

신종 누룩사상균, *Aspergillus coreanus* NR 15-1의 α -Amylase의 효소학적 특성

이 상 훈 · 정 혁 준 · ¹여 수 환 · 김 현 수 · † 유 대 식
계명대학교 미생물학과, ¹계명대학교 전통미생물 자원 개발 및 산업화 연구센터
(접수 : 2004. 8. 2., 게재승인 : 2004. 8. 23.)

Characteristics of α -Amylase of, a New Species, *Aspergillus coreanus* NR 15-1

Sang Hoon Lee, Hyuck Jun Jung, Soo Hwan Yeo¹, Hyun Soo Kim, and Tae Shick Yu†
Department of Microbiology, Keimyung University, Taegu 701-704, Korea

¹Traditional Microorganism Resources Center, Keimyung University, Taegu 701-704, Korea
(Received : 2004. 8. 2., Accepted : 2004. 8. 23.)

The characteristics of the α -amylase of *Aspergillus coreanus* NR 15-1 isolated from traditional Korean *Nuruk* have been carried out. The α -amylase of *A. coreanus* NR 15-1 was purified by ammonium sulfate precipitation followed by column chromatographies on CM-cellulose, DEAE-cellulose, Sephadex G-100 gel filtration and hydroxyapatite. The α -amylase was purified 78-fold with a yield of 8.7%. The molecular weight of the α -amylase was estimated to be 49 kDa by Sephadex G-100 gel filtration and 51 kDa by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. These experimental results suggested that the purified enzyme might be monomer. The enzyme was stable between pH 4 and 11. The optimum pH was 5.0. The optimum temperature for enzyme was 45°C and the enzyme was stable up to 50°C. The enzyme was significantly inhibited by 1 mM *N*-bromosuccinimide. These results suggested that tryptophan residue was involved in the active site of α -amylase. The enzyme was identified as α -amylase because the reaction products of soluble starch hydrolyzed by the purified enzyme was oligosaccharide by thin layer chromatography.

Key Words : *Aspergillus coreanus* NR 15-1, α -amylase

서 론

누룩은 우리 조상들의 지혜가 담겨있는 훌륭한 작품이지만, 누룩에 관한 연구는 많이 알려져 있지 않다. 재래 전통누룩에는 다양한 사상균류와 효모류가 존재한다고 알려져 있다. 이들에 대한 분석과 효소학적 측면의 연구 또한 많지 않았으므로 누룩의 미생물상에 관여하는 균주를 검색하여 효소학적 특성을 규명하는 작업이 절실히 요구되고 있다.

우리나라의 전통누룩에 다양하게 분포하는 사상균 중 *Aspergillus*속 균주는 식품 뿐만 아니라 의약제제, 향생제, 효소제 등의 생산에도 많이 이용되고 있다. 이 균주는 특히 산업적으로 유용한 전분가수분해효소를 많이 분비하는 균주로

알려져 왔다. 한편 전분은 식품으로 사용될 뿐 아니라 주정, 포도당, 가용성 전분, 전분당 등의 제조에 사용되어 생물자원 중 가장 많은 양이 소비되고 있는 실정에 있다. 전통누룩의 사상균에 관한 연구는 1906년 Ueno에 의하여 3종의 *Mucor*속 사상균을 분리한 것이 최초이며(1), 1990년 한국산 누룩 중의 *Absidia*속에 관한 연구를 한 것이 최근의 연구이다(2). α -Amylase (1,4- α -D-glucan glucanhydrolase, EC 3.2.1.1)는 전분의 α -1, 4-glucoside 결합을 무작위로 가수분해하므로 glucose, maltose, maltotriose, maltotetraose, maltopentaose, maltohexaose, maltoheptaose 등과 같은 단당류 및 다당류 등을 생산하는 세포의 amylase이다. 전분을 분해하는 α -amylase를 생산하는 미생물로는 *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *A. saitoi*, *Rhizopus oryzae*, *Monascus* sp.과 *Streptococcus bovis*, *Bacillus* sp. 등이 알려져 있다.

이와 같은 균주에 관한 연구는 우리나라에서도 활발히 진행되고 있으며, Kim 등(3, 4)의 *Rhizopus oryzae*의 생전분 분해효소에 관한 연구와 Chung 등(5)에 의한 생전분 분해효소

† Corresponding Author : Department of Microbiology,
Keimyung University, Taegu 701-704, Korea
Tel : +82-53-580-5252, Fax : +82-53-580-5164
E-mail : tsyu@kmu.ac.kr

의 개량에 관한 연구, Jung(6)의 *A. niger*의 α -amylase에 관한 연구 등이 있다. 그러나 Yu 등에 의하여 전통누룩으로부터 분리한 *A. oryzae* NR 3-6의 glucoamylase(7)와 glucoamylase를 정제(8)하여 각각의 효소학적 특성을 검토한 연구만이 있을 뿐이다. 그러므로 전통주류의 품질 향상과 규격화, 산업화 기술 등을 개발하는 일환으로 본인의 연구가 중요한 역할을 담당할 것이라 생각하고, 한국 전통누룩으로부터 분리된 사상균에 관한 미생물학적, 효소학적 기초자료는 물론 산업적으로 이용할 수 있는 자료를 얻기 위해 본 실험을 실시하게 되었다.

본 연구에서는 전통누룩으로부터 분리된 신종누룩곰팡이인 *Aspergillus coreanus* NR 15-1이 생산하는 α -amylase를 분리·정제하여 그 효소학적 특성을 살펴보았다. 또한 연구의 말미에는 정제된 효소를 이용하여 산업적으로 이용가치가 높은 oligosaccharide의 생성유무를 TLC를 통해 분석한 결과를 보고하여 누룩연구의 기초자료로 제시하고자 하였다.

재료 및 방법

사용시약

N-bromosuccinimide, CM-cellulose, DEAE-cellulose, Sephadex G-100 (Sigma Co., USA) 제품을 사용하였다. SDS-Polyacrylamide gel 전기영동의 분자량 측정용 표준 단백질 (Pharmacia Co., Sweden) 제품을 사용하였으며, 단백질 정량시약은 Bio-Rad Co. (USA) 제품을 사용하였다. YM broth, YM agar, Czapek solution agar (Difco Lab., USA) 제품을 사용하였다.

공시균주

본 실험에서는 전통누룩으로부터 분리하여 동정한 신종 누룩곰팡이인 *Aspergillus coreanus* NR 15-1(9)을 공시균주로 사용하였다.

포자현탁액 제조

포자현탁액은 공시균주를 Czapek agar배지의 시험관에 접종하여 28°C에서 사면배양하여 포자를 충분히 형성시켜, 살균된 0.1% Tween 80 용액을 3~5 ml 정도로 넣어 백금으로 포자를 서서히 교반시켜 유리시킨다. 같은 방법으로 2회 포자를 유리시킨 후, 약간의 균사가 함유된 포자현탁액을 격렬하게 진탕하여 균사와 포자를 완전히 유리시켜 살균된 탈지면으로 여과하여 균사를 제거시킨다. 포자현탁액을 10,000×g에서 10~15분간 원심분리하여 포자를 침전시킨다. 침전된 포자를 멸균수로 씻은 다음, 20% glycerol용액으로 포자수가 약 1.0×10^7 spores/ml되게 포자현탁액을 조제하였다. 포자현탁액은 -70°C에서 보관하면서 사용했다.

공시균주의 배양

효소를 생산하기 위하여 사용한 호화밀기울배지는 2 l 용량의 삼각 플라스크에 wheat bran 100 g을 넣고 증류수 40 ml를 가하여 잘 혼합한 후, 121°C에서 15분간 살균하였다. 이 배지에 포자현탁액 (7×10^7 spores/ml) 4 ml를 접종한 후 배양일수별로 생성된 효소의 활성을 측정하였으며, 배양기간

중 균사증식에 의한 배지의 고형화를 방지하기 위하여 적당한 배양시간에 배지를 흔들어서 주었다.

조효소액의 조제

공시균주를 배양한 밀기울국 (koji) 100 g에 0.5% NaCl액 500 ml를 가하고 4°C에서 하룻밤 방치하여 효소를 추출했으며, 실온 (15~20°C)에서 bead beater를 사용하여 교반시켜 착즙하였다. 착즙액을 4°C, 8,000 rpm에서 10분간 원심분리하고 그 상등액을 조효소액으로 사용하였다.

α -Amylase 활성 측정

α -amylase 활성은 기질용액 (1% soluble starch in 40 mM acetate buffer pH 5.0) 2 ml를 40°C에서 5분간 예열하고, 조효소액 0.1 ml를 첨가한 즉시 반응액 0.1 ml를 취하고, 40°C에서 30분간 반응시킨 반응액 0.1 ml를 취하여 0.00025 N 요오드 용액 10 ml에 첨가하여 효소반응을 정지시켰다. 이 반응액을 분광광도계 (Shimadzu UV 120-02, Japan)를 사용하여 670 nm의 투과도를 측정한 후, Wohlgemuth value에 준한 아래의 식에서 효소의 활성도 (unit)를 산출하였다(10).

$$DU \text{ (units/g koji)} = \left\{ \frac{12.75 \times (T_{30\text{min}} - T_{0\text{min}})}{30 \text{ min}} \right\} \times \text{희석배율}$$

단백질의 정량

단백질의 정량은 protein assay kit (Bio-Rad Co.)를 사용하여 Bradford 방법(11)에 준하여 측정했으며, 표준단백질로 bovine serum albumin (Sigma Co., USA)을 사용하였다. 정제과정 중의 단백질의 양은 280 nm의 흡광도로 측정하였다.

효소의 정제

염석 및 탈염

효소정제의 모든 과정은 4°C에서 실시하였다. 조효소액 500 ml에 황산암모늄을 20%로 포화시켜 4°C에서 12시간 정치한 후, 원심분리 (8000 rpm, 30 min, 4°C)하여 비활성 단백질인 침전물을 제거하고 상등액에 황산암모늄을 80%로 포화시켜 하룻밤 정치시켰다. 황산암모늄이 80%로 포화된 효소액을 원심분리 (8000 rpm, 30 min, 4°C)하여 얻어진 침전물을 0.02 M Na-acetate 완충액 (pH 5.0)에 용해한 후, 동일 완충액으로 4°C에서 24시간 투석하여 황산암모늄을 제거시켰다.

CM-cellulose column chromatography

투석한 효소액을 0.02 M Na-acetate 완충액 (pH 5.0)으로 평형화시킨 CM-cellulose column ($\phi 3.4 \times 15$ cm)에 충전시켜 시간당 20 ml 유속으로 5 ml씩 분획하였다. 먼저 동일 완충액으로 비결합 단백질을 씻어낸 후, 0~0.5 M의 NaCl을 함유한 완충액을 이용하여 농도구배법으로 단백질을 용출시켜서 분획했다.

DEAE-cellulose column chromatography

CM-cellulose에서 얻은 효소액을 0.02 M Tris-HCl 완충액 (pH 8.0)으로 평형화시킨 DEAE-cellulose column ($\phi 3.4 \times 15$ cm)에 충전시켜 시간당 20 ml 유속으로 5 ml씩 분획하였다.

먼저 동일 완충액으로 비결합 단백질을 씻어낸 후, 0~0.6 M의 NaCl을 함유한 완충액을 이용하여 농도구배법으로 단백질을 용출시켜서 분획했다.

Sephadex G-100 gel filtration

DEAE-cellulose에서 얻은 효소활성 분획을 0.02 M Na-acetate 완충액 (pH 5.0)으로 평형화시킨 Sephadex G-100 column ($\phi 1.8 \times 70$ cm)에 충전시켜 동일 완충액으로 시간당 20 ml 유속으로 3 ml씩 분획하였다.

Hydroxyapatite column chromatography

조정제된 효소액을 1 mM 인산 완충액 (pH 6.8)으로 평형화시킨 hydroxyapatite column ($\phi 2 \times 10$ cm)에 충전시킨 후, 시간당 20 ml 유속으로 3 ml씩 분획하였다. 먼저 동일 완충액으로 비결합 단백질을 씻어낸 후, 0.01 M, 0.02 M 인산 완충액 (pH 6.8)과 0.04 M 인산 완충액 (pH 6.8)을 사용하여 순차적으로 흡착된 효소단백질을 용출시켜서 분획했다.

분자량 측정

본 효소의 분자량은 Andrews 방법(12)에 따라 0.02 M Na-acetate 완충액 (pH 5.0)으로 평형화시킨 Sephadex G-100 column ($\phi 1.8 \times 60$ cm)을 이용하여 gel 여과로 측정하였다. 정제효소의 순도 및 분자량을 측정하기 위하여 Laemmli 방법(13)에 따라 15% SDS-polyacrylamide gel을 사용하여 0.1% SDS 존재 하에서 Tris-glycine 완충액 (pH 8.3)을 사용하여 전기영동을 실시한 후, 0.1% Coomassie brilliant blue R-250 (methanol : acetic acid : water = 45 : 45 : 10)으로 염색하고, 탈색용액 (methanol : acetic acid : water = 10 : 10 : 80)으로 탈색하였다.

TLC에 의한 분해생성물의 확인

1% soluble starch 2 ml에 정제 효소액 50 μ l, 25 μ l, 5 μ l를 각각 가하여 40°C에서 반응시킨 후, 급냉시켜 효소반응을 정지시키고, 그 반응액 4 μ l와 표준당용액 (glucose, maltose, maltotriose, maltotetraose, maltopentaose, maltohexaose, maltoheptaose) 2.5 μ l를 함께 TLC plate (silica gel 60 aluminium sheet Merck, Co.)에 점적시켜 nitromethane : 1-propanol : H₂O = 2 : 5 : 2의 용매로 상향법으로 전개시켰다. 전개한 후, TLC plate를 건조시켜 발색시약으로 aniline-diphenylamine(14)을 분무하고 85°C에서 10분간 발색시켜 반응생성물을 확인하였다.

효소학적 특성 검토

본 효소의 특성을 검토하기 위해 pH 안정성, 열 안정성, 반응최적 pH, 반응최적온도 등을 조사하였다. 본 효소의 pH 안정성을 검토하기 위해서 효소액을 pH 1.0에서 pH 12.0까지 pH가 다른 여러 종류의 완충액에 효소액을 4°C에서 24시간 투석한 후, 반응최적 pH로 조절하여 그 잔존효소활성을 측정하였다. 사용한 완충액은 pH 1.0에서 pH 3.0까지는 glycine-HCl 완충액, pH 4.0에서 pH 5.0까지는 Na-acetate 완충액, pH 6.0은 citrate phosphate 완충액, pH 7.0에서 pH 8.0까지는 Tris-HCl 완충액, pH 9.0에서 pH 12.0까지는

glycine-NaOH 완충액을 각각 사용하였다.

열 안정성은 효소액을 40°C에서 70°C까지 각 온도에서 20분간 열처리하고 급냉시켜 잔존효소활성을 측정하였다. 반응최적 pH는 효소반응액의 pH를 2.0에서 10.0까지 달리하여 40°C에서 효소를 반응시켜 효소활성을 측정하였다. 실험에 사용한 완충액은 pH 2.0에서 pH 3.0까지는 glycine-HCl 완충액, pH 4.0에서 pH 5.0까지는 Na-acetate 완충액, pH 6.0은 citrate phosphate 완충액, pH 7.0에서 pH 8.0까지는 Tris-HCl 완충액, pH 9.0에서 pH 10.0까지는 glycine-NaOH 완충액을 각각 사용하였다. 본 효소의 반응최적온도는 30~70°C까지의 각기 다른 온도에서 효소를 반응시켜 효소활성을 측정하였다. 금속이온과 효소활성 저해제가 효소활성에 미치는 영향을 검토하기 위하여 각종 금속이온과 저해제의 농도가 1 mM되게 효소액에 넣어 40°C에서 30분간 효소 반응시킨 후, 잔존효소활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

α -Amylase의 정제

조효소액 500 ml을 황산암모늄 (20~80%)으로 포화시켜 얻은 효소액을 CM-cellulose, DEAE-cellulose, Sephadex G-100, hydroxyapatite column chromatography로 α -Amylase 효소를 정제했다. 그 결과 Fig. 1에 나타난 바와 같이, hydroxyapatite column chromatography에 의한 효소활성은 0.01 M 인산 완충액 (pH 6.8)의 용출단계인 분획 No. 11~13에서 높게 나타났으며, 단백질의 용출 pattern과 효소활성의 용출 pattern이 일치했으며, 정제효소를 SDS-polyacrylamide gel 전기영동을 한 결과, Fig. 2에 나타난 바와 같이 본 α -amylase는 단일 밴드의 단백질 밴드를 나타내어 본 효소는 단일 효소단백질로 정제되었다고 추정할 수 있었다.

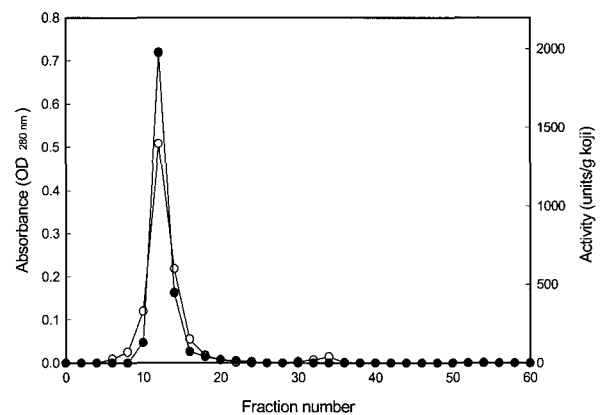


Figure 1. Elution profile of the enzyme on hydroxyapatite column chromatography. The column was equilibrated with 1 mM phosphate buffer (pH 6.8). The enzyme absorbed was eluted by stepwise addition of 0.01, 0.02 and 0.04 M phosphate buffer (pH 6.8) at a flow rate of 20 ml/hr and each fraction volume was 3 ml. ○ : absorbance at 280 nm, ● : α -amylase activity.

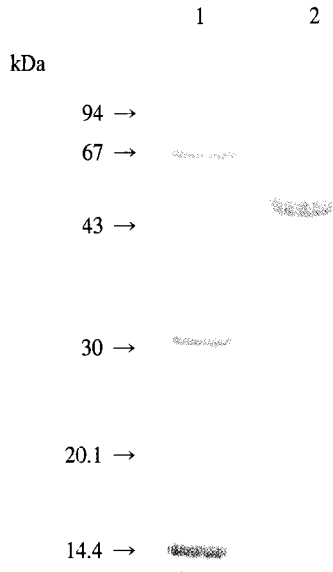


Figure 2. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the purified enzyme. Lane 1, protein size markers : phosphorylase b (94 kDa), bovin serum albumin (67 kDa), ovalbumin (43 kDa), carbonic anhydrase (30 kDa), soybean trypsin inhibitor (20.1 kDa), α -lactalbumin (14.4 kDa) ; lane 2, purified α -amylase.

이상의 결과로부터 본 효소는 8.7%의 수율을 보이며, 78 배로 정제되었음을 알 수 있었다(Table 1).

Table 1. Result of purification steps of α -amylase from *Aspergillus coreanus* NR 15-1

Purification step	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Yield (%)	Purification (fold)
Crude enzyme	337.5	459,000	1,360	100	1.0
(NH ₄) ₂ SO ₄ (20~80%)	81.5	287,215	3,524	62.6	2.6
CM-cellulose chromatography	30.6	172,890	5,650	37.7	4.2
DEAE-cellulose chromatography	9.9	125,739	12,701	27.4	9.3
Sephadex G-100 gel filtration	4.5	84,966	18,881	18.5	13.9
Hydroxyapatite chromatography	0.375	39,780	106,080	8.7	78

분자량 측정

정제된 α -amylase의 분자량을 측정하기 위하여 정제효소와 표준단백질을 Laemmli 방법(13)에 따라 15% SDS-polyacrylamide gel 전기영동하여 정제효소와 표준단백질의 전기영동거리를 이용하여 정제효소의 분자량을 측정한 결과, 정제효소의 분자량은 51 kDa으로 계산되었다(Fig. 3A). Andrews 방법(12)에 따라 Sephadex G-100에 의한 gel 여과법으로 정제효소의 분자량을 측정한 결과, 정제효소의 분자량은 49 kDa으로 나타났(Fig. 3B). 이상의 두 결과로부터 정제효소는 monomer로 추정되었다. *A. awamori*(15)와

A. niger(16)의 α -amylase의 분자량은 41~63 kDa정도로 나타나 있으며, *A. niger* K-25(17)는 58 kDa의 분자량을 가진다. 본 공시균주가 생산하는 α -amylase의 분자량도 같은 *Aspergillus*속에 속하는 다른 사상균의 분자량과 비슷한 결과를 나타내었다.

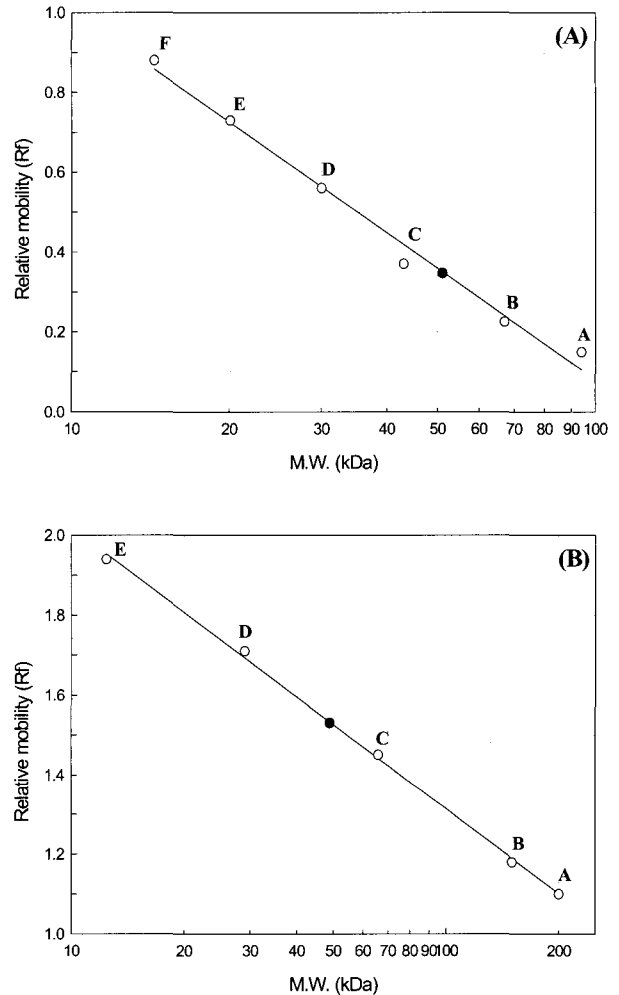


Figure 3. Determination of molecular weight of the enzyme by SDS-PAGE (A), and gel filtration (B).

A : The electrophoresis was performed in 15% PAG containing 0.1% SDS. Molecular weights of standard proteins were as follows A : phosphorylase (94 kDa) , B : bovin serum albumin (67 kDa), C : ovalbumin (43 kDa), D : carbonic anhydrase (30 kDa), E : soybean trypsin inhibitor (20.1 kDa), F : α -lactalbumin (14.4 kDa).

B : A column of Sephadex G-100 equilibrated with 0.02 M Na-acetate buffer (pH 5.0) was eluted at a flow rate of 10 ml per hour. Each standard protein was applied as a solution of 1 mg in 1 ml of buffer. V_e is the elution volume. The void volume (V_0) was determined by elution of blue dextran. Molecular weights of standard proteins were as follows A : β -amylase (200 kDa), B : alcohol dehydrogenase (150 kDa), C : bovin serum albumin (66 kDa), D : carbonic anhydrase (29 kDa), E : cytochrome c (12.4 kDa). ○ : standard proteins, ● : α -amylase.

pH와 열 안정성

본 효소의 안정성에 미치는 pH의 영향을 검토한 결과, 정제된 α -amylase는 pH 3.0에서 비교적 안정하여 50%의 효

소활성이 잔존했으며, pH 4.0에서부터 pH 11.0 사이까지 안정하여 알칼리성의 넓은 영역까지 매우 안정한 효소였다(Fig. 4A). 이러한 효소의 pH 안정성은 공시균주와 같은 *A. awamori*(15)가 pH 3.5에서 6.5사이에서 안정함을 보인 것과 비교하면 비교적 높은 알칼리성 영역까지 본 효소활성이 안정함을 알 수 있었다.

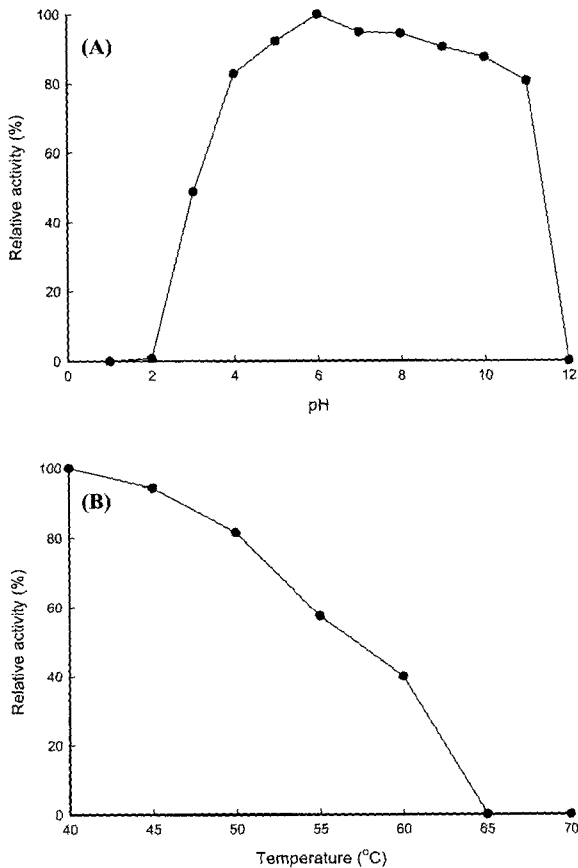


Figure 4. pH (A), and thermal stability (B) of the enzyme activity.

A : The enzyme solution was kept in 0.02 M buffer of pH 1.0 to 12.0 at 4°C for 24 hours. The residual activity was assayed under standard conditions using glycine-HCl buffer (pH 1.0 to 3.0), Na-acetate buffer (pH 4.0 to 5.0), citrate phosphate buffer (pH 6.0), Tris-HCl buffer (pH 7.0 to 8.0), and glycine-NaOH buffer (pH 9.0 to 12.0).

B : The enzyme solution was kept in 0.02 M Na-acetate buffer (pH 5.0), and incubated at the indicated temperature for 20 min. The residual activity was assayed under standard reaction conditions.

본 효소의 안정성에 미치는 온도의 영향을 검토한 결과, 정제된 α -amylase는 50°C에서는 84%의 잔존효소활성을 나타내지만, 60°C에서는 효소활성이 급격히 저하되어 40%의 잔존효소활성을 나타내었다(Fig. 4B). 그리고 정제된 α -amylase 효소활성은 65°C에서 완전히 실패되었다. 사상균이 생산하는 대부분의 α -amylase는 70°C 이상의 고온에서 그 활성의 대부분이 실패되지만 내열성 α -amylase는 80°C 이상의 온도에서도 50% 이상의 활성을 유지하여(18), 본 효소의 열 안정성은 비교적 낮음을 알 수 있었다.

반응최적 pH와 온도

본 효소의 활성에 미치는 pH의 영향을 조사하기 위하여, 효소 반응액의 pH를 2.0에서 10.0까지 조절하여 40°C에서 30분간 효소 반응시켜 효소활성을 측정하였다. 정제된 α -amylase는 pH 5.0에서 가장 높은 효소활성을 나타내었으며 pH 8.0에서는 효소의 활성이 거의 나타나지 못했다(Fig. 5A).

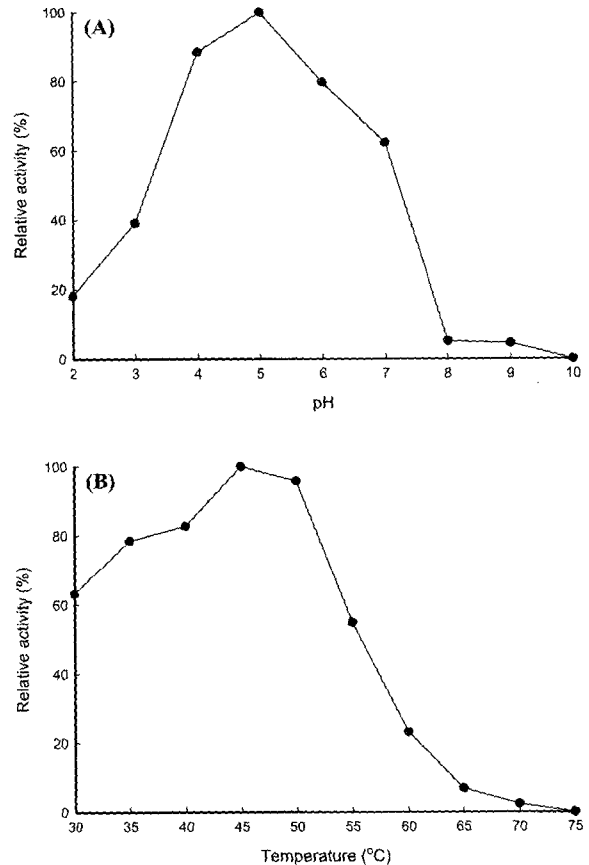


Figure 5. Effect of pH (A), and temperature (B) on the enzyme activity.

A : The enzyme activity was assayed under standard reaction conditions using glycine-HCl buffer (pH 2.0 to 3.0), Na-acetate buffer (pH 4.0 to 5.0), citrate phosphate buffer (pH 6.0), Tris-HCl buffer (pH 7.0 to 8.0), and glycine-NaOH buffer (pH 9.0 to 10.0).

B : The enzyme activity was assayed under standard reaction conditions at various temperature.

A. niger K-25(19)와 효모인 *Schwannimyces castelli*(20)의 효소는 반응 최적 pH가 4.0과 5.5로 본 효소의 반응 최적 pH와 비슷한 값을 나타내었다.

본 효소의 활성에 미치는 온도의 영향을 조사하기 위해 30°C에서 75°C까지 각 온도에서 효소 반응을 시켜 효소활성을 측정하였다. 정제된 α -amylase는 45°C에서 가장 높은 효소활성을 나타내었으며, 50°C에서도 90% 이상의 효소활성을 나타내었다. 그러나 60°C 이상의 온도에서는 20% 이하의 낮은 효소활성을 나타내었다(Fig. 5B).

A. niger K-25(19)와 *Schwannipmyces castelli*(20)의 효소의 반응 최적 온도는 두 균주 모두 40°C를 나타내어 본 효소와 비슷한 온도에서 반응 최적 온도를 나타내었다.

금속이온 및 저해제의 영향

금속이온과 효소활성 저해제가 효소활성에 미치는 영향을 검토하기 위하여, 금속이온과 효소활성 저해제를 효소반응액에 첨가하여 효소반응을 시킨 후, 잔존활성도를 측정하였다. 본 실험에서 정제된 효소는 Table 2에서 보는 바와 같이, 실험에 사용한 모든 금속이온에 의한 효소활성은 거의 영향을 받지 않았다. 효소활성 저해제인 *p*-chloromercuribenzoate (*p*-CMB), dithiothreitol과 pyridoxal 5'-phosphate는 본 효소활성에 아무런 영향을 미치지 않았다. 그러나 tryptophan의 indol기에 특이적으로 작용하는 것으로 알려져 있는 *N*-bromosuccinimide에 의해서는 본 효소의 활성이 완전히 저해되었다. 이상의 결과로부터 본 α -amylase효소의 활성부위에 tryptophan잔기의 아미노산이 관여한다고 추정할 수 있었다.

Table 2. Effect of metal ions and inhibitors on the purified α -amylase activity

Metal ion and inhibitor (1 mM)	Relative activity* (%)
	α -Amylase
CaCl ₂	104.4
CdCl ₂	97.3
CuCl ₂	95.8
MnCl ₂	102.2
PbCl ₂	83.6
ZnCl ₂	98.3
<i>p</i> -CMB	97.4
<i>N</i> -bromosuccinimide	0
Dithiothreitol	95.1
EDTA	104.7
2-Mercaptoethanol	101
Pyridoxal 5'-phosphate	102.5
None	100

분해생성물의 검토

Soluble starch에 대한 정제효소의 분해생성물을 TLC로 확인한 결과, 표준당인 glucose, maltose, maltotriose, maltotetraose, maltopentaose, maltohexaose, maltoheptaose의 Rf치는 0.56, 0.49, 0.42, 0.34, 0.27, 0.23, 0.19로 각각 나타났다. 일반적으로 α -amylase는 전분의 α -1,4 glucoside 결합을 무작위로 절단하며, 그 분해 산물로 maltose 이상의 oligosaccharide를 생성한다고 알려져 있다. *Bacillus circulans*의 효소를 30분간 기질에 효소반응시켰을 때 반응초기에는 maltohexaose가 생성되었으나, 반응이 진행되면서 maltohexaose의 양은 서서히 감소하면서 maltose와 maltotetraose가 생성되었다(21). 본 정제된 α -amylase를 기질에 효소반응시켰을 때, 고분자 당인 maltohexaose와 maltopentaose로부터 저분자당인 maltotetraose와 maltotriose가 생성되는 것을 볼 수 있었다. 이 효소를 30분간 반응시키므로 maltotriose가 가장 많이 생성되었으며, maltose와 maltotetraose의 순으로 생성되었다. 특히, 이 효소반응계에

서 본 α -amylase는 maltopentaose를 약간 생성되었으나, maltohexaose 이상의 고분자 oligosaccharide는 생성되지 않았으며(Fig. 6), 이상의 결과는 *Bacillus circulans*의 효소반응 생성물과 매우 유사한 결과를 얻었다. 그리고 본 정제된 효소는 포도당은 생성시키지 않으나 maltose 이상의 분자량 정도의 당을 생성하여 정제된 효소가 α -amylase임을 확인할 수 있었다.

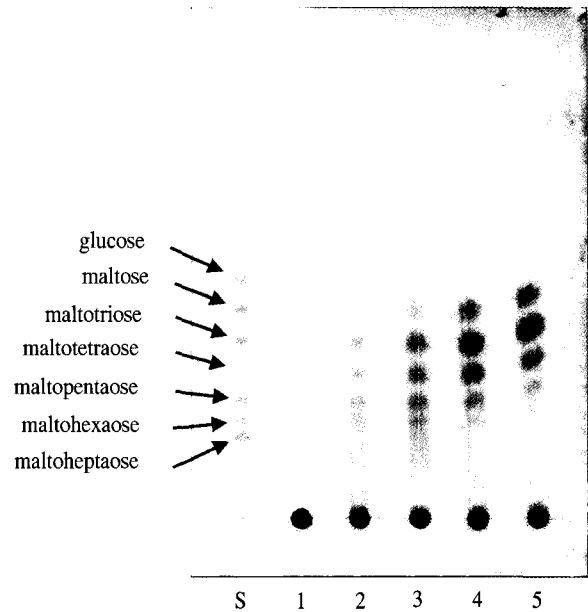


Figure 6. Thin layer chromatography of the reaction products of soluble starch hydrolyzed by the enzyme. Lane S: standard sugar (glucose, maltose, maltotriose, maltotetraose, maltopentaose, maltohexaose, maltoheptaose), lane 1~5 : oligosaccharide produced by hydrolyzing of the purified α -amylase at 40°C for 0~30 min.

요약

한국 전통누룩으로부터 분리한 신종 *Aspergillus coreanus* NR 15-1가 생산하는 α -amylase의 효소학적 특성을 조사했다. 공시균주가 생산하는 α -amylase는 황산암모늄을 이용한 분별 침전, CM-cellulose, DEAE-cellulose, Sephadex G-100, hydroxyapatite column chromatography를 통하여 8.7%의 수율을 보이며, 78배로 정제되었다. 공시균주의 α -amylase의 분자량은 Sephadex G-100 겔 여과에 의해 49 kDa으로 나타났으며, SDS-PAGE에 의하여 51 kDa으로 측정되어 본 효소는 monomer로 추정할 수 있었다. 정제효소는 pH 4.0~11.0 사이에서 안정하였으며, 반응최적 pH는 5.0이었고, 50°C 이하의 온도에서 비교적 안정하며, 반응최적온도는 45°C로 나타났다. 정제효소는 금속이온에 의해 효소활성에 영향을 받지 않았으나, *N*-bromosuccinimide에 의해서는 효소활성이 완전히 저해되어 본 공시균주의 α -amylase의 활성부위에는 tryptophan 잔기가 관여한다고 추정할 수 있었다. 정제효소의 전분분해물은 maltose, maltotriose 등의 oligosaccharide를 형성하므로 α -amylase임을 확인할 수 있었다.

신종 누룩시상균인 *Aspergillus coreanus* NR 15-1의 α -amylase는 50°C 이하의 온도와 pH 4.0~11.0사이에서 안정하여 온도와 pH의 안정성이 우수하여 누룩제조용 사상균으로 사용이 가능함을 알 수 있었다.

감 사

본 연구는 산업자원부, 한국산업기술재단과 과학기술부, 한국과학재단 지정 계명대학교 전통미생물자원 개발 및 산업화 개발연구 센터의 지원에 의한 연구 결과의 일부이며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Ueno, K. (1906), Report of examination of Korean "Koji" (I), *Yakugaku Zasshi* **27**, 203-212.
2. Uchimura, T., S. Takaki, K. Watanabe, and M. Kozaki (1990), *Absidia* sp. in the Chinese starter(Nuruk) in Korean, microorganisms in Chinese starter from Asia (part 3), *J. Brew. Soc. Papan.* **85**, 888-894.
3. Kim, C. J., M. J. Oh, and J. S. Lee (1985), Studies on digestion of raw starch by *Rhizopus oryzae*, *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **13**, 329-337.
4. Kim, T. Y. and S. J. Kim (1998), Study on the α -amylase activity in *Aspergillus oryzae*, *Kor. Biochem. J.* **13**, 89-98.
5. Kim, C. J., M. J. Oh, and J. S. Lee (1986), Purification and characterization of raw starch digesting enzyme from *Rhizopus oryzae*, *Kor. J. Food Sci. Technol.* **18**, 288-293.
6. Chung, M. J., W. N. Hou, J. H. Jeong, and H. Taniguchi (1990), Studies on the development and the characteristics of the powerful raw starch digesting enzyme, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **18**, 251-259.
7. Yu, T. S., T. H. Kim, and C. Y. Joo (1999), Purification and characteristics of glucoamylase in *Aspergillus oryzae* NR 3-6 isolated traditional Korean Nuruk, *J. Microbiol.* **37**, 80-85.
8. Han, Y. J. and T. S. Yu (2004), Characteristics of two forms of glucoamylase from traditional Korean Nuruk fungi, *Aspergillus coreanus* NR 15-1, *J. Microbiol. Biotechnol.* **14**, (in press).
9. Yu, T. S., S. H. Yeo, and H. S. Kim (2004), A new species of Hyphomycetes, *Aspergillus coreanus* sp. nov., isolated from traditional Korean Nuruk, *J. Microbiol. Biotechnol.* **14**, 182-187.
10. The Brewing Society of Japan. 1993. *The annotation of the official method of analysis of the National Tax Administration Agency.* 4th ed. Tokyo: Brewing Society of Japan.
11. Bradford, M. M. (1976), A rapid and sensitive method for the quantitation of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
12. Andrews, P. (1964), Estimation of the molecular weights of proteins by Sephadex gel filtration, *J. Biochem.* **91**, 222-233.
13. Laemmli, U. K. (1970), Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄, *Nature(London).* **227**, 680-685.
14. Hansen, S. A. (1975), Thin-layer chromatographic method for identification of oligosaccharides in starch hydrolysates, *J. Chromator.* **105**, 388-390.
15. Bhella, R. S. and I. Altosaar (1985), Purification and some properties of the extracellular α -amylase from *Aspergillus awamori*. *Can. J. Microbiol.* **31**, 149-153.
16. Arai, M., T. Koyano, H. Ozawa, and K. Yamada (1968), Acid stable α -amylase of black *Aspergilli*. Part IV. Some physicochemical properties, *Agric. Biol. Chem.* **32**, 507-513.
17. Cho, M. H. (1989), Purification and characterization of acid-stable α -amylase of *Aspergillus niger* K-25, *Kor. J. Mycol.* **17**, 145-148.
18. Jung, M. J., and H. S. Park (1999), Purification and characteristics of amylase from *Haloarcula* sp. EH-1, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **27**, 129-135.
19. Jung, M. J. (1997). Purification and characteristics of raw starch hydrolyzing enzyme from *Aspergillus niger*, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**, 166-172.
20. Park, J. C., S. Bai, S. Y. Lim, H. Lee, and S. B. Chun (1993), The purification and properties of *Schwannomyces castelli* CBS 2863, *Kor J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **21**, 582-587.
21. Taniguch, H., F. Ogashima, M. Igarashi, Y. Maruyama, and M. Nakamura (1982), Characterization of a potato starch-digesting bacterium and its production of amylase, *Agric. Biol. Chem.* **46**, 2107-2115.