KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL.
Vol. 5, *No.* 4 (1973)

微生物 Tannase에 依한 食品의 Tannin 成分 分解에 關한 硏究

第1報 韓國產 도토리 Tannin 分解 酵素 生產菌株의 分離와 酵素 生產을 위한 培養條件의 檢討

蔡 洙 圭·劉 太 鍾

高麗大學校 農科大學 食品工學科

(1973년 10월 16일 수리)

Studies on the Hydrolysis of Tannin in Food by Fungal Tannase

Part 1. Screening test of Molds on the Production of Acorn tannin hydrolyzing Enzyme and studies on the cultural conditions of selected strain

by

Soo-Kyu Chae and Tai-Jong Yu

Department of Food Technology, College of Agriculture, Korea University.

(Received October 16, 1973)

Abstract

Chemical analysis and enzymatic hydrolysis of certain Korean acorns were performed in order to make use of the local acorns. Exclusion of tannin from acorns is aided in the processing. Studies of these were undertaken and the results obtained are summarized as follows;

1. Several Korean acorns were used to analyze their proximate composition, tannin and major inorganic principles. The content of acorn tannin was found to be 6.5 to 7.5%.
2. An Attempt was made to screen suitable strains in order to make acorn-tannin-hydrolyzing enzyme accumulated in the culture broth, and *Aspergillus flavus* and *Asp. sp. AN*-11, which showed in their cluture broths, were obtained from the contaminated acorns.
3. Cultural measures for the strains of *Aspergillus flavus* and *Asp. sp. AN*-11 for an improved tannase production and optimal conditions were determined.

序 論

植物을 原料로 한 食品의 澁味와 褐變은 tannin(tannic acid) 成分에 기인하는 경우가 많다.

Tannin은 狹義로는 澁味와 鞣皮性을 가진 高分子의 것을 말하지만 일반적으로는 소위 잿물등 澁味는 없지

만 褐變의 원인이 되는 低分子의 것도 포함하는 넓은 의미로 사용되고 있다.

現在 tannin은 Stenhouse-Procter의 分類[1](分解産物에 의해 pyrogallol tannin과 catechol tannin으로 二大別한다.) 보다도 Perkin의 分類[2]에 따라 chestnut, myrobalan, valonia, oak wood, sumack, divi-divi tannin 등과 같이 加水分解될 수 있는 tannin (hydrolysable tannin)과 quebracho, wattle, mangrove, sprus, hemlock, ganbia, burma cutch, myrtatan, oak bark tannin 등과 같은 縮合型 tannin(condensed tannin)으로 區分되고 있다.[3]

Tannin의 성질도 그 source 및 분자량의 大小에 따라 상당히 相違하지만 일반적으로 극히 불안정하여 變化하기 쉽다. 이러한 tannin들의 食品의 品質에 미치는 영향을 고려하면, 變色, 沈澱 및 混濁, 加工 障害, 澁味, 香味의 變化, vitamin의 損失 등의 品質 低下로 작용하는 경우와 반대로 酸化 褐變, 蛋白質과 結合 沈澱 등의 品質 向上에 이용되는 경우의 二面이 있다.[4~8] 이같은 食品加工 상의 品質 低下를 가져오는 tannin 成分을 제거하기 위한 것으로서 tannase (tannin acyl hydrolase)에 의한 방법이 있다.

Tannase는 Scheel (1786)에 의해 五倍子 中에서, Raulin (1860)에 의해 糸狀菌 中에서 발견된 酵素로 tannin의 deposited 結合인 ester 結合을 gallic acid와 glucose로 加水分解한다.

最近 인도의 Madhavakrishna[9]들은 Divi-divi Pods로부터 tannase를 분리하였는데, 이 같이 tannin 함량이 높은 植物 組織 중에는 tannase의 存在가 확인되고 있다. 특히 糸狀菌인 *Aspergillus* 및 *Penicillium* 屬에는 tannase를 강력히 분비하는 것이 있다.

연이나 이들 tannase에 대한 많은 연구로 Freudenberg[10]들은 myrobalan 粉末의 water extract, ammonium sulfate, dipotassium phosphate와 magnesium sulfate를 영양 성분으로 함유한 배지에서 성장한 *Aspergillus niger*의 菌體抽出液으로 부터 알코올 침전에 의해 이 酵素를 調製했고, Tóth[11]들은 alumina를 이용한 chromatography에 의해 tannase를 精製했으며, Haworth[12]들 및 Haslam[13]들은 *Aspergillus niger*의 抽出液을 陰이온 交換樹脂 Dowex-2에 吸着, 溶出의 處理에 의해 tannase와 glucosidase의 分離 精製를 시도했고, 또한 Lippitsch[14]는 *Aspergillus niger*의 tannase 生産과 그 性質에 관해 보고한바 있다.

한편 喜多[15]의 麴菌과 tannin 分解, 小田[16]들의 강력한 tannase를 생산하는 麴곰팡이 屬 糸狀菌의 檢索 및 檢索 菌株의 代用 醬油 製造에의 應用, 中林[17]의 淡水藻 tannin 硏究에 있어 黑곰팡이 tannase의 이용 등의 보고가 있으며, 또한 麥林[18]들은 *Penicillium sp.* No.80 B′의 4% tannin 添加穀麴의 抽出液으로 부터, Yamada[19~22]들은 *Aspergillus oryzae* No.7의 배양액으로 부터, Adachi[23~25]들은 *Aspergillus flavus*의 배양액 및 菌體抽出物로 부터 얻은 tannase의 精製와 物理 化學的 性質에 관해 보고한 바 있다. 이와 같은 광범위한 酵素 化學的 연구에 의해 酵素의 諸性質이 명확히 되어가고 있지만 아직 이용방면에 대해서는 未開拓이라 말할 수 있다.

著者들은 미생물 tannase를 이용, 食品의 tannin 成分 分解에 관하여 연구를 개시했으며, 먼저 國內資源의 開發을 목적으로 우리나라에서 대량 수집이 가능한 반면 별로 이용되고 있지 않는 도토리에 대해 加工에 障害가 되고 있는 tannin 成分의 分解 실험을 시도하였다.

도토리는 유럽의 이태리, 스페인 등지에서 서민층에 의해 빵, 과자의 형태로 또는 coffee의 대용물로 소비되었으며 북아메리카 인디안들은 죽(mush) 제조에 도토리 가루를 사용했다[26~27]. 한편 우리나라에서는 1970년도 생산량이 122만 t[28]로 주로 묵의 製造에 이용되고 있을 뿐이다.

도토리에 관한 보고로서는 Baumgras[29]와 Goodrum[30]의 도토리의 여우다람쥐에 의한 영양 시험, Ofcarcik[31]들의 도토리의 물리적 화학적 성질 등의 보고가 있으며 한편 여러 유기 용매에 의한 tannin 추출에 관한 연구가 있을 뿐이다.

最近 國內에서는 有實樹 장려에 따른 밤의 수확이 증가될 것이므로 이에 대한 加工 硏究가 요망되고 있다.

本 硏究에서 著者들은 韓國産 주요 도토리에 대해 成分 分析을 실시하였고, 미생물 tannase를 이용하여 도토리 중의 tannin 成分을 분해하기 위해 강력한 tannin 分解 酵素 生産 菌株를 分離하였고, 그의 酵素 生産을 위한 培養條件을 檢討하였기에 그 결과를 이에 보고하는바이다.

材料 및 方法

1. 實驗 材料

본 실험용 도토리는 淸平 근교의 것으로 京東 市場에서 구입하여 剝皮한 후 風乾시켜 60 mesh로 粉碎하여 試料로 사용하였다.

Tannic acid는 Yoneyama Chemical Industries Ltd. Osaka, Japan 製品이다.

2. 成分 分析

가) 一般成分 分析

試料 중의 水分, 粗脂肪, 粗蛋白質, 粗灰分, 粗纖維 등의 一般成分은 常法에 準하여 각각 定量하였다.

나) Tannin의 定量

Loewenthal's method[32]에 의하여 定量하였다. 즉 試料 5 g에 증류수 400 ml를 가해 50°C에서 1시간, 그후

water bath 상에서 沸騰하여 30分間 抽出하고 여과하여 이 여액 중에 全 被酸化物을 酸化하는데 要하는 potassium permanganate의 量을 定하고 다음에 tannin을 gelatin으로 제거하여 남은 被酸化物의 量을 求하여 前後의 差로 부터 tannin을 定量하였다.

다) 無機 鹽類의 分析

試料 중의 주요 無機 成分인 calcium, phosphorous 및 iron을 定量하였다. 즉 Ca은 酸化 滴定法[33]에 의해 P는 Vanado molybdate method[34]에 의해, Fe는 orthophenanthroline method[35]에 의해 각각 定量하였다.

3. Tannic acid의 精製

Yoneyama chemical industries Ltd, Osaka, Japan 製品의 tannic acid를 酵素 反應의 基質로 사용하기 위해 Fig. 1과 같은 방법으로 精製하여 無晶形의 黃白色 粉末을 얻었다.

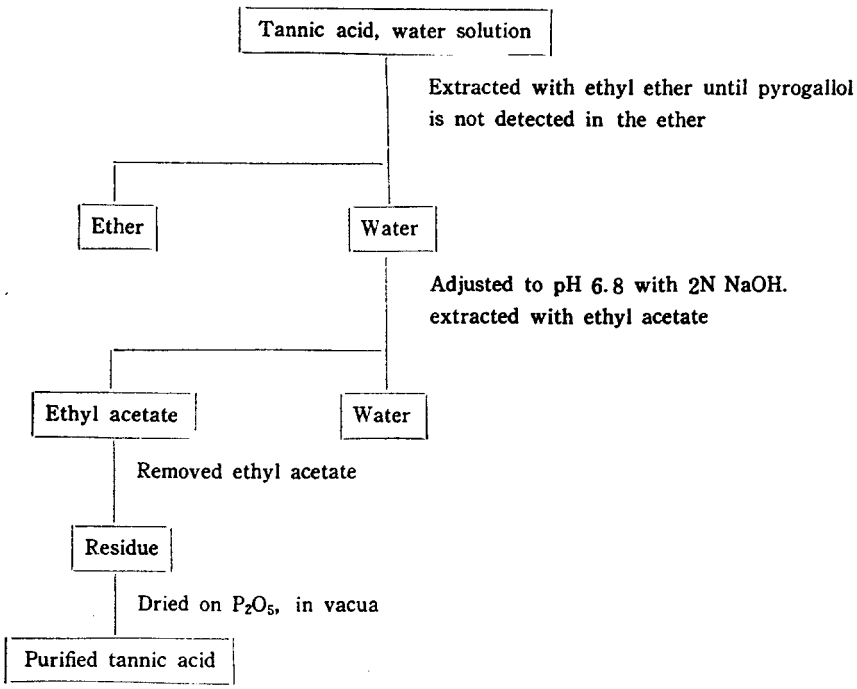


Fig. 1. Purification of tannic acid

4. 菌株의 分離

菌 分離用 배지로서 Czapek-Dox agar (pH 6.0)를 사용하여 도토리 부패물, 토양, 고목 등을 分離源으로 해서 dilution pour plate method로 純粹 分離하여 選別試驗用 菌株로 하였다.

5. 有用 菌株의 選別

上記 方法에 의해서 分離된 菌株 30여종과 高麗大學校 食品工學科 研究室의 保存 菌株 및 收集된 菌株 50여종, 도합 80여종의 糸狀菌을 대상으로 도토리 중의 tannin에 대한 分解 能力이 강한 菌株를 選別하기 위해 tannic acid를 유기 탄소원으로 하는 배지를 사용하였으며 그 選別操作은 다음과 같다.

가) 1차 選別

Petri dish 底面에 원형의 濾紙를 깔고 이 위에 Table 1의 組成 중 tannic acid 이외의 諸成分을 agar와 함께 넣어 미리 굳혀 놓은 후 소요량의 tannic acid 濃厚水溶液을 agar 위에 흘려 침투시켜서 만든 選別用 배지에 각각 試驗菌株들을 접종하여 30°C에서 배양해 비교적 생육 상태가 양호한 菌株들을 選拔하여 동일 組成의 사면 배지에 보존하였다.

Table 1. The Composition of medium for 1st screening

$NaNO_3$	2.0 g
K_2HPO_4	1.0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5
KCl	0.5
Tannic acid (E.P)	10
Agar	25
Distilled water	1.0 l
pH 6.0 (adjusted with 2N NaOH)	

나) 2차 選別

(A) 사용 배지

(i) Tannic acid media (TA media)

Table 1의 組成을 가진 1차 選別用 배지와 같으며

단지 agar만을 제외한 액체 배지이다.

(ii) Acorn powder extract media(APE media)

도토리 試料에 10배량의 증류수를 가하고 50°C의 water bath에서 1시간 抽出한 후 여과해서 얻은 여액을 2N NaOH로 pH 6.0으로 조절한 배지이다. 이때 배지 중의 tannin 함량은 0.5±0.05%이었다.

(B) 酵素液의 調製

1차 選別에 의해 選拔된 菌株들을 각각 TA media와 APE media 50 ml가 들어 있는 500 ml 삼각 flask에 접종하고 30°C에서 96시간 연속 진탕배양(120 strokes/min)한 후 배양액을 여과하여 酵素液으로 하였다.

(C) 酵素 反應液의 調製와 作用

Table 2. Composition of the reaction mixture

Tannase activity	
Substrate (0.350 w/v purified tannic acid dissolved in 0.05 M citrate buffer (pH 5.5)	20 ml
Enzyme solution	5
Acorn tannin hydrolyzing activity (ATHA)	
Substrate (acorn powder)	0.5 g
0.05 M citrate buffer pH 5.5	20 ml
Emzyme solution	5

酵素 反應液의 組成은 Table 2와 같으며, 이 때 酵素(tannase)는 다음 式과 같이 tannic acid를 分解한다.

$$\text{Tannic acid} + n\,H_2O \xrightarrow{\text{tannase}} n\,\text{gallic acid} + \text{glucose}.$$

基質液을 100 ml 삼각 flask에 넣어 37°C에서 예온한 후 酵素液을 가하고 30分間 진탕 반응시킨 후 酵素 活性度 測定用 sample로 하였다.

(D) 酵素 活性度 測定

酵素 活性度는 Iibuchi 등[20]의 spectrophotometric method를 약간 수정한 방법으로 측정하였다. 즉 酵素反應液 1 ml를 취해 99% ethanol을 가하여 酵素 反應을 멈추고 증류수로 희석한 후에 Shimadzu Model QV-50 spectrophotometer를 사용하여 310 mμ에서 吸光度의 감소를 측정하여 加水分解된 基質의 量을 標準 曲線에 대조하여 측정하였다.

對照 實驗은 water bath 상에서 10分間 沸騰시켜 불활성시킨 酵素液을 사용하여 같은 조건하에서 실행하였다.

이와같은 조건하에서 酵素液 1 ml가 1分間에 1 μg의 tannic acid 當量을 分解하는 酵素 活性을 tannase 및 acorn tannin hydrolyzing enzyme (ATHE) 1單位(unit)로 定하였다.

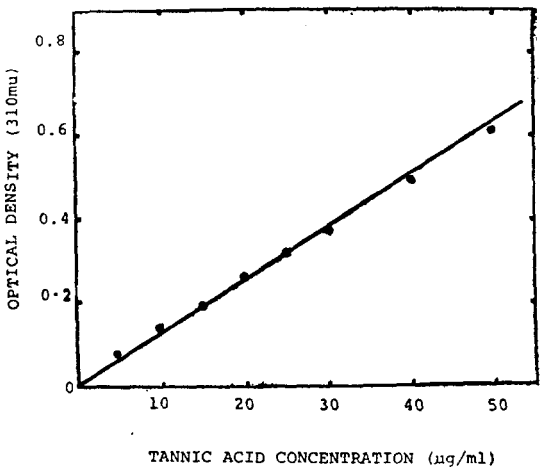


Fig. 2. Standard curve of tannic acid solution

다) 最終 選別

2차 選別에서 높은 酵素 活性을 보인 菌株들을 前述한 TA 및 APE media에 접종하여 30°C에서 96시간 연속 진탕배양하면서 24시간 마다 배양액을 酵素液으로 하여 2차 選別 時와 같은 방법으로 酵素活性度를 측정하였다.

6. 酵素 生産을 위한 培養 條件의 檢討

酵素 生産을 위한 培養 條件의 대부분은 培地 成分의 種類, 濃度, 그 외의 條件을 달리하여 前述한 방법으로 酵素 活性을 측정하고 그 결과를 고려하여 最適 條件을 檢討하였다.

가) Tannic acid 濃度의 영향

Tannic acid의 最適 濃度를 구하기 위해 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 g/*l*의 各濃度에서 배양을 행하였다. tannic acid 이외의 組成은 前述한 培地 組成과 같으며 培養은 30°C로 48時間 행하였다. 단 TA media에 있어서는 tannic acid 0 g/*l*, 炭素源으로서 glucose 30 g/*l*를 첨가했다.

나) 最適 pH의 選定

選別 菌株의 最適 pH 범위를 찾기 위해서 2N HCl 또는 NaOH 용액에 의하여 각각 다른 pH로 조절한 배지에 上記 方法과 같이 배양한 후 酵素 活性度를 측정 비교하였다.

다) 窒素源의 選擇

窒素源을 제외한 TA media와 APE media 50 ml에 N량으로서 약 0.4 g/*l*의 濃度가 되도록 各種 窒素源을 가하여 上記 方法과 같이 배양한 후 酵素 活性을 측정 비교하였다.

라) 金屬鹽 첨가의 영향

有效 金屬鹽을 檢索하기 위하여 前述한 배지에 일정량의 各種 金屬鹽을 첨가하여 上記 方法과 같이 배양한 후 酵素 活性度를 측정 비교하였다.

結果 및 考察

1. 도토리의 化學 成分

본 실험에 사용한 도토리(*Quercus serrata Thumb Seed*) 및 상수리(*Quercus acutissima Carruthers Seed*)에 대한 主要 成分을 分析한 結果는 Table 3과 같았다.

Table 3. Proximate composition of some Korean acorns used for experiment(%)

Composition \ Acorn	*Quercus serrata Thumb Seed*	*Quercus acutissima Carruthers Seed*
Moisture	10.20	9.30
Crude ash	2.76	2.20
Crude fat	1.10	1.41
Crude protein	5.78	6.91
Crude fiber	2.66	3.05
N-free extract	77.50	77.13
Tannin	6.72	7.40
Ca (mg%)	92.7	87.6
P (mg%)	80.0	120.0
Fe (mg%)	3.70	4.80

위에서 보는 바와 같이 地域 및 品種에 따라 다소 차이는 있지만 보통 우리나라의 도토리는 粗灰分이 2~3%, 粗脂肪이 1.0~1.5%, 粗蛋白質이 5.5~7.0%, 粗纖維가 2.5~3.5% 정도이며, 可溶性 無窒素物의 함량은 77~78%정도이다. 또한 도토리와 상수리의 특수 성분인 tannin은 6.5~7.5% 정도 함유되고 있다.

이같이 食品으로서의 그의 가치는 인정되면서도 별로 이용되고 있지 않는 것은 다량 함유되어 있는 tannin 成分에 원인이 있다. 資源이 不足한 우리나라로서는 tannin을 抽出 除去하여 tannin은 tannin 대로 또한 도토리 澱粉 등은 食品 加工에 效果的으로 이용될 것이 기대되는 바이다.

2. Tannin 分解 酵素 生產菌株의 選別

(1) 1차 選別

Tannic acid는 미생물의 發育에 대해서 일반적으로 生育 阻害를 나타내는 물질이다. 그러나 糸狀菌 tannase는 液體培養에 있어서나 數固體培養에 있어서나 培地中에 對應 基質 tannic acid가 存在할 때 만이 이른바 適應的으로 生產되는 酵素이다. 1차 選別의 結果 tannic acid를 유기 탄소원으로 한 Table 1의 組成의 培地에서 비교적 양호한 생육을 나타낸 菌株 15개를 選別하여 2차 選別을 시도했다. 이 중에 *Aspergillus* 屬이 8株, *Penicillium* 屬이 7株였으며, 이들은 모두 생육함에 따라 紫色의 選別用 培地를 黑色으로 變色시켰다.

(2) 2차選別

1차 選別에서 選拔된 15개의 菌株들을 각각 TA media와 APE media에 30°C에서 96시간 진탕 배양시킨 후 배양액을 酵素液으로 하여 tannase activity와 acorn tannin hydrolyzing activity (ATHA)를 前述한 選別 條件下에서 측정해 본 결과는 Table 4와 같았다.

Table 4. Tannase and acorn tannin hydrolyzing activity of second screening tested molds

Strains \ Media / Content	TA media			APE media		
	Tannase activity	ATHA	Growth	Tannase activity	ATHA	Growth
Aspergillus niger KU 1	25.0	7.2	++	73.3	4.7	+++
Aspergillus niger KU 2	13.3	4.7	+++	60.8	3.2	+++
Aspergillus sp. AN-II*	98.3	9.5	+++	53.7	18.5	+++
Aspergillus oryzae	23.3	4.3	++	20.0	5.3	++
Aspergillus sp. AO-32*	81.7	5.6	++	20.0	15.1	+++
Aspergillus sp. TEO-101**	293.3	1.9	+++	243.8	3.2	++
Aspergills flavus	177.5	3.7	+++	105.0	2.8	++
Aspergillus flavus var coulumaris	28.3	3.1	++	178.3	14.6	+++
Penicillium chrysogenum	50.0	3.3	++	32.2	4.9	++
Penicillium expansum	73.3	1.4	++	20.0	1.1	+
Penicillium notatum	54.2	1.2	+	18.3	1.0	+
Penicillium sp. SP-85	16.7	1.0	±	20.0	1.6	±
Penicillium sp. SP-86	36.7	1.6	±	22.5	1.4	±
Penicillium sp. AP-91*	83.3	3.3	++	75.5	1.9	+
Penicillium sp. AP-92*	23.3	1.8	++	41.0	15.5	++

*; 도토리 부패물로부터 분리한 균주
**; 도토리분 열수 추출물에 생성한 균주
+++ 최강, ++ 강, + 약, − 미약

tannase의 생성은 TA media에서 또한 ATHE의 생성은 APE media에서 보다 이상적인 것 같았으며 同一培地에서 各菌株들의 生育 狀態를 觀察해 본 結果 *Aspergillus niger*, *Asp. flavus*, *Asp. oryzae*, *Penicillium sp.*, *Pen. chrysogenum* 순으로 나타났다. 한편 各菌株마다 밀기울에 tannic acid 및 acorn powder를 첨가한 固體培養을 시도하여 NaOH 滴定 方法에 의해 酵素 活性度를 측정하였으나 酵素液의 着色과 基質 tannic acid의 褐變에 의한 end point의 不明으로 酵素 活性의 비교가 곤란하여 위와 같이 合性 培地의 液體培養을 실시하였다.

(3) 優秀菌株의 最終 選別

2차 選別에서 tannase activity 및 ATHA가 강한 菌株들에 대하여, 즉 *Aspergillus sp.* TEO-101, *Asp. flavus*는 TA media에, *Aspergillus sp.* AN-11, *Asp. sp.* AO-32, *Asp. flavus var. coulumaris*, *Penicillium sp.* AP-92는 APE media에 배양하면서 tannase 및 ATHE 생성을 檢討해 본 결과 Table 5, 6 및 Fig. 3, 4와 같았다.

Table 5. Culturing time and formation of tannase

Strain \ Content \ Culturing time (hrs)		24	48	72	96
Aspergillus sp. TEO-101	Tannase activity (unit)	69.2	292.2	219.7	189.3
	Dried weight of the mycelium(mg/50 ml)	40.6	104.8	140.1	144.2
Aspergillus flavus	Tannase activity	244.4	390.3	344.5	128.3
	Dried weight of the mycelium	19.9	95.0	112.1	107.6

Table 6. Culturing time and formation of acorn tannin hydrolyzing enzyme

Strain \ Content \ Culturing time (hrs)		24	48	72	96
Aspergillus sp. AN-ll	ATHA (units)	19.6	26.3	16.2	13.0
	Dried weight of the mycelium(mg/50 ml)	87.4	209.5	241.3	343.8
Aspergillus sp. AO-32	ATHA	15.6	21.1	15.0	10.1
	Dried weight of the mycelium	70.3	106.8	129.1	132.4
Asperillus flavus var. coulumaris	ATHA	17.5	19.5	14.3	9.4
	Dried weight of the mycelium	90.4	144.7	167.8	166.6
Penicillium sp. AP-92	ATHA	5.3	14.3	14.3	10.1
	Dried weight of the mycelium	36.6	80.3	104.1	135.9

Tannase의 생성은 *Aspergillus flavus*, ATHE의 생성은 *Aspergillus sp.* AN-11에 의해서 모두 48시간 배양시에 最高値에 달함을 알 수 있었다. 그러나 ATHA가 비교적 약한 것은 基質 도토리에 酵素作用의 阻害物質이 存在하는 것이 아닌가 생각된다. 이에 대하여는 前處理나 作用條件의 改善이 앞으로 요망된다.

3. 酵素生産을 위한 選別菌株의 培養條件

(1) Tannic acid 濃度의 영향

TA 및 APE media에 各濃度로 tannic acid를 첨가하여 배양한 結果는 Table 7. 및 Fig. 5와 같았다.

즉 *Aspergillus flavus*의 TA media에서는 10g/*l* 前後의 濃度가 바람직하며, *Aspergillus sp.* AN-11의 APE media에는 오히려 첨가하지 않은 원래의 培地가 적당하였다. 한편 tannic acid의 高濃度에서는 *Aspergillus flavus*의 生育 및 酵素 生産量이 현저히 저하했으며, 또한 炭素源이 glucose 만이었을 때는 菌體의 生育은 양호함에도 불구하고 酵素 生産이 인정되지 않았다. 이것은 本 酵素가 適應的으로 生産된다고 하는 西羅[36]의 보고와 일

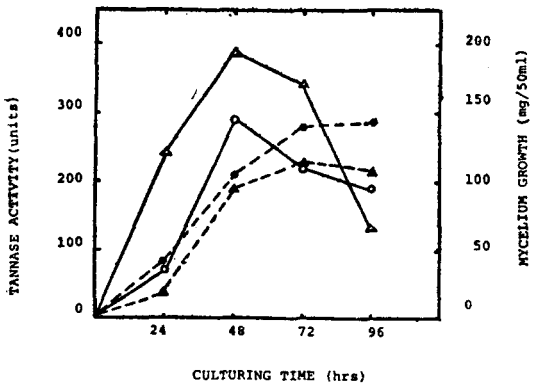


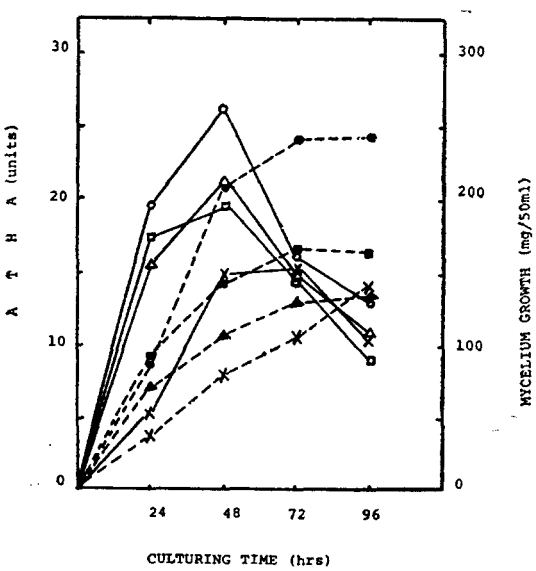
Fig. 3. Culturing time and formation of tannase

—○—○— : Tannase Activity, *Asp. sp.* TEO-101
···●···●··· : Dried weight of the mycelium, *Asp. sp.* TEO-101
—△—△— : Tannase activity, *Asp. flavus*
···▲···▲··· : Dried weight of the mycelium, *Asp. falous* (TA media)

Fig. 4. Culturing time and formation of acorn tannin hydrolyzing enzyme

—○—○— ATHA. *Asp. sp.* AN-ll
···●···●··· Dried weight of the mycel. .*Asp.sp*AN-ll
—△—△— ATHA. *Asp. sp.* AO-32
···▲···▲··· Dried weight of the mycel.*Asp. sp* AO-32
—□—□— : ATHA. *Asp. flavus var. Coulumaris*
···■···■··· : Dried weight of the mycel. *Asp. flavus var Coulumaris*
—×—×— : ATHA. *Pen. sp.* AP-92
···×···×··· : Dried weight of the mycel, *pen. sp.* AP-92. (APE media)

치한다. 그러나 *Aspergillus sp.* AN-11의 경우 tannic acid의 高濃度에서 별로 生育에 阻害를 받지 않았음에도 酵素 活性이 tannic acid를 첨가하지 않은 원래의 培地에서 보다 저하했다. 이는 APE media 자체에 acorn powder로부터 抽出된 tannin이 함유되어 있으며, 또한 이 菌株가 tannic acid에 대한 耐性이 강하고,



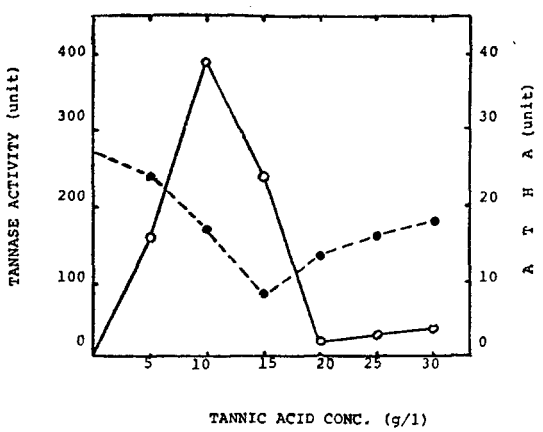


Fig. 5. Enzyme activity and tannic acid concentration

—○—○— : Tannase activity, *Asp. flavus.* TA media
···●···●··· : ATHA. *Asp. sp.* AN-ll APE media

Table 7. Enzyme activity and tannic acid concentration.

Tannic acid(g/l) / Enzyme actvity(unit)	0	5	10	15	20	25	30
Tannase activity (*Asp. flavus*, TA media)	0	158	390	241	20	32	37
ATHA (*Asp. sp.* AN-ll, APE media)	26.5	24.1	16.8	8.3	13.3	16.2	18.1

한편 첨가한 tannic acid와 基質 도토리 tannin의 차이 때문인 것으로 생각된다.

(2) pH에 따른 영향

TA 및 APE media를 HCl 또는 NaOH 용액으로 각각 다른 pH로 조절하여 배양한 후 두 酵素 活性을 측정한 結果는 Fig. 6과 같았다.

즉 tannase나 ATHE 모두 pH 6 부근에서 높은 活性을 나타내고 있다.

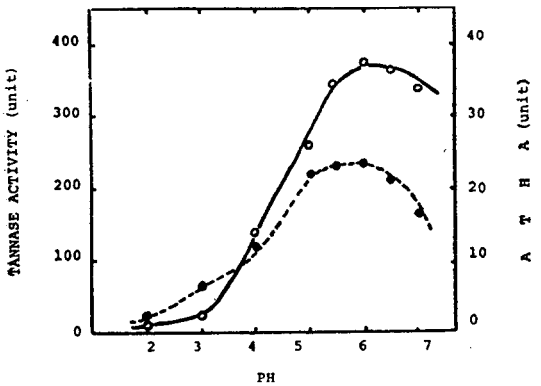


Fig. 6. Effect of pH of media on the production of tannase from *Asp. flavus* and acorn tannin hydrolyzing enzyme from *Asp. sp.* AN-11

—○—○— : Tannase activity

···●···●··· : ATHA

(3) 窒素源 첨가의 영향

Table 8. Effect of additional nitrogen source on the production of tannase and acorn tannin hydrolyzing enzyme

Nitrogen source	Concentration (g/l)	Relative activity	
		Tannase*	ATHE**
Control	0	100	100
Casein	2.5	25	49
Peptone	2.5	460	167
Yeast extract	5.0	251	173
$(NH_4)_2HPO_4$	2.0	400	181
$NH_4H_2PO_4$	3.5	454	84
$(NH_4)_2SO_4$	2.0	451	100
NH_4Cl	1.5	451	77
$(NH_2)_2CO$	1.0	98	132
NH_4NO_3	1.0	495	181
$NaNO_3$	2.5	430	35
KNO_3	3.0	429	167

*Tannase from TA media by *Asp. flavus*

**Acorn tannin hydrolyzing enzyme from APE media by *Asp. sp.* AN-11

TA 및 APE media에 일정한 濃度의 各種 窒素源을 가하고 前述한 方法에 의해 배양한 후 두 酵素 活性을 측정한 結果는 Table 8 및 Fig. 7과 같았다.

즉 各 窒素源에 대하여 tannase activity에는 별로 큰 영향을 미치지 않으나 ATHA는 相異한 結果를 나타냈다. 그 중 casein은 대단히 阻害力이 강했으며, tannase나 ATHE 生産을 위한 窒素源選擇에 있어 모두 NH_4NO_3가 가장 우수하였다.

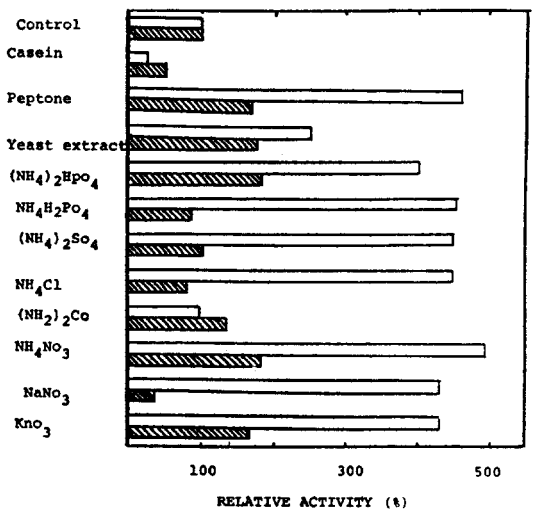


Fig. 7. Enzyme activity and nitrogen sources

□ : Tannase Activity. TA media, *Asp. flavus*

▨ : ATHA. APE media, *Asp. sp.* AN-11

(4) 金屬鹽 첨가의 영향

TA 및 APE media에 일정량의 各種 金屬鹽을 첨가

Table 9. Effect of additional metal salts on the production of tannase and acorn tannin hydrolyzing enzyme

Metal salt	Concentration (g/l)	Relative activity	
		Tannase*	ATHE**
Control	0	100	100
$AlCl_3 \cdot 6H_2O$	0.01	153	92
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	1.0	144	18
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.01	125	147
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.01	81	29
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	0.01	138	44
$(NH_4)_6Mo_6O_{24} \cdot 4H_2O$	0.01	133	84
NaCl	1.0	136	18
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.01	128	116
Tap water		133	63

*Tannase from TA media by *Asp. flavus*

**Acorn tannin hydrolyzing enzyme from APE media by *Asp. sp* AN-11

하여 前述한 方法으로 배양한 후 두 酵素 活性을 측정한 結果는 Table 9, Fig. 8과 같았다.

培地에 이미 함유되어 있는 K(K_2HPO_4)와 Mg($MgSO_4$)에 대해서는 어느 하나라도 存在하지 않으면 酵素 生産量이 현저히 저하하기 때문에 다른 金屬鹽과 똑같이 취급하지 않았다. 즉 TA media로 부터의 tannase 活性은 $AlCl_3 \cdot 6H_2O$가, APE media로 부터의 ATHA는 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$가 가장 効果的이었다. 그러나 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$는 tannase activity나 ATHA에 모두 阻害的이었으며 또한 APE media의 경우 金屬鹽의 첨가는 대부분 阻害的이었다. 이는 acorn powder 抽出物로 이루어진 APE media 중에 여분의 各種 金屬鹽이 存在하고 있는데 원인이 있는 것으로 생각된다. 특히 Na 鹽은 窒素源選擇實驗의 경우 APE media의 $NaNO_3$ 첨가에서 보는바와 같이 현저한 阻害를 나타내고 있다.

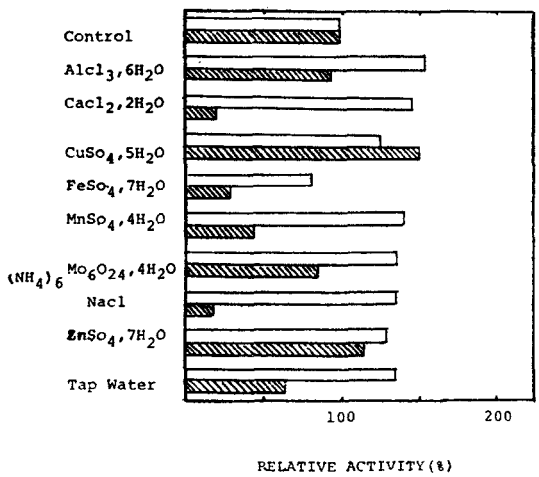


Fig. 8. Enzyme activity and metal salts

□ : Tannase activity TA media *Asp. flavus*

▨ : ATHA, APE media, *Asp. sp.* AN-11

(5) 最適 培養 條件

이상과 같은 培養條件 檢討의 結果로 부터 tannase 및 acorn tannin hydrolyzing enzyme 生産을 위하여 Table 10, 11과 같은 最適 培養條件을 決定했다.

Table 10. The optimal conditions of cultivation on the production of tannase by *Aspergillus flavus*

Tannic acid (E.P.)	10 g
NH_4NO_3	1.0
K_2HPO_4	1.0
KCl	0.5
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5
$AlCl_3 \cdot 6H_2O$	0.01
Distilled water	1 *l*
Initial pH 6.0 (adjusted with 2N-NaOH)	
50ml of medium/500 m*l* vol. flask	
120 strokes/min	
48 hrs cultivation	
Pre-cultured on the agar medium of the same composition	

Table 11. The optimal conditions of cultivation on the production of acorn tannin hydrolyzing enzyme by *Aspergillus sp.* AN-11

Acorn powder water extract (10% w/v extraction at 50°C for 1hr)	1 *l*
NH_4NO_3	1.0 g
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.01
Initial pH 6.0 (adjusted with 2N-aOH)	
50ml of medium/500m*l* vol. flask	
120 strokes/min	
48 hrs cultivation	
Pre-cultured on the agar medium of the same composition	

要 約

國內 도토리의 利用을 위하여 그의 成分 分析을 실시하였고, 加工에 障害가 되고 있는 tannin 成分의 酵素的 加水分解를 시도하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

1) 도토리와 상수리에 대한 主要 成分을 分析하였다. 도토리 중의 tannin 함량은 6.5~7.5%이었다.

2) 배양액 중에 tannin 加水分解 酵素를 多量으로 生産하는 優秀菌株의 分離를 시도하여 活性이 강한 *Aspergillus flavus*와 *Aspergillus sp.* AN-11을 부패도토리로 부터 얻었다.

3) *Aspergillus flavus* 및 *Aspergillus sp.* AN-11의 酵素生産을 위한 最適 培養條件을 決定하였다.

Reference

1) Procter H. R.: *J. Am. Chem. Soc.*, **16**, 247 (1894).

2) Perkin, A. G., Everest, A.E.: *The Natural Orgamic Coloring Matters*, London, P.498 (1918).

3) 大島康義 : 日本農藝化學會誌, **32** (7) 81 (1958).

4) 中林敏郎 : 日本食品工業學會誌, **15**, 73 (1968).

5) 中林敏郎 : 日本食品工業學會誌, **15**, 118 (1968).

6) 中林敏郎 : 日本食品工業學會誌, **15**, 199 (1968).

7) 中林敏郎 : 日本食品工業學會誌, **15**, 502 (1968).

8) 中林敏郎 : 日本食品工業學會誌, **18**, 33 (1971).

9) Madhavakrishna W. and Bose S. M.: *Bull, Cent Leath. Res. Inst.* (Madras) **8**, 153 (1961).

10) Freudenberg, K., Brümmel F. and Frank, T.: *Z. physiol. Chem.*, **164**, 262 (1927).
11) Toth, G. and Barsony, G.: *Enzymol*, **11**, 19(1943).
12) Haworth, R.D., Jones, K. and Rogers H.J.: *Chemical Abstracts*, **52**, 8776h (1958).
13) Haslam, E., Haworth, R.D., Jones K. and Rogers, H. J.: *J. Chem. Soc.*, 1829 (1961).
14) Lippitsch, M.: *Arch. Mikrobiol.*, **39**, 209 (1961).
15) 喜多源逸：工業化學雜誌(日本), **20**, 134 (1917).
16) 小田雅夫, 池田恭一, 谷本正尙：醱酵工學雜誌(日本), **27**, (4) 16 (1949).
17) 中林敏郎：日本農藝化學會誌, **29**, 161 (1955).
18) 麥林梅太郎, 西羅寬, 西體雄二郎, 新家龍 醱酵協會誌(日本) **23**, 50 (1965).
19) Yamada, K., Iibuchi, S. and Minoda, Y.: *J. Ferment. Tech.*, **45**, 233 (1967).
20) Iibuchi, S., Minoda, Y. and Yamada, K.: *J. Agr. Biol, Chem.*, **31**, 513, (1967).
21) Iibuchi, S., Minoda, Y. and Yamada, K.: *J. Agr. Biol. Chem.*, **32** 803 (1968).
22) Iibuchi, S., Minoda Y. and Yamada, K.: *J. Agr. Biol, Chem*, **36**, 1553 (1972).
23) Yamada, H., Adachi, O., Watanabe, M.: *J. Agr. Biol. Chem.*, **32**, 1070 (1968).
24) Adachi O., Watanabe M., Yamada H.: *J. Agr. Biol. Chem.*, **32**, 1079 (1968).
25) Adachi, O., Watanabe, M., Yamada, H.: *J. Ferment. Tech.*, **49**, 230 (1971).
26) Hill A. R.: *Economic Botany* McGraw-Hill Book Co, Inc., N.Y. (1937).
27) Fernald, H. and Kinsey A.: "*Edible Wild Plants of Easturn North Ammerica* Academic Press, Cornwall-on-Hudson, N.Y. (1943).
28) 韓國統計硏究所: 統計年鑑, p. 316 (1972).
29) Baumgras, P.: *J. Wildlife Management*, 8, 296 (1944).
30) Goodrum, P.D.: *South eastern Assn of Game and Fish Commissioners*, 13th annual Conference(1959).
31) Ofcarcik, R.P., and Burns E.E.: *J, Food, Science*, **36**, 576 (1971).
32) 京都大學 農學部 農藝化學敎室: 農藝化學 實驗書, 產業圖書, 東京, 第三卷, p. 1092 (1966).
33) Fisher, R.B., Peters D. G.: *Quantitative Chemical Analysis*, Sounders, p. 561 (1968).
34) Snell, F. D., Snell C. T.: *Colorimentric Methods of Analysis*, Van nostrand, 3rd, Edition Vol. 3 (1963).
35) Fisher, R. B., Peters, D. G.: *Quantative Chemical Analysis*, Sounders, p. 184 (1968).
36) 西羅寬：醱酵工學雜誌(日本), **37**, 85 (1959).