

## D-Amino Acid Aminotransferase 활성보유 고온성미생물의 탐색 및 분류학적 특성 연구

곽미선<sup>1,3</sup> · 이승구<sup>1</sup> · 정상철<sup>2</sup> · 서승현<sup>2</sup> · 이재흥<sup>2</sup> · 전영중<sup>2</sup> · 김영호<sup>3</sup> · 성문희<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>생명공학연구소 미생물전환연구UNIT, <sup>2</sup>제일제당 종합연구소, <sup>3</sup>충남대학교 제약학과

**Screening and Taxonomic Characterization of D-Amino Acid Aminotransferase-producing Thermophiles.** Kwak, Mi-Sun<sup>1,3</sup>, Seung-Goo Lee<sup>1</sup>, Sang-Cheol Jeong<sup>2</sup>, Seung-Hyun Suh<sup>2</sup>, Jae-Heung Lee<sup>2</sup>, Yeong-Joong Jeon<sup>2</sup>, Young-Ho Kim<sup>3</sup>, and Moon-Hee Sung<sup>1,\*</sup>. <sup>1</sup>Microbial Conversion RU, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Yusong, Taejeon 305-600, Korea, <sup>2</sup>Cheil Foods and Chemicals Inc., Kyunggi-Do 467-810, Korea, <sup>3</sup>College of Pharmacy, Chungnam National University, Taejeon 305-764, Korea – To acquire an industrially useful biocatalyst for the enzymatic synthesis and production of various D-amino acids, 1,300 thermophiles isolated from the soil of Korea were analyzed for D-amino acid aminotransferase (D-AAT) activity. The enzyme activity was found from 110 strains of isolated thermophiles revealing its wide occurrence in thermophiles. Enzyme activity and thermal stability of the D-AAT producers were compared. Finally we have selected four thermophiles as producers of potent biocatalysts for the D-amino acid production; two thermophiles, *Bacillus* sp. LK-1 and LK-2, having higher specific activity and two thermophiles, *B. stearothermophilus* KL-01 and *Bacillus* sp. KLS-01, having higher thermal stability than the D-AAT producers. Taxonomic and physiological characteristics of the four isolated thermophiles were described herein.

**Key words :** screening, D-amino acid aminotransferase, taxonomic characterizaion, thermophiles

D-아미노산은 자연계에서 미생물 세포벽, 펩타이드성 항생물질, 신경 펩타이드 등의 구성성분으로 다양하게 분포되어 있으며, 특히 미생물 세포벽의 peptidoglycan에는 D-alanine, D-glutamate, D-aspartic acid의 D-아미노산이 필수적인 구성성분으로써 함유되어 있다[2]. 이러한 D-아미노산 중에서 D-hydroxyphenylglycine은 β-락탐계 반합성항생제 합성 출발물질로 사용되어 공업적 생산기술이 확립되어 있으며[8], D-아미노산이 함유된 저 칼로리 고 감미도의 감미료(Alitame; L-aspartyl-D-alanine amides)가 개발되어 D-아미노산의 산업적 수요 증가가 예견되고 있다.

D-아미노산의 공업적 생산법으로는 (i) D-stereospecific amidase를 이용한 광학분할법[14], (ii) D-hydantoinase를 이용한 D,L-hydantoin 유도체의 개환반응법(ring opening)[9], (iii) 기질특이성이 broad한 D-amino acid aminotransferase(D-AAT) (D-alanine : 2-oxoglutarate aminotransferase; EC 2.6.1.21)를 이용한 효소전환법[3, 5](Fig. 1), (iv) amino acid racemase와 L-amino acid decarboxylase의 복합 효소반응계를 이용한 광학분할법[13, 14] 등이 개발되고 있다. 이와 같은 D-아미노산 생산법 중에서 D-amidase를 이용하는 방법은 효소반응에 이용되지 않고 잔여하는 L-amino acid amide의 제거 또는 라세미화 반응을 수행하여야 하며, D-hydantoinase를 이용한

는 방법은 hydantoin 유도체의 개환반응에 의하여 생성된 N-카바모일-D-아미노산의 카바모일기를 제거시키기 위한 공정이 추가로 요구된다.

한편 D-AAT를 이용한 전환법(Fig. 1)은 저가의 아미노산과 α-케토산을 원료로 하여 광학적으로 순수한 D-아미노산을 직접 합성하는 기술으로써, 저가의 D,L-aspartic acid와 pyruvic acid로부터 D-alanine을 합성하는 반응에 이용하는 경우 다음과 같은 장점을 갖는다. 기질 D-aspartic acid는 아미노기전이반응에 의하여 α-케토산인 oxaloacetate로 된 후, 자발적으로 탈탄산되어 pyruvic acid로 전환되므로 기질 pyruvic acid를 연속첨가하지 않고도 D-alanine을 효율적으로 생산할 수 있는 장점이 있다. 또한 생물전환반응에 기질로 이용되지 않고 잔여하는 L-aspartic acid는 반응산물인 D-alanine과 쉽게 분리 가능하므로 D-alanine과 L-aspartic acid의 동시생산기술로 이용될 수 있는 장점이 있다(Fig. 2).

D-AAT는 미생물 세포벽의 필수적인 구성요소인 D-alanine, D-glutamate의 D-아미노산 생합성기능을 수행하는 효소로서, *Bacillus sphaericus*, *B. licheniformis*, *Staphylococcus haemolyticus* 등의 그림양성 세균에서 주로 발견되어 보고되었다[6, 12]. Tanizawa 등은 sauna dust에서 분리한 고온성 *Bacillus* sp. YM-1으로부터 내열성 D-AAT를 분리정제하여 기질특이성 및 열안정성에 관하여 보고한 바 있다[10, 11].

일반적으로 고온의 환경에 적응하여 증식하는 고온성미

\*Corresponding author

Tel. + 82-42-860-4732, Fax. + 82-42-860-4595

E-mail: smoonhee@mail.kribb.re.kr

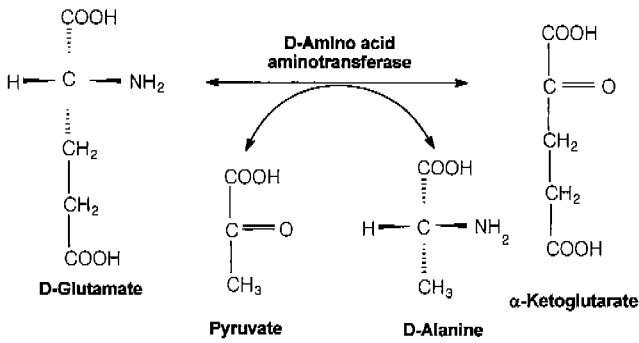


Fig. 1. Reaction scheme of D-amino acid aminotransferase.

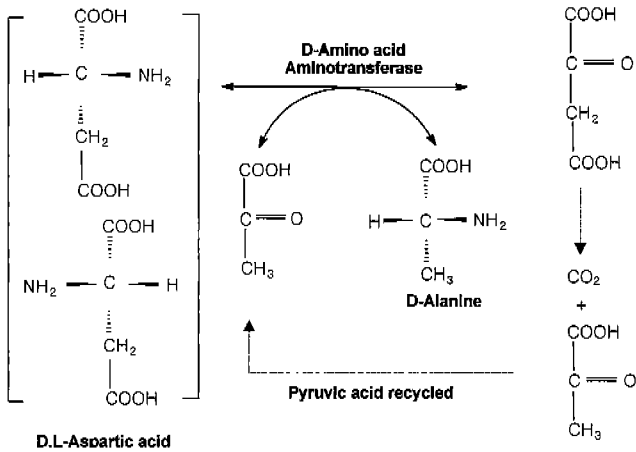


Fig. 2. Production of D-alanine from D,L-aspartic acid by using D-amino acid aminotransferase.

생물은 생육환경인 고온의 극한환경에 적응하기 위하여 열에 안정한 내열성효소를 가지고 있으며, 이러한 내열성효소는 열에 안정한 특징 이외에도 유기용매에 대한 안정성, pH에 대한 안정성 및 화학변성제에 대한 안정성도 보유하고 있는 것으로 보고되고 있다[4]. 따라서 국내의 고온 환경에서 분리된 신규의 고온성미생물로부터 D-AAT 활성을 보유한 신규 고온성미생물의 탐색 분리 연구는 D-AAT를 생물촉매로 이용한 D-아미노산 합성 및 생산 기술 확립을 위해서 필수적으로 수행되어야 한다고 판단된다.

위와 같은 연구목적으로 본 연구에서는 국내 각지의 온천, 토양, 두엄 및 공장폐수 등에서 분리한 1,300여종의 신규 고온성미생물을 대상으로 D-AAT 활성 조사를 수행하여 D-AAT 활성을 보유하는 고온성미생물 110여종을 선별하였다. 선별된 110여종의 D-AAT 활성보유 고온성미생물을 대상으로 D-AAT의 비활성 및 열안정성을 조사하여 최종적으로 4종의 D-AAT 활성보유 고온성미생물을 선별하였고, 선별된 4종의 D-AAT 활성보유 고온성미생물의 생리·생화학적 특성과 배양학적 특성에 관하여 기술하고자 한다.

재료 및 방법

재료

실험에 사용된 각종 D-아미노산과 α-케토산은 Sigma사(MO, USA)로부터 구입하였다. Yeast extract, tryptone 등의 배지 성분은 Difco사(MI, USA)에서 구입하였고, HPLC 분석을 위한 methanol 및 acetonitrile은 Merck사(Germany), 또는 Burdick and Jackson Lab(MI, USA)제품을 사용하였다. 그 밖의 시약들은 Sigma사에서 구입하여 사용하였다.

D-AAT 활성보유 고온성미생물의 탐색

전국 각지의 고온폐수, 온천, 퇴비, 부식토, 하천 등에서 분리한 고온성미생물을 대상으로 D-AAT 활성 보유 고온성미생물을 탐색하였다[11].

먼저 전국 각지에서 탐색 분리한 고온성미생물을 1.5% polypeptone, 0.2% yeast extract, 0.2% meat extract, 0.2% glycerol, 0.2% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.2% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.026% NH<sub>4</sub>Cl, 0.0009% biotin의 조성을 갖는 5 ml MY 액체배지(pH 7.2)에 접종하고, 55 °C에서 8-10시간 배양한 후, 4000 rpm으로 10분간 원심분리하여 균체를 회수하였다. 회수된 균체는 0.1M Tris-HCl(pH 8.5) 완충액에 현탁시킨 후, Branson sonifier 450(Ultrasonics Co. CT)으로 초음파 파쇄하여 조효소액을 제조하고 D-AAT 활성정량을 통하여 D-AAT 활성보유 고온성미생물을 탐색하였다.

D-AAT 활성의 정량

0.1 M Tris-HCl 완충액(pH 8.5) 0.2 ml에 D-AAT 효소반응 기질인 10 mM의 D-alanine과 10 mM의 α-ketoglutaric acid를 넣은 반응액에 배양액 0.1 ml에 해당하는 양의 조효소액을 넣은 후, 55 °C에서 1시간 동안 효소반응을 수행하여 D-AAT 활성을 측정하였다. D-AAT 효소반응에 의하여 생성된 pyruvic acid의 측정은 상기의 효소반응액에 0.2 ml의 60% potassium hydroxide와 0.1 ml의 2% salicylal-dehyde를 가하고, 37 °C에서 30분간 정치하여 발색시킨 후, 물로 2배 희석하여 480 nm에서 흡광도로 측정하였다. 효소활성 1 unit은 1분 동안에 1 μmol의 pyruvic acid를 생성하는 효소의 양으로 정의하였다[1].

균주의 동정

고온성미생물의 형태, 크기 및 운동성은 광학현미경(1,000 ×)과 투사 전자현미경(transmission electron microscope)을 사용하여 관찰하였고, 생육단계에 따른 형태학적 특성변화는 MY 액체배지를 사용하여 55 °C에서 배양하며 광학 현미경으로 관찰하였다. 콜로니의 형태적 특성관찰은 2% agar를 함유한 MY 평판배지에서 수행하였다. 생리·생화학적 특성은 API identification kit(bioMerieux, France)을 이용하여 관찰하였고, respiratory type, amylase 활성, 탄소원 이용성 등의 조사는 YTA 배지(0.5% yeast extract, 1.0% tryptone, 0.5% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)를 사용하여 수행하였다. 그 밖

의 자세한 실험방법과 분리된 미생물의 동정은 *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*(vol. 2)[7]의 방법에 의하여 수행되었다.

D-아미노산의 HPLC 및 TLC 분석

D-AAT반응을 통하여 생성된 반응산물인 D-아미노산의 광학적 특성을 조사하기 위하여  $\mu$ Bondapak C<sub>18</sub> column(Waters, MA)을 장착한 HPLC를 사용하여 반응액을 분석하였다. HPLC 분석 시료는 *o*-phthalaldehyde와 N-acetyl-L-cysteine의 혼합용액으로 전처리 한 후 injection 하였으며 전개용매로는 50 mM sodium acetate 완충액(pH 6.8)과 methanol을 각각 90 : 10(v : v)으로 혼합한 용액을 사용하였다. 유속은 1 ml/min이었고, fluorescence detector(excitation at 342 nm and emission at 452 nm)를 사용하여 detection하였다.

TLC를 이용한 D-AAT 반응산물의 분석은 Chiral TLC plate(Sigma)에 2  $\mu$ l의 반응액을 loading 한 후, butanol/acetic acid/water를 4/1/2의 비율로 포함한 용매를 사용하여 20분 동안 전개한 후, 2% ninhydrin으로 발색시키는 방법을 사용하였다.

결과 및 고찰

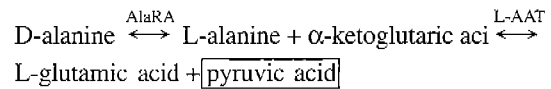
고온성미생물에서의 D-AAT 활성 분포

국내 고온환경으로부터 분리된 1,300종의 고온성미생물로부터 산업적으로 이용 가능한 신규 생물촉매를 분리하기 위하여 D-AAT 활성 탐색연구를 수행하였다.

먼저 D-alanine과  $\alpha$ -ketoglutaric acid를 기질로 이용하여 pyruvic acid를 생성하는 고온성미생물을 선별한 결과, 110여 종의 고온성미생물이 1차 분리되었다. 선별된 고온성미생물들은 폐수, 토양, 개천, 두엄 등의 다양한 고온환경으로부터 얻어졌으며, 현미경 관찰 결과 분리된 고온성미생물의 약 90% 이상이 호기적인 생육조건에서 spore를 생성하는 *Bacillus* 속의 미생물인 것으로 확인되었다.

한편 peptidoglycan의 구성 및 D-아미노산의 합성기작이 *Bacillus*와 다른 고온성 그람음성미생물인 *Thermus* 속의 균주에 대하여 D-AAT활성을 조사한 경우에서도 미량의 pyru-

vic acid가 관찰되었다(Table 1). 그러나 이 pyruvic acid는 반응산물의 HPLC 분석 결과로부터, 다음의 효소작용에 의하여 생성되는 것으로 판단된다. 즉 미생물 세포벽 peptidoglycan의 구성성분인 D-alanine을 생합성하는 효소인 alanine racemase(AlaRA) (EC 5.1.1.1)에 의하여 반응액 중의 D-alanine이 L-alanine으로 라세미화되고, L-alanine이 다시 질소대사계(nitrogen metabolism)의 중요한 효소인 L-alanine amino-transferase(L-AAT, L-alanine:2-oxoglutarate aminotransferase)의 작용에 의하여 pyruvic acid로 되는 것으로 판단된다;



실제로 분리된 고온성미생물과 *Thermus* 균주의 조효소액을 사용하여 반응을 수행한 후, 반응용액 중에 생성된 아미노산을 HPLC로 분석한 결과 국내의 고온환경에서 분리한 대부분의 고온성미생물에서는 D-AAT 효소반응 산물인 D-glutamic acid가 생성되었으나, *Thermus* 속 균주에서는 관찰되지 않았다(Fig. 3).

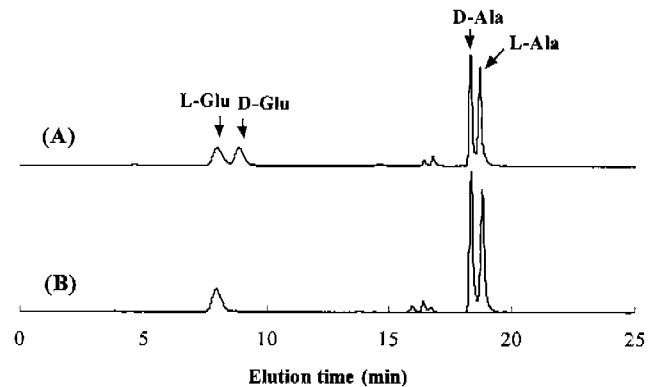


Fig. 3. HPLC analysis of the D-AAT reaction solution of *Bacillus stearothermophilus* KL-01(A) and *Thermus* sp. (KCTC 2654)(B). D-alanine and  $\alpha$ -ketoglutaric acid were used as amino-group donor and amino-group acceptor, respectively.

Table 1. D-AAT activities of thermophilic *Bacillus* strains isolated and *Thermus* strains

Thermophiles	D-AAT activity(U/ml)	Specific activity (U/mg)
<i>Bacillus</i> sp. LK-1 (Strain No. 377)	0.22	0.07
<i>Bacillus</i> sp. LK-2 (Strain No. 417)	0.23	0.08
<i>B. stearothermophilus</i> KL-01 (Strain No. 257)	0.06	0.015
<i>Bacillus</i> sp. KLS-01 (Strain No. 292)	0.04	0.013
<i>Thermus</i> sp. (KCTC 2654)	0.005	0.000
<i>Thermus</i> sp. (KCTC 2655)	0.002	0.000
<i>T. aquaticus</i> (KCTC 2755)	0.01	0.000

고활성 및 내열성 D-AAT 활성보유 고온성미생물의 선별 앞서 분리된 110종의 D-AAT 활성보유 고온성미생물 중에서 높은 D-AAT의 비활성과 다양한 기질에 대하여 효소 활성을 나타내는 균주(고활성 D-AAT 생산 고온성미생물로 명명)를 선별하기 위하여  $\alpha$ -ketoglutarate,  $\alpha$ -ketoisovalerate,  $\alpha$ -ketonorvalerate, phenylpyruvate 등의  $\alpha$ -keto acids를 D-AAT 효소반응의 amino acceptor로 사용하여 D-glutamate, D-valine, D-norvaline, D-phenylalanine을 합성하는 활성 비교 연구를 수행하였다. 합성된 D-아미노산을 TLC 법으로 분석한 결과, 다른 균주에 비하여 높은 D-AAT 활성(D-alanine과  $\alpha$ -ketoglutarate을 기질로 하는 활성 정량조건에서 비활성이 약 0.07 units/mg 이상)을 나타내고, 다양한  $\alpha$ -케토산으로부터 각종의 D-아미노산을 합성하는 기질특이성이 넓은 2종의 D-AAT 활성보유 고온성미생물 Strain No. 377과 417을 탐색하여 미생물의 동정 및 분류학적 특성 연구를 수행하였다(Table 1).

또한 고온에서의 생물전환 반응에 적합한 내열성 D-AAT의 탐색을 위하여 110종의 D-AAT 활성보유 미생물들을 70°C에서 배양하여 24시간 이내에 미생물의 생장이 관찰

된 20종을 선별하였다. 선별된 균주들을 다시 MY배지에 접종하고 60°C에서 8-10시간 배양한 후, D-AAT활성을 반복 측정함으로써 열안정성이 높은 D-AAT 생산 고온성미생물 Strain No. 257과 292를 탐색하여 내열성 D-AAT 생산 고온성미생물 균주로 명명하고 다음과 같은 분류학적 연구를 수행하였다(Table 1).

D-AAT 생산 고온성미생물의 동정 및 분류학적 특성 연구 고활성 D-AAT 생산 고온성미생물인 Strain No. 377과 417은 30°C 이상 60°C 이하의 호기적인 조건에서 생육하는 그람양성의 간균이었다. 두 고온성미생물은 65°C 이상의 고온에서는 전혀 생육하지 못하는 중등도 고온성미생물(moderate thermophile)로 판단되었으며, 액체배지에서 장시간 배양하는 경우 구형의 내생포자를 형성하는 특징이 있는 *Bacillus sphaericus*[7]와 유사한 고온성 *Bacillus*로 판단되었다. 또한 포도당을 비롯한 단당류를 전혀 탄소원으로 이용하지 못하여 생리적 특성에 있어서도 *Bacillus sphaericus*와 매우 유사하였다[7]. 이러한 고활성 D-AAT 생산 고온성미생물 strain No. 377과 417은 각각 *Bacillus* sp.

Table 2. Taxonomic properties of isolated thermophilic *Bacillus* strains

Property	<i>B. sphaericus</i>	<i>B. stearothermophilus</i>	LK-1	LK-2	KL-01	KLS-01
Cell shape	small rod	small rod	small rod	small rod	small rod	small rod
width>1.0 $\mu$ m	-	-	-	-	-	-
chains	-	-	-	W	-	+
Spore						
ellipsoidal	-	+	-	-	+	+
round	+	-	+	+	-	-
central or paracentral	-	V	-	-	-	-
subterminal or terminal	+	V	+	+	+	+
swelling the sporangium	+	+	+	+	+	+
Growth temperature (°C)	5-45	30-70	30-60	30-60	30-70	40-75
Motility	+	V	+	W	W	W
Gram staining	v	+	+	+	+	V
Catalase	+	+	+	+	+	+
Oxidase	-	+	+	+	+	+
V-P reaction	-	-	-	-	-	-
pH in V-P broth <6	-	+	-	-	+	+
>7	+	-	+	+	-	-
NO <sub>3</sub> to NO <sub>2</sub>	-	V	-	-	-	-
Hydrolysis of casein	-	V	-	-	W	W
gelatin	-	+	-	-	+	+
starch	-	+	-	-	W	W
Growth in pH 5.7	-	V	-	-	-	W
0.02% azide	-	-	-	-	-	-
7% NaCl	-	-	-	-	-	-
Anaerobic growth	-	-	-	-	-	-
Acid from glucose	-	+	-	-	+	-
xylose	-	V	-	-	-	-
mannitol	-	V	-	-	-	-
Gas from glucose	-	-	-	-	-	-
Growth without shaking	-	disperse	-	-	disperse	flocculent sediment

+: positive - : negative w: weakly positive v: variable

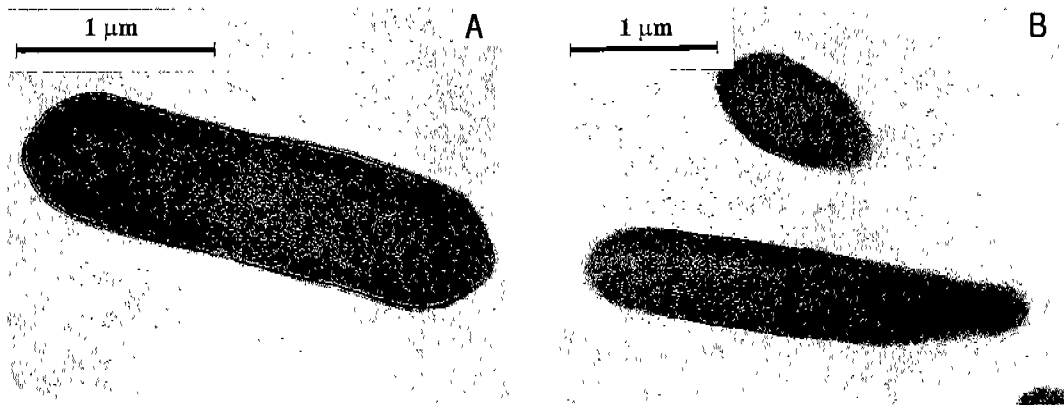


Fig. 4. Transmission electron micrograph (TEM) of *B. stearotherophilus* KL-01 (A) and *Bacillus* sp. KLS-01 (B). The thermophiles were cultivated at 60 °C for 8 hours before the microscopic observation (magnification fold; A, 45,000×; B, 33,000×).

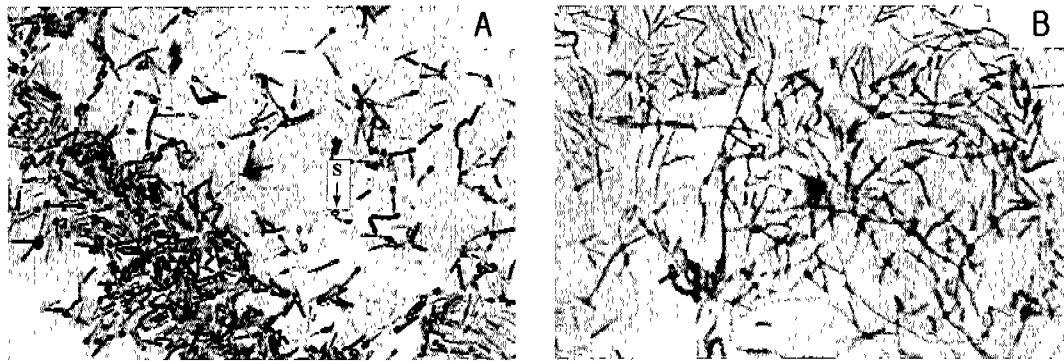


Fig. 5. Microscopic observation of *B. stearotherophilus* KL-01 (A) and *Bacillus* sp. KLS-01 (B). The thermophiles were cultivated at 60 °C for 27 hours and stained with crystal violet before the microscopic observation (magnification fold: 1,000×). S: Spore.

LK-1, *Bacillus* sp. LK-2로 명명하였다(Table 2). 그리고 고활성 D-AAT 생산균주 *Bacillus* sp. LK-1과 *Bacillus* sp. LK-2는 미생물의 크기, 저온에서의 생육특성 등에 있어서는 서로 다른 특징을 나타내었다. *Bacillus* sp. LK-2는 *Bacillus* sp. LK-1에 비하여 상대적으로 길게 성장하여 3-5개의 cell이 연결된 사슬모양(chain)으로 자라는 특성이 있었고, 저온(30 °C)에서 배양시 *Bacillus* sp. LK-1이 수시간 후에 자라는데 비하여 *Bacillus* sp. LK-2는 약 48시간 이후에 생육이 관찰되었다. 또한 nutrient broth에서 배양한 *Bacillus* sp. LK-2는 *Bacillus* sp. LK-1보다 D-AAT 효소비활성에 있어서 4-5배 정도 높게 나타났다.

내열성 D-AAT생산 고온성미생물 Strain No. 257과 292는 투사전자현미경(transmission electron microscope)으로 균체의 모양 및 세포벽 구조를 관찰한 결과 그람양성의 간균으로 판명되었으며(Fig. 4), 70 °C 이상의 고온에서도 생육이 가능하였다. 고온성미생물 Strain No. 257은 한천평판배지에서 배양하였을 때, 반투명한 크림색 콜로니를 형성하였고, 액체배지 또는 한천평판배지에서 장기 배양할 경우, 균체의 끝부분(terminal)에서 sporangium을 swelling 시

키는 티원형의 내생포자를 형성하는 전형적인 *Bacillus stearotherophilus*의 형태적 및 생리적 특성을 나타내었다(Fig. 5A)[4]. 상세한 생리적 및 생화학적 동정결과는 Table 2에 나타낸 바와 같으며 *Bacillus stearotherophilus* KL-01로 명명하였다.

그리고 고온성미생물 Strain No. 292는 한천평판배지에서 독립된 콜로니를 형성하지 않고 넓게 펼쳐지는(swarming) 특징적인 미생물 집락을 형성하였다. MY액체배지에서 배양한 후, 광학현미경으로 관찰한 경우에는 긴 사슬(chain)형의 균체로 존재하였으며(Fig. 5B), 정지상태로 액체배양하는 조건에서는 배양액 중에 균질(homogeneous)하게 확산되지 않고 pellicle 상태로 부유하는 형태의 미생물 생장이 관찰되었다. 또한 MY 액체배지에서 57시간까지 장기 배양한 경우에도 내생포자는 전혀 관찰되지 않았으며, 대부분의 미생물 균체가 용균(lysis)되는 특징을 나타내었다. 이 고온성미생물은 MY 한천평판배지에서 오랫동안 배양한 경우에서도 내생포자가 관찰되지 않았으나, 2가의 당간이온을 다량 함유하는 nutrient 한천평판배지에서는 균체의 말단(terminal)에서 sporangium을 크게 swelling 시키는

타원형의 내생포자가 관찰되었다. Strain No. 292의 상세한 생리·생화학적 특성 조사 결과는 Table 2에 나타냈으며, 본 분리균은 *Bacillus* sp. KLS-01로 명명하였다.

D-AAT 생산 고온성미생물의 배양 및 D-AAT 활성변화 내열성 D-AAT생산 고온성미생물 *B. stearothermophilus* KL-01과 *Bacillus* sp. KLS-01을 각각 MY 액체배지에 접종하고 60 °C에서 호기적으로 진탕배양하면서 고온성미생물생육과 D-AAT 효소활성변화의 연관관계를 조사하였다. 그 결과 *B. stearothermophilus* KL-01에서는 D-AAT 활성이 미생물 성장속도와 매우 밀접하게 연관되어 있어서 지수증식기(exponential growth phase)에 최대의 D-AAT 활성(0.022 units/mg protein)을 나타내었고(Fig. 6A), *Bacillus* sp. KLS-01의 경우에는 D-AAT 활성이 균체 증식량에 비례하여 미생물의 생장이 정지기(stationary phase)에 이르렀을 때 최대의 D-AAT 활성을(0.014 units/mg protein)을 나타내었

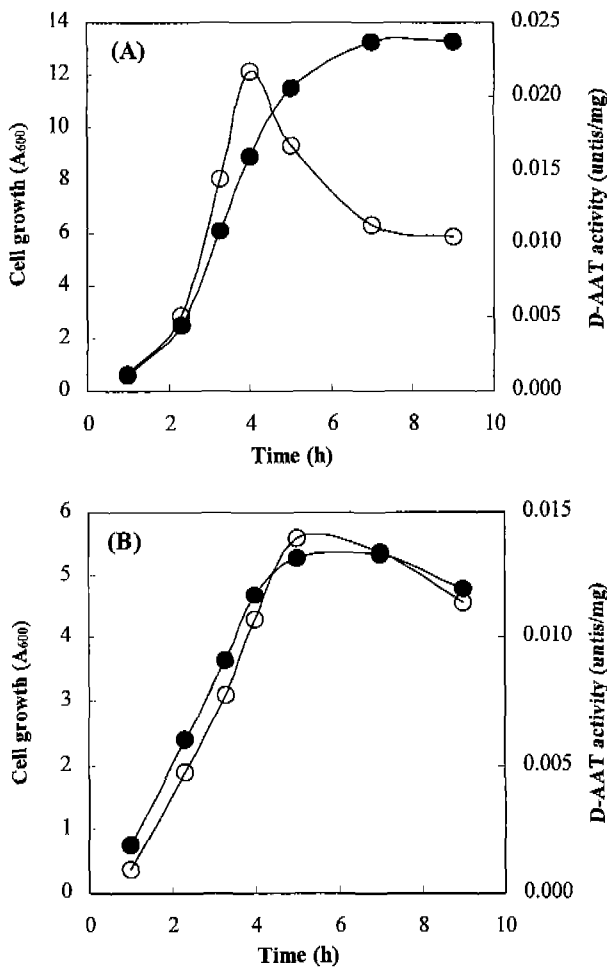


Fig. 6. Change of D-AAT activity during the growth of *Bacillus stearothermophilus* KL-01(A) and *Bacillus* sp. KLS-01 (B). The thermophiles were cultivated at 60 °C in MY medium. Symbols: ●, cell growth; ○, D-AAT activity.

다(Fig. 6B).

이러한 결과로부터 D-AAT는 미생물 세포벽 peptidoglycan의 주요 구성성분인 D-아미노산 합성에 관여하는 필수적인 효소로 미생물의 생육에 중요한 역할을 수행하고 있다고 판단된다.

## 요 약

국내의 고온폐수, 온천, 퇴비, 부식토, 하천 등 고온환경에서 분리한 1,300여종의 고온성 미생물을 대상으로 D-AAT 활성을 조사한 결과, 110여종의 고온성미생물에서 D-AAT 효소활성이 관찰되었고, 이중 90% 이상은 고온성 *Bacillus* 로 판단되었다. 이것은 D-AAT가 주로 고온성 *Bacillus* 속 에 폭넓게 분포되어 있음을 보여주고 있다.

탐색 분리된 D-AAT 생산균주의 효소활성 및 기질특이성을 비교하여 고활성 D-AAT 생산균주 2종과, 열안정성이 높은 내열성 D-AAT 생산균주 2종을 선별하였다. 선별된 고활성 D-AAT 생산균주(*Bacillus* sp. LK-1, LK-2)는 원형의 내생포자를 형성하고 포도당을 탄소원으로 이용하지 못하여 *Bacillus sphaericus*와 매우 유사한 분류학적 성질을 나타내었다. 그리고 내열성 D-AAT 생산균주 *Bacillus* sp. KLS-01은 일반적인 *Bacillus* 속의 미생물에서는 관찰되지 않는 독특한 분류학적 성질을 갖는 신규 고온성미생물인 것으로 판단되어, D-AAT 뿐만 아니라 다양한 내열성 효소의 탐색·분리원으로써 활용 가치가 있을 것으로 기대된다.

## 감사의 글

본 연구는 1997년도 과학기술처의 선도기술개발과제 연구비 지원에 의해 이루어졌으며, 지원에 감사드립니다.

## REFERENCES

- Berntsson, S. 1955. Spectrometric determination of pyruvic acid by the salicylaldehyde method. *Anal. Biochem.* 27: 1659-1660.
- Caparros, M., A. G. Pisabarro, and M. A. de Pedro. 1992. Effect of D-amino acids on structure and synthesis of peptidoglycan in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 174: 5549-5559.
- Galkin A., L. Kulakova, T. Yoshimura, K. Soda, and N. Esaki. 1997. Synthesis of optically active amino acids from alpha-keto acids with *Escherichia coli* cells expressing heterologous genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4651-4656.
- Kristjansson, J. K. 1992. Thermophilic bacteria, pp. 1-18. In J. K. Kristjansson (ed.), *Thermophilic Bacteria*. CRC Press, London.
- Nakajima, N., K. Tanizawa, H. Tanaka, and K. Soda.

1988. Enantioselective synthesis of various D-amino acids by a multi-enzyme system. *J. Biotechnol.* **8**: 243–248.
6. Pucci, M. J., J. A. Thanassi, H. T. Ho, P. I. Falk, and T. I. Dougherty. 1995. *Staphylococcus haemolyticus* contains two D-glutamic acid biosynthetic activities, a glutamate racemase and a D-amino acid transaminase. *J. Bacteriol.* **177**: 336–342.
7. Sneath, P. H. A. 1986. Endospore-forming Gram-positive rods and cocci, pp. 1104–1139. In P.H.A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, and J. G. Holt (eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2. Williams and Wilkins, Baltimore.
8. Takahashi, S. 1983. Microbial synthesis of D-amino acids from DL-5-substituted hydantoins. *Hakkokogaku* **61**: 139–151.
9. Takahashi, S., T. Ohashi, Y. Kii, H. Kumagai, and H. Yamada. 1979. Microbial transformation of hydantoins to N-carbamoyl-D-amino acids. *J. Ferment. Technol.* **57**: 328–332.
10. Tanizawa, K., S. Asano, Y. Masu, S. Kuramitsu, H. Kagamiyama, H. Tanaka, and K. Soda. 1989. The primary structure of thermostable D-amino acid aminotransferase from a thermophilic *Bacillus* species and its correlation with L-amino acid aminotransferases. *J. Biol. Chem.* **264**: 2450–2454.
11. Tanizawa, K., Y. Masu, S. Asano, H. Tanaka, and K. Soda. 1989. Thermostable D-amino acid aminotransferase from a thermophilic *Bacillus* species. Purification, characterization, and active site sequence determination. *J. Biol. Chem.* **264**: 2445–2449.
12. Taylor, P. P. and I. G. Fotheringham. 1997. Nucleotide sequence of the *Bacillus licheniformis* ATCC 10716 *dat* gene and comparison of the predicted amino acid sequence with those of other bacterial species. *Biochim. Biophys. Acta* **1350**: 38–40.
13. Yagasaki M., K. Iwata, S. Ishino, M. Azuma, and A. Ozaki. 1995. Cloning, purification, and properties of a cofactor-independent glutamate racemase from *Lactobacillus brevis* ATCC 8287. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **59**: 610–614.
14. Yagasaki, M. and A. Ozaki. 1998. Industrial biotransformations for the production of D-amino acids. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic.* **4**: 1–11.

(Received January 25, 1999)