

Bacillus megaterium KSM B-404으로부터 생산되는 Maltopentaose 생성 Amylase의 정제 및 특성

박제원 · 김병주¹ · 이재우² · 김영배*

고려대학교 생명공학원, ¹(주)태평양 기술연구원, ²김천대학 식품영양과

Purification and Characterization of a Maltopentaose-producing Amylase from *Bacillus megaterium* KSM B-404. Park, Je-Won, Byung-Ju Kim¹, Jae-Woo Lee², and Young-Bae Kim*. Graduate School of Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701, Korea, ¹R&D Center, AmorePacific Co., Yongin, Kyunggido 449-729, Korea, ²Department of Food Science and Nutrition Management, Gimcheon College, Gimcheon 740-704, Korea – An amylase that hydrolyzes starch into maltopentaose as a main product was found in the culture supernatant of a strain of *Bacillus megaterium* KSM B-404 isolated from local soil. The enzyme was purified 129-fold by ammonium sulfate precipitation, DEAE-Toyopearl and Superdex 75 HR 10/30 column using a FPLC system. The molecular weight of the amylase was determined as about 68 kDa by using SDS-PAGE. Optimum pH and temperature of amylase were found to be 50°C and pH 6.0~7.0, respectively. The enzyme was stable up to 60°C by addition of Ca²⁺ and its pH stability was in the range of 6.0~10.0. The activity of enzyme was inhibited by Cu²⁺, Hg²⁺, and Fe³⁺ and maintained by Ca²⁺ and Mg²⁺. EDTA and pCMB also showed inhibitory effect to the enzyme. TLC and HPLC analysis of the products of the enzyme reaction showed the presence of maltopentaose (52%), maltotriose (25%), maltose (11%), glucose, and maltotetraose in the starch hydrolysates.

Key words: Maltopentaose, *Bacillus megaterium* KSM B-404, amylase

α -Amylase(1,4- α -D-glucan glucanohydrolase EC 3.2.1.1)는 전분을 가수 분해하는 효소로서 식품산업에 널리 이용되어 왔고, 특히 산업화 효소 생산량의 약 12%를 차지하여 세제에 사용되는 알칼리성 protease 다음으로 가장 많이 생산되고 있는 산업적으로 중요한 효소이다[10]. 최근, 식품의 물성개량 및 기타 여러 기능을 갖고 있는 식품소재로서 올리고당이 각광 받고 있으며, 특정한 올리고당을 주요 산물로 생산하는 amylase가 꾸준히 보고되고 있다. *Bacillus megaterium* G-2[27]와 *B. licheniformis*[9]의 amylase는 전분을 분해하여 maltose(G2)를 주로 생산하고, *B. subtilis*[26] *Streptococcus bovis*[4]는 maltotriose(G3)를 주요산물로 하는 amylase를 생산한다고 보고되어있다. 또한, maltotetraose(G4)를 생산하는 amylase는 *Pseudomonas stutzeri*[20], *Bacillus* 속[28], *Streptomyces albus* KSM-35[2], 그리고 *Pseudomonas* 속[7]에서 보고되었다. 한편, maltopentaose(G5)는 *B. licheniformis*[21], *B. cereus* NY-114[30], *Pseudomonas*속[22], *Bacillus*속[12], 그리고 maltohexaose(G6)는 *B. circulans* G-6[25], *B. caldovelox*[6]의 amylase로부터 생산된다고 보

고 되고있다. 이런 새로운 종류의 amylase들이 지속적으로 발견됨으로써 말토올리고당의 대량생산이 보다 용이하게 되었다. 말토올리고당은 두개 이상 열 개 정도의 포도당 분자가 α -(1 → 4) 결합에 의해 형성된 것으로 그 다양한 기능성으로 인해 새로운 식품소재로 주목 받고있다[18]. 이 중 G5는 감미도가 설탕에 비해 30%이하로서 식품에 첨가되어 감미보다는 식품의 점도와 보습성을 증가시켜 식품물성 개선에 이용될 수 있으며, 전분의 노화 및 마이알 반응에 의한 갈변 현상도 감소시킬 수 있다[16,18,29]. 그리고 높은 용해성과 낮은 감미도 때문에 노약자 및 회복기 환자를 위한 영양식으로 이용되고 있다[5]. 그 밖에도 의약품용으로 혈청과 뇨 내 amylase 분석용 기질로도 이용되고 있다[19].

본 실험은 전분을 분해하여 G5를 주요산물로 생산하는 새로운 amylase의 탐색을 목적으로 시도되었으며, 선발된 균주 *Bacillus megaterium* KSM B-404으로부터 생산되는 G5 생산성 amylase를 분리, 정제하여 효소학적 특성을 살펴보았다.

재료 및 방법

Maltopentaose 생산 균의 탐색 및 동정

Maltopentaose를 생산하는 미생물 분리를 위하여, 곡류 및 토양시료 1 g을 80°C에서 20분간 가열 처리한 후 0.85%

*Corresponding author

Tel: 82-2-3290-3416, Fax: 82-2-3290-3416

E-mail: ybkim@korea.ac.kr

NaCl 용액 10 ml에 현탁하였다. 현탁액 적당량을 취하여 LBS 한천 배지(tryptone 10 g, yeast extract 5 g, NaCl 10 g, soluble starch 10 g, agar 20 g, distilled water 1,000 ml)에 도달하여 37°C에서 12시간 배양하였다. 배지 위에 나타난 콜로니를 다시 새로운 LBS 한천 배지에 tooth picking 하여 37°C에서 12시간 배양하고 Gram's iodine 용액을 떨어 뜨려 콜로니 주위에 투명환 형성 여부로서 amylase 생산 균을 1차로 선별하였다. 선별 균의 한 백금이를 5 ml의 LBSCa 액체 배지(tryptone 10 g, yeast extract 5 g, NaCl 10 g, soluble starch 10 g, CaCl₂ · 2H₂O 0.008 g, distilled water 1,000 ml)가 담긴 15 ml cap tube에 접종하여 37°C에서 150 rpm으로 24시간 진탕 배양한 후 원심분리(3000×g, 20 min)하였다. 얻어진 상등액을 호화시킨 1% 가용성 전분과 반응시킨 후, 그 가수분해 산물을 TLC와 HPLC로 분석한 결과를 토대로 최종 한 균을 선별하였다. 선별된 KSM B-404 균주는 Bergey's Manual[24]와 The Prokaryotes[23]에 준하여 동정되었다.

효소의 생산 및 정제

Bacillus megaterium KSM B-404 균주를 LBS 액체 배지에 접종하여 37°C에서 150 rpm의 조건으로 18시간동안 진탕 배양하였다. 배양액을 4°C에서 원심분리(8000×g, 30 min)하여 균체를 제거한 후, 상등액을 (NH₄)₂SO₄로 75% 포화시켰다. 단백질을 침전물을 4°C에서 원심분리(8000×g, 30 min)하여 회수한 후, 1 mM CaCl₂를 포함한 20 mM Tris-HCl 완충용액(pH 8.2)에 용해시키고[10] 동일한 완충용액으로 투석하여 조효소용액을 얻었다. 효소의 정제를 위하여 FPLC system(Pharmacia Biotech., Sweden)을 사용하였다. 우선 DEAE-Toyopearl 650C(TOSOH Biosep., Tokyo, Japan) anion column(25 mm×450 mm)을 이용하여 조효소용액을 흡착시킨 후, 0.5 ml/min의 유속으로 NaCl의 농도를 0.5 M 까지 높이는 동안 분리된 단백질 중 효소 활성 분획만을 취하였다. 활성 분획을 한외여과 막(Amicon202, MWCO 10,000, Millipore Co., Bedford, MA, U.S.A.)으로 농축시켰다. 다음, 농축된 활성 분획을 동일한 완충용액으로 평형화된 Superdex 75 HR 10/30(Pharmacia Biotech.) column에 적용하여 0.25 ml/min의 유속으로 용출하였다. 활성 분획은 다시 한외여과 막(Centriplus, MWCO 3,000, Millipore Co.)으로 농축시켰다. 각 정제 단계마다 SDS-PAGE를 실시하여 효소의 정제정도를 확인하였다.

효소의 활성 측정

효소의 활성은 3,5-dinitrosalicylic acid(DNS)를 이용하는 환원당 측정법[15]을 변형시켜 측정하였다. 호화 된 5%(w/v) 가용성 전분 용액 0.5 ml을 기질로 하여 여기에 50 mM 인산 완충용액(pH 6.0) 0.4 ml을 첨가하여 50°C 진탕 항온 수조에서 10분간 예열한 후, 효소용액 0.1 ml을 가하여 30

분간 반응시켰다. DNS용액 3 ml을 가하여 반응을 정지시킨 다음, 끓는 물에서 5분간 중탕하여 발색 시켰고 이 후 640 nm에서 흡광도를 측정하여 환원당량으로 환산하였다. 환원당 정량의 표준물질로 maltose를 이용하였고 효소 활성 1 U는 위의 조건 하에서 1분 동안 1 μmole의 환원당을 생산하는 효소의 양으로 정의하였다.

단백질 정량 및 분자량 측정

단백질 정량은 Bradford[1]의 방법에 준하여 실시되었고, 표준단백질로는 BSA를 사용하였다. 효소의 분자량은 Laemmli[13]의 방법에 따라 10% SDS-PAGE를 실시하였다. 단백질은 Coomassie brilliant blue R-250용액으로 염색되었고, 분자량 표준 단백질로 lysozyme(M.W. 14,300), β-lactoglobulin(M.W. 18,400), trypsinogen(M.W. 24,000), egg albumin(M.W. 45,000), 그리고 bovine albumin(M.W. 66,000)를 이용하였다.

N-말단 아미노산 서열의 결정

정제된 효소를 SDS-PAGE한 후 transfer 완충용액(20 mM Tris, 150 mM glycine in 20% methanol)을 사용하여 polyvinylidene difluoride(PVDF) 막(Millipore Co.)에 0.5 A의 세기로 30분간 전기 흡착하였다. PVDF 막을 증류수로 5분간 세척한 후 진공 젤 건조기(Bio-Rad model 583 gel dryer, Bio-Rad Co., Hercules, CA, U.S.A.)로 건조하였고 이를 Procise Protein Sequence System(494/HT, Applied Biosystems, Foster City, CA, U.S.A.)을 이용하여 N-말단 아미노산 서열을 결정하였다[14].

온도의 영향

온도가 효소의 활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 30, 40, 50, 60, 70, 그리고 80°C로 서로 달리한 온도에서 반응시킨 후 효소 활성을 측정하였다. 효소용액을 각각 30, 40, 50, 60, 70, 그리고 80°C 항온 수조에서 30분간 방치한 후 반응시켜 그 잔존 활성을 측정하였다. 한편 Ca²⁺ 이온의 존재가 amylase의 열 안정성에 영향을 미치는가를 조사하기 위하여 효소용액에 CaCl₂를 최종 농도 10 mM이 되도록 첨가한 후 각각의 온도에서의 잔존 활성을 비교하였다.

pH의 영향

효소 활성에 대한 pH의 영향을 조사하기 위하여 50 mM citric acid-sodium citrate 완충용액(pH 4, 5, 6), 50 mM 인산 완충용액(pH 6, 7, 8), 그리고 50 mM glycine-NaOH 완충용액(pH 8, 9, 10)을 이용하여 반응 완충 용액의 최종 농도가 20 mM이 되도록 조정된 후 효소 활성을 측정하였다. 효소의 pH 안정성은 효소용액을 각각의 완충용액으로 pH를 조정하고 40°C 항온 수조에서 30분간 방치한 후, 인산 완충

용액을 사용하여 반응 pH 6으로 재조정하여 그 잔존활성으로 나타내었다.

금속이온 및 저해제의 영향

효소 활성에 대한 금속이온 및 저해제의 영향을 조사하기 위하여, 금속이온을 chloride염의 형태로 반응용액 내 최종 농도가 1 mM이 되도록 첨가하였다. 저해제로 이용된 acetic anhydride, EDTA, hydroxylamine-HCl, p-chloromercuribenzoate(pCMB) 또한 최종 농도가 1 mM이 되도록 첨가한 다음, 40°C 항온 수조에서 30분간 방치한 후 그 잔존활성을 측정하였다. 한편, concanavalin A는 10 mg/ml의 농도로 첨가하여 동일 방법으로 방치한 후 원심분리(10,000×g, 10 min)하여 상등액에 존재하는 잔존활성을 측정하였다.

반응산물의 분석

호화 된 5%(w/v) 가용성 전분 용액 0.5 ml과 50 mM 인산 완충용액(pH 6.0) 0.4 ml에 효소용액(5 unit/ml) 0.1 ml을 가하여 40°C 항온 수조에서 일정 시간 반응시킨 다음 끓는 물에서 5분간 중탕하여 반응을 정지시켰다. 반응용액 5 μl을 pre-coated Kiesel 60 silica plate(Merck AG, Darmstadt, Germany)에 점적 한 후, n-propanol/water(8:2, v/v)를 용매로 하여 상온에서 2회 전개 시켰다. Plate를 완전히 건조시킨 후 발색제(H₂SO₄/phenol/ethanol, 5:3:92, v/w/v)를 뿌리고 110°C에서 15분 이상 구워서 그 반응산물을 확인하였다. 한편 반응산물을 정량적으로 분석하기 위하여 다음과 같은 조건으로 HPLC 분석법을 실시하였다. 사용된 column은 YMC-Pack Polyamine-II(4.6×250 mm, YMC Co., LTD., Kyoto, Japan)이었고 용출용액으로는 acetonitrile/water(55:45, v/v)를 이용되었다. 유속은 Intelligent pump/SLC-100 (Samsung, Seoul, Korea)로 1 ml/min을 유지하였으며 시료 주입량은 20 μl, 검출은 Shodex RI-71 RI detector(Showa Denko K.K., Japan)로 하였다. 한편 반응용액은 0.45 μm nylon 여과 막(Alltech Associates, Inc., Deerfield, IL, U.S.A.)으로 여과된 후 column에 주입되었다.

결과 및 고찰

선발 균의 동정

선발 균은 Gram 양성균의 간균으로 내열성 포자를 형성하

며 catalase 양성인 *Bacillus*속이었으며 현미경 관찰 시 그 지름이 1 μm 이상인 점과 그 생리적인 특성을 토대로 하여 *Bacillus megaterium*으로 동정하였다(Table 1).

효소의 정제 및 분자량

Bacillus megaterium KSM B-404의 배양 상등액을 (NH₄)₂SO₄ 침전분획, DEAE-Toyopearl 음이온 교환 크로마토그래피, 그리고 Superdex 75 HR 10/30으로 겔 여과한 결과 129배 정제되었고 이때 수율은 21.4%이었다. 각 단계별 정제도와 수율은 Table 2에 나타내었다. 다음으로 *Bacillus megaterium* KSM B-404가 생산하는 amylase의 분자량은 약 68 kDa으로 나타났다(Fig. 1). 기존에 보고된 G5 생산 amylase들 중에서 *B. cereus* NY-14[30] 및 *Pseudomonas*속[22] 유래 amylase의 경우 그 분자량이 각각 55 kDa와 64 kDa로 알려져 있어 본 amylase와 다소 차이를 보였다. 한편 본 amylase의 N-말단 아미노산 서열은 Asp(Gly)-Thr-Val-(Asn)-Asn-Gly-Thr-Leu-Met-Gln-Tyr-Phe-Glu-X-(Tyr)로 나타나서, 기존에 보고된 바 있는 다른 세균성 amylase들과 비교한 결과 높은 상동성을 보였고 특히 *Bacillus*속의 균들과는 더욱 그러하였다(Fig. 2).

Table 1. Morphological and physiological characteristics of the strain KSM B-404.

Characteristics	KSM B-404 <i>Bacillus megaterium</i> ^a	
Shape of cell	Rod	Rod
Diameter of cell	>1 μm	1.2~1.5 μm
Length of rod	2~5 μm	2~5 μm
Gram staining	+	+
Spore formation	+	+
Catalase	+	+
Anaerobic growth	-	-
Voges-Proskauer test	-	-
pH <6 in V-P broth	+	d ^b
Acid from glucose	+	+
Gas from glucose	-	-
Acid from mannitol	-	D
Hydrolysis of starch and casein	+	+
Nitrate reduced to nitrite	+	D
Growth in 7% NaCl	-	D
Growth at 50°C	-	-

^aReference 24, ^b11~89% of strains are positive.

Table 2. Purification of the amylase produced by *Bacillus megaterium* KSM B-404.

Step	Specific purification					
	Volume (ml)	Activity (U/ml)	Protein (mg)	Activity (U/mg)	fold (times)	Yield (%)
Culture supernatant	3700	0.64	138.75	17.07	1	100
75% (NH ₄) ₂ SO ₄	86	8.16	34.11	20.57	1.20	29.64
DEAE-Toyopearl 650C	5.3	129.9	2.84	242.42	14.2	29.07
Superdex 75 HR 10/30	16.5	30.7	0.23	2202.39	129.02	21.39

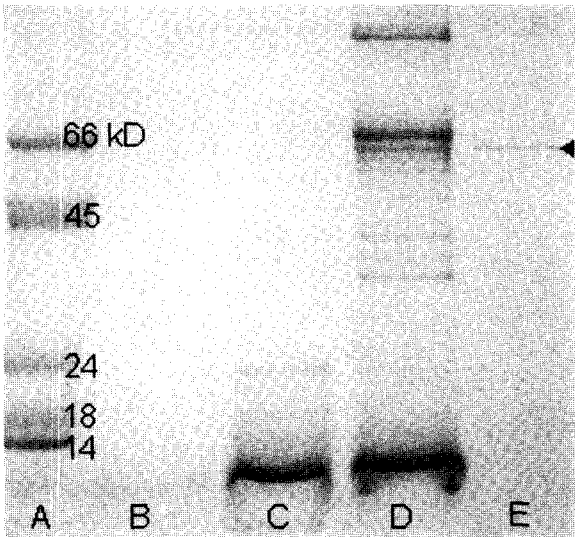


Fig. 1. SDS-PAGE pattern of the amylase in each purification steps. Lane A: Standard proteins, Lane B: Culture supernatant, Lane C: After 75% (NH₄)₂SO₄ precipitate, Lane D: After chromatography on DEAE-Toyopearl 650C, Lane E: After chromatography on Superdex 75 HR 10/30.

<i>B. megaterium</i> KSM B-404	-48 DTVNNGTLMQYFEXY--
<i>B. amyloliquefaciens</i> [17]	-32 VNGTLMQYFEWY--
<i>B. licheniformis</i> [8]	-30 ANLNGTLMQYFEWY--
<i>B. stearothermophilus</i> [8]	-35 AAPFNGTMMQYFEWY--
<i>Streptococcus bovis</i> [3]	MINETLMQYFEWY--

Fig. 2. N-terminal amino acid sequence of the amylase produced by *Bacillus megaterium* KSM B-404 in comparison with that of others. The amino acid residues identical to the sequence of the amylase from *B. megaterium* KSM B-404 were shaded.

반응 최적 온도 및 열 안정성

Bacillus megaterium KSM B-404의 G5 생산성 amylase의 반응 온도별 효소 활성 및 열 안정성을 Fig. 3에 나타내었다. 반응 최적 온도는 약 50°C이었고, 60°C 이상의 온도에서는 활성이 급격히 감소함을 알 수 있었다. 이는 기존에 보고된 바 있는 G5 생산 amylase들 중에서 *B. cereus* NY-14 [30] 및 *Pseudomonas*속[22] 유래 amylase의 최적 온도인 55°C와 비슷한 결과를 보여주었으나, *Bacillus licheniformis* 584[21]의 내열성 amylase의 최적 온도인 76°C보다는 낮았다. 한편 본 amylase는 반응 최적 온도인 50°C에서 30분간 방치된 후에 약 25%의 활성을 잃었으나, 10 mM의 Ca²⁺이온 존재 시에는 50°C까지 열에 안정하였고 60°C에서도 그 활성의 50%를 유지하였다(Fig. 3). 다수의 amylase들이 Ca²⁺ 이온에 의해서 그 열 안정성이 증가하는 것 처럼[2,22, 25,28,30], 본 amylase 또한 열 안정성을 위해서는 Ca²⁺ 이온이 필요함을 알 수 있었다.

반응 최적 pH 및 pH 안정성

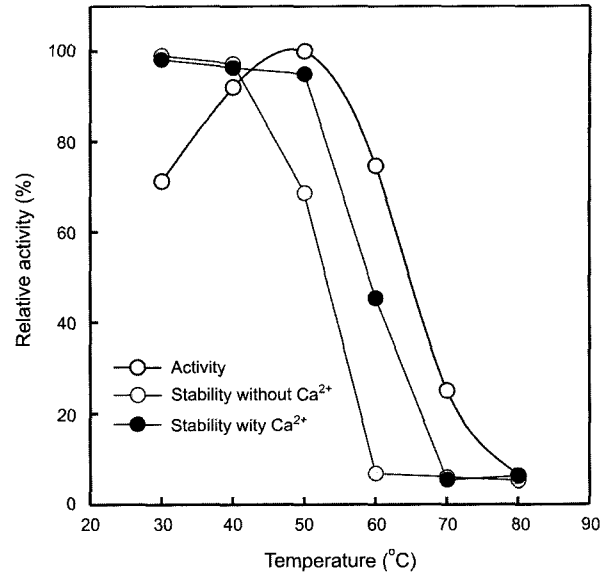


Fig. 3. Effect of temperature on the activity and stability of the amylase.

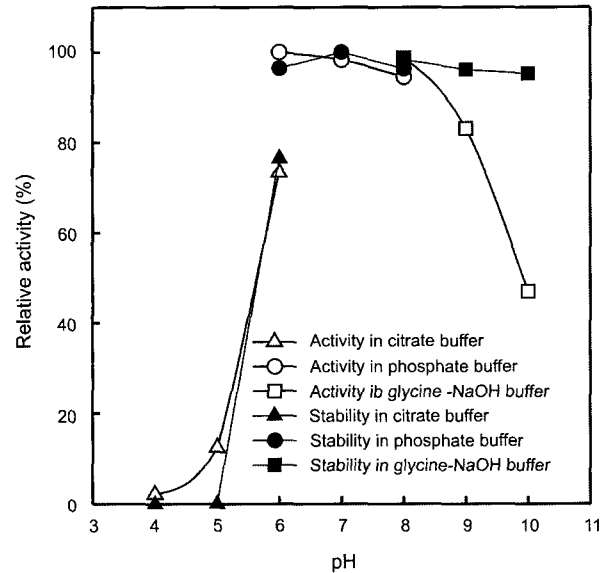


Fig. 4. Effect of pH on the activity and stability of the amylase.

본 amylase의 반응 최적 pH는 6.0~7.0이었고 pH 6.0~10.0의 알칼리 범위에서 매우 안정하였다(Fig. 4). 특히 본 효소는 기존에 보고된 G5 생산 amylase들의 최적 pH 및 pH 안정성과 매우 유사한 결과를 보이고 있다(Table 4).

금속이온 및 저해제의 영향

본 amylase는 Ca²⁺, Mg²⁺ 이온에 의해 미약하나마 그 활성이 증가하였고, 특히 Ca²⁺ 이온은 전술한 바와 같이 효소의 열 안정성에 기여하는 것으로 나타났다. 반면 Cu²⁺, Hg²⁺, 그리고 특히 Fe³⁺ 이온은 효소의 활성을 강하게 저해하였다

(Table 3). 이는 기존에 보고된 G5 생산 amylase 들의 결과와 유사한 결과를 보였다(Table 4). 한편 여러 가지 저해제가 amylase의 활성에 미치는 영향을 살펴본 결과, 당단백질의 활성을 저해하는 것으로 알려진 concanavalin A는 효소 활성에 저해 효과를 나타내지 않는 반면 다른 저해제들은 모두 효소 활성을 저해하였다(Table 3). 우선 pCMB에 의한 효소 활성의 저해는 본 amylase의 활성을 위해서는 활성 부위에 -sulfhydryl 잔기의 존재가 중요함을 알 수 있고, 또한 EDTA에 의한 저해 효과를 미루어 볼 때 amylase는 그 활성 부위에 금속이온을 포함하였다. 한편 acetic anhydride 그리고 hydroxylamine-HCl같은 modifier에 의한 저해 효과는 각각 효소 내 functional group이나 아미노산 잔기의 modification이 효소 활성에 영향을 끼쳤음을 보여 주고 있다. 특히 본 amylase에 대한 pCMB와 EDTA의 효소 활성 저해 효과는 기존에 보고된 G5 생산 amylase들 중 *B. cereus* NY-14[30] 유래 amylase의 결과와 크게 구별되는 점이다(Table 4). 이상의 결과로부터 본 amylase는 효소 활성 부위에 -sulfhydryl 잔기를 가지고 있으며 금속이온과 결합되어 있는 비당단백질 효소로 추정되었다.

Table 3. Effects of metals and inhibitors on the amylase activity.

Metals ^a or inhibitors ^b	Relative activity (%)
None	100
Ca ²⁺	102.9
Cu ²⁺	11.8
Fe ³⁺	0
Hg ²⁺	16.2
Mg ²⁺	104.9
Acetic anhydride	0
Concanavalin A ^c	104.2
EDTA	0
Hydroxylamine-HCl	0
PCMB	0

^a All metals were used as the chloride salt at 1 mM concentration,

^b All inhibitors except for concanavalin A were used at 1 mM concentration, ^c Concanavalin A was used at 10 mg/ml concentration.

Table 4. Comparison of the amylase produced by *Bacillus megaterium* KSM B-404 and others.

Properties	<i>B. megaterium</i> KSM B-404	<i>B. cereus</i> NY-14 ^a	<i>B. licheniformis</i> 584 ^b	<i>Pseudomonas</i> sp. KO-8940 ^c
Optimum temperature (°C)	50	55	76	45~55
Optimum pH	6.0~7.0	6.0	5.0~8.0	6.0~7.0
pH stability	6.0~11.0	5.5~10.0	6.0~11.0	6.5~9.0
Minimum substrate	G6	G6	G4	G6
Molecular weight (kDa)	68	55	22.5	64
Yield of G5 from starch (%)	52	40.9	33.3	N.T.
Inhibited by metals	Cu ²⁺ , Hg ²⁺ , Fe ³⁺	Cu ²⁺ , Hg ²⁺ , Fe ²⁺	N.T. ^d	Cu ²⁺ , Hg ²⁺
Inhibited by EDTA	+	-	+	N.T.
Inhibited by pCMB	+	-	N.T.	N.T.

^aReference 30, ^bReference 21, ^cReference 22, ^dNot tested.

반응산물의 분포

본 amylase에 의한 가용성 전분의 반응시간에 따른 가수분해 산물을 TLC 분석법으로 확인하였다(Fig. 5). 반응 초기에는 주산물인 G5 외에도 G3, G6, G7 등이 나타나지만 반응 시간이 길어지면서 G6과 G7는 더 작은 당류로 분해되었다. 반면 반응 초기에는 미량으로 존재하던 glucose(G1)와 G2는 반응시간이 길어지면서 계속 증가하여, G2의 경우 반응 24시간 후에 전체 가수분해 산물의 약 10%를 차지하였다. 한편 본 amylase가 가수분해 할 수 있는 최소 기질은 G6이었다(Data not shown).

반응산물의 정량적 분석을 위하여 HPLC를 이용하였고 그 크로마토그램을 Fig. 6에 나타내었다. 5% 전분용액을 효소와 24시간 반응시킨 후 얻어진 가수분해 산물 중 약 52%가 G5로서 주산물이었다. 다음으로 G3와 G2가 각각 25% 및 11%를 차지하였으며, 그 밖에 소량의 G1과 G4가 검출되었다. 기존에 보고된 *Bacillus licheniformis* 584[21]와 *Pseudomonas*속[22] 유래 G5 생산 amylase들은 반응 초기에는 G5가 높은 비율로 생산되지만 반응 시간이 길어지면서 보다

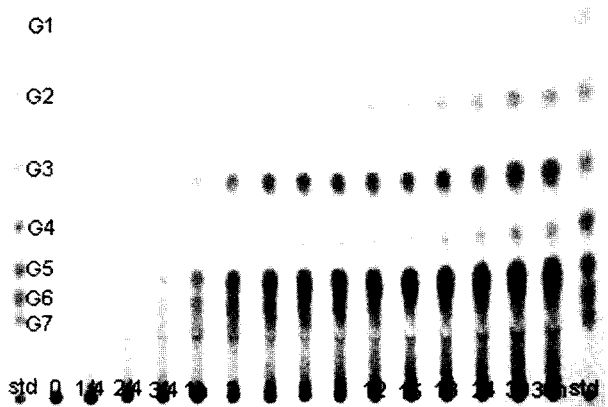


Fig. 5. Thin layer chromatogram of the starch hydrolysates produced by the amylase. G1: glucose, G2: maltose, G3: maltotriose, G4: maltotetraose, G5: maltopentaose, G6: maltohexaose, G7: maltoheptaose.

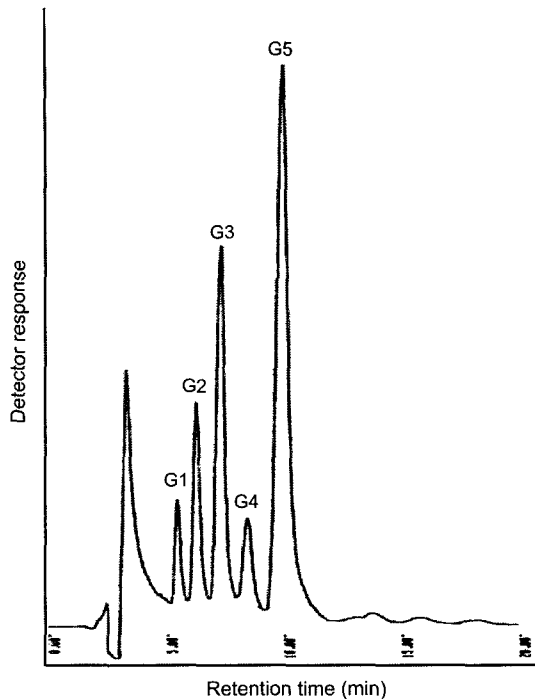


Fig. 6. High performance liquid chromatogram of the starch hydrolysates produced by the amylase. G1: glucose, G2: maltose, G3: maltotriose, G4: maltotetraose, G5: maltopentaose.

작은 당류로 분해되는 것이 확인되었으며, 또 다른 *B. cereus* NY-14[30] 유래 amylase는 그 반응산물 간의 비율 및 24시간 반응 후 주산물이 G5인 점에서는 유사하지만 G5의 비율이 41%이므로 본 amylase의 G5 생성율(52%)이 보다 높게 나타났다. 본 실험은 *Bacillus megaterium* KSM B-404의 maltopentaose 생산 amylase의 일반적인 특성을 조사하였으며 기존 보고된 다른 G5 생산성 amylase들의 특징과 함께 Table 4에서 비교하였다. 본 효소는 *Bacillus licheniformis* 584[21]와 *Pseudomonas*속[22] 유래 amylase들과는 상당 부분 차이가 나타났으나 *B. cereus* NY-14[30] 유래 amylase와는 대체로 유사한 특성을 지녔다. 그러나 전술한 바와 같이 본 amylase는 효소 활성에 금속이온이 필요하고 또한 그 활성 부위에 -sulfhydryl 잔기를 가지고 있다는 점에서 그 차이점을 찾을 수 있었다. *Bacillus megaterium* KSM B-404이 생산하는 amylase는 그 생산량이 적으므로, 산업적으로 이용하기 위하여 그 유전자를 cloning하고 적절한 숙주에 발현하고자 현재 실험 중이다.

요 약

토양으로부터 maltopentaose 생산성 amylase를 분리하는 세균 KSM B-404를 분리하여 그의 형태적, 생리적인 특성을 고려한 결과 *Bacillus megaterium*으로 동정되었다. 효소는 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 침전 분획, DEAE-Toyopearl 및 Superdex 75

HR 10/30 크로마토그래피로 129배 정제되었으며 21.4%의 활성이 회수되었다. 정제된 효소를 SDS-PAGE로 분석한 결과 분자량은 약 68 kDa이었고, 최적 반응 온도는 50°C이며 Ca^{2+} 이온의 존재 시 열 안정성이 증가하였다. 한편 최적 반응 pH는 6.0~7.0 부근이며 알칼리 조건에서도 안정하였다. 또한 효소의 활성은 Cu^{2+} , Hg^{2+} , 그리고 특히 Fe^{3+} 이온 등의 금속이온에 의해 강하게 저해 받았고 acetic anhydride, EDTA, hydroxylamine-HCl, ρ -chloromercuribenzoate 등의 저해제에 의해서 활성이 저해되었으나 concanavalin A에 의한 저해 효과는 나타나지 않았다. 전분의 가수분해 산물을 HPLC로 분석한 결과 maltopentaose가 주산물로 나타났으며 반응 24시간 후 총 가수분해 산물의 약 52%를 차지하였다.

REFERENCES

- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing for the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-251.
- Cha, J., Y. B. Kim, B. C. Seo, and K. H. Park. 1994. Characterization of *Streptomyces* sp. KSM-35 and purification of its maltotetraose forming amylase. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **26**: 633-637.
- Cotta, M. A. and T. R. Whitehead. 1993. Regulation and cloning of the gene encoding amylase activity of the ruminal bacterium *Streptococcus bovis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 189-195.
- Eiichi, S., T. Uchimura, T. Kudo, and K. Komagata. 1997. Purification, characterization, and nucleotide sequence of an intracellular maltotriose-producing α -amylase from *Streptococcus bovis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 4941-4944.
- Fogarty, W. M. and C. T. Kelly. 1990. Recent advances in microbial amylase, pp. 71-132. In W. M. Fogarty and C. T. Kelly (eds.), 2nd ed, *Microbial Enzymes and Biotechnology*, Elsevier Science Publishers, NY, U.S.A.
- Fogarty, W. M., F. Bealin-Kelly, C. T. Kelly, and E. M. Doyle. 1991. A novel maltohexaose-forming amylase from *Bacillus caldovelox*: Patterns and mechanisms of action. *Appl. Environ. Microbiol.* **36**: 184-189.
- Fogarty, W. M., C. T. Kelly, A. C. Bourke, and E. M. Doyle. 1994. Extracellular maltotetraose-forming amylase of *Pseudomonas* sp. IMP 353. *Biotechnol. Lett.* **16**: 473-478.
- Gray, G. L., S. E. Mainzer, M. W. Rey, M. H. Lamsa, K. L. Kindle, C. I. Carmona, and C. Pequart. 1986. Structural genes encoding the thermophilic α -amylases of *Bacillus stearothermophilus* and *Bacillus licheniformis*. *J. Bacteriol.* **166**: 635-642.
- 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.
- Kim, C. S. and H. W. Seo. 1993. The developing state and

- the view of microbial industry: the state and the view of microbial enzymes production. *Bioindustry News* **6**: 1031-1033.
11. Kim, B. J. 1997. *Characterization of Maltopentaose-producing Amylase from Bacillus megaterium* KSM B-404. M. S. thesis, Korea Univ., Seoul, Korea.
 12. Kim, Y. M., E. S. Seo, D. Kim, D. W. Kim, J. H. Lee, and A. Kimura. 2001. Isolation of *Bacillus* sp. AIR-5 producing maltopentaose forming amylase and optimization of maltopentaose production. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **16**: 246-252.
 13. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
 14. Matsudaira, P. 1987. Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. *J. Biol. Chem.* **262**: 10035-10040.
 15. Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426-428.
 16. Min, B. C., S. H. Yoon, J. W. Kim, Y. W. Lee, Y. B. Kim, and K. H. Park. 1998. Cloning of novel maltooligosaccharide-producing amylases as anti-staling agents for bread. *J. Agric. Food Chem.* **46**: 779-782.
 17. Palva, I., R. F. Petersson, N. Kalkkinen, P. Lehtovara, M. Sarvas, H. Soderlund, K. Takkinen, and L. Kaarianinen. 1981. Nucleotide sequence of the promoter and NH₂-terminal signal peptide region of the α -amylase gene from *Bacillus amyloliquefaciens*. *Gene*. **15**: 43-46.
 18. Park, K. H. 1992. The development of new carbohydrate materials. *Food Sci. and Technol.* **25**: 73-82.
 19. Pierre, K. J., K. K. Tung, and H. Nadj. 1976. A new enzymatic kinetic method for determination of α -amylase. *Clin. Chem.* **22**: 1219-1221.
 20. Robyt, J. F. and R. J. Ackerman. 1971. Isolation, purification and characterization of a maltotetraose-producing amylase from *Pseudomonas stutzeri*. *Arch. Biochem. Biophys.* **145**: 105-114.
 21. Saito, N. 1973. A thermophilic extracellular α -amylase from *Bacillus licheniformis*. *Arch. Biochem. Biophys.* **155**: 290-298.
 22. Shida, O., T. Takano, H. Takagi, K. Kadowaki, and S. Kobayashi. 1992. Cloning and nucleotide sequence of the maltopentaose-forming amylase gene from *Pseudomonas* sp. KO-8940. *Biosci. Biotech. Biochem.* **56**: 76-80.
 23. Slepecky, R. A. and H. E. Hemphill. 1991. The genus *Bacillus*-nonmedical, pp. 1663-1696. In A. Balows, H. G. Truper, M. Dworkin, W. Harder, and K. Schleifer (eds.), 2nd ed, *The Prokaryotes*. Vol 2., Springer-Verlag, NY, U.S.A.
 24. Sneath, P. H. A. 1986. Endospore forming gram positive rods and cocci, pp. 1104-1139. In P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, and J. G. Holt (eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol 2., Williams and Wilkins, BL, U.S.A.
 25. Takasaki, Y. 1982. Production of maltohexaose by α -amylase from *Bacillus circulans* G-6. *Agric. Biol. Chem.* **46**: 1539-1547.
 26. Takasaki, Y. 1985. An amylase producing maltotriose from *Bacillus subtilis*. *Agric. Biol. Chem.* **49**: 1091-1097.
 27. Takasaki, Y. 1989. Novel maltose-producing amylase from *Bacillus megaterium* G-2. *Agric. Biol. Chem.* **53**: 341-347.
 28. Takasaki, Y., H. Shinohara, M. Tsuruhisa, S. Hayashi, and K. Imada. 1991. Maltotetraose-producing amylase from *Bacillus* sp. MG-4. *Agric. Biol. Chem.* **55**: 1715-1720.
 29. Yamamoto, T. 1988. *Handbook of Amylases and Related Enzymes*, pp. 210-219. Pergamon press, Oxford, U.K.
 30. Yoshigi, N., T. Chikano, and M. Kamimura. 1985. Characterization of maltopentaose-producing bacterium and its cultural conditions. *Agric. Biol. Chem.* **49**: 2379-2384.

(Received Sep. 11, 2002/Accepted Nov. 1, 2002)