

고활성 단백질분해효소 생산균주의 개발을 위한 *Aspergillus oryzae*의 원형질체 융합에 의한 변이

김두상 · 김형락¹ · 남택정 · 변재형*

부경대학교 식품생명과학과, ¹여수대학교 식품영양학과

Strain Improvement of *Aspergillus oryzae* for Increasing Productivity of a Proteolytic Enzyme.
Kim, Doo-Sang, Hyeung-Rak Kim¹, Taek-Jeong Nam, and Jae-Hyeung Pyeun*. Department of Food and Life Science, Pukyong National University, Namgu, Pusan 608-737, Korea, ¹Department of Food Science and Nutrition, Yosun National University, Kukdong, Yosun, Chunnam 550-749, Korea - *Aspergillus oryzae* producing high proteolytic enzyme was isolated from soybean koji and named tentatively *A. oryzae* O-1. *A. oryzae* U-1 was obtained by mutation of *A. oryzae* O-1 with ultraviolet (UV)-irradiation and produced 14 times higher protease activity compared with *A. oryzae* O-1. *A. oryzae* E-1 was acquired by treatment of *A. oryzae* U-1 with 0.5 M ethylmethanesulfonate (EMS) for 6 min at 30°C and produced 39 times higher proteolytic activity than *A. oryzae* O-1. With protoplast fusion between *A. oryzae* O-1 and *A. oryzae* E-1 in the presence of polyethyleneglycol (PEG)-CaCl₂, proteolytic activity was increased to 82 times compared to *A. oryzae* O-1, and the fusant was named *A. oryzae* PF. The activities of the cultures containing proteolytic enzymes produced by the strains were determined to be 0.23 U/ml for *A. oryzae* O-1, 3.29 U/ml for *A. oryzae* U-1, 8.91 U/ml for *A. oryzae* E-1, and 19.0 U/ml for *A. oryzae* PF.

Key words: *Aspergillus oryzae*, protease, protoplast fusion, mutation

최근 생명공학의 발전과 더불어 식품, 의약품 및 섬유 산업에 이르기까지 효소자원의 수요는 급격히 증가하고 있으며, 다양한 생물로부터 새로운 종의 효소가 발견되고 있을 뿐만 아니라, 효소의 이용분야도 점차 증대되고 있다. 산업적 이용을 위한 효소의 개발 생산에는 비교적 짧은 시간에 값싼 원료배지로서 목적 효소의 생산이 가능하고, 배양기법의 응용에 따라서는 효소 생산이 능률적인 변이균주의 개발이 가능하기 때문에 미생물에 의한 효소생산이 널리 응용되고 있다[3, 6, 12].

원형질체융합 변이균주를 이용한 단백질분해효소의 생산에 관한 연구는 *Aspergillus*속 균주를 중심으로 연구되었다. Furuya 등[24]은 간장제조용 *A. oryzae* var. No. 13를 이용하여 성장율이 빠른 균주와 protease를 많이 생산하는 균주를 원형질체 융합처리하여 원형질융합체를 얻었다. Ushijima와 Nakadai[21]는 *A. oryzae*와 *A. sojae*를 원형질체 융합함으로써 glutaminase 및 protease 두 효소를 많이 생산하는 균주를 얻었고, Ushijima 등[22]은 간장제조에 유용한 코오지 균주를 얻기 위하여 서로 다른 *A. sojae*를 원형질체 융합하여, 몇몇의 이배체에 의하여 높은 효소 생산성을 나타내었다고 보고하였다.

본 연구에서는 단백질식품의 이용가공에 기여할 수 있는 역가 높은 단백질분해효소를 개발하기 위하여 자연계(누룩, 메주, 어류 및 젓갈, 토양)에 분포하는 단백질분해 효소 생산 미생물을 분리 동정하여 이를 이용한 물리·화학적 변이조건과 원형질체 융합 등의 과정을 거쳐 높은 활성의 단백질분해효소 생산능을 보유한 *A. oryzae*의 변이균주를 얻었다.

재료 및 방법

균주의 급원

균주 분리용으로 사용한 시료 중 누룩과 메주는 1993년 6월 6일 부산시 부산진구 부전동 부전시장에서, 어류(고등어, 정어리, 멸치, 오징어)와 젓갈류(새우젓, 멸치젓, 꼴뚜기젓)는 1993년 7월 17일 부산시 수영구 남천동 해변시장에서 각각 구입하였다. 그리고 토양은 1993년 7월 17일 부산시 남구 대연동 부경대학교 구내의 잔디밭에서 채취하였다.

배지

본 실험에 사용된 배지 중 단백질분해효소 생산미생물의 검색배지로서는 skim milk 한천배지(skim milk 5%, yeast extract 0.2%, casamino acid 0.2%, Triton x-100 0.1%, agar 1%)를 사용하였다. *A. oryzae*의 배양에는 완

*Corresponding author
Tel. 82-51-620-6331, Fax. 82-51-628-8147
E-mail: nadskim@netian.com

전배지(complete medium)로서 8% malt-extract medium(pH 6.0), 최소배지(minimal medium)로서 Czapek Dox 배지(NaNO_3 0.3%, K_2HPO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, KCl 0.05%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001%, sucrose 3%)를 사용하였다. 그리고, 고체배지는 위의 액체배지에 1.5%의 한천을 첨가하여 조제하였다.

그리고 원형질체 융합용 배지는 Dextrin-peptone배지(2% dextrin, 1% peptone, 0.5% KH_2PO_4 , 0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)를 사용하였다.

균주의 분리, 선발 및 동정

균주는 O'Donell 등[13]의 방법을 일부 수정하여 분리하였다. 즉, 각 5g의 균주분리용 시료에 0.1% Tween 80 용액 100 ml를 가하여 초음파 세척기(주파수 47 kHz, 5분)로써 현탁시켜 살균한 cheesecloth로서 여과하였다. 이 여액을 0.1% Triton X-100을 함유한 최소 한천 평판배지에 각각 도말하고 30°C에서 3일간 배양하여 균총 주위의 투명환이 큰 균주들을 취하였다.

단백질 분해능이 우수한 미생물의 선발은 위에서 분리한 균주를 30°C에서 7일간 배양한 사면배지에 0.1% Tween 80 5 ml를 가한 후, 1g의 CaCO_3 를 가하여 격렬하게 교반하였다. 이를 무균적으로 흡인여과(glass filter 17G2) 후, 여액을 원심분리(3,000×g, 10분)하고 잔사에 멸균 증류수를 가하여 균수가 약 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 의 현탁액을 얻었다. 이 현탁액 0.1 ml씩을 각각 취하여, 단백질분해효소 활성 검색 배지에 도말하고 30°C에서 3일간 배양하여 투명환이 큰 균주를 얻었다. 분리된 각 균주는 1% skim milk를 함유한 최소 액체배지에 각 1 백금이씩 접종하여 30°C에서 3일간 진탕 배양하고 균체를 제거한 후에, 각 배양액 중 단백질 분해능이 가장 높은 균주를 선별하였다.

이 결과, 균주 배양액중에서 단백질 분해능이 강한 균주는 누룩으로부터 분리한 *Aspergillus oryzae* 균주로 추정되었기에 다음의 실험은 *A. oryzae* 균주와 관련하여 진행하였다. 균주의 동정은 한천 평판배지에서 균주를 각각 분리하여 Raper와 Fennel[17]의 방법에 따라 *A. oryzae* ATCC 14156, *A. oryzae* ATCC 14605, *A. oryzae* ATCC 11489 및 *A. oryzae* IAM 2640을 표준 균주로 하여 형태학적 및 생리적 특성을 비교·확인하였다.

선별균주의 보존

선별된 균주의 보존은 최소 한천사면배지에 각각 도말하여 30°C에서 3일간 배양하고, 4°C에 보존하면서 2개월마다 계대배양하여 본 실험에 사용하였다. 그리고, 장기간의 보존은 O'Donell 등[13]의 방법에 따랐다. 즉, 15 ml cap tube에 실리카겔(6-12 mesh, 대한화학)을 1/2 정도 넣어 160°C에서 2시간 건조시켜 0°C로 냉각한 다

음, skim milk 7.5% 용액에 현탁한 포자 현탁액 0.5 ml를 가하여 진공 데시케이터에서 건조시킨 후, 균주의 생존여부를 확인 후 밀봉하여 보관하였다.

균주의 개량방법

자외선 조사에 의한 변이 *A. oryzae*를 완전배지에 배양(30°C, 7 일)하여 포자 현탁액(포자수 약 $1 \times 10^6/\text{ml}$)을 얻은 다음, 이 포자 현탁액 5 ml를 petri dish(ϕ 9 cm)에 취하여 자외선 등(GL-20, 20W, Matsushita electronic)으로 30~80초 조사(거리 15 cm) 하였다. 자외선 조사를 마친 포자 현탁액을 최소 한천배지에 도말하여 3일간 배양 후, 각각의 균총을 멸균한 0.1% Tween 80 용액에 현탁시켜 포자 현탁액을 얻었다. 이 현탁액 0.1 ml씩을 단백질분해효소 활성 검색 배지에 각각 도말하고 배양(30°C, 3일)하여 투명환이 가장 큰 균주(*A. oryzae* U-1)를 조사 시간별로 10주씩 취하여 효소생산배지에서 배양하여 배양액 중의 단백질분해효소 활성을 비교하였다.

Ethyl methanesulfonate(EMS)에 의한 변이 *A. oryzae* U-1균의 포자를 100 mM의 인산완충액(pH 7.2)에 현탁(포자수 약 $1 \times 10^6/\text{ml}$) 후, 이 현탁액에 EMS를 0.5 M 되게 가하여, 3~30분간 배양(37°C)하였다. 원심분리(3,000×g, 10분) 후, 포자를 100 mM sodium thiosulfate를 함유한 100 mM phosphate buffer(pH 7.2)로서 포자 현탁액을 얻었다. 이 포자 현탁액을 1~100배의 범위로 희석하여 각각 0.1 ml씩 취한 다음, 단백질분해효소 활성 검색 배지에 도말·배양(30°C, 3일)하여 투명환이 가장 큰 균주(*A. oryzae* E-1)를 배양시간별로 5주씩 취하여 효소생산성을 비교하였다.

원형질체융합 Dextrin-peptone배지 100 ml를 함유하는 삼각 flask(500 ml)에 *A. oryzae* E-1을 진탕배양하였다. 균체를 흡인여과하여 모으고, 멸균수로서 세정 후, 적당량을 L자관에 넣었다. 다음 무균여과한 protoplast 화액(10 mg/ml Novozyme 234-0.8 M NaCl-10 mM phosphate buffer, pH 6.0) 10 ml를 가하여, 30°C에서 3시간 동안 서서히 교반하였다. 반응액을 흡인여과하여 균체 잔사를 제거하고, protoplast를 함유한 여액을 원심분리(700×g, 5분)하여 모았다. 이와 같이 동일한 방법으로 *A. oryzae* O-1도 같이 처리하였다.

얻어진 각각의 protoplast를 0.8 M NaCl로 2회 세척한 다음, 용액 I(0.8 M NaCl-10 mM CaCl_2 -10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5)에 1회 세척하여 형질전환용으로 하였다. 얻어진 각 원형질체를 최종 농도가 $2.5 \times 10^8/\text{ml}$ 로 되도록 조절한 후, 용액 I을 최종액의 4/5에 해당하는 양을 가하여 먼저 현탁하고, 다음에 최종액의 1/5에 해당하는 용액 II(40% PEG 4000-50 mM CaCl_2 -50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5)와 1%에 해당하는 DMSO를

첨가 한 후, 각각을 혼합하고 실온에서 1시간 방치하여 protoplast 융합이 일어나게 하였다.

위의 과정에 따라 얻은 원형질융합체를 원심분리(700 ×g, 4℃, 5분) 후, 그 침전을 소량의 용액 I로 현탁하여 최소 한천배지에 접종하고, 주위에 연한천(0.5% 한천용액, 40℃)을 서서히 주입하여 중층을 이루게 하였다. 이를 30℃에서 5~7일 배양하여 비융합체 보다 성장이 왕성한 균층(원형질융합체)을 취하여 완전 한천배지에 계대배양 시켰다. 분리된 형질전환체의 포자현탁액을 UV 처리하여 단백질분해효소 검색배지에 도말 후, 단백질 분해능이 가장 큰 균주(*A. oryzae* PF)를 분리하고, 최소 배지에 2~3회 계대배양함으로써 완전한 형질전환체를 얻었다.

단백질농도의 측정

효소 단백질의 농도는 Bradford[5]의 방법에 따라 측정하고, 표준단백질(bovine serum albumin)로서 측정한 검량곡선에 의하여 단백질 농도를 결정하였다.

단백질분해효소 활성의 측정

효소활성의 측정은 기질로서 azocasein을 사용하였다. 즉 시험관에 0.25 ml의 2% azocasein용액과 0.75 ml의 완충액을 넣고 50℃에서 5분간 평형화시킨 후에 효소용액 0.1 ml을 가하여 10분간 반응시켰다. 반응 후 10% TCA 1 ml을 가하여 반응을 종결시키고 원심분리(3,000 ×g, 10 min)하여 상층액을 파장 410 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소의 활성 단위는 단위 반응 시간(분)당 흡광도 값을 0.1 상승시키는데 필요한 효소량을 1 Unit (U)로 나타내었다.

결과 및 고찰

단백질분해효소 생산균주의 선발

각각의 균주분리용 시료에서 단백질분해효소활성이 있는 균주를 검색·선발하여 가장 강한 활성을 가지는 균주를 분리하여 동정하였다(Table 1). 이 균주는 완전 한천배지(8% malt-extract, pH 6.0)에서 배양하였을 때, 외관상으로 곰팡이의 형태를 갖추고, 흰색 colony에 분생자의 색상이 초기에는 흰색에서 배양기간이 지남에 따라 황색, 녹색, 갈색의 색상을 가지는 것으로 나타났다. 또한 완전배지에서 배양하였을 때 균사체가 솜털뭉치 형태를 가지고 부드러운 분생자를 가짐으로서 표준균주(*Aspergillus oryzae* ATCC 14156, *A. oryzae* ATCC 14605, *A. oryzae* ATCC 11489 및 *A. oryzae* IAM 2640) 분생자의 형태학적 및 생리적 특성을 비교·확인한 결과 *A. oryzae*로 추정되어 *A. oryzae* O-1로 명명하였다.

황녹 *A. oryzae*속의 분류에서 분생자벽에 작은 돌기가

Table 1. Characteristics of the strain isolated from soybean koji*¹

Item	Character
Source	wheat bran koji
Color	
colony	white
conidia	white → yellow → green → brown
Structure	
mycelium	flocculate
conidia	smooth
Protease productivity* ²	
activity (U/ml)	0.23
protein (mg/ml)	0.52
cell mass (mg/ml)	20

*¹Culture condition: temperature, 33℃; culture time, 3 days; medium, Czapek Dox agar

*²Culture condition: temperature, 33℃; culture time, 3 days; working volume, 3 L; aeration, 8 L/min; medium composition, protease producing medium (defatted soybean flour, 2%; lactose, 2%; KH₂PO₄, 3%; CaCO₃, 0.3%; MgSO₄ · 7H₂O, 0.06%; pH adjustment, pH 7.0)

전혀 없고, 거친 형태를 띄우며, 컵 모양의 형태로서 분생자가 완전히 성장하였을 때 녹색을 띄울 뿐만 아니라 기간이 지날수록 갈색으로 되는 균주는 *A. oryzae* var. *brunneus* Murakami로 분류하고, 계속적으로 녹색을 유지하는 균주는 *A. oryzae* var. *viridis* Murakami로, 자낭이 없고 분생자의 크기가 직경 5~6 μm 이상인 것은 *A. oryzae*(Ahlburg) Cohn var. *oryzae*로 분류된다[17, 18]. 이 분류 기준에서 비추어 볼 때 본 균주는 *A. oryzae* var. *brunneus* Murakami로 분류할 수 있었다.

또한, 이 균주를 단백질분해효소 생산용 배지(Defatted soybean flour, 2%; lactose, 2%; KH₂PO₄, 3%; CaCO₃, 0.3%; MgSO₄ · 7H₂O, 0.06%; pH 7.0)에서 진탕배양(30℃, 3일간)하였을 때, 균체량은 20 mg/ml이었다. 그리고 이 배양액을 원심분리(8,000 ×g, 15분)하여 균체를 제거한 다음, 상층액 중의 단백질의 농도를 측정된 결과, 0.52 mg/ml였으며, 단백질 가수분해효소의 활성은 azocasein에 대하여 0.23 U/ml였다.

자외선에 의한 균주의 개량

위에서 얻은 균주(*A. oryzae* O-1)포자 현탁액을 자외선으로 30~80초간 조사시켜 포자의 단백질분해효소 활성 투명환이 가장 큰 균주를 10주씩 취하였다. 이를 각각 배양하여 무균체 배양액의 단백질분해효소 활성을 측정·비교한 결과(Table 2), 90초간 조사한 균 중에서 단백질분해효소 활성이 가장 강한 균주를 얻을 수 있었다. 이 균주의 단백질분해효소 활성은 3.29 U/ml로서 분리균(*A. oryzae* O-1)보다 효소활성이 14.3배 증가하였으며,

Table 2. Proteolytic activity of the culture containing protease produced by *Aspergillus oryzae* O-1 irradiated by UV

UV-irradiation time* ¹ (sec)	Number of strain	Proteolytic activity* ² (U/ml)
0		0.230
30	1	0.230
	2	0.178
	3	0.385
	4	1.400
	5	0.160
	6	0.307
	7	0.810
	8	0.495
	9	0.240
	10	0.398
60	1	1.770
	2	0.412
	3	0.126
	4	0.490
	5	0.330
	6	0.230
	7	0.640
	8	0.472
	9	0.699
	10	0.312
90	1	0.265
	2	3.294 ←
	3	0.242
	4	1.050
	5	2.100
	6	0.280
	7	0.452
	8	0.470
	9	0.135
	10	0.412
120	1	0.372
	2	0.520
	3	0.442
	4	0.347
	5	0.508
	6	0.698
	7	0.382
	8	0.212
	9	0.870
	10	0.588
150	1	0.390
	2	0.950
	3	0.615
	4	0.570
	5	0.323
	6	0.450
	7	0.760
	8	0.130
	9	0.988
	10	0.875

Table 2. Continued

UV-irradiation time* ¹ (sec)	Number of strain	Proteolytic activity* ² (U/ml)
180	1	0.940
	2	0.305
	3	0.360
	4	0.190
	5	0.420
	6	0.330
	7	0.378
	8	0.440
	9	0.212
	10	0.630

*¹Distance from 20W UV-lamp to the culture media was fixed to 15 cm.

*²1% azocasein in 0.02 M Tris-HCl buffer, pH 7.5, was used as a substrate for determining proteolytic activity.

*Arrow mark indicates the selected strain.

이 균주를 *A. oryzae* U-1으로 명명하였다.

Furuya 등 [24]은 간장제조용 균주인 *A. oryzae* No. 13을 사용하여 최소 사면배지를 써서 30°C에서 6일간 배양하여 얻어진 포자현탁액을 자외선 등(15 W)으로 15 cm거리에서 1분간 조사하여 *A. oryzae* ac 7을 얻었는데, 이 균주의 효소활성은 친주에 비해 약 13배 증가한 것으로 보고되고 있다. 그리고 UV 조사에 의한 균주개량법은 비교적 간단하고, 변이율이 높아서 산업적으로 많이 이용되고 있다[23].

EMS 처리에 의한 균주의 개량

A. oryzae U-1균의 포자현탁액에 EMS를 0.5 M 되게 가하여, 3~30분간 배양 후, 단백질분해효소 활성이 강한 균주 5주씩을 취하여 효소생산성을 비교하였다(Table 3). 이 실험의 결과, 6분간 EMS처리 군에서 단백질분해효소 활성이 강한 균주를 얻을 수 있었으며, 이 균주를 *A. oryzae* E-1으로 명명하였다. *A. oryzae* E-1의 단백질분해효소 활성은 *A. oryzae* O-1보다는 약 39배, *A. oryzae* U-1에 비하면 약 2.7배 높아서 균주 개량효과가 있는 것으로 나타났다.

또한 EMS처리 시간별로 활성이 비교적 높은 변이주들을 이용하여 배양 규모를 scale-up하여 배지 중의 단백질분해효소 활성을 측정된 결과(Table 4), 대량배양에서도 시험관 배양과 마찬가지로 단백질분해효소의 활성이 서로 비슷한 경향을 보여 대량배양에의 적용 가능성도 확인할 수 있었다.

원형질체융합에 의한 균주의 개량

앞의 실험에서 얻은 *A. oryzae* E-1과 야생균주인 *A. oryzae* O-1의 원형질체를 융합하여 얻은 융합체(Fig. 1)

Table 3. Proteolytic activity of the culture containing protease produced by *Aspergillus oryzae* U-1 treatment with ethylmethane sulfonate

Treatment time* ¹ (min)	Strain number	Proteolytic activity* ² (U/ml)
0		3.29
3	1	1.63
	2	7.04
	3	8.04
	4	7.20
	5	8.20
6	1	8.91 ←
	2	2.14
	3	0.34
	4	0.62
	5	0.49
12	1	0.88
	2	0.68
	3	0.88
	4	0.43
	5	0.63
18	1	7.33
	2	5.42
	3	8.21
	4	6.39
	5	4.89
30	1	8.77
	2	7.50
	3	5.60
	4	8.13

*¹Fungal spore was mutated in Czapek-Dox's broth containing 0.5 M ethyl methanesulfonate. *²1% azocasein in 0.02 M Tris-HCl buffer, pH 7.5, was used as a substrate for determining proteolytic activity. *Arrow mark indicates the selected strain.

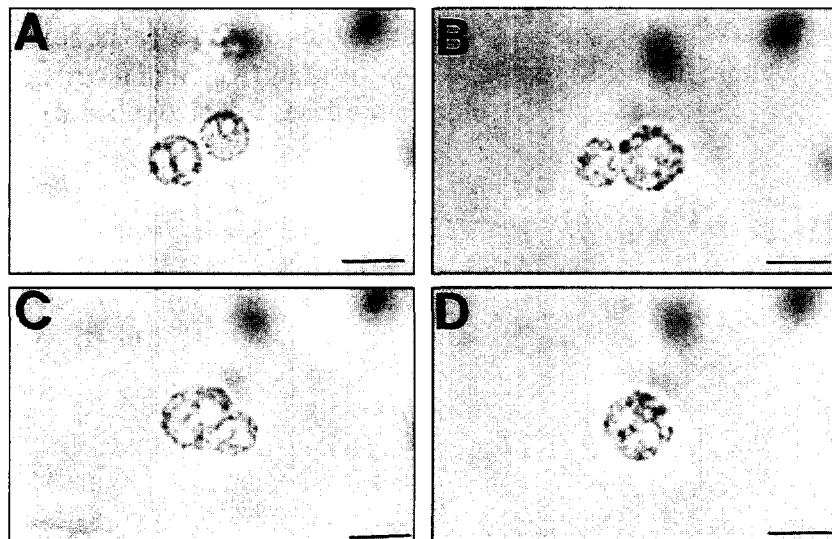
Table 4. Proteolytic activity of the culture containing protease produced by *Aspergillus oryzae* U-1 in large volume of liquid medium after treatment with ethylmethane sulfonate*¹

Strain No.* ²	Time of treatment* ³ (min)	Proteolytic activity (U/ml)
1	3	7.50
2	3	6.39
3	6	9.63 ←
4	18	8.21
5	18	5.42
6	30	8.47
7	30	7.33
8	30	5.60

*¹Incubation condition: working volume, 2 l; temperature, 33°C; pH, 6.5; aeration, 4 l/min. *²Strain number is ordered by intensity of the proteolytic activity on the plate culture.

*³Culture time in Czapek-Dox's broth containing 0.5 M ethylmethane sulfonate. *Arrow mark indicates the selected strain.

를 연한천 중층배지에서 배양 후 UV처리하여 단백질분해효소 활성을 측정한 결과(Table 5), 대부분의 변이주들이 *A. oryzae* E-1보다 낮게 나타났으며 유독한 균주가 효소활성이 높았다. 이를 분리하여 *A. oryzae* PF라고 명명하였으며, 이는 단백질분해효소활성이 19 U/ml로서 *A. oryzae* O-1보다는 약 82배, *A. oryzae* U-1 보다는 약 5.7배, 그리고, *A. oryzae* E-1보다는 약 2.1배로 높게 나타났으며, 또한 *A. oryzae* E-1의 낮은 균체 성장율을 보완하여 주었으며, 균체성장율이 야생균주보다는 낮지만 *A. oryzae* E-1보다는 약 1.5배 높아서 보다 안정한 균주

**Fig. 1. Microscopic pattern during protoplast fusion between *A. oryzae* O-1 and *A. oryzae* E-1. Protoplast fusion was performed using PEG-CaCl₂.**

Magnifying power, 1,000; dimension in bar, 10 μ m. Photograph condition: Microscope, Olympus C-35AD; camera, Olympus BH-2; camera adaptor, Olympus PM-10AD; film, Kodak XTRACROM ASA 400. Exposure condition: Exposure time, automatic exposure; reciprocity, 6 times; film exposure, ASA 400.

Table 5. Proteolytic enzyme activity by the protoplast fusant between *A. oryzae* O-1 and *A. oryzae* E-1

Fusant No.	Proteolytic activity (U/ml)
1	3.5
2	5.2
3	2.8
4	4.7
5	2.2
6	3.8
7	2.5
8	2.6
9	4.0
10	3.9
11	19.0 ←
12	4.2
13	2.9
14	5.9
15	2.8
16	2.0
17	2.1
18	8.6
19	3.7
20	0.7
21	4.9
22	4.0
23	4.0
24	3.3
25	8.9

*Arrow mark indicates the selected strain.

Table 6. Comparison of the proteolytic activity and cell mass in the cultured medium among the methods of mutation

Mutated strain	Proteolytic activity* (U/ml)	Cell mass (mg/ml)
<i>Aspergillus oryzae</i> O-1	0.23	20.22
<i>Aspergillus oryzae</i> U-1	3.29	9.89
<i>Aspergillus oryzae</i> E-1	8.91	8.75
<i>Aspergillus oryzae</i> PF	19.00	13.50

*Proteolytic activity was determined using azocasein as a substrate.

임을 알 수 있었다. 결과적으로 원형질체융합에 의한 변이과정을 통하여 얻어진 균주는 *A. oryzae* O-1의 빠른 성장속도와 *A. oryzae* E-1의 높은 효소생산성이 이상적으로 결합된 새로운 균주임을 알 수 있었다(Table 6).

원형질체의 융합은 주로 *Aspergillus*[10, 7, 21, 15], *Mucor*[8, 16], *Penicillium*[1] 및 *Tricoderma*[15] 등에서 시도되었으며, 이 중에서, Toyama, H.와 Toyama, N. [19, 20]는 *A. oryzae*와 *A. niger*간의 원형질체융합에서 균사체의 핵을 염색한 후 관찰한 결과, 두 가지의 형태로 나타났는데 *A. oryzae*에서 유도된 것 같은 핵이 작은 group와 핵이 큰 *A. niger*에서 유도된 group으로 구분되

고, 이 균주들은 항생제 내성 등 여러 가지 성질에서 차이를 보여 원형질체융합 균주들의 성질은 친주의 성격에 따라 좌우된다고 보고하였다.

Furuya 등[24]은 간장제조용 *A. oryzae* var. No. 13의 변이주들을 이용하여 성장율이 빠른 균주와 protease를 많이 생산하는 두가지 균주를 원형질체 융합처리하여 두 효소 모두를 많이 생산하는 원형질체융합체를 얻었다고 하였다. Ushijima와 Nakadai[21]는 glutaminase를 많이 생산하는 *A. oryzae*와 protease를 많이 생산하는 *A. sojae*를 원형질체 융합함으로써 두 효소를 동시에 많이 생산하는 균주를 얻었고, 또한, Ushijima 등[22]은 간장제조시 유용한 코오지용 균주를 얻기 위하여 효소생산에 중점을 두고 *A. sojae*의 원형질체융합에 관하여 실험한 결과, 몇몇의 이배체에 의하여 높은 효소 생산성을 나타내었다고 보고하였다.

이 연구 보고들과 관련하여 본 연구에 의한 균주는 *A. oryzae* 균주를 단계적으로 변이를 거쳐 *A. oryzae* 균주 상호간에 원형질체 융합을 시킴으로서 고효율 단백질 분해효소를 생산할 수 있는 *A. oryzae* PF를 얻었다는 점에서 그 특징을 들 수 있다.

요 약

단백질 식품의 가공에 이용할 수 있는 역가 높은 단백질분해효소를 개발하기 위하여 누룩, 메주, 어류, 젓갈 및 토양 등의 시료 중에서 활성이 높은 단백질분해효소의 생산 균주로 *A. oryzae* O-1균을 분리 동정하였다. *A. oryzae* O-1을 UV조사(20 W, 15 cm, 90초)하여 활성이 높은 단백질분해효소 생산균주, *A. oryzae* U-1을 선발하였고, 다시 *A. oryzae* U-1 포자를 0.5 M EMS 용액에 처리(30℃, 6분간)하여 보다 활성이 높은 *A. oryzae* E-1을 선별하였다. 다음에 이 *A. oryzae* E-1과 *A. oryzae* O-1의 원형질체 융합체 중 단백질분해효소 생산능이 가장 강한 변이균주 *A. oryzae* PF를 분리하였다. 각 단계별 생산효소의 활성은 azocasein 기질에 대하여 *A. oryzae* O-1이 0.23 U/ml, *A. oryzae* U-1은 3.29 U/ml, *A. oryzae* E-1은 8.91 U/ml, 그리고 최종 변이단계를 거친 *A. oryzae* PF는 19.0 U/ml로서 최초의 선별균주 *A. oryzae* O-1에 비하여 그 활성이 약 82배까지 증가하였다.

감사의 글

이 연구는 농림부 농림수산물기술관리센터의 1996년도 수산업 분야 선정 첨단연구과제 「세포질융합 *Aspergillus* spp. 변이균주에 의한 수산가공용 고효율 단백질분해효소의 개발과 그 산업적 이용」의 수행된 연구의 일부분으로서 연구비의 지원에 깊은 사의를 표합니다.

REFERENCES

1. Ann, J. and J. F. Peberdy. 1976. Induced fusion of fungal protoplast following treatment with polyethylene glycol. *J. Gen. Microbiol.* **92**: 413–417.
2. Atkinson, T., M. D. Scawen, and P. M. Hammond. 1987. Large scale industrial techniques of enzyme recovery, pp. 279–323. In J. F. Kennedy (ed.), *Biotechnology* Vol. 7a. VCH publishers, Weinheim.
3. Aunstrup, K. 1979. Production, isolation and economics of extracellular enzymes, pp. 27–69. In L. Wingard, E. Katchalaski-Katzir, and L. Goldstein (eds.), *Applied Biochemistry and Bioengineering* Vol. 2. Academic Press, New York.
4. Bigelis, R. 1992. Food enzymes, pp. 361–415. In D.B. Finkelstein and C. Ball (eds.), *Biotechnology of Filamentous Fungi*. Technology and Products, Butterworth-Heinemann.
5. Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248–254.
6. Frost, G. M. and D. A. Moss. 1987. Production of enzymes by fermentation, pp. 156–182. In H. J. Rehm and G. Reed (eds.), *Biotechnology*. VCH Publishers, Weinheim.
7. Furuya, T., M. Ishige, K. Uchida, and H. Yosino. 1983. Koji-mold breeding by protoplast fusion for soy sauce production. *Nippon Nogeikagaku Kaishi* **57**: 1–8 (in Japanese).
8. Genthner, F. J. and P. T. Borgia. 1978. Spheroplast fusion and heterokaryon formation by formation in *Mucor racemosus*. *J. Bacteriol.* **134**: 349–352.
9. Kao, K. N. and M. R. Michayluk. 1974. A method for intergeneric fusion of plant protoplasts. *Planta* **115**: 355–367.
10. Kevei, F. and J. F. Peberdy. 1977. Interspecific hybridization between *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus rugulosus* by fusion of somatic protoplasts. *J. Gen. Microbiol.* **102**: 255–262.
11. Kiyohara, H., T. Watanabe, J. Imai, N. Takizawa, T. Hatta, K. Nagao, and A. Yamaoto. 1990. Intergeneric hybridization between *Monascus anka* and *Aspergillus oryzae* by protoplast fusion. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **33**: 671–679.
12. Knorr, D. and A. J. Sinskey. 1985. Biotechnology in food production and processing. *Science* **229**: 1224–1229.
13. O'Donnell, K. and S. W. Peterson. 1992. Biotechnology of filamentous fungi, pp. 16–25. In D. B. Finkelstein and C. Ball (eds.), *Biotechnology of Filamentous Fungi*. Butterworth-Heinemann, Stoneham, USA.
14. Ogawa, K., J. A. Brown, and T. M. Wood. 1987. Intraspecific hybridization of *Trichoderma reesei* QM9414 by protoplasts fusion using color mutant. *Enzyme Microb. Technol.* **9**: 229–232.
15. Ogawa, K., H. Ohara, and N. Toyama. 1988. Intraspecific hybridization of *Aspergillus awamori* var. *kawachi* by protoplasts fusion. *Agric. Biol. Chem.* **52**: 337–342.
16. Ohnuki, T., Y. Etoh, and T. Beppu. 1982. Intraspecific and interspecific hybridization of *Mucor pusillus* and *M. miehei* by protoplast fusion. *Agric. Biol. Chem.* **46**: 451–458.
17. Raper, K. B. and D. I. Fennel. 1965. *The Genus of Aspergillus*, pp. 1–35. The Williams & Wilkins Co., New York.
18. Tochikura, T. 1988. *Sciences and Technology of Soy Sauce*, pp. 152–227. Japanese Brewery Industry Assoc. (in Japanese).
19. Toyama, H. and N. Toyama. 1990a. Factors affecting the genetic stability of non-parental type segregants derived from fusants *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus niger*. *Agric. Biol. Chem.* **54**: 2789–2792.
20. Toyama, H. and N. Toyama. 1990b. Protoplast fusion between *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus niger* in relation to their multinuclear nature. *J. Ferment. Bioeng.* **69**(3): 186–188.
21. Ushijima, S. and T. Nakadai. 1987. Breeding by protoplast fusion of koji mold, *Aspergillus sojae*. *Agric. Biol. Chem.* **51**: 1051–1057.
22. Ushijima, S., T. Nakadai, and K. Uchida. 1991. Interspecific electrofusion of protoplast between *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus sojae*. *Agric. Biol. Chem.* **55**: 129–136.
23. Wainwright, M. 1992. *An Introduction to Fungal Biotechnology*, pp. 28–35. John Wiley & Sons, New York.
24. Ward, O. P. 1989. Industrial enzymes, pp. 194–200. *Fermentation Biotechnology*. John Wiley & Sons, New York.

(Received July 10, 1998)