

Aspergillus awamori var. *kawachii*에 의한 쌀 Koji 제조시 유기산의 생산조건

소 경 환

부천전문대학 식품영양과

Cultural Conditions for the Production of Organic Acid During Rice-Koji Making by *Aspergillus awamori* var. *kawachii*

Myung-Hwan So

Dept. of Food and Nutrition, Bucheon Junior College, Buchon, 421-735, Korea.

Abstract

This study was carried out to investigate the influences of cultural conditions of koji on the production of organic acid during rice-koji making by *Aspergillus awamori* var. *kawachii* which is now widely used as koji-mold in brewing Takju and Yakju in Korea. The optimum temperature for the germination of the conidia of this mold was 36°C, and the time required for germination at this temperature was 8 hours. Rapid germination occurred when the water content of steamed rice was above 40%, but germination retardation occurred markedly below 35%. The optimum cultural temperature for the production of organic acid was 32°C, and the production of organic acid was markedly restricted at 36°C and 40°C. It was effective for the high production of both saccharogenic amylase and organic acid to shift the cultural temperature from initial 36°C to 32°C after 20~25 hours of cultivation. Initial water content suitable to the production of organic acid was 40% in steamed rice, but its production was markedly restricted below 30% of water content. When the quantity of conidial inoculation was too small, the production of organic acid was low in initial phase, but it was retrieved at later period. Acid production was markedly restricted together with the increase in koji thickness.

Key words : *Aspergillus awamori* var. *kawachii*, rice-koji, organic acid.

서 론

Aspergillus awamori var. *kawachii*는 1927년경 일본 남부지방에서 Kawachii(河内)에 의하여 처음으로 발견된 회백색의 곰팡이이다. Kawachii씨는 고구마 소주의 제조시에 이용되는 흑국국인 “中酸性 黑麴菌”을 desiccator에 보관하던 중 돌연변이에 의하여 본균이 생겨났다고 하며¹⁾, 모균에 비하여 제국이 용이하고 고구마의 수지물질을 잘 분해하기 때문에 고구마로서 소주를 제조하는 데 특히 적합하다고 하였다¹⁾.

본 균은 분류학상의 위치가 확실히 밝혀지지 않은

체 일본에서 주류공업에 많이 이용되어 오다가 1949년 이후 Kitahara(北原) 등^{1,6)}에 의하여 그 특성이 많이 밝혀지게 되었다. Kitahara씨는 Kawachii씨로부터 본 균과 모균을 분양받은 후 다른 균들과 함께 형태학적인 특성과 효소학적인 특성을 비교 검토한 후에 본 균은 “中酸性 黑麴菌”의 백색 변이주이며⁴⁾ “中酸性 黑麴菌”은 *Aspergillus awamori*에서 유래되었다⁵⁾는 결론을 내렸다.

본 균이 우리나라에 처음으로 도입된 것은 1938년이며 李⁷⁾가 Kawachii씨로부터 직접 입수하였다고 한다. 우리나라는 고래로부터 주류제조용 발효제로 누룩을 사용해 왔다. 그러나 일제시대 이후 가정에서의 양조행위가 금지되고 양조장에서 대규모의 양조가 이루어짐에 따라 술덧의 산패방지와 균일한 주질유지의

필요성이 중요한 과제로 대두되었으며 이의 해결책으로 *Aspergillus awamori* var. *kawachii*의 koji가 사용되게 되었다⁴⁾.

본 균은 구연산을 생산하여^{1, 4)} 주류발효에 안전한 산성 pH를 제공할 뿐만 아니라 주류에 청량감을 주며, α -amylase, β -amylase 및 maltase를 생산하여^{2, 3, 5)} 발효의 수율을 높이고, 포자의 색이 희기 때문에^{1, 4)} 탁주의 색을 나쁘게 하지 않는 장점을 지니고 있다. 요즘의 탁·약주 양조에서는 누룩이 거의 사용되지 않고 있으며 반면 *Aspergillus awamori* var. *kawachii*의 koji가 주 발효제로 사용되고 있다⁶⁾.

탁·약주 발효제 중 누룩에 대한 연구는 비교적 많이 이루어 졌으나¹⁰⁻¹⁶⁾ 현재 탁·약주용 발효제 중 가장 중요한 위치를 차지하고 있는 *Aspergillus awamori* var. *kawachii*의 koji에 관한 연구¹⁷⁾는 매우 미흡한 실정이다.

본 연구에서는 *Aspergillus awamori* var. *kawachii*로서 탁·약주용 쌀 koji를 제조할 때에 유기산의 생산에 미치는 여러 조건들의 영향을 검토하였다.

재료 및 방법

1. 국 균

본 실험에 사용된 국균은 *Aspergillus awamori* var. *kawachii*로 충무발효연구소에서 세대배양하면서 현재 국내의 탁·약주 양조장에 koji제조용으로 보급하고 있는 것이다.

2. 쌀

Koji제조에 사용된 쌀은 9분 도정된 통일계의 쌀이었다.

3. 국균포자의 발아 소요시간 측정

온도에 따른 국균포자의 발아소요시간 측정시에는 Petri dish에 고화시킨 맥아즙 한천배지의 표면에 시험용 국균포자를 도말접종한 후 20~44℃의 온도에서 발아를 시키면서 80배의 직시현미경으로 때때로 관찰하여 포자의 발아로 인한 균사의 발생을 확인할 수 있을 때까지 소요되는 시간을 구하였고, 수분함량에 따른 발아소요시간의 측정시에는 수분함량 30~60%의

냉각된 멸균증미에 국균포자를 접종한 후 screw cap tube에 넣어 밀폐한 다음 36℃에서 배양하면서 때때로 검경하여 발아에 소요되는 시간을 구하였다.

4. Koji의 제조방법

쌀을 4시간 침수시킨 다음 물기를 빼고 60g씩 달아서 500ml의 삼각플라스크에 넣고 면천한 다음 고압멸균기에서 120℃로 15분간 증자한 후 냉각시켜 수분함량 40%인 멸균증미를 제조하였다. 멸균증미에 *Aspergillus awamori* var. *kawachii* 포자 현탁액 1ml(5×10^8 개의 포자 함유)를 가하고 잘 흔들어서 고루 섞은 후 소정의 온도(24℃, 28℃, 32℃, 36℃ 및 40℃)에서 20~60시간 배양하였다. 단, 증미의 수분함량의 영향에 관한 실험시에는 수분함량 30%의 멸균증미를 제조한 후 멸균된 증류수를 가하여 소정의 수분함량(30~65%)이 되도록 하였고, 온도의 영향에 관한 실험을 제외하고는 모두 32℃에서 배양하였다. 또 koji 두께의 영향에 관한 실험시에는 국균포자를 접종한 증미를 삼각플라스크에 넣고 36℃에서 20시간 전배양한 후 직경 4cm, 높이 8cm, 입구직경 2cm의 유리병에 소정의 두께(1~6cm)가 되게 넣은 후 가법계 면천을 하고 32℃의 항온기에서 30시간 및 40시간 배양하였다.

5. Koji의 산도 측정

국세청의 발효제 품질분석방법에 따라 koji 20g에 증류수 100ml를 가하고 실온에서 3시간 침출한 후 그 여과액 10ml를 취하여 0.1N-NaOH 용액으로 적정하여 소비된 ml수를 구하고, 이에 0.0064를 곱하여 koji의 구연산의 함량(%)으로 나타내었다.

결과 및 고찰

1. 온도 및 수분함량에 따른 국균포자의 발아소요시간

맥아즙 한천배지에 *Aspergillus awamori* var. *kawachii*의 포자를 접종하고 20~48℃의 온도에서 발아시키며 발아에 소요되는 시간을 측정한 결과는 Table 1과 같았다.

Table 1. Time required for germination of the conidium of *Aspergillus awamori* var. *kawachii* at different temperature

Incubation temperature(°C)	20	24	28	32	36	40	44	48
Time for germination(hr.)	36	19	13	10	8	9	14	—*

* Germination did not occur up to 72 hours of incubation.

Table 2. Time required for germination of the conidium of *Aspergillus awamori* var. *kawachii* at different water content on steamed rice

Water content(%)	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60
Time for germination(hr.)	—*	73	35	17	11	9	8.5	8	8	8

* Germination did not occur up to 120 hours of incubation at 36°C.

본 균 포자의 발아최적온도는 36°C내외이며 이때 발아소요시간은 8시간이었다. 또 온도가 28°C이하이거나 44°C이상일 때는 발아가 심하게 지연되었다. 본 결과로 예측해 본다면 koji제조시에 증미의 냉각을 지나치게 하여 보습온도가 28°C이하로 되거나, 반대로 증미의 냉각을 불충분하게 하여 44°C이상의 온도에서 보습을 했을 경우에는 국균의 발아가 억제되어 보습에서 뒤집기까지 시간이 많이 소요될 것이다. 그러므로 양조장에서 본 균으로 koji를 제조할 때에는 보습 이후의 냉각을 고려하여 겨울철에는 38°C내외의 품온에서, 여름철에는 36°C의 품온에서 보습작업을 하는 것이 좋을 것으로 생각된다.

증미의 수분함량이 국균포자의 발아에 미치는 영향을 알기 위하여 증미의 수분함량을 15~60%로 조정하여 발아소요시간을 측정해 본 결과는 Table 2와 같았다.

수분함량 40% 이상일 때는 발아가 잘 되었으나 35% 이하에서는 현저하게 지연되었다. 일반적으로 세균의 생육에 필요한 최저 수분함량치는 곰팡이의 생육에 필요한 최저 수분함량치보다 높기 때문에 *Aspergillus awamori* var. *kawachii*의 쌀 koji 제조시에 냉각 증미의 수분함량을 50% 이상으로 하면 국균포자의 발아가 잘 이루어지기는 하지만 오염된 세균들의 증식도 또한 왕성해질 것이다. 따라서 보습시의 증미수분함량을 40~45%로 유지시키면 오염세균증식의 위험성을 줄이면서 국균포자의 발아도 비교적 잘 진행되게 할 수 있기 때문에 좋을 것으로 생각된다.

2. 배양온도 및 배양시간이 유기산 생산에 미치는 영향

수분함량 40%인 증미에 *Aspergillus awamori* var. *kawachii*의 포자를 접종하고 배양온도를 각각 다르게 하여 koji를 제조하면서 배양시간의 경과에 따른 유기산 함량의 변화를 조사해 본 결과는 Fig. 1과 같았다.

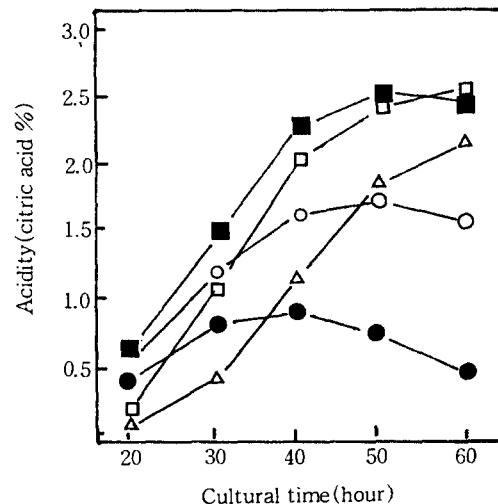


Fig. 1. Time courses of acid production during koji cultivation by *Aspergillus awamori* var. *kawachii* at different temperature.

—△— : 24°C, —□— : 28°C, —■— : 32°C
—○— : 36°C, —●— : 40°C

유기산의 함량은 배양시간이 경과함에 따라 점점 증가하여 최고치를 이룬 후 그 이후에는 감소하였다. 배양시간이 30~50시간의 범위에서는 32℃ 배양구가 가장 높았으나 60시간이 경과 했을 때에는 28℃ 배양구가 가장 높았다. 배양온도가 36℃ 또는 40℃로 높아짐에 따라 유기산생산은 현저히 감소하였다.

이상의 결과는 윤 등¹⁸⁾이 *Aspergillus usamii* mut. *shirousamii*의 유기산 생산 최적온도를 30℃로 보고한 것이나, Hannan 등¹⁹⁾이 *Aspergillus niger*의 구연산 생산 최적온도를 30℃로 보고한 것과 일치하는 것으로 볼 수 있다.

통상 탁·약주용 koji제조시 과정에서 출국까지의 시간을 36~38시간⁹⁾으로 하고 있으므로 유기산의 생산을 위한 koji의 최적배양온도는 32℃로 봐야 할 것이다. 일반적으로 탁·약주용 koji를 제조할 때에 품온을 36~42℃로 유지하고 있는데⁹⁾ 본 실험의 결과로 본다면 이 온도는 유기산의 생산을 위한 최적배양온도보다 4~10℃가 높은 온도이다.

北原 등¹⁾에 의하면 *Aspergillus awamori* var. *kawachii*도 oxalic acid를 소량 생산한다고 하며, Sodeck 등²⁰⁾은 *Aspergillus niger*에 의한 구연산 발효시에 발효온도를 33℃ 이상으로 올리면 oxalic acid의 생산량이 증가한다고 하므로 탁·약주용 koji제조시 품온을 36~42℃로 유지하는 현행의 방법에 대하여 재고를 해 보아야 할 것으로 생각한다.

3. 배양중 온도변경이 유기산 생산에 미치는 영향

본 균의 유기산 생산최적온도는 32℃이었으나(Fig. 1), 발아최적온도가 36℃이고(Table 1), 또 본균의 당화효소생산의 최적온도도 36℃이므로²¹⁾ 발아와 당화효소의 생산이 급격히 이루어지는 배양초기에는 36℃로 배양하다가 일정한 시간 후에 32℃로 온도를 낮추어 배양을 하면 koji의 당화효소 생산량도 높고 유기산의 생산량도 높을 것으로 생각이 되었다. 이러한 가정을 확인하기 위하여 36℃에서 20시간, 25시간 및 30시간 배양을 한 후에 배양온도를 32℃로 낮추어 계속 배양을 했을 때 koji 중의 유기산 함량변화를 조사해 본 결과는 Fig. 2와 같았다.

예상했던 바와 같이 국균포자를 접종한 후 20~25시간까지 36℃로 배양을 하면, 당화효소의 생산량을 높

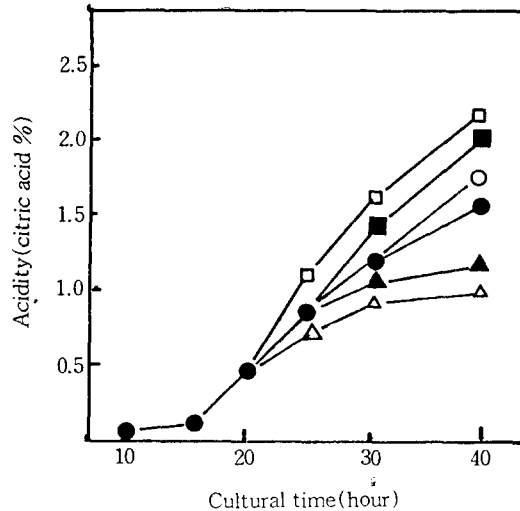


Fig. 2. Effect of temperature shift on acid production during koji cultivation by *Aspergillus awamori* var. *kawachii*.

Cultural temperature was shift from 36℃ (—●—), to 32℃ after 20 hours (—□—), 25 hours (—■—) and 30 hours (—○—), or to 40℃ after 20 hours (—△—) and 25 hours (—▲—) during cultivation.

이 유지하면서²⁰⁾ 유기산의 생산량도 현저히 높일 수 있었다. 그러나 배양 개시 후 20~25시간까지 36℃로 배양하다가 그 이후에 40℃로 온도를 올려서 배양을 했을 경우에는 유기산의 생산량이 현저히 감소하였다. 이러한 결과는 현재 양조업계에서 잘 알고 있는 바와 같이 koji제조시 2차 손질작업 이후에 품온을 지나치게 높이면 산도가 낮은 koji가 된다는 사실¹⁰⁾을 재확인시켜 주는 것이 된다.

4. 증미의 수분함량이 유기산 생산에 미치는 영향

냉각증미의 수분함량을 30~65%로 조절할 다음 국균포자를 접종하고 32℃에서 배양하면서 30시간, 40시간 및 50시간이 경과했을 때 koji의 유기산 함량을 측정해 본 결과는 Fig. 3과 같았다. 단, 본 실험에서는 koji의 수분함량이 각각 다르므로 실험에서 얻은 측정치를 수분함량 30%의 koji로 환산한 후에 plotting하였다.

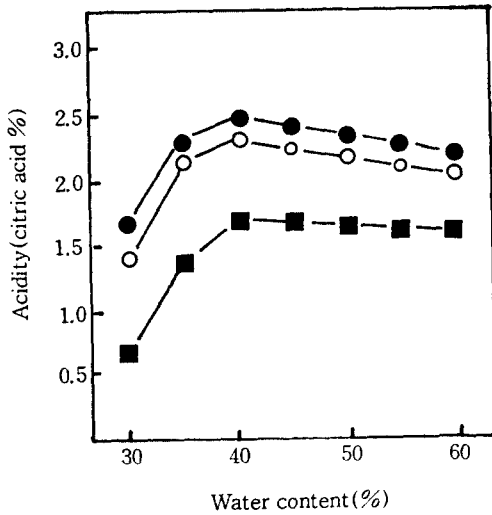


Fig. 3. Influence of water content of steamed rice on acid production during koji cultivation by *Aspergillus awamori* var. *kawachii*.

Cultivation of 30hrs(—■—), 40hrs(—○—) and 50 hrs(—●—) at 32°C.

Fig. 3에서 보면 유기산의 생산은 수분함량 40%일 때에 가장 높았다. 수분함량 45% 이상일 때는 유기산 생산이 완만하게 감소되었으나, 35% 이하일 때는 급격히 감소되었다. 이러한 결과는 윤 등¹⁸⁾이 *Aspergillus usamii* mut. *shirousamii*를 밀가루에 배양할 때에 유기산 생산을 위한 최적 수분첨가량이 60%라고 한 것¹⁸⁾보다 훨씬 낮다.

본 실험의 결과에 의하면 냉각증미의 수분함량이 40%일 때 유기산 생산이 가장 좋은 것으로 나타났지만 이는 삼각플라스크 내에서 배양했을 때의 결과이며, 실제 양조장에서는 국상자 또는 자동제국기를 이용하여 koji를 제조하기 때문에 배양과정중에 증미의 건조가 심하게 이루어질 것이므로 이를 고려한다면 증미의 수분함량을 45%정도가 되게 하는 것이 좋을 것으로 생각된다. 통상 쌀을 충분히 침수시킨 후 증자하여 냉각했을 때에는 수분함량이 35~40%가 되므로 증미의 수분함량을 45%정도 되게 하기 위해서는 증미작업시에 소량의 물을 살수해 주는 것이 바람직하리라 본다.

5. 국균포자의 접종량이 유기산 생산에 미치는 영향

Koji제조시에 국균포자 접종량이 유기산 생산에 미치는 영향을 조사해 본 결과는 Fig. 4와 같았다. 본 실험에서 증미 1g당의 포자접종량이 최소인 log 5.2접종구는 자연수로 환산하면 포자수 1.6×10^5 이므로 조제종국(1g중에 국균포자수 40×10^8) 0.004%를 접종한 것에 해당되고, 포자접종량이 최대인 log 8.2접종구는 조제종국 4%를 접종한 것에 해당되며, log 7.0 접종구는 조제종국 0.25%를 접종했을 때의 포자수에 해당된다.

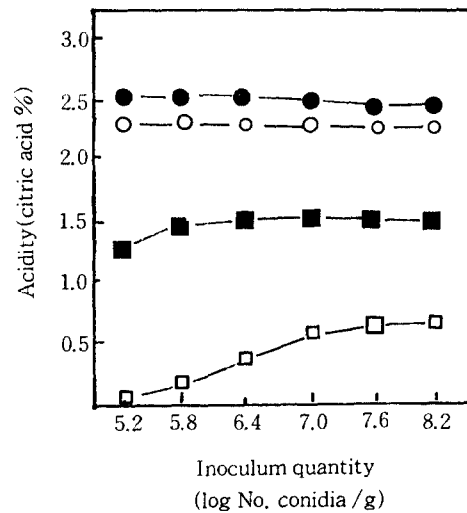


Fig. 4. Influence of inoculum quantity of conidia on acid production during koji cultivation by *Aspergillus awamori* var. *kawachii*.

Cultivation of 20 hrs(—□—), 30 hrs(—■—), 40 hrs(—○—) and 50 hrs(—●—) at 32°C.

Fig. 4에서 보면 배양초기인 20시간에서는 포자의 접종량이 지나치게 적은 시험구는 유기산의 생산량이 다소 낮았으나 배양시간이 경과함에 따라 그 차이가 차츰 줄어들어 40시간 배양시에는 포자접종량의 많고 적음에 따른 차이는 전혀 나타나지 않았다.

본 결과는 실험실에서 무균적으로 배양할 때의 결과이며, 양조장에서 실제로 koji를 제조할 때에는 무균적인 작업이 불가능하기 때문에 국균포자의 접종량이 지나치게 적으면 배양초기에 오염균이 증식하여 koji의

품질을 나쁘게 할 수도 있을 것으로 생각된다. 본 실험에서 알 수 있듯이 국균포자의 접종량이 통상의 접종량인 1g당 log 7(조제종국 0.25%접종에 해당)보다 2~16배 더 많은 양을 접종했을 때에는 초기의 산생성이 빨라지고 완성된 koji에는 차이가 나타나지 않으므로 잡균의 오염이 심한 조건하에서 koji제조를 할 때에는 종국을 통상의 사용량보다 2~4배 가량 더 많이 사용하면 초기의 오염균증식을 억제하는 데 효과적일 것으로 생각된다.

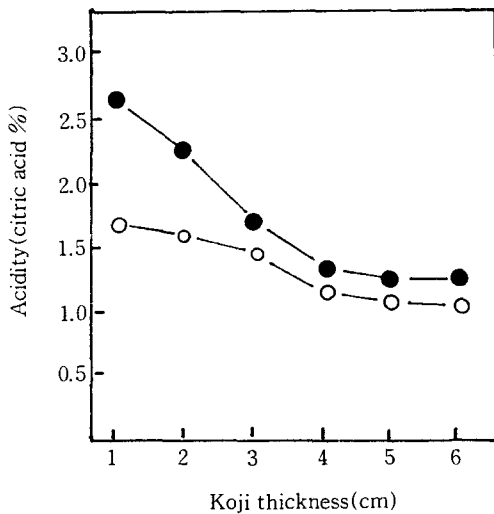


Fig. 5. Influence of koji thickness on acid production during koji cultivation by *Aspergillus awamory* var. *kawachii*.

Cultivation of 30 hrs(○-○) and 40 hrs(●-●) at 32°C

Koji의 두께가 두꺼워짐에 따라 유기산의 생산량이 현저히 줄어들었다. koji의 두께가 두꺼워지면 산소의 부족으로 인한 국균의 생육부진과 품온상승 등의 원인에 의하여 유기산의 생산이 불량해지는 것으로 생각된다. 양조장에서 국상자 또는 자동제국기를 사용하여 koji를 제조할 때는 반개방 상태이고 1, 2차 손질작업 또는 강제 송풍으로 열의 발산과 공기교환을 하여주기 때문에 본 실험의 결과와는 다소 다를 수 있을 것이다.

요 약

현재 우리나라에서 탁, 약주의 양조에 사용되고 있는 국균인 *Aspergillus awamory* var. *kawachii*로 쌀 koji를 제조할 때에 유기산 생산에 영향을 미치는 배양 조건을 검토하였다. 본 균의 발아최적온도는 36°C이었고, 이 때의 발아소요시간은 8시간이었다. 증미의 수분함량이 40% 이상일 때는 발아가 잘 이루어졌으나 35% 이하일 때에는 발아 지연현상이 현저하게 나타났다. 유기산 생산을 위한 최적 배양온도는 32°C이었고, 36°C 및 40°C에서는 유기산 생산이 현저하게 억제되었다. 배양개시 후 20~25시간까지 36°C로 배양을 하고 그 이후에 32°C로 배양을 했을 때는 유기산의 생산량도 높고 당화효소의 생산량도 높았다. 증미의 수분함량이 40%일 때 유기산 생산량이 가장 높았고, 30% 이하일 때는 유기산 생산이 현저히 억제되었다. 국균포자의 접종량이 적을 때에는 배양 초기의 유기산 생산량이 낮았으나 배양말기에서는 차이가 없었다. Koji의 두께가 두꺼울 때는 유기산의 생산이 현저히 억제되었다.

참고문헌

1. 北原 覺雄, 吉田 満智子: 絲狀菌의 Diastase 組成에 關する 研究(第3報), 泡盛白麴菌に 就て, 其1 形態的 並に 二, 三の 生理的 性質に 就て, 日本醱酵工學會誌, 27(7), 162(1949)
2. 北原 覺雄, 久留島 通後: 絲狀菌의 Diastase 組成에 關する 研究(第1報), 二, 三의 重要 絲狀菌의 Diastase 組成의 比較: 日本醱酵工學會誌, 27(1), 1(1949)
3. 北原 覺雄, 久留島 通後: 絲狀菌의 Diastase 組成에 關する 研究(第2報), 各麴 Diastase 組成比 並に 黑麴 Amylase의 特異性に 就て, 日本醱酵工學會誌, 27(4), 6(1949)
4. 北原 覺雄, 久留島 通後: 絲狀菌의 Diastase 組成에 關する 研究(第3報), 泡盛白麴菌に 就て, 其의 2 *Aspergillus kawachii* nov. sp.는 果して 黑麴菌의 變異種なりや, 日本醱酵工學會誌, 27(8), 182(1949)
5. 北原 覺雄, 久留島 通後: 絲狀菌의 Diastase 組成

- に 關する 研究(第6報), 綜合糖化 曲線による 黑麴菌の 分類の 可能性に 就て, 日本醱酵工學會誌, 28(3), 106(1950)
6. 北原 覺雄, 阿部 卓二, 久留島 通後: 絲狀菌の Diastase 組成に 關する 研究(第8報), 曾て 喜多氏가 指摘した 特殊 Amylase 作用의 檢證, 日本醱酵工學會誌, 28(11), 422(1950)
7. 李斗永: 백국균 *Aspergillus kawachii kitahara*의 생태학적 연구, 한국미생물학회지, 6(4), 113 (1968)
8. 유주현: 생물공학계의 숨은 선구자 이두영 박사 탐방, 미생물과 발효, 16(1), 1(1992)
9. 정동효: 발효와 미생물공학, 선진문화사, p. 228~275(1985)
10. 이두영: 곡자제조방법, 한국특허 제272호(1950)
11. 이병우: 강력한 효소를 보유한 곡자제조법, 한국특허 제682호(1956)
12. 이성범: 탁·약주류 제조에 있어서 효소원 및 그의 효율적인 첨가방법, 한국미생물학회지, 5(2), 43(1967)
13. 이두영: 한국곡자의 발효생산력에 관한 연구(제1보), 곡자중 함유 사상균의 분리와 그 성장, 한국미생물학회지, 5(2), 51(1967).
14. 이두영: 한국곡자의 발효생산력에 관한연구(제2보), 증강소맥을 재료로 한 곡자제조, 한국미생물학회지, 7, 41(1969)
15. 정기택, 유대식: 고구마 전분질 원료를 이용한 주류제조, 국제청기술연구소보, 제2호, 19(1969)
16. 정호권: 곡자의 개량에 관한 연구(제1보), 개량곡자의 제조 및 그 능력, 한국식품과학회지, 2, 88 (1970)
17. 이상영, 임형식, 박계인: *Aspergillus kawachii*를 이용한 탁주양조법에 따른 무기물의 변화, 한국미생물학회지, 13(3), 116(1975)
18. 윤복현, 박운중, 이석근: *Aspergillus kawachii* U2 균의 국식배양에 의한 유기산 및 당화효소 생성에 관한 연구, 한국식품과학회지, 6(3), 127(1974)
19. Hannan, M.A., F. Robbi, A.T.M. Faizur Rahman, and N. Choudhury: Analysis of some mutants of *Aspergillus niger* for citric acid production, *J. Ferment. Technol.*, 51(8), 606(1973)
20. Sodeck, G., J. Modl, T. Kominek and W. Salzbrunn: Production of citric acid according to the submerged fermentation process, *Process Biochemistry*, October-November, 9 (1981)
21. 소명환: *Aspergillus awamori* var. *kawachii*에 의한 쌀 koji 제조시 당화효소의 생산조건, 한국식품영양학회지, 6(4), (1993)

(1993년 11월 14일 수리)