J. Korean Agric. Chem. Soc.
한국농화학회지 31(4), 346—350 (1988)

돌연변이에 의한 한국간장균의 유전적 육종

김 종 규·김 상 달
영남대학교 농축산대학 응용미생물학과

Genetic Breeding of Korean Soy Sauce-Fermenting *Bacillus* by UV Mutation

Jong-Kyu Kim and Sang-Dal Kim
Department of Applied Microbiology, College of Agriculture and Animal Science, Yeungnam University, Kyongsan, Korea

Abstract

A mutant for Korean soy sauce which will improve the productivity of amylase and protease was obtained through the second mutation of the original strain using UV radiation. The original strain was the NTG treated mutant of the *Bacillus* sp. producing peculiar flavour which had been isolated from the Korean soy sauce. The mutant could improve the productivity of amylase by 58% and that of protease by 41%. The enzyme produced in this way were similar in enzymatic properties such as optimal reaction pH and temperature. The reaction was not deterred by highly densed salt solution of 5 M and the enzyme productivity was not influenced in the concentration of up to 2 M.

서 론

한국간장은 그 독특한 맛과 향기 때문에 고래로부터 우리나라에서 가장 널리 이용되고 있는 조미식품이다.[1] 한국간장에 관한 연구는 많이 보고되어 있으나[2,3] 발효에 관계하는 미생물과 그 역할에 관한 연구는[4] 별로 많지 않다. 간장이 발효될 때는 *Bacillus, Lactobacillus, Streptococcacae* 등의 세균과 *Torulopsis* 등의 효모가 관계한다는 보고가 있으며 특히 간장의 독특한 향기는 *Bacillus* sp.가 관계한다고 하였다.[4,5] 한국간장의 독특한 향기를 생산하는 *Bacillus* 속의 한 균주를 분리한 후 이 균주의 amylase, protease 등 발효기간 단축에 기여할 수 있는 효소 생성을 증강시키기 위해 NTG에 의해 효소증강균주를 얻었는데[6] 이 균주를 모균주로 하여 자외선에 의해 재차 변이시켜 보다 강력한 효소생성력 증강균주를 얻고, 동시에 품질열화에 원인이 되는 deaminase, decarboxylase 생성력이 저하되는 우량변이주를 개발하기 위해 본 실험을 시도하였다.

1988년 8월 5일 수리
Corresponding Author: J.K. Kim

재료 및 방법

1. 사용 균주

본 실험의 돌연변이에 사용한 균주는 한국 재래식간장으로부터 그 고유한 특향(特香)을 생산하는 한 주의 *Bacillus* sp. (SSA 3)를 분리한 후 N-methyl-N′-nitro-N-nitroguanidine (NTG) 처리로 얻은 변이주(SSA 3-M 1)를 모균주로 사용하였다.

2. 변이주의 선발

우량변이주를 선발하기 위해 18시간 정도 배양된 모균주를 starch, casein 등 각 기질을 함유한 세균영양배지 상에 균질하게 도말한 후 10W UV lamp를 30cm 거리에서 비추어 mutation 시켜 배

양하였다.

이때 amylase 생성력 증강변이주를 선발하기 위해서는 1% soluble starch를 첨가한 세균영양배지를, protease 증강변이주는 1% casein 첨가 배지를 사용하였으며 그 증강 정도를 알기 위해서 plate 상의 colony 주위에 나타나는 기질분해환 (halo zone)의 크기를 전보의 방법[6]에 따라 측정하였다. Agar plate 상에서 선발된 clear halo zone이 큰 변이주를 대상으로 그 효소생성력을 각 효소활성도 측정법에 의해 확인하였다.

3. 효소활성도 측정

기 등의 세균영양배지를 이용하여[1] 35°C에서 2일간 120rpm으로 진탕배양시킨 후 그 원침상등액을 조효소로 사용하였다. Amylase 활성도는 starch를 기질로 하여 di-nitro-salicylic acid(DNS) 발색법[7]으로, protease는 casein을 기질로 235nm에서 측정하는 Hiroshi 방법으로,[8] deaminase는 asparagine을 기질로 하여 Nessler 발색법으로[9] 측정하였다. 또한 decarboxylase는 L-cystein sulfinate를 기질로 하는 Tate 등의 방법으로[10] 측정하였으며 활성도는 glucose, casamino acid, ammonium sulfate 등을 이용하여 만든 standard curve로 환산하여 분당 생성된 환원력, amino acid, ammonia를 1 unit로 나타내었다.

결과 및 고찰

1. 우량변이주의 선발

한국재래식간장의 특항생성균주인 *Bacillus* sp.의 변이주인 SSA3-M1 균주를 모균주로 해서 UV mutation에 의해 amylase, protease 등 효소생성력이 증강된 변이주를 25주 선발했으며 이들 균주 중 amylase, protease 동시증강변이주를 Table 1과 같이 3균주를 선발할 수 있었다. 특히 SSA3-2M1 균주의 경우 amylase는 58%, protease는 41% 정도 증강시킬 수 있는 변이주이었다.

간장의 발효기간을 단축할 수 있는 이들 효소생성력 증강균주 등에서 암모니아취로 품질저하의 원인이 되는 deaminase와 amine 생성 원인이 되는 decarboxylase의 변화를 조사해본 결과 Table 2와 같이 대상균주 모두 별다른 증강이 없었다. 이 결과로 미루어보아 amylase나 protease 생성력을 동시에 증강시킴으로서 장기간이 소요되는 간장 발효기간을 단축시킬 수 있는 우량균주를 개발했다고 생각된다.

Table 1. Enzyme production of amylase and protease of *Bacillus* sp. isolated from soy sauce and its mutants

Mutants	amylase		protease	
	activity	increase	activity	increase
	(U)	(%)	(U)	(%)
SSA3-M1	18.9	100	10.5	100
SSA3-2M1	29.9	158.2	14.8	140.9
SSA3-2M2	21.7	114.8	11.2	106.7
SSA3-2M3	20.1	106.3	13.5	128.7

Table 2. Enzyme production of deaminase and decarboxylase of *Bacillus* sp. isolated from Soy sauce and its mutants

Mutants	deaminase		decarboxylase	
	activity	decrease	activity	decrease
	(U)	(%)	(U)	(%)
SSA3-M1	4.6	100	0.05*	100
SSA3-2M1	5.0	108.6	0.04	80
SSA3-2M2	4.8	104.3		
SSA3-2M3	4.5	97.8		

* nearly no activity

Table 3. Optimal reaction condition of the enzyme produced by *Bacillus* sp. (SSA3-M1) and its mutant

opt. cond. / mutant	amylase		protease		deaminase	
	pH	temp.	pH	temp.	pH	temp.
SSA3-M1	7.5	50	10.0	50	8.5	45
SSA3-2M1	7.5	50	10.2	50	8.5	45

2. 선발균주의 효소적 특성

우량균주로 선발된 변이주가 생산하는 각 효소들의 최적작용 PH, 최적작용온도등의 효소학적 성질을 비교 조사함으로써 변이주가 생산하는 효소 특성의 변화여부를 알아보았다. 그 결과 Table 3과 같이 protease의 최적 PH가 약간 상이한 것을 제외하고는 모균주나 변이주들이 생산하는 효소의 특성에 아무런 변화가 없었다. 또한 생산된 단백의 량과 각 효소활성도를 측정, 비교한 각 효소의 specific activity를 조사해보면 거의 같은 비활성도를 나타내므로 변이주의 활성도 증가는 효소단백의 활성기능이나 효소분자 그 자체에 변화가 있었다기 보다는 효소생산에 관계하는 생산조절 유

전자에 어떤 변화가 일어난것이 아닌가 추측된다.

3. 효소활성도에 미치는 NaCl의 영향

고염농도에서 발효시키는 실제 간장발효의 특성을 보면 상당히 높은 농도의 식염용액에서도 효소의 활성이 유지되어야 한다. 따라서 변이주가 생산하는 효소들의 활성이 반응액의 식염농도 5M까지 증가시킴에 따라 어떻게 변화되는가를 조사해 보았다.

그 결과 amylase 활성도의 경우는 Fig. 1과 같이 모균주의 효소는 식염 3M 농도에서부터 약간 저하되었으나 변이주 SSA 3-2 M 1 균주의 그것은 5M까지도 그 활성도가 그대로 유지되었다. 그러나 protease의 경우는 Fig. 2와 같이 모균주의 효소는 비교적 안정하였으나 변이주의 그것은 2M 이상에서 약간 저하되는 경향이었으며 4M 이상에서는 10% 정도 감소되었다. Deaminase의 경우는 Fig. 3과 같이 모균주나 변이주 공히 식염농도에 관계없이 비슷한 활성도를 나타내었다. 이로 미루어보아 변이주의 효소는 고염의 간장 발효시에도 그 효소활성도가 크게 떨어지지 않는 우량발효균주라고 생각되어진다.

4. NaCl이 효소 생성에 미치는 영향

모균주나 선발된 변이주(SSA 3-2M 1)가 고농도의 NaCl을 함유한 배지에서 각 효소의 생산능이 어떻게 영향받겠는가를 조사하기 위해 NaCl을 제거한 세균영양배지에 NaCl을 최종농도 2.5M까지 되게 첨가하고 30°C에서 2일간 진탕배양한 후 그 효소활성도를 측정하였다.

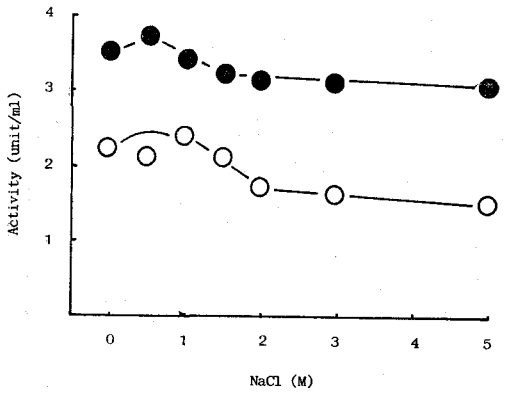

Fig. 1. Effect of NaCl on the amylase activity of the *Bacillus* sp. isolated from soy sauce and its mutant ○ SSA 3-M1. ● SSA 3-2 M1

그 결과 Fig. 4와 같이 amylase의 경우는 식염농도 증가에 관계없이 큰 변화가 없었고 protease의 경우는 0.5M~1.0M의 저농도에서는 약간 증가하였으나 고농도에서는 특히 모균주는 약간 감소되는 경향이었다. Deaminase는 식염농도가 증가할수록 모균주나 변이주 공히 서서히 감소됨을 알았다. 이 결과는 Hiroshi[11]나 Masahiro[12]가 보고한 호염세균의 amylase나 protease의 생산성이 식염농도가 1M 이상 증가하면 저하된다는 결과와 비교해 본다면 더 높은 식염농도에서도 그 효소생산성이 변함없는 간장발효를 위해서는 아주 유리한 균주라고 추측된다.

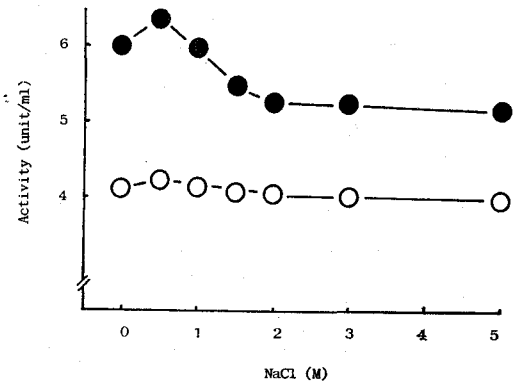

Fig 2. Effect of NaCl on the protease activity of the *Bacillus* sp. isolated from soy sauce and its mutant ○ SSA 3-M1, ● SSA 3-2 M1

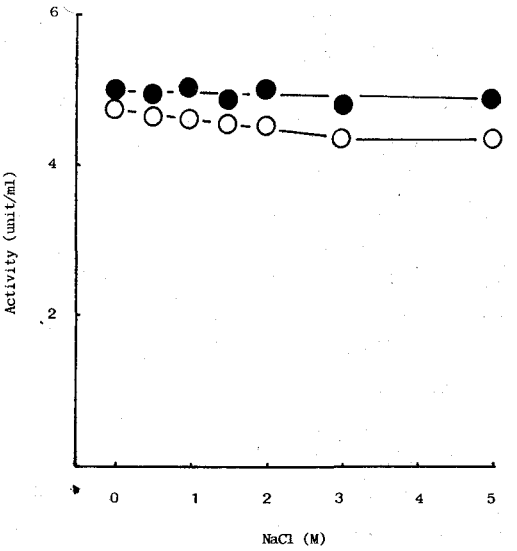

Fig. 3. Effect of NaCl on the deaminase activity of the *Bacillus* sp. isolated from soy sauce and its mutant ○ SSA 3-M1, ● SSA 3-2 M1

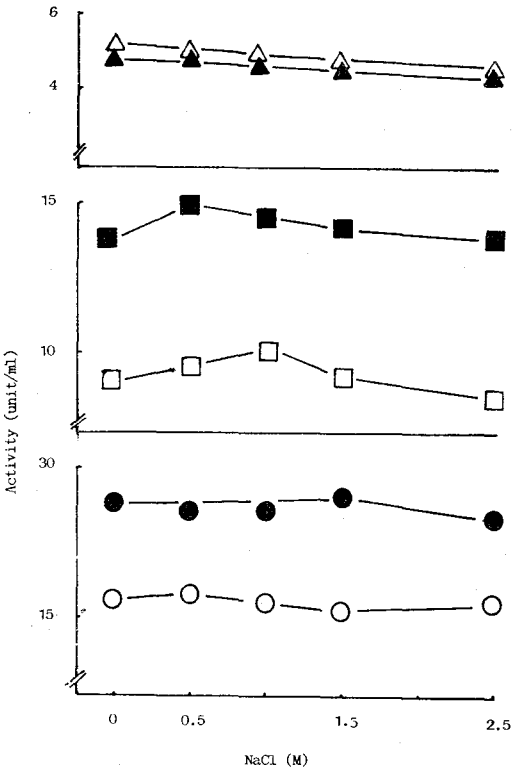

Fig. 4. Effect of NaCl on the enzyme production ○□△ SSA3-M1, ●■▲ SSA3-2M1, ○ Amylase, □ Protease, △ Deaminase

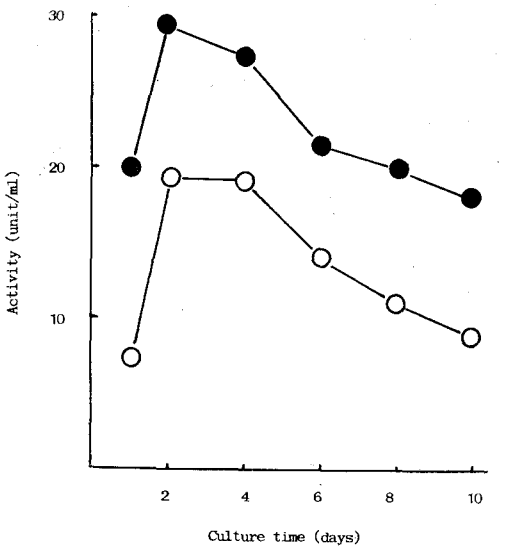

Fig. 5. Amylase production of the *Bacillus* sp. isolated from soy sauce and its mutant
○ SSA 3-M1, ● SSA 3-2 M1

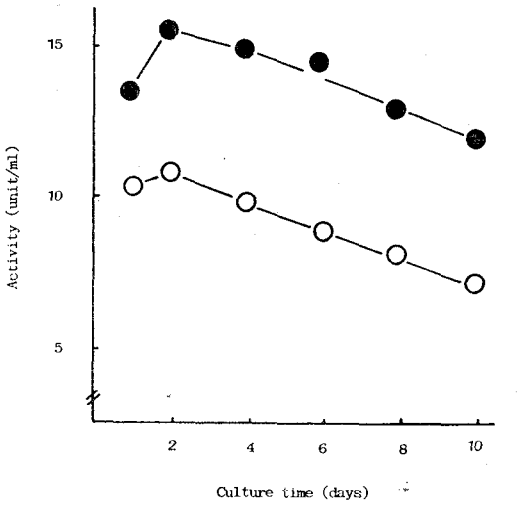

Fig. 6. Protease production of the *Bacillus* sp. isolated from soy sauce and its mutant
○ SSA 3-M1, ● SSA 3-2 M1

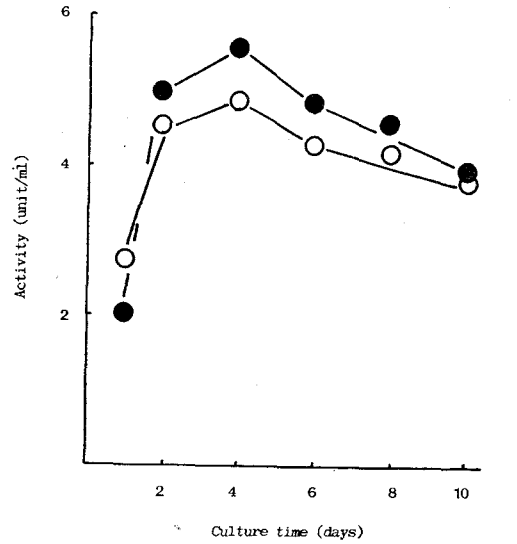

Fig. 7. Deaminase production of the *Bacillus* sp. isolated from soy sauce and its mutant
○ SSA 3-M1, ● SSA 3-2 M1

5. 배양시간별 효소생산성

모균주와 그 변이주가 배양 일수에 따라 각 효소들의 생산양상이 어떻게 변화하는가를 조사함으로써 한국장류 발효의 특징인 장기간의 발효시간을 단축시킬 수 있는지 그 가능성을 검토해 보았다. 이때 배양조건은 30°C에서 120rpm으로 진탕배양하였다.

그 결과 먼저 amylase의 생산성은 Fig. 5와 같이 배양 2~4일째 가장 높았으며 배양일수가 경과할수록 감소되었으나 10일이 경과해도 최고치의 70%정도의 활성도가 잔존했다. Protease의 경우도 Fig. 6과 같이 2일간 배양으로 최고치에 달하며 10일 후에도 81%의 활성도가 잔존하였으며 deaminase의 경우도 Fig. 7과 같이 amylase와 유사한 양상이었다. 이로 미루어보아 배양개시후 빠른 시간내 효소생산성이 최고치에 달하고, 그 후 서서히 감소되어 장기간 동안에 그 잔존활성도가 남아있으므로 한국장류발효에는 아주 이상적인 균주이고 발효 10일이 경과해야 최고치에 달한다는 이 등[13]의 보고와 비교해 볼 때 그 발효시간도 단축시킬 가능성이 있다고 본다.

초 록

한국재래식간장에서 분리한 특향생성 *Bacillus* sp.의 NTG 변이주를 모균주로하여 자외선에 의해 2차 돌연변이시킴으로써 amylase, protease의 생산성이 증강된 우량간장 발효균주를 개발할 수 있었다. 변이주는 모균주에 비해 amylase의 경우 58%, protease의 경우 41% 정도 증강시킬 수 있었으며 그 생성효소들은 최적반응 pH, 최적반응온도 등 효소학적 특성이 거의 유사하였다. 5M의 고농도 식염용액에서도 그 작용이 크게 저하되지 않았으며 효소생산농도 2M 정도까지는 별다른 영향을 받지 않았다.

사 의

본 연구는 한국과학재단의 연구비 지원에 의해 수행되었음을 감사드리며 신동주 실원의 노고를 고맙게 생각합니다.

참 고 문 헌

1. 김종규 : 한국농화학회 영남지부 심포지움, 21 (1988)
2. 이태녕 : 한국식품문헌총람(1917~1968), 한국과학기술연구소, 459(1971)
3. 정동효 : 한국식품문헌총람 (1977~1981), 225 (1984)
4. 권오진, 김종규, 정영건 : 한국농화학회지, 29 : 422(1986)
5. 김종규, 정승용, 송재영, 장진규 : 영남대학교 자원문제연구소 논문집, 5 : 83(1986)
6. 기우경, 김종규, 강동학, 조용운 : 한국산업미생물학회지, 15 : 21(1987)
7. 도재호, 김상달 : 한국산업미생물학회지, 13 : 173(1985)
8. Hiroshi Uehera, Yuko Yoneda, Kunio Yamane and Bunji Maruo: J. Bacteriol., 119 : 82 (1974)
9. John C. Wriston: Method in Enzymology AP., 17 : 732(1970)
10. Suresh S. Tate, Abraham Novogrodsky, Kenji Soda, Edith Willson Mills and Alton Meister: Method in Enzymology AP., 17 : 681(1970)
11. Hiroshi Onishi: J. Bacteriol, 109 : 570(1972)
12. Masahiro Kamekura and Hiroshi Onishi: Appl. Microbiol., 27 : 809(1974)
13. 이갑랑, 김동률 : 한국식품과학회지, 17 : 146 (1985)