Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.
Vol. 29, No. 1, 12–17 (2001)

Aspergillus coreanus NR 15-1과 *Aspergillus oryzae* NR 2-5의 원형질체 형성의 최적조건

정혁준 · 유대식*
계명대학교 미생물학과

Optimal Conditions of Protoplast Formation of *Aspergillus coreanus* NR 15-1 and *Aspergillus oryzae* NR 2-5. Jung, Hyuck Jun and Tae Shick Yu*. *Department of Microbiology, Keimyung University, Taegu 704-701, Korea* – *Aspergillus coreanus* NR 15-1 and *Aspergillus oryzae* NR 2-5 from traditional Korean Nuruk were selected as parental strains producing starch hydrolysis enzymes. X11(Arginine$^-$) mutant from *A. coreanus* NR 15-1 showed high glucoamylase activity and total acid productivity. Z6(Adenine$^-$) mutant from *A. oryzae* NR 2-5 showed the highest α-amylase activity. Therefore, both X11 and Z6 mutants were selected and investigated for the optimal conditions of protoplast formation for protoplast fusion. Mixture of equal amount of cellulase and driselase(10 mg/ml each) was the most effective as lytic enzymes. The optimal pH and temperature for protoplast formation were 5.0 and 30°C, respectively. The most effective reaction for protoplast formation time was 4 hours. The maximum of protoplast formation of X11 mutant and Z6 mutant were 6.54×10^7 protoplasts/ml and 3.04×10^7 protoplasts/ml, and the regeneration frequencies of the protoplasts were 11.3% and 11.6%, respectively. The size of the protoplasts from X11 and Z6 mutants were 3~6 μm and 4~9 μm, respectively.

Key words: *Aspergillus coreanus* , *Aspergillus oryzae* , Nuruk, protoplast

우리나라의 전통주의 양조학적 특징은 당화제로 누룩을 사용하는 것이라 할 수 있다. 누룩은 조분쇄한 생전분질 원료와 물을 혼합한 일정한 크기로 성형하여 원료에 부착한 미생물뿐 아니라 공기중의 야생미생물의 자연접종으로 제조된다. 전통주의 양조에 있어서 중요한 기능을 나타내는 전통누룩의 우수성을 재현하기 위해서는 전통누룩에 관여하는 균주의 미생물학적 연구가 필수적이다. 현재 우리 술을 세계주류시장에서 경쟁력을 갖춘 전통술로 상품성을 높이기 위해서는 우선 전통누룩의 고품질의 대량생산기술, 발효공정의 과학화를 통한 주질의 균일화와 위생적 생산기술 및 저장성 향상 등의 기술개발이 이루어져야 한다.

이 같은 문제점을 해결하기 위하여 누룩의 미생물학적 측면과 효소학적 측면의 보다 체계적인 연구가 절실히 요구된다.

누룩중에는 많은 종류의 사상균, 세균과 효모류가 존재하여 당화제와 발효제의 역할을 동시에 수행할 수 있다. 특히, 누룩의 당화력은 주로 누룩사상균인 *Aspergillus*속과 *Rhizopus* 속 등에 의하여 생성된다. 누룩미생물에 관한 연구는 여러 편이 보고되어 있으며[2-6,19,32], 최근 Uchimura 등에 의하여 한국산 누룩으로부터 *Absidia*속 사상균을 선택적으로 분리하여 *Absidia corymbifera*와 *Absidia ramosa*를 동정하고, 그의 생리적 특성을 규명한 바 있다[26]. *Aspergillus*속과 *Rhizopus*속 사상균은 우리 인간의 생활과 밀접한 관계를 맺어 왔으며 많은 종류의 효소를 생산한다고 알려 지고 있다. 그 중 α-amylase와 glucoamylase 등 산업적으로 유용한 전분가수분해효소를 많이 분비하는 균주로 오래 전부터 알려져 왔으며, 이러한 효소들은 현재 전분을 가수분해시켜 포도당을 생산하는데 산업적으로 크게 이용되고 있다. 더욱이 의약재제와 항생제 등의 생산에도 많이 이용되어지고 있다. 최근 누룩사상균의 각종 효소의 효소화학적 특성, 양조학적 특성, 효소생산 능력의 증대 등의 목적으로 인공 돌연변이와 세포융합 등의 방법이 행해지고 있다. 사상균의 세포융합에 관한 연구는 *Aspergillus*를 대상으로 많은 연구가 진행되어 왔으며, *A. oryzae*[10]는 원형질체 재생율이 1.46-14%로 다른 사상균에 비하여 재생율이 높고 종내 융합율도 0.12-0.16으로서 융합주의 amylase활성은 친주보다 약 1.5배 높은 결과를 나타내었다. 또한 *A. awamori* var. *kawachi* [14], *Trichoderma reesei*[16]와 *A. sojae*[27,28]에서도 동종간의 원형질체융합에 관한 연구가 있어 왔다. 더욱이 β-glucosidase 분비력이 우수한 *A. niger*와 avicelase와 carboxy-methylcellulase 분비력이 우수한 *A. wentii*[20]의 각각의 포자로부터 형성된 원형질체의 이종간의 융합주는 친주의 효소활성보다 각각 1.2-1.5배 높은 효소활성을 나타내었다. 그리고 *A. terreus*와 *A. usamii*[7], *A. awamori* var. *kawachi*와 *A. oryzae*[15], *Mucor pusillus*와 *M. miehei*[17], *T. koningii*와 *T. reesei*[18], *A. oryzae*와 *A. sojae*[29,30]간의

*Corresponding author
Tel. 82-53-580-5252, Fax. 82-53-580-5164
E-mail: tsyu@kmu.ac.kr

이종간 원형질체융합에 관한 연구보고도 있다. 또한 유 등에 의하여도 누룩 사상균의 효소학적 특성에 관한 연구도 수행되어져 왔다. 누룩사상균인 *A. oryzae* NR 3-6의 glucoamylase를 정제하였으며, 정제된 효소는 밀 생전분의 분해력이 가용성 전분의 분해력에 비해 17.5배 높게 나타내어 누룩 사상균은 밀 생전분에 특이적인 전분분해력을 나타내었다[32]. 위와 같이 누룩사상균의 효소학적 특성에 관한 연구는 있으나, 누룩사상균을 육종하기 위한 연구는 거의 없는 실정이다.

본인 등은 한국 전통누룩에 분포하는 사상균중 새로운 누룩사상균으로 동정된 신종, *A. coreanus* NR 15-1과 누룩사상균으로 알려진 *A. oryzae* NR 2-5 균주를 변이처리하여 영양요구 변이주를 분리했다[3]. 이들 변이주중 amylase 활성과 산 생성능이 우수한 변이주로부터 원형질체융합을 통한 신기능성균주 육종의 일환으로 원형질체 형성의 최적조건에 관하여 연구한 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

사용시약

Cellulase, driselase, nicotinic acid, pantothenic acid, leucine, biotin, riboflavin, sorbitol, mannitol, adenine, methionine, lysine, histidine, arginine, tryptophan, tyrosine, ascorbic acid는 (Sigma Co, USA) 제품을 사용하였다. Yeast extract와 casamino acid는 (Difco Co, USA) 제품을, 그 외 일반시약은 시장에서 구입한 특급 제품을 사용했다.

실험균주

본 실험에 사용된 균주는 전통누룩으로부터 분리·동정된 *A. coreanus* NR 15-1과 *A. oryzae* NR 2-5를 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(NTG) 변이처리로 각각 얻어진 X11과 Z6 변이주를 사용하였다. X11 변이주는 arginine을 요구하는 영양요구변이주이며, glucoamylase활성이 높으며 산 생성능도 우수한 것이 특징이다. Z6 변이주는 adenine을 요구하는 영양요구변이주로서 α-amylase활성이 특이적으로 높은 변이주이다[3].

원형질체 형성

완전배지(2% glucose, 0.5% yeast extract, 0.5% casamino acid, 0.2% $NaNO_3$, 0.1% K_2HPO_4, 0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.05% KCl, 0.001% $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, pH 5.6) 50 ml에 각각의 포자현탁액을 접종한 다음, 28°C에서 15시간 배양시켜 G3 소결 glass filter여과로 포자를 제거하여 균사체를 모았다. 분리된 균사체를 삼투압 안정제로서 0.6 M KCl이 포함된 10 mM citrate-phosphate 완충액(pH 5.0)으로 두 번 세척한 후, 균사체 300 mg을 세포벽 분해효소가 첨가된 동일 완충액 1 ml로 현탁하고 30°C에서 4시간 반응시켰다. 잔여 균사파편으로부터 원형질체의 분리를 위하여 이 반응액을 다시 소결 glass filter로 여과한 후, 삼투압 안정제가 첨가된 액체 최소배지(3% sucrose, 0.2% $NaNO_3$, 0.1% K_2HPO_4, 0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.05% KCl, 0.001% $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, pH 5.6)로 두 번 세척하였다. 형성된 원형질체의 수는 hemacytometer로 측정했다.

원형질체의 재생

위의 방법에 의하여 형성된 원형질체의 재생배지는 완전배지에 0.6 M의 삼투압 안정제가 첨가된 hypertonic complete medium(HCM)을 사용하였다. Petri dish에 10 ml의 solid HCM(2% agar)를 넣어 굳히고, solid HCM위에 5 ml의 soft HCM(0.5% agar)을 붓고 적당히 희석한 원형질체를 넣어 soft HCM과 잘 섞은 후, 28°C에서 3~5일간 생육시켜 원형질체를 재생시켰다.

재생율은 hemacytometer로 측정한 수와 HCM상에서 재생된 원형질체수의 비로 표시했다.

원형질체 형성의 최적조건 검토

변이주의 원형질체 형성의 최적조건을 검토하기 위하여, 세포벽 분해효소의 영향, 삼투압 안정제의 영향, 반응 최적 pH, 반응 최적온도, 반응 최적시간을 조사하였다.

세포벽 분해효소는 cellulase와 driselase를 사용하였으며 각각의 효소를 5~20 mg/ml의 농도와 두 효소를 복합적으로 각각 5 mg/ml, 10 mg/ml되게 사용하여 원형질체 형성의 최적 세포벽 분해효소와 그 농도를 결정하였다. 삼투압 안정제로는 먼저 0.6 M의 KCl, sorbitol, mannitol, NaCl, NH_4Cl, $MgSO_4$를 사용하여 원형질체 형성의 최적조건을 알아 본 다음, 결정된 삼투압 안정제를 농도별로 첨가하여 최적조건을 검토하였다. 반응 최적 pH는 pH 4.0~7.0의 범위에서 검토하였으며 pH 4.0~5.5는 10 mM citrate phosphate 완충액을, pH 6.0~7.0은 10 mM sodium phosphate 완충액을 사용하였다. 반응 최적온도의 경우, 20°C~40°C의 범위에서 검토하였으며 원형질체 형성에 있어서 반응 최적시간은 반응 6시간까지 각각의 시간대 별로 최적조건을 검토하였다.

결과 및 고찰

세포벽 분해효소의 영향

원형질체 형성에 있어서 세포벽 분해효소의 종류에 대하여 검토했다. Table 1에 나타난 바와 같이, 세포벽 분해효소를 1종류만을 처리했을 때는 cellulase가 driselase보다 변이주 X11과 Z6의 원형질체 형성에 효과적이었다. X11 변이주와 Z6 변이주에 있어서 cellulase의 원형질체 형성의 최적 농도는 각각 5 mg/ml와 20 mg/ml이었으며, driselase의 최적농도는 15 mg/ml와 10 mg/ml이었다. X11 변이주의

Table 1. Effect of various lytic enzymes on the protoplast formation.

Lytic enzymes	Conc. of enzymes (mg/ml)	No. of protoplast / ml	
		X11 mutant	Z6 mutant
Cellulase	5	6.8×10^6	1.2×10^7
	10	5.8×10^6	1.4×10^7
	15	5.2×10^6	1.8×10^7
	20	5.0×10^6	2.2×10^7
Driselase	5	2.0×10^6	5.0×10^6
	10	2.4×10^6	1.2×10^7
	15	4.4×10^6	1.1×10^7
	20	1.4×10^6	1.1×10^7
Cellulase and Driselase	5 mg/ml each	9.9×10^6	1.2×10^7
	10 mg/ml each	2.8×10^7	2.3×10^7

Each reaction mixture was incubated at pH 5.0, 30°C for 4 hours. Osmotic stabilizer used was 0.6M KCl.

원형질체 형성은 cellulase와 driselase를 단독으로 처리하였을 때 전체적으로 $1.4\sim6.8\times10^6$ protoplasts/ml이 형성되었으나 두 효소를 복합적으로 각각 10 mg/ml되게 처리하였을 경우 2.8×10^7 protoplasts/ml로 세포벽 분해효소를 단독처리한 것보다 약 4배 이상 높은 원형질체 형성율을 보였다. 그리고 Z6 변이주의 경우도, X11 변이주와 같이 세포벽 분해효소를 단독 처리했을 때보다 복합적으로 각각 10 mg/ml 처리하는 것이 효과적이었다.

삼투압 안정제의 영향

여러 종류의 삼투압 안정제가 원형질체 형성에 미치는 영향에 대하여 살펴본 결과(Fig. 1), NaCl을 사용하였을 때 X11과 Z6 변이주 모두 각각 4.48×10^7 protoplasts/ml, 3.04×10^7 protoplasts/ml로 가장 많은 원형질체가 형성되었다. 삼투압 안정제로 사용한 sorbitol[15]이 X11 변이주의 원형질체 형성에 있어서 가장 낮은 형성율인 1.5×10^7 protoplasts/ml을, Z6 변이주의 경우 $MgSO_4$를 사용하였을 때 6.8×10^6 protoplasts/ml로 가장 낮은 형성율을 나타내었다. 일반적으로 삼투압 안정제로 많이 사용되는 KCl, sorbitol, mannitol보다 본 실험에 사용된 변이주들의 원형질체 형성에는 NaCl이 가장 양호하였다.

원형질체 형성에 있어서 NaCl의 최적농도를 검토한 결과(Fig. 2), X11 변이주는 0.4 M NaCl에서 6.5×10^7 protoplasts/ml의 형성율을 나타내어 가장 높은 값을 나타냈으며, Z6 변이주는 0.6 M NaCl에서 3.0×10^7 protoplasts/ml로 가장 높은 원형질체 형성율을 나타내었다. *M. pusillus*의 원형질체 형성에 사용된 삼투압 안정제인 sorbitol의 최적농도는 0.4-0.6 M이였으며[17], *A. sojae*[27]와 *A. oryzae*[29]는 0.8 M sorbitol이, *T. koningii*는 0.6 M mannitol[18]이 원형질체 형성에 가장 양호한 농도였다. X11과 Z6 변이주의 원형질체 형성의 최적 NaCl의 농도는 0.4-0.6 M로서 위의 결과들과 비슷한 삼투압 안정제의 농도를 나타냈다.

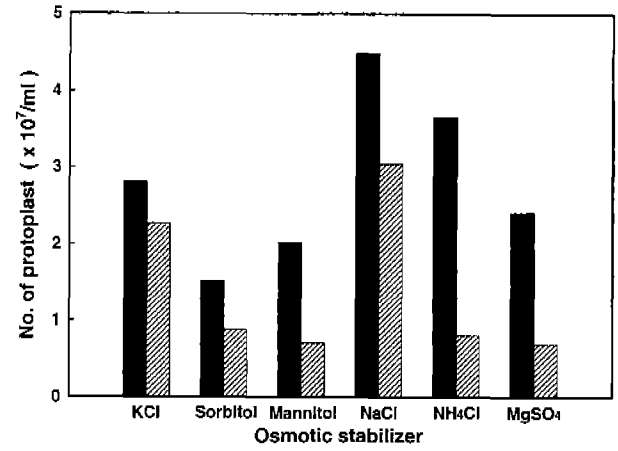

Fig. 1. Effect of the osmotic stabilizers on the protoplast formation.
Each reaction mixture was incubated at pH 5.0, 30°C for 4 hours. 0.6 M osmotic stabilizers were used for protoplast formation. Symbols: ■, X11 mutant; ▨, Z6 mutant.

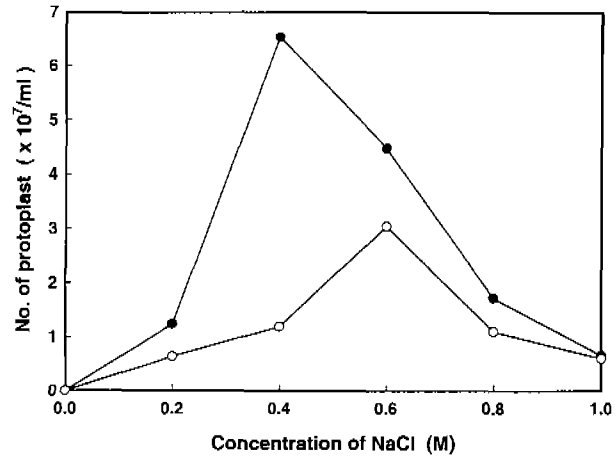

Fig. 2. Effect of the concentration of NaCl on the protoplast formation.
Each reaction mixture was incubated at pH 5.0, 30°C for 4 hours. Symbols: ●, X11 mutant; ○, Z6 mutant.

반응 최적 pH

원형질체 형성에 있어서 반응 최적 pH를 알아보기 위하여 균사체를 세포벽 분해효소와 삼투압 안정제가 첨가된 pH 4.0~pH 7.0 범위의 완충액에 현탁하여 30°C에서 4시간 반응시켰다. Fig. 3에 나타난 바와 같이, X11과 Z6 변이주 모두 pH 4.5~pH 5.0의 범위에서 높은 원형질체 형성율을 보였으며 pH 5.0에서 각각 6.54×10^7 protoplasts/ml와, 3.04×10^7 protoplasts/ml로 원형질체 형성율이 가장 높았다.

A. sojae 2048과 *A. sojae* 2164는 pH 6.5[27]에서, *A. oryzae* ATCC 22788은 pH 5.5~6.0[10]에서, *A. terreus* IFO 6123과 *A. usamii* IAM 2185는 pH 6.0 [7]에서, *A. niger*

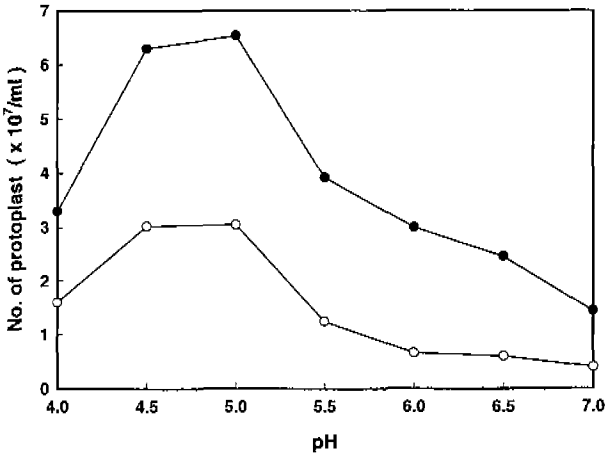

Fig. 3. Effect of pH on the protoplast formation.
Each reaction mixture was incubated at 30°C for 4 hours. The osmotic stabilizers and their concentrations were 0.4 M NaCl for X11 mutant (●) and 0.6 M NaCl for Z6 mutant (○).

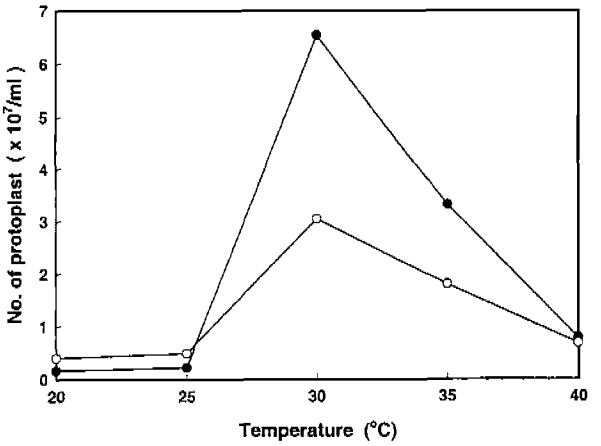

Fig. 4. Effect of temperature on the protoplast formation.
Each reaction mixture was incubated at pH 5.0 for 4 hours. The osmotic stabilizers and their concentrations were 0.4 M NaCl for X11 mutant (●), and 0.6 M NaCl for Z6 mutant (○).

MAN-831과 *A. wentii* MAW-538은 pH 6.0[20]에서 원형질체를 형성시킨 것과 비교하면 본 변이주는 이보다 낮은 pH 5.0의 범위에서 그 형성율이 최고에 달했으며 pH 6.0에서는 원형질체 형성율이 50% 이하로 줄어들었다.

이상의 결과로 이들 변이주는 pH 5.0이 원형질체 형성에 가장 양호하여 반응 완충액의 pH를 5.0으로 고정하여 사용했다.

반응 최적 온도

본 실험에 사용된 변이주들의 원형질체 형성에 미치는 반응 온도의 영향에 대하여 조사한 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 그 결과, 두 변이주 모두 20°C~25°C의 범위에서는 10^7 protoplasts/ml 이하가 형성되었으나 30°C에서 X11 변이주가 6.54×10^7 protoplasts/ml로, Z6 변이주는 3.04×10^7 protoplasts/ml로 원형질체 형성율이 가장 높았으며 그 이상의 온도에서는 원형질체 형성율이 급격히 감소하였다. *A. terreus*[7], *A. usamii*[7]와 *A. oryzae*[10]의 원형질체 형성의 최적온도는 30°C였으며, *A. awamorii* var. *kawachi*[14]는 35°C에서 원형질체가 가장 잘 형성된 것과 비교할 때 X11과 Z6 변이주의 원형질체 형성의 최적온도가 30°C인 것은 다른 연구자들의 결과와 비슷했다.

세포벽 분해효소의 반응 최적 시간

원형질체 형성에 있어서 세포벽 분해효소의 반응시간의 영향을 알아보기 위하여 0~6시간 반응시켜 형성된 원형질체의 수를 조사하였다.

Fig. 5에 나타난 바와 같이, 두 변이주 모두 반응 2시간 이후 원형질체 형성율이 급격히 증가하여 X11 변이주가 반응 5시간에서, Z6 변이주는 반응 6시간에서 원형질체 형성율이 최고치에 도달했다. 반응 최적시간인 5시간 처리한

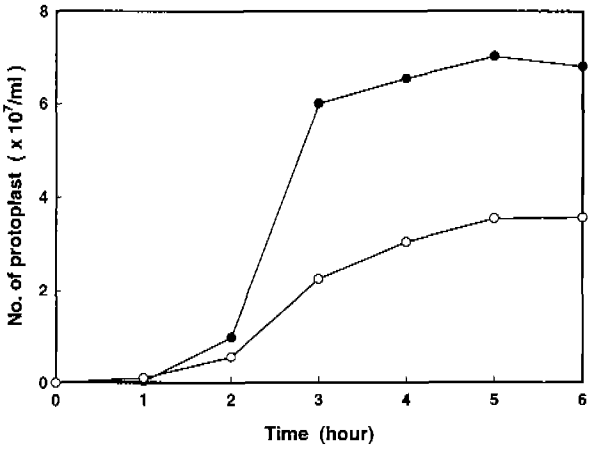

Fig. 5. Effect of the reaction time on the protoplast formation.
Each reaction mixture was incubated at 30°C, pH 5.0. The osmotic stabilizers and their concentrations were 0.4 M NaCl for X11 mutant (●) and 0.6 M NaCl for Z6 mutant (○).

X11 변이주의 원형질체 형성은 7.02×10^7 protoplasts/ml였으며, 6시간 반응시킨 Z6 변이주는 3.56×10^7 protoplasts/ml로 가장 높게 원형질체가 형성되었다.

A. niger[20], *Aspergillus sp.*[22]와 *A. flavus*[12]의 원형질체 형성의 반응 최적시간은 4시간으로 이 변이주의 결과보다 짧은 시간이였다. 그러나 *Tri. reesei*[25]는 이 변이주의 결과보다 긴 6시간으로 나타났다. 위의 결과에서 나타난 바와 같이, 원형질체 형성의 반응시간이 다른 것은 효소의 종류와 농도, 반응처리의 조건 등에 따라 다르게 나타날 수 있으며 특히, 균주의 세포벽의 조성의 차이가 크게 다른 결과로 나타난다고 생각된다.

원형질체 재생율

원형질체의 재생율은 Table 2에 나타난 바와 같이, X11

Table 2. Regeneration frequency of protoplast from the auxotrophic mutants.

Strains	Incubation time (hour)	No. of protoplast/ml	Regeneration frequency (%)
X11 mutant	1	1.5×10^5	3.6
	2	9.7×10^6	6.3
	3	6.0×10^7	10.0
	4	6.5×10^7	11.3
	5	7.0×10^7	9.3
	6	6.8×10^7	4.4
Z6 mutant	1	8.9×10^5	5.1
	2	5.5×10^6	7.3
	3	2.2×10^7	9.4
	4	3.0×10^7	11.6
	5	3.5×10^7	9.7
	6	3.6×10^7	7.6

The regeneration frequency was defined as the ratio of the number of protoplasts and the regenerated number of colonies on the hypertonic complete medium.

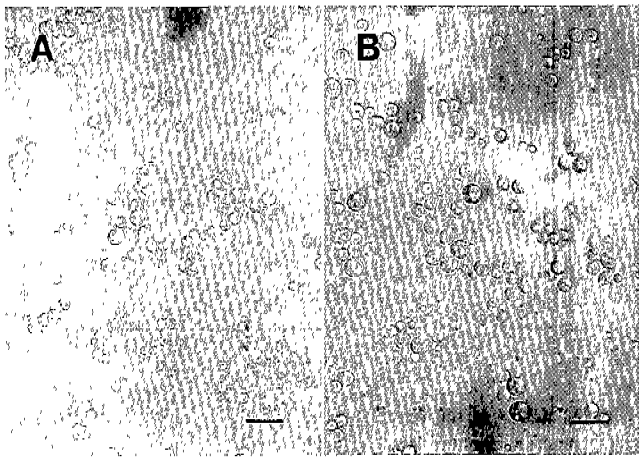

Fig. 6. Light micrograph of protoplasts from X11 mutant of *Asp. coreanus* NR 15-1(A), and Z6 mutant of *Asp. oryzae* NR 2-5(B).
The bar marker represents 15 μm.

변이주의 경우, 반응 4시간 때 11.3%로 원형질체의 재생율이 가장 높았으며 재생된 수도 ml당 7.39×10^6 protoplasts/ml인데 반해 원형질체 형성율이 가장 높았던 반응 5시간 때의 재생율은 9.3%로 6.54×10^6 protoplasts/ml이 재생된 것과 비교할 때 재생율에 있어서 X11 변이주는 4시간이 오히려 효율적이라고 사료된다. Z6 변이주의 경우도 반응 4시간 때의 재생율은 11.6%로, 재생된 원형질체의 수도 3.54×10^6 protoplasts/ml로 오히려 반응 최적시간인 6시간 때 재생율이 7.6%인 것과 비교할 때 반응 4시간이 재생율에 있어서 더욱 효율적이었다. 이러한 결과는 세포벽 분해효소에 의한 과도한 세포벽 분해가 원형질체의 재생에 나쁜 영향을 준 것으로 사료된다. 원형질체의 평균 크기는 Fig. 6의 A와 B에 나타난 바와 같이, X11 변이주의 경우 3~6 μm이며 Z6 변이주는 4~9 μm로 다양한 크기로 형성되었다.

일반적으로 원형질체융합을 위한 원형질체의 수가 각 균주당 $1\sim5 \times 10^7$ protoplasts/ml인 것을 볼 때[10,14,27] 이 조건에서 원형질체융합을 위한 충분한 양의 원형질체가 형성되었다. 또한 앞으로 이러한 우수한 균주를 대상으로 한 원형질체융합을 통해 새로운 기능을 나타내는 균주의 육종이 가능하리라 사료된다.

요 약

한국 전통누룩으로부터 분리·동정된 *Aspergillus coreanus* NR 15-1로부터 glucoamylase활성이 높은 X11(Arginine$^-$) 변이주와 *A. oryzae* NR 2-5로부터 α-amylase활성이 높은 Z6 (Adenine$^-$) 변이주의 원형질체융합을 위한 원형질체 형성의 최적조건을 검토했다.

원형질체 형성을 위한 세포벽 분해효소는 X11 변이주와 Z6 변이주 모두 cellulase와 driselase를 복합적으로 각각 10 mg/ml되게 사용하였을 때 원형질체 형성율이 가장 높았다. 삼투압 안정제는 X11 변이주에서는 0.4 M NaCl이, Z6 변이주에서는 0.6 M NaCl이 가장 효율적이었다. 원형질체 형성을 위한 반응 최적 pH는 X11 변이주와 Z6 변이주 모두 pH 5.0에서 가장 높은 원형질체 형성율을 나타내었으며 pH 6.0에서는 형성율이 반 이하로 감소하였다. 반응 최적온도는 두 변이주 모두 30°C가 가장 적합하였으며 그 이상의 온도에서는 원형질체 형성율이 감소하였다. 원형질체 형성을 위한 세포벽 분해효소의 반응 최적시간은 X11 변이주에서는 반응 5시간에, Z6 변이주에서는 반응 6시간이 원형질체 형성율이 가장 높았다. 원형질체의 재생율에 있어서는 두 변이주 모두 반응 4시간 때 X11 변이주가 11.3%로, Z6 변이주는 11.6%로 가장 높았으며 재생되는 원형질체의 수도 가장 많아 반응 시간은 4시간이 적당한 것으로 나타났다.

이상의 조건에서 형성된 원형질체의 평균 크기는 X11 변이주가 3~6 μm이며, Z6 변이주는 4~9 μm로 다양한 크기의 원형질체가 형성되었으며 원형질체 형성율은 각각 6.54×10^7 protoplasts/ml와 3.04×10^7 protoplasts/ml이었다.

REFERENCES

1. Chung, M. J. and N. K. Park. 1979. Studies on the proteolytic enzyme of mold. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechol.* 7: 157–164.
2. Jo, G. Y. and C. W. Lee. 1997. Isolation and identification of the fungi from Nuruk. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **26**: 759–766.
3. Jung, H. J. and T. S. Yu. 2000. Isolation of mutants overproducing amylase from Nuruk fungi by NTG. *J. Korean Soc.*

Food Sci. Nutr. **29**: [submitted].
4. Kim, H. S., J. S. Hyun, J. Kim, H. P. Ha, and T. S. Yu. 1996. General characterization of traditional Korean Nuruk. *J. Inst. Nat. Sci. Keimyung University.* **15**: 235–242.
5. Kim, H. S., J. S. Hyun, J. Kim, H. P. Ha, and T. S. Yu. 1997. Characteristics of useful fungi isolated from traditional Korean Nuruk. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **26**: 767–774.
6. Kim, H. S., J. S. Hyun, J. Kim, H. P. Ha, and T. S. Yu. 1998. Enzymological characteristics and identification of useful fungi isolated from traditional Korean Nuruk. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26**: 456–464.
7. Kirimura, K., T. Sato, N. Nakanishi, M. Terada, and S. Usami. 1997. 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.
8. Lee, D. Y. 1969. Studies on industrialization of the Korean Kockja(I), It's isolation and physiological characteristics of mold from Kockja. *Kor. J. Microbiol.* **5**: 51–54.
9. Lee, M. J. and M. J. Chung. 1980. Studies on the production of protease by *Aspergillus oryzae* KC-15 and characteristics of the enzymes. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **8**: 77–85.
10. Lee, S. Y., J. S. Lee, and Y. N. Lee. 1989. Protoplast fusion of *Aspergillus oryzae*. *Kor. J. Microbiol.* **27**: 216–220.
11. Lee, Z. S. and T. W. Rhee. 1970. Studies on the microflora of Takju brewing. *Kor. J. Microbiol.* **8**: 116–133.
12. Moore, P. M. and J. F. Peberdy. 1976. Release and regeneration of protoplast from the conidia of *Aspergillus flavus*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **66**: 421–627.
13. Nakanishi, H. 1929. Studies on Chosen Kockja(I). *J. Brew. Soc. Japan.* **6**: 717–871.
14. Ogawa, K., H. Ohara, and N. Toyama. 1988. Intraspecific hybridization of *Aspergillus awamori* var. *kawachi* by protoplast fusion. *Agric. Biol. Chem.* **52**: 337–342.
15. Ogawa, K., H. Ohara, and N. Toyama. 1988. Interspecific hybridization of *Aspergillus awamori* var. *kawachi* and *Aspergillus oryzae* by protoplast fusion. *Agric. Biol. Chem.* **52**: 1985–1991.
16. Ogawa, K., H. Ohara, T. Koide, and N. Toyama. 1989. Intraspecific hybridization of *Trichoderma reesei* by protoplast fusion. *J. Ferment. Bioeng.* **67**: 207–209.
17. 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.
18. Park, H. M., J. M. Jeong, S. W. Hong, Y. C. Hah, and C. N. Seong. 1986. Interspecific protoplast fusion of *Trichoderma koningii* and *Trichoderma reesei*. *Kor. J. Microbiol.* **24**: 91–97.
19. Park, J. W., K. H. Lee, and C. Y. Lee. 1995. Identification of filamentous molds isolated from Korean traditional Nuruk and their amylolytic activies. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 737–746.
20. Park, S. K., S. W. Lee, I. S. Moon, B. S. Shon, and S. K. Kang. 1995. 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.
21. Shin, Y. D. and D. H. Cho. 1970. A study on the microflora changes during Takju brewing. *Kor. J. Microbiol.* **8**: 53–64.
22. Sung, N. K., S. W. Lee, K. H. Shim, Y. C. Jung, and J. S. Rho. 1989. Isolation and protoplast formation of cellulolytic *Aspergillus* sp. *J. Inst. Agr. Res. Util.*(Gycongsang Nat'l. Univ.). **23**: 137–144 .
23. Takeda, Y. 1934. Studies on Chosen alcoholic fermented microorganisms(II). *Nippon Nogeikagaku Kaishi.* **10**: 281–317.
24. The Brewing socicty of Japan. 1993. *The annotation of the official method of analysis of the National Tax Administration Agency.* 4th ed. Tokyo: 218–226.
25. Toyama, H., A. Shinmyo, and H. Okada. 1983. Protpplast formation from conidia of *Trichoderma reesei* by cell wall-lytic enzymes of a strain of *Trichoderma viride*. *J. Ferment. Technol.* **61**: 409–411.
26. Uchimura, T., S. Takagi, K. Watanabe, and M. Kozaki. 1990. *Absidia* sp. in the Chinese starter (Nuruk) in Korea, Microorganisms in Chinese starter from Asia (part 3). *J. Brew. Soc. Japan.* **85**: 888–894.
27. Ushijima, S. and T. Nakadai. 1987. Breeding by protoplast fusion of koji mold, *Aspergillus sojae*. *Agric. Biol. Chem.* **51**: 1051–1057.
28. Ushijima, S., T. Nakadai, and K. Uchida. 1987. Improvement of enzyme productivities through mutation or haploidization of heterozygous diploids obtained by protoplast fusion of *Aspergillus sojae*. *Agric. Biol. Chem.* **51**: 2781–2786.
29. Ushijima, S., T. Nakadai, and K. Uchida. 1990. Breeding of new koji-molds through interspecific hybridization between *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus sojae* by protoplast fusion. *Agric. Biol. Chem.* **54**: 1667–1676.
30. Ushijima, S., T. Nakadai, and K. Uchida. 1990. 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.
31. Yu, K. W., C. K. Seoung, S. S. Lee, and J. Y. Yoo. 1996. Studies on the fungal isolates of Mucorales collected from Korean home made Mejus and Nuluks. *Kor. J. Mycol.* **24**: 280–292.
32. Yu, T. S., T. H. Kim, and C. H. Joo. 1999. Purification and characteristics of glucoamylase in *Asp. oryzae* NR 3-6 isolated from traditional Korean Nuruk. *Kor. J. Microbiol.* **37**: 80–85.

(Received Oct. 12, 2000/Accepted Dec. 22, 2000)