

## $\alpha$ -Amylase 생성균주 *Bacillus* sp. AIV 1940의 분리, 특성 및 합성폐수분해능

박형수\* · 김무훈 · 양선영 · 조미영 · 고범준 · 박용근<sup>1</sup>

삼성엔지니어링 기술연구소, <sup>1</sup>고려대학교 생명공학원

전분가공폐수처리장 활성슬러지와 논, 밭 토양에서 전분성분을 분해하는  $\alpha$ -amylase를 생성하는 균주들을 분리 선별하였다. 이중 효소활성이 우수한 AIV 19를, 형태학적 분석 및 API system과 지방산분석(MIDI) 방법을 이용한 결과 *Bacillus* 속으로 동정되었다.  $\alpha$ -amylase 생성능을 향상시키기 위해 nitrosoguanidine (NTG) 처리를 한 균주 중 선별된 AIV 1940 균주의 효소활성능이 원 균주에 비해 1.8배 향상되었다. 분리균주는 그람양성간균으로 길이가 2.3-5  $\mu\text{m}$  폭이 0.8-1  $\mu\text{m}$ 이었고, Bioscreen C 시스템을 이용한 균주성장능 평가에서는 전분이 3 g/l 농도에서 성장능이 증가되었다. 전분합성폐수를 이용한 유기물제거실험에서는 초기 CODcr가 4,455 mg/l인 고농도 합성폐수를 1일, 3일 반응 후 각각 40.2% 72.3%의 유기물 제거율을 나타내었다.

**Key words** □  $\alpha$ -amylase, *Bacillus* sp., starch degradation

전분은 자연계에서 풍부한 탄소원이며, glucose가  $\alpha$ -1,4-bond로 연결된 직쇄상의 amylose와  $\alpha$ -1,6-bond로 측쇄를 형성하는 amylopectin으로 이루어져 있다. 그리고,  $\alpha$ -amylase (1,4- $\alpha$ -D-glucanohydrolase; EC3.2.1.1)는 타액, 세균, 곰팡이류 및 채장에서 분비되며, 전분과 관련된 물질의  $\alpha$ -1,4-glycosidic 결합을 무작위로 가수분해하여 텍스트린, 맥아당, 포도당의 혼합물을 생성하는 효소이다(11). 혐기성세균으로  $\alpha$ -amylase를 분비하는 종들은 *Clostridium acetobutylicum* (2), *C. thermohydrosulfuricum* (9) 등이 알려지고 있으며, 호기성균주로서는 주로 *Bacillus*속 균주들이 보고되고 있다(11,12,15,16). 또한,  $\alpha$ -amylase는 산이나 알카리, 온도에 대한 안정성을 보이는 경우가 많으며, 배양조건을 조절하면 대량 생산이 가능하여 식품, 약품, 섬유, 양조등 산업적인 응용성이 높은 효소이다(11).  $\beta$ -Amylase (14)는  $\alpha$ -amylase와 마찬가지로  $\alpha$ -1,4 글리코시드 결합에 작용하나 비환원성 말단에서부터 maltose 단위로 분해하기 때문에 amylose로부터 maltose만 생성하고 amylopectin에 작용하여  $\alpha$ -1,6 결합분지점에서 작용이 중지되므로 maltose와 dextrin을 생성한다. 또한 glucoamylase는  $\alpha$ -1,4 및  $\alpha$ -1,6 결합의 양자를 분해하여 glucose를 생성한다.

한편, 생물화학공학 제품을 생산하기 위해서 미생물 고농도배양과 제품의 비생산속도를 향상시키는 연구가 활발히 진행되고 있다. *Bacillus* group은 효소들을 대부분 세포외로 분비하는 특성이 있어  $\alpha$ -amylase, protease,  $\alpha$ -galactosidase 등의 효소 및 치료제 목적의 재조합 단백질의 생산에 이용되고 있는 실정이다(17). 한편,  $\alpha$ -amylase는 양조, 녹말분해, 소화제 등을 포함한 여러 산업에 사용된다. 그리고 열에 안정성을 가진  $\alpha$ -amylase는 공업적

으로 유용하게 사용되므로 고부가가치 효소산업에 응용되고 있으며, 특히 폐수처리시 발생하는 응집, 침강효과를 증대시키고 처리효율을 높이기 위해 *Bacillus* 균주를 이용한 폐수처리응용에도 이용되고 있다(6).

본 연구는 활성슬러지 및 논, 밭 토양에서 amylase 활성이 우수한 균주를 분리, 동정하여 균주특성을 규명하고, 효소 활성능을 증대시키기 위해 돌연변이하여 원 균주와 특성을 비교하였으며, 균주의 산업적 이용 및 전분함유 합성폐수 처리에 응용 하였다.

### 재료 및 방법

#### 시료채취 및 사용 균주

본 실험에서 사용된 균주는 전분가공 폐수처리장치내(SG공장, 인천) 반송슬러지, 용인시 인근 논, 밭 토양 등에서 시료를 채취하여 멸균 생리식염수(0.85%, NaCl)를 사용하여 연속 희석하여 고체배지에 도말하였다. 균주배양에 사용한 고체배지(BY medium)는 meat (beef) extract 0.5% (w/v), peptone 1%, NaCl 0.2%, yeast extract 0.2%, soluble starch 2%, agar 1.5%으로 제조하였으며, 액체배지(ABY medium)는 meat (beef) extract 1%, peptone 2%, NaCl 0.4%, yeast extract 0.4%, soluble starch 1%, pH 는 7.0으로 조절하여 제조하였다. 배양된 콜로니 주위에 0.01 M  $\cdot \text{KI} \cdot \text{I}_2$  용액을 분무시켜서 분해환(halo)이 10 mm 이상을 나타내고(5), 효소활성이 우수한 균주들을 선별하였고, 분리된 균주들은 glycerol-nutrient broth에 현탁시켜 -70°C 냉동고에 보관하였다. 대조균은 생명공학연구원 유전자은행에서 분양받은 *Bacillus subtilis* KCTC 2210, *Bacillus* sp. KCTC 1730, *Pseudomonas aeruginosa* KCTC 1750을 사용하였다.

\*To whom correspondence should be addressed.  
Tel: 031-260-6014, Fax: 031-260-6008  
E-mail: jacob@samsung.co.kr

### 효소 조제

$\alpha$ -amylase 활성실험을 위한 효소액은 균주를 10 ml의 LB (peptone 1%, yeast extract 0.5%, NaCl 0.5%, pH 7.0) 배지에서 30°C로 24 시간동안 진탕배양 후 8,000×g에서 3 분간 원심분리하여 균체를 완전히 제거한 상등액을 crude enzyme solution으로 사용하였다.

### NTG 처리에 의한 돌연변이 유발

$\alpha$ -Amylase 생성능을 향상시키기 위하여 Miller의 방법(8)을 변형하여 실험하였다. *Bacillus* sp. AIV 19를 LB 5 ml에 접종하여 30°C에서  $3\sim5\times 10^8$  cells/ml 까지 배양한 후 8,000×g에서 5 분간 원심분리하여 균을 침전시켰다. 상등액을 제거하고 0.1 M citrate buffer (pH 5.5) 5 ml로 3회 세척하여 4 ml 0.1 M citrate buffer에 현탁한 후 NTG (Sigma Co. USA)를 최종농도가 100  $\mu\text{g/ml}$ 이 되도록 맞추어서 30°C에서 30 분간 정지하였다. 그리고 8,000×g에서 5 분간 원심분리하여 침전시킨 후 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0)로 세척하고 LB 10 ml에 재 현탁하여 12 시간 배양하였다. 이를  $10^{-6}$ 까지 희석하고 BY배지에 도달한 후 30°C에서 20~24 시간 배양하여 요오드용액법(5)으로 직접 선별하여 여러세대에서 안정되고 우수한  $\alpha$ -amylase 활성능을 유지하는 AIV 1940을 선별하였다.

### Amylase 활성도 측정

Soluble starch를 1%가 되게 50 mM phosphate buffer (pH 7.0)에 용해시켜 사용하였다. 측정은 1% soluble starch sol. 0.25 ml에 효소액 0.25 ml을 넣고 37°C에서 5 분간 반응시킨 후 DNS (Dinitrosalicylic acid) 방법(3)에 의해 glucose를 표준물질로 하여 550 nm에서 흡광도를 측정, 비색정량 하였으며, 효소단위는 1 분에 1  $\mu\text{mole}$ 의 glucose에 상당하는 환원당을 유리하는 효소량을 1 unit로 하였다. Specific activity는 단백질 mg당의 activity로 표시하였다. 균체량은 배양균주를 spectrophotometer (DU 550, Beckman, USA)를 사용하여 OD 600 nm에서 측정하였다. 단백질량은 Biuret 법으로 정량하였다(4).

### 형태학적 관찰

균주는 LB배지에서 배양하여 그람염색 후 광학현미경 (Olympus BS51TR-32000, Japan)으로 형태 및 배열상태를 관찰하였다. 또한, 주사전자현미경(FE-SEM, HITACHI-S4500II)으로 분리균주의 세부적인 형태와 크기 등을 관찰하였다.

### 균주동정

균주의 catalase, oxidase test는 Gerhardt 등의 방법(4)을 변형하여 사용하였다. 기타 생화학적 실험은 API 50 CHB (API bioMerieux Co, France)을 이용하여 실시하였다. 결과판독은 APILAB plus software version 4.0을 사용하여 similarity %로 나타내었다. 지방산분석에 의한 동정은 Miller 방법(7)을 변형하여 실시하였다. Trypticase soy broth agar (BBL, Cockeysville, MD)에서 28°C, 24 시간 배양한 다음 슬러지 약 40 mg을 screw

cap tube (13×100 mm)에 넣고 50% methanol, 15% NaOH 1 ml을 첨가하여 100°C에서 30 분간 끓였다. 가수분해물을 실온으로 식혀 methanolic HCl 2 ml를 첨가하고 80°C에서 10분간 buthyl ether (1:1; vol/vol) 1.25 ml를 첨가하였다. Fatty acid methyl ester물질을 취한 다음 base washing으로 희석하고 NaOH 3 ml을 첨가하여 상등액을 분석용 vial에 넣어 분석용 시료로 사용하였다. 분석은 Microbial Identification System (MIDI, Inc. Newark, DE, USA)으로 실시하였고, 지방산조성은 MIS Library entry에서의 similarity index (SI)로 나타내었다.

### 최적 성장능평가

균체를 LB배지에 24 시간 30°C 배양후 배양액 1 ml을 effendorf tube에 넣어 원심분리(8,000×g) 한 후, D.W로 2번 세척하여 OD (600 nm) 1로 조정된 균주를 Bioscreen C (Labsystems co, Finland)에 5% 접종하였다. 반응액은 amylase 합성최소배지(glucose 2 g, yeast extract 10 mg, NaCl 0.1 g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  10 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2 g,  $\text{FeCl}_2$  5 mg,  $\text{CaCl}_2$  50  $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ) 380  $\mu\text{l}$  사용하였으며, 기질로 전분농도를 0~20 g/l를 주입하여 성장능을 평가하였다.

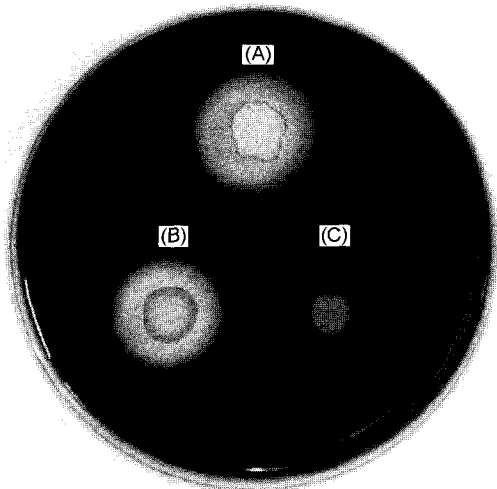
### 합성폐수 제거능 실험

분리균주를 이용하여 amylase의 유기물분해능을 평가하였다. Amylase 합성폐수 50 ml을 제조 후 30°C 배양기에서 1 일간 배양 후 균주를 8,000×g으로 2 분간 원심분리하고 멸균중류수로 2번 세척 후 5% 접종하였다. 교반배양기에서 150 rpm으로 30°C에서 반응시켰다. 성장에 따른 유기물감소량은 반응초기, 1 일과 3 일후에 COD 측정용 vial (HACH, Co, USA) 중 1500 mg/l까지 측정가능한 vial로 시료를 희석하여 CODcr 변화량을 측정하였고, pH meter (DP-880P, 동아과학, Korea)로 수소이온농도를 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### 균주분리 및 선별

전분가공 폐수처리장에서 채취한 활성슬러지와 용인시 기흥읍 근처의 논, 밭 등지에서 시료를 채취하여 균주들을 확보하였다. 전분을 기질로 하는 BY고체배지상에서 연속희석법으로 배양하여 배양특성이 *Bacillus*속 계통균주들을 주로 선택하여 배지에 다시 picking하여 배양시킨 후, 0.01 M  $\text{KI} \cdot \text{I}_2$  용액을 분무하여 분해환이 10 mm 이상인 균주를 선별하였다, 분리된 세균은 수차례 계대배양을 통해 순수 단일 균주임을 확인하였으며, 단일 세균들 중 효소활성능 측정을 통해 우수한 균주인 *Bacillus* sp. AIV 19를 분리하였으며, 보다 우수한 효소활성능을 지닌 균주제를 위해 NTG 처리를 통한 돌연변이 방법을 사용하여 200개의 콜로니를 선택하여 분해환 크기가 10 mm 이상인 균주들을 1차선별후 효소활성능이 우수한 *Bacillus* sp. AIV 1940 균주를 2차 선별하였다(Fig. 1). Enzyme activity는 *Bacillus* sp. AIV 19 균주가 1,534U이고 돌연변이균주 *Bacillus* sp. AIV 1940 균주가

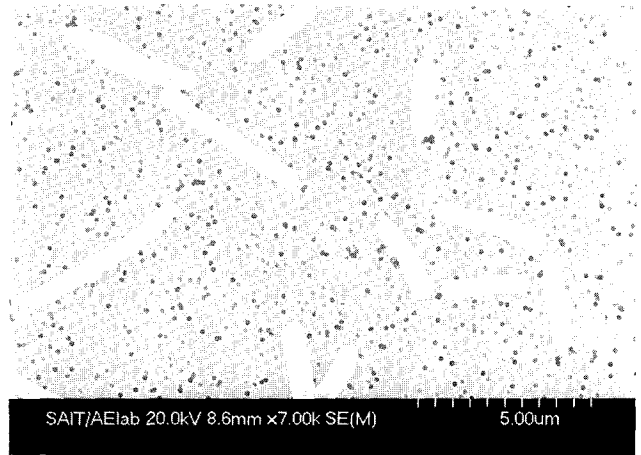


**Fig. 1.**  $\alpha$ -amylase halo formation on agar plates. (A) *Bacillus* sp. AIV1940, (B) *Bacillus* sp. KCTC 1730, (C) *Pseudomonas aeruginosa* KCTC 1750.

2,812U로 1.8배가 증가 하였다(Table 1). Specific enzyme activity는 약 1.8배 향상되었다. 이 후 여러 세대 계대를 통한 생리특성 유지여부를 검증하여 안정된 결과를 나타낸 *Bacillus* sp. AIV 1940 균주를 최종선별 하였다.

**분리균주의 동정**

선별된 분리균주 *Bacillus* sp. AIV 1940에 대해 형태학적 관찰을 하였다. 배지상에서의 집락은 약한 회백색의 3-4 mm 크기로 가장자리가 약간 돌기형태로 되어있고, 평확현미경으로 관찰한 결과 이중심성 내성아포를 나타내었으며, 그람양성으로 염색되었다. 위상차 현미경과 전자현미경으로 관찰한 결과 전형적인 간균이며, 길이가 2.3~5  $\mu$ m, 폭이 0.8~1  $\mu$ m이었다(Fig. 2). API-50CHB를 이용한 생리, 생화학적 실험결과는 Table 2에 나타내었다. AIV 19와 AIV 1940 균주는 “Good identification”으로 나타났으며, 표준균주로 사용한 KCTC 2210은 “Excellent identification”으로 *Bacillus subtilis*의 생리 생화학특성을 보였다. AIV 19는 *Bacillus stearothermophilus*으로 match가 되었으나, *Bacillus* sp. AIV 1940은 돌연변이에 의해 생리특성의 변이가 발생한 것으로 사료되어, *Bacillus subtilis*로 동정되었다(Table 2). Glycerol, inositol, sorbitol,  $\alpha$ -methyl-D-glucoside, Sucrose, maltose, trehalose 이용능에서 *Bacillus* sp. AIV 19는 음성이었으나, *Bacillus* sp. AIV 1940, *B. subtilis* KCTC 2210은 양성을 나타내었고, cellobiose, lactose 이용능은 AIV 19는 양성이었으나,



**Fig. 2.** The SEM image of *Bacillus* sp. AIV 1940. Bar represents 5  $\mu$ m.

*Bacillus* sp. AIV 1940과 *B. subtilis* KCTC 2210은 음성을 나타내었다. 분리균주를 전분분해에 사용하고자 하므로, starch 이용 특성에서는 분리균주가 예상대로 양성하였고, *B. subtilis* KCTC 2210은 음성을 나타내었다. 이 결과를 Bergey’s manual에 따라 비교분석한 결과 *Bacillus*속에 속하는 것으로 나타났다(10). 지방산은 균주의 세포막과 세포벽의 중요한 구성인자로 각 균주가 지닌 지방산 생합성계에 따른 조성차이로 균주를 분류할 수 있다. 표준균주의 지방산분석에서 *B. subtilis* KCTC 2210은 similarity index치가 0.796 (*B. subtilis*)으로 first choice에서 잘 일치하고 second choice에서 *Bacillus amyloliquefaciens* (0.724)를 나타낸 것으로 보아 전형적인 *Bacillus* group에 속한 것으로 나타났다. 분리균주 *Bacillus* sp. AIV 1940은 API 결과와 동일하게 MIS 결과역시 *B. subtilis*의 SI수치가 0.779로 나타나 *B. subtilis* KCTC 2210와 유사성이 매우 높은 균주로 판단된다(Table 3). 그러나, 보다 정확한 동정을 위해서는 수리분석학적 해석, 16S rRNA 분석을 통한 유전자적 유사성 등의 검토가 요구된다. Abel 등(1)에 의하면 균체의 지방산 조성은 유전적 지배를 받으므로 표준화된 조건에서 plasmid나 미세한 변이에 의한 뚜렷한 영향을 받지 않으며 지리적 차이와 관계없이 주어진 조건에서 분류 및 동정이 용이하다고는 점을 감안 할 때, API 결과와 지방산 조성에 따른 분류결과에서 *Bacillus*속으로 분류하는 것이 바람직한 것으로 사료된다.

**분리균주의 최적 성장능평가**

Bioscreen C를 이용한 기질 이용 능을 평가하기 위해 기질첨가량을 각각 0.1, 0.2, 0.2, 1, 3, 5, 10, 15, 20 g/l로 농도별로

**Table 1.** The of  $\alpha$ -amylase activity of the isolated *Bacillus* sp. AIV19, its mutant and the reference strain *Bacillus* sp. KCTC 1730

| Strains                       | Protein (mg) | Enzyme Activity (U) | Specific Activity (U/mg protein) | Halo size on plate (mm) |
|-------------------------------|--------------|---------------------|----------------------------------|-------------------------|
| <i>Bacillus</i> sp. KCTC 1730 | 3.66         | 478                 | 130.6                            | 11                      |
| <i>Bacillus</i> sp. AIV 19    | 4.47         | 1,534               | 343.1                            | 13                      |
| <i>Bacillus</i> sp. AIV 1940  | 4.68         | 2,812               | 600.8                            | 16                      |

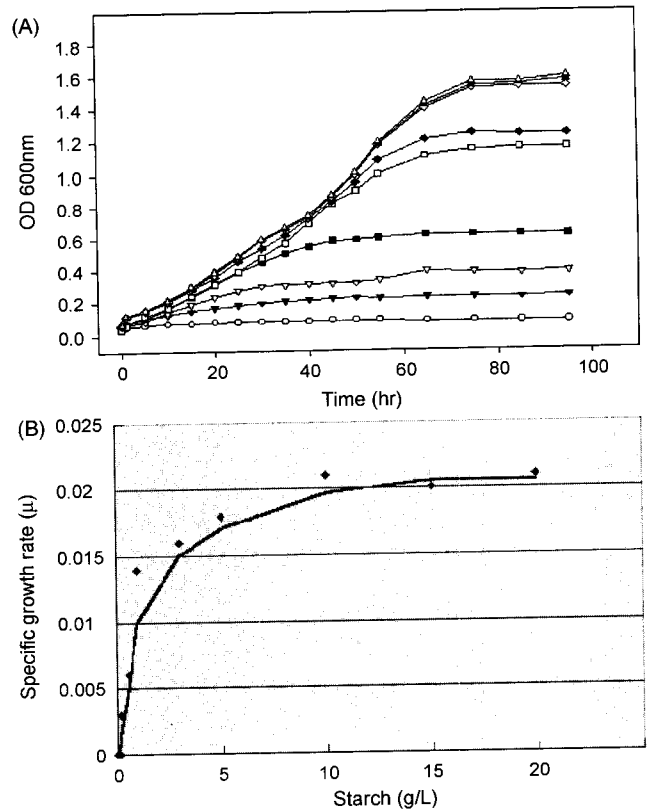
**Table 2.** Physiological and biochemical characteristics of the isolate, *Bacillus* sp. AIV19, its mutant AIV 1940 and the reference strain KCTC2210

| Strains Substrates         | AIV19 | AIV1940 | KCTC2210 |
|----------------------------|-------|---------|----------|
| Glycerol                   | -     | +       | +        |
| Erythritol                 | -     | -       | -        |
| D-Arabinose                | -     | -       | -        |
| L-Arabinose                | -     | +       | +        |
| Ribose                     | -     | +       | +        |
| D-Xylose                   | -     | -       | +        |
| L-Xylose                   | -     | -       | -        |
| Adonitol                   | -     | -       | -        |
| $\beta$ Methyl-D-xyloside  | -     | -       | -        |
| Galactose                  | -     | -       | -        |
| Glucose                    | +     | +       | +        |
| Fructose                   | +     | +       | -        |
| Manose                     | +     | +       | +        |
| Sorbose                    | -     | -       | -        |
| Rhamnose                   | -     | -       | -        |
| Dulcitol                   | -     | -       | -        |
| Inositol                   | -     | +       | +        |
| Mannitol                   | +     | +       | +        |
| Sorbitol                   | -     | +       | +        |
| $\beta$ Methyl-D-mannoside | -     | -       | -        |
| $\beta$ Methyl-D-glucoside | -     | +       | +        |
| N Acetyl glucosamine       | -     | -       | -        |
| Amygdalin                  | -     | -       | -        |
| Arbutin                    | -     | -       | -        |
| Esculin                    | +     | +       | +        |
| Salicin                    | -     | -       | -        |
| Cellobiose                 | +     | -       | -        |
| Maltose                    | +     | +       | +        |
| Lactose                    | +     | -       | -        |
| Melibiose                  | -     | +       | +        |
| Sucrose                    | -     | +       | +        |
| Trehalose                  | -     | +       | +        |
| Inulin                     | -     | +       | +        |
| Melezitose                 | -     | -       | -        |
| Raffinose                  | -     | -       | +        |
| Starch                     | +     | +       | -        |
| Glycogen                   | +     | -       | -        |
| Xylitol                    | -     | -       | -        |
| Gentiobiose                | -     | -       | -        |
| D-Turanose                 | -     | -       | +        |
| D-Lyxose                   | -     | -       | -        |
| D-Tagatose                 | -     | -       | -        |
| D-Fucose                   | -     | -       | -        |
| L-Fucose                   | -     | -       | -        |
| D-Arabitol                 | -     | -       | -        |
| L-Arabitol                 | -     | -       | -        |
| Gluconate                  | -     | -       | -        |
| 2 keto-gluconate           | -     | -       | -        |
| 5 keto-gluconate           | -     | -       | -        |

균주 성장 능을 평가하였다. 전분농도가 1 g/l 이하의 농도에서의 균주 최대성장능이 OD 600 nm에서 0.6정도였으며,  $\mu$  (비증식속도)값이 0.014로 낮게 측정되었다(Fig. 3). 농도에 따라 대체적으로 세균의 생장곡선 중 유도기가 길어지면서 분해가 지연되었다. 3 g/l 이상의 농도에서는 균주성장이 저 농도에 비해 현저히 향상되었으나, 전반적으로 균체성장능이 낮게 나타났다. 이는 분리균주의 pH값이 4.5-5 정도로 낮아져서 발생한 것으로 사료된다(Data not shown). 외부의 pH가 낮아지면 전리되지 않은 유기산들이 친유성이 강해 쉽게 통과되어 proton motive force ( $\Delta P$ )를 상쇄시키므로 호흡은 촉진되나 ATP 합성이 이루어지지 않아 균주성장이 저해되게 된다(13). 따라서 외부 pH를 조절하지 않을 경우 균체성장과 효소활성도 저하되므로 pH 조절이 선행되어야 할 것으로 사료된다.

**유기물 제거능**

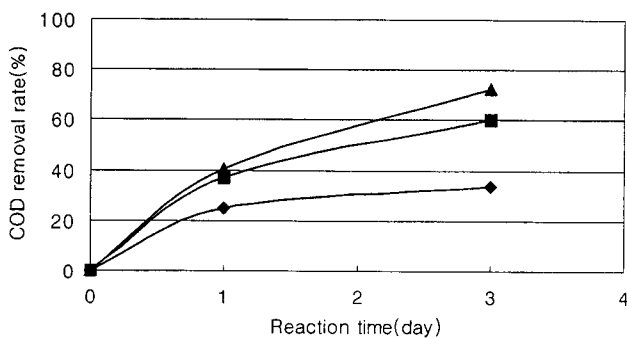
전분 함유 합성 폐수의 유기물 제거능 효과를 알아보기 위해 분리균주를 합성폐수에 접종하여 조사하였다(Fig. 4). 부가 탄소원으로 glucose를 첨가하였고, 질소원으로는 peptone을 첨가하였다. 유기물제거반응 1일이 경과되었을 때 비교균주 *Bacillus* sp. KCTC 1730균주는 API Kit결과(Table 2)에서 Starch 이용능이



**Fig. 3.** (A) Effect of starch concentration (mg/l) on growth of *Bacillus* sp. AIV 1940 on synthetic wastewater. (B) The  $\mu$  value depends on substrate concentration. Symbols; starch concentration (mg/l)  $\circ$  , 100;  $\blacktriangledown$  , 200;  $\nabla$  , 500;  $\blacksquare$  , 1000;  $\square$  , 3000;  $\blacklozenge$  , 5000;  $\diamond$  , 10000;  $\blacktriangle$  , 15000;  $\triangle$  , 20000.

**Table 3.** Identification results of discrepancies between the API system and the MIS (MIDI)

| Strains                      | System | API (API 50CHB) similarity (%)      | MIS (fatty acid) similarity index   |
|------------------------------|--------|-------------------------------------|---|
| <i>B. subtilis</i> KCTC2210  |        | <i>B. subtilis</i> (98.2)           | <i>B. subtilis</i> - 0.779<br><i>B. amyloliquefaciens</i> - 0.724         |
| <i>Bacillus</i> sp. KCTC1730 |        | <i>Bacillus</i> sp. (97.1)          | Not tested  |
| <i>Bacillus</i> sp. AIV 19   |        | <i>B. stearothersophilus</i> (98.2) | <i>Microbacterium liquefaciens</i> - 0.716<br><i>B. coagulans</i> - 0.367 |
| <i>Bacillus</i> sp. AIV 1940 |        | <i>B. subtilis</i> (98.7)           | <i>B. subtilis</i> - 0.779<br><i>B. amyloliquefaciens</i> - 0.767         |



**Fig. 4.** The CODcr removal rate (%) comparison of starch synthetic wastewater depend on strains. The initial CODcr was 4,455 mg/l. Symbols: ◆, *Bacillus* sp. KCTC 1730, ■, *Bacillus* sp. AIV 19; ▲, *Bacillus* sp. AIV 1940.

없는 것으로 판명되어 비교적 낮은 분해율(25.1%)을 나타내었다. 따라서 COD 분석결과에 나타난 분해율은 전분성분의 기질의 분해에 의한 제거된 것으로 보인다. *Bacillus* sp. AIV 19 균주는 36.9%, 돌연변이균주인 *Bacillus* sp. AIV 1940 균주는 40.2%의 분해율을 나타내었다. 초기 CODcr이 4,455 mg/l인 고농도의 유기물합성폐수인 점을 감안한다면 매우 높은 분해율을 나타내었고, 분해균주가 유기물분해 및 전분함유폐수의 유기물제거에도 이용할 수 있는 가능성을 제시하는 결과이다. 반응 3일후에는 *Bacillus* sp. AIV 1940이 72.3%의 높은 제거율을 나타내어 전분함유폐수의 유기물제거에 활용이 가능한 유용한 균으로 판명되었다. 효소활성능 비교에서는 *Bacillus* sp. AIV 1940이 AIV 19보다 1.8배 정도 활성이 우수하였으나(Table 1), 합성폐수 결과에서는 상대적으로 낮은 분해율을 나타내었다. 이는 효소활성능과 비례하여 기질의 분해능이 증가되지는 않았으며, 아마도 배지의 pH의 저하로 효소활성이 다소 낮게 나타난 것으로 사료된다.

Amylase는 식품가공 산업에서 널리 사용되고 있고, 여러 연구자들이 이에 관련된 균주의 분리 및 효소 생산성 연구 등을 하였다. 그러나 고농도 유기물 분해능을 가진 균주분리는 미진한 상태이다. 본 연구를 통하여 폐수처리장의 전분함유 고농도 유기물의 제거에 이용 가능성을 높여주고, 향후 bioreactor나 pilot에 의한 대량처리기술에 적용시켜 관련폐수 처리 등에 응용하는 방향으로 진행되어야 할 것이다.

### 감사의 글

분리균주의 전자현미경사진과 MIDI실험을 도와주신 삼성종합기술원의 신정은 전문연구원님께 깊이 감사드립니다.

### 참고문헌

- Abel, K., H. de Schmertzing, and J.I. Peterson, 1963. Classification of microorganism by analysis of chemical composition. 1. Feasibility of utilizing gas chromatography. *J. Bacteriol.* 85, 1039-1044.
- Annous, B. and H. Blaschek. 1991. Isolation and characterization of *Clostridium acetobutylicum* mutants with enhanced amyolytic activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 2544-2548.
- Bernfeld, P. 1955. Amylase, α and β, Method in Enzymology, 1, 149-158
- Gerhardt, P., R.G.E. Murray, R.N. Costilow, W.A. Wood, N.R. Krieg, E.W. Nester, and G.B. Philips. 1994. Manual of methods for general Bacteriology, 543. ASM.
- Kim, M.S. and P.S. O. 1991. Isolation of thermostable α-amylase hyperproducing *Bacillus* sp. No. 32H417 and some properties of the enzyme. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 19, 122-127.
- Ledent P, H. Michels, G. Blackman, H. Naveau, and S.N. Agathos, 1999. Reversal of the inhibitory effect of surfactants upon germination and growth of a consortium of two strains of *Bacillus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51, 370-374.
- Miller, J.M. 1972. Experiments in molecular genetics. Cold spring Harbor Laboratory, New York.
- Miller, L. and T. Berger, 1985. Bacteria identification by gas chromatography of whole cell fatty acid. *Hewlett-Pacard Application.* Note 228-248.
- Melasniemi, H. 1988. Purification and some properties of the extracellular α-amylase-pullulanase produced by *Clostridium thermohydrosulricum*. *Biochem. J.* 230, 813-818.
- Peter, H. and A. Sneath, 1998. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd ed, p1105-1138, Springer.
- Priest, F.G. 1977. Extracellular enzyme synthesis in the *Bacillus* genus. *Bacteriol. Rev.* 41, 711-753.
- Robyt, J.F. and R.J. Ackerman. 1973. Structure and function of amylase. II Multiple forms of *Bacillus subtilis* α-amylase. *Arch. Biochem. Biophys.* 155, 445-451.
- Russel, J.B. 1992. Another explanation for the toxicity of

- fermentation acids at low pH; anion accumulation vs uncoupling. *J. Appl. Bacteriol.* 73, 363-370.
14. Takasaki, Y. 1976. Purification and enzymatic properties of  $\beta$ -amylase and pullulanase from *Bacillus cereus*. *Agric. Biol. Chem.* 40, 1523-1530.
15. Vihinen, M. and P. Mantsala. 1989. Microbial amylolytic enzymes. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 24, 329-418.
16. Yamazaki, H., K. Ohmura, and A. Nakayama. 1983.  $\alpha$ -Amylase genes *amyR2* and *amyE* from an  $\alpha$ -amylase hyperproducing *Bacillus subtilis* strain: Molecular cloning and nucleotide sequence. *J. Bacteriol.* 156, 327-337.
17. Yoo, Y.H. 1988. Fed-Batch Fermentation for the Production of  $\alpha$ -Amylase by *Bacillus Amyloliquefaciens*. *Biotech. Bioeng.* 31, 426-432.

(Received November 12, 2001/January 18, 2002)

---

**ABSTRACT: Isolation and Characterization of  $\alpha$ -Amylase Producing *Bacillus* sp. AIV 1940 and Properties of Starch Synthetic Wastewater Degradation**

**Park, Hyung-Soo\*, Moo-Hoon Kim, Sun-Young Yang, Mi-Young Cho, Bum-Jun Ko, and Yong-Keun Park<sup>1</sup>** (Samsung engineering R&D center, Yongin 449-844, Korea, <sup>1</sup>Department of Biology and Biotechnology of Graduate School, Korea university, Seoul 136-701, Korea)

$\alpha$ -Amylase producing bacteria were isolated from activated sludge of corn processing wastewater plant and paddy field soil samples and selected by the direct iodine reaction. The isolate was identified as *Bacillus* sp. after morphology, API system and fatty acid analyses. To enhance  $\alpha$ -amylase productivity, a successive mutation of *Bacillus* sp. AIV 19 was performed using the treatment of nitrosoguanidine (NTG). The mutant, *Bacillus* sp. AIV 1940, showed about 1.8-fold level of amylase activity compared with parental strain. The isolate was Gram-positive and rod (2.8-3.0  $\mu\text{m}$  long, 0.5-0.6  $\mu\text{m}$  wide) type. The strain increased the bacterial mass at 3000  $\text{mg/l}$  starch concentration. Organic substance removal rate was 40.2, 72.3% respectively after 1 and 3 day reaction using starch synthetic wastewater (initial CODcr was 4,455  $\text{mg/l}$ ).