



전통누룩에서 분리한 양조용 곰팡이의 혼합 배양에 따른 품질 특성

문지영¹ · 백성열¹ · 노현수² · 여수환^{1*}

¹농촌진흥청 국립농업과학원 농식품자원부 발효식품과, ²경상대학교 생명과학부

Mixed Culture Characteristics of Fungi Strains isolated from Korean Traditional *Nuruk*

Ji-Young Mun¹, Seong-Yeol Baek¹, Hyeon-Su Ro² and Soo-Hwan Yeo^{1*}

¹Fermented Food Science Division, Dept. of Agrofood Resources, NIAS, RDA, Wanju 55365, Korea

²Dept. of Microbiology and Research Institute of Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 52828, Korea

ABSTRACT

We analyzed the mixed culture characteristics of isolated brewing fungi obtained from Korean traditional *nuruk* for their development as fermentation starters. In a previous study, we selected appropriate fungi strains based on their large fungi bodies and strong enzyme activities. These fungi strains were mixed cultured under various combination of ratios, pHs and temperatures. As a result, total acidities of *R. delemar* mixed culture media were higher than those of *A. oryzae* cultured at 20°C and 37°C. The pHs of *A. luchuensis* 34-1 and *A. oryzae* 37-7 as well as *R. delemar* 58-8 and *A. oryzae* 37-7 mixed culture media gradually increased with the culture period. On the contrary, total acidities of the mixed culture media gradually decreased. α -Amylase activities of *R. delemar* 26-4 and *R. oryzae* 82-7 mixed culture media were strong at 20°C and pH 4, glucoamylase activities of *R. delemar* 58-8 and *A. oryzae* 37-7 were strong at 37°C, pH 3 and 1:2 ratio, and acidic protease activities of *R. delemar* 26-4 and *A. oryzae* 78-5 were strong at 20°C, pH 4 and 1:4 ratio. This study provides the optimal mixed culture conditions for fermentation starters based on changes in pH and total acidity, favorable enzyme activities, and fungi varieties.

Key words : Korean traditional *nuruk*, fungi, mixed culture, enzyme activity, starter

서 론

발효제는 발효공정에서 발효를 일으키기 위해 사용하는 것으로 곰팡이, 효모, 세균 등의 미생물과 이러한 미생물이 생산하는 각종 효소, 영양원이 되는 전분, 배지 등이 혼합되어 있다. 특히, 우리 술의 대명사인 탁주 제조에 사용되는 발효제는 전통누룩, 개량누룩, 입국, 정제효소 등이 있다(Kwon YH 등 2012; Park CS & Lee TS 2002). 전통누룩은 거칠게 빻은 밀을 성형한 후, 자연 상태의 미생물을 이용하여 발효시킨 것으로, 탁주의 풍미가 조화롭지만 품질관리가 까다로운 면이 있다(So MH 등 1999). 개량누룩은 멸균한 전분질 원료에 순수 배양한 종균을 접종하여 만든 것으로 개량누룩을 사용했을 때, 탁주의 맛과 향이 단조로워지나 원료별, 균주별로 다양한 누룩을 만들 수 있다(Park JH 등 2012; Im SY 등 2014; Jeong JH 등 2015; Kim MS 등 2015). 입국(쌀누룩)은 주로 쌀을 증자하여 곰팡이를 접종, 배양한 것으로 일본에서 도입된 *Aspergillus luchuensis*로 만든 입국이 대부분의 공장형 탁주 대량생산에 사용되고 있다(So MH & Lee JW

1996). 우리나라 전통발효식품은 종균을 첨가하지 않고 원료나 공기 중에서 유입된 미생물에 의한 자연발효 과정을 주로 이용하고 있다. 그러나 이러한 방법은 미생물이 균일하지 못하여 제조 공정의 표준화가 어렵고, 더 나아가 발효식품의 세계화 및 산업화를 위한 경쟁력을 저하시키고 있다. 따라서 발효식품의 발효과정 및 제조법의 표준화를 위한 우수한 발효능을 가진 종균(발효제) 개발이 필요하다. 우리 술은 국산 종균으로 만들어야 한다는 생각과 더불어 2014년에 나고야 의정서가 발효되고, 종균 수입으로 인한 로열티 지출이 예상되자(IIT 2014; <http://www.bioin.or.kr>), 전통누룩에서 우수한 곰팡이를 분리하여 국산 발효제 개발에 사용되어야 한다는 필요성이 제기되고 있다(So MH & Lee YS 2009). 이와 관련하여 전통누룩에서 분리한 *Rhizopus* sp. 균주를 접종하여 제조한 쌀누룩과 시판누룩의 품질을 비교하거나(Cho HK 등 2012), 당화 아밀라아제 활성을 높이는 *Rhizopus* sp. 쌀누룩 제조 조건에 관한 연구가 보고되어 있다(So MH & Lee YS 2009). 또한 *A. luchuensis* 누룩과 *A. oryzae* 누룩의 병용(So MH 1991), *Rhizopus* sp. 누룩과 *Aspergillus* sp. 누룩의 병용으로 탁주를 제조하였을 때, 품질이 가장 우수한 최적 비율에 대한 연구가 보고되었다(So MH & Lee JW 1996). 그러나 대부분의 연구

* Corresponding author : Soo-Hwan Yeo, Tel: +82-63-238-3610, Fax: +82-63-238-3843, E-mail: yeobio@korea.kr

가 누룩과 탁주의 품질 개선을 위하여 단일 종균 누룩을 사용하였거나, 2종의 단일 종균 누룩을 병용하였지만(So MH 1991; So MH & Lee JW 1996), 균주의 혼합 배양액을 접종한 혼합 종균 누룩을 사용한 연구는 거의 없는 실정이다. 우수한 국산 발효제 개발 및 생산을 위해서는 다양한 종류의 종균 및 발효제 연구가 지속적으로 이루어져야, 이를 발효식품 제조에 적용하여 소비자의 다양한 기호를 만족시킬 수 있다. 따라서 본 연구에서는 본 연구진의 선행연구 결과(Mun JY 등 2016), 균체 성장능과 효소활성 등이 우수하다고 판단되는 전통누룩에서 분리된 유용 곰팡이 2종(*Rhizopus* sp., *Aspergillus* sp.)을 대상으로 최적 혼합 배양 조건을 구명하고, 혼합 종균 누룩으로의 개발 가능성을 검토하였다.

재료 및 방법

1. 균주 선발

본 연구진의 선행연구(Mun JY 등 2016)에서 단일 배양 특성 및 효소활성이 우수한 곰팡이 6종을 선발하였으며, 본 연구에서는 이들 균주를 혼합배양 하였다. 실험에 사용한 6종의 균주는 Table 1에, 균주의 혼합 배양 조합은 Table 2에 제시하였다. 혼합 배양은 동일 종 내 다른 균주, 다른 종(species)의 균주, 다른 속(genus)의 균주를 각각 2종씩 배양하였다. 먼저 동일 종 내의 균주들에 대하여 다양한 온도(20°C, 28°C, 37°C) 및 pH(3, 4, 6, 8) 조건에서 혼합 배양과 단일 배양을 수행하였고, 단일 배양 특성이 우수한 균주 중에서 배양 조건이 동일하게 겹치는 균주 및 조건을 선택하여, 이를 대상으로 종간, 속 간 혼합 배양을 진행하였다.

2. 혼합 배양을 위한 액체배지 제조 및 배양조건 설정

액체배지는 5% 밀기울(wheat extract broth) 배지를 사용하였다. 분쇄된 밀기울에 중량 대비 20배의 증류수를 넣고, 60°C 항온수조에서 6시간 동안 교반하며 추출하였다. 추출 후 여과지(Miracloth, Calbiochem 475855, EMD Biosciences, Inc., Germany)로 밀기울을 거른 뒤, 1 N HCl 또는 1 N NaOH를

사용하여 배지의 pH를 3, 4, 6, 8로 조정하였다. pH를 조정된 뒤 배양용 삼각플라스크에 넣고 고압증기멸균(121°C, 15분)한 후, 균주를 접종하여 온도별(20°C, 28°C, 37°C)로 배양하였다.

3. 균주 접종량 설정

1) 포자 현탁액 제조

실험에 사용된 균주는 동결보존(-70°C)되어 있는 상태로, 상온에서 녹인 후 PDA 배지 당 5 µL씩 접종하였다. 균주별로 서로 다른 성장속도를 고려하여 *Rhizopus* sp.는 4일, *Aspergillus* sp.는 7일 동안 28°C에서 배양하였다. 포자가 형성되면 멸균수 10 mL를 넣어 spreader로 포자를 긁고, 멸균수를 희수하여 솜을 넣어 멸균한 주사기에 여과시켰다. 균체가 여과된 포자 현탁액은 접종 전까지 냉장보관(4°C)하였다.

2) 혼합 배양을 위한 균주 접종비율 및 접종량 설정

포자 현탁액을 일정배율로 희석하여 현미경으로 포자를 계수(Hemocytometer, DHC-N01, INCYTO Co. Ltd., Republic of Korea)하고, 다시 모든 균주가 10⁶ CFU/mL가 되도록 희석하였다. 이와 같이 균주별 포자수를 일정하게 하여 동일 종 내, 다른 종 간 혼합 배양은 1:1 비율로 포자를 접종하였고, 다른 속 간 혼합 배양은 균주별 성장속도를 고려하여 *Aspergillus* sp.를 먼저 접종하여(선접종) 5일간 배양한 뒤, 배양 5일째 성장속도가 상대적으로 빠른 *Rhizopus* sp.를 접종(후접종)하였으며, 접종 비율은 *Rhi.:Asp.* = 1:1, 1:2, 1:4, 1:8로 실험하였다. 포자 접종량은 배지 부피의 1%(v/v)가 되도록 하였고, 혼합 배양의 경우에도 접종 비율과 상관없이 총 접종량이 배지 부피의 1%가 되도록 접종하였다.

4. 배양액의 pH 및 총산도 측정

각각의 곰팡이 배양액을 원심분리 및 여과하여 균체를 분리한 후, 배양액의 pH를 pH meter(Benchtop pH meter Orion Star A211, Thermo Scientific Co., USA)로 측정하였다. 곰팡이 배양액 5 mL를 다른 튜브에 옮겨 페놀프탈레인 지시약을

Table 1. Fungi strains used in this study

Sample no.	Strains							
S4	<i>Rhizopus delemar</i> 26-4		S4	S5	S6	S7	S10	S11
S5	<i>Rhizopus delemar</i> 58-8							
S6	<i>Rhizopus oryzae</i> 82-7							
S7	<i>Aspergillus luchuensis</i> 34-1							
S10	<i>Aspergillus oryzae</i> 78-5							
S11	<i>Aspergillus oryzae</i> 37-7							

Table 2. Various mixed culture fungi used in this study

Experiment	Mixed culture fungi
Mixed culture within fungi species	· <i>Rhizopus delemar</i> 26-4 and <i>Rhizopus delemar</i> 58-8 · <i>Aspergillus oryzae</i> 78-5 and <i>Aspergillus oryzae</i> 37-7
Mixed culture between fungi species	· <i>Rhizopus delemar</i> 26-4 and <i>Rhizopus oryzae</i> 82-7 · <i>Aspergillus luchuensis</i> 34-1 and <i>Aspergillus oryzae</i> 78-5
Mixed culture between fungi genus	· <i>Rhizopus delemar</i> 26-4 and <i>Aspergillus oryzae</i> 78-5 · <i>Rhizopus delemar</i> 58-8 and <i>Aspergillus oryzae</i> 37-7

2~3방울 떨어뜨리고 중화적정 시까지 소모되는 0.1 N NaOH의 부피를 측정하여 아래 식으로 총산도를 계산하였다.

$$\text{Total acidity (\%, v/v)} = [(0.1 \text{ N NaOH(mL)} \times 0.1 \text{ N NaOH factor (1.0)} \times 0.006 \text{ (conversion factor)}) \div 5 \text{ (sample volume)}] \times 100$$

5. 배양액의 효소활성 측정

1) α -Amylase 활성

전분-요오드 복합체 분석법을 기반으로 시료 중의 기질(전분)의 양을 측정하여 효소활성을 계산하였다. 2% 가용성 전분 용액 40 μ L에 배양액 40 μ L를 넣고 50 $^{\circ}$ C 항온수조에서 30분간 반응시켰다. 1 M 염산용액 20 μ L를 넣어 반응을 정지시키고, 요오드 용액 100 μ L를 넣어 발색시켰다. 반응액 150 μ L를 96-well plate(96well plate SP32096, SPL Life Science Co. Ltd., Korea)에 넣고 570 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 요오드 용액은 요오드 0.0317 g에 요오드화칼륨 0.1 g, 10% 염산 50 mL를 넣고 물에 녹여 1 L를 만들었다. 전분 표준곡선은 가용성 전분 용액을 0~20 mg/mL 농도로 만들고, 요오드 용액으로 발색시켜 570 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 작성하였다. α -Amylase 활성은 50 $^{\circ}$ C에서 60분간 가용성 전분 1 mg을 분해하는 배양액 1 mL의 활성을 1 unit으로 정의하여 아래와 같이 계산하였다.

$$\text{Unit/mL} = [(A_{570} \text{ control} - A_{570} \text{ sample}) \div A_{570} \text{ mg soluble starch}] \times 2 \text{ (60 min} \div 30 \text{ min)} \div 0.04 \text{ (sample volume)}$$

2) Glucoamylase 활성

DNS(3,5-dinitrosalicylic acid) 환원당 측정법을 기반으로 시료 중에 생성된 포도당의 양을 측정하여 효소활성을 계산하였다. 2% 가용성 전분 용액 1 mL에 0.2 M 초산 완충액 0.2 mL를 넣고 40 $^{\circ}$ C 항온수조에서 5분간 예열하였다. 여기에 곰팡이 배양액 0.1 mL를 넣어 40 $^{\circ}$ C에서 20분간 반응시키고, 1 N 수산화나트륨 용액 0.1 mL를 첨가해 반응을 정지시킨 후, 30분간 방치하였다가 1 N 염산 용액 0.1 mL를 넣어 중화시켰다. 중화된 반응액 50 μ L를 튜브에 옮겨 담고 DNS 시약 150 μ L를 첨가해 100 $^{\circ}$ C 항온수조에서 5분간 발색시켰다. 반응액 150 μ L를 96-well plate에 넣고 550 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 0.2 M 초산 완충액은 0.2 M 초산 용액과 0.2 M 초산나트륨 용액을 1:2로 혼합하고, pH를 5.0으로 맞추어 제조하였다. 포도당 표준곡선은 특급 무수포도당을 0.2~2 mg/mL 농도로 만들어 DNS 시약으로 발색시키고, 550 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 작성하였다. Glucoamylase 활성은 40 $^{\circ}$ C에서 20분간 가용성 전분으로부터 1 mg의 포도당을 생성하는 배양액 1 mL의 활성을 1 unit으로 정의하여 아래와 같이 계산하였다.

$$\text{Unit/mL} = \text{glucose (mg)} \times 30 \text{ (1.5 mL} \div 0.05 \text{ mL)} \div 0.1 \text{ (sample volume)}$$

3) Acidic Protease 활성

0.5% 카제인 용액 0.15 mL에 맥바인 완충액 0.1 mL를 넣어 40 $^{\circ}$ C 항온수조에서 5분간 예열하고, 배양액 0.05 mL를 첨가하여 40 $^{\circ}$ C에서 60분간 반응시켰다. 여기에 TCA(trichloroacetic acid) 용액 0.3 mL를 가해 반응을 정지시키고, 여과하여 침전물을 제거하였다. 여과된 반응액 0.1 mL에 0.4 M 탄산나트륨 용액 0.5 mL와 페놀시약(Folin & Ciocalteu's phenol reagent F9252, Sigma-Aldrich Co. LLC., USA) 0.1 mL를 넣고 40 $^{\circ}$ C에서 30분간 발색시킨 후, 660 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 맥바인 완충액은 0.2 M 인산-2-나트륨 용액과 0.1 M 구연산용액을 1:4로 혼합하고, pH를 3.0으로 맞추어 제조하였다. 티로신 표준용액은 특급 L-티로신을 20~100 μ g/mL 농도로 만들어 위의 과정과 동일하게 발색시키고, 흡광도를 측정하여 작성하였다. Acidic protease 활성은 40 $^{\circ}$ C에서 60분간 단백질로부터 1 μ g의 티로신을 생성하는 배양액 1 mL의 활성을 1 unit으로 정의하여 아래와 같이 계산하였다.

$$\text{Unit/mL} = \text{tyrosine (\mu g)} \times 6 \text{ (0.6 mL} \div 0.1 \text{ mL)} \div 0.05 \text{ (sample volume)}$$

6. 통계처리

실험은 3반복으로 측정하여 결과를 평균 \pm 표준편차로 나

타내었다. 통계처리는 SPSS 12.0(SPSS Inc., Chicago, IL)을 이용하여 이원분산분석(two-way ANOVA)을 수행하였고, 유의성 비교는 Duncan's multiple range test로 $p < 0.05$ 수준에서 검증하였다.

결과 및 고찰

1. 양조용 곰팡이 종(Species) 내 혼합 배양 특성

1) 배양액의 pH 및 총산도

양조용 곰팡이 *R. delemar* 26-4와 *R. delemar* 58-8, *A. oryzae* 78-5와 *A. oryzae* 37-7의 배양 조건(온도, pH)에 따른 혼합 배양액의 pH 및 총산도를 측정하여 Fig. 1에 제시하였다. 배양 기간이 길어짐에 따라 총산도가 점차 감소하고, pH는 증가하는 경향을 나타내었으나, *R. delemar* 26-4와 *R. delemar* 58-8 혼합 배양액(20°C)에서는 배양 3일째 총산도가 pH 4, pH 6에서 배양 2일째보다 각각 2.3배, 1.4배 증가하였고, pH는 감소

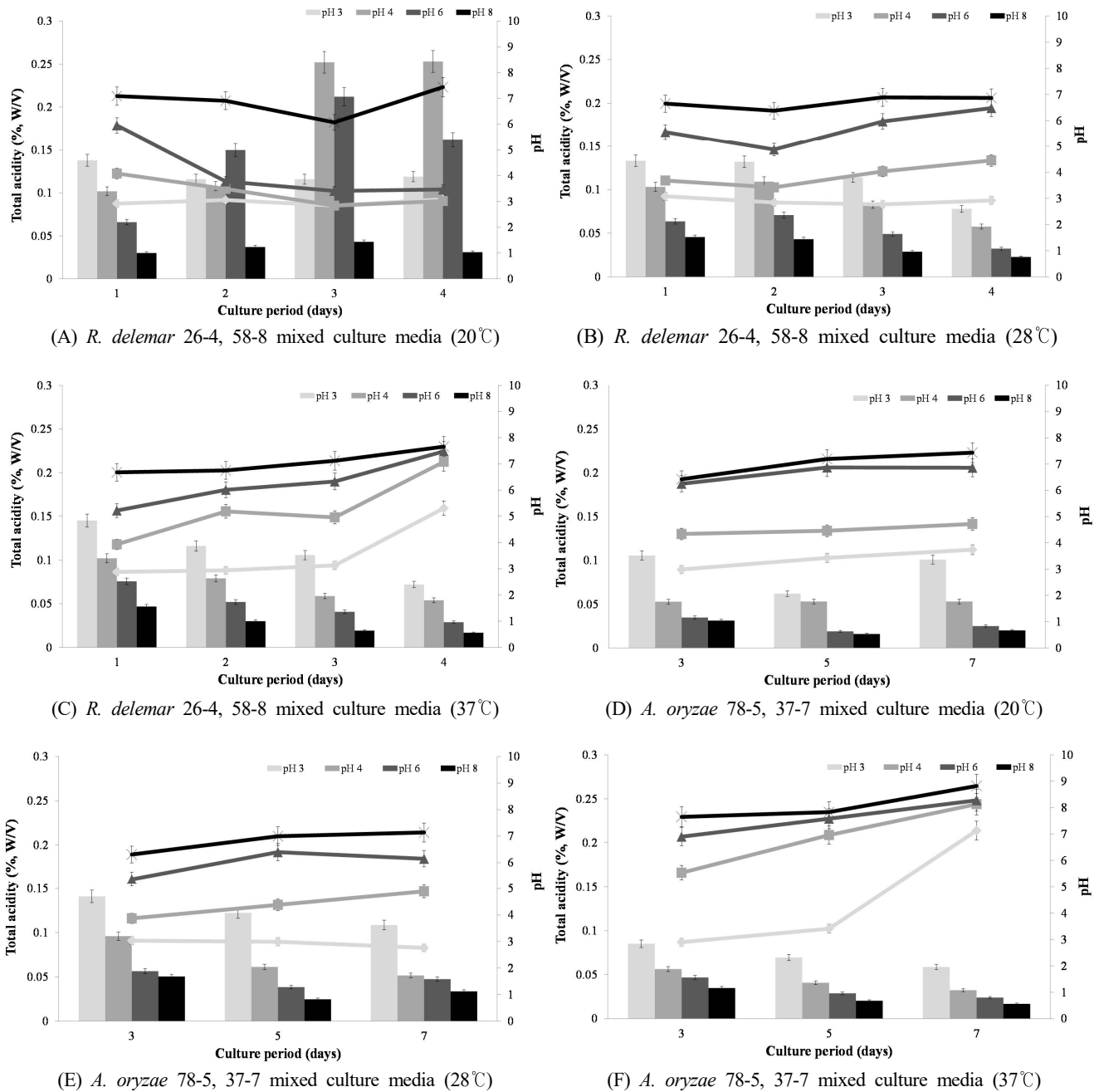


Fig. 1. Total acidity and pH of mixed culture media within fungi species upon various temperature and pH.
 (A)~(C) *R. delemar* 26-4 and *R. delemar* 58-8 mixed culture media, (D)~(F) *A. oryzae* 78-5 and *A. oryzae* 37-7 mixed culture media.

하여[Fig. 1 (A)], 향후 유기산 분석 등 추가실험이 필요할 것으로 보인다. pH 변화는 대체로 균주 접종 전 배지의 pH를 크게 벗어나지 않는 범위 내에서 일어났으나, 37°C에서는 배양 4일째 pH가 초기 pH보다 증가하였다[Fig. 1 (C), (F)]. 배양 온도 20°C와 37°C에서는 *R. delemar* 26-4와 *R. delemar* 58-8 혼합 배양액의 총산도가 *A. oryzae* 78-5와 *A. oryzae* 37-7 혼합 배양액보다 전반적으로 높았으며, 이는 *Rhizopus* 속 곰팡이에 의해 젖산, 푸마르산 등의 유기산이 생성된 것으로 생각된다(Liao W 등 2007; So MH & Lee YS 2010).

2) 배양액의 α -Amylase 활성

배양 온도 및 pH에 따른 *R. delemar* 26-4와 *R. delemar* 58-8 혼합 배양액의 α -amylase 활성 결과를 Fig. 2에, *A. oryzae* 78-5와 *A. oryzae* 37-7 혼합 배양액의 분석 결과를 Fig. 3에 제시하였다. 혼합 배양액 중에서는 *A. oryzae* 78-5와 *A. oryzae* 37-7을 37°C, pH 3에서 배양했을 때 α -amylase 활성이 86.2 units/mL로, pH 4에서도 효소활성이 86.2 units/mL로 유의적으로 가장 높게 나타났($p < 0.05$). 단일 배양액 중에서는 *R. delemar* 58-8을 28°C, pH 4에서 배양했을 때 86.1 units/mL로, *A. oryzae* 37-7을 37°C, pH 3에서 배양했을 때 86.3 units/mL로 효소활성이 유의적으로 가장 높았다($p < 0.05$). *R. delemar* 혼합 배양액은 pH 3°C, 37°C에서 배양 3일까지 활성이 증가하지 않다가 4일째 2.5배 증가하였는데, 이는 배양 4일째 pH가 5.3으로 급격히 증가하였기 때문인 것으로 생각된다(Noh JM 등 2013). *A. oryzae*는 액체배양 및 pH 5~6 조건에서 효소 생산성이 높다고 보고되어 있지만(Noh JM 등 2013), 본 연구결과에 따르면 *A. oryzae* 혼합 배양액은 같은 pH 조건이라도 20°C, 28°C보다 37°C에서 효소활성이 높은 것으로 보아, pH보다 온도에 더 큰 영향을 받는 것으로 생각된다.

3) 배양액의 Glucoamylase 활성

배양 온도 및 pH에 따른 *R. delemar* 26-4와 *R. delemar* 58-8 혼합 배양액의 glucoamylase 활성 결과를 Fig. 4에, *A. oryzae* 78-5와 *A. oryzae* 37-7 혼합 배양액의 효소활성을 Fig. 5에 제시하였다. 혼합 배양액 중에서 *R. delemar* 26-4와 *R. delemar* 58-8을 37°C, pH 6에서 배양했을 때, 3,668.2 units/mL로 효소활성이 유의적으로 가장 높게 나타났($p < 0.05$). 단일 배양액 중에서는 *R. delemar* 26-4를 28°C, pH 8에서 배양했을 때 3,865.6 units/mL로, *A. oryzae* 37-7을 37°C, pH 3에서 배양했을 때 3,132.4 units/mL로 효소활성이 유의적으로 가장 높았다($p < 0.05$). So MH & Lee YS(2009) 보고에 따르면 *Rhizopus* sp.을 28°C에서 48시간 이상 배양하였을 때 당화 아밀라아제 활성이 높았고, Kim CJ 등(1985)은 *R. oryzae*를 30°C, pH 3.5~4에서 배양하였을 때, 높은 생전분 당화력을 보였다고 보

고한 바 있다. 본 연구에서도 일부 조건(28°C, pH 8)에서는 배양 시간이 길어질수록 효소 활성이 높아졌으나, 낮은 온도인 20°C에서는 모든 시험군에서 배양 3일째까지 효소 활성이 증가하다가 4일째 감소하였다. *A. oryzae*의 당화효소 생산이 36°C에서 48시간 배양하였을 때 가장 높았다가 이후에 감소한다고 보고된 바 있으며(So MH 1993), 본 연구의 배양 온도 37°C에서 배양 7일까지 효소활성이 꾸준히 증가한 이유는 양조용 곰팡이의 특성이나 배양에 사용된 전분의 종류에 따른 차이라고 여겨진다.

4) 배양액의 Acidic Protease 활성

배양 온도 및 pH에 따른 *R. delemar* 26-4와 *R. delemar* 58-8 혼합 배양액의 acidic protease 활성 결과를 Fig. 6에, *A. oryzae* 78-5와 *A. oryzae* 37-7 혼합 배양액의 결과를 Fig. 7에 제시하였다. 혼합 배양액 중에서는 *A. oryzae* 78-5와 *A. oryzae* 37-7을 28°C, pH 3에서 배양했을 때 acidic protease 활성이 51.1 units/mL로 가장 높게 나타났으며($p < 0.05$), 단일 배양액 중에서는 *R. delemar* 58-8을 37°C, pH 8에서 배양했을 때 47.9 units/mL로, *A. oryzae* 78-5를 20°C, pH 8에서 배양했을 때 72.7 units/mL로 효소활성이 유의적으로 가장 높았다($p < 0.05$). *R. delemar* 혼합 배양액의 활성은 37°C에서, *A. oryzae* 혼합 배양액의 활성은 20°C에서 높았으며, 효소활성이 배지의 pH 및 배양 기간에 의해서는 큰 영향을 받지 않았다. 본 연구 결과는 28~32°C에서 배양하는 것이 프로테아제 생성에 유리하고, 배양 시간이 경과할수록 프로테아제 활성이 증가하였다는 연구 결과들(So MH & Lee YS 2010; So MH 1993)과 일치하지 않았지만, 이는 사용한 곰팡이의 균학적 특성에 따른 차이라고 생각된다.

2. 양조용 곰팡이의 종(Species) 간 혼합 배양 특성

1) 배양액의 pH 및 총산도

R. delemar 26-4와 *R. oryzae* 82-7, *A. luchuensis* 34-1과 *A. oryzae* 37-7 혼합 배양액의 pH, 총산도 분석 결과를 Fig. 8에 제시하였다. *R. delemar* 26-4와 *R. oryzae* 82-7 혼합 배양액은 [Fig. 8 (A)] 배양 2일째 pH는 감소하고, 총산도는 증가하였다가 3일부터 pH는 다시 증가하고, 총산도는 감소하였으며, pH의 범위는 3~4로 접종 시 배지의 pH이었던 4에서 크게 벗어나지 않았는데, 이는 *Rhizopus* sp.에 의해 각종 유기산이 생성된 것으로 여겨진다(Liao W 등 2007; So MH & Lee YS 2010). *A. luchuensis* 34-1과 *A. oryzae* 37-7 혼합 배양액[Fig. 8 (B)]은 배양 기간에 따라 총산도가 감소하는 경향을 보였고, 접종 시 배지의 pH보다 증가하여 배양 7일째에는 pH 7~8의 범위를 나타내었다. *A. luchuensis*는 유기산 생성능이 높고 내

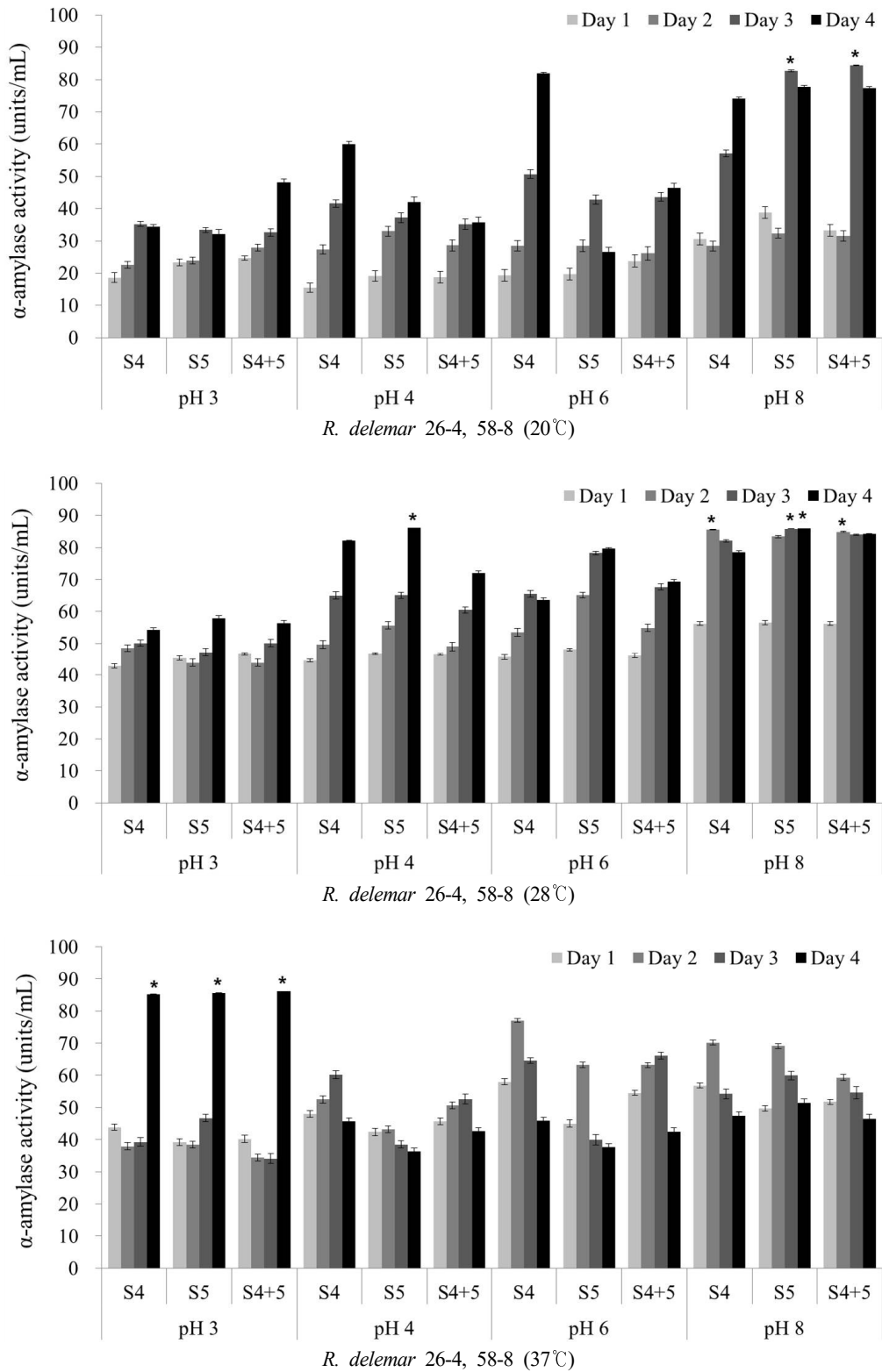


Fig. 2. α -Amylase activity of mixed culture media within fungi species (*R. delemar* 26-4 and 58-8) upon various temperature and pH.

Symbols: S4, *R. delemar* 26-4; S4+S5, *R. delemar* 26-4 + *R. delemar* 58-8; S5, *R. delemar* 58-8.

* $p < 0.05$.

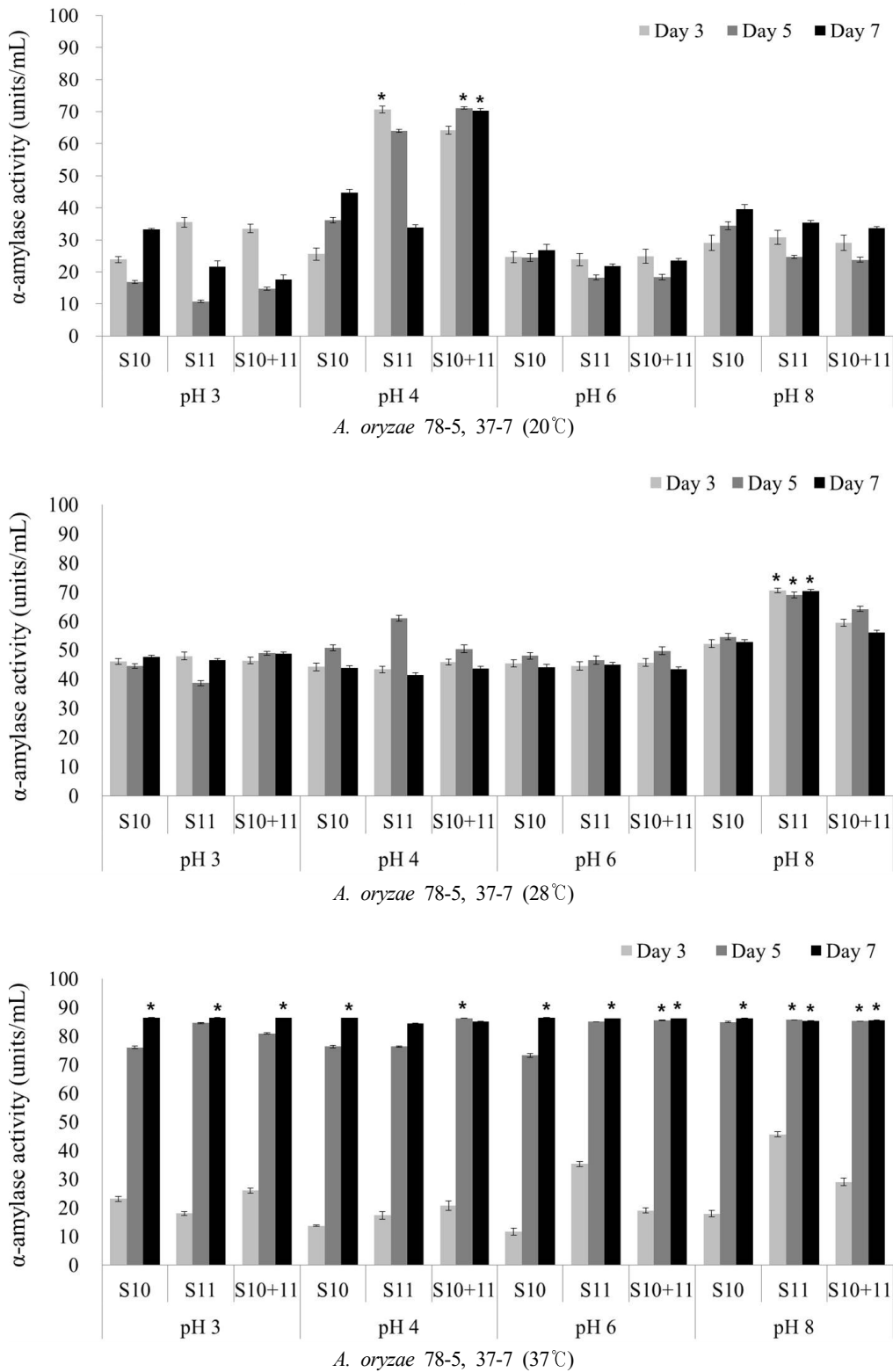


Fig. 3. α -Amylase activity of mixed culture media within fungi species (*A. oryzae* 78-5 and 37-7) upon various temperature and pH.

Symbols: S10, *A. oryzae* 78-5; S10+S11, *A. oryzae* 78-5 + *A. oryzae* 37-7; S11, *A. oryzae* 37-7.

* $p < 0.05$.

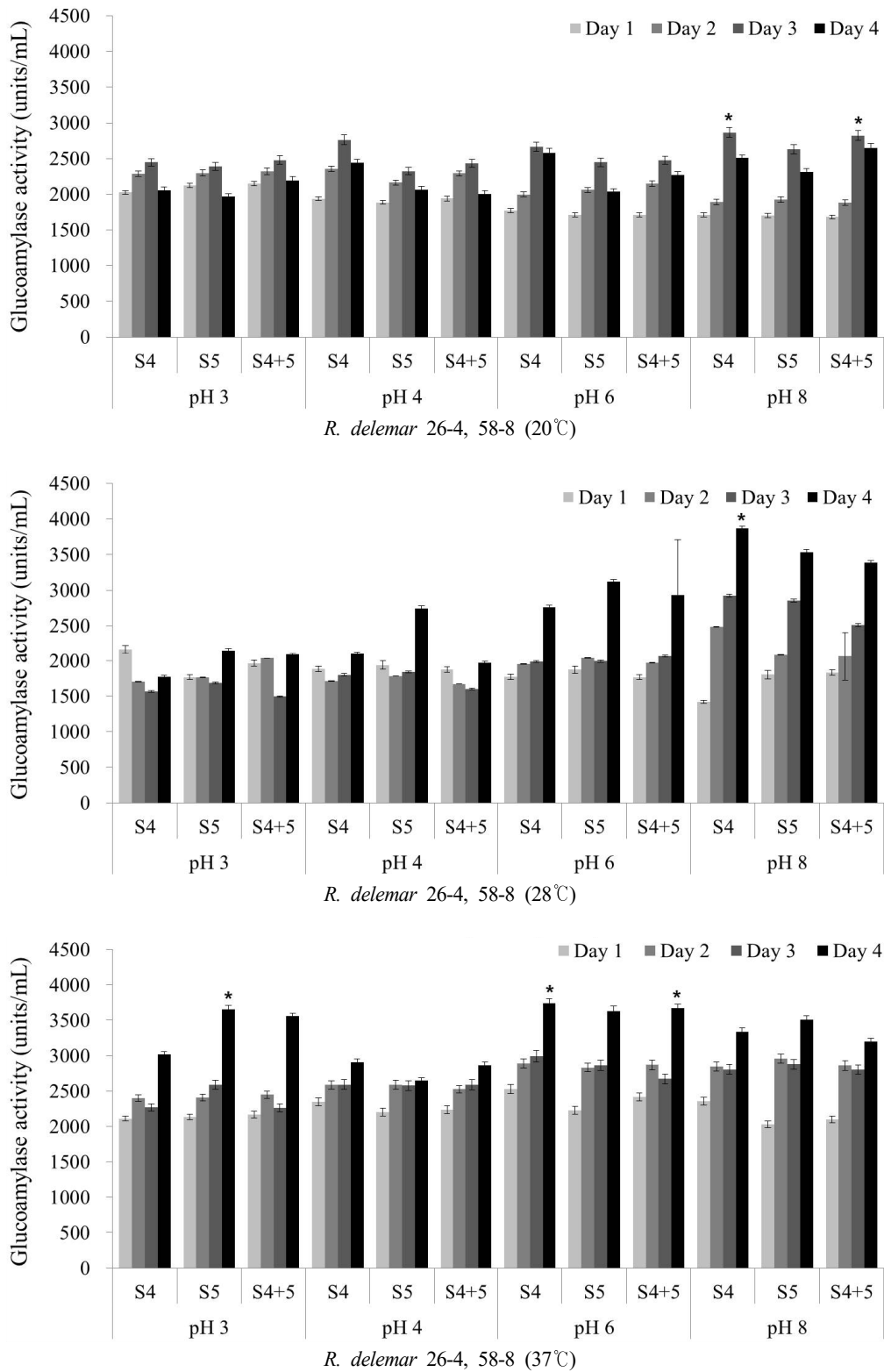


Fig. 4. Glucoamylase activity of mixed culture media within fungi species (*R. delemar* 26-4 and 58-8) upon various temperature and pH.

Symbols : S4, *R. delemar* 26-4; S4+S5, *R. delemar* 26-4 + *R. delemar* 58-8; S5, *R. delemar* 58-8

* $p < 0.05$.

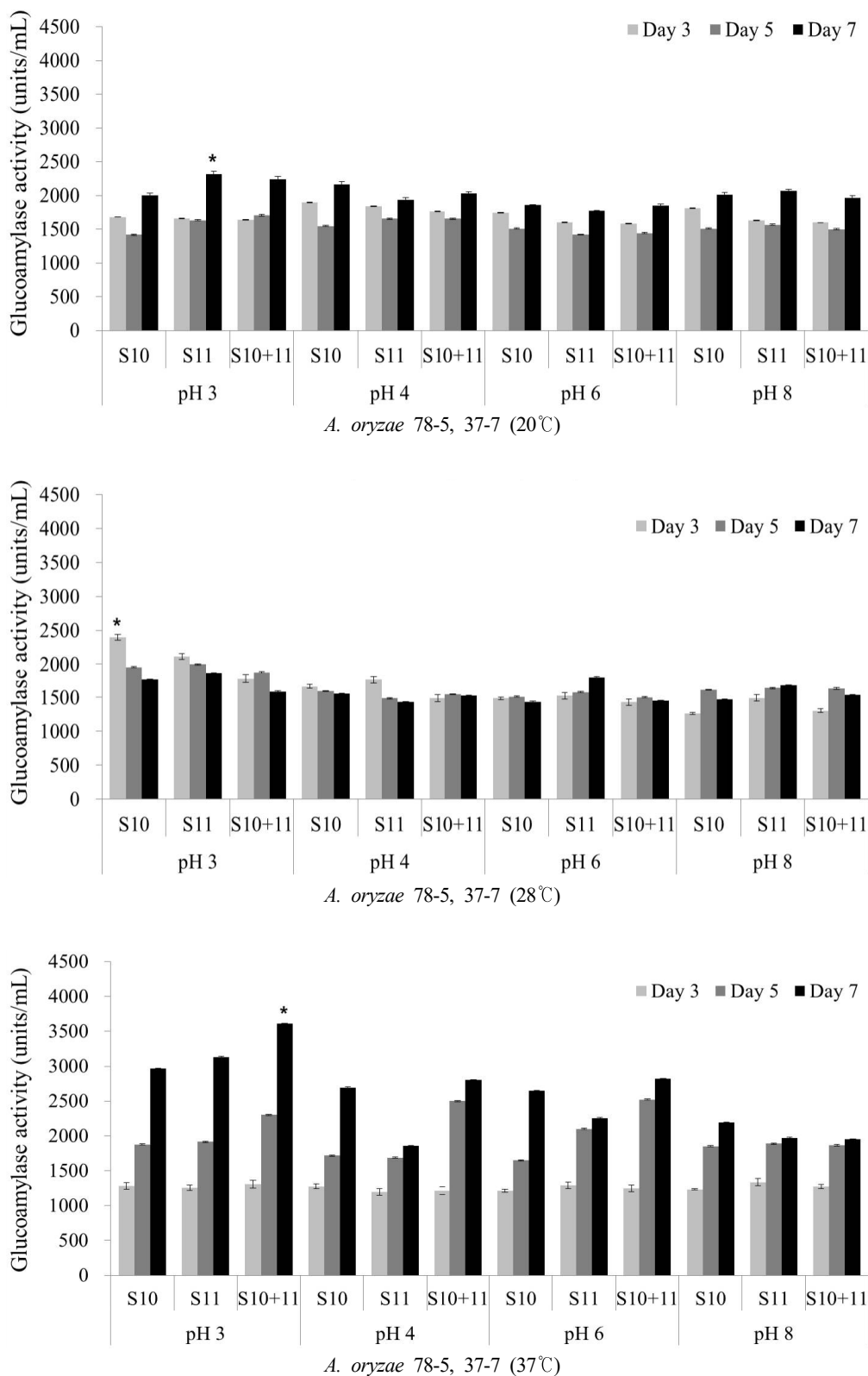


Fig. 5. Glucoamylase activity of mixed culture media within fungi species (*A. oryzae* 78-5 and 37-7) upon various temperature and pH.

Symbols : S10, *A. oryzae* 78-5; S10+S11, *A. oryzae* 78-5 + *A. oryzae* 37-7; S11, *A. oryzae* 37-7.

* $p < 0.05$.

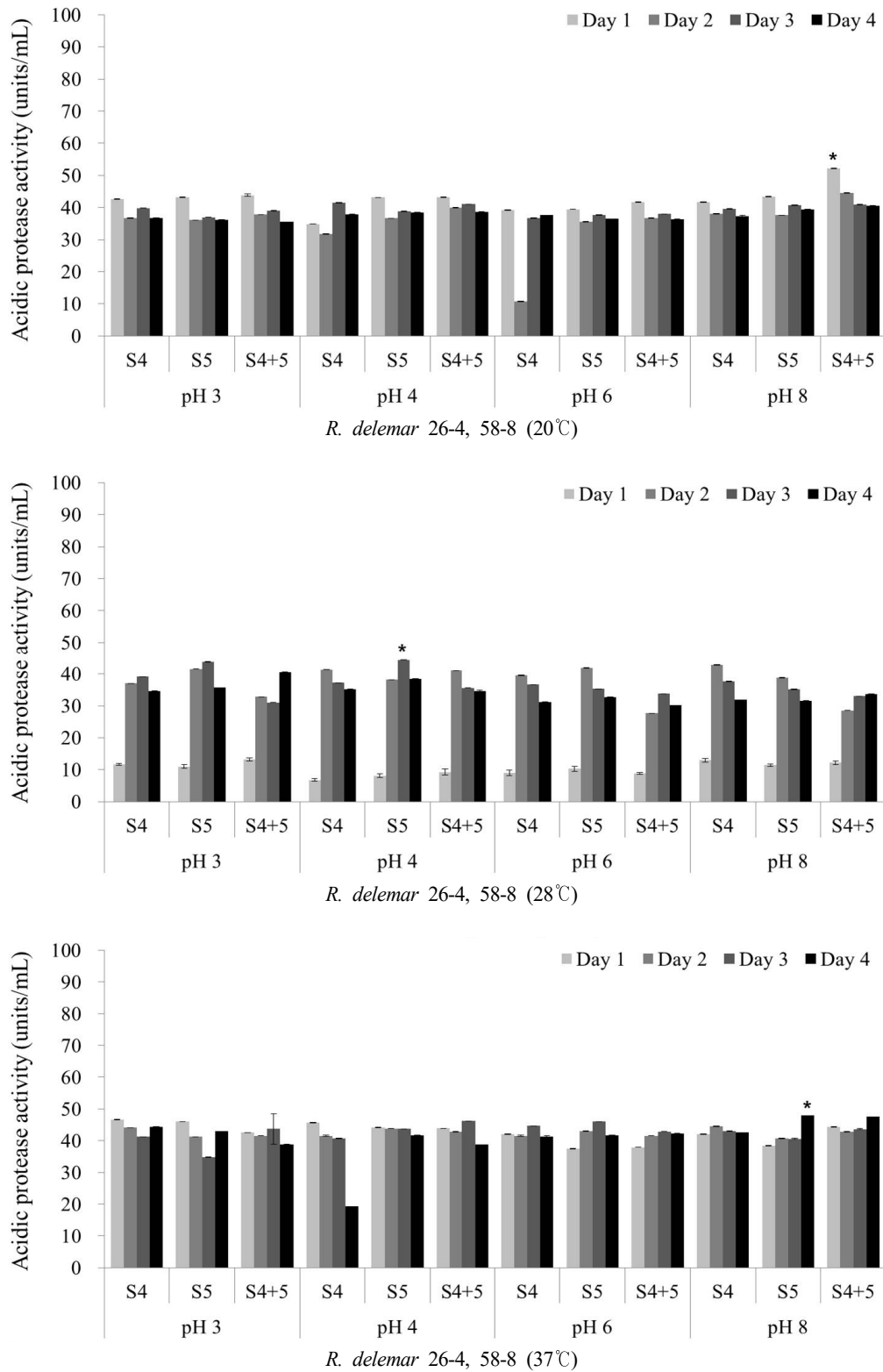


Fig. 6. Acidic protease activity of mixed culture media within fungi species (*R. delemar* 26-4 and 58-8) upon various temperature and pH.

Symbols: S4, *R. delemar* 26-4; S4+S5, *R. delemar* 26-4 + *R. delemar* 58-8; S5, *R. delemar* 58-8.

* $p < 0.05$.

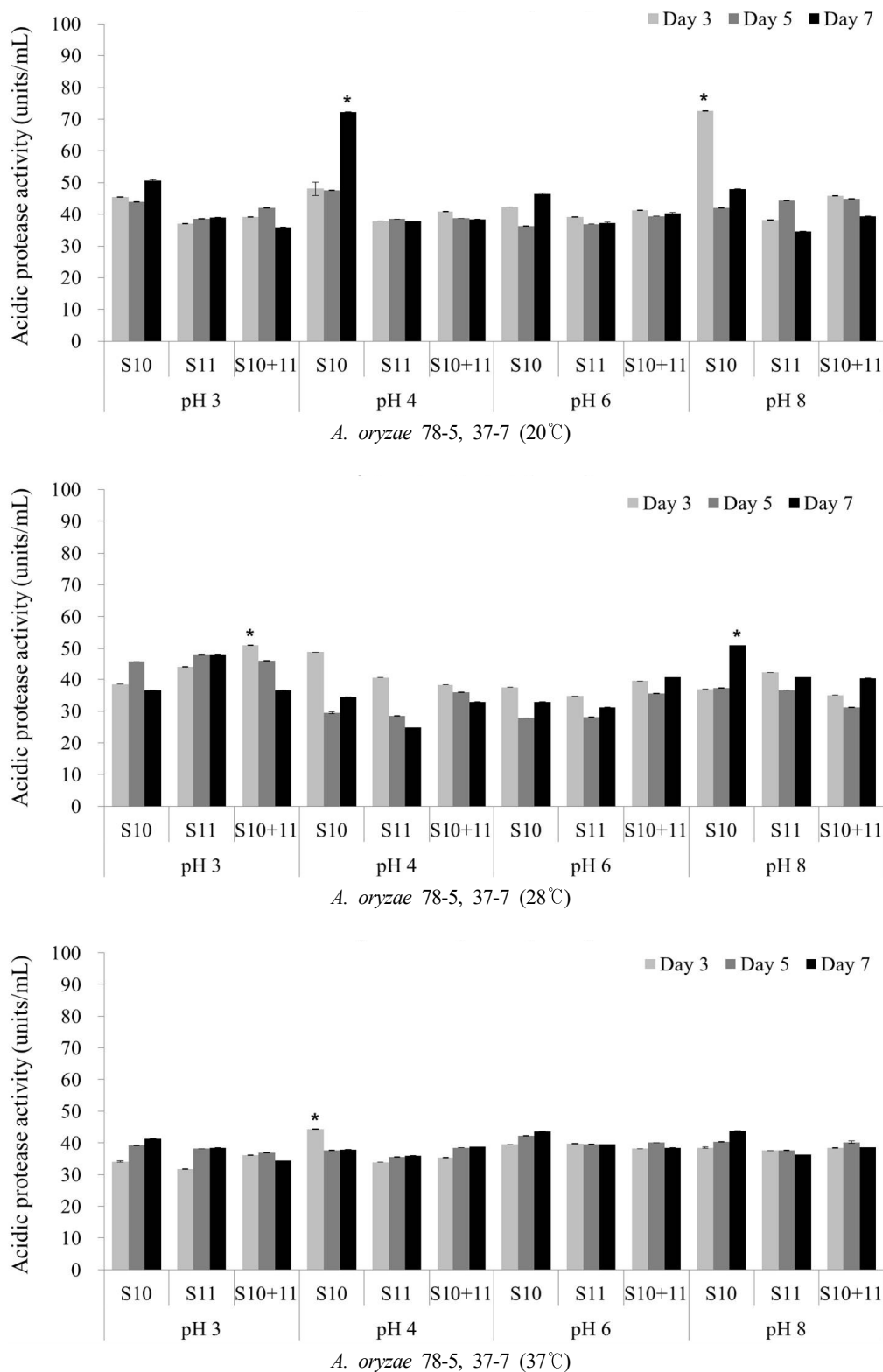


Fig. 7. Acidic protease activity of mixed culture media within fungi species (*A. oryzae* 78-5 and 37-7) upon various temperature and pH.

Symbols: S10, *A. oryzae* 78-5; S10+S11, *A. oryzae* 78-5 + *A. oryzae* 37-7; S11, *A. oryzae* 37-7.

* $p < 0.05$.

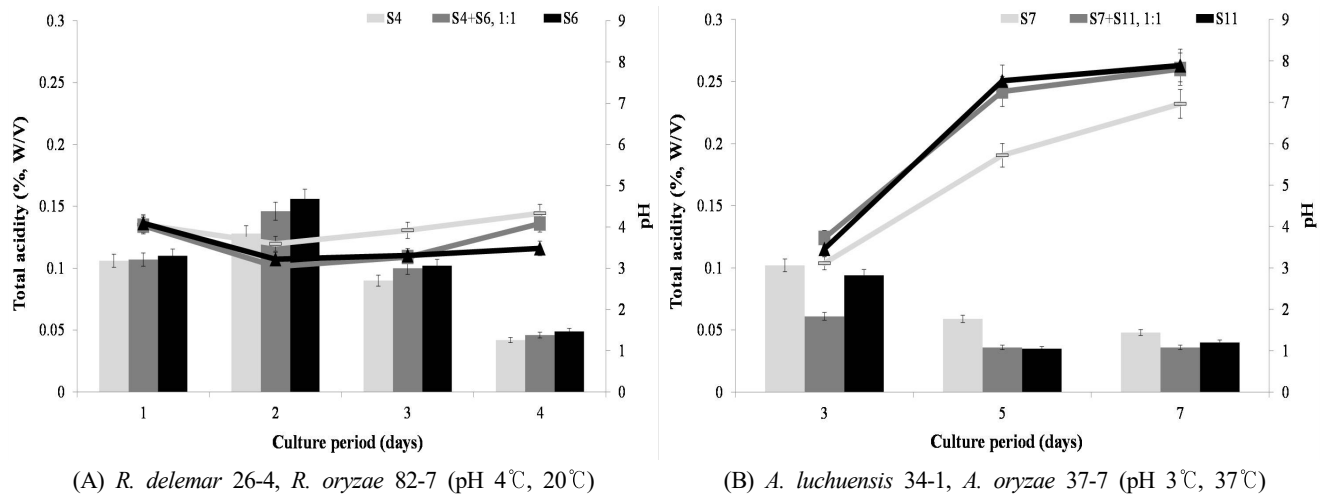


Fig. 8. Total acidity and pH of mixed culture media between fungi species.

(A) *R. delemar* 26-4 and *R. oryzae* 82-7 at pH 4°C, 20°C, (B) *A. luchuensis* 34-1 and *A. oryzae* 37-7 at pH 3°C, 37°C.

Symbols: S4, *R. delemar* 26-4; S4+S6, *R. delemar* 26-4 + *R. oryzae* 82-7; S6, *R. oryzae* 82-7; S7, *A. luchuensis* 34-1 + *A. oryzae* 37-7; S11, *A. oryzae* 37-7.

산성 당화효소를 생산하는 반면, *A. oryzae*가 생산하는 당화효소는 내산성이 낮다고 보고된 바 있다(So MH 1991). 본 연구에서 이들 두 균주의 혼합 배양으로 인해 *A. luchuensis*의 유기산 생산이 영향을 받았을 것으로 생각된다.

2) 배양액의 효소(α -Amylase, Glucoamylase, Acidic Protease) 활성

R. delemar 26-4와 *R. oryzae* 82-7 혼합 배양액(20°C, pH 4)의 효소활성 결과를 Fig. 9 (A)~(C)에 제시하였다. α -Amylase 활성은 *R. delemar* 26-4와 *R. oryzae* 82-7을 혼합 배양하였을 때 유의적으로 가장 높게 나타났으나(85.8 units/mL, $p < 0.05$), glucoamylase 활성은 *R. delemar* 26-4를 단일 배양하였을 때 가장 높게 나타나(2,572.1 units/mL), 혼합 배양으로 인한 효소활성 상승효과는 없었다. Acidic protease 활성은 *R. oryzae* 82-7을 단일 배양하였을 때 30.5 units/mL로 유의적으로 가장 높게 나타났($p < 0.05$). α -Amylase, glucoamylase 활성은 배양 기간이 길어질수록 효소활성이 증가하는 경향을 보였으나, acidic protease 활성은 배양 2일까지 증가하였다가 3일부터 감소하였다.

A. luchuensis 34-1과 *A. oryzae* 37-7 혼합 배양액(37°C, pH 3)의 효소활성 결과를 Fig. 9 (D)~(F)에 제시하였다. α -Amylase 활성은 *A. oryzae* 37-7을 단일 배양하였을 때 가장 높게 나타나(82.0 units/mL) 혼합 배양으로 인한 효소활성 상승효과는 나타나지 않았다. Glucoamylase 활성은 *A. luchuensis* 34-1을 단일 배양하였을 때 유의적으로 가장 높게 나타났고(3,032.7 units/mL, $p < 0.05$), acidic protease는 *A. luchuensis* 34-1과 *A. oryzae* 37-7 혼합 배양 3일째 활성이 30.3 units/mL로 가장

높았다.

3. 양조용 곰팡이의 속(Genus) 간 혼합 배양 특성

1) 배양액의 pH 및 총산도

접종비율에 따른 *R. delemar* 26-4와 *A. oryzae* 78-5 혼합 배양액(20°C, pH 4)의 pH 및 총산도 분석 결과를 Fig. 10 (A)에, *R. delemar* 58-8과 *A. oryzae* 37-7 혼합 배양액(37°C, pH 3)의 결과를 Fig. 10 (B)에 제시하였다. *R. delemar* 26-4와 *A. oryzae* 78-5 혼합 배양액은 배양 기간에 따른 총산도 감소 또는 증가 경향이 나타나지 않았고, pH는 접종 시 배지의 pH이었던 4에서 크게 벗어나지 않았다. *R. delemar* 58-8과 *A. oryzae* 37-7 혼합 배양액은 배양 기간에 따라 총산도가 감소하는 경향을 보였고, 접종 시 배지의 pH보다 증가하여 pH 6~8 범위를 나타내었다. *A. oryzae* 누룩과 *R. japonicus* 누룩을 병용하여 발효시킨 So MH & Lee JW(1996)의 연구에서 *A. oryzae*의 비율이 높을수록 pH가 높았으며, *R. japonicus*의 비율이 높을수록 pH가 낮았다고 보고되었다. 본 연구에서 *R. delemar* 58-8과 *A. oryzae* 37-7 혼합 배양 2일째 배양액의 pH가 접종 비율 58-8:37-7 = 1:8, 1:4, 1:2, 1:1 순으로 높아 보고된 선행 연구와 같은 결과를 보였으나, 배양 3일 이후로는 1:1, 1:2 비율의 혼합 배양액 pH가 1:4, 1:8보다 높아 배양 기간에 따른 차이를 보였다.

2) 배양액의 효소(α -Amylase, Glucoamylase, Acidic Protease) 활성

접종비율에 따른 *R. delemar* 26-4와 *A. oryzae* 78-5 혼합 배

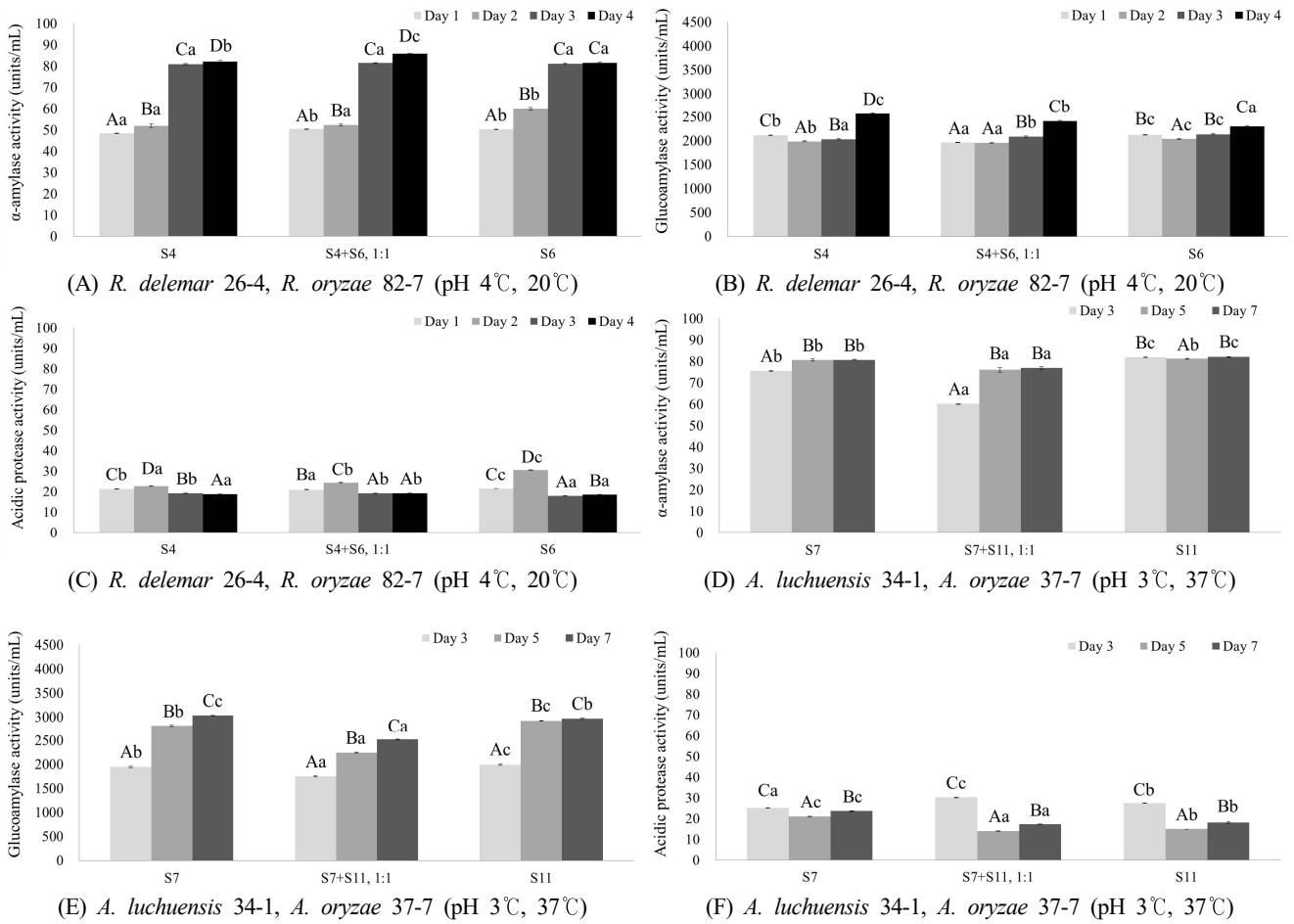


Fig. 9. Enzyme activities of mixed culture media between fungi species.

(A)~(C) *R. delemar* 26-4 and *R. oryzae* 82-7 at pH 4°C, 20°C, (D)~(F) *A. luchuensis* 34-1 and *A. oryzae* 37-7 at pH 3°C, 37°C. Symbols: S4, *R. delemar* 26-4; S4+S6, *R. delemar* 26-4 + *R. oryzae* 82-7; S6, *R. oryzae* 82-7; S7, *A. luchuensis* 34-1; S7+S11, *A. luchuensis* 34-1 + *A. oryzae* 37-7; S11, *A. oryzae* 37-7.

Values with different capital letters A~D are significantly different among the culture periods in the same sample ($p < 0.05$). Values with different small letters a~c are significantly different among the samples in the same culture periods ($p < 0.05$).

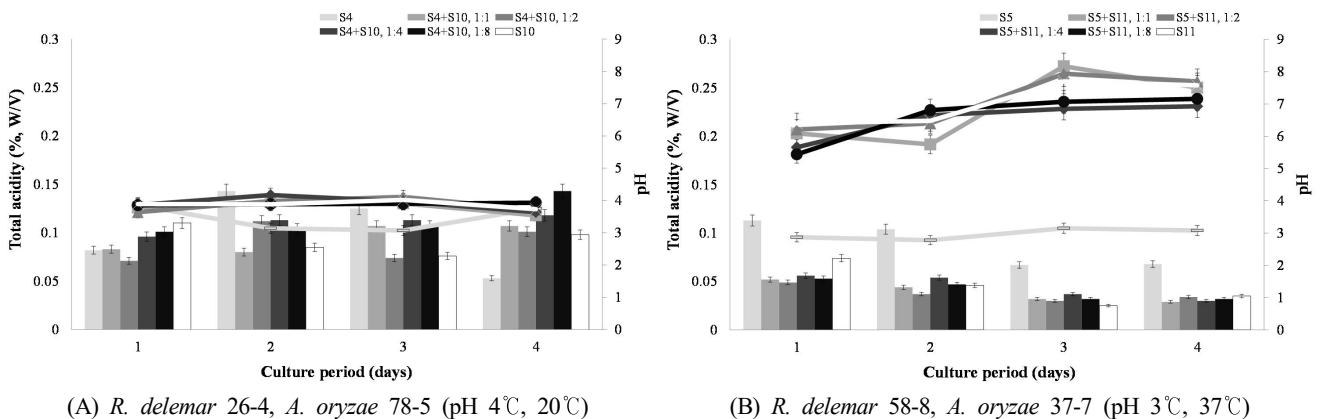


Fig. 10. Total acidity and pH of mixed culture media between fungi genus.

(A) *R. delemar* 26-4 and *A. oryzae* 78-5 at pH 4°C, 20°C, (B) *R. delemar* 58-8 and *A. oryzae* 37-7 at pH 3°C, 37°C. Symbols: S4, *R. delemar* 26-4; S4+S10, *R. delemar* 26-4 + *A. oryzae* 78-5; S10, *A. oryzae* 78-5; S5, *R. delemar* 58-8; S5+S11, *R. delemar* 58-8 + *A. oryzae* 37-7; S11, *A. oryzae* 37-7.

양액(20°C, pH 4)의 효소활성 결과를 Fig. 11 (A)~(C)에, *R. delemar* 58-8과 *A. oryzae* 37-7 혼합 배양액(37°C, pH 3)의 효소활성 결과를 Fig. 11 (D)~(F)에 제시하였다. 효소별 유의적($p<0.05$)으로 가장 높은 활성이 나타난 조건은 α -amylase의 경우, *R. delemar* 58-8과 *A. oryzae* 37-7을 1:8의 비율로 3일간 배양했을 때 84.8 units/mL이었고, glucoamylase는 *R. delemar* 58-8과 *A. oryzae* 37-7을 1:2의 비율로 4일간 배양했을 때 3,393.0 units/mL이었으며, acidic protease는 *R. delemar* 26-4와 *A. oryzae* 78-5를 1:4의 비율로 3일간 배양했을 때 89.5 units/mL로 나타났다. 전반적으로 acidic protease 활성은 *R. delemar* 26-4와 *A. oryzae* 78-5 혼합 배양액이 30~90 units/mL 범위로 나타난 것과 달리, *R. delemar* 58-8과 *A. oryzae* 37-7 혼합 배양액은 20~30 units/mL 범위에 그쳤다. *A. oryzae* 누

룩과 *R. japonicus* 누룩을 병용하여 발효시킨 연구에서 AO:RJ = 1:2 비율일 때 아미노산 함량이 가장 높았으며, 이는 누룩 병용으로 단백질 분해효소의 종류가 다양해진 결과라고 보고되었다(So MH & Lee JW 1996). 본 연구에서도 단일 균주로 배양했을 때보다 혼합 균주(*R. delemar*와 *A. oryzae*)로 배양한 경우 protease 활성이 높았지만, So MH & Lee JW(1996)가 보고한 결과와는 다소 차이가 있었다.

요약 및 결론

본 연구인의 선행연구(Mun JY 등 2016)에서 도출한 토착 곰팡이의 증식 속도, 균체 성장능 및 효소활성이 우수한 배양조건을 바탕으로, 본 연구에서는 *Rhizopus* sp.와 *Aspergillus*

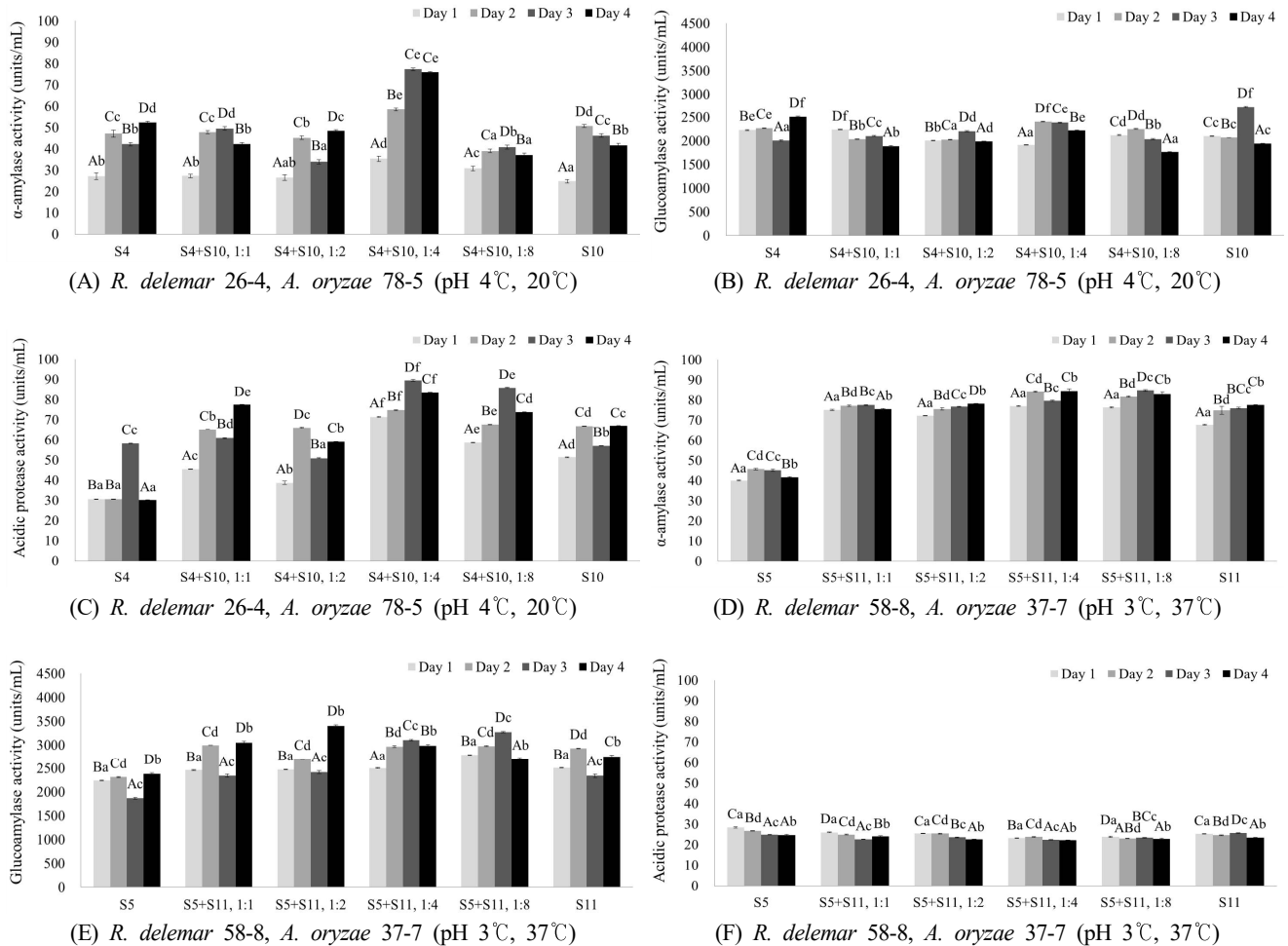


Fig. 11. Enzyme activities of mixed culture media between fungi genus.

(A)~(C) *R. delemar* 26-4 and *A. oryzae* 78-5 at pH 4°C, 20°C, (D)~(F) *R. delemar* 58-8 and *A. oryzae* 37-7 at pH 3°C, 37°C. Symbols: S4, *R. delemar* 26-4; S4+S10, *R. delemar* 26-4 + *A. oryzae* 78-5; S10, *A. oryzae* 78-5; S5, *R. delemar* 58-8; S5+S11, *R. delemar* 58-8 + *A. oryzae* 37-7; S11, *A. oryzae* 37-7. Values with different capital letters A~D are significantly different among the culture periods in the same sample ($p<0.05$). Values with different small letters a~f are significantly different among the samples in the same culture periods ($p<0.05$).

sp.의 혼합 배양 특성을 구명하여 탁주의 품질 향상을 위한 쌀 누룩 제조 최적 조건을 찾는 기초 연구로서 수행되었으며, 이에 의한 연구 결과는 다음과 같다.

R. delemar 혼합 배양액은 20℃와 37℃에서 *A. oryzae* 혼합 배양액보다 총산도가 높았으며, *R. delemar* 26-4와 *R. oryzae* 82-7 혼합 배양액의 총산도는 배양 2일까지 증가하였다가 3일부터 감소하였다. *A. luchuensis* 34-1과 *A. oryzae* 37-7, *R. delemar* 58-8과 *A. oryzae* 37-7 혼합 배양액은 배양 기간에 따라 pH는 점차 증가하고, 총산도는 감소하는 경향을 보였다.

α -Amylase 활성은 *A. oryzae* 37-7(37℃, pH 3, 단일 배양), *A. oryzae* 78-5와 *A. oryzae* 37-7(37℃, pH 3~4, 혼합 배양), *R. delemar* 58-8(28℃, pH 4, 단일 배양), *R. delemar* 26-4와 *R. oryzae* 82-7(20℃, pH 4, 혼합 배양) 균주와 배양조건에서 높았다.

Glucoamylase 활성은 *R. delemar* 26-4(28℃, pH 8, 단일 배양), *R. delemar* 26-4와 *R. delemar* 58-8(37℃, pH 6, 혼합 배양), *R. delemar* 58-8과 *A. oryzae* 37-7(37℃, pH 3, 1:2 혼합 배양), *A. oryzae* 37-7(37℃, pH 3, 단일 배양) 균주와 배양조건에서 높았다.

Acidic protease 활성은 *R. delemar* 26-4와 *A. oryzae* 78-5(20℃, pH 4, 1:4 혼합 배양), *A. oryzae* 78-5(20℃, pH 8, 단일 배양), *A. oryzae* 78-5와 *A. oryzae* 37-7(28℃, pH 3, 혼합 배양), *R. delemar* 58-8(37℃, pH 8, 단일 배양) 균주와 배양조건에서 높았다.

혼합 배양액의 pH, 총산도, 효소활성, 균주의 다양성을 종합적으로 고려하여 *R. delemar* 26-4와 *R. oryzae* 82-7(20℃, pH 4), *R. delemar* 58-8과 *A. oryzae* 37-7(37℃, pH 3, 1:2 혼합 배양), *R. delemar* 26-4와 *A. oryzae* 78-5(20℃, pH 4, 1:4 혼합 배양) 조건이 향후 쌀누룩 제조에 적합한 것으로 판단된다. 다만, 혼합 배양 종균으로 제조한 쌀누룩의 특성이 미생물 간 어떠한 상호작용에 의한 것인지 규명할 필요가 있으며, 향후 쌀누룩의 미생물 균집 분석 등 추가 연구가 필요하다고 생각된다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 국립농업과학원 농업과학기술 연구사업(과제번호 PJ00999301)의 지원에 의해 이루어진 것이며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

Cho HK, Seo WT, Lee JY, Cho KM (2012) Quality characteristics of cereal *Makgeolli* rice *Nuruk* prepared *Rhizopus*

oryzae CCS01. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41(7): 1002-1008.

<http://www.bioin.or.kr/board.do?cmd=view&bid=system&num=229722>. Accessed on August 27, 2012.

IIT (2014) Effect of *Nagoya* protocol on industry. Trade Brief, Korea. No. 59, Institute for International Trade, Seoul. pp 1-8.

Im SY, Baek CH, Baek SY, Park HY, Choi HS, Choi JH, Jeong ST, Shin WC, Park HD, Yeo SH (2014) Quality characteristics of *Takju* according to different rice varieties and mixing ratio of *Nuruk*. *Korean J Food Preserv* 21(6): 892-902.

Jeong JH, Chai HS, Lee YH, Kim JM, Lee JH (2015) Quality characteristics of *Takju*, *Yakju*, spirit made by cereal *Nuruks*. *The Korean Journal of Culinary Research* 21(1): 267-280.

Kim CJ, Oh MJ, Lee JS (1985) Studies on digestion of raw starch by *Rhizopus oryzae*. *Korean J Appl Microbiol Biocng* 13(4): 329-337.

Kim MS, Lee YS, Kim JS, Shin WC, Sohn HY (2015) *In-vitro* anti-thrombosis activity of R4-*Nuruk* made from *Rhizopus oryzae* KSD-815. *Microbiol Biotechnol Lett* 43(2): 169-174.

Kwon YH, Lee AR, Kim JH, Kim HR, Ahn BH (2012) Changes of physicochemical properties and microbial during storage of commercial *Makgeolli*. *Korean J Mycol* 40(4): 210-214.

Liao W, Liu Y, Frear C, Chen S (2007) A new approach of pellet formation of a filamentous fungus - *Rhizopus oryzae*. *Bioresource Technol* 98: 3415-3423.

Mun JY, Baek SY, Park HY, Ro HS, Yeo SH (2016) Cultural characteristics of fungi strains isolated from Korean *Nuruk*. *J East Asian Soc Diet Life* 26(2): 125-140.

Noh JM, Choi JH, Jung ST, Yeo SH, Park JW, Lee JW, Choi HS (2013) Mycelial production and amylase activity of fungi for brewing in different submerged culture conditions. *J East Asian Soc Dietary Life* 23(6): 833-838.

Park CS, Lee TS (2002) Quality characteristics of *Takju* prepared by wheat flour *Nuruks*. *Korean J Food Sci Technol* 34(2): 296-302.

Park JH, Yeo SH, Choi JH, Jeong ST, Choi HS (2012) Production of *Makgeolli* using rice treated with *Gaeryang-Nuruk* (for non-steaming process) extract. *Korean J Food Preserv* 19(1): 144-152.

So MH (1991) Improvement in the quality of *Takju* by the combined use of *Aspergillus kawachii* and *Aspergillus oryzae*. *Korean J Food & Nutr* 4(2): 115-124.

- So MH (1993) Conditions for the production of amylase and protease in making wheat flour *Nuruk* by *Aspergillus oryzae* L2. Korean J. Food & Nutr 6(2): 89-95.
- So MH, Lee JW (1996) *Takju* brewing by combined use of *Rhizopus japonicus-Nuruk* and *Aspergillus oryzae-Nuruk*. J Korean Soc Food Nutr 25(1): 157-162.
- So MH, Lee YS, Noh WS (1999) Improvement in the quality of *Takju* by a modified *Nuruk*. Korean J Food & Nutr 12(4): 427-432.
- So MH, Lee YS (2009) Effects of culture conditions of *Rhizopus* sp. ZB9 on the production of saccharifying amylase during the preparation of rice *Koji*. Korean J Food & Nutr 22(4): 644-649.
- So MH, Lee YS (2010) Effects of culture conditions of *Rhizopus* sp. ZB9 on the production of organic acid during the preparation of rice *Koji*. Korean J Food & Nutr 23(1): 70-75.

Date Received Nov. 16, 2016
Date Revised Feb. 27, 2017
Date Accepted May 12, 2017