

## Amylase 生成細菌에 관한 研究 (第 1 報) Amylase 生成細菌의 分離와 그 培養條件에 對하여

李 錫 健 · 李 漢 昌

(샘표醬油釀造場 研究室)

### Studies on the Amylase Producing Bacteria. (Part I) Isolation of a High Amylase Producing Strain and its Cultural Conditions.

Lee, Suk Kun and Lee, Han Chang.

(Laboratory, Saim Pyo Soy Brewery Co.)

(1964. 10. 7. 受理)

#### Summary

- ① Three hundred and twenty four strains of amylase producing bacteria were isolated from various sources and a high amylase producing new strain, which was isolated from MEJU, M-181, was selected for further investigations.
- ② The new strain M-181 was similar to *Bacillus subtilis* in the characteristics.
- ③ Wheat bran medium was the best one for production of amylase so far as the investigations had been done. The amylase activity of M-181 was measured D  $40^{\circ}_{30}$ , 25,000 to 26,800 on the medium of wheat bran.
- ④ The strain M-181 did not demand phosphate for production of amylase.

#### 緒 論

今世紀初에 出現된 細菌 amylase 는 주로 織物의 糊拔劑로서 利用되어 왔으며 1959 年 日本에서 酵素糖化法으로 結晶葡萄糖을 製造하게 된 以來 澱粉의 液化劑로서 澱粉糖製造工業 및 釀造工業 其他 澱粉加工工業에서 多量使用하게 되었다.

이 細菌 amylase 에 關하여는 19 世紀末 Wortmann 과 Bitter<sup>(1)</sup> 등이 澱粉을 分解하는 細菌이 있음을 밝힌 것을 비롯하여 1908 年 Boidin, Effront, Joucla 등은 細菌 amylase 의 工業的利用과 生産에 關한 特許를 얻었고, 1925 年 獨逸의 Kalle 商會에서 Biolase 라는 商品名으로 出品된 酵素劑가 市販되었다. 當時 그 製造過程을 秘密에 부쳐 왔으나 1935 年頃에 이르러 비로써 歐美에서는 Blom<sup>(2)</sup> 등의 研究에 依하여 細菌 amylase 의 起源과 性狀이 밝혀졌다. 1937 年 日本의 福本<sup>(3)</sup>는 그가 分離한 菌株을 *Bacillus amyloliquefaciens* nov. SP. Fukumoto 라 命名하였고, amylase 製造方法에 對한 特許를 얻은 바 있다. 皆川<sup>(4), (5)</sup>는 *B. Mesentericus* var. Minagawa의 培養에 對한 特許와 amylase 生産條件,

耐熱性 등에 對한 報告를 한바 있다. 1943 年 福本<sup>(6), (7)</sup>는 同菌株의 分離過程, 生理實驗, amylase 生産條件, 酵素的 性質 등에 對한 報告를 하였고 1953 年 福田<sup>(8), (9)</sup>는 草本植物에서 amylase 分泌菌을 分離하여 *B. subtilis* var. *amyloliquefaciens* 라 命名하여 amylase 生成에 關한 報告를 한바 있다. 1957 年 福本等<sup>(10), (11), (12)</sup>은 細菌 amylase 生産 機構에 對한 多數의 報告와 其外 여러 學者들의 研究發表로서 日本에서의 細菌 amylase 工業은 急進적으로 發展을 보게 되었던 것이다. 한편 우리나라에 있어서는 6.25 事變을 前後하여 비로써 美國의 lipase, necotase 와 獨逸의 biolase 등을 織物工業界에서 試用하게 된 것을 비롯하여 1959 年 以後 그 需要는 急増되어 1962 年度에 日本의 fukutase, spitase, biotex 등의 輸入量은 大略 200 噸에 達하였다고 한다. 아울러 近間 國內 各處에서 細菌 amylase 製造 工業을 서두르고 있는 바 이 細菌 amylase 에 關한 研究는 1963 年 金<sup>(13)</sup>이 amylase 生成菌의 分離와 그 菌學的 性質에 對한 報告가 있고 其外 여러 學者들이 研究를 繼續하고 있는 것으로 보인다. 筆者等은 現在 國內에서 時急히 要求되는 이 細菌 amylase

의 生産과 利用에 關한 研究에 着手하여 各種 自然 試料에서 amylase 生成菌株의 分離를 試圖한 結果 市販 메주로 부터 強力한 amylase를 分泌하는 有用菌 1株을 얻어 그 菌學的 性質에 對한 實驗과 아울러 amylase 生産을 爲한 培養條件에 對하여 實驗 하였으므로 그 結果를 報告하려는 바이다.

本 研究에 있어서 始終 激勵과 指導를 受하신 서울大學校農科大學 金浩植學長님과 忠南大學校農科大學 朴允仲教授님께 衷心으로 感謝드리며 또한 本 研究의 發表를 許容해주시신 샘포醬油釀造場 朴奎會社長님과 朴承東專務님께 謝意를 表하는 바이다.

## 實驗方法

### 使用培地

液體培地: (1) Nutrient broth; Bacto beef extract 1%, peptone 1%, NaCl 0.5%, pH 7.0.

(2) Glucose peptone water; glucose 0.5%, peptone 0.5%,  $K_2HPO_4$  0.5%, pH 7.0.

(3) Tryptophan peptone water; tryptophan 0.1%, peptone 1%, NaCl 0.5%, pH 7.0.

(4) Nitrate broth<sup>(14)</sup>;  $KNO_3$  0.1%, Bacto beef extract 0.3%, peptone 0.5%, pH 7.0.

(5) Carbohydrate broth; Nutrient broth에 各種 糖類를 各其 1%, pH 7.0.

(6) Litmus milk media; 新鮮한 脫脂乳에 litmus 液數滴을 加하고 3回 間歇殺菌.

(7) Soy bean and starch media; 7%의 大豆粕을 0.2% NaOH 溶液으로 1時間 boiling 抽出한 것에 soluble starch 3%,  $(NH_4)_2HPO_4$  1.2%, KCl 0.02%,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.01%, pH 7.0.

(8) Sodium chloride broth; nutrient broth에 NaCl을 各種 濃度로 添加.

固體培地: (1) Nutrient agar; nutrient broth에 agar 2.5%.

(2) Starch nutrient agar; nutrient agar에 corn starch 2~3%.

(3) Glucose nutrient agar; nutrient agar에 glucose에 1%.

(4) Nutrient gelatin; nutrient broth에 gelatin 20%.

(5) Glucose nitrate agar; glucose nutrient agar에  $KNO_3$  0.1%.

(6) Glucose asparagin agar; glucose 1%, asparagin 0.3%, agar 2.5%.

(7) Potato media; 水洗한 馬鈴薯의 눈을 베어낸 다음 0.1%  $HgCl_2$ 에 60分間 浸漬한 後 水洗 脫皮 다시 水洗하여 3回 間歇殺菌함.

(8) Soy bean extract agar; 大豆 50g에 물 1l를 加하여 1時間 boiling 抽出液에 agar 2.5%, pH 7.0.

(9) Lead acetate media; nutrient agar에 lead acetate 0.05~0.1%.

(10) Wheat bran media; wheat bran에 170% 給水, 加壓殺菌함.

### 菌株의 分離

大豆粕, 누룩, 메주, 土壤, 空氣, 乾草 등을 試料로 하여 starch nutrient agar를 利用하여 平板法으로 37°C, 48時間 培養後 colony 周圍에 澱粉分解 環을 만드는 菌株 324株을 分離하고 이들이 分泌하는 amylase의 activity를 調査하여 가장 強力한 菌株 M-181을 選擇하였다.

### 選擇된 菌株의 菌學的 實驗

菌體는 nutrient broth에 37°C, 24時間 培養한 것을 檢鏡하였으며, 運動性은 寒天 0.5% 含有한 半流動性培地에 穿刺培養하여 觀察하였다. 死滅溫度에 對한 試驗은 試驗管에 nutrient broth 5cc씩 分注하여 殺菌한 것에 1白金耳씩 接種하여 各各의 溫度로 10分間 加熱한 것에서의 生育與否를 觀察하였다. 25°C에서 nutrient gelatin培地에 穿刺培養하여 液化與否를 觀察하였으며 litmus milk media에 培養하여 peptone 化與否를 觀察하였다. katalase는 3%의 過酸化水素水로 檢出하였으며 urease는 1% urea solution에서의 ammonia 生成與否를 試驗하였다. ammonia의 檢出은 Nessler 試藥 1cc를 加하여 變色度를 觀察하였고 tryptophan peptone water에 一週間培養한 可檢液 5cc에 5% vanilin ethyl alcohol 5滴과 濃鹽酸 2cc를 加하여 indol의 生成 與否를 檢出하였다.  $H_2S$ 의 檢出은 lead acetate media에 穿刺培養하여 培地の 黑變與否를 觀察하였고, 硝酸鹽의 還元性은 nitrate broth media에 培養한 것을 可檢液으로 하여 沃素澱粉生成法으로 亞硝酸의 有無를 確認하였다. acetyl methyl carbinol 檢出은 glucose peptone water에 3日間 培養하여 Voges-Prospauer 反應으로 試驗하였다. carbohydrate로부터의 生酸性은 carbohydrate broth에 48時間 培養하여 B.T.B.로 pH의 變化를 調査하였다. 이 試驗에 있어서는 糖類에 따라 加壓殺菌後에 pH의 變化가 있었으므로 殺菌後 pH를 7.0로 調節하였

다. 培養의 性質에 對한 試驗은 各種 media 에 接種하여 37°C 로 48 時間 培養後에 그 狀態를 觀察하였다.

#### 培養과 酵素液의 調製

菌株의 選擇을 爲한 培養: Soy bean extract and starch media 를 300 cc 容 三角 flask 에 100 cc 식 分注하여 加壓殺菌한 것에 澱粉分解能에 있는 菌들을 各各 接種하여 37°C 로 72 時間 靜置培養하였다.

前培養: 保存된 strain 에서 nutrient broth 5 cc 에 37°C 로 一次 12 時間 振盪(振幅 8 cm, 115 r.p.m.) 培養하여 菌의 休眠으로 부터 一段 活力을 賦與한 다음 이것을 다시 nutrient broth 500 cc 를 담은 1 l 容 flask 에 注入接種하여 2 時間 振盪培養하였다.

本培養: wheat bran media 를 500 cc 容 三角 flask 에 40 g 식 담아 加壓殺菌한 것에 前培養液 0.25 cc 로 接種하여 37°C 로 48 時間 培養하였다.

酵素液: 菌株의 選擇에 있어서는 便宜上 72 時間 靜置培養한 濾液을 酵素原液으로 하였으며, 本培養後 風乾物은 0.1% NaCl 溶液 20 倍量으로 室溫에

서 3 時間 浸出한 濾液을 酵素 20 倍 稀釋液으로 하였다.

#### Amylase activity 測定

Wohlgemuth 法으로 amylase 의 activity 를 測定하였다. 卽 酵素原液 1 cc 또는 乾物 1 g 에 依하여 Kolthoff Buffer 6.0, 作用溫度 40°C, 作用時間 30 分間에 있어서 液化되는 1% soluble starch solution 의 液量(cc 數)으로 表示하였다.

$$D_{30'}^{40^\circ} = \frac{1\% \text{ starch solution의 cc 數}}{\text{所要酵素液의 cc 數}} \times \text{酵素液의 稀釋率}$$

比色의 基準 e 으로는 0.05% 의 dextrin solution 5 cc 에 N/100 I<sub>2</sub> 溶液 0.5 cc 를 加하여 나타나는 赤色을 標準色度로하였다.

#### 實驗 結果

##### 分離菌의 菌學的 性質

形態의 性質: (1) 形態: Rods, 0.8~0.9×2.6~4.0μ 대부분 3~5 의 chain 을 이루고 있으며 兩端은 圓形

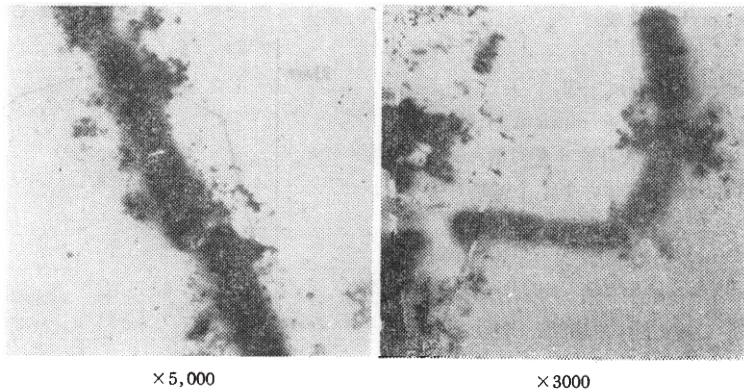


Fig. 1. The Electron Microscopic Photograph of M-181.

(2) Motility; motile.

(3) Gram stain; positive.

生理的 性質: (1) Relation with free oxygen; aerobic.

(2) Temperature relations; 最適溫度. 37~38°C, 100°C 로 10 分間 加熱해도 生存.

(3) Optimum pH; 6.8~7.0.

(4) Liquefaction of gelatin; positive.

(5) Hydrolysis of starch; wheat bran media 에 培養한 것의 amylase activity 는  $D_{30'}^{40^\circ}$  25,000~26,800.

(6) Litmus milk medium; peptonized.

(7) Reduction of litmus; positive.

(8) Katalase; positive.

(9) Urease; negative.

(10) Ammonia; produced.

(11) Indol; negative.

(12) Hydrogen sulfide; negative.

(13) Nitrite from nitrate positive.

(14) Acetyl methyl carbinol; positive.

(15) 各種炭水化合物에서의 生酸性; glucose, fructose, sucrose, mannitol, sorbit, glycerin 에서는 生酸하였으며, maltose, lactose, xylose, galactose, dextrin, alcohol, starch 等에서는 生酸하지 않았다.

培養의 性質: (1) Nutrient agar slant; growth abundant, rough, dry, opaque, dull, white to yellow, spreading, variations; smooth, slim and thin.

(2) Starch nutrient agar slant; nutrient agar 에 서와 거의 비슷하며 투명한 zone 을 만들고 色素는 生成되지 않았다.

(3) Glucose nutrient agar slant; growth heavier, softer than on nutrient agar, wrinkled.

(4) Soy been extract agar slant; growth more abundant, softer than on nutrient agar forming pigment.

(5) Potato; growth heavy, wrinkled, offwhite to yellow, concave.

(6) Nutrient agar stab; 上部에서만 生育.

(7) Nutrient gelatin stab; liquefy.

(8) Glucose nitrate agar slant; growth.

(9) Glucose asparagin agar slant; growth abundant.

(10) Nutrient broth; pellicle formed, wrinkled, clear.

(11) Sodium chloride broth; growth.

#### 培養條件과 amylase 生成

##### 前培養條件

##### (1) 前培養 age 와 amylase 生成

一次 12 時間 前培養한 것을 nutrient broth 500cc 에 注入 接種하여 振盪 培養하면서 經時的으로 0.25 cc 를 取하여 wheat bran media 40g 에 接種하여 48 時間 本培養을 한 結果 amylase 의 力價는 Fig. 2 와 같다. 即 2 次 前培養에 있어서 2 時間 經過後에 接種한 것이 amylase 의 生成能이 가장 크며, 以後 絲體數는 增加하나 amylase 生成能은 減少하였다.

前培養의 age 를 달리하여 接種한 本培養物을 經

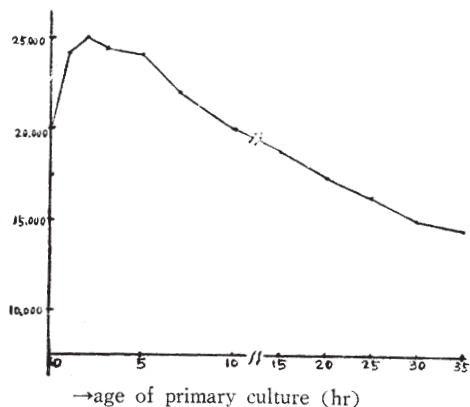


Fig 2. Effect of age of primary cultures on the amylase Formation (pH 7.0, 37°C)

時的으로 取하여 amylase 力價를 測定해 본 結果 (table 1)에 있어서도 2 時間 동안 2 次 前培養한 것이 가장 良好하였으며 100% 給水 wheat bran media 에 2 次前培養한 것을 70% 追加하여 培養한 結果 亦是 2 時間 培養한 것이 그 力價가 가장 높았

Table 1. The relationships between the age of culture and amylase formation

Cultural period Primary culture	Wheatbran media Cultural period (hr)					
	24	32	40	48	56	64
2	12,500	18,830	24,800	25,000	18,830	17,300
5	10,000	17,300	22,600	20,500	17,300	16,000
20	8,900	16,000	18,830	18,830	17,300	16,000

다, 接種量은 0.1~1.0 cc 에 이르기까지 各各 달리 接種하였을 때도 amylase 生成에는 別다른 差異가 없었다.

##### (2) 前培養의 initial pH 와의 關係

前培養하는 nutrient broth 의 initial pH 를 HCl 과 NaOH 로 各各 다르게 調節하여 2 時間 동안 前培養한 것을 本培地에 接種한 結果는 Fig. 4. 와 같다.

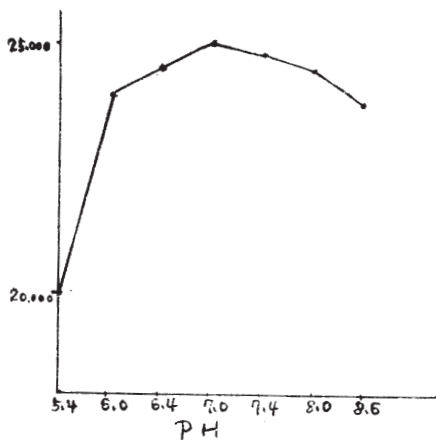


Fig 3. Influence of initial pH in primary culture (at 37°C)

即 initial pH 7.0 로 前培養한 것이 가장 良好하였으며 alkali 側에서 보다 酸性側에서 그 影響은 더욱 顯著하였다.

##### 本培養條件

##### (1) 培養溫度와 培養時間과의 關係

培養溫度에 따라 發育速度的 差를 볼수 있었으므로 培養溫度와 amylase 生成과의 關係를 알아보기 위하여 培養溫度를 30°C 로 부터 45°C 에 이르기까지 各各 달리하여 培養하면서 經時的으로 amylase



生成량이 最高에 達하는 時間을 調査하였다. 그 結果는 Table 2와 같다. 即 amylase 生産의 最高條件은 37°C로 48時間임을 알 수 있었다.

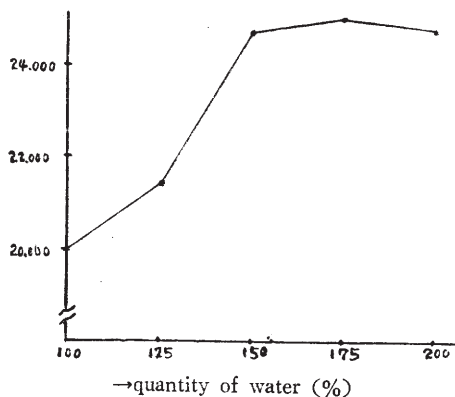
**Table 2.** The relationships between cultural temperature and period.

Cultural temperature (°C)	Cultural period (hr)			
	24	48	72	96
30	3,200	8,000	16,670	20,000
33	5,000	12,500	20,000	12,500
35	7,670	16,670	16,000	11,300
37	9,670	25,000	14,000	10,670
40	10,830	16,000	12,500	8,000
45	12,500	5,000	1,670	800

培養溫度가 높음에 따라 培養初期에 培養이 빠르며 amylase 生成도 빠르나 時間이 經過함에 따라 生成된 amylase의 activity는 急激히 떨어지며 反面培養溫度가 낮을 때는 發育과 amylase 生成이 遲延되어 工業的 操作의 境遇 時間的損失을 보게 될 것이다.

#### (2) 培地の選擇과 處理

小麥麩, 米糠, 大豆粕, 옥수수 等 數種의 原料로 培地를 만들어 amylase 生成效果를 檢討해 본 結果 M-181 菌의 培養에는 小麥麩의 培地에서 가장 좋은 結果를 보였다. 小麥麩에 各種의 原料를 各各의 比率로 混合하였을 때 小麥麩單獨으로 培養하였을 때 보다 amylase 生成이 低下하였으며 大豆粕 alkali 浸出液을 添加한 境遇에도 亦是 不良하였다. 왕겨는 10%, 脫鹽간장粕은 20%까지 添加해도 無妨하였으나 本菌의 培養物은 0.5% 添加에서도 阻害하였으며 野生 청국장 菌類緣菌(100°C로 30分間 加



**Fig. 4.** The relationships between amylase activity and quantity of H<sub>2</sub>O in the medium of wheat bran.

熱한 버짐에서 分離한 樣소 N-1 號菌)을 大豆粕에 培養하여 蒸溜水 또는 alkali 液으로 抽出한 것을 添加했을 때 別般效果를 認定할 수 없었다.

小麥麩에 給水하는 量은 170% 前後가 가장 좋았다.

#### (3) 無機鹽類의 添加影響

各種無機鹽類를 5 mg% 添加한 培地에 本培養하여 amylase activity를 調査한 結果는 다음과 같다.

**Table 3.** The influence of inorganic salts in the media for amylase activity. (added 5 mg%)

salts	amylase activity (D <sub>40°</sub> <sup>30'</sup> )
Control	25,000
Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> ·9H <sub>2</sub> O	22,600
ZnCl <sub>2</sub>	22,600
AlCl <sub>3</sub>	25,000
Pb(C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> ·3H <sub>2</sub> O	17,900
NaCl	25,000
KCl	25,000
MnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	23,800
MgSO <sub>4</sub>	25,000
BaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	25,000
CO(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	20,600
SrCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	25,000
CaCO <sub>3</sub>	25,000

Lead acetate는 微量添加에서도 顯著하게 阻害하였으며 AlCl<sub>3</sub>와 MgSO<sub>4</sub> 등은 微量일 때 別影響이 없었고 KCl과 NaCl 등은 1% 까지 影響이 없었으나 그 以上일 때 生育과 酵素力價가 低下되었다. BaCl<sub>2</sub>는 0.1%에서 阻害하였으며 CO(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O는 0.85% 添加했을 때 全혀 培養이 되지 않았다. SrCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O는 2%에서 CaCO<sub>3</sub>는 5%에서도 酵素生産에 阻害를 주지 않았다.

磷酸鹽으로는 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>와 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>를 各各 또는 混合添加했을 때 別로 效果가 없었다.

#### 考 察

選擇된 M-181 菌株의 菌學的 性質을 Bergey's manual<sup>(15)</sup>에 따라 살펴보면 澱粉分解能에 있는 *B. macerans*와 *B. firmus*와는 potato에 잘 生育하는點과 acetyl-methyl-carbinol을 生成하는點等 相異하며 *B. coagulans*와 *B. polymyxa*와는 7% NaCl을 含有하는 broth에서 生育하는點과 lactose에서 生酸하지 않는點等이 相異하였으나 *B. subtilis*에 類似한點이 많았다.

그리고 既往에 強力한 amylase를 生産하는 菌으

로 報告된 *B. amyloliquefaciens* Fukumoto 와 *B. subtilis* var. *bioticus* Nagase 와는  $H_2S$  를 生成하지 않는 點 등이 다르며 福田<sup>(8)</sup>가 分離한 *B. subtilis* var. *amyloliquefaciens* 와는 maltose 와 galactose 에서 生酸하지 않으며 mannitol 에서 生酸하는 點等 生理的 性質의 差를 볼 수 있고 金<sup>(13)</sup>이 amylase 生成菌으로 分離한 4 strains 과는 starch 나 maltose 에서 生酸하지 않는 點 등이 다르다.

M-181 菌의 amylase 生産을 爲한 固體培養에 있어서 前培養條件으로는 2 次 前培養을 2 時間하여 本培地인 小麥麩培地に 接種한 것이 良好하였으며 前培養의 培地 pH 는 7.0 으로 할 것이 要求되었다. 本培養의 培地 initial pH 는 6.8 로 한 것이 良好하였으며 培養後期の pH 는 8.6~9.0 으로 變하였으나 小麥麩에 培養하였을 때 amylase 生成에는 別로 支障이 없었다. 그러나 液體培養에 依한 amylase 生成의 境遇에는 緩衝性有無에 따라 顯著한 差를 볼 수 있었다.

M-181 의 培養溫度는 37°C 가 最適이었으며 이 때 48 時間 後 amylase 生成은 最高에 達하였다.

## 概 要

市販 메주로 부터 強力한 amylase 를 分泌하는 菌株 M-181 을 分離하여 그 菌學的 性質과 固體培養에 있어서 amylase 生成條件을 檢討하였다.

그 結果는 다음과 같다.

(1) 選擇된 M-181 은 *B. subtilis* 와 類似하였다.

(2) Amylase 生産用 固體培地로는 小麥麩單用이 良好하였다.

(3) 小麥麩培地に 培養한 것의 amylase activity 는 Wohlgemuth 法으로 測定하여  $D_{30}^{40}$  25,000~26,800 이었다.

(4) 磷酸鹽의 添加를 必要로 하지 않았다.

## REFERENCE

1. 朝井勇直編; 微生物工業 p. 478 (1956)
2. 福本壽一郎, 山本武彦; 日農化誌 31 : A. (1957)
3. 福本壽一郎; 日本特許 120, 653 (1937)
4. 皆川豐作; 日農化誌 13 : 875 (1937)
5. 皆川豐作; 日本特許 129, 726 (1939)
6. 福本壽一郎; 日農化誌 19 : 487, 634, 689, 789, 853 (1943)
7. Ibid., 20 : 23, 121, 309 (1944)
8. 福田重夫; 日農化誌 27 : 745, 749 (1953)
9. Ibid., 32 : 86 (1958)
10. 福本壽一郎, 山本武彦, 鶴大典; 日農化誌 31 : 421, 425, 429, 506, 510, 545, 724, 727, 807 (1957)
11. Ibid., 33 : 1159 (1959)
12. Ibid., 34 : 474 (1960)
13. 金燦祚; 忠南大學校 論文集 第3輯 p. 439 (1963)
14. 飯塚廣, 瀬戸尙典; 醱酵協會誌 20 : VII—22 (1962)
15. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 7th. edition (1957)
16. L.D. Beckord, E. Kneen, and K.H. Lewis; Ind. Eng. Chem., 37 : 692 (1945)
17. L. Wallerstein : Ibid., 31 : 1218 (1939)