

## Streptomyces sp. KSM-35의 특성과 Maltotetraose 생산성 아밀라제의 정제

차 진·김영배·서병철\*·박관화\*

고려대학교 식품공학과, \*서울대학교 식품공학과

### Characterization of *Streptomyces* sp. KSM-35 and Purification of Its Maltotetraose Forming Amylase

Jin Cha, Young Bae Kim, Byung Cheol Seo\* and Kwan Wha Park\*

Department of Food Technology, Korea University and

\*Department of Food Science and Technology, Seoul National University

#### Abstract

A bacterial strain KSM-35 producing maltotetraose forming amylase was isolated from compost and identified as *Streptomyces* based on its morphological, cultural, and physiological characteristics. The amylase from *Streptomyces* sp. KSM-35 culture filtrate was purified by ammonium sulfate precipitation, followed by the liquid chromatographic procedures using DEAE-Toyo pearl and sephadex G-100 with 27.1% activity recovery. The molecular weight of the enzyme was estimated to be 50,000 and the isoelectric point 4.3. The main product by the amylase from soluble starch was maltotetraose which accounted for 56% of all the oligosaccharides detected after 26 hrs of reaction. Maltose (20%) and maltotriose (16%) were the next important byproducts while glucose and maltopentaose were detected as traces.

Key words: amylase, maltotetraose, *Streptomyces*

#### 서 론

아밀라제는 전분을 가수분해하는 효소로서 동 식물에서부터 미생물에 까지 널리 분포하여 그 종류가 매우 다양하며, 산업적인 중요성 때문에 작용 온도나 pH, 생전분 분해능 등 새로운 특성을 지닌 효소들이 탐색되고 있다. 이러한 아밀라제는 흔히 전분을 가수 분해하는 양상에 따라  $\alpha$ -아밀라제,  $\beta$ -아밀라제 및 글루코아밀라제로 구별지어 왔다. 이 가운데  $\alpha$ -아밀라제로서 맥아당을 주산물로 생산하는 효소<sup>(1)</sup>가 발견된 이후, 분해산물에 특정 종류의 올리고당이 다량으로 생산되는 효소들이 발견되고 있다. 즉, *Pseudomonas stutzeri*<sup>(2)</sup> 및 *P. saccharophila*<sup>(3)</sup>, 및 *Bacillus*<sup>(4)</sup> 종류의 아밀라제는 전분에서 maltotetraose를, *Bacillus licheniformis* 및 *Aerobacter aerogenes* 아밀라제의 경우는 각각 maltopentaose 및 maltohexaose를 주요 산물로 생산하는 것이 알려져 있다<sup>(5)</sup>.

이러한 말토올리고당은 식품의 보습력, 점도, 빙점, 삼투압 등의 물리적 성질을 감미의 현격한 증가없이

조절할 수 있다. 또한 갈변반응의 감소와 결정방지과 같은 효과도 기대되어 식품공업에서 이용될 수 있는 가능성이 높다<sup>(7)</sup>. 본 연구는 전분 가수분해시 maltotetraose를 주산물로 생성하는 아밀라제를 생산하는 방선균을 분리하여 이 미생물의 분류학적 위치를 밝히려 하였다. 또한 이 방선균이 생산하는 아밀라제를 정제하여 몇 가지 특성을 조사하였기에 보고하는 바이다.

#### 재료 및 방법

##### 미생물의 분리 및 동정

토양 및 퇴비시료를 50°C에서 3일간 건열처리 한 후 0.85% NaCl 용액에 현탁하였다. 현탁액을 inorganic salts-starch 한천배지에 도말하여 45°C에서 3일 배양 후 나타나는 방선균을 육안으로 선별하여 분리하였다. Inorganic salts-starch 한천배지는 가용성 전분 10g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1g, NaCl 1g, CaCO<sub>3</sub> 2g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1g, 미량 염류 용액 1 ml, 한천 2%, 증류수 1000 ml로 만들어 pH 7.2로 조정하였다. 미량 염류 용액은 FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.1g, MnCl<sub>2</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.1g, 및 ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.1g을 증류수 100 ml에 녹여 제조하였다. 분리한 균주는 다시 같은 조건에서 배양하여 요드 용액을 부어 콜로니 주위에 투명한 형성 여부로 아밀라제 생산을 확인하였다. 이들을

Corresponding author: Young Bae Kim, Department of Food Technology, Korea University Anam-dong, Sungbuk-ku, Seoul 136-701, Korea

비교적 활성이 강한 균주들의 분해산물을 HPLC로 조사하고 maltooligo당을 생성하는 균주를 선별하였다. 선별한 KSM-35 균주는 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology<sup>(7)</sup>에 의하여 동정하였으며 일부의 시험은 Korn-Wendisch and Kutzner의 방법<sup>(8)</sup>을 따라서 실시하였다. 시험균주는 inorganic salts-starch 한천사면에서 45°C로 3일 배양하여 냉장고에 보관하였고, 1개월 마다 계대 배양하였다.

### 효소의 생산

보관 균주를 다시 Inorganic salts-starch 한천사면에서 3일간 배양한 후 균체 한 백금니를 100 ml의 생산배지가 담긴 500 ml의 삼각 플라스크에 접종하여 150 rpm으로 회전 진탕하면서 45°C에서 36시간 배양하였다. 이 배양물을 다시 같은 배지에 1% 접종하여 같은 조건에서 48시간 배양하였다. 배양액은 5000×G에서 30분 동안 원심분리하고 얻어진 상등액을 조효소로 사용하였다. 효소생산배지는 가용성 전분 20g, peptone 10g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1g, NaCl 5g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2g, CaCO<sub>3</sub> 0.11g을 1000 ml의 물에 녹이고 최종 pH를 7.2로 조절하였다.

### 효소의 정제

조효소액에 유안을 가하여 40~70% 포화시 침전되는 분획을 취하였다. 얻은 침전물은 20 mM 인산완충용액(pH 5.9)으로 24시간 투석하였다. 투석된 시료는 다시 20 mM 인산완충(pH 7.0)으로 평형시킨 DEAE-Toyo Pearl (650°C) 이온수지로 만든 관(24×500 mm)에 흡착시키고 NaCl의 농도가 0~0.5 M로 증가되는 20 mM 인산완충용액(pH 7.0)으로 용출시켰다. 효소의 활성을 나타내는 분획은 한외여과(Amicon membrane, MW. cut off 10,000)에 의하여 농축하고 Sephadex G-100으로 만든 관(20×900 mm)에 주입하여 20 mM 인산완충용액(pH 7.0)을 사용하여 2회 겔 여과 크로마토그래피하였다.

### 아밀라제의 활성측정

호화된 1% 가용성 전분용액 0.5 ml과 0.04 M 인산완충용액(pH 5.9) 0.4 ml, 그리고 효소용액 0.1 ml을 섞어 37°C에서 30분 동안 반응시킨 후 0.1 N HCl용액 0.1 ml을 가하여 반응을 정지시켰다. 반응액에 생성된 환원당을 DNS방법으로 측정하였다. 이 때 효소의 1 단위는 위의 조건하에서 1 μmole의 maltose를 생산하는 효소의 양으로 정하였다.

### 단백질 및 당류의 분석

단백질은 Bradford의 방법<sup>(9)</sup>에 의하여 ovalbumin을 표준물질로 사용하여 정량하였다. 전분의 가수분해산물인 당들은 HPLC(Waters, R 401 Pye Unicam, PU4023 refractive index detector)를 사용하여 분석하였다. Nucleosyl 10 NH<sub>2</sub>관(4×300 mm)에 20 μl의 시료를 주입하고 유속 1.0 ml/min의 acetonitrile : water (65 : 35) 용액을

이동상으로 사용하였다.

### 효소의 분자량 및 등전점 측정

효소 단백질의 분자량은 Laemmli 방법<sup>(10)</sup>에 의하여 SDS-PAGE에 의하여 측정하였으며 등전점은 phastsystem (Pharmacia)를 이용한 isoelectrical focusing에 의하여 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### 분리주 KSM-35의 동정

분리한 KSM-35는 발달된 기증 균사를 형성하며 전자현미경 관찰로 KSM-35의 포자사슬에서는 뚜렷한 spiral 형성이 관찰되었으며, 포자의 표면은 매끈하였으며, 12~15개의 포자가 하나의 포자 사슬을 형성하는 경우가 보통이었다(Fig. 1). 균사에서 분리한 세포벽 가수분해물에서 L-diaminopimelic acid 외에도, glycine, alanine, glutamic acid이 검출되었다. 이러한 형태적 특성과 세포벽 성분 분석 결과에서 KSM-35 균주는 세포벽 성분에 따른 방선균의 분류에 의하여 *Streptomyces* 속에 속하는 것으로 판단하였다.

분리주의 배양 특성 및 생리적 특성을 Table 1 및 2에 나타내었으며 이 결과를 Bergey's manual of systematic bacteriology<sup>(7)</sup>와 비교 검토하였다. 배양중 수용성 색소는 생기지 않았으며 다양한 화합물들을 탄소원 혹은 질소원으로 이용하였다. 한편 neomycin(50 μg/ml), penicillin G(10 IU), lysozyme(100 μg/ml)에 저항성을 보이며 45°C에서도 성장하였다. 또한 7% NaCl, 0.01% sodium azide 및 0.1% phenol 첨가 시에도 성장하였다. 이러한 특징들을 고려하여 *Streptomyces albus*에 가깝다고 생각되었으나 일치하지 않는 점도 다수 있어 종명을 확정짓기가 어려웠다. 정확한 종명을 밝히기 위하여 더욱 세밀한 분석이 필요한 것으로 생각되었고 따라서 우리는 일단 분리균주를 *Streptomyces* sp. KSM-35이라고 부르기로



Fig. 1. Electron microphotograph of *Streptomyces* sp. KSM-35

하였다.

효소의 정제

Streptomyces sp. KSM-35의 배양여액을 조효소로 하여 유안 침전분획, DEAE-Toyo Pearl 이온교환 크로마토그래피, 그리고 2회의 Sephadex G-100으로 겔 여과한 결과 44.5배 정제하였으며 이때 수율은 27%이었다. 각 단계의 정제도와 수율을 Table 3과 같이 정리하였으며 정제 과정의 크로마토그램을 Fig. 2에 나타내었다.

효소의 분자량과 등전점의 측정

Streptomyces sp. KSM-35의 amylase 분자량을 SDS-PAGE로 측정된 결과 Fig. 3과 같이 50,000 정도로 나타났다. 또한 isoelectric focusing으로 측정된 등전점은 4.3으로 측정되었다(Fig. 4). Maltotetraose 생성 amylase들의 분자량은 Pseudomonas stutzeri 및 P. saccharophila의 경우 각각 62,000 및 57,000이며 등전점은 각각 4.7 및 5.3으로 알려져 있어 Streptomyces KSM-35의 아밀라제는 이들과 다소 차이를 보였다<sup>(3)</sup>. 또한 본 효소의

등전점은 같은 속에 속하는 Streptomyces hygroscopicus의 5.1 보다도 현저히 낮은 값이었다<sup>(1)</sup>.

Table 1. Morphological and cultural characteristics of Streptomyces sp. KSM-35

Characteristics	KSM-35
Aerial mycelium	
Chain of arthrospores	formed
Spore surface	smooth
Spore chains	spirales
Spore mass color on	
Glycerol-asparagine agar	greyish white
Inorganic salts-starch agar	white
Yeast-malt extract agar	white
Oat meal agar	white
Diffusible pigment	not observed
Colony reverse pigmentation	pale brown
Melanin production on	
Peptone iron agar	not observed
Tyrosine agar	formed
Amino acids in cell wall	L,L-diaminopimelic acid, glycine, alanine, glutamic acid
Sugars in cell wall	not detected

Table 2. Some physiological characteristics of Streptomyces sp. KSM-35

Characteristics	KSM-35
Utilization of carbon sources	
i-inositol	+
galactose	+
melibiose	+
salicin	+
xylose	+
rhamnose	+
sucrose	+
mannitol	+
raffinose	+
arabinose	+
fructose	+
glucose	+
citrate	+
oxalate	-
Utilization of Nitrogen sources	
potassium nitrate	+
histidine	+
phenylalanine	+
hydroxyproline	+
cysteine	+
asparagine	+
Degradation of	
esculine	+
xanthine	-
tyrosine	+
casein	+
cellulose	+
urea	+
Resistance to	
neomycin(50 µg/ml)	+
rifamycin(50 µg/ml)	-
oleandomycin(100 µg/ml)	-
penicillin G(10 IU)	+
lysozyme(100 µg/ml)	+
Growth with	
7% NaCl	+
0.01% sodium azide	+
0.1% phenol	+
Growth at 45°C	+

Table 3. Purification of the amylase from Streptomyces sp. KSM-35

Purification steps	Volume (ml)	Total activity (units)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Purification fold (times)	Yield (%)
Culture filtrate	2000	128400	804.8	160	1.0	100.0
40-70% Sat. (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ppt.	56	92370	484.4	191	1.2	71.9
DEAE-Toyo pearl, Ultra filtration	23	73420	146.0	503	3.2	57.2
Sephadex G-100 gel filtration(I)	180	36540	6.8	5374	33.7	28.5
Sephadex G-100 gel filtration(II)	236	34810	4.9	7104	44.5	27.1

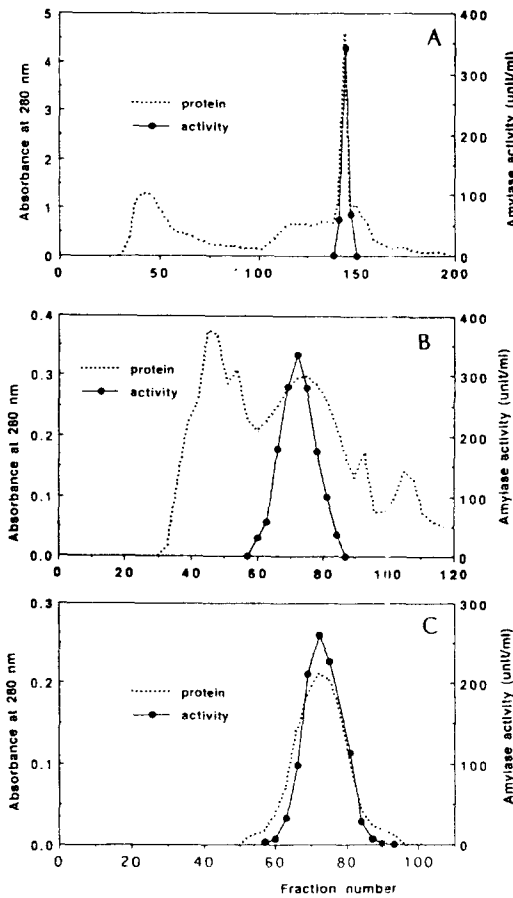


Fig. 2. Liquid chromatograms of amylase from *Streptomyces* sp. KSM-35 using DEAE-Toyo pearl (A), Sephadex G-100 (B and C)

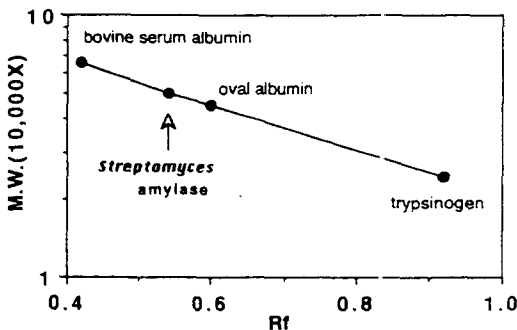


Fig. 3. Determination of molecular weight of the amylase from *Streptomyces* sp. KSM-35

전분 가수분해 산물의 분석

*Streptomyces* sp. KSM-35의 amylase에 의한 전분 가수분해 산물을 분석한 결과는 Fig. 5와 같다. 2.5% 전분



Fig. 4. Isoelectric focusing of amylase from *Streptomyces* sp. KSM-35

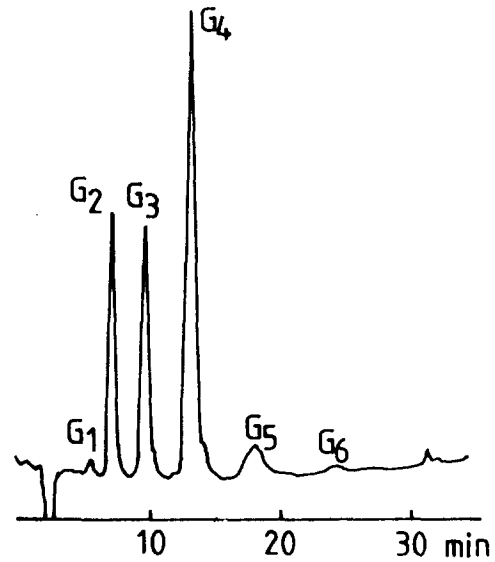


Fig. 5. HPLC analysis of oligosaccharides produced from soluble starch by the amylase of *Streptomyces* sp. KSM-35

G1; glucose, G2; maltose, G3; maltotriose, G4; maltotetraose, G5; maltopentaose, G6; maltohexaose.

용액을 조효소와 26시간 반응시킨 후 얻어진 소당류중에서 56%가 maltotetraose로서 주산물이었다. 다음으로는 maltose 및 maltotriose가 각각 20% 및 16%를 차지하였으며, 그 외에도 소량의 maltopentaose, maltohexaose 등과 미량의 포도당이 검출되었다. 이미 알려진 *Pseudomonas stutzeri*의 경우 maltotetraose의 생성율이 55%로서<sup>(2)</sup> 본 효소와 비슷한 수준이나, *Bacillus circulans* sp. MG-4 효소의 경우에도 maltotetraose가 최고 65%까지 가능한 조건을 제시하고 있다<sup>(4)</sup>. 본 효소의 경우도 전분의 전처리나 반응조건의 개선이 추시되어야 할 것으로 생각된다. 그러나 *Streptomyces* 속에 속하는 종류로는 *S. hygroscopicus* SF-1084가 amylose에서 88% 맥야당을 생산한다고 보고되어 있을 뿐<sup>(1)</sup> 다른 종류의 올리고당 생성에 관한 보고는 찾지 못하였다.

퇴비에서 maltotetraose 생산성 아밀라제를 분리하는 세균 KSM-35를 분리하여 그의 형태적, 생화학적 특성을 고려하여 *Streptomyces albus*로 잠정 동정하였다. 이 균주가 생산하는 아밀라제는 유안침전 분획, DEAE-Toyo pearl 및 2회의 sephadex-100 크로마토그래피로 44.5배 정제하며 27.1%의 활성을 회수할 수 있었다. 이 효소의 등전점은 4.3이었으며 SDS-PAGE로 분석한 결과 분자량은 약 50,000이었다. 이 균주의 아밀라제를 2% 전분과 26시간 반응시킨 후 생성된 올리고당류를 HPLC로 조사한 결과 56%가 maltotetraose로서 주산물이었고 maltose와 maltotriose가 각각 20% 및 16%를 차지하였으며 기타 소량의 glucose, maltopentaose가 검출되었다.

### 감사의 글

본 보문은 한국과학재단의 1989년 목적기초연구과제의 일부결과로서 지원에 대하여 감사드립니다.

### 문헌

- Hidaka, H., Koaze, Y., Yoshida, K., Niwa, T., Shomura, T. and Niida, T.: Isolation and some properties of amylase from *Streptomyces hygrosopicus* SF-1084. *Die Stärke*, 26, 413(1974)
- Robyt, J.F. and Ackerman, R.J.: Isoaltion, purification, and characterization of a maltotetraose producing amylase from *Pseudomonas stutzeri*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 145, 105(1971)
- Kobayashi, S., Okemoto, H., Hara, K., Hashimoto, H. and Yamasato, K.: Preparation and some properties of a novel maltotetraose-forming enzyme of *Pseudomonas saccharophila*. *Denpun Kagaku.*, 38, 27(1991)
- Takasaki, Y., Shinohara, H., Tsuruhisa, M., Hayashi, S. and Imada, K.: Maltotetraose-producing amylase from *Bacillus* sp. MG-4. *Agric. Biol. Chem.*, 55, 1715 (1991)
- Kainuma, K.: Alpha amylases which produce specific oligosaccharides. In *Handbook of Amylases and Related Enzymes*, The Amylase Research Society of Japan(ed.), Pergamon Press, Oxford, p.50(1988)
- Tsujiyaka, Y.: Maltotetraose syrup. In *Handbook of Amylases and Related Enzymes*, The Amylase Research Society of Japan(ed.), Pergamon Press, Oxford, p.213 (1988)
- Locci, R.: *Streptomyces* and Related Genera. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Williams, S.T., Sharpe, M.E. and Holt, J.G.(ed.), Williams Wilkins, Baltimore, Vol.4, p.2451(1989)
- Korn-Wendisch, F. and Kutzner, H.J.: The family *Streptomycetaceae*. In *The Prokaryotes 2nd ed., a Handbook on the Biology of bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, and applications*, A. Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W. and Schleifer, K.H.(ed.), Springer-Verlag, New York, Vol.1, p.921(1992)
- Bradford, M.M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing for the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248(1976)
- Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680(1970)

(1994년 8월 23일 접수)