

Haloarcular sp. EH-10이 생산하는 Amylase의 정제 및 특성

정명주* · 박형숙
경성대학교 생물학과

Purification and Characteristics of Amylase from *Haloarcular* sp. EH-1. Jung, Myung-Ju and Hyung-Sook Park. Department of Biology, Kyungsoong University, Pusan 608-736, Korea The growth and enzymatic activity of *Haloarcular* sp. EH-1 was highest at 9 days of incubation. This revealed the amylase production appeared to be a growth-related phenomenon. The amylase was purified by acetone fractionation, DEAE-Cellulose column chromatography, 1st Sephadex G-75 gel filtration, CM-Cellulose column chromatography and 2nd Sephadex G-75 gel filtration. The amylase was purified about 98.64 fold with a yield of 11.75%. The molecular weight of amylase was estimated to be about 43,000 and 40,000 by gel filtration and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, respectively, suggesting that the enzyme was a monomer. Amylase had an optimal temperature of 40°C, and an optimum pH of 7.0, and the thermal stability was observed the above 50% at 100°C after 1 hour, and the stable range of pH was 6.0 to 8.0. The enzymatic activity was increased in the presence of 10 mM NaCl, KCl, MgCl₂ · 6H₂O and EDTA, and strongly inhibited by adding of 10 mM 2-mercaptoethanol, slightly by 10 mM SnCl₂ · 2H₂O, FeCl₂ · 4H₂O, CuCl₂ · 2H₂O, HgCl₂ · 6H₂O, FeCl₃ · 6H₂O and SDS. End products from soluble starch were glucose, maltose and maltotriose, and Km value for soluble starch was 2.5 mg/ml.

Key words: extremely halophilic bacteria, *Haloarcular* sp., archaeobacteria, amylase

아밀라아제는 전분을 가수분해하는 효소의 총칭으로서 고등 동물에서부터 사상균, 세균 등의 미생물에 이르기까지 자연계에 널리 분포하고 있으며, 전분당공업, 주정공업, 섬유공업 등에서 전분의 액화 및 당화에 사용되며[9], 전분식품의 노화방지에 효과가 있고[3], 의약품, 동물사료, 오수처리, 세제 등에도 이용[18]되어 왔으므로 오래 전부터 잘 알려진 효소이다.

상업적으로 가장 많이 사용되고 있는 아밀라아제는 *Aspergillus oryzae*, *Bacillus amyloliquefaciens* 또는 *Bacillus licheniformis* 등에서 생산된 것이지만[19], 어떤 공업적 유기합성에서는 고농도의 기질이 존재할 때, 즉 수분활성도가 낮을 때 작용할 수 있는 효소가 요구되는데, 일반적인 미생물로부터 얻은 효소는 이러한 환경에서 불활성화 되나 고호염성 미생물로부터 생산된 효소는 이용이 가능하다[5].

고호염성균은 25% 이상의 염농도에서 생육이 가능하므로, 이들 미생물로부터 생산된 호염성 효소는 고염 환경 및 저수분 활성도의 환경에서 작용할 수 있어서 최근에는 호염성균이 아밀라아제의 생산을 위해 검토되고 있다[6, 10]. 중호염성(0.2~2.0 M NaCl) 아밀라아제가 *Micrococcus* sp.[15]와 *Micrococcus* sp. 4[7]로부터 생산

되었으며, 고호염성(3.0~5.0 M NaCl) 아밀라아제의 경우 *Halobacterium halobium*[4, 18]에서 보고되었으나, 단지 효소의 생산을 증대시키는 조건만을 검토하였을 뿐이며, 그들의 정제 및 상세한 특성에 대한 연구는 거의 이루어지지 않은 실정이다[4, 16].

따라서 본 연구에서는 25%의 NaCl 농도에서 증식할 수 있는 고호염성 *Haloarcular* sp. EH-1으로부터 아밀라아제를 정제하여 효소의 성질을 조사하였다.

재료 및 방법

사용 균주 및 효소의 생산

천일염으로부터 분리한 *Haloarcular* sp. EH-1을 사용하였으며[17], 효소의 생산을 위해 NaCl 25%, MgSO₄ · 7H₂O 2%, KCl 0.3%, yeast extract 1%, soluble starch 1%(pH 7.5)의 액체배지 500 ml의 진탕 플라스크에 100 ml씩 준비하여 SGC 액체배지[22]에서 전배양한 종균액을 2% 접종한 후 40°C에서 진탕 배양하였다.

효소의 역가 측정

효소활성은 Somogyi-Nelson 법[1]에 의하여 측정하였다. 즉 시험관에 먼저 효소용액 0.5 ml를 가하고 40°C의 항온수조에서 기질용액(1% 가용성 녹말) 0.5 ml를 가하여 10분간 반응시킨 다음 Somogyi-Nelson 시약 A 용

*Corresponding author

Tel. 82-51-620-4645, Fax. 82-51-627-4115
E-mail: nah6@netsgo.com

액 1 ml를 가하여 끓는 물에서 10분간 가열하였다. 식힌 다음 Somogyi-Nelson 시약 B 용액 1 ml를 가하여 15분 동안 방치한 후 물로 나머지를 채워 10 ml로 만들어 잘 섞은 후 540 nm에서 측정된 흡광도로부터 활성을 계산하였다. 효소 역가는 위의 반응조건에서 1분 동안 1 μmol의 환원당을 생산하는 효소의 양을 1 unit로 정하였다.

단백질 정량

Bovine serum albumin(Sigma사)을 표준 단백질로 하여 Lowry 등의 방법[13]에 따라 총 단백질량을 측정하였으며, column 용출액은 280 nm에서의 흡광도에 의해 정량하였다.

효소의 정제

배양액을 4℃에서 원심분리한 후 균체를 완전히 제거하고 상등액만을 회수하여, 0.01 M sodium-phosphate 완충액(pH 7.0)에서 투석한 후 이 투석액을 조효소액으로 사용하였다. 이 조효소액은 아세톤(60%, w/v)으로 분별 침전시키고 원심분리하여 침전물을 회수하였다. 침전물은 투석 후 0.01 M sodium-phosphate 완충액(pH 7.0)으로 충분히 평형화시킨 DEAE-cellulose column(2.4×21 cm)에 흡착시킨 후 0.5~1.0 M NaCl의 염농도로 직선구배로 용출시켜서 활성 분획을 회수하였다. 그 다음 0.01 M Tris-HCl 완충액(pH 8.0)으로 평형화시킨 Sephadex G-75 gel filtration column(2.0×50 cm)에 DEAE-cellulose에서 얻은 활성분획을 주입하여 활성이 있는 분획을 회수하였다. 이 활성 분획의 효소액을 농축시킨 후 0.01 M acetate 완충액(pH 5.0)으로 미리 평형화시킨 CM-cellulose column(2.1×20 cm)에 통과시켜 활성이 있는 분획을 모아서, Sephadex G-75 gel filtration column에서와 같은 방법으로 2차 gel filtration chromatography를 행하여 활성이 있는 분획을 모았다.

효소의 분자량 측정

Gel filtration Andrews의 방법[2]에 따라 Sephadex G-75에 의한 gel 여과에 의해서 측정하였다. 0.01 M Tris-HCl 완충액(pH 8.0)으로 평형화시킨 Sephadex G-75 column(2.0×24 cm)에 효소시료 및 표준단백질을 용출시키고 2 ml씩 분취하고, 각종 단백질이 용출될 때까지의 액량을 측정하여 분자량을 구하였다.

SDS-PAGE Laemmli의 방법[12]에 따라 SDS-PAGE를 행하였다. Separating gel은 10%, Stacking gel은 4% polyacrylamide gel(acrylamide:bis=29.2:0.8)로 조제하여 수행하였고, 단백질 염색은 coomassie 염색액으로 gel을 염색한 후 탈색액(10% acetic acid, 30% methanol)으로 탈색하여 band의 위치를 확인하였으며, 단백질의 상대이동도를 대수값에 대하여 표시한 표준곡선

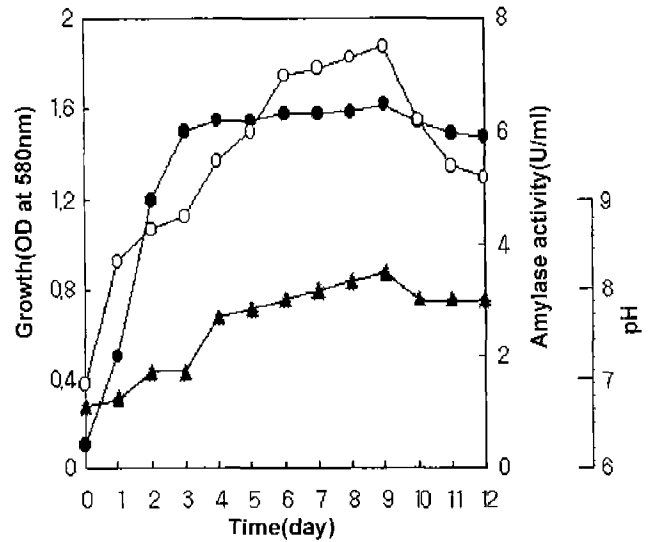


Fig. 1. Growth and amylase production in *Haloarcular* sp. EH-1 during the shaking culture under optimal growth condition.

●, Cell growth; ○, Amylase activity; ▲, pH. Optimal growth condition was as follows; 1% soluble starch, 1% yeast extract, 2% MgSO₄ · 7H₂O, 0.1% KCl, 25% NaCl(pH 7.5) at 40℃.

으로부터 정제된 효소의 분자량을 구하였다.

결과 및 고찰

최적 배양조건에서의 배양

배양경과에 따른 효소의 생산과 균의 증식 및 pH 변화를 관찰한 결과는 Fig. 1과 같다. 효소의 생산은 배양 후 9일에서 최대치를 나타내었으며, 그 이후부터는 감소하였고, 균의 생육정도는 배양 후 4일부터 증식기에 이르러 9일 배양 후 최대치를 나타내었으며, 10일 이후부터 서서히 감소하기 시작하였다. pH는 균의 증식과 함께 10일까지 서서히 증가하였다. 이는 균의 생육정도와 효소생산 사이에서 증식연관형을 나타내는 것으로, 생육도 및 효소생산이 10일 경과 후에 최대를 나타내었다는 *H. halobium*의 결과[18]와 유사하였다. 그러나 NaCl 내성 아밀리아제를 생산하는 *Bacillus* sp. 64의 경우[8] 배양 시간에 따른 효소의 생산과 생육정도가 24시간에서 최대를 나타낸다는 결과와 비교해 볼 때 고염균의 효소생산과 생육에는 비교적 긴 시간이 필요하다고 생각된다.

아밀리아제의 정제

Haloarcular sp. EH-1에서 아밀리아제를 분리, 정제한 결과는 Table 1 및 Fig. 2, 3과 같다. 배양액을 아세톤(60%) 분획한 결과 정제도는 5.26배, 회수율은 87.43%였다. 아세톤으로 침전시킨 효소액을 DEAE-cellulose column chromatography한 결과, 0.5~1.0 M NaCl 농

Table 1. Purification of amylase from *Haloarcular* sp. EH-1

| Purification step | Total activity (U) | Total protein (mg) | Specific activity (U/mg) | Yield (%) | Purification fold |
|--------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------------|-----------|-------------------|
| Culture supernatant | 804.00 | 1398.00 | 0.57 | 100 | 1 |
| Acetone fractionation (60%) | 703.00 | 234.00 | 3.00 | 87.43 | 5.26 |
| DEAE-cellulose column chromatography | 459.80 | 32.80 | 14.01 | 57.18 | 24.57 |
| 1st Sephadex G-75 gel filtration | 317.90 | 11.05 | 28.76 | 39.53 | 50.45 |
| CM-cellulose column chromatography | 146.60 | 2.66 | 55.11 | 18.23 | 96.68 |
| 2nd Sephadex G-75 gel filtration | 94.47 | 1.68 | 56.23 | 11.75 | 98.64 |

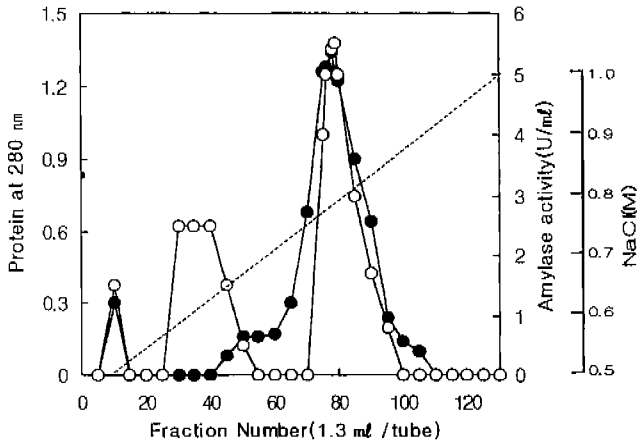


Fig. 2. DEAE-cellulose column chromatography of amylase from *Haloarcular* sp. EH-1.

A column (2.4×21 cm) was previously equilibrated with 10 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0). The enzyme solution was applied to the column and absorbed was eluted by a linear gradient of NaCl at a flow rate of 6 ml/hr. —○—, Absorbance at 280 nm; —●—, Amylase activity; ·····, NaCl Concentration.

도 직선구배를 행하였을 때 0.7~0.8 M NaCl 농도부분에서 아밀라아제 활성이 용출되었고, 효소 활성이 높은획분을 모은 효소액의 정제도는 24.57배, 회수율은 57.18%였다(Fig. 2). 앞단계에서 얻은 효소 활성부분을 모아 1차 Sephadex G-75 gel filtration chromatography한 결과 정제도는 50.45배, 회수율은 39.53%로 나타났다. 1차 Sephadex G-75 gel filtration 유출물 중 효소활성이 있는 부분을 모아 CM-cellulose column chromatography한 결과 정제도는 96.68배, 회수율은 18.23%였다. CM-cellulose column 유출물 중 효소활성이 있는 분획을 모아 더욱 순수하게 정제하기 위해서 2차 Sephadex G-75에서 gel 여과한 결과 단백질과 아밀라아제 활성이 일치하는 분획의 정제도는 98.64배, 회수율은 11.75%였다(Fig. 3).

분자량 측정

Andrews의 방법에 따라 Sephadex G-75에 의한 gel 여과에 의해 측정된 분 효소의 분자량은 약 43,000으로서 *Asperigillus oryzae*에서 추출한 아밀라아제의 분자량

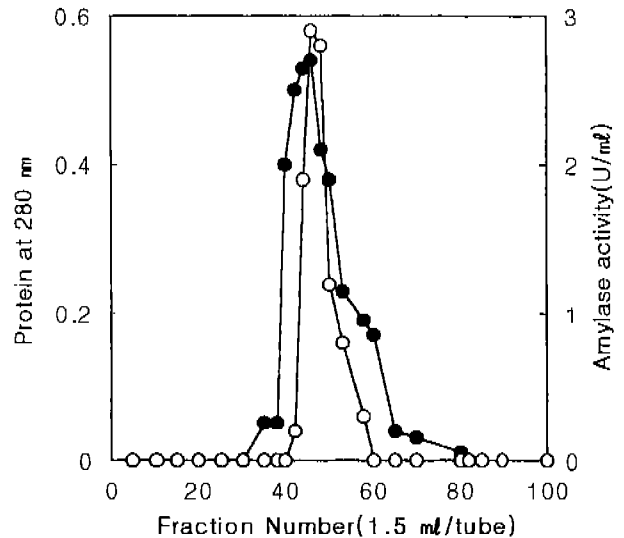


Fig. 3. 2nd gel filtration of amylase from CM-cellulose column chromatography on Sephadex G-75.

The amylase from CM-cellulose column chromatography was placed on a Sephadex G-75 column (2.0×50 cm) equilibrated with 10 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0). The column was eluted with the same buffer at a flow rate of 12 ml/hr. —○—, Absorbance at 280 nm; —●—, Amylase activity.

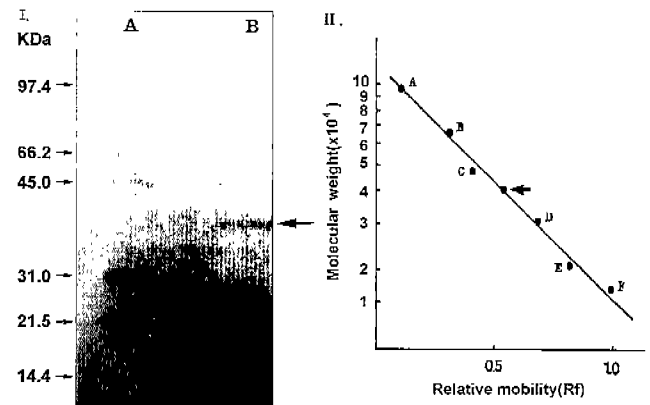


Fig. 4. Estimation of the molecular weight of the purified amylase on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis was performed on a 10% gel. The gel was stained with Coomassie brilliant blue R-250. I-A. Marker protein; I-B. Purified enzyme; II-A. Phosphorylase b(97,000); II-B. Bovine serum albumin(66,200); II-C. Ovalbumin(45,000); II-D. Carbonic anhydrase(31,000); II-E. Soybean trypsin inhibitor(21,500); II-F. Lysozyme(14,400)

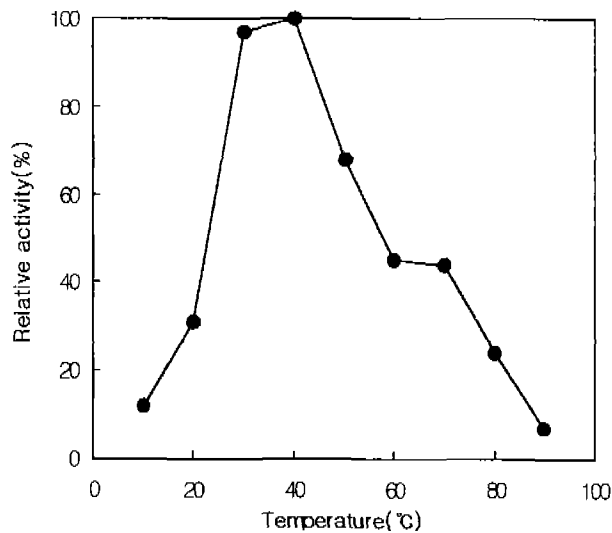


Fig. 5. Effect of temperature on amylase activity of *Haloaricular* sp. EH-1.
The reaction was carried out at various temperature in 0.01 M sodium phosphate buffer (pH 7.0) for 30 min.

51,000과 *Bacillus subtilis*의 분자량 47,000에 비해 낮은 편이나, *Bacillus stearothermophilus*의 분자량 15,600 [21]에 비해서는 아주 높게 나타났다. Laemmli의 방법에 따라 10% SDS-polyacrylamide 전기영동에 의해 본 효소의 분자량을 측정된 결과 약 40,000(Fig. 4)으로 밝혀졌다. 따라서 본 효소는 monomer인 것으로 사료된다.

최적 온도 및 열 안정성

효소활성을 위한 최적 온도를 측정된 결과 Fig. 5에서 나타낸 바와 같이 40°C에서 최대활성을 나타내었다. 이러한 결과는 고호염성균인 *H. halobium*[18]의 최적온도와 일치하였으며, 중호염성균인 *Micrococcus* sp. 4[7]의 경우 50°C, 열 안정성이면서 염내성인 아밀라아제를 생산하는 *Bacillus* sp. 64[8]의 경우 60°C인 것에 비해 낮은 온도에서 최대활성을 나타내었다.

효소의 열 안정성을 측정된 결과는 Fig. 6과 같이 본 효소는 모든 실험 온도에서 30분 가열 후 효소활성에 전혀 변화가 없었으며, 40°C에서 60분 가열 후에도 90% 이상의 활성을 나타내었으며, 100°C에서도 50% 이상의 활성을 나타내었다. 80°C 이상의 온도에서 2시간 가열 처리한 후에 약 50%의 실활이 나타났다. 이러한 결과는 열 안정성이면서 염내성인 아밀라아제를 생산하는 *Bacillus* sp. 64[8]가 30분 가열 후 60°C에서는 안정하나 70°C에서 약 30% 이상이 실활 되는 것과 비교하여 본 공시균이 생산하는 아밀라아제가 매우 높은 열 안정성을 가지는 것으로 나타났다.

최적 pH 및 pH 안정성

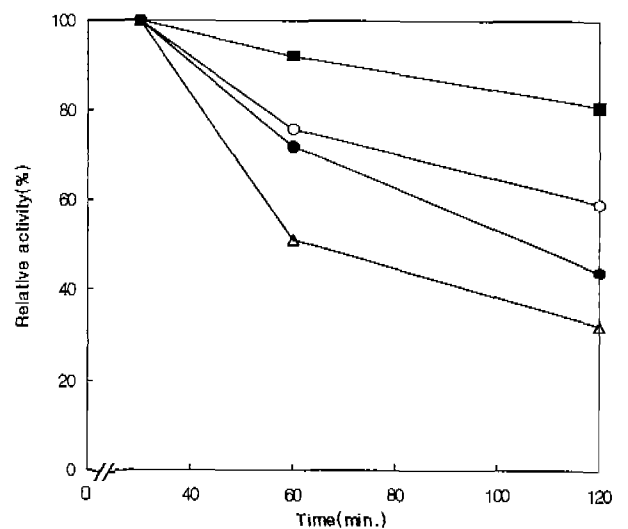


Fig. 6. Thermal stability of amylase from *Haloaricular* sp. EH-1.
The enzyme solution was incubated at various temperature in 0.01 M sodium phosphate buffer(pH 7.0). After incubation, the reaction mixture was quickly chilled in ice and residual activity was determined by standard assay method. —■—, 40°C; —○—, 60°C; —●—, 80°C; —△—, 100°C.

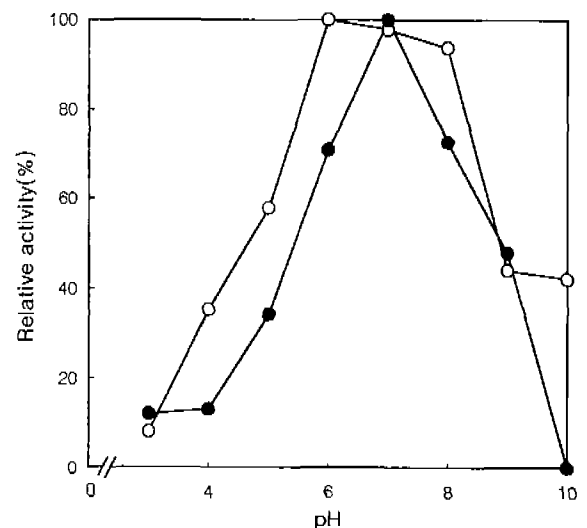


Fig. 7. Effect of pH on amylase activity and stability for optimum pH from *Haloaricular* sp. EH-1.
amylase activity was measured using desired buffers(0.01 M citrate-phosphate buffer (pH 3.0~7.0), 0.01 M sodium phosphate buffer (pH 6.0~8.0), 0.01 M Tris-HCl buffer (pH 7.2~9.0) and 0.01 M glycine-NaOH buffer (pH 8.6~10.0)) at 40°C for 10 min. For pH stability, the enzyme solution at a desired pH were kept 4°C for 72 hr and then used for activity measurement. —●—, Effect of pH on amylase activity; —○—, pH stability.

효소활성에 미치는 최적 pH 및 효소 안정성에 미치는 pH의 영향을 검토한 결과 Fig. 7과 같이, 본 효소의 최적 pH는 7.0으로써, 최적 pH가 6.5인 *H. halobium*[16], 7.5인 *Micrococcus* sp. 4[7], 7.0인 *Bacillus* sp. 64[8]의

Table 2. Effect of some reagents on amylase from *Haloarcular* sp. EH-1

| Reagents | Relative activity(%) |
|---------------------------------------|----------------------|
| | 10 mM |
| NaCl | 116.13 |
| KCl | 115.49 |
| LiCl | 104.94 |
| CaCl ₂ | 103.28 |
| SnCl ₂ · 2H ₂ O | 88.35 |
| ZnCl ₂ | 103.47 |
| MgCl ₂ · 6H ₂ O | 116.32 |
| FeCl ₂ · 4H ₂ O | 95.71 |
| MnCl ₂ · 4H ₂ O | 109.17 |
| CuCl ₂ · 2H ₂ O | 94.39 |
| HgCl ₂ · 6H ₂ O | 79.46 |
| FeCl ₃ · 6H ₂ O | 85.49 |
| 2-Mercaptoethanol | 20.64 |
| EDTA* | 108.80 |
| SDS** | 95.17 |
| Control | 100 |

The enzyme solution was preincubated with various reagents at 40°C for 30 min. After preincubation enzyme activities were assayed by standard assay method except the reagents were present as indicated.

경우와 비교적 유사한 범위에서 최대활성을 나타내었다. 아밀라아제의 경우 효소 활성에 대한 pH의 효과는 대부분 벨 형 곡선을 나타내고 최적 pH는 4.5~7.0 범위에 속한다는 Robyt 등[21]의 보고와 일치하였다. 또한 pH 6.0~8.0 범위 내에서 90% 이상의 효소안정성을 나타내었으며, 이러한 결과는 pH 6.0~8.0 범위 내에서 100%의 활성을 유지하는 *Bacillus* sp. 64[8]의 경우와 유사하였으나, 중효염성균인 *Micrococcus* sp. 4[7]의 경우 pH 8.0 에서는 안정하나, pH 7.0 및 9.0에서 10%~20%의 실활이 있었으므로 본 공시균이 보다 넓은 범위의 pH 안정성을 나타내었다.

금속이온 및 화학물질의 영향

각종 금속이온 및 화학물질이 효소의 활성에 미치는 영향을 측정된 결과는 Table 2에 나타낸 바와 같이, NaCl, KCl 및 MgCl₂ · 6H₂O에 의하여 효소 활성이 증가되었고, 2-mercaptoethanol에 의해 효소활성이 크게 저해되었으며, SnCl₂ · 2H₂O, FeCl₂ · 4H₂O, CuCl₂ · 2H₂O, HgCl₂ · 6H₂O, FeCl₃ · 6H₂O 및 SDS에 의해서도 다소 저해 효과가 나타났다. 이러한 결과는 NaCl과 KCl에 의해 효소활성이 촉진된다는 Larsen의 보고[10, 11]와 유사한 경향을 나타내었다.

NaCl이 효소활성에 미치는 영향

NaCl이 효소활성에 미치는 영향을 검토한 결과 Fig. 8

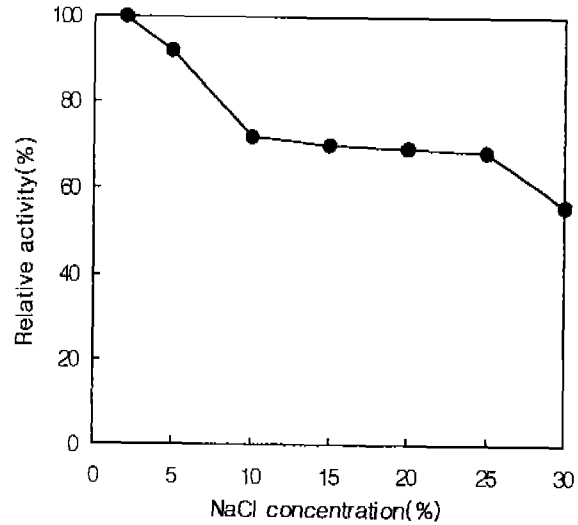


Fig. 8. Effect of NaCl on amylase activity of *Haloarcular* sp. EH-1.

에 나타낸 바와 같이, NaCl 농도가 2%일 때 최대활성을 나타내었으며, NaCl 농도가 증가할수록 효소활성은 감소되었다. *H. halobium*[4]의 경우 NaCl 농도가 1%일 때 최대의 활성을 나타내고 23%의 NaCl 농도에서 60% 이상이 실활 된 것에 비해 본 공시균이 *H. halobium*에 비해 NaCl 농도에 덜 민감한 것으로 판단된다. 그리고 고효염성균이 생산한 효소액을 투석에 의해 탈염시킴으로서 효소활성을 촉진시킬 수 있다고 하는 Larsen[11]의 보고와 일치하였다.

기질 특이성

효소의 기질 특이성을 검토한 결과는 Table 3에 나타낸 바와 같이, 본 효소는 soluble starch, amylose, amylopectin 및 glycogen 등에만 특이적으로 작용하며 다른 기질에는 작용하지 않는 것으로 나타났다. 따라서 본 효소는 분지가 긴 다당류의 α(1 → 4) 혹은 α(1 → 6) 글리코시드 결합을 가수분해하는 효소라고 생각된다

Thin layer chromatography(TLC) 분석

Table 3. Substrate specificity of amylase from *Haloarcular* sp. EH-1.

| Substrates | Relative activity (%) |
|----------------|-----------------------|
| Soluble starch | 100 |
| Amylose | 96 |
| Amylopectin | 101 |
| Dextrin | 0 |
| Glycogen | 103 |
| Maltose | 0 |

The concentration of each substrate was 1%. The results were compared with the hydrolytic activity for soluble starch.

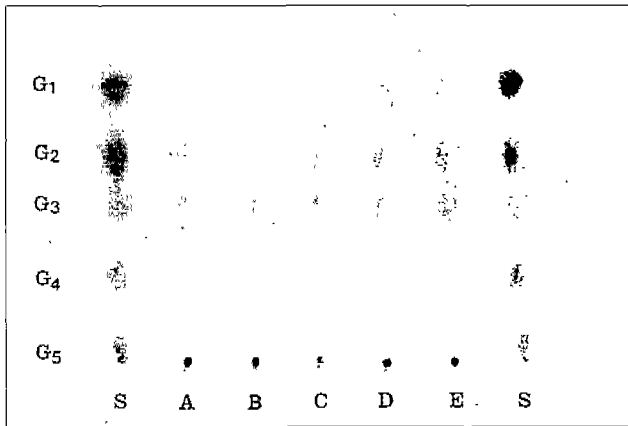


Fig. 9. Thin layer chromatogram of reaction products of the amylase purified from *Haloarcula* sp. EH-1.
Thin layer chromatography was carried out with *n*-butanol:acetic acid:water (3:1:1, v/v/v), colors were developed by 20% H₂SO₄ in ethanol and heating for 5 min at 105°C. Standard sugars (S) used were G1, Glucose; G2, Maltose; G3, Maltotriose; G4 and G5, Maltooligosaccharide. A, B, C, D and E, 20, 40, 60, 90 and 120 min, respectively, reaction time on 1% soluble starch.

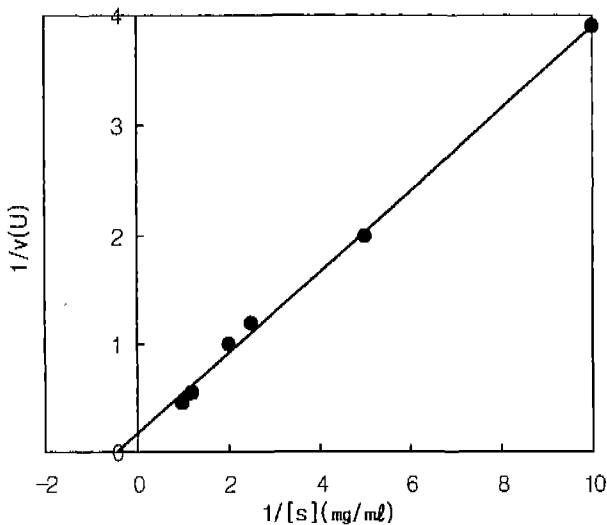


Fig. 10. Kinetic of substrate concentration by Lineweaver-Burk plot.

아밀라아제의 반응종말 생성물은 Fig. 9에 나타낸 바와 같이, 반응초기부터 maltose 및 maltotriose을 생성하여 반응시간이 경과하면서 glucose가 나타났으므로 *H. halobium*[4]의 반응종말 생성물과 일치하였으며, maltose 및 maltotriose와 함께 glucose의 양이 다소 약하게 나타나는 *micrococcus* sp. 4로부터 생산된 중효염성 아밀라아제와도 유사하였다[8]. 이는 Robyt[20]의 보고에서처럼 효소의 작용이 multichain을 나타냄을 알 수 있었다.

K_m 값

효소활성에 미치는 기질농도의 영향을 검토하기 위하

여 soluble starch의 농도를 조절하여 효소반응 초속도를 측정된 결과 Fig. 10에서 나타낸 바와 같이 효소의 soluble starch에 대한 K_m 값은 약 2.5 mg/ml으로써, 2.19 mg/ml의 K_m 값을 나타내는 *Aspergillus foetidus*[13]보다 높게 나타났다.

요 약

25% NaCl 농도에서 증식할 수 있는 고효염성 *Haloarcula* sp. EH-1로부터 아밀라아제를 정제하여 효소의 성질을 검토한 결과는 다음과 같다.

아밀라아제 생산은 배양 후 9일에 가장 높았으며 균의 생육정도는 9일 배양 후 최대치를 나타내었으므로 증식 연관형임을 알 수 있었다. 아밀라아제를 정제한 결과 정제된 아밀라아제의 비활성은 56.23 U/mg이었으며, 배양 상등액에 비해 98.64배 정제되었고, 회수율은 11.75%였다. 정제된 아밀라아제의 분자량은 gel filtration법에 의해 약 43,000으로 나타났고, SDS-PAGE에 의해 약 40,000으로 나타났으므로, 본 효소액은 monomer로 생각된다.

아밀라아제의 최적 온도 및 pH는 40°C, pH 7.0이었으며, 열 안정성은 100°C에서 1시간 가열 후에도 50% 이상의 활성을 나타내었으며, 80°C 이상의 온도에서 2시간 가열 후에 50%의 실활이 나타났다. pH 안정성은 pH 6.0~8.0 범위 내에서 90% 이상의 활성이 유지되었으나, pH 9.0에서 효소 활성이 급격히 실활되었다. 10 mM의 NaCl, KCl 및 MgCl₂ · 6H₂O에 의하여 효소 활성이 증가되었고, 2-mercaptoethanol에 의해 효소활성이 크게 저해되었다. 효소의 활성은 NaCl 농도가 2%일 때 최대를 나타내었으며, NaCl 농도가 증가할수록 효소활성은 감소되었다. 효소의 기질 특이성을 검토한 결과 soluble starch, amylose, amylopectin 및 glycogen 등에만 특이적으로 작용하였고, 반응종말 생성물은 glucose, maltose, maltotriose이었으며, K_m 값은 2.5 mg/ml이었다.

감사의 말

본 연구는 학술진흥재단의 신진연구인력 연구장려 선정 사업으로 수행된 연구결과이며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Ahn, Y. G. 1994. *Enzyme Purification*, pp. 12-16. Yang-seogak.
2. Andrews, P. 1970. Estimation of molecular size and molecular weights of biological compounds by gel filtration. *Methods Biochem. Anal.* **18**: 1.
3. Dziezak, J. D. 1991. *Enzymes: Catalyst for food process.* *Food Technol.* **45**: 78-85.

4. Good, W. A. and P. A. Hartman. 1970. Properties of the amylase from *Halobacterium halobium*. *J. Microbiol.* **104**: 601–603.
5. Hough, D. W. and M. J. Danson. 1989. Archaeobacteria: Ancient organisms with commercial potential. *Letters Appl. Microbiol.* **9**: 33–39.
6. Kamekura, M. 1986. Production and function of enzymes of eubacterial halophiles. *FEMS Microbiol. Reviews* **39**: 145–150.
7. Khire, J. M. 1994. Production of moderately halophilic amylase by newly isolated *Micrococcus* sp. 4 from a salt-pan. *Letters Appl. Microbiol.* **19**: 210–212.
8. Khire, J. M. and A. Pant. 1992. Thermostable, salt-tolerant amylase from *Bacillus* sp. 64. *World J. Microbiol.* **8**: 167–170.
9. Komaki, T. 1988. Application of amylases and related enzymes to industry, pp. 195–196. In The Amylase Research Society of Japan(ed.), *Handbook of Amylases and Related Enzymes*. Pergamon Press, England.
10. Kushner, D. J. 1985. The Halobacteriaceae, pp. 171–214. In C. R. Woese and R. S. Wolf(eds.), *The Bacteria*, Vol. 18. London, Academic Press.
11. Larsen, H. 1967. Biochemical aspects of extreme halophilism, pp. 97–132. *Advances in Microbial Physiology*, Vol. 1. Academic Press Inc., New York.
12. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature(London)* **227**: 680–685.
13. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, F. A. Lewis, and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265–275.
14. Michelena, W. and F. J. Castillo. 1984. Production of amylase by *Aspergillus foetidus* on rice flour medium and characterization of the enzyme. *J. Appl. Bacteriol.* **56**: 395–407.
15. Onishi, H. 1972. Halophilic amylase from a moderately halophilic micrococcus. *J. Bacteriol.* **109**: 570–574.
16. Oren, A. 1983. A thermophilic amyloglucosidase from *Halobacterium sodomense*, a halophilic bacterium from the Dead Sea. *Current Microbiol.* **8**: 225–230.
17. Park, H. S. and M. J. Jung. 1996. Isolation and identification of an extremely halophilic bacterium from solar salts. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **24**: 671–677.
18. Patel, S., N. Jain, and D. Madamwar. 1993. Production of α -amylase from *Halobacterium halobium*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 25–28.
19. Pricst, F. G. 1984. Extracellular enzymes, pp. 32–34. In J. A. Cole, C. J. Knowles, and D. Schlessinger(eds.), *Aspects of Microbiology*, Vol. 9. Wokingham, UK: Van Nostrand Reinhold.
20. Robyt, J. F. and D. French. 1963. Action pattern and specificity of an amylase from *Bacillus subtilis*. *Arch. Biophys.* **100**: 451–467.
21. Robyt, J. F. and W. J. Whelan. 1968. The α -amylase, pp. 430–476. In J. A. Radley(ed.), *Starch and Its Derivatives* (4th). Chapman and Hall Ltd., London.
22. Schgal, S. N. and N. E. Gibbons. 1960. Effect of some metal ions growth of *Halobacterium cutirubrum*. *Can. J. Microbiol.* **6**: 165–169.

(Received January 28, 1999)