

Alternaria alternata α -Amylase의 특성에 관한 연구

정상진* · 황백

*청주대학교 유전공학과, 전남대학교 생물학과

Characterization of *Alternaria alternata* α -Amylase

Sang-Jin Chung* and Baik Hwang

*Department of Genetic Engineering, Chongju University, Chungbuk, 360-764, Korea
Department of Biology, Chonnam National University, Chonnam, 500-757, Korea

ABSTRACT: The α -amylase of *Alternaria alternata* was purified through ammonium sulfate precipitation, dialysis and Sephadex G-100 column chromatography. One single band was obtained in SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The optimum pH for enzyme activity was 5.0 and the enzyme activity was maintained at 3.6~7.0 pH range. The optimum temperature for α -amylase activity was 40°C and 71% of the activity was still maintained until 30 min after heating at 80°C. The α -amylase was slightly activated by Mn^{2+} , Zn^{2+} and Sn^{2+} , but inhibited by Ba^{2+} , Pb^{2+} , Co^{2+} and Ag^{+} . The Hg^{2+} and Ag^{2+} slightly inhibited the activity of the enzyme at concentrations of 10^{-3} and 10^{-4} M. The Michaelis constant (K_m) to soluble starch was 6.50×10^{-2} M and inhibition constant (K_i) by the 1 mM EDTA was 8.0×10^{-2} M. The inhibition of this enzyme by EDTA was competitive one.

KEYWORDS: *Alternaria alternata*, α -Amylase

α -Amylase(EC 3.2.1.1.)는 전분의 성분인 amylase와 amylopectin의 α -1,4 결합을 임의로 공격하는 endoamylase로서 여러 형태의 소당류를 분해하는 전분액화 효소이다(Roby, 1984). 이 효소는 동물, 식물, 미생물에 널리 분포하고 있는데 미생물 Amylase가 타 기원에 비하여 이용범위가 넓고 성분이 균일하며 경제성이 있어 많이 연구되고 있다(Kim, 1983).

미생물 가운데 *Aspergillus* sp.(Seu과 Kim, 1967; Lineback 등, 1969), *Calvatia gigantea* (Kekos과 Macris, 1983), *Paecilomyces* sp. (Zenin과 Park, 1983), *Rhizopus* sp.(Hur, 1976) 및 *Streptomyces limosus*(Fairbairn 등, 1986) 등의 균류 amylase에 대한 보고가 있다. 본 연구는 불완전 균류로서 식물의 잎에 기생하는 *Alternaria alternata*에 의해 생산되는 α -amylase를 정제하여 물리화학적 특성을 파악하고 다른 균류

및 세균류에 의해 생산되는 α -amylase와 비교한 것이다.

재료 및 방법

균주

균주는 청주대학교 교내의 낙엽이 다량 퇴적된 토양에서 분리하였다. 토양은 증류수로 세척하였으며 세척된 용액은 Whatman No. 2 여지에 여과한 후 건조시켰다. 건조된 포자는 malt extract 배지에 접종하여 25°C에서 5일동안 배양하였다(Harley과 Waid, 1955). Domsch 등(1980)의 *Alternaria* sp.의 형태적 분류 key에 따라 배양된 균 가운데에서 *A. alternata*를 분리하여 실험에 적용하였다.

배지 및 균체배양

*A. alternata*의 배양을 위한 배지로 malt extract 2%, yeast extract 0.5%, peptone 0.5%,

*Corresponding author

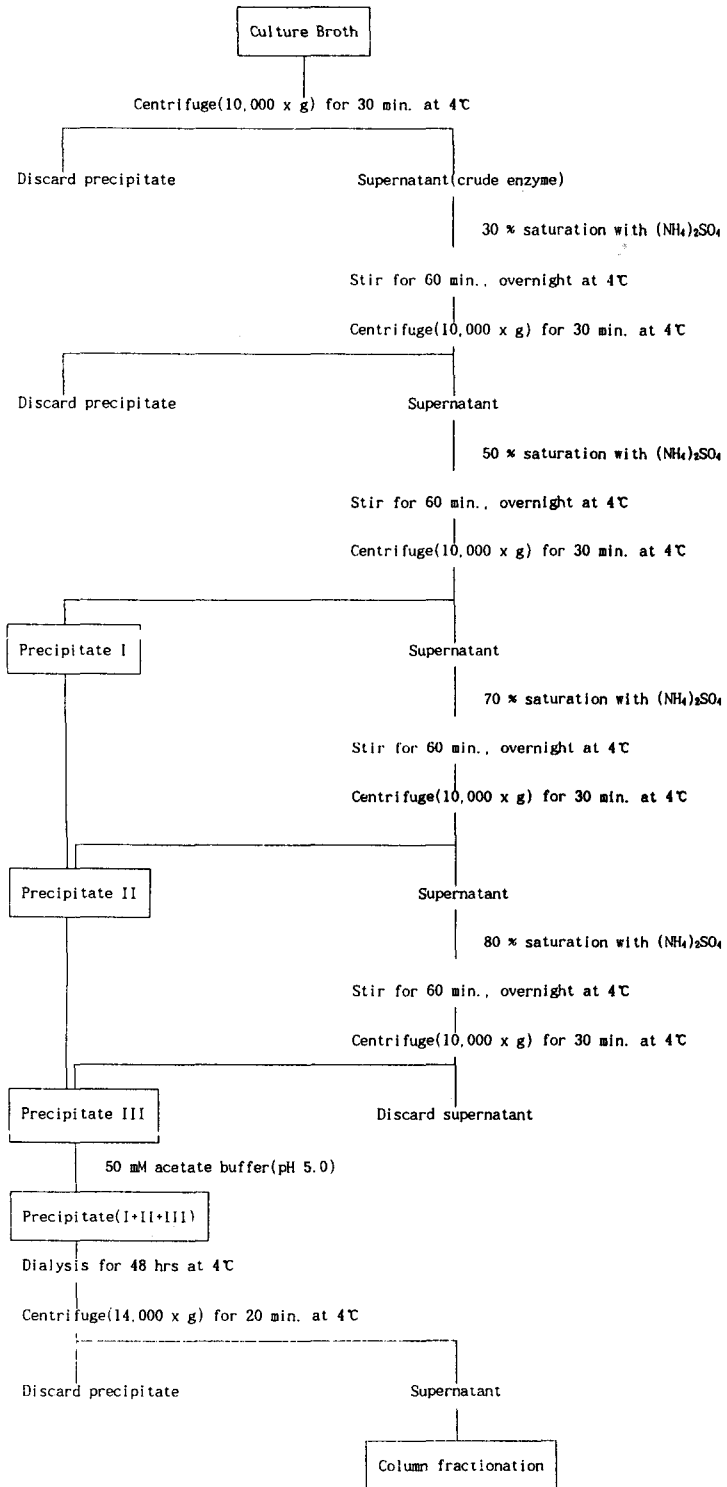


Fig. 1. The purification process of *Alternaria alternata* α -amylase

beef extract 0.3%를 가한 액체배지(Booth, 1971; Miller & Churchill, 1986)를 사용하였으며 0.5N HCl 용액으로 pH를 6.0으로 조절하여 25°C에서 8일간 배양하였다(Difco, 1984).

효소활성의 측정 및 단백질의 정량

Total amylase 활성도는 DNS법(Bernfeld, 1955)에 따라 효소액 0.1 ml에 1%(W/V)의 soluble starch 0.2 ml를 첨가하여 40°C에서 3분간 반응시킨후 546 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소의 단위는 효소와 기질이 1분동안 반응하였을 때 1 g의 maltose를 분해하는 효소의 역가를 1 unit로 하였다(Bergmeyer, 1974).

α -amylase의 활성도는 Iodine법(Bergmeyer, 1974)에 따라 1%(W/V)의 soluble starch 2 ml를 기질로 하여 50 mM acetate buffer(pH 5.0) 1 ml을 혼합한 다음 효소 1 ml를 가하여 37°C에서 30분간 배양시킨후 0.1N HCl 2 ml를 가하고 I-KI 용액 1 ml를 가해 발색시켜 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 효소단위는 blue value 10% 저하시키는 soluble starch의 mg 값으로 나타냈으며 specific activity는 단백질의 mg 당 활성도로 표시하였다(Bergmeyer, 1974; Bak, 1981).

단백질의 정량은 crystalline bovine serum albumin을 표준물질로 사용하여 Lowry법(Lowry 등, 1951)로 측정하였다.

SDS-polyacrylamide gel 전기영동

전기영동의 resolving gel은 8% acrylamide, stacking gel은 4% acrylamide에 10% SDS 및 10% ammonium persulfate를 첨가한 slab gel을 사용하였다. 시료 50 μ l를 loading한 후 Tris-glycine buffer(pH 8.3)에서 실온, 100V, 20 mA의 직류로 5시간 전개하였다. Gel의 염색은 0.025%(W/

V) coomassie brilliant blue R-250으로 2시간 실 시한 후 10%의 methanol을 함유한 10% acetic acid로 2시간 탈색시켰다(Weber & Osborn, 1969).

결과 및 고찰

효소의 조제 및 순화

배양된 균체는 ultra sonicator로 50분간 파쇄한 후 원심분리($\times 10,000$ g, 4°C, 30 min)하여 얻은 상등액 600 ml를 조효소로 사용하였다.

조효소액은 ammonium sulfate를 가하여 30%에서 80%까지 단계적으로 염석시켜 각 단계에서 얻은 단백질 침전물을 수집하여 50 mM의 acetate buffer(pH 5.0)로 4°C에서 48시간 투석하였다. 투석이 끝난 20 ml의 시료는 50 mM acetate

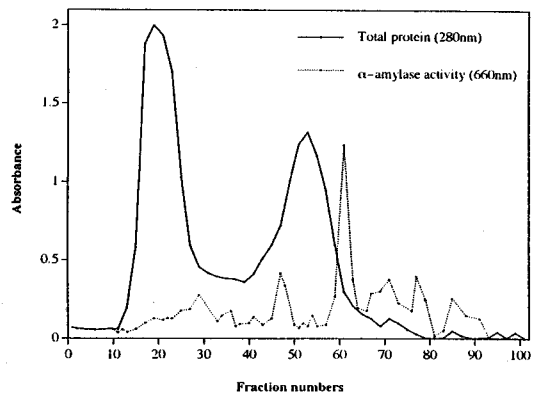


Fig. 2. The purification of α -amylase from *Alternaria alternata* by Sephadex G-100 gel filtration. Protein (solid line) peaks I, II and α -amylase activity (dotted line) were measured at 280 nm and 660 nm, respectively. The α -amylase activity was observed at fractions between 58 and 63 near protein peak II.

Table 1. The summary of purification procedure of *Alternaria alternata* α -amylase

	Volume (units/ml)	Total activity (units/ml)	α -amylase (units/ml)	Protein (mg/ml)	Specific activity (units/ml)	Yield (%)
Crude enzyme	610	956.9	26.6	0.605	4.4	100.0
Dialyzed enzyme	30	907.5	150.8	0.114	132.2	94.8

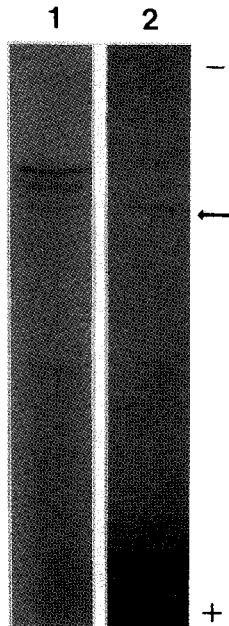


Fig. 3. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the crude enzyme (lane 1) and the purified enzyme (lane 2). Crude enzyme showed several bands while the purified enzyme showed only one band (arrow)

buffer(pH 5.0)로 평형시킨 Sephadex G-100으로 column chromatography(2.1×40.0 cm)하였다. 효소는 20 ml/h의 속도로 용출하여 5 ml씩 분획하였다(Fig. 1).

분획된 시료의 단백질 및 α -amylase의 활성도를 측정 한 결과는 Fig. 2와 같다. 단백질 peak I, II 중 α -amylase peak는 fraction No. 58-63 사이에서 가장 높게 나타나 이 부분을 정제 효소로 사용하였다. 조효소는 chromatography 후 약 34배 농축되었으며 specific activity는 6배로 나타나 많이 정제되었음을 알 수 있었다. 또한 정제된 α -amylase의 활성도는 152.9 unit/ml, 단백질은 0.025 mg/ml로 나타났다(Table 1).

정제 효소의 SDS-polyacrylamide gel 전기영동

전기영동 결과 정제 효소는 단일 band, 조효소는 여러개의 band를 나타냈는데 정제효소의 band는 하나로 나타났다(Fig. 3).

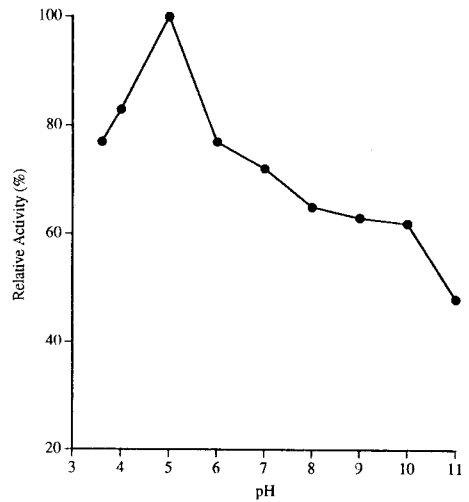


Fig. 4. Effect of pH on α -amylase activity was measured at pH 5.0 for maximum activity and at pH 11.0 for minimum activity.

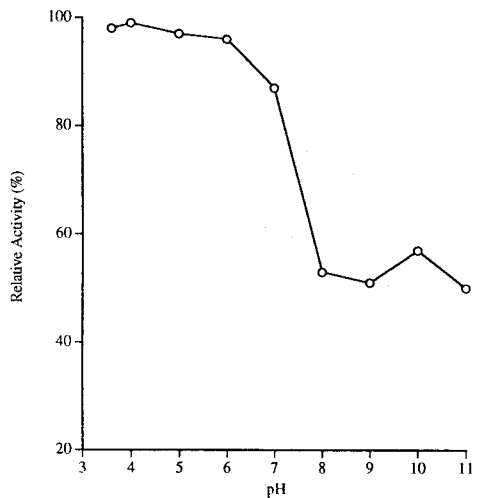


Fig. 5. Effect of pH on the stability of α -amylase. The α -amylase was stable at pH 3.6~7, and unstable above pH 8.0.

pH의 영향

α -amylase의 활성은 Fig. 4와 같이 pH 5.0에서 가장 높은 활성을 나타냈으며 pH 11에서 가장 낮은 활성을 나타내었다. 효소의 안정성은 기질을 가하지 않은 상태에서 각 pH에서 4, 12시간 방치한 결과 pH 3.6과 7.0 사이에서 활성이 유지되었

다(Fig. 5).

이 결과는 균류 *Aspergillus oryzae*의 최적 pH는 pH 5.5~5.9(Fisher & Stein, 1960), black *Aspergillus* sp.의 pH 4.0(Seu & Kim, 1967), *Aspergillus* sp.의 pH 6.5(Kim, 1983), *Paecilomyces* sp.의 pH 4.0(Zenin & Park, 1983), 효모 *Filobasidium capsuligenum*의 5.6(De Mot & Verachtert, 1985), 세균류 *Bacillus amyloliquefaciens*(Fogarty & Kelley, 1979)의 pH 5.9, *Bacillus* sp. Y-127의 pH 4.0~7.0(Oh *et al.*, 1981), *B. circulans* F-2의 pH 6.0~6.5(Chung *et al.*, 1982), *B. circulans*(Orlando *et al.*, 1983)의 pH 6.0~7.0, *Pseudomonas stutzeri*(Sakano *et al.*, 1983)의 pH 7.8~8.2로 본 효소는 이제까지 보고된 세균류의 최적 pH가 약 산과 알카리인 반면 균류, 효모와 같이 내산성으로 나타났다(Table 2).

또한 pH 안정성의 경우 균류 *A. oryzae*의 pH 5.5 ~8.5(Fisher & Stein, 1960), black *Aspergillus*의 pH 2.0~6.6(Seu & Kim, 1967), 세균류 *B. amyloliquefaciens*의 pH 5.9(Forgarty &

Kelly, 1979), *Bacillus circulans* F-2의 pH 5.5 ~11.0(Chung *et al.*, 1982), *P. stutzeri*의 pH 5.5~11.0(Sakano *et al.*, 1983)와 비교할 때 본 효소의 경우 안정성이 비교적 강산에서 중성까지 광범위하게 나타났다(Table 2). 따라서 본 효소의 최적 pH와 안정성은 균류, 효모와 같이 산성으로 조사되어 세균류보다 내산성이 강한 것으로 나타났

Table 2. A comparison of pH effect on the α -amylase from various microorganisms

Species	Optimum pH	Stability range
<i>Alternaria alternata</i>	5.0	3.6~7.0
<i>Aspergillus oryzae</i>	5.5~5.9	5.5~8.5
<i>Aspergillus</i> sp. (black <i>Aspergilli</i>)	4.0	2.0~6.6
<i>Aspergillus</i> sp.	6.5	—
<i>Paecilomyces</i> sp.	4.0	—
<i>Filobasidium capsuligenum</i>	5.6	—
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	5.9	5.9
<i>Bacillus</i> sp. Y-127	4.0~7.0	—
<i>Bacillus circulans</i> F-2	6.0~6.5	5.5~11.0
<i>Bacillus circulans</i>	6.0~7.0	—
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	7.8~8.2	5.5~11.0

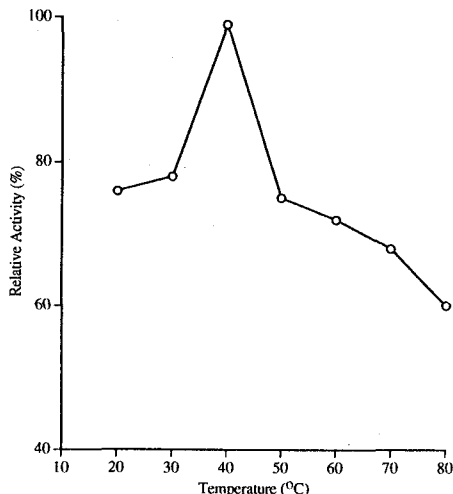


Fig. 6. Effect of temperature on the activity of α -amylase. The α -amylase revealed maximum activity at 40°C.

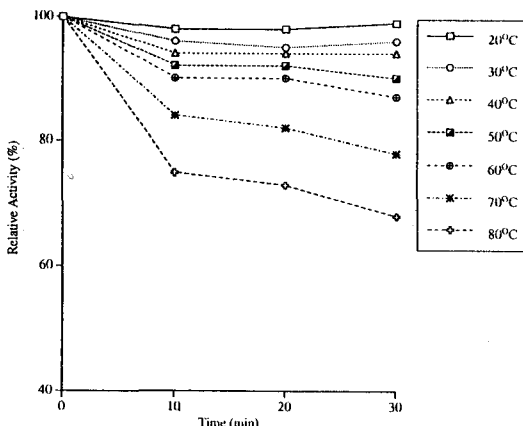


Fig. 7. Effect of temperature on the stability of α -amylase. There were no change in enzyme activity from 20°C to 50°C, but enzyme activity decreased at every 10 minutes interval from 60°C to 80°C.

다.

온도의 영향

효소에 대한 온도의 영향은 20°C에서 80°C까지 10°C 간격으로 활성을 측정한 결과 Fig. 6과 같이 α -amylase의 활성은 40°C에서 가장 높았다. 그러나 50°C부터 활성이 20% 이상 감소되어 80°C에서는 잔존 활성이 60%로 나타났다. 효소의 안정성에 미치는 온도의 영향을 보기 위해 효소를 위와 같은 조건에서 기질을 가하지 않고 10분, 20분, 30분씩 열처리를 한 후 40°C에서 활성을 측정하였다. Fig. 7과 같이 α -amylase의 열에 대한 안정성은 20°C에서 50°C까지 열에 의한 변화가 없었으나 60°C의 열을 가할 경우 열처리 30분 후부터 활성이 감소되어 잔존 활성이 87%였고, 80°C에서 30분 열처리시 잔존 활성이 71%로 나타났다.

이 결과는 균류 *A. oryzae* α -amylase의 최적 온도 40°C(Fogarty & Kelly, 1979), black *Aspergillus*의 60°C(Seu & Kim, 1967), *Aspergillus* sp.의 45°C(Kim, 1983), *Paecilomyces* sp.의 45°C(Zenin & Park, 1983), 효모 *F. capsuligenum*의 50°C(De Mot & Verachtert, 1985), 세균류 *B. liquefaciens*의 65°C(Fisher & Stein, 1960), *P. stutzeri*의 45°C(Sakano *et al.*, 1983)와 비교할 때 세균류의 최적온도보다 낮았고 균류와 효모의 최적 온도와 유사한 경향을 나타냈다(Table 3).

열에 대한 안정성은 균류 black *Aspergillus*의 0~65°C(Seu & Kim, 1967), 효모 *F. capsuligenum*의 40°C(De Mot & Verachtert, 1985), 세균류 *B. stearothermophilus*의 90°C(Fogarty & Kelly, 1979), *B. circulans* F-2의 0~45°C(Chung *et al.*, 1982), *Bacillus* sp.의 60°C(Oh *et al.*, 1976), *P. stutzeri*의 0~45°C(Sakano *et al.*, 1983)와 비교할 때 본 효소는 최적 활성 온도가 비교적 낮은 40°C로 일반적인 균류 효소와 같이 전형적인 저온성 효소로 나타났으나 균류에 의해 생성되는 α -amylase의 내열성이 일반적으로 약한 것으로 알려져 있는 것에 반해 본 효소는 80°C에서도 71%의 잔존 활성이 남아 있어 세균류의 α -amylase에 가까운 내열성을 나타내고 있는데

Table 3. A comparison of effect of temperature on the α -amylase from various microorganisms.

Species	Optimum temperature (°C)	Stability range (°C)
<i>Alternaria alternata</i>	40	20~60
<i>Aspergillus oryzae</i>	40	—
<i>Aspergillus</i> sp. (black <i>Aspergilli</i>)	60	0~25
<i>Alternaria</i> sp.	45	—
<i>Paecilomyces</i> sp.	45	—
<i>Filobasidium capsuligenum</i>	50	40
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	—	90
<i>Bacillus liquefaciens</i>	65	—
<i>Bacillus circulans</i> F-2	60	0~45
<i>Bacillus</i> sp.	—	60
<i>Escherichia coli</i> & <i>B. subtilis</i>	70	—
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	45	0~45

Table 4. The effects of metal ions on *Alternaria alternata* α -amylase activity.

Metal ion	Relative activity (%)		
	10 ⁻⁵ M	10 ⁻⁴ M	10 ⁻³ M
None	100	100	100
Mn ²⁺	112	110	122
Ba ²⁺	94	83	98
Pb ²⁺	94	95	99
Co ²⁺	98	87	98
Hg ²⁺	100	100	95
Mg ²⁺	104	93	94
Zn ²⁺	108	107	104
Sn ²⁺	105	103	105
Ag ¹⁺	87	94	92
Ca ²⁺	105	104	105

이는 효소가 고열에서 견딜 수 있는 독특한 random coil 구조를 포함하고 있기 때문인 것으로 추정된다(Fogarty & Kelly, 1979).

Table 5. A comparison of effect of metal ions on α -amylase from various microorganisms.

Species	Activator	Inhibitor
<i>Alternaria alternata</i>	Mn ²⁺ , Zn ²⁺ , Sn ²⁺ , Ca ²⁺	Ba ²⁺ , Pb ²⁺ , Co ²⁺ , Ag ¹⁺
<i>Aspergillus</i> sp. (black <i>Aspergillus</i>)	Ba ²⁺ , Ca ²⁺	
<i>Alternaria</i> sp.	Mn ²⁺ , Sn ²⁺ , Ca ²⁺	Pb ²⁺
<i>Bacillus circulans</i> F-2	Ca ²⁺ , Mn ²⁺	Ag ¹⁺ , Cu ²⁺ , Hg ²⁺ , Pb ²⁺
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Ca ²⁺	

효소 활성에 미치는 금속 이온의 영향

효소 활성에 미치는 각종 금속 이온의 영향을 조사하기 위하여 각 금속 염화물을 10⁻³~10⁻⁵M의 농도로 처리하여 상기 실험에서 최적 조건으로 나타난 40°C, pH 5.0에서 효소와 반응시킨 후 그 활성을 측정하였다. 대부분의 금속 이온은 Table 4와 같이 효소 활성에 큰 영향을 주지 않는 것으로 나타났는데 Mn²⁺, Sn²⁺은 비교적 활성을 촉진하는 효과를 나타낸 반면 Ba²⁺, Pb²⁺, Co²⁺, Ag¹⁺는 모든 농도에서 활성을 저해하는 효과를 나타냈다. 특히 Co²⁺, Ba²⁺은 10⁻⁵M에서 각각 83%, 87%를 Ag¹⁺는 10⁻⁴M에서 87%의 활성을 나타내 가장 강한 저해 효과를 나타냈다. 그 외 Hg²⁺와 Mn²⁺은 일부에서만 약간의 저해 현상을 보였고 thiol기의 산화를 방지하는 Hg²⁺도 효소 활성을 크게 저해하지 않았다.

한편, black *Aspergillus*(Seu & Kim, 1967) α -amylase는 Ba²⁺, Ca²⁺ 이온 첨가시 활성이 증가하는 것으로 보고되었으며 *Aspergillus* sp.(Kim, 1983)에서 Mn²⁺, Sn²⁺, Ca²⁺ 이온 첨가시 활성 증가 효과를 나타내고 Pb가 활성 감소 효과를 나타낸 것은 본 효소와 일치하였으나 Hg²⁺는 효소 저해 효과가 크게 나타나지 않았다. 그러나 *B. circulans* F-2 α -amylase(Chung *et al.*, 1982)는 Hg²⁺에 의해 효소 활성이 강력히 저해되었으며 Ag¹⁺, Cu²⁺, Pb²⁺에 의해서는 비교적 효소 활성을 많이 감소되었다. 그러나 Ca²⁺, Mn²⁺은 부활제로 작용되었다고 보고되어 Ca²⁺, Mn²⁺의 경우만이 본 효소와 일치되었다.

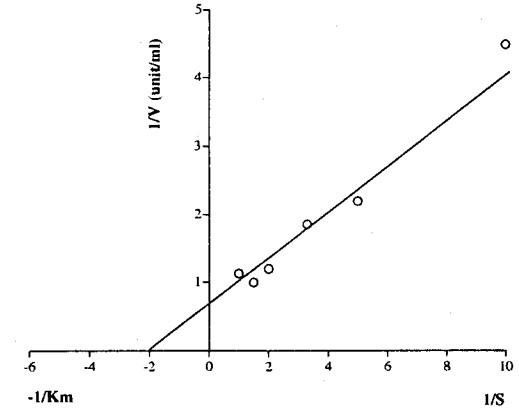


Fig. 8. Effect of substrate concentration on α -amylase activity by Lineweaver-Burk plot. The Michaelis constant of α -amylase is 6.5×10^{-3} mM. This enzyme activity was about 1,000 times higher than fungal α -amylase

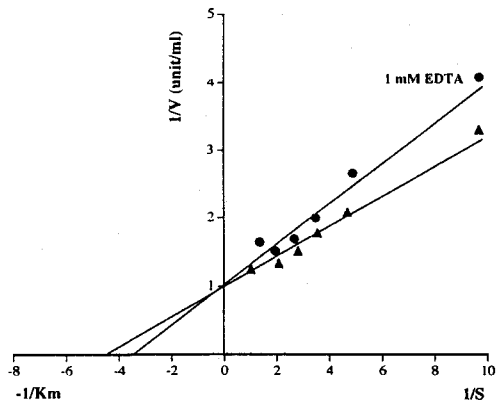


Fig. 9. The plot for inhibition constant by EDTA on α -amylase activity. Inhibition constant on α -amylase by 1 mM EDTA was 8.0×10^{-5} mM.

P. stutzeri(Sakano *et al.*, 1983)는 Ca²⁺만이 저해 작용을 하지 않았을 뿐 대부분 금속이온이 저해 작용을 하여 본 효소와는 많은 차이를 나타냈다 (Table 5). 따라서 전체적으로 Mn²⁺, Ca²⁺은 활성 증가를, Hg²⁺, Pb²⁺는 활성 감소 효과를 나타내는 것으로 나타났는데 이는 금속 이온중 Ca²⁺이 효소의 disulfide bridge를 강화하여 전체적인 효소 구조의 안정성을 증가시키고 protease로부터 효소를 보호하기 때문으로 해석된다(Fisher & Stein, 1960).

그러나 본 효소는 최대로 활성이 저해될 때도 83% 잔존 활성을 나타내 전체적으로 금속 이온의해 크게 저해받지 않는 것으로 나타났다.

효소 역학

Soluble starch 용액의 농도별 반응 속도에 의하여 본 효소의 기질에 대한 친화력 측정을 위한 실험으로 효소 역학에 대한 분석을 Lineweaver-Burk plot에 의해 실시하였다. Lineweaver-Burk plot에 의해 얻어진 α -amylase의 K_m 값은 6.5×10^{-2} M(Fig. 8)로, K_i 값은 8.0×10^{-2} M(Fig. 9)로 측정되었다. 본 효소는 *B. circulans* F-2 α -amylase의 K_m 값 1.704 mg/ml(Chung *et al.*, 1982)를 제외한 *B. subtilis*, *P. saccharophila*, *A. oryzae*(Fisher & Stein, 1960)의 K_m 값 $1 \sim 5 \times 10$ mM, *Klebsiella pneumoniae* α -amylase의 K_m 값 5.7~5.9 mM(Sakano *et al.*, 1983)과 비교할 때 *Alternaria* sp. α -amylase의 친화력이 *B. circulans* F-2(Chung *et al.*, 1982)보다 약간 떨어졌다. 즉 본 효소는 *B. circulans* F-2를 제외한 미생물에 비하여 soluble starch에 대한 친화력이 약 1,000배 정도 강하여 균류에서 분리된 α -amylase으로서 친화력이 매우 양호한 것으로 나타났다.

한편 EDTA(ethylenediamine tetracetate)에 대한 저해작용은 V_{max} 가 0.81로 경쟁적 저해작용을 하는 것으로 나타났다. EDTA는 α -amylase의 활성저하를 촉진하는 물질로 알려져 있는데(Boyer *et al.*, 1960) *P. stutzeri*(Sakano *et al.*, 1983)와 *B. cereus* NY-14(Yoshigi *et al.*, 1985) α -amylase는 본 효소와 달리 활성 증가 현상을 나타내 금속염에 대한 반응에 차이를 보였다. 그러나 본 정제 효소는 soluble starch와 EDTA에 대한 결합력이 강하며 EDTA에 의해 강하게 저해받는 것으로 나타났다.

적 요

토양에서 분리된 *A. alternata*의 조효소액은 ammonium sulfate 염석, 투석 Sephadex G-100 column chromatography를 통하여 정제한 후 SDS-polyacrylamide gel 전기영동에 의해 단일

band의 α -amylase를 얻었다. 이 효소의 물리화학적 특성을 분석한 결과는 다음과 같다.

1. 정제 효소의 최적 활성 pH는 5.0이었고 pH 안정성 범위는 pH 3.6~7.0으로 비교적 산성에서 안정성을 보이는 내산성 효소로 나타났다.

2. 효소의 최적 활성 온도는 40°C, 열에 대한 안정성 범위는 20~60°C로 나타났으며 80°C에서 30분 열처리시 잔존 활성이 71%로 세균류와 거의 동일한 내열성을 보였다.

3. 본 효소는 Mn^{2+} , Zn^{2+} 및 Sn^{2+} 의해 활성이 촉진되었으나 Ba^{2+} , Pb^{2+} , Co^{2+} , Ag^{+} 에 의해 저해효과를 나타냈으며 또한 Hg^{2+} , Mn^{2+} 는 10^{-3} M 및 10^{-4} M 농도에서 저해작용을 나타냈다. 그러나 최대 활성 저해시 잔존 활성이 83%로 본 효소는 전반적으로 금속 이온의 영향을 크게 받지 않았다.

4. 본 효소의 soluble starch에 대한 K_m 값은 6.50×10^{-2} M이었으며 1 mM EDTA에 대한 K_i 값은 8×10^{-2} M로서 경쟁적 저해작용을 하였다.

참고문헌

- Bak, H.S. 1981. Studies on the amylase produced by Actinomycetes J-9525s. Part II. Culture conditions for amylase production by Actinomycetes J-9525s. *Pusan Industrial Univ. Thesis Coll.* 2: 281-290.
- Bergmeyer, H.U. 1974. Methods of Enzymatic Analysis. Vol 2. Acad. Press London & New York. pp. 885-902.
- Bernfeld, P., S.P. Colowick and N.O. Kaplan. 1955. Methods in Enzymology. Acad. Press. New York. pp. 149.
- Booth, C. 1971. Methods in Microbiology. Vol. 4. Acad. Press London & New York, pp. 59.
- Chung, M.J., H. Taniguchi, Y. Maruyama and M.J. Lee. 1982. Studies on α -amylase of *Bacillus circulans* F-2. Part II. Enzymatic characteristics of the purified α -amylase. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* 10(2): 123-132.
- De Mot, R. and H. Verachttert. 1985. Purification and characterization of extracellular amylolytic enzymes from the

- Yeast *Filobasidium capsuligenum*. *Appl. Environ. Microbiol.* pp. 1474-1482.
- Difco, 1984. Difco Manual. Difco Laboratories. Detroit. pp. 57.
- Domsch, K.H., W. Gams & T.-H. Anderson. 1980. Compendium of Soil Fungi, Vol. I. Academic Press. London. pp. 34-39.
- Fairbairn, D.A., F.G. Priest and J.R. Stark. 1986. Extracellular amylase synthesis by *Streptomyces limosus*. *Enzyme Microbiol. Technol.* 8: 89.
- Fellig, J., E.A. Stein and E.H. Fisher. 1957. Purification and crystallization of α -amylase from *Bacillus subtilis* (Strain Takamine) amyolytic enzyme 23. *Helv. Chim. Act.* 40: 529-534.
- Fisher, E.H. and E.A. Stein. 1960. α -amylase, In the Enzymes. Acad. press, New York, 4: 313-343.
- Fogarty, W.M. and C.T. Kelly, 1979. Developments in microbial extracellular Enzymes, In Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology, John Wiley & Sons. New York. 3, pp. 45-57.
- Harley, J.L. and J.S. Waid. 1955. A Method for studying active mycelia on living roots and other surface in the soil. *Transactions of the British Mycolog. Soci.* 38: 104-118.
- Hur, J.H. 1976. Study on the development of fermentation food. 1: Effects of several carbon sources on amylases production in *Rhizopus* spp. *Jin Ju Education Coll. Thesis. Coll.* 13: 233-238.
- Kekos, D. and B.J. Macris. 1983. Production and characterization of amylase from *Calvatea gigantea*. *Appl. Environ. Microbiol.* 45: 935.
- Kim, Y.S. 1983. Studies on the producing amylase by the *Aspergillus* sp. Jung Ang Univ. Thesis. pp. 1-30.
- Lineback, D.R., I.J. Russell and C. Rasmussen. 1969. Two forms of glucoamylase of *Aspergillus niger*. *Arch. Biochem. Biophys.* pp. 134 & 559.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Miller, T.L. and B.W. Churchill. 1986. Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology. American Society of Microbiology. Washington DC. pp. 123-136.
- Oh, D.H., K.P. Lee, Y.R. Pyun and J.H. Yu. 1981. Studies on the production of thermostable amylase. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* 9(2): 91-97.
- Orlando, A.R., P. Ade, D. Di Maggio, C. Faneli. and L. Vittozzi. 1983. The purification of a novel amylase from *B. subtilis* and its inhibition by wheat proteins. *Biochem. J.* 209: 561-564.
- Robyt, J.F. 1984. Starch, Acad. Press. New York. pp. 87-118.
- Sakano, Y., E. Kashiyama and T. Kobayashi. 1983. Purification of α -maltotetraose forming exo-amylase of *Pseudomonas stutzeri*-Two forms of the amylase and their enzymatic properties. *Agric. Biol. Chem.* 47(8): 1761-1768.
- Seu, J.H. and J.K. Kim, 1967. Studies on acid stable α -amylase producing by black *Aspergilli*. *Kyung Buk Univ. Thesis Coll.* 11: 69-75.
- Weber, K. and M. Osborn. 1969. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244(16): 4406-4412.
- Yoshigi, N., T. Chikano and M. Kamimura. 1985. Purification and properties of an amylase from *Bacillus cereus* NY-14. *Agric. Biol. Chem.* 49(12): 3369-3376.
- Zenin, C.T. and Y.K. Park. 1983. Purification and Characterization of acid stable α -amylase from *Paecilomyces* sp. *J. Ferm. Technol.* 61(1): 109-112.