

Saprolegnia ferax에 의한 β -amylase의 생산 및 특성

배 석* · 조남철¹ · 전순배

전남대학교 미생물학과, ¹동신전문대학 식품영양과

Production and Characterization of β -amylase from *Saprolegnia ferax*. Suk Bai*, Nam-Chul Cho¹ and Soon-Bai Chun. Department of Microbiology, Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea, ¹Department of Food and Nutrition, Dongshin Junior College, Kwangju 500-714, Korea - The Oomycete *Saprolegnia ferax* produces an extracellular β -amylase. Maximum enzyme yield was attained after 7 days of growth in YNB starch medium (pH 6.5) at 25°C. The amylase was purified 24-fold by ultrafiltration, HPLC DEAE column and HPLC gel filtration. The purified enzyme was a monomeric glycoprotein with a molecular weight of about 44,000 dalton. The pH and temperature optima were 6.5 and 50°C, respectively. The enzyme was fairly stable up to 50°C and at acidic pH region (pH 4.0-7.0). The apparent K_m and V_{max} values of the enzyme against soluble starch were 0.77 mg/ml and 2,174 μ moles/mg protein, respectively. Amino acid analysis indicated that the enzyme was enriched in alanine, glycine, leucine and acidic amino acid. Starch hydrolysis with the enzyme released maltose but not glucose, whereas maltotriose, Schardinger dextrin (α -cyclodextrin) and pullulan were not hydrolysed by the enzyme. The enzyme was inhibited by Schardinger dextrin, p-chloromercuribenzoate(PCMB), Cu^{2+} and Hg^{2+} . Inhibition of the enzyme by PCMB could be reversed by the addition of cysteine and mercaptoethanol.

β -amylase (α -1,4-glucan maltohydrolase, EC 3.2.1.2)는 전분의 α -1,4-glucoside결합을 비환원말단으로부터 하나씩 걸러 가수분해하여 maltose를 생산하게 하는 exo-acting amylase로서 식품과 음료산업에 중요한 효소이고 (1, 2), 감자, 밀, 보리와 같은 고등식물에 분포하고 있으며 세균, 곰팡이, 효모같은 미생물에 의해서도 생산된다.

Bacillus cereus(3), *B. circulans*(4), *B. megaterium*(5, 6, 7), *B. polymyxa*(8, 9, 10), *B. stearothermophilus*(11), *Clostridium thermocellum*(12) 그리고 *C. thermosulfurogenes*(13, 14) 등과 같은 세균들이 생산하는 β -amylases가 정제되어 그 특성이 보고된 바 있고, α -amylase나 glucoamylase를 주로 생산하는 곰팡이와 효모류에서는 *Aspergillus oryzae*(15), *Emmericella*(*Aspergillus*) *nidulans*(16, 17), *Hendersonula toruloidea*(18), *Phaffia rhodozyma*(19) 그리고 *Brettanomyces naardensis*(20)에서 β -amylases에 관한 연구가 있었다.

*Saprolegnia ferax*는 난균류(Oomycetes)에 속하며 수중이나 습기있는 토양중의 식물체 혹은 동물체에 부생하고 있다(21). 식물체의 주요 성분중의 하나인 전분을 유일한 탄소원으로 *S. ferax*를 배양해 보면 α -amylase나 glucoamylase가 아닌 β -amylase가 주로 생산됨을 알 수 있었다.

본 연구에서는 *S. ferax*가 생산하는 β -amylase의 생산 조건을 조사하고 정제하여 그 효소학적 특성을 검토하였다.

재료 및 방법

사용 균주 및 시약

본 실험에서 사용한 균주는 *Saprolegnia ferax* ATCC 36051이었다. 균주보존은 GY배지(0.25% yeast extract, 1% glucose, 2% Bacto agar)와 3% soluble starch를 함유한 최소배지(0.67% yeast nitrogen base [YNB], 2% Bacto agar)에서 균사체를 25°C로 5-7일간 배양한 후 4°C에서 보관 하였으며 4주마다 계대배양하였다. 배지에 사용한 시약은 Difco Laboratories(Detroit, Michigan, U.S.A)에서 구입하였고 단백질의 분리 정제, 아미노산 조성 분석에 필요한 시약은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo., U.S.A)제품을 사용하였다. 기타 각 종 시약은 일급품을 구입, 사용하였다.

효소의 생산

*S. ferax*의 포자현탁액($1-2 \times 10^5$ /ml) 1 ml을 0.1 M sodium-phosphate 완충용액(pH 5.0-8.0)에 1% soluble starch와 0.67% YNB를 첨가한 50 ml배지에 접종하여 25°C에서 대수기후기까지(7일) 배양하면서 효소활성이 가장 좋은 배양 pH를 조사하였고, 최적 배양 pH조건에서 배양온도를 10-40°C로 하여 최적 배양온도를 조사

*Corresponding author

Tel. 82-62-520-6882, Fax. 82-62-520-6546

E-mail: sukbai@orion.chonnam.ac.kr

Key words: *Saprolegnia ferax*, β -amylase, Purification, Characterization

하였다.

효소의 분리 및 정제

S. ferax 포자 현탁액을 1% soluble starch 함유 YNB 배지(pH 6.5)에 접종하고 25°C에서 대수기후기까지 진탕배양(120 rpm)한 다음 균사체가 포함된 배양액을 여과시켜 균사체를 제거한 상등액을 ultrafiltration (10,000 molecular weight cut off, Aminco Co., U.S.A)하여 농축한 후 이를 10 mM Tris-HCl 완충용액(pH 7.6)으로 투석하고 농축하여 미리 동일 완충용액으로 평형시킨 HPLC(Waters Associate Co., U.S.A) DEAE column (TSK DEAE-5PW for HPLC, 0.8×7.5 cm)에 가한 후 0.0 M에서 0.4 M까지의 linear gradient로 분당 1 ml씩 용출하였다. 용출된 분획중 amylase활성이 있는 분획을 모아 농축하고 centricon 10(Aminco Co., U.S.A)을 이용하여 탈염한 후 HPLC gel filtration(Bio-Sil TSK-250 for HPLC, 0.75×60 cm)을 하였다. HPLC gel여과는 10 mM HEPES 완충용액 (pH 7.0)으로 평형시킨 상태에서 분당 0.5 ml의 유속으로 실시하였다.

효소의 활성 및 단백질량 측정

효소의 활성은 540 nm에서 2,4-dinitrosalicylic acid (DNS)방법(22)과 Somogyi-Nelson(23)방법으로 측정하였다. 효소단위는 1분간 1 μmole의 maltose를 유리시키는 효소량을 1 unit로 하였다. 효소의 단백질량은 bovine serum albumin을 표준단백질로 하여 Lowry 등(24)의 방법으로 측정하였고 흡광도법(280 nm)(25)을 병행하였다.

전기영동

Laemmli(26)의 방법에 따라 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)를 12.5% gel에서 실시하였고 vertical slab gel electrophoresis apparatus(Hoeffer Scientific Co., U.S.A)를 이용하였다. gel염색은 0.25% Coomassie blue R-250으로 하였다.

Gel filtration 및 탄수화물 함량 측정

Native 효소 단백질의 분자량은 β-amylase (200 KDa), alcohol dehydrogenase (150 KDa), bovine serum albumin (66 KDa), ovalbumin (45 KDa), carbonic anhydrase (29 KDa)를 표준단백질로 하여 HPLC gel filtration column에서 Cho 등(27)의 방법에 따라 효소의 용출비로 측정하였다. 탄수화물의 함량은 Dubois 등(28)의 방법에 따라 정제한 효소단백질 100 μg이 함유된 시료 1 ml에 5% phenol용액 1 ml를 혼합한 후 황산 5 ml를 신속히 첨가하고 10분 후 490 nm에서 hexose양을 측

정하여 탄수화물 함량을 %로 표시하였다.

최적 pH 및 pH 안정성

효소의 최적 pH를 조사하기 위해 pH 3에서 8까지 각각 제조된 완충용액에 효소를 가하고 50°C에서 30분간 기질과 반응시켜 활성도를 비교하였다. pH 3.0-6.0은 50 mM citrate-phosphate 완충용액을, 그리고 pH 5.0-8.0은 0.1 M sodium-phosphate 완충용액을 사용하였다. 각 pH에서 효소의 안정성을 조사하기 위해 위 완충용액 1 ml에 1 unit의 효소를 첨가하고 30°C에서 24시간 정치시킨 후 잔존 효소활성을 측정하였다.

최적 온도 및 열안정성

효소활성에 대한 온도의 영향을 조사하기 위해 0.1 M sodium-phosphate 완충용액(pH 6.5)에 효소와 기질을 첨가한 용액을 20-80°C 사이의 각 온도에서 30분간 반응시킨 후 효소활성을 측정하였으며 정제 효소의 열안정성은 0.1 M sodium-phosphate 완충용액 (pH 6.5) 1 ml에 1 unit의 효소를 첨가한 후 30-70°C 온도 범위에서 30분간 정치시키면서 5분간격으로 효소용액의 잔존활성을 측정하였다.

Km값과 Vmax값 측정

β-amylase의 기질로 soluble starch를 농도별(0.5-6 mg/ml)로 50°C에서 효소와 반응시킨 후 각 농도에서 생성된 환원당(maltose)의 양으로 효소활성을 측정하여 Lineweaver-Burk(29) plot에 의해 Michaelis상수(Km)와 최대반응속도(Vmax)를 계산하였다.

아미노산 조성 분석

정제된 효소의 아미노산 조성은 건조된 시료를 6N HCl로 110°C에서 24시간 처리하여 가수분해시키고 PITC(phenylisothiocyanate)유도체 처리과정을 거친 후 HPLC Pico-Tag column(3.9×150 mm)을 이용하여 분석하였다. Cysteine과 cystine은 performic oxidation reagent로 산화시켜 cysteic acid로 측정하였다.

가수분해 산물의 thin layer chromatography(TLC)

Soluble starch, pullulan, Sharding dextrin(α-cyclodextrin, cyclo-G₆), maltose(G₂)-maltoheptaose(G₇)을 0.5%가 되도록 0.1 M sodium-phosphate 완충용액 (pH 6.5)에 현탁시킨 기질용액 1 ml에 정제한 효소 1 μg을 처리하여 50°C에서 30분간 반응시킨 후 반응액을 Silica gel plate에 전개시켰으며 전개용매로서는 n-butanol:ethanol:water(5:3:2) 혼합액을 사용하였고 AgNO₃-NaOH용액을 분사하여 β-amylase가수분해 산물을 확인하였다.

결과 및 고찰

효소의 생산

*Saprolegnia ferax*를 1% soluble starch를 탄소원으로 하는 YNB 배지에서 예비실험을 통해 확인한 효소활성이 가장 높은 후기 대수기(7일)까지 배양한 결과, Fig. 1과 같이 최적배양온도는 25°C이었으며 최적배양 pH는 6.5~7.0이었다. 또한 배양상등액을 조효소로하여 soluble starch와 반응시켜 생성물을 thin layer chromatography로 확인해 본 결과, maltose가 주로 생성되었고 maltotriose와 반응시켰을 때 전혀 가수분해되지 않는 배양상등액중의 amylase는 주로 β -amylase이었다(data not shown). 여러 가지 탄소원이 amylase 생산에 미치는 효과를 보면(Table 1), starch와 amylopectin이 amylase 생산에 효과적이었다. 세균성 β -amylase 생산에는 starch와 거의 동일하게 maltose도 효과적인 inducer라는 보고가 있으나(12, 13), *S. ferax*에서는 자낭균 곰팡이 *Emmericella nidulans*(16)에서와 같이 maltose를 탄소원으로 했을 때는 glucose를 탄소원으로 했을 때와 유사하게 amylase 생산이 강하게 억제를 받았다.

효소의 정제

*S. ferax*의 배양상등액중 β -amylase를 ultrafiltration, HPLC-DEAE column 그리고 HPLC-gel filtration의 3단계를 통하여 정제하였고(Table 2) 이때 최종 효소단

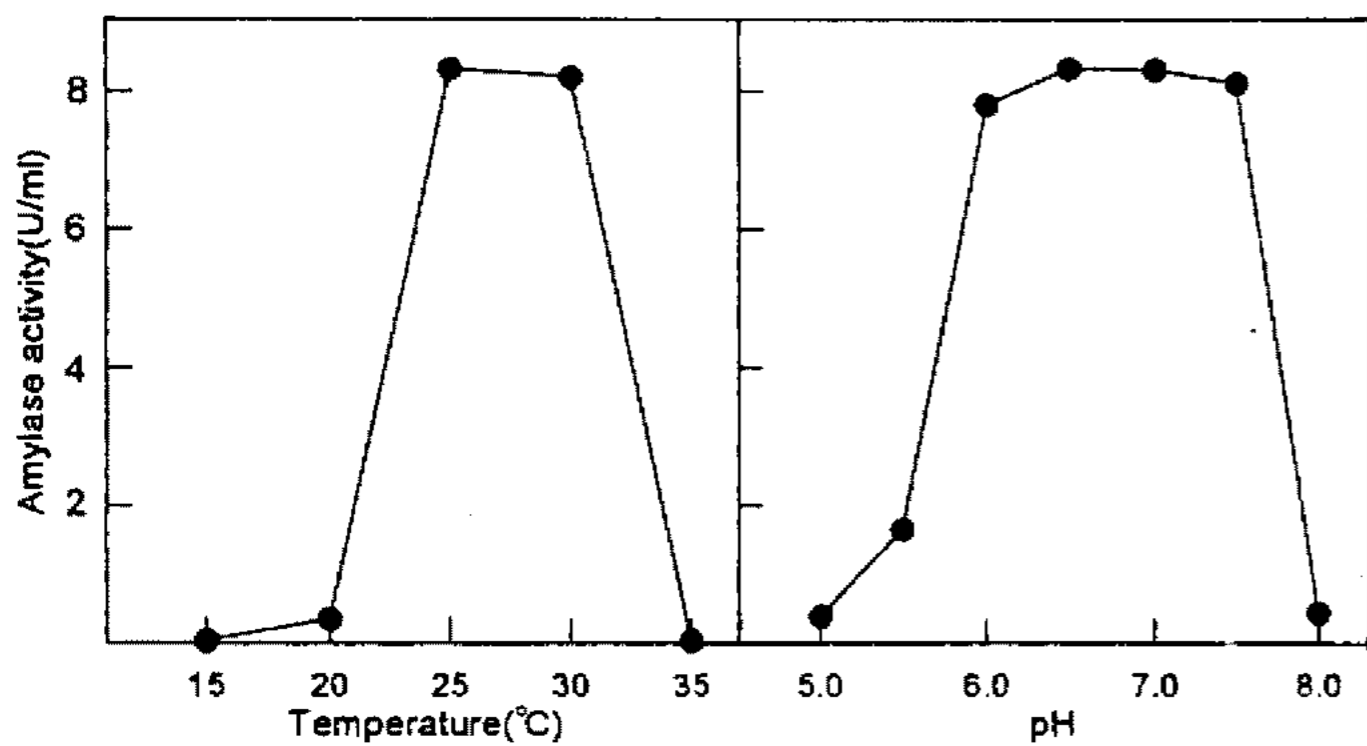


Fig. 1. Effect of cultural temperature and pH on amylase production of *Saprolegnia ferax*.
Culture conditions were described in Materials and Methods.

Table 1. Effect of carbon sources on the production of amylase by *S. ferax*

Carbon source	Amylase activity (Units/ml)
No addition	0
Soluble Starch	8.32
Amylopectin	8.15
Pullulan	5.90
Maltose	0.6
Glucose	0.03

백질의 회수율과 정제도는 각각 35.4%와 24.3배이었다. 정제된 효소의 분자량을 SDS-PAGE와 HPLC-gel filtration을 통해 측정해 본 결과, SDS-PAGE에서 측정된 분자량은 약 44 KDa이었고(Fig. 2.), gel filtration에 의하여 추정된 분자량의 크기는 약 37 KDa으로 단량체임을 알 수 있었다. 또한 정제된 효소는 탄수화물 함량이 약 9%인 당단백질이었다. 일반적으로 당단백질의 경우 SDS-PAGE에 의한 분자량 추정은 결합된 탄수화물에 의해 실제보다 큰 값을 보이므로 실제 단량체 분자량과 차이가 있는 것으로 사료된다. 본 효소의 분자량의 크기는 *Bacillus cereus*(3)의 β -amylase (35 KDa)를 제외하고는 대부분 세균의 β -amylases (51~68 KDa) (4, 6, 7, 8, 10, 14)와 곰팡이 *Hendersonula toruloidea*(18)의 β -amylase (60 KDa)에 비해 작았다.

효소의 특성

정제된 *S. ferax* β -amylase의 효소 활성에 대한 최적 pH는 6.5이었는데, 이는 자낭균류 *Emmericella nidulans* (16) β -amylase의 pH 7.0~7.5보다는 약간 낮았고 불완

Table 2. Purification scheme of β -amylase from *S. ferax*

Purification step	Total activity (Units)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Purification (fold)	Yield (%)
Culture filtrate	32,884	474	69.4	1.0	100
Ultrafiltration	25,059	85.4	293.4	4.2	76.2
HPLC DEAE-SPW	22,201	16.7	1,329.3	19.2	67.5
HPLC gel filtration	11,655	6.9	1,689.1	24.3	35.4

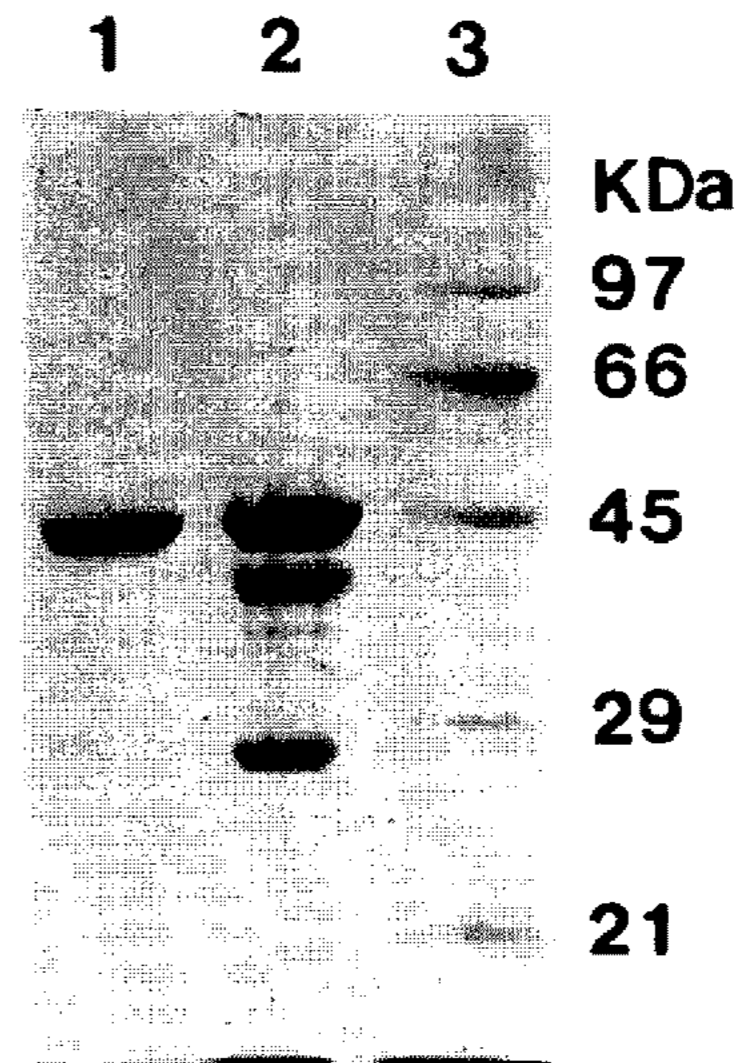


Fig. 2. SDS-PAGE of β -amylase from *S. ferax*.
Lanes: 1. purified enzyme, 2. crude enzyme, 3. molecular size markers.

Table 3. Amino acid composition of β -amylase from *S. ferax*

Amino acids	Molar ratio (%)
Asx	14.5
Glx	7.1
Cys	2.1
Met	0.6
Ser	7.7
Thr	7.4
Arg	3.8
His	1.7
Lys	5.2
Ala	13.9
Gly	10.2
Ile	3.2
Leu	9.4
Pro	4.0
Val	6.8
Phe	2.0
Trp	0.3
Tyr	0.1

전균류 *Hendersonula toruloidea*(18), 효모 *Phaffia rhodozyma*와 *Brettanomyces naardensis*(19, 20)에서의 β -amylase 최적 pH인 5.0~6.0보다 높았다. 한편, pH 4.0~8.0범위에서 효소의 활성이 80%이상 유지되었는데, 이는 식물성 β -amylases(7)와 타 곰팡이 β -amylases(16, 18)의 pH안정성과 유사하였고 산성 pH에서 불안정한 세균류 β -amylases(4, 7)와는 차이가 있었다. 효소 활성의 최적 온도는 50°C이었고, 50°C까지 안정성을 유지하지만 55°C이상에서는 30분 동안에 효소 활성이 점차 감소하였고 70°C에서는 5분 안에 활성을 완전히 상실하였는데, 이와 같은 결과는 *P. rhodozyma*와 *B. naardensis*(19, 20) β -amylase에서도 유사하였으나, *H. toruloidea*(18)의 β -amylase 경우 60°C가 최적 온도이었고 70°C에서 30분간 처리했을 때 잔존 활성이 74%라고 보고된 바 있다. 한편, 세균류 β -amylases(4, 6, 12)에서도 *B. polymyxa*(7, 10) β -amylases (최적 온도, 37~45°C; 열안정성 범위, 40°C이하)를 제외하고는 대부분 본 효소보다 최적 온도 및 열안정성이 유사하거나 높았다. 그리고 효소의 전분에 대한 Km값과 Vmax값은 각각 0.77 mg/ml와 2,174 μ moles/mg protein이었는데 Odibo 등(18)이 *H. toruloidea* β -amylase로부터 얻었던 Km값 0.3 mg/ml보다는 높았지만 세균 *B. circulans*와 *C. thermosulfurogenes*(4, 14) β -amylases의 Km값인 0.93 mg/ml와 1.68 mg/ml보다 낮았다. 정제한 효소의 아미노산 조성을 분석한 결과(Table 3), 소수성 아미노산이 49.9%를 차지하였으며 이 중 alanine, glycine 및 leucine이 높은 비율로 존재하였고 친수성 아미노산으로 asx가 많음을 알 수 있었다. 이는 *B. polymyxa*(30)의 β -amylase 아미노산 조성과의 유사하였으나 열안정성에 기여한다고 알

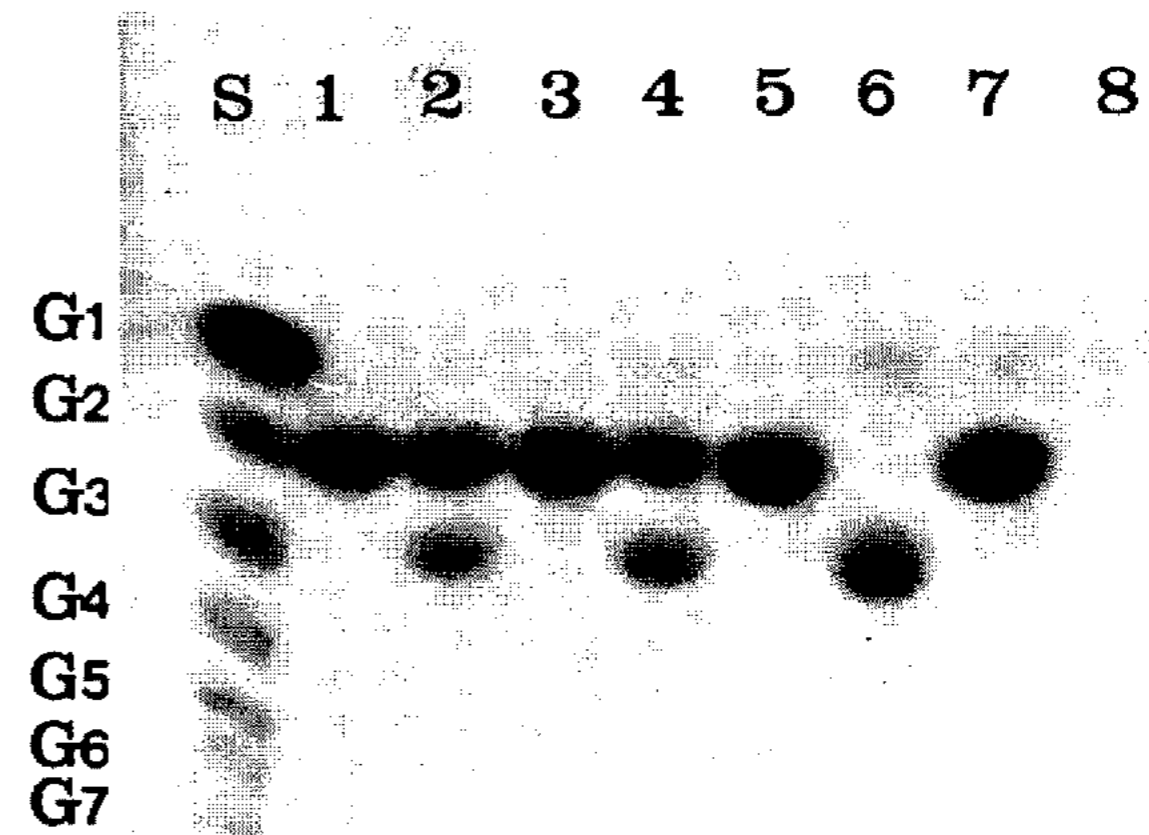


Fig. 3. Thin layer chromatography of soluble starch and oligosaccharides hydrolysing products by β -amylase from *S. ferax*.

Experimental details were described in Materials and Methods. Lanes: S, standard oligosaccharides (G_1 , glucose; G_2 , maltose; G_3 , maltotriose; G_4 , maltotetraose; G_5 , maltopentaose; G_6 , maltohexaose; G_7 , maltoheptaose); 1, enzyme plus soluble starch; 2, enzyme plus G_7 ; 3, enzyme plus G_6 ; 4, enzyme plus G_5 ; 5, enzyme plus G_4 ; 6, enzyme plus G_3 ; 7, enzyme plus G_2 ; 8, enzyme plus Schardinger dextrin (α -cyclodextrin).

려진 cysteine 함량은 본 효소가 높았다.

가수분해 산물 분석

정제된 효소는 starch와 maltotetraose (G_4)를 가수분해시켜 maltose (G_2)를 생성하였고 maltose, maltotriose (G_3), pullulan, Schardinger dextrin (α -cyclodextrin, Cyclo- G_6)는 가수분해하지 못했다(Fig. 3). 이러한 특성은 *B. polymyxa*와 *B. cereus*(3, 7)의 β -amylases에서 보고된 바와 일치하였으며, α -cyclodextrin을 가수분해할 수 있는 α -amylase와 달리 본 효소는 이를 가수분해할 수 없으므로 β -amylase임을 알 수 있었다(31).

효소활성에 미치는 이온 및 화합물의 영향

효소액에 각종 이온 및 화합물을 넣어 1 mM로 조절하고 50°C에서 30분간 처리하여 잔존활성을 측정된 결과는, Table 4와 같이 Cu^{2+} 와 Hg^{2+} 이온 그리고 PCMB 처리시에 강하게 저해를 받았고 Schardinger dextrin 처리시에도 저해를 받았다. 한편, mercaptoethanol, dithiothreitol 그리고 cysteine을 첨가하면 활성이 촉진되었다. 이와 같은 결과는 PCMB의 영향을 받지 않는 일부 α -amylases(32)와는 달리 본 효소의 활성은 식물성 β -amylases(2)와 세균 β -amylases(3, 6, 14)와 같이 PCMB에 의해 억제 받았고, Schardinger dextrins의 영향을

Table 4. Effect of chemicals on β -amylase activity

Chemical ^a	Relative activity (%)
none	100
EDTA	102
MgCl ₂	106
CaCl ₂	80
CuCl ₂	29
HgCl ₂	3
p-chloromercuribenzoate	9
Schardinger dextrin	85
10 mM Schardinger dextrin	27
p-chloromercuribenzoate+mercaptoethanol	128
p-chloromercuribenzoate+cysteine	141
Iodoacetamide	103
Dithiothreitol	132
Mercaptoethanol	130
Cysteine	141

^aEach compound was tested at 1mM final concentration.

받지 않는 *B. megaterium*의 β -amylase(9)를 제외한 대부분의 β -amylases(3, 7, 14)와 같이 Schardinger dextrins에 의해 저해를 받았다. 한편, mercaptoethanol과 cysteine 등에 의해서는 활성이 촉진되어(3, 6, 7) 본 효소가 β -amylase임이 확인되었다. 현재 β -amylase 생산 능이 보다 우수한 *Saprolegnia* 균주를 선별하고 있으며 β -amylase유전자 구조 및 특성을 파악하기 위해 NH₂-말단 아미노산 서열부위와 타 β -amylase유전자들의 보존 부위를 이용하여 유전자 cloning을 시도하고 있는 중이다.

요 약

난균류 *Saprolegnia ferax*는 균체의 β -amylase를 생산한다. 최대 효소생산은 YNB starch배지(pH 6.5)에서 25°C로 7일간 배양하여 얻어졌다. Ultrafiltration, HPLC DEAE column chromatography 및 HPLC gel filtration에 의하여 효소는 24배 정제되었다. 정제된 효소의 분자량은 약 44,000 dalton인 glycoprotein이었고 단량체이었다. 효소의 최적 pH와 최적 온도는 각각 6.5와 50°C이었으며 50°C까지 온도안정성을 유지하였고 산성 pH 범위(pH 4.0-7.0)에서 pH안정성을 유지하였다. Starch에 대한 Km값과 Vmax값은 각각 0.77 mg/ml, 2,174 μ moles/mg protein이었다. 아미노산 조성 분석 결과 이 효소에는 alanine, glycine, leucine 그리고 asx가 많음을 알 수 있었다. 정제된 효소로 starch를 가수분해하면 glucose가 아닌 maltose가 주로 생성되었고 maltotriose, Schardinger dextrin(α -cyclodextrin)과 pullulan은 가수분해되지 않았다. 또한 이 효소의 활성은 Schardinger dextrin, p-chloromercuribenzoate, Cu²⁺와

Hg²⁺ 등에 의해 억제되었다.

감사의 말

이 논문은 1995년도 전남대학교 학술연구비 지원에 의하여 연구수행되었습니다.

참고문헌

- Aunstrup, K. 1979. Production, isolation and economics of extracellular enzymes, Pp. 27-29. In L. B. Wingard, Jr., E. Katchalski-Katzir, and L. Goldstein (ed.), *Applied biochemistry and bioengineering*, Vol. 2. Enzyme technology. Academic Press, Inc., New York.
- Fogarty, W. M. and C. T. Kelly. 1980. Amylases, amyloglucosidases and related glucanase, Pp. 115-169. In A. H. Rose (ed.), *Microbial enzymes and bioconversions*. Academic Press, Inc., New York.
- Takasaki, Y. 1976. Purifications and enzymatic properties of β -amylase and pullulanase from *Bacillus cereus* var. *mycoides*. *Agr. Biol. Chem.* **40**: 1523-1530.
- Kwan, H. S., K. H. So, K. Y. Chan, and S. C. Cheng. 1994. Purification and properties of beta-amylase from *Bacillus circulans* S 31. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **10**: 597-598.
- Higashihara, M. and S. Okada. 1974. Studies on β -amylase of *Bacillus megaterium* strain No. 32. *Agr. Biol. Chem.* **38**: 1023-1029.
- Takasaki, Y. 1989. Novel maltose-producing amylase from *Bacillus megaterium* G-2. *Agr. Biol. Chem.* **53**: 341-347.
- Fogarty, W. M. and P. J. Griffin. 1975. Purification and properties of β -amylase produced by *Bacillus polymyxa*. *J. Appl. Chem. Biotechnol.* **25**: 229-238.
- Friedberg, F. and C. Rhodes. 1986. Cloning and Characterization of the beta-amylase gene from *Bacillus polymyxa*. *J. Bacteriol.* **165**: 819-824.
- Ray, R. R., S. C. Jana, and G. Nada. 1994. Beta-amylase from *Bacillus megaterium*. *Folia Microbiol.* **39**: 567-570.
- Sohn, C. B., S. M. Lee, M. H. Kim, J. H. Ko, K. S. Kim, J. E. Chang, Y. K. Ahn, and C. H. Kim. 1996. Purification and characterization of beta-amylase from *Bacillus polymyxa* No. 26-1. *J. Food Sci.* **61**: 230-234.
- Srivastava, R. A. K. 1987. Purification and chemical characterization of thermostable amylases produced by *Bacillus stearothermophilus*. *Enzyme Microb. Technol.* **9**: 749-754.
- Swamy, M. W., M. S. Ram, and G. Seenayya. 1994. Beta-amylase from *Clostridium thermocellum* SS8—a thermophilic, anaerobic, cellulolytic bacterium. *Lett. Appl. Microbiol.* **18**: 301-304.
- Hyun, H. H. and J. G. Zeikus. 1985. Regulation and genetic enrichment of β -amylase production in *Clostridium thermosulfurogenes*. *J. Bacteriol.* **164**: 1162-1170.
- Shen G. J., B. C. Saha, Y. E. Lee, L. Bhatnagar, and J.

- G. Zeikus. 1988. Purification and characterization of a novel thermostable beta-amylase from *Clostridium thermosulfurogenes*. *Biochem. J.* **254**: 835-840.
15. Bayindirli, A., M. Ozilgen, and S. Ungan. 1991. Kinetic analysis of *Aspergillus oryzae* cultivations on starch. *Bio-catalysis* **5**: 71-78.
 16. Chatterjee, B. and A. Das. 1988. Beta-amylolytic activity of *Emericella nidulans*. *Biotechnol. Lett.* **10**: 143-147.
 17. Chatterjee, B., A. Ghosh, and A. Das. 1992. Starch digestion and absorption by beta-amylase of *Emericella nidulans*(*Aspergillus nidulans*). *J. Appl. Bacteriol.* **72**: 208-213.
 18. Odibo, F. J. C., N. Okafor, M. U. Tom, C. A. Oyeka. 1992. Purification and characterization of a beta-amylase of *Hendersonula toruloidea*. *Starch.* **44**: 228-233.
 19. Gautam, S. P., A. Gupta, S. K. Hasija, and S. Kekre. 1991. Production and properties of alpha-and beta-amylases from *phaffia rhodozyma* and *Brettanomyces naardensis*. *Indian J. Microbiol.* **31**: 431-434.
 20. Kekre, S., A., Gupta, S. P. Gautam, and S. K. Hasija. 1991. Studies on alpha and β -amylases produced by *Brettanomyces naardensis* and *Phaffia rhodozyma*. *Yeast Mol. Biol. Biotechnol.* **341**: 445-449.
 21. Dick, M. W. 1990. Oomycota Pp. 661-685. In: *Handbook of protocista*. Eds. L. Margulis, J. O. Corliss, M. Melkonian, and D. J. Chapman. Jones and Bartlett, Boston.
 22. Bernfeld, P. 1955. Amylases, α and β . *Methods Enzymol.* **1** : 149-154.
 23. Somogyi, M. 1952. Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.* **195**: 19-23.
 24. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein estimation with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
 25. Wetlaufer, D. R. 1962. Ultraviolet spectra of proteins and amino acids. *Adv. Prot. Chem.* **17**: 303-390.
 26. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural properties during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* (London) **227**: 680-685.
 27. Cho, N. C., K. H. Kim, S. B. Chun, and K. C. Chung. 1990. Effect of cellobiose octaacetate, avicel and KC-flock on production of avicelase from *Penicillium veruculosum*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech.* **18**: 383-389.
 28. Dubois, M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, and F. Smith, 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* **28**: 350-356.
 29. Lineweaver, H., and D. Burk. 1934. The determination of enzyme dissociation constants. *J. Am. Chem. Soc.* **56**: 658-666.
 30. Kitamoto, N., H. Yamagata, T. Kato, N. Tsukagoshi, and S. Uda. 1988. Cloning and sequencing of the gene encoding thermophilic β -amylase of *Clostridium thermosulfurogenes*. *J. Bacteriol.* **170**: 5848-5854.
 31. Abdullah, M., D. French, and J. F. Robyt. 1966. Multiple attack by α -amylases. *Arch. Biochem. Biophys.* **114**: 595-598.
 32. Somkuti, G. A., and D. H. Steinberg. 1980. Thermoacidophilic extracellular α -amylase of *Mucor pusillus*. *Developments in Industrial Microbiology.* **21**: 327-337.

(Received 28 October 1996)