

麹菌 醱酵飼料의 Methionine 合成에 關한 研究

Studies on the methionine synthesis of the fermentated potato starch waste feed

서울대학교 農科大學 農化學科

金浩植 · 朴泰濟 · 全在根

H.S. Kim, T.J. Park, J.K. Chun.

Summary

To make a methionine rich feed with the potato starch waste product, a study on the methionine synthesis by the *Aspergillus oryzae* and its mutants was carried out through the synthetic and potato starch waste product media. The strains 11021 and C₁ 302 F₁ were selected as the methionine productive strains from forty strains and mutants which were induced by one of the authors.

The addition of metal ions and yeast extract, as the Vitamin B₁₂ source, show little effect to the methionine synthesis, but good response to the growth of the strains. It was cleared, however, that the methionine synthesis was markedly enhanced in the potato starch waste media in which formaldehyde, as C₁ unit, was added together with folic acid, metal ions and yeast extract, as the cofactor.

The percentage of the methionine to the pure protein of the fermentated potato starch waste feed increased to 2.10 from 0.15. The maximum utilization of the ammoniacal nitrogen into the mycel protein was 78%.

In view point of the effect of C₁ unit and Pteroyl glutamic acid to the methionine synthesis, it was assumed that *Aspergillus oryzae* might synthesize methionine similar to *Escherichia coli* and *Neurospora crassa*.

序 論

澱粉醱酵副産物인 고구마 澱粉粕은 50% 内外 多量의 澱粉을 含有하고 있다. 그 利用에 對하여 金, 實⁽¹⁾은 硫安을 添加한 澱粉粕에 麹菌을 培養하여 多量의 蛋白質을 合成하는데 成功하였으

며 飼料的인 價値가 鷄기을 以上으로 良好함을 示했다. 이에 著者 等은 麹菌을 培養한 고구마 澱粉粕 醱酵飼料中에 Methionine을 많이 含有하게끔 製造하고 同時에 J.A. Stekol,⁽²⁾ Horowitz⁽³⁾ 等이 *Neurospora crassa*와 *Escherichia coli*에서 解明한 Methionine 合成操作이 果然 麹菌에 依해서도 成立하는지를 究明코저 Methionine-methyl group 形成에 必要하다고 生覺되는 C₁ unit 類들과 Folic acid, yeast extract 및 金屬 ion 等의 影響을 살피며 實驗을 하였으나 다음과 같은 結果를 얻었으므로 이에 報告하는 바이다.

〔材料 및 方法〕

〔材料〕

本實驗에 使用한 材料로는 全北 井邑産 고구마 澱粉粕, 市販鷄기을, Formaldehyde, Folic acid, yeast extract 및 硫安을 主로 使用하였다. 麹菌으로는 著者들의 一人이 誘發한 *Aspergillus oryzae* 突然變異株 및 NRRL 菌 40 株를 使用하였다.

〔培養法 및 試料調製〕

soil culture로 保存하여온 *A. oryzae* 變異菌株를 鷄汁培養基(糖度 10° Bllg)에 接種, 27°C에서 72 時間 活性化시킨 後 Czapek 斜面培養基에 옮긴 것 들을 使用하였다. 本實驗을 通하여 發菌은 autoclave 內에서 15 lbs 15 分間 行하고 接種은 米 5 ml의 鷄汁培養基에 Czapek 斜面培養한 것에서 一 白金耳를 接種, 活性化시킨 後 發菌水 5 ml를 加하여 菌體 및 胞子를 모두 섞어 稀釋한 液을 0.1 ml 에 接種하였다. 接種 後의 培養條件은 27°C에서 100 時間 靜置培養 하였다. 培養이 完了한 것은 液體培養인 樣은 菌體를 遠心分離하고 固體培養인 樣은 菌體 및 培地全部를 50°C에서 乾燥하여 20 mesh 로 粉碎한 後 純蛋白質 및 Methionine을 定量할 試

자료 하였다.

[分析方法]

純蛋白質의 定量: 試料 1g 을 定秤하여 Stutzer⁽⁴⁾ 法에 依하였다.

Methionine 의 定量: 試料 2g 을 定秤하여 Sullivan and McCarthy 法⁽⁵⁾에 依하였다. 菌 粉末菌體를 20% HCl 로 抽出, Na-Nitroprusside 로 發色시켜 510 m μ 에서 Beckman DU spectrophotometer 를 使用하여 Optical density 를 測定하고 미리 作成한 standard curve 로 부터 Methionine 量 을 算出하였다.

[結果 및 考察]

Methionine 多量生産菌株의 選擇

40個의 變異菌株중에서 多量의 Methionine 을 合成하는 菌株를 選擇하기 爲하여 500 ml 의 三角 Flask 內의 밀기울培地(밀기울 15g, 蒸溜水 15ml)에 이 들 菌株들을 接種 培養後 調製한 試料로부터 純蛋白과 Methionine 을 定量한 結果 Table 1 과 같 았다.

Table 1. The synthetic power of the pure protein and methionine from mutant strains of *Aspergillus oryzae*

Strains	pure protein% in dry matter	methionine% in dry matter	methionine% in pure protein
6A-2041	16.4	0.25	1.52
NO. 1	16.2	0.14	0.86
11021	18.2	0.31	1.71
NO. 5	16.4	0.27	1.65
A 209 E	16.5	0.27	1.64
NO. 7	19.0	0.27	1.42
C ₁ 303 F ₁	18.2	0.23	1.25
21531	17.7	0.23	1.30
A. Ory 1	16.2	0.25	1.54
NO. 3	17.3	0.16	0.93
NRRL 1988	15.6	0.26	1.58
E ₁ 10	16.3	0.20	1.23
6 B	17.9	0.21	1.17
NO. 2A	17.6	0.27	1.53
S 6 A 201	16.7	0.27	1.62
21512	17.8	0.19	1.12
NO. 7 A	18.1	0.17	0.94
NRRL 695	17.5	0.21	1.20
A 207 E	18.1	0.21	0.85
U.S.	17.3	0.17	0.97
NRRL 2222	18.0	0.17	0.95
2	17.0	0.20	1.18
10 A 2031	16.9	0.28	1.65
L 6 A 208 C	16.6	0.28	1.68

C ₁ 302 F ₁	18.2	0.31	1.71
NO. 6	17.3	0.24	1.39
6 A 1031	18.0	0.30	1.67
A 209 E ₂	17.6	0.21	1.19
F ₂ 251	18.0	0.15	0.85
F ₂ 252	18.3	0.19	1.04
NO. 1013	18.1	0.28	1.50
A 209 E ₁	17.1	0.23	1.34
NO. 4	17.4	0.27	1.55
7 A 401	17.9	0.25	1.40
S. 變.	17.7	0.25	1.41
E ₂ 102	16.1	0.23	1.38
6 A	17.4	0.21	1.20
E 202	17.3	0.25	1.44
Asp. ory.	17.3	0.22	1.27
Q 176	—	—	—
Blank	10.1	0.13	0.12

以上の 結果로 菌株에 따라 蛋白合成力及 Methionine 生産力이 相異함을 알 수 있다. 이中에서 兩者의 合成力이 큰 菌株인 11021 과 C₁ 302 F₁을 Methionine 生産菌株로 選擇하였다. 그리고 次後 培地實驗을 이 選擇菌株에 限하여 行하였다.

窒素同化力及 Methionine 合成에 미치는 窒素源의 影響

이미 選擇한 菌株에 對하여 이들의 窒素同化力 및 Methionine 合成力을 살펴기 爲하여 窒素源으로 硫酸, UREA, NaNO₃ 등을 各各 添加한 培地(Table 2)를 用하여 菌의 生育을 觀察하고 培養完了後 調製한 試料인 菌體 0.15g 中의 methionine 을 定量한 結果는 表 3-a.b. 와 같다.

Table 2 The Composition of the Medium

sucrose	30 g
ammonium sulfate	2.63 g
KH ₂ PO ₄	1.0 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5 g
potassium chloride	0.5 g
FeSO ₄ · 7H ₂ O(1% soln.)	10 ml
Distilled water	1000 ml

Table 3-a Effect of nitrogen sources on the growth and methionine synthesis (on the media No. 1)

Strains	N-source	Growth
11021	UREA	—
	(NH ₄) ₂ SO ₄	++++
	NaNO ₃	+++
C ₁ 302 F ₁	UREA	++
	(NH ₄) ₂ SO ₄	++++
	NaNO ₃	+++

Table 3-b Effect of nitrogen sources on the methionine percentage of mold protein

Strains	N-sources.	methionine%
11021	UREA	1.38
	(NH ₄) ₂ SO ₄	1.62
	NaN ₃	1.6
C ₁ 302 F ₁	UREA	1.44
	(NH ₄) ₂ SO ₄	1.30
	NaN ₃	1.4

이상의 결과로부터 질소원으로 질산을 추가 하였을 때 곰팡이의 생육은 좋았으나 (Table 3-a) methionine 합성에는 질소원으로 별 영향이 없었다. 따라서 곰팡이의 생육에 좋은 질산을 질소원으로 사용하기로 하였다.

無機 ion 이 Methionine 합성에 미치는 영향

無機 ion 이 蛋白質合成 及 Methionine 합성에 미치는 영향을 보기 위하여 고구마澱粉粕培地(澱粉粕 15g, 蒸溜水 15ml)에 無機 ion 으로 KH₂PO₄, MgSO₄, KCl, FeSO₄ 등을 추가하여 非添加區와 比較한 결과 다음(表 4)와 같다.

이상의 결과에서 질소원을 추가하지 않은關係로 곰팡이의 생육이 좋지 않았고 菌株 11021에서는 그 영향이 적었으나 菌株 C₁ 302 F₁에서는 Metal ion 의 효과를 認定할 수 있는 傾向을 보였으므로 다

Table 4. The Effect of metal ions on the methionine synthesis

Strains	metal ions*	methionine (%) (in pure protein.)
11021	+	1.47
	-	1.40
C ₁ 302 F ₁	+	1.73
	-	1.40

* (+) : added, (-) : none

음 實驗부리는 metal ion 을 加하기로 하였다.

Formaldehyde, folic acid, yeast extract 가 Methionine 합성에 미치는 영향

J.A. Stekol,⁽¹²⁾ P. Berg,⁽¹³⁾ D.D. Woods⁽¹⁴⁾ and M. A. Bennett⁽¹⁵⁾ 등은 *Escherichia coli*, *Neurospora crassa* 의 Methionine 합성 研究에서 Serine, Glycine, 羧酸, Formaldehyde, Betain, Choline 등의 C₁ unit 源들이 methionine-methyl group 합성에서 前驅物로 作用하며 한편 이들 C₁ unit 源으로 부터 methyl group 이 形成될 때 Pteroyl glutamic acid (folic acid) 와 Vitamin B₁₂ 가 關與한다고 報告하였다. 이에 著者 등은 이 機作을 麹菌에 適用하여 보고저 다음 表 7-A 의 培地에서 培養하고 이로부터 調製한 試料인 菌體 0.15g 中の Methionine 을 定量하였던 바 Table 7-B 와 같은 結果였었다.

Table 7. The Composition of media (A) and the methionine from the respect media

media		composition												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Sucrose	(g)	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
(NH ₄) ₂ SO ₄	(g)	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2
KH ₂ PO ₄	(mg)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
KCl	(mg)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
MgSO ₄ · 7H ₂ O	(mg)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
FeSO ₄ · 7H ₂ O	(mg)	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025
Folic acid	(γ)	—	10	20	30	10	10	10	10	10	10	10	10	10
100 m Mole HCHO	(ml)	—	—	—	—	0.1	1	5	—	—	—	0.1	1	5
10% Yeast Extract	(ml)	—	—	—	—	—	—	—	0.25	0.5	2.5	0.5	0.5	0.5
중류수를加한最終容積(ml)		50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50

pH adjusted to 7.00

media		strains												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
11021		2.8	1.4	1.4	1.4	2.4	4.0	2.7	3.0	2.4	2.4	3.2	3.2	3.0
C ₁ 302 F ₁		2.6	2.6	2.6	3.4	3.4	4.0	4.0	3.4	3.0	3.0	4.2	4.4	3.0

* The methionine (mg) was measured from 0.15g of the mycel.

以上の結果에서 볼 때 Folic acid 또는 yeast extract 만을 添加 하였을 때는 뚜렷한 影響이 없었으나 Formaldehyde, Yeast extract 및 Folic acid 를 함께 加한 培地에서는 methionine 合成에 뚜렷한 結果를 보였고 Folic acid 가 10γ, Formaldehyde 2 m Mole 일 때 合成能力이 가장 컸다.

C₁ Unit 源들이 Methionine 合成에 미치는 影響 Formaldehyde 를 C₁ unit 源으로 加하였을 때 Methionine 合成을 增加 시켰으므로 다음 따라서 Formaldehyde 以外の C₁ unit 源에 대하여 Methionine 合成能力을 比較하여 보려고 C₁ unit 源들로 Betain, 蟻酸, Formaldehyde 를 同一 mole 濃度로 添加하고 比較 實驗한 結果는 다음 表 8 과 같다.

Table 8. The effect of C₁ unit sources on the methionine synthesis

C ₁ unit sources	Methionine/0.15g of mycel (mg)
(2 m mole)	
HCHO	3.7
HCOOH	3.4
Betain	4.0

以上の結果에서 Betain 이 가장 좋았고, Formaldehyde, 蟻酸의 順이었다. 그러나 그 合成의 差는 적으며 醱酵飼料製造面에서 볼 때 Formaldehyde 가 適合할 것 같다.

고구마澱粉粕培地에서 Formaldehyde 및 Folic acid 의 影響

이 合成培地實驗을 통하여 C₁ unit 의 添加는 Folic acid, Yeast extract 의 存在下에서 Methionine 의 合成을 增加시켰다. 이 結果를 고구마澱粉粕培地에 適用하여 多量의 Methionine 을 含有하는 醱酵飼料을 製造할 目的으로 다음 表 9-1 과 같은 培地에 Formaldehyde 및 Folic acid 의 濃度를 달리하여 添加하고 培養한 後 測定한 試料로 부터 分析한 結果는 Table 9-2 와 같다.

Table 9-1. The composition of the medium

Potato starch waste product	15 g
Ammonium sulfate	1.2 g
Calcium carbonate	0.84 g
Yeast extract	0.05 g
KH ₂ PO ₄	1.0
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5
KCl	0.5
FeSO ₄ · 7H ₂ O (1% soln)	10 ml
distilled water	5 ml

Table 9-2. Methionine synthesis in the potato starch waste medium

Folic acid (γ)	Formaldehyde ¹ / ₁₀₀ mole(ml)	Methionine %	
		by strain 11021	by strain C ₁ 302 F ₁
0	0	1.57(%)	1.48(%)
10	0.1	1.57	1.84
10	1	1.90	2.06
10	2	1.87	3.75
10	5	1.32	1.43
10	10	—	—
20	0.1	1.31	1.94
20	1	2.20	2.03
20	2	1.5	2.03
30	0.1	1.17	1.63
30	1	0.96	1.54
30	2	0.61	1.90

以上 表와 같이 菌株에 따라 若干의 差異는 있으나 Formaldehyde, Folic acid 의 添加는 合成培地 實驗에서 일은 結果와 同一한 傾向을 보여 주었다. 또한 蛋白合成量에도 그 影響이 커서 添加한 4%의 硫安으로 부터 最高 78%까지 Ammonia 窒素를 菌絲 蛋白合成에 關與시켰음을 다음과 같이 表 10 에서 計算으로 알 수 있다.

※ 醱酵 培養後 合成된 蛋白은 培養時 重量減少를 考慮할 때 $\frac{2}{3}(13.9-5.3)=5.7\%$ 이다.

添加한 硫安中 窒素全部가 蛋白化된다면 7.3% 가 되므로 $\frac{5.7}{7.3} \times 100 = 78\%$

Table 10. Comparison between the potato starch waste and its fermented feed.

	protein weight decrease	
non-fermented	5.3	0
fermented	13.9*	1/3

* The maximum p. protine synthesized from table 8.

(要約)

Methionine 生産菌으로 알려진 *Escherichia coli* *Neurospora crassa* 에서 解明된 合成操作을 醱酵에 適用시켜 Methionine 을 많이 含有한 醱酵飼料을 製造코저 實驗한 結果를 要約하면 다음과 같다.

- ① *A. oryzae* 突然變異 40 菌株中 11021, C₁302 F₁ 을 Methionine 生産菌株로 選擇하였다.
- ② 選擇菌株에 對한 培地實驗을 통하여 金屬 ion 및 yeast extract 는 菌의 生育에만 關與하였을

은 Methionine 合成에 직접 關與하지 않았다.

- ③ 그러나 菌의 最適生育條件下에서 適當量의 C₁ unit 와, folic acid 의 存在下에선 細菌에 依한 Methionine 合成을 增加시켰다.
- ④ C₁ unit 또는 Formaldehyde가 適合하였고 이에 添加한 硫安으로 부터 78%까지 ammonia 窒素를 菌絲蛋白合成에 關與시켰다. 또한 Methionine 의 純蛋白에 對한 百分率을 1.5% 内外로 부터 2.10% 까지 增加시켰다.
- ⑤ 以上과 같은 結果로 부터 A. oryzae에 依한 Methionine 合成도 E. Coli, Neurospora crassa 등에서와 類似한 操作을 通하여 이루어 지는 것 같다.

[參考文獻]

1. 金浩植 實惠鉉, 韓國農化學會誌 1 (1960).
2. J. A. Stekol in W. D. Mc Elroy and B. Glass "Amino acid metabolism"
3. Horowitz N.H., J. Biol Chem. 171 255-264 (1947).
4. 東京大學農藝化學教室 實驗農藝化學上卷 107 項
5. Sullivan & Mc Carthy J. Biol. Chem. 133. C. (1940).
6. P. Berg J. Biol. Chem. 145. 705 (1953)
7. D. D. Woods, C. W. Helleiner. Biol. J. 63 26 (1956).
8. M.A. Bennett J. Biol. Chem 187 751 (1950).