

Bacillus sp. SUH4-2로부터 생산되는 말토올리고당 생성 α -Amylase의 정제 및 특성

윤상현 · 김묘정 · 김정완² · 권기성 · 이인원¹ · 박관화*
서울대학교 식품공학과·농업생물신소재연구센터, ¹서울대학교 농생물학과
²인천대학교 생물학과

Purification and Characterization of a Novel Malto-oligosaccharides Forming α -Amylase from *Bacillus* sp. SUH4-2

Sang-Hyeon Yoon, Myo-Jeong Kim, Jung-Wan Kim², Kisung Kwon,
Yin-Won Lee¹ and Kwan-Hwa Park*

Department of Food Science and Technology, ¹Department of Agricultural Biology
and Research Center for New Bio-Materials in Agriculture,
Seoul National University, Suwon 441-744, Korea
²Department of Biology, University of Incheon, Incheon, Korea

Abstract — A *Bacillus* strain capable of producing an extracellular malto-oligosaccharides forming α -amylase was isolated from soil and designated as *Bacillus* sp. SUH4-2. The enzyme was purified by ammonium sulfate fractionation, DEAE-Toyopearl and Mono-Q HR 5/5 column chromatographies using a FPLC system. The specific activity of the enzyme was increased by 16.1-fold and the yield was 13.5%. The optimum temperature for the activity of α -amylase was 60~65°C and more than 50% of initial activity was retained after the enzyme was incubated at 60°C for 40 min. The enzyme was stable over a broad pH range of 5.0~8.0 and the optimum pH was 5.0~6.0. The molecular weight of the enzyme was determined to be about 63.6 kD and isoelectric point was around 5.8. The enzyme activity was strongly inhibited by Mn²⁺, Ni²⁺, and Cu²⁺; slightly by Ca²⁺. The purified enzyme produced starch hydrolyzates containing mainly maltose and malto-triose from soluble starch. The starch hydrolyzates were composed of 11% glucose, 59% maltose, 25% maltotriose and 5% maltotetraose.

α -Amylase(1,4- α -D-glucan glucanohydrolase EC 3.2.1.1)는 전분내의 α -1,4-glucosidic 결합을 가수분해하는 효소로서 다양한 미생물과 식물, 동물에 널리 분포되어 있으며(1) 그중 내열성 균주에서 발견되는 내열성 α -amylase는 호화온도 이상에서도 역가를 유지하여 전분의 액화나(2) 전분식품의 노화방지에(3) 이용되고 있다.

최근에 식품의 물성개량에 유용한 성질을 가지고 있는 올리고당에 대한 관심이 증대되고 특정한 올리고당만을 선택적으로 많이 생산하는 amylase가 발견되면서 효소를 이용한 올리고당의 생산에 대한 관심이 높아지고 있으며(4), 특정한 올리고당을 생산하는 amylase의 탐색도 활발히 진행되어 maltohexaose를 생

산하는 *Bacillus circulans* G-6(5), *Bacillus caldovelox* (6), maltotetraose를 생산하는 *Bacillus* sp. MG-4(7), *Streptomyces* sp. KSM-35(8), *Pseudomonas* sp. IMD 353(9), maltotriose를 생산하는 *Bacillus subtilis*(10), 그리고 maltose를 생산하는 *Bacillus licheniformis*(11), *Bacillus megaterium* G-2(12), *Bacillus stearothermophilus*(13)등이 이미 보고되어었다.

이러한 말토올리고당은 설탕과 물리적인 성질이 매우 유사하고 감미도 비교적 흡사하기 때문에 설탕 대체물질로 사용되며 생리적인 특징이 설탕과 달라서 건강에도 매우 유익하다(4). 또한 maltotriose~maltononaose의 말토올리고당이 전분식품에 첨가되면 아밀로펙틴간의 회합을 방해하여 전분식품의 노화를 억제하는 효과가 있다(14, 15). 내열성이 있는 amylase는 전분원료에 직접처리되어 전분의 호화온도 이상에서 작용하여 말토올리고당을 생산함으로써 전

Key words: Malto-oligosaccharides, *Bacillus* sp. SUH4-2, α -amylase

*Corresponding author

분의 노화를 억제하는 anti-staling 효소로 사용되기도 하지만 적당한 열처리로 완전히 실효될 수 있는 중간정도의 내열성이 요구된다(16).

본 실험에서는 토양에서 분리한 내열성 균주인 *Bacillus* sp. SUH4-2로부터 중간정도의 내열성을 갖고 maltose와 maltotriose를 생산하는 amylase를 분리, 정제하여 정제된 효소의 일반적인 특성을 보았다.

재료 및 방법

효소의 생산

토양에서 분리된 *Bacillus* sp. SUH4-2 균주를 Bac-totrypton 1.0%, yeast extract 0.5%, NaCl 0.5%, soluble starch 1.0%의 조성으로 이루어진 LBS 배지에서 55°C로 20시간동안 100 ml 전배양한 후, amylase 분비용 배지인 SH배지 2000 ml에 전배양한 균을 1% (v/v) 접종하여 55°C, 200 rpm, aeration 조건에서 16 시간동안 본배양을 실시하였다. SH배지의 조성은 Table 1에 나타내었다.

효소의 정제

Bacillus sp. SUH4-2가 생산하는 amylase는 세포 외로 분비되는 효소이다. 균 배양액을 4°C에서 30분간 원심분리(8000 rpm)하여 균체를 제거한 후, 상정액을 ammonium sulfate로 80% 포화시켰다. 생성된 단백질을 침전물은 4°C에서 30분간 원심분리(8000 rpm)하여 분리한 후, 20 mM Tris-HCl 완충용액(pH 8.0)에 녹이고 투석으로 염물질을 제거하여 조효소용액을 얻었다.

효소의 정제는 FPLC system(fast protein liquid chromatography system, Pharmacia)을 이용하여 실시하였다. 1차 정제는 DEAE-ToyoPearl 650S column (24 mm×200 mm)을 이용하여 위와 동일한 Tris-HCl 완충용액에서 실시하였고 7 ml/min의 유속으로 하였으며 NaCl의 농도를 0.0M에서 0.5M로 점차적으로 높여줄 때 분리되어 나오는 단백질중에 역가가 있는 부분만을 취하였다. 2차 정제는 Mono-Q HR 5/5 co-

lumn으로 20 mM Tris-HCl(pH 8.5) 완충용액에서 실시하였고 유속은 1 ml/min이었으며 염으로는 역시 0.5 M NaCl을 사용하였다. 각 단계마다 전기영동(SDS-PAGE)을 실시하여 효소의 정제정도를 확인하였다.

Amylase의 활성측정

효소의 역가는 dinitrosalicylic acid(DNS)를 사용하는 환원당 정량법(17)으로 측정하였다. 완충용액에 호화되어 있는 1% 가용성 전분용액 0.5 ml과 동일한 완충용액 0.4 ml을 섞어 반응 온도에서 5분간 예열시킨 후, 효소용액 0.1 ml을 넣은 시각부터 30분간 반응시키고 DNS 3 ml을 넣어 반응을 중지시켰다. 이를 끓는 물에 5분간 중탕하여 발색시킨 후 575 nm에서의 흡광도를 측정하여 환원당의 양으로 환산하였다. 환원당 정량을 위한 표준물질로는 glucose를 사용하였고 효소역가 1 unit는 1분동안 1 μmol의 환원당을 생산하는 효소의 양으로 정하였다.

단백질량 측정

단백질은 Bradford 방법(18)에 의하여 bovine serum albumin을 표준물질로 사용하여 정량하였다.

최적 pH 및 안정성

효소활성에 대한 pH의 영향을 조사하기 위해, 각각의 universal 완충용액(100 mM, pH 4.0~10.0) 0.4 ml과 증류수에 호화되어있는 1% 가용성 전분용액 0.5 ml을 섞어 60°C에서 5분간 예열시킨 후 각각의 pH 완충용액으로 희석한 효소용액 0.1 ml을 넣고 30분간 반응시켜 측정하였다. pH 안정성은 효소용액을 각각의 pH 완충용액에서 50°C로 30분간 방치시킨 후 pH 6.0인 기질과 완충용액에서 30분간 반응시켜 상대활성도로 나타내었다.

최적온도와 열 안정성

최적 반응온도는 50 mM K₂HPO₄-NaOH 완충용액 (pH 6.0)에 호화되어 있는 1% 가용성 전분용액 0.5 ml과 같은 완충용액 0.4 ml을 섞어 50°C, 55°C, 60°C, 65°C, 70°C, 75°C, 80°C로 달리한 반응온도에서 5분간 예열시킨 후 효소용액 0.1 ml을 넣고 30분간 반응시켜 측정하였다. 효소액을 각각 50°C, 60°C, 70°C에서 일정한 시간별(5, 15, 30, 40, 50, 60분)로 방치시킨 후 pH 6.0인 기질과 완충용액으로 60°C에서 30분간 반응시킨 뒤 잔류 활성을 %로 나타내어 열 안정성을 측정하였다.

금속이온과 EDTA의 영향

Table 1. Composition of SH media used

Component	Amount (w/v)
Soluble starch	2%
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0.35%
Yeast extract	0.6%
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.05%
Sodium acetate	0.2%
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.008%

60°C, pH 6.0에서 금속이온 또는 EDTA를 5 mM 첨가하여 역가를 측정하여 아무것도 첨가되지 않은 기준반응액과 비교하여 상대활성도로 나타내었다.

효소의 분자량 및 등전점 측정

Laemmli(19)의 방법에 따라 10% gel을 사용하여 SDS-PAGE를 실시하였다. Gel의 염색은 Coomassie brilliant blue R-250 용액(0.125% Coomassie brilliant blue R-250, 40% methanol, 7% glacial acetic acid)으로 하였고 탈색(30% methanol, 10% glacial acetic acid)후에 진공 겔 건조기로 건조하였다. 분자량 표준 시료로는 myosin(MW 205,000), β-galactosidase(MW 116,000), phospholipase b(MW 97,400), bovine serum albumin(MW 66,000), egg albumin(MW 45,000), carbonic anhydrase(MW 29,000)을 사용하였다. 등전점은 phastsystem(Pharmacia)를 이용한 isoelectric focusing(IEF)에 의하여 측정하였다.

당류의 분석

Thin Layer Chromatography(TLC) 완충용액(pH 6.0)에 호화되어 있는 1% 가용성 전분용액에 1 unit/ml인 효소용액을 동량 가한 뒤 60°C에서 반응시키면서 0.5, 1, 3, 6, 12, 24시간 후에 sampling 하였다. TLC Plate(Silica gel 60, Merck)는 110°C에서 2시간 동안 구워 활성화 시켰으며 반응액 4 μl를 loading한 후 isopropyl alcohol : ethyl acetate : water = 3 : 1 : 1의 조성비로 이루어진 용매에서 전개시켰다. Plate를 잘 건조시킨 후 50% 황산을 뿌리고 110°C에서 20분간 구워 발색시켰다.

High Performance Ion Chromatography(HPIC)

생성물의 정량적 분석을 위해 HPIC(Dionex BioLC, Dionex Co.)를 사용하였다. 당 전용 column인 Carbo-pac PA1 column(Dionex Co.)으로 분석하였으며 당의 검출은 pulsed amperometric detector(PAD, Dionex Co.)로 하였고 pulse potential은 E₁ = 0.05, E₂ = 0.60, E₃ = -0.80이었다. 용매는 150 mM NaOH 용액을 사용하였고 600 mM sodium acetate로 30분 동안 30%

까지 직선적으로 gradient를 걸어주었다. 유속은 1 ml/min, 시료 주입량은 20 μl로 하였다. 기록은 Chromate V2.2(Model : DS, Interface Eng. Co.)를 이용하였으며 여기에서 계산된 peak의 면적을 표준시료의 면적과 비교하여 질량으로 환산하였다.

결과 및 고찰

효소의 정제

Bacillus sp. SUH4-2의 배양액을 침전분획, DE-AE-Toyopearl 음이온 교환 크로마토그래피, 그리고 Mono-Q HR 5/5 column으로 정제한 결과 16.1배 정제되었으며 이때 수율은 13.5%이었다. 각 단계의 정제도와 수율은 Table 2에 정리하였으며 정제과정의 크로마토그램을 Fig. 1에 나타내었다.

온도와 pH의 영향

Bacillus sp. SUH4-2가 생산하는 α-amylase의 온도별 효소활성도는 Fig. 2와 같다. 최적온도는 60~65°C이었고 70°C에서도 70% 이상의 역가를 나타내었다. 이는 *Bacillus licheniformis*(20)가 생산하는 내열성

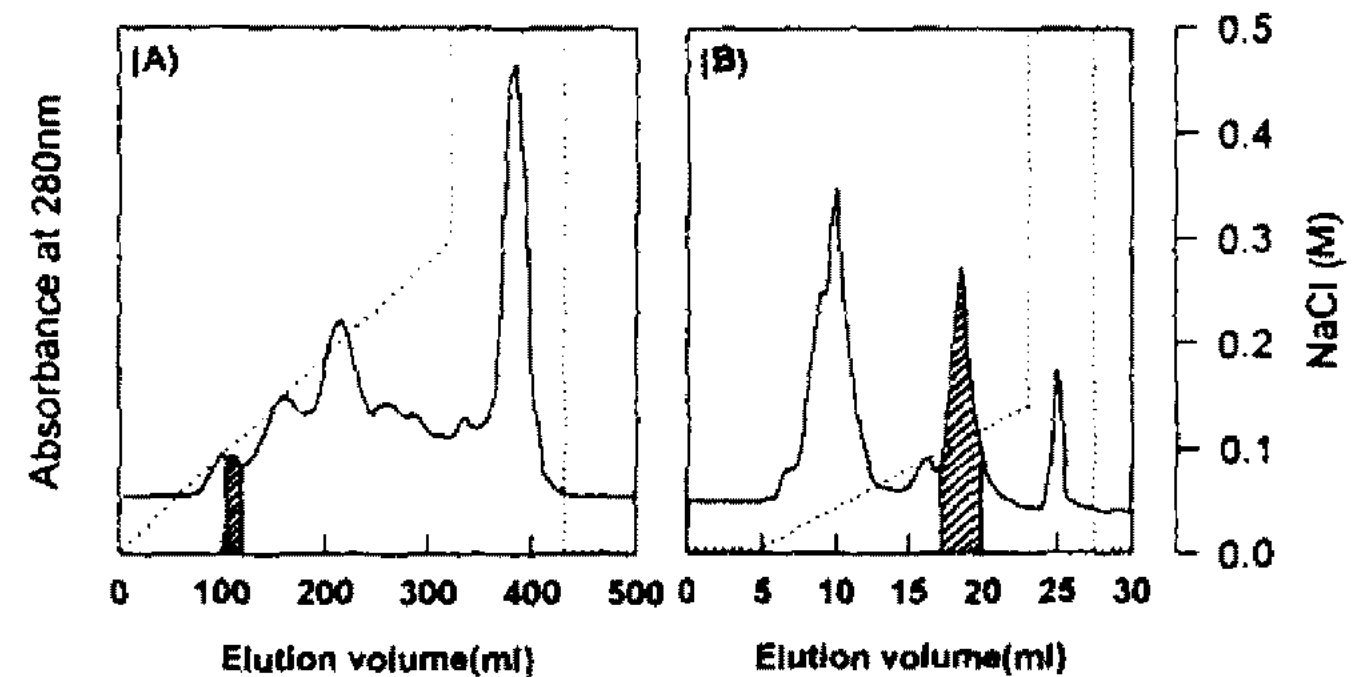


Fig. 1. Anion exchange column chromatographies of crude enzyme using FPLC. (A) column, DEAE-Toyopearl 650S (24 mm×200 mm); eluent, 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0); flow rate, 7 ml/min. (B) column, Mono-Q HR 5/5; eluent, 20 mM Tris-HCl (pH 8.5); flow rate, 1.0 ml/min. Elution was carried out by the application of linear gradient of 0.0~0.5 M NaCl.

Table 2. Purification of α-amylase from *Bacillus* sp. SUH4-2

Purification	Volume (ml)	Activity (unit)	Protein (mg)	Specific activity (unit/mg)	Purification fold	Yield (%)
Culture broth	1400	657	179.0	3.7	1.0	100.0
80% (NH ₄) ₂ SO ₄ ppt.	115	355	81.2	4.4	1.2	54.1
DEAE-Toyopearl 650S	19	184	5.9	31.2	8.5	28.0
Mono-Q HR 5/5	6.7	88.4	1.5	58.9	16.1	13.5

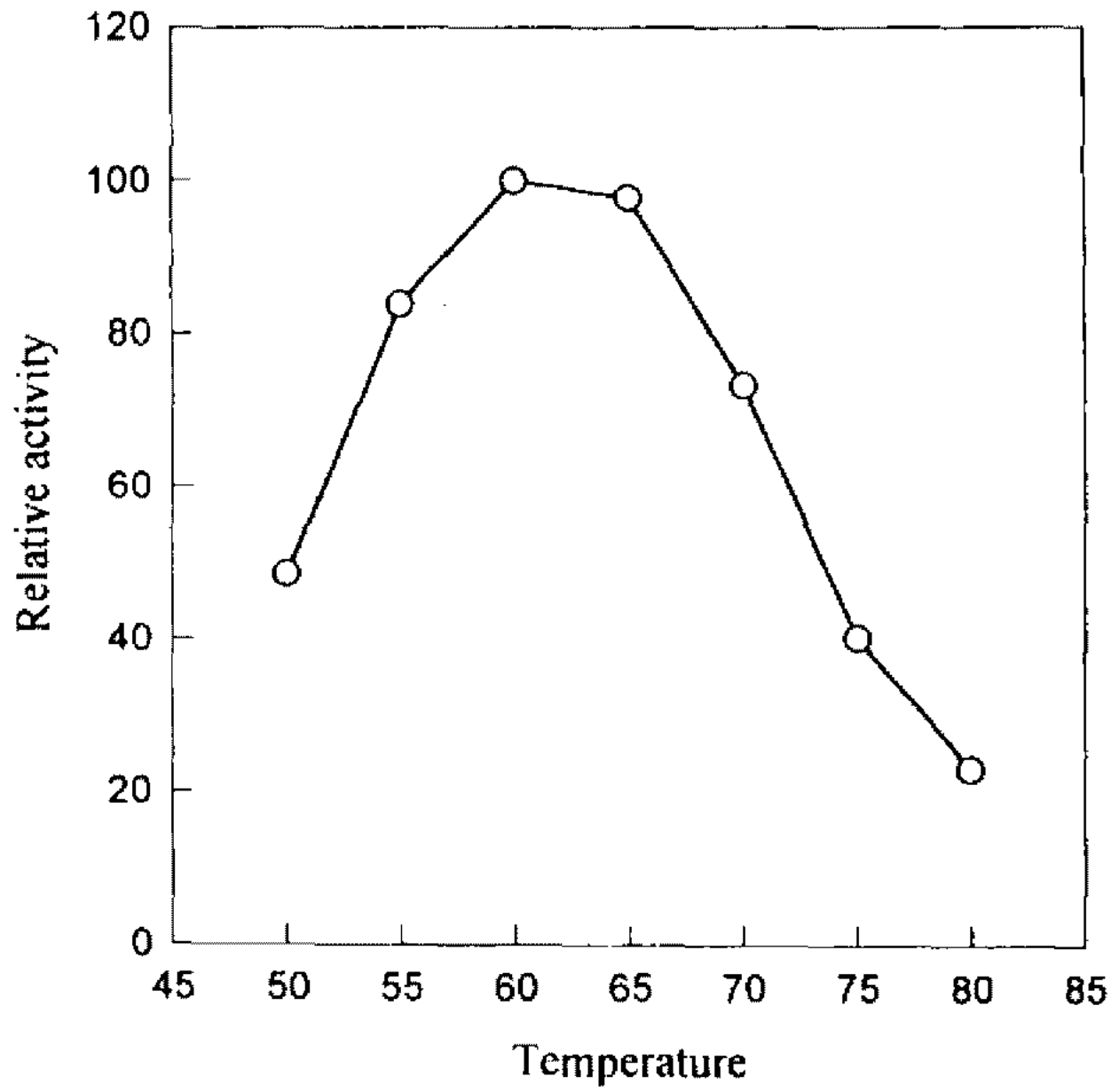


Fig. 2. The effect of temperature on the amylase activity.

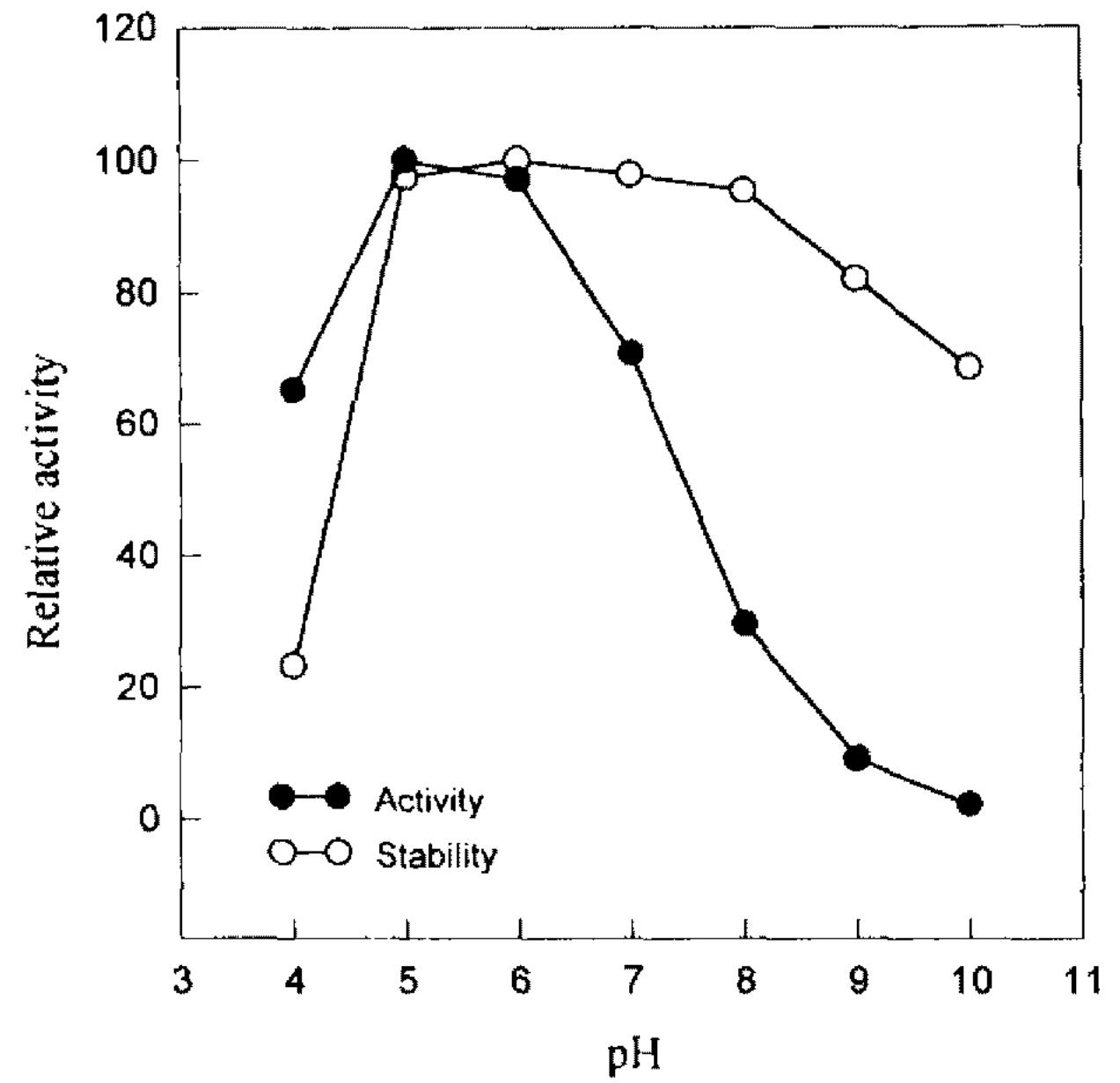


Fig. 4. The effect of pH on the amylase activity and stability. 50 mM universal buffer (pH 4.0~10.0) was used.

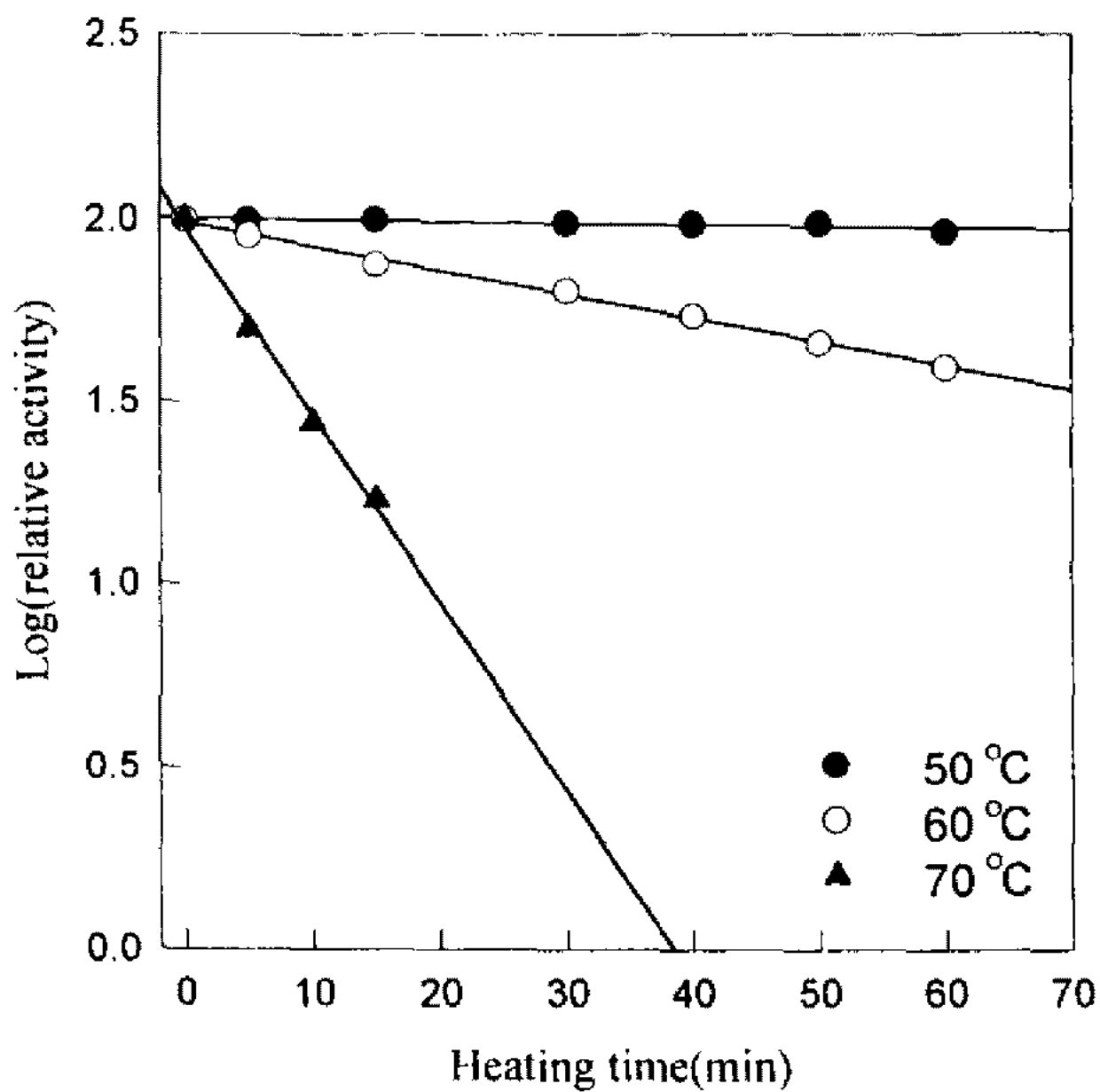


Fig. 3. The effect of temperature on the amylase stability.

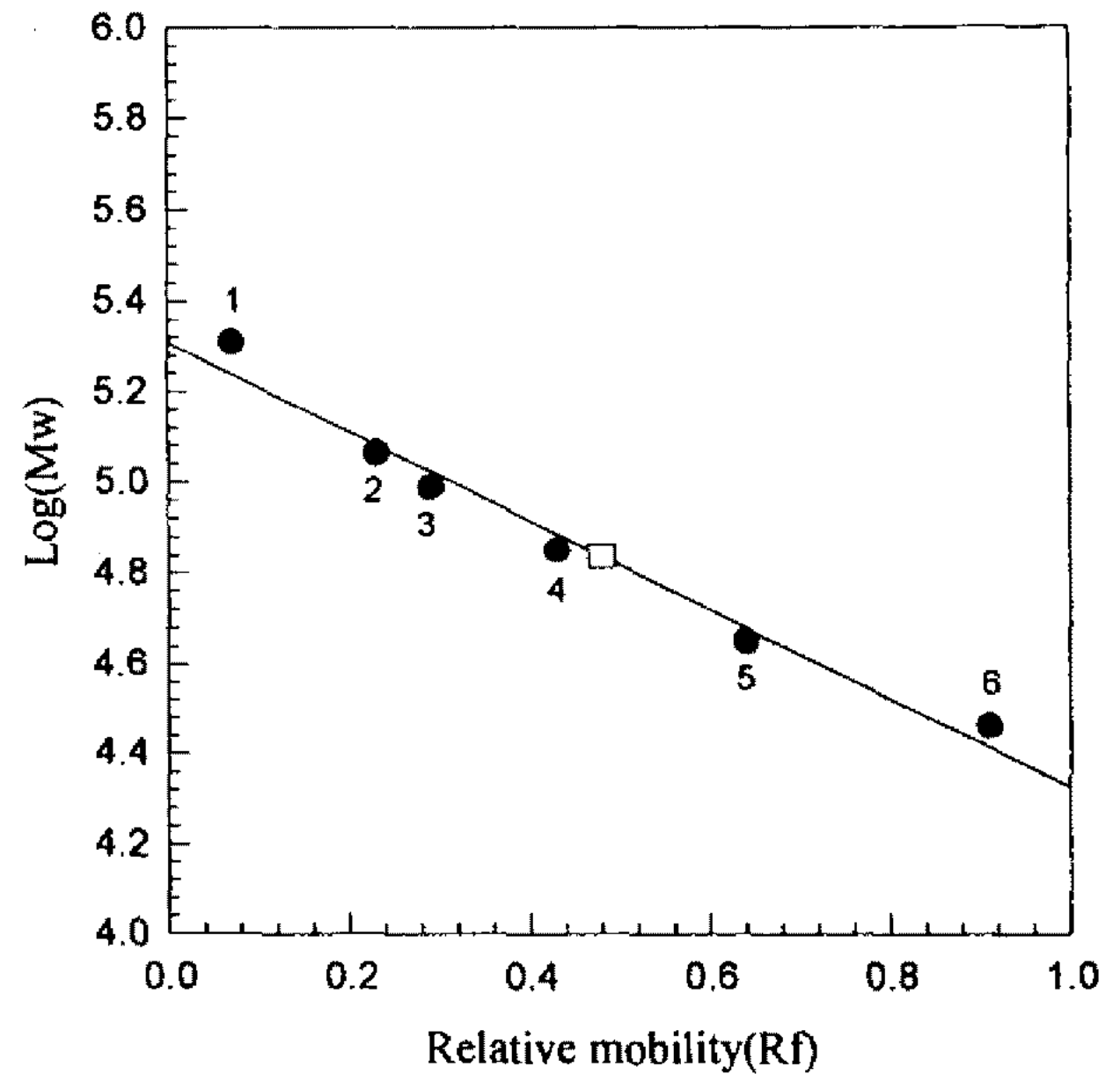


Fig. 5. Determination of molecular weight of amylase from *Bacillus* sp. SUH4-2.

1, myosin; 2, β-galactosidase; 3, phospholipase b; 4, bovine serum albumin; 5, egg albumin; 6, carbonic anhydrase; □, the amylase of *Bacillus* sp. SUH4-2.

다(Fig. 4).

분자량과 등전점

Bacillus sp. SUH4-2가 생산하는 amylase의 분자량을 SDS-PAGE를 통해 확인한 결과 약 63.6 kD로 측정되었다(Fig. 5). SDS-PAGE에서는 Fig. 6A에서 볼 수 있는 바와 같이 단일 band를 확인할 수 있었으

α-amylase의 최적 반응온도보다는 많이 낮지만 *Bacillus caldovelox*(6), *Bacillus* sp. MG-4(7), *Bacillus subtilis*(10)보다는 높으며 *Bacillus circulans* G-6(5), *Bacillus megaterium* G-2(12), *Bacillus stearothermophilus*(13)와는 비슷한 수준으로 중간 정도의 열 안정성을 갖는다. 또한 이 효소는 60°C에서 40분간 방치된 후에도 50% 이상의 역가를 유지하였으며 D-value는 60°C에서 166분, Z-value는 9.9°C이었다(Fig. 3). 이 효소의 최적 pH는 pH 5.0~6.0으로 약한 산성에서 최고의 역가를 나타내었으며 pH 5.0~8.0 범위에서 안정하였

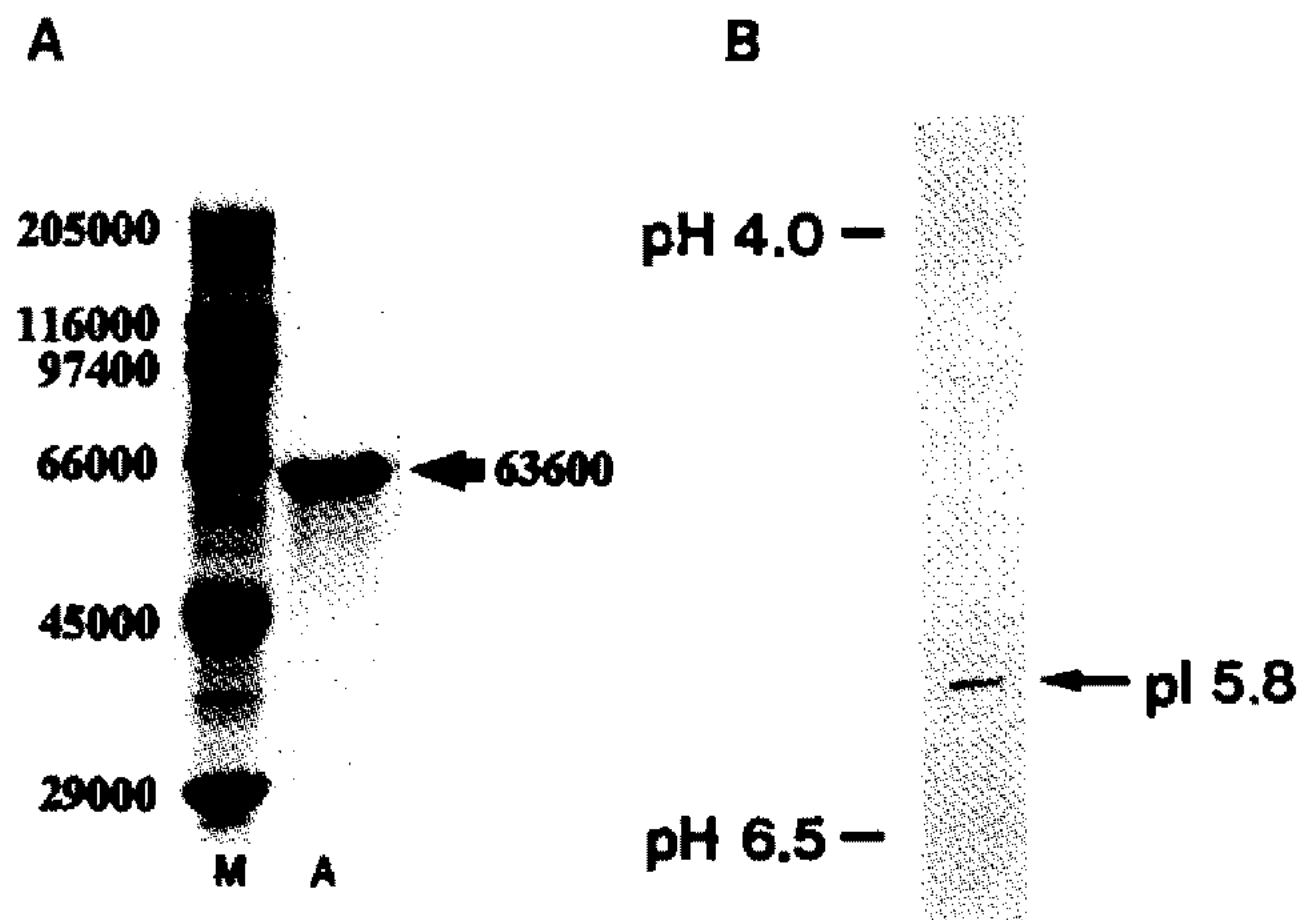


Fig. 6. SDS-PAGE (A) and isoelectric focusing (B) patterns of the purified amylase from *Bacillus* sp. SUH4-2.

Lane M: standard molecular weight marker; lane A: amylase from *Bacillus* sp. SUH4-2. Electrofocusing was carried out with Phast Gel (IEF 4-6.5) and the separated proteins were detected by silver staining.

Table 3. Effect of various metal ions and EDTA on the activity of α -amylase from *Bacillus* sp. SUH4-2

Metal ions or Reagent (mM)	Relative activity (%)
Control	100
Li ²⁺ 5	96.1
Mg ²⁺ 5	85.2
Ca ²⁺ 5	80.2
10	51.2
20	28.8
Zn ²⁺ 5	15.4
Co ²⁺ 5	12.5
Mn ²⁺ 5	5.9
Ni ²⁺ 5	4.7
Cu ²⁺ 5	3.3
Fe ³⁺ 5	0
EDTA 5	83.8

며 이로부터 이 효소는 단일 peptide 사슬에 의해 이루어진 것을 알 수 있었다. 또한 정제된 효소로 Phastsystem을 이용하여 isoelectric focusing을 실시한 결과를 Fig. 6B에 나타내었으며 여기서 계산된 이 효소의 등전점은 5.8이었다. 일반적으로 미생물에서 생산되는 α -amylase는 50,000~70,000 정도의 분자량을 나타내며 *Bacillus* sp. SUH4-2가 생산하는 amylase의 분자량도 이 범위에 해당한다. *Bacillus megaterium* G-2(12)의 maltose 생산효소와 *Bacillus licheniformis* maltogenic amylase(11)의 분자량도 각각 60,000, 64,000으로서 *Bacillus* sp. SUH4-2가 생

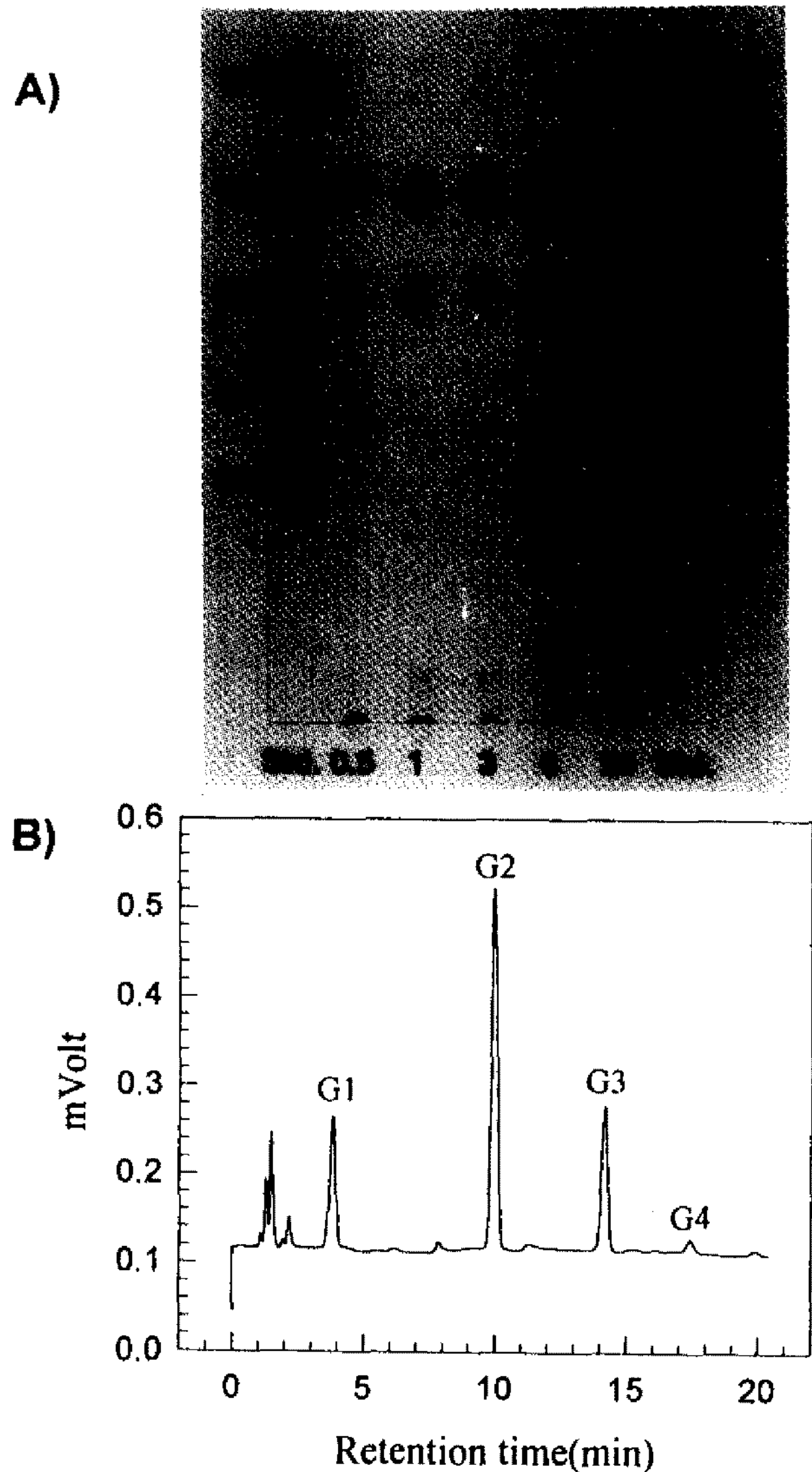


Fig. 7. Thin layer chromatogram (A) and high performance ion chromatogram (B) of the starch hydrolyzates from the reaction with the amylase of *Bacillus* sp. SUH4-2.

A: the soluble starch was incubated with the purified enzyme at various reaction time and analyzed by TLC using isopropyl alcohol: ethyl acetate: water (3:1:1) as solvent. B: HPIC analysis was carried out under the following conditions: column, Carbowac PA1; detector, pulsed amperometric detector; eluents, eluent A-150 mM NaOH, eluent B-150 mM NaOH containing 600 mM NaOAc. G1, G2, G3, G4 and G5 indicate glucose, maltose, maltotriose, maltotetraose and maltopentaose, respectively.

산하는 amylase와 비슷하다.

금속이온 및 EDTA의 영향

이 효소는 Li²⁺, Mg²⁺에 의해서 약하게 저해되었으며 Zn²⁺, Co²⁺, Mn²⁺, Ni²⁺, Cu²⁺, Fe³⁺에 의해서는 매우 강하게 저해되었다. 특히 Ca²⁺를 첨가하였을

Table 4. Characteristics of maltose producing α -amylase from *Bacillus* sp.

	<i>Bacillus</i> <i>stearothermophilus</i>	<i>Bacillus</i> <i>megaterium</i> G-2	<i>Bacillus</i> sp. SUH4-2
Optimum temperature	60°C	60°C	60~65°C
Optimum pH	5.3	7.0~7.5	5.0~6.0
Main products from starch	maltose	maltose	maltose
Action on CD	+	-	-
Action on G3	+	-	-
Molecular weight	70 kD	60 kD	63.6 kD
Isoelectric point			5.8

*CD=cyclodextrin, G3=maltotriose

경우에도 Ca^{2+} 를 첨가하지 않은 기준 효소에 비해 약간 감소된 역가를 나타내었으며 EDTA에 의해서도 약하게 저해작용을 받았다. 대부분의 amylase는 Ca^{2+} 에 의해서 안정화 된다고 알려져 있으며 이런 경우 Ca^{2+} 첨가시 향상된 역가를 나타내지만 *Bacillus* sp. SUH4-2가 생산하는 amylase는 5 mM Ca^{2+} 첨가시 약간 감소된 역가를 나타내었으며 Ca^{2+} 첨가량을 증가시킬 경우 역가 감소가 더욱 크게 나타났다. *Bacillus licheniformis*의 maltogenic amylase도 Ca^{2+} 에 의해 저해작용을 받는 것으로 보고되어지고 있으나 저해효과가 매우 강하며 EDTA 첨가시 역가가 증가하는 점이 본 효소와 다르다(11). 결과는 Table 3에 나타내었다.

당류의 분석

이 효소는 전분을 분해하여 주로 maltose와 maltotriose를 생산하였으며 반응시간에 따른 생성당의 변화는 TLC를 이용하여 확인하였다(Fig. 7A). 반응 초기부터 maltose와 maltotriose만을 주로 생성하며 반응시간이 길어지면서 glucose가 나타나기는 하지만 그 증가량은 미미하였다. 반응 초기에 maltotetraose가 조금 나타나기는 하지만 곧 대부분 분해되었다. 생성당의 정량적 분석은 HPIC를 이용하여 실시하였다(Fig. 7B). 각각의 생성물의 비율은 G1 : G2 : G3 : G4 = 11 : 59 : 25 : 5 (G1 : glucose, G2 : maltose, G3 : maltotriose, G4 : maltotetraose)이었으며 가수분해율은 56.5%로 계산되었다. *Thermoactinomyces vulgaris*(21)도 전분으로부터 maltose와 maltotriose를 55%와 23%로 생산하여 본 효소와 비슷한 경향을 보이지만 소량의 panose를 만드는 점과 pullulan을 분해하는 능력이 있으며, *Bacillus subtilis*(10)는 maltose와 maltotriose만을 주로 생산하지만 maltose : maltotriose = 25 : 56으로 maltotriose를 더 많이 생성한다. 이상과 같이 *Bacillus* sp. SUH4-2가 생산하는 amy-

lase의 일반적인 특성을 조사하였으며 비슷한 성질을 가지는 amylase를 Table 4에서 비교하였다.

Bacillus sp. SUH4-2가 생산하는 amylase는 이른바 'Intermediate Temperature Stability(ITS) enzyme' 이라고 불리는 중간내열성 효소에 속하며 maltose와 maltotriose를 선택적으로 많이 생산하는 좋은 성질을 가지고 있는 것으로 확인되었다. 특히 maltotriose도 전분입자 내에서 전분입자의 노화를 억제하는 역할을 한다는 보고가 있으므로(15) *Bacillus* sp. SUH4-2가 생산하는 amylase도 anti-staling 효소로서 사용될 수 있는 가능성이 있다고 사료된다.

요 약

토양에서 분리된 내열성 균주인 *Bacillus* sp. SUH 4-2가 생산하는 maltose, maltotriose 생성 amylase를 $(NH_4)_2SO_4$ 침전 분획, DEAE-Toyopearl 및 Mono-Q HR 5/5 column 크로마토그래피로 16.1배 정제하였으며 수율은 13.5%이었다. 이 효소의 최적 반응온도는 60~65°C이며 60°C에서 40분간 방치된 후에도 50% 이상의 역가가 유지되었다. 최적 반응 pH는 5.0~6.0이며 pH 5.0~8.0에서 안정하였다. 이 효소의 등전점은 5.8이었으며 SDS-PAGE로 분석한 결과 분자량은 약 63.6 kD이었다. 이 효소를 가용성 전분과 반응시켜 생성된 당류를 TLC로 조사하여 maltose와 maltotriose가 선택적으로 많이 생성되는 것을 확인할 수 있었으며 HPIC로 정량하여 당들이 glucose : maltose : maltotriose : maltotetraose = 11 : 59 : 25 : 5의 비율로 생성됨을 알 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 농업생물신소재연구센터의 지원으로 수행하였으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Vihinen, M. and P. Mäntsälä. 1989. Microbial amyolytic enzymes. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **24**: 329-418.
2. Komaki, T. 1988. Application of amylases and related enzymes to industry. Pp. 195-196. In The amyase Research Society of Japan. (ed), *Handbook of amylases and related enzymes*. Pergamon Press. England.
3. Dziezak, J.D. 1991. Enzymes: catalyst for food process. *Food Technol.* **45**: 78-85.
4. 박관화. 탄수화물 신소재의 개발. 1992. 식품과학과 산업 **25**(2): 73-82.
5. Takasaki, Y. 1982. Production of maltohexaose by α -amylase from *Bacillus circulans* G-6. *Agric. Biol. Chem.* **46**: 1539-1547.
6. Fogarty, W.M., F. Bealin-Kelly, C.T. Kelly, and E.M. Doyle. 1991. A novel maltohexaose-forming α -amylase from *Bacillus caldovelox*: Patterns and mechanisms of action. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **36**: 184-189.
7. Takasaki, Y., H. Shinohara, M. Tsuruhisa, S. Hayashi, and K. Imada. 1991. Maltotetraose-producing amylase from *Bacillus* sp. MG-4. *Agric. Biol. Chem.* **55**: 1715-1720.
8. 차진, 김영배, 서병철, 박관화. 1994. *Streptomyces* sp. KSM-35의 특성과 maltotetraose 생산성 아밀라제의 정제. 한국식품과학회지 **26**: 633-637.
9. Fogarty, W.M., C.T. Kelly, A.C. Bourke, and E.M. Doyle. 1994. Extracellular maltotetraose-forming amylase of *Pseudomonas* sp. IMP 353. *Biotechnol. Lett.* **16**: 473-478.
10. Takasaki, Y. 1985. An amylase producing maltotriose from *Bacillus subtilis*. *Agric. Biol. Chem.* **49**: 1091-1097.
11. Kim, I.C., J.H. Cha, J.R. Kim, S.Y. Jang, B.C. Seo, T.K. Cheong, D.S. Lee, Y.D. Choi, and K.H. Park. 1992. Catalytic properties of the cloned amyase from *Bacillus licheniformis*. *J. Biol. Chem.* **267**: 22108-22114.
12. Takasaki, Y. 1989. Novel maltose-producing amylase from *Bacillus megaterium* G-2. *Agric. Biol. Chem.* **53**: 341-347.
13. Outtrup, H. and B.E. Norman. 1984. Properties and application of a thermostable maltogenic amylase produced by a strain of *Bacillus* modified by recombinant-DNA techniques. *Starch.* **36**: 405-411.
14. Martin, M.L. and R.C. Hosney. 1991. A mechanism of bread firming: II. Role of starch hydrolyzing enzymes. *Cereal Chem.* **68**: 503-507.
15. Akers, A.A. and R.C. Hosney. 1994. Water-soluble dextrans from α -amylase-treated bread and their relationship to bread firming. *Cereal Chem.* **71**: 223-226.
16. Hebeda, R.E., K.B. Kinda, and W.M. Teague. 1990. Developments in enzymes for retarding staling of baked goods. *Cereal Foods World.* **35**: 453-457.
17. Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426-428.
18. Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing for the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-251.
19. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature.* **227**: 680-685.
20. Ivanova, V.N., E.P. Dobрева, and E.I. Emanuilova. 1993. Purification and characterization of a thermostable alpha-amylase from *Bacillus licheniformis*. *J. Biotechnol.* **28**: 277-289.
21. Shimizu, M., M. Kanno, M. Tamura, and M. Suekane. 1978. Purification and some properties of a novel α -amylase produced by a strain of *Thermoactinomyces vulgaris*. *Agric. Biol. Chem.* **42**: 1681-1688.

(Received 20 May 1995)