

Acceptor and transglycosylation reaction by mixed dextransucrase prepared from *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMCM, 742CB3, 1299C

박현정, 이소영<sup>1</sup>, 류화자<sup>2</sup>, 이진하, 김도만<sup>3,4</sup>, 김도원<sup>5</sup>  
전남대학교 화학공학부, 물질생물화학공학과<sup>1</sup>, 정밀화학공학과<sup>2</sup>, 공업기술연구소<sup>3</sup>,  
생물산업기술연구소<sup>4</sup>, 강릉대학교 동해안해양생물자원연구센터<sup>5</sup>  
전화 (062)530-0874 Fax (062)530-1849

**Abstract**

*Leuconostoc mesenteroides* B-512FMCM, 742CB3, 1299C의 dextransucrase들의 glycosyl기 전이 특성을 수용체 반응과 transglycosylation반응을 통해 확인하였다. 수용체 반응의 경우 10% sucrose에 수용체로 4% maltose를 첨가하여 반응시켰고 transglycosylation반응은 다른 크기, 다른 농도 그리고 다른 종류의 가지 결합의 dextran을 합성하는 효소들을 이용하여 수행하였다. 각각의 효소들은 maltose를 이용한 수용체 반응에서 유사한 종류의 수용체 산물들을 합성한 것에 비해 세 dextransucrase들(512FMCM, 742CB3, 1299C)을 일정 비율로 혼합하여 maltose를 이용한 수용체 반응 결과 512FMCM효소의 활성 비율을 줄이고 742CB3, 1299C효소의 활성 비율을 증가시켰을 경우에는  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 3의 가지결합이 많은 dextran을 합성하였다. 또한, 세 가지 다른 구조의 dextran(T40, 742CB, B1299)에 100mM maltose를 수용체로 첨가해 각각의 dextransucrase(512FMCM, 742CB3, 1299C)와 transglycosylation을 수행한 결과 1299C효소가 세 종류의 dextran(T40, 742CB, B1299)에 모두 가지 결합이 많은 dextran을 합성함을 확인하였다. 또한  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 6 결합으로 주로 이루어진 2%, 5% dextran(T10, T40, T70, T500, T2000)에 dextransucrase(512FMCM, 742CB3, 1299C)를 반응시켜 기존의 dextran보다 가지결합이 더 많이 형성된 transglycosylation 산물을 합성하였다. 이때 maltose를 첨가했을 경우 이 수용체에 의해 많은  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 3 가지 결합의 dextran을 합성함을 확인하였다.

**Introduction**

*Leuconostoc*속균은 Gram 양성이고, 통성 혐기성 구균으로 sucrose를 이용하여 dextransucrase를 생산한다. *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMCM균은 주로 95%의  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 6 결합과, 5%의  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 3 가지 결합을 갖는 dextran을 합성한다. *Leuconostoc mesenteroides* B-742CB3, B-1299C균의 효소에 의해서는 512FMCM보다 더 높은 비율의  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 3 가지 결합을 합성하는데 현재까지 알려져 있는 가지결합 형성 기작은 생성된 dextran에 glucose가 효소의 특성에 따라 다른 구조의 결합을 하는

수용체 반응의 결과로 설명되어지기도 하고, 효소 자체의 합성부위 특성으로 이해되기도 한다. 현재까지 알려진 dextransucrase 유전자들에 의해 합성된 효소들 중 자체적으로 모균의 효소만큼 가지 결합을 갖는 dextran을 합성하는 효소들의 유전자는 발표되지 않았다. 그러나 유전자의 종류에 따라 가지 결합된 dextran의 정도는 달라 효소 자체의 특성이 어느 정도 가지 결합 형성에 관여하지만 dextran이 수용체로 작용할 것이라는 생각도 좀 더 자세히 검토되어야 한다. 현재까지 이에 대한 연구결과는 구체적으로 보고된바 없으며 다른 구조의 dextran을 합성하는 효소들의 복합 작용에 의해 합성되는 dextran의 구조차이에 대한 연구결과도 구체적으로 없다. 본 연구에서는 여러 가지 효소들의 복합 작용에 의해 합성되는 dextran의 가지 결합 정도를 확인하고 transglycosylation반응을 수용체를 넣거나 넣어 주지 않은 조건에서 수행하여 그 생산물의 가지 결합 정도를 확인하였다. *Leuconostoc mesenteroides* B-742 균주가 만드는 Fraction L dextran 은 38% alcohol에 침전되고 약 14%의  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 4 가지 결합을 갖고 있으며, fraction S dextran은 44%의 alcohol에 침전되며, 모든 glucose unit에 한 개의 glucose가  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 3가지 결합을 가지고 있다(전체 가지결합 정도는 50%). B-1299C dextransucrase는 주 결합인  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 6결합과 가지 결합으로  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 2결합을 특이적으로 가지는 dextran을 합성한다. Sucrose로부터 dextran을 합성하는 반응 외에도, dextransucrase는 sucrose로부터 glucose 단위를 반응액에 따로 존재하는 탄수화물들에 전이하는 반응도 한다. 이때 glucose기를 전달받는 탄수화물들을 수용체라 부르며 이 반응을 수용체반응이라 한다. 특별히 dextran이 수용체로 사용되며 동시에 glucose의 donor로 사용되어 일어나는 반응을 transglycosylation반응이라 한다.

### Material and methods

**배양조건** : 본 연구에 사용된 *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMCM, 742CB3, 1299C는 28℃, pH 5.2의 조건에서 2%(w/v) glucose가 포함된 LWG배지를 이용하여 배양하였다. LWG배지의 조성은 yeast extract 5g/l, peptone 5g/l, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5g/l, 1% mineral solution (0.2g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.01g NaCl, 0.01g FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.01g MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 0.013g CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O)이다. 이 배지에 *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMCM, 742CB3, 1299C를 접종한 후 glucose가 모두 소비되었을 때 배양을 정지하였다.

**효소회수** : 각각의 *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMCM, 742CB3, 1299C를 배양 후 원심 분리하여 상등액을 얻었다.

**효소의 활성 확인** : 효소의 활성은 100mM sucrose(pH 5.2)용액과 효소(dextransuc

rase)를 28°C에서 1:1(v/v)로 시간별로 반응시킨 후 0.05M의 NaOH로 정지시켰다. 반응 후 생산된 fructose의 양은 TLC(thin layer chromatography)로 분석하였으며 사용한 전개 용매는 acetonitrile : water-85 : 15 (v/v)를 사용하였다.

**다른 dextransucrase를 각각의 비율로 혼합한 수용체 반응 :** 10% sucrose를 이용하여 세 효소(512FMCM, 742CB3, 1299C) 각각의 활성 비율을 달리하여 혼합하고 4% maltose를 수용체로 첨가하여 총 반응부피 10ml, 총 효소 활성을 10U으로 조절 한 뒤 28°C에서 반응시키고 67%의 ethanol을 넣어 침전시킨 dextran을 dextransucrase로 처리하여 분해되어 나온 산물을 전개용매로 nitromethane : 1-propanol : water-2:5:1.5(v/v/v)를 사용하여 TLC로 확인하였다.

**세 종류의 dextran을 이용한 transglycosylation반응 :** 2%의 세 종류의 dextran (T40, 742CB, B1299)에 100mM maltose를 수용체로 첨가하고 각각의 세 dextransucrase(512FMCM, 742CB3, 1299C)를 28°C에서 반응한 후 산물을 전개용매로 nitromethane : 1-propanol : water-2:5:1.5(v/v/v)를 사용하여 TLC로 확인하였다.

**Dextran을 이용한 transglycosylation반응 :** 0.1%, 2%, 5%의 dextran (T10, T40, T70, T500, T2000)을 준비해 dextransucrase (512FMCM, 742CB3, 1299C)와 28°C에서 transglycosylation 반응을 한 후 67% ethanol로 침전된 산물을 dextransucrase 처리하여 TLC로 확인하였다. 사용한 전개 용매는 nitromethane : 1-propanol : water-2:5:3(v/v/v)이었다.

**Dextran에 maltose를 첨가한 transglycosylation반응 :** 0.1%, 2%, 5%의 dextran (T10, T40, T70, T500, T2000)을 준비해 4% maltose를 수용체로 첨가하여 dextransucrase (512FMCM, 742CB3, 1299C)와 28°C에서 transglycosylation 반응을 한 후 67% 에탄올로 침전된 산물을 dextransucrase 처리하여 TLC로 확인하였다. 사용한 전개 용매는 nitromethane : 1-propanol : water-2:5:3(v/v/v)이었다.

## Results and Discussions :

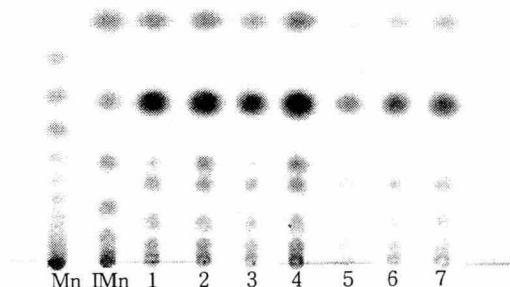


그림 1. 다른 활성의 혼합 dextransucrase(512FMCM, 742CB3, 1299C)와 sucrose, 그리고 maltose를 이용한 수용체 반응 후 67% ethanol로 침전된 산물의 dextransucrase처리

### 결과 TLC

Lane 1: 512FMCM, 742CB3, 1299C = 1:3:0      Lane 2: 512FMCM, 742CB3, 1299C = 1:0:3  
Lane 3: 512FMCM, 742CB3, 1299C = 0:1:1      Lane 4: 512FMCM, 742CB3, 1299C = 1:1:0  
Lane 5: 512FMCM, 742CB3, 1299C = 0:1:1      Lane 6: 512FMCM, 742CB3, 1299C = 1:1:1  
Lane 7: 512FMCM, 742CB3, 1299C = 1:1.5:1.5

▷ 복합 효소를 이용한 반응에서 얻어진 산물이 가지 결합을 더 많이 갖고 있는 dextran임을 확인하였다.

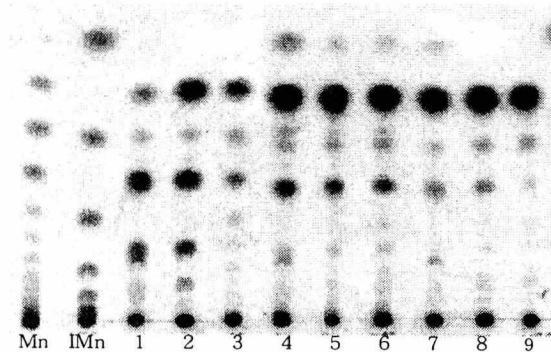


그림 2. 세 종류의 dextran(T40, 742CB, B1299)을 이용한 transglycosylation

Lane 1, 2, 3: T40 dextran에 maltose를 첨가한 뒤 각각의 dextransucrase(512FMCM, 742CB3, 1299C)와 반응

Lane 4, 5, 6: 742CB dextran에 maltose를 첨가한 뒤 각각의 dextransucrase(512FMCM, 742CB3, 1299C)와 반응

Lane 7, 8, 9: B1299 dextran에 maltose를 첨가한 뒤 각각의 dextransucrase(512FMCM, 742CB3, 1299C)와 반응

▷ 각각의 효소들이 transglycosylation반응 후 생산하는 올리고당의 종류는 달랐으며 glucose의 donor로서 사용되는 dextran의 종류에 따라서도 다른 반응 산물을 생산함을 확인하였다.

### References

1. Baek, J. S., D. Kim, J. H. Lee, P. S. Chang, N. S. Han, and J. F. Robyt. 1998. Enzymatic synthesis of new oligosaccharides using glycosucrases. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 26: 179-186
2. Robyt, J. F. and R. Mukerjea. 1994. Separation and quantitative determination of nanogram quantities of maltodextrins and isomaltodextrins by thin-layer chromatography. *Carbohydr. Res.* 251: 187-202.
3. Kim, D. and J. F. Robyt. 1994. Production and selection of glucansucrases. *Enzyme Microbial Technol.* 16: 659-664
4. Kim, D. and J. F. Robyt. 1994. Properties of *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMC constitutive dextransucrase. *Enzyme Microbial Technol.* 16: 1010-1015
5. Fu, D. and J. F. Robyt. 1990. A facile purification of *Leuconostoc mesenteroides* B-512FM dextransucrase. *Prep. Biochem.* 20: 93-106.