

Aspergillus usamii mut. *shirousamii* S1에 의한 밀가루누룩 제조시 Amylase와 Protease의 생산조건

소명환 · 박서영 · 김수화 · 오현진
부천전문대학 식품영양과

Conditions for the Production of Amylase and Protease in Marking Wheat Flour Nuluk by *Aspergillus usamii* mut. *shirousamii* S1

Myung-Hwan So, Seo-Young Park, Su-Hwa Kim, Hyun-Jin Oh
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 usamii* mut. *shirousamii* S1 which had strong abilities in producing amylase and protease. The cultural conditions for the production of saccharogenic and proteolytic enzymes were tested. The productivities of saccharogenic and dextrogenic enzymes were improved when nuluk was made with unsteamed wheat flour as compared with steamed one, but those of proteolytic enzyme and organic acid were reduced. The addition of water containing 0.5% of hydrochloric acid was unfavorable for the production of saccharogenic, dextrogenic and proteolytic enzymes. The optimum ratios of water added to wheat flour for the production of saccharogenic enzyme and proteolytic enzyme were 32% and 28%, respectively on the basis of wheat flour. The optimum temperatures for the production of saccharogenic enzyme and proteolytic enzyme were 36°C and 28°C, respectively. The activity of saccharogenic enzyme reached its maximum after 120 hours of cultivation at 36°C, but that of proteolytic enzyme 96 hours. The productivity of saccharogenic enzyme was enhanced when the nuluk was molded after 24 hours of precultivation but that of proteolytic enzyme was reduced as compared with no molding.

Key words : *Aspergillus usamii* mut. *shirousamii*, nuluk, koji, amylase, protease

서론

우리나라의 전통적인 탁약주 제조방법에서 주발효체는 누룩이었다. 그러나 해방 이후 일본에서 소주제조에 이용되던 *Aspergillus awamori* var. *kawachii*의 입국이 탁약주 제조에 도입되고¹⁾, 이것이 양조업자들로 부터 호평을 받게 됨에 따라 누룩의 사용량은 급격히 줄어들기 시작하였다.

전통적으로 탁주는 농사철에 농민들이 간식으로 많이 애용하였으며, 농사일로 땀을 많이 흘리고 갈증을

느끼는 여름철에 그 소비량이 가장 많았다. 그러나 양조장의 품질관리적인 측면에서 불 때 날씨가 더운 여름철은 술덧의 안전관리가 매우 어려웠다. 여름철의 자연온도가 높은 것에 더하여 탁주의 수요량 증가에 부응한 대량 담금시의 술덧과열 현상이 겹치어져서 술의 제조가 실패할 수 있기 때문이다.

이러할 때에 *Aspergillus awamori* var. *kawachii*의 입국은 술덧의 실패를 방지하는 데 매우 도움이 되었다. 이 곰팡이는 입국제조시에 당화효소를 생산하는 외에 구연산을 생산하여²⁾ 술덧의 pH를 산성으로 유지하여 주며, 그 결과 주모 또는 술덧에서 잡세균의 증식이 억제되고 효모는 잘 증식하여 정상적인 발효를 하

기 때문이다. 1960년대 중반부터는 쌀소비를 줄이기 위한 목적으로 탁주양조에 쌀의 사용이 금지되고 대신 경질원료인 옥수수가루 및 밀가루의 사용이 의무화되었고, 또 주세법의 탁주규격에는 주정도수를 중요시하게 됨에 따라 탁주발효제가 갖추어야 할 요구사항은 많은 유기산과 높은 당화효소력이었다.

이러한 요구는 *Aspergillus awamori* var. *kawachii* 입국 외에 당화효소력이 강한 조효소제를 탁주양조에 도입하게 하였고, 그에 따라 누룩은 탁주양조에 불필요한 발효제인 것처럼 취급당하게 되었다. 오늘날의 탁주양조에서도 대부분의 양조업자들은 누룩을 거의 사용하고 있지 않으며, *Aspergillus awamori* var. *kawachii* 입국만을 사용하거나 이에 소량의 조효소를 병용하고 있다.

누룩을 주발효제로 한 탁주와 *Aspergillus awamori* var. *kawachii* 입국을 주발효제로 한 탁주는 술맛에 상당한 차이가 있다. 입국으로 만든 탁주는 입국에서 오는 산이 지나치게 많고³⁾ 아미노산이 부족하여⁴⁾ 맛의 조화가 이루어져 있지 않으며, 독특한 향도 없다⁵⁾. 입국과 조효소제가 탁주양조에 적용된 점은 탁주의 발효수율 향상과 술덧의 실패방지에는 큰 도움을 주었으나 탁주의 주질은 오히려 후퇴시키는 결과를 가져왔다고 볼 수 있다.

요즘은 소비자들의 기호수준이 높아졌고, 탁주 이외에도 여러 종류의 술들이 있으므로 입국으로 양조한 단조로운 술맛을 가진 오늘날의 탁주는 설령 포장과 유통이 개선된다 하더라도 소비자들에게 좋은 반응을 얻기 어렵다.

특히 발효된 술덧 그대로를 막걸려서 전체성분을 마시는 탁주에서는 발효제의 특성이 술의 맛과 향에 그대로 반영된다. 이러한 점에서 볼 때에 탁주의 주질을 되살리는 가장 좋은 방법은 질 좋은 누룩을 탁주양조에 사용하는 일이다. 요즘은 냉각설비를 이용하여 술덧의 온도를 자유롭게 조절할 수 있기 때문에 술의 맛 조화를 깨뜨리면서 굳이 입국의 산에 의한 술덧 안전관리를 고집할 필요도 없다.

문제가 되는 점은 탁주양조에 당장 누룩을 사용하고 자 하여도 만족할 정도로 품질이 우수한 누룩이 없는 점이다. 누룩의 품질을 향상시키기 위한 기초연구는 1950년대와 1960년대에는 비교적 활발하였으나⁶⁻¹²⁾

1970년대 중반부터는 이 분야에 대한 연구가 거의 중단되다시피 하였다.

저자는 누룩의 품질개선을 위한 기초연구로 주류제조에 이용되는 여러 곰팡이들의 특성을 조사한 바 있으며¹³⁾, 밀가루에 *Aspergillus oryzae*¹⁴⁾ 또는 *Rhizopus japonicus*¹⁵⁾를 접종하는 밀가루누룩의 제조를 검토한 바 있다.

본 연구에서는 *Aspergillus usamii* mut. *shirousamii*를 접종하여 밀가루누룩을 제조할 때에 amylase와 protease의 생산에 미치는 여러 조건들의 영향을 검토하였다.

재료 및 방법

1. 사용균주

본 실험에 사용된 *Aspergillus usamii* mut. *shirousamii* 중 균주번호 Q1, R1, S1 및 T1은 한국 및 일본의 종국에서 분리하여 부천전문대학 식품영양과 미생물실험실에 보관하고 있는 것이고, U1은 고려대학교 식품공학과 미생물연구실에서 분양받은 것이다.

2. 밀가루

밀가루는 1993년 12월에 제일제당에서 제품화한 강력분 1등급이며 표백제나 기타 첨가물이 함유되지 않은 것이다.

3. 누룩의 제조

밀가루에 급수비율이 28%되게 물을 첨가한 후 *Aspergillus usamii* mut. *shirousamii*의 포자를 소량 접종하고 일정시간 전배양을 한 후 성형 없이 입상하여 배양하거나 또는 성형을 하여 배양하였다. 누룩을 성형할 때에는 직경 15cm, 두께 3cm 되게 하였고, 배양실은 온도 34℃, 습도 85% 유지하였다. 배양실에서 2~6일간 배양한 후에 30℃에서 통풍이 잘 되게 3일간 건조하여 수분함량이 10% 내외가 되게 하였다(Fig. 1). 단, 밀가루의 열처리실험에서는 물을 첨가한 밀가루를 수증기로 30분간 증자하였고, 산처리실험에서는 염산 0.5%를 함유하는 물을 밀가루에 대하여 28% 급수하였다.

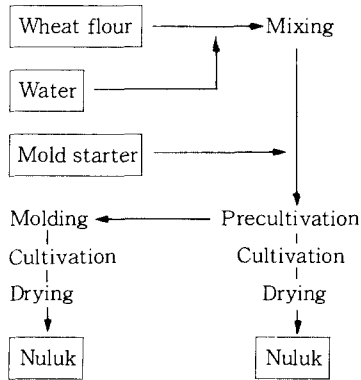


Fig. 1. Flow diagram for the preparation of nuluk.

4. 당화효소력의 측정

국세청의 발효제 분석규정¹⁶⁾에 따라 누룩 10g에 1% NaCl용액 200ml를 가하고 가끔 흔들면서 실온에서 3시간 침출하여 5% 침출액을 얻는다. 초산완충액으로 pH를 3.5 또는 5.0으로 조정한 2% 가용성 전분액을 기질로, 누룩침출액을 효소액으로 하여 55℃에서 60분간 효소반응을 시킬 때 생산되는 환원당의 양을 Lane-Eynon법¹⁷⁾으로 측정하여 당화율을 산출하고 이에 효소의 회석배수를 곱하여 누룩의 당화력으로 하였다.

5. 호정화 효소력의 측정

국세청의 발효제 분석규정¹⁶⁾에 따라 초산완충액으로 pH를 3.5 또는 5.0으로 조정한 1% 가용성 전분액을 기질로, 누룩침출액을 효소액으로 하여 40℃에서 효소반응을 시켜서 요오드 전분반응이 소실되는 데 소요되는 시간을 측정하여 누룩 1g이 40℃에서 30분간에 호정화시킬 수 있는 1% 가용성 전분액의 ml수 즉, Wohlgemuth값으로 표시하였다.

6. 단백질분해효소력의 측정

Anson 개량법¹⁸⁾에 따라 pH를 3.0 또는 7.0으로 조정한 0.6% casein용액을 기질로, 누룩침출액을 효소액으로 하여 40℃에서 15분간 효소반응을 시킬 때 생산되는 Folin 발색성 비단백성 물질의 양을 Folin 비색법으로 측정하여 누룩 1g이 1분간에 생산하는 ty-

rosine의 mg수로 나타내었다.

7. 산도 측정

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

8. 갈변 및 냄새의 검사

누룩의 갈변 여부 검사는 산도측정에 사용한 누룩찌꺼기를 여과지 위에 올려놓고 실온에서 공기중에 48시간 방치한 후 갈변 여부를 육안으로 검사하였고, 누룩의 냄새 검사는 저자의 주관적인 기준에 의하여 묘사법으로 평가하였다.

결과 및 고찰

1. 균주의 선발

Aspergillus usamii mut. *shirousamii* 중에서 누룩제조에 적합한 균주를 선발하기 위하여 5개의 균주 각각으로 밀가루누룩을 제조하여 amylase와 protease의 효소활성, 산도, 갈변여부, 향기로운 냄새 또는 불쾌한 냄새의 존재 여부를 조사한 결과는 Table 1과 같았다.

실험된 5균주는 모두 누룩에서 유기산을 거의 생산하지 않았고, 누룩을 갈변시키지도 않았다. 건조되지 않은 누룩은 모두 흙냄새와 비슷한 좋지 못한 냄새를 약간 나타내었다. 그러나 건조된 누룩에서는 이러한 냄새를 전혀 느낄 수 없었고 오히려 약간 구수하게 느껴지는 향기를 나타내었다. 호정화 효소력과 단백질분해효소력은 5균주 모두 비슷하였으나 당화효소력은 균주번호 S1이 가장 좋았다. 따라서 *Aspergillus usamii* mut. *shirousamii* S1을 누룩제조를 위한 우수 균주로 선발하였다.

2. 열처리 및 산침가의 영향

앞의 실험에서 선발된 *Aspergillus usamii* mut. *shirousamii* S1을 접종하여 밀가루누룩을 제조할 때에 밀가루의 가열처리 또는 염산 첨가가 당화효소, 단백질분해효소 및 유기산 생산에 미치는 영향을 검토해본 결과는 Table 2와 같았다.

Table 1. Properties of wheat flour nuluk made by different strains of *Aspergillus usamii* mut. *shirousamii*

Mold strains	Saccharogenic activity		Dextrogenic activity		Proteolytic activity		Acidity (Citrate %)	Brown-ing	Aroma		Off-flavor	
	pH3.5	pH5.0	pH3.5	pH5.0	pH3.0	pH7.0			BD*	AD*	BD*	AD*
<i>Asp.usamii</i> mut. <i>shirousamii</i> Q1	1570	2110	1310	1670	32.5	3.5	0.02	-	-	+	+	-
<i>Asp.usamii</i> mut. <i>shirousamii</i> R1	1330	2050	1220	1730	31.6	3.1	0.02	-	-	+	+	-
<i>Asp.usamii</i> mut. <i>shirousamii</i> S1	1840	3860	1250	1780	32.0	3.9	0.02	-	-	+	+	-
<i>Asp.usamii</i> mut. <i>shirousamii</i> T1	1710	3690	1140	1550	32.1	3.7	0.02	-	-	+	+	-
<i>Asp.usamii</i> mut. <i>shirousamii</i> U1	1490	1980	1260	1630	32.0	3.4	0.02	-	-	+	+	-

Nuluk was made by cultivating at 35°C for 48 hours.

* BD(Before drying), AD(After drying).

Table 2. Influences of heat or acid treatment of wheat flour on enzyme production of nuluk made by *Aspergillus usamii* mut. *shirousamii* S1

Treatment of wheat flour*	Cultural time(hr.)	Saccharogenic activity		Dextrogenic activity		Proteolytic activity		Acidity (citrate %)
		pH3.5	pH5.0	pH3.5	pH5.0	pH3.0	pH7.0	
H ⁻ A ⁻	48	1910	3780	1250	1764	32.0	3.6	0.02
H ⁻ A ⁻	72	2510	4530	1500	2142	35.1	3.8	0.02
H ⁻ A ⁺	48	1519	2481	892	1304	27.0	3.4	0.02
H ⁻ A ⁺	72	1721	2552	1150	1452	31.0	3.8	0.02
H ⁺ A ⁻	48	2260	2218	250	280	46.1	3.2	2.69
H ⁺ A ⁻	72	2395	2380	260	294	47.7	3.2	2.18

* H⁻A⁻: heat and acid not treated, H⁻A⁺: heat not treated and acid treated, H⁺A⁻: heat treated and acid not treated.

당화효소력과 액화효소력은 무처리구가 가장 좋았고, 산성 protease의 활성과 유기산 생산은 가열처리구가 가장 좋았다. 산처리구는 뚜렷한 장점이 나타나지 않았다. 무처리구가 가열처리구보다 amylase 생산이 높게 나타난 점은 *Aspergillus oryzae*¹⁴⁾ 및 *Rhizopus japonicus*¹⁵⁾의 밀가루누룩에서의 결과와 일치하며, 이는 낱원료로 제조하는 누룩의 중요한 특징인 것으로 생각된다. 또 가열처리구에서 유기산의 축적량이 높게 나타난 점도 특이한데 이는 TCA cycle의 citric acid 대사에 관여하는 필수성분이 밀가루의 가열처리에 의하여 변성되거나 실활되어 구연산이 다량 축적되었기 때문인 것으로 생각된다.

3. 수분첨가량의 영향

낱밀가루에 *Aspergillus usamii* mut. *shirousamii* S1을 접종하고 배양할 때에 수분의 첨가량이 당화효소와 단백질분해효소의 생산에 미치는 영향을 조사해 본 결과는 Fig. 2와 같았다.

당화효소 생산은 급수비율 32%에서 가장 좋았고, 단백질분해효소 생산은 급수비율 28%에서 가장 좋았다. 이러한 결과는 *Aspergillus oryzae*¹⁴⁾ 및 *Rhizopus*

*japonicus*¹⁵⁾에 의한 밀가루누룩 제조시의 amylase 생산 최적급수비율보다는 약간 높은 수치이며, protease 생산의 최적급수비율은 위의 두 곰팡이들과 일치하는 것으로 볼 수 있다.

4. 배양온도의 영향

Aspergillus usamii mut. *shirousamii* S1을 급수비율 32%인 밀가루에 접종하고 72시간 배양할 때에 배양온도가 당화효소 및 단백질분해효소의 생산에 미치는 영향을 조사해 본 결과는 Fig. 3과 같았다.

당화효소 생산의 최적온도는 36℃이었고, 단백질분해효소 생산의 최적온도는 28℃이었다.

이러한 결과는 *Aspergillus oryzae*¹⁴⁾에 의한 밀가루누룩 제조시의 당화효소 및 단백질분해효소 생산의 최적온도와 각각 잘 일치한다. 또 *Rhizopus japonicus*¹⁵⁾에 의한 밀가루누룩 제조시와 비교해 볼 때 단백질분해효소 생산의 최적온도는 서로 일치하나 당화효소 생산의 최적온도는 본 실험쪽이 다소 높다.

5. 배양시간의 영향

밀가루에 32%의 수분을 급수하고 *Aspergillus us-*

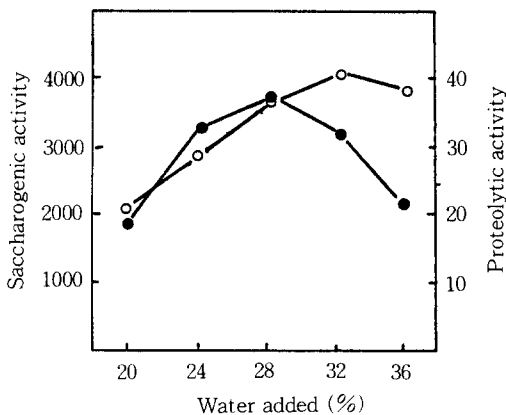


Fig. 2. Influences of the quantity of water added to wheat flour on enzyme production of nuluk made by *Aspergillus usamii* mut. *shirousamii* S1.

○-○ : Saccharogenic activity at pH 5.0
●-● : Proteolytic activity at pH 3.0

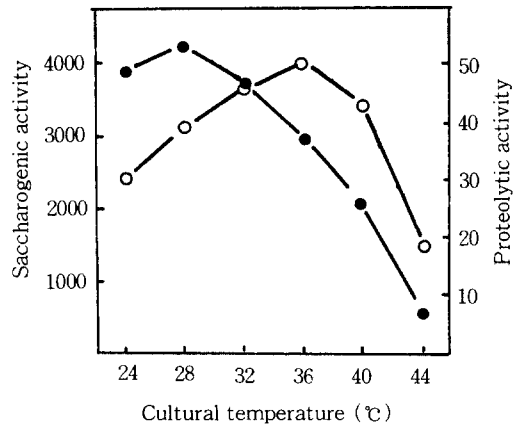


Fig. 3. Influences of cultural temperature on enzyme production of nuluk made by *Aspergillus usamii* mut. *shirousamii* S1.

○-○ : Saccharogenic activity at pH 5.0
●-● : Proteolytic activity at pH 3.0

amii mut. *shirousamii* S1을 접종하고 36°C에서 배양할 때에 배양시간이 당화효소와 단백질분해효소의 생산에 미치는 영향을 조사해 본 결과는 Fig. 4와 같았다.

단백질분해효소력은 96시간 배양시에 최고에 도달하였고, 당화효소력은 120시간 배양시에 최고에 도달하였다. 이러한 결과는 *Aspergillus usamii* mut. *shirousamii*¹⁹⁾ 또는 *Aspergillus niger*²⁰⁾를 밀기울에 배양했을 때의 결과나 *Aspergillus oryzae*¹⁴⁾ 또는 *Rhizopus japonicus*¹⁵⁾를 밀가루에 배양했을 때의 결과와는 다소 다르다.

6. 성형여부 및 성형시기에 따른 영향

급수율 32%인 밀가루에 *Aspergillus usamii* mut. *shirousamii* S1을 접종하고 36°C에서 배양할 때에 누룩의 성형여부 및 성형시기가 당화효소 및 단백질분해효소의 생산에 미치는 영향을 조사해 본 결과는 Table 3과 같았다.

당화효소의 생산은 24시간 전배양을 한 후에 성형하는 것이 가장 좋았고, 단백질분해효소의 생산은 성형을 하지 않는 것이 가장 좋았다. 이러한 결과는 *Aspergillus oryzae*¹⁴⁾ 및 *Rhizopus japonicus*¹⁵⁾를 사용한 선

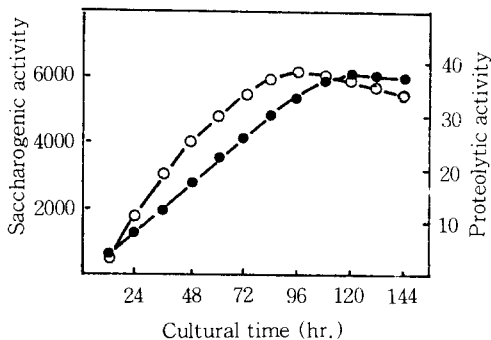


Fig. 4. Influences of cultural time on enzyme production of nuluk made by *Aspergillus usamii* mut. *shirousamii* S1.

○—○: Saccharogenic activity at pH 5.0
●—●: Proteolytic activity at pH 3.0

Table 3. Influences of cultural time before or after molding on enzyme production of nuluk by *Aspergillus usamii* mut. *shirousamii* S1.

Cultural time (hr.)		Saccharogenic activity (pH 5.0)	Proteolytic activity (pH 3.0)
Before molding	After molding		
0	96	6710	22.8
12	84	6785	23.7
24	72	7910	27.5
36	60	5653	31.0
48	48	5376	34.1
96	0	5880	38.0

연구의 결과들과 일치한다.

요 약

당화효소와 단백질분해효소의 생산능력이 강한 *Aspergillus usamii* mut. *shirousamii* S1을 접종하여 밀가루누룩을 제조할 때에 당화효소와 단백질분해효소의 생산을 위한 배양조건을 검토하였다. 밀가루를 가열처리했을 때에는 날밀가루에 비하여 단백질분해효소와 유기산의 생산은 증가되었으나 당화효소와 호정화효소의 생산은 감소되었다. 밀가루에 염산 0.5%를 함유하는 물을 급수했을 때에는 당화효소, 호정화효소 및 단백질분해효소의 생산이 감소되었다. 당화효소 생산의 최적급수비율은 32%이고, 단백질분해효소 생산의 최적급수비율은 28%이었다. 당화효소 생산의 최적온도는 36°C이고, 단백질분해효소 생산의 최적온도는 28°C이었다. 당화효소력은 120시간 배양시에 최고치에 도달하였고, 단백질분해효소력은 96시간 배양시에 최고치에 도달하였다. 당화효소의 생산은 곰팡이 접종 후 즉시 성형하는 것보다 24시간 전배양을 한 후에 성형하는 것이 좋았고, 단백질분해효소의 생산은 성형을 하지 않는 것이 좋았다.

참고문헌

1. 유주현 : 생물공학계의 숨은 선구자 이두영박사 탐방, 미생물과 발효, 16(1), 1(1992).
2. 北原覺雄, 久留島通俊 : 絲狀菌의 Diastase 組成에 關する 研究, 日本釀造工學會誌, 27(8), 182 (1948).
3. 소명환 : *Aspergillus kawachii*와 *Aspergillus oryzae*의 병용에 의한 탁주의 품질개선, 한국식품영양학회지, 4(2), 115(1991).
4. 이원경, 김정립, 이명환 : 국균을 달리한 탁주양조 중 유리아미노산 및 유기산의 소장, 한국농화학회지, 30(4), 323(1987).
5. 배상면 : 탁주 양조기술, 배한산업부설효소연구소, p.131(1988).
6. 이두영 : 곡자 제조방법, 한국특허 제272호(1950).
7. 이병우 : 강력한 효소를 보유한 곡자 제조방법, 한국특허 제682호(1956).
8. 이성범 : 탁약주류 제조에 있어서 효소원 및 그의 효율적인 첨가방법, 한국미생물학회지, 5(2), 43 (1967).
9. 이두영 : 한국곡자의 발효생산력에 관한 연구(제1보), 곡자중 함유 사상균의 분리와 그 성상, 한국미생물학회지, 5(2), 51(1967).
10. 이두영 : 한국곡자의 발효생산력에 관한 연구(제2보), 증강소맥을 재료로 한 곡자제조, 한국미생물학회지, 7, 41(1969).
11. 정기택, 유대식 : 고구마 전분질을 이용한 주류제조, 국세청기술 연구소보, 제2호, 19(1969).
12. 정호권 : 곡자의 개량에 관한 연구(제1보), 개량 곡자의 제조 및 그 성능, 한국식품과학회지, 2, 88(1970).
13. 소명환 : 한국 및 일본의 주류용 중국에서 분리한 국균곰팡이의 특성, 한국식품영양학회지, 6(1), 1(1993).
14. 소명환 : *Aspergillus oryzae* L2에 의한 밀가루누룩 제조시 amylase와 protease의 생산조건, 한국식품영양학회지, 6(2), 89(1993).
15. 소명환 : *Rhizopus japonicus* T2에 의한 밀가루누룩 제조시 amylase와 protease의 생산조건, 한국식품영양학회지, 6(2), 96(1993).
16. 국세청기술연구소 : 국세청기술연구소 주류분석 규정, 국세청훈령 제743호, p.12~14(1979).
17. Horwitz, W. : *Method of Analysis of the A.O.A.C.*, 12th ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington, p.189(1975).
18. 유주현, 양한철, 정동효, 양음 : 식품공학실험, 제2권, 탐구당, p.474~479(1977).
19. 윤복현, 박윤중, 이석진 : *Aspergillus usamii* mut. *shirousamii* U2 균의 국식배양에 의한 유기산 및 당화효소 생성에 관한 연구, 한국식품과학회지, 6(3), 127(1974).
20. 박윤중, 손천배 : 흑국균의 인공변이에 관한 연구, 한국식품과학회지, 14(1), 72(1982).

(1994년 3월 15일 수리)