

酒精醱酵用 酵素劑 培養製造 條件이 Amylase 活性에 미치는 影響

李 成 東 · 柳 榮 鴻

高麗大學校 大學院 化學工學科
(1973년 8월 30일 수리)

The Effect of the Culture Condition on the Activity of Amylase used for Alcohol Fermentation

by

Sung Dong Lee and Young Hong Ryu

Department of Chemical Engineering, Graduate School, Korea University, Seoul, Korea,
(Received August 30, 1973)

Abstract

The culture used wheat bran as media for four kind of mold strains such as *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus kawachii*, *Aspergillus usamii* and *Rhizopus javanicus* to examine which strain could higher the activity of amylase most which is used for alcohol fermentation.

It also provided three different kind of wheat bran media containing starch of 47%, 51% and 55% respectively for each strain. For each media it also added three different kind of nitrogen sources; ammonium sulfate, casein, and ammonium sulfate and casein equally mixed. Each nitrogen source added was subordinately differentiated into three different percentages, 2%, 4% and 6% respectively, except the 2% for the ammonium sulfate.

The results obtained were summarized as follows

- (1) The activity of α -amylase was highest in the media of starch value 47% of wheat bran with 6% of casein added.
- (2) The activity of β -amylase was highest in the media of starch value 51% of wheat bran with 2% of the equal mixture of ammonium sulfate and casein added.
- (3) The activities of both α -amylase and β -amylase of *Aspergillus usamii* were highest in the media of starch value 47% wheat bran with no addition of nitrogen source.
- (4) Of the four strains examined, the activities of α -amylase and β -amylase cultured in *Rhizopus javanicus* were both relatively higher.
- (5) The activities of α -amylase and β -amylase of the strains examined became lower as the percentage of starch contents increased except in *Rhizopus javanicus*.

緒 論

酒精醱酵은 澱粉의 糊精化 및 糖化를 前過程으로 하고 있다.

우리나라의 酒製造 歷史⁽¹⁾는 三國時代以前까지 거슬러 올라갈 수 있고 특히 藥, 濁酒는 우리나라 固有의 술로서 農酒라고도 하며 農民들에 의해 釀造 傳來되어 긴 歷史를 지니고 있음은 周知의 事實이다. 또한 酒類用, 食品工業 및 化學工業等 多方面으로 利用되는 酒精製造

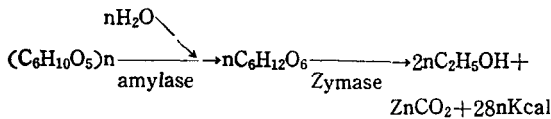
亦是 約 半世紀의 歷史를 지니고 있다

酒精醱酵工業은 原料面에서 食糧과 密接한 關係가 있으며 釀造用 原料가 不足한 우리나라 現 實에서는 이 에 對한 研究가 時急히 要請되는 바이다.

酵素劑의 力價向上 및 酒母의 酒精醱酵을 爲한 諸 問題(2,3)가 매우 重要視되고 特히 強力하고도 效果의인 酵 素劑의 開發研究가 먼저 이루어져야 함은 再論의 餘地 가 없으며 醱酵工業化學의인 面에서 매우 意義 깊은 일 이라 하겠다. (4,5)

酒精醱酵中 數糖法(6)에 依한 酒精生産過程은 澱粉質原 料를 蒸煮 tank에 仕込하고 適當量 水를 加한後 水蒸氣 로 40 psi 定壓下에서 30~50分間 蒸煮하여 糊化시킨 다음 糖化 tank로 輸送하여 60°C가 되도록 冷却하고 pH를 4.0~5.0으로 調節한후 여기에 糖化酵素劑를 넣고 約 1 ~2時間 糖化시킨다. 糖化가 끝난 醪는 30°C가 되도록 다시 冷却하여 醱酵 tank로 輸送하고 여기에서 酒母와 함께 混合하여 醱酵시킨다. 醱酵은 48~72時間 經過後 熟成되고 熟成된 醪는 蒸溜塔으로 보내서 蒸溜하므로써 高濃度의 酒精을 生産하게 된다.

即 酒精生産 反應기전은 다음과 같다.



한편 澱粉의 液化 및 糖化를 爲한 酵素劑의 研究는 最近 여러 研究者(7~11)들에 의해 이루어졌다.

또 酵素生成力價가 높은 菌株들이 分離同定(12,13)되었 고 이에 對한 力價向上 研究(14~16)도 進行되고 있다. 그 런데 特히 酵素劑製造에 있어서 原料의 澱粉含量을 달 리하고 여기에 각기 窒素源을 다른 含量 比率로 添加시 켜 amylase 生成能이 높은 菌株를 培養하여 製造한 酵 素劑의 活性을 觀察한 實驗 報告는 많지 않다.

이에 著者는 酒精醱酵의 前過程에 利用되는 糖化 酵 素劑의 重要性을 認識하여 優秀한 酵素劑를 製造하여 酒 精生産의 收得率을 높이고 또한 生産原價를 切下하기 爲한 試圖로서 澱粉을 培地 原料로 使用하여 이의 澱 粉含量을 47%, 51% 및 55%로 하고 硫安과 casein을 각기 다른 比率로 添加하여 培養製造한 酵素劑의 α-amylase와 β-amylase 活性을 觀察한 바 興未있는 結果 를 얻었기에 이에 報告한다.

實驗材料 및 方法

1. 實驗材料

本實驗의 酵素劑 製造에 使用한 供試菌株는 韓國種菌 協會에서 保存하는 *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus kawachii*, *Aspergillus usamii* 및 *Rhizopus javanicus* 등의 4 菌株를 分選받아 使用하였고, 製造原料인 澱粉은 市

中에서 販賣되는 新鮮한 澱粉을 購入하였다. (市販購 入 澱粉의 澱粉含量은 47%였다).

2. 酵素劑 製造 및 方法

種糖製造는 菌株들을 蒸煮한 澱粉에 純粹培養 方式 으로 incubator 內에서 30°C로 5日間 培養하여 乾燥시 켜다. (水分含量 7±1%)

酵素劑는 澱粉을 10g을 200 ml 三角 flask에 取하고 種 糖을 0.5% 넣고 여기에 窒素源 添加物을 Table 1과 같 이 넣어 잘 混合한 다음 0.5% HCl를 加하여 攪고루 混 化하고 Table 2와 같은 條件으로 培養 乾燥시켰다.

即 酵素劑를 澱粉價 47%, 51% 및 55% (澱粉含量이 40~65%일때 製糖에 適當함(17) 澱粉에 製造하되 아무 것도 添加하지 않은 無添加群(對照群), Casein 添加群 및 硫安과 casein混合(1:1)添加群 등으로 大別하고 이 들의 添加比率를 각기 달리하여 總 9個實驗群으로 나누 어 培養하였고 酵素劑 製造數는 108 가지였다. 한가지 酵素劑에 對하여 3回 反復 製造 하였고 活性度 測定은

Table 1. The composition of wheat bran media

Substance	Raw wheat bran (g)	Seed koji (mg)	0.5% HCl (ml)	1) Ammonium sulfate (mg)	2) Casein (mg)	3) Mixture (mg)
Control (non-added)	10	50	8			
Ammonium sulfate added	4%	10	50	8	400	
	6%	10	50	8	600	
Casein added	2%	10	50	8		200
	4%	10	50	8		400
	6%	10	50	8		600
Mixture added	2%)	10	50	8		200
	4%)	10	50	8		400
	6%)	10	50	8		600

1) Ammonium sulfate extra pure, made in Germany (Merck reagent).

2) Casein from milk, made in Japan(Kanto Chemical Co.)

3) Ammonium sulfate+Casein(1:1)

Table 2. The dehydration and condition of culture of enzyme source

Culture Temperature	Time	Upset		Dry		Moisture contents after dried
		First	Second	Temperature	Time	
30°C	48hrs	24hours after cultured	36 hours after cultured	48°C	24hrs	10± 1%

每 酵素劑마다 2回 反復하므로써 한가지 酵素劑에 對 한 活性度測定은 總 6회가 되며 測定值는 統計學的으로

計算하였다.

3. 測定方法

① α -Amylase (Dextrinogenic amylase) 活性度, Wohlgemuth에 의한 iodine method⁽¹⁸⁾로 測定하였다. 即 粉碎한 酵素劑 2g을 100 ml 三角 flask에 取하고 여기에 30°C 蒸溜水 50 ml를 加하여 30°C incubator 內에서 30分間 抽出한 後 濾過하였다. 基質溶液은 2% soluble starch solution 5 ml와 acetate buffer solution (pH 4.8) 1 ml를 混合한 溶液을 使用하였고 여기에 酵素劑 抽出 濾液을 稀釋하여 넣고 40°C 恒溫水槽에서 30分間 作用시킨後 冷却하고 0.05N I₂ solution 1滴, (0.05 ml)을 滴下하여 赤紫色이 認定되는 試驗管을 取하여 여기에 加한 酵素液量으로 부터 1 ml의 酵素液에 依하여 分解되는 2% soluble starch solution의 ml數(Wohlgemuth unit)를 다음 式에 依하여 算出하였다.

$$D_{30}^{40} = \frac{1}{\text{酵素液所要ml數}} \times 5 \times \text{稀釋倍數}$$

② β -Amylase(Saccharogenic amylase) 活性度, Somogyii modification method⁽¹⁹⁾로 還元糖을 測定하여 活性度를 求하였다.

即, 粉碎한 酵素劑 2g을 100 ml 三角 flask에 取하고 여기에 30°C 蒸溜水 50 ml를 加하여 30°C로 incubator內에서 2時間 30分동안 抽出한後 濾過하였다. 다음 100 ml 三角 flask에 2% soluble starch solution 50 ml와 acetate buffer solution(pH 4.8) 30 ml를 넣고 55°C 恒溫水槽에서 豫熱한後 酵素抽出濾液 10倍 稀釋液을 10 ml 넣고 55°C恒溫에서 1時間 糖化시키고 여기에 0.5NNaOH液 10 ml를 넣어 糖化를 中止한 後 冷却한다.

다음은 Fehling solution에다 測定하고 Lane-Eynon 氏糖定量表⁽²⁰⁾에 依하여 糖液所費 ml로 부터 glucose 量을 찾아 다음 式에 依하여 活性度를 求하였다. (酵素液 1 ml가 10 mg의 葡萄糖을 生成하는 酵素力價를 1 unit로 하여 SP로 表示하였다)

$$SP = \frac{\text{反應液 100 ml 中の glucose(mg)} \times \text{酵素液稀釋倍數}}{10 \times 10}$$

4. 原料分析方法

밀기울 中の 水分은 乾燥法⁽²¹⁾, 灰分은 灰化法⁽²²⁾, 粗脂肪은 Soxhlet法⁽²³⁾, 粗蛋白質은 micro Kjeldahl法⁽²⁴⁾에 依하였고 澱粉價는 Lane-Eynon⁽²⁵⁾에 依하여 定量하였다. 分析結果는 Table 3에 表示한 바와 같다.

Table 3. The Composition of material used

Material	Composition(g)	Moisture	Starch	Carbohydrate [*]	Crude protein (N×6.25)	Crude lipid	Ash
Raw wheat bran of starch value 47%		7.3	47.0	69.6	14.6	4.3	4.2
Raw wheat bran of starch value 51%		8.8	51.0	72.0	13.0	3.4	3.3
Raw wheat bran of starch value 55%		8.8	55.0	72.5	12.3	3.3	3.1

* Carbohydrate=100-(moisture+crude protein+crude lipid+ash).

實驗結果

1. α -Amylase 活性度

Table 4. The α -amylase activities of the enzyme source cultured at 30°C for 48 hours (Wohlgemuth unit)

Wheat bran	Strain	Group	Non-added (control)	Ammonium sulfate added		Casein added			Mixture added		
				4%	6%	2%	4%	6%	2%	4%	6%
				SV 47%	<i>Asp. oryzae</i>	694±44	542±26	472±18	764±44	833±0	1111±88
<i>Asp. kawachii</i>	382±22	362±19	327±10		377±13	542±26	542±26	377±13	472±18	425±26	
<i>Asp. usamii</i>	193±6	179±5	171±2		163±5	178±0	167±4	179±5	160±2	185±10	
<i>Rh. javanicus</i>	327±10	382±22	291±13		327±10	316±15	331±17	342±10	327±10	327±10	
SV 51%	<i>Asp. oryzae</i>	542±26	228±8	156±0	625±0	583±26	542±26	445±18	316±15	397±13	
	<i>Asp. kawachii</i>	208±0	289±7	222±9	257±19	301±7	405±30	242±5	271±13	301±7	
	<i>Asp. usamii</i>	137±2	147±3	149±4	130±3	145±4	174±2	170±10	165±8	156±0	
	<i>Rh. Javanicus</i>	301±7	327±10	236±9	280±11	280±11	382±22	357±0	417±0	542±26	
SV 55%	<i>Asp. oryzae</i>	301±7	56±0	71±0	417±0	445±18	514±38	235±5	153±2	245±13	
	<i>Asp. kawachii</i>	221±4	119±2	125±0	175±5	178±0	203±3	81±1	80±1	179±5	
	<i>Asp. usamii</i>	125±0	167±4	157±4	123±4	142±2	128±4	142±2	171±5	142±5	
	<i>Rh. javanicus</i>	278±0	280±11	125±0	266±19	312±0	211±10	250±0	269±6	235±5	

* Ammonium sulfate+casein (1 : 1)

oryzae (以下 oryzae 라 略稱), *Aspergillus kawachii* (以下 kawachii 라 略稱), *Aspergillus usamii* (以下 usamii 라 略稱) 및 *Rhizopus javanicus* (以下 javanicus 라 略稱) 가 各各 694 ± 44 , 382 ± 22 , 193 ± 6 및 327 ± 10 으로 菌株間에 큰 活性度 差異를 나타냈다. 疏安添加群에서는 添加가 4% 添加보다 良好한 活性를 나타냈고 菌株間에 活性度 差異는 對照群의 것과 비슷하나 同一菌株에 있어서는 對照群의 活性度에는 미치지 못했다. casein 添加群에서는 特히 oryzae 가 casein 2%, 4% 및 6% 增加에 對하여 漸次 높은 活性度를 나타냈고 對照群에 比해서도 높아졌다.

kawachii 는 casein 4% 및 6% 添加가 2% 添加보다 높았고, 對照群 382 ± 22 에 比하여 4% 및 6% 添加에서는 共히 542 ± 26 으로 統計學的으로 有意性있는 높은 ($P < 0.01$) 活性度 差異를 보였다. 其外 usamii 와 javanicus 는 對照群에 比하여 減소한 傾向이다. 疏安과 casein 混合添加群에서는 oryzae 의 경우 增加添加에 따라 漸次 減少된 活性度를 나타냈으나 2% 의 833 ± 0 은 casein 添加群의 4% 添加와 같은 活性이 었고 對照群의 694 ± 44 에 比해서는 높았다. Kawachii 는 對照群에 比하여 4% 와 6% 에서 增加되었고 其他 菌株들은 對照群과 比하거나 或은 未達되었다.

大體的으로 SV 47% 밀기울 培地에서 oryzae 와 kawachii 는 casein 6% 添加 培養이, javanicus 는 疏安 2% 添加 그리고 usamii 는 無添加로 培養하는 것이 α -amylase 活性도가 높았다.

다음은, SV 51% 밀기울 培地를 原料로 使用時 oryzae, kawachii, usamii 및 javanicus 의 對照群은 各各 542 ± 26 , 및 208 ± 0 , 137 ± 2 및 301 ± 7 로 亦是 菌株間에 큰 活性度 差異를 보였고 이중 oryzae 가 제일 높은 活性度를 보였다. 疏安添加는 oryzae 를 除外하고는 對照群과 큰 차이를 보이지 않았고, casein 添加는 oryzae 와 kawachii 가 對照群 보다 보다 높은 活性를 보였고, 混合添加群에서는 javanicus 만이 添加濃度 增加에 따라 活性도가 增加되었고 餘他 菌株들은 對照群과 비슷하거나 或은 減少된 活性度를 나타냈다. 大體的으로 볼 때 SV 51% 밀기울을 培地 原料로 할 경우 oryzae 는 casein 2% 添加한 것이, kawachii 는 casein 6% 添加한 것이, javanicus 와 usamii 는 疏安과 casein 混合添加(以下 混合添加라 略稱) 6% 와 2% 에서 各各 높은 活性度를 보였다.

끝으로, SV 55% 밀기울을 培地로 培養製造한 酵素劑의 活性도는 對照群에서 oryzae, kawachii, usamii 및 javanicus 가 各各 301 ± 7 , 221 ± 4 , 125 ± 0 및 278 ± 0 으로 亦是 菌株間에 큰 活性度 差異를 보였으며 이들 중에서도 또한 oryzae 가 제일 높은 活性度를 보였다. 疏安添加는 usamii 만이 對照群 125 ± 0 에 比하여 167 ± 4

$\sim 157 \pm 4$ 로 若干 높았고 其他는 全部 減少되었다. casein 添加群에서는 oryzae 만이 casein 添加 增加에 따라 增加했을 뿐 다른 것들은 對照群과 別로 差異를 보이지 않았고 混合添加群에서는 usamii 가 對照群보다 약간 增加했을 뿐 其外는 全部 減少되었다. 大體的으로 SV 55% 밀기울 培地에서 oryzae 는 casein 6%, usamii 는 疏安 4% 添加, 其外는 無添加 培養이 오히려 좋았다.

全體的으로 볼 때, oryzae 는 SV 47% 밀기울 培地에 casein 6% 添加 培養이 α -amylase 活性이 越等히 높았고 kawachii 도 亦是 oryzae 와 같은 條件이었고, usamii 는 47% 밀기울 培地에 無添加로 培養하는 것이 좋았고 Javanicus 는 SV 51% 밀기울 培地에 混合添加 6% 가 제일 좋았다. 4 菌株中에서 oryzae 의 活性이 가장 높았다.

2. β -Amylase 活性度

β -Amylase 의 活性를 觀察한 結果는 Table 5에 表示와 바와 같다.

먼저 SV 47% 밀기울을 培地로 하여 培養製造한 酵素劑에서 對照群에 있어서는 oryzae, kawachii usamii 및 Javanicus 가 各各 438 ± 9 , 344 ± 5 , 714 ± 20 및 685 ± 3 으로 α -amylase 活性도와 같이 菌株間에 큰 活性度 差異($P < 0.01$)를 보였다. 疏安添加群에서는 javanicus 만이 對照群보다 增加되었고 其外는 全部 減少되었다. casein 添加群은 2% 添加에서 javanicus 만이 對照群보다 增加되었고, 混合添加群은 usamii 를 除外한 다른 菌株들은 混合添加 6% 에서 가장 높은 活性度를 보였다.

다음은 SV 51% 밀기울 培地에 培養한 對照群의 oryzae, kawachii, usamii 및 javanicus 는 各各 445 ± 5 , 268 ± 2 , 550 ± 15 및 782 ± 10 이었고 亦是 菌株間에 顯著한 差異를 보였다. 疏安添加群에서 oryzae 는 對照群에 比하여 減少되었고 javanicus 는 增加되었다, casein 添加群에서는 kawachii 와 usamii 가 增加傾向이었고 다른 菌株들은 對照群 活性과 비슷하였다. 混合添加群 亦是 kawachii, usamii 및 javanicus 가 漸次 增加된($P < 0.01$) 活性度를 나타냈고 oryzae 는 反對로 減少되었다. 大體的으로 볼 때 oryzae 는 casein 6% 添加 培養이, kawachii usamii 및 javanicus 는 混合添加 培養이 良好한 活性를 나타냈다. 끝으로, SV 55% 밀기울을 培地에 培養한 경우 對照群은 oryzae, kawachii, usamii 및 javanicus 가 各各 374 ± 7 , 217 ± 3 , 511 ± 12 및 750 ± 4 이고 疏安添加群에서는 usamii 만이 活性이 增加되었다. casein 添加에 依해서는 oryzae, kawachii 및 usamii 가 對照群에 比하여 增加되었고, 混合添加에서는 usamii 와 javanicus 만이 增加되었다. 大體的으로 보아 oryzae, kawachii 는 casein 4% 및 6% 添加培養이 良好하였고 javanicus 와 usamii 는 混合添加 4% 및 6% 가 優秀하였다.

全體的인 傾向에서 oryzae, kawachii 및 javanicus 는

Table 5. The β -amylase activities of the enzyme source cultured at 30°C for 48 hours

(SP unit)

Wheat bran	Strain	Group	non-added (cotrol)	Ammonium sulfate added		Casein added			Mixture ※added		
				4%	6%	2%	4%	6%	2%	4%	6%
SV 47%	<i>Asp. oryzae</i>		436± 9	389± 2	359±10	449± 6	433± 3	443± 3	449± 2	459± 4	459± 5
	<i>Asp. kawachii</i>		344± 5	334± 6	272± 2	369±15	358± 3	378± 5	376±11	389± 4	389± 4
	<i>Asp. usamii</i>		714±20	623± 7	508±13	690± 8	669±10	664± 3	633± 4	631± 8	640± 7
	<i>Rh. javanicus</i>		685± 3	724± 8	701±14	733± 8	669± 8	681± 9	762± 5	765± 8	779± 17
SV 51%	<i>Asp. oryzae</i>		445± 5	290±14	241± 2	420±12	444±11	468± 3	406± 9	423± 4	437± 1
	<i>Asp. kawachii</i>		268± 2	316± 4	267± 4	305± 8	351± 2	372±10	354± 3	387± 4	358± 8
	<i>Asp. usamii</i>		550±15	677±13	611± 8	571± 3	653± 4	658± 9	679±23	704±18	655± 6
	<i>Rh. jnvanicus</i>		782±10	853± 2	730±21	757±14	708±10	764±25	864±19	855±15	856± 3
SV 55%	<i>Asp. oryzae</i>		374± 7	130± 0	151± 0	428± 9	441± 7	437± 3	274±23	233± 5	254±11
	<i>Asp. kawachii</i>		217± 3	195± 2	193± 3	273± 8	259± 2	326± 3	168± 7	185± 7	234±14
	<i>Asp. usamii</i>		511±12	678± 7	679±12	589± 7	627± 1	618±11	629±15	671±25	700± 6
	<i>Rh. javanicus</i>		750± 4	775± 2	416±17	702±19	712±25	587± 2	763±11	795± 4	769±11

※ ammonium sulfate+casein (1:1)

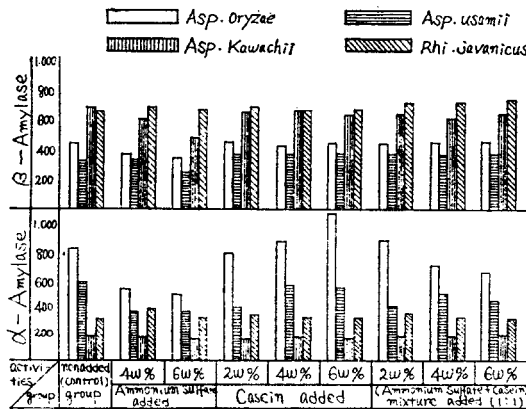


Fig. 1. The amylase activities of the enzyme source cultured at 30°C for 48 hours (starch value 47% raw wheat bran media)

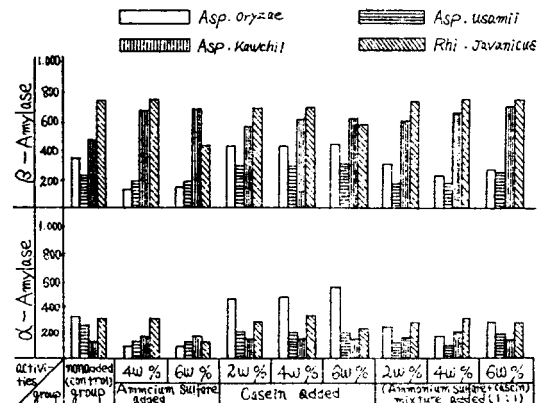


Fig. 3. The amylase activities of the enzyme source cultured at 30°C for 48 hours (starch value 55% raw wheat bran media)

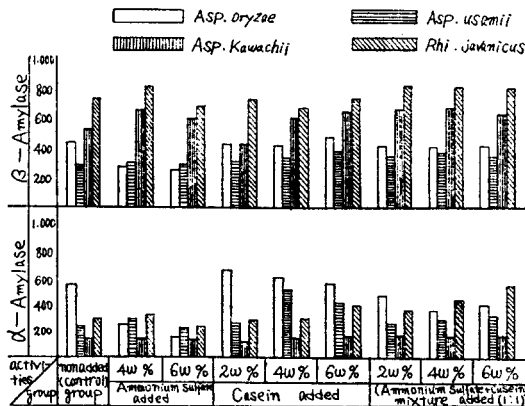


Fig. 2. The amylase activities of the enzyme source cultured at 30°C for 48 hours (starch value 51% raw wheat bran media)

混合添加培養의 경우가 제일 優秀하였고, usamii는 SV 47% 밀기울에 無添加培養이 優秀하였다. β -Amylase 활성中 javanicus가 제일 優秀하였고 다음의 usamii, oryzae 및 kawachii의 順位였다.

考 察

Amylase는 α -amylase와 β -amylase로 區分되며 α -amylase (α -1,4-glucan-4-glucanhydrolase)는 澱粉의 中心部를 加水分解하여 먼저 큰 dextrin을 이루고 繼續 加水分解하여 maltose와 glucose를 産出한다. 即 glucose로 이루어진 carbohydrate의 α -1,4-glucoside의 結合을 分解한다.

β -Amylase (α -1,4 glucan maltohydrolase)는 polysaccharide에 作用하여 non-reducing end에서 부터 mal-

tose를 하나씩 分離시킨다.^(26,27)

amylopectin을 α -amylase로 加水分解하면 α -1,6-glucoside linkage는 branch가 섞여 있거나 혹은 없는 oligosaccharide가 된다. β -amylase로 加水分解하면 maltose가 non-reducing end에서 부터 하나씩 떨어져 나가다가 α -1,6 결합에 이르면 分解는 더 못한다. 이와 같이 하여 남은 것이 dextrin이다.⁽²⁸⁾

이에 本 實驗에서는 밀기울을 原料 培地로 使用하여 이에 硫安과 casein을 窒素源으로 하고 各己 其 含量 比率를 달리 添加한 培地에 麴菌을 培養하여 製造한 酵素劑의 α -amylase와 β -amylase의 活性度를 測定하여 比較 觀察하였다.

實驗 結果中 α -amylase 活性度는 oryzae 및 kawachii가 SV 47% 밀기울에 casein 4~6% 添加한 培地에서 높았고, β -amylase 活性度도 亦是 SV 47% 밀기울에 混合 添加 4~6% 培地에서 높은 活性度를 보였음은 注目되는 點이며 이는 硫安과 casein이 菌體 增殖에 必要한 無機窒素源 및 amino酸으로 많이 利用되었음을 示唆하고 있다.

한편, SV 47% 밀기울 培地에 培養한 oryzae의 α -amylase 活性이 對照群에 比하여 硫安添加群은 其 添加 濃도가 높을수록 低下되었고, 反對로 casein 添加群은 casein 添加濃도가 높을수록 增加되었고 또 混合添加群에서는 添加濃도가 높을수록 低下되었다. 이러한 事實은 oryzae의 增殖에 添加 窒素源의 種類와 最適量과의 關係를 暗示해 줌이라 하겠다.

襄等⁽¹¹⁾은 供試菌株로 *Endomycopsis fibuliger* No. 55, *Endomycopsis javanensis* No. 112 및 *Candida tropicalis* No. 340 등을 使用한 實驗에서 無機窒素源으로 硫安을 밀기울에 5% 添加 培養했을 때 酵素力生成이 顯著하게 增加하였다고 報告한 바 있는데 이는 本 實驗에서 無機窒素源으로 使用한 硫安의 最適量과 比較하여 볼 때 使用菌株에 따라 各各 달라짐을 알 수 있다.

또한, 微生物은 生存 및 增殖하는데 營養素를 必要로 하고 있는데^(29,30) 特別히 麴菌에 있어서는 炭素源, 窒素源 其外 여러가지 無機鹽類 등을 必要로 하고 있으며 이들의 最適量 與否에 따라 酵素活性에 至大한 影響을 미치게 되고 過量인 경우는 오히려 酵素活性을 阻害하게 될 것이 豫想된다. 本 實驗에서 usamii는 α -amylase 및 β -amylase 活性이 SV 47% 밀기울 培地의 無添加群에서 活性이 제일 높았는데 여기서 usamii는 oryzae나 kawachii처럼 相當한 量의 硫安과 casein 등을 培養에 必要로 하지 않고 밀기울 自體內에 含有되어 있는 蛋白質 量만으로도 增殖에 必要한 amino酸을 供給할 수 있고 또한 自體內의 炭素源 含量으로도 充分하므로 澱粉含量 增加에 따른 活性 增加는 오히려 逆效果를 가져오는 것으로 생각되며 이 點들은 앞으로 더욱 追求하고자 한다.

Javanicus는 α -amylase 및 β -amylase 活性에 있어서 共히 SV 51% 밀기울 培地에 混合添加 6%와 2%에서 가장 높은 活性을 보였음은 oryzae의 경우와 같이 菌體 合成에 硫安과 casein이 많이 利用되었으리라 豫想된다.

酵素劑는 amylolytic enzyme 活性에 있어서 α -amylase 活性과 β -amylase 活性이 綜合的으로 優秀하여야만 單一 酵素劑로서 價値가 높은 것인데 本 實驗結果로 보아 javanicus가 이에 該當된다고 하겠다.

다음, 本 實驗結果에서 밀기울 培地의 澱粉含量을 높여 준다고 해서 酵素活性 增加는 없었고 大體的으로 減少傾向을 보였음은 澱粉含量이 어느 適當量 以上 含有되어 있을 때는 酵素劑 培養中 空氣流通과 濕度調節 등에 좋은 影響을 주지 못할 것이며 또한 단위 培養空氣 表面積이 적어지므로 인하여 孢子形成 面積을 低下시킴으로 amylase 活性이 낮아진다고 보겠다.

한편, 李等⁽¹⁵⁾은 막걸리 製造를 爲한 酵素劑의 開發 研究에서 糖化力은 밀기울에 *Rhizopus*屬을 培養한 것이, 液化力은 蒸餾한 밀기울에 *Asp. oryzae*를 培養한 것이 제일 優秀하였다고 報告한 바있다. 이는 本 實驗結果와 關聯性이 있다고 하겠으며 이것으로 미루워 보아 amylase 活性은 菌株 特異性에 따라 크게 左右된다고 생각된다.

結 論

酒精發酵에 利用되는 酵素劑의 酵素活性을 높일 수 있는 培養製造條件과 菌株를 選擇하고자 밀기울을 培地原料로 使用하여 *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus kawachii*, *Aspergillus usamii* 및 *Rhizopus javanicus* 등 4菌株를 供試菌株로 培養 製造하였다. 밀기울 培地의 澱粉含量(47%, 51% 및 55%)을 各己 달리하였고 또 窒素源(casein 및 硫安)을 相異한 比率(2%, 4% 및 6%)로 添加 培養製造한 酵素劑의 α -amylase는 Wahlgemuth에 依한 iodine method로 活性을 測定하였고, β -amylase는 Somogyii modification method로 活性을 測定 觀察한 바 다음과 같은 結論을 얻었다.

① α -Amylase 活性은 *Asp. oryzae*가 가장 優秀했으며 特別 SV 47% 밀기울 培地에 casein 6% 添加 培養 製造가 높았다.

② β -Amylase 活性은 *Rhiz. javanicus*가 가장 優秀했으며 特別 SV 51% 밀기울 培地에 硫安과 casein 混合 2% 添加培養製造가 높았다.

③ *Asp. usamii*는 α -amylase 및 β -amylase 活性이 共히 SV 47% 밀기울 培地에 따른 添加補強없이 培養製造하는 것이 더 높았다.

④ 供試菌株中 *Rh. javanicus*가 α -amylase 및 β -amylase 活性이 比較의 共히 높았다.

⑤ *Rh. javanicus*를 除外한 다른 菌株들은 一般的으로

로 밀기울 培地의 澱粉含量이 높을수록 α -amylase 및 β -amylase 活性이 낮아졌다.

以上の結果로 미루워 보아 밀기울 培地의 澱粉含量의 相異, 窒素源과 添加比率 및 菌株 特異性에 따라 α -amylase 活性과 β -amylase 活性이 相異함을 알 수 있다.

본 實驗을 함에 시중 指導와 校閱을 하여 주신 柳榮鴻, 朱軫淳 兩 敎授님께 深深한 感謝를 드리오며, 技術的 指導를 하여 주신 生化學敎室의 여러 先生님들과 鞭撻을 아끼지 않으시고 주신 化學工學科 여러 先生님들, (그리고 그의 여러선생님들께) 感謝를 드립니다.

References

- 1) 李春寧, 張智鉉: 國稅廳技術研究所報, 2, 27, (1969).
- 2) 李星範: 酒精工業, 1, 20 (1971).
- 3) 姜孝源: 酒精工業, 2, 19 (1972).
- 4) 岡崎浩: 化學と工業, 9, 595 (1972).
- 5) 安東赫: 化學工業概論, 文運堂, 서울, p.569 (1964).
- 6) 韓國酒精工業, 大韓酒紀協會, p.35, 1970.
- 7) 渡邊敏幸: 日本農藝化學會誌, 40, 401 (1966).
- 8) 前澤辰雄: 日本農藝化學會誌, 41, 365 (1967).
- 9) 洪淳佑: 韓國微生物學會誌, 6, 141 (1968).
- 10) 金燦祚: 韓國農化學會誌, 10, 59 (1968).
- 11) 裴貞高: 韓國微生物學會誌, 9, 32 (1971).
- 12) 李培威: 釀造試驗所報, 1, 39 (1968).
- 13) 金尙村: 韓國微生物學會誌, 9, 1 (1971).
- 14) 李錫健, 李漢昌: 韓國微生物學會誌, 2, 19 (1964).
- 15) 李星範: 國稅廳技術研究所報, 2, 62 (1969).
- 16) 李斗永: 韓國微生物學會誌, 7, 41 (1969).
- 17) 金浩植: 釀酵工學, 鄉文社, 서울, p.138 (1969).
- 18) Wohlgermuth: *Biochem. Zs.*, 9, 1 (1908) cited by 衛生試驗法註解, 日本藥學會篇, p. 162 (1967).
- 19) M. Somogyi: *J. Biol. Chem.*, 125, 399 (1938) cited by 日本釀造協會雜誌, 64, No. 1, 78 (1969).
- 20) Alcohol Hand Book: p. 105, 日本釀酵協會, (1963).
- 21) 永原太郎, 岩尾祐之: 食品分板法, 柴田書店, 東京, p.72 (1955).
- 22) 藤井嶋三: 生化學實驗法(定量篇), 11版, 南山堂, 東京, p.20 (1965).
- 23) 尹鑑燮: 食品分析, 螢雪出版社, 서울, p.166 (1969).
- 24) 沈吉淳: 衛生化學, 東明社, 서울, p. 127 (1964).
- 25) 尹鑑燮: 食品分析, 螢雪出版社, 서울, p. 186 (1969).
- 26) Oser, B. L.: *Hawk's Physiological Chem.*, 14Ed., McGraw-Hill Book Co., New York, U. S. A., p. 93 (1965).
- 27) West, E.S. and Todd, W. R.; *Text Book of Biochem.*, 4th Ed., Macmillan Co., New York, U. S. A., p. 238 (1966).
- 38) Harper, H. A.: *Review of Physiol. Chem.*, 13th Ed., Lange Medical Publications Marzen Co., Ltd., San Fransisco, U. S. A., p. 237 (1971).
- 29) 宮路憲二: 應用菌學(下卷), 岩波書店, 東京, p. 87. 1971.
- 30) Ernest Jawetz, etal.: *Review of Medical Microbiology*, 9th Ed., Lange Medical Publications Marzen Co., Ltd., San Fransisco, U. S. A., p. 73 (1970).