

耐酸性 아밀라제를 생산하는 *Aspergillus niger* 균주의 분리

조 명 환

건국대학교 공과대학 미생물공학과

Isolation of *Aspergillus niger* K-25 Producing Acid-stable α -amylase

Myung-Hwan Cho

Department of Microbiological Engineering, College of Engineering, Kon Kuk University
Seoul 133-701, Korea

ABSTRACT: One strain of *Aspergillus niger* K-25 producing an acid-stable α -amylase was isolated from the soil. The optimum culture conditions were investigated. The production of the acid-stable α -amylase was enhanced when the strain was incubated in a medium containing soluble starch 3.5%, peptone 2%, KH_2PO_4 0.5%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25% and FeCl_3 1.0% at pH 3 for 7 days. However, higher activity of acid-stable α -amylase was demonstrated on wheat bran culture. Amylase production was doubled when *A. niger* K-25 was incubated on the wheat bran supplemented with fumaric acid buffer (pH 3).

KEYWORDS: *Aspergillus niger*, Acid-stable amylase.

사상균은 2가지 형태의 amylase를 생산한다. 즉 전분의 옥도반응이 일어나는 α -amylase와 전분의 비환원 말단으로부터 포도당의 단위로 분해하고 전분의 80%가 분해될 때까지 전분의 옥도반응이 일어나지 않는 β -amylase인 glucoamylase를 생산한다(Cochrane, 1958; Guilbault, 1976). 이러한 효소는 *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Bacillus* species 중에서 생산되어 공업에 이용되고 있으나 산성 pH나 높은 염도에서 활성이 크게 약해진다(Minoda 등, 1968). 또한 엿기름, 타액, 취장, 식물종자에서 생산된 아밀라제도 일반적으로 낮은 pH에서 불안정하다는 것이 보고되었다(Bergmeyer, 1974). 따라서 소화효소와 같은 산성조건에서나, 아밀라제를 생산하는 효소공업에서 내산성 아밀라제의 필요성이 강조되어 왔다.

몇몇 흑색 *Aspergillus*에 내산성인 아밀라제가 존재하는 것이 보고되었으며, 또한 흑색 *Aspergillus*에 속하는 *A. usami*, *A. awamori*, *A. inuii*, *A. niger*, *A. cinamomeus* 등이 산성 조건하에서 Taka amylase A와 거의 같은 안정

성을 갖는 아밀라제를 생산한다는 사실이 널리 알려져 있다(Minoda, 1968). 더욱이 Arai 등(1968)이 *A. niger*가 생산하는 산에 안정한 아밀라제의 특성을 밝혔으며, Minoda 등(1968)은 같은 균주로부터 내산성, 비내산성 α -아밀라제를 분리하여 성질을 비교 조사했다.

내산성인 균의 분리 및 특성에 대한 연구는 산업적으로도 매우 큰 비중을 가지기 때문에 그리고 새로운 신규물질 창출의 목적으로 이 연구를 시작하였고, 본 연구에서는 내산성 α -amylase를 강력히 생산하는 *Aspergillus niger* K-25를 토양으로부터 분리하였기에 보고하는 바이다.

材料 및 方法

사용 균주

1) 균의 분리

내산성 α -amylase를 강력히 생산하는 균주를 분리하기 위해서 경기도 광주, 수원, 강화 등지에서 채취한 토양 80점을 시료로 사용하였으며, 토

양을 각각 살균 증류수로 적당히 현탁하여 30분간 정지한 후 현탁액 1.0 ml 씩을 도포하였다.

2) 분리 배지

분리용 배지로 다음과 같은 배지를 사용하였다. Nutrient agar, Starch agar (Soluble starch 0.5g, Nutrient agar 100g, 증류수 1000 ml, pH 3.5)와 Starch peptone agar (수용성 전분 0.03g, peptone 0.005g, KH_2PO_4 0.001g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.005g, 증류수 1000 ml, pH 3.5)와 Sporulation 배지 (NH_4NO_3 0.45g, KH_2PO_4 0.072g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.06g, Beer 60 ml, CaCO_3 0.5g, agar 30g, 증류수 1000 ml) 등이다.

3) 배양 방법

Nutrient agar 를 페트리 접시에 10 ml 씩 분주 시킨 후, Starch agar 5 ml 을 가하여 이차 분주 고화시킨 다음 토양에서 채취한 시료를 10배까지 희석하여 0.1 ml 을 접종하여 30°C에서 3-4일 배양하였다.

4) 유효균주 선정 방법

상기 Nutrient agar 배지에 배양한 후 Iodine 용액 (iodine 1.0g, potassium iodide 2.0g, 증류수 300 ml) 5 ml 을 플레이트에 첨가 옥도반응 및 적갈색 띠의 크기를 비교하여 분해력이 우수한 균주를 1차 선정 (112주) 하였으며, 선정된 균주를 아래와 같은 Starch peptone 배지에 접종하여 30°C에서 6일간 배양한 후 그 유출액에 대하여 내산성 액화력을 측정하여 활성이 높은 9개 균주를 2차로 선정하였으며, 그것들에 대하여 평판 배양법을 여러번 반복 후 Starch peptone 배지에서 다시 배양한 후 내산성 액화력을 측정하여 활성이 가장 강한 균주 1주를 선정하였다.

배양 방법

내산성 α -amylase 를 생성하기 위한 배지로는 밀기울을 탄소원으로 한 고체배지와 합성배지를 사용한 액체배지를 사용하였다. 고체배지로 사용한 밀기울은 시판 사료용 (수분 18%, 조단백질 5.5%)을 이용하였으며, 액체배지로서 질소원과 탄소원 그리고 그외 미량 원소가 서로 다른 각각의 배지 30 ml 을 100 ml 삼각 플라스크에 넣어 최종적으로 분리한 균을 한 백금이 접종하여 진탕 배양한 후 배양액을 동양여지 No. 2로 여과하고 그 여

과액을 효소액으로 사용하였으며 배지조성이 서로 다른 배지들의 각 내산성 액화력을 각각 조사하였다.

밀기울 고체배지의 경우에는 밀기울 50g 을 증류수 50 ml 와 혼합하여 1000 ml 삼각 플라스크에 넣어 120°C에서 30분 고압 멸균 후 5일간 배양하여 배양물에 대하여 증류수를 가하여 마쇄한 후 8°C에서 24시간 추출한 후 여과하여 그 여과액을 효소액으로 하였으며 액체배양을 하였을 경우에는 배양액을 여과하여 그 여과액을 효소액으로 하여 각각 내산성 액화력을 조사하였다.

효소력 측정방법

효소역가 및 당화 효소력을 측정하였으며 내산성 효소역가는 α -amylase 가 완전히 불활성되는 조건인 pH 2.5, 37°C에서 30분 열처리하여 측정하였다.

1) 효소역가 측정

Starch-iodine 정색반응으로 amylase 활성을 측정하는 Iometric method 와 Wohlgemuth 법 (Bergmeyer, 1974)으로 액화력을 측정하여 각각 Unit (W/V)로 표시했다.

2) 당화 효소력

Somogy-Nelson 법으로 측정했다 (Somogy, 1952).

원충액의 준비

모든 원충액은 Colowick 와 Kaplan (1955) 방법을 사용했다.

結果 및 考察

균주동정 및 배양

1차 선정에서 121주 (대부분이 흑색 콜로니를 형성하는 균이었으며 황벽색 콜로니 균주는 10균주)의 균을 얻었으며, 2차 선정에 의하여 비교적 내산성 amylase 생산이 강한 균 9주 (전부 흑색 콜로니를 형성)를 얻었다. 이를 대상으로 하여 효소 활성을 측정된 결과 내산성 amylase 생산력이 강한 흑색균주 1주를 최종적으로 선정하여 동정하였다. 분리 선정된 균은 "The Genus *Aspergillus*" (Raper 등, 1965)에 수록된 표준방법에 의하여 검사한 결과 *Aspergillus niger* 와 유사하였으며, 또한 생리적 관찰을 한 결과 "Physiology Fungi"

Table I. Physiological characteristics of *A. niger* and isolated strain K-25.

Tests	<i>A. niger</i>	K-25	Tests	<i>A. niger</i>	K-25
Glucose	+	+	Sulfate	+	+
Ammonium chloride	+	+	Persulfate	+	+
Citric acid	+	+	Bisulfite	+	+
Chitin	+	+	Dithionate	-	-
Molybdenum	+	+	Hyposulfite	+	+
Cyanide	+	+	Thiosulfate	+	+
Tyrosine	+	+	Sulfide	+	+
Calcium cyanide	+	+	Disulfide	+	+
Chlorate	-	-	Cysteine	+	+
Phosphite	-	-	Cystine	+	+
B ₁₂	-	-	Methionine	+	+
Ferric iron	-	-	Thiourea	-	-

(+) = growth, (-) = no growth

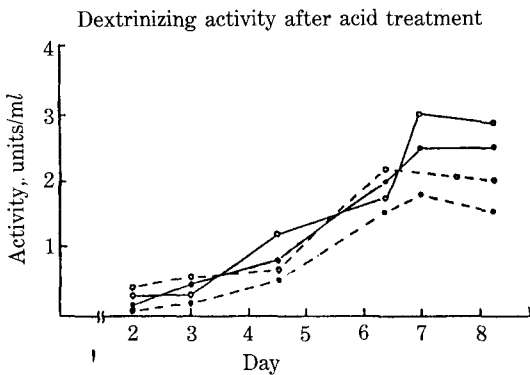


Fig. 1. Acid-stable amylase formation of *A. niger* K-25 in several media.

(○, medium A, ●, medium B, ■, medium C, □, medium D).

(Cochrane, 1958)에 서술된 *Asp. niger*의 특성과 일치하였으며 조사한 결과는 Table 1과 같다. 이 균은 *Aspergillus niger* K-25라 명명하였다.

배지의 조성을 상이하게 하여 100여종의 합성배지를 검사해 본 결과는 Table 1의 배지들이 비교적 효소생산이 좋았으며, Fig. 1과 같이 A 배지에서 7일간 배양시 가장 높은 내산성 액화력을 보였다. 배지를 달리하여 25°C, 30°C, 35°C에서 각각 아밀라제 활성을 조사해본 결과 30°C에서 배양된

Table II. Composition of media employed for *A. niger* K-25.

Additions%	Medium					
	A	B	C	D	E	F
Soluble starch	3.5	-	-	3.0	-	5.0
Glucose	-	2.0	1.5	-	1.5	-
Mannitol	-	-	1.5	-	-	-
Galactose	-	-	-	-	1.5	-
Corn Steep Liquor	-	2.0	-	-	-	-
Peptone	2.0	-	2.0	5.0	2.0	2.0
NH ₄ NO ₃	-	-	-	0.1	-	0.1
KH ₂ PO ₄	0.5	0.5	0.5	0.1	0.5	0.1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.25	0.25	0.25	0.5	0.25	0.05
FeCl ₃	1.0	-	1.0	-	1.0	0.5
CaCO ₃	-	0.5	-	0.5	-	-
pH	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0

내산성 아밀라제가 가장 활성이 높았다. 배지 A에 대하여 최초 pH를 각각 달리하여 얻은 아밀라제 활성을 조사한 결과 Fig. 2에서 보는 바와 같이 산처리 후에는 최초 pH를 3으로 했을 때 유도기에는 활성이 낮았지만 정상기에는 내산성 아밀라제의 활성이 가장 높았다.

밀기울 고체배양의 경우에도 배양온도 25°C, 30°C, 그리고 35°C에서 각각 배양해 본 결과 35°C에서 배양했을 때 전분 액화력이 가장 높았으며, Fig. 3에서 보는 바와 같이 액체 진탕배양으로 배양했을 때 보다 훨씬 높은 효소활성을 나타내었다.

밀기울을 탄소원으로 하여 배양시 산을 첨가했을 때의 내산성 아밀라제 활성을 조사하기 위하여 0.05 N HCl 용액과 fumaric acid, citrate 및 maleic acid 완충용액과 그 염을 써서 pH 2, 3, 4 완충용액으로 만든 후 밀기울과 1:1(W/V)로 혼합 배양하여 내산성 액화력을 조사하였다(Fig. 4).

HCl 첨가시는 무첨가한 것에 비하여 별차이는 없었으나, citric acid의 첨가 경우에는 일반적으로 산을 첨가하지 않은 것과 유사한 경향을 보였으며, maleic acid의 경우는 현저하게 내산성 활성

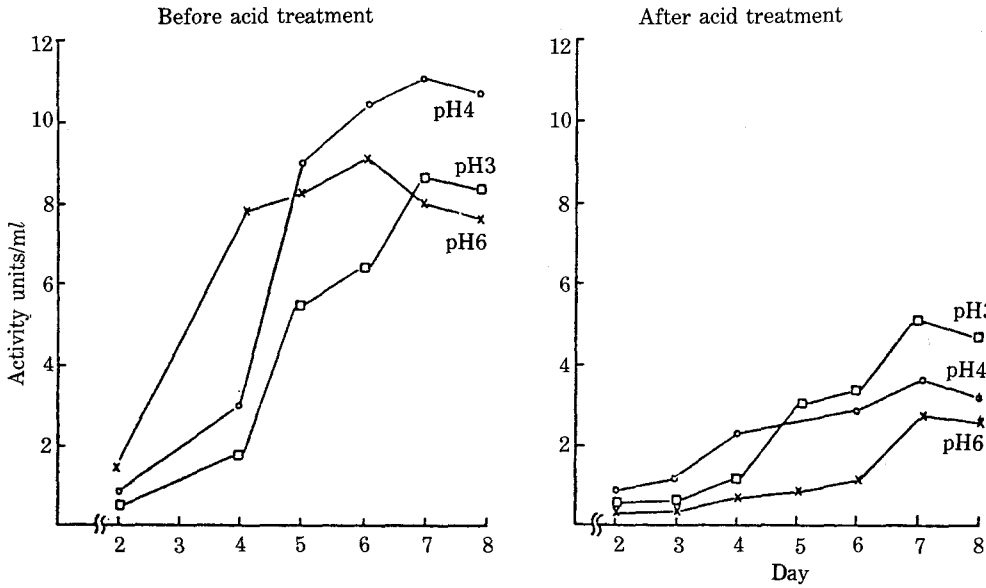


Fig. 2. Amylase production by *A. niger* at several pHs in the medium A. The pH refer to initial pH.

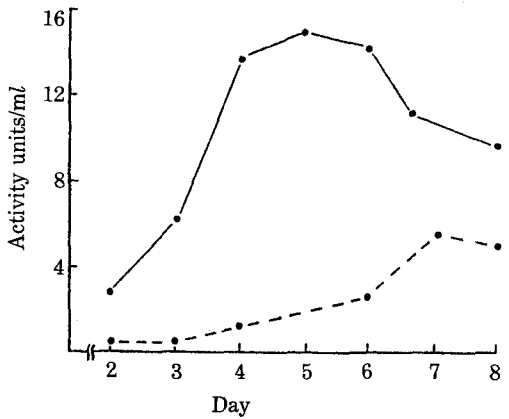


Fig. 3. Dextrinizing activity of acid stable α -amylase after acid treatment (pH 2.5). (—●—, wheat bran, - - ● - -, medium A).

력이 감소하였으며, fumaric acid의 결과는 특히 pH 3의 용액을 첨가했을 경우에는 첨가하지 않은 경우보다 내산성 활성력이 약 2배 정도 높게 생산되었으며 산용액들을 첨가했을 때 비교적 활성이 높았다.

밀기울을 fumaric acid을 혼합하여 배양한 경우가 내산성 아밀라제의 활성과 생산이 높게 나타났다 것은 *A. niger* K-25 균주가 내산성 아밀라제를 생산하는 것을 입증해 주고 있다. 특히

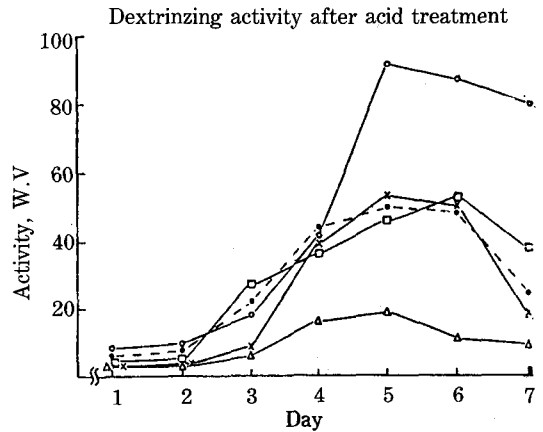


Fig. 4. Effects of addition of several acids on production of acid-stable amylase on wheat bran culture.

(—●—, no addition; -○-, fumaric acid, pH; -×-, HCl, 0.05 N; -□-, citric acid, pH 4; -△-, maleic acid, pH 3).

30°C의 저온에서도 발효 효과있는 것은 산업적으로도 매우 유용한 균주라고 할 수 있다.

摘 要

내산성 α -아밀라제를 강력히 생산하는 *Aspergillus niger* K-25 균주를 토양으로부터 분리하였

다. 내산성 아밀라제 효소를 생산하기 위한 균주의 배양조건을 조사하였다. 합성배지 A(soluble starch 3.5%, peptone 2%, KH_2PO_4 0.5%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25%, FeCl_3 1.0%, pH 6)에서 배양시 아밀라제 생산이 높았다. 밀기울에 fumaric acid 원충용액(pH 3)을 1:1(W/V)로 첨가하여 배양했을 때 내산성 α -아밀라제의 생산력은 원충액 HCl, citric acid 과 밀기울만 넣은 배지보다 약 2배가 높았고, 배지 A 보다 현저하게 높았다.

參考文獻

- Arai, M., T. Koyano, H. Ozawa, Y. Minoda and K. Yamada. (1968): Acid-stable α -amylase of black *Aspergilli*. Part IV. Some physicochemical properties. *Agr. Biol. Chem.* **32**(4): 507-513.
- Bergmeyer, H.U. (1974): Methods of Enzymatic Analysis. Academic Press, Inc. Vol.2, pp.884-915.
- Cochrane, V.W. (1958): Physiology of fungi. John Wiley & Sons, Inc., pp.300-317.
- Colowick, S.R. and N.O. Kaplan. (1955): Methods in Enzymology. Vol. 1. pp.141-143.
- Guilbault, G.G. (1976): Handbook of Enzymatic Methods of Analysis. Marcel Dekker, Inc., pp.72-76.
- Minoda, Y., T. Koyano, M. Arai, K. Yamada. (1968): Acid-stable α -amylase of black *Aspergilli*. Part II. Some general properties. *Agr. Biol. Chem.* **32**(1): 104-109.
- Minoda, Y., M. Arai, Y. Torigoe and K. Yamada. (1968): Acid-stable α -amylase of black *Aspergilli*. Part III. Acid-stable α -amylase and acid-unstable α -amylase from the same mold amylase preparation. *Agr. Biol. Chem.* **32**(1): 110-113.
- Raper, K.B. and D.I. Fennell. (1965): The Genus *Aspergillus*. The Williams & Wilkins Co. pp. 293-318.
- Somogyi, M. (1952): Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.* **195**: 19-23.

Accepted for Publication 6 September 1989