

내열성 Amylase 의 생산에 관한 연구 (제 1 보) 최적배양조건과 효소의 정제

오두환, 이강표, 변유량, 유주현
연세대학교 공과대학 식품공학과
(1981년 6월 1일접수)

Studies on the Production of Thermostable Amylase.

Part 1. Optimal Culture Conditions and Purification of Enzyme.

Doo Hwan Oh, Kang Pyo Lee, Yu Ryang Pyun and Ju Hyun Yu

Department of Food Engineering, College of Engineering, Yonsei University

(Received June 1, 1981)

Abstract

A thermophilic soil isolate *Bacillus* sp. Y-127 was selected for the production of thermostable amylase. The strain was used for the enzyme production and the thermostable amylase was characterized. The optimum cultural conditions for the enzyme production were 60°C at pH 7.0 for 32 hours using a mineral medium containing 2% soluble starch and 0.2% yeast extract. The extra-cellular enzyme was purified about 123-folds with about 6% recovery. The purified enzyme was stable at pH between 4.0 and 7.0, and temperature up to 60°C.

서 론

전분을 분해시키는 효소에는 α -amylase (endo-amylase), β -amylase (exo-amylase), amyloglucosidase, R-enzyme (endo-1, 6-glucosidase, isoamylase) 등이 있으며⁽¹⁻³⁾ 이들의 작용을 통해 전분은 dextrins, oligosaccharides, maltose 및 glucose 등으로 분해된다.⁽⁴⁻⁶⁾

이러한 전분의 분해에 관련하는 효소는 효모, 곰팡이, 세균, 맥아 및 동물체내에 널리 존재한다. 이들 효소중에서 열안정성은 bacterial amylase 가 가장 좋은 것으로 알려지고 있으며,^(3,7,8) Stein 등,⁽⁹⁾ Fukumoto⁹⁾, Toda 등,⁽¹⁰⁾ Hasegawa 등⁽¹¹⁾은 Ca^{2+} 이온의 존재시에는 60°C 이상의 높은 온도에서도 amylase 의 열안정성이 유지된다고 보고하였다. 한편 Campbell 등⁽¹²⁻¹⁵⁾과 Chandra 등⁽¹⁶⁾은 *Bacillus stearothermophilus* 와 *Bacillus licheniformis* 등과

같은 고온성 미생물을 이용한 내열성 amylase 의 생산에 대해 보고하였다.

본연구는 토양에서 분리한 고온균주를 이용하여 amylase 의 생산을 위한 최적배양조건을 검토하였으며, 아울러 고온균이 생산하는 amylase 의 내열성과 관련, 물리적, 생화학적 성질을 검토하고자 정제과정 및 효소의 안정성에 대하여 조사하였다.

실험재료 및 방법

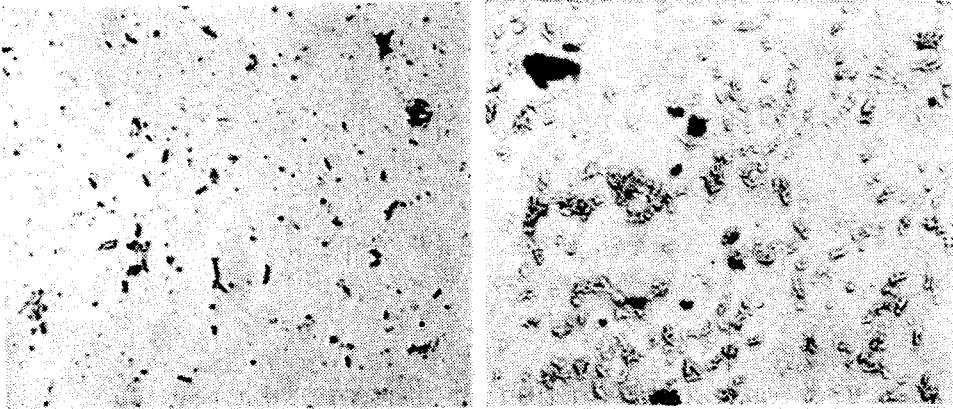
1. 실험재료

(1) 균주

본연구에 사용한 균주는 토양에서 분리한 고온균인 *Bacillus* sp. Y-127이었다.

(2) 시약

배지로 사용한 nutrient agar 및 nutrient broth 는 Difco Laboratory, soybean trypsin inhibitor 는 Sigma Chemicals, Sephadex G-150은 Pharmacia



1-(a)

1-(b)

Fig. 1. Photomicrography of Y-127 strain.

1-(a) : Gram stain without counterstain

1-(b) : Gram stain

Magnitude ($\times 300$)

Fine Chemicals, soluble starch는 Shimakyu's Pure Chem'cals 제품이었으며, 기타 시약은 Wako Pure Industry의 제품이다.

2. 실험 방법

(1) 균체의 배양

균체의 배양은 nutrient broth를 기본배지로 하여 요구되는 조성을 가한 뒤 진폭 7cm의 회전진탕 배양기(150rpm)에서 배양하였으며, ml 당 2.5 $\times 10^8$ cells의 seed를 2% (w/v)를 접종하였다.

(2) Amylase의 역가 측정⁽¹⁷⁾

Amylase의 역가측정은 1% 전분용액을 기질로 하여 효소액을 첨가해 10분간 반응시킨 뒤 0.1N-HCl로 반응을 정지시키고, 이를 0.005% I₂-0.5% KI액으로 발색시켜 blank와의 차이로서 결정하였으며 1% 전분용액의 blue value를 660nm에서 1분에 1% 저하시키는 효소의 역가를 Dextrogenic unit of Nagase(이하 D. U. N.) 1로 하였다.

$$D. U. N. = \frac{D-D'}{D} \times \frac{100}{10} \times n$$

$$\begin{cases} D : \text{blank의 흡광도} \\ D' : \text{반응액의 흡광도} \\ n : \text{효소의 희석배수} \end{cases}$$

그리고 효소활성은 10D. U. N.을 1 unit로 하였다.

(3) 단백질의 농도 측정⁽¹⁸⁾

Gel chromatography 용출액의 단백질농도는 280 nm에서의 흡광도 측정을 하였으며, 기타의 경우에는 Biuret 방법으로 550nm에서의 흡광도를 측정하여 단백질의 농도를 정량하였고 표준곡선은

serum albumin으로 작성하였다.

(4) 효소의 정제^(19,20)

균체를 제거한 배양액에 (NH₄)₂SO₄를 가해 효소를 침전시킨 뒤, 투석하고 Sephadex G-150을 사용하여 gel chromatography를 통해 정제하였다. 염석과정중에 일어나는 amylase의 proteolysis를 방지하기 위하여 soybean trypsin inhibitor를 효소액 1ml 당 0.5mg이 되게 첨가하여 사용하였다.

실험결과 및 고찰

1. 균주의 분리 및 선정

소량의 토양을 70°C의 생리식염수에 가해 1시간 동안 열처리를 한 뒤, 이의액 2ml를 18ml의 nutrient agar 배지에 가해 30시간 동안 70°C에서 plate culture하여 287주의 균을 분리하였다. 이들 중 70°C에서의 amylase 활성이 가장 좋은 Y-127을 본 실험의 균주로 선정하였다. 본 실험에서는 균주의 동정보다는 amylase의 생산이 목적이었으므로 균주의 동정에 대한 생리적 실험은 많이 못하였으나 현미경사진을 통한 Fig 1-a와 b등을 통한 형태학적인 특성을 검토한 결과⁽²¹⁾ gram 양성, rods, catalase 양성, facultative aerobe 또는 anaerobe, 내열성 포자형성등으로 미루어 *Bacillus* sp.로 추정되었으며 이를 *Bacillus* sp. Y-127로 명명하였다.

2. 배양온도와 pH의 영향

Nutrient broth를 기본 배지로 하여 amylase의

생산을 위한 온도의 영향을 30°C에서 90°C 사이에서 검토한 결과 균체의 생육과 amylase의 활성은 60°C에서 가장 높았다(Fig. 2). 따라서 이하에서는 최적배양온도와 효소활성 측정온도는 60°C로 하였다.

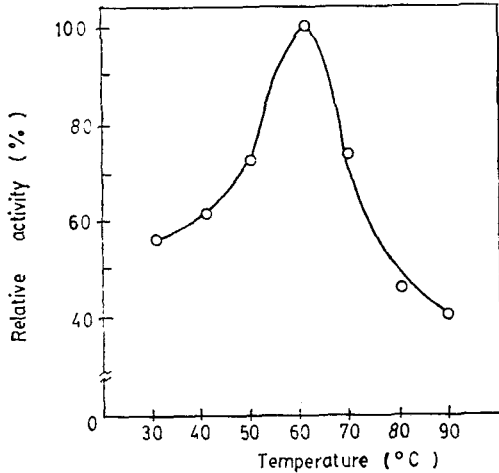


Fig. 2. Effect of Temperature on the Production of Amylase (at pH 7.0)

pH에 따른 영향을 Fig. 3에서와 같이 4~10사이에서 검토한 결과, 균체의 생육과 효소활성은 pH 7.0에서 가장 좋았으므로 최적 pH는 7.0으로 결정하였다.

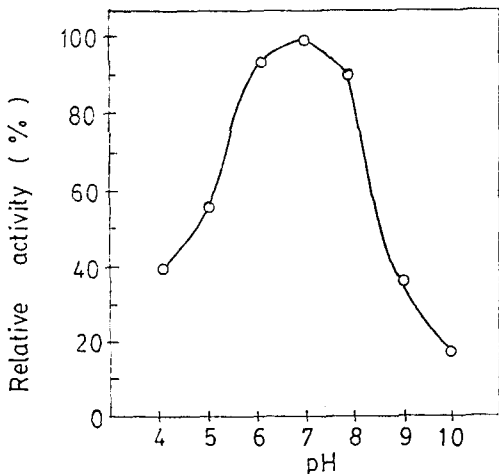


Fig. 3. Effect of pH on the Production of Amylase (at 60°C).

3. 배양시간에 따른 영향

Nutrient broth에서 48시간 배양한 seed (2.5×10^8 cells/ml)를 2% (v/v)되게 배지에 접종하여 균의 생육과 배양시간에 따른 효소의 활성을 비교 검토

하였다(Fig. 4).

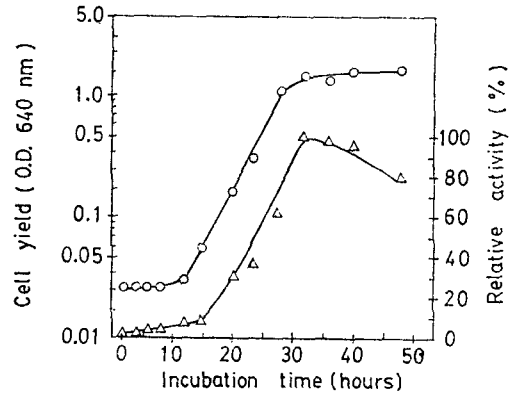


Fig. 4. Effect of Incubation Time on the Production of Amylase (pH 7.0 and 60°C).

○—○ : cell yield
△—△ : amylase activity

그 결과 균체의 생육은 32시간 배양에서 최고를 보였으며 그 이후부터는 증가가 거의 없었다.

효소의 활성도 32시간 배양에서 최고를 보인뒤 점차 감소되었으며, 이는 배지속의 영양원의 고갈 등에 의해 균이 정지기에 들어가고, Stein 등²²⁾이 보고한바와 같이 균주 자체가 생산하는 protease에 의해 amylase가 분해되기 때문이라고 생각된다. 이러한 현상을 방지하기 위해 Stein 등⁽²²⁾은 diisopropyl phosphofluoride 또는 trypsin inhibitor의 첨가가 필요하다고 보고하였으며, 따라서 본실험에서는 protease의 저해제로 soybean trypsin inhibitor를 정제과정에서 이용하였다.

4. 영양원에 의한 영향

(1) 탄소원의 영향

효소의 생산을 위한 탄소원의 영향을 검토하기 위해 각 탄소원을 1% (w/v)씩 배지에 첨가한 다음 효소의 활성을 비교한 결과 starch, lactose 및 dextrin 등은 amylase의 생산성이 크게 증가되었으나 fructose, galactose, glucose, maltose, sucrose 나 xylose를 사용하였을 때는 amylase의 생산이 control과 큰 차이가 없었다. 이중 가장 amylase의 활성이 높은 starch를 탄소원으로 선정하고, starch 농도에 따른 영향을 검토한 결과 2% (w/v)까지는 amylase의 생산량이 증가되었으나 그 이상의 농도에서는 생산량이 점차 감소하였다(Fig. 5). 따라서 이하에서는 starch를 배지에 2% (w/v) 첨가하여 사용하였다.

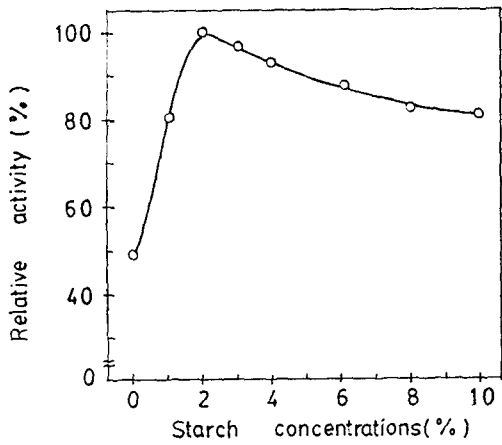


Fig. 5. Effect of starch concentrations on the production of amylase (pH 7.0 and 60°C).

(2) 질소원의 영향

배지속에 질소원으로서 ammonium sulfate, ammonium chloside 및 urea 를 0.5% (w/v)씩 첨가하여 검토한 결과 amylase 의 생산을 위한 질소원으로서는 urea 가 가장 좋았으며 urea 농도에 따른 amylase 생산은 Fig. 6에서와 같이 N함량기준으로서 0.2% (w/v)일때가 가장 좋았다.

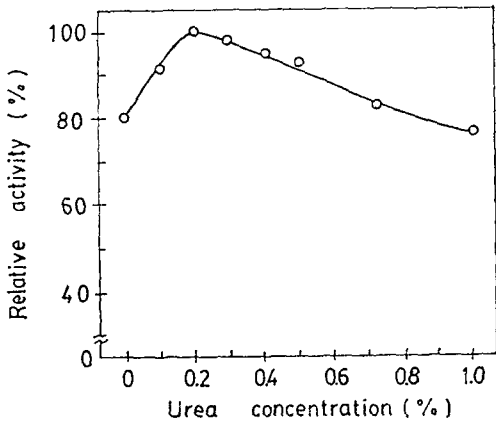


Fig. 6. Effect of Urea Concentrations on the Production of Amylase (pH 7.0, 60°C and 2% starch).

(3) Mg 와 K 및 P 의 영향

Amylase 생산에 미치는 Mg 이온의 영향을 검토하기 위해 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 와 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 를 Mg 농도로서 0~0.1% (w/v)까지 농도별로 첨가한 다음 비교하였다. 그 결과 Fig. 7에서와 같이 $MgSO_4 \cdot$

$7H_2O$ 가 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 보다 효과가 더 좋았으며 Mg 의 농도가 0.02% (w/v)일때 최고의 활성을 나타내었다.

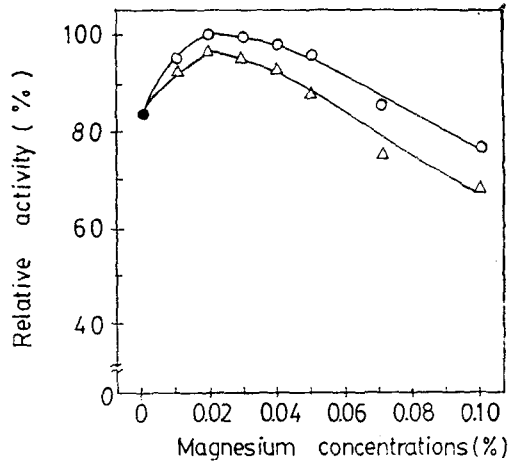


Fig. 7. Effect of Magnesium Sources and Concentrations on the Production of Amylase. (pH 7.0, 60°C, 2% starch 0.2% urea and 0.02% potassium phosphate, dibasic)

○—○ : magnesium sulfate
 ○—○ : magnesium chloride

K 및 P 의 종류와 농도에 따른 amylase 생산을 검토하기 위하여 KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , K_3PO_4 를 배

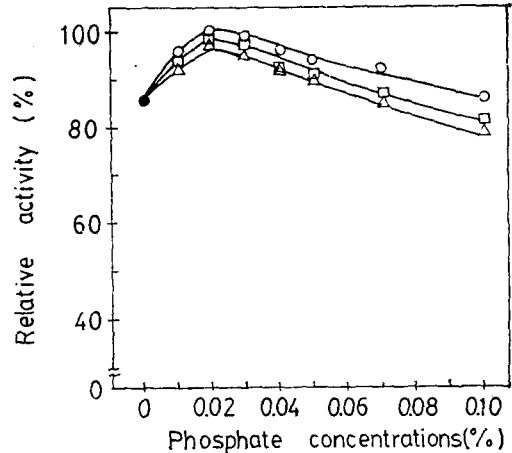


Fig. 8. Effect of Phosphate Sources and Concentrations on the Production of Amylase (pH 7.0, 60°C, 2% starch and 0.2% urea).

□—□ : potassium phosphate, monobasic
 ○—○ : potassium phosphate, dibasic
 △—△ : potassium phosphate, tribasic

지에 0.01%에서 0.1%까지 첨가한뒤 배양하여 검토한 결과 Fig.8에서와 같이 K_2HPO_4 가 가장 좋았으며 P의 농도로서 0.02% (w/v)에서 가장 높은 활성을 나타내었다.

(4) 천연물의 영향

천연물로서 yeast extract, corn steep liquor, beef extract, polypeptone 을 0.4% (w/v)씩 첨가하여 배양한 결과 yeast extract가 amylase의 생산에 가장 좋았으며 yeast extract의 농도가 0.2% (w/v)일 때 가장 높은 활성을 나타내었다(Fig. 9).

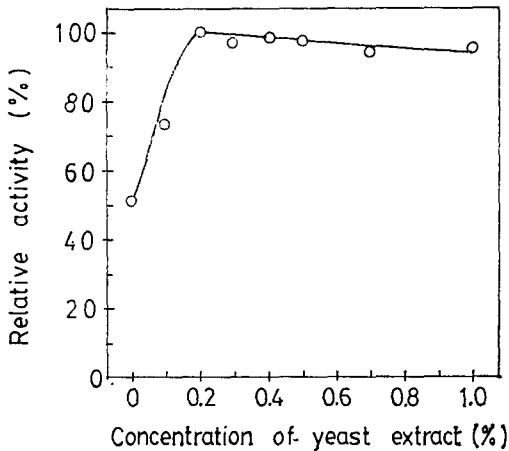


Fig. 9. Effect of yeast extract on the production of amylase.

이상에서 얻어진 최적 배양조건은 Table 1과 같이 nutrient broth 0.8% (w/v), soluble starch 2% (w/v), urea 0.2% (w/v, N 기준), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02% (w/v, Mg 기준), K_2HPO_4 0.02% (w/v, P 기준), yeast extract 0.2% (w/v), 배양온도 60°C 및 pH 7.0이었다.

5. 효소의 정제^{19, 20)}

Table 1과 같은 최적 조건하에서 *Bacillus* sp. Y-127을 배양한 다음 10,500×g에서 15분간 원심분리하여 조효소액을 얻은 다음, 이 조효소액에 $(NH_4)_2SO_4$ 를 20% 첨가시켜 12시간동안 5°C에서 방치하고 원심분리하여 침전물을 제거하였다. 여기에 다시 $(NH_4)_2SO_4$ 를 40% 포화가 되게 첨가하여 위와같은 방법으로 amylase의 침전물을 얻고, 원심분리하여 침전물을 소량의 phosphate buffer로 용해시킨후 여기에 soybean trypsin inhibitor를 0.5mg/ml가 되게 첨가한뒤 0~4°C에서 증류수로 24시간동안 투석하였다.

그 후 이 투석액을 pH 7.0, 0.2M phosphate

Table 1. Optimal culture conditions and medium composition on the production of amylase by *Bacillus* sp. Y-127.

Incubation time	32 hours
Temperature	60°C
Carbon source	2% (w/v) of starch
Nitrogen source	0.2% (w/v) of urea, nitrogen base
K and P source	0.02% (w/v) of potassium phosphate, dibasic, phosphate base
Magnesium source	0.02% (w/v) of magnesium sulfate, magnesium base
Yeast extract	0.2% (w/v)
Nutrient broth	0.8% (w/v)

buffer를 사용하여 Sephadex G-150 column(40×300mm)에서 유속 10ml/hr로 용출하여 5ml씩 분획하였다. 이때 amylase의 활성이 검출되는 13번과 33번사이의 fraction을 모은 다음 다시 위와같은 조건으로 염색 및 투석하여 동일 조건으로 rechromatography를 행하였다(Fig. 10). 그 결과 32~48번 사이의 fraction에서 단백질의 함량과 거의 일치되는 peak를 얻었으며 따라서 거의 정제된 amylase fraction을 얻을 수 있었다. 이를 다시 염색 및 투석한 결과 조효소액보다 123배의 비활성 증가를 볼 수 있었다(Table 2).

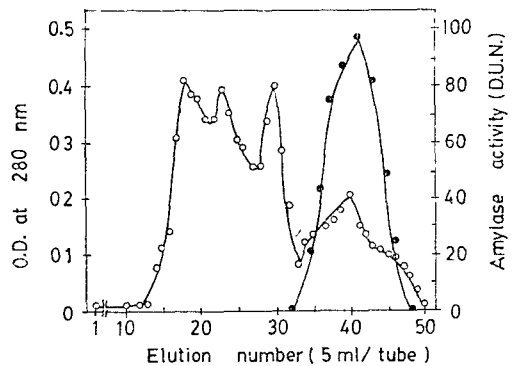


Fig. 10. Column Rechromatogram of Amylase on Sephadex G-150(column size: 40 × 300mm, flowrate: 10ml/hour).

○—○ : O. D. at 280nm
●—● : amylase activity

Table 2. Summary of Purification Procedure of Amylase.

Procedure	Volume, ml	Protein, mg/ml	Total activity, D. U. N.	Specific activity, D. U. N. /m protein	Yield, %	Purification fold
Culture broth	1,276.0	4.08	7,184	1.38	100.0	1.0
Ammonium sulfate precipitation	9.6	6.80	1,704	26.1	23.7	4.2
Sephadex G-150 chromatography	4.2	3.00	1,443	114.5	20.1	82.9
Sephadex G-150 rechromatography	2.9	0.90	444	170.0	6.2	123.0

6. 효소의 pH 안정성 및 열안정성

(1) pH 안정성

위에서 얻은 효소액을 희석한뒤 여기에 pH 3에서 10까지의 완충액을 1:1의 비율로 가하여 4°C에서 12시간 방치한뒤 잔존활성을 측정한 결과 Fig. 11에서 볼 수 있는 바와 같이 pH4.0~pH7.0 사이에서 안정성을 나타내었다.

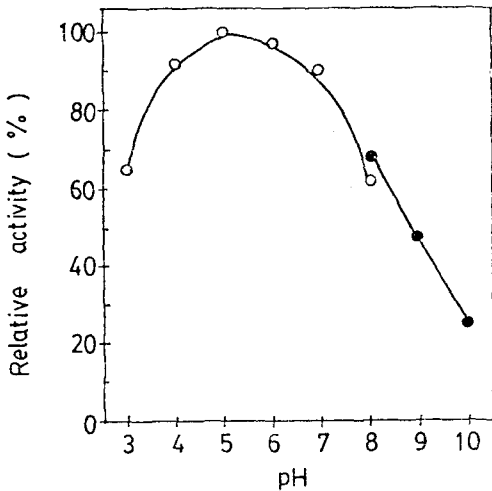


Fig. 11. Effect of pH on the Stability of Amylase(at 4°C, for 12 hours).

○—○ : Na₂HPO₄-citric acid buffer
●—● : Na₂CO₃-boric acid-KCl buffer

Fukumoto³⁰ 등은 pH 안정성이 액화성 세균은 pH 4.8~10.6, 당화성 세균은 pH4.0~7.8, *Rhizopus* 는 5.4~7.0, *Asp. oryzae* 와 *Asp. niger* 는 4.7~9.5에서 각각 안정성이 있다고 보고하였으며, 본 *Bacillus* sp. Y-127의 pH 안정성은 Fukumoto 등이 보고한 당화성 세균과 유사한 것을 보여주었다.

(2) 효소의 열안정성

정제효소(4.08mg/ml)를 0°C 부터 70°C 까지 각

온도에서 30분과 1시간씩 처리한뒤 급냉하여 잔존활성을 측정한 결과 0°C에서 60°C까지는 잔존활성이 95~85%로서 비교적 안정하였으나 70°C에서는 1시간 처리시 75%정도로서 60°C 이상에서는 열에 의한 불활성화 속도가 증대되었다.

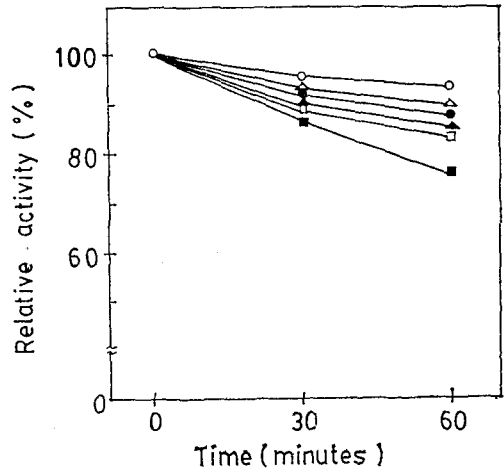


Fig. 12. Effect of temperature on the stability of amylase.

○—○ : 0°C, —△— : 30°C
—△— : 40°C, —●— : 50°C
—□— : 60°C, —■— : 70°C

Hasegawa 등¹¹, stein 등²²⁻²⁴, Toda 등¹⁰은 60°C 이상의 고온에서 내열성을 증가시키기 위하여 Ca²⁺ 이온의 첨가를 보고하였으며, Ca²⁺ 이온은 효소의 disulfide bridge를 강화하여 전체적인 효소구조의 안정성을 증가시킨다고 보고하였다. 이러한 효소의 열안정성과 효소의 생화학적 성질에 대하여서는 차후에 보고하고자 한다.

요 약

고온균종에서 amylase의 생산능이 우수한 *Bacillus* sp. Y-127을 토양에서 분리, 선정하고 다음과

같은 실험결과를 얻었다.

1. Amylase 생산의 최적배양조건은 nutrient broth 0.8% (w/v), soluble starch 2% (w/v), urea 0.2% (w/v, N기준), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02% (w/v, Mg 기준), K_2HPO_4 0.02% (w/v, P기준), yeast extract 0.2% (w/v), 60°C, pH7.0이었다.

2. Amylase 를 $(NH_4)_2SO_4$ 침전, 투석, Sephadex G-150 column chromatography 및 Sephadex G-150 column rechromatography 를 통해 정제한 결과 123 배의 비활성 증가를 볼 수 있었다.

3. Amylase 의 pH 안정성은 pH4.0에서 7.0 사이였으며, 온도에 따른 효소의 불활성도는 온도가 증가함에 따라 증대되었다.

謝 意

이 연구는 1980년도 문교부 학술조성비로서 실험한 결과이다.

참 고 문 헌

- Greenwood, C.F. and E.A. Milne: In Advances in carbohydrate chemistry, 23, 281, M.L. Wolform, Academic Press, N.Y. (1962)
- Whelan: In Methods in carbohydrate chemistry, IV, 252, R.L. Whistler (eds.), (1965)
- Wayne W. Umbreit: Advances in Applied Microbiology, 7, 273, Academic, N.Y. (1965)
- John R. and Dexter French: Arch. Biochem. Biophys., 100, 451, (1963)
- J. T. Kung, V.M. Hanrahan and M.L. Caldwell: J. Am. Chem. Soc., 75, 5548, (1953)
- John R. Whitaker: Principles of enzymology for the food science, 442, Marcel Dekker Inc. N. Y., (1972)
- Byron. S., Miller. J.A., Johnson and Donald, L.P: Food Technol., Jan., 38, (1953)
- Marta S.M., Y. Pomeranz, and J.A. Shellenberger: Cereal Chem., 40, 442, (1963)
- B. L. Vallee, E. A. Stein, W.N. Sumerwell and E. Fischer: J. Biol. Chem., 234, 2901, (1959)
- H. Toda and K. Narita: J. Biochem., 63, 302, (1968)
- A. Hasegawa and K. Imahori: J. Biochem., 79, 469, (1976)
- G.B. Manning and L.L. Campbell: J. Biol. chem., 236, 2952, (1961)
- G.B. Manning and L.L. Campbell: *ibid.*, 236, 2958, (1961)
- L.L. Campbell and G.B. Manning: *ibid.*, 236, 2962, (1961)
- L.L. Campbell and P.D. Cleveland: *ibid.*, 236, 2966, (1961)
- A.K. Chandra, S. Medda, and A.K. Bhadra: J. Ferment. Technol., 58, 1, (1980)
- S. Y. Choi: M.O. Thesis, Yonsei University, (1974)
- 유주현, 양한철, 정동효, 양웅: 식품공학실험 I, 342, 탐구당, (1975)
- 日本化學會編: 新實驗化學講座, 20(1), 17, 丸善株式會社, (1978)
- S.P. Colowick and N.O. Kaplan: Methods in Enzymology, 22, 273, Academic press N. Y., (1971)
- Buchanan, R.E., In Bergey's manual of determinative bacteriology, 8th ed. R.E. Buchanan(ed), willlams and wilkins Comp. Publ. Baltimore, (1974)
- E. A. Stein and E.H. Fischer: J. Biochem., 232, 867, (1958)
- E. A. Stein, J. Hsiu, and E.H. Fischer: Biochemistry, 3, 56, (1963)
- J. Hsiu, E.H. Fischer, and E.A. Stein: Biochemistry, 3, 61, (1963)