

NTG에 의한 Amylase활성이 높은 누룩사상균의 변이주의 분리

정혁준 · 김영숙* · 유대식†

계명대학교 미생물학과

*대구대학교 식품영양학과

Isolation of Mutants Overproducing Amylase from Nuruk Fungi by NTG

Hyuck-Jun Jung, Young-Sook Kim* and Tae-Shick Yu†

Dept. of Microbiology, Keimyung University, Taegu 704-701, Korea

*Dept. of Food and Nutrition, University of Taegu, Kyungsan 712-701, Korea

Abstract

Aspergillus coreanus NR 15-1, *Asp. oryzae* NR 15-3 and *Asp. oryzae* NR 2-5 isolated from traditional Korean *nuruk* were screened as parental strains producing starch hydrolyzing enzymes. They were mutagenized by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) and mutants were isolated for analysis of various amylase activities and the ability of acid production. Among them, the mutants harboring high saccharogenic activity, dextrinogenic activity, and the ability of acid production were selected. Fifteen, six, and five strains of mutants were isolated from *Asp. coreanus* NR 15-1, *Asp. oryzae* NR 2-5, and *Asp. oryzae* NR 15-3, respectively followed by NTG mutagenesis. Among these mutants, thirteen strains were identified as auxotrophic mutants. X11 (Arg⁻) mutant from *Asp. coreanus* NR 15-1 showed high glucoamylase activity and total acid productivity. Z6 (Ade⁻) mutant from *Asp. oryzae* NR 2-5 showed the highest α -amylase activity, therefore X11 and Z6 mutant were selected.

Key words: *nuruk*, *nuruk* fungi, mutant, NTG, *Aspergillus coreanus*, *Aspergillus oryzae*

서 론

우리 나라에서 오래 전부터 빛어 온 전통술의 양조학적 특징은 누룩의 사용이라 할 수 있다. 한국의 전통누룩은 주로 생소맥을 조분쇄하여 물과 혼합하여 일정한 모양으로 성형하여 야생의 미생물들을 자연접종에 의한 자연발효법으로 제조되고 있다. 전통 누룩중에는 다양한 사상균류와 효모류가 존재하여 전통술의 양조에서 누룩은 당화제의 역할 뿐 아니라 발효제의 역할도 수행하고 있다. 그러나 시판 누룩은 야생 미생물의 자연접종으로 제조되므로 세균에 오염될 가능성도 매우 높아 위생적으로 제조되어야 하며 상대적으로 효소활성이 낮은 결점도 있다(1). 이러한 결점을 보완하여 위생적이고 효소활성이 높은 누룩의 제조가 요구되고 있으며, 이에 부응하기 위한 연구가 진행되고 있다.

누룩에 관한 연구는 1900년 초기에 일본 학자들에 의하여 시작되어 최근에는 우리나라 학자들에 의하여 누룩사상균의 효소학적 특성(2,3)과 누룩의 제조방법의 개량(4), 누룩 젖산세균(5,6)의 연구 등으로 극히 단편적이고 기초적인 연구에 불과하다 할 수 있다. 누룩에 관한 연구가 지속적으로 수행되어 양조학적 관점에서 일본의 국(koji)

보다 누룩의 우수성이 입증되어야 한다. 전통 주류의 양조에서 중요한 기능을 나타내는 전통누룩의 우수성을 재현하기 위해서는 전통누룩에 관여하는 균주의 미생물학적 연구가 필수적이다. 최근 누룩으로부터 효소학적 특성이 우수한 사상균을 분리, 동정했으며 이들 균주를 육종하고자 하는 노력으로 전통누룩으로부터 분리한 *Aspergillus* (7-13), *Trichoderma*(14,15)와 *Mucor*속(16) 등을 대상으로 동종 또는 이종간의 세포융합에 관한 연구가 보고되고 있다.

본 연구는 한국 전통누룩에 분포하는 사상균중 신종으로 확인된 누룩사상균인 *Asp. coreanus* NR 15-1과 효소학적 특성이 우수한 누룩사상균인 *Asp. oryzae* NR 15-3과 *Asp. oryzae* NR 2-5(17)를 대상으로 변이주를 분리하고, 이들 변이주중 amylase 활성과 산 생성능이 우수한 균주의 세포융합에 사용할 영양요구변이주를 분리하고자 했다.

재료 및 방법

사용 시약

변이원인 NTG(N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine)

* To whom all correspondence should be addressed

dine)는 Aldrich Co.(U.S.A.) 제품을 사용하였다. 주요 배지인 Czapek solution agar, hammasten milk casein, yeast extract와 casamino acid는 Difco Co.(U.S.A.) 제품을 사용하였다. Glucose oxidase, peroxidase, 4-amino-antipyrine, Tween 80, Folin and Ciocalteu's phenol시약과 Triton X-100은 Sigma Co.(U.S.A.) 제품을 사용하였다. 기타 사용된 시약 및 재료들은 구입 가능한 최상의 제품을 사용하였다.

공시균주

본 실험에 사용된 균주는 전통누룩으로부터 분리·동정된 누룩사상균으로 액화력과 당화력이 우수한 균주인 *Asp. oryzae* NR 15-3, *Asp. oryzae* NR 2-5와 처음 동정된 신종 사상균인 *Asp. coreanus* NR 15-1(17)을 공시균주로 사용하였다.

포자현탁액 조제

포자현탁액은 공시균주를 Czapek solution agar배지의 시험판에 접종하여 28°C에서 사면배양하여 포자를 충분히 형성시켜, 살균된 0.1% Tween 80용액을 3~5 mL 넣어 백금이로 포자를 서서히 교반시켜 유리시킨다. 같은 방법으로 2회 포자를 유리시킨 후, 약간의 균사가 함유된 포자현탁액을 격렬하게 진탕하여 균사와 포자를 완전히 유리시켜 살균된 탈지면으로 여과하여 균사를 제거시킨다. 포자현탁액을 10,000×g에서 10~15분간 원심분리하여 포자를 침전시킨다. 침전된 포자를 멸균수로 씻은 다음, 20% glycerol용액으로 포자수가 약 1.0×10^9 spores/mL되게 포자현탁액을 조제하였다. 포자현탁액은 -70°C에서 보관하면서 사용했다.

변이주의 분리

각 균주의 포자현탁액을 멸균수로 세척한 후, 0.5 M Tris-HCl 완충액(pH 9.0)으로 현탁하고 변이원인 NTG를 1~3 mg/mL첨가하였다. 이 현탁액을 30°C에서 15분간 처리(1~10% survival ratio)한 후, 멸균수로 2회 세척하였다. 세척된 균주를 완전배지(2% glucose, 0.1% K₂HPO₄, 0.05% MgSO₄ · 7H₂O, 0.05% KCl, 0.2% NaNO₃, 0.001% FeSO₄ · 7H₂O, 0.5% yeast extract, 0.5% casamino acid, 1.5% agar, pH 5.6)에 도말하여 28°C에서 3~4일간 생육시킨 후, 육안으로 보았을 때 친주와 다른 포자색과 생육양상을 보이는 균주를 선별하였다.

변이주의 영양요구성

영양요구성 변이주(auxotrophic mutant)를 분리하기 위하여 위의 방법에 의해 변이처리한 포자현탁액을 최소배지로서 Czapek solution agar배지(3% sucrose, 0.1%

K₂HPO₄, 0.05% MgSO₄ · 7H₂O, 0.05% KCl, 0.2% NaNO₃, 0.001% FeSO₄ · 7H₂O, 1.5% agar, pH 5.6)에 접종하여 28°C에서 12~18시간 배양시켰다. 이 배양액을 sintered glass filter를 이용하여 최소배지에 생육하지 않은 영양요구변이주로부터 변이되지 않았거나 영양요구변이주가 아닌 종들을 분리하는 작업을 4~5회 반복하였다. 최종적으로 여과된 배양액을 멸균수로 세척하고 완전배지에 도말하여 28°C에서 3~4일간 배양시켜 자란 colony를 최소배지로 옮겨 배양하였다. 최소배지의 plate상에서 생육하지 않거나 매우 느리게 생육하는 colony를 선별하고 다시 이 균주를 adenine, arginine, ascorbic acid, biotin, histidine, leucine, lysine, methionine, nicotinic acid, pantothenic acid, pyridoxine-HCl, riboflavin, tryptophan, tyrosine을 각각 함유한(50 µg/mL) 최소배지에 생육시켜 영양요구성을 결정하였다.

고체배양

5 g의 밀기울에 증류수 4 mL를 첨가하고 121°C에서 15분간 고압증기 살균한 것을 호화밀기울(cooked wheat bran) 배지로 사용하였고, ethylene oxide gas로 멸균한 밀기울 5 g에 멸균수 4 mL를 첨가한 것을 생밀기울(raw wheat bran) 배지로 사용하였다.

위의 배지에 각 균주의 포자현탁액(1×10^9 spores/mL) 150 µL를 접종하고 28°C에서 7일간 배양하였다.

조효소액 조제

배양 균체 5 g에 0.5% NaCl 용액 25 mL를 가하고 4°C에서 하룻밤 정치한 다음 실온(15~20°C)에서 3시간 서서히 교반시켜 여과한 후, 그 여과액을 4°C, 8,000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 그 상등액 10 mL를 0.01 M sodium acetate 완충액(pH 5.0)에서 15시간 투석한 후, 그 효소액을 20 mL로 fill up(2배 희석)하여 조효소액으로 사용하였다.

효소활성 측정

Glucoamylase 활성

Glucoamylase의 활성은 일본국세청 주류분석규정(1993년 개정)(18)에 따라 분광광도계(Shimadzu UV-120-02, Japan)를 사용하여 505 nm에서 흡광도(OD)를 측정하였다. 2% 전분용액 1 mL와 0.2 M acetate 완충액(pH 5.0) 0.2 mL를 혼합하여 40°C에서 5분간 예열시킨 다음, 이 혼합액에 조효소액 0.1 mL를 첨가하여 40°C에서 20분간 반응시켜 1 N NaOH 0.1 mL를 가하고 30분간 방치하여 효소 반응을 정지시키고 1 N HCl 0.1 mL를 첨가하여 중화시켰다. 대조구의 경우 기질용액에 먼저 1 N NaOH를 첨가한 다음 조효소액을 넣고 다음의 반응을 따랐다.

색소용액(40.5 mg 4-aminoantipyrine, 250 mg phenol, 50 mg Triton X-100 in 100 mL of 0.1 M Tris-phosphate buffer(pH 7.3)와 효소용액(800 units glucose oxidase, 2,000 units peroxidase in 125 mL of 0.1 M Tris-phosphate buffer(pH 7.3)를 1:1로 혼합한 포도당 정량 시약 3 mL에 위의 반응액 0.1 mL를 첨가하여 이를 40°C에서 40분간 반응시켰다. 같은 방법으로 종류수와 표준포도당 용액(0.05% glucose, 0.1% benzoic acid in water)에 대하여 반응시킨 다음, 505 nm에서 흡광도를 측정하여 효소활성을 계산하였다. 효소 활성도 1 unit는 40°C에서 1시간 가용성 전분에 작용하여 1 mg의 포도당을 생성하는 효소의 양으로 정의하였다.

$$\text{생성 포도당(mg/mL)} = \frac{E_1 - E_2}{E_S - E_2} \times 0.5$$

E_1 : 검체를 사용한 경우의 OD

E_2 : 검체 대신 종류수를 사용한 경우의 OD

E_S : 검체 대신 표준포도당 용액을 사용한 경우의 OD

α -Amylase 활성

배양체를 각각 2 g씩 취하여 10 mL의 40 mM acetate 완충액(pH 5.0)에 혼탁한 후, 25°C에서 1시간 진탕배양하고 8,000 rpm에서 10분간 원심분리한 상등액을 조효소액으로 사용하였다.

기질용액(1% soluble starch in 40 mM acetate 완충액 pH 5.0) 2 mL를 40°C에서 5분간 예열하고 적당한 양으로 희석한 조효소액 0.1 mL를 첨가한 즉시 반응액 1 mL를 취하고, 40°C에서 30분간 반응시킨 반응액 0.1 mL를 취하여 이 반응액으로부터 효소활성을 측정하였다. 즉, 반응액 0.1 mL에 0.25 mM 요오드 용액 10 mL를 첨가한 다음, 이 반응액을 670 nm에서 투과도로 측정하였다. 효소의 활성도(unit)는 Wohlgemuth value에 준한 아래의 식으로 산출하였다(18).

$$U (\text{units/g koji}) = (12.75 \times (T_{30\text{min}} - T_{0\text{min}})/30_{\text{min}}) \times 5$$

$T_{30\text{min}}$: 30분간 효소반응을 시킨 후의 투과도

$T_{0\text{min}}$: 효소반응을 시키기 전의 투과도

β -Amylase 활성

Glucoamylase와 동일한 방법으로 조효소액을 조제한 다음, Somogyi-Nelson법(19)에 따라 β -amylase 활성을 측정하였다. 먼저 기질용액(2% soluble starch in water) 0.5 mL에 0.2 M acetate 완충액(pH 5.0) 0.2 mL를 첨가하고 40°C에서 5분간 예열한 후, 조효소액 0.1 mL를 첨가하여 40°C에서 20분간 반응시켰다. 이 후 1 N NaOH 0.1 mL를 첨가하여 반응을 정지시키고 실온에서 30분간 방치한 다음 1 N HCl 0.1 mL를 첨가하여 반응액을 중화시켰다. 이 반응액에 A용액(15% CuSO₄ · 5H₂O)과 B용액(2.5% Na₂CO₃, 2.5% Rochelle salt, 2% NaHCO₃, 20%

Na₂SO₄)을 1:25의 비율로 혼합한 혼합액 1 mL를 첨가하고 10분간 가열한 후, 1.0 mL의 C용액(25 g (NH₄)₆Mo₇O₂₄ · 4H₂O, 21 mL H₂SO₄, 3 g Na₂HAsO₄ · 7H₂O in distilled water 500 mL)을 첨가하여 거품이 생기지 않을 때까지 잘 섞은 다음 실온에서 20분간 방치하고 이 반응액을 적당히 희석한 후, 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구의 경우 기질용액에 먼저 1 N NaOH를 첨가한 다음 조효소액을 넣고 다음의 반응을 따랐다. 효소 활성도 1 unit는 40°C에서 1시간 가용성 전분에 작용하여 1 mg의 maltose를 생성하는 효소의 양으로 정의하였다.

Acid protease 활성

배양체 5 g에 종류수 100 mL를 넣어 잘 파쇄한 후, 실온에서 서서히 교반하면서 1시간 방치하고, 8,000 rpm에서 10분간 원심분리한 상등액을 조효소액으로 사용하였다.

산성 pH에서 작용하는 산성 protease 활성 측정을 위해 hammarsten milk casein을 0.6%가 되게 McIlvaine 완충액(pH 2.7)에 용해한 기질용액 5 mL에 조효소액 1 mL를 가하고 37°C에서 10분간 반응시킨 다음, 0.44 M trichloroacetic acid(TCA) 5 mL를 첨가하여 반응을 중지시키고 37°C에서 20분간 방치한 후 여과하였다. 여액 1 mL에 0.55 M Na₂CO₃ 용액 5 mL와 Folin-Ciocalteu's phenol시약(3배 희석액) 1 mL를 혼합한 후, 37°C에서 20분간 발색하고 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구는 조효소액 1 mL에 0.44 M TCA용액 5 mL를 가한 후, 기질 5 mL를 첨가한 것에 대하여 같은 방법으로 흡광도를 측정하였다. 효소활성은 대조구와의 흡광도의 차로 나타내었다(20,21).

산 생성능 측정

배양체 1 g에 1% NaCl 용액 20 mL를 넣어 잘 파쇄한 후, 30°C에서 3시간 서서히 교반하고 8,000 rpm에서 10분간 원심분리한 상등액을 대상으로 산 생성능을 측정하였다.

시료 5 mL를 100 mL beaker에 넣고 60% 알코올용액으로 용해한 0.1% phenolphthalein 용액 2~3 방울을 첨가하고, 0.1 N NaOH 용액으로 선홍색이 될 때까지 적정하였다. 그 적정 mL수를 적정산도로 표시하였으며 각각의 시료의 최종 pH값을 나타내었다.

결과 및 고찰

변이주 분리

Asp. coreeanus NR 15-1, *Asp. oryzae* NR 15-3 그리고 *Asp. oryzae* NR 2-5를 친주로하여 NTG 처리로 변이주를 분리한 결과, *Asp. coreeanus* NR 15-1로부터 15종의 변이주(Table 1), *Asp. oryzae* NR 15-3로부터 5종의 변이주(Table 2)와 *Asp. oryzae* NR 2-5로부터 6종의 변

Table 1. Amylase activity of the mutants isolated from *Aspergillus coreanus* NR 15-1

Strains	Glucoamylase (units/g koji)		α -Amylase (units/g koji)		β -Amylase (units/g koji)	
	RWB ¹⁾	CWB ²⁾	RWB	CWB	RWB	CWB
Parent NR 15-1	188	102	410	76	376	281
Mutant X1	256	233	735	404	390	360
X2	394	209	795	457	354	351
X3	97	177	342	312	360	350
X4	51	260	162	383	195	365
X5	93	115	244	125	300	360
X6	145	158	242	431	369	353
X7	40	120	140	287	167	354
X8 His.	105	49	115	8	359	105
X9 Lys.	38	19	53	37	153	57
X10 Met.	163	70	104	28	338	209
X11 Arg.	186	46	431	34	366	141
X12 Lys.	126	87	166	84	296	229
X13 His.	95	55	312	31	365	168
X14 Lys.	62	28	179	49	273	86
X15 Arg.	155	55	253	50	327	163

The strains were incubated at 28°C for 7 days.

Abbreviations used as follows; His.⁻ : histidine, Lys.⁻ : lysine, Met.⁻ : methionine, Arg.⁻ : arginine.

¹⁾RWB : Raw wheat bran

²⁾CWB : Cooked wheat bran

Table 2. Amylase activity of the mutants isolated from *Aspergillus oryzae* NR 15-3, and *Aspergillus oryzae* NR 2-5

Strains	Glucoamylase (units/g koji)		α -Amylase (units/g koji)		β -Amylase (units/g koji)	
	RWB ¹⁾	CWB ²⁾	RWB	CWB	RWB	CWB
Parent NR 15-3	152	175	94	351	340	366
Mutant Y1	152	104	667	697	399	390
Y2	192	196	689	740	401	402
Y3 Lys.	157	24	703	134	335	156
Y4 Rib.	120	69	1,036	375	350	317
Y5 Nic., Trp.	195	151	40	30	291	306
Parent NR 2-5	181	136	62	531	373	361
Mutant Z1	187	106	51	115	352	366
Z2	163	66	47	36	382	356
Z3	121	77	51	612	360	366
Z4	171	90	11	81	360	356
Z5 Ade.	72	143	1,007	511	341	315
Z6 Ade.	123	154	1,348	591	351	317

The strains were incubated at 28°C for 7 days.

Abbreviations used as follows; Lys.⁻ : lysine, Trp.⁻ : tryptophan, Rib.⁻ : riboflavin, Nic.⁻ : nicotinic acid, Ade.⁻ : adenine.

¹⁾RWB : Raw wheat bran

²⁾CWB : Cooked wheat bran

이주(Table 3)를 분리할 수 있었다. 이들 26종의 변이주 중 13종이 영양요구변이주로서 영양요구성을 나타내었다. *Asp. coreanus* NR 15-1의 생육형태와 생육양상이 다른 변이주를 임의로 X1에서 X15 변이주로, *Asp. oryzae* NR 15-3으로부터 Y1에서 Y5 변이주로, 그리고 *Asp. oryzae* NR 2-5로부터 Z1에서 Z6 변이주를 분리하고 표기하였다.

변이주는 최소배지에서 친주와 같이 생육하였으나 포자의 색과 colony의 형태는 현저히 달랐으며, 영양요구 변이주의 경우는 완전배지에서는 친주와 변이주 모두 생육하였으나 최소배지에서는 친주는 생육하나 이들 영양

요구변이주는 생육하지 않았다. 또한 각각의 영양요구변이주는 특정 아미노산과 핵산염기 등을 최소배지에 첨가했을 경우에만 생육하므로, 이로부터 이들 변이주의 영양요구성을 결정할 수 있었다.

변이주의 효소활성

Amylase 활성

분리된 변이주를 생밀기울과 호화밀기울에서 생육시킨 후, 생성된 amylase의 활성을 측정한 결과, Table 1과 Table 2에 나타난 바와 같이 *Asp. coreanus* NR 15-1의 glucoamylase 활성은 친주와 변이주인 X1와 X2 변이주

는 생밀기울에서 호화밀기울에서보다 효소활성이 높았으며 X2 변이주는 친주보다 2배 이상의 효소활성이 394 units/g koji로 가장 높은 glucoamylase 활성을 나타내었다. Arginine 영양요구성 변이주인 X11 변이주의 glucoamylase활성이 186 units/g koji로 친주와 비슷한 효소활성을 나타냈으며, X1, X2와 X11 변이주 이외의 변이주는 효소활성이 친주보다 낮았다.

X2 변이주의 α -amylase는 생밀기울에서 795 units/g koji로 친주보다 약 2배 높은 활성을 나타내었으며, β -amylase는 X1 변이주가 생밀기울에서 390 units/g koji로 높은 활성을 보였다. *Asp. coreanus* NR 15-1의 변이주들은 α -amylase와 β -amylase의 활성이 호화밀기울에서보다 생밀기울에서의 활성이 대체적으로 높았다. Park 등(22)이 한국전통누룩으로부터 분리한 *Asp. oryzae*의 5 균주중 glucoamylase와 α -amylase활성이 가장 높은 J04 균주의 glucoamylase활성이 160 units였으며 α -amylase활성은 32 units였다. 본인 등이 분리한 X2변이주의 glucoamylase활성이 394 units로서 Park 등(22)의 결과보다 2.5배 높은 활성을 나타내었으며, α -amylase활성은 457 units로서 Park 등(22)의 결과보다 약 14.3배 높은 효소활성을 나타내었다.

Asp. oryzae NR 15-3의 glucoamylase는 호화밀기울에서 활성이 높은 반면, 영양요구변이주인 Y3, Y4와 Y5 변이주는 생밀기울에서의 효소활성이 높았다. Nicotinic acid와 tryptophan 영양요구 변이주인 Y5는 생밀기울에서 195 units/g koji로 높은 glucoamylase 활성을 나타내었다. Y4(riboflavin⁻)변이주의 α -amylase활성은 생밀

기울에서 1,036 units/g koji로 친주보다 11배 높은 효소활성을 나타내어 다른 변이주들보다 높은 활성을 나타내었으며, β -amylase는 Y2 변이주가 호화밀기울에서 402 units/g koji로 가장 높았다. 친주의 α -amylase와 β -amylase활성이 호화밀기울에서 활성이 높은 반면 Y3, Y4와 Y5 변이주는 대체적으로 생밀기울에서 효소활성이 높았다.

Asp. oryzae NR 2-5로부터 변이된 Z1 변이주의 glucoamylase활성이 생밀기울에서 187 units/g koji로 친주와 비슷한 효소활성을 가졌으며, α -amylase의 경우 adenine 영양요구변이주인 Z6 변이주는 생밀기울에서 1,348 units/g koji로 친주보다 21.7배 높은 효소활성을 나타내었다. *Asp. oryzae* NR 2-5의 β -amylase활성이 친주와 변이주 모두 비슷한 효소활성을 나타내었다.

공식균주인 *Asp. coreanus* NR 15-1은 생소맥분을 원료로 제조된 누룩으로부터 분리된 전통사상균이므로 당연히 생소맥분배지에서 amylase활성이 높은 것은 당연한 일이라 할 수 있다.

이상의 결과로부터 *Asp. coreanus* NR 15-1로부터 얻은 X2 변이주는 α -amylase 뿐 아니라 glucoamylase활성도 매우 높으며 생전분배지에서의 효소생성도 양호하여 한국전통누룩의 제조용 사상균주로서 산업적 가치가 충분한 균주라 사료된다.

Acid protease 활성 및 산 생성능

Table 3와 Table 4에 나타난 바와 같이, *Asp. coreanus* NR 15-1의 산성 protease활성이 *Asp. oryzae* NR 15-3과 *Asp. oryzae* NR 2-5의 효소활성보다 60~400% 높았

Table 3. Acid protease activity and total acid productivity of the isolated mutants

Strains	Acid protease (OD 660 nm)		Total acid productivity				
			RWB ¹⁾		CWB ²⁾		
	RWB ¹⁾	CWB ²⁾	pH	used NaOH (mL)	pH	used NaOH (mL)	
Parent NR 15-1	0.083	0.117	4.58	0.7	2.81	3.9	
Mutant X1	0.088	0.055	5.08	0.6	4.36	0.9	
X2	0.133	0.080	5.38	0.3	4.42	0.9	
X3	0.074	0.048	4.53	0.8	3.64	2.5	
X4	0.079	0.053	4.08	1.1	3.41	1.8	
X5	0.102	0.050	5.28	0.7	3.73	1.7	
X6	0.099	0.061	5.69	0.8	5.52	0.8	
X7	0.160	0.082	4.32	0.8	3.63	1.2	
X 8 His. ⁻	0.095	0.104	4.44	0.4	2.82	3.0	
X 9 Lys. ⁻	0.069	0.021	4.19	0.6	3.89	0.6	
X10 Met. ⁻	0.099	0.088	4.03	0.5	2.88	2.9	
X11 Arg. ⁻	0.101	0.107	5.02	0.3	2.79	3.1	
X12 Lys. ⁻	0.022	0.014	3.50	1.1	3.20	1.4	
X13 His. ⁻	0.069	0.117	4.98	0.3	2.78	3.2	
X14 Lys. ⁻	0.020	0.008	5.17	0.2	3.54	1.0	
X15 Arg. ⁻	0.033	0.055	4.13	0.5	2.62	3.0	

The strains were incubated at 28°C for 7 days.

Abbreviations used as follows; His.⁻ : histidine, Lys.⁻ : lysine, Met.⁻ : methionine, Arg.⁻ : arginine.

¹⁾RWB : Raw wheat bran

²⁾CWB : Cooked wheat bran

Table 4. Acid protease activity and total acid productivity of the auxotrophic mutants

Strains	Acid protease (OD 660 nm)		Total acid productivity			
	RWB ¹⁾	CWB ²⁾	pH	used NaOH (mL)	pH	used NaOH (mL)
Parent NR 15-3	0.033	0.094	6.14	0.3	6.30	0.2
Mutant Y1	0.028	0.074	6.32	0.4	6.28	0.5
Y2	0.036	0.062	6.26	0.5	6.05	0.4
Y3 Lys.	0.031	0.010	6.13	0.5	5.94	0.5
Y4 Rib.	0.078	0.101	6.37	0.3	5.41	0.5
Y5 Nic., Trp.	0.038	0.204	4.71	0.5	4.14	0.7
Parent NR 2-5	0.052	0.106	6.23	0.3	6.17	0.2
Mutant Z1	0.060	0.094	6.09	0.4	5.58	0.4
Z2	0.032	0.091	5.07	0.4	4.31	0.6
Z3	0.085	0.095	6.28	0.3	6.29	0.2
Z4	0.070	0.098	5.07	0.5	4.04	0.7
Z5 Ade.	0.022	0.023	5.89	0.9	6.27	0.8
Z6 Ade.	0.001	0.045	6.49	0.4	6.72	0.5

The strains were incubated at 28°C for 7 days.

Abbreviations used as follows; Lys.: lysine, Trp.: tryptophan, Rib.: riboflavin, Nic.: nicotinic acid, Ade.: adenine.

¹⁾RWB: Raw wheat bran

²⁾CWB: Cooked wheat bran

으며, 생밀기울과 호화밀기울에서 친주와 변이주 모두 OD 0.1내외로 다양한 효소활성을 나타내었다. 그 중 Y5 변이주의 경우 호화밀기울에서 OD 0.204로 가장 높은 효소활성을 나타낸 반면 생밀기울에서는 0.038로서 친주와의 효소활성과 비슷한 활성을 나타내었다. 그리고 Z6 변이주는 생밀기울에서 OD 0.001의 산성 protease활성을 나타내어 효소활성이 가장 낮은 변이주였다. 밀기울배지에서 *Asp. oryzae* KC-15의 산성 protease활성은 0.046으로서 극히 미약하게 생성된다고 했으나(21) 생밀기울 배지에서 *Asp. coreeanus* NR 15-1의 효소활성은 0.083으로서 위의 결과보다 약 2배 높은 활성을 나타내었다. 공시균주로부터 얻은 X2, X7과 X11 변이주의 산성 protease 활성은 0.133, 0.160과 0.101으로 높은 효소활성을 나타내었으며 특히, X7 변이주는 친주보다 약 2배 높은 효소활성(0.160)을 나타냈다. 산성 protease활성이 높은 X7 변이주는 전통술의 양조에서 담금액의 pH가 일반적으로 4.0이하인 점을 고려한다면 pH 3.0에서 효소활성을 나타내는 protease의 작용은 양조학적 측면에서 큰 역할을 한다고 사료된다.

Asp. oryzae NR 15-3과 NR 2-5의 산성 protease 활성은 *Asp. oryzae* KC-15(21)의 효소활성과 비슷한 활성을 나타내며, Y5 변이주를 제외한 변이주도 친주와 비슷한 효소활성을 나타내었다.

산 생성능에 있어서는 *Asp. coreeanus* NR 15-1, *Asp. oryzae* NR 15-3와 *Asp. oryzae* NR 2-5보다 대체적으로 산 생성능이 우수하였으며 생밀기울에서보다 호화밀기울에서 산을 많이 생산하는 것으로 나타났다. Lysine 요구성 변이주인 X12 변이주는 생밀기울에서 pH 3.5로 산 생성능이 우수하였으며 호화밀기울에서는 arginine 요구성 변이주인 X15 변이주가 pH 2.62로 가장 많은 산을

생산하는 것으로 나타났다.

위의 효소활성을 검토한 결과, 산 생성능이 우수한 *Asp. coreeanus* NR 15-1의 영양요구변이주 중 glucoamylase 활성이 높은 X11(Arg.) 변이주와 *Asp. oryzae* NR 2-5의 α-amylase 활성이 가장 높은 영양요구변이주인 Z6 (Ade.) 변이주를 세포융합에 사용이 가능한 균주라 사료되었다.

변이주의 형태적 특성

Asp. coreeanus NR 15-1로부터 얻은 arginine 영양요구변이주인 X11과 *Asp. oryzae* NR 2-5로부터 얻은 adenine 영양요구변이주인 Z6, 그리고 이들 변이주의 친주를 완전배지에서 7일간 생육시켜 자란 colony의 형태적 특성을 살펴보았다.

Asp. coreeanus NR 15-1의 경우, 친주와 X11 변이주 모두 circular이며 중앙돌기형의 형태에 사상형의 가장자리, 방사상의 표면을 가진 colony가 형성되었다. 그리고 X1과 X7 변이주의 colony색상은 친주보다 연한 황색이며 colony 중앙부의 돌기형부분에 백색에 가까운 흰황색의 포자가 밀생하고 있었다. 또한 Y4 변이주의 colony 중앙부의 돌기형부분에 황갈색의 포자가 밀생하여 다른 변이주와 색상에서 많은 차이점을 나타내었다. *Asp. oryzae* NR 15-3의 Y1 변이주는 친주의 황색색소 생성능력이 상실되어 포자의 색상은 완전히 백색을 나타내고 있었다. 그리고 Y2 변이주는 친주보다 색소생성능력이 약하여 colony색상이 아주 연한 황백색을 나타내었으며 colony 중앙부위에서 약한 황색을 나타내었다. *Asp. oryzae* NR 2-5의 경우, 친주는 불록한 주름진 형태의 colony이나 Z6 변이주는 평편한 동심형의 colony로 생육하였다(Table 5).

Table 5. Morphological characteristics of the isolated mutants

Strains	Form	Elevation	Margin	Surface
<i>Asp. coreeanus</i> NR 15-1				
Parental strain	circular	umbonate	filamentous	radiate
X11 Arg.	circular	umbonate	filamentous	radiate
<i>Asp. oryzae</i> NR 2-5				
Parental strain	circular	convex	filamentous	rugose
Z6 Ade.	circular	flat	filamentous	concentric

The strains were incubated at 28°C for 7 days on complete agar medium.

Asp. oryzae NR 2-5의 colony에는 진한 황갈색의 포자가 흔재해 있으며 영양요구변이주인 Z5의 colony 색상은 깨끗한 황색으로 형성된 특징을 나타내고 있었다.

요 약

한국 전통누룩으로부터 분리·동정된 *Asp. coreeanus* NR 15-1, *Asp. oryzae* NR 15-3, 그리고 *Asp. oryzae* NR 2-5로부터 amylase활성이 높고 세포융합에 사용될 변이주를 분리하고 그의 특성을 검토했다. *Aspergillus* 속 사상균을 변이처리하기 위한 변이원으로는 NTG를 사용하였으며 *Asp. coreeanus* NR 15-1로부터 총 15종의 변이주 중 8종의 영양요구변이주, *Asp. oryzae* NR 15-3으로부터 총 5종 중 3종의 영양요구변이주를, *Asp. oryzae* NR 2-5로부터 총 6종 중 2종의 영양요구변이주를 분리하였다. 이들 영양요구변이주는 최소배지에서는 생육하지 않았으며 특정 아미노산과 핵산염기 등을 배지에 첨가했을 경우에만 생육하였다. 분리된 변이주의 당화력, 액화력 및 산 생성능 등을 검토한 결과, 산 생성능이 우수한 균주인 *Asp. coreeanus* NR 15-1로부터 glucoamylase 활성이 높은 X11(Arg.) 변이주와 *Asp. oryzae* NR 2-5로부터 α -amylase 활성이 우수한 영양요구변이주인 Z6(Ade.) 변이주를 세포융합에 사용이 가능한 변이주라 사료되었다. 앞으로 이들의 변이주를 대상으로 세포융합을 통해 우수한 사상균주를 획득할 수 있는 기초적 자료가 됨으로서 전통누룩의 과학화에 기여할 뿐만 아니라 외국 주류와 경쟁력이 있고 과학화된 전통주류의 개발이 가능하리라 사료된다.

문 헌

- Kim, H.S., Hyun, J.S., Kim, J., Ha, H.P. and Yu, T.S. : General characterization of traditional Korean nuruk. *J. Inst. Nat. Sci. Keimyung University*, **15**, 235-242 (1996)
- Kim, H.S., Hyun, J.S., Kim, J., Ha, H.P. and Yu, T.S. : Characteristics of useful fungi isolated from traditional Korean nuruk. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **26**, 767-774 (1997)
- Yu, T.S., Kim, T.H. and Joo, C.Y. : Purification and characteristics of glucoamylase in *Aspergillus oryzae* NR 3-6 isolated traditional Korean nuruk. *J. Microbiol.*, **37**, 80-85 (1999)
- Kim, T.Y. and Yoon, I.W. : Fermentation characteristics of traditional alcoholic beverages brewed with improved-nuruk. *J. East Asian of Dietary Life*, **7**, 399-404 (1997)
- Lee, J.H. and Yu, T.S. : Identification and characteristics of lactic acid bacteria isolated nuruk. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **15**, 359-365 (2000)
- Jo, J.K. and Ha, D.M. : Isolation and identification of the lactic acid bacteria from nuruk. *Agri. Chem. Biotechnol.*, **38**, 95-99 (1995)
- Ushijima, S., Nakadai, T. and Uchida, K. : Breeding of new koji-molds through interspecific hybridization between *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus sojae* by protoplast fusion. *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 1667-1676 (1990)
- Ushijima, S., Nakadai, T. and Uchida, K. : Further evidence on the interspecific protoplast fusion between *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus sojae* and subsequent haploidization, with special reference to their production of some hydrolyzing enzymes. *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 2393-2399 (1990)
- Ogawa, K., Ohara, H. and Toyama, N. : Interspecific hybridization of *Aspergillus awamori* var. *kawachi* and *Aspergillus oryzae* by protoplast fusion. *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 1985-1991 (1988)
- Lee, S.Y., Lee, J.S. and Lee, Y.N. : Protoplast fusion of *Aspergillus oryzae*. *Kor. Jour. Microbiol.*, **27**, 216-220 (1989)
- Ogawa, K., Ohara, H. and Toyama, N. : Intraspecific hybridization of *Aspergillus awamori* var. *kawachi* by protoplast fusion. *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 337-342 (1988)
- Kirimura, K., Sato, T., Nakanishi, N., Terada, M. and Usami, S. : Breeding of starch-utilizing and itaconic-acid-producing koji molds by interspecific protoplast fusion between *Aspergillus terreus* and *Aspergillus usamii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **47**, 127-131 (1997)
- Park, S.K., Lee, S.W., Moon, I.S., Shon, B.S. and Kang, S.K. : Formation and fusion of protoplasts from the cellulolytic fungi, *Aspergillus niger* MAN-831 and *Aspergillus wentii* MAW-538. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **24**, 964-969 (1995)
- Ogawa, K., Ohara, H., Koide, T. and Toyama, N. : Intraspecific hybridization of *Trichoderma reesei* by protoplast fusion. *J. Ferment. Bioeng.*, **67**, 207-209 (1989)
- Park, H.M., Jeong, J.M., Hong, S.W., Hah, Y.C. and Seong, C.N. : Interspecific protoplast fusion of *Trichoderma koningii* and *Trichoderma reesei*. *Kor. Jour. Microbiol.*, **24**, 91-97 (1986)
- Ohnuki, T., Etoh, Y. and Beppu, T. : Intraspecific and interspecific hybridization of *Mucor pusillus* and *M. miehei* by protoplast fusion. *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 451-458 (1982)
- Kim, H.S., Hyun, J.S., Kim, J., Ha, H.P. and Yu, T.S. : Enzymological characteristics and identification of useful

- fungi isolated from traditional Korean *nuruk*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **26**, 456-464 (1998)
18. The Brewing Society of Japan : *The annotation of the official method of analysis of the National Tax Administration Agency*. 4th ed., Tokyo, p.218-226 (1993)
19. Somogyi, M. : Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.*, **195**, 19-23 (1952)
20. Chung, M.J. and Park, N.K. : Studies on the proteolytic enzyme of mold. *Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **7**, 157-164 (1979)
21. Lee, M.J. and Chung, M.J. : Studies on the production of protease by *Aspergillus oryzae* KC-15 and characteristics of the enzymes. *Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **8**, 77-85 (1980)
22. Park, J.W., Lee, K.H. and Lee, C.Y. : Identification of filamentous molds isolated from Korean traditional *nuruk* and their amylolytic activities. *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **23**, 737-746 (1995)

(2000년 8월 19일 접수)