

## *Bacillus circulans* $\alpha$ -amylase 유전자의 *Bacillus subtilis*와 *Bacillus megaterium*에서의 클로닝 및 발현

김지연<sup>1</sup> · 김한복<sup>2</sup> · 이동석\*

인제대학교 의생명공학대학 임상병리학과, <sup>1</sup>인제대학교 생물건강산업육성지원센터,

<sup>2</sup>호서대학교 자연과학부 생명과학전공

재조합 플라스미드 pAL850에 함유된 *Bacillus circulans* KCTC3004  $\alpha$ -amylase 유전자를 pUB110을 이용하여 shuttle 플라스미드 pALS111을 만들어 *Bacillus* 세포에 이종·발현시켰다. *Bacillus subtilis* (고초균)와 *Bacillus megaterium* (거대균)으로 형질전환된 pALS111로부터  $\alpha$ -amylase는 세포중식과 비례하여 생산되었다. 형질전환주가 생산하는  $\alpha$ -amylase의 최대활성을 유전자 공여 균주인 *B. circulans*와 비교했을 때, 고초균은 약 95배, 거대균은 약 34배 정도의 높은 활성을 나타내었다. 그리고 대장균 형질전환주는 분비율이 10% 정도인데 반하여 고초균 형질전환주는 생산된 효소 전부를, 거대균 형질전환주는 약 98%를 세포 외로 분비함을 보임으로써 고초균과 거대균은 실용적인 면에서 대장균보다 우월함을 나타내었다. pALS111의 각 숙주 내에서의 안정성을 살펴본 결과 거대균에서는 92%, 고초균에서는 76%, 대장균에서는 38%로 나타났다. SDS-PAGE와 zymogram을 통해 추정된 대장균과 고초균, 거대균에서 발현된 효소의 분자량은 약 55,000으로 확인되었다. 이들 형질전환주가 생산하는  $\alpha$ -amylase는 starch에 작용하여 주된 산물로서 maltotriose 이상의 다양한 maltooligosaccharide들을 생산함이 확인되었다.

**Key words** □  $\alpha$ -amylase, *Bacillus circulans*, *B. megaterium*, *B. subtilis*, shuttle vector, stability

*Bacillus*는  $\alpha$ -amylase, xylanase, CMCase, laminarinase,  $\beta$ -1,3-1,4-glucanase 등 다양한 세포 외 분비효소를 생산함으로써 유전자 및 효소수준에서 연구해 볼만한 가치를 가지고 있다(12). 이들 효소 중에서도  $\alpha$ -amylase는 starch의  $\alpha$ -1,4 결합을 random한 형식(endo-acting hydrolytic mechanism)으로 가수분해하여 덱스트린 및 맥아당, 포도당의 혼합물을 생성하는 효소로서 세균으로는 *B. circulans*와 *B. subtilis* 중, 일부 균주에서 그 생산이 보고되고 있다(5,13). 그러나 그 생산율이 저조하고 또한 다른 효소들과 함께 분비되므로 이 효소의 면밀한 생화학적 특성 연구나 산업적인 응용에 어려움이 있다. 이를 해결하기 위해서는 효소의 다량생산 및 효율적 분비가 필요하다.

대장균과 *Bacillus*는 재조합 DNA 기술을 통한 단백질 생산에 가장 많이 이용되고 있는 숙주이다. 대장균은 유전적, 생리적 측면에서 그 기작이 잘 알려져 있고, 성장 속도가 빠르며, 형질전환을 용이하게 할 수 있으나 전반적으로 균체 내에 단백질을 함유하고 있기 때문에 단백질의 분비에 어려움이 따른다. 이에 반하여 *Bacillus*는 대장균과는 달리 생산된 단백질을 대부분 세포 밖으로 분비하는 특성이 있어 실용적인 면에서 대장균보다 우월하여 산업적으로 유용한 효소들을 효율적으로 생산하는 데 널리 이용될 수 있다.

Ehrlich(4)는 *Staphylococcus aureus*로부터 항생제 내성을 지닌

플라스미드를 얻어 *B. subtilis* (고초균)으로 형질전환시킨 바 있으며, Chang과 Cohen(3)은 고초균 원형질체(protooplast)에 polyethyleneglycol(PEG)을 첨가했을 때 *S. aureus*의 플라스미드가 잘 형질전환됨을 밝혀내었다. 한편, Brown과 Carlton(2)은 *S. aureus*의 플라스미드를 *B. megaterium* (거대균)으로 삽입, 발현시킴으로써 또 다른 PEG-원형질체 매개의 형질전환 기법을 확립하였다.

우리는 *B. circulans* KCTC3004 유래의  $\alpha$ -amylase 유전자를 pUC19를 vector로 하여 재조합 플라스미드 pAL850을 얻어 대장균 내에서 클로닝 및 발현시켜 기본적인 분자생물학적 연구를 수행한 바 있다(10).

본 연구에서는 pAL850과 pUB110을 이용하여 대장균-고초균-거대균 shuttle 플라스미드를 제작하여, 유용한 숙주인 고초균과 거대균에  $\alpha$ -amylase 유전자를 이종·발현시켜, 효소 생산 및 분비, processing 여부 등을 비교 연구하여 응용적인 측면을 탐구해 보고자 한다.

### 재료 및 방법

#### 사용균주 및 플라스미드

본 연구에 사용된  $\alpha$ -amylase 유전자의 공여 균주는 *B. circulans* KCTC3004였으며, 숙주로는 *E. coli* DH5 $\alpha$ [supE44  $\Delta$ lacU169( $\Phi$ 80 *lacZ*  $\Delta$ M15) *hsdR*17 *recA*1 *endA*1 *gyrA*96 *thi*-1 *relA*1] 및 *B. subtilis* RM125[*leuA*8 *arg*15 *hsrM*<sup>-</sup> *hsmM*<sup>-</sup>], *B. megaterium* ATCC14945[wild type,  $\beta$ -glucanase negative]를 사용

\*To whom correspondence should be addressed.

Tel: 055-320-3262, Fax: 055-334-3426

E-mail: mbslee@ijnc.inje.ac.kr

하였다. 또한 플라스미드 pAL850(10)( $\alpha$ -amylase positive)과 pUB110(8), pUC19(1)은 새로운 재조합 shuttle 플라스미드를 제작하는 데 사용하였다.

### 배지 및 생장조건

*B. circulans* 및 *B. subtilis*, *B. megaterium*은 본 실험실에서 확립한 LN(0.3% beef extract와 0.5% peptone, 1.0% tryptone, 0.5% yeast extract, 1.0% NaCl) 배지를 사용하여 37°C에서 진탕 배양하였으며, *E. coli*는 LB 또는 LN 배지를 사용, 역시 37°C에서 진탕배양하였다. 한천 평판배지의 경우에는 LN 배지에 한천을 1.5%(w/v)되게 하였으며, 효소활성을 나타내는 형질전환주의 선별에는 기질인 starch(0.3%)를 첨가하고 항생제로는 ampicillin (100  $\mu$ g/ml) 또는 kanamycin(50  $\mu$ g/ml)을 사용하였다. Nutrient broth(Difco) 또는 Penassay broth(Difco)는 원형질체 준비를 위하여 *Bacillus* 배양세포에 첨가하였으며 DMP-3(kanamycin, 100  $\mu$ g/ml 첨가)(3) 배지는 세포벽 재생을 위하여 사용하였다.

### 재조합 Shuttle 플라스미드 제작

*B. subtilis* RM125와 대장균 숙주세포로부터 플라스미드 pUB110과 pUC19를 각각 분리, 정제하여 제한효소 *EcoRI*으로 절단한 다음 서로 ligation시켜 이를 다시 *HindIII*와 *Sall*으로 이중 절단하였다. 여기에 동일한 방식으로 이중 절단한 pAL850의 3.9 kb  $\alpha$ -amylase 유전자 절편을 ligation하여 shuttle 플라스미드를 완성하였다. 재조합 shuttle 플라스미드의 분석 및 확인은 제한효소로 자른 DNA 절편의 agarose gel(0.7-1.0%) 전기영동을 통하여 이루어졌다.

### 형질전환

대장균은 변형된 Hanahan의 방법(6)으로 competent cell을 이용하여 형질전환하였다. 재조합 shuttle 플라스미드를 고초균과 거대균으로 형질전환하기 위하여 Chang과 Cohen(3) 그리고 Brown과 Carlton(2)의 원형질체를 이용한 방법을 적절히 변형시켜 수행하였다. 고초균과 거대균은 10 ml LN 액체배지로 37°C에서 진탕배양하였다. 이 배양액을 18°C에서 6,000 $\times$ g로 5분간 원심분리하여 0.5 M sorbitol이 첨가된 protoplasting buffer (SoMM) (3)로 현탁시킨 후 lysozyme(40 mg/ml)을 넣었다. 잘 만들어진 원형질체에 재조합 shuttle 플라스미드를 넣고 45% PEG 용액을 첨가하여 잘 섞어 주었다. 2-4시간 동안 37°C에서 preincubation시킨 형질전환세포들을 4% polyvinylpyrrolidone (PVP)을 넣은 DMP-3 재생용 배지에 도말하고 24시간 정도 배양하여 단일 콜로니를 얻었다. 이들을 0.3% starch가 함유된 LN(kanamycin, 50  $\mu$ g/ml 첨가) 배지에 각각 toothpicking하여 Iodine 염색법(7)을 이용, 효소활성을 나타내는 형질전환주를 선별하였다.

### 효소활성 측정

형질전환주를 10 ml LN(ampicillin 50  $\mu$ g/ml 또는 kanamycin 10  $\mu$ g/ml 첨가) 배지에서 37°C로 16시간 동안 진탕배양한 후 원심분리하여 상등액을 준비하고, 남은 세포 침전물은 20 kHz에서

3분간 초음파로 파쇄처리한 후 12,000 $\times$ g에서 15분간 원심분리하여 상등액을 얻었다. 이 두 가지 효소액을 효소활성 측정용으로 사용하였다.

0.05 M citrate buffer(pH 3.6)에 1% starch를 잘 녹여 효소반응의 기질로 사용하였다. 기질 0.5 ml와 효소액 0.5 ml를 혼합하여 45°C에서 10분 동안 반응시켰다. Starch 가수분해로 생성된 환원당은 3,5-dinitrosalicylic acid(DNS)에 의한 방법(11)에 따라 550 nm에서 흡광도를 측정, 비색정량하였으며 4°C에서 1분간 1  $\mu$ mol의 환원당을 생성하는 효소량을 1 unit로 표시하였다.

### 플라스미드 안정성

25 ml의 LB 액체 배지에 항생제(kanamycin 50  $\mu$ g/ml 또는 ampicillin 100  $\mu$ g/ml 포함)를 넣고 여기에 재조합 플라스미드를 지닌 kanamycin 내성의 *Bacillus* 형질전환주 또는 ampicillin 내성의 대장균 형질전환주의 단일 colony를 접종하여 37°C에서 12-16시간 동안 진탕 배양하였다. 잘 자란 배양액 0.2 ml을 20 ml의 LB 액체 배지에 1%되게 접종하고 다시 37°C에서 12-16시간 동안 배양하였다. 배양액을 새로운 LB 액체 배지로 24시간마다 1:1000 되게 희석하여 약 30 세대 이상 될 때까지 72시간 동안 배양한 후 LB 한천 평판 배지에 도말, 37°C에서 12-16시간 동안 배양하였다. 다음 날 비선택적 평판배지인 LB 한천 평판배지에 도말한 후 잘 자란 100개 단일 colony들의 항생제에 대한 저항성 여부를 알아보기 위해 항생제 kanamycin(50  $\mu$ g/ml) 또는 ampicillin(100  $\mu$ g/ml)이 포함된 LB 한천 평판배지에 toothpicking하여 배양된 colony 수를 기록하였다. 또한 기질인 starch가 0.3% 첨가된 LB(kanamycin 50  $\mu$ g/ml 또는 ampicillin 100  $\mu$ g/ml 포함) 한천 평판배지에도 replica plating하여 24시간 배양한 다음 Iodine으로 염색하여 효소 활성대(halo)를 나타내는 colony 수를 기록, 각 숙주에서의 플라스미드 안정성을 살펴보았다.

### Activity staining(Zymogram)

세 가지의 형질전환주와 대조균으로 사용된 *E. coli* DH5 $\alpha$  (pUC19)를 10 ml의 LN 배지(ampicillin 50  $\mu$ g/ml 또는 kanamycin 10  $\mu$ g/ml 첨가)에 접종하여 37°C에서 16시간 동안 진탕배양하였다. 배양액을 12,000 $\times$ g에서 10분간 원심분리하여 얻은 상등액을 SDS-PAGE용 sample buffer와 섞어 끓인 다음 Laemmli 방법(9)에 따라 1% starch가 첨가된 12% SDS-polyacrylamide gel에 loading하여 전기영동하였다. 단백질이 분리된 gel은 0.25% starch가 첨가된 pH 6.8의 10 mM Tris-HCl로 세척한 후 0.05 M citrate buffer(pH 3.6)에서 37°C, 12시간 동안 효소-기질 반응을 진행시켰다. 이어서 Iodine 용액으로 30분간 염색하고 효소 활성대(halo)를 관찰하였다.

### 분해 생성물의 분석

Starch 가수분해 산물은 thin layer chromatography(TLC)법을 이용, 분석하였다. 효소액 0.5 ml와 2.5% starch(pH 3.6 시트르산 완충용액) 0.5 ml이 혼합된 용액을 45°C에서 24시간 동안 반응시킨 후 Silica Gel 60 TLC plate(Merck 제)에 loading하였다. 이

때 isoamylalcohol : ethanol : ammonia : water(50 : 60 : 1 : 30, v/v) 혼합액을 용매로 하여 전개한 후 공기 중에서 건조시키고, 5%의 4-methoxybenzaldehyde( $C_8H_8O_2$ , Art822314, Merck제)와 5%의  $H_2SO_4$ , 소량의 glacial acetate, 90%의 ethanol이 혼합된 용액을 분사한 후 120°C에서 10분간 발색시켰다.

## 결 과

### $\alpha$ -Amylase 유전자의 대장균과 고초균, 거대균에서의 발현

pAL850의  $\alpha$ -amylase 유전자를 고초균 및 거대균으로 이동·발현시키기 위해서는 pUC19과 *Bacillus* 세포에서 복제가 가능하며 kanamycin 내성 marker를 가지고 있는 pUB110을 각각 *EcoRI*

제한효소로 절단하여 ligation하였다. 이를 다시 *HindIII*와 *SalI*로 이중 절단하고, 동일한 제한효소로 이중 절단한 pAL850의 3.9 kb  $\alpha$ -amylase 유전자 절편과 ligation하여 재조합 shuttle vector를 만든 다음 대장균에 형질전환시켰다. Shuttle 플라스미드는  $\alpha$ -amylase 유전자와 ampicillin 및 kanamycin 내성 marker를 갖고 있을 뿐만 아니라 대장균과 *Bacillus* 세포 모두에서 복제할 수 있는 두 개의 복제원점도 가지고 있는데, 이를 pALS111이라 명명하고 고초균과 거대균으로 이동·발현시켜 보았다(Fig. 1).

형질전환주의 선별을 위해서는 kanamycin 내성의 콜로니를 분리한 후 starch 함유 평판배지로 옮겨 Iodine 염색법을 이용,  $\alpha$ -amylase 활성여부를 확인하는 방법을 사용하였다.

### 유전자 공여균과 재조합 형질전환주들이 생산하는 효소의 특성

세포 분획별 효소활성을 알아보기 위하여 시료를 배양 상등액과 세포 추출물로 나눈 후 기질인 starch에 대한 효소활성을 검토했었는데, 그 결과는 Table 1과 같았다. 즉, *B. circulans* 모균의  $\alpha$ -amylase 효소는 균체 내에 존재하지 않고 모두 균체 외로 분비되었으며, pALS111을 함유한 고초균은 모두 균체 외로, 거대균은 약 98% 정도를 분비하였다. 대장균의 경우는 균체 내에 약 90%의 효소가 함유되어 있었으며, 나머지 10% 정도만이 세포 외로 분비되었다. 그리고 기질인 starch에 대한 효소활성을 알아본 결과, pALS111을 함유한 고초균은 모균에 비해 95배 정도의 많은 효소를 증폭 생산하였으며, 거대균은 34배 정도의 효소활성을 보였다.

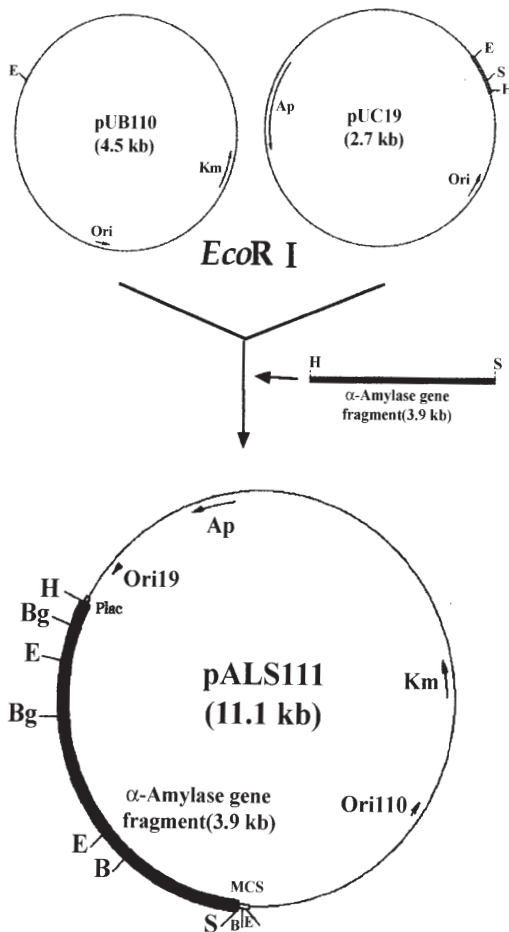
### 균체 배양시간에 따른 생육과 효소 생산의 변화

*B. circulans*와 *B. subtilis*(pALS111), *B. megaterium*(pALS111)을 LN 배지(kanamycin 첨가)에서 37°C로 16시간 동안 배양시킨 종배양액을 10 ml의 LN 배지에 1%(w/v) 되도록 각각 나누어 접종하여 배양시간에 따른 효소의 활성을 경시적으로 비교, 검토하였다.

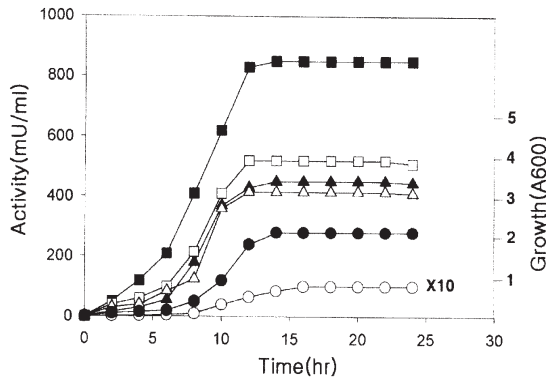
**Table 1.** Activity and localization of an  $\alpha$ -amylase in transformed cells of *E. coli*, *B. subtilis* and *B. megaterium*

Strains	Enzyme activity (mU/ml of culture broth) in			
	Culture supernatant	Cell extract	Total	Ratio
<i>B. circulans</i> KCTC3004 (gene donor)	10(100)	0(0)	10	1
<i>B. megaterium</i> ATCC14945 (pALS111)	328(98)	7(2)	335	33.5
<i>B. subtilis</i> RM125 (pALS111)	953(100)	0(0)	953	95.3
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ (pALS111)	601(10)	5414(90)	6015	601.5

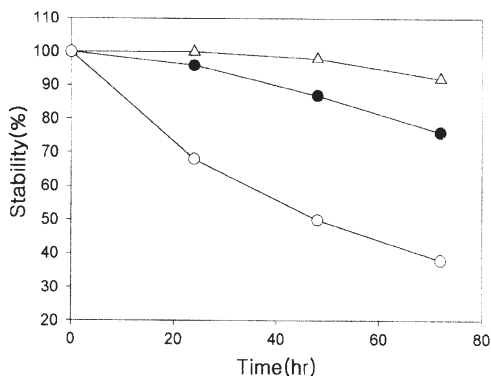
Strains of *Bacillus* and *E. coli* were grown in LN medium. All cultures were aerated vigorously for 16 hr at 37°C before the enzyme samples were harvested. Numbers in parentheses represent relative distribution(%) of the enzyme.



**Fig. 1.** Schematic representation of the construction of a recombinant shuttle plasmid pALS111. For detailed explanations, see the text in MATERIALS AND METHODS. Symbols: Ap, ampicillin resistance gene; B, *Bam*HI; Bg, *Bgl*II; E, *Eco*RI; H, *Hind*III; Km, kanamycin resistance gene; MCS, multiple cloning site; Ori19, replication origin from pUC19; Ori110, replication origin from pUB110; Plac, lac promoter; S, *Sal*I.

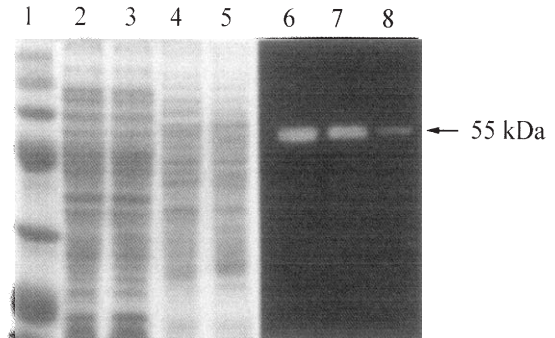


**Fig. 2.** Changes of  $\alpha$ -amylase activities in the culture broths during the growth of *B. subtilis* RM125(pALS111), *B. megaterium* ATCC14945(pALS111) and *B. circulans* KCTC3004. The three strains were grown aerobically in LN medium at 37°C. Culture supernatants and whole cell extracts were prepared periodically and  $\alpha$ -amylase activities of them were assayed. Symbols: ○ - ○, activity of *B. circulans*; ● - ●, activity of *B. megaterium*(pALS111); △ - △, growth of *B. megaterium*(pALS111); ▲ - ▲, growth of *B. circulans*; □ - □, growth of *B. subtilis*(pALS111); ■ - ■, activity of *B. subtilis*(pALS111); × 10, enzyme activity magnified ten times.



**Fig. 3.** Stability of pALS111 in *E. coli* DH5 $\alpha$ , *B. subtilis* RM125 and *B. megaterium* ATCC14945 in LB media. The culture was diluted 1 : 1000 with fresh medium every 24 hr. Symbols: ○ - ○, stability of *E. coli* DH5 $\alpha$ (pALS111); ● - ●, stability of *B. subtilis* RM125 (pALS111); △ - △, stability of *B. megaterium* ATCC14945 (pALS111).

Fig. 2에서와 같이 *B. circulans*와 *B. subtilis*(pALS111), *B. megaterium*(pALS111)의 생육정도를 살펴보면 *B. circulans*는 접종 후 14시간만에, *B. subtilis*(pALS111), *B. megaterium* (pALS111)의 경우에는 12시간만에 정지기에 도달하였다.  $\alpha$ -Amylase의 발현 및 생산은 *B. circulans*의 경우 16시간만에, *B. subtilis*(pALS111)와 *B. megaterium*(pALS111)의 경우에는 모두 14시간만에 최대활성에 도달한 후 안정한 값을 유지하였다. 즉,  $\alpha$ -amylase 효소활성은 생육정도에 거의 비례하여 증가하다가 세포생육 정지기 이후 정체됨을 알 수 있었다.



**Fig. 4.** Activity staining of the  $\alpha$ -amylase produced by *E. coli*(pALS111), *E. subtilis*(pALS111) and *B. megaterium*(pALS111). The *E. coli*, *B. subtilis* and *B. megaterium* cells were grown for 16 hr at 37°C in LN medium. Culture supernatants were appropriately concentrated and applied to 12%(w/v) polyacrylamide gel containing 1% starch. Lanes 1-5, Coomassie blue stained gel; lanes 6-8, Iodine stained gel; lane 1, high molecular weight markers(200, 97.4, 68, 43, 29, 18.4 kDa); lane 2, *E. coli*(pUC19) as a control; lane 3 and 6, *E. coli*(pALS111); lane 4 and 7, *B. subtilis*(pALS111); lane 5 and 8, *B. megaterium*(pALS111).

#### 다양한 숙주에서의 Shuttle 플라스미드 안정성

여러 숙주 내에서 shuttle 플라스미드가 얼마만큼 안정한지를 알아보기 위하여 항생제가 없는 배지에서 균주를 30 세대 이상 배양하여 살펴보았다(Fig. 3). Shuttle 플라스미드는 *B. megaterium*에서 가장 안정한 정도(92%)로, *B. subtilis*에서는 보통 정도(76%)로, *E. coli*에서는 가장 낮은 수준(38%)으로 유지되었다. 이러한 플라스미드의 안정성 문제는 배지에 항생제를 첨가함으로써 해결할 수 있었으며, 이런 조건으로 50 세대 이상 배양하였을 때 플라스미드는 안정하게 유지되었다 (결과 미제시).

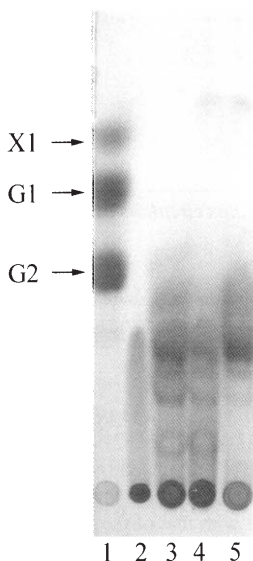
#### 분자량 측정 및 Processing 여부 확인

pALS111을 함유한 대장균과 고초균, 거대균 형질전환주들이 생산하는 단백질을 denaturing polyacrylamide gel을 이용, 분리하여 activity staining(zymogram) 방법을 통하여 비교 분석하였다(Fig. 4). 그 결과 이 효소의 분자량은 55,000으로 추정되었으며 zymogram의 band가 각 lane마다 하나씩만 나타나므로 pALS111을 가진 대장균과 고초균, 거대균에서 processing은 일어나지 않는다고 여겨진다.

#### TLC를 통한 분해 산물의 확인

효소액 0.5 ml과 2.5% starch 용액(시트르산 완충용액, pH 3.6) 각 1 ml의 혼합액을 45°C에서 24시간 동안 반응시켜 TLC로 그 생성물을 조사한 결과 *E. coli* DH5 $\alpha$ (pALS111)와 *B. megaterium* ATCC14945(pALS111), *B. subtilis* RM125 (pALS111)들에서 생산된  $\alpha$ -amylase가 기질로 starch만을 가수 분해하여 maltotriose 이상의 다양한 올리고당 분자들을 주산물로 생산함이 확인되었다(Fig. 5).





**Fig. 5.** Thin-layer chromatogram of the products released from the hydrolysis of starch by the  $\alpha$ -amylase in *E. coli* DH5 $\alpha$ (pALS111), *B. megaterium* ATCC14945(pALS111) and *B. subtilis* RM125 (pALS111). 0.5 ml of culture supernatants were mixed with 1 ml of 2.5% starch(0.05 M citrate buffer, pH 3.6) and incubated for 24 hr at 45°C, and each sample was applied to the thin-layer chromatography plate. Lane 1, standard xylose(X1), glucose(G1) and cellobiose(G2); lane 2, before start of  $\alpha$ -amylase reaction; lane 3, after reaction of  $\alpha$ -amylase from *E. coli* DH5 $\alpha$ (pALS111); lane 4, after reaction of  $\alpha$ -amylase from *B. megaterium* ATCC14945(pALS111); lane 5, after reaction of  $\alpha$ -amylase from *B. subtilis* RM125(pALS111).

## 고 찰

*Bacillus*의  $\alpha$ -amylase는 균체외로 분비되며 starch를 가수분해하는 효소로 산업적으로 매우 중요하다(5,12,13). 특히 본 연구진이 개발한 *B. circulans*  $\alpha$ -amylase는 호산성의 특성이 있다(10).

*B. circulans* 유래의  $\alpha$ -amylase 유전자를 지닌 새로운 shuttle 플라스미드 pALS111을 제작, *Bacillus* 균주(고초균 및 거대균)로 형질전환시킴으로써 효소의 대량생산, 분비가 가능하게 되었다(Fig. 1). pALS111을 함유한 고초균과 거대균은 각각 모균인 *B. circulans*에 비해 약 95배와 34배 정도의 효소활성을 보였는데, 여기서 고초균이 거대균보다 높은 활성을 보이는 것은 세포 안에서 복제·유지되는 재조합 플라스미드의 copy수와 유전자의 전사 효율상의 차이가 크게 작용하였기 때문이라고 생각된다. 한편, 이 고초균과 거대균이 세포의 생육정도에 비례하여 효소를 생산하는 것은  $\alpha$ -amylase 유전자가 성장 시기별로 차등적 억제 또는 유도 등을 받지 않는 constitutive한 발현 방식을 갖추고 있음을 알 수 있다(Fig. 2).

대장균과 고초균, 거대균 형질전환주에서 생산된  $\alpha$ -amylase의 분비 양상을 조사해 본 결과, 대장균 형질전환주는 생산된 효소의 10%만을 세포 외로 분비하였고 고초균 형질전환주는 전부를, 거대균 형질전환주는 약 98% 정도를 세포 외로 분비하였다. 이

는 고초균과 거대균이  $\alpha$ -amylase 효소 생산·분비 속주로 대장균보다 월등히 우수함을 시사해 준다(Table 1).

Shuttle 플라스미드 pALS111의 각 숙주 내에서의 안정성은 거대균, 고초균, 대장균 순으로 나타남에 따라 거대균은 비록 효소 생산 면에서는 다른 숙주에 뒤지나 플라스미드 안정성 면에서는 제일 우수함을 알 수 있다. 앞으로 플라스미드 안정성이 높은 거대균의 발현율을 개선시키는 연구가 필요하다.

대장균과 거대균 형질전환주들의 배양 상등액으로부터 얻어진  $\alpha$ -amylase 효소 시료들을 가지고 activity staining(zymogram)을 수행했을 때 분자량은 약 55,000인 것으로 추정되었으며, 대장균과 고초균, 거대균 형질전환주로부터 얻어진 시료로부터는 효소가 세포막을 통해 분비될 때 proteolytic processing 현상이 일어나지 않음을 알 수 있었다(Fig. 4). 또한 TLC 상에서 그 생성물을 조사한 결과, maltotriose(G3) 이상의 올리고당 분자들이 주된 분해산물이고, maltose(G2)와 glucose(G1)는 거의 생성되지 않음을 알 수 있었는데(Fig. 5) 이는 클로닝된 amylase가 전형적인  $\alpha$ -amylase임을 나타낸다.

앞으로 본 연구를 바탕으로  $\alpha$ -amylase의 고초균과 거대균 형질전환주에서의 발효공학적 심층 연구를 수행한다면 산업적 응용 측면에서 긴요한 정보를 더 얻을 수 있을 것으로 사료된다.

## 참고문헌

- Bolivar, F. and K. Backman. 1979. Plasmid of *Escherichia coli* as cloning vectors. *Meth. Enzymol.* 68, 245-280.
- Brown, B. J. and B. C. Carlton. 1980. Plasmid-mediated transformation in *Bacillus megaterium*. *J. Bacteriol.* 142, 508-512.
- Chang, S. and S. N. Cohen. 1979. High frequency transformation of *Bacillus subtilis* protoplasts by plasmid DNA. *Mol. Gen. Genet.* 168, 111-115.
- Ehrlich, S. D. 1977. Replication and expression of plasmids from *Staphylococcus aureus* in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74, 1680-1682.
- Greenwood, C. T. and E. A. Milne. 1981. Starch degrading and synthesizing enzymes. In *Advances in Carbohydrate Chemistry* Vol. 23. Academic Press Inc. New York and London.
- Hanahan, D. 1985. Techniques for transformation of *Escherichia coli*. In D. M. Glover (ed.), *DNA cloning*, vol. I. IRL press, Oxford. p.109-135.
- Hernandez, E. and S. J. Pitt. 1975. Kinetics of utilization of highly polymerized carbon source(starch) in a chemostat culture of *Klebsiella aerogenes* pullulanase and  $\alpha$ -amylase activities. *J. Appl. Chem. Biotech.* 25, 297-304.
- Jalanko, A., I. Palva, and H. Soderlund. 1981. Restriction maps of plasmids pUB110 and pBD9. *Gene* 14, 325-328.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lee, J. S., J. Y. Kim, H. B. Kim, and D. S. Lee. 2000. Cloning and expression of an acidophilic  $\alpha$ -amylase gene from *Bacillus circulans* in *Escherichia coli*. *Kor. J. Microbiol.* 36, 112-118.
- Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31, 426-428.
- Priest, F. G. 1997. Extracellular enzyme synthesis in the genus

*Bacillus. Bacteriol. Rev.* 41, 711-753.

13. Vihinen, M. and P. Mantsala. 1989. Microbial amylolytic enzymes.

*Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 24, 329-418.

(Received August 21, 2000/Accepted September 8, 2000)

---

**ABSTRACT : Cloning and Expression of an  $\alpha$ -Amylase Gene from *Bacillus circulans* in *B. subtilis* and *B. megaterium***

**Ji Yeon Kim,<sup>1</sup> Han Bok Kim<sup>2</sup>, and Dong Seok Lee\***(Department of Medical Laboratory Science and <sup>1</sup>Biohealth Industry Upbringing Center, Inje University, Kimhae 621-749, <sup>2</sup>Department of Life Science, Hoseo University, Asan 336-795, Korea)

A *Bacillus circulans* KCTC3004  $\alpha$ -amylase gene contained in a recombinant plasmid pAL850 was transferred into a new shuttle vector plasmid pALS111 by ligating linearized DNAs of pUC19 and pUB110. *B. subtilis* RM125 and *B. megaterium* ATCC14945 transformed with pALS111 produced the  $\alpha$ -amylase substantially. Most of the enzyme was produced during the exponential growth period. The maximum activities of the  $\alpha$ -amylase produced by the *Bacillus* transformants were compared with that of the *B. circulans* gene donor strain. The *B. subtilis* RM125(pALS111) enzyme showed the activity 95 times higher than that of the gene donor cells, followed by the *B. megaterium* ATCC14945(pALS111) enzyme with activity 34 times higher than that of the gene donor cells. While *E. coli* secreted about 10% of the produced enzyme, *B. subtilis* excreted the enzyme into the medium wholly and *B. megaterium* about 98% of the total product. The plasmid pALS111 was quite stable in *B. megaterium* (92%), moderately stable in *B. subtilis* (76%), but was unstable in *E. coli* (38%). The SDS-PAGE and zymogram of this enzyme produced in *E. coli*(pALS111), *B. subtilis*(pALS111) or *B. megaterium* (pALS111) indicated a molecular weight of 55,000. The enzymes over-produced in three different host cells hydrolyzed starch to produce mainly maltotriose and maltooligosaccharides.