

Fructosyloligosaccharide를 Acceptor 반응의 기질로 사용한 새로운 올리고당의 생합성

이찬용* · 이충환¹

대전대학교 이과대학 미생물학과, 생명공학연구소¹

충치 원인균의 일종인 *Streptococcus sobrinus* ATCC27351 균주를 자외선 조사와 NTG 처리에 의하여 bacitracin 내성변 이주를 얻었다. 선발된 변이주들 중 glucosyltransferase 활성이 모균주보다 증가된 변이주 4균주를 선발하였다. 이들의 bacitracin 내성은 모균주 보다 5~48배, glucosyltransferase (GTF-S) 활성은 약 2배 증가하였다. 모균주의 glucosyltransferase (GTF-S)를 이용하여 maltose acceptor 반응을 하여 TLC와 image analysis로 분석하였다. 그 결과 sucrose와 acceptor인 maltose 간의 몰 비가 1:2 또는 1:4 에서 가장 많은 종류와 양의 acceptor 산물을 얻을 수 있었다. 여러 종류의 acceptor를 사용하여 반응을 시킨 결과 모균주와 변이주의 glucose 전이효소 사이에는 acceptor 특이성에 차이가 있었다. 모균주의 효소와는 반응하지 않는 acceptor인 fructose를 함유하는 1-kestose (G-F-F)와 nystose (G-F-F-F) 그리고 turanose (G-F)를 acceptor로 하여 변이주 *S. sobrinus* BR24C 균주의 glucosyltransferase (GTF-S)와 반응을 시켰다. 얻어진 acceptor 산물을 정제하여 ¹H, ¹³C-NMR 분석을 한 결과, 자연계에서는 발견되지 않는 새로운 구조의 올리고당 6²- α -D-glucopyranosyl 3²-O- α -D-glucopyranosyl-D-fructose (Glucose-fructose-glucose)와 6¹- α -D-glucopyranosyl 1³- β -D-fructofuranosyl sucrose (G-G-F-F)를 확인하였다.

KEY WORDS □ glucosyltransferase, acceptor reaction, new fructosyloligosaccharides

Sucrose로부터 dextran의 합성은 Hehre에 의하여 처음으로 보고되었으며(9), 이 때 관여하는 효소를 dextransucrase 또는 glucansucrase라 하였다. 그 이후 합성하는 dextran의 구조에 따라서 alternansucrase, mutansucrase 등이 알려졌으며 이들은 모두 glucosyltransferase의 일종이다. 이 효소들을 분비하는 미생물로는 주로 *Leuconostoc* 속과 *Streptococcus* 속의 세균들이다(6,9,12). 이 두 속의 세균들은 모두 그람양성이고, 통성 혐기성 구균으로 서로 비슷한 특성을 가진다. 한 가지 현저한 차이점은 *Leuconostoc* 속은 배양액 중에서 효소를 합성할 경우 효소의 유도에 sucrose를 필요로 하지만 *Streptococcus* 속 균주들은 배지내에 sucrose가 없을 때에도 glucansucrase를 합성한다. 그러므로, *Leuconostoc* 속의 glucansucrase들은 유도 효소이고, *Streptococcus* 속의 효소들은 구성 효소이다(9). *Leuconostoc mesenteroides* B-512F 균주가 만드는 dextran의 구조는 α -1 \rightarrow 6 결합으로 연결된 glucopyranose 잔기들의 주사슬과 두 가지 종류의 결사슬로 되어 있다. 즉, 하나의 glucose 단위와 α -1 \rightarrow 6 결합 사슬에 α -1 \rightarrow 3 결사슬 결합으로 연결된 α -1 \rightarrow 6 단위의 사슬들이다(18).

Streptococcus sobrinus (serotype g)는 구강내에 존재하는 치아 우식성 세균으로 알려져 있으며 두 종류의 glucansucrase를 갖고 있다. 이 중 수용성 dextran을 합성하는 효소를 GTF-S (glucosyltransferase-soluble)라고 하며, α -1 \rightarrow 3 결사슬 결합을 35% 함유하는 dextran을 만든다(3,16). 또한 *Streptococcus sobrinus* 균주는 상기한 수용성 dextran이 아닌 불

용성의 특징을 갖는 다당류(mutan)를 합성하는 효소인 GTF-I (glucosyltransferase-insoluble, mutansucrase)를 갖고 있다. 이 효소가 합성하는 다당류는 주사슬의 결합이 α -1 \rightarrow 6가 아닌 α -1 \rightarrow 3 결합이다. 이 다당류는 endo-dextranase에 의하여 기수 분해되지 않으며 구강 내에서 충치 치태의 주된 원인이 된다(5).

Sucrose로부터 dextran을 합성하는 반응 외에도, dextransucrase는 sucrose로부터 glucose단위를 반응액 등에 존재하는 다른 탄수화물들에 전달하는 반응도 촉매 한다(4,11). 이때 glucose가 전달되는 다른 탄수화물들을 acceptor(수용체)라 부르며 이 반응을 acceptor 반응(수용체 반응)이라 한다. acceptor가 단당류 또는 이당류의 경우 일련의 올리고당들이 acceptor반응의 산물이 된다(9).

실제로 acceptor에는 두 등급의 acceptor가 있다. 하나의 종류는 동질의 glucose 단위가 한 개씩 차이가 나는 일련(series)의 acceptor 산물을 내는 것이고, 또 다른 한 종류는 acceptor 보다 한 개의 glucose단위가 더해진 하나의 acceptor 산물을 만든다.

Acceptor 반응의 산물들의 구조를 살펴보면 D-glucose, methyl- α -D-glucopyranoside, maltose와 isomaltose들을 acceptor로 사용하면, sucrose로부터 glucose단위를 단당류의 C-6 hydroxyl기 또는 이당류의 비환원성 말단 glucose잔기의 C-6 hydroxyl기에 전달하여 증합도 2 내지 7의 isomaltodextrin들을 acceptor에 연결한 acceptor 산물들을 만든다. Isomaltose와 반응한 경우 첫 번째 acceptor 산물(분자량이 가장 작은 산물)은 isomaltotriose이고, cellobiose와 구조와 유사한 lactose는 오직 한 개의 acceptor 반응 산물, 즉 2¹- α -D-glucopyranosyl lactose를 만드는 acceptor이다(4,17).

Fructose가 acceptor로 사용된 경우, fructose의 ring 구조에

*To whom correspondence should be addressed
Tel : 042-280-2438, Fax : 042-280-2436
E-mail : chanylee@dragon.taejon.ac.kr

따라 두 개의 acceptor 산물이 생긴다. 주된 산물은 leucrose (5-O- α -D-glucopyranosyl-D-fructopyranose)가 D-fructopyranose로부터 생기고, 소량 생기는 산물로 isomaltulose [4-O- α -D-glucopyranosyl-D-fructofuranose]가 D-fructofuranose로부터 생긴다(14,17). D-fructose는 sucrose로부터 dextransucrase에 의한 dextran 합성시 나오는 주된 산물이기 때문에, 모든 dextransucrase와 sucrose의 반응으로부터, leucrose를 만드는 acceptor로서 작용한다(15). 그 밖의 acceptor 산물들로는 D-mannopyranose로부터 비환원성이며, α , β -trehalose의 isomer인 α -D-glucopyranosyl- β -D-mannopyranoside, 그리고 D-galactofuranose로부터 α -D-glucopyranosyl- β -D-galactofuranoside 등이다(4).

Fu와 Roby에 의하면, *Leuconostoc mesenteroides* B-512FM의 dextransucrase는 G₃-G₈의 환원성과 비환원성 말단 모두의 C-6 hydroxyl에 D-glucose를 전달한다(4). 그러므로 G₃ (Maltotriose)에 glucose를 전달하여 6³- α -D-galactopyranosyl maltotriose의 두 개의 acceptor 산물을 만든다. 그러나 전자는 acceptor로서 동류의 일련의 isomaltodextrin을 만들지만, 후자는 acceptor로서 작용하지 않는다.

*Streptococcus sobrinus*의 GTF-S와 GTF-I는 *Leuc. mesenteroides* B-512FM의 dextransucrase와 같이 maltose의 acceptor산물로 panose를 만든다. 또한 panose는 두 개의 acceptor 산물들(6²- α -isomaltosyl maltose와 6²- α -nigerosyl maltose)를 만드는 acceptor이다.

본 연구에서는 현재까지 알려진 acceptor 반응의 기질이 아닌 fructosyl oligosaccharide(turanose, kestose, nystose) 등을 acceptor로 하여 *Streptococcus sobrinus*의 다당류 합성효소인 glucansucrase (glucanoyl transferase)의 secondary 촉매반응(acceptor reaction)을 이용한 새로운 구성당과 결합위치를 가지는 올리고당을 합성하여 만들어진 새로운 구조의 올리고당을 확인하고 NMR로 분석하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 돌연변이

본 실험에 사용한 균주는 *Streptococcus sobrinus* ATCC 27351이었으며 배양은 mannitol 배지를 사용하였다. Mannitol 배지의 조성(12)은 증류수 1L당 5g tryptone, 5g yeast extract, 5g mannitol, 0.5g Tween80, 5g potassium phosphate (dibasic)이며 pH 7.6, 그리고 37°C에서 18시간 진탕 배양 후의 pH는 5.7이었다. Mannitol은 이 균주의 성장에만 사용하며 dextran 합성의 기질로는 사용하지 못한다. 균주의 돌연변이는 자외선 조사와 NTG처리를 병행하였으며 mutant의 선별 표지물질로서 bacitracin 내성이 증가한 변이주들을 선별하여 효소활성을 비교하였다.

효소의 생산 및 정제

효소생산을 위한 배양은 Ciardi 등(2)의 방법에 따라 *Streptococcus sobrinus* 균주를 5L 발효조에 Mannitol배지를 사용하여, aeration 없이 agitation속도는 1분당 150 rpm으로 37°C에서 pH 조절없이 18시간 배양하였으며 배양이 끝난 후

배양액을 원심분리하여 상등액을 ultrafiltration으로 농축하고 -20°C의 에탄올을 가하여 단백질을 침전시키고 imidazole·HCl 완충용액 (pH 6.2)을 사용하여 용해하였다(10). 이 용액을 hydroxyapatite를 사용하여 단백질을 흡착시킨 후 0.07 M 그리고 0.4 M phosphate 완충용액(pH 6.5)을 사용하여 효소를 용출시켰다. 이때 0.07 M 분획은 GTF-S 활성을 보였으며, 0.4M 분획은 GTF-I 활성을 가진다(3,15).

효소의 활성 측정

효소활성의 측정은 [U-glucosyl-¹⁴C] sucrose와 효소의 반응으로 생성된 glucan에 첨가된 ¹⁴C-glucose의 radio activity를 측정하여 단위 시간당 radio activity증가율을 계산하여 나타내었다(12). 효소 반응액은 최종농도로서 imidazole·HCl 완충용액 20 mM (pH 6.2), sodium azide 0.02%, 150 mM sucrose (3 Ci), 효소용액 등을 혼합하여 25°C에서 반응하였으며 효소의 활성단위는 위의 반응조건에서 1분 동안 sucrose로부터 glucose 1 mole을 다당류에 첨가하는 효소의 활성을 1 U로 하였다.

Acceptor 반응 및 TLC 분석

Acceptor 반응은 96 well plate에 200 mM의 sucrose와 acceptor를 넣고 효소액을 넣어 최종 부피가 100 μ l가 되도록 하여 25°C에서 24시간 반응시킨다. 반응이 끝난 후 반응액을 silica gel TLC plate (Whatman K5)에 5 μ l 점적하여 acetonitrile : 1-propanol : H₂O (85 : 50 : 50) 혼합용매로 3회 전개하고 건조한 후 발색제(5% 황산, 0.5% (w/v) α -naphthol)를 뿌려 100°C에서 10분간 가열하여 발색시킨 후 Bio-profil Image Analysis system(Vilber Lourmat, Paris)을 사용하여 정량 분석하였다(7). TLC 분석 후 나타난 acceptor 산물의 분석을 위하여 acceptor 반응을 100 ml 부피로 같은 조건에서 24시간 반응시킨 후 reverse phase prep. HPLC(Shimadzu, Japan)와 RI detector를 사용하여 acceptor 산물의 분획을 모아 TLC로 확인하고 농축한 후 동결 건조하여 NMR 분석의 시료로 하였다.

NMR 분석

시료 약 10 mg, 20 mg을 각각 D₂O 500 μ l에 녹인 다음 5 mm NMR tube에 넣어 Varian사의 UNITY INOVA 500 MHz (HMQC, HMBC) 및 300 MHz (¹H, ¹³C, COSY, DEPT) 핵자기 공명 분광기에서 실험을 하였다(1,8). 수소와 탄소의 1차원 분광법과 DEPT(Distortionless Enhancement by Polarization Transfer), 2차원 분광법으로는 PFG-COSY (Pulsed Field Gradient Correlation Spectroscopy), PFG-HMQC (Heteronuclear Multiple-Quantum Correlation), PFG-HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation)을 사용하였다. 모든 핵자기 공명 분광 실험은 25°C에서 수행하였다.

결과 및 고찰

Bacitracin 내성 변이주의 선별과 효소활성

Streptococcus sobrinus ATCC 27351의 Glucosyltransferase

Table 1. Glucosyltransferase activities of bacitracin resistant mutants of *S. sobrinus*.

Strains	MIC($\mu\text{g/ml}$) to bacitracin	GTF-S	GTF-I
<i>S. sobrinus</i> ATCC 27351	0.01	0.22	0.13
<i>S. sobrinus</i> CH-5	0.05	0.28	0.12
<i>S. sobrinus</i> BR12L	0.12	0.34	0.08
<i>S. sobrinus</i> BR24C	0.24	0.45	0.11
<i>S. sobrinus</i> BR48J	0.48	0.28	0.18

활성을 높이기 위하여 자외선 조사와 NTG-처리에 의하여 돌연변이하고 선택 marker로서 bacitracin 내성이 증가된 균주를 선발하여 배양액의 효소활성을 측정하였다. Bacitracin 내성이 증가된 균주 중에서 모든 균주가 glucosyltransferase 효소활성이 높아진 것 (약 10%만 증가)은 아니었으나 bacitracin 내성의 증가와 GTF-S 효소활성의 증가와는 상관관계가 있었다 (Table 1). Bacitracin은 미생물의 세포벽의 다당류합성을 저해하는 항균기작을 갖는 항생물질로서 bacitracin 내성의 증가가 glucosyltransferase 효소활성의 증가를 유도하는 기작은 현재 까지 알려진 바 없으며, glucosyltransferase 효소활성(GTF-S)의 증가를 유도하기 위한 mutant의 선별 marker로는 본 연구에서 처음으로 보고하는 것이다.

S. sobrinus CH-5의 경우에는 bacitracin에 대한 MIC가 원균주에 비하여 5배 높아 졌으며 효소활성은 약간 증가하였으며 *S. sobrinus* BR12L은 bacitracin에 대한 MIC가 12배 효소활성은 GTF-S의 경우 약 1.5배, GTF-I의 경우에는 감소하였다. *S. sobrinus* BR24C의 경우에는 MIC가 24배, GTF-S의 경우 2배 증가하였고, GTF-I의 경우에는 큰 차이가 없었다. 그러나 가장 큰 MIC를 보인 *S. sobrinus* BR48J의 경우에는 모균주에 비하여 bacitracin 내성이 48배나 증가하였으나 효소활성의 증가는 없었다. 앞으로 glucosyltransferase 활성의 증가와 bacitracin 내성과의 관계에 관한 연구가 요구된다.

***S. sobrinus* ATCC 27351의 maltose acceptor 반응 (GTF-S)**

S. sobrinus ATCC 27351의 배양액에서 분리 정제된 GTF-S(glucosyltransferase-soluble)를 이용하여 가장 acceptor 반응을 잘 일으키는 것으로 알려진 maltose를 acceptor로 하여 maltose와 sucrose와의 비를 달리하여 acceptor 반응을 시키고 그 결과를 TLC로 분석하여 Fig. 1에 나타내었다. Maltose와 sucrose의 비율이 커질수록 acceptor의 양은 상대적으로 증가하지만 maltose의 양이 아주 많이 존재할 경우에는 acceptor 산물이 panose에 국한되어 나타나므로 Fig. 1에서 볼 수 있듯이 가장 크기가 큰 올리고당을 얻으려면 acceptor와 sucrose의 몰 비가 1:2(maltose : sucrose) 또는 1:4가 적당하였다. 이 결과를 정량적으로 나타내기 위하여 image analysis에 의한 분석을 하여 그 일부를 Table 2에 나타내었다. Maltose를 acceptor로 사용한 경우 첫 번째 acceptor product는 panose (6²- α -D-glucopyranosyl maltose)이다(4). Maltose acceptor 반응의 두 번째 산물은 사당류로서 6²- α -D-isomaltosyl maltose 이고, 이것 보다 더 큰 acceptor 산물들은 maltose의 비환원

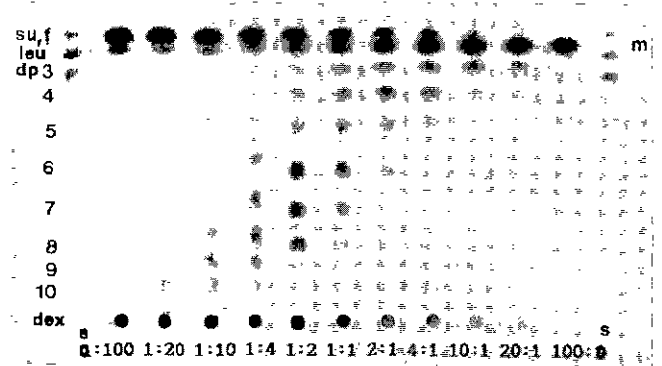


Fig. 1. Thin-layer chromatographic analysis of the acceptor reactions using different ratios of maltose to sucrose at 200 mM constant total carbohydrate with GTF-S from *Streptococcus sobrinus* ATCC27351. Lane s shows standard peaks of glucose, isomaltose, isomaltotriose and isomaltotetraose from the top. su, sucrose; f, fructose; leu, leucrose. DP, degree of polymerization, dex, dextran, lane 1-11, ratio of maltose : sucrose=0 : 100, 1 : 20, 1 : 10, 1 : 4, 1 : 2, 1 : 1, 2 : 1, 4 : 1, 10 : 1, 20 : 1, 100 : 0

Table 2. Carbohydrate compositions of oligosaccharides produced from different ratios of sucrose to maltose, using GTF-S (glucosyltransferase-soluble) from *Streptococcus sobrinus* BR24C^a.

Carbohydrates ^b	Maltose/Sucrose (%w/w) ^c				
	1/4	1/2	1/1	2/1	4/1
Dextran	21.0	16.2	12.6	8.3	7.0
Sucrose	30.2	24.8	17.3	6.2	2.5
Maltose	0	4.2	24.0	40.5	46.8
Acceptor products					
Leucrose(DP2)	2.6	1.9	0.5	0	0
DP3	0	0.2	3.4	5.8	4.8
DP4	0.3	2.6	9.2	8.3	6.5
DP5	0.6	4.7	14.1	7.5	3.9
DP6	0.2	12.6	11.6	5.6	0.4
DP7	2.0	19.1	2.4	0.6	0
DP8	7.6	10.4	0.8	0	0
DP9	8.7	2.8	0	0	0
DP10	5.2	0	0	0	0
Total oligosaccharides	27.2	54.8	41.0	27.8	15.6

^aThe total concentrations of carbohydrates and enzyme dosage were kept constant at 200 mM and 250 mU (GTF-S), respectively. ^bDPn represents a saccharide of DP (degree of polymerization)=n, having an isomaltodextrin chain linked by α -(1-6) to the nonreducing end of maltose. ^cRelative weight percent of the dextran or oligosaccharides was calculated on the basis of area and intensity of the peaks by densitometry.

성 말단 glucose의 C-6 hydroxyl group에 중합도가 더 커진 iso-maltodextrin 사슬들이다. Sucrose와 GTF-S에 의하여 dextran 합성 시에는 sucrose에서 dextran합성을 위하여 glucose가 제거되고 남은 fructose를 acceptor로 하여 acceptor

산물인 leucrose 만이 생성된다.

Dextranucrase 효소활성이 큰 것으로 알려진 *Leuconostoc mesenteroides* B-512F의 glycosyltransferase의 maltose acceptor반응의 산물은 대개 DP(degree of polymerization) 7~8까지만 만들어지지만 Fig. 1에서 보는 바와 같이 본 연구의 *S. sobrinus* ATCC 27351의 GTF-S를 사용하여 maltose acceptor 반응을 시킨 결과 acceptor 산물이 중합도(DP) 10이상 까지도 만들어짐을 알 수 있었으며, 이는 size가 커다란 올리고당을 만드는 데에 더 유리한 결과라고 생각된다. 본 연구자들은 *S. sobrinus* ATCC 27351의 GTF-I를 사용하여 maltose acceptor 반응산물을 중합도 11이상까지 합성하여 이미 보고한 바 있다(7).

Acceptor 특이성의 변화

Glucosyltransferase를 이용한 acceptor 반응의 수율은 acceptor의 종류에 따라서 크게 다르게 나타난다. 이는 *Leuconostoc mesenteroides* B-512F이나 *S. sobrinus* ATCC 27351의 GTF-S에서나 마찬가지이다. Maltose의 경우가 가장 좋은 acceptor이며 이를 100%로 하여 상대적인 acceptor 반응의 수율을 Table 3에서 나타내었다. 그런데 Table 3과 Fig. 2에서 보는 바와 같이 *Leuconostoc mesenteroides* B-512F와 *Streptococcus sobrinus* ATCC 27351의 glucosyltransferase에서는 1-kestose와 nystose에는 acceptor 반응이 일어나지 않는데에 비하여 *S. sobrinus*의 bacitracin 내성 mutant인 *Streptococcus sobrinus* BR24C에서 분리한 GTF-S와는 acceptor 반응이 일어남을 알았다. 이는 *Streptococcus sobrinus* ATCC 27351의 돌연변이와 bacitracin 내성의 증가로 나타난 표현형의 변화와 더불어 acceptor 결합 부위의 구조 변화가 일어났을 것으로 생각되지만 이는 효소의 순수분리와 3차원적 구조의 결정 등의 연구가 뒷받침 되어야 할 것이라고 여겨된다.

1-kestose의 acceptor 반응

Streptococcus sobrinus ATCC 27351의 dextranucrase에서는 1-kestose와 acceptor 반응이 일어나지 않았지만(Fig. 2), bacitracin 내성 mutant인 *Streptococcus sobrinus* CH-5와 *Streptococcus sobrinus* BR24C에서 분리한 glucosyltransferase

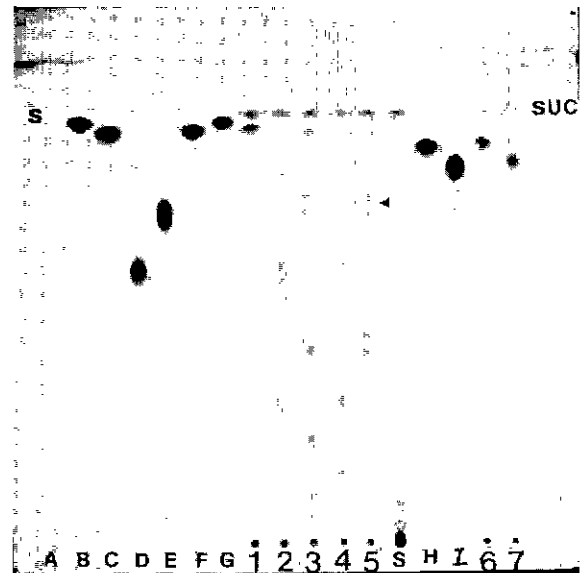


Fig. 2. Acceptor reaction of glucosyltransferase(GTF-S) of *S. sobrinus* ATCC 27351 with various acceptors. A. fructose; B. Sucrose; C. Nigerose; D. Isomaltose; E. Panose; F. Palatnose; G. Turanose; H. 1-Kestose; I. Nystose; s, standard (isomaltodextrins), s or suc, sucrose; Number (1-7), enzyme reaction with 1(nigerose); 2(isomaltotriose) 3(panose); 4(palatnose); 5(turanose); 6(1-kestose); 7(nystose); ◀, first acceptor product with turanose.

(GTF-S)는 1-kestose와 acceptor 반응이 일어났다(Fig. 3). TLC 분석상에서도 알 수 있듯이 *S. sobrinus* BR24C의 효소가 *S. sobrinus* CH-5의 효소보다 acceptor 반응의 수율이 높게 나타났다. 이는 동일한 효소활성을 갖도록 반응액에 첨가하였는데도 acceptor 산물의 농도에 차이가 나는 것이 흥미롭다. 이것은 glucose 전이활성과 acceptor 반응촉매활성이 효소의 서로 다른 부위에서 일어난다고 한 Robyt의 보고(11)와도 일치하는 결과이다.

Fructosyloligosaccharides를 acceptor로 한 acceptor 산물의 구조 분석

Fructosyloligosaccharides을 이용한 새로운 acceptor 산물의

Table 3. Quantitative effects of acceptors in the glucosyltransferase reaction of *S. sobrinus* ATCC 27351 and *S. sobrinus* BR24C.

acceptors	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> B-512F		<i>Streptococcus sobrinus</i> BR24C	
	% glucose incorporated	relative acceptor yield	% glucose incorporated	relative acceptor yield
aaltose	80.7	100.0	81.2	100.0
somaltotriose	71.9	88.7	72.1	87.8
nigerose	47.4	58.1	53.5	65.9
turanose	11.2	13.4	13.6	16.7
lactose	9.0	10.7	18.3	22.5
kcstose(GFF)	n.i. ^a	0	4.2	5.2
nystose(GFFF)	n.i. ^a	0	2.8	3.4
reference	Fu and Robyt(1991)		This work	

n.i.^a : no incorporation.

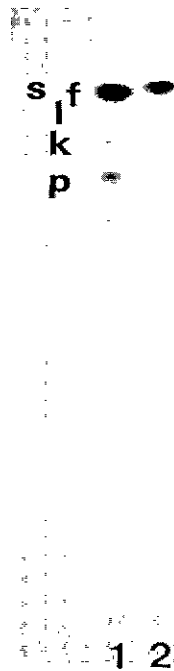


Fig. 3. Acceptor reaction of glucosyltransferase(GTF-S) of *S. sobrius* mutants (BR24C and CH-5) with 1-kestose. s, susrose; f, fructose; k, 1-kestose; l, leucrose; p, acceptor product. Lane 1, *S. sobrius* BR24C; 2, *S. sobrius* CH-5.

NMR분석을 시도하였다(Fig. 2의 turanose; 3-O- α -D-glucopyranosyl-D-fructose). Turanose의 acceptor반응의 첫 번째 산물은 6³- α -D-glucopyranosyl 3²-O- α -D-glucopyranosyl-D-fructose (glucose-fructose-glucose)(1)으로 예측할 수 있으며 Fig. 3의 1-kestose (1³- β -D-fructofuranosyl sucrose. G-F-F)의 acceptor 산물은 6⁴- α -D-glucopyranosyl 1³- β -D-fructofuranosyl sucrose (G-F-F-G)로 예측되며 이를 NMR 분석을 통하여 결합순서를 결정하였다. NMR을 이용한 일반적인 당의 구조분석에 있어서 수소 핵자기 공명 스펙트럼에서 anomeric proton의 chemical shift는 4.3-5.9 ppm에서 관찰되나, H2-H6의 경우는 3.0-4.2 ppm에서 증첩되어 나타남으로 구별이 쉽지 않다. ¹³C NMR spectrum에서 anomeric carbon chemical shift는 90-105 ppm에서 관찰되며 나머지 탄소의 경우는 70-85 ppm, CH₂OH인 탄소는 55-65 ppm으로 ¹H 경우보다 분산되어 분석이 용이하다(8).

Compound 1 (turanose의 acceptor 산물)에 대한 ¹³C NMR 및 HMQC data 분석 결과 18개의 carbon peak가 관찰되었으며, ¹H, HMQC 및 DEPT 분석에 의하여 4개의 CH₂ (60.57, 60.84, 61.91, 65.34 ppm), 67.93-97.92 ppm 사이에 13개의 CH 그리고 103.23 ppm에 1개의 사차탄소 signal이 관찰되었다. 103.23 ppm에서 관찰된 사차탄소는 fructose의 C2 위치의 탄소로, 91.54, 97.92 ppm의 탄소는 각각 glucose의 anomeric carbon으로 추정되었으며, 이러한 결과를 바탕으로 2개의 glucose와 1개의 fructose가 결합된 구조로 추정되었다. 또한 glucose-1의 C1 carbon (91.54 ppm)에 결합된 H1의 chemical shift가 5.42에서 관찰되어 이 수소의 위치를

equatorial로 추정하였다. HMBC 분석결과 glucose-1의 H1 proton (5.42 ppm)으로부터 fructose의 C2 (103.23 ppm)로의 long range signal이 관찰되었으며, fructose의 H2 (3.7, 4.0 ppm)로부터 glucose-2의 carbon (97.92 ppm), fructose의 carbon (80.78, 75.77 ppm)들에 long range signal이 관찰되었다. 이상의 결과로부터 첫 번째 산물은 glucose-fructose-glucose (1)으로 예측할 수 있었다

Compound 1: ¹³C NMR chemical shift, D₂O, 75 MHz (¹H NMR chemical shift, 300 MHz), 60.57 (CH₂, 3.75 ppm), 60.84 (CH₂, 3.67 ppm), 61.91 (CH₂, 3.80 ppm), 65.34 (CH₂, 3.70, 4.04 ppm), 67.93 (CH, 3.84 ppm), 68.66 (CH, 4.00 ppm), 68.83 (CH, 3.90 ppm), 68.99 (CH, 3.55 ppm), 70.40 (CH, 3.57 ppm), 70.48 (CH, 3.96 ppm), 70.84 (CH, 4.05 ppm), 72.10 (CH, 3.75 ppm), 73.42 (CH, 4.07 ppm), 75.77 (CH, 4.23 ppm), 80.78 (CH, 3.90 ppm), 91.54 (CH, 5.42 ppm), 97.92 (CH, 5.00 ppm), 103.23

Compound 2 (1-kestose의 acceptor 산물)에 대한 ¹H, ¹³C NMR 및 HMQC, HMBC data 분석 결과 21개의 carbon peak가 관찰되었으나, peak가 중복되어 나타났다. ¹H-¹H COSY, HMQC 및 DEPT 분석에 의하여 6개의 CH₂ (52.96, 60.24, 60.72, 60.89, 62.10, 62.10 ppm), 69.07에서 92.39 ppm 사이에 CH signal이 증첩되었으며, 그리고 102.90, 103.07 ppm에 2개의 사차탄소 signal이 관찰되었다. 102.90과 103.07 ppm에서 관찰된 사차탄소는 2개의 fructose 각각의 C2 위치의 탄소로 추정되었으며, 이 결과 2개의 glucose와 2개의 fructose가 결합된 구조로 추정되었다. 각각의 결합양식을 COSY 및 TOCSY spectrum을 이용하여 분석하고자 시도 하였으나, peak가 증첩되어 정확한 확인이 어려웠으며, 참고문헌과의 비교를 통하여 그 구조를 추정하였다(1,8).

Compound 2: ¹³C NMR chemical shift, D₂O, 75 MHz (¹H NMR chemical shift, 300 MHz), 59.96 (CH₂, 3.81 ppm), 60.24 (CH₂, 3.67, 3.73 ppm), 60.72 (CH₂, 3.71, 3.85 ppm), 60.89 (CH₂, 3.74, 3.84 ppm), 62.10 X 2 (CH₂, 3.74, 3.81, 3.85 ppm), 69.07 (CH, 3.45 ppm), 71.03 (CH, 3.54 ppm), 72.30 (CH, 3.83 ppm), 72.45 (CH, 3.76 ppm), 73.72 (CH, 4.05 ppm), 74.18 (CH, 4.11 ppm), 74.31 (CH, 4.08 ppm), 76.51 (CH, 4.18 ppm), 76.63 (CH, 4.27 ppm), 77.35 (CH, 4.22, 4.24 ppm), 80.93 (CH, 3.87 ppm), 81.09 (CH, 3.88 ppm), 92.37 X 2 (CH, 5.43, 5.45 ppm), 102.90, 103.07

이 결과 turanose의 acceptor 산물은 glucose-fructose-glucose의 순서로 결합되어 있었으며, 1-kestose의 acceptor 산물은 glucose-glucose-fructose-fructose의 순서로 나타나 이러한 구조의 올리고당들은 자연계에서는 존재하지 않으며 오로지 효소적인 방법에만 합성되는 새로운 구조의 올리고당임이 확인되었으며 아직까지 보고된 바 없다. 추후 이 구조의 올리고당의 특성 및 용도, 정확한 결합위치의 결정 등의 연구가 요구되어 진다.

감사의 말

본 연구는 1997년도 교육부 학술진흥재단의 연구비 지원

(1997-002-G00097)에 의하여 수행되었습니다. 또한 김도만(전 남대), John F. Robyt(미국 Iowa 주립대)박사의 도움에 감사드립니다.

참고문헌

1. Bock, K., and C. Pedersen. 1983. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of monosaccharides. In *Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry*, Academic press. **41**, 27-224.
2. Ciardi, J.E., Beaman, A.J., and C.L. Wittenberger. 1977. Purification, resolution, and interaction of the glucosyltransferases of *Streptococcus mutans* 6715. *Infection and Immunity*, **18**, 237-246.
3. Chludzinski, A.M., Germaine, G.R., and C.F. Schachtele. 1974. Purification and properties of dextranucrase from *Streptococcus mutans*. *J. Bacteriol.* **118**, 1-7.
4. Fu, D. and J.F. Robyt. 1991. Maltodextrin acceptor reactions of *Streptococcus mutans* 6715 glucosyltransferases. *Carbohydr. Res.* **217**, 201-211.
5. Guggenheim, B. 1970. Enzymatic hydrolysis and structure of water-insoluble glucan produced by glucosyltransferase from a strain of *Streptococcus mutans*. *Int. Dent. J.* **20**, 157-178.
6. Jeanes, A., W.C. Haynes, C.A. Williams, J.C. Rankin, E.H. Melvin, M.J. Austin, J.E. Cluskey, B.E. Fisher, H.M. Tsuchiya, and C.E. Rist. 1954. Characterization and classification of dextrans from ninety-six strains of bacteria. *J. Am. Chem. Soc.* **76**, 5041-5052.
7. Lee, C.Y., C.Y. Yun, J.W. Yun, T.K. Oh, and C.J. Kim. 1997. Production of glucooligosaccharides by an acceptor reactor reaction using two types of glucansucrase from *Streptococcus sobrinus*. *Biotechnol. Letters* **19**, 1227-1230.
8. Liu, J., A.L. Waterhouse, and N.J. Chatterton. 1993. Proton and carbon NMR chemical-shift assignment for $[\beta\text{-D-Fru f-(2} \rightarrow 1)]_3\text{-}$ (2 \leftrightarrow 1)- $\alpha\text{-D-Glcp(nystose)}$ and $[\beta\text{-D[Fru f-(2} \rightarrow 1)]_4\text{-(2} \leftrightarrow 1)\text{-}\alpha\text{-D-Glcp(1,1,1-ketopentaose)}$ from two-dimensional NMR spectral measurements. *Carbohydr. Res.* **245**, 11-29.
9. Neely, W.B. 1960. Dextran structure and synthesis. *Adv. Carbohydr. Chem.* **15**, 341-369.
10. Kuramitsu, H.K. 1975. Characterization of extracellular glucosyl-transferases activity of *Streptococcus mutans*. *Infection and Immunity*. **12**, 738-749.
11. Robyt, J.F. 1992. New products from the action of sucrose-glucosyltransferases. In *Carbohydrates in Industrial Synthesis* (M.A. Clarke ed.) 56-67. Bartens, Berlin.
12. Robyt, J.F. and P.J. Martin. 1983. Mechanism of synthesis of D-glucans by glucosyltransferases from *Streptococcus mutans* 6715. *Carbohydr. Res.* **113**, 301-315.
13. Robyt, J.F. and R. Mukerjee. 1994. Separation and quantitative determination of nanogram quantities of maltodextrins and isomaltodextrins by thin-layer chromatography. *Carbohydr. Res.* **251**, 187-202.
14. Robyt, J.F. and T.F. Walseth. 1978. The mechanism of acceptor reactions of *Leuconostoc mesenteroides* B-512F dextranucrase. *Carbohydr. Res.* **61**, 433-445.
15. Shimamura, A., H. Tsumori, and H. Mukasa. 1982. Purification and properties of *Streptococcus mutans* extracellular glucosyltransferase. *Biochim. Biophys. Acta.* **702**, 72-80.
16. Shimamura, A., H. Tsumori, and H. Mukasa. 1983. Three kinds of extracellular glucosyltransferases from *Streptococcus mutans*. *FEBS Letters.* **157**, 79-83.
17. Su, D. and J.F. Robyt. 1993. Control of the synthesis of dextran and acceptor products by *Leuconostoc mesenteroides* B-512F dextranucrase. *Carbohydr. Res.* **248**, 339-348.
18. van Cleve, J.W., W.C. Schaefer, and C.E. Rist. 1956. The structure of NRRL B-512 dextran. Methylation studies. *J. Am. Chem. Soc.* **78**, 4435-4438.

(Received March 5, 1999/Accepted May 13, 1999)

ABSTRACT : Biosynthesis of New Oligosaccharides via Acceptor Reaction using Fructosyloligosaccharide as an Acceptor

Chan Yong Lee* and Choong Whan Lee¹ (Department of Microbiology, Taejon University, Taejon 300-716, and ¹Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Taejon 305-600, Korea)

Acceptor reaction of glucosyltransferase of *Streptococcus sobrinus* with fructosyloligosaccharides was studied for the biosynthesis of novel oligosaccharides. First, bacitracin resistant mutants were selected by mutagenesis of *Streptococcus sobrinus* ATCC27351. Among these mutants 4 strains were selected by resistance to bacitracin and increase of glucosyltransferase. Acceptor reaction of maltose was analyzed by TLC and image analysis. There were differences in the specificity of the acceptor reaction by the glucosyltransferase between mother strain (*Streptococcus sobrinus* ATCC2735) and bacitracin resistant mutants (*Streptococcus sobrinus* BR24C, *Streptococcus sobrinus* CH-5). Mother strain did not show an acceptor reaction with fructosyloligosaccharides such as 1-kestose and nystose. Acceptor reaction products of turanose and 1-kestose with glucosyltransferase (GTF-S) of *Streptococcus sobrinus* BR24C were 6³- α -D-glucopyranosyl 3²-O- α -D-glucopyranosyl- D-fructose (glucose-fructose-glucose) and 6⁴- α -D-glucopyranosyl 1³- β -D-fructofuranosyl sucrose (glucose-glucose-fructose- fructose) . respectively. These are novel oligosaccharides which can be produced only by enzymatic reaction.