

Leuconostoc mesenteroides B512FMC/6HG8가 생산하는 Dextranucrase에 의한 Cellobiose의 당전이반응

강현록 · 양지영[†] · 이현규*

부경대학교 식품생명공학부

*한양대학교 식품영양학과

Transglycosylation Reaction on Cellobiose by Dextranucrase of *Leuconostoc mesenteroides* B512FMC/6HG8

Hyun-Rok Kang, Ji-Young Yang[†] and Hyeon-Gyu Lee*

Div of Food Sci. & Biotechnology, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

*Dept. of Food and Nutrition, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea

Abstract

The transglycosylation reaction by dextranucrase from *Leuconostoc mesenteroides* B512FMC/6HG8 was investigated with cellobiose as an acceptor molecule and sucrose as a donor. The optimal conditions of transglycosylation on cellobiose were found that the ratio of sucrose to cellobiose was 3:1, the amount of enzyme was 2 U/mL, the ionic strength of buffer was 25 mM, pH was 5.0 and reaction temperature was 25°C. Also, acceptor products of cellobiose by transglycosylation were a series of oligosaccharides showing the degree of polymerization of 6.

Key words: transglycosylation, cellobiose, dextranucrase, oligosaccharide

서 론

Cellulose는 그 견고한 구조적인 특징으로 인하여 식품산업에의 이용에는 많은 어려움이 따른다. Cellulose에 대한 연구는 주로 화학적으로 그 구조를 일부 변형시켜 제조하는 셀룰로오스 유도체(cellulose derivatives)에 관한 연구와 발효당의 생산을 위한 cellulose의 효소적 가수분해시 수율을 높이기 위한 방법에 관한 연구이다. 셀룰로오스 유도체는 그 종류가 많으며 유화제, 흡착제, 콜로이드 안정제, 농화제(thickening agent), 습윤제(humectant), 점착제(binding agent), 교질안정제, 현탁촉진제(suspending agent), 피막제, 절착제, 점착제, 유량제어제 등으로서 의약품과 식품산업에 널리 이용되어 왔다(1). 발효당의 생산을 위한 cellulose의 효소적인 가수분해시 가장 문제가 되는 것은 낮은 수율과 높은 비용이다. 따라서 식품산업에서는 고효성을 지닌 cellulase의 탐색을 비롯하여 다른 효소와의 상승효과와 물리적·화학적 전처리후의 효소적 가수분해 등의 방법으로 발효당의 생산수율을 높이고자 많은 연구를 해오고 있다. 한편 발효당 중에서도 올리고당(oligosaccharide)은 기존의 감미료로서의 이용 외에도 안정제나 응집제 및 장내유용 세균인 비피더스균을 선택적으로 증가시켜 장내 부패세균의 증

식을 억제하는 기능을 가지고 있을 뿐만 아니라 다양한 기능성으로 인하여 새로운 식품소재로서 사용되어 오고 있다(2). 올리고당의 산업적 생산을 위해 식물에서의 추출 및 식물성이나 미생물성 탄수화물 고분자의 산 또는 효소의 가수분해 방법이 사용되고 있다(3). 올리고당은 그 기능적 특성으로 인해 다른 발효당에 비해서 상대적으로 고가이므로 이의 산업적 생산에 값이 저렴하고 자연계에 널리 존재하는 cellulose로부터 올리고당을 생산하는 일은 의미 있는 것이라 할 수 있겠다. 한편, cellulose의 가수분해물인 cellobiose를 이용하여 올리고당을 생합성하려는 연구가 일부 보고되고 있다 그 중, Yan과 Liao(4)는 β -glucosidase를 이용하여 cellobiose를 기질로 사용하였을 때 cellobiose를 합성하였다고 보고하였고, Gama와 Mota(5)는 cellulase의 역 가수분해반응을 이용하여 고중합도의 올리고당을 생합성하였다고 보고하였다. 그러나, Yan과 Liao의 경우 trisaccharide이상의 고중합도의 올리고당은 생성되지 않았고, Gama와 Mota의 경우에는 고중합도의 올리고당은 생성되었으나 반응시간이 너무 오래 걸리는 단점이 있다.

Dextranucrase는 sucrose를 glucose공여체로 하여 dextran을 합성하는 효소이나, 효소반응기내에 다른 탄수화물이 존재하거나 따로 넣어주게 되면 이 첨가된 탄

[†]To whom all correspondence should be addressed

수화물에도 glucose를 전달하는 것으로 알려져 있다. 이때 따로 넣어준 탄수화물을 수용체(acceptor)라 부르며, 이러한 반응을 수용체 반응(acceptor reaction)이라 한다. 수용체의 종류는 상당히 광범위하며 dextranucrase의 경우 100가지 이상의 탄수화물들이 알려져 있다. 이에 는 단당류, 이당류, 올리고당류 그리고 작은 크기의 dextran들이 포함되며 수용체의 종류에 따라 각기 다른 정도의 반응 효율을 나타낸다(6-10). 수용체 반응에 관하여 가장 많이 연구된 *Leuconostoc mesenteroides* B-512F dextranucrase의 경우 maltose 또는 isomaltose를 수용체로 하여 일련의 올리고당을 포함하는 수용체산물을 생성하지만 D-fructose, lactose 및 raffinose를 수용체로 사용할 경우에는 단 한가지의 수용체 산물만을 생산하는 것으로 알려져 있다(11).

따라서 본 연구에서는 cellobiose를 수용체로 하여 dextranucrase의 수용체 반응시 생성되는 올리고당의 경향을 알아보고자 한다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용한 cellobiose는 Sigma Co.(St. Louis, USA)에서 구입하였고 나머지 시약은 분석용 특급시약을 사용하였다. Dextranucrase(20.5 U/mg solid)는 *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMC/6HG8균주에서 분리된 것이고, John F. Robyt의 연구실(Iowa State University)에서 공급받은 것이다.

TLC분석

시료 1 µL를 TLC plate(Silica gel 60 F₂₅₄, Merck Co., Germany)에 점적하여, hair dryer로 건조시킨 후 전개용매로 두 번 전개시켰다. 발색제에 1회 dipping한 후 120°C에서 5분간 반응시켰다. 전개제는 isopropanol : ethyl acetate : water = 3 : 1 : 1로 사용하였고, 발색제는 N-(1-Naphthyl)ethylenediamin 0.3%을 함유한 methanol 95 mL와 황산 5 mL를 혼합하여 사용하였다.

Cellobiose와 sucrose 농도비율에 따른 acceptor reaction

25 mM pyridine acetate buffer(pH 5.0) 2 mL에 cellobiose와 sucrose를 농도별(cellobiose : sucrose = 10 : 1, 5 : 1, 3 : 1, 1 : 1, 1 : 3, 1 : 5, 1 : 10)로 넣고 dextranucrase 2 U를 가하여 실온에서 반응시켰다. 24시간 동안 50 µL씩 반응액을 취하여 TLC로 분석하였다.

효소 농도별에 따른 acceptor reaction

25 mM pyridine acetate buffer(pH 5.0) 2 mL에 cel-

lobiose 51.34 mg, sucrose 17.12 mg을 넣고 dextranucrase 20, 10, 7.5, 2, 0.2 U를 각각 가하여 실온에서 반응시켰다. 24시간 동안 50 µL씩 반응액을 취하여 TLC로 분석하였다.

이온 강도에 따른 acceptor reaction

2500, 250, 25, 2.5, 0.25 mM pyridine acetate buffer(pH 5.0) 2 mL에 cellobiose 51.34 mg, sucrose 17.12 mg을 넣고 dextranucrase 2 U를 각각 가하여 실온에서 반응시켰다. 48시간 동안 50 µL씩 반응액을 취하여 TLC로 분석하였다.

pH에 따른 acceptor reaction

25 mM pyridine acetate buffer(pH 3.0), 25 mM pyridine acetate buffer(pH 5.0), 2.5 mM phosphate buffer(pH 7.0), 2.5 mM tris-hydrochloride buffer(pH 9.0) 2 mL에 cellobiose 51.34 mg, sucrose 17.12 mg을 넣고 dextranucrase 2 U를 각각 가하여 실온에서 반응시켰다. 12시간 간격으로 50 µL씩 반응액을 취하여 TLC로 분석하였다.

반응 온도에 따른 acceptor reaction

25 mM pyridine acetate buffer(pH 5.0) 2 mL에 cellobiose 51.34 mg, sucrose 17.12 mg을 넣고 dextranucrase 2 U를 가하여 15, 20, 25, 30, 35°C에서 반응시켰다. 12시간 간격으로 50 µL씩 반응액을 취하여 TLC로 분석하였다.

반응 시간에 따른 Acceptor reaction

25 mM pyridine acetate buffer(pH 5.0) 2 mL에 cellobiose 51.34 mg, sucrose 17.12 mg을 넣고 dextranucrase 2U를 가하여 실온에서 반응시켰다. 24시간 동안 50 µL씩 반응액을 취하여 TLC로 분석하였다.

결과 및 고찰

기질농도에 따른 변화

Cellobiose와 sucrose를 농도별로 반응시켜 생성되는 acceptor products의 결과를 알아보았다(Fig 1). 반응시간의 경과에 따라 cellobiose가 줄어들면서 fructose 및 반응생성물이 형성되는 것을 확인할 수 있었다. 즉 효소에 의해 sucrose가 분해되어 glucose가 cellobiose에 전이되면서 새로운 가지결합을 가지는 생성물이 형성되었음을 나타낸다. Sucrose농도가 cellobiose농도보다 높을 때 중합도 2에서 중합도 6까지의 acceptor products가

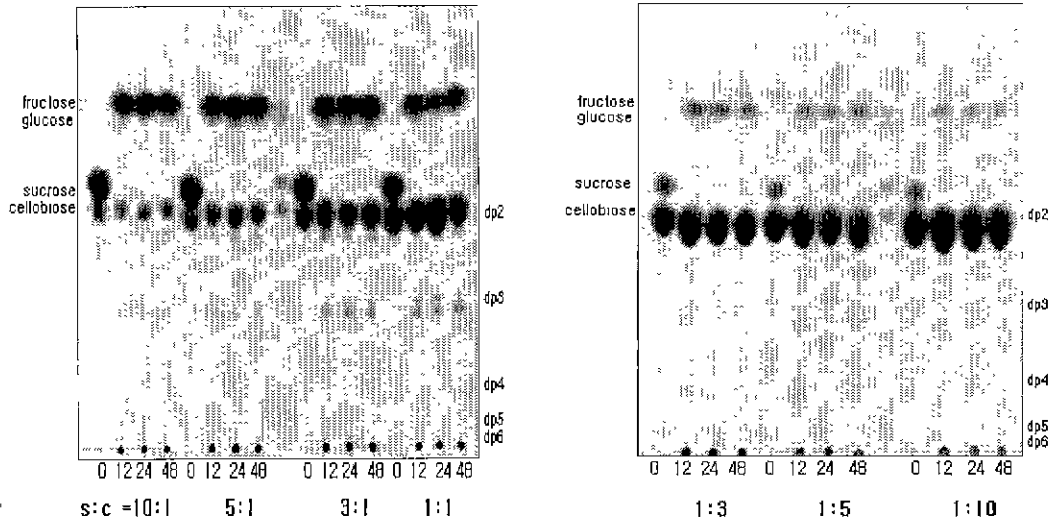


Fig. 1. TLC analysis of acceptor products in different ratio of sucrose and cellobiose (S:C).

형성되었고, 농도가 같거나 cellobiose의 농도가 sucrose농도보다 높을 때는 중합도 3에서 중합도 6까지의 products가 생성되어, products의 수가 줄었고 상대적으로 농도도 낮았다. Baek 등(12)이 maltose를 수용체로 하여 B-512 FMCM dextransucrase를 반응시켰을 때 수용체(maltose)의 비율이 증가할수록 acceptor products의 수가 줄어든다고 보고한 결과와 유사한 경향을 나타내었다.

효소농도에 따른 변화

Cellobiose와 sucrose의 비율을 3:1로 고정하여 효소농도에 따른 acceptor products의 생성결과를 알아보았

다(Fig 2). 20, 5, 2 U의 효소 반응시 중합도 2에서 중합도 6까지의 products가 생성되었고, 2 U 첨가시 기질로 사용된 sucrose는 24시간만에 다 소모되었고, 5 U를 첨가하였을 때는 반응 18시간 후에 거의 소모되었다. 0.5와 0.1 U의 효소반응시 생성되는 products는 없었으나, 반응시간이 지남에 따라 fructose와 glucose는 관찰이 되었고 점적부위에 건개되지 않은 dextran이 확인되었다. Baek 등(12)은 효소양의 변화에 대해서 maltose와 gentiobiose의 수용체반응에서 생성된 acceptor products의 수와 양은 효소양이 증가함에 따라 증가하였으나 lactose의 경우에는 효소양의 증가에 대해 acceptor products의 양의 변화가 크지 않았다고 보고하였다

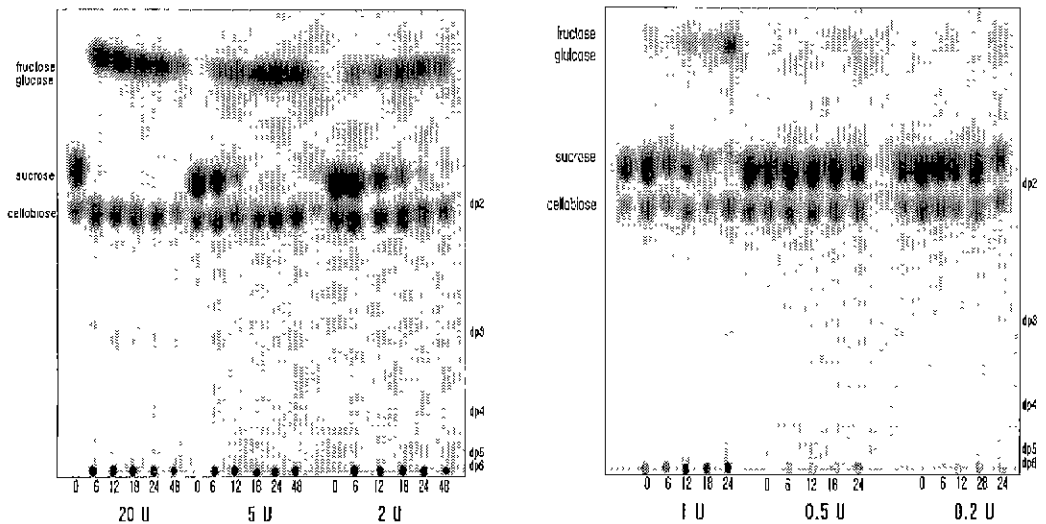


Fig. 2. TLC analysis of acceptor products in different concentration of dextransucrase.

이온강도에 따른 변화

Buffer의 이온강도에 따른 acceptor products의 생성 결과를 알아보았다(Fig. 3). 2500 mM에서는 전혀 반응이 일어나지 않았고 25, 2.5, 0.25 mM에서는 생성된 products가 중합도 2에서 중합도 6으로 비슷했고, sucrose는 반응 개시 후 6시간만에 모두 소모되었다.

pH에 따른 변화

pH에 따른 acceptor products의 생성결과를 알아보았다(Fig. 4). pH 5에서는 중합도 2에서 중합도 6까지의 products가 관찰되었고, pH 7에서는 중합도 2의 product만

이 관찰되었다. 한편, pH 3과 9에서는 products가 거의 생성되지 않았고 pH 5, 7에서는 dextran의 생성이 관찰되었지만 pH 3, 9에서는 관찰이 되지 않았다. Robyt과 Eklund(8)는 cellobiose와 sucrose의 비율을 1.1로 하고 dextranucrase 1.6 U/mL를 반응시켰을때, 중합도 3에서 중합도 5까지의 acceptor products를 확인하였다고 보고하였는데 이번 결과에서는 더 높은 중합도(중합도 6)의 products를 확인할 수 있었다

온도에 따른 변화

반응온도에 따른 acceptor products를 알아보았다(Fig. 5). 35°C를 제외한 나머지 조건에서는 중합도 2에서

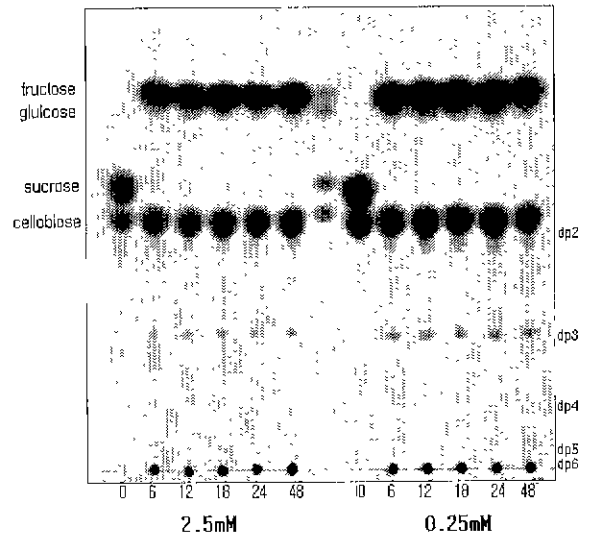
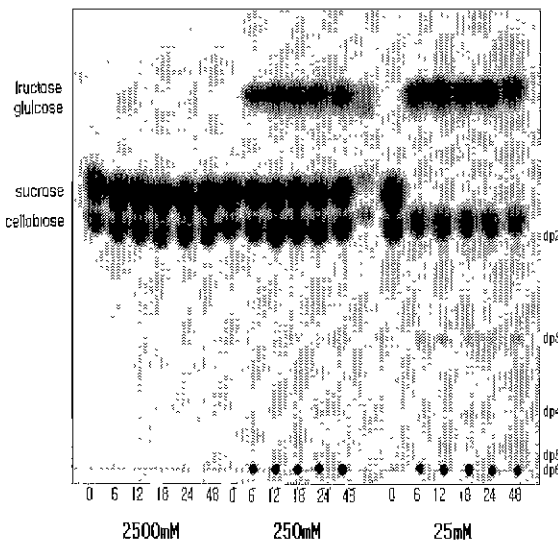


Fig. 3. TLC analysis of acceptor products in different ionic strength of Tris-acetate buffer.

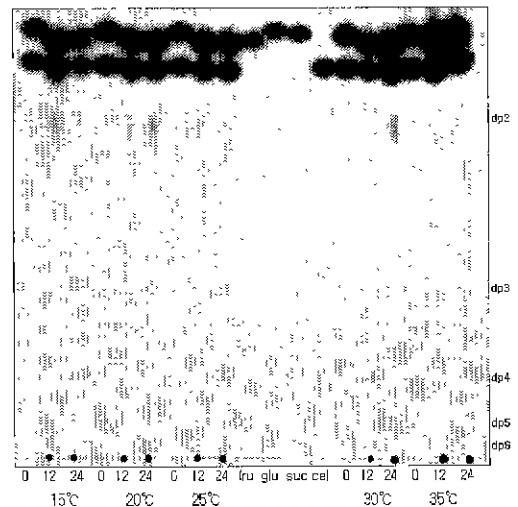
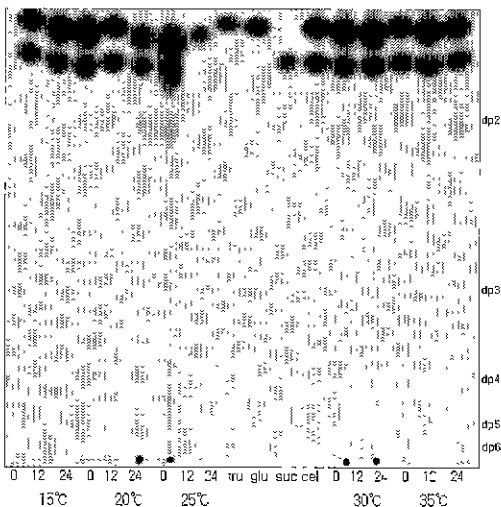


Fig. 4. TLC analysis of acceptor products in different pH.

Fig. 5. TLC analysis of acceptor products in different reaction temperature

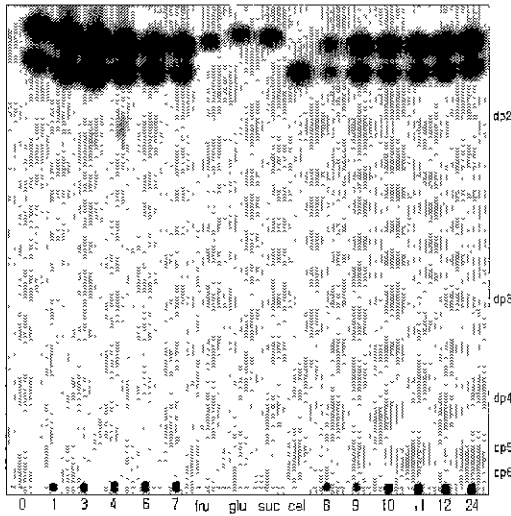


Fig. 6. TLC analysis of acceptor products according to the reaction time.

부터 중합도 6까지의 products가 확인되었으나, 15°C에서보다 20°C, 25°C, 30°C의 조건에서 더 선명한 product가 관찰되었다.

시간에 따른 변화

시간에 따른 acceptor products의 생성결과를 알아보았다(Fig. 6). 반응시작 후 3시간만에 중합도 2부터 6까지의 products가 생성되었고, 6시간만에 sucrose가 완전히 소모되면서 products의 생성이 선명하게 나타남을 확인하였다.

요 약

Cellobiose에 당전이 효소인 dextranucrase를 여러 가지 조건별로 반응시켜 올리고당의 생성경향을 알아보았다. Cellobiose에 대한 acceptor 반응의 최적조건은 cellobiose와 sucrose의 비율은 3:1, 효소의 양은 2 U/mL, buffer의 이온강도는 25 mM, pH는 5, 반응온도는 25°C로 나타났다. Cellobiose의 acceptor products는 중합도 6까지 생성되었으며, 구조는 2-O-1somalto-dextrinyl cellobiose로 추정하였다.

감사의 글

본 연구는 1998년도 한국과학재단의 국산연구기기 활용에 관한 연구비(98-0607-009-1)로 행한 결과의 일부이며 연구지원에 감사를 드립니다.

문 헌

1. Greminger, G.K. Jr. and Krumel, K.L. : *In handbook of Water-Soluble Gums and Resins*. Davidson, R.L. (ed.), McGraw-Hill, New York, Chapter 3 (1980)
2. Simeon, M.R., Munguia, A.L., Pelenc, V., Paul, F. and Monsan, P. : Production and use of glycosyltransferase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 for the synthesis of oligosaccharides containing α (1 \rightarrow 2) linkage. *Appl Biochem Biotechnol.*, **44**, 101-117 (1994)
3. Mansan, P. and Paul, F. : Enzymatic synthesis of oligosaccharides. *FEMS Microbiol Rev.*, **16**, 187-192 (1995)
4. Yan, T.R. and Liao, J.C. : Synthesis of cello-oligosaccharides from cellobiose with β -glucosidase II from *Aspergillus niger* *Biotechnol Lett.*, **20**, 591-594 (1998)
5. Gama, F.M. and Mota, M. : Cellulases for oligosaccharide synthesis : a preliminary study *Carbohydr. Poly.*, **37**, 279-281 (1998)
6. Cote, G.L. and Robyt, J.F. : Acceptor reactions of altermansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* B-1355. *Carbohydr Res.*, **111**, 127-142 (1982)
7. Fu, D. and Robyt, J.F. : Acceptor reaction of malto-dextrins with *Leuconostoc mesenteroides* B-512FM dextranucrase *Arch Biochem Biophys.*, **283**, 379-386 (1990)
8. Robyt, J.F. and Eldand, S.H. : Relative, quantitative effects of acceptors on the reaction of *Leuconostoc mesenteroides* B-512F dextranucrase *Carbohydr. Res.*, **121**, 279-286 (1983)
9. Robyt, J.F. and Walseth, T.F. : The mechanism of the acceptor reaction of *Leuconostoc mesenteroides* B512F dextranucrase *Carbohydr. Res.*, **154**, 229-238 (1986)
10. Su, D. and Robyt, J.F. : Control of the synthesis of dextran and acceptor-products by *Leuconostoc mesenteroides* B-512FM dextranucrase. *Carbohydr. Res.*, **248**, 339-348 (1993)
11. Robyt, J.F. : Mechanism in the glucanucrase synthesis of polysaccharides and oligosaccharides from sucrose. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **51**, 133-144 (1995)
12. Back, J.S., Kim, D.M., Lee, J.H., Chang, P.S., Han, N.S. and Robyt, J.F. : Enzymatic synthesis of new oligosaccharides using glucanucrases. *Kor. J. Appl Microbiol Biotechnol.*, **26**, 179-186 (1998)

(2000년 7월 29일 접수)