한국농화학회지 Vol. 18, No. 1, March 1975
J. Korean Agricultural Chemical Society

微生物 Inulase에 관한 硏究(第一報)

Inulase生產菌株의 分離와 酵素生產을 위한 培養條件의 檢討

金 奇 哲
忠北大學校 農化學科

(1975년 2월 20일 受理)

Studies on Microbial Inulase (Part I)

A Study on the Isolation of an Inulase Producing strain and the Optimum Cultural Conditions for the Enzyme Production

Ki Choul Kim
Dept. of Agricultural Chemistry, Chung Buk National University.

(Received, February 20, 1975)

SUMMARY

Penicillium sp I which produces a powerful hydrolysing enzyme was isolated from putrefid and dry Jerusalem artichoke medium. The strain was used to study on the optimum culture conditions for enzyme production. The results obtained are as follows:

1. *Penicillium sp* I was a vigorous strain to produce inulase.
2. The optimum culture conditions of the strain was examined in the Jerusalem artichoke extract medium and the synthetic medium.
3. Inulase productivity in the Jerusalem artichoke extract medium was higher than that of the synthetic medium.
4. The optimum culture period of the Jerusalem artichoke extract medium was four days, whereas that of the synthetic medium was five days.
5. The optimum temperature, pH and concentration in the Jerusalem artichoke extract medium were 30°C, 5.0 and 4.0% (W/V), respectively.
   Meanwhile, the optimum temperature, pH and concentration in the synthetic medium were 30~33°C, 5.0~6.0, and 1.0~1.5% (W/V), respectively.
6. Corn steep liquor, peptone, $(NH_4)_2HPO_4$, $NH_4H_2PO_4$, $(NH_4)_2SO_4$, etc. were favorable as nitrogen sources. Of these, especially, Corn steep liquor and peptone as organic nitrogen sources caused an increase in inulase production in the synthetic medium.
7. All sugars except for inulin have no effect upon the inulase production.
8. KCl, $MgSO_4$ and $FeSO_4$ were favourable mineral sources for inulase production.

本硏究遂行에 있어서 처음부터 끝까지 指導鞭達을 베풀어 주신 指導敎授李春寧博士任께 깊은 謝意를 表하는 바입니다.

緒　論

Inulase는 carbohydrase의 一種으로 Inulin을 加水分解하여 果糖을 生産하는 酵素이다.

主로 Inulase는 Inulin을 含有하고 있는 植物의 塊根(特히 發芽中의 돼지감자). 微生物. 無脊椎 動物中에 存在한다.[1,5,12,13,20,21,22,26,27,29,36,40] Inulin은 多糖類의 一種으로서 Dahlia, 돼지감자, Brussels chicory 其他의 菊花科 植物의 貯藏物質로서 地下莖 또는 塊根에 豐富하게 들어있다[3,6,19,34]. Inulase에 關해서는 Green[22] 이 其 存在를 認定한 以來 많은 報文이 發表되었다. Bourquelot[9] Dean[8]등은 *Asp. niger* 또는 *Pen. glaucum*의 兩種에서 Inulase를 認定하였으며 Schaffer[37]는 *Asp. oryzae, Asp. wentti, Asp. fumigatus, Asp. glaucus, Pen. luteum, Pen. rubrum, Pen. italicum*中에 存在함을 確認하였다.

또한 *P. Lindner*[33]는 *Rhi. japonicus*가 Inulin을 强力하게 醱酵한다고 하였고 武田[38]도 南洋產 *Rhizopus*屬中 Inulin을 醱酵하는 10餘種을 分離하였다. 其後 R. Dedonder[35] Pringshein[14] Pigman[40]등은 *Asp. niger*에 對하여 Adams[26] lindner[32] 朝井 本江[17], Biswas[28], Snyder[12]등은 酵母에 對하여 硏究報告하였다. 絲狀菌에 對해서는 Baurquelot[9] H. Pringsheim[15] A. Kiesel[2] 朝井[3]等의 硏究報告가 있다. H.Pringsheim는 *Asp. nige*를 2% 蔗糖含有培養基中에서 5~14日間 培養後 菌體를 海砂와 같이 磨碎하여 pH3.8의 枸櫞酸鹽 鹽酸緩衝液中에서 浸出하여 Fishblasen 또는 celophan paper로 透析後 酵素液을 만든다음 0.6% Inulin 水溶液을 pH3.8에서 37°C로 21日間 反應시켜 約 90%의 糖化率을 얻었고 朝井은 *Penicillium*屬으로 Inulin의 約 80%를 糖化했다고 報告하였다. 中村[30]는 微生物의 Inulase에 關한 硏究에서 *Penicillium*屬의 Inulase 生産을 위한 基本的 培養條件을 報告하였다. 炭水化物의 資源으로서 돼지감자(Jerusalem Artichoke Herianthus. L)의 利用은 돼지감자中의 Inulin의 酸加水分解에 依한 果糖製造[24]가 있으며 朝井[7]의 돼지감자中에는 Inulin의 含量이 産地別 또는 收穫期에 따라 다르나 普通 全還元糖[5]으로 10~16% 程度이며 平均 13~15%가 大部分이고 特히 忠北地方의 돼지감자에는 16.37%(Inulin으로서는 13.94%)인 가장 높은量을 含有하고 있다.

돼지감자는 炭水化物의 含量이 많을뿐 아니라 作物中 栽培方法이 가장 容易하고 收穫量은 Sweet potato보다 오히려 多量인 便이다. (10a當 1,100~2,300kg)[31]

그러나 돼지감자中의 炭水化物은 前述한바와 같이 Inulin으로 되어 있어서 사람은 물론 家蓄에서도 이용할 수 없기 때문에 좋은 炭水化物資源이 現狀態下에서 放任되고 있다. 最近 우리나라에서는 糖質資源이 不足하기 때문에 甘味劑開發의 硏究가 더욱 要望되고 있다. 本 硏究는 돼지감자中의 Inulin을 利用하여 營養價나 甘味度가 높은 果糖을 製造하기 위하여 試圖하였다. 우선 돼지감자를 利用하기 위하여 돼지감자中의 Inulin을 强力하게 分解하는 酵素生産菌株를 分離하였고 그의 酵素生産을 위한 培養條件을 檢討한바 몇가지 結果를 얻었으므로 報告하는 바이다.

I. 實驗方法

1) 實驗材料

A. 돼지감자(Jerusalem Artichoke: Herianthus. L)

本 實驗用 돼지감자는 本大學 實驗圃場에서 秋季收穫한 것을 使用했다.

B. Inulin

E. Merck Darmstadt製品을 使用하였다.

2) 菌의 分離

A. 分離材料

① 돼지감자 : 乾燥, 腐敗, 生등의 돼지감자

② 土　壤 : 돼지감자 栽培實習田의 土壤

③ Dahlia 및 腐敗果實

B. 分離培地

① 麥芽汁寒天培地 :

② 돼지감자培地 : (J. A. E Media)

돼지감자를 水洗한 다음 蒸溜水로 再次 洗滌하고 잘게 細片으로 切斷하고 돼지감자 1kg에 對하여 2,500ml의 蒸溜水를 加하여(돼지감자 : 蒸溜水 =1 : 2.5) 100°C로 蒸煮後 Warling Blender로 磨碎하여 冷却되기 前에 麻布를 使用하여 여과하고 동여액을 IN-HCl을 使用하여 Initial pH 6.0으로 調節하였다. 1次選別用培地는 80ml容 試驗管에 20ml씩 分注하고 2次選別用 培地는 500ml容 shaking flask에 20ml씩 分注한 後 各各 棉栓하여 15LBS에서 30分間 加壓殺菌하여 使用하고 30°C에서 진당배양(120 strokes/min)하였다.

③ 合成培地 :

Basal medium I (B.M I)과 Basal medium Ⅱ (B.M

Ⅱ)는 Table I. II 에 表示한 바와 같다.

Table I Composition of basal medium I for Ist screening

Inulin	2.0 %	$NaNO_3$	0.15%
K_2HPO_4	0.1 %	KCl	0.05%
$MgSo_47H_2O$	0.05%	$FeSO_47H_2O$	0.01%
Initial pH	6.0		

Table II. Composition of basal medium II for 2nd screening

Inulin	1.0%	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.05%
Peptone	0.5%	KCl	0.05%
$NH_4H_2PO_4$	0.8%	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.001%
$(NH_4)_2HPO_4$	0.4%	Initial pH	6.0

C. 分離方法

上記 麥芽汁寒天培地를 利用하여 上記分離材料를 分離源으로 하고 滅菌水에 少量씩 懸濁하여 dilution pour plate method로 純粹分離한 다음 分離菌를 7日間 培養後 選別用菌株로 使用하였다.

① 1次選別

上記 方法에 依하여 分離된 絲狀菌를 對象으로 Inulin에 對한 分解能力이 强한 菌株를 選別하기 위하여 Inulin을 炭素液源으로 하는 T.A.E 및 B.M I Media에 分離된 菌株를一白金耳씩 接種하여 30°C 2日間 shaking culture(120 Strokes/min)로 배양시킨다음 生成還元糖을 Lehman-Schoorl method[39]로 分析하고 糖化率이 높은 菌株를 選拔하여 2次 選別菌株로 使用하였다. 但本法의 還元糖分析에 Lehman-Schoorl method를 使用한 理由는 檢液中에 第1銅을 含有한 不純物이 存在하드라도 分析에 방해되지 않고 蛋白質을 含有하는 溶液의 定量에 適合하기 때문이다.

② 2次選別

1次選別에서 糖化力이 優秀한 菌株만을 選別하여 J.A.E 및 B.M II에 接種 培養하여 酵素活性度를測定하고 活性度가 높은 菌株를 本實驗의 供試菌株로 使用했다.

酵素液의 調製

上記 J.A.E및 B.M II media의 培養液을 遠心分離(12,000rpm)하여 上澄液 10ml를 取하고 여기에 1/16M燐酸緩衝液(pH5.0)[25] 40ml를 加하여 稀釋한 다음 酵素液으로 使用했다.

酵素 活性度 測定

稀釋한 酵素液 2ml를 0.5% Inulin溶液(1/16M 燐酸緩衝液으로 溶解된것) 20ml에 加하여 其中一部는 再次遠心 分離하여 浮遊物과 溶解되지 않은 Inulin을 分離하여 非加水分解 sample로 使用하였다.(A液)

나머지 全量은 100ml의 三角flask에 넣고 密栓하여 攪伴하면서 40°C의 恒溫槽內에서 正確히 40分間 加水分解하여 酵素活性度 測定用 sample로 使用하였다.(B液)

定量法

25ml의 標線이 있는 乾燥된 試驗管에 미리 3.5-Dinitrosalicylic acid(DNS)를 3.0ml넣고 이곳에 各 Sample(A液, B液) 1ml를 加하여 잘 混合한 後 正確히 100°C에서 5分間 加熱하여 發色시킨다음 冷水로 冷却하였다. 여기에 distilled water를 加하여 正確히 25ml로 稀釋하였다. blank test는 DNS 試藥 3.0ml에 distilled water 1ml를 加하여 上法과 같이 處理했다.

糖標準液의 調製는 D—(—)—fructose를 使用하여 distilled water로 250μg/ml, 500μg/ml. 1000μg/ml의 3種으로 調製使用하였다.

以上 測定試料 A液 B液 blank test 標準糖液을 波長 500mm에서 ATAGO 36形으로 測定하여 다음과 같은 數式으로 酵素液 1ml當 1分間에 1μmole의 還元糖을 生成하는 酵素量을 1 unit로 表示하였다.

Inulase 力價＝(B液測定値－A液測定價)×(稀釋배율)÷40÷180.1＝( )μ mol/min.

試 藥

4.5% NaOH 溶液 300ml에 1% DNS 溶液 880 ml 및 Rochelle salt 225g을 첨가한다. 別途로 10% NaOH 溶液 22ml에 結晶 phenol 10g를 加하여 100ml가 될때까지 distlled waster를 加한다.

이 phenol溶液 69ml에 $NaHCO_3$ 6.9g를 加하여 溶解시켜 이것의 全量을 上記 DNS 溶液에 넣어 Rochelle Salt가 充分히 溶解 할때까지 흔들어 주고 2日間 放置後 여과하여 着色병에 保存하여 使用했다.

3) 酵素 生產을 위한 선별菌株의 培養條件 檢討

酵素生產을 위한 培養條件과 培地組成 濃度 및 其他의 諸條件을 달리하여 上記方法에 따라 培養한 後 前述한 方法으로 酵素活性을 測定하고 其結果를 고려하여 最適培養條件을 檢討하였다.

A. Inulin 濃度의 影響

Inulin 最適濃度를 求하기 위하여 0, 0.5, 1.0,

1.5, 2.0 2.5%의 各 Inulin濃度를 다르게 加하여 各各 다른 Inulin濃度에서 上記 方法과 같이 30°C 96시간 培養하여 酵素活性度를 測定하였다. Inulin 以外의 培地組成과 培養 條件은 前述한 바와같다.

B. pH의 影響

J.A.E 및 B.M Ⅱ media에 IN-HCl 또는 IN-NaOH 溶液을 첨가하여 各各 다른 Initial pH로 調節하고 30°C 96時間 培養하여 酵素活性度를 測定하였다.

C. 培養溫度의 影響

J.A.E 및 B.M Ⅱ media의 Initial pH5.0으로 調節하고 Inulin濃度는 J.A.E Media는 2.5倍로 稀釋하고, B.M II media는 1.0% 로固定하여 各各 다른 溫度에서 48時間 培養하여 酵素活性度를 測定하였다.

D. 無機窒素源의 影響

J.A.E 및 B.M II media에 無機窒素源의 濃度를 1/10 및 1/50M로 調節하고 各種 無機窒素源만을 代置하여 上記 法에 따라 72時間 培養後 酵素活性度를 測定하였다.

E. 有機窒素源의 影響

J.A.E 및 B.M II media에 有機窒素源의 濃度를 0.5 및 1.0%로 하여 各種 有機窒素源만을 代置하고 上記 方法과 같이 72時間 培養後 酵素 活性度를 測定하였다.

F. 糖類의 影響

J.A.E media에는 各種 糖類의 濃度를 0.5%로 調節하여 添加하고 B.M Ⅱ media에서는 各種 糖類의 濃度를 0.5, 1.0%로 調節하여 各種 糖類만을 代置하고 各各 다른 糖類를 다른 濃度에서 上記方法과 같이 30°C 72時間 培養後 酵素活性度를 測定하였다.

G. 金屬鹽類의 影響

J.A.E 및 B.M II media에 金屬鹽類의 濃度를 1/100. 1/500 1/1000M로 調節하고 各種 金屬鹽類만을 代置하여 上記 方法과 같이 72時間 培養後 酵素活性度를 測定하였다.

H. 培養液量의 影響

最適 通氣量을 求하기 위하여 500ml shaking flask에 培養液의 量을 各各 20, 50, 80, 110, 140ml씩 分注하고 上記 方法과 같이 30°C 96時間 培養後 酵素活性度를 測定하였다.

I. 經時的인 影響

最適 培養時數를 檢討하기 위하여 이제까지 얻어진 培養條件 및 培地組成으로된 兩 培地를 上記方法과 같이 經時的으로 30°C 6日間 培養하여 1日 간격으로 酵素活性度를 測定하였다.

II. 結果 및 考察

1. 菌의 分離

前記 方法에 依하여 여러가지 材料로 부터 malt extract agar media를 使用하여 分離된 絲狀菌 42株와 忠北大學 農化學科 研究室의 保存菌株 및 收集된 菌株 30種 도합 72種中 Inulase 生產能이 良好한 菌株를 選拔하기 위하여 實驗한 結果는 다음과 같다.

1) 1次選別

Inulase의 力價가 큰 絲狀菌를 分離하기 위하여

Table III. Saccharification ratio of tested molds in the lst screening.

Media / Contents / Strains	J.A.E				B.M I			
	T.S	R.S	S.R	Growth	T.S	R.S	S.R	Growth
	(gr)	(gr)	(%)		(gr)	(gr)	(%)	
Asp. niger	0.4	0.282	58.0	##	0.22	0.105	47.7	##
Asp. clavatus	0.4	0.141	35.3	#	0.22	0.074	33.5	+
Asp. oryzae	0.4	0.240	60.1	##	0.22	0.113	51.3	#
Asp. ochraceus	0.4	0.160	40.1	#	0.22	0.061	27.7	+
Pen. glaucum	0.4	0.224	5.61	##	0.22	0.053	24.0	#
Pen. sp. 1	0.4	0.249	62.3	#	0.22	0.110	50.0	#
Pen. sp. 2	0.4	0.244	61.1	##	0.22	0.100	49.0	#
Rhiz. delemar	0.4	0.232	58.0	#	0.22	0.081	36.8	#
Mon. sp	0.4	0.238	59.7	##	0.22	0.090	40.9	#

糖化率은 生成還元糖과 全還元糖에 對한 比率을 %로 表示함.

全還元糖은 10ml中의 Inulin의 量을 果糖으로 換算하였음[5].

T.S: Total sugar R.S: Reducing sugar S.R: Saccharification ratio

##：最强 #：强 +：弱

(即 pellet의 形成程度로 表示함)

炭素源을 Inulin으로한 J.A.E media와 B.M I media를 使用하여 上記의 72菌株를 各各 一白金耳씩 接種하여 30°C에서 48時間 培養한 後 糖化率이나 生育程度가 優秀한 菌株中 9種에 對한 分析 結果는 Table III과 같다.

① 糖化率

一般的으로 모든 絲狀菌이 J.A.E media에서 糖化率이 높았다. 兩培地에 糖化率이 크게 나타난 것은 *Pen. sp*1, *Pen. sp*2, *Asp. niger*, *Asp. oryzae*, *Monascus sp*, *Rhij. delemar*등 6個 菌株로 나타났다. 特히 이제까지 Inulase生產이 알려지지 않은 *Monascns sp*가 비교적 높은 당화율을 보인것은 았으로 더욱 연구할 문제로 생각된다.

以上 나타난 菌株들로 봐서 Inulase는 培地中에 對應基質로 Inulin이 存在할때 適應的으로 生產되는 유도 酵素이다. 以上 나타난 6個 菌株를 2次選別의 菌株로 使用했다.

② 生育程度 및 其他諸性質

醱酵가 始作되면서 菌絲는 大小 pellet가 생기고 比較的 糖化率이 높은 것일수록 pellet의 球狀크기가 작고 其量도 많고 배양液이 맑다. pellet가 가장 크고 量이 많은 것은 *Asp. niger*이다. *Monascus sp*는 배양액이 混濁하며 엷고 붉은 色을 나타나고 있다. 이것은 *Monascus sp*[23]가 桃色의 色素를 生產하기 때문인 것같다. 糖化率이 떨어지거나 微弱한 것은 pellet 形成도 없고 배양液도 大部分 混濁되었다. 兩 培地中 生育過程도 J.A.E media가 良好했다.

2) 2次選別

1次選別에서 糖化率이 높은 優秀한 菌株 6株를 選拔하여 J.A.E 및 B.M Ⅱ media에 接種하여 30°C에서 96hrs 培養後酵素活性度를 測定한 結果는 Table IV와 같다. 兩培地에서 *Pen. sp* 1이 酵素의 activity가 가장 크게 나타났으므로 本菌를 1.2次選別에 依한 最終優秀菌株로 選拔하였다.

Table IV. Inulase activity of 2nd screening tested molds.

Strains \ Activity	J.A.E	B.M II
Monascus sp	1.486	1.668
Rhi. delemar	1.701	1.900
Pen. sp 1	1.854	2.102
〃 *sp* 2	1.730	1.850
Asp. niger	1.321	1.426
〃 *oryzae*	1.604	1.782

2. 酵素生產을 위한 選別菌株의 培養 條件 檢討

1) Inulin濃度의 影響

J.A.E 및 B.M II media에 Inulin을 各濃度別로 代置하여 *Pen. sp I*을 接種하고 30°C 96時間 培養後 酵素活性度를 測定한 結果는 Fig. 1과 같다.

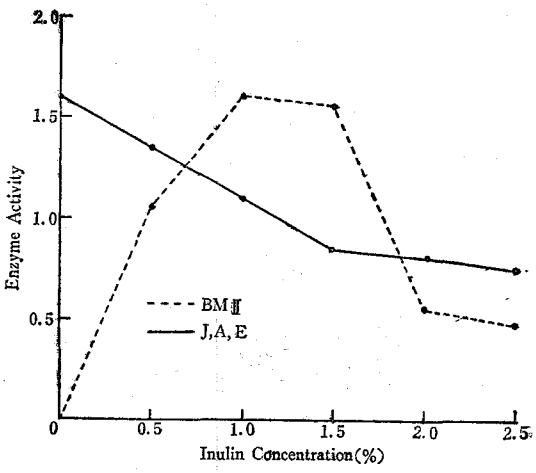

Fig. 1. Enzyme activity and inulin concentration.
The basal medium was consisted of peptone 0.5%, $NH_4H_2PO_4$ 0.8%, $(NH_4)_2HPO_4$ 0.4% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%, and $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.001%. (…) The J.A.E medium was the same as those shown in 2nd screening(—).

即 J.A.E media는 Inulin을 添加하지 않은 원래의 培地가 酵素生產이 良好하며 添加濃度가 높을수록 活性이 급격히 떨어졌다.

B.M Ⅱ media에서는 1.0~1.5%에서 良好했으며 이것은 中村[30]의 最適濃度 1.0%에 근사하며 朝井[3]의 2.0%보다는 낮은편이다. Inulin의 濃度가 增加함에 따라 兩培地全部가 酵素의 活性度가 極히 떨어졌다.

2) pH의 影響

J.A.E 및 B.M Ⅱ media의 Initial pH를 IN-HCl 및 IN-NaOH로 各各 다른 pH 4.0, 5.0, 6.0, 7.0으로 調節하고 上記 方法과 같이 30°C 96시간 培養後 酵素活性度를 測定한 結果는 Fig. 2와 같다.

J.A.E media의 最適 pH는 pH 5.0이고 B.M Ⅱ media는 pH 5.0—6.0範圍이다. 微生物 Inulase生成은 培地의 組成에 따라 달라지는 理由 때문에 Opt. pH가 약간 다르게 나타난 것으로 사료된다. 一般的으로 Inulase生成最適 pH는 pH 5.0의 前後에 있다. 이 結果는 中村[30]의 報告에 依한 *Peni*—

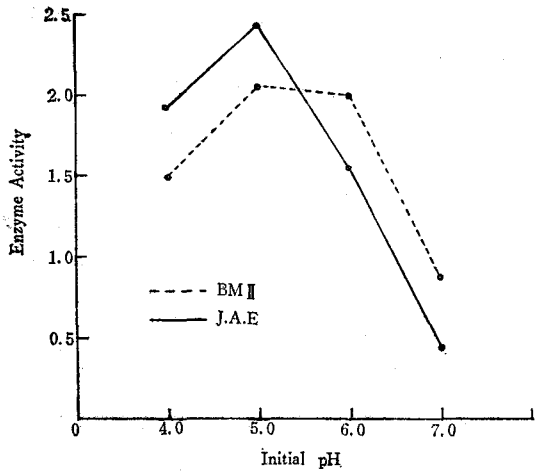

Fig. 2. Effect of initial pH of medium on the production of inulase from *Pen. sp.* 1

The basal medium was consisted of inulin 1.0 %, peptone 0.5%, $NH_4H_2PO_4$ 0.8%, $(NH_4)_2HPO_4$ 0.4%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05% KCl 0.05%, and $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.001%. (…)
The J.A.E medium was the same as those shown in 2nd Screening. (—)

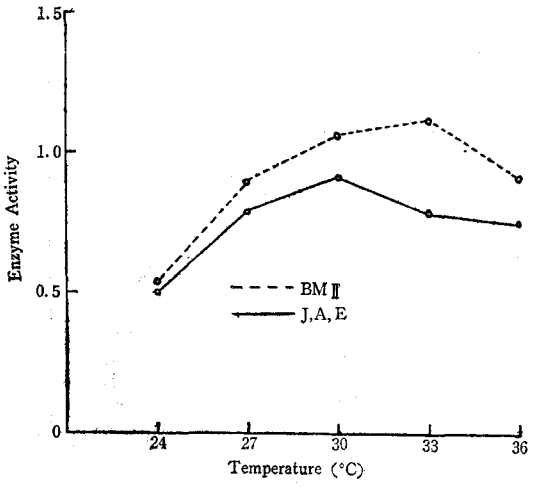

Fig. 3. Effect of culturing temperature on the production of Inulase by *Pen. sp* 1

The basal medium was consisted of inulin 1.0 %, peptone 0.5%, $NH_4H_2PO_4$ 0.8%, $(NH_4)_2HPO_4$ 0.4%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%, KCl 0.05 %, and $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.001% (pH 5.0) (…)
The J.A.E medium was the same as those shown in 2nd screening (pH 5.0) (—)

*cillium sp.*가 Initial pH 5.0에서 最高의 活性度를 나타낸 傾向과 같고 本江[17]의 緩衝溶液에 依한 pH調節値 pH 4.6이나 朝井[3]의 絲狀菌 pH 4.1보다는 약간 높은 便으로 나타났다.

3) 培養溫度의 影響

前記 兩培地에 培養溫度를 各各 24, 27, 30, 33, 36 °C등으로 調節하여 上記 方法과 같이 48時間 培養後 酵素活性度를 測定한 結果는 Fig. 3과 같다. Fig. 3에서 나타난것과 같이 Inulase生産 opt. temp.의 범위는 30—33°C이고 J.A.E media에서 Opt. temp.는 30°C이며 B.M Ⅱ media의 opt. temp.는 33 °C이다.

溫度의 影響은 朝井[5]의 絲狀菌 Inulase의 opt temp. 37°C보다는 약간 낮은편이다.

4) 無機窒素源의 影響

兩培地에 各種 無機窒素源의 濃度를 1/10, 1/50 M로 調節한 各各 다른 無機窒素源만을 添加하고 上記 方法과 같이 30°C 72時間 培養後 酵素活性度를 測定하여 control區와 比較한 結果는 Table V와 같다.

Table V. Effect of various inorganic nitrogen sources on the production of Inulase by *Pen. sp* 1

Contents / N·Sources	Concentration (M)	Enzyme activity J.A.E	B.M Ⅱ
$(NH_4)_2SO_4$	1/10	1.201	1.326
	1/50	1,002	1.113
NH_4Cl	1/10	1.031	1.210
	1/50	1.120	1.123
NH_4NO_3	1-10	1.601	0.903
	1/50	1.675	1.210
$(NH_4)_2HPO_4$	1/10	1.751	1.513
	1/50	1.700	1.501
$NH_4H_2PO_4$	1/10	1.826	1.672
	1/50	1.826	1.510
$NaNO_3$	1/10	1.532	0.926
	1/50	1.106	1.123
KNO_3	1/10	1.210	0.817
	1/50	1.136	1.210
Control		1.657	1.026

The basal medium was consisted of inulin 1.0 % peptone 0.5% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%, KCl 0.05%, and $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.001% (pH5)
The J.A.E medium was the same as those shown in 2nd screening (pH5)

即, J.A.E media는 無機窒素源의 添加影響이 別로 크게 나타나지 않고 있으나 $(NH_4)_2HPO_4$, $NH_4H_2PO_4$添加區만이 control區보다 높게 나타났다.

B.M Ⅱ media는 全般的으로 無機窒素源의 添加影響이 커서 control區보다 높게 나타났다. B.M Ⅱ media도 亦時 J.A.E media와 같이 $(NH_4)_2HPO_4$, $NH_4H_2PO_4$區가 가장 높은 結果를 나타냈다.

5) 有機窒素源의 影響

兩培地에 各種 有機窒素源의 濃度를 0.5, 1.0%로 調節한 各各 다른 有機窒素源만을 添加하고 上記 方法과 같이 30°C 72時間 培養後 酵素活性度를 測定하여 control區와 比較한 結果는 Table VI과 같다.

有機窒素源의 影響은 J.A.E media에서는 큰 効果를 나타나지 않고 있으나 B.M Ⅱ media에서는 큰 効果를 나타냈다. 即 가장 큰 効果는 corn steep liquor 및 peptone으로 거의 같은 影響을 나타 냈으며 無機 및 有機窒素源中 가장 큰 効果를 가져왔다. urea와 yeast extract는 큰 影響을 미치지 못했다.

Table VI. Effect of various organic nitrogen sources on the production of Inulase by *Pen. sp.* 1

Contents / N·Sources	Concentration(%)	Enzyme activity	
		J.A.E	B.M II
Peptone	0.5	1.523	0.813
	1.0	1.026	1.401
Corn steep liquer	0.5	1.565	1.021
	1.0	1.410	1.816
Urea	0.5	0.926	0.326
	1.0	0.813	0.210
Yeast extract	0.5	1.261	0.132
	1.0	1.001	0.213
None(control)	0	1.501	0.035

The basal medium was consisted of inulin 1.0%, $NH_4H_2PO_4$ 1.0%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%, KCl 0.05%, and $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.001% (pH 5)
The J.A.E medium was the same as that shown in the 2nd screening except that $NH_4H_2PO_4$ was added to the former.

6) 糖類의 影響

兩 培地에 各種 糖類의 濃度를 0.5, 1.0%로 調節하고 上記 方法과 같이 30°C 72時間 培養後 酵素活性度를 測定한 結果는 Table VII과 같다. J.A.E media는 各種 糖類의 添加로 酵素生産은 全般的으로 크게 抵下되었으나 sucrose, fructose 添加區는 生育 程度는 좋은 便이었으나 역시 酵素의 活性은 떨어졌다. B.M II media는 Inulin 代置區만이 酵素生産이 높았다. 特히 Inulin 1.0%區가 월등하게 높았고 다른 糖類에서 거의 酵素를 生産하지 않았다. 故로 本 酵素는 Inulin을 炭素源으로 했을때 適應的으로 生産된다고 하는 中村[30]의 報告와 일치한다.

Table VII. Effect of various carbon sources on the production of Inulase by *Pen. sp* 1.

Media / Concentation / Carbon sources	J.A.E	B.M II	
	0.5(%)	0.5(%)	1.0(%)
Inulin	1.795	0.977	1.641
Sucrose	1.001	0.084	0.012
Fructose	0.915	0.006	0.051
Glucose	1.230	0.010	0.015
Galactose	1.101	0.019	0.008
Xylose	0.881	0.000	0.000
Lactose	0.701	0.000	0.000
Dextrin	0.923	0.070	0.070
Raffinose	0.923	0.090	0.009
Soluble starch	0.626	0.027	0.017
Arabinose	0.781	0.000	0.000
Mannit	0.756	0.000	0.000
None	1.826	0	0

The basal medium was consisted of C.S.L 1.0%, $NH_4H_2PO_4$ 1.0%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%, KCl 0.05%, and $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.001%(pH 5.0)
The J.A.E media was the same as those shown in table VI.

7) 金屬鹽類의 影響

兩 培地에 各種 金屬鹽類의 濃度를 1/100, 1/500, 1/1000M로 調節하고 上記 方法과 같이 30°C 72時間 培養後 酵素活性度를 測定한 結果는 Table VIII과 같다.

即 J.A.E media에서는 酵素의 生産이 抵下되었다. B.M II media에서는 크게 酵素生産에 影響이

되고 그 順位는 KCl (1/100M), $MgSO_4$(1/100M), $FeSO_4$(1/1000M)로 나타났다.. $ZnSO_4$, NaCl, Mn SO_4등은 別로 影響이 되지 않고 酵素生産이 오히려 抵下되었다.

Table VIII. Effect of various salt on the production of inulase by *Pen. sp.* 1

Media / Mole / Salts	J.A.E			BM II		
	1/100(M)	1/500(M)	1/1000(M)	1/100(M)	1/500(M)	1/1000(M)
KCl	0.852	0.712	0.700	1.323	0.781	0.701
$MgSO_4$	0.726	0.851	0.691	1.263	0.710	0.691
$FeSO_4$	0.610	0.623	1.210	0.661	0.715	1.126
$ZnSO_4$	0.601	0.606	0.701	0.510	0.610	0.561
NaCl.	0.513	0.600	0.561	0.612	0.632	0.600
$MnSO_4$	0.710	0.762	0.810	0.719	0.815	0.862
Control	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

The balsel medium was consisted inulin 1.0%, C.S.L 1.0%, $NH_4H_2PO_4$ 1.0%(pH 5)
The J.A.E medium was the same as those shown in Table VI.

8) 培養液量의 影響

最適通氣量을 檢討하기 위하여 500m*l* shaking flask에 培養液의 量을 兩培地 共히 20, 50, 80, 110, 140m*l*씩 各各 分注하고 上記方法과 같이 30°C 96時間 培養後 酵素活性度를 測定한 結果는 Fig. 4와 같다.

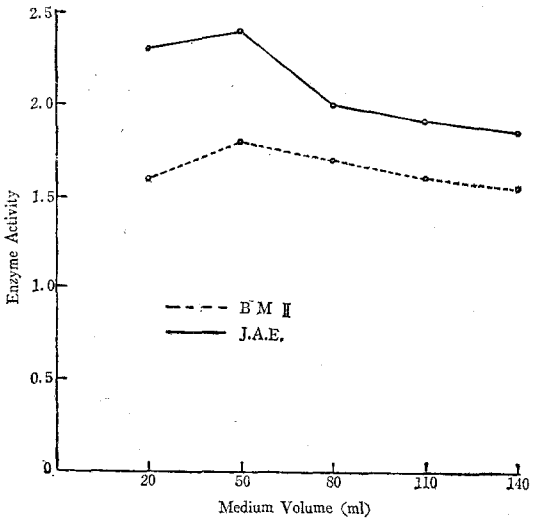

Fig. 4. Effect of culture solution volume on the production of inulase by *Pen. sp.* 1
The basel medium was consisted of inulin 1.0 %, C.S.L 1.0%, $NH_4H_2PO_4$ 1.0%, KCl 0.05 %, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.005%, and $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.001% (pH 5.0) (…)
The JA.E medium was the same as that shown in the table VI except that $FeSO_4$ was added to the former.(—)

培養液이 增加함에 따라 兩培地 共히 酵素生産이 抵下되었다.

9) 經時的인 影響

最適培養 時數를 檢討하기 위하여 위에서 얻어진 最適 兩培地를 上記方法과 같이 經時的으로 1, 2, 3, 4, 5, 6日間 30°C로 培養後 酵素 活性度를 測定한 結果는 Fig. 5와 같다.

即 最適 Inulase生産 條件은 J.A.E는 4日 B.M Ⅱ media는 5日로 나타났다. 이 傾向은 中村[30]의 報

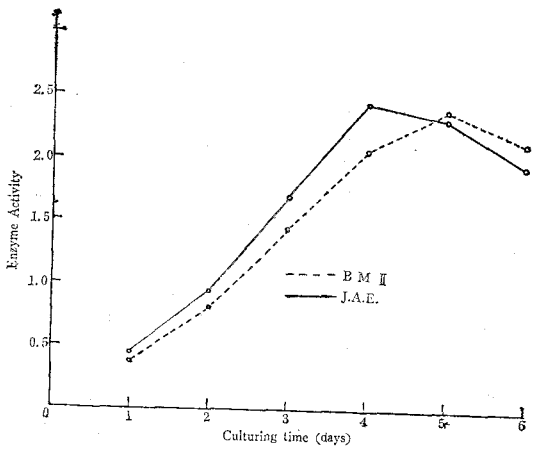

Fig. 5. Effect of culturing time on the production of inulase by *Pen. sp.* 1
The basel medium was the same as that shown in the Fig. 4 except that 50ml of medium/500 ml shaking flak was added to the former.(…)
The J.A.E medium was the same as that shown in the Fig. 4 except that 50ml/500ml shaking flask was added to the former. (—)

告에 나타난 絲狀菌 Inulase의 最適培養日數 6—7日보다 크게 短縮된 時間이다.

10) 最適培養 條件

以上과 같은 培養條件 檢討의 結果로 Pen. *sp.* 1에 依한 J.A.E 및 basel media로 부터 Inulase生産을 위한 最適培養條件을 Table IX.X과 같이 決定하였다.

Table IX. The optimal conditions of cultivation on the basal media for the production of inulase by *Pen. sp.* 1

Inulin(E.p)	1.0%	Corn steep liqor	1.0%
$NH_4H_2PO_4$	1.0%	KCl	0.05%
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.05%	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.001%

Initial pH 5.0(adjusted with IN-HC1)
50ml of medium/500ml shaking flask
Cultivation was carried out for 120hrs at 30°C

Table X. The optimal conditions of cultivation J.A.E media for the production of inulase by *Pen. sp.* 1

Jerusalem artichoke extract	100%
(4% W/V extraction at 100°C for 20 min)	
$NH_4H_2PO_4$	1.0%
$FeSO_4$	0.001%

Initial pH 5.0 (adjusted with IN-HCl)
50ml of medium/500ml shaking flask
Cultivation was carried out for 96hrs at 30°C

摘 要

돼지감자 試料(Putrefactived and dry Jerusalem artichoke)로 부터 强力한 Inulin加水分解 酵素를 生産하는 *Penicillium sp.* I을 分離選拔하였고 本菌을 使用하여 酵素生産에 關한 最適培養條件을 檢討하여 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. *Penicillium sp.* I은 Inulase生産力이 强한 菌株이다.
2. 本菌의 Inulase生産을 위한 最適培養 條件을 Jerusalem artichokoke extract media와 Basal media의 두 培養基에서 決定 하였다.
3. Jerusalem artichoke extract media에서 Basal media보다 Inulase生産力이 높았다.
4. Inulase生産能도 Jerusalem artichoke extract media에서는 4日 Basal media에서는 5日 培養으로써 最高値에 도달하였다.
5. Inulin濃度, pH. 溫度條件
   Jerusalem artichoke extract media에서는 opt. temp 30°COpt. pH 5.0, Opt. conc 4.0% (W/V)로 나타나고 Basal media에서는 Opt temp 30～33°C, Opt. pH 5.0～6.0, Opt conc 1.0～1.5%(W/V)
6. 窒素源으로서는 Corn Steep Liquir, Peptone, $(NH_4)_2HPO_4$, $NH_4H_2PO_4$, $(NH_4)_2SO_4$등이 良好하고 특히 有機窒素源을 加함으로써 Basal meaia에서 Inulase生産을 增加시켰다.
7. 糖源의 利用으로써는 Inulin以外의 諸糖은 Inulase生産에 影響을 미치지 않았다.
8. 金屬 鹽類의 利用은 KCl. $MgSO_4$, $FeSO_4$등이 Inulase生産을 增加시켰다.

引 用 文 獻

1. 赤掘四郎：酵素 ハンドブツク 462(1972).
2. A.Kiesel: Aull Acad. St. petershourg 1077～1092(1915)
3. 朝井勇宣：釀學 **15**, 771～780(1937)
4. 朝井勇宣：釀學 **15**, 851(1937)
5. 朝井勇宣：釀學 **15**, 853(1937)
6. 朝井勇宣：釀學 **16**, 511(1938)
7. 朝井勇宣, 雪ノ浦哲夫：釀學, **16**. 417～428 (1938)
8. Dean: Botan. Gazette. **35**, Jan. (1903)
9. E. Bourquelot: Comptes Rendus Acad. sci. 116, 1143 (1893)
10. 福井作藏：化學と生物. 3(9), 37(1965)
11. H.E. Snyder and H.J. Phaff: Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol., **26**, 432 (1960)
12. H. E. Snyder and H. J. Phaff: Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol., **26**, 433 (1960)
13. H.E. Snyder and H.J. Phaff: J. Biol. chem., **237**, 2438 (1962)
14. H. Pringsheim: Ber. **65**, 1242(1932)
15. H. Pringsheim: Ber. **55**, 1414(1922)
16. H. Pringsheim: Zeit. F. physiol. Chem., **133**. 80, 153. 138-146. (1926)
17. 本江原吉：農化, **18**, 981(1942)
18. 逸見文雄, 富田寬武：日本農化 **19**, 816-822 (1943)
19. 逸見文雄, 富田寬武：日本農化 **20**, 221-226 (1943)
20. J. Edelman, J.S.D. Bacon: Biochem. J. **49**,

446(1951)
21. J. Edelman. T.G. Jefford: Biochem. J. **88**, 30. (1963)
22. J.R. Green: Ann. Bot.,**1**, 223(1887)
23. 金浩植：醱酵微生物學 65, (1968)
24. 京都大學農學部農藝化學教室編：新改版 農藝化學實驗書 第三卷 1300(1960)
25. Macll vaine: J. Boil. chem., **19**, 183(1921)
26. M. Adams, N.K. Richtmyer and C.S. Hudson: J. Am. chem. soc., **65**, 1369(1943)
27. M. Holden, M. V. Tracey: Biochem. J. **47**, 407 (1950)
28. M.M. Biswas: Indian J. Appl. chem., **26**(3), 56(1963)
29. 村上進：酵素化學 シンボウム **8**, 120(1953)
30. 中村豐彥, 中凡足信一郎：日本 農化學會誌, **43** 第九號 599-605(1969)
31. 西川五郎：工藝作物學 448(1963)
32. P. Lindner: Ws. Brau., **17**, 713(1900)
33. P. Lindner: Mikoros. Betriebskent,and Garge werbe. 4. Aufl. Berlin S. 234(1905)
34. Prescott and Dunn: Industrial microbiology second Edition. 135(1945)
35. R. Dedonder: Bull. Soc. Chem. Bid., **34**, 157 (1952)
36. Rudolf Vadas: Chem. zeit. 249, (1634)
37. Schaffer: Dissert. Erlangen. 15(1901)
38. 武田義人：日本農化學會誌 **11**, 85(1935)
39. 友田宜考：共立全書 44(1955)
40. W.W.Pigman: J. Res. Natl. Bur. Stds., **30**, 159(1943)