한국농화학회지 제 41 권 제 1 호(1998)
Agricultural Chemistry and Biotechnology
Vol. 41, No. 1, pp. 18~22(1998)

α-Amylase 고생산성 *Bacillus licheniformis* 변이주의 개발과 특성 분석

정허진 · 정경화[1] · 장종수[2] · 윤기홍[3] · 박승환[1] · 김 훈*

순천대학교 농화학과, [1]생명공학연구소 응용미생물그룹, [2]대진대학교 생물학과, [3]우송산업대학교 식품생명공학과

초 록 : *Bacillus licheniformis*를 화학적 돌연변이를 시켜 내열성 α-amylase 고생산성 변이주 SK-5를 얻었다. 변이주는 모균에 비하여 약 50배 정도의 α-amylase를 생산하였으며, 그 모양이 가늘고 길이가 길어졌고, 성장속도가 감소되었다. 이 효소의 유전적 변화를 분석하기 위하여 변이주 SK-5로부터 α-amylase 유전자 염기배열을 결정한 결과 구조유전자의 염기배열은 동일하였으나 promoter 지역에서 일부 변이가 일어난 것이 확인되어 이것이 부분적으로 효소생산성 증가에 영향을 미칠 것으로 여겨진다. SK-5의 α-amylase 생산성이 높기 때문에 이의 배양상층액으로부터 열처리와 황산암모늄 침전 후 한 단계의 hydroxyapatite 컬럼을 사용하여 순수하게 정제된 α-amylase를 얻을 수 있었다. 변이에 따른 세포외 단백질분해효소의 영향을 검증하기 위하여 SK-5 배양액을 시간별로 준비하여 Western blot으로 분석한 결과 변이주에서 분비되는 α-amylase의 구조에 변화가 없음을 확인하였다.(1997년 11월 21일 접수, 12월 19일 수리)

서 론

α-Amylase (α-1,4-D-glucan glucanohydrolase, EC 3.2.1.1, endo-amylase)는 전분을 비롯한 다당류 내에 존재하는 α-1,4 glycosidic 결합을 무작위적으로 가수분해하여 저분자량의 dextrin, 과당류, maltose, glucose 등을 형성하는 효소로서, 발아 중인 종자, 췌장액, 침 중에 존재하며 *Bacillus* 속과 *Aspergillus* 속에 속하는 미생물과 더불어 여러 종류의 미생물에서 생산되고 있다.[1] 이러한 α-amylase는 전분을 발효될 수 있는 당류로 전환시키므로 ethanol 발효 등 발효공업에 이용됨은 물론 전분질 원료를 액화시켜 물리적 성질을 개선하고 가공을 편리하게 하여 풍미를 향상시키는 등 여러 가지 이점을 갖고 있기 때문에 제빵공업에도 널리 이용되고 있다.[2] 그 뿐 만 아니라 최근에는 cellulase와 함께 섬유가공용으로도 그 사용이 증대되고 있는데, 면사 직조시 사용하였던 전분을 염색과정 전에 직물로 부터 제거하는 호발제로서도 사용이 되고 있다. 호발제로 이용되기 위해서는 내열성 효소의 사용이 유리하기 때문에 내열성 α-amylase를 생산할 수 있는 배양체계 확립과 고수율로 생산할 수 있는 재조합 균주 개발을 통한 섬유 가공용 효소의 산업화가 요구된다. 섬유가공용 효소인 α-amylase는 중온성과 내열성 효소로 구분되는데, 중온성 α-amylase는 *B. subtilis*에서 주로 생산되고 있으며 내열성 α-amylase는 *B. amyloliquefaciens*와 *B. licheniformis*에서 주로 생산되고 있다. 최근에는 내열성 α-amylase의 수요량이 계속적으로 증가하여 중온성 효소의 수요량을 대체하고 있는 실정이다.

내열성 α-amylase는 모든 동, 식물에서 미생물에 이르기까지 폭 넓게 존재하는 효소이므로 단백질의 아미노산 서열이나 DNA의 염기서열을 비교함으로써 유사정도를 측정하는 척도가 되며, 또한 일반 효소 단백질보다도 고온에서 안정한 상태를 유지하므로 열 안정성에 관여하는 인자를 연구하는 자료로도 중요하다고 할 수 있다. 고온성 효소들은 그 자체의 화학적 일차 구조에 의해서 내열성을 갖거나 또는 단백질, 핵산 등의 이차 구조 변화에 의한 내열화에 의하여 열 안정성이 증가될 수 있다. 고온성 미생물의 경우 유전자의 G+C 함량이 중온성 미생물의 것보다 높으며 특히 codon의 세번째 염기의 G+C 함량이 높다는 보고가 있어 DNA의 염기서열이 열 안정성에 큰 영향을 미칠 것으로 생각되고 있다.

*B. licheniformis*가 생산하는 α-amylase (BLA)는 1973년 Saito[3]에 의해 처음으로 분리되었으며, BLA의 열 안정성 때문에 많은 연구가 진행되어왔고, 이 유전자의 클로닝, 염기서열분석 및 물리화학적 성질이 알려졌다.[4] X-ray crystallography에 의한 BLA crystal의 삼차원적 구조는 tetragon이며, 3개의 domain과 4개의 보존적 부위를 가지는 것으로 보고 되어있다.[5,6] 또한, BLA는 90°C에서 30분 동안 처리할 경우 20%의 효소 활성 손실이 있었고, *B. amyloliquefaciens*가 생산하는 α-amylase (BAA)의 경우 90°C에서 5분 동안 처리 시 90%의 활성이 손실되었다. 이와 같은 BLA의 열 안정성은 Gln178[7,8]과 His133, Ala209[9,10] 등이 관여하고 있으며, BLA와 BAA는 80%의 상동성[4]을 가지고 있는 것으로 보고되었다. 최근까지 BLA 보다 더 내열성이 높은 α-amylase를 찾고 만들기 위하여 계속 연구하고 있으며, 이 중 *Pyrococcus furiosus*가 생산하는 세포외 α-amylase (PFA)가 BLA보다 내열성이 더 우수한 것으로 보고되었다.[11]

본 연구에서는 내열성 α-amylase를 높은 수율로 생산하

핵심어말 : *Bacillus licheniformis*, 고생산성 돌연변이주 제조, α-amylase, Western blot
*연락저자

도록 *B. licheniformis*를 돌연변이 시키고, 고 생산성 돌연변이주가 생산하는 내열성 α-amylase의 세포외 분비 과정 중에서의 변형 여부를 조사하였다.

재료 및 방법

사용 균주, 플라즈미드 및 배양조건

내열성 α-amylase 생산균인 *B. licheniformis* ATCC 27811이 변이주 제조에 사용되었으며, 고생산성 변이주 SK-54가 내열성 α-amylase 생산균으로 사용되었다. 유전자 조작을 위한 숙주균으로는 *Escherichia coli*의 여러 균주들이 사용되었으며, 클로닝에 pUC19 벡타를 사용하였다. 포자형성배지는 Shaeffer's sporulation medium (Difco Nutrient broth, 8 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.25 g; KCl, 1 g; 1 mM $FeSO_4$, 1 m*l*; 1 M $Ca(NO_3)$, 1 m*l*; 0.01 M $MnCl_2$, 1 m*l* in 1 *l*)을 사용하였다. *E. coli*는 LB 배지를 사용하였고, *B. licheniformis* SK-5는 2% lactose, 0.5% beef extract, 1% polypeptone을 포함하는 배지를 사용하여 37℃에서 배양하였다. *B. licheniformis* ATCC 27811은 Brain Heart Infusion 배지를 사용하였다.

제한효소 및 시약

수용성 전분과 감자전분은 Merck에서, glucose와 mal-tooligosaccharide들은 Sigma Chemical Co.에서, 제한효소들은 Boehringer Mannheim과 Promega에서 구입하였다. Sequenase ver 2.0은 United States Biochemical Corp.에서, [α-^{35}S]dATP는 Amersham에서, 그리고 Gene Clean II는 Bio 101 Inc.에서 구입하였다.

총 염색체 은행의 제조와 DNA 조작

B. licheniformis 변이주 SK-5의 총 염색체를 분리하여,[12] 제한효소 Sau3AI으로 부분 절단한 후 sucrose 농도구배 (10%~40%) 원심분리를 수행하여 크기가 2.0~10 kb의 DNA 조각을 분획하였다. 이를 T4 DNA ligase로 BamHI으로 절단된 플라스미드 pUC19와 접합시킨 후 competent cell 방법으로[13] 대장균에 도입함으로써 *B. licheniformis* SK-5의 총 염색체 은행을 제조하였다.

돌연변이

*B. licheniformis*의 돌연변이는 중기대수기 상태의 배양액에 돌연변이원인 nitrosoguanidine (NTG)를 최종농도가 100 μg/m*l* 되도록 첨가하여 배양온도 37℃에서 30분간 방치한 후 배양액을 원심분리하였다. 회수된 균체는 멸균된 생리식염수로 2회 세척한 후 희석하여 2%의 수용성 전분을 포함한 고체배지에 도말하여 24시간 배양하였다. 배양된 콜로니 주위에 전분이 분해된 것을 관찰하기 위해서는 4℃에 배지를 하룻밤 방치하여 관찰하였다.

α-Amylase의 정제방법

B. licheniformis SK-5를 위 배지에서 48시간 진탕배양한 후에 원심분리기 (한일 Supra 25K)를 이용하여 6,900 rpm에서 15분간 원심분리하여 상층액을 모은 후, PM10 한외여과막을 장착한 여과장치 (Amicon)를 사용하여 4℃에서 12배 농축시켰다. 농축액에 10 mM $CaCl_2$를 넣고 끓는물에서 20분간 물중탕 한 다음 원심분리하여 불순단백질을 제거한 후, 80% 황산암모늄으로 효소원을 처리한 후 15,000 rpm에서 원심분리하여 단백질 침전물을 얻었다. 회수된 단백질 침전물을 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) 완충액에 녹여 투석막을 이용하여 염을 제거하였다. 이 효소원으로부터 hydroxyapatite (2.9 × 5.3 cm) 컬럼을 이용하여 α-amylase를 정제하였다. 단백질 정량은 표준물질로 Bovine serum albumin을 사용하여 Lowry 방법[14]에 의하여 수행하였다. 효소의 순도와 분자량 결정은 Laemmli 방법[15]에 따라 SDS-PAGE로 하였다.

표준효소활성 측정 방법

효소활성측정은 Miller 방법[16]을 변형하여 사용하였다. 0.2% 감자전분을 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) 완충액에 넣고 최종 반응물을 1 m*l*로 하여 50℃에서 10분간 반응시킨 후 dinitrosalicylic acid (DNS) 용액 3 m*l*를 넣고 끓는 물에서 5분 동안 발색시켜 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소 1 U는 1분당 1 μmol의 환원당을 생성할 수 있는 효소의 양으로 정의하였다. 환원당 표준물질로는 maltose를 사용하였다. 0.4% 감자전분농축액은 0.4 g의 고형감자전분에 몇 방울의 증류수를 떨어뜨리고, 400 μ*l*의 2 N NaOH를 넣어 잘 갠 후, 4~10시간 후에 적당량의 증류수를 넣어 가열판에서 교반하여 녹이고 2 N HCl을 사용하여 pH를 7.0으로 맞춘 후 최종 부피가 100 m*l*가 되게하였다.

Western blot 분석

정제된 α-amylase를 1회에 100 μg씩 4주 간격으로 총 4회 토끼에 피하주사 하였다. 토끼 귀의 혈관에서 소량의 혈액을 채취하여 5,000 rpm에서 5분 동안 원심분리한 상층액을 dot blotting하여 항체 생성여부를 확인하였다.[17] 항체가 충분히 생성된 것을 확인한 후 다량의 항체를 확보하였다. 이것을 사용하여 *B. licheniformis* SK-5가 세포외로 분비하는 α-amylase의 시간에 따른 구조변화의 유무를 Western blotting으로 분석하였다.[17] 5,000배 희석한 일차항체를 결합시킨 후, 이차항체인 anti-IgG (Promega사)를 넣고 혼합한 후 비결합 이차항체를 제거하고 alkaline phosphatase로 1~15분 정도 발색 반응시키고 색깔이 보이면 증류수로 씻어서 반응을 정지시켰다.

결과 및 고찰

α-Amylase 고생산성 변이주 *B. licheniformis* SK-5의 제조와 특성

내열성이 우수한 α-amylase를 생산하는 *B. licheniformis* ATCC 27811의 효소생산성을 향상 시키기 위해 NTG를 처리하여 돌연변이를 유도하였다. 돌연변이주를 2% 수용성

전분을 함유한 복합배지에서 배양한 후 저온 (4°C)에 방치하여 분해되지 않은 전분이 응집되도록 하였다. 콜로니 주위의 전분이 α-amylase에 의해 분해됨으로써 저온에서 응집현상이 일어나지 않아 생기는 투명환의 크기와 투명도를 관찰하여 효소 생산능이 우수한 변이주를 선발하고 SK-5라 명명하였다. 전분을 함유한 agar plate에 구멍을 내어 변이주와 모균의 동일한 세포농도의 배양상층액을 넣고 효소 활성정도를 비교한 결과 변이주가 모균에 비해 다량의 α-amylase를 생산함을 알 수 있었다 (Fig. 1).

변이주 SK-5를 모균과 비교하기 위해 현미경 관찰한 결과 Fig. 2와 같이 변이주 SK-5가 형태적으로 매우 신장되어 있음이 확인되었다. 또한 포자 형성능이 세포외 분비효소의 생합성과 관련이 있으므로 포자 형성 배지에서 배양하여 포자의 형성여부를 관찰한 결과 변이주 SK-5는 모균과 같이 포자를 형성하였으나 성장정도는 서로 차이가 있었으며 SK-5가 모균에 비해 성장이 잘 되지 않는 것으로 확인되었다 (Fig. 3).

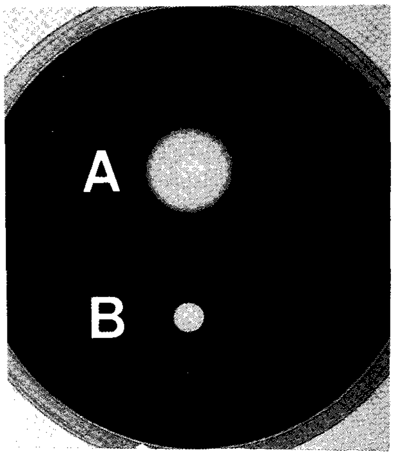

Fig. 1. Clear zones of degradaded starch by mutant strain SK-5 (A) and wild type strain (B) of *B. licheniformis* ATCC 27811. After the cells were grown on nutrient broth, supernatants were loaded onto the plate containing 0.2% (w/v) soluble starch and then incubated for 4 h at 50°C. The plate was stained with KI-I_2 solution. The amount of each superanatant was adjusted to the same optical density at 600 nm.

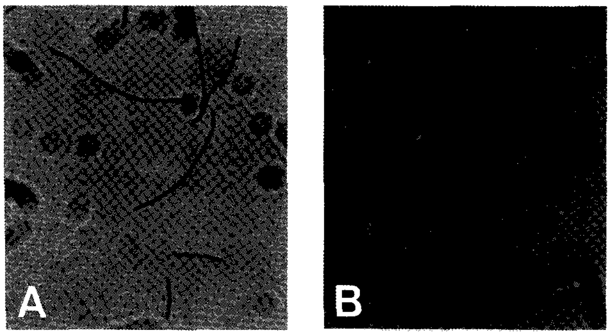

Fig. 2. Morphological observation of the mutant SK-5 (A) and *B. licheniformis* wild type (B). The cells were grown in Brain Heart Infusion medium.

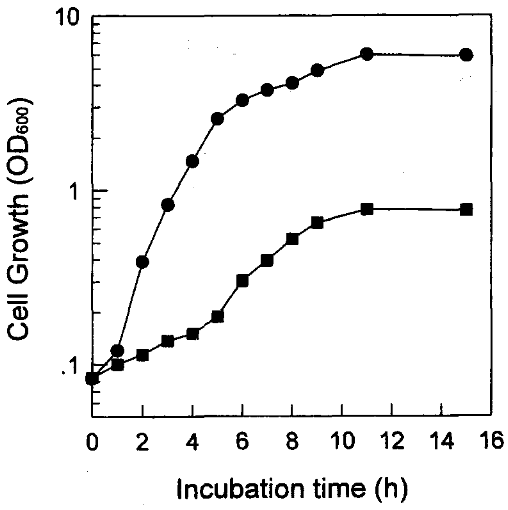

Fig. 3. Growth patterns of the mutant SK-5 and *B. licheniformis* wild type in sporulation medium. Spores were observed at 9 h of culture by phase-contrast magnifier (x500). The growth was observed periodically in 100 m*l* of Shaeffer's sporulation medium. Symbols: ■-■, growth of SK-5; ●-●, growth of *B. licheniformis* wild type.

모균과 SK-5 간에 성장온도와 생화학적 특성을 조사한 결과 모균은 50°C에서 정상적인 성장을 하는데 비해 SK-5는 45°C까지에서는 정상적인 성장을 보이나 50°C에서는 전혀 자라지 못 하였다 (결과 미제시). 또한, 모균에서는 활성을 보이는 β-galactosidase와 arginine dehydrogenase 등이 변이주에서는 활성을 보이지 않아 α-amylase 고생산성 변이주 SK-5의 생리학적 특성이 많이 변화한 것으로 판단된다.

B. licheniformis SK-5의 α-amylase 유전자 분석

변이주로 부터 α-amylase를 코드하는 유전자를 크로닝하기 위해 분리된 SK-5의 총 염색체 DNA를 제한효소로 처리하여 플라스미드 pUC19와 ligation하고 이를 이용하여 얻은 약 10,000 주의 *E. coli* 형질전환주 중에서 α-amylase 활성에 의해 전분분해능을 보이는 형질전환주를 선발하였다. 이러한 형질전환주로 부터 플라스미드를 분리하고 제한 효소로 처리하여 분석한 결과 약 7.0 kb의 염색체 DNA를 지니고 있음이 확인되었다.

변이주의 효소 생산성의 향상에 효소 유전자의 변이가 영향을 미칠 가능성이 있는지를 분석하기 위해 염기배열을 결정한 결과 α-amylase의 구조 유전자는 이미 밝혀진 유전자의 염기배열과 동일하였으나 Fig. 4에서 보는 바와 같이 promoter 지역의 염기배열에서 두 염기가 바뀌었음이 밝혀졌다. 변이주에서 이러한 α-amylase 유전자 promoter 지역의 염기치환이 효소 생산성 증가의 모든 원인이라고는 할 수 없으나 발현에 관련된 promoter 지역의 변화라는 측면에서 변이주의 효소 생산성에 부분적으로 영향을 미칠 것으로 여겨진다. 특히 변이주의 모양과 생화학적 성질이 달라진 것으로 보아 효소의 생산성 증가는 promoter 지역의 변이 뿐 만 아니라 다른 부위의 변이가 효소 생산성에 더 큰

```
SK-5              CTTGTTAAAAATTCGGAATATTTATACAACA-ATG-TTCGT-
B. licheniformis  TTTGTTAAAAATTCGGAATATTTATACAATA-ATG-TTGCT-
                     -35                       -10
```

Fig. 4. Comparison of the promoter and operater sequences of thermostable α-amylase genes between SK-5 and *B. licheniformis* wild type.

영향을 미쳤을 것으로 판단된다.

α-Amylase의 분리 및 정제

돌연변이주 *B. licheniformis* SK-5를 37°C, 180 rpm에서 48시간 진탕배양하였을 때 최대 성장과 최대 효소 생산 능력을 보였고, 모균은 72시간 배양에서 최대의 효소생산능력을 보였으며, 변이주가 44.7 U/m*l*, 모균이 0.89 U/m*l*로 약 50배 정도의 효소생산량의 증가를 얻을 수 있었다. 실제 α-amylase의 구조유전자에 전혀 변이가 일어나지 않아 내열성의 변화 등 효소의 특성은 변화되지 않았다는 것을 알 수 있었다 (결과 미제시). 그러나, 변이주가 무작위 돌연변이에 의해 유도된 것이므로 변이주의 또 다른 부위의 변이에 의해 배양액에서 생산된 α-amylase의 안정성이 세포외 단백질 분해효소나 이를 분비하는 계의 변화에 의하여 영향을 받을 가능성이 있다. 이의 조사에 필요한 α-amylase의 항체를 제조하기 위해 효소를 정제하였는데, 변이주의 효소 생산성이 높아 배양상층액을 한외여과막 PM10으로 농축하고 80% ammonium sulfate로 침전 분리한 후 hydroxyapatite column을 통과시킴으로써 순수한 α-amylase를 얻을 수 있었다.

Antibody 생산과 구조변화

변이주의 α-amylase 과량 생산이 세포외 분비효소 합성의 조절기능 변화에 연관되었는지의 일차적인 조사를 위하여 분비되는 세포외 단백질분해효소에 의한 α-amylase의 구조변화를 Western blotting으로 추적하였다. 정제한 α-amylase를 토끼에게 4주 간격으로 총 4회 주사하여 1차로 1 m*l*의 혈액을 채취하여 dot blotting으로 확인한 결과 항체가 생성되었다. 이로부터 확보한 α-amylase 항체를 이용하여 SK-5의 배양시간에 따른 α-amylase의 변화를 Western blotting으로 분석한 결과, 배양 시간에 따른 효소의 생산량의 증가를 확인할 수 있었다. 그러나, 배양 60시간 까지 완

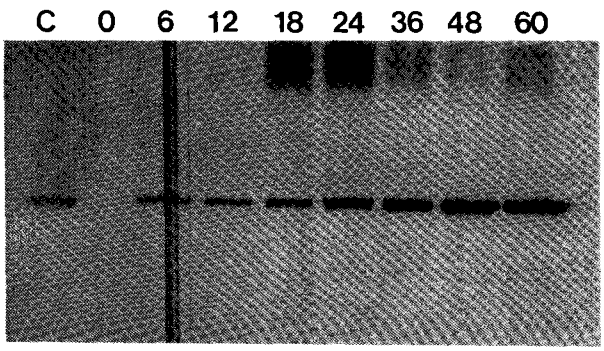

Fig. 5. Western blot analysis of the secreted α-amylase from SK-5 at various culture times. Lane C represents the purified enzyme as a control. Numbers on the top are the culture time in h.

전한 α-amylase 단백질 이외의 다른 띠가 관찰되지 않아 (Fig. 5), 특정 크기로 잘려지는 효소내부의 절단이나 다른 형태의 일차구조의 변화는 없는 것으로 확인되었고, 이는 과량 생산 변이주에서의 효소생산이 안정적이라는 것을 의미한다.

감사의 글

본 연구는 과학기술처의 특정연구개발 사업에 의하여 수행된 연구결과의 일부이며 연구비 지원에 감사드립니다.

참고문헌

1. Cornelis, P. (1987) Microbial amylases. *Microbiol. Sci.* **4**, 342-343.
2. Takasaki, Y. (1987) Pullulanase-amylase complex enzyme from *Bacillus subtilis*. *Agric. Biol. Chem.* **51**, 9-16.
3. Saito, N. (1973) A thermophilic extracellular α-amylase from *Bacillus licheniformis*. *Arch. Biochem. Bioyphys.* **155**, 290-298.
4. Yuuki, T., T. Nomura, H. Tezuka, A. Tsuboi, H. Yamagata, N. Tsukagoshi and S. Udaka (1985) Complete nucleotide sequence of a gene coding for heat- and pH-stable α-amylase of *Bacillus licheniformis*: comparison of the amino acid sequences of three bacterial liquefying α-amylases deduced from the DNA sequences. *J. Biochem.* **98**, 1147-1156.
5. Machius, M., G. Wiegand and R. Huber (1995) Crystal structure of calcium-depleted *Bacillus licheniformis* α-amylase at 2.2Å resolution. *J. Mol. Biol.* **246**, 545-559.
6. Hwang, K. Y., H. K. Song, C. Chang, J. Lee, S. Y. Lee, K. K. Kim, S. Choe, R. M. Sweet and S. W. Suh (1997) Crystal structure of thermostable α-amylase from *Bacillus licheniformis* refined at 1.7Å resolution. *Mol. Cells,* **7**, 251-258.
7. Yamamoto, T. (1995) In Enzyme chemistry and molecular biology of amylases and related enzymes. p. 179-195, CRC Press, Boca Raton, Florida.
8. Suzuki, Y., N. Ito, T. Yuuki, H. Yamagata and S. Udaka (1989) Amino acid residues stabilizing a *Bacillus* α-amylase against irreversible thermoinactivation. *J. Biol. Chem.* **264**, 18933-8.
9. Declerck, N., P. Joyet, J. Y. Trosset, J. Garnier and C. Gaillardin (1995) Hyperthermostable mutants of *Bacillus licheniformis* α-amylase: multiple amino acid replacements and molecular modelling. *Protein Eng.* **8**, 1029-1037.
10. Declerck, N., M. Machius, R. Chambert, G. Wiegand, R. Huber and C. Gaillardin (1997) Hyperthermostable mutants of *Bacillus licheniformis* α-amylase: thermodynamic studies and structural interpretation. *Protein Eng.* **10**, 541-549.
11. Dong, G., C. Vieille, A. Savchenko and J. G. Zeikus (1997) Cloning, sequencing, and expression of the gene encoding extracellular α-amylase from *Pyrococcus furiosus* and biochemical characterization of the recombinant enzyme. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 3569-3576.
12. Rodriguez, R. L. and R. C. Tait (1983) In Recombinant

DNA Techniques: An Introduction, p. 162-163, Addison-Wesley Publishing Company, Massachusetts.
13. Rodriguez, R. L. and R. C. Tait (1983) In Recombinant DNA Techniques: An Introduction, p. 184-186, Addison-Wesley Publishing Company, Massachusetts.
14. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
15. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of sturctural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* (London) **227**, 680-685.
16. Miller, G. L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for the determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**, 426-428.
17. Harlow, E. and D. Lane. (1988) In Antibodies: A Laboratory Manual, p.471-510, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

Development of an α-amylase-hyperproducing mutant of *Bacillus licheniformis* and its characteristics

Heo-Jin Jeong, Kyung Hwa Jung,[1] Jong-Soo Chang,[2] Ki-Hong Yoon,[3] Seung Hwan Park[1] and Hoon Kim*
(Department of Agricultural Chemistry, Sunchon National University, Sunchon 540-742; [1]Applied Microbiology Research Unit, Korea Research Institute of Bioscience & Biotechnology (KRIBB), P.O. Box 115, Taejon 305-600; [2]Department of Biology, Daejin University, Pochun 487-800, [3]Department of Food Biotechnology, Woosong University, Taejon 300-100, Korea)

Abstract : A mutant strain which hyperproduced thermostable α-amylase was obtained by chemical mutagenesis of *Bacillus licheniformis*. The mutant strain, SK-5, produced the enzyme about 50 times higher than the original strain. The mutant was longer and slimmer in shape, slower in growth compared to the original strain. Nucleotide sequence analysis of the SK-5 α-amylase gene revealed no changes in the the structural gene. The changes found in the promoter region might be responsible for the hyperproduction of the enzyme by the mutant. No structural changes in the enzyme structure could be observed when the secreted enzymes at various culture times were analyzed by Western blot.

Key words: *Bacillus licheniformis*, α hyperproducing mutant, α-amylase, Western blot
*Corresponding author