

## (S7-B)

### *Bacillus licheniformis*의 내열성 $\alpha$ -amylase 및 maltogenic amylase 유전자의 분리와 그 효소 특성

김 인 철  
서울대학교 농과대학 식품공학과

#### 서 론

$\alpha$ -amylase [ $\alpha$ -1,4-D-glucan glucanohydrolase, EC 3.2.1.1, endo-amylase]는 동,식물을 비롯하여 미생물에 이르기까지 널리 분포되어 있으며, amylose, amylopectin 그리고 glycogen 등과 같은 다당류내에 존재하는  $\alpha$ -1,4-glycosidic 결합을 가수분해하며, 전분의 액화 공정에 필수적으로 사용되는 효소이다.

$\alpha$ -amylase의 catalytic 작용은  $\alpha$ -1,4-glycosidic 결합에 aspartic acid 등의 carboxylated anion이 nucleophile로, histidine의 imidazolium cation이 electrophile로 작용함으로써 이루어지는데 Matsuura 등(7)은 Taka-amylase A의 X-ray crystallographic 분석을 통하여 Taka-amylase의 활성 부위(active center)에는 His-210과 Asp-297이 관여하며, 기질 결합 부위(substrate binding site)로는 His-122, His-296 및 Asp-297이 관련되어 있다고 보고하였다.

최근들어 전분을 분해하여 특수한 oligosaccharide만을 선택적으로 생산하는 새로운 amylase가 발견되기 시작하면서 효소를 이용한 oligosaccharide의 생산이 관심거리가 되고 있는데 Takasaki(16)는 maltose를 주로 생산하는 amylase를 발견하여 보고하기도 하였다.

Debranching enzyme은 전분이나 amylopectin에 존재하는  $\alpha$ -1,6-glycosidic linkage를 분해하는 효소로 고등식물이나 미생물에 존재하고 있다. Isoamylase, pullulanase 및 amylo-1, 6-glucosidase(10) 등이 이 부류에 속하며 이 효소를 이용하면 전분의 당화율을 높힐 수가 있어 전분 공업에서 내열성  $\alpha$ -amylase와 함께 널리 이용되고 있다.

Pullulan은 maltotriose가  $\alpha$ -1,6-glycosidic linkage로 연결된 polymer로써  $\alpha$ -amylase나  $\beta$ -amylase 등의 효소로는 분해되지 않고, pullulanase, isopullulanase 그리고 neopullulanase에 의해서 분해되어 특정한 반응물을 생산한다. pullulanase는 1961년 Bender 등(1)에 의해

*Klebsiella aerogenes*로부터 발견된 효소로써 pullulan의  $\alpha$ -1,6-glycosidic linkage를 분해하여 maltotriose를 생산하며, Isopullulanase(11)는 pullulan에 작용하여  $\alpha$ -1,4-glycosidic linkage를 분해하여 isopanose를 생산하며, 최근에 알려지기 시작한 neopullulanase(16)는  $\alpha$ -1,4-glycosidic linkage에 작용하나 isopullulanase와는 작용부위가 달라 panose만을 생성한다고 최근에 보고되고 있다.

Amylo-1,6-glucosidase는  $\alpha$ -1,6-glycosidic linkage를 가수분해 할 뿐만 아니라 축합 또는 당전이작용을 하고있어 새로운 linkage를 합성하는 것이 발견되었다. 또한 당전이작용을 가진 amylase도 다수 보고되고 있다(2,8). David 등(2)은 *Bacillus megaterium*으로부터 새로운 형태의 amylase를 발견하고 cloning에 성공하였다. 이효소는 전분에 작용하여  $\alpha$ -1,4- 및  $\alpha$ -1,6-glycosidic linkage를 분해하여 당화 공정시 glucoamylase와 함께 사용할 경우 당화수율이 0.5-0.7% 상승하였다고 보고하고 있으며 또한 glucose 존재하에 pullulan을 가수분해시키면 당전이작용을 하는데 glucose를 panose에 전이시키어  $\alpha$ -1,4-glycosidic linkage가 생성된다고 보고하고 있다.

Isopullulanase나 neopullulanase가 pullulan에 작용하여 생기는 isopanose나 panose는 분지(branched)된 상태이므로 이들은 식품을 비롯한 여러 산업에 유용하게 사용될 수 있는데 이들 분지 올리고당은 전분액에 비하여 점도가 낮고, 저감미도이며, 낮은 수분 활성도를 가지고 있을 뿐만 아니라 장내 세균인 *Bifidus*균의 growth factor로 작용하는 것으로 알려져 있다(3,5).

따라서 본고에서는 *B. licheniformis*로부터 내열성  $\alpha$ -amylase 및 maltogenic amylase를 coding하는 유전자를 분리하여 분자수준에서의 특성을 파악하고 그 효소 특성을 규명함과 아울러, 내열성  $\alpha$ -amylase와 새로운 형질의 amylase의 산업적 측면에서의 이용 가능성에 대하여 연구한것을 보고하는 바이다.

## 본 론

### 1. 내열성 $\alpha$ -amylase 및 Maltogenic amylase 유전자의 cloning

내열성  $\alpha$ -amylase의 생산 균주인 *B. licheniformis*에서 효소적 특성이 다른 내열성  $\alpha$ -amylase와 maltogenic amylase를 code하는 두개의 유전자를 분리하였으며, 각 유전자에 의해 생산되는 amylase의 효소적 특성을 조사하였다. *E. coli* HB101과 pBR322를 숙주세포와 vector로 각각 사용하여 *B. licheniformis*에서 내열성  $\alpha$ -amylase와 maltogenic-amylase를 code하는 유전자를 분리하여 각각의 재조합체 DNA를 pTA322와 pIJ322로 명명하였다(Fig.1).

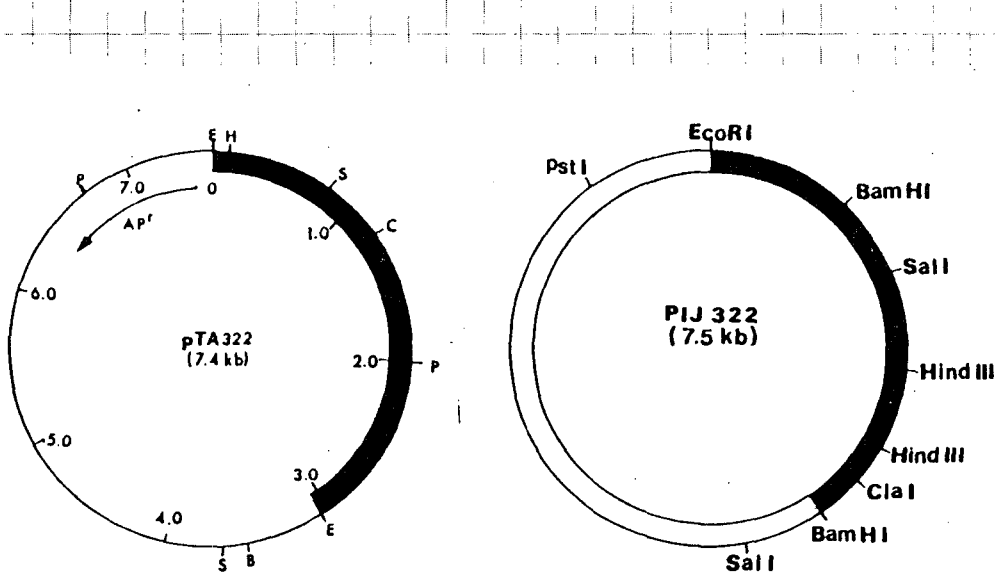


Figure 1. Restriction map of pTA32 and pIJ322

## 2. 형질전환체에서 생산된 amylase의 특성

내열성  $\alpha$ -amylase의 유전자는 *B. licheniformis* 염색체의 3.1kb에 이르는 EcoRI DNA 단편에 존재하였다. 형질전환체에서 얻은  $\alpha$ -amylase의 최적 온도와 pH는 각각 70° C 및 pH 6-9 이었고 5mM의 Ca<sup>++</sup> 이온 존재시 최적 온도가 90° C로 상승하였으며, 모균주에서 얻은 효소와 동일한 특성을 나타내었다. 이 효소의 분자량은 55,000, 등전점은 7.2였다.

Maltogenic amylase의 유전자는 *B. licheniformis* 염색체의 2.5kb EcoRI/HindIII DNA 단편에 존재하였으며, 이 유전자에서 발현된 효소는 최적 온도가 50° C, 최적 pH는 7이었다. 이 효소는 전분과 cyclodextrin에서는 주로 maltose를, pullulan에서는 panose만을 생산하였다. 이 효소의 분자량은 약 64,000이었고 등전점은 5.4였다(Table 1).

Table 1. Comparison of substrate specificity between thermostable  $\alpha$ -amylase and BLA.

	Thermostable $\alpha$ -amylase	BLA
Soluble starch	+ + +	+ +
Pullulan	-	+ + +
$\alpha$ -cyclodextrin	-	+ + +
$\beta$ -cyclodextrin	-	+ + +
$\gamma$ -cyclodextrin	-	+ + +
major product	G <sub>6</sub> , G <sub>7</sub>	G <sub>2</sub> , panose
Thermostability	stable	labile

Maltogenic amylase는 amyolytic property 이외에도 당 전이 작용을 보여주는 데 이는 기질을 분해하여 생긴 glucose나 maltose등의 소 당류를, 기질을 분해하면서 비 환원성 말단에 전이시키는 것으로써, maltogenic amylase는 glucose 또는 maltose unit를 acceptor에  $\alpha$ -(1-6)-glycosidic linkage로 전이시킨다(19). Amyolytic enzyme의 transglucosylation은 David등(2)이 *Bacillus megaterium*으로 부터 효소를 분리하여 보고한 바 있는데 이 *B. megaterium* amylase는 새로운  $\alpha$ -(1-4)-glycosidic linkage를 형성하여 당 전이를 시키나 maltogenic amylase는

분류번호 제목

$\alpha$ -(1-6)-glycosidic bond를 형성하기 때문에 생성되는 당 전이물은 분지된 형태 (branched form)를 가지게 된다. 이상의 결과를 Table 2에 표시하였다.

Table 2. Action of various amylolytic enzymes.

	starch	cyclo-dextrin	pullulan		transglycosylation	reference
			$\alpha$ -1,4-	$\alpha$ -1,6-		
Maltogenic amylase	+	+++	++	-	+	this work
<i>B. thermoamylolique-faciens</i> $\alpha$ -amylase	++	+++		+	-	12
<i>Thermoactinomyces vulgaris</i> $\alpha$ -amylase	++	?	++	+	-	18
<i>B. stearothermophilus</i> neopullulanase	+	+	++	+	-	13,15
CGTase	+	+		-	+	4
<i>B. megaterium</i> amylase	+	+	+	-	+	2

### 3. 내열성 $\alpha$ -amylase 및 Maltogenic amylase 유전자의 DNA 염기 서열 결정

내열성  $\alpha$ -amylase 유전자의 DNA 염기서열을 결정한 결과 이 유전자는 1,536bp의 open reading frame(ORF)으로 구성되어 512개의 아미노산을 code하며, start codon과 stop codon은 각각 ATG와 TAG였다. start codon으로부터 11bp 윗쪽에 Shine-Dalgarno sequence로 추정되는 GAAAGG의 배열이 있었고, 예상 promoter(-35와 -10 부위)의 염기 서열은 TTGTTA와 ATACAA였다. 이 효소는 N-terminal에 signal peptide로 추정되는 29개의 아미노산을 가지고 있으며 가공후 완성된 효소는 483개의 아미노산으로 추정되며 분자량은 55,200으로 SDS-PAGE의 결과와 일치하였다. 그러나 형질전환체에서 발현된 내열성  $\alpha$ -amylase의 세포내의 분포는 cytoplasm내와 밖에 각각 65%와 35%였다. 내열성  $\alpha$ -amylase 유전자의 G+C함량은 47.46 mol%, 세번째 codon의 G+C 함량은 53.41 mol%였다.

Maltogenic amylase의 유전자는 1734bp의 ORF으로 존재하며, 578개의 아미노

산을 code하며 start codon과 stop codon은 각각 ATG와 TAG였다. start codon으로부터 2bp 위쪽에 SD sequence로 추정되는 AAAGGGGAA 배열이 있었고, 예상 promoter(-35와 -10)는 GTTAACA와 TGATAAT였다. DNA 염기서열로부터 아미노산 서열을 추정하여 타 효소와의 아미노산 상동성을 비교하여 3개의 상동부위를 발견하였으며 특히 이 부위들은 *B. stearothermophilus* neopullulanase와 유사하였다 (Table 3).

Table 3. Comparison of amino acid sequence in the conserved regions.

	Region 1	Region 2	Region 3	Region 4	reference
consensus	ⒹⒶ⒱ⒾⓃⓂⓂ	ⒼⒻⒼⒼⒾⒹⒶⒶⓀⓂ	Ⓔ⒱ⒾⓂ	Ⓕ⒱ⒹⓃⓂⓂ	
thermostable α-amylase	129D V V I N H	G F R L D A V K H	D Y W Q	F V D N H D	this work
maltogenic amylase	237D A V F N H	G V W M W Q M K L	E I W H	L L D S H E	this work
neopullulanase	240D A V F N H	G W R L D V A N E	E I W H	L L G S H D	17
pullulanase	281D V V Y N H	G F R F D L M G I	E G W D	Y V E S H D	9
CGTase	160D F A D N H	G I R V D A V K H	E Y H Q	F I D N H D	14

#### 4. 내열성 α-amylase와 maltogenic-amylase를 이용한 분지 올리고당의 제조

내열성 α-amylase의 유전자를 maltogenic amylase의 유전자가 들어있는 pIJ322에 삽입하여 새로운 재조합체 DNA인 pTMA322를 재조합하였다. pTMA322가 형질 전환된 대장균으로부터 두개의 유전자가 동시에 발현되어 각각의 효소적 특성을 지니고 있음을 확인하였고, 두 효소를 40° C에서 24시간 15% 전분액에 작용시켜 높은 수율(50% 이상)의 분지 올리고당(branched oligosaccharide)을 제조할 수 있었다(Table 3).

Table 4. Comparison of sugar compositions of ' Alo mixture ' syrups.

DP*	sugar	content(%)	
		on marketing	this work
1	glucose	40.5	10.0
2	maltose	6.7	20.5
	isomaltose	16.9	
	others**	4.7	
3.	maltotriose	0.8	10.8
	panose	12.5	9.2
	isomaltotriose	3.4	
	other**	2.3	
4.	maltotetrose		7.2
	Anomously linked tetraoligomers**	8.9	13.9
5.	Anomously linked pentaoligomers**	3.3	21.9
	Others		6.5

\* Degree of polymerization.

\*\* The structure(s), not determined.

## 결 론

일반적으로 *B. licheniformis*는 내열성  $\alpha$ -amylase를 생산하기 위하여 7일간 배양하기 때문에 효소의 생산 기일이 장기간이고, 생산이 낮으므로 이를 개선하기 위하여 *B. licheniformis*의  $\alpha$ -amylase유전자를 *E. coli*에 형질 전환시켰다. 형질 전환된 대장균은 37° C에서 10시간 배양으로도 모균주보다 100배 이상의 생산성의 향상을 가져왔다. 그러나 포도당 제조 공정에서는 액화 공정에서  $\alpha$ -amylase는 알칼리에서 작용하며 당화공정에서는 glucoamylase가 pH 5근처의 산성에서 작용하기 때문에 공정중에 pH를 조절해야 한다. 따라서 결정된 DNA 염기서열을 기초로하여 site-directed mutagenesis 등의 방법으로 효소의 특성을 개선하여 산성 범위에서도 안정하게 작용할 수 있도록 하는것이 바람직하다.

Maltogenic amylase는 고온성균에서 분리된 유전자에 coding된 효소이지만 최적 온도가 50° C로 다른 고온성균에서 분리된 효소에 비하여 상대적으로 열안정성이 낮다. 이는 이 효소가 균체 밖에서보다는 균체 내에 미량 존재하며 당 전이능에 의한 균의 building block을 만드는데 이용되기 때문이라 생각된다. 또한 maltogenic amylase는 여러 기질을 분해하는데 본 효소와 가장 유사한 작용을 보이는 것으로는 *B. stearothermophilus*에서 분리된 neopullulanase로서 전분과 pullulan을 분해하고, pullulan의 분해산물이 panose인것이 maltogenic amylase와 가장 유사한점이나 neopullulanase는  $\alpha$ -1,4-뿐 아니라  $\alpha$ -1,6-glycosidic bond도 분해하는 반면 maltogenic amylase는  $\alpha$ -1,6-glycosidic bond는 분해하지 못하며 당 전이능을 보여주고 있다. 이들은 유사한 작용을 하는 전분 분해 효소이면서도 각각의 작용 형태가 조금씩 다른 양상을 보여주고 있으며 이를 분자 수준에서 이해하는 것은 매우 흥미로운 일이다. DNA 염기서열을 결정하여 각 효소의 아미노산의 conserved region의 상동성을 비교한 결과 일반적으로 알려진 4개의 상동 부위 중 두번째 부위를 제외한 세개의 상동부위를 발견할 수 있었고 이중 첫번째 부위는  $\alpha$ -amylase와 다른 점이 없었으나 나머지 부위는 거의 일치하지 않았다. 그러나 세번째와 네번째 부위는 neopullulanase와 매우 유사한 아미노산 배열을 이루는 것으로 보아, 이 두 부위가 pullulan의  $\alpha$ -1,4-glycosidic bond를 분해하는 것으로 추정된다. 그리고 neopullulanase와도 일치하지 않는 두번째 부위가 당 전이능과 관계가 있는 부분이라고 추정할 수 있다.

또한 내열성  $\alpha$ -amylase와 maltogenic amylase를 이용하여 분지 올리고당을 제조하는 1단계 공정을 개발하였으나 반응 온도가 40° C로 고온에서 작용시킬 경우보다 효소 반응 속도가 저하되며 미생물이 오염될 가능성이 있으므로 maltogenic amylase의 최적 온도가 상승되면 더 좋은 결과를 얻을 수 있을것으로 생각된다.



내열성  $\alpha$ -amylase의 효소 특성의 개선이나 maltogenic amylase의 당 전이 작용 및 pullulan의  $\alpha$ -1,4-glycosidic bond의 분해 작용에 관여하는 인자를 확인하고 또한 효소의 특성을 개선하기 위하여는 mutagenesis등의 연구가 더 진행되어야 할 것으로 생각된다.

Molecular Cloning of Thermostable  $\alpha$ -Amylase and Maltogenic Amylase Genes from *Bacillus licheniformis* and Characterization of their Enzymatic Properties.

Kim, In-Cheol

Abstract

The genes encoding the thermostable  $\alpha$ -amylase and maltogenic amylase from *Bacillus licheniformis* were cloned and expressed in *E. coli*. The recombinant plasmid pTA322 was found to contain a 3.1kb EcoRI genomic DNA fragment of the thermostable  $\alpha$ -amylase. The cloned  $\alpha$ -amylase was compared with the *B. licheniformis* native  $\alpha$ -amylase. Both  $\alpha$ -amylases have the same optimal temperature of 70°C and are stable in the pH range of 6 and 9. The complete nucleotide sequences of the thermostable  $\alpha$ -amylase gene were determined. It was composed of one open reading frame of 1,536 bp. Start and stop codons are ATG and TAG. From the amino acid sequence deduced from the nucleotide sequence, the cloned thermostable  $\alpha$ -amylase is composed of 483 amino acid residues and its molecular weight is 55,200 daltons. The content of guanine and cytosine is 47.46mol% and that of third base codon was 53.41mol%. The recombinant plasmid, pIJ322 encoding the maltogenic amylase contains a 3.5kb EcoRI-BamHI genomic DNA fragment. The optimal reaction temperature and pH of the maltogenic amylase were 50° C and 7, respectively. The maltogenic amylase was capable of hydrolysing pullulan, starch and cyclodextrin to produce maltose from starch and panose from pullulan. The maltogenic amylase also showed the transferring activity. The maltogenic amylase gene is composed of one open reading frame of 1,734 bp. Start and stop codons are ATG and TAG. At 2bp upstream from start codon, the nucleotide sequence AAAGGGGAA seems to be the ribosome-binding site(RBS, Shine-Dalgarno sequence). A putative promoter(-35 and-10 regions) was found to be GTTAACA and TGATAAT. From deduced amino acid sequence from

the nucleotide sequence, this enzyme was composed of 578 amino acid residues and its molecular weight was 77,233 daltons. The content of guanine and cytosine was 48.1mol%. The new recombinant plasmid, pTMA322 constructed by inserting the thermostable  $\alpha$ -amylase gene in the EcoRI site of pIJ322 to produce both the thermostable  $\alpha$ -amylase and the maltogenic amylase were expressed in the *E. coli*. The two enzymes expressed from *E. coli* containing pTMA322 was reacted with the 15% starch slurry at 40° C for 24 hours. The distribution of the branched oligosaccharides produced by the single-step process was of the ratio 50:50 between small oligosaccharide up DP<sub>3</sub> and large oligosaccharide above DP<sub>3</sub>.

## 참 고 문 헌

1. Bender, H., and K. Wallenfels. (1961), Untersuchungen an pullulan. II. Spezifischer abbau durch ein basterielles enzyme. *Biochem. Z.*, 334:79-95
2. David M.H., H. Gunter and H. Roper (1897), Catalytic Properties of *Bacillus megaterium* Amylase, *Starch*, 39:436-440
3. Hidemasa, H., T. Eida, T. Takizawa (1986), Effects of Fructooligosaccharides on Intestinal Flora and Human Health, *Bifidobacteria Microflora*, 5:37-50
4. John, C.R. (1985), Conserved amino acid Sequence Domains in Alpha-amylases from plant, mammals, and Bacteria. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 128:470-478
5. Kouhei, Y. and Z. Tamura (1982), Search for Sugar Source for Selective Increase of Bifidobacteria, *Bifidobac. Microflora*, 1:39-44
6. Kuriki, T., J.H. Park, S. Okada, and T. Imanaka (1988), Purification and Characterization of Thermostable Pullulanase from *Bacillus stearothermophilus* and Molecular Cloning and Expression of the Gene in *Bacillus subtilis*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 54:2881-2883
7. Matsuura, Y., M. Kusunoki, W. Harada, and M. Kakudo. (1984), Structure and possible catalytic residues of Taka-amylase. *J. Biochem.*, 95:697-702
8. Matsumoto, A., and K. Matsuda. (1983), Role of Branching Enzyme in Glycogen Biosynthesis in *Neurospora crassa* *J. Japan Soc. Starch Sci.*, 30:212-222
9. Nakajima, R., T. Imanaka, and S. Aiba. (1985), Nucleotide sequence of the *Bacillus stearothermophilus*  $\alpha$ -amylase gene, *J. Bacteriol.*, 163:401-406
10. Ryoichi, N., T. Imanaka and S. Aiba (1986) Comparison of amino acid Sequence of eleven different  $\alpha$ -Amylase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 23:355-360
11. Sakano, Y., N. Masuda, and T. Kobayashi. (1971), Hydrolysis of Pullulan by a Novel Enzyme from *Aspergillus niger*, *Agric. Biol. Chem.*, 35:971-973
12. Setsuzo T., Y. Iimura, K. Gomi, K. Takahashi, S. Hara, and K. Yoshizawa (1989), Cloning and Nucleotide Sequence of the Genomic Taka-amylase A Gene of *Aspergillus oryzae*, *Agric. Biol. Chem.*, 53:593-599
13. Stephen A.O., J.F. Ollington and D.J. McConnell (1983), Molecular

cloning in *Bacillus subtilis* of a *Bacillus licheniformis* gene encoding a thermostable alpha amylase, *Gene*, 23:267-276

14. Stephens, M.A., S.A. Ortlepp, J.F. Ollington and D.J. McConnell (1984), Nucleotide Sequence of the 5' Region of the *Bacillus licheniformis*  $\alpha$ -Amylase Gene: Comparison with the *B. amyloliquefaciens* Gene, *J. Bacteriol.*, 158:369-372

15. Suzuki, Y., Nagayama, T., Nakana, H. and Oishi, K. (1987) Purification and Characterization of a Maltotriogenic  $\alpha$ -Amylase I and a Maltogenic  $\alpha$ -Amylase II Capable of Cleavage  $\alpha$ -1,6-Bonds in Amylopectin. *Starch*, 39:246-252

16. Takasaki, Y. (1988), Novel Maltose-producing Amylase from *Bacillus Megaterium* G-2 *Agric. Biol. Chem.* 53:341-347

17 Takagi, M., T. Imanaka and S. Aiba (1985) Nucleotide sequence and promoter region for the neutral protease gene from *Bacillus stearothermophilus*. *J. Bacteriol.*, 163:824-831

18. Yoshida, M., K. Oishi, T. Kimura, M. Ogata and T. Nakakuki (1989), Continuous Production of Maltose Using a Dual Immobilized Enzyme System, *Agri. Biol. Chem.* 53:3139-3142

19. 김정렬. 서울대학교 석사 학위 논문, 1991, "*Bacillus licheniformis*에 의한 분지 올리고당의 합성"