

Bacillus circulans F-2 가 生産하는 α -Amylase에 関한 研究

(第 1 報) α -Amylase 의 精製

鄭萬在, 谷口肇,* 丸山芳治*

忠北大學校農科大學農化學科, *東京大學農學部農芸化學科

(1981년 9월 21일 수리)

Studies on α -Amylase of *Bacillus circulans* F-2

(Part I) Purification of α -amylase

Man Jae Chung, Hajime Taniguchi,* Yoshiharu Maruyama*

Dept. of Agricultural Chemistry, College of Agriculture, Chung-Buk University

*Dept. of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Tokyo University

(Received September 21, 1981)

Abstract

1. α -amylase from *B. circulans* F-2 was purified with specific activity 55.0 u/mg. protein (about 23 times of the original specific activity) and the yield of 25.5%, by means of corn starch absorption, salting out with ammonium sulfate (80% saturation), gel filtration on Bio-Gel P-100 and DE-32 column chromatography.

2. The purified enzyme showed two closely migrated protein bands on polyacrylamide disc gel electrophoresis, both of which have amylase activity judging from the activity staining of the gel. On SDS-polyacrylamide disc gel electrophoresis, however, the purified enzyme showed a single band suggesting that those two bands are the charge isomers of an amylase having the slightly different charge.

3. Plot of log mobility of two bands versus polyacrylamide gel concentration according to Hedrick and Smith gave the parallel lines indicating them to be charge isomers.

4. To confirm the action pattern of two enzyme protein bands, each band was separated and was eluted from the gel and eluates were incubated with soluble starch. Oligosaccharide pattern produced by each eluate was examined by paper chromatography. The eluates of two bands showed the same action pattern.

5. The maltohexaose was the only hydrolysis product of soluble starch in the early stage of hydrolysis.

緒 論

糊化澱粉은 Amylase에 의하여 용이하게 分解되지만 生澱粉(澱粉粒)은 一般적으로 分解되기 어렵다. Amylase에 의한 生澱粉의 分解에 關한 研究를 보면 Sandstedt등⁽¹⁾, Schoch등⁽²⁾, Walker등⁽³⁾, 上田

⁽⁴⁾, 久留등⁽⁵⁾, Mizokami등⁽⁶⁾, Fuwa등⁽⁷⁾의 研究가 있을뿐 아직까지 廣範圍하게 研究되어 있지 않는 實情이다.

Amylase에 의하여 가장 分解되기 어려운 生澱粉은 감자 生澱粉으로 알려져 있으며, 現在까지 밝혀진 各種 amylase에 의한 감자 生澱粉의 分解率

은 20%未滿으로 極히 저조한 分解率을 나타내고 있다.^{6,7)}

따라서 筆者들은 特히 감자 생전분의 分解力이 強한 *α-amylase*를 生産하는 *Bacillus circulans* F-2를 選拔하고 이 菌株가 生産하는 *α-amylase*를 精製하였으며, 精製효소의 polyacrylamide disc gel electrophoresis, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide disc gel electrophoresis 및 反應産物의 oligosaccharide pattern을 檢討하고 그 結果를 報告하는 바이다.

實驗材料 및 方法

菌 株

Bacillus circulans F-2 (東京大學 農學部 農藝化學科 保管)

培 地

Yeast extract 0.1%, (NH₄)₂SO₄ 0.2%, K₂HPO₄ 1.4%, KH₂PO₄ 0.6%, MgSO₄·7H₂O 0.02%, Potato starch 1.0%. (pH7.5)

※ 감자 전분은 Ethylene oxide로 滅菌하여 接種直前に 넣었음.

滅菌條件 :

1. Gas concentration : Ethylene oxide 20%
CO₂ 80%
2. Sterilization time : 16 hrs.
3. Temperature : 45°C
4. Gas pressure : 2kg/cm²

培 養

前培養 : 培地 100ml를 500ml容 振盪 후라스크에 넣고 120°C에서 30分間 加壓殺菌한 後 供試菌을 1白金耳 接種하여 37°C에서 7日間 振盪培養 (Oscillation 125/min, Stroke 5cm) 하였다.

本培養 : 上記 培地 20ℓ를 Jar fermenter에 넣고 前培養液 100ml를 接種하여 37°C에서 48時間 培養하였다. (agitation : 300 r.p.m, aeration : 20 ℓ/min)

Activity의 測定

基質 : Soluble starch를 1%가 되게 50mM phosphate buffer (pH 6.5)에 溶解시켜 使用하였다.

測定方法 : 1% soluble starch soln. 0.1ml에 酵素液 0.1ml를 넣고 30°C에서 5分間 反應시킨 後 Dinitrosalicylic acid method⁸⁾에 의하여 glucose를 標準物質로 하여 525nm에서 定量하였다.

酵素單位는 1分間に 1μ mole의 glucose에 相當하는 還元糖을 遊離하는 酵素量을 1unit로 하였음

며, Specific activity는 protein mg當의 activity도 表示하였다.

蛋白質의 定量

Lowry et al法⁹⁾에 의하여 定量하였다.

Oligosaccharide의 檢出

Paper chromatography에 의하여 檢出하였다. 即 反應液의 一定量을 Toyo paper No. 50 (19×19 cm)에 Spot하고 密閉容器中에서 65% n-propyl alcohol을 展開劑로 하여 70°C에서 上昇法에 의하여 2回 展開시켰다. 展開後 glucoamylase를 處理하고 40°C에서 30分間 反應시킨 後 alkaline silver nitrate-dip method¹⁰⁾에 의하여 發色시켰다.

Polyacrylamide disc gel electrophoresis

Davis의 方法¹¹⁾에 의하여 實施하였다. 即 5% acrylamide gel (pH 9.4用 Gel)을 사용하여 泳動을 行하였다. 酵素蛋白質은 Gel當 10μg程度로 調節하였으며 Gel 1本當 3mA의 電流로 4°C에서 約 90分間 泳動을 實施하였으며 染色은 coomassie brilliant blue R-250으로 1時間 染色시킨 後 7% acetic acid (methanol 10% 含有)로 脫色시켰다.

SDS polyacrylamide gel electrophoresis

Weber & Osborn의 方法¹²⁾에 의하여 實施하였다. 이 때 酵素蛋白質을 1% SDS와 5% 2-mercaptoethanol中에서 5分間 煮沸하였다. 酵素蛋白質은 gel當 10μg程度로 調節하였으며 gel當 8mA의 電流로 室溫에서 3時間 泳動을 實施하였다. 染色은 coomassie brilliant blue R-250으로 1時間 染色시킨 後 7% acetic acid (methanol 10% 含有)로 脫色시켰다.

實驗結果 및 考察

酵素의 精製

*α-amylase*의 澱粉吸着과 硫酸分劃 : 粗酵素液 20ℓ를 magnetic stirrer로 攪拌하면서 ammonium sulfate를 30% 飽和度가 될때까지 徐徐히 加하여, 一夜 低溫室 (4°C)에 放置한 後 冷凍 遠心分離 (10,000xg, 30min)하여 沈澱을 除去하고, 上澄液에 corn starch를 2% 添加하고 4°C에서 30分間 攪拌하여 Amylase를 吸着시켰다. 이것을 冷凍 遠心分離하여 corn starch를 分離하고 30% 飽和度가 되도록 ammonium sulfate를 녹인 0.14M phosphate buffer (pH 6.1) 1,400ml로 各各 3回 洗滌한 後 0.05M acetate buffer (pH 6.0) 1,000ml에 懸탁시켜 37°C에서 1時間 교반하면서 corn starch에 吸

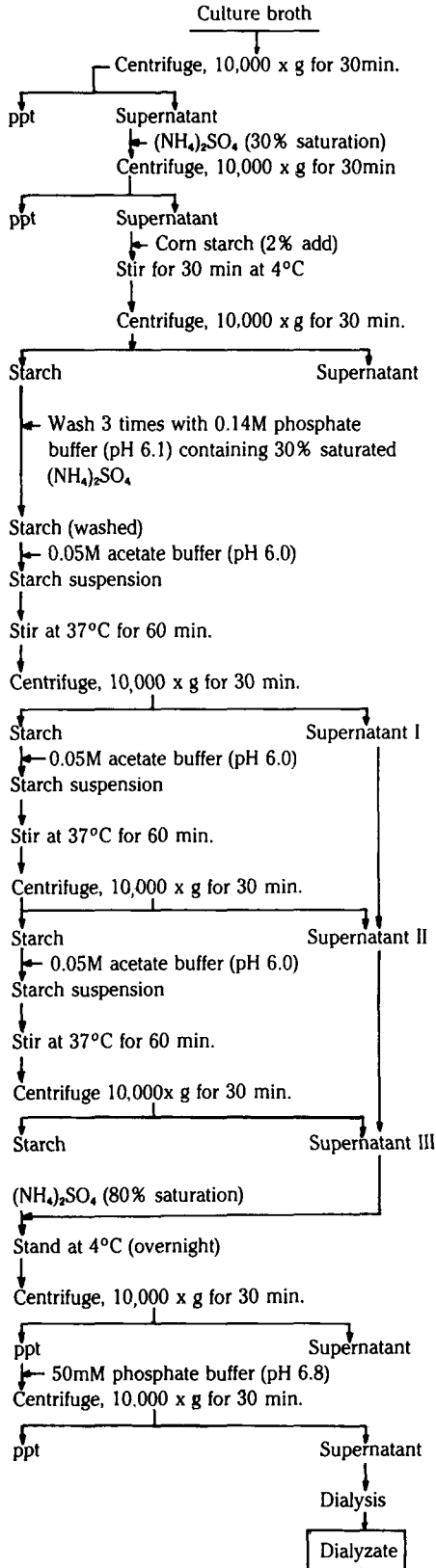


Fig. 1. Starch Absorption and Ammonium Sulfate Fractionation of α -Amylase.

착된 amylase를 용출시켰다. 이와 같은 작업을 3회 반복하였다.

이 작업에 의하여 얻은 上澄液 3,000ml를 교반하면서 ammonium sulfate를 80% 飽和度가 되도록徐徐히 添加하여 一夜 低温室(4°C)에 放置한 後 冷凍 遠心分離하여 沈澱을 分離하고 이 沈澱을 少量의 50mM phosphate buffer (pH 6.8)에 녹여 冷凍 遠心分離하여 上澄液 25ml를 얻고 同 - 緩衝液으로 一夜 透析하였다. 以上の amylase 澱粉吸着操作을 圖示하면 Fig. 1과 같다.

Bio-Gel P-100에 의한 Gel filtration : Starch eluate 2ml를 50mM phosphate buffer (pH 6.8)로 平衡化시킨 Bio-Gel P-100의 column (2.6×81cm)에 注入하고 같은 Buffer를 使用하여 4ml씩 分割하였다. 各 fraction의 蛋白質은 280nm에서의 吸光度로 表示하고 Activity는 1% Soluble starch soln. 0.1ml에 各 fraction 0.1ml를 넣어 30°C에서 5分間 反應시킨 後 DNS 試藥 0.4ml를 加하고 沸騰水浴中에서 5分間 煮沸한 後 H₂O 1.8ml를 加하여 525 nm에서 吸光度를 測定하고 이 吸光度를 amylase activity로 表示하였다.

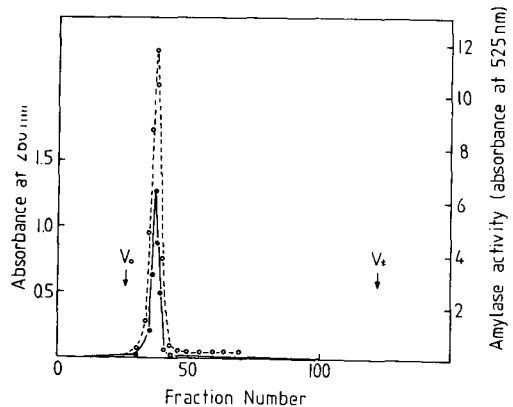


Fig. 2. Gel Filtration on Bio-Gel P-100

Column was equilibrated with 50mM phosphate buffer (pH 6.8). Elution was performed with the same buffer at a flow rate of 10ml per an hour. Column size : 2.6 x 81cm

Fraction volume : 4ml

Applied protein : 15.2mg

o—o: Amylase activity

•—•: Absorbance at 280 nm

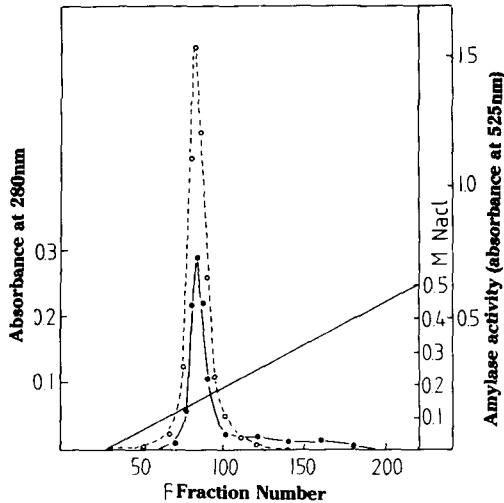


Fig. 3. Column Chromatography on DE-32

Column was equilibrated with 50mM Tris buffer (pH 8.0). After washing the column with 90ml of the same buffer, α -amylase was eluted with a linear gradient increase in NaCl concentration at a flow rate of 30ml per an hour.

Reservoir was filled with 300ml of 50mM Tris buffer (pH 8.0) containing 0.5M NaCl and mixing chamber was filled with 300ml of 50mM Tris buffer (pH 8.0).

Column size : 2.0 x 25.5cm,

Fraction volume : 3ml

Applied protein : 9.1mg

○—○: Amylase activity,

●—●: Absorbance at 280nm

Fraction pattern은 Fig. 2에서 보는 바와 같이 fraction No. 30~45 사이에서 peak가 나타났으며, protein의 peak와 amylase activity의 peak가

致하였다.

DE-32 Column chromatography : Amylase activity를 가진 fraction을 모아 濃縮하고 50mM Tris buffer (pH 8.0)로 平衡化시킨 DE-32의 Column (2.0×25.5cm)에 注入하였다. reservoir에는 50mM Tris buffer (pH 8.0, 0.5M NaCl含有) 300ml와 mixing chamber에는 50mM Tris buffer (pH 8.0) 300ml를 넣고 溶出시켰다. 이 때 溶出速度는 時間當 30ml였으며 3ml씩 fraction하였다.

Fig. 3에서 보는 바와 같이 protein과 activity는 0.14M의 NaCl濃度에서 다 같이 Single peak로 溶출되었다. 活性部分을 모아 濃縮하고 이것을 精製酵素로 使用하였다. 이와 같은 操作에 의하여 specific activity가 55.0 u·mg·protein(原比活性的의 約 23倍), 收率 25.5%의 精製酵素를 얻었다.

이상의 精製과정을 요약하면 Table 1과 같다.

精製酵素의 Electrophoresis 및 oligosaccharide의 生成

Polyacrylamide disc gel electrophoresis와 SDS-polyacrylamide disc gel electrophoresis : Fig. 4, 5에서 보는 바와 같이 polyacrylamide disc gel-electrophoresis에서 아주 隣接된 二個의 Band가 나타났으나, SDS-polyacrylamide disc gel electrophoresis의 結果 single band가 나타났다. 이 結果로 보아 polyacrylamide disc gel electrophoresis에서 나타난 二個의 band는 charge가 약간 다른 charge isomer의 α -amylase임을 示唆한다. 이와 같은 사실은 polyacrylamide의 濃度를 달리하고 電氣泳動을 行하였을 때 一層 明白하게 되었다.

Hedrick와 Smith의 方法⁽¹³⁾에 따라 polyacryla-

Table 1. Purification Procedure of α -Amylase

Procedure	Volume (ml)	Total protein (mg)	Total activity (unit)	Specific activity (unit/mg.protein)	Yield (%)
Culture broth	20,000	9,200	21,800	2.37	100
Starch absorption and (NH ₄) ₂ SO ₄ fractionation (80% saturation)	25	220	8,290	37.7	38.0
Bio-Gel P-100 gel filtration	32	174	7,500	43.1	34.4
DE-32 column chromatography	30	101	5,560	55.0	25.5

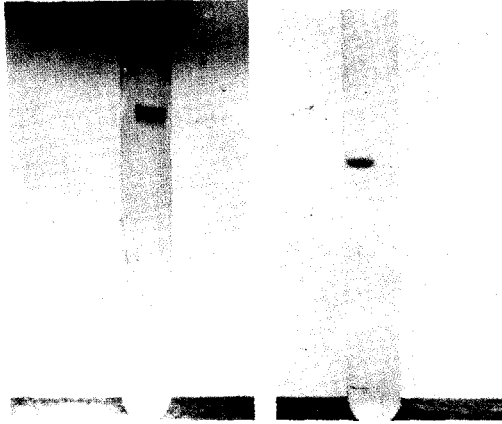


Fig. 4. Polyacrylamide Disc Gel Electrophoresis of the Purified α -Amylase. (Left)

The purified enzyme was applied to 5% polyacrylamide gel. Electrophoresis was carried out at a constant current of 3mA per tube for 90 min, Tris-glycine buffer (pH 8.3) was used.

Fig. 5. SDS-Polyacrylamide Disc Gel Electrophoresis of the Purified α -Amylase.

Electrophoresis was carried out on 5% polyacrylamide gel in the presence of sodium dodecyl sulfate and 2-mercaptoethanol by the general procedure of Weber & Osborn.

amide의 농도를 달리하고 electrophoresis를 행하였을 때 二個 band의 log mobility의 plot는 charge isomer를 가리키는 平行線을 나타내었다.^(Fig. 6)

2個 Band의 Oligosaccharide生成樣相: 2個 Band의 作用 pattern을 알기 爲하여 Band를 各各 分離하여 50mM phosphate buffer (pH 6.5)로 24時間 抽出하고 0.5% soluble starch에 作用시켜 生成된 oligosaccharide를 paper chromatography로 確認한 結果 Fig. 7에서 보는 바와 같이 2個의 Band는 同一한 作用 pattern을 나타내었다.

Soluble starch에 對한 初期 分解產物은 Fig. 7에서 보는 바와 같이 2個 Band의 抽出液은 다 같이 maltohexaose이며 時間이 經過됨에 따라 maltotetraose와 maltose가 生成되었다.

maltohexaose生成酵素로서는 *Aerobacter aerogenes*의 maltohexaose生成 amylase⁽¹⁴⁾에 이어 본 酵素는 두번째의 maltohexaose生成 amylase이다.

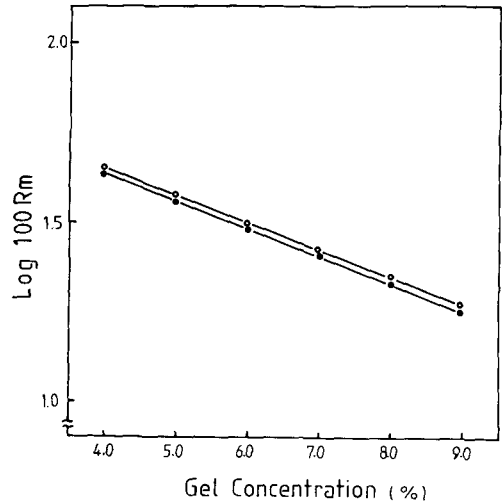


Fig. 6. The Effect of Different Gel Concentration on the Mobility of two Forms of α -Amylase.

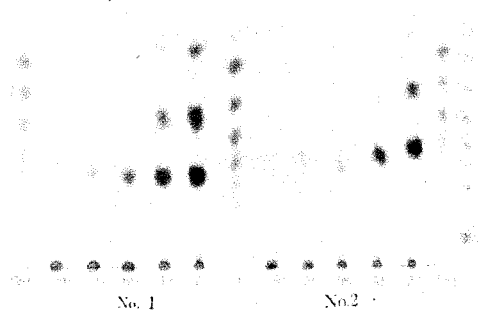


Fig. 7. Paper Chromatogram of the Reaction Products of the two Enzyme Bands No. 1 and No. 2 Eluates on the Soluble Starch.

G ₁ : Glucose	G ₆ : Maltohexaose
G ₂ : Maltose	G ₇ : Maltoheptaose
G ₃ : Maltotriose	G ₈ : Maltooctaose
G ₄ : Maltotetraose	std: Standard
G ₅ : Maltopentaose	maltooligosaccharide

要 約

감자 생전분의 分解力이 強한 α -amylase를 生産하는 *Bacillus circulans* F-2를 選拔하고, 이 菌株가 生産하는 α -amylase를 精製하였으며, 精製 酵素의 polyacrylamide disc gel electrophoresis,

SDS-polyacrylamide disc gel electrophoresis 및 soluble starch에 對한 分解産物을 檢討하고 그 結果를 要約하면 다음과 같다.

1. 粗酵素液을 corn starch吸着, 硫酸分劑, Bio-Gel P-100에 依한 gel filtration 및 DE-32 column chromatography에 依하여 specific activ 50.0 u/mg protein(原 比活性의 約 23倍), 取率 25.5%의 精製酵素를 얻었다.

2. 精製酵素에 對하여 polyacrylamide disc gel electrophoresis를 實施한 結果 α -amylase activity를 가지는 아주 인접된 2個의 Band가 나타났으나, SDS-polyacrylamide disc gel electrophoresis의 結果, polyacrylamide disc gel electrophoresis에서 나타난 2個의 Band는 charge가 약간 다른 charge isomer의 α -amylase임을 示唆하는 single band가 나타났다.

3. Polyacrylamide의 濃度에 따른 2個 Band의 log mobility의 plot는 charge isomer를 가리키는 平行線을 나타내었다.

4. 두 酵素蛋白質 Band의 作用 pattern을 알기 爲하여 2個의 Band를 各各 分離하여 抽出하고 soluble starch에 作用시켜 生成된 oligosaccharide의 pattern을 paper chromatography로 確認한 바 2個의 酵素蛋白質 Band는 同一한 作用 pattern을 나타내었다.

5. Soluble starch로부터 生成되는 唯一한 初期 加水分解産物은 maltohexaose이었다.

參考文獻

1. Sandstedt, R.M. : *J. Biol. Chem.*, **156**, 203 (1937).
2. Schoch, T. J. and H. W. Beach : *Cereal - Chem.*, **38**, 34 (1961).
3. Walker, G. J. and P. M. Hope : *J. Biochem.*, **86**, 452 (1963).
4. 上田誠之助 : 日農化, **31**, 898 (1957).
5. 久留島通俊, 佐藤淳司, 北原覺雄 : 日農化, **48**, 379 (1974).
6. Mizokami, K., M. Ozaki and K. Kitahara : *J. Agr. Chem. Soc. Japan*, **51**, 299 (1977).
7. Fuwa, H., Y. Sugimoto. and T. Takaya : *J. Japan Soc. Starch Sci.*, **26**, 105 (1979).
8. Bernfeld, P. : *Method in Enzymology*, Vol. **1**, P. 149.
9. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr

and R. J. Randall : *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).

10. Terevelyan, W. E., O. D. Procter and J. S. Harrison : *Nature*, **166**, 444 (1950).
11. Davis, J. : *Ann. New York Acad. Sci.*, **121**, 404 (1964).
12. Weber, K and M. Osborn : *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406 (1969).
13. Hedrick, J. L. and A. J. Smith. : *Arch. Biochem. Biophys.*, **126**, 155 (1968).
14. Kainuma, K., K. Wako, S. Kobayashi, A. Nagami and S. Suzuki : *Biochim. Biophys. Acta.*, **410**, 333 (1975).