

## *Aspergillus oryzae*와 *Aspergillus shirousamii*간의 원형질체의 융합

신동분 · 류병호\* · 진성현  
경성대학교 식품공학과

### Protoplast Fusion Between *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus shirousamii*

Dong-Bun Shin, Beung-Ho Ryu and Seung Heun Jin

Department of Food Science and Technology, Kyungung University, Pusan 608-736

#### Abstract

This study mainly designed to high quality of mirin production by using protoplast fusion. In order to enhance the acid carboxypeptidase (ACPase) activity by the method of protoplast fusion. In order to enhance the acid carboxypeptidase (ACPase) activity by the method of protoplast fusion, the mutants, *Aspergillus oryzae* 9-12 and *Aspergillus shirousamii* IFO 6082-60 were selected by mutation among various mutants. Protoplast of *Aspergillus oryzae* 9-12 and *Aspergillus shirousamii* IFO 6082-60 were formed effectively by incubation of the mixtures of chitinase (10 mg/ml), cellulase (10 mg/ml) and zymolase 20T (5 mg/ml). For protoplast fusion, the mixture of two mutant were fused to effective under the optimum conditions by solutions containing 30% PEG 6,000, 0.01 M  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.6 M KCl and 0.05 M glycine. Fusion frequency was 0.71% and fusant, F-50 appeared ACPase activity of 20,800 unit/g which has 1.5 times higher than that of each mutants.

Key words: mirin, protoplast fusion.

## 서 론

미림은 알코올과 당분을 많이 함유한 특유한 향미를 지닌 담황색의 투명한 액체로서 국균에 의하여 발효시킨 천연 주류조미료이다. 미림은 찹쌀에 접종한 국균에서 분비되는 amylase, protease, acid carboxypeptidase 및 기타 각종 효소에 의하여 양조되지만 양조기간 및 분해속도가 지연되므로 이를 개선하기 위한 방법 등의 많은 연구가 진행되고 있다<sup>1,2</sup>. 미림 제조시 원료의 처리조건, 소화율에 대한 연구<sup>3,4</sup>가 보고된 이후, 미림의 생산성과 품질은 증자된 찹쌀에 대한 효소적 소화와 원료에 대한 효소의 소화효율에 좌우된다고 한다<sup>5</sup>. 그러나 미림의 제조시 알코올의 농도가 높기 때문에 미림 발효에 있어서 효소의 효율과 알코올의 농도와의 상호관계가 미림 제조시 최대 생산성을 높인다고 하였다<sup>6,7</sup>.

한편, Nakadai 등<sup>8</sup>은 국균에서의 peptidase의 활성을 측정하여 미림 양조시 효소의 기능을 조사하였으며, 고위 국균에서 분비하는 효소가 미림의 품질을 좌우한다는

보고가 있는 후, Nunokawa 등<sup>9</sup>은 소주 양조시 사용한 koji로서 미림을 발효시켰고, Tanaka 등<sup>10</sup>은 *Aspergillus oryzae*로부터 acid carboxypeptidase의 활성이 높은 변이주를 선별하여 미림을 제조하여 제품의 저온 저장시 백탁의 생성이 낮았다고 하였다. 그리고 Oyashiki 등<sup>11</sup>은 미림 제조시 여러가지 국균을 사용하여 실험한 결과 *Aspergillus usami*의 koji로 만든 미림이 품질면에서 우수하였다고 하였다. 또 Oyashiki 등<sup>11</sup>은 *Aspergillus usami*를 번이시켜 번이주에 의한 미림 제조시 찹주보다 acid carboxypeptidase의 활성이 높고 oligo당의 함량이 높아 저온 저장시 백탁의 생성이 적었다고 보고하였다. 이와 같이 미림 제조시 국균에서 분비하는 효소의 활성에 따라 제품의 생산성과 품질에 미치는 영향이 크므로 최적단기법을 도입한 미림의 제조연구가 절실히 필요하다. 미림의 제조에 관한 연구중 미생물의 활용에 대한 연구는 없으나, 양조기술이 비교적 앞선 소주나 청주의 생산성과 품질개선을 위한 연구에서 국균중의 효소의 활성을 높혀 발효시킨 연구가 있으므로, 이를 활용하면 효과적일 것이다. Gomi 등<sup>12</sup>은 청주 양조중 국균을 세 포융합시켜 품질이 우수한 제품의 제조를 시도하였으며, Suginami와 Imayasu<sup>13</sup>는 국균의 융합주에 의한 청주의 양조에서 주인의 개선에 대한 연구를 보고하였다. 이러한

Corresponding author: Beung-Ho, Ryu, Department of Food Science and Technology, Kyungung University, Pusan 608-736, Korea

연구를 기초로 하여 Ushijima와 Nakadai<sup>11)</sup>는 세포융합에 의하여 protease와 glutaminase 활성이 높은 융합주로서 미림을 제조하여 품질을 개선하였다. Oyashiki 등<sup>12)</sup>은 미림 제조시 *Aspergillus oryzae*와 *Aspergillus usamii* 상호간의 세포융합에서 얻어진 acid carboxypeptidase의 역가가 높은 융합주로서 품질이 좋은 미림을 제조하였다고 하였다. 이와 같이 종래의 방법에서는 mutants에 의한 미림의 제조나 세포융합에 의한 protease나 glutaminase의 효소역가가 높은 균주를 얻어 제조하였고, 또 세포융합에 의하여 acid carboxypeptidase의 활성이 높은 균주를 육종하여 미림을 제조하였다. 그러나 이와 같이 제조된 미림은 제품에 포도당이 많고 또 냉장시 백탁이 생성되어 제품의 품질이 저하될 우려가 있어, 이러한 결점을 보완하고 품질이 우수한 미림을 제조하고자 한다.

류 등<sup>13)</sup>은 acid carboxypeptidase의 활성이 높은 균주를 국균 중에서 선별하고, 그중에서 효소활성이 가장 높은 *Aspergillus oryzae* 9와 *Aspergillus usamii* mut. *shirousamii* IFO 6082를 각각 자외선을 조사하여 효소활성이 우수한 돌연변이주인 *Aspergillus oryzae* 9-12와 *Aspergillus shirousamii* 6082-60를 분리하였다. 따라서 본 연구는 이들 변이주 중 특히 acid carboxypeptidase의 활성이 높은 균주를 세포융합시켜, 그 조건을 검토하였다.

## 재료 및 실험방법

### 사용 균주

*Aspergillus oryzae* 9-12와 *Aspergillus shirousamii* IFO 6082-60을 세포융합 균주로 사용하였다<sup>14)</sup>.

### 시약

본 실험에 사용한 carbobenzoxy-glutamyl-tyrosine (Cbz-Glu-Tyr),  $\alpha$ -methyl-D-glucoside,  $\alpha$ -amylase, protease 및 cellulase는 Sigma Co.의 제품을 사용하였고, chitinase, zymolase 및 polyethylene glycol(PEG)은 Seikagaku Koggo Co.의 제품을 사용하였다.

### 배지

Malt-agar medium(pH 6.0) (complete medium, CM)은 20g glucose, 1g peptone, 15g agar를 물 1에 녹여 사용하였다. Czapek's agar medium(pH 5.9) (minimum medium MM)은 2g NaNO<sub>3</sub>, 1g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.5g KCl, 0.5g MgSO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.01g FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 30g sucrose 및 15g agar를 물 1에 녹인 다음 121°C에서 15분간 멸균한 후 사용하였다.

### Protoplast의 형성

Protoplast 형성은 Yabuki 등의 방법<sup>15)</sup>에 따라 실시하였다. 균주로는 자외선으로 조사하여 ACPase의 활성이 가장 높은 변이주인 *Aspergillus oryzae* 9-12와 *Aspergillus*

*shirousamii* IFO 6082-60을 각각 Czapek's 배지에 배양하였다. Whatman No.1 여과지로 여과하여 균체를 모은 후 0.6 M KCl로 2회 씻은 다음, 균사체 50 mg에 chitinase, zymolase 및 cellulase 등의 효소를 각각 일정한 비율로 혼합하여, 0.2 M Tris buffer(pH 6.0) 10 ml에 넣어 서서히 흔들면서 30°C에서 일정시간 배양하여 protoplast를 형성시켜 glass filter로 여과하고 protoplast를 얻은 후 0.6 M KCl로 2회 세척하였다.

### Protoplast의 융합과 재생

Protoplast의 융합과 재생은 Anne 등의 방법<sup>16)</sup>에 따라 실험하였다. 즉 *A. oryzae* 9-12와 *A. shirousamii* IFO 6082-60으로부터 형성시킨 각 균주의 protoplast를 1.0 × 10<sup>7</sup> ml로 조질한 후 1:1의 비율로 혼합하였다. 이것을 30%(w/w) polyethylene glycol 6,000, 0.01 M CaCl<sub>2</sub> 및 0.05 M glycine(pH 6.0) 용액 1 ml에 현탁시켜 30°C에서 15분간 반응시킨 후 원심분리하고, 0.6 M KCl로 2회 씻은 다음 다시 0.6 M KCl 5 ml에 현탁하여 최소배지와 완전배지에 도말하고 30°C에서 48시간 배양하여 융합주를 얻었다. 융합주는 최소배지에서 3회 계대하여 안정시켰다.

### 세포 융합의 빈도

세포융합의 빈도는 최소배지에 나타낸 colony 수를 완전배지에서 생성된 colony 수로 나눈 값을 백분율로 나타내었다.

### Koji의 제조

500 ml 삼각 flask에 증자한 참쌀(200g)을 넣고, 미리 사면배양하여 얻은 곰팡이의 포자(0.2g)를 접종한 다음 무균상자에 넣어 30°C에서 48시간 배양하였다<sup>15)</sup>.

### Koji로부터 조효소의 조제

Koji(麹) 10g을 acetate buffer(pH 5.0)를 함유하는 0.5% NaCl 25 ml로 혼합하였다. 이를 여과지(Toyo filter paper No.2)로 여과하여, 여액 5 ml를 cellulose film 투석막에 넣고, 10 mM acetate buffer(pH 5.0)로 5°C에서 24시간 투석시킨 다음 10 mM acetate buffer(pH 5.0) 10 ml를 넣은 후 이를 조효소의 역가 측정 시료로 하였다<sup>15)</sup>.

### 융합주의 효소의 측정

$\alpha$ -Amylase 및 glucoamylase의 활성은 alkali-gelatinized potato starch로, protease는 milk casein법으로 측정하였다<sup>17)</sup>. Acid carboxypeptidase(ACPase)는 Nakadai 등<sup>12)</sup>이 시술한 방법으로 측정하였으며, ACPase 활성 1 unit는 30°C에서 시간당 carbobenzoxy-glutamyl-tyrosine(Cbz-Glu-Tyr)으로부터 tyrosine 1  $\mu$ g이 생성되는데 필요한 효소의 양으로서 나타내었다.

Transglucoamylase(TGase)는 National Research Institute of Brewing(Tax Administration Agency, Japan)의

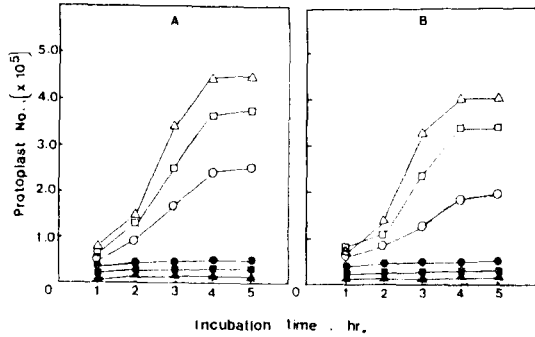


Fig. 1. Effect of incubation time with concentration variation of chitinase, cellulase, zymolase and glucuronidase on the formation of protoplast of *A. oryzae* 9-12(A) or *A. shirousamii* IFO 6082-60(B)

△—△: 10 mg/ml chitinase, 10 mg/ml cellulase, 5 mg/ml zymolase 20T, □—□: 10 mg/ml chitinase, 5 mg/ml cellulase, 10 mg/ml glucuronidase, ○—○: 10 mg/ml chitinase, 5 mg/ml cellulase, 5 mg/ml zymolase 20T, ●—●: 10 mg/ml chitinase, ■—■: 10 mg/ml zymolase, ▲—▲: 10 mg/ml cellulase

방법<sup>(21)</sup>으로 측정하였다. 효소의 활성 1 unit는 40C 에서 시간당 α-methyl-D-glucoside로부터 glucose 1μg이 생성되는데 필요한 효소의 양으로 나타내었다.

### 결과 및 고찰

#### 세포융합의 조건

*A. oryzae* 9-12와 *A. shirousamii* 6082-60의 protoplast의 생성: *A. oryzae*의 세포벽은 chitin과 β-1,3 및 β-1,4 glucan의 복합체로 구성되어 있기 때문에 protoplast 형성시에는 chitinase, β-1,3-glucanase 사용이 protoplast 형성능과 상관관계가 있다<sup>(22)</sup>.

본 실험에서 *A. oryzae* 9-12와 *A. shirousamii* IFO 6082-60을 융합시키기 위하여 우선 protoplast의 형성을 시도하였다. 이들 균주의 세포벽을 분해하기 위하여 chitinase, cellulase(Onozuka R-10), zymolase 및 β-glucuronidase 등의 효소를 사용하여 실험한 결과는 Fig. 1과 같다.

*A. oryzae* 9-12와 *A. shirousamii* IFO 6082-60의 원형 질체 형성조건은 chitinae(10 mg/ml), cellulase(10 mg/ml) 및 zymolase 20T(5 mg/ml)를 혼합하였을 때 가장 좋았으며, 이 조건으로 30C 에서 4시간 반응시켰을 경우 4.0×10<sup>5</sup> ml로 가장 높은 protoplast의 형성을 나타내었다. 그리고 chitinase(10 mg/ml), cellulase(5 mg/ml) 및 β-glucuronidase(10 mg/ml)의 효소 혼합액을 사용하여 반응시킨 결과, protoplast 생성은 3.0×10<sup>5</sup> ml이었고, chitinase(10 mg/ml)와 cellulase(5 mg/ml) 및 zymolase 20T(5 mg/ml)를 단독으로 사용했을 때는 protoplast 형성은 낮았다.

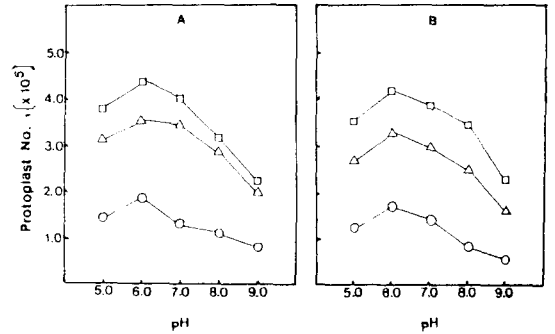


Fig. 2. Effect of pH with various incubation times on the protoplast formation by mutant of *A. oryzae* 9-12(A) or *A. shirousamii* IFO 6082-60(B)

○ : incubation for 1 hr, △—△: incubation for 2 hr, □—□: incubation for 3 hr

국균의 protoplast를 형성시킬 때 chitinase와 β-1,3-glucan을 분해하는 효소를 복합적으로 사용해야 된다고 한다<sup>(21, 25)</sup>. Isaac와 Peberdy<sup>(26)</sup>는 *Tricoderma harzianum* 배양액으로 *A. nidulans*의 protoplast를 형성시켰다고 하였다. Nohmi와 Ichishima<sup>(27)</sup>는 *Aspergillus*속의 protoplast 형성시에 달팽이의 소화 효소액과 cellulase의 혼합액으로 protoplast를 조제하였고, Ohnuki 등<sup>(28)</sup>은 *Mucor pusillus*와 *Mucor miehei*의 종간의 protoplast 생성시에 chitinase, chitosanase 및 sulfatase의 효소혼합액을 반응시켜 protoplast의 생성이 높았다고 하였다. Sugiyama와 Imayasu<sup>(19)</sup>는 *Aspergillus*속의 protoplast는 chitinase와 zymolase 20T(Seikagaku kogyo Co.)의 효소를 사용하여 만들었다고 하였다.

본 실험에서도 이들 연구결과와 비교해 볼 때 각종 효소를 단독으로 사용하는 것보다는, *Aspergillus*속의 세포벽을 잘 분해할 수 있는 복합효소를 사용하여 좋은 결과를 얻었다.

#### pH의 영향

Protoplast 형성에 있어서도 효소처리가 pH에 의하여 영향을 받는다. 본 실험에서는 pH 5.0에서 pH 9.0까지 조절한 후 protoplast 형성을 조사해 보았으며, 그 결과를 Fig. 2에 나타내었다.

본 실험결과 *A. oryzae* 9-12와 *A. shirousamii* IFO 6082-60의 protoplast 형성은 pH 6.0일 때 가장 높았고, pH가 알칼리 쪽으로 높아질수록 protoplast의 형성이 낮았다.

Ryu 등<sup>(29)</sup>은 *Monascus anka*의 protoplast 형성시의 최적 pH를 6.0이라고 하였다. 能美 등<sup>(22)</sup>은 국균의 protoplast 형성에서는 pH 5.0이 제일 좋았다고 하여 본 실험과 비슷한 경향이였다.

#### 안정제의 선택과 농도

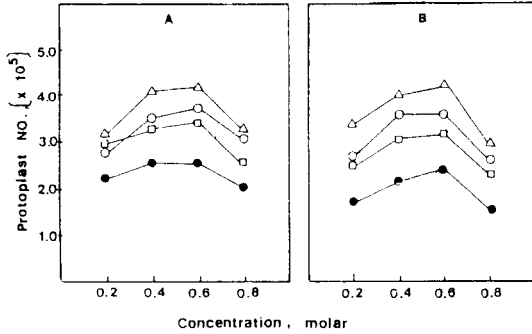


Fig. 3. Effect of osmotic stabilizers on the formation of protoplast by mutant of *A. oryzae* 9-12(A) or *A. shirousamii* IFO 6082-60(B)  
 △—△; 0.6 M KCl, □—□; 0.5 M Sorbitol, ○—○; 0.5 M Mannitol, ●—●; 0.6 M MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O

미생물의 protoplast 형성시 삼투압에 대한 안정제의 선택과 그 농도가 큰 영향을 미친다. 삼투압 안정제로 알려진 MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, KCl, mannitol 및 sorbitol을 이용하여 실험하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 *A. oryzae* 9-12와 *A. shirousamii* IFO 6082-60의 protoplast 형성시의 삼투압 안정제로는 0.6 M KCl이 가장 좋았고, 0.6 M MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O를 사용했을 때 protoplast 형성이 가장 낮았다.

Ohnuki 등<sup>(28)</sup>은 *Mucor pusillus*와 *Mucor miehei*의 protoplast 생성시 안정제로서 0.5 M mannitol 또는 0.5 M sorbitol을 사용하였을 때 protoplast가 가장 많이 형성되었다고 하였다. 그러나 Nohmi 등<sup>(27)</sup>은 *A. oryzae*의 protoplast 제조시 0.6 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 사용했을 때 protoplast 형성이 좋았으나, 이 보다는 0.6 M CaCl<sub>2</sub>를 사용하였을 때 가장 높은 protoplast 형성율을 보였다고 하였다. 그리고 Ryu 등<sup>(29)</sup>의 *Monascus anka*와 Anne<sup>(18)</sup>의 *A. nidulance*에서도 0.6 M KCl이 가장 좋다고 보고하였으므로 본 실험결과와 비슷하였다.

Protoplast의 융합

무기염의 영향: 미생물의 protoplast의 융합은 polyethylene glycol(PEG) 존재하에서 양이온의 영향을 받는다. *A. oryzae* 9-12와 *A. shirousamii* IFO 6082-60의 protoplast 융합시 무기염이 미치는 영향을 조사한 결과는 Fig. 4와 같다.

K<sup>+</sup>나 Mg<sup>2+</sup>은 Ca<sup>2+</sup>의 존재하에서 융합되는율이 낮은 것으로 알려져 있다. 그리고 Na<sup>+</sup>도 원형질체 융합을 억제시키는 것으로 알려져 있다<sup>(30)</sup>. Kao와 Michayluck<sup>(31)</sup>는 Ca<sup>2+</sup>이 식물의 원형질체 융합 빈도를 높였다고 하였다.

본 실험에서는 0.01 M CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O의 농도에서 융합율이 가장 높았으며, 다른 무기염인 0.01 M KCl, 0.01 M MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 및 0.01 M NaCl의 존재하에서는 protop-

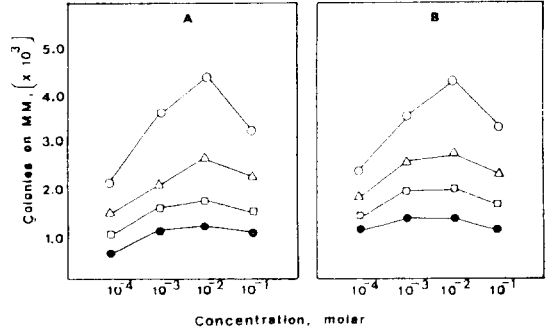


Fig. 4. Effect of inorganic ions on the yield of protoplast fusion by mutant of *A. oryzae* 9-12(A) or *A. shirousamii* IFO 6082-60(B) on developing MM  
 ○—○; 0.01 M CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, □—□; 0.01 M KCl, △—△; 0.01 M MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, ●—●; 0.01 M NaCl

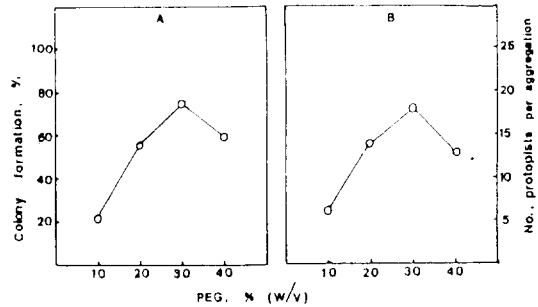


Fig. 5. Effect of PEG concentration on aggregation of protoplast by mutant of *A. oryzae* 9-12(A) or *A. shirousamii* IFO 6082-60(B)

last의 융합이 아주 낮았다.

PEG의 영향

Protoplast의 융합은 PEG가 직접 또는 수소 결합으로 세포와 세포사이를 연결하므로 이루어진다. 따라서 PEG는 protoplast의 융합에 큰 영향을 미친다<sup>(32,33)</sup>. 본 실험에서는 *A. oryzae* 9-12와 *A. shirousamii* IFO 6082-60의 protoplast로서 융합을 시도하였다. *A. oryzae* 9-12와 *A. shirousamii* IFO 6082-60의 protoplast를 각각 1.0×10<sup>6</sup> cell/ml로 희석하고 30% PEG 6,000, 0.1 M CaCl<sub>2</sub> 및 0.05 M glycine이 함유된 완전배지에서 융합시켰다. 이때 PEG 6,000을 10, 20, 30 및 40%의 농도로 조절하여 protoplast의 융합 생성율을 조사한 결과, Fig. 5에 나타난 바와 같이 30% PEG 6,000일 때 protoplast fusion이 가장 높았다.

형성된 융합체(protoplast fusion)를 최소배지에 접종하여 72시간 내지 96시간 배양하여 융합주가 생성되었고, 융합되지 않은 protoplast 포자 및 균사체는 이 배지에서 생육하지 못하였다. Anne 등<sup>(18)</sup>은 *Penicillium chrysogenum*과 *Penicillium roquefortii*의 원형질체 융합시 PEG의

**Table 1. Fusion frequency between protoplasts of auxotrophic mutants obtained from *A. oryzae* 9-12 and *A. shirousamii* IFO 6082-60**

Fusion mixture	Protoplast regenerated on CM		Fusants formed on MM		Fusion Frequency (%)
	Before fusion treatment	After PEG treatment	Before fusion treatment	After PEG treatment	
<i>A. oryzae</i> 9-12	$1.03 \times 10^6$	$7.7 \times 10^4$	0	$1.12 \times 10^3$	0.71
<i>A. shirousamii</i> 6082-60	$1.05 \times 10^6$	$8.0 \times 10^4$	0		

Fusion was carried out by protoplast fusion in 30% PEG 6,000, 0.01 M-CaCl<sub>2</sub> and 0.05 M-glycine with each complementary nutrients required of auxotrophic mutant at 30°C and pH 6.0 for 15 min. The frequency was defined as the ratio of the number of colonies growing on MM over agar

**Table 2. Enzyme activity in *Koji* prepared with fusant between *A. oryzae* 9-12 and *A. shirousamii* IFO 6082-60**

<i>Koji</i> prepared	$\alpha$ -amylase	Glucoamylase	Protease(PU/g)		ACPase	TGase
	(DU/g)	(GU/g)	pH 3.0	pH 6.0	(unit/g)	(unit/g)
<i>A. oryzae</i> 9-12	214	36	223	73	19,200	58
<i>A. shirousamii</i> IFO 6082-60	214	38	214	68	18,200	53
F-15	213	32	165	80	19,800	79
F-32	128	24	193	78	20,100	87
F-50	211	28	187	83	20,800	82

DU: Dextrinogenic unit, GU: Glucose Unit, PU: Proteolytic unit

농도가 영향을 미친다고 하였다. *Aspergillus oryzae*<sup>(27)</sup>, *Aspergillus niger*<sup>(28)</sup>를 사용하여 원형질체의 융합시 30% PEG 6,000이 가장 이상적이라고 지적하였다. Ryu 등<sup>(29)</sup>도 *Monascus anka*의 원형질체 융합시에 30% PEG 6,000이 적합하다고 보고하였다. 본 실험에서도 PEG 6,000의 농도가 30%일 때 protoplast의 융합이 가장 높았다.

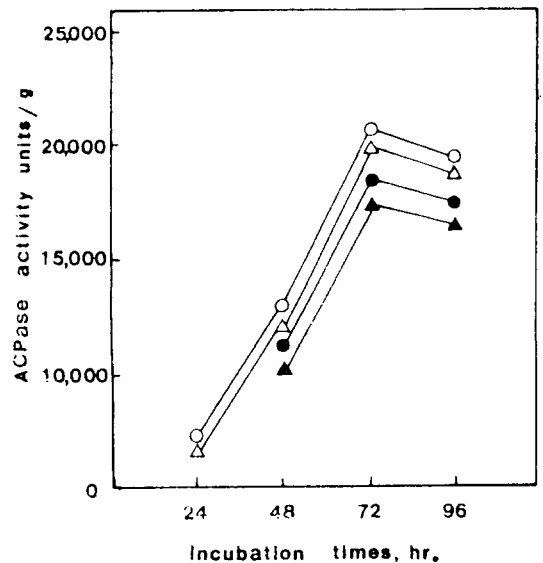
#### 융합의 빈도

*A. oryzae* 9-12와 *A. shirousamii* IFO 6082-60의 원형질체를 각각  $1.0 \times 10^6$  cell/ml으로 회석하고, 30% PEG 6,000, 0.01 M CaCl<sub>2</sub> 및 0.05 M glycine이 함유된 배지에서 융합시켰을 때의 결과는 Table 1에서 보는 바와 같다. 표에서와 같이 융합빈도는 0.71%였다. Perberdy와 Isaac<sup>(30)</sup>은 *Aspergillus*속의 세포융합에서 융합빈도는 0.5~0.9%이었다고 하였다.

Anne 등<sup>(18)</sup>은 *Penicillium* sp.간의 융합빈도는 0.1~0.7%이었다고 하였고, Kevi와 Peberdy<sup>(19)</sup>는 *A. nidulans*와 *A. rugulosus*간의 융합에서 그 빈도는 2.23~5.58%이었다고 하였다. 그리고 Ohnuki 등<sup>(28)</sup>은 *Mucor pasillus*와 *Mucor miehei*의 원형질체 융합에서 5% 이상의 높은 융합빈도를 나타내었다고 하였다. 본 실험에서는 *Penicillium* sp.나 *Mucor* sp.보다는 융합빈도가 낮으나 *A. oryzae*의 융합빈도와는 비슷한 경향을 나타내고 있다.

#### 융합주의 특성

*A. oryzae* 9-12와 *A. shirousamii* IFO 6082-60의 원형질체를 융합시켜 약 250주의 융합주를 얻었다. 이들 융합주를 증가한 참쌀에 접종시킨 후 72시간 배양한 다음 생육이 우수한 20군주를 선별하였다. 이들 20개의 융합



**Fig. 6. Time course of ACPase production during *Koji* making. Rice polished was steamed. The mutants and fusants were inoculated separately on steamed and cultivated rice at 30°C for 96h**

●-●: *A. oryzae* 9-12, ▲-▲: *A. shirousamii* 6082-60, ○-○: Fusant-50, △-△: Fusant-32

주를 모두 참쌀에 접종하여 *koji*를 만들고  $\alpha$ -amylase, glucoamylase, protease, ACPase 및 TGase의 활성을 측정할 결과는 Table 2와 같다.

융합주인 F-15, F-32 및 F-50의  $\alpha$ -amylase, glucoamylase 및 protease의 활성은 진주보다 약간 높으나

TGase와 ACPase의 활성은 훨씬 높았다.

특히 F-15, F-32는 ACPase의 활성이 각각 19,800 unit/g, 20,100 unit/g이었으며, 융합주 F-50은 ACPase의 활성이 20,800 unit/g으로 가장 높았으며 친주인 *A. oryzae* 9-12와 *A. shirousamii* IFO 6082-60보다 높은 결과를 나타내었다. 미림의 제조시에 국균에서의  $\alpha$ -amylase, glucoamylase, protease, ACPase 및 TGase의 활성은 미림의 품질에 미치는 영향이 매우 크다. Oyashiki 등<sup>(15)</sup>은 ACPase의 활성이 높은 균주로 미림을 제조하였을 때 포도당은 증가하지 않고, oligosaccharides가 생성되기 때문에 미림의 제조에 적합하다고 하였다. 또 Oyashiki 등<sup>(34)</sup>은 ACPase가 높은 *A. oryzae*의 변이주를 이용하여 제조한 미림은 품질이 우수하다고 하였고, 저장시 백탁(白濁, white haze formation)도 감소하였다고 하였다. 따라서 ACPase의 활성이 높으면 감미도 적당하여 맛이 좋을 것으로 기대된다.

#### 융합주에 의한 효소의 활성

미림의 제조시 국균에 의한 ACPase의 활성이 높아야 품질이 좋은 미림을 제조할 수 있다. *A. oryzae* 9-12와 *A. shirousamii* IFO 6082-60의 원형질체를 융합시켜 증자한 쌀에 접종시킨 후 30°C에서 96시간 배양하여 ACPase의 활성을 조사한 결과를 Fig. 6에 나타내었다. 융합주인 F-50의 경우 배양 48시간에서는 ACPase의 활성이 14,000 unit/g이었으나, 72시간에서는 20,800 unit/g으로 가장 높았으며, 배양 96시간에서는 ACPase의 활성이 다소 감소하였다. 또한 융합주 F-32의 경우 배양 48시간에서는 12,000 unit/g이었으나, 배양 72시간이었을 때는 ACPase 활성이 20,000 unit/g으로 가장 높았으며, 배양 96시간에서는 약간 감소하였다. 그러나 돌연변이주인 *A. oryzae* 9-12와 *A. shirousamii* IFO 6082-60에서 ACPase의 활성은 융합주보다는 전반적으로 낮았다. 따라서 *A. oryzae* 9-12와 *A. shirousamii* IFO 6082-60사이의 원형질체로 융합시킨 융합주 F-50과 F-32 모두 ACPase의 활성이 높으나, 그중 F-50이 가장 높았으므로 F-50을 이용하여 미림을 제조하면 우수한 품질의 미림을 얻을 수 있을 것이다.

#### 요 약

본 연구는 미림 제조시 미림의 품질을 높이기 위한 방법의 하나로 세포 원형질체의 융합체 의해 ACPase 활성이 높은 균주를 얻으려고 시도하였다. 돌연변이방법으로 acid carboxypeptidase(ACPase) 활성이 높은 *A. oryzae* 9-12와 *A. shirousamii* IFO 6082-60을 선별하여 사용하였다. *A. oryzae* 9-12와 *A. shirousamii* IFO 6082-60의 원형질체의 형성조건은 chitinase(10 mg/ml), cellulase(10 mg/ml) 및 zymolase(20T(5 mg/ml) 등의 효소 혼합용액에서 30°C에서 4시간 반응시켰을 때 가장 높았으며, pH 6.0일 때, 안정제로서는 0.6 M KCl 및 무기

염류로서는 0.01 M  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 가 가장 높았고, 30% PEG 6,000이 가장 좋았다. 이때의 융합빈도는 0.71%였다. 융합주의 ACPase의 활성은 F-50이 20,800 unit/g으로 변이주보다 1.4배 높았다.

#### 문 헌

1. 深谷伊和男, 横井信正, 酒井敏秀, 徳村治彦, トランスグルコシダゼを利用したみりんの製造, 醸協, 78, 552(1983)
2. 布川彌太郎, 岩野君夫, 秋葉哲典, みりんの改質に関する研究(第1報), 醸協, 76, 655(1981)
3. 布川彌太郎, 椎木敏, 廣常正人, しょうちゅう こうじよを用いた みりんの製造, 醸協, 77, 123(1982)
4. 岩野君夫, 岡田光司, 三上重明, 椎木敏, 鏝米を利用した味 製造について, 醸協, 84, 259(1989)
5. Uchida, M. and Oka, S.: Efficiency of Utilization of Raw Materials in *Mirin*-Making, *J. Ferment. Technol.*, 61, 13(1983)
6. Oyashiki, H., Uchida, M., Hanai, S., Obayashi, A. and Oka, S.: Relationship between Enzyme Efficiency and Alcohol Concentration in *Mirin* Mash, *J. Ferment. Technol.*, 65, 537(1987)
7. Uchida, M., Oyashiki, H., Nagahama, G. and Hanai, S.: Improvement of Yield by Application of Some Commercial Enzyme Preparations in *Mirin*-Making, *J. Ferment. Technol.*, 61, 127(1983)
8. Nunokawa, Y., Iwano, K. and Akiba, T.: Quality Improvement *Mirin*(I): Production of *Mirin* Containing Large Amounts of Unfermentable Sugars, *J. Brew. Soc. Japan*, 76, 655(1981)
9. Tanaka, T., Okazaki, N., Gomi, K., Konno, H. and Ide, M.: Isolation of Acid Carboxypeptidase-Low-Producing Mutants from *Aspergillus oryzae* and their Application for Sake-Brewing, *J. Brew. Soc. Japan*, 79, 274(1984)
10. Oyashiki, H., Uchida, M., Obayashi, A. and Oka, S.: Evaluation of *Koji* Prepared with Various Mold's for *Mirin*-Making, *J. Ferment. Bioeng.*, 67(3), 163(1989)
11. Oyashiki, H., Nurata, K., Hirai, N., Kurose, N., Uchida, M., Obayashi, A. and Oka, S.: Use of *Koji* Prepared with a High Citric Acid Producing Mutant of *Aspergillus usumii* as a Raw Material for Sake-Brewing, *J. Ferment. Technol.*, 66, 111(1988)
12. Gomi, K., Inoue, H., Okazaki, N. and Tanaka, T.: Breeding of *Koji* Mold for Sake-Brewing, *J. Brew. Soc. Japan*, 79, 710(1984)
13. Suginami, K. and Imayasu, S.: Fusants by Protoplast Fusion between *Aspergillus awamori* and *Aspergillus oryzae* and their Application for Sake-Brewing, *J. Brew. Soc. Japan*, 79, 725(1984)
14. Ushijima, S. and Nakadai, T.: Breeding by Protoplast Fusion of *Koji* Mold, *Aspergillus sojae*, *Agric. Biol. Chem.*, 51, 1051(1987)
15. Oyashiki, H., Uchida, M., Obayashi, A. and Oka, S.: *Mirin*-Making from *Koji* Prepared with a Mutant *Aspergillus oryzae* Producing High Activity of Carboxypeptidase, *J. Ferment. Bioeng.*, 67, 1(1989)
16. Ryu, B.H., Shin, D.B. and Bin, J.H.: Production of *mirin* by mutants of *Aspergillus*, *J. Korean Soc. Food*

- Nutr.*, (1983) Submitted.
17. Yabuki, M., Kasai, Y., Ando, A. and Fujii, T.: Rapid Method for Converting Fungal Cells into Protoplasts with a High regeneration Frequency. *Experiment. Mycol.*, **8**, 386(1984)
  18. Anne, J., Eyssen, H. and Somer, D.E.: Formation and Regeneration of *Penicillium Prysogenum* Protoplasts. *Archives of Microbiology*, **98**, 159(1974)
  19. Uchida, M., Oyashiki, H., Nagahama, G. and Hanai, S., Improvement of Yield by Application of Some Commercial Enzyme Preparations in *Mirin*-Making. *J. Ferment. Technol.*, **61**, 127(1983)
  20. Nakadai, T., Nasuno, S. and Iguchi, N.: Quantitative Estimation of Activities of Peptidases in *Koji*. *Seasoning Science, Japan*, **18**, 435(1971)
  21. Murakami, H.: Kokuzeicho Shotei Bunsekiho Chukai, 3rd ed., *J. Brew. Soc., Tokyo, Japan*, 463(1984)
  22. 能美健彦, 一島英治, 麹菌プロトプラストの単離とその應用. *醸協*, **78**, 167(1982)
  23. Ferenczy, L., Kevei, F. and Zsolt, J.: Fusion of Fungal Protoplasts. *Nature, London*, **248**, 793(1974)
  24. Ferenczy, L., Kevei, F. and Szegedi, M., High Frequency Fusion of Fungal Protoplasts, *Experientia*, **31**, 1028(1975)
  25. Ferenczy, L., Kevei, F., Szegedi, M., Franko, A. and Rojik, I.: Factors Affecting High-Frequency Fungal Protoplast Fusion. *Experientia* **32**, 1156(1976)
  26. Isaac, S. and Peberdy, J.F.: Protoplasts-Applications in Microbial Genetics (Peberdy, J.F. eds.), University of Nottingham, 12(1979)
  27. Nohmi, T. and Ichishima, E.: Regeneration of Mycelial Protoplasts of *Aspergillus oryzae*. *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 809(1982)
  28. Onuki, T., Etoh, Y. and Beppu, T.: Intraspecific and Interspecific by Protoplast Fusion. *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 451(1982)
  29. Ryu, B.U., Lee, B.H., Park, B.G., Kim, H.S., Roh, M.H.: Production of Red Pigment by Using Protoplast Fusion of *Monascus anka*. *Korean, J. Food Sci. Technol.*, **21**, 37(1989)
  30. Peberdy, J.F. and Isaac, S.: An Improved Procedure for the Isolation of Protoplasts from *Aspergillus nidulans*. *Microb. Letters* **3**, 7(1976)
  31. Kao, K.N., Michayluk, M.R.: A method for High-Frequency Intergeneric Fusion of Plant Protoplasts, *Planta*, **115**, 355(1974)
  32. Constabel, F. and Kao, K.N.: Agglutination and Fusion of Plant Protoplasts by Polythylenglycol, *Canad. J. Bot.*, **52**, 1603(1974)
  33. Ferenczy, L., Kevei, F. and Szegedi, M.: Increased Fusion Frequency of *Aspergillus nidulans* Protoplasts. *Experientia*, **31**, 50(1975)

(1993년 6월 10일 접수)