

## 덱스트란수크라제를 이용한 전분의 변형 및 특성 조사

이진하<sup>1</sup> · 김도만<sup>1,2,3\*</sup> · 백진숙<sup>1</sup> · 박관화<sup>3</sup> · 한남수<sup>4</sup> · John F. Robyt<sup>4</sup>  
전남대학교 <sup>1</sup>생물화학공학과, <sup>2</sup>촉매연구소, <sup>3</sup>서울대학교 농업생물신소재연구센터,  
<sup>4</sup>Department of Biochemistry and Biophysics, Iowa State University

**Modification of Starch using Dextranase and Characterization of the Modified Starch.** Lee, Jin Ha<sup>1</sup>, Doman Kim<sup>1,2,3\*</sup>, Jin Sook Baek<sup>1</sup>, Kwan Hwa Park<sup>3</sup>, Nam Soo Han<sup>4</sup> and John F. Robyt<sup>4</sup>. <sup>1</sup>Department of Biochemical Engineering, <sup>2</sup>Institute for Catalysis, Chonnam National University, Kwangju 500-757, <sup>3</sup>Research Center for New Bio-Materials in Agriculture, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea, <sup>4</sup>Department of Biochemistry and Biophysics, Iowa State University, Ames, IA, USA. – Many enzymes catalyze a primary reaction and/or secondary reaction. Dextranase usually synthesizes dextran from sucrose as a primary reaction. The secondary reaction of dextranase is the transfer of glucose from sucrose to carbohydrate acceptors. We have reacted dextranase from *Leuconostoc mesenteroides* B-742CB with sucrose and starches; granule or gelatinized starches, and Small or Potato starches. The yield of modified starch was ranged from 46% to 72%(s.d.<±5%) of theoretical depends on various reaction conditions. Modified products were more resistant against the hydrolysis of α-amylase, isoamylase, pullulanase and endo-dextranase than those of native starch. Based on the reactions from enzyme hydrolysis and methylation followed by acid hydrolysis modification of granule starch was more efficient than the modification of gelatinized starch. After modification of granule starch with dextranase, there produced a soluble modified starch. After modification the starch granules were fractionated to small size. The positions of glucose substitution of 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 and C6 free hydroxyl group of glucose residues in the starch.

**Key words:** *Leuconostoc mesenteroides*, starch modification, dextranase, TLC, methylation

Sucrose로부터 텍스트란을 합성하는 텍스트란수크라제(EC 2.4.1.5)는 주로 *Leuconostoc mesenteroides*에 의해 생산된다[1, 6, 7]. 텍스트란수크라제를 생산하기 위하여 대부분의 *Leuconostoc*균들은 sucrose를 효소 생산 기질에 넣어 주어야하며 이때 생산되는 텍스트란수크라제는 텍스트란과 결합이 되어 있어 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 텍스트란수크라제 또는 alternansucrase를 생산하는 constitutive 돌연변이 균주들을 개발하였다 [5, 6, 7, 8]. 따라서 sucrose가 아닌 glucose와 fructose 등을 탄소원으로 이용하여 생장시 텍스트란수크라제를 생산함으로써 텍스트란의 오염이 없는 효소를 생산할 수 있게 되었다. *Leuconostoc mesenteroides* B-742는 sucrose를 이용하여 2종류의 텍스트란들을 합성한다. 이 텍스트란들은 39%의 에탄올에서 침전되는 L형의 텍스-

트란과 45% 에탄올에서 침전되는 S형의 텍스트란으로 나눌 수 있는데, S형의 텍스트란은 50%의  $\alpha 1 \rightarrow 6$ 결합과 50%의  $\alpha 1 \rightarrow 3$ 가지 결합을 가지며, L형의 텍스트란은 87%의  $\alpha 1 \rightarrow 6$ 결합과 13%의  $\alpha 1 \rightarrow 4$  가지결합을 가지고 있다고 보고 되었다[14, 15]. 높은 가지구조 비율로 인하여 S형의 텍스트란은 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 [7], 본 연구에서 이용한 B-742CB 텍스트란수크라제는 모균주의 텍스트란수크라제와는 달리  $\alpha 1 \rightarrow 6$ 의 주결합과  $\alpha 1 \rightarrow 2$ ,  $\alpha 1 \rightarrow 3$  그리고  $\alpha 1 \rightarrow 4$ 의 가지구조를 갖는 텍스트란을 합성하였다[7].

B-742CB 텍스트란수크라제는 sucrose로부터 텍스트란을 생산하는 이외에, sucrose의 glucose를 효소반응기 내에 존재하거나 따로 넣어준 다른 탄수화물 등에 전달하는 반응을 촉진하는 것으로 알려졌다. 이때 따로 넣어 준 탄수화물을 수용체(acceptors)라 부르며, 이 반응기 작을 수용체 반응(acceptor reaction)이라 한다. 수용체들의 종류는 상당히 광범위하여 B-512F 텍스트란수크라제

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

의 경우는 100가지 이상의 탄수화물들이 알려졌다. 이에는 단당류, 이당류, oligo당류 그리고 작은 크기의 텍스트란들이 포함되며 수용체의 종류에 따라 각기 다른 정도의 수용체로서의 반응 효율을 나타낸다[2, 4, 11, 12, 16]. Glucose를 이용하여 constitutive하게 생산된 텍스트란수크라제는 효소에 텍스트란이 결합되어 있지 않아 수용체 반응이 더 잘 일어난다[7]. 본 연구에서는 수용체로서 해당의 한 종류인 전분(전분 입자, 호화된 전분)을 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(1 L의 종류수당 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, 생육온도로는 28°C를 유지하였다[7].

### 재료

전분은 메탄올로 변형된 Small starch와 산과 메탄올로 변형된 Potato starch[13]를 사용하였으며, 다른 시약은 GR 등급의 것을 정제 없이 사용하였다.

### 효소

텍스트란수크라제는 membrane filtration (30K cut-off) 후에 Kim과 Robyt의 방법[5]으로 순수 분리하였고 효소 역가는 fructose를 표준물질로 하여 copper-bicinchoninate 분석법으로 확인하였으며[13], 1 Unit는 분당 해리 되는 fructose의  $\mu mol$ 수로 정의하였다.

### 전분의 변형

전분을 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% Tween80)에 혼탁시켜주거나 호화 시킨 후 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. 넣어준 sucrose가 다 소비 되었을 때 변형 산물을 회수하였으며, 수용성 산물은 2배의 ethanol(v/v)을 넣어서 침전시키고 acetone과 ethanol로 수분제거 후에 40°C에서 건조시켜 구조 및 특성 분석 실험에 사용하였다[9].

### 변형 전분의 가수분해 효소에 대한 저항성 조사

0.5%(w/v)의 변형 전분 100  $\mu l$ 에 1%의  $\alpha$ -amylase (0.2 U/ml) (*humany salivary*와 *Bacillus amyloliquefaciens*  $\alpha$ -amylase)와 *Pseudomonas amylobornerosa* iso-amylase(0.2 U/ml), *Klebsiella pullulanase*(0.5 U/ml), 그리고 *Penicillium endo-dextranase*(0.3 U/ml)를 각각 50  $\mu l$  처리하였다. 가수분해 효소반응후 분해산물들은 Thin layer chromatography(TLC) 분석법으로 생산물의 분포를 조사하였다. TLC plate는 Merck사의 silica gel 60 aluminium sheets에 1  $\mu l$ 씩 점적하여 nitromethane:1-propanol:water(2:5:1.5) 조성의 전개용매로 2 번 전개시킨 후, 0.5%(w/v)  $\alpha$ -naphtol, 5%(v/v)  $H_2SO_4$ 를 포함한 메탄올을 이용하여 발색시켰다. 이상의 반응 결과들을 변형하지 않은 전분의 가수분해 효소에 대한 저항성과 비교하였다.

### 변형 전분의 Iodine염색

변형 전분입자들은 1 mg/ml의 농도로 물에 혼탁하여 121°C에서 15분간 가열한 후 50  $\mu l$ 를 microsample plates에 더해 주고 iodine/iodide 시약 (0.2 mg  $I_2$ 와 2 mg KI/ml 용액)을 25  $\mu l$  넣어 준 후에 630 nm에서 흡광도를 측정하였다[9].

### 용해도 조사

변형 전분의 수용체 반응 산물을 22°C 물에 1시간 녹인 후 원심분리(8000 g, 15분)하고, 상정액중의 가용성 탄수화물을 정량하였다[3].

### Scanning Electron Micrographs를 이용한 변형 전분의 연구

변형이전과 이후의 전분입자를 50%, 60%, 70%, 95%, 100%의 에탄올에 10분씩 담가두어 수분을 완전히 제거시키고 Ion Sputter(JEOL, JFC-1100)를 이용하여 gold/palladium으로 coating(20 mA, 4 min)시킨 뒤, 입자형태나 표면의 모양을 전자 현미경으로 살펴보았다.

### Methylation분석

Glucose가 수식된 위치를 정하기 위하여, 변형 전분을 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 전분의 free-OH기를 sucrose의 glucose로 수식하여 새로운 구조의 변형 전분을 만들고자 반응조건을 연구하였다. 즉 전분

입자나 호화 전분의 glucose를 다른 glucose로 수식함으로써 가지 결합을 형성하여 구조가 달라진 전분을 만들고 물성의 변화가 일어난 전분을 생산하고자하는 것으로, 변형 반응후 산물은 수용성과 불용성으로 분리하고 이 산물들의 생성되는 양, 변형 정도 등을 관찰하였다.

### 전분의 변형

변형 전분의 생산 수율을 고려하여 0.37%(w/v)의 전분(입자 혹은 호화된 전분)과 효소의 농도를 0.1 U/ml 사용하였으며 pH와 온도는 각각 5.2와 28°C로 유지하였다. 변형 전분의 수율은 Small starch와 Potato starch를 입자 형태로 사용할 경우 수용성 산물은 전량으로 각각 이론적 수율의 26%와 34%였으며, 불용성 산물은 20%와 22%였다. 총수율은 변형 Small starch의 경우는 46%, Potato starch의 경우에는 56%를 보였다(Table 1). 반응후 효소 반응기내에는 회수된 수용성과 불용성 다당류 외에 에탄올로 침전시키기가 어려운 단당, 이당과 작은 크기의 올리고당등이 생산되어 에탄올 침전시 손실되었다. 호화 시킨 전분을 수용체로 사용한 경우의 수율은 입자를 사용한 경우보다 다소 높아 수용성 산물의 경우 Small starch는 이론적 수율의 52% 그리고 불용성 산물의 경우는 11%였으며, Potato starch는 수용성 산물의 수율이 61%였고 불용성 산물의 경우는 11%였다 (Table 1).

### 변형 전분의 가수분해 효소에 대한 반응

변형 Small starch 전분의 변형에 사용한 B-742CB 텍스트란수크라제에 의해서 합성된 텍스트란은 본 연구에서 사용한 가수분해 효소에 의해 분해되지 않았다 (Fig. 1, lanes a-d). Small starch를 buffer용액에 녹이거나 혼탁시켜 가수분해 효소들로 처리한 결과  $\alpha$ -amylase에 의해서는 주로 glucose로 분해되었고, mal-

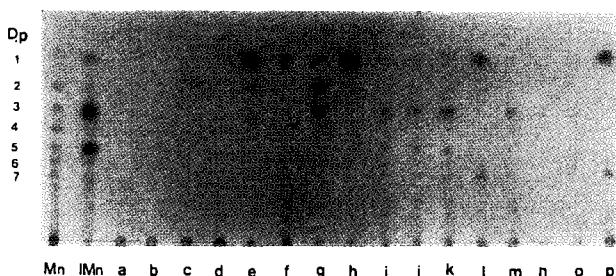


Fig. 1. TLC analysis of  $\alpha$ -amylase, isoamylase, pullulanase and endo-dextranase hydrolyzates of native Small starch, B-742CB dextran and modified Small starch prepared from reaction using granule starch as an acceptor.

Mn and IMn are series of maltodextrins and isomaltodextrins, respectively. Lanes a-d, the hydrolyzates of B-742CB dextran by  $\alpha$ -amylase, isoamylase, pullulanase and endo-dextranase; lanes e-h, the hydrolyzates of native Small starch by  $\alpha$ -amylase, isoamylase, pullulanase and endo-dextranase; lanes i-l, the hydrolyzates of modified soluble Small starch prepared by  $\alpha$ -amylase, isoamylase, pullulanase and endo-dextranase; lanes m-p: the hydrolyzates of modified insoluble Small starch prepared by  $\alpha$ -amylase, isoamylase, pullulanase and endo-dextranase.

tose와 maltotriose를 소량 생산하였으며 (Fig. 1, lane e), isoamylase에 의해서는 소량만의 glucose와 maltooligo당이 생산되었으며 (Fig. 1, lane f), pullulanase에 의해서는 주로 maltose, maltotriose 등으로 가수분해되었고 소량의 glucose도 생산하였다 (Fig. 1, lane g). *Penicillium* endo-dextranase에 의해서는 거의 glucose만을 생산하였다 (Fig. 1, lane h). 효소 변형 후 반응액 중의 수용성 변형 Small starch는  $\alpha$ -amylase에 의해 가수분해가 일어났으나 생성되는 glucose의 양은 변형 전의 Small starch보다 줄었고, 작은 크기의 올리고당의 생산이 증가되었으며 이는 isoamylase와 pullulanase를 처리한 경우에도 같은 양상을 보였다 (Fig. 1, lane i-k). Endo-dextranase와 반응시킨 결과 변형전과 비교할 때에 가수분해되는 glucose양은 줄어들었고 가지구조를 가진 올리고당의 생성을 보였다 (Fig. 1, lane l). 즉 가지구조의 생성과 이에 따른 가수분해 효소에 대한 저항성의 증가 그리고 가수분해되어 나오는 가지구조에서 기인한 새로운 구조의 분지올리고당의 생성을 볼 수 있었다. 불용성 효소 변형 산물을 가수분해한 결과 분해 산물의 생산은 적었고 가수분해 효소의 처리 후에도 불용성에서 수용성으로 전환된 당의 양이 적은 것으로 보아 변형 정도가 큰 것으로 생각된다 (Fig. 1, lanes m-p).

호화된 전분을 사용하여 변형 시킨 후 ethanol 침전으로 얻은 산물중 수용성의 산물을 가수분해한 경우는 가수분해 효소의 작용에 대한 저항성이 다소 증가되었으나 (Fig. 2, lanes i-l) 불용성 산물(변형 반응후 원심 분리하여 침전된 산물)을 가수분해 처리한 결과는 변형전 전분의 가수분해 pattern과 같아 변형이 되지 않은 물질임을

Table 1. The yield of modified starch

Yield (%)	Small starch <sup>1</sup>		Potato starch <sup>2</sup>	
	Granule starch <sup>3</sup>	Gelatinized starch <sup>3</sup>	Granule starch	Gelatinized starch
Soluble	26	52	34	61
Insoluble	20	11	22	11
Total	46	63	56	72

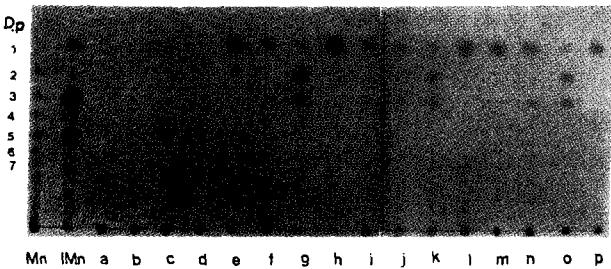
<sup>1</sup>The yield of modified starches using Small starch(soluble, prepared by Robyt *et al.*, 13) as an acceptor

<sup>2</sup>The yield of modified starches using Potato starch(soluble, prepared by Robyt *et al.*, 13) as an acceptor

<sup>3</sup>The types of starch used as acceptors for modification reaction

\*Calculation of yield; The amount of modified starch(soluble or insoluble)/(the amount of starch used as acceptor+0.48×the amount of sucrose)×100.

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



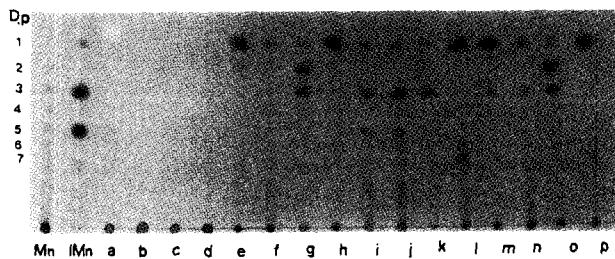
**Fig. 2.** TLC analysis of  $\alpha$ -amylase, isoamylase, pullulanase and endo-dextranase hydrolyzates of native Small starch, B-742CB dextran and modified Small starch prepared from reaction using gelatinized starch as an acceptor.

Mn and IMn are series of maltodextrins and isomaltodextrins, respectively. Lanes a-d, the hydrolyzates of B-742CB dextran by  $\alpha$ -amylase, isoamylase, pullulanase and endo-dextranase; lanes e-h, the hydrolyzates of native Small starch by  $\alpha$ -amylase, isoamylase, pullulanase and endo-dextranase; lanes i-l, the hydrolyzates of modified soluble Small starch prepared by  $\alpha$ -amylase, isoamylase, pullulanase and endo-dextranase; lanes m-p: the hydrolyzates of modified insoluble Small starch prepared by  $\alpha$ -amylase, isoamylase, pullulanase and endo-dextranase.

확인하였다. 이는 전분 입자를 수용체로 사용하는 것이 호화 전분을 사용하는 경우보다 텍스트란수크라제를 이용하여 변형을 잘 시킬 수 있음을 말한다. 이는 Fig. 6에서 얻은 methylation의 결과로부터도 확인할 수 있었다 (Fig. 6, lanes b, e, f). 하지만 호화된 전분보다 입자 전분의 텍스트란수크라제와의 반응성이 큰 이유는 분명하지 않다.

#### 변형 Potato starch

변형전 입자 상태의 Potato starch는  $\alpha$ -amylase에 의해 glucose로 분해되었으며, isoamylase에 의해서는 소량의 glucose로 분해되나 대체로 분해가 되지 않았고, pullulanase에 의해서는 glucose, maltose, maltotriose 등으로 가수분해되고, endo-dextranase에 의해서는 glucose로 분해되었다 (Fig. 3, lanes e-h). 변형 수용성 산물을  $\alpha$ -amylase로 처리한 결과는 Small starch의 가수분해 양상과 같아 분지올리고당을 많이 생산하였고, isoamylase에 의해서도 변형 Small starch의 수용성 산물보다 더 많은 가수분해 산물을 볼 수 있었다 (Fig. 3, lanes i-j). Pullulanase에 의해서는 변형전의 Potato starch에서보다 가수분해되는 maltose와 maltotriose 양은 줄어들었으며, endo-dextranase에 의한 가수분해의 경우에는 glucose 외에도 다른 분해 올리고당 산물이 나왔다 (Fig. 3, lanes k-l). 불용성 산물은 Potato starch가 변형되기 전에 가수분해 효소반응에 의해서 생성된 가수분해 산물의 분포와 비슷하여 텍스트란수크라제에 의해서 거의 변형되지 않았음을 알 수 있었다 (Fig. 3, lanes m-p).



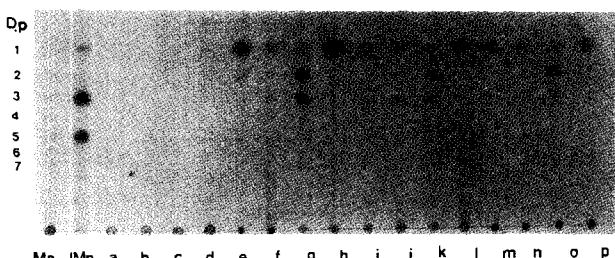
**Fig. 3.** TLC analysis of  $\alpha$ -amylase, isoamylase, pullulanase and endo-dextranase hydrolyzates of native Potato starch, B-742CB dextran and modified Potato starch prepared from reaction using granule starch as an acceptor.

Mn and IMn are series of maltodextrins and isomaltodextrins, respectively. Lanes a-d, the hydrolyzates of B-742CB dextran by  $\alpha$ -amylase, isoamylase, pullulanase and endo-dextranase; lanes e-h, the hydrolyzates of native Potato starch by  $\alpha$ -amylase, isoamylase, pullulanase and endo-dextranase; lanes i-l, the hydrolyzates of modified soluble Potato starch prepared by  $\alpha$ -amylase, isoamylase, pullulanase and endo-dextranase; lanes m-p: the hydrolyzates of modified insoluble Potato starch prepared by  $\alpha$ -amylase, isoamylase, pullulanase and endo-dextranase.

Potato starch를 호화시켜 변형시켜 얻은 변형 산물들의 가수분해 효소들에 대한 저항성은 변형 전의 전분보다 커졌으나 가수분해되어 나오는 산물들의 종류는 변형 전의 전분의 가수분해 산물 형태와 비슷하였다 (Fig. 4, lanes a-p).

#### Iodine 결과

변형 Small starch를 iodine으로 염색한 결과 변형전의 Small starch에 비해 99%가량 iodine에 의한 염색이 감소하였고 Potato starch의 경우는 변형전 보다 iodine에 의해 염색되는 정도가 35%가량 감소하였다. 이는 전



**Fig. 4.** TLC analysis of  $\alpha$ -amylase, isoamylase, pullulanase and endo-dextranase hydrolyzates of native Potato starch, B-742CB dextran and modified Potato starch prepared from reaction using gelatinized starch as an acceptor.

Mn and IMn are series of maltodextrins and isomaltodextrins, respectively. Lanes a-d, the hydrolyzates of B-742CB dextran by  $\alpha$ -amylase, isoamylase, pullulanase and endo-dextranase; lanes e-h, the hydrolyzates of native Potato starch by  $\alpha$ -amylase, isoamylase, pullulanase and endo-dextranase; lanes i-l, the hydrolyzates of modified soluble Potato starch prepared by  $\alpha$ -amylase, isoamylase, pullulanase and endo-dextranase; lanes m-p: the hydrolyzates of modified insoluble Potato starch prepared by  $\alpha$ -amylase, isoamylase, pullulanase and endo-dextranase.

**Table 2. The solubility comparison between native and modified starch**

Small starch (0.5%) <sup>1</sup>			Potato starch (0.5%) <sup>1</sup>		
Native starch	Modified starch	Native starch	Modified starch	Granule	Gelatinized
160	320	220	200	100	100

<sup>1</sup>The condition of modification was that 0.37%(w/v) starch was reacted with 48 mM sucrose and 0.1 U/ml enzyme under pH 5.2 and 28°C.

분의 glucose의 free-OH기에 glucose가 수식됨으로서 iodine의 안정된 결합을 변화 시켜서 iodine이 전분의 내부에 결합되는 능력이 떨어진 것으로 생각된다.

#### 변형 전분의 용해도 측정

변형 산물 중 수용성 산물의 용해성을 전분의 종류와 상태에 따라 비교한 결과는 Table 2와 같다. Small starch의 경우 입자 전분을 수용체로 사용하여 얻은 산물의 용해성은 호화 전분을 수용체로 사용하여 얻은 산물보다 다소 낮으나 변형 전의 전분이 불용성인 것과 비

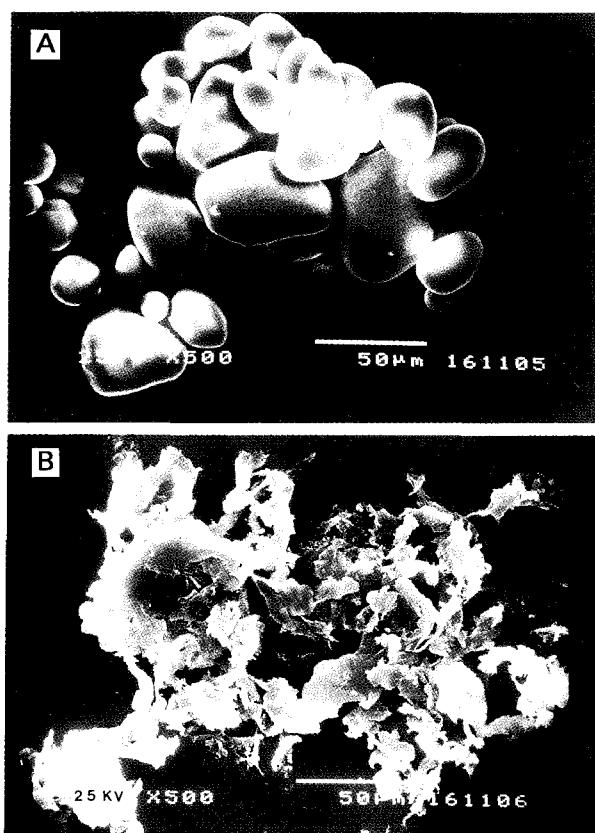
교하면 용해도가 1.6배 정도로 향상됨을 볼 수 있었다. Potato starch의 경우에도 변형 전의 전분에 비해 2배 정도 용해도가 향상되었다.

#### 변형 전분의 Scanning Electron Micrographs

전분입자의 효소 변형 이전과 이후의 입자형태나 표면의 모양을 SEM을 이용하여 500배의 비율로 조사하였다. 변형전의 전분은 표면이 매끄럽고 규칙적이었으나, 변형 전분의 경우는 전분의 입자가 불규칙한 작은 조각형태의 모양을 띠고 있었다(Fig. 5, A, B). 이는 전분 입자가 텍스트란수크라제에 의해 glucose가 수식되어 가지구조가 증가되고 이는 전분 입자의 규칙적인 helical구조를 변형하여 형태의 변화가 일어났을 것으로 생각되며 이는 iodine에 의한 염색 정도의 감소와 수용성의 증가 등과 밀접한 관련이 있을 것으로 여겨진다.

#### 변형 전분의 methylation과 산 가수분해

변형 Small starch의 methylation과 산 가수분해 변형 전분의 가수분해효소에 대한 저항성과 관련된 가지구조의 증가를 알아보기 위하여 산물의 구조를 methylation을 통하여 확인하였다. B-742CB dextranase에 의해 생산된 변형 Small starch를 methylation한 후 산 가수분해하고 이를 densitometer로 분석한 결과는 Table 3, 4와 Fig. 6, 7과 같다. 전분의 변형에 이용한 B-742CB 텍스트란수크라제에 의해서 합성된 텍스트란의 methylation 결과 2,3,4,6-tetra-O-methyl-D-glucose는 24.6%, 2,3,6-tri-O-methyl-D-glucose, 2,4,6-tri-O-methyl-D-glucose 그리고 2,3,4-tri-O-methyl-D-glucose는 각각 6.7%, 24.4% 그리고 24.0%였으며 2,4-di-methyl-D-glucose와 3,4-di-O-methyl-D-glucose는 각각 12.3%와 8.0%였다. 변형 전의 전분은  $\alpha 1 \rightarrow 4$ 를 주 가지구조로



**Fig. 5. Visualization of Small starch granules using scanning electron microscope(SEM).**

A; SEM pictures of native Small starch granule (X 500), B; SEM pictures of modified Small starch granule (X 500).

**Table 3. Proportions of the methylated D-glucoses from the methylation and acid hydrolysis of Small starch, B-742CB dextran and modified Small starch by B-742CB dextranase**

O-Me-D-Glucose	Relative amount (%)					
	B-742CB Dextran	Native Small	Granule starch <sup>1</sup>	SOL <sup>2</sup>	INS <sup>2</sup>	Gelatinized
2,3,4,6-tetra-	24.6	11.2	15.0	20.8	20.9	7.1
2,3,6-tri-	6.7	65.7	16.4	8.1	36.2	81.5
2,4,6-tri-	24.4		10.0	15.2	8.6	
2,3,4-tri-	24.0		41.0	36.8	19.6	
2,3-di-	12.3	23.1	12.7	19.9	8.4	11.4
2,4-di-						
2,6-di-				4.9	9.2	6.3
3,4-di-		8.0				

<sup>1</sup>The type of starch when dextranase was treated.

<sup>2</sup>SOL and INS mean soluble and insoluble reaction products.

**Table 4. Proportions of the methylated D-glucoses from the methylation and acid hydrolysis of Potato starch, B-742CB dextran and modified Potato starch by B-742CB dextranase**

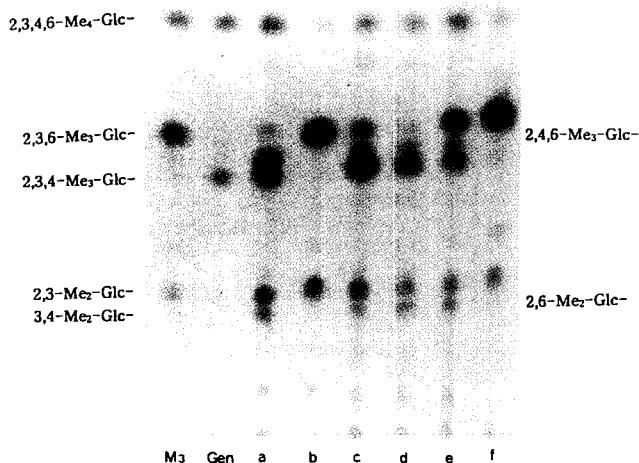
O-Me-D-Glucose	Relative amount (%)					
	B-742CB Dextran	Native Potato starch	Granule starch <sup>1</sup>		Gelatinized starch <sup>1</sup>	
			SOL <sup>2</sup>	INS <sup>2</sup>	SOL	INS
2,3,4,6-tetra-	23.7	12.9	14.2	14.8	21.1	10.0
2,3,6-tri-	5.2	52.6	17.0	60.4	34.1	66.2
2,4,6-tri-	21.2		9.4	11.8	7.0	
2,3,4-tri-	22.9		38.8		19.2	
2,3-di-	14.8	34.3	13.6	13.0	10.2	23.8
2,4-di-						
2,6-di-		7.0			8.4	
3,4-di-	12.2					

<sup>1</sup>The type of starch when dextranase was treated. <sup>2</sup>L and INS mean soluble and insoluble reaction products.

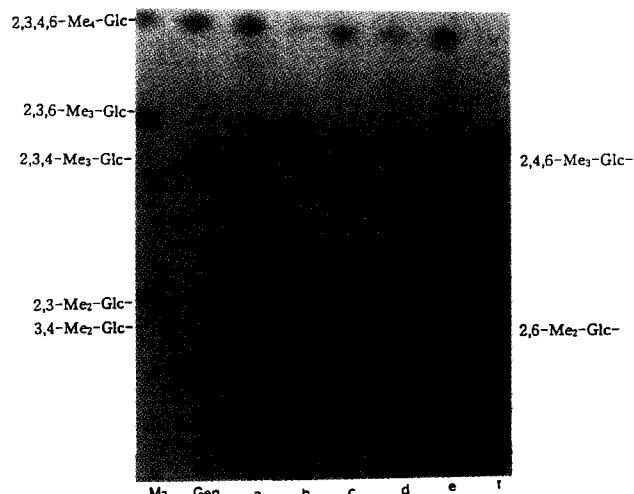
가져, 2,3,6-tri-O-methyl-D-glucose는 65.7% 가량 생산되었고  $\alpha 1 \rightarrow 6$  가지구조는 2,3-di-O-methyl-D-glucose로 23.1% 생산되었다. 입자 상태로 변형 생산된 Small starch의 변형 산물 중 수용성 산물은 주로  $\alpha 1 \rightarrow 6$  가지구조로부터 연유된 2,3,4-tri-O-methyl-D-glucose가 41.0%였으며  $\alpha 1 \rightarrow 4$ 와  $\alpha 1 \rightarrow 3$ 으로부터 연유된 2,3,6-tri-O-methyl-D-glucose와 2,4,6-tri-O-methyl-D-glucose는 각각 16.4%와 10.0%였고, 2,3-di-O-methyl-D-glucose

와 2,6-di-O-methyl-D-glucose는 각각 12.7%와 4.9%였다. 따라서 변형 Small starch는 변형전 보다  $\alpha 1 \rightarrow 4$ 가 상대적으로 줄어들고,  $\alpha 1 \rightarrow 3$ 과  $\alpha 1 \rightarrow 6$  branch된 가지구조가 새로이 생겼음을 알 수 있었다.

입자의 형태로 변형된 Small starch의 불용성 산물과 호화 시켜 변형시킨 Small starch의 수용성 산물의 methylation과 산 가수분해 결과는 양의 차이는 있었으나 입자상태로 변형시킨 Small starch의 수용성 산물과 비

**Fig. 6. TLC from methylation and acid hydrolysis of modified Small starch using B-742CB dextranase.**

M<sub>3</sub> and Gen mean the methylation and acid hydrolysis products of maltotriose and gentiobiose, respectively. Lane a and b are the methylation and acid hydrolysis products of B-742CB dextran and native Small starch. Lane c and d are the methylation and acid hydrolysis products of soluble and insoluble type of modified Small starch prepared from reaction using granule starch as an acceptor. Lane e and f are the methylation and acid hydrolysis products of soluble and insoluble type of modified Small starch prepared from reaction using gelatinized starch as an acceptor.

**Fig. 7. TLC from methylation and acid hydrolysis of modified Potato starch using B-742CB dextranase**

M<sub>3</sub> and Gen mean the methylation and acid hydrolysis products of maltotriose and gentiobiose, respectively. Lane a and b are the methylation and acid hydrolysis products of B-742CB dextran and native Potato starch. Lane c and d are the methylation and acid hydrolysis products of soluble and insoluble type of modified Potato starch prepared from reaction using granule starch as an acceptor. Lane e and f are the methylation and acid hydrolysis products of soluble and insoluble type of modified Small starch prepared from reaction using gelatinized starch as an acceptor.

슷한 양상을 보였으며, 호화 시켜 변형한 반응 산물중 불용성 산물의 methylation결과는 변형전의 Small starch 와 같아 변형이 안된 전분임을 확인하였다(Fig. 6, Table 3). 특이한 것은 입자 형태로 변형 시킨 반응에서 얻어진 산물 중 불용성 산물은 methylation결과로 보아  $\alpha 1 \rightarrow 4$  결합의 상대적인 양이 가장 적었으며 glucose가 하나씩 수식이 된 2,3,4,6-tetra-O-methyl-D-glucose의 양이 다른 산물보다 많으나 용해성이 작은 것으로 보아 전분의 용해성이 단지 가지구조의 구성 변화에만 영향을 받는 것은 아니라 생각되며 다당류의 용해성에 관하여는 자세한 연구가 필요하리라 생각된다.

#### 변형 Potato starch의 methylation과 산 가수분해

Potato starch의 경우도 변형전의 전분은 주결합으로  $\alpha 1 \rightarrow 4$  구조를 가져 2,3,6-tri-O-methyl-D-glucose가 주성분을 이루고 있으며, 가지구조로부터 2,3-di-O-methyl-D-glucose가 생산되었다. 입자와 호화 시킨 상태로 변형시킨 반응 산물중 수용성 산물의 경우 2,3,6-tri-O-methyl-D-glucose는 줄어들고  $\alpha 1 \rightarrow 6$  결합에서 기인한 2,3,4-tri-O-methyl-D-glucose 잔기와  $\alpha 1 \rightarrow 3$  결합의 2,4,6-tri-O-methyl-D-glucose는 증가되었으며, 2,3-di-O-methyl-D-glucose 양은 줄어들고, 2,6-di-O-methyl-D-glucose의 양은 늘어났다. Small starch와는 달리 변형 Potato starch의 경우 사용한 전분의 형태가 입자이건 혹은 호화 시킨 전분이건간에 관계없이 새로운 가지구조가 보이지 않았다(Fig. 7, Table 4).

#### 요 약

덱스트란수크라제는 sucrose를 이용하여 덱스트란의 합성을 촉진하는데 sucrose 이외에 다른 탄수화물이 효소 반응기 중에 존재하는 경우에는 sucrose의 glucose기를 이 탄수화물에 전달하는 반응을 촉진하여 새로운 구조의 산물을 생산한다. *Leuconostoc mesenteroides* B-742CB로 부터 얻은 덱스트란수크라제를 이용하여 입자 전분과 호화 전분에 sucrose의 glucose를 수식함으로써 변형을 시도하였다. 사용한 전분의 종류(Small starch 또는 Potato starch)에 따라 그리고 전분의 상태(입자 혹은 호화된 상태)에 따라 이론적 수율의 46-72%(s.d.<±5)를 얻었다. 변형 전분을  $\alpha$ -amylase, isoamylase, pullulanase 그리고 endo-dextranase로 처리하여 변형 전의 전분과 가수분해 상태를 비교한 결과 변형전의 산물에 비해 이들 가수분해효소에 대해 저항성을 보였다. 변형에서 얻어진 산물들의 methylation결과 입자 전분을 이용한 변형 반응의 산물의 변형 정도가 더 커졌으며, 변형 입자를 SEM으로 관찰하면 불규칙한 크기의 작은 조각의 산물을 확인할 수 있었다. 변형 반응으로 sucrose의

glucose가 전분 glucose의 C3, C4, 그리고 C6 위치의 free-OH group에 수식된 새로운 구조의 변형 산물을 생산하였고 이는 iodine에 의한 염색 정도를 크게 감소시켰으며 용해성을 증가시켰다.

#### 감사의 말

본 연구는 과학기술처 '97년도 (국책)생명공학기술개발사업과 농업생물신소재개발연구센터를 통한 한국과학재단의 지원을 받아 수행되었으며 이에 감사드립니다.

#### 참고문헌

- Chludzinski, A. M., G. R. Germaine, and C. F. Schachtele. 1974. Purification and properties of dextranase from *Streptococcus mutants*. *J. Bact.* **118**: 1-7.
- Cote, G. L. and J. F. Robyt. 1982. Acceptor reactions of alternansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* B-1355. *Carbohydr. Res.* **111**: 127-142.
- Fox, J. D. and J. F. Robyt. 1991. Miniaturization of three carbohydrate analyses using a microsample plate reader. *Anal. Biochem.* **195**: 93-96.
- Fu, D. and J. F. Robyt. 1990. Acceptor reactions of maltodextrans with *Leuconostoc mesenteroides* B-512FM dextranase. *Arch. of Biochem. and Biophys.* **283**: 379-386.
- Kim, D. and J. F. Robyt. 1994. Properties of *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMC constitutive dextranase. *Enzyme Microbial Technol.* **16**: 1010-1014.
- Kim, D. and J. F. Robyt. 1995. Production and selection of mutants of *Leuconostoc mesenteroides* constitutive for glucansucrases. *Enzyme Microbial Technol.* **16**: 659-664.
- 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.
- Kim, D. and J. F. Robyt. 1995. Dextranase constitutive mutants of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299. *Enzyme Microbial Technol.* **17**: 1050-1056.
- Kim, D., J. S. Baek., and J. H. Lee. 1995. Characteristics of dextranase of *Leuconostoc mesenteroides* B-1299 mutants, and enzymatic modification of the amylose and pullulan. *Ann. RCNBMA*. **4**: 41-57.
- 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.
- Robyt, J. F. and S. H. Eklund. 1983. Relatives, quantitative effects of acceptors in the reaction of *Leuconostoc mesenteroides* B-512F dextranase. *Carbohydr. Res.* **121**: 279-286.
- Robyt, J. F. and T. F. Walseth. 1986. The mechanism of the acceptor reaction of *Leuconostoc mesenteroides* B-

- 512F dextranucrase. *Carbohydr Res.* **154**: 229–238.
13. Robyt, J. F., J. Y. Choe, J. d. Fox, R. S., and Hahn, E. B. Fuchs. 1995. Acid modification of starch granules in alcohols: reactions in mixtures of two alcohols combined in different ratios. *Carbohydr. Res.* **283**: 141–150.
14. 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-aldononitriles. *Carbohydr. Res.* **53**: 153–166.
15. 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.
16. Su, D. and J. F. Robyt. 1993. Control of the synthesis of dextran and acceptor-products by *Leuconostoc mesenteroides* B-512FM dextranucrase. *Carbohydr. Res.* **248**: 339–348.

(Received November 18, 1997)