

生澱粉 資化性 微生物의 分離와 性質에 관한 研究(I)

— *Aspergillus* sp. SN-871의 분리와 효소 생산조건 —

서명자·노경희

부산대학교 가정대학 식품영양학과

Studies on the screening and properties of Raw Starch Saccharifying Microorganism.(I)

— Selection, optimum condition of enzyme production of *Aspergillus* sp. SN-871. —

Myung-Ja Suh·Kyoung-Hee Nho

Dept. of Food & Nutrition, Home Economic College Pusan National University, Pusan 607, Korea

ABSTRACT: The studies on the screening and properties of Raw Starch Saccharifying Microorganism were as follows; Apotent mold strain was selected and screened to digest raw starch, which was classified as a strain of *Aspergillus* sp. SN-871.

The crude enzyme production was maximized when grown on wheat bran media for 5 days at 30°C and pH 4.0.

The stable range of pH was 2 to 5.

KEYWORDS: Raw starch saccharifying microorganism, *Aspergillus* sp., SN-871, Crude enzyme production.

전분으로부터 저분자 당류로 분해하기 위한 효소 처리에 대해서는 많이 알려져 왔으나(French 등, 1974; Whitaker, 1972) 생전분에 작용하는 amylase는 몇 종류의 미생물만이 생전분을 분해할 수 있는 amylase 생산균으로서 연구 보고되고 있다.

생전분을 가수분해 가능한 amylase의 생산균으로는 *Aspergillus awamori*와 *Uralar paradoxa*, *Aspergillus* sp., *Streptococcus* sp., *Rhizopus oryzae*, *Aspergillus cinnamoneus*, *Aspergillus niger*, *Rhodosporidium* sp., *Aspergillus shirousami*, *Bacillus circulans*와 *Aspergillus awamor var kawachii* 등이 알려져 있다(Rose, 1980; 上田, 1978; Sredby 등, 1974; Taniguchi 등, 1982; Akaki 등, 1984; 김찬조 등, 1975; 1985; 久留 등, 1974; 정만재, 1981; 1982; Buchman 등, 1974).

한편 국내에서의 생전분에 작용하는 amylase에 관한 연구보고는 최근 배등(1984), 손등(1983) 및

김등(1975)의 연구보고가 있으며, 생전분 분해효소의 작용기작에 관한 연구로서는 Hayasida 등(1982) Fuwa 등(1979)의 연구보고가 있다.

전분질 가수분해 효소가 식품가공, 농산물 폐기물 처리와 폐수처리 등의 여러방면에 그 이용 가능성에 관한 관심이 고조되어가고 있으며(손천배 등, 1983) 또한 주정공업이나 전분공업에서 증자의 공정을 간소화시키며, energy를 절감하고 ethanol 생산에도 효율적인 활용을 위한 연구가 진행중이다.

이런 점들을 고려하여 본 연구는 폐수, 토양등의 자연으로부터 생전분 분해효소를 가지고 있는 균을 분리, 동정 및 그 효소의 최적 생산조건을 살펴보기에 이에 보고하는 바이다.

材料 및 方法

균주분리 및 분리균주 배양

Table I. Composition of media used for isolation of mold, yeast and bacteria. Composition of medium for wheat bran.

mold medium		yeast medium		bacteria medium		wheat bran medium	
polypeptone	1%	yeast extract	0.01%	yeast extract	0.2%	wheat bran	10 g
yeast extract	0.5%	(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5%	NaNO ₃	0.2%	D. W.	8 ml
K ₂ HPO ₄	0.3%	KH ₂ PO ₄	0.1%	K ₂ HPO ₄	0.1%	raw soluble	
KH ₂ PO ₄	0.3%	MgSO ₄	0.05%	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.05%	starch	0.1 g
NaCl	0.1%	raw soluble		KCl	0.05%		
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.01%	starch	1 %	FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.01%		
raw soluble				raw soluble			
starch	1 %			starch	2 %		
pH 7.0		pH 5.4		pH 4.5			

1986年 동래구 사직동에 소재한 방앗간의 폐수, 주정회사의 폐수, 산성막걸리 공장의 토양을 Table 1에 의한 분리용 배지에 접종하여 생전분 당화능이 있는 균을 선택하여 순수분리하였다.

조효소액 제조

순수분리된 곰팡이는 밀기를 배지에서 배양한 후 증류수를 加하여 상온에서 정확히 3시간 침출한 후 그 여액을, 그리고 세균, 효모는 Table I과 같은 배지에서 배양한 후 그 상등액을 조효소액으로 하였다.

효소활성 측정

환원당 비색정량법인 Somogyi-Nelson法에 준하여 540 nm와 500 nm에서 흡광도를 측정하였다 (Somogyi, 1952).

효소반응은 100 ml 삼각플라스크에 기질로 가용성 전분을 2.5%를 넣은 후 증류수 15 ml와 0.1 M 초산원충액 (pH 4.0) 4 ml를 가하여 40°C, 60분간 반응시킨 후 즉시 0.1 N NaOH 10 ml를 가하여 효소 반응을 정지시킨 후 여액 중 0.5 ml를 취하여 500 nm와 540 nm에서 효소활성을 측정하였다.

효소활성 단위는 40°C, 60분간의 반응조건에서 효소액 1 ml가 1 mg의 glucose를 유리시키는 양을 역가로서 1 Raw Starch Saccharifying Unit(R. SAU)로 표시하였다.

동 정

순수분리한 세균 35종, 효모 29종, 곰팡이 40종 중 가장 생전분 당화력이 강한 곰팡이 1종을 선택하여 "A Manual of the *Aspergilli*"에 준하여 동정을

행하였다(Thom 등, 1945; Raper 등, 1965).

pH 안정성

원충액의 pH를 pH 1.0에서 8.0까지 (pH 1.0에서 5.0; 0.1 M 식초산 원충용액, pH 6.0에서 8.0; 0.

Table II. Morphological characteristics of *Aspergillus* sp. SN-871.

colony character	rate of growth texture colour above reverse	slowly spread roughly black yellow
conidial heads	colour shape size	brown globose 250-300 μm
conidophores	colour marking length width	colourless upper; brown smooth 1000-2000 10-15 μm
vesicle	colour shape size origino	yellowish brown globose 40 μm substratum
primary strigma	length width	20-25 μm 4.0
conidia	colour form size	coffee globose 3-4 μm

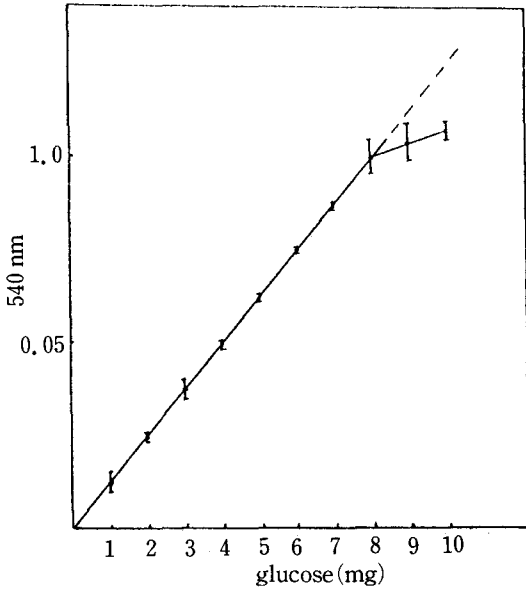


Fig.1. Glucose standard curve.

1 M 인산완충용액) 각각 조절하여 1% 생전분 용액 1ml와 효소액 0.5ml를 加하여 37°C에서 30분간 반응시켜 pH 안정성을 측정하였다.

結果 및 考察

동 정

총 분리균주 104종 중 가장 활성이 강한 곰팡이 1종을 선택하여 동정한 결과 Table II에서 보는 바와 같이 그 형태학적, 배양학적 특성으로 보아 *Aspergillus* sp. SN-871로 동정되었다. 특히 본 균은 *Aspergillus niger*에 속하는 것으로 사료되었다.

pH에 따른 amylase의 생산

밀기울 배지의 pH를 3.0에서 9.0까지 각각 조절하여 30°C에서 배양하여 amylase 활성을 측정한 결과 Fig. 2에서 나타난 바와 같이 pH 4.0에서 가장 강하였다.

이것은 Akaki 등이(1984) 효소의 pH가 5.0부근에서 최적을 나타낸다는 보고와 곰팡이류의 glycoamylase 생산이 pH 5.0 부근에서 가장 높았다는 보고가 있으나 김 등의(1985; 1975) 연구보고에서는 생전분당화효소인 *Rhizopus oryzae*의 효소생산 최적 pH가 약 3.5에서 4.0이었으며, 오히려 pH 5.0에서 보다 3.0에서 더 높은 효소활성을 보였다는 결과는 본 실험과 일치하였다.

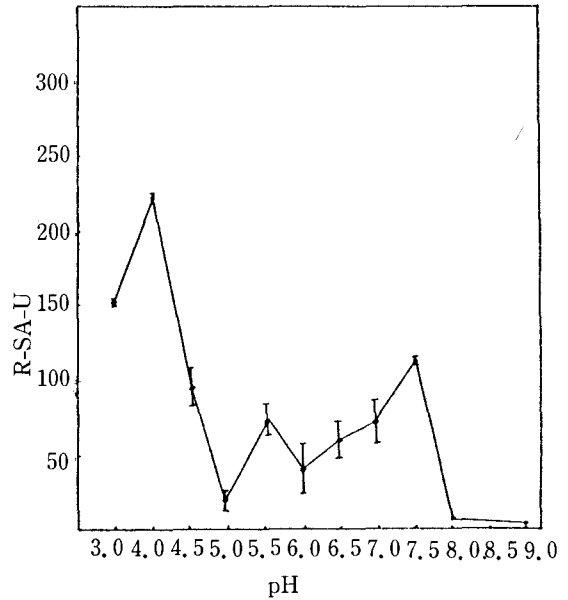


Fig.2. Effect of pH of the media on the production of raw starch saccharifying enzyme at 30°C.

온도에 따른 amylase의 생산

pH 4.0일 때 온도를 25°C에서 40°C로 조절하여 3일간 배양한 결과 30°C에서 효소활성이 가장 강하게 나타났다(Fig. 3).

이것은 역시 손 등의(1983) *Aspergillus niger*와 그 변이주의 생전분 당화효소생산 최적온도가 30°C였다는 보고와 같은 결과를 나타냈다. 그리고 조의(1984) 생전분 분해효소에 관한 연구에서도 일치된 결과를 보였다.

배양시간에 따른 amylase의 생산

pH 4.0에서 30°C일 때 배양기간을 1일에서 6일로

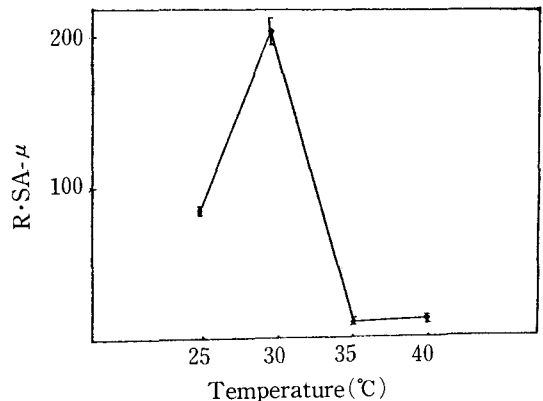


Fig.3. Effect of temperature on the production of raw starch saccharifying enzyme.

Table III. Effect of addition of carbon sources on wheat bran medium.

1 %	amylase activity(R. SA-U)
raw rice starch	191.89±7.99
raw sweet potato starch	107.25±0.98
raw potato starch	121.68±2.93
raw soluble starch(control)	169.26±4.97
raw corn starch	295.23±7.02
0.5 %	
lactose	47.27±9.23
fructose	150.65±9.14
raffinose	28.94±7.09
dextrose	36.36±1.39
galactose	97.96±0.02
arabinose	97.96±9.34
xylose	76.44±2.15
cooked corn starch	51.21±0.95

조절하여 배양한 결과 5일일 때 가장 활성이 강하게 나타났다(Fig. 4).

이것은 Ueda(1956 ; 1957)의 Black-koji Molds

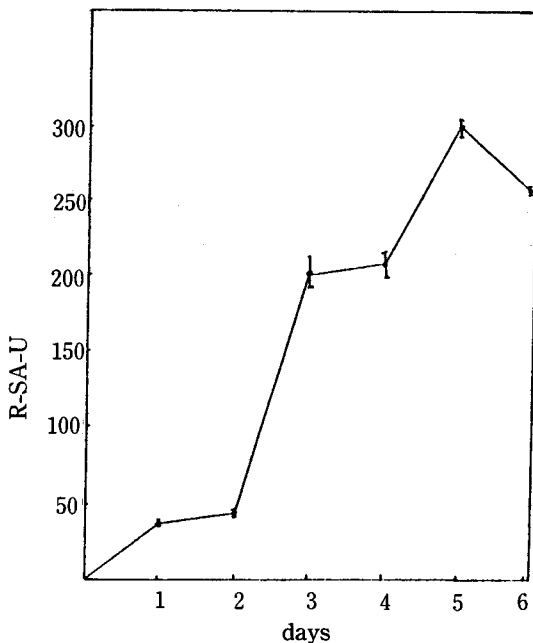


Fig. 4. Effect of cultivation time on the production of raw starch saccharifying enzyme.

의 amylolytic계에 대한 연구 중 생전분 분해효소에 대한 실험결과와 유사한 결과를 보였다.

탄소원의 영향

Table III에서 보는 바와 같이 raw rice starch, raw sweet potato starch, raw potato starch, raw soluble starch, raw corn starch를 각각 1%씩 첨가하여 탄소원의 영향을 본 결과 raw corn starch가 현저히 높게 나타났다.

또한 lactose, fructose, raffinose, dextrose, galactose, arabinose, xylose, corn starch를 생전분 대신에 0.5%를 첨가하여 배양하였을 때의 이용률은 Table III에서와 같이 fructose가 높은 반면 raffinose가 현저히 낮게 나타났다. 조(1987)의 *Penicillium* sp. SC-865의 연구에서 보면 액체배지에 0.5%의 탄소원으로 fructose와 glucose를 첨가하였을 때 효소활성이 현저히 저하되었다는 연구보고와 비교해 보면 상반된 결과를 보여주었다.

질소원의 영향

1%의 raw soluble starch를 첨가한 배지에 0.1%의 각종 질소원으로서 peptone, tryptone, Urea, NaNO₃, (NH₄)₂SO₄, NH₄Cl, NH₄NO₃ 등을 첨가하였을 때의 효과를 보면 NaNO₃첨가시 효소활성이 현저히 증가함을 볼 수 있었다(Table V). 유기태 질소원인 Urea는 현저히 효소활성이 저하되었으나 peptone과 무기태 질소원인 NaNO₃ 첨가시는 상당히 증가되었다.

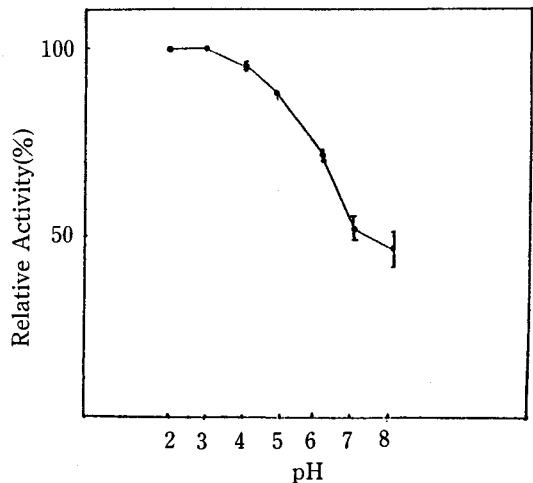


Fig. 5. Effect of pH on the stability of amylase by *Aspergillus* sp. SN-871.

The enzyme was incubated in various buffer(pH 1.0 to 5.0, 0.1 M acetate buffer; pH 6.0 to 8.0, 0.1 M phosphate buffer) at 37°C for 30 min.

Table IV. Effect of addition of nitrogen sources on wheat bran medium.

N=0.1 %	amylase activity (R. SA-U)
peptone	218.01±0.98
tryptone	144.3±4.88
urea	54.46±2.83
NaNO ₃	741.39±8.53
(NH ₄) ₂ SO ₄	110.76±3.71
NH ₄ Cl	126.36±2.34
NH ₄ NO ₃	104.91±1.95
control	171.2±5.3

김 등(1975 ; 1985)의 amylase의 최적배양 조건에 관한 연구에서 Urea가 가장 효과가 좋다는 보고와는 서로 상반된 결과를 보였다.

pH 안정성

효소의 pH 안정성을 살펴 본 결과 Fig. 5에서 보듯이 pH 2에서 5까지는 거의 안정한 편이나 pH 7에서는 현저히 활성이 저하됨을 알 수 있었다. 이 효소는 비교적 산에 안정한 편이었다.

摘 要

생전분 당화효소 생산능이 우수한 균주를 얻기 위하여 방앗간의 폐수, 주정회사의 폐수와 산성막걸리 공장의 토양 등에서 생전분 당화효소 생산능이 있는 효모 29종, 세균 35종, 곰팡이 40종을 순수분리하고 이들중에서 가장 생전분 당화력이 강한 곰팡이 1종을 선정하여 동정한 후 효소생산 조건과 pH 안정성을 측정 한 결과는 다음과 같다.

1. 생전분 당화효소 생산능이 가장 강한 분리균주는 *Aspergillus* sp. SN-871로 동정되었다.
2. 효소생산 조건은 pH 4.0, 온도 30°C와 배양기간이 5일 일때 가장 좋았다.
3. 탄소원으로 생전분 종류에서는 1% raw corn starch 첨가시, 생전분 대신의 첨가에서는 0.5% fructose 첨가시 효과가 가장 좋았다.
4. 질소원으로는 0.1%의 NaNO₃ 첨가가 가장 효과가 좋았다.
5. 조효소의 pH 안정범위는 pH 2.0에서 pH 5.0 까지가 비교적 안정하였다.

參考文獻

- Akaki, M., Kawamura, R. and Yamada, T.(1984): Selection, Identification and properties of Yeast that Assimilate Starch. *Nipp. Nog. Kaishi*. **58**(2): 153-159.
- Buchaman, R.E., Gibbon, N.E.(1974): *Bergeys Natural of Determinative Bacteriology* 8. Baltimore, The Williams and Wilkinson.
- Fuwa, H.Y., Sugimoto and Takaya, T.(1979): Crystallization of m-type amylase of *Aspergillus candidus* var *amylolyticus*. *J. Japan. Soc. Starch Sci.* **26**: 105.
- Hayashida, S., Kunisahi, S. Nakao, M. and Flor, P. Q.(1982): Evidence for Raw starch-affinity site on *Aspergillus awamori* Glucoamylase I. *Agr. Biol. Chem.* **46**(1): 83-89.
- Jorn, R. and French, D.(1963): Action pattern and specificity of an amylase from *Bacillus subtilis*. *Arch Biochem. Biophys* **100**: 451.
- John, R.W.(1972): Principles of enzymology for the Food Science. *Marcel Dekker Inc.* N.Y: 442.
- Minoda, Y., Arai, M. Torigoe, Y. and Yamada, K. (1968): Acid-stable m-amylase of *Black Aspergilli*. *Agr. Biol. Chem.* **32**(1): 110-113.
- Raper, K.B. and Fennel, P.L.(1965): The Genus *Aspergillus*. Williams & Wilkins Baltimore.
- Rose, A.H.(1980): Economic Microbiology. *Academic Press*. 128-149.
- Somogyi, M.(1952): Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.* **195**: 19.
- Sredby, O., Yamamoto, T, Katutan, K Matsumura, T. and Iizuka, M.(1981): Ethanol fermentation of Uncooked Sweet Potato with the Application of Enzyme. *J. Fermt. Technol.* **59**(6):780-785.
- Taniguchi, H., Odashina and Nakamura, M.(1982): Characterization of a Potato Starch-digesting *Bacterium* and Its Production of Amylase. *Agr. Biol. Chem.* **46**: 2107-2115.
- Thom and Raper(1945): Manual of the *Aspergilli*. The Williams and Wilkins Com.
- Ueda, S.(1956): Studies on the Amyolytic system of the *Black-Koji Molds(part I)*. *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan* **20**: 148-154.
- Ueda, S.(1957): Studies on the Amyolytic system of the *Black-Koji Molds(part II)*. *Bull. Agr. Chem.*

- Soc. Japan 21(5): 284-290.
- 김찬조, 오만진, 이종수(1975) : *Rhizopus oryzae*가 생성하는 생전분 분해효소에 대한 연구. 한국 식품 과학회지 3 (3): 185-190.
- 김찬조, 오만진, 이종수(1985) : *Rhizopus oryzae*에 의한 생전분 분해효소에 관한 연구. 한국 산업 미생물 학회지 13 (4) : 329-337.
- 배무, 이재문(1984) : 캣사바 전분의 무증자 당화에 의한 ethanol 발효에 관한 연구. 한국 산업 미생물 학회지 12(4): 261-264.
- 손천배, 박윤중(1983) : *Aspergillus niger*와 그 변이주의 생전분 당화효소에 관한 연구. 충남대 농기 연보 10(1) : 166-185.
- 정만재, 谷田肇, 丸山芳治(1981) : *Bacillus circulans* F-2가 생산하는 m-amylase에 관한 연구 (I), 한국 산업 미생물 학회지 9 (3): 185-190.
- 조영경(1987) : *Penicillium* sp. SC-865의 생전분 당화효소에 관한 연구. 부산대학교 석사학위 논문집.
- 久留島通俊, 佐藤淳司, 北原覺雄(1974) : Raw Sarch Saccharifying Amylase of *Aspergillus cinnamomeus*. 日農化誌 48: 379-384.
- 上田誠之助(1978) : Alcoholic Fermentation of Rice without Previous Cooking by Using *Black-koji* amylase. 澱分科學 25: 124-131.

Accepted for Publication 9 November