

## *Aspergillus niger* group 의 Dextrinogenic Amylase 에 관한 研究

金 尙 材 · 李 培 咸 · \*李 容 旭

(建國大學校 應用微生物研究所, \*서울대 학교 보건대학원)

### A Study on Dextrinogenic Amylase in the *Aspergillus niger* group.

KIM, Sang Jae, Bae Ham LEE, and Yong Wook LEE\*

(The Institute of Applied Microbiology, Kon-Kuk University)

\*Seoul Natl. Univ.

#### ABSTRACT

A comparison of dextrinogenic amylase activities in the *Asp. niger* group was made with their crude and ethanol dialyzed enzymes before and after heating at high temperature (60—75°C). The results obtained are as follows;

1. The dextrinogenic amylase activity of crude enzymes of *Asp. kawachii* and *Asp. foetidus* was strong, but *Asp. phoenicis*, *Asp. carbonarius* and *Asp. japonicus* showed weak activity. The others showed medial grades of activity.

2. The ethanol dialyzed enzymes of *Asp. kawachii*, *Asp. foetidus* and *Asp. japonicus* was very sensitive to high temperature (60 or 65°C) and their enzymatic activities were diminished greatly. The others did not show diminution of enzymatic activity at 60 or 65°C, but diminished greatly at 70 or 75°C.

3. The ethanol dialyzed enzymes of the *Asp. niger* group heated to 65°C was more sensitive at pH 6.0 and 6.5 than at pH 4.5, 5.0 and 5.5.

4. Tested strains in the *Asp. niger* group were subdivided into 4 subgroups by their dextrinogenic amylase activities before and after heating at 60 or 65°C. The first group showed a medial grade of activity before heating and no diminution of their enzymatic activities after heating. *Asp. niger*, *Asp. pulverulentus*, *Asp. awamori* and *Asp. usamii* were included in this group. The second group had strong enzymatic activity before heating, but diminished greatly after heating. *Asp. kawachii* and *Asp. foetidus* were included in this group. The third group had weak enzymatic activity before heating, but no diminution of activity after heating. *Asp. carbonarius* and *Asp. phoenicis* were included in this group. The fourth group showed very weak enzymatic activity before heating, and was inactivated easily by heating. *Asp. japonicus* was included in this group.

5. Reference strain, *Asp. oryzae* of the *Asp. flavus* group showed a very strong dextrinogenic amylase activity before heating. After the heat treatment, however, its enzymatic activity was diminished greatly.

#### 緒 論

*Aspergillus niger* group 은 그들이 이용할 수 있는 유기물질이 자연에 풍부하기 때문에 일반적으로 그 분포가 대단히 크고 광범

하며 이 菌群 중에는 또한 오랜 옛날부터 산업적으로 이용해온 균종도 많이 있다. 그러므로 *Asp. niger* group 에 관한 연구는 오래 전부터 다른 어느 菌群보다도 광범하고 심오하게 이루어져 왔고 그에 따라 이들의 분

류도 크게 진전되어 왔다.

*Asp. niger* group의 분류는 주로 그들의 형태학적 특징을 기초로 행해지는 것이 대부분이지만 학자에 따라서는 그들의 생리학적 특성을 비교하는 독창적인 분류법을 만들고 있다.

저자들은 본연구소에서 보존하고 있는 *Asp. niger* group의 균주로 dextrinogenic amylase 활성을 비교관찰 하였던 바 그들의 분류에 도움이 되는 성상을 관찰할 수 있었기에 보고하는 바이다.

## 材料 및 方法

### 實驗材料

우리나라 특유의 자연발효식품인 메주와 곡자에서 분리된 *Asp. niger*와 *Asp. pulverulentus* 각 1주와 美農務省 산하에 있는 Northern Utilization Research and Development Division으로 부터 분양받은 *Asp. awamori*, *Asp. carbonarius*, *Asp. foetidus*, *Asp. japonicus*, *Asp. niger* 및 *Asp. phoenicis* 각 1주 그리고 현재 우리나라 발효공업에 이용되고있는 *Asp. usamii* 및 *Asp. kawachii* 각 1주등을 본 실험의 재료로 이용하였다. 그리고 일반적으로 강력한 dextrinogenic amylase 활성을 가지고 있는 *Asp. flavus* group의 *Asp. oryzae* 1주를 참고균주로 供試하였다(Table 1)

Table 1. Tested Strains and Sources

Serial strain No.	Species name of strains	Received or isolated from:
A 1	<i>Asp. niger</i>	Meju (and from Kokja)
A 2	<i>Asp. pulverulentus</i>	Meju (and from Kokja)
A 40	<i>Asp. kawachii</i>	Brewing industry
A 56	<i>Asp. usamii</i>	Brewing industry
A 74	<i>Asp. awamori</i>	NRRL(U.S.A.)
A 79	<i>Asp. niger</i>	NRRL(U.S.A.)
A122	<i>Asp. carbonarius</i>	NRRL(U.S.A.)
A123	<i>Asp. phoenicis</i>	NRRL(U.S.A.)
A126	<i>Asp. foetidus</i>	NRRL(U.S.A.)
A127	<i>Asp. japonicus</i>	NRRL(U.S.A.)
A113	<i>Asp. oryzae</i>	Brewing industry

## 實驗方法

### 1. 酵素生産

a) Wheat bran culture: wheat bran 20g을 증유수 12ml와 함께 500ml들이 flask에 넣고 15Lbs에서 30분간 고압멸균한 다음 식혀서 균의 포자를 접종한 후  $30 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 5일간 배양하였다.

b) Submerged culture: 고압멸균된 액체배양기(wheat bran 5g, starch 1g, ammonium citrate 0.3g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1g,  $\text{NaNO}_3$  0.3g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05 g, tap water 100ml, initial pH 5.5) 300ml가 든 flask(1000ml들이)에 균의 포자를 접종한 후  $30 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 5일간 배양하였다.

### 2. 酵素液의 造製

① 粗酵素液: wheat bran culture 10g(乾量)에 80ml의 증유수를 가하고 강하게 진탕하여 2시간 동안 추출한 후에 여과한 濾液을 조효소액으로 사용하였다.

② Ethanol 정제 효소액: submerged culture liquid를 여과한 여액을 無水 ethanol과 1:1로 혼합한 후  $5^\circ\text{C}$ 에 24시간 靜置하여 투명한 상등액은 제거하고 乳濁沈渣를 1,500 rpm으로 원심분리하여 얻어진 침전물 1g(濕量)당 증유수, acetate buffer(pH 4.5, 5.0) 또는 phosphate buffer(pH 5.5, 6.0, 6.5)등을 10ml가하여 용해시킨 것을 ethanol 정제 효소액으로 하였다.

3. 熱處理: ethanol 정제 효소액 중 증유수에 용해한 것을 60, 65, 70 및  $75^\circ\text{C}$ 의 항온수조에 각각 20분간 처리하고, 그리고 *Asp. usamii*와 *Asp. oryzae*는  $70^\circ\text{C}$ 에서 처리시간을 각각 5, 10, 15, 20, 30 및 40분으로 달리하였다. 완충액에 용해된 효소액은  $65^\circ\text{C}$ 에 20분간 처리하였다.

4. Dextrinogenic amylase 力價測定: 열처리하지 않은 粗酵素液 및 ethanol 정제 효소액과 열처리한 ethanol 정제 효소액은 Winslow法에 따라 전분액화형효소의 역가를 측정하였다.

**結果 및 考察**

우리나라 특유의 자연발효식품인 메주와 누룩에 분포하는 *Asp. niger*(A1)와 *Asp. pulverulentus*(A2) 각 1주 및 美農務省 산하의 Northern Utilization Research and Development Division 으로부터 분양받은 *Asp. awamori*(A74), *Asp. niger*(A79), *Asp. carbonarius*(A122), *Asp. phoenicis*(A123), *Asp. foetidus*(A126) 및 *Asp. japonicus*(A127) 각 1주 등과 현재 우리나라 발효공업에 널리 이용

되고있는 *Asp. kawachii*(A40) 및 *Asp. usamii*(A56) 각 1주 등 10 주의 *Asp. niger* group 과 *Asp. flavus* group 의 1 주(*Asp. oryzae*, A113) 등을 대상으로 그들의 전분액화형효소활성을 비교관찰한 바 다음과 같은 결과를 얻었다. 먼저 wheat bran culture 로 부터 추출한 조효소액의 역가를 비교해 보면 *Asp. kawachii*, *Asp. foetidus* 및 *Asp. usamii* 등은 768~1536 으로 비교적 강한 편이었고 *Asp. carbonarius* *Asp. japonicus* 및 *Asp. phoenicis* 등은 12~96 으로 약한 편이었다. 그밖의 균주들은 256~

**Table 2.** Comparison of Dextrinogenic amylase activities in the *Aspergillus niger* group.

Serial strain No.	Dextrinogenic amylase activities without heating(Winslow's unit)		Dextrinogenic amylase activities after heating for 20 minutes in water bath(Winslow's unit)			
	Crude enzyme extracted from wheat bran culture	Alcohol dialyzed enzyme extracted from submerged culture	60° C	65° C	70° C	75° C
A 1	384	256	256	256	96	8
A 2	256	128	128	96	48	0
A 40	1,536	1,024	24	8	4	0
A 56	768	768	768	512	96	0
A 74	384	256	256	192	48	0
A 79	384	384	384	384	128	24
A 122	24	32	32	24	16	0
A 123	96	96	96	64	16	0
A 126	1,024	1,024	16	4	4	0
A 127	12	16	0	0	0	0
A 113	16,384	13,288	256	32	32	16

384로서 중등정도의 역가를 나타내었다. 참고균주인 *Asp. oryzae* 는 16384 로 대단히 강했다(Table 2). 증유수에 용해한 ethanol 정제효소로서 열처리하지 않은 효소액의 역가는 Table 2에서 보는 바와같이 75° C에서는 *Asp. niger* 를 제외하고는 모두 불활성화되었고 70° C에서는 균주에 따라 차이는 있지만 시험된 균주 모두 현저한 역가의 감소를 나타내었다. 그러나 60° C와 65° C에서는 *Asp. kawachii*, *Asp. foetidus* 및 *Asp. japonicus* 등이 불활성화 내지 현저한 감소를 나타낼 뿐 그밖의 균주들은 균종에 따라 다소의 차이는 있지만 역가의 감소가 없거나 적었다.

*Asp. oryzae* 는 60 내지 65° C에서 역가의 감소가 대단히 컸다. 이상의 관찰결과를 그림으로 나타내면 Fig. 1 과 같다.

다음은 ethanol 정제효소를 수소이온농도가 서로 다른 완충액에 용해한 효소액의 열처리 전후 역가를 비교해 보면 Table 3에서 보는 바와 같다. 즉 65° C에서 20분간 처리한 후 측정된 역가를 보면 pH 6.0에서 대부분의 균주가 불활성화 내지 현저한 역가의 감소가 일어나며 pH 6.5에서는 시험된 균주 모두 불활성화 되었다. 그러나 pH 4.5, 5.0, 5.5에서는 균주에 따라 차이는 있지만 *Asp. foetidus* 와 *Asp. kawachii* 를 제외하고는 모두

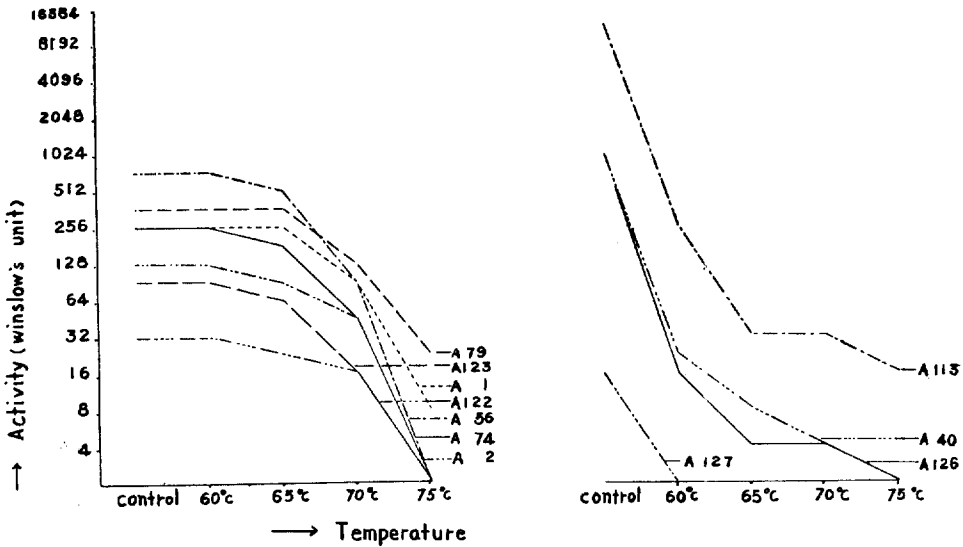


Fig. 1. Comparison of Dextrinogenic amylase activities in the *Asp. niger* group after heating at 60, 65, 70 and 75°C, respectively for 20 minutes.

Serial strain No.	Initial activities of alcohol dialized enzymes in distilled water.	Activities of alcohol dialized enzymes after heating in different pH values in buffer solutions.				
		pH 4.5*	pH 5.0*	pH 5.5**	pH 6.0**	pH 6.5**
A 1	32	32	32	32	2	0
A 2	24	24	24	16	12	0
A 40	64	8	8	2	2	0
A 56	128	128	128	128	32	0
A 74	12	12	12	8	0	0
A 79	64	64	64	64	32	0
A122	8	8	8	8	2	0
A126	256	0	0	0	0	0
A113	2048	4	24	16	4	4

Table 3. Stability of Dextrinogenic Amylase activities in the *Aspergillus niger* group by heating in the various pH values at 65°C for 20 minutes. (Winslow's unit)

(\* Acetate buffer, \*\* Phosphate buffer)

역가의 감소를 거의 볼 수 없었다. *Asp. kawachii*는 pH 4.5 및 5.0에서 역가의 감소가 대단히 컸고 pH 5.5 및 6.0에서는 보다 더 감소되었으며 pH 6.5에서 불활성화 되었다. *Asp. foetidus*는 pH 4.5에서도 불활성화 되었다. *Asp. oryzae*는 pH 4.5에서 역가의 감소가 크게 일어났고 이미 감소된 역가는 수소이온농도의 변화에 큰 영향을 받지 않았

다. 이상의 관찰결과를 그림으로 나타내면 Fig. 2에서 보는 바와 같다.

다음은 *Asp. usamii*와 *Asp. oryzae*의 증류수에 용해한 ethanol 정제 효소액을 70°C 상온수조에 처리시간을 달리하여 역가의 변화를 관찰한 결과를 보면 Fig. 3에 나타난 바와 같다. 즉 *Asp. usamii*는 대체로 처리시간에 따른 역가의 감소가 급격하지 않다. 20

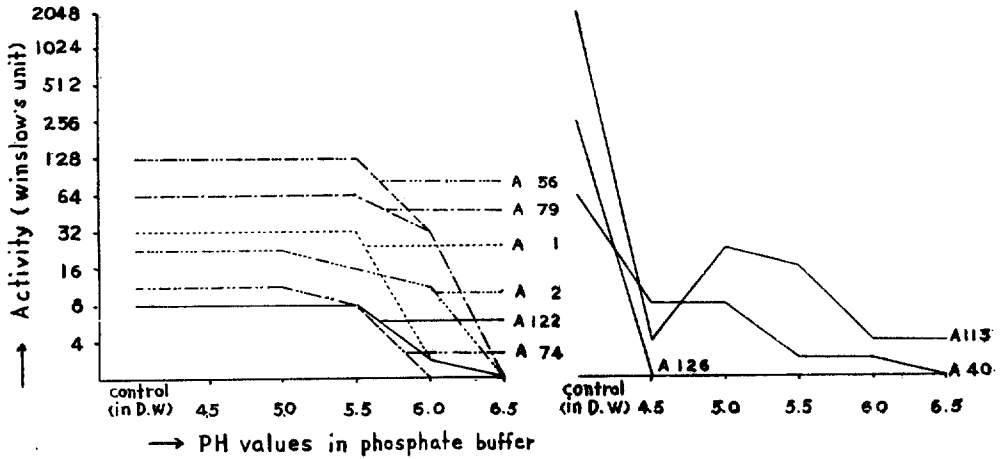


Fig. 2. Comparison of dextrinogenic amylase activities of *Asp. niger* group after heating at 65°C for 20 minutes in varied PH values.

~30분사이에 비교적 급격한 감소를 보여주고 있다. *Asp. oryzae*는 15분 처리에서 급격한 감소를 보여주었다.

상을 비교관찰하여 분류하는 경우도 있다. 예를 들면 坂口와 山田(1944)등은 *Asp. niger* group을 sterigmata의 배열과 conidia의 크기 및 표면의 형태를 비교하여 *Asp. carbonarius*群, *Asp. niger*群, *Asp. japonicus*群 및 *Kuro-koji* mold群 등 4군으로 분류하고 그 중에서 *Kuro-koji* mold군을 conidial head의 색깔과 亞硝酸鹽의 동화능력을 비교하여 *Asp. usamii*, *Asp. saitoi*, *Asp. inuii*, *Asp. aureus* 및 *Asp. awamori* 등으로 분류하고 있다. 그리고 北原과 久留(1950)등은  $\alpha$ -및  $\beta$ -amylase와 maltase의 力價를 비교관찰하여 *Asp. niger* group을 4군으로 분류하고 있다. 즉 그 제 1군은 Awamori型으로  $\beta$ -amylase와 maltase의 역가가 어느정도 인정되지만  $\alpha$ -amylase가 특히 강한 군으로서 *Asp. luchuensis*, *Asp. awamori*와 그 變種 *Asp. kawachii* 및 中酸性黑麴菌등을 이에 소속시켰고 그리고 제 2군은 Niger型으로서  $\alpha$ -amylase의 역가는 中等程度이지만  $\beta$ -amylase와 maltase가 Awamori型보다 강한 군이며 *Asp. niger*, *Asp. batatae*와 그 變種 및 *Asp. usamii*등을 이에 소속시켰다. 그리고 제 3군은 Carbonarius型으로  $\beta$ -amylase를 주체로하

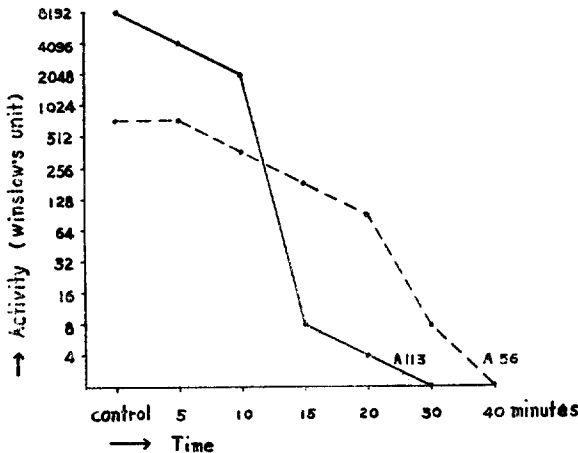


Fig. 3. Inactivation of Dextrinogenic Amylase activities of *Asp. usamii* and *Asp. oryzae* by heating at 70°C

*Aspergillus niger* group의 분류는 대체로 그들의 형태학적 특징을 비교하여 행한다. 그러나 학자에 따라서는 그들의 생리학적 성

고  $\alpha$ -amylase는 약한 균이며 *Asp. carbonarius*, *Asp. cinamomeus* 및 *Asp. atropurpureus* 등을 이에 소속시키고 그리고 제 4군은 Japonicus 형으로서  $\alpha$ -,  $\beta$ -amylase 및 maltase 모두 약한 균이며 *Asp. japonicus*를 이에 소속 시켰다. 저자(1971)도 *Asp. niger group*의 전분액화 및 당화효소의 역가를 비교관찰한 바 그들의 분류에 유용하다는 사실을 밝힌바 있다.

이처럼 *Asp. niger group*의 분류에 있어서 亞硝酸鹽의 동화능력이나 amylolytic enzyme system과 같은 생리학적 성상의 비교가 형태학적 특징의 비교관찰에 못지않게 유용하다는 사실을 알 수 있다. 저자등도 이러한 점에 착안하여 *Asp. niger group*의 전분액화형 효소의 열에 대한 感受性を 비교관찰한 결과 분군군의 분류에 도움을 줄 수 있는 결과를 얻었다.

대체로 *Asp. niger group*의 전분액화형효소는 균종에 따라 열에 대한 감수성이 대단히 다양하였다.

먼저 열처리전 粗醱素의 전분액화력을 비교해 보면 *Asp. kawachii*와 *Asp. foetidus*등이 가장 강했고 *Asp. usamii*, *Asp. niger*, *Asp. pulverulentus* 및 *Asp. awamori* 등은 비

교적 강한 편이거나 中等程度였으며 *Asp. phoenicis*, *Asp. carbonarius* 및 *Asp. japonicus* 등은 약한 편이었다.

다음은 ethanol로 정제한 효소를 열처리한 후의 전분액화력을 비교해 보면 *Asp. kawachii*, *Asp. foetidus* 및 *Asp. japonicus* 등은 60~65°C에서 역가의 감소가 대단히 크거나 不活性化되었지만 그밖의 균주들은 정도의 차는 있지만 대체로 60~65°C에서는 역가의 감소가 거의 없고 70~75°C에서 현저한 역가의 감소 내지 불활성화가 일어났다. 따라서 *Asp. kawachii*, *Asp. foetidus* 및 *Asp. japonicus* 등은 전분액화효소의 열에 대한 감수성이 같은 경향을 보여주고 있다. 그중에서 *Asp. japonicus*는 열처리전 효소의 역가가 다른 2주와 크게 다르지만 *Asp. kawachii*와 *Asp. foetidus*는 열처리전후의 역가가 近似한 점이 많아 이 두 균주는 서로 近緣의 관계에 있다고 본다. 北原과 久留(1949) 등은 *Asp. kawachii*를 그 형태 및 diastase 組成을 타균종과 비교관찰하여 中酸性黑麴菌인 *Asp. luchuensis*와 近緣의 관계에 있다고 하였다. 그리고 中酸性黑麴菌은 *Asp. awamori*에서 유래되었다고 주장하고 있다.

Table 4. Subgrouping of *Asp. niger group* by their Dextrinogenic amylase activities

Dextrinogenic amylase activity		Subgroup members
Without heating	After heating at 65°C for 20 minutes	
Medial or moderately strong	Not diminished greatly	Subgroup 1 <i>Asp. niger</i> (A1, A79) <i>Asp. usamii</i> (A56) <i>Asp. pulverulentus</i> (A2) <i>Asp. awamori</i> (A74)
Strong	Diminished greatly	Subgroup 2 <i>Asp. kawachii</i> (A40) <i>Asp. foetidus</i> (A126)
Weak	Not diminished greatly	Subgroup 3 <i>Asp. phoenicis</i> (A123) <i>Asp. carbonarius</i> (A122)
Weak	Inactivated	Subgroup 4 <i>Asp. japonicus</i> (A127)

이상의 실험결과를 종합해 보면 Table 4에 나타난 바와 같이, *Asp. niger* group을 4군으로 분류할 수 있었다. 즉 제 1군은 열처리전 전분액화효소의 역가가 비교적 강한 편이거나 中等程度이며 열처리(60~65°C)로 역가감소가 거의 없는 군으로서 *Asp. niger*, *Asp. pulverulentus*, *Asp. usamii* 및 *Asp. awamori* 등이 이에 속했고 제 2군은 열처리전 효소의 전분액화력이 대단히 강하지만 열처리로 역가의 감소가 크게 일어나는 군으로서 *Asp. kawachii*와 *Asp. foetidus*가 이에 속했다. 제 3군은 열처리전 효소의 역가가 낮아도 열처리로 감소되지 않는 군으로서 *Asp. phoenicis*

와 *Asp. carbonarius*가 이에 속했고 그리고 제 4군은 열처리전 효소의 역가도 대단히 낮지만 열처리로 쉽게 불활성화되는 군으로서 *Asp. japonicus*가 이에 속했다.

다음은 pH 변화에 따른 ethanol 정제효소의 열에 대한 감수성은 군중에 따라 다소의 차는 있지만 대체로 *Asp. kawachii*와 *Asp. foetidus*를 제외하고는 모두 pH 4.5, 5.0, 5.5에서는 역가의 변화를 볼수 없지만 pH 6.0 및 6.5에서는 크게 감소되거나 불활성화되었다. *Asp. kawachii*와 *Asp. foetidus*는 열에 대해 민감하여 pH 변화에 따른 역가의 변화를 관찰할 수 없었다.

### 摘 要

*Aspergillus niger* group에 속하는 균주 10주로 wheat bran culture와 submerged culture를 통해 얻어진 粗酵素와 ethanol로 정제한 효소를 熱처리 전후에 Winslow法에 따라 전분액화형효소의 力價를 비교관찰한 결과 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 열처리전 조효소의 역가는 *Asp. kawachii*와 *Asp. foetidus*가 가장 높고 *Asp. phoenicis*, *Asp. carbonarius* 및 *Asp. japonicus* 등이 대단히 낮으며 기타 균주는 中等程度였다.
2. Ethanol 정제효소의 열에 대한 감수성은 *Asp. kawachii*, *Asp. foetidus* 및 *Asp. japonicus* 등이 가장 민감하여 60~65°C에 역가의 감소가 크게 일어나거나 불활성화 되었다. 기타 균주는 70~75°C에 역가가 감소되거나 불활성화 되었다.
3. pH 변화에 따른 열에 대한 감수성을 보면 대부분의 균주가 pH 6.0~6.5에서 불활성화 되었다.
4. 열처리 전후의 효소의 力價를 비교한 결과 *Asp. niger* group을 4群으로 나눌수 있었다. 즉 제 1군은 효소의 역가가 비교적 높거나 中等程度이고 열처리(60~65°C)로 역가의 감소가 거의 없는 군으로서 *Asp. niger*, *Asp. pulverulentus*, *Asp. awamori* 및 *Asp. usamii* 등이 이에 속했고 제 2군은 효소의 역가가 높지만 열처리로 크게 감소되는 군으로서 *Asp. kawachii*와 *Asp. foetidus*가 이에 속했다. 제 3군은 효소의 역가가 매우 낮아도 열처리로 거의 감소되는 경향이 없는 군으로서 *Asp. carbonarius*와 *Asp. phoenicis*가 이에 속했고. 그리고 제 4군은 효소의 역가가 매우 낮으면서 열처리로 쉽게 불활성화 되는 군으로서 *Asp. japonicus*가 이에 속했다.
5. 참고균주로 供試된 *Asp. flavus* group의 *Asp. oryzae*는 열처리전 효소의 역가가 대단히 높지만 열처리로 역가감소가 크게 일어났다.

### 引 用 文 獻

1. Raper, K.B. and D.I. Fennell. 1965, The genus *Aspergillus*. The Williams and Wilkins Co., Baltimore.
2. Technical manual. 1964. U.S. Department of the Army.
3. 北原覺雄, 久留島通俊, 1949a. 絲狀菌類의 디아스타제組成에關する研究. 醸工學誌. 27: 162,
4. 北原覺雄, 久留島通俊. 1949b. 絲狀菌類의 디아스타제組成에關する研究. 醸工學誌. 27: 182,
5. 北原覺雄, 久留島通俊, 1950. 絲狀菌類의 디아

- スタゼ組成に関する研究. 醸工學誌. 28: 101,
6. 金尙材, 1971. 韓國産 *Aspergilli* 에 관한 分類 學的 研究. 韓國微生物學會誌. 21: 1,
7. 微生物學 Hand Book(日本) 1960. 技報堂 pp. 670~672,