

Aspergillus oryzae 와 *Asp. oryzae var. fulvus* 의 amylase
 成能에 미치는 各種 炭素源의 影響에 關하여

朴 啓 仁

(國立工業研究所)

尹 政 羲

(서울保健大學)

Studies on the amylase activity of *Asp. oryzae* and *Asp. oryzae var. fulvus* in various carbon-source media.

Park, Ke In

(Dept. of Food Technology, N.I.R.I.)

Youn, Jung Eui

(Dept. of Food Technology, Seoul Health College)

Abstract

1. Amylolytic enzyme activities of *Asp. oryzae* and *Asp. oryzae var. fulvus* using the glucose as the carbon sources increased remarkably according to the decrease of the residual sugars.
2. The amylase productions of *Asp. oryzae* and *Asp. oryzae var. fulvus* were increased and enhanced when the organisms have been cultured in modified Koji media containing maltose as adaptive substrate. However, being devoid of maltose the level of amylase activities were lower and the beginning of the production was prolonged.
3. The effects of C-sources on the amylase production of them were observed. The level of amylase activity varied with C-sources and their concentrations. Marked increase of amylase production was afforded by starch and maltose. The effects of citric acid and tartaric acid were little or nothing.
4. Using the sucrose and lactose as the adaptive substrates both strains show the maximum amylolytic enzyme activities at the 3% concentrations of those sugars.

緒 論

微生物에 의한 amylase 의 生成에 對하여 細菌이 나 絲狀菌에서 starch 가 有效한 炭素源으로서 되어 있다는 것은 J. Wortman 과 G.L. Funke 가 認定하였지만 最近에 이르러서 D. Scott 등은 starch 또는 starch fraction 이 없는 物質인 경우 amylase 生成이 增加되는 事實과 또한 福本 등도 반드시 有效한 炭素源이 starch 나 maltose 에 限하지 않는다는 것을 보고한 바 있다. 絲狀菌의 amylase 生成에 對하여는 J.J. Goodmann 이 *Asp. flavus* 및 *Asp.*

terreus 에서 amylase 의 炭素源에 對한 適應性을 研究한 것 외에 R. Naordström 등도 *Penicillium* SP 에서 amylase 와 dextranase 와의 生成에 對한 特異性을 지적하였다. 또한 우리나라에서는 韓·朴 등이 메주 및 곡자에서 分離固定한 *Asp. oryzae* 의 澱粉分解力 및 蛋白質分解力을 觀察하였고 閔은 메주에서 分離된 *Asp. sp.* 의 澱粉分解力과 蛋白質分解力을 測定한 바 있다. 田邊 등은 *Asp. oryzae sp.* 에 對하여 드물게 glucose 中에 混入한 微量의 maltose 로 생각되는 物質에 依하여 amylase 의 生成이 현저하게 增加된다는 것을 認定하였으므로 著

者는 李, 金 등이 메주에서 分離同定한 *Asp. sp.* 14 菌株中 澱粉分解力이 強한 두 菌株를 選擇하여 各種炭素源의 amylase 生成에 미치는 영향에 對해서 比較實驗하였기에 이에 報告한다.

材料 및 實驗

1. 材 料

1) 使用菌株: 使用菌株는 建國大學校 應用微生物 研究所에 分離保管中인 *Asp. oryzae* 와 *Asp. oryzae var. fulvus* 의 두 菌株를 供試材料로 하였다.

2) 基本培地: Czapeck's media

3) 基質液: 1%, 2% soluble starch solution

- 4) 炭素源: 1. Glucose 2. Glycerine
- 3. Maltose 4. Soluble starch
- 5. Fructose 6. Xylose
- 7. Sucrose 8. Lactose
- 9. Citric acid 10. Tartaric acid

2. 實驗方法

1) 麴의 製法

前培養: 멸균試驗管에 7ml 의 炭素源의 濃度를 달리한 Czapeck's solution을 넣고 高壓 滅菌한 後 여기에 供試한 두 菌株를 (Lindner 小滴法으로 單胞子 分離하여 48 時間 slide에서 培養한 것) 無菌的으로 接種移殖하여 30°C 의 incubator에서 48 時間 培養하였다.

本 培養: 멸균된 500ml의 培養 flask에 dried wheat bran 20gm 과 Table 1 과 같은 濃度로 溶解한 溶液 12ml를 添加하여 잘 混合한 後 autoclave에서 15Lbs로 30 分間 處理後 前培養液 1ml씩을 接種移殖하여 30°C의 incubator에서 5 日間 培養하였

Table I : Concentration of various C-sources in Czapeck's solution for wheat bran medium

C-Sources	Concentration		
	Percent (gm/100ml)		
Glucose	1.0	3.0	5.0
Glycerine	1.0	3.0	5.0
Soluble Starch	0.05	0.1	0.5
Maltose	0.05	0.1	0.5
Fructose	1.0	3.0	5.0
Xylose	1.0	3.0	5.0
Sucrose	1.0	3.0	5.0
Lactose	1.0	3.0	5.0
Citric acid	0.1	0.5	1.0
Tartaric acid	0.1	0.5	1.0

다.

製麴: 本培養의 固體培地를 40°C 의 incubator 內에서 24 時間 乾燥시킨 後 粉碎하였다.

2) 酵素液의 調製

(1) Dextrinogenic amylase 活性度 測定: 乾燥粉碎한 麴 5g 에 dist. water 40ml 를 加하여 室溫에서 1 時間 抽出하여 그 抽出液을 70°C 로 10 分間 加熱해서 Saccharogenic amylase 를 不活性化시킨 後 filtration 하여 그 여액을 dextrinogenic amylase 測定用 酵素液으로 하였다. (이 조작에서 糖化力은 最初의 5~7% 로 떨어지지만 糊精化力은 60% 保持된다)

(2) Saccharogenic amylase 의 活性度 測定: 乾燥粉碎한 麴 5gm 에 dist. water 50ml 를 加하여 30°C 의 incubator 內에서 가끔 흔들어 주면서 2 時間 抽出하여 이 抽出液을 0°C 에서 dil. HCl 溶液을 加하여 pH 3.5 로 하여 15 分間 放置後 filtration 하고 pH 를 5.5 로 調節하여 Saccharogenic amylase 測定用 酵素液으로 하였다. (이 조작에서 酵素液의 糖化力은 最初의 70~80% 로 되지만 糊精化力은 1~2% 로 低下된다)

3) 比較試驗(control test)

(1) 前培養: 炭素源을 添加하지 않은 Czapeck's solution 7ml 에 前記와 같은 方法으로 培養하였다.

(2) 本培養: 멸균된 500ml 의 培養 flask 에 dried wheat bran 20gm 과 dist. water 12ml 를 添加하여 前記와 같은 方法으로 培養하였다.

4) 酵素의 生成能 測定法

(1) 液化酵素 生成能의 測定

Dextrinogenic amylase 의 生成能 測定은 Wohlgemuth 에 依한 沃度法으로 測定하였다. 即 基質液으로는 1% 可溶性 澱粉液을 使用하여 各 作用液에 0.1 N-Iodine solution 을 一滴씩 添加하고 赤紫色이 認定되는 試驗管을 取하여 이것에 加한 酵素의 量으로 부터 1cc 의 酵素液에 依하여 分解되는 1% 澱粉液의 cc. 數를 算出하였다.

$$D_{30'}^{40^{\circ}} \frac{1\% \text{可溶性澱粉溶液}}{\text{酵素液의 所要 cc}} \times \text{稀釋倍數}$$

作用條件은 各 酵素液을 倍數로 稀釋한 試驗管에 基質液 5ml씩을 加하여 40°C 의 water bath에서 30 分間 作用시킨 後 冷水로 冷却하여 呈色反應을 觀察하였다.

(2) 糖化酵素 生成能의 測定

Saccharogenic amylase 의 生成能 測定은 Somogyi modification으로 reduced sugar 를 測定하여 糖化

Saccharogenic amylase의 生成能 測定은 Somogyii modification으로 reduce sugar를 測定하여 糖化率을 求하였다. 即 10%의 酵素液을 500倍로 稀釋하고 그中 10ml를 미리 60°C water bath에서 예열중인 2% 可溶性 澱粉液 50ml에 加하고 1時間 作用시킨 後 여기에 N/2-NaOH液 10ml를 넣어 糖化를 中止하고 다시 M/10 acetate buffer solution

(M/10 CH₃COOH : M/10 CH₃COONa=1 : 2.5, pH 5.0) 30ml를 넣어 總量 100ml가 되게 하고 그 中에서 10ml를 取하여 Fehling A solution 20ml를 넣고 加熱(2分 50初) 冷却시킨 後 Fehling B,C solution을 各各 10ml씩 넣어 Fehling D solution으로 titration하였다. 糖化率에 稀釋倍數를 곱하여 算出하였고 糖化率은 다음 式에 依하여 計算하였다.

$$\text{糖化率} = \frac{\text{澱粉糖化液의 糖分\%} - \text{稀釋酵素液의 糖分\%} \div 10}{\{(2\% \text{可溶性澱粉液의 全糖\%} \div 2) - \{(\text{稀釋酵素液의 全糖\%}) - \text{稀釋酵素液의 直糖\%} \} \div 10} \times 100$$

結果 및 考察

1. 培養基에 炭素源을 投與하지 않았을 경우 : 炭素源을 投與하지 않았을 때의 酵素生成能과 稀釋酵素液의 residual sugar는 Fig. 1에 圖示된 것과 같다.
2. 培養基에 炭素源으로서 glucose와 glycerine을 投與하였을 경우 : Glucose와 glycerine의 amylase 生成能에 미치는 影響은 Fig. 2에 圖示한 것과 같다.

(Somogyii Unit)
Saccharogenic Amylase Activity

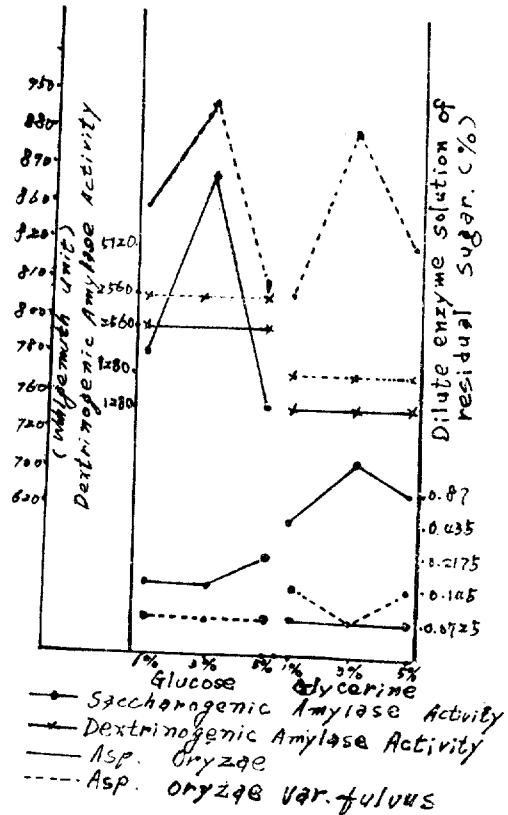
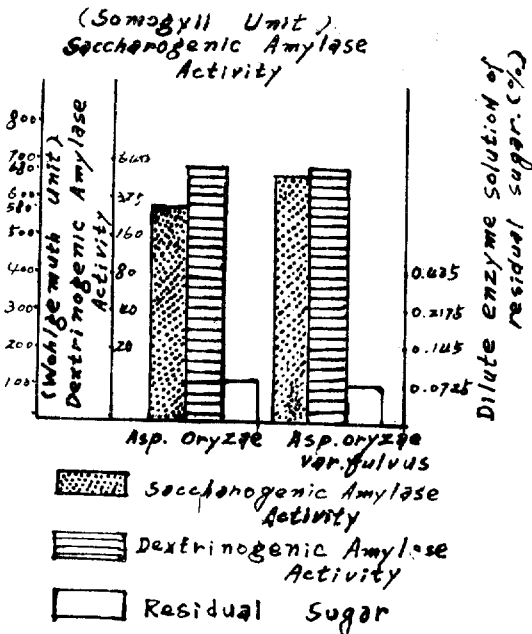


Fig. 1. The amylase activity and residual sugar in fermented wheat bran without C-sources.

Fig. 2. The amylase activity in fermented wheat bran containing glucose and glycerine as C-sources.

glucose에서 糖化酵素 生成能은 Asp. oryzae가 1%에서 780, 3%에서 870, 5%에서 760의 成績이며 Asp. oryzae var. fulvus는 1%에서 860, 3%에서

950, 5%에서 810의 成績으로 液化酵素 生成能은 Asp. oryzae, Asp. oryzae var. fulvus 두 菌株 모두 濃度에 關係없이 2,560으로 安定性을 이루었다. 또한 glycerine에서는 糖化酵素 生成能이 Asp. oryzae가 1%에서 620, 3%에서 720, 5%에서 700의 成績

이고 *Asp. oryzae var. fulvus* 는 1%에서 800, 3%에서 880, 5%에서 860이며 液化酵素 生成能은 두 菌株 모두 濃度에 關係없이 1,280이었다. 以上과 같이 糖化酵素 生成能은 炭素源이 不足한 경우는 물론 炭素源이 過剩인 경우도 amylase 生成能은 억제 되었다.

3. 培養基에 炭素源으로서 Soluble starch와 maltose를 投與하여올 경우: Soluble starch와 maltose의 amylase 生成能에 미치는 影響은 Fig. 3에 圖示한 것과 같다.

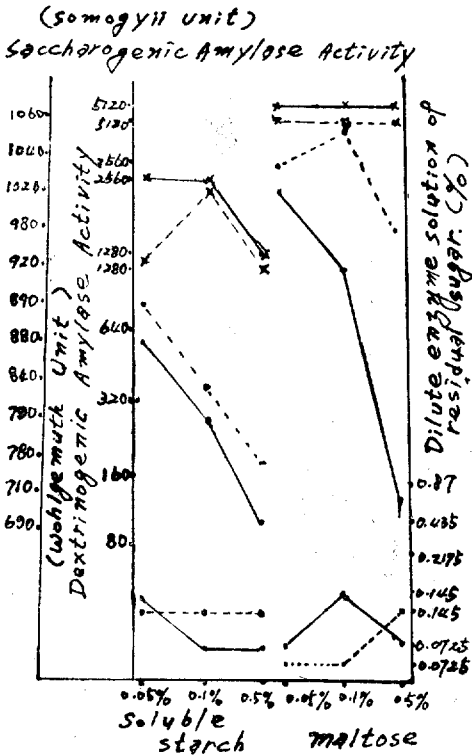


Fig. 3. The amylase activity in fermented wheat bran containing soluble starch and maltose as C-sources.

田邊는 soluble starch, maltose, organic acid가 極히 微量 存在時 amylase activity가 增加되고 炭素源의 濃度가 增加되면 amylase activity는 低下된다는 報告가 있으므로 著者는 炭素源을 微量으로 投與하여 實驗하였다. 即 soluble starch에서 糖化酵素 生成能은 *Asp. oryzae*가 0.05%에서 880, 0.1%에서 790, 0.5%에서 690의 成績이며 *Asp. oryzae var. fulvus*는 0.05%에서 890, 0.1%에서 860, 0.5

%에서 780의 成績으로 液化酵素 生成能은 *Asp. oryzae*가 0.05%, 0.1%에서 2,560, 0.5%에서 1280으로 濃度가 增加됨에 따라 amylase 生成能은 低下되었다. *Asp. oryzae var. fulvus*는 0.05%에서 1280, 0.1%에서 2560, 0.5%에서 1280으로 0.1%에서 Amylase 生成能의 增加를 보였으며 炭素源으로서의 maltose에서 糖化酵素 生成能이 *Asp. oryzae*가 0.05%에서 1020, 0.1%에서 920, 0.5%에서 710의 成績이며 *Asp. oryzae var. fulvus*는 0.05%에서 1040, 0.1%에서 1060, 0.5%에서 980의 成績으로 液化酵素 生成能은 *Asp. oryzae*, *Asp. oryzae var. fulvus* 두 菌株 모두 濃度에 關係없이 5,120으로 安定性を 나타내며 使用한 炭素源中 가장 amylase 生成能이 높았다.

4. 培養基에 炭素源으로서 organic acid (citric acid, tartaric acid)를 投與하였을 경우 citric acid 및 tritaric acid의 amylase 生成能에 미치는 影響은 Fig 4에 圖示한 것과 같다.

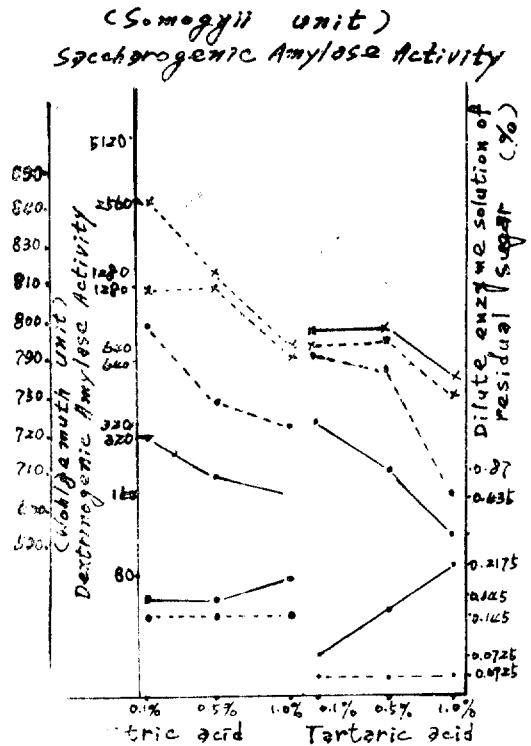


Fig. 4. The amylase activity in fermented wheat bran containing citric acid and tartaric acid as C-sources.

citric acid 에서 糖化酵素 生成能은 *Asp. oryzae* 가 0.1%에서 720, 0.5%에서 750, 1.0%에서 720 의 成績이며 *Asp. oryzae var. fulvus* 는 0.1%에서 800, 0.5%에서 750, 1.0%에서 720 의 成績으로 液化酵素 生成能은 *Asp. oryzae* 가 0.1%에서 2560, 0.5%에서 1280, 1.0%에서 640 이며 tartaric acid 에서는 糖化酵素 生成能이 *Asp. oryzae* 가 0.1%에서 720, 0.5%에서 710, 1.0%에서 590 의 成績이며 *Asp. oryzae var fulvus* 는 0.1%에서 790, 0.5%에서 750, 1.0%에서 620 이며 液化酵素 生成能은 *Asp. oryzae*, *Asp. oryzae var. fulvus* 두 菌株 모두가 0.1%, 0.5%에서 640, 1.0%에서 320 으로 低下되었다. 이 상과 같이 citric acid 와 tartaric acid 에서 *Asp. oryzae*, *Asp. oryzae var. fulvus* 두 菌株 모두가 炭素源의 濃度가 增加됨에 따라 糖化酵素 生成能과 液化酵素 生成能은 점점 低下되며 炭素源을 添加하지 않은 것 과 비슷하게 나타났다.

5. 培養基에 炭素源으로서 fructose 와 xylose 를 投與하였을 경우 : fructose 와 xylose 의 amylase 生成能에 미치는 影響은 Fig 5 에 圖示한 것 과 같다.

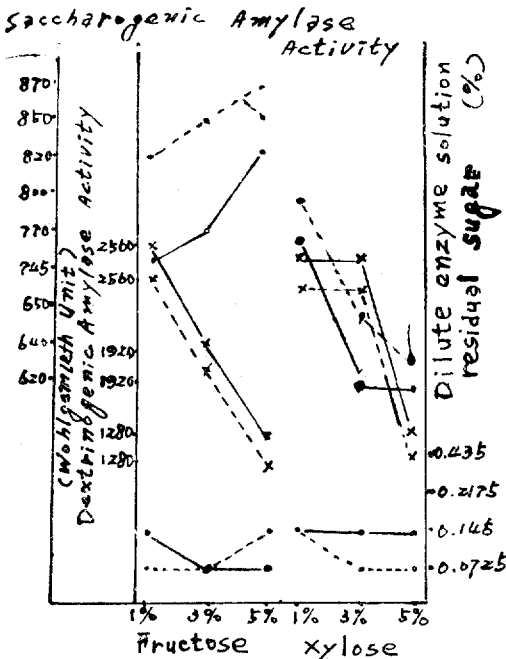


Fig. 5. The amylase activity in fermented wheat bran containing fructose and xylose as C-sources.

fructose 에서 糖化酵素 生成能은 *Asp. oryzae* 가

1.0%에서 745, 3%에서 770, 5%에서 820 의 成績을 보이며 *Asp. oryzae var. fulvus* 는 1%에서 820, 3%에서 850, 5%에서 870 으로 두 菌株 모두 炭素源의 濃度가 增加됨에 따라 amylase 生成能도 역시 增加하는 傾向을 보였으며 液化酵素 生成能은 *Asp. oryzae*, *Asp. oryzae var. fulvus* 두 菌株 모두가 1%에서 2560, 3%에서 1920, 5%에서 1280 으로 炭素源의 濃度가 增加됨에 따라 Amylase 生成能은 低下하였다. 또한 xylose 에서는 *Asp. oryzae* 가 1%에서 770, 3%, 5%에서 620 의 成績이며 *Asp. oryzae var. fulvus* 는 1%에서 800, 3%에서 650, 5%에서 640 으로 두 菌株 다같이 炭素源의 濃度가 增加됨에 따라 amylase 生成能은 低下하였으며 液化酵素 生成能은 두 菌株같이 1%, 3%에서 2560, 5%에서 1280 으로 濃度가 增加됨에 따라 amylase 生成能은 低下되었다.

6. 培養基에 炭素源으로서 sucrose 와 lactose 를 投與하였을 경우 : sucrose 와 lactose 의 amylase 生成能에 미치는 影響은 Fig 6 에 圖示한 것 과 같다.

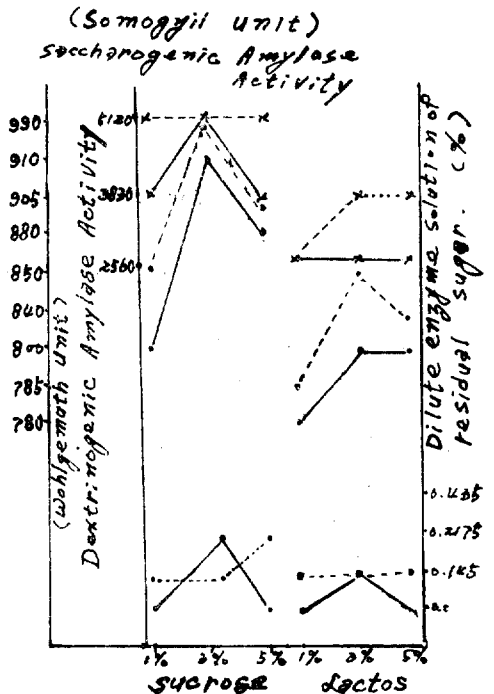


Fig. 6. The amylase activity in fermented wheat bran containing sucrose and lactose as C-sources.

Sucrose 에서 糖化酵素 生成能은 *Asp. oryzae* 가

1.0%에서 800, 3%에서 910, 5%에서 880의 成績 이고 *Asp. oryzae var. fulvus*는 1%에서 850, 3%에서 990, 5%에서 905로 두 菌株 3%에서 maximum을 이루며 液化酵素 生成能은 *Asp. oryzae*가 1%에서 3830, 3%에서 5120 5%에서 3830이며 *Asp. oryzae var. fulvus*는 成素源의 濃度에 關係없이 5120으로 安定하였으며 lactose는 糖化酵素 生成能이 *Asp. oryzae*가 1%에서 780, 3%, 5%에서 800이며 *Asp. oryzae var fulvus*는 1%에서 790 3%에서 850 5%에서 840이었고 液化酵素 生成能은 *Asp. oryzae*가 炭素源의 濃度에 關係없이 2560으로 安定하였으며 *Asp. oryzae var. fulvus*는 1%에서

2560, 3%, 5%에서 3830으로 生成能의 增加를 보였다. Fig. 2, 3, 4, 5, 6은 *Asp. oryzae*와 *Asp. oryzae var. fulvus*를 使用한 各種 炭素源의 amylase 生成에 미치는 影響을 表示한 것이다. 使用한 菌體의 量과 培養時間이 一致하지 않으므로 嚴密한 比較는 되지 않으나 어느 정도 比較는 되는 것으로 생각된다. 또한 Fig 2, 3, 4, 5, 6에 依하여 상술한 炭素源을 크게 5group으로 나누어 보았다. soluble starch와 maltose가 다른 炭素源에 比하여 현저하게 amylase의 生成을 增加시킨 것은 amylase類가 amylase 生成에 커다란 意義를 갖는 外에 炭素源의 濃度도 影響을 미치는 것으로 思料된다.

摘 要

1. *Asp. oryzae* 및 *Asp. oryzae var. fulvus*에 미치는 炭素源으로서의 glucose는 residual sugar가 낮아짐에 따라 amylase 生成能은 현저하게 增加된다.
2. *Asp. oryzae*와 *Asp. oryzae var. fulvus*의 amylase 生成은 炭素源으로서의 maltose를 포함한 培地에서는 높고 그 時期는 促進되지만 이것이 在存하지 않는 경우에는 낮고 또한 늦어진다.
3. 菌體에 의한 amylase 生成에 對해서는 炭素源의 種類와 濃度가 큰 影響을 주었다. 即 starch와 maltose는 amylase의 生成을 현저하게 增加시키지만 glucose와 glycerine은 약간 增加되며 citric과 glycerine은 약간 增加되며 citric acid와 tartaric acid는 거의 影響을 認定할 수 없었다.
4. Sucrose, lactose에서 糖化酵素 生成能, 液化酵素 生成能이 두 菌株 모두 3%에서 maximum을 이룬다.

References

- (1) Wortmann: J. Z., 1882. *Physiol. Chem*, 6, 787
- (2) Funke: G.L., 1923. *Zbl. Bakt.* 11 59, 162
- (3) Scott, D. and Hedrick, L.R., 1952. *J. Bact.*, 63 795
- (4) Fukumoto: 1952. *Symposium*, 7, 3
- (5) Goodmann: J.J. 1950. *Science*, 112, 176
- (6) Nokoström R, and Hultin: E., 1948 1949 *Svensk, Ken, Tid*, 60283, C.A. 433050.
- (7) Han, Y.S., and Park, 1957. *B.D: Industrial Research Zns*. 7. 51-55
- (8) Lee B.H. and Mheen, T.I, 1957, 建國大學校 大學院生物學科 學位論文.
- (9) Tanabe. O, Tonomura: K., 1954, *J. of Agr. Chem.*, *Jap.* 28, 227.
- (10) Lee, B.H., and Kim, S. J., 1966, 서울大學校 保健大學院 論文集 (上卷).
- (11) Prescott, S.C. and Junn, C.G., 1959. *Industrial Microbiology (Third eddition)* 515-532 McGraw Hill Book Co. Inc.
- (12) Maxwell, M.E., 1950. *Australian. Jour. Appl. Sci.* 1, 348
- (13) Inoue, N., Ayano, Y., and Y,A,B.B: 1959. *Jap. J. Fer. Tech.*, 37 49
- (14) Matsushima, K.I. 1958. *Jap. J. Agr. Chem.* 32, 3 215-218
- (15) 友田宜孝, 外三人; 1956 徽의 利用工業(共立出版社) 162-163
- (16) Ohlsson; E., *Dhyoiol. Z., Chem*, 189, 17.
- (17) Wohllegemuth, J., 1908. *Biochem. Z.* 91
- (18) Somogyii M., 1945. *J., Chem.* 160. 61