

Aspergillus oryzae 의 alpha 및 beta-amylase 활성에 미치는 gibberellin 의 影響에 關한 研究

鄭基澤 · 俞大植

(慶北大學校 · 農科大學 · 農化學科)

Effects of gibberellin on alpha-and beta-amylase activities of *Aspergillus oryzae*

Chung, Ki Taek and Yu, Tae Shick

(Dept. of Agri. Chem., College of Agriculture, Kyung Pook National University)

Abstract

Effects of gibberellin on alpha and beta-amylase activities of *Aspergillus oryzae* var. *microsporus* have been studied.

Results obtained are as follows:

1. The growth of mycelium and dry weight of surface ped was accelerated by 0,0001% gibberellin solution, spores of *Aspergillus oryzae* var. *microsporus*. were preveously soaked for three days.

2. Adding to culture media with 0,0015% gibberellin, alpha-amylase was increased 50% much as beta-Amylase was as much as 50%

緒 論

Gibberellin의 研究는 벼의 키다리病的 研究에서 始作했으며 벼의 키다리病은 키다리病菌, *Gibberellin Fujikuroi* Wollenueber의 寄生에 의해 일어나는 現象이라고 1926年 黑澤이 證明했다. 1934年 藪田 等は 벼의 菌에서 生長을 促進하는 物質을 抽出하고 病原菌의 命名에 따라 1935年 이 物質을 gibberellin이라고 命名했다. 이것이 gibberellin의 最初의 誕生이다. 1938年 生長促進 物質에서 gibberellin a와 gibberellin b를 그리고 1941年 gibberellin c가 分離됐다. 그리고 그後 日本에서 이 3個物質을 Gibberellin A₁, A₂, A₃라 命名하고 1957年 gibberellin A₄가 分離됐다. West and Phinney는 강낭콩의 未熟種子에서 gibberellin A₁과 비슷한 Bean factor I과 신장作用을 나타내는 Bean factor II를 發見하고 MacMillian은 같은 科에 屬하는 *Phaseolus multiflorus*의 種子에서 Gibberellin A₁, A₅를 얻었다. 이中 Gibberellin A₅는 Bean factor II와 同一物質이라는 것이 判明되었으며 Gibberellin의 培養法은 初期에 있어서 表

面培養法을 利用했으나 그후 振蕩培養 및 Tank 培養法이 採用되어 大量培養하기 始했다. Gibberellin의 處理에 의해 生物體內的 成分變化가 일어난다. 이들의 變化는 酵素의 作用에 의한 變化라 보고 研究를 거듭하고 있으며 林武는 벼의 葉鞘中에서 phosphatase, alkari-pyro phosphatase, acetyl-esterase, maltase, β -glycosidase, α -and β -Galactosidase, amylase, urease, dipeptidase, ascorbic-acid, oxidase, catalase 및 그밖의 8種은 一定 生體重量當 酵素의 活性이 減少하고 peroxidase, invertase는 活性이 增加한다고 報告했다. 또한 Munekata and Kato, Pleaning and Johnson 등은 麥芽製造에 gibberellin 添加로 α -amylase, β -amylase, protease 및 catalase의 活性이 增大됨을 報告했다. 이렇게 高等植物의 伸張에 作用할 뿐만 아니라 生物體內的 酵素作用에도 增大乃至 減少하는 作用을 가지고 있다. 그러나 微生物에 關한 研究報告는 稀少한 實情이다. 本人等은 gibberellin이 같은 生命體이며 生物界에 屬하는 微生物에게도 어떤 影響을 미칠것이라고 생각하여 *Aspergillus oryzae*를 選定하여 試驗한 結果를 報告하는 바이다.

材料 및 方法

가) 材料 및 試藥

1. Gibberellin: 協和醱酵工業(日本) 製品有効成分: 3.1(%)를 25 p.p.m., 50 p.p.m., 75 p.p.m., 100 p.p.m., 150 p.p.m. 으로 調製하여 使用했다.

2. 菌株: *Aspergillus oryzae* var. *fumens*, *microsporus* 의 spore 를 取하여 使用前에 28°C Incubator 內에서 gibberellin 各 p.p.m. 溶液에 1 日間, 2 日間, 3 日間, 4 日間, 5 日間, 6 日間, 7 日間 浸漬시켜 使用했으며 蒸溜수에 같은 條件으로 處理시킨 것을 control 로 使用했다.

3. 麴汁: pH=4.5, Bilg. 10° 인 麴汁을 常法에 依해 殺菌後 液體培地로 使用했으며 前記 麴汁에 agar, Fisher Scientific Co. 1.2%를 添加하여 凝固시켜 固體培地로 使用했다.

나) 實驗方法

1. 菌絲體 測定

Petri-dish 42 個를 乾熱殺菌시켜 各各 麴汁 固體培養基 10 cc 를 取하여 여기에 各各 gibberellin p.p.m. 溶液에서 1 日 乃至 7 日間씩 浸漬시킨 各菌의 spore 를 無菌의으로 一白金耳 中央部에 接種시켜 28°C Incubator 內에서 5 日間 培養시키며 培養基의 面이 코르크 菌絲의 發育이 良好하다고 認定되는 方向을 定하여 對角線을 그려놓고 24 時間마다 線上의 diameter 를 測定했으며 蒸溜수에 같은 條件으로 浸漬시켜 各數日間 培養한 것을 control 로 使用했다.

2. 乾物量 測定

250 ml, 三角 flask 42 個를 乾熱殺菌하여 各各 前記 麴汁 100 ml 를 넣고 여기에 各各 gibberellin p.p.m. 溶液에서 1 日 乃至 7 日間 浸漬시킨 菌의 spore 를 無菌의으로 一白金耳 接種시킨 後 28°C Incubator 에서 6 日間 即 培養基 上部에 어느 것이 든 菌苔로 덮일때 까지 培養시켜 三角 flask 의 上面에 形成된 菌苔를 濾過紙에 分離시켜 90~100°C 에서 恒量時까지 乾燥시켜 乾物量을 測定했다.

3. α -amylase 의 力價 測定

a) 酵素液 調製

澱粉含量이 可及的 적은 麥皮, 一定量에 control 區와 菌浸漬은 一定量의 물을, gibberellin 添加區는 gibberellin 各 p.p.m. 溶液을 直接 加하여 混合, 殺菌한 後 放冷하여 無菌의으로 control 區와 gibberellin 添加區는 蒸溜수에 28°C Incubator 內에서 3 日間 浸漬한 供試 菌의 spore 를, 菌浸漬區는 各 gibberellin 75, 100, 150, p.p.m. 溶液에 3 日間

28°C. Incubator 內에서 浸漬한 供試菌의 spore 를 接種하여 28°C 에서 3 日間 製麴하여 製麴 1g 에 1%—食鹽水 10 ml 를 加하여 37°C water-bath 上에서 2 時間 靜置後 濾過하여 이 濾液을 酵素原液으로 하였다. 酵素原液에 N/10-NaOH 를 滴加하여 pH, 7.0 로 固定시켜 55°C 15 分間 處理後 冷却하여 N/50-HCl 로 酵素原液의 pH 로 還元시켜 β -amylase 와 maltase 를 完全히 不活性으로 만들어 供試 酵素液으로 했다.

b) 試驗法

2% soluble starch solution 50 cc 에 N/10-acetic buffer solution (pH=5.0) 25 cc 및 酵素原液으로 換算한 供試酵素液 5 ml 를 1000 ml massflask 에 取하여 蒸溜수로 100 ml 에 fill-up 시켜 toluene 1 ml 를 加하여 50°C water-bath 上에 靜置하여 5 分마다 40 分까지 5 ml 의 反應液을 取하여 willstätter and Schudel method에 依해 N/10 I₂ solution 과 N/10-NaOH 를 加하여 12~15 分間 靜置後 Conc.-H₂SO₄ 로 酸性으로 하고, N/10-Na₂S₂O₃ 로 靑의 I₂ 를 滴定하여 I₂-solution 의 消費 ml 數로 表示했다.

4. β -amylase 의 力價 測定

a) 酵素液의 調製

α -amylase 測定時의 酵素原液에 N/10-HCl 를 滴加하여 pH=3.5 로 固定시켜 50°C water bath 上에서 15 分間 處理한 後 N/10-NaOH 로 原 pH 로 還元시켜 α -amylase 와 maltase 를 完全 不活性으로 만들어 供試酵素液으로 하였다

b) 試驗法

2% soluble starch solution 50 ml 에 N/10 acetic-buffer solution (pH=5.0) 25 ml 및 酵素原液으로 換算한 供試 酵素液 5 ml 를 100 ml-messflask 에 取하여 蒸溜수로 100 ml 에 fill-up 시켜 toluene 1 ml 를 加하여 5 分마다 40 分까지 5 ml 의 反應液을 取하여 Willstätter and Schudel method에 依해 前記와 같이 I₂-solution 의 ml 數로 表示했다.

實驗結果 및 考察

實驗結果는 Table 1, 2, 3, 4 와 같다.

Table 1. Growth of Mycelium in Koji-agar media, which have been soaked in gibberellin already.

(A)

(F=Full)

Conc. of gibberallin	days	1	2	3	4	5
Control		(mm) 9×8	(mm) 24×20	(mm) 37×34	(mm) 48×46	(mm) 52×50
25 p.p.m		9×8	22×19	39×38	48×45	53×50
50 p.p.m		10×9	25×23	39×38	55×52	65×64
75 p.p.m		12×7	29×26	42×40	60×54	68×65
100 p.p.m		12×11	29×28	48×45	70×68	F
150 p.p.m		10×10	28×27	45×43	69×68	F

※ Fungal spores are soaked for one day.

(B)

Conc. of gibb.	days	1	2	3	4	5
Control		(mm) 10×11	(mm) 18×20	(mm) 37×35	(mm) 40×40	(mm) 47×43
25 p.p.m		12×11	23×22	39×37	40×38	52×47
50 p.p.m		11×10	26×24	39×34	44×40	58×45
75 p.p.m		12×12	28×26	46×36	46×38	70×62
100 p.p.m		12×10	28×27	48×48	69×62	F
150 p.p.m		10×10	25×23	43×43	66×61	F

※ Fungal spores are soaked for two days.

(C)

Conc. of gibb.	days	1	2	3	4	5
Control		(mm) 12×11	(mm) 27×26	(mm) 39×27	(mm) 58×54	(mm) 68×66
25 p.p.m		12×11	30×28	48×48	68×66	F
50 p.p.m		13×12	34×32	51×48	68×67	F
75 p.p.m		13×12	36×33	48×45	68×66	F
100 p.p.m		13×12	35×31	48×46	70×72	F
150 p.p.m		12×11	35×31	47×44	68×62	F

※ Spores are soaked for three days.

(D)

Conc. of gibb.	days	1	2	3	4	5
Control		(mm) 11×10	(mm) 20×19	(mm) 40×38	(mm) 48×46	(mm) 66×63
25 p.p.m		12×11	25×23	40×39	49×47	67×64
50 p.p.m		11×10	25×22	36×34	56×52	69×67
75 p.p.m		13×11	27×27	42×40	68×60	F
100 p.p.m		12×12	26×24	45×44	67×65	F
150 p.p.m		13×12	27×25	46×39	62×60	F

※ Spores are soaked for four days.

(E)

Conc. of gibb. \ days	1	2	3	4	5
Control	(mm) 8×7	(mm) 28×25	(mm) 46×43	(mm) 66×63	(mm) 77×71
25 p.p.m	8×8	28×26	38×36	54×53	68×66
50 p.p.m	9×8	29×28	48×48	69×68	F
75 p.p.m	9×9	52×29	49×48	68×67	F
100 p.p.m	10×9	29×28	50×49	71×70	F
150 p.p.m	9×8	27×26	44×43	60×59	76×68

※ Spores are soaked for five days.

(F)

Conc. of gibb. \ days	1	2	3	4	5
Control	(mm) 8×7	(mm) 21×18	(mm) 34×31	(mm) 47×39	(mm) 68×64
25 p.p.m	8×6	16×15	21×19	33×27	58×54
50 p.p.m	9×8	17×19	30×28	48×48	68×57
75 p.p.m	10×9	26×24	46×43	67×65	F
100 p.p.m	11×10	26×26	46×46	62×60	F
150 p.p.m	9×7	25×23	35×31	45×41	66×65

Spores are soaked for six days.

(G)

Conc. of gibb. \ days	1	2	3	4	5
Control	(mm) 8×7	(mm) 21×20	(mm) 28×26	(mm) 46×38	(mm) 56×54
25 p.p.m	8×6	19×19	28×22	30×28	46×35
50 p.p.m	9×8	22×19	34×29	49×38	56×48
75 p.p.m	10×9	24×28	37×35	58×50	78×68
100 p.p.m	10×10	27×26	40×38	46×45	67×58
150 p.p.m	8×7	26×25	40×38	48×45	56×52

※ Spores are soaked for seven days.

Table 2. Dry weight of Mycelium cultured in Koji-media containing gibberellin.

Conc. of gibb. \ days	1	2	3	4	5	6	7
Control	(mg) 851.0	(mg) 903.1	(mg) 1196.0	(mg) 1102.2	(mg) 931.0	(mg) 798.0	(mg) 748.5
25 p.p.m	853.0	1002.6	1147.0	1124.0	1049.0	781.7	774.5
50 p.p.m	921.0	968.1	1193.0	1231.5	993.0	756.8	794.0
75 p.p.m	957.0	1018.7	1326.0	1346.6	1047.0	858.3	794.3
100 p.p.m	938.0	947.2	1344.0	1356.5	1101.0	881.8	893.3
150 p.p.m	928.0	955.5	1332.0	1275.5	942.0	889.2	799.6

菌絲體의 伸張을 보면 1日 浸漬菌에서는 初期에 있어서 75 p.p.m 區와 100 p.p.m 區는 Control 區와 他 p.p.m 區보다 優勢함을 보였으나 5日間 培養했을 時 100 및 150 p.p.m 에 浸漬한 菌이 가장 優勢

함을 나타냈다. 即 初期에 Control 區보다 Gibberellin 浸漬區가 生育이 旺盛함을 나타내며 또한 生育中에도 Control 區보다 Gibberellin 浸漬區는 계속 生育이 旺盛함을 나타낸다. 이런 現象은 Gibberellin 이

spore의 發芽에 영향을 주는 것 같으며 生育中에도 영향을 미치는 것 같다. 또한 2日 浸漬菌 역시 같은 效果를 보였다. 3日 浸漬菌은 5日間 培養時 control 區에 비해 gibberellin 浸漬區는 모두 優勢함을 보였다. 이런 現象으로 미루어 gibberellin 역시 微生物에도 고등식물과 같은 生長促進 作用을 한다는 것을 나타내며 특히 微生物의 spore는 3日間 浸漬함이 가장 良好하다는 結果를 얻었다.

4日 浸漬菌은 75, 100, 105 p.p.m 이 control 25, 50, p.p.m 區보다 旺盛하며 25, 50 p.p.m 區는 高濃도區 보다 不良 했으나 역시 control 區보다 良好하다. 5日 浸漬菌에 있어서는 低濃도와 高濃도

는 75, 100 p.p.m 보다 伸長效果가 不良 했으며 6日 浸漬菌 역시 低濃度 및 高濃度는 control 區와 同一하게 좋은 效果를 나타내지 못했으며 7日 浸漬菌 부터는 전연 他日數 浸漬菌 보다 나쁜 效果를 나타냈으므로 6日 이상 gibberellin 溶液에 菌株를 浸漬하는 것은 不良하다는 結論을 얻었으며 菌苔의 乾物量 역시 3日 浸漬菌이 가장 良好하며 그중 75, 100 및 150 p.p.m 에 浸漬한 菌이 가장 良好하다. control 區보다 약 20%上昇을 보여주고 3日間 以後 浸漬함은 前記 實驗과 같은 結果로 차차 日數에 따라 비례하여 不良함을 나타내고 있다.

Table 3. α -Amylase activities of *Asp. oryzae* as influenced by gibberellin.

(A)

Treatment	Conc.	Time	5	10	15	20	25	30	35	40
			minutes.	(ml)	(ml)	(ml)	(ml)	(ml)	(ml)	(ml)
Control	0		2.2	2.3	2.4	2.5	2.7	2.8	2.8	2.8
Soaking before culture.	75 p.p.m		2.2	2.3	2.4	2.6	3.1	3.2	3.2	3.2
	100 p.p.m		2.2	2.4	2.6	3.0	3.2	3.4	3.4	3.4
	150 p.p.m		2.5	2.7	2.9	3.1	3.3	3.5	3.5	3.5
Addition of gibb. into media	75 p.p.m		2.6	2.7	3.0	3.4	3.8	4.1	4.1	4.1
	100 p.p.m		2.8	2.8	3.3	3.8	4.4	4.7	4.7	4.7
	150 p.p.m		2.6	3.1	3.6	4.0	4.6	5.4	5.4	5.4

※ Gibb. = Gibberellin

※ Activity was estimated by the amount of consuming iodine.

(B)

Treatment	Conc.	Activity	pH	Activity	Percent(%)
				(ml)	
Control	—		5.6	2.8	—
Soaking before culture.	75 p.p.m		5.7	3.2	+ 14%
	100 p.p.m		5.8	3.4	+ 21%
	150 p.p.m		5.8	3.5	+ 25%
Addition of gibb.	75 p.p.m		6.2	4.1	+ 46%
	100 p.p.m		6.2	4.7	+ 67%
	150 p.p.m		6.2	5.4	+ 92%

前實驗 結果 微生物에 있어서 Gibberellin 은 菌絲體의 伸長效果를 나타내며 菌苔의 乾物量 역시 약 28% 增大시킨을 알았다. α -amylase의 活性은 control 區 보다 菌浸漬區는 평균 28% 上昇하며 150 p.p.m 浸漬菌은 control 區 보다 25%의 上昇

率은 보여 주었으나 gibberellin 添加區는 菌浸漬區보다 약 70%라는 높은 上昇率을 나타냈다. β -amylase 역시 α -amylase와 같은 酵素의 活性을 나타내었다.

即 gibberellin 150 p.p.m 添加區는 control 區보

Table 4. β -Amylase activities of *Asp. oryzae* as influenced by gibberellin.

(A)

Treatment	Conc.	Time	5	10	15	20	25	30	35	40
			minutes	(ml)	(ml)	(ml)	(ml)	(ml)	(ml)	(ml)
Control	—		2.1	2.2	2.4	2.6	2.8	3.0	3.0	3.0
Soaking before culture.	75 p.p.m		2.5	2.7	2.8	3.0	3.1	3.2	3.2	3.2
	100 p.p.m		2.6	2.7	2.9	3.0	3.1	3.3	3.3	3.2
	150 p.p.m		2.5	2.8	3.0	3.1	3.3	3.5	3.5	3.5
Addition of gibb. into media.	75 p.p.m		2.6	2.7	2.9	3.2	3.4	3.7	3.7	3.7
	100 p.p.m		2.8	2.9	3.0	3.2	3.6	4.0	4.0	4.0
	150 p.p.m		2.9	3.0	3.3	3.6	4.1	4.5	4.5	4.5

(B)

Treatment	Conc.	Activity	pH	activity	percent
Soaking before culture	75 p.p.m		5.7	3.2	+ 6%
	100 p.p.m		5.8	3.3	+ 10%
	150 p.p.m		5.8	3.4	+ 13%
Addition of gibb. into media.	75 p.p.m		6.2	3.7	+ 23%
	100 p.p.m		6.2	4.0	+ 33%
	150 p.p.m		6.2	4.5	+ 50%

다 50%의 上昇率을 보여 주었다. 또한 菌苔의 乾物量은 약 20% 上昇함에 비해 α -amylase 는 92%, β -amylase 는 50% 상승함에 비추어 gibberellin 이 微生物의 酵素活性에 영향을 직접적으로 줌을 알았다. 本實驗에 있어서 酵素의 活性은 control 區보다 gibberellin 處理區가 良好하다. gibberellin 處理方法은 浸漬法보다 培養基內에 직접 添加하는 添加法이 良好함을 알았다.

結 論

Aspergillus oryzae var. *microsporus* 에 대한 gibberellin 영향 즉 生育과 酵素의 活性에 대한 영향을 알기 위해 菌絲體의 伸長과 乾物量을 測定한 結

果 *Aspergillus Oryzae* var. *microsporus* 의 spore 를 3日間 100 p.p.m 에 浸漬한 菌이 가장 良好했으며 菌苔의 乾物量 역시 伸長面과 같은 100 p.p.m 溶液에 3日間 浸漬한 菌이 가장 重量이 높았다. 이것으로 보아 gibberellin 의 영향은 spore 에 處理할時 3日間 100 p.p.m 에 浸漬함이 가장 良好하다. 또한 gibberellin 이 微生物의 酵素活性에 미치는 영향은 培養基內에 직접 gibberellin 의 濃度가 150 p.p.m 되게 添加함으로써, α -amylase 에 있어서는 92%, β -amylase 에 있어서는 50% 上昇함을 보았다. 고로 gibberellin 은 微生物의 伸長 및 乾物量 뿐만 아니라 酵素活性 역시 增大시킨다.

摘 要

1. *Aspergillus oryzae* var. *microsporus* 의 spore 를 100 p.p.m 의 gibberellin 溶液에 3日間 浸漬함이 伸長度에 있어서 가장 良好하다.
2. 菌苔의 乾物量 역시 伸長度와 같은 結果로 100 p.p.m 용액에 3日間 浸漬함이 가장 良好하다.
3. 培養基內의 gibberellin 濃度가 150 p.p.m 되게 添加하므로 α -amylase 는 92%, β -amylase 는 50% 上昇함을 보였다.

Reference

- 1) 黒澤 1926; Experimental studies on the secretion of *Fusarium heterosporum* on rice plants. Source Book on Gibberellin 210.
- 2) 藪田 1934; Biochemistry of the Bakanae fungus of rice, Part I. Fusaric-acid, A new Product of the Bakanae fungus, Source Book on Gibberellin 588.
- 3) 藪田 1935; Biochemistry of the Bakanae fungus of rice. Part I. 農業斗 園藝 10(I)
- 4) West and Phinney Properties of Gibberellin-like factors from extracts of higher plants. *ibid.* 31 Sup. 20
- 5) West and Phinney 1957; Purification and properties of gibberellin-like substances from flowering plants. *ibid.* 32 Sup. 32
- 6) Mac Millian, et al. 1958. The occurrence of gibberellin A. in higher plants; Isolation from seed of runner ban. 45. p. 46
- 7) Mac Millian, et al. 1959. A new plant growth-promoting acid-gibberellin A₅ from the seed of *Phaseolus multiflorus*. Proc. Chem. Soc, (London) p. 325.
- 8) Mac Millian, et. al. 1960; Plant Hormones I. Isolation of gibberellin A₁ and gibberellin A₅ from *Phaseolus multiflorus*. *Tetrahedron* 11 (1, 2)
- 9) 林武 1956. Bulletin of the Agr. Chemical Society of Japan 20.
- 10) Munekata, et al. 1957; Biochemical studies on Bakanae fungus. part 40. Application of gibberellin to malting industry.
- 11) Flemming and Johnson 1966; Effect of potassium gibberellate on the production of alpha-and beta-amylase and protease activities during the malting of wheat.
- 12) 龜山 1958; 化學分析 試薬の 調製法 104, 119.
- 13) 川口 1950; 農藝化學實驗書 下卷 824.