

## *Leuconostoc mesenteroides* B-742CB로부터 Dextranucrase를 Coding하는 유전자 분리 및 특성 연구

<sup>1</sup>박미란·<sup>2</sup>이소영·<sup>3</sup>류화자·<sup>4</sup>김호상·<sup>5</sup>강희경·<sup>6</sup>유선균·<sup>6</sup>조성용·<sup>8</sup>조동련·<sup>†3,6,7,8</sup>김도만·<sup>8</sup>김도원  
<sup>1</sup>진남대학교 의공학협동과정, <sup>2</sup>물질·생물화학공학과, <sup>3</sup>정밀화학공학과, <sup>4</sup>(주)녹십자, <sup>5</sup>촉매연구소 및 <sup>6</sup>공업기술연구소,  
<sup>7</sup>화학공학부 및 <sup>8</sup>강릉대학교 동해안해양생물자원연구센터  
(접수 : 2001. 3. 23., 게재승인 : 2001. 4. 23.)

### Cloning and Characterization of a Gene Coding for a Dextranucrase from *Leuconostoc mesenteroides* B-742CB

Mi-Ran Park<sup>1</sup>, So-Young Lee<sup>2</sup>, Hwa-Ja Ryu<sup>3</sup>, Ho-Sang Kim<sup>4</sup>, Hee-Kyoung Kang<sup>5</sup>, Sun-Kyun Yoo<sup>6</sup>,  
Seung-Young Cho<sup>6</sup>, Dong-Lyun Cho<sup>6</sup>, Doman Kim<sup>†2,6,7,8</sup>, and Do-Won Kim<sup>8</sup>

<sup>1</sup>Department of Biomedical Engineering, <sup>2</sup>Department of Fine Chemical, <sup>3</sup>Department of Materials · Biochemistry,  
Chonnam National University, <sup>4</sup>Korea Green Cross Corporation, <sup>5</sup>The Research Institute for Catalysis,  
<sup>6</sup>Engineering Research Institute, <sup>7</sup>Faculty of Chemical Engineering, <sup>8</sup>East Coastal Marine Bioresources Research  
center, Kangnung National University

(Received : 2001. 3. 23., Accepted : 2001. 4. 23.)

A gene encoding the dextranucrase(*dsCB*) that synthesizes mostly  $\alpha$ -(1→6) linked dextran with low amount(10%) of  $\alpha$ -(1→3) branching was cloned and sequenced from *Leuconostoc mesenteroides* B-742CB. The 6.1 kbp DNA fragment carrying *dsCB* showed one open reading frame(ORF) composed of 4,536bp. The deduced amino acid sequence shows that it begins from the start codon(ATG) at position 698 of the cloned DNA fragment and extends to the termination codon(TAA) at position 5,223. The enzyme is consisted of 1,508 amino acids and has an calculated molecular mass of 168.6kDa. This calculated Mw was in good agreement with an activity band of 170kDa on non-denaturing SDS-PAGE. A recombinant *E. coli* DH5  $\alpha$  harboring pDSCB produced extracellular dextranucrase in 2% sucrose medium, and synthesized both soluble and insoluble dextran. To compare the properties of enzyme with B-742CB dextranucrase, the acceptor reaction, hydrolysis of dextran and methylation were performed. The expressed enzyme showed the same properties as B-742CB dextranucrase, but its ability to synthesize  $\alpha$ -(1→3) branching was lower than that of B-742CB dextranucrase. In order to identify the critical amino acid residues known as conserved regions related to catalytic activity, Asp-492 was replaced with Asn. D492N resulted in a 1.6 fold decrease in specific activity.

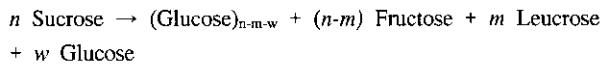
**Key Words** : dextranucrase, *Leuconostoc mesenteroides*, dextran, site-directed mutagenesis, SDS-PAGE

### 서 론

덱스트란수크라제(Dextranucrase; EC 2.4.1.5)는 sucrose로부터 덱스트란을 합성하는 효소로서 합성된 덱스트란은 주쇄에 glucose 단위가  $\alpha$ -(1→6)으로 연결된 다당으로서 덱스트란수크라제의 종류에 따라 가지결합의 종류[예;  $\alpha$ -(1→2),  $\alpha$ -(1→3) 및  $\alpha$ -(1→4)], 비율 및 길이가 각각 달라진다(1). 덱

스트란수크라제는 *Leuconostoc*과 *Streptococcus* 속의 미생물들로부터 주로 생산되는 세포외로 분비되는 glucanucrase이다. *Streptococcus* 속 균들에 의해 생산되는 효소는 constitutive하게 sucrose가 없는 배지에서도 생산되는 반면, *Leuconostoc* 속 균들은 sucrose가 효소의 유도물질로 요구된다. 그러나 Kim과 Robyt에 의해 개발된 *L. mesenteroides* B-742, B-1355, B-1299 및 B-512FM 등의 돌연변이들은 glucanucrase 생성에 있어서 sucrose의 요구성이 없어진 constitutive 돌연변이 균들이다(2,3). 이 돌연변이들은 배지 내에 glucose와 fructose가 sucrose 대신에 탄소원으로 제공되어도 활성효소를 생산하였다. Glucanucrase의 sucrose에 대한 반응기작은 다음과 같다(4).

†Corresponding Author : Faculty of Chemical Engineering,  
Chonnam National University, Gwangju 500-757  
Tel : +82-62-530-1844, Fax : +82-62-530-1849  
E-mail : dmkim@chonnam.chonnam.ac.kr



이 효소반응의 주된 산물은 고분자량의 덱스트란 (약  $10^7$ - $10^8$  Da)과 fructose이며 부산물로는 glucose와 leucrose (5-O- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-D- fructopyranose)가 생산된다. 효소 반응 중 sucrose 이외의 다른 탄수화물이 존재하면 작은 분자량의 올리고당이 생산된다. *L. mesenteroides* B-742는 효소 생산 배지에 sucrose 존재 시 두 종류의 덱스트란수크라제를 생산한다고 보고되고 있다. 한가지 효소는  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4) 가지 결합을 갖는 덱스트란을 합성하며, 다른 한가지 효소는 단일의  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3) 가지 결합된 glucose 잔기를 갖는 덱스트란을 합성한다(1, 2). *L. mesenteroides* B-742로부터, Kim과 Robyt은 덱스트란수크라제의 constitutive mutant인 *L. mesenteroides* B-742C를 얻었다. 다시 B-742C를 돌연변이하여 두 가지 다른 constitutive mutant인 B-742CA와 B-742CB를 분리하였다. B-742CB는 B-742가 2% sucrose가 포함된 배지에서 생산했던 것보다 2% glucose를 포함한 배지에서 더 높은 활성을 갖는 세포외로 분비되는 덱스트란수크라제를 생산한다. B-742CB로부터 생산된 덱스트란수크라제는 수용성과 불용성의 덱스트란을 모두 합성한다. 이 두가지 glucans(수용성과 불용성)은 모두 *endo-dextranase*에 의해 가수분해가 잘 안되는 편이며 구조면에서 동일하다고 보고되었다(2). *Leuconostoc* 속의 덱스트란수크라제 유전자에 관한 연구는 최근에 시작되었으며, 효소 활성에 관여하는 catalytic site와 dextran binding site에 관한 연구가 진행 중에 있다. 현재까지 연구된 *L. mesenteroides*의 덱스트란수크라제 유전자는 NRRL B-512F와 NRRL B-1299 그리고 NRRL B-1355 계열의 균이며, B-512FMCM 균으로부터는 *fnmcds*(9), B-742CB 균으로부터는 *dsrB742*(10)가 cloning되고 염기 서열이 분석되었다. NRRL B-512F에서 얻어진 덱스트란수크라제 유전자(*dsrS*)는 1527개의 아미노산으로 되어있고(13) 이 아미노산의 서열은 DSR-B, DSR-A, 그리고 *Streptococcus*균의 GTFs와 상당히 많은 homology를 가지고 있다(12). Monchois 등은 DSR-S의 활성에 영향을 미치는 중요한 아미노산을 확인하기 위하여 유전자중 4군데의 염기를 site-directed mutagenesis를 이용하여 변화 시켰다. 그 4군데는 D511N, D513N, D551N, H661R로 D511N, D551N은 dextran과 oligosaccharide의 합성을 완전히 억제하였고 D513N, H661R의 경우는 활성의 감소만을 보여주었다. 따라서 D511N과 D551N의 두 carboxyl group은 이 효소의 촉매작용에 있어서 필수적인 부분으로 생각되고 있다. 지금까지 연구되어 온 이러한 유전자들은 *E. coli*내에서 발현이 되어왔으며 발현된 덱스트란수크라제는 세포외로 분비되지 않고 모두 세포질 내에 존재하였다.

본 연구에서는 *L. mesenteroides* B-742CB로부터 10%의  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3) 결합의 가지 구조를 갖는 덱스트란을 합성하는 덱스트란수크라제를 coding하는 유전자를 세포외로 분리하는 clone을 얻고, 유전자의 DNA 염기서열과 아미노산 조성을 결정하고, 발현한 효소의 촉매작용에 관여하는 것으로 알려진 Asp-492를 asparagine으로 site-directed mutation시켜 효소 활성에 미치는 영향을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 사용균주, 벡터 및 배양 조건

본 실험에서 유전자분리를 위하여 사용한 균주는 *Leuconostoc mesenteroides* B-742CB이며 이 균은 덱스트란수크라제를 constitutive하게 생산한다. 클로닝을 위한 발현 숙주로는 *E. coli* DH5  $\alpha$  를, 벡터로서는 pGEM3Zf(-)(Promega, USA)를 사용하였다. *E. coli* BL21(DE3)pLysS, pRSET(Invitrogen, Netherlands) 플라스미드는 덱스트란수크라제 유전자의 발현을 위해 사용하였다. Site-directed mutagenesis를 위한 균주로는 QuickChange™ site-directed mutagenesis kit(Stratagene, USA)에 포함되어 있는 *Epicurian Coli* XL1-Blue supercompetent cell을 사용하였다. *Leuconostoc mesenteroides* B-742CB는 2%(w/v) glucose를 포함한 LM배지(1L의 종류수당 4 g yeast extract, 2 g pepton, 0.2 g MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.015 g CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 0.01 g FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.01 g NaCl, 2 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.01 g MnSO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O)에서 28°C로 배양하였다. *E. coli*의 생육배지로는 Luria-Bertani(LB) 액체 배지(1%(w/v) Trypton, 0.5%(w/v) yeast extract, 0.5%(w/v) NaCl)와 고체 배지(1.5%(w/v) agar 포함한 LB)에서 37°C로 배양하였으며, 형질전환된 *E. coli*는 ampicillin(50  $\mu$ g/mL)을 포함한 LB 배지를 사용하였다.

### 재료

제한효소는 Promega(USA), KOSCO(Korea) 및 Boehringer Mannheim(Germany)에서 구입하였고, T4 DNA ligase는 KOSCO(Korea)와 Promega(USA)에서 구입하여 사용하였다. Site-directed mutagenesis를 위한 효소와 시약은 Stratagene (USA)에서 구입하였다. 당류, 표준단백질, 기타 효소들은 Sigma사 (St. Louis, USA)의 제품이며, Tryptone 등의 배지성분들은 Difco 사(Difco laboratories, Detroit, USA)에서 구입하였다. 그 외의 시약은 1급 이상의 것을 사용하였다.

### 덱스트란수크라제 유전자 클로닝

*L. mesenteroides* B-742CB로부터 chromosomal DNA를 준비한 후 *Kpn* I 제한 효소로 부분절단하였다. 여기서 얻은 6-9kb 유전자 조각을 아가로스 겔 전기영동을 통하여 정제하여 *Kpn* I 으로 자른 후 탈인산화시킨 pGEM-3Zf(-)와 ligation 시켰다. 이 재조합 플라스미드를 *E. coli* DH5  $\alpha$  숙주 세포에 형질전환하였다. 형질전환된 재조합 *E. coli* DH5  $\alpha$ 는 5% 설탕과 100  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> ampicillin이 함유된 LB고체 배지를 이용하여 선별하였다(14).

### DNA 염기서열분석

*L. mesenteroides* B-742CB 덱스트란수크라제 유전자의 sequencing은 GeneAmp 9600 thermal cycler와 DNA sequencing system(model 373-18, Applied Biosystems)을 이용하여 ABI PRISM Cycle Sequencing Kit(Perkin Elmer)를 가지고 결정하였다.

### 덱스트란수크라제 유전자의 발현

B-742CB 덱스트란수크라제 유전자를 발현시키기 위해, insert DNA를 pRSETC vector에 ligation 한 후, *E. coli*

BL21(DE3)pLysS에 형질전환 하였다. 이 플라스미드내에서 유전자는 T7 promotor의 조절하에 있게되어 isopropyl- $\alpha$ -D-thiogalactoside(IPTG)에 의해 유도된다. 형질전환하여 선별된 콜로니를 5 mL ampicillin(50  $\mu$ g/mL)을 포함한 LB 액체 배지에서 28°C, 16시간 배양하였다. 그 중 1/100부피를 다시 LB배지에 접종하여 OD<sub>600nm</sub>로 0.2 될 때까지 배양하였다. 이때 최종 농도가 0.4 mM 되게 IPTG를 넣어서 28°C에서 일정 시간 간격으로 6시간까지 sampling하여 시간에 따른 발현 정도를 알아보았다. 시간별로 각각 1 mL씩 sampling한 시료는 원심분리하여 세포를 모은 후에 100  $\mu$ L의 20 mM Na-acetate buffer(pH 5.2)를 첨가한 후 초음파 파쇄기를 이용하여 파쇄하였다. cell-free extract를 준비하여 SDS-PAGE로 단백질 패턴을 확인하였으며 100 mM sucrose와 28°C에서 반응하여 활성을 확인하였다.

### Site-directed mutagenesis

텍스트란수크라제 유전자(dsCB)의 492번째의 아미노산인 Asp를 Asn으로 point-mutation시키기 위하여, 변화 시키고자 하는 아미노산 잔기의 한 nucleotide를 바꿔서 mutagenic oligonucleotide를 합성하였다. 사용한 primer는 D492N-F는 ACTCTACTCGCTAATAATGATGACAACTCTAATC이었고 D492N-R는 GATTAGAGTTGCTACATATTAGCGAGTAA GAGT이었다. 원하는 point mutation된 텍스트란수크라제 유전자를 얻기 위하여 PCR을 수행하였다. PCR 조건은 template DNA(pDSCB) 2  $\mu$ L(50 ng/ $\mu$ L), D492N-F와 D492N-R를 각각 1.25  $\mu$ L(100 ng/ $\mu$ L), dNTP 1  $\mu$ L, reaction buffer(100 mM KCl; 100 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 200mM Tris-HCl/pH 8.8; 20 mM MgSO<sub>4</sub>; 1% Triton X-100; 1 mg/mL nuclease-free bovine serum albumin(BSA)) 5  $\mu$ L, pfuTurbo™ DNA polymerase (2.5 U/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L를 사용하여 최종 반응 부피가 50  $\mu$ L가 되게 반응시켰다. PCR 반응은 GeneAmp 2400(Perkin Elmer)을 이용하였으며 맨 처음의 DNA를 95°C에서 5분간 denaturation 시켰고, 두 번째 cycle부터는 DNA denaturation을 95°C에서 45초, annealing은 55°C에서 60초, elongation은 68°C에서 18분으로 하는 cycle을 총 20회 실시하고 마지막 cycle에서 denaturation 반응은 95°C에서 45초, annealing 반응은 55°C에서 60초, elongation 반응은 68°C에서 10분간 하였다. PCR이 끝난 후, 0.8% agarose gel을 이용하여 전기영동하여 원하는 크기의 DNA를 확인하였다. Nonmutated parental DNA template를 제거하기 위해 각 반응액에 1  $\mu$ L의 DpnI(10 U/ $\mu$ L)을 섞어 37°C에서 1시간 반응시켰다. 각각의 DpnI이 처리된 DNA 1  $\mu$ L를 *Epicurian Coli* XLI-Blue competent cell에 조심스럽게 섞어 ice상에서 30분간 정지하였다. 그후 42°C에서 45초간 heat shock하여 ice에서 2분간 놓아둔 후, 42°C로 예열된 0.5ml LB 액체배지를 섞어 37°C에서 1시간 동안 배양하였다. 각각의 형질 전환된 cell은 5%의 sucrose와 50  $\mu$ g/ $\mu$ L의 ampicillin이 함유된 LB배지 (LBSA) 고체배지에 도말하여 37°C에서 8시간 배양 후, 28°C로 옮겨 16시간 배양하여 mucous한 cell과 non-mucose한 mutant들을 구별하여 선별하였다.

### 텍스트란수크라제의 정제

텍스트란수크라제 유전자(dsCB) 재조합체로 형질전환된 *E. coli* DH5  $\alpha$ 를 2% sucrose와 50  $\mu$ g/ $\mu$ L ampicillin을 포함한 LB배지에 접종하여 28°C에서 27시간 동안 배양하였다. 이 배양액을 원심분리(8,000 rpm, 15 min)후 상등액을 회수하여 1차 효소액으로 사용하였다. 회수한 1차 효소액을 농축하기 위해 polyethyleneglycol(PEG, Mw=1,500, 50% w/v in H<sub>2</sub>O)을 최종 농도 20%가 되도록 천천히 첨가해 주었다. 1시간동안의 교반을 통하여 포화시킨후 원심분리하여 텍스트란이 많은 층에서 텍스트란수크라제 활성을 회수하였다(15). 이 PEG 농축액에 dextranase를 1 unit/mL로 첨가하여 실온에서 24시간 동안 교반 후 원심분리를 통하여 침전물을 제거한 후, 1 mM CaCl<sub>2</sub>가 포함된 20 mM sodium acetate buffer(pH 5.4)에 투석하였다. 이 투석액을 단백질 분리에 이용할 조효소액으로 사용하였다. 조효소액을 동일 buffer로 평형화시킨 DEAE-Sephrose CL-6B 이온교환 컬럼에 흡착시키고, 같은 완충 용액으로 5배의 부피로 결합되지 않는 단백질을 세척하였다. 흡착된 단백질은 NaCl 농도를 0-0.5 M까지 단계적으로 증가시키면서 60 mL/hr의 유속으로 용출시켰다. 각각의 분획은 2.5 mL/tube이었다.

텍스트란수크라제 활성을 보이는 분획(0.1 M NaCl로 elution 된 부분)을 투석막에 넣어 PEG(15,000-20,000)를 이용하여 농축하여, 농축된 단백질을 동일한 buffer로 평형화시킨 Phenyl-sepharose 컬럼(2×13 cm)에 흡착시키고, 흡착된 단백질은 buffer의 이온강도를 단계적으로 감소시키면서 90 mL/hr의 유속으로 용출시켰고, 용출 분획은 3 mL/tube이었다. 효소의 정제 여부를 알기 위해서 각 시료는 Laemmli의 방법에 의해 Tris-glycine buffer(pH 8.8)로 준비된 8% polyacrylamide gel로 50 mA에서 전기영동하였다(18). 전기영동이 끝난 후, gel은 염색 용액(2.75 g Coomassie Brilliant Blue R-250, 100 mL 초산, 500 ml 메탄올, 500 mL 증류수)에 담귀 30분 동안 흔들며 주면서 염색하였으며, 탈색은 탈색용액[10%(v/v) 메탄올, 10%(v/v) 초산] 300 mL를 3-4번 바꾸어 주면서 수행하였다. 정제 단백질의 크기는 Bio-Rad사의 표준 단백질(kDa-Myosin 200,  $\beta$ -Galactosidase 116, Phosphorylase b 97.4, Serum albumin 66.2, Ovalbumin 45, Carbonic anhydrase 31, Trypsin inhibitor 21.5, Lysozyme 14.4, Aprotinin 6.5kDa)을 기준으로 하여 결정하였다. Dextranucrase 활성 밴드를 gel 상에서 확인하기 위하여, SDS-PAGE(boiling하지 않은 non-denaturing condition)한 gel은 20mM sodium acetate buffer(pH 5.2)에서 1시간 동안 세척하였다. 세척한 gel은 100 mM sucrose 용액에 넣어 28°C에서 16시간 동안 반응 후 Periodic acid-Schiff 방법에 따라 활성 밴드를 확인하였다(17).

### 효소의 특성 분석

효소의 활성측정은 기질로는 20 mM sodium acetate buffer(pH 5.2)에 녹여 준비한 100 mM sucrose를 사용하여 28°C에서 측정하고 TLC를 통하여 분석하였다(18). 효소의 1 U은 1분당 효소 1 mL당 sucrose로부터 유리되는 fructose의  $\mu$ mol수로 표현한다. 수용체 반응은 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mg/mL Tween80이 포함된 20 mM sodium acetate buffer(pH 5.2)에 녹여서 준비한 100 mM sucrose와 수용체로 100 mM maltose

를 모균의 효소인 B-742CB 텍스트란수크라제와 재조합 *E. coli*로부터 얻은 텍스트란수크라제(0.2 unit/mL)와 혼합하여 28°C에서 16시간 동안 반응하였다. 반응산물을 확인하기 위하여, 반응액 1 µL를 취하여 TLC plate에 점적한 후 nitromethane/1-propanol/water(2/5/2 v/v/v)에서 두 번 전개하였다. 분리된 탄수화물의 성분은 TLC plate를 0.3%(w/v) N-(1-naphthyl) ethylenediamine과 5%(v/v) 황산을 함유한 발색 시약을 이용하여 확인하였다(19). 재조합 *E. coli*를 LBS(2%) 배지에서 27시간 배양 후, 원심분리(8,000 rpm)하여 상등액에서 효소를 분리하였다. 얻은 효소액은 100 mM sucrose(pH 5.2)와 1:1로 반응시켜 sucrose가 전부 분해되었음을 확인한 후, 에탄올 침전을 통하여 polymer를 회수하였다. 남아있는 잔당을 제거하기 위하여 증류수로 3번 세척한 후, 재침전하여 회수하였다. 텍스트란을 1% 농도로 준비하여 *Penicillium dextranase*(60U/ml)를 37°C, 16시간 반응하여 반응산물을 확인하였다. 재조합 *E. coli*에 의해 생산된 polymer의 구조를 확인하기 위하여 methylation을 행하였다. 준비된 polymer를 Hakomori시약으로 methylation하고, 2M trifluoroacetic acid로 산 가수분해 후에 가수분해 산물들을 TLC plate에 점적한 후 acetonitrile/chloroform/methanol (3/9/1, v/v/v)로 분석하였다(20). 단백질은 Bradford 방법(21)으로 흡광도를 595nm에서 측정하여 정량화 하였으며, bovine serum albumin(Sigma Co., A-7517, USA)을 표준물질로 사용하였다.

## 결과 및 고찰

### B-742CB 텍스트란수크라제 유전자의 cloning

*Leuconostoc mesenteroides* B-742CB로부터 chromosomal DNA를 순수 분리하여 제한효소인 *PstI*로 부분 절단하고, 부분 절단된 chromosomal DNA 중 3-6Kb사이의 DNA를 *PstI* 과 CIAP(Calf Intestinal Alkaline Phosphatase)로 처리된 pGEM3Zf(-)에 삽입하여, *E. coli* DH5 α에 형질전환시킨 후에 LBSA 고체배지에 도말하여 mucose한 물질을 생성하는 형질전환체를 얻었다. 이 형질전환체가 합성한 텍스트란은 *L. mesenteroides* B-742CB 균으로부터 얻어진 텍스트란수크라제 유전자(*pdsrB742*)의 형질전환체로부터 합성한 텍스트란보다 가지 결합구조의 양이 많았다(10). 이 형질전환체로부터 플라스미드 DNA를 추출하여 전기영동하여 본 결과 삽입 DNA의 크기가 6.1kb임을 알 수 있었다.

### DNA 염기서열과 아미노산 서열 결정

본 연구에서 얻어진 dsCB를 가지고 있는 6.1kb의 DNA fragment의 염기서열은 Figure 1과 같이 4,536 bp의 염기로 구성되어진 하나의 open reading frame(ORF)을 가지고 있다. 추정된 아미노산 서열은 확인된 염기서열의 698번째 nucleotide 위치의 start codon(ATG)으로부터 5,223번째 위치의 stop codon(TAA)까지 위치한다. 구조 유전자의 아미노산은 1,508개로 구성되어있고 분자량은 계산에 의하면 168.6 kDa이었다. 추정되는 ribosome-binding site 염기서열(AGGA)은 번역 개시 codon 위쪽으로 4개의 nucleotides에 위치하였다(10). DSCB 아미노산 서열에서 sucrose binding site[ANFDGIRVD AVDNVDADLLQI]를 확인할 수 있었으며, DSCB의 Asp-533

은 Mooser 등(22)에 의해 *S. sobrinus* GTF의 active site의 일부분으로 확인된 Asp-453과 *S. mutans* GTF(23)의 Asp-451에 대해 homology를 가지고 있었다. 또한 Funane 등(24)에 의해서 제안된 glucosyl-transfer site[GGFELLANDVDNSNPVVQ AEQLN]가 483에서 506까지의 아미노산 위치에서 확인되었다. Asp-492, Asp-494와 His-642는 GTFC(7)와 DSRS(13)의 효소 활성에 대해 필수적인 아미노산으로 확인된 conserved 잔기들과의 homology를 보여주었다. DSCB 아미노산 서열에서도 일반적인 glucanucrase에서 확인된 glucan-binding domain의 특별한 아미노산 서열을 확인할 수 있었고 주로 C-terminal에 존재함을 볼 수 있었다. 이들은 Figure 1에서 A repeat, C repeat, 그리고 N-repeat 등으로 표시하였다.

### 텍스트란수크라제 유전자의 발현

B-742CB 텍스트란수크라제 유전자를 발현시키기 위해, insert DNA인 dsCB를 pRSETC vector에 ligation한 후, *E. coli* BL21(DE3)pLysS에 형질전환 하였다. 선별된 콜로니로부터 유전자의 발현과 시간에 따른 발현정도를 알아보기 위해서 IPTG를 넣어서 유전자를 발현시켰다. 시료는 시간별로 0시간, 0.5시간, 1시간, 2시간, 3시간, 4시간에 채취하여 IPTG 유도 시간에 따른 텍스트란수크라제 유전자의 발현정도를 알아 보았다. 그 결과 IPTG 유도 3시간 후의 시료에서 가장 높은 효소 활성이 확인되었으며, activity staining을 실시하여 증가된 활성 정도를 확인하였다(Figure 2).

### Site-directed mutagenesis

*L. mesenteroides* B-512F의 텍스트란수크라제 유전자를 갖는 형질전환체(DSR-S)에서 알려진 효소 활성 부위로 예측되는 D511과 D513에 해당하는 아미노산(13)을 DSCB의 아미노산 조성에서도 확인할 수 있었고 각각은 D492와 D494였으며, 이중 D492의 효소 활성에 관련된 특성을 확인하고자 site-directed mutagenesis를 수행하였다. 각각의 mutagenic oligonucleotide를 이용하여 PCR을 수행한 결과 약 9.3kb의 원하는 크기 band가 합성되었음을 확인하였다. PCR product 중 nonmutated parental DNA template를 제거하기 위하여 *DpnI*를 처리하였다. 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 후, *Epicurian Coli* XL1-Blue competent cell에 형질전환하였다. 형질전환된 콜로니 중에서 point mutation된 유전자를 갖는 콜로니를 선별하기 위해서 5% sucrose를 포함하는 LBA 고체배지에 도말하여 37°C에서 8시간 배양한 후, 텍스트란수크라제의 발현을 유도하기 위하여 28°C로 옮겨 overnight 배양하였다. 그 결과 각각의 plate로부터 mucous(+)-한 형태와 non-mucous(-)한 형태의 콜로니들을 관찰할 수 있었다. 이러한 각기 다른 형태(+, -)의 형질전환주 중에서 원하는 유전자를 갖는 콜로니를 확인하기 위하여, 각각의 플라스미드를 준비하여 nucleotide sequencing에 사용하였다. Mutation된 dsCB 유전자의 nucleotide sequence를 확인하기 위하여, forward primer (DMK3D1D2F: ATCATTTACAAAACGGCGC TTTGACTTTTCG)와 reverse primer (DMK3D1D2R: ACTATCG TGTG CGCGAA CAAAGCTGTAATT)를 합성하여 사용하였다. Sequencing을 하여 염기서열을 확인해본 결과, Asp-492→Asn(D492N)의 mutant를 얻을 수 있었다. 각 mutant의 증가되

1 CTGCAGCTAAACTCACTTTAACTATTGCTGGTTTTTTGAGAAAATAATCAACCACGTCG  
 61 CACCATAATTTAAAAAACCACTAGCAAACACTAATAAAGGTATATCGATAGGTAATGGTT  
 121 TTTGAAGTATCATGTCCAAATACAGTATGATGACAATAGGTGTTAAAACAAAATACAGAC  
 181 GACCAATGGCCGGACTGATATAATAAACACCAAAATAGCGAGTAAATAATATAAATAGA  
 241 TATTACCAAATACTAATTTAGAGACAGATAATAAGCTATATATTTATGGCAAAAACACCA  
 301 CAACCGTAATCAATTGCCATACCAACGTATTAGGTTTCTCCAGAAAATTTAAAATTGTCA  
 361 ATACTTTGATGCCTAATCCAATAACCATTTGTCGATAATATCAAGGTAATAATTATTACCG  
 421 TCCACATAGGTCCTCCCAAAATCCACACATTGCATTAAAAACGACACTAACACTACACA  
 481 TTTTATCATATAAATTACATAAAACATATTAAGAAGAATCCCGTGATATAGCGCTCTTAT  
 539 CAACTAAAAAAGCGAGCGGCCATTATTTTATCACTTTATAAATATTGTTTATTTTATAT  
 601 GTTAAAGAATTGTTAATCGTTTGTGAAATGATATAAGTTCGTAATTTTATAGCTTATAAT

-35

-10

661 TCATTTGTTTCAAAGAATAATCACAAATGGAGGAGAGAATGTTTATGATTAAAGAGAGAA  
 1 RBS M F M I K E R  
 721 ATGTACGAAAAAAGCTCTACAAGTCTGGTAAGAGTTGGGTTATTGGGGGACTCATTTTAT  
 8 N V R K K L Y K S G K S W V I G G L I L  
 781 CGACAATTATGCTGTCTATGACCGCTACTTCACAAAATGTTAATGCAGATAGCACAAACA  
 28 S T I M L S M T A T S Q N V N A D S T N  
 841 CAGTGACGGATAAGTCAGTTACTGGCTCCAATAATTCGAATACAACCAATCAACACGATA  
 48 T V T D K S V T G S N N S N T T N Q H D  
 901 CTGTCGTTGACAAACAACGATACCTGTCAAAAATGACCAAACAACACAACAAATCGCCG  
 68 T V V D K Q T I P V K N D Q T T Q Q I A  
 961 CAAATGCCACCCAAGCAGAAAAAGTAAAAGCATCAGACACAACGACTGATACGCAAAAGC  
 88 A N A T Q A E K V K A S D T T T D T K Q,  
 1021 AAGCTGAAACGGCAAACAACACTTACAAGGATTCGATAGATAATCTCACCAAGCAGTTGC  
 108 A E Q T A N N T Y K D S I D N L T K Q L  
 1081 CGGCTGTTACCAACAGCTAATCAAAAAACTGGTTATCTGGAAAAAGATGGTAAATGGT  
 128 P A V T P T A N Q K T G Y L E K D G K W  
 1141 ACTATGTAACCAGTGATAACACACTTGCTAAGGGGTTGACTACTGTTGACAACCACAAGC  
 148 Y Y V T S D N T L A K G L T T V D N H K  
 1201 AGTATTTTGACAACAATGGCGTGCAAGCAAAAAGGCAATTCGTTACCGATAACAGTAAAA  
 168 Q Y F D N N G V Q A K R Q F V T D N S K  
 1261 CATACTATCTCGATCCTAACTCCGGTAACGCAGTAACCGGGATAACAATAATTGGCTCAC  
 188 T Y Y L D P N S G N A V T G I Q Q I G S  
 1321 AAACATTAGCCTTCAATGACAACGGTGAACAAGTTTTTGGCTGATTTCTATACAGCGCCAG  
 208 Q T L A F N D N G E Q V F A D F Y T A P  
 1381 ATGGCAAAACTTATTATTTTGACGATAAAGGACAAGCAACTATTGGTCTAAAGGCCATTA  
 228 D G K T Y Y F D D K G Q A T I G L K A I  
 1441 ATGGGCACAATTACTTCGATAGTTTGGGACAACATAAAAAAGGATTTACCGGTGTCA  
 248 N G H N Y Y F D S L G Q L K K G F T G V  
 1501 TTGACGGTCAAGTACGCTATTTTGGATCAAGAATCAGGACAAGAGGTATCAACAACCGACT  
 268 I D G Q V R Y F D Q E S G Q E V S T T D  
 1561 CACAAATCAAAGAAGGTTTAACTTCTCAGACAACAGACTATACAGCACATAATGCCGTTT  
 288 S Q I K E G L T S Q T T D Y T A H N A V

1621 ACAGCACCGATAGCGCTGATTTTCGACAATTTTAATGGTTATTTGACCGCTTCTTCATGGT  
 308 H S T D S A D F D N F N G Y L T A S S W  
 1681 ATCGCCCTAAAGATGTTTTAAGAAATGGTCAACACTGGGAAGCAACAACAGCTAATGACT  
 328 Y R P K D V L R N G Q H W E A T T A N D  
 1741 TCCGGCCCATTTGTGTCAGTTTGGTGGCCTAGCAAGCAAACACAAGTAAATTACCTAAACT  
 348 F R P I V S V W W P S K Q T Q V N Y L N  
 1801 ACATGTCTCAAATGGGACTCATTGACAATCGTCAGATGTTCTCGCTAAAAGACAATCAAG  
 368 Y M S Q M G L I D N R Q M F S L K D N Q  
 1861 CCCTGTTGAATATTGCTTGCACAACAGTCCAACAAGCAATTGAACCAAAAATCGGTGTGG  
 388 A L L N I A C T T V Q Q A I E P K I G V  
 1921 CTAATAGTACAGCATGGCTTAAAACAGCCATTGATGATTTTCATTTCGTACACAGACCCCAT  
 408 A N S T A W L K T A I D D F I R T Q T P  
 1981 GGAACATGTCGAGTGAAAATCCCAAAAATGATCATTTCACAAAACGGCGCTTTGACTTTCG  
 428 W N M S S E N P K N D H L Q N G A L T F  
 2041 TCAACAGTCCATGCACACCAGATACTAACTCTTATTTTCAGACTATTAATTCGCACACCAA  
 448 V N S P C T P D T N S Y F R L L N R T P  
 2101 CAAACCAGACAGGTGTGCCAAAATATACAATTGATCAATCTAAGGGTGGTTTTGAACTCT  
 468 T N Q T G V P K Y T I D Q S K G G F E L  
 2161 TACTCGCTAATGATGTAGACAACCTCTAATCCTGTTGTGCAAGCTGAGCAGTTAAATTGGT  
 488 L L A N D V D N S N P V V Q A E Q L N W  
 2221 TACACTATTTGATGAATTTTGGTAGCATTACAGCAAACGATTCTGCTGCTAATTTTGATG  
 508 L H Y L M N F G S I T A N D S A A N F D  
 2281 GGATACGTGTCGATGCTGTGCGATAATGTTGACGCTGATTTACTCCAGATTGCAGCAGATT  
 528 **G I R V D A V D N V D A D L L Q I A A D**  
 2241 ATTTCAAAGCTGCTTATGGTGTGATAAAAATGACGCAACAGCAAATCAACATCTTTCAA  
 548 Y F K A A Y G V D K N D A T A N Q H L S  
 2401 TTCTTGAAGATTGGAGCCATAACGACCCCTGAATACGTGAAGGATTTTGGTAATAATCAAC  
 568 I L E D W S H N D P E Y V K D F G N N Q  
 2461 TCACAATGGATGATTACATGCATACCCAGTTAATCTGGTCCTTGACTAAAGATATGCGTA  
 588 L T M D D Y M H T Q L I W S L T K D M R  
 2521 TGCGTGGTACCATGCAACGCTTCATGGACTATTACCTCGTCAATCGAAATCACGATAGTA  
 608 M R G T M Q R F M D Y Y L V N R N H D S  
 2581 CCGAAAACACTGCCATTCCAAATTACAGCTTTGTTTCGCGCACACGATAGTGAAGTACAAA  
 628 T E N T A I P N Y S F V R A H D S E V Q  
 2641 CAGTCATTGCTCAAATTATTTCTGAGTTACATCCCGACGTAAAAAATAGTTTGGCACCAA  
 648 T V I A Q I I S E L H P D V K N S L A P  
 2701 CAGCAGACCAGCTAGCCGAAGCCTTTAAAATTTATAATAACGATGAAAAACAGGCGGATA  
 668 T A D Q L A E A F K I Y N N D E K Q A D  
 2761 AGAAATATACACCAAATCCAACATGCCTAAGCGCCTATGCGATGCTGTTAACTAATAAAG  
 688 K K Y T P N P T C L S A Y A M L L T N K  
 2821 ATACAGTACCGCGCGTATTATTATGGTGTATTTATACACCGATGATGGTCAATATATGGCAA  
 708 D T V P R V Y Y G D L Y T D D G Q Y M A  
 2881 ATAAGTCCCCTTATTTTGTATGCCATCAACGGCTTGCTAAAGTCACGTATCAAATATGTTG  
 728 N K S P Y F D A I N G L L K S R I K Y V

2941 CTGGTGGTCAGTCAATGGCTGTTGATCAAAAACGATATCCTGACAAATGTTTCGTTATGGTA  
 748 A G G Q S M A V D Q N D I L T N V R Y G  
 3001 AAGGTGCCATGAGTGTGACAGATAGCGGTAATGCAGACACACGAACACAAGGTATTGGTG  
 768 K G A M S V T D S G N A D T R T Q G I G  
 3061 TGATTGTCAGTAATAAAGAAAATCTGGCCTTAAAATCAGGCGACACGGTGACATTACACA  
 788 V I V S N K E N L A L K S G D T V T L H  
 3121 TGGGTGCCGCTCACAAAAATCAAGCATTCAAGATTATTATTAGGGACAACCTGCTGACAATT  
 808 M G A A H K N Q A F R L L L G P T A D N  
 3181 TGTCTTATTATGATAATGACAACGCCCCAGTAAAGTACACCAATGATCAGGGCGATTAA  
 828 L S Y Y D N D N A T V K Y T N D Q G D L  
 3241 TTTTTGATAAATACTGAAATCTATGGTGTCCGTAACCCGCAAGTCTCTGGCTTCTTAGCTG  
 848 I F D N T E I Y G V R N P Q V S G F L A  
 3301 TTTGGGTGCCCTGTTGGGGCTGACAGCCATCAAGACGCGGTAAGTCTTGTCTGACGACACAG  
 868 V W V P V G A D S H Q D A R T L S D D T  
 3361 CCCATCATGATGGCAAAACCTTCCACTCAAATGCTGCTTTAGATTCTCAGGTTATTTACG  
 888 A H H D G K T F H S N A A L D S Q V I Y  
 3421 AAGGTTTTTCAAATTTCCAAGCTTTTGCCACAAACACTGAAGACTATACAAATGCTGTCA  
 908 E G F S N F Q A F A T N T E D Y T N A V  
 3481 TTGCAAAAAATGGTCAGTTATTCAAAGATTGGGGTATCACAAGTTTCCAGTTGGCACCAC  
 928 I A K N G Q L F K D W G I T S F Q L A P  
 3541 AATATCGTTCAAGCACCGATACCAGTTTCTTAGATTCAATTATCCAAAATGGTTATGCCT  
 948 Q Y R S S T D T S F L D S I I Q N G Y A  
 3601 TTACAGATCGTTATGATTTAGGCTACGGTACACCAACAAAATATGGCACAGTTGACCAGT  
 968 F T D R Y D L G Y G T P T K Y G T V D Q  
 3661 TACGCGATGCCATCAAGGCTCTGCACGCAAATGGCATCCAAGCAATCGCTGACTGGGTAC  
 988 L R D A I K A L H A N G I Q A I A D W V  
 3721 CCGACCAAATTTATAATTTACCGGGTCAAGAATTAGCGACCGTCACCCGAACAAACTCTT  
 1008 P D Q I Y N L P G Q E L A T V T R T N S  
 3781 ATGGTGATAAAGACACTAACTCAGATATTGATCAGTCACTATATGTCATACAAAGTCGTG  
 1028 Q G D K D T N S D I D Q S L Y V I Q S R  
 3841 GTGGTGGTAAATACCAAGCACAGTATGGCGGTGCCTTCTTATCCGATATCCAGAAAAAAT  
 1048 G G G K Y Q A Q Y G G A F L S D I Q K K  
 3901 ATCCAGCACTTTTCGAAACAAAACAAATTTCTACAGGGCTACCTATGGATCCTAGTCAGA  
 1068 Y P A L F E T K Q I S T G L P M D P S Q  
 3961 AAATAACAGAATGGTCTGGTAAATACTTTAATGGCTCAAATATTCAAGGCAAAGGGGCTG  
 1088 K I T E W S G K Y F N G S N I Q G K G A  
 4021 GCTATGTCTTGAAGGACAGTGGTACCGATCAATACTATAAGGTTACATCAACCAATAATA  
 1108 G Y V L K D S G T D Q Y Y K V T S T N N  
 4081 ATCGTGAAGTCTTGGCAAAACAATTAACAGATGACTTATCTGAAACCGGATTTGTCCGCG  
 1128 N R D F L P K Q L T D D L S E T G F V R  
 4141 ATAACATTGGTATGGTCTATTACACACTGAGTGGCTATCTAGCTCGAAACACCTTTATAC  
 1148 D N I G M V Y Y T L S G Y L A R N T F I  
 4201 AAGATGATAATGGCAATTATTACTTTGATAGCACCGGCCATCTCGTTACTGGCTTCC  
 1168 Q D D N G N Y Y Y F D S T G H L V T G F

(A repeat)

4261 AGAATATTAATAACCATCACTATTTCTTCCTACCAAACGGTATTGAACTCGTTCAATCTT  
 1188 Q N I N N H H Y F F L P N G I E L V Q S  
 4321 TCTTACAGAATGCTGACGGTTC AACGATTTATTTTGACCAAAAAGGGCGTCAAGTATTTA  
 1208 F L Q N A D G S T I Y F D Q K G R Q V F

(C repeat)

4381 ATCAATACATTACTGACCAAACCGGTACCGCCTATTACTTCCAGAATGATGGCACAATGG  
 1228 N Q Y I T D Q T G T A Y Y F Q N D G T M  
 4441 TCACTTCTGGCTTCACTGAAATCGATGGTCATAAGCAATACTTCTACAAGAACGGCACAC  
 1248 V T S G F T E I D G H K Q Y F Y K N G T

(C repeat)

4501 AAGTCAAAGGGCAATTTGTATCAGACACTGATGGTCACGTTTTCTACTTAGAAGCTGGTA  
 1268 Q V K G Q F V S D T D G H V F Y L E A G  
 4561 ACGGCAACGTGGCGACACAAAGATTTGCACAAAATAGTCAAGGTCAGTGGTTCTATTTGG  
 1288 N G N V A T Q R F A Q N S Q G Q W F Y L

(A repeat)

4621 GTAATGATGGCATTGCCTTGACTGGTTTTGCAACCAATCAATGGTGTTCAAAATTATTTCT  
 1308 G N D G I A L T G L Q P I N G V Q N Y F  
 4681 ACGCCGATGGTCATCAAAGTAAGGGTGATTTTATTACGATACAAAATCACGTATTATATA  
 1328 Y A D G H Q S K G D F I T I Q N H V L Y  
 4741 CTAACCCACTAACTGGCGCTATAACGACAGGTATGCAACAAATTGGTGACAAGATTTTTG  
 1348 T N P L T G A I T T G M Q Q I G D K I F

(N repeat)

4800 TCTTTGACAATACGGGCAACATGTTGACCAATCAATACTATCAAACACTAGATGGCCAAT  
 1368 V F D N T G N M L T N Q Y Y Q T L D G Q

(N repeat)

4861 GGTACATTTAAGCACTCAAGGTCCAGCAGACACTGGTTTGGTAAACATTAATGGTAATT  
 1388 Q L H L S T Q G P A D T G L V N I N G N

(N repeat)

4921 TGAAATATTTCCAAGCTAATGGTTCGGCAAGTGAAAGGTCAATTTGTGACTGATCCTATCA  
 1408 L K Y F Q A N G R Q V K G Q F V T D P I  
 4981 CGAACGTGAGTTATTATATGAATGCCACTGATGGTTCGGCAGTATTTAATGACTACTTTA  
 1428 T N V S Y Y M N A T D G S A V F N D Y F

(N repeat)

(N repeat)

5041 CCTATCAAGGCCAATGGTATTTAACGGATAGTAATTATCAACTCGTCAAAGGATTTAAAG  
 1448 T Y Q G Q W Y L T D S N Y Q L V K G F K

(N repeat)

5101 TTGTTAATAATAAGCTACAACATTTTGATGAAATAACAGGCGTACAAACTAAATCAGCTC  
 1468 V V N N K L Q H F D E I T G V Q T K S A  
 5161 ATATCATCGTTAATAATCGAACATACATTTTCGATGACCAAGGTTACTTTGTCTCAGTCG  
 1488 H I I V N N R T Y I F D D Q G Y F V S V

(N repeat)

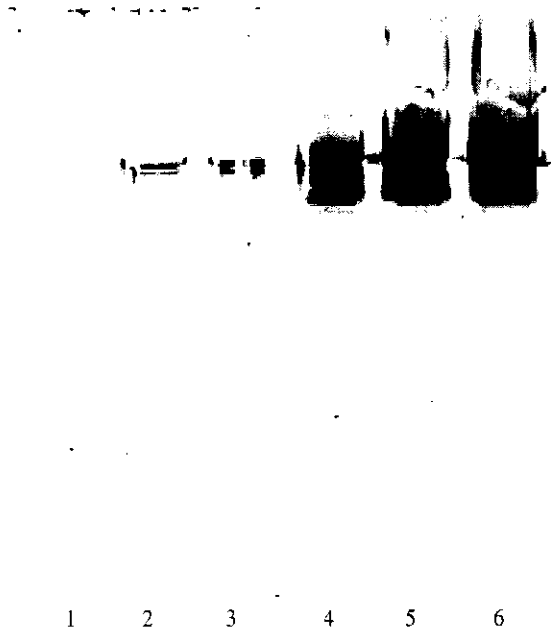
5221 CTTAACTAAAAAAGCCTACTCAATTAAGAGTGGGCTTTTTTAATTTAAGAAGTATAAGG  
 1508 A

5281 CAATTAAGCAACCAACGCCGTAATCCTTGTACCACAAGAATTTCCGAGCTGATGTTA



5341 TGCTGCCATATATCGCTGCAATTAAGATATAGAGCATTTCAAATTGTAACATCAGCACTT  
 5401 GTTGCGGACCATGAATGAAAAACATGGTCACCAATATGAGTACTCCGAATAAACCGTTGT  
 5461 ATATTCCCTGATTAGCTAATAACACCTTCACTTCTGGCATTTTTAAAACAGCTGCTTCTA  
 5521 ATTCAAACGACTTAGCTTGTCTGTGCAAATGAGCCAAAAATTTCTATCATCATGATAATGA  
 5581 TTGATTCAATAGCAACTAACCCGGTAATAATTTGTGCGATCATTTTATACTGTCTCTTTC  
 5641 TTTATTTCTACCACAATCTTACCACGCGCATGATGTGTTTCCGTACGCTGATGAGCTGCA  
 5701 CGCATACCTTCTGTTGTTAGCGGATAAATACTATCGACCACAATTTGTAATTGATTTTTT  
 5761 GTAATATAATCAGCGAGTGTGGTTAAATCTTTACCATTAGTATCCAACCAACCGGTTGTA  
 5821 ATTGTTTTGTTAGGTGTCTGCTGTTGTTGAGCCGTTAACTGCGCAGAAATTGTCACCAAA  
 5881 TGGCCGCCATATTTTAAAATATGAATACCATTATCGATGTCCCAACCATATCAAATACA  
 5941 GCATCGTAATCAGACAAAACATCCTGTATTTGGTATGCGTGGTAATCAATCACTTGATCT  
 6001 GCCCCAGTGACGCAACAAAATCGTGATTAACTTGAATCGCTGTTGTTGCTACATAAGTA  
 6061 CACATTAACTTGGCGAGTTGAATGGCATAAATACCAACGCCACCAGCGCCAGCTTGTATT  
 6121 AACACCTTGTGCCCTGATTTAACTTGTAGTTTTTCCAACATTTGTAGCGCTGTTAGGGCT  
 6181 GCTAATGGTACTGCAG

**Figure 1.** Nucleotide sequence of the *L. mesenteroides* B-742CB dextranucrase gene and the deduced amino acid sequence. The left-hand margin represent the nucleotide and amino acid number. The putative sucrose binding site(italic, bold letters), the glucosyl-transfer site(bold letters, underlined) are indicated. The RBS, putative promotor, and the repeat regions(A, C, N) sequences are underlined.



**Figure 2.** PAS-staining of the expressed dextranucrase with IPTG induction according to expression time. Samples of lane 1 to 6 were collected at 0hr, 0.5hr, 1hr, 2hr, 3hr and 4hr after IPTG induction, respectively.

거나 혹은 감소된 텍스트란수크라제의 활성 정도를 확인하기 위하여 각각의 플라스미드를 *E. coli* BL21(DE3)pLysS에 다시 형질전환하여 동일한 방법으로 IPTG induction을 행하였다. 활성 측정시, 세포 파쇄물로부터 얻은 상등액을 이용하여 돌연변이 되지 않은 wild-type과 비교하였다. 그 결과 D492→N의 경우, wild-type에 비하여 약 38%의 활성 감소를 확인하였다. 이러한 결과로부터 Asp-492는 효소의 촉매활성에 관여

**Table 1.** Activities obtained with wild-type and mutant DSCB protein.

Mutation in DSCB	Specific activity (U/g)	Ratio of relative activity
Wild-type	21.757	1
D492N	13.438	0.617

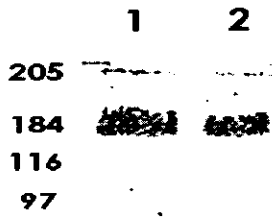
\*Specific activity is shown as units per gram of protein in the cell extract from either the wild-type or mutant *dsCB* clone.

하는 아미노산임을 확인할 수 있었다 (Table 1). 정제된 효소의 활성을 확인하는 non-denatured SDS-PAGE를 이용하여 활성 단백질의 분자량을 확인한 결과 170kDa 가량으로 확인이 되어 유전자 염기 서열로부터 계산된 값과 비슷함을 확인하였다 (Figure 3).

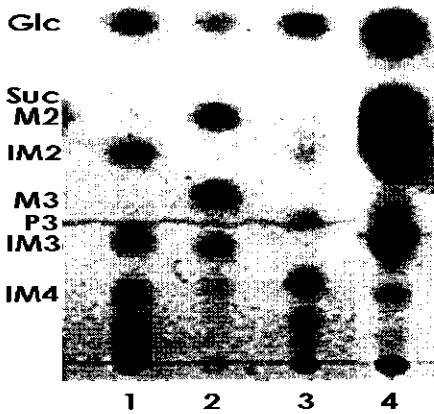
#### 효소의 특성

재조합 *E. coli*로부터 얻은 텍스트란수크라제의 수용체 반응에서 maltose와의 수용체 산물의 경우, 모균인 B-742CB 텍스트란수크라제의 수용체 산물과 같은 산물인 panose(6<sup>2</sup>- $\alpha$ -D-glucopyranosylmaltose), 6<sup>2</sup>- $\alpha$ -isomaltosylmaltose, 6<sup>2</sup>- $\alpha$ -isomaltotriosylmaltose, 6<sup>2</sup>- $\alpha$ -isomaltotetrosylmaltose와 그의 branched된 수용체 산물들이 모두 생성되었음을 확인하였다 (Figure 4).

모균의 효소인 B-742CB 텍스트란수크라제로부터 얻은 텍스트란과 형질 전환된 균의 텍스트란수크라제로부터 얻은 텍스트란의 dextranase에 의한 가수분해 산물을 TLC로 분석하여 Figure 5에 나타내었다. DSCB 텍스트란수크라제에 의해서 준비된 텍스트란의 경우, dextranase의 가수분해에 의해서 가지결합을 포함한 올리고당이 생산됨을 확인하고 dextranase에 잘려지지 않은 polymer가 origin에 남아있음을 확인하였다. 효소반응을 통하여 합성된 텍스트란의 구조를 알기 위해

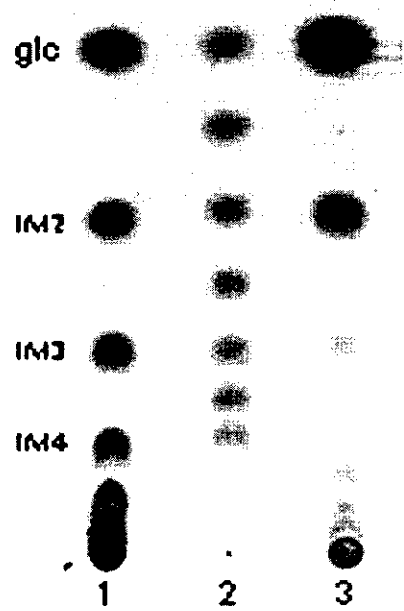


**Figure 3.** Activity staining of dextranucrase from recombinant *E. coli* harboring pDSCB. The active band was stained by Periodic acid-Schiff(PAS) staining procedure. Lane 1: PAS staining of B-742CB dextranucrase, Lane 2: PAS staining of DSCB from *E. coli*

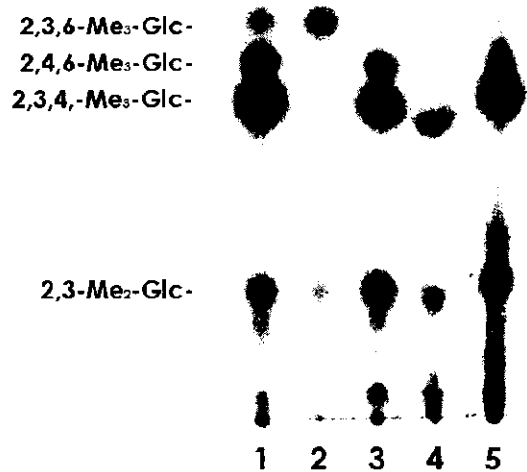


**Figure 4.** Thin layer chromatogram of acceptor reaction products of dextranucrase from recombinant *E. coli* harboring pDSCB. Lane 1: isomaltodextrin series, Lane 2: maltodextrin series, Lane 3: maltose acceptor product of B-512F dextranucrase, Lane 4: maltose acceptor product of dextranucrase expressed in *E. coli*, P3; Panose, Glc; Glucose, Suc; Sucrose, M2; Maltose, IM2; Isomaltose, M3; Maltotriose, IM3; Isomaltotriose, IM4; Isomaltotetraose

methylation과 산기수분해실험을 수행하였다(Figure 6). B-742CB 텍스트란에서 보이는  $\alpha$ -(1→6)(2,3,4-Me<sub>3</sub>-Glc)과  $\alpha$ -(1→3)(2,4,6-Me<sub>3</sub>-Glc)결합이 있음을 확인하였다. 지금까지 발표된 dextranucrase의 대부분의 유전자들은 유전자를 분리한 균들의 차이에도 불구하고  $\alpha$ -(1→6)결합이 주된 구조인 텍스트란을 합성하는 효소 생산 유전자들이었다 (9-15). DSCB clone은 같은 B-742CB 균에서 얻은 DSRB742와 비교하여 7% 가량 더 많은  $\alpha$ -(1→3) 가지 결합을 형성한다. 합성된 텍스트란의 가지 결합 정도의 차이는 두 효소의 활성 특성 차이는 두 단백질의 아미노산 서열에서 다른 부분, 즉 sucrose



**Figure 5.** Thin Layer Chromatogram of the dextranase hydrolysis product of dextranucrase from recombinant *E. coli* harboring pDSCB. Lane 1: isomaltodextrin series, Lane 2: maltodextrin series, Lane 3: dextranase hydrolysis product of dextran prepared by dextranucrase expressed in *E. coli*. glc; Glucose, IM2; Maltose, IM3; Isomaltotriose, IM4; Isomaltotetraose



**Figure 6.** Methylation of dextran synthesized by dextranucrase from recombinant *E. coli* harboring pDSCB. Lane 1: standard materials for methylation, Lane 2: maltotriose, Lane 3: 742CB dextran, Lane 4, B-512F dextran, Lane 5; dextran prepared by dextranucrase expressed in *E. coli*

binding site에서 변화된 아미노산 부분인 56, 116, 403, 426, 434, 452, 469, 692-697 부분과 glucosyl-transfer site로 알려져 있는 부분에서 변화된 481-506 아미노산들의 차이에서 야기될 수 있다고 생각되어 이에 관한 자세한 연구는 진행 중에 있다.

## 요 약

10%의  $\alpha$ -(1→3)가지 결합을 갖고  $\alpha$ -(1→6)으로 연결된 텍스트란을 합성하는 텍스트란수크라제를 coding하는 유전자(dsCB)를 *Leuconostoc mesenteroides* B-742CB로부터 분리하여 염기서열과 아미노산 서열을 결정하였다. dsCB가 포함된 6.1kb의 DNA fragment는 4,536 bp의 염기로 구성된 하나의 open reading frame(ORF)를 가지고 있었다. 추정된 아미노산 서열은 ORF의 698번째 nucleotide 위치에 있는 start codon(ATG)으로부터 5,223번째 위치에 있는 stop codon(TAA)까지였다. 구조 유전자의 아미노산은 1,508개로 구성되고 분자량의 계산 값은 168.6 kDa였고 non-denatured SDS-PAGE를 이용하여 활성 band를 분석한 결과 170 kDa이었다. pDSCB를 가지고 있는 재조합 *E. coli*는 2% sucrose배지에서 세포외로 텍스트란수크라제를 생산하였으며, soluble과 insoluble 텍스트란을 생산하였다. 텍스트란수크라제의 효소 촉매작용에 관여하는 것으로 알려졌이는 conserved region의 아미노산 중 Asp-492를 Asparagine으로 바꾸고자 point mutation을 시도하였고, 결과로 얻어진 D492N은 돌연변이 이전의 균에 비하여 활성이 1.6배 감소함을 확인하였다.

## 감 사

본 연구논문은 1999년도 전남대학교 학술연구비 지원에 의하여 연구되었으며 이에 감사합니다.

## REFERENCES

- J. F. Robyt. (1995), Mechanism in the glucansucrase synthesis of polysaccharides and oligosaccharides from sucrose. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **51**, 133-168
- Kim, D. and J. F. Robyt. (1995), Production, selection, and characteristics of mutants of *Leuconostoc mesenteroides* B-742 constitutive for dextransucrase. *Enzyme Microbial Technol.* **17**, 689-695
- Kim, D. and J. F. Robyt. (1994), Selection of *Leuconostoc mesenteroides* mutants constitutive for glucansucrases. *Enzyme Microbial Technol.* **16**, 1010-1015
- J. F. Robyt. (1996), Mechanism and action of glucansucrase. In Park, K. H., J. F. Robyt., and Y. D. Choi. (ed), *Progress in Biotechnology.* **12**, 1-22
- Kato, C. and H. K. Kuramitsu (1990), Carboxyl-terminal deletion analysis of the *Streptococcus mutans* glucosyltransferase- I enzyme. *FEMS Microbiol. Lett.* **72**, 299-302
- Lis, M., T. Shiroza, and H. K. Kuramitsu (1995), Role of the C-terminal direct repeating units of the *Streptococcus mutans* glucosyltransferase-S in glucan binding. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 2040-2042
- Tsumori, H., Minami, and H. K. Kuramitsu. (1997), Identification of essential amino acids in the *Streptococcus mutans* glucosyltransferases. *J. Bacteriol.* **179**, 3391-3396
- Sulavik, M. C., G. Tardif, and D. B. Clewell. (1992), Identification of a gene, *rgg*, which regulates expression of glucosyltransferase and influences the *Spp* phenotype of *Streptococcus gordonii* *challis*. *J. Bacteriol.* **174**, 3577-3586
- Ryu H. J., D. Kim, D. W. Kim, Y. Y. Moon, and J. F. Robyt (2000), Cloning of a dextransucrase gene(*fmcmds*) from a constitutive dextransucrae hyper-producing *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMCM developed using VUV. *Biotechnol. Lett.* **22**, 421-425
- Kim H. S., D. Kim, H. J. Ryu, and J. F. Robyt (2000), Cloning and sequencing of the  $\alpha$ -1→6 dextransucrase gene from *Leuconostoc mesenteroides* B-742CB. *J. Microbiol. Biotechnol.* **10**(4), 559-563
- Monchois, V., M. Remaud-Simeon., P. Monsan., and R.-M. Willemot (1998), Cloning and sequencing of a gene coding for an extracellular dextransucrase(DSRB) from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 synthesizing only a  $\alpha$ (1-6) glucan. *FEMS Microbiol. Lett.* **159**, 307-315
- Monchois, V., Willemot, R.-M., Remaud-Simeon, M., Croux, C., and P. Monsan (1996), Cloning and sequencing of a gene coding for a novel dextransucrase form *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 synthesizing only  $\alpha$ (1-6) and  $\alpha$ (1-3) linkages. *Gene*, **182**, 23-32
- Monchois, V., Remaud-Simeon, M., Russel, R. R. B., Monsan, P., and Willemot, R.-M (1997), Characterization of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F dextransucrase (DSRS) and identification of amino-acid residues playing a key role in enzyme activity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **48**, 465-472
- Maniatis, T., E. F. Fritsch, and J. Sambrook (1989), *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*(2nd edition). pp. 1.25-1.84. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold spring Harbor, NY, U.S.A.
- M. Remaud, F. Pau., and P. Monsan (1999), Characterization of  $\alpha$ -(1→3) branched oligosaccharides synthesized by acceptor reaction with the extracellular glucosyltransferases from *L. mesenteroides* NRRL B-742. *J. Carbohydr. Chem.* **11**(3), 359-378
- Laemmli, U. K. (1970), Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685
- A. W. Miller and J. F. Robyt. (1986), Detection of dextransucrase and levansucrase on polyacrylamide gels by the Periodic acid-Schiff stain, Staining artifacts and their prevention. *Anal. Biochem.* **156**, 357-363
- Lee, J. H., D. Kim, J. S. Baek, K. H. Park, N. S. Han, and J. F. Robyt (1998), Modification of starch using dextransucrase and characterization of the modified starch. *Kor. J. Appl. Microbiol. Technol.* **26**(2), 143-150
- Tanirseven, A. and J. F. Robyt. (1993), Interperation of dextransucrase inhibition at high sucrose concentration. *Carbohydr. Res.* **245**, 97-104
- Mukerjee, R., Kim, D., 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
- Bradford, M. M. (1976), A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254
- Moser, G., S. A. Hefta, R. J. Paxton, J. E. Shively, and T. D. Lee (1991), Isolation and sequence of an active-site peptide containing a catalytic aspartic acid from two *Streptococcus sobrinus* glucosyltransferase. *J. Biol. Chem.* **266**, 8916-8922
- Fujiwara, T., Y. Terao, T. Hoshino, S. Kawabata, T.

Ooshima, S. Sobue, S. Kimura, and S. Hamada. (1998), Molecular analysis of glucosyltransferase genes among strains of *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiol. Lett.* **161**, 331-336

24. Funane, K., T. Ookura, and M. Kobayashi (1998), Glucan binding regions of dextranucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**, 123-127