

耐酸性 消化酵素劑의 生産에 關한 研究

耐酸性 酵素生産菌의 分離와 酵素 生産條件에 關하여

孫天培·朴允仲

忠南大學校 食品加工學科

(1981년 6월 16일 수리)

Studies on the Production of Acid Digestive Enzyme

Isolation and Characterization of a Fungal Strain Which Produces Acid Enzymes

Cheon Bae Sohn and Yoon Joong Park

Department of Food Science and Technology, Chungnam National University, Daejeon 300

(Received June 16, 1981)

Abstract

A fungal strain which produced high levels of acid protease and amylase was isolated from the atmosphere for application to the manufacture of digestive enzyme preparation. This study was carried out to elucidate its microbiological characteristics, environmental conditions for production of the enzymes, and relationships between the enzyme activity and acidity.

1. The isolate was identified as a fungal strain which belonged to *Aspergillus niger* by the manual of Raper and Fennel, and was found to be a strain producing high levels of acid protease and amylase.
2. The optimal pH of the enzymes produced by the strain were: protease, 2.0; α -amylase, 4 to 5; and glucoamylase, 3 to 5.
3. The optimal culture conditions for production of the enzymes were: protease (at pH 2.5), 2 to 3 days incubation on wheat bran at 30°C; α -amylase and glucoamylase (at pH 3.0), 3 days incubation at 30°C.
4. The production of acid protease and glucoamylase was increased approximately by 20 percent when 2 percent of corn starch was added to the wheat bran medium.
5. The addition of 0.3 percent ammonium sulfate to the wheat bran medium resulted in enhancing the enzyme production, especially of acid protease.

序 論

消化酵素劑로서는 protease, amylase, lipase 등의 효

소가 사용되고 있으며, 그다: protease와 amylase가
主體가 되고 있다. 그러나 이들 효소의 能力을 充分히
發揮하려면 耐酸性의 條件을 必要로 하게 된다. 따라
서 消化酵素를 低廉하게 工業적으로 生産하기 위해서

는 微生物에 依한 耐酸性 protease 또는 耐酸性 amylase 의 效果의인 生産이 要望되고 있다. 微生物이 生産하는 耐酸性 protease 에 關하여는 Amano⁽¹⁾, 吉田⁽²⁾, 蔭山⁽³⁾, 松島⁽⁴⁾, 坂本⁽⁵⁾, Ichishima⁽⁶⁾, 岬⁽⁷⁾, 金⁽⁸⁾, 鄭⁽⁹⁾의 研究 等 많은 報告가 있으며, 耐酸性 amylase 生産에 關한 研究로서는 北原⁽¹⁰⁾, 岡崎⁽¹¹⁾, Minoda⁽¹²⁾, 山田⁽¹³⁾, 久留島⁽¹⁴⁾, 朴⁽¹⁵⁾ 等의 報告가 있다. 이들의 研究에서 使用된 生産菌株를 살펴보면 Black *Aspergillus* 屬菌이 가장 많고 이밖에 *Rhizopus* 屬, *Penicillium* 屬, *Asp. oryzae* var. *microsporus*, *Paecilomyces varioti* 等이 있다.

耐酸性 protease 또는 耐酸性 amylase 生産에 關한 研究는 많으나 아직 研究 檢討해야 할 點이 많고 또 이것을 綜合的으로 檢討 할 必要가 있다. 따라서 著者는 自然界에서 耐酸性 protease 와 耐酸性 amylase 生産能이 강한 우수 菌株를 分離 選定하였으며, 選定菌株의 菌學的 性質을 檢討하고 밀기울培地를 使用하여 耐酸性 酵素의 生産 條件을 試驗하였다.

材料 및 方法

菌의 分離

1 l 들이 三角 플라스크에 우유 카제인(milk casein) 2g, 글루코오스 30g 및 水道水 500 ml 를 加하여 섞어 주고 (milk 는 현탁됨) 따로 水道水 500 ml 에 25 g 의 寒天을 加하여, 이들 兩者를 15 psi 에서 20分間 加壓殺菌한 後, 各各의 三角 플라스크에 50% 醋산을 滴下하여 pH 3.0이 되도록 培地의 pH 를 調節하고 이들 兩者를 無菌的으로 混合하여 乾熱殺菌된 petri dish 에 10 ml 씩 分注하였다. 이 petri dish 를 여러地域 (대전 시 주변 및 평택, 오산, 수원, 서울, 강릉, 속초等)의 땅위에서 數分 정도 開放하거나, 버스나 列車 走行時에 창문 밖에서 30 초 정도 開放하여 空氣中에서 菌의 胞子를 채집한 後 30°C에서 2~3日間 培養하고 냉장고에 1~2日間 넣어 두어 生成된 카제인 消化環의 크기를 指標로 하여 1次 screening 을 하였다.

1차 選定한 菌들을 밀기울培地(100 ml 三角플라스크에 밀기울 5 g 과 물 5 ml 를 加하여 혼합하고 加壓殺菌한 培地)에 접종하고 30°C에 2~3日간 배양하였다. 培養後 菌의 生育狀況을 살펴 生育이 良好한 것에 증류수 100 ml 를 加하여 酵素抽出液을 調製하고 이들에 대하여 산성 protease 및 산성 amylase 力을 측정하여 우수군주를 選定하였다.

菌株의 同定

選定菌株의 菌學的 性質을 살피기 위하여 malt extract agar slant 에서 30°C, 10일간 배양한 後 다시

Czapek's agar plate (pH 5.0)에 培養하여 콜로니特性을 관찰하였으며 또한 slide culture 를 하여 현미경으로 관찰하였다. 또한 conidia 表面의 性質을 살피기 위하여 Czapek's agar slant 上에서 30°C, 10일간 培養한 後 conidia 를 조제하고 電子현미경으로 관찰하였다. 本 實驗은 Raper & Fennel⁽¹⁶⁾의 同定項目에 따라 실시하였다.

麴製造 및 酵素液 調製

가. 麴製造

밀기울에 100%의 水道水를 加하여 고루 섞고 잠시 방치하여 수분을 고르게 한 다음 100 ml 三角플라스크에 10 g 씩 넣고 이것을 15 psi 에서 20分間 加壓殺菌하고 이것에 寒天斜面培養의 菌胞子 1白金耳씩을 접종하여 25~35°C에서 일정기간동안 배양하였다.

나. 효소액 조제

麴製造 後 三角플라스크에 100 ml 의 물을 加하여 유리봉으로 잘 저어주고 실온에서 4~5시간 방치한다. 그간 때때로 흔들어 주고 이것을 濾紙로 여과하여 여액을 효소액(麴의 20倍 稀釋)으로 사용하였다.

酵素力價의 測定

가. Protease 活性的 測定

카제인을 基質로 하는 Anson 改良法⁽¹⁷⁾에 準하여 測定하였다.

(1) 基質液의 調製

0.6% 카제인液을 조제하여 使用하였다. pH 6.0 以上の 경우는 0.05 M Na₂HPO₄ 100 ml 에 우유카제인 1.2 g 을 加하여 加熱溶解시키고 0.1 N HCl 또는 NaOH 로 소정의 pH 로 조정한 後에 同一 pH 의 완충용액을 加하여 200 ml 로 하였다. pH 5.0 이하의 경우는 0.05 M lactic acid 100 ml 에 우유카제인 1.2 g 을 가열용해시키고 以下 同一하게 하였다. 완충용액은 McIlvaine buffer 와 Clark-Lubs buffer 를 使用하였다.

(2) 測定法

反應試驗管에 효소액(麴의 20倍 抽出液, 必要에 따라 稀釋하여 使用함) 0.5 ml 씩을 取하여 30°C 의 항온조에 넣고 5分後 미리 30°C 에 保溫해둔 0.6% 基質液 2.5 ml 씩을 가하여 잘 흔들어 주고 정확히 10分間 酵素反應을 시켰다(反應液中的 基質濃度는 0.5%가 된다). 다음 0.5 M TCA 溶液 2 ml 를 곧 加하고 약 30分間 30°C 물중탕에 방치하여 단백질이 完全히 침전되던 지름 3 cm 의 갈매기를 使用하여 여과하였다. 對照試驗은 효소액 0.5 ml 씩을 取한 시험관을 항온조에 넣고, 먼저 TCA 용액 2 ml 씩을, 이어서 기질액 2.5 ml 씩을 첨가하고 앞에서와 같이 하여 여과하였다. 각 여액 1 ml 씩을 시험관에 取하고 0.5 M Na₂CO₃ 2.5 ml, 다음에 3倍 희석한 Folin 試藥 0.5 ml 을 加하여

곧 흔들어 주고 30°C에서 30分間 放置하여 發色시킨 後 波長 660 nm에서 各 試料의 吸光度를 spectrophotometer(Hitachi-124)로 測定하였다. Protease力價는 酵素反應液의 吸光度에서 各자의 對照試驗의 吸光度를 뺀 값을 吸光度 測定值로 하였다. 別途로 作成한 標準 曲線(水溶液中の tyrosine 量과 吸光度 測定值의 關係 曲線)에 依하여 吸光度 測定值로부터 測定液의 tyrosine 量을 求하고 酵素力價의 單位는 30°C, 1分間에 1 μg tyrosine에 相當하는 吸光度를 나타내는 酵素量을 1單位로 하고 麴 1 g이 나타내는 力價로 表示하였다.

나. α-Amytase 活性的 測定

不破⁽¹⁸⁾의 blue-value 法의 變法에 依하여 測定하였다. 1% 可溶性 澱粉액 1 ml와 所定 pH의 McIlvaine buffer 1 ml에 희석효소액(麴의 20倍 抽出液을 100倍 희석한 液, 稀釋倍數는 必要에 따라 調整함) 0.5 ml를 加하여 40°C에서 30分間 反應시킨 後 1N CH₃COOH 5 ml를 加하여 反應을 停止시키고 이中에서 0.5 ml를 取하여 0.005% I₂액 5 ml를 넣어서 시험관에 넣고 發色시킨 後, 660 nm에서 吸光度를 測定하였다. 酵素 反應液의 吸光度에서 對照試驗(酵素液 代身 蒸溜水를 使用함)의 吸光度를 뺀값으로 吸光度 測定值를 表示하고 이것에 麴의 稀釋倍數를 곱한 값으로 酵素力價를 表示하였다.

다. Glucoamylase 活性的 測定

中型試驗管에 5% 可溶性 澱粉溶液 2 ml와 McIlvaine buffer 2 ml(所定の pH)를 取하여 40°C의 恒溫水槽 中에 담구어 約 5分間 豫熱한 다음 40°C에 保溫한 稀釋 酵素液(麴의 20倍 抽出液을 2倍 稀釋한 液, 稀釋倍數는 必要에 따라 調整함) 1 ml를 pipette로 붙어넣고 흔들어 준다. 正確히 20分間 反應시킨 後 反應液 1 ml를 取하여 糖定量을 하였다. 對照試驗으로서는 酵素液을 添加한 直後의 反應液(反應 開始前 液) 1 ml를 取하여 糖定量을 하였다. 糖定量은 Hypoidide法⁽¹⁹⁾으로 하였으며 糖化酵素力은 A.U.(Amylotic Unit)^(15,20) 單位로 表示하였다. 即 酵素反應液의 糖量에서 對照 試驗液의 糖量을 뺀값에 依하여 生成糖量을 求하고 40°C, 10分間에 1 mg의 글루코오스에 相當하는 糖을 生成하는 活性을 1 A.U.로 하여 麴 1 g이 나타내는 力價로 表示하였다.

$$A.U. = \frac{\text{反應液 全量中の 生成糖量}(mg)}{\text{使用한 酵素液量}}$$

$$\times \frac{1}{2} \times \text{麴의 稀釋倍數}$$

윗 식에서 1/2을 곱한 것은 反應時間을 10分으로 規定 한데 대하여 實際反應時間은 20分間이기 때문이다.

結果 및 考察

分離菌의 菌學的 性質

가. 形態的 性質

Raper와 Fennel⁽¹⁶⁾의 同定項目에 따라 調査한 結果는 Table 1과 같다.

Table 1. Descriptive sheet of the isolated strain incubated in Czapek's agar(pH 5.0) for 10 days at 30°C

| | | |
|------------------|-----------|---|
| Colony character | Color | Black |
| | Texture | Roughly velvety |
| Conial | Shape | Globose |
| | Color | Black |
| | Diameter | 300~350 μ |
| Conidiophore | | Not constricted below the vesicle |
| | Wall | Smooth, almost colorless and pigmented with yellowish brown below the vesicle |
| | Length | 2~4 mm |
| | Diameter | 10~15 μ |
| Vesicle | Shape | Globose |
| | Size | 60~70 μ |
| Sterigmata | | two series |
| | Primary | 30~45 > 8 μ |
| | Secondary | 8×4 μ |
| Conidia | Shape | Globose |
| | Wall | Roughened with conspicuous ridges |
| | Diameter | 4~5 μ |
| Perithecia | | Not produced |
| Sclerotia | | Not produced |

選定菌株는 Raper & Fennel⁽¹⁶⁾의 同定 key에 따르면 分生子의 끝이 평대하여 頂囊이 되고 많은 梗子를 着生하여 그 끝에 分生子를 連鎖狀으로 形成하였다. 梗子는 複列이며 分生子頭와 정낭은 球形이고 정낭하부에서 分生子柄은 壓縮되지 않고 分生子頭는 黑色이고 分生子柄은 平滑하고 頂囊下部가 黃褐色으로 着色된 點 等에 依하여 *Asp. niger* group으로 同定되었다. 더욱 分生子柄의 길이가 2~4 mm이고 分生子는 球形이며 直徑이 4~5 μ이고 表面에 小突起를 갖는 點에 依하여 *Asp. niger*로 同定되었다.

作用 pH와 酵素力

選定菌株를 밀기를 培地에서 30°C로 2日間 培養하여 生成된 protease 및 amylase의 pH에 따른 活性的

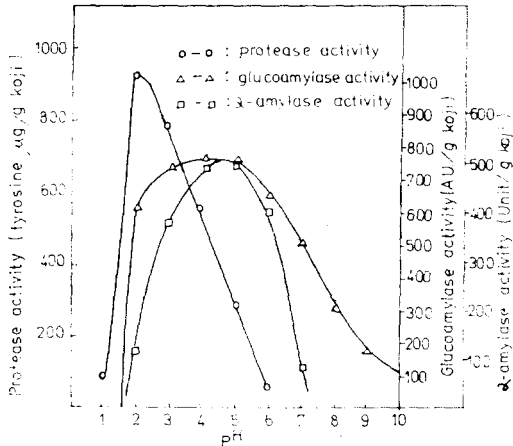


Fig. 1. Effect of pH on the enzyme activity

변화를 살핀 결과는 Fig. 1 과 같다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 protease는 pH 2.0 부근에서 최저 활성을 보였으며 最適活性的 pH 범위가 매우 좁음을 알 수 있었다. α-Amylase는 pH 4~5에서 最適活성을 나타냈으며 pH 2.0부근에서는 活性이 많이 떨어졌다. Glucoamylase는 pH 3~5에서 最適活성을 나타냈으며 pH 2~6 범위에서는 효소활성에 큰 변화가 없었다. 이 결과를 岬등(7)의 報告와 比較할 때 菌株에 따라 protease 및 amylase 系에 多少의 差異가 있음을 알 수 있다.

酵素의 生産

가. 耐酸性 protease 의 生産

選定菌株을 밀기울培地에 接種하고 培養 溫度를 달리 하여 經時的으로 acid-protease(pH 2.5에서의 活性)의 生産을 檢討한 바 그 結果는 Fig. 2와 같다.

Fig. 2에서 보는 바와 같이 25°C 培養에서는 4日後, 에 最高力價에 達하였고, 30°C 培養에서는 3~4日 後에, 35°C 培養에서는 2日 後에 最高力價에 達하였으나 3日 以後는 力價가 떨어졌다. 雜菌汚染防止와 培養期間 短縮의 必要性 等을 考慮할 때 acid protease의 實際生産에 있어서는 30°C에서 約 2日間 培養이 適當하다고 생각된다.

나. 耐酸性 α-amylase 의 生産

Acid protease 生産의 경우와 같은 방법으로 培養하여 耐酸性 α-amylase 活性(pH 3.0에서의 活性)을 測定한 結果는 Fig. 3과 같다. 實驗結果에서 보는 바와 같이 25~30°C 培養에서는 培養 3日 後에, 35°C 培養에서는 培養 2日 後에 最高活性을 나타냈다.

다. 耐酸性 glucoamylase 의 生産

上記한 acid protease 生産의 경우와 같이 培養하여 耐酸性 glucoamylase 活性(pH 3.0에서의 活性)을 檢

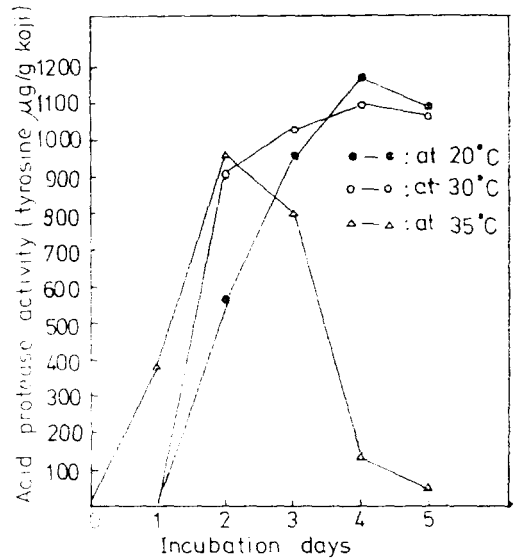


Fig. 2. Acid protease (at pH 2.5) produced by the selected strain

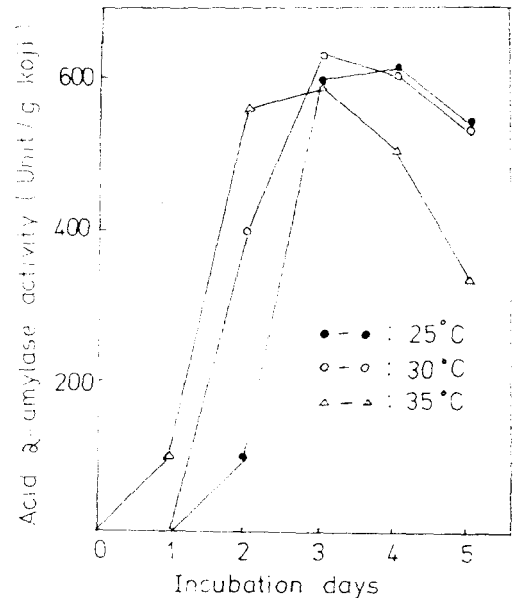


Fig. 3. Acid α-amylase (at pH 3.0) produced by the selected strain

討한 結果는 Fig. 4와 같다. Fig. 4에서 알 수 있는 바와 같이 25°C 培養에서는 培養 4日 後, 30°C 培養에서는 3日 後, 35°C 培養에서는 2日 後에 거의 最高活性에 達하였다.

以上の 結果를 綜合해 보면 選定菌을 밀기울培地에 培養하여 protease, α-amylase 및 glucoamylase를 生産하는 경우 實際上的 問題를 考慮하여 30°C에서 約 2日間 培養하는 것이 適當하다고 생각된다. α-Amylase

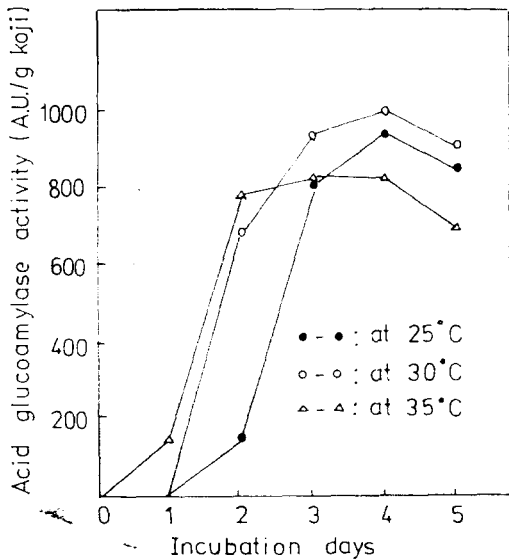


Fig. 4. Acid glucoamylase(at pH 3.0) produced by the selected strain

및 glucoamylase의 活性을 強化하기 위해서는 培養時間을 多少 延長할 必要가 있다고 판단된다.

한편 밀기울培地에서의 *Aspergillus*屬 菌의 最適培養時間에 關한 研究를 살펴보면 *Asp. oryzae*의 72時間培養⁽²¹⁾, *Asp. sojae*의 50時間培養⁽²²⁾, *Asp. flavus*의 60時間培養⁽²³⁾, *Asp. niger* 등의 30~40時間培養⁽⁵⁾ 등의 報告가 있으며 이들 報告와 本實驗의 結果로 미루어 보아 菌株에 따라 最適 培養時間에 약간의 差異가 있음을 알 수 있다.

라. 酵素生産에 미치는 炭素源과 窒素源의 添加影響
(1) 옥수수 籾粉의 添加 影響

밀기울培地에 炭素源으로서 옥수수 籾粉을 1~10% 添加하고 30°C에서 2日間 培養하여 耐酸性 protease 및 glucoamylase 生成에 미치는 影響을 檢討한 結果, Fig. 5와 같이 2% 添加時 耐酸性 protease와 glucoamylase의 生成이 約 20%씩 增加되었다. Ichishima 등⁽⁶⁾은 *Asp. saitoi*의 紫外線 照射 變異株의 밀기울 培養에 있어서 可溶性 籾粉, 글루코오스, 슈크로오스 등은 protease 生産에 별 效果가 없었으나 락토오스는 1% 添加時 약간의 效果를 보였다고 하였으며, 李等⁽²¹⁾은 *Asp. oryzae*의 protease 生産에 있어서 슈크로오스 添加가 效果의이었다고 報告한 바 있다. 이와 같이 炭素源의 添加影響이 다른 것은 菌株의 差異에 基因하는 것으로 생각된다.

(2) 황산암모늄의 添加影響

밀기울培地에 窒素源으로서 (NH₄)₂SO₄를 0.1~0.5%까지 添加하고 30°C에서 2日間 培養하여 耐酸性 pr-

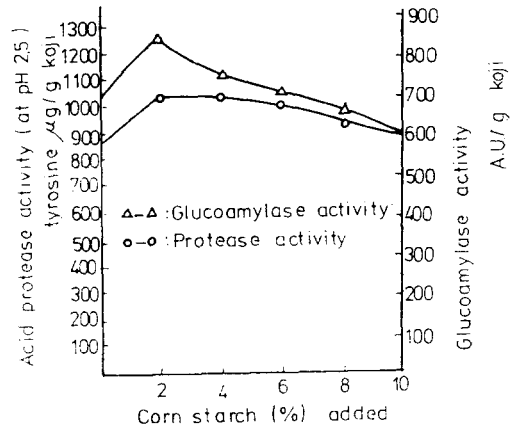


Fig. 5. Effect of corn starch on the enzyme formation in wheat bran culture (at 30°C, for two days)

otease 및 glucoamylase 生成에 미치는 影響을 檢討한 結果는 Fig. 6과 같다. (NH₄)₂SO₄를 0.3% 添加時 protease의 生成은 約 30% glucoamylase의 生成은 約 15% 增加되었다. Ichishima 등⁽⁶⁾은 *Asp. saitoi*와 *Asp. usamii*의 acid protease 生産에 있어서 NH₄Cl의 添加가 特히 效果的이었다고 報告한 바 있는 데 本實驗의 結果에서 보는 바와 같이 耐酸性 glucoamylase의 경우보다 耐酸性 protease의 경우 암모늄鹽의 添加 結果가 컸으며, 이 結果는 Ichishima의 報告와 一致한다.

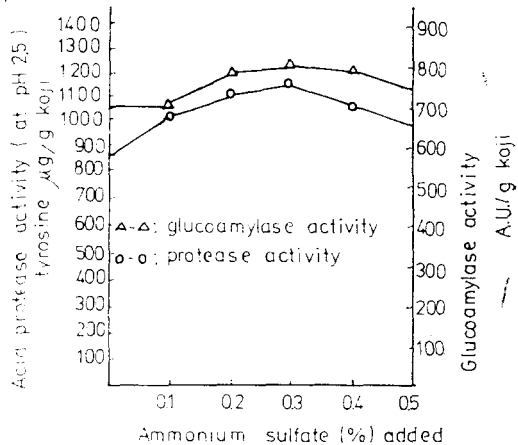


Fig. 6. Effect of ammonium sulfate on the enzyme formation in wheat bran culture (at 30°C, for two days)

要 約

消化酵素劑의 生産에 利用하기 爲하여 空氣中에서

耐酸性 protease 및 amylase 生産能이 강한 菌株를 分離, 選定하고 選定菌의 菌學的 性質을 檢討하였다. 아울러 生成酵素의 耐酸性(反應 pH와 酵素活性과의 關係)과 酵素 生産條件을 檢討하였다.

1. 選定菌株는 耐酸性 protease 및 amylase 를 強하게 生産하는 菌株로서 Raper 와 Fennel 의 manual 에 依하여 *Aspergillus niger* 로 同定되었다.

2. 選定菌의 protease 는 pH 2.0에서 最大活性을 나타냈으며, α -amylase 는 pH 4~5, glucoamylase 는 pH 3~5에서 最大活性을 나타냈다.

3. 밀기울 培地에 培養時 protease(pH 2.5에서의 활성)生産의 最適條件은 30°C, 2~3日間이며, α -amylase 및 glucoamylase(pH3.0 에서의 活性)의 경우는 30°C, 3日間이었다.

4. 밀기울培地에 옥수수전분을 2% 添加한 경우 耐酸性 protease 및 glucoamylase 의 生成이 約 20%씩 增加되었다.

5. 밀기울培地에 황산암모늄 0.3%를 添加한 경우 耐酸性 protease 및 glucoamylase 의 生成이 增加되었으며, 特히 耐酸性 protease 의 生成에 效果的이었다.

謝 意

本 研究는 1980年度 保健獎學會의 學術研究費 支援에 依하여 이루어진 것으로서 同 獎學會에 깊은 謝意를 表하는 바입니다.

文 獻

1. Amano, T., Isojima, S. and Fujio, H.: *Med. J.*

Osaka Univ., 4, 255 (1953)

2. 吉田文彦: 日農化, 28, 66 (1954)

3. 蔭山公雄, 杉田 脩: 日農工, 33, 109 (1955)

4. 松島欽一: 日農化, 32, 215 (1958); 33, 116, 120 (1959)

5. 坂本政義, 守隨稀雪: 日農工, 35, 98, 137 (1957)

6. Ichishima, E. and Yoshida, F.: *Agr. Biol. Chem.*, 26, 554 (1962)

7. 柳 哲夫, 安井 一, 澤田二郎, 田中一郎: 日農化, 35, 1258, 1264 (1961)

8. 金想烈: 韓國產業微生物學會誌, 1, 98 (1973)

9. 鄭萬在: 韓國產業微生物學會誌, 5, 153 (1977)

10. 北原覺雄, 久留島通俊: 日農工, 27, 213 (1949)

11. 岡崎 浩: 日農化, 24, 88 (1950)

12. Minoda, Y. and Yamada, K.: *Agr. Biol. Chem.*, 27, 806 (1963)

13. 山田寧洋: 日農化, 37, 637 (1963)

14. 久留島通俊, 佐藤淳司, 北原覺雄: 日農化, 48, 379 (1974)

15. 朴允仲, 李錫健: 韓國農化誌, 9, 91 (1968)

16. Raper, K. B. and Fennel, D. I.: *The Genus Aspergillus*, R. E. Kieger Co. (1973)

17. 東京大學農藝化學教室: 實驗農藝化學, 上卷, p. 281 (1976)

18. 片倉健二, 畑中千歲: 日農協, 54, 442 (1959)

18. 山田正一: 釀造分析法, p. 112 (1956)

20. 小卷利章: 日澱粉工學誌, 7, 3 (1959)

21. 李美子, 鄭萬在: 韓國產業微生物學會誌, 8, 77 (1980)

22. 梁漢喆: 韓國農化學誌, 2, 67 (1966)

23. 嶋田 協, 松島欽一: 日農化, 42, 325 (1967)