

細菌 Amylase 生産에 관한 研究 (第 1 報)

菌의 分離, 同定, Amylase 生産條件 및 生成酵素의 酵素的性質에 對하여

大田農業高等專門學校

裴 貞 高 · 朴 允 仲*

(1969 年 5 月 1 日 受理)

Studies on the Production of Bacterial Amylase (I)

Isolation, Bacteriological Characteristics, Cultural Conditions and its Amylase Characteristics of a High Amylase Producing Strain

by

Jung Surl Bae and Yoon Choong Park*

Taejon Agricultural Junior College, Taejon

(Received May 1, 1969)

Abstract

1. According to the Bergey's manual of determinative bacteriology, the high amylase producing strain A-162 isolated from corn was similar to *Bacillus subtilis* in the characteristics.
2. The addition of corn powder 30%, milk casein 5% and CaCO₃ 5% to wheat bran was excellent as amylase producing media.
3. According to vessel content and quantities of the media, the optimum steaming condition of media was different. Excessive steaming (pressure and time) suppressed the growth of *Bacillus subtilis* var. A-162.
4. The optimum temperature of amylase produced was about 50°C and its optimum pH 6.0.

緒 論

細菌 amylase 에 關하여는 1819 年의 De Saussur⁽¹⁾의 報告를 비롯하여 Wortmann, Bitter 等⁽²⁾의 研究報告와 Boidin⁽³⁾, Effront⁽⁴⁾, Joucla⁽⁵⁾ 등의 工業의 利用에 關한 特許가 있다. 最初의 市販品으로는 1925 年頃 獨逸에서 Biolase 라는 商品名으로 製造販賣되었고 歐美에서는 Blom⁽⁶⁻⁸⁾에 依하여 細菌 amylase 의 起源과 性狀이 밝혀졌으며 日本에서는 福本⁽⁹⁻¹⁴⁾가 amylase 生産

菌 *Bac. amyloliquefaciens* 을 使用하여 amylase 生産機構에 對한 多數의 報告를 한 바 있다. 한편 우리나라에서는 1962 年頃 日本으로부터 各種의 細菌 amylase 劑를 年間 200ton 相當量 輸入하게 되자 國內의 各 研究機關에서도 많은 關心을 갖게 되어 朴⁽¹⁵⁻¹⁶⁾, 金⁽¹⁷⁾, 李⁽¹⁸⁾, 朴⁽¹⁹⁾ 등의 報告와 아울러 生産工業도 急進의 發展을 보게 된 것이다. 細菌 amylase 는 처음 주로 糊拔劑로 使用되었으나 1959 年 小卷等⁽²⁰⁻²¹⁾의 酵素糖化法에 依한 葡萄糖 製造에 關한 研究가 發表된 以來 澱粉의

* 忠南大學校 農科大學

液化劑로서 葡萄糖製造에 多量 使用하게 되었으며 水飴製造用, 釀造用으로도 相當量이 使用되고 있다. 筆者는 酒精工業에 있어서 澱粉質原料의 高濃度 仕込에 使用하기 爲하여 보다 우수한 amylase 生産細菌의 分離를 試圖한 바 corn 에서 우수菌株 A-162를 分離하였고 그 菌學的 性質과 amylase 生産條件 및 酵素의 性質等에 對하여 檢討하였으므로 그 結果를 報告하는 바이다.

實驗方法

1. 菌株의 分離選定

各種 自然試料에서 澱粉 液化能이 강한 菌株의 分離를 試圖하였다. 2%의 corn starch를 添加한 nutrient agar를 利用하여 平板培養法으로 37°C, 48時間 培養後 colony 周圍에 形成되는 澱粉分解環의 크기를 基準으로 하여 菌의 一次分離를 하였다. 空氣中에서의 分離는 starch nutrient agar를 샤아레에 平板固化하고 一定場所에서 一定時間 샤아레의 뚜껑을 열었다가 닫은 후 37°C, 48時間 培養後 分離選定하였다. 一次로 選定된 菌株로서 空氣에서 6株, 土壤에서 9株, 穀類에서 12株, 누룩에서 10株, 메주에서 5株, 乾草에서 3株, 都合 45株을 얻었다. 이들을 大豆粕 alkali 浸出培地 (0.2% NaOH 液으로 5%의 大豆粕을 1時間 boiling 浸出 濾過하고 soluble starch 3%를 加하여 pH 7.0)에 37°C, 48時間 培養한 液을 酵素液으로 하고 amylase activity(Wohlgemuth value)를 測定하여 가장 強力한 A-162를 選定하였다.

2. 分離菌의 同定

選定된 菌株를 nutrient broth에 37°C로 48時間 培養하여 菌體의 크기를 測定하였으며 0.5% 寒天의 半流動性培地에 stick culture하여 運動性を 觀察하였다. 死滅溫度는 nutrient broth 5ml씩을 分注 殺菌한 試驗管에 1白金耳씩 接種 한 다음 各各의 溫度로 10分間씩 加熱하고 다시 37°C로 incubating하여 生育 與否를 調査하였다. Nutrient gelatin 培地에 stick culture (25°C)하여 gelatin 液化 與否를 調査하였으며 1%의 urea solution에서 ammonia의 生成 與否로 urease의 有無를 調査하였다. Indol의 生成 與否는 tryptophan pepton water에 一週間 培養한 可檢液 5ml에 5% vanilin ethanol 5滴과 conc. HCl 2ml를 加하여 indol의 檢出을 調査하였다. H₂S의 生成 與否는 lead acetate media에 stick culture하여 培地의 黑變 與否를 觀察하였고 窒酸鹽의 還元性은 0.1% KNO₃ 含有 nutrient broth media에 培養한 것을 可檢液으로 하여 沃素澱粉生成法으로 亞窒酸의 生成有無를 確認하였다. acetyl methyl carbinol의 檢出은 glucose 0.5% 含有 pepton

water에 72時間 培養하여 Voges-Prospauer 反應으로 試驗하였다. Carbohydrate로부터의 酸生成 與否는 各種의 糖類를 各各 1%씩 含有한 nutrient broth에 48時間 培養하여 B. T. B. 로 pH의 變化를 測定하였다.

培養的 性質에 對한 試驗은 各種 media에 接種하여 37°C로 48時間 培養한 後 그 培養狀態를 觀察하였다.

3. 培養方法

保存된 strain에서 nutrient broth 5ml에 37°C로 12時間 一次 前培養하고 다시 이것을 nutrient broth 500 ml에 3時間 二次 前培養한 것을 0.5ml씩 取하여 酵素生成을 爲한 各種培地에 接種하여 37°C로 48時間 培養하였다.

4. 酵素液의 調製와 Amylase 力價測定

밀기울培養風乾物을 20倍量의 蒸溜水로 30°C에서 3時間 浸出した 濾液을 酵素液으로 使用하였다. Amylase 力價測定은 Wohlgemuth法에 依하여 測定하였다. 即 風乾物 1g에 依하여 液化되는 1%의 starch solution 液量으로 表示하였다. 作用條件은 Kolthoff Buffer pH 6.0, 作用溫度 50°C, 作用時間 30分間으로 하였다.

$$D_{500}^{50} = \frac{1\% \text{澱粉液의 ml 數}}{\text{所要酵素液의 ml 數}} \times \text{酵素液의 稀釋率}$$

結 果

1. 分離菌의 菌學的 性質

가. 形態的 性質

- (1) Rods: 0.7~0.9×1.8~2.6μ, Ends are round, almost 3~5 chains.
- (2) Motility, motile
- (3) Gram stain, positive

나. 生理的 性質

- (1) Liquefaction of gelatin; positive
- (2) Temperature reaction; opt. temp. 37°~38°C
- (3) Optimum pH; 6.8~7.0
- (4) Oxygen demand; aerobic
- (5) Reduction of litmus; positive
- (6) Urease; negative
- (7) Ammonia; produced
- (8) Indol forming; negative
- (9) Nitrite from nitrate; positive
- (10) Hydrogen sulfide; negative
- (11) Acetyl methyl carbinol; positive
- (12) Gas forming starch; negative
- (13) 各種炭水化物에서의 酸生成; sucrose, glucose, fructose, maltose 등에서 生酸하였으며 starch, lactose, galactose, raffinose, dextrin, arabinose 등에서 生酸하지 않았다.

다. 培養의 性質

- (1) Nutrient agar plate; irregular rhizoid, rough moist, opaque, white
- (2) Glucose nutrient agar plate; usually wrinkled
- (3) Potato; growth abundant, wrinkled heavy spreading, offwhite, yellow, concave
- (4) Nutrient agar slant; spreading
- (5) Glucose nutrient agar slant; growth
- (6) Nutrient gelatin stab; liquefy
- (7) Nutrient agar stab; 上部에서만 生育
- (8) Nutrient broth; ppt. formed, wrinkled clear
- (9) Sodium chloride broth; growth in 7% NaCl.

2. Amylase 生産條件

가. 培地組成과 Amylase 生成

밀기울(澱粉含量 15%)에 對하여 milk casein 5%, CaCO₃ 5%을 添加하고 corn powder 를 5~50% 添加했을 때 amylase 生成에 對한 影響은 다음 Table 1 과 같다.

Table 1. Effect of Quantity of Corn Powder on the Amylase Formation

Quantity of corn powder(%)	Amylase activity(D ₅₀ ^{60°})
5	21,000
10	22,500
15	24,000
20	24,600
25	25,000
30	25,000
35	25,000
40	24,000
45	24,000
50	23,000

澱粉含量이 적은 밀기울에 corn powder 添加는 25~35% 程度일 때 amylase 生成이 最高로 되었으며 그 以上の 添加에 있어서는 오히려 低下되었다. 또한 밀기울에 對하여 corn powder 를 30%, CaCO₃ 을 5% 添加하고 milk casein 을 1~10% 添加했을 때의 amylase 生成은 Table 2와 같다.

Table 2. Effect of Quantity of Milk Casein on the Amylase Formation

Quantity of milk casein(%)	Amylase activity(D ₅₀ ^{60°})
0	23,000
2	24,000
4	25,000
6	25,000
8	24,000
10	24,000

Milk casein 의 添加量은 5% 附近에서 가장 좋았다. CaCO₃ 의 添加에 있어서는 1~5%의 範圍에서 效果가 있었다.

나. 培地의 給水量

밀기울에 corn powder 30%, milk casein 5% Ca CO₃ 5%를 添加하고 이 原料에 對하여 給水量(井水)을 各 各 달리 했을때 amylase 生成의 差는 다음 Table 3 과 같다.

Table 3. The Relationships between Amylase-Producing and Quantity of Water in the Medium

Quantity of water(%)	Amylase activity D ₅₀ ^{60°}
100	23,000
120	24,000
140	24,000
160	25,000
180	25,000
200	24,000

다. 培地의 蒸煮條件

酵素生産培地를 500ml 容 三角 flask 에 40g 씩 담고 培地를 加壓 殺菌하는데 加壓狀態를 各 各 달리하고 20 分間씩 殺菌했을때 菌의 生育과 amylase 生成에 對한 影響을 살펴본 結果는 Table 4와 같다.

Table 4. The Relationships between Steaming Condition and Amylase-producing (for 20 min.)

Steaming pressure(Lb/in ²)	Amylase activity(D ₅₀ ^{60°})
0	15,000
5	23,000
10	25,000
15	25,000
20	24,500
25	24,000
30	20,000

即 10~15Lbs 에서 가장 良好하였으며 平壓일 때는 耐熱性雜菌의 汚染으로 酵素生成菌의 生育이 阻害되었다. 培地를 多量 담아서 培地層이 두꺼울 때는 10Lbs, 20 分間 殺菌에 있어서도 殺菌이 不完全할 때가 있었으며 또한 25Lbs 以上の 高壓殺菌에 있어서는 菌의 生育이 顯著히 더디고 酵素生成도 떨어졌다. 15Lbs 로 30 分間 以上の 殺菌에 있어서도 低下되었다.

3. 生成 Amylase 의 酵素的 性質

가. 溫度와 活性

生成 amylase 의 力價測定에 있어서 作用溫度를 各 各 달리하여 30 分間 作用시켰을 때의 活性度는 다음 Fig 1과 같다.

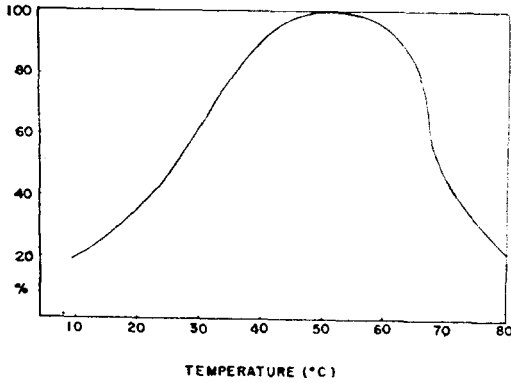


Fig. 1. The relationships between temperature and amylase activity (at pH 6.0)

即 amylase 活性 最適溫度는 50~55°C 였다.

나. pH 와 活性

各種 pH 의 buffer solution 을 1ml 씩 加한 條件에서 amylase 의 activity 를 測定하여 最高值를 100 으로 한 比活性度는 Fig. 2와 같다.

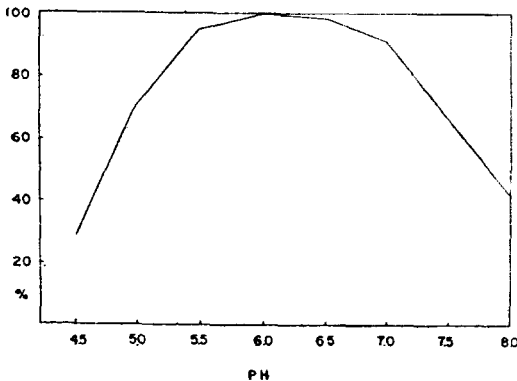


Fig. 2. The relationships between pH and amylase activity (at 50°C)

活性 最適 pH 는 6.0 附近이며 失活性는 alkali 側에서 보다도 酸性側에서 더욱 銳敏하였다.

考 察

Corn 에서 分離한 amylase 生成菌 strain A-162 의 菌學的 性質을 Bergey's manual(22)에 따라 살펴보면 Potato 에 잘 生育하고 7% NaCl 을 含有하는 broth 에서 生育하는 點 등으로 보아 Bacillus subtilis 에 類似한 點이 많았다. 또한 Bacillus amyloliquefaciens Fu-

kumoto 와는 indol 과 H₂S 를 生成하지 않는 點이 相異하고 Bacillus subtilis var. amyloliquefacus 와는 galactose 에서 酸을 生成하지 않는 등의 差를 볼 수 있었다. 金(17)이 發表한 4 strain 과는 starch 에서 酸을 生成하지 않는 點이 다르고 李等(18)이 報告한 Bacillus subtilis var. M-181 과는 maltose 에서 生酸하는 點 등이 다르다. 李等은 M-181 의 酵素生成 培地로서는 밀기울 單用이 良好하다고 報告한 바 있으나 A-162 의 酵素生成을 爲한 培地組成은 밀기울에 milk casein 을 5%, CaCO₃ 5%, corn powder 30% 의 比率로 添加하였을 때가 가장 좋았다. 給水量은 原料에 對하여 170 % 前後의 井水를 添加했을 때 좋았으며 培養溫度는 生育最適溫度보다 약간 높은 溫度인 38~40°C 에서 48 時間 培養했을 때 酵素生成이 最高이었다. 培地の 蒸煮條件을 살펴본 結果에 依하면 容器와 培地量에 따라 蒸煮條件을 달리할 必要가 있었다. 本實驗의 條件에서는 30Lbs, 30分間 蒸煮했을 때 菌의 發育繁殖이 좋지 않았으며 이것은 培地中의 Biose 등이 破壞되기 때문인 것으로 생각된다. A-162 의 生産 amylase 의 酵素의 性質에 있어서 活性最適溫度가 50°C 로서 Bacillus mesentericus 의 amylase 가 40°C 에서 最高活性을 나타낸다는 Efront(23)의 報告와 biolase 의 活性最適溫度가 65°C 라는 Glimm 등의(24) 報告와는 差異가 있었으나 M-181 의 活性最適溫度가 50°C 라는 朴等의 報告와 비슷하였다. 活性最適 pH 는 6.0~6.5 로서 B. amyloliquefaciens 의 amylase 活性最適 pH 가 6.0 이라는 福本의 報告와 大體로 비슷하였다.

要 約

1. Corn 에서 分離한 強力 amylase 生産菌株 A-162 의 菌學的 性質을 Bergey's manual 에 따라 살펴 보면 Bacillus subtilis 에 類似하였다.
2. 酵素生産 培地로는 밀기울에 對하여 corn powder 30%, milk casein 5%, CaCO₃ 5% 를 添加했을 때가 가장 좋았다.
3. 培地の 蒸煮條件은 容器의 크기와 培地量에 따라 달라야 했고 지나친 高壓과 長時間의 蒸煮에 있어서는 菌의 生育이 阻害되었다.
4. 生成 amylase 의 活性最適溫度는 50°C, 最適 pH 는 6.0 附近이었다.

引 用 文 獻

(1) T. De Saussur; Ann. Chem. et Phys, 11, 379 (1819)
 (2) 朝井勇宜編; 微生物工業, p. 478 (1956)
 (3) A. Boidin; Fr. Pat., 399, 87 (1908)
 (4) A. Boidin et. G. Efront; Fr. Pat., 475, 431

- (1915)
- (5) H. Jocula; Fr. Pat., 474, 948 (1915)
- (6) J. Blom, A. Bak und B. Braae; *Z. Physiol. Chem.*, 241, 273 (1936)
- (7) *Ibid*, 250, 104 (1937)
- (8) *Ibid*, 252, 261 (1938)
- (9) 福本壽一郎; 日本特許 120,653 (1937)
- (10) 福本壽一郎; 日農化誌, 19, 487, 634, 689, 789, 853, (1943)
- (11) *Ibid*, 20, 23, 121, 309, (1944)
- (12) 福本壽一郎, 山本武彦, 鶴大典; *Ibid*, 31, 421, 425, 429, 506, 510, 545, 724, 727, 807, (1957)
- (13) *Ibid*, 33, 1159 (1959)
- (14) *Ibid*, 34, 474 (1960)
- (15) 朴啓仁; 國立工業研究所報告, 11, 66 (1962)
- (16) 朴啓仁, 金妍植, 李鍾斗, 安秉或; *Ibid*, 14, 191 (1964)
- (17) 金燦祚; 忠南大學校 論文集, 3, 439, (1963)
- (18) 李錫健, 李漢昌; 韓國微生物學會誌, 2, 19 (1964)
- (19) 朴允仲, 李漢昌, 李錫健; 農化學會誌, 9, 105 (1968)
- (20) 小卷利章; 澱工, 6, 91 (1959)
- (21) 小卷利章, 松葉豊, 岡本昇, 佐藤時治; 澱工, 6, 98 (1959)
- (22) *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 7th. edition (1957)
- (23) G. Efront, *Compt. Rend.*, 164 415 (1957)
- (24) E. Glimm und I. U. Gizycki; *Biochem. Z.*, 248, 443 (1932)