

극한환경에서 분리한 고온성 *Bacillus* sp. TR-25에 의한 내열성 α -amylase의 생산

노석범 · 손홍주* · 이종근†

부산대학교 자연과학대학 미생물학과

*부산대학교 환경문제연구소

Thermostable α -Amylase Production by Thermophilic *Bacillus* sp. TR-25 Isolated from Extreme Environment

Suk-Bum Roh, Hong-Joo Son* and Jong-Kun Lee†

Department of Microbiology

*Institute of Environmental Studies, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

Abstract

For screening thermostable α -amylase from thermophiles, various samples from extreme environments such as hot spring and sewage near them, and compost, were examined microbial growth in enrichment culture medium at 55°C on the assumption that enzymes from thermophiles are inevitably thermostable. One strain showing higher α -amylase activity was pure cultured and designated as *Bacillus* sp. TR-25 from the results of morphological, cultural and physiological characteristics. The most important carbon sources for the enzyme production were soluble starch, dextrin, potato starch and corn starch. Glucose and fructose had a catabolite repression on the enzyme production. The good nitrogen sources for the enzyme production were yeast extract, nutrient broth, tryptone, corn steep liquor and ammonium sulfate. The enzyme production was accelerated by addition of $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. The optimal medium composition for the enzyme production was soluble starch 2.0%, yeast extract 0.5%, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.01%, Tween 80 0.001%, pH 8.0, respectively. In jar fermenter culture, this strain shows a rapid growth and required cheaper carbon and nitrogen source. These properties are very useful to fermentation industry. The α -amylase of this strain demonstrated a maximum activity at 80°C, pH 5.0, respectively. And calcium ion did not improve thermostability of the enzyme. At 100°C, this enzyme has 23% of relative activity. Transformation was carried out by thermophilic *Bacillus* sp. TR-25 genomic DNA. As a result, the transformant has increased thermostable α -amylase activity.

Key words : *Bacillus* sp. TR-25, thermostable α -amylase, thermophilic

† Corresponding author

서 론

Amylase는 전분의 α -1,4 결합 또는 α -1,6 결합을 가수 분해하는 효소로서 동식물, 미생물 등에 광범위하게 분포되어 있고 그 작용양식에 따라 다양한 종류로 분류되는 효소이다¹⁾. 그중 α -amylase [α -1,4-glucan 4-glucanohydrolase, EC 3.2.1.1]는 알콜, 전분, 제당, 제빵, 피혁공업 등에 널리 쓰이는 산업용 효소로서 많은 연구가 진행되어 왔다. 전분 액화용으로 사용되는 내열성 α -amylase는 호화된 전분을 고온에서도 실활시키지 않고 전분사슬을 액화시켜 당화효소의 작용을 용이하게 만들어준다. 이 경우, 내열성이 강조되는 이유는 전분을 고온으로 호화시킨 후, 온도를 낮추게 되면 전분이 retrogradation되어 효소분해가 어렵게 되고, 냉각 cost의 증가 및 생산수율이 저하되기 때문이다.

고온성균은 일반적으로 55°C 이상의 고온에서 활발히 생육하는 균을 말하는데, 이러한 고온성균은 토양, 퇴비, 온천 지역 등에 널리 분포하고 있으며, 대부분 화학종속영양균이다. 고온성균이 생산하는 효소는 대부분 중온성균의 효소보다 내열성이 우수한 것으로 알려져 있으므로 자연생태계 및 인공환경으로부터 고온성균과 내열성 효소를 분리하고, 내열성 효소의 성질을 검토하는 것은 산업미생물학적인 측면 뿐만 아니라 미생물 생태학적인 면에서도 그 의의가 크다. Tamuri 등²⁾은 수천종의 고온성 미생물을 분리하였고, 그 중에서 수백종의 내열성 α -amylase 생산균주를 분리하여 *Bacillus licheniformis*의 α -amylase와 비교하였다. Kindle 등³⁾은 *Bacillus*속에서 분리한 α -amylase는 Ca^{2+} 을 적게 요구하고, 90°C 근방에서 최적활성을 나타내었다고 보고하였다. 현재 국내에서는 60~80°C까지 열안정성을 보이는 α -amylase를 생산하는 *Bacillus licheniformis*의 분리에 관한 보고가 있다⁴⁾.

α -Amylase의 정제는 유안침전, 이온교환 크로마토그래피, 젤여과 크로마토그래피 등과 같은 보편적인 단백질 정제법뿐만 아니라 α -amylase와 corn starch와의 특이결합을 통한 affinity type의 정제를 할수 있다는 장점이 있다^{5,6)}. α -Amylase에 관한 유전적인 연구는 대부분 *Bacillus subtilis*에서 행해졌다. 즉 *Bacillus subtilis*는 고온성 세균이 가지고 있는 gene을 형질전환에 의하여 수용할 수 있는 훌륭한 숙주가 되기 때문에 각종 효소의 overproducer로서 각광을 받고있다. Green 등⁷⁾은 각종 *Bacillus* 속의 균주를

이용하여 whole cell DNA를 적당하게 처리하여 형질전환 실험을 하였다. Lindsey 등⁸⁾은 고온성 *Bacillus caldalyticus*의 DNA를 중온성 *Bacillus subtilis*에 형질전환시킨 결과, transformant가 70°C에서도 생육할 수 있었으며, 형질전환된 *Bacillus subtilis*의 histidinol dehydrogenase의 내열성이 훨씬 증가되었다는 것을 보고하였다. 이것은 고온성균의 DNA가 중온성균의 생육온도와 효소의 내열성을 바꿀수 있다는 것을 의미한다. 내열성 α -amylase 생산균주에 NTG (N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine)를 처리함으로써 α -amylase의 생산성을 증가시킨 보고도 있다⁹⁾. 학문적인 측면에서 열안정성에 관한 연구는 그 분자수준까지는 명확히 규명되어 있지 않다¹⁰⁾. 따라서 고온성 단백질생산기구를 보유하고 있는 고온균을 대상으로 효소 열안정성의 일반적인 규칙들이 알려진다면 다른 효소로의 열안정성 부여가 가능해 질것으로 사료된다.

본 연구에서는 여러 극한환경(고온환경)으로부터 내열성 α -amylase를 생산하는 고온성균을 분리, 동정하고, 그 중 내열성이 우수한 효소를 생산하는 균주를 선정한 후, 최적 효소생산조건을 확립하고 생산된 조효소의 특성을 검토하였다. 또한 공시균의 genomic DNA를 분리하여 중온성 *Bacillus*속에서 형질전환시킴으로써 효소생산능에 대한 효율성을 검토하였다.

재료 및 방법

내열성 α -amylase 생산균의 분리 및 고온성 미생물의 생태 내열성 α -amylase 생산균을 분리하기 위하여 부산, 김해 근교의 토양, 퇴비, 분변, 온천수 및 온천수가 유입되는 하천수와 같은 자연환경과 고온의 공장폐수, 고온의 혐기성 소화조와 같은 인공환경으로부터 시료를 채취하여 분리용 시료로 사용하였다. 이때 사용한 분리용 배지의 조성은 nutrient broth 8g/l, soluble starch 10g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1g/l, pH 7.0이었으며, agar의 대체고형제로 Gelrite(Kelco 제품) 8g/l을 첨가하였다. 각 지역에서 채취한 시료를 일정한 양 취하여 분리용 고체배지에 희석평판법으로 도말하여 55°C 항온배양기에 넣어 배양시켰다. 생성된 colony 주위에 0.1N iodine 용액을 분무하여 투명환을 나타내는 colony만을 취하여 순수분리하였다. 순수분리된 균주를 대상으로 효소 생산 배지에서 α -amylase 생산능을 검색하여 그중 효소생산능과 내열성이 가장 우수한 균주를 본 실험에 사용할 공

시균으로 선정하였다. 효소생산을 위한 기초배지의 조성은 yeast extract 15g/l, peptone 5g/l, soluble starch 20g/l, NaOH 5g/l, MgSO₄ · 7H₂O 1g/l, pH 7.0이었다. 또한 일반적인 고온성 미생물의 분포를 알아보기 위하여 각 시료를 고온환경과 일반환경, 자연환경과 인공환경으로 구분하여 60°C에서 배양함으로써 각 환경에 분포하는 고온성 미생물을 계수하였다.

α-Amylase 활성측정법

α-Amylase의 활성측정은 blue value법을 사용하였다¹¹⁾. 즉 1% soluble starch 용액 2ml에 0.1M acetate buffer (pH 5.0) 1ml를 가하여 80°C water bath에서 5분간 예온시킨 후, 적당히 희석된 효소액 1ml를 넣어 30분간 반응시켰다. 반응정지제로서 0.5N acetic acid 10ml를 넣어 잘 교반시키고, 이 혼합액 1ml에 1/3000N I₂ 용액 10ml를 넣어 발색시킨 후, 660nm에서 흡광도로서 효소활성을 측정하였다. 상기의 조건하에서 1% soluble starch 용액의 blue value를 30분간에 10% 저하시키는 효소의 양을 1 unit로 정했으며, 계산식은 다음과 같다.

$$\text{Enzyme activity} = 20 \times \frac{\text{OD}_0 - \text{OD}}{\text{OD}_0} \times \frac{100}{10} \times n$$

여기서 OD₀는 blank activity를, OD는 sample activity를, n은 dilution factor를 나타낸다.

공시균의 분류 및 동정

공시균으로 선정된 내열성 α-amylase 생산균의 분류학적 위치를 검토하기 위하여 형태학적, 배양적, 생화학적 제특성을 조사하였으며, 이에 따른 공시균의 분류와 동정은 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 제 8 판¹²⁾과 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 2¹³⁾에 의하여 실시하였다.

내열성 α-amylase의 최적 생산조건 및 발효조배양

공시균의 내열성 α-amylase의 최적 생산조건을 알아보기 위하여 탄소원, 질소원, 각종 무기염, 통기량, 계면활성제 첨가효과, pH의 영향 등을 60°C에서 48시간동안 배양하여 검토하였으며, 배양온도에 따른 효소생산능도 조사하였다. 상기에서 결정된 최적생산조건에서 jar fermenter를 이용한 batch culture를 실시하여 시간에 따른 균체생육과 효소생산량을 검토하였다. 이때 사용된 발효조는 B. Braun사의

BIOSTAT[®]E였으며, 발효조 운전조건은 배지량 5 L, pH 7.0, agitation speed 400rpm, temperature 65°C, pO₂ 70%이었다.

조효소액의 조제 및 특성검토

전배양액 1% (v/v)를 본배양액에 접종한 후, 2일간 180 rpm으로 회전진탕배양하였다. 이 배양액을 4°C, 12,000 rpm에서 20분간 냉동원심분리하여 균체를 제거한 후, 상등액을 회수하였다. 다시 membrane filter(0.22μm)를 사용하여 균체를 완전히 제거하였으며, 이것을 조효소액으로 사용하였다. 상기의 α-amylase 활성측정법에 따라 효소활성에 미치는 온도, pH, CaCl₂ · 2H₂O의 영향을 검토하였다.

Genomic DNA의 분리¹⁴⁾

LB media에서 배양된 균체에 HTE buffer를 가한 후, 2% sarcosyl로 잘 섞었다. RNase, pronase를 넣고 50°C에서 예온한 후, phenol : choloform : isoamylalcohol을 사용하여 DNA를 추출하였다. Sodium acetate와 isopropanol을 첨가하여 -20°C에서 DNA를 침전시켰다. DNA pellet을 70% ethanol로 씻은 후, 건조하였다. 침전된 DNA를 TE buffer에 용해한 후, -20°C에 보관하였다. 분리된 genomic DNA는 0.7% agarose gel상에서 5V/cm로 전기영동하여 확인하였다.

Transformation¹⁵⁾

생육최적온도가 30°C인 중온성 *Bacillus subtilis* KCTC 1024를 nutrient broth에서 18시간동안 배양한 후, LB media로 100배 희석하여 OD₆₀₀ 0.4까지 생육시켰다. 미리 냉각시킨 동량의 2×TSS를 넣어 얼음에 방치하였다. 이렇게 만들어진 competent cell 100μl와 5μl의 DNA를 polypropylene tube에 넣어 4°C에서 1시간동안 배양한 후, 200 mM의 glucose를 함유한 LB media를 첨가하여 37°C에서 1시간동안 교반하였다. 1%의 soluble starch를 함유한 LB plate에 희석도말하여 얻어진 colony에 0.1N iodine을 분무하여 투명환이 가장 크게 나타난 것만 임의로 선별한 후, 65°C에서 배양하여 α-amylase 생산능을 검토하였다.

결 과

고온성 미생물의 생태

다양한 자연환경과 인공환경에 존재하는 고온성 미생물

의 분포를 알아보기 위하여 비교적 상온을 유지하고 있는 토양 및 동물의 분변과 60~80°C를 유지하고 있는 온천수, 산업폐수, 혐기성 소화조의 슬러지를 시료로 하여 세균, 효모, 방선균의 개체수와 출현 곰팡이의 종류를 각각의 선택 배지를 이용하여 조사한 결과는 Table 1에서 보는바와 같다. 조사된 자연환경 시료중에 존재하는 고온성 미생물은 (퇴비>분변>온천수>토양)의 순서로 많이 검출되었다. 온천수의 경우, 상재 미생물이 고온에 적응되어 있을 가능성이 있어 비교적 많은 수의 고온성 미생물이 나타나리라 예상하

였으나, 검출된 세균수는 매우 작았을뿐만 아니라 효모, 곰팡이 등은 전혀 검출되지 않았다. 이것은 온천수 자체가 미생물의 생육에 필요한 각종 영양원이 부족한 빈영양상태라는 것을 의미한다. 인공환경에서는 산업폐수와 혐기성 소화조의 슬러지 모두에서 조사한 모든 종류의 고온성 미생물이 많이 검출되었다. 혐기성 소화조에서 우점을 이루는 미생물은 *Clostridium* 등의 절대혐기성 세균으로 알려져 있어, 혐기배양기법을 이용할 경우 더욱 다양한 고온성 미생물이 검출되리라 예상된다. 고온환경으로부터 특수미생물의 분리는 대부분 온천수를 중심으로 실시되고 있다. 그러나 본 연구의 결과를 종합컨데, 보다 다양한 고온성 미생물을 분리하기 위해서는 자연의 고온환경보다는 인공적인 고온환경을 분리원으로 하는 것이 좋으며, 또한 빈영양세균, 혐기성세균 등을 분리하기 위한 다양한 배양기법을 사용해야 한다는 것을 알 수 있었다.

Table 1. Occurrence and number of thermophiles in each environments

Environments	Samples	Kind of isolates	Number of isolates (CFU/g or ml)
Soil		Bacteria	1.8×10^4
		Mold	2 types*
		Yeast	ND
		Actinomycetes	2.1×10^2
Feces		Bacteria	8.4×10^4
		Mold	2 types*
		Yeast	1.2×10^2
Natural		Actinomycetes	5.6×10^3
		Bacteria	2.1×10^6
		Mold	7 types*
Compost		Yeast	3.2×10^3
		Actinomycetes	5.3×10^6
		Bacteria	2.4×10^3
Hot spring water		Mold	1 types*
		Yeast	ND
		Actinomycetes	ND
Industrial wastewater		Bacteria	6.3×10^7
		Mold	4 types*
		Yeast	2.0×10^2
		Actinomycetes	6.3×10^4
Artificial Anaerobic digester sludge		Bacteria	3.6×10^5
		Mold	6 types*
		Yeast	3.8×10^3
		Actinomycetes	5.0×10^2

ND, not detected ; *, indicated kind of appeared molds.

Table 2. Effect of carbon sources on the production of α -amylase

Carbon sources (1.0%)	Final pH	Growth (OD at 660nm)	Enzyme activity (units/ml)
Soluble starch	5.1	4.0	412
Potato starch	5.3	4.5	330
Corn starch	6.2	1.5	22
Glucose	5.6	4.7	19
Maltose	6.0	4.3	81
Xylose	4.6	2.2	14
Galactose	8.5	3.0	90
Arabinose	4.7	3.0	10
Fructose	4.7	3.0	10
Lactose	9.0	2.5	160
Sucrose	6.2	4.2	28
C.M.C*	8.8	2.2	69
Mannitol	6.2	4.3	20
Sorbitol	8.9	2.8	50
Dextrin	5.3	4.3	349

*, carboxymethyl cellulose.

내열성 α -amylase 생산균의 분리 및 동정

상기에서 분리된 고온성 미생물중 세균을 대상으로 1%

soluble starch를 함유한 분리용 배지에 접종하여 0.1N의 I₂ 용액을 분무하여 직경 10 mm이상의 투명환을 보이는 집락만을 순수분리하였다. 분리된 각각의 집락을 효소생산 기초배지에서 48시간동안 배양하여 70 여종의 균주를 분리하였다. 90°C 이상에서도 양호한 효소활성을 나타내는 균주는 대부분 compost 및 산업폐수에서 분리된 균주들이었다. 이들 균주들의 생육도를 측정하고, 효소활성을 90°C 이상에서 검토했으며 그 중 가장 효소활성이 우수한 균주를 공시균으로 선정하였다. 공시균의 형태학적, 배양적 및 생화학적 특성을 조사하여 분류학상의 위치를 검토한 결과, 고온성 *Bacillus* 속으로 동정되었다(미제시). 고온성 *Bacil-*

lus 속에 관한 연구자료와 type strain이 빈약하여 명확한 비교실험을 할 수 없는 관계로 편의상 본 균주를 *Bacillus* sp. TR-25로 명명하여 본 실험에 사용하였다.

내열성 α-amylase의 생산조건 검토

각종 탄소원을 효소생산 기초배지에 1% (w/v)씩 첨가하여 60°C에서 48시간 배양한 후, 효소활성을 검토한 결과는 Table 2와 같다. Soluble starch, dextrin, potato starch, corn starch 등의 다당류에서는 효소활성이 우수하였고

Table 3. Effect of soluble starch concentration on production of α-amylase

Concentration (%)	Growth (OD at 660nm)	Enzyme activity (units/ml)
0	0.9	8
1	3.3	45
2	2.6	120
3	3.0	93
4	2.8	92
5	3.0	93
6	2.6	80
7	2.7	82
8	2.9	64
9	2.5	60
10	2.8	58

Table 4. Effect of nitrogen sources on the production of α-amylase

Inorganic nitrogen sources(0.2%)	Growth (OD at 600m)	Enzyme activity (units/ml)
Ammonium nitrate	4.0	53
Ammonium sulfate	3.5	104
Ammonium chloride	3.3	100
Ammonium phosphate monobasic	3.3	94
Sodium nitrate	0.2	7
Organic nitrogen sources(0.5%)		
Casein hydrolysate	3.9	65
Nutrient broth	3.3	119
Yeast extract	3.0	135
Tryptone	3.1	105
Peptone	3.8	73
Corn steep liquor	0.5	104

Table 5. Effect of inorganic salts on the production of α-amylase

Salts	0.1 %		0.01 %		0.001 %	
	Growth*	Enzyme activity**	Growth*	Enzyme activity**	Growth*	Enzyme activity**
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.3	0	3.1	84	2.2	176
MgSO ₄ · 7H ₂ O	3.3	173	4.2	166	2.8	138
MnCl ₂ · 4H ₂ O	0.3	0	3.8	60	2.6	61
NaCl	3.3	149	3.3	139	3.0	111
CaCl ₂ · 2H ₂ O	4.1	789	4.4	404	2.7	143
H ₃ BO ₃	3.3	144	3.5	149	3.9	14

*, OD at 600nm ; **, units/ml.

glucose, fructose 등의 당당류에서는 효소활성이 낮았다. 이것은 glucose 등의 당당류의 존재하에서는 amylase의 생산이 catabolite repression을 받고, soluble starch, dextrin 등의 다당류에서는 효소생산이 촉진된다는 보고와 일치하였다¹⁶⁾. 효소활성이 가장 우수한 soluble starch를 최적탄소원으로 선정하여 그 농도를 검토해 본 결과 Table 3과 같이 2%에서 효소활성이 가장 우수하였다. 2%의 soluble starch를 함유한 효소생산 기초배지에 각종 질소원을 첨가하여 효소활성을 검토한 결과는 Table 4에 나타난 바와같이 0.5%의 yeast extract가 가장 높은 효소활성을 나타냈었으며, 비교적 값싼 질소원인 ammonium sulfate, corn steep liquor 등도 비교적 활성이 우수했다. 2% soluble starch, 0.5% yeast extract를 첨가한 효소생산 기초배지에 각종 무기염을 농도별로 첨가하여 효소활성을 검토한 결과는 Table 5에서 보는바와 같이 0.1% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 에서 효소활성이 가장 우수하였으며, 이것은 Manning 등¹⁷⁾의 결과와 일치하였다. 그러나 Co^{2+} , Sn^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , KCl 등은 효소생산을 강하게 억제하였다(미제시). 1N의 HCl과 NaOH로서 배지의 pH를 3.0~10.0으로 조정하여 효소활성을 비교한 결과, Table 6에 나타난 바와 같이 pH 8.0에서 가장 효소활성이 우수하였다. 배양온도가 효소생산에 미치는 영향을 알아보기 위하여 30°C~80°C로 배양온도를 달리하여 측정된 결과는 Table 7에 나타내었다. 60°C~65°C에서 효소활성이 가장 양호했으며, 40°C 이하에서는 균생육 및 효소생산을 전혀 보이지 않았다. 통기량의 영향을 알아보기 위하여 250ml 삼각 flask에 배지를 용량별로 분

Table 6. Effect of initial pH on the production of α -amylase

Initial pH	Final pH	Growth (OD at 660nm)	Enzyme activity (units/ml)
3.0	4.3	0.18	0
4.0	5.1	0.18	0
5.0	5.4	0.71	52
6.0	5.2	1.51	52
7.0	5.4	1.97	137
8.0	5.5	2.08	295
9.0	5.9	2.00	44
10.0	8.0	0.06	0

Table 7. Effect of temperature on the production of α -amylase

Temperature (°C)	Growth (OD at 660nm)	Enzyme activity (units/ml)
30	0.12	0
37	0.11	0
40	0.12	0
45	0.92	52
50	1.98	137
55	3.01	275
60	5.13	301
65	3.46	299
70	2.27	156
75	0.34	26
80	0.32	18

Table 8. Effect of aeration on the production of α -amylase

Medium volume* (ml)	Growth (OD at 660nm)	Enzyme activity (units/ml)
50	2.2	135
75	4.2	171
100	1.4	167
125	2.9	169
150	2.8	157

*, Obtained by varying the amount of medium in the 250ml shaking flasks and keeping the agitation speed (180rpm).

주하여 배양한 후, 효소활성을 검토한 결과는 Table 8에서 보는바와 같이 75ml의 경우 효소활성이 가장 양호하였다. 계면활성제의 첨가가 많은 미생물의 효소분비를 촉진시킨다는 보고가 있어¹⁸⁾ 각종 계면활성제를 농도별로 첨가하여 효소활성을 검토한 결과를 Table 9에 나타내었다. 그 결과 0.001%의 Tween 80의 첨가는 효소활성을 증가시키는 효과가 우수하였다.

발효조 배양

15 L 용량의 jar fermenter에 상기에서 결정된 효소생산

Table 9. Effect of surfactants on the enhancement of α -amylase production

Surfactants	Concentration (%, w/v or v/v)	Growth (OD at 660nm)	Enzyme activity (units/ml)
Sodiumdodesyl sulfate	0.1	0.38	31
	0.01	1.03	57
	0.001	2.98	57
Tween 80	0.1	0.38	57
	0.01	3.29	117
	0.001	2.43	250
Triton X-100	0.1	0.04	0
	0.01	3.68	97
	0.001	2.65	101

Table 10. Enzyme activity of transformant

Strains	α -Amylase activity (units/ml)	Increased activity (%)
<i>Bacillus subtilis</i>	400*	89
KCTC 1024 ^a		
<i>Bacillus</i> sp. TR-25 ^b	450**	100
Transformant	813**	181

*, Assayed by blue value method at 30°C ; **, assayed by blue value method at 65°C ; a, mesophilie ; b, thermophile.

최적배지 5 L를 넣고 전배양액 100ml을 접종하여 65°C에서 24시간동안 배양하여 시간에 따른 균체생육과 효소생산을 검토한 결과는 Fig. 1에서 보는바와 같다. 즉 균체생육은 명확한 유도기를 거치지 않고 배양 9시간만에 대수증식기 말기에 도달하여 생육속도가 매우 빠름을 알 수 있었다. 또한 효소생산도 균체생육과 비례하여 증가하기 시작하여 배양 16시간만에 최고 생산능을 나타내었다.

조효소액의 특성

배양액을 4°C, 12,000rpm으로 20분간 냉동원심분리한 상등액을 조효소액으로 하여 효소적 성질을 검토하였다. 효소활성에 미치는 온도영향은 Fig. 2에 나타낸 바와 같이 80°C에서 최고값을 보였으며, 100°C 근방에서도 23%의 활성을 나타내었다. Tamuri 등²⁾은 75~80°C에서 효소활성이 최고값을 나타내었다고 보고하였다. 효소활성에 미치는 pH

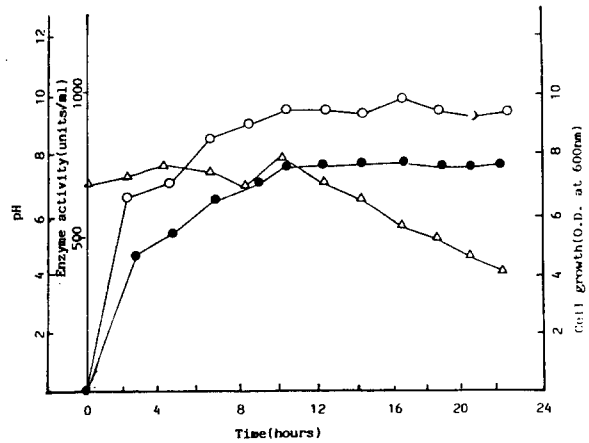


Fig. 1. Time courses of cell growth and α -amylase production in jar fermenter. \bullet —, α -amylase activity ; \circ —, cell growth ; \triangle —, pH.

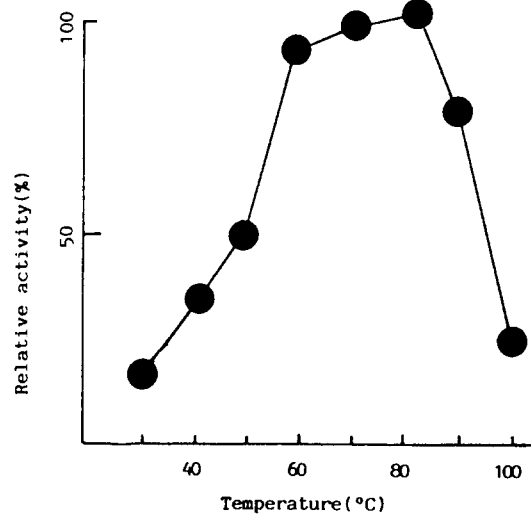


Fig. 2. Effect of temperature on α -amylase activity.

의 영향을 다양한 buffer를 사용하여 pH 3.0~10.0의 범위에 걸쳐 검토한 결과는 Fig. 3에 나타내었다. 효소활성의 최적 pH는 5.0이었고, Ogashara 등¹⁹⁾이 pH 5.0~6.0에서 효소활성이 최적이라는 보고와 일치하였다. 일부 보고에 따르면 Ca^{2+} 이 효소의 내열성을 증가시킨다¹⁷⁾고 하여, Ca^{2+} 의 첨가효과를 검토해 본 결과, 전혀 효과를 보이지 않았다 (미제시).

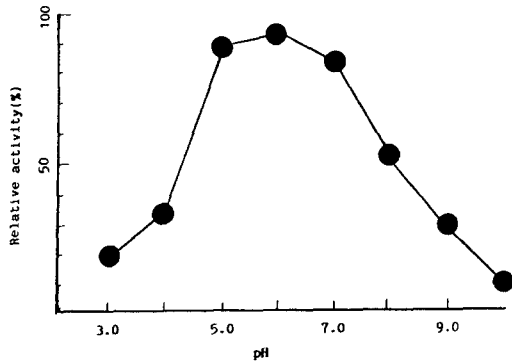


Fig. 3. Effect of pH on α -amylase activity.

Transformation

Streptococcus 속, *Hemophilus* 속 및 *Bacillus* 속은 natural transformation이 쉽게 일어난다고 알려져 있으며²⁰⁾, α -amylase의 생산능은 거의 plasmid가 아닌 chromosome에 유래하는 것으로 알려져 있다²¹⁾. 따라서 고온성 세균인 본 공시균의 DNA를 생육최적온도가 30°C인 중온성 *Bacillus subtilis* KCTC 1024에 형질전환시킨 후, 65°C에서 배양하여 상호간의 α -amylase 활성을 비교해 본 결과, *Bacillus* sp. TR-25의 DNA가 전이된 transformant는 65°C에서의 생육은 물론, wild type에 비하여 약 2배 정도의 효소활성이 증가했음을 알 수 있었다(Table 10). 이러한 결과는 Lindsey 등⁸⁾이 보고한 내용과 일치하였다.

고찰

내열성 α -amylase에 관한 연구는 60년대부터 각광을 받기 시작하여 70년대초에는 100°C 이상에서도 높은 활성을 가지는 상업용 α -amylase가 시판되기 시작했다. 전분백화용 고온성 효소는 현재 그보다 더 높은 온도에서도 활성을 보이는 것들이 속속 개발되고 있는 실정이다. 또한 생전분 가수분해효소들도 현재 활발히 연구되고 있다. Amylase는 연구역사가 길고, 자료들이 풍부한 효소중의 하나이며, 그 생산량도 효소중에서 최상위를 기록하고 있다. 그러나 국내에는 이러한 특수용도의 효소개발이 미진하며, 상업적으로 시판되는 내열성 α -amylase들도 외국의 제품에 비해 온도범위, 정제도, 가격면에서 경쟁이 힘든 실정이다. 또한 고온성 세균 또는 내열성 세균이 생산하는 고온성 효소에 대한 내

열성부여의 분자수준의 연구나 고온성 세균의 분리 등에 관한 연구가 외국에 비해 별로 이루어지고 있지 않다²¹⁾. 실제로 고온에서 자라는 미생물의 종류는 다양함에도 불구하고 그들이 생산하는 단백질이나 효소에 관한 성질들은 대부분 잘 알려지지 않았고, 고온성 미생물에 대한 분류도 미약한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 이러한 고온성 미생물을 순수분리하는 기법과 고온성 미생물에 대한 배양기법, 고온성 단백질에 대한 성질검토, 형질전환에 의한 효소활성 증진 등을 검토하였다. 본 실험에 사용한 공시균주는 빠른 성장률을 보이며 저렴한 탄소원, 질소원으로도 효소생산능이 우수할뿐 아니라 높은 배양온도로 인해 발효배양시 온도조절과 오염의 문제가 적어 산업적 응용이 유망시된다고 생각된다.

요약

내열성 α -amylase를 생산하는 미생물을 분리하기 위하여 각종 분리원으로부터 시료를 채취하여 55°C 이상에서 생육하고 가장 내열성 α -amylase 생산능이 우수한 균주를 분리, 동정한 결과 thermophilic *Bacillus* 속으로 추정되었다. 균체생육과 효소생산의 최적온도는 60~65°C였고, 초발 pH 8.0에서 가장 높은 효소생산능을 보였다. α -Amylase 생산에 가장 양호한 탄소원은 soluble starch, dextrin, potato starch, corn starch 등의 다당류이었으며 glucose, fructose 등의 단당류에서는 효소생산이 미약하거나 억제제를 받았다. α -Amylase 생산에 가장 중요한 질소원은 yeast extract이었다. 0.1% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.001%의 Tween-80의 첨가는 α -amylase 생산성을 증가시켰다. 본 공시균이 생산한 조효소액의 특성을 검토해 본 결과, 80°C에서 최적 효소활성을 보였으며, 100°C에서도 23%의 잔존활성을 나타내었다. 최적 pH는 5.0이었다. Ca^{2+} 은 효소활성 증진에는 영향을 미치지 않았다. 공시균으로부터 분리한 genomic DNA를 중온성 *Bacillus subtilis* KCTC 1024에 형질전환시킨 결과, transformant는 wild type에 비하여 약 2배의 효소활성이 증가되었다.

참고문헌

1. 이갑상 : 효소이용학 개론, pp. 87-107, 원광대학교 출판국(1987).
2. Tamuri, M., Mitsue, Y., Miyoshi, K. and Ishii, Y. :

- Heat and acid-stable alpha-amylase enzymes and processes for producing the same. US patent, No. 4284722(1982).
3. Karen, L. K : Characteristics and production of thermostable α -amylase. *Appl. Biochem. & Biotechnol.*, **8**, 153(1983).
 4. 강희일 : 신규효소 개발에 대하여, pp. 18-19, 유전공학(여름호)(1991).
 5. 정만재 : *Bacillus circulans* F-2가 생산하는 α -amylase에 관한 연구. 한국산업미생물학회지, **9**, 185(1981).
 6. Pfueller, S. L. and Ellitt, W. H. : Purification of α -amylase by precipitation of amylase-starch complex. *J. Biol. Chem.*, **244**, 48(1969).
 7. Green, D. M. and Colorusso, L. J. : Whole-cell DNA transformation of bacteria. *Biochem. Biophys. Acta.*, **89**, 277(1964).
 8. Lindsay, J. A. and Creaser, E. H. : Purification and characterization of histidyl dehydrogenase. *Nature*, **255**, 650(1975).
 9. 오평수 : Isolation of thermostable α -amylase hyper-producing *Bacillus* sp. No32H417 and some properties of the enzyme. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **19**, 122(1991).
 10. Horikoshi, K. : 極限微生物, pp. 138-169, 講談社(1988).
 11. Fuwa, H. : α -Amylase ; measurement of reducing sugar. *J. Biol. Chem.*, **244**, 48(1969).
 12. Krieg, N. R. and Holt, J. G. : *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed., The William and Wilkins Co., USA(1974).
 13. Krieg, N. R., and Holt, J. G. : *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2, The William and Wilkins Co., USA(1984).
 14. Jupith, W. Z., Sanford, I. B. : *Recombinant DNA laboratory manual*, Academic Press(1985).
 15. Chung, C. T., Niemela, S. L. and Miller, R. M. : Transformation of *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 2172(1989).
 16. Saito, N. and Yamamoto, K. : Production and some properties of α -amylase producing *Bacillus starothermophilus*. *J. Bacteriol.*, **121**, 848(1975).
 17. Manning, G. P. and Campbell, L. L. : Filamentation in *Bacillus cereus* during α -amylase production. *J. Biol. Chem.*, **236**, 2952(1961).
 18. Chandra, A. K., Medda, S. and Bhadra, A. K. : Production and characterization of raw starch hydrolyzing enzyme from bacteria. *J. Ferment. Technol.*, **58**, 1(1980).
 19. Ogashara, K. Imanishi, A. and Isemura, A. : Purification and action pattern on soluble starch of α -amylase from sugar cane leaves. *J. Biochem.*, **67**, 77(1970).
 20. Roger, Y. S. : *The Microbial World* 4th ed., Prentice Hall(1976).
 21. Labeda, D. : Isolation of biotechnological organisms from nature, pp. 141-181, McGraw-Hill Publishing Company(1990).