

Dextranase 생산균주의 분리, 동정 및 효소생산

이종태* · 이동희¹ · 곽이성 · 김영호 · 성현순 · 김찬조²

한국인삼연초연구원 제품개발부, ¹건국대학교미생물공학과, ²충남대학교 식품공학과

Isolation and Identification of Dextranase Production Strains and Enzyme Production

Jong-Tae Lee*, Dong-Heui Yi¹, Yi-Seong Kwak, Young-Ho Kim, Hyun-Soon Sung and Chan-Jo Kim²

Korea Ginseng and Tobacco Research Institute, Taejon 305-345, Korea

¹Department of Microbial Technology, College of Engineering, Konkuk University, Seoul 133-701, Korea

²Department of Food Technology, Chungnam National University, Taejon 305-764, Korea

Abstract — In order to screen dextranase with high dextranolytic activity from microbial origins, dextranase producing fungal isolates were isolated from soil of the Taeion area. 197 strains with dextranolytic activities were isolated, out of which 3 strains with high dextranolytic activities were selected in the first screening. A strain (GR-98) with a best dextranolytic activity was selected in the second screening. The strain was identified to be similiar *Aspergillus ustus* by the morphological and cultural characteristics. The optimum culture temperature and initial pH for the dextranase production of the strain was 30°C and 7.0, respectively. The optimum culture medium was composed of 2% dextran, 0.3% KNO₃, 0.05% K₂HPO₄, 0.02% MgSO₄·7H₂O, 0.05% KCl, and 2.5 µg/ml pyridoxamine, and the enzyme production was maximum when the strain was subcultured at 30°C for 7 days.

Dextran은 미생물이 생산하는 다당류의 일종으로 glucose의 α-1.6 결합을 주결합으로 하고 α-1.2 및 α-1.3 분지결합의 구조를 가진 glucan이며(1, 2), 이 dextran을 가수분해하는 효소를 dextranase(α-D-1,6-glucose 6-glucanohydrolase, EC 3.2.1.11)라 한다(3). Dextranase에 관한 연구는 1948년 Ingelman(4)과 Nordström 등(5)이 *Penicillium* sp.의 배양액에 dextran을 분해하는 효소가 존재한다는 것을 처음 보고 하면서 시작되어 여러 종류의 미생물에서 다양하게 관찰되고 있다(6-10). Dextranase는 사탕수수 또는 사탕무우를 원료로 하는 제당공장에서 제조과정중에 dextran이 생성되어 여과저해를 일으키는 것을 방지할 목적으로 최초로 사용되었으며(11), 그 후 고분자의 dextran을 dextranase를 이용하여 적당한 크기로 부분 가수분해한 후 대용혈장제를 제조하는데 사용했다(12). 최근에는 치과분야에서 “충치의 발병은 음식물

중의 설탕과 구강내에 충치병원균의 일종인 *Streptococcus mutans*가 생산하는 dextransucrase의 작용으로 glucan이 만들어지고 이러한 glucan이 치석을 형성하며 충치로 발전된다.”는 이론이 확립되어 있으며, 또한 구강내에 dextranase를 투여하면 치석형성을 저지하고 충치예방에도 효과를 나타내는 것이 확인되었다. 따라서 dextranase는 치석형성 저지 및 충치예방을 위하여 치약, 가글류, 껌 등에 첨가하는 새로운 용도가 개발되고 있다(6, 13). 미생물에 의한 dextranase 생산은 dextran 및 dextran 분해산물 등에 의해 유도되어 생산되므로 dextranase 생산배지에 유도물질의 첨가가 필수적이며, 이것은 효소의 대량 생산시 많이 소요되는 단점이 된다(17). 이를 해결하기 위하여 효소활성이 높은 균주의 선별(18), 설탕함유 배지에 dextran 생산균을 접종하여 dextran을 생성시킨 후 배양액에서 dextran을 회수하지 않고 그 배양액에 dextranase 생산균을 접종하여 연속적으로 dextranase를 생산하는 복식발효방법(13), 배양액의 pH 및 통기교반조건 조절에 의한 효소생산 증대방법

Key words: Dextranase, isolation and identification, *Aspergillus ustus* dextranase production

*Corresponding author

(19, 20), dextranase 생산균이 증식한 후 배양 도중에 특정한 제한기질을 공급하는 유가(流加)배양법(20), repressor의 기능이 상실된 depressed mutant를 사용하여 dextranase 생산을 증가시키는 방법(21) 및 BMG(1- β -Methyl glucopyranoside)와 같은 새로운 유도물질을 탐색하는 방법(17) 등을 연구하였다. 그리고 Baig(22), Tsuchiya 등(7), Madhu 등(23) 및 Fukumoto 등(24)은 *Penicillium* sp., 이(25), Hanada 등(13) 및 Tsuru 등(8)은 *Aspergillus* sp., Horita 등(20)은 *Chaetomium* sp., Amanda 등(26)은 *Paecilomyces* sp.의 dextranase 생산에 초발 pH, 온도, 영양원 및 배양조건 등의 영향에 관하여 보고하였다. 따라서 본 연구에서는 dextranase의 실용화를 목표로 대전근교의 토양에서 활성이 강한 dextranase를 생산하는 균을 분리, 선별하여 동정하였으며, 또한 이 균에 의한 dextranase 생산조건을 검토하였기에 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

Dextranase 생산균의 분리 및 선별

대전 근교에서 채취한 토양을 멸균수로 3단 희석한 다음 dextran을 유일한 탄소원으로 하는 분리용 배지에 접종하여 30°C에서 평판배양하였으며, 형태가 다른 콜로니들을 새로운 분리용 고체배지에 도말하여 균주를 순수분리하였다. 우량균주를 선별하기 위하여 순수분리된 각 균주의 dextranase 활성을 조사하였다. Dextranase 활성은 dextranase 생산용 액체배지 10 ml를 100 ml 삼각 flask에 주입하고 121°C에서 15분간 살균한 다음 각 균주를 접종하여 30°C에서 7일간 정지배양한 후 Whatman No.41 여과지로 여과한 배양여액을 dextranase 활성측정법에 따라 측정하였다. 균주의 분리 및 보관용 배지조성은 dextran(T-5,000~40,000) 10.0 g/l, NH_4NO_3 5.0 g/l, KH_2PO_4 1.0 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0 g/l, Agar 18.0 g/l, pH 5.0이었으며, dextranase 생산용 배지조성은 dextran(T-5,000~40,000) 10.0 g/l, NaNO_3 5.0 g/l, K_2HPO_4 1.0 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/l, KCl 0.5 g/l, pH 7.0이었다.

Dextranase의 활성 및 균체량 측정

Dextranase의 활성 측정용 조효소액은 균체를 제거한 배양여액을 사용하였다. 1% dextran(T-5,000~40,000) 용액 0.5 ml, 0.1M citrate-0.2M Na_2HPO_4 완충액(pH 6.0) 0.4 ml 및 조효소액 0.1 ml를 가하여 37°C에서 10분간 반응시킨 후 DNS 방법(14)으로 환원당을 정량하여 효소역가를 측정하였다. 효소활성

단위는 효소용액 1 ml가 1분간에 유리하는 환원당의 mole 수로 표시하였으며, 표준검량곡선은 glucose를 사용하여 작성하였다. 균체량 측정은 균 배양액을 Whatman No. 41 여과지로 여과한 후 증류수로 3회 세척하고 105°C에서 항량이 될 때까지 건조하여 측정하였다.

선별균주의 동정

선별한 균을 Czapek's agar와 20% Czapek's agar 및 Malt extract agar plate에 접종하여 25°C에서 10일간 배양한 후 형태학적 특성을 조사하고, Raper(15), Samson 등(16)의 방법에 따라 동정하였다.

Dextranase 발효생산

Aspergillus ustus GR-98이 생산하는 dextranase의 최적 생산조건을 검토하기 위하여 상기의 dextranase 생산용 배지를 사용하였으며, 균의 배양은 배지 10 ml를 100 ml 삼각 flask에 주입하고 121°C에서 15분간 살균한 다음 분리 균주의 포자현탁액을 0.5 ml 씩 접종하여 30°C에서 7일간 정지 배양하였다. Dextranase 생산용 배지조성은 dextran(T-5,000~40,000) 10.0 g/l, NaNO_3 5.0 g/l, K_2HPO_4 1.0 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/l, KCl 0.5 g/l, pH 7.0이었다.

시약

본 실험에 사용된 dextran(T-5,000~40,000), 3,5-dinitrosalicylic acid(DNS), 아미노산류 및 비타민류는 Sigma 회사의 제품을, 그외의 시약은 특급 또는 1급 시약을 사용하였다.

결과 및 고찰

분리 및 선별

대전 근교의 토양에서 197주의 dextranase 생산균주를 분리하여 dextranase 활성도 측정방법에 의해 효소활성이 높은 3균주를 1차로 선별하였고, 2차 선별에서 Table 1과 같이 효소활성이 가장 강한 GR-98 균주를 선정하였다.

Tsuru 등(8)에 의하면 세균 및 효모에서는 dextranase 활성이 높지 않고 곰팡이중에서 *Rizopus* 속이 생산하는 dextranase 활성은 미약하며 *Penicillium* 속의 균주는 중간 정도의 활성을 나타내는 반면 가장 높은 활성을 나타내는 균주가 *Aspergillus carneus* 유연균이라고 보고하였다. 이 균이 생산하는 dextranase 활성과 저자등이 분리한 균인 GR-98 균주가 생산하는 dextranase 활성을 동일한 조건(같은 농도

Table 1. Dextranase activities of three strains selected from the first screening

Strain No.	Final pH	Dextranase activity (units/ml)
GR-88	8.4	5.4
GR-98	8.2	5.7
GR-99	8.5	5.6

의 기질, 효소량)에서 비교한 결과 *Aspergillus carneus*는 비활성이 52.6 units/ml인 반면에 본 균주는 57 units/ml로서 지금까지 알려진 사상균중에서 우수한 활성을 나타내었다.

동정

GR-98 균주의 Czapek's agar, 20% Czapek's agar 및 malt extract agar 배지에서의 colony 형태는 Fig. 1 과 같으며 20% Czapek's agar에서 10일 배양시 閉子器가 생성되지 않았고 25°C에서 30일 배양시에도 菌核은 생성되지 않았다. 分生子頭를 광학현미경으로 관찰한 결과 Fig. 2와 같이 *Aspergillus*의 특징인 頂囊이 관찰되었고, 分生子頭는 방사형, 梗子는 復列, 分生子는 구형이었다. 이상의 결과를 요약한 분리균의 형태적 특성은 Table 2와 같으며, Raper(15), Samson 등(16)의 방법에 준하여 형태적 특성을 비교 검토한 결과 *Aspergillus ustus*의 유연 균주로 사료된다.

효소 생산조건

배양온도 및 pH 효소생산에 미치는 배양온도의 영향을 조사한 결과는 Fig. 3과 같이 30°C에서 효소 생산이 가장 좋았고, 균체량도 가장 많았다. 이는 *A. ustus*(13, 25) 및 *A. carneus*(8)의 dextranase 생산에서와 일치하며, 곰팡이의 일반적인 생육 최적온도와 일치한다. 효소생산에 미치는 초발 pH의 영향을 조사한 결과는 Fig. 4와 같이 pH 5에서 pH 10까지 넓은 범위에서 효소생산이 좋았으며, 초발 pH 7.0이 가장 좋았다. *A. ustus*(13)의 dextranase 생산에 초발 pH 6.0이, *A. carneus*(8)의 dextranase 생산에 초발 pH 8.5가 효소생산에 최적 초발 pH라고 보고하였는데 GR-98 균주는 중성부근의 초발 pH가 최적이었으며, 또한 넓은 범위의 초발 pH에서 효소생산이 좋았다.

배지성분 탄소원, 질소원, 금속이온 등 영양물질의 배지내 최적첨가농도를 조사하여 요약한 결과는 다음 Table 3과 같다.

효소생산에 미치는 각종 탄소원의 영향을 조사한 결과는 Table 3과 같이 dextran 이외의 당류는 효소

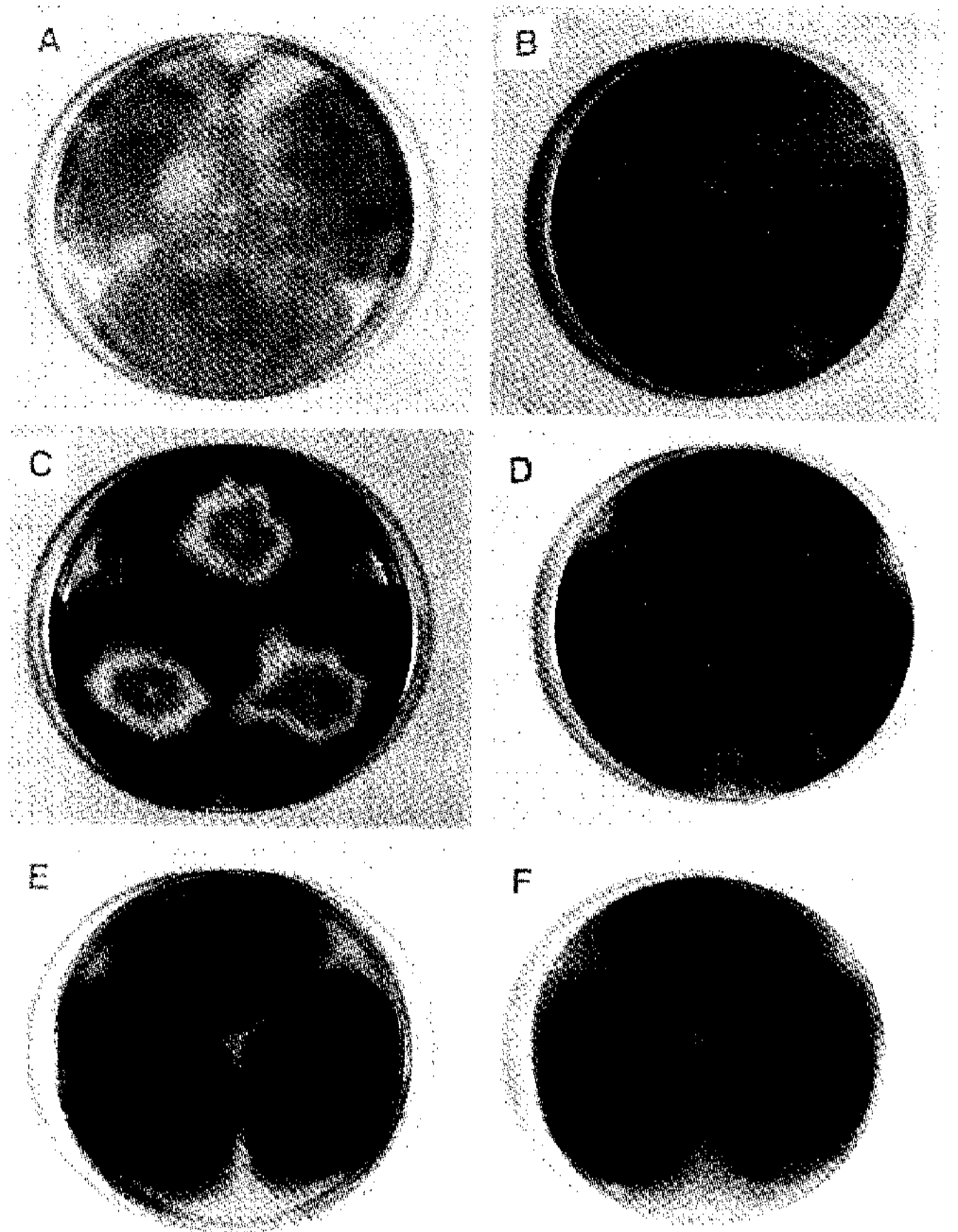


Fig. 1. Colonies of the isolated GR-98 strain on the various media.

The fungus was cultured at 25°C for 10 days. A, Czapek's agar; B, Czapek's agar reverse; C, 20% Czapek's agar; D, 20% Czapek's agar reverse; E, Malt extract agar; F, Malt extract agar reverse

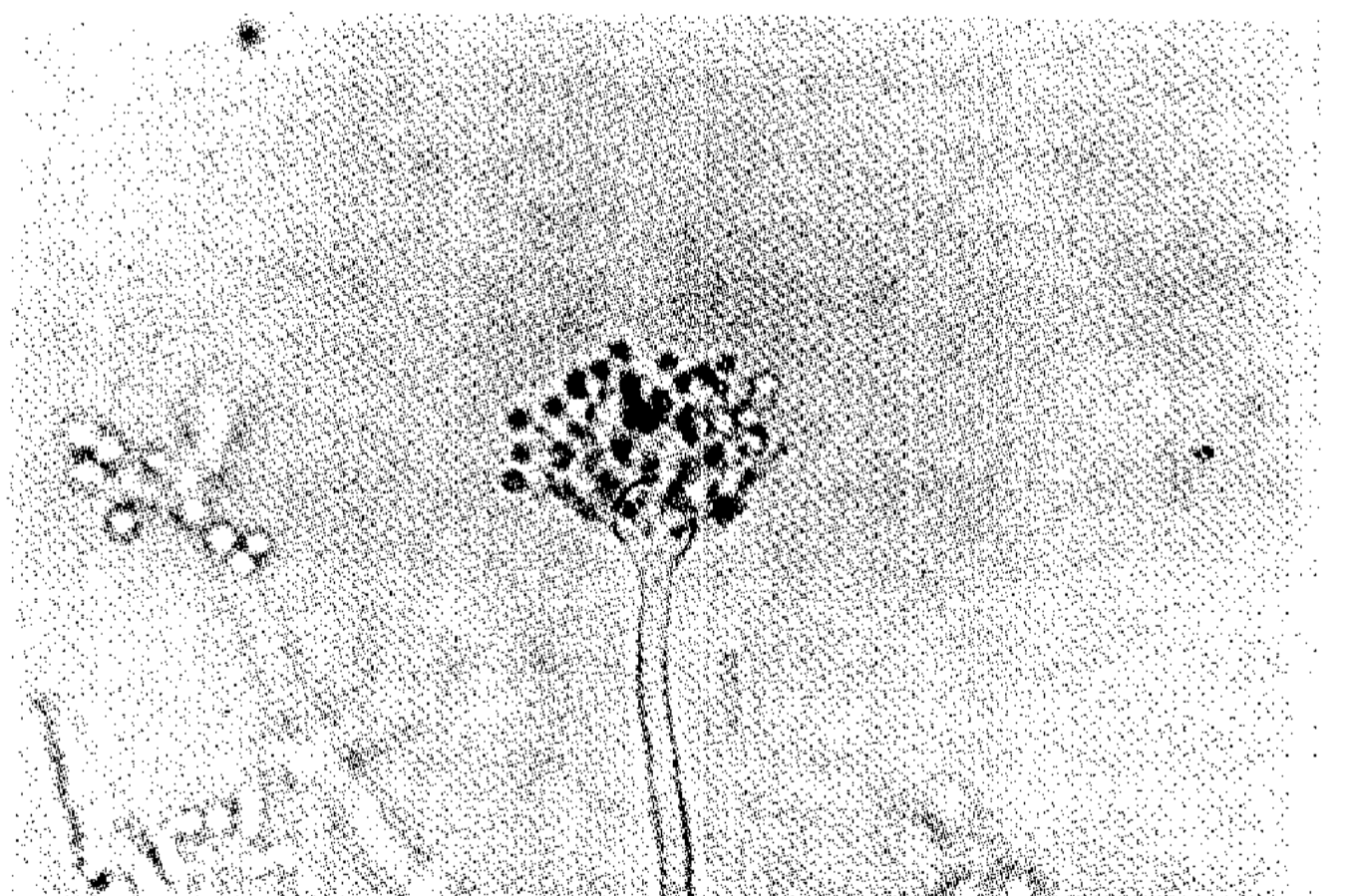


Fig. 2. Photomicrograph showing detail conidial head structure of the isolated GR-98 strain (×400).

The fungus was cultured at 25°C for 10 days on Czapek's agar medium.

생산에 효과가 없었다. Dextranase는 유도효소이므로 효소생산에 dextran 및 그 분해물이 존재하지 않으면

Table 2. Morphological characteristics of the isolated GR-98 strain in different media

Characteristics	Czapek's agar medium	Malt agar Medium
Growth	φ 30~40 mm	φ 40 mm
Colony color	Cream to pale yellowish	Dull drab shades
Colony reverse	Yellowish shades	Dull olive-brown
Character of surface	Colony plane, Rarely zonate, Floccose	Colony plane, Heavily spring
Exudate	Absent	Absent
Conidial head	Radiate, 100~130 μ in diameter	Radiate, 120~150 μ in diameter
Vesicle	Subglobose, 7~10 μm in diameter	Subglobose, 10~12 μm in diameter
Sterigmata	Strictly biseriate, Primary φ 3×6 μ, Secondary φ 3×5μ	Strictly biseriate, Primary φ 3×6.5 μ, Secondary φ 3×5.5 μ
Conidia	Globose, 3 μ in diameter	Globose, 3 μ in diameter
Cleistothecia	Absent	Absent
Sclerotia	Absent	Absent

The fungus was cultured at 25°C for 10 days.

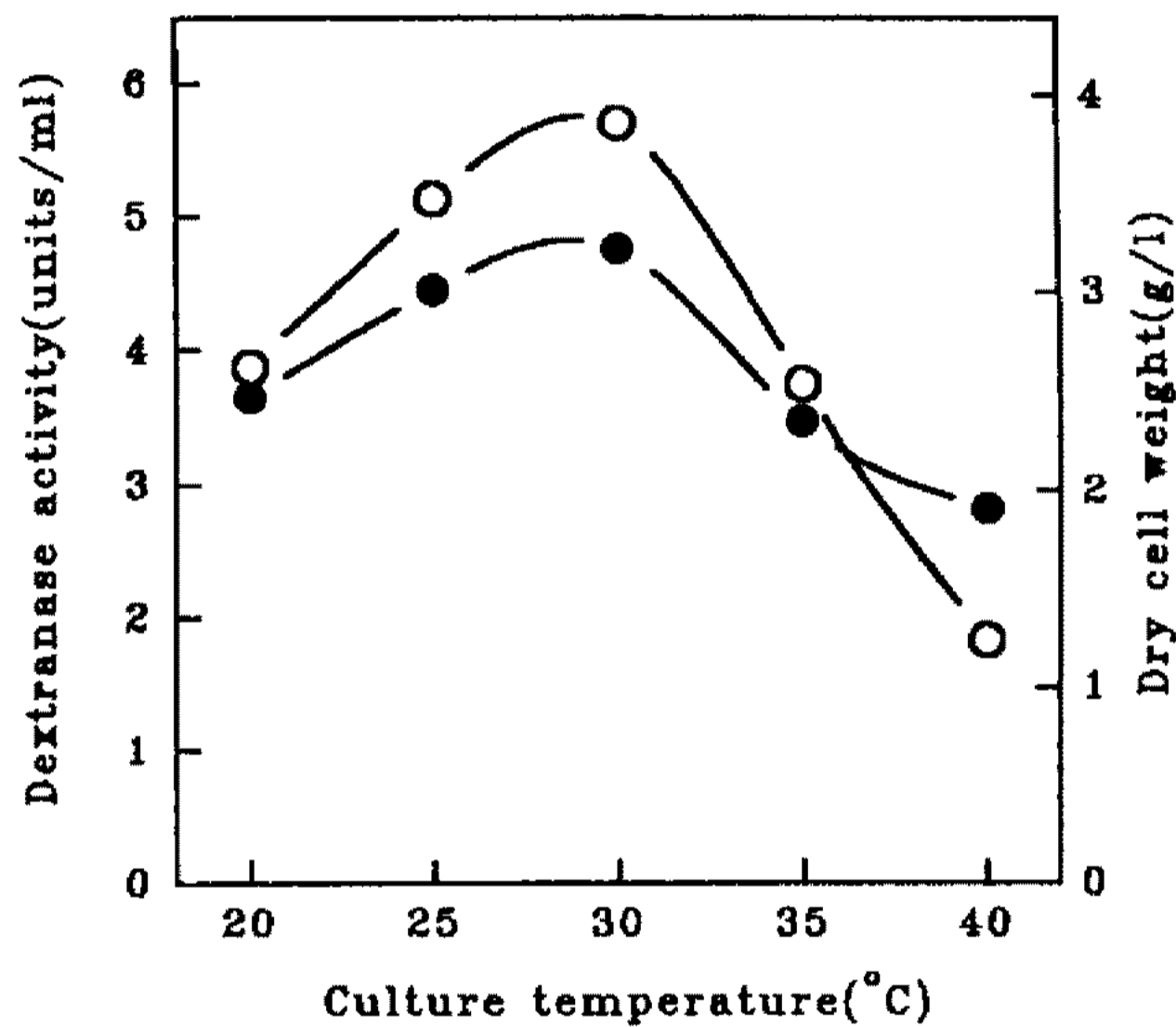


Fig. 3. Effect of temperature on the dextranase production by *Aspergillus ustus* GR-98.

○; Dextranase activity, ●; Dry cell weight

효소생산을 낡는다는 보고(17)와 일치한다. 또한 GR-98 균주는 dextran 분자량이 클수록 효소생산이 양호함을 나타내고 있으며 이는 Horita 등(20)이 *C. gracile*의 dextranase 생산에서 보고한 것과 일치한다.

효소생산에 미치는 질소원의 영향은 NaNO_3 , KNO_3 , NH_4NO_3 , urea, ammonium citrate, ammonium acetate는 효소생산이 양호하였고 그중 KNO_3 가 가장 좋았으며, 이외의 질소원은 효과가 없었다. 이는 Hanada 등(13) 보고와 유사하다.

효소생산에 미치는 금속이온의 영향으로 MgSO_4 가 가장 좋았고 이외의 금속이온들은 효소생산에 효과가 없었다.

아미노산 첨가는 효소생산에 효과가 없었다.

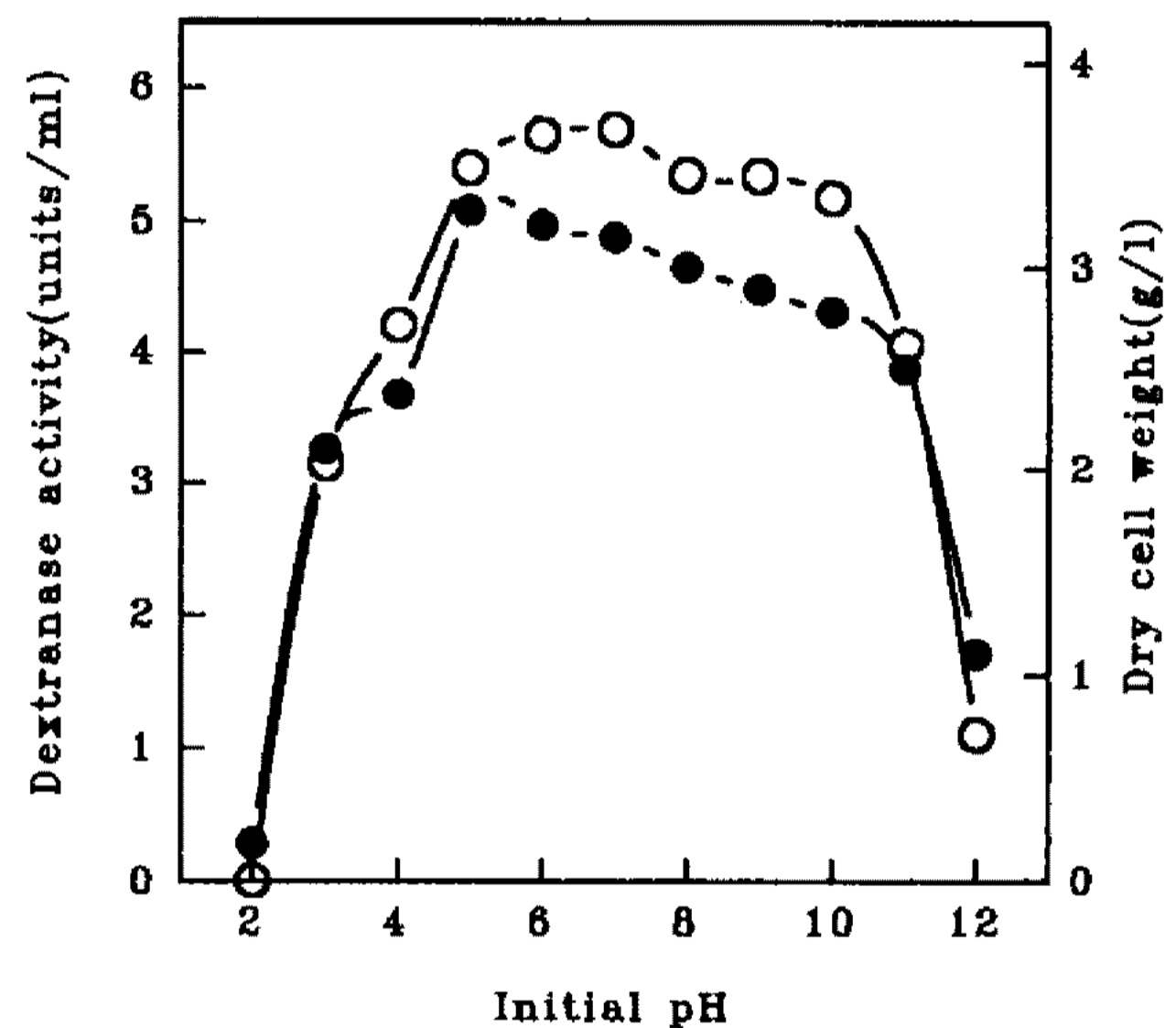


Fig. 4. Effect of initial pH on the dextranase production by *Aspergillus ustus* GR-98.

*The pH of culture medium was adjusted with 1N HCl and 1N NaOH. The fungus was cultured in the stationary condition in 10 ml dextranase production medium in a 100 ml Erlenmeyer flask at 30°C for 7 days.

○; Dextranase activity, ●; Dry cell weight

효소생산에 미치는 각종 비타민의 영향을 검토한 결과는 비타민 B₆ 군과 nicotinic acid의 첨가가 효소생산을 증대시켰으나 이외의 비타민은 효과가 없었다. 비타민중 pyridoxanin은 무첨가에 비해 약 25%의 효소생산 증대효과를 나타내었다.

배양시간 상기의 최적 배지조성에 *Aspergillus ustus* GR-98을 접종하여 최적배양조건으로 배양하면서 배양시간별 효소생산성을 검토한 결과는 Fig. 5와 같다. 배양일수 7~9일에 효소생산 및 균체량이 최고에 달하였으며 final pH는 9.0 부근이었다. Hanada 등

Table 3. Composition of the medium optimal for production of the dextranase by *Aspergillus ustus* GR-98

Ingredient	Concentration (g/l)
Dextran	20
KNO ₃	3
K ₂ HPO ₄	0.2
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5
KCl	0.5
Pyridoxamine	2.5 mg
Temperature	30°C
pH	7.0
Culture time	7 days

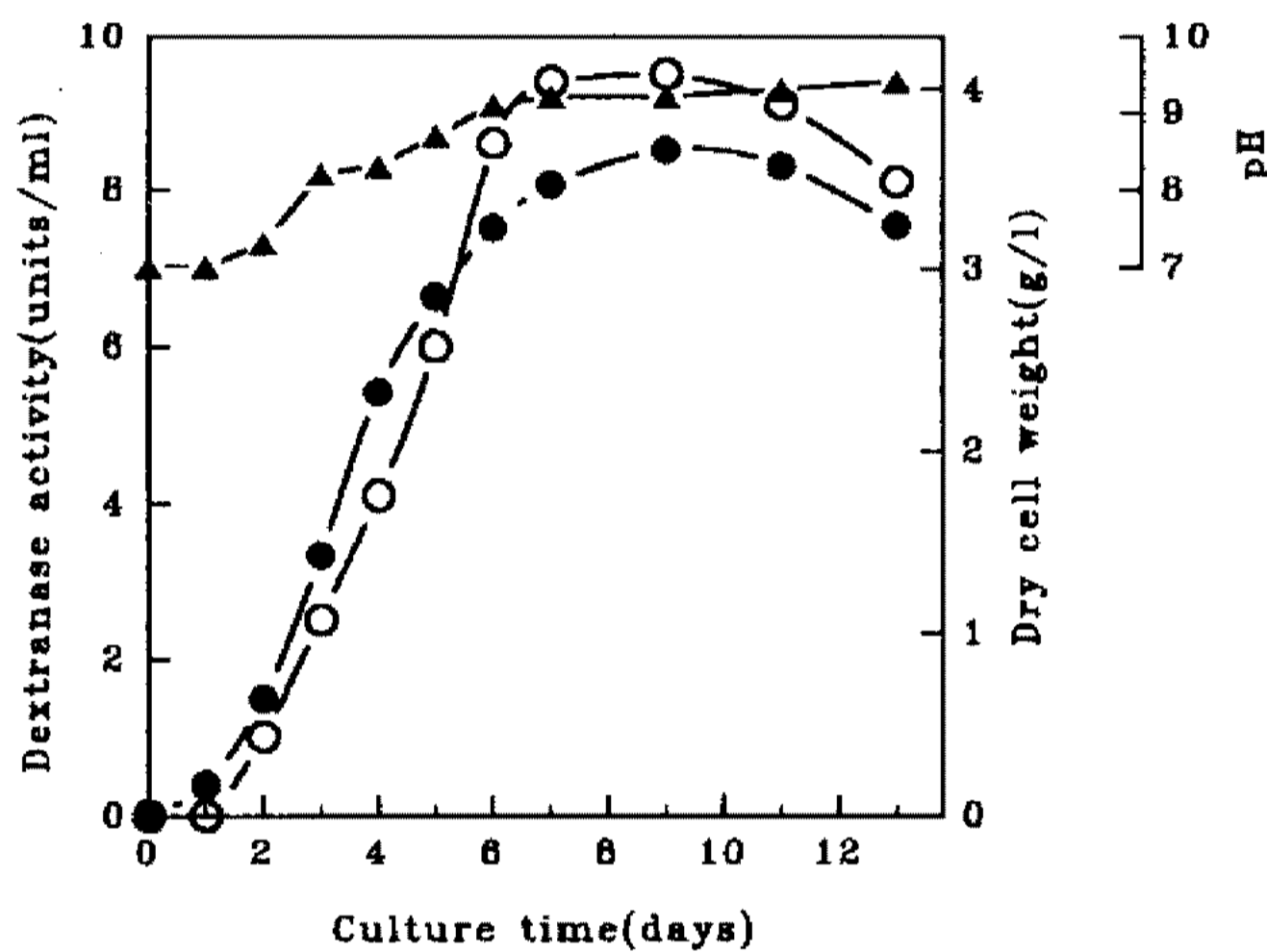


Fig. 5. Time course of dextranase production at optimal conditions.

The composition and initial pH of the culture medium was 2% dextran, 0.3% KNO₃, 0.05% K₂HPO₄, 0.02% MgSO₄·7H₂O, 0.05% KCl, 2.5 µg/ml pyridoxamine and pH 7.0.

The fungus was cultured in the stationary condition in 10 ml medium in a 100 ml Erlenmeyer flask at 30°C.

○; Dextranase activity, ●; Dry cell weight, ▲; pH

(13)은 *A. ustus* 효소생산에 배양기간 4일이, 이(25), Tsuru 등(8)은 *A. ustus* 및 *A. carneus* 효소생산에 배양기간 6일이 최적이라고 보고하였는데 본 균주는 이보다 약간 긴 배양시간을 요구하였다.

요 약

Dextran을 잘 분해하는 미생물 기원의 dextranase를 검색코자 토양에서 dextranase 생산균주를 분리, 동정하였으며 이 균주가 생산하는 dextranase의 최적 생산조건을 검토하였다. 대전근교의 토양에

서 dextran 분해활성을 지닌 197주를 분리하였으며, 그중 높은 dextran 분해활성을 가진 3주를 1차 선발하였고, 최종적으로 dextran 분해활성이 가장 높은 GR-98 균주를 선발하였다. 이 균주를 형태학적 및 배양상의 특성등에 의해 동정한 결과 *Aspergillus ustus* 또는 그 유연군으로 추정되었다. 이 균주의 dextranase 생산성을 조사한 결과, 최적 배양온도 및 초발 pH로 30°C 및 pH 7.0이었고, 2% dextran, 0.3% KNO₃, 0.05% K₂HPO₄, 0.02% MgSO₄·7H₂O, 0.05% KCl, 2.5 µg/ml의 농도로 pyridoxamine을 첨가하여 7일간 정지 배양하였을 때 생산량이 가장 많았다.

참고문헌

- Margaritis, A. and G.W. Pace. 1985. Microbial Polysaccharides, Pp. 1005-1044. In M.Y. Murray (ed.), Comprehensive Biotechnology, Vol.3, Pergamon Press, Oxford.
- 小林幹彦. 1986. 데키스트란의 생합성および分解に関する酵素化學的研究. 日本農藝化學會誌 60: 717-723.
- Barman, T.E. 1969. Enzyme Handbook, Vol.2., Pp. 569-569. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg.
- ngelman, B. 1948. Enzymatic breakdown of dextran. *Acta. Chem. Scand.* 2: 803-812.
- Nordström, L. and E. Hultin. 1948. Dextranase, a new enzyme from mould. *Svensk. Kem. Tid.* 60: 283-284.
- 漆貞正. 1983. 데키스트라나제. 日本農藝化學會誌 57: 155-166.
- Tsuchiya, H.M., A. Jeanes, H.M. Bricker, and C. A. Wilham. 1952. Dextran-degrading enzymes from molds. *J. Bacteriol.* 64: 513-519.
- Tsuru, D., N. Hiraoka, T. Hirose, and J. Fukumoto. 1971. Studies on mold dextranases. Part II. Dextranase production by a strain of *Aspergillus carneus*. *Agric. Biol. Chem.* 35: 1727-1732.
- Hattori, A. and K. Ishibashi. 1981. Screening of dextranase producing microorganisms. *Agric. Biol. Chem.* 45: 2347-2349.
- 정재호, 이형환, 김영희, 이희무. 1987. 세포외 덱스트란 분해효소를 생산하는 *Flavobacterium multivorum*의 분리. 한국미생물학회지 25: 346-352.
- Godfrey, T. 1983. Dextranase and sugar processing. Pp. 422-423. In Godfrey, T. and J. Reichelt (ed.), Industrial Enzymology, The Nature Press, New York.
- Whiteside-Carlson, V. and W.W. Carlson. 1952. Enzymatic hydrolysis of dextran. *Science* 115: 43-43.
- Hanada, K., A. Hirose, and E. Ninomiya. 1974. Isolation, identification and culture condition of

- a dextranase-producing mold (studies on the dextran produced by *Aspergillus ustus* 237 Part I). *Nippon Nôgeikagaku Kaishi* **48**: 15-20.
14. Bernfeld, P. 1955. Amylases, α and β , Pp 149-150. In Colowick, S.P. and N.E. Kaplan (ed.), *Methods in Enzymology*, Vol. 1, Academic Press, New York.
 15. Raper, K.B. and D.I. Fennell. 1965. *The Genus Aspergillus*, Pp. 543-557. Robert, E. Krieger Publishing Company, Inc., Florida.
 16. Samson, R.A., E.S. Hoekstra, and C.A.N. Van Oorschot. 1981. *Introduction to Food-Borne Fungi*, Pp. 52-77. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn.
 17. Koenig, D.W. and D.F. Day. 1989. Induction of *Lipomyces starkeyi* dextranase. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 2079-2081.
 18. Sun, J.W., X.L. Cheng, Z.Z. Yang, M.F. Zhu, and S.Z. Zhang. 1988. Screening of dextranase producing strains and comparison of their enzymatic properties. *China Acta Microbiologica Sinica* **28**: 45-55.
 19. 横井信正, 日比芳男, 仲恭實, 長谷川宣昭, 淺田敏. 1973. デキストラナ-ゼの製造法. 日本 公開特許公報 昭 **48-87081**: 403-408.
 20. Horita, M., T. Katsuro, K. Obayashi, and H. Akahori. 1989. Dextranase production in fed-batch culture (Studies on dextranase production. Part I). *Nippon Nôgeikagaku Kaishi* **63**: 837-844.
 21. Koenig, D.W. and D.F. Day. 1988. Dextranase production by a derepressed mutant, Pp. 111-114. In Blanch, H.W. and A.M. Klibanov (ed.), *Enzyme Engineering*, The New York Academy of Sciences, New York.
 22. Baig, M.A. 1987. Nutritional requirements of *Penicillium funiculosum* for the production of dextranases: I. Effect of nitrogen sources. *Pakistan J. Sci. Ind. Res.* **30**: 673-675.
 23. Madhu, G.L.S. and K.A. Prabhu. 1989. Study of some parameters for the production of dextranase by *Penicillium aculeatum*. *Emzyme Microb. Technol.* **11**: 533-536.
 24. Fukumoto, J., H. Tsuji, and D. Tsuru. 1971. Studies on mold dextranases, I. *Penicillium luteum* dextranase: Its production and some enzymatic properties. *J. Biochem.* **69**: 1113-1121.
 25. 이진주. 1980. Mold dextranases에 관한 연구, I. *Aspergillus ustus*의 dextranase 생산에 관하여. 한국미생물학회지 **18**: 188-192.
 26. Amanda, G.M. and L.H. Agustin. 1991. Production and characterization of a dextranase from an isolated *Paecilomyces lilacinus* strain. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **36**: 327-331.

(Received 8 March 1995)