

*Candida muscorum*의 Amylase에 관한 研究

朴 允 仲 · 尹 漢 教 · 孫 天 培

忠南大學校 農科大學

(1975년 10월 15일 수리)

Studies on the Amylase Produced by *Candida muscorum*.

Yoon-Joong Park, Han-Kyo Yoon and Cheon-Bae Son

College of Agriculture, Choongnam University.

(Received October 15, 1975)

Abstract

This experiment were carried out to investigate the conditions of amylase produced by *Candida muscorum* in wheat bran cultures and the properties of its amylase (crude enzyme). The results obtained were as follows.

1. The optimum conditions for amylase production in wheat bran cultures were; water content 75 percent, temperature 25°C and incubation time 4-7 days.
2. The production of amylase was increased about 20 percent in the medium added 0.5 percent of ammonium sulfate or ammonium chloride to wheat bran, but the production of those was decreased in the case of addition of nitrates.
3. No significant effect was found in the case of the addition of carbon source on the production of amylase.
4. The properties of liquefying amylase of the selected strain were; the optimum pH 4.2, the optimum temperature 60-65°C, the stable pH 3.2-6.8 and the stable heating (for 15 minutes heating) below 65°C.
5. The properties of saccharifying amylase of the selected strain were; the optimum pH 4.5, the optimum temperature 55°C, the stable pH 3.8-6.2 and the stable heating (for 15 minutes heating) below 45°C.

緒 論

Amylase는 自然界에 널리 分布하는 酵素로서 그 起源에 따라 多樣性을 보이고 있다. 微生物 amylase中에서 가장 잘 알려진 것은 糸狀菌과 細菌의 amylase이며

이들에 對한 研究報告는 헤아릴 수 없을 만큼 많으며 이들 amylase는 食品工業, 其他分野에서 널리 利用되고 있다. 그러나 不完全菌이나 酵母의 菌體外 amylase에 關하여는 몇種의 것이 報告되어 있을 뿐이며, 特히 酵母의 菌體外 amylase로서는 *Endomycopsis*屬菌의 것이

알려져 있을 뿐이다.

不完全菌의 菌體外 amylase에 관한 研究로서는 Wickerham等⁽¹⁾, 福本等⁽²⁾, 山田⁽³⁾의 報告 등이 있으며, 酵母의 菌體外 amylase에 관한 研究로서는 服部^(4,5)의 *Endomycopsis*屬 特殊菌의 amylase에 관한 報告, 裴等⁽⁶⁾의 *Endomycopsis fibuliger*에 관한 報告가 있다.

上記 報告에서도 알 수 있는 바와 같이 酵母의 amylase는 糸狀菌이나 細菌起源의 amylase와 相當한 差異가 있으며 또 amylase 生産 酵母의 培養에 있어서는 培養法으로서 連續培養方式을 쉽게 採用할 수 있는 등의 特徵이 있다고 생각되어 筆者等은 amylase 生産 酵母의 分離를 試圖하였던 바 菌體外 protease 生産 酵母로서 分離 保存中인 *Candida muscorum*⁽⁷⁾이 amylase도 相當量 生産한다는 것을 알게 되었으며, 우선 選定菌 *Candida muscorum*의 발기을 固體培養(麵式)에 依한 amylase 生産條件과 그 amylase(粗酵素)의 性質을 檢討하였으므로 그 結果를 報告하는 바이다.

實驗 方法

1. Amylase의 生産條件

1) 培養方法

培地의 加水量을 달리한 實驗外에는 발기을에 75%의 水道水를 加하여 混和한 것을 100ml 容 三角 flask에 8.75g씩 넣어 加壓殺菌後 選定菌의 滅菌水 懸濁液을 0.25 ml씩 接種하였고, 添加物의 影響에 관한 實驗에 있어서는 添加物을 培地用水에 溶解하여 添加하였으며, 그 濃度는 發기을에 對한 重量百分率로 表示하였다.

2) Amylase力價測定

Amylase力은 發기을 固體培養物(風乾) g當의 液化酵素力 및 糖化酵素力으로 나누어 表示하였으며, 酵素反應은 pH 4.2에서 反應시켰다.

(1) 粗酵素液

培養風乾物에 10倍量의 蒸溜水를 加하여 室溫에서 2時間 浸出後 使用하였다.

(2) 測定方法

a. 液化酵素力

Wohlgemuth法⁽⁸⁾ ($D_{590}^{1\%}$)으로 測定하여 W.V.로 表示하였다.

b. 糖化力

Hypoidide法으로 反應液의 糖을 定量하고 A.U.^(9,10)單位로 表示하였다.

2. Amylase(粗酵素)의 性質

1) 作用最適 pH

pH 2.5~8.0 사이의 各 pH의 Mcllvaine buffer溶液을 50%씩 添加하여 調製한 基質溶液을 使用하여 各

pH에서 酵素力을 測定하였다.

2) 作用最適溫度

pH 4.2의 Mcllvaine buffer溶液을 20%씩 添加하여 調製한 基質溶液을 使用하여 20~75°C의 各溫度에서 酵素力을 測定하였다.

3) pH 安定性

pH 2.2~9.0 사이의 各 pH의 buffer溶液(pH 2.2~8.0의 Mcllvaine buffer 및 pH 8.5~9.0의 Kolthof buffer)을 粗酵素液에 1:1로 混合하여 各 pH에서 30°C 1時間동안 放置한 後 1N-NaOH 또는 1N-HCl을 使用하여 作用最適 pH인 pH 4.2로 調整하고 (pH調整後의 液全量이 同一量이 되도록 蒸溜水를 加하여 調整)이 液의 酵素力을 pH 4.2에서 測定하였다.

4) 耐熱性

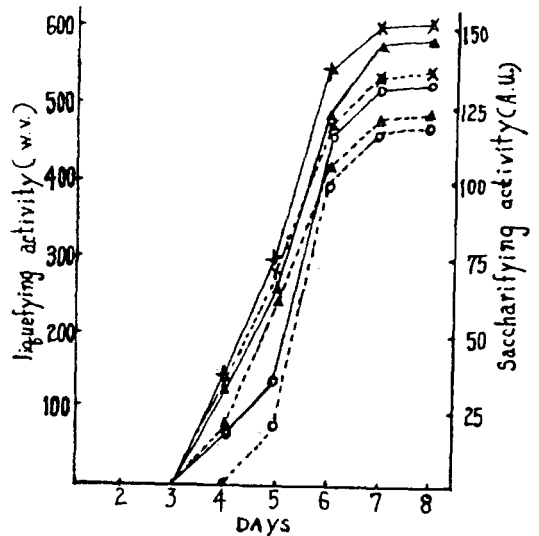
粗酵素液을 45~80°C사이의 各溫度에서 10分 및 15分間 加溫處理한 後 急冷하여 殘存酵素力을 測定하였다.

結果 및 考察

1. Amylase의 生産條件

1) 培養溫度 및 添水量의 影響

發기을 5g에 50, 75 및 100%의 水道水를 添加한 培地에 菌을 接種하여 20, 25, 30, 및 35°C에서 2~8日間



Quantity of water added to wheat bran.

liquefying amylase, saccharifying amylase

50 %	○—○	○- -○
75 %	×—×	×- -×
100 %	▲—▲	▲- -▲

Fig. 1. Influence of cultural time and quantity of water added to wheat bran (at 20°C).

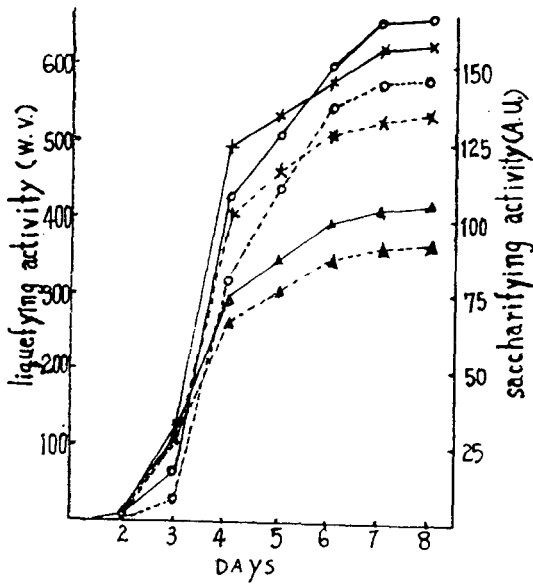


Fig. 2. Influence of cultural time and quantity of water added to wheat bran (at 25°C)

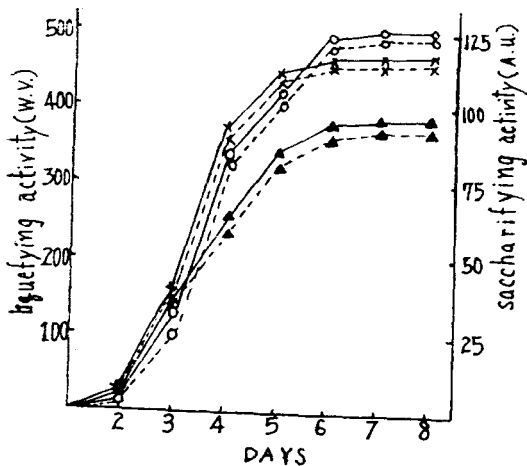


Fig. 3. Influence of cultural time and quantity of water added to wheat bran (at 30°C)

培養하면서 經過日數別로 amylase activity를 測定한 結果는 Fig. 1~4와 같다.

Fig. 1~4에서 보는 바와 같이 本菌의 液化酵素 및 糖化酵素의 生成은 어느 것이나 35°C 培養時에는 20~30°C의 경우에 比하여 많이 떨어졌으며, 25°C가 培養 適溫이었다. 添水量은 25°C 培養의 경우 5日培養까지는 75% 加水가 가장 좋았으며 培養 6日 後에는 50% 加水가 가장 좋았다. 그러나 本菌을 一般麴式으로 培養하는 경우에는 培養中 培養物의 水分蒸發도 相當히 있게 되므로 加水量은 75% 또는 以上이 適當한 것으로

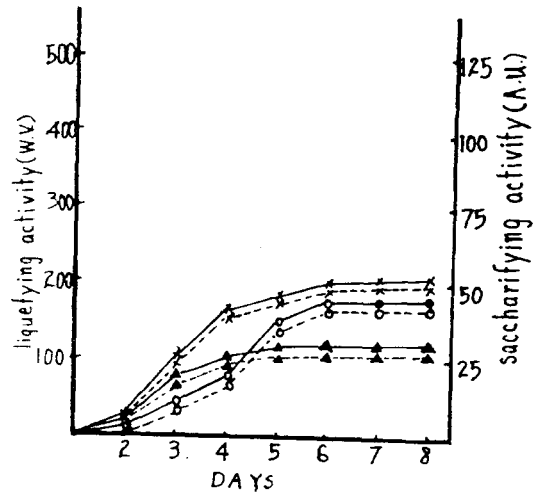


Fig. 4. Influence of cultural time and quantity of water added to wheat bran (at 35°C)

생각된다. 또 25°C 培養의 경우를 보면 培養 7日 後까지 酵素의 生成이 계속 增加되고 있으나, 實際의 生産에 있어서는 培養中 汚染 其他의 理由로 培養日數를 4日 程度로 하는 것이 適當할 것으로 생각된다. 本菌에 依한 amylase 生産의 最適條件은 *Endomycopsis* 類似特殊菌의 밀기울 固體培養에 依한 amylase 生産에 있어서 服部等⁽⁵⁾이 使用한 條件과 비슷하며 *Endomycopsis fibuliger*의 밀기울 固體培養에 依한 amylase 生産에 있어서 培養溫度는 30°C, 밀기울에 對한 添水量은 120%이 있다는 裴等⁽⁶⁾의 報告와는 相當히 差異가 있다.

2) 培地두께의 영향

밀기울에 75%의 水道水를 添加한 것을 100ml容 三角 flask에 量을 달리넣어 培地의 두께를 달리하고 加壓殺菌한 後 25°C에서 4日間 培養한 結果는 Table 1과 같다.

本實驗의 範圍內에서 amylase의 生成은 培地의 두께

Table 1. Influence of thickness of wheat bran medium upon the amylase production.

Quantities of wheat bran (g)	Thickness of medium (cm)	Amylase	
		液化力 (W.V.)	糖化力 (A.U.)
4.0	1.1	500	95
5.0	1.2	490	90
6.0	1.3	440	80
7.0	1.4	320	57
8.0	1.7	250	45
9.0	2.0	240	37
10.0	2.3	200	30

가 낮을수록 良好하였고, 두꺼울수록 떨어졌다. 培養의 두께가 너무 두꺼우면 酸素의 공급이 不足할 뿐만 아니라 培養物의 溫度가 上昇하여 好氣性이며 amylase 生成 適溫이 비교적 낮은 本菌의 밀기울 固體培養에서는 amylase 生成이 나빠진다고 생각된다.

3) 無機窒素源 添加의 影響

밀기울에 對하여 $(NH_4)_2SO_4$ 은 0.5%, NH_4Cl , KNO_3 , $(NH_4)_2CO$, NH_4NO_3 등의 其他 無機窒素源은 窒素量이 $(NH_4)_2SO_4$ 의 경우와 同一量이 되도록 添加하여 25°C 에서 4日間 培養한 後 amylase 力價를 測定한 結果는 Fig. 5와 같다.

$(NH_4)_2SO_4$ 및 NH_4Cl 添加時는 液化酵素 및 糖化酵素의 生成이 모두 增加되었으나 其他 窒素源 添加時는 兩酵素의 生成이 모두 떨어졌으며, 特히 KNO_3 , $NaNO_3$ 添加時에 많이 떨어졌다.

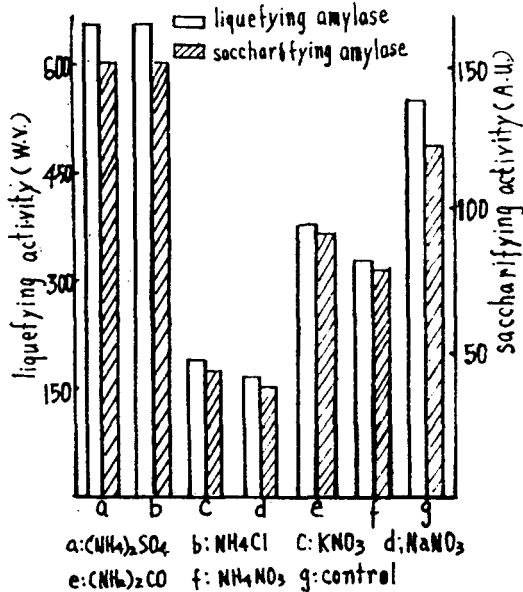


Fig. 5. Effect of various nitrogen salts added to wheat bran upon the amylase production (at 25°C after 4 days)

4) $(NH_4)_2SO_4$ 의 最適添加量

無機窒素源의 添加實驗에서 amylase 生成에 效果를 보인 ammonium 鹽中 $(NH_4)_2SO_4$ 의 添加濃度를 달리하여 培養한 結果는 Fig. 6과 같다. $(NH_4)_2SO_4$ 0.5% 添加時에는 液化酵素 및 糖化酵素生成이 增加되었으며, 1.0%보다 많은 量을 添加할 時는 amylase의 生成이 甚히 저해되었다. 이 結果는 襄⁽⁶⁾ 등이 *Endomycopsis fibulizer*의 밀기울固體培養에서 $(NH_4)_2SO_4$ 7.5% 添加時에도 amylase 生成이 增加되었다는 報告와는 相當한 異差가 있다. 本 實驗에서는 밀기울에 $(NH_4)_2SO_4$ 만을

添加하였으며, 襄等의 實驗에서는 $(NH_4)_2SO_4$ 와 같이

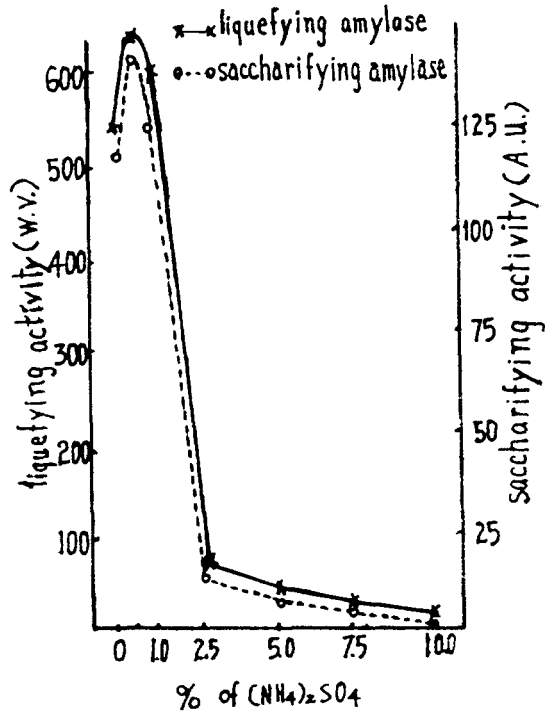


Fig. 6. Effect of quantity of ammonium sulfate added to wheat bran upon the amylase production (at 25°C after 4 days).

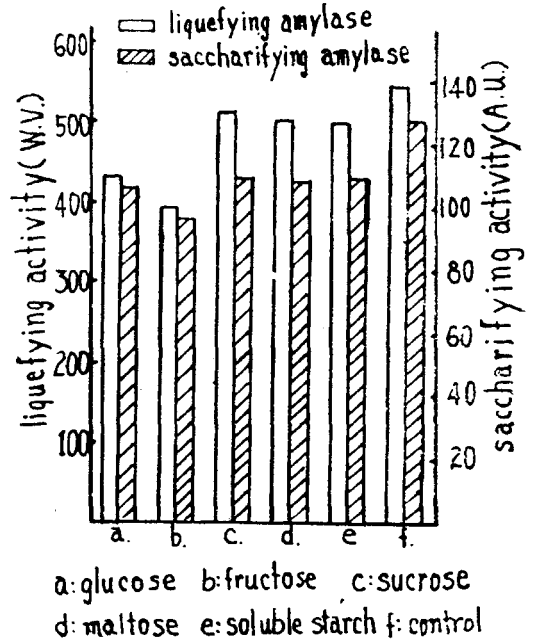


Fig. 7. Effect of various carbon source added to wheat bran upon the amylase production (at 25°C after 4 days)

(NH₄)₂SO₄의 70% 相當의 CaCO₃를 添加하였으므로 同一 培養條件에서의 比較가 必要하다고 생각된다.

5) 炭素源 添加의 영향

밀기울에 대하여 glucose, fructose, sucrose, maltose 및 soluble starch 등의 炭素源을 1% 添加하여 25°C에서 4日間 培養한 後 amylase力價를 測定한 結果는 Fig. 7과 같다. 炭素源中에서 amylase 生成에 添加效果를 보인 것은 없었으며, glucose 및 fructose 添加時는 amylase 生成이 相當히 떨어졌다.

다음에 밀기울에 대하여 sucrose의 添加濃度를 달리 하여 培養한 結果는 Fig. 8과 같다. 본 結果에서 보는 바와 같이 sucrose의 添加濃度가 클수록 amylase의 生成이 甚히 沮害되었는데, 이것은 基本培地인 밀기울에 充分量의 炭素源이 含有되며, 炭素源의 添加는 C/N率이나 其他 條件에서 amylase 生成에 不適當하게 되기 때문이 아닌가 생각된다.

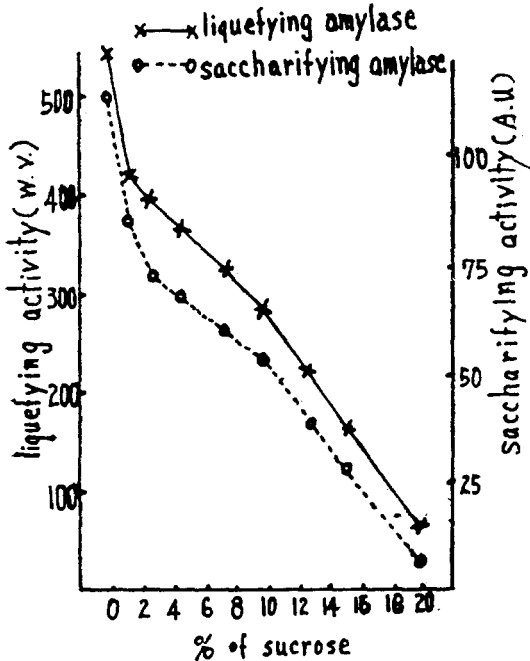


Fig. 8. Effect of quantity of sucrose added to wheat bran upon the amylase production (at 25°C, after 4 days)

2. Amylase(粗酵素)의 性質

1) 作用 pH와 酵素活性

pH 2.5~8.0 사이의 各 pH에서 酵素反應을 시켜 amylase活性을 檢討한 結果는 Fig. 9에서 보는 바와 같이 液化酵素는 pH 4.2, 糖化酵素는 pH 4.5에서 最高의 活性을 보였으며, pH 5.0以上에서는 이들 酵素의 活性이 점차 떨어져 pH 7.0 以上에서는 酵素活性이 甚히 弱화되었다. 그러나 pH 2.5~3.0의 酸性側에서는

兩酵素의 活性이 中性側에서 보다 높았다.

本實驗의 結果는 福本等^(11,12), 服部等⁽⁴⁾의 報告와 比較해 보면(粗酵素와 精製酵素와의 差異는 考慮해야함) 實驗菌株 *Candida muscorum*의 液化酵素의 作用最適 pH는 細菌, *Asp. oryzae*, *Asp. niger*, *Endomycopsis* 속 및 *Oospora* 속의 것보다 낮았으며, *Rhizopus* 속의 것보다 높았다. 또 實驗菌株의 糖化酵素의 作用最適 pH는 *Endomycopsis* 속의 것보다 낮았으며, *Asp. niger*, *Rhizopus* 속의 것과는 비슷하였다.

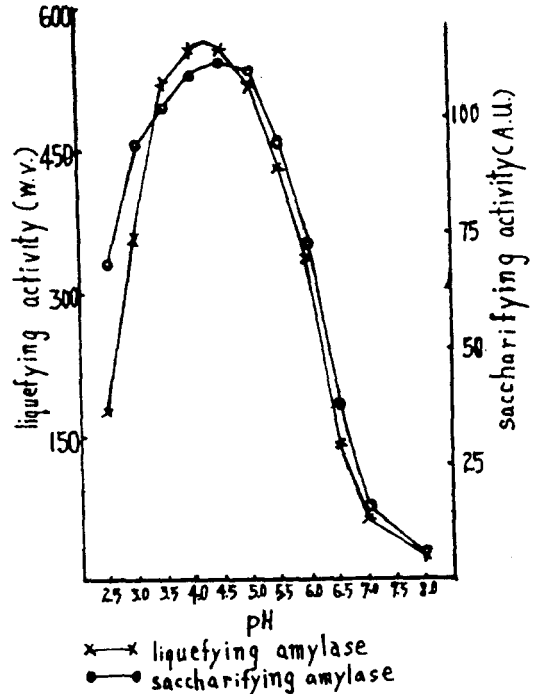


Fig. 9. Relation between pH and amylase activity on the enzyme reaction.

2) 作用溫度와 酵素活性

20~75°C 사이의 各溫度에서 酵素反應을 시켜 amylase의 活性을 測定한 結果는 Fig. 10에서 보는 바와 같이 液化酵素의 作用最適溫度는 60~65°C, 糖化酵素의 作用最適溫度는 50~55°C이었다.

3) pH安定性

酵素液을 各 pH의 buffer液과 混合하여 所定 pH에서 30°C, 1時間 放置한 後 殘存酵素活性을 測定한 結果는 Fig. 11과 같다. 實驗結果로 알 수 있는 바와 같이 液化酵素의 安定 pH는 3.2~6.8이었으며, 糖化酵素의 安定 pH는 3.8~6.2이었다. 本實驗 結果를 福本等^(11,12), 服部等⁽⁴⁾, 岡崎^(13,14)의 報告와 比較해 보면 實驗菌株 *Candida muscorum*의 液化酵素의 pH 安定性은 細菌, *Rhizopus* 속, *Asp. niger*, *Asp. oryzae*, *Endomycopsis*

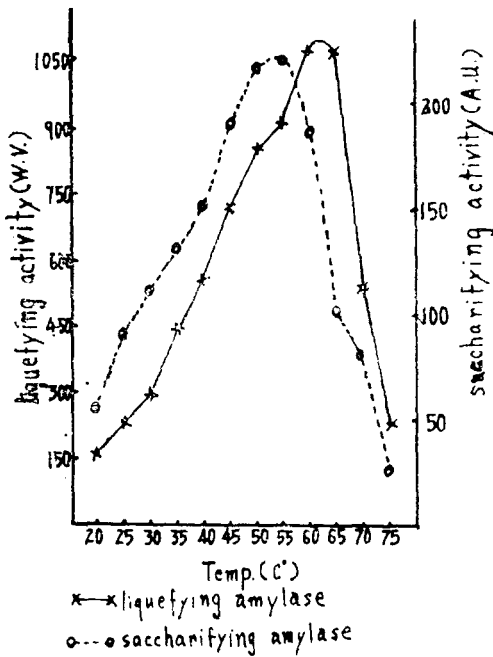
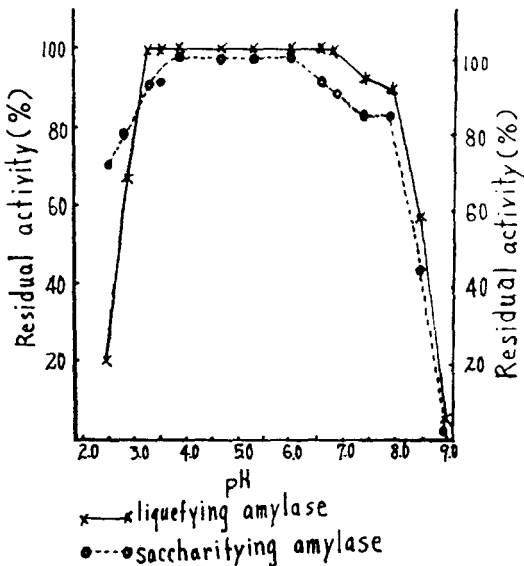


Fig. 10. Relation between temperature and amylase activity on the enzyme reaction.

속 및 *Oospora* 속의 것보다 약간 낮은 pH에 있었다. 實驗菌株의 糖化酵素 pH 安定性은 *Endomycopsis* 속의 것보다 약간 낮았으며 *Asp. oryzae*의 것과 類似하였다.

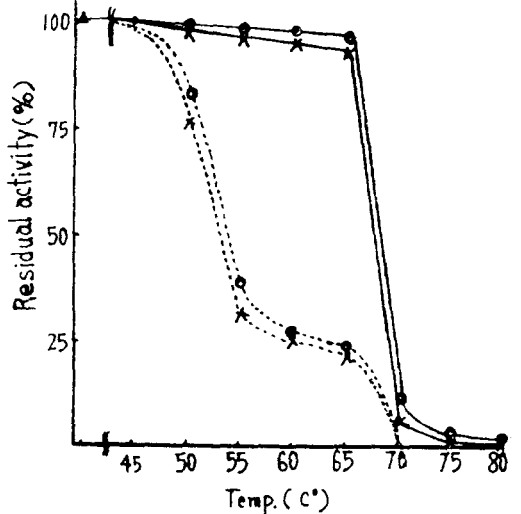


Residual activity after storage for 1 hr. at 30°C
McIlvain buffer for pH 2.0-8.0, Kolthof buffer for pH 8.5-9.0.

Fig. 11. Relation between pH and stability of *Candida muscorum* amylase.

4) 耐熱性

酵素液을 45~80°C의 各溫度에 10分 및 15分間 加溫 處理한 後 殘存酵素活性을 測定한 結果는 Fig. 12와 같다. 液化酵素는 65°C, 15分間 處理에서도 거의 失活되지 않았으나 糖化酵素는 50°C, 15分 處理로 25%, 60°C, 15分 處理로 75%가 失活되었으며, 70°C, 15分 處理로 完全히 失活되었다. 本 實驗結果를 福本等^(11,12), 服部等⁽⁴⁾, 岡崎^(13,14)의 報告와 比較해보면 實驗菌株 *Candida muscorum*의 液化酵素의 耐熱性은 *Endomycopsis* 속의 것보다 높았다. 또 糖化酵素의 耐熱性은 *Endomycopsis* 속의 것보다 낮았으며 *Asp. oryzae*의 것과는 비슷하였다.



Residual activity after heating for 10 and 15 minutes at each temperature.

- liquefying amylase (10 minutes)
- ×—× liquefying amylase (15 minutes)
- saccharifying amylase (10 minutes)
- ×---× saccharifying amylase (15 minutes)

Fig. 12. Relation between temperature and stability of *candida muscorum* amylase.

要 約

分離保存中인 *Candida muscorum*의 밀기울 固體培養에 있어서의 amylase生成條件과 그 amylase(粗酵素)의 性質에 對하여 檢討한 結果는 다음과 같다.

1. 밀기울 固體培養에 있어서 amylase의 最適生産條件은 加水量 75%, 培養溫度 25°C, 培養期間 4~7日이었다.

2. 밀기울에 (NH₄)₂SO₄ 및 NH₄Cl을 0.5% 添加한 培地에서는 液化酵素 및 糖化酵素의 生成이 約 20% 增加되었으며, NO₃態窒素化合物 添加培地에서는 酵素

生成이沮害되었다.

3. Amylase 生成에 있어서 炭素源 添加效果는 없었다.

4. 實驗菌株의 液化酵素의 作用最適 pH는 4.2, 作用最適溫度는 60~65°C, 安定 pH 範圍는 3.2~6.8, 耐熱性은 65°C以下(15分間 處理)이었다.

5. 實驗菌株의 糖化酵素의 作用最適 pH는 4.5, 作用最適溫度는 55°C, 安定 pH範圍는 3.8~6.2, 耐熱性은 45°C以下(15分間 處理)이었다.

參 考 文 獻

- 1) Wickerham, L.J. Lockwood, L.B. Pettijohn, O.G. Ward, G.E.: *J. Bact.*, 48, 413 (1945).
- 2) 福本壽一郎, 辻阪好夫, 荒木萬里子, 松本悅了: *Science & Industry*, 35, 412 (1961).
- 3) 山田覃洋: 日本農藝化學會誌, 37, 706, 712 (1963).
- 4) Hattori, Y.: *Agrl. Biol. Chem.*, 25, 737, 895 (1961).
- 5) 服部行彦, 飯田茂次: 日本特許 昭 35-15438, (1960).
- 6) 裴貞高, 朴允仲, 李錫健, 李澤守: 微生物學會誌(韓國), 9, 27, 32 (1971).
- 7) 孫天培, 朴允仲: 忠南大 大學院研究報告集, 3, 137 (1974).
- 8) 井上憲政: 綜合酵素化學, 富山房, 東京 p. 386 (1952).
- 9) 小卷利章: 日本澱粉工學誌, 7, 3 (1959).
- 10) 朴允仲, 李錫健: 韓國農化學會誌, 9, 91 (1968).
- 11) 福本壽一郎, 山本武彦, 辻阪好夫, 岡田茂孝: 日本醱酵協會誌, 22, 305 (1964).
- 12) 福本壽一郎, 辻阪好夫, 荒木萬里子: 科學と工業, 34, 423 (1960).
- 13) 岡崎 浩: 日本農藝化學會誌, 28, 48, 51 (1954).
- 14) 岡崎 浩: 日本農藝化學會誌, 29, 181 (1955).