

한국전통누룩에서 분리한 유용곰팡이의 효소학적 특성 및 동정

김현수 · 현지숙 · 김 정 · 하현팔¹ · 유대식*

계명대학교 미생물학과, ¹경주 법주 주식회사

Enzymological Characteristics and Identification of Useful Fungi Isolated from Traditional Korean Nuruk. Kim, Hyun-Soo, Ji-Sook Hyun, Jung Kim, Hyun-Pal Ha¹, and Tae-Shick Yu*.
Department of Microbiology, Keimyung University, Taegu 704-701, Korea, ¹Research Institute, Kyong Ju Beob Joo Co., LTD, Kyong Ju 780, Korea—For the standardization and quality improvement of traditional Korean Nuruk, 10 strains of fungi, which were isolated from Nuruks and showed good productivity of the saccharogenic and dextrinogenic enzymes, acid and flavor, were selected and their enzymological characteristics and identification were carried out. *Aspergillus* spp. and *Rhizopus* sp. showed a high liquefying activity without regard to cultivation time, whereas the majority of strains except for *Rhizopus* sp. had decreasing saccharifying activity in proportion to the increase in cultivation time. *Aspergillus* spp. No.17-2, No.17-6 and *Rhizopus* sp. No.18-1 showed high liquefying and saccharifying activity after 15 and 30 day cultivation. The optimum temperature of most of these saccharogenic and dextrinogenic enzymes was from 40°C to 60°C, and their optimum pH was extensive between pH 3 and pH 11. But *Penicillium* spp.(2 strains) and *Rhizopus* sp. showed low activity under the alkalic and acidic conditions. Among these isolated strains, 5 strains which had shown the high productivity of materials were identified as *Aspergillus oryzae* NR3-6 and *Aspergillus oryzae* NR17-6, *Aspergillus penicilloides* NR12-1, *Penicillium expansum* NR7-7 and *Rhizopus oryzae* NR18-1, respectively. Five kinds of mixed culture were carried out and all of them showed a better productivity of saccharogenic and dextrinogenic enzymes than single culture. These results indicate that it is possible to make traditional Korean liquors of good quality by using these fungi.

Key words: Nuruk, fungi, amylase activity, glucoamylase activity

최근 우리나라 국민의 식생활 수준이 향상됨으로 술에 대한 다양한 기호도와 고급화가 요구되고 있다. 또한 젊은 층을 중심으로 외국문화로부터 해방 또는 탈피하고 우리 문화를 전승, 계승, 발전시키고자 하는 전통문화로의 회귀 현상이 고조되고 있으며, 더욱이 수입 개방에 따른 외국 주류의 수입에 대한 국내주류의 경쟁력 향상을 위해 전통주류의 품질향상과 규격화, 산업화기술의 개발이 절실히 요구된다. 우리나라 전통술의 역사는 일반적으로 삼국시대 이전으로 추측하고 있으며[3], 술의 주원료인 전분질 원료와 다양한 누룩이 있어서 다양한 종류의 전통술이 있었다. 누룩은 당화제의 역할뿐 아니라 발효제의 역할도 수행하는 물료(物料)로서 그 연구에 불과했다[4, 6, 10, 11, 21].

누룩에 관한 고문서로서 정조 11년(1787년)에 간행된 「攷事十二集」의 「戊集 5, 6」에 누룩은 “밀, 밀가루, 녹두즙과 여뀌즙을 섞어 반죽하여 이를 잘 디더 성형한 후,

연잎이나 창이잎에 꼭꼭 싸서 바람맛이가 서늘한 곳에 매달았다가 10월에 갈무리해 둔다”라고 기술되어 있다 [9]. 1906년 한국산 곡자에 관한 과학적 연구가 Ueno [29]에 의하여 시작되었다고 할 수 있으며, Matsuda와 Nakashima[12]는 한국 곡자로부터 11종의 사상균과 3종의 효모를 분리했다. Saito[18]는 조선산 곡자와 조선주술덧 중의 미생물을 조사하여 곡자로부터 10여종의 사상균과 2종의 산막성 효모를 분리했으며, 이들 외에 신종 효모인 *Saccharomyces coreanus*와 *Saccharomyces coreanus forma major*를 분리, 동정했으며, *Saccharomyces coreanus*는 한국산 주정음료의 양조학상 중요한 균주로 규정되었다. 그리고 Torri[28]에 의하면 한국산 곡자의 당화력은 *Rhizopus*에 기인하며, Nakanishi[13]는 당화력이 강한 누룩으로부터 사상균 37균주, 효모 9균주 및 세균 4균주를 분리하였다. 곡자중의 미생물의 출현 빈도는 *Absidia*속, *Aspergillus oryzae*와 *Endomyces*속 사상균이 가장 많으며 그 다음으로 *Rhizopus*속의 사상균이 분리되었다. 더욱이 곡자 내부의 농홍색부분으로부터 *Monascus purpureus*를, 황색부분으로부터 *Aspergillus glaucus*를, 적갈색 또는 황갈색 부분으로부터 내열성 사상균인 *Thermoascus*를 분리했다.

*Corresponding author

Tel. 82-53-580-5252, Fax. 82-53-580-5164
E-mail: tsyu@kmucc.keimyung.ac.kr

麴子 製造 講本[15]에는 “조선주 양조에 있어서 곡자(누룩)는 주모(酒母)를 사용하지 않고 당화와 발효의 양작용이 일어나므로 곡자의 기능은 위대하다. 국(麴)과 주모의 양 기능을 구비한 곡자가 조선주 양조에 미치는 역할은 실로 중대한 것”이라고 극찬했으며, Ohara[14]에 의하면 한국곡자는 “전분의 당화제로서 국의 기능을 가짐과 동시에 어느 정도의 주모로서의 기능도 가지고 있다”라고 정의하였다. 김[5]은 시판누룩보다 액화력이 9배 이상 높으나 당화력은 오히려 1/3 정도 낮은 누룩을 제조하기도 했다.

현재 시판되는 대다수의 누룩은 가내공업으로 제조되기 때문에 다양한 사상균, 효모와 세균이 존재하여 미생물상이 대단히 복잡하고 비위생적이며 효소역가가 낮은 제품이 많이 유통되고 있는 실정이다. 이같은 시판누룩의 문제점을 해결하기 위해 누룩에 대한 효소학적 측면과 위생적인 측면에서 보다 체계적인 연구가 요구된다. 한편, 김 등[7, 8, 30]은 우리 전통술의 양조에 필요한 전통누룩의 규격화 및 품질향상을 위한 일환으로 누룩제조에 관여하는 균주를 검색하여 우수한 사상균을 분리, 고정하고 이들을 대상으로 단일배양 및 혼합배양에 따른 액화력, 당화력, 향기성분 생성능 및 산생성능 등을 비교 검토한 바 있다.

본 연구에서는 각종 효소 및 맛과 향기성분의 생성능이 우수한 균주를 선별한 후[7], 각 균주의 효소활성, 생산효소의 반응 최적온도 및 최적pH, 생전분 분해력 등을 비교 검토하였으며, 일부 균주들의 동정을 실시하고 그 결과를 바탕으로 종간 및 속간 혼합배양에 의한 효소활성을 측정하여 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

사용균주 및 배양조건

본 실험에 사용한 균은 전국 각지로부터 수집한 누룩으로부터 분리하였으며, 밀기울을 사용한 고체배지에서 액화력, 당화력 및 산생성능이 우수한 *Aspergillus* sp. 7주, *Penicillium* sp. 2주와 *Rhizopus* sp. 1주를 사용균주로 사용하였다[7]. 이들 균주의 생육배지로는 Czapek solution agar배지[1](Bacto-saccharose 3%, K₂HPO₄ 0.1%, MgSO₄ · 7H₂O 0.05%, KCl 0.05%, NaNO₃ 0.2%, FeSO₄ · 7H₂O 0.001%, agar 1.5%)를 사용하였으며, 사용균주의 배양은 ethylene oxide gas로 멸균한 생밀기울 10 g에 멸균수 3.5 ml를 첨가한 고체배지에 포자현탁액(약 1.0 × 10⁹ spores/ml) 300 μl를 접종하여 28℃에서 배양하였다.

효소액의 조제

액화력 측정의 경우, 배양체 2 g을 10 ml의 40 mM Na-acetate buffer(pH 5.0)에 현탁하여 25℃에서 1시간

진탕시킨 후 8,000 rpm에서 10분간 원심분리한 상등액을 조효소액으로 사용하였다.

당화력 측정의 경우, saccharogenic power(SP) 측정 시에는 배양체 1 g을 1% NaCl용액 20 ml에 현탁하여 30℃에서 3시간 추출한 상등액을 사용하였으며, glucoamylase 활성의 측정 시에는 배양체 1 g을 0.5% NaCl 용액 5 ml에 현탁하여 5℃에서 12시간 추출한 후, 실온에서 약하게 3시간 교반시켜 원심분리한 상등액을 0.01 M Na-acetate buffer(pH 5.0)에서 하루동안 투석하여 조효소액으로 사용하였다.

효소활성 측정

액화력(dextrinogenic activity, DU) 측정은 40℃에서 5분간 예열한 1% 가용성전분용액(40 mM Na-acetate buffer 사용, pH 5.0) 2 ml를 기질용액으로 하여 희석 효소액 0.1 ml를 넣고 40℃에서 30분간 반응시켰다. 효소 반응액 0.1 ml에 0.00025N 요오드용액(0.0025N KI 함유) 10 ml를 가하여 670 nm 파장에서 투과도(T%)를 측정 후, Wohlgemuth value에 준한 아래식에서 활성도를 산출하였다[26].

$$DU(U/ml) = 12.75(T_{30min} - T_{0min}) / 30min$$

당화력은 2% 가용성전분용액을 기질로 하여 국제청주류분석규정[25]에 따른 방법과 일본국제청주류분석규정(1993년 개정)[26]에 따른 glucoamylase의 활성을 측정하여 비교하였다. Saccharogenic power(SP)는 기질용액을 55℃에서 1시간 효소반응시킨 다음, 생성된 포도당의 양을 Lane-Eynone법으로 측정하여 기질의 당화율이 15%되는 범위에서의 당화율에 희석배수를 곱하여 산출하였다[1].

당화율(%) =

$$\frac{\text{전분당화액의 당분}(\%) - (\text{희석효소액의 당분}(\%) \times 1/10)}{(2\% \text{가용성전분의 전당} \times 1/2) + (\text{희석효소액의 전당} - \text{희석효소액의 직당}) \times 1/10} \times 100$$

Glucoamylase의 활성은 40℃에서 20분간 반응시킨 효소기질반응액 0.1 ml를 사용하여 일본 국제청주류 분석규정에 의한 glucoamylase 활성 측정법으로 효소반응액 내에 생성된 포도당량을 측정하였다. 효소활성도는 아래식에 준하여 산출하였다.

$$\text{효소활성도}(\text{Unit}) = \text{생성포도당량}(\text{mg}) \times 60 / 20(\text{반응시간}) \times 1 / 0.1(\text{효소량}) \times 100 / 10(\text{추출율})$$

액화력 및 당화력의 단위는 배양체 1 g당의 효소활성으로 표시하였다.

생산효소의 반응 안정온도 및 안정pH 범위 검토

사용균주가 생산하는 액화효소와 당화효소의 반응 안정 온도 범위를 검토하기 위해, 기질의 예열온도와 반응 온도를 여러가지로 조정하여 각각의 효소활성을 측정하였다.

한편, 효소의 반응 안정pH 범위는 각각의 효소가 가지는 반응 최저온도에서 기질용액의 pH를 3, 4, 5, 6, 7, 9, 11로 각각 조정하여 효소반응시킨 후, 가장 높은 활성을 나타낸 pH를 반응 안정pH 범위로 판정하였다.

생전분 분해력 검토

선별균주를 생밀기울 배지에서 7일간 배양하여 생산되는 효소의 생전분 분해력을 측정하기 위하여 2% 소맥전분 현탁액 1 ml에 0.1M Na-acetate buffer(pH 5.0) 1 ml를 가하여 30℃에서 5분간 예열한 후, 효소액 0.2 ml를 첨가하여 30℃에서 5시간 반응시켰다. 냉각수로 효소 반응을 정지시킨 다음, 일본 국세청 주류분석규정[26]에 의한 glucoamylase 활성 측정법으로 효소기질 반응액 1 ml에 함유된 포도당량(mg)을 측정하여 아래 식에 의해 효소활성도를 산출하였다.

$$\text{Glucoamylase activity (생전분분해력, units)} \\ = \text{생성포도당량(mg)} \times 1/5 (\text{반응시간}) \times 1/0.2 (\text{효소량}) \\ \times 100/10 (\text{추출율}) \times 2 (\text{효소기질반응액량})$$

우수균주의 동정

선별된 우수 균주 10균주 중 5균주를 대상으로하여 동정을 실시하였다. 즉, Czapek solution agar, malt extract agar(MA, Difco Co.), yeast-malt extract agar (YM, Difco Co.), potato dextrose agar(PDA, Difco Co.), Sabouraud agar배지(glucose 2%, neopeptone 1%, agar 2%, pH 7.0)에 각각 평판배양하여 colony의 성장형태와 색깔의 변화 등을 배지에 따라 관찰하고, Sabouraud agar 배지로 슬라이드 배양하여 균사와 분생포자의 형태를 관찰하였다. 또한 toxin 생산을 조사하기 위해 Czapek-dox 배지(sucrose 3%, K₂HPO₄ 0.1%, MgSO₄ · 7H₂O 0.05%, KCl 0.05%, NaNO₃ 0.2%, FeSO₄ · 7H₂O 0.001%)에 액체배양한 배양액을 사용하여 aflatoxin의 생성유무를 Thin Layer Chromatography로 확인하였다. 선별균주의 동정은 "The Genus *Aspergillus*" [17], "An Introduction to Industrial Mycology" [22], "Illustrated Genera of Imperfect Fungi" [2], "Textbook of Fungi" [20], "A Manual of the *Aspergilli*" [27], "The Manual of the *Penicillium*" [16]을 참고로하여 동정하였다.

우수균주의 혼합배양체의 효소활성 측정

다양한 기능을 가진 혼합균주를 사용한 양질의 누룩제

조를 위하여, 각 선별균주 1균주씩 배양한 단일배양의 결과와 선별균주를 동정한 결과를 바탕으로 *Aspergillus oryzae*의 5균주를, *Asp. oryzae* 5균주와 *Rhizopus oryzae*를, *Asp. oryzae* 5균주와 *Penicillium expansum*을, *Asp. oryzae* 5균주와 *Rhi. oryzae*와 *Pen. expansum*을, *Asp. oryzae*(NR 3-6)와 *Rhi. oryzae*와 *Pen. expansum*을 각각 생밀기울 배지에 함께 접종하여 5종류의 혼합배양을 실시하고 배양 7일 및 15일째의 배양체의 효소를 추출한 후, 효소활성을 측정하였다. 즉, 단일배양의 결과에서 효소활성의 반응온도 및 반응pH의 범위가 넓은 균주 가운데 서로 다른 종으로 동정된 균주들을 구분하여 단일배양과 동일한 방법으로 배양하되, 4종류 이상의 균주 배양시에는 각각의 포자현탁액을 100 μl씩 접종하였으며 3종류의 균주 배양시에는 각각의 포자현탁액 200 μl씩을 접종하였다. 각각의 효소활성은 단일배양의 경우와 동일한 방법으로 액화력 및 당화력을 측정하였다.

결과 및 고찰

배양일수에 따른 효소생성능

재래시판 누룩의 경우, 제국기간이 25~30일 정도 소요되는 점에서 누룩에 생육하는 균종에 따라 제국기간에 따른 효소생산능의 변화가 예상된다. 이같은 관점에서 누룩제조시 사용균에 따른 효소생산능을 극대화할 수 있는 제국기간을 검토하기 위해, 본 연구에서도 액화력, 당화력 및 산생성능이 우수하고 향기성분 생성능이 양호한 균주들로부터 선별된 10균주[7]를 7일, 15일, 30일간 배양하여 각각의 배양체(麴)로부터 효소를 추출하여 액화력과 당화력을 측정하였다.

Table 1. Dextrinogenic and saccharogenic activity of selected molds by cultivation time

Strains	Cultivation time (days)					
	DU ^a (units/g)			SP ^b (units/g)		
	7	15	30	7	15	30
<i>Asp.</i> sp. No.						
2-5	1148	1136	1231	900	330	300
3-6	1065	1041	1127	720	495	276
7-6	1190	1258	904	405	132	150
12-1	1220	1225	1248	360	216	246
15-1	1081	1108	1236	450	375	204
17-2	1308	1122	1262	120	567	228
17-6	1158	1296	1099	120	630	300
<i>Pen.</i> sp. No.						
7-1	1012	788	190	945	560	120
7-7	1278	1312	240	903	432	115
<i>Rhi.</i> sp. No.						
18-1	1289	1295	1211	405	750	810

^aDU : Dextrinogenic activity. ^bSP : Saccharogenic power.

Table 1에서 보인 바와 같이, 액화력의 경우 *Aspergillus* sp.의 7균주와 *Rhizopus* sp. 균주는 7, 15, 30일 배양시 모두 양호한 경향을 보였으나 *Penicillium* sp.의 2균주는 30일 배양시 액화력의 활성이 급격히 감소되는 결과를 나타내었다. 당화력은 *Rhizopus* sp.을 제외한 대부분의 균주가 배양시간이 경과할수록 감소하는 경향을 보였으며 *Aspergillus* sp.의 2-5, 3-6, 7-6, 12-1과 15-1균주 및 *Penicillium* sp.의 7-1과 7-7균주는 배양 7일째 효소생산능이 우수하였다. 이에 비해 *Aspergillus* sp.의 17-2 및 17-6균주는 배양 7일째의 당화력이 매우 낮았으나 배양 15일째에 증가하였다가 30일 배양시에 다시 감소하는 결과를 보였다. *Rhizopus* sp. 18-1균주의 당화력은 배양 7일부터 서서히 증가되어 배양 30일에 810 units/g배양체로 최고값을 나타냈다. 이들 결과에서 효소생산 시기를 고려하여 누룩제조에 이용할 수 있는 균주를 선별할 수 있었으며, 이들 균주들을 혼합배양함으로써 누룩제조기간의 단축 및 효소의 활성유지가 우수한 누룩의 제조가 가능하다고 판단된다.

생산효소의 반응 안정온도 범위

선별균주를 생밀기울 배지에 7일간 배양하여 생산된 액화효소와 당화효소의 반응 안정온도 범위를 측정하기 위해 각 온도에서의 효소활성을 측정하였다.

Table 2에서 보인 바와 같이, 액화력의 경우 *Aspergillus* sp. 3-6, 7-6, 12-1, 15-1과 17-6균주는 20~60℃에서 최대 효소활성의 90%이상의 효소활성을 유지했으며, *Aspergillus* sp. 2-5와 17-2균주는 30~50℃와 30~60℃에서 각각 90%이상의 효소활성을 나타냈다. 특히 *Aspergillus* sp. 7-6, 15-1과 17-6균주는 20~60℃에서

Table 2. Dextrinogenic activity of the produced enzyme on the various reaction temperature

Strains	Temperature (°C)					
	20	30	40	50	60	80
<i>Asp. sp. No.</i>						
2-5	941	982	1077	980	939	614
3-6	1092	1140	1128	1082	1056	644
7-6	1099	1112	1124	1120	1131	669
12-1	1118	1030	1033	1043	1077	748
15-1	1116	1119	1105	1100	1090	644
17-2	971	1037	1128	1128	1131	417
17-6	1122	1120	1060	1108	1116	516
<i>Pen. sp. No.</i>						
7-1	999	1072	1069	943	818	287
7-7	1103	1109	1022	1001	939	332
<i>Rhi. sp. No.</i>						
18-1	368	401	682	903	1126	527

Selected strains were cultivated at 28℃ for 7 days.

최대 효소활성의 약 100%의 액화력을 나타내었다. 따라서 *Aspergillus* sp. 2-5, 3-6, 7-6, 12-1, 15-1, 17-2 및 17-6균주가 생산하는 액화효소의 반응 안정온도 범위는 각각 40℃, 30~40℃, 40~50℃, 20℃, 20~50℃, 40~60℃ 및 20~60℃였다. *Penicillium* sp. 7-1과 7-7균주는 30~40℃와 20~30℃에서 액화효소의 활성이 가장 양호하였으며, *Rhizopus* sp. 18-1균주는 60℃에서 양호하였으나 50℃에서는 60℃에서의 효소활성의 80%를 나타내었다.

당화력의 경우, Table 3에서 보인 바와 같이 대부분의 *Aspergillus* sp. 균주의 효소 반응 최적온도는 50℃였으며 *Aspergillus* sp. 2-5균주는 40~50℃에서 최대의 효소

Table 3. Optimum temperature in saccharogenic power of selected molds

Strains	Temperature (°C)								
	20	30	35	40	45	50	55	60	80
<i>Asp. sp. No.</i>									
2-5	276	420	690	735	735	735	690	600	63
3-6	243	510	540	600	600	705	555	465	56
7-6	300	540	660	480	600	630	600	390	41
12-1	276	390	660	600	705	765	600	630	41
15-1	120	252	300	351	351	420	351	330	41
17-2	159	276	300	420	450	525	270	243	-
17-6	243	300	420	540	600	720	540	480	41
<i>Pen. sp. No.</i>									
7-1	240	630	690	750	1020	735	600	600	41
7-7	300	420	600	600	570	705	450	360	42
<i>Rhi. sp. No.</i>									
18-1	300	300	600	1050	900	960	780	555	41

Selected strains were cultivated at 28℃ for 7 days.

Table 4. Optimum pH in dextrinogenic activation of selected molds

Strains	pH							(units/g)
	3	4	5	6	7	9	11	
<i>Asp. sp. No.</i>								
2-5	1097	1073	1120	1024	1153	1088	1141	
3-6	1088	1041	1058	1009	1088	1148	1162	
7-6	1135	1088	1107	1031	1090	1175	1169	
12-1	1203	1178	1179	1186	1122	1165	1175	
15-1	1133	1092	1179	1160	1177	1182	1199	
17-2	1105	1133	1199	1139	1143	1167	1099	
17-6	1139	1131	1152	1165	1158	1154	1150	
<i>Pen. sp. No.</i>								
7-1	540	850	1182	1101	1111	1114	1067	
7-7	714	810	1186	1107	1171	1173	1103	
<i>Rhi. sp. No.</i>								
18-1	77	83	1184	1043	1099	1158	1156	

Selected strains were cultivated at 28°C for 7 days.

활성을 나타냈다. 그리고 *Penicillium sp.* 7-1균주는 45°C에서 반응 최적온도를 나타내었으며, *Rhizopus sp.* 18-1균주는 40°C에서 당화효소의 반응 최적온도를 나타냈다.

생산효소의 반응 안정pH 범위

선별균주를 생밀기울 배지에 7일간 배양하여 생산된 효소의 반응 안정pH 범위를 조사하기 위해 *Rhizopus sp.* 18-1균주를 제외한 모든 실험균주의 효소반응은 40°C에서, *Rhizopus sp.* 18-1균주의 효소반응은 60°C에서 실시하였으며, pH는 3~11까지 다르게 조정된 반응기질을 이용하여 액화력 및 당화력을 각각 측정하였다.

Table 4에 나타난 바와 같이, *Aspergillus sp.*의 액화력은 pH 3~11에서 비교적 활성이 양호하였으며, *Penicillium sp.* 및 *Rhizopus sp.*균주의 액화효소는 pH 5~11에서 양호한 활성을 보였다. 특히 모든 실험균주의 액화력이 pH 3.0과 pH 11.0에서도 극히 양호한 것은 기질인 전분이 효소에 의하여 가수분해된 분해물의 양보다 강산과 강알칼리에 의하여 가수분해된 기질의 분해물이 더 많았기 때문이라 사료된다.

본 실험에 사용한 균주의 당화력은 Table 5에 나타난 바와 같이, 선별된 10균주 모두 pH 5.0에서 반응 최적 pH를 나타냈다. *Aspergillus sp.* 2-5, 3-6, 7-6, 12-1, 17-6균주와 *Penicillium sp.* 7-7균주의 당화력은 pH 6.0에서도 반응 최적pH의 효소활성에 비하여 90%이상의 효소활성을 나타내었다. 그리고 *Rhizopus sp.* 18-1균주를 제외한 모든 균주가 pH 4.0과 pH 7.0에서의 당화력이 각 균주의 최대 효소활성보다 60~70% 감소한데 반해, *Rhizopus sp.* 18-1균주의 당화력은 pH 7.0에서도 반응 최적pH의 효소활성에 비해 약 20%만 감소한 결과로써

Table 5. Optimum pH in saccharogenic power of selected molds

Strains	pH							(units/g)
	3	4	5	6	7	9	11	
<i>Asp. sp. No.</i>								
2-5	180	282	750	705	420	105	45	
3-6	162	345	810	780	420	150	30	
7-6	111	276	720	660	288	105	45	
12-1	180	300	750	690	420	147	45	
15-1	192	198	570	243	252	105	45	
17-2	156	162	585	243	225	105	30	
17-6	114	234	690	660	303	105	30	
<i>Pen. sp. No.</i>								
7-1	105	390	780	690	390	150	30	
7-7	105	204	660	645	282	105	42	
<i>Rhi. sp. No.</i>								
18-1	30	30	780	645	630	150	45	

Selected strains were cultivated at 28°C for 7 days.

다른 균주에 비하여 넓은 pH영역(pH 5.0~7.0)에서 효소활성을 나타내는 균주로 판단되었다.

생전분 분해력

누룩제조시 주된 사용원료가 생밀기울인 점에서 전통 누룩의 당화력은 액화효소와 당화효소 뿐 아니라 생전분 분해효소의 역할도 중요할 것이라고 사료되었다. 이러한 관점에서 선별균주를 생밀기울 배지에 7일간 배양한 후, 추출한 효소액의 생전분 분해력을 측정하였다.

생전분 분해력은 glucoamylase의 활성을 지표로 하여 Table 6에 나타난 바와 같이, *Aspergillus sp.* 2-5, 3-6, 7-6, 12-1, 17-6균주의 glucoamylase 활성은 평균 2.60 units/g배양체로서 비교적 높은 효소활성을 나타냈으며

Table 6. Raw starch digestion activity of selected molds

Strains	GA ^a (units/g)
<i>Asp. sp. No.</i>	
2-5	2.59
3-6	2.59
7-6	2.63
12-1	2.76
15-1	2.12
17-2	1.98
17-6	2.47
<i>Pen. sp. No.</i>	
7-1	2.16
7-7	2.39
<i>Rhi. sp. No.</i>	
18-1	0.56

^aGA : Glucoamylase activity units.

Selected strains were cultivated at 28°C for 7 days.

Table 7. Morphological characters of selected *Aspergillus* spp.

Strains		3-6	12-1	17-6
Front color	YM	gray green	yellow green	yellow green
	Czapek solution agar	white green	yellow green	white green
	MA	green	green	yellow gray
	Sabouraud	green	green	yellow gray
	PDA	gray green	yellow green	yellow green
Aflatoxin productivity		-	-	-
Vesicle	shape	flask shape to globose	globose	globose
	fertile area	upper	upper half to two-third	entire surface
	size (μm)	20~30	10~30	20~30
Phialide		single non-metulae	single non-metulae	single non-metulae
Reversed color		creamy	dark yellow to non-color	creamy yellow
Conidial head	shape	radiate	radiate to columnar	radiate
	size (μm)	100~200	200~300	100~300
Stipe	marking	smooth	semi-rough	smooth
	length	long	short	long
Conidium	shape	spherical	ellipsoidal to spherical	spherical
	marking	smooth	rough	smooth
	size (μm)	2~4	3~5	2~4
Identified name		<i>Asp. oryzae</i>	<i>Asp. penicilloides</i>	<i>Asp. oryzae</i>

Aspergillus sp. 15-1과 17-2균주는 평균 2.0 units/g배양체로서 약간 낮은 활성을 나타내었다. *Penicillium* sp. 7-1과 7-7균주의 생전분 분해력은 2.27 units/g배양체로 나타났으며 *Rhizopus* sp. 18-1균주는 아주 낮은 0.56 units/g배양체의 활성을 나타내었다. *Aspergillus* sp. 12-1균주의 효소활성은 2.76 units/g배양체로서 가장 높은 활성을 나타내었다. 위의 결과로부터 분리된 누룩 사상균 중 *Penicillium* 균주보다 *Aspergillus* 균주의 glucoamylase 활성이 더 높았으며 *Rhizopus* 균주는 아주 낮은 생전분 분해력을 나타내었다.

우수균주의 동정

선별균주 가운데 효소 생산능, 향기성분 생산능, 그리고 산생성능이 양호한 5균주(*Aspergillus* sp. 3-6, 12-1, 17-6, *Penicillium* sp. 7-7, *Rhizopus* sp. 18-1)를 대상으로 하여 colony의 성장형태, 색상의 변화, 균사와 분생포자의 형태 등으로부터 유용 누룩 사상균을 동정하였다.

Aspergillus sp. 3균주의 경우 Table 7에 나타낸 바와 같이 colony의 색깔이 주로 녹색을 띠었으며 aflatoxin을 생산하지 않았다. 이들 균주는 대체로 구형의 vesicle, 단일형의 phialide, 방사형의 conidial head, 구형의 conidium을 소유하고 있었으나, *Aspergillus* sp. 12-1균주가 약간 거칠고 짧은 분생자병을 소유하면서 conidium의 표면은 거친 데 비해 *Aspergillus* sp. 3-6 및 17-6균주는 길고 부드러운 분생자병을 소유하며 conidium의 표면도 부드러웠다. 이들 형태적인 특징으로부터

Aspergillus sp. 3-6 및 17-6균주는 *Aspergillus oryzae* NR3-6 및 *Aspergillus oryzae* NR17-6으로 동정하였으나 배양매지에 따른 포자의 색상, vesicle의 형태가 다소 다른 점에서 RNA 분석을 통한 보다 정확한 동정이 요구된다. 그리고 *Aspergillus* sp. 12-1균주는 특히 30% sucrose를 함유하는 Czapek solution agar 배지에서도 생육이 가능하여 내삼투압성을 나타내며, 분생포자의 표면은 약간 거칠며, 약한 난형 또는 구형으로서 3~5 μm의 크기로서 다른 종보다 큰 분생포자였다. 이상의 형태적 특징으로 이 균주를 *Aspergillus penicilloides* NR12-1로 동정하였다(Fig. 1).

한편, *Penicillium* sp. 균주 가운데 효소 및 향기성분 생성능이 우수했던 *Penicillium* sp. 7-7균주의 형태학적 특징을 검토한 결과, colony의 색상은 YM배지에서 pink blue, Czapek solution agar에서는 blue green, MA배지에서는 dark blue였으며, Sabouraud배지와 PDA배지에서는 gray blue 등으로 나타났다. *Penicillium* sp. 7-7균주의 reversed color는 pink yellow였다. 또한 *Penicillium* sp. 7-7균주는 *Aspergillus* sp.의 3균주와 같이 aflatoxin은 생산하지 않았으며, 분생자병의 표면은 약간 거칠었으며, biverticillate 형태로 2차 verticillia가 둘로 갈라진 형이었다. 분생포자는 구형 또는 아주 약한 난구형으로서 직경은 2.5~3.0 μm로서 dark blue green 색상이었다. 이와 같은 형태적 특징으로부터 *Penicillium* sp. 7-7균주는 *Penicillium expansum* NR7-7로 동정하였다(Fig. 2). *Aspergillus penicilloides* NR12-1과 *Penici-*



Fig. 1. Light micrograph of isolated *Aspergillus* sp. No. 12-1 strain. Conidiophore and conidia were illustrated in the microscopy (Magnification, $\times 400$).

lium expansum NR7-7는 지금까지 누룩으로부터 분리되지 않은 미기록 누룩 곰팡이로 판단되었다[8].

Rhizopus sp. 18-1균주의 경우 colony가 매우 빨리 성장했으며, 투명한 기균사, stolons, rhizoids, sporangio-phores, apophysate, columellate 등이 형성되었으며 많은 포자가 포함된 sporangia를 소유하고 있었다. Colony는 회갈색, 부드러운 stolon은 무색에서 황갈색 정도였으며 rhizoid는 갈색을 띠었다. 비교적 부드러운 포자낭병이 단일 또는 최고 5개까지의 집단으로도 형성되었으며, 흑갈색의 포자낭은 대체로 둥근형이었고 직경이 50~200 μm 정도였다. 직경 30~120 μm 의 columella는 난형이나 구형에 부드러운 세포벽을 소유하였으며, 4~10 μm 크기의 sporangiospore는 구형, 난형, 부정형이었으며 다각형이나 striate형도 종종 볼 수 있었다. 균사로부터 발생한 직경 10~35 μm 의 chlamyospore는 무색에 구형이나 타원형 또는 원통형도 있었으며, 과립물질을 함유하고 있었다. 위의 특징으로부터 *Rhizopus* sp. 18-1균주는 *Rhizopus oryzae*로 동정하였다.

이상의 동정결과에서 1945년 이전까지 누룩으로부터 분리된 12속 59종의 사상균[30]과 비교할 때 본 연구에서 분리된 *Asp. penicilloides* 및 *Pen. expansum*이 새로운 누룩 곰팡이로서 판단되며, 미동정된 *Aspergillus* sp. 2-5, 15-1, 17-2는 *Asp. oryzae*로 추정되나 RNA 분석법을

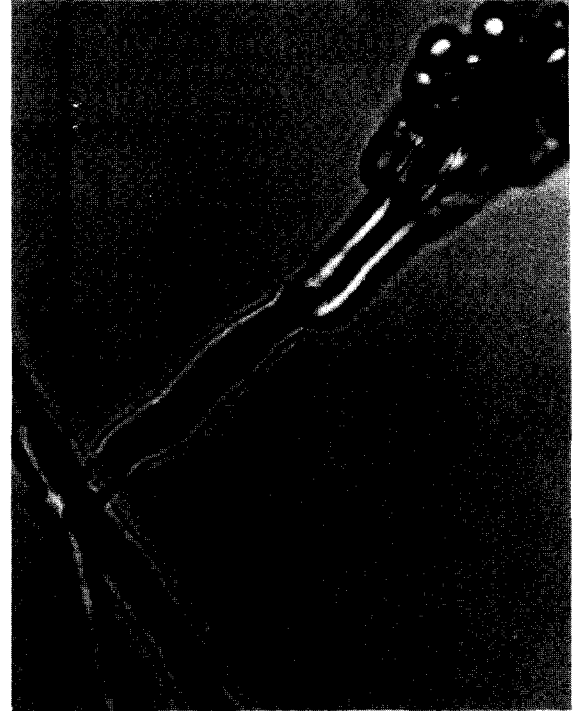


Fig. 2. Light micrograph of isolated *Penicillium* sp. No. 7-7 strain. Biverticillate conidiophore and conidia were illustrated in the microscopy (Magnification, $\times 1,000$).

통하여 동정을 수행중에 있다.

혼합배양에 의한 효소 생성능

선별된 누룩곰팡이 10균주 가운데에서 단일배양에서의 효소활성과 선별균주의 동정결과를 바탕으로 같은 속간과 다른 속간의 혼합배양을 하여 선별균주간의 생육 및 효소생성능의 간섭 또는 촉진효과 등을 검토하기 위해, 생밀기울 배지에서 배양 7일 및 배양 15일째의 효소생성능을 측정하였다.

Table 8에서 나타난 바와 같이, 혼합배양과 단일배양에 의한 액화력은 비슷한 효소활성을 나타내어 중간 및 속간 혼합배양에 의한 효소활성의 변화는 기대할 수 없었다. 그러나 당화력은 한 균주를 단독배양한 것보다 혼합배양한 경우의 효소활성이 평균적으로 25~60% 증가되었다. 즉, *Aspergillus* 5균주(2-5, 3-6, 7-6, 12-1, 17-2)를 혼합배양한 혼합배양 1균의 당화력(배양 15일)은 900 units/g배양체로 *Aspergillus* sp. 17-2균주의 단독배양한 경우의 당화력(567 units/g배양체)보다 약 63% 증가하였으며, *Aspergillus* 5균주와 *Rhizopus* sp. 18-1, *Penicillium* sp. 7-7균주를 혼합배양한 혼합배양 4균의 당화력(배양 15일)은 1,050 units/g배양체로 *Rhizopus* sp. 18-1균주의 단독배양시 당화력(750 units/g배양체)보다 40% 증가하였다. 또한 5종류의 *Aspergillus* sp. 균

Table 8. Dextrinogenic and saccharogenic activity from mixed culture

Sample No.	Cultivation time (days)			
	DU ^a (units/g)		SP ^b (units/g)	
	7	15	7	15
1	1286	1256	1230	900
2	1258	1207	900	930
3	1288	1029	870	720
4	1256	1241	735	1050
5	1250	1226	1500	930

^aDU: Dextrinogenic activity units.

^bSP: Saccharogenic power.

No. 1: *Asp. sp.* (2-5, 3-6, 7-6, 12-1, 17-2)

No. 2: No. 1+*Rhi. oryzae* (18-1)

No. 3: No. 1+*Pen. expansum* (7-7)

No. 4: No. 1+*Rhi. oryzae* (18-1)+*Pen. expansum* (7-7)

No. 5: *Asp. oryzae* (3-6)+*Rhi. oryzae* (18-1)+*Pen. expansum* (7-7)

주(2-5, 3-6, 7-6, 12-1, 17-2)가 포함된 혼합배양 1군, 2군, 3군과 4군의 경우보다 *Aspergillus sp.* 3-6군주만이 포함된 혼합배양 5군의 배양 7일째 당화력이 특히 우수하였다. 한편 이들 혼합배양체들의 포자생성상태는 *Rhizopus sp.* 18-1군주가 포함되지 않은 혼합배양 3군보다 *Rhizopus sp.* 18-1군주가 포함된 혼합배양 2군, 4군과 5군이 매우 불량하였으나(결과미계재) 효소생산에는 영향이 없는 것으로 판단되며 이 결과는 *Rhizopus sp.*과의 혼합배양시 균사신장의 간섭에 따른 결과라고 추정된다.

Table 8의 결과를 종합하면, 효소활성이 단기간 높은 누룩 제조에서는 혼합배양 5군의 혼합배양방법이 양호하였으며 장기간 배양으로 효소활성이 높은 누룩을 제조하기 위해서는 혼합배양 4군의 혼합배양방법이 양호하였다. 이상과 같은 결과들을 바탕으로, 누룩제조시에 다양한 혼합균주를 사용함으로써 규격화된 고품질의 전통주류 생산이 가능하다고 사료된다.

요 약

한국전통누룩의 규격화 및 품질향상을 위한 일환으로 액화효소 및 당화효소, 산, 향기성분 등의 생성능이 우수한 누룩 곰팡이 10균주를 선별한 후, 약간의 효소학적 특성과 각 균주의 동정을 실시하였다. 액화력의 경우 *Aspergillus sp.* 및 *Rhizopus sp.*균주는 배양시간에 상관없이 양호하였으나, *Penicillium sp.*균주는 생밀기울 배지에서 30일간 배양시 액화력이 급격히 감소하였다. 또한 당화력의 경우 *Rhizopus sp.*을 제외한 대부분의 균주가 배양시간이 경과할수록 효소활성이 감소하는 경향을 보였으나, *Aspergillus sp.* 17-2, 17-6군주 및 *Rhizopus sp.* 18-1군주는 배양시간이 경과할수록 높은 효소활성을 보였다. 이들 균주가 생산하는 액화효소의 반응 안정온도 범위는

20~60℃정도였으며, 반응 안정pH 범위는 3~11 정도로 비교적 광범위하였으나 *Penicillium sp.*의 두 균주와 *Rhizopus sp.* 균주는 산성 영역에서 낮은 활성을 나타내었다. 또한, 당화효소의 반응 최적온도는 *Penicillium sp.* 7-1군주가 45℃, *Rhizopus sp.* 18-1군주가 40℃, 그 외 8균주는 50℃였으며, 반응 최적pH는 모두 5로 나타났다. Glucoamylase의 활성을 지표로 한 각 선별균주의 생전분 분해력은 전체적으로 낮은 결과를 보였다. 한편, 선별 균주 가운데 효소, 향기성분, 산 생성능이 양호한 5군주(3-6, 12-1, 17-6, 7-7, 18-1)의 동정결과, *Aspergillus sp.* 3-6 및 *Aspergillus sp.* 17-6군주는 *Aspergillus oryzae* NR3-6 및 *Aspergillus oryzae* NR17-6으로, *Aspergillus sp.* 12-1군주는 *Aspergillus penicilloides* NR12-1로, *Penicillium sp.* 7-7군주는 *Penicillium expansum* NR7-7로, *Rhizopus sp.* 18-1군주는 *Rhizopus oryzae* NR18-1로 동정되었다. 중간과 속간의 혼합배양을 실시하여 간이누룩의 효소 생성능을 측정한 결과, 단일배양의 경우보다 혼합배양이 우수하였다. 이와 같은 결과들을 바탕으로 다양한 혼합균주를 사용함으로써 고품질의 전통주류 생산이 가능하다고 사료된다.

감사의 글

본 연구는 1996년도 과학기술처 선도기술개발과제 연구비 지원에 의하여 수행된 결과의 일부이며, 이에 깊이 감사드립니다.

REFERENCES

1. Atlas, R. M. 1993. p. 280. In L. C. Parks(ed.), *Handbook of Microbiological Media*. CRC Press, Boca Raton.
2. Barnett, H. L. and B. B. Hunter. 1972. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*, 3rd ed. Burgess Publishing Company, Minneapolis, Minnesota.
3. Chang, J. H. 1989. *History of Korean Spirits*. *Korean J. Dietary Culture* 4: 271-274. (in Korean)
4. Choi, S. H. 1961. On the microbiological studies in the Korean Kokza. Part 1: Isolation of fungus from Korean Kokza. Ms. thesis, Dept. of Pharmacy, Sung Kyun Kwan University, Suwon, Korea. (in Korean)
5. Kim, C. J. 1969. Microbiological and enzymological studies on Takju brewing. *J. Korean Agri. Chem. Soc.* 10: 69-100. (in Korean)
6. Kim, H. S. 1961. On the bacterial studies in the Korean Kokza. Part 1: Morphological studies of Korean Kokza's bacteria of a special samples. Ms. thesis, Dept. of Pharmacy, Sung Kyun Kwan University, Suwon, Korea. (in Korean)
7. Kim, H. S., J. S. Hyun, J. Kim, H. P. Ha, and T. S. Yu. 1997. Characteristics of useful fungi isolated from trad-

- itional Korean Nuruk. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **26**: 767–774. (in Korean)
8. Kim, H. S., J. S. Hyun, J. Kim, H. P. Ha, and T. S. Yu. 1997. Tendency of studies on fungi of traditional Korean Nuruk. *Bioindustry News* **10**: 27–32. (in Korean)
 9. Kim, S. M. 1993. A study on the cooking in "The Kosasibi Jip". *J. Est. Asian Soc. of Dietary Life* **3**: 1–14. (in Korean)
 10. Lee, D. Y. 1969. Studies on industrialization of the Korean Kokja (I), its isolation and physiological characteristics of mold from Kokja. *Kor. J. Microbiol.* **5**: 51–54. (in Korean)
 11. Lee, Z. S. and T. W. Rhee. 1970. Studies on the microflora of Takju brewing. *Kor. J. Microbiol.* **8**: 116–133. (in Korean)
 12. Matsuda, K. and E. Nakashima. 1910. Microbial investigation of Korean Kokja. *Report of Korean provincial branch of Saseikoku.* (in Japanese)
 13. Nakanishi, H. 1929. Studies on Chosen Kokja (I). *J. Brew. Soc. Japan* **6**: 717–871. (in Japanese)
 14. Ohara, Y. 1942. Studies on Chosen Kokja (II), Manufacturing test of Kokja improved saccharogenic power. *J. Brew. Soc. Japan* **20**: 141–147. (in Japanese)
 15. Partnership federation of Taegu's Chosenju brewing. 1941. *Manufacturing Textbook of Kokja*, p. 1. (in Japanese)
 16. Raper, K. B. and C. Thom. 1949. *The Manual of the Penicillium.* Williams and Wilkins, Baltimore, Maryland, USA.
 17. Raper, K. B. and D. I. Fennell. 1965. *The Genus Aspergillus.* Williams and Wilkins, Baltimore, Maryland.
 18. Saito, K. 1910. Notizen ber einige koreanische gärungsorganismen. *Cent. f. Bakt. II. Abt. Bd.* **26**: 369–374. (in German)
 19. Sato, K. 1930. On *Monascus* in Kokja of Mansyu and Tyosen (I). *Nippon Nogeikagaku Kaishi* **6**: 957–965. (in Japanese)
 20. Sharma, O. P. 1989. *Textbook of Fungi.* B. L. Dogra, New Delhi.
 21. Shin, Y. D. and D. H. Cho. 1970. A study on the microflora changes during Takju brewing. *Korean. J. Microbiol.* **8**: 53–64. (in Korean)
 22. Smith, G. 1969. *An Introduction to Industrial Mycology,* 6th ed. Edward Arnold, London.
 23. Takeda, Y. 1930. Studies on Chosen alcoholic fermented microorganisms (I), On *Saccharomyces* of Kokja. *Nippon Nogeikagaku Kaishi* **6**: 1023–1053. (in Japanese)
 24. Takeda, Y. 1934. Studies on Chosen alcoholic fermented microorganisms (II). *Nippon Nogeikagaku Kaishi* **10**: 281–317. (in Japanese)
 25. Technical Service Institute. 1973. *Analytical Regulation of Alcohol Beverages*, pp. 181–189. National Tax Administration, Rep. Korea. (in Korean)
 26. The Brewing Society of Japan. 1993. *The Annotation of the Official Method of Analysis of the National Tax Administration Agency*, pp. 218–226. 4th ed. Tokyo. (in Japanese)
 27. Thom, C. and K. B. Raper. 1945. *A Manual of the Aspergilli.* The Williams and Wilkins Company, Baltimore, Maryland.
 28. Torri, G. 1906. Investigation of Korean "Koji". *Yakugaku Zasshi* **282**: 675–683. (in Japanese)
 29. Ueno, K. 1906. Report of examination of Korean "Koji" (I). *Yakugaku Zasshi* **277**: 203–212. (in Japanese)
 30. Yu, T. S., H. S. Kim, J. Hong, H. P. Ha, T. Y. Kim, and I. W. Yoon. 1996. Bibliographical study on microorganisms of Nuruk (Until 1945). *J. Korean Soc. Food Nutr.* **25**: 170–179. (in Korean)

(Received April 30, 1998)