

Cassava 전분을 이용하는 *Rhizopus* 및 *Aspergillus niger*에 관한 연구

權景蘭·金鍾協

동덕여자대학교 대학원 약학과

Studies on the Utilization of Cassava Starch by a Strain of *Rhizopus* and *Aspergillus niger*

Kyung-Ran Kwon and Jong-Hyup Kim

Department of Pharmacy, Graduate School, Dong-Duck
Women's University, Seoul 136, Korea

ABSTRACT: Several species of the fungi were isolated from cassava (*Manihot esculenta Gruntz*) starch which had formed into pellet, those had been stored for a while in southern part of Thailand. The species of *Rhizopus*, *Aspergillus niger*, and *Aspergillus fumigatus* were identified.

The experimental results are as follows;

Dry weight increases were checked during the static liquid culture with modified Czapek Dox medium to which cassava starch was partly replaced to sugar, *Aspergillus niger* and *Aspergillus fumigatus* had grown more than *Rizopus* species when 6% cassava starch was replaced to sugar and had been cultured for 72 hours.

Amounts of mycelial protein of *Aspergillus niger* were checked, the highest amount was shown in 6% cassava starch involved medium.

When nitrogen sources were varied such as ammonium sulfate or urea against sodium nitrate, there was no significant difference in mycelial production.

Alpha amylase activity of each fungus isolated here was checked, those of *Aspergillus niger* have shown the highest peak at 72 hours.

KEYWORDS: Cassava starch, Mycelial production, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Rhizopus*.

Cassava는 大戟科에 屬하는 多年生의 灌木으로 學名은 *Manihot esculenta Gruntz*이며, 이 植物은 흔히 Mandioca, Manioca 또는 Tapioca라고도 부른다.

Cassava의 特性은 줄기가 연약하여 부러지기 쉽고, 잎은 有柄으로 掌狀深裂, 꽃은 總狀花序로 黃綠色, 種子는 3個로, 比蕷子와 類似하며, 塊根은 多量의 濕粉을 含有하고 있어 Tapioca 濕粉의 原料가 된다(Chada, 1970; 新澤, 1973). 이것은 Brazil의 原產으로 옛부터 热帶地方에서 大量으로 生產되고 있으며 아프리카, 동남아시아, 印度 및 中部 아프리카 等의 全地域에 分布되어 있다(Gray 등, 1966; Chada, 1970).

FAO의 1962-1963年 年鑑에 依하면, 耕作面積이

830萬 Hectare에서 總生產量은 7,600萬M/T이었으며, 이런 樣相으로 볼 때 現存로서는 그때보다 많은 量이 收穫되고 있으리라고 생각된다. Brook(1969)에 依하면 Cassava는 다른 作物에 比해서 單位面積當生產量이 옥수수나 쌀에 比하여 2-3倍, 고구마에 比하면 1.5-2倍 가량 높기 때문에 옥수수나 고구마에 比해 價格面에서 產業的 利用價值가 높다.

우리나라에서의 고구마 生產은 많지만 貯藏이 困難하므로 酶酵工業, 製藥工業, 食品工業, 飼料工業等의 濕粉質 原料로서 Cassava 濕粉을 많이 輸入하고 있으며, 우리나라 酒精會社의 일률 生產源으로서 Cassava 輸入은 1975年에 71,000M/T에 이르렀다고 한다(李, 1976).

現存 Cassava는 飼料 및 濕粉의 原料 뿐만 아니

라 精製하여 食品으로서의 用途로도 그 需要가 계속 增大되고 있다.

Tropical products Institute(英國)의 乾燥 Cassava에 對한 成分分析報告에 依하면, 灰分이 1.6%-2.8%, 脂肪이 0.4%-1.2%, 組織維는 2.0%-3.6%, 蛋白質은 1.2%-2.5%, 淀粉은 79.1%-85.8% 이다(Chada, 1970).

오늘날 人口增加에 比해 食糧生產이 그 需要를 뒤따르지 못함으로 全世界의 食量不足이 甚刻한데 특히 營養面에서 蛋白質의 不足이 于甚하다. 따라서 最近에 이 蛋白質源의 解決방안으로 微生物菌體蛋白(Single cell protein) 利用을 FAO, WHO 等에서 勸誘하고 있다. (Protein Advisory Group에 依하면 單細胞 또는 簡單한 構造의 多細胞生物의 菌體蛋白을 Single cell protein라고 定義하고 있는데, 細菌, 酵母, 곰팡이, 藻類, 原生動物 等의 生體蛋白을 意味한다(金, 1974). 또한 微生物의 種類를 選擇함에 있어서도 安全性을 考慮하여 古來로부터 우리 人類의 食品과 關係가 깊은 곰팡이(*Aspergillus niger*, *Aspergillus Oryzae*, *Penicillium*, *Fusarium* 및 그 밖의 여러 菌株)를 菌體蛋白의 生產用 菌株로 採擇되어 研究하고 있다(金, 1974). 곰팡이는 炭水化物을 쉽게 分解하고 菌體의 回收가 容易하며, 食品加工이나 調理加工面에서 바람직한 長點이 많다(Gray 등, 1966; Brook 등, 1969; Gray 등, 1966; Gray 1966). 이와같이 곰팡이의 菌體蛋白이 現視點에서는 가장 安全하고 값싸며, 손쉽게 얻을 수 있다는 것이다(Brook 등, 1969; Gray 등, 1966).

Cassava 淀粉을 原料로 하여 곰팡이를 培養하는 研究는 美國의 Gray(1966)에 依해서 發表되었고 使⽤된 菌株는 *Cladosporium* 屬, *Brachysporium* *Oosporum* 및 *Linderina pennispora* 等 2-3種의 不完全菌株를 使用하였고(Gray 등, 1966), 또한 英國에서는 價格이 低廉한 淀粉質(例컨데 Cassava, 糖蜜等)을 酵酶基質로 하여 *Fusarium graminearvan*을 使用하여 大量 培養한 바 있다(加藤, 1973). 그러나 아직까지 Cassava 淀粉에 自然寄生하는 곰팡이를 菌體生産 및 利用에 對한 研究는 없다.

本 研究의 目的是 Cassava 淀粉 利用能力이 왕성한 菌株를 選擇코자 人爲의으로 特定菌을 接種하지 않고 Cassava 淀粉에 自然的으로 寄生하는 곰팡이를 分離同定하고 그 곰팡이의 生理活性을 追求하고 純粹培養과 接種 可能性을 調査하기 爲해 實驗한 結果를 얻었기에 이를 報告하고자 한다.

材料 및 方法

實驗材料

本 實驗에 使用한 試料는 泰國產 Cassava (*Manihot esculenta* Gruntz)를 使用하였다.

實驗方法

1) 곰팡이의 分離

Cassava 淀粉의 저장중 自然的으로 곰팡이가 寄生한 Cassava 淀粉의 pellet로부터 곰팡이를 分離하기 爲하여 Czapek-Dox Broth에 Cassava pellet를 投入하고 28°C에서 3日-7日間 培養하여 菌을 增菌시켰다. 增菌된 菌을 Czapek-Dox Agar, Sabouraud-Dextrose Agar 및 Potato-Dextrose Agar에 接種하여 3回 連續繼代하여 純粹 分離시켰다.

2) 곰팡이의 同定

純粹分離된 곰팡이의 集落을 取하여 Block Agar Method에 따라 petri dish에 Sabouraud-Dextrose Agar를 6 ml-8 ml씩 45°C를 유지하면서 부어 培地에 두께가 0.5 mm-0.8 mm 程度로 준비하여 응고시킨 다음, 1 cm²씩 block culture하여 petri dish에 滅菌된 濾紙를 깔고 거기에 U字유리管을 놓고, slide glass를 올려놓은 다음 1 cm²씩 짜른 培地를 놓고 菌을 四方 끝에 接種後 cover glass를 덮고 滅菌蒸留水 3-4 ml를 濾紙에 붓은 다음 28°C에서 3-7日間 培養하여 光學顯微鏡 400倍율에서 各種 菌의 形態 및 特性을 Raper and Fennell(1965)의 Key 및 Moore and Jaciow(1979)의 Key에 依해서 同定하여 分離된 곰팡이를 實驗의 供試菌株로 使用하였다.

3) 分離된 곰팡이의 培養

繼代培養된 곰팡이를 無菌狀態로 Sabouraud Dextrose agar Slant에 接種하고 28°C에서 7日間 恒溫培養하여 胞子를 얻었다.

· 胞子發芽用 盡湯培養

胞子發芽用 盡湯培養 培地는 基礎無機鹽類溶液(Table I) 10倍 濃縮液 20 ml와 (NH₄)₂SO₄ 792 mg, Glucose 4g을 蒸留水에 녹여 全體量을 200 ml가 되게 한 다음 pH를 2.3으로 조절하였다. 이와같이 製造한 培地를 250 ml 三角 flask에 培地 50 ml씩 넣고 면전을 한 후 高壓滅菌하였다.

4) 곰팡이 培養液中の 淀粉液化 酶素液 採取

Sabouraud Dextrose agar 사면에서 培養된 곰팡이의 胞子를 滅菌蒸留水에 懸獨시키고 이 懸獨液을 glass filter로 濾過하여 胞子를 얻었다. 이 胞子의

Table I. Components of basal minerals for the liquid media

Components	Contents (mg/l)
KH_2PO_4	100
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	250
$\text{CuSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$	0.234
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	6.32
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.1
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	3.5
CaCl_2	46.7

Table II. The Modified Czapek-Dox medium and composition of various cassava concentration

Components	Conc. of Cassava Starch			
	4 %	6 %	8 %	10%
Cassava	40	60	80	100
NaNO ₃	3.0	3.0	3.0	3.0
K ₂ HPO ₄	1.0	1.0	1.0	1.0
KCl	0.5	0.5	0.5	0.5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5	0.5	0.5	0.5
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01	0.01	0.01	0.01

懸獨液 50 ml 을 Czapek-Dox broth 500 ml 를 넣은
1000 ml 용 Beaker에 옮기고 28°C에서 5 日間 定置培
養하였다. 定置培養된 液을 充分히 혼들어 섞은 다
음 濾紙를 사용하여 濾過하고 그 濾液을 酵素液으로
사용하였다.

5) 分離된 곱팡이의 Cassava 濬粉利用能實驗

① Cassava 濕粉의 含有된 培地의 調製

Czapek-Dox 培地中에 들어가는 Saccharose 대신에 Cassava 澱粉을 사용하였으며 Cassava의 濃度를 4%, 6%, 8% 및 10%되게 하였다(Table II).

이때에 窒素源은 NaNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 및 Urea이고 그 含量을 變化시켜 使用하였다. 窒素源의 量은 Czapek-Dox 培地中에 들어가는 窒素源量의 100%, 50% 및 100%에 0.1% pepton을 添加한 培地를 만들었다(Table III).

②. Cassava 濕粉의 液化處理 및 곱팡이의 培養

250 ml 三角 flask에 Cassava 澱粉을 浓度別로 넣고 Cassava 1g에 對해 蒸留水 5 ml 加해 懸獨시켜 高壓滅菌한 뒤에 4)에서 만든 澱粉液化酵素液 40 ml를 加하여 60°C에 8時間 동안 置湯하면서 液化시킨 후, 이것을 Cassava를 利用한 곰팡이의 培養培地로 사용하였으며 3)-b에서 얻어진 菌絲를 Cheese cloth로 濾過하고 滅菌蒸留水로 2-3回 洗滌한 菌絲를 위에서 液化시킨 培地에 接種하여 28°C에 1日 2-3回 흔들어 4日間 培養하면서 每 24時間마다 菌體量, 菌

Table III. The Composition of various nitrogen sources in modified Czapek-Dox Medium(pH 7.3)

(Unit : g/l)

體蛋白 및 酶素活性 測定에 사용하였다.

③ 菌體量測定 및 一般成分分析

· 菌體量測定: 곰팡이 培養中 每 24時間마다 培養液을 取하여 12,000 r.p.m에서 20分 동안 遠心分離하고 上澄液은 酶素液으로 하여 菌體는 蒸留水로 2-3回 洗滌한 다음 8時間동안 80°C-85°C 恒溫乾燥器에서 乾燥시켜 Desiccator에서 1시간 冷却後 乾燥量을 化學天秤으로 測量하였다.

· 水分測定: 水分定量은 乾燥減量法中 常壓加熱乾燥法에 依하여 實驗하였다.

$$\text{水分 \%} = \frac{b - c}{b - a} \times 100$$

a: 秤量 捨시의 무게(g)

b: 秤量 捨시와 試料무게(g)

c: 乾燥後 恒量이 되었을 때의 무게(g)

· 灰分定量: 灰化法에 適用시켜 定量하였다.

$$\text{灰分 \%} = \frac{W_1 - W_0}{S} \times 100$$

W_0 : 恒量이 된 灰化容器의 무게(g)

W_1 : 灰化後의 灰化容器와 灰分의 무게(g)

S: 檢體의 採取量(g)

· 粗脂肪 定量: 酸分解法에 依하여 定量하였다.

$$\text{粗脂肪 \%} = \frac{W_1 - W_0}{S} \times 100$$

W_0 : 그릇의 무게(g)

W_1 : 粗脂肪을 抽出하여 乾燥시켜 받는 그릇의 무개(g)

Cassava Starch
Mycelial 5.0g

Dried porcelain dish to constant weight

Dried in oven(105°C) with sample for 4 hr. cooled to room temperature for 30 min.

First Weighing

Repeated till constant weight

Final Weighing

Water Content

Scheme 1. Procedure for the determination of the water content of cassava starch.

Cassava Starch
Mycelial 5.0g

Dried porcelain dish to constant weight preheated with sample at 200°C-300°C for 30 min.

Heated at 600°C for 5 hr.

Cooled to 200°C in furnace, moved to desiccator and cooled to room temperature.

Ash Content

Scheme 2. Procedure for the ash content determination of cassava starch

Cassava Starch
Mycelial 5.0g

Crude lipid content

Filled sample in filter paper tube.
Dried in an oven at 105°C for 3 hr.
Cooled to room temperature in a desiccator. Extracted in Leahi apparatus with ether at 35°C for 8 hr.

Evaporated

Dried in an oven for 1 hr.
Cooled in a desiccator

Scheme 3. Procedure for crude lipid content determination of cassava starch.

S: 檢體의 採取量(g)

· 總炭水化物定量: 差引法으로 定量하였다²⁶⁾(永原 등, 1978).

④ 菌體蛋白質量의 測定

菌體蛋白質의 定量分析은 Lowry法(1951)에 依하여 實施하였다.

⑤ 菌體의 濃粉液化酵素 α -Amylase 活性測定

α -Amylase 活性測定은 Blue-Value法에 準하여 測定하였으며 그 活性單位는 D.P_{mgA}^{40°C 30'} unit로 表示하였다(Fuwa, 1954).

Soluble starch 200 mg \circ 1 N NaOH 4 ml를 加하여 2°C-5°C에서 하룻밤 放置한 다음 均一하게 녹여 100 ml mass-flask에 옮겨 물로 約 80 ml로 稀釋한 後 phenolphthalein 한방을 加해서 1 N 醋酸으로 中和시켰다. 10% Potassium Iodide 溶液에 1% I₂을 넣어 溶解시켜 100 ml로 만든 다음 使用할때 蒸留水

로 200倍 稀釋하여 사용하였다.

· 酶素活性度 單位(D. P. $\frac{40^{\circ}\text{C} 30'}{\text{mgA}}$) : $40^{\circ}\text{C}, 30'$ 에서의 Blue Value을 10% 低下시키는 澱粉의 mg數로써 表示하였다.

$$\text{D. P. } \frac{40^{\circ}\text{C} 30'}{\text{mgA}} = 4 \times \frac{D_0 - D}{D_0} \times 100 \div 10 = 40 \times \frac{D_0 - D}{D_0}$$

· 菌體의 酶素 a-Amylase 活性測定 : 試驗管 A와 B(Blank)에 0.2% Soluble starch 2 ml 및 0.4 M Acetate Buffer(pH 5.0) 1 ml를 각각 加하여 40°C 의 恒溫槽에서 約 5分間 放置한 뒤 A tube에는 4%, 6% 및 8% 濃度의 澱粉培地에서 培養시킨 菌液을 24時間마다 濾過한 酶素液 1 ml씩 加하고 B tube에는 蒸留數 1 ml를 加하여 40°C 恒溫槽에서 30分間 放置後 A B試驗管에 0.5 N Acetic acid 10 ml를 넣고 反應을 停止시킨 다음 이 液 1 ml에 1/3000 N I_2 를 10 ml씩 加하고 波長 660 nm에서 蒸留水를 對照液으로 Blank (D_0)와 反應物(D)의 吸光係數(OD)를 測定하였다.

結果 및 考察

곰팡이의 分離同定

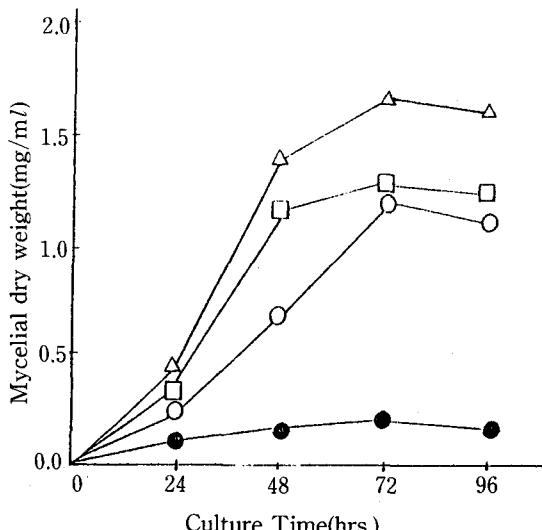


Fig.1. Mycelial mass of *Rhizopus* in modified Czapek Dox medium.

* Used medium is shown in Table II.

○ - ○ : 4% Cassava Starch

△ - △ : 6% Cassava Starch

□ - □ : 8% Cassava Starch

● - ● : 10% Cassava Starch

Cassava pellet에 부착 기생한 곰팡이는 *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Paecilomyces* 및 *Penicillium*屬 곰팡이를 Raper와 Fennell(1965), Ainsworth와 sparrow(1973) 및 Moore와 Jaciow(1979)에 依해 分離同定하였다.

菌體量의 測定 및 一般成分分析

Cassava pellet에서 分離한 *Rhizopus*屬, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*를 선택해서 Table III의 培地를 使用하여 6% Cassava 澱粉濃度로 28°C 에서 4日間 培하면서 每 24時間마다 菌體量을 測定한 結果, 각各의 菌體量은 *Rhizopus*屬이 1.75 mg/ml, *Aspergillus niger* 19.1 mg/ml 및 *Aspergillus fumigatus*는 16.4 mg/ml이었다(Fig. 1, 2, 3).

한편 菌體生長에 미치는 窒素源의 種類와 含量을 變化시킨 實驗에서는 Cassava 澱粉培地에 窒素源으로 NaNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 및 urea를 각각 50%, 100% 및 100% + 1.0% pepton을 投與한 바 菌體量의 變化는 Fig. 4-9와 같다. 태국產 Cassava flour와 分離된 菌體의 一般成分分析은 Table V와 같다.

菌體蛋白質의 定量

Cassava 澱粉의 濃度別로 培養한 菌株의 菌體總

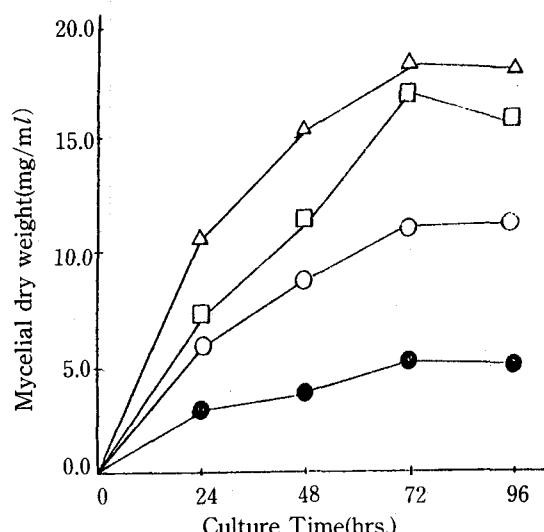


Fig.2. Mycelial mass of *A. niger* in modified Czapek Dox medium.

* Used medium is shown in Table II.

○ - ○ : 4% Cassava Starch

△ - △ : 6% Cassava Starch

□ - □ : 8% Cassava Starch

● - ● : 10% Cassava Starch

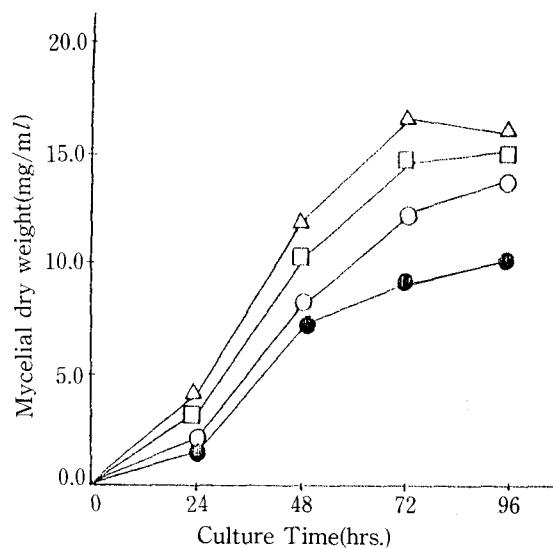


Fig.3. Mycelial mass of *A. fumigatus* in modified Czapek Dox medium.

*Used medium is shown in Table II.
 ○ - ○: 4% Cassava Starch
 △ - △: 6% Cassava Starch
 □ - □: 8% Cassava Starch
 ● - ●: 10% Cassava Starch

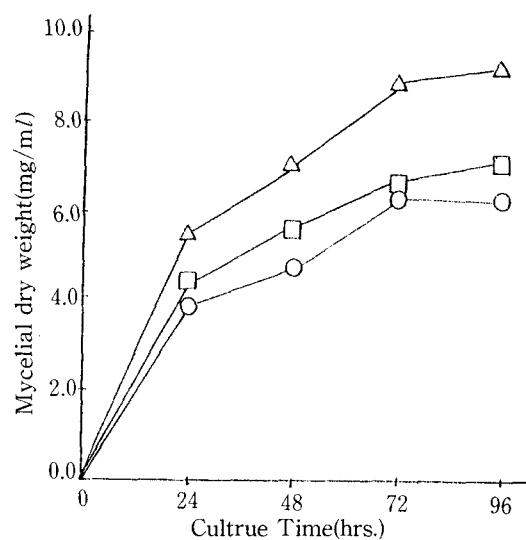


Fig.5. Mycelial mass of *Rhizopus* in various concentration of (NH₄)₂SO₄.

○ - ○: 50% (NH₄)₂SO₄
 △ - △: 100% (NH₄)₂SO₄
 □ - □: 100% (NH₄)₂SO₄ + 0.1% peptone

蛋白質을 Lowry 法(1951)으로 测定한 結果
Rhizopus 屬은 6% 濃度의 48時間 培養된 菌體에서

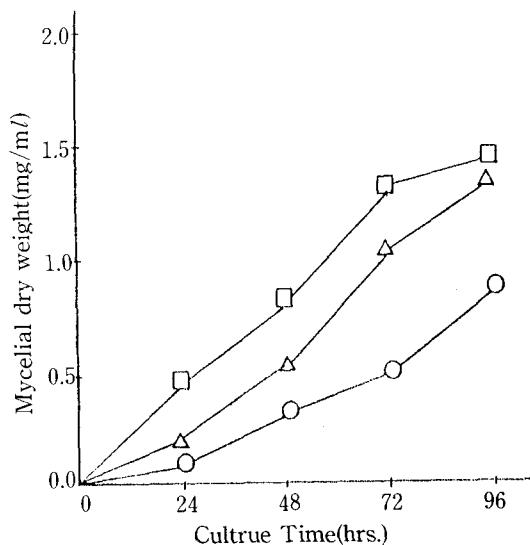


Fig.4. Mycelial mass of *Rhizopus* in Various concentration of NaNO₃.

○ - ○: 50% NaNO₃
 △ - △: 100% NaNO₃
 □ - □: 100% NaNO₃ + 0.1% peptone

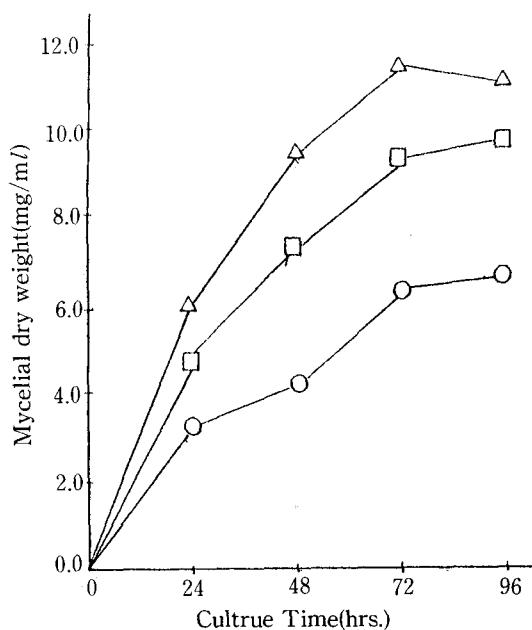


Fig.6. Mycelial mass of *Rhizopus* in various concentration of Urea.

○ - ○: 50% Urea
 △ - △: 100% Urea
 □ - □: 100% Urea + 0.1% peptone

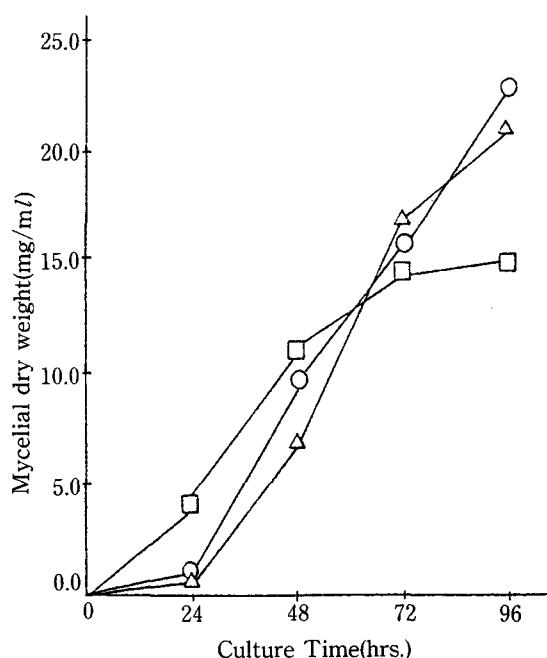


Fig.7. Mycelial mass of *A. niger* in various concentration of NaNO_3 .

○-○: 50% NaNO_3
△-△: 100% NaNO_3
□-□: 100% NaNO_3 + 0.1% peptone

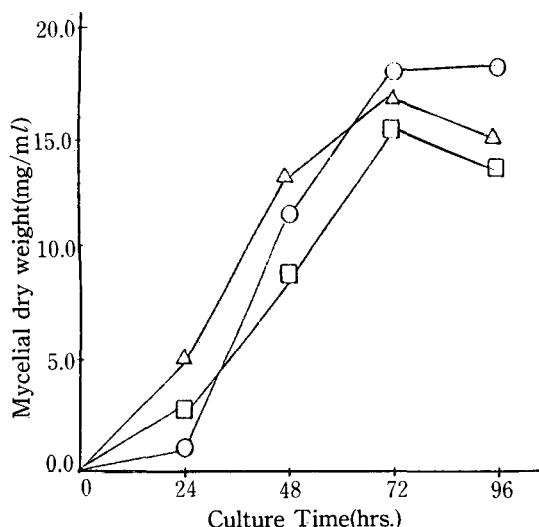


Fig.8. Mycelial mass of *A. niger* in various concentration of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

○-○: 50% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
△-△: 100% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
□-□: 100% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + 0.1% peptone

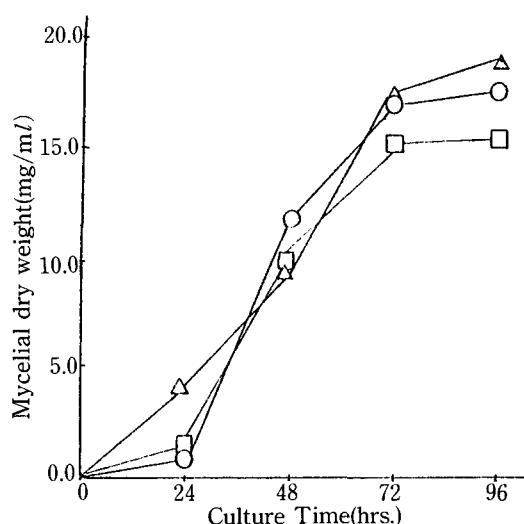


Fig.9. Mycelial mass of *A. niger* in various Concentration of Urea.

○-○: 50% Urea
△-△: 100% Urea
□-□: 100% Urea + 0.1% peptone

Table IV. Chemical analysis of cassava starch (%) / g

Raw material and Mycelial Constituents	Cassava,	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. niger</i>	<i>Rhizopus</i>
Water	11.3	6.6	6.4	7.2
Ash	0.1	5.1	4.1	3.4
Lipid	0.4	12.9	3.7	4.8
Protein	0.4	4.6	11.7	25.7
Carbohydrate	85.7	46.7	54.7	33.7

175 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 으로 가장 많은量의菌體蛋白質을 얻었다.

*Aspergillus niger*와 *Aspergillus fumigatus*에서는 72時間培養된菌體에서 508 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 및 228 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 의菌體蛋白質을 얻었다(Fig. 10, 11, 12).

菌體의澱粉液化酶(m-Amylase)活性

m-amylase活性測定에서 *Rhizopus*屬은活性이培養 144時間만에 *Aspergillus*屬보다 낮게測定되었고, *Aspergillus*屬活性은 Fig. 13-15에 나타나 있다.

走査電子顯微鏡 사진촬영

純粹分離된 곰팡이의胞子 및菌絲는 Fig. 16-18에

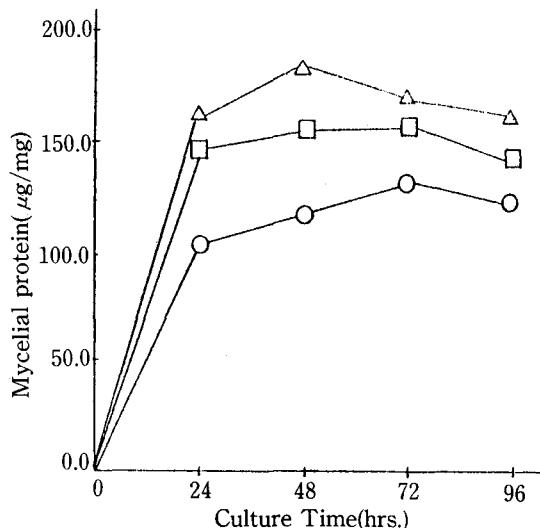


Fig.10. Levels of *Rhizopus* mycelial protein during fermentation.

○ - ○ : 4% Cassava Starch
 △ - △ : 6% Cassava Starch
 □ - □ : 8% Cassava Starch

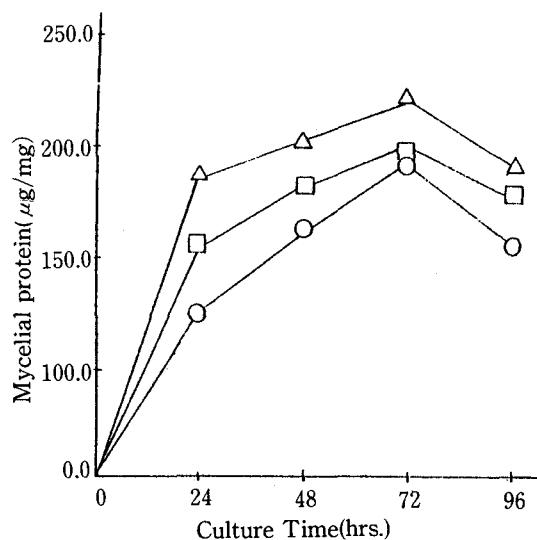


Fig.12. Levels of *Aspergillus fumigatus* mycelial protein during fermentation.

○ - ○ : 4% Cassava Strach
 △ - △ : 6% Cassava Starch
 □ - □ : 8% Cassava Starch

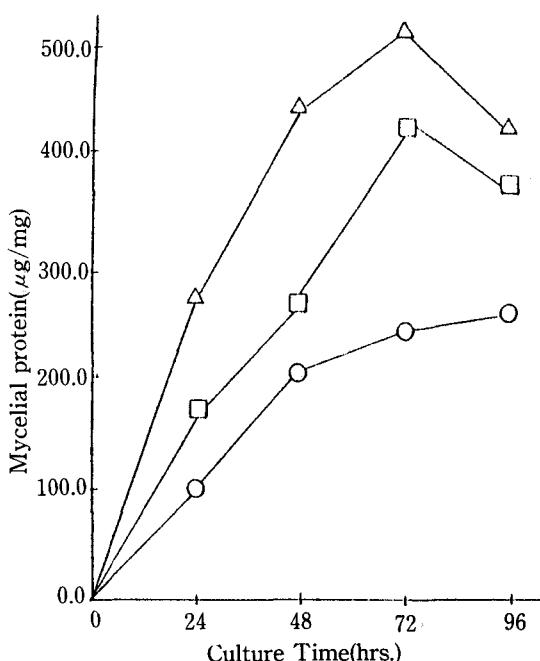


Fig.11. Levels of *Aspergillus niger* mycelial protein during fermentation.

○ - ○ : 4% Cassava Starch
 △ - △ : 6% Cassava Starch
 □ - □ : 8% Cassava Starch

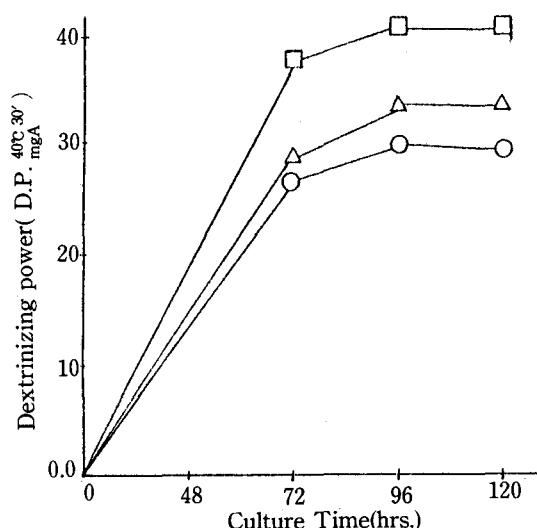


Fig.13. α -amylase activity of the culture broth of *A. niger*.

* D.P.: Dextrinizing power in Fuwa's method
 ○ - ○ : 4% Cassava Starch
 △ - △ : 5% Cassava Starch
 □ - □ : 8% Cassava Starch

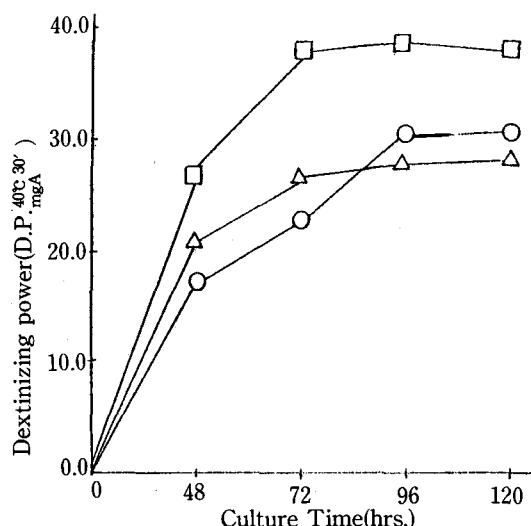


Fig.14. α -Amylase activity of the culture broth of *A. fumigatus*.

* D.P.: Dextrinizing power in Fuwa's method
 ○ - ○ : 4% Cassava Starch
 △ - △ : 6% Cassava Starch
 □ - □ : 8% Cassava Starch

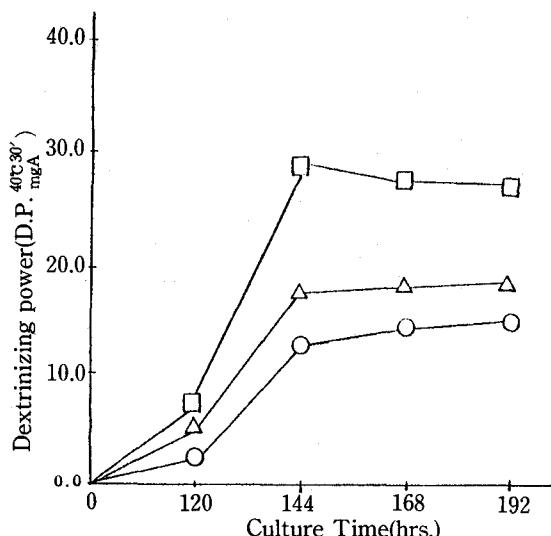


Fig.15. α -Amylase activity of the culture broth of *Rhizopus*.

* D.P.: Dextrinizing power in Fuwa's method
 ○ - ○ : 4% Cassava Starch
 △ - △ : 6% Cassava Starch
 □ - □ : 8% Cassava Starch

培地에 곰팡이를 培養하면서 菌體量을 測定하였을 때
 各濃度의 培地에서 72時間 培養된 菌體量은
Rhizopus 屬은 $0.23\text{ mg}/\text{ml}$, $1.75\text{ mg}/\text{ml}$, 1.27

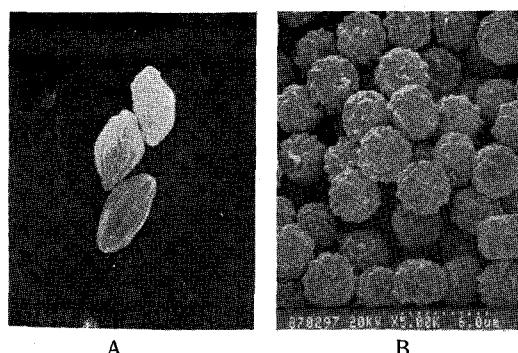


Fig.16. Scanning electron micrographs of the spores of two cultivated forms of *Fungi*.
 (A): The spores of *Rhizopus*(magnification: X 5.000)
 (B): The spores of *Aspergillus*(magnification: X 5.000)

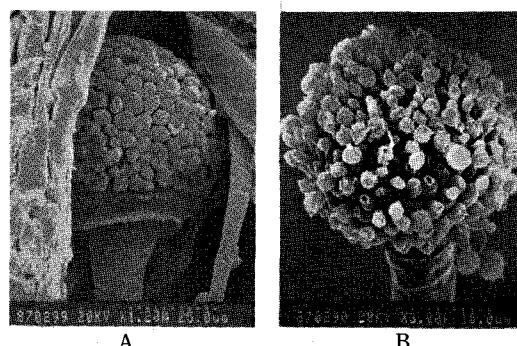


Fig.17. Scanning electron micrographs of the Asexual spores.
 (A): Asexual spores of *Rhizopus*(magnification: X 1.200)
 (B): Asexual spores of *Aspergillus niger*(magnification: X 3.000)

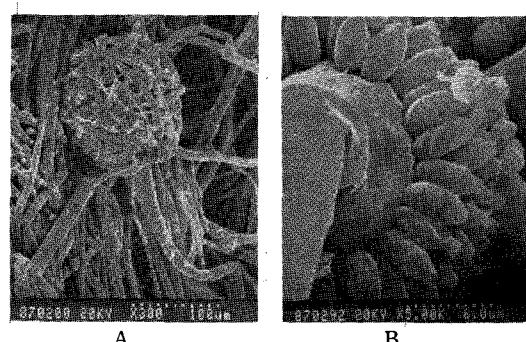


Fig.18. Scanning electron micrographs.
 (A): Mature Zygosporangium of *Rhizopus* surrounded by appendages(magnification: X 3.000)
 (B): Asexual spores of *A. fumigatus* on the sterigmata(magnification: X 5.000)

mg/ml 및 1.21 mg/ml였고, *Aspergillus niger*는 菌體量이 11.5 mg/ml, 19.1 mg/ml, 17.0 mg/ml 및 16.1 mg/ml, *Aspergillus fumigatus*의 菌體量은 12.0 mg/ml, 16.4 mg/ml, 14.6 mg/ml 및 12.4 mg/ml이었으며 Cassava의 澱粉을 6% 含有한 培地에서 菌體의 生產이 가장 많았다. 이 結果는姜(1977)의 *Aspergillus flavus*에서 報告한 Czaper-Dox 培地에서 培養한 菌體生產보다 15%-20% 더 많은 菌體量을 얻었으며 方(1986)이 *Aspergillus niger*에서 報告한 것보다 3-6 mg/ml 더 많은 菌體量을 얻었다. 또한 곰팡이 菌體蛋白質量을 Lowry(1951)法에 依하여 測定하였을 때 培地中 Cassava 澱粉을 6% 含有시킨 培地에서 培養된 菌體의 總蛋白質量은 96時間동안 每 24時間마다 測定하였을 때 單位乾燥重量에 對하여 *Rhizopus* 屬은 160 µg/mg, 175 µg/mg, 168 µg/mg 및 164 µg/mg여서 평균치는 166.8 ng/mg으로 菌體의 約 16.7%이었다. 이 結果는 Gray(1974)가 發表한 0.6%의 蛋白質을 含有하고 있는 Cassava에 0.25% ammonia nitrogen과 0.5% Urea를 使用하여 *Rhizopus oryzae*를 培養시켜 얻은 菌體蛋白質量 23.2%보다는 적었다.

*Aspergillus niger*는 268 µg/mg, 444 µg/mg, 507 µg/mg 및 411 µg/mg 이었고, *Aspergillus fumigatus*는 196 µg/mg, 199 µg/mg, 228 µg/mg 및 181 µg/mg이었으며 72時間 培養된 菌體의 總蛋白質量은 單位乾燥重量에 對해 *Aspergillus niger*는 平均 407.5 µg/mg 으로 40.8%, *Aspergillus fumigatus*는 201 µg/mg으로 菌體의 20.1%가 菌體蛋白質임을 알 수 있다. 이것은 Robinson and Davidson이 Cassava 澱粉培地를 使用해서 *Aspergillus niger*를 培養하여 얻은 菌體蛋白質 測定量인 50%보다 적었으며 方(1986)의 菌體蛋白質 25%보다는 16.3% 더 많았다.

分離된 菌株 *Rhizopus*, *Aspergillus niger* 및 *Aspergillus fumigatus*의 α -amylase 生成을 為한 最適培養條件를 규명하고자 菌體의 生長 및 m-amylase 生成能에 미치는 Cassava 澱粉의 濃度, 時間의 영향·等을 調査한 結果 *Aspergillus niger* 및 *Aspergillus fumigatus*의 두 菌株는 cassava 澱粉 8% 濃度 때 72時間에서 Dextrinizing Power(D.P.)

가 가장 높다. m-amylase 活性은 胞子 形成이 되는 時期 即 72時間後에 나타나기 始作하였으며 이것은 金(1974; 1978)의 研究結果와 一致한다.

菌體의 種類에 따라서 胞子의 微細構造上에 어떤 差가 있는가를 밝히기 為하여 走査顯微鏡으로 胞子의 形態를 摄影한 結果 *Rhizopus*의 zygosporangium을 觀察하였고, 또한 이를 分類와 同定에 活用하였다. 이것은 Donnell(1973)이 電子顯微鏡으로 觀察한 것과 一致한다.

摘要

1. Cassava 澱粉을 利用하여 곰팡이를 28°C에서 96時間 液體定置 培養한 바 培地中의 Cassava 澱粉含量이 6%, 72時間일 때에 菌體量이 가장 많았다.

2. Cassava 澱粉이 6% 含有된 培地에서 곰팡이를 培養하여 얻은 菌體蛋白質量은 *Rhizopus*는 48時間 培養하였을 때 가장 많았고, *Aspergillus niger* 및 *Aspergillus fumigatus*에서는 72時間 培養했을 때 菌體蛋白質量이 많았다.

3. Cassava 澱粉量을 4%, 6% 및 8%되게 變化시킨 培地에서 分離菌을 接種하여 96時間 培養하면서 24時間마다 培養濾液 中의 m-amylase의 活性을 測定한 바 8%濃度에서 *Aspergillus niger* 및 *Aspergillus fumigatus*는 72시간일 때 높은 D.P. 값을 얻었고, *Rhizopus*는 144시간일 때 D.P. 값이 높았다.

参考文獻

- Ainsworth, G.C. and Sparrow, F.K.(1973): The Fungi vol.IV B: 187-217.
- Alexopoulos, C.J. and Mims, C.W.(1973): Introductory Mycology.(3rd ed.) 191-228.
- Brook, E.J., Stanton, W.R. and Wallbridge, A. (1969): Fermentation methods for protein enrichment of Cassava. Biotech. and Bioeng. 11: 1271-1284.
- Chada, Y.R.(1970): Sources of Starch in Commonwealth territories. III; Cassava. Tropical Science: 101-113.
- Chesson, A., Morgan, J.J. and Codner, R.C.(1978): Comparative electrophoretic study of proteins of Acremoniumlike Hyphomycets-Trans. Br. Mycol. soc. 70(3): 345-361.

- Fuwa, H.,(1954): A New Method for Microdetermination of Amylase activity by the use of Amylose as the Substrate. *J. Biochem.* 41(5): 583-603.
- Gray, W.D.(1966): Fungal protein for food and feeds. I. Introduction. *Economic Botany*. 20(1): 89-93.
- Gyar, W.D. and Abou-el-seoud, M.O.(1966): Fungal protein for food and feeds. II. whole sweet potato as a substrate. *Economic Botany*. 20(2): 119-126.
- Gray, W.D. and Abou-el-seoud, M.D.(1966): Fungal protein for food and feeds. III. Manioc as a potential crude raw material for tropical areas, *Economic Botany*, 20(3): 251-255.
- Gyay's I.R.(1974): The enrichment of Cassava with protein by moistsolids fermentation. *Trop. Sci.* 16(4): 179-194.
- Gray S.M. and Douglas M.J.(1979): Mycology for the Clinical Laboratory. *Mucormycosis Chapter 5*: 99-106.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.R., Farr, A.J. and Rand-all, R.J.(1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Noparatnaraporn, N. and Nishizawa, Y.(1983): Single cell protein production from Cassava Starch by *Rhodopseudomonas gelatinosa*. *Ferment. Technol.* 61(5): 515-519.
- Park, Y.K., Cella. and Zenin, T.(1982): Microflora in Beiju and Their Biochemical Characteristics. *Ferment. Technol.* 60(1): 1-4.
- Raper, K.B. and Fennell D.T.(1965): The Genus *Aspergillus*, 686. Williams and Wilkins, Baltimore, Md. U.S.A.
- Robinson, R.F. and Davidson, R.S.(1950): The large scale growth of higher fungi, Adv. in Applied Microbiol. 1: 261-278. Academic press. Inc. New York.
- Shu, P. and Blackwood, A.C. (1950): Studies on Carbon and Nitrogen Sources for the production of Amylolytic Enzymes by submerged culture of *Aspergillus niger*. *J. Botany*. 29(104): 113-124.
- 新澤信男(1973) : 將來の畜産の方向をさぐる, 飼料と飼料工業. 東京. 13(10).
- 裴武(1984) : Cassava Starch의 無蒸煮糖化에 依한 에타놀 酸酵에 關한 研究(II). *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* 12(4) : 301-304.
- 方晶熙(1986) : Cassava Starch을 利用한 *Aspergillus niger*의 菌體生產研究. 梨花女大 碩士學位論文. 222.
- 金鍾協(1974) : 菌體蛋白資源(SCP)의 開發方向, 海外技術情報. Korstic 6(2): 107-113.
- 姜德委(1977) : *Aspergillus Flavus*의 Amylase 生成能에 미치는 炭素源의 影響. 高麗大學校 碩士學位論文. 1-20.
- 金鍾協(1978) : 검정곰팡이의 形태분화에 따른 세포 외성호소의 신생적 생합성에 관한 연구. 韓國菌學會. 6(2) : 1-10.
- 加藤清昭(1973) : The second international symposium single cell protein 11(11): 742-746.
- 李啓湖(1976) : 우리나라의 酸酵酒精의 發展과 展望. 118-139.
- 衛生試驗法·注解(1983) : 日本藥學會編. 139-178.
- 食品分析法(1978) : 永原太郎, 岩尾裕之, 久保彰治 119-121.

Accepted for Publication 9 November