

## Pullulanase를 생산하는 *Aeromonas caviae* No. S-76의 특성과 배양조건

손천배\* · 김명희 · 이명자

충남대학교 식품영양학과

### Characterization and Some Cultural Conditions of a Pullulanase Producing *Aeromonas caviae* No. S-76

Sohn, Cheon-Bae\*, Myung-Hee Kim and Myung-Ja Lee

Department of Food and Nutrition, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

**Abstract** — A bacterial strain No. S-76 which produced pullulanase powerfully was isolated from soil. The isolated bacterium was  $0.4\sim 0.6\times 0.8\sim 1.4\ \mu\text{m}$  in size, gram negative, rods, motile and was identified as *Aeromonas caviae* by Bergey's manual of determinative bacteriology with various characteristics investigated. The highest yield of pullulanase of the strain was obtained by using the following medium: 1% pullulan, soluble starch or corn starch as a carbon sources and 0.5% yeast extract, peptone as nitrogen sources with an initial pH of 9.0. The optimal culture conditions for production of pullulanase were at  $32^\circ\text{C}$  for 2 days.

Pullulanase(Pullulan glucanhydrolase, E.C. 3.2.1. 41)는 pullulan이나 amylopectin, glycogen의  $\alpha$ -1,6 glycoside 결합을 절단하는 효소로서 1961년 Bender와 Wallenfalls(1)가 *A. aerogenes*의 배양액 중에서 발견한 것이 최초의 연구이며 그 후 많은 연구자에 의해 다른 미생물이나 고등식물에서 검색되어 *Escherichia intermedia*(2), *Streptococcus mitis*(3), *Streptomyces flavochromogenes*(4), *Lactobacillus*(5), *Nocardia*(5), *Micrococcus*(5), *Bacillus polymyxa*(6), *B. cereus* var. *mycoides*(7), Alkalophilic *Bacillus* sp.(8), *Pseudomonas stutzeri* NRRL B3389(9), *Thermus* sp.(10), *B. acidopullulyticus*(11) 등의 미생물과 sweet corn(12), 맥아(13)에서 pullulanase가 발견되고 있다. 이 효소는  $\alpha$ -amylase,  $\beta$ -amylase, glucoamylase 등의 효소와 함께 조합사용하여 전분에서 생산되는 주요 당인 glucose, maltose, 이성화당의 공업적 생산에 있어 당화속도와 수율을 높이는데 이용되고 있다. 최근에는 그 용도가 다양한 maltosyl- $\beta$ -cyclodextrin 생산에 있어서 cyclodextrin과 maltooligosaccharide에

pullulanase를 작용시켜 역합성반응으로 분지 cyclodextrin을 생산(14, 15)하고 있다. 현재 *Enterobacter aerogenes*(Sigma Co.)와 *B. acidopullulyticus*(NOVO Industrials)의 pullulanase가 상품화되어지고 있으나 고가이므로 우수균주의 분리와 효소생산이 요망된다. 따라서 본 연구에서는 pullulanase 활성이 강한 균을 토양으로부터 분리하였고 그 특성을 살펴본 결과 *Aeromonas caviae*로 동정되었으며 이 균주의 pullulanase 생산의 최적조건을 검토하였다.

### 재료 및 방법

#### Pullulanase 생산균주의 분리

대전시 및 기타 여러 지역에서 수집한 토양을 5 ml의 멸균수에 소량 현탁하고 그 상징액 0.1 ml 취하여 평판배지에 도말하여  $32^\circ\text{C}$ 에서 배양하고, 출현한 colony 중에서 amylopectin의 분해환을 보아 균을 취하였다. 다시 이 균주들을 L형 시험관에 10 ml씩 분주한 액체배지에  $32^\circ\text{C}$ 에서 2일간 진탕배양하고 배양액의 효소활성을 측정하여 우수균주를 분리, 선정하였다. 평판배지의 조성은 0.5% amylopectin, 0.8% nutrient broth, 2% agar, pH 9.0이었으며 액체배지의

**Key words:** *Aeromonas caviae* No. S-76, pullulanase production, branched-cyclodextrin

\*Corresponding author

조성은 1% pullulan, 0.8% nutrient broth, pH 9.0으로 하였다.

**균주의 동정**

분리 선정된 균의 동정은 Bergey's manual of determinative bacteriology(16) 및 API 20E Test에 의하였다.

**효소의 생산**

효소생산을 위한 배지조성, pH, 온도 및 배양기간 등의 최적조건을 알기 위하여 탄소원, 질소원, pH 등을 다르게 배양하여 효소활성을 측정, 비교하였다.

**효소활성 측정**

1% pullulan 용액 0.3 ml에 원심분리하여 균체를 제거한 배양조효소용액 0.05 ml를 가하여 40°C에서 30분간 반응시키고, DNS(3,5-dinitrosalicylic acid) 시약(17) 0.5 ml를 가하여 비등수 중에서 5분간 가열한 후 증류수 4 ml를 가하고, Spectrophotometer로 535 nm에서의 흡광도를 측정하여 생성당을 측정하였다. 1 unit는 위 조건에서 1분당 pullulan에서 1 μmol의 환원당(maltotriose)이 생성되는 효소의 양으로 정하였다.

**결과 및 고찰**

**분리균의 특성**

토양으로부터 분리선정된 균주 No. S-76의 특성을 요약하면 Table 1과 같았다. 본 균주는 0.4~0.6×0.8~1.4 μm 크기의 gram음성의 무포자 간균으로, 섬모를 갖고 운동성이 있으며, catalase, oxidase 양성이고, 통성혐기적으로 생육을 하며, 발효적으로 당에서 산을 생성하는 등의 API 20E Test의 결과로 보아 *Aeromonas caviae*로 동정하였다. 본 균주의 TEM의 사진은 Fig. 1과 같다.

**효소생산을 위한 배양조건**

**탄소원의 영향** : 탄소원을 제외한 기본배지에 각종 탄소원을 1% 첨가하여 만든 배지에 균을 접종하여 32°C에서 2일간 배양하여 효소활성을 비교한 결과는 Fig. 2와 같았다. pullulan>soluble starch>potato starch의 순으로 활성이 높았으며 기타 단당류나 이

**Table 1. Morphological, cultural and biochemical characteristics of isolated strain No. S-76**

A. Morphological characteristics

Characteristics	Strain No. S-76
Form	Straight rod (coccobacilli) with rounded ends
Size	0.4~0.6×0.8~1.4 μm
Motility	Motile
Gram reaction	Negative
Spore	Non-spore forming

B. Cultural and biochemical characteristics

Characteristics	Strain No. S-76	<i>A. caviae</i> (KCTC1653)	<i>A. hydrophila</i> (KCTC2358)
β-Galactosidase	+	+	-
Arginine dehydrolase	+	+	+
Lysine decarboxylase	-	-	-
Ornithine decarboxylase	-	-	-
Citrate utilization	-	-	-
H <sub>2</sub> S production	-	-	-
Urease	-	-	-
Tryptophane deaminase	-	-	-
Indole production	+	+	+
Acetoin production	-	-	-
Gelatinase	+	+	+
Fermentation/Oxidation			
glucose	+	+	+
mannitol	+	+	+
inositol	-	-	-
sorbitol	-	-	-
rhamnose	-	-	-
sucrose	+	+	+
melibiose	+	-	-
amygdalin	+	+	-
arabinose	+	+	-
Cytochrome-oxidase	+	+	+
NO <sub>2</sub> production	-	-	+
Catalase production	+	+	+

당류는 미약하였다.

**질소원의 영향** : 질소원을 제외시킨 기본배지에 여러 가지 질소원을 첨가하여 만든 배지에 균을 접종하여 32°C에서 2일간 배양하여 활성을 측정한 결과는 Fig. 3과 같다. 질소원으로서 0.5% yeast extract와 0.5% peptone 또는 1% yeast extract 첨가에서 효소활성이 가장 높았으며 밀기울, 쌀겨, ammonium sulfate, urea의 경우 활성이 아주 낮았다.

**pH의 영향** : 1% pullulan, 0.5% yeast extract, 0.5%

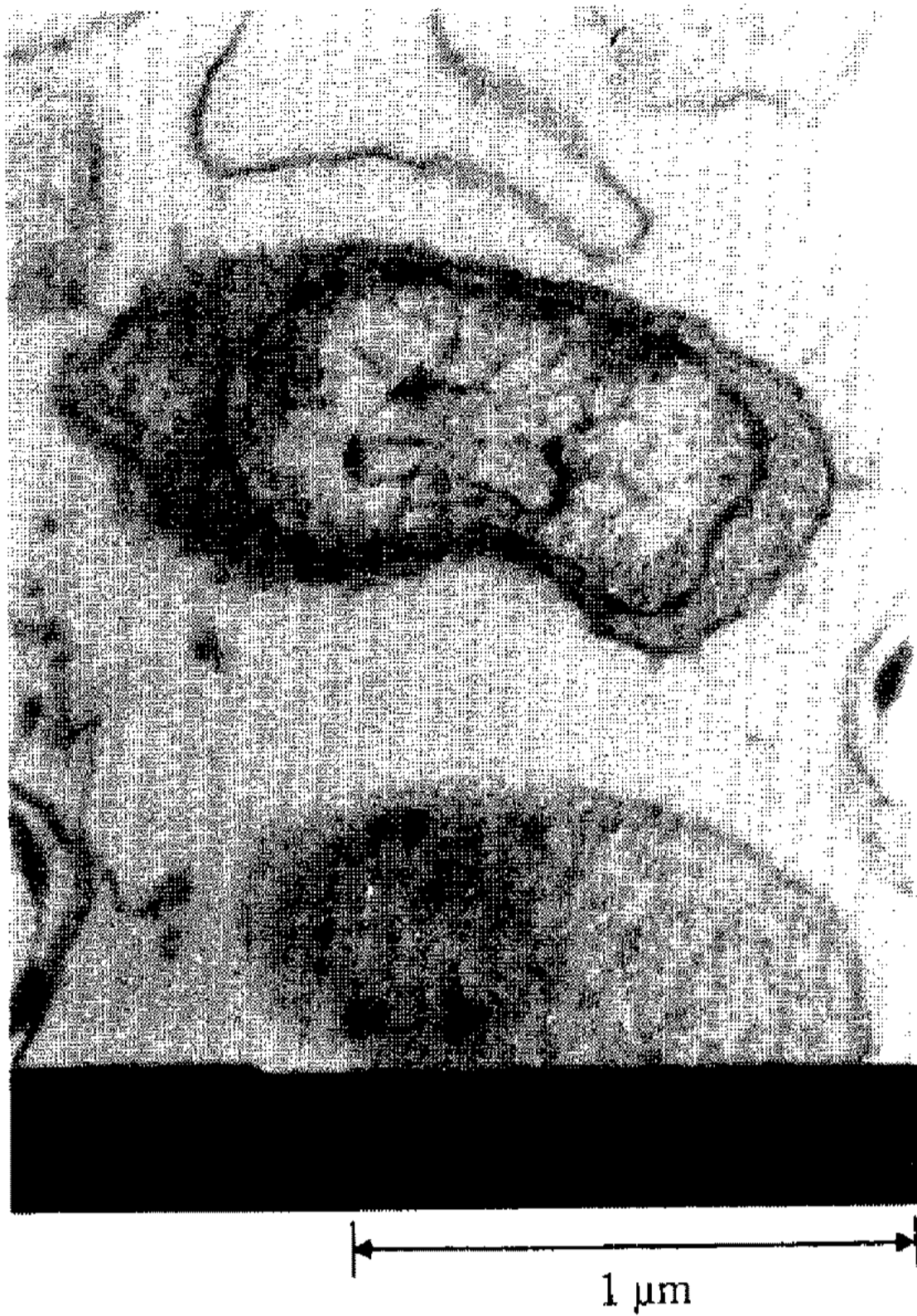


Fig. 1. Transmission electron microscopy of isolated strain No. S-76.

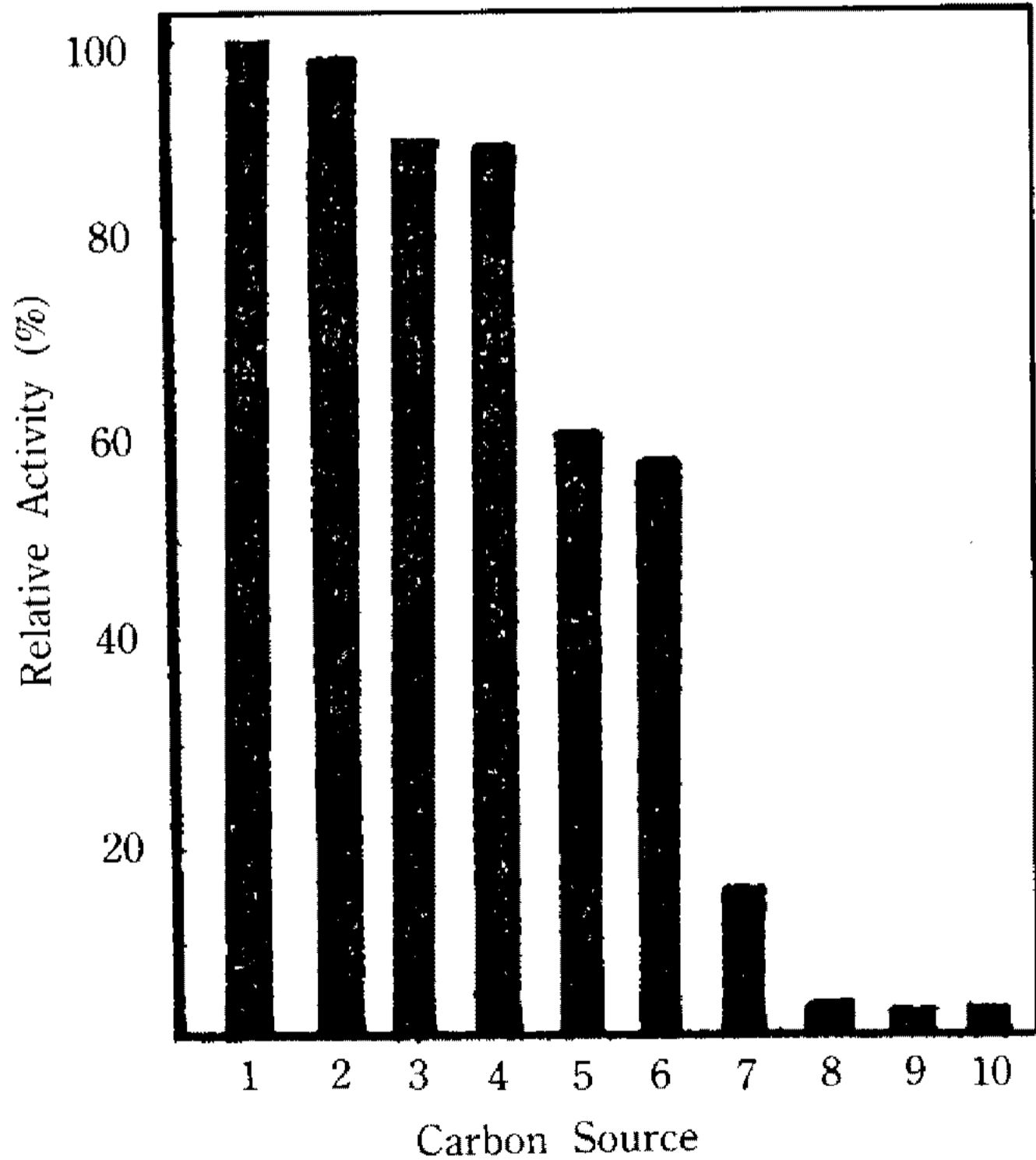


Fig. 2. Effect of various carbon sources added to basal medium for the pullulanase production by *Aeromonas caviae* No. S-76.

Basal medium: yeast extract 0.5%, peptone 0.5%, pH 9.0  
 1. pullulan, 2. soluble starch, 3. corn starch, 4. potato starch, 5. amylopectin, 6. maltose, 7. glucose, 8. sucrose, 9. lactose, 10. fructose

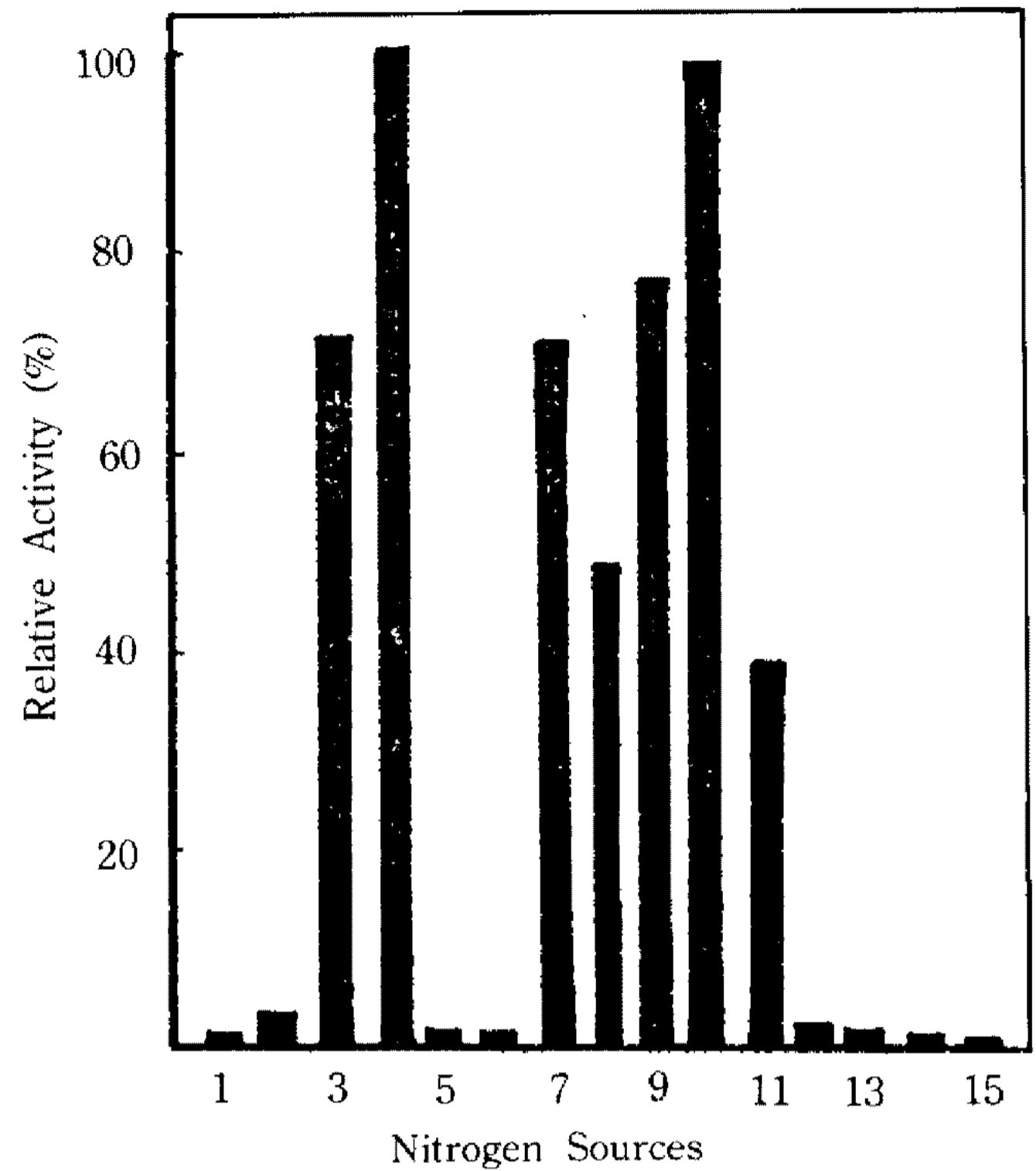


Fig. 3. Effect of various nitrogen sources added to basal medium for the pullulanase production by *Aeromonas caviae* No. S-76.

1. 0.25% yeast extract, 2. 0.5% yeast extract, 3. 0.75% yeast extract, 4. 1.0% yeast extract, 5. 0.25% peptone, 6. 0.5% peptone, 7. 0.75% peptone, 8. 1.0% peptone, 9. 0.5% yeast ex. + 0.25% peptone, 10. 0.5% yeast ex. + 0.5% peptone, 11. 0.25 yeast ex. + 0.5% peptone, 12. 5% wheat bran, 13. 5% rice bran, 14. 0.5% ammonium sulfate, 15. 0.5% urea

Table 2. Effect of medium pH on the pullulanase production by *Aeromonas caviae* No. S-76.

Initial pH	Final pH	Relative activity (%)	growth (OD <sub>610</sub> )
7.0	5.3	24	1.30
8.0	5.4	33	1.30
8.5	5.5	63	1.34
9.0	8.5	100	1.40
9.5	9.5	0	No growth
10.0	10.0	0	No growth

peptone의 배지를 pH 7~10으로 조정하고, 균을 접종하여 32°C에서 2일간 배양한 결과는 Table 2와 같았으며, 초기 pH 9.0에서 가장 활성이 높았고, pH 9.5 이상에서는 생육하지 못하였다.

배양온도 및 기간 : 1% soluble starch, 0.5% yeast extract, 0.5% peptone, pH 9.0의 조성으로 된 배지에 균을 접종하고, 배양온도를 달리하여 진탕배양하면서

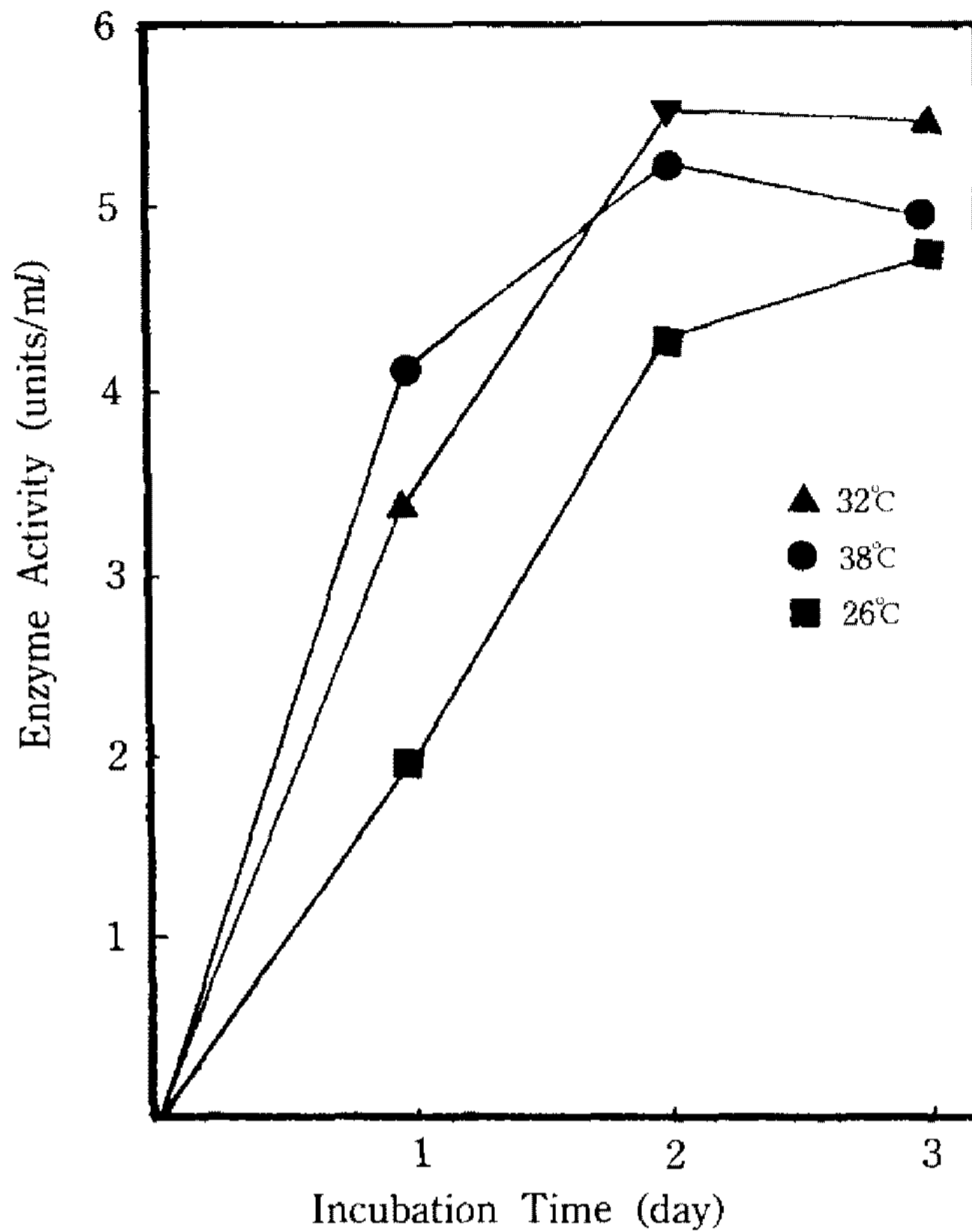


Fig. 4. Effect of temperature and periods for the pullulanase production by *Aeromonas caviae* No. S-76.

경시적으로 효소활성을 측정된 결과는 Fig. 4와 같았으며, 32°C에서 2일간 배양시 활성이 가장 높았다.

## 요 약

Pullulanase 생산력이 높은 세균 No. S-76을 토양으로부터 분리하였다. 분리된 균은  $0.4 \sim 0.6 \times 0.8 \sim 1.4 \mu\text{m}$ 의 크기의 gram음성, 간균으로서 운동성이 있으며, 여러 가지 특성을 조사한 결과 Bergey의 세균 분류 동정법에 따라 *Aeromonas caviae*로 동정되었다. 본 균의 pullulanase 생산배지로서는 탄소원은 1% pullulan, soluble starch 또는 corn starch가, 질소원으로는 0.5% yeast extract 또는 peptone이 적당하였으며 initial pH는 9.0의 배지가 가장 좋았으며 32

°C에서 2일간 배양이 적당하였다.

## 감사의 말

이 연구는 미원문화재단의 지원에 의해 이루어졌으며, 연구비 지원에 감사드립니다.

## 참고문헌

- Bender, H. and K. Wallenfells: *Biochem. Z.*, **334**, 79 (1961)
- Ueda, S. and N. Nanri: *Appl. Microbiol.*, **15**, 492 (1967)
- Walker, G.J.: *Biochem. J.*, **108**, 33 (1968)
- Yagisawa, M., K. Kato, Y. Koba and S. Ueda: *J. Ferment. Technol.*, **50**, 572 (1972)
- 堺修造: 澱粉科學, **28**, 72 (1981)
- Griffin, P.J. and W.M. Forgarty: *Biochem. Soc. Trans.*, **1**, 397 (1973)
- Takasaki, Y.: *Agric. Biol. Chem.*, **40**, 1515 (1976)
- Nakamura, N., K. Watanabe and K. Horikoshi: *Biochem. Biophys. Acta.*, **397**, 188 (1975)
- Wöber, B.: *Hoppe Seyleis Z. Physiol. Chem.*, **354**, 115 (1973)
- Nakamura, N. and N. Sashihara: *J. Jpn. Soc. Starch. Sci.*, **34**, 38 (1987)
- Manners, D.J. and K.L. Rowe: *Carbohydr. Res.*, **9**, 107 (1969)
- Lec, E.Y.C., J.J. Marshall and W.J. Whelan: *Arch. Biochem. Biophys.*, **143**, 365 (1971)
- Maeda, I., Z. Nikuni, H. Taniguchi and M. Nakamura: *Carbohydr. Res.*, **61**, 309 (1978)
- 白石遵憲, 坂野好幸, 丹谷陽一: 日本農藝化學會講演要旨集, 646 (1986)
- 白石遵憲, 坂野好幸, 丹谷陽一: 日本農藝化學會講演要旨集, 82 (1987)
- Buchman, R.E. and N.E. Gibbons: *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 8th ed., Williams and Wilkins Co., Baltimore (1974)
- 中村道徳, 鈴木繁男: 澱粉科學, 핸드ブック, 朝倉書店, 188 (1980)

(Received May 9, 1991)