

## Aspergillus niger가 생성하는 생전분 분해효소의 정제와 특성

정만재\*

충북대학교 식품공학과

**Purification and Characteristics of Raw Starch Hydrolyzing Enzyme from *Aspergillus niger*.** Man-Jae Chung. Department of Food Science and Technology, Chungbuk University, Cheongju 361-763, Korea - *Aspergillus niger* was selected as a strain producing the potent raw starch hydrolyzing enzyme. These experiments were conducted to investigate the conditions of the glucoamylase production, the purification of the enzyme, some characteristics of the purified enzyme and hydrolysis rate on various raw starches such as corn, rice, potato, glutinous rice, sweet potato, wheat and barley. The optimum cultural temperature and time for the enzyme production on wheat bran medium were 30°C and 96hrs, respectively. The respective addition of yeast extract and nutrient broth on wheat bran medium increased slightly the enzyme production. The enzyme was purified by ammonium sulfate fractionation and DEAE-cellulose column chromatography. The specific activity of the purified enzyme was 30.7 u/mg·protein and the yield of enzyme activity was 25.8%. The purified enzyme showed a single band on polyacrylamide disc gel electrophoresis and its molecular weight was estimated to be 56,000 by SDS-polyacrylamide disc gel electrophoresis. The isoelectric point for the purified enzyme was pH3.7. The optimum temperature and pH were 65°C and pH 4.0, respectively. The purified enzyme was stable in the pH range of pH 3.0~9.5 and below 45°C, and its thermal stability was slightly increased by the addition of Ca<sup>2+</sup>. The purified enzyme was activated by Co<sup>2+</sup>, Sr<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>. Raw rice starch, raw corn starch, raw glutinous rice starch, raw sweet potato starch, raw wheat starch and raw barley starch showed more than 90% hydrolysis rate in 48hrs incubation. Even raw potato starch, most difficult to be hydrolyzed, showed 80% hydrolysis rate. The purified enzyme was identified as glucoamylase.

호화전분은 효소에 의하여 용이하게 분해되지만 생전분은 분해되기 어렵다. 따라서 전처리 과정으로 생전분을 호화시킨 다음 효소를 처리하여 당화시키고 있다. 전분을 호화시키기 위해서는 막대한 양의 Energy가 필요하므로 전분을 호화시키지 않고 당화시킬 수 있다면 전분가공 공정이나 Energy 절약면에서 상당한 이익을 가져올 수 있을 것이다.

생전분의 분해에 관여하는 효소로는 *Aspergillus awamori* glucoamylase I(1), *Aspergillus* sp. K-27 glucoamylase(2, 3), *Aspergillus niger* IFO 8541 glucoamylase(4), *Chalara paradoxa* glucoamylase(5), *Bacillus circurans* F-2 amylase(6, 7), *Aspergillus awamori* var. *kawachi* glucoamylase(8), *Aspergillus usarii* IAM 2185 glucoamylase(9), *Rhizopus oryzae* glucoamylase(10), *Rhizopus delemar* IAM 6254 glucoamylase(11), *Streptococcus bovis* amylase(12), *Aspergillus cinnamomeus* amylase(13), black *Aspergillus* glucoamylase II(14), *Bacillus* sp. raw starch hydrolyzing enzyme(15) 등이 보고되었으나 아직까지 광범

위하게 연구되어 있지 않은 실정이다.

본 연구는 곡류 생전분 뿐만 아니라 potato starch의 분해력이 강한 효소를 생산하는 *Aspergillus niger*를 우수균주로 선발하고, 생전분 분해효소의 생산조건을 검토하였으며, 아울러 효소를 정제하여 정제효소의 특성 및 각종 생전분에 대한 분해율을 조사하고 그 결과를 보고하는 바이다.

### 재료 및 방법

#### 기본배지

Wheat bran 5 g과 Tap water 5 ml를 100 ml 삼각플라스크에 넣어 잘 혼합하고 15Lbs에서 30분간 가압살균하였다.

#### Aspergillus속 균주의 분리

**분리재료** 곡자, 토양, 메주

**분리방법** 분리 배지로는 potato glucose agar를 사용하였고 상법에 따라 가압살균한 후 petri dish에 분주하여 평판을 만들고 각종 균분리재료를 멸균수에 현탁시킨 액을 평판에 도말하고 30°C에서 3일간 배양하여 *Aspergillus*속 균주를 분리하였다.

#### 우수균주의 선발

\*Corresponding author

Tel. 82-431-61-2566, Fax. 82-431-271-4412

Key words: Glucoamylase, Hydrolysis rate, Fractionation, Specific activity, Isoelectric point, Raw starch

자연계에서 분리한 *Aspergillus*속 균주와 충북대학교 식품공학과에 보관 중인 *Aspergillus*속 균주를 기본배지에 1백금이씩 접종하여 30°C에서 3일간 배양하고 강력한 생전분 분해효소 생산균주를 선발하였다.

### 조효소액의 조제

밀기울 배양물에 50 ml의 증류수를 가하여 waring blender(viritis형)로 2분간 마쇄하고 원심분리(10,000 rpm, 20분간)하여 상정액을 조효소액으로 사용하였다.

### 효소 활성의 측정

2% Raw corn starch suspension 0.1 ml에 효소액 0.1 ml를 넣고 45°C에서 1시간 진탕반응(120 oscill/min)시킨 후 생성된 환원당을 DNS법(16)에 의하여 정량하였다. 효소단위는 1시간에 1  $\mu$ mole의 glucose를 유리시키는 효소량을 1 unit로 하였다.

### 각종 질소원의 첨가시험

각종 무기질소원은 기본배지에 각각 0.2%씩, 각종 유기질소원은 기본배지에 각각 1%씩 첨가하였다.

### Protein의 정량

Bovine serum albumin을 표준단백질로 하여 Lowry 등 (17)의 방법에 따라 정량하였다.

### Polyacrylamide disc gel electrophoresis

Davis(18)의 방법에 따라 실시하였으며 7.5% gel을 사용하였고 gel당 3 mA의 전류로 영동을 실시한 다음 Commassie Brilliant Blue R-250으로 염색하고 7% acetic acid로 탈색하였다.

### SDS-polyacrylamide disc gel electrophoresis

Weber와 Osborn(19)의 방법에 따라 실시하였으며 10% gel을 사용하였고 gel당 8 mA의 전류로 실온에서 4시간 영동하였다. 영동 후 Commassie Brilliant Blue R-250으로 염색한 후 7% acetic acid로 탈색하였다. 표준단백질로는 lysozyme(MW 14,300),  $\beta$ -lactoglobulin (MW 18,400), trypsinogen(MW 24,000), pepsin(MW 34,700), egg albumin(MW 45,000), bovine albumin (MW 66,000)을 사용하였다.

### Gel electrofocusing

Wrigley(20)의 방법에 따라 실시하였으며 pH3.0-10.0의 ampholine을 사용하고 350 V에서 4시간 통전하였다. 이때 두개의 gel을 병행하여 실시하였고 그 중 한개는 5% TCA로 세척하여 ampholine을 완전히 제거하고 amidoblack 10B로 염색한 후 탈색하였다. 나머지 한개

는 5 mm간격으로 절단하고 각 slice를 2 ml의 증류수에 넣어 하룻밤 침출하여 pH를 측정하였다.

### Paper chromatography

Whatman No.1 filter paper에 반응액을 10  $\mu$ l씩 spot 하고 60°C에서 상승법에 의하여 2회 전개시켰다. 전개제로는 65% n-propyl alcohol을 사용하였으며 전개 후 glucoamylase를 처리하고 40°C에서 1시간 반응시켜 alkaline silver nitrate dip method(21)에 의하여 발색시켰다.

### 효소의 정제

조효소액을 ammonium sulfate fractionation, DEAE-cellulose column chromatography에 의하여 정제하였다.

**Ammonium sulfate fractionation** 조효소액 500 ml에 ammonium sulfate를 90%포화도가 되도록 서서히 첨가하여 4°C에서 3시간 방치한 후 10,000 rpm으로 10분간 원심분리하였다. 이 때 생긴 침전물을 소량의 50 mM Tris buffer (pH 8.0)에 녹인 다음 동일 완충액으로 투석하였다.

**First DEAE-cellulose column chromatography** 투석액을 50 mM Tris buffer (pH 8.0)로 평형화시킨 column(2.0 cm  $\times$  40 cm)에 주입하고 동일 완충액 300 ml로 세척한 다음 reservoir에는 0.5 M NaCl을 함유하는 50 mM Tris buffer (pH 8.0) 300 ml와 mixing chamber에는 50 mM Tris buffer(pH 8.0) 300 ml를 넣고 용출시켰다. 이 때 용출속도는 시간당 30 ml였고 10 ml씩 분획하였다.

**Second DEAE-cellulose column chromatography** First DEAE-cellulose column chromatography의 활성 peak 부분을 모아 50 mM Tris buffer(pH 8.5)로 투석하였다. 이것을 50 mM Tris buffer (pH 8.5)로 평형화시킨 column에 주입하고 column chromatography를 실시하였다.

Reservoir에는 50 mM Tris buffer(pH 8.5, 0.5M-NaCl함유) 300 ml와 mixing chamber에는 50 mM Tris buffer(pH 8.5) 300 ml를 넣고 용출시켰다. 이 때 용출속도는 시간당 30 ml였고 10 ml씩 분획하였다.

### 생전분의 분해율 측정

각종 생전분 20 mg에 효소액 0.5 ml(10 u), 0.05 M acetate buffer(pH 4.0)1.48 ml, toluene 0.02 ml를 넣고 45°C에서 진탕 반응시켰다. (120 oscill/min). 반응액을 0.1 ml씩 취하고 H<sub>2</sub>O를 0.9 ml씩 가한 후 원심분리(12,000 rpm, 10 min)하여 상정액과 침전물을 분리하고 이 침전물에 1N-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4.9 ml를 넣어 비등수욕중에서 5분간 끓여 가수분해시킨 다음 phenol sulfuric acid법(21)으로

당을 정량하고 각종 생전분의 분해율을 구하였다.

생전분의 분해율(%)

$$= \left(1 - \frac{x\text{시간 반응시켰을 때의 잔존 생전분량}(mg)}{\text{미반응액의 생전분량}(mg)}\right) \times 100$$

### 결과 및 고찰

#### 우수균주의 선발

자연계에서 분리한 *Aspergillus*속 균주 432주와 본연구실에 보관중인 52주를 기본배지에 배양하여 효소를 추출하고 이들 효소의 raw corn starch에 대한 activity를 측정한 결과 토양에서 분리, 동정하여 보관중인 *Aspergillus niger*(Strain No.25)가 생산하는 조효소액의 활성이 77.8 u/ml로 공시균주중 생전분 분해능이 가장 강하였으므로 이 균주를 우수균주로 선발하였다.

#### 효소의 생산

**배양온도** 기본배지를 사용하여 20-40°C에서 96시간 배양한 결과는 Fig.1과 같이 최적배양온도는 30°C이었다.

**배양시간** 기본배지를 사용하여 30°C에서 24~144시간 배양한 결과는 Fig.1과 같이 최적배양시간은 96시간이었다.

**각종 질소원의 첨가시험** 기본배지에 각종 질소원을 첨가하고 배양한 결과는 Table 1과 같이 yeast extract

와 nutrient broth의 첨가는 각각 5.8%, 4.6%의 효소생산을 증가시켰으나 다른 성분의 첨가효과는 거의 없었다

#### 효소의 정제

Ammonium sulfate fractionation에서 투석액 48 ml를 얻었으며 이 액에 대하여 First DEAE-cellulose column chromatography를 실시한 결과 fraction No.71-83에서 활성 peak가 나타났다. 활성 peak부분을 모아서 Second DEAE-cellulose column chromatography를 실시한 결과는 Fig. 2와 같이 fraction No.57-87에서 활성 peak가 나타났으며 이 부분을 모아 50 mM acetate buffer(pH 4.0)로 투석하여 정제효소로 사용하였다.

Table 1. Effect of nitrogen sources on the enzyme production

Nitrogen sources	Activity (u/ml)
NH <sub>4</sub> Cl	72.4
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	70.6
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	77.8
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	76.0
(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CO	74.2
Casein	74.2
albumin	70.6
yeast extract	82.3
peptone	77.8
nutrient broth	81.4
control	77.8

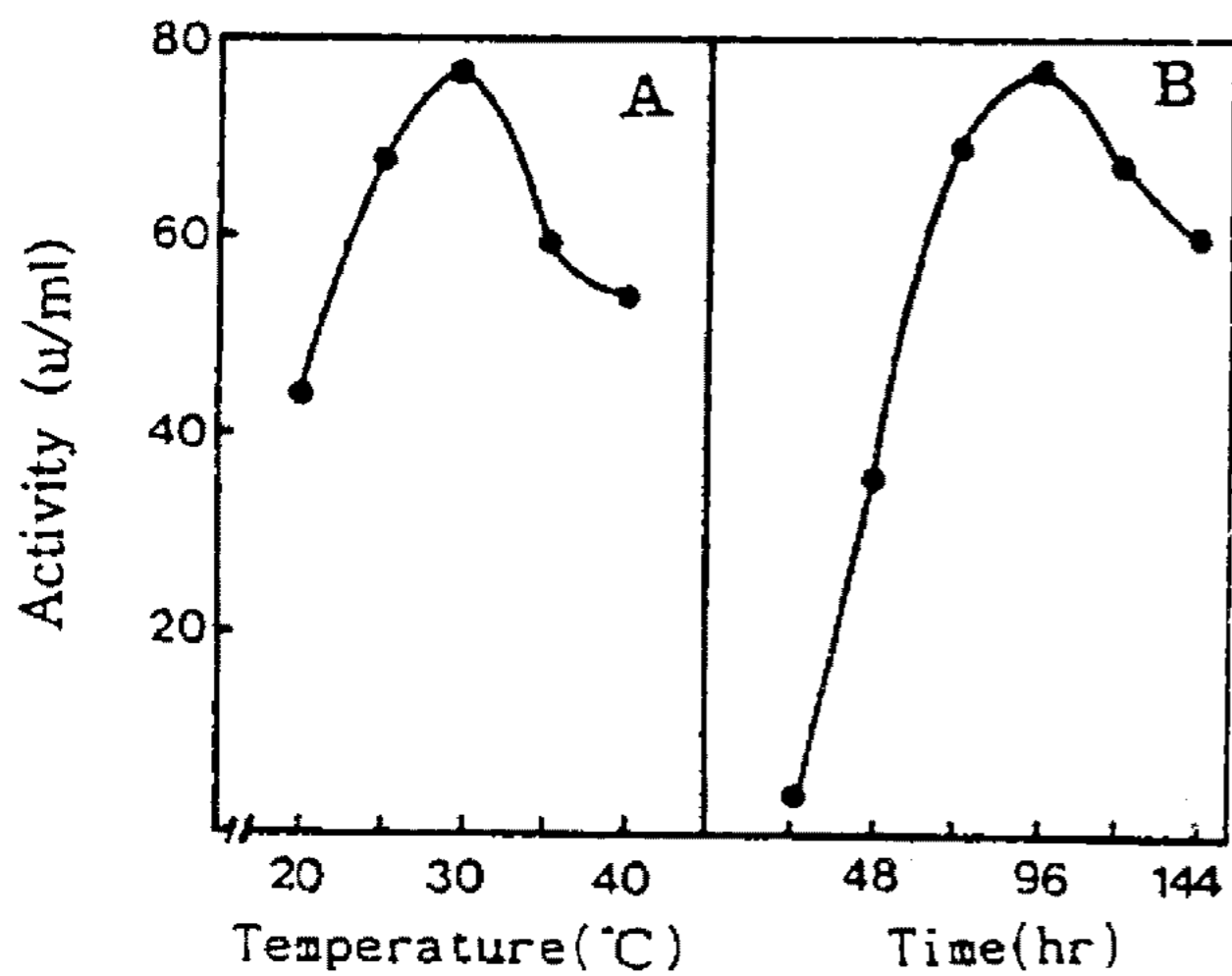


Fig. 1. Effect of cultural temperature(A) and time(B) on the enzyme production.

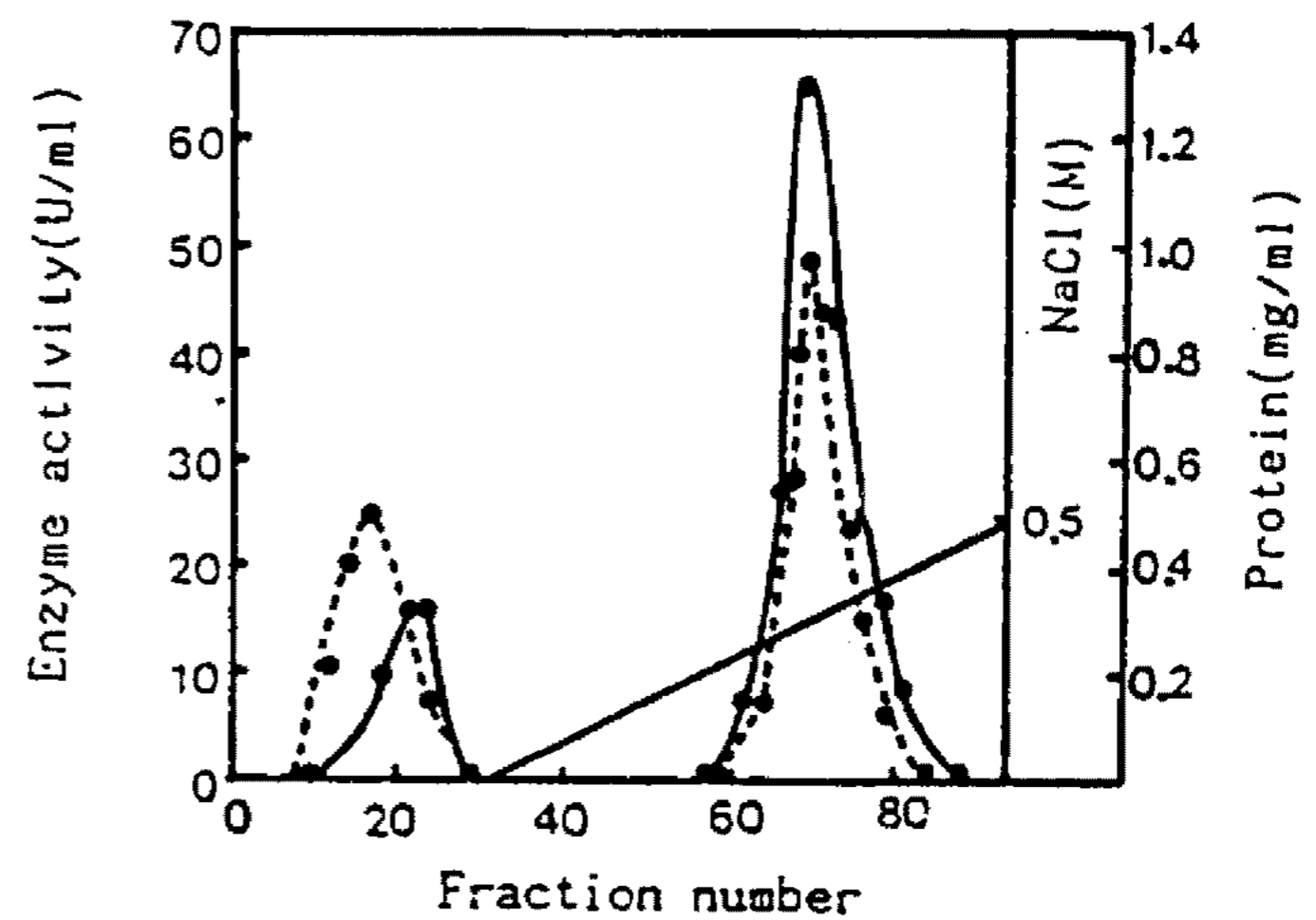


Fig. 2. Second column chromatography on DEAE-cellulose. ●—● : activity, ●---● : protein.

Table 2. Purification procedure of the enzyme

Procedure	Total activity (u)	Total protein (mg)	Specific activity (u/mg protein)	Yield (%)
Crude enzyme	13,200	1,950	6.8	100.0
Ammonium sulfate fractionation	5,731	480	11.9	43.4
First DEAE-cellulose column chromatography	4,170	158	26.4	31.6
Second DEAE-cellulose column chromatography	3,409	111	30.7	25.8

이상의 정제과정을 요약하여 보면 Table 2와 같으며 정제효소의 activity는 30.7 u/mg.protein, yield는 25.8%이었다.

**정제 효소의 특성**

**정제효소의 polyacrylamide disc gel electrophoresis**  
polyacrylamide disc gel을 사용하여 전기영동을 실시한 결과는 Fig. 3과 같이 single band를 나타내었다.

**분자량** SDS-polyacrylamide disc gel electrophoresis에 의하여 추정된 분자량은 Fig. 4와 같이 56,000으로 추정되었다.

*Chalara paradoxa* glucoamylase(5)는 82,000, *Rhizopus oryzae* glucoamylase(10)와 *Aspergillus usami* gluco-

mylase(9)는 67,000, *Aspergillus niger* IFO 8541 glucoamylase(4)는 76,000으로 균주에 따라 차이를 나타내었다.

**등전점** Wrigley(19)의 방법에 따라 등전점을 측정된 결과는 Fig. 5와 같이 pH 3.7이었다.

*Chalara paradoxa* glucoamylase(5)는 3.20-3.52, *Aspergillus niger* IFO 8541 glucoamylase(4)는 pH 3.4, *Aspergillus usami* IAM 2185 glucoamylase(9)는 pH 3.7, *Rhizopus delemar* IAM 6254 glucoamylase(11)는 pH 5.4로 균주에 따라 약간의 차이를 나타내고 있다.

**최적온도와 열안정성** 20-75℃에서 효소의 활성을 측정한 결과는 Fig. 6과 같이 최적 온도는 65℃이었다.

효소액을 소정온도로 20분간 처리한 다음 잔존활성을 측정된 결과는 Fig. 6과 같이 45℃에서는 100%의 잔존활성을 나타내었으나 65℃에서 20분간 처리하였을 때

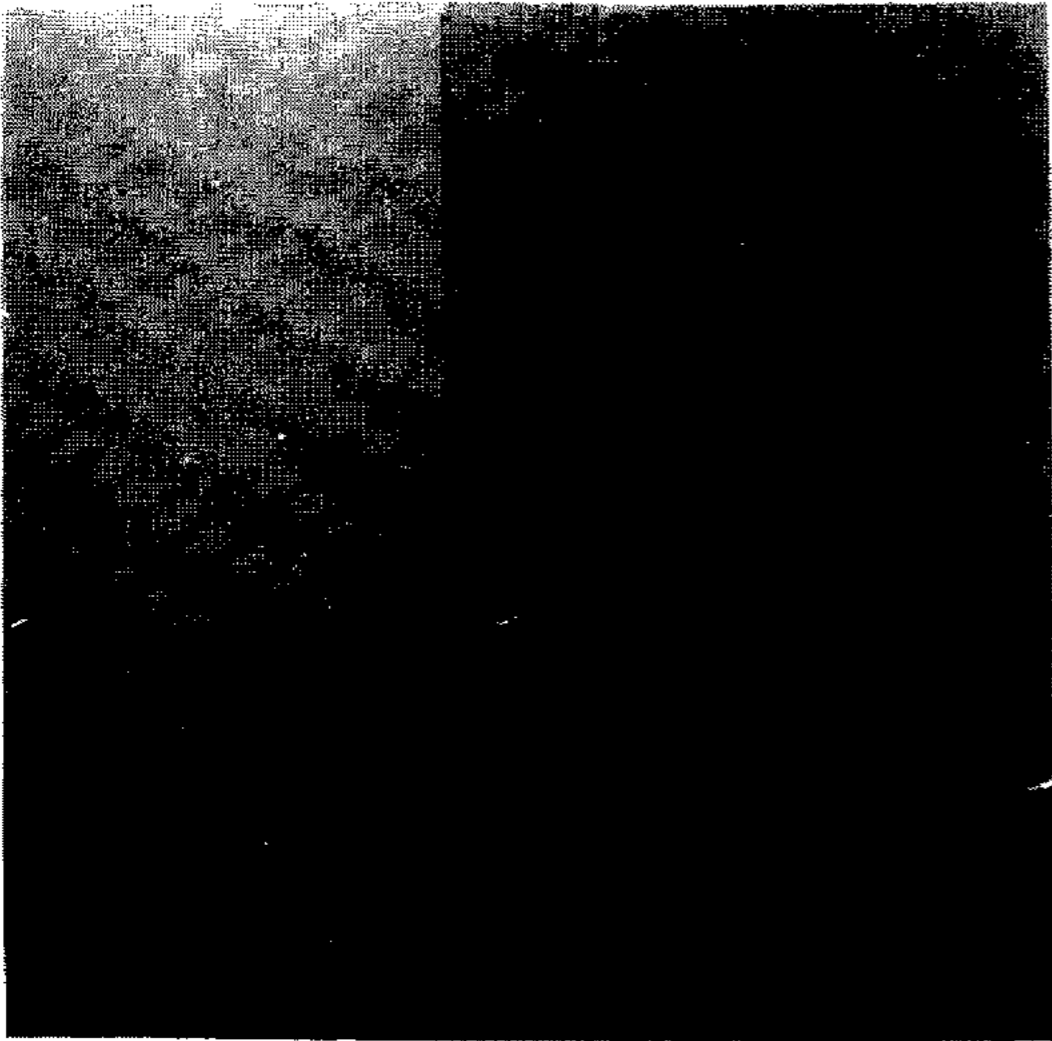


Fig. 3. Polyacrylamide disc gel electrophoresis of the purified enzyme.

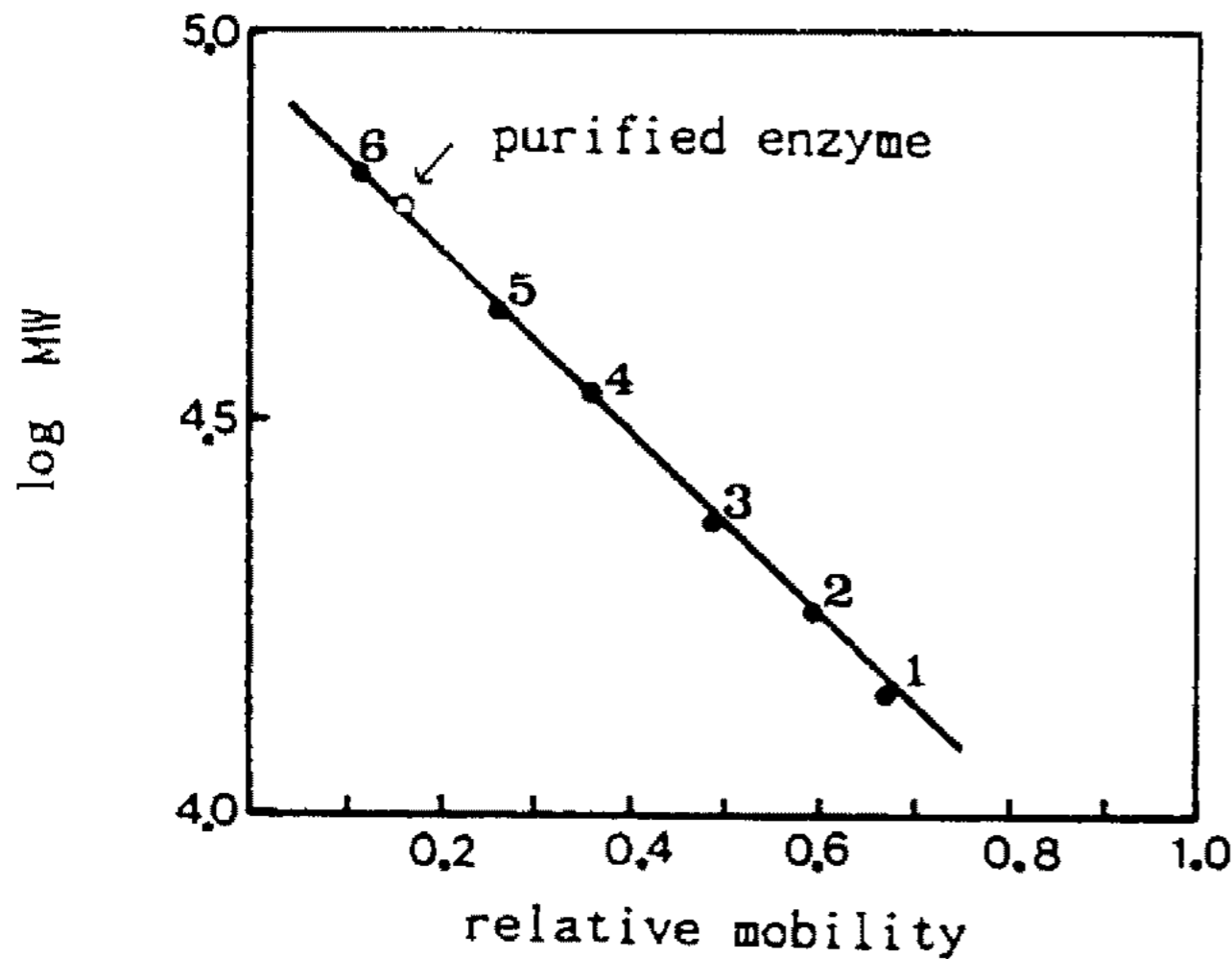


Fig. 4. Determination of molecular weight by SDS-polyacrylamide disc gel electrophoresis of the purified enzyme.

1. Lysozyme (MW 14,300), 2. β-lactoglobulin (MW 18,400), 3. Trypsinogen (MW 24,000), 4. Pepsin (MW 34,700), 5. Egg albumin (MW 45,000), 6. Bovine albumin (MW 66,000).

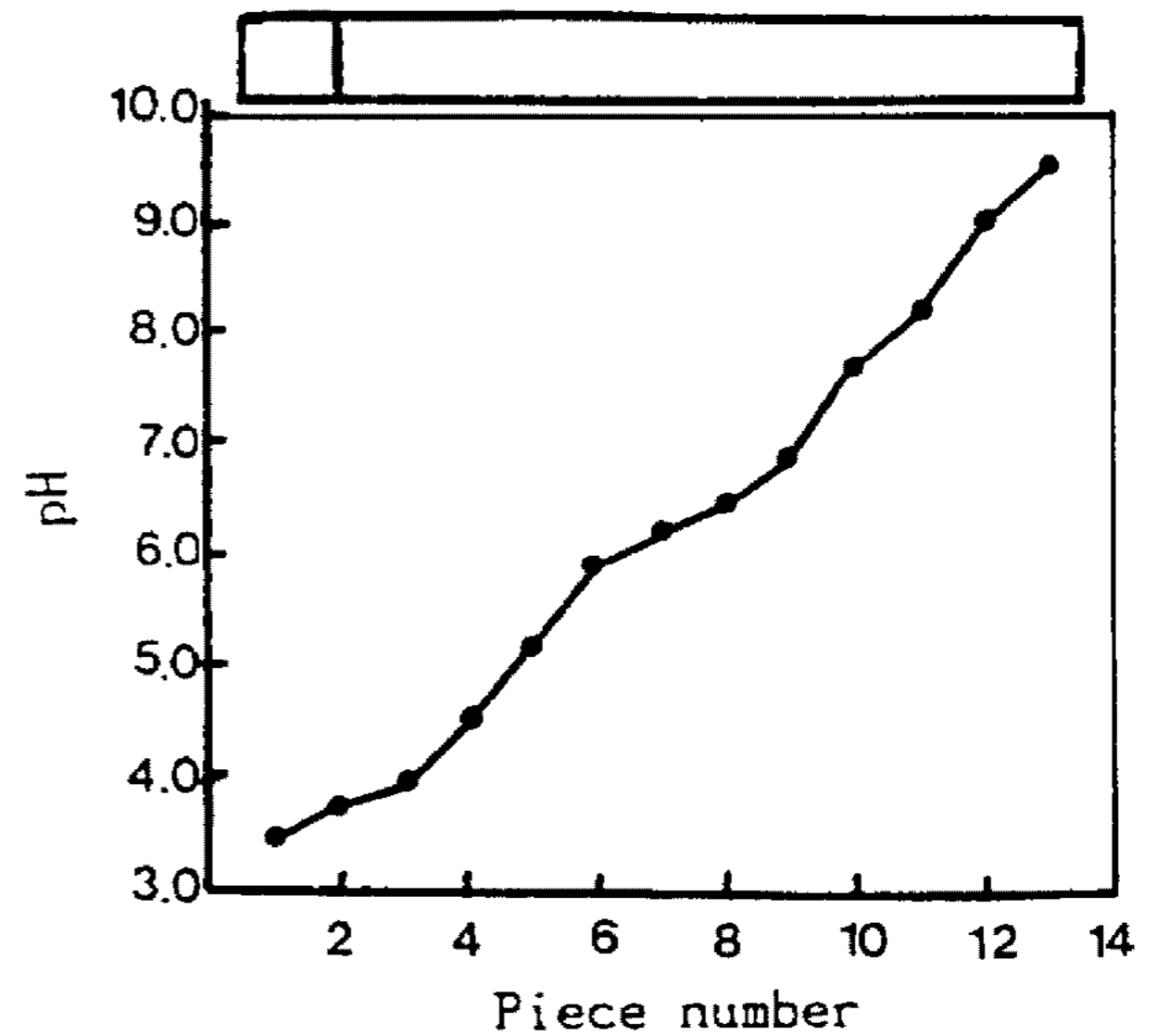


Fig. 5. Gel electrofocusing of the purified enzyme.

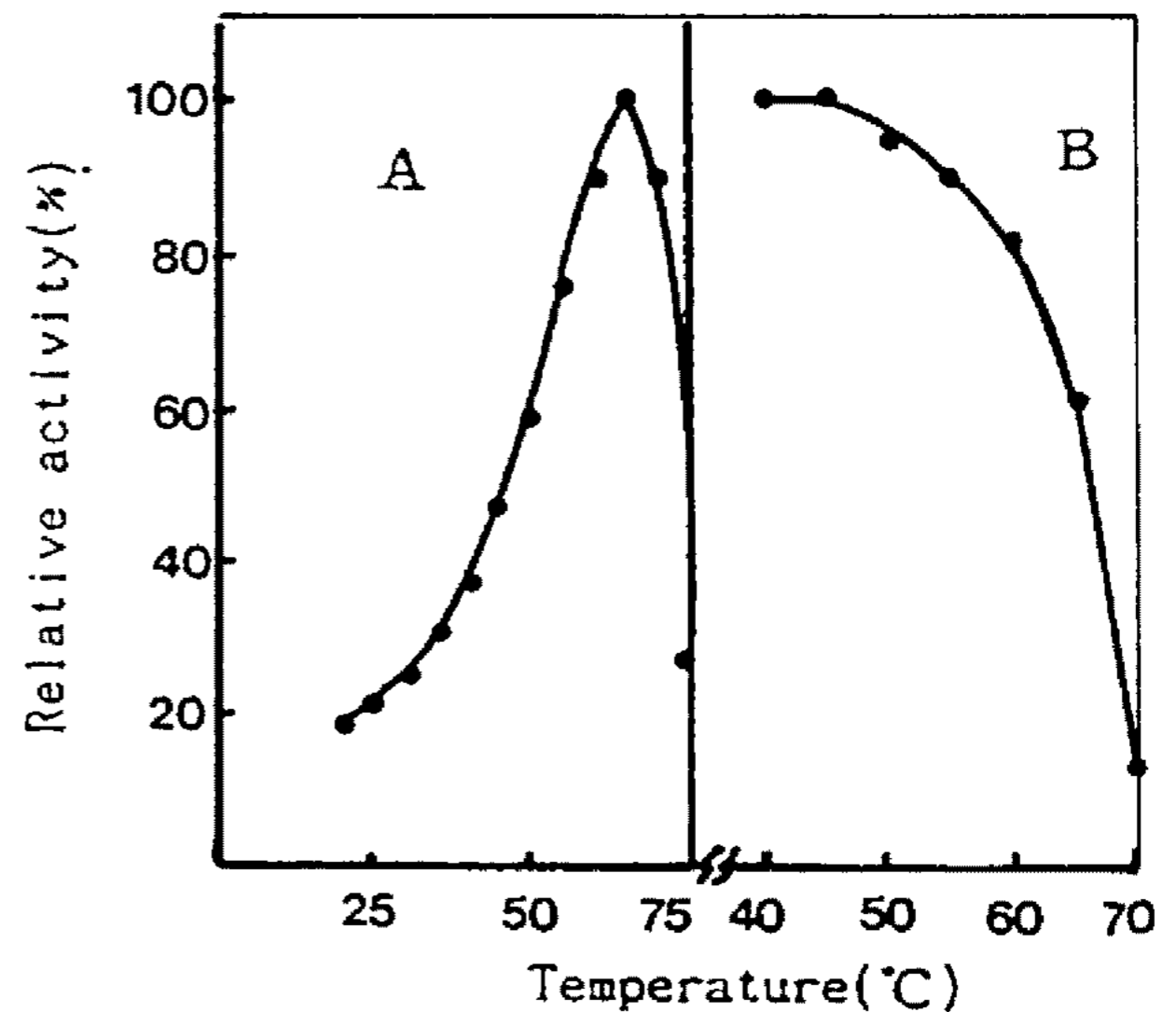


Fig. 6. Effect of temperature on the activity(A) and thermal stability(B) of the purified enzyme.

64%의 잔존활 성을 나타내었다.

다른 생전분 분해효소의 최적온도와 비교하면 *Chalara paradoxa* glucoamylase(5)는 45°C, *Aspergillus usami* IAM 2185 glucoamylase(9)와 *Aspergillus niger* IFO 8541 glucoamylase(4)는 60°C, *Rhizopus oryzae* glucoamylase(10)는 50°C내외, *Rhizopus delemar* IAM 6254 glucoamylase(11)는 55°C로 균주에 따라 차이를 나타내었다.

*Rhizopus delemar* IAM 6254 glucoamylase(11)는 60°C에서 5분간 처리하였을 때 6%의 잔존활성을, *Aspergillus* sp. K-27 glucoamylase (2, 3)는 60°C에서 1시간 처리로 90%의 잔존활성을 나타내었으나 65°C에서 1시간 처리로는 20%의 잔존활성을 나타내었고, *Aspergillus niger* IFO 8541 glucoamylase(4)는 60°C에서 30분간 처리시 약 65%의 잔존활성을, *Rhizopus oryzae* glucoamylase(10)는 70°C에서 1시간 처리하였을 때 잔존활성이 약 70%로 균주에 따라 상당한 차이를 나타내고 있다.

**열안정성에 미치는 Ca<sup>2+</sup>의 영향** 효소액에 동량의 20 mM CaCl<sub>2</sub>를 넣고 70°C에서 5-20분간 처리한 후 잔존활성을 측정하는 결과는 Fig. 7과 같이 70°C에서 20분간 처리하였을 때 Ca<sup>2+</sup>첨가구는 24%, 무첨가구는 13%의 잔존활성을 나타내었다.

*Chalara paradoxa* glucoamylase(5), *Aspergillus usami* IAM 2185 glucoamylase(9)는 CaCl<sub>2</sub>의 첨가로 내열성이 증가되었는데 본 효소도 이들 효소와 마찬가지로 Ca<sup>2+</sup>에 의하여 내열성이 약간 증가되었다.

**최적 pH와 pH 안정성** pH 1.0-2.5는 acetate buffer, pH 3.0-8.0은 McIlvaine buffer, pH 8.5-10.5는 Atkins와 Pantin buffer, pH 11.0-12.0은 Ringer buffer를 사용하여 최적 pH를 측정하는 결과는 Fig. 8과 같이 최적 pH는 4.0이었다.

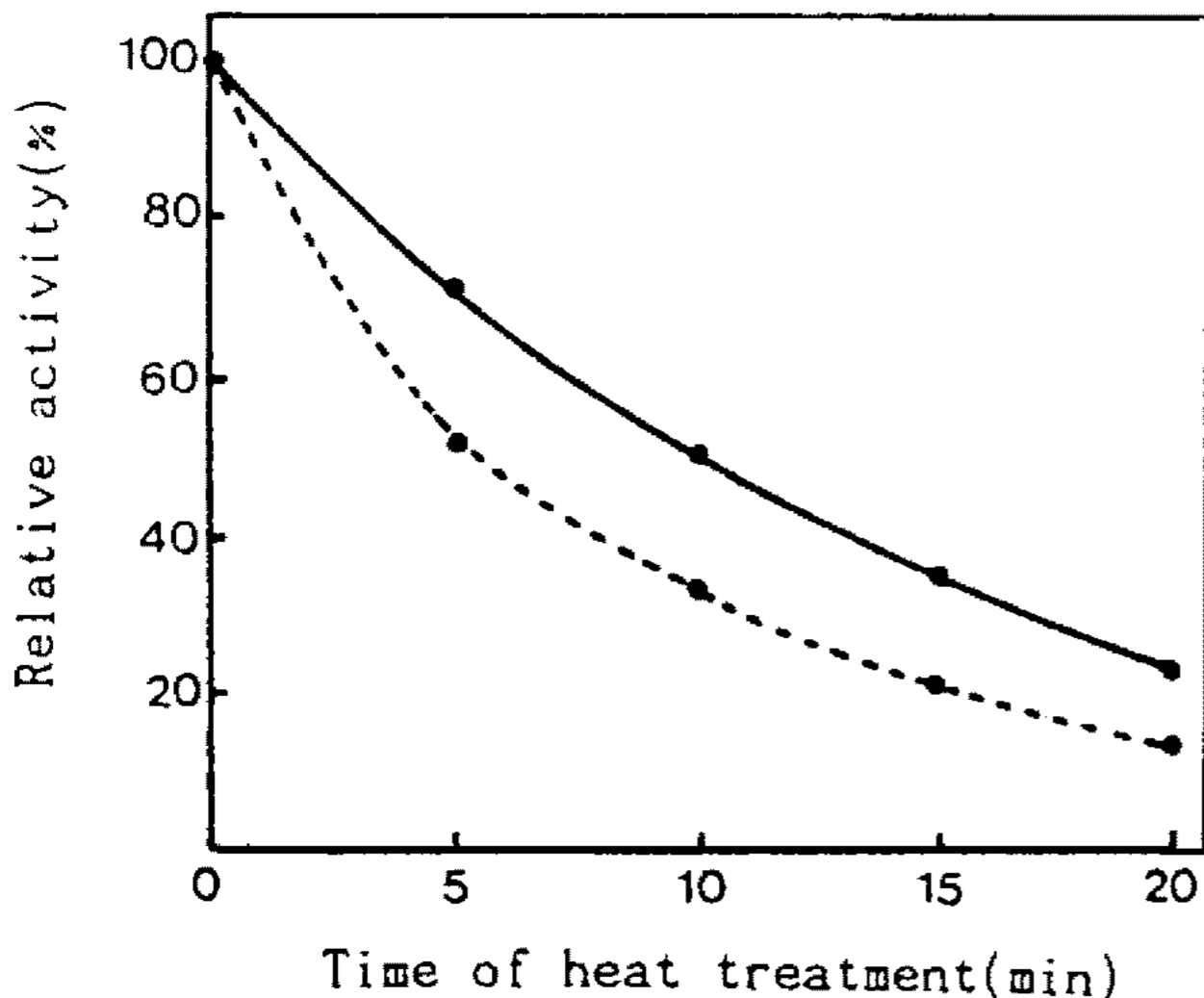


Fig. 7. Effect of Ca<sup>2+</sup> on the thermal stability of the purified enzyme.  
●—● : with CaCl<sub>2</sub>, ●---● : without CaCl<sub>2</sub>.

pH 안정성은 효소액의 pH를 소정 pH로 조절하고 4°C에서 24시간 방치한 후 pH를 4.0으로 조절하고 잔존활성을 측정하는 결과는 Fig.8과 같이 pH 3.0-9.5의 범위에서 안정하였다.

*Aspergillus niger* IFO 8541 glucoamylase(4)의 최적 pH는 3.5, *Rhizopus oryzae* glucoamylase(10)는 pH 4.0-5.0, *Aspergillus* sp. K-27 glucoamylase(2, 3)는 pH 4.2-5.9, *Aspergillus usami* IAM 2185 glucoamylase(9)는 pH 3.0, *Rhizopus delemar* IAM 6254 glucoamylase(11)와 *Chalara paradoxa* glucoamylase(5)는 pH 5.0으로 균주에 따라 약간의 차이를 나타내었다.

pH 안정성을 보면 *Chalara paradoxa* glucoamylase(5)는 pH 4.5-7.5, *Aspergillus* sp. K-27 glucoamylase(2, 3)는 pH 4.0-7.1, *Rhizopus delemar* IAM 6254 glucoamylase(11)는 pH 3.0-5.0, *Aspergillus niger* IFO

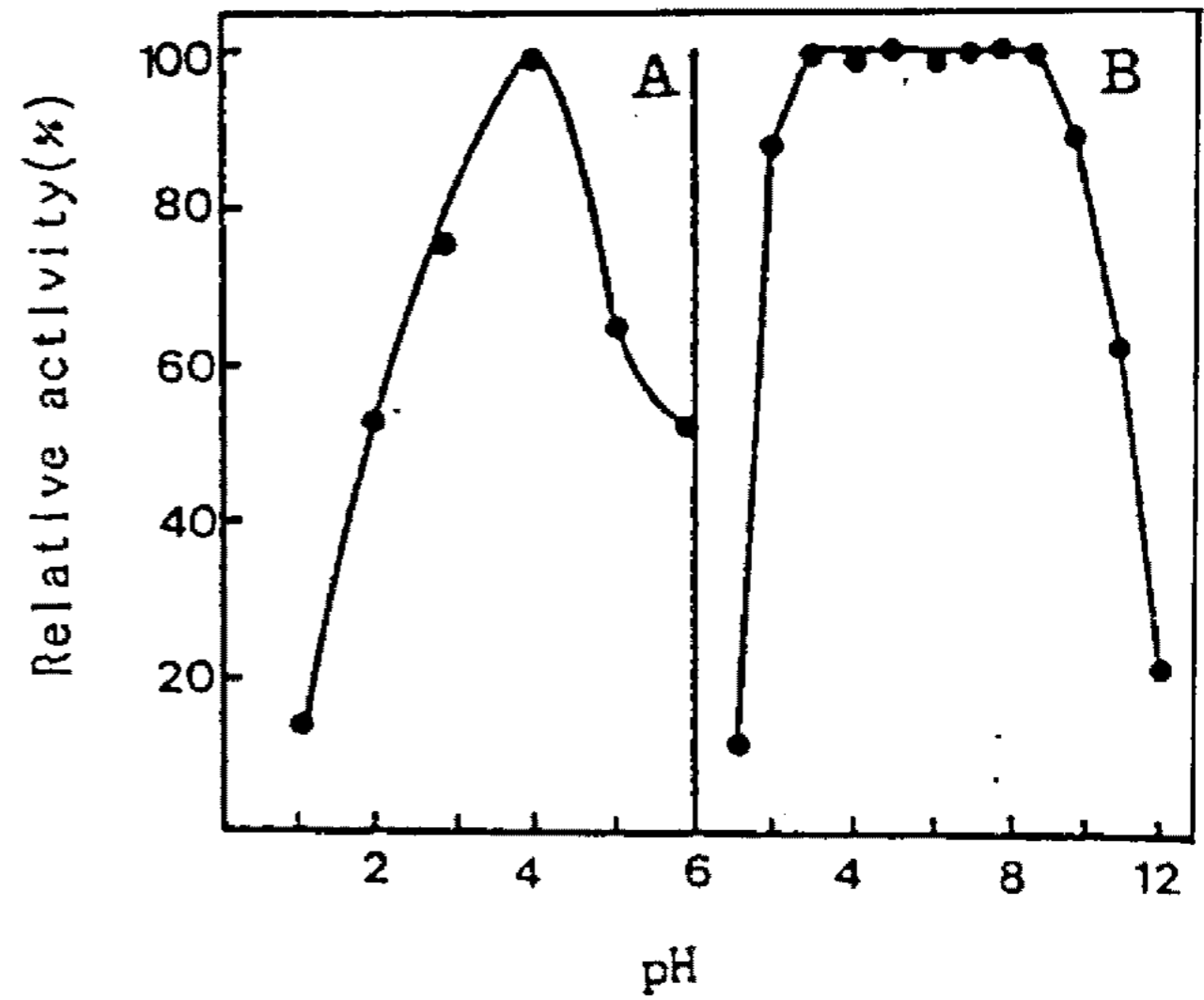
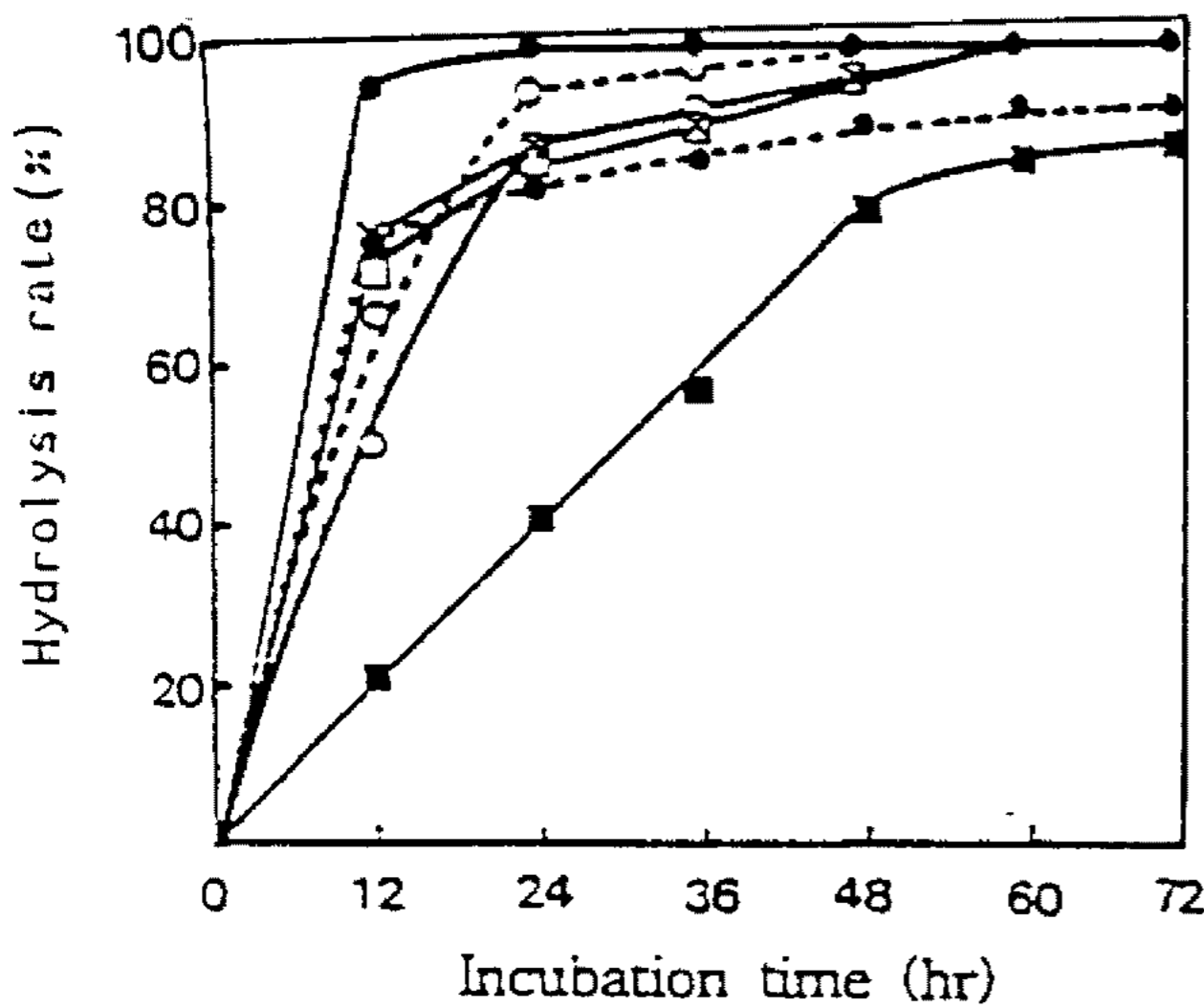


Fig. 8. Optimal pH(A) and pH stability(B) of the purified enzyme.

Table 3. Effect of metal ions on the purified enzyme activity

Metal ions	Relative activity (%)
AgNO <sub>3</sub>	100.0
HgCl <sub>2</sub>	93.8
PbCl <sub>2</sub>	100.0
CdCl <sub>2</sub>	106.3
CaCl <sub>2</sub>	101.0
CoCl <sub>2</sub>	134.4
SrCl <sub>2</sub>	143.8
MnCl <sub>2</sub>	131.3
BaCl <sub>2</sub>	93.6
Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	103.1
FeSO <sub>4</sub>	134.1
ZnSO <sub>4</sub>	103.1
MgSO <sub>4</sub>	96.9
CuSO <sub>4</sub>	118.8
Control	100.0



**Fig. 9. Hydrolysis rate of various raw starches.**  
 ○---○ : Corn starch, ●—● : Rice starch, ■—■ : Potato starch,  
 □—□ : Glutinous rice starch, ○—○ : Sweet potato starch,  
 ●---● : Wheat starch, ×—× : Barley starch.

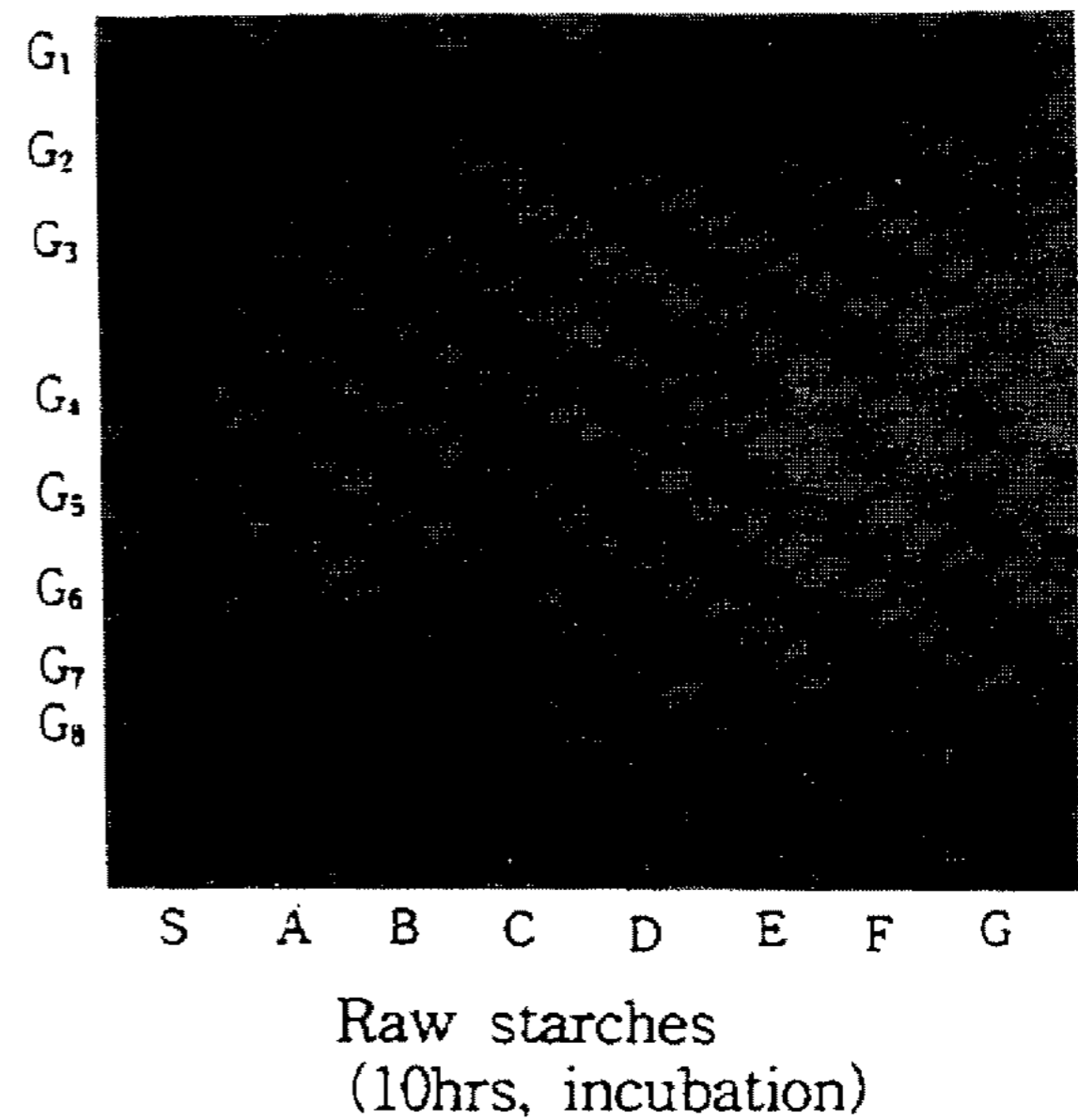
8541 glucoamylase(4)는 pH 3.0-8.5에서 안정하다는 보고와 비교할 때 본 효소는 다소 넓은 범위에서 안정성을 나타내었다.

**금속이온의 영향** 효소액에 각종 금속이온의 용액을 넣어 그 농도를 1 mM로 조절하고 30°C에서 30분간 처리한 다음 잔존활성을 측정된 결과는 Table 3과 같이  $Co^{2+}$ ,  $Sr^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ 는 본 효소에 대하여 activator로써 작용하였다.

*Rhizopus oryzae* glucoamylase(10)와 *Chalara paradoxa* glucoamylase(5)는  $Hg^{2+}$ 에 의하여 크게 저해되었는데 본 효소는  $Hg^{2+}$ 에 의하여 약간 저해되었다. 이와 같은 현상은 균주에 따른 효소의 특성에 기인되는 것으로 사료된다.

**각종 생전분에 대한 분해율** raw corn starch, raw rice starch, raw potato starch, raw glutinous rice starch, raw sweet potato starch, raw wheat starch, raw barley starch에 대하여 분해율을 측정된 결과는 Fig. 9와 같이 raw rice starch의 분해율은 24시간에 100%, raw corn starch는 94%의 분해율을 나타내었고, 전분의 종류에 따라 약간의 차이는 있으나 공시생전분 중 raw potato starch를 제외하고는 48시간 반응시켰을 때 90% 이상의 높은 분해율을 나타내었으며, 생전분 중 가장 분해되기 어려운 raw potato starch도 80%의 분해율을 나타내었다. 전분의 종류에 따라 분해율이 다른 것은 전분의 특성에 기인되는 것으로 사료된다.

다른 생전분 분해효소의 분해율을 보면 생전분의 종류에 따라 분해율이 다르며 raw corn starch에 대한 분해율은 *Aspergillus* sp. K-27 glucoamylase(2, 3)는 24시간에 70%, *Aspergillus niger* IAM 2086 glucoamylase(22)는 52%, *Aspergillus awamori* var. *kawachi* glucoamyl-



**Fig. 10. Paper chromatograms of hydrolysis products on the various raw starches.**  
 S: Standard maltooligosaccharides, A: Corn starch, B: Rice starch, C: Potato starch, D: Glutinous rice starch, E: Sweet potato starch, F: Wheat starch, G: Barley starch.

ase(8)는 54%, *Aspergillus niger* IFO 8541 glucoamylase(4)는 75%, *Rhizopus delemar* IAM 6254 glucoamylase(11)는 95%, *Bacillus circulans* F-2 amylase(6, 7)는 80%, *Rhizopus oryzae* glucoamylase(10)는 33%, *Chalara paradoxa* glucoamylase(5)는 73%, *Aspergillus usarii* IAM 2185 glucoamylase(9)는 90%의 분해율을 나타내었다.

특히 본 효소는 생전분 중 가장 분해되기 어려운 것으로 알려진 raw potato starch를 잘 분해시켰다. 다른 생전분 분해효소의 raw potato starch에 대한 분해율을 보면 48시간 반응시켰을 때 *Aspergillus niger* IFO 8541 glucoamylase(4)는 17%, *Rhizopus delemar* IAM 6254 glucoamylase(11)는 27%, *Aspergillus niger* IAM 2086 glucoamylase(23)는 32%, *Aspergillus usarii* IAM 2185 glucoamylase(9)는 70%의 분해율을 나타내었다.

**각종 생전분에 대한 분해산물** 각종 생전분에 대한 분해산물을 paper chromatography로 검출한 결과는 Fig. 10과 같이 각종 생전분에 작용하여 glucose만을 생성하였다. 따라서 본 정제 효소는 glucoamylase이다.

**요 약**

생전분 분해력이 강한 glucoamylase를 생산하는 균주로서 *Aspergillus niger*를 선발하고 본 균주에 의한 glucoamylase의 생산조건을 검토하였으며, 아울러 효소를 정제하고 정제효소의 성질과 옥수수생전분, 쌀생전분, 감자생전분, 찹쌀생전분, 고구마생전분, 밀생전분, 보리생

전분에 대한 분해율을 조사하였다.

밀기울 배지에서 효소생산의 최적배양 온도는 30℃, 최적배양시간은 96시간이었고, 밀기울 배지에 yeast extract와 nutrient broth의 첨가는 효소의 생산을 약간 증가시켰다. Ammonium sulfate fractionation, DEAE-cellulose column chromatography에 의하여 효소를 정제하였으며 정제효소의 비활성은 30.7 U/mg.protein, 수율은 25.8%이었다.

정제효소는 polyacrylamide disc gel electrophoresis에 의하여 single band를 나타내었고, SDS-polyacrylamide disc gel electrophoresis에 의하여 추정된 분자량은 56,000, 등전점은 pH3.7, 최적온도는 65℃, 최적pH는 4.0, pH안정범위는 3.0~9.5, 45℃이하에서 안정하였으며, Ca<sup>2+</sup>은 효소의 내열성을 약간 증가시켰다. 본 효소는 Co<sup>2+</sup>, Sr<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>에 의하여 활성이 증가하였다.

각종 생전분에 대하여 분해율을 조사한 결과 48시간 반응시켰을 때 쌀생전분, 옥수수생전분, 찹쌀생전분, 고구마생전분, 밀생전분, 보리생전분에 대하여 90%이상의 분해율을 나타내었으며, 생전분중 가장 분해되기 어려운 것으로 알려진 생감자 전분에 대하여도 80%의 분해율을 나타내었다. 본 정제효소는 glucoamylase로 확인되었다.

### 감사의 말

본 연구는 1995년도 한국과학재단 핵심전문 연구비(951-0603-077-1) 지원으로 수행되었으며 지원에 감사를 드립니다.

### 참고문헌

- Hayashida, S., S. Kunisaki, M. Nakao, and P. Q. Flor. 1982. Evidence for raw starch-affinity site on *Aspergillus awamori* glucoamylase I. *Agric. Biol. Chem.* **46**: 83-89.
- Abe, J., F. W. Bergman, K. Obata, and Hizukuri. 1985. Raw starch digesting enzyme of *Aspergillus* sp. K-27. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.* **32**: 128-135.
- Yamamoto, M., S. Ushiro, and N. Nakamura. 1988. Digestion of raw corn starch digesting amylase of *Aspergillus* sp. K-27. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.* **35**: 235-243.
- Sohn, C.B. 1983. Studies on the raw starch saccharifying enzyme from *Aspergillus niger* and its mutant. The graduate school of Chungnam National University. *Thesis for the degree of Doctor.*
- Kainuma, K., H. Ishigami, and S. Kobayashi. 1985. Isolation of novel raw starch digesting amylase from a strain of black mold. *Chalara paradoxa*. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.* **32**: 136-141.
- Chung, M. J., H. Taniguchi, and Y. Maruyama. 1981. Studies on  $\alpha$ -amylase of *Bacillus circulans* F-2 (Part I). Purification of  $\alpha$ -amylase. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **9**: 185-190.
- Chung, M. J., H. Taniguchi, Y. Maruyama, and M.J. Lee. 1982. Studies on  $\alpha$ -amylase of *Bacillus circulans* F-2 (Part II). Enzymatic characteristics of the purified  $\alpha$ -amylase. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **10**: 123-132.
- Hayashida, S. and P. Q. Flor. 1981. Raw starch digestive glucoamylase productivity of protease-less mutant from *Aspergillus awamori* var. *kawachi*. *Agri. Biol. Chem.* **45**: 2675-2681.
- Chung, M. J., W. N. Hou, J. H. Jeong, and H. Taniguchi. 1990. Studies on the development and the characteristics of the powerful raw starch digesting enzyme. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **18**: 251-259.
- Kim, C. J., M. J. Oh, and J. S. Lee. 1986. Purification and characterization of raw starch digesting enzyme from *Rhizopus oryzae*. *Korean J. Food Sci. Technol.* **18**: 288-293.
- Chung, M. J., J. S. Woo, G. S. Lim, and D. S. Cho. 1991. Characteristics of raw starch hydrolyzing enzyme from *Rhizopus delemar* IAM 6254. *Jour. Agr. Sci. Chungbuk Nat'l Univ.* **9**: 34-44.
- Mizokami, K., M. Kozaki, and K. Kitahara. 1977. Crystallization and properties of raw starch hydrolyzing enzyme produced by *Streptococcus bovis*. *Bull. Agri. Chem. Soc. Japan.* **51**: 299-307.
- Kurushima, M., I. Sato, and K. Kitahara. 1974. Raw starch saccharifying amylase of *Aspergillus cinnamomeus*. *Bull. Agri. Chem. Soc. Japan.* **48**: 379-384.
- Saha, B. C. and S. Ueda. 1984. Raw starch degradation by glucoamylase II of black *Aspergillus*. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.* **31**: 8-13.
- Park, I. S., I. Nam, S. O. Kho, G. N. Kim, and K. S. Suh. 1990. Production and characterization raw starch hydrolyzing enzyme from Bacteria. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **18**: 244-250.
- Bernfeld, P. 1955. *Methods in enzymology.* **1**: 149-150.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randal. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-295.
- Davis, B. J. 1964. Disc electrophoresis II. method and application to human serum protein. *Ann. New York Acad. Sci.* **121**: 404-427.
- Weber, K. and M. Osborn. 1969. The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **244**: 44-60.
- Wrigley, C. M., 1971. *Method in enzymology.* **22**: 559-564.
- Trevelyan, W. E., D. P. Procter, and J. S. Harrison. 1950. Detection of sugars on paper chromatography. *Nature.* **166**: 441-445.
- Dubois, M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, and F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugar and related substance. *Analytical Chem.(USA).* **28**: 350-358.
- Chung, M. J. and J. S. Woo. 1992. Studies on the raw starch digesting enzyme from *Aspergillus niger* IAM 2086. *Jour. Agr. Sci. Chungbuk Nat'l Univ.* **10**: 228-242.

(Received 28 October 1996)