

## 밀기울배지를 이용한 *Bacillus natto* $\alpha$ -Amylase 生産

김 광 · \*박 인 호 · \*선우양일  
동아대학교 공과대학 화학공학과  
\*동아대학교 자연과학대학 생물학과

### $\alpha$ -Amylase production of *Bacillus natto* IAM 1212 in the wheat bran medium

Kwang Kim, In Ho Park\* and Yangil Sunwoo\*  
Department of Chemical Engineering, College of Engineering,  
\*Department of Biology, College of Natural Sciences,  
Dong-A University, Busan 604-714, Korea

#### ABSTRACT

The liquifying  $\alpha$ -amylase production from *B. subtilis*, *A. oryzae* and *B. natto* using wheat and rice bran as low cost culture medium was investigated. Among 3 strains, *B. natto* showed heigest productivity of  $\alpha$ -amylase in the outer wheat bran medium. And the optimum culture condition is pH 6.8 and 37°C for the production of  $\alpha$ -amylase. The  $\alpha$ -amylase activity of the crude enzyme and the purified enzyme are 256 unit/ml and 10,700 unit/ml, respectively. The  $\alpha$ -amylase from *B. natto* cultrtured in outer wheat bran medium was purified into nearly a pure state(98.7%). And the molecular weight of the purified  $\alpha$ -amylase was 34,000.

#### 서 론

$\alpha$ -amylase(Amylo-(1,4)-dextrinase)는 extracellular enzyme를 분비하는 미생물에 의해 생산되고 있으며 전분과 glycogen등의  $\alpha$ -1,4-glucoside결합을 무작위로 가수분해하여 분자량이 비교적 큰 각종 올리고당을 생성시켜 최종 분해 생성물인 dextrin과 glucose단위의 중합체, maltose 그리고 소량의 glucose로 전환된다.  $\alpha$ -amylase는 전분으로부터 발효될 수 있는 당류를 생성하는 이외에 전분질 원료를 액화하여 물리적 성질을 변화시키므로써 공업적 생산품의 가공을 편리하게 하고 풍미를 향상시키는 호정화성질이 있다(1-3). Endoamylase인 액화형  $\alpha$  amylase의 특성은 glucose, maltose, maltotriose, maltotetrose, maltopentose 및 maltohexose를 생산하기 위해 amylose를 가수분해하며 maltoheptose를 maltohexose와 glucose로,

maltooctose를 maltohexose와 maltose로 각각 분해한다. *Bacillus subtilis*균에서 분비하는 액화형 amylase는 전분 syrup, 유아식, chocolate syrup, dextrose 생산 및 textile의 desizing 등 제과분야와 섬유공학분야 및 제약분야에서 널리 사용되어 왔다. 특히 고농도의 maltose syrup은 낮은 흡습성, 용액에서의 낮은 점도, 결정화 방지, 저당, 주정력의 증가 및 높은 열 안정 특성이 있어서 수분조절제, 결정방지제, 안정제, 담체와 bulking 작용제로서 사용되고 있어 (3,4) amylase의 효용성이 더욱 크다. *Bacillus subtilis*균에서 생성되는 amylase는 액화형 및 당화형 이외에도 이들의 중간 형태도 가질 수 있으나 최근 효소를 이용하는 식품에서는 액화공정에 이용되는 내열성 액화형 amylase가 많이 요구되고 있는 실정이다. *Bacillus natto*는 일본에서 끓인 콩의 발효에 의해 제조된 식물성 치즈인 "Natto"로부터 Sawamura에 의해 최초로 분리된

균주로서 extracellular protease를 생산하고, 또한 높은 활성을 갖는 액화형 amylase의 효소를 생산하는 것이 보고되었다(5). 이러한 amylase효소의 공업적 생산을 위해서는 보다 값싸고 풍부한 배양액을 사용할 필요성이 있으며 분리정제과정도 단순화할 필요가 있다.

그러므로 본 논문에서는 효소생산의 경제성을 제고시키기 위하여 저가의 배양배지로 사용할 수 있는 제분업계와 도정업계의 부산물인 밀기울과 쌀겨를 이용하여 *Bacillus amylase*의 생성공정을 개발하기 위하여 수행한 실험결과와 일부를 보고한다.

## 재료 및 방법

### 미생물과 배양조건

사용균주는 한국과학기술원 유전자은행에서 분양받은 *Bacillus subtilis* (ATCC 15245), *Bacillus natto*(IAM 1212), *Aspergillus oryzae*(IFO 30113)를 Bouillon-Yeast 배지, Glutamate-Citrate배지 혹은 외밀기울(첫번째 도정한 밀기울), 내밀기울(두번째도정 밀기울), 통밀분말 및 쌀겨로 구성된 배지(Table 1)에서 37°C, 24시간 배양하였다.

Table 1. Composition of culture medium containing wheat bran or rice bran

component	content
wheat bran or rice bran	30 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5 g
CaCO <sub>3</sub>	5 g
Tap water	1 l

### 액화활성 측정

액화활성측정은 Blue value method(6)에 따랐다. 0.2%(w/v) 가용성 전분과 1mM CaCl<sub>2</sub>가 포함된 20mM 초산완충액(pH 6.0) 200μl에 효소액 100μl를 첨가하여 37°C에서 10분간 반응시킨 후 발색시켜 660nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소 1 unit는 같은 조건에서 1분간에 10mg의 가용성전분을 가수분해할 수 있는 효소량으로 하였다.

### 단백질 측정

단백질 함량은 Lowry법(9)에 따라 750nm에서 흡광도를 측정하여 산출하였고 표준 단백질은 우혈청알부민을 사용하였다.

### 효소정제

배양액을 거르로 여과하여 밀기울이나 쌀겨를 제거한 후 여과액을 8,000rpm에서 15분간 원심분리하여 crude enzyme-용액 3l를 얻었다. 이 crude enzyme-용액을 ammonium sulfate precipitation, dialysis, CM-cellulose chromatography, Sephadex A-50 chromatography, Biogel P-100 chromatography 및 preparative PAGE electrophoresis를 통하여 정제하였다(Table 3)

## 결과 및 고찰

### 순수배지(GC, BY), 밀기울 및 쌀겨 배지에 따른 생성

*B. natto* IAM 1212는 *B. subtilis* Marburg strain의 α-amylase에 비하여 열안정성이 낮으나 α-amylase 생성은 5배정도로 높은 균주이다. 본 연구에서는 저렴한 원료를 이용한 공업적 효소생산을 목적으로 밀기울 성분(외밀기울, 내밀기울: 제일제당에서 제공)과 시중에서 구입하여 만든 통밀분말 및 김해지역 쌀도정공장에서 부산물로 나오는 쌀겨를 배지로 선택하여 3가지 표준 균을 배양하였다. 각각을 24시간 배양시킨 다음 배양액에 분비된 단백질양과 액화활성을 측정된 결과는 Table 2와 같다. 세 균주중에서 액화형 α-amylase 효소활성이 *B. natto* 균에서 가장 높은 액화형 α-amylase 활성이 나타났는데 배지별로는 외밀기울을 사용한 배지에 가장 높은 효소활성이 나타났다. *B. subtilis*와 *A. oryzae*의 경우는 순수배

Table 2. Protein content and liquefying activity in the various culture medium

strain	medium	protein (mg/ml)	liquefying activity (unit/ml)
<i>B. subtilis</i> ATCC 15245	BY*	2.22	27.03
<i>A. oryzae</i> IFO 30113	GC*	1.04	81.08
<i>B. natto</i> IAM 1212	GC*	2.20	27.30
	WO*	2.41	256.00
	WI*	2.25	23.90
	WW*	2.20	96.00
	RB*	3.00	137.00

\*BY, GC, WO, WI, WW, and RB mean Bouillon-yeast extract medium, glutamate-citrate medium, outer wheat bran medium, inner wheat bran medium, whole wheat podder medium, and rice bran medium.

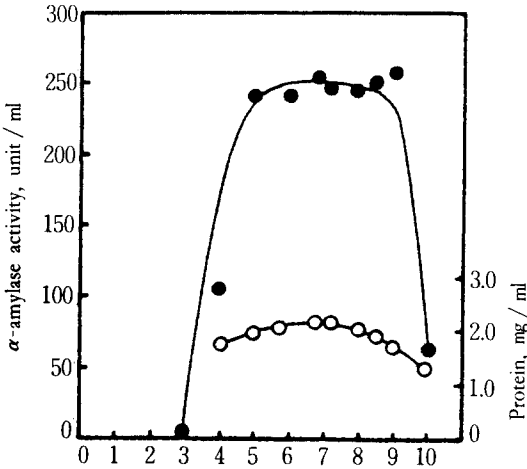


Fig. 1. Effect of pH of outer wheat bran culture medium for α-amylase production by *B. natto* at 37°C: Protein(○), liquefying α-amylase(●).

지와 밀기울 및 쌀겨 배지에서 효소활성에는 큰 차이가 없었다. 외밀기울 배지에서 높은 효소생산능을 갖는 *B. natto*균의 최적효소생산 조건을 조사하기 위하여 배양액의 pH를 3.0-10.0으로 조정하고, 온도를 20-60°C로 조정하여 균을 배양한 후 조효소액의 액화활성과 단백질양을 측정된 결과 최적 pH는 6.8-7.2이었으며 최적온도는 37°C였다(Fig. 1&2).

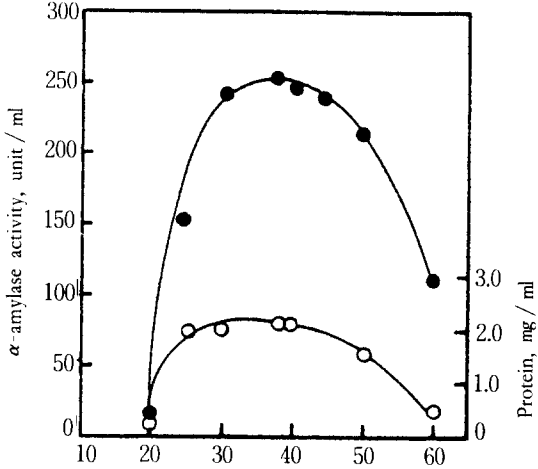


Fig. 2. Effect of temperature of outer wheat bran culture medium for α-amylase production by *B. natto* at pH 6.8: Protein(○), liquefying α-amylase(●).

외밀기울 배지에서 생산된 *B. natto* α-amylase의 분리정제

pH 7.5에서 ammonium sulfate의 포화농도를 30, 40, 50, 60, 70, 그리고 85%로 변화시켜 침전시킨 뒤 상등액의 액화활성을 측정된 결과 각각 190, 250, 260, 21, 7, 그리고 3.5 units/ml로서 85% ammonium sulfate 포화농도에서 침전함을 확인하였다. 침전된 효소를 투석한

Table 3. Purification of α-amylase from *B. natto* IAM 1212 cultured in outer wheat bran medium

Purification step	Volume (ml)	Total Protein (mg)	Liquefying activity (units / ml)	Total liquefying activity (*10 <sup>3</sup> units)	Specific activity (units / mg)	Fator (fold)	Yield (%)
Crude medium	3000	7230.0	256.0	768.0	106.2	1	100
Dialysis	1000	1450.6	511.1	511.1	352.2	3.3	66.5
CM-cellulose	240	308.2	932.1	223.7	725.9	6.8	29.1
DEAE-Sephadex A-50(I)	70	57.1	1577.1	110.4	1933.4	18.2	14.4
Bio Gel P-100	50	31.7	1940.0	97.0	3040.8	28.6	12.6
DEAE-Sephadex A-50(II)	30	5.1	673.3	20.2	3960.8	37.2	2.6
Preparative disc gel electrophoresis		2.2		10.7	4881.6	46.0	1.3

후 CM-cellulose 이온교환크로마토그래피를 한 결과 crude medium의 총단백질의 29.1%가 수회되었으며 액화활성은  $2.2 \times 10^6$  unit, 비활성은 725.9 unit/mg protein으로서 수율은 66.5%를 나타내었다. DEAE-Sephadex A-50 column (1.5×45cm) chromatography에서는 0.15-0.2M NaCl농도에서 용출되었으며 최고 비액화활성치는 4881.6 units/mg이었다. 각 효소정제 단계에서의 단백질, 액화활성, 비활성도 및 정제배수를 Table 3에 나타냈다. 최종적으로 정제된  $\alpha$ -amylase를 전기영동을 통하여 분자량을 계산한 결과 34,000dalton이었다.

## 요 약

세균액화형의  $\alpha$ -amylase의 공업적 생산의 효율성을 높이기 위한 연구의 일환으로 제분공장과 도정공장의 부산물인 밀겨울과 쌀겨를 이용하여 배양배지를 조성하고 *B. subtilis*와 *A. oryzae* 및 *B. natto*를 배양한 후 액화형  $\alpha$ -amylase의 활성을 조사한 결과 *B. subtilis*와 *A. oryzae*의 경우 순수배지와 비교하였을 때 큰 차이가 없었으나 *B. natto*의 경우 외밀겨울에서 액화활성이 다른 대조구에 비하여 크게 나타났는데 순수 배지를 이용한 액화활성은 crude enzyme에서 27.3 unit/ml이고, 최종 액화 활성은 1,255.8u/ml인데 반해 외밀겨울을 이용한 액화 활성은 crude enzyme에서 256.0 unit/ml이고, 최종 액화 활성은 10,700 unit 이었으며 최적 배양온도는 37°C이며 최적 배양액 pH는 6.8이었다. 그리고 정제된 효소의 분자량은 34,000dalton이었다. 이상의 결과로 보아 밀겨울이  $\alpha$ -amylase의 공업적 생산을 위한 저렴한 기질로 사용될만한 가치가 있다고 사료된다.

## 참 고 문 헌

1. W. W. Windish and N. S. Mhatre(1965), *Microbial Amylase.*, p.273. Academic Press, New York.

2. 大西正健, 坂野好幸(1989), 마미라-세., 3rd ed., 141, 學會出版社セニター.
3. The Amylase Research Society of Japan (1988), *Handbook of Amylases and Related Enzymes.*, p. 18, Pergamon Press., Tokyo.
4. B. C. Saha, J. G. Zeikus (1989), *Biotech. Bioeng.*, **34**, 299.
5. T. Yamaguchi., H. Matsuzaki and B. Maruo (1969), *Gen. Appl. Microbiol.*, **15**, 97.
6. H. J. Fuwa (1954), *Biochem. (Tokyo).*, **41**, 580.
7. M. J. Somogyi (1952), *Biol. Chem.*, **195**, 19.
8. N. J. Nelson (1944), *Biol. Chem.*, **153**, 395.
9. O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall(1951), *J. Biol. Chem.*, **193**, 265.
10. U. K. Laemmli (1970), *Nature.*, **227**, 680.
11. K. Weber and M. Osborn. (1969), *J. Biol. Chem.*, **244**(16), 4406.
12. C. E. Weill and P. Hanke (1962), *Anal. Chem.*, **34** (13), 1736.
13. T. Tojo, T. Tokuyama and B. Maruo (1983), *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, **57**(8), 717.
14. J. Fukumoto and S. Okada (1963), *Ferment. Eng.*, **41**(8), 427.
15. Y. Yoneda, K. Yamane and B. Maruo (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **50**(3), 765.
16. K. Kadowaki, J. Hosoda and B. Maruo(1965), *Biochim. Biophys. Acta.*, **103**, 311.
17. T. Kokubu, I. Karube and S. Suzuki (1978), *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **5**, 233.
18. S. Akabori, T. Ikenaka and B. Hagihara (1954), *J. Biochem.*, **41**(5), 577.
19. M. Graber and D. Combes (1990), *Biotech. Bioeng.*, **36**, 12.

(Received; May 20, 1991, Accepted; July 2, 1991)