

## Dextranucrase와 $\alpha$ -amylase의 혼합효소를 이용한 새로운 구조의 올리고당 생산 및 특성 연구

<sup>1,2</sup>이인수 · †김도만 · <sup>3</sup>장판식  
전남대학교 공업화학과, <sup>1</sup>생물화학공학과, <sup>2</sup>서울대학교 농업생명연구소 연구센터  
<sup>3</sup>서울산업대학교 식품공학과  
(접수 : 1999. 12. 2., 게재승인 : 1999. 12. 15.)

### Production and Characterization of New Structured-oligosaccharides from Mixed-enzyme of Dextranucrase and $\alpha$ -amylase

In-Su Lee<sup>1,2</sup>, Doman Kim<sup>†</sup>, and Pahn-Shick Chang<sup>3</sup>  
Department of Chemical Technology, <sup>1</sup>Department of Biochemical Engineering  
Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea  
<sup>2</sup>Research Center for New Bio-Materials in Agriculture, Seoul Industrial National University  
Suwon 441-774, Korea  
<sup>3</sup>Department of Food Science and Technology, Seoul National University, Seoul 139-743, Korea  
(Received : 1999. 12. 2., Accepted : 1999. 12. 15.)

We have produced new-structured oligosaccharides using mixed-enzyme reactor of dextranucrase from *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMCM and  $\alpha$ -amylase. When the concentrations of sucrose and starch were 10%(w/v) and 5%(w/v), respectively, the maximum yield of oligosaccharides with both dextranucrase(100U) and  $\alpha$ -amylase(1000U) was 66.4%. The activity of dextranucrase in mixed-enzyme reactor was increased about 2.5 times by acceptor reaction with starch hydrolyzates. As the activities of dextranucrase: $\alpha$ -amylase were increased from 20U:200U to 500U:5000U, the amount of polymer was increased and the yield of oligosaccharides was decreased. By the addition of sucrose into mixed-enzyme reactor following the pre-hydrolysis of starch with  $\alpha$ -amylase, the yield was increased up to 12% compared with that of mixed-enzyme reactor without the addition of starch hydrolyzate. New structured-oligosaccharides showed heat resistance up to 140°C and was stable in acidic condition at pH 3~6.

**Key Words :** *Leuconostoc mesenteroides*, dextranucrase,  $\alpha$ -amylase, oligosaccharide,

#### 서론

1987년 프락토올리고당(fructo-oligosaccharides)이 생산된 이후 설탕(sucrose)과 과당(fructose)등을 중심으로 하는 기존의 감미료 산업은 여러 가지 기능을 갖고있는 올리고당류(oligosaccharides)가 개발되면서부터 각광을 받고 있다. 이러한 올리고당류는 대부분 난소화성으로 분해되지 않아 기존의 감미료가 갖고 있는 비만, 충치, 당뇨병 등의 문제점을 극복하는 동시에 충치 발생억제 효과, 장내세균군 유용균의 증식, 저 칼로리성 등의 여러 가지 유용한 기능성을 지니고 있는 것으로 보고되었으(1-4), 최

근 다양한 용도 개발을 위해 김치발효중 mannitol생성에 미치는 영향(5), 잼의 품질특성에 미치는 영향 등 식품첨가제로서 기능이 연구되고 있다(6).

현재 국내에서 생산되고 있는 올리고당의 하나인 아이소말토 올리고당(isomalto-oligosaccharides)은 글루코스분자들이  $\alpha$ -(1→6) 결합을 이루고 있는 isomaltotriose, isomaltotetraose 등의 올리고당류를 총칭하지만 이당류인 isomaltose뿐만 아니라  $\alpha$ -(1→6) 결합과  $\alpha$ -(1→4)결합으로 이루어져 있는 panose, isopanose 또는 그 계열의 올리고당을 모두 포함시키는 것이 일반적이다(3).

*Leuconostoc mesenteroides*에서 얻은 dextranucrase는 글루코스 단위가  $\alpha$ -(1→6)으로 연결된 다당인 dextran을 합성하는 효소로, 효소 생산균의 종류에 따라 텍스트란의 가지 결합(예;  $\alpha$ -(1→2),  $\alpha$ -(1→3), 및  $\alpha$ -(1→4)) 비율 및 길이가 각각 달라진다. Dextranucrase는 설탕으로부터 dextran을 생합성하는 반응이외에도 효소 반응액에 설탕이외의 다른 탄수화물이 첨가될 경우, 설

†Corresponding author: Department of Biochemical Engineering  
Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea  
Tel : 062-530-1844, Fax : 062-530-1849  
E-mail : dmkim@pasteur.chonnam.ac.kr

당의 글루코스 단위를 첨가한 탄수화물에 전달하여 올리고당을 합성하기도 한다(7, 8). 이때 첨가한 탄수화물을 수용체(acceptor)라 하며, 이 반응을 수용체 반응(acceptor reaction)이라 한다.

지금까지 dextransucrase를 이용한 올리고당 생산 방법은 maltose를 수용체로 하여 maltose에  $\alpha$ -(1→6)으로 글루코스를 연속적으로 결합시키는 것으로 합성된 올리고당은 상대적으로  $\alpha$ -(1→4) 결합이 적다(3).

대부분의 글루코스로 구성된 올리고당은 주로 한가지의 연결 구조로 구성된 당들이며  $\alpha$ -(1→4)와  $\alpha$ -(1→6)의 복합적인 구조의 올리고당은 존재하지 않는다. 따라서 본 연구자는 dextransucrase고 생산성 돌연변이 균주인 *Leuconostoc mesenteroides* B-512 FCMC에서 얻은 dextransucrase의 수용체로  $\alpha$ -amylase의 가수분해에 의해 녹말로부터 생산된 산물을 이용하여, 다양한 크기의  $\alpha$ -(1→4)결합에  $\alpha$ -(1→6)으로 글루코스가 연결된 올리고당을 연속적으로 생산하기 위한 조건과 생성된 올리고당의 특성을 연구하였다.

## 재료 및 방법

### 균주 및 배양조건

본 연구에서 dextransucrase(EC.2.4.1.5)를 얻기 위해 사용한 *L. mesenteroides* B-512FCMC은 *L. mesenteroides* B-512FMC를 포항고속기의 진공자외선(VUV)을 사용하여 얻은 균으로, 구성적(constitutive)으로 dextransucrase를 생산한다(9, 10). *L. mesenteroides* B-512FCMC의 배양은 탄소원으로 2%(w/v) 글루코스를 포함한 LM배지(1 L의 증류수당 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, 생육 온도는 28℃를 유지하였다(9).

### 재료

올리고당 생산용 설탕은 상업용 백설탕(Cheil Jedang, Korea)을 사용하였으며, 녹말은 가용성 녹말(Yakuri Pure Chemical Co, Japan)을 100℃에서 15분간 호화 시킨 후 정제하지 않고 사용하였다.  $\alpha$ -amylase는 태평양 기술 연구소에서 제공받았다. Yeast는 Perfect Rise Yeast(SAF, U.S.A)를 이용하였다. 그 밖의 시약들은 일반 시약 등급을 사용하였다.

### 효소활성 측정

Dextransucrase의 활성은 과당을 표준물질로 하여 환원당 분석법으로 확인하였으며, 효소의 1U는 1분당 설탕에서 해리되는 과당의  $\mu$ mL수로 정하였다(9).  $\alpha$ -amylase의 활성은 maltose를 표준물질로 하여 환원당 분석법으로 확인하였으며, 효소의 1U는 1분당 녹말에서 해리되는 maltose의  $\mu$ mL수로 정하였다(11).

### 혼합효소 반응

Dextransucrase와  $\alpha$ -amylase의 혼합효소반응은 500 mL flask에 반응부피를 300 mL로 수행하였다. 기질인 녹말은 호화 시킨 후 사용하였다. 효소반응은 28℃에서 수행하였으며 20 mM Na-acetate 완충용액(pH 5.2, 0.1%-v/v, Tween 80, 10 mM  $CaCl_2$ )을 사용하였다(9).

### 고정화 효모준비

40 mL의 25%(w/v) yeast 현탁액을 3%(w/v) Na-alginate-용액 100 mL와 섞은 후, 기포 제거를 위해 4℃에서 30분 동안 보관하고, 이 혼합용액을 2%(w/v)  $CaCl_2$  용액에 적하한 후 비드 강도 강화를 위해 2시간 더 교반 후 사용하였다(8).

### 올리고당의 회수 및 성분분석

고정화 효모를 이용하여 단당과 maltose를 제거한 후, 반응기 내에 남아있는 다당은 에탄올이 66%(v/v)가 되도록 천천히 넣어 주고, 냉장고에서 2시간정도 보관한 후, 원심분리하여 회수하였다. 상등액의 에탄올을 증발기(EYELA, Japan)로 증발시키고 남은 올리고당을 회수하였다(11). 올리고당의 수율은 공급된 기질의 양을 100으로 하고 여기에서 글루코스(G), maltose(M), 그리고 66% 에탄올로 침전시킨 다당(P)을 제외한 나머지양으로 환산하였다. 올리고당의 구성성분의 종류와 양은 시료를 1  $\mu$ l씩 취하여 Whatman K5F TLC plate에 점적한 후, nitromethane/water(85/15, v/v) 혹은 nitromethane/1-propanol/water(2/5/2, v/v/v)를 전개 용매로 2번 전개한 후 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(13-15).

올리고당 생산수율(%)

$$= \left( \frac{\text{전체 탄수화물양(g)} - (G + M + P)\text{양(g)}}{0.48 \times \text{설탕양(g)} + \text{녹말양(g)}} \times 100 \right)$$

### 올리고당의 내산성 확인

올리고당을 5%(w/v)의 농도로 준비한 후 pH를 3에서 6으로 조정하고, 60℃에서 120℃까지 각각 15분간 유지시킨 후, 얼음물로 급냉하고 변화된 올리고당의 함량을 TLC로 분석하였다(16). 산 처리전의 올리고당의 양을 100으로 정하고 각각의 pH에서 올리고당으로부터 분해되어 나온 DP(degree of polymerization)가 1에서 3인 당의 양을 고려하여 내산성 올리고당의 양을 계산하였다.

내산성(%) = 100 -

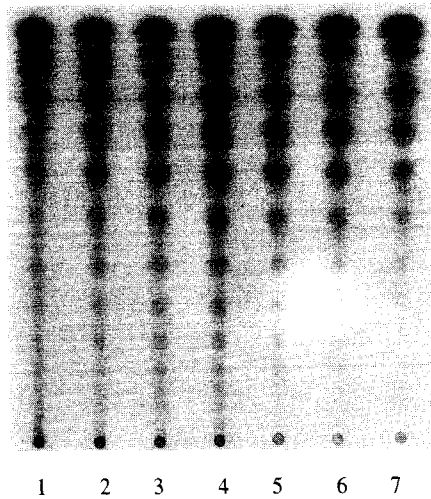
$$\left( \frac{\text{열처리 후 올리고당에서 유래된 DP 1-3의 함량(g)}}{\text{올리고당의 양(g)}} \times 100 \right)$$

### 올리고당의 내열성 확인

올리고당을 5%(w/v, pH 6)의 농도로 준비하고 90~140℃에서 각각 15분과 30분간 열처리한 후, 얼음물로 급냉하고 잔존 올리고당의 함량을 TLC로 분석하였다(16). 열처리전의 올리고당의 양을 100으로 정하고 각각의 온도에서 올리고당으로부터 분해되어 나온 DP가 1에서 3인 당의 양을 고려하여 내열성 올리고당의 양을 확인하였다.

내열성(%) = 100 -

$$\left( \frac{\text{열처리 후 올리고당에서 유래된 DP 1-3의 함량(g)}}{\text{올리고당의 양(g)}} \times 100 \right)$$

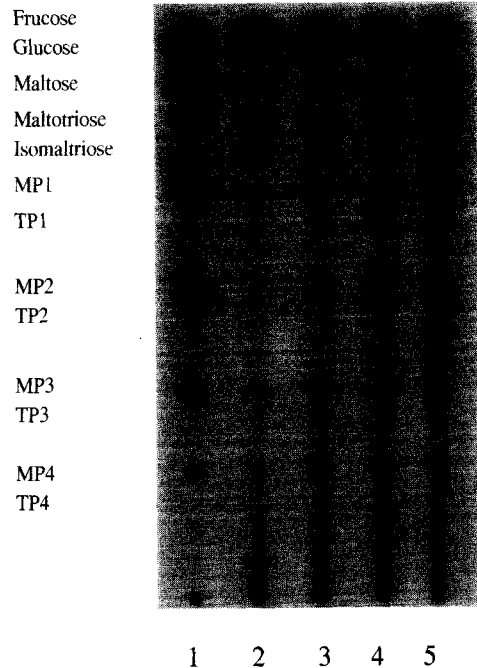


**Figure 1.** Thin layer chromatogram of reaction products formed by various activities of  $\alpha$ -amylase at fixed dextransucrase activity(100U/300 mL), sucrose(10%-w/v), and starch(5%-w/v). Lane 1; 100U/300 mL of  $\alpha$ -amylase, lane 2; 200U/300 mL of  $\alpha$ -amylase, lane 3; 500U/300 mL of  $\alpha$ -amylase, lane 4; 1000U/300 mL of  $\alpha$ -amylase, lane 5; 2000U/300 mL of  $\alpha$ -amylase, lane 6; 5000U/300 mL of  $\alpha$ -amylase, lane 7; 10000U/300 mL of  $\alpha$ -amylase.

**결과 및 고찰**

**올리고당 생산수율에 대한 dextransucrase와  $\alpha$ -amylase의 활성비 영향**

올리고당 생산양에 미치는 dextransucrase와  $\alpha$ -amylase의 활성 최적 비율을 알아보기 위해 녹말과 설탕의 농도를 각각 5%(w/v)와 10%(w/v)로 일정하게 하고, dextransucrase의 활성을 100U로 고정된 후  $\alpha$ -amylase의 활성을 100U에서 10000U까지 증가시켰다. 올리고당의 종류는  $\alpha$ -amylase의 활성이 100 U에서 1000 U까지 증가할수록 증가하다가, 그 이상에서는 감소하였다(Figure 1). Figure 1의 결과를 데이터화한 결과  $\alpha$ -amylase의 활성이 증가할수록 에탄올 66%(v/v)에 침전된 dextran의 농도는 20.7%에서 3.0%로 감소하였다. 분해되지 않고 남은 녹말의 농도는 15.4%에서 2.0%로 감소하였고 글루코스와 maltose의 전체농도는 12.7%에서 40.4%로 증가하였다. 올리고당의 생산수율은  $\alpha$ -amylase의 활성이 커질수록 증가하다가 1000U일 때 66.4%로 가장 높았으며, 그 이상에서는 감소하였다. dextransucrase의 수용체 반응기에서 수용체로 작용할 수 있는 탄수화물의 양이 증가할수록 수용체 산물의 종류는 감소하고, dextran의 양은 적게 합성되었다. 그리고 반응기 중 수용체 반응을 하지 않고 남은 탄수화물의 양은 증가하였다(17-19). 따라서  $\alpha$ -amylase의 활성이 증가할수록 수용체로 작용할 수 있는 글루코스와 maltose 그리고 maltotriose가 많이 생성되어 올리고당의 종류는 감소하고, 수용체로 작용하지 않고 남은 maltose나 maltotriose의 양은 증가하였다. 이는 수용체 반응에 의해 합성되는 올리고당보다는 maltose나 maltotriose가 더 좋은 수용체이기 때문에 수용체 산물의 종류가 감소한 것으로 생각된다. 또한  $\alpha$ -amylase가 수용체 산물을 분해하기 때문에 maltose와 maltotriose의 양이 더 증가한 것으로 생각된다(17). 그러나  $\alpha$ -amylase의 활성이 상대적으로 낮은 1000U이하에서는 수용체의 양이 상대적으로 적어 올리고당의 종류는 감소하고 또한 dextran 합성이 증가하였다.



**Figure 2.** Thin layer chromatogram of reaction products by different concentration of starch at the fixed amount of sucrose (10%-w/v), dextransucrase (100U/300 mL) and  $\alpha$ -amylase(1000U/300 mL). Lane 1; maltose-acceptor products, lane 2; 2.5% of starch, lane 3; 5.0% of starch, lane 4; 10% of starch, lane 5; 20% of starch. MP1; panose, TP1; 6<sup>3</sup>- $\alpha$ -glucosylmaltotriose, MP2; 6<sup>2</sup>- $\alpha$ -isomaltosylmaltose, TP2; 6<sup>3</sup>- $\alpha$ -isomaltosylmaltotriose, MP3; 6<sup>2</sup>- $\alpha$ -isomaltotriosylmaltose, TP3; 6<sup>3</sup>- $\alpha$ -isomaltotriosylmaltotriose, MP4; 6<sup>2</sup>- $\alpha$ -isomaltotetrosylmaltose, TP4; 6<sup>3</sup>- $\alpha$ -isomaltotetraosylmaltotriose.

**올리고당 생산수율에 대한 녹말과 설탕의 농도비의 영향**

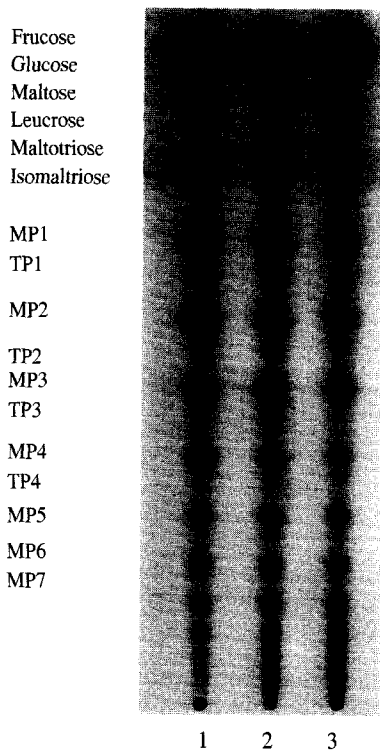
올리고당 생산에 대한 녹말과 설탕비의 영향을 알아보기 위해 설탕의 농도를 10%(w/v)로, dextransucrase와  $\alpha$ -amylase의 활성을 100U와 1000U로 각각 고정시킨 후, 녹말의 농도를 2.5%(w/v)에서 20%(w/v)까지 증가시켰다. 녹말의 농도가 증가할수록 maltose, maltotriose가 증가하였으며, 그 수용체 산물인 MP1(panose), MP2(6<sup>2</sup>- $\alpha$ -isomaltosylmaltose), 그리고 TP1(6<sup>3</sup>- $\alpha$ -glucosylmaltotriose)양이 증가하였다(Figure. 2). 올리고당 생산수율은 녹말이 2.5%일 때 69.9%로 가장 높았으며, 녹말의 농도가 20%(w/v)일 경우는 글루코스와 maltose의 양은 38.8%이고, 반응하지 않고 남은 녹말에 의해 66%(v/v) 에탄올에 침전된 다당은 27.0%로 가장 높았다. 그리고 수용체가 dextransucrase의 활성을 2.5배 증가시켰는데(Table 1), 이는  $\alpha$ -amylase의 가수분해산물이 dextransucrase에 붙는 글루코스를 잘 떼어내어 설탕의 분해를 증가시켜 dextransucrase의 활성이 증가한 것으로 생각된다(20-22).

**Relative activity of dextransucrase(%)**

$$= \left( \frac{\text{Dextransucrase activity in starch and } \alpha\text{-amylase reactor}}{\text{Dextransucrase activity without starch in } \alpha\text{-amylase reactor}} \times 100 \right)$$

**Table 1.** The effect of  $\alpha$ -amylase hydrolyzates in dextransucrase activity.

Starch(%)	0	0.5	1	5	10	20
Relative activity of dextransucrase(%)	100	117	166	200	244	250



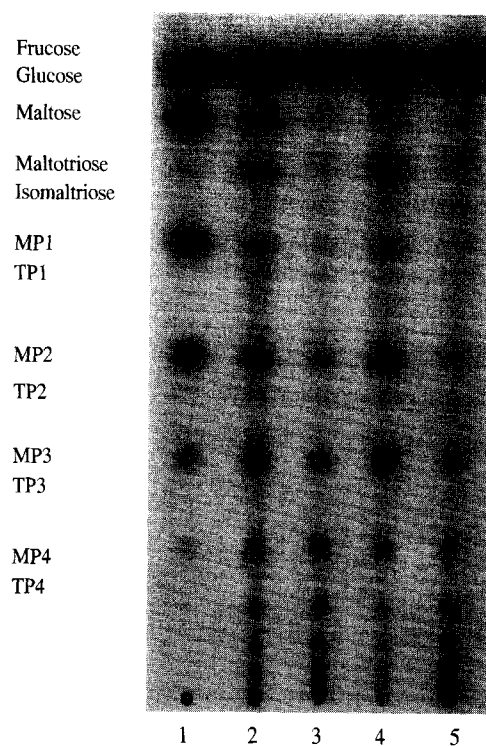
**Figure 3.** Thin layer chromatogram of reaction products by different activities of dextransucrase and  $\alpha$ -amylase at fixed concentration of sucrose (10%-w/v) and starch(5%-w/v). Lane 1; 20U/300 mL of dextransucrase and 200U/300 mL of  $\alpha$ -amylase, lane 2; 100U/300 mL of dextransucrase and 1000U/300 mL of  $\alpha$ -amylase, lane 3; 500U/300 mL of dextransucrase and 5000U/300 mL of  $\alpha$ -amylase. MP1; 6<sup>2</sup>- $\alpha$ -glucosylmaltose, TP1; 6<sup>3</sup>- $\alpha$ -glucosylmaltotriose, MP2; 6<sup>2</sup>- $\alpha$ -isomaltosylmaltose, TP2; 6<sup>3</sup>- $\alpha$ -isomaltosylmaltotriose, MP3; 6<sup>2</sup>- $\alpha$ -isomaltotriosylmaltose, TP3; 6<sup>3</sup>- $\alpha$ -isomaltotriosylmaltotriose, MP4; 6<sup>2</sup>- $\alpha$ -isomaltotetraosylmaltose, TP4; 6<sup>3</sup>- $\alpha$ -isomaltotetraosylmaltotriose, MP5; 6<sup>2</sup>- $\alpha$ -isomaltopentaosylmaltose, MP6; 6<sup>2</sup>- $\alpha$ -isomaltohexaosylmaltose, MP7; 6<sup>2</sup>- $\alpha$ -isomaltoheptaosylmaltose.

#### 올리고당 생산수율에 대한 효소 농도의 영향

올리고당 생산에 대한 혼합효소의 전체 활성 영향을 알아보기 위하여 dextransucrase와  $\alpha$ -amylase의 활성의 비율 20U:200U에서 500U:5000U까지 증가시켰다. 혼합효소의 전체활성이 증가할수록 MP1과 TP1같은 DP가 작은 당보다는 MP7(6<sup>2</sup>- $\alpha$ -isomaltoheptaosylmaltose) 이상의 큰 당이 주로 생산되었고, 과당의 수용체산물인 leucrose(5- $\alpha$ -glucopyranosylfructopyranose)양이 증가하였다(Figure 3). Dextransucrase와  $\alpha$ -amylase의 활성이 각각 20U:200U에서 500U:5000로 증가할 경우, 에탄올 66%(v/v)에 침전된 다당의 양은 1.8배 증가하였다. 올리고당 생산수율은 dextransucrase와  $\alpha$ -amylase의 활성이 20U:200일 경우 71.1%로 가장 높았으며, 혼합효소의 전체활성이 증가할수록 감소하였다. 즉 혼합효소의 전체활성이 증가할수록  $\alpha$ -amylase에 의한 수용체의 생산속도보다는 상대적으로 dextransucrase의 dextran합성 속도가 더 빨라 dextran을 상대적으로 많이 합성하기 때문에 생각된다(23).

#### 올리고당 생산수율에 대한 기질 공급방법의 영향

기질 공급방법에 따른 올리고당 생산수율을 알아보기 위해서 녹말과 설탕의 공급방법을 달리하였다. 10%(w/v) 설탕과 5%(w/v)



**Figure 4.** Thin layer chromatogram of reaction products by addition of different substrate concentration into mixed-enzyme reactor of dextransucrase (100U/300 mL) and  $\alpha$ -amylase(1000U/ 300 mL). Lane 1; maltose-acceptor products, lane 2; sample from sucrose and starch batch addition 10%(w/v), 5%(w/v) respectively, lane 3; sample from batch addition sucrose to 10%(w/v), following 5%(w/v) starch hydrolysis with mixed-enzyme for 1 hr, lane 4; sample from sucrose addition every 4 hr to 10%(w/v) during 5%(w/v) starch hydrolysis with mixed-enzyme, lane 5: sample from sucrose and starch fed-batch addition every 4 hr to 10%(w/v), 5%(w/v) respectively. MP1; panose, TP1; 6<sup>2</sup>- $\alpha$ -glucosylmaltotriose, MP2; 6<sup>2</sup>- $\alpha$ -isomaltosylmaltose, TP2; 6<sup>3</sup>- $\alpha$ -isomaltosylmaltotriose, MP3; 6<sup>2</sup>- $\alpha$ -isomaltotriosylmaltose, TP3; 6<sup>3</sup>- $\alpha$ -isomaltotriosylmaltotriose, MP4; 6<sup>2</sup>- $\alpha$ -isomaltotetraosylmaltose, TP4; 6<sup>3</sup>- $\alpha$ -isomaltotetraosylmaltotriose.

녹말이 혼합된 기질을 반응초기부터 모두 공급하였던 회분식(batch) 방법이 maltose(13.4%)와 maltotriose(10.7%)가 가장 많이 생성되었으며, 최종농도가 10%(w/v)와 5%(w/v)가 되도록 설탕과 녹말의 혼합기질을 4시간 간격으로 나누어서 공급하는 유가식(fed-batch) 방법은 다당(33.0%)이 가장 많이 생성되었다(Figure 4). 5%(w/v) 녹말을 혼합효소와 반응하면서 최종농도가 10%(w/v)가 되도록 설탕을 4시간 간격으로 나누어서 공급하는 방법은 MP2와 MP3(6<sup>2</sup>- $\alpha$ -isomaltotriosylmaltose)를 가장 많이 생산하였으며, 다당은 14.3%로 가장 적었다. 그러나 5%(w/v) 녹말만을 혼합효소로 1시간 동안 반응시킨 후, 10%(w/v) 설탕을 회분식으로 공급하는 방법은 올리고당 생산수율이 77.8%로 가장 높았다. 이것은 dextransucrase 반응이 일어나기 전에 수용체로 작용할 수 있는 녹말의 분해산물이 많이 생산되어 dextran 합성 반응보다 수용체 반응이 더 잘 진행되어 올리고당 생산수율이 증가한 것으로 생각된다(8, 12). 혼합기질을 4시간 간격으로 나누어서 공급하는 유가식 방법은 혼합효소의 전체활성이 증가하는 효과가 생겨 다른 방법보다 작은 올리고당보다는 큰 당류를 많이 생산된 것 같다(23).

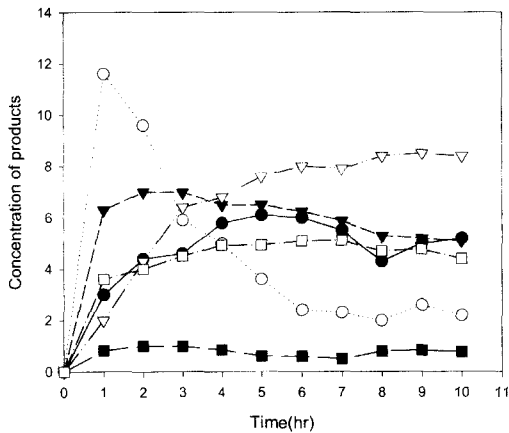


Figure 5. Concentration of saccharides produced in mixed-enzyme reactor of dextranucrase(100U/300 mL) and  $\alpha$ -amylase(1000U/ 300 mL) at sucrose (10%-w/v) and starch(5%-w/v). ●; glucose, ○; maltose, ▼; maltotriose; ▽; panose, □; 6<sup>2</sup>- $\alpha$ -isomaltosylmaltose, ■; 6<sup>3</sup>- $\alpha$ -glucosylmaltotriose.

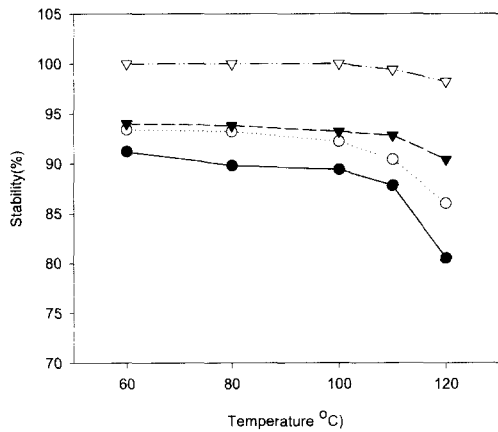


Figure 6. The stability of oligosaccharides at different temperatures (°C) and pHs. ●; pH 3, ○; pH 4 ▼; pH 5, ▽; pH 6.

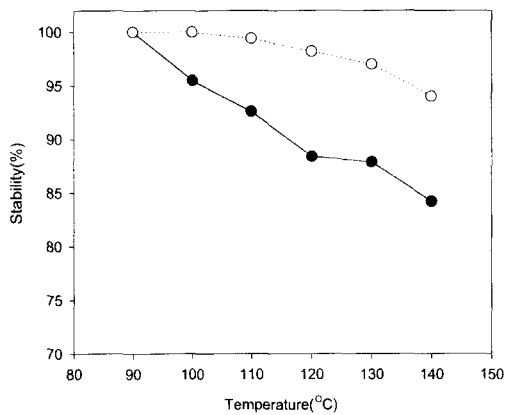


Figure 7. The heat stability of oligosaccharides at different temperatures (°C) at pH 6. ○; 15min. ●; 30min.

**회분식 반응**

반응시간에 따른 생산물의 변화를 알아보기 위하여 10%(w/v)의 설탕과 5%(w/v)의 녹말을 사용하였으며, dextranucrase와  $\alpha$ -amylase의 활성을 100U와 1000U로하여 반응하면서 1시간 간격으로 샘플링하였다. 글루코스는 증가하다가 5시간부터 수용체로 작용하면서 감소하였다. 하지만 반응 8시간 이후에는 maltotriose 이상의 수용체에 결합되어 얻어진 산물이  $\alpha$ -amylase에 의해 분해되면서 다시 증가하였다(Figure 5). Maltose는 반응 1시간까지 급속히 증가한 후 감소하였는데, maltose의 수용체산물인 panose와 6<sup>2</sup>- $\alpha$ -isomaltosylmaltose는 maltose가 감소하면서 급격히 증가하였다. 즉 dextranucrase의 수용체로 전환율이 가장 높은 maltose가 dextranucrase의 수용체로 작용한 것으로 생각된다. maltotriose는 반응초기에 증가한 후 일정하게 유지되는 반면, 1차 수용체산물인 6<sup>3</sup>- $\alpha$ -glucosylmaltotriose은 반응 2시간까지는 증가하다가 6시간까지 감소한 후 다시 증가하였다. 이것은 6<sup>3</sup>- $\alpha$ -glucosylmaltotriose가 수용체로 작용하면서 감소하였지만, maltotetraose 이상의 수용체에 결합되어 얻어진 산물이  $\alpha$ -amylase에 의해 분해되면서 다시 증가한 것으로 생각된다(17).

**새로운 구조의 올리고당 내산성 확인**

pH 변화에 따른 새로운 구조의 혼합올리고당 분해정도를 각 온도별로 Figure 6에 나타내었다. 100°C에서 15분간 유지한 pH 6에서 올리고당은 전혀 분해가 되지 않아 산에 안정함을 보였고, pH 5에서는 6.8%, pH 4에서는 7.8%, pH 3에서는 10.6% 정도 분해된 것으로 나타났다. 올리고당의 이러한 내산성 특성은 식품첨가물로 사용하거나 산성 조건하에서 보관시 유용할 것으로 생각된다.

**새로운 구조의 올리고당 내열성 확인**

90°C 이상의 고온처리 후 새로운 구조의 혼합올리고당 안정성을 Figure 7에 나타내었다. 올리고당은 pH 6과 90°C에서 30분간 처리해도 전혀 분해가 되지 않았다. 15분간 처리한 경우에는 100°C까지 분해되지 않았으며, 140°C까지 94.0%의 안정성을 보였다. 따라서 식품에 첨가하여 가열하였을 경우 조리시간의 조정으로 올리고당 구조의 분해를 줄일 수 있으리라 생각된다.

**요 약**

Dextranucrase와  $\alpha$ -amylase의 혼합효소반응 통하여 새로운 구조의 올리고당을 생산하였고, 그 특성을 조사하였다. 기질인 설탕과 녹말의 농도를 10%(w/v), 5%(w/v)로 하였을 때 dextranucrase와  $\alpha$ -amylase의 활성비가 100U대 1000U일 경우 올리고당의 종류와 생산수율이 66.4%로 가장 높았다. 녹말의 분해산물이 dextranucrase의 수용체 반응을 활성화시켜 dextranucrase 활성을 증가시켰다. 혼합효소의 활성이 증가할수록 올리고당보다는 다당을 생산하였다. 5%(w/v)의 녹말을 1시간동안 반응시켜 수용체로 이용될 수 있는 산물의 양을 증가시킨 후 설탕의 농도가 10%(w/v)가 되도록 반응시킨 방법이 녹말과 설탕을 반응초기부터 모두 반응시킨 방법보다 올리고당 생산수율이 12% 더 증가하였다. 새로운 구조의 올리고당은 pH 3에서는 10.6, pH 4에서 7.8%의 분해를 보였다. 새로운 구조의 올리고당은 pH 6과 140°C 고온에서 89.3%까지 안정하였다.

## 감사의 말

본 연구는 보건복지부에서 시행한 '97 보건의료기술 연구개발 사업과 농업생물신소재연구센터를 통한 한국과학재단의 지원을 받아 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

## REFERENCES

- Kim, K. S. and Y. K. Chae (1997), The effects of addition of oligosaccharide on the quality characteristics of tomato jam, *Korean J. Food Sci. Technol.* **13**, 348-354.
- McKee, T. and J. F. McKee (1996), *Biochemistry*, WCB, 165.
- 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.
- Pack, J. H., J. Y. Yoo, O. H. Shin, H. K. Shin, S. J. Lee, and K. H. Park (1992), Growth effect of branched oligosaccharides on principal intestinal bacteria, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**, 237-242.
- Kang, S. C., J. W. Yun, and T. W. Ro (1996), Effect of oligosaccharides on mannitol accumulation during fermentation of Kimchis, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **11**, 181-185.
- Nunokawa, Y. (1981), Oligosaccharides in sake, *J. Jpn. Soc. Starch Sci.* **28**, 109-118.
- Roby, J. F. and S. H. Eklund (1983), Relative, quantitative effects of effects acceptors in the reaction of *Leuconostoc mesenteroides* B-512F dextranase, *Carbohydrate research*, **121**, 279-286.
- Baek, J. S., D. Kim, J. H. Lee, P. S. Chang, N. S. Han, and J. F. Roby (1998), Enzymatic synthesis of new oligosaccharides using glucansucrase. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26**, 9-186.
- Lee, J. H., D. M. Kim, J. S. Baek, K. H. Park, N. S. Han, and J. F. Roby (1998), Modification of starch using dextranase and characterization of the modified starch. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26**, 143-150.
- Kim, D. and J. F. Roby (1994), Selection of *Leuconostoc mesenteroides* mutants constitutive for glucansucrases, *Enzyme Microbiol. Technol.* **16**, 1010-1015.
- Heo, S. J., D. Kim, I. S. Lee, and P. S. Chang (1999), Development of a mixed-culture fermentation process and characterization for new oligosaccharides and dextran using *Lipomyces starkeyi* and *Leuconostoc mesenteroides*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **27**, 304-310.
- Roby, J. F., D. Kim and L. Yu (1994), Mechanism of dextran activation of dextranase, *Carbohydrate research*, **267**, 215-262.
- Tanriseven, A. and J. F. Roby (1993), Interperation of dextranase inhibition at high sucrose concentration, *Carbohydrate Research*, **245**, 97-104.
- Kim, D., J. S. Baek, and J. H. Lee (1995), Characteristics of dextranases of *Leuconostoc mesenteroides* B-1299 mutants, and enzymatic modification amylose and pullulan, *Ann. RCNBMA* **4**, 41-57.
- Remaud, M., F. Paul, and P. Monsan (1992), Characterization of  $\alpha(1\rightarrow3)$  branched oligosaccharides synthesized by acceptor reaction with the extracellular glycosyltransferase from *L. mesenteroides* NRRL B-742, *J. Carbohydrate Chemistry* **11**, 359-378.
- Kim, J. R., C. Yook, H. K. Kwon, S. Y. Hong, C. K. Park, and K. H. Park (1995), Physical and physiological properties of isomaltooligosaccharides and fructooligosaccharides, *Korean J. Food Sci. Technol.* **27**, 170-175.
- Fu, D. and J. F. Roby (1990), Acceptor reactions of maltodextrins with *Leuconostoc mesenteroides* B-512FM dextranase, *Archives of Biochemistry and Biophysics* **283**, 379-387.
- Killey, M., R. J. Dimler, and J. F. Cluskey (1955), Preparation of panose by the action of NRRL B-512 dextranase on a sucrose-maltose mixture, *J. Am. Chem. Soc.* **77**, 3315-3318.
- Roby, J. F. and T. F. Walseth (1987), The mechanism of acceptor reaction of *Leuconostoc mesenteroides* B-512F dextranase, *Carbohydr. Res.* **61**, 433-445.
- Roby, J. F. and S. H. Eklund (1982), Stereochemistry involved in the mechanism of action of dextranase in the synthesis of dextran and the formation of acceptor products, *Bioorg. Chem.* **11**, 115-132.
- Roby, J. F. and T. F. Walseth (1978), The mechanism of acceptor reactions of *Leuconostoc mesenteroides* B-512F dextranase, *Carbohydr. Res.* **61**, 433-445.
- Roby, J. F. (1995), Mechanisms in the glucansucrase synthesis of polysaccharides and oligosaccharides from sucrose, *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* **51**, 133-168.
- Su, D. and J. F. Roby (1993), Control of the synthesis of dextran and acceptor-products by *Leuconostoc mesenteroides* B-512F dextranase, *Carbohydr. Res.* **248**, 339-348.