

Leuconostoc mesenteroides B-742CB와 B-512FMCM Dextranase의 수용체 반응을 이용한 고분자 Isomaltodextrin의 생산

김문수¹·이선옥²·류화자⁴·강희경⁵·유선균⁶·장석상⁷·김도원^{†3,4,5,7}·김도만⁸·김성혁
전남대학교 의·공학협동과정, ¹물질·생물화학공학과, ²정밀화학공학과, ³화학공학부, ⁴촉매연구소, ⁵공업기술연구소,
⁶포항가속기연구소, ⁷강릉대학교 동해안해양생물자원연구센터, ⁸(주)라이프엔자
(접수 : 2001. 3. 26., 게재승인 : 2001. 4. 23.)

Synthesis of Highly Branched Isomaltodextrin by Acceptor Reaction using Dextranases from *L. mesenteroides* B-742CB and B-512FMCM

Moon-Soo Kim, Sun-Ok Lee¹, Hwa-Ja Ryu², Hee-Kyoung Kang⁴, Sun-Kyun Yoo⁵, Seuk-Sang Chang⁶,
Do-Won Kim⁷, Doman Kim^{†3,4,5,7}, and Seung-Heuk Kim⁸

Department of Biomedical Engineering, ¹Department of Materials · Biochemical Engineering,

²Department of Fine Chemical Engineering, ³Faculty of Chemical Engineering,

⁴The Research Institute for Catalysis, ⁵Engineering Research Institute, Gwangju 500-757,

⁶Pohang Accelerator Laboratory, Pohang 790-784, ⁷East Coastal Marine Bioresources Research Center at Kangnung National University, Kangnung 210-702, ⁸Lifenza Co. Ltd, Seoul 135-514, Korea

(Received : 2001. 3. 26., Accepted : 2001. 4. 23.)

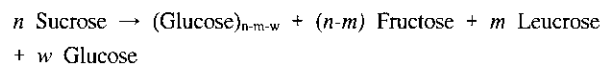
In this study we tried to optimize the enzyme reaction conditions for the synthesis of highly branched isomaltodextrin (Mw > 2.5 kDa) using two dextranases from *L. mesenteroides* B-742CB and B-512FMCM that are dextranase constitutive mutants. As the concentration of sucrose or the ratio of maltose to sucrose increased, the amount of dextran decreased and the number and the amount of acceptor-products (of sucrose or maltose) increased. With high sucrose concentration (over 34%), there was more branched isomaltodextrin (as acceptor products) than dextran. When the ratio of sucrose to maltose was 2.5, there produced 86.7% of isomaltodextrin were produced. The Mw of dextran, however, was over 2×10^6 and there was no significant amounts of branched clinical dextran or high molecular weight oligosaccharides. With the combined activities of B-742CB dextranase and B-512FMCM dextranase we could synthesize high molecular weight branched isomaltodextrin (Mw > 2.5 kDa). The high molecular weight dextran was composed of high branches as B-742CB dextran.

Key Words : *Leuconostoc mesenteroides*, dextranase, acceptor reaction, isomaltodextrin

서론

Dextran은 glucose가 α -(1→6) 결합으로 주로 연결되어 이루어진 세균성 다당의 일종이며, 생산 균의 종류에 따라 다른 양과 길이의 가지결합[예; α -(1→2), α -(1→3), α -(1→4)]을 갖는다(1). Dextran을 합성하는 효소인 dextranase의

sucrose에 대한 반응 기작은 다음과 같다(2).



이 효소반응의 주된 산물은 고분자량의 dextran (약 10^7 - 10^8 Da)과 fructose이며 부산물로는 glucose와 leucrose (5-O- α -D-glucopyranosyl-D-fructopyranose)가 생산된다(1). 주로 *Leuconostoc*과 *Streptococcus*속의 균에 의해 생산되는 dextran은 sucrose로부터 dextran을 생합성하는 반응이외에도 효소 반응액에 sucrose 이외의 다른 탄수화물이 첨가될 경우, sucrose의 glucose를 첨가한 탄수화물에 전달하여 isomaltodextrin을 합성하기도 한

†Corresponding Author : Faculty of Chemical Engineering, Chonnam National University, Gwang-Ju 500-757, Korea.

Tel : +82-62-530-1844, Fax : +82-62-530-1849

E-mail : dmkim@chonnam.chonnam.ac.kr

다(3, 4-8). 이때 첨가한 탄수화물을 수용체(acceptor)라 하며, 이 반응을 수용체 반응(acceptor reaction)이라 한다(9). 고분자량의 dextran은 상업적으로 *L. mesenteroides* NRRL B-512F균을 15-20%(w/v)의 sucrose와 다른 영양분이 포함된 배지에서 배양하여 생산하며, 생산된 dextran의 분자량은 대략 5×10^8 Dal에 이른다. 작은 분자량의 dextran[dextran 70(average Mw 70,000)과 dextran 40(average Mw 40,000)]은 혈장 확장제 및 혈류개선제로 사용되어와서(1, 10, 11) 이 크기 범위(Mw 75,000±25,000)의 dextran을 clinical dextran으로 부르고 있다(10). Clinical dextran은 고 분자량의 dextran을 조절된 산 가수분해와 유기용매 분획을 통해 상업적으로 얻고 있다. Clinical dextran의 유도체는 그 기능이 다양한 것으로 알려져 있으며(12), 그 중에서도 dextran sulfate는 항 응고성 활성을 가지며 HIV-1의 당 단백질과 특이적으로 작용하여 동물세포에 결합하는 당단백질의 능력을 저해한다고 알려져 있다(10, 11). 하지만 상업적 clinical dextran 생산 방법은 공정 중 dextran의 손실이 많고 20% 이상 고온 처리와 냉각, 그리고 탈이온 공정의 필요 등 공정상 어려운 점이 있어 1994년 Kim과 Day는 dextranase 생산 균인 *Lipomyces starkeyi*와 dextranucrase 생산 균인 *L. mesenteroides* B-512F 균을 이용한 혼합발효 배양을 통해 clinical dextran을 고 수율로 쉽게 생산하는 신규제조공법을 개발한 바 있다(10). 이 혼합발효 방법에 의해서 생산되는 dextran은 주로 α -(1→6)결합을 가진 *L. mesenteroides* B-512계열의 균에 의해 만들어져 왔으며 가지결합을 가진 clinical dextran 크기의 dextran을 생산하는데 적용할 수 있는지는 아직 연구되지 않았다(10, 11). *L. mesenteroides* B-742종은 효소 생산 배지에 sucrose 존재 시 두 종류의 dextranucrase를 생산한다고 보고되고 있다. 한가지 효소는 α -(1→4) 가지 결합을 갖는 dextran을 합성하며, 다른 한가지 효소는 단일의 α -(1→3) 가지 결합으로 된 glucose 잔기를 갖는 dextran을 합성한다(13, 14). Kim과 Robyt은 *L. mesenteroides* B-742로부터 dextranucrase의 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 dextranucrase를 생산한다. B-742CB로부터 생산된 dextranucrase는 수용성과 불용성의 dextran을 모두 합성한다. 이 두가지 dextrans(수용성과 불용성)은 모두 *endo*-dextranase에 의해 가수분해가 잘 안되는 편이며 구조면에서는 동일하다고 보고되었다(13).

본 연구에서는 고분자의 isomaltodextrin을 합성하기 위하여 *L. mesenteroides* B-742CB균의 고분자 dextran 합성 dextranucrase를 사용하여 sucrose 및 수용체로서 maltose의 농도 등의 반응조건을 조절하고, 선형 dextran을 합성하는 *L. mesenteroides* B-512FMCM dextranucrase와의 혼합 효소 반응조건을 연구하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 배양조건

Dextranucrase(EC.2.4.1.5)를 얻기 위해 사용한 균은 *Leuconostoc*

mesenteroides B-742CB균과 B-512FMCM균으로 구성적(constitutive)으로 dextranucrase를 생산한다(13). 두 균의 효소는 발효조(Bio-G8, Hanil R&D, Korea)를 이용하여 생산하였으며, 탄소원으로는 2%(w/v) glucose 혹은 2%(w/v) sucrose를 포함한 LM배지(1ℓ의 증류수 당 4 g yeast extract, 2 g peptone, 0.2 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.01 g NaCl, 0.01 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.01 g $MnSO_4 \cdot H_2O$, 0.015 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$)를 사용하였고 pH는 5.2, 온도는 28℃를 유지하였다(15).

시약 및 재료

Dextran 합성용 sucrose는 상업용 백설탕(Cheil Jedang, Korea)을 사용하였으며, 가용성 녹말은 Yakuri사(Yakuri Pure Co., Osaka, Japan)제품을 호화시켜 사용하였다. Yeast extract 등의 배지성분들은 Duchefa사(Haarlem, Netherland)의 제품을, 그리고 그 밖의 시약들은 일반 시약등급을 사용하였다.

효소액의 준비

효소액은 *L. mesenteroides* dextranucrase를 2%(w/v)의 glucose 혹은 sucrose를 포함한 LWS(LW+MS+sucrose)배지를 이용하여 생산하였다(13, 16, 17). Glucose를 이용한 경우는 상등액을 30K cut-off Microfiltration Module (Pall, Japan)로 농축하여 사용하였고, 설탕을 이용한 배양의 경우는 상등액을 polyethyleneglycol(PEG, Mw=1,500)을 이용하여 농축하였다. PEG(50%, w/v) 농축은 최종농도가 20%(w/v)가 되도록 천천히 첨가 한 후 상등액을 원심분리(8000 rpm, 25 min)하고 dextran 상을 회수하였으며, 이 분획을 효소액으로 이용하였다(18).

효소활성

Dextranucrase의 활성은 fructose를 표준물질로 하여 환원당 분석법으로 확인하였으며, 1U은 1분당 100 mM의 sucrose에서 헤리되는 fructose의 μ mol수로 정하였다(10). 효소반응은 28℃에서 수행하였으며 20 mM Na-acetate 완충용액(pH 5.2, 0.1% v/v Tween 80, 10 mM $CaCl_2$)을 사용하였다(15).

효소반응

다른 sucrose농도에서의 dextranucrase 반응은 3, 6, 12, 20, 34, 50 그리고 68%(w/v)의 sucrose 용액에 10U의 dextranucrase를 첨가하여 28℃에서 수행하였다(19). Sucrose와 maltose의 농도비는 100, 50, 25, 12.5, 5 그리고 2.5이었다. Dextranucrase의 활성은 10U으로 일정하게 사용하였으며 28℃에서 반응을 수행하였다(20). Maltose와 sucrose 용액 그리고 dextranucrase의 효소 반응에서 생산한 수용체 산물인 올리고당 및 분지 isomaltodextrin을 다음 효소 반응의 수용체로 이용하면서 sucrose의 공급량을 조절하고 공급한 sucrose가 dextran이나 분지 isomaltodextrin으로 전환되는 정도를 확인하였다(21). 사용한 dextranucrase는 반응초기에 10U을 사용하였고 초기 maltose의 반응기내의 농도는 60 mM 혹은 120 mM, 초기 설탕의 농도는 300 mM 이었으며, 추가로 공급한 설탕은 실험 내용에 따라 달리하였다. 혼합효소의 경우 초기에 5U의 B-742CB dextranucrase를 전체 부피가 100 ml인 반응기에 2.5 g sucrose와 1 g maltose (S/M=2.5)가 들어 있는 기질에 반응을

Table 1. Relative weight percentage of total products with various sucrose concentrations at fixed B-742CB dextransucrase activity(10U).

Sucrose (g/L)	Yield of total products(%)		
	Dextran ^a	Branched isomaltodextrin ^b	Leucrose ^c
30	94.2	3.7	2.1
60	75.0	16.2	8.8
120	60.7	28.5	10.8
200	45.2	44.0	10.9
340	38.7	47.8	13.5
500	16.0	65.0	19.1
680	5.7	78.8	15.5

^{a,b} Calculated by the equation of Yield(%) = $(\frac{\text{product}(g)}{0.48 \times \text{sucrose}(g)} \times 100)$, ^a Dextran was prepared with 67% ethanol precipitation and weighed after drying, ^c Calculated by the equation of Yield(%) = $(\frac{\text{leucrose}(g)}{\text{sucrose}(g)} \times 100)$

시작하고 23시간 후에 수용체 반응에 의해 합성된 분지 isomaltodextrin의 양을 확인하고 5U의 B-512FMCM dextransucrase를 첨가하였으며 반응 진행 중 sucrose의 분해 정도에 따라 최종 sucrose의 농도가 18-25%(w/v)가 되도록 공급하였다. Sucrose와 maltose의 연속적 공급을 이용한 혼합 효소(B-742CB dextransucrase, B-512FMCM dextransucrase) 반응은 반응초기에 총탄수화물의 양이 전체 부피의 3%(w/v)가 되도록 하고 sucrose와 maltose의 비(S/M)를 5로 하여 시작하였다. 반응 23시간일 때 전체부피의 5%(w/v)에 해당하는 sucrose와 maltose를 S/M비가 5가 되도록 공급하였고 반응 중 sucrose의 분해정도를 관찰하면서 49시간 일 때 10%(w/v)에 해당하는 sucrose와 maltose를 같은 S/M비로 공급하였다. 이후의 반응에서는 sucrose의 분해정도에 따라 maltose를 제외한 sucrose만을 일정농도로 공급하였으며 반응은 공급해준 sucrose가 모두 이용된 후, 혹은 반응산물의 양상이 특별한 변화가 없이 일정 할 때 종료하였다.

효소 반응 산물 중의 분지 isomaltodextrin 성분 확인

효소 반응 후 시료를 1 μ l 취하여 Whatman K5F plate (Whatman Inc, Clifton, New Jersey)에 점적한 후, nitromethane/1-propanol/water(2/5/2, v/v/v)를 전개용매로 2번 전개하고 0.3%(w/v) N-1-naphthylethylenediamine과 5%(v/v)황산을 함유한 메탄올을 이용하여 발색한 후, 각 당의 표준물질을 기준으로 NIH Image Program을 이용하여 분석하였다(22).

Dextran의 회수 및 크기 분석

Sucrose의 분해 정도에 따라 반응액을 80 $^{\circ}$ C에서 20분간 가열하여 반응을 종료시킨 후 최종농도가 67%가 되도록 에탄올을 넣었다(18). 침전된 생성물을 증류수로 다시 녹인 후 에탄올을 다시 천천히 넣어주어 침전을 시키는 과정을 2-3번 반복함으로써 잔당을 완전히 제거하고 최종 생성물은 70%(v/v)와 95%(v/v)의 에탄올과 아세톤을 이용하여 수분을 완전히 제거하고 건조시킨 후 분말상태로 실험에 사용하거나 보관하였다. 생성물의 크기는 GPC(Gel permeation chromatography) column을 사용하여 확인하였다. Column은 Macrosphere GPC(Alltech, U.S.A)를, 검출은 differential refractometer (Shimadzu, Japan)를 사용하였다. 이동상으로는 초순수 (0.35 mL/min)를 사용하였고 column은 50 $^{\circ}$ C로 유지하였으며 10

μ L의 시료를 주입하였다. 생성물의 크기분석에는 isomaltose, isomaltooligosaccharides, maltooligosaccharides, dextran T10, T40, T70, T500, T2000(Sigma Chemical Co., St Louis, U.S.A)을 표준물질로 사용하였다(11).

결과 및 고찰

Sucrose농도가 dextran과 분지 isomaltodextrin 수율 및 크기에 미치는 영향

Sucrose농도를 3-68%(w/v)로 다양하게 조절하여 dextransucrase와 반응시킨 결과는 Table 1과 같다. *L. mesenteroides* B-742CB dextransucrase의 특성상 sucrose농도가 증가함에 따라 sucrose가 dextran 합성을 위한 glucose 제공 물질로 작용할 뿐 아니라, 수용체로서 사용되어(14) 수용체 반응이 활발히 진행이 되고, 이는 dextran의 크기에 영향을 주어 작은 크기의 dextran (평균 분자량 10,000 - 70,000 Da)이 합성될 것으로 예상했지만 sucrose농도가 증가할수록 d.p. 10 이상의 큰 크기의 올리고당인 분지 isomaltodextrin 양은 증가하였지만 의료용(평균 분자량 10,000 - 70,000 Da) dextran이 합성되지는 않았다. 저농도인 3%(w/v) sucrose 용액 반응에서는 dextran이 94.2%이고 분지 isomaltodextrin이 3.7%이었으나 68%(w/v)의 sucrose 용액에서는 dextran이 5.7%로 크게 감소하였고 분지 isomaltodextrin은 크게 증가하여 78.8%이었다. 즉 고농도의 sucrose 반응에서 sucrose가 수용체로 작용하여 합성된 분지 isomaltodextrin들이 clinical size dextran을 합성하기 위한 효율적인 수용체로서는 작용을 하지 못한 결과로 생각된다. 이는 maltooligosaccharide가 수용체로 작용할 때 크기가 클수록 수용체로서의 효율은 떨어지는 것처럼, 일정 크기 이상의 수용체 산물이 합성되면 중합도가 큰 분지 isomaltodextrin보다는 작은 크기의 분지 isomaltodextrin이 수용체로 더 잘 이용되기 때문으로 생각된다. 따라서 작은 크기의 고분자 dextran (평균 분자량, 10,000 - 40,000 Da)만을 주로 생산할 수 있는 조건을 sucrose의 농도 조절만으로 정하기는 어려울 것으로 판단되었다. 실험한 모든 범위의 설탕 농도에서 합성된 산물은 여러가지 크기의 분지 isomaltodextrin과 큰 분자량의 dextran으로 나누어지는데 dextran의 경우는 효소와 결합된 상태로 연속적으로 만들어진 결과이지만, 비슷한 크기의 분지 isomaltodextrin만이 선택적으로 주로 생산

Table 2. Relative weight percentage of total products with various ratio of sucrose to maltose at fixed B-742CB dextranucrase activity(10U).

sucrose (g/L)	maltose (g/L)	S/M	Yield of total products(%)		
			Dextran ^a	Branched isomaltodextrin ^b	Leucrose ^c
100	1	100	70.6	21.2	8.2
	2	50	67.2	22.2	10.6
	4	25	56.2	34.2	9.7
	8	12.5	36.4	54.7	8.9
	20	5	14.7	77.6	7.7
	40	2.5	4.6	86.7	8.8

^{a,b} Calculated by the equation of Yield(%) = ($\frac{\text{product(g)}}{\text{maltose(g)} + 0.48 \times \text{sucrose(g)}} \times 100$), ^a Dextran was prepared with 67% ethanol precipitation and weighed after drying, ^c Calculated by the equation of Yield(%) = ($\frac{\text{leucrose(g)}}{\text{sucrose(g)}} \times 100$)

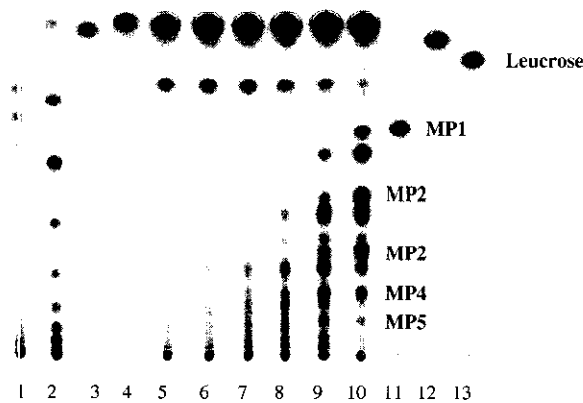


Figure 1. Thin layer chromatogram of reaction products with various ratio of sucrose to maltose at fixed B-742CB dextranucrase activity(10U).

lane 1; maltodextrin series, lane 2; isomaltodextrin series, lane 3; glucose, lane 4; fructose, lane 5 - 10; various ratio of sucrose to maltose, lane 5; 100, lane 6; 50, lane 7; 25, lane 8; 12.5, lane 9; 5, lane 10; 2.5, lane 11; MP1(panose), lane 12; sucrose, lane 13; leucrose, MP1; 6²-α-glucosylmaltose, MP2; 6²-α-isomaltosylmaltose, MP3; 6²-α-isomaltotriosylmaltose, MP4; 6²-α-isomaltotetraosylmaltose, MP5; 6²-α-isomaltopentaosylmaltose.

되지 않은 것은 중합도가 큰 분지 isomaltodextrin이 효소 활성 부위에 있는 수용체 결합 부위에 붙기에는 작은 isomaltodextrin 또는 작은 올리고당 보다 효율이 떨어지고, 어느 크기 이상의 분지 isomaltodextrin은 수용체로 작용하기에 어렵기 때문으로 생각된다. 따라서 sucrose의 농도를 높이는 것 이외에 추가로 수용체로서의 효율이 높은 외부의 수용체를 제공해야 할 것으로 판단되었다. Sucrose농도가 증가할수록 fructose에 의해서 합성된 수용체 산물인 leucrose의 양은 2.1%에서 19.1%로 증가하였다.

다양한 S/M비에서의 효소 반응

수용체로써 sucrose와 maltose를 사용하여 수용체 반응을 유도하고 고분자량의 dextran 합성 대신 큰 크기의 분지 isomaltodextrin을 합성하고자하였다. Sucrose와 maltose의 농도비 (S/M)를 2.5 - 100으로 한 dextranucrase 반응기의 생성물 성분을 분석한 결과 S/M비가 작을수록 공급해 준 sucrose

가 dextran보다는 분지 isomaltodextrin으로 많이 전환되는 것을 볼 수 있었다(Figure 1 and Table 2). S/M비가 100에서는 dextran이 70.6%, 분지 isomaltodextrin이 21.2%를 구성하고 있었으며, S/M비가 2.5에서는 dextran이 4.6%, 분지 isomaltodextrin이 86.6%로 maltose의 농도가 증가할수록 공급해 준 maltose가 dextranucrase의 효율적인 수용체로 작용하여 dextran보다는 분지 isomaltodextrin의 생산이 증가하였다. 합성된 dextran의 크기를 GPC로 분석한 결과 dextran의 크기는 S/M비가 변하여도 거의 일정하게 나타났으며 그 크기는 T2000의 retention time보다 빠른 시간에 elution되는 것으로 보아 2000 kDa 이상이였다(결과는 보이지 않음). Sucrose농도를 조절한 dextran 합성 반응에서 sucrose가 수용체로 작용했던 것처럼 반응초기에 maltose에 의해 합성된 일차 수용체 산물들(분지 isomaltodextrin들)이 크기가 커짐에 따라 B-742 dextranucrase의 수용체로서 효율이 떨어졌다.

Sucrose와 maltose의 수용체 반응에서 일차 수용체 반응 후 추가로 sucrose를 공급해주는 반응

S/M의 비가 2.5와 5에서 반응 후 각각 다른 농도(5 ~ 10%-w/v)의 sucrose를 공급하면서 생성된 산물의 성분을 HPLC로 관찰하였고 그 결과를 Table 3에 정리하였다. 일차 반응의 S/M의 농도 비가 2.5일 때와 5일 때를 비교하면 dextran의 양은 S/M의 비가 5인 경우 더 많이 생산되었고 추가로 sucrose를 첨가해 주는 경우 초기 비에 관계없이 모두 증가 하였다. S/M의 비가 2.5일 때가 5일 때 보다 1차 수용체 산물이 많이 생기고, 이 산물은 sucrose를 넣어주어 진행되는 2차 반응의 수용체로 사용되어 2차 반응의 S/M 비가 달라지게 되었다. 즉 초기 S/M의 농도에따라 같은 양의 sucrose를 추가하여도 다른 양의 dextran이 합성되는 것은 수용체(1차 반응에서 생산된 분지 isomaltodextrin)의 양 차이에서 오는 것으로 생각된다. Table 3의 A - C 반응의 경우나 D - F 반응에서 2번째 반응의 S/M의 비가 작을수록 2차 반응에서 합성된 산물 중 분지 isomaltodextrin의 양은 상대적으로 많았다. 고정된 초기 S/M의 농도 비(2.5)에서 추가 sucrose의 공급량을 각각 5, 7 그리고 10%(w/v)로 증가시킬수록 수용체로 작용할 수 있는 분지 isomaltodextrin의 양은 넣어주는 sucrose의 양에 비해 상대적으로 적어 큰 분자량의 dextran합성이 주로 이루어졌다. 즉, S/M의 비가 1.31인 경우

Table 3. Relative weight percentage of total products with various sucrose supplying conditions at fixed B-742CB dextransucrase activity(10U).

Condition	Yield of total products(%)		
	Dextran ^a	Branched isomaltodextrin ^b	Leucrose ^c
A	21.9	74.0	4.1
B	29.0	64.4	6.7
C	37.5	52.4	10.1
D	47.1	44.6	8.4
E	51.3	37.4	11.3
F	54.3	33.3	12.4

^{a,b} Calculated by the equation of Yield(%) = ($\frac{\text{product}(g)}{\text{maltose}(g) + 0.48 \times \text{sucrose}(g)} \times 100$), ^a Dextran was prepared with 67% ethanol precipitation and weighed after drying, ^c Calculated by the equation of Yield(%) = ($\frac{\text{leucrose}(g)}{\text{sucrose}(g)} \times 100$)

A-C; Reaction(step 1) was started at the 2.5 ratio of sucrose to maltose(5g sucrose, 2g maltose) and different sucrose concentration(step 2) was supplied in the enzyme reactor, A; 5g sucrose was added(step 2) and ratio of supplied sucrose to branched isomaltodextrin(product formed by step 1) was **1.31**, B; 7g sucrose was added(step 2) and ratio of supplied sucrose to branched isomaltodextrin(product formed by step 1) was **1.84**, C; 10g sucrose was added(step 2) and ratio of supplied sucrose to branched isomaltodextrin(product formed by step 1) was **2.63**, 12g sucrose and 1.2g maltose(S/M-12.5) were added(step 3), D-F; Reaction(step 1) was started at the 5 ratio of sucrose to maltose(5g sucrose, 1g maltose) and different sucrose concentration(step 2) was supplied, D; 5g sucrose was added(step 2) and ratio of supplied sucrose to branched isomaltodextrin(product formed by step 1) was **1.92**, E; 7g sucrose was added(step 2) and ratio of supplied sucrose to branched isomaltodextrin(product formed by step 1) was **2.69**, 12g sucrose and 1.2g maltose(S/M-12.5) were added(step 3), F; 10g sucrose was added(step 2) and ratio of supplied sucrose to branched isomaltodextrin(product formed by step 1) was **3.84**, 7.5g sucrose and 0.6g maltose(S/M-12.5) were added(step 3).

Table 4. Relative weight percentage of total products with fed-batch type sucrose addition at single(B-742CB) and mixed(B-742CB and B-512FMCM) dextransucrase reaction.

Condition	Yield of total products(%)				Mw of HMW Dextran (kDa)	Mw of HMW Branched isomaltodextrin ^b (kDa)
	HMW Dextran ^a	HMW Branched isomaltodextrin ^b	LMW Branched isomaltodextrin ^b	Leucrose ^c		
A	38.3	4.2	47.6	9.9	>2000	n.d ^d
B	22.7	57.7	10.0	9.6	>2000	>2.5

^{a,b} Calculated by the equation of Yield(%) = ($\frac{\text{product}(g)}{\text{maltose}(g) + 0.48 \times \text{sucrose}(g)} \times 100$), ^a Dextran was prepared with 67% ethanol precipitation and weighed after drying, ^c Calculated by the equation of Yield(%) = ($\frac{\text{leucrose}(g)}{\text{sucrose}(g)} \times 100$), ^d n.d was not detected.

A, B; Reaction was started at the 2.5 ratio of sucrose to maltose(2.5g sucrose, 1g maltose) and total 18% sucrose was supplied as fed-batch type, A; 10U B-742CB dextransucrase was only used, B; 5U B-742CB dextransucrase was used at initial enzyme reaction and after 23hrs, 5U B-512FMCM dextransucrase was added with sucrose.

dextran이 21.9%, 분지 isomaltodextrin이 74.0%인 것에 비해 S/M의 비가 1.84인 C인 조건의 경우는 dextran이 37.5%, 분지 isomaltodextrin이 52.4%로 dextran의 함성량이 증가함을 볼 수 있었다. 따라서 B-742CB dextransucrase에 의해 합성된 1차 분지 isomaltodextrin (sucrose의 추가 공급하기 전에 생산된 분지 isomaltodextrin)들이 sucrose를 추가 공급할 때 수용체로 잘 활용이 되어 수용체 반응이 길고 연속적으로 진행되도록 하여 큰 분지량의 분지 isomaltodextrin을 생산하도록 하고자 B-512FMCM dextransucrase처럼 B-742CB dextransucrase 보다 상대적으로 수용체 반응 능력이 좋은 효소를 함께 사용하는 방법을 개발하고자 하였다(21).

단일효소 (B-742CB dextransucrase만)와 혼합효소 (B-742CB와 B-512FMCM dextransucrase)를 사용한 합성 반응

Table 4에 나타낸 것처럼 B-742CB dextransucrase만을 사용(Table 4, A) 했을 때보다 B-742CB dextransucrase 반응기

에 B-512FMCM dextransucrase를 추가로 혼합하여 사용(Table 4, B)했을 때 고 분지량의 dextran 수율이 낮아졌고, 대신 수용체 산물로 고 분지량의 분지 isomaltodextrin이 생성되었으며 그 양도 전체 산물의 57.7%이었다. B-742CB dextransucrase만을 사용한 경우 시간이 경과하면서 반응초기에 생산된 분지 isomaltodextrin들은 점차적으로 그 중합도가 커지면서 TLC(Thin layer chromatography)의 아래쪽으로 이동하는 양상을 보였다(결과는 보이지 않음). 큰 분지 isomaltodextrin의 크기는 GPC 분석에 따라 2.5 kDa 이상으로 확인되었다. 또한 두 효소의 수용체 반응으로 합성된 분지 isomaltodextrin도 B-742CB dextran의 경우처럼 가지결합을 가지고 있는 분지 isomaltodextrin임을 확인하였다.(Figure 2)

본 연구를 통하여 고분지의 isomaltodextrin을 생산하기 위하여는 설당의 농도 뿐 아니라 수용체의 양 조절이 필요함을 확인하였고, 수용체 반응 효율이 좋은 효소를 혼합하여 사용함으로써 생산물의 성분을 조절 할 수 있음도 확인하였다. 보다 효율적인 고분지 의료용 크기 dextran과 고분지의 큰

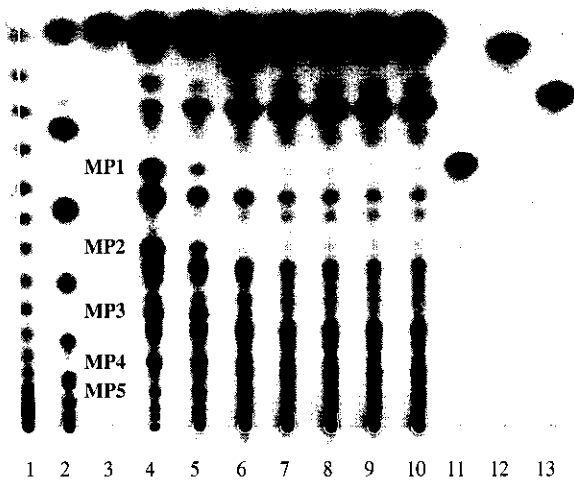


Figure 2. Thin layer chromatogram on the time course of reaction products with dextranucrase reaction(B-742CB and B-512FMCM). lane 1; maltodextrin series, lane 2; isomaltodextrin series, lane 3; fructose, lane 4 - 10; reaction products formed at various reaction time: lane 4; 23hrs, lane 5; 42hrs(19hrs after 5U B-512FMCM dextranucrase addition), lane 6; 78hrs, lane 7; 118hrs, lane 8; 138hrs, lane 9; 173hrs, lane 10; 194hrs, lane 11; MP1(panose), lane 12; sucrose, lane 13; leucrose, MP1; 6'- α -glucosylmaltose, MP2; 6'- α -isomaltosylmaltose, MP3; 6'- α -isomaltotriosylmaltose, MP4; 6'- α -isomaltotetraosylmaltose, MP5; 6'- α -isomaltopentaosylmaltose.

isomaltodextrin을 합성하기 위하여는 수용체 반응 조건 연구와 더불어 수용체 반응은 잘하고 dextran 합성 능력은 적은 dextranucrase를 개발하는 것도 필요하겠다. 이에 관한 연구는 유전자의 분리와 site directed mutagenesis 연구로 수행 중에 있다.

요약

L. mesenteroides B-742CB와 B-512FMCM dextranucrase와 dextranase를 이용하여 sucrose으로부터 평균 분자량 2.5 kDa 이상의 branched isomaltodextrin을 합성하고자 효소 반응 조건을 연구하였다. 기질인 sucrose의 농도가 34%(w/v) 이상인 경우 수용체 반응에 의해서 dextran보다는 분지 isomaltodextrin의 합성량이 많아져, sucrose가 68%인 경우 분지 isomaltodextrin의 생산량은 78.8%이었고, 생산된 dextran은 주로 고 분자량(평균 분자량 2×10^6 이상)이었으며, 분지 isomaltodextrin은 중합도(d.p.)가 작은 당(dp=2)부터 큰 당(dp=15 가량)까지 널리 분포하고 있었다. 수용체로써 maltose를 효소반응에 첨가하고 sucrose와의 농도비를 조절하는 경우 sucrose와 maltose의 mol 비(S/M)가 2.5일 때 분지 isomaltodextrin의 생산이 86.7%로 가장 높았으며 S/M비가 커질수록 dextran의 합성량이 많아졌고, 생산된 dextran은 주로 고 분자량이었으며 수용체 산물인 분지 isomaltodextrin은 sucrose만을 사용할 때 보다 큰 분지 isomaltodextrin(d.p.>20)이 합성되었다. Fructose의 수용체 산물인 leucrose는 sucrose의 양이 증가할수록 증가하였다. B-742CB dextranucrase만을 사용한 단일효소 합성 방법에 비하여 B-742CB dextranucrase와 B-512FMCM dextranucrase의 혼합 효소를 이용하는 경우 생산된 고분지

isomaltodextrin의 크기가 더 컸고(2.5 kDa 이상) 양도 증가하였다. 혼합효소와 단일 효소에 의해서 합성된 분지 isomaltodextrin은 가지결합이 많은 B-742CB 계통의 dextran 구조를 가지고 있었다.

감사

본 연구는 보건복지부에서 시행한 보건 의료기술연구 개발 사업(HMP-00-B-20507-00187)의 지원을 받았고, 군주개발을 위한 포항방사광가속기에서의 실험은 과학기술처와 포항제철의 지원을 받아 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Robyt, J. F. (1986). Dextran. In: *Encyclopedia of polymer science and engineering*. Vol. 4, 2nd ed., p752-767, John Wiley&Sons, New York.
2. Robyt, J. F. In Park, K. H., J. F. Robyt, and Y. D. Choi. (ed). (1996). Mechanism and action of glucansucrase. *Progress in Biotechnology*. Elsevier, **12**, 1-22.
3. Lee, C. Y. and J. F. Robyt. (1995). Glucansucrase characteristics and oligosaccharides synthesis using acceptor reaction. *Biotechnol. News*, **2**, 261-272.
4. Robyt, J. F. and S. H. Eklund. (1982). Stereochemistry involved in the mechanism of action of dextranucrase in the synthesis of dextran and the formation of acceptor products. *Bioorg. Chem.* **11**, 115-132.
5. Kim, D., D. W. Kim, J. H. Lee, K. H. Park, L. M. Day, and D. F. Day. (1997). Development of constitutive dextranucrase hyper-producing mutants of *Leuconostoc mesenteroides* using the synchrotron radiation in the 70-1000eV region. *Biotechnol. Techniq.* **11**, 319-321.
6. Tsuchiya, H. M. (1960). Dextranucrase. *Butt. Soc. Chim. Biol.* **42**, 1777-1787.
7. Robyt, J. F. and T. F. Walseth. (1978). The mechanism of acceptor reactions of *Leuconostoc mesenteroides* B-512F dextranucrase. *Carbohydr. Res.* **61**, 433-445.
8. Baek, J. S., D. Kim, J. H. Lee, P. S. Jang, N. S. Han, and J. F. Robyt. (1998). New oligosaccharides synthesis using glucansucrase. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26**, 179-186.
9. Robyt, J. F. and S. H. Eklund. (1983). Relative, quantitative effects of acceptors in the reaction of *Leuconostoc mesenteroides* B-512F dextranucrase. *Carbohydr. Res.* **121**, 279-286.
10. Kim, D. and D. F. Day. (1994). A new process for the production of clinical dextran by mixed-culture fermentation of *Lipomyces starkeyi* and *Leuconostoc mesenteroides*. *Enzyme Microbial Technol.* **16**, 844-848.
11. Kim, D., H. C. Seo, and D. F. Day. (1996). Dextran production by *Leuconostoc mesenteroides* in the presence of a dextranase producing Yeast, *Lipomyces starkeyi*. *Biotechnol. Techniq.* **10**, 227-232.
12. Maiga-Revel, O., F. Chaubet, and J. Jozefonvicz. (1997). New investigations on the heparin-like derivatized dextrans: CMDBS, synergistic role of benzylamide and sulfate substrate substituents in anticoagulant activity. *Carbohydr. Pol.* **32**, 89-93.

13. Kim, D. and J. F. Robyt. (1995). Production, selection, and characteristics of mutants of *Leuconostoc mesenteroides* B-742 constitutive for dextransucrases. *Enzyme Microbial Technol.* **17**, 689-695.
14. Ebert, K. J. and G. Schenk. (1962). Enzymatic polymerization III. Preparation, purification, and characterization of dextransucrase from *L. mesenteroides* B-512(F). *Z. Naturforsch.* **17**, 732-741.
15. Yun, J. W. , J. S. Noh, J. Y. Song, and S. K. Song. (1994). Isomaltooligosaccharide production from maltose by intact cell of *Aureobasidium pullulans*. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **9**, 122-126.
16. Dols, M., M. Remaud-Simeon, and P. Monsan. (1997). Dextransucrase production by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299. Comparison with *L. mesenteroides* NRRL B-512F. *Enzyme Microbial Technol.* **20**, 523-530.
17. Kim, H. S., D. Kim, H. J. Ryu, and J. F. Robyt. (2000). Cloning and Sequencing of the α -1 \rightarrow 6 Dextransucrase Gene from *Leuconostoc mesenteroides* B-742CB. *J. Microbiol. Biotechnol.* **10**, 559-563.
18. Remaud, M., F. Paul, and P. Monsan. (1992). Characterization of α -(1 \rightarrow 3) branched oligosaccharides synthesized by acceptor reaction with the extracellular glucosyltransferase from *L. mesenteroides* NRRL B-742. *J. Carbohydr. Chem.* **11**, 359-378.
19. Lee, I. S., D. Kim, S. J. Heo, M. S. Kim, K. Y. Lee, and S. Chiba · A. Kimura. (2000). Producton and characterization of new structured-oligosaccharides from immobilized mixed-enzyme reactor. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **15**, 88-95.
20. Oriol, E., D. Auriol, and P. Monsan. (1986). Acceptor reaction of a highly purified dextransucrase with maltose and oligosaccharides. Application to the synthesis of controlled-molecular-weight dextrans. *Carbohydr. Res.* **149**, 433-441.
21. Remaud, M., F. Paul, and P. Monsan. (1991). Molecular weight characterization and structural properties of controlled molecular weight dextrans by acceptor reaction using highly purified dextransucrase. *J. Carbohydr. Chem.* **10**, 861-876.
22. Lee, I. S., D. Kim, and P. S. Jang. (1999). Producton and characterization of New structured-oligosaccharides from mixed-enzyme of dextransucrase and α -amylase. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **14**, 707-712.