

# 맥아에서 분리한 *Bacillus amyloliquefacies* CNL-90이 생산하는 α-amylase와 Protease의 특성

배형철<sup>1</sup> · 최성현<sup>2</sup> · 나석한<sup>3</sup> · 남명수<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>충남대학교 농업생명과학대학 동물바이오시스템학과, <sup>2</sup>KG Si-Tech., <sup>3</sup>청미바이오

## Characteristics of α-Amylase and Protease Produced from *Bacillus amyloliquefacies* CNL-90 Isolated from Malt Grain

Hyoung Churl Bae<sup>1</sup>, Seong Hyun Choi<sup>2</sup>, Seuk Han Na<sup>3</sup> and Myoung Soo Nam<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Lab. of Milk Food Biochemistry and Biotechnology College of Agriculture and Life Sciences Chungnam National University, Yuseong, Daejeon 305-764, Korea, <sup>2</sup>Research Institute, KG Si-Tech. 337-4, Oh-dong, Seo-gu, Daejeon 302-080, Korea, <sup>3</sup>Chung Mi Bio Inc., 219-1 Iljuk, Ansong 456-910, Korea

### ABSTRACT

A bacterium, identified as *Bacillus amyloliquefacies* CNL-90 using 16S rDNA analysis, was isolated from malt grain. The optimal activities of its α-amylase and protease were observed at pH 6 and 60°C, and at pH 6 and 50°C, respectively although their activities remained stable at pH 7 and 40°C for α-amylase and at pH 7 and 50°C for protease. After solid-state fermentation of *B. amyloliquefacies* CNL-90 on wheat bran for 72hr or 144hr, the α-amylase and protease activities were 170,000 and 290,000 units/kg, and 290,000 and 310,000 units/kg, respectively. The viable bacterial cell counts were  $1.5 \times 10^9$  CFU/g and  $2.2 \times 10^9$  CFU/g at 72hr and 144hr of the solid-state fermentation, respectively. A feeding trial with a total of 127 piglets was also conducted. The animals were divided into two groups: an experimental group fed with the fermented product (63 piglets) and a control group (64 piglets). The growth rate of the experimental group was 6.66% higher than that of the control group ( $P < 0.05$ ). The results of this study indicate that the α-amylase and protease from *B. amyloliquefacies* CNL-90 can be used for industrial applications due to their activity in production of carbohydrate hydrolysates.

(**Key words** : *Bacillus amyloliquefacies* CNL-90, α-amylase, Protease, Growth rate)

### 서 론

미생물이 생산하는 효소들이 산업적으로 이용되고 있는 분야는 식품산업과 동물사료산업 그리고 세제산업, 제약 및 환경산업 등 다양하다(Rao 등, 1998). 2009년 세계의 산업용 효소 전체시장은 약 875억 달러로 추산되며, 세제용 효소가 23.0%, 식품가공용 효소가 36.6%, 농업용 효소가 25.5%, 기타 효소가 15%의 비율로 시장을 구성하는 것으로 예측하고 있다. 국내 효소 시장은 2000년 기준 약 400억원 규모로 의약품 효소시장이 200억원으로 50%를 차지하여 가장 크고, 세제용 효소가 65억원으로 16%, 섬유가공용 효소가 60억원으로 15%, 전분당 및 식품용 효소가 40억원으로 10%, 피혁공업 및 환경용 효소가 35억원으로 9% 정도 차지한다(Oh, 2004).

*Bacillus* 계통의 효소를 이용하는 균주는 *B. subtilis* MB4(Ahn 등, 2006), *B. amyloliquefacies* A1, A2, B1, MC1, SB2, SC1, SD1(Ahn 등, 2006), *B. licheniformis* YB-42(Kim 등, 2004), *B. subtilis* KIBGE HAS(Bano 등, 2011) 등 다양하다. 미생물이 생산하는 효소가 함유된 배양액을 첨가한 가축사료의 경우 사료의 효율 증진, 소화장애 감소, 질병 저항성 증진, 섬유질과 전분 등의 유기물 분해력, 유지방 생산 증가, 악취 제거, 유해균 증식 억제 등의 다양한 기능이 있다.

식품에 이용하는 protease의 경우는 치즈의 숙성, 식육의 연화, 조미료 제조 등이 있고, 의약품 원료로는 소화제, 소염진통제, 피혁 가공, 세제산업 등 다양한 분야에 걸쳐 이용되고 있다(Godfrey and Reichelt, 1983). 생균제로써 *B. subtilis*를 이용한 최근의 연구는 *B. subtilis* EB464가 생산하는 단백질 분해효소를 이용하여

\* Corresponding author : Myoung Soo Nam, Lab. of Milk Food Biochemistry and Biotechnology College of Agriculture and Life Sciences Chungnam National University. Yuseong, Daejeon 305-764, Korea. Tel: 042-821-5782, Fax: 042-823-2766, E-mail: namsoo@cnu.ac.kr

대두박의 소화효율을 높인 연구 (Park, 2002)와 산란 후기에 사료 내 *B. subtilis*를 첨가하여 급여한 후 난의 생산성, 난질, 혈액 및 장내 미생물 조성 등을 연구한 보고 (Lee 등, 2010)가 있다.

본 연구는 높은 활성의 전분분해효소와 단백질분해효소를 생산하는 *Bacillus* sp.을 선발하여 동정하였고, 이 균주를 이용하여 식품 및 사료 첨가제로 유용하게 이용하기 위하여 효소의 특성을 조사하였고, 본 균주의 배양물을 첨가한 사료를 자돈에 급여하여 성장율을 조사하여 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 세균의 분리

맥아 등 발아곡물을 이용하여 0.85% 생리식염수에 십진희석법으로  $10^7$ 배까지 희석하였다. 희석된 용액을 nutrient agar (Becton Dickinson and Company, MD, USA)에 도말하여 37°C에서 48시간 배양하여 자란 colony를 평판배지에 접종하여 전분분해효소 및 단백질분해효소 활성을 측정하여 가장 높은 활성을 보이는 10 균주를 분리하였다. 즉, 가용성 전분 (soluble starch)이 1% 포함된 nutrient agar 배지에 10종의 균주를 접종한 뒤 30°C에서 24시간 배양한 후 요오드 용액으로 염색하여 생기는 투명 환의 크기가 큰 3종의 균주를 선발하였다. 선발된 3균주를 탈지분유 (skim milk)가 1% 포함된 nutrient agar 배지에 접종한 뒤 30°C에서 24시간 배양한 후 투명환의 크기가 가장 크게 형성되는 Strain 15를 맥아에서 분리하였고 균주번호를 CNL-90으로 명명하였다.

### 2. 세균의 동정

분리된 세균의 동정은 형태학적 특성을 관찰하기 위해서 현미경 (ECLIPSE TS100, Nikon, JAPAN)을 사용하였고, 당 이용성은 API 50CHB kit (bioMerieux, France)로 확인하였다. 미생물을 30°C에서 24시간 배양한 후 원심분리하여 균체를 회수하고 배양액을 당 이용성 배지에 현탁하여 API 50CHB kit에 접종 후 24시간 경과 후 biochemical test, assimilation test 그리고 fermentation test를 하였다. 미생물의 동정은 위의 결과를 바탕으로 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology의 기준에 따라 동정하였다 (Murray 등, 1986).

### 3. 세균의 염기서열 분석

미생물부터 DNA의 분리는 Dneasy Tissue Kit (Quigen, CA, USA)를 사용하여 분리하였고, 분리된 미생물의 16S rDNA 단편을 PCR로 증폭하여 사용하였다. 분리한 균주의 16S rDNA 단편을 증폭하기 위해 사용한 primer는 27F: 5'-AGAGTTTGATC-ACTGGCTCAG-3', 1492R: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'를 사용하였으며, PCR 반응은 95°C에서 5분간 denaturation 하고

94°C에서 1분, 56°C에서 40초, 72°C에서 3분의 사이클을 30회 반복하였다. PCR 산물의 염기서열 결정은 Genetic analyzer 377 (perkin-Elmer, CA, USA)를 사용하였으며, 염기서열의 분석은 CLUSTALW 프로그램 (Felsenstein, 1993)을 사용하였다.

### 4. 세균의 pH와 온도에 대한 영향

분리된 세균의 pH 및 열에 대한 안정성을 조사하기 위해서 pH 3~10까지의 20mM 완충용액 (pH 3~6: Citrate-phosphate buffer pH 6~8: sodium phosphate buffer pH 9~12: Glycine-NaOH buffer)에 분리된 배양액을 4시간 실온에 방치한 후 nutrient agar (Becton Dickinson, USA)에 도말하여 30°C에서 24시간 배양하여 생균수 (colony number)의 상대 비를 조사하였다. 또한, 열에 대한 안정성은 배양액을 수조에서 10°C~70°C까지 변화시키면서 15분간 처리한 뒤 상기와 같은 방법으로 생균수를 측정하여 판단하였다.

### 5. 효소의 활성 및 생균수 측정

밀기울 배지에 각각  $1.0 \times 10^7$  CFU/g 농도로 분리된 세균을 접종하여 고체배양 [30°C, 3일과 6일, 50% (v/w) 수분함량]를 진행한 후 발효가 완료된 발효산물 5g 을 멸균된 증류수 15ml 에 현탁하여 30°C에서 약 10분간 진탕한 후 6,000rpm의 속도로 원심분리하여 얻은 상등액을 조효소 추출액으로 사용하여 효소의 역가를 측정하였다.

전분분해효소의 측정은 요오드액 1 ml를 넣은 시험관을 준비하고, 또 다른 시험관에 기질용액인 가용성 전분 (1.0% w/v) 3 ml를 취하여 40°C에서 가온하였다. 실온상태의 효소액 1 ml를 시험관에 가해 잘 혼합하고 40°C에서 반응시켰다. 40°C 반응상태에서 효소액을 가하여 2분 후부터 1분 간격 (또는 2 내지 5분 간격)으로 반응시킨 반응액 0.2 ml를 취하여 순서대로 1 ml의 요오드액 중에 가하였다. 요오드반응의 색이 청색에서 적색으로 변할 때까지 반응을 계속하였다. 600 nm에서 흡광도를 1 cm의 셀로 측정하고 흡광도차가 0.4가 될 때의 반응시간 (t)를 그래프로부터 구했다. t의 값이 3분에서 10분 사이에 들지 않으면 효소액의 농도를 바꾸어서 다시 측정하였다. 효소의 단위는 10 mg의 amylose를 가수분해하여 30분 후에 상기의 요오드 반응의 흡광도를 0.4까지 저하시키는 효소량을 1단위로 하였다 (김 등, 1992).

단백질분해효소의 활성은 Kunitz (1947)의 방법을 변형하여 측정하였는데 1% casein 용액 100  $\mu$ l을 반응용액 400  $\mu$ l에 첨가한 후 효소액 100  $\mu$ l을 가하여 30°C에 반응시켰다. 이후 동량의 10% TCA를 처리하여 얼음에 5분간 방치하고 12,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 얻은 상등액을 660 nm 파장에서 흡광도 값을 측정하여 계산하였다. 단위 활성 (Unit)은 기질 용액과 30°C에서 1분간에 tyrosine 1  $\mu$ g 상당량의 생산물을 생산하는 효소량을 1 단위로 하여 계산하였다. 생균수 측정은 영양한천배지 (beef extracts 0.3%, peptone 0.5%, agar 1.5%)에 도말하여 30°C에서 24시간 배양하

여 생균수(colony number)를 측정하였다.

6. 효소의 최적 pH 및 온도

최적 pH는 조효소액을 20 mM 완충용액 (pH 3~6 : Citrate-phosphate buffer; pH 6~8 : sodium phosphate buffer)에 넣고 기질과 함께 37°C에서 10분간 반응시킨 후  $\alpha$ -amylase와 protease의 활성을 조사하였다. 최적 온도는 50 mM Tris-HCl 완충용액 (pH 7.0)에 조효소액을 첨가하고 기질을 사용하여 20°C, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C에서 30분간 반응시킨 후  $\alpha$ -amylase와 protease의 활성을 조사하였다.

7. 효소의 pH 안정성 및 온도 안정성

pH 안정성은 pH 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 까지 각각 buffer 용액에 조효소액을 첨가하여 4°C에서 24시간 반응 시킨 후 protease와 amylase 효소의 활성을 측정하였다. 온도 안정성은 50 mM Tris-HCl buffer 용액 (pH 7.0)에 조효소액을 첨가하여 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80°C 에서 15분 동안 반응을 시키고 protease 와  $\alpha$ -amylase 효소의 활성을 측정하였다.

8. 기질(서리태)의 분해

콩의 일종인 서리태 분말에 대조구로써 서리태 무처리 군, 분리된 CNL-90과 *Bacillus subtilis* natto가 생산하는 효소를 각각 처리하여 10시간 배양 후 탄수화물의 분해도를 HPLC로 분석하였다. HPLC system (Waters Co. Milford, MA, USA)으로 분석하였고, 사용한 column은 SUPELCOGEL C-610H (30 × 7.8 mm, Sigma-Aldrich Co. MO, USA), 유속은 40°C에서 1 ml/min로 하였다.

9. 사료 효율 개선

분리한 세균을 밀기울에 접종하여 6일간 발효시킨 발효산물을 자동용 (뉴페이스 2호, 도드람 B&F)에 첨가하여 이유 자돈에 급여하여 사료 효율 측정을 시험하였다. 전주 C양돈 연구농장에서 수행하였고, 시험두수는 이유 자돈 127두로 평균체중은 11 kg 이었다. 시험기간은 15일로 분리된 CNL-90의 발효산물 0.2%를 사료에 첨가하여 급여하였다. 시험기간 중 폐사, 전출된 자돈은 없었다.

10. 통계 분석

효소의 활력과 탄수화물의 분해 수치는 평균값과 표준편차로 나타내었으며 통계적인 유의성은 student's t-test로 분석하였고, 미생물에 의한 탄수화물 분해의 유의성 검정은 Duncan's multiple range test로 하였다.

결과 및 고찰

1. protease와  $\alpha$ -amylase 생산 세균의 분리 동정 및 특성

전분분해효소 활성이 가장 높은 균주로 분리된 3 균주가 단백질 분해효소 활성 여부를 확인하기 위해서 탈지분유 (skim milk)가 1% 포함된 nutrient agar배지에 접종한 뒤 30°C에서 24시간 배양한 후 투명환의 크기가 가장 큰 균주 CNL-90 (strain 15)을 선발하였다. 선발된 CNL-90의 16S rDNA의 염기 서열을 분석하여 *Bacillus amyloliquefaciens* 근연균과의 상관관계를 조사하여 작성한 phylogenetic tree 결과는 Fig. 1과 같다. 이 균주가 *B. amyloliquefaciens*로 확인되어 *B. amyloliquefaciens* CNL-90으로 명명하였고, *B. amyloliquefaciens* ATCC23350과는 유전적으로 가장 근연관계가 있는 99.99%의 상동성을 가지는 미생물로 밝혀졌다. 이 균의 생화학적 특성은 Table 1에 나타난 바와 같으며 *B.*

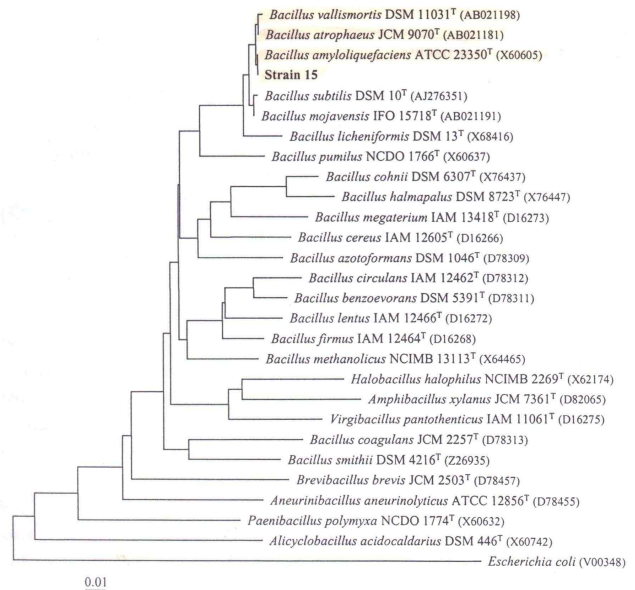


Fig. 1. Phylogenetic tree based on the 16S rDNA sequences of the isolated CNL-90 from isolated natural grains. Scale bar represents 0.01 substitutions per nucleotide position.

Table 1. Characterization of morphological and biochemical of *Bacillus amyloliquefaciens* CNL-90

| Items      | Characteristics of microorganisms |
|------------|-----------------------------------|
| Gram stain | +                                 |
| Cell shape | rod                               |
| Spore      | +                                 |
| Motility   | +                                 |
| Aerobic    | +                                 |
| Amylase    | +++                               |
| Protease   | +++                               |
| Cellulase  | trace                             |

*amyloliquefaciens* CNL-90은 Gram 양성이고 간균 형태, 포자형성과 운동성 및 호기성이 있는 것으로 확인되었다. Table 2는 *B.*

Table 2. Carbohydrate fermentation analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* CNL-90

| No. | Carbohydrates                | <i>B. amyloliquefaciens</i> CNL-90 |
|-----|------------------------------|------------------------------------|
| 0   | Control                      | -                                  |
| 1   | Glycerol                     | +                                  |
| 2   | Erythritol                   | -                                  |
| 3   | D-Arabinose                  | -                                  |
| 4   | L-Arabinose                  | -                                  |
| 5   | Ribose                       | +                                  |
| 6   | D-Xylose                     | +                                  |
| 7   | L-Xylose                     | -                                  |
| 8   | Adonitol                     | -                                  |
| 9   | $\beta$ -Methyl-D-Xyloside   | -                                  |
| 10  | Galactose                    | -                                  |
| 11  | D-Glucose                    | +                                  |
| 12  | D-Fructose                   | +                                  |
| 13  | D-Mannose                    | +                                  |
| 14  | L-Sorbose                    | -                                  |
| 15  | Rhamnose                     | -                                  |
| 16  | Dulcitol                     | -                                  |
| 17  | Inositol                     | -                                  |
| 18  | Mannitol                     | +                                  |
| 19  | Sorbitol                     | +                                  |
| 20  | $\alpha$ -Methyl-D-Mannoside | -                                  |
| 21  | $\alpha$ -Methyl-D-Glucoside | +                                  |
| 22  | N-Acetyl-Glucosamine         | +                                  |
| 23  | Amygdaline                   | +                                  |
| 24  | Arbutine                     | +                                  |
| 25  | Esculine                     | +                                  |
| 26  | Salicine                     | +                                  |
| 27  | Cellobiose                   | +                                  |
| 28  | Maltose                      | +                                  |
| 29  | Lactose                      | +                                  |
| 30  | Melibiose                    | -                                  |
| 31  | Surcrose                     | +                                  |
| 32  | Trehalose                    | +                                  |
| 33  | Inulin                       | -                                  |
| 34  | Melezitose                   | -                                  |
| 35  | Raffinose                    | +                                  |
| 36  | Starch                       | +                                  |
| 37  | Glycogen                     | +                                  |
| 38  | Xylitol                      | -                                  |
| 39  | Gentiobiose                  | +                                  |
| 40  | D-Turanose                   | -                                  |
| 41  | D-Lyxose                     | -                                  |
| 42  | D-Tagatose                   | -                                  |
| 43  | D-Fucose                     | -                                  |
| 44  | L-Fucose                     | -                                  |
| 45  | D-Arabitol                   | -                                  |
| 46  | L-Arabitol                   | -                                  |
| 47  | Gluconate                    | -                                  |
| 48  | 2-Keto-Gluconate             | -                                  |
| 49  | 5-Keto-Gluconate             | -                                  |

*amyloliquefaciens* CNL-90의 당 발효특성을 나타낸 것으로 D-glucose, D-fructose, D-mannose, cellobiose, maltose, lactose, sucrose, raffinose, starch, glycogen 등의 성분을 발효과정 중에 이용하는 것으로 확인되었다. 이 미생물은 대한민국 대전 소재 국제기탁기관 Korean Collection for Type Cultures에 기탁번호 KCTC 10477BP로 수탁하였다.

2. CNL-90의 pH 및 온도에 따른 생존율

*B. amyloliquefaciens* CNL-90의 pH 및 온도에 따른 생존율 조사는 Fig. 2에 나타난 바와 같다. *B. amyloliquefaciens* CNL-90은 pH 6에서 pH 9까지의 범위에서 95%의 생존율을 보임으로써 안정적으로 생존함을 알 수 있었고, pH 6 이하와 9-10에서는 생존율이 급격히 감소되었다. 또한, 온도에 따른 생존율은 10~35°C 범위에서 90~95%의 생존율을 나타내어 안정적으로 생존하는 것으로 나타났고, 40°C에서는 약 75% 정도의 생존율을 보였으며 45°C 이상의 범위에서는 급격히 감소되었고, 50°C 이상에서는 생존율이 0으로 나타났다. 따라서 *B. amyloliquefaciens* CNL-90이 가장 안정적으로 자랄 수 있는 조건은 pH 6-9, 온도는 10~35°C로 확인되었는데 약산성에서 약알칼리에서, 온도는 저온에서 중온에 걸쳐 안정하게 잘 성장하는 것으로 확인되었다.

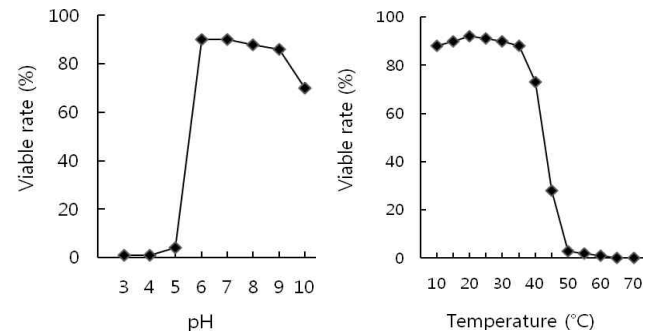


Fig. 2. Effects of pH and temperature on the *Bacillus amyloliquefaciens* CNL-90. pH 3~6 : Citrate-phosphate buffer; pH 6~8 : sodium phosphate buffer; pH 9~10 : Glycine-NaOH buffer.

3. 효소활성과 생균수

*B. amyloliquefaciens* CNL-90에 의해 생산된  $\alpha$ -amylase, protease의 활성은 Table 3에 나타내었다. 밀기울 100%의 배지에 3일간 배양 후 생산된  $\alpha$ -amylase, protease의 활성은 170,000 unit/kg, 290,000 unit/kg으로 각각 나타났고, 6일 배양 후에는  $\alpha$ -amylase, protease가 각각 290,000 unit/kg, 310,000 unit/kg으로 높은 활성도를 나타내었다. Table 4는 *B. amyloliquefaciens* CNL-90을 밀기울 배지에 배양하여 생균수를 측정된 것으로 배양 3일 이후에는  $1.5 \times 10^9$  CFU/g, 배양 6일 후에는  $2.2 \times 10^9$  CFU/g으로 약 1.5배 증가한 것을 알 수 있었다. Park 등 (2002)은

Table 3.  $\alpha$ -amylase and protease activity of solid matter fermented by *Bacillus amyloliquefaciens* CNL-90

|                               | Fermentation period  |                      |
|-------------------------------|----------------------|----------------------|
|                               | 3 day                | 6 day                |
| Protease (unit/kg) *          | 290,000 $\pm$ 36,056 | 310,000 $\pm$ 13,229 |
| $\alpha$ -amylase (unit/kg) * | 170,000 $\pm$ 15,100 | 290,000 $\pm$ 20,019 |

\* Media was wheat bran source entirely.

Data are indicated as mean  $\pm$  S.E.M. of the result obtained from 3 independent experiments (p<0.05).

Table 4. Viable cell count of *Bacillus amyloliquefaciens* CNL-90

|                        | Fermentation period |                   |
|------------------------|---------------------|-------------------|
|                        | 3 day               | 6 day             |
| Viable count (cfu/g) * | $1.5 \times 10^9$   | $2.2 \times 10^9$ |

\* Media was wheat bran source entirely.

대두박에 고체배양 할 경우 최대 활성시기는 배양 24시간 이었고, 균수도  $1.5 \times 10^{10}$  CFU/g 으로 최고에 도달했다고 보고하였다. 밀기울 배지와 대두박 배지는 일반 조성분 차이가 있고 특히 탄수화물과 단백질의 함량 차이가 있기 때문에 이들 성분들이 미생물의 생육에 영향을 미치는 것으로 생각된다.

4.  $\alpha$ -amylase의 최적 pH, 온도 및 안정성

$\alpha$ -amylase의 최적 pH, 온도 안정성은 Fig. 3에 나타난 바와 같다.  $\alpha$ -amylase의 pH의 영향(A)은 pH 6에서 효소의 활성이 가장 높게 나타났다. 온도에 따른  $\alpha$ -amylase의 활성은 60 $^{\circ}$ C에서 가장 효소 활성이 높은 것으로 나타나 이 효소의 반응 최적 pH는 6, 온도는 60 $^{\circ}$ C로 나타났다.  $\alpha$ -amylase의 pH 안정성(C)은 pH 6-8가

지는 효소의 활성을 최고로 유지하였고, pH가 4, 5, 6으로 증가함에 따라 효소 활성도 증가하였고 8-10에서는 조금 감소되었다. 온도에 대한  $\alpha$ -amylase의 안정성(D)은 40 $^{\circ}$ C일 때 효소의 활성을 최고로 유지하였고, 온도가 10 $^{\circ}$ C에서 20, 30, 40 $^{\circ}$ C로 증가함에 따라 효소 활성도 증가하였으나, 40 $^{\circ}$ C 이상에서는 급격히 감소됨을 알 수 있었다.

5. Protease의 최적 pH, 온도 및 안정성

Protease의 최적 pH, 온도 안정성은 Fig. 4에 나타난 바와 같다. pH가 protease에 미치는 영향(A)은 pH 5~6일 때 효소의 활성이 가장 높게 나타났다. 온도에 따른 효소의 활성에 미치는 영향(B)은 50 $^{\circ}$ C에서 효소의 활성이 가장 높게 나타났다. 따라서 이 효소의 반응 최적 pH는 6, 온도는 50 $^{\circ}$ C로 나타났다. 이러한 결과는 Park 등(2002)과 Kim 등(1995)이 보고한 *Bacillus* sp.의 protease 반응 최적온도와 비슷하였다. Protease의 pH 안정성(C)은 pH가 4, 5, 6으로 높아짐에 따라 활성이 증가되었고, pH가 7일 때 protease의 활성은 가장 높게 나타났고 7 이상 되면 급격히 감소하였다. Protease의 온도 안정성(D)은 온도가 50 $^{\circ}$ C일 때 protease의 활성이 가장 높게 나타났고 그 이상이 되면 급격히 감소하였다. 이와 같은 결과는 Park 등(2002)은 대두단백질 분해균주인 *B. subtilis* EB464 균주의 효소 안정성에서 40 $^{\circ}$ C에서 30분까지는 안정하였으나 50 $^{\circ}$ C 이상에서는 효소의 활성이 급격히 실패된다고 보고한 것과는 차이가 있었고, Kim 등(1995)이 보고한 고온성 *B. amyloliquefaciens* NS-15-4의 protease 안정성과는 비슷한 결과로 나타났다.

6. 기질의 분해

서리태 분말에 대조구로써 무처리 서리태 구, *B. amyloliquefaciens* CNL-90과 *B. subtilis* natto가 생산한 효소를 처리하여 10시간 배양 후 탄수화물의 분해도를 HPLC로 분석한 결과는

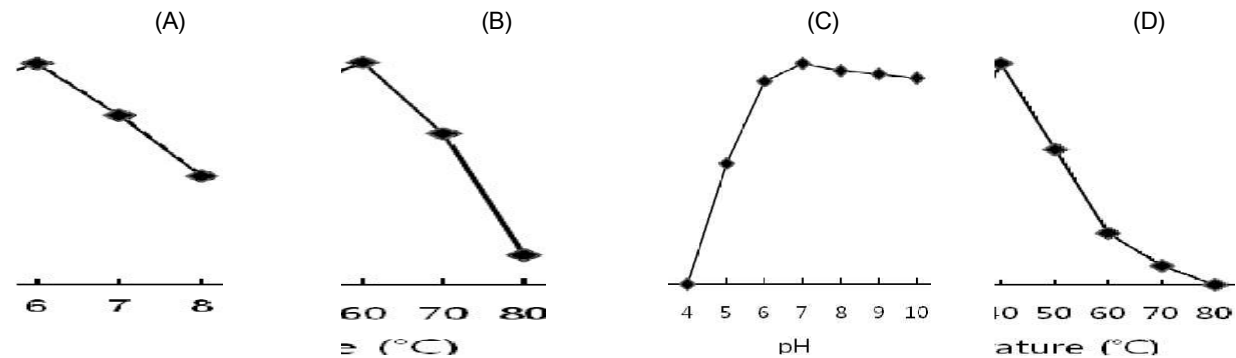


Fig. 3. Effects of the  $\alpha$ -amylase activity produced from *Bacillus amyloliquefaciens* CNL-90. (A) Effects of pH on the  $\alpha$ -amylase activity (B) Effects of temperature on the  $\alpha$ -amylase activity (C) Effects of pH on the  $\alpha$ -amylase activity and stability (D) Effects of temperature on the  $\alpha$ -amylase activity and stability. pH 4~6: Citrate-phosphate buffer; pH 6~8: sodium phosphate buffer; pH 9~10: Glycine-NaOH buffer.

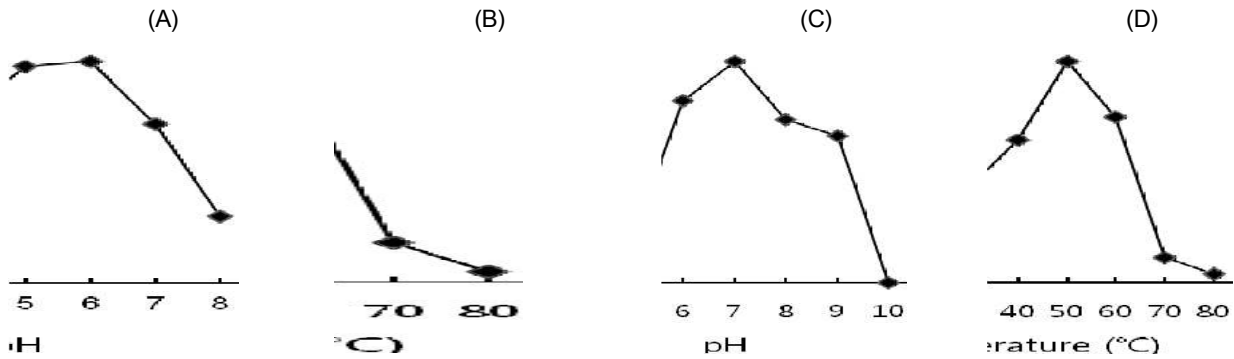


Fig. 4. Effects of the protease activity produced from *Bacillus amyloliquefaciens* CNL-90. (A) Effects of pH on the protease activity (B) Effects of temperature on the protease activity (C) Effects of pH on the protease activity and stability (D) Effects of temperature on the protease activity and stability. pH 4~6 : Citrate-phosphate buffer; pH 6~8 : sodium phosphate buffer; pH 9~10 : Glycine-NaOH buffer.

Table 5에 나타난 바와 같다. 무처리구는 탄수화물의 stachylose는 3.6%였으나 *B. amyloliquefaciens* CNL-90 효소 처리구는 1.21%로 약 3배 감소한 것으로 나타났고, sucrose도 무처리구 1.11%에 비해서 *B. amyloliquefaciens* CNL-90 효소 처리구가 0.36%로 3배 정도 감소하였다. Glucose는 무처리구가 0.19%이었으나 *B. amyloliquefaciens* CNL-90 효소 처리구는 0.32%로 증가된 것으로 나타나 다당류가 분해되어 단당류인 glucose 함량이 증가한 것으로 확인되었다. 이는 효소제제로 이용하는 *B. subtilis* natto 균주와 비교하였을 때 비슷한 결과가 나타나 *B. amyloliquefaciens* CNL-90이 분비하는 효소를 생균제제로 이용할 수 있다고 판단된다.

7. 사료 요구율 개선

사료 요구율 개선 효과는 Table 6에 나타난 바와 같이 시험기간은 15일로 *B. amyloliquefaciens* CNL-90 발효물 0.2%를 사료에 첨가해서 급여한 후 증체량을 나타낸 것이다. 생후 3주 때 이유한 자돈의 시험 시작 당시 체중은 11.8 kg/두 이었다. 대조구 11.5 kg, *B. amyloliquefaciens* CNL-90 발효물 첨가구 11.8 kg으로 15일 후 사양시험 종료 시 체중이 대조구 18.3 kg, *B.*

*amyloliquefaciens* CNL-90 발효물 첨가구 19.1 kg으로 대조구에 비해 증체량이 4.37% 증가하였다. 두당 사료섭취량은 대조구는 664 g, *B. amyloliquefaciens* CNL-90 발효물 첨가구 692 g으로 *B. amyloliquefaciens* CNL-90 발효물 첨가구가 28 g을 많이 섭취하였다. 일당 증체량은 대조구는 450 g, *B. amyloliquefaciens* CNL-90 발효물 첨가구가 480 g으로 *B. amyloliquefaciens* CNL-90 발효물 첨가구가 6.66% 높았다. 사료 요구율은 대조구가 1.47인데 비해서 *B. amyloliquefaciens* CNL-90 발효물 첨가구는 1.42로 *B. amyloliquefaciens* CNL-90 발효물 첨가구가 사료 요구율이 더 우수한 것으로 나타났다. 따라서 *B. amyloliquefaciens* CNL-90 발효물 첨가 사료가 자돈의 증체를 개선 효과가 높은 것으로 나타났다.

Na 등 (2008)은 발효초유사료 0.5% 급여를 자돈에 한 결과 급여구가 대조구에 비해 증체율이 16.73% 증가하였고, 1일 증체량은 대조구에 비해 84.56 g 높은 것으로 보고하였다. 또한 Bae 등 (2008)은 *Enterococcus faecium* KHM-11을 이용한 요구르트 급여가 자돈의 성장에 미치는 영향에 관한 보고에서 0.5% 요구르트 급여구가 대조구에 비해 증체율이 21.67% 증가한 것으로 보고하였다. 이와 같이 *Bacillus* 균 또는 유산균 배양물 첨가 사료 급여가 가축의 증체를 향상에 영향을 미치는 것을 확인 할 수 있었다.

Table 5. Contents of carbohydrates of hydrolysates of soybean powder by enzyme produced from *Bacillus amyloliquefaciens* CNL-90

|                          | Carbohydrate (%)         |                          |                          |                          |
|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
|                          | Stachylose               | Raffinose                | Sucrose                  | Glucose                  |
| Control                  | 3.60 <sup>a</sup> ± 0.09 | 0.39 <sup>a</sup> ± 0.02 | 1.11 <sup>a</sup> ± 0.10 | 0.19 <sup>b</sup> ± 0.03 |
| <i>B. CNL-90</i>         | 1.21 <sup>b</sup> ± 0.07 | 0.21 <sup>b</sup> ± 0.03 | 0.36 <sup>b</sup> ± 0.03 | 0.32 <sup>a</sup> ± 0.04 |
| <i>B. subtilis natto</i> | 1.18 <sup>b</sup> ± 0.03 | 0.24 <sup>b</sup> ± 0.03 | 0.36 <sup>b</sup> ± 0.06 | 0.31 <sup>a</sup> ± 0.04 |
| *R <sup>2</sup>          | 0.999992                 | 0.98592                  | 0.994698                 | 0.995235                 |

\* Correlation coefficients between amount and area in standard calibration of organic acids by HPLC.

Data are indicated as mean ± S.E.M. of the result obtained from 3 independent experiments (p<0.05).

<sup>a,b</sup> Means with the different letter in same column are significantly different by Duncan's multiple range test (p<0.05).

Table 6. Growth rate after intake of fermented products from *Bacillus amyloliquefaciens* CNL-90 in piglet during 15 days

| Item                                    | Control      | <i>B. CNL-90</i><br>(0.2%) |
|---|--------------|----------------------------|
| No. of pigs                             | 64           | 63                         |
| Starting average body weight (kg)       | 11.5         | 11.8                       |
| Final average body weight (kg)          | 18.3         | 19.1                       |
| Feeding feed (g)/pig                    | 664.0        | 692.0                      |
| Gain weight (g)/day/pig <sup>1)</sup> * | 450.0 ± 17.5 | 489.0 ± 13.6               |
| Improvement (%)                         | 0            | 6.66                       |
| Feeding demand                          | 1.47         | 1.42                       |

<sup>1)</sup> Mean ± S.D., \* p<0.05.

이와 같이 *B. amyloliquefaciens* CNL-90이 생산하는 단백질을 분해 효소와 전분 분해효소는 식품산업 및 가축사료 산업에 크게 기여할 수 있을 것으로 사료된다.

### 요 약

*Bacillus* 균주가 생산하는 효소를 식품과 동물사료 첨가제로 이용하기 위해서 맥아로부터 단백질을 분해능력과 전분 분해능력이 우수한 균주를 분리 동정하여 *Bacillus amyloliquefaciens* CNL-90으로 명명하였다. 분리된 *B. amyloliquefaciens* CNL-90이 생산하는  $\alpha$ -amylase의 안정성은 pH는 7, 온도는 40°C, protease의 경우는 pH가 7, 온도는 50°C에서 안정했다. *B. amyloliquefaciens* CNL-90을 밀기울에 접종하여 고체 배양한 결과  $\alpha$ -amylases의 효소활성은 6일 배양 후 290,000 unit/kg이었고, protease의 효소활성은 310,000 unit/kg으로 나타났다. 밀기울에 고체 배양한 생균수는 배양 6일 후에는  $2.2 \times 10^9$  CFU/g으로 높았다. 사료 요구율 개선은 *B. amyloliquefaciens* CNL-90 배양액 0.2% 첨가구가 대조구에 비해서 일당 증체량은 6.66% 높았고, 사료 요구율은 0.05% 효과가 있었다. 이러한 결과는 *B. amyloliquefaciens* CNL-90이 생산하는 단백질을 분해효소와 전분 분해효소는 식품산업 및 가축사료 첨가제 산업에 응용할 수 있는 가능성을 확인하였다.  
(주제어 :  $\alpha$ -아밀레이즈, 프로테이즈, 효소활성, 자돈, 성장율)

### 인 용 문 헌

Ahn, Y-S., Kim, Y-S. and Shin, D-H. 2006. Isolation, identification, and fermentation characteristics of *bacillus* sp. with high protease activity from traditional Cheonggukjang. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 38:82-87.  
Bae, H. C., Lee, J-Y. and Nam, M. S. 2008. Effect of feeding yogurt using *Enterococcus faecium* KHM-11 on the growth in

piglet. *Kor. J. Food Sci. Ani. Resour.* 28:204-210.  
Bano, S., Qader, S. A. U., Aman, A., Syed, M. N. and Azhar, A. 2011. Purification and characterization of novel  $\alpha$ -amylase from *Bacillus subtilis*. *KIBGE HAS.* 12:255-261.  
Felsenstein, J. 1993. PHYLIP: Phylogenetic Inference Package, version 3.5. Seattle: University of Washington.  
Godfrey, T. and Reichelt, J. 1983. *Industrial enzymology : The application of enzyme in industry.* The Nature,s Press Co., Mercer, U.S.A. pp127-172.  
Kim, H-K., Kim, K-H., Lee, J-K., Kim, Y-O., Nam, H-S. and Oh, T-K. 1995. Characterization of thermostable protease from thermophilic *Bacillus amyloliquefaciens* NS 15-4. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 23:322-328.  
Kim, H. S., Lee, K-S., So, J. H., Lee, M-S., Choi, J. H. and Yoon, K-H. 2004. Characterization of extracellular  $\alpha$ -galactosidase produced by *Bacillus lincheniformis* YB-42. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 32:128-134.  
Kunitz, M. 1947. Crystalline soybean trypsin inhibitor. II. General properties. *J. Gen Physiol.* 30:291-297.  
Lee, W. S., Lee, B. K., Kim, J. Y., Kim, J. S., Lee, S. Y., Oh, S. T., Ahn, B. K., Hwang, Y. B., Sim, S. K., Kim, D. G. and Kang, C. W. 2010. Effects of three strains of *bacillus subtilis* supplemented to diets on egg quality, intestinal microflora and tibia in the late stage of laying hens. *J. Anim. Sci. Techno.* 52:389-398.  
Murray, R. G. E., Brenner, D. J., Bryant, M. P., Holt, J. G., Kreig, N. R., Moulder, J. W., Pfenning, N., Sneath, P. H. A. and Staley, J. T. 1986. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* 2:1104-1139.  
Na, S. H., Choi, S. H., Renchinthand, G., Bae, H. C. and Nam, M. S. 2008. Effects of feeding fermented colostrum feed on the growth to piglets. *Kor. J. Food Sci. Ani. Resour.* 28:355-362.  
Oh, S-H. 2004. Trends in the market of the industrial enzyme. *Food Industrial and nutrition.* 9:10-17.  
Park, C-S., Min, D-K., Ahn, Y-S., Lee, J., Hong, S-K., Kim, J-H. and Kang, D-K. 2002. Isolation and characterization of soy protein-degrading strain, *Bacillus subtilis* EB464. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 30:210-215.  
Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S. and Despande, V. V. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial protease. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 597-635.  
김광호, 노승배, 심우만, 안용근, 오문현, 최우영. 1992. *생화학 실험.* 양서각. 서울. pp 91-94.  
(Received Jan. 30, 2012; Revised Apr. 24, 2012; Accepted Apr. 24, 2012)