

## *Schwanniomyces castellii* CBS 2863(ATCC 26077)으로부터 $\alpha$ -Amylase 정제 및 특성

박종천<sup>1</sup> · 배 석 · 임선영 · 이진중<sup>1</sup> · 이 향<sup>1</sup> · 전순배\*  
전남대학교 미생물학과, <sup>1</sup>생물학과

### The Purification and Properties of $\alpha$ -Amylase from *Schwanniomyces castellii* CBS 2863

Park, Jong-Chun<sup>1</sup>, Suk Bai, Suh-Young Lim, Jin-Jong Lee<sup>1</sup>,  
Hyang Lee<sup>1</sup> and Soon-Bai Chun\*

Department of Microbiology, <sup>1</sup>Department of Biology,  
Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea

**Abstract** — The extracellular  $\alpha$ -amylase was purified to homogeneity from the culture filtrate of starch grown *Sch. castellii* CBS 2863. The purified enzyme was glycoprotein with a molecular weight of about 56 KDa. The pH and temperature optimum were 5.5 and 40°C, respectively. The enzyme was fairly stable up to 40°C and at acid pH range (pH 4.0~7.0). The apparent  $K_m$  and  $V_{max}$  of the enzyme toward starch was 1.0 mg/ml and 100 U/mg protein, respectively. The analysis of amino acid composition was found to be acidic protein. The amino acid sequence of N-terminal peptide consisted of Asp-Val-Ser-Ser-Ser-Ala-X-X-Thr-Arg-Ser-Glu-Ser-Ile-Tyr.

전분을 알코올로 전환하기 위해서는 먼저 화학적인 방법이나 미생물에 의한 전분의 액화와 당화 과정이 필요하다. 후자의 경우 다양한 미생물과 식물로부터 전분 분해효소를 산업적으로 분리, 정제하여 사용해 왔다(1).

많은 미생물들은 전분을 탄소원 및 에너지원으로 이용할 수 있다(1, 2, 3). 이들 미생물 중 전분을 이용하는 효모는 100여 종으로 알려졌다(2). 전분을 소당류(glucose, oligosaccharide)로 전환하는 효율은 분비되는 전분 분해 효소에 따라 다르며(4), 전분을 분해하는 효소는 세 가지 유형인  $\alpha$ -amylase, glucoamylase 그리고  $\beta$ -amylase 등이 있다(5, 6). 이들 효소 중 *Schwanniomyces castellii*는  $\alpha$ -amylase와 glucoamylase를 생산, 분비한다(7).

*Schwanniomyces* 종들로부터  $\alpha$ -amylase의 분리 정제는 이미 보고된 바 있다(1, 8, 9). 본 논문에서는 단

두 단계의 정제 과정을 통해 *Sch. castellii* CBS 2863 으로부터  $\alpha$ -amylase를 분리, 정제하였고, 정제된 효소의 아미노산 조성 및 N-말단 아미노산 서열을 분석하였다.

### 재료 및 방법

#### 사용균주 및 시약

사용된 효모균주는 *Schwanniomyces castellii* CBS 2863(*Sch. occidentalis* ATCC 26077)이었으며, 배지에 사용된 시약은 Difco Laboratories(Detroit, MI U.S.A)에서 구입하였고, 단백질의 분리 정제, 아미노산 조성 및 서열분석에 필요한 시약은 Sigma chemical Co.(St. Louis, MO., U.S.A) 제품 등을 사용했다. 그리고 기타 각종 시약은 일급품을 구입, 사용하였다.

#### 배지 및 배양조건

효모균주인 *Sch. castellii*의 생장곡선 및 계대배양을

**Key words:** *Schwanniomyces castellii*,  $\alpha$ -amylase, purification

\*Corresponding author

위한 배지로는 YEPD(2% Glucose, 2% Bacto peptone, 1% Yeast extract)를 사용했고, 평판 배지는 2% Bacto agar를 첨가하였다. 효소 생산을 위한 배지로는 0.05 M sodium-acetate 완충용액(pH 5.5)에 1% soluble starch(Sigma)와 YNB(0.67% Yeast nitrogen base w/o amino acid)를 첨가하여 사용했다. 효소 생산을 위한 배양조건은 2 liter 삼각 플라스크에 배지를 500 ml씩 넣어 30°C에서 150 rpm으로 진탕배양하여 효소 활성이 가장 좋은 후기 대수기까지(48시간) 배양하였다.

### 효소의 생산 및 분리, 정제

*Sch. castellii*를 1% soluble starch YNB 배지에서 30°C로 후기 대수기까지 배양한 다음, 10,000×g로 30분 동안 원심분리하여 균체를 제거한 상침액을 ultrafiltration(10,000 molecular weight cut off, Aminco Co., U.S.A)으로 농축하고, 0.05 M sodium-acetate 완충용액(pH 5.5)으로 2회 교환한 다음, 약 200배 농축하였다. 모든 정제 과정은 4°C로 유지된 저온실에서 하였고, 효소 활성은 0.5% soluble starch를 기질로 한  $\alpha$ -amylase 활성으로 표시하였다. 투석된 농축액을 Sephacryl S-200 gel filtration column(2.6×60 cm, Total volume, 270 ml; 유속, 0.10 ml/min)에서 분획하였다. 각 분획을 SDS-PAGE로 순도를 확인한 후, 순도가 확인된 분획을 모아 ultrafiltration으로 농축하고, 0.05 M sodium-acetate 완충용액(pH 5.5)으로 교환, 투석하였다.

### 효소의 활성 및 단백질량 측정

$\alpha$ -Amylase의 활성은 Somogyi-Nelson 방법으로 측정하였다. 이때 흡광도는 Spectronic 20을 사용하여 550 nm에서 측정하였고,  $\alpha$ -Amylase unit는 분당 1  $\mu$ mol의 환원당을 생산하는 효소량으로 하였다. 효소 단백질의 양은 bovine serum albumin(BSA)을 표준 단백질로 하여 Lowry 등(10)의 방법으로 측정하였고, 흡광도법(280 nm)을 병행하였다.

### 전기영동

Laemmli 등(11)의 방법에 따라 slab gel(10%)에서 Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)를 실시하였다. 전기영동은 vertical slab gel electrophoresis apparatus(Hoeffer Scientific Co., U.S.A)에서 40 mA, 3시간 30분 동안 영동하였다. Gel 염색은 Coomassie brilliant blue R-

250 용액(40% ethanol, 10% acetic acid, 0.125% Coomassie brilliant blue R-250)으로 하였고, 탈색(40% ethanol, 10% acetic acid) 후에 진공 건조기에서 건조하였다.

### Gel filtration 및 탄수화물 함량

정제한 효소의 분자량은 Cho 등(12)의 방법에 따라 HPLC(Waters Associate Co., U.S.A)와 gel filtration column(0.75×60 cm, Biosil TSK-250, Bio-Rad)에서 실시하였다. 탄수화물의 함량은 5% phenol 용액과 sulfuric acid를 사용한 Dubois 등(13)의 방법으로 분석하였다.

### 최적 pH 및 안정성

효소 활성에 대한 pH의 영향을 조사하기 위하여 0.05 M sodium acetate 완충용액(pH 2.0~7.0)과 0.1 M sodium phosphate 완충용액(pH 5.0~8.0)을 사용하여 10  $\mu$ l 효소액과 기질(0.5% starch) 990  $\mu$ l를 첨가, 40°C에서 30분간 반응시킨 후,  $\alpha$ -amylase 활성을 측정하였으며, 각 pH에서 효소 활성의 안정성을 조사하기 위해 상기 완충용액 1 ml에 1 unit의 효소를 첨가하고, 30°C에서 24시간 정치시킨 후에 잔존하는 효소 활성을 측정하였다.

### 최적 온도와 열안정성

효소 활성에 대한 온도의 영향을 조사하기 위하여 0.05 M sodium acetate 완충용액(pH 5.5)에 효소와 기질을 첨가한 용액을 10~80°C 사이의 각 온도에서 30분간 정치 반응시킨 후, 효소의 활성을 측정하였으며, 정제 효소의 열 안정성은 30~70°C 온도 범위에서 0.05 M sodium acetate 완충용액(pH 5.5) 1 ml에 1 unit의 효소를 첨가한 용액을 30분간 정치 반응시키면서 5분 간격으로 각 온도에서의 효소 잔존 활성을 측정하였다.

### 기질 특이성 및 $K_m$ 값 측정

$\alpha$ -Amylase 기질인 soluble starch를 농도별(0.2~3 mg/ml)로 반응시킨 후, 각 농도에서 생산된 환원당의 양으로 효소 활성을 측정하여 Lineweaver-Burk 방정식에 의하여 Michaelis-Menten 상수( $K_m$ )와 최대 반응속도( $V_{max}$ )를 계산하였다.

### 아미노산 조성 및 N-말단 부위 서열

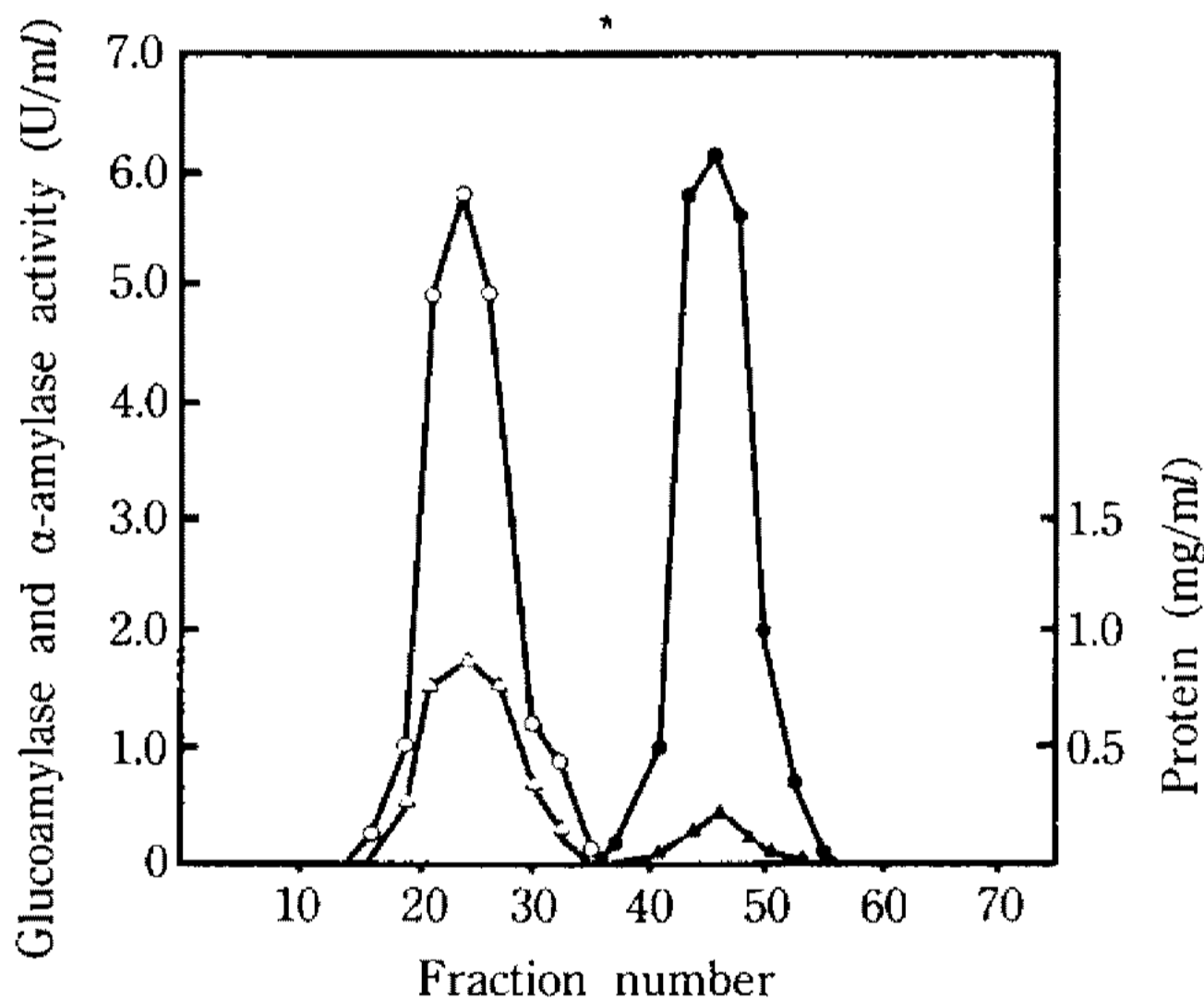
정제된 효소의 아미노산 조성은 건조된 시료를 6 N

HCl로 100°C에서 24시간 처리하여 가수분해시키고, PITC(phenylisothiocyanate) 유도체 처리과정을 거친 후, HPLC(Waters)에서 Pico-Tag column(3.9×150 mm)으로 분석하였다. 한편 cysteine과 cystine을 정량하기 위해서 건조된 시료를 가수분해시키기 전에 시료를 performic oxidation reagent를 처리하여 HCl에 안정한 cysteic acid로 변환시켰으며, tryptophan의 경우도 HCl에 불안정하므로 methane sulfonic acid(MSA)를 건조 시료에 처리하여 가수분해하였다. 그리고 N-말단 서열 분석은 아미노산 Sequencer(Milligen Biosearch Prosequencer 6600, U.S.A)에서 실시하였다.

## 결과 및 고찰

### 효소의 정제

*Schwanniomyces castellii* CBS 2863(ATCC 26077) 배양 상정액 중의  $\alpha$ -amylase를 ultrafiltration과 Sephacryl S-200 gel filtration 두 단계를 통하여 정제하였다(Fig. 1). *Sch. castellii*  $\alpha$ -amylase의 정제 단계는 Table 1과 같다. 최종 정제효소의 수율과 정제 정도는 각각 33%와 5.7배이었다. Wilson과 Ingledew(1)는 *Sch. alluvius*로부터 ultrafiltration, ion-exchange chromatography 그리고 gel filtration 등 세 단계로 정제하였고, Deibel 등(14)도 이 균주로부터 ultrafiltration, Suprose 12-FPLC 그리고 MonoQ FPLC 등 역시 세 단계를 거쳐 정제한 바 있다. 이들이 정제한  $\alpha$ -amylase 효소단백질의 최종 회수율과 정제 정도는 전자의 경우 각각 17%와 약 11배였고, 후자는 각각 14%와 28배이었다. 이것은 본 연구에 비해 회수율이 낮은 반면 정제 정도가 높았는데, 그 이유는 본 연구에서는 두 단계만으로 정제가 이루어졌기 때문으로 사료된다.



**Fig. 1.** Gel filtration of culture filtrate of *Sch. castellii* on Sephacryl S-200 column at a flow rate 0.10 ml/min. Enzyme activity and protein were assayed for each fraction. Symbols: ●—●; Activity of  $\alpha$ -amylase, ○—○; Activity of glucoamylase, ▲—▲; Protein of  $\alpha$ -amylase, △—△; Protein of glucoamylase

phacryl S-200 gel filtration 두 단계를 통하여 정제하였다(Fig. 1). *Sch. castellii*  $\alpha$ -amylase의 정제 단계는 Table 1과 같다. 최종 정제효소의 수율과 정제 정도는 각각 33%와 5.7배이었다. Wilson과 Ingledew(1)는 *Sch. alluvius*로부터 ultrafiltration, ion-exchange chromatography 그리고 gel filtration 등 세 단계로 정제하였고, Deibel 등(14)도 이 균주로부터 ultrafiltration, Suprose 12-FPLC 그리고 MonoQ FPLC 등 역시 세 단계를 거쳐 정제한 바 있다. 이들이 정제한  $\alpha$ -amylase 효소단백질의 최종 회수율과 정제 정도는 전자의 경우 각각 17%와 약 11배였고, 후자는 각각 14%와 28배이었다. 이것은 본 연구에 비해 회수율이 낮은 반면 정제 정도가 높았는데, 그 이유는 본 연구에서는 두 단계만으로 정제가 이루어졌기 때문으로 사료된다.

### 분자량 및 탄수화물 함량 측정

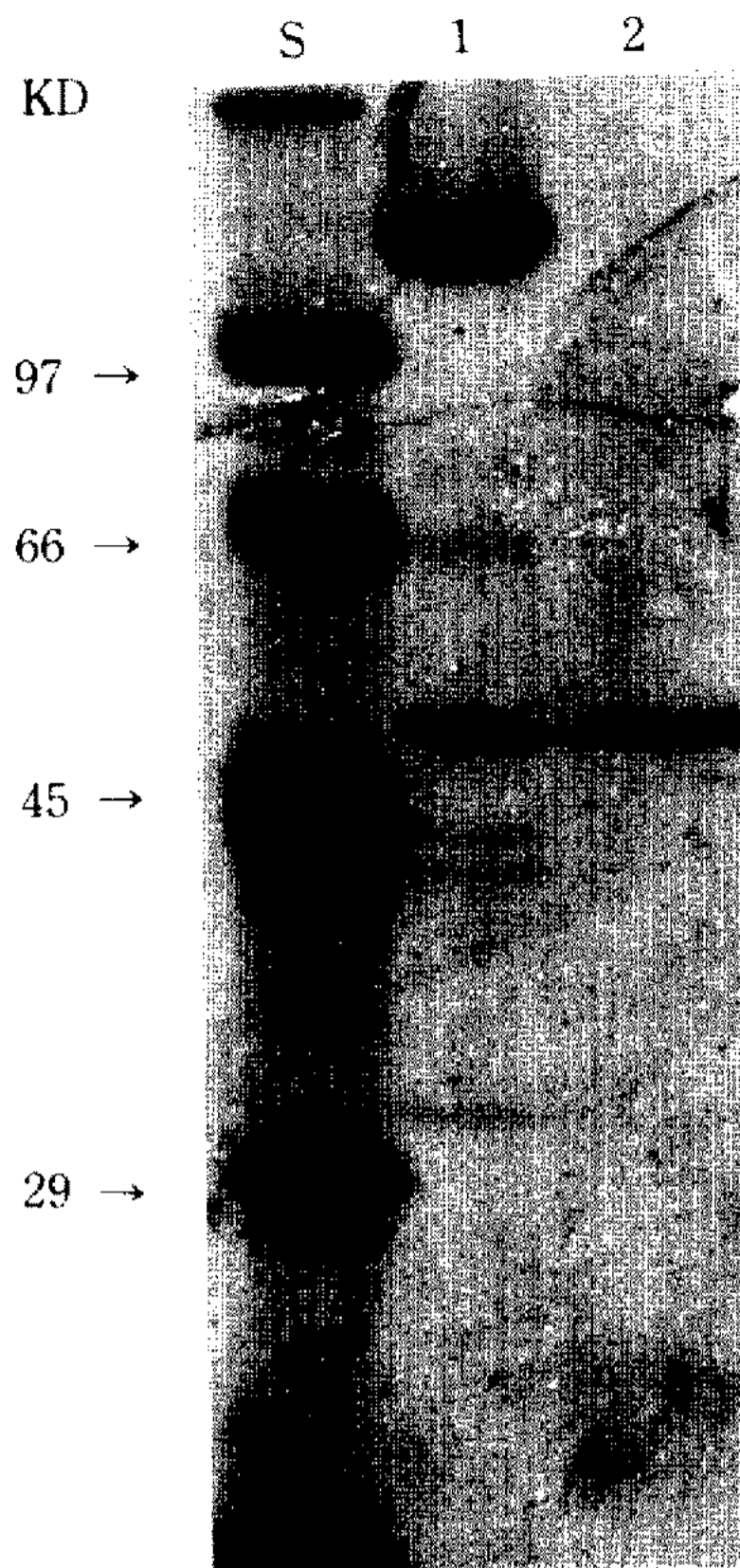
효소의 분자량 및 정제 정도를 확인하기 위해 SDS-PAGE를 실시하였다(Fig. 2). SDS-PAGE에 의해 측정된 분자량은 대략 56 KD이었고, gel filtration에 의하여 추정된 native 단백질의 분자량은 49.5 KD으로 단량체이었다(Fig. 3). 이것은 Deibel 등(14)이 보고한 결과(54.5와 47 KD)와 비슷하였다. 그리고 정제된 효소의 탄수화물 함량은 약 9~10%로 Deibel 등(14)이 분석한 *Sch. occidentalis*  $\alpha$ -amylase의 탄수화물 함량 12~14% 보다 약간 낮았다.

### 효소의 특성

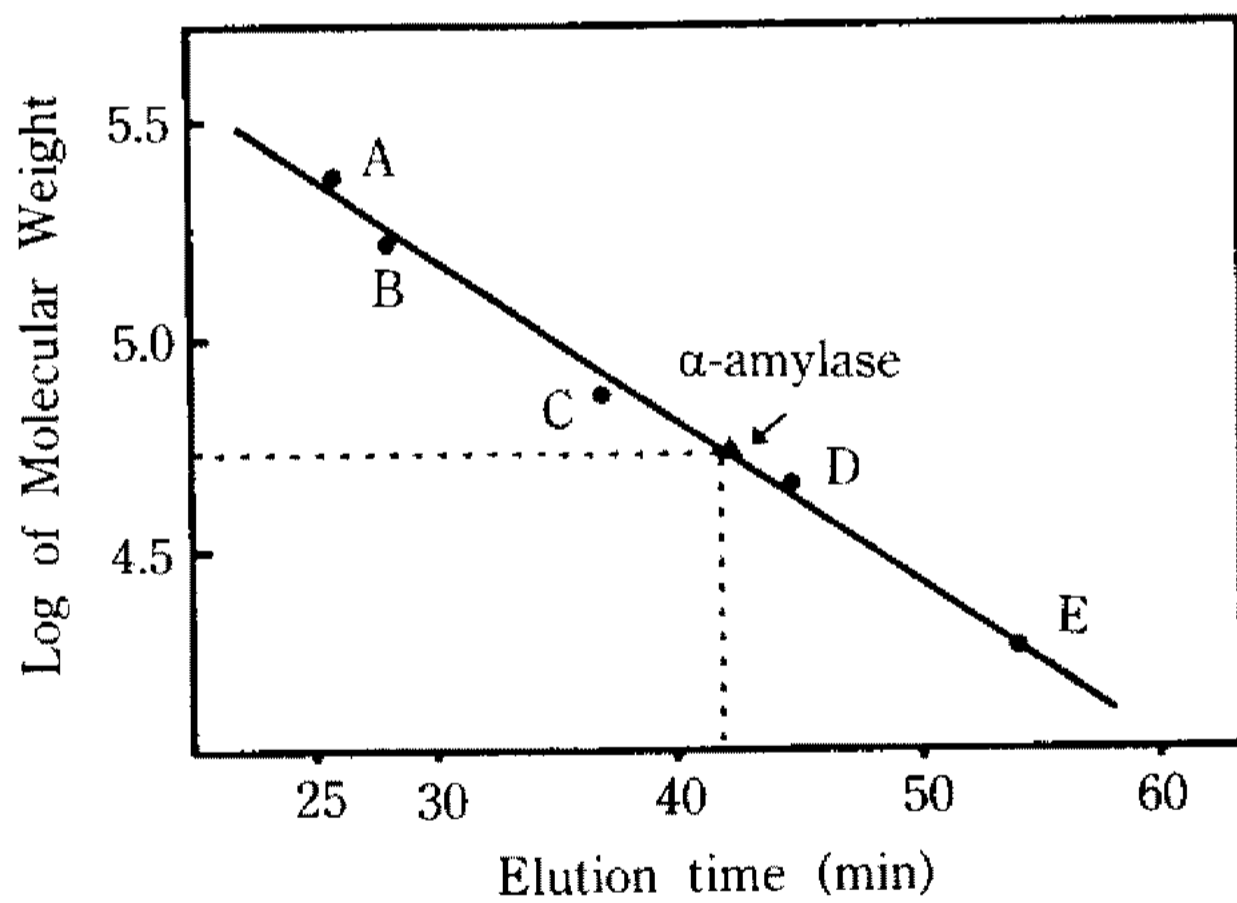
정제된 *Sch. castellii*  $\alpha$ -amylase 효소활성에 대한 최적 pH는 5.5였는데(Fig. 4), 이는 Sills 등(9)이 보고한 *Sch. castellii* CBS 2864  $\alpha$ -amylase의 그것과 일치한 반면, Wilson과 Ingledew(1)가 보고한 pH 6.3 보다는 약간 산성쪽이었다. 또 pH 4.0~7.0 범위에서 효소의 활성이 80% 이상 유지되었는데(Fig. 5), 이것은 Sills 등(9)과 Simoes-Mendes(8)가 보고한 결과와 거의 일치하였다. 한편, 효소의 최적 온도는 40°C 이었고

**Table 1.** Summary of purification of  $\alpha$ -amylase from the culture filtrate of starch grown *Sch. castellii*

Purification step	Volume (ml)	Total protein(mg)	Total activity(U)	Sp. act. (U/mg/protein)	Purification fold	Yield (%)
Culture filtrate	1,950.0	130.4	1,030.5	7.9	1.0	100
Ultrafiltration	8.0	67.7	570.8	8.4	1.1	55
Sephacryl S-200 filtration	24.5	7.6	340.0	44.7	5.7	33

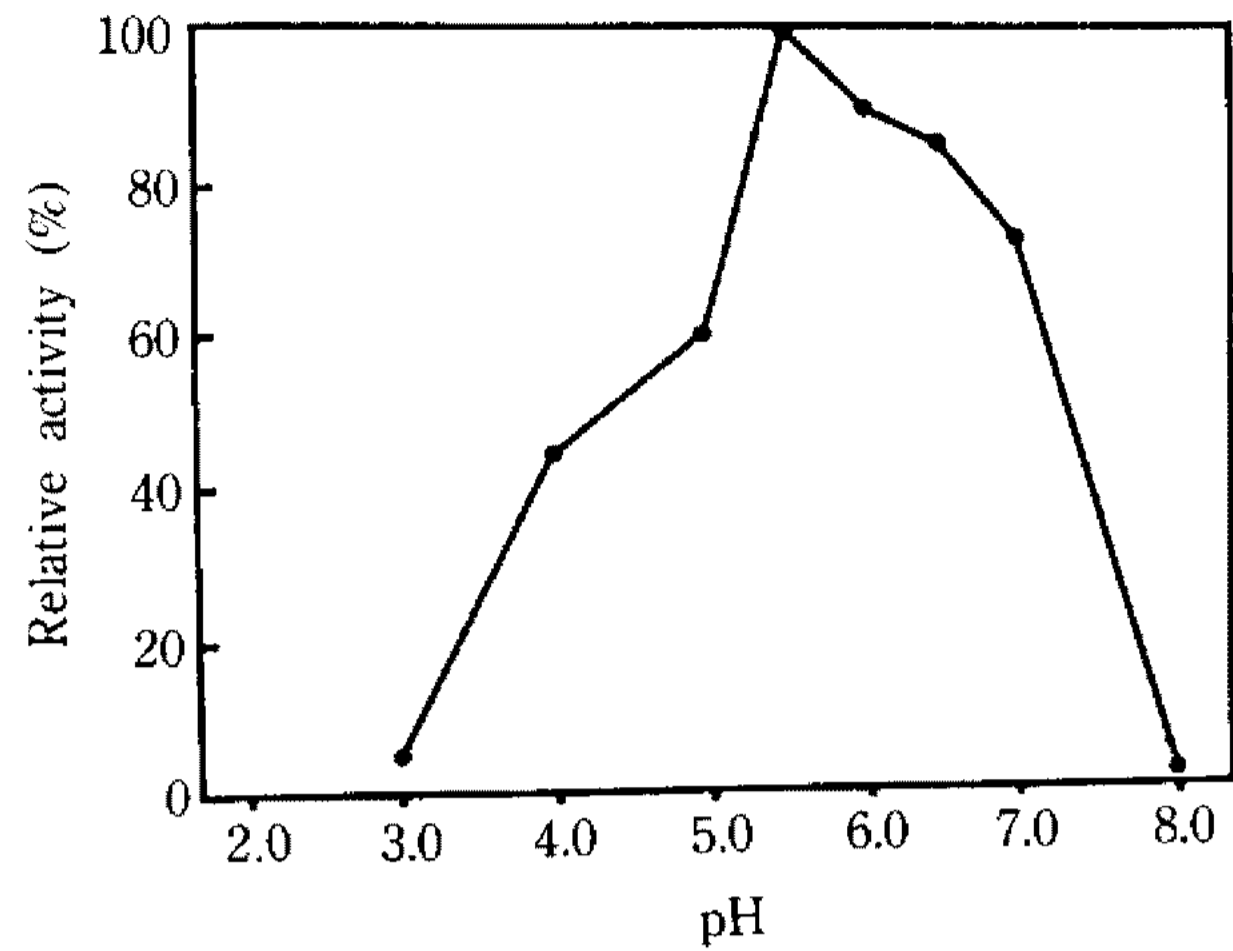


**Fig. 2. SDS-PAGE of extracellular  $\alpha$ -amylase from *Sch. castellii* grown on soluble starch.**  
The gel lanes from left to right are: (S), Molecular mass maker proteins; (1), Crude enzymes and (2), Purified enzyme.

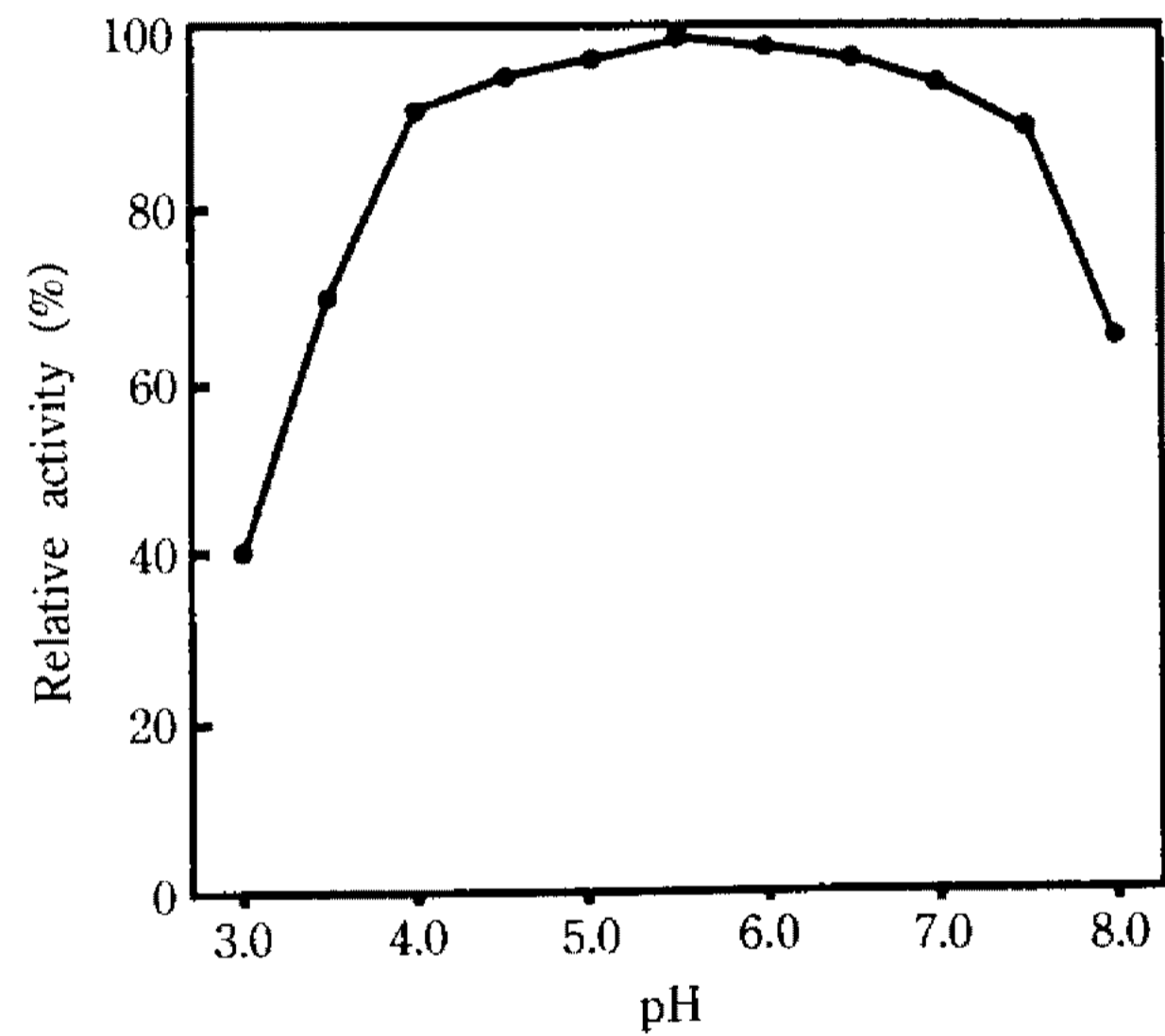


**Fig. 3. Determination of native molecular weight of  $\alpha$ -amylase of *Sch. castellii* by HPLC-Gel filtration.**  
A, catalase (244 KD); B,  $\gamma$ -globulin (155 KD); C, bovine serum albumin (66 KD); D, ovalbumin (45 KD); E, myoglobin (17 KD)

(Fig. 6), 50°C 이상에서는 30분 이후 효소활성이 급격히 감소하였고, 70°C 에서는 5분만에 완전히 활성을 잃었다(Fig. 7). 이같은 결과는 Sills 등(9)이 *Sch. caste-*

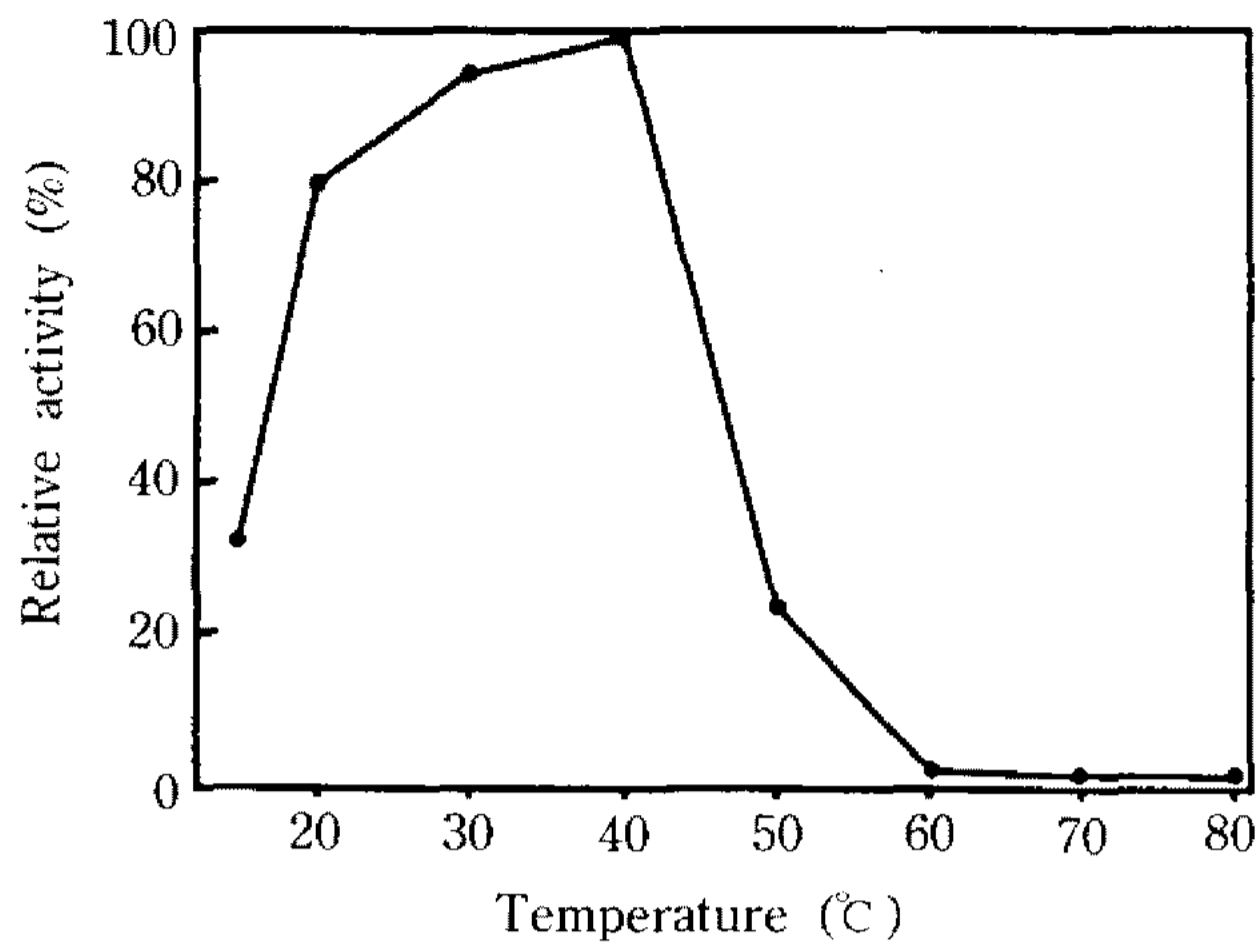


**Fig. 4. Effect of pH on  $\alpha$ -amylase isolated from *Sch. castellii*.**  
The enzyme activity was measured at various pHs under standard condition.

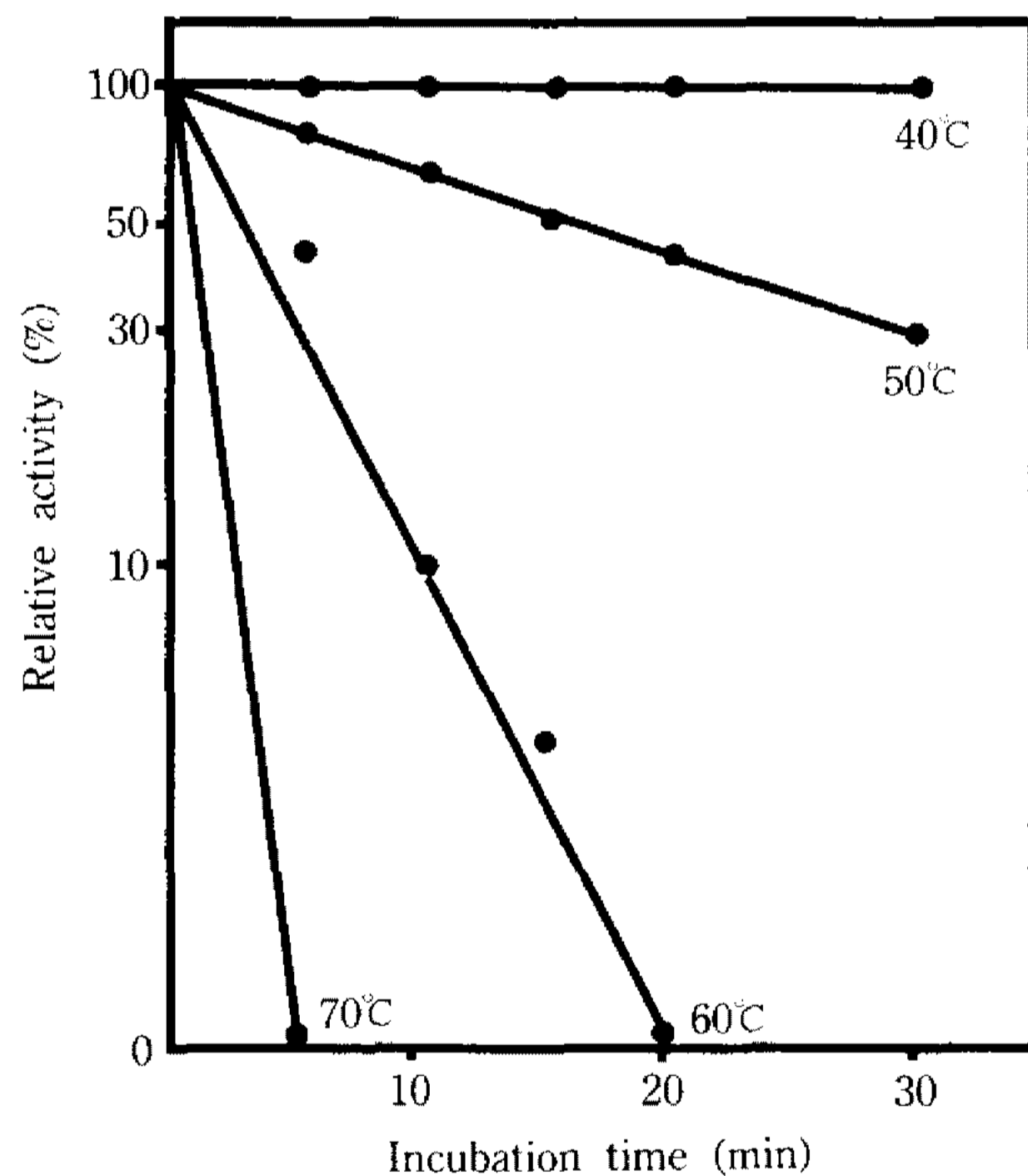


**Fig. 5. Effect of pH on the stability of  $\alpha$ -amylase isolated from *Sch. castellii*.**  
The enzyme activity was assayed under standard conditions after incubation at various pHs for 2 hours.

*llii* CBS 2864  $\alpha$ -amylase로부터 얻은 결과와 일치하고 있다. 그리고 *Sch. castellii*  $\alpha$ -amylase의 전분에 대한  $K_m$ 값과  $V_{max}$ 값이 각각 1.0 mg/ml과 100(U/min/mg protein)이었는데, 이 결과는 Dubreucq 등(15)과 Sills 등(9)이 *Sch. castellii* CBS 2863과 CBS 2864의  $\alpha$ -amylase로부터 얻었던 전분에 대한  $K_m$ 값 0.9 mg/ml과 1.15 mg/ml와는 비슷하였으나, *Sch. alluvius*  $\alpha$ -amylase의 전분에 대한  $K_m$ 값인 0.35 mg/ml(1)와 4.9 mg/ml(8)와는 차이가 있었다. 이같은 차이는 균종의 차이나 실험자의 오차 그리고 사용한 기질 원(source)의 차이에 기인될 수 있다고 사료된다.



**Fig. 6.** Effect of temperature on  $\alpha$ -amylase isolated from *Sch. castellii*. The enzyme activity was assayed at various temperatures.



**Fig. 7.** Thermal inactivation of  $\alpha$ -amylase isolated from *Sch. castellii*. The enzyme activity was assayed under standard conditions after incubation at various temperatures for 0 to 30 min in the absence of substrate.

### 아미노산의 조성 및 N-말단 서열분석

*Sch. castellii* CBS 2863으로부터 정제된  $\alpha$ -amylase의 조성은 Table 2와 같다. 본 효소의 아미노산 조성은 염기성 및 소수성 아미노산(Leu, Gly은 예외)의 수준이 낮았고, 산성 및 극성 아미노산(His은 예외)이 높은 비율로 존재하여 산성 단백질임을 알 수 있었다. 따라서 *Sch. castellii*의  $\alpha$ -amylase도 Sills 등(9)과 Deibel 등(14)이 *Sch. castellii*와 *Sch. occidentalis*로부터 정제한  $\alpha$ -amylase와 마찬가지로 산성 단백질이었다. 한편, N-말단 peptide의 아미노산 서열이 결정되었는데, Asp-Val-Ser-Ser-Ser-Ala-X-X-Thr-Arg-Ser-Glu-Ser-Ile-Tyr이었다. 이 결과를 이미 보고된  $\alpha$ -amylase 아미노산 서열과 비교하였다(Table 3). 그 결과 *Sch. occidentalis* ATCC 26076(16)과 *Sch. occide-*

**Table 2.** Amino acid composition of *Sch. castellii*  $\alpha$ -amylase

Amino acids	Amino acid analysis Mol %
Phe	3.2
Trp	1.3
Leu	7.5
Ile	6.4
Met	1.6
Val	5.9
Ser	11.4
Pro	3.6
Thr	6.1
Ala	6.5
Tyr	4.9
His	1.5
Glx	7.9
Asx	16.2
Lys	3.2
Cys	2.0
Arg	3.5
Gly	7.9

**Table 3.** Comparison of N-terminal sequence between *Sch. castellii*  $\alpha$ -amylase and other strain  $\alpha$ -amylases

Strain	N-terminal amino acid sequence	Reference
<i>Sch. castellii</i> CBS 2863(ATCC 26077)	D V S S S A X X Y R S Q S I Y	This work
<i>Sch. occidentalis</i> ATCC 26076	D <sup>34</sup> V S S S A D K W K D Q S I Y	Strasser <i>et al.</i> (16)
<i>Sch. occidentalis</i> CCRC 21164	D <sup>34</sup> V G S S A D K W K D Q S I Y	Wu <i>et al.</i> (17)
<i>Sa. fibuligera</i>	K <sup>34</sup> R Q T S A D K W R S Q S I Y	Itoh <i>et al.</i> (18)

*ntalis* CCRC 21164(17)와는 66%의 상동성을 가지고 있었고, *Saccharomycopsis fibuligera*의  $\alpha$ -amylase(18)의 그것과는 53%의 상동성을 보여주었다.

## 요 약

*Schwanniomyces castellii* CBS 2863의 배양 상정액으로부터  $\alpha$ -amylase를 정제하였다. Ultrafiltration과 gel filtration 두 단계를 통하여 정제된  $\alpha$ -amylase의 분자량은 약 56 KD이었고, glycoprotein이었다. 정제된  $\alpha$ -amylase 최적 pH와 온도는 각각 5.5와 40°C였고, pH 4.0~7.0 범위와 40°C에서 안정하였다. 전분에 대한  $K_m$ 값과  $V_{max}$ 값은 각각 1.0 mg/ml과 100 U/mg protein이었다. 그리고 아미노산 조성 분석결과 산성단백질이었으며, N-말단 아미노산 서열은 Asp-Val-Ser-Ser-Ser-Ala-X-X-Thr-Arg-Ser-Glu-Ser-Ile-Tyr이었다.

## 감사의 글

본 연구는 1992년도 교육부 유전공학연구비 일부에 의하여 수행되었습니다.

## 참고문헌

1. Wilson, J.J. and W.M. Ingledew. 1982. Isolation and characterization of *Schwanniomyces alluvius* amylolytic enzymes. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**: 301-307.
2. Lodder, J. 1970. *The yeasts, a Taxonomic study*. North-Holland Publishing Co., Amsterdam and London.
3. Sills, A.M. and G.G. Stewart. 1982. Production of amylolytic enzymes by several yeast species. *J. Inst. Brew.* **88**: 313-316.
4. Spencer-Martin, S. and N. van Uden. 1977. Extracellular amylolytic system of the yeast *Lipomyces kononenkoae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **6**: 241-250.
5. Evertova, H. 1966. Amylolytic enzymes of *Endomycopsis capsularis* I. Formation of the amylolytic system in cultures of *Endomycopsis capsularis*. *Folia Microbiol.* (Prague). **11**: 14-20.
6. Greenwood, C.T. and E.A. Milne. 1968. Starch degrading and synthesizing enzymes. In *Advances in carbohydrate chemistry*, Vol. 23. Edited by M.L. Wallfrom and R.S. Tipson. Academic Press.

- New York and London. Pp. 281-366.
7. Simoes-Mendes, B. 1982. Degradation del' amidon par des combinasons bimares de levures selection nees. *Indust. Aliment. Agric.* **11**: 983-987.
8. Simoes-Mendes, B. 1984. Purification and characterization of the extracellular amylases of the yeast *Schwanniomyces alluvius*. *Can. J. Microbiol.* **30**: 1163-1170.
9. Sills, A.M., M.E. Sauder and G.G. Stewart. 1984. Isolation and characterization of the amylolytic system of *Schwanniomyces castellii*. *J. Inst. Brew.* **90**: 311-314.
10. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein estimation with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
11. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. *Nature(London)*. **227**: 680-685.
12. Cho, N.C., K.H. Kim, S.B. Chun and K.C. Chung. 1990. Effect of cellobiose octaacetate, avicel and KC-flock on production of avicelase from *Penicillium verreculosum*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech.* **18**: 383-389.
13. Dubois, M., K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers and F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* **28**: 350-356.
14. Deibel, M.R., R.R. Hiebsch and R.D. Klein. 1988. Secreted amylolytic enzymes from *Schwanniomyces occidentalis*: Purification by fast protein liquid chromatography(FPLC) and preliminary characterization. *Prep. Biochem.* **18**: 77-120.
15. Dubreucq, E., H. Boze, D. Nicol, G. Moulin and Galzy. 1989. Kinetics of the  $\alpha$ -amylase of *Schwanniomyces castellii*. *Biotechnol. Bioengin.* **33**: 369-373.
16. Strasser, A.W.M., R. Selk, R.J. Dohmen, T. Niermann, M. Bielefeld, P. Seeboth, G. Tu and C.P. Hollenberg. 1989. Analysis of the  $\alpha$ -amylase gene of *Schwanniomyces occidentalis* and the secretion of its gene product in transformants of different yeast genera. *Eur. Biochem.* **184**: 699-706.
17. Wu, F.M., T.T. Wang and W.H. Hsu. 1991. The nucleotide sequence of *Schwanniomyces occidentalis*  $\alpha$ -amylase gene. *FEMS Microbiology Lett.* **82**: 313-318.
18. Itoh, T., I. Yamashita and S. Fukui. 1987. Nucleotide sequence of the  $\alpha$ -amylase gene (ALP1) in the yeast *Saccharomycopsis fibuligera*. *FEBS Letters.* **219**: 339-342.

(Received October 18, 1993)