

카페인 분해균주의 분리 및 특성

류병호 · 주신희
경성대학교 식품공학과

Isolation and Characterization of Caffeine Degrading Bacteria

Beung-Ho Ryu, Ju Sin Hae

Department of Food Science and Technology, Kyungsung University

Abstract

Several bacterial strains capable of degrading caffeine were isolated and studied for their biodegradation ability of the caffeine and some biochemical characteristics. The isolate KS-5 was identified as *Pseudomonas putida* and was designated as the *P. putida* KS-5. The optimum conditions were at 30°C, pH 7.0 and 1.0% caffeine. Agarose gel electrophoresis and curing experiment were found that the gene for caffeine degradation was encoded on the plasmid in *P. putida* KS-5 and that this strain was resistant to several antibiotics.

Key words: *Pseudomonas putida*, caffeine degradation, plasmid

서 론

카페인(1,3,7-trimethylxanthine)은 자연계에 널리 분포되어 있는 성분의 하나로서 식품 중에도 커피, 코코아, 홍차, 녹차 및 음료수에 많이 들어 있다⁽¹⁾. 그리고 카페인을 의약품으로 중추신경계⁽²⁾, 심장혈관 확장⁽³⁾ 및 각성제⁽⁴⁾ 등에 널리 애용되고 있으나 체내에 들어가면 카페인 및 그 분해산물이 돌연변이원성⁽⁵⁾, 세포독성⁽⁶⁾, DNA 수선의 억제⁽⁷⁾ 및 cyclic AMP phosphodiesterase의 활성저하⁽⁷⁾ 등의 부작용이 있어 이의 양면성에 대한 논란이 많이 제기되고 있다. 이와 같이 카페인은 인체에 해롭다고 알려져 식품 중에 들어있는 카페인을 제거하려는 시도가 이루어지고 있다. 비교적 카페인을 제거하기 위하여 mythylene chloride 등의 유기용매에 의한 추출 방법을 제시하고 있으나^(8,9), 잔유 유기용매의 독성이 논란의 대상이 되고 있어 바람직하지 못하며 그의 carbon dioxide에 의한 방법^(10,11) 및 활성탄에 의한 제거⁽¹²⁾ 등이 있으나 기호 등에 문제가 있다. 그리고 cyclodextrine에 의한 카페인의 제거법이 있지만 다른 향기성분의 흡착으로 제품의 품질이 떨어질 염려가 있다^(13, 15). 그러므로 최근에는 이들 방법외에 미생물을 이용한 카페인의 분해가 이루어지고 있다.

Schwimmer 등⁽¹⁶⁾은 카페인의 생분해는 theoromine을 거쳐 xanthine으로 분해될 것으로 추정하였다. Alam과 Elzainy⁽¹⁷⁾은 카페인은 *Penicillium chrysogenum*에 의하

여 allantoin acid, uric acid로 분해된다고 하였다. 이러한 분해과정은 *Aspergillus*, 다른 *Penicillium* 속에서도 비슷한 메카니즘이 알려져 있다. Blecher와 Lings⁽¹⁸⁾은 *Pseudomonas putida*을 질소함유배지에서 배양하였을 때 3,7-dimethylxanthine 등 분해산물의 생성을 확인하였고 Gluck와 Lings⁽¹⁹⁾은 *P. putida*에 의하여 theobromine과 heteroxanthin으로 분해된다고 하였다.

본 연구는 식품의 성분으로 들어있는 카페인을 제거하기 위한 방안의 하나로 토양에서 카페인의 분해균주를 분리동정하고, 이 균주의 특성을 조사하였다.

재료 및 실험방법

시료 및 시약

시료는 부산시내 사상에 있는 분뇨처리장 부근으로 토양과 폐수를 사용하였다. 카페인은 Sigma Co.(U.S.A)에서 구입하였고 그의 배지 및 시약은 특급을 사용하였다.

배지

카페인 분해세균을 분리하기 위한 배지(C 배지)는 1.0g caffeine, 1.0g K₂HPO₄, 0.5g KH₂PO₄, 0.1g MgSO₄·7H₂O, 0.1g NaCl 및 1 ml trace element를 물 1l에 녹여 사용하였다. Trace element로는 0.5g B(OH)₃, 0.04g, CuSO₄·5H₂O, 0.2g FeCl₃·6H₂O, 0.4g MnSO₄·7H₂O, 0.2g (NH₄)₂Mo₇O₄·4H₂O, 0.4g ZnSO₄·7H₂O를 1l에 녹여 사용하였다⁽¹⁸⁾. 최소배지로는 2g NH₄Cl, 4.3g K₂HPO₄, 3.75g NaH₂PO₄, 0.48g MgSO₄·7H₂O, 0.03g CaCl₂·2H₂O, 0.01g MnCl₂·4H₂O, 0.01g FeSO₄·7H₂O, 0.001g CoCl₂

Corresponding author: Beung-Ho Ryu, Department of Food Science and Technology, Kyungsung University 110-1, Daeyeon-dong, Namgu, Pusan 608-736, Korea

6H₂O, 0.001g Na₂MOO₄ 2H₂O를 H₂O 1l에 녹여 사용하였다. 카페인은 적정농도로 만들어 막여과지(0.45 μm)를 사용하여 여과 멸균 후 첨가하였다.

카페인 분해균주의 분리 및 동정

300 ml의 flask에 50 ml의 C배지를 넣어 121°C에서 15분간 멸균한 다음 시료를 선택적인 농화배양법(selective enrichment technique)에 의하여 상온에서 5일간 배양하고 적당히 희석하여 한천배지에 도말하여 30°C에서 15일간 배양하였다.

생성된 균주를 tooth pick를 계대배양하여 카페인 분해능이 가장 강한 균주를 분리 선별하였다.

균주의 동정은 gram 염색법, OF test, oxidase test로 일차 분류한 후 Pickett의 scheme⁽²⁰⁾과 API 20NE kit⁽²¹⁾를 이용하여 동정하였다. 일단 동정된 균주는 The prokaryotes⁽²²⁾와 *Bergey's manual of systematic bacteriology*⁽²³⁾를 참고로 하여 몇 가지 실험을 추가로 시행한 다음 확인하고 동정하였다.

분리균주의 최적 생장조건

균주의 생장은 pH 5~9, 온도 20~40°C와 질소원으로 첨가한 각 농도별 caffeine 최소배지에서 측정하였다. 생장속도는 적정의 배지에 대수기의 균주를 접종하여 정체기에 들어갈 때까지의 매시간 660 nm에서 측정하여 생육곡선을 구한 뒤, 대수기 동안의 균체량은 생균수로 표시하였다.

Plasmid DNA의 분리

카페인 분해균주의 특성을 알아보기 위한 plasmid DNA는 Hansen과 Olsen의 방법⁽²⁴⁾에 따라 분리하였다. 카페인의 분해균주를 C-배지에서 2.0×10⁸/ml이 되도록 배양한 후 원심분리(12,000×g)하여 얻은 균체를 모은 후 여기에 25% sucrose 0.05 M Tris buffer(pH 8.0)와 0.1 ml lysozyme(10 mg/l), 25 mM Tris buffer(pH 8.0)을 넣고 잘 섞어 37°C에서 배양한 후 0°C에서 5분간 방치하였다. 여기에 0.25M EDTA 0.5 ml(pH 8.0)을 넣고 잘 섞어 37°C에서 배양한 후 0°C에서 5분간 방치한 다음 원심분리하여 얻은 상등액을 buffer(0.05 M Tris-HCl 0.5 M EDTA buffer, pH 8.0)에 녹였다. 무수 ethylalcohol을 첨가한 후 원심분리하여 얻은 plasmid DNA를 다시 TES buffer(20 mM-Tris HCl 5 mM EDTA 100 mM NaCl, pH 8.0)에 적당히 녹여 전기영동법으로 확인한 후 실험에 사용하였다.

Plasmid DNA의 curing

카페인 분해균주에 대하여 그 분해유전자가 plasmid에 존재하는가를 Reinwald의 방법⁽²⁵⁾으로 확인하였다. C-배지에 mitomycin C(5~40/ml)를 첨가하여 30°C에서 48시간 동안 진탕배양한 다음 생존한 균체는 caffeine이 첨가된 최소한천배지에 접종하여 배양하였을 때 분해능

Table 1. Characterization of the isolates with Pickett scheme

	KS-1	KS-2	KS-3	KS-4	KS-5	KS-6	KS-7
Diameter of colonies(mm)	1-2	2	2	2	2	2	2
Gram staining	-	-	-	-	-	-	-
MacConkey medium, growth	+	+	+	+	+	+	+
Oxidation/Fermentation	0	0	0	0	0	0	0
Oxidase	-	+	+	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+	+	+
MN medium; Motility	-	+	+	+	+	+	+
Nitrate-reduction	-	-	-	-	-	-	-
FLN medium; Fluorescence	-	+	+	+	+	+	+
Lactose utilization	+	-	-	-	-	-	-
Denitrification	-	-	-	-	-	-	-
Growth at 42°C	+	-	-	-	-	-	-
Acetamide	-	-	-	-	-	-	-
Fructose	-	+	+	-	+	+	+
Gluconate	-	+	+	-	+	-	+
Maltose	+	-	-	-	-	-	-
Tartrate	-	+	-	+	+	+	+

을 상실하여 clear zone이 나타나지 않는 cured cell들은 상기의 "plasmid의 분리"의 방법에 따라 DNA를 추출하여 전기영동법으로 분석함으로써 plasmid의 curing 여부를 재확인하였다.

전기영동

순수분리된 plasmid DNA의 전기영동은 0.7% agarose의 horizontal slab gel을 이용하였다. Buffer system은 Maniatis 등⁽²⁶⁾의 TBE(0.089 M-Tris borate, 0.089 M-boric acid, 0.02 M-EDTA)를 이용하여 전개시킨 후 UV-transilluminator(UV-160, Shimadzu, Japan)로서 관찰하였다.

카페인의 분석

Cloughley의 방법⁽²⁷⁾에 따라 실험하였다. 즉 배양액을 5000×g로 원심분리한 후 여액을 일정량 취한 다음 10 mM 수산화암모늄용액 1ml을 가하고 여기에 10 ml 클로로포름으로 3회 추출하여 276 nm에서 흡광도를 측정하여 카페인을 정량하였다.

결과 및 고찰

균주의 분리 및 동정

토양과 하천수의 시료를 caffeine을 유일한 질소원으로 이용하는 C-배지에서 배양하여 분해능이 우수한 균주를 토양에서 3종, 하천수에서 4종을 분리하여 이들을 각각 KS-1에서 KS-7으로 명하였다. 토양과 하천에서 분리된 균주는 Table 1과 같이 모두 그람음성으로서 짧은 간균이었고, 이들 균주를 Pickett scheme의 동정법⁽²⁰⁾에 따라 분류한 결과 균주 KS-1을 제외한 6종은 균주의 특성이 거의 유사하였다. 균주 KS-1은 oxidation negative group으로서 비운동성이고 형광성이 없으며 lactose와

Table 2. Identification of the strains with API 20NE kit

	KS-1	KS-2	KS-5
β-Galactosidase	-	-	-
Arginine dihydrolase	-	+	+
Lysine decarboxylase	-	-	-
Ornithine decarboxylase	-	-	-
Citrate utilization	-	+	+
H ₂ S production	-	-	-
Urease	-	-	-
Tryptophan deaminase	-	-	-
Indole	-	-	-
VP reaction	-	-	-
Gelatinase	-	-	-
Utilization of			
Glucose	+	+	+
Mannitol	-	-	-
Inositol	-	-	-
Sorbitol	-	-	-
Rhamnose	-	-	-
Saccharose	-	-	-
Melibiose	+	+	+
Amygdalin	-	-	-
Arabinose	+	-	-
Oxidase	-	+	+

Table 3. Differentiation of the *Pseudomonas fluorescens* group with standard strain

	<i>P. fluorescens</i> IFO 14160	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 25619	<i>P. putida</i> IFO 14164	Isolate KS-5
Growth at 42°C	-	+	-	-
0.5% NaCl	-	-	-	-
Acetamide	+	+	-	-
Lecithinase	-	-	-	-

maltose를 자화할 수 있으므로 *Acinetobacter*속으로 분류하였고, KS-2, KS-3, KS-4, KS-5, KS-6 및 KS-7 등 6종의 균주는 oxidase가 positive였으며 lactose를 자화할 수 없고 초산 환원성이 없으며 형광성 색소를 생성하는 성질을 갖는 fluorescent 그룹으로 *Pseudomonas*속으로 분류하였다.

이와 같이 분류한 7종의 균주중 실험의 편의상 특이한 성질을 갖는 KS-1과 카페인에 들어있는 최소배지에서 생장율이 가장 좋은 KS-2, KS-5를 선별하여 API 20 NE kit로 동정하였다. 이 결과 두 균주는 API index에서 각각 뚜렷한 성질을 갖는 균으로 판명되었다(Table 2).

KS-1은 Table 2에서와 같이 glucose와 arabinose의 자화능이 있는 것으로 보아 *Acinetobacter calcoaceticus*로 동정하였다. KS-2와 KS-5는 API 20NE kit에 의한 실험결과에서 arginine dihydrolase의 양성반응, citrate 자화능 및 oxidase의 양성반응의 독특한 성질이 있으므로 *Pseudomonas fluorescens* 그룹으로 분류하였다. 분해능이 우수한 *Pseudomonas*속인 KS-5의 균명을 알기 위하여

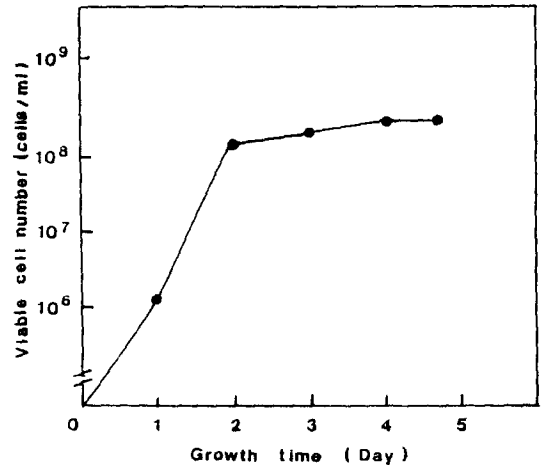


Fig. 1. Growth curve of *P. putida* KS-5 on caffeine as a sole source of carbon in the MM liquid medium

표준비교균주로서 *Pseudomonas fluorescens* IFO 14160 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25619 및 *Pseudomonas putida* IFO 14164 등을 이용한 4가지의 추가 실험결과 42°C에서 생육이 거의 되지 않으며, acetamide을 자화하지 못하는 등 상호 다른 뚜렷한 성질이 있어 KS-5 균주를 *Pseudomonas putida*로 동정하여 KS-5 균주를 *Pseudomonas putida* KS-5로 명명하였다(Table 3).

***P. putida* KS-5의 최적생장조건**

카페인 분해능이 우수한 *P. putida* KS-5의 생장곡선은 Fig. 1과 같다. *P. putida* KS-5는 C-액체배지에서 5일간 배양한 결과 배양 1일에 2.0 × 10⁶/ml이었고 2일에는 2.0 × 10⁸/ml이었으며, 배양 2일만에 정제기에 들어갔다.

P. putida KS-5의 생장의 최적온도는 20°C에서 40°C까지의 온도범위에서 660 nm의 흡광도를 측정된 결과 30°C에서 가장 생육도가 좋았으며 40°C에서는 거의 생육하지 않았다(Fig. 2). pH는 7.0에서 생장이 가장 좋았고 pH 6.5와 7.0에서도 생장율이 좋았으나, pH 6.0과 pH 8.0에서는 생육도가 낮았으며 pH 5.0과 pH 9.0에서는 매우 낮았다(Fig. 3).

P. putida KS-5의 생장을 알아보기 위하여 최소배지에 질소원으로 caffeine을 첨가하여 배양시킨 결과를 농도에 따른 생장은 카페인 농도가 낮을 수록 좋으나, 카페인의 농도가 증가할 수록 생장이 억제되었다(Fig. 4). Blecher와 Lingens⁽¹⁸⁾는 카페인의 농도가 1~2%일 때가 생육도가 가장 높았다고 보고하였으므로 카페인의 분해 농도가 본 실험결과와 비슷한 경향이었다.

***P. putida* KS-5의 기질별 생육도**

카페인 분해균주인 *P. putida* KS-5의 생육과 카페인의 분해를 촉진시키기 위하여 기질인 당, 당알코올, 유기산 및 핵산염기에 대한 생육도에 대하여 검토하였다⁽¹⁸⁾. *P.*

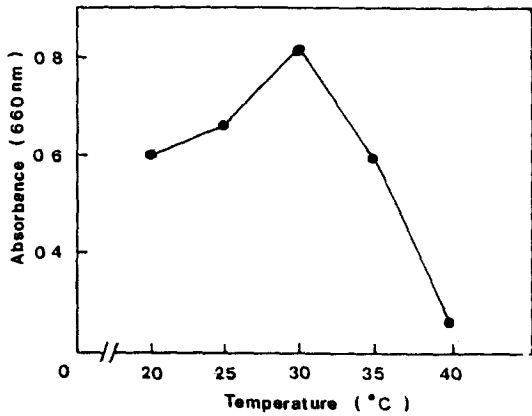


Fig. 2. Effects of temperature on the growth of *P. putida* KS-5

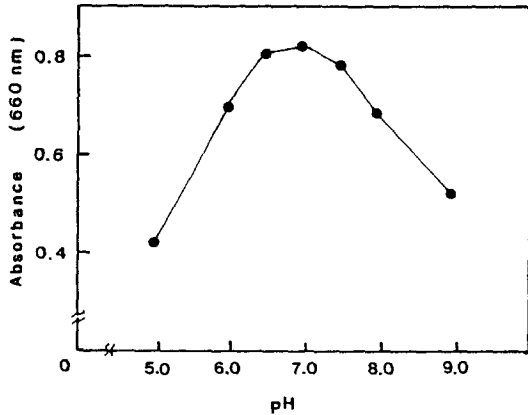


Fig. 3. Effects of pH on the growth of *P. putida* KS-5

putida KS-5의 생육에 대하여 탄소원으로 당류 및 당 알코올류를 각각 1.0% 첨가하였을 때 galactose, lactose, trehalose와 mannitol 및 mesoinositol의 첨가시에는 생육되지 않았다(Table 4).

Caffeine의 분해균인 *P. putida* KS-5는 glucose을 탄소원의 기질로 사용했을 때 분해력이 높았다고 보고하였다⁽¹⁸⁾. 염기의 첨가효과에 있어서의 *P. putida* KS-5의 생육도는 1.0% guanine을 첨가시에 생육이 좋았으나 그의 adenine, uracil 및 thymine의 첨가시에는 거의 생육이 되지 않았다(Table 5).

핵산염기에 대한 이러한 결과는 Blecher와 Lingens의 보고⁽¹⁸⁾와 비슷한 수치를 나타내고 있다.

Amino acid의 첨가효과는 D-glycine, L-histidine, L-valine, L-arginine 및 L-alanine을 각각 1.0% 첨가시 생육도가 좋았으며, 1.0% L-tryptophan에서는 거의 생육되지 않았다(Table 6).

Caffeine 및 caffeine의 분해화합물은 돌연변이원성 및 세포독성 등을 일으키므로⁽⁶⁾ 카페인이나 그 분해화합물

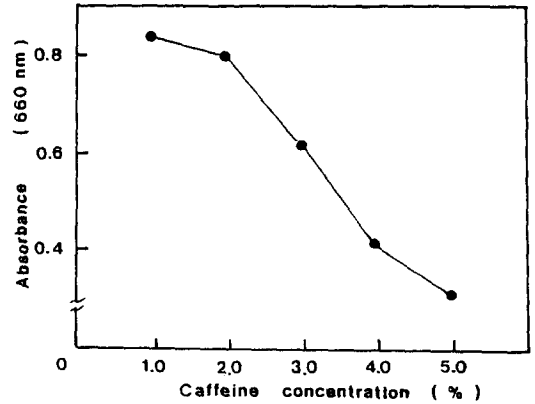


Fig. 4. Effects of caffeine concentration on the growth of *P. putida* KS-5

Table 4. Effects of carbon sources on the growth of *P. putida* KS-5 in the C-medium¹⁾

Carbon sources	Dry cell weight(mg/ml)
Glucose	0.80
Fructose	0.62
Galactose	0.12
Lactose	0.12
Maltose	0.54
Trehalose	0.12
Mannitol	0.12
Meso-inositol	0.12

¹⁾Each carbon source was added 1.0% in the C-medium.

을 첨가한 후 배양시켰을 때 생육도를 보면 1.0% 1-methyl-xanthine과 1.0% 1,7-dimethyluric acid를 첨가하였을 때는 거의 생육하지 않았으나, 1,7-dimethylxanthine, 3,8-dimethylxanthine 등의 첨가시는 *P. putida* KS-5는 생육이 잘되는 것으로 나타났다(Table 7).

Caffeine 분해물인 1,7-dimethylxanthine과 3,8-dimethylxanthine은 caffeine의 구조인 1,3,7-trimethylxanthine에서 한 개의 methyl기만 떨어져 나왔으므로 *Pseudomonas putida* KS-5가 잘 생육되는 것으로 생각된다.

Plasmid DNA의 분리과 curing

P. putida KS-5가 카페인을 분해할 때 plasmid DNA와의 연관성을 확인하기 위하여 plasmid DNA 존재를 확인한 결과는 Fig. 5에 나타내었다. *P. putida* KS-5에서 분리된 1개 이상의 plasmid를 함유하고 있었다.

방향족 탄화수소의 분해는 *Acinetobacter* 및 *Pseudomonas*속의 세균들에 들어있는 plasmid DNA에 의하여 이뤄진다는 보고가 있으므로⁽²⁷⁻²⁹⁾ 본 실험에서 분리된 plasmid DNA는 caffeine을 분해할 수 있는 유전자가 존재할 수 있을 것으로 기대된다.

P. putida KS-5를 카페인 분해 유전자의 특징을 규

Table 5. Effects of nucleotide bases on the growth of *P. putida* KS-5 in the C-medium¹⁾

Bases	Dry cell weight(mg/ml)
Adenine	0.12
Guanine	0.43
Uracil	0.12
Thymine	0.12

¹⁾Each bases was added 1.0% in the C-medium

Table 6. Effects of amino acids on the growth of *P. putida* KS-5¹⁾

Amino acids	Dry cell weight(mg/ml)
Glycine	0.60
L-Histidine	0.52
L-Valine	0.46
L-Arginine	0.50
L-Alanine	0.42
L-Tryptophan	0.12

¹⁾Each amino acid was added 1.0% in the C-medium

Table 7. Effects of hydrolytic compound of caffeine on the growth of *P. putida* KS-5 in the C-medium¹⁾

Hydrolytic compounds	Dry cell weight(mg/ml)
Caffeine	0.81
1,7-Dimethylxanthine	0.58
3,7-Dimethylxanthine	0.60
1-methylxanthine	0.12
3-methylxanthine	0.47
1,7-Dimethyluric acid	0.12
Allantoin L-Arginine	0.50
Alantoic acid	0.40
Uric acid	0.48

¹⁾Each substrate was added 1.0% in the C-medium

명하고 유전자조작을 하는 것이 앞으로도 진행될 연구의 그 분해유전자가 plasmid DNA에 있는지를 확인하였다. 분리한 plasmid DNA를 recipient cell과 recombination 시켰을 때 그 recombinant를 분리해 내기 위해서는 항생물질의 내성을 특성의 marker로 이용할 수 있다. 이러한 목적으로 몇 가지 항생물질에 대한 분해균주들의 저항성을 조사한 결과는 Table 8과 같다. Caffeine 분해균주인 *P. putida* KS-5는 항생물질 중 ampicilline의 농도가 10, 25 및 100 µg/l일 때 내성을 나타내었으며 tetracycline의 10, 25 및 50 µg/l의 농도에서 chloramphenicol도 50, 100 및 200 µg/l의 농도에서 모두 내성을 나타내고 있다. *P. putida* KS-5는 이와 같이 다약제내성의 특성을 보였다. Pemberton 등⁽³³⁾은 항생제 내성유전자는 transposable genetic element 또는 broad host range를 갖는 plasmid DNA에 의하여 전파된다고 지적하였다. 따라서 본 연구에 사용된 *P. putida* KS-5는 각종

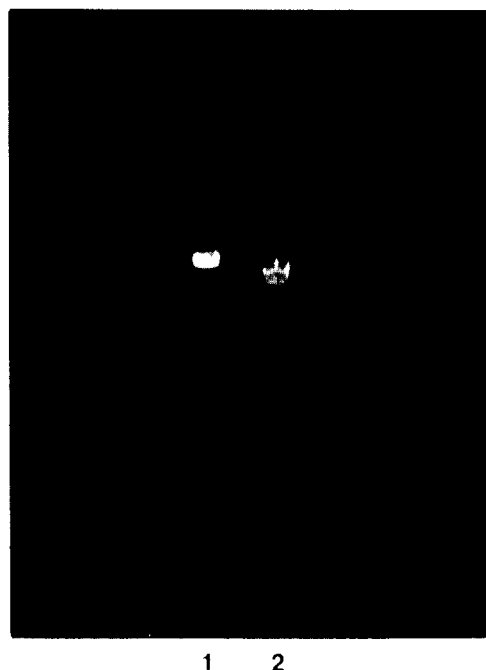


Fig. 5. Agarose gel electrophoresis of plasmid DNA isolated from *P. putida* KS-5 and cured plasmid DNA Lane 1: cured DNA, Lane 2: plasmid DNA

Table 8. Effects of antibiotics on the resistivity of *P. putida* K-S

Antibiotics (µg/ml)	Concentration		
	10	25	100
Ampicillin	R ¹⁾	R	R
Tetracycline	R	R	R
Kanamycin	R	R	R
Streptomycin	R	R	R
Chromophenicol	R	R	R
Genetamycin	S ²⁾	S	S

¹⁾R: Resistance, ²⁾S: Sensitive

항생물질에 대하여 내성이 있으므로 clone된 분해유전자의 선발 marker로서 이용될 수 있고, 또 *P. putida* KS-5의 분해유전자의 위치확인 유전자의 조성과 발현 등 유전학적인 특성을 밝히는데 유용하게 이용할 수 있을 것이다.

요 약

Caffeine을 기질로 이용할 수 있는 균을 토양과 폐수에서 7종을 분리하고 그중 카페인 분해능이 가장 좋은 KS-5를 동정하여 *Pseudomonas putida* KS-5라고 명명하였다. *P. putida* KS-5의 생장 최적조건은 온도 30°C,

pH 7.0이었고 카페인 농도는 1.0%였다. *P. putida* KS-5는 plasmid DNA가 존재하였으며, 카페인 분해유전자가 plasmid에 존재할 수 있음을 알 수 있었다. 한편 이들 분해유전자의 유전적 특징을 규명하기 위한 curing test와 transformation에 필요한 marker를 찾아본 결과 각종 항생물질에 대하여 내성이 있었다.

문 헌

- Spiller, G.A.: The methylxanthine beverages and foods: chemistry, consumption, and health effects. Alan R. Liss, Inc., New York, (1984)
- Europaisches Arzneibuch: *Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart* Coffeinum p.670, Theophyllinum p.1213, Theobrominum p.1209(1978)
- Goering, J.E.: Xanthine derivatives and pharmaceutical compositions containing them, *Eur. Pat. Appl. EP*, 42, 706; *GB Appl* 80, 418(1982)
- Ritchie, J.M.: The xanthines, *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 5th ed, Mac Millan, New York, p.367 (1975)
- Kihlman, B.: Effects of caffeine on the genetic material *Mut. Res.*, 26, 53(1974)
- Timson, I.: Theobromine and theophylline, *Mut. Res.* 32, 169(1975)
- Hartley, B. and Kihman, B.A.: Caffeine derivatives and chromosomal aberrations, *Hereditas*, 69, 326(1971)
- Jones, G.V. Meinhold, J.F. and Musto, J.A.: Decaffeination of aqueous roasted coffee extract by solvent extraction with return of extraction caffeine solids to the product. *US patent* 4, 505, 940(1985)
- Knupp, J.L.: Extracting substances from aqueous solution using fluorocarbon solvent. *US patent* 4, 515, 695 (1985)
- Cafe Toro Ltd: Decaffeinating naturally moist green coffee by extraction with carbon dioxide on supercritical conditions under controlled temperature increase and recovery after expansion. *DE patent* 3, 445, 502 (1985)
- General Foods Corp.: Decaffeination of green coffee beans by extraction with carbon dioxide containing dimethyl sulfoxide. *US patent* 4, 472, 442 (1984)
- Green, D. and Blanc, M.: Decaffeination of green coffee beans by extraction with aqueous medium and treatment of this with neutral carbon. *US patent* 4, 508, 783(1985)
- Nakamura, N., Horikoshi, K.: Development of and prospects for cyclodextrins based on alkaline fermentation process, *Chem. Econ. Eng. Rev.*, 14, 32(1982)
- Saleeb, F.Z., Zeller, B.L.: Decaffeination of soluble coffee extract utilizing solvent extraction and formation of a caffeine caffeic acid complex. *US patent* 4, 547, 378(1985)
- Shaw, P.E., Tatum, J.H. and Wilson, C.W.: Improved flavor of navel orange and grapefruit juices by removal of bitter components with cyclodextrin polymer. *J. Agric Food Chem.*, 32, 832(1984)
- Schwimmer, S., Kurtzmann, R.H. and Heftmann, E.: Caffeine metabolism by *Penicillium roqueforti*. *Arch. of Biochem. and Bioph.*, 147, 109(1971)
- Allam, A.M. and Elzainy, T.A.: Degradation of xanthine by *Penicillium chrysogenum*. *J. Gen. Microbiol.*, 56, 293 (1969)
- Blecher, R. and Ringens, F.: The metabolism of caffeine by a *Pseudomonas putida* strain. *Hoppe Aeyler's Z. physiol. Chem.*, 358, 807(1977)
- Gluck, M. and Lingens, F.: Studies on the microbial production of the obromine and heteroxanthine from caffeine. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 25, 334(1987)
- Koneman, E.W., S.D. Allen, V.R. Dowell, Jr. and H.M. Sommers: *Diagnostic microbiology*, p.111, J.B. Lippincott Company, Philadelphia(1979)
- Robertson, E.A. and MacLower, J.D. and Sommers, H. M.: Diagnostic mathematical analysis of the API enteric-20 profile register using a computer diagnostic model. *Appl. Microbiol.*, 28, 691(1979)
- Starr, M.P., H. Stolp, H.G. Truper, A. Balows and H.G. Schlegel: *The prokaryotes*. vol. I. p.655, Springer-Verlag, Berlin(1981)
- Krieg, N.R. and J.G. Holt(1984): *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. I. p.140, Williams and Wilkins, Baltimore, (1984)
- Hansen, J.B. and Olsen, R.H.: Isolation of large plasmids and characterization of P₂ incompatibility group plasmids PMG1 and PMG5, *J. Bacteriol.*, 135, 227 (1978)
- Rheinwald, J.G. Chakrabarty and Gunsalus, I.C.: A transmissible plasmid controlling camphor degradation on *Pseudomonas putida*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 70, 885(1973)
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J.: Agarose gel electrophoresis, p.1576, In *Molecular cloning*, a laboratory manual, Cold Spring, New York(1982)
- Cloughy, J.B.: Influencing the caffeine content of tea, Rep. of Central Africa, Biochemistry, Tea Res. section, 104(1979)
- Furukawa, K. and Miyazaki, T.: Cloning of gene cluster *alcaligenes*. *J. Bacteriol.*, 166, 292(1986)
- Chakrabarty, A.M. and Furukawa, K.: Involvement of plasmids in total degradation of chlorinated biphenyls. *Appl. Environ. Microbiol.*, 44, 619(1982)
- Fisher, P.R., Pemberton, J.M.: Isolation and characterization of the pesticide-degrading plasmid PJP1 from *Alcaligenes paradoxus*. *J. Bacteriol.*, 135, 798(1978)

(1992년 1월 13일 접수)