

세포외 덱스트란 분해효소를 생산하는 *Flavobacterium multivorum*의 분리

정재호·이형환¹·김영희*·이희무**

건국대학교 생물학과, * 동의 공업전문대학 식품가공학과

**안동대학교 생물학과

Isolation of *Flavobacterium multivorum* Producing Exo-dextranase

Chung, J.H., H.H. Lee¹, Y.H. Kim*, and H.M. Lee**

Department of Biology, Kon Kuk University, Seoul 133,

*Technical College of Dong Eui, and **Andong University

ABSTRACT: One hundred and seventeen colonies were screened for the detection of the production of exodextranase on the dextran-mineral salts medium. Ten colonies out of them produced the dextranase. *Flavobacterium multivorum* greatly producing the enzyme was isolated from soil, identified and then studied for various biochemical characteristics. The activity of the dextranase in the cultured medium was high between pH 8 and 9 at 35°C, and between 45°C and 55°C at pH 8. By the growth curves the generation times of the bacterium were approximately 52 minutes in the LB broth, 38 minutes in the LB plus 1% dextran and 660 minutes in the dextran-salts. The strain did not have any plasmid, and was susceptible to gentamicin, cotrimoxazole and cefoperazone, and moderately susceptible to chloramphenicol, cefamandole and cefotaxime, but resistant to ampicillin, cephalothin, tetracycline, amikacin and tobramycin.

KEY WORDS □ *Flavobacterium multivorum*, Exodextranase

덱스트란은 주로 α -1, 6-glycoside 결합으로 이루어진 포도당의 중합체이며 덱스트란을 분해하는 효소인 덱스트란 분해효소(dextranase)는 덱스트란을 적당한 분자량으로 잘라주는 역할을 한다(Whiteside와 Carlson, 1952; Janson과 Porach, 1966; Yamaguchi와 Gocho, 1973).

덱스트란 분해효소의 분비는 여러 종류의 미생물에서 다양하게 관찰되고 있으며, 또한 분비되는 효소의 특성도 제각기 달라서 *Lactobacillus bifidus*가 생산하는 덱스트란 분해효소의 경우 덱스트란을 이소말토트리오스, 이소말토테트로오스,

이소말토펜타오스 등의 올리고당까지로만 분해하며, *Bacillus subtilis*와 *Bacillus megaterium*은 분해산물로 포도당만을 생성하기도 한다(Zevenhuizen, 1968). 그리고 *Brevibacterium*의 덱스트란 분해효소는 알칼리 쪽에서 더 안정하며(Yamaguchi와 Gocho, 1973), *Flavobacterium*의 덱스트란 분해효소는 덱스트란을 α -1, 2 위치에서 절단시킨다는 보고가 있다(Mitsuishi 등, 1979).

한편 Walker 등(1981)은 사람의 충치에 존재하는 세균의 33% 이상이 덱스트란 내의 α -(1→6)

¹: Corresponding author

-D-glycoside 결합을 가수분해시켜 D-glucose를 생성시키는 exodextranase(E. C. 3.2.1. 70)와 덱스트란으로 부터 올리고당류를 생성시키는 endodextranase(E. C. 3.2.1. 11)를 분리한다고 밝혔다.

Takamori 등(1976)은 사람의 구강으로부터 덱스트란 분해효소를 분리하는 *Bacteriodes oralis*를 분리해내었고, Yamaguchi와 Gocho(1973) 그리고 Mitsuishi 등(1979)은 토양으로 부터 덱스트란 분해효소를 분리하는 균을 분리하였다.

또한 덱스트란 분해효소를 이용하기 위한 여러 가지 실험보고도 발표되었는데 Whiteside-Carlson 등(1952)은 혈액 증량제의 합성에서 덱스트란을 적당한 분자량으로 절단하는데 덱스트란 분해효소를 사용했으며, Fitzgerald 등(1968a, b)은 햄스타의 충치억제 효과를 조사했다. Konig 등(1968)은 충치에 대한 덱스트란 분해효소의 생체외 효과를 조사했으며, Keyes(1970) 및 Caldwell 등(1971)은 덱스트란 분해효소로 구강을 세척하였을 때 충치를 예방하는 효과가 있다고 하였다. 또한 충치예방을 위한 백신의 개발이 Bowen(1969)에 의해 이루어지기도 하였다.

이상과 같은 보고 등을 통하여 덱스트란 분해효소는 수액, 혈액 증량제, 그리고 충치예방 등의 가치가 확인되었으므로 그 목적을 위하여 유용한 제품을 개발코자 세포의 덱스트란 분해효소를 생산하는 균을 분리하여 이 효소의 특성과 효율성을 조사하였다.

실험재료 및 방법

세포의 덱스트란 분해효소 생산균의 분리 및 동정

세포의 덱스트란 분해효소를 생산하는 균을 분리하기 위한 최소배지, 즉 dextran-mineral salt (DMS)배지(dextran 1%, NaNO_3 0.2%, NH_4NO_3 0.07%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01%, K_2HPO_4 0.2%, KH_2PO_4 0.1%, Yeast extract 0.01%, pH 8.0) 20ml에 1g의 토양을 첨가시키고 30°C에서 180rpm으로 72시간 회전배양(Environ shaker 3579) 한 후 배양액 일부를 20ml의 새로운 분리배지에 접종시켜 똑같은 조건하에서 배양시키는

직접 배양과정을 두번 더 시행하였다. 세포의 덱스트란 분해효소를 약칭하여 덱스트란 분해효소라고 이후에는 기재하였다.

그런 후 1.5% agar를 함유하는 DMS 평판배지에 배양액을 도말한 후 30°C 항온기에서 3일간 배양시킨 다음 배지표면이 덮히도록 에탄올을 가했을 때 콜로니 주위에 투명한 환이 생긴 균주를 덱스트란 분해효소 생산균으로 선택하였다(Yamaguchi와 Gocho 1973; Matsuda, 1976). 선택된 균을 DMS 배지에서 150rpm으로 72시간 동안 30°C에서 회전배양한 후 배양액을 4°C에서 $18,000 \times g$ 으로 10분간 원심분리(Centrifuge H 401)하여 얻은 상층액에 동량의 에탄올을 가했을 때 침전물이 생기지 않은 경우 이를 덱스트란 분해효소 생산균으로 인정하였다(Richards와 Streamer 1972).

한편 실험에 사용한 덱스트란(Sigma Co.)은 분자량이 79,000 달톤이었다.

증식곡선

토양에서 분리해 낸 덱스트란 분해효소 생산균의 증식특성을 알아보기 위해 3종류의 배지에서 측정하였다. 즉 ① LB배지 ② 덱스트란 1%가 첨가된 LB배지(DLB) 그리고 ③ 덱스트란 분해효소 생산균 분리배지인 DMS 배지로 균의 증식곡선을 측정하였다.

먼저 위의 세 배지 각각 20ml에 덱스트란 분해효소 생산균을 접종하여 30°C에서 150rpm으로 18시간 회전배양시키고, 전배양액을 1:50의 비율로 각각의 배지 100ml에 접종하여 30°C에서 150rpm으로 진탕배양 하였다. 성장은 점종 즉시부터 일정 시간마다 파장 600nm에서 분광광도계(Shimadzu uv-120-02)로 측정하여 그래프를 그리고, 세대시간(generation time)은 Stanier 등(1986)의 방법을 이용하여 산출했다.

덱스트란 분해효소 활성도 측정 및 특성조사

효소액을 얻기 위해 덱스트란 분해효소 생산균을 덱스트란 분해효소 분리배지에 접종하여 30°C에서 150rpm으로 3일간 진탕배양 후 4°C에서 $18,000 \times g$ 로 10분간 원심분리하여 얻은 상층액을 덱스트란 분해효소액으로 이용하였다.

그리고 덱스트란 분해효소의 활성도는 Mitsuishi 등(1979)과 Fukumoto 등(1971)이 사용한 방법

을 참고로 하여 측정하였으며 환원당은 Somogyi (1945)법으로 측정하였다.

1) pH에 따른 덱스트란 분해효소 활성도 측정
pH 변화에 따른 덱스트란 분해효소 활성도를 측정하기 위해 0.05 M의 pH별 완충액을 조성하여 사용하였다.

즉, pH 4와 5는 acetate 완충액, pH 6과 7은 인산염 완충액, pH 8은 Tris-Cl 완충액 그리고 pH 9와 10은 Carbonate 완충액을 사용하였다.

0.05 M의 pH별 완충용액에 덱스트란의 최종 농도가 2.5%가 되도록 첨가후, 이들 기질용액에 5 ml의 효소액을 가하여, 35°C에서 30분 반응시킨 다음 증류수 10 ml과 Somogyi의 A용액(Roschell염 180g과 $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 450g을 증류수 1l에 녹이고 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 60g과 KIO_3 7g을 증류수 200 ml에 녹여 전체를 2l로 조정했다) 10 ml을 가하고 3분간 끓인 후에 다시 이 용액을 실온에서 식혔다. 다음에 B용액($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 180g과 KI 80g을 증류수에 녹여 2l로 조정했다)과 C용액(H_2SO_4 112 ml을 증류수로 2l가 되게 했다)을 각각 10 ml씩 넣은 다음 D용액(무수 Na_2CO_3 0.6g과 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 26g을 증류수에 녹여 2l가 되게 했다)으로 적정하였는데 종말점은 청녹색이 생기는 점으로 하며, 지시약으로는 1% 전분시액을 사용하였다.

2) 온도에 따른 덱스트란 분해효소 활성도 측정
Tris-Cl 완충용액(pH 8.0) 5 ml에 2.5% 농도가 되도록 덱스트란을 녹인 후 5 ml의 효소액을 가하고 25°C에서 55°C까지 5°C 간격으로 30분 동안 반응시킨 다음 Somogyi(1945)법에 따라 유리 환원당을 측정하였다.

항생제 내성검사

덱스트란 분해효소 생산균의 항생제 내성검사는 Bauer 등(1966)의 방법을 사용하였다.

표준 균주로서 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923과 *Escherichia coli* ATCC 25922를 사용하였다.

분리균의 생화학적 특성

분리한 균의 생화학적 동정(Table 1)은 Cowan과 Steel(1974)의 방법을 이용하여 실시하였다.

Plasmid의 분리

분리균에서 Plasmid의 분리는 Lee 등(1984)의

Table 1. The biochemical characteristics of *Flavobacterium multivorum*

Characteristics	Reactions
Acid production from rhamnose, xylose, glucose and lactose	+
Urease, catalase, oxidase productions	+
Esculin hydrolysis	+
Acid production from mannitol	-
Productions of arginine dihydrolyase, lysine decarboxylase, ornithine decarboxylase, acetamide, gelatinase, and indole	-
Growth at 42°C	-
Motility	-
Citrate utilization	-
Nitrate reduction	-
Production of gas, H_2S and alkali on TSI medium	-

(-): negative reaction, (+): positive reaction.

방법에 따라서 실시하였다.

결과 및 고찰

덱스트란 분해효소 생산균의 분리 및 동정

덱스트란 분해효소 생산균 분리배지에서 성장한 117개의 균중에서 덱스트란 분해효소를 분비하는 균은 10균주 이었고, 그 중에서 덱스트란 분해능이 가장 높은 균을 선별하여 동정한 결과 *Flavobacterium multivorum*으로 동정되었다. 이 균은 그람음성 균이었고, 모양은 막대상 균이며, 양 말단이 둥근 모양으로 현미경하에서 관찰되었다.

상기균이 성장한 분리평판 배지에 에탄올을 가했을 때 콜로니 주위에 투명한 환이 형성되었고 또한, 배양액을 원심분리하여 얻은 효소액에 동량의 에탄올을 가했을 때에도 침전물이 형성되지 않았다(Fig. 1).

*F. multivorum*의 생화학적 특성은 Table 1과 같다. rhamnose와 xylose 발효시에 산을 생성한 반면, mannitol로 부터는 산을 생성하지 않았다. Macconkey agar에서는 성장하였다. 42°C에서는 자라지 못했다. urease, catalase와 oxidase를 생

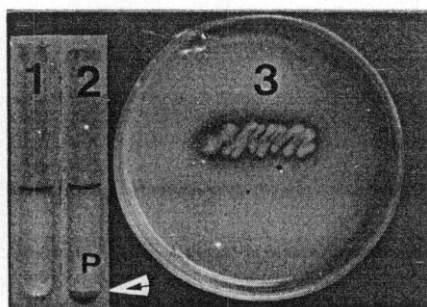


Fig. 1. Activities of dextranase produced by *Flavobacterium multivorum* on dextran agar plate by ethanol flooding and ethanol precipitation tests of the cultured-media.

Tube 1: Clear dextran-salts medium grown by *F. multivorum* which was treated with ethanol. The dextran was exhausted by the bacteria, therefore there is no dextran precipitate.

Tube 2: Normal dextran-salts medium not inoculated with the bacteria. Therefore there is dextran precipitate (P).

Plate 3: Clear zone formed by the ethanol flooding after growth of the bacteria on the dextran-salts medium. Dextran in the medium was exhausted by the bacteria.

산하였다. arginine dihydrolase, lysine decarboxylase, 그리고 ornithine decarboxylase 생산 시험에서는 모두 음성이었다. esculine을 가수분해했다. 운동성이 없었다. DNase와 acetamide를 생산하지 않았으나 gelatin을 액화했다.

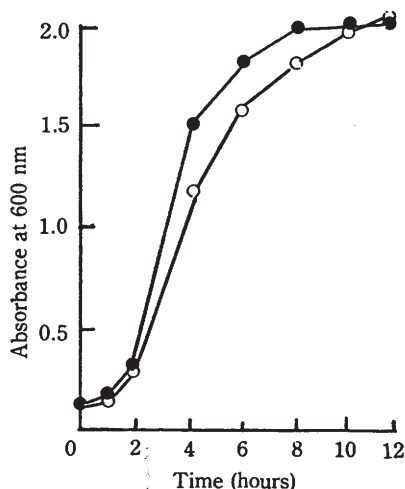


Fig. 2. Growth patterns of *Flavobacterium multivorum* in LB broth and LB-1% dextran broth at 30°C (—●—): LB-1% dextran broth culture, and (---○---): LB broth culture.

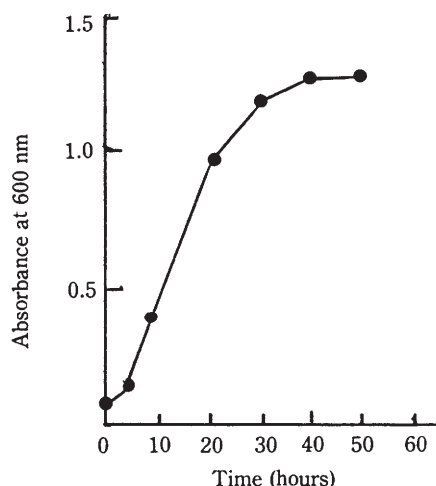


Fig. 3. Growth pattern of *Flavobacterium multivorum* in dextran-mineral salts medium at 30°C.

The dextran salts medium was composed of dextran 1%, NaNO_3 0.2%, NH_4NO_3 0.07%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01%, K_2HPO_4 0.2%, KH_2PO_4 0.1% and Yeast extract 0.01%, pH8.

TSI agar 배지에서 산을 생성하였으나 알칼리, H_2S , gas 생산은 하지 않았다. 또한 indole 생산 반응과 citrate 이용과 nitrate 환원은 모두 음성으로 나타났다. 이 특성은 Krieg와 Holt(1984)에 있는 *F. multivorum*의 특성과 일치하였다.

생장곡선

LB배지와 DLB배지 그리고 DMS 배지에서의 생장곡선은 Fig.2와 3에 제시되었다. LB배지와 덱스트란이 1% 함유된 DLB 배지에서는 접종한 후 90분 후 부터 대수기에 들어갔고, 7~8시간 후에는 정지기에 도달하였으며 LB배지에 비해 생장이 느렸다. LB배지에서는 세대 시간이 52분이었고, 덱스트란이 함유된 DLB 배지에서는 38분, 그리고 덱스트란 최소 DMS 배지에서는 660분이었다(Fig.2와 3).

덱스트란 분해효소의 활성도와 특성

1) pH의 영향

덱스트란 분해효소의 활성에 대한 pH의 영향을 알아보기 위해 기질용액의 pH를 4~10으로 조정하여 35°C에서 30분 반응시킨 결과는 pH4~10 범위에서 거의 비슷하게 안정하였으며, pH8과 9인 알칼리 쪽에서 약간 높은 분해능을 나타냈다(Table 2).

사람의 타액과 치약의 기본 구성 물질이 알칼리

Table 2. Effects of pH on the exodextranase activity from *F. multivorum*

pH	Residual sugar(%)
4	35.8
5	34.6
6	33.3
7	33.3
8	32.1
9	32.1
10	33.3

성에 가깝다는 보고(Yamaguchi와 Gocho 1973)를 감안해 보면 이 효소의 실질적인 응용 가능성이 있음을 알 수 있다.

2) 온도의 영향

덱스트란 분해효소의 활성에 대한 온도의 영향을 알아보기 위해 기질 용액의 pH를 8.0으로 조정하여 25°C에서부터 55°C까지 30분간 반응시킨 결과는 Table 3에 제시되었다. 덱스트란 잔당의 변화는 30°C~40°C 사이는 36.9~38.8%로 비교적 높았으나, 45°C~55°C에서는 잔당의 4~5% 정도가 낮았다. 45°C~55°C 사이에서 약간 높은 활성을 나타냄을 알 수 있었다.

분리균의 항생제 내성 검사

*F. multivorum*의 항생물질에 대한 내성을 검사한 결과는 Table 4에 있다. 이 균은 ampicillin, cephalothin, tetracycline, amikacin, tobramycin에는 내성이었으며 chloramphenicol, cefamandole, cefotaxime에는 중간 감수성 이었고, gentamicin, cotrimoxazole, cefoperazone에는 감수성을 나타냈다.

분리균에서 플라스미드 분리

F. multivorum 세포내의 플라스미드 존재 여부를 조사한 결과 이 균의 세포내에서는 플라스

Table 3. Effect of temperature on the dextranase activity from *F. multivorum*

Temperature(°C)	Residual sugar(%)
25	36.1
30	37.6
35	38.8
40	36.9
45	33.9
50	35.1
55	33.9

Table 4. Antibiotics resistance of *Flavobacterium multivorum*

Antibiotics	Reactions
ampicillin, cephalothin, amikacin, tetracycline, tobramycin.	Resistant
chloramphenicol, cefamandole, cefotaxime.	Moderately susceptible
gentamicin, cotrimoxazole, cefoperazone.	Susceptible

미드가 검출되지 않았다. 이 결과에 따르면 염색체 DNA에 덱스트란 분해효소 유전자가 존재하는 것 같다.

본 연구에서는 세포의 덱스트란 분해효소를 생산하는 균주를 분리하는 것이 일차 목표였으며 토양에서 상기효소를 분비하는 균주를 분리하여 동정한 것이 *F. multivorum* 균주였다. *F. multivorum* 분리균주가 성장하면서 배지에 분비한 세포의 덱스트란 분해효소의 특성을 조사하였다. 이 효소의 보다 더 정확한 특성은 순수분리를 하여 좀 더 연구하는 것이 필요하다. 이 효소의 응용성이 높아서 현재 이 효소 유전자의 클로닝을 연구하고 있다.

적 요

덱스트란 분해효소를 분비하는 균을 조사한 결과 117개의 콜로니중에 10개의 덱스트란 분해효소 생산균을 분리하였으며 그 중에서 이 효소의 생산능이 가장 높은 균을 선택하여 동정한 결과 *Flavobacterium multivorum*로 나타났다. 이 균주의 성장과 특성 그리고 항생물질에 대한 내성을 검사하였고 또한 이 균이 배지에 분비한 세포의 덱스트란 분해효소의 일반적 특성을 조사하였다.

*F. multivorum*균은 rhamnose, xylose, glucose와 lactose 분해에서 산을 생산하였고, 또한 urease, catalase와 oxidase

를 생산하는 특징을 나타냈다. 또한 이 균의 세대 시간은 LB배지에서는 52분, LB-1% 덱스트란 배지에서는 38분이었고, 덱스트란이 함유한 최소배지에서는 660분이었다. 배지에 함유된 덱스트란 분해효소의 활성은 35°C에서 반응했을 때 pH8과 9 사이에서 그리고 pH8인 반응액에서는 45°C와 55°C 사이에서 비교적 높았다. 항생물질인 ampicillin, cephalothin, tetracycline, amikacin과 tobramycin에는 내성을, chloramphenicol, cefamandole과 cefotaxime에는 중간 감수성을 그리고 gentamicin, cotrimozaloe와 cefoperazone에는 감수성을 나타냈다. 이 균주에서는 플라스미드가 추출되지 않았다.

REFERENCES

- Bauer, A.W., W.M.M. Kirby, J.C. Sherris, and M. Turck, 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *Amer. J. Clinic. Pathol.*, **45**, 493-496.
- Bowen, W.H. 1969. A vaccine against dental caries. *British Dental J.*, **18**, 159-160.
- Caldwell, R.C., H.J. Sandham, W.V. Finn, and A.J. Formicola, 1971. The effect of dextranase mouth wash on dental plaque in young adult and children. *J. Amer. Dent. Ass.* **82**, 124-131.
- Cowan, S.T., and K.J. Steel, 1974. Manual for the identification of medical bacteria. p103-116, 2nd ed., Cambridge University Press.
- Fitzgerald, R.J., D.M. Spinnel, and T.H. Stoudt, 1968a. Enzymatic removal of plaque. *Arch. Oral. Biol.*, **13**, 125-128.
- Fitzgerald, R.J., P.H. Keys. T.H. Stoudt, and D.M. Spinnel. 1968b. The effect of a dextranase preparation on plaque and caries in hamsters, a preliminary reports. *J. Amer. Dent. Ass.*, **76**, 301-329.
- 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.
- Janson, J.C., and J. Porach, 1966. A bacterial dextranases. *Methods in Enzymology* **8**, 615-621.
- Keyes, P.H., M.A. Hicks, R.J. Fitzgerald, and B.M. Goldman, 1970. Dispersion of dextranous bacterial plaques with dextranase mouth wash. G.M. IADR. Abstract No. 624, 48.
- König, K.G., and B. Guggenheim, 1968. *In vivo* effects of dextranase on plaque and caries. *Helv. Odont. Acta.*, **12**, 48-55.
- Krieg, N.R., and J.G. Holt, 1984. *Bergey's manual of systematic bacteriology* Vol. 1. William and Wilkins, Baltimore.
- Lee, H.H., K.H. Yoo and S.Y. Kim, 1984. Cloning of *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki* insecticidal protein gene. *HG. J. Gen. Eng.* **1**, 29-35.
- Matsuda, Y, 1976. Dextran degrading bacteria in human oral cavity and their activity against insoluble glucan from *Streptococcus* mutants. *Bull. Tokyo Med. Dent. University* **23**, 27-40.
- Mitsuishi, Y., M. Kobayashi, and K. Matsuda, 1979. Dextran alpha-1,2 debranching enzyme from *Flavobacterium* sp. M-73; Its production and purification. *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 2283-2290.
- Richards, G.N., and M. Streamer, 1972. Studies on dextranases. I. Isolation of extracellular bacterial dextranase. *Carbohydrate Res.*, **25**, 323-332.
- Somogyi, M., 1945. A new reagent for the determination of sugars. *J. Biol. Chem.*, **160**, 61-73.
- Stanier, R., J.L. Ingraham, M.L. Wheelis, and P.R. Painter, 1986. *Microbial World*, 5th ed., p183-195, Prentice-Hall, New Jersey.
- Takamori, K., F. Mizuno, Y. Matsuda, N. Takahashi, and T. Horikawa, 1976. Dextran degrading activity of oral microbial flora. *Bull. Tokyo Med. Dent. University* **23**, 23-26.
- Walker, G.L., A. Pulkownik, and J.G. Morrey, 1981. Metabolism of the polysaccharides of human dental plaque; release of dextranase in batch cultures of *Streptococcus*

- mutants. *J. Gen. Microbiol.*, **127**, 201-208.
20. Whiteside-Carlson, V., and W.W. Carlson, 1952. Enzymatic hydrolysis of dextran. *Science* **115**, 43.
21. Yamaguchi, T., and S. Gocho, 1973. Production and properties of alkaline dextranase from a newly isolated *Brevibacterium*. *Agric. Biol. Chem.*, **37**, 2527-2533.
22. Zevenhuizen, L.P., 1968. Cell-bound exodextranase of *Bacillus* species. *Carbohydr. Res.*, **6**, 310-318.

(Received Aug. 26, 1987)