

덱스트란수크라제를 이용한 플루란의 변형 및 특성조사

이진하 · 김도만^{2*} · 류화자 · 허수진 · 전덕영¹ · 한남수³ · John F. Robyt³

전남대학교 생물화학공학과, ¹식품영양학과, ²촉매연구소

³Department of Biochemistry and Biophysics, Iowa State University

Modification of Pullulan Using Dextranucrase and Characterization of the Modified Pullulan. Lee, Jin Ha, Doman Kim^{2*}, Hwa Ja Ryu, Soo Jin Heo, Deok Young Jhon¹, Nam Soo Han³, and John F. Robyt³. Department of Biochemical Engineering, ¹Department of Food and Nutrition, ²Institute for catalysis, Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea, ³Department of Biochemistry and Biophysics, Iowa State University, Ames, IA, USA. - Many enzymes catalyze a primary reaction and/or secondary reaction. Dextranucrase usually synthesizes dextran from sucrose as a primary reaction. The secondary reaction of dextranucrase is the transfer of glucose from sucrose to carbohydrate acceptors. We have reacted dextranucrase from *Leuconostoc mesenteroides* B-742CB with sucrose and pullulan as an acceptor under different reaction conditions; various concentrations of pullulan, enzyme, sucrose and different pHs and temperatures of reaction digests. The yield of modified pullulan was 57% ($\pm 5\%$) of theoretical under the reaction condition of pH 5.2, temperature 28°C, 0.37% of pullulan, and 0.1U/ml of dextranucrase. Modified products were more resistant against the hydrolysis of pullulanase and endo-dextranase than those of native pullulan. The positions of glucose substitution in the modified products were determined by methylation followed by acid hydrolysis and analyzed by TLC. The products were modified by the addition of glucose to the position of C3, C4, C6 free hydroxyl group of glucose residues in the pullulan.

Key words: *Leuconostoc mesenteroides*, pullulan modification, dextranucrase, TLC, methylation

*Leuconostoc mesenteroides*와 *Streptococcus*종은 sucrose로부터 glucan을 합성하는 덱스트란수크라제 (EC 2.4.1.5) 또는 글루칸수크라제를 생산한다[1, 7, 9]. 대부분의 *Leuconostoc*균들은 모두 inducible 하게 덱스트란수크라제를 생산하는 바 sucrose를 효소 생산 기질에 넣어 주어야만 효소를 생산할 수 있었다. 이때 생산되는 덱스트란수크라제는 덱스트란과 결합이 되어 있어 이 효소의 정제에 어려움을 주었다. Kim과 Robyt은 여러 가지 종의 *Leuconostoc mesenteroides*균들(예, NRRL B-512F, B-1142, B-1355, B-742, B-1299)로부터 sucrose를 기질에 넣지 않아도 독특한 덱스트란수크라제 또는 글루칸수크라제를 생산하는 constitutive 돌연변이 균주들을 개발하였다[6, 7, 8, 9]. 따라서 sucrose가 아닌 glucose와 fructose등을 탄소원으로 이용하여 생장시 덱스트란수크라제를 생산함으로써 덱스트란의 오염이 없는 효소를 생산할 수 있게 되었다. *Leuconostoc mesenteroides* B-742는 sucrose를 이용하여 2종류의 덱스트란들을 합성한다. 이 덱스트란들은 39%의 에탄올에서 침전되는 L형의 덱스트란과 45% 에탄올에서 침전되는 S형의 덱스트

란으로 나눌 수 있는데, S형의 덱스트란은 50%의 $\alpha 1 \rightarrow 6$ 결합과 50%의 $\alpha 1 \rightarrow 3$ 가지 결합을 가지며, L형의 덱스트란은 87%의 $\alpha 1 \rightarrow 6$ 결합과 13%의 $\alpha 1 \rightarrow 4$ 가지결합을 가지고 있다고 보고하였다[13, 14]. L형의 덱스트란은 endo-dextranase에 의해 가수분해되는 반면에 S형의 덱스트란은 endo-dextranase에 의한 가수분해에 대해 비교적 높은 저항성을 가지고 있다. Kim과 Robyt은 B-742로부터 세 가지의 다른 constitutive mutants(B-742C, B-742CA, B-742CB)를 분리해 냈으며[6], 본 연구에서 이용한 B-742CB 덱스트란수크라제는 특이하게도 $\alpha 1 \rightarrow 6$ 결합과 $\alpha 1 \rightarrow 2$, $\alpha 1 \rightarrow 4$ 결합을 가지구조로 가지며 약간의 $\alpha 1 \rightarrow 3$ 결합도 갖는 덱스트란을 합성하였다.

B-742CB 덱스트란수크라제는 sucrose로부터 덱스트란을 생산하는 이외에, sucrose의 glucose를 효소반응기 내에 존재하거나 따로 넣어준 다른 탄수화물 등에 전달하는 반응을 촉진하는 것으로 알려졌다. 이때 따로 넣어준 탄수화물을 수용체(acceptors)라 부르며, 이 반응기작을 수용체 반응(acceptor reaction)이라 한다. Acceptor들의 종류는 상당히 광범위하여 *Leuconostoc mesenteroides* B-512F 덱스트란수크라제의 경우 100가지 이상의 탄수화물들이 알려졌다. 이에는 단당류, 이당류, oligo당류 그리고 작은 크기의 덱스트란들이 포함되며 각기

*Corresponding author

Tel. 82-62-530-1844, Fax. 82-62-530-1849
E-mail: dmkim@pasteur.chonnam.ac.kr

다른 정도의 acceptor로서의 반응 효율을 나타낸다[2, 4, 11, 12, 15]. Glucose를 이용하여 생산된 텍스트란수크라제는 효소에 텍스트란이 결합되어 있지 않아 수용체 반응이 더 잘 일어난다[8]. 본 연구에서는 수용체로서 다당의 한 종류인 플루란을 이용하여 새로운 구조와 특성의 물질을 생산하고자 하였으며, 이와 관련하여 효소의 반응조건을 최적화 하고자 하였다.

재료 및 방법

균주와 배양조건

Leuconostoc mesenteroides B-742CB의 배양은 탄소원으로 2%(w/v) glucose를 포함한 LM배지(1L의 증류수당 4 g yeast extract, 2 g peptone, 0.2 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.015 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.01 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.01 g NaCl, 2 g K_2HPO_4 , 0.01 g $MnSO_4 \cdot H_2O$)를 사용하였고, 생육 온도는 28°C를 유지하였다[8].

재료

플루란(Mn=69000)은 Hayashibara Biochemical Laboratories, Inc.(Japan)에서 구입하였고, 다른 시약은 GR 등급의 것을 정제 없이 사용하였다.

효소

텍스트란수크라제는 membrane filtration (30K cut-off)후에 Kim과 Robyt의 방법[9]으로 순수 분리하였고 효소 역기는 fructose를 표준물질로 하여 copper-bicinchoninate 분석법으로 확인하였으며[3], 1 Unit는 분 당 해리 되는 fructose의 μmol 수로 정의하였다.

플루란의 변형

플루란을 0.5%, 1.0%, 1.5%, 2.0%(w/v)의 농도로 20 mM Na-acetate buffer(pH5.2, 1 mM $CaCl_2$, 0.02% NaN_3 , 0.01% Tween 80)에 녹여 준후 8.4 U/ml, 4.2 U/ml, 1.7 U/ml 또는 0.8 U/ml의 효소를 넣어주고 100 mM의 sucrose를 천천히 첨가하였다. Sucrose를 넣어 주는 속도는 원하는 반응시간 내에 원하는 정도의 glucose를 수식시켜 줄 수 있는 속도로 정하여 주었다. 넣어 준 sucrose가 다 소비되었을 때 변형 산물을 회수하였으며, 초기에 수용성인 다당류는 2배의 ethanol(v/v)을 넣어 침전 시키고 침전된 다당류는 acetone과 ethanol로 수분제거 후에 40°C에서 건조시켜 구조 및 특성분석 실험에 사용하였다[5].

변형 플루란의 가수분해 효소에 대한 저항성 조사

0.5%(w/v)의 변형 플루란 100 μl 에 *Klebsiella pullulana*(0.5 U/ml; Sigma P1067), *Penicillium endo-dex-*

tranase(0.3 U/ml; Sigma D8144)를 각각 50 μl 처리하였다. 가수분해 효소반응후 분해산물들은 Thin layer chromatography(TLC) 분석법으로 생산물의 분포를 조사하였다. TLC plate는 Merck사의 silica gel 60 aluminium sheets에 1 μl 씩 점적하여 nitromethane:1-propanol:water(2:5:1.5) 조성의 전개용매로 2번 전개시킨 후, 0.5%(w/v) α -naphthol, 5%(v/v) H_2SO_4 를 포함한 메탄올에 담가주고 완전히 건조시킨 후, 121°C에서 10분간 발색시켰다. 이상의 반응결과들을 변형하지 않은 플루란을 표준물질의 가수분해 효소에 대한 저항성과 비교하였다.

용해도 조사

변형 플루란을 물에 녹인 후에 121°C에서 30분간 열처리하였다. 다당류 수용액을 실온에서 식힌 후에 원심분리(15분, 8,000 g)하고, phenol-sulfate방법으로 가용성 탄수화물의 양을 정량하였다[3].

Methylation분석

Glucose가 수식된 위치를 정하기 위하여, 변형 다당을 Hakomori시약으로 methylation하고, 2M trifluoroacetic acid로 산 가수분해 한 후 가수분해 산물을 TLC(전개용매; Acetonitrile: Chloroform: Methanol=3:9:1)로 분석하였다[10].

결과 및 고찰

텍스트란수크라제의 수용체로 사용한 플루란의 free-OH기를 sucrose의 glucose로 수식하여 새로운 구조의 변형 플루란을 만들고자 반응조건을 연구하였다.

플루란의 변형

수용체 플루란의 반응 초기 농도, 효소와 sucrose양, pH와 온도 등의 조건에 따라 플루란의 변형되는 정도가 달랐다. 가장 좋은 수율의 변형 플루란 생산 조건은 pH 5.2, 28°C에서 0.37%(w/v)의 기질과 반응한 효소의 농도가 0.1 U/ml이고 sucrose의 농도가 48 mM 일 때였다. 이때의 수용성 다당 수율은 이론적 수율의 57%(± 5)였고(Table 1), 나머지는 불용성 텍스트란과 glucose

Table 1. The yield of modified pullulan

Type	Modified Pullulan
Soluble	57
Insoluble	13
Total yield	70

*Calculation of yield; The amount of modified pullulan/(the amount of pullulan+0.48×the amount of sucrose)×100.

**Standard deviation; less than $\pm 5\%$

및 올리고당으로 생산되었다(결과 제시하지 않음).

변형 플루란의 특성 조사

변형 플루란의 가수분해 효소에 대한 저항성을 알아보았다. 표준물질인 B-742CB 텍스트란은 α -amylase, isoamylase, pullulanase 그리고 endo-dextranase에 의해 분해되지 않았다(Fig. 1, lane a to d). 변형전의 플루란은 pullulanase에 의해 maltotriose로 완전히 분해되었으나(Fig. 1, lane e), 변형 플루란으로부터는 maltotriose이외에 약간의 glucose와 올리고당들이 분해 산물로 생성되었다(Fig. 1, lane h). Endo-dextranase에 의해서 플루란은 glucose, maltose, 그리고 가지구조의 hexaose로 분해되었으나(Fig. 1, lane f), 변형 플루란은 가지구조의 올리고당을 추가로 생산하였으며 시료를 점적한 위치에 남은 양을 보아 dextranase의 가수분해작용에 더 강한 저항성을 보임을 알 수 있었다(Fig. 1, lane i). Pullulanase와 endo-dextranase를 같이 처리하면 변형전의 플루란은 glucose와 maltose로 완전히 분해되었으나(Fig. 1, lane g), 변형 플루란은 변형전의 플루란에 비해 가수분해 효소들의 가수분해에 대해 더 저항성을 보이고 있었다(Fig. 1, lane j). 수용체 반응시에 넣어준 일정량의 효소와 sucrose에 대해 플루란 농도가 증가할수록 생산된 수용체 산물의 가수분해 효소에 의한 분해 산물은 더 많은 가지구조를 갖는 경향을 보였다. 또한 변형 플루란의 합성에 쓰인 효소의 역가가 낮아질수록 플루란을 변형시킨 정도가 감소하였으며, 가수분해 효소에 대한 저항성도 감소하였다(결과 제시하지 않음).

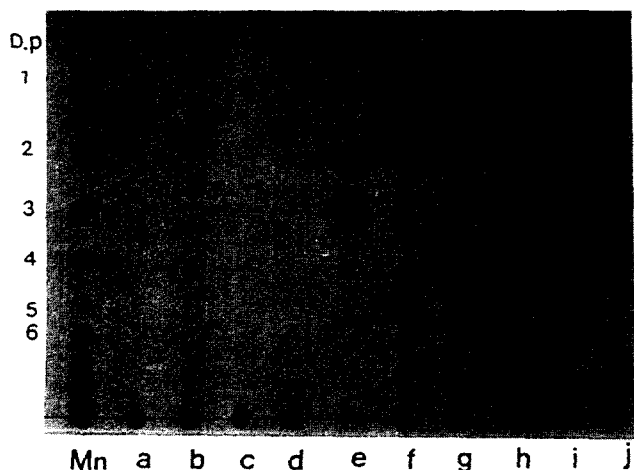


Fig. 1. TLC analysis of pullulanase and/or dextranase hydrolyzates of pullulan and modified pullulan.

Mn: series of maltodextrins. Lane a to d are the B-742CB dextran hydrolysis products after treatments of α -amylase, isoamylase, pullulanase and endo-dextranase, respectively. Lane e to g: native pullulan hydrolysis products after treatments of pullulanase, endo-dextranase and both, respectively. Lane h to j: modified pullulan hydrolysis products after treatments of pullulanase, endo-dextranase and both, respectively.

변형 플루란의 용해성

변형 플루란과 변형전 플루란의 물에 대한 용해성을 비교하기 위하여 0.1M과 1M의 sucrose 용액을 glucose의 공여체로 하여 준비한 시료들의 용해도를 비교하였다. 1M의 sucrose를 이용한 경우가 0.1M의 sucrose를 이용한 경우보다 2.4배 가량 가지 구조 형성이 많았는데 이는 시료의 용해성에 영향을 주었다. 1M의 sucrose를 사용하였을 때 만든 변형 플루란의 용해도는 0.1M의 sucrose를 이용한 변형을 통해 얻은 시료보다 2.6배 가량의 용해성의 증가를 보였으며 변형전의 플루란보다는 1.2배 가량 증가된 용해성을 보였다. 가지구조의 증가가 변형 플루란의 용해성을 증가시켰다고 사료되지만 0.1M의 sucrose에서 준비한 시료의 용해도는 변형전의 플루란에 비해 2.1배 떨어져 가지결합의 형성이 어느 정도에서는 용해성에 영향을 줄을 확인하였으나, 이에 대한 자세한 연구는 계속 진행 중이다.

변형 플루란의 methylation

변형산물의 methylation과 산 가수분해 결과 sucrose의 glucose가 플루란 glucose의 C3, C4, C6 위치의 free-OH group에 수식되었음을 알 수 있었다 (Fig. 2, Table 2). 플루란은 maltotriose가 $\alpha 1 \rightarrow 6$ 으로 결합된 다당

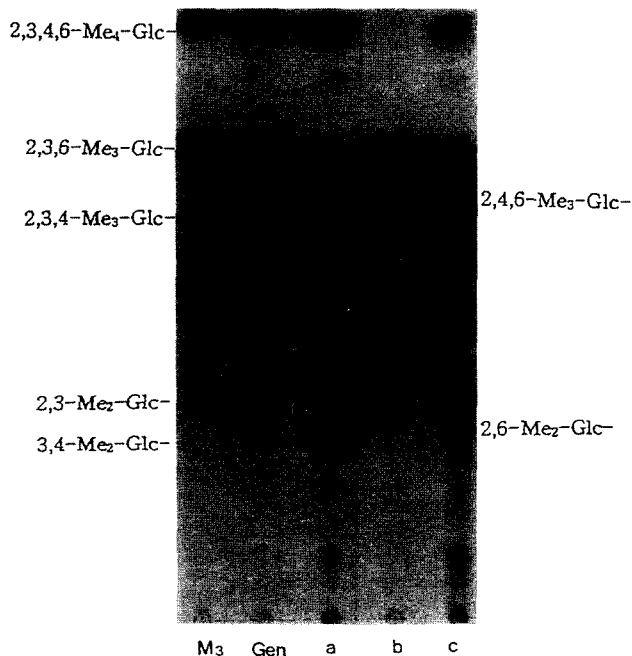


Fig. 2. Methylations of the B-742CB dextranase modified pullulans prepared from reaction using various concentrations of pullulan.

M₃ and Gen mean the methylation and acid hydrolysis products of maltotriose and gentiobiose, respectively. Lane a to c are the methylation and acid hydrolysis products of B-742CB dextran, native pullulan and modified pullulan, respectively.

Table 2. Proportions of the methylated D-glucose in the acid hydrolysis products of the methylated pullulan, B-742CB dextran and modified pullulan

O-Me-D-Glucose	Relative amount (%)		
	B-742CB Dextran	Control Pullulan	Modified Pullulan
2,3,4,6-tetra-	25.0		12.7
2,3,6-tri-	5.3	66	27.9
2,4,6-tri-	18.0		
2,3,4-tri-	28.9	34	37.2
2,3-di-	13.3		18.6
2,4-di-			
2,6-di-			3.6
3,4-di-	9.5		
Mono			

*Methylated sugars were separated by TLC as described in the methods and analyzed with Macintosh (Power PC; 7100/80) computer using the Public Domain NIH Image Program (developed at the U.S. National Institutes of Health).

로, $\alpha 1 \rightarrow 4$ 로 연결된 glucose잔기에서 66%의 2,3,6-tri-O-methyl-D-glucose와 $\alpha 1 \rightarrow 6$ 으로 연결된 glucose잔기로 부터 34%가 2,3,4-tri-O-methyl-D-glucose로 생성되었다(Fig. 2, lane b). 본 연구에서 사용한 B-742CB 텍스트란수크라제에 의해서 생성된 텍스트란은 $\alpha 1 \rightarrow 6$ 의 구조에 의해 2,3,4-tri-O-methyl-D-glucose와 $\alpha 1 \rightarrow 3$ 가지결합에 의해 2,4,6-tri-O-methyl-D-glucose와 2,3,4,6-tetra-methyl-D-glucose, 2,4- 그리고 3,4-di-O-methyl-D-glucose가 생성되었다(Fig. 2, lane a). 변형 플루란을 methylation한 결과를 변형전의 플루란과 비교해보면, 2,3,4,6-tetra-O-methyl-D-glucose의 상대적인 양은 증가하였고, 2,3,6-tri-O-methyl-D-glucose와 2,3,4-tri-O-methyl-D-glucose의 상대적인 양은 감소하였으며, 2,3- 그리고 2,6-di-O-methyl-D-glucose가 새로이 생겨났다. 이들의 생성은 glucose가 플루란에 $\alpha 1 \rightarrow 3$, $\alpha 1 \rightarrow 4$ 그리고 $\alpha 1 \rightarrow 6$ 의 결합으로 가지구조로 수식됨으로써 생긴 것이고 2,3,4,6-tetra-O-methyl-D-glucose의 증가는 glucose가 하나씩 수식된 구조가 생겼음을 나타낸다.

수용체 반응에 사용한 효소량의 영향을 살펴본 결과 효소 양을 8.4 U/ml에서 0.8 U/ml로 감소함에 따라 변형 플루란의 가지구조의 $\alpha 1 \rightarrow 4$ 결합의 상대적인 양은 1.5배 증가하고, $\alpha 1 \rightarrow 6$ 결합과 $\alpha 1 \rightarrow 2$ 그리고 $\alpha 1 \rightarrow 3$ 가지구조의 양은 줄어들었다. 이는 이 효소의 작용 특이성이 다른 결합에 비하여 $\alpha 1 \rightarrow 4$ 구조를 선호하기 때문으로 생각된다.

요 약

텍스트란수크라제는 sucrose를 이용하여 텍스트란의 합성을 촉진하는데 sucrose 이외에 다른 탄수화물이 효

소 반응기 중에 존재하는 경우에는 sucrose의 glucose를 이 탄수화물에 전달하는 반응을 촉진하여 새로운 구조의 산물을 생산한다. *Leuconostoc mesenteroides* B-742CB로부터 얻은 텍스트란수크라제를 이용하여 플루란을 변형하고 그 조건을 최적화 하고자 했다. 수용성 변형 플루란은 이론적 수율의 57%(± 5)를 얻었다. 플루란 변형의 최적 조건으로는 pH 5.2, 28°C에서 기질 0.37%(w/v)와 반응한 효소의 농도와 sucrose농도가 각각 0.1 U/ml과 48 mM일 때 였다. 변형 플루란을 pullulanase, endo-dextranase로 처리하여 변형 전의 플루란과 가수분해 상태를 비교 분석한 결과 변형전의 산물에 비해 이들 가수분해 효소에 대해 더 저항성을 보였다. 변형 플루란을 methylation과 산가수분해 후 TLC한 결과 sucrose의 glucose가 플루란 glucose의 C3, C4, C6 위치의 free-OH group에 수식된 새로운 구조의 변형 플루란임을 확인 하였다.

감사의 말

본 연구는 농림수산부에서 시행한 농림수산 특정연구사업의 지원과 농업생물신소재개발연구센터를 통한 한국과학재단의 지원을 받아 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Chludzinski, A. M., G. R. Germaine, and C. F. Schachtele. 1974. Purification and properties of dextranase from *Streptococcus* mutants. *J. Bact.* **118**: 1-7.
2. Cote, G. L. and J. F. Robyt. 1982. Acceptor reactions of alternansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* B-1355. *Carbohydr. Res.* **111**: 127-142.
3. Fox, J. D. and J. F. Robyt. 1991. Miniaturization of three carbohydrate analyses using a microsample plate reader. *Anal. Biochem.* **195**: 93-96.
4. Fu, D. and J. F. Robyt. 1990. Acceptor reactions of maltodextrins with *Leuconostoc mesenteroides* B-512FM dextranase. *Arch. Biochem. Biophys.* **283**: 379-386.
5. Kim, D. and J. F. Robyt. 1994. Properties of *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMC constitutive dextranase. *Enzyme Microbial Technol.* **16**: 1010-1014.
6. Kim, D. and J. F. Robyt. 1995. Production and selection of mutants of *Leuconostoc mesenteroides* constitutive for glucansucrases. *Enzyme Microbial Technol.* **16**: 659-664.
7. Kim, D. and J. F. Robyt. 1995. Production, selection, and characteristics of mutants of *Leuconostoc mesenteroides* B-742 constitutive for dextranases. *Enzyme Microbial Technol.* **17**: 689-695.
8. Kim, D. and J. F. Robyt. 1995. Dextranase constitutive mutants of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299. *Enzyme Microbial Technol.* **17**: 1050-1056.
9. Kim, D., J. S. Baek, and J. H. Lee. 1995. Characteristics

- of dextransucrase of *Leuconostoc mesenteroides* B-1299 mutants, and enzymatic modification of the amylose and pullulan. *Ann. RCNBMA*. **4**: 41–57.
10. Mukerjea, R., D. Kim, and J. F. Robyt. 1996. Simplified and improved methylation analysis of saccharides, using a modified procedure and thin-layer chromatography. *Carbohydr. Res.* **292**: 11–20.
 11. Robyt, J. F. and S. H. Eklund. 1983. Relative, quantitative effects of acceptors in the reaction of *Leuconostoc mesenteroides* B-512F dextransucrase. *Carbohydr. Res.* **121**: 279–286.
 12. Robyt, J. F. and T. F. Walseth. 1986. The mechanism of the acceptor reaction of *Leuconostoc mesenteroides* B-512F dextransucrase. *Carbohydr. Res.* **154**: 229–238.
 13. Seymour, F. R., E. C. Chen, R. D. Plattner, and A. Jeanes. 1977. Six unusual dextrans: Methylation structural analysis by combined G.L.C.-M.S. of per-*o*-acetyl-al-dononitriles. *Carbohydr. Res.* **53**: 153–166.
 14. Seymour, F. R., E. C. M. Chen, and S-H. Bishop. 1979. Methylation structural analysis of unusual dextrans by combined gas-liquid chromatography-mass spectrometry. *Carbohydr. Res.* **68**: 113–121.
 15. Su, D. and J. F. Robyt. 1993. Control of the synthesis of dextran and acceptor-products by *Leuconostoc mesenteroides* B-512FM dextransucrase. *Carbohydr. Res.* **248**: 339–348.

(Received November 18, 1997)