

Aspergillus oryzae L2에 의한 밀가루 누룩 제조시 Amylase와 Protease의 생산조건

소 명 환

부천전문대학 식품영양과

Conditions for the Production of Amylase and Protease in Making Wheat Flour Nuluk by *Aspergillus oryzae* L2

Myung-Hwan So

Department of Food and Nutrition, Bucheon Junior College, Bucheon 421-735, Korea

Abstract

A Nuluk, a Korean traditional Koji for brewing, was made with wheat flour and *Aspergillus oryzae* L2 which had a good aroma and strong abilities in producing saccharogenic and dextrogenic enzymes. The cultural conditions for the production of saccharogenic and proteolytic enzymes were tested. The productivity of dextrogenic enzyme was improved when Nuluk was made with unsteamed wheat flour as compared with steamed one, but that of proteolytic enzyme was reduced. The addition of water containing 0.5% hydrochloric acid was unfavorable for the production of those two enzymes. The optimum ratio of water added to wheat flour for the production of those two enzymes was 28% on the basis of wheat flour. The productivity of saccharogenic enzyme was enhanced when the Nuluk was molded after 20 hours of precultivation, but that of proteolytic enzyme was reduced as compared with no molding. The optimum temperatures for the production of saccharogenic enzyme and proteolytic enzyme were 36°C and 28°C, respectively.

Key words : *Aspergillus oryzae*, Nuluk, koji, amylase, protease

서 론

한국 전통주류의 제조에 사용되는 주발효제는 누룩이다. 누룩은 밀 또는 밀기울을 원료로하여 가열처리를 하지 않고 배양하기 때문에 미생물의 증식결과로 생성된 효소 외에 밀자체의 효소도 함유되어 있다.

우리의 전통주류인 탁주, 약주 및 증류식소주의 제조에서는 전통적으로 누룩이 사용되어 왔으나 해방 직후에 *Aspergillus kawachii*에 의한 코지가 적용된 후 요즘은 *Aspergillus kawachii*의 코지만 사용하거나 *Aspergillus kawachii*의 코지와 *Aspergillus shirousamii*에 의한

조효소제를 병용하기도 하며 누룩은 극히 일부의 양조장에서 부발효제로 소량이 사용되고 있는 실정이다. 이러한 양조방법은 주류의 이상발효를 방지하고, 발효기간을 단축시키고, 알코올의 수율을 높이는 데는 크게 기여했지만 주류의 품질을 떨어트리는 결과를 초래하였다.

현재 탁·약주의 양조에서 가장 시급히 해결해야 할 문제는 주류의 품질을 소비자의 수준에 맞게 높이는 일이다. 이 문제를 해결하는 데는 질 좋은 다양한 종류의 누룩의 생산이 뒷받침되어야 할 것으로 생각한다.

누룩의 제조와 그 개량에 관한 연구는 1950년대와 1960년대에는 비교적 활발히 이루어져 밀기울에 *Rhizopus*속 또는 *Aspergillus*속의 곰팡이를 접종하는 방법¹⁻⁶⁾, *Aspergillus*속 곰팡이를 이용하는 액체국의 제조방법⁷⁾ 등이 보고되었으나 누룩의 제조시에 미생물을 인위

적으로 집중하는 것을 근년에까지 금지하여 왔기 때문에 1970년대 중반 이후부터 이 분야의 연구가 거의 단절되고 말았다. 현재의 누룩들은 효소력이 높지 못하고 향도 좋지 않을 뿐만 아니라 소맥피가 불순물로 함유되어 있어서 양조업자들로부터 외면당하고 있다.

본 연구는 누룩의 주공팡이로⁸⁻¹⁰⁾ 알려져 있는 *Aspergillus*속 중에서 효소생산력이 높고 향도 좋은 선발된 균주와 이물질이 없는 밀가루로써 탁·약주와 증류식 소주의 제조에 이용될 수 있는 보다 개선된 누룩을 제조하기 위한 기초자료를 얻기 위한 것이다.

재료 및 방법

1. 사용균주

본 실험에 사용된 국균의 균주는 *Aspergillus awamori* var. *kawachii* 3개, *Aspergillus oryzae* 6개, *Aspergillus usamii* mut. *shirousamii* 3개이며 모두 한국과 일본의 누룩과 코지에서 저자가 분리 및 동정한 후 부천전 문대학 식품영양과 미생물실험실에 보존하고 있는 것이다.

2. 쌀 및 밀가루

쌀은 경남 밀양에서 1992년에 수확된 일반벼 9분도정 백미이고, 밀가루는 1993년 3월에 제일제당에서 제품화한 박력분 1등급이다.

3. 쌀 코지의 제조

쌀을 4시간 침수한 후에 건져서 원심분리기로 탈수하고 수증기로 30분간 쪄 후 식혀서 250ml 삼각플라스크에 30g씩 넣고 솜마개를 한 후 100℃에서 30분간 다시 찌고 식힌다. 이어서 potato dextrose agar의 사면배지에 배양된 국균의 포자를 1백금이 접종하고 혼합한 후 30℃에서 48시간 배양한다.

4. 누룩의 제조

밀가루에 급수비율이 28%되게 물을 첨가한 후 국균의 포자를 소량 접종하고 30℃에서 일정시간 전배양을 한 다음 성형 없이 입상하여 배양하였으며, 누룩의 성형 실험시에는 직경 15cm 두께 3cm되게 성형하여 배양하였다. 배양실의 온도는 30℃, 습도는 85%로 유지하며

48시간 또는 72시간 배양한 후에 30℃에서 수분함량 10% 내외가 되게 건조하였다. 단, 밀가루의 열처리 실험에서는 물을 첨가한 밀가루를 수증기로 30분간 증자하였고, 산처리실험시에는 염산 0.5%를 함유하는 물을 밀가루에 급수하였다(Fig.1).

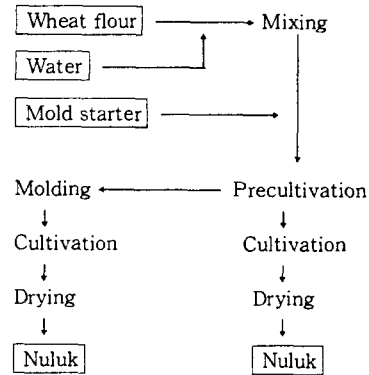


Fig. 1. Flow diagram for the preparation of Nuluk.

5. 당화 효소력의 측정

국제청의 발효제 분석규정에¹¹⁾ 따라 누룩 또는 코지 10g에 1% NaCl용액 200ml를 가하고 가끔 흔들면서 실온에서 3시간 침출하여 5%의 침출액을 얻는다. 초산완충액으로 pH를 5.0 또는 3.5로 조정한 2% 가용성전분액을 기질로, 누룩 또는 코지침출액을 효소액으로 하여(필요에 따라 적당히 희석하여) 55℃에서 60분간 효소반응을 시킨 후 생성된 환원당의 양을 Lane-Eynon 법으로¹²⁾ 측정하여 당화율을 산출하고 이에 효소의 희석배수를 곱하여 누룩 또는 코지의 당화력으로 하였다.

6. 호정화 효소력의 측정

국제청의 발효제 분석규정에¹¹⁾ 따라 초산완충액으로 pH를 5.0 또는 3.5로 조정한 1% 가용성전분액을 기질로, 누룩 또는 코지 침출액을 효소액으로 하여 40℃에서 효소반응을 시켜서 요오드-전분반응이 소실되는 데 소요되는 시간을 구하여 누룩 또는 코지 1g이 40℃에서 30분간에 호정화시킬 수 있는 1% 가용성전분액의 ml 수 즉, Wohlgemuth값으로 표시하였다.

7. 단백질분해 효소력의 측정

Anson 개량법에¹³⁾ 따라 pH를 7.0 또는 3.0으로 조정 한 0.6% casein 용액을 기질로, 누룩 또는 코지 침출액을 효소액으로 하여 40℃에서 10분간 효소반응을 시킨 후 생성된 Folin 발색성 비단백성물질의 양을 Folin 비색법으로 측정하여 누룩 또는 코지 1g이 1분간에 생성하는 tyrosine의 mg수로 나타내었다.

8. 산도 측정

코지 5g에 증류수 100ml를 가하고 실온에서 3시간 침출한 후 그 여과액 20ml를 취하여 0.1N-NaOH 용액으로 중화적정을 하고 이에 0.0064를 곱하여 구연산의 함량(%)으로 나타내었다.

9. 갈변 및 향의 검사

코지의 갈변정도 검사는 산도측정에 사용한 코지의 입자를 여과지 위에 올려 놓고 공기중에서 48시간 방치한 후 갈변의 정도를 육안으로 검사하였고, 코지의 향과 냄새는 저자의 주관적인 기준에 의하여 묘사법으로 평가하였다.

결과 및 고찰

1. 균주의 선발

*Aspergillus*속의 곰팡이 중에서 누룩제조에 적합한 균주를 선발하기 위하여 누룩 또는 코지에서 분리하여 *Aspergillus*속으로 동정된 12개의 균주로써 쌀코지를 각각 제조하여 amylase와 protease의 생산능력, 향 및 색을 조사해 본 결과는 Table 1과 같았다.

Aspergillus awamori var. *kawachii*를 접종한 것은 불쾌한 냄새가 없고, 색이 좋고, 생산된 효소가 산성측에서 잘 작용하고, 유기산도 많이 생성되었으나 당화 효소력과 호정화효소력의 값이 높지 못하며 좋게 느껴지는 향이 없었다. *Aspergillus oryzae*를 접종한 것은 당화효소력과 호정화효소력이 높고 밤향이라고 부르는 특유의 향이 있고 색도 좋았다. 당화효소력과 호정화효소력이 pH 3.5에서는 pH 5.0에서보다 감소되는 현상을 보이거나 효소력의 절대값이 매우 높았다. *Aspergillus usamii* mut. *shirousamii*를 접종한 것은 당화효소력과 단백질분해효소력이 높고, 호정화효소력도 비교적 높고, 색도 좋으나 흙 냄새와 유사한 좋지 못한 냄새를 나타내었다. 12개의 균주 중에서 당화효

Table 1. Properties of rice kojies made by different mold strains

Mold strains used	Saccharogenic activity		Dextrogenic activity		Proteolytic activity		Acidity (citrate %)	Browning	Aroma	Off-flavor
	pH 3.5	pH 5.0	pH 3.5	pH 5.0	pH 3.0	pH 7.0				
<i>Asp. awamori</i> var. <i>Kawachii</i> A1	632	624	79.5	80.6	25.0	0	2.19	-	-	-
<i>Asp. awamori</i> var. <i>Kawachii</i> F1	628	628	84.0	80.6	23.8	0	1.90	-	-	-
<i>Asp. awamori</i> var. <i>Kqwachii</i> H1	860	824	89.8	88.7	30.7	0	3.42	-	-	-
<i>Asp. oryzae</i> J2	1305	2128	1333	1400	37.0	12.3	0.15	+	+	-
<i>Asp. oryzae</i> L2	1635	2336	1678	2400	30.1	12.6	0.14	+	+	-
<i>Asp. oryzae</i> M2	1545	2240	1563	2120	37.9	21.3	0.13	++	+	-
<i>Asp. oryzae</i> N2	1200	1936	1320	1538	32.7	14.1	0.13	-	+	-
<i>Asp. oryzae</i> P4	1620	2368	1578	1786	27.3	11.2	0.13	-	+	-
<i>Asp. oryzae</i> S2	1110	1872	1323	1471	29.3	15.1	0.13	++	+	-
<i>Asp. usamii</i> mut. <i>shirousamii</i> Q1	1290	1376	294	375	61.1	11.7	1.16	-	-	+
<i>Asp. usamii</i> mut. <i>shirousamii</i> R1	1320	1360	265	384	56.9	11.2	1.37	-	-	+
<i>Asp. usamii</i> mut. <i>shirousamii</i> S1	2895	2848	265	357	57.2	11.5	2.70	-	-	+

- : negative, + : weak positive, ++ : strong positive

Table 2. Influence of heat or acid treatment of wheat flour on enzyme production of Nuluk by *Aspergillus oryzae* L2

Treatment of wheat flour*	Cultural time(hr.)	Saccharogenic activity(pH 5.0)	Proteolytic activity	
			pH 3.0	pH 7.0
H ⁺ A ⁻	48	5680	42.2	13.1
H ⁺ A ⁻	72	6320	46.6	14.1
H ⁻ A ⁻	48	8080	35.5	17.0
H ⁻ A ⁻	72	8560	40.3	19.4
H ⁻ A ⁺	48	3360	33.0	13.6
H ⁻ A ⁺	72	3600	29.1	12.6

* H⁺A⁻ : heat treatment and acid no treatment, H⁻A⁻ : heat no treatment and acid no treatment, H⁻A⁺ : heat no treatment and acid treatment.

소력과 호정화효소력의 생산능력이 높고, 단백질분해 효소력도 비교적 높으며, 향과 색도 좋은 *Aspergillus oryzae* L2를 누룩제조를 위한 실험용 균주로 선발하였다.

2. 열처리 및 산 첨가의 영향

앞의 실험에서 선발된 *Aspergillus oryzae* L2로써 밀가루누룩을 제조할 때에 밀가루의 열처리 또는 산첨가가 당화효소와 단백질분해효소의 생산에 미치는 영향을 검토해 본 결과는 Table 2와 같았다.

열처리의 영향을 보면 산성 protease의 생산은 열처리를 한 쪽이 높았으나 당화효소와 중성protease의 생산은 열처리를 하지 않은 쪽이 높았다. 또 산첨가에 따른 영향을 보면 산첨가를 한 쪽이 산첨가를 하지 않은 쪽보다 당화효소와 단백질분해효소의 생산이 낮았

다.

이 등은¹⁴⁾ 밀기울에 염산 0.7%를 함유하는 물을 첨가하고 *Aspergillus oryzae*를 배양할 때에 열처리를 한 것이 열처리를 하지 않은 것보다 당화효소와 액화효소의 생성에 좋았다고 하였고, 정 등은¹⁰⁾ 날밀기울에 *Aspergillus oryzae*를 배양할 때에 염산 0.8%를 함유하는 물을 첨가한 쪽이 염산을 함유하지 않는 물을 첨가한 쪽보다 α -amylase와 β -amylase의 생성에 좋았다고 보고하여 본 실험에서의 결과와는 일치하지 않고 있는데 이는 배양기질과 균주가 다르기 때문인 것으로 풀이된다.

3. 수분 첨가량의 영향

날밀가루에 *Aspergillus oryzae* L2를 접종하고 배양할 때에 수분의 첨가량이 당화효소와 단백질분해효소

Table 3. Influence of the quantity of water added to wheat flour on enzyme production of Nuluk by *Aspergillus oryzae* L2

Water added (%)	Cultural time (hr.)	Saccharogenic activity (pH 5.0)	Proteolytic activity (pH 3.0)
20	48	7500	32.3
20	72	7760	35.4
24	48	8000	33.9
24	72	8240	38.8
28	48	8080	34.5
28	72	8560	40.3
32	48	7800	33.0
32	72	8000	37.6

의 생산에 미치는 영향을 검토해 본 결과는 Table 3과 같았다.

당화효소와 단백질분해효소의 생산에 가장 좋은 급수비율은 밀가루에 대하여 28%이었으나 20~32%의 급수비율 범위에서는 급수비에 따른 현저한 차이가 나타나지 않았다.

이러한 결과는 윤 등이¹⁵⁾ 가열처리한 밀가루에 *Aspergillus usamii* mut. *shirousamii*를 배양할 때에 25~100% 급수비율 범위에서 급수비율이 높아질수록 당화효소의 생성이 잘된다고 한 것과는 다르나, 소가¹⁶⁾ 증자된 쌀에 *Aspergillus awamori* var. *kawachill*를 배양할 때에 급수비율 35~60%의 범위에서 급수비에 따른 당화효소의 생성에 큰 차이가 없었다고 한 것과는 일치되는 것으로 볼 수 있다. 본 실험에서 급수비율이 32%로 높아졌을 때 당화효소와 단백질분해효소의 생산이 다소 낮아지게 되는 것은 급수비율이 높아지면 밀가루가 큰 덩어리로 뭉쳐져서 국균이 증식할 수 있는 표면적이 줄어들게 되고, 또 수분함량의 증가로 날 밀가루에 함유되어 있는 세균들의 증식이 상대적으로 활발해져서 국균의 증식이 지장을 받았기 때문일 것으로 풀이된다.

4. 성형 및 성형시기의 영향

날밀가루에 *Aspergillus oryzae* L2를 접종하여 누룩을 제조할 때에 성형여부와 성형시기가 당화효소와 단백질분해효소의 생산에 미치는 영향을 조사해 본 결과는 Table 4와 같았다.

성형의 여부와 성형시기가 당화효소와 단백질분해

효소의 생산에 영향을 미치고 있음을 알 수 있는데 당화효소의 생산은 국균을 접종한 후 20시간정도 전배양을 하다가 성형을 하는 것이 가장 좋았고, 단백질분해효소의 생산은 성형을 하지 않은 것이 가장 좋았으며 성형을 한다면 10시간 전배양을 한 후에 성형하는 것이 좋았다. 국균을 접종한 후 바로 성형을 한 것은 당화효소와 단백질분해효소의 생산이 좋지 않았다. 당화효소와 단백질분해효소의 생산을 동시에 고려한다면 국균의 접종 후 10~20시간 전배양을 한 후에 성형을 하는 것이 좋을 것으로 판단되었다. 누룩을 제조할 때에 국균을 접종한 후 즉시 성형을 하는 것보다 일정시간 전배양을 한 후에 성형을 한 것이 좋게 나타나는 이유는 국균을 접종한 후 즉시 성형을 하고 배양할 경우에는 누룩표면의 부분적인 건조가 이루어져 국균의 발아와 증식이 고루 이루어지지 않게 되지만 성형전에 전배양을 했을 경우에는 이러한 점이 개선되었을 수 있었기 때문인 것으로 생각된다.

5. 배양온도의 영향

Aspergillus oryzae L2를 날밀가루에 접종하고 배양할 때에 당화효소와 단백질분해효소의 생산에 미치는 온도의 영향을 조사해 본 결과는 Table 5과 같았다.

당화효소의 생산은 36℃일 때 가장 좋았고 단백질분해효소의 생산은 28℃일 때가 가장 좋았다. 이러한 결과는 *Aspergillus usamii* mut. *shirousamii*를 사용한 윤의¹⁵⁾ 연구, *Aspergillus awamori* var. *kawachii*를 사용한 소의¹⁶⁾ 연구 및 *Aspergillus niger*를 사용한 박 등의¹⁷⁾ 연구결과와 거의 일치하는 것으로 볼 수 있다. 그러

Table 4. Influence of cultural time before or after molding on enzyme production of Nuluk by *Aspergillus oryzae* L2

Cultural time (hr.)		Saccharogenic activity (pH 5.0)	Proteolytic activity (pH 3.0)
Before molding	After molding		
0	50	8160	36.7
10	40	8320	43.2
20	30	8480	41.0
30	20	8470	38.4
40	10	8350	36.3
50	0*	8240	46.2

* Cultural time of zero hour after molding means practically no molding.

Table 5. Influence of cultural temperature on enzyme production of Nuluk by *Aspergillus oryzae* L2

Cultural temperature (°C)	Cultural time (hr.)	Saccharogenic activity (pH 5.0)	Proteolytic activity (pH 3.0)
24	30	7240	23.1
28	30	8040	36.3
32	30	8480	34.0
36	30	8600	31.0
40	30	8260	18.9
44	30	6400	6.0

나 *Rhizopus japonicus*를 사용한 정희¹⁸⁾ 연구나 *Candida muscorum*을 사용한 박 등의¹⁹⁾ 연구결과와는 상이하다.

6. 배양시간의 영향

Aspergillus oryzae L2를 낱밀가루에 접종하고 36°C에서 배양할 때 당화효소와 단백질분해효소의 생산에 미치는 배양시간의 영향을 조사해 본 결과는 Table 6과 같았다.

Table 6. Influence of cultural time on enzyme production of Nuluk by *Aspergillus oryzae* L2 at 36°C

Cultural time (hr.)	Saccharogenic activity (pH 5.0)	Proteolytic activity (pH 3.0)
12	7000	14.9
24	8100	23.5
36	8500	32.5
48	8640	38.4
60	8635	40.5
72	8600	42.7

당화효소의 생산은 48시간에 최고를 나타낸 후 그 이후에는 완만하게 감소하였으며 단백질분해효소의 생산은 48시간 이후에도 완만한 증가를 보였다. 이러한 결과는 *Aspergillus usami* mut. *shirousami*를 사용한 윤 등의¹⁷⁾ 연구, *Aspergillus awamori* var. *kawachii*를 사용한 소의¹⁶⁾ 연구 및 *Aspergillus niger*를 사용한 박 등의¹⁷⁾ 연구결과와는 일치하나, *Rhizopus japonicus*를 사용한 정희¹⁸⁾ 연구결과와는 일치하지 않는다.

요 약

당화효소와 호정화효소의 생산능력이 높고 향도 좋은 *Aspergillus oryzae* L2와 밀가루로써 누룩을 제조할 때에 당화효소와 단백질분해효소의 생산을 위한 배양 조건을 검토하였다. 밀가루를 가열치리했을 때에는 낱밀가루에 비하여 단백질분해효소의 생산은 증가되었으나 당화효소의 생산은 감소되었다. 밀가루에 0.5%의 염산을 함유하는 물을 급수했을 때에는 당화효소와 단백질분해효소의 생산이 현저하게 감소되었다. 급수비율은 밀가루에 대하여 28%일 때가 가장 좋았다. 국균을 접종한 후 즉시 성형을 하는 것보다 20시간 전배양을 한 후에 성형을 하는 것이 당화효소의 생산에 좋았고 단백질분해효소의 생산은 성형을 하지 않은 것이 좋았다. 당화효소생산의 최적온도는 36°C이었고 단백질분해효소생산의 최적온도는 28°C이었다.

참고문헌

- 이두영 : 곡자제조방법, 한국특허 제272호(1950)
- 이병우 : 강력한 효소를 보유한 곡자제조법, 한국특허 제682호(1956)
- 이성범 : 탁약주류 제조에 있어서 효소원 및 그의 효율적 첨가방법, 한국미생물학회지, 5(2), 43 (1967)
- 이두영 : 한국곡자의 발효생산력에 관한 연구(제2보), 증강소맥을 재료로 한 곡자의 제조, 한국미생물학회지, 7, 41(1969)
- 정기택, 유대식 : 고구마전분질 원료를 이용한 주

- 류제조, 국세청기술연구소보, 제2호, 19(1969)
6. 정호권 : 곡자의 개량에 관한 연구(제1보), 개량곡자의 제조 및 그 능력, 한국식품과학회지, 2 88 (1970)
 7. 정기택, 유대식 : 액체국의 제조에 관한 연구, 이종균주의 혼합배양시 국균의 이식방법, 경북대학교 자연과학논문집, 12, 44(1968)
 8. 이두영 : 한국곡자의 발효생산력에 관한 연구(제1보), 곡자중 함유 사상균의 분리와 그 성상, 한국미생물학회지, 5(2), 51(1967)
 9. 김찬조 : 탁주양조에 관한 미생물학적 및 효소학적 연구, 한국농화학회지, 10, 69(1968)
 10. 정기택, 유대식 : 고구마전분질을 원료로 이용한 주류제조, 한국미생물학회지, 9, 103(1971)
 11. 국세청기술연구소 : 국세청기술연구소 주류분석규정, 국세청훈령 제743호, p.12~24(1979)
 12. Horwitz, w. : *Method of Analysis of the A.O.A.C.*, 12th ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington, p.189(1975)
 13. 유주현, 양한철, 정동효, 양용 : 식품공학실험, 제2권, 탐구당, p.474~479(1977)
 14. 이성범, 최경환, 임동순, 김덕치 : 막걸리의 제조를 위한 효소제의 개발연구(제1보), 탄수화물 및 단백질분해력에 대하여, 국세청기술연구소보, 제2호, 62(1969)
 15. 윤복현, 박윤중, 이석건 : *Asp. usamii shirousamii* U2균의 국식배양에 의한 유기산 및 당화효소의 생성에 관한 연구, 한국식품과학회지, 6(3), 127 (1974)
 16. 소명환 : *Aspergillus kawachii kitahara*에 의한 탁주용입국 제조시 유기산과 당화효소의 생성조건, 부천전문대학논문집, 제6집, 247(1986)
 17. 박윤중, 손천배 : 흑국균의 인공변이에 관한 연구, 한국식품과학회지, 14(1), 72(1982)
 18. 정만재 : *Rhizopus japonicus* S-62가 생성하는 단백질분해효소에 관한 연구, 한국식품과학회지, 9 (1), 31(1977)
 19. 박윤중, 윤한교, 손천배 : *Candida muscorum*의 amylase에 관한 연구, 한국식품과학회지, 7(1), 243(1975)
-
- (1993년 5월 6일 수리)