

전분으로부터 Amyloglucosidase의 당전이반응에 의한 배당체의 합성

박종이 · 이희정 · 이태호*
부산대학교 자연과학대학 미생물학과

Synthesis of Glycoside by Transglycosylation of Amyloglucosidase from Starch. Park, Jong Yi, Hee Jung Lee, and Tae Ho Lee*. Department of Microbiology, College of Natural Sciences, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea - Glycosides were synthesized using transglycosylation reaction of amylase in water system. Starch as a glycosyl donor and benzylalcohol as an acceptor were selected as substrates of transglycosylation reaction. Among tested 9 commercial amylase, amyloglucosidase from *Rhizopus* sp. had high activity for transglycosylation from starch. The glycoside synthesized in water phase by amyloglucosidase was identified as benzylalcohol- α -glucoside (BG) of which one molecule of benzylalcohol was bound to 1-OH of glucose. The transglycosylation reaction by amyloglucosidase were carried out in reaction system containing 50 mg starch, 50 mg benzylalcohol, and 10 units enzyme in pH 5.0 at 45°C. The synthesized BG was hydrolyzed by α -glucosidase to produce glucose and benzylalcohol.

Key words: transglycosylation, glycoside, benzylalcohol- α -glucoside

특정 물질의 합성에 있어 선택적 촉매제로서 효소의 중요성이 재인식되고 있고[4, 15], 효소반응이 수계에서 뿐만 아니라 비수계(非水界)에서도 가능하다는 사실이 입증됨에 따라 이런 효소의 특수한 기능을 이용한 신물질의 합성이 활성화되기 시작하였다. 초기에는 주로 esterase, lipase, oxidase 및 hydrogenase 등의 효소가 가지는 기질 선택성(substrate selectivity), enantioselectivity 또는 regioselectivity[11, 24, 25] 등의 특수 성질이 고가의 chiral 전구체, 향생물질 중간체, 탄수화물계의 의약품 및 고분자 화합물 등의 합성에 이용되어 왔으며, 최근에는 이들 외에도 여러 종류의 효소들을 이용한 고부가가치의 물질생산이 가능하게 되었다. 특히 이들 효소로 종래의 유기합성법으로는 조제가 곤란했던 이성체를 쉽고 간단하게 생산할 수 있다고 하는 사실이 밝혀지면서, 효소를 이용한 특정물질의 선택적 합성이 시도되어[1, 8], 이들에 의한 신규물질의 합성이 크게 주목을 받기 시작하고 있다[12].

현재 이와 같은 반응 예로는 lipase, esterase, protease 등에 의한 가수분해 반응의 역반응 및 에스테르 교환 반응[16], 당 가수분해 효소인 glycosidase, galactosidase, amylase 등에 의한 기능성 당의 합성 및 transglycosylation반응[16] 등 많은 경우가 알려져 있다. 당에는 functional group, 즉 hydroxyl기가 많이 존재하기 때문에 transglycosylation, alkylation, reverse hydro-

lysis 반응 등의 기질로 자주 사용되며, 그 예로서 porcine pancreatic lipase의 glucose의 acylation반응[24], β -glucosidase의 transglycosylation, 또는 reverse hydrolysis반응에 의한 cellobiose의 alkylation반응이 확인되고 있다[5, 27]. 당을 기질로 하여 합성되는 배당체 화합물은 거기에 결합된 aglycon의 종류에 따라 다양한 성질을 가지게 되며, 이들은 주로 계면활성제, 기능성 식품, 변성제 (denaturant), 유연제 (plasticizer), 식품 첨가물, 향생제, 생리활성물질 등으로 광범위한 용도를 나타내는 것으로 알려져 있다[3, 9, 10, 13, 18, 29].

본 연구는 수계 혹은 비수계 용매에서 종래의 효소의 반응과는 그 특성이 다른 새로운 반응을 유도하여 보다 부가가치가 높은 신물질의 합성에 초점을 맞추어 계획되었고, 이미 이러한 연구의 일환으로 유기 용매계에서 lipase에 의해 계면활성능이 우수한 당acyl화합물을 합성하여 그 구조와 기능을 밝힌 바 있다[19-22]. 본 연구는 다당 가수분해효소인 amyloglucosidase의 transglycosylation반응을 이용하여 starch로부터 배당체(glycoside)를 합성한 내용으로서, 수계의 반응에서 transglycosylation활성이 높은 효소를 선정한 다음, 효소활성과 안정성에 미치는 영향인자를 검토하고 반응 최적 조건을 확립하여 반응산물의 구조를 확인한 결과에 대해 기술하고자 한다.

재료 및 방법

사용시약 및 기기

*Corresponding author
Tel. 82-51-510-2267, Fax. 82-51-583-0134
E-mail: leeth@hyowon.pusan.ac.kr

Biozyme S(*Aspergillus oryzae* amylase)는 Amano (Japan)사의 제품을, porcine pancrease, α -amylase (barley malt), α -amylase(human saliva), α -amylase (*Aspergillus oryzae* and *Bacillus* sp.), amyloglucosidase(*Rhizopus* sp.), β -amylase(from Barley), α -glucosidase, β -glucosidase 등은 Sigma사의 제품을 사용하였다. Soluble starch는 Yachuri Pure Chemicals Co., LTD.(Japan) 제품을, benzylalcohol은 Aldrich(U.S.A)사 제품을, Maltotriose는 Sigma(U.S.A)사의 제품을 사용하였다. 당과 반응산물은 HPLC(Waters, U.S.A)를 사용하여 Sugar pak column(Waters, U.S.A)으로 정량하였으며 합성된 glycoside의 분자량은 ESI-MASS(V. G. Quattro., England)로 측정하였다.

Enzyme screening

시판되고 있는 당 가수분해효소 중 transglycosylation활성이 높은 효소를 선정하기 위하여 starch와 benzylalcohol을 기질로 하여 효소반응을 행하였다. 효소반응시 pH와 반응조건에 따라 생성물의 종류도 달라질 수 있기 때문에 우선 모든 공시효소의 작용 pH를 공유하는 pH 5.0(0.1 M citric acid-sodium citrate buffer)과 pH 7.0(0.1 M Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 buffer)에서 효소반응을 시켜 반응산물의 생성여부를 조사하였다. 각 완충액에 녹인 starch용액(50 mg/ml) 1 ml에 각각 50 mg의 benzylalcohol 및 9종의 시판효소 10 unit를 첨가하여 40°C shaking water bath에서 3일 동안 반응시킨 후 생성되는 당과 glycoside를 TLC로 확인하고 HPLC로 정량분석하였다.

반응산물의 분석

Starch와 benzylalcohol의 transglycosylation반응에서 생성된 산물을 확인하기 위하여 반응중의 시료를 sampling하여 100°C에서 10분간 가열하여 반응을 정지시키고, 원심분리한 후 적정 시료량을 TLC 및 HPLC 분석을 행하였다. 전개용매는 chloroform:acetic acid:water(3:3.5:0.5)를 사용했으며, 발색시약은 glycolipid 발색시약인 diphenylamine:aniline:phosphoric acid(5:5:1)와 sulfuric acid:methanol(50:50)을 사용하였다. TLC로 반응산물을 확인한 후 HPLC로 반응산물을 정량하였다. 정량분석에서는 internal standard로 fructose를 이용하였다. HPLC 분석에서 나온 peak의 정량분석은 internal standard의 peak 면적과 정제된 BG의 peak 면적비를 기준으로 하여 계산되었다.

BG의 정제 및 분석

1 g의 starch가 녹아있는 0.1 M citric acid-sodium citrate buffer solution(pH 5.0) 20 ml에 benzylalcohol

1 g과 amyloglucosidase 200 unit를 첨가하여 45°C shaking water bath에서 3일 동안 반응시킨 후 glycoside를 정제하기 위해 chromatography를 실시하였고 순도는 TLC 및 HPLC로 검증하였다. TLC, HPLC에서 정제가 확인된 glycoside의 분자량은 ESI(Electron Spray Ionization)-MASS를 이용해 결정하였다. 또한 이 물질의 구조를 분석하기 위하여 합성된 glycoside의 환원력을 측정함과 동시에 α -glucosidase에 의한 분해여부를 조사하였다.

유화활성 측정

유화활성 측정[28]은 0.01 M $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 를 함유하고 있는 0.05 M Tris-HCl buffer(pH 8.0) 7.5 ml에 유화기질인 n-hexadecane과 2-methylnaphthalene의 1:1 (v/v) 혼합액 0.1 ml를 섞은 후, 배양상징액 0.2 ml를 넣고 1분간 vortexing하여 유화시킨 다음 10분간 정치시킨 뒤, 유화액의 밑부분에서 1 ml를 뽑아내어 540 nm에서 흡광도를 측정하여 탁도로서 유화활성을 나타내었다. Blank로는 유화기질을 넣지 않은 것(blank-1; 배양상징액 자체의 탁도를 제거하기 위한 것)과 배양상징액 대신 bioemulsifier 생산배지를 넣은 것 (blank-2; 배지자체의 유화활성치를 제거하기 위한 것)을 사용하여 sample의 탁도에서 blank의 탁도를 뺀 값을 유화활성값으로 정하였다.

결과 및 고찰

Enzyme의 선정

Starch와 benzylalcohol을 기질로 선택하고 수계에서 transglycosylation활성이 높은 효소를 검색하기 위해 상업적으로 시판되고 있는 효소의 활성을 검토하여 그 결과를 Table 1에 나타내었다. 여기에서 α -amylase는 starch를 가수분해할 때 중합도가 다른 여러 종류의 oligo당이 생성되므로 transglycosylation시에 benzylalcohol이 결합한 glycoside 또한 여러 종류가 생성될 것으로 기대할 수 있다. 실제 α -amylase의 경우에는 반응초기에 여러 중합도를 가진 glycoside가 합성되어 어느 종류가 main product인지 알 수 없으나 최종적으로는 benzylalcohol- α -glucoside(BG)와 benzylalcohol- α -maltoside(BM)의 두 종류가 중점적으로 생산된다는 것이 확인되었다. 또한 각 효소는 그 기원에 따라 혹은 작용 pH에 따라 반응산물의 양상이 달라지는 경향을 보였다. α -amylase의 경우에는 반응 pH에 따라 달라지긴 하나 대체로 BG와 BM이 동시에 생성됨을 볼 수 있었다. 그것도 pH 5에서는 BG가, pH 7에서는 BM이 주로 생성됨을 알 수 있었다. 특히 이러한 경향은 *Aspergillus oryzae* 기원의 α -amylase인 경우에 현저하였으며 반응수율 또한 가장 높

Table 1. Glycoside synthesis from starch by various enzyme

Enzyme	BG:BM(mg/ml) pH 5.0	BG:BM(mg/ml) pH 7.0
Control, no enzyme	0	0
Biozyme S(α-amylase from <i>Aspergillus oryzae</i>)	2.43:0	1.06:1.73
α-amylase(from porcine pancrease)	0.69:0.09	0.93:0
α-amylase(from Barley malt)	1.29:0	0.15:0.47
α-amylase(from <i>Bacillus</i> sp.)	0:0.35	0:1.01
α-amylase(from human saliva)	0	0
α-amylase(from <i>Aspergillus oryzae</i>)	3.83:0	0.92:2.49
β-amylase(from Barley)	0	0
Amyloglucosidase(from <i>Rhizopus</i> sp.)	1.67:0	0.19:0
α-glucosidase	0	0

The reaction mixture containing 50 mg starch, 50 mg benzylalcohol, and 10 unit enzyme in 1 ml was incubated at 40°C. After 3 days reaction, the synthesized glycosides were measured as Materials and Methods. The enzyme reaction were carried out in 0.1 M citric acid-sodium citrate buffer(pH 5.0) and 1 M Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ buffer(pH 7.0), respectively. BG, benzylalcohol-α-glucoside; BM, benzylalcohol-α-maltoside.

게 나타났다. 공시효소 중 β-amylase와 α-glucosidase의 경우에는 glycoside의 합성은 확인할 수 없었다. 물론 예상할 수 있는 결과이긴 하지만 amyloglucosidase의 경우에는 glucose 한분자와 benzylalcohol 한분자가 결합한 BG만이 반응 pH에 관계없이 생성되었다. 그러나 이 경우에는 반응수율이 낮게 나타나는 결점이 있지만 단일종의 glycoside를 생성한다는 관점에서 본 효소를 transglycosylation반응의 작용양상 및 생성물의 구조를 확인하는 이후의 실험을 위한 공시효소로 선정하였다. 이상의 각종 amylase의 transglycosylation반응에서 생성물로서 glycoside 뿐만 아니라 여러 종류의 중합도를 가진 oligo당도 동시에 생성된다는 것을 확인하였으며 또한 amyloglucosidase의 경우에는 단일종의 glycoside이외에 유리당으로서는 glucose만이 생성되었다.

반응 pH의 영향

Starch의 transglycosylation반응에 미치는 pH의 영향을 검토하기 위해 50 mg/ml의 starch를 녹인 여러 pH의 buffer solution(pH 3.0~7.0) 1 ml에 각각 50 mg의 benzylalcohol과 10 unit의 amyloglucosidase를 첨가하여 40°C에서 3일 동안 반응시킨 후 반응 생성물을 HPLC로 정량하였다. Table 2에 나타난 결과와 같이 pH 4-6 근방에서 glycoside의 합성이 비교적 양호하였으며 다량의 glucose가 동시에 생성되었다. 이 pH는 starch의 가수분해시 amyloglucosidase가 갖는 적정 pH와 유사하며 효소의 가수분해 활성이 높을수록 transglycosylation활성도 상대적으로 증가함을 알 수 있었다. 따라서 이후의 모든 실험은 pH 5.0에서 진행하였다.

기질농도비의 영향

Transglycosylation반응에 미치는 기질 benzylalcohol

Table 2. Effect of pH for the enzymatic synthesis of benzylalcohol-α-glucoside

pH	Glucose (mg/ml)	benzylalcohol-α-glucoside (mg/ml)
3.0	15.21	0.57
3.5	24.36	0.67
4.0	36.41	1.45
4.5	39.50	1.51
5.0	41.86	1.77
5.5	41.20	1.43
6.0	32.43	1.08
6.5	17.92	0.52
7.0	15.33	0.19

The reaction mixture containing 50 mg starch, 50 mg benzylalcohol, and 10 unit enzyme in 1 ml was incubated in various pHs as indicated at 40°C. After 3 days reaction, the synthesized glycosides were measured as Materials and Methods. pH 3.0~6.0, 0.1 M citric acid-sodium citrate buffer; pH 6.5~7.0, 0.1 M

과 starch의 농도에 따른 영향을 검토하기 위해 50 mg/ml의 starch가 녹아 있는 0.1 M citric acid-sodium citrate buffer solution(pH 5.0) 1 ml에 10 unit의 amyloglucosidase를 첨가한 후 benzylalcohol의 농도를 각각 0에서 100 mg까지 변화시켜 40°C에서 3일 동안 반응시켜 반응 생성물을 HPLC로 정량하였다.

또한 starch 농도에 따른 반응양상을 조사하기 위해 각각 10, 50, 100, 200 mg의 starch가 녹아있는 0.1 M citric acid-sodium citrate buffer solution(pH 5.0) 1 ml에 10 unit의 amyloglucosidase와 50 mg의 benzylalcohol을 첨가한 후 40°C에서 각 반응시간별로 시료를 적정량 채취하여 반응 생성물을 HPLC로 정량하였다. 그 결과를 Table 3과 Fig. 1에 각각 나타내었다. Table 3에서 starch의 농도를 50 mg/ml로 고정하고 benzylal-

Table 3. Effect of benzylalcohol concentration for the enzymatic synthesis of benzylalcohol- α -glucoside

Benzylalcohol (mg/ml)	Glucose (mg/ml)	benzylalcohol- α -glucoside (mg/ml)
0	45.28	0
10	42.81	0.35
20	42.56	0.61
40	42.00	1.55
50	37.73	1.86
80	36.27	1.75
100	35.96	1.66

The reaction mixture containing 50 mg starch, the concentration of benzylalcohol as indicated, and 10 unit enzyme in 1 ml was incubated in pH 5.0 at 40°C. After 3 days reaction, the glucose and synthesized glycosides were measured as Materials and Methods.

cohol의 농도를 변화시켰을 때 40 mg/ml까지는 생성물이 증가하나 그 이상에서는 일정한 농도로 유지되었고, 60 mg이상 첨가된 경우에는 BG 합성이 더이상 증가하지 않는 결과로 나타났다. 또한 benzylalcohol의 농도가 증가할수록 생성되는 glucose의 양은 오히려 줄어드는 경향을 보였다. 이때 benzylalcohol의 물에 대한 용해도는 1 ml당 40 mg으로서 40 mg이상의 경우에는 현탁된 상태에서 반응을 진행시켰으며 반응의 경과에 따라 다소 탁도가 감소하는 것으로 나타났다. 따라서 반응이 진행됨에 따라 줄어드는 양을 고려하여 benzylalcohol의 농도를 50 mg/ml로 첨가하여 이후의 실험을 계속하였다.

Transglycosylation반응에 의한 BG합성에서 starch의 적정농도를 결정하기 위해 benzylalcohol의 농도를 50

mg/ml로 하고 starch의 농도를 변화시키면서 반응산물의 수율을 조사하였다. Fig. 1에 나타난 바와 같이 starch의 농도가 증가할수록 BG의 합성량도 상대적으로 증가됨을 알 수 있으며 반응 8시간 이내에 거의 transglycosylation 반응이 종결되었다. 이때 starch가 거의 분해되는 반응 8시간 이후, glycoside의 수율이 그 이상 증가하지 않는 것은 본 효소가 유리 glucose에는 benzylalcohol을 glycosylation 시킬 수 없다는 것을 뜻하며 동시에 합성된 glycoside도 이 효소에 의해 재차 가수분해되지 않는 것을 의미한다. 물론 합성과 분해가 동시에 일어나 평형상태가 유지될 수 있다고도 볼 수 있으나, 확인 결과 그와 같은 반응은 일어나지 않는 것으로 판단되었다. 즉 유리 glucose에는 전혀 glycosylation반응이 일어나지 않는 것으로 확인되어 상기 결론을 뒷받침하였다. 따라서 BG의 합성은 starch의 가수분해와 더불어 benzylalcohol에 glucose의 transglycosylation반응이 동시에 일어나는 것으로 생각할 수 있으며 오히려 유리 glucose가 많이 존재할 경우에는 transglycosylation반응이 다소 저해되는 경향을 보였다. 이와 같은 결과는 β -glucosidase를 이용하여 glucose로부터 glycoside를 합성할 때 높은 glucose의 농도에서는 오히려 합성수율이 감소한다고 하는 Galzy[6] 등의 연구예와 흡사한 경우로서, 만약 반응시 유리 glucose를 기술적으로 제거할 수만 있으면 glycoside의 수율을 높일 수 있을 것으로도 생각된다. 이하의 실험에서는 반응시간과 기질농도에 따른 BG의 합성률을 고려하여 starch의 농도를 50 mg/ml로 정하여 실험을 진행하였다.

효소농도

효소농도에 따른 반응양상을 검토하기 위해 50 mg/ml의 starch가 녹아 있는 0.1 M citrate buffer solution (pH 5.0) 1 ml에 50 mg의 benzylalcohol과 amyloglucosidase를 각각 1, 5, 10, 25 unit씩 첨가하여 40°C에서 각 반응시간별로 시료를 적정량 sampling하여 반응산물을 HPLC로 정량하였다. Fig. 2에 나타난 결과와 같이 효소의 양이 증가함에 따라 반응속도가 빨라지는 경향이 있으나 glycoside의 생성량에는 큰 변화가 나타나지 않았다. 즉 전분으로부터 유리되는 glucose와 glycoside의 양은 효소의 양과는 무관하게 거의 일정한 비율로 생산되었으며, 단지 효소양이 많을수록 반응초기에 반응속도가 비례하여 증가함을 보여 주었다.

반응온도

50 mg/ml의 starch가 녹아 있는 0.1 M citric acid-sodium citrate buffer solution(pH 5.0) 1 ml에 benzylalcohol 50 mg과 10 unit의 amyloglucosidase가 첨가된 시료를 각각 25°C에서 60°C까지의 온도에서 3일동안 반

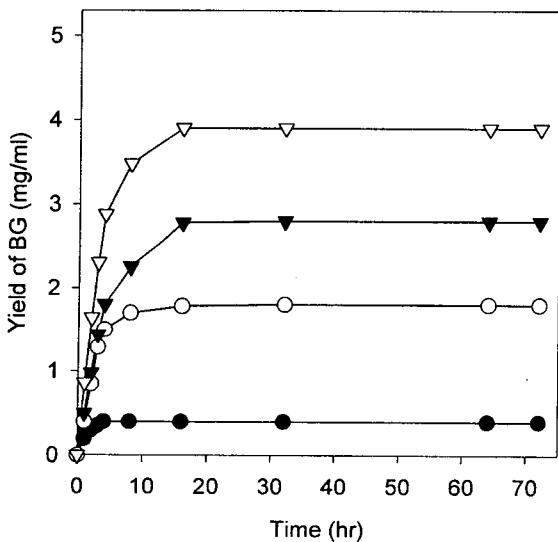


Fig. 1. Effect of starch concentration for the enzymatic synthesis of benzylalcohol- α -glucoside(BG).

Concentration of starch are as follows; ● : 10 mg/ml, ○ : 50 mg/ml, ▲ : 100 mg/ml, ▽ : 200 mg/ml.

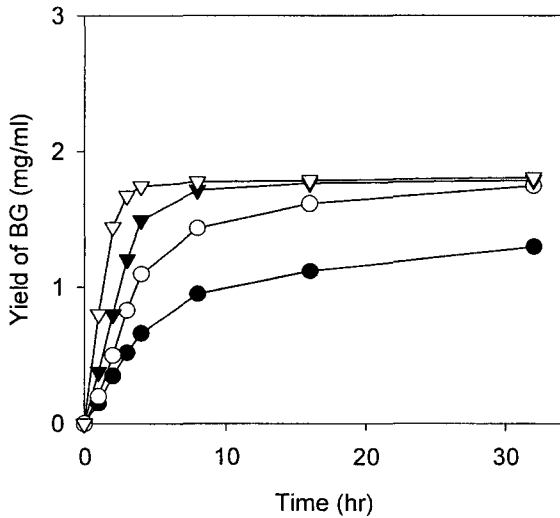


Fig. 2. Effect of enzyme concentration for the enzymatic synthesis of benzylalcohol- α -glucoside.

The reaction mixture containing 50 mg starch, 50 mg benzylalcohol, and 1 unit (●), 5 unit (○), 10 unit (▼), and 25 unit (▽) of enzyme in 1 ml was incubated in 0.1 M citric acid-sodium citrate buffer (pH 5.0) at 45°C. The synthesized glycosides were measured to time intervals as indicated.

Table 4. Effect of temperature for the enzymatic synthesis of benzylalcohol- α -glucoside

Temperature (°C)	Glucose (mg/ml)	Benzylalcohol- α -glucoside (mg/ml)
25	25.96	0.68
30	29.57	1.13
35	35.45	1.53
40	41.86	1.67
45	38.54	1.97
50	28.96	0.86
55	28.87	0.80
60	29.17	0.66

The reaction mixture containing 50 mg starch, 50 mg benzylalcohol, and 10 unit enzyme in 1 ml was incubated in 0.1 M citrate buffer (pH 5.0) at various temperatures as indicated. After 3 days reaction, the synthesized glycosides were measured as Materials and Methods.

응시킨 후 반응 생성물을 HPLC로 정량하였다. 그 결과 (Table 4) 45°C에서 starch의 가수분해 및 transglycosylation반응이 가장 잘 일어나는 것으로 나타났다.

반응시간

이상에서 설정한 반응조건에서 효소의 transglycosylation반응을 경시적으로 측정하여 Fig. 3에 나타내었다. 반응개시 8시간 후에는 거의 모든 starch가 가수분해되어 반응이 종결되는 것으로 나타났으며 반응시간을 연장하여도 glycoside의 양에는 변화가 나타나지 않았다. 이

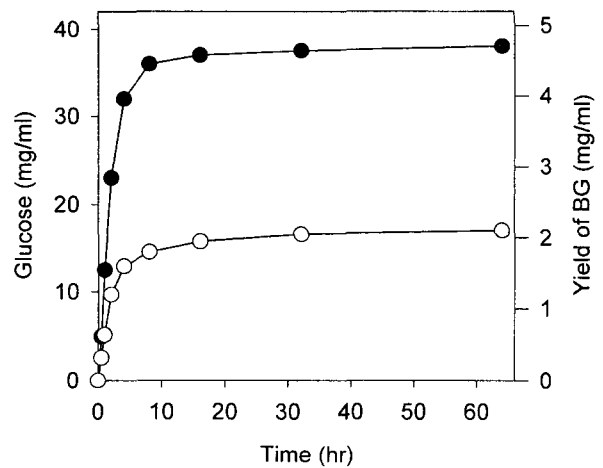


Fig. 3. The time courses for the enzymatic synthesis of benzylalcohol- α -glucoside.

The reaction mixture containing 50 mg starch, 50 mg benzylalcohol, and 10 unit of enzyme in 1 ml was incubated in 0.1 M citric acid-sodium citrate buffer (pH 5.0) at 45°C. The synthesized glycosides were measured to time intervals as indicated. ○—○ : benzylalcohol- α -glucoside, ●—● : glucose.

결과는 반응산물인 glycoside가 amyloglucosidase에 의해서 가수분해되지 않는다는 것을 의미함과 동시에 유리된 glucose에는 glycosylation반응이 일어나지 않는다는 것을 뜻한다.

Schellenbarger[17] 및 Sulisty[23] 등에 의하면 invertase와 xylosidase로 sucrose와 xylooligosaccharide를 알콜류에 transglycosylation시켰을 때 합성된 glycoside가 반응시간의 경과에 따라 다시 가수분해되는 양상을 보인다고 보고하고 있으나, 본 실험에서 합성된 glycoside는 amyloglucosidase에 의해서는 가수분해되지 않았으며 계속 안정한 상태로 유지되었다.

반응산물의 확인

Amyloglucosidase에 의해 starch와 benzylalcohol로부터 합성된 glycoside의 구조 및 물성을 조사하기 위해 정제를 행하였다. 즉, 20 ml의 효소반응액을 10,000 rpm, 10분 동안 원심분리하여 잔여 starch를 제거한 후 5 ml로 농축하였다. 농축액은 2배 volume의 chloroform으로 2회 추출하여 잔여 benzylalcohol을 제거하고, 다시 2배 분량의 ethanol로 생성된 oligo당과 효소를 원심분리에 의해 제거하였다. 상정액은 건조후에 chromatography의 전개용매 1 ml에 녹인 후 Silica gel G60 column(column: 2.5×70 cm, flow rate: 30 ml/hr, fraction volume: 3 ml, 전개용매: chloroform/methanol) chromatography을 행하였다. 용출액은 TLC로 확인한 후 정제여부를 HPLC한 결과(Fig. 4) 하나의 peak로 나타나 물질이 순수하게 정제되었음을 확인할 수 있었다. 정제물질의 구조를 확인하기 위해 우선 분자량을

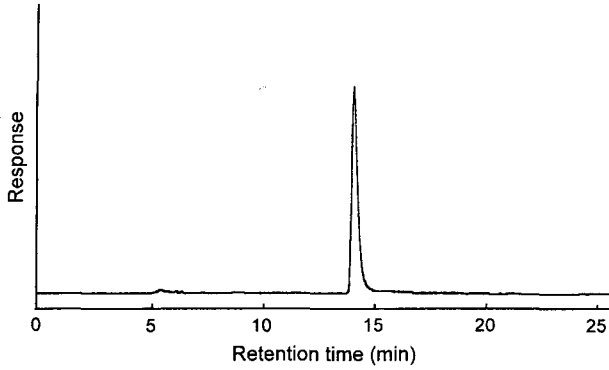


Fig. 4. HPLC chromatogram of purified benzylalcohol- α -glucoside.

Mobile phase: water, Colume: Sugar pak, Temperature: 85°C, Flow rate: 0.8 ml/min, Detector: Waters 410 Differential Refractometer.

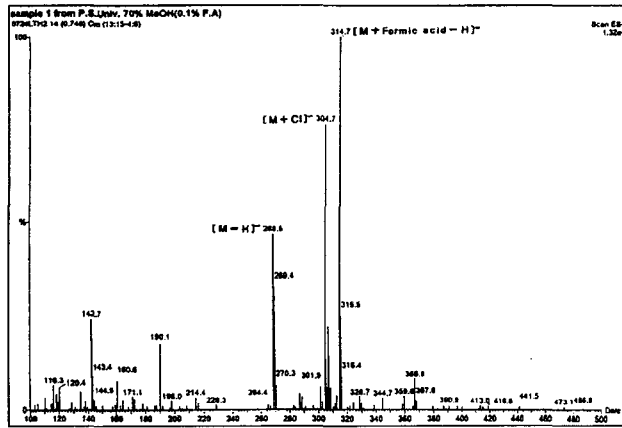


Fig. 5. ESI-Mass spectrum of purified benzylalcohol- α -glucoside.

측정하였다.

ESI-Mass를 이용하여 분석한 결과를 Fig. 5에 나타내었다. 본 물질은 $[M-H]^+$, $[M+Cl]^-$, $[M+Formic acid-H]^+$ 의 값이 각각 268.5, 304.7, 314.7로 나타나 분자량이 270인 것으로 확인되었다. 따라서 본 물질은 한 분자의 glucose에 benzylalcohol 한 분자가 glycosidic bond로 결합한 benzylalcohol-glucoside(BG)임을 알 수 있었다. 그러나 glucose의 어느 hydroxyl기에 benzylalcohol이 결합해 있는지 알 수 없기 때문에 정제물질의 환원력을 측정하였다. 그 결과 합성된 glycoside는 환원력을 갖지 않는 것으로 보아 glucose의 1번 위치가 결합에 관여해 있음을 추정할 수 있었다.

한편 amyloglucosidase는 starch의 가수분해 중에 configuration의 inversion이 일어나 β -glucoside를 형성하기도 하므로 생성된 BG 중에는 α -결합 뿐만 아니라 β -결합의 BG도 있을 가능성이 있기 때문에 이를 확인하기 위하여 정제된 10 mg의 BG를 α -glucosidase로 가수

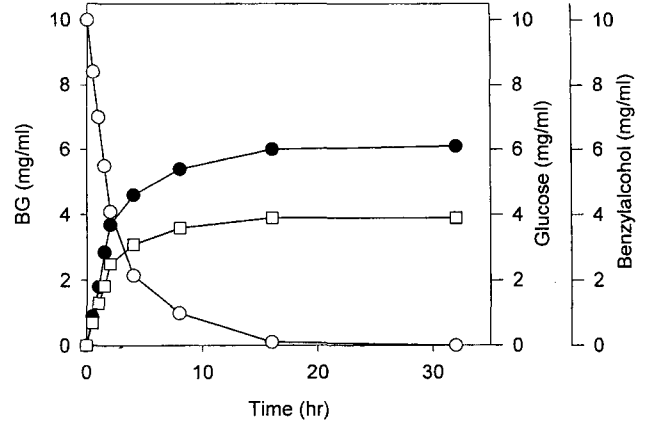


Fig. 6. Hydrolysis of benzylalcohol- α -glucoside by α -glucosidase.

The reaction mixture containing 10 mg benzylalcohol- α -glucoside and 5 units of α -glucosidase was incubated in 1 ml of phosphate buffer (pH 7.0) at 25°C. The hydrolysis rate of glycoside was measured to time intervals as indicated. —○—: benzylalcohol- α -glucoside, —□—: benzylalcohol, —●—: glucose.

분해하였다. Fig. 6에 나타난 결과와 같이 25°C, pH 7.0에서 glycoside는 α -glucosidase에 의해 glucose와 benzylalcohol로 완전히 정량적으로 분해되어 본 물질이 α -결합에 의한 배당체임을 확인할 수 있었다. 따라서 이상과 같은 결과를 종합해 볼 때 amyloglucosidase에 의해 합성된 glycoside는 glucose의 1번 OH기에 benzylalcohol 한 분자가 α 형태로 결합된 benzylalcohol- α -glucoside임을 알 수 있었다.

종래 효소에 의한 배당체의 합성에는[17, 23] 몇몇 알려진 것이 있으나 전분을 기질로 하여 직접 glycoside를 합성한 예는 본 연구가 처음이며 이는 효소의 새로운 특성을 이용한 연구결과라고 할 수 있다. 즉 이는 다당 가수분해 효소를 이용하여, 이용성이 낮은 기질에서 보다 유용성이 높은 새로운 화합물을 합성한다는 것에 의미가 있으며, 어떤 종류의 기질에 단당을 glycosylation시키느냐에 따라서는 유용성, 응용성이 뛰어난 고가의 물질 합성도 가능하다고 하는 결과를 제시했다고 본다. 한편 본 물질의 응용성을 검토하기 위해 원래의 시도대로 각종 oil류에 대한 유화능 및 계면활성능(data not shown)을 조사했으나 기존의 물질만큼의 활성이 나타나지 않아 유화제 및 계면활성제로서의 용도는 높지않은 것으로 판단되어 다른면으로의 용도를 현재 검토중에 있다.

요 약

수계에서 전분 가수분해효소의 transglycosylation반응을 이용하여 배당체(glycoside)를 합성하였다. Glycosyl donor인 starch와 glycosyl acceptor인 benzylalcohol을 반응기질로 선택하였다. 시판되는 9종의 당

가수분해효소의 transglycosylation활성을 조사한 결과 glucose와 한 종류의 glycoside만을 생산하는 amyloglucosidase(from *Rhizopus* sp.)를 반응효소로 선정하였다. Amyloglucosidase에 의해 합성된 배당체는 여러 가지 분석을 통해 glucose의 1번 OH기에 benzylalcohol이 α 형태로 결합된 benzylalcohol- α -glucoside(BG)임을 확인하였다. 수계에서 이 효소에 의한 transglycosylation 반응의 최적조건은 starch 50 mg/ml, benzylalcohol 50 mg/ml, 온도 45°C, 효소량 10 unit/ml, pH 5.0, 반응시간 32시간이었으며 합성된 BG는 amyloglucosidase에 의해서는 분해되지 않았고 α -glucosidase에 의해 glucose와 benzylalcohol로 가수분해되었다.

감사의 말

이 연구는 한국과학재단(과제번호 971-1108-054-2) 및 1997년도 교육부 학술연구조성비(BSRI-97-4410)의 연구비에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Boland, W., C. Frobl, and M. Lorenz. 1991. Esterolytic and lipolytic enzymes in organic synthesis. *Synthesis* 1094–1099.
- Chinsky, N., A. L. Margolin, and A. M. Klivanov. 1989. Chemoselective enzymatic monoacylation of bifunctional compounds. *J. Am. Chem. Soc.* **111**: 386–388.
- Cirigliano, M. C. and G. M. Carman. 1984. Isolation of a bioemulsifier from *Candida lipolitica*. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**: 747–750.
- Drueckhammer, D. G., W. J. Hennen, R. L. Pederson, C. F. Barbas, C. M. Gautheron, T. Krach, and C. H. Wong. 1991. Enzyme catalysis in synthetic carbohydrate chemistry. *Synthesis*. 499–526.
- Gabin V. and D. Thomas. 1992. Enzyme-catalyzed synthesis of alkyl β -D-glucoside in organic media. *Tetrahedron Lett.* **33**: 4567–4570.
- Galzy, P., Y. Gueguen, P. Chemardin, and P. Pommaris. 1995. Enzymatic synthesis of dodecyl β -D-glucopyranoside catalyzed by *Candida molischiana* 35M5N β -glucosidase. *Bioresource Technology* **53**: 26370–26375.
- Holla, E. W. 1989. Enzymatic synthesis of selectively protected glycals. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **28**: 220–221.
- Jones, J. B. 1986. Enzymes in organic synthesis. *Tetrahedron.* **42**: 3351–3403.
- Jones J. D., A. J. Hacking, and P. S. J. Cheetham. 1992. Biological method for protection of 6-position of sucrose in synthesis of disaccharide high-intensity sweetener. *Biotechnol. Bioeng.* **39**: 203–210.
- Kinoshita, M., S. Sakuda, and Y. Yamada. 1993. Preparation of N-monoalkyl and O-acyl derivative of allosamidine and their chitinase inhibitory activity. *Biosci. Biochem. Bioeng.* **57**: 1699–1703.
- Kirchner, G., M. P. Scollar, and A. M. Klivanov. 1985. Resolution of racemic mixture via lipase catalysis in organic solvent. *J. Am. Chem. Soc.* **107**: 7272–7276.
- Klivanov, A. M. 1986. Enzyme that work in organic solvent. *Chemtech.* **16**: 354–359.
- Nakano, H., S. Takenishi, and Y. Watanabe. 1988. Formation of transfer products from soybean arabinogalactan and glycerol by galactanase from *Penicillium citrinum*. *Agric. Biol. Chem.* **52**: 1913–1921.
- Nilson, K. G. I. 1988. Enzymatic synthesis of oligosaccharides. *Trends Biotechnol.* **6**: 256–263.
- Otera, J. 1993. Transesterification. *Chem. Res.* **93**: 1449–1454.
- Oyama, K., S. Nishimura, Y. Nonoka, and T. Hashimoto. 1981. Synthesis of an aspartame precursor by immobilized thermolysis in an organic solvent. *J. Org. Chem.* **46**: 5241–5245.
- Schlotterbeck, A., S. Lang, V. Wray, and F. Wagner. 1993. Lipase-catalyzed monoacylation of fructose. *Biotechnol. Lett.* **15**: 61–64.
- Schellenbarger, A. 1990. Invertase-catalyzed reaction in alcoholic solutions. *Biotech. Bioeng.* **35**: 1006–1012.
- Sin, Y. M., S. H. Chung, J. Y. Park, and T. H. Lee. 1996. Synthesis of biodegradable emulsifier using lipase in anhydrous pyridine. *Biotechnol. Lett.* **18**: 689–694.
- Sin, Y. M., S. O. Lee, J. D. Lee, and T. H. Lee. 1997. Synthesis of fructose ester compound by lipase in organic solvent. *Kor. J. Microbiol.* **33**: 181–186.
- Sin, Y. M., S. H. Chung, S. O. Lee, H. K. Shin, and T. H. Lee. 1997. Synthesis of bioemulsifier by transesterification reaction of lipase. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**: 420–426.
- Sin, Y. M., K. W. Cho, and T. H. Lee. 1998. Synthesis of fructose esters by *Pseudomonas* sp. lipase in anhydrous pyridine. *Biotechnol. Lett.* **20**: 91–94.
- Sulistyo, J., Y. Kamiyama, H. Ito, and T. Yasui. 1994. Enzymatic synthesis of hydroquinone β -xyloside from xylooligosaccharides. *Biosci. Biotech. Biochem.* **58**: 1311–1313.
- Therisod, M. and A. M. Klivanov. 1986. Facile enzymatic preparation of monoacylated sugar in pyridine. *J. Am. Chem. Soc.* **108**: 5638–5640.
- Therisod, M. and A. M. Klivanov. 1987. Regioselective acylation of secondary hydroxyl groups in sugars catalyzed by lipase in organic solvent. *J. Am. Chem. Soc.* **109**: 3977–3982.
- Trincone A., B. Nicolaus, L. Lama, and A. Gambacorta. 1991. Stereochemical studies of enzymatic transglycosylation using *Sulfolobus solfataricus*. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*: 2841–2844.
- Valerie L. and M. R. Willemot. 1992. Glucoside synthesis by glucoamylase or β -glucosidase in organic solvents. *Biotechnol. Lett.* **14**: 169–174.

28. Vulfson, E. N., R. Patel, and B. A. Law. 1990. Alkyl- β -glucoside synthesis in water-organic two phase system. *Biotechnol. Lett.* **12**: 397–402.
29. Wang L. X., C. Li, Q. W. Wang, and Y. Z. Hui. 1993. Total synthesis of the sulfated lipooligosaccharide signal involved in *Rhizobium meliloti*-*Alfalfa* symbiosis. *Tetrahedron Lett.* **34**: 7763–7766.
30. Wong, C. H., M. Schuster, P. Wang, and P. Sears. 1993. Enzymatic synthesis of N- and O-linked glycopeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **115**: 5893–5901.

(Received January 12, 1998)