

막걸리의 제조를 위한 효소제의 개발연구(제 1 보)

—탄수화물 및 단백질 분해력에 대하여—

이성범 · 최경환 · 임동순 · 김덕치

(국세청 양조시험소)

Studies on improvement of manufacturing method of enzymic source for Maggerley(Korean wine) brewing(I)

—On amylolytic and proteolytic activity of new enzyme source—

Sung Bum LEE, Kyung Hwan CHOE, Dong Sun IM, and Duk Chi KIM

(Research Institute of Brewing, Republic of Korea)

ABSTRACT

It is necessary to develop and strengthen the activity of enzymic source which in how applied for Maggerley brewing as an amylolytic and proteolytic starter, recently in this country the active and strong enzymic starter is required for the better brewing and to substitute another starch material for the present wheat flour.

In this study, manufacturing method of the strong enzymic source have been developed and established with use of raw wheat bran plus fungal strains of *Rhizopus* sp. and *Aspergillus usamii* the culture of starter.

The results on experimental the activities of enzymic sources (starter) are as following;

1. Method of making the enzymic source (starter) is to cultivate the strains of *Aspergillus oryzae*, *Asp. kawachii*, *Asp usamii* and *Rhizopus* sp. in the acid treated raw or heat-boiled wheat bran.

2. The saccharogenic power (S.P.) of enzymic source which consisted of raw bran plus fungi and cultured in it is generally stronger than those of heat-boiled bran plus fungi, the strongest power was shown in the culture of *Rhizopus* plus raw bran, and the next other is in mixture of *Asp. usamii* and *Rhizopus* on raw wheat bran.

3. The most strong alpha amylase activity was expressed in the plot of *Asp. oryzae* on heat-boiled wheat bran, the next was in the culture of *Rhizopus* and *Aspergillus usamii* on raw wheatbran.

4. The most vigorous acidic proteinase activity was expressed in the mixture of raw bran plus *Asp. usamii* and *Rhizopus* those were independently cultured before mixing for neutral proteinase activity, it was shown in the mixed culture of *Asp. usamii* and *Rhizopus* on raw wheat bran, the most active alkaline proteinase activity of enzymic source was found in the plot of raw bran material.

5. For poly-peptidase activity in pH 6.5 it is found that the culture of *Rhizopus* and *Asp. usamii* on raw bran was most active among them of enzymic sources.

6. Generally, it is concluded that the culture of fungi on acid treated raw wheat bran is stronger in its activity than those of heat boiled wheat bran, especially the culture of *Rhizopus* and *Asp. usamii* on raw bran exhibited the most vigorous and non-polarized activity for all aspects, so it is considered to be most desirable enzymic starter in Korean Maggerley brewing and this would be able to substitute brewing material for the present wheat flour because of its strong and wide hand activity of amylolytic and proteolytic action.

## 緒 論

우리나라의 막걸리는 고래로부터 쌀을 사용하여 왔으나, 1962년 본 시험소에서 정부의 식량정책에 호응하여 소맥분의 대체 가능성을 연구한 끝에 이를 완성, 1963년부터 소맥분을 원료로 사용할 것을 결정하게 되었던 것이다.

현재는 전부 소맥분을 사용하고 있으나, 이 소맥분은 외국산의 도입양곡의 일부인 만큼 불원간 국내산의 다른 원료로 대체하지 않으면 안될 시점에 도달하게 되었다.

주류의 제조원료가 그 나라의 식량정책과 세계적인 식량정세와 관련이 있다는 것은 주지의 사실이다. 따라서 우리는 1967년 이후 고구마 전분을 소맥분과 부분적으로 대체할 것을 정책면에서 결정한 바 있으며, 이제 현 시점에서는 더욱 더 많은 양의 고구마 전분 대체가 국가적으로 요청되고 있다.

따라서 금번의 이 연구는 막걸리의 제조원료가 교체되었을 때 필연적으로 야기 될 것으로 생각되는 발효제의 역가향상문제, 향미의 유지문제, 주모의 주정발효를 위한 발효제의 전초적인 작업능력문제 등이 가로 놓여 있는 것이다. 즉 강력하고도 효율적인 효소제의 개발연구가 선행되어야 할 것과 원료의 교체를 어느 한계까지 감당 할 것이냐의 가능성을 검토코저 하였다.

우리 나라에서 현재 사용되고 있는 발효용 종곡을 일별하면 곡자, 입곡, 분곡 등이 있다. 그러나 각각 일장 일단이 있으며 단위 중량당의 amylolytic activity와 proteolytic activity에 있어서 강력하지 못하며 개량의 여지가 상당히 남아 있는 것이다. 간혹 우

수한 발효제가 있다고 하더라도 원치 않는 냄새라든가 맛이 개입되는 단점이 있는 것도 있다.

가까운 장래에 있을 것으로 예상되는 원료의 대체문제에 직면하여 여기 대응할 수 있는 강력한 효소제의 개발이 시급하게 되었다.

현재까지 국내의 학자들에 의하여 연구된 발효제에 관하여 본다면, 김찬조(1968)에 의하여 발표된 탁주양조에 관한 미생물학적 및 효소학적 연구가 있다. 金은 이 연구에서 누룩과 백미를 사용하였는데 그 목적은 고유의 탁주에 대한 학문적인 종합 고찰을 하기 위함이라고 할 수 있다. 이 두영(1967, 1969)은 한국곡자의 발효능력에 관한 연구에서 한국곡자의 효소역가를 중심으로 연구하여 막걸리 양조에 있어서 효소의 역가 증진을 위하여 노력하였다.

이에 앞서서 이미 1966년에 이성범은 현재 우리나라에서 사용되는 각 종의 곡자 및 기타의 효소제에 대하여 그 효율적 사용방법을 상세히 연구한 바 있다. 본인은 이 연구에서 이미 미생물균주가 효소제의 역가를 지배함을 지적하였으며 우리나라의 막걸리 제조에 있어서 강력한 효소제의 개발이 필요함을 각종 비교실험을 실시함으로써 예견하였다.

현 시점에서 요구되는 바람직스러운 효소제의 성격으로서 막걸리의 맛과 향미를 향상시키고, 상쾌한 산미와 양질의 알콜발효를 시키면서, 나쁜 냄새와 맛을 발생시키지 않는 것이 요구된다.

본 연구는 이와 같은 국가적 요청과 우수한 막걸리의 제조를 전제로 하여 그 전 발효과정인 효소제의 역할을 중요한 것으로 보

고 우수한 성능의 효소제 개발에 관한 연구를 시도한 것이다.

材料 및 方法

1. 효소제의 제법

a) 생밀기울을 원료로 한 효소제

발효미생물 균주에 속하는 *Rhizopus* 속균, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus usamii* 및 *Aspergillus kawachii* 등을 각각 독립적으로 또는 부분적으로 배양하였다.

상기의 종균을 순수배양 방식으로 배양한 후 0.7%의 염산(HCl)을 생밀기울에 60% 중량 살수 한 것에 접종하였다. 종균의 접종량은 면밀한 밀기울 20g에 균주를 30°C,

6일간 배양한 것은 0.2% 되게 하였다. 효소제의 배양조건은 30°C, 48시간 배양하여 건조하였다.

b) 증자밀기울을 원료로 한 효소제

밀기울에 0.7% 염산(HCl)를 60% 중량 가하고 1시간 방치후 40분간 증자, 냉각후 배양 종균을 0.2% 접종하여 30°C, 48시간 배양한 다음에 건조하였다.

c) 효소제의 원료 및 균주 조정

상기의 두가지 원료와 각종 균주를 조합하여 각종의 효소제 구를 시험 제조하고 그 성능을 비교 실험하였다. 효소제의 조합비는 Table 1과 같다.

2. 효소력의 측정

Table 1. Combination of materials and fungi in preparative enzyme sources

Materials	Treatment of wheat bran	Strain of fungi
Sample No. 1	Heated wheat bran	<i>Asp. oryzae</i>
2	Un-heated wheat bran	<i>Asp. oryzae</i>
3	Heated wheat bran	<i>Asp. usamii</i>
4	Un-heated wheat bran	<i>Asp. usamii</i>
5	Heated wheat bran	<i>Asp. kawachii</i>
6	Un-heated wheat bran	<i>Asp. kawachii</i>
7	Un-heated wheat bran	<i>Rhizopus</i> sp.
8	Un-heated wheat bran	* <i>Rhizopus</i> + <i>Asp. usamii</i> (1:1)
9	Un-heated wheat bran	** <i>Asp. usamii</i> + <i>Rhizopus</i> (1:1)

\*Mixed together after separated culture.

\*\*Cultured with mixed condition.

a) 총당화력(Saccharogenic power, S.P.)의 측정

본 양조시험소 소정분석법에 의하여 실시하였으며 S.P.의 산출은 다음식에 의하여었다.

$$S.P. = \frac{(a-b-c)}{T-b} \times 100$$

T: 2% 전분용액중의 전화당으로서의 총 포도당 양

a: 효소분해용액중의 총 포도당 양 (효소 분해후)

b: 전화조작 이전의 전분용액중의 포도당 양

c: 효소제 수출액중의 포도당 양

이 때 T의 값은 anthron 발색법으로(620 mμ), a, b, c의 값은 Somogyi 및 Nelson 법

(725mμ)을 이용하여 spectrophotometer로 측정하였다.

또 한편으로는 시간 경과에 따르는 maltose의 생성능을 알기 위하여 Willstätter법을 이용하여 당화력을 측정하였다. 당정량은 Somogyi 및 Nelson법에 의하여었다.

$$S.f. = \frac{\text{maltose formed}}{\text{dry wt. of sample.}}$$

$$k = \frac{1}{t} \log \frac{a}{a-x}$$

t: 반응시간, a: 전분,

x: 생성된 maltose

b) 액화력(α-amylase)의 측정

Wohlgemuth의 방법에 의하여었으며 효소력

가는  $D_{37}^{30}$  로 표시하였다.

c) 효소제의 수용성 단백질 측정

단위 중량당의 효소제 수침액이 효소용액으로서 사용되므로 효소함량을 알기 위하여 Lowry 법에 의하여 Folin-Ciocalteu 시약으로서 단백질함량을 측정하였다. 사용된 기제는 spectrophotometer (570m $\mu$ ) 이었다.

d) 단백질분해능 측정

단백질분해효소능의 측정에 있어서 proteinase 및 polypeptidase activity 로 구분하여 실시하였다. Proteinase activity 의 측정방법은 Lowry 법 및 Ogihara 변법에 의하였으며, 산성 (pH3.0), 중성 (pH7.0) 및 알칼리성 (pH9.0)의 영역에 걸쳐서 시험하였다. Proteinase 의 activity 는  $[pu]_{\text{meq. try.}}^{\text{cas. 3500-FR}}$  unit 로서 표시하였다 (spectrophotometer, 660m $\mu$ ).

Polypeptidase activity의 측정은 효소추출액에 기질로서 Difco. peptone을 가하고, 일정시간후에 생성되는 amino acid를 ninhydrin 으로 발색 시켜 570m $\mu$  흡광도를 spectrophotometer로써 측정 하였다.

e) 효소제의 수분함량 측정

수분함량의 측정은 상례법에 의하여 실시하였다.

f) 효소제 alcohol 추출액의 자외선 흡광도 측정.

효소제 내의 미생물의 발육성장량을 알아보기 위하여 70% ethyl alcohol로서 30°C, 20 시간 추출하여 그 상층액을 spectrophotometer DU-2 를 써서 자외선 파장에서 측정 하였다.

結果 및 考察

생밀기울과 증자밀기울에 각종 균을 배양

Table 2. Moisture and soluble protein contents of experimental enzyme sources.

No.	Sample	Enzyme sources	Moisture(%)	Soluble protein (mg/g)
1		Heated bran & <i>Asp. oryzae</i> .	9.28	10.9
2		Un-heated bran & <i>Asp. oryzae</i>	6.93	11.4
3		Heated bran & <i>Asp. usamii</i>	8.67	10.9
4		Un-heated bran & <i>Asp. usamii</i>	6.97	13.1
5		Heated bran & <i>Asp. kawachii</i>	8.23	10.9
6		Un-heated bran & <i>Asp. kawachii</i>	8.26	11.4
7		Un-heated bran & <i>Rhizopus</i> , sp.	6.87	13.1
8		Un-heated bran & <i>Rhizopus</i> , plus <i>Asp. usamii</i>	8.55	11.4
9		Un-heated bran & <i>Asp. usamii</i> plus <i>Rhizopus</i>	7.32	14.1

Table 3. Amylolytic activities of enzyme sources

Sample	Activity	S.P.(Unit)	Sf.(Am-W)	Alpha-amylase (Wholgemuth-W)
				$D_{37}^{30}$
1		156.7	0.013	312
2		120.0	0.006	40
3		173.5	0.017	80
4		140.6	0.009	161
5		124.4	0.008	20
6		134.1	0.013	40
7		227.0	0.036	40
8		173.5	0.017	161
9		204.5	0.026	40

Remarks : S.P.....Saccharogenic power  
S.f.....Willstätter's Amylasen-wert

Table 4. Proteolytic activities of enzyme sources [PU] casein, 37°C, FR. meq. try.

Sample	Activity Acidic proteinase (pH 3.0)	Neutral proteinase (pH 7.0)	Alkaline proteinase (pH 9.0)	Poly-peptidase (pH 6.5) (as alanine) (mg/enz. g/60')
1	$17.0 \times 10^{-5}$	$15.2 \times 10^{-5}$	$11.2 \times 10^{-5}$	1.28
2	$16.6 \times 10^{-5}$	$16.9 \times 10^{-5}$	$14.3 \times 10^{-5}$	6.08
3	$15.2 \times 10^{-5}$	$13.7 \times 10^{-5}$	$10.6 \times 10^{-5}$	0.50
4	$18.8 \times 10^{-5}$	$12.2 \times 10^{-5}$	$9.7 \times 10^{-5}$	4.24
5	$182.2 \times 10^{-5}$	$11.4 \times 10^{-5}$	$9.4 \times 10^{-5}$	1.12
6	$18.4 \times 10^{-5}$	$10.4 \times 10^{-5}$	$7.3 \times 10^{-5}$	5.76
7	$17.6 \times 10^{-5}$	$12.2 \times 10^{-5}$	$12.2 \times 10^{-5}$	0.51
8	$17.2 \times 10^{-5}$	$17.6 \times 10^{-5}$	$10.3 \times 10^{-5}$	10.48
9	$18.4 \times 10^{-5}$	$13.7 \times 10^{-5}$	$9.2 \times 10^{-5}$	3.20

하여 제조한 효소제의 탄수화물 및 단백질 분해효소 활성은 Table 3 및 4와 같다. 효소제의 수분 함량과 수용성 단백질 함량은 Table 2와 같다. 수분 함량은 각 효소제마다 큰 차이가 없으며, 가용성 *exo-enzyme*로 간주 되는 수용성물질 중의 단백질 함량은 10.9mg/g 내지 14.1mg/g이었다. 이점으로 보아 대체로 밀기울에서는 미생물이 모두 생장이 평균적으로 우량함을 알 수 있다. 각 효소제의 수용성 단백질함량이 비슷하다는 것은 단위 중량당의 효소제의 효소력을 실험하는데 있어서 효소의 물량이 비슷하다는 것을 의미한다. 따라서 각 효소작용에 대한 질적 활성도만 실험하면 효소제의 성능이 비교되는 것이다. 그 성능은 Table 3 및 4에서 보는 바와 같다.

효소제의 *amylolytic enzyme activity*는 S. P. (Saccharogenic power)와 *alpha-amylase*의 종합적 역가가 우수 하여야만 단일 효소제로서 가치가 있는 것이므로 두 가지의 효소 활성을 비교 종합하면 sample no. 1, 2, 4, 8, 9의 4개구가 종합성적이 우수하다. 이 가운데 2, 4, 8번의 효소제는 생밀기울을 원료로 한 것이다.

생밀기울을 원료로한 효소제의 특징은 특히 *alpha-amylase*의 뛰어난 력가에 있음을 알 수 있다(No. 1, 2, 4, 8 참조).

효소제 No. 1, 2, 3, 4의 성분균주는 *Asp.*

*oryzae*, *Asp. usami* 및 *Rhizopus* 균이며 이 균이 산성 생밀기울에서 강력한 *alpha-amylase*를 생성한다는 것은 미생물 생리학적인 면에서 흥미를 이끈다.

이들 효소제의 proteolytic enzyme activity를 보면 acidic proteinase(pH 3.0)는 No. 4, 5, 6, 9이다. 그러나 최하위의 sample 과의 사이에는 20%의 편차 밖에 나지 않는다. 다시 말하면 키다란 력가의 차이가 없다는 것이다. 그러나 neutral proteinase(pH 7.0)에 있어서는 No. 2, 8이 강력하며 최하위에 비하여 60%의 차이가 있다. Alkaline proteinase(pH 9.0)는 No. 2, 3, 7이 오히려 강력하다. 이 효소는 양조에 있어서 그 중요성이 전자의 acidic 및 neutral proteinase 보다도 그 의의가 적은 것으로 본다.

이상은 proteinase를 고찰한 것이지만 막걸리 향미의 증대한 여건인 amino acid로의 분해에까지 효소활동을 할 것으로 보아지는 polypeptidase의 효소 활성을 보면, No. 2, 6, 8이 강력하며 특히 No. 8은 최하위의 효소력이 보다도 20 배(2000%) 강력하다. 이 점은 주목을 끄는 사실이며, 단백질을 amino acid까지 잘게 분해하여 주는 섬세하고 끈질긴 효소제라고 볼 수 있다. No. 2와 6의 sample은 이 No. 8의 50% 밖에 되지 않으나 이들 No. 2, 6, 8이 한결같이 산성 생밀기울에다 미생물이 배양된 것임을

지적하고자 하는 것이다.

이와 같은 생밀기울을 원료로 한 효소제가 alpha-amylase 나 또는 protein 과 polypeptide 를 강력하게 분해한다는 사실은 균주 보다도 오히려 그 생질의 원료와 균과의 생리적인 연관성이 있는 것으로 해석된다. 이 생밀기울의 특징은 또 막걸리 제조에 있어서 중요한 의의를 가지고 있다. 그것은 생밀기울은 막걸리에 나쁜 냄새나 또는 나쁜 맛을 주지 않는다는 점이다. 일반적으로 밀기울은 증자 할때에 고열로 인하여 지방산의 산화라든가 당(sugar)과 amino 산과의 가

가 강력한 alpha-amylase 와 proteinase 및 peptidase 를 생성하는 효소제가 필요함은 재본의 여지가 없는 것이다.

Fig. 1의 표에서 보는 바와 같이 단위 증량당의 효소제품에 대하여 70% ethyl alcohol 용성인 자외선 흡광물질의 함량을 실험한 바 생피나 증자피를 원료로 한 효소제의 핵산(nucleic acid)(260m $\mu$  흡광물질) 함량은 증자피인 H<sub>1</sub>, 생피인 RB<sub>1</sub>, RK<sub>1</sub> 등이 모두 근사한 함량이었다. 이것은 개발효소제인 생피원료의 미생물배양물에 있어서 미생물이 많이 번식하였음을 의미한다. 함량이 근사하다는 것은 증자피에서와 같이 생피에서도 미생물이 잘 자랐음을 표시한다. 한편 곡(Kock)은 단백질(280m $\mu$  흡수부분)이 많음에도 불구하고 260m $\mu$  흡수부의 핵산함량은 상당히 적다. 이것은 곡의 원료가 많이 있음에도 불구하고 미생물의 균체량이 적음을 의미한다. 국(Koji) 역시 핵산(260m $\mu$ ) 함량이 비교적 적었다. 이것은 원료의 충분한 이용이라고 볼수 없는 것이다. 증자피와 생피를 비교하면 핵산함량이 거의 같으므로 미생물은 잘 자랐다고 보아진다.

소맥분이 막걸리의 사입(담금)원료로서 대폭 감소 될 때에 막걸리의 향미를 좌우하는 단백질의 사입량이 대폭 감소함을 의미한다. 이때에 강력한 단백질 분해 효소를 채용하지 않으면 막걸리의 향미유지는 기술적으로 곤란하게 될 것으로 생각된다.

이와 같은 전망은 정제처리 된 고구마 전분이 대량 대체될 때에도 강력한 호정화력을 가진 효소제의 필요성을 느끼게 되는 것이다. 따라서 본 연구결과에서 밝혀진 개발 효소제는 막걸리의 원료대체를 상당한 한계까지 가능케 할 것으로 생각되는 것이다.

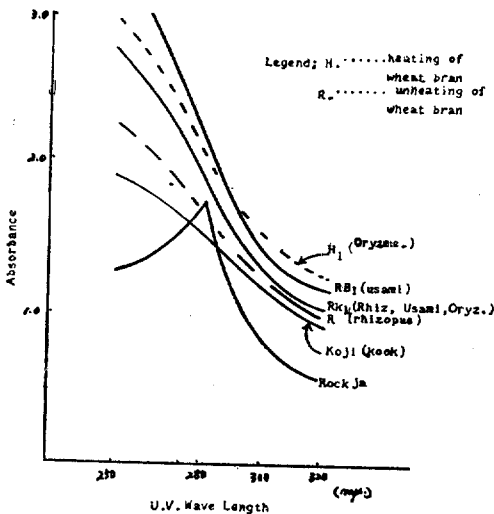


Fig. 1. UV absorption of 70% alcohol ext. of enzyme sources.

열반응으로 인한 aldehyde 및 ketone 화합물이 생성하기 때문이다.

국가 식량정책면에서 볼 때에 이 밀기울효소제는 25,000석 이상의 소맥분을 절약케 한다는 것이다. 현재 정부 시책의 일환으로 소맥분 절약을 목적으로 하는 고구마 전분의 대체를 전제로 할 때에 가장 중요한 문제

摘 要

막걸리의 제조에 있어서 사용되고 있는 효소제는 현재 그 역가면이나 식량자원의 절약면 또는 소맥분 원료의 대체를 전제로 할 때에 개발되어야만 한다. 특히 향미와 기타의 품질면에서도 개량과 개발 연구의 필요성은 절실하다.

본 연구에 있어서 효소제의 제조 원료로서 생밀기울을 사용하여 각종 균주를 배양 한 후 종합적인 효소력을 실험하여 우수한 막걸리의 제조를 위한 가능성을 검토하였다. 연구실험의 결과는 다음과 같다.

1. 염산 산성의 생밀기울과 증자한 밀기울에 *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus kawachii*, *Rhizopus* 속 균 및 *Aspergillus usamii* 균주를 혼합 또는 단독으로 접종하여 막걸리의 제조를 위한 효소제를 제조하였다.

2. 실험효소제의 총 당화력(S.P.)은 생밀기울에 배양한 것이 증자한 밀기울에 배양 한 것 보다 컸었다. 특히 생밀기울에 *Rhizopus* 균을 배양 한 것이 가장 컸으며, *Asp. usamii* 균과 *Rhizopus* 균을 혼합배양한 것이 그 다음이었다.

3. Alpha-amylase의 효소력은 증자한 밀기울에 *Asp. oryzae*를 배양한 것이 가장 높았으며 그 다음이 *Rhizopus*와 *Asp. usamii*를 생밀기울에 단독 배양후 혼합 한것과 *Asp. kawachii* 단독 배양구이었다.

4. Acid proteinase의 효소력은 생밀기울에 *Asp. usamii* 또는 *Asp. usamii*와 *Rhizopus* sp.를 단독배양 후 혼합한 것이었다. Neutral proteinase의 역가는 생밀기울에 *Rhizopus*균 *Asp. usamii*을 배양한 후 혼합한 것이며 대체로 생밀기울에 배양한 것이 효소력이 컸다. Alkaline proteinase 역시 대체로 생밀기울에 배양한 효소제가 컸다.

5. Polypeptidase(pH 6.5)의 효소력은 특이하여 생밀기울에 *Rhizopus* sp.와 *Asp. usamii*를 혼합한 것이 가장 강력하였으며 그 효소력은 다른 효소제의 20배에 달하였다.

6. 단일효소제로서 탄수화물 분해효소력과 단백질 분해능을 종합적으로 높은 수준에서 구비하는 효소제는 생밀기울에 *Rhizopus*균과 *Asp. usamii*를 배양한 것이다. 특히 그 polypeptidase activity는 극히 우수하다.

7. 금번 개발된 효소제는 그의 강력한 효소력의 영향으로 막걸리 원료인 소맥분을 다른 원료로 대체할 수 있는 가능성을 나타내었다.

## REFERENCES

1. 李星範, 1967. 濁藥酒製造에 있어서의 酵素源 및 그의 效率的 添加方法에 關한 研究. 韓國 微生物學會誌. 5, 43
2. 李星範, 1969. 막걸리 제조시 술덧의 성분동태에 관한 연구(제 1보). 韓國微生物學會誌, 7, 153-158
3. 李斗永, 1967. 韓國麴子の 醱酵生産力에 關한 研究(第 1報). 韓國微生物學會誌. 5, 93-96
4. 李斗永, 1969. 韓國麴子の 醱酵生産力에 關한 研究(第 2報). 韓國微生物學會誌 7, 41-44
5. 國稅廳所定 分析法註解, 增訂版, 1968. 東京.
6. Bhatti, R.S. 1968. Studies on the proteolytic enzymes of a commercial malt, *J. Inst. Brewing* 74, 370
7. Bernfeld, P., 1955. Amylases, alpha and beta, *Methods in Enzymology*, 1, 46 Acad. Press.
8. Hara, S.D., 1967. Studies on fermentation control of sake mash, *J. Fermt. Tech.* 45, 400.
9. Matsushima, K.I., 1967. On the proteolytic systems of UV-mutants of *Aspergillus niger*. *J. Japan. Agri. Chem.* 12, 671
10. Ogihara, B.J., 1954. Assay method of proteinase with Folin's reagent. *Ann. Rep. Fac. Sci. Osaka Univ.* 35
11. Smith, G.N., 1949. A colorimetric modification

- of the Willstätter method for the rapid determination of amylase activity in pharmaceutical preparations. *J. Biol. Chem.*
13. Somogyi, M., 1952. Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.* 195, 19
14. Welker, N. E., and L.L. Campbell, 1967. Comparison of the alpha-amylase of *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens*. *J. Bact.* 94, 1
15. \_\_\_\_\_, 1967. Unrelatedness of *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis*, 94, 1124