

醬類用 強力麴菌에 關한 研究 (第 3 報)

Aspergillus oryzae 紫外線變異株의 酵素 및 Vitamin 生成能에 關하여

李 啓 瑚 · 張 建 型

(陸軍技術研究所)

Studies on Koji for Soy Sauce Brewing. (Part 3)

On the Producibilities of Protease, Amylase and Vitamins
by UV-Induced Mutants of *Aspergillus oryzae*.

Lee, Ke Ho and Chang, Kun Hyung

(Army Research and Testing Laboratory R. O. K.)

Abstract

The enzyme-producing potentials of industrially important strains of *Aspergillus spp.* were studied. Irradiation of three original isolates of *Aspergillus oryzae* to ultra-violet rays resulted in the production of mutants which differed from the parent riboflavin and vitamin B₁₂ in culture media.

1. Irradiation three strains of *Aspergillus oryzae* to ultra-violet light produced mutants and two strains of them were selected for soy sauce brewing.

2. The two strains are the physiological mutants of *Aspergillus oryzae*. Both were found to have superior enzyme activity to their relatives.

3. *Aspergillus oryzae* UV-induced mutant 172-722 and 569-713 were more powerful than others in the production of riboflavin and vitamin B₁₂. The enzyme activity of these strain were high and decreased only slightly even in 20 percent solution of NaCl.

4. *Aspergillus oryzae* UV-induced mutant 172-722 had more powerful protease producibility in wheat bran media than in modified Czapek's solution. On the contrary, *Aspergillus oryzae* UV-induced mutant 569-713 had more powerful producibility of saccharogenic and dextrinogenic amylase in modified Czapek's solution than in mold bran.

5. *Aspergillus oryzae* UV-induced mutant 172-722 formed the spore rapidly and *Aspergillus oryzae* UV-induced mutant 569-713 did ordinarily.

6. It is found from the results that *Aspergillus oryzae* UV-induced mutant 172-722 is valuable material for the manufacture of soy sauce because of its high protease activity in 20 percent solution of NaCl. *Aspergillus oryzae* UV-induced mutant 569-713 is suitable for soy bean mash and for fermented red pepper sauce for its high saccharogenic and dextrinogenic amylase activity in 20 percent solution of sodium chloride.

緒 論

前報(李, 張, 1964)에서 醬類釀造用으로 Saccharogenic, dextrinogenic amylase 와 protease activity 가 強力한 *Aspergillus oryzae* 3 strains 을 screen 하여 選拔하였다. Maxwell(1952), Nobuyoshi(1951), Raper(1945), Oda(1952) 등은 紫外線照射로 變異를 시켰고 Diller 等(1950)은 X-ray 로 突然變異를 일으켜 酵素生成을 增加시킨 報告가 있다. 그리고 金 等(1960)은 突然變異株中에서 vitamin 生成이 親株보다 增加했음을 報告한바있으므로 本報에서 이 3 strains 에 紫外線을 照射시켜 人工的으로 突然變異를 일으켜 產生된 各變異株의 酵素活性을 親株와 比較했으며 아울러서 riboflavin 및 vitamin B₁₂의 生成能에 對해서도 檢討하였다. 그리고 이 strain 들의 醬類釀造用으로서의 適否를 判定하기 爲하여 食鹽濃度(15~20%)에 따른 saccharogenic, dextrinogenic amylase, protease activity 의 阻害度 및 sporulation velocity 도 比較檢討하였으므로 報告하는 바이다.

方 法

使用菌株: *Aspergillus oryzae* strain S-56-9, M-17-2 및 S-10 3 株와 對照로서 *Aspergillus oryzae* N.R.R.L 1988 을 使用하였다(Lee and Chang 1964)

酵素生成培地: Modified Czapek's solution wheat bran media (Chang, Lee and Park(1960), Kim, and Lee(1963))

Mutation: ① Test tube(160×16)에 Czapek's agar (pH 5.6) 7 ml 를 分注, 滅菌한 slant 의 *Asp. oryzae* 의 各試驗菌株을 接種, 30°C 에서 10 日間 培養 完全히 sporulation 시킨다.

② Sporulation 된 tube 에 滅菌蒸溜水 10 ml 를 加하여 spore suspension 으로 한다.

③ 250 ml 容三角 flask 에 蒸溜水 100 ml 를 分注하고 15 分間 autoclaving(15 lbs. 121°C)한後 spore suspension 1 ml 를 滅菌된 pipette 로 取하여 滅菌蒸溜水 100 ml 中에 加하여 10⁻⁵ 까지 稀釋한다.

④ 無菌室內에서 滅菌된 petri dish(徑 90 mm contained stirrer)에 spore suspension 5 ml(10⁻⁵로 稀釋된것)를 滅菌된 pipette 로 取하고 Fig. 1. 과 같이 petri dish 上面 2 cm 높이에 紫外線燈(115 V, 15 W, 2537 Å)을 裝置하고 dish 는 magnetic stirrer 上에 올려놓았다. 그리고 dish 뚜껑을 열며 同時에 UV-lamp switch 와 magnetic stirrer 를 作動시켜 spore suspen-

sion 을 攪拌하면서 UV-light 를 菌 spore 에 均一하게 照射시켰다.

⑤ UV-ray 照射時間은 1~10 分間으로 各 1 分을 間隔으로하여 照射하였다.

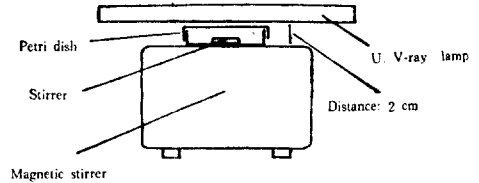


Fig. 1. Irradiation apparatus.

⑥ 照射된 spore suspension 0.8 ml 를 滅菌된 pipette 로 미리 準備해놓은 malt agar(pH 5.6 petri dish)에 接種하였다.

⑦ 30°C incubator 에서 培養하여 生殘하였든 胞子의 獨立 colony 를 採取하여 malt agar slant 에 transfer 해주고 供試菌으로하고, 이같이 survival colony 로서 lethal effect 를 檢討하였다.

酵素生成 및 酵素液의 調製: 酵素生成 및 酵素液調製는 前報에 準했다.

親株와 突然變異株의 酵素活性比較: 親株 및 突然變異株의 saccharogenic 및 dextrinogenic amylase, protease activity 를 前報의 方法에 따라 測定比較했다.

酵素活性에 미치는 食鹽濃度の 影響: 親株 및 mutants 의 saccharogenic, dextrinogenic amylase 와 protease activity 를 測定時 各酵素測定の substrates 에 NaCl 을 計算量 加하여 double strength 로 하고 酵素反應系의 NaCl 最終濃도에 미치는 影響을 檢토했다.

酵素生成培地에 따른 酵素生成能의 比較: Media A: modified Czapek's solution (Chang, Lee and Park (1960)) media B: wheat bran (Kim and Lee(1963)) media A,B 에 親株 및 mutants 를 接種培養하여 酵素를 形成시켜 enzyme activity 를 測定比較하였다.

Vitamin B group 生成能比較: (A) Riboflavin 및 vitamin B₁₂ 生成: media A 및 B 에 各菌株을 接種하여 30°C 에서 5 日間 培養시키므로써 riboflavin 과 vitamin B₁₂ 를 生成시켰다.

1) Riboflavin 의 抽出: Media A 의 경우는 culture media 를 그대로 pH 6.8 로 調整하여 riboflavin 含量을 定量했다으며 media B 는 培養된 mold bran

Table II. Enzyme and vitamin producibilities on cultured media of strains

Test strain No.	Media*	Enzyme activity			Vitamin formation	
		Protease**	Saccharogenic amylase+	Dextrinogenic amylase++	Riboflavin (r/ml)	B ₁₂ (mr/100 ml)
172-722	C	15.0	1280	64	0.65	78
	M	30.7	2560	256	1.77	218
569-711	C	14.3	1280	256	0.58	56
	M	30.8	2560	256	1.07	240
172-732	C	12.5	40960	64	0.64	115
	M	29.8	2560	128	1.19	100
569-75	C	13.9	20480	1024	0.39	80
	M	24.9	2560	512	0.65	90
569-713	C	13.1	10240	1024	0.60	160
	M	24.6	5120	512	1.15	222
NRRL. 1988	C	8.4	320	8	0.24	8
	M	23.6	640	8	0.80	13

* C: Modified Czapek's solution
 ** ml. of N/20 sodium hydroxide solution
 + : Modified Lintner's units

M: Mold bran
 ++ : Modified Wohlgenuth units $D_{30}^{40^{\circ}}$

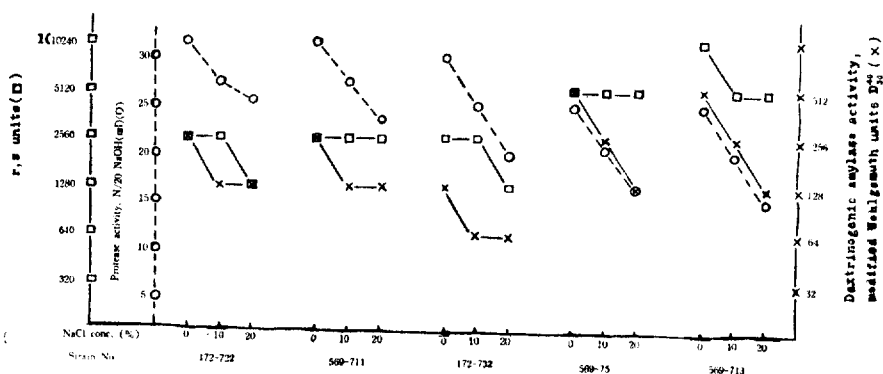


Fig. 2 Effect of sodium chloride concentration on enzyme activities of mold bran

Table III. Sporulation velocity on wheat bran and enzyme activities on sodium hydroxide 20 percent conc. in enzyme reaction

Strain No.	Protease activity, N/20 NaOH soln. (ml)	Saccharogenic amylase activity, Lintner's units	Dextrinogenic amylase activity, Wohlgenuth $D_{30}^{40^{\circ}}$ units	Sporulation velocity	Vitamin B ₁₂ r/ml	Vitamin B ₁₂ mr/100 ml
172-722	25.9	1280	128	+++	0.65	78
569-711	23.5	2560	128	++	0.58	56
172-732	21.2	1280	64	+++	0.64	114
569-75	16.7	5120	128	++	0.39	80
569-713	15.6	5120	128	++	0.60	160
NRRL 1988	13.7	320	0	+	0.24	8

* { +++ : Completely sporulation in 72 hrs. cultured
 ++ : " " " 96 " "
 + : " " " 120 " "

의 protease activity는 다른 strain에 비해서 완만한 decrease를 보여주어 20%의 NaCl 농도에서도 酵素能이 强했으며 saccharogenic activity는 變異株 569-713이 比較的 食鹽濃度의 영향을 받지않았고 變異株 569-75는 全然 영향을 받지않았다. 다음으로 sporulation velocity의 比較結果는 Table III과 같다. 即變異株 172-722 및 172-732가 가장 sporulation이 빨랐다.

以上の 여러結果로보아 간장 製造用 麹菌으로서는

strain 172-722, 된장 및 고추장 製造用 麹菌으로서는 變異株 569-713이 가장 優秀한 strain임을 指摘할수 있다.

結論的으로 酵素生成能이 優秀하고 saccharogenic, dextrinogenic amylase와 protease activity가 NaCl 20%의 농도에서 阻害가 僅少하고 riboflavin 및 B₁₂의 生成能이 强하며 sporulation velocity가 빠른菌 即 實際 醬類製造用으로 優秀한 麹菌으로는 變異株 172-722, 569-713임을 알수있다.

摘 要

1. *Aspergillus oryzae* 3株를 紫外線照射로 mutation을 야기시켜 醬類釀造에 必要한 酵素生成能이 强한 突然變異株 2株를 選抜하였다.

2. 이 2株는 酵素生成能이 親株보다 越等하게 높은 生理學的인 *Aspergillus oryzae* U.V.-induced mutants이다.

3. *Asp. oryzae* UV-mutants 172-722 및 569-713은 riboflavin과 vitamin B₁₂의 生成能이 强하고 이 變異株가 生産하는 酵素는 食鹽濃度 20%에서 enzyme activity의 阻害가 僅少하였다.

4. *Asp. oryzae* UV-mutant 172-722는 wheat bran에서 培養한 mold bran이 modified Czapek's solution에서 培養한 cultured media보다 protease 生成能이 强했고 反面에 *Asp. oryzae* UV-mutant 569-713은 modified Czapek's solution에서 培養한 cultured media가 saccharogenic, dextrinogenic amylase의 生成能이 mold bran에서 보다 强했다.

5. *Asp. oryzae* UV-mutant 172-722의 sporulation velocity는 빠른 *Asp. oryzae* U.V.-mutant 569-713은 普通이었다.

6. *Asp. oryzae* UV-mutant 172-722는 食鹽濃度 20%에서도 protease activity가 强했으므로 간장 釀造用으로서 適當하며 *Asp. oryzae* UV-mutant 569-713은 saccharogenic 및 dextrinogenic amylase activity가 强하므로 된장 고추장 製造用으로 適當하다.

(이 報文 要旨는 1963年 11月 10日 韓國微生物學會 年次 學術發表大會에서 報告하였음).

References

1. C. E. Choe., C.H.Kim., P.S. Song & T.Y. Lee 1959. Variation of vitamins in soybean during germination I. Formation of vitamin B₁ & B₂. Bull. Sci. Res. Inst.(Korea) 4, 11
2. Diller, V.M., Alice G. Tytell & H.Kersten 1950. A soft X-ray mutant of *Aspergillus niger*. Plant Physiol. 25, 340
3. D.H.Tae & K.H.Lee 1960. Isolation of vitamin B₁₂-producing microorganisms. Bull. Sci. Res. Inst. (Korea) 5, 61
4. H.S. Kim & S.R.Lee 1959. Biochemical changes during the preparation of soybean-koji and barley-koji. J.Seoul Univ.(Agr.Biol. series) 4, 37
5. H.S. Kim & D.H.Cho 1960. Induction of an exceedingly riboflavin productive *Aspergillus oryzae* mutants by UV-ray irradiation. J. Nat. Acad. of Science(R.O.K) 2, 1
6. H.S. Kim & K.H.LEE 1963. Studies on the 5'-phosphodiesterase produced by microorganisms I. On the 5'-phosphodiesterase of *Pen. sclerotium*. J. Korean Agr. Chem. Soc. 4, 11
7. K.H.Chang., K.H.Lee & S.O. Park 1960. Studies on koji for soy sauce brewing. Bull. Army Res. & Testing Lab. (R.O.K) 1, 40
8. K.H. Lee & K.H.Chang 1964. Studies on koji for optimum conditions of growth and identific-

- ation of *Aspergillus spp.* Korean Jour. Microbiol. **2**, 17
9. Maxwell, M. E 1952. Enzymes of *Aspergillus oryzae* II. The yield of enzymes from mutants produced by U.V.-ray irradiation. Australian Jour. Sci. Res. B **5**, 56
 10. Nobuyoshi, I 1951. Studies on *Aspergillus* III. J. Agr. Chem. Soc. Japan **24**, 283
 11. Oda, M., Kame, S., Takiguchi, H., Nunetani, A. & Yamagata, K 1952. Variation of *Aspergillus oryzae* I. The induced variation. J.Ferment. Technol. (Japan) **30**, 120
 12. Raper, K.B., R.D. Coghill & A. Hollaender 1945. The production and characterization of U.V. induced mutations in *Aspergillus terreus* II. Cultural & morphological characteristics of the mutations. American Jour. Bot. **32**, 226
 13. U.S.P. XV 885 (1955)