

Herpetosiphon geysericola 균주의 Amylase 생성

전 영 수·서 정 훈*

*부산대학교 가정대학 식품영양학과·경북대학교 자연대학 미생물학과
(1985년 3월 23일 접수)

Production of Amylases from *Herpetosiphon geysericola*

Yeong-Soo Jun and Jung-Hwn Seu*

Department of Food and Nutrition, Pusan National University

*Department of Microbiology, Kyungpook National University

(Received March 23, 1985)

Abstract

A thermophilic and cellulolytic bacterium, *Herpetosiphon geysericola* CUM 317 isolated from the compost, produced α -amylase, β -amylase, and glucoamylase. Mutual relationships on the production of the three amylases were studied by changing the cultivation conditions. α -Amylase and glucoamylase were produced highly after 40 hrs on wheat bran medium at 50°C and after 30 hrs on liquid medium at 40°C, though β -amylase was produced best at 10 hrs of initial cultivation phase. The production of the amylases was generally repressed by the addition of carbon sources in liquid medium containing polypeptone. α -Amylase production was enhanced relatively by the addition of cupric sulfate in the liquid medium, β -amylase was enhanced by cadmium sulfate, and glucoamylase was enhanced by calcium chloride.

서 론

전분분해 효소는 그 작용방식에 따라서 α -amylase (E. C. 3, 2, 1, 1), β -amylase (E. C. 3, 2, 1, 2) 그리고 glucoamylase (E. C. 3, 2, 1, 3)로 대별할 수 있으며, 전분을 포도당, 맥아당, dextrin, syrup 등의 저분자 당류로 분해하기 위한 이들 효소처리에 대해서는 많이 알려져 있다.¹⁻⁴⁾ 특히 미생물 유래의 amylase는 대량생산 및 정제 용이성의 이유로 많이 연구되었으며, 그 중에서도 고온균에 의한 내열성 amylase의 생산에 대해서 많은 관심이 모아지고 있다.^{1, 5-12)} 이들은 대부분 한 종류의 amylase의 대량생산 및 성질들에 관한 연구들이었으며,¹³⁻²¹⁾ 본 연구에서는 퇴비

숙성화 연구^{22, 23)} 과정에서 분리된 cellulose 분해성 고온균 즉 *Herpetosiphon geysericola* CUM 317 균주를 대상으로 하여 위의 세가지 종류의 amylase 생성에 대해 조사한바, 이들 모든 효소들을 생산할 수 있었으며, 이 고온균을 대상으로 하여 배양조건을 달리함으로써 각 amylase의 생성변화의 관련성을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 사용균주

퇴비숙성화 연구과정에서 cellulose 분해균으로 분리된 *Herpetosiphon geysericola* CUM 317 균주를 사용

하였으며 그 동정 및 생리적 성질은 이미 발표되었다. 22, 23)

2. 배양방법

고체배양으로서는 수분함량이 60% 되게 한 시판 밀기울 10g을 사용하여 100ml 삼각 flask에서 48시간동안 50°C에서 배양하였다. 액체배양은 0.2% CMC, 0.5% polypeptone, 0.05% K₂HPO₄, 0.01% MgSO₄·7H₂O, 0.01% NaCl의 조성으로 40°C에서 36시간 동안 배양하였다.

3. 효소액 조제

효소액가 측정을 위하여 고체배양물은 1g당 9ml의 증류수로 1시간 추출 후 3000ppm에서 30분간 원심분리한 다음 상층액을 효소액으로 사용하였으며, 액체배양액은 균체를 제거한 후 효소원액으로 사용하였다.

4. α-amylase 측정

0.5%의 감자전분을 기질로 사용하여 Fuwa의 microdetermination method²⁴⁾를 이용하였다.

5. β-amylase 측정

Somogyi-Nelson법²⁵⁾에 따라서 유리되어 나오는 전체 환원당을 측정한 다음 glucose oxidase에 의해서 정량되는 유리 glucose 함량과의 차이를 maltose로 환산하여 나타내었다. 효소단위는 1분당 유리되는 1μg의 maltose를 생성하는 효소량으로 규정하였다.

6. glucoamylase 측정

Glucose oxidase(Sigma)를 사용하여 반응액중의 유리 glucose를 정량하였으며, 효소단위는 1분당 유리되는 1μg의 glucose를 생성하는 효소량으로 규정하였다.

결과 및 고찰

1. 고체배지에 의한 amylase 생성

밀기울 고체배지를 사용하여 50°C에서 배양한 결과 Fig.1과 같이 α-amylase와 glucoamylase는 배양 44시간과 46시간만에 각각 최대 활성을 나타내었으며 이에 반하여 β-amylase는 10시간만에 최대치를 보였으나 그 후 급격히 감소하여 40시간 후부터는

전연 활성이 없었다. 그리고 이 밀기울 배지에 ammonium acetate(0.1%)를 첨가하면 α-amylase 및 glucoamylase 공히 그 활성도가 높이 측정되었다. 금속염으로서 calcium chloride도 마찬가지로 α-amylase에 대하여 3배정도 높게 나타났으며 sodium tungstate는 그 생성을 크게 저해하였다.

2. 액체배지에 의한 amylase 생성

(1) 배양시간의 효과

30°C의 배양온도에서는 45시간까지 α-amylase는 거의 생성되지 않았고 그의 효소는 소량생성되었다. 30°C에서 진탕배양시켰을 경우 20시간만에 β-amylase

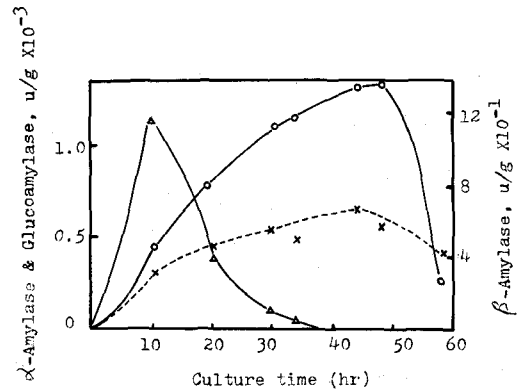


Fig. 1. Changes of amylase production on wheat bran medium containing 60% moisture at 50°C. X...X, α-amylase; Δ-Δ, β-amylase; ○-○, glucoamylase.

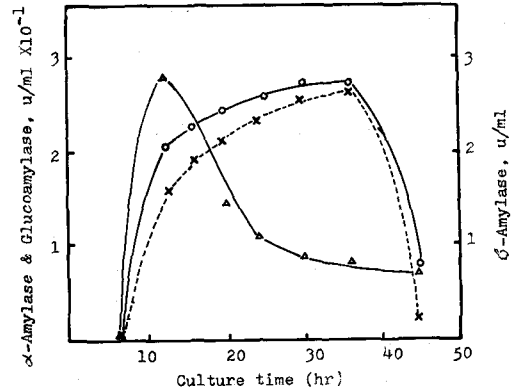


Fig. 2. Changes of amylase production on liquid medium at 40°C. X...X, α-amylase; Δ-Δ, β-amylase; ○-○, glucoamylase.

lase는 최대치를 이루었으며, 그의 효소는 생성되기 시작하여 36시간만에 최대생성량을 보였다. 40°C에서는 Fig.2에서 보는 바와 같이 β -amylase가 12시간만에 최대치를 보인 후 급격히 감소함에 따라 α -amylase와 glucoamylase가 서서히 증가하여 36시간 때 최대를 이루었다. β -amylase의 경우는 고체배지에서와 마찬가지로 배양초기에 생성되었다가 그 후 열변성에 의해 급격히 그 활성이 감소되었다.

(2) 탄소원의 효과

대부분 탄소원의 첨가는 탄소원이 첨가되지 않은 polypeptone 배지보다 생성역가가 적어졌으며, 반면에 1% cellulose를 첨가했을 경우 glucoamylase만이 polypeptone 배지에서서보다 150% 만큼 더 많이 생성되었다.

(3) 질소원의 효과

질소함량이 0.1% 되게 각각의 무기질소원을 사용했을 경우 전반적으로 효소생성을 볼 수 없었으며, 유기질소원으로 tryptone 및 polypeptone이 효소생성에 적당함을 볼 수 있다.

(4) 금속염의 효과

Sodium과 magnesium이 첨가되지 않은 배지에서 금속염의 효과를 본 바 $10^{-3}M$ 의 sodium chloride, potassium chloride, barium chloride, sodium tungstate를 첨가함으로써 각효소의 전반적인 생성이 좋았다. 이들 금속염 중에서 특히 cupric sulfate를 첨가할 경우 상대적으로 α -amylase의 생성이 증가했으며, cadmium sulfate를 첨가한 경우에는 상대적으로 β -amylase의 생성이 증가되었고, 또 calcium chloride를 첨가할 경우에는 상대적으로 glucoamylase의 생성이 많이 증가되었다. 따라서 이들 각 효소의 상대적 생성증가 효과를 검토한 바 다음과 같다. 우선 cupric sulfate를 $10^{-7}M$ 에서 $5 \times 10^{-4}M$ 농도까지 첨가해 줄에 따라서 각amylase의 상대적 생성을 조사한 바 Fig.3과 같이 균체의 증식이 일어나는 $10^{-4}M$ 농도까지는 α -amylase 생성이 점진적으로 132%까지 증가한 반면, 그의 효과는 감소되거나 별로 영향을 받지 않았다. 다음 cadmium sulfate에 의한 상대적 효소생성력을 조사한바 Fig.4에서 보는 바와 같이 균체의 증식은 $5 \times 10^{-5}M$ 농도까지 점차 감소한 반면, 특히하게 β -amylase의 생성능력이 약 990% 정도까지 증가되었으며, 그의 효소에는 별 효과를 주지 못했다. 또 calcium chloride 첨가효과에 의한 결과는 Fig.5에서와 같이 $10^{-7}M$ 에서 $10^{-2}M$ 까지 증가

함에 따라서 β -amylase의 생성은 급격히 감소하였으며, 상대적으로 glucoamylase가 550% 까지 점차 증

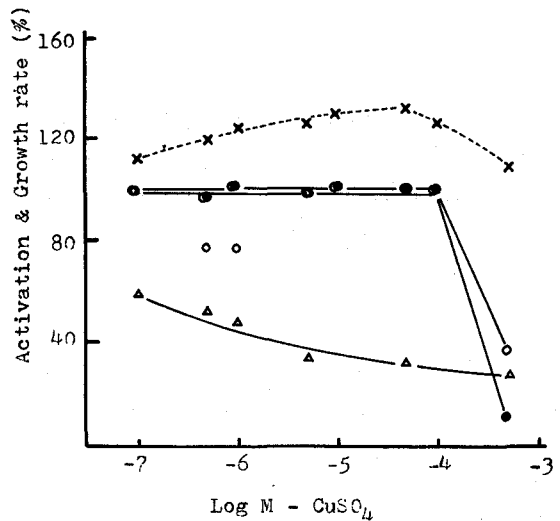


Fig. 3. Effect of CuSO₄ on the production of amylases in liquid medium. X...X, α -amylase; Δ - Δ , β -amylase; \circ - \circ , glucoamylase; \bullet - \bullet , cell growth

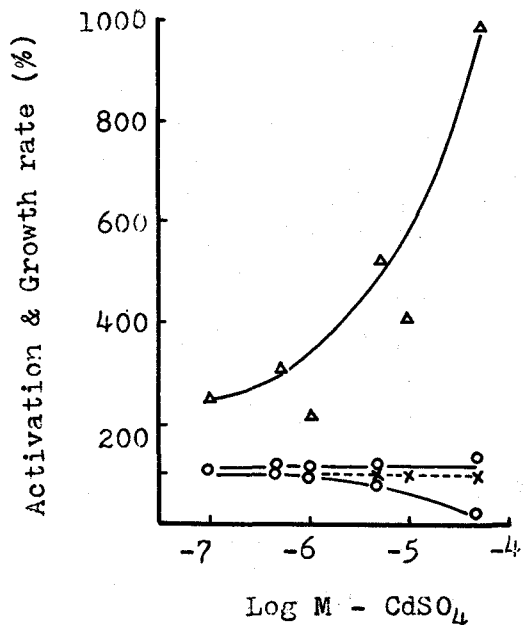


Fig. 4. Effect of CdSO₄ on the production of amylases in liquid medium. X...X, α -amylase; Δ - Δ , β -amylase; \circ - \circ , glucoamylase; \bullet - \bullet , cell growth.

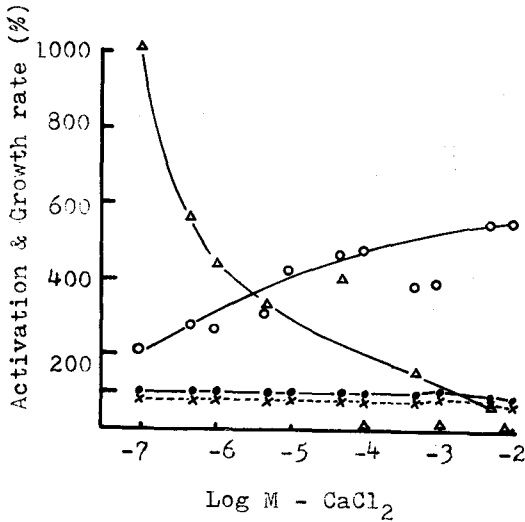


Fig. 5. Effect of CaCl₂ on the production of amylases in liquid medium. X...X, α-amylase; Δ-Δ, β-amylase; ○-○, glucoamylase; ●-●, cell growth.

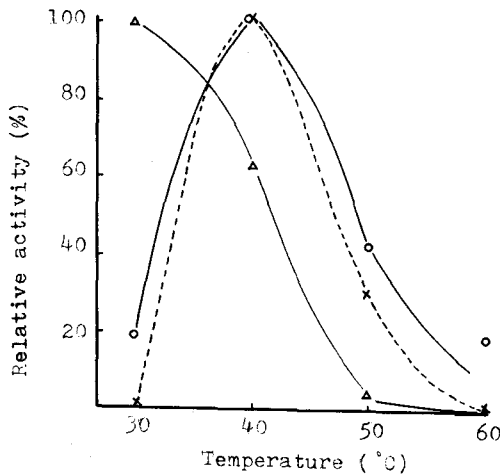


Fig. 6. Optimum temperature on the production of amylases in liquid medium. X...X, α-amylase; Δ-Δ, β-amylase; ○-○, glucoamylase.

가하였다. 이때 α-amylase 및 균체증식에는 별로 영향이 없었다.

(5) pH의 영향

모든 amylase가 pH 7.5일 때 최대의 효소생성을 나타내었으며, 특히 α-amylase는 pH 8.0 이상에서는 거의 생성되지 않았다.

(6) 온도의 영향

각 amylase 생성의 최적온도를 조사한 바 Fig. 6에서 보는 바와 같이 α-amylase와 glucoamylase의 생성에 대해서는 40°C에서 효소생성이 최대를 이루었으며, β-amylase는 30°C에서 효소생성이 최대로 나타났으며 50°C에서는 거의 생성되지 않았다.

요 약

퇴비 숙성초기에 고온성 cellulose 분해이용균으로 분리된 *Herpetosiphon geysericola* CUM 317균주는 전분분해 효소인 α-amylase, β-amylase 및 glucoamylase를 모두 생성한다. 이 균을 사용하여 그 배양조건을 달리하여 각 amylase의 생성관계를 서로 비교한바 50°C의 밀기울 고체배지나 40°C의 액체배지상에서 β-amylase는 배양초기 10시간만에 최대의 생성력가를 보였는 반면, α-amylase와 glucoamylase는 30 내지 40시간 정도의 배양말기에 최대를 이루었다. Polypeptone을 함유한 액체배지에 탄소원의 첨가나 무기질소원의 첨가는 전반적으로 amylase들의 생성이 크게 저하되었으나 cellulose에 의해서 glucoamylase의 경우 150% 정도 증가되었다. 액체배지에 Cu SO₄를 첨가해 줌으로서 α-amylase만의 생성증가 효과를 얻었고 CdSO₄에 의하여 β-amylase만의 생성증가가 있었으며, 그리고 CaCl₂에 의하여 glucoamylase만의 증가효과가 있는 반면, 상대적으로 β-amylase의 급격한 감소가 일어났다. 이들 amylase들의 최적 효소생성 pH는 7.5였으며, 최적온도는 α-amylase와 glucoamylase의 경우 40°C였고 β-amylase는 30°C였다.

참 고 문 헌

1. Takagi, T., Toda, H., and Isemura, T.: *The Enzymes*; 5, Academic Press, N. Y., 235(1971)
2. Takasaki, Y.: *Agr. Biol. Chem.*, 40, 1515 (1976)
3. Pazur, J. H., and Ando, T.: *J. Biol. Chem.*, 235, 297(1960)
4. Reed, G.: *Enzymes in Food Processing*, Academic Press, N. Y., 42(1966)
5. Stark, E., and Tetrault, P. A.: *J. Bacteriol.*, 62, 247(1951)
6. Ogasahara, K., and Isemura, T.: *J. Biochem.* 67, 65(1970)
7. Stutzenberger, F., and Carnell, R.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 34, 234(1977)