

## Maltopentaose 생산 균의 분리 및 생산 조건 연구

김영민 · 서은성 · †2,3,4,5김도만 · 김도원 · 이진하 · Atsuo Kimura  
전남대학교 의공학협동과정, <sup>1</sup>물질·생물화학공학과, <sup>2</sup>화학공학부, <sup>3</sup>공업기술연구소, <sup>4</sup>축매 연구소, <sup>5</sup>강릉대학교  
동해안해양생물자원연구센터, <sup>6</sup>일본 홋카이도대학교  
(접수 : 2001. 3. 23., 게재승인 : 2001. 4. 23.)

### Isolation of *Bacillus* sp. AIR-5 Producing Maltopentaose Forming Amylase and Optimization of Maltopentaose Production

Young-Min Kim, <sup>1</sup>Eun-Seong Seo, †<sup>2,3,4,5</sup>Doman Kim, <sup>5</sup>Do-Won Kim, <sup>6</sup>Jin-Ha Lee, and <sup>6</sup>Atsuo Kimura  
Department of Biomedical Engineering, <sup>1</sup>Department of Materials · Biochemical Engineering, <sup>2</sup>Faculty of Chemical Engineering, <sup>3</sup>Engineering Research Institute, <sup>4</sup>The Research Institute for Catalysis, Gwangju 500-757, <sup>5</sup>East Coastal Marine Bioresources Research Center at Kangnung National University, Kangnung 210-702, Korea, <sup>6</sup>Hokkaido University, Sapporo, 060, Japan.  
(Received : 2001. 3. 23., Accepted : 2001. 4. 23.)

We isolated a bacterium that produces an extracellular maltopentaose(G5)-forming amylase from amylose and soluble starch. The bacterium was identified and assigned as a *Bacillus* sp. AIR-5. The amylase did not hydrolyze maltose, maltotriose, maltotetraose or maltopentaose. Optimum medium composition for maltopentaose production in flask culture was 2%(w/v) soluble starch, 0.4%(w/v) tryptone, 0.5%(w/v) NaCl, 0.5%(w/v) K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, and 3 mM CaCl<sub>2</sub> at pH 8.0, 28°C. The highest yield for maltopentaose production in this condition was 6.45 g/L and was 32.25% of theoretical yield.

**Key Words** : maltopentaose, amylase, *Bacillus*, starch

### 서론

전분은 식물체의 주요 에너지 저장 형태로서 포도당이  $\alpha$ -(1→4)로 주로 연결되어 있고,  $\alpha$ -(1→6)의 가지 결합을 가지고 있는 탄수화물 중합체이다.  $\alpha$ -amylase [ $\alpha$ -(1→4)-D-glucan glucanohydrolase, E.C 3. 2. 1. 1]는 동, 식물을 비롯하여 미생물에 이르기까지 자연계에 널리 분포되어 있으며, amylose, amylopectin, 그리고 glycogen 등과 같은 다당류에 존재하는  $\alpha$ -(1→4) 글루코시드 결합을 가수분해한다(1). 전분을 분해하여 특수한 올리고당만을 선택적으로 생산하는 새로운 미생물이 발견되기 시작하면서 여러 가지 효소들이 분리되고 있다. *Streptococcus bovis*(2)와 *Bacillus subtilis*(3)는 maltotriose(G3)를, *Pseudomonas stuetzeri*(4)는 maltotetraose(G4)를, *B. licheniformis*(5), *B. cereus* NY-114(6)는 maltopentaose (G5)를, *B. amyloliquefaciens*(7), 그리고 *Bacillus* sp. US100(8)은 주로 maltohexaose(G6)를 생산하는 것으로 보고되어 있다. 최근,

여러 가지 기능을 갖고 있는 올리고당 류가 개발되어 식품소재로 각광을 받고 있다(9). 올리고당이란 단당류의 분자가 2이상 10개 정도(분자량으로는 300 - 2,000 가량)까지 글리코시드 결합으로 탈수·축합된 화합물을 의미한다. 전분으로부터 생산되는 말토올리고당은 포도당 분자가  $\alpha$ -(1→4) 결합을 하고 있으며, 보통 maltotriose, maltotetraose가 주성분(전체 당 함량의 50% 이상)인 당을 말한다. 식품소재로 사용되고 있는 주요 올리고당이 체내에서 소화효소에 의해 단당으로 분해되어 흡수되는 일반 당들과는 달리 올리고당은 소화효소에 의해 분해되지 않기 때문에 설탕에 비해 저 칼로리(10)이며, 대장에 있는 장내 유용세균인 비피더스균의 증식을 촉진시키는 정장작용, 정균 작용과 혈당 또는 콜레스테롤의 상승억제 작용(11), 그리고 구강에서 충치의 원인인 불용성 클루칸의 합성을 억제하는 효과, 음료의 골격형성이나 혼탁방지 등의 용도가 보고되고 있다. 이러한 특성의 올리고당 중 G5는 체내의 urine이나 serum에 존재하는 amylase 활성을 정확히 확인하는데 사용되는 기질로 의약품 산업에서 이용되고 있고, 고가의 높은 순도를 갖는 특정 올리고당의 생산을 위한 정제관련 분야에서 활발히 연구가 진행되고 있다(12). 그리고 높은 용해성, 낮은 점성과 감미도를 지니고 있기 때문에 노인이나 유아, 회복기 환자를 위한 영양식으로 이용되고 있다(13). 또

†Corresponding Author : Faculty of Chemical Engineering,  
Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea.  
Tel : +82-62-530-1844, Fax : +82-62-530-1849  
E-mail : dmkim@chonnam.chonnam.ac.kr

한, G5를 지방산에 첨가하면 에스테르화 반응에 의해 물에 쉽게 용해되어 매우 안정한 에스테르화된 지방산을 생성하게 되고, 에스테르화된 지방산은 약물주입(infusion)용액으로서 사용되어지고 있다(14).

본 연구는 토양으로부터 G5올리고당을 주로 생산하는 균을 분리 동정하고, 이전의 G5를 생산하기 위해서 주로 사용되어진 산 가수분해나 amylase를 이용하는 방법과는 달리 *Bacillus* sp. AIR-5를 플라스크와 발효조를 이용하여 직접 배양하면서 G5를 생산하기 위한 배지성분의 적절한 농도, 그리고 G5생산에 영향을 미치는 배양 요인 등을 조사하여 G5의 생산을 위한 최적의 조건을 확인하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 시약 및 효소

본 실험에 사용된 당류, 표준 단백질, 기타 효소들은 Sigma 사(St. Louis, USA)의 제품이며, 가용성 전분은 Sigma 사(St. Louis, USA)와 Yakuri 사(Yakuri Pure Co., Osaka, Japan)의 제품을 호화시킨 후, 정제하지 않고 사용하였다. Tryptone 등의 배지성분들은 Difco 사(Difco laboratories, Detroit, USA)에서 구입하였다. 그 외의 시약은 1급 이상의 것을 사용하였다.

### 배지 조성 및 배양 조건

Maltopentaose 생산 미생물의 선택 배지로는 0.05%(w/v) beef extract, 0.05% (w/v) yeast extract, 0.03%(w/v) peptone, 0.9%(w/v) NaCl, 0.2%(w/v) ammonium citrate, 0.001%(w/v)  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.0005%(w/v)  $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ 로 구성되어 있는 RL배지에 2%(w/v)의 가용성 전분(Yakuri Pure Co., Osaka, Japan)을 포함하는 RLS배지를 사용하였다(15). Maltopentaose 생산을 위한 기본 배지로는 2%(w/v) 가용성 전분과 0.3%(w/v) tryptone, 0.5%(w/v) NaCl, 0.25%(w/v)  $K_2HPO_4$ , 1mM  $CaCl_2$  그리고 0.001%(w/v)  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 를 포함하는 배지(MPS배지로 명명)를 사용하였으며, 미생물의 성장 정도는 Microplate Reader(Bio-Rad Model 550)로 흡광도를 660 nm에서 측정하였다.

### 균 분리 및 특성

여러 장소(전분공장 근처, 옥수수, 감자밭)의 토양 시료 1 g을 100 mL의 0.85%(w/v)의 생리 식염수에 현탁하여 적당한 비율로 희석하여 RLS 고체 배지에 희석 도말하였다. 37°C incubator에서 24시간 배양한 후, 형성된 콜로니를 새로운 RLS(RL 배지 + 2%-w/v 가용성 전분)배지에 옮기고, 요오드 용액(0.2 mg/mL  $I_2$ , 2 mg/mL KI)을 처리한 후, 투명환이 생성된 균을 1차 선별하였다(15). 이 콜로니들은 RLS 액체 배지로 28°C에서 진탕 배양한 후, 원심 분리하여 얻은 상등액을 조 효소액으로 하여 1%(w/v) 가용성 전분과 반응시키고, TLC로 분석(16)하여 특정 말토올리고당의 수율이 높은 균을 최종 선별하였다.

### 효소의 활성 측정 및 환원당 정량과 탄수화물 분석(TLC)

효소의 활성은 copper-bicinchoninate assay법(16)을 사용하

였다. 기질로 사용된 호화 시킨 가용성 전분 용액 1%(w/v) 0.5 mL과 20 mM Tris-HCl buffer(pH 8.5) 0.4 mL을 첨가하여 37°C 항온조에서 미리 예열을 시킨 후, 0.1 mL의 효소액을 첨가하고, 1시간 동안 반응시키면서 일정한 간격으로 시료 50  $\mu$ L를 취하였다. 반응 후, 시료와 동량의 0.1 M NaOH를 첨가하여 반응을 정지시키고, 이를 copper-bicinchoninate 시약 A와 B를 동량으로 섞은 시약 100  $\mu$ L와 반응 시료 100  $\mu$ L를 반응시켜 80°C 항온조에서 35분간 반응 후, 냉각수에서 급속히 냉각하고, 10분 후에 흡광도를 550 nm에서 조사하여 측정하였다(16). 대조 실험은 기질-완충액(pH 8.5) 혼합액에 먼저 0.1 M NaOH를 가하고 예열 후, 효소액을 0.1 mL 첨가한 것을 사용하였다. 효소 1 unit은 1분당 가용성 전분에서 해리 되는 maltose  $\mu$ mol수로 정하였다.

효소 반응 생성물의 양과 종류는 효소 반응액 1  $\mu$ L를 Whatman K5F TLC plate에 점적 한 후, nitromethane/1-propanol/water (2/5/1.5, v/v/v) 또는 (2/5/2, v/v/v)를 용매로 하여 상온에서 2회 전개한 후, 0.3%(w/v) N-1-naphthylethyldiamine과 5%(v/v)  $H_2SO_4$ 를 포함하는 메탄올에 담가 완전히 건조시킨 후, 120°C에서 10분간 발색하여 확인하였다(17). 각 종류의 올리고당의 양은 NIH image program을 이용하여 분석하였다(18,19). 플라스크와 발효조(BL-3L, Bok sung Engineering Co., Korea)를 사용하여 배양으로 생산된 상등액 중의 올리고당도 동일한 TLC시스템을 이용하여 분석하였다.

### 플라스크 배양

플라스크 배양은 250 mL 플라스크에 배지 성분의 농도를 달리한 MPS배지 100 mL을 고온 가압 멸균 후, 균을 접종하여 28°C, 155 rpm에서 G5의 생산성을 조사하였다. 상등액 중의 올리고당 분포는 기술한 탄수화물 분석법에 따라 확인하였다. 생산된 올리고당의 선택도와 이론 수율은 다음과 같이 계산하였다.

$$\begin{aligned} \text{선택도}(\%) &= [\text{생산된 G5양}(\text{g/L}) / \text{전체 올리고당}(\text{g/L})] \times 100 \\ \text{이론 수율}(\%) &= [\text{생산된 G5 농도}(\text{g/L}) / \text{초기 공급한 가용성 전분의 농도}(\text{g/L})] \times 100 \end{aligned}$$

### 발효조 배양

G5를 대량으로 생산하기 위한 발효조 배양은 발효조(BL-3L, Bok-Sung, working volume 1.5 L, Korea)를 이용하여 플라스크 배양에서 얻어진 MPS배지를 고온 가압 멸균 후, pH 7.0으로 제어하고, 공기 유입속도를 1 vvm, 교반 속도를 150 rpm하여 배양하면서 일정 시간에 시료를 채취하여 분석하였다. 전 배양에 사용된 균은 3일 동안 동일한 배지에서 계대 배양하면서 활성화시켜 사용하였으며, 1.5 L의 조업 용량에 5-6%(v/v)되도록 접종하였다. 상등액 중의 올리고당 분포는 탄수화물 분석법에 따라 확인하였다.

### 효소의 분리, 정제

*Bacillus* sp. AIR-5를 28°C 발효조(BL-10 L, 조업용량 8 L, Hanil R&D Co., Korea)에서 12시간 배양 후, 배양액을 4°C, 10000×g에서 15분간 원심분리하여 균체와 분리하였고, 효소 활성을 위해 pH 8.5 조정하여 1차 효소액(7.8 L)으로 사용

Table 1. Physiological and biochemical properties of *Bacillus* sp. AIR-5

Growth temperature	4°C 22°C 28°C 37°C 40°C 50°C
Gram staining	- + + + + -
Shape	rod
Diameter	1-1.5 μm
Length	3-7 μm
Spore formation	+
Catalase reaction	+
NaCl concentration in medium	0% 2.5% 5% 7%
Acid formation from carbohydrates	+ + - - d + -
Hydrolysis of casein	+
Hydrolysis of starch	+
Voges-Prokauer test	+

glucose, fructose, galactose, xylose, ribose, sucrose, melibiose  
maltose, lactose, trehalose, raffinose, mannitol, cellobiose

\* d : 11-89% of strains are positive, + : positive, - : negative

하였다. 1차 효소액을 30 K cut off membrane (Prep/ Scale-TFF 2.5 ft<sup>2</sup>, Sterling Drug Co., USA)을 이용하여 농축하고, Ultrafiltration membrane (MW 30,000, Amicon, Inc, Beverly, USA)과 N<sub>2</sub> gas를 이용하여 농축(800 mL)하고, 이 효소액을 단백질 분리에 이용할 농축된 조 효소액으로 사용하였다. 농축된 조효소액(32.11 mg/mL)을 20 mM Tris-HCl (pH 8.5) 완충액으로 평형화시킨 DEAE-Cellulose(Sigma, Co., USA) 컬럼 (3.9×25 cm)에 흡착시키고, 같은 완충액으로 10배 부피로 결합되지 않는 단백질을 세척하였다. NaCl 농도를 0-0.5 M (20 mM Tris-HCl Buffer, pH 8.5)까지 직선적으로 농도구배를 주어 흡착된 단백질(24.11 mg/mL)을 0.56 mL/min의 속도로 용출시켰다. 각각의 분획은 1.5 mL/tube이었다. Maltopentaose 생성 amylase 활성을 보이는 분획을 N<sub>2</sub> gas와 Ultrafiltration membrane (MW 30,000, Amicon, Inc, Beverly, USA)을 이용하여 농축된 단백질을 동일한 완충액으로 평형화시킨 Sephadex G-150 컬럼(1.5×42 cm)에 적용하여 동일한 완충액을 이용하여 0.01 mL/min의 속도로 용출시켰고 용출 분획은 0.8 mL/tube이었다.

**결과 및 고찰**

**선발 균의 분류 및 동정**

가용성 전분을 분해하여 maltopentaose를 주로 생산하는 균의 분류학적 위치를 검토하기 위하여 "Bergey's Manual"과 "Microbiological Applications"에 제시된 방법에 따라 동정하였다(20,21). 선별한 균은 그람 양성균의 간균으로서 포자를 형성하는 특성을 보였으며, ampicilline을 포함하는 배지에서 저항성을 보였다. 이외의 실험된 분리 균의 생리, 화학적 특성은 Table 1에 제시하였다. 분리 균은 *Bacillus*가 가지는 특성과 유사함을 보임으로 *Bacillus* 속으로 정의하였고, 편의상 *Bacillus* sp. AIR-5로 명명하였다.

Table 2. Hydrolysis patterns of maltooligosaccharides by *Bacillus* sp. AIR-5 amylase.

Substrate distribution	Hydrolysis by AIR-5 amylase (%)		
	G6	G7	G8
G1	6.65	4.27	2.42
G2	5.35	18.07	8.41
G3	14.59	13.66	28.92
G4	13.93	15.31	9.57
G5	28.35	30.47	34.31
G6	31.12	10.94	16.38
G7	-	7.28	-

**플라스크 배양에서의 성장곡선과 올리고당 분포**

플라스크 배양에서 *Bacillus* sp. AIR-5를 MPS의 액체 배지에 접종하여 28°C에서 호기적으로 진탕 배양, 관찰한 결과, 배양 상등액 중 가용성 전분(초기 20 g/L)은 지수성장기동안에 주로 분해되어 매우 빠른 속도로 올리고당으로 전환하였다(Figure 1). 가용성 전분은 유도기(접종 후 6시간)-지수성장기에 이르면 빠르게 분해되어 G1-G7의 올리고당으로 전환되고, G5보다 큰 올리고당은 G5와 더 작은 올리고당으로 분해되었고, G1-G3당은 시간이 지남에 따라 미생물에 의해 이용되어 감소하였다. 접종 후, 34시간에 이르면 G6는 G5와 G1으로 분해되어 감소하여 1.8 g/L 농도로 잔존하였고, G4(1 g/L)도 시간이 지남에 따라 서서히 분해되어 소량 잔존하였다. G5(5 g/L)는 상등액의 주된 올리고당으로 존재하였다.

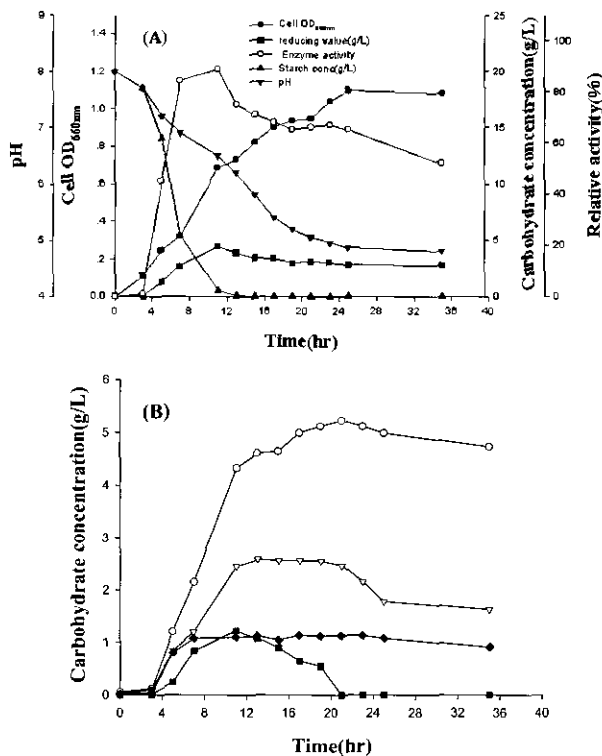
**전분류의 가수분해 산물 분포**

AIR-5 amylase의 말토올리고당 분해 기작을 구체적으로 알아보기 위해 1%(w/v)의 말토올리고당(G6-G8)용액 가수분해 산물을 TLC로 분석한 결과를 Table 2에 나타내었다. AIR-5 amylase는 G2, G3, G4 및 G5는 분해하지 못하였으며 G6는 주로 G5와 G1으로 분해하였다. 이로부터 AIR-5 amylase는

**Table 3.** Hydrolysis product from soluble starch, amylose, amylopectin and glycogen by *Bacillus* sp. AIR-5 amylase.

Distribution	Substrate	Amylose	Soluble starch	Amylopectin	Glycogen
Relative reducing value(%) *		109	100	69	59
G2		8.1	8.0	8.0	3.4
G3		7.7	9.0	7.6	3.2
G4		3.0	4.1	4.4	0.8
G5		42.0	40.0	38.0	30.8
G6		5.7	8.4	7.5	5.7
HMW*		33.5	30.5	34.5	56.1

\* 100% means the reducing value of soluble starch hydrolyzate. HMW\* indicates high molecular weight starch.



**Figure 1.** (A) Growth characteristic of *Bacillus* sp. AIR-5. Cultivation was at 28°C for 24h. Medium : 2%(w/v) soluble starch, 0.3%(w/v) trypton, 0.5%(w/v) K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.5%(w/v) NaCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>. (B) The maltoligosaccharides distribution in flask culture. Yield(%) = [produced maltopentaose amount(mg/ml)/initial starch amount(mg/ml)] × 100. The concentration of each product was measured by TLC using NIH image program as described in methods. ■-G3, ◆-G4, ○-G5, ▽-G6.

$\alpha$ -(1→4)로 연결된(6-8개) 기질을 사용했을 때, 기질의 크기가 증가할수록 빠르게 기질을 분해함을 확인하였고 가수분해 산물은 주로 G5였다. 또한 가용성 전분, amylose, amylopectine 그리고 glycogen과의 가수분해 산물을 비교한 결과는 G5의 양이 많아 glycogen을 기질로 하는 경우 생산된 올리고당 중 70.2%의 구성을 보이고 있다(Table 3). Maltopentaose를 생산하는 *B. licheniformis*(5)의 BLA와 가용성 전분의 가수분해 산물과 비교하면, maltopentaose가 주로 생산됨은 유사하나 AIR-5 amylase는 가용성 전분으로부터 반응 초기 단계에 G2-G6 범위의 maltoligosaccharide를 생성하기 때문에 liquefying

amylase로 분류할 수 있겠다(5,22,23,24). Saccharifying 형태의 amylase는 주로 G1, G2 그리고 G3를 생산한다(24). 기질의 크기에 따른 Km 값도 차이를 보여 maltoheptaose에 대한 Km값은 1.67 mM이고 maltooctaose에 대한 Km 값은 1.24 mM로 Kazuaki 등(25)이 보고한 alkaliphilic  $\alpha$ -amylase (LAMY)의 maltoheptaose에 대한 Km값(2.18 mM)과 비교하여 작으며, maltooctaose에 대한 Km 값(0.82 mM) 보다는 높은 수치를 보였다. 이러한 효소의 특성으로 인하여 전분을 이용한 미생물의 배양으로부터 높은 농도의 G5의 생산이 가능하리라 생각되어 G5의 대량 생산을 위한 배양 조건을 확인하였다. 또한  $\alpha$ -amylase의 가장 잘 알려진 저해제인 acarbose에 대한 저해 기작의 연구는 가용성 전분을 기질로 하여 조사하였다. 다양한 농도 (0.1-10 mg/mL)의 가용성 전분에 acarbose 2.5, 10, 20, 그리고 50  $\mu$ M 농도에 대하여 조사해본 결과, Ki 값은 4.975  $\mu$ mol이었고, acarbose에 의한 저해는 mixed type의 저해 형태를 보여 일반적인  $\alpha$ -amylase(PPA)와 저해 특성이 동일하였다(26).

**G<sub>1</sub>-G<sub>8</sub>까지의 분해 경로 연구**

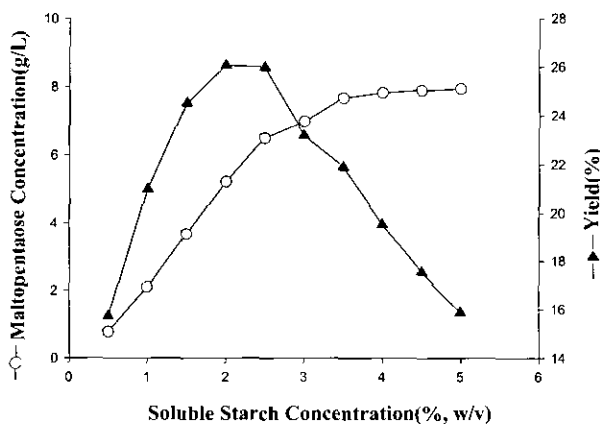
기질로 말토올리고당(maltose-maltooctaose) 1% (w/v) 농도의 용액을 준비하여 가수분해산물을 TLC로 분석한 결과 AIR-5 아밀라제는 maltose, maltotriose, maltotetraose 및 maltopentaose를 분해하지 못하였으며, maltohexaose를 주로 maltopentaose와 glucose로, maltoheptaose는 주로 maltopentaose와 maltose로, maltooctaose는 maltopentaose과 maltotriose로 분해하였다. 동일한 농도의 기질 (10 mM) 을 AIR-5 Amylase가 분해하는 속도는 상대적으로 G<sub>8</sub>>G<sub>7</sub>>G<sub>6</sub>로 빠름을 보였다. 이로부터 AIR-5 Amylase는  $\alpha$ -(1→4)로 직선적으로 연결된 6개 이상의 기질을 사용했을 때, 주로 maltopentaose를 생성하며, 여기서 생성된 maltopentaose는 더 이상 분해되지 않아서, 전분 가수 분해할 때에 반응액상에 maltopentaose가 높은 비율로 잔존함을 뒷받침하고 있다.

**가용성 전분 농도에 따른 maltopentaose 생산**

G5 최적 생산조건을 위해 MPS 배지에 가용성 전분의 농도를 달리 하여 *Bacillus* sp. AIR-5를 배양하였다. 초기 가용성 전분의 농도가 0.5%에서 3.5%까지 증가할 때, 생성되는 G5의 양은 0.5-7.5 g/L로 직선적으로 증가하였으나, 3.5%보다 높은 농도에서는 7.8 g/L 농도의 G5를 생산하였다. 초기 전분의 농도가 증가할수록 G5 이외의 다른 올리고당도 생성되

**Table 4.** Effects of tryptone, NaCl, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, and CaCl<sub>2</sub> concentration on maltopentaose production.

Source	Concentration (%)	Cell growth (O.D. at 660 nm)	Maltopentaose production (g/L)
Tryptone(% , w/v)	0.0	0.12	1.25
	0.2	1.16	5.53
	0.4	1.18	5.83
	0.60	1.26	5.38
	0.8	1.29	4.79
	1.0	1.29	4.05
NaCl(% , w/v)	0.0	1.17	4.65
	0.25	1.18	6.05
	0.5	1.18	6.28
	0.75	1.17	5.96
	1.0	1.17	5.59
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (% , w/v)	0.0	0.94	3.36
	0.25	1.10	6.28
	0.5	1.18	5.27
	0.75	1.21	4.89
	1.0	1.32	3.87
CaCl <sub>2</sub> (mM)	0.0	1.20	4.29
	1.0	1.26	5.78
	2.0	1.26	6.23
	3.0	1.26	6.45
	5.0	1.18	6.12



**Figure 2.** The maltopentaose yield on different concentration of soluble starch (% , w/v). Cultivation was at 28°C for 24h. Yield(%) = [the amount of maltopentaose in culture supernatant(mg/ml)/initial supplied starch amount(g/L)]×100. The concentration of each product was measured by TLC using NIH image program. -○- : production of maltopentaose , -▲- : Yield(%).

어 배양액 내에서의 G5의 상대적인 순도는 감소하였다. 이론 수율로 환산하면 초기 가용성 전분 농도가 2-2.5%인 경우에 가장 높은 수율(26%)을 얻을 수 있었다(Figure 2).

**Maltopentaose에 영향을 미치는 여러 가지 성장 인자의 농도 효과**

다양한 성장 인자(yeast extract, peptone, tryptone, beef extract, casamino acid, corn steep liguor)들 중 한가지(1%, w/v) 또는 두 가지의 성장 인자들을 0.5%(w/v)씩 각각 첨가

한 MPS 배지에서 G5생산성에 미치는 영향을 조사하였다. 두 가지 성장 인자를 섞은 시료에서도 G5생산성이 높았으나 다른 성분과 섞지 않고, tryptone만을 유일한 성장 인자로 사용하였을 때, 가장 많은 G5생산성을 보였다. 플라스크 배양에서 MPS 배지에 0-1.0%(w/v)의 tryptone을 첨가하여 G5생산성을 비교하였다. Tryptone의 양이 증가할수록 균 성장은 빨랐지만, 배지 상등액상에 존재하는 올리고당의 양은 그 만큼 감소하였다. MPS 배지(20 g/L의 전분)중의 tryptone이 0.4%(w/v)일 때 5.89 g/L 농도의 G5 생산성을 보였고, 이는 이론 수율의 29.5%였다. MPS배지에 0-1%(w/v)까지 NaCl 농도를 달리하여 실험한 결과, 0.5%(w/v) 농도의 NaCl에서 가장 많은 G5의 생산량(6.25 g/L)을 보였고, 이는 이론 수율의 31.5%였다. 인산은 ATP, 세포막, DNA, RNA 등을 이루며, 또한 생명 현상을 유지하는데 필수적인 역할을 하는 물질이다. 또한 인산은 liquefying amylase를 생산하는 *B. licheniformis*의 효소 분비에 필수적인 인자이다(5). G5생산은 세포성장이 너무 빠른 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 농도에서는 당 분해가 그만큼 빨리 되어 상대적으로 어느 적절한 시점에서보다 G5생산은 높지 않았다(Table 4). 하지만 전혀 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>가 존재하지 않을 때는 세포성장이 더디었고, G5생산(4.2 g/L)도 저조하였다. 0.25%에서 24시간에 이론 수율의 32%인 생산성을 보였다. CaCl<sub>2</sub>는 효소 반응에 있어서 G5 형성 효소의 activator로서의 역할 뿐만 아니라, 높은 열 안정성의 유지에 뛰어난 결과를 보였다. 또한 Ca<sup>2+</sup>는 liquefying amylase 생성에 필수적인 인자이다(5). Ca<sup>2+</sup>이온을 0-5 mM 농도로 배양액에 첨가하여 G5생산정도를 조사한 결과, 최종 농도가 3 mM일 때 초기에 첨가된 20 g/L의 가용성 전분에서 Ca<sup>2+</sup>가 전혀 들어가지 않는 경우보다 1.3배 더 많은 6.3 g/L의 G5생성을 보였다. (Table 4).

**Table 5.** Effects of temperature and initial pH concentration on production of maltopentaose

	Condition	Cell growth (O.D. at 660 nm)	Maltopentaose production (g/L)
Temperature(°C)	0	0.2050	0.420
	15	0.4520	2.1300
	22	0.8640	4.2300
	28	1.1720	6.4200
	37	1.0450	5.7700
	55	0.2140	1.2300
Initial pH	3.0	0.1280	0.4796
	4.0	0.1850	0.4140
	5.0	0.5680	0.7941
	6.0	0.7350	3.4500
	7.0	0.9850	5.5600
	8.0	1.0230	6.4300
	9.0	0.9540	5.8400
	10.0	0.8940	4.9500
	11.0	0.8510	4.1200

**Maltopentaose 생성에 미치는 초기 pH와 온도의 효과**

초기 pH를 3.0에서 11까지 달리한 조건에서 G5의 생산성을 조사하였다(Table 5). 초기 pH가 6이하에서는 세포 성장과 G5생산량은 낮았으나, 초기 pH가 6이상에는 높은 G5생산량을 보였다. 이는 AIR-5 amylase가 친 알칼리성이라는 사실과 일치한 결과로 초기 pH가 6이상의 조건(pH 7.0-10)에서는 세포성장이 왕성하였으며, G5생산 수율에 있어서도 높았다. 최대 수율은 초기 pH가 8.0일 때 였으며 초기 가용성 전분(20 g/L)에 대한 G5의 생산성은 이론 수율의 32.15%였다. G5생성을 위한 최적 배양 온도를 결정하기 위하여 0, 15, 22, 28, 37 그리고 50°C에서 MPS 배지로 G5 생산 정도를 확인하였다(Table 5). 미생물의 성장은 22°C에서부터 37°C온도에서 왕성한 성장과 높은 G5생산을 보였고, 그 이하 또는 이상의 온도에서는 세포 성장 및 G5생산이 0.8-4.5 g/L로 미비하였다. G5생성은 28°C에서 최적의 생산성을 보였고, 37°C에서도 최적 생산성을 보인 28°C에 비교해 90% 이상의 생산을 보였다. 플라스크배양에서 얻어진 최적 배양배지의 조성은 2-4% Soluble starch, 0.4% Tryptone, 0.5% NaCl, 0.25% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(w/v)였다. MPS 배지조건에 3 mM CaCl<sub>2</sub>의 농도에서 가장 높은 6.45 g/L (이론 수율-32.25%) G5생산성을 보였다.

**요 약**

$\alpha$ -(1→4) 글루코시드 결합으로 구성된 amylose나 가용성 전분을 분해하여 maltopentaose(G5)를 주로 생산하는 균을 토양으로부터 분리, 동정하고, 높은 순도의 maltopentaose를 대량 생산하는 발효조건을 연구하였다. 분리한 균은 동정하여 *Bacillus* sp. AIR-5로 명명하였다. 플라스크 배양에서 G5를 생산하기 위한 최적 배지조성은 2%(w/v) 가용성 전분, 0.4%(w/v) tryptone, 0.5%(w/v) NaCl, 0.5%(w/v) K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3 mM CaCl<sub>2</sub>이었고, 최적 온도와 초기 pH는 28°C와 8.0이었으며, 이 조건에서 최대의 G5생산성(6.45 g/L)을 보였고, 이론 수율의 32.25%을 얻었다.

**감 사**

본 논문은 2000년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구(KRF-Y00-290)되었으며 이에 감사드립니다.

**REFERENCES**

1. Guoqiang, D., C. Vielle, A. Savchenko, and J. Gregory Zeikus (1997), Cloning sequencing, and expression of the gene encoding extracellular  $\alpha$ -amylase from *Pyrococcus furiosus* and biochemical characterization of the recombinant enzyme, *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 3569-3576.
2. Eiichi, S., T. Uchimura, T. Kudo, and K. Komagata (1997), Purification, characterization, and nucleotide sequence of an intracellular maltotriose-producing  $\alpha$ -amylase from *Streptococcus bovis* 148, *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 4941-4944.
3. Takasaki, Y. (1983), Abstracts of Papers, *The Annual Meeting of the Agri-cultural Chemical Society of Japan*. Sendai. March, pp169.
4. Robyt, J. F. and R. J. Ackerman (1971), Isolation, purification and characterization of a maltotetraose-producing amylase form *Pseudomonas stutzeri*, *Arch. Biochem. Biophys.* **145**, 105-114.
5. Saito, N. (1973), A thermophilic extracellular  $\alpha$ -amylase from *Bacillus licheniformis*, *Arch. Biochem. Biophys.* **155**, 290-298.
6. Yoshigi, N., T. Chikano, and M. Kamimura (1985), Characterization of maltopentaose-producing bacterium and its cultural conditions, *Agr. Biol. Chem.* **49**, 2379-2384.
7. Takasaki, Y. (1982), Production of maltohexaose by  $\alpha$ -amylase from *Bacillus circulans* G-6, *Agr. Biol. Chem.* **46**, 1539-1547.
8. Norman, B. E. (1979), The application of polysaccharide degrading enzymes in the starch industry, In *Microbial Polysaccharide and Polysaccharides*, Berkeley R. C. W., Gooday, G. W., and Ellwood, D. C. Eds., p339-367 Academic Press. London.
9. Mamdoub, B. A., M. Mezghani, and S. Bejar (1999), A

- thermostable  $\alpha$ -amylase producing maltohexaose from a new isolated *Bacillus* sp. US100: study of activity and molecular cloning of the corresponding gene, *Enz. Microbial Technol.* **24**, 574-589.
10. Kim, K. S. and Y. K. Chae (1997), The effects of addition of oligosaccharide on the quality characteristic of tomato jam, *Korean J. Food Sci. Technol.* **13**, 348-354.
  11. Kim, J. R., C. Yook, H. K. Kwon, S. Y. Hong, C. K. Park, and K. H. Park (1994), Physical and physiological properties of isomaltooligosaccharides and fructooligosaccharides, *Korean J. Food Sci. Technol.* **27**, 8-9.
  12. Thomas, H. and Misson Viejo CA. (1975), Diagnostic reagent for the determination of amylase, *US patent 0400042*.
  13. Fogarty, W. M. and C. T. Kelly (1990), Recent advances in microbial amylase, In *Microbial enzymes and biotechnology*, 2nd ed, W. M. Fogarty and C. T. Kelly Eds., p71-132, Elsevier Science Publishers, New York.
  14. Schmid, G. and C. A. Bock. August (1994), Biologically pure culture of maltopentaose forming amylase producing alkalophilic bacteria, *US patent 53042723*.
  15. Chung, J. (1997), Identification of *Microbispora rosea* producing mutanase and chemical properties of mutanase, Ph.D. Dissertation, Faculty of dental science, Chonnam National University.
  16. Fox, J. D. and J. F. Robyt (1991), Miniaturization of three carbohydrate analyses using a microsample plate reader, *Anal. Biochem.* **195**, 93-96.
  17. Baek, J. S., D. M. Kim, J. H. Lee, P. S. Chang, N. S. Han, and J. F. Robyt (1998) Enzymatic synthesis of new oligosaccharides using glucansucrase, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26**, 179-186.
  18. Tanirseven, A. and J. F. Robyt (1993), Interpretation of dextranucrase inhibition at high sucrose concentration, *Carbohydr. Res.* **245**, 97-104.
  19. Kim, D. M., J. S. Baek, and J. H. Lee (1995), Characteristics of dextranucrase of *Leuconostoc mesenteroides* B-1299 mutants and enzymatic modification of the amylose and pullulan, *Ann. RCNBMA.* **4**, 41-57.
  20. Stanley, T., M. Williams, E. Sharpe, and J. G. Holt (1989), *Bergey's manual of Systematic Bacteriology*, p1105-1139, Williams & Wilkins Co., USA.
  21. Johnson, M., J. E. DeShaw, J. K. Brimeyer, L. A. Schrandt, and J. E. Waters (1994), *Microbiological Applications, Complete Version, Laboratory manual in general microbiology*, sixth Edition, Wm. C. Brown Communications, Inc.
  22. Yoshigi, N., T. Chikano, and M. Kamimura (1985), Purification and properties of an amylase from *Bacillus cereus* NY-14, *Agr. Biol. Chem.* **49**, 3369-3376.
  23. Long-Liu, L. C. Chyau, and W. Hsu (1998), Production and properties of a raw-starch-degrading amylase from the thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. TS-23, *Biotechnol. Appl. Biochem.* **28**, 61-68.
  24. Yamamoto, T., S. Endo, K. Mizokamin, K. Kainuma, and K. Fujita (1988), *Handbook of amylases and related enzymes: Their sources, isolation methods, Properties and application*, The amylase research society of Japan Eds., p40-64. Pergamon press, Oxford.
  25. 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 amylase from *Bacillus licheniformis*, *J. Biol. Chem.* **267**, 22108-22114.
  26. Qian, M., R. Hase, G. Buisson, E. Duee, and F. Payan (1994), The active center of a mammalian  $\alpha$ -amylase. Structure of the complex of a pancreatic  $\alpha$ -amylase with a carbohydrate inhibitor refined to 2.2 Å, *Biochem.* **33**, 6284-6294.