

## *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1149의 Glucosyltransferase와 Fructosyltransferase의 분리와 특성 연구

<sup>1</sup>이진하 · <sup>2</sup>박준성 · <sup>3</sup>이희선 · †<sup>1,4,5</sup>김도만  
<sup>1</sup>전남대학교 공업기술연구소, <sup>2</sup>물질·생물화학공학과, <sup>3</sup>분자생물공학협동과정,  
<sup>4</sup>동신대학교 산업용 가속기 이용 생물 연구센터, <sup>5</sup>전남대학교 생명과학기술학부, 촉매연구소  
(접수 : 2004. 8. 22., 게재승인 : 2004. 10. 12.)

### Purification and Characterization of Glucosyltransferase and Fructosyltransferase in *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1149

Jin-Ha Lee<sup>1</sup>, Jun-Seong Park<sup>2</sup>, Hee-Sun Lee<sup>3</sup>, and Doman Kim<sup>1,4,5†</sup>

<sup>1</sup>The Engineering Research Institute, <sup>2</sup>Department of Materials and Biochemical Engineering,

<sup>3</sup>Department of Molecular Biotechnology, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea,

<sup>4</sup>Biology Research Center for Industrial Accelerator, Dongshin University, Naju, Jeonnam 520-714, Korea,

<sup>5</sup>School of Biological Sciences and Technology and Research Institute for Catalysis,

Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

(Received : 2004. 8. 22., Accepted : 2004. 10. 12.)

The optimal condition for the production of a glucan and a fructan synthesizing enzymes from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1149 were studied based on the different medium compositions. Response surface methodology was applied to find the optimistic condition showing the relationship between the fermentation response (enzyme activities) and the fermentation variable concentrations of yeast extract, peptone concentration, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> concentration and sucrose. Optimum medium composition for both enzymes production was 0.75% yeast extract, 0.72% peptone, 1% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> and 2.17% sucrose. Using this medium, the activities produced in culture was 0.90 U/ml for glucosyltransferase (GTase) and 0.96 U/ml for fructosyltransferase (FTase). After purification of 1149FTase by consecutive chromatographies using Sephadex G-150 and DEAE-Sepharose, a 1149FTase of 210 kDa on 7% poly acrylamide gel was isolated and it synthesized soluble fructan. The 1149GTase showed a band of 180 kDa on 8% poly acrylamide gel after purification using Bio-Gel P-100 gel chromatography and DEAE-Sepharose ion exchange chromatography and it synthesized insoluble glucan. The linkages of polymers were determined by methylation using Hakomori reagent and following NMR analysis. The glucan was composed of  $\alpha(1\rightarrow6)$  and  $\alpha(1\rightarrow3)$  linkages and the fructan was levan.

**Key Words** : Purification, glucosyltransferase, fructosyltransferase, response surface methodology

#### 서론

Lactic acid 박테리아는 cofactor 없이 sucrose로부터 glucose와 fructose로 이루어진 polymer를 합성하는 glucosyltransferase (GTase)와 fructosyltransferase (FTase)를 생산한다(1,

2). *Leuconostoc* 속 균의 GTase인 dextransucrase (EC 2.4. 1.5)는 혈장 확장제 및 혈류개선제로 사용되고 있는 작은 분자량의 dextran T-70 (평균분자량 70,000)과 dextran T-40 (평균분자량 40,000), 그리고 평균분자량이 75,000  $\pm$  25,000 범위인 clinical dextran을 생산하는데 사용된 dextransucrase의 종류에 따라 합성되는 dextran의 가지결합의 종류 [예;  $\alpha(1\rightarrow2)$ ,  $\alpha(1\rightarrow3)$ ,  $\alpha(1\rightarrow4)$ ] 및 비율이 다르다(3). GTase가 sucrose를 기질로 glucan을 합성하는 것과 더불어 효소 반응액 중에 다른 탄수화물 혹은 자유 OH기를 갖는 화합물을 첨가할 경우 sucrose의 glucose 잔기가 첨가한 화합물에 전달되어 일련의 올리고당 혹은 당전이 화합물을 합성한다. 이때 sucrose외에

† Corresponding Author : School of Biological Sciences and Technology, Chonnam National University, Gwang-Ju 500-757, Korea

Tel : +82-62-530-1844, Fax : +82-62-530-1844

E-mail : dmkim@chonnam.ac.kr

넣어준 탄수화물 혹은 화합물을 수용체 (acceptors)라 하며, 이 반응 기작을 수용체 반응 (acceptor reaction)이라 한다. 수용체 반응에 의해 합성된 올리고당 혹은 당전이 화합물은 효소의 종류 뿐만 아니라 기질인 sucrose와 수용체 농도의 비율, 그리고 첨가한 수용체의 종류에 따라 산물의 구조 및 수율이 다르게 된다(4, 5).

GTases는 크기가 155~200 kDa 정도이며 sucrose의 결합과 분해작용을 하는 catalytic domain이라 불리는 N-terminal의 sucrose binding domain과 glucan-binding 역할을 하는 C-terminal domain으로 구성되어 있는 것으로 알려져 있지만 현재까지 amylosucrase를 제외한 3차 구조는 밝혀지지 않았다(6). FTases 중 inulosucrase (EC 2.4.1.9)는 fructose가 sucrose에  $\beta(2\rightarrow1)$ 로 연결된 inulin을 합성하고 levansucrase (EC 2.4.1.10)는 fructose가 sucrose에  $\beta(2\rightarrow6)$  구조로 연결된 levan을 합성한다. 최근 fructan과 fructooligosacchride는 식품과 화장품, 의약품 소재 분야 등 상업적 활용 가능성이 커지고 있으며 현재까지 19종의 FTases의 유전자 Genbank 상에 등록되어 있다.

*L. mesenteroides* NRRL B-1149에서 생산된 효소는 glucose가  $\alpha(1\rightarrow3)$  결합으로 연결된 불용성 glucan을 합성하는 것으로 알려졌다(7). 하지만 최근 본 연구실에서는 *L. mesenteroides* NRRL B-1149균이 glucose를  $\alpha(1\rightarrow6)$ 과  $\alpha(1\rightarrow3)$ 으로 연결하여 불용성 glucan을 합성하고 수용성 fructan을 합성함을 확인하였다. 따라서 본 연구에서는 *L. mesenteroides* NRRL B-1149에서 GTase와 FTase의 최적 생산을 위한 배지 조건 확인을 위하여 Box-Behnken design를 통한 반응 표면 분석법 (response surface methodology)(8, 9)을 사용하여 배지 성분을 결정하였고, 불용성 glucan과 수용성 fructan을 합성하는 효소를 분리 정제하여 그 생화학적 특성을 확인하였다.

**재료 및 방법**

**재료**

수용체로 사용한 탄수화물과 항생제는 Sigma Chemical Co.(USA)에서 구입하였고, 다른 시약은 GR 등급의 것을 정제 없이 사용하였다.

**균주와 배양조건**

*L. mesenteroides* NRRL B-1149는 2% (w/v) glucose를 포함한 LM 배지 (1 l의 증류수당 4 g yeast extract, 2 g peptone, 0.2 g MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.015 g CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 0.01 g FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.01 g NaCl, 2 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.01 g MnSO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O)를 이용하여 28°C에서 배양하였다.

**Table 1.** Independent variables and experimental design levels for trial

X <sub>i</sub> *	Medium condition (%)	Standard levels		
		- 1	0	+ 1
X <sub>1</sub>	Yeast extract	0.25	0.5	0.75
X <sub>2</sub>	Peptone	0.25	0.5	0.75
X <sub>3</sub>	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1	2	3
X <sub>4</sub>	Sucrose	1	2	3

\*Independent variables

**효소 생산 최적 조건**

효소의 최적 생산을 위한 변수로 yeast extract와 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>의 경우는 낮은 농도, 중간 농도 그리고 높은 농도로 0.25%, 0.5% 그리고 0.75%를 선택하고 peptone과 sucrose의 경우는 1.0%, 2.0% 그리고 3.0%로 농도를 변화시켜(Table 1), 반응 표면 분석법으로 효소 생산 최적 배지 조성을 확인하였다(Table 2).

**Table 2.** The Box-Behnken design for the four independent variables

Trial no.	Unit: %			
	Yeast extract (X <sub>1</sub> )	Peptone (X <sub>2</sub> )	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (X <sub>3</sub> )	Sucrose (X <sub>4</sub> )
1	0.25	0.25	2.00	2.00
2	0.75	0.25	2.00	2.00
3	0.25	0.75	2.00	2.00
4	0.75	0.75	2.00	2.00
5	0.50	0.50	1.00	1.00
6	0.50	0.50	3.00	1.00
7	0.50	0.50	1.00	3.00
8	0.50	0.50	3.00	3.00
9	0.25	0.50	2.00	1.00
10	0.75	0.50	2.00	1.00
11	0.25	0.50	2.00	3.00
12	0.75	0.50	2.00	3.00
13	0.50	0.25	1.00	2.00
14	0.50	0.75	1.00	2.00
15	0.50	0.25	3.00	2.00
16	0.50	0.75	3.00	2.00
17	0.25	0.50	1.00	2.00
18	0.75	0.50	1.00	2.00
19	0.25	0.50	3.00	2.00
20	0.75	0.50	3.00	2.00
21	0.50	0.25	2.00	1.00
22	0.50	0.75	2.00	1.00
23	0.50	0.25	2.00	3.00
24	0.50	0.75	2.00	3.00
25	0.50	0.50	2.00	2.00
26	0.50	0.50	2.00	2.00
27	0.50	0.50	2.00	2.00
28	0.50	0.50	2.00	2.00
29	0.50	0.50	2.00	2.00

**효소 활성 측정**

GTase와 FTase의 활성은 기질로 각각 pH 6.8과 pH 6.3의 50 mM sodium phosphate buffer에 녹인 200 mM sucrose를 사용하여 28°C에서 반응하여 유리된 단당을 TLC (Silica gel 60 aluminium sheet, Merck Co., Germany)로 분석하였다. 각각의 반응액을 1 µl씩 취하여 TLC plate에 점적하고 nitromethane/1-propanol/water (2/5/1.5, v/v/v)로 두 번 전개하였다. 전개된 TLC plate를 0.3% N-(1-naphthyl)-ethylenediamine와 5% 황산을 함유한 시약을 이용하여 발색한 후 해리되어 나온 fructose 혹은 glucose 양을 분석하였다(10). 효소 1 Unit은 1분당 효소 1 ml당 sucrose로부터 유리된 fructose 양 (GTase 경우)과 glucose 양 (FTase 경우)의 µmol 수로 표현한다.

**단백질 정량**

적절하게 희석된 샘플 100 µl에 Bradford 시약 1 ml를 넣고 5분간 상온에서 방치한 후 595 nm에서 흡광도를 측

정하고 bovine serum albumin (A-7517, Sigma Chemical Co., USA)을 표준 물질로 하여 샘플 단백질 농도를 결정하였다 (11).

#### 조효소액 준비

반응 표면 분석법으로 확인한 최적 배지 조성인 0.75% yeast extract, 0.72% peptone, 1%  $K_2HPO_4$  그리고 2.17%의 sucrose로 구성된 배지에 배양하여 얻은 3 l의 배양액을 원심분리 (10,000 × g, 15분)하여 회수한 상등액에 0.1% (w/v) Tween 80과 1 mM  $CaCl_2$ , 0.02%  $NaN_3$ 를 첨가하였다. 회수한 효소액을 hollow fiber filtration 방법 (30 kDa cut off, Millipore, USA)을 이용하여 300 ml로 농축하였고 농축한 효소는 20 mM sodium phosphate buffer (pH 6.8)로 투석한 후 이를 단백질 분리에 이용할 조효소액으로 준비하였다.

#### 1149FTase와 1149GTase의 정제

조효소액을 20 mM sodium phosphate buffer (pH 6.8)로 평형화시킨 DEAE-Sepharose column (2.5 cm × 35 cm)에 흡착시키고, column 부피 3배에 해당하는 같은 완충용액으로 결합되지 않는 단백질을 세척하였다. 흡착된 단백질은 NaCl 농도를 0-1 M까지 단계적으로 증가시키면서 60 ml/hr의 유속으로 용출시켰다. 각각의 분획은 2.5 ml/tube이었다. 분획 중 FTase 활성이 강한 A group과 GTase와 FTase 활성을 같이 갖는 B group으로 나누고 FTase 활성을 보이는 group A의 효소는 PEG (Mw 20,000)를 이용하여 농축 후 20 mM sodium phosphate buffer (pH 6.8)로 투석하였다. 이후 같은 buffer로 평형화시킨 Sephadex G-150 column (0.7 cm × 1.7 m)에 loading하고 같은 buffer로 용출하여 이 중 FTase 활성이 있는 부분을 회수하였다. FTase 활성과 GTase 활성을 동시에 가진 효소 B group은 투석막 (MW 12,000, cellulose membrane, Spectrum Inc., Canada)에 넣고 PEG (Mw 20,000)을 이용하여 농축하고, 농축된 단백질은 20 mM sodium phosphate buffer (pH 6.8)로 투석한 후, 동일한 buffer로 평형화시킨 Bio-Gel P-100 column (1.5 cm × 100 cm)에 loading하고, 같은 buffer를 이용하여 용출시켜 GTase의 활성을 가지는 분획을 모아 20 mM sodium phosphate buffer (pH 6.8)로 평형화시킨 DEAE-Sepharose column (1.4 cm × 20 cm)에 흡착시킨 후 NaCl (0-0.5 M)을 이용하여 용출하였다. 효소 정제의 모든 과정은 15°C에서 수행하였다.

#### 단백질의 전기영동

효소의 정제 여부는 준비된 각 시료를 Laemmli의 방법에 의해 Tris-glycine buffer (pH 8.8)로 준비한 7~8% polyacrylamide gel을 이용하여 50 mA에서 전기영동으로 확인하였다(12). 전기영동이 끝난 후, 단백질은 Coomassie Brilliant Blue R-250 용액을 사용하여 염색하였다.

#### 효소 활성에 미치는 pH 영향

최적 pH와 pH 안정성을 결정하기 위하여 20 mM의 citrate buffer (pH 3-4.5), sodium acetate buffer (pH 3.5-5.5), sodium phosphate buffer (pH 6.0-8.0) 그리고 Tris-HCl (pH

7.0-9.0) buffer를 사용하여 pH별로 효소 반응을 하였다. 효소의 최적 pH는 200 mM sucrose를 각 pH의 buffer에 녹이고 효소와 28°C에서 20분간 반응시킨 후 효소 활성을 결정하였다. 또한, pH에 대한 효소 안정성은 효소를 각 pH의 buffer와 혼합하여 12시간 동안 4°C에 보관한 후, 50 mM sodium phosphate buffer pH 6.8과 pH 6.3에 녹아 있는 200 mM sucrose와 28°C에서 20분간 반응하고 남아 있는 GTase와 FTase의 활성을 측정하였다. 각 buffer의 pH가 효소 반응 기질의 pH에 주는 영향은 없었다.

#### 효소 활성에 미치는 온도 영향

반응 최적 온도를 결정하기 위하여 효소를 여러 온도 (4~60°C)에서 pH 6.8과 pH 6.3의 20 mM sodium phosphate buffer pH 6.8과 pH 6.3에 녹인 200 mM sucrose와 1시간 반응시켜 유리되어 나온 fructose 양과 glucose 양을 측정하여 GTase와 FTase의 활성을 각각 구하였으며, 온도 안정성은 각 온도에서 효소를 10시간 동안 방치시킨 후 pH 6.8과 pH 6.3의 200 mM sucrose와 28°C에서 20분간 반응하고 잔존하는 효소 활성을 측정하였다.

#### Polymer 합성

정제된 GTase (3.2 U/ml)와 FTase (4.6 U/ml) 각각을 300 mM sucrose와 28°C에서 sucrose가 모두 소모될 때까지 반응시킨 후, 반응액을 원심 분리하여 불용성과 수용성 polymer로 나누고, 불용성 polymer는 물로 여러 번 씻어 건조시키고, 수용성의 polymer는 수용액 2배 부피의 ethanol을 첨가하여 침전시킨 후 이를 물에 다시 녹이고 침전시키는 과정을 2번 반복하여 단당을 제거한 순수한 수용성 polymer만을 얻었다.

#### Polymer의 구조분석

GTase와 FTase에 의해 합성된 polymer의 구조는 methylation과 NMR 분석을 이용하였다. 준비된 polymer를 Hakomori시약으로 methylation하고, 2 M trifluoroacetic acid로 산 가수분해 후에 가수분해 산물들을 TLC plate에 점적한 후 acetonitrile/chloroform/methanol (3/9/1, v/v/v)로 두 번 전개하여 분석하였다(13). NMR 분석으로는 불용성 glucan의 경우 DMSO (Merck, Germany)를 이용하여 녹이고, 수용성 fructan의 경우는  $D_2O$  (Merck, Germany)에 녹여 carbon NMR (125 MHz, Bruker AMX-500)과 proton NMR (500 MHz, Bruker AMX-500)을 수행하였다.

#### 수용체 반응

수용체 반응은 20 mM sodium phosphate buffer (pH 6.8)에 녹여서 준비한 200 mM sucrose와 각각의 수용체: 이당류 [maltose {glc α(1→4) glc}, isomaltose {glc α(1→6) glc}, cellobiose {glc β(1→4) glc}, turanose {glc α(1→3) fru}, β-gentiobiose {glc β(1→6) glc}]들과 삼당인 [panose {glc α(1→6) maltose}, raffinose {glc α(1→6) sucrose}, maltotriose {glc α(1→4) maltose}, isomaltotriose {glc α(1→6) maltose}]을 GTase (3.2 U/ml)와 혼합하여 28°C에서 2일 동안 반응하였다. 반응산물은 반응액 1 μl를 TLC plate에 점적한 후 먼저

nitromethane/1-propanol/ water (2/5/2, v/v/v)로 전개 후 충분히 말리고 다시 ethylacetate/ethanol/acetic acid/boric acid (5/2/1/1, v/v/v/v)로 전개하였다. 분리된 탄수화물의 성분은 NIH Image Program을 이용하여 분석하였다(3, 10, 14).

**결과 및 고찰**

**효소 생산 최적 조건**

효소의 최적 생산을 위한 배지 조성 결정을 위해 반응 표면 분석법을 이용하였다(8, 9). 그 결과 GTase와 FTase 최적 배지 조성은 0.75% yeast extract, 0.72% peptone, 1% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 그리고 2.17%의 sucrose였다(Table 3, Tabel 4). 이 배지 조건에서 생산된 GTase 활성은 0.9 U/ml였고, FTase의 경우에는 0.96 U/ml이었다(Table 4).

**Table 3.** Experimental and theoretical predicted values for enzymes activity

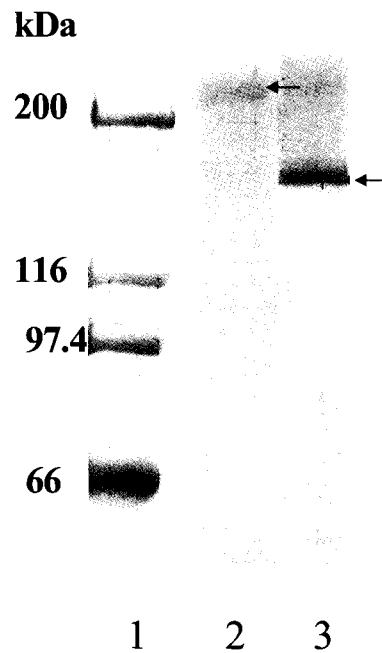
Trial no	GTase (U/ml)		FTase (U/ml)	
	Experimental values	Predicted values	Experimental values	Predicted values
1	0.68	0.71	0.47	0.48
2	0.65	0.70	0.55	0.62
3	0.79	0.78	0.61	0.59
4	0.72	0.73	0.74	0.78
5	0.66	0.65	0.72	0.67
6	0.27	0.25	0.45	0.47
7	0.68	0.74	0.47	0.50
8	0.48	0.54	0.22	0.31
9	0.49	0.50	0.60	0.60
10	0.46	0.51	0.66	0.67
11	0.86	0.73	0.33	0.33
12	0.75	0.66	0.60	0.60
13	0.86	0.80	0.48	0.46
14	0.89	0.84	0.77	0.85
15	0.52	0.49	0.60	0.52
16	0.56	0.55	0.37	0.39
17	0.83	0.89	0.56	0.57
18	0.87	0.88	0.81	0.77
19	0.58	0.60	0.40	0.40
20	0.59	0.56	0.60	0.54
21	0.47	0.44	0.54	0.59
22	0.45	0.45	0.68	0.65
23	0.56	0.59	0.36	0.35
24	0.61	0.68	0.64	0.55
25	0.68	0.68	0.57	0.57
26	0.65	0.68	0.57	0.57
27	0.67	0.68	0.58	0.57
28	0.70	0.68	0.58	0.57
29	0.69	0.68	0.58	0.57

**Table 4.** Enzyme activities in culture of optimum medium composition

Enzyme	Medium composition (%)				Activity (U/ml)
	Yeast extract	Peptone	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Sucrose	
GTase	0.28	0.73	1.11	2.10	0.92
FTase	0.72	0.73	1.40	1.52	0.87
Both	0.75	0.72	1.00	2.17	0.90(GTase) 0.96(FTase)

**1149FTase와 1149GTase의 정제**

*L. mesenteroides* NRRL B-1149의 효소액을 DEAE-Sephrose column으로 1차 정제 후 분획을 FTase와 GTase의 활성을 보이는 두 group으로 나누었다. Group A는 FTase의 활성을 강하게 보였으며, group B의 경우는 FTase와 GTase의 활성을 동시에 보였다. 각각의 group를 따로 정제 시도하여 group A의 FTase의 경우 Sephadex G-150과 DEAE-Sephrose column을 이용하여 정제 효소를 얻었다. 정제된 1149FTase의 경우 7% poly acrylamide gel에서 210 kDa의 크기를 보였는데(Fig. 1), 대부분의 박테리아의 FTases의 분자량이 50~100 kDa까지 분포되어 있고, *S. salivarius*의 FTase 분자량은 140 kDa이 보고되어 있어(15-17), 1149FTase는 다른 FTases보다 특별히 분자량이 큰 것을 확인하였다. 한편, group B의 경우 Bio-Gel P-100과 DEAE-Sephrose column chromatography 정제 이후에 180 kDa 크기의 활성을 보이는 1149GTase를 확인하였다(Fig. 1). 이는 *S. mutans*, *L. mesenteroides*, *S. sobrinus*, *S. salivarius*의 GTases의 평균 분자량이 약 130에서 180 kDa인 것과 비교하면 비슷한 크기의 활성 단백질임을 알 수 있었다(18-20).



**Figure 1.** Purification of 1149FTase and 1149GTase. Lane 1: Molecular mass standard marker, lane 2: FTase of *L. mesenteroides* NRRL B-1149 after purification with Sephadex G-150 gel chromatography and DEAE-Sephrose ion-exchange chromatography, lane 3: GTase after purification with Bio-Gel P-100 gel chromatography and DEAE-Sephrose ion exchange chromatography.

**Polymer의 Methylation과 NMR Spectroscopy를 통한 구조 분석**

1149FTase에 의해 합성된 fructan의 경우 NMR분석 결과에 따라 56.0, 104.0, 76.1, 75.4, 80.2, 60.7 ppm의 shift 값을 보이는데, 이는 inulin보다는 levan의 C-1, C-2, C-3, C-4, C-5,

C-6와 유사한 chemical shift 결과로(Table 5)(21), 1149FTase fructan은 fructose가 β(2→6) 결합이 주결합인 levan임을 알 수 있었다.

Table 5. Chemical shifts<sup>a)</sup> for <sup>13</sup>C-NMR spectra of 1149FTase D-fructan

Fructan	Carbon atom					
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
Levan <sup>b)</sup>	60.9	103.3	77.0	74.3	81.1	62.2
Inulin <sup>b)</sup>	59.9	104.2	76.3	75.2	80.3	63.4
Fructan(1149)	56.0	104	76.1	75.4	80.2	60.7

<sup>a)</sup>in ppm, <sup>b)</sup>Assignment cited from ref (21).

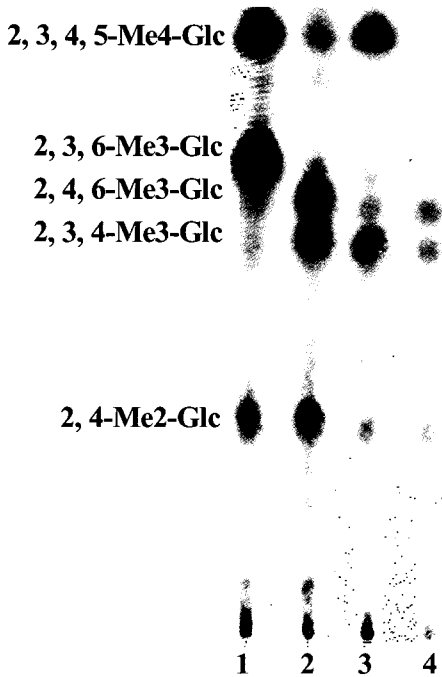


Figure 2. Methylation of 1149GTase D-glucans. Lane 1 to 4 are the methylation and acid hydrolysis products of maltotriose, alternan, gentiobiose and 1149GTase glucan.

Table 6. Chemical shifts<sup>a)</sup> for <sup>13</sup>C NMR spectra of 1149GTase D-glucans

Carbon atom	Glucan from <i>L. mesenteroides</i>				
	B-512F <sup>b)</sup>	B-1299 <sup>b)</sup>	B-742 <sup>b)</sup>	B-1149	
C-1	α-1, 2	-	97.20	-	
	α-1, 3	-	96.40	100.30	
	α-1, 4	-	-	-	
	α-1, 6	98.76	98.80	98.80	98.32
C-2		71.25	71.30	71.30	71.43
C-3	US <sup>c)</sup>	72.46	72.50	72.50	72.11
	OS <sup>d)</sup>	-	-	81.70	82.95
C-4	US <sup>c)</sup>	74.45	74.50	74.50	73.44
	OS <sup>d)</sup>	-	-	-	-
C-5		70.65	70.70	70.70	70.49
C-6	US <sup>c)</sup>	-	61.40	61.50	60.83
	OS <sup>d)</sup>	66.72	66.70	66.50	66.16

<sup>a)</sup>in ppm, <sup>b)</sup>assignment cited from ref (21), <sup>c)</sup>unsubstituted, <sup>d)</sup>O-substituted

Fig. 2의 lane 4로부터 GTase에 의해서 합성된 glucan은 glucose가 α(1→6)과 α(1→3)으로 연결된 alternan과 비슷한 결합 구조를 보이며, NMR분석 결과로부터의 9개 chemical shift는 *L. mesenteroides* B-742의 dextransucrase에서 합성된 glucan과 비슷한 shifts를 보여, 1149 GTase에 의해 합성된 glucan은 α(1→6)과 α(1→3)로 연결된 불용성의 alternative comb dextran임을 확인하였다(Table 6).

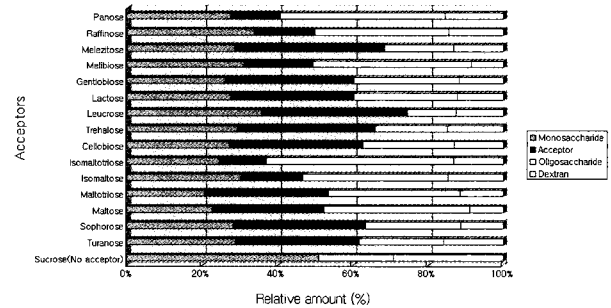


Figure 3. Synthesis of acceptor reaction products by 1149GTase.

정제 효소 특성

FTase는 28℃, pH 6.3에서, GTase는 28℃, pH 6.8에서 최적 활성을 보였다. 다양한 탄수화물을 수용체로 하여 여러 가지의 수용체 반응 산물을 합성하였다(Fig. 3). Panose, maltose, maltotriose의 경우 각각 45%, 43% 그리고 40%의 수용체 산물을 생산하여 이들이 1149GTase의 좋은 수용체임을 확인하였다. 그밖에 α(1→6)결합의 isomaltose와 isomaltotriose의 경우에도 35%와 37%의 수용체 반응 수율을 보였으며 β-결합의 cellobiose와 gentiobiose의 경우에도 각각 17%와 25%의 효율을 보였다. 이처럼 1149GTase와 1149FTase의 다양한 구조의 수용체를 이용하여 수용체 반응 산물을 합성 하는 능력은 새로운 구조의 식품 및 의료용 소재 생산을 위한 활용 가능성을 기대할 수 있겠다.

요약

*Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1149로부터 불용성 glucan과 수용성 fructan을 합성하는 효소를 생산하는 최적 배지 조건을 정해 주고, 그 효소들을 정제하였다. 효소의 최적생산 배지조성 결정은 반응 표면 분석법을 이용하였고, 최적배지 조성은 0.75% yeast extract, 0.72% peptone, 1% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 그리고 2.17%의 sucrose였으며, 이 조건에서 생산된 효소의 활성은 GTase의 경우에는 0.9 U/ml였고 FTase의 경우에는 0.96 U/ml였다. DEAE-Sepharose column chromatography 방법을 이용하여 2회 반복 정제 후 불용성 glucan을 생산하는 GTase와 수용성 fructan을 생산하는 FTase의 분획을 분리하였다. FTase의 특성을 나타내는 분획들은 Sephadex G-150 column 정제 이후에 210 kDa의 활성을 나타내는 밴드가 전기영동 후 확인되었다. GTase의 특성을 나타내는 분획은 Bio-gel P-100 column 정제 이후에 180 kDa 크기의 활성을 나타내는 밴드가 확인이 되었다. 이 효소들이 합성한 다당의 구조는 methylation 및 <sup>13</sup>C NMR 분석으로 확인하였으며, 불

용성 glucan은  $\alpha(1\rightarrow6)$ 과  $\alpha(1\rightarrow3)$ 의 결합을 가지는 alternative comb dextran으로 확인이 되었고, 수용성 fructan은 levan임을 확인하였다. 효소를 이용하여 sucrose를 공여체로 한 수용체 반응연구를 수행하였으며, 여러 가지 수용체에 sucrose의 glucose가 전이된 산물을 얻을 수 있었다.

## 감 사

본 논문은 과학기술부 21세기 프론티어연구개발사업의 미생물 유전체활용기술개발사업 지원 (Grant MG02-0301-004-1-0-0)에 의하여 연구 되었으며 이에 감사드립니다.

## REFERENCES

- Funane, K., M. Shiraiwa, K. Hashimoto, E. Ichishima, and M. Kobayashi (1993), An active-site peptide containing the second essential carboxyl group of dextranase from *Leuconostoc mesenteroides* by chemical modifications, *Biochemistry* **32**, 13696-13702.
- Perez, M. A., L. Guereca, and L. A. Mungua (1996), Properties of levansucrase from *Bacillus circulans*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **45**, 465-471.
- Monsan, P., F. Paul, R. Remaud, and A. Lopez-Munguia (1989), Novel enzymatic synthesis of oligosaccharides, *Food Biotechnol.* **3**, 111-130.
- 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 glucansucrases, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26**, 179-186.
- Kim, M. S., S. O. Lee, H. J. Ryu, H. K. Kang, S. K. Yoo, S. S. Chang, D. W. Kim, D. Kim, and S. H. Kim (2001), Synthesis of highly branched isomaltodextrin by acceptor reaction using dextranases from *L. mesenteroides* B-742CB and B-512FMCM, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **16**, 200-206.
- Skov, L., O. Mirza, A. Henriksen, G. Potocki de Montalk, M. Remaud-Simeon, P. Sarcabal, R. Willemot, P. Monsan, and M. Gajhede (2000), Crystallization and preliminary X-ray studies of recombinant amylosucrase from *Neisseria polysaccharea*, *Acta Crystallogr.* **56**, 203-205.
- Allene, J., W. C. Haynes, C. A. Wilham, 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<sup>1b</sup>, *J. Am. Chem. Soc.* **76**, 5041-5052.
- Chan, L., B. Jinghua, C. Zhaoling, and O. Fan (2002), Optimization of a cultural medium for bacteriocin production by *Lactococcus lactis* using response surface methodology, *J. Biotechnol.* **93**, 27-34.
- Lee, H. S., S. H. Park, H. H. Lee, and H. K. Lee (2001), Effect of aeration rates on production of extracellular polysaccharides, EPS-R by marine bacterium *Hahella chejuensis*, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **6**, 359-362.
- Lee, J. H., D. Kim, J. S. Baek, K. H. Park, N. S. Han, and J. F. Robyt (1998), Modification of starch using dextranase and characterization of the modified starch, *Kor. J. Appl. Microbiol. Technol.* **26**, 143-150.
- Bradford, M. M. (1976), A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Laemmli, U. K. (1970), Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature.* **227**, 680-685.
- Mukerjee, R., Kim, D 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.
- Tanirseven, A., and J. F. Robyt (1993), Interperation of dextranase inhibition at high sucrose concentration, *Carbohydr. Res.* **245**, 97-104.
- Shiroza, T. and H. K. Kuramitsu (1988), Sequence analysis of the *Streptococcus mutans* fructosyltransferase gene and flanking regions, *J. Bacteriol.* **175**, 810-816.
- Steinmetz, M., D. Le Coq, S. Aymerich, G. Gonzy-Treboul, and P. Gay (1985), The DNA sequence of the gene for the secreted *Bacillus subtilis* enzyme levansucrase and its genetic control sites, *Mol. Gen. Genet.* **200**, 220-228.
- Milward, C. P. and N. A. Jacques (1990), Secretion of fructosyltransferase by *Streptococcus salivarius* involves the sucrose-dependent release of the cell-bound form, *J. Gen. Microbiol.* **136**, 165-169.
- Funane, K., M. Yamada, M. Shiraiwa, H. Takahara, N. Yamamoto, E. Ichishima, and M. Kobayashi (1995), Aggregated form of dextranases from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F and its constitutive mutant, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **59**, 776-780.
- Giffard, P. M., C. L. Simpson, C. P. Milward, and N. J. Jacques (1991), Molecular characterization of a cluster of at least two glucosyltransferase genes in *Streptococcus salivarius* ATCC 25975, *J. Gen. Microbiol.* **137**, 2577-2593.
- Shimamura, A., H. Tsumori, and H. Mukasa (1982), Purification and properties of *Streptococcus mutans* extracellular glucosyltransferase, *Biochem. Biophys. Acta.* **702**, 72-80.
- Tomasic, J., H. J. Jennings, and C. P. J. Gludemans (1978), Evidence for a single type of linkage in a fructofutan from *Lolium perenne*, *Carbohydr. Res.* **62**, 127-133.