

Lipomyces starkeyi JLC26에서 유래된 Carbohydrase의 특성

전 선 미 · †^{1,2}김 도 만 · ³김 도 원
전남대학교 의공학협동과정, ¹생물화학공학과 및 촉매연구소
²서울대학교 농업생물신소재 연구센터, ³강릉대학교 물리학과
(접수 : 1999. 12. 2., 게재승인 : 1999. 12. 15.)

Properties of Carbohydrase Prepared from *Lipomyces starkeyi* JLC26

Sun-Mee Jun, Doman Kim^{†1,2}, and Do-Won Kim³

Department of Biomedical Engineering, ¹Biochemical Engineering and the Research Institute for Catalysis,
Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea

²Research Center for New Bio-Materials in Agriculture, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea

³Department of Physics, Kangnung National University, Kangnung 210-702, Korea

(Received : 1999. 12. 2., Accepted : 1999. 12. 15.)

We have isolated a dextranase and amylase constitutive and hyper-producing mutant, *Lipomyces starkeyi* JLC26, from *Lipomyces starkeyi* ATCC 74054 after mutation using UV irradiation. After partial purification of dextranase and amylase (together DXAMase; both activities were always co-purified) by ammonium sulfate precipitation, CM-Sepharose column chromatography, the specific activities of amylase and dextranase were 5367 and 3045 unit/mg, respectively. The pH effects for activity and stability of both enzymes were similar to each other: Optimum pH and temperature for activity were at 5.5 and 37°C and optimum ranges for stability were at pH 2.5-5.5 and 4-55°C, respectively. The reaction end products of dextranase and amylase activities were found to be typical for those of endo-dextranase and endo-amylase. When the carbohydrase and maltotriose were reacted, glucose, maltose, isomaltose, maltotriose, panose and $\alpha(1\rightarrow6)$ glucosylmaltotriose were produced by disproportionation reaction.

Key Words : *Lipomyces starkeyi*, amylase, dextranase, disproportionation reaction, UV, carbohydrase

서 론

Dextranase(EC 3.2.1.11)는 dextran의 $\alpha(1\rightarrow6)$ glucoside 결합을 가수분해하는 효소이다(1). Dextran은 *Leuconostoc* sp. 등의 젓산균에 의해 설탕에서 glucose를 $\alpha(1\rightarrow6)$ 로 주 결합시켜 합성된 다당으로 $\alpha(1\rightarrow3)$, $\alpha(1\rightarrow4)$ 그리고 $\alpha(1\rightarrow2)$ 결합으로 분지된 α -glucan의 통칭이다(2). α -amylase(EC 3.2.1.1)는 endo-type으로 작용하는 효소로서 starch의 $\alpha(1\rightarrow4)$ glucoside 사슬을 가수분해한다(3). 최근 식품분야에서 올리고당에 관심을 보이면서 특정한 올리고당을 생산하는 amylase에 많은 연구가 진행 중에 있다(4).

*Lipomyces starkeyi*는 자낭 포자형성 효모균으로서 endo-dextranase (5-6)나 α -amylase (7-9)를 생산한다. 이 효소는 식품·의학 관련 분야에 이용되어지고 있고 향생 물질이나 독성 물질을 생산하지 않는 것으로 알려져 있다(10). 몇 가지 박테리아에서 생산된 dextranase를 제외한 대부분의 미생물성 dextranase는 유도성

효소이다. Kim과 Day는 dextranase와 amylase를 동시에 생산하는 구성적(constitutive) 돌연변이주를 개발하였다(11). 이 균은 dextran이나 starch를 기본배지로 사용하여 두 효소를 동시에 생산할 수 있는 특징이 있다. 현재 이 효소는 치태제거를 위한 효소제(12)와 혼합 발효에 의한 clinical size dextran 생산(11, 13-15), 그리고 올리고당의 생산 및 용용(16)을 위해 연구되고 있다.

Disproportionation reaction은 하나의 탄수화물이 공여체(donor)로 작용하고, 단당을 동일한 혹은 비슷한 탄수화물 수용체(acceptor)로 전이하는 반응을 말한다(예: $2 \text{ maltose} \rightleftharpoons \text{glucose} + \text{maltotriose}$). 이 작용이 알려진 효소들로는 cellulase(17), amylase(18), transglucosidase(19), glucoamylase, transglucosylase, glucodextranase, isomaltodextranase, glucansucrase(20)와 cyclodextrin glucanosyl-transferase(CGTase)(21) 등이 보고되고 있다.

본 논문에서는 *L. starkeyi* ATCC 74054로부터 amylase와 dextranase 활성을 동시에 분비하는 변이주를 선발하고, 그 효소 생화학적 특성의 일부와 disproportionation 반응에 의한 올리고당 생산 가능성을 연구하였다.

† Corresponding Author : Department of Biochemical Engineering,
Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea
Tel : 062-530-1844, Fax : 062-530-1849
E-mail : dmkim@pasteur.chonnam.ac.kr

재료 및 방법

사용균주

본 실험에서 사용한 모균은 *L. starkeyi* ATCC 74054로 생육온도는 28°C를 유지하고, 초기 pH 5.5의 LMS 배지(Table 1)에서 배양하였다. 시약은 GR급 이상을 사용하였다.

돌연변이 과정 및 선별

모균 배양액을 원심 분리(4,000×g, 10분)하여 균을 얻고, 0.1 M MgSO₄을 초기배지 양의 0.5배 넣어 현탁하고, 이 액을 petri dish에 옮겨 담아 교반시키면서 UV(253.7 nm)에 노출시켰다(22). 이때 UV와의 간격은 30 cm를 유지하고 30초간 조사(사멸률 93%)한 후 적절히 희석하여 LMS 고체배지에 도말하였다. 이 고체배지에서 자란 균을 LMS 고체배지와 LMD 고체배지에 옮겨 길러주고, amylose 활성이 우수한 균은 LMS 고체배지에 요오드 용액(0.2 mg/ml I₂, 2 mg/ml KI)을 처리하여 투명한 형성을 하는 정도를 관찰하여 선별하고, dextranase 생산성이 우수한 균은 LMD 고체배지의 파란색이 없어지는 정도를 확인하여 두 환의 크기가 동시에 모균보다 큰 colony(JLC26)를 선별하였다.

Table 1. The composition of media.

	Components and Concentration(w/v)
LMS	1% soluble starch, 0.3% KH ₂ PO ₄ , 0.3% yeast extract, 1%(v/v) mineral solution
LMD	0.5% blue dextran, 0.3% KH ₂ PO ₄ , 0.3% yeast extract, 1%(v/v) mineral solution
Mineral solution	2% MgSO ₄ · 7H ₂ O, 0.1% NaCl, 0.1% FeSO ₄ · 7H ₂ O 0.1% MnSO ₄ · H ₂ O, 0.13% CaCl ₂ · 2H ₂ O

효소 생산

LMS배지 50 ml에서 3일간 키운 전배양액을 3개의 1 L flask에 300 ml씩 준비한 LMS 배지에 1%(v/v) 접종하고 28°C, pH 5.5에서 배양한 후, 균 배양액을 4°C에서 원심 분리(10,000×g, 15분)하여 상등액을 얻었다. 상등액에 ammonium sulfate(70%)를 넣어 단백질을 침전시켜 4°C에서 원심 분리(10,000×g, 15분)한 후, 20 mM의 citrate-phosphate buffer(pH 5.5, 0.02%(w/v) sodium azide)에 녹이고, 동일 buffer 8L로 투석하여 염물질을 제거한 후 조효소액으로 사용하였다. CM-Sepharose column(2.5×15 cm)을 20 mM의 citrate-phosphate buffer(pH 5.5)로 평형화시킨 후 조효소액을 흡착시키고 동일한 buffer 500 ml로 세척한 후 NaCl 농도 구배(0-0.4 M)로 carbohydrase를 용출시켰다.

단백질 정량

단백질은 Bradford 방법(23)을 이용하여 흡광도 595 nm로 측정하여 정량화 하였으며, bovine serum albumin(Sigma Co. A-7517)을 표준물질로 사용하였다.

효소 활성

효소 활성은 glucose를 표준 물질로 하여 각 기질에 대한 분해산물의 정도를 Copper-bicinchoninate법(24)을 이용하여 흡광도 550 nm에서 환원당량을 측정하였다. 1 unit은 효소 1 ml 당, 1

분당, dextran(1%(w/v) T2000) 또는 전분(1%(w/v) soluble starch) 기질로부터 해리되는 glucose에 해당하는 탄수화물의 μmol 수로 정의한다.

최적 pH 및 온도

적정 pH 확인을 위해 pH 2.5-4.0에서는 20 mM acetic acid buffer, 5.0-6.0에서는 20 mM citrate-phosphate buffer, 7.0-8.0에서는 20 mM phosphate buffer를 준비하고, 각 buffer에 2%(w/v) 기질(dextran, soluble starch)을 준비하여 효소를 처리한 후 37°C에서 15분간 반응시켜 활성을 확인하였다. 안정성은 각 pH의 buffer에 효소를 첨가(90:10, v/v)하여 20시간 동안 37°C에 저장한 후 효소를 기질에 첨가하여 37°C에서 15분간 반응시키고 활성을 확인하였다. 온도에 대한 효소 활성은 각 온도에서 효소를 15분간 기질과 반응시킨 후 역가를 측정하였고, 온도 안정성은 각 온도에서 45분간 효소를 놓아둔 후, 37°C에서 15분간 기질 반응시켜 남은 활성을 확인하였다.

SDS-PAGE

단백질의 정제 정도 및 분자량은 SDS-PAGE를 실시하여 확인하였다(25). 정제된 단백질 band의 효소 활성은 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride(TTC) 0.1 g과 1 M NaOH 100 ml를 이용(26)하여 확인하였다.

Disproportionation reaction

효소 3 μl (amylase activity - 418.6 unit)와 1%(w/v) maltotriose 10 μl (20 mM citrate-phosphate, pH 5.5)를 섞어 37°C에서 반응시킨 후, 1 μl 씩 취하여 TLC(thin layer chromatography, Merck K5F) plate에서 점적하여 분석하였다. 전개용매는 1-propanol/ethyl acetate/water(2/2/1, v/v/v)로 세 번 전개하였고, 0.3%(w/v) N-(1-naphthyl)ethylenediamine과 5%(v/v) 황산을 함유한 methanol 발색시약 용액에 담갔다 121°C에서 10분간 구워 발색하여 구성 성분을 확인하였다(27). 각 성분들에 분석은 NIH Image Program을 사용하였다.

결과 및 고찰

균 선별

모균인 *L. starkeyi* ATCC 74054의 UV 돌연변이 후 사멸률이 93% 되었을 때 생존한 균들 중에서 dextranase와 amylase 활성이 동시에 우수한 균을 선별하여 *L. starkeyi* JLC26이라 하였다. 선별된 균의 배양액은 모균보다 dextranase 활성은 1.6(±0.2)배, amylase 활성은 1.7(±0.2)배 증가를 보였다. 효소의 기질과의 반응 후 생산된 당들의 분포는 Figure 1에서 보이는 바와 같이 dextranase와 amylase의 두 경우 모두 모균의 효소들과 같은 종류의 산물을 생산함을 확인할 수 있었다. Amylase의 경우 glucose, maltose, maltotriose를 주로 생산하였고, 상대적 양은 각각 58.3, 5.6 그리고 11.5%를 생산하였다. Dextranase 활성의 경우는 glucose, isomaltose, isomaltotriose를 상대적 양 비로 각각 50.9, 20.4 그리고 5.5%를 생산하였다. 이 결과로 JLC26의 dextranase와 amylase는 모두 endo-type의 효소임을 확인할 수 있었다.

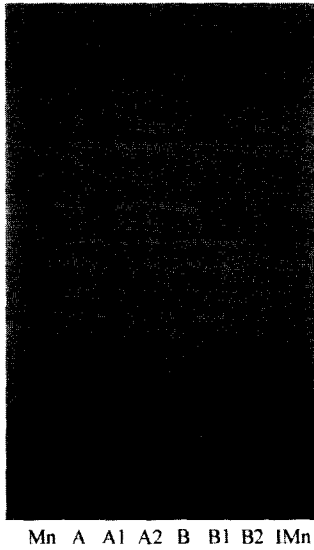


Figure 1. TLC comparison of products formed by amylase and dextranase activities from *Lipomyces starkeyi* ATCC 74054(A) and *Lipomyces starkeyi* JLC26(B). Mn, maltooligosaccharides; IMn, isomaltooligosaccharides; A1 and B1, the hydrolyzates of soluble starch by ATCC 74054 and JLC26, respectively; A2 and B2, the hydrolyzates of dextran(T-2000) by ATCC 74054 and JLC26, respectively.

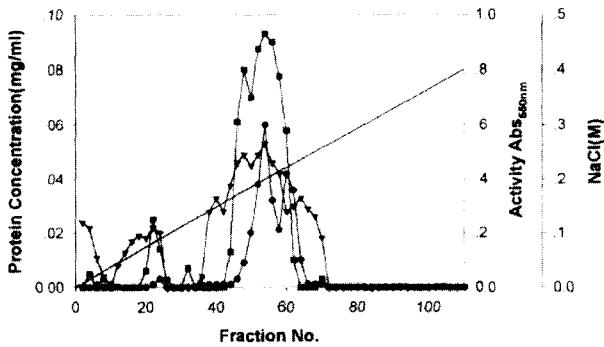


Figure 2. CM-Sepharose column chromatography of *Lipomyces starkeyi* JLC26. ●-, protein concentration; ■-, amylase activity; ▼-, dextranase activity

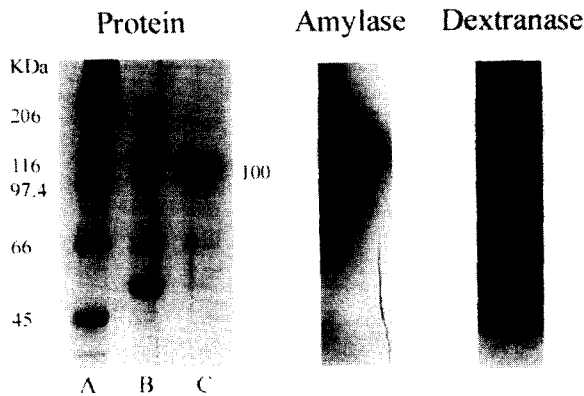


Figure 3. SDS-PAGE of *Lipomyces starkeyi* JLC26 enzyme. A, size marker; B, crude enzyme; C, partially purified enzyme by ammonium sulfate precipitation and CM-Sepharose column chromatography.

효소의 정제 및 특성

L. starkeyi JLC26의 배양액 850 ml을 ammonium sulfate로 침전분획하여 15.8 ml의 조효소액을 얻었다. 총 단백질량은 0.99 mg이었으며, amylase 활성은 배양 상등액에는 610 unit이었고 ammonium sulfate 침전후의 조효소액은 454 unit을 보였으며, dextranase 활성은 배양 상등액에 378 unit이 있었고, 조효소액에는 290 unit이 남아 있었다. 조효소액에서의 amylase 활성과 dextranase 활성의 specific activity는 각각 458.6 unit/mg와 292.9 unit/mg이었다.

조효소 0.628 mg을 CM-Sepharose column을 이용하여 정제하였으며(Figure 2), 단백질량이 가장 많은 fraction의 단백질량은 0.078 mg으로 SDS-PAGE 상에서 하나의 단백질(100 KDa)만 존재하면서(Figure 3), 두 효소의 활성을 동시에 가지고 있음을 확인하였다(12). 이때 각 효소의 specific activity는 amylase 활성의 경우는 5367 unit/mg이었고 dextranase 활성의 경우는 3045 unit/mg이었다.

효소의 최적 pH는 5.5이었으며, pH 5.5 이하에서는 86% 이상 안정함을 보였다(Table 2). 최적 온도는 37℃였으며, 55℃ 이하의 온도에서 45분간 90% 이상의 안정성을 나타냈었다(Table 3).

Table 2. The optimum pH for activity and stability.

pH	Relative activity(%)		Relative stability(%)	
	Dextranase	Amylase	Dextranase	Amylase
2.5	93.5	93.1	86.6	87.5
3.0	96.5	96.1	90.6	90.4
4.0	98.2	97.4	98.6	97.5
5.5	100	100	100	100
6.0	96.0	96.3	74.0	75.3
7.0	96.0	96.3	68.0	68.5
8.0	94.1	94.2	59.6	59.0

Table 3. The optimum temperature(℃) for activity and stability.

Temperature (℃)	Relative activity(%)		Relative stability(%)	
	Dextranase	Amylase	Dextranase	Amylase
4	87.6	89.6	100	100
10	90.3	92.7	98.8	95.1
28	96.9	97.3	98.8	94.5
37	100	100	97.6	94.5
55	88.6	90.4	97.5	94.4
80	75.0	79.0	61.1	54.1

Disproportionation reaction

1%(w/v) maltotriose(20 mM citrate-phosphate buffer, pH 5.5) 기질과 정제된 효소를 반응(37℃)시켜서 얻은 반응 결과는 Figure 4와 같다. 여기서 정제된 효소의 amylase 활성에 의해 maltotriose가 maltose와 glucose로 가수분해되고, 분해된 glucose는 α

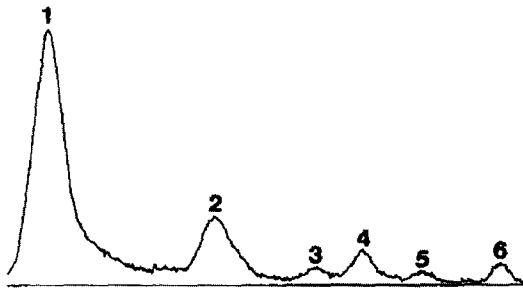


Figure 4. Densitometry of TLC of products produced from the action of *Lipomyces starkeyi* JLC26 carbohydrase on maltotriose. 1, glucose; 2, maltose; 3, isomaltose; 4, maltotriose; 5, panose; 6, $\alpha(1\rightarrow6)$ glucosylmaltotriose.

(1 \rightarrow 6)으로 maltotriose의 비환원당 말단에 연결되어 $\alpha(1\rightarrow6)$ glucosylmaltotriose가 생성됨을 알 수 있었다. 또한 glucose가 glucose와 maltose에 $\alpha(1\rightarrow6)$ 으로 결합하여 각각 isomaltose와 panose도 생성되었다. 따라서 이 효소는 기질을 수용체와 공여체로 동시에 이용하는 disproportionation reaction 특성이 있음을 알 수 있었다. 시간이 더 경과하면 효소가 가진 amylase와 dextranase 활성에 의해 전부 glucose로 분해된다.

요 약

Lipomyces starkeyi ATCC 74054를 UV로 돌연변이하여 선발한 JLC26의 효소적인 특성을 알아보았다. 효소는 70% ammonium sulfate로 침전시키고, CM-Sepharose column chromatography로 부분 정제하였다. 이때 얻어진 각 효소 specific activity는 amylase 활성의 경우는 5367 unit/mg이었고 dextranase 활성의 경우는 3045 unit/mg이었다. 효소의 최적 pH와 온도는 5.5와 37 $^{\circ}$ C였으며, pH 2.5-5.5와 4-55 $^{\circ}$ C에서 안정성을 보였다. 부분 정제된 효소는 amylase와 dextranase 활성을 동시에 보이는 100 KDa의 크기를 가지는 하나의 단백질이었다. 이 효소는 maltotriose 기질과 반응할 때 disproportionation reaction 현상을 보여 가지구조를 지닌 panose와 $\alpha(1\rightarrow6)$ glucosylmaltotriose을 생산하였다. 이 균은 starch 배지에서 키워 amylase와 dextranase 활성을 동시에 지니는 효소를 생산함으로써 dextran과 mutan으로 구성된 치태를 분해하는 효소재료로의 이용성이 기대된다.

감 사

이 논문은 1998년 한국학술진흥재단의 학술연구비에 의하여 지원되었으며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Pleszczynska, M., J. Szczodrak, J. Rogalski, and J. Fiedurek (1997), Hydrolysis of dextran by *Penicillium notatum* dextranase and identification of final digestion products, *Alycol. Res.*, **101**, 69-72.
- Robyt, J. F. (1986), Dextran, *Encyclopedia of polymer science and engineering* Vol. 4, 2nd ed., p752, John Wiley&Sons, New York.
- Vihinen, M. and P. Mantsala (1989), Microbial amyolytic enzymes, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **24**, 329-418.
- Yoon, S. H., M. J. Kim., J. W. Kim., K. Kwon, Y. W. Lee, and K. H. Park (1995), Purification and characterization of a novel malto-oligosaccharides forming α -amylase form *Bacillus* sp. SUH4-2, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **23**, 573-579.
- Webb, E. and I. Spencer-Martins (1983), Extracellular endo-dextranase from the yeast *Lipomyces starkeyi*, *Can. J. Microbiol.*, **29**, 1092-1095.
- Koenig, D. and D. Day (1988), The purification and characterization of a dextranase from *Lipomyces starkeyi*, *Eur. J. Biochem.*, **183**, 161-167.
- Kelly C. T., M. E. Moriarty, and W. M. Fogarty (1985), Thermostable extracellular α -amylase and α -glucosidase of *Lipomyces starkeyi*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **22**, 352-358.
- Moulin, G. and P. Galzy (1979), Study of an amylase and its regulation in *Lipomyces starkeyi*, *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 1165-1171.
- Pumpeng, B., Y. Nakata, M. Goto, Y. Teramoto, and S. Hayashida (1992), A novel raw-starch digesting yeast α -amylase from *Lipomyces starkeyi* HN-606, *J. Ferment. Bioeng.*, **73**, 108-111.
- Kreger-van Rij, N. J. W. (1984), The Yeast A-Taxonomic Study Genus 14. *Lipomyces*, 3rd ed., p252, Elsevier, Amsterdam.
- Kim, D. and D. F. Day (1995), Isolation of a dextranase constitutive mutant of *Lipomyces starkeyi* and its use for the production of clinical size dextran, *Lett. in Applied Microbiol.*, **20**, 268-270.
- Kim, D., S. J. Ryu, S. J. Heo, D. M. Kim, and H. S. Kim (1999), Characterization of a novel carbohydrate from *Lipomyces starkeyi* KSM22 for dental application, *J. Microbiol. Biotechnol.*, **9**, 260-264.
- Kim, D., H. C. Seo, and D. F. Day (1996), Dextran production by *Leuconostoc mesenteroides* in the presence of a dextranase producing yeast, *Lipomyces starkeyi*, *Biotech. Tech.*, **10**, 227-232.
- Kim, D. and D. F. Day (1994), A new process for the production of clinical dextran by mixed-culture fermentation of *Lipomyces starkeyi* and *Leuconostoc mesenteroides*, *Enzyme Microbiol. Technol.*, **16**, 844-848.
- Kim, D., D. Y. Jhon, K. H. Park, and D. F. Day (1996), Mixed culture fermentation for the production of clinical quality dextran with starch and sucrose, *Biotech. Lett.*, **18**, 1031-1034.
- Heo, S. J., D. Kim, I. S. Lee, and P. S. Chang (1999), Development of a mixed-culture fermentation process and characterization for new oligosaccharides and dextran using *Lipomyces starkeyi* and *Leuconostoc mesenteroides*, *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.*, **27**, 304-310.
- Kanda, T., I. Noda, K. Wakabayashi, and K. Nisizawa (1983), Transglycosylation activities of exo- and endo-type cellulases from *Irpex lacteus*(poyporus tulipiferae), *J. Biochem(Tokyo)*, **93**, 787-794.
- Penninga, D., B. Strokopytov, H. J. Rozeboom, C. L. Lawson, B. W. Dijkstra, J. Bergsma, and L. Dijkhuizen (1995), Site-directed mutations in tyrosine 195 of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* strain 251 affect activity and product specificity, *Biochem.*, **34**, 3368-3376.
- Ahn, J. W., S. S. Hong, K. W. Park, and J. H. Seo (1996), Reaction mode of transglucosidase from *Aspergillus niger* for production of isomaltooligosaccharides, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **28**, 273-278.

20. Kim, D., K. H. Park, and J. F. Robyt (1998), Acarbose effect for dextran synthesis, acceptor and disproportionation reactions of *Leuconostoc mensenteroides* B-512FMCM dextransucrase, *J. Microbiol. Biotechnol.*, **8**, 287-290.
21. The amylase research society of japan (1988), Handbook of amylases and related enzymes : Their sources, isolation methods, properties and applications, p154, Pergamon Press, UK.
22. Gerhardt. P., R. G. E. Murray, R. N. Costilow, E. W. Nester, W. A. Wood, N. R. Krieg, and G. B. Phillips (1981), Manual of methods for general bacteriology, p224, American society for microbiology, USA.
23. Bradford M. M. (1976), A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
24. Fox, J. D. and J. F. Robyt (1991), Miniaturization of three carbohydrate analyses using a microsample plate reader, *Anal. Biochem.*, **195**, 93-96.
25. Laemmli, U. K. (1970), Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680-685.
26. Manchenko, G. P. (1994), handbook of detection of enzymes on electrophoretic gels, p222, CRC Press, USA.
27. Mukerjea, R., D. Kim, and J. F. Robyt (1996), Simplified and improved methylation analysis of saccharides, using a modified procedure and thin-layer chromatography, *Carbohydr. Res.*, **292**, 11-20.