

대장균에서 발현된 *B. licheniformis*의 α -amylase 생성에 관한 연구

차 월 석 · 하 성 림 · *박 승 규
조선대학교 공과대학 화학공학과
*우일식품주식회사

A Study on the Production of α -amylase from *Bacillus licheniformis* Expressed in *E. coli*

Wol-Suk Cha, Sung-Lim Ha and *Seung-Kyu Park

Dept. of Chemical Engineering, Chosun University, Kwang-ju 501-759, Korea

*Wool IL Food Co. LTD : 450-20. Wonsoo-RI JangHang-Eup
Seocheon-gun Chunganam Korea

ABSTRACT

For the production of α -amylase cloned from *Bacillus licheniformis* expressed in *E. coli*, cultivating factors including the concentrations of glucose, maltose and acetic acid were investigated. The results were as follows: 1) Maximum α -amylase yield and maximum specific production rate obtained from glucose source were better than those achieved from maltose source. 2) The optimum production yield of α -amylase was obtained at 1.0ml/l or less of initial acetic acid concentration.

서 론

미생물을 이용하여 생물화학공학 제품을 경제적으로 생산하기 위하여서는 미생물을 고농도 배양하는 것과 미생물에 의한 제품의 비생산속도(specific production rate)를 향상시키는 것이 중요하다.

미생물을 고농도로 배양시키기 위해서는 많은 연구가 수행되고 있는데 현재까지 Yeast 및 *E. coli*에 대하여서는 많은 연구 결과가 보고되고 있다.

Yeast의 경우에는 산소 부족 및 포도당 농도가 높은 경우 대사산물로서 ethanol이 생성됨으로써 생성된 ethanol이 yeast의 성장을 저해하므로 포도당을 적절하게 주입하며 산소를 충분히 공급함으로써 yeast의 세포농도를 증가시키는 배양 방법이 보고되었으며(1-3), 최근에는 yeast의 glycosylation 특성 때문에 분자유전학적 분야에서 많은 연구가 진행되

었다. Yeast glycosylation의 특성은 N-linked glycosylation시 올리고당이 단백질에 결합하는 core부분은 포유류 단백질의 그것과 일치하나 다른 부분은 높은 농도의 mannose단위만으로 이루어져 있어 'complex' 올리고당이 존재하지 않고, O-linked glycosylation도 이와 비슷하게 짧은 mannose 배열만을 가지게 된다(4).

Yeast는 세포 성장 속도가 빠르고 안전성이 있는 숙주이기는 하나, 일반적으로 분자량 25,000 이하의 단백질만 분비하고, 재조합 단백질의 발현 수준(전체 세포 단백질의 약 5%)이 낮아서 glycosylation의 문제만 아니면 가급적 다른 박테리아를 사용하였는데, 최근에는 여러 가지 signal 배열의 사용과 *Sac. cerevisiae*외의 다른 종류의 Yeast(예; *Pichia pastoris*(5), *Schwanniomyces occidentalis*(6), *Hansenula polymorpha*(7), *Kluyveromyces lactes* (8),

Schizosaccharomyces pombe(9) 및 *Yarrowia lipolytica*(10)를 사용하여 재조합 단백질의 분비 및 발현 수준이 높아져 비상한 관심을 모으고 있다.

*E. coli*의 경우는 현재까지 가장 많은 세포 유전학 및 생리학적 실험 결과가 축적되어 있기 때문에 널리 사용되고 있으며 다양한 유전자 조작을 할 수 있다는 장점이 있는 반면 그램 음성균으로서 periplasmic층이 있어 단백질 분비가 나쁘며 endotoxin을 생산하는 단점이 있다. 사실 현재까지 알려진 거의 모든 단백질 합성에 관한 연구가 이 균을 사용하여 이루어졌기 때문에, 다른 숙주를 시도해 보기 전 단계로서 *E. coli*에서 먼저 control 발현 실험을 해 보는 경우가 많으며, 이 숙주를 이용하여 이미 여러 재조합 단백질이 대량생산 단계에 있다(11-13).

또한 *E. coli*의 경우에는 배양도 중 acetate가 축적되고 이 acetate에 의하여 *E. coli*의 농도를 증가시킬 수 있는 배양 방법이 보고되었다(14).

여러 종류의 미생물 중 Yeast 및 *E. coli* 이외에 산업적으로 중요한 것의 하나는 *Bacillus*류이다.

*Bacillus*류는 효소를 생산하며 세포 밖으로 분비하는 특성이 있어 최근 α -amylase, Protease, α -galactosidase 등의 효소 및 치료제 목적의 재조합 단백질의 생산에 많이 이용되고 있다(15).

예를 들면 *Bacillus*의 α -amylase 생산은 *B. amyloliquefaciens*로부터 얻을 수 있으며, 이것은 기질로서 glucose 및 maltose를 이용하며 성장시킬 수 있고 이로부터 α -amylase 생합성을 유도할 수 있다(16).

또한 α -amylase의 특징인 양조, 녹말분해, 직물제조, 소화제 등을 포함한 여러 산업에 사용된다. 그리고 열에 안정성을 가진 α -amylase는 공업적으로 여러 가지에 유용하게 응용되고 있다(17).

B. stearothermophilus(18)에 의한 α -amylase 합성은 성장 중간에 관찰된 반면 *B. subtilis*(19)와 *B. amyloliquefaciens*(20)에 의한 α -amylase 합성은 성장단계와 postlog 성장단계 끝에 생합성된 것으로 알려졌다.

또한 *B. amyloliquefaciens*(18)의 성장 및 α -amylase의 생합성에 미치는 탄소원의 영향이 최근 보고되고 있다.

특히 *B. licheniformis*(21) 특성은 poly saccharides에 α -1,4-glucosidase 결합을 가수분해하는 endo형 가수분해 효소인 α -amylase를 생성할 뿐만 아니라 신장 등의 동물조직을 비롯하여 여러 기원에서 얻어지는 exopeptidase와 아밀로말단에 α -amino acid를 가진 peptide에서부터 말단 아미노산을

분해하는 aminopeptidase를 생성하고, 미생물 배양에 높은 활성을 갖도록 하기 위해 pH와 금속성에 Zn^{2+} ion과 Ca^{2+} ion관계가 있는 metal protease와 serine을 가수분해하는 serine protease를 생성하며, 그리고 pencillins와 cephalosporins의 β -lactam ring에서 amide bond를 가수분해하는 pencillinases와 β -lactamase를 생성한다.

또한 세균 세포벽 용해효소인 Endo-N-acetylglucosaminidase, N-acetylmuramyl-L-alanine amidase와 동물의 취장, 식물종자(아주까리), 효모, 곰팡이속에 들어있는 triacylglycerol와 fatty acid anion을 분해하는 lipase를 생성한다. 이와 같이 *Bacillus*류 및 *B. licheniformis*는 많은 효소를 생산하는 능력을 가지고 있고, 단점으로는 세포 성장속도가 매우 느리다는 점이 있다. 이상의 특성을 이용한 방법으로서 α -amylase를 생성하기 위해 *B. licheniformis*를 재조합시키고 이를 대장균에서 발현시켜서 세포성장을 증대시킨 방법과 α -amylase의 수율을 증대시킨 방법들이 다각적으로 연구되고 있다.

그러므로 본 연구는 *Bacillus licheniformis*(ATCC 27811)의 α -amylase를 *E. coli*(NM. 522)에서 발현시킨 재조합 대장균을 이용하여, 회분식 배양으로 탄소원 농도에 따라 α -amylase 생성물의 관계를 검토하였다.

재료 및 방법

균주

Bacillus licheniformis (ATCC 27811)을 *E. coli* (NM 522) 내에서 *B. licheniformis* α -amylase를 함유하게 한 재조합한 대장균을 균주로 사용하였다.

배지

균주 재생용 배지는 Nutrient agar medium을 사용하여 plate에서 배양하고 이것은 냉동 보관시켜 두고, L. B medium를 사용하여 접종용 종균을 배양한 후 S. P medium을 사용하여 배양하였다.

균주 배양

균주의 배양에 사용된 표준 medium의 조성을 L. B medium으로 하고, 탄소원으로는 전분을 사용하였고, 포자(spore) 상태인 균주의 발아를 돕기 위하여 유기질소원으로 Yeast extract를 사용하였다.

질소원과 탄소원은 고농도에서 갈색반응(brown reaction)을 일으켜 미생물의 성장을 저해하고, 또한

고농도의 인산염은 금속염들과 침전을 형성하므로 전분과 Yeast extract, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 를 서로 분리하여 삼각 플라스크에 넣고 121°C, 15psi, 30분간 멸균한 뒤, clean bench 내에서 충분히 식힌 후에 혼합한다. 다음, 멸균처리한 삼각플라스크 200ml 용량 5개에 각각 200ml을 취한 후, Nutrient agar Slant에서 보관한 균주 1Loop를 접종하여 shaking incubator에서 37°C, 170rpm으로 24시간 배양 후, 4°C 냉장고로 옮겨 보관하여 사용하였다.

회분식 배양

실험장치

회분식 배양실험을 행할 수 있는 장치, 배양조는 용량 5ℓ (한국발효기, SY-500)에 compressor로부터 공기를 여과하여 1vvm으로 공급하였고, pH 조절은 pH 7로 유지하기 위하여 pH controller를 거쳐 1M NaOH 용액으로 하였다. 포말에 의한 물질 전달의 방해를 막기 위해 필요한 경우 silicon 소포제(antifoaming agent)를 주입하였다. 분석을 위한 시료는 공기에 의한 배양조 내의 자체 압력을 이용, 시료 채취구(sampling port)를 통해 채취하였다. 온도는 37°C에서 유지하였고, 교반속도는 170rpm으로 유지하였다.

균체 농도 측정

분광광도계(Bausch Lomb Spectronic 20)를 이용하여 650nm에서 흡광도를 측정하여 표준곡선으로부터 결정하였다.

표준 곡선은 시료를 원심분리기에서 3000rpm으로 30분간 원심분리하여 상등액을 제거하고, 증류수로 침전물을 여러 차례 씻은 뒤, 건조 오븐 90°C에서 하룻 동안 건조한 뒤 무게를 측정하여 흡광도에 따른 표준 곡선을 얻어 적용하였다.

α -amylase 활성 측정

α -amylase 활성은 starch-iodine method(22)에 의하여 측정하였다. 배양액을 원심분리기에서 3000rpm으로 30분간 원심분리한 뒤 상등액 0.5ml를 채취하여 0.04M pH 5.9 potassium phosphate 완충 용액과 전분 기질 용액(starch substrate solution)을 1:1로 혼합한 용액 5ml에 첨가하여 25°C의 수조에서 10분간 반응시켰다. 5ml의 0.1M HCl 용액을 떨어뜨려 반응을 중지시킨 뒤, 이 혼합물 0.5ml에 5ml의 iodine 용액을 첨가하여 발색시킨 뒤 660nm에서 흡광도를 측정하여 활성을 구하였다.

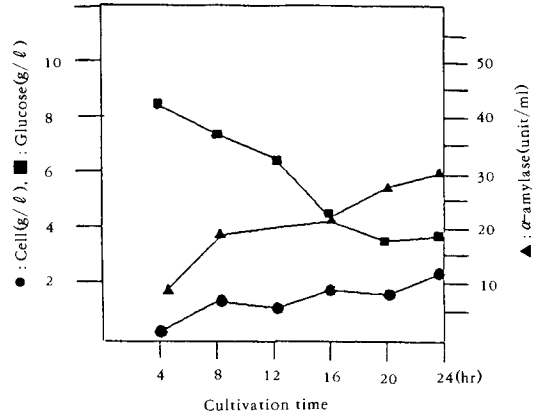


Fig 1. Cell growth and α -amylase products of *B. licheniformis* expressed in *E. coli* for batch culture at 10g/l of glucose in S. P medium.

여기서 α -amylase 1unit는 25°C, pH 5.9에서 10분 동안 1mg의 전분을 분해하는 효소의 양으로 정의된다(23).

여기서 α -amylase의 활성은 다음 식으로 구하였다.

$$\text{Activity (unit/ml)} = D \frac{R_0 - R}{R_0} \times 100 \quad (1)$$

여기서 R_0 는 효소가 존재하지 않는 substrate-iodine complex의 흡광도이고, R 은 시료 혼합물의 흡광도, D 는 시료의 희석 비율이다.

결과 및 고찰

S. P medium에서 포도당에 대한 α -amylase의 생성 포도당 초기농도를 각각 10g/l, 20g/l, 30g/l로 사용하여 공기를 1vvm로 주입하면서 pH 7.0, 온도 37°C 유지하여 배양시키면서 세포성장과 α -amylase 생성을 관찰하여 그 결과는 Fig. 1-4와 Table 1에 나타냈다.

세포 최대 밀도는 포도당 초기농도 30g/l 일 때 세포 배양실시 후 24시간에서 2.78g/l로 나타났으며, 세포 비 생산속도는 포도당 초기농도 20g/l 일 때 0.33g/g-hr을 나타났으며 세포 최대수율은 포도당 초기농도 20g/l 일 때 0.42g/g이었다. 그리고 α -amylase 최대치는 포도당 초기농도 10g/l 일 때 29.50unit/ml이고 최대 α -amylase 수율은 포도당 초기농도 20g/l 일 때 1.30unit/g이었고 효소 비 생산속도는 포도당 초기농도 10g/l 일 때 2.18unit/g

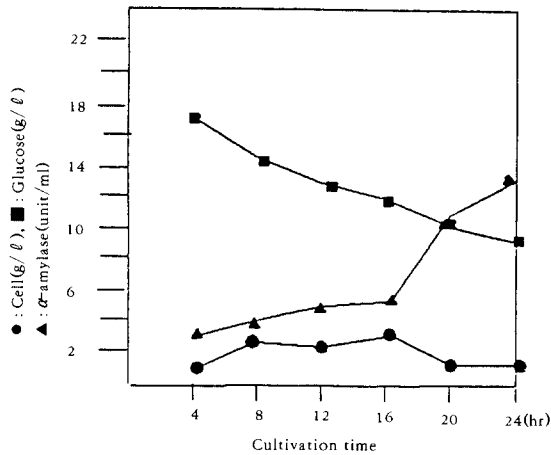


Fig 2. Cell growth and α -amylase products of *B. licheniformis* expressed in *E. coli* for batch culture at 20g/l of glucose in S. P medium.

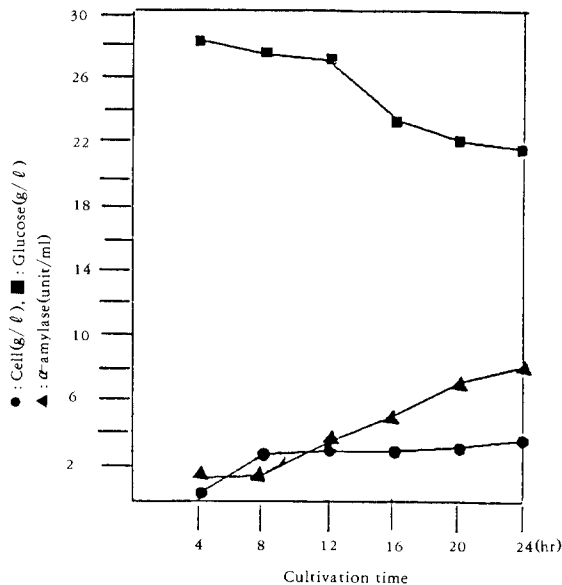


Fig 3. Cell growth and α -amylase products of *B. licheniformis* expressed in *E. coli* for batch culture at 30g/l of glucose in S. P medium.

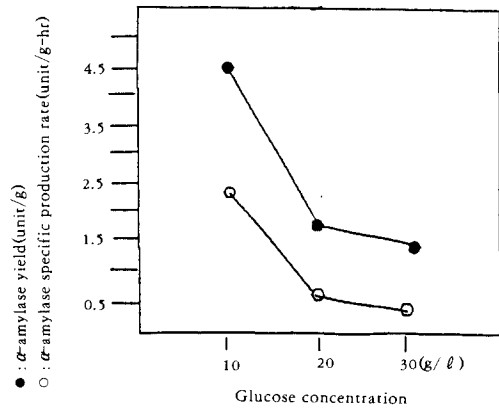


Fig 4. The α -amylase yield and specific production rate of *B. licheniformis* expressed in *E. coli* for batch culture as glucose concentration in S. P medium.

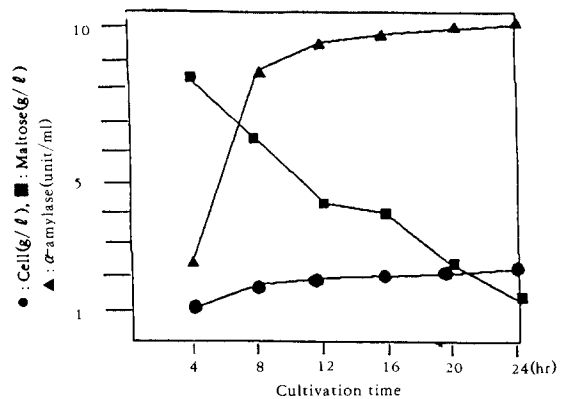


Fig 5. Cell growth and α -amylase products of *B. licheniformis* expressed in *E. coli* for batch culture at 10g/l of maltose in S. P medium.

Table 1. Effects of glucose concentration at S. P medium.

Glucose (g/l)	X_m (g/l)	α_m (unit/ml)	$Y_{\alpha s}$ (g/g)	μ_m (g/g-hr)	$Y\alpha_s$ (unit/g)	μ_m (unit/g-hr)
10	2.10	29.50	0.32	0.30	4.50	2.18
20	2.31	12.71	0.42	0.20	1.30	0.67
30	2.78	6.25	0.29	0.33	0.74	0.18

-hr이었다. 이와 같이 S. P medium에서는 포도당 초기농도가 적을수록 α -amylase가 많이 생성되었다.

이 결과는 L. B medium하에서 배양한 결과를 Snay(22) 등이 제시한 바와 같이 탄소원의 농도가

증가함에 따라 세포의 농도는 커지고 일정농도까지

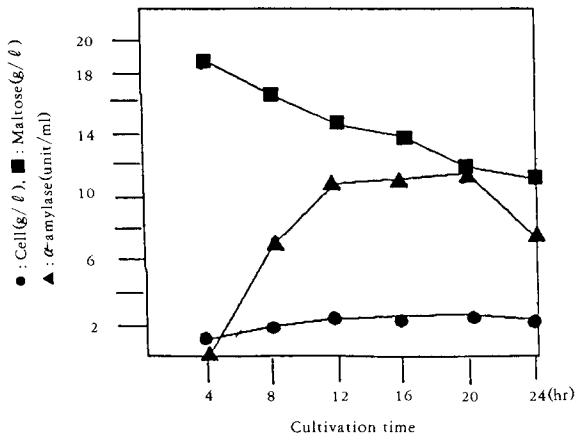


Fig 6. Cell growth and α -amylase products of *B. licheniformis* expressed in *E. coli* for batch culture at 20g/l of maltose in S. P medium.

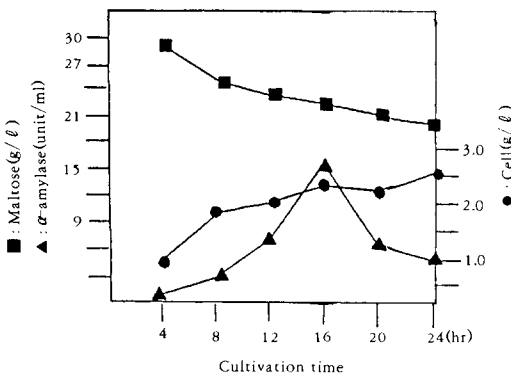


Fig 7. Cell growth and α -amylase products of *B. licheniformis* expressed in *E. coli* for batch culture at 30g/l of maltose in S. P medium.

는 증가하나 과량일 때는 큰 영향이 없으며, 세포수율을 높게 하고 α -amylase 생성을 높게 하려면 탄소원의 농도를 낮게 함이 적합함을 알 수 있다.

S. P medium에서 maltose에 대한 α -amylase의 생성

Maltose 초기농도를 각각 10g/l, 20g/l, 30g/l로 사용하여 세포를 배양시키면서 세포성장과 α -amylase 생성을 관찰하여 Fig 5-8와 Table 2에 나타냈다. 세포 최대역가는 maltose 초기농도 30g/l 일 때 24시간에서 2.45g/l 이고 세포 최대 수율은 maltose 초기농도 10g/l 일 때 0.38g/g이고 세포

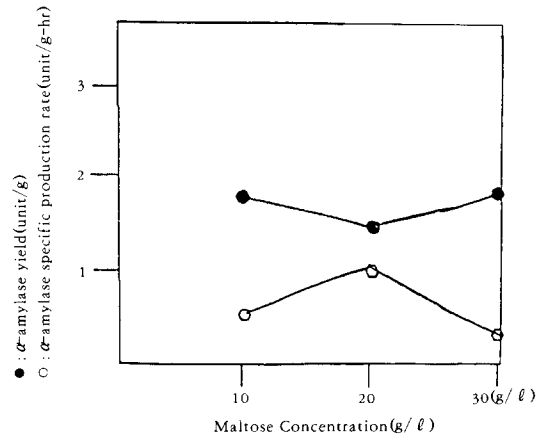


Fig 8. The α -amylase yield and specific production rate of *B. licheniformis* expressed in *E. coli* for batch culture as maltose concentration in S. P medium.

Table 2. Effects of maltose concentration in S. P medium.

Maltose (g/l)	X_m (g/l)	a_m (unit/ml)	Y_{vis} (g/g)	μ_m (g/g-hr)	a_s (unit/g)	μ_n (unit/g-hr)
10	2.31	10.71	0.38	0.14	1.84	0.87
20	2.31	9.37	0.26	0.31	1.73	1.34
30	2.45	15.15	0.24	0.22	2.10	0.59

최대 비생산속도는 maltose 초기농도 20g/l 일 때 0.31g/g-hr이었다.

그리고 α -amylase의 최대밀도는 maltose 초기농도 30g/l 일 때 16시간 전후에서 15.15unit/ml이고 최대 수율은 maltose 초기농도 30g/l 일 때 2.10 unit/g이고 효소 최대 비생산속도는 maltose 초기농도 20g/l 일 때 1.34unit/g-hr이었다. 이러한 결과에서 α -amylase 최대 수율은 maltose 초기농도가 높을 때 큰 값으로 나타났다.

이런 현상은 Shrinji⁽²⁵⁾와 Snay⁽²⁴⁾ 등이 제안한 바와 같이 maltose 초기 농도가 높을 때 세포의 수율은 높으며 α -amylase 수율은 maltose 초기농도가 낮을 때 높은 값으로 얻어짐을 알 수 있고, 그리고 Fig. 8에서 본 바와 같이 α -amylase 수율과 생성속도는 비례적으로 maltose 초기농도가 낮을 때와 높을 때 마찬가지로 비슷하게 비례적으로 나타났다.

S. P medium에서 acetic acid에 대한 α -amylase 생성 세포성장 저해제로 알려진 acetic acid 세포가 성

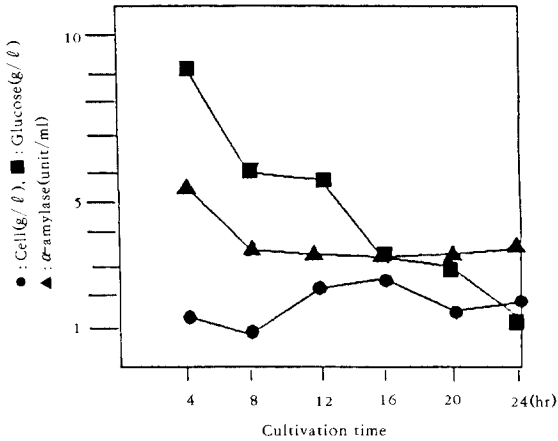


Fig 9. Cell growth and α -amylase products of *B. licheniformis* expressed in *E. coli* for batch culture at 0.25ml/l of acetic acid in S. P medium.

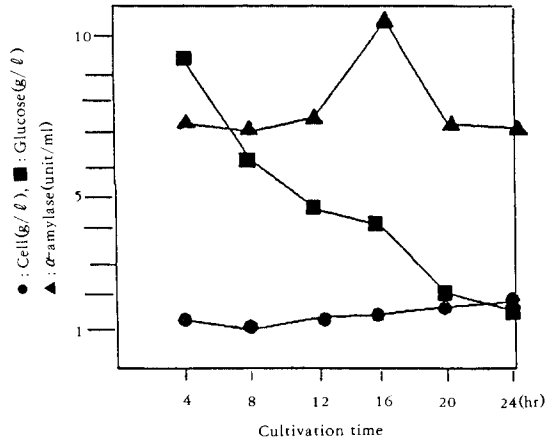


Fig 11. Cell growth and α -amylase products of *B. licheniformis* expressed in *E. coli* for batch culture at 1.0ml/l of acetic acid in S. P medium.

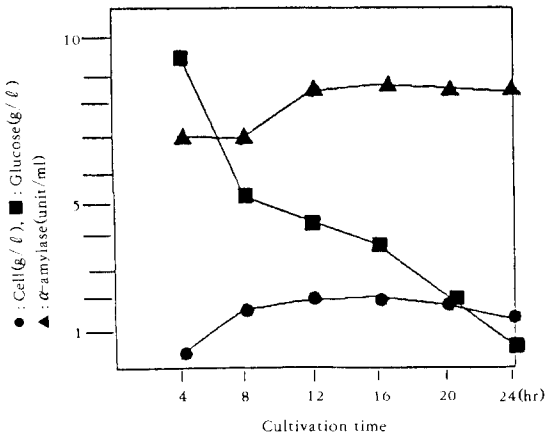


Fig 10. Cell growth and α -amylase products of *B. licheniformis* expressed in *E. coli* for batch culture at 0.5ml/l of acetic acid in S. P medium.

장과 α -amylase 생성에 미치는 영향을 알기 위해 glucose 초기농도가 10g/l 일 때 acetic acid 초기 농도를 0.25ml/l, 0.50ml/l, 1.0ml/l, 2.0ml/l 을 각각 가하여 S. P medium에서 배양시키면서 세포 성장과 α -amylase 생성에 대하여 검토하였다.

이 실험결과는 Fig. 9-13과 Table 3에 나타났다. 최대 세포 비생산속도는 acetic acid 초기농도 0.5ml/l

일 때 12시간에서 0.28g/g-hr이다. 세포의 최고치는 acetic acid 초기농도 0.25ml/l 일 때 16시간에서 2.10g/l로서 제일 좋고 이때의 세포의 수율은 0.33g/g이며 수율의 최고치는 acetic acid 초기농도 2.0ml/l 일 때지만 Table 3에서 보면 비슷한 현상이고 acetic acid가 적은 농도일수록 세포의 생성 최고치는 큰 값이다.

그리고 α -amylase의 최고치는 acetic acid 초기농도 1.0ml/l 일 때 12.50unit/ml로서 제일 높고 이때의 α -amylase의 수율은 2.66unit/g, 수율의 최고치는 acetic acid 초기농도 0.25ml/l 일 때 11.59unit/g이고 최대 비생산속도는 acetic acid 초기농도 2ml/l 일 때 2.79unit/g-hr이다.

이상의 결과에서 보면 세포의 최고치는 acetic acid 초기 농도가 조금 낮을 때 더 높은 값으로 나타났다. α -amylase의 최고치는 acetic acid의 초기농도가 조금 높은 값인 1.0ml/l 일 때이고 너무 높으면 세포의 성장과 α -amylase의 생성이 적게 나타남을 알 수 있다. 그리고 이 결과들은 Lee⁽²⁶⁾ 등이 제안한 바와 같이 재조합 *E. coli* 배양에서 세포 성장에 방해하는 물질은 주로 acetic acid라고 한 내용과 일치한다. 또한 Maiorella⁽²⁷⁾ 등이 제시한 내용에서 효모류의 성장과정에서 부산물로 acetic acid가 생성되고 이것은 세포 성장에 저해 작용을 한다는 내용과도 일치한다. 또한 Park⁽²⁸⁾ 등이 제시한 바와 같이 *B. subtilis*로서 glucose 이용의 배양에서 배양액 내

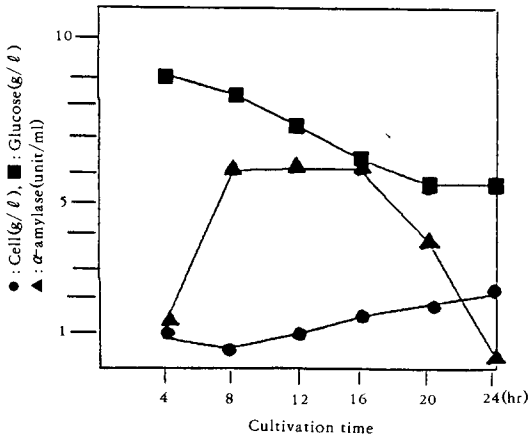


Fig. 12. Cell growth and α -amylase products of *B. licheniformis* expressed in *E. coli* for batch culture at 2.0ml/l of acetic acid in S. P medium.

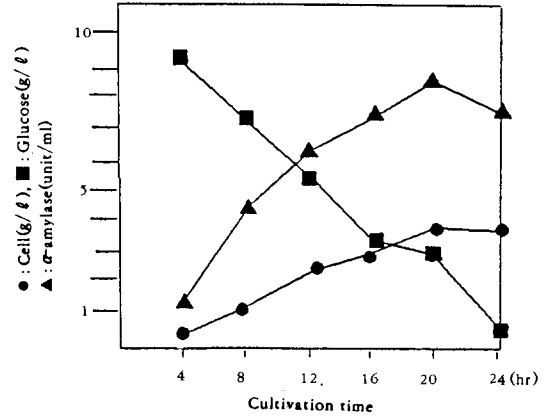


Fig. 14. Cell growth and α -amylase products of *B. licheniformis* expressed in *E. coli* for batch culture at 10g/l of glucose in S. P medium.

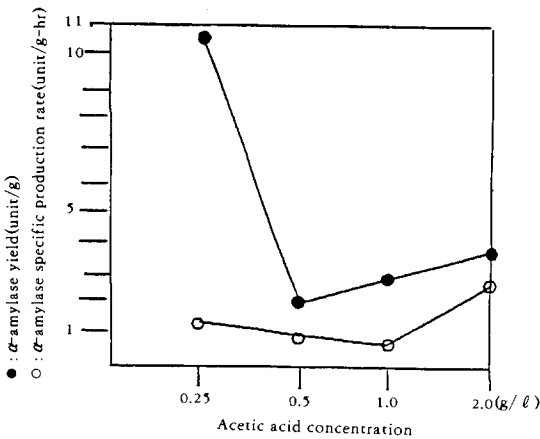


Fig. 13. The α -amylase yield and specific production rate of *B. licheniformis* expressed in *E. coli* for batch culture as 10g/l of glucose and acetic acid concentration in S. P medium.

에 다량의 propionic acid와 lactic acid와 acetic acid 등이 축적되고 이들은 대사물로서 세포성장을 감소하고 효소 활성을 감소하는 원인의 물질이라고 한 내용과도 비슷한 현상임을 알 수 있다.

그러므로 acetic acid의 감소는 세포성장과 세포수율에 영향이 큰 것을 알 수 있다. 그리고, Fig. 13에

Table 3. Effects of acetic acid concentration at S. P medium.

ACOH (ml/l)	X_m (g/l)	a_m (unit/ml)	Y_{xs} (g/g)	μ_m (g/g-hr)	Y_{a_s} (unit/g)	ν_m (unit/g-hr)
0.25	2.10	5.17	6.33	0.13	11.59	1.03
0.5	1.96	10.02	0.33	0.28	1.69	0.47
1.0	1.89	12.50	0.24	0.17	2.66	0.10
2.0	1.68	5.89	0.38	0.24	3.35	2.79

X_m =maximum cell density

a_m =maximum α -amylase activity

Y_{a_s} =maximum α -amylase yield

X_{v_s} =maximum cell yield

μ_m =maxium cell specific production rate

ν_m =maxium enzyme specific production rate

는 α -amylase 생성수율과 α -amylase 최대 생성속도를 나타내었다. α -amylase의 수율은 acetic acid 초기농도 0.25ml/l 일 때 최대이고 최대비 생성속도는 acetic acid 초기농도 2.0ml/l 일 때이지만 α -amylase 생성수율이 현저하게 차이가 있어 이 결과에서 α -amylase 생성목적으로는 acetic acid가 현저하게 저해 물질임을 알 수 있다.

S. P medium과 L. B medium의 결과

Glucose 10g/l, maltose 10g/l 을 이용하여 S. P medium 및 L. B medium에서 각각 배양시키면서

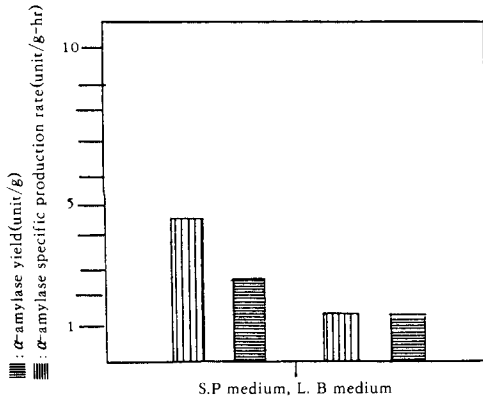


Fig 15. The α -amylase yield and specific production rate of *B. licheniformis* expressed in *E. coli* for batch culture as 10g/l of glucose in L. B medium, S. P medium.

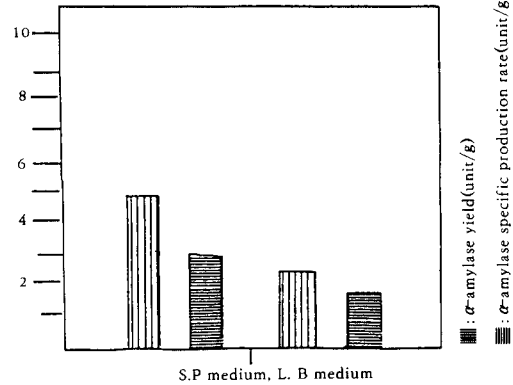


Fig 17. The α -amylase yield and specific production rate of *B. licheniformis* expressed in *E. coli* for batch culture as 10g/l of maltose in L. B medium, S. P medium.

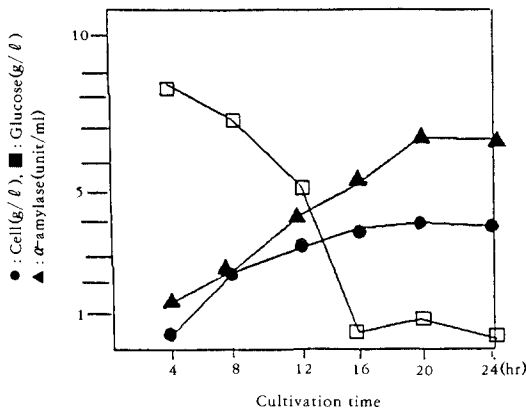


Fig 16. Cell growth and α -amylase products of *B. licheniformis* expressed in *E. coli* for batch culture at 10g/l of maltose in L. B medium.

세포성장과 α -amylase 생성을 고찰하여 그 결과 Fig. 14-17과 Table 4, 5에 나타내었다.

세포 최대 밀도는 maltose 10g, L. B medium에서 20시간 전후에서 3.96g/l 이고 세포 최대 비생산속도는 maltose 10g, L. B medium일 때 0.45g/g-hr 이고 세포 최대 수율은 glucose 10g, L. B medium에서 0.56g/g이다.

그리고 α -amylase 최대치는 glucose 10g, S. P medium에서 24시간 전후에서 29.46unit/ml이고 최대 효소 수율은 glucose 10g, S. P medium에서

Table 4. Effects of 10g/l of glucose at L. B medium, S. P medium.

Glucose (10g/l)	X_m (g/l)	α_m (unit/ml)	Y_{vs} (g/g)	μ_m (g/g-hr)	$Y\alpha_s$ (unit/g)	ν_m (unit/g-hr)
L.Bmedium	3.92	8.56	0.56	0.4	1.23	1.21
S.Pmedium	2.10	29.46	0.32	0.3	4.50	2.18

Table 5. Effects of 10g/l of maltose at L. B medium, S. P medium.

Maltose (10g/l)	X_m (g/l)	α_m (unit/ml)	Y_{vs} (g/g)	μ_m (g/g-hr)	$Y\alpha_s$ (unit/g)	ν_m (unit/g-hr)
L.Bmedium	2.31	10.71	0.38	0.14	1.84	12.87
S.Pmedium	3.96	6.85	0.42	0.45	0.73	0.27

X_m =maximum cell density

α_m =maximum α -amylase activity

$Y\alpha_s$ =maximum α -amylase yield

X_{vs} =maximum cell yield

μ_m =maximum cell specific production rate

ν_m =maximum enzyme specific production rate

4.50unit/g이고 효소 최대 비생산속도는 glucose 10g, S. P medium에서 2.18unit/g-hr이다.

이러한 결과를 Table 4, 5에서 볼 때 세포 최대 수율은 탄소원으로서 glucose가 좋고 배지는 L. B 배지가 좋으며, α -amylase 최대 수율은 탄소원으로서 glucose가 좋고 배지는 S. P medium가 좋은 것으로 나타났다.

결 론

대장균에서 발현된 *B. licheniformis*의 세포성장에 따른 α -amylase를 알기 위하여 탄소원으로서 포도당과 maltose농도를 변화시키고, 저해제인 acetic acid농도를 변화하고 medium을 S. P, L. B로 구분하여 발효시킨 결과는 다음과 같다.

탄소원 포도당에서는 α -amylase 최대수율이 포도당 초기농도 10g/l 일 때 4.50unit/g이었고, 효소 최대비 생성속도는 포도당 초기농도 10g/l 일 때 2.18unit/g-hr이었고 α -amylase 최대치는 포도당 초기농도 10g/l 일 때 29.50unit/ml로서 각각 나타났다.

또한 탄소원 maltose에서는 α -amylase 최대수율은 maltose 초기농도 30g/l 일 때 2.10unit/g이었고, 효소 최대비 생성속도는 maltose 초기농도 20g/l 일 때 1.34unit/g-hr이었고, α -amylase 최대치는 maltose 초기농도 30g/l 일 때 15.15unit/ml로 나타났다.

그리고 저해제도 acetic acid를 사용하였을 때 α -amylase 최대수율은 acetic acid 초기농도 0.25ml/l 일 때 11.59unit/g이고 효소 최대비생성속도는 acetic acid 초기농도 2.0ml/l 일 때 2.79unit/g-hr이고 α -amylase 최대치는 acetic acid 초기농도 1.0ml/l 일 때 12.50unit/ml로서 각각 나타났다.

그리고 L. B medium과 S. P medium영향으로서는 포도당 초기농도 10g/l 를 사용할 때 α -amylase 최대치가 S. P medium에서 29.46unit/ml, α -amylase 최대수율은 S. P medium에서 4.50unit/g, 효소 최대비생성속도는 S. P. medium에서 2.18unit/g-hr로서 각각 나타났다.

Maltose 초기농도 10g/l 을 사용할 때 α -amylase 최대치는 L. B medium에서 10.71unit/ml이고, α -amylase 최대수율은 L. B medium에서 1.84unit/g이고 효소 최대비생성속도는 L. B medium에서 12.87unit/g-hr로서 각각 나타났다.

이상의 결과로서 α -amylase 생성을 위해서는 탄소원은 포도당이 적합하고 배지는 S. P배지가 적합하며, 탄소원 maltose에서는 L. B 배지가 적합한 결과이다.

그리고 저해제 acetic acid는 세포성장에 저해를 가져오지만 α -amylase 생성조건으로서 1.0ml/l 이하로 사용하면 효율적이었다.

참고 문헌

1. S. Aiba, S. Nagni and Y. Nishizawa (1976)

- Biotechnol. Bioeng.*, **18**, 1001.
2. Williams (1986), *Biotechnol., Bioeng.*, **28**, 631.
 3. J. C. Fieschko et al. (1987), *Biotechnol. Bioeng.*, **29**, 1113.
 4. M. H. Marino (1989), Expression Systems for Heterologous Protein Production. *Biopharm.* July/August: 18-33.
 5. R. S. Siegel, R. Buckholz and G. P. Thillm (1989), Production of Epidermal Growth Factor in *Pichia Pastoris* Yeast Cells. *European Patent Application*, W, 090/10697.
 6. M. Pointek and C. P. Hollenberg (1989), Production of Epidermal Growth Factor in *Pichia Pastoris* Yeast Cells, European Patent Application W 090/10697.
 7. S. H. Shen, L. Bastien, T. Nguyen, M. Fung and S. N. Slilaty (1989), Synthesis and Secretion of Hepatitis B. Middle Surface Antigen by the Methylophilic Yeast, *Hansenula Polymorpha*. *Gene* 84 : 303-309.
 8. J. A. van Den Berg, K. J. van Der Laken, A. J. J. van Ooyen, C. H. M. Rennie, K. Rietveld, A. Schaap, A. J. Beake, R. J. Bishop, K. Schultz, O. Moyer, M. Richman and J. R. Shuster (1990), *Bio/Technology*, **8** : 135-139.
 9. M. Broker and O. Bauml (1989), New Expression Vectors for the Fission Yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *FEBS Lett.*, **248** : 105-110.
 10. A. E. Franke, F. S. Kaczmarek, M. E. Eisenhard, K. F. Geoghegan, D. E. Danley, J. R. Dezeuw, M. M. O'Donnell, M. G. Gollaher, and L. S. Davidow (1988), *Devel. Ind. Microbiol.* Vol. 29 : pp. 43-57.
 11. A. Pluckthun (1991), *Antibody Engineering : Bio/Technology.*, **9** : 545-551.
 12. S. Hoffman, D. L. Looker, J. M. Roehrich, P. E. Cozart, S. L. Durfer, J. L. Tedesco, and G. L. Sietler (1990), Expression of Fully Tetrameric Human Hemoglobin in *Escherichia Coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87** : 8521-8525.
 13. J. Buchner and R. Rudolph (1991), *Bio/Technology.* **9** : pp. 157-162.

14. N. Shimizu. et al. (1988), *J. Ferment, Technol.*, **66**, 187.
15. Y. H. Yoo. et al. (1988), *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. **31**, pp. 426-432.
16. A. Wiseman (1975), *Handbook of Enzyme Technology* (Wiley. New York.) pp. 114-146.
17. K. I. Kindle (1983), *Appl. Biochem Biotechnol.* Vol. **8**, p. 153.
18. N. E. Welker and L. L. Campbell (1966), *J. Bacteriol*, **86**, 681.
19. G. Coleman, J. Gen (1967), *Microbiol*, **49**, 421.
20. G. Coleman and M. A. Grant (1966), *Nature*, **211**, 306.
21. G. Fergus Priest (1977), *Bacteriological Review* (Am. So. Microbiology) Vol. **41**, No. 3, pp. 711-753.
22. Y. J. Yoo, J. Hong and R. T. Hatch (1986), *Biotechnol. Bioeng.*, in press.
23. R. Bird and R. H. Hopkins (1954), *J. Biochem.*, **56**, p. 86.
24. J. Sany, J. W. Jeong and M. M. Ataa (1971), *Cam. J. Rev.*, **25**, pp. 56-136.
25. A. K. Chandra, S. Medda and A. K. Bhadra (1980), *J. Ferment. Technol.*, Vol. **58**, No. 1, pp. 1-10.
26. Y. L. Lee and H. N Chang (1990), *Biotechnol. and Bioeng.*, **36**, 330-337.
27. B. Maiorell, H. W Blanch and C. R. Wike (1983), *Biotechnol, and Bioeng.*, **25**, 103-121.
28. Y. S. Park, K. Kaw. S. Irjim and T. Kobayshi (1992), *Biotechnol. and Bioeng.*, Vol. **38**, N. 10, pp. 948-953.