

우리나라 재래 소주에 관한 미생물학적 연구

제 1 보. 영광 토종국에서 분리한 곰팡이의 Amylase 활성

정 원 휘 · 강 성 훈* · 정 지 흔*

주식회사 화영, *전남대학교 농과대학 식품공학과
(1987년 8월 30일 수리)

Microbial Studies on the Korean Traditional Soju

Part 1. Characteristics of Fungal Amylases Produced by the Isolate from the Native Youngkwang Koji

Won-Hwi Chung, Sung-Hoon Kang* and Ji-Heun Jung*

Research and Development Division, Wha Yöng Foods Ltd., Inchon,

*Department of Food Science and Technology, Chonnam National University, Kwangju, Korea

Abstract

The most active strain for the amylase activity from the native Youngkwang koji, was isolated and identified as *Aspergillus awamori*. The optimal conditions for the production of α -amylase and glucoamylase were investigated and the properties of these enzymes were also examined. Maximum yields of α -amylase and glucoamylase were obtained at 30°C, pH 5.0 for days. The production of these two enzymes were increased with the addition of maltose, urea, K_2HPO_4 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, and $CaCl_2 \cdot 2H_2O$. The activities of these enzymes were maximized at 50°C, pH 5~6. The heat stabilities of α -amylase and glucoamylase were maintained at 50°C for 20min and 40min, respectively. Also, the addition of $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, K_2HPO_4 , and $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ salt increased the heat stabilities of these enzymes.

서 론

전분질의 액화 및 당화작용에 관여하는 효소인 amylase는 α -amylase, β -amylase, glucoamylase의 3 group으로 크게 나누어지는데 이들 각 효소의 특성은 미생물 또는 동식물 등의 source에 따라 다르기 때문에 높은 활성을 갖는 효소의 발견과 효소 생산체계의 확립은 발효공업에서 중요시되고 있다.¹⁻³⁾ 이에 관한 연구는 α -amylase와 glucoamylase의 생산 및 정제효소활성의 특성과 반응기작에 관한 Barton⁴⁾ 및 Lineback^{5,6)} 등의 보고가 있으며 특히 우리나라 재래곡자에 대한 연구는 上野⁷⁾를 비롯하여 長西는 당화력이 강한 곡자 제조와 제곡법의 개량과 함께 백국균의 공업적 가

치를 인정하였다. 그후 배지에 따른 효소 생산성에 대해서 장⁹⁾, 이¹⁰⁾ 등은 밀기울을 배지로 할 때 가장 활성이 높은 효소생산을 기대할 수 있다고 하였다. 한편 우리나라의 전통 소주인 영광의 재래토종주 제조시 이용되는 토종국에서의 효소활성 및 특성에 관한 연구가 미흡한 바 본 연구는 토종국에서 amylase 생산성이 우수한 균주를 분리하고 분리균주의 α -amylase와 glucoamylase 생산의 최적 배양조건과 효소특성에 관하여 검토하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

본 실험에 사용한 토종국은 1985년 10월 전남 영광에서 가내제조된 것으로 효소생산의 기본배지

로는 시판용 밀기울을 사용하였다.

2. 균주분리 및 동정

토종국 1g을 dilution method로 1×10^{-4} 희석한 후 표 1의 기본배지를 사용하여 상법으로 순수분리하였다. 분리된 곰팡이중 amylase 생산성이 가장 우수한 균주를 선정하기 위해 0.01N iodine 용액으로 착색시킨 표 2 배지를 사용하여 cork borer method¹¹⁾로 최종선발하였다. 최종선발된 균주의 동정은 slide culture¹²⁾ 등을 행하여 Raper와 Fennel의 분류법¹³⁾에 따라 실시하였고 colony는 Czapek-Dox medium에 평판배양한 후 관찰하였다.

3. 효소활성 측정

조효소액의 조제 : 250ml elenmeyer flask에 밀기울 10g와 동량의 증류수를 혼합, 살균한 후 순

Table 1. Composition* of the basal medium for isolation

Ingredients	Amount(g)
Dextrose	10.0
NaCl	20.0
Peptone	5.0
KH ₂ PO ₄	1.0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5
Streptomycin	0.03
Rosebengal	0.03
Agar	15.0

* Dissolved in 1,000ml distilled water and adjusted the final pH at 5.0

Table 2. Composition* of the starch-agar medium for amylase activity determination

Ingredients	Amount(g)
Soluble starch	30.0
Peptone	20.0
KH ₂ PO ₄	5.0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	2.5
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.05
Agar	15.0

* Dissolved in 1,000ml distilled water and adjusted the final pH at 5.0

수분리된 균주를 1백금이양 접종하여 30°C에서 3일간 배양한 후 10배량의 증류수와 toluene 1ml를 가하고 2시간 진탕한 다음 여과하고 6,000×g에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 조효소액으로 하였다.

α -Amylase의 활성 측정 : McCready와 Hassid¹⁴⁾ 방법에 따라 1% soluble starch 용액 5ml와 조효소액 1ml를 test tube에 넣고 50°C에서 15분간 반응시킨 후, 0.1N HCl 1ml를 가하여 효소반응을 정지시켜 0.005% I₂-0.5% KI 용액으로 발색시켜 spectrophotometer(660nm)로 흡광도를 측정하였다. 이 때 α -amylase 역가측정은 blue value를 1% 저하시키는 효소의 역가를 1 dextrogenic unit of nagase(1 DUN)로 나타냈으며 계산식은 다음과 같다.

$$1 \text{ DUN} = \frac{Ab - Ab'}{Ab} \times \frac{100}{15} \times n$$

(Ab : Blank OD, Ab' : 효소반응액의 OD, n : 희석배수)

Glucoamylase의 활성 측정 : Sumner의 방법¹⁵⁾에 따라 3,5-dinitrosalisilic acid(DNS)로 측정하였고 효소역가는 효소액 1ml가 1분간에 생성하는 glucose 1 μ g을 1 unit로 하였다.

효소생산 최적조건 : 분리균주의 α -amylase와 glucoamylase의 최적 생산조건을 규명하기 위해 배양시간을 30°C에서 24시간 간격으로 5일간, 배양온도는 15~50°C에서 5°C 간격으로, 탄소원, 질소원 및 무기염류의 종류와 농도에 따른 효소 생산성에 미치는 영향을 검토하였다.

효소활성과 pH 및 열안정성 : 효소활성의 최적 반응온도와 pH는 25~60°C 및 pH 2.0~10.0에서 측정하고 열안정성은 30~70°C에서 10°C 간격으로 각 온도별로 20분 간격으로 1시간 동안 열처리 후 측정하였다. pH 안정성은 pH 2.0~10.0에서 완충용액과 효소액을 1 : 1로 혼합하여 4°C에서 12시간 방치후 잔존활성을 측정하였다.

무기염 첨가에 따른 열 및 pH 안정성 : 최적효소생산에 요구되는 무기염류로서 0.08% K₂HPO₄와 MgSO₄·7H₂O 및 0.06% CaCl₂·2H₂O를 각각 첨가하여 배양한 후 얻은 효소액에 대해 열, pH 안정성은 위와 같은 방법으로 측정하였다.

결과 및 고찰

1. 균주의 분리, 동정

Table 3. Decomposition ability of starch-agar medium of the isolates

Strain No.	Diameter of zone (cm)	Area activity zone (cm ²)
M-1	1.10	0.40
M-2	1.43	0.40
M-3	2.02	0.80
M-4	1.67	0.55
M-5	1.55	0.47

Table 4. Morphological characteristics of the isolate M-3

Characteristics	<i>Aspergillus awamori</i>	M-3
Hyphae	+	+
Septa	+	+
Conidia	+	+
Conidiophore	+	+
Foot cell	+	+
Vesicle	+	+
Conidia head	Globose	Globose
	Globose or Subglobose	Globose
	Brown or Brownish black	Brown
Sterigmata	Two series	Two series
Ascospore	—	—
Sclerotia	—	—
Huller cell	—	—

Table 5. Optimal culture conditions and medium composition for the maximum production of amylases by the isolate M-3

Ingredients	Condition	Activity	
		α -Amylase (DUN)*	Glucoamylase (μ g/ml)
Incubation time	3 days	84.9	105.1
Temperature	30°C	85.5	105.0
Carbon source	4%(w/w) maltose	90.3	148.7
Nitrogen source	0.2%(w/w) urea	90.6	138.4
Magnesium source	0.08%(w/w) MgSO ₄ ·7H ₂ O	89.3	136.8
K and P source	0.08%(w/w) K ₂ HPO ₄	92.5	144.7
Calcium source	0.06%(w/w) CaCl ₂ ·2H ₂ O	91.2	139.2

* Abbreviation of dextronic unit of nagase

전남 영광지방의 토종국에서 표 1의 분리용배지를 사용하여 5 균주를 순수분리했으며 cork border 법¹¹⁾으로 효소활성을 측정된 결과 표 3에서와 같이 M-3 균주가 가장 우수하여 최종선발하였다. 선발균주는 *Asp.*屬 특징의 하나인 균사(두께 4~6 μ)의 일부가 팽대한 병쪽세포에서 분생자병(두께 6~8 μ , 길이 400~500 μ)을 수직으로 분지하였으며 분생자 표면은 매끄러웠다. 또한 agar-plate에서 colony color는 초기에는 황갈색에서 점차 갈색으로 변하였다. M-3 균주의 형태를 관찰한 결과는 표 4와 같으며 이는 Raper와 Fennel, 그리고 Iizuka와 Yamaguchi¹⁶⁾가 보고한 *Asp.*屬의 *Asp. awamori*와 일치되어 M-3 균주는 *Asp. awamori*로 밝혀졌으며 이 균주를 본 실험에 사용하였다.

2. 효소생산 최적조건

α -Amylase와 glucoamylase의 최적생산조건을 검토한 결과는 표 5와 같다.

3. 효소활성 최적온도 및 pH

온도에 따른 효소활성을 측정된 결과 그림 1과 같이 두 효소 모두 50°C에서 최대활성을 나타냈는데 김¹⁷⁾ 등과 Kundu¹⁸⁾ 등의 *Asp. niger*가 생산한 효소활성온도와 같은 경향을 나타냈고, pH 영향은 그림 2에서와 같이 pH 5.0~6.0에서 최대였는데 Alazard와 Raimbault¹⁹⁾는 *Asp.* sp.가 생산한 두 효소의 최적 pH는 4.0~6.5라고 보고하였다.

4. 효소의 열 및 pH 안정성

열안정성 : 효소의 열안정성은 그림 3과 4와 같

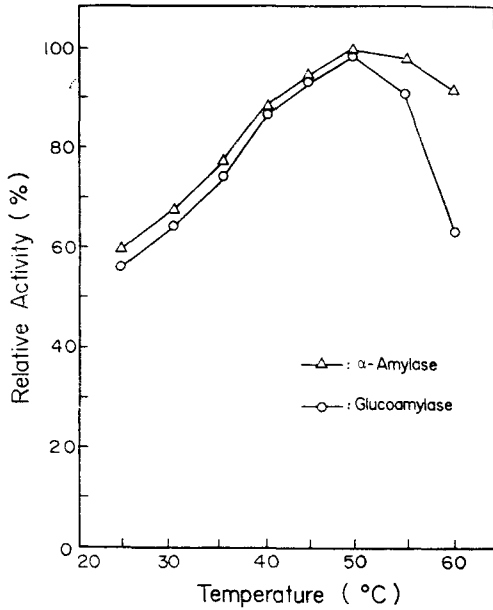


Fig. 1. Effect of temperature on the activities of amylase

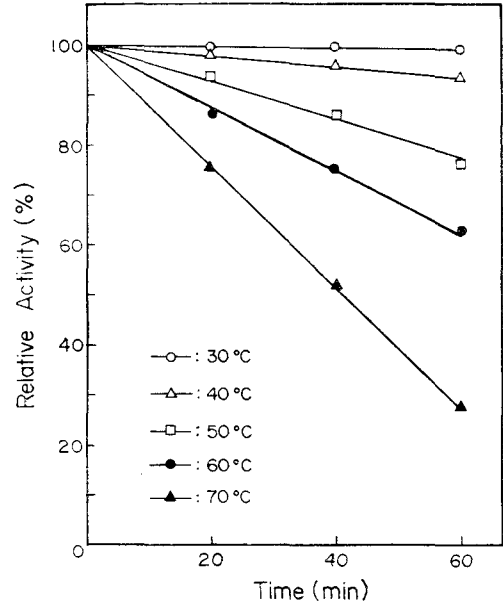


Fig. 3. Effect of temperature on the stability of α-amylase activity

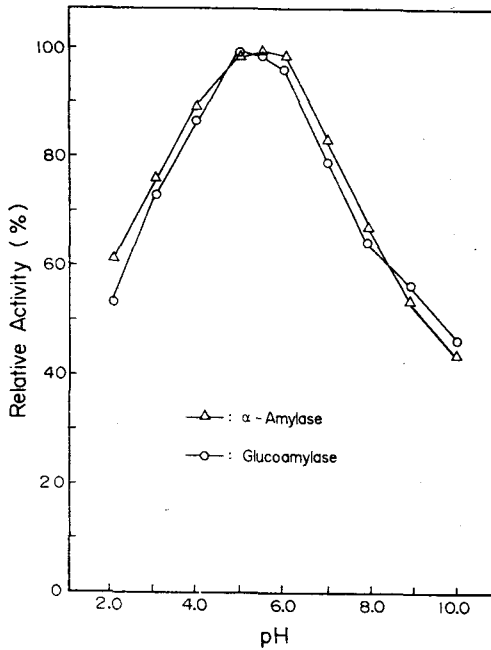


Fig. 2. Effect of pH on the activities of amylase. MacIlvine buffer solution was used at pH of 2.0 to 7.0, and Clark-Lubs buffer solution was used at pH of 8.0 to 10.0

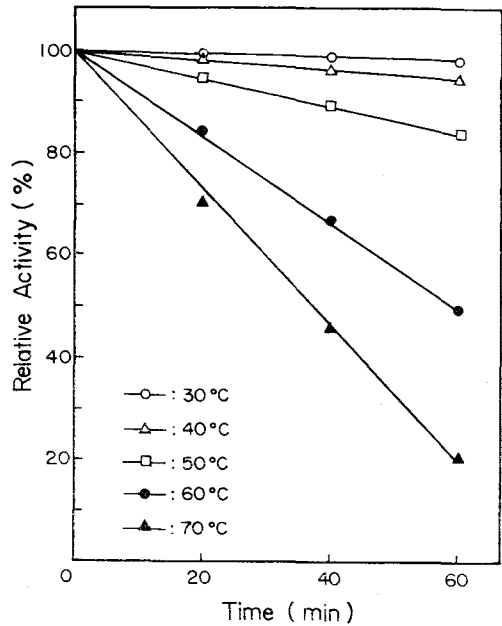


Fig. 4. Effect of temperature on the stability of glucoamylase activity

이 α -amylase는 50°C에서 20분간, glucoamylase는 50°C에서 40분간 각각 열처리 하였을 때 효소 활성이 90% 이상 유지되었고, 그 이상 온도에서는 효소활성이 급격히 감소하였다.

pH 안정성 : 두 효소의 pH 안정성에 대해 실험한 결과는 그림 5에서와 같이 두 효소 모두 최적 활성 pH인 5.0~6.0에서 가장 안정하였으며 전형적인 bell-shape curve를 나타냈다. Freedberg²⁰⁾ 등은 *Asp. niger*에서 생성된 glucoamylase의 pH 안정성은 4.0~5.5이고 김¹⁶⁾ 등은 *Asp. oryzae*에 의해 생성된 α -amylase는 pH 3.0~6.0에서 안정하다고 보고하였다.

5. 무기염류 첨가에 따른 열 및 pH 안정성

열안정성 : 0.08% K_2HPO_4 를 첨가했을 때 α -amylase는 50°C에서 1시간 동안 glucoamylase는 40분간 열처리했을 때 안정성이 90% 이상 유지되었고 0.08% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 를 첨가한 경우 α -amylase는 50°C에서 1시간, glucoamylase는 50°C에서 20분간 안정하였으며 0.06% $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 를 첨가한 경우 α -amylase는 50°C에서 20분, glucoamylase는 1시간 동안 안정성이 유지되었다. 이 결과는 그림 6, 7 및 8과 같다.

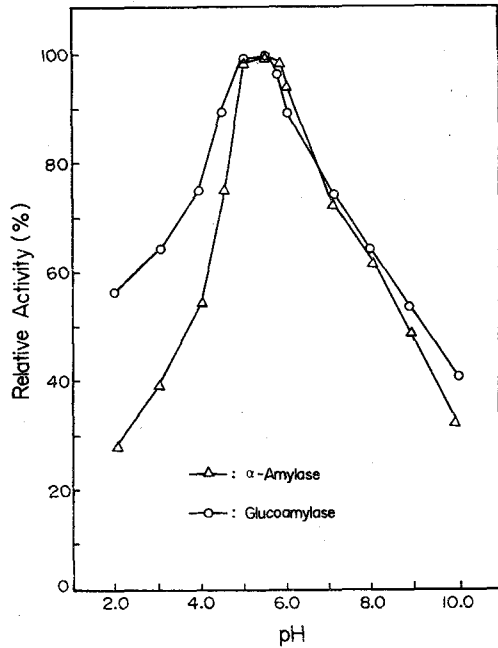


Fig. 5. Effect of pH on the stability of amylases activity after 12 hrs incubation at 4°C

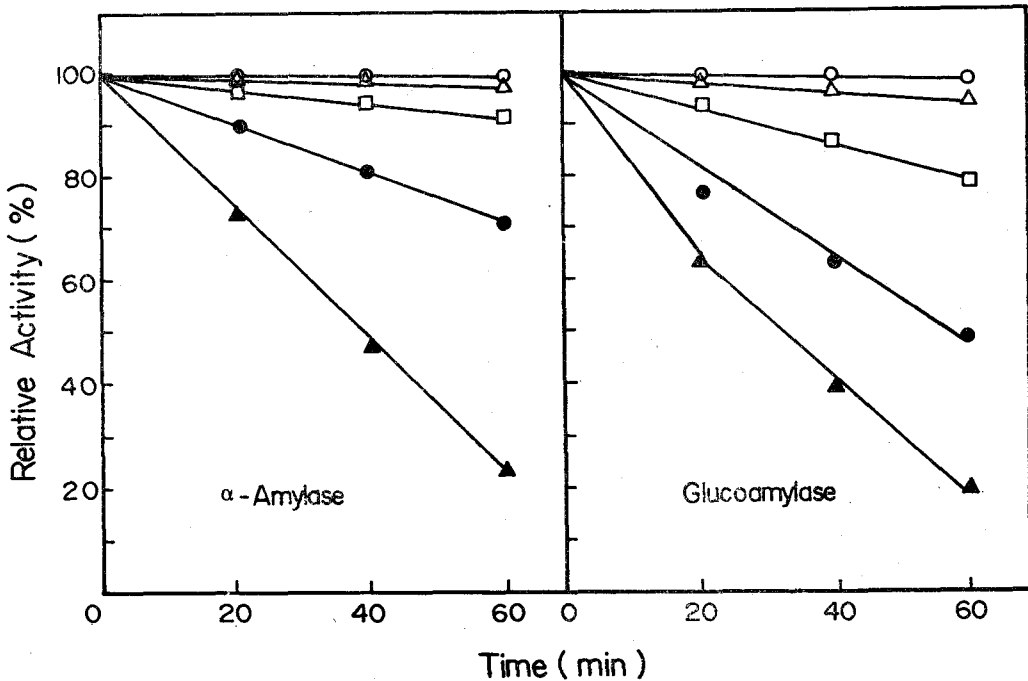


Fig. 6. Effect of temperature on the stabilities of amylase activities with the addition of potassium phosphate dibasic

—○— : 30°C, —△— : 40°C, —□— : 50°C, —●— : 60°C —▲— : 70°C

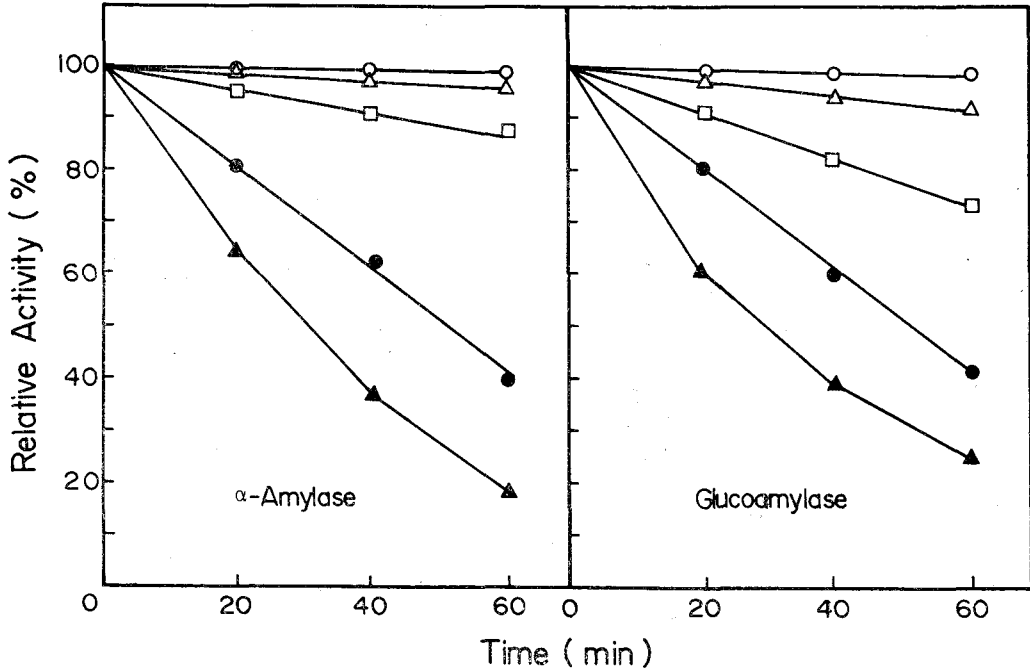


Fig. 7. Effect of temperature on the stabilities of amylase activities with the addition of magnesium sulfate

—○— : 30°C, —△— : 40°C, —□— : 50°C, —●— : 60°C, —▲— : 70°C

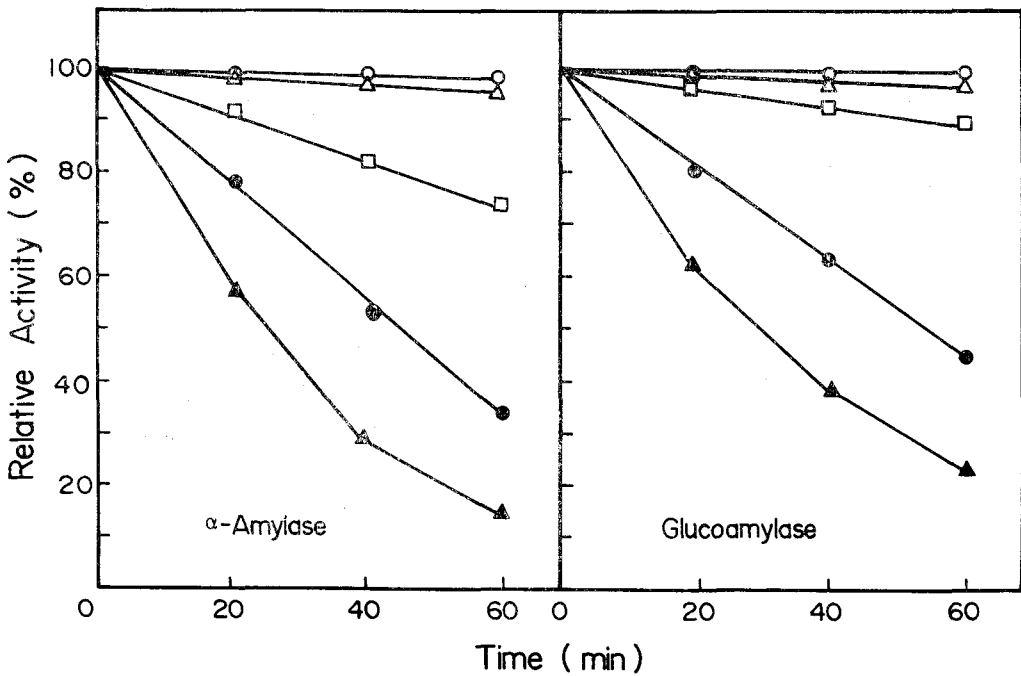


Fig. 8. Effect of temperature on the stabilities of amylase activities with the addition of calcium chloride, dihydrate

—○— : 30°C, —△— : 40°C, —□— : 50°C, —●— : 60°C, —▲— : 70°C

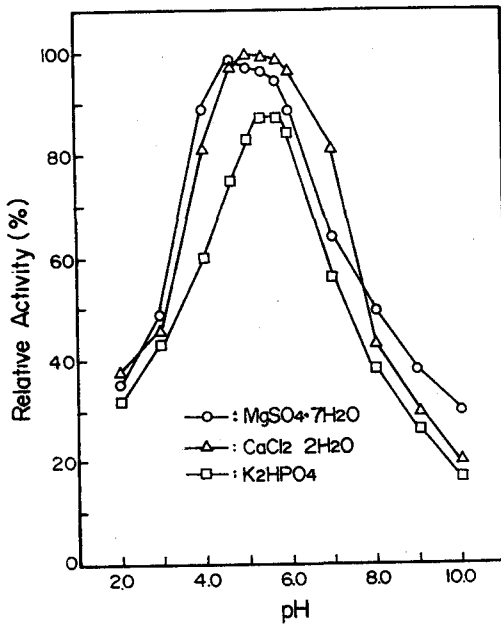


Fig. 9. Effect of pH on the stability of α -amylase with the addition of mineral sources

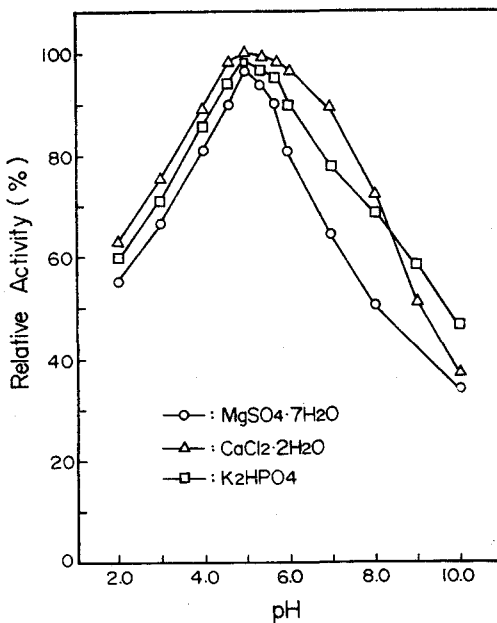


Fig. 10. Effect of pH on the stability of glucoamylase with the addition of mineral sources

pH 안정성 : 무기염의 첨가에 따른 두 효소의 pH 안정성을 검토한 결과 그림 9와 10에서와 같이 α -amylase는 0.06% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 첨가시 pH 4.5~6.5로, glucoamylase는 pH 4.0~7.0으로 pH 안정성이 증대되었으나 Mg염과 인산염의 영향은 인정되지 않았다. Whitaker²¹⁾는 Ca염이 직접 enzyme-substrate complex 형성에 영향을 미치지 않는 않지만 효소의 최대활성과 안정성을 유지할 수 있는 형태를 갖추는데 중요한 영향을 미친다고 설명했는데, 이 같은 효소형태의 유지에 의해 효소의 열변성이 억제되기 때문인 것으로 생각되었다.

초 록

영광 토종국에서 분리된 곰팡이중, amylase 생산성이 우수한 *Asp. awamori*의 α -amylase, glucoamylase의 생산 및 활성에 대해 밀기울을 기본 배지로 하여 배양조건을 검토한 결과, 본 군주에 대한 두 효소의 생산성은 30°C에서 72시간 배양했을 때 최대에 달하였고 기본배지에 maltose, urea, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, K_2HPO_4 , $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 를 첨가했을 때 현저히 증대되었다. 최대효소활성은 pH 5.0 및 50°C에서 나타났고, pH 5.0~6.0에서 안정하였으며 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 를 첨가하면 pH 안정성이 증가하였다. 열안정성은 50°C에서 α -amylase는 20분, glucoamylase는 40분간 열처리 후에도 유지되었고, α -amylase는 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, K_2HPO_4 를 glucoamylase는 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 를 첨가했을 때 열에 대한 안정성이 증대되었다.

參 考 文 獻

1. Robyt, J.F. and Whelan, W.J.: In "Starch and It's Derivatives" (J.A. Radley, ed), 4th ed, Chapman & Hall. London, pp.430~476 (1968)
2. Fischer, S. and Stein, E.A.: Arch. Sci., 7 : 131 (1954).
3. Manner, D.J., M.L., Wolfrom and R.S. Tison: In "Advances in carbohydrates chemistry", 17th ed, Academic press N.Y., pp. 371 (1962)
4. Barton, L.L., Georgi, E.C. and Lineback, D.R.: J. Bacteriol., 111(3) : 771 (1972)

5. Lineback, D.R., Russell, I.J. and Rasmussen, C.: Arch. Biochem. Biophys., 134 : 539 (1969).
6. Lineback, D.R., Aira, L.A. and Hormor, R. L.: Cereal Chem., 49 : 283 (1972)
7. 上野金太郎 : 日藥學雜誌, 227號, 203 (1906)
8. 長西廣輔 : 日釀造學, 6 : 717 (1929)
9. 장교순 : 高麗大學校 食糧開發大學院 食品微生物學論文 (1979)
10. 이종근 : 釜山大學校 論文集, 17 : 69 (1974)
11. 유주현, 추명희, 유마철, 홍윤명 : 韓國食品科學會誌, 2 : 67 (1970)
12. Booth, C.: In "Method in Microbiology", Academic press N.Y., pp.313~363 (1976)
13. Raper, K.B. and D.I. Fennell: The genus, pp.13~577 (1973)
14. R.M., McCready and W.Z., Hassid: J. Am. Chem. Soc., 65 : 1154 (1943)
15. Sumner, J.B.: J. Biol. Chem., 47 : 5 (1921)
16. Iizuka, H. and T., Yamaguchi: J. Agr. Chem. Soc. Japan., 28(12) : 972 (1954)
17. 김찬조, 오만진, 이종수 : 韓國食品科學會誌, 18(4) : 288 (1986)
18. Kundu, A.K. and Das. S.: Appli. Microbio., 19(14) : 598 (1970)
19. Alazard, D. and Raimbault, M.: Euro. J. Appl. Microbiol. Biotech., 12 : 113 (1981).
20. Freedberg, I.M., Y, Levin., C.M., Kay and William, D.M.: Biochim. Biphys. Acta., 391 : 361 (1975)
21. Whitaker, J.R.: In "Principles of Enzymology for the Food Sciences", Dekker, N.Y., pp.433~463 (1972)