

Bacillus cereus β -아밀라아제의 정제 및 이화학적 성질

송 예 헌

리라병원 보험심사과

Purification and Some Physicochemical Study of *Bacillus cereus* β -Amylase

Ye-Hun Song

Dept. of Medical Insurance, Leerha General Hospital, Cheongju, 360-568, Korea

Abstract

Bacillus cereus β -amylase was purified by Sephadex G-100 gel filtration, CM Sephadex C-50 ion exchange chromatography and CM Sephadex C-50 ion exchange rechromatography. The purified enzyme showed 871 unit/mg of specific activity. The purified enzyme was identified as homogenous by disc PAGE, SDS-PAGE and analysis of reaction product. The purified enzyme showed optimum pH 7.0, optimum temperature 50°C, and was stable at 0~50°C and at pH range of 6~10.

Key words : *Bacillus cereus*, β -amylase

서 론

β -아밀라아제(EC 3.2.1.2, α -1,4-glucan maltohydrolase)는 녹말이나 글리코겐 등 α -1,4-글루칸의 비환원성 말단에서부터 차례대로 가수분해하여 말토오스를 생성하는 효소이다.

말토오스는 전분공업, 제당공업, 제과공업 등의 식품공업에 필수적인 당으로 날로 수요가 증가하고 있다. 또, 의료에서 당뇨병 환자는 다른 당은 섭취할 수 없으나 말토오스는 지장없이 섭취할 수 있다. 그래서 말토오스는 당뇨병 환자용으로 많이 필요하며 말토오스 제조에는 β -아밀라아제가 필수적이다. 그러므로 당뇨병 환자들을 고통에서 해방시키기 위해서는 가장 효율적으로 말토오스를 생산하는 β -아밀라아제를 얻는 것이 중요하다.

β -아밀라아제는 식물에만 존재하는 것으로 알려져 왔으나 미생물도 β -아밀라아제를 생산하는 것으로 밝혀졌다. 그중에서 고구마 β -아밀라아제만 분자량 55,707¹⁾의 동일 서브유니트로 넷으로 형성된 분자량 222,828의 테트라머일뿐 나머지 다른 효소는 대부분

분자량 5만 전후의 모노머이다. Ann등²⁾은 산화 전분을 효소에 결합시켜 활성인 모노머를 얻는 데 성공하여 고구마 β -아밀라아제의 서브유니트 구조는 촉매기능에는 관계 없고 효소의 안정화 기능에만 관여한다는 사실을 밝혔다.

대부분의 β -아밀라아제는 SH 시약으로 실활되기 때문에 SH 효소^{3,4)}로 알려져 왔으나 콩 β -아밀라아제를 통한 자세한 연구로 필수적이 아닌 것으로 밝혀졌다.

가장 먼저 알려진 것은 고구마 β -아밀라아제⁵⁾이며, 그외에 콩,¹⁰⁾ 밀,¹¹⁾ 보리,^{12, 13)} 무우,¹⁴⁾ 등 여러 식물에서 보고되어 있다. 미생물 β -아밀라아제는 1970년대에 발견되기 시작하여 *Bacillus cereus*, *B. polymixa*, *B. megaterium* 등의 세균^{15, 21)}과 *Streptomyces* sp.²⁵⁾ 등의 방선균 등에서 발견되었다.

식물은 재배기간이 길고, 효소를 정제하는 데 시간이 많이 걸리기 때문에 β -아밀라아제를 얻는 데는 미생물이 효과적이다. 그래서 아마노제약에서 제조하고 있는 *Bacillus cereus* β -아밀라아제를 택하여, 크로마토그래피로 정제한 다음 성질을 검토하여 말토오스 제조에 응용하고자 연구하였다.

재료 및 방법

1. 시 약

Bacillus cereus β -아밀라아제는 일본 아마노제약(天野製藥)에서 시판하고 있는 조효소 제품을 사용하였다. 크로마토그래피용 Sephadex G-100과 CM Sephadex C-50은 Pharmacia사 제품을 사용하였다. 나머지 시약은 특급 내지 일급을 사용하였다.

2. 효소의 정제

1) Sephadex G-100 겔크로마토그래피

아마노제약의 *Bacillus cereus* β -아밀라아제를 황산암모늄으로 80% 포화시켜 침전시킨 다음 0.1M NaCl을 함유한 0.01M acetate buffer(pH 6.5)로 평형화시킨 3 × 95cm의 Sephadex G-100 컬럼에 가하여 같은 완충액으로 용출시켰다. 그 결과 활성과 단백질 피크가 일치하는 분획을 합쳐 황산암모늄으로 침전시켜 농축한 다음 CM-Sephadex C-50에 적용하였다.

2) CM Sephadex C-50 이온교환 크로마토그래피

Sephadex G-100에서 얻은 활성피크를 0.01M 아세트산 완충액(pH 5.0)에 투석하여 평형화한 다음 같은 완충액으로 평형화시킨 1.3 × 30cm의 CM-Sephadex C-50 컬럼에 가하여 흡착시킨 후 같은 완충액 300ml로 세정하였다. 그 다음 같은 완충액 250ml와 5M NaCl이 들어 있는 같은 완충액 250ml를 사용하여 NaCl의 0~0.35M 직선 농도기울기로 효소를 용출시켰다.

3) CM Sephadex C-50 이온교환 리크로마토그래피

위에서 얻은 활성피크를 0.01M 아세트산 완충액(pH 5.0)에 투석하여 평형화한 다음 같은 완충액으로 평형화시킨 2.1 × 30cm의 CM-Sephadex C-50 컬럼에 가하여 흡착시킨 후 같은 완충액 300ml로 세정하였다. 다음, 같은 완충액 250ml와 0.5M NaCl이 들어 있는 같은 완충액 250ml를 사용하여 NaCl의 0~0.35M 직선 농도기울기로 효소를 용출시켰다.

3. 전기이동

1) 폴리아크릴아미드겔 전기이동

Davis²⁶⁾와 Orstein²⁷⁾의 방법에 따라 아크릴아미드를 7.5% 농도로 중합하여 pH 8.3의 Tris 완충액에서 컬럼당 20g을 가하여 4mA의 전류로 전기이동하였다. 전기이동후 Coomassie brilliant blue R-250으로 단백질을 염색시켰다.

2) SDS 폴리아크릴아미드겔 전기이동

7.5%의 아크릴아미드겔을 사용하여 0.1% SDS 존재하, pH 8.8의 Tris 완충액에서 컬럼당 20 μ g의 효소를 가하여 5mA의 전류로 전기이동시킨 후 Coomassie brilliant blue R-250으로 단백질을 염색하였다.

4. 분자량 측정

효소를 2-mercaptoethanol, SDS 존재 하에 100℃에서 3분 가열한 후 SDS 전기이동하였다. 마커로서는 내열성 RNA polymerase B(서브유닛 분자량: A: 180K, B: 140K, C: 100K, D: 42K, E: 39K)를 사용하였다. SDS전기 이동후 마커의 상대적 이동도로부터 분자량을 산정하였다.

5. 활성 측정

1) 기 질

가용성 전분 200mg을 소량의 물에 풀어 100℃에서 3분간 가열하여 녹인 후 1M phosphate buffer(pH 7.0) 0.5ml를 가하고, 나머지를 증류수로 채워 10ml로 하였다. 이 용액은 0.05M 인산 완충액 속에 2% 가용성 전분기질을 함유한다.

2) 효소용액

활성 측정 효소액은 0.05M 인산완충액(pH 7.0)으로 적정 농도로 희석하여 사용하였다.

3) 반응

상기와 같이 조제한 기질용액 0.5ml에 효소용액 0.5ml를 가하여 37℃에서 10분간 반응시킨 다음 Somogyi-Nelson법²⁸⁾으로 정량하였다. 활성은 이 조

건에서 1분간에 1 mol의 말토오스를 유리하는 효소력을 1unit로 하였다.

6. 단백질 정량

Lowry-Folin법²⁹⁾으로 정량하였다. 그러나 크로마토그래피의 분획은 280nm에서의 흡광도로 측정하였다.

7. 반응산물 분석

0.05M 인산완충액(pH 7.0) 중의 2% 가용성 전분 용액에 효소를 100 μ g/ml의 농도로 가하여 37 $^{\circ}$ C에서 15시간 반응시킨 다음 실리카겔 판(19.5 \times 19.5cm)에 spot하여 n-butanol-pyridine-water(8:1:1) 용매를 사용하여 37 $^{\circ}$ C에서 전개한 다음 황산-에탄올(1:9)로 발색시켰다.

8. 반응최적 온도

0.05M 인산완충액(pH 7.0) 중에서 효소(0.5 μ g/ml)와 1% 가용성전분을 각 온도에서 10분간 반응시켰다.

9. 반응최적 pH

효소(0.5 μ g)를 각 pH의 0.1M Britton-Robinson 완충액 중에서 1% 가용성전분 기질과 37 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응시켰다.

10. 온도 안정성

0.05M 인산완충액(pH 7.0) 중의 효소(5 μ g/ml)를 각온도에서 25분간 처리한 후 잔존 활성을 측정하였다.

11. pH 안정성

각 pH의 Britton-Robinson 완충액 중에서 5 μ g/ml 효소를 37 $^{\circ}$ C에서 6시간 처리한 후 잔존활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

황산암모늄으로 농축한 효소를 Sephadex G-100으

로 겔크로마토그래피하여 Fig. 1과 같은 결과를 얻었다. 이중 활성과 단백질이 일치하는 피크 중 순도가 높은 90~103 분획만을 모아 CM Sephadex C-50로 이온교환 크로마토그래피한 결과 Fig. 2와 같이 F I, F II 두 성분으로 나누어졌다. 이 중 양이 많은 F 피크만을 모아 다시 재크로마토그래피한 결과 Fig. 3과 같이 단일한 피크를 나타냈다. (Fig. 2, Fig. 3)

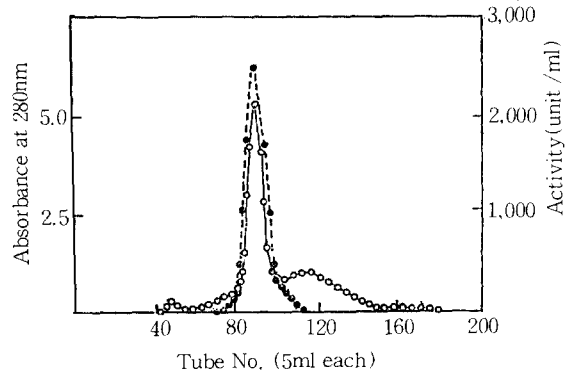


Fig. 1. Gel chromatography of *Bacillus cereus* β -amylase on a column of sephadex G-100.

Column size, 3 95cm; Buffer, 0.01M acetate buffer(pH 6.5); ●, absorbance at 280nm; ○, activity

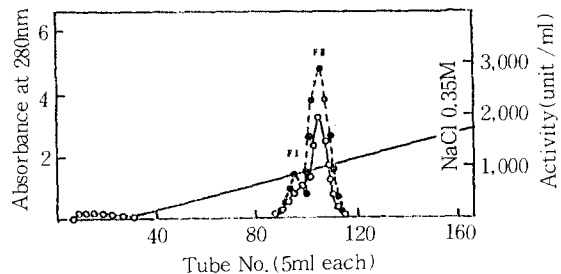


Fig. 2. Ion exchange chromatography of *Bacillus cereus* β -amylase on DEAE-cellulose.

Column size, 1.3 \times 30cm; buffer, 0.01M acetate buffer(pH 5.0); ●, absorbance at 280nm; ○, activity. The enzyme was eluted by linear gradient of NaCl concentration from 0(350ml) to 0.35M(350ml) in 0.01M acetate buffer(pH 5.0)

정제 효소의 폴리아크릴아미드겔 전기이동 결과는 Fig. 4의 A와 같이 균일한 밴드를 나타냈다. 정제효소는 SDS 폴리아크릴아미드겔 전기이동한 결과에서도

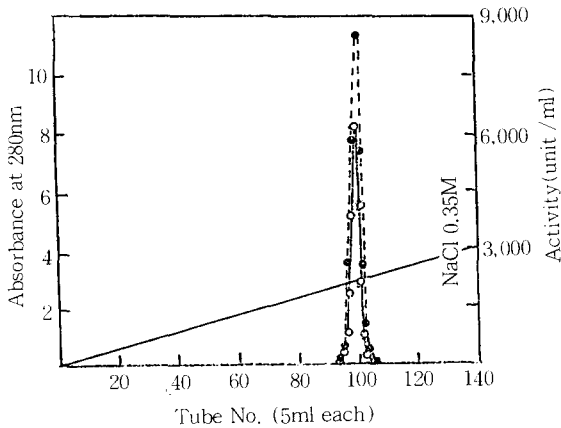


Fig. 3. Rechromatography of *Bacillus cereus* β -amylase on DEAE-Cellulose.

Column size, 2.1 \times 30cm Buffer: 0.01M acetate buffer (pH 5.0); ●, absorbance at 280nm; ○, activity. The enzyme was eluted by linear gradient of NaCl concentration from 0 (350ml) to 0.35M (350ml) in 0.01M acetate buffer (pH 5.0)

Fig. 4의 B와 같이 역시 순수한 단일 밴드를 나타냈다. 따라서 정제효소는 전기이동적으로 순수한 것으로 판단된다.

Fig. 4의 C는 마커의 전기이동 결과이다. 마커와의 상대적 이동도로부터 정제 효소의 분자량을 측정할 결과, 60,000을 나타냈다(Fig. 5). 한편, Biogel P-150을 사용한 *Bacillus polymyxa* No. 72의 경우¹⁹⁾는 44,000, Biogel P-100을 사용한 *Bacillus* sp. No. 2718의 경우는 42,000²⁰⁾, Sephadex G-200을 사용한 *B. megaterium*의 경우는 36000~38000¹⁵⁾으로 보고되어 있다. Sephadex G-100에 의한 *B. cereus* var. *mycooides*의 경우는 160,000, 80,000, 37,000 세 가지 분자량⁴⁾을 나타낸다. 이들이 아이소자임인가, 서브유닛구조에 의한 헤리회합인가에 대해서는 밝혀져 있지 않다. *B. cereus* BQ10-S1 Spd의 6M guanidine-HCl 존재하의 Sephacryl S-200에 의한 겔 크로마토그래피 결과로는 62,000, SDS-전기이동에 결과로는 60,000⁵⁾으로 보고되어 있다. 본 결과는 Nanmori 등의 결과²⁰⁾와 유사하다. 분자량의 차이가 나는 것은 균주에 의한 차이나 컬럼에 대한 흡착 가능성이 있다.

정제효소는 회수율 51.2%로서 871unit/ml의 활성

을 나타냈다(Table 1).

효소를 가용성 전분 기질과 15시간 반응시킨 다음 TLC로 반응산물을 분석한 결과 Fig. 6과 같이 생성물로서는 말토오스만 생겼다. 따라서, 정제효소는 β -아밀라아제에 틀림없으며, 효소적으로 다른 아밀라아제의 활성은 함유하지 않는 순수한 것으로 판단할 수 있다.

반응최적 온도는 Fig. 7과 같이 50℃를 나타냈다 이 결과는 50~60℃를 발표한 新家龍²⁰⁾, 60℃를 발표

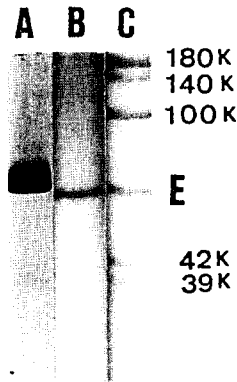


Fig. 4. Electrophoresis of *Bacillus cereus* β -Amylase.

A, Polyacrylamide disc gel electrophoresis of the enzyme, B, SDS polyacrylamide disc gel electrophoresis of the enzyme, C, SDS polyacrylamide disc gel electrophoresis of markers (RNA polymerase), E, *Bacillus cereus* β -amylase

Table 1. Purification Procedure of *Bacillus cereus* β -Amylase

Purification step	Specific activity (unit/ml)	Total activity (unit)	Total protein (mg)	Activity recover (%)
Crude	115	176,640	1,536	100.0
Sephadex G-100				
CM	560	123,984	221	70.2
Sephadex C-50	871	90,514	104	51.2

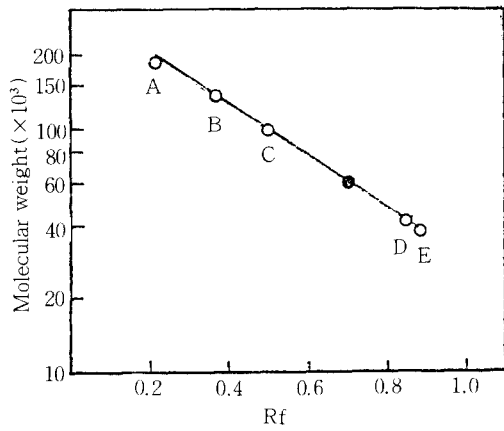


Fig. 5. Estimation of molecular weight for *Bacillus cereus* β-amylase by SDS PAGE.

A, 180K; B, 140K; C, 100K; D, 42K; E:39K ●. *Bacillus cereus* β-amylase

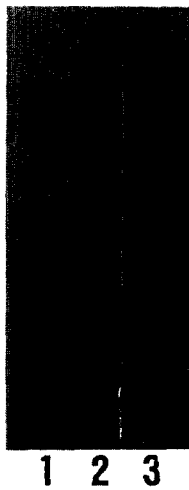


Fig. 6. Thin layer chromatography of reaction products of soluble starch by *Bacillus cereus* β-amylase.

The enzyme(0.1mg/ml) was reacted with 2% soluble starch in 0.05M phosphate buffer(pH 7.0) at 37°C for 15 hour. 1, Glucose, 2, Maltose 3, Reaction products

한 Nanmori²⁰⁾, 50~60°C를 발표한 Shinke 등의 결과

와 유사하다(Fig. 7).

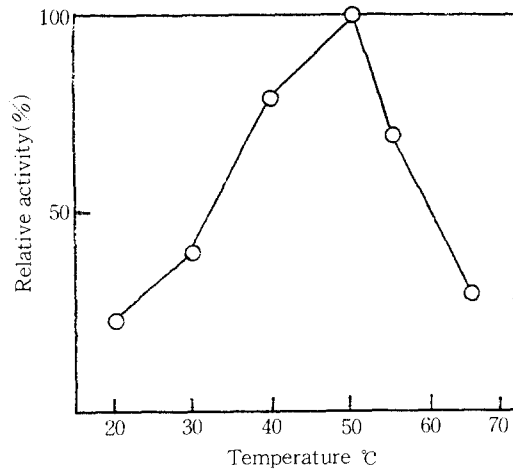


Fig. 7. Optimal temperature of *Bacillus cereus* β-amylase.

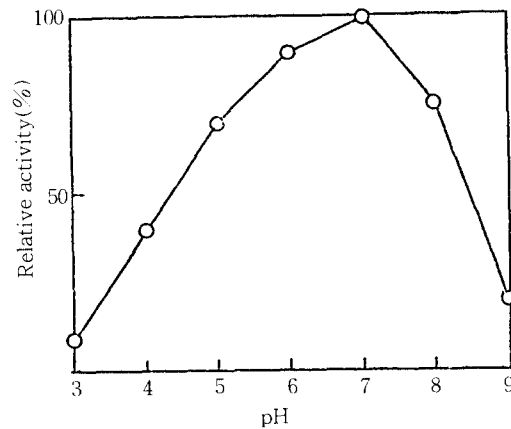


Fig. 8. Optimal pH of *Bacillus cereus* β-amylase.

반응최적 pH는 Fig. 8과 같이 pH 7.0을 나타냈다. 이 결과는 6~7로 발표한 新家龍²⁰⁾, 7~8로 발표한 Nanmori²⁰⁾, 7.0으로 발표한 Takasaki¹⁶⁾ 등의 결과와 유사하다.

온도 안정성은 Fig. 9와 같이 0~50°C까지 안정한 것으로 나타났다. Takasaki¹⁶⁾, 31)는 50°C까지 안정한 것으로 보고하였다. 한편 *B. polymyxa*는 50°C¹⁹⁾,

55℃²⁾, 37℃³³⁾까지, *B. megaterium*은 55℃까지³⁴⁾안정 한 것으로 보고되어 있다.

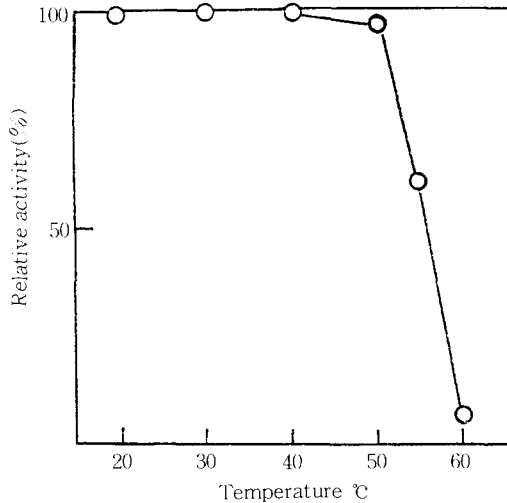


Fig. 9. Thermal stability of *Bacillus cereus* β-amylase.

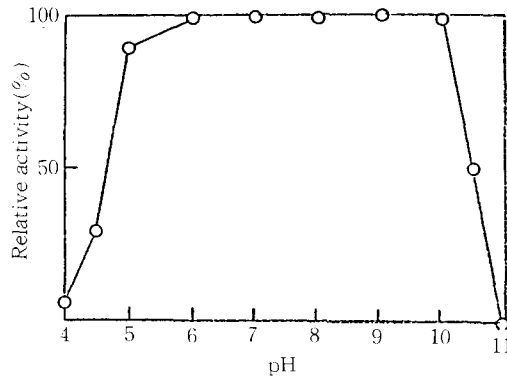


Fig. 10. pH stability of *Bacillus cereus* β-amylase.

pH 안정성은 Fig. 10과 같이 6~10까지 안정하였다. Takasaki¹⁶⁾는 6~10으로 보고하였다. *B. polymyxa*는 pH 5~9¹⁹⁾, *B. megaterium*은 pH 5~8³¹⁾로 보고되어 있다. *Bacillus* sp. 는 pH 5~8¹⁵⁾로 보고되어 있다.

이와 같이 *B. cereus* β-아밀라아제는 안정성 면에서 다른 미생물 β-아밀라아제보다 뛰어나다.

아마노제약의 *Bacillus cereus* β-아밀라아제를 Sephadex G-100 겔크로마토그래피, CM Sephadex G-100 이온교환크로마토그래피로 정제하였다. 정제효소는 871 unit /mg의 비활성을 나타냈고, 폴리아크릴아미드 전기이동과, SDS 폴리아크릴아미드 전기이동적으로 순수하였다. 반응산물은 말토오스만을 유리해 효소적으로도 순수하였다. 반응 최적 pH는 7.0, 반응 최적 온도는 50℃, 온도안정성은 50℃, pH 안정성은 6~10을 나타냈다.

참고문헌

1. 戸田弘子: 澱粉科學: 36, 87(1989).
2. Ann, Y. G., Iizuka, M, Yamamoto, T. and Minamiura, N: *Agric. Biol. Chem.*, 54, 769 (1989).
3. Englard, S., Sorof, S. and Singer, T. D. : *J. Biol. Chem.*, 189, 217(1951).
4. Ioto, M. and Yoshida, S. : *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, 22, 287(1958).
5. Riem, J. P. : Doctor Dissertation, Michigam State University(1961).
6. 竹田靖史, 會作進: 蛋白質酵素研究法, 蛋白質核酸別冊, 共立出版 東京, 438 (1976).
7. Spradlin, J. and Thoma, J. A. : *J. Biol. Chem.*, 245, 117(1970).
8. 三上文上, 野村啓一, 馬島けい, 森田雄平: 澱粉科學, 36, 67(1989).
9. Balls, A. K, Walden, M. K. and Thompson, R. R. : *J. Biol. Chem.*, 173, 9(1948).
10. Mikami, B., Aibara, S. and Morita, Y. : *Agric. Biol. Chem.*, 46, 943(1982).
11. Tkachuk, R. and Tipples, K. H. : *Cereal Chem.*, 43, 62(1986).
12. Cooper, A. H. and Pollock, J. R. A. : *J. Inst. Brew.*, 63, 24(1957).
13. Visuri, K. and Nummi, M. : *Eur. J. Biochem.*, 28, 555(1972).
14. 三上文上, 和田野晃: アミラ-ゼシンボジウム, 7,

요 약

- 79(1972).
15. 東原昌孝, 岡田茂孝: *아미라-제신보지움*, 6, 39(1971).
16. Takasaki, Y. : *Agric. Biol. Chem.*, 40, 1523 (1976).
17. Takasaki, Y. : *Report Ferment. Res. Inst.* 50, 29(1978).
18. 新家龍: *醱酵工學*, 57, 102(1979).
19. Murao, S. Ohyama, K. and Arai, M. : *Agric. Biol. Chem.*, 43, 719(1979).
20. Nanmori, T., Shinke, R., Aoki, K. and Nishira, H. : *Agric. Biol. Chem.*, 47, 941 (1983).
21. Nanmori, T., Shinke, R., Nakano, Y., Kitaoka, S. and Nisira, H. : *Appl. Microbial Biotechnol.*, 21, 383(1985).
22. 東原昌孝, 三吉新介, 岡田茂孝: *科學と工業*, 60 (3), 91(1986).
23. Kawazu, T., Nakanishi, Y., Uozumi, N., Sasaki, T., Yamagata, H., Tsukagoshi, N., and Udaka, S. : *J. Bacteriol.*, 169, 1564 (1987).
24. Shinke, R., Kunimi, Y. and Nishira, H. : *J. Ferment. Technol.*, 53, 698(1975).
25. Obi, S. K. C. and Odibo, F. J. C. : *Appl. Environ. Microbial.*, 47, 571(1984)
26. Davis, J. : *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 121, 321 (1964).
27. Orstein, L. : *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 121, 404 (1964).
28. Somogyi, M. : *J. Biol. Chem.*, 195, 19(1952).
29. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : *J. Biol. Chem.*, 193, 265 (1951).
30. 新家龍, 國見祐治, 谷川敬次, 西羅 寛: *아미라-제신보지움*, 9, 51(1974).
31. Takasaki, Y. and Yamanobe, T. (1981): *Enzymes and Food Processing*, ed. by Birch, G. G., Blakebrough, N., and Paker, K. J., *Applied Sci. Pub. Ltd.*, p. 73.
32. 岡田茂孝, 東原昌孝: *아미라-제신보지움*, 9, 61(1994).
33. Fogarty, W. M. and Griffin, P. J. : *J. Appl. Chem. Biotechnol.*, 25, 229(1975).
34. Higashihara, M and Okada, S. : *Agric. Biol. Chem.*, 38, 1023(1974)

(1993년 11월 17일 수리)