

細菌에 의한 Amylase 生産에 관한 研究

朴 允 仲

(忠南大學校 農科大學)

(1970. 6. 1. 受理)

Studies on the Amylase Production by Bacteria

Park Yoon Joong

(College of Agriculture, Choongnam University)

(Received June 1, 1970)

Summary

1. Isolation and identification of amylase-producing bacteria.

The powerful strain A-12 and S-8 were respectively isolated from air and soil after screening a large number of amylase-producing bacteria. Their bacterial characteristics have been investigated and it has been found that all characteristics of strain A-12 and S-8 are similar to *Bac. subtilis* of Bergey's manual except for the acid formation from a few carbohydrates and the citrate utilization, i.e., the strain A-12 shows negative in the citrate utilization, and the acid formation from arabinose and xylose, S-8 shows negative in the acid formation from xylose.

2. Amylase production by liquid cultures with solid materials.

Several conditions for amylase production by strain A-12 in stationary cultures have been studied. The results obtained are as follows.

(1) The optimum conditions are: temperature 35°C, initial pH 6.5 to 7.0 and incubation time 3 to 4 days.

(2) The amylase production is not affected by the preservation period of the stock cultures.

(3) Among the various solid material, the defatted soy bean is found to be the best for the amylase production. However, the alkali treatment of the defatted soy bean gives no effect contrary to the case of defatted rape seed. The addition of soluble starch to the alkali extract of defatted soy bean shows the increased amylase production.

(4) Up to 1% addition of ethanol to carbon deficient media gives the improved amylase production, whereas the above effect is not found in the case of carbon rich media.

(5) The amylase production can be increased 2.5 times when 10% of defatted soy bean is admixed to cheaply available wheat bran.

(6) The excellent effect is found for amylase production when 20% of wheat bran is admixed to defatted dry milk which is a poor medium. The activity is found to be $D_{405}^{40\%}$ 7,000(L.S.V. 1,800) in 10% medium.

(7) No significant effect is observed due to the addition of various inorganic salts.

3. Amylase production by solid cultures.

Several conditions for amylase production by strain A-12 in wheat bran cultures have been studied and the results obtained are as follows.

(1) The optimum conditions: are temperature 33°C, incubation time 2 days, water content added 150 to 175% and the thickness of the medium 1.5cm. The activity is found to be $D_{540}^{1\%} 36,000$ (L.S.V. 15,000)

(2) No significant effect is found in the case of the additions of various organic and inorganic substances.

緒 論

細菌 amylase 는 他 起源의 amylase 에 比하여 耐熱性이 크며 澱粉液化力이 強하기 때문에 오래 前부터 織物의 糊拔劑로서 多量 使用되어 왔으며 近年에는 製飴工業, 포도당製造工業, 酒精釀造工業 및 醫藥品 分野에서도 그 價値가 認定되어 需要가 漸次 增大되고 있다. 그러나 現在 生産되고 있는 細菌 amylase 는 그 品質 및 力價가 一定하지 않다.

amylase 生産菌은 自然界에 널리 分布되어 있으며 그 種類도 매우 많다. Kneen 등⁽¹⁾은 細菌 amylase 를 *Bac. subtilis* 液化型, *Bac. subtilis* 糖化型, *Bac. polymyxa* 型 및 *Bac. macerans* 型 등 4 種의 型으로 分類하였으나 細菌 amylase 中에서 現在 工業적으로 生産利用되고 있는 것은 液化型의 amylase 이며 그 生産菌株로서는 *Bac. subtilis*, *Bac. mesentericus*, *Bac. adhaerens* 등에 屬하는 細菌이 알려져 있다.

細菌은 菌株에 따라 amylase 生産能이 다르고 生理的 性質에 差異가 있으며 amylase 의 生産力價는 培養條件에 따라 甚하게 變動한다. 그러므로 細菌 amylase 의 工業的 生産에 있어서는 優秀 菌株의 分離選擇과 아울러 培養條件의 改善에 관한 研究가 切實히 要望된다.

筆者는 上記한 바와 같은 觀點에서 強力한 amylase 生産菌株를 分離同定하고 이것을 工業的 生産에 利用하기 위한 基礎研究로서 液體培養에 있어서의 amylase 生産의 培養條件, 各種 資源을 原料로 使用하여 培地組成이 amylase 生産에 미치는 影響을 檢討하고 아울러 固體培養에 있어서의 amylase 生産의 培養條件, 더욱 培地組成과 amylase 生産과의 關係 등을 究明하기 위하여 이 研究를 實施하였으며 몇가지 注目할만한 結果를 얻었으므로 報告하는 바이다.

研 究 史

細菌의 澱粉分解作用에 對하여는 19世紀 末葉부터 斷片的으로 報告되었으나 細菌 amylase 의 生産 및 利用에 관한 研究는 今世紀에 들어서 活潑히 進展되었다. 今世紀初 Boidin⁽²⁾, Boidin 및 Efront⁽³⁾ 등은 細菌 amylase 의 生産에 관한 特許를 얻었으며 1917年 Efront⁽⁴⁾는 그가 使用한 細菌의 培養液은 澱粉液化力이 強하며 麥芽의 20 倍에 이른다고 하였다. 1930年을 前後하여 Walton⁽⁵⁾ 등은 그 當時 起源을 秘密에 붙여서 販賣하고 있던 澱粉液化劑에 對한 實驗을 하여 그 起源이 細菌임을 밝히고 그 特性을 報告하였다. 今後 細菌 amylase 에 관한 研究는 實用的인 見地에서 活氣를 띠게 되었다.

1937年 皆川⁽⁶⁾는 *Bac. mesentericus* 變種를 麴汁에 純粹하게 培養하면 amylase 를 僅少하게 生産하나 이것에 3~5%의 工業用소금을 添加하면 amylase 를 強하게 生産한다고 하였다. 1939年 Wallerstein⁽⁷⁾은 主炭素源으로서 amylase 液化澱粉, 窒素源으로서 casein, 大豆粕 등을 使用한 培地로 各種 無機鹽添加의 影響을 試驗한 結果 比較的 多量의 磷酸鹽, 少量의 K, Ca, Mg 鹽 및 微量의 Fe, Mn 鹽의 添加가 amylase 生産에 效果가 있다고 報告하였다.

1943年 福本^(8,9)는 amylase 生産細菌을 廣範圍하게 分離檢索하여 두 菌株를 選定하고 이들은 그 性質이 極히 類似하며 *Bac. mesentericus* 에 가까운 菌種이라고 하였다. 福本⁽¹⁰⁾는 더욱 選擇菌株를 靜置培養하는 경우 大豆粕의 5% alkali 浸出液이 가장 좋으며 이 培地에 2%의 ethylalcohol 을 添加하면 amylase 生産은 2 倍로 增加된다고 報告하였다. 1945年 Peltier 및 Beckord⁽¹¹⁾는 各種의 天然資源에서 amylase 生産細菌을 分離하는 集計的 研究를 한바 粘敗(rope)한 빵, 小麥粉, 澱粉質 및 其他의

植物性 資料도 좋은 分離資源이 되기는 하나 特히 空氣는 效果의인 分離源이었다고 하였으며 高力價의 amylase 生産菌은 *Bac. subtilis* 群에 屬한다고 하였다. 同年 Beckord⁽¹²⁾ 등은 묽은 磷酸鹽緩衝液으로 加濕하고 加壓蒸餾한 밀기울 培地에 *Bac. subtilis* 를 培養하여 良好한 結果를 얻었으며 밀기울과 添水量的 比가 1 : 1.75 일 때 amylase 生産이 最大로 된다고 하였다. 더욱 Beckord⁽¹³⁾ 등은 1946年 alcohol 蒸溜廢液을 使用하는 amylase 生産菌의 培養法에 관한 研究를 報告하였다. 同年 Daniels⁽¹⁴⁾ 등은 *Bac. macerans* 를 深部培養하면 靜置培養하는 경우에 比하여 amylase 收率이 2倍 以上으로 增加되며 培養期間도 短縮된다고 하였다.

1948年 照井⁽¹⁵⁾는 堆肥에서 amylase 生産能이 큰 細菌을 分離檢索하고 이 菌은 從來 amylase 生産菌으로 가장 널리 使用되고 있는 *Bac. subtilis*, *Bac. mesentericus* 와는 分類學上的 性質이 뚜렷이 다르며 深部培養의 경우 稀薄한 培養液에서도 相當히 高力價의 amylase 를 生産한다고 하였다. 더욱 그⁽¹⁶⁾는 1948年 natto 菌의 檢索過程에서 amylase 生産菌을 分離하여 이 菌은 *Bac. adhaerens* 에 屬하나 生理的으로는 *Bac. subtilis* 에 類似하다고 하였고 麴式培養에서 10,000/g, L.S.V., 5% 基質濃度의 深部培養에서 1,000/cc L.S.V.의 amylase 를 生産한다고 報告하였다.

松島^(17,18)는 1950年 土壤에서 分離한 *Bac. mesentericus* 變種을 使用하여 amylase 生産에 미치는 物理的 要因에 對하여 檢討하였고 菌의 發育과 酵素生産과의 關係를 報告하였다. 또 그^(19,20)는 1952年 細菌의 amylase 生産에 있어서는 炭素源에 比하여 窒素源이 過多한 培地가 適當하다고 하였고 glucose 其他의 生酸性糖類를 含有하는 培養液에서는 菌의 發育과 amylase 生成이 微弱하나 감자, 무우잎 등의 浸出液을 添加하면 浸出液 中の 無機成分 때문에 菌의 發育과 amylase 生産이 뚜렷이 上昇된다고 하였다. 福岡⁽²¹⁾는 1950年 土壤 中에서 amylase 生産力이 강한 菌을 分離하고 그 菌學的 性質을 檢討하여 이 菌은 *Bac. adhaerens* 에 屬한다고 하였으며 5% 大豆粕 alkali 浸出液에 靜置培養하는 경우 amylase 의 最高力價는 750/cc L.S.V.이고, 大豆粕 3%, 밀기울 2%의 培地에 深部培養하는 경우 amylase 의 最高力價는 1,000/cc L.S.V. 라고 하였다. 또 그⁽²²⁾는 1954年 分離菌을 振盪培養하는 경우 窒素로서 0.2%에 相當하는 窒素源과 3~5%의

可溶性澱粉을 含有하는 培地에서 amylase 生産이 最大로 된다고 하였다.

Lulla⁽²³⁾는 1951年 合成培地를 使用하는 靜置培養에 依하여 C/N 比 및 濃度를 檢討하고 4%의 可溶性澱粉, 0.8%의 窒酸암몬液에서 amylase 生産이 最大로 되며 窒산암몬, 구연산암몬, 鹽化암몬은 良好한 ammonia 態窒素源이라고 하였다.

福田^(24,25)는 1953年 草本植物에서 高力價의 amylase 를 生産하는 細菌을 分離하고 菌學的 性質을 檢討하여 이 菌을 *Bac. subtilis* 의 變種이라고 認定하였으며, 大豆粕을 natto 菌으로 消化分解 시킨 培地에 培養하면 大豆粕 alkali 浸出液에 培養하는 경우에 比하여 amylase 의 生成이 約 4倍로 增加한다고 하였다. 더욱 大豆粕의 natto 菌 分解培地의 경우는 C/N 比가 3:1~5:1 일 때, 合成培地의 경우는 C/N 比가 5:1~8:1 일 때 amylase 生産이 最大로 된다고 하였다. 또 그⁽²⁶⁾는 1958年 細菌 amylase 의 生成을 뚜렷이 促進하는 natto 抽出物 中の 有效成分을 檢索한 結果 natto 抽出物의 分別 區分 中에서 鹽基性 amino 酸이나 peptide 등을 含有하는 區分이 促進效果를 나타냈으나 이것을 加水分解한 것은 오히려 amylase 力價를 減少시킨다고 報告하였다.

1954年 Campbell⁽²⁷⁾은 高溫性細菌의 amylase 는 培養溫度에 따라 耐熱性이 달라진다고 하였고 1957年 福本 등은 amylase 生産菌의 洗滌細胞를 使用하여 amylase 生成에 미치는 無機鹽⁽²⁸⁾, 糖類,⁽²⁹⁾ 窒素源⁽³⁰⁾의 影響에 對하여 報告하였다. 同年 野村⁽³¹⁾ 등은 *Bac. subtilis* 의 菌體懸濁液에 amylase 生成菌體의 煮沸液을 加하면 amylase 生成이 뚜렷이 促進된다고 하였다. 1960年 吉川⁽³²⁾ 등은 野村 등의 實驗에 이어서 *Bac. subtilis* 의 amylase 生成促進因子를 同一菌의 菌體에서 抽出精製하여 結晶狀態의 活性因子를 얻었으며 이것은 alkyldiamine, polyalkylamine 에 類似하다고 하였다. 皆川⁽³³⁾는 1960年 粗碎옥수수에 *Bac. mesentericus* 變種, *Bac. subtilis* 變種 등을 培養하면 amylase 의 生産이 激減하나 그 反面 強力한 protease 가 生産된다고 하였다.

1962年 朴⁽³⁴⁾은 amylase 生産細菌을 分離하여 그 菌學的 性質을 檢討하였고 朴⁽³⁵⁾ 등은 1964年 選定菌株를 5% 大豆粕 alkali 浸出液에 靜置培養하는 경우 amylase 의 力價는 1,000/cc L.S.V. 이고 밀기울에 1.25 倍의 磷酸鹽緩衝液을 加한 培地

에 固體培養하는 경우 amylase의 力價는 11,800/g L.S.V.이라고 報告하였다. 1963年 金⁽³⁶⁾은 4種의 amylase 生産細菌을 分離하고 그 菌學的 性質에 對하여 報告하였다. 1964年 李⁽³⁷⁾ 등은 米에서 amylase 生産力이 강한 細菌을 分離하였으며 固體培養의 경우 밀기울 單用培地가 좋고 生産 amylase의 力價는 Wohlgemuth 法(D_{50%}⁴⁰)으로 25,000~26,800이라고 하였다. 1969年 筆者⁽³⁸⁾ 등은 分離保存 中인 一種의 *Bac. subsilis* 類似菌株를 使用하여 密기울에 固體培養하는 試驗을 한 結果 密기울에 5%의 CaCO₃, 5%의 milk casein 등을 添加할 때 amylase 生産이 增加됨을 報告하였다. 同年 李⁽³⁹⁾는 amylase 生産細菌의 密기울培養에 있어서 大豆粕을 多量混用하면 amylase의 生産이 減少하고 少量混用은 影響이 없으나 蠶蛹을 少量添加하면 amylase의 力價는 越等히 增加한다고 報告하였다.

實驗方法

I. 菌의 分離 및 同定

1. 菌의 分離

(1) 分離源

土壤……………大田市一圓의 田 및 畚土壤
穀類……………쌀, 보리, 밀, 옥수수 등
加工副產物……쌀겨, 보리겨, 사료 등
野菜類……………배추, 무우 등
枯草類……………짚, 마른 잡초
汚水……………大田市 一圓의 下水
空氣……………大田市 一圓

(2) 分離培地

옥수수澱粉 30g, nutrient broth 8g,
寒天 25g, 水道水 1l

(3) 分離方法

前記 各種試料를 滅菌水에 少量懸濁하여 懸濁液 數滴을 分離培地에 混入하고 混和平板法에 依하여 35°C, 2日間 培養한 後 colony 周圍에 뚜렷한 澱粉分解環을 만드는 菌株를 分離하였다. 空氣中에서 分離는 分離 平板培地를 所定場所에서 10~20 分間 뚜껑을 열었다가 닫은 後 上記한 바와 같이 培養하여 分離하였다.

2. 菌株의 選定

(1) 菌株의 選定培地

a. 5% 大豆粕 alkali 浸出培地

脫脂大豆粕 50g에 0.2% NaOH 1l를 加하여 1 時間 煮沸한 後 6N-HCl 및 1N-HCl로 pH 7.0으로 調節하고 gauze로 濾過한 다음 그 濾液 30ml를 100 ml 三角 flask에 넣고 常法으로 加壓殺菌하였다.

b. 密기울 固體培地

密기울에 1.5 倍量의 蒸溜水를 加하여 잘 混和한 다음 添水한 密기울 15g을 100ml 三角 flask에 넣고 常法으로 加壓殺菌하였다.

(2) 菌株의 選定方法

分離菌株의 保存培養(0.8% nutrient broth 寒天 斜面)에서 菌體 1白金耳를 取하여 5% 大豆粕 alkali 浸出液에 接種하고 35°C로 3日間 培養한 後 培養液의 amylase 力價를 Wohlgemuth 法으로 測定하여 D_{50%}⁴⁰ 800/ml 以上の 菌株를 一次로 screening 하였다. 여기서 얻은 菌株를 密기울 固體培地에 接種하여 35°C, 2日間 培養한 後 風乾하고 風乾物의 amylase 力價를 Wohlgemuth 法 및 Lintner-Sollied-Doesel 法으로 測定하여 優秀菌株를 選定하였다.

3. amylase의 力價測定

液體培養의 경우에는 그 培養液의 濾液을 酵素原液으로 하고 固體培養의 경우는 風乾한 培養物 一定量에 0.1% NaCl 20 倍量을 加하여 室溫에서 2 時間 浸出한 後 그 濾液을 20 倍 稀釋酵素液으로 하여 amylase의 力價를 測定하였다. 이 實驗에서는 主로 Wohlgemuth 法에 準하여 amylase의 力價를 測定하였으며 特記할만한 것만 Lintner-Sollied-Doesel 法에 依한 力價도 測定하였다.

(1) Wohlgemuth 法⁽⁴⁰⁾

反應液의 Iodo 澱粉呈色이 紫赤色으로 되는 點을 基準으로 하여 酵素原液 1ml 또는 固體培養物 1g가 40°C, 30 分間에 分解할 수 있는 1% 可溶性澱粉液의 ml 數로 表示하였다 (D_{50%}⁴⁰ 單位). 測定操作에 있어서는 다음의 두 方法을 適用하였다.

① 酵素液의 濃度를 차례로 半減稀釋하는 方法

1列의 試驗管에 미리 蒸溜水 1ml씩을 넣고 1番試驗管에 酵素液 1ml를 加하여 잘 混合한 後 그 1ml를 2番試驗管에 옮기는 操作을 이어나가 試驗管 中의 酵素濃度가 차례로 半減되게 한 다음 試驗管을 40°C 水槽에 넣어 豫熱하고 이것에 40°C 水槽에서 豫熱해 둔 1% 可溶性澱粉液* 5ml씩을

*可溶性澱粉는 日本關東化學社製를 使用하고 調製用水는 pH 6.0의 McIlvaine buffer 液을 10% 容量으로 되게 加한 것을 使用함.

加하면서 흔들어 주고 40°C 水槽에 넣어 正確히 30 分間 反應시킨다. 反應後 곧 試驗관을 冷水中에 넣어 冷却시키고 0.01N-I₂液 0.5ml 를 加하여 呈色을 觀察하였다.

② 酵素液의 添加量을 달리하는 方法

1 列의 試驗管에 1% 可溶性澱粉液 5ml 씩을 加하고 1 番試驗管부터 차례로 蒸溜水 0.9ml, 0.8ml, 0.7ml, ……를 加한 다음 試驗관을 40°C 水槽에 넣어 豫熱하고 1 番試驗管부터 차례로 酵素液 0.1ml, 0.2ml, 0.3ml ……를 加하면서 흔들어 주고 40°C 水槽中에서 正確히 30 分間 反應시켰다.

(2) Lintner-Sollied-Doesel 法⁽⁴¹⁾

酵素原液 1ml 또는 固體培養物 1g 가 65°C, 15 分間에 液化할 수 있는 감자澱粉的 g 數로 表示하였다(L.S.V. 單位)

4. 選定菌株의 同定

選定菌株의 形態的, 生理的, 培養의 諸性質을 一般法⁽⁴²⁾ ⁽⁴³⁾ 및 飯塚⁽⁴⁴⁾ 등의 方法에 따라 檢討하고 同定하였다.

(1) 形態的 性質

a. 菌의 形態 및 size 의 測定은 nutrient broth agar slant 에 37°C, 48 時間 培養한 菌體를 Ziehl 의 carbolie fuchsin 液으로 染色하여 檢鏡하였다.

b. 胞子는 nutrient broth agar slant 에 48 時間 培養한 것을 Möller 法에 依하여 染色檢鏡하였다.

c. 運動性은 nutrient broth 液에 20 時間 培養한 것을 懸滴標本으로 하여 檢鏡하였다.

d. gram 染色은 Hucker 의 變法에 따라 染色檢鏡하였다.

(2) 生理的 性質

a. 窒酸鹽還元性은 KNO₃ 0.1%, peptone 0.5%의 培地에 37°C, 48 時間 培養한 液의 一部에 α -naphthyl amine-acetic acid 液과 sulphanilic acid-acetic acid 液을 添加할 때의 赤變與否로 確認하였다.

b. acetyl methyl carbinol 檢出은 peptone 0.5%, glucose 0.5%, NaCl 0.5%, pH 7.0 의 培地에 3 日間 培養한 液 1ml 에 5% α -naphthol alcohol 溶液 0.6ml 와 40% NaOH 液 0.2ml 를 加한 後 분홍色 或은 주황色으로 變色하는가를 觀察하였다.

c. methyl red 反應은 앞의 peptone, glucose 培養液에 methyl red 溶液을 滴加하여 變色을 觀察하였다.

d. ammonia 의 生成은 peptone 1%, NaCl 0.5%, pH 7.0 의 培地에 48 時間 培養하고 이것의 一部와 菌을 培養하지 않는 同一量의 培地에 各各 Nessler

試藥을 加하여 呈色을 比較 觀察하였다.

e. indol 의 生成은 tryptophan 0.1%, peptone 1%, NaCl 0.5%, pH 7.0 의 培地에 7~10 日間 培養한 培養液 10ml 를 檢液으로 하여 Kovács 의 方法으로 觀察하였다.

f. 硫化水素의 檢出은 0.1% lead acetate 를 添加한 nutrient broth agar medium 에 穿刺培養하여 培地의 黑變與否를 觀察하였다.

g. catalase 의 有無는 斜面培養한 test tube 에 3% 의 H₂O₂ 를 加하여 確認하였다.

h. urease 의 有無는 菌體懸濁液에 1%의 urea 液을 加하고 密栓하여 數時間 保存한 後 Nessler 試藥을 加하여 ammonia 의 生成 與否로 檢定하였다. 이때 盲檢으로서 菌體와 urea 液 各各에 對하여 ammonia 呈色反應을 시킨 것과 比較하였다.

i. 炭素源으로부터의 gas 生成 與否는 各種 炭素源을 各各 1% 加한 nutrient broth 液에 Durham 管을 넣어 觀察하였다.

j. carbohydrate 로부터의 酸의 生成與否는 培養 24 時間 및 72 時間 後에 pH 의 變動으로 檢定하였다. 이 試驗에서는 加壓殺菌 後의 培地의 pH 를 同時에 測定하여 이것과 比較하였다.

(3) 培養의 性質

nutrient broth agar 外 11 種(Table 3 參照)의 供試 培地에 接種, 37°C 로 培養하여 培養의 性質을 調査하였다.

II. 液體培養에 依한 amylase 生産

1. amylase 生産의 基本條件

(1) 使用菌株; strain A-12

(2) 培地의 調製

미리 綿栓殺菌한 100ml 三角 flask 에 1% 可溶性澱粉添加 nutrient broth(0.8%)液을 30ml 씩 加하고 15Lbs, 15 分間 加壓殺菌하였다.

(3) 培養方法

nutrient broth 液에 35°C, 24~48 時間 前培養한 菌의 培養液을 10 倍의 滅菌水로 稀釋한 懸濁液 0.5ml 씩을 上記의 本 培養培地에 接種하였다. 다만 前培養한 것을 어느 期間 保存하여 그 影響을 檢討하는 경우에는 35°C 에 24 時間 前培養하여 保存해 두었던 nutrient broth 寒天斜面이나 nutrient broth 液의 菌體 1 白耳씩을 取하여 本培養培地에 接種하였다.

2. 培地의 組成과 amylase 生産

(1) 使用菌株; strain A-12

(2) 培地原料의 配合

培地原料은 一種만을 單用으로 또는 數種을 配合해서 使用하였으며 여기에 無機窒素源, 無機鹽類도 添加하였다. 培地原料 및 添加物의 濃度는 培地用水量에 對한 百分率로 表示하였다. 脫脂粕은 Hexane 抽出法에 依하여 脫脂한 것이며 原料는 모두 20 mesh 以上의 粒子로 해서 使用했다.

(3) 培地의 調製

細菌 amylase 의 生産에 미치는 原料處理方法의 差異를 比較하기 위하여 다음과 같은 方法으로 培地를 調製하였으며 100ml 三角 flask 에 所定量의 原料와 물 30ml 가 加入되게 하였다. 培地의 pH 는 pH 比較試驗을 除外하고는 모두 pH 6.5로 調整하였으며 培地는 常法에 依하여 15Lbs, 15分間 加壓殺菌하였다.

a. 無處理培地

100ml 三角 flask 에 所定量의 原料와 蒸溜水 30 ml 를 加하여 常壓으로 30分間 加熱한 다음 1N-NaOH 또는 1N-HCl 을 滴加하여 pH 6.5로 調整하고 加壓殺菌하였다.

b. alkali 處理培地

100ml 三角 flask 에 所定量의 原料와 0.2%-NaOH 30ml 를 加하여 常壓으로 1時間 加熱한 다음 6N-HCl 과 1N-HCl 을 滴加하여 pH 6.5로 調整한 後 加壓殺菌하였다.

c. alkali 浸出培地

1l 平底 flask 에 所定量의 原料와 0.2% NaOH 500ml 를 加하여 常壓으로 1時間 加熱한 다음 6N-HCl 과 1N-HCl 을 滴加하여 pH 6.5로 調整한 後 이 液을 gauze 로 濾過하고 그 濾液을 100ml 三角 flask 에 30ml 씩 넣어 加壓殺菌하였다.

d. 細菌酵素分解培地

100ml 三角 flask 에 所定量의 原料와 蒸溜水 30 ml 를 加하여 常壓으로 30分間 加熱한 다음 pH 6.5로 調整하고 原料 1.5g 에 對하여 5mg 의 比率로

amylase 生産細菌의 밀기울 培養物(D₄₀⁰:33,000/g) 을 加하여 50°C 水槽에서 30分間 反應시킨 後 加壓殺菌하였다.

(4) 培養方法

前記한 amylase 生産의 培養條件과 同一하게 하였다.

II. 固體培養에 依한 amylase 生産

1. amylase 生産의 基本條件

(1) 使用菌株: strain A-12

(2) 培地의 調製

밀기울에 對하여 蒸溜水를 1.5倍 添加(添水量을 달리한 實驗을 除外)하고 水分을 均一하게 한 다음 100ml 三角 flask 에 15g 씩 덩어리가 지지 않도록 담고 常法에 依하여 15Lbs, 20分間 加壓殺菌 하였다.

(3) 培養方法

nutrient broth 液에 35°C, 24~48時間 前培養한 菌의 培養液을 5倍의 滅菌水로 稀釋한 懸濁液 0.3 ml 씩을 上記의 本培養培地에 接種하고 培養溫度와 期間에 對한 實驗 外에는 33°C로 48時間 培養 하였다.

2. 培地의 組成과 amylase 生産

밀기울을 主原料로 하고 이것에 對하여 다른 有機質原料를 5% 또는 20% 加하고 前記한 바와 같이 培地를 調製하고 培養하였다. 이밖에 無機窒素源, 無機鹽類의 添加實驗에 있어서는 이들을 培地用水에 溶解하여 添加하였으며 그 濃度는 밀기울에 對한 重量 百分率로 表示하였다.

實驗 結果

I. 菌의 分離同定

1. 優秀菌株의 選定

前記한 實驗方法에 依하여 空氣 中에서 한 分離 strain A-12 및 土壤 中에서 分離한 strain S-8를

Table 1. The morphological characteristics of the selected strains.

| strain No. | A-12 | S-8 |
|------------|--|--|
| morphology | | |
| shape | 0.7~0.8μ×2.0~3.5μ round ends, mostly chains | 0.7~0.9μ×3.8~4.5μ round ends, mostly chains |
| spores | 0.6~0.7μ×0.8~1.0μ ellipsoid, not swollen | 0.6~0.7μ×0.8~0.9μ ellipsoid, not swollen |
| motility | motile | motile |
| gram stain | positive | positive |

Table 2. The physiological characteristics of the selected strains.

| physiological test | strain No. | | gas formation from carbohydrates | gas formation from alkaline nitrate stab | acid formation from arabinose |
|---------------------------------|-------------------------|-------------------------|----------------------------------|--|-------------------------------|
| | A-12 | S-8 | | | |
| oxygen demand | aerobic | aerobic | // | xylose | - |
| optimum growth temperature | 33-35°C | 37-38°C | // | glucose | + |
| optimum growth pH | 6.5-6.8 | 6.8-7.0 | // | sucrose | + |
| nitrite from nitrate | produced | produced | // | mannitol | + |
| acetyl methyl cabinol formation | + | + | // | sorbitol | + |
| methyl red reaction | + | + | // | galactose | + |
| ammonia formation | + | + | // | lactose | - |
| indol formation | - | - | // | maltose | + |
| H ₂ S formation | - | - | // | rhamnose | - |
| catalase test | + | + | // | fructose | + |
| urease test | - | - | // | glycerine | + |
| litmus reduction | + | + | // | alcohol | - |
| milk medium | slowly peptonized | slowly peptonized | // | salicine | - |
| | becoming alkaline | becoming alkaline | // | inuline | - |
| gelatin liquefaction | liquefaction | liquefaction | // | raffinose | + |
| | ion | ion | // | treharose | - |
| starch utilization | wide zone of hydrolysis | wide zone of hydrolysis | // | mannose | + |
| | | | // | inositol | - |
| citrate utilization | not | poor | // | melibiose | - |
| | | | // | dulcit | - |
| | | | // | dextrin | + |

Table 3. The cultural characteristics of the selected strains on the various media.

| strain No. | A-12 | S-8 |
|-----------------------------------|--|--|
| media | | |
| nutrient broth agar plate | good growth, rough, opaque, white to offwhite, dry, spreading, flat, undulate, irregular round | growth abundant, rough, opaque, off-white, dry, spreading, flat, undulate, irregular round |
| nutrient broth agar slant | rough, opaque, white to offwhite, dry, spreading, flat | spreading, dry |
| glucose nutrient broth agar slant | growth heavier, spreading, rough, opaque, offwhite, dry, flat | growth, more abundant, spreading, rough, opaque, dry, flat |
| starch nutrient broth agar slant | growth more heavier, rough, dry, flat | growth same as on glucose nutrient agar |
| glucose nitrate agar slant | not growth | very scant growth filiform |
| glucose asparagin agar slant | very scant growth | scant growth echinulate |
| soy bean agar slant | growth more abundant, offwhite, dry, opaque, rough, spreading, flat | growth more abundant, offwhite, dry, opaque, rough, spreading, flat |

| | | |
|-----------------------------------|---|--|
| tyrosin nutrient broth agar slant | same as on nutrient broth agar slant | same as on nutrient broth agar slant |
| nutrient broth | clear, pellicle | clear, pellicle |
| 7% NaCl nutrient broth | growth, ring | growth, ring |
| glucose ammonium sulfate water | very scant growth, flocculent | scant growth, flocculent |
| potato medium | growth abundant, dry, spreading, offwhite, wrinkled | growth abundant, wrinkled and raised, offwhite to thin brown |

優秀菌株로 選定하였다. 이들을 밀기울 固體培地에 35°C, 2日間 培養한 경우 amylase 力價는 다음과 같았다.

A-12; D_{30}^{40} : 33,000 (L.S.V. 14,000)

S-8; D_{30}^{40} : 27,000 (L.S.V. 11,000)

2. 選定菌株의 菌學的性質

選定된 A-12 및 S-8의 形態, 生理 및 培養의 諸性質에 관한 實驗結果는 다음 Table 1, 2, 3과 같다.

上記表에 나타난 바와 같이 A-12와 S-8의 菌學的性質은 大體로 비슷하나 形態에 있어서 S-8는 A-12보다 더 길며 구연산 利用性은 A-12는 陰性이나 S-8는 微弱하게 利用하였으며 또 酸의 生成에 있어서 A-12는 arabinose가 陰性, glycerine이 陽性인데 對하여 S-8은 이의 反對였다. 培養의 性質에 있어서는 뚜렷한 差異가 없었다. 以上の 菌學的性質로 보아 A-12와 S-8는 *Bac. subtilis*에 屬하는 菌株라고 생각된다.

II. 液體培養에 依한 amylase 生産

1. amylase 生産의 培養條件

(1) 培養 initial pH와 培養日數

1%의 可溶性澱粉을 添加한 nutrient broth 液에 NaOH 및 HCl을 加하여 pH를 달리 調節하고 35°C에 培養하면서 經過日數別로 amylase 力價를 測

Table 4. Influences of initial pH and cultural period on the amylase production by strain A-12.

| period(days) | amylase activity(D_{30}^{40}) | | | |
|--------------|-----------------------------------|-----|-----|-----|
| | 2 | 3 | 4 | 5 |
| initial pH | | | | |
| 5.5 | 150 | 350 | 400 | 600 |
| 6.0 | 180 | 370 | 420 | 530 |
| 6.5 | 200 | 400 | 450 | 500 |
| 7.0 | 200 | 370 | 470 | 500 |
| 7.5 | 200 | 320 | 350 | 450 |
| 8.0 | 170 | 250 | 300 | 400 |

定한 結果는 Table 4와 같다.

培養日數 3日과 4일에 있어서는 培養 initial pH 6.5~7.0에서 amylase 生産이 가장 좋았으며 培養日數가 經過함에 따라 initial pH가 낮은 편이 좋았다.

(2) 培養溫度

pH 6.5의 培地에 溫度를 달리하여 培養한 경우의 amylase 力價는 Table 5와 같다.

Table 5. Influence of cultural temperature on the amylase production.

| temperature (°C) | amylase activity(D_{30}^{40}) | | | | |
|------------------|-----------------------------------|-----|-----|-----|-----|
| | 30 | 33 | 35 | 37 | 40 |
| period (days) | | | | | |
| 3 | 300 | 370 | 400 | 400 | 350 |
| 4 | 370 | 450 | 450 | 420 | 370 |
| 5 | 400 | 480 | 500 | 400 | 300 |

30~35°C에서는 培養 5日 後까지 日數經過에 따라 amylase 生産이 上昇되었으나 37~40°C에서는 4日 後까지 amylase 生産이 上昇되고 5日後에는 低下되었다. amylase 生産에 있어서 이 菌의 培養最適溫度는 35°C라고 推定된다.

(3) 培地의 表面率과 培養日數

100ml 三角 flask에 pH 6.5로 調節한 培地의 量을 달리 分注하여 表面率(표면적(cm^2)÷부피(cm^3))를 다르게 하고 35°C로 培養하면서 經過日數別로 amylase 力價를 測定한 結果는 Table 6과 같다.

Table 6. Influence of surface coefficient of medium on the amylase production.

| quantity (ml) | coefficient of surface | amylase activity (D_{30}^{40}) | | | | |
|---------------|------------------------|------------------------------------|-----|-----|-----|-----|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 20 | 1.629 | 180 | 300 | 450 | 520 | 600 |
| 30 | 1.140 | 100 | 200 | 400 | 450 | 500 |
| 40 | 0.755 | 60 | 150 | 350 | 400 | 430 |

培地の表面率이 큰 것일수록 amylase의 力價가 높았다.

(4) 前培養 後의 保存期間의 影響

nutrient broth 液과 nutrient broth agar slant 에 各各 24時間 前培養한 것을 5°C의 冷藏庫에 2日 間隔으로 保存日數를 달리하여 保存해 두었다가 5% 大豆粕 alkali 浸出液과 nutrient broth 液에 接種하고 3日間 培養하여 amylase 生成에 미치는 前培養後의 保存日數의 影響을 檢討하였다. 實驗結果 前培養後의 保存日數 14日까지는 變動이 없었다.

2. 培地組成과 amylase 生産

(1) 原料의 選定

밀기울, 보리겨, 脫脂米糠, 大豆粕 等の 加工副 産物과 脫脂粉乳, 蠶蛹 등을 原料로 하고 이들 原料를 前記한 바와 같이 處理하여 使用하였다. 原料濃度 5%의 培地에서 35°C, 3日間 培養한 경우의 生産 amylase의 力價는 Table 7과 같다.

Table 7. Amylase production by strain A-12 in the media prepared from various sources.

| sources of media | treatment of sources | | | |
|-------------------------|---|-----------|-----------|-----------|
| | amylase activity (D _{50%} ^{40°}) | | | |
| | medi-um-A | medi-um-B | medi-um-C | medi-um-D |
| defatted red paper seed | 600 | 400 | 350 | 600 |
| defatted soy bean | 1600 | 1550 | 1300 | 1600 |
| defatted perilla | 500 | 600 | 600 | 600 |
| defatted rice bran | 500 | 350 | 300 | 600 |
| defatted rape seed | 100 | 800 | 600 | 100 |
| defatted sesame | 350 | 350 | 350 | 400 |
| barley bran | 550 | 280 | 250 | 600 |
| wheat bran | 630 | 470 | 400 | 650 |
| defatted milk powder | 50 | — | — | 80 |
| silkworm pupa | 480 | 600 | 600 | 450 |

Note: medium-A; not treated.
 medium-B; treated with alkali.
 medium-C; extracted with alkali.
 medium-D; hydrolyzed with bacterial enzyme.

原料別로는 脫脂大豆粕 이 菌의 生育과 amylase 生成에 가장 良好한 結果를 보였다. 處理에 依한 影響은 原料의 種類에 따라 各各 다르게 나타났는데, 油菜粕, 蠶蛹의 경우는 alkali 處理가 amylase 生成에 좋았으며 其他의 原料에 있어서는 無處理 또는 酵素處理한 것이 좋았다. 특히 脫脂粉乳에 있어서는 alkali 處理의 경우 菌이 全然 生育

하지 못했으며 油菜粕은 alkali 處理에 依하여 無處理의 6~8倍로 amylase 生成이 增加되었다. 酵素處理에 있어서는 脫脂米糠, 보리겨, 밀기울 등 炭素源이 많은 原料에 있어서 多少의 效果를 認定할 수 있었으나 大部分의 경우 無處理와 같은 結果를 나타냈다.

(2) 原料의 濃度

大豆粕의 濃度를 各各 다르게 調製한 大豆粕 alkali 浸出培地에 35°C에서 3日間 培養했을 때 amylase 力價는 Fig. 1과 같다.

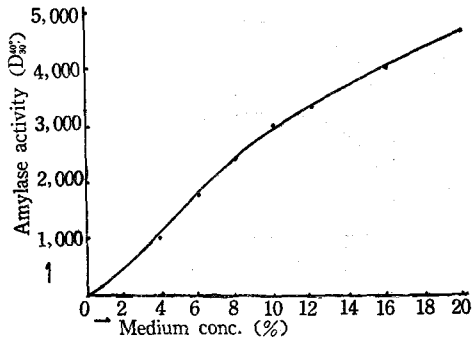


Fig 1. Influence of concentration in the alkali extract of defatted soy bean.

이 實驗의 濃度範圍(20%)에서는 培地의 濃度가 增加함에 따라 amylase 生成도 繼續增加되었다. 大豆粕 濃度가 15%까지는 培地 調製에 있어서 別支障이 없었으나 20%培地 調製에 있어서는 alkali 處理液 全體가 죽 모양으로 되어 濾過가 困難하였다.

(3) Peptone 添加의 影響

5% 및 10%의 大豆粕 alkali 浸出液을 基本으로 하고 이것에 peptone을 1~10% 添加한 培地에서 35°C, 3日間 培養한 경우의 amylase 力價는 Fig. 2와 같다.

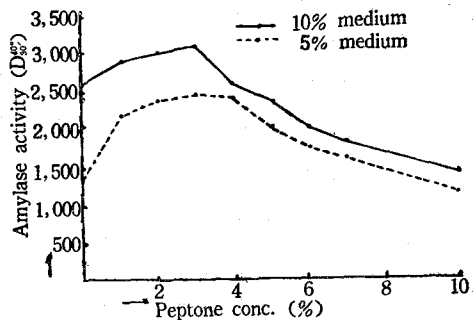


Fig. 2. Influence of addition of peptone to alkali-extract of defatted soy bean upon the amylase production.

5%, 10%의 大豆粕 alkali 浸出液 어느것에서나 peptone 1%添加時 amylase 生成이 뚜렷히 增加 되었으나 그 以上 3%까지는 뚜렷한 增加는 없었 으며 3%以上 添加時는 添加量이 많아짐에 따라 amylase 生成이 減少되었다.

(4) Starch 添加의 影響

5% 및 10%의 大豆粕 alkali 浸出液에 可溶性 澱粉을 1~10% 添加한 培地에서 35°C로 3日間 培養했을 때 amylase의 力價는 Fig. 3과 같다.

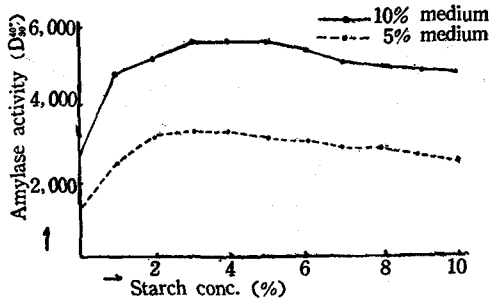


Fig. 3. Influence of addition of soluble starch to alkali-extract of defatted soy bean upon the amylase production.

5% 大豆粕 alkali 浸出培地에서는 2%, 10% 大豆粕 alkali 浸出培地에서는 3% 程度까지 可溶性澱粉添加의 效果가있으며 特히 3%添加時에 amylase 生成이 가장 높았다. 그리고 各種 有機質 資源의 5% alkali 浸出液에 可溶性澱粉을 1% 및 3% 添加한 培地에서 35°C로 3日間 培養한 경우의 amylase 力價는 Table 8과 같다.

Table 8. Influence of addition of soluble starch to alkali-extracts of various sources upon the amylase production.

| sources of media | sluble starch added (%) | | |
|-------------------------|-------------------------|------|------|
| | 0 | 1 | 3 |
| defatted red peper seed | 350 | 750 | 800 |
| defatted soy bean | 1300 | 2400 | 3200 |
| defatted perilla | 600 | 1200 | 1500 |
| defatted rice bran | 300 | 350 | 400 |
| defatted rape seed | 600 | 830 | 830 |
| defatted sesame | 350 | 830 | 830 |
| barley bran | 250 | 400 | 420 |
| wheat bran | 400 | 450 | 600 |
| defatted milk powder | — | — | 50 |
| silkworm pupa | 600 | 1200 | 1800 |

고추씨粕, 大豆粕, 들깨粕 등 窒素源이 많은 油粕

類와 蠶蛹에 있어서는 1~3%의 可溶性澱粉을 添加할 때 添加하지않은 것에 比하여 amylase 力價가 뚜렷히 增加되었으며 米糠, 麥糠, 밀기울등 比較的 炭素源이 많은 原料에 있어서는 別로 效果가 없었다.

(5) Ethanol 添加의 影響

5% 大豆粕 alkali 浸出液과 이것에 可溶性澱粉을 3% 및 5%를 添加한 3種의 培地에 菌接種時 ethanol을 1~4% 添加하고 35°C, 3日間 培養하여 amylase 生成에 미치는 ethanol의 影響을 檢討한바 그 結果는 Table 9와 같다.

Table 9. Influence of ethanol addition to the media upon the amylase production.

| ethanol conc. (%) | amylase activity (D _{40°} ^{30'}) | | |
|-------------------|---|-----------|-----------|
| | media non-starch | 3% starch | 5% starch |
| 0 | 1,300 | 3,200 | 4,000 |
| 1 | 1,800 | 2,400 | 3,000 |
| 2 | 1,000 | 1,800 | 1,800 |
| 3 | 700 | 1,300 | 1,200 |
| 4 | 300 | 900 | 800 |

可溶性澱粉을 添加하지 않은 大豆粕 alkali 浸出培地에서단 ethanol 1% 添加時 amylase 生成이 增加되었으나 ethanol의 添加量이 2%以上의 경우 그리고 可溶性澱粉을 3~5% 添加한 培地에서 ethanol을 1%以上 添加할 경우에는 오히려 amylase 生成이 減少되었다.

(6) 複合培地の 影響

培地用水에 對하여 大豆粕 6%, 其他 原料 4%

Table 10. Effects of compound media consisted of various sources on the amylase production.

| main source(6%) | amylase activity (D _{40°} ^{30'}) | |
|-------------------------|---|------------|
| | defatted soy bean | wheat bran |
| other source (4%) | | |
| defatted red peper seed | 2,400 | 1,500 |
| defatted soy bean | (3,200) | 3,200 |
| defatted perilla | 2,200 | 1,600 |
| defatted rice bran | 2,400 | 1,200 |
| defatted rape seed | 700 | 750 |
| defatted sesame | 2,000 | 1,300 |
| barley bran | 2,600 | 600 |
| wheat bran | 3,300 | (1,200) |
| defatted milk powder | 3,600 | 3,400 |
| silkworm pupa | 2,000 | 1,500 |

를 混用한 培地와 밀기울 6%, 其他 原料 4%를 混用한 培地에서 35°C, 3日間 培養하여 amylase 生成에 미치는 複合 培地の 影響을 檢討한바 그 結果는 Table 10 과 같다.

大豆粕과 他原料의 複合培地에 있어서는 脫脂粉乳 또는 밀기울을 混用하는 경우에만 大豆粕單用培地에서보다 amylase 生成이 약간 上昇되었으며 其他의 경우에는 amylase 生成이 低下되었다. 그러나 밀기울과 他原料의 複合培地에 있어서는 油菜粕, 麥糠 混用의 경우를 除外하고는 어느 경우나 밀기울單用培地에서 보다 amylase 生成이 增加되었으며 特히 脫脂粉乳 또는 大豆粕混用時에 amylase 生成이 2倍以上으로 되었다.

脫脂粉乳單用의 培地에서는 前述한바와 같이 菌의 生育과 amylase 生成이 極히 不良하였으나 이 實驗의 結果로 보아 脫脂粉乳는 複合培地の 原料로서 매우 優秀함을 알수 있었다. 그리고 밀기울 單用培地에서는 大豆粕單用 培地の 경우에 比하여 amylase 生成이 相當히 떨어지나 밀기울, 大豆粕의 複合培地에서는 大豆粕單用培地에서와 同等한 amylase 를 生成하는 點으로 보아 amylase 의 工業生産에 있어서는 大豆粕과 低廉한 밀기울의 複合培地를 使用하는 것이 有利함을 알수 있었다.

다음에 밀기울, 大豆粕複合培地(10% 濃度)에 있어서 混合比率와 amylase 生成과의 關係를 檢討한바 그 結果는 Table 11 과 같다.

Table 11. Effects of composition ratios of wheat bran and defatted soy bean upon the amylase production.

| | | | | | | |
|---|-------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| ratio | wheat bran | 90 | 80 | 60 | 40 | 20 |
| | defatted soy bean | 10 | 20 | 40 | 60 | 80 |
| amylase activity (D ₃₀ ⁴⁰) | | 3,000 | 3,000 | 3,200 | 3,400 | 3,400 |

밀기울, 大豆粕 混用 培地에 있어서는 混用比率에 相當한 差異가 있어도 amylase 生成에는 큰 差가 없었다.

(7) 脫脂粉乳混用의 影響

밀기울, 脫脂粉乳의 混用培地 및 大豆粕, 脫脂粉乳의 混用培地 調製에 있어서 培地用水에 對한 全 原料의 濃度를 10%로 하고 脫脂粉乳와 他原料의 混合比率를 달리하여 35°C에서 3日間培養하여 脫脂粉乳混用의 效果를 檢討한바 그 結果는 Fig. 4, 5 와 같다.

大豆粕과 脫脂粉乳 混用의 경우 大豆粕과 脫脂

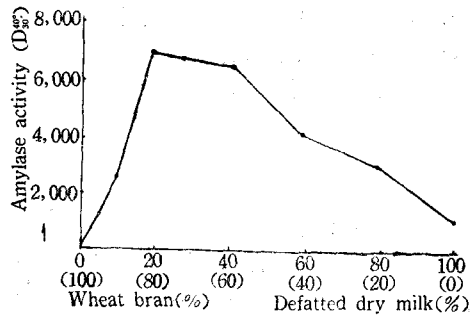


Fig. 4. Effects of composition ratio of wheat bran and defatted dry milk upon the amylase production.

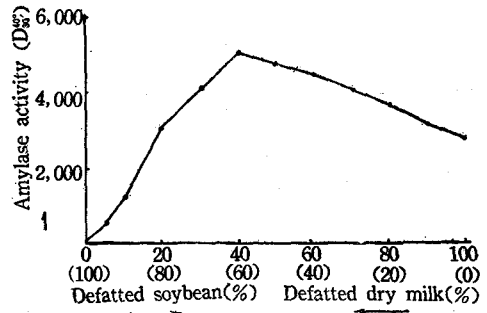


Fig. 5. Effects of composition ratios of defatted soy bean and defatted dry milk upon the amylase production.

粉乳를 40:60의 比率로 混用했을 때 amylase 의 力價가 D₃₀⁴⁰ 5,000 으로서 가장 높았고 밀기울과 脫脂粉乳 混用의 경우는 效果가 더욱 뚜렷 하였으며 밀기울과 脫脂粉乳를 20:80 으로 混用했을 때 amylase 力價는 D₃₀⁴⁰ 7,000 으로서 가장 높았다. 그리고 最高의 amylase 가 生成되는 配合比率에 이르기까지는 밀기울이나 大豆粕의 混用量的 增加에 따라 amylase 力價가 大略 比例의으로 올라감을 알수 있다.

脫脂粉乳單用의 培地에서 amylase 生成이 極히 不良한 事實이 乳製品 一般에 해당하는가를 檢討하기 위하여 脫脂粉乳外에 加糖粉乳, 生牛乳에 對하여 實驗하였던 바 生牛乳 > 加糖粉乳 > 脫脂粉乳의 順으로 amylase 生成이 약간 減少하나 뚜렷한 差異는 없었다 더욱 이러한 現象이 使用菌株의 特性에 基因하는 것인가를 살피기 위하여 保存 中인 別個의 3種의 amylase 生産細菌에 對하여 實驗하였던 바 同一한 結果를 보였다.

(8) 無機鹽類 添加의 影響

10% 濃度の 밀기울, 脫脂粉乳(2:8) 混用培地와

밀기울, 大豆粕(9:1) 混用培地에 無機鹽類를 添加하고 35°C에서 3日間 培養하여 amylase 生成에 미치는 影響을 檢討한바 그 結果는 Table 12와 같다.

Table 12. Effects of addition of inorganic salt to basal media upon the amylase production.

| kind of salts | kind of media conc. (%) added | amylase activity (D _{30'} ^{40°}) | |
|--|-------------------------------|---|--|
| | | wheat bran and defatted dry milk (2:8) | wheat bran and defatted soy bean (9:1) |
| control | — | 7,000 | 3,000 |
| (NH ₄) ₂ HPO ₄ | 0.5 | 4,800 | 2,400 |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 0.5 | 5,200 | 3,300 |
| NaNO ₃ | 0.5 | 7,000 | 2,000 |
| CO(NH ₂) ₂ | 0.5 | 4,800 | 3,000 |
| NaCl | 0.1 | 7,500 | 2,500 |
| KH ₂ PO ₄ | 0.1 | 7,000 | 2,500 |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 0.02 | 8,000 | 3,000 |
| FeCl ₃ | 0.01 | 7,000 | 2,700 |
| CaCO ₃ | 1.0 | 7,000 | 3,000 |

밀기울, 脂脫粉乳培地에서는 MgSO₄·7H₂O, NaCl의 添加에 있어서 多少 效果가 있었다. 또 밀기울 大豆粕培地에서는 (NH₄)₂SO₄의 添加에 있어서 多少 效果가 있었을 뿐이며 大部分이 control과 같거나 沮害作用을 나타냈다. 그리고 control과 같거나 多少 效果가 있는 鹽類들을 上記 濃度の 5배로 높여서 實驗하였던 바 CaCO₃ 경우만 control과 같고 其他는 control보다 amylase 力價가 低下되었다.

(NH₄)₂SO₄와 같은 無機窒素源의 添加量이 많을 때 沮害作用이 심한 것은 培養中 이들의 鹽이 培養液을 酸性化하기 때문이 아닌가 생각되어 培地에

Table 13. Effect of addition of ammonium sulfate to basal media mixed with calcium carbonate (3%).

| kind of media conc. (%) added | amylase activity (D _{30'} ^{40°}) | |
|-------------------------------|---|--|
| | wheat bran and defatted dry milk (2:8) | wheat bran and defatted soy bean (9:1) |
| 0 | 7,000 | 3,000 |
| 0.25 | 6,500 | 3,200 |
| 0.5 | 5,300 | 3,300 |
| 1 | 4,000 | 2,600 |
| 2 | 3,200 | 1,800 |
| 2.5 | 2,000 | 1,800 |

CaCO₃ 3%를 加하고 (NH₄)₂SO₄를 0.25~2.5%量 添加하여 培養하였던 바 Table 13에서 보는바와같이 低濃度 添加에서는 control과 비슷하였으며 高濃度 添加에서는 역시 amylase 生成을 沮害하였다.

Ⅱ. 固體培養에 依한 amylase 生産

1. amylase 生産의 培養條件

(1) 培養溫度和 培養期間

밀기울에 1.5倍의 蒸溜水를 加하여 고루 섞은 것을 100ml 三角 flask에 15g씩 넣어 加壓殺菌한 後 前培養한 菌을 接種하고 培養溫度和 그 期間을 다르게 하여 amylase 生産에 미치는 影響을 檢討한바 그 結果는 Table 14와 같다.

Table 14. Effects of cultural temperature and period on the amylase production.

| temperature (°C) | amylase activity (D _{30'} ^{40°}) | | | |
|------------------|---|--------|--------|--------|
| | period (days) | | | |
| | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 30 | 6,000 | 30,000 | 33,000 | 33,000 |
| 33 | 7,000 | 36,000 | 33,000 | 30,000 |
| 35 | 10,000 | 33,000 | 32,000 | 27,000 |
| 37 | 11,000 | 27,000 | 20,000 | 15,000 |
| 40 | 16,000 | 25,000 | 16,000 | 12,000 |

30°C 培養에 있어서는 日數經過에 따라 3~4日까지 力價가 繼續上昇되었으나 33°C 以上の 培養에 있어서는 培養 2日後에 力價가 最高로 되었으며 그 以後時日이 經過함에 따라 amylase 力價는 점차 減少되었다. 最適條件은 33°C, 2日間 培養이었다.

(2) 培地添水量的 影響

밀기울에 對하여 添水量을 各各 달리한 培地에 33°C, 2日間 培養한 경우의 amylase 力價는 Table 15와 같다.

Table 15. Influence of amount of water added to wheat bran upon the amylase production.

| water (%) added | amylase activity (D _{30'} ^{40°}) |
|-----------------|---|
| 100 | 25,000 |
| 125 | 30,000 |
| 150 | 36,000 |
| 175 | 36,000 |
| 200 | 33,000 |

밀기울에 對한 最適添水量은 밀기울의 澱粉含量에 따라 多少 다르나 大略 150% 및 175%에서 amylase 生成이 가장 좋았고 200%의 添水에 있어서는 菌의 生育이 빠르나 培地가 UNGCHIZH는 缺點이 있고 2日間 培養에 있어서는 150% 添水한 것 보

다 amylase 生成도 적었다.

(3) 培地두께의 影響

밀기울에 150% 添水한 것을 100ml 三角 flask에 量을 달리 넣어 培地의 두께를 달리하고 加壓殺菌한 後 33°C로 培養한 結果는 Table 16와 같다. 1日間 培養한 것에 있어서는 培地의 두께가 낮은 것일수록 菌의 生育이 빠르고 amylase 生成이 높

Table 16. Influence of thickness of wheat bran medium upon the amylase production.

| quantity of medium (g) | thickness of medium (cm) | period (days) | |
|------------------------|--------------------------|---|--------|
| | | amylase activity (D _{30'} ^{40°}) | |
| | | 1 | 2 |
| 10 | 1.1 | 9,000 | 32,000 |
| 15 | 1.5 | 7,000 | 36,000 |
| 20 | 2.1 | 7,000 | 33,000 |
| 25 | 2.7 | 5,000 | 32,000 |
| 30 | 3.1 | 3,000 | 30,000 |

았다. 그러나 2日間 培養에 있어서는 培地의 두께가 1.1cm의 것보다 1.5~2.1cm의 것이 amylase 力價가 더 높았다.

2. 培地組成과 amylase 生産

(1) 原料의 配合

밀기울에 對하여 各種의 農産 加工副産物 및 脫脂粉乳, 蠶蛹 등의 粉末을 各各 5%, 20% 添加한 培地에 33°C, 2日間 培養했을 때의 amylase 生成은 Table 17과 같다. 이 實驗에 使用한 原料 中에는 밀기울에 混用하여 amylase 의 生成을 增大시킨 것은 없었으며 脫脂粉乳를 除外하고는 20% 混用時에 amylase 生成을 減少 시켰다.

Table 17 Effects of various materials added to wheat bran upon the amylase production.

| materials | amylase activity (D _{30'} ^{40°}) | |
|-------------------------|---|--------|
| | 5% | 20% |
| defatted red paper seed | 34,000 | 34,000 |
| defatted soy bean | 34,000 | 34,000 |
| defatted perilla | 34,000 | 30,000 |
| defatted rice bran | 35,000 | 34,000 |
| defatted rape seed | 34,000 | 34,000 |
| defatted sesame | 34,000 | 30,000 |
| barley bran | 36,000 | 34,000 |
| defatted milk powder | 36,000 | 36,000 |
| silkworm pupa | 34,000 | 30,000 |
| control | 36,000 | |

(2) 無機鹽類添加의 影響

無機鹽類를 培地用水에 溶解하여 밀기울에 添加하고 33°C, 2日間 培養하여 amylase 生成에 미치는 影響을 檢討한바 그 結果는 Table 18과 같다. NaNO₃, CO(NH₂)₂, (NH₄)₂HPO₄를 添加한 培地에서는 amylase 生成이 僅少하게 減少되었으며 그 밖의 無機鹽類의 添加도 效果가 없는것 같다.

Table 18. Effects of inorganic salts added to wheat bran medium upon the amylase production

| kind | salts conc. (%) added | amylase activity (D _{30'} ^{40°}) |
|--|-----------------------|---|
| | | |
| CaCO ₃ | 1.0 | 36,000 |
| (NH ₄) ₂ HPO ₄ | 0.5 | 34,000 |
| (NH ₄)SO ₄ | 0.5 | 36,000 |
| NaNO ₃ | 0.5 | 32,000 |
| CO(NH ₂) ₂ | 0.5 | 34,000 |
| NaCl | 0.1 | 36,000 |
| KH ₂ PO ₄ | 0.1 | 36,000 |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 0.02 | 36,000 |
| FeCl ₃ | 0.001 | 36,000 |

考 察

1. 菌의 分離 및 同定

空氣 및 土壤 中에서 分離한 優秀菌株인 strain A-12와 strain S-8의 菌學的性質을 Bergey's Manual⁽⁴⁵⁾의 分類 Key에 依하여 살펴보면 두 菌株가 모두 有孢子, 好氣性 桿菌이고 gram 染色 및 catalase 陽性으로서 *Bacillus*에 屬하며 또 sporangia는 swelling 하지 않고 glucose nutrient broth agar 및 soy bean agar slant에서 잘 生育하는 點, 7% NaCl broth에서 生育하는 點, 澱粉과 gelatin의 分解力이 강한 點, 窒酸鹽을 還元하는 點, pH 5.2 以上에서 生育하고 嫌氣, alkali 性에서 窒酸鹽으로부터 gas를 生成하지 않는 點 등으로 보아 *Bacillus subtilis*의 類緣菌이라고 생각된다. 한편 Bergey's Manual에 記載된 事項과 다른 點으로서 strain A-12의 경우 炭素源으로서 citrate를 利用하지 않고 arabinose와 xylose에서 酸을 生成하지 않는 點이 다르고, strain S-8은 citrate medium과 glucose asparagin agar slant에서 僅少하게 生育하나 역시 xylose에서 酸을 生成하지 않는 點이 다르다. amylase 生産에 있어서 특히 優秀한 菌株인 strain A-12

와 既往에 amylase 生産菌으로 報告된 菌들과 菌學的性質을 比較하면 *Bacillus amyloliquefaciens* Fukumoto⁽⁹⁾와는 maltose, dextrin, raffinose 등에서 酸을 生成하는 點이 다르고 福岡⁽²⁴⁾가 報告한 *Bacillus subtilis* var. *amyloliquefacus*와는 acetyl methyl carbinol의 生成이 뚜렷한 點, treharose에서 酸을 生成하지 않는 點, glycerin과 dextrin에서 酸을 生成하는 點이 다르다. 福岡⁽²¹⁾가 報告한 *Bacillus moriguchiensis*와는 窒酸鹽還元성이 陽性인 點이 다르나 照井가^(15,16) 報告한 *Bacillus hydrolyticus*와는 sporangia가 swelling하지 않고 milk medium를 顯著하게 alkali性으로 變化시키는 點 등이 다르고 *Bacillus amylosolvans*와는 硫化水素와 indol을 生成하지 않는 點 등이 다르다.

2. 液體培養에 의한 amylase 生産

靜置培養의 경우 strain A-12의 最適培養期間은 3~4日間이며 最適 Initial pH는 6.5~7.0이었다. 이菌의 最適 Initial pH는 福本⁽¹⁰⁾, 朴⁽³⁵⁾ 등이 報告한 最適 Initial pH 7.0~7.4 보다는 낮고 松島⁽¹⁷⁾, 福岡⁽²¹⁾ 등이 報告한 pH 5.5 附近 보다는 높다. 最適培養溫度는 35°C로서 既往에 報告된 松島⁽¹⁷⁾, 福本⁽¹⁰⁾, 福田⁽²⁴⁾, 등의 實驗結果와 비슷하나 最適培養溫度가 30°C라고 한 福岡⁽²¹⁾의 報告와는 相當한 差異가 있다. 이菌을 30°C에 培養할 때에는 最適溫度 35°C에 培養하는 경우에 比하여 amylase 生成이 뚜렷이 떨어졌다.

培地의 表面率에 관한 實驗에 依하면 同一 容器에서는 液量이 적을 수록 表面率이 커져서 細菌 amylase의 生産이 높았다. 이 結果는 Boidin 및 Effront⁽⁸⁾, 福本⁽¹⁰⁾, 松島⁽¹⁷⁾, 등에 依하여 認定된 바와 같다. 前培養한 菌을 5°C의 冷藏庫에 保存해 두었다가 本培養에 使用하는 경우 生産 amylase의 力價는 保存期間의 差異(0~14日間)에 關係없이 거의 一定하였다. 松島⁽¹⁷⁾는 前培養한 amylase 生成細菌을 2~10°C에 保存해 두었다가 使用할 때 保存日數 9~11일의 것이 amylase 生成에 가장 좋으며 그 前後의 것은 amylase 生成이 떨어진다고 한 바 있는데 이 報告는 筆者의 實驗結果와는 큰 差가 있다. 또 外村⁽⁴⁶⁾ 등은 麴菌에 있어서 age가 다른 前培養菌體를 本培養에 옮기면 amylase 生成에 뚜렷한 差異가 생긴다고 한 바 있다. 그러나 이와 같은 絲狀菌의 生理現象을 細菌에 直接 關聯시켜서 생각 할 수는 없는 것이다.

液體培地의 組成과 細菌 amylase 生産과의 關係를 檢討한 研究는 많으나 培地原料에 對하여 多角

的으로 檢討한 報告는 別로 없다. 따라서 筆者는 多種의 原料를 選定하여 여러 角度로 amylase 生産에 미치는 影響을 檢討하였다. 培地原料를 그대로 單用하는 경우에는 福本⁽¹⁰⁾, 福田⁽²⁵⁾, 등이 報告한 바와 같이 amylase 生産에 있어서 大豆粕이 가장 좋았다. 福島⁽⁴⁷⁾ 등은 大豆 또는 大豆粕의 低級 alcohol 抽出物이 各種菌의 菌體生育과 酵素生産을 促進한다고 報告한 바 있다. 한편 照井⁽¹⁶⁾는 脫脂粉乳培地에서 高力價의 amylase가 生産된다고 報告한 바 있는데 筆者의 實驗에 依하면 脫脂粉乳培地에서는 菌의 發育이나 amylase 生産이 매우 不良하였다.

原料에 前處理를 加한 경우의 實驗結果를 보면 strain A-12를 alkali 處理培地(中和 後 그대로 使用한 것) 또는 alkali 浸出培地(中和 後 濾過한 것)에 培養할 때 油菜粕, 蠶蛹을 除外하고는 amylase 生産이 모두 떨어졌다. 특히 脫脂粉乳를 alkali로 處理한 培地에서는 菌의 發育이나 amylase 生成을 거의 認定할 수 없었는데 脫脂粉乳를 alkali로 處理할 때에는 他 原料에 比하여 더욱 甚하게 分解되는 點 등으로 보아 이러한 特異現象은 脫脂粉乳의 alkali 處理에 依하여 어떤 種類의 有害物質이 生成되거나 一部の 蛋白質分解로 생기는 amino 酸이 蛋白質狀態에서 보다 吸收利用이 나쁘게 되기 때문이 아닌가 推定된다. 어떤 條件下에서 amino 酸이 細菌의 生育에 對하여 沮害의으로 作用한다는 것은 Gjessing⁽⁴⁸⁾, 天羽⁽⁴⁹⁾ 등의 報告에 依하여 알려져 있다. Gjessing은 蛋白質을 完全히 加水分解하여 amino 酸으로 할 때에는 細菌의 窒素源으로서 活性을 잃게된다고 하였으며 天羽⁽⁴⁹⁾ 등은 amino 酸 相互의 拮抗作用에 對하여 報告한 바 있다. 이 實驗의 結果로 보아 이菌의 培養에 있어서는 一般的으로 使用되는 大豆粕, 밀기울 등의 原料를 alkali 處理하는 것 보다 그대로 使用하는 것이 有利함을 알 수 있다.

그러나 油菜粕을 alkali로 處理한 培地에서는 amylase의 生産이 6~8 배로 增大되었는데 油菜粕은 他原料에 比하여 添水 後 常壓으로 30分間 加熱할 때 液의 反應이 보다 酸性으로 되나 中和하는데 alkali 量이 적게드는 點 또 alkali 液을 加하여 常壓으로 1時間 加熱할 때에는 酸으로 中和하지 않아도 거의 中性을 나타내는 點으로 보아 油菜粕은 衝緩能이 적으며 加熱時에 酸性物質을 多量 生成함을 알 수 있고 이러한 特異性 때문에 alkali로 處理할 때에는 amylase 生産培地로서 보다 適合하

게 된다고 생각된다.

다음에 細菌酵素로 各種 原料를 消化分解 시킨 培地에 strain A-12를 培養하였던 바 이러한 處理의 效果는 認定되지 않았다. 中井⁽⁶⁰⁾ 등은 *Rhizopus* 屬菌의 通氣培養에 있어서 有機窒素源인 casein, 小麥 gluten, 脫脂大豆粕 등을 蛋白分解酵素로 消化分解하여 使用하면 glucose 生成 amylase의 生産이 뚜렷이 增加된다고 하였는데 strain A-12는 培養 中에 amylase 外에 相當量의 pectase를 生成하여 原料 中의 澱粉質이나 蛋白質을 쉽게 分解利用할 수 있으므로 澱粉質이나 蛋白質資源을 미리 消化分解 시켜서 使用하여도 別로 效果가 없었다고 생각된다. 다만 細菌酵素에 依한 原料의 消化分解는 高濃度原料의 培地를 調製하는 경우 培地의 粘度를 低下시켜서 取扱을 便하게 하는 效果가 있다.

福本⁽¹⁰⁾는 大豆粕 alkali 浸出培地에 *Bac. amyloliquifaciens*를 培養하는 경우 大體의 大豆粕 濃度 5%까지는 漸次的으로 酵素의 分泌를 增加하나 그 以上이 되면 大差가 없었다고 한 바 있는데 이 實驗에 依하면 培地의 調製操作이 多少 困難하게 되는 20% 濃度에서도 菌은 何等의 支障없이 旺盛하게 發育하며 培地濃度和 amylase 生産은 大體의 比例關係를 보였다. 이 點으로 보아 strain A-12는 高濃度液體培養時에도 適合함을 알 수 있다.

從來의 研究에 依하면 細菌 amylase를 生産하는 경우 培地의 炭素源과 窒素源의 量比가 amylase 生産에 影響을 미치며 一般的으로 炭素源에 比하여 窒素源의 比率이 過多한 편이 amylase 生産에 좋다고 알려져 있다. 松島⁽²⁰⁾는 合成培地에 peptone을 添加할 때 5% 濃度까지는 添加量에 따라 amylase 生産이 增大되나 그 以上の 添加에 있어서는 amylase 生産이 一定하다고 報告한 바 있는데 筆者의 實驗에 依하면 5% 및 10%의 alkali 浸出液을 基本培地로 하는 경우 peptone 2~3% 添加까지는 amylase 生産이 增加되나 그 以上の 添加에 있어서는 amylase 生産이 peptone 3% 添加의 경우보다 減少되었다. 한편 同一한 基本培地에 澱粉을 添加할 때에는 1~3% 添加로 amylase 生産은 2倍 以上으로 增大되었다.

다음에 各種 原料의 5% alkali 浸出液에 澱粉을 1%와 3% 添加하여 amylase 生産에 미치는 影響을 檢討하였던 바 比較的 炭素源이 많은 밀기울, 脫脂米糠 등의 5% alkali 浸出液에서는 amylase 生

産이 若干 增加되었으나 比較的 窒素源이 많은 大豆粕, 高추씨粕, 들깨粕, 참깨粕, 蠶蛹 등의 5% alkali 浸出液에서는 amylase 生産은 約 2倍로 增大되었다. 以上の 結果로 볼 때 大豆粕, 들깨粕, 참깨粕 등의 alkali 浸出液을 細菌 amylase의 生産培地로서 使用하는 경우 窒素源 보다도 炭素源인 澱粉을 補給해야 함을 알 수 있다.

福本⁽¹⁰⁾는 5% 大豆粕 alkali 浸出液에 ethanol를 1~2% 添加할 때 生産 amylase의 力價는 倍以上으로 增大된다고 한 바 있으나 이와 反對로 朴⁽⁶⁵⁾ 등은 ethanol의 添加에 依하여 amylase의 力價는 增加되지 않았으며 1.5% 以上 添加할 때에는 沮害作用을 나타낸다고 報告하였다. 筆者는 細菌 amylase의 生産에 미치는 ethanol 添加의 影響을 究明하기 위하여 5% 大豆粕 alkali 浸出液을 基本培地로 하는 한편 이것에 可溶性澱粉을 3% 및 5% 添加한 것도 基本培地로 하여 ethanol 添加의 影響을 檢討하였던 바 5% 大豆粕 alkali 浸出液을 基本培地로 하여 1%의 ethanol를 添加한 경우만 amylase 生成이 약간 增加되었으며 그밖의 경우에는 1% 以上の ethanol를 添加할 때 amylase 生成이 모두 沮害되었다. 以上の 結果로 보아 1% 以上の ethanol 添加는 amylase 生成에 沮害의 作用함을 알 수 있다. 그러나 ethanol 만을 炭素源으로 하는 合成培地에서 菌이 生育하는 點과 上記의 實驗結果로 보아 5% 大豆粕 alkali 浸出液과 같이 炭素源이 不足한 培地에서는 1%의 ethanol 添加는 沮害作用面에서 보다 炭素源으로서의 利用面에서 amylase 生成에 有利하게 影響하는 것이라고 推定된다.

細菌 amylase의 生産에 있어서는 天然資源을 單一原料로 쓰는 것 보다 이들을 알 맞게 混用하는 것이 C/N 비나 其他 成分의 組成面에서 볼 때 有利할 것이라고 생각되어 먼저 比較的 窒素源이 많은 大豆粕과 炭素源이 많은 밀기울을 主原料로 하여 이것에 他原料를 配合하는 경우의 amylase 生産을 檢討하였던 바 밀기울, 大豆粕의 混用に 依하여 細菌 amylase를 有利하게 生産할 수 있음을 알았으며 그리고 脫脂粉乳를 混用할 때에는 amylase 生産이 뚜렷이 增加됨을 알 수 있었다.

大豆粕만을 單用하는 경우에 比하여 밀기울을 많이 混用하면 그만큼 原價面에서 有利하게 된다. 그러므로 大豆粕과 밀기울을 여러가지 比率로 混用할 때의 amylase 生産을 檢討하였던 바 밀기울과 大豆粕量의 比에 相當한 差異가 있어도 amylase 生

産에는 큰 差가 없음을 알았다. 밀기울과 大豆粕을 9:1로 配合한 培地에서도 生産 amylose의 力價는 大豆粕만의 경우와 거의 같았으며 밀기울만의 경우에 비하면 約 2.5 배로 增加되었다. 細菌 amylose의 工業的인 生産試驗에 있어서 照井⁽¹⁵⁾는 밀기울 2%, 大豆粕 1%의 培地를 使用하였으며 福岡⁽²¹⁾은 밀기울 2%, 大豆粕 3%의 培地를 使用한 바 있는데 筆者의 試驗에 依하면 밀기울, 大豆粕의 混用培地로서 밀기울을 原料의 90% 程度까지 多量 使用하는 것이 有利함을 알 수 있다.

上記한 바와 같이 脫脂粉乳만의 培地에서는 strain A-12의 生育과 amylose 生成이 極히 不良하나 脫脂粉乳를 밀기울이나 大豆粕과 混用할 때에는 amylose 生産이 뚜렷이 增加되는 事實은 매우 興味 있는 現象으로서 더욱 檢討를 要하므로 筆者는 脫脂粉乳와 밀기울의 混用比率, 脫脂粉乳와 大豆粕의 混用比率를 여러가지로 變化 시켜서 比較하였던 바 脫脂粉乳와 밀기울 混用培地에서는 그 比率이 8:2 일때, 脫脂粉乳와 大豆粕 混用培地에서는 그 比率이 6:4 일 때 最高의 amylose가 生成되었는데 最高의 amylose가 生産되는 條件까지의 變化를 보면 밀기울이나 大豆粕의 量이 늘어남에 따라 amylose 生産은 거의 比例的으로 올라감을 알 수 있다.

以上の 實驗結果에 依하여 脫脂粉乳에는 strain A-12의 生育이나 酵素生産에 必要한 어떤 種類의 成分이 不足되며 이 不足成分은 밀기울이나 大豆粕에 依하여 補充되는 것이라고 解釋된다. 脫脂粉乳의 不足成分에 對하여는 別途로 究明하려고하나 strain A-12가 硫酸암몬을 單一 窒素源으로 하는 포도당, 無機鹽培養液에서 貧弱하나마 生長하는 點과 上記의 事實로 미루어 볼 때 不足成分은 strain A-12에 比較의 多量으로 要求되는 生長因子가 아닌가 推定된다.

밀기울, 大豆粕 混用の 液體培地와 밀기울, 脫脂粉乳 混用の 液體培地에 各種의 無機鹽類를 添加하여 그 影響을 檢討하였던 바 밀기울, 大豆粕(9:1) 混用培地에 0.5%의 硫酸암몬을 添加했을 때 amylose 生産이 若干 增加되었으며 그 밖의 것에서는 無添加의 경우와 비슷하거나, 오히려 沮害하였다. 福本⁽¹⁰⁾은 大豆粕 alkali 浸出液에 硫酸암몬이나 磷酸암몬을 1% 添加하면 amylose 生産이 若干 增加된다고 한 바 있으나 이 實驗에서는 磷酸암몬을 0.5% 添加했을 때 沮害作用을 나타냈다.

3. 固體培養에 依한 amylose 生産

固體培養法에 依하여 strain A-12를 밀기울에 培養하는 경우 amylose 生産의 最適溫度는 33°C이며 培養期間은 2日間이 좋았다. 이 菌은 最適條件에서 $D_{500}^{1\%}$ 36,000/g(L.S.V. 15,000)의 amylose를 生産하였으며 既往에 報告된 것과 比較해 볼 때 매우 優秀한 菌株라고 認定된다. 固體培養에 依한 amylose 生産에 있어서 strain A-12를 既往에 報告된 他 菌들과 比較해 볼 때 相當한 差異가 있었다.

Beckord⁽¹²⁾은 그가 分離한 *Bac. Subtilis No.23*은 밀기울 培養에 있어서 37°C가 培養最適溫이라고 報告한 바 있고 朴⁽³⁵⁾ 등은 *Bac. subtilis var. amyloliquefaciens Koreanus Park*의 밀기울 培養에 있어서 培養最適溫이 더욱 高溫으로서 37~40°C라고 報告한 바 있다. 또한 李⁽³⁷⁾ 등이 報告한 바 있는 *Bac. subtilis M-181*의 밀기울 培養에 있어서는 37°C, 2日間 培養할 때 amylose 生成이 가장 良好했다는 點 등으로 보아 strain A-12의 培養最適溫은 이들 菌과는 많은 差를 보였으며 *Bac. amylosolvens*의 麴式培養에 있어서 培養最適溫이 32~35°C라고 한 照井⁽¹⁶⁾의 報告와 近似하였다.

培養添水量은 밀기울에 對해서 150~175%로서 가장 좋은 結果를 보였는데 이것은 Beckord나 李 등이 報告한 바와 大差가 없다. 培地의 두께는 flask 培養의 경우 두께 1.5cm 일 때 amylose 生成이 가장 좋았으며 이보다 培地의 두께가 높거나 낮을 때에는 amylose 生成이 떨어졌다 培地의 두께가 너무 높으면 酸素의 供給이 不足할 뿐만 아니라 自體發熱에 依하여 溫度가 지나치게 上昇하게 되고 培地의 두께가 너무 낮으면 培養後期에 지나치게 乾燥하여 菌의 生育이 좋지 않게 되므로 어느 경우나 amylose 生成이 떨어진다고 생각된다.

밀기울에 各種 原料를 配合하여 培養할 때 어느 경우나 밀기울 單用에서 보다 amylose 生産이 增加된 것은 없었다. 이 菌의 液體培養에 있어서는 各種 原料를 알맞게 混用할때 單用한 경우보다 amylose 生成이 좋았으며 특히 脫脂粉乳의 添加效果는 特異的으로 amylose 生産을 增加시켰으나 밀기울 固體培養에 있어서는 脫脂粉乳를 20% 添加한 경우에도 밀기울 單用的 경우와 비슷하였다. 照井은 *Bac. amylosolvens*의 麴式培養에 있어서 밀기울과 大豆粕을 5:5로 配合 했을때 보다 8:2로 配合한 경우 amylose 生成이 약간 떨어진다고 한바 있고 福本⁽⁵¹⁾은 밀기울에 挽割옥수수를 5:5로 配合했을 때 amylose 生成이 가장 良好하다고 한 바

있다. 그러나 strain A-12의 培養에 있어서는 밀기울에 對하여 大豆粕을 20% 添加했을 때 밀기울 單用의 경우보다 오히려 amylase 生成이 低下되었다. 또 李⁽⁸⁰⁾는 蠶蛹의 添加效果에 對하여 報告한 바 있으나 strain A-12의 培養에 있어서는 蠶蛹의 添加 效果가 認定되지 않았다. 그리고 無機鹽類의 添加影響에 對하여 檢討한 바 어느 것이나 低濃度에 있어서는 添加되지 않은 것과 大差가 없었고 添加濃度를 增加할 때는 오히려 amylase 生成을 阻害하는 結果를 보였다. Beckord⁽¹²⁾ 등은 0.5%의 磷酸鹽을 含有하는 물을 밀기울에 對하여 175% 添加했을 때 amylase 生成이 가장 良好하다고 報告한 바 있으나 strain A-12의 amylase 生成에 있어서는 磷酸鹽의 效果를 전혀 볼 수 없었으며 磷酸암몬의 添加에 있어서는 液體培養 時와 마찬가지로 多少阻害하는 傾向을 볼 수 있었다.

要 約

1. Amylase 生産細菌의 分離 및 同定

多數의 amylase 生産細菌을 檢索하여 空氣 및 土壤에서 強力菌株 A-12 및 S-8 를 얻었다. 이들 菌의 菌學的 性質을 檢討한 結果 菌株 A-12 및 S-8 의 모든 特性은 Bergey's manual 의 *Bac. subtilis* 와 비슷하나 몇가지 炭水化物로부터의 酸生成과 구연산 利用性이 달랐다. 即 A-12 는 구연산을 利用하지 않고 arabinose 와 xylose 에서 酸을 生成하지 않았으며 S-8 는 xylose 에서 酸을 生成하지 않았다.

2. 液體培養에 依한 Amylase 生産

靜置培養에 있어서 菌株 A-12 의 amylase 生産에 關한 諸般條件을 檢討한 結果는 다음과 같다.

(1) 最適條件은 培養溫度 35°C, 初發 pH 6.5~7.0, 培養期間 3~4日의 條件이었다.

(2) 前培養한 菌의 保存期間은 amylase 生成에 影響을 주지 않았다.

(3) amylase 生産에 있어서 各種의 固形原料中 脫脂大豆粕이 가장 좋았다. 그러나 脫脂大豆粕을 alkali 處理한 것은 油菜粕의 경우와는 反對로 그대로 使用하는 것보다 效果가 적었다. 大豆粕 alkali 浸出液에 可溶性 澱粉을 添加한 培地는 amylase 生成을 뚜렷이 增加시켰다.

(4) 炭素源이 不足한 培地에서는 1%의 ethanol 의 添加는 amylase 生成을 增加시켰으나 炭素源이 豊富한 培地에서는 效果가 없었다.

(5) 低廉하게 求할 수 있는 밀기울에 10%의 脫脂大豆粕을 混合할 때에는 amylase 生成이 밀기울

單의 경우의 2.5 倍로 增加되었다.

(6) 脫脂粉乳의 單用培地에서는 amylase 生成이 極히 不良하였으나 脫脂粉乳에 20%의 밀기울을 混合 할 때에는 amylase 生産이 越等히 增大되었다. 그 力價는 10% 濃度培地에서 D_{30}^{40} 7,000(L.S.V. 1,800)이었다.

(7) 各種 無機鹽類의 添加效果는 認定되지 않았다.

3. 밀기울 固體培養에 있어서 菌株 A-12 의 amylase 生産에 關한 諸般條件을 檢討한 結果는 다음과 같다.

(1) 最適培養條件은 培養溫度 33°C, 期間 2日間 添水量 150~175%, 培地의 두께 1.5cm 의 條件이었다. 最適條件에서의 amylase 力價는 D_{30}^{40} 36,000 (L.S.V. 15,000)이었다.

(2) 各種 有機資源 및 無機物質의 添加效果는 認定되지 않았다.

引 用 文 獻

1. K. Kneen, L.D. Beckord: Arch. Biochem., 10, 41 (1946)
2. A. Boidin: Fr. Pat., 399, 087 (1908)
3. A. Boidin et Efront: Fr. Pat., 475, 431 (1915)
4. G. Efront: Chem. Abst., 11, 1841 (1917)
5. Walton: Comprehensive survey of starch chemistry. 1, 230 (1928)
6. 皆川豐作: 日農化, 13, 11 (1937)
7. L. Wallerstein: Ind. Eng. Chem., 37, 1218 (1939)
8. 福本壽一郎: 日農化, 19, 487 (1943)
9. 福本壽一郎: 日農化, 19, 634 (1943)
10. 福本壽一郎: 日農化, 19, 689, 789 (1943)
11. G.L. Peltier and L.D. Beckord: J. Bact., 50, 711 (1945)
12. L.D. Beckord, E. Kneen and K.H. Lewis: Ind. Eng. Chem., 37, 692 (1945)
13. L.D. Beckord, G.L. Peltier and E. Kneen: Ind. Eng. Chem., 38, 232 (1946)
14. Daniel, Stahly: J. Bact., 52, 351 (1946)
15. 照井堯造: 醸工, 26, 147 (1948)
16. 照井堯造: 醸工, 27, 289 (1949)
17. 松島欽一: 醸工, 28, 90 (1950)
18. 松島欽一: 醸工, 28, 173 (1950)
19. 松島欽一: 醸工, 30, 111 (1952)
20. 松島欽一: 醸工, 30, 166 (1952)

21. 福岡甲子郎：醸工，28，241（1950）
22. 福岡甲子郎，原田雅之，小田雅夫：醸工，32，243（1954）
23. B.S. Lulla: Biochem. et Biophys. Acta., 1, 244（1951）
24. 福田重夫：日農化，27，745（1953）
25. 福田重夫：日農化，27，749（1953）
26. 福田重夫：日農化，32，86（1958）
27. L.L. Campbell, Jr: J. Am. Chem. Soc., 76, 5256（1954）
28. 福本壽一郎，山本武彦，鶴大典：日農化，27，425（1957）
29. 福本壽一郎，山本武彦，鶴大典：日農化，27，506（1957）
30. 福本壽一郎，山本武彦，鶴大典：日農化，27，724（1957）
31. 野村眞康，細田淳子，丸尾文治，赤堀四郎：酵素化學，シンポジウム，12，250（1957）
32. 吉川寛，細田淳子，西村暹，高橋甫，丸尾文治：酵素化學シンポジウム，14，296（1960）
33. 皆川豊作：日本特許，35，15436（1960）
34. 朴啓仁：國立工業研究所報告，11，66（1962）
35. 朴啓仁，金妍植，李鍾斗，安秉或：國立工業研究所報告，14，191（1964）
36. 金燦祚：忠南大學校論文集，3，439（1963）
37. 李錫健，李漢昌：韓國微生物學會誌，2，19（1964）
38. 裴貞高，朴允仲：한국식품과학회지，1，85（1969）
39. 李斗永：韓國微生物學會誌，14，86（1969）
40. 井上憲政：綜合酵素化學，386（1952）
41. Oppenheimer, Pincussen: Die methodik der fermente, S. 877（1929）
42. 宮路憲二：應用菌學 下卷 55~129（1958）
43. 東京大學農學部農藝化學教室：實驗農藝化學（改正新版）上卷，204~248（1961）
44. 飯塚廣，瀬戸當典：醸協，18，22（1952）
45. R.S. Breed, E.G. Murray, N.R. Smith: Bergey's manual of Determinative Bacteriology (7th edition, 1957)
46. 外村健三，田邊脩：日農化，30，596（1956）
47. 福島男兒，林和也：日本特許，40，10951（1965）
48. E.G. Gjessing: Arch. Biochem. Biophys., 53, 44（1954）
49. 天羽幹夫，坂口謹一郎：日農化，26，353（1952）
50. 中井正，松栗豊，山田哲也，草井清：日本特許，37,9291（1962）
51. 朝井勇宣 編集：微生物工業，478~489（1956）