

## *Bacillus thuringiensis*, 19 혈청형의 세포외 $\alpha$ -Amylase 생산 검색

이건주<sup>1</sup>·박동왕<sup>2</sup>·이형환<sup>2\*</sup>·이영주<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 한국중외제약(주) 미생물학연구소, <sup>2</sup> 건국대학교 이과대 생물학과

### Examination of the Production of Extracellular $\alpha$ -Amylase by *Bacillus thuringiensis*, 19 serotypes

Lee, Kon-Joo, Dong-Wang Park, Hyung-Hoan Lee\*, and Y.J. Lee

Department of Biology, Kon Kuk University, Seoul 133-701, Korea

The production of extracellular  $\alpha$ -amylase by *Bacillus thuringiensis* 19 serotypes was examined by the hydrolysis test of starch. Thirteen serotypes produced the amylase. *B. thuringiensis* serovar *thuringiensis*, *alesti*, *kurstaki*, *sotto*, *kenya*, *israelensis*, *morrisoni*, *entomocidus*, *tolworthi*, *thompsoni*, *toumanoffi*, *pakistani*, and *indiana* produced the enzyme. The amylase produced by *B. thuringiensis* serovar *israelensis* showed highest activity around pH 6.7 to 7.2 and 55°C to 65°C. The high production medium of the amylase was composed of 1% bacto-peptone, 0.3% beef-extract, 0.3% yeast extract, 0.5% NaCl, 0.3% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.2% soluble starch, 0.012% CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.005% MnCl<sub>2</sub>, and 0.03% MgCl<sub>2</sub>·7H<sub>2</sub>O. The highest production of the enzyme was observed at 4 hours culture in the soluble starch (0.6 units/ml) or glucose (0.43 units/ml) substrate.

*Bacillus thuringiensis*는 현재 편모의 혈청형에 따라서 24개의 혈청형변이군주(serovariety)로 분류되어 있고(1-4), 이 군주는 곤충의 유충에 치사성을 갖는 delta-endotoxin(2, 3, 5)과  $\beta$ -exotoxin(2, 3, 6)을 분비하기 때문에 살충제로 이용이 되고 있다(2, 3, 7).

*B. thuringiensis*의 증식과 발효 연구를 위하여 세포외 효소의 활성 연구가 요구되고 있으나, 아직 이 분야의 연구는 미비한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 혈청형 19군주에 대하여 세포외  $\alpha$ -amylase 생산을 검색했고, 생산된 아밀라제의 활성 적정온도와 pH, 그리고 배지조성에 따른 생산을 연구하였다.

#### 실험재료 및 방법

##### 균 주

본 실험에 사용한 균주는 *Bacillus* Genetic Stock Center(The Ohio State Univ., Dept. of Biochemistry)로부터 분양받아 건국대학교 생물학과에 보관중인 것으로서 다음과 같다.

*Bacillus thuringiensis* serovar. *thuringiensis* (4A-1), *finitimus* (4B-1), *alesti* (4C-1), *kurstaki* (4D-1), *sotto* (4E-1), *kenya* (4F-1), *galleriae* (4G-1), *canadensis* (4H-1), *entomocidus* (4I-1), *aizawai* (4J-1), *morrisoni* (4K-1), *tolworthi* (4L-1), *darmstadiensis* (4M-1), *toumanoffi* (4N-1), *thompsoni* (4O-1), *pakistani* (4P-1), *israelensis* (4Q-1), *dakota* (4R-1), *indiana* (4S-1).

##### 배지 및 시약

①  $\alpha$ -아밀라제를 생산하는 균주를 확인하기 위하여 LB agar 배지에 soluble starch(Sigma)가 1% 되도록 첨가한 LBS 배지를 사용하였다.

② Iodine 용액은 0.1N acetic acid에 2% KI를 조성하여 I<sub>2</sub>가 0.2% 되도록 하였다.

③  $\alpha$ -아밀라제 생산배지의 조성은 1.0% bacto-peptone, 0.3% yeast-extract, 0.3% beef-extract, 0.012% CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.005% MnCl<sub>2</sub>, 0.5% NaCl, 0.03% MgCl<sub>2</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.3% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>와 0.2% soluble starch 또는 0.2%

Key words: *B. thuringiensis*  $\alpha$ -amylase.

\*Corresponding author

glucose로 하였다.

④  $\alpha$ -아밀라제 활성 측정에서 표준곡선의 작성을 위하여 정제된 글루코스를 사용하였다.

⑤ 1% 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS)용액은 다음과 같이 조성하였다. sodium potassium tartrate를 증류수에 용해하여 60%로 만든 용액 50 ml과 2 mol/l NaOH에 용해한 5% 3,5-dinitrosalicylic acid (Fluka AG)용액 20 ml를 섞고 증류수로 100 ml이 되게 하였다(9).

⑥ pH에 따른 아밀라제 활성을 조사하기 위하여 각 pH에 따른 0.1 M 완충액을 다음과 같이 조성하였다. pH 4.0~5.2는 acetate 완충액을, pH 5.4-6.2는 citrate 완충액을, pH 6.7-8.3은 phosphate 완충액을, pH 9.2-10.2는 Tris 완충액을 사용하였다.

**$\alpha$ -아밀라제 생산 균주의 검색**

*B. thuringiensis* 균주 중에서 아밀라제를 생산하는 균주를 찾기 위하여 1% soluble starch를 포함한 LBS 평판배지에 각 균을 접종하고, 37°C에서 18시간 배양한 후, Iodine 용액을 배지 위에 뿌려서 집락 주위에 염색이 되지 않은 환이 형성된 균주를  $\alpha$ -아밀라제 생산균주를 선택하였다.

**조(粗)효소 용액의 준비**

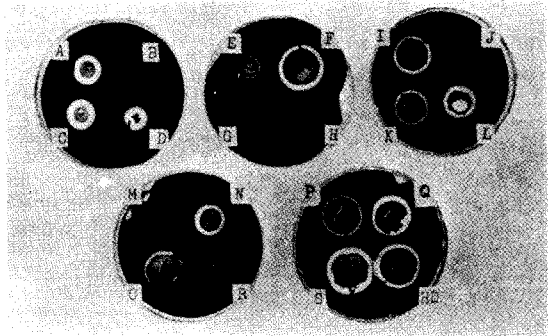
LB배지 20 ml에 접종하여 37°C, 150 rpm으로 18시간 배양한 균액을 0.2% 전분이 포함된 생상배지인 LBS 배지에 1 : 50으로 접종한 후에 32°C, 150 rpm (Environ, Shaker lab line)으로 24시간 배양하여 6.000×g로 15분 원심분리한 후, 상등액을 4°C에 보관하고 조(粗)효소 용액으로 사용하였다.

**$\alpha$ -아밀라제의 활성측정**

활성측정 방법은 3.5 dinitro salicylic acid 환원당 측정방법을 이용하였다(9). 효소용액의 활성측정을 위한 표준곡선 작성은 다음과 같이 하였다. 각 시험관에 0.05-1.0 mg/ml 되도록 글루코스용액을 3ml씩 조성하고, 1% DNS 용액을 1.0 ml씩 첨가하여 끓는 물에서 5분간 중탕시켰다. 흐르는 물로 식혀 실온이 되게 하고, 대조군은 증류수 만을 사용하여 같은 처리를 한 후, 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소의 활성측정은 0.1% 전분용액과 0.1 M phosphate 완충액을 1.0 ml씩 섞어서 반응용액을 조성하여 적정온도에서 10분간 방치한 후, 같은 온도에서 10분간 방치한 효소용액을 반응 시험관에 1.0 ml 첨가하여 흔들어 주면서, 10분간 반응시켰다. 1% DNS 용액을 1.0 ml 첨가하고 앞의 방법과 같이 흡광도를 측정하였다. 다른 시험관에는 효소용액을

첨가한 직후, 1% DNS 용액을 1.0 ml 첨가하여 반응 시험관과 동일한 처리를 하고 측정한 흡광도 값을 제하여  $\alpha$ -아밀라제 활성을 계산하였다.

$\alpha$ -아밀라제 활성은 적정온도, 적정 pH에서 5분간 반응했을 때 녹말용액으로부터 glucose 1.0 mg을 생산하는 효소의 양을 1 unit로 하였다. 활성을 위한 적정 pH를 조사하기 위하여, 1.0% 전분용액 1.0 ml과 각 pH완충용액 1.0 ml을 혼합한 다음에 효소용액 1.0 ml을 가하고 아밀라제의 활성을 측정하였다.



**Fig. 1. *Bacillus thuringiensis* cultures on LB media containing 1% soluble starch for 18 hours.**

The halo ring zone around the colonies indicates the hydrolysis of starch by the bacterial strains. Symbols: A, *B. thuringiensis* serovar *thuringiensis*; B, *finitimus*; C, *alesti*; D, *kurstaki*; E, *sotto*; F, *kenya*; G, *galleriae*; H, *canadensis*; I, *entomocidus*; J, *aizawai*; K, *morrisoni*; L, *tolworthi*; M, *darmstadiensis*; N, *toumanoffi*; O, *thompsoni*; P, *pakistani*; Q, *israelensis*; R, *dakota*; S, *indiana*.

**Table 1. Estimate of amylase productions by *Bacillus thuringiensis*.**

Serovarieties	<sup>a</sup> Units of amylase/ml
<i>thuringiensis</i>	0.76
<i>alesti</i>	0.17
<i>kurstaki</i>	0.28
<i>sotto</i>	0.32
<i>kenya</i>	0.22
<i>entomocidus</i>	0.19
<i>morrisoni</i>	0.18
<i>tolworthi</i>	0.17
<i>toumanoffi</i>	0.37
<i>thompsoni</i>	0.38
<i>pakistani</i>	0.23
<i>israelensis</i>	0.39
<i>indiana</i>	0.40

<sup>a</sup>; amounts of the amylase production in the 24 hours culture medium

반응온도의 변화에 따른 활성을 측정하기 위하여 준비한 효소용액을 사용하여 실험하였다. 1% 전분 용액과 효소용액을 혼합하여 30~90°C에서 흔들어 주면서 10분간 반응시켜 1% DNS 용액을 첨가한 다음에 5분간 중탕하고 흡광도를 측정하였다.

**α-아밀라제 생산을 위한 배지의 조성**

기본배지(AB)의 조성은 1.0% bacto-peptone, 0.3% beef-extract, 0.3% yeast-extract, 0.5% NaCl, 0.3% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>이었다. ABG(AB glucose)배지는 기본배지에 0.2% glucose를, ABS(AB soluble starch)배지는 기본배지에 0.2% soluble starch를 첨가했다. ABG 배지와 ABS 배지에 각각 0.012% CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.005%

MnCl<sub>2</sub>와 0.03% MgCl<sub>2</sub>·7H<sub>2</sub>O를 첨가하여 ABG 또는 ABS mineral media를 만들었다.

**결과 및 고찰**

**α-아밀라제의 생산과 활성**

*B. thuringiensis* 각 균주를 1% soluble starch가 포함된 LB 평판배지에 배양한 후 iodine 용액을 집락위에 부어 확인한 결과는 *B. thuringiensis* serovar. *thuringiensis*, *alesti*, *kurstaki*, *sotto*, *kenya*, *entomocidus*, *morrisoni*, *tolworthi*, *toumanoffi*, *thompsoni*, *pakistani*, *israelensis*와 *indiana* 등이 환을 형성하는 것으로 보아 아밀라제를 생산하는 균주들로 확인되었다(Fig. 1).

이 균주들을 전분이 포함된 아밀라제 생산 액체배지에서 배양한 후에 아밀라제의 활성을 측정한 결과 *B. thuringiensis* serovar. *thuringiensis*가 생산한 효소의 활성이 0.76 units/ml로서 제일 높았고 *alesti*와 *tolworthi*의 경우는 0.17 units/ml로 제일 낮았다(Table 1).

*B. thuringiensis* var. *israelensis*가 생산하는 아

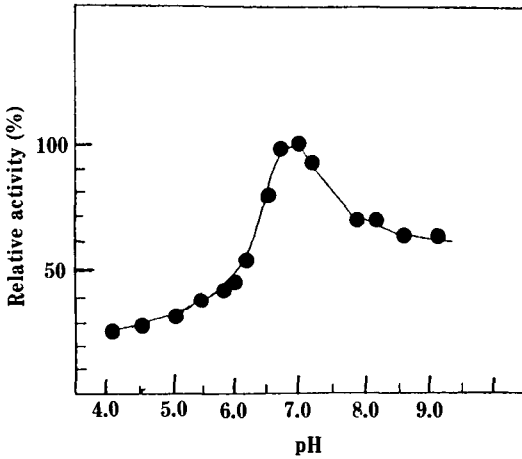


Fig. 2. Effect of pH on the activity of amylase produced by *B. thuringiensis* var *israelensis*.

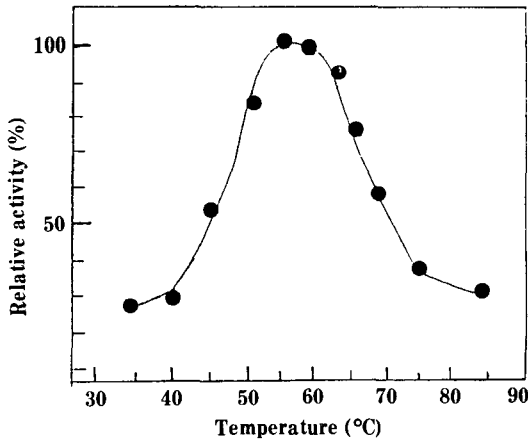


Fig. 3. Effect of temperature on the activity of amylase produced by *B. thuringiensis* var *israelensis*.

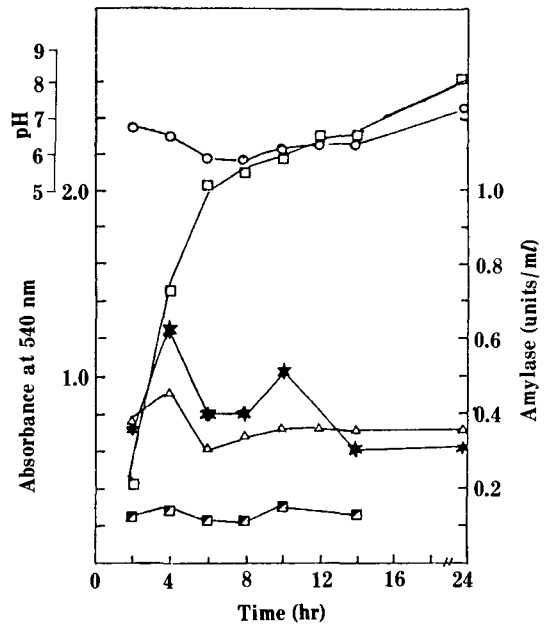


Fig. 4. Growth, pH change and amylase production of *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* grown in the amylase production medium.

Symbols: (○), pH; (□), growth in soluble starch medium; (△), amylase production in soluble starch medium; (★), amylase production in glucose medium; (■), amylase production in LB medium.

밀라제는 pH 6.7~7.2 사이에서 활성이 가장 높게 나타났으며 (Fig. 2), 최적온도는 55°C~65°C 사이로 나타났다 (Fig. 3).

#### 배지조성에 따른 $\alpha$ -아밀라제의 생산

*B. thuringiensis* var. *israelensis* 균주로부터 아밀라제 생산에 미치는 영향을 조사하기 위하여 기본 배지에 0.2% glucose를 첨가한 배지와 0.2% soluble starch를 첨가한 배지에서 접종후 2시간마다 증식 및 pH의 변화와 활성을 측정하였다. 균 증식은 8시간에 사멸기에 들어 갔으며, 이때 pH는 5.82로 가장 낮았고 활성은 접종후 4시간 때에 가장 높았다 (Fig. 4). 배양 12시간 때에 배지조성에 따라 활성을 비교한 결과 starch와 glucose를 포함하지 않은 경우보다 포함한 경우가 활성이 높았고 starch의 경우보다 glucose의 경우가 약간 높았다. 또한,  $Ca^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ 를 포함한 경우가 가장 활성이 높았다.

Li와 Yousten (1975)은 *B. thuringiensis*가 생산하는 프로티아제의 경우  $Mn^{2+}$ 은 효소의 생산에 필요하며,  $Ca^{2+}$ 은 안정화에 필요하다는 결과를 얻었으며, Tobey와 Yousten (1976)은  $\alpha$ -아밀라제의 생산이  $Ca^{2+}$ 과  $Mn^{2+}$ 가 존재할 때만 높다고 하였다. 이 결과는 본 연구와 유사한 점이 있다.

#### 요 약

*Bacillus thuringiensis*, 19 serovars가  $\alpha$ -amylase를 생산하는지를 검색했다. 각 균주를 soluble starch가 포함된 배지에서 배양하여 Iodine 용액으로 확인한 결과 *B. thuringiensis* serovar, *thuringiensis*, *alesti*, *kurstaki*, *sotto*, *kenya*, *entomocidus*, *morrisoni*, *tolworthi*, *toumanoffi*, *thompsoni*, *pakistanii*, *israelensis*와 *indiana*는 아밀라제를 생산하였으며, 이 중에서 serovar. *thuringiensis*가 생산을 제일 많이 했고, serovar. *alesti*와 *tolworthi*는 제일 낮았다.

*B. thuringiensis* var. *israelensis*가 생산하는  $\alpha$ -

아밀라제의 활성은 pH 6.7~7.2와 55~65°C에서 제일 높았고, 효소생산은 LB배지보다 기본배지 (1.0% bacto-peptone, 0.3% beef-extract, 0.3% yeast-extract, 0.5% NaCl, 0.3%  $K_2HPO_4$ 와 0.1%  $KH_2PO_4$ , 0.2% soluble starch)에 금속이온인 0.012%  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ , 0.005%  $MnCl_2$ , 0.03%  $MgCl_2 \cdot 7H_2O$ 을 첨가한 배지에서 제일 높았다. 배양 후 4시간 됐을 때에  $\alpha$ -amylase 생산이 제일 높았다. Starch 배지에서는 0.6 units/ml, glucose 배지에서는 0.43 units/ml씩이 생산되었다.

#### 참고문헌

1. de Barjac, H. and A. Bonnefoi: *Entomophaga*, **18**, 15-18 (1973).
2. Burges, H.D.: Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980. Academic Press, London, (1981).
3. Kurstak, E.: Microbial and viral pesticides. Marcel Dekker Inc., New York. (1982).
4. Lee, H.H., Y.M. Park and C.W. Lee: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **14**, 205-208 (1986).
5. Hannay, C.I. and P. Fitz-James: *Can. J. Microbiol.*, **1**, 694-710 (1955).
6. Lee, H.H., C.B. Shim and H.M. Lee: *Kor. J. Microbiol.*, **23**, 271-281 (1985).
7. de Barjac, H., A. Burgerjon and A. Bonnefoi: *J. Invertebr. Pathol.*, **8**, 536-538 (1966).
8. Lee, H.H.: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **14**, 325-328 (1986).
9. Colowick, S.G. and N. Kaplan: *Methods in enzymology*, Academic Press, N.Y. **1**, 149-155 (1955).
10. Li, E. and A.A. Yousten: *Appl. Microbiol.*, **30**, 354-361 (1975).
11. Tobey, J.F. and A.A. Yousten: *Devel. in Ind. Microbiol.*, **18**, 499-510 (1976).

(Received August 1, 1988)