

## 고염성 *Haloarcular* sp. EH-1으로 부터 amylase 생산

정 명 주

경성대학교 교양과정부

### Amylase Production from *Haloarcular* sp. EH-1

Myung-Ju Jung

School of Liberal Arts, Kyungsoong University, Busan 608-736, Korea

#### Abstract

The extremely halophilic archaeobacterium *Haloarcular* sp. EH-1 was isolated from solar salts. Amylase production from *Haloarcular* sp. EH-1 have been studied. The results obtained were as follows. The optimal medium composition for the production of amylase from *Haloarcular* sp. EH-1 were soluble starch 1.5%, yeast extract 1.0%,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  2.0%, KCl 0.1%, NaCl 25% (pH 7.5). The incubation temperature, aeration rate and agitation speed were 40°C, 100 ml medium / 500 ml shaking flask, and 110 rpm. The cell growth and enzymatic activity was highest at 9 days of incubation. So amylase production appeared to be a growth-related phenomenon.

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

#### 서 론

호염성 미생물은 일광으로 증발이 많은 염호소나 자연적인 염호수, 염장어류와 피혁과 같은 인위적으로 염도를 높은 환경과 같이 극도로 염도가 높은 곳에서 우점 미생물 집단을 형성하는 화학합성 유기영양균으로[1,6,14,20], 성장을 위해 요구되는 호염도에 따라 내염성(0~0.3 M), 중호염성(0.2~2.0 M), 고호염성(3.0~5.0 M)으로 분류하고 있다[4]. 극한 환경에서 자랄 수 있는 미생물의 연구나 이 환경의 생화학적 특성 등의 조사는 고염의 환경에서 살아가기 위해 필요한 생물학적 체계의 적응기작에 대한 중요한 실마리를 제공하였을 뿐 만 아니라[12], 생물공학적 활용가능성에 대한 기초를 제공하였다. 산업적 유기합성의 경우

높은 입체특이성 및 효율성에 대한 중요성이 점차 증가되고 있으나 경제적인 문제로 인해 고농도의 기질에서 작용하는 효소가 요구된다.

아밀라아제는 전분을 가수분해하는 효소의 총칭으로서 고등 동식물에서부터 사상균, 세균 등의 미생물에 이르기까지 자연계에 널리 분포하고 있으며, 식품 또는 발효공정에 직·간접적으로 이용되어 왔다. 즉 전분당공업, 주정공업, 섬유공업 등에서 전분의 액화 및 당화에 사용되며[11], 전분식품의 노화방지에 효과가 있고[4], 의약품, 동물사료, 오수처리, 세제 등에도 이용[19]되고 있으므로 오래 전부터 잘 알려진 효소이다. 상업적으로 가장 많이 사용되고 있는 아밀라아제는 *Aspergillus oryzae*, *Bacillus amyloliquefaciens* 또는 *Bacillus licheniformis*에서 생산된 것이지만[20], 어떤 공업적 유기합성에서는 고농도의 기질이 존재할 때, 즉 수분활성도가 낮을 때 작용할 수 있는 효소가 요구되는데, 일반적인 미생물로부터 얻은 효소는 이러한 환경

\*To whom all correspondence should be addressed  
Tel : 051-620-4648, Fax : 051-627-4115  
E-mail : nah25@star.ks.ac.kr

에서 불활성 되나 고호염성 미생물로부터 생산된 효소는 이용이 가능하다[7].

고호염성균은 단백질의 변성없이 25% 이상의 염농도에서 생육이 가능하므로, 이들 미생물로부터 생산된 호염성 효소는 고염환경 및 저수분활성도의 환경에서 작용할 수 있어서 최근에는 호염성균이 아밀라아제의 생산을 위해 검토되고 있다[8,12]. *Micrococcus* sp.[17]와 *Micrococcus* sp. 4[9]로부터 중호염성 아밀라아제, *Halobacterium halobium* [5,19]에서 고호염성 아밀라아제가 생산되었을 뿐 아직 연구가 부족하다고 사료된다.

따라서 본 연구에서는 고호염성 아밀라아제를 분리, 정제하여 상업적으로 활용하기 위해 천일염에서 분리하여 25%의 NaCl의 농도에서 생육이 양호한 고호염성 *Haloarcular* sp. EH-1[18]으로부터 아밀라아제를 생산하기 위한 최적 조건을 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 사용균주

천일염으로부터 분리한 *Haloarcular* sp. EH-1[18]을 사용하였다.

### 사용 배지

아밀라아제 생산 균주의 분리배지는 Sehgal과 Gibbons 복합배지[21]를 사용하였고, 아밀라아제 활성을 확인하기 위한 배지는 casamino acids 0.5%, potassium chloride 0.2%, sodium chloride 25%, calcium chloride 0.02%, magnesium chloride 2%, soluble starch 1%, agar 2% (pH 7.2)를 사용하였으며[22], 이때 soluble starch는 아밀라아제 생성 유도물질로 사용하였다. 그리고 아밀라아제 생성 배지는 sodium chloride 25%, magnesium sulphate 2%, potassium chloride 0.3%, trisodium citrate 0.2%, peptone 1%, soluble starch 1% (pH 7.2)의 액체배지를 사용하였다 [19].

### 아밀라아제 생산 균주의 분리

*Haloarcular* sp. EH-1[18]의 아밀라아제 활성은 Iodine-staining 방법[10]으로 확인하였다.

### 효소활성 및 균의 생육도 측정

효소활성은 Somogyi-Nelson 법에 의하여 측정하였으며, 균의 생육도 측정은 580 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 단백질 정량

Bovine serum albumin (Sigma 사)을 표준 단백질로 하여 Lowry 등[15]의 방법에 따라 총 단백질량을 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### 탄소원의 영향

기본배지에 각종 탄소원 1% (w/v)를 첨가하여 40°C에서 7일간 진탕 배양한 후 균의 생육도와 효소활성도를 조사한 결과는 Table 1에 나타낸 바와 같이 glucose, fructose, galactose, sorbitol 및 xylose 등은 생육 및 효소생산을 억제하였으나, soluble starch, corn starch, potato

Table 1. Effect of carbon sources on the growth and amylase production by *Haloarcular* sp. EH-1.

Carbon source (1% w/v)	Amylase activity (U/ml)	Cell growth (580 nm)
None	1.17	1.54
Soluble starch	3.25	1.75
Corn starch	2.70	1.57
Potato starch	3.01	1.60
Glucose	0	0.36
Fructose	0	0.12
Galactose	0	0.09
Sorbitol	0	0.15
Lactose	2.75	1.58
Maltose	3.01	1.61
Inositol	2.43	1.51
Raffinose	2.05	1.31
Xylose	0	0.19
Sucrose	1.69	1.07

Culture was carried out in basal salt medium containing 1% yeast extract as nitrogen source at 40°C and pH 7.2.

Composition of basal salt medium was as follows; 25% sodium chloride, 2% magnesium sulphate, 0.3% potassium chloride, 0.2% trisodium citrate.

2 ml seed culture was inoculated into 100 ml medium in 500 ml flask. Amylase activity was calculated from the difference of OD at 540 nm as detailed in Materials and Methods.

starch, lactose, maltose, inositol, raffinose 및 sucrose 등은 비교적 양호한 효과를 나타내었다. 이러한 결과는 *Micrococcus* sp. 4[9]로부터 아밀라아제를 생산하기 위한 조건에서 저분자대사성 당의 경우 효소생산을 억제하는 현상과 유사하였으며, *H. halobium*[19]과 마찬가지로 soluble starch가 효소생산이 가장 높았고 corn starch 및 potato starch의 효과가 낮게 나타났다. 따라서 아밀라아제의 활성이 가장 양호한 탄소원인 soluble starch를 선정하여 그 최적농도를 조사하기 위하여 농도를 단계별로 조정하여 각 농도에 따라 효소생산에 미치는 영향을 검토한 결과는 1%에서 최대의 생육 및 효소생산을 나타내었으며(Table 2), 이와같은 현상은 *H. halobium*[19]의 최적 탄소원의 농도와 비슷하였다.

#### 질소원의 영향

효소생산에 미치는 질소원의 영향을 검토하기 위해 1% soluble starch가 함유된 기본배지에 각종 유기 및 무기질소원을 1%(w/v)씩을 첨가하여 40°C에서 7일간 진탕 배양한 후 균의 생육도와 효소활성을 측정된 결과 Table 3에 나타낸 바와 같이 무기질소원을 첨가한 배지에서는 생육 및 효소생산을 거의 볼 수 없었다. 복합유기질소원을 첨가한 배지에서는 yeast extract, casamino acid, tryptone의 순으로 생육 및 효소생산에 양호한 효과를 나타내었으나 peptone과 malt extract는 효과가 없는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 효소생산을 위한 기본배지에서 peptone이 최적 질소원인 *H. halobium*[19]과 뚜렷한 차이를 나타내었

Table 2. Effect of soluble starch concentration on the growth and amylase production by *Haloarcula* sp. EH-1.

Soluble starch con. (%)	Amylase activity (U/ml)	Cell growth (580 nm)
0	1.12	1.51
0.5	1.37	1.64
1.0	3.51	1.79
1.5	3.31	1.73
2.0	2.92	1.37
2.5	2.42	1.25
3.0	1.07	0.91

Table 3. Effect of nitrogen sources on the growth and amylase production by *Haloarcula* sp. EH-1.

Nitrogen source (1% w/v)	Amylase activity (U/ml)	Cell growth (580 nm)
None	0	0.14
Peptone	0.09	0.69
Yeast extract	3.54	1.72
Casamino acid	3.10	1.56
Malt extract	0	0.38
Tryptone	2.0	1.18
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0	0.13
NH <sub>4</sub> Cl	0	0.15
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0	0.17
NaNO <sub>3</sub>	0	0.06
KNO <sub>3</sub>	0	0.09

Culture was carried out in basal salt medium containing 1% soluble starch as carbon source at 40°C and pH 7.2.

다. Yeast extract가 양호한 효과를 나타낸 것은 조성 성분 중 비타민이 growth factor로서의 역할[16]과 함께 효소활성에도 영향을 주는 것으로 사료된다. 질소원으로 가장 효과적인 yeast extract의 최적농도를 조사한 결과는 Table 4에 나타낸 바와 같이 1%에서 최대의 효과를 나타내었다.

#### NaCl의 영향

NaCl 농도에 따른 생육과 효소생산을 비교 검토한 결과 Table 5에 나타낸 바와 같이 생육과 함께 효소생산도 25%

Table 4. Effect of yeast extract concentration on the of growth and amylase production by *Haloarcula* sp. EH-1.

Yeast extract con. (%)	Amylase activity (U/ml)	Cell growth (580 nm)
0	0	0.13
0.5	2.15	1.33
1.0	3.60	1.96
1.5	3.31	1.76
2.0	3.09	1.64
2.5	2.57	1.43

Culture was carried out in basal salt medium containing 1% soluble starch as carbon source at 40°C and pH 7.2.

Table 5. Effect of NaCl concentration on the growth and amylase production by *Haloarcal* sp. EH-1.

NaCl concentration (% w/v)	Amylase activity (U/ml)	Cell growth (580 nm)
0	0	0.02
5	0	0.03
10	0	0.03
15	0	0.04
20	2.44	1.37
25	3.53	1.77
30	3.49	1.69

Culture was carried out in basal salt medium containing 1% soluble starch and 1% yeast extract.

에서 최대의 효과를 나타내었는바, 본 균주는 고호염성 특성을 나타내고 있으며, 이러한 결과는 *H. halobium*[19]의 NaCl 효과와 일치하였다.

#### 무기염류의 영향

기본배지에 함유된 무기염류가 효소생산에 필요한가를 검토한 결과는 Table 6에 나타낸 바와 같이 기본배지에 마그네슘 이온 또는 칼륨 이온을 첨가하였을 경우 생육과 효소생산이 증가하였다. 마그네슘 이온 및 칼륨 이온이 우선적으로 균의 생육에 있어서 필수적인 요인[2]이라는 보고와 호염성 효소를 활성화시키는데 칼륨 이온이 나트륨 이온만큼 효과가 있으며, 마그네슘 이온은 단백질의 구조를 안정화시키는데 중요한 역할을 한다는 보고[13]에 비추어 볼 때, 마그네슘 이온 및 칼륨 이온이 균의 생육에 있어서 필수적인 요인일 뿐 아니라 효소생산을 위해서 중요한 역할을 하는 것으로 판단된다. Trisodium citrate를 기본배지에 첨가하였을 경우, 생육 및 효소생산을 억제하였다. 이는 sodium nitrate, potassium nitrate, sodium acetate 등의 염이 NaCl이나 KCl에 비해 효소생산을 높이지 않는다는 Good[5]의 보고와 유사하였다.

#### 온도의 영향

배양온도에 따른 생육도와 효소생산의 영향을 검토하기 위하여 종배양액을 2% (V/V) 접종하여 20℃~50℃로 배양온도를 변화시켜 7일 동안 진탕 배양하여 효소활성을 측

Table 6. Effect of metal ions on the growth and amylase production by *Haloarcal* sp. EH-1.

Metal ion con. (% w/v)	Amylase activity (U/ml)	Cell growth (580 nm)
<b>MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O</b>		
0	0	0.11
0.5	0	0.19
1.0	0.09	0.59
1.5	0.09	0.63
2.0	3.12	1.67
2.5	3.09	1.66
3.0	2.50	1.44
<b>KCl</b>		
0	1.92	1.31
0.1	3.26	1.66
0.2	3.00	1.57
0.3	2.21	1.30
0.4	2.00	1.25
0.5	2.00	1.25
<b>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>7</sub> · 2H<sub>2</sub>O</b>		
0	3.23	1.61
0.1	2.08	1.28
0.2	2.00	1.27
0.3	1.97	1.19
0.4	1.97	1.18
0.5	1.92	1.17

정해 본 결과를 Table 7에 나타내었다. 생육 최적온도의 범위는 35℃~45℃이었으며, 40℃에서 균의 생육도 및 효소생산이 가장 높게 나타났는데, 이는 *H. halobium*[19]의 아밀라아제 생산을 위한 최적 온도와 일치하였다.

#### pH의 영향

아밀라아제 생산에 적합한 초기 pH의 영향을 검토하기 위하여 기본배지를 0.1 N NaOH 또는 0.1 N HCl로 pH를 조정하고 종배양액을 각각 2%(V/V) 접종하여 40℃에서 7일 동안 진탕 배양한 후 균의 생육도와 효소활성을 측정된 결과, Table 8에 나타낸 바와 같이 pH 6.0~8.0의 넓은 범위에서 균의 생육도 및 효소생산이 효과적이었으며, pH 7.5 부근에서 가장 높게 나타났다.

Table 7. Effect of temperature on the growth and amylase production by *Haloarcular* sp. EH-1.

Temperature (°C)	Amylase activity (U/ml)	Cell growth (580 nm)
20	0.10	0.52
25	0.91	0.82
30	0.92	0.97
35	3.20	1.61
40	3.51	1.72
45	3.49	1.67
50	0.91	0.81

Culture was carried out in basal salt medium containing 1% soluble starch and 1% yeast extract.

Table 8. Effect of initial pH on the growth and amylase production by *Haloarcular* sp. EH-1.

pH	Amylase activity (U/ml)	Cell growth (580 nm)
4.0	0	0.12
5.0	0	0.13
6.0	2.75	1.41
6.5	2.97	1.54
7.0	3.24	1.61
7.5	3.50	1.67
8.0	3.50	1.67
9.0	0.61	0.77

Culture was carried out in basal salt medium containing 1% soluble starch and 1% yeast extract.

#### 통기량의 영향

본 실험균은 통성 혐기성[18]으로 용존 산소가 균 생육 및 효소 활성에 미치는 영향을 검토하기 위해서 500 ml 진탕 플라스크에 50, 100, 150, 200 ml씩의 기본배지를 준비하여 전배양액을 접종한 후 40°C에서 110 rpm으로 7일 동안 진탕 배양한 결과 100 ml의 배지가 들어있는 플라스크의 배양액이 가장 좋은 효소활성을 나타내었으며(Table 9), 균의 생육에는 영향을 미치지 아니하였다. 따라서 본 실험균은 용존산소의 영향을 크게 받지 않는 것으로 추정된다.

#### 시간의 영향

상기의 배양조건들을 종합 검토하여 최적배양 조건을

Table 9. Effect of aeration on the growth and amylase production by *Haloarcular* sp. EH-1.

Volume (ml) in 500 ml flask	Relative Amylase activity (%)	Cell growth (580 nm)
50	36	1.63
100	100	1.68
150	82	1.64
200	75	1.63

Culture was carried out in basal salt medium containing 1% soluble starch and 1% yeast extract.

설정하고 Table 10에 나타내었다. 이 조건에 따라 준비한 배지에 전배양액을 2% 접종하여 배양하면서 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 증식연관형(growth-related type)을 나타내는 것으로, 생육도 및 효소생산이 10일 경과 후에 최대를 나타내었다는 *H. halobium*의 결과[19]와 유사하였다. 그러나 NaCl 내성 아밀라아제를 생산하는 *Bacillus* sp. 64의 경우[10] 배양시간에 따른 효소의 생산과 생육정도가 24시간에서 최대를 나타낸다는 결과와 비교해 볼 때 고호염균의 효소생산과 생육에는 비교적 긴 시간이 필요하다고 생각된다.

Table 10. Optimal cultural conditions for the growth and amylase production by *Haloarcular* sp. EH-1.

Composition of culturing medium for shake culture	
Soluble starch	1.0%
Yeast extract	1.0%
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	2.0%
KCl	0.1%
NaCl	25%
Conditions initial	
pH	7.5
Temperature	40°C
100 ml medium / 500 ml shaking flask	
110 rpm	

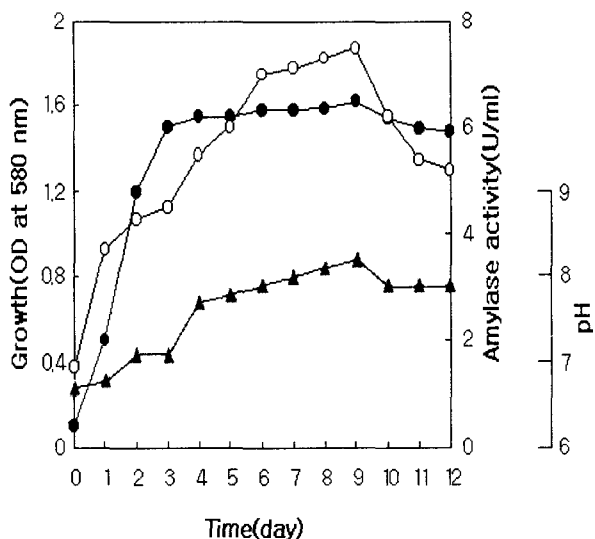


Fig. 1. Growth and amylase production in *Haloarcular* sp. EH-1 under optimal growth condition.

-●-, Cell growth; -○-, Amylase activity; -▲-, pH Optimal growth condition was as follows; 1% soluble starch, 1% yeast extract, 2%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.1% KCl, 25% NaCl (pH 7.5) at 40°C.

## 요 약

천일염에서 분리된 고호염성균인 *Haloarcular* sp. EH-1 으로부터 amylase 생성을 위한 배양조건을 검토하여 최적 조건을 설정하였다. 그 결과는 다음과 같다. 아밀라아제 생산을 위한 배양 조건은 40°C, pH 7.5이었으며, 최적 생육배지를 soluble starch 1.5%, yeast extract 1.0%,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  2.0%, KCl 0.1%, NaCl 25%로 조성하여 500 ml 삼각 플라스크에 100 ml 씩 분주하여 110 rpm/min으로 진탕 배양시켰다. 생육과 효소활성은 9일 배양 후 최대치를 나타내어서, 균의 생육정도와 효소생산 사이에서 증식연관형을 나타내었다.

## 참 고 문 헌

- Anderson, H. 1954. The reddening of salted hides and fish. *Appl. Microbiol.* **2**, 64-69.
- Brown, H.J. and N.E. Gibbons. 1955. The effect of magnesium, potassium and iron on the growth and morphology of red halophilic bacteria. *Can. J. Microbiol.* **1**, 486-494.
- Dziejak, J.D. 1991. Enzymes: Catalyst for food process. *Food Technol.* **45**, 78-85.
- Glauert, A.M. 1974. Practical methods in electro microscopy. Vol. 3, North-Holland Publishing Company, Amsterdam.
- Good, W.A. and P.A. Hartman. 1970. Properties of the amylase from *Halobacterium halobium*. *J. Microbiol.* **104**, 601-603.
- Grant, W.D. and H. Larsen. 1989. Extremely halophilic archaeobacteria. Order Halobacteriales ord. nov., pp. 2216-2233, In N. Pfennig (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. 3, Williams and Wilkins, Baltimore.
- Hough, D.W. and M.J. Danson. 1989. Archaeobacteria: ancient organisms with commercial potential. *Letters Appl. Microbiol.* **9**, 33-39.
- Kamekura, M. 1986. Production and function of enzymes of eubacterial halophiles. *FEMS Microbiol. Reviews.* **39**, 145-150.
- 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.
- Khire, J.M. and A. Pant. 1992. Thermostable, salt-tolerant amylase from *Bacillus* sp. 64. *World J. Microbiol.* **8**, 167-170.
- 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.
- Kushner, D.J. 1985. The Halobacteriaceae, pp. 171-214, In Woese, C.R. and R.S. Wolf, *The bacteria*. Vol. 8(eds.), London, Academic Press.
- Larsen, H. 1967. Biochemical aspects of extreme halophilism, pp. 97-132, In *Advances in microbial physiology*. Vol. 1, Academic Press, Inc., New York.
- Lochhead, A.G. 1934. Bacteriological studies on the red discoloration of salted hides. *Can. J. Res.* **10**, 275-286.
- 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.
- Norberg, P. and B.V. Hofsten. 1969. Proteolytic enzymes from extremely halophilic bacteria. *J. Gen. Microbiol.* **55**, 251-256.
- Onishi, H. 1972. Halophilic amylase from a moderately halophilic micrococcus. *J. Bacteriol.* **109**, 570-574.

18. Park, H.S. and M.J. Jeong. 1996. Isolation and Identification of an Extremely Halophilic Bacterium from Solar Salts. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **24**. 671-677.
19. Patel, S., N. Jain and D. Madamwar. 1993. Production of  $\alpha$ -amylase from *Halobacterium halobium*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **9**. 25-28.
20. Priest, F.G. 1984. Extracellular enzymes, pp. 32-34, In Cole, J.A., C.J. Knowles and D. Schlessinger, Aspects of Microbiology. Vol. 9 (eds.), Wokingham, UK: Van Nostrand Reinhold.
21. Sehgal, S.N. and N.E. Gibbons. 1960. Effect of some metal ions growth of *Halobacterium cutirubrum*. *Can. J. Microbiol.* **6**. 165-169.
22. Tomlinson, G.A. and L.I. Hochstein. 1972b. Studies on acid production during carbohydrate metabolism by extremely halophilic bacteria. *Can. J. Microbiol.* **18**. 1973-1976.

(Received July 12, 2002; Accepted September 25, 2002)