

## 해양 호염성 세균 *Vibrio alginolyticus*가 생산하는 Extracellular Amylase의 특성

김 영 재

창원대학교 자연과학대학 미생물학과

**Properties of an Extracellular Amylase Produced by the Marine Halophilic Bacterium *Vibrio alginolyticus*.** Kim, Young Jae. Department of Microbiology, College of Natural Sciences, Changwon National University, Sarim-Dong, Changwon 641-773, Kyungnam, Korea – *V. alginolyticus* 138-2, a marine halophilic bacterium, produced an extracellular amylase with a molecular weight of ca. 56,000. The analysis of the digestion products of soluble starch by thin layer chromatography (TLC) revealed that the extracellular amylase of *V. alginolyticus* 138-2 is a saccharifying-type alpha-amylase. The alpha-amylase activity of the culture supernatant of soluble starch was optimal at pH 6.0 and 45 °C.  $\text{Ca}^{2+}$  slightly increased the alpha-amylase activity, whereas  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ , and  $\text{Mn}^{2+}$  inhibited the enzymatic activity. Alkylating thiol group agent, iodoacetic acid did not affect the alpha-amylase activity, but reduced thiol reagents such as dithiothreitol, cysteine, and beta-mercaptoethanol stimulated the enzymatic activity. On the other hand, even if *V. alginolyticus* 138-2 is a marine halophilic bacterium, its alpha-amylase activity was significantly inhibited by NaCl.

**Key words :** marine bacterium, *Vibrio alginolyticus*, extracellular alpha-amylase, reduced thiol reagents, NaCl.

Amylase는 식품, 음료, 의약품 산업에 널리 이용되는 중요한 효소로서 가수분해 기작에 따라 다음과 같이 분류되어지고 있다. 비환원성 말단으로부터 전분을 가수분해하여 나가는 exo-type과 거의 무작위에 가까운 분해양식을 갖는 endo-type으로 나누어진다. Exo-type의 amylase로는 전분을 비환원성 말단으로부터 가수분해하여 glucose를 생성하는 glucoamylase, maltose unit를 생성하는 beta-amylase, maltotriose를 생성하는 exo-maltotriohydrolase, malto-tetraose를 생성하는 exo-maltotetrahydrolase, maltohexaose를 생성하는 exomaltotetrahydrolase가 있다. Endo-type의 분해양식을 갖는 것으로는 전분의  $\alpha(1\rightarrow4)$  glycosidic bond만을 가수분해하는 alpha-amylase와  $\alpha(1\rightarrow6)$  glycosidic bond만을 선택적으로 가수분해하는 pullulanase와 isoamylase가 있다. 이들 중 alpha-amylase, beta-amylase, glucoamylase는 대표적인 amylase로서 연구가 잘 되어있다. Alpha-amylase는 상기에서 설명한 바와 같이 endoenzyme으로서 전분의  $\alpha(1\rightarrow4)$  glycosidic bond를 분해하여 glucose와 oligosaccharide를 생산하며 동물, 식물, 미생물에 걸쳐 광범위하게 존재한다. 세균 유래의 alpha-amylase 중에는 *Bacillus subtilis*[25], *B. amyloliquefaciens*[13, 22], *B. licheniformis*[1, 16], *B. stearothermophilus*[14, 21, 24], *B. coagulans*[5, 6]의 alpha-amylase가 잘 연구되어 있다. Beta-amylase는 exoenzyme으로서 전분의  $\alpha$

(1→4) glycosidic bond를 가수분해하여 비환원성 말단으로부터 maltose unit를 생산하며 식물 및 미생물 유래의 것이 알려져 있다. 세균 유래의 beta-amylase 중에는 *B. cereus*[11], *B. circulans*[8], *B. megaterium*[4, 15, 20], *B. polymyxa*[2, 3], *B. stearothermophilus*[17] 등과 같은 세균들이 생산하는 beta-amylase가 정제되어 그 특성이 보고된 바 있다. Alpha-amylase와 beta-amylase는  $\alpha(1\rightarrow4)$  glycosidic bond만을 가수분해할 수 있으며  $\alpha(1\rightarrow6)$  glycosidic bond는 가수분해하지 못하는 것으로 알려져 있다. 한편, glucoamylase는 전분의  $\alpha(1\rightarrow4)$  glycosidic bond와  $\alpha(1\rightarrow6)$  glycosidic bond를 모두 분해하여 전분을 거의 완전히 glucose unit로 가수분해하기 때문에 glucose의 조제에 공업적으로 이용되어지고 있다. 현재 이용되어지고 있는 glucoamylase는 *Rhizopus*[10, 19]나 *Aspergillus* [12] 등의 곰팡이 유래의 것이 주를 이루고 있다.

Amylase에 관한 연구는 상기에서 언급한 바와 같이 *Bacillus* 속을 중심으로한 그람 양성 세균에서 주로 행해졌으며, 그람 음성 세균이 분비하는 amylase에 관해서는 연구가 활발히 이루어지지 않고 있다. 특히, 고농도의 NaCl이 존재하는 해수에서 서식하는 그람 음성 세균이 분비하는 amylase에 관해서는 연구가 거의 이루어지지 않고 있는 실정이다. 일반적으로 효소는 고농도의 NaCl에 의하여 그 활성이 현저히 저해되어지는 것으로 알려져 있다. 이에 본 연구에서는 그람 음성 해양 세균 *Vibrio alginolyticus*[7, 23]가 생산하는 extracellular amylase의 가수분해기작 및 NaCl의 영향 등을 포함하는 효소학적 성질을 연구하여 그 결과를 보고한다.

\*Corresponding author

Tel. 82-551-279-7464, FAX. 82-551-279-7464

E-mail: yjkim@sarim.changwon.ac.kr

## 재료 및 방법

### 균주 및 생장배지

본 연구에 사용된 균주는 *V. alginolyticus* 138-2로서 일본국 동경대학 Tokuda Hajime 박사로부터 분양받았다. *V. alginolyticus* 138-2는 37 °C에서 50 mM potassium phosphate buffer(pH 6.5), 0.5% polypeptone, 0.5% yeast extract, 3% NaCl로 이루어진 액체배지내에서 호기적으로 배양되어졌다.

### Extracellular amylase의 활성 측정

효소 활성은 전분을 기질로 하여 dinitrosalicylic acid (DNS)법으로 측정하였다. 약 12시간 배양시킨 전배양을 600 nm에서 약 0.05의 탁도로 액체배지(100 ml)에 접종하였다. Extracellular amylase의 활성을 측정하기 위하여, 배양액 1 ml를 한 시간 간격으로 취하여 4 °C에서 20분 동안 원심분리(12,000×g)하였다. 원심분리된 상등액 0.1 ml에 0.4 ml의 50 mM MES-NaOH(pH 6.0)를 가하고 기질인 soluble starch (1% in 50 mM MES-NaOH, pH 6.0) 0.5 ml를 가하여 반응시켰다. 이때 가수분해 반응은 45 °C에서 30분 동안 이루어졌으며 반응 종결을 위하여 3,5-dinitrosalicylic acid(1 ml)를 첨가 하였고 reagent blank 와 sample 을 수조내에서 7분 동안 가열한 후 얼음 속에서 냉각하였다. 이들을 증류수로 5배 희석하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### SDS-PAGE상에서 extracellular amylase의 검출

Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)상에서 *V. alginolyticus*의 extracellular amylase를 검출하기 위하여 12.5% gel을 사용하였으며, SDS-PAGE는 Laemmli 방법을 따랐다[9]. 전기영동전에 시료들은 100 °C에서 2분 동안 가열되어졌다. 전기영동후 gel로부터 SDS를 제거하기 위하여 Triton X-100(2.5%, v/v)로 실온에서 한 시간 동안 gel을 세척하였다. 그리고 45 °C에서 두 시간 동안 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.5% starch를 함유한 0.1 M glycine buffer (pH 6.0)내에서 gel을 incubation하였다. 반응을 종결 시키기과 가수분해 반응이 이루어지지 않은 starch background를 염색하기 위하여 gel을 10 mM I<sub>2</sub>-KI용액으로 처리하였다. Amylase 활성이 존재하는 부분은 dark background하에서 light band로 나타났다.

### Thin layer chromatography(TLC)에 의한 가수분해 산물의 분석

50 mM MES-NaOH(pH 6.0)에 1%의 농도로 조제된 soluble starch 0.5 ml와 50 mM MES-NaOH(pH 6.0) 0.4 ml를 Sartorius사(Goettingen, Germany)의 EasyFlow unit로 농축한 상등액 0.1 ml와 혼합하여 45 °C에서 반응시켰다. 반응은 100 °C에서 2분간 열처리한 다음 얼음에 정치시킴으로써 종료시켰다. 반응액 20 µl를 TLC silica gel plate에 점

적하여 전개시켰다. 전개 용매로는 *n*-butanol : ethanol : water (5 : 3 : 2) 혼합액을 사용하였고 0.5% AgNO<sub>3</sub>(acetone으로 녹임)와 0.5 M NaOH(ethanol로 녹임) 용액을 분사하여 extracellular amylase에 의한 soluble starch의 가수분해 산물을 분석하였다.

## 결과 및 고찰

### Extracellular amylase의 분자량 및 가수분해 산물의 분석

*V. alginolyticus* 138-2는 분자량 약 56,000 Da의 extracellular amylase를 생산하는 것으로 SDS-PAGE상에서 밝혀졌다(Fig. 1). 이 extracellular amylase는 전기영동시 SDS 및 2분간 열처리를 하여도 gel로부터 SDS만 제거해 주면 효소 활성이 회복되었다. Active staining과 상호비교에 의하여 Coomassie Brilliant Blue R로 염색한 gel에서도 extracellular amylase의 위치를 확인할 수 있었다(Fig. 1A). Thin layer chromatography(TLC)를 이용하여 extracellular amylase에 의한 soluble starch의 가수분해 산물을 분석한 결과, 주요 end product로서 glucose, maltose, maltotriose가 생성된 것을 확인하였다(Fig. 2). 또한, 반응시간이 길어질수록 glucose, maltose, maltotriose의 양이 크게 증가하였다. 따라서 *V. alginolyticus* 138-2가 생산하는 extracellular amylase는 당화형 alpha-amylase임을 알 수가 있다.

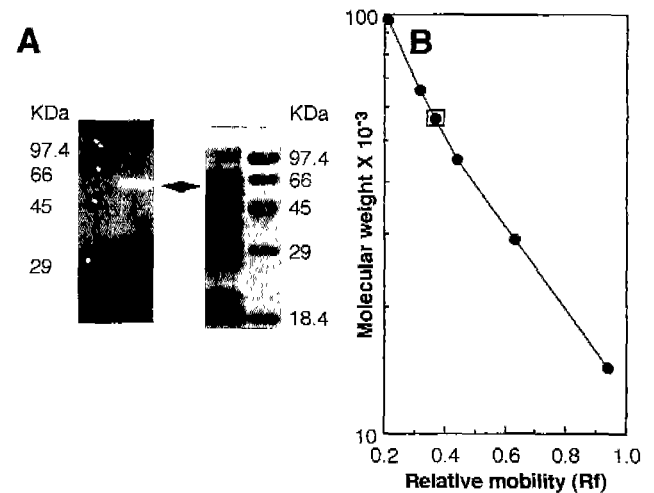


Fig. 1. Molecular weight estimation of an extracellular amylase from *V. alginolyticus* 138-2.

(A) Coomassie Brilliant Blue R staining(right) and active staining Brilliant Blue R staining(left). Amylase activity was detected *in situ* after SDS-PAGE, as described in Materials and Methods. A 12.5% gel was used to analyze 15 µl of culture supernatant. (B) Molecular weight estimation. The molecular weight standards used were phosphorylase b, bovine serum albumin, ovalbumin, carbonic anhydrase, and beta-lactoglobulin.

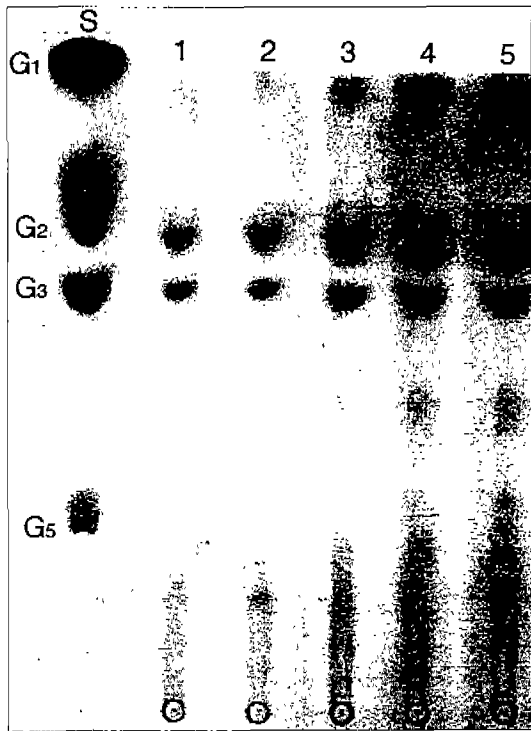


Fig. 2. TLC analysis of the digestion products of soluble starch by an extracellular amylase from *V. alginolyticus* 138-2.

Enzyme reaction was carried out at 45 °C for 12 h as described in Materials and Methods. The hydrolysis products were analyzed at different reaction time. Lane 1, 0.5 h; lane 2, 1 h; lane 3, 2 h; lane 4, 4 h; lane 5, 12 h. As standards (S), glucose (G<sub>1</sub>), maltose (G<sub>2</sub>), maltotriose (G<sub>3</sub>), and maltopentose (G<sub>5</sub>) were used.

Extracellular alpha-amylase의 활성에 있어서 최적조건 배양 상등액내에 존재하는 extracellular alpha-amylase의 활성에 있어서 최적조건을 조사하였다. Extracellular alpha-amylase의 최적 pH는 6.0, 최적 온도는 45 °C였다(Fig. 3). 최적조건에서 벗어나면 효소 활성이 저하되어졌다.

Extracellular alpha-amylase의 활성에 영향을 미치는 화합물들

Extracellular alpha-amylase가 포함되어 있는 배양 상등액내에 각종 화합물을 넣어 반응시킨 후 잔존활성을 측정하여 그 결과를 Table 1에 나타내었다. *V. alginolyticus* 138-2가 분비하는 extracellular alpha-amylase는 4 mM ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA)에 의하여 그 활성이 약 59% 저해되어졌다. 따라서, extracellular alpha-amylase는 어떤 2가 금속이온에 의하여 효소 활성이 촉진되어짐을 짐작할 수 있다. 실질적으로, CaCl<sub>2</sub>는 0.5 mM 농도에서 extracellular alpha-amylase의 활성을 촉진 시켰다. CaCl<sub>2</sub> 외에 MgCl<sub>2</sub>는 효소 활성에 큰 영향을 미치지 않았으며, MnCl<sub>2</sub>, FeCl<sub>2</sub>, NiCl<sub>2</sub>, CuCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, HgCl<sub>2</sub>와 같은 화합물들은 효소 활성을 저해

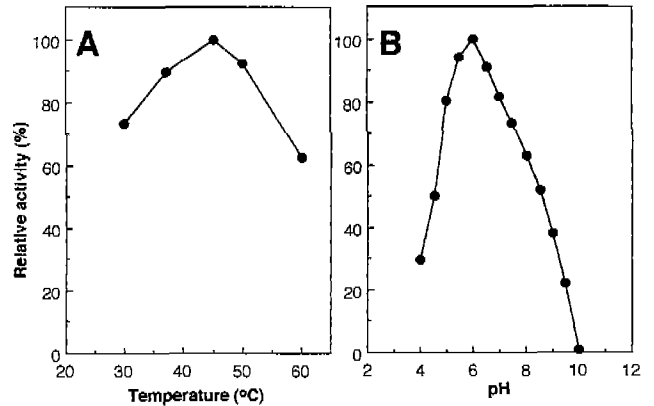


Fig. 3. Temperature and pH profiles of an extracellular alpha-amylase produced by *V. alginolyticus* 138-2.

(A) The extracellular alpha-amylase activity of culture supernatant was assayed at various ranges of temperature in 50 mM MES-NaOH buffer (pH 6.0). (B) The extracellular alpha-amylase activity in the culture supernatant was measured with different ranges of pH. Buffers used at 50 mM were MES (pH 6 to 6.5), HEPES (pH 7 to 8), tricine (pH 8 to 8.5), and CAPSO (pH 10). Hydrolysis of 0.5 ml of 1% soluble starch was done in a mixture containing 0.1 ml of enzyme sample and 0.4 ml of 50 mM buffer solution at 45 °C.

Table 1. Effects of metal ions and chelating reagents on the activity of extracellular alpha-amylase from *V. alginolyticus*

Compounds	Concentration (mM)	Relative activity (%)
None		100
EDTA	1	51
	4	41
Phenanthroline	1	94
	4	90
Iodoacetic acid	1	100
	4	99
CaCl <sub>2</sub>	0.5	111
	1	108
MgCl <sub>2</sub>	0.5	104
	1	96
MnCl <sub>2</sub>	1	73
	4	62
FeCl <sub>2</sub>	1	85
	4	60
NiCl <sub>2</sub>	1	86
	4	74
CuCl <sub>2</sub>	1	61
	4	41
ZnCl <sub>2</sub>	1	65
	4	50
HgCl <sub>2</sub>	1	46
	4	9

시켰다. Zinc-specific chelator 1,10-phenanthroline에 의해서 extracellular alpha-amylase의 활성이 거의 저해되지 않

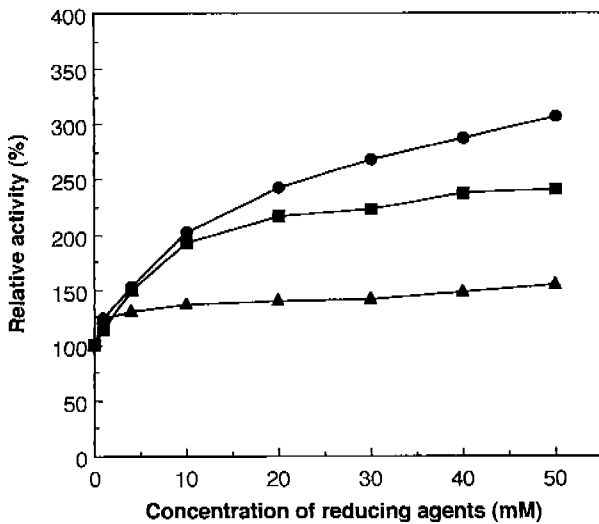


Fig. 4. Effect of the reduced thiol reagents on the extracellular alpha-amylase activity.

The extracellular alpha-amylase activity of culture supernatant was assayed at various concentrations of dithiothreitol (circles), cysteine (squares), and beta-mercaptoethanol (triangles).

았다. 따라서, extracellular alpha-amylase의 활성화에는 Zn<sup>2+</sup>가 요구되어지지 않음을 알 수가 있다. 오히려, 4 mM ZnCl<sub>2</sub>에 의하여 효소 활성이 50%나 저해되어졌다. 한편, dithiothreitol(DTT), cysteine, beta-mercaptoethanol과 같은 reduced thiol reagent들은 extracellular alpha-amylase의 활성을 크게 촉진시켰다(Fig. 4). 즉, 50 mM 농도에서 dithio-threitol은 약 3배, cysteine은 약 2.4배, beta-mercapto-ethanol은 약 1.5배로 효소의 활성을 촉진시켰다. 그러나, iodoacetic acid와 같은 thiol enzyme inhibitor에 의해서는 효소 활성이 거의 저해되지 않는 것으로 보아 extracellular alpha-amylase의 효소 활성 부위에는 SH group이 존재하지 않는 것으로 판단된다.

NaCl이 extracellular alpha-amylase의 활성화에 미치는 영향

해양 세균 *V. alginolyticus* 138-2는 최적 생육을 위하여 약 3%의 NaCl을 요구하며 NaCl이 존재하지 않을 때는 전혀 자라지 못하는 전형적인 호염성 세균이다. 따라서, 고농도의 NaCl이 extracellular alpha-amylase의 활성화에 어떤 영향을 미치는지를 조사해 보았다. 일반적으로 해수의 염농도는 3.5% 정도로 알려져있다. Fig. 5에서 보듯이 NaCl이 존재하지 않는 실험계와 비교하여 볼 때 *V. alginolyticus* 138-2의 extracellular alpha-amylase 활성은 4%의 NaCl 존재하에서 약 16% 정도, 10%의 NaCl 존재하에서는 약 40% 정도 저해되어졌다. 즉, *V. alginolyticus* 138-2는 전형적인 호염성 세균임에도 불구하고 흥미롭게도 extracellular alpha-amylase는 NaCl이 존재하면 활성이 오히려 저해되어졌다. 한편, 해안 침전물에서 분리된 절대 혐기성 그람-양성 해

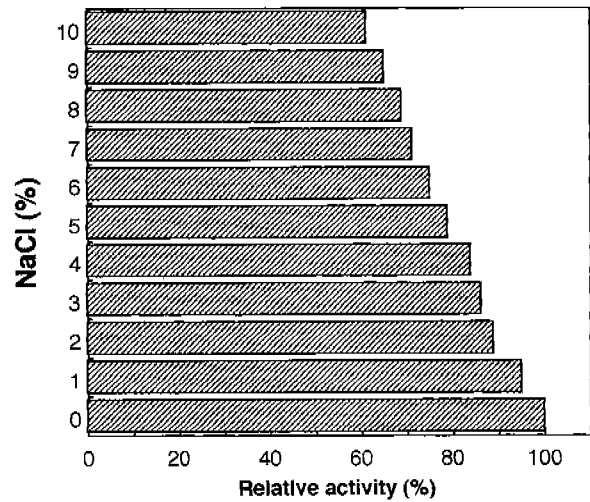


Fig. 5. Effect of NaCl concentration on the activity of an extracellular alpha-amylase from *V. alginolyticus* 138-2.

양 세균 SS71이 생산하는 extracellular alpha-amylase는 0.5-2%의 NaCl에 의하여 효소 활성이 촉진되어진다는 보고가 있었다[18].

요 약

해양 호염성 세균 *Vibrio alginolyticus* 138-2는 분자량 약 56,000 Da의 extracellular amylase를 생산하였다. Thin layer chromatography(TLC)에 의한 soluble starch의 가수분해 산물의 분석으로부터 extracellular amylase는 당화형 alpha-amylase로 밝혀졌다. 배양 상등액내에서 extracellular alpha-amylase의 최적 pH 및 온도는 각각 6.0과 45 °C였다. 금속 이온 Ca<sup>2+</sup>는 extracellular alpha-amylase의 활성을 촉진시켰으나 Mn<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>와 같은 이온들은 효소 활성을 저해시켰다. Dithiothreitol, cysteine, beta-mercap-toethanol과 같은 환원된 thiol 시약은 extra-cellular alpha-amylase의 활성을 촉진시켰다, 그러나, thiol enzyme inhibitor인 iodoacetic acid는 extracellular alpha-amylase의 활성을 거의 저해시키지 않았다. 따라서, extra-cellular alpha-amylase의 효소 활성 부위에는 SH group이 존재하지 않는 것으로 판단된다. 한편, 고농도의 NaCl이 존재하는 환경에서 서식하는 *V. alginolyticus* 138-2가 생산하는 extracellular alpha-amylase는 NaCl에 의해 효소 활성이 저해되어졌다.

감사의 말

이 논문은 1996-97년도 한국과학재단 핵심전문 연구비(961-0507-059-2)의 지원으로 수행되어졌으며 지원에 감사드립니다.

## REFERENCES

1. Bajpai, P. and P. K. Bajpai. 1989. High-temperature alkaline alpha-amylase from *Bacillus licheniformis* TCRDC-B13. *Biotechnol. Bioeng.* **33**: 72–78.
2. Fogarty, W. M. and P. J. Griffin. 1975. Purification and properties of beta-amylase produced by *Bacillus polymyxa*. *J. Appl. Chem. Biotechnol.* **25**: 229–238.
3. Friedberg, F. and C. Rhodes. 1986. Cloning and characterization of the beta-amylase gene from *Bacillus polymyxa*. *J. Bacteriol.* **165**: 819–824.
4. Higashihara, M. and S. Okada. 1974. Studies on beta-amylase of *Bacillus megaterium* strain No. 32. *Agr. Biol. Chem.* **38**: 1023–1029.
5. Keating, L., C. Kelly, and W. Fogarty. 1998. Mechanism of action and the substrate-dependent pH maximum shift of the alpha-amylase of *Bacillus coagulans*. *Carbohydr. Res.* **309**: 311–318.
6. Keating, L. A., C. T. Kelly, and W. M. Fogarty. 1996. The alpha-amylase of *Bacillus coagulans*. *Biochem. Soc. Trans.* **24**: 44S.
7. Kim, Y. J., S. Mizushima, and H. Tokuda. 1991. Fluorescence quenching studies on the characterization of energy generated at the NADH:quinone oxidoreductase and quinol oxidase segments of marine bacteria. *J. Biochem.* **109**: 616–621.
8. Kwan, H. S., K. H. So, K. Y. Chan, and S. C. Cheng. 1994. Purification properties of beta-amylase from *Bacillus circulans* S 31. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **10**: 597–598.
9. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* **227**: 680–685.
10. Muthukumar, N. and S. C. Dhar. 1983. Purification and properties of a glucoamylase fraction from the culture filtrate of *Rhizopus nodosus*. *Ital. J. Biochem.* **32**: 239–253.
11. Nanmori, T., M. Nagai, Y. Shimizu, R. Shinke, and B. Mikami. 1993. Cloning of the beta-amylase gene from *Bacillus cereus* and characteristics of the primary structure of the enzyme. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 623–627.
12. Ono, K. and E. E. Smith. 1986. Purification of glucoamylase by acarbose (BAY g-5421) affinity chromatography. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **8**: 201–209.
13. Palva, I. 1982. Molecular cloning of alpha-amylase gene from *Bacillus amyloliquefaciens* and its expression in *B. subtilis*. *Gene* **19**: 81–87.
14. Pfueller, S. L. and W. H. Elliott. 1969. The extracellular alpha-amylase of *Bacillus stearothermophilus*. *J. Biol. Chem.* **244**: 48–54.
15. Ray, R. R., S. C. Jana, and G. Nada. 1994. Beta-amylase from *Bacillus megaterium*. *Folia Microbiol.* **39**: 567–570.
16. Saito, N. 1973. A thermophilic extracellular alpha-amylase from *Bacillus licheniformis*. *Arch. Biochem. Biophys.* **155**: 290–298.
17. Srivastava, R. A. K. 1987. Purification and chemical characterization of thermostable amylases produced by *Bacillus stearothermophilus*. *Enzyme Microb. Technol.* **9**: 749–754.
18. Sugita, H., A. Kuruma, and Y. Deguchi. 1997. Purification and some properties of an alpha-amylase from an anaerobic bacterium isolated from coastal sediment. *Biosci. Biotech. Biochem.* **61**: 1757–1759.
19. Takahashi, T., Y. Tsuchida, and M. Irie. 1978. Purification and some properties of three forms of glucoamylase from a *Rhizopus* species. *J. Biochem. (Tokyo)* **84**: 1183–1194.
20. Takasaki, Y. 1989. Novel maltose-producing amylase from *Bacillus megaterium* G-2. *Agr. Biol. Chem.* **53**: 341–347.
21. Takata, H., T. Takaha, T. Kuriki, S. Okada, M. Takagi, and T. Imanaka. 1994. Properties and active center of the thermostable branching enzyme from *Bacillus stearothermophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 3096–3104.
22. Takkinen, K., R. F. Pettersson, N. Kalkkinen, I. Palva, H. Söderlund, and L. Kääriäinen. 1983. Amino acid sequence of alpha-amylase from *Bacillus amyloliquefaciens* deduced from the nucleotide sequence of the cloned gene. *J. Biol. Chem.* **258**: 1007–1013.
23. Tokuda, H. and T. Unemoto. 1984. Na<sup>+</sup> is translocated at the NADH:quinone oxidoreductase segment in the respiratory chain of *Vibrio alginolyticus*. *J. Biol. Chem.* **259**: 7785–7790.
24. Vihinen, M. and P. Mantsala. 1990. Characterization of a thermostable *Bacillus stearothermophilus* alpha-amylase. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **12**: 427–435.
25. Yamamoto, T. 1988. Bacterial alpha-amylase (liquefying and saccharifying types) of *Bacillus subtilis* and related bacteria, pp. 40–45. In *The Amylase Research Society of Japan* (ed.), *Handbook of Amylases and Related Enzymes*. Pergamon Press, Oxford, England.

(Received April 7, 1999)