

Bacillus circulans의 호산성 α -amylase 유전자의 클로닝 및 발현

이종석¹ · 김지연¹ · 김한복² · 이동석*

인제대학교 의생명공학대학 임상병리학과, ¹인제대학교 생물건강산업육성지원센터,

²호서대학교 자연과학부 생명과학전공

Bacillus circulans KCTC3004 유래의 호산성 α -amylase 유전자가 pUC19을 vector로 하여 대장균 내에서 클로닝되었다. 클로닝된 5.8 kb 크기의 *Pst* I DNA 절편은 pUC19 내에서의 삽입방향과는 무관하게 α -amylase 활성을 나타내었으며, 이 재조합 플라스미드를 pAL850이라고 명명하였다. 대장균 형질전환체는 모균인 *B. circulans*보다 약 40배 정도의 높은 효소활성을 나타내었다. 본 연구에서 클로닝 및 발현된 효소의 최적 pH와 온도는 각각 pH 3.6과 45°C였으며, 40°C에서 1시간 동안의 사전 열처리에도 활성의 감소를 일으키지 않았다. 이 효소는 SDS-PAGE와 zymogram을 통해 분석해 본 결과 분자량은 약 55,000으로 추정되었으며 기질로 starch만을 가수분해하여 maltotriose 이상의 올리고당 분자들을 주로 생산할 수 있었다.

Key words □ acidophilic α -amylase, *Bacillus circulans*, cloning

자연계에 널리 존재하는 탄수화물은 cellulose와 같이 식물체에서 골격 역할을 하거나 starch나 glucose와 같이 세포의 에너지원으로서 식물과 동물, 미생물에 다양하게 쓰여지고 있다(32). 이 중 starch는 자연계에 존재하는 가장 중요한 세포의 연료 저장물질로서 각종 곡물과 채소류 등에 다량 함유되어 있으며, 세포 내에서 커다란 집합체나 과립상태로 존재한다(17).

Starch는 직쇄상으로 길게 늘어진 구조를 가지는 glucose 분자의 amylose와 glucose 분자 사슬의 α -1,6 결합에서 분기한 구조를 가지는 amylopectin으로 구성되어 있다. 그리고 starch를 가수분해하는 효소로는 α -amylase와 β -amylase, isomaltase, glucoamylase 등이 있다(26, 3).

α -amylase(24,30)는 액화효소라고도 하며 췌장이나 타액, 세균, 곰팡이류에 존재하며 random한 형식(endo-acting hydrolytic mechanism)으로 starch의 α -1,4 글리코시드 결합의 가수분해를 촉매하여 amylose에서는 maltose의 혼합물을 생성하고 amylopectin에서는 glucose와 maltose 외에 직쇄상 및 분지상 소당류인 oligosaccharide의 혼합물을 생성한다.

β -amylase(5,27,14)는 당화효소라고도 하며 α -amylase와 마찬가지로 α -1,4 글리코시드 결합에 작용하나 비환원성 말단에서부터 maltose 단위로 분해하기 때문에 amylose로부터 maltose만 생성하고 amylopectin에 작용하여서는 α -1,6 결합 분지점에서 작용이 중지되므로 maltose와 limit dextrin을 생성한다.

Isomaltase(8)는 분지점, 즉 α -1,6 글리코시드 결합만을 가수분해하며, glucoamylase(4)는 α -1,4 및 α -1,6 결합의 양자를 분해하여 거의 100% glucose를 생성한다.

특히, α -amylase는 동물계와 식물계, 미생물계 등 효소원이 매우 다양하며 기질을 random하게 분해하는 특징이 있고, 드물게 산이나 알칼리에 대한 넓은 안정성과 열에 대한 높은 안정성을 보이는 경우가 있다. 미생물계의 경우 다른 동물계나 식물계의 효소원에 비해 배양 조건을 조절하여 대량으로 값싸게 얻을 수 있다는 장점이 있어 식품이나 약품, 섬유, 양조, 종이 산업 등에 대한 산업적인 응용성도 높아지고 있다(10).

한편, 곰팡이류인 yeast(9) 외에, 세균인 *Bacillus amyloliquefaciens*(29) 및 *B. subtilis*(28), *B. stearothermophilus*(31), *B. coagulans*(21), *B. licheniformis*(2,23), *B. circulans*(13) 등으로부터 유래된 다양한 종류의 α -amylase 유전자가 *Escherichia coli*에서 성공적으로 발현됨이 보고된 바 있다.

본 연구에서는 *B. circulans* KCTC3004 균주로부터 호산성 α -amylase 유전자를 클로닝하여 *E. coli* DH5 α 에 발현시킨 후 유전자 및 효소의 특성을 규명하였다.

재료 및 방법

사용 균주 및 플라스미드

본 연구에 사용된 α -amylase 유전자의 공여 균주는 *Bacillus circulans* KCTC3004였으며, 형질전환을 위한 숙주로는 *E. coli* DH5 α [*supE44* Δ *lacU169*(Φ 80 *lacZ* Δ M15) *hsdR17* *recA1* *endA1* *gyrA96* *thi-1* *relA1*]가 사용되었다. 한편, cloning 및 subcloning vector로는 pUC19(1)이 사용되었다.

배지 및 생장 조건

*B. circulans*는 본 실험에서 확립한 효소생산 최적배지인 LN 배지(0.3% beef extract와 0.5% peptone, 0.5% yeast extract, 1% tryptone, 1% NaCl 함유)를 사용하여 37°C에서 진탕 배양하였으

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 055-320-3262, Fax: 055-320-3011
E-mail: mbdsllee@ijnc.inje.ac.kr

며, *E. coli*는 LB(0.5% yeast extract와 1% tryptone, 1% NaCl 함유)나 LN 배지를 사용, 역시 37°C에서 진탕 배양하였다. 한천 평판배지의 경우에는 LN이나 LB 배지에 한천을 1.5%(w/v)되게 첨가하였으며, 형질전환체들은 MacCONKEY 한천 배지에 ampicillin을 100 $\mu\text{g/ml}$ 되게 함유시켜 선별하였다. 효소활성을 나타내는 형질전환체의 선별을 위해서는 기질인 starch(0.3%)와 ampicillin(100 $\mu\text{g/ml}$)을 첨가하여 사용하였다.

DNA의 분리

Doi의 방법(25)을 적절히 개선하여 chromosomal DNA를 분리하였다. 플라스미드 DNA는 그 용도에 따라 소량 또는 다량의 rapid alkaline lysis법(18)과 WizardTM minipreps DNA purification system법을 이용하여 분리하였다.

재조합 플라스미드 제작 및 형질전환

분리 정제된 *B. circulans*의 chromosomal DNA를 *Pst*I 제한효소로 절단하여 크기 1-10 kb의 DNA를 얻은 후, CIP로 처리한 pUC19과 14°C에서 16시간 동안 ligation시켜 *E. coli* DH5 α 에 형질전환시켰다. 형질전환은 Hanahan이 확립한 과정을 적절히 변형하여 실시하였다(6,16).

α -Amylase 클론의 선별

Ampicillin (100 $\mu\text{g/ml}$) 함유 MacCONKEY 배지에서 생육하는 전체 형질전환체 중 육안으로 보아 흰색 군락(colony)을 형성하는 것들만을 선별하였다. 이들을 0.3%의 starch와 ampicillin (100 $\mu\text{g/ml}$)이 첨가된 한천 평판배지에 toothpicking한 후 37°C에서 18시간 동안 배양하였다. 그리고 Iodine 염색법(7)으로 황색혼륜대(halo) 형성 유무를 관찰하여 클론을 선별하였다.

효소액 조제

형질전환체를 10 ml의 LB(ampicillin 50 $\mu\text{g/ml}$ 함유) 배지에서 37°C로 18시간 동안 진탕 배양한 후 14,000 \times g에서 10분간 원심 분리하여 상등액을 획득하고, 남은 침전 세포체의 적정 현탁액은 초음파 세포 파쇄기(Heat System Inc. Co. Type XL2015)로 20 kHz에서 3분간 초음파 처리한 다음 14,000 \times g에서 10분간 원심 분리하여 상등액을 얻었다. 이 두 가지 효소액을 효소활성 측정과 starch 가수분해 산물 확인을 위한 효소액으로 사용하였다.

효소활성 측정

1% starch가 첨가된 시트르산 완충용액(0.05 M, pH 3.6)을 증탕 가열한 다음, 12,000 \times g에서 10분 동안 원심분리하여 얻은 상등액을 효소 반응의 기질로 사용하였다. 기질 용액 0.5 ml에 효소액 0.5 ml를 가하여 45°C에서 10분간 반응시켰다. Starch가 가수분해로 생성된 환원당은 3,5-dinitrosalicylic acid(DNS)에 의한 방법(19)에 따라 550 nm에서 흡광도를 측정하는 비색정량을 수행하였다. 효소-기질 반응에서 1분 간에 1 μmol 의 환원당을 생성하는 효소량을 1 unit로 표시하였다.

SDS-PAGE 및 Zymogram(Activity staining)

효소 단백질의 분리 및 염색을 위해서 효소액 시료들은 Laemmli 방법(15)에 따라 실시하였다.

형질전환체를 10 ml의 효소생산 최적배지에서 37°C, 24시간 동안 진탕 배양한 후 14,000 \times g에서 10분간 원심분리하여 세포 전체를 1 ml의 SDS-PAGE용 sample buffer에 녹인 다음 5분간 끓였다. 이를 0.5% starch가 첨가된 12.5% polyacrylamide gel을 사용하여 200 V에서 60분간 전기영동한 후 동일한 gel을 양분하여 한 개는 Coomassie blue 염색약으로 염색하였다. Zymogram 용인 나머지 gel은 0.25% starch가 첨가된 pH 6.8의 10 mM Tris-HCl로 세척한 후 다시 동일 완충용액에서 37°C, 12시간 동안 효소-기질 반응을 진행시켰다. 이어서 iodine 용액으로 30분간 염색하고 효소 활성대(halo)를 관찰하였다.

Thin-layer chromatography

Starch 가수분해 산물은 thin layer chromatography법을 이용, 분석하였다. 효소액 0.5 ml과 1% starch 용액 1 ml의 혼합액을 45°C에서 12시간 혹은 24시간 동안 반응시킨 후 Silica Gel 60 TLC plate(Merck제)에 loading하였다. 이 때 isoamylalcohol : ethanol : ammonia : water(50 : 60 : 1 : 30, v/v) 혼합액을 용매로 하여 전개한 후 공기중에서 건조시키고, 5%의 4-methoxybenzaldehyde(C₈H₈O₂, Art822314, Merck제), 5%의 H₂SO₄, 소량의 glacial acetate 그리고 90%의 ethanol이 혼합된 용액을 분사한 후 120°C에서 10분간 발색시켰다.

결 과

α -Amylase 유전자의 대장균에로의 클로닝

B. circulans KCTC3004 균주로부터 분리 정제된 chromosomal DNA를 *Pst*I로 절단한 후 크기 1-10 kb 단편들과 *Pst*I로 완전히 절단하여 CIP를 처리한 pUC19을 ligation시킨 다음, *E. coli* DH5 α 에 형질전환시켜 약 10,000개의 형질전환체를 확보하였다. 이들을 starch 함유 평판배지에 모두 toothpicking하여 iodine 염색법으로 선별해 본 결과 뚜렷한 황색혼륜대를 형성하는 한 개의 클론을 분리할 수 있었다. 이 형질전환체로부터 플라스미드 DNA를 분리하여 다시 숙주 균주인 *E. coli* DH5 α 에 재형질전환시켜 본 결과 모두 α -amylase 활성을 획득하였다. 이 재조합 플라스미드는 숙주 균주내에서 안정하게 잘 유지됨을 항생제 ampicillin 존재 하 또는 부재 하에서 수차례 계대배양해 봄으로써 확인할 수 있었다.

재조합 유전자의 특성

α -Amylase 활성을 나타내는 형질전환된 대장균으로부터 재조합 플라스미드 DNA를 분리하여 *Pst*I로 절단한 후 전기영동을 행한 결과 5.8 kb의 DNA band가 존재하고 있음을 확인하였고, 이 재조합 플라스미드를 pAL850으로 명명하였다.

재조합 플라스미드의 제한효소 지도

α -Amylase 활성을 나타내는 pAL850 재조합 플라스미드를 여러 가지 제한효소로 절단하여 제한효소 지도를 작성한 결과,

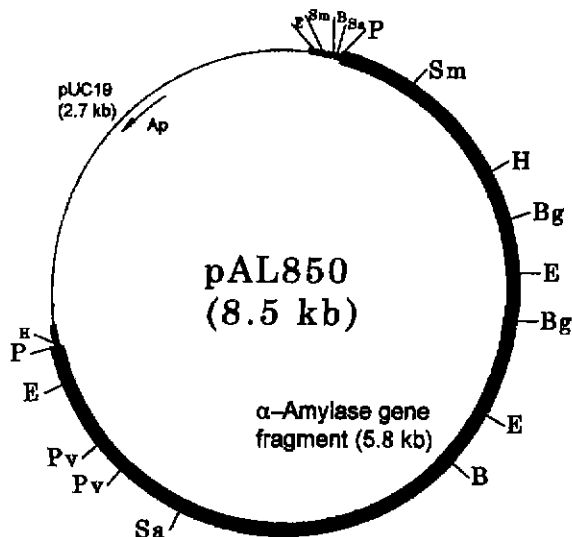


Fig. 1. Restriction map of recombinant plasmid pAL850. The thick bar represents *Pst*I fragment of *B. circulans* DNA inserted into the pUC19 vector. Symbols: Ap, ampicillin resistance; B, *Bam*HI; Bg, *Bg*III; E, *Eco*RI; H, *Hind*III; MCS, multiple cloning site; P, *Pst*I; Pv, *Pvu*II; Sa, *Sal*I; Sm, *Sma*I.

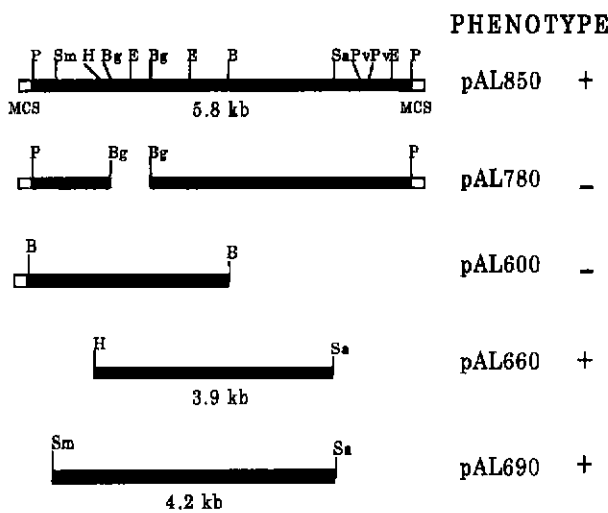


Fig. 2. Subcloning of α -amylase coding region from the cloned pAL850. Symbols: B, *Bam*HI; Bg, *Bg*III; E, *Eco*RI; H, *Hind*III; MCS, multiple cloning site; P, *Pst*I; Pv, *Pvu*II; Sa, *Sal*I; Sm, *Sma*I; +/-, plasmid conferring or not α -amylase activity.

Fig. 1과 같았다. 삽입된 DNA 단편에는 *Bam*HI, *Bg*III, *Eco*RI, *Hind*III, *Pvu*II, *Sal*I 그리고 *Sma*I 인식부위가 존재하였고 *Kpn*I, *Sac*I 그리고 *Xba*I 인식부위는 존재하지 않았다.

Subcloning

pAL850의 α -amylase 활성과 관련된 5.8 kb DNA 단편의 삽입방향을 알아보고 활성영역을 유추해 보기 위하여 여러 제한효소로 절단하여 일련의 subcloning을 시도하였다(Fig. 2). pAL850을 *Bg*III로 절단하여 0.7 kb의 *Bg*III 단편을 분리한 후 7.8 kb의 나머지 단편을 self-ligation시켰으나 α -amylase 활성을 보이지 않

Table 1. Activity and localization of an α -amylase in *E. coli* transformants and *B. circulans*

Strains	Activity(mU/ml of culture broth)			
	Culture supernatant	Cell extract	Total	Halo size on plate
<i>B. circulans</i> KCTC3004 (gene donor)	10(100)	0(0)	10(100)	+
<i>E. coli</i> DH5 α (pAL850)	43(10)	363(90)	406(100)	++

Numerals in parentheses represent relative distribution of the enzyme.

Table 2. Substrate specificity of the α -amylase produced in *E. coli* (pAL850)

Substrate	Activity (mU/ml of culture broth)
Starch	406
Laminarin	0
Lichenan	0
CMC	0
Pustulan	0
Mannan	0
Xylan(oat spelt)	0

All reactions were carried out at 45°C in 0.05 M citrate buffer, pH 3.6.

았다. 또한 5.8 kb의 *Pst*I단편을 *Bam*HI 효소로 절단하여 얻은 3.3 kb의 단편을 pUC19에 subcloning한 결과 역시 α -amylase의 활성을 나타내지 않았다.

5.8 kb의 *Pst*I 삽입단편을 분리하여 *Sal*I과 *Sma*I 효소로 이중 절단한 다음 pAL850의 *Pst*I 삽입단편과 동일한 방향으로 subcloning하였더니 α -amylase 활성을 보였다. 같은 방법으로 5.8 kb의 *Pst*I 절편을 *Hind*III와 *Sal*I 효소의 이중절단으로 3.9 kb의 단편을 만들어 pAL850의 *Pst*I 단편과 반대방향으로 subcloning한 결과 α -amylase 활성이 나타났다.

모균이 생산한 효소와 재조합 형질전환체가 생산하는 효소의 특성 비교

세포 분획별 효소활성을 알아보기 위해 시료를 배양 상등액과 세포 추출물로 나눈 후 기질인 starch에 대한 효소활성을 검토한 결과는 Table 1과 같았다. 즉, *B. circulans* 모균의 α -amylase 효소는 균체내에 존재하지 않고 전부 균체외로 분비되었다. 그리고 pAL850을 함유한 *E. coli*의 α -amylase 효소는 균체 세포내에 약 90%가 함유되어 있었고 약 10%만이 세포외로 분비되었다 또한, pAL850을 함유한 *E. coli*는 모균에 비해 약 40배 정도 많은 효소를 증폭생산하였다 한편, pAL850을 함유한 *E. coli*의 기질 특이성을 DNS법을 이용하여 정량적으로 조사해 본 결과 오직 starch 기질에 대해서만 분해능을 보였으며, 평판배지상에서의 iodine 염색법에 의해서도 동일한 결과를 얻었다(Table 2)

균체 배양시간에 따른 생육과 효소활성의 변화

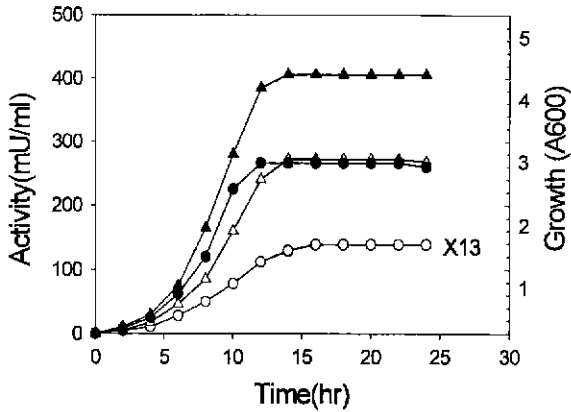


Fig. 3. Production of an α -amylase by *B. circulans* KCTC3004 and *E. coli* DH5 α (pAL850) transformant during growth. The two strains were grown aerobically in LN medium at 37°C. Culture supernatants and whole cell extracts were prepared periodically and α -amylase activities of them were assayed. Symbols: \circ - \circ , activity of *B. circulans*; \bullet - \bullet , growth of *E. coli*(pAL850); \triangle - \triangle , growth of *B. circulans*; \blacktriangle - \blacktriangle , activity of *E. coli*(pAL850); \times 13, enzyme activity magnified 13 times.

공여 균주 *B. circulans*와 *E. coli*(pAL850)를 LN 배지에서 37°C로 15시간 동안 배양한 배양액을 10 ml의 LN 배지에 1%(w/v) 되도록 각각 접종하여 배양시간에 따른 효소의 활성을 정기적으로 비교 검토하였다. Fig. 3에 나타난 바와 같이 *B. circulans*와 *E. coli* DH5 α (pAL850)의 생육정도를 살펴보면 *B. circulans*는 접종 후 14시간만에, *E. coli* DH5 α (pAL850)의 경우에는 접종 후 12시간만에 정지기에 도달하였다. α -Amylase의 발현 및 생산은 *B. circulans*의 경우 16시간만에, *E. coli* DH5 α (pAL850)의 경우에는 14시간만에 최대활성에 도달한 후 안정한 값을 유지하였다. 즉, 효소활성은 생육정도에 거의 비례하여 증가하다가 세포생육 정지기 이후 효소생산은 곧 중단됨을 알 수 있었다.

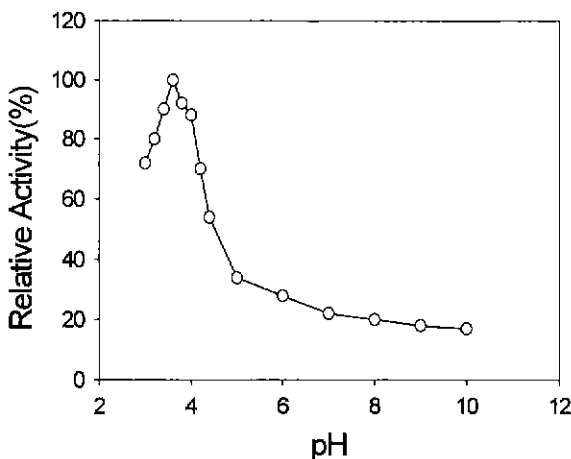


Fig. 4. Effect of pH on activity of the α -amylase. The enzyme reaction was carried out at 45°C for 10 min in 0.05 M citrate(pH 3-6), 0.1 M phosphate(pH 6-8), and 0.1 M bicarbonate(pH 9-11) buffer.

효소활성에 미치는 pH의 영향

pAL850을 함유한 *E. coli* DH5 α 가 생산하는 α -amylase의 일반적인 성질을 알아보았다. α -Amylase 활성에 미치는 pH의 영향은 Fig. 4와 같다. 이 효소는 pH 3.6에서 가장 활성이 높았고, pH 11 이상에서는 효소가 거의 불활성화되었다.

효소활성과 안정성에 미치는 온도의 영향

각각의 온도별 α -amylase의 활성을 측정하여 효소활성에 미치는 온도의 영향을 검토한 결과는 Fig. 5와 같다. 이 효소의 반응 최적 온도는 45°C였다. 이 효소의 열 안정성에 대해 조사한 결과는 Fig. 6과 7에서 보는 바와 같이 40°C 이하에서는 100%의 안정성을 보인 반면에 50°C에서는 일부 저해를 받다가 70°C 이상에서는 거의 불활성화됨을 알 수 있었다.

TLC를 통한 분해산물의 확인

조제된 효소액 0.5 ml과 1% starch 용액 1 ml의 혼합액을

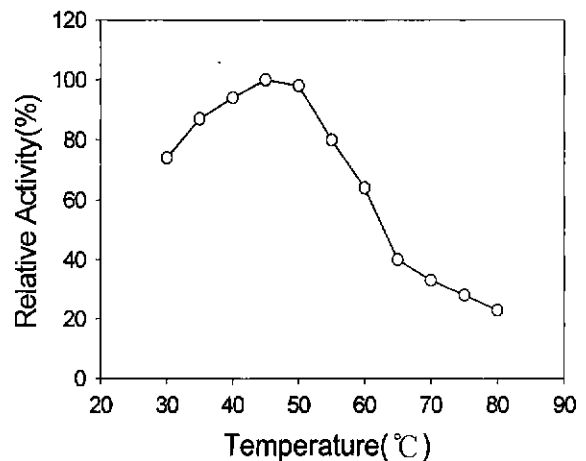


Fig. 5. Effect of temperature on activity of the α -amylase. The enzyme reaction was carried out at various temperatures for 10 min in 0.05 M citrate buffer(pH 3.6).

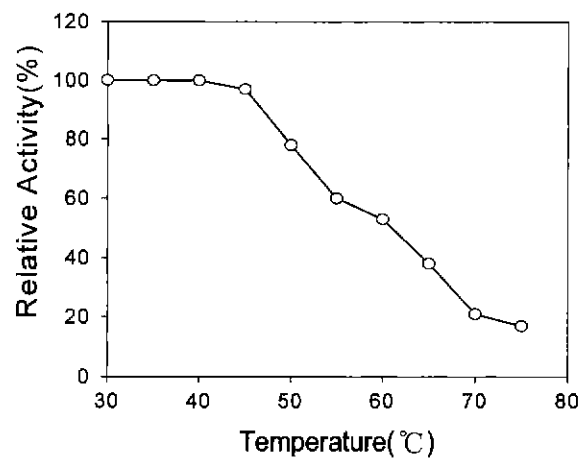


Fig. 6. Thermal stability of the α -amylase. The enzyme reaction was carried out at optimal condition after preincubating of the enzyme solutions at various temperature for 1 hour.

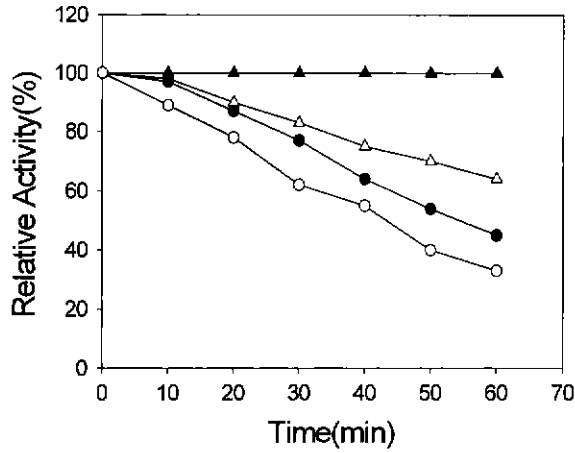


Fig. 7. Thermal stability of the α -amylase. The enzyme reaction was carried out at optimal condition after preheating of the enzyme solution at the indicated temperatures for the different time periods. Symbols: ○ - ○, 55°C; ● - ●, 50°C; △ - △, 45°C; ▲ - ▲, 40°C

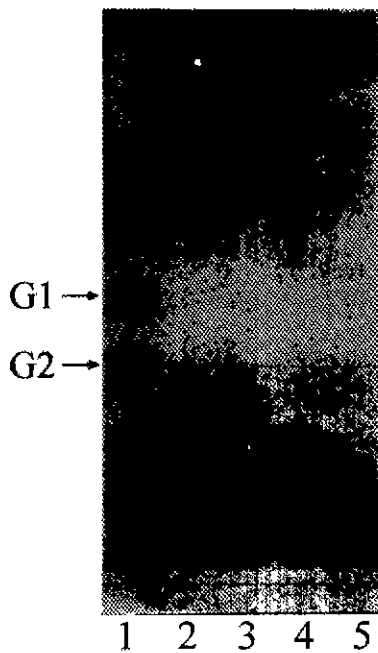


Fig. 8. Thin-layer chromatogram of the products released from the hydrolysis of starch by the α -amylase in *E. coli* DH5 α (pAL850). 0.5 ml of whole cell extracts were mixed with 1 ml of 1% starch(0.05 M citrate buffer, pH 3.6) and incubated for 0, 3, 12 or 24 hr at 45°C, and each sample(lane 1, 5 μ l; lanes 2-5, 10 μ l) was applied to the thin-layer chromatography plate. Lane 1, standard glucose(G1) and maltose(G2); lane 2, α -amylase reaction for 24 hr; lane 3, α -amylase reaction for 12 hr; lane 4, α -amylase reaction for 3 hr; lane 5, before start of α -amylase reaction.

45°C에서 3시간, 12시간, 그리고 24시간 반응시켜 TLC 상에서 그 생성물을 조사한 결과, maltotriose(G3) 이상의 고분자 등이 주된 분해산물이었으며, maltose(G2)와 glucose(G1)는 거의 생성되지 않음을 알 수 있었다(Fig. 8). 따라서 클로닝된 amylase는 전형적인 α -amylase임을 알 수 있었다.

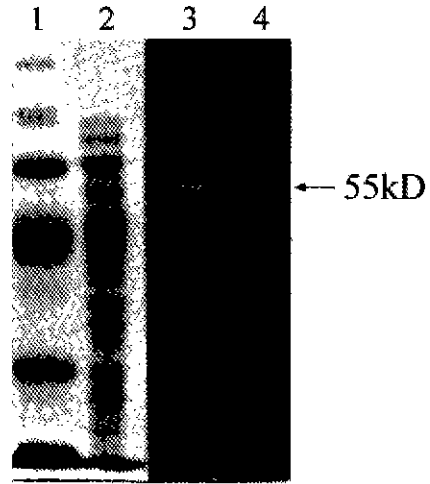


Fig. 9. SDS- PAGE analysis and zymogram of α -amylase produced by *E. coli* transformant. Lanes 1, 2, Coomassie blue stained gel, lanes 3, 4, Iodine stained gel; lane 1, high molecular weight markers(200, 97.4, 68, 43, 29, 18.4 kDa); lane 2, 3, *E. coli*(pAL850); lane 4, *E. coli*(pUC19) as a control.

분자량 측정 및 processing 여부 확인

pAL850을 함유한 대장균 클론들이 생산하는 총 단백질들을 동일 조건으로 SDS-PAGE를 수행하여 단백질 분리 및 염색과 zymogram을 비교·분석하였다. 그 결과 이 효소의 분자량은 55,000으로 추정되었으며 zymogram의 band가 pAL850의 각 lane마다 하나씩만 나타나므로 대장균 periplasm내에서 processing은 일어나지 않는다고 여겨진다(Fig 9).

고찰

B. circulans KCTC3004로부터 유래한 α -amylase 활성 DNA 단편을 가진 제조합 플라스미드 pAL850을 조사해 본 결과, 5.8 kb *Pst*I DNA 단편이 삽입되어 있었으며, 이 단편을 분리하여 역방향으로 삽입시키거나 *Sa*I과 *Sma*I으로 이중절단하여 4.2 kb의 단편을 만들어 pUC19에 정방향으로 subcloning하거나, *Hind*III와 *Sa*I으로 이중절단하여 3.9 kb의 단편을 만들어 pUC19에 역방향으로 subcloning하더라도 항상 α -amylase의 활성이 나타났다 (Fig. 2). 이처럼 클로닝된 DNA 단편이 원래 크기의 역방향으로 들어가거나, 크기가 줄어들면서 정 또는 역방향으로 삽입되더라도 삽입방향과는 무관하게 α -amylase를 발현시킬 수 있다는 것은 클로닝된 DNA 조각 내부에 고유의 promoter가 작용하고 있음을 시사해 준다.

E. coli DH5 α (pAL850)가 모균 *B. circulans*보다 효소활성을 약 40배 정도 보이는 것은(Table 1) 주로 *E. coli* DH5 α 내에서 유지되는 제조합 플라스미드의 copy 수에 수반된 유전자의 증폭에 따른 것으로 여겨진다.

한편, *E. coli* DH5 α (pAL850)가 세포의 성장시기에 관계없이 성장된 세포양에 비례적으로 효소를 발현하는 것으로 보아(Fig. 3) 본 연구에서 클로닝된 유전자는 성장시기별로 차등적 억제 또

는 유도 등을 받지 않는 constitutive한 발현방식을 갖추고 있음을 알 수 있다.

Table 2에서 살펴본 바에 의하면 *B. circulans* KCTC3004에서 클로닝된 α -amylase는 starch만을 인식하여 분해하는 전형적인 amylase의 기질 특이성을 보여 주었다.

클로닝된 효소의 최적 pH와 온도는 각각 pH 3.6과 45°C였는데(Fig. 4, Fig. 5) 이 결과는 클로닝된 효소가 Kim 등(11)과 Nishizawa 등(22)이 보고한 중성 또는 알칼리성 효소들과는 달리 독특하게 산성 pH 범위에서 안정함을 보여 주고 있다.

Thin layer chromatography에서 관찰된 결과로 미루어 볼 때(Fig. 8) *B. circulans*에서 유래한 α -amylase가 soluble starch를 가수분해시켜 maltotriose(G3) 이상의 고분자를 생성하였고 maltose(G2) 또는 glucose(G1)는 생성하지 못하였다. 이러한 특성은 Kim 등(12)과 Na 등(20)이 보고한 바와 유사한데, 이는 클로닝된 효소가 α -amylase임을 나타낸다고 말할 수 있다.

E. coli DH5a(pAL850)로부터 얻은 효소 시료를 가지고 SDS-PAGE와 zymogram을 수행하였을 때 효소의 활성대가 오직 한 곳에서만 나타나는 것으로 보아 *E. coli*내에서 단백질의 주목할 만한 processing은 일어나지 않은 것으로 추측된다(Fig. 9).

앞으로 본 연구에서 더 나아가 pAL850의 α -amylase 유전자 영역의 염기서열 분석, 효소정제 및 정밀한 특성 규명, 그리고 다른 type의 amylase 효소들과의 공동작용에 의한 분해양상 규명 등을 수행해 본다면 분자생물학적, 생화학적 그리고 응용적 측면에서 중요한 지식을 더 얻을 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 1998학년도 인제대학교 학술연구조성비 지원에 의하여 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Bolivar, F. and K. Backman. 1979. Plasmid of *Escherichia coli* as cloning vectors. *Meth Enzymol.* 68, 245-280.
- Cornelis, P., C. Digneffe, and K. Wellemot. 1982. Cloning and expression of a *Bacillus coagulans* amylase gene in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 186, 507-517.
- Frazier, W. and D.C. Westhoff. 1988. Food Microbiology 4th ed. McGraw-Hill Book Company.
- Fukushima, T., Y. Sakano, and H. Iwai. 1982. Hydrolysis of α -1,6-glycosidic linkages by an β -amylase from *Thermoactinomyces vulgaris* R-47. *Agric. Biol. Chem.* 46, 1423-1424.
- Greenwood, C.T. and E.A. Milne. 1981. Starch degrading and synthesizing enzymes. In *Advances in Carbohydrate Chemistry* Vol. 23. Academic Press Inc. New York and London.
- Hanahan, D. 1985. Techniques for transformation of *Escherichia coli*. In D.M. Glover (ed.), DNA cloning, vol. I. IRL press, Oxford. p. 109-135.
- Hernandez, E. and S.J. Pilt. 1975. Kinetics of utilization of highly polymerized carbon source(starch) in a chemostat culture of *Klebsiella aerogenes* pullulanase and α -amylase activities. *J. Appl. Chem. Biotech.* 25, 297-304.
- Higashihara, M. and S. Okada. 1974. Studies on β -amylase of *Bacillus megaterium* strain No. 32. *Agric. Biol. Chem.* 38, 1023-1029.
- Ilkka, P., L. Paivi, and K. Leevi. 1983. Secretion of interferon by *Bacillus subtilis*. *Gene* 22, 229-235.
- Jurgen, D.R., A. Stasser, and C. Hollenberg. 1990. Cloning of *Schwanniomyces occidentalis* glucoamylase gene GAM1 and its expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 95, 111-121.
- Kim, C.H., H. Sata, and Y. Maruyama. 1990. Cloning and expression of raw-starch-digesting α -amylase gene from *Bacillus circulans* F-2 in *E. coli*. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1048, 223-230.
- Kim, E.S., H.K. Na, and D.Y. Jhon. 1996. Cloning sequence and expression of the amylase isozyme gene from *Pseudomonas* sp. KFCC10818. *Biotech. Lett.* 18, 169-174.
- Koivula, T.T., H. Harri, P. Raimo, and S. Mervi. 1993. Cloning and sequencing of a gene encoding acidophilic amylase from *Bacillus acidocaldarius*. *J. Gen. Microbiol.* 139, 2399-2407.
- Kwan, H.S., K.H. So, and S.C. Cheng. 1994. Purification and properties of β -amylase from *Bacillus circulans* S31. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 10, 597-598.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lee, D.S. and H.G. Chang. 1995. Cloning and expression of a β -1,3-glucanase gene from *Bacillus circulans* KCTC3004 in *Escherichia coli*. *Biotech. Lett.* 17, 355-360.
- Lehninger, A.L. 1980. Biochemistry 2th ed. 264-265.
- Maniatis, T., E.F. Fritsch, and J. Sambrook. 1989. Molecular cloning, A Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31, 426-428.
- Na, H.K., E.S. Kim, and H.B. Lee. 1996. Cloning and nucleotide sequence of the α -amylase gene from alkalophilic *Pseudomonas* sp. KFCC10818. *Mol. Cells.* 6, 203-208.
- Nakajima, R., T. Imanaka, and S. Aiba. 1985. Nucleotide sequence of the *Bacillus stearothermophilus* α -amylase gene. *J. Bacteriol.* 163, 401-406.
- Nishizawa, M., F. Ozawa, and F. Hishinuma. 1987. Molecular cloning of an amylase gene of *Bacillus circulans*. *DNA* 6, 255-265.
- Ortlepp, S.A., J.F. Ollington, and D.J. McConnell. 1983. Molecular cloning in *Bacillus subtilis* of *Bacillus licheniformis* gene encoding a thermostable α -amylase. *Gene* 23, 267-279.
- Priest, F.G. 1977. Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. *Bacteriol. Rev.* 41, 711-753.
- Rodriguez, R.L. and R.C. Tait. 1983. Recombinant DNA Techniques, An Introduction. p. 162-163. Addison-Wesley Pub.
- Stanier, R.Y., J.L. Ingrham, M.L. Wheelis, and P.R. Panter. 1986. The Microbial World 5th ed.
- Takasaki, Y. 1976. Purification and enzymatic properties of β -amylase and pullulanase from *Bacillus cereus*. *Agric. Biol. Chem.* 40, 1523-1530.
- Takkinen, K., R.F. Pettersson, and I. Palva. 1983. Amino acid sequence of α -amylase from *Bacillus amyloliquefaciens* deduced from the nucleotide sequence of cloned gene. *J. Biol. Chem.* 258, 1007-1013.
- Wang, T.T., L.L. Long, and H.H. Wen. 1989. Cloning and expression of a *Schwanniomyces occidentalis* α -amylase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 3167-3172.
- Whistler, R.L., J.N. Bemiller, and E.F. Paschall. 1984. STARCH-Chemistry and Technology 2th ed. Academic Press Inc. p. 87-118.
- Yamazaki, H., K. Ohmura, and A. Nakayama. 1983. α -Amylase

genes amyR2 and amyE from an α -amylase hyperproducing *Bacillus subtilis* strain. Molecular cloning and nucleotide sequence. *J. Bacteriol.* 156, 327-337.

32. Zeikus, J.G. 1980. Chemical and fuel production by anaerobic bac-

teria. *Ann. Rev. Microbiol.* 34, 423-464.

(Received June 24, 2000/Accepted July 10, 2000)

ABSTRACT: Cloning and Expression of an Acidophilic α -Amylase Gene from *Bacillus circulans* in *Escherichia coli*

Jong Seok Lee,¹ Ji Yeon Kim,¹ Han Bok Kim² and Dong Seok Lee*(Department of Medical Laboratory Science and ¹Biohealth Industry Upbringing Center, Inje University, Kimhae 621-749, Korea, ²Department of Life Science, Hoseo University, Asan 336-795, Korea)

A new gene encoding an acidophilic α -amylase of *Bacillus circulans* KCTC3004 was cloned into *Escherichia coli* using pUC19 as a vector. The gene localized in the 5.8 kb *Pst*I DNA fragment was expressed independently of its orientation in the cloning vector showing enzyme activity about 40 times greater than that produced by the original *B. circulans*. The optimum pH and temperature of the cloned enzyme were pH 3.6 and 45°C, respectively. The enzyme hydrolyzed starch to produce maltotriose and maltooligosaccharides. The SDS-PAGE and zymogram of the enzyme produced in *E. coli*(pAL850) indicated a molecular weight of 55,000.