

Asp. usamii shirousamii U₂ 균의 국식배양에 의한 유기산 및 당화효소 생성에 관한 연구

尹福鉉 朴允仲 李錫健

충남대학교 농과대학

(1974년 6월 5일 수리)

Studies on Formation of Organic Acid and Saccharifying Amylase in Koji Culture by *Asp. usamii shirousamii* U₂

by

Bok Hyun Youn, Yoon Joong Park, Suk Kun Lee

College of Agriculture, Chungnam Univ.

(Received June 5, 1974)

Summary

This experiment was carried out to investigate the producing conditions of organic acid and saccharifying amylase in Koji culture by *Asp. usamii shirousamii* U₂. The results were as follows.

1. When the strain U₂ was incubated at 30°C, for 3 days in wheat flour and wheat bran media, the organic acid production was maximum. In the case of incubation at 35°C, for 3 days in wheat flour medium and at 35°C, for 2 days in wheat bran medium the activity of saccharifying amylase was highest.

2. When water was added 60% to wheat flour and 50% to wheat bran in the case of 3 days incubation, the organic acid production was superior. Both in wheat flour and wheat bran media, the saccharifying amylase production was most highly, when water was added 90—100%.

3. Comparatively speaking, the organic acid production was better in wheat flour medium than wheat bran medium, but the activity of saccharifying amylase was higher in wheat bran medium.

4. When the sweet potato starch waste and the wheat flour were mixed with same amount, the organic acid and saccharifying amylase production were higher than in simple wheat flour medium.

5. In the medium of sweet potato starch waste the organic acid and saccharifying amylase production were low extremely.

6. In the case of incubation at 30°C, 3 days in wheat flour medium admixed with 60% water, the amount of citric acid in the organic acid formed was about 91%.

서 론

유기산 중에서 구연산은 산미료, 의약품 원료등으로써 그 수요가 많은 산이며 19세기말까지는 전적으로 감귤류를 원료로 제조하였으나 1893년 Wehmer⁽¹⁾가 처음

으로 사상균에 의한 구연산 발효를 발표한 이래 미생물에 의한 구연산 생산에 대하여 많은 연구를 시도하게 되었다. Maze와 Perrier⁽²⁾, Currie⁽³⁾, Bernhauer⁽⁴⁾, Shu와 Johnson⁽⁵⁾, Szüer⁽⁶⁾, 宇佐美⁽⁷⁾등은 사상균의 액내배양에 의한 구연산 생산의 연구를 보고한바있다. 국식배

양에 의한 구연산 생산의 연구로서는 전분박을 원료로 하는 배양 또는 왕겨나 톱밥을 담체로한 당밀배지에서 공업적 생산에 관한 照井^(8,9,10)의 보고가 있으며 또한 국식배양에 의한 구연산 발효에 있어서 공기 또는 산소와 기타 gas 의 혼합물을 취입하는 野口⁽¹¹⁾의 특허등을 볼수 있다. 照井⁽¹²⁾는 흑국균의 배양에 있어서 생성 amylase 의 당화반응과 당을 기질로 하는 구연산 발효가 함께 진행되며 발효종료물 중에는 당화 amylase가 상당히 축적되어 있다고 하였다. 또 1966년 照井⁽¹³⁾등은 사상균의 국식배양에 있어서 구연산과 같이 생산되는 amylase 를 회수하는 방법에 대하여 보고한바 있으며 久永⁽¹⁴⁾⁽¹⁵⁾은 전분박을 원료로 하는 구연산 발효법과 발효시 품온을 28°C로 유지하여 구연산을 제조하는 방법 등에 대하여 특허를 낸바 있다. 한편 우리나라에 있어서는 이에 대한 연구를 거의 찾아볼 수 없으며 발효법에 의한 구연산 생산을 서두르고 있으나 현재 구연산 석회를 원료로 수입하여 구연산을 제조하고 있는 상태이며 균주선정 기타 생산기술 면에서 해결해야 할 문제가 많은 것으로 생각된다. 저자들은 국식배양에 있어서 구연산 등의 유기 산을 대량 생산하는 균주를 얻고자 자연계에서 분리한 다수의 균주와 기왕에 분리 보존중인 각종 *Asp.* 속균의 유기산 생성능을 조사한 결과 내산성 amylase 생성균으로서 보존중인 *Asp. usamii shirousamii* U₂ 균의 유기산 생성능이 가장 우수 하였으므로 이 균의 국식 배양에 있어서 유기산과 amylase 생산 조건의 차이점을 검토하여 그 결과를 보고하는 바이다.

실 험

1) 균주선정

pH 2.5의 산성맥아즙 및 산성맥아즙 한천배지를 사용하여 자연계에서 분리한 *Asp.* 속 358주와 실험실(충남대 농대)에 보존중인 *Asp.* 속 20주를 50% 침수하여 증자한 밀가루 배지에 접종하여 30°C에서 72시간 배양한 후 유기산 생산량을 조사하여(배양물을 20배의 물로 추출하고 그 일정량을 0.1N NaOH로 적정하는 산도 비교실험) 우수균주로서 보존균주 U₂⁽¹⁶⁾균을 선정하고 본 균주를 실험에 사용하였다.

2) 사용배지

밀가루, 밀기울 및 고구마전분박의 단용 또는 혼용배지를 사용하였다.

밀기울, 고구마전분박 배지는 상법에 따라 원료에 소정량의 물을 첨가하여 혼합한 후 풍건원료 8g에 해당하는 양을 각각 100 ml용 삼각 flask에 넣어 15 Lbs, 20분간 증자 살균하여 사용하였다.

그러나 밀가루 배지는 밀가루에 다량의 물을 일시에 첨가하여 상법으로 조제하면 뭉쳐서 덩어리가 되어 균 배양에 적당하지 않게 되므로 물을 25%이상 첨가하는 경우에는 먼저 밀가루에 25%의 물을 침수하여 autocl-

ave에서 상압으로 30분간 증자한 후 과립상태로 하여 건조물 8g에 해당하는 양을 각각 100 ml용 삼각 flask에 넣고 15 Lbs, 20분간 증자 살균한 다음 무균실에서 소정량의 멸균수를 더욱 첨가하여 흔들어서 사용하였다.

3) 접종

선정균주를 맥아즙한천 사면배지에 30°C로 7~10일간 배양한 후 포자 2백균이를 취하여 멸균수 10 ml에 현탁하고 현탁액 0.2 ml씩을 100 ml용삼각 flask내의 배지에 적가하고 흔들어서 혼합하였다.

4) 유기산 측정

배양풍건물 5g에 100 ml의 물을 가하여 상온에서 1시간 30분 추출하고 그 5 ml를 취하여 0.1 N-NaOH로 적정하였다. 0.1 N-NaOH 1 ml는 구연산으로 환산할 경우 0.007 g에 상당하므로 배양풍건물의 유기산량을 다음식에 의하여 계산 표시하였다.

$$\text{배양풍건물의 유기산량 (\%)} = \frac{0.1 \text{ N-NaOH 적정ml} \times 20 \times 0.007 \text{ g}}{5} \times 100$$

5) 구연산 정량

생성된 유기산중 구연산 정량은 Saffran⁽¹⁷⁾ 법에 의하여 정량하였다. 즉 시료용액 1 ml중에 구연산이 15~400 γ가 되도록 시료용액을 희석(희석배수 : a)한후 이것을 발색시켜 400 mμ에서 흡광도를 측정(흡광도 : b)하고 시료용액 1 ml중의 구연산을 구한 다음 생성 유기산중의 구연산량을 계산하였다. 표준용액으로는 증류수 1 ml중에 구연산을 300 γ 용해시킨 액을 사용하였는데 상기와 동일한 조건에서의 흡광도는 0.46이었으므로

$$\text{시료 용액 1 ml중의 구연산량} = \frac{b}{0.46} \times 300 \gamma \times a$$

6) 당화효소력 측정

상기와 같은 추출액(20배의 효소희석액)을 사용하여 당화효소력을 측정하고 A.U. 단위로서 표시하였다. 당정량은 Hypoiodide 법으로서 실시하였다.

a. A.U.

Koji 풍건물 1g가 pH 5.0의 1% 가용성 전분액에서 40°C 10분간 작용하여 1 mg의 glucose에 상당하는 환원당을 생성하는 활성을 1 A.U.로 함

b. 기질의 조제

가용성 전분을 무수물로서 1.2g 취하여 물에 녹인 다음 pH 5.0의 Walpole buffer 20 ml을 넣고 물을 가하여 100 ml로 하였다.

c. 조작

1.2% 가용성 전분액 12.5 ml를 구경 2 cm의 시험관에 취하고 40°C 항온수조 중에서 수분간 예열한 후 효소액 2.5 ml를 가하여 잘 혼합하는 즉시 5 ml를 sampling 하고 20분간 반응후에 다시 5ml를 sampling 하였다.

d. 당정량

Sampling 한 두액(반응액을 혼합즉시 취한 것과 20분간 반응시킨 후에 취한것)을 각각 미리 0.1N-NaOH 액 10 ml 을 취해둔 100 ml 용 삼각 flask 에 넣어 효소작용을 정지시키고 곧 0.05N-I₂ 10 ml 을 가하여 전탕하고 30분 방치한 다음 1N-H₂SO₄을 가하여 산성으로 하고 유리 I₂를 0.05N-Na₂S₂O₃로 적정하였다.

이 hypo 액 1 ml 는 4.5 mg 의 glucose 에 상당하므로 두 경우의 적정 ml 수의 차에 의하여 당량을 glucose 로서 산출 하였다.

$$A.U. = \frac{\text{glucose 생성량(mg)} \times 3}{\text{효소액량(ml)} \times 2} \times \text{효소액의 희석배수}$$

결과 및 고찰

1) 배양온도와 기간

(1) 밀가루 배지

50% 침수의 밀가루 배지에 5°C간격으로 25~35°C에 2~5일간 배양하여 유기산량과 당화효소력을 측정 한 결과는 Fig. 1, 2와 같았다.

유기산의 생성은 Fig. 1에서 보는바와 같이 30°C, 3일간 배양한 경우에 가장 좋은 성적을 나타냈으며 25°C에 배양한 경우에는 배양 5일까지 유기산의 생성이 계속 증가하였으나 5일 후에도 30°C, 3일 배양의 경우보다 적었다. 35°C 배양의 경우에는 배양 2일째에 최고의 유

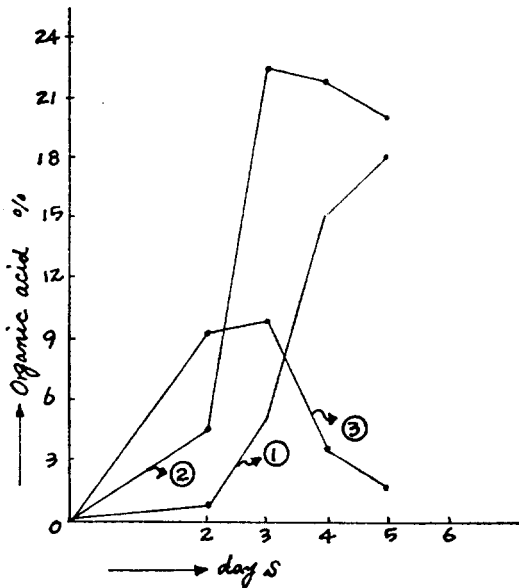


Fig. 1. Influence of cultural temperature and period upon the organic acid production in wheat flour medium.

- ① at 25°C
- ② at 30°C
- ③ at 35°C

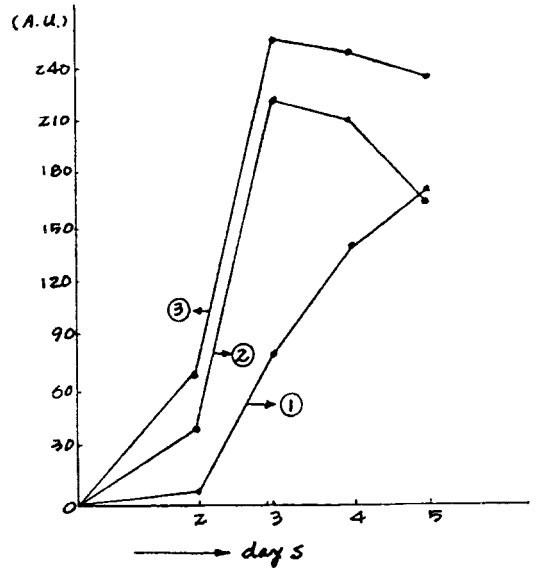


Fig. 2. Influence of cultural temperature and period upon the amyolytic units in wheat flour medium.

- ① at 25°C
- ② at 30°C
- ③ at 35°C

기산의 생성을 보였으며 이후 시일이 경과함에 따라 생성 유기산량은 감소되었다.

유기산 생성의 최고치의 차를 비교하면 35°C 배양의

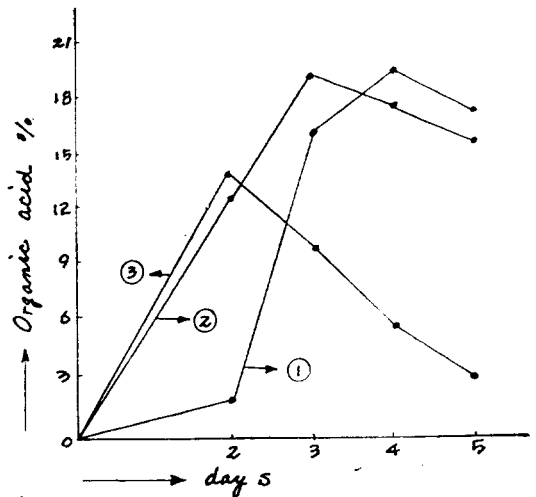


Fig. 3. Influence of cultural temperature and period upon the organic acid production in the wheat bran medium.

- ① at 25°C
- ② at 30°C
- ③ at 35°C

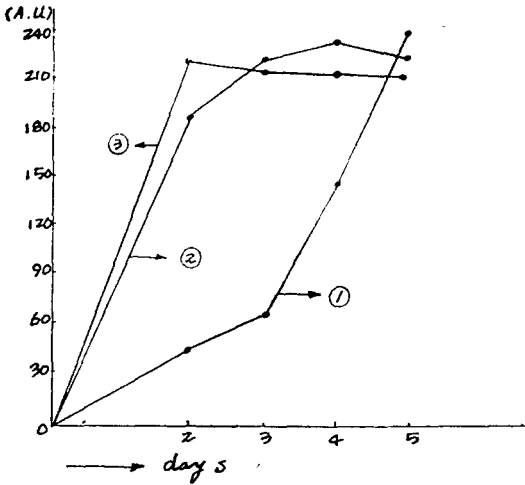


Fig. 4. Influence of cultural temperature and period upon the amyolytic units in wheat bran medium.

- ① at 25°C
- ② at 30°C
- ③ at 35°C

경우는 30°C 경우의 약 반량밖에 되지 않았다. 한편 당화효소의 생성은 Fig. 2에서 보는바와 같이 35°C에 3일 배양한 경우에 최고치의 값을 보였으며 30°C 경우와 별로 차가 없음을 알 수 있었다.

이상의 결과로 보아 유기산 생성을 목적으로 사상균을 배양할 때는 당화효소 생성의 경우보다 약 5°C가 낮은 30°C 부근이 최적조건이며 35°C 배양의 경우는 유기산의 생성이 상당히 감소됨을 알 수 있었다. 이것은

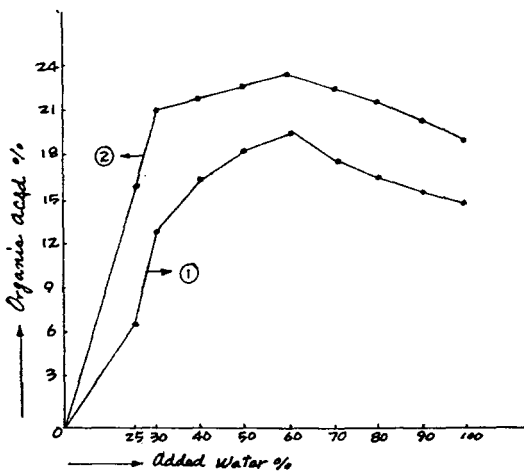


Fig. 5. Effect of amounts of water added to wheat flour medium upon the organic acid production.

- ① after 2 days, at 30°C
- ② after 3 days, at 30°C

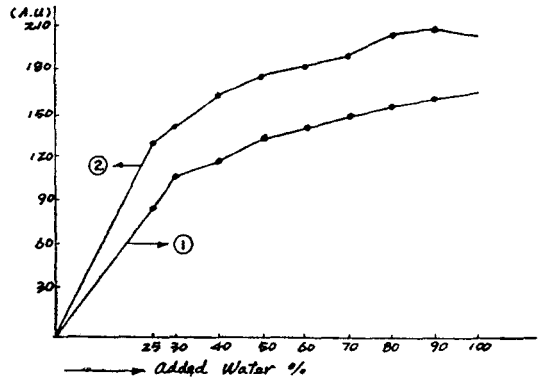


Fig. 6. Effect of amount of water added to wheat flour medium upon the amyolytic units

- ① after 2 days, at 30°C
- ② after 3 days, at 30°C

구연산의 생성이 온도 35°C 이상에서 심히 저하된다는 西村⁽¹⁸⁾의 보고와 일치하는 경향이다.

(2) 밀기울 배지

50% 침수의 밀기울 배지에서의 유기산 생성은 Fig. 3에 표시한바와 같이 35°C에서 2일간, 30°C에서 3일간, 25°C에서 4일간 배양한 경우에 각각 가장 높았으며 30°C, 3일간 또는 25°C, 4일간의 배양이 최적조건임을 알 수 있었다. 당화효소 생성은 Fig. 4에 표시한바와 같이 35°C, 2일간 배양으로 거의 최고의 역가를 나타냈다.

당화효소 생성의 최적온도는 밀가루 배지와 밀기울 배지의 어느것에서나 35°C 부근이었으나 밀기울 배지에서는 밀가루 배지의 경우보다 균의 생육이 다소 빨랐다.

이와같은 경향은 밀기울배지의 영양상태 또는 기타의 조건이 균의 생육에 더욱 적합하기 때문이라고 생각된다.

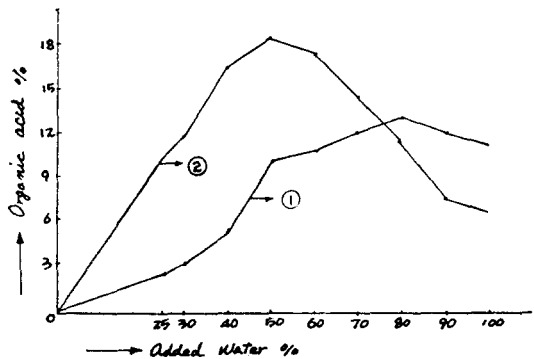


Fig. 7. Effect of amount of water added to wheat bran medium upon the organic acid production.

- ① after 2 days, at 30°C
- ② after 3 days, at 30°C

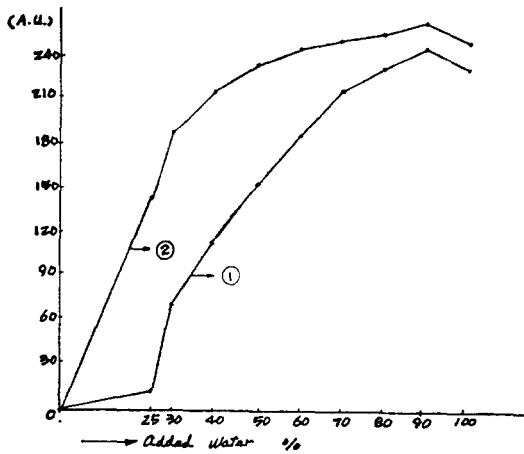


Fig. 8. Effect of amounts of water added to wheat bran medium upon the amyolytic units.

- ① After 2 days, at 30°C
- ② after 3 days, at 30°C

2) 침수량의 영향

(1) 밀가루 배지

침수량을 각각 달리하고 30°C에서 2~3일간 배양한 결과는 Fig. 5와 같았다.

유기산 생성은 2일 배양시나 3일 배양시에 60%의 침

Table 1. Effect of composition ratio of sweet potato starch waste and wheat flour upon the organic acid production and amyolytic activity

Ratio		Organic acid %		Amyolytic Units	
starch waste %	flour %	after 2 days	3 days	after 2 days	3 days
100	0	1.76	6.2	18.56	85.6
75	25	9.54	18.64	55.68	218.2
50	50	16.2	20.64	278.2	226.8
25	75	15.7	21.75	256.8	248.2
0	100	14.6	19.53	241.2	209.7

Table 2. Effect of composition ratio of wheat flour and wheat bran upon the organic acid production and amyolytic activity

Ratio		Organic acid %		Amyolytic units	
flour %	wheat bran %	after 2 days	3 days	after 2 days	3 days
100	0	19.75	23.08	196.8	175.4
75	25	19.75	18.64	184.0	179.7
50	50	19.53	17.76	192.6	261.0
25	75	18.87	16.65	205.4	239.6
0	100	16.42	16.42	201.1	243.9

수에서 가장 좋았으며 당화효소력은 Fig. 6에 표시한 바와 같이 90~100% 침수일때 최고의 역가를 나타냈다.

본 실험에서 유기산의 생성의 최적 침수량은 60% 배의인데 이것은 당밀, 톱밥을 사용한 배지에서 최적 침수량이 50~55%이었다는 照井⁽⁸⁾의 보고 보다는 다소 높았으며 전분박 배지에 배양할 때 최적 침수량이 70~80%이었다는 西村⁽¹⁷⁾의 보고 보다는 다소 낮음을 알수있다

(2) 밀기울 배지

밀기울에 침수량을 각각 달린 배지에서 30°C로 배양한 경우의 유기산 생성량은 Fig. 7과 같았다. 2일 배양시는 80% 침수에서, 3일 배양시는 50% 침수에서 가장 우수하였다.

당화효소는 Fig. 8에 표시한바와 같이 2일 배양시나 3일 배양시 모두 90~100%에서 최고의 역가를 나타내었다.

3) 배지조성

고구마전분박, 밀가루 및 밀기울 중에서 2종의 원료에 50%의 침수분 하여 조제한 혼합배지에서 30°C, 2~3일간 배양하여 유기산량과 당화효소력을 측정 한 결과는 Table 1, 2, 3. 과 같다.

고구마전분박과 밀가루의 혼합배지에서는 혼합비율 1:1의 경우에 유기산 생성과 당화효소력이 밀가루 단일 배지에서 보다 증가를 보였으며 전분박 단일 배지의 경우에 비하여 월등히 우수하였다.

밀가루와 밀기울의 혼합배지에서는 혼합비율에 따른 유기산량과 당화효소력에 큰 차가 없었으나 2일 또는 3일 배양의 어느 경우나 밀가루량이 많을수록 유기산 생성은 증가하는 반면 당화효소력은 감소하였다. 즉 유기산 생성면으로 볼때는 밀가루단일 배지가 양호하였으며 당화효소생성에 있어서는 밀기울 단일배지가 양호하였다.

Table 3. Effect of composition ratio sweet potato starch waste and wheat bran upon the organic acid production and amyolytic activity

Ratio		Organic acid %		Amyolytic units	
starch waste %	wheat bran	after 2 days	3 days	after 2 days	3 days
100	0	1.76	6.2	8.56	85.6
75	25	10.54	11.76	85.6	88.2
50	50	11.84	13.34	185.4	98.4
25	75	12.43	12.21	205.4	171.2
0	100	16.43	16.42	201.1	243.9

고구마전분박과 밀기울의 혼합배지에 있어서 밀기울을 25% 이상 혼합시에 전분박 단일배지의 경우에 비해 유기산 생성량이 월등히 증가하였다. 2일 배양시는 밀기울량이 많을수록 유기산량이 증가 되었으나 3일 배양시는 밀기울량이 25~100% 사이에 큰 차가 없었다. 당

화효소력은 밀기울의 혼합비가 증가할수록 계속 증가하였으며 밀기울 단일배지는 전분박 단일배지에 비하여 2 일 또는 3일 배양의 어느 경우나 유기산 생성량 및 당화효소력이 월등히 높았다.

이상의 결과로 고구마 전분박 단일배지는 유기산 및 당화효소 생성배지로는 부적당함을 알 수 있다.

4) 생성유기산중 구연산 함량

본 실험에서 유기산을 최고로 생성한 조건 즉 60% 침수의 밀가루배지에서 30°C, 3일간 배양한 경우에 대하여 생성 구연산량을 측정하면 유기산 중의 91.3%가 구연산이었다.

생성 유기산 중의 구연산량은 배지 및 배양조건에 따라 달라진다고 생각되나 상기 경우와 유사한 조건에서는 생성 유기산 중 약 90%가 구연산임을 알 수 있다.

요 약

Asp. usamii shirousamii U₂ 균의 국식 배양에 있어서 유기산 및 당화효소생성 조건에 대하여 실험한 결과는 다음과 같다.

(1) 유기산 생산은 밀가루 및 밀기울 배지의 경우 30°C에서 3일간 배양시에 가장 좋았으며 당화효소력은 밀가루 배지의 경우 35°C, 3일간 배양시에 가장 높았고 밀기울 배지는 35°C, 2일간 배양시에 거의 최고 역가를 나타냈다.

(2) 3일 배양의 경우 배지의 침수량은 밀가루 배지에서는 60% 침수일때, 밀기울 배지에서는 50% 침수일때 유기산 생성이 가장 좋았으며 당화효소 생성은 밀가루, 밀기울의 어느 배지에서나 90~100% 침수에서 가장 좋았다.

(3) 밀가루와 밀기울의 배지를 비교하여 볼때 유기산의 생성은 밀가루 배지가 좋았으며 당화효소생성은 밀기울 배지에서 높았다.

(4) 고구마 전분박과 밀가루를 동량으로 혼합했을 때 밀가루 단일배지보다 유기산 및 당화효소 생성이 높았으며 밀기울에 고구마전분박 첨가의 효과는 없었다.

(5) 밀가루, 밀기울 단일배지에 비하여 고구마전분박 단일배지에서는 유기산 및 당화효소 생성이 극히 나빴다.

(6) 60% 침수의 밀가루배지에서 30°C, 3일간 배양한 경우 생성유기산중의 약 90%가 구연산이었다.

Reference

- 1) Wehmer, C.: *Comp. Rend. Acad. Sci., (paris),* 117. 332 (1893).
- 2) Mäze, P., and Perrier. A.: *Ann. inst. Pasteur,* 18, 553 (1905).
- 3) Currie J.N.: *Boil. Chem.* 31, 15 (1917).
- 4) Bernhauer, K.: *Biochem. Z.,* 286, 45 (1936).
- 5) Shu, P., and M.J. Johnson: *Ind. Eng. Chem,* 40 1202 (1948).
- 6) Szües: U.S. Patent 2353771 (1944).
- 7) 宇佐美 照次: *化學と工業* 111, 727 (1944).
- 8) 照井堯造, 芝崎, 望月: *醸工* 35, 105 (1957).
- 9) 照井堯造: *生産と技術* 2, 8 (1950).
- 10) 照井堯造, 芝崎, 望月: *醸工* 36, 109 (1958).
- 11) 野口靖二郎: *日本特許 昭* 29-4196.
- 12) 照井堯造, 芝崎, 望月: *醸工* 37, 332 (1959).
- 13) 照井堯造, 北田牧夫, 土山英夫: *醸工* 44, 86 (1966)
- 14) 欠永周一郎, 西村幸男: *日本特許 昭* 43-20708.
- 15) 欠永周一郎, 西村幸男: *日本特許 昭* 41-16555.
- 16) 朴允仲, 李錫健: *한국농화학회지* 9, 91. (1968)
- 17) Saffran, M. D.F. Denstedt,: *J. Biochem.* 175, 849 (1949)
- 18) 西村幸男: *日本特許 昭* 39-43938.