

Cyclodextrin Glucanotransferase를 이용한 당전이 Xylitol의 합성과 비피더스균 생육증식 효과

김태권 · 박동찬 · 이용현*
경북대학교 자연과학대학 유전공학과

Synthesis of Transglucosylated Xylitol Using Cyclodextrin Glucanotransferase and Its Stimulating Effect on the Growth of *Bifidobacterium*. Kim, Tae-Kwon, Dong-Chan Park, and Yong-Hyun Lee*. Department of Genetic Engineering, College of Natural Sciences, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea - Several transglucosylated xylitols were synthesized using intermolecular transglucosylation reaction of cyclodextrin glucanotransferase (CGTase) and their bifidogenic effects were investigated. The CGTase from *Thermoanaerobacter* sp. showed the highest transglycosylation activity on xylitol compared to those obtained from other strains. Extruded starch was identified to be the most suitable glucosyl donor for transglucosylation reaction on xylitol molecule by CGTase. The optimum reaction conditions for transglucosylation were also studied using extruded starch as a glucosyl donor. The transglucosylated xylitols were purified by activated carbon column chromatography with ethanol gradient elution from 0 to 18%, and their chemical structures were analyzed by fast atom bombardment mass spectrometer, ¹³C-nuclear magnetic resonance spectrometer, and enzyme digestion method. Two transglucosylated xylitol, F-I and F-II, which had one or two glucose molecules attached to maternal xylitol by α -1,4-linkage, were mainly obtained. F-II showed increased stimulation effect on the growth of *Bifidobacterium breve* compared to xylitol, indicating the possibility utilized as a new functional alternative sweeteners having bifidogenic effects.

Key words: transglucosylation, cyclodextrin glucanotransferase, transglucosylated xylitol, bifidogenic effector

Cyclodextrin glucanotransferase(EC 2.4.1.19, CGTase)는 환화반응(cyclization), coupling과 disproportionation 반응, 그리고 cyclodextrin(CD) 분해반응 등 여러 가지 촉매작용을 동시에 일으키는 효소이다[16, 22]. 이중 coupling과 disproportionation 반응은 전분, CD, maltooligo당 등 당공여체의 말단 당분자를 각종 당 수용체에 전이시키는 분자간 당전이 반응을 말하는데 이를 이용하여 새로운 기능성을 가진 유용 당전이 반응산물을 생산하려는 연구가 활발히 진행되고 있다[16].

CGTase의 당전이 반응은 glucose, sucrose, xylose, sorbose, inositol, lactose와 같은 당류[7, 15, 18, 20, 23], ascorbic acid, moranoline, stevioside, hesperidin, rutin 등과 같은 배당체[1, 9, 21]를 당수용체로 이용한 연구가 이루어지고 있으며, 포도당 분자가 부가된 당전이 산물은 주로 감미의 향상, 용해성 증가, 장내 유용세균 증식효과, 화학안정성의 증가 등의 기능을 부가하는 것으로 알려져 있다[16].

당알콜(sugar alcohol)은 sorbitol, mannitol, maltitol, xylitol, 그리고 수소화된 전분가수분해물 등이 있으며,

glucose, maltose, xylose와 같은 일반적인 당류의 aldehyde기가 alcohol기로 환원된 분자구조를 가지고 있는 기능성 당류로서 현재 대체감미료로 많이 활용되고 있다 [3]. 일반적으로 당알콜은 free carbonyl기를 가지고 있지 않아 Maillard 반응이 일어나지 않으며, 다른 단당류, 이당류에 비하여 열에 안정하고, 미생물에 의해 쉽게 분해되지 않으며, 대부분 체내에 흡수되어 에너지원으로 이용되나 체내 흡수는 느리게 진행된다. 용액상에서 흡열성이 높아 청량감이 있으며, 감미도는 설탕과 비교하여 다소 낮거나 거의 유사한 수준이며, mannitol을 제외한 대부분은 흡습성이 높은 특징이 있다. 용도는 주로 저충치성, 저칼로리성 기능성 당으로서 식품, 의약품, 화장품 등 다양한 분야에서 설탕의 대체감미료로 이용되고 있다[3].

이러한 당알콜을 당수용체로 이용하여 각종 전이효소로 당분자를 전이결합시켜 얻어지는 전이당알콜은 당알콜이 가지는 우수한 물리화학적 특성이외에도 장내유용세균인 *Bifidobacterium*의 증식 효과를 부가적으로 가지는 새로운 기능성 올리고당으로써 주목받고 있으며, 최근 전이효소의 검색과 효율적인 생산법에 관한 연구가 진행되고 있다. Sato 등[18, 19]은 *Bacillus ohbensis* 유래의 CGTase를 이용하여 당수용체인 *myo*-inositol에 당을 전이시켜 얻어진 oligoglucosyl-inositol이 장내유용세균

*Corresponding author
Tel. 82-53-950-5384, Fax. 82-53-959-8314
E-mail: leeyh@kyungpook.ac.kr

인 *Bifidobacterium*의 증식효과가 매우 크다고 보고하였으며, Kitao 등[8]은 glucose-1-phosphate를 당공여체로, xylitol을 당수용체로하여 *Leuconostoc mesenteroides* 유래의 sucrose phosphorylase의 당전이 반응을 이용하여 얻어진 glucosyl-xylitol이 충치균인 *Streptococcus mutans*에 의한 glucan의 형성 억제 효과가 있으며, 그 외에도 다양한 새로운 기능성을 가질 것으로 기대된다고 보고한 바 있다.

전보[6]에서 본 연구자들은 각종 당알코올을 당수용체로 이용하여 여러 종류의 당전이 효소의 당전이능을 검토하여 CGTase가 maltitol, myo-inositol, 그리고 xylitol 등에 높은 당전이능을 보이는 것을 확인하였으며, 최적 당전이 반응조건을 검토하고, 생성된 전이당알코올의 당쇄결합구조를 분석하였다. 특히 CGTase가 xylitol을 당수용체로 이용하여 여러 종류의 당전이 xylitol을 높은 수율로 생산할 수 있음을 확인하였으며, 이를 바탕으로 생산된 당전이 xylitol을 새로운 기능성 당으로 활용하기 위한 가능성을 검토할 필요성이 있음을 알았다.

본고에서는 xylitol을 당수용체로 하였을 때, 기원이 다른 여러 종류의 CGTase에 대한 당전이능을 검토하여 적정 효소를 선별하고, 당공여체의 검토와 반응 최적 조건을 확립하였으며, 생성된 당전이 xylitol을 분리하여 당쇄결합구조를 확인하였다. 그리고 당전이 xylitol의 장내유용세균인 *Bifidobacterium*에 대한 생육 증식 효과를 검토하였다. 이러한 연구는 기능성 대체감미료로 사용량이 점차 증가되고 있는 당알코올류가 가지는 고유의 특성이 외에 새로운 생리적 효과를 부여한 기능성 당류로 활용하기 위한 기초 자료로 이용될 수 있을 것이다.

재료 및 방법

Cyclodextrin glucanotransferase의 활성 측정

당전이 효소로 사용한 cyclodextrin glucanotransferase는 *Bacillus macerans*(Amano Pharmaceutical Co., Ltd., Japan), *Thermoanaerobacter* sp.(Novo-Nordisk Co., Denmark), 그리고 *Bacillus firmus* var. *alkalophilus*[5] 유래의 것을 사용하였다.

CGTase의 활성은 Kitahata 등[7]의 방법에 따라 1% (w/v) 가용성 전분 용액(pH 6.0) 1 ml과 효소액 10 μ l을 50°C에서 10분간 반응시킨 후 8 ml의 iodine 용액(0.02% I₂, 0.2% KI)을 첨가하여 550 nm에서 투광도를 측정하여 결정하였으며 분당 1%의 투광도를 증가시키는 효소의 양을 1 unit로 하였다. *B. macerans* 유래의 CGTase의 비활성은 513.5 units/mg protein, *Thermoanaerobacter* sp. 유래의 CGTase는 488.2 units/mg protein, 그리고 *B. firmus* var. *alkalophilus* 유래의 CGTase는 353.8 units/mg protein이었다.

당수용체 및 당공여체

당수용체로는 xylitol(M.W. 152.1, Sigma Chemical Co., U.S.A.)을 이용하였으며 당공여체로는 maltooligosaccharides(G₃-G₇, Sigma Chemical Co., U.S.A.), α -, β -, γ -CD(CycloLab, Ltd., Hungary), 가용성 전분, glycogen, 그리고 dextrin(Sigma Chemical Co., U.S.A.)을 이용하였고 압출 전분(extruded starch)은 전보[17]에서와 같이 제조하여 사용하였다.

당전이 효소반응

당공여체 50 g/l와 당수용체 50 g/l를 20 mM Tris-Maleic acid-NaOH 완충용액(pH 6.0)에 현탁하고 각 당전이 효소를 첨가하여 50°C에서 200 rpm으로 교반하면서 반응시켰으며 경우에 따라 상기반응을 변화시켰다.

당전이 반응 수율 측정

당전이 반응 수율은 반응 전후의 당수용체의 농도를 측정하여 다음과 같이 구하였다.

당전이 반응 수율(%)=

$$\left(1 - \frac{\text{반응 후 당수용체의 농도}}{\text{반응 전 당수용체의 농도}}\right) \times 100$$

당전이 산물의 분리 및 정제

반응 후의 압출 전분과 당전이 산물의 혼합물은 3000 \times g에서 15분 동안 원심분리하여 분리하였고 감압농축기로 5배 농축하였다. 당전이 산물의 분리는 활성탄-셀라이트 칼럼 크로마토그래피를 이용하여 분리하였다. 즉 활성탄과 셀라이트를 2:1로 섞은 뒤 이를 증류수에 하루 동안 잘 교반시킨 후 직경 3 cm, 길이 15 cm의 유리 칼럼에 충전시켰다. 5 ml의 반응혼합물을 넣은 후 100 ml의 증류수로 전개시켜 주었다.

활성탄에 흡착된 당전이 산물은 에탄올 0~18%(v/v) 농도구배로 유출시켜 분리하였으며 이때 유속은 15 ml/hr로 유지하였고 각각 2 ml씩 분획하였다. 각 분획의 당농도는 페놀-황산법[4]으로 측정하였으며 그 조성은 HPLC를 통해 확인하였다.

Fast atom bombardment(FAB) mass spectrometer와 ¹³C-nuclear magnetic resonance(NMR) spectrometer를 이용한 당전이 산물의 당쇄결합 구조확인

분리한 당전이 산물의 분자량은 JEOL JMS-AX 505 mass spectrometer(Jeol Co., Japan)을 이용하여 FAB 모드로 확인하였으며 glycerol을 matrix로 argon gas를 bombarding gas로 사용하였다. 당전이 산물의 당쇄결합 구조는 ¹³C-NMR을 통해 확인하였다. NMR용 시료는 각각 분리된 분획을 동결건조하여 Me₂SO-d₆에 녹여 조제

하였으며 ^{13}C -NMR 스펙트럼은 25°C에서 75 MHz Varian Unity Plus Spectrometer(Varian Co., USA)를 통해 확인하였고 trimethylsilane(TMS)를 표준물질로 사용하였다.

효소소화법을 이용한 당전이 산물의 당쇄 결합구조의 확인

당전이 산물의 포도당 결합양상을 좀 더 확실하게 확인하기 위해 상기 반응조건에서 반응시킨 당전이 반응액을 amyloglucosidase(EC 3.2.1.3., Sigma. Co. U.S.A)로 처리하여 생성된 당조성을 HPLC로 분석하였다. Amyloglucosidase의 비활성은 11.6 units/mg protein이었으며 사용량은 2,000 units/ml이었고 20 mM Tris-Maleic acid-NaOH 완충용액(pH 6.0), 50°C 조건에서 12시간 동안 반응시켰다.

당전이 xylitol을 이용한 *Bifidobacterium*에 대한 생육 효과 검토

당전이 xylitol의 *Bifidobacterium*에 대한 생육효과 검토에 사용된 균주는 *Bifidobacterium breve* KCTC 3220였다. Trypticase-Phytone-Glucose(TPG) 배지에서 활성화하여 7일마다 계대 배양하였으며 배지 1 l 중의 조성은 trypticase(BBL 11921) 10.0 g, phytone(BBL 11906) 5.0 g, glucose 15.0 g, yeast extract 2.5 g, cystein 0.5 g, K_2HPO_4 2.0 g, MgCl_2 0.5 g, ZnSO_4 0.25 g, 미량의 FeCl_3 , 그리고 agar 8.0 g이었다. 당전이 xylitol의 탄소원으로서의 이용성은 변형된 PYF 당검색용 배지[2]를 이용하였고, 배지 1 l 조성은 yeast extract 10.0 g, protase peptone NO.3(Difco. Co.) 5.0 g, tryptone 5.0 g, L-cystein · HCl · H_2O 0.5 g, 염용액(CaCl_2 0.2 g/l, NaHCO_3 10.0 g/l, MgSO_4 0.2 g/l, NaCl 2.0 g/l, K_2HPO_4 1.0 g/l) 40.0 ml이었으며, 탄소원의 첨가량은 5 g/l였고 seed를 5% 접종하였다. 배양을 위한 seed는 상기 TPG 배지에서 2일간 배양하여 제조하였다.

각 배양용기는 질소로 치환하였으며, 37°C에서 120시간 동안 정치배양하였다. 각 배양액의 흡광도는 spectrophotometer(Milton Roy. Co. U.S.A.)를 이용하여 600 nm의 파장에서 측정하여 생육곡선을 작성하였다.

분석 방법

각종 당수용체와 CD의 농도는 high performance liquid chromatography(HPLC. Model-305, Gilson Medical Electronics, Inc., France.)을 사용하여 결정하였으며, column은 Cosmosil 5NH₂ packed column(Nacalai Tesque, Inc., Japan), 용출용매는 acetonitril과 H_2O (65:35)의 혼합용액, 용출속도는 1.0 ml/min이었고, RI detector로 검정하였다.

Table 1. Comparison of the transglycosylation yield of various CGTases using sugar alcohols as glycosyl acceptor

| Sugar alcohols | Source of CGTase | | |
|----------------|--------------------------|-------------------------------|---|
| | <i>Bacillus macerans</i> | <i>Thermoanaerobacter</i> sp. | <i>Bacillus firmus</i> var. <i>alkalophilus</i> |
| Sorbitol | 15.6 ¹⁾ | 7.8 | N.D. |
| Xylitol | 27.8 | 28.3 | 12.9 |
| myo-Inositol | 46.5 | 58.7 | N.D. |
| Mannitol | N.D. ²⁾ | 4.0 | N.D. |
| Erythritol | N.D. | N.D. | N.D. |
| Maltitol | 48.4 | 60.3 | 44.7 |
| Lactitol | N.D. | N.D. | N.D. |

1) transglycosylation yield(%) after 24 hr. 2) not detected.
Reaction conditions: 50 g/l of sugar alcohol, 50 g/l of soluble starch, 1,200 units of enzyme/g of starch, pH 6.0, 50°C, and 24 hr.

결과 및 고찰

각종 cyclodextrin glucanotransferase의 당알콜에 대한 당전이능

Table 1은 *Bacillus macerans*, *Thermoanaerobacter* sp., 그리고 *B. firmus* var. *alkalophilus* 유래의 CGTase를 이용하여 여러 종류의 당알콜을 당수용체로 하여 24시간 후의 당전이 수율을 비교한 것이다. *B. macerans*와 *Thermoanaerobacter* sp. 유래의 CGTase는 sorbitol, xylitol, myo-inositol, maltitol 등의 당알콜류에 당전이능을 보였으나, *B. firmus* var. *alkalophilus* 유래의 CGTase는 xylitol, maltitol외에는 당전이능이 관찰되지 않았다. *B. macerans* 유래의 CGTase는 xylitol의 경우 27.8%, myo-inositol과 maltitol은 각각 46.5, 48.4%의 당전이 수율을 나타내었다. 또한 *Thermoanaerobacter* sp. 유래의 CGTase의 경우 xylitol은 28.3%, myo-inositol은 58.7%, 그리고 maltitol의 경우 60.3%의 당전이 수율을 보여 *B. macerans* 유래의 CGTase보다 높은 당전이 수율을 나타내었다. 이러한 결과는 기원에 따라서 당수용체 특이성과 당전이능이 다른 CGTase의 반응특성에 의한 것으로 사료된다.

한편 Kitao 등[8]은 *Leuconostoc mesenteroides* 유래의 sucrose phosphorylase의 당전이 반응을 이용하여 xylitol과 glucose-1-phosphate를 기질로 하여 glucosyl-xylitol을 합성하였는데 이 경우 당전이 수율이 5.1%에 불과하였고, 중합도가 2 이상인 당전이산물의 합성은 불가능하였으며 glucose-1-phosphate와 같은 특이한 당공여체를 사용하여야 하는 단점이 있었다. 이에 비하여 본 실험에서와 같은 CGTase를 이용한 경우 28.3%의 높은 수율로 당전이 xylitol을 합성할 수 있었으며, 중합도 2 이상의 여러 가지 당전이 산물의 생산도 가능하였다. 또한 당공여체로 전분을 사용할 수 있는 장점이 있으므로 당전이 xylitol의 생산에 매우 유용한 방법이라 할 수 있다.

Table 2. Donor specificity for transglycosylation reaction of CGTase from *Thermoanaerobacter* sp. using xylitol as the glucosyl acceptor

| Kinds of donors | Transglycosylation yield (%) |
|---------------------------------|------------------------------|
| α -Cyclodextrin | 31.3 ¹⁾ |
| β -Cyclodextrin | 28.4 |
| γ -Cyclodextrin | 10.4 |
| Maltotriose (G ₃) | 4.5 |
| Maltotetraose (G ₄) | 6.0 |
| Maltopentaose (G ₅) | 17.9 |
| Maltohexaose (G ₆) | 20.1 |
| Maltoheptaose (G ₇) | 26.8 |
| Dextrin | 21.5 |
| Soluble starch | 28.4 |
| Glycogen | 27.8 |
| Extruded starch | 33.7 |

1) transglycosylation yield (%) after 24 hr.

Reaction condition : 50 g/l of xylitol, 50 g/l of each donors, 1,200 units/g of starch, 50°C, 200 rpm, and 24 hr.

Thermoanaerobacter sp. 유래 CGTase의 당전이 반응에 적절한 당공여체의 검토

Table 2는 xylitol을 당수용체로 하고 여러 가지 포도당 중합체를 당공여체로 하였을 때 *Thermoanaerobacter* sp. 유래의 CGTase의 당전이 반응 수율을 나타낸 것이다. CDs, dextrin, 그리고 전분을 당공여체로 사용하였을 때 높은 당전이 수율을 보여주며 중합도 4 이하의 maltooligosaccharides는 매우 낮은 당전이 수율을 나타내고 있다. 사용된 CD 중에는 α -CD가 당전이 수율 31.3%로 β -, γ -CD에 비해 높은 수율을 나타내었다. 이러한 결과는 *Thermoanaerobacter* sp. 유래의 CGTase가 α -CD를 주로 합성하는 효소로 알려져 있어 효소의 활성부위가 α -CD와 가장 친화력이 높은 구조적 특이성을 가지기 때문으로 추정된다.

한편 maltooligosaccharides는 중합도가 높아질수록 당전이 수율이 증가하는 경향을 보이며 중합도가 4이하인 경우는 당공여체로 거의 이용될 수 없음을 알 수 있다. 사용한 다당류들은 거의 비슷한 당전이 수율을 보이며 압출 전분을 사용하였을 경우 당전이 수율이 33.7%로 가장 높았다. 불용성 압출 전분을 당공여체로 이용할 경우는 전보[10-14]에서 살펴본 바와 같이 높은 반응 속도와 수율을 얻을 수 있으며 반응 산물의 분리가 용이한 장점이 있을 것으로 기대된다.

CGTase를 이용한 당전이 xylitol의 생산 조건 검토

적정 당전이 효소 사용량 Fig. 1은 *Thermoanaerobacter* sp. 유래의 CGTase를 이용한 xylitol의 당전이 반응에서 적절한 효소사용량을 검토하고자 당공여체인 압출 전분 50 g/l와 당수용체인 xylitol 50 g/l를 첨가하고 당전이효소인 CGTase의 양을 100~6,000 units/g starch

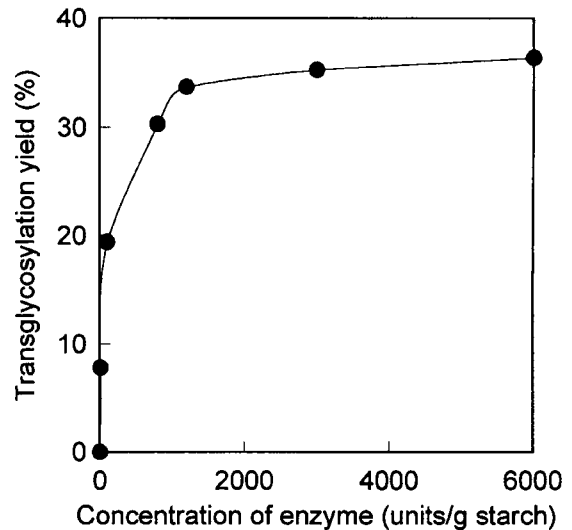


Fig. 1. Effect of the amount of CGTase from *Thermoanaerobacter* sp. on the transglycosylation yield of xylitol using extruded starch as the glucosyl donor.

Reaction condition : 50 g/l of xylitol, 50 g/l of extruded starch, pH 6.0, 200 rpm, 50°C and 24 hr.

로 변화시켰을 때 24시간 후의 당전이 수율을 나타낸 것이다. 효소의 양이 1,000 units/g starch일 때까지는 당전이 수율이 일정하게 증가하였으나 그 이후로는 거의 일정한 수율을 유지하였다. 이러한 결과는 전보[6]에서 살펴본 바와 같이 일정한 양 이상의 효소가 첨가되어도 작용할 수 있는 당공여체의 환원성 말단의 양이 고정되어 있으므로 반응이 어느 수준이상 일어나지 않기 때문으로 생각된다. 이러한 결과로 볼 때 xylitol의 당전이 반응의 적정 효소 사

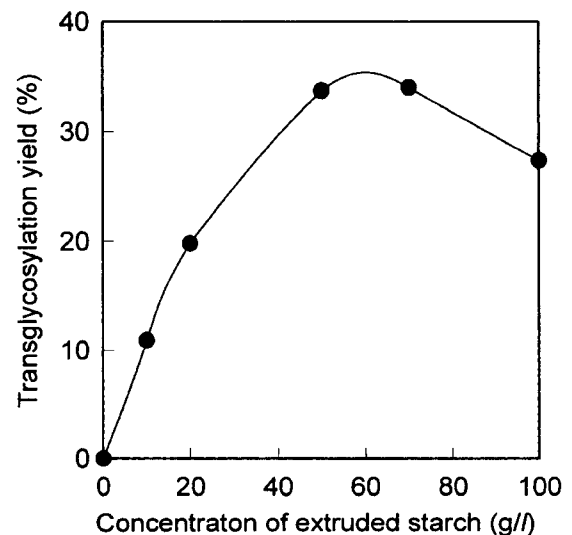


Fig. 2. Effect of mixing ratio between xylitol and extrusion starch on the transglycosylation yield of xylitol.

Reaction condition : 50 g/l of xylitol, 10~100 g/l of extruded starch, pH 6.0, 200 rpm, 50°C and 24 hr.

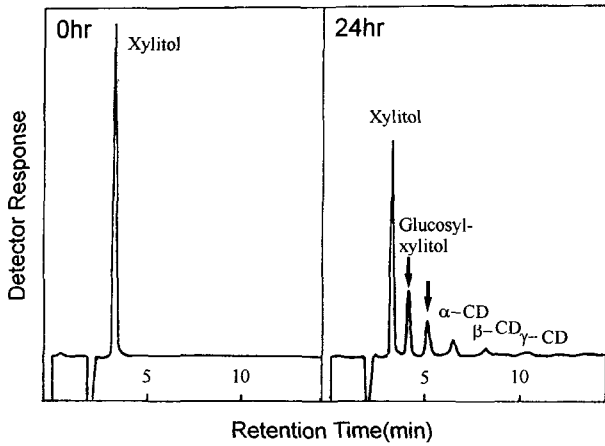


Fig. 3. HPLC chromatogram of the reaction mixture obtained from transglycosylation reaction of CGTase using xylitol as the glucosyl acceptor and extruded starch as the glucosyl donor.

용량은 1,000~1,500 units/g starch 전후로 판단된다. 당공여체와 당수용체의 혼합비 Fig. 2는 당공여체와 당수용체의 적정 혼합비를 정하고자 xylitol의 농도를 50 g/l로 고정하고 당공여체인 압출 전분의 농도를 10~100 g/l로 변화시켰을 때 24시간 후의 당전이 수율이 나타낸 것이다. 당공여체의 농도가 50 g/l까지는 농도에 비례하여 당전이 수율이 증가하였으나 그 이후에는 오히려 당전이 수율이 감소하는 경향을 나타내었는데 이는 높은 전분 농도에서는 CD 합성반응과 같은 당전이 반응 이외의 반응이 촉진되기 때문인 것으로 유추된다. 이러한 결과로 볼 때 적절한 당공여체와 당수용체의 혼합비는 1:1 (g starch/g xylitol)인 것으로 판단된다.

당전이 산물의 분리와 구조분석

활성탄-셀라이트 칼럼 크로마토그래피를 이용한 당전이 xylitol의 분리 Fig. 3은 xylitol을 당수용체로 하고 압출 전분을 당공여체로 하였을 때 CGTase의 당전이 반응 산물을 HPLC로 분석한 결과이다. Fig. 3(A)는 반응 전의 구성물을 HPLC로 확인한 결과로 xylitol만이 단일 peak로 확인되었으며 Fig. 3(B)는 반응 24시간 후의 HPLC로 분석한 결과로 미반응 xylitol, 여러 종류의 당전이 xylitol, 그리고 미량의 CD에 대한 peak들이 관찰되었다. 각각의 당전이 xylitol은 glucose 한 개와 두 개가 전이된 것으로 추정되는데 이들의 정확한 결합 양상과 구조를 해석하기 위해서는 먼저 각각의 당전이 산물을 분리할 필요가 있다.

Fig. 4는 이러한 당전이 xylitol의 분리를 위하여 활성탄-셀라이트 칼럼 크로마토그래피에서 먼저 증류수 100 ml로 유출시킨 후 에탄올 농도를 0~18%로 증가시키면서 분획한 각 시료의 당농도를 측정한 결과이다. 에탄올

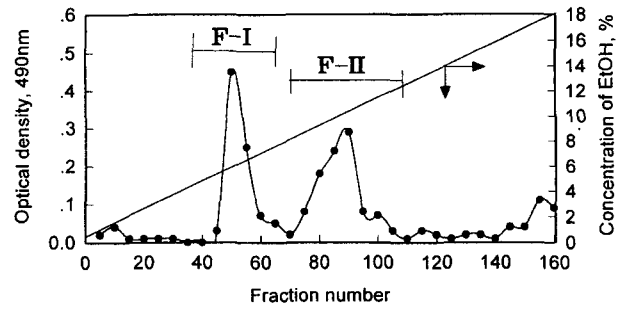


Fig. 4. Purification profiles of each transglycosylated product on activated carbon column chromatography. Packing glass column, 3 cm diameter and 15 cm height; ethanol gradient elution from 0 to 18% (v/v); flow rate, 15 ml/hr; fraction volume, 2 ml.

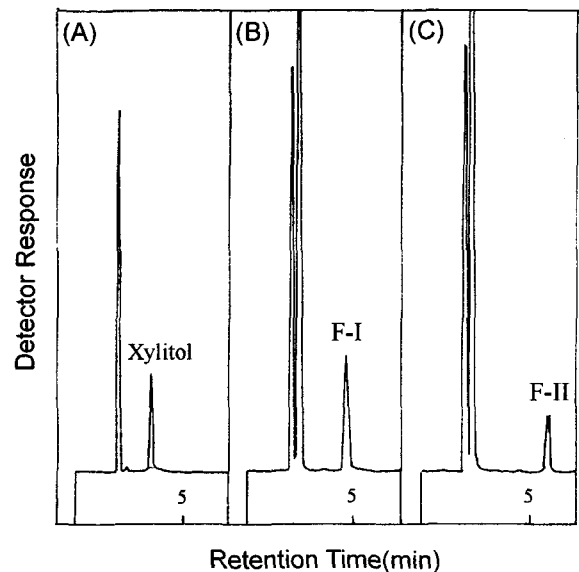


Fig. 5. HPLC chromatogram of xylitol (A) and purified fraction of glucosyl xylitols, F-I (B), and F-II (C).

의 농도가 각각 6~8%와 9~12%일 때 peak가 관찰되었으며 이를 각각 F-I과 F-II로 구분하였다.

Fig. 5는 증류수로 유출시킨 분획(A), F-I 분획(B), 그리고 F-II 분획(C)을 각각 HPLC로 분석한 결과이다. 각 분획에서 단일 peak가 관찰되었고 이로 미루어 각 분획은 한 종류의 당으로 분리되었음을 알 수 있다. 또한 각 peak의 유지시간(retention time)으로 미루어 보아 Fig. 5(A)는 미반응 xylitol로 확인되었으며, Fig. 5(B)와 (C)는 각각 당전이 xylitol인 것으로 판단된다. 그러나 이러한 당전이 xylitol의 포도당 잔기의 정확한 결합 양식의 확인을 위해서는 mass spectrometer나 ¹³C-NMR spectrometer와 효소소화법을 이용한 분석이 필요한 것으로 사료된다.

FAB-Mass spectrometer와 ¹³C-NMR spectrometer를 이용한 당전이 xylitol 분획 F-I의 당쇄결합 구조 확인 Fig. 6은 분리된 당전이 산물인 F-I의 FAB-Mass 스

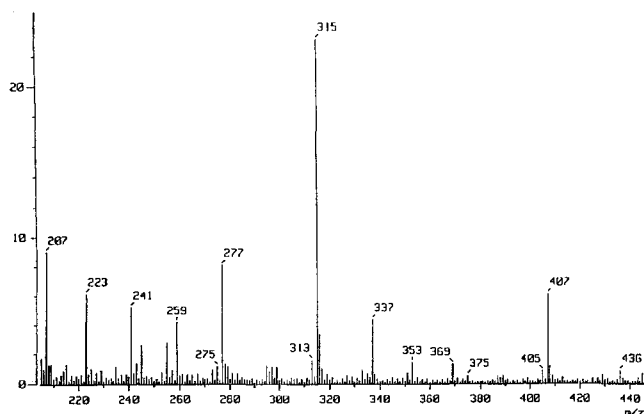


Fig. 6. FAB-Mass spectrum of purified F-I.

펙트럼을 나타낸 것이다. 여기서 $[M+H]^+$ peak는 315로 확인되었는데 이는 xylitol과 glucose가 glucosidic 결합을 하였을 때 이론적 분자량인 314.2와 거의 같은 값으로 그 구성당이 xylitol과 glucose임을 추정할 수 있다.

이러한 결합구조를 보다 명확히 규명하기 위해 ^{13}C -NMR을 이용하여 각각의 당전이 xylitol(F-I)의 glucose기와의 결합 양식을 확인하였다. Fig. 7은 분리된 F-I의 ^{13}C -NMR 스펙트럼을 나타낸 것으로 각각의 탄소의 화학적 이동을 나타내고 있다. Table 3는 xylitol, α -D-glucose, 당전이산물인 F-I, 그리고 표준물질인 α -D-glucose- α -1,4-Xylitol의 각각의 탄소의 화학적 이동값(chemical shift)을 나타내었다.

F-I 시료의 glucose분자의 C-1과 xylitol 분자의 C-4에 대한 화학적 이동값이 각각의 표준 시료 값에 비하여 약간의 변화가 있으며 다른 탄소의 경우는 표준 시료의 값과 거의 유사한 값을 보이고 있다. 즉 F-I 시료에서 glucose잔기의 C-1에 대한 화학적 이동값은 δ 100.9로 표준 시료인 α -D-glucose의 C-1의 값(δ 93.0)에 비하여 다소 증가하였는데 이는 시료의 glucose C-1 탄소가 다른 당분자의 탄소와 결합을 하고 있기 때문에 그 resonance가 downfield로 이동하기 때문이다.

또한 F-I 시료의 xylitol 잔기의 C-4에 대한 화학적 이동값은 δ 80.8로서 표준시료 xylitol의 C-4에 대한 화학적

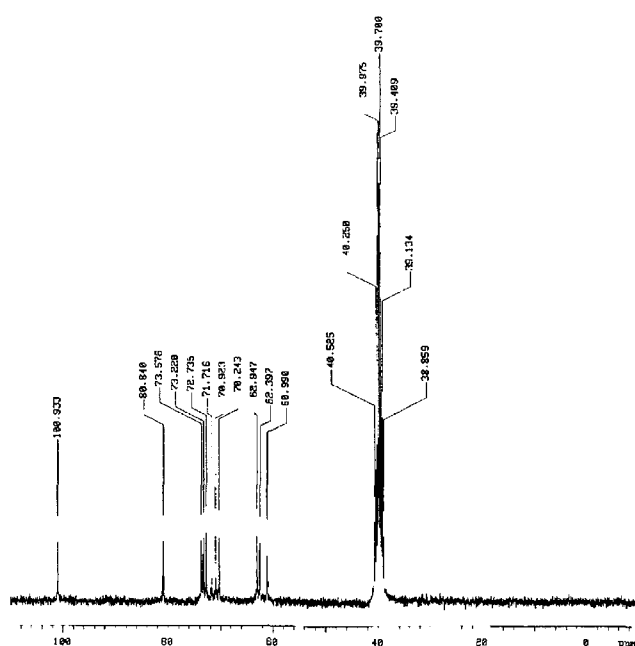


Fig. 7. ^{13}C -NMR spectrum of purified F-I.

이동값 δ 71.9에 비하여 downfield로 이동해 있어 이 탄소 또한 다른 당과의 결합에 관련되어 있다고 판단된다. 또한 비교표준물질로 나타낸 α -D-glucose- α -1,4-Xylitol의 각각의 탄소의 화학적 이동값과 F-I의 화학적 이동값이 거의 일치하는 것으로 보아 F-I은 각각의 glucose 잔기 사이의 결합은 α -1,4 결합으로 연결되어 있음을 알 수 있었다. 이로 미루어 F-I의 구조는 glucosyl-xylitol(α -D-glucose- α -[1,4]-xylitol)로 판단된다.

효소소화법을 이용한 당전이 xylitol 분획 F-II의 당쇄결합양상 다른 하나의 당전이 산물의 분획인 F-II의 당결합 구조를 확인하기 위하여 당전이 xylitol 분획 F-II를 glucoamylase로 처리하여 HPLC 크로마토그램으로 분석한 결과는 Fig. 8과 같다. 당전이 xylitol 분획 F-II의 당조성은 Fig. 8(A)와 같으며, 이 시료를 glucoamylase로 처리한 결과 Fig. 8(B)와 같이 모두 glucose와 xylitol로 전환되었다.

사용한 glucoamylase는 α -1,4-glycosidic 결합 분해

Table 3. Chemical shift of xylitol, α -D-glucose, and separated glucosyl-xylitol F-I in ^{13}C -NMR spectra

| Glucosyl-xylitol and standards | Residues | C-1 | C-2 | C-3 | C-4 | C-5 | C-6 |
|---------------------------------------|-----------------------|--------------------|------|------|------|------|------|
| Xylitol | | 62.6 ^{a)} | 71.9 | 70.7 | 71.9 | 62.6 | |
| α -D-Glucose | | 93.0 | 72.5 | 73.8 | 70.6 | 72.3 | 61.8 |
| F-I | D-Glu ^{b)} | 100.9 | 71.7 | 73.6 | 70.2 | 72.7 | 60.9 |
| | α -1,4-xylitol | 62.9 | 73.2 | 70.9 | 80.8 | 62.3 | |
| α -D-Glucose- | D-Glu | 99.2 | 72.2 | 73.4 | 70.1 | 72.4 | 60.9 |
| α -[1,4]-Xylitol ^{c)} | α -1,4-xylitol | 62.9 | 72.9 | 70.7 | 82.2 | 60.7 | |

a) Chemical shift (δ) in ppm downfield from tetramethylsilane. b) D-glucose residue. c) Data from Kitao and Sekine (8).

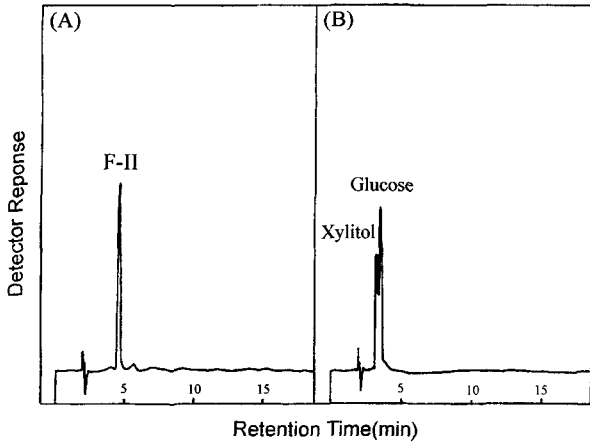


Fig. 8. HPLC chromatogram of F-II before glucoamylase treatment (A) and digested broth by glucoamylase (B).

효소로서 생성된 당전이 xylitol을 모두 분해하였으므로 CGTase가 glucose을 당수용체에 전이할 때는 모두 α -1,4-glycosidic 결합에 의해 연결하는 것으로 추정되며, 당전이 xylitol 분획 F-II는 당수용체인 xylitol에 glucose 2분자가 α -1,4-glycosidic 결합으로 연결된 maltosyl-xylitol(α -D-glucose- α -[1,4]-D-glucose- α -[1,4]-xylitol)의 구조를 하고 있는 것으로 추정된다.

이러한 결과로 얻어진 당전이 xylitol은 CGTase가 합성하는 새로운 올리고당이며 이들 물질에 대한 특징에 대한 연구가 필요할 것으로 생각된다. 특히 신규 당질류에 대한 비피더스 인자로서의 작용에 대한 연구가 활발한 연구가 진행되고 있으며 이에 따른 당전이 xylitol의 비피더스 인자로서의 작용에 대한 검증도 이루어져야 한다고 생각된다.

당전이 xylitol의 Bifidobacterium에 대한 생육 증식 효과

앞에서 분리한 두 종류의 당전이 xylitol에 대한 비피더스균 생육촉진 효과를 대표적인 Bifidobacterium인 B. breve을 사용하여 검토하였다. Fig. 9는 glucose, xylitol, 그리고 당전이 xylitol을 각각 탄소원으로 사용하였을 경우 B. breve에 대한 생육 곡선을 나타낸 결과이다. glucose를 탄소원으로 하였을 때 성장속도는 48시간을 전후로 해서 최고치를 나타내다가 그 이후에는 생육이 거의 정지하는 경향을 보였다. 당전이 xylitol의 경우 F-I은 xylitol을 탄소원으로 이용했을 때와 거의 유사하게 B. breve의 생육에 효과가 거의 없는 반면, F-II를 탄소원으로 첨가하였을 경우에는 24시간까지 성장이 증가하였으며 그 이후에는 조금씩 증가하는 추세를 보였으나 glucose를 탄소원으로 사용한 경우보다 생육 속도와 균체의 농도가 현저하게 증가하였다. 이로 미루어 glucose 1분자가 전이 결합된 당전이 xylitol(F-I)보다는 maltose 분자가 전이 결합된 것으로 추정되는 당전이 xylitol(F-II)

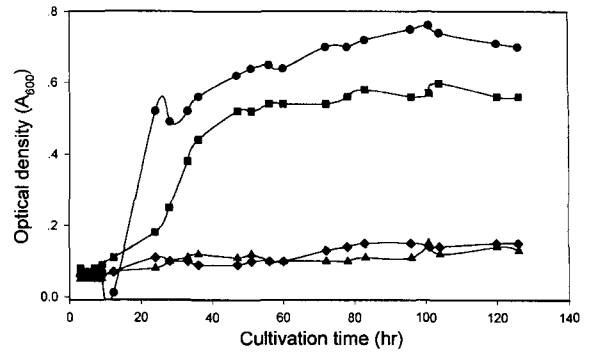


Fig. 9. Growth curve of Bifidobacterium breve in the culture media containing different sugar.

■, Glucose; ▲, F-I; ●, F-II; ◆, xylitol.

이 비피더스균의 생육을 증식하는 효과가 있는 것으로 판단된다. 따라서 이는 본래의 xylitol이 비피더스균의 생육을 증식시키지 못하는 반면, F-II는 당전이 반응에 의해 비피더스균의 생육을 증가시키는 가능성이 부여되었다고 판단되어진다.

인체의 장내에는 B. breve 이외에도 많은 종류의 Bifidobacterium이 존재하고 있으며 Clostridium속의 미생물과 같은 다수의 유해세균도 공존하고 있으므로 앞으로 합성된 당전이 xylitol에 의한 장내 균총의 변화에 대한 종합적인 검토가 필요한 것으로 판단된다. 또한 Bifidobacterium 증식인자로서의 기능성 이외에도 저칼로리성, 충치발생 억제효과와 같은 기능성 및 물리화학적 특성의 검토 등 신규 기능성 대체감미료로 활용하기 위한 후속 연구가 필요한 것으로 사료된다.

요 약

CGTase를 이용한 당전이 xylitol의 합성과 당전이 xylitol의 비피더스균 생육증식 효과에 대한 연구를 수행하였다. 수종의 세균류가 분비하는 CGTase의 xylitol에 대한 당전이능을 비교하였으며, Thermoanaerobacter sp. 유래의 CGTase가 가장 우수한 당전이능을 보였다. 각종 당공여체를 검토한 결과 압출전분이 가장 우수한 결과를 보였으며, 당전이 효소반응의 최적 조건을 검토하였다. 생성된 당전이 xylitol을 활성탄-셀라이트 칼럼 크로마토그래피를 이용하여 분리하여 두 개의 fraction인 F-I, F-II를 얻었다. 이들의 당쇄결합 양상을 FAB mass spectrometer와 ¹³C-NMR spectrometer, 그리고 glucoamylase을 이용한 효소소화법을 이용하여 분석한 결과 xylitol에 glucose와 maltose 분자가 α -1,4 결합되어 있는 것으로 유추되었다. 얻어진 당전이 xylitol은 xylitol과 달리 Bifidobacterium breve에 대한 생육촉진효과를 보였다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단 특정기초 연구비(과제번호 95-0402-05-01-3)와 서울대학교 농업생물신소재연구센터를 통한 한국과학재단 우수연구센터 지원금에 의해 수행되었으며, 연구비 지원에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Aga, H., M. Yoneyama, S. Sakai, and I. Yamamoto. 1991. Synthesis of 2-O- α -D-glucopyranosyl L-ascorbic acid by cyclomaltodextrin glucanotransferase from *Bacillus stearothermophilus*. *Agric. Biol. Chem.* **55**: 1751–1756.
2. Ahn, J. B., J. K. Hwang, C. T. Kim, K. H. Lee, and J. H. Park. 1997. Bifidogenic effect of glucooligosaccharide prepared from glucose by extrusion process. *J. Microbiol. Biotechnol.* **7**: 174–179.
3. Bar, A. 1986. Xylitol, pp. 185–216. In L. O. Narrows and R. C. Gelardi (eds.), *Alternative Sweeteners*. Marcel Dekker, Inc., New York.
4. Chaplin, M. F. 1986. Monosaccharides, pp. 1–2. In M. F. Chaplin and J. F. Kennedy (eds.), *Carbohydrate Analysis-A Practical Approach*. IRL Press, Oxford.
5. Do, E. J., H. D. Shin, C. Kim, and Y. H. Lee. 1993. Selection and characterization of catabolite repression resistant mutant of *Bacillus firmus* var. *alkalophilus* producing cyclodextrin glucanotransferase. *J. Microbiol. Biotechnol.* **3**: 78–85.
6. Kim, T. K., D. C. Park, and Y. H. Lee. 1997. Synthesis of glucosyl-sugar alcohols using glucosyltransferases and structural identification of glucosyl-maltitol. *J. Microbiol. Biotechnol.* **7**: 310–317.
7. Kitahata, S. and S. Okada. 1976. Studies on cyclodextrin glycosyltransferase IV. Enzymatic synthesis of 3-O- α -D-glucopyranosyl-D-sorbose and 4-O- α -D-glucopyranosyl-D-xylose using cyclodextrin glycosyltransferase. *J. Biochem.* **79**: 641–648.
8. Kitao, S. and H. Sekine. 1992. Transglycosylation catalyzed by sucrose phosphorylase from *Leuconostoc mesenteroides* and production of glucosyl-xylitol. *Biosci. Biotech. Biochem.* **56**: 2011–2015.
9. Kometani, T., Y. Terada, T. Nishimura, H. Takii, and S. Okada. 1994. Transglycosylation to hesperidin by cyclodextrin glucanotransferase from an alkalophilic *Bacillus* species and in alkaline pH and properties of hesperidin glycosides. *Biosci. Biotech. Biochem.* **58**: 1990–1994.
10. Lee, Y. H. and D. C. Park. 1991. Enzymatic synthesis of cyclodextrin in a heterogeneous enzyme reaction system containing insoluble extruded starch. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **19**: 514–520.
11. Lee, Y. H. and D. C. Park. 1992. Direct synthesis of cyclodextrin in a heterogeneous enzyme reaction system containing insoluble extruded starch, pp. 127–129. In S. Furusaki, I. Endo, and R. Matsuno (eds.), *Biochemical Engineering for 2001*. Springer-Verlag, Tokyo.
12. Lee, Y. H., S. G. Baek, H. D. Shin, and D. C. Park. 1993. Transglycosylation reaction of cyclodextrin glucanotransferase in the attrition coupled reaction system using raw starch as a donor. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **21**: 461–467.
13. Lee, Y. H. M. J. Cho, and D. C. Park. 1995. Reaction mechanism of cyclodextrin formation from extrusion starch by cyclodextrin glucanotransferase. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 416–424.
14. Lee, Y. H. and D. C. Park. 1996. Characteristics of carbohydrate reactions in heterogeneous enzyme reaction system utilizing swollen extrusion starch as the substrate, pp. 171–188. In K. H. Park, J. F. Robyt, and Y. D. Choi(eds.), *Enzymes for Carbohydrate Engineering*. Elsevier, Amsterdam.
15. Okada, S. 1987. Studies on cyclomaltodextrin glucanotransferase and coupling sugar. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.* **34**: 75–82.
16. Okada, S., S. Kitahata, M. Shiosaka, H. Bunya, M. Kubota, S. Sakai, and Y. Tsujisaka. 1991. Application of cyclodextrin glucanotransferase. *Denpun Kagaku* **38**: 211–215.
17. Park, D. C., T. K. Kim, and Y. H. Lee. 1998. Characteristics of transglycosylation reaction of cyclodextrin glucanotransferase in the heterogeneous enzyme reaction system using extrusion starch as a glucosyl donor. *Enzyme Microb. Technol.* **22**: 217–222.
18. Sato, M., T. Matsuo, N. Orita, and Y. Yagi. 1991. Synthesis of novel sugars, oligoglucosyl-inositols, and their growth stimulating effect for *Bifidobacterium*. *Biotechnol. Lett.* **13**: 69–74.
19. Sato, M., K. Nakamura, H. Nagano, Y. Yagi, and K. Koizumi. 1992. Synthesis of glucosyl-inositol using a CGTase, isolation and characterization of the positional isomers, and assimilation profiles for intestinal bacteria. *Biotechnol. Lett.* **14**: 659–664.
20. Shibuya, T., Y. Miwa, M. Nakano, T. Yamauchi, H. Chaen, S. Sakai, and M. Kurimoto. 1993. Enzymatic synthesis of novel trisaccharide, glucosyl lactoside. *Biosci. Biotech. Biochem.* **57**: 56–60.
21. Suzuki, Y. and K. Suzuki. 1991. Enzymatic formation of 4G- α -glucopyranosyl-rutin. *Agric. Biol. Chem.* **55**: 181–187.
22. Szejtli, Z. 1988. *Cyclodextrin Technology*, pp. 1–78. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht.
23. Vetter, D., W. Thorn, H. Brunner, and W. A. König. 1992. Directed enzymatic synthesis of linear and branched glucooligosaccharides, using cyclodextrin-glucosyltransferase. *Carbohydr. Res.* **223**: 61–69.

(Received May 22, 1998)