B-742CB dextransucrase는 모균주의 dextransucrase와는 달리 α 1-6의 주결합과 α 1-2, α 1-3 그리고 α 1-4의 가지구조를 갖는 텍스트란을 합성하며 B-1355C alternansucrase는 α 1-6과 α 1-3으로 번갈아

*Corresponding author
Tel. 62-530-1844, Fax. 62-530-1849
E-mail: dmkim@pasteur.chonnam.ac.kr

결합한 구조의 다당류인 alternan 단을 선택적으로 생산한다[8].

Dextransucrase는 텍스트란의 생합성과 더불어 효소반응액 중에 설탕외의 다른 탄수화물이 침가될 경우 설탕의 glucose 단위를 침가된 탄수화물에 전달하여 올리고당을 생성한다. 이때 침가된 탄수화물을 수용체라 하며 이 반응을 수용체반응이라고 한다. 수용체 반응에 관하여 가장 많이 연구된 B-512F dextransucrase의 경우 maltose 또는 isomaltose를 수용체로하여 일련의 올리고당을 포함하는 수용체산물을 생산하지만 D-fructose, lactose 및 raffinose를 수용체로 사용할 경우에는 단 한 가지의 수용체산물만을 생산하는 것으로 알려져 있다[11]. 본 연구에서는 dextransucrase의 수용체 반응을 이용하여 자연계에는 없는 새로운 구조의 수용체 산물 또는 올리고당을 생산하기 위하여 constitutive mutant들의 dextransucrase들과 maltose, gentiobiose, raffinose 및 lactose를 수용체로 사용하였고, 올리고당 생산성에 대한 설탕과 수용체의 비율 및 효소양의 영향에 관하여 살펴보았다.

재료 및 방법

효소액의 조제

Leuconostoc mesenteroides B-512FMCM, B-742CB, B-1355C 균의 배양과 dextransucrase 또는 alternansucrase의 생산과 정제는 Kim과 Robyt의 방법에 따랐다[1, 3].

사용시약

탄수화물은 Sigma사에서 구입하였다.

수용체반응

수용체 반응액은 20 mM sodium acetate buffer(pH 5.2)에 녹여서 준비한 설탕과 수용체로서 maltose, gentiobiose, raffinose 그리고 lactose를 혼합하여 준비하였다. 총탄수화물농도를 100 mM로 고정한 후 수용체와 설탕비를 1/10, 1/5, 1/1, 4/1 및 10/1로 달리하여 수용체반응에서 산물의 종류 및 수율에 끼치는 설탕과 수용체의 농도 비의 영향을 알아보았다. 수용체반응에 대한 효소양의 영향은 일정 총탄수화물농도(100 mM)에 수용체와 설탕비를 1/1로 고정한 후 효소양을 각각 0.45, 4.5, 45, 90, 및 450(U/digest)로 달리하여 넣어주었다. 효소의 1Unit은 1분당 효소 1 ml당 설탕으로부터 유리되는 fructose의 μmol 수로 나타내었다. 28°C에서 20시간 반응시켰고 반응액 1 μl 를 취하여 Merck K6F TLC plate에 점적한 후 nitromethane/1-propanol/water (2/5/2.5, v/v/v)에서 두 번 전개하였다. 분리된 탄수화물의 성분은 TLC plate를 0.5%(w/v) α -naphthol과 5%(v/v) 황산을 함유한 발색시약을 이용하여 확인하였다. 각 탄수화물에 대

한 정량분석은 Macintosh(Power PC; 7100/80) 컴퓨터를 이용하여 NIH Image Program으로 하였다[3, 9, 14].

고정화 효모의 준비

25%(w/v) yeast 혼탁액 40ml를 3%(w/v) sodium alginate 용액 100 ml와 섞었다. 이때 빠른 교반으로 용액을 균일하게 한 후 기포를 제거하기 위해 4°C에서 1시간 방치하였다. 준비된 yeast-alginate 용액을 교반중인 2% (w/v) calcium chloride 용액에 적하한 후 비드의 강도 강화를 위해 2시간 더 교반하고 냉장보관하였다.

올리고당의 분리

반응용액 중의 불필요한 성분인 D-fructose는 준비된 고정화 yeast를 반응액과 실온에서 반응시켜 제거하였고, 반응중에 합성된 텍스트란은 반응액의 2배부피의 에탄올을 이용하여 침전시킨 후 원심분리(6000 g, 30분)하여 제거하였다. 상징액은 rotary evaporator로 농축한 후 동결건조하였다. 5% 농도의 전조시료 2 ml를 활성탄칼럼에 주입하여 에탄올의 단계별 농도구배(2%, v/v-16%, v/v)를 통해 올리고당을 크기별로 순수 분리하였다[10].

올리고당의 구조분석

올리고당의 구조를 분석하기 위해 메틸레이션분석법을 이용하였다[5, 8]. 전조된 올리고당(10 mg)을 0.8 ml Me_2SO 로 교반하여 녹였다. 이 용액은 튜브에 옮겨서 Hakomori시약을 첨가하고 septum으로 막아 밤새 녹인 후 iodomethane 0.2 ml를 첨가하여 2시간 반응시켰다. 여기에 물 4 ml를 첨가한 혼합액을 2 ml CHCl_3 로 세 번 추출한 후 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 결정 2-3조각을 첨가하여 둔탁한 색을 제거하고 10 ml의 물로 두 번 추출하였다. CHCl_3 층을 공기로 말린 후 4M $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$ 1 ml를 첨가한 용액을 캡튜브에 옮겨 121°C에서 30분간 가열하고 60°C에서 전조시켰다. 이렇게 얻어진 시료는 MeOH 1 ml에 녹여서 냉동 보관하였다.

결과 및 고찰

본 연구에서는 B-512FMCM과 B-742CB dextransucrase 그리고 B-1355C alternansucrase, 설탕 그리고 수용체들(maltose, gentiobiose, raffinose 및 lactose)이 텍스트란과 수용체산물(올리고당)의 생산과 종류에 미치는 영향을 비교분석하였다.

B-512FMCM dextransucrase의 수용체반응

수용체와 설탕 농도 비율의 영향 Maltose의 수용체반응 결과를 Fig. 1과 Table 1에 보였다. B-512F dextransucrase의 수용체 반응에서 가장 좋은 수용체로 알

려져있는 maltose는 본 실험에서 사용한 B-512FMCM dextranase의 경우에도 가장 좋은 수용체 반응 효율을 보였다. 일련의 수용체산물의 구성은 maltose/설탕(M/S) 비율이 증가하면 수용체산물수가 줄어들었다. 비율이 1/1 이하일 때는 수용체산물로 panose(P3), $6^2\text{-}\alpha\text{-D-isomaltosylmaltose}$ (P4), $6^2\text{-}\alpha\text{-D-isomaltotriosylmaltose}$ (P5), $6^2\text{-}\alpha\text{-D-isomaltotetraosylmaltose}$ (P6), $6^2\text{-}\alpha\text{-D-isomaltopentaosylmaltose}$ (P7)등이 생성되었으며, 비율이 10/1일 때는 두가지의 수용체산물 panose(P3)와 $6^2\text{-}\alpha\text{-D-isomaltosylmaltose}$ (P4)만이 생성되었다. 수용체의 양이 증가할수록 수용체산물의 상대적인 양은 증가하거나 반응기내에 반응하지 않고 남아있는 수용체의 양 또한 증가하므로, 총탄수화물의 농도가 일정한 반응기에서 모든 수용체가 반응하여 가장 많은 수용체 산물을 생산하기 위해서는 1/1의 비율이 적합하였다.

B-512FMCM dextranase의 gentiobiose와의 수용체반응 결과는 Fig. 2, Table 2와 같다. Gentiobiose는 maltose와 같은 반응양상을 보여 비율 1/1 이하에서는

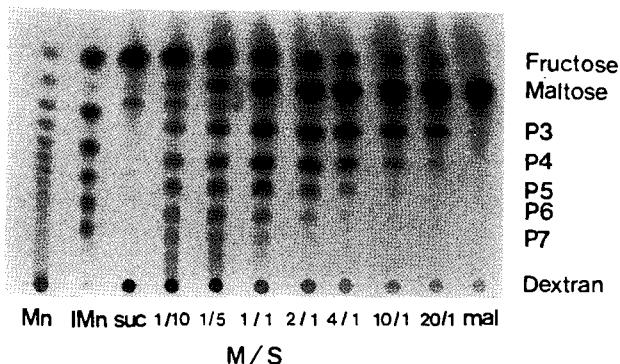


Fig. 1. TLC of acceptor reaction of B-512FMCM dextranase in different ratio of maltose to sucrose at constant total carbohydrate(100 mM) and 45 U/200 μ l of reaction digest

Thin-layer chromatography was conducted on Merck K6 plates using 2 ascents of 2/5/2.5 of nitromethane/n-propanol/water. P3 to P7 represent panose, $6^2\text{-}\alpha\text{-D-isomaltosylmaltose}$, $6^2\text{-}\alpha\text{-D-isomaltotriosylmaltose}$, $6^2\text{-}\alpha\text{-D-isomaltotetraosylmaltose}$, and $6^2\text{-}\alpha\text{-D-isomaltopentaosylmaltose}$, respectively. Mn and IMn mean standards of malto- and isomaltooligosaccharide, respectively. Lane 3 is dextranase reaction products with sucrose, lane 4 to 10 are the acceptor reaction products in different ratio of maltose to sucrose (the values indicate the ratio of maltose to sucrose). Lane 11 is dextranase reaction product with gentiobiose.

Table 1. Relative percentage of dextran and acceptor products^a formed by B-512FMCM dextranase as a function of the ratio of maltose to sucrose

M/S ^b	Dextran	P3	P4	P5	P6	P7	P8
10/1	10.6	66.8	22.6				
4/1	8.6	56.3	25.0	10.1			
1/1	11.6	34.7	25.1	16.1	8.4	4.1	
1/5	19.6	22.8	19.6	17.5	12.9	7.6	
1/10	28.3	16.5	15.0	14.2	12.1	8.1	5.8

512FMCM dextranase (45 U/200 μ l of digest) was incubated with various ratios of maltose to sucrose at a constant total carbohydrate (100 mM) at 28°C for 20h. ^aThe percentages do not include D-glucose incorporated into leucrose(acceptor-product of D-fructopyranose) and unreacted maltose. ^bM/S, the ratio of the concentrations of maltose to sucrose. P3 to P7 represent panose, $6^2\text{-}\alpha\text{-D-isomaltosylmaltose}$, $6^2\text{-}\alpha\text{-D-isomaltotriosylmaltose}$, $6^2\text{-}\alpha\text{-D-isomaltotetraosylmaltose}$, and $6^2\text{-}\alpha\text{-D-isomaltopentaosylmaltose}$, respectively.

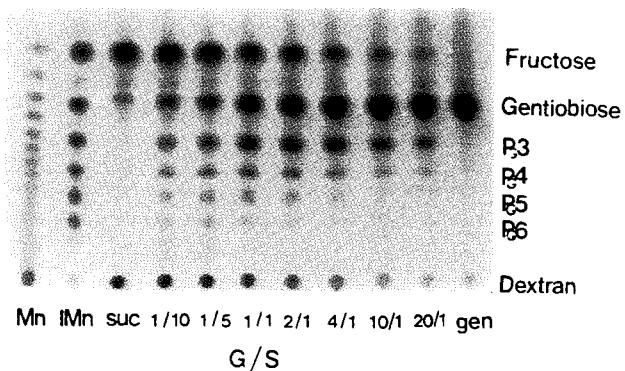


Fig. 2. TLC of acceptor reaction of B-512FMCM dextranase in different ratio of gentiobiose to sucrose at constant total carbohydrate (100 mM) and 45 U/200 μ l of reaction digest

Thin-layer chromatography was conducted on Merck K6 plates using 2 ascents of 2/5/2.5 of nitromethane/n-propanol/water. P_{G3} to P_{G7} represent $6^2\text{-}\alpha\text{-D-glucopyranosylgentiobiose}$, $6^2\text{-}\alpha\text{-D-isomaltosylgentiobiose}$, $6^2\text{-}\alpha\text{-D-isomaltotriosylgentiobiose}$, $6^2\text{-}\alpha\text{-D-isomaltotetraosylgentiobiose}$, and $6^2\text{-}\alpha\text{-D-isomaltopentaosylgentiobiose}$, respectively. Mn and IMn mean standards of malto- and isomaltooligosaccharide, respectively. Lane 3 is dextranase reaction products with sucrose, lane 4 to 10 are the acceptor reaction products in different ratio of gentiobiose to sucrose (the values indicate the ratio of gentiobiose to sucrose). Lane 11 is dextranase reaction product with gentiobiose.

Table 2. Relative percentage of dextran and acceptor products^a formed by B-512FMCM dextranase as a function of the ratio of gentiobiose to sucrose

G/S ^b	Dextran	P _{G3}	P _{G4}	P _{G5}	P _{G6}	P _{G7}
10/1	15.7	69.0	15.3			
4/1	20.4	58.8	16.3	4.5		
1/1	25.4	44.2	18.5	8.7	3.2	
1/5	34.7	33.2	16.1	9.4	4.4	2.2
1/10	44.1	28.3	13.6	8.1	4.4	1.5

512FMCM dextranase (45 U/200 μ l of digest) was incubated with various ratios of gentiobiose to sucrose at a constant total carbohydrate (100 mM) at 28°C for 20h. ^aThe percentages do not include D-glucose incorporated into leucrose(acceptor-product of D-fructopyranose) and unreacted gentiobiose. ^bG/S, the ratio of the concentrations of gentiobiose to sucrose. P_{G3} to P_{G7} represent $6^2\text{-}\alpha\text{-D-glucopyranosylgentiobiose}$, $6^2\text{-}\alpha\text{-D-isomaltosylgentiobiose}$, $6^2\text{-}\alpha\text{-D-isomaltotriosylgentiobiose}$, $6^2\text{-}\alpha\text{-D-isomaltotetraosylgentiobiose}$, and $6^2\text{-}\alpha\text{-D-isomaltopentaosylgentiobiose}$, respectively.

일련의 수용체산물들 즉 $6^2\text{-}\alpha\text{-D-glucopyranosylgentiobiose}$ (P_{G3}), $6^2\text{-}\alpha\text{-D-isomaltosylgentiobiose}$ (P_{G4}), $6^2\text{-}\alpha\text{-D-isomalto-triosylgentiobiose}$ (P_{G5}), $6^2\text{-}\alpha\text{-D-isomaltotetraosylgentiobiose}$ (P_{G6}), $6^2\text{-}\alpha\text{-D-isomaltopen-taosylgentiobiose}$ (P_{G7})등이 생성되었으며, 비율 10/1 이상에서는 단 두 가지의 수용체산물인 $6^2\text{-}\alpha\text{-D-glucopyranosylgentiobiose}$ (P_{G3})과 $6^2\text{-}\alpha\text{-D-isomaltosylgentiobiose}$ (P_{G4})만을 얻었다.

Fig. 3과 Table 3은 lactose의 수용체반응 결과를 보여준다. 다른 수용체와는 달리 lactose의 수용체반응에서는 단일 수용체산물인 $2^1\text{-}\alpha\text{-D-glucopyranosyllactose}$ (P_{L3})만이 생성되었다.

이들의 구조는 Fig. 4에서와 같이 메틸레이션분석법으로

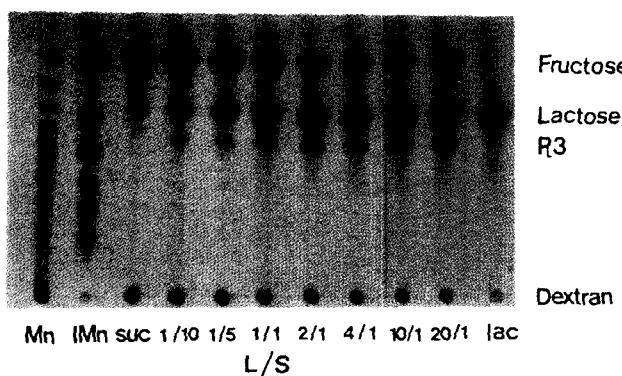


Fig. 3. TLC of acceptor reaction of B-512FMCM dextranucrase in different ratio of lactose to sucrose at constant total carbohydrate (100 mM) and 45 U/200 μ l of reaction digest.

Thin-layer chromatography was conducted on Merck K6 plates using 2 ascents of 2/5/2.5 of nitromethane/n-propanol/water. P_{L3} represents $2^1\text{-}\alpha\text{-D-glucopyranosyl lactose}$. Mn and IMn mean standards of malto- and isomaltooligosaccharide, respectively. Lane 3 is dextranucrase reaction products with sucrose, lane 4 to 10 are the acceptor reaction products in different ratio of lactose to sucrose(the values indicate the ratio of lactose to sucrose). Lane 11 is dextranucrase reaction product with lactose.

Table 3. Relative percentage of dextran and acceptor products^a formed by B-512FMCM dextranucrase as a function of the ratio of lactose to sucrose

L/S ^b	Dextran	P _{L3}
10/1	42.1	57.9
4/1	47.1	52.9
1/1	57.1	42.9
1/5	73.4	26.6
1/10	77.8	22.22

512FMCM dextranucrase (45 U/200 μ l of digest) was incubated with various ratios of lactose to sucrose at a constant total carbohydrate (100 mM) at 28°C for 20h. ^aThe percentages do not include D-glucose incorporated into leucrose (acceptor-product of D-fructopyranose) and unreacted lactose. ^bL/S, the ratio of the concentrations of lactose to sucrose. PL3 represents $2^1\text{-}\alpha\text{-D-glucopyranosyl lactose}$.

로 분석하였다.

올리고당의 구조분석

Maltose, lactose 및 gentiobiose와 각각의 첫 번째 수용체산물을 메틸레이션하고 산가수분해하여 이를 TLC로 분석하였다(Fig. 4). Maltose의 메틸레이션 결과 2,3,4,6-tetra-O-methyl-D-glucose와 2,3,6-tri-O-methyl-D-glucose의 두 점이 보였으며, maltose의 첫번째 수용체 반응산물은 2,3,4,6-tetra-O-methyl-D-glucose, 2,3,6-tri-O-methyl-D-glucose 및 2,3,4-tri-O-methyl-D-glucose의 세점이 보였다. 이로써 이 산물은 설탕의 D-glucose가 수용체의 비환원말단에 $\alpha(1\text{-}6)$ 으로 결합한 $6^2\text{-}\alpha\text{-D-glucopyranosyl maltose}$ 임을 알 수 있었다. Gentiobiose의 메틸레이션 결과 2,3,4,6-tetra-O-methyl-D-glucose와 2,3,4-tri-O-methyl-D-glucose의 두 점이 보였으며 이의 첫번째 수용체 산물은 2,3,4,6-tetra-O-methyl-D-glucose와 2,3,4-tri-O-methyl-D-glucose의 두점이 얻어졌다. 이로써 이 산물은 설탕의 D-glucose가 수용체의 비환원말단에 $\alpha(1\text{-}6)$ 으로 결합한 $6^2\text{-}\alpha\text{-D-glucopyranosylgentiobiose}$ 임을 알 수 있었다. Lactose의 경우 2,3,4,6-tetra-O-methyl-D-galactose와 2,3,6-tri-O-methyl-D-glucose의 두 점이 보였으며 이의 유일한 수용체 산물은 2,3,4,6-tetra-O-methyl-D-glucose, 2,3,4,6-tetra-O-methyl-D-galactose 및 3,6-di-O-methyl-D-glucose의 세점을 얻었다. 이로써 이 산물은 설탕의

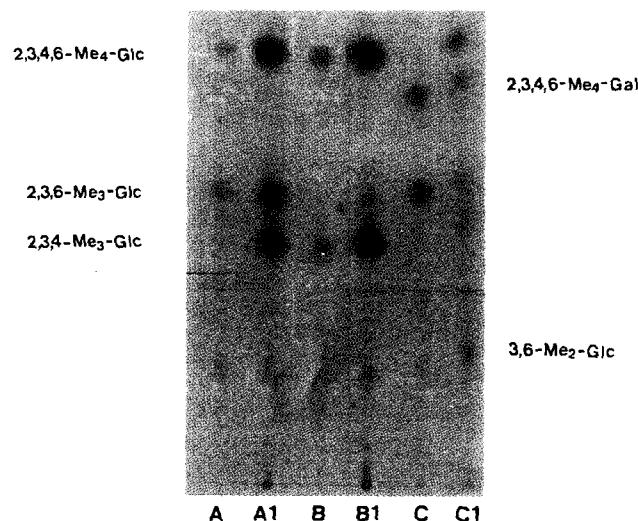


Fig. 4. TLC of methylated and acid hydrolyzed acceptors and acceptor products.

Thin-layer chromatography was conducted on Merck K6 plates using 2 ascents of 3/9/1 of acetonitrile/chloroform/methanol. A, B, and C represent methylation and acid hydrolysis results of maltose, gentiobiose, and lactose, respectively. A1, B1, and C1 are the methylation and acid hydrolysis results of acceptor product using maltose, gentiobiose, and lactose.

D-glucose가 수용체의 환원말단인 glucose에 $\alpha(1\text{-}2)$ 으로 결합한 $2^1\text{-}\alpha\text{-D-glucopyranosyl lactose}$ 임을 알 수 있었다. 위의 반응에서 gentiobiose의 수용체산물들인 gentiobiose의 비환원말단에 D-glucose나 isomaltodextrin이 $\alpha(1\text{-}6)$ 으로 결합된 형태의 탄수화물들 그리고 lactose의 유일한 수용체산물인 $2^1\text{-}\alpha\text{-D-glucopyranosyl lactose}$ 는 자연계에서는 얻을 수 없는 효소적으로만 합성될 수 있는 삼당 또는 올리고당이다.

효소양의 영향

Maltose, gentiobiose 및 lactose의 수용체반응에서 일정한 총탄수화물농도(100 mM)를 사용한 경우 수용체와 설탕의 비율이 1/1일 때 효소양이 올리고당 생산량에 미치는 영향을 각각 Table 4-6에 보였다. Maltose 수용체반응의 경우 효소양이 증가함에 따라 수용체산물의 수와 양이 증가하면서 텍스트란 생성량은 감소하였다 (Table 4). 효소의 양이 450 U/digest의 경우는 α 1-6의 결합 대신 α 1-3결합으로 glucose가 수식이된 수용체 산물도 생성되었다.

Table 4. Relative percentage of dextran and acceptor products formed by B-512FMCM dextransucrase as a function of the different amount of enzyme at the 1/1 ratio of maltose to sucrose

Enzyme (U/digest)	Dextran	P ₃	P _{3a} ^b	P ₄	P ₅	P ₆	P ₇
0.45	12.9	38.6		30.2	13.9	4.4	
4.5	11.7	38.1		26.3	16	7.9	
45	8.1	35.7		24.3	16.5	9.7	5.7
90	7.8	35.3		25.4	15.8	10.3	5.4
450	5.0	41.4	8.6	25.2	13.4	6.4	

Various amount of 512FMCM dextransucrase was incubated with 1/1 ratio of maltose to sucrose at a constant total carbohydrate (100 mM) at 28°C for 20h. ^aSee footnotes to Table 1. ^bP_{3a}, $3^2\text{-}\alpha\text{-D-glucopyranosylmaltose}$. Pn represents the same saccarides to Table 1.

Table 5. Relative percentage of dextran and acceptor products formed by B-512FMCM dextransucrase as a function of the different amount of enzyme at the 1/1 ratio of gentiobiose to sucrose

Enzyme (U/digest)	Dextran	P _{G3}	P _{G4}	P _{G5}	P _{G6}
0.45	32.6	50.1	12.9	4.4	
4.5	28.0	48.5	15.5	6.2	1.8
45	19.3	46.9	19.6	10.6	3.6
90	13.6	43.7	23.3	13.1	6.3
450	7.9	53.2	22.4	11.4	5.1

Various amount of 512FMCM dextransucrase was incubated with 1/1 ratio of gentiobiose to sucrose at a constant total carbohydrate (100 mM) at 28°C for 20 h. ^aSee footnotes to Table 2. Pn represents the same saccarides to Table 2.

Gentiobiose 수용체반응의 경우도 maltose의 경우와 같이 효소양의 증가에 따라 수용체산물의 수와 양이 늘었으며, 이에 따라 텍스트란생성량은 감소하였다(Table 5). 하지만 생산된 수용체 산물의 구조는 maltose가 아닌 gentiobiose를 가지는 isomaltooligo당이었다.

Lactose의 경우 $\text{효소양} \geq 45 \text{ U/digest}$ 까지 증가할 때는 수용체산물의 양에 큰 변화가 없었다. 이는 lactose가 maltose나 gentiobiose와는 달리 생성된 수용체 산물이 다시 수용체로 작용하지 않아서 한 가지만의 수용체산물을 생성하기 때문이다(Table 6). 그러나 $\text{효소양} \geq 450 \text{ U/digest}$ 이상으로 증가하면 텍스트란의 양은 34.5%로 급격히 감소하였으며 구조가 확인되지 않은 올리고당이 생성되었다(결과 제시하지 않음).

Dextransucrase 농도의 증가에 따른 다당 생산량의 감소는 1993년 Su와 Robyt(14)이 B-512FM dextransucrase와 maltose를 수용체로 이용하여 연구 발표한 바 있다. 그들은 효소농도가 증가함에 따라 설탕의 가수분해가 빨라져서 D-glucose와 D-fructose의 생성이 증가하고 이들이 또한 수용체로 작용하여 각각 isomaltose와 leucrose를 생성하게 되며 isomaltose는 또한 효율이 좋은 수용체이므로 일련의 isomaltodextrin을 합성하게 되는데 그들은 효소의 수용체 결합부위에 위치하여 glucose가 텍스트란을 합성하는 대신 수용체산물을 생산하도록 함으로써 수용체산물양은 증가하는 반면 텍스트란 생성량은 감소하게 된다고 설명하고 있다. 본 연구에서 확인된 maltose와 gentiobiose의 수용체반응에서 얻어진 효소양의 수용체 올리고당 생산에 대한 영향 결과도 이와 같은 사실로 설명할 수 있겠다. 이와 관련하여 lactose의 경우 효소양의 증가가 수용체산물양의 변화에 크게 영향을 주지 않는 이유는 lactose의 수용체산물이 그 다음 수용체반응을 위해 작용하지 않기 때문에 일어난 현상이고, 특별히 $\text{효소의 양} \geq 450 \text{ U/digest}$ 이상으로 증가하면 텍스트란의 양은 34.5%로 급격히 감소하였으며 구조가 확인되지 않은 올리고당이 생성되었다(결과 제시하지 않음).

Table 6. Relative percentage of dextran and acceptor products formed by B-512FMCM dextransucrase as a function of the different amount of enzyme at the 1/1 ratio of lactose to sucrose

Enzyme (U/digest)	Dextran	P _{L3}	P _{L3a}	P _{L4}
0.45	59.6	40.4		
4.5	56.5	43.5		
45	57.3	42.7		
90	52.9	32.0		5.9
450	34.5		27.6	5.9

Various amount of 512FMCM dextransucrase was incubated with 1/1 ratio of lactose to sucrose at a constant total carbohydrate (100 mM) at 28°C for 20h. ^aSee footnotes to Table 3. P₃ represents $2^1\text{-}\alpha\text{-D-glucopyranosyl lactose}$; the structures of P_{3a} and P₄ are not determined.

digest)는 설탕의 가수분해가 빨라 물이 수용체로 작용하여 fructose뿐만 아니라 glucose도 반응기내로 생산되고 이것이 lactose보다 효율이 좋은 수용체로 작용하여 glucose의 올리고당을 생산한 것으로 생각되며 이에 관한 자세한 연구는 진행중이다.

B-742CB dextranucrase의 수용체반응

수용체와 설탕농도비의 영향

742CB dextranucrase의 maltose와 gentiobiose를 이용한 수용체반응의 결과는 B-512FMCM dextranucrase의 경우와 특별한 차이가 없었으므로 이 효소의 경우는 lactose와 raffinose의 수용체 반응 결과만을 제시한다. 742CB dextranucrase의 수용체 반응에서 lactose와 설탕과의 농도비에 따른 수용체산물 분포를 Table 7에 보였다. B-512FMCM dextranucrase와는 달리 B-742CB dextranucrase는 lactose를 이용하여 여러 가지의 수용체 산물을 합성하였다. 수용체와 설탕의 비율이 5/1의 경우는 한가지만의 수용체 산물이 합성이 되었고 텍스트란의 양은 반응 조건중 가장 낮은 29.4% 생산이 되었다. 설탕의 양이 증가됨에 따라 텍스트란의 양은 증가되어 1/1의 비율에서는 가장 많은 텍스트란의 합성을 보였으며 그 이후 설탕의 양이 더욱 증가되면 텍스트란의 생성 양은 감소하고 이당, 삼당 등의 작은 크기의 올리고당의 생산양이 증가하였으며 종류도 증가하였다. 이는 B-512FMCM dextranucrase의 lactose 수용체반응과는 큰 차이를 보이는 결과로 현재로서는 742CB dextranucrase의 수용체반응 특이성으로만 이해할 수 있겠다.

Raffinose의 경우 설탕양 변화에 따른 수용체산물 분포를 Table 8에 보였다. Raffinose의 수용체 반응도 lactose 수용체반응처럼 수용체와 설탕의 비율이 5/1일 때 한가지 수용체산물만 생산되었고 설탕의 양이 1/5 이상의 비율로 증가될 때에는 텍스트란의 양이 감소함을 보여주었다. 더불어 이당, 삼당등의 작은 크기의 올리고당의 생산양이 증가하였으며 종류도 증가하였다. 이는 dextranucrase 수용체반응에서 처음으로 나타난 결과로 이 효소를 이용하여 raffinose를 포함하는 올리고당을

Table 7. Relative percentage of dextran and acceptor products^a formed by B-742CB dextranucrase as a function of the ratio of lactose to sucrose

L/S ^b	Dextran	P _L C	P _L 3	P _L 4	P _L 5	P _L 6	P _L 7	P _L 8
5/1	29.4		70.6					
1/1	50.6		49.4					
1/5	44.7	15.7	24.3	8.0	5.0	2.3		
1/10	36.3	15.9	15.4	15.4	7.3	8.3	6.1	10.7

B-742CB dextranucrase (1.2U/digest) was incubated with various concentration of sucrose and 50 mM lactose at 28°C. a, b See footnotes to Table 3. PL3 repesents 2¹- α -D-glucopyranosyl lactose. The structures of P_L^c and P_L4 to P_L8 are not determined.

Table 8. Relative percentage of dextran and acceptor products^a formed by B-742CB dextranucrase as a function of the ratio of raffinose to sucrose

R/Sb	Dextran	PR4	PR5	PR6	PR7	PR8	PR9	PR10
5/1	49.1	50.9						
1/1	60.7	39.3						
1/5	44.8	39.8	8.9	6.5				
1/10	34.2	24.1	6.6	5.7	7.8	3.4	10.8	7.3

B-742CB dextranucrase (1.2U/digest) was incubated with various concentration of sucrose and 50 mM raffinose at 28°C. ^aThe percentages do not include D-glucose incorporated into leucrose (acceptor-product of D-fructopyranose) and unreacted raffinose. ^bR/S, the ratio of the concentrations of raffinose to sucrose. P_R4 represents 2²- α -D-glucopyranosyl raffinose. The structures of P_R5 to P_R10 are not determined.

생산할수 있음을 보여준다.

B-1355C alternansucrase의 수용체반응

수용체와 설탕농도비의 영향 B-1355C alternansucrase의 수용체반응 중 다른 dextranucrase들의 반응과는 특별한 차이를 보이는 raffinose 수용체 반응의

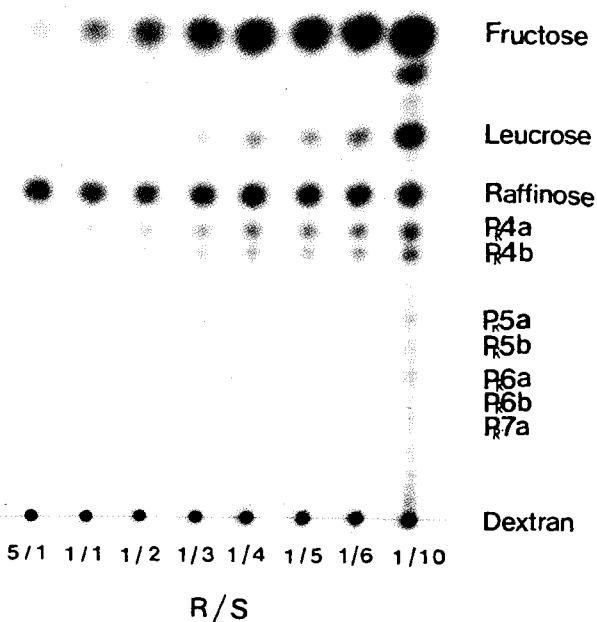


Fig. 5. TLC of dextran and acceptor products formed by B-1355C alternansucrase as a function of the ratio of raffinose to sucrose.

Thin-layer chromatography was conducted on Merck K6 plates using 2 ascents of 2/5/2.5 nitromethane/n-propanol/water. P_R4 represents 3²- α -D-glucopyranosyl raffinose, P_R5a to P_R7a represent glucose, isomaltose, isomaltotriose linked α -(1-6) to the non-reducing end of glucose of 3²- α -D-glucopyranosyl raffinose, P_R4b represents 2²- α -D-glucopyranosyl raffinose, P_R5b to P_R7b represent glucose, isomaltose, isomaltotriose linked α -(1-6) to the nonreducing end of glucose of 2²- α -D-glucopyranosyl raffinose.

Table 9. Relative percentage of dextran and acceptor products formed by B-1355C alternansucrase as a function of the ratio of raffinose to sucrose

R/S ^b	Dextran	P _R 4a	P _R 4b	P _R 5a	P _R 5b	P _R 6a	P _R 6b	P _R 7a
5/1	58.9	27.8	13.3					
1/1	59.3	23.7	17.0					
1/5	46.2	23.7	22.5	7.6				
1/10	39.2	21.4	17.3	3.8	4.4	5.3	4.6	4.0

B-1355C alternansucrase (1 U/digest) was incubated with various concentration of sucrose and 50 mM raffinose at 28°C. a, b See footnotes to Table 8 and Figure 5.

결과는 다음과 같다. Raffinose의 경우 설탕양 변화에 따른 수용체산물 분포를 Fig. 5, Table 9에 보였다. B-1355C alternansucrase와 raffinose의 수용체 반응에서 설탕의 농도가 수용체보다 크게 증가할 경우 raffinose를 포함한 올리고당을 합성하였다. B-742CB dextransucrase와 다른 결과는 alternansucrase는 첫 번째 수용체산물로서 2²-α-D-glucopyranosyl raffinose와 더불어 3²-α-D-glucopyranosyl raffinose를 생성하고 이후 비환원 말단의 glucose에 α1-6구조로 glucose를 결합한 올리고당을 생산하였다. 정확한 생성기작은 알지 못하며 단지 이 효소의 반응 특이성으로 생각된다.

본 연구를 통하여 B-512FMCM 및 B-742CB dextransucrase와 B-1355C alternansucrase를 여러 가지 탄수화물 수용체와 반응시켜 자연계에 없는 새로운 구조의 올리고당을 생산할 수 있음을 확인하였다. B-742CB dextransucrase와 B-1355C alternansucrase의 경우에 lactose와 raffinose의 수용체반응에서 여러 가지 올리고당을 생성할 수 있었는데 이는 B-512FMCM dextransucrase와는 다른 특이한 성질로서 이의 자세한 반응 기작에 대한 생화학적 연구가 필요하다. 또한 특이적 구조를 가진 올리고당의 산업적 이용을 위해서는 대량생산이 요구되어진다. 이를 위해 고정화효소를 이용한 반응기 개발연구가 진행중이다.

요 약

본 연구에서는 dextransucrase hyper-producing *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMCM과 dextransucrase constitutive mutants인 B-742CB 및 B-1355C에서 얻은 dextransucrase 및 alternansucrase를 이용하여 maltose, lactose, gentiobios 및 raffinose의 수용체반응을 수행하였다. B-512FMCM의 경우 수용체로서 maltose와 gentiobiose는 설탕에 대한 농도비가 1/1이하일 때 수용체에 α1-6으로 D-glucose가 결합한 일련의 올리고당을 생성하였고, 9/1이상에서는 단 두 가지의 수용체산물로서 maltose의 경우에는 panose와 isomaltosyl mal-

tose를, gentiobiose의 경우에는 6²-α-D-glucopyranosyl gentiobiose와 isomaltosyl gentiobiose만을 생성하였다. 그러나 lactose는 유일한 산물인 2¹-α-D-glucopyranosyl lactose만을 생성하였다. 효소양의 변화에 대해서 maltose와 gentiobiose의 수용체반응에서 생성된 수용체산물(올리고당)의 수와 양은 효소양이 증가함에 따라 증가하였으나 lactose의 경우에는 효소양의 증가에 대해 수용체산물 양의 변화가 크지 않았다. B-742CB dextransucrase와 B-1355C alternansucrase를 사용하면 B-512FMCM dextransucrase에서는 단 한가지만의 수용체산물을 생산하였던 lactose와 raffinose를 수용체로 하여 여러 가지의 수용체산물(올리고당)을 생산하였다.

감사의 말

본 연구는 보건복지부에서 시행한 '97 보건의료기술 연구개발사업과 농업생물신소재개발연구센터를 통한 한국과학재단의 지원을 받아 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Kim, D. and J. F. Robyt. 1994. Production and selection of mutants of *Leuconostoc mesenteroides* constitutive for glucansucrases. *Enzyme Microbiol Technol.* **16**: 659–664.
- Kim, D. and J. F. Robyt. 1994. Properties of *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMC constitutive dextransucrase. *Enzyme Microbiol Technol.* **16**: 1010–1015.
- Kim, D., J. S. Baek, and J. H. Lee. 1995. Characteristics of dextransucrases of *Leuconostoc mesenteroides* B-1299 mutants, and enzymatic modification amylose and pullulan. *Ann.RCNBMA.* **4**: 41–57.
- Kim, D., D. W. Kim, J. H. Lee, K. H. Park, Lorraine M. Day, and Donal F. Day. 1997. Development of constitutive dextransucrase hyper-producing mutants of *Leuconostoc mesenteroides* using the synchrotron radiation in the 70-1000 eV region. *Biotechnol. Techniq.* **11**: 319–321.
- Maruta, K., T. Nakada, M. Kubota, H. Chaen, T. Sugimoto, M. Kurimoto, and Y. Tsujisaka. 1995. Formation of trehalose from maltooligosaccharides by novel enzymatic system. *Biosci. Biotech. Biochem.* **59**(10): 1829–1834.
- Monsan, P., F. Paul, R. Remaud, and A. Lopez-Munguia. 1989. Novel enzymatic synthesis of oligosaccharides. *Food Botechnol.* **3**(11): 111–130.
- Monsan, P. and F. Paul. 1995. Enzymatic synthesis of oligosaccharides. *FEMS Microbiol. Rev.* **16**: 187–192.
- Mukerjea, R., D. Kim, and J. F. Robyt. 1996. Simplified and improved methylation analysis of saccharides, using a modified procedure and thin-layer chromatography.

- Carbohydr. Res.* **292**: 11–20.
- 9. Remaud, M., F. Paul, and P. Masan. 1992. Characterization of $\alpha(1 \rightarrow 3)$ branched oligosaccharides synthesized by acceptor reaction with the extracellular glycosyltransferase from *L. mesenteroides* NRRL B-742. *J. Carbohydr. Chem.* **11**(3): 359–378.
 - 10. Robyt, J. F. and B. J. White. 1987. *Biochemical Techniques: Theory and Practice*. Brooks/Cole Publishing Company, Monterey, California.
 - 11. Robyt, J. F. 1995. Mechanism of synthesis of glucan chain, branching, and acceptor-products by glucansucrases. *Oyo Toshitsu*. **42**(1): 53–67.
 - 12. Simeon, M. R., A. L. Munguia, V. Pelenc, F. Paul, and P. Monsan. 1994. Production and use of glycosyltransferase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 for the synthesis of oligosaccharides containing $\alpha(1 \rightarrow 2)$ linkage. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **44**: 101–117.
 - 13. Su, D. and J. F. Robyt. 1993. Control of the synthesis of dextran and acceptor-products by *Leuconostoc mesenteroides* B-512FM dextranucrase. *Carbohydr. Res.* **248**: 339–348.
 - 14. Tanriseven, A. and J. F. Robyt. 1993. Interpretation of dextranucrase inhibition at high sucrose concentration. *Carbohydr. Res.* **245**: 97–104.

(Received December 16, 1997)