

## 재조합 균주 *Bacillus subtilis* LKS88에 의한 *Streptomyces albus* KSM-35 Amylase의 생산 조건

최원진 · 유도진 · 이재우\* · 소명환\*\* · 김영배

고려대학교 생명공학원, \*김천대학 식품영양과, \*\*부천대학 식품영양과

### Production of *Streptomyces albus* KSM-35 Amylase from *Bacillus subtilis* LKS88 Harboring the Recombinant Plasmid pASA240

Won-Jin Choi, Do-Jin Ryu, Jae-Woo Lee\*, Myung-Hwan So\*\*  
and Young-Bae Kim

Graduate School of Biotechnology, Korea University, Seoul 146-701, Korea

\*Dept. of Food and Nutrition, Kimcheon College, Kimcheon 740-200, Korea

\*\*Dept. of Food and Nutrition, Bucheon College, Bucheon 421-735, Korea

#### Abstract

The effects of culture conditions on the production of amylase expressed by *Bacillus subtilis* LKS88 with a cloned gene from *Streptomyces albus* KSM-35 were investigated. The production of amylase was increased significantly by using sodium citrate and rice hull as a carbon source. In addition, the use of a mixture of sodium citrate and rice hull (1:1) resulted in increase of enzyme production by 20-fold when compared to that of soluble starch. The soybean meal as the nitrogen source could be partially replaced with yeast extract without changing the enzyme production yield. The amylase production was also increased by adjusting initial pH to 6.0 or by adding 0.01% SDS. Maximum amylase production was observed in the medium containing 1.5% sodium citrate, 1.5% rice hull, 0.7% soybean meal, 0.3% yeast extract, 0.66%  $K_2HPO_4$ , 0.05%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.008%  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ , 0.01% SDS with initial pH of 6.0. The maximum yield of amylase reached 56.6 U/ml when *B. subtilis* LKS88 (pASA 240) was cultured at 37°C for 36 hr.

Key words : amylase, maltotetraose, *Bacillus subtilis*, *Streptomyces albus*.

#### 서 론

전분을 가수 분해하는 amylase는 일반적으로 작용 형태에 따라  $\alpha$ -amylase (1,4- $\alpha$ -D-glucan 4-glucanohydrolase, EC 3.2.1.1.),  $\beta$ -amylase (1,4- $\alpha$ -D-glucanmaltohydrolase, EC 3.2.1.2.), glucoamylase (1,4- $\alpha$ -D-glucan glucohydrolase, EC 3.2.1.3.) 등으로 구분되어져 있었다<sup>1)</sup>. 그러나 Robyt 등<sup>2)</sup>이 전분을 exo-mechanism으로 가수 분해하여 maltotetraose를 생산하는  $\alpha$ -amylase를 *Pseudomonas stutzeri* (exo-maltotetraohydrolase, EC

3.2.1.60.)로부터 분리한 이래로 새로운 형태의 amylase들이 다수 발견되었으며 이들에 의해서 전분으로부터 maltooligo당을 포함한 특수한 형태의 당의 생산이 가능하게 되었다. Maltooligo당은 *Pseudomonas*<sup>2~4)</sup>, *Streptomyces*<sup>5)</sup> 및 *Bacillus*<sup>6~8)</sup> 속들로부터 분리한 amylase들에 의해 생산되는 당류로 다양한 기능성으로 인해 주목을 받고 있는 식품 소재의 하나이다. Maltooligo당은 설탕에 비해 낮은 감미를 갖고 있어 식품의 품질에 영향을 주지 않고 감미를 줄일 수 있는 장점을 가지고 있다. 또한 보수력과 점도를 증가시켜 물성 개선에 이용될 수 있으며 결정화 방

Corresponding author : Jae Woo Lee

지, 빙점 강하 및 Maillard 반응 감소 등 여러 기능을 가지고 있다<sup>9,10</sup>). 현재 maltose, maltotriose, maltotetraose를 주성분으로 하는 제품들이 개발되어 있어 수요가 증대될 것으로 기대된다.

본 실험실에서는 *Streptomyces albus*<sup>11</sup>) 및 *S. cyanus*<sup>12,13</sup>)로부터 전분 분해 산물로 maltotetraose를 주로 생산하는 amylase를 발견하였으며 이들 효소의 정제 및 효소학적 특성을 조사하였다. 특히, *S. albus* KSM-35의 amylase의 경우 생산량을 증가시키기 위하여 amylase 유전자를 *Bacillus subtilis*에서 발현을 시켰다<sup>14</sup>). 따라서 본 연구는 *S. albus* KSM-35의 amylase 유전자를 *B. subtilis* LKS88에서 발현시킨 균주로부터 효소의 대량 생산을 위하여 미생물의 성장과 효소 생산에 미치는 몇 가지 요인들을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 사용 균주 및 배지

Amylase 생산 균주로 *Streptomyces albus* KSM-35의 amylase 유전자를 *Bacillus subtilis*에 발현시킨 *B. subtilis* LKS88 (pASA240)<sup>14</sup>)을 사용하였다. Amylase 생산을 위한 기본 배지로 1.0% 가용성 전분, 0.5% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.5% yeast extract, 0.05% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.008% CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O를 첨가한 것을 사용하였다. 이때 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>는 따로 살균하여 첨가하였다.

### 2. 시 약

본 실험에서 사용한 sodium citrate는 Junsei Chemical 사 (Japan), 가용성 전분은 Showa 사 (Japan), dinitrosalicylic acid는 Sigma 사 (USA) 및 배지는 Difco 사 (USA)의 제품이었다. 그리고 왕겨는 경기도 남양주군에서 수집하였고, 대두박은 (주) 개미 산업에서 각각 구입하였다. 그 외 시약은 일급 이상의 시약을 사용하였다.

### 3. 조효소액 제조

*B. subtilis* LKS88 (pASA240) 한 colony를 10 μg/ml의 kanamycin이 첨가된 기본 배지에 접종한 후 37°C에서 16시간, 150 rpm의 속도로 진탕 배양시켜 전 배양액을 제조하였다. 준비된 전 배양액을 각 성분이 변형 조절된 배지에 2%를 접종하여 24시간 진탕 배양한 후 원심 분리하여 얻은 상정액을 조효소로 사용하였다.

### 4. 균수 측정

총균수는 Petroff-Hauser bacterial counting chamber를 사용하여 계수하였다. 생균수는 시료를 0.85% 생리적 식염수에서 침전법으로 희석한 후 LB 배지 (1% tryptone, 1% NaCl, 0.5% yeast extract)에 도말하여 37°C에서 24시간 배양하여 나타나는 colony를 계수하였다.

### 5. Amylase 활성 측정

Amylase 활성은 DNS 방법<sup>15</sup>)을 사용하여 다음과 같이 측정하였다. 호화시킨 5% (w/v) 가용성 전분 용액 0.5 ml와 50 mM 인산 완충 용액 (pH 7.0) 0.4 ml를 섞어 50°C 진탕 항온 수조에서 10분간 예열시켰다. 예열 후 0.1 ml의 조효소액을 가해 30분간 반응을 시킨 후 DNS 용액 3 ml를 더하여 반응을 정지시키고 95°C에서 5분간 가열하여 발색시켰다. 분광광도계 (UVICON spectrophotometer, Swiss)를 이용하여 640 nm에서 흡광도를 측정한다. 표준 곡선을 사용하여 환원당의 양을 측정하였다. 대조군으로는 기질-완충액 혼합 용액에 DNS 용액 3 ml를 가한 후 조효소액을 첨가한 것을 사용하였다. 표준 물질로는 맥아당을 사용하였으며 효소 1 U는 분당 1 μmole의 맥아당을 생산할 수 있는 효소의 양으로 정의하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 탄소원의 영향

기본 배지에 여러가지 탄소원을 1% 첨가한 후 amylase의 생산에 미치는 탄소원의 영향을 조사하여 Fig. 1에 나타내었다. 포도당, 맥아당, 텍스트린, 감자 전분 및 옥수수 전분 등 탄수화물의 첨가구들은 대체로 기본 배지에서 사용된 가용성 전분과 비슷한 정도의 효소를 생산하였다. 반면 sodium염 형태로 첨가된 유기산들은 탄수화물을 첨가했을 경우보다 효소 생산량이 많았고 특히, sodium citrate 첨가구는 가용성 전분에 비하여 효소 생산이 10배 이상 증가하였다. 이러한 경향은 유기산에 의해서 amylase의 생산이 증가하는 *B. licheniformis*<sup>16,17</sup>) 및 *B. amyloliquefacience*<sup>18</sup>)의 결과와 유사하였다. 한편 폐자원인 벧짚 및 왕겨 첨가구에서도 7~8배 효소 생산이 증가되었는데 벧짚과 왕겨는 *Bacillus* 속의 주 서식처로서 불용성이지만 균의 생육에 미치는 여러 미지 인자로 인하여 효소 생산의 증가를 초래한 것으로 추정된다.

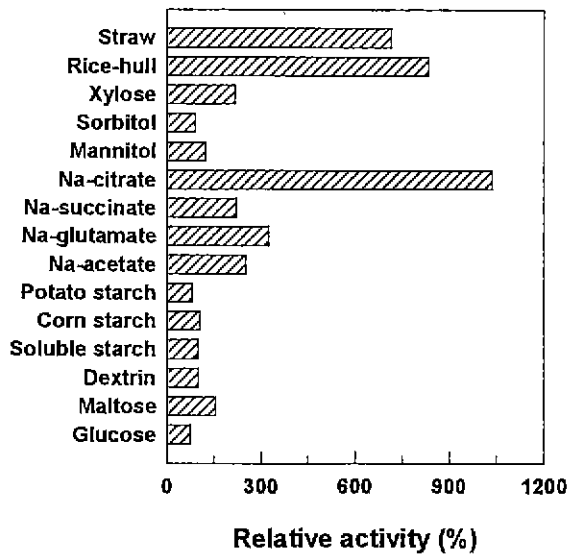


Fig. 1. Effect of carbon sources on amylase production by *B. subtilis* LKS88 (pASA240). Relative activity was measured base on 1% soluble starch.

Amylase 생산량이 높은 sodium citrate와 왕겨를 동량으로 혼합하여 첨가하였을 때 amylase 생산량은 각각을 단독으로 첨가하였을 때보다 효소 활성이 1.5~2배 증가하였다 (Fig. 2). 이들 sodium cit-

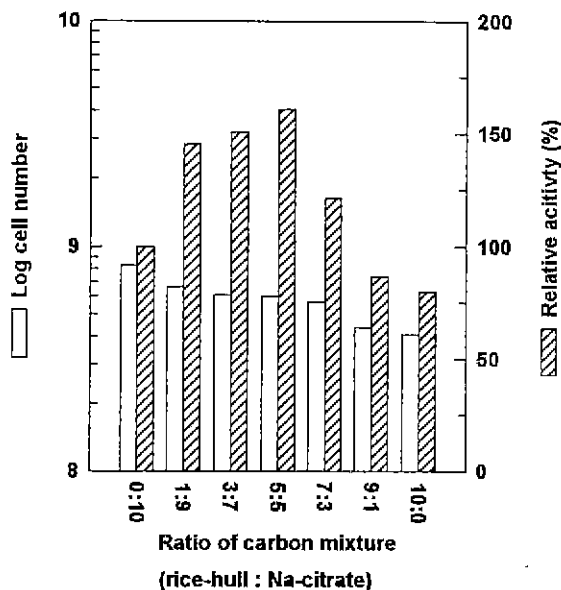


Fig. 2. Effect of the rice hull/Na-citrate on amylase production by *B. subtilis* LKS88 (pASA240). Relative activity was measured based on rice hull:Na-citrate (9:10).

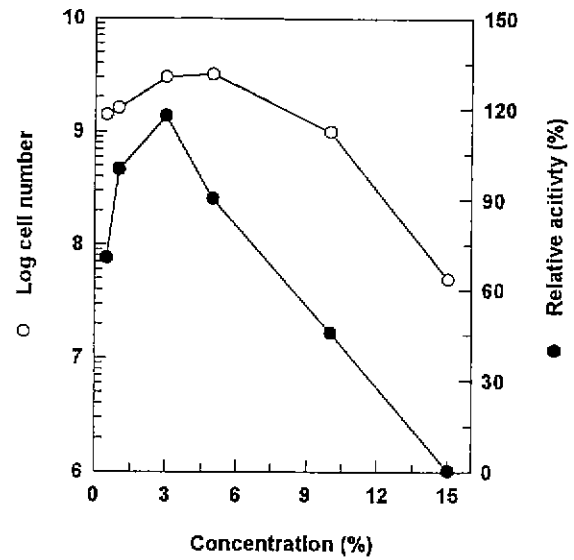


Fig. 3. Effect of carbon mixture concentration on amylase production by *B. subtilis* LKS88 (pASA240). Relative activity was measured based on 1% carbon mixture.

rate와 왕겨 혼합물의 농도는 3%에서 amylase의 생산이 최고치를 기록하였으며 농도의 증가에 따라 감소하여 고농도인 10~15%의 경우에는 효소의 생산 및 균수가 현저히 감소하였다 (Fig. 3). 이는 고농도의 sodium citrate에 의한 균의 생육 저해와 왕겨의 흡수 작용으로 인하여 배양 용액의 감소로 충분한 교환과 통기가 이루어지지 않아 균의 성장 및 효소 생산의 감소가 일어났을 것이라고 추정된다.

2. 질소원의 영향

탄소원으로 결정한 sodium citrate와 왕겨를 각각 1.5% 씩을 포함한 배지에 몇 가지 질소원을 각각 0.5%를 첨가한 후 효소 생산량을 비교하여 Fig. 4에 나타내었다. 대두박 첨가구는 대조구인 ammonium phosphate에 비해 2배 이상의 효소 생산을 나타내었으며 corn steep liquor 및 peptone의 경우도 대조구에 비해 1.7배의 효소 생산을 나타내었다. 한편, potassium nitrate와 urea의 첨가시 대조구보다 효소 생산 및 균 성장이 적었다.

대두박을 질소원으로 하여 기본 배지에 포함된 yeast extract와 혼합 비율을 달리하여 효소 생산에 미치는 영향을 조사한 결과 yeast extract와 대두박은 그 비율이 3 : 7일 때 효소 생산이 가장 많았으며 대조구인 5 : 5일 경우보다 10% 이상 증가하였다

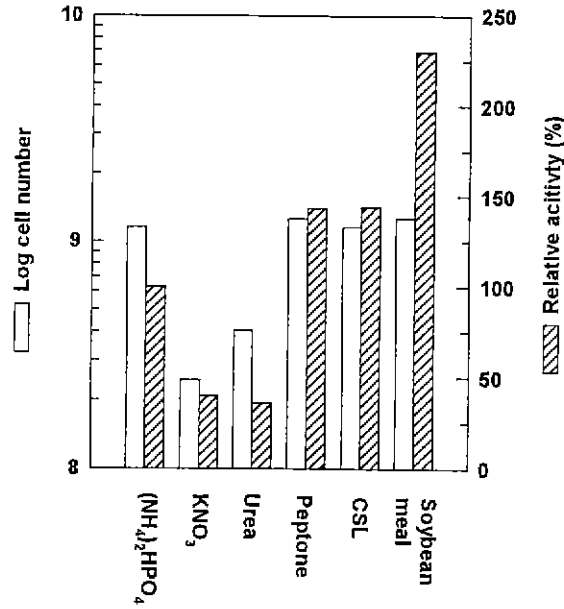


Fig. 4. Effect of nitrogen sources on amylase production by *B. subtilis* LKS88 (pASA240). Relative activity was measured based on 0.5% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.

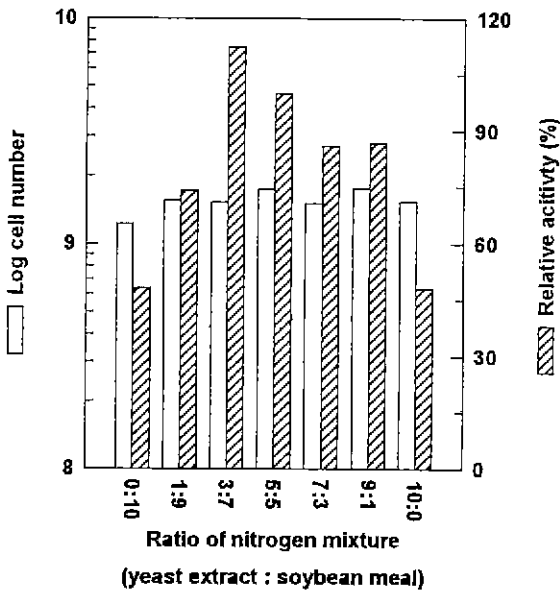


Fig. 5. Effect of yeast extract/soybean meal on amylase production by *B. subtilis* LKS88 (pASA240). Relative activity was measured based on yeast extract:soybean meal (5:5).

(Fig. 5). Yeast extract와 대두박 혼합물의 농도를 달리하여 첨가하였을 때 효소의 생산량은 점차 증가

하다가 1~3%에서 거의 차이가 없었고 그 이상에서는 감소하는 경향을 나타내었다(Fig. 6). 따라서 yeast extract와 대두박의 혼합물 농도는 1%로 결정하였다.

3. 초기 pH의 영향

초기 pH를 각각 5.0에서 9.0까지 조절하여 amylase의 생산을 조사하여 Table 1에 나타내었다. 효소의 생산은 pH 6.0과 pH 7.0에서 가장 높았으며 균의 성장은 이보다 다소 높은 pH 7.0과 pH 8.0에서 우수하였다. 그러나 초기 pH의 변화에도 효소 생산 및 균의 성장의 변화 범위는 20% 이내로 그다지 크지 않았다. 이러한 경향은 Chandra 등<sup>19)</sup>이 보고한 *B. licheniformis*의 amylase 생산과 비슷하였다. 또한, 24시간 배양 후의 pH는 초기 pH 5.0인 실험구를 제외하고는 pH 8.3~8.8을 유지하였다. 본 실험에 사용한 효소는 pH 6.0~9.0 사이에서 안정하며 특히 pH 8.0에서 가장 안정하다고 알려져 있다<sup>20)</sup>. 따라서, 생산된 효소가 배양 중 높아진 pH의 영향으로 불활성화되었을 가능성은 적었을 것이라고 판단된다.

4. 계면활성제의 영향

계면활성제인 SDS, Tween 80 및 Triton X-100의 첨가가 amylase 생산에 미치는 영향을 Table 2

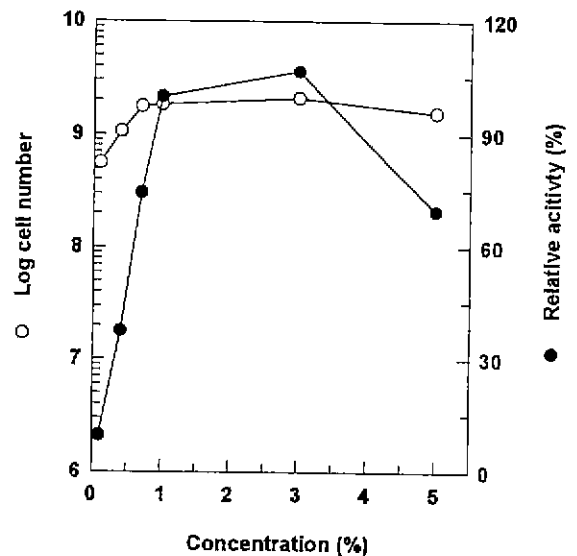


Fig. 6. Effect of nitrogen mixture concentration on amylase production by *B. subtilis* LKS88 (pASA240). Relative activity was measured based on 1% nitrogen source mixture.

**Table 1. Effect of initial pH on amylase production by *B. subtilis* LKS88 (pASA240)**

pH		Total	Relative
Initial	Final	cell number	activity (%)
5.0	7.8	$1.5 \times 10^9$	84.9
6.0	8.3	$1.5 \times 10^9$	100.0
7.0	8.8	$1.6 \times 10^9$	98.1
8.0	8.8	$1.6 \times 10^9$	89.3
9.0	8.6	$1.5 \times 10^9$	87.9

**Table 2. Effect of surfactants on amylase production by *B. subtilis* LKS88 (pASA240)**

Surfactants (%)	Total cell number	Relative activity (%)
None	$2.2 \times 10^9$	100.0
Tween 80		
0.0001	$2.2 \times 10^9$	105.4
0.001	$2.2 \times 10^9$	105.2
0.01	$2.2 \times 10^9$	109.6
Triton X-100		
0.0001	$2.2 \times 10^9$	109.8
0.001	$2.2 \times 10^9$	112.0
0.01	$2.2 \times 10^9$	95.0
SDS		
0.0001	$2.2 \times 10^9$	104.6
0.001	$2.2 \times 10^9$	107.6
0.01	$2.2 \times 10^9$	113.2

에 나타내었다. 모든 시험구들의 24시간 배양 후 균수는 계면활성제를 첨가하지 않은 대조구와 비교할 때 큰 변화가 없었지만 효소의 생산은 계면활성제의 종류나 첨가량에 의해 다소 차이를 보였다. Tween 80은 0.01% 첨가의 경우는 10% 정도 효소 생산이 증가하였고 그의 농도에서도 다소 효소 생산이 증가하였다. Triton X-100은 0.0001%와 0.001%의 농도에서는 대조구에 비하여 효소 생산이 10% 정도 증가하였다. 반면 0.01%에서는 대조구보다 낮은 효소 활성을 나타내었다. SDS는 농도가 증가할수록 효소 생산이 증가하여 0.01%에서는 대조구에 비해 약 13% 증가하였다. 일반적으로, 계면활성제의 효과는 Gram 음성 세균에서 많이 알려져 있는 반면 Gram 양성 세균의 경우에는 많이 보고되어 있지는 않다. 그러나 Chandra 등<sup>19)</sup>은 *B. licheniformis*에서 Tween 80을 0.01% 첨가함으로써 amylase 생산이 증가한다고 보고하였는데 이러한 결과는 Gram 양성균에서도 amylase의 생산에 계면활성제가 영향을 미치는 것으로 판단된다.

5. 최적 배지와 기본 배지에서의 효소 생산의 비교  
 이상의 실험을 통해 설정된 sodium citrate 1.5%, 왕겨 1.5%,  $K_2HPO_4$  0.66%, yeast extract 0.3%, 대두박 0.7%, SDS 0.01% 및 초기 pH를 6.0으로 조절한 최적 배지와 기본 배지에 각각 *B. subtilis* LKS88 (pASA240) 균주를 24시간 배양한 후 효소의 생산과 균수의 변화를 비교하였다(Table 3). 최적 배지에서 효소의 생산은 53.3 U/ml로서 기본 배지의 0.7 U/ml에 비해 76배의 증가를 나타내었다. 이때 총균수는 약 7배의 증가를 나타내었으며, pH는 기본 배지에서 7.2에서 8.0으로 변화하였고 최적 배지에서는 6.0에서 8.5로 변화하였다.

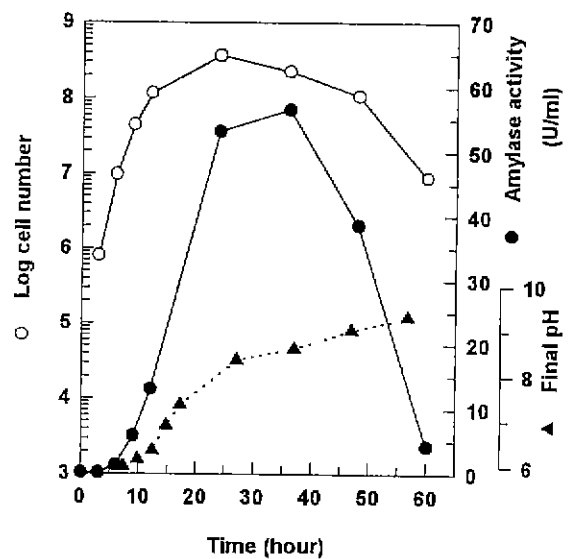
6. 배양 시간에 따른 효소 생산의 변화

최적 배지에서 *B. subtilis* LKS88 (pASA240)을 37°C에서 150 rpm으로 진탕 배양하였을 때 배양 시간에 따른 균수 및 효소 생산량의 변화를 Fig. 7에 나타내었다. 균수는 12시간까지 대수적인 증가를 보이

**Table 3. Comparison of cell growth and amylase production in basal- and optimum medium after 24 hr cultivation**

Media	pH		Total	Enzyme
	Initial	Final	cell number	activity*
Basal	7.2	8.0	$3.0 \times 10^8$	0.7
Optimum	6.0	8.5	$2.2 \times 10^9$	53.3

\* : U/ml



**Fig. 7. Time course of amylase production by *B. subtilis* LKS88 (pASA240).**

고, 이후 정지기로 들어서서 48시간까지  $10^8$  cfu/ml 이상 수준을 유지하였다. Amylase는 대수기 후반에서 생산이 시작되며 9시간 이후에 급격히 증가하였다. 효소의 생산은 36시간에서 최고 생산량을 보이며, 24시간에서 36시간에 걸쳐 높은 효소의 생산이 유지되었다. 이때의 효소의 활성은 56.6 U/ml로 기본 배지에 비하여 80배 정도 효소의 생산량이 증가하였고 pH는 배양 기간 중 점차 증가하여 대수기 후반에는 pH 8.0을 유지하며 배양 후기에는 pH 9.0 이상이 되었다.

## 요 약

*Streptomyces albus* KSM-35의 amylase의 유전자를 *Bacillus subtilis* LKS88에서 발현시킨 균주를 사용하여 amylase의 생산에 미치는 몇가지 요인들을 조사하였다. 본 실험에 사용한 탄소원들중에서 sodium citrate와 왕겨의 효소 생산량이 가장 높았고, 이들을 1:1의 비율로 혼합하여 첨가하였을 때 효소의 생산량은 대조군으로 사용한 가용성 전분에 비하여 20배 이상 증가하였다. 질소원으로 대두박을 사용하였을 경우 yeast extract의 첨가량을 줄이면서 효소의 생산량을 증가시켰다. 배양을 위한 초기 pH를 6.0으로 조절하고 SDS를 0.01% 첨가하였을 때 대조구보다 높은 효소 생산량을 나타내었다. *Bacillus subtilis* LKS88 (pASA240)을 sodium citrate와 왕겨 각각 1.5%,  $K_2HPO_4$  0.66%, yeast extract 0.3%, 대두박 0.7%, SDS 0.01% 및 초기 pH를 6.0으로 조절한 배지에서 37°C에서 배양시 최대 효소 활성은 배양 후 36시간에서 나타났으며 이때 효소 활성은 56.6 U/ml 이었다.

## 감사의 말

본 연구는 과학기술처 G7 연구 과제의 일부 결과로 지원에 대해서 감사를 드립니다.

## 참고문헌

- 정동효 : 효소학 개론. 대광출판사, 서울, p.131~194 (1992).
- Robyt, J.F. and Ackerman, R.J. : Isolation, purification and characterization of maltotetraose producing amylase from *Pseudomonas stutzeri*, *Arch. Biochem. Biophys.*, 145, 105~114(1971).
- Zhou, J., Takano, T. and Kobayashi, S. : Cloning of exo-maltotetraohydrolase gene from *Pseudomonas saccharophila* in *Escherichia coli*, *Agric. Biol. Chem.*, 53, 301~302(1989).
- Shida, O., Takano, T., Takagi, H., Kadowaki, K. and Kobayashi, S. : Cloning and nucleotide sequence of the maltopentaose-forming amylase gene from *Pseudomonas* sp. KO~8940, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56, 76~80(1992).
- Wako, K., Takahashi, C., Hashimoto, S. and Kaneda, J. : Studies on maltotriose- and maltose-forming amylases from *Streptomyces*, *J. Jap. Soc. Starch Sci.*, 25, 155~161(1978).
- Takasaki, Y., Shinohara, H., Tsuruhisa, M., Hayashi, S. and Imada, K. : Maltotetraose-producing amylase from *Bacillus* sp. MG~4, *Agric. Biol. Chem.*, 55, 1715~1720(1991).
- Bourke, A.C.M., Kelly, C.T. and Fogarty, W.M. : A novel maltooligosaccharide producing amylase. *Biochem. Soc. Trans.*, 19, 16s(1991).
- Kim, T.U., Gu, B.G., Jeong, J.Y., Byun, S.M. and Shin, Y.C. : Purification and characterization of a maltotetraose-forming alkaline  $\alpha$ -amylase from an alkalophilic *Bacillus* strain, GM8901, *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 3105~3112(1995).
- 박관화 : 탄수화물 신소재의 개발. *식품과학과 산업*, 25, 73~82(1992).
- Handbook of Amylase and Related Enzymes*, Pergamon Press, Oxford, p.213~215(1988).
- 차진, 김영배, 서병철, 박관화 : *Streptomyces* sp. KSM~35의 특성과 maltotetraose 생산성 아밀라제의 정제, *한국식품과학회지*, 26, 633~637(1994).
- 차진, 이재우, 최경훈, 김영배 : Maltotetraose 생산성 아밀라제를 생산하는 *Streptomyces cyaneus* KSM~386의 특성, *고려대학교 생물공학논집*, 8, 49~53(1996).
- 최경훈, 이재우, 이흥국, 김영배 : *Streptomyces cyaneus* KSM~386의 Maltotetraose 생산성 아밀라제의 특성, *고려대학교 생물공학논집*, 8, 54~59(1996).
- Lee, J.W., Choi, W.J., Rhim, S.L. and Kim, Y.B. : Expression of *Streptomyces albus* KSM~35 amylase with a *Bacillus subtilis* secretion vector, *Foods Biotechnol.*, 5, 358~362(1996).
- Miller, G.M. : Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Anal. Chem.*, 31, 426~428(1959).
- Rothstein, D.M., Devlin, P.E. and Cate, R.L. : Expression of  $\alpha$ -amylase in *Bacillus licheniformis*, *J. Bacteriol.*, 168, 839~842(1986).
- Tonkova, A. : Effect of glucose and citrate on  $\alpha$ -amylase production in *Bacillus licheniformis*, *J. Basic Microbiol.*, 31, 217~221(1991).
- Zhang, Q., Tsukagoshi, N., Miyashiro, S. and Udaka, S. : Increased production of  $\alpha$ -amylase by *Bacillus amyloliquefaciens* in the presence of glycine, *Appl. Environ. Microbiol.*, 46, 293~295(1983).
- Chandra, A.K., Medda, S. and Bhadra, A.K. :

Production of extracellular thermostable  $\alpha$ -amylase from *Bacillus licheniformis*, *J. Ferment. Technol.*, 58, 1~10(1980).

20. 차진 : 자연계로부터 분리한 *Streptomyces* sp. KSM-35

amylase의 정제와 특성, 고려대학교 석사 학위 논문 (1991).

---

(1998년 6월 14일 접수)