J. Korean Agric. Chem. Soc.
한국농화학회지 32(2), 148-153(1989)

돌연변이에 의한 한국된장균의 유전적 육종

김상달 · 김종규
영남대학교 농축산대학 응용미생물학과

Genetic Breeding of Korean Soybean Paste-Fermenting *Bacillus* sp. by UV Mutation

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

Abstract

Several mutants for rapid fermentation of Korean soybean paste 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 soybean paste. A mutant (SSA3-2M1) could improve the productivity of amylase by 4.4 times and that of protease by 3.7 times. Other one (SSA3-2M2) depressed deaminase productivity by 90% in spite of improvement of amylase and protease. The enzymes produced by strains were similar in enzymatic properties such as optimal reaction pH and temperature. The reaction and productivity of enzymes were not influenced in the high concentration of salt.

서 론

한국된장은 간장과 더불어 우리나라 고유의 조미식품으로써 널리 애용되고 있는데 단백질을 비롯하여 아미노산 유기산 비타민 등 각종 영양물질과 우리 기호에 맞는 맛과 향기성분이 풍부하게 함유되어 있는 전통조미식품이다. 그럼에도 불구하고 우리 식생활의 큰 비중을 차지하고 있는 민간의 재래식 된장발효에는 *Aspergillus, Penicillium, Mucor* 등 사상균과 *Saccharomyces* 등 효모, *Bacillus* 등 세균이 다양하고 복잡하게 관계되어 있고 그 발효기간도 수개월이라는 장기간이 요하는[1] 큰 불편이 있으므로 단시간내 고정된 방법으로 발효시킬 수 있는 속양법을 모색해 오고 있다[2,3].

Bacillus subtilis 등의 단일균으로 한국간장이나 된장을 발효시키고자 한 연구들이 수편 보고되어 있으며[4~6] 송 등은 한국재래식된장에서 그 특유의 향기를 생성하는 *Bacillus* 속의 한 균주를 분리하여[7] 한국된장의 인공발효에 이용할려고 하였다. 기 등은 상기 송 등이 분리한 향기우수균주를 NTG로 변이시켜 amylase와 protease가 약간 증강된 균주를 선발하였는데[8] 본 연구에서는 자외선을 이용하여 효소생성력이 더욱 증강되고 암모니아취의 원인이 되는 deaminase 생산을 저하하는 우량변이주를 개발하고자 시도하였다.

1989년 2월 15일 수리
Corresponding author: S.D. Kim

재료 및 방법

사용 균주

본 실험에 사용한 균주는 한국재래식된장으로부

터 그 특유한 향기를 생산하는 일주의 *Bacillus* sp.를 분리한 후 N-methyl-N′-nitro-N-nitrosoguanidine(NTG) 처리로 얻은 변이주(SPB1-M1)를 모균주로 사용하였다[8].

변이주의 선발

모균주의 1 overnight 배양액을 각 농도로 희석하여 기질을 포함시킨 세균영양배지[8]의 평판 위에 도말한 후 10W UV lamp를 30cm 거리에서 시간별로 비추어 *mutation* 시켰다. 이 때 amylase 증강변이주를 선발하기 위해서는 1% soluble starch를 첨가한 세균영양배지 plate를 사용하였으며, protease 증강변이주는 1% casein 첨가배지를 사용하였는데 그 plate의 colony 주위에 나타나는 분해환(halo *zone*)의 크기를 기 등[8]의 방법으로 측정하여 각 효소생산 증강균주로 선발하였다.

Agar plate에서 얻은 증강균주 즉 clear halo zone이 큰 균주를 대상으로 그 효소생성력을 각종 효소활성도 측정방법에 의해 확인하였다.

효소활성도의 측정

세균영양배지를 이용하여 35°C에서 2일간 120 rpm으로 진탕배양시킨 후 원심분리하여 그 상등액을 조효소로 사용하였다. Amylase 활성도는 starch를 기질로 하여 dinitro-salicylic acid(DNS) 발색법[9]으로 protease는 casein을 기질로하여 235 nm에서 측정하는 Hiroshi등[10]의 방법으로, deaminase는 asparagine을 기질로 하여 Nessler발색법[11]으로 측정하였다. 한편 decarboxylase는 L-cystein sulfinate를 기질로 하는 Tate 등[12]의 방법으로 측정하였다. 활성도는 glucose, casamino acid, ammonium sulfate 등을 이용하여 만든 standard curve로 환산하여 unit로 나타내었다.

결과 및 고찰

우량균주의 선발

한국재래식된장 유래의 *Bacillus* 균주인 SPB1-M1 균주를 모균주로 하여 UV돌연변이에 의해 얻은 20여 균주의 효소증강균주 중에서 amylase와 protease 동시 증강균주 4균주를 Table 1과 같이 선발할 수 있었다. 이들 중에서도 특히 SPB1-2M1 균주는 amylase, protease 공히 4배 이상 증강시키는 아주 강력한 효소생산균주이었다. 한국된장의 발효기간을 단축할 수 있는 이들 효소증강균주를 대상으로 ammonia 취의 원인이 되는 deaminase와 유독 amine 생성의 원인이 되는 decarboxylase의 생성변화에 대해 조사한 결과 Table 2와 같이 대상균주 중 SPB1-2M2 균주가 모균주에 비해 90% 정도의 deaminase 생성력이 감소됨을 알았다. 한편 decarboxylase는 대상균주 모두가 별다른 변화가 없었으며 그 생성력도 모균주나 변이주 모두 아주 약하였다. 따라서 amylase와 protease 생산력을 동시에 증강시키거나 더 나아가 deaminase 생산력을 감소시킴으로써 한국된장의 발효기간을 단축하고 아울러 불량된장의 원인인 ammonia 취를 감소시킬 수 있는 이상적인 된장 발효균주를 개발했다고 생각되어진다.

Table 1. Enzyme production of amylase and protease of *Bacillus* sp. isolated from soybean paste and their mutants

Mutants	Amylase		Protease	
	Activity	Increase	Activity	Increase
SPB1-M1	4.9(U)	100.0%	2.8(U)	100.0%
SPB1-2M1	21.7	442.9	11.6	418.0
SPB1-2M2	9.0	183.7	9.8	356.8
SPB1-2M3	9.5	193.9	10.2	369.1
SPB1-2M4	6.2	126.5	5.6	205.0

Table 2. Enzyme production of deaminase and decarboxylase of *Bacillus* sp. isolated from soybean paste and their mutants

Mutants	Deaminase		Decarboxylase	
	Activity	Decrease	Activity	Decrease
SPB1-M1	3.4(U)	100.0%	0.020(U)*	100.0%
SPB1-2M1	3.0	88.2	0.020	100.0
SPB1-2M2	0.2	5.8	0.025	125.0
SPB1-2M3	1.2	35.3	0.020	100.0
SPB1-2M4	3.5	102.9		

* *nearly no activity*

선별균주의 효소적 특성

선발된 변이주들이 생산하는 각종 효소들의 효소학적 특성을 비교함으로써 변이주에 의해 생산된 효소의 기능적 변화가 동반되었는지를 알아보기 위해 작용최적 pH, 최적온도 등 효소적 성질

을 조사해본 결과 Table 3과 같이 모균주나 변이주들이 생산하는 효소의 특성에 별다른 차이를 찾아볼 수 없었다. 다만 모균주가 생산하는 amylase 경우 그 작용최적 pH가 7.2인데 비하여 변이주의 그것들은 7.5로써 약간 상이하게 나타났다. 이는 변이주들이 생산한 amylase에 약간의 기능적 변화가 일어난 것이 아닌가 추측이 된다.

한편 생산된 각종 효소단백의 량과 효소활성도를 측정하여 각 효소의 specific activity를 조사해 보면 거의 같은 활성도를 나타내므로 변이주의 활성도 증가는 효소의 활성기능이 증가했다기 보다는 효소생성에 관계하는 조절유전자에 어떤 변화가 일어난 것이 아닌가 생각되어진다.

Table 3. Optimal reaction condition of the enzyme produced by *Bacillus* sp. (SPB1-M1) and its mutants

Opt. cond. / Mutant	Amylase pH	Amylase Temp.	Protease pH	Protease Temp.	Deaminase pH	Deaminase Temp.
SPB1-M1	7.2	50	8.0	50	7.0	50
SPB1-2M1	7.5	50	8.0	50	7.0	50
SPB1-2M2	7.5	50	8.0	50	7.0	50
SPB1-2M3	7.5	50	8.0	50	7.0	50

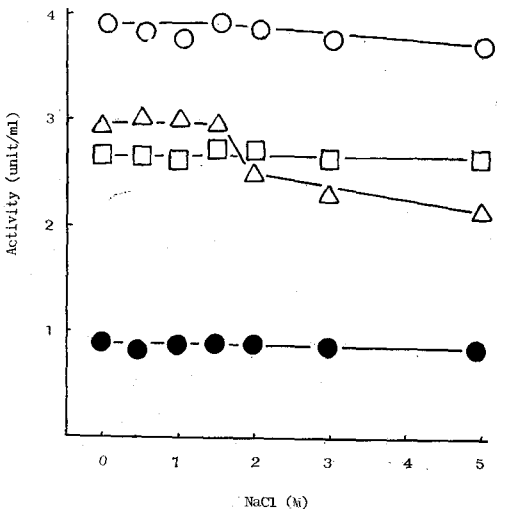

Fig. 1. Effect of NaCl on the amylase activity of the *Bacillus* sp. isolated from soybean paste and their mutants
● SPB1-M1, ○ SPB1-2M1, □ SPB1-2M2 and △ SPB1-2M3

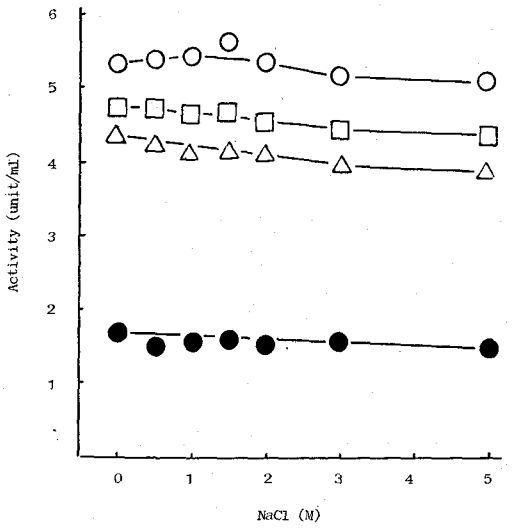

Fig. 2. Effect of NaCl on the protease activity of the *Bacillus* sp. isolated from soybean paste and their mutants
● SPB1-M1, ○ SPB1-2M1, □ SPB1-2M2 and △ SPB1-2M3

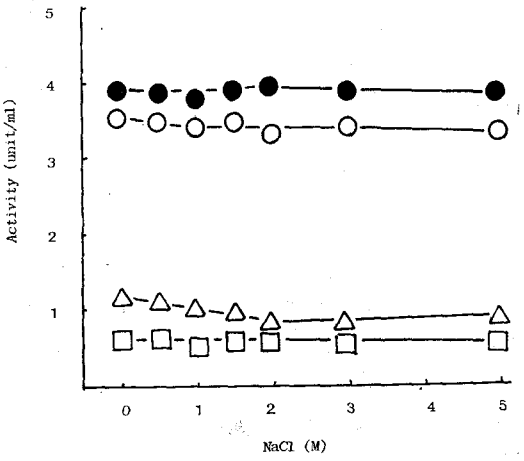

Fig. 3. Effect of NaCl on the deaminase activity of the *Bacillus* sp. isolated from soybean paste and their mutants
● SPB1-M1, ○ SPB1-2M1, □ SPB1-2M2 and △ SPB1-2M3

효소 활성도에 미치는 NaCl의 영향

효소반응액 중에서 식염농도 증가에 따라 변이주들이 생산한 각 효소들의 활성도가 어떻게 변화되는가를 측정하여 실제 장류발효시에 필수적으로 첨가되는 식염이 효소작용에 어떠한 영향을 미치는가를 조사해 보았다.

먼저 모균주나 변이주가 생산한 amylase는 Fig.

1과 같이 식염농도가 증가하더라도 그 활성도에는 큰 영향을 받지 않았으나 변이주 SPB1-2M3의 경우는 NaCl 2M 이상에서는 그 활성도가 약간 저하되었다. 한편 Fig. 2 및 Fig. 3과 같이 protease나 deaminase의 활성에 미치는 영향도 별다른 변화가 없었다. 이로 미루어 보아 장류발효시 첨가되는 식염에 의해 각 효소들의 활성도는 큰 영향을 받지 않았는데 이는 고농도 염용액에서 효소단백의 변성이 크게 일어나지 않았음을 추측할 수 있었다.

NaCl이 효소 생산성에 미치는 영향

모균주나 선발된 변이주(SPB1-2M2)가 고농도의 식염이 첨가된 배지에서 각 효소의 생산성이 어떻게 변화되는가를 조사하기 위해 세균영양배지에 NaCl을 최종농도가 2.5M 되게까지 첨가하여 35°C에서 2일간 배양한 후 그 효소활성도를 측정하였다. Fig. 4와 같이 amylase, protease, deaminase 공히 염농도 1.5M까지는 아주 서서히 감소하며 protease의 경우는 0.5M, 1.0M에서는 오히려 약간 증가하는 경향이었으나 2.5M에서는 비교적 크게 감소되었다. 이는 Hiroshi[13]나 Masahiro와 Hiroshi[14]가 보고한 호염성세균의 amylase나 protease의 생산이 식염농도 1M 이상에서는 저하된다는 결과에 비추어 볼 때 훨씬 더 높은 식염농도에서도 그 효소생산성이 변함이 없는 우수한 장류발효균주라고 믿어진다.

배양시간별 효소생산성

모균주와 그 변이주들이 배양일수에 따라 amylase, protease, deaminase 등 각종 효소생산의 양상이 어떻게 변하는가를 조사함으로써 한국장류발효의 특징인 과도하게 긴 발효시간을 단축할 수 있는지의 가능성을 검토해 보았다. 이때 배양조건은 35°C에서 진탕배양(120rpm)하였다.

먼저 모균주나 변이균주의 amylase 생산은 Fig. 5와 같이 배양 2일째 그 생산성이 가장 높았으며 배양일수가 경과할수록 특히 4일째 이후는 그 활성도가 약간 감소하였으나 10일 배양 후에도 최고 활성도에 비해 60% 정도의 효소활성도가 잔존하였다. 이 결과는 현[15]의 5일째 최대치에 달한다는 보고보다 좀 빨랐으나 이는 사용한 배지조성에 관계한 것이라고 본다. 이로 미루어 보아 모균주에 비해 짧은 배양시간에 더 많은 효소를 생산하였으며 생산된 효소도 장시간 그 활성도가 유지되

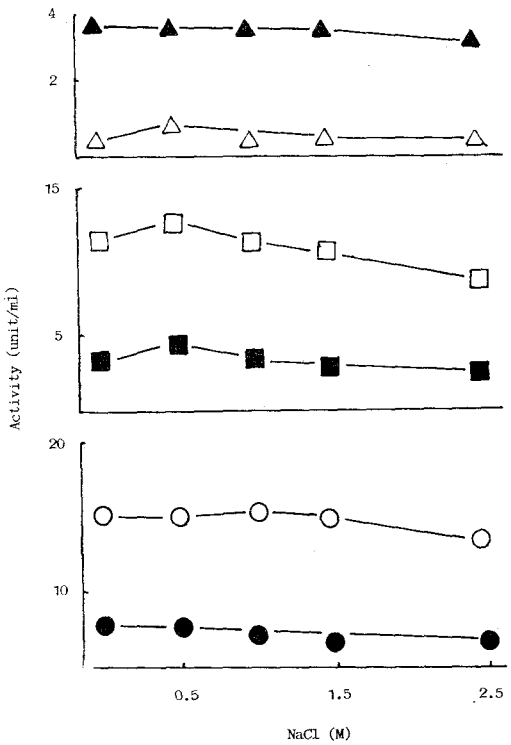

Fig. 4. Effect of NaCl on the various enzyme productions
●■▲ SPB1-M1, ○□△ SPB1-2M2,
○ Amylase, □ Protease and △ Deaminase

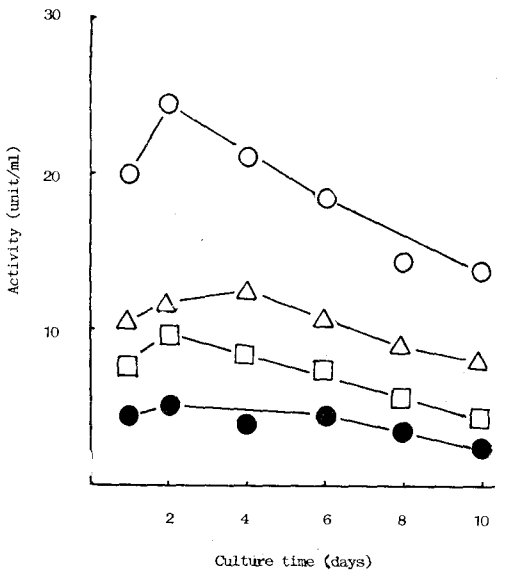

Fig. 5. Amylase production of the *Bacillus* sp. isolated from soybean paste and their mutants
● SPB1-M1, ○ SPB1-2M1, □ SPB1-2M2 and △ SPB1-2M3

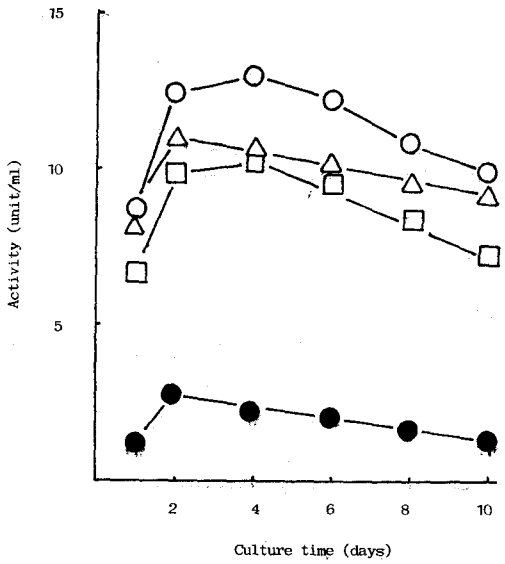

Fig. 6. Protease production of the *Bacillus* sp. isolated from soybean paste and their mutants ● SPB1-M1, ○ SPB1-2M1, □ SPB1-2M2 and △ SPB1-2M3

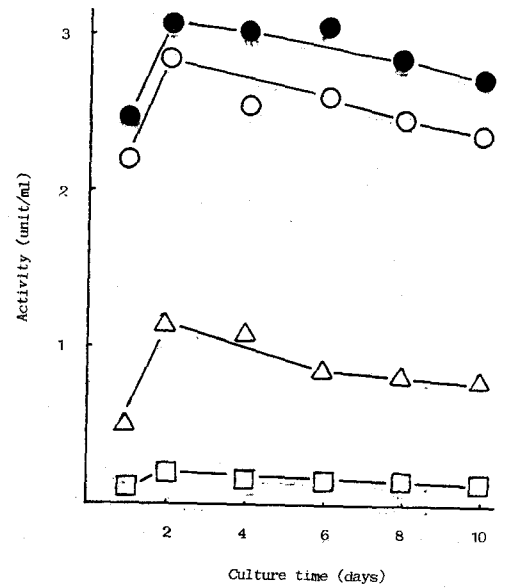

Fig. 7. Deaminase production of the *Bacillus* sp. isolated from soybean paste and their mutants ● SPB1-M1, ○ SPB1-2M1, □ SPB1-2M2 and △ SPB1-2M3

므로 실제 발효시 큰 이점이 있다고 생각한다. 둘째 protease의 생산성은 Fig. 6과 같이 배양 4일째까지 그 활성도가 급격히 증가하였으며 그 후는 배양일수가 증가하더라도 서서히 감소하는 경향이었으며 10일 후에는 그 활성도가 77% 정도나 유지되었다. 10일이 경과해야 최고치에 도달한다는 이와 김[16]의 결과와 비교해 볼 때 발효기간을 단축할 수 있는 우량변이주라고 생각된다. 마지막으로 deaminase의 생산성은 Fig. 7과 같이 배양 2일째가 가장 높았으나 변이주 모두 모균주에 비해 그 활성도가 낮았으며 특히 변이주 SPB1-2M2 균주는 배양일수에 관계없이 극히 작게 나타났다.

요 약

한국재래식된장에서 분리된 특향생성 *Bacillus* sp.의 NTG 변이주를 모균주로 하여 자외선에 의해 다시 돌연변이시킴으로써 amylase, protease의 증강과 동시에 deaminase가 감소되는, 한국된장의 발효시간 단축과 품질을 향상시킬 수 있는 우량변이주를 육종할 수 있었다. Amylase의 경우는 4.4배, protease의 경우는 4.2배까지 동시에 증강시킬 수 있는 우수한 변이주를 얻을 수 있었으며 두 효소 동시증강균주 중 deaminase 생성을 90%까지 저하시키는 한 균주를 개발할 수 있었다. 한편 각 변이주와 모균주와의 효소학적 특성은 거의 동일하였으며 고농도의 식염용액에서도 효소생산 및 작용에 큰 영향을 받지 않았다.

사 의

본 연구는 한국과학재단의 연구비 지원에 의해 수행되었음을 감사드리며 이영선·이은탁 실원의 노고를 고맙게 생각합니다.

참 고 문 헌

1. 양성호 : 영남대학교 박사학위 논문, 3(1985)
2. 이계호, 장건형 : 한국미생물학회지, 3 : 9(1965)
3. 이양희 : 특허공보 제216호(1970)
4. 주현규, 노진규, 임무현 : 한국식품과학회지, 4 : 276(1972)
5. 윤일섭, 김현오, 윤세억, 이갑상 : 한국식품과학회지, 9 : 131(1977)
6. 신순영, 김영배, 유태종 : 한국식품과학회지, 17 : 8(1985)
7. 송재영, 안철우, 김종규 : 한국산업미생물학회지, 12 : 147(1984)

8. 기우경, 김종규, 강동학, 조용운 : 한국산업미생물학회지, 15 : 21(1987)
9. 도재호, 김상달 : 한국산업미생물학회지, 13 : 173(1985)
10. Hiroshi Uehara, Yuko Yoneda, Kunio Yamane and Bunji Maruo: J. Bacteriol., 119 : 82 (1974)
11. John C. Wriston: Method in Enzymology AP, Vol. 17 : 732(1970)
12. Suresk S. Tate, Abraham Novogrodsky, Kenji Soda, Edith Willson Mills and Alton Meister: Method in Enzymology, AP, Vol. 17 : 681(1970)
13. Hiroshi Onishi: J. Bacteriol. 109, 570(1972)
14. Masahiro Kamekura and Hiroshi Onishi: Appl. Microbiol., 27, 809(1974)
15. 현인환 : 영남대학교 박사학위논문, p. 28(1985)
16. 이갑상, 김동륜 : 한국식품과학회지, 17, 146 (1985)