

Streptomyces sp. 4M-2에 의한 生澱粉 분해효소의 생산

최성현·김찬조*·오만진·이종수

충남대학교 식품공학과의

Production of Raw Starch Digesting Enzyme by Streptomyces sp. 4M-2

Choi, Seong-Hyun, Chan-Jo Kim*, Man-Jin Oh and Jong-Soo Lee

Department of Food Science and Technology, Chungnam National University
Daejeon 302-764, Korea

A potent actinomycetes strain was selected to digest raw starch, which was classified as a strain of Streptomyces sp.. Its amylase production was maximized when it was grown on wheat bran extract media added 4% of cooked corn starch and 0.16% of potassium nitrate for 6 days at 30°C and initial pH 6.2.

生澱粉 분해효소를 생산하는 미생물은 *Aspergillus niger* (1), *Aspergillus awamori* (2), *Aspergillus cinnamomeus* (3), *Rhizopus oryzae* (4, 5), *Streptococcus bovis* (6), *Bacillus circulans* (7~9) 등이 알려져 있으나 放線菌의 이 효소에 대한 연구는 아직 미흡하다.

최근에는 放線菌이 생산하는 효소를 식품공업에 이용하고자 하는 연구도 진행되고 있으며 (10~13) 이들의 전분분해 효소생산에 관한 연구는 梁 등 (10)의 고온성 放線菌에 의한 α -amylase 생산에 관한 연구와 Shimizu 등 (12)의 *Thermoactinomyces vulgaris*가 생산하는 α -amylase의 정제와 특성, Sakano 등 (13)의 *Thermoactinomyces vulgaris*의 α -amylase에 대한 특성과 작용 패턴 등을 볼 수 있다.

필자 등은 放線菌이 생산하는 生澱粉 분해효소를 알코올 생산 등 발효음식물 공업에 이용하고자 토양 등에서 生澱粉 분해력이 강한 放線菌을 분리하여 동정하고 효소생산에 미치는 배지의 조성 및 배양 일수 등의 조건을 검토하여 그 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

균의 분리 및 동정

Key words: Raw starch digestion, amylase, *Streptomyces* sp.

* Corresponding author

생옥수수전분을 첨가한 Dulaney's 배지 (14)를 이용하여 김 등 (4)의 방법에 따라 토양, 메주 등에서 生澱粉 분해균주를 분리한 후 PY배지 (6)에 접종하여 30°C에서 3일간 진탕배양하고 2,300×g로 20분간 원심분리하여 조효소액을 얻은 다음 久留島 등 (3)의 방법으로 生澱粉 당화역가를 측정하여 RSU (Raw Starch Saccharifying Unit)로 나타내고 강한 균주를 선정하였다. 또한 Shirling 등 (15), 都 등 (16), 정 등 (17)의 방법에 준하여 선정균주의 배양학적, 형태학적 및 생리적 특성을 검토하고 NaCl과 Streptomycin 등에 대한 내성 실험은 Bennet의 고체 및 액체배지 (14)에 이들을 각각 일정농도로 첨가하여 같은 방법으로 검토한 후 Bergey's manual of determinative bacteriology (18)와 The Actinomycetes (19) 및 ISP strain key (20) 등에 따라 동정하였다.

효소생산 조건

배지: Yeast extract-malt extract 배지 (15), PY 배지 (6), Glucose bouillon 배지 (14), 밀기울에 10배의 물을 가한 밀기울액체배지와 이 밀기울액체배지를 5°C에서 5일간 浸出시켜 여과한 밀기울浸出液배지 및 밀기울 10g에 8 ml의 물을 가한 밀기울배지에 선정균주를 접종하여 30°C에서 4일간 정치 및 진탕 배양 (90 osc./min.; stroke 3 cm)한 후 久留島 등

Table 1. Cultural characteristics of the isolated strain.

Medium	Growth*	Aerial mycelium color	Reverse side color
Yeast extract-malt extract agar	E	Grey	Dark brown
Oatmeal agar	M	Greyish white	pale yellow
Inorganic salt-starch agar	E	Grey	Dark brown
Glycerol-asparagine agar	G	Greyish white	Pale yellow
Tyrosine agar	G	Grey	Dark brown
Peptone-yeast extract-iron agar	G	Grey	Yellow
Melanine formation medium	G	Greyish white	Brown
Sucrose-nitrate agar	G	Greyish white	Brown
Glucose-asparagine agar	P	Grey	Grey
Peptone-beef extract agar	G	Greyish white	Brown
Starch agar	M	Grey	Brown
Glucose-yeast extract beef-peptone agar	E	Pale brown	Brown

*Growth: E: excellent, G: good, M: moderate, P: poor

The strain was cultured in various kind of media at 28°C for 14 days.

(3)의 방법으로 효소역가를 측정 비교하여 효소생산에 미치는 배지의 영향을 검토하였다.

pH 및 온도: 밀기울浸出液배지(기본배지)의 pH를 4.0-10.0까지 일정하게 조절하고 선정균주를 전과 같이 진탕배양한 후 효소역가를 측정하여 초기pH의 영향을 검토하였다.

또한 pH 6.2로 조절한 기본배지에 선정균주를 접종하고 20°C에서 45°C까지 5°C 간격으로 조정하여 온도의 영향을 검토하였다.

탄소원 및 질소원: 호화 및 생육수수전분, 감자전분과 maltose 등 15종의 탄소원을 기본배지에 0.5%씩 첨가하여 (4) 그 효과를 검토하였으며 또한 효과적이었던 호화 옥수수전분, 감자전분과 maltose는 0.5%에서 10%까지 일정하게 첨가하여 그 영향을 검토하였다.

또한 옥수수전분을 4% 첨가한 기본배지에 peptone 등 5종의 유기태 질소를 1% 그리고 KNO₃, (NH₄)₂SO₄ 등 8종의 무기태 질소를 0.2%씩 첨가하여 (10) 그 영향을 검토하고 또한 가장 효과적이었던 KNO₃를 0.02%에서 0.32%까지 일정하게 첨가하여 그 영향을 보았다.

금속 이온: 4%의 옥수수전분과 0.16%의 KNO₃를 첨가한 기본배지에 Mg²⁺ 등 8종의 금속 이온을 1 mM씩 첨가하여 그 효과를 검토하였다.

배양 시간: 4%의 옥수수전분과 0.16%의 KNO₃를 첨가한 기본배지에 선정균주를 접종하여 30°C에서 7일간 진탕배양하면서 經時的으로 효소역가를 측정 비교하였다.

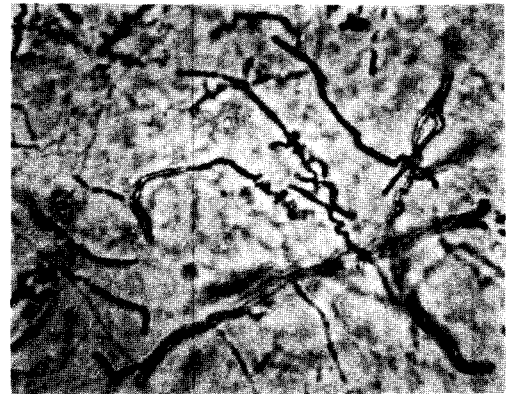


Fig. 1. Photomicrograph of aerial mycelium of the isolated strain (the strain was grown on glycerol-asparagine agar at 28°C for 14 days: ×400)

Note: Rectiflexibiles (RF)

결과 및 고찰

균의 동정

메주로부터 生澱粉 분해력이 강한 4M-2균주를 분리하여 그의 배양 및 형태적 특성과 생리적 특성을 조사한 결과는 Table 1과 2 및 Fig. 1과 같다.

선정균주는 호기성이고 연쇄상 포자鎖를 형성하며 전분과 casein을 분해하고 H₂S와 catalase를 생산하였으며 indole을 생성하지 않는 점 등으로 보아 *Streptomyces*속으로 추정되었다.

Table 2. Physiological characteristics of the isolated strain.

Factor	Characteristics
Starch hydrolysis	Positive
Casein hydrolysis	Positive
Gelatin hydrolysis	Positive
Indole production	Negative
H ₂ S production	Positive
Catalase production	Positive
Optimum pH	7.0
Optimum temperature	30 °C
NaCl tolerance	≥8%, but < 16%
Melanine pigment	Positive or Negative
Tyrosine agar	Dark brown(Positive)
Peptone-yeast extract-iron agar	Yellow(Negative)
Melanine formation medium	Brown(Positive)
Antibiotics	Growth*
Penicillin G (200 µg/ml)	++
Cephalexin (200 µg/ml)	++
Cefazolin (200 µg/ml)	++
Streptomycin (30 µg/ml)	+
" (50 µg/ml)	-
Kanamycin (10 µg/ml)	+
" (30 µg/ml)	-
None	++
Carbon compound	Growth*
D-Glucose	++
D-Xylose	+
L-Arabinose	++
Sucrose	++
i-Inositol	-
Mannitol	++
D-Fructose	++
L-Rhamnose	-
Raffinose	-
Cellulose	±
No carbon	-

* ++: Good +: Moderate ±: Doubtful -: Negative

효소생산 조건

배지: 효소생산에 미치는 각종 배지의 영향을 검토한 결과 Fig. 2와 같이 기본배지로한 밀기울浸出液 배지에서 진탕배양 시켰을 때 효소생산이 제일 좋았다.

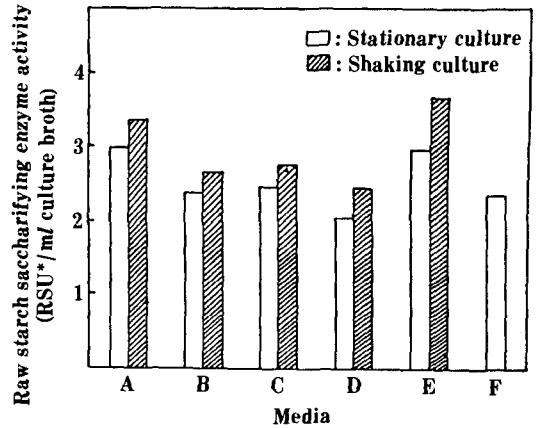


Fig. 2. Effect of medium on the production of raw starch saccharifying enzyme by *Streptomyces* sp. 4M-2.
 A : Yeast extract-malt extract medium
 B : PY medium
 C : Glucose bouillon medium
 D : Wheat bran medium (added 10 fold water)
 E : Wheat bran extracts (extracted for 5 days at 5 °C after adding 10 fold water)
 F : Wheat bran (solid)
 RSU* : Raw Starch Saccharifying Unit

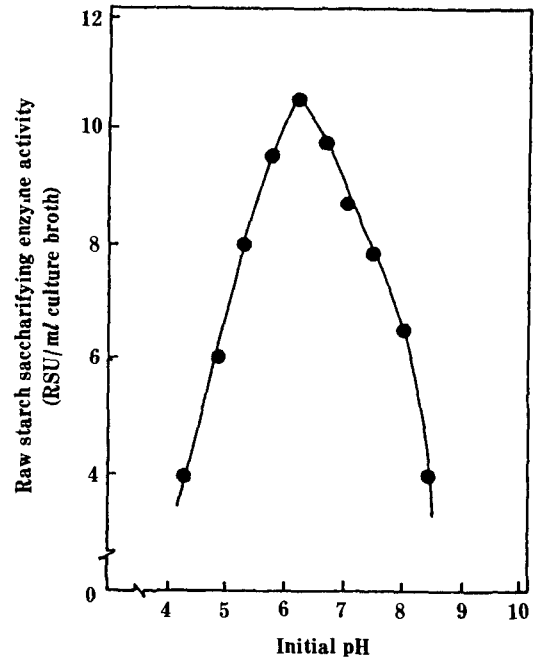


Fig. 3. Effect of pH of the wheat bran extracts on the production of raw starch saccharifying enzyme.
 (The basal medium was wheat bran extracts)

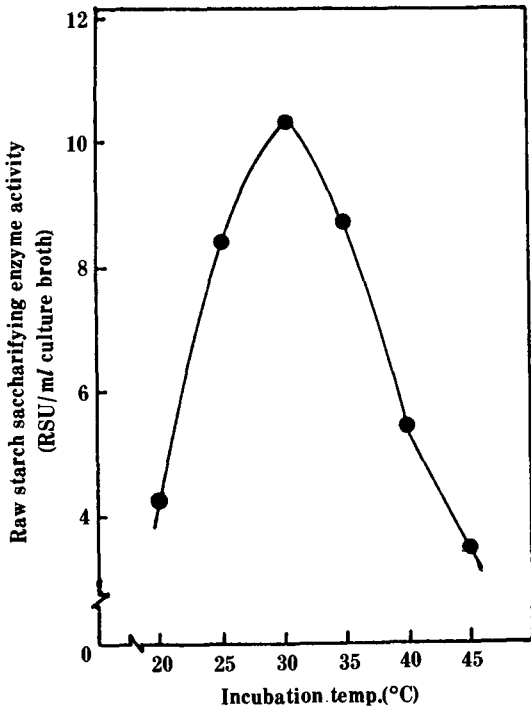


Fig. 4. Effect of temperature on the production of raw starch saccharifying enzyme.

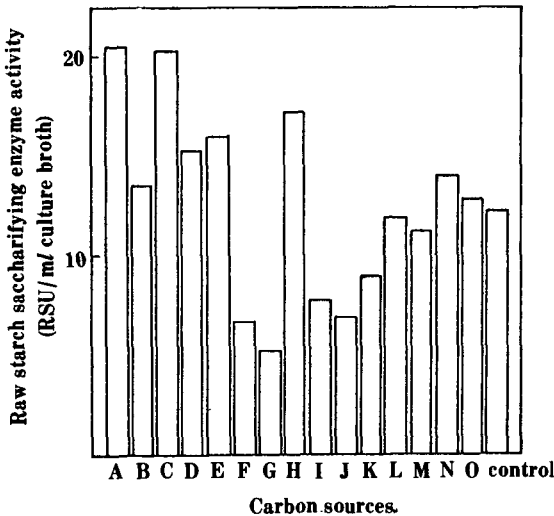


Fig. 5. Effect of carbon sources on the production of raw starch saccharifying enzyme.

- A: cooked corn starch* F: glucose K: mannose
 - B: raw corn starch G: sucrose L: fructose
 - C: cooked potato starch* H: maltose M: mannitol
 - D: raw potato starch I: raffinose N: sorbitol
 - E: soluble starch J: xylose O: trehalose
- *: corn & potato starch were cooked at 15 lbs for 15 min.

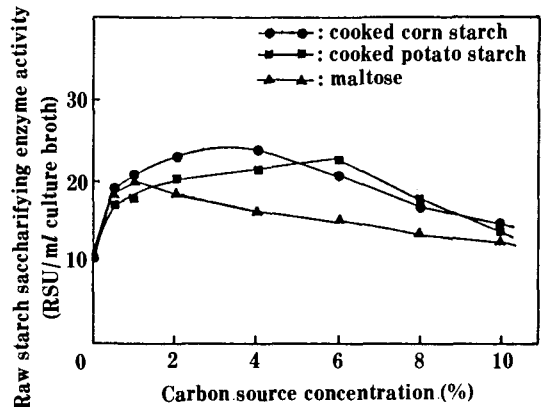


Fig. 6. Effect of concentration of carbon source on the production of raw starch saccharifying enzyme.

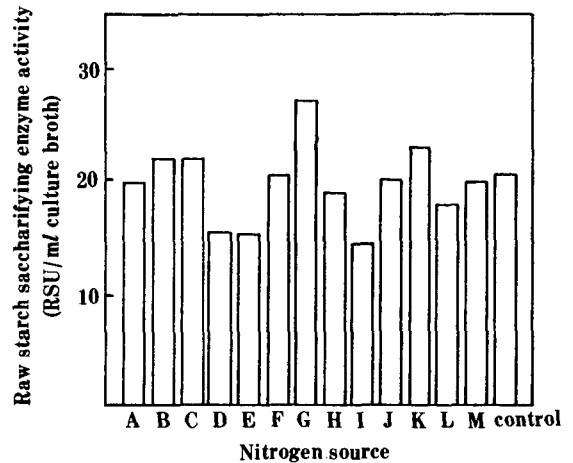


Fig. 7. Effect of nitrogen source on the production of raw starch saccharifying enzyme.

- A: Urea F: NaNO₃ K: NH₄NO₃
- B: Peptone G: KNO₃ L: (NH₄)₂H₂PO₄
- C: Yeast ext. H: NaNO₂ M: NH₄CO₃
- D: Beef ext. I: (NH₄)₂SO₄
- E: Asparagine J: NH₄Cl

pH 및 온도 : Fig. 3에서와 같이 효소생산에 제일 적합한 기본배지의 초기pH를 6.2로 하였을 때 효소생산이 가장 좋았으며 선정균주의 생육 최적 pH인 중성부근에서도 효소생산은 비교적 양호하였다. 김 등(4)은 *Rhizopus oryzae*에 의한 生澱粉 분해효소에 관한 연구에서 밀기울배지를 사용하여 효소생산을 할 때 초기pH를 4.0으로 하였을 때 효소생산이 가장 양호하였다고 보고한 바 있다.

온도는 Fig. 4에서와 같이 30°C에서 가장 양호하였으며 손 등(1)과 김 등(4)도 *Asperillus niger* 및 그 변이주와 *Rhizopus oryzae*에 의한 生澱粉 당화효소

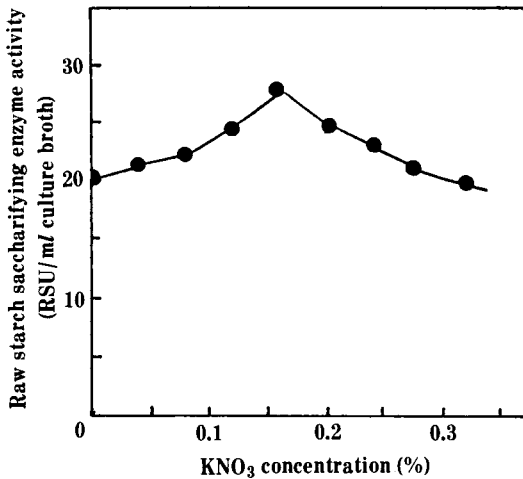


Fig. 8. Effect of concentration of potassium nitrate on the production of raw starch saccharifying enzyme.

Table 3. Effect of metal ion on the production of raw starch saccharifying enzyme.

Metal ion	Raw starch saccharifying enzyme activity (RSU/ml culture broth)
KCl	8.0
NaCl	22.9
CoCl ₂	1.3
MgCl ₂	28.4
CaCl ₂	12.7
SnCl ₂	12.7
HgCl ₂	0
FeCl ₃	10.4
control	28

The concentration of metal ion in the enzyme production medium was 1 mM.

생산에 관한 연구에서 배양 최적온도가 30°C이었다고 보고한 바 있다.

탄소원 : Fig. 5와 같이 기본배지에 호화 옥수수전분 감자전분 및 maltose를 0.5%씩 각각 첨가했을 때 효소생산이 촉진되었고 또한 이들의 최적 농도는 Fig. 6과 같이 옥수수전분 4%, 감자전분 6%, maltose 1%의 첨가가 효소생산에 가장 좋았다.

질소원 : Fig. 7과 같이 KNO₃ 및 NH₄NO₃의 첨가 효과가 인정되었으며 KNO₃를 0.16% 첨가하였을 때 가장 효소생산이 좋았다(Fig. 8).

금속 이온 : Table 3과 같이 효소생산에 상승 효과를 보이는 금속 이온은 인정되지 않았다.

배양 시간 : 선정균주를 효소생산 최적 조건에서 5

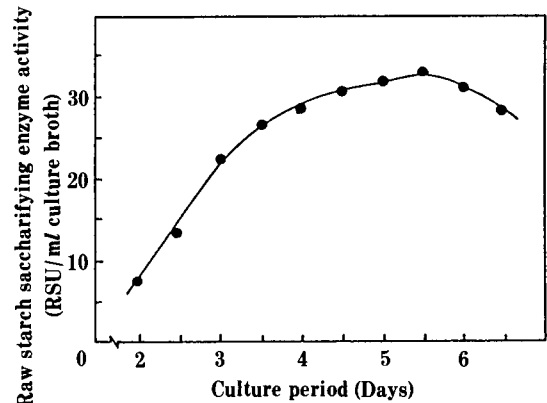


Fig. 9. Effect of culture period on the production of raw starch saccharifying enzyme.

~6일 배양하였을 때 효소생산이 제일 좋았다(Fig. 9). 이는 김 등(4)의 *Rhizopus oryzae*와 손 등(1)의 *Aspergillus niger* 및 그 변이주에 의한 生澱粉 분해 효소 생산에서 배양 2~3일에 효소생산이 제일 좋았다는 결과보다 길었다.

요 약

放線菌이 생산하는 生澱粉 분해효소를 식품공업에 이용하기 위한 자료를 얻고자 메주로부터 生澱粉 분해력이 강한 放線菌을 분리하여 *Streptomyces* sp.로 同定하였다. 밀기울浸出液 기본배지에 4%의 호화 옥수수전분과 0.16%의 KNO₃를 첨가하고 pH를 6.2로 조정한 다음 분리균주를 접종한 후 30°C에서 5~6일간 진탕배양하였을 때 33 RSU/ml의 生澱粉 분해효소를 생산하였다. 또한 효소생산에 효과적인 금속 이온은 인정되지 않았으며 Hg²⁺ 및 Co²⁺ 등은 저해가 현저하였다.

참고문헌

1. 손천배, 박윤중 : 충남대 농기연보 10(1), 166 (1983).
2. 山崎何恵, 上田誠之助, 島田豊明 : 醸酵協會誌, 21(8), 83(1963).
3. 久留島通俊, 佐藤淳司, 北原覺雄 : 日農化誌, 48(6), 379(1974).
4. 김찬조, 오만진, 이종수 : 한국산업미생물학회지, 13(4), 329(1985).
5. 김찬조, 오만진, 이종수 : 한국산업미생물학회지, 18(4), 288(1986).
6. 溝上恭平, 小崎道雄, 北原覺雄 : 澱粉科學, 25

- (2), 132(1978).
7. 鄭萬在, 谷口肇, 丸山芳治, 李美子: 한국산업미생물학회지 **10**(2), 123(1982).
 8. Taniguchi, H., F. Odashima, M. Igarashi, Y. Maruyama and M. Nakamura: *Agric. Biol. Chem.* **46**(8), 2107 (1982).
 9. Taniguchi, H. and Y. Maruyama: *J. Jpn. Soc. Starch Sci.* **32**(2), 142 (1985).
 10. 梁漢喆, 金凡煥, 崔瑢鎭: 한국산업미생물학회지, **3**(2), 73(1975).
 11. Kuo, M.J. and P.A. Hartman: *J. Bacteriol.* **92**, 723 (1966).
 12. Shimizu, M., M. Kanno, M. Tamura and M. Suekane: *Agric. Biol. Chem.* **42**(9), 1681 (1978).
 13. Sakano, Y., S. Hiraiwa, J. Fukushima and T. Kobayashi: *Agric. Biol. Chem.* **46**(5), 1121 (1982).
 14. 金燦祚, 金教昌, 張智鉉, 鄭址炢: 微生物學實驗書, 修學社(1983).
 15. Shirling, E.B. and D. Gottlieb: *Intern. J. System. Bacteriol.* **16**(3), 313 (1966).
 16. 都在浩, 金相達: 한국산업미생물학회지, **10**(4), 237(1982).
 17. 정현호, 성하진, 최용진, 양한철: 한국산업미생물학회지, **14**(5), 377(1986).
 18. Buchaman, R.E. and N.E. Gibbons: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriol.*, 8th ed., The Williams and Wilkins Co., Baltimore, U.S.A. (1974).
 19. Waksman, S.A.: *The Actinomycetes* Vol. II, The Williams and Wilkins Co., Baltimore, U.S.A. (1961).
 20. Nonomura, H.: *J. Ferment. Technol.* **52**(2), 78 (1974).

(Received September 27, 1988)