KOR. JOUR. MICROBIOL. 7, 86~90 (1969)

Amylase 生產細菌 및 生產能의 促進條件에 關한 硏究 (第 1 報)

——Amylase 生產菌의 分離, 酵素能 및 天然物質의 添加効果에 對하여——

李 斗 永
(韓國醱酵化學硏究所)

Studies on amylase producing bacteria and its stimulation. (I)

—— Isolation, enzyme activity and additional effects of natural substances. ——

Doo Young LEE
(Korean Fermentation Chemistry Institute)

ABSTRACT

1. Amylase producing bacteria have been isolated from natural sources and was identified out. The above strain is identical to *Bacillus subtilis* in every details of physiological and morphorogical characteristics by this investigations.

2. Silkworm chrysalis and chlorella extracts are proved to be further effective for the stimulation of amylase production than any other sources. The former silkworm extract is more stronger in its activity.

3. It is found that effective result had been accepted by a less soybean meal addition per that of wheat bran in the mixture ratio of them, also less addition of corn is needed in the mixture ratio of between corn and wheat bran. In the mixing ratio of wheat bran per silkworm or chlorella extracts, the more addition of wheat bran is necessary for stimulation of amylase production.

4. For the stimulation of amylase production, the effective substances from natural sources and its order of activity in cultral media is proved as follows, silkworms ext.>chlorella ext.> alcohol>skim-milk and peptone>fermented milk>radish leaf ext.

緖 論

細菌性 amylase 의 需要는 紡織工業, 醱酵工業, 食品 및 醫藥品製造部門에서 漸增되어가고 있다. 이에 對한 硏究는 19 世期 初부터 始作되어 왔으며, 近年에는 日本의 福本(1943, 1957), 皆川(1951), 照井(1949), 松島(1950, 1952), 福岡(1954), 福田(1958), 遠藤(1959) 및 우리나라의 李(1964)等에 依하여 各自가 分離한 細菌의 amylase 의 力價 또는 그 生產條件에 關하여 報告된 바 있다.

本 硏究에서는 細菌 amylase 의 強力菌에 對한 檢索을 廣範하게 實施하였으며, 福本가 指摘한 以外에도 生產能이 強力한 菌株를 自然界의 到處에서 分離할 수 있음을 알았다. 今般 amylase 分泌力이 強한 細菌을 分離하여, 그 形態學的 및 生理的 性狀을 調査하고 amylase 生成을 促進하는 條件을 硏究하였다.

福本은 ethyl alcohol 의 添加効果를 報告한 바 있으며 照井은 脫脂粉乳와 peptone 의 有効함을, 또 松島는 무우의 葉部分이 有効하다고 報告 한바 있다. 本 硏究에서 取扱한 天然物質은 chlorella 粉末, 麵子粉末, 乾明

太, 蠶蛹乾末, 醱酵乳, 미나리의 搾汁 等이었으며, 添加培地의 狀態(固狀 또는 液狀)에 따르는 促進效果의 差異를 考察하면서 工業化의 可能性을 檢討하였다.

材料 및 方法

1. Amylase 生產細菌의 分離

菌의 分離는 Table 1. 과 같은 培地에서 施行하였으며 40°C, 72時間 培養方法으로 하고, 純粹分離는 各處에서 收集한 sample 을 agar-plate method 에 依하여 實施하였다.

Table 1. Isolation media for amylase producing bacteria.

Wheat bran ext.	50 g.(equiv.)
Bacto peptone	5 g.
Soluble starch	10 g.
Agar agar	10 g.
Dist. water	500 ml.

*p*H. 6.8

2. Amylase 生產促進을 위한 各種 天然物質의 添加

前記 分離菌株의 培地에 麩子粉末, Chlorella 粉末, 乾明太, 醱酵乳, 蠶蛹乾末, 미나리, 大蒜等과 이미 效果가 알려어져 있는 ethyl-alcohol, 脫脂粉乳와 peptone, 무 葉部分도 追加하였다. 實驗에 使用된 基礎培地는 Table 2 와 같다.

Table 2. Basal media for addition of stimulating substances.

Wheat bran	40 g
Soy bean meal	10 g
Stimulating substance	1~5%
Dist. water	500 ml.

*p*H. 6.8
15 Lbs. 30 min.

上記 培地에서 40°C, 72時間 培養 하였다.

3. Amylase activity 의 測定

本 實驗에서 液化力의 測定은 Wholgemuth 法의 照井變法으로 測定하였다. 液化力(D)는 次式으로 表示하였다.

$$D^{40^\circ}_{30'} = a/e \times 30/t \times N$$

a: 1% 可溶性 澱粉液의 使用 ml 數.
e: 酵素液의 使用 ml 數.
t: 赤紫色이 되기까지의 時間
30′: 測定時間 30 分
N: 酵素液의 稀釋倍率

結果 및 考察

1. Amylase 生產菌의 分離 結果

Petri dish 에 發生한 colony 의 周圍에 白色 ring 이 큰것을 選擇하여 純粹 培養을 계속하였다. 選擇된 18株中에서 強力菌으로 指目되는 1株를 分離하였다.

A. 本 菌에 對한 形態的 性質을 顯微鏡的 所見으로 관찰한 바는 다음과 같다.

抽出液에 peptone 1%을 加한 培養液에 24時間 培養한바 兩端鈍化 圓形이며 運動性은 없고 單獨 또는 2個~3個 以上으로 連鎖되어 있다.

크기는 0.4×0.7 μ×1.8~3.8 μ이고 胞子는 楕圓形 또는 卵形으로 크기는 0.4~0.5 μ ×0.6~0.9 μ이다.

割線培養에서 接種線에 따라 徐徐히 發育하며 穿刺培養에서는 穿刺線의 上部에만 發育함으로 好氣性이다. 液體培地에 接種하여 37°C에 18時間 培養한바 液表面에 엷은 白色의 膜이, 48時間 後에는 膜에 厚薄의 層이 生기고 얼룩 얼룩한 形狀이 된다.

B. 生理的 性質은 litmus milk medium 의 赤色이 거의 消失되고 peptone 化하고 48時間이면 下部에 沈降한다. 發育 適正溫度는 37°C 附近이고, 30°C 에서도 發育하나 48°C 서도 發育이 可能하다. 胞子의 耐熱性은 沸騰水中에서 5分間은 若干殘存하나 12分間에서는 完全 死滅한다. gelatin 의 液化는 37°C 에서 24時間 培養後 層狀으로 液化하며 70時間에 完全 液化하여 陽性이다. optimum *p*H 는 6.8~7.2 이다.

Catalase 는 H_2O_2 液 5 ml 에 醱酵液 2 ml. 을 添加하여 酵素 無添加와 對照하기 爲하여 比較 觀察한 結果 catalase 의 存在가 確認되었다. Urease 는 1% 尿素液 2 ml. 을 添加 toluol

存在下에 37°C 24時間後에 Nessler 試藥으로 NH_3 生成의 有無를 試驗한 結果 對照와 差異가 없이 陰性이다. Ammonia는 肉汁培養 24時間後 Nessler 試藥反應 結果 顯著한 反應을 보였으며 陽性이다. Indol生成은 肉汁培養 5日後에 北里 및 Solkowski 反應과 Legel 反應에 依한 結果는 全部 陰性이다.

窒酸還元性은 窒酸加里 添加肉汁에 培養後 Griese 法에 依하여 亞窒酸의 檢出을 한바 亞窒酸을 生成하였으며 陽性이다. 硫化水素는 肉汁培養後 醋酸鉛 試驗紙로 黑變反應을 본바 陰性이다.

炭水化物로부터의 酸生成은 1%의 酵母水에 各各의 炭素源 1%式을 培養한 後 *p*H 試驗紙로 生酸與否를 試驗하였다. glucose, sucrose, glycerin, mannose, galactose, maltose, 試驗에서는 生酸하고 lactose, xylose, mannit, soluble starch, fructose 等에서는 酸生成이 없다. 本 菌은 *B. Subtilis*에 近似 하였다. 天然物質을 使用한 amylase 生產促進 試驗에서는 麴子, chlorella, 乾明太, 醱酵乳, 蠶蛹, 乾末, 미나리, 마늘 等을 各各 使用量을 달리하여 比較하고, 過去에 發表된 ethyl alchol, 大根葉, 脫脂粉乳 및 peptone 等과 比較한바 蠶蛹 3% 使用으로 가장 amylase의 生產이 높고, chlorella가 3% 使用으로 2650, 비듬입시귀는 2600, 醱酵乳는 2450 單位이였다.

Table 7. 8의 結果와 같이 chlorella를 促

Table 3. Stimulating effect of the additives (juice)

Materials %	Control	1%	2%	3%	5%
Radish leaf	2100	—	2200	2400	2400
Alcohol	2100	2300	2650	2650	2650
Parsely leaf	2100				
Garlic	2100	2350	—	2200	—
Fermented milk	2100	—	2450	2460	—

Remark : Unit of Wohlgemuth' at D40°, 30′.

Table 4. Stimulating effect of the additives (powder)

Materials %	Control	1%	2%	3%	5%
Kock-Ja	2100	2200	2400	2300	2200
Dried pollak	2100	—	2300	2450	2450
Silk-worm chrysalis	2100	2600	2750	2750	2600
Gunmahl	2100	2200	—	2300	2100
Chlorella	2100	2400	2500	2650	2450
Skim milk plus peptone	2100	2300	2500	2500	—

Remark: Unit of Wohlgmuth' at D 40°, 30′.

Table 5. Stimulating effects of wheat bran and soybean meal mixture as influenced by the additive silkworm powder.

Silkworm (%) \ Ratio	1 : 9	2 : 8	3 : 7	4 : 6	5 : 5	6 : 4	7 : 3	8 : 2	9 : 1	10 : 0
0	650	800	1,200	5,900	8,000	10,500	12,000	12,000	12,500	12,500
0.5	650	800	1,000	6,800	12,000	15,500	21,500	26,000	27,800	28,500
0.8	650	800	13,500	9.500	14,500	18,500	28,500	29,500	31,500	33,000
1	650	800	13.500	7,800	13,500	16,800	23,500	27,800	28,500	28,500

Remark: Unit of Wohlgemuth at D40°, 30′.

進物로 使用할 比率을 決定한 것이며 固體培地에서는 1%의 効果가 있었다.

Table 5. 의 結果도 亦是 脫脂大豆 粕의 混用比率이 많으면 反比例로 amylase 의 生産이 적어졌다. chlorella 는 蠶蛹보다 効果가 弱하지만 alcohol 보다는 優越하였다. Table 6, 8의 結果는 玉固黍의 混用 比이며 Table 6의 麩와 玉蜀黍의 配合比에 따른 蠶蛹의 使用比의 結果는 亦是 麩의 使用量이 많은 것이 좋으며 玉蜀黍는 脫脂大豆粕과 같이 混合比가 크며는 効果가 나쁘다. 蠶蛹의 使用比는 8%가 가장 좋았고 玉蜀黍의 添加効果는 없었다. 麩에 澱粉質을 混合한 것은 効果가 좋지 않았다.

위의 實驗에서 促進効果가 큰 天然物質인 蠶蛹 및 chlorella 을 固體 生産培地에 添加한 結果도 大端히 有効하고 固體培地의 配合比에 따라 其効果의 差異는 없었다. 麩 1 : 脫脂大豆粕 9의 比에는 蠶蛹의 効果는 없었으나 6 : 4에서부터는 顯著한 効果가 있었다. 脫脂大豆粕의 混用은 脫脂大豆粕이 적고 麩가 많은 것이 좋으며 蠶蛹은 使用量이 0.8일 때 効果가 컸었다.

細菌 amylase 의 生産用 固體培地에 麩와 脫脂大豆粕의 混合比에 따른 chlorella 의 使用効果를 0.5%, 0.8%, 1%, 2%의 使用比로 알아 보았다.

이 實驗에서는 麩과 脫脂大豆粕은 9 : 1 로부터 10 : 0까지 또는 脫脂大豆粕과 麩의 比를 9 : 1 로부터 10 : 0으로 하였다.

Table 6. Stimulating effects of wheat bran and corn mixture as influenced by the additive silk worm powder.

Silkworm \ Ratio	1 : 9	2 : 8	3 : 7	4 : 6	5 : 5	6 : 4	7 : 3	8 : 2	9 : 1	10 : 0
(%)										
0	800	1,000	2,000	6,800	9,500	11,500	12,000	12,500	12,500	12,500
0.5	800	1.000	2,500	7,500	18,000	19,000	25,000	26,500	27,000	27,500
0.8	800	1,000	3,200	13,500	23,000	26,000	27,800	31,000	34,500	34,500
1	800	1,000	3,000	9,100	19,001	24,500	27,000	28,000	28,500	28,500

Table 7. Stimulating effects of wheat bran and soybean meal mixture as influenced by the additive chlorella powder.

Chlorella \ Ratio	1 : 9	2 : 8	3 : 7	4 : 6	5 : 5	6 : 4	7 : 3	8 : 2	9 : 1	10 : 0
(%)										
0	650	800	1,200	5,900	8,000	1,050	12,000	12,000	12,000	12,500
0.5	650	800	1,250	6,000	9,500	14,000	20,000	24,500	26,000	26,600
0.8	650	800	1,250	6,500	11,000	14,500	22,600	25,800	27,000	27,000
1	650	800	1,300	70,000	12,500	16,500	26,500	29,000	29,500	29,500
2	650	800	1,150	6,500	10,000	13,500	18,500	24,500	25,000	25,000

Table 8. Stimulating effects of wheat bran and corn mixture as influenced by the additive chlorella powder.

Chlorella \ Ratio	1 : 9	2 : 8	3 : 7	4 : 6	5 : 5	6 : 4	7 : 3	8 : 2	9 : 1	10 : 0
(%)										
0	800	1,000	2,000	6,800	9,500	11,500	12,000	12,500	12,500	12,500
0.5	800	1,000	2,300	7,000	16,500	18,500	25,000	26,000	2,600	26,000
0.8	800	1,000	28,000	9,000	18,500	24,000	26,800	27,000	27,000	27,000
1	800	1,000	3,000	12,000	21,000	25,000	26,700	29,000	29,500	29,500
2	800	1,000	2,750	8,800	17,500	18,500	24,500	25,500	25,800	26,600

chlorella의 使用은 粉末로 한것이다. 其結果는 Table 7, 8과 같다.

過去에 發表한 福本의 alchohol添加에서 2650, 照井의 脫脂粉乳 및 peptone添加에서 2500, 松島의 大根葉은 2400이었다. 이 試驗結果로 보아서 蠶蛹이 다른 物質보다 有效하였고 chlorella는 福本의 alcohol添加方法과 比等하거나 優越하였다. 醱酵乳도, 역시 促效進果가 있었다. 이 結果는 液體培地로서 靜置 培養하여 얻은 것이다.

比率이 많으면 效果가 떨어졌다. 麩에 玉豆黍의 混合比는 8:3까지는 無妨하였으나 其以上의 玉蜀黍의 混用은 오히려 力價가 떨어졌다. 固體培養 原料에는 麩의 使用比率이 많은 것이 力價가 좋은 結果를 얻었다.

Table 7, 8의 chlorella의 使用比는 固體培地에 있어서 1% 使用이 效果的 이었다. 細菌 amylase生產用 固形培地는 麩에 脫脂大豆粕 또는 玉蜀黍를 混用使用하는 것이 高力價의 amylase을 얻을 수 있다는 過去의 發表와는 다른 結果를 얻었으며, amylase生產의 促進物은 蠶蛹이 旣往에 發表된 것보다 優秀하다고 認定한다.

摘 要

國內 土壤中에서 强力한 amylase生產菌을 分離하여 그 形態學的 및 生理學的 特性을 究明하고, 生產化에 必要한 諸種 促進物質等의 添加 影響을 實驗하여 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 分離된 amylase生產菌의 同定結果, 本菌이 *Bacillus subtilis*와 性狀이 같음을 確認하였다.

2. 本分離菌의 amylase生產을 促進시키는 天然物質中에서 蠶蛹과 chlorella의 添加效果가 가장 컸었다. 이 效果는 ethyl alcohol, 脫脂粉乳 및 peptone의 添加效果, 보담도 越等히 컸었다.

3. 麩와 脫脂大豆粕의 混合比率에 있어서 後者의 添加比가 적을수록 促進效果가 컸었다. 또 麩와 玉蜀黍의 混合比率은 前者의 添加比가 클수록 效果的 이었다.

chlorella와 麩의 混合比에 있어서는 麩의 比率이 큰 것이 有效하였다.

4. Media에 있어서의 添加效果는 다음 順序와 같이 促進效果가 있었다.

蠶蛹>chlorella>ethyl alcohol>脫脂粉乳+peptone>醱酵乳>radish 精

REFERENCES

1. 福本壽一郎, 1943. 日本特許 157728號.
2. 福本壽一郎, 1962. 最近酵素工業, 酵素と食品加工一, 醱酵工學誌, **20**, 18-22.
3. 福岡甲子次, 原田雅之, 小田雅夫, 1954. *Bac.* の *Amylosolvens*, 並に protease生產條件に關する研究, 醱酵工學誌 **32**, No 5, 199-204.
4. 福田重夫 1958. 細菌アミテーゼ 生成に關する研究, 第2報 日農化誌, **32**, 2, 86-90.
5. 皆川豐作著 1951. 酵素化學 **44**-126.
6. 松島欽一 1952. 細菌 Amylase生產に關する研究 葡萄糖の醱醱酵を阻止する 天然物中の有效成分について 其の 1. 醱酵工學誌, **30**, 4, 116-168.
7. 遠藤滋俊 1959. 高温細菌の アミラーゼ に關する研究 第1報 菌の分離及び酵素の製造, 醱酵工學誌, **37**, 9, 353-355.
8. 照井堯造 1949. 細菌 hydrolaseに關する研究, 第4報, *Bac. amylase*, 7, *sp.* 並に之が製法及び深部培養法に依る hydrolaseの生產に就て 醱酵工學誌 **27**, 11, 289-298.