

Asp, 屬菌에 의한 耐酸性

Amylase 生産에 關한 研究 (第 I 報)

分離 및 培養 pH에 對하여

朴 允 仲 · 李 錫 健

忠南大學校 農科大學

(1968 年 3 月 10 日 受理)

Studies on the Production of Acid Resistant Amylase by Molds (part 1)

Isolation and its Cultural pH

Park Yoon Choong, Lee Suk Kun

College of Agriculture, Chung Nam University

Summary

1. Two strains of Aspergilli producing acid resistant amylase were isolated from air. The strain U⁻¹ and U⁻² were similar to Asp. usamii tan type mutant in the morphological characteristics.

2. The influence of cultural pH for production of amylase were investigated in the surface culture, it was different each other in the cultural optimum initial pH. The activity of acid resistant amylase produced by strain U⁻¹ was higher than that of strain U⁻². The acid resistance was increased by culturing in lower pH.

3. The lower initial pH (U⁻¹ pH 4.0, U⁻² pH 2.0) was better than neutral (pH 6.0) for the production of amylase and growth of them. The effect of low initial pH for the production of amylase was not to accelerate but caused by change of pH in the cultural process, in the range of this experiment.

緒 言

耐酸性 Amylase 生産菌으로서從來 알려져 있는 것은 주로 Black Asp. 屬菌⁽¹⁻⁸⁾이며 이 밖에 몇 種의 다른 菌의 Amylase가 알려져 있다. Misaki(山甲)等은⁽⁹⁾ Asp. oryzae var. microsporus 및 Paecilomyces 屬菌의 耐酸性 Amylase에 對한 研究를 發

表하였으며 Yamada (山田)⁽¹⁰⁾는 耐酸 Amylase를 生産하는 菌으로서 Pullularia 屬菌을 分離하고 그 液內培養에 關한 研究를 報告하였다.

Black Asp. 屬菌에 關한 報告는 많은데 培養條件 特히 培養 pH에 關한 研究로서는 Asai(朝井)⁽¹¹⁾ Minoda(裊田)⁽¹²⁾ 및 Tsuchiya 等의⁽¹³⁾ 研究가 있으며 Black Asp. 屬菌의 Amylase는 培養 pH나 培地 組成에 따라 質的, 量的으로 變化된다는 것이 一般의 所以로 認定되고 있으나 그들의 實驗에 對하여는 더욱 檢討할 必要가 있다고 생각 된다.

著者は 耐酸性 Amylase의 工業的 生産에 關한 基礎資料를 얻기 위하여 強力한 耐酸性 Amylase 生産 菌株로서 Asp. 屬의 2 菌株를 分離하였으며 Amylase 生成에 미치는 培養 pH의 影響에 關하여 實驗하였으므로 그 結果를 報告하는 바이다.

本研究는 文教部 研究助成費의 補助를 받아 實驗한 것이며 끝으로 始終助力해준 孫天培君의 勞告에 感謝한다.

實 驗

1. 菌의 分離選定

下記의 Starch Peptone 培地(pH 2.5)를 페트리 접시에 分注 固化시킨 後 室外에서 15~30 分間 開放하여 空氣中에서 孢子를 採取하고 30°C에 3~4 日間 培養한 다음 이것을 5°C의 冷藏庫에 2~3 日間 넣어 菌의 繁殖을 抑制하면서 生産한 Amylase가 培地 中에 擴散되게 하고 그 酵素作用만이 나타나

게 하였다. 이렇게 하면 **耐酸性 Amylase 生産菌은 Colony 周圍에 Starch 分解環을 만드므로 이環의 크기를 指標로 하여 一次 選定을 하였다.** 一次로 選定한 菌株에 對하여는 數廻을 만들고 그 浸出液에 對하여 **耐酸性 液化 Amylase 및 耐酸性 糖化酵素力을 測定하여 二次 選定을 하였다.**

Starch Peptone 培地: Corn starch 3% Peptone 0.5%, KH_2PO_4 , 0.1% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, 寒天 2.5%의 水道水溶液 上記培地를 15 Lbs.로 30 分間 加壓滅菌한 後 寒天이 굳기 前에 無菌室에서 2 N-HCl 로 pH 2.5 에 調整하고 直徑 9 cm 의 滅菌한 Shale 에 15 ml 씩 分注했다.

2. 培地 및 培養法

本 實驗에서는 Amylase 生成에 對한 培養 pH 의 영향을 檢討하는 것이 目的이므로 다음과 같은 合成培地를 使用하였다.

合成培地: 可溶性澱粉 35 g. peptone 20 g, KH_2PO_4 5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.5 g, FeCl_3 10 mg Distil water 1 l (pH 는 여러가지로 했음)

上記 培地를 100 ml 容 三角 flask 에 50 ml 씩 넣어 15 Lbs, 30 分間 殺菌하고 無菌室에서 2 N-HCl 또는 2 N-NaOH 로 適當한 pH 로 調整한 後 米泔汁寒天斜面에 培養하여 充分히 胞子를 着生시킨 것을 滅菌수로 잘 씻어 내어 胞子懸濁液을 만들고 잘 흔들어 그 1 ml 를 接種했다. 이것을 35°C 의 Incubator 에 넣어 靜置 培養했다.

3. 菌體內酵素力

菌體를 flask 에서 꺼내어 濃紙上에서 蒸溜수로 數回 洗滌하고 30°C 에서 眞空乾燥한 後 濾體量을 秤量했다 다음에 이것을 磨碎하여 粉末로 하고 50 ml 의 蒸溜水를 加하여 常溫에서 3 時間 抽出하고 菌過 後 濾液에 對하여 酵素力을 測定하였다.

4. 酵素力測定

酵素力은 培養液 및 菌體에 對하여 液化酵素力 및 糖化酵素力으로 나누어 測定했다. 그리고 全酵素力은 pH 5 에서 耐酸性 酵素力은 便宜上 pH 2.5 에서 作用시켜 測定했다.

(1) 液化酵素力

Wohlgemuth 法(D_{540}^{60})으로 測定하여 W.V. 로 表示했다.

(2) 糖化酵素力

糖化酵素力은 A.U. (Amylolytic Unit)^{(14) (15)} 單位로 나타냈고 糖定量은 Hypiodide 法⁽¹⁶⁾으로 했다
a. A.U 單位: 1% 可溶性澱粉液에서 pH 5.0 (또는 pH 2.5), 溫度 40°C 로 하여 作用시킬 때 酵素液 1 ml (固體麩의 경우는 乾物 1 g)에 依하여 10 分間

에 1 mg 의 Glucose 에 相當하는 還元力을 生成하는 活性을 1 A.U 라 함.

b. 基質의 調製: 可溶性澱粉을 無水物로서 1.2g. 取하여 물에 녹인 다음 Walpole buffer pH 5.0 (또는 pH 2.5) 20 ml 를 넣고 물을 加하여 100 ml 로 한다.

c. 操作: 1.2% 可溶性澱粉 12.5 ml 를 口徑 2.0 cm 의 Test tube 에 取하고 40°C 의 恒溫水槽中에서 數分間 豫熱한 後 適當히 稀釋한 酵素液 2.5 ml 를 加하여 잘 混合한다. (이때 基質의 濃度는 1% 液으로 된) 混合直後 5 ml 를 Sampling 하고 20 分 後에 다시 Sampling 했다.

d. 糖定量: Sampling 한 두液(酵素液을 混合 直後 取한것과 20 分 後에 取한 것)은 各各 米리 0.1 N-NaOH 液 15 ml 를 取해둔 100 ml 容 三角 Flask 에 넣어 酵素作用을 中止시키고 곧 0.05 N- I_2 15 ml 를 加하여 振盪混合한 다음 常溫에서 30 分間 放置 後 1 N- H_2SO_4 , 5 ml 를 加하여 酸性으로 하고 遊離 I_2 를 0.05 N- $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 로 滴定했다. 이 hypo 液 1 cc 는 4.5 mg 의 glucose 에 相當하므로 兩 滴定值의 差異에 依하여 糖量을 Glucose 로서 算出했다.

$$A.U. = \frac{\text{生成 Glucose 量} \times 3}{\text{酵素液量}(2.5) \times 2} \times \text{酵素液의 稀釋倍數}$$

本法에서는 Sample 中の 糖量(酵素液에 原因하는 既存糖과 生成糖을 合한것)이 60 mg 以下라야 한다. 또 酵素液 ml 當의 力價가 3~12 A.U. 일때의 값과 酵素液의 稀釋度가 比例하므로 酵素液을 適當히 稀釋해서 使用하였다.

結 果

1. 菌의 同定

1 次選定法에 依하여 108 株(大部分이 黑色 colony 株이고 黃褐色 colony 株는 小數)의 菌을 얻었고 2 次選定法에 依하여 比較的 耐酸性 Amylase 生産이 강한 菌 9 株(4 株는 黑色 colony 株이고 5 株는 黃褐色 Colony 株)를 얻었다. 이들에 對하여 平板稀釋培養法을 數回 反覆하여 純粹分離를 하고 다시 2 次選定法을 實施하여 最終的으로 耐酸性 Amylase 生産力이 강한 黃褐色 Colony 의 2 株를 얻었다.

이 兩 菌株는 Sakaguchi & Iizuka(坂口, 飯塚⁽¹⁷⁾)의 分類에 依하면 Asp. usamii 系에 해당 하므로 이들은 Asp. usamii 의 Tan type Mutant 에 類似한 것으로 생각된다. 그런데 이 兩 菌株는 形態的 性質에 差가 있었다. 兩 菌株를 比較할 때 한쪽은 Conidial head 가 크며 Conidiophor 의 길이가 길고 다른 쪽은 Conidial head 가 작고 Conidiophor 의 길

기가 짧았다.

本實驗에서는 便宜上 前者를 u^{-1} 菌, 後者를 u^{-2} 菌이라 한다.

2. 培養初發 pH의 영향

培養液의 初發 pH를 2, 3, 4, 5 및 6으로 區分하여 培養하고 全般的인 酵素生成의 傾向을 보았을 때 u^{-1} 菌은 初發 pH 4 附近에서 液化酵素 및 糖化酵素의 生成이 가장 좋았으며 初發 pH 3에서는 酵素生成이 相當히 阻害되었다. 그러나 u^{-2} 菌은 pH

2와 같은 低 pH를 初發 pH로 할 때 他 pH의 경우에 比하여 特異的으로 酵素生成을 增加하였다. 以上の 實驗을 基礎로 하여 u^{-1} 菌에서는 pH 4의 경우 u^{-2} 菌에서는 pH 2의 경우를 擇하고 各各 中性側인 pH 6을 初發 pH로 했을 때의 差異를 比較檢討했다.

(1) 培養中の pH 變化

6에 培養할 때 一時 pH가 4以下까지 내려 갔으나 u^{-2} 菌에서는 初發 pH 6에 培養할 때 pH

實驗結果는 Fig. 1 및 Fig. 2 와 같다. u^{-1} 菌에서는 初發 pH

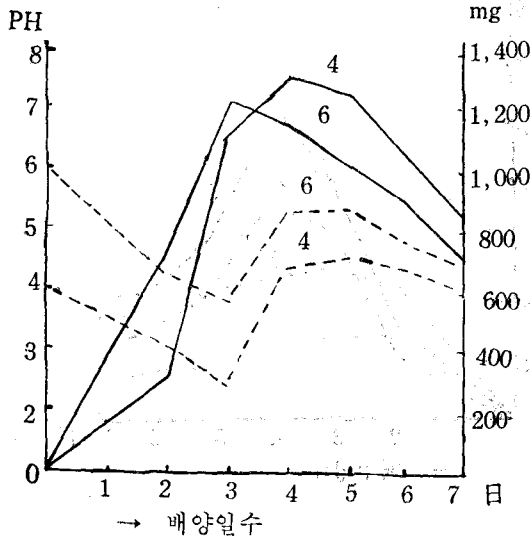


Fig. 1. U^{-1} 菌의 pH와 菌體量의 變化
點線은 pH, 實線은 菌體量, 數字는 初發 pH

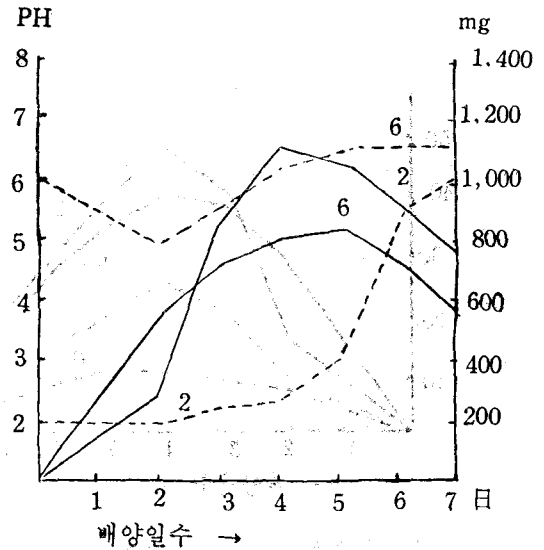


Fig. 2. U^{-2} 菌의 pH와 菌體量變化
記號表示는 Fig. 1. 과 同一

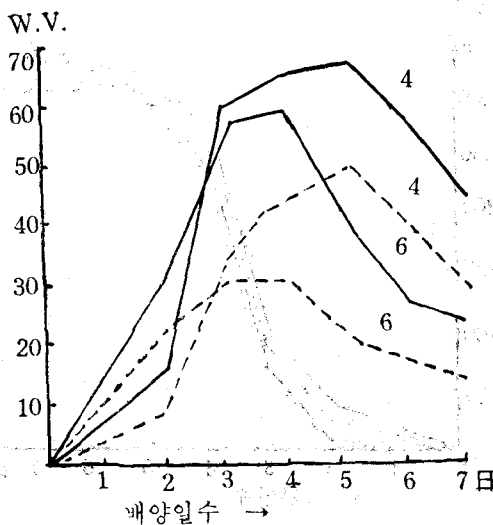


Fig. 3. U^{-1} 菌體內的 液化酵素, 實線은 全酵素力
點線은 耐酸性酵素力 數字는 初發 pH

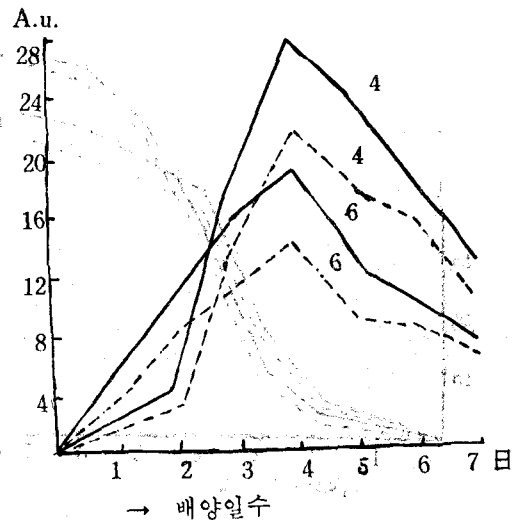


Fig. 4. U^{-2} 菌體內的 糖化酵素, 記號表示는 Fig 3 과 同一

5 附近까지 밖에 내려 지지 않았다. 初期의 菌體量은 어느 菌에서나 初發 pH 6에 培養할 때 많았으나 中間期부터는 低 pH에 培養한 것 (u⁻¹ 菌은 pH 4, u⁻² 菌은 pH 2)에 比하여 떨어 졌다.

(2) 菌體內 酵素

結果는 Fig 3~Fig. 4와 같다. u⁻¹, u⁻² 어느 菌에서나 菌體內的 液化酵素 및 糖化酵素의 生成傾向은 비슷하다. 即 初發 pH 6에 培養한 것은 低

pH에 培養한것 (u⁻¹ 菌은 pH 4, u⁻² 菌은 pH 2)에 比하여 初期에는 酵素生成이 앞서나 中間期以後는 떨어졌다. 이것은 菌體量의 變化와 비슷한 傾向이다.

液化酵素 및 糖化酵素의 耐酸性度를 보면 菌體內 酵素의 耐酸性度は 相當히 떨어졌다. 그리고 어느 菌에서나 糖化酵素보다 液化酵素의 耐酸性度가 많 이 떨어 졌다.

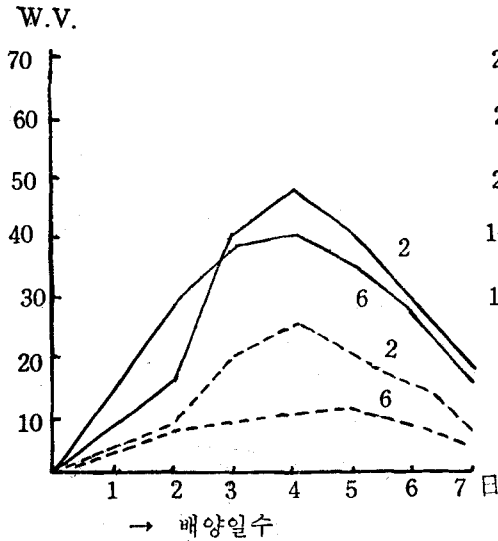


Fig. 5. U⁻² 菌體內的 液化酵素, 實線은 全酵素力, 點線은 耐酸性 酵素力, 數字는 初發 PH

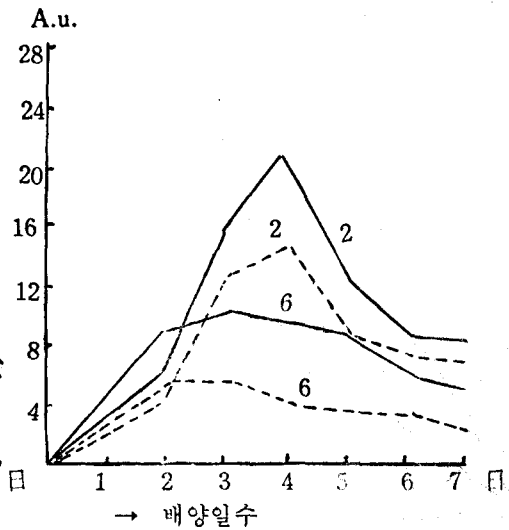


Fig. 6. U⁻² 菌體內的 糖化酵素 記號表示는 Fig 5와 같음

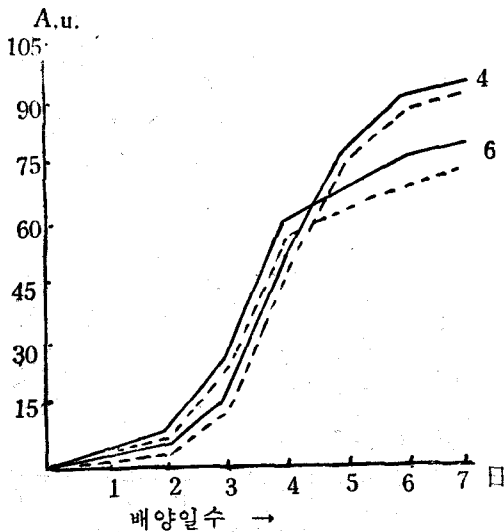


Fig. 7. U⁻¹ 菌培養液의 液化酵素 實線은 全酵素力, 點線은 耐酸性酵素力

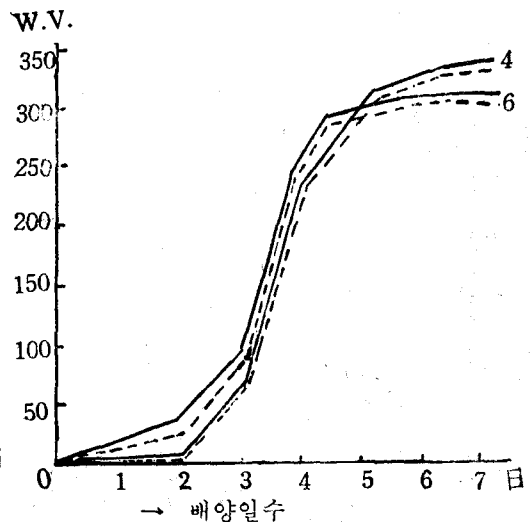


Fig. 8. U⁻¹ 菌培養液의 糖化酵素 記號表示는 Fig. VII과 同一

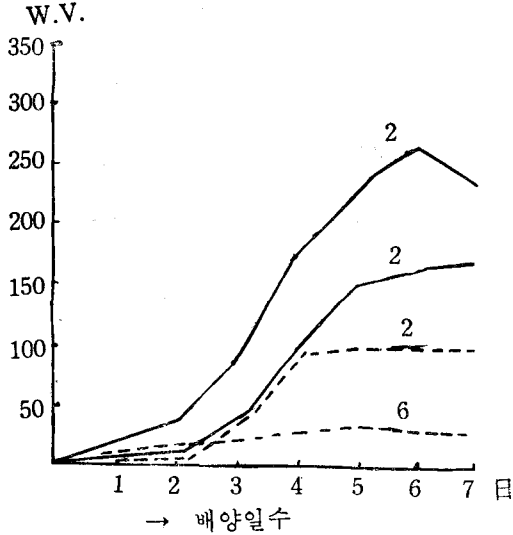


Fig. 9. U-² 菌培養液의 液化酵素, 記號表示는 Fig 7 과 同一함

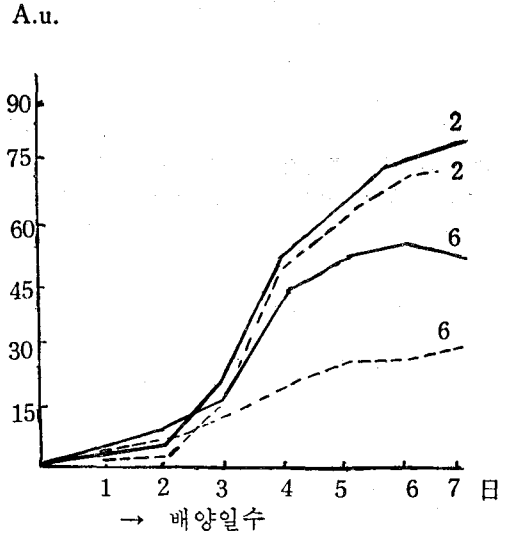


Fig. 10. U-² 菌培養液의 糖化酵素, 記號表示는 Fig 8 과 同一함

(3) 培養液酵素

結果는 Fig 7~Fig 10 과 같다. u-¹ 菌 培養液의 液化酵素 및 糖化酵素의 生成傾向은 菌體內酵素의 生成傾向과 비슷하다 그러나 이들 酵素의 耐酸性度는 매우 컸다.

u-² 菌 培養液의 糖化酵素의 生成傾向은 u-¹ 菌과 비슷하나 初發 pH 6에서 培養한 것의 糖化酵素는 耐酸性도가 많이 떨어졌다.

u-² 菌 培養液의 液化酵素는 耐酸性도가 많이 떨어졌고 특히 初發 pH 6에 培養한 것은 耐酸性도가 매우 적었다. 이와 같은 酵素의 特性 때문에 培養後半期에는 初發 pH 2에 培養한 것은 pH 6에 培養한 것에 比하여 全液化酵素力은 떨어졌으나 耐酸性 液化酵素力은 約 2倍로 많았다.

3. 一次培養 pH의 영향

選定菌 中 u-² 菌은 初發 pH를 2와 같이 매우 낮게 할때 酵素의 生成能이 좋으며 中性側인 pH 6에서 培養한 것과 比較檢討할 點이 많으므로 本實驗에서는 u-² 菌만을 使用했다. 初發 pH를 낮게 하여 低 pH의 영향이 있다면 그 影響이 2次培養에도 나타날 것이라는 假定아래 다음과 같이 實驗했다. 前記의 starch peptone 培地와 Czapeck 培地를 口徑 2 cm의 test tube에 5 ml씩 取하여 pH 2 또는 6으로 調整하고 u-² 菌이 麥汁寒天斜面의 胞子를 1白金耳씩 接種하여 35°C에서 24時間 또는 48時間 培養한 後 그 繁殖菌體를 2白金耳씩 取하여 前記 培養에서와 같이 100 ml容 三角 flask에 넣은 pH 6의 starch peptone 培地에 옮겨 35°C로 5日 間 培養했다. 그 結果는 Table 1과 같다.

Table. 1 一次培養 pH의 影響(本培養 5日)

1次培養期間 1次培養 pH 1次培養 酵素质價 1次培養 培地		Czapeck 液		Starch peptone 液	
		液化力(W.V)	糖化力(A.U)	液化力(W.V)	糖化力(A.U)
24 hrs	2.0	90(60)	50(42)	87(64)	55.4(50.2)
	6.0	100(72)	60(56)	86(64)	48.0(41.0)
48 hrs	2.0	74(54)	42(38)	80(54)	51.2(39.2)
	6.0	80(60)	46(44)	78(50)	49.2(31.0)

* ()內的 數字는 耐酸性酵素力임.

考 察

1. u⁻¹ 菌과 u⁻² 菌

u⁻¹ 菌과 u⁻² 菌은 모두 *Asp. usamii* 系의 菌이라고 認定되나 前記한 바와 같이 두 菌株는 形態의 性質이 다르며 培養生理에도 差가 있다. 同一한 初發 pH 6의 培地에 培養할 때 u⁻¹ 菌은 u⁻² 菌에 比하여 培地의 pH를 더욱 低下시키고 生成酵素의 耐酸性도 컸다. 이러한 差異는 菌의 生酸性의 差異에도 關係가 있겠으나 生成酵素의 耐酸性도는 生酸性만으로는 論할 수 없다. 實驗結果에 의하면 u⁻² 菌의 培養 pH가 u⁻¹ 培養液 pH에 比하여 낮은 때에도 u⁻² 菌의 菌體酵素의 耐酸性도가 떨어져 있는데 이것은 生酸性이나 培養液의 條件만으로는 說明할 수 없다. 이러한 差異는 菌의 固有한 遺傳的 性質에 依하는 것이라고 解釋하는 것이 妥當하다고 생각 한다.

本 實驗의 條件으로 보면 酵素生産을 爲해서는 u⁻¹ 菌에서는 初發 pH를 4로, u⁻² 菌에서는 初發 pH를 2로 하는 것이 좋았다.

2. Amylase 生産에 미치는 pH의 影響

實驗結果에 依하면 初發 pH를 低下시켜 (u⁻² 菌은 pH 4, u⁻² 菌은 pH 2) 培養할 때는 初發 pH를 中性側으로 하여 培養할 때에 比하여 初期에는 菌體 生育이나 培養液 및 菌體內의 酵素生成이 떨어져 있는데 이것은 低 pH가 菌體生育에 一時 阻害作用을 한 때문이라고 생각 된다. 그러나 中間期 以後에는 낮은 初發 pH에 培養한 것이 菌體生育이나 酵素 生成에서 앞 컸다. 그런데 Minoda (19,20) 등은 黑麴 菌의 Amylase 生成에 있어서는 培養中 一時的이나 pH 低下가 일어날 때 精化酵素生成이 增加된다고 報告한 바 있으므로 著者は 初發 pH를 낮은 것과 中性側으로 한 것에서 1次培養한 後 各 各의 菌體를 pH 6의 培地에 옮겨 培養하고 그 酵素力을 比較했다. 이 때 別差를 認定할 수가 없었다. 上記의 結果로 미루어 볼 때 Minoda 등이 報告한 바와 같이 培養中 一時的으로나 pH 低下가 일어날 때 酵素生成이 增加된다고 한 것은 그 菌株의 特性때 문이거나 그렇지 않으면 그 條件이 培養中の pH 經過를 比較的 適當하게 만든 때문이 아닌가 생각 한다.

本 實驗의 結果로는 酵素生成에 미치는 培養中の 低 pH의 一時的 影響 特히 低 初發 pH의 一時的인 影響을 認定할 수 없었다.

要 約

耐酸性 Amylase를 強力히 生産하는 2개의 菌株를 分離하고 靜置培養에 있어서의 培養 pH의 영향에 關하여 實驗했다.

1. 두 菌株는 모두 *Asp. usamii*의 tan type mutant와 類似했다.

2. u⁻¹ 菌은 初發 pH를 4로, u⁻² 菌은 初發 pH를 2로 할 때 酵素生成이 가장 좋았는데 이것은 低 pH의 一時的인 影響에 依하는 것이 아니며 初發 pH를 比較的 낮은 할 때 培養期間中の pH 經過가 適合했기 때문이다.

3. u⁻² 菌보다 u⁻¹ 菌酵素의 耐酸性이 컸으며 u⁻² 菌은 初發 pH를 낮은 하여 (pH 2) 培養할 때 生成 酵素의 耐酸性이 컸다.

參 考 文 獻

1. 長西廣輔: 釀學 5 155 (1927)
2. 佐藤喜吉, 內藤嚴: 釀學 9. 34 (1931)
3. 山崎何風, 里村幸男, 牧山進: 日本特許 178635 (1948)
4. 里村幸男, 牧山進: 藥學雜誌 69 451 (1949)
5. 岡崎浩: 日農化誌 24 88 (1950)
6. 松山正宣: 釀工誌 28 233 (1950)
7. 坂本政義: 宇隨稀雪: 釀工誌 35 278 (1957)
8. 北原覺雄, 久留島通俊: 釀工誌 27 44 (1949)
9. 山甲哲夫, 安井一, 澤田二郎, 田中一郎: 日農化誌 35 1258 1264 (1961)
10. 山田翠洋, 日農化誌 37 637, 706 (1963)
11. 朝井勇宣, 藁田泰治: 日農化誌 26 190 (1952)
12. 藁田泰治, 茂木孝世, 中村哲郎: 日農化誌 29 115 (1955)
13. H.N. TSU CHIYA, JCORMAN and H.J. KO EPSSELL: Cereal chem., 27 332 (1950)
14. 小卷利章: 澱粉工學誌 7 3 (1959)
15. 金浩植, 李瑞來, 田南秀: 韓農化誌 3 9 (1962)
16. 山田正一編: 釀造分析法 p 112 (1956)
17. 坂口謹一郎, 飯塚廣, 山崎千二: 日農化誌 24 138 (1950)
18. Ibid; 27 524 (1953)
19. 藁田泰治, 茂木孝世, 中村哲郎: 日農化誌 29 115 (1955)
20. 藁田泰治: 日農化誌 35 479 482 (1961)