

*Aspergillus oryzae*와 *Aspergillus shirousamii*간의 융합주에 의한 미림의 생산

신동분 · 류병호*

경성대학교 식품공학과

Production of Mirin by Fusant Obtained Between *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus shirousamii*

Dong-Bun Shin and Beung-Ho Ryu

Department of Food Science and Technology, Kyungshung University, Pusan

Abstract

This study was carried out for high quality mirin production by fusant F-50. Cellularly fused between *Aspergillus oryzae* 9-12 and *Aspergillus shirousamii* 6082-60. The conventional and the improvement methods in *Mirin*-making by F-50 showed high level of total sugar, reducing sugar and amino-nitrogen of 42%, 38% and 0.18%, respectively. Free amino acids in *Mirin* were found to 387.2 mg% glutamic acid, 283.8 mg% arginine, 244.0 mg% leucine, 218.0 mg% aspartic acid, 231.1 mg% alanine, 168.3 mg% serine and 148 mg% phenylalanine. Organic acids in *Mirin* were contained: oxalic acid, citric acid, malic acid, succinic acid, lactic acid, acetic acid and propionic acid. Sugars such as glucose, maltose, isomaltose, maltotriose, ribose, isomaltotriose and isomatotetraose were also found in *Mirin*. The clouding formation of *Mirin* made by F-50 showed 0.03 alcohol clouding, 0.08 water clouding and negative heat clouding.

Key words: mirin production, *Aspergillus* sp.

서 론

식생활의 향상과 더불어 식문화의 급격한 변화로 인하여 식품이 양에서 질로 전환하는 과정에서 사람들의 기호에 알맞은 천연 조미료의 개발이 요구되고 있다. 현재 조미료는 설탕, 식염 및 식초 등의 조미료와 식품에서 추출한 천연 조미료 및 화학 조미료 등이 많이 있으나, 식품의 종류에 따라 조미료의 사용이 제한되어 있다.

요즈음 가정이나 사회에서 일고 있는 분위기는 음식물이나 가공식품의 양에서 질의 시대에 접어들어 음식물의 다양화, 고급화, 천연식품 지향 및 건강지향의 방향으로 전환하고 있으므로, 인공 합성조미료 보다는 안전하고 풍미가 우수한 발효 주류 조미료(酒類 調味料)의 사용이 훨씬 확대될 것으로 전망된다. 미림은 발효 주류 조미료로서 식품의 조리 및 가공에 특유의 풍미를 제공해 줄 뿐만 아니라, 식품의 재료가 가지고 있는 냄새의 은폐효과(masking effect), 특히 어취의 은폐효과, 감미의 부여, 최상의 지미(旨味)를 나타내며, 짠맛, 뉘은맛의 완

화작용 및 식품의 조직(texture)의 개량 등에 큰 역할을 한다^{1) 2)}. 미림은 원래 수산식품의 어취의 은폐효과와 사용목적으로 개발되었으나, 그 후 식품가공의 부향미료(賦香味料)로서 어육연제품, 축육제품, 침지물, 야채, 스프, 과자, 빵 등에 널리 사용되고 있고, 최근에는 일반 가정에까지 애용되고 있다³⁾.

종래에는 미림을 제조할 때 증자한 찹쌀에 국균을 접종하여 배양시킨 후 35% 알코올을 첨가하여 발효시켜 만들었다. 그러나 이러한 방법으로 만들어진 미림은 수율이 낮을 뿐 아니라, 이용 불가능한 부산물이 많이 나오기 때문에 양조법의 개선이 필요하다^{4) 5)}. Uchida 등⁶⁾은 미림의 생산성을 높이기 위하여 시판되는 여러가지 효소를 사용하여 품질을 개선하였고, 또 알코올 농도를 일정하게 제한한 후 효소를 농도별로 첨가하여 미림의 제조공정의 개선을 시도하였다⁶⁾.

한편 미림의 양조시 국균에서 효소활성을 조사하였으며 국균에서 분비하는 효소가 미림의 분비를 촉진한다고 하였다^{10) 11)}. 미림을 제조하는 국균중 *Aspergillus oryzae*의 acid carboxypeptidase의 활성이 높은 변이주가 미림의 제품을 개선하였다고 보고하였다¹²⁾. Suginami와 Imayasu는 이러한 연구를 토대로 하여 국균을 세포융합하여 효소의 활성이 높은 융합주로서 미림의 품질을 개선하였다¹³⁾. Ushijima와 Nakadai 등¹⁴⁾은 국균의 원형질체의

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

융합으로 acid carboxypeptidase의 활성이 높은 융합주로서 품질이 우수한 미림을 생산하였다⁽¹⁴⁾. 본 연구는 전보에서 *Aspergillus oryzae* 9-12와 *Aspergillus shirousamii* 6082-60간에 세포융합시켜 효소활성이 제일 높은 융합주 F-50으로 미림을 제조하고 그 제품의 품질을 검토하였다.

재료 및 방법

재료

본 연구에 사용되는 찹쌀은 시중에서 구입하였다. 미림 제조에 사용하는 찹쌀을 잘 씻은 후 12~24시간 물에 담구었다가 건져 121℃에서 20분 동안 증자한 후 사용하였다.

사용균주

본 연구에 사용된 균주는 전보에서 세포융합으로 육종한 융합주인 F-50 균주를 사용하였다⁽¹⁵⁾.

Koji의 제조

500 ml 삼각 flask에 증자한 찹쌀(200g)을 넣고, 미리 사면배양하여 얻은 곰팡이의 포자(0.2g)를 접종한 다음 무균상자에 넣어 30℃에서 48시간 배양하였다⁽¹⁶⁾.

Koji로부터 조효소의 조제

Koji(麴) 10g을 10 mM 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℃에서 24시간 투석시킨 다음 10 mM acetate buffer(pH 5.0) 10 ml를 넣은 후 이를 조효소의 여가 측정시료로 하였다.

미림의 제조

미림의 제조에 사용된 균주는 *A. oryzae* 9의 변이주인 *A. oryzae* 9-12와 *A. shirousamii* FIO 6082의 변이주인 *A. shirousamii* IFO 6082-60과 이 두 변이주에 의하여 원형질체를 융합한 융합주 F-50을 사용하여 제조하였다.

재래식 방법은 증자한 찹쌀 628g, koji 93g에 35% 알코올 279g을 넣고 30℃에서 30일간 발효하였다. 그리고 개량식은 증자한 찹쌀 628g, koji 93g과 12.5% 알코올 201g을 첨가하여 30℃에서 5일간 배양한 후, 다시 여기에 α-amylase 40 mg(4.000 DU·g⁻¹)과 protease 48.3 mg(6.000 PU g⁻¹), 93.2%의 알코올 78g을 넣은 다음 30℃에서 25일간 발효한 후 여과하여 미림의 시료로 사용하였다⁽¹⁶⁾.

조효소액의 조제

Koji 10g에 0.5% NaCl 100 ml를 혼합하여 그 혼합액을 때때로 교반하면서 20℃에서 3시간 반응시킨 후, 그 추출액을 조효소액으로 하여 활성을 측정하였다.

Table 1. HPLC conditions for sugar analysis

Column	: μBondapak/CH
Column temperature	: 23℃
Elute solution	: Acetonitrile : water (75:25)
Elute flow	: 2 ml/min
Detector	: Refractometer (R-401 waters Co.)

Table 2. HPLC conditions for organic acid analysis in Mirin

Column	: Aminex HPX-87H
Column temperature	: 60℃
Guard column	: Miro-Guard Ion Exclusion Refill Cartridge
Eluant	: 0.012 M H ₂ SO ₄
Flow rate	: 0.8 ml/min
Detector	: UV/Vis detector(436 nm)

효소활성의 측정

α-Amylase 및 glucoamylase의 활성은 alkali-gelatinized potato starch로, protease는 milk casein법으로 측정하였다⁽¹¹⁾. Acid carboxypeptidase(ACPase)는 Nakadai 등⁽¹¹⁾이 서술한 방법으로 측정하였으며, ACPase 활성 1 unit는 30℃에서 시간당 carbobenzoxy-glutamyl-tyrosine(Cbz-Glu-Tyr)으로부터 tyrosine 1 μg이 생성되는데 필요한 효소의 양으로서 나타내었다.

Transglucoamylase(TGase)는 National Research Institute of Brewing(Tax Administration Agency, Japan)의 방법⁽¹²⁾으로 측정하였다. 효소의 활성 1 unit는 40℃에서 시간당 α-methyl-D-glucoside로부터 glucose 1 μg이 생성되는데 필요한 효소의 양으로 나타내었다.

미림의 일반성분의 분석

총당, 환원당 및 질소는 상법에 따라 분석하였다.

유리 아미노산의 분석

시료 50 ml를 Amberite IR-120(H⁺) column(2.0×2.5 cm)에 통과시킨 후, 200 ml NH₄OH로 용리시킨 다음 감압농축하여 그 잔사를 구연산 완충액(pH 2.2) 25 ml로 정용한 다음 이를 아미노산 자동분석기(JLC-6AH No. 310)로 분석하였다⁽¹⁷⁾.

당의 분석

당류의 분석은 HPLC의 방법에 따라 실험하였다⁽¹⁸⁾. 시료 일정량을 막 여과지(0.45 μm)로 여과한 후 HPLC로 분석하였다. HPLC의 분석조건은 Table 1과 같다.

유기산의 정량

시료를 막여과지(0.45 μm)로 여과한 후 여액 90 μl을 주입하고 0.012 M H₂SO₄로 0.8 ml/min의 유속으로 용리시켰다. 용리시킨 액에 0.2 mM bromophenol blue, 15 mM Na₂HPO₄ 및 2 mM NaOH 혼합액을 넣어 HPLC의

분석용 시료로 하여 0.5 ml/min에서 유속으로 흘리면서 436 nm의 UV/Vis detector로 정량하였다⁽⁶⁾. 유기산의 분석조건은 Table 2에 나타내었다.

에탄올 분석

Gas-chromatography법에 의하여 측정하였다. 각각의 배양액을 여과하여 증류수로 25배 희석한 후 gas-chromatography에 2 μ l를 주입하였고, 내부표준물질로는 cyclohexanol을 사용하였다. 에탄올의 분석조건은 Table 3에 나타내었다.

백탁(白濁)물질의 검색

제조된 미림을 여과지(Toyo paper No.2)로 여과한 다음 Yamashita와 Doi의 방법⁽³⁰⁾에 따라 백탁(clouding)의 생성을 조사하였다⁽¹⁹⁾.

알코올에 의한 백탁(alcohol clouding)의 생성: 미림 5 ml에 알코올의 농도가 44.5%(v/v)가 되도록 알코올을 첨가하여 조절하여 백탁의 생성여부를 관찰하였다.

물에 의한 백탁(water clouding)의 생성: 미림 5 ml에 증류수 5 ml를 가한 후 이 혼합액을 잘 흔들어 2시간 동안 방치한다. 이때 생성된 탁도를 spectrophotometer를 이용하여 660 nm에서 측정하였다.

가열에 의한 백탁(heat clouding)의 생성: 미림 100 ml를 50 ml가 될 때까지 농축한 후 2~3시간 동안 방치한 다음 탁도가 생기면 positive(+), 형성되지 않으면 negative(-)로 표시하였다.

Table 3. Conditions of GLC for alcohol analysis in Mirin

Column	: 30% sorbitol 60-80 mesh shimalite 3 mm \times 6 m stainless steel
Carrier gas	: N ₂ (22.5 ml/min)
Oven temperature	: 120 $^{\circ}$ C
Injector temperature	: 235 $^{\circ}$ C
Detector	: FID

Table 4. Yield and chemical components of Mirin made from different Koji by Fusant F-50 *A. oryzae* 9-12 and *A. shirousamii* IFO 6082-60

Components	Conventional mash			Improvement mash		
	F-50	<i>A. oryzae</i> 9-12	<i>A. shirousamii</i> IFO-6082-60	F-50	<i>A. oryzae</i> 9-12	<i>A. shirousamii</i> IFO 6082-60
Total sugar as glucose(%)	41.3	40.0	40.2	42.0	41.0	41.0
Reducing sugar as glucose(%)	34.2	36.9	36.8	38.0	40.0	40.0
Nitrogen(%)	0.082	0.076	0.075	0.401	0.402	0.402
Amino nitrogen(%)	0.034	0.028	0.023	0.180	0.163	0.163
Ethanol(%)	10.3	10.3	10.3	10.3	10.3	10.3
Acidity(0.1 N NaOH \cdot ml/min)	0.46	0.46	0.47	0.48	0.48	0.48
Specific gravity at 15 $^{\circ}$ C	1.160	1.161	1.161	1.161	1.163	1.163
pH	5.7	5.7	5.7	5.6	5.6	5.6
Yield of Mirin(Mirin \cdot g/mash \cdot g)	0.69	0.69	0.69	0.85	0.85	0.85

결과 및 고찰

미림의 제조

A. oryzae 9-12와 *A. shirousamii* IFO 6082-60으로부터 융합한 융합주 F-50을 이용하여 재래식과 개량식인 효소첨가법으로 미림을 제조하여 일반성분을 분석한 결과 Table 4와 같다.

총당은 재래식과 효소첨가법에 의한 F-50, *A. oryzae* 9-12 및 *A. shirousamii* IFO 6082-60 균주 모두 40.2~42%로 거의 비슷한 수치를 나타내었고, 환원당은 재래식 방법에서는 3균중서 34.2~36.9% 범위였으며, 효소를 첨가하여 만든 미림에서는 38.0~40.0%로 약간 높은 경향이었다. 특히 맛에 관계하는 아미노태 질소는 재래식 방법으로 만든 미림에서는 F-50, *A. oryzae* 9-12 및 *A. shirousamii* IFO 6082-60에서 각각 0.034, 0.028 및 0.023%이었으나 효소를 첨가하여 만든 미림에서는 F-50, *A. oryzae* 9-12 및 *A. shirousamii* IFO 6082-60에서 각각 0.180, 0.163 및 0.162%로 약 50배 이상 많았다. 이러한 결과는 재래식 보다는 효소를 첨가하여 만든 미림의 경우, 첨가한 효소인 protease에 의하여 단백질의 분해가 잘 이루어진 것으로 생각된다.

미림의 수율은 3균주 모두 재래식의 경우 0.69 g/mash \cdot g이었으나 효소를 첨가한 미림의 경우는 0.85 g/mash \cdot g으로 약간 높았다. 이러한 결과는 α -amylase와 protease의 첨가로 기질의 분해가 잘 일어난 것으로 판단된다. 그리고 재래식과 개량식인 효소첨가에 의한 미림의 제조에 있어서 친주보다 융합주인 F-50이 총당, 환원당 및 아미노태 질소의 함량이 높았다. 이것은 융합주가 친주보다 ACPase의 활성이 약 1.5배 이상 높기 때문인 것으로 사료된다. 深谷 등⁽⁴⁾은 미림 제조시 쌀 국균외에 transglucosidase, α -amylase, β -amylase 및 protease를 첨가하여 품질이 우수한 미림을 제조하였다고 하였다. 본 실험의 결과는 森田과 松岡⁽¹⁾ 및 Oyashiki 등⁽²⁰⁾과의 실험결과와 비슷한 경향이었다.

Table 5. Free amino acids in Mirin made from different Koji by Fusant F-50, *A. oryzae* 9-12 and *A. shirousamii* IFO 6082-60 (mg%)

Amino acids	Conventional mash			Improvement mash		
	F-50	<i>A. oryzae</i> 9-12	<i>A. shirousamii</i> IFO-6082-60	F-50	<i>A. oryzae</i> 9-12	<i>A. shirousamii</i> IFO 6082-60
L-Aspartic acid	43.0	28.4	22.4	218.0	183.6	170.0
L-Threonine	18.2	16.0	18.0	68.0	40.6	41.0
L-serine	31.0	30.6	22.3	168.3	146.2	140.3
L-Glutamic acid	92.4	85.5	72.6	387.2	340.2	350.0
L-proline	16.0	14.2	13.0	87.0	64.0	64.2
L-Glycine	23.0	18.6	10.2	10.7	83.0	70.6
L-Alanine	46.6	43.0	40.4	213.1	184.5	180.7
L-Valine	27.3	30.2	23.8	147.0	120.0	116.2
L-Cysteine	7.0	6.2	4.7	10.3	9.2	7.0
L-Methionine	15.3	13.4	14.6	44.2	30.8	31.6
L-Isoleucine	24.6	20.8	18.0	108.6	92.0	90.4
L-Leucine	43.0	40.4	38.0	244.0	206.3	210.0
L-Tyrosine	40.0	38.0	39.4	138.0	120.3	122.0
L-Phenylalanine	38.0	36.2	35.2	148.6	141.2	140.3
L-Histidine	13.7	12.8	14.0	45.0	38.6	30.3
L-Lysine	32.0	28.4	26.2	142.0	120.5	122.0
L-Arginine	64.8	63.2	68.8	283.8	253.0	260.8
Total	575.9	525.9	481.6	2463.8	2174.0	2147.4

유리아미노산의 함량

재래식으로 만든 미림과 효소를 첨가하여 만든 미림에서의 유리아미노산의 함량을 비교 검토한 결과는 Table 5와 같다.

재래식 방법에 의하여 만든 미림의 유리아미노산은 F-50, *A. oryzae* 9-12 및 *A. shirousamii* IFO 6082-60 모두 아미노산의 함량과 그 조성비율이 거의 비슷하게 나타내고 있으며, F-50으로 만든 미림의 경우 총 유리아미노산은 575.9 mg%로서 그중 glutamic acid가 92.4 mg%, arginine이 64.8 mg%, alanine이 46.6 mg%, aspartic acid가 43.0 mg%, leucine이 43.0 mg%, tyrosine이 40.0 mg%, phenylalanine이 38.0 mg%로 가장 높은 함량을 나타내고 있으며, 이들 아미노산이 전체 아미노산의 63.9%를 차지하고 있다. 또한 *A. oryzae* 9-12로 만든 미림의 총 유리아미노산은 525.9 mg%이었고, *A. shirousamii* IFO 6082-60인 경우 481.6 mg%이었다. 각종 균주를 이용하여 만든 미림중 F-50으로 만든 미림의 유리아미노산의 함량이 가장 많았다.

한편 개량식으로 만든 미림의 경우, 재래식으로 만든 미림과 비교할 때 큰 차이를 나타내는데 F-50으로 만든 미림의 경우 총 유리아미노산은 2463.8 mg%로서, 그중 glutamic acid가 387.2 mg%, arginine이 283.8 mg%, leucine이 244.0 mg%, aspartic acid가 218.0 mg%, alanine이 213.1 mg%, serine이 168.3 mg% 및 phenylalanine이 148.6 mg%로 가장 높은 함량을 나타내고 있으며, 이들 아미노산이 전체 아미노산의 약 67.5%를 나타내고 있다.

또한 *A. oryzae* 9-12와 *A. shirousamii* IFO-6082-60으로 만든 미림의 총 유리아미노산은 각각 2174 mg%와 2147.4

mg%로서 glutamic acid가 각각 340.2 mg%, 350.0 mg%, arginine이 각각 253.0%, 260.8%이며 leucine이 각각 206.3 mg%, 210.0 mg%였으며, alanine은 184.5 mg%, 180.7 mg%, aspartic acid가 183.6 mg%, 170.0 mg%, serine은 146.2 mg%, 140.3 mg%, phenylalanine은 141.2 mg%, 140.3 mg%로 가장 높은 아미노산의 함량을 나타내고 있으며, 이들 아미노산이 각각 전체 아미노산의 66.9% 및 67.6%를 나타내고 있다.

특히 F-50에 의하여 만들어진 미림은 ACPase 활성이 20,800 unt/g으로 다른 균주에 비하여 다소 높은 활성이 있으므로 효소활성이 저해되지 않는 저농도의 알코올과 효소를 첨가하여 만든 경우는 총 유리아미노산의 2463.8 mg%로 재래식으로 만든 미림의 총 유리아미노산보다 약 4배 더 높았다. 布川 등⁽⁶⁾은 소주국인 *Aspergillus kawachii*로 koji를 만들어 유리아미노산을 분석한 결과, arginine과 leucine의 함량이 높았고, 그 다음이 glutamic acid, phenylalanine 및 theronine이 많았다고 하였으며, 시판 미림의 경우는 leucine, glutamic acid, isoleucine 및 arginine의 함량이 높았다고 하였다. 증자한 쌀에서 ACPase 작용에 의하여 방출되는 아미노산의 조성은 극히 양호하였다.

F-50의 융합주에 의하여 만든 미림의 아미노산의 조성은 시판 미림의 분석 예와 비교해 볼때 다소 차이는 있으나, F-50으로 만든 미림과 시판 미림은 glutamic acid, isoleucine, arginine 및 leucine 등의 주요 아미노산의 구성비율이 거의 비슷한 경향을 나타내었다^(1,3).

Oyashiki 등⁽¹⁶⁾은 *Aspergillus oryzae* IFO 4079를 UV 조사에 의하여 돌연변이시킨 변이주 *Aspergillus*속은 재

Table 6. Composition of organic acids in Mirin made from different Koji by fusant F-50, *A. oryzae* 9-12 and *A. shirousamii* IFO 6082-60 (mg%)

Organic acid	Conventional mash			Improvement mash		
	F-50	<i>A. oryzae</i> 9-12	<i>A. shirousamii</i> IFO-6082-60	F-50	<i>A. oryzae</i> 9-12	<i>A. shirousamii</i> IFO 6082-60
Oxalic acid	3.1	Trace	2.0	2.5	2.1	2.9
Citric acid	18	9.2	285	16.5	8.6	275
Malic acid	2.4	3.1	2.5	2.3	4.2	3.1
Succinic acid	0.5	0.7	0.4	0.6	0.9	0.5
Lactic acid	16	19	31	15	22	28
Acetic acid	2.5	4.3	1.8	1.1	5.0	2.2
Propionic acid	1.8	2.4	1.1	Trace	2.0	Trace
Total	44.3	38.7	323.8	38.0	44.8	311.7

래식 방법에 의하여 만든 미림의 경우 유리 아미노산의 양은 적었다고 하였다. 그러나 Oyashiki 등⁽¹⁰⁾은 저농도의 알코올과 효소를 첨가한 개량식 방법에 의하여 만들어진 미림은 많은 양의 유리 아미노산이 방출되었으며, 특히 정미성분에 관여하는 glutamic acid, arginine, aspartic acid, alanine 및 leucine 등이 전체 아미노산의 반 이상이 들어있다고 하였다.

Oyashiki 등⁽²¹⁾은 *A. oryzae*, *A. niger*, *A. awamori*, *A. shirousamii* 및 *Rhizopus oligosporus* 등 각종 국균에 의하여 미림을 제조한 후 아미노산을 조사하였는데, *A. oryzae*와 *A. shirousamii*의 경우 가장 많이 방출되었고, 이들 유리 아미노산 중에 glutamic acid, arginine, leucine 및 aspartic acid 등의 함량이 높았다고 하였다.

본 연구에서도 유리 아미노산이 많이 방출되었으며, 개량식의 경우 특히 융합주인 F-50으로 만든 미림의 총 유리 아미노산이 2463.8 mg%로서, 정미에 관여하는 glutamic acid, arginine, leucine, aspartic acid 및 alanine이 많이 들어있어 이들 아미노산이 미림의 맛에 큰 역할을 한 것으로 사료된다.

유기산의 함량

미림의 맛은 당의 농도가 높을 때 감미가 강하지만 여기에 각종 유기산이 가지는 맛의 특성에 따라 맛의 완충작용으로 미림 특유의 맛을 가지고 있다. Table 6은 F-50, *A. oryzae* 9-12 및 *A. shirousamii* IFO 6082-60에 의한 재래식과 저농도 알코올 및 효소의 첨가에 의하여 만들어진 미림 중의 유기산의 함량을 나타낸 것이다.

본 실험에서 유기산의 함량 중 citric acid는 다른 유기산보다 함량이 많으며, 특히 *A. shirousamii* IFO 6082-60은 재래식에서 285 mg%, 개량식에서 275 mg%로 높은 함량을 나타내고 있는데, 이것은 원래 *Aspergillus*속은 특징적으로 citric acid를 많이 분비하는 것으로 알려져 있다⁽²¹⁾.

그러나 미림 중의 lactic acid는 *A. shirousamii* IFO 6082-60의 경우 재래식과 개량식 모두 citric acid의 함량보다 낮은 결과를 보였으며, F-50의 경우는 citric

acid와 비슷한 경향을 나타내었다. Acetic acid의 경우는 *A. oryzae* 9-12의 경우 재래식에서는 4.3 mg%, 개량식에서 5.0 mg%로 나타났다⁽²¹⁾.

융합주인 F-50을 이용하여 개량식으로 만든 미림은 각종 유기산의 함량에는 큰 차이를 나타내지 않았으나, 친주인 *A. shirousamii* IFO 6082-60과 비교해 보면 매우 낮았다. 이러한 현상은 친주를 원형질체 융합에 의하여 형질변형시키므로 citric acid의 생산이 감소되는 것으로 사료된다. 布川 등⁽⁶⁾은 *A. kawachii*로 만든 미림 중의 유기산은 lactic acid, acetic acid, pyruvic acid, formic acid, malic acid, propionic acid, succinic acid 및 citric acid가 들어 있으며, 이들 중 구연산은 1496~2112 mg%이었다고 보고하였으며, 이는 소주 국균에 의해 구연산이 특이적으로 많이 분비되는 것으로 보인다.

森田과 松岡 등⁽¹¹⁾은 3종류의 시판 미림의 유기산 함량은 acetic acid 2.57~3.6 mg%, succinic acid 0.95~5.15 mg%, lactic acid가 2.15~21.52 mg%, malic acid가 0.88~1.83 mg% 그리고 citric acid가 2.9~7.80 mg%라고 하였다.

Oyashiki 등⁽²¹⁾은 미림제조시 사용되는 국균 중 *A. oryzae*, *A. niger*, *A. shirousamii* 및 *Rhizopus oligosporus*로 만든 koji로 미림을 제조하여 유기산의 함량을 조사한 결과, 소주 국균으로 알려진 *A. niger*, *A. awamori* 및 *A. shirousamii*로 만든 미림은 구연산 함량이 매우 높았고 *A. oryzae*와 *Rhizopus oligosporus*의 경우는 구연산의 함량이 매우 낮았다고 하였다.

본 실험에서 유기산의 함량은 F-50의 경우는 시판중인 미림의 유기산 함량과 크게 차이가 없는 것으로 나타났으며, 요즈음의 미림의 제조 경향은 유기산의 함량이 낮은 제품이 많이 소비되고 있는 시점에서 바람직하다고 생각된다⁽¹²⁾.

당의 함량

Table 7에서 보는 바와 같이 재래식으로 만든 미림의 경우는 일반적으로 glucose가 가장 많고, 그 다음이 isomaltose, maltose, maltotriose, isomaltotriose, maltotet-

Table 7. Sugar contents in Mirin made from Koji by Fusant F-50, *A. oryzae* 9-12 and *A. shirousamii* IFO 6082-60

Sugars	Sugar contents (mg/ml)					
	Conventional mash			Improvement mash		
	F-50	<i>A. oryzae</i> 9-12	<i>A. shirousamii</i> IFO-6082-60	F-50	<i>A. oryzae</i> 9-12	<i>A. shirousamii</i> IFO 6082-60
Glucose	248.6	267.0	257.4	240.0	248.2	246.3
Maltose	6.8	6.3	6.0	7.0	6.3	6.2
Isomaltose	15.2	10.3	12.0	17.9	11.6	12.0
Maltotriose	6.5	5.0	5.0	6.7	6.1	6.0
Ribose	1.5	2.2	2.1	1.5	2.0	2.1
Isomaltotriose	3.8	2.6	2.3	3.0	2.3	2.2
Maltotetraose	2.6	1.3	2.0	2.5	1.2	1.8

Table 8. Cloudings in Mirin made by Fusant F-50, *A. oryzae* 9-12 and *A. shirousamii* IFO 6082-60

Kinds of clouding	Clouding of Mirin					
	Conventional mash			Improvement mash		
	F-50	<i>A. oryzae</i> 9-12	<i>A. shirousamii</i> IFO-6082-60	F-50	<i>A. oryzae</i> 9-12	<i>A. shirousamii</i> IFO 6082-60
Alcohol clouding	0.102	0.675	0.502	0.030	0.435	0.348
Water clouding	0.040	0.481	0.360	0.018	0.470	0.350
Heat clouding	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)

(+): Not detection of Clouding.
 (-): Detection of Clouding.

raose 및 ribose의 순서로 미량씩 들어 있었다. 개량식의 경우에도 재래식과 마찬가지로 glucose의 함량이 가장 높았고, 그 다음이 isomaltose의 순서였으며, maltose, maltotriose, isomaltotriose, ribose 및 maltotetraose는 미량씩 들어 있었다. 布川 등⁽⁶⁾ 미림의 당의 조성은 glucose가 261~318 mg/ml로 가장 높고, 그 다음이 isomaltose가 44~85 mg/ml였으며, 그 외 panose, maltose 및 isomaltose가 적은 양이 들어 있다고 하였다. 岩田 등⁽²³⁾은 소주 국균인 *A. kawachii*가 glucoamylase의 활성은 낮으나 transglucosidase의 활성이 높은 점을 이용하여 비발효성인 oligo당의 함량이 높고 품질이 좋은 미림을 만들었다고 하였다. Oyashiki 등⁽¹⁶⁾은 세포융합시킨 국균으로 미림을 제조한 결과, 재래식과 개량식에서 모두 융합주가 transglucosidase의 활성이 높으므로 비발효성 oligo당의 함량 또한 높아 풍미가 좋은 미림을 만들었다고 하였다.

본 실험에서도 융합주인 F-50은 transglucosidase의 활성이 *A. oryzae* 9-12와 *A. Shirousamii* IFO 6082-60 보다 다소 높아 F-50에 의하여 만든 미림의 ACPase의 활성이 높을 뿐 아니라 비발효성인 oligo당이 높아 풍미가 좋은 미림을 제조할 수 있었다.

미림의 백탁 생성

미림은 쌀로 koji를 만들어 발효시켜 만들기 때문에

가열 저장중에 단백질에 의하여 백탁이 일어날 가능성이 있다^(1,3). 미림의 제조시 ACPase 활성이 높은 국균을 사용하면 백탁의 생성을 억제한다고 알려져 있다⁽¹⁶⁾. 그러므로 본 실험에서는 백탁의 생성을 없애기 위하여 원형질체 융합에 의하여 ACPase 활성이 높은 융합주인 F-50으로 미림을 만들었다. Table 8에서 보는 바와 같이 재래식 및 개량식에 의한 각 국균별로 만든 미림의 백탁 생성을 조사한 결과 F-50에 의한 개량식으로 만들어진 미림이 가장 낮았고, 다음이 F-50에 의한 재래식으로 만든 미림이었으며, 그 다음이 *A. shirousamii* IFO 6082-60에 의한 개량식의 미림이었다. 물에 의한 백탁의 생성에 있어서는 알코올 백탁의 경우와 마찬가지로 F-50 국균에 의한 개량식 미림이 가장 낮았고, 그 다음이 융합주인 F-50 국균에 의하여 만든 재래식 미림이 낮았다. 그리고 가열에 의한 백탁은 F-50 국균에 의하여 재래식과 개량식으로 만든 미림에서는 백탁이 생성되지 않았고, *A. oryzae* 9-12와 *A. shirousamii* IFO 6082-60에서는 약간씩 생성되었다.

山下 등⁽²⁴⁾은 백탁 생성을 방지하기 위한 실험에서 α-amylase를 첨가하여 만든 미림은 백탁이 적었다고 하였다. Yamashida 등⁽²²⁾은 미림의 백탁 생성은 분자량이 약 4,000 정도의 단백질이라고 하였다. 그리고 Oyashiki 등⁽²⁰⁾은 *Aspergillus oryzae*에 의하여 유도된 ACPase의 활성이 높은 변이주로 만든 Koji로 미림을 제조하였던

바, 친주보다는 훨씬 적은 양의 백탁이 생성되었다고 보고하였다. 深谷 등⁽⁴⁾은 transglucosidase, α -amylase, β -amylase, protease 및 쌀 *koji*로 미림을 만들어 총 당 중에 20~30% 정도로 비발효성당인 isomaltose, panose, isomaltotriose 및 isomaltotetrose가 생성되었고 감미도 좋았으며, 찬곳에서 포도당의 결정도 생성되지 않았다고 하였다.

大屋 등⁽²³⁾은 미림을 0°C에서 저장하면 한냉정출(寒冷晶出)이 생성되는데, 이같은 현상은 고농도의 포도당에 의하여 생성되며, 38%의 glucose 농도에도 생성된다고 하였다. 이러한 현상은 포도당 농도를 38% 이하로 떨어뜨리면 방지할 수 있다. *Aspergillus oryzae* 국과 *A. Shirousamii* IFO 6082-60을 사용하여 미림을 만든 후 0~10°C의 저온에서 포도당의 결정을 조사한 결과, *A. shirousamii* IFO 6082-60을 사용하여 만든 미림을 *A. oryzae* 국을 사용하여 만든 미림과 비교해 보면, 전 당함량은 비슷하지만 oligo당은 증가하였고 glucose 농도도 33.9%로 *A. oryzae*의 경우 40%보다 낮았다.

요 약

본 연구는 품질이 우수한 미린을 생산하기 위하여 효소활성이 높은 *Aspergillus oryzae*와 *Aspergillus Shirousamii*간의 융합주인 F-50으로 미린을 제조하였다.

융합주인 F-50과 이를 비교하기 위하여 이의 친주인 *A. oryzae* 9-12와 *A. Shirousamii* IFO 6082-60으로 재래식과 효소를 첨가한 개량식으로 미림을 제조하여 생성 총당과 환원당을 조사한 결과, 개량식의 경우 F-50에서 각각 42.0%, 38%로 가장 높았고, 수율도 0.85 g/mash·g이었다. 미림 중에 들어있는 유리 아미노산은 재래식보다 효소첨가에 의한 개량식으로 만든 제품이 월등히 높았고, 그중 glutamic acid가 387.2 mg%, arginine이 283.8 mg%, leucine이 244.0 mg%, aspartic acid가 218.0 mg%, alanine이 213.1 mg%, serine이 168.3 mg% 및 phenylalanine이 148.6 mg%로 많이 들어 있으며, 전체 아미노산의 67.5 mg%를 차지하였다.

유기산의 함량은 oxalic acid, citric acid, malic acid, succinic acid, lactic acid, acetic acid 및 propionic acid가 들어 있으며, F-50에 의하여 개량식으로 만든 미림이 38.0%로 제일 낮았다. 당의 함량은 glucose, maltose, isomaltose, maltotriose, ribose, isomaltotriose 및 isomaltotetrose가 들어 있으며 glucose의 함량이 높았다. 미림은 저장 중 포도당에 의하여 백탁이 생성되는데, 개량식의 경우 ACPase의 활성이 높은 F-50으로 만든 미림은 alcohol clouding이 0.030, water clouding이 0.018 그리고 heat clouding이 음성으로 나타나 품질이 우수하였다.

문 헌

1. 森田日出男, 松岡聰: *みりんの味*, 醸協, 75, 893(1980)
2. 竹内五男: 調理に使われる酒-清州とみりん(2), 醸協, 76, 793(1981)
3. 長沢源壯, 松田秀喜, 森田日出男: *みりんおよびみりん類似調味料の開発動向*, 醸協, 81, 722(1986)
4. 深谷伊和男, 横井信正, 酒井敏秀, 徳村裕彦: *トランスグルコシダーゼを利用したみりんの製造*, 醸協, 78, 552(1983)
5. 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)
6. 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)
7. 岩野君夫, 岡田光司, 三上重明, 椎木敏: *梗米を利用した味製造について*, 醸協, 84, 259(1989)
8. Uchida, M. and Oka, S.: Efficiency of Utilization of Raw Materials in Conventional *Mirin*-Making. *J. Ferment. Technol.*, 61, 13(1983)
9. 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)
10. Oyashiki, H., Uchida, M., Obayashi, A. and Oka, S.: *Mirin*-Making at Low Alcohol Concentration with *Koji* Prepared with a new Mutant of *Aspergillus usamii*. *J. Ferment. Technol.*, 66, 333(1988)
11. Nakadai, T., Nasuno, S. and Iguchi, N.: Quantitative Estimation of Activities of Peptidases in *Koji*. *Seasoning Science, Japan*, 18, 435(1971)
12. 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)
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. 류병호, 신동분, 진성형: *Aspergillus oryzae*와 *Aspergillus shirousamii*간의 원형질체의 융합, 한국식품과학회지, 25, 366(1993)
16. 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)
17. Spackmann, D.H., Stein, W.H. and Moore, S.: Automatic Recording Apparatus for Use in the Chromatography of Amino Acids. *Anal. Chem.*, 30, 1190(1958)
18. Whistler, R.L. and Wolfrom, M.L.: (eds.), *Methods in Carbohydrate Chemistry*, vol. 1, Analysis and Preparation of Sugars, Academic Press, New York (1962)
19. Yamashita, S. and Doi, S.: Studies on the Haze Formation During *Mirin*-Making. VIII. Materials of the Haze Formation. *J. Brew. Soc. Japan*, 73, 558(1978)
20. 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)
21. 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 usamii* as a Raw Material for Sake-Brewing. *J.*

Ferment. Technol., **66**, 111(1988)

22. Yamashita, S., Ohashi, N.M. and Maeda, K.: Studies on the Formation During *Mirin*-Making. IX. Mechanism of Haze Formation. *J. Brew. Soc., Japan*, **76**, 838 (1981)
23. 大屋敷春夫, 内田正裕, 長竝源壯, 境淳, 大林晃, 岡智: みるいの寒冷晶出とグルコース濃度との關係. *醸協*, **83**, 210(1988)
-

(1993년 6월 10일 접수)