

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

소 명 환

부천전문대학 식품영양과

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

Myung-Hwan So

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

Abstract

This study was carried out to investigate the influences of cultural conditions of koji on the production of saccharogenic amylase 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 cultural temperature for the production of saccharogenic amylase by this mold was 36°C, and at this temperature it needed 40 hours of cultivation for maximum production of this enzyme. It was favorable for high production of both organic acid and saccharogenic amylase to shift the cultural temperature from initial 36°C to 32°C after 20~25 hours of cultivation. The production of saccharogenic amylase was low when the water content of steamed rice was below 35%, but its production was high at 40~60% of water content. When the quantity of conidial inoculation was too small, the production of saccharogenic amylase was low in initial phase, but it was retrieved after 40 hours of cultivation. When koji-thickness was over 3cm, the production of saccharogenic amylase was markedly restricted. The saccharogenic amylase of this koji was stable at pH 2~7, and showed high activity at pH 2~5.

Key words : *Aspergillus awamori* var. *kawachii*, rice koji, saccharogenic amylase

서 론

탁주 및 약주는 전통적으로 누룩을 주발효제로 사용하여왔다. 그러나 해방 직후에 *Aspergillus awamori* var. *kawachii*에 의한 koji가 적용된¹⁾ 이후 요즘은 *Aspergillus awamori* var. *kawachii*의 koji만을 사용하거나 *Aspergillus awamori* var. *kawachii*의 koji에 소량의 조효소제나 소량의 누룩을 병용하기도 한다²⁾.

이와 같이 오늘날의 탁·약주 양조에 가장 필수적인 koji곰팡이가 된 *Aspergillus awamori* var. *kawachii*는 일본의 awamori 소주의 제조에 이용되어 오던 *Aspergillus awamori*의 백색 변이주로 1927년경에 일본에서

발견되었다³⁾. 본균에 대한 연구는 일찍이 일본에서 많이 이루어졌다. 그러나 그 연구의 내용은 본균의 분류학상의 위치를 밝히기 위한 내용^{4~6)}과 일본 특유의 발효공업에 이용하기 위한 것^{9~12)}이어서 그 자료를 우리의 탁·약주용 koji의 제조에 적용하기에는 무리한 점이 있다. 즉 일본에서는 본균을 증류주 제조용의 koji곰팡이로 이용하기 때문에 당화효소의 생산만을 중요시하면 되지만 우리나라에서는 술덧 전체를 음용하는 탁주 및 약주 제조용의 koji곰팡이로 이용하므로 본균이 생산하는 효소 뿐만 아니라 유기산에 대해서도 깊이 고려를 하여야 하기 때문이다.

국내에서 탁주제조용 발효제에 관한 연구^{13~21)}는 여러 연구자들에 의하여 많이 이루어졌으나 현재 탁·약주용 발효제로서 가장 중요한 위치를 차지하고 있는

Corresponding author : Myung-Hwan So

Aspergillus awamori var. *kawachii*의 koji에 관한 연구^{22, 23)}는 매우 미흡하다. 또 현재 본 국균을 탁·약주 제조시에 필수적으로 사용하고 있으면서도 이를 사용한 탁·약주 koji의 배양에 관한 체계적인 기초연구가 없었으며, *Aspergillus oryzae*에 의한 청주 koji의 배양 조건 및 *Aspergillus niger*에 의한 소주 koji의 배양 조건에 준하여 탁·약주용 koji를 배양하고 있는 실정이다.

저자는 본균을 사용한 탁·약주 koji의 제조시 유기산의 생산에 영향을 미치는 배양조건²⁴⁾을 검토하여 보고한 바 있으며, 본 연구에서는 당화효소의 생산에 영향을 미치는 배양조건을 검토하였기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 국균

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

2. 쌀

Koji 제조에 사용된 쌀은 9분 도정된 통일계의 쌀이었다.

3. Koji의 제조방법

쌀을 4시간 침수시킨 다음 물기를 빼고 60g씩 달아서 500ml의 삼각플라스크에 넣고 면전한 다음 고압멸균기에서 120℃로 15분간 증자한 후 냉각시켜 수분함량 40%인 멸균증미를 제조하였다. 멸균증미에 *Aspergillus awamori* var. *kawachii* 포자현탁액 1ml(5×10^8 개의 포자 함유)를 가하고 잘 흔들어 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 실험

을 제외하고는 모두 32℃에서 배양하였다. 또 koji 두께의 영향에 관한 실험시에는 국균포자를 접종한 증미를 삼각플라스크에 넣어 36℃에서 20시간 전배양을 한 후 직경 4cm, 높이 8cm, 입구직경 2cm의 유리병에 소정의 두께(1~6cm)가 되게 넣은 후 가법계 면전을 하고 32℃의 항온기에서 30시간 및 40시간 배양하였다.

4. 효소액의 조제 및 전처리

Koji 10g을 1%의 식염수 200ml에 가하여 실온에서 3시간 침출시킨 후 원심분리하여 그 상등액을 실험용 효소액(5% 효소액)으로 사용하였다. 효소액의 pH별 안전성 측정시에는 본 효소액을 1N-HCl 또는 1N-NaOH로 소정의 pH(pH 1~9)로 조정된 후 40℃에서 1시간 유지시킨 다음 다시 1N-NaOH 또는 1N-HCl로 pH를 5.0으로 조정된 후 증류수를 가하여 2.5%의 효소액이 되게 하였다.

5. 기질의 조제

0.1N-acetate buffer 용액(pH 5.0)을 50% 첨가하여 조제한 pH 5.0인 2% soluble starch용액을 기질용액으로 사용하였다. 단, 기질용액의 pH에 따른 효소활성의 변화를 측정할 때에는 acetate buffer(pH 1~5) 또는 phosphate buffer(pH 6~9)를 50% 가하여 기질의 pH를 1~9의 범위에서 일정하게 유지시켰다.

6. 효소작용 및 당화효소 역가측정

국세청의 발효제 분석규정²⁵⁾에 준하여 대형 시험관에 기질용액 50ml를 가하고 40℃의 항온수조에서 5분간 예열시킨 후 효소액 또는 전처리를 한 효소액 10ml를 가하여 40℃에서 1시간 효소반응시켰다. 이어서 시험관을 냉각수에 옮기고 즉시 0.5N-NaOH 10ml를 가하여 효소반응을 정지시킨 후 증류수를 가하여 전체액이 100ml되게 하고 효소반응에 의하여 생성된 환원당의 양을 Lane-Eynon 법으로 측정하여 기질의 당화율을 구하고 당화율이 15%일 때의 효소회석배수를 곱하여 당화력가를 계산하였다.

결과 및 고찰

1. 배양온도 및 배양시간이 당화효소 생산에 미치는 영향

수분함량 40%인 증미에 국균포자를 집중한 후 배양 온도를 각각 다르게(24℃, 28℃, 32℃, 36℃ 및 40℃) 하여 koji를 제조하면서 배양시간의 경과에 따른 당화효소 생산의 변화를 조사해 본 결과는 Fig. 1과 같았다. 당화효소의 생산은 36℃에서 가장 잘 이루어 졌으

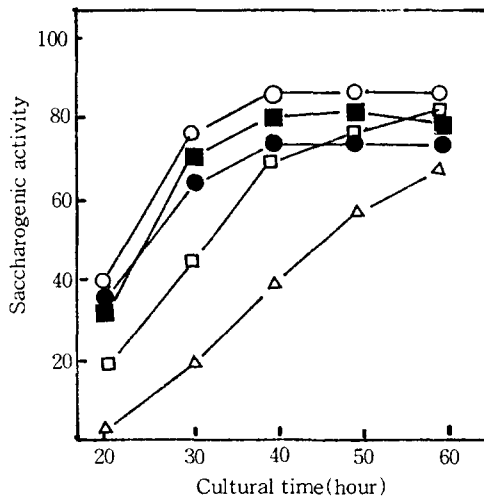


Fig. 1. Time courses of the production of saccharogenic amylase during koji cultivation by *Aspergillus awamori* var. *kawachii* at different temperature.

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

며 본 온도에서 40시간 배양했을 때 최고치에 도달하였다. 전보²⁴⁾의 유기산 생산곡선과 비교해 보면 본 균의 당화효소 생산 최적온도는 유기산생산 최적온도보다 4℃ 정도가 더 높으며, 당화효소 생산량이 최고치에 도달하는 데 소요되는 배양시간은 유기산 생산량이 최고치에 도달하는 데 소요되는 배양시간보다 10시간 정도 더 빠르다.

본균의 당화효소 생산의 최적온도는 *Aspergillus usamii* mut. *shirousamii*를 사용한 윤 등²⁵⁾의 연구, *Aspergillus niger*를 사용한 박 등²⁷⁾의 연구 및 *Aspergillus oryzae*를 사용한 소²¹⁾의 연구 결과와 잘 일치하

는 것으로 볼 수 있으나 *Rhizopus oryzae*를 사용한 김 등²⁸⁾의 연구, *Rhizopus japonicus*를 사용한 소²¹⁾의 연구 및 *Candida muscorum*을 사용한 박 등²⁸⁾의 연구결과와는 상이하다.

일반적으로 탁주 양조장에서 국상자를 사용하여 본 균으로 koji를 제조할 때에 입상 후 호흡열로 품온이 40℃~42℃ 정도로 상승되었을 때 손질작업을 하여 품온을 36~38℃로 낮추는 과정을 되풀이 하면서²⁾ koji를 제조하고 있는데 본 실험의 결과로 미루어 본다면 이 온도는 당화효소 생산의 최적온도보다 다소 높은 온도임을 알 수 있다.

2. 배양 중 온도 변경이 당화효소 생산에 미치는 영향

전보²⁴⁾에서 본 균으로 koji제조시 배양초기에는 36℃에서 배양하다가 20~25시간 후에 온도를 32℃로 낮추어 배양하면 36℃에서 계속 배양했을 때보다 유기산의 생산량이 훨씬 많음을 알 수 있었으므로 koji 제조시 이와 같은 온도 변경이 당화효소의 생산에 미치는 영향을 검토해 보았으며 그 결과는 Fig. 2와 같았다.

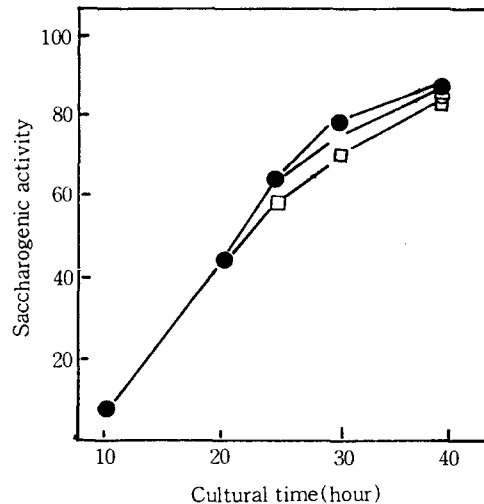


Fig. 2. Effect of temperature shift on the production of saccharogenic amylase during koji cultivation by *Aspergillus awamori* var. *kawachii*.

Cultivation temperature was shifted from 36℃ (—●—) to 32℃ after 20 hours (—□—) or 25 hours (—○—) during cultivation.

Fig. 2에서 알 수 있듯이 국균포자를 접종한 후 20~25시간까지 36℃로 배양하다가 그 이후에 32℃로 온도를 낮추어 배양했을 때에 40시간 배양한 koji의 당화효소 함량은 온도변경 없이 36℃로 40시간 배양했을 때와 별 차이가 없었다. 따라서 양조장에서 koji 제조시 이와 같은 온도변경은 유기산의 함량이 높고 동시에 당화효소의 활성도 높은 koji를 제조하는 데 효과적인 방법이 될 것으로 본다.

3. 수분함량이 당화효소의 생산에 미치는 영향

냉각증미의 수분함량을 30~65%로 조절한 다음 32℃에서 배양하면서 30시간, 40시간 및 50시간이 경과했을 때 당화효소의 함량을 측정해 본 결과는 Fig. 3과 같았다.

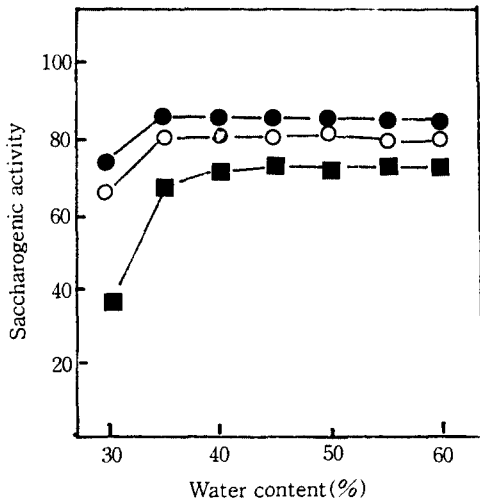


Fig. 3. Influence of water content of steamed rice on the production of saccharogenic amylase during koji cultivation by *Aspergillus awamori* var. *kawachii*.

Cultivation of 30 hrs (—□—), 30hrs (—○—) and 50 hrs (—●—) at 32℃

당화효소의 생산량은 증미의 수분함량이 30%이하 일 때는 낮았으나 35%이상에서는 같은 수준으로 모두 높았다. 전보²¹⁾의 유기산 생산과 비교하여 보면 수분함량이 35% 이하로 낮아졌을 때에는 유기산 생산이 당화효소 생산보다 더 지장을 받게됨을 알 수 있다. 이러한 결과는 양조장에서 본 균으로 koji를 제조할 때에

증미의 수분함량이 지나치게 낮아졌을 때에는 당화효소 생산보다 유기산 생산이 특히 불량한 koji가 될 것으로 생각된다.

4. 국균포자의 접종량이 당화효소의 생산에 미치는 영향

쌀 koji 제조시 국균포자의 접종량이 당화효소의 생산에 미치는 영향을 조사해 본 결과는 Fig. 4와 같았다.

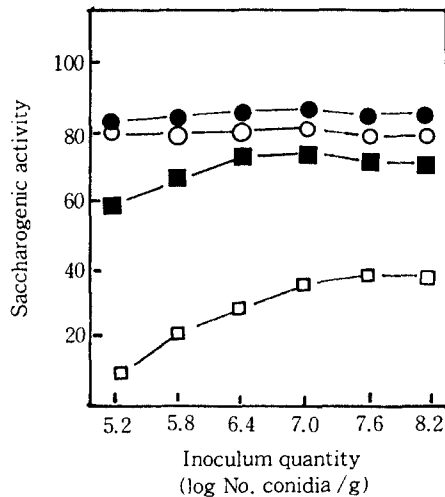


Fig. 4. Influence of inoculum quantity of conidia on the production of saccharogenic amylase during koji cultivation by *Aspergillus awamori* var. *kawachii*

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

배양초기인 20시간 경과시에는 국균포자의 접종량이 적을 수록 당화효소 생산량이 낮았으나 30시간 경과시에는 그 차이가 많이 회복되어졌고, 40시간 이후에서는 국균포자의 접종량에 따른 차이는 인정되지 않았다. 본 실험에서 1g당 포자수 log 7을 접종한 것은 현행의 표준접종량²¹⁾인 조제종국 0.25%를 접종한 것에 해당되고, log 5.2 접종은 조제종국 0.004%를 접종한 것에 해당되고, log 8.2 접종은 조제종국 4%를 접종한 것에 해당된다. 즉, 종국의 접종량을 통상의 접종량보다 62.5배 적은 양(log 5.2)을 접종한 것, 통상의 접종량(log 7.0)과 같게 접종한 것 및 통상의 접종량보다 16배 많은 양(log 8.2)을 접종한 것 간에 배양초

기에는 약간의 차이가 있었으나 배양말기에는 없었을 을 의미한다.

따라서 본 균으로 koji를 제조할 때에 종국집중량의 다소에 대해서는 크게 고려하지 않아도 무방할 것으로 생각된다. 다만, 배양초기의 신속한 국균증식을 도모 하여 오염균을 압도하도록 하기 위해서는 통상의 집중 량보다 2~4배 많이 접종하는 것이 좋을 것으로 생각 되며, 이때는 초기의 균 증식량이 많아져서 보쌈에서 뒤집기까지의 시간이 다소 단축되어질 것으로 본다.

5. Koji의 두께가 당화효소 생산에 미치는 영향

입상시 koji의 두께가 당화 효소 생산에 미치는 영 향을 알기 위하여 국균을 집중한 증미를 36℃에서 20 시간 전배양한 후 배양병에 소정의 두께(1~6cm)가 되게 넣고 가볍게 면전을 한 후 32℃의 항온기에서 배 양하면서 30시간 및 40시간이 경과했을 때 당화효소의 생산량을 조사해 본 결과는 Fig. 5와 같았다.

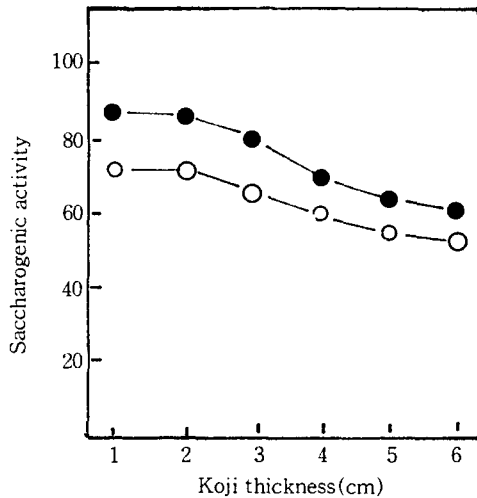


Fig. 5. Influence of koji thickness on the pro duction of saccharogenic amylase during koji cul tivation by *Aspergillus awamori* var. *kawachii*
Cultivation of 30hrs(-○-) and 40hrs(-●-) at 32℃

Koji의 두께가 두꺼워질수록 당화효소의 생산이 불 량해졌으며, 이러한 현상은 koji두께가 3cm이상일 때 에 더욱 현저하였다. 이러한 원인은 koji의 두께가 두 께워질수록 산소의 결핍현상이 심하게 나타나서 국균 의 증식에 지장을 주었기 때문인 것으로 생각되며, 이

를 해결하기 위해서는 입상시 koji의 두께를 얇게 하 고, 공기공급이 잘 될 수 있도록 손질작업을 잘 해 주 던가 강제송풍을 해 주어야 할 것으로 생각된다.

6. 당화효소의 pH에 따른 안정성 및 활성도 변화

본 균을 사용하여 제조한 koji를 침출시킨 후 침출 액 중에 함유된 당화효소 조효소의 pH에 따른 안정성 변화를 조사해 본 결과는 Fig. 6과 같았고, pH 에 따른 효소활성도의 변화를 조사해 본 결과는 Fig. 7 과 같았다.

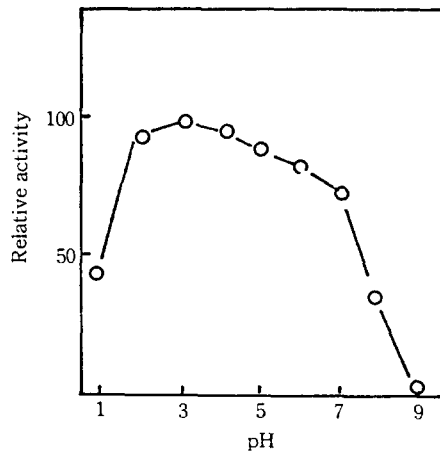


Fig. 6. Influence of pH on the stability of saccharogenic amylase of koji cultivated by *Aspergillus awamori* var. *kawachii*.

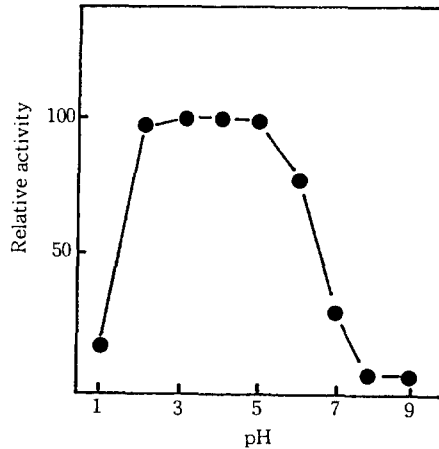


Fig. 7. Influence of pH on the activity of saccharogenic amylase of koji cultivated by *Aspergillus awamori* var. *kawachii*.

본 조효소는 pH 2~7의 넓은 범위에 걸쳐서 안정성을 나타내었고, 최적 안정 pH는 3.0이었다. 또 본 조효소는 pH 2.0~5.0의 범위에서 높은 활성도를 나타내었다. 이러한 결과들은 흑국계균의 당화효소의 특성²⁹⁻³¹⁾과 일치하는 것으로 볼 수 있으며, 소^{22, 23)}도 본 균으로 제조한 koji의 당화효소가 내산성이 강함을 보고한 바 있다.

일반적으로 탁주 및 약주의 제조시에 오염세균의 증식을 억제하고 효모에 의한 안전한 발효를 도모하기 위하여 술덧의 pH를 3.5~4.5 정도로 유지시키고 있는데 본 균으로 제조한 koji의 당화효소는 이 pH 범위 내에서 높은 안정성과 최고의 활성도를 보이고 있으므로 탁·약주 제조용으로 아주 적합한 것으로 평가되어진다.

요 약

탁주 및 약주의 양조시에 koji 곰팡이로 사용되고 있는 *Aspergillus awamori* var. *kawachii*로서 쌀 koji를 제조할 때에 당화효소의 생산에 영향을 미치는 배양조건을 검토하였다. 본 균의 당화효소 생산 최적온도는 36℃이었고, 이 온도에서 40시간 배양했을 때 최고값에 도달하였다. 배양개시 후 20~25시간까지 36℃로 배양한 후 그 이후에 32℃로 배양하는 방법은 koji의 유기산 생산과 당화효소 생산에 호의적이었다. 증미의 수분함량이 35% 이하일 때는 당화효소의 생산이 낮았으나 40~60% 일 때는 높았다. 국균포자의 접종량이 지나치게 적을 때에는 배양초기의 당화효소 생산은 낮았으나 배양 40시간 이후에서는 차이가 없었다. Koji의 두께가 3cm 이상일 때는 당화효소의 생산이 현저히 억제되었다. 본 koji의 당화효소는 pH 2~7에서 안정하였고, pH 2~5에서 높은 활성을 나타내었다.

참고문헌

- 李斗永 : 한국미생물학회지, 6(4), 113(1968).
- 정동효 : 발효와 미생물공학, 선진문화사, p. 228~275(1985)
- 北原 覺雄, 吉田 滿智子 : 日本醱酵工學會誌, 27(7), 162(1949)
- 北原 覺雄, 久留島 通後 : 日本醱酵工學會誌, 27(1), 1(1949)
- 北原 覺雄, 久留島 通後 : 日本醱酵工學會誌, 27(4), 6(1949)
- 北原 覺雄, 久留島 通後 : 日本醱酵工學會誌, 27(8), 182(1949)
- 北原 覺雄, 久留島 通後 : 日本醱酵工學會誌, 28(3), 102(1950)
- 北原 覺雄, 阿部 卓二, 久留島 通後 : 日本醱酵工學會誌, 28(11), 442(1950)
- Hayashida S. : *Agric. Biol. chem.*, 39, 2093(1975)
- Hayashida S., Nomura T., Yoshino E., and Hong O.M. : *Agric. Biol. Chem.* 40, 141(1976)
- Yoskio Y. M. and Hayashida S. : *J. Ferment. Technol.*, 56, 289(1978)
- Hayashida S. and Perfecto Q.F. : *Agric. Biol. Chem.* 45, 2675(1981)
- 이두영 : 곡자제조방법, 한국특허 제 272호(1960)
- 이병우 : 강력한 효소를 보유한 곡자 제조법, 한국특허 제 682호 (1956)
- 이성범 : 한국미생물학회지, 5(2), 43(1967)
- 이두영 : 한국미생물학회지, 5(2), 51(1967)
- 이두영 : 한국미생물학회지, 7, 41(1969)
- 정기택, 유대식 : 국제청기술연구소보, 제2호, 19(1969)
- 정호권 : 한국식품영양학회지, 2, 88(1970)
- 소명환 : 한국식품영양학회지, 6(2), 89(1993)
- 소명환 : 한국식품영양학회지, 6(2), 96(1993)
- 소명환 : 한국식품영양학회지, 4(2), 115(1991)
- 소명환 : 한국식품영양학회지, 6(1), 1(1993)
- 소명환 : 한국식품영양학회지, 6(4), 287(1993)
- 韓國稅政新報社, 酒稅 實務要覽, p. 287(1975)
- 박윤현, 박윤중, 이석근 : 한국식품과학회지, 6(3), 127(1974)
- 박윤중, 손천배 : 한국식품과학회지, 14(1), 72(1982)
- 박윤중, 윤한교, 손천배 : 한국식품과학회지, 7(4), 243(1975)

29. 根平 武雄, 能美 良作 : 日本醱酵工學會誌, 34, 423(1956)
30. 北原 覺雄, 久留島 通後 : 阿部 卓二 : 日本醱酵工學會誌, 28, 388(1950)
31. 姜永燮, 玄光哲 : 국세청기술연구소보, 제3호, 90 (1975)