

## 한국전통누룩에 존재하는 사상균의 분리 동정 및 Amylolytic 효소 활성

박정웅 · 이계호 · 이찬용\*

서울대학교 식품공학과, \*대전대학교 미생물학과

### Identification of Filamentous Molds Isolated from Korean Traditional Nuruk and their Amylolytic Activities

Jeong-Woong Park, Ke-Ho Lee and Chan-yong Lee\*

Department of Food Science and Technology, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea

\*Department of Microbiology, Taejon University, Taejon 300-716, Korea

**Abstract** — Through the study of identification of filamentous molds isolated from 12 traditional Nuruk, collected from several regions in Korea, 78 strains of *Absidia* spp., including *Absidia corymbifera*, *Absidia ramosa*, and *Absidia* sp. of which specific names were not identified, 19 strains of *Rhizopus* spp. including *Rhizopus cohnii*, *Rhizopus arrhizus*, and *Rhizopus oryzae*, 8 strains of *Circinella* spp., 1 strain of *Actinomucor* sp., 49 strains of *Aspergillus* spp., including *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus flavus* var. *columnaris*, *Aspergillus wentii*, *Aspergillus candidus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, and *Aspergillus foetidus*, 2 strains of *Cladosporium* spp. and 2 strains *Botryotrichum* spp., etc. total 159 kinds of filamentous molds were isolated and identified. There were many differences in numbers and distributions of filamentous molds from each Nuruk according to their collected region. *Absidia* spp. were most frequently isolated from every Nuruk sample. *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus candidus*, and *Rhizopus cohnii* showed even distribution. *Penicillium* sp. and *Mucor* sp. were not detected. *Actinomucor* sp., *Aspergillus foetidus*, *Botryotrichum* sp., and *Cladosporium* spp., which have not been reported by far, were found. Amylase activities, pH stability of amylase, and acid productivity of isolated strains were compared.

한국의 전통적 누룩은 오래전부터 쌀 약주와 탁주 제조에서 전분 분해효소 및 발효미생물 원료로 사용된 긴 역사를 지닌 미생물 유기체로서 소맥을 주원료로 하여 제조되어 왔으며 소맥의 분쇄정도에 따라 거친 것은 조곡, 고운것은 분곡으로, 계절에 따라 춘곡, 하곡, 절곡, 동곡으로 분류되고 있다(1). 제조방법은 증자과정을 거치지 않고 분쇄한 생소맥분에 수분을 약 30~40%로 가하고 원형판으로 성형하여 충분한 발효기간을 거친후 건조시키는 것으로서 이러한 과정중 세균, 효모, 곰팡이 등의 미생물이 착생, 번식하게 되고 이들은 주조시 전분 액화 및 당화, 알코올발효 등의 중요한 역할을 하게 된다. 즉, 술을 담글 때 누룩중에 번식한 미생물에 의해 생성된 amylase, protease 등의 효소작용으로 전분과 단백질은 당과 아미노산 등으로 분해되고, 효모에 의한 알코올 발효가 동시에 행해지는 병행 복합발효가 일어나는 것

이다(2, 3).

재래식 전통누룩중 amylase activity가 우수한 곰팡이와 알코올 발효성이 우수한 효모균주등은 증자하지 않는 생밀가루를 선호하여 착생, 번식되는 미생물들이기 때문에 생전분 발효성도 있으며 사상균의 효소작용 이외에  $\alpha$ -amylase의 활성이 높은 *Bacillus* sp. 등의 작용도 기대할 수 있고 젖산균과 *Rhizopus* sp. 등에 의한 유기산생성으로 맛과 향기 증진이 일어날 수 있으며 접합균류 세포벽 분해산물인 chitosan oligomer 등에 의한 면역부활성, 혈액중 cholesterol 저하능, 항암성, 항종양성, 항혈전성 등의 생리활성(4)은 식품으로서 뿐만 아니라 의약품으로의 기능도 고려할 수 있다. 그러나 누룩제조시 미생물이 자연적으로 착생되므로 유용한 균의 생육을 저해하거나 누룩의 변패등을 일으키고, 또는 mycotoxin을 생성하는 균의 존재가능성도 고려해야 할 것이므로 그에 대한 연구가 요구되고 있다.

누룩에 대한 연구는 koji의 개념이 도입된 개량식 누룩개발(5), 누룩에 착생된 미생물의 분포조사, 그리

**Key words:** Traditional Nuruk, filamentous mold, amylase activity, acid producing ability

\*Corresponding author

고 발효기간 중의 각종 유기산, 아미노산, 비타민 등의 성분 변화에 관한 내용(6, 10)이 주종을 이루었다. 그 중 재래식 누룩의 미생물에 관해 보고된 내용을 보면 일찌기 한(1) 등이 *Aspergillus* sp., *Rhizopus* sp., *Mucor* sp. 등에 관한 형태학적인 연구와 당화력의 조사가 있었고 이(11)도 균의 분리와 분류학적 연구동정을 행한 바 있다. 또한 이(12, 13)는 *Rhizopus* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. 등을 분리 보고하였으나 한정된 지역의 누룩을 사용하였고, 김(2)은 보다 넓게 시료를 수집하였으나 *Aspergillus* sp.에 국한된 보고였으며 김(2)은 *Aspergillus* sp.가, 김(14)은 *Rhizopus* sp.가 높은 빈도로 분리되었다고 보고 하였다. 그리고 이(6), 신(7) 등은 사상균 이외에 효모와 세균도 대상으로하여 *Rhizopus* sp., *Mucor* sp., *Absidia* sp. 등의 사상균 이외에 *Saccharomyces* sp., *Candida* sp., *Bacillus* sp. 등의 효모와 세균이 분리되었다고 보고하였다.

전통 재래식 누룩에 대한 연구보고는 단편적인 사항에 그치고 있으며 특히 사상균에 관한 보고는 서로 다른 경향을 나타내었다. 따라서 본 연구에서는 전국으로부터 재래식 누룩(자가제조와 장터에서 파는 소규모 제조)을 수집하고 여기에 착생된 전체적인 사상균을 분리, 동정하여 그 종합적 분포를 조사하였으며 분리, 동정된 균주의 amylase 활성과 산생성능을 비교하였다.

## 재료 및 방법

### 균주 분리원

전국에서 지역별 경인지역 2곳, 충청남북지역 6곳, 전라남북지역 2곳, 경상남북지역 2곳, 모두 12곳의 재래식 누룩을 일반가정에서 제조한 것과 장터에서 판매하는 소규모 제조의 것을 수집하여 본 실험의 시료로 사용하였다.

### 배지

일반적 분리를 위해 Malt extract agar 배지, Potato dextrose agar 배지, Czapek-Dox agar 배지를 사용하였고 *Rhizopus* sp., *Absidia* sp.와 같이 생육이 빨라 단일 colony의 분리가 어려운 경우는 사상균의 생육을 억제하는 효과를 지닌 Rose bengal agar 배지를 사용하였다(7, 9, 15, 16).

사용된 모든 배지에는 누룩중 세균의 발현을 억제하여 사상균의 분리를 용이하게 하기 위해 chloramphenicol을 100 ppm씩 첨가하였다.

### 균주분리

분쇄한 누룩 5g에 멸균수 45 ml를 가하여 20분간 교반, 현탁시킨후 상징액을 단계별로 희석하고 각 희석액으로 부터 평판도말법을 사용하여 독립된 콜로니를 분리하였다(17). 그리고 pH 지시약으로 bromocresol purple을 40 ppm 첨가한 Potato dextrose agar 배지를 사용하여 생육시 배지를 노란색으로 변화시키는 산생성이 우수한 균주를 분리, 선발하였다.

분리된 콜로니는 다시 평판배양을 한 후 관찰을 통해 순수분리된 것임을 확인하였으며 4°C에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

### 동정

분리된 균주의 동정은 Czapek-Dox agar 배지와 Malt extract agar 배지에 접종하여 colony의 형태적 특성을 관찰하고, Sabouraud's agar 배지(17)로 슬라이드 배양 한 후 Raper와 Fennell의 "The genus *Aspergillus*"(18), G. Smith의 "Industrial mycology"(19), Olgafassatiova의 "Moulds and filamentous fungi in technical microbiology"(15), Kulwant 등의 "An illustrated manual on identification of some seed-borne *Aspergillus*"(20), J.A. Von Arx의 "The genera of fungi sporulating in pure culture"(21), 그리고 Barnett 등의 "Illustrated genera of imperfect fungi"(22), O. P. Sharma의 "Textbook of fungi"(23) 참고로 동정하였다.

### Koji 제조

분리균주를 각각 5g의 좁쌀을 넣은 시험관에 접종하여 30°C에서 5일간 배양하고, 5 ml의 멸균수를 가한 후 교반시켜 포자현탁액을 만들었다. 그 현탁액 1 ml를 10g의 멸균된 wheat meal에 접종한 후 5 ml의 멸균수를 가했다. 상대습도를 맞추기 위해 두개의 크기가 다른 petri dish를 이용하여 가운데 작은 petri dish에 접종된 wheat meal을 넣고 주변의 큰 petri dish에 10 ml의 멸균수로 수분을 공급한 후, 30°C에서 5일간 배양하여 koji를 제조하였다(24, 25).

### 조효소액 제조

Koji 10g에 멸균수 100 ml를 가하고 30°C에서 5시간 교반시킨 다음 5000 rpm에서 10분간 원심분리 후 상징액을 취하여 이를 조효소액으로 이하의 실험에 사용하였다.

### $\alpha$ -amylase activity 측정

시험관 10개를 한 sample series로 하여 1~10개

까지의 시험관에 0.2M acetate 완충용액을 1 ml씩 분주하고 첫번째 시험관에 효소용액 1 ml를 가하여 pipette으로 잘 혼합한 후 그 혼합액 1 ml를 두번째 시험관으로 옮기고, 같은 방법으로 순차적으로 배수 희석하여 열번째 시험관에 가서는 혼합액 1 ml를 버렸다. 그 다음 2% starch solution을 1 ml씩 분주하고 그 series를 40°C 항온수조에 넣어 30분간 효소반응시켰다. 그 후 100°C에서 10분간 끓임으로써 반응을 중지시키고 수도불에서 식힌 후 얼음물에서 0.25 ml의 0.01N iodine 용액 (0.03N HCl 포함)을 각 시험관에 가하여 색변화를 관찰하였다. 반응액의 색이 red-brown인 것을 종말점으로 하였으며, yellow-colorless은  $\alpha$ -amylase activity가 없는 것을 표시하였다. 효소활성이 나타난 가장 높은 희석배수의 시험관의 효소활성을 1로 하여 희석된 배수를 곱하여 효소활성을 표시하였으며, 실험은 pH 3.5와 pH 5.5에서 각각 수행하였다.

#### Glucosylase activity 측정

효소용액과 완충용액의 양, 희석법과 기질, 반응조건 등은  $\alpha$ -amylase 활성측정의 경우와 동일하게 하였다. 효소반응이 끝난 후 10분간 끓여 반응을 중지시키고, 공기중에서 방냉 후 Fehling 용액 0.5 ml씩을 각 시험관에 첨가하고 100°C 항온수조에서 10분간 처리한 후 색변화를 관찰하였다(25).

반응액의 색이 orange-red blue인 것을 종말점으로 하였고, 색이 orange이고 빨간 침전물이 형성되는 것을 positive로 하고 Fehling 용액이 완전히 환원된 것으로 보았으며, 색이 blue인 것은 negative로 표시하고 Fehling 용액이 전혀 환원되지 않은 것으로 보아 glucosylase 활성이 없는 것으로 보았다. 실험은 pH 3.5와 pH 5.5에서 각각 수행하였다.

#### Acidity 측정

쌀 100 g을 12시간 침지시킨후 2시간 방치하여 수분을 빼고 60 mesh 이하로 갈아서 멸균수 150 ml, koji 10 g 그리고 *Saccharomyces sake*의 starter를  $10^7$  cells/ml의 농도가 되도록 첨가하여 담금하였다. 30°C에서 10일간 발효시킨 후 발효액을 원심분리하고 그 상정액 5 ml를 0.5% phenolphthalein 지시약 1 ml와 끓는 물 200 ml가 든 삼각 flask에 넣고 0.1N NaOH로 중화적정하는데 소요되는 0.1N NaOH의 ml 수를 산도로 표시하였다(16).

### 결과 및 고찰

Table 1. Number of molds in Nuruk according to collected area

Region	Sample	Number of molds
Chung-Cheong	A	$3.0 \times 10^8$ (Nuruk)
	B	$3.2 \times 10^9$ (Nuruk)
	C	$2.1 \times 10^7$ (Nuruk)
	D	$2.2 \times 10^7$ (Nuruk)
	E	$3.0 \times 10^9$ (Nuruk)
	F	$1.6 \times 10^7$ (Nuruk)
Kyung-In	H	$1.2 \times 10^7$ (Nuruk)
	I	$1.6 \times 10^7$ (Nuruk)
Cheol-La	J	$2.0 \times 10^8$ (Nuruk)
	K	$1.6 \times 10^7$ (Nuruk)
Kyung-Sang	L	$3.8 \times 10^7$ (Nuruk)
	M	$1.6 \times 10^7$ (Nuruk)

#### 분리 및 동정

12개의 재래식 누룩시료로부터 총 159개의 균주를 분리 동정하였다.

누룩의 수집지역, 시료당 착생되어 있는 균주의 수, 그리고 각 균주 분리 빈도는 Table 1, 2와 같고 분리균주의 동정결과는 Table 3, 4에 나타내었다.

#### *Absidia* sp.

균사에 격벽이 발견되지 않으며 가근(rhizoid), 기는 균사(stolon)이 존재하고, 특히 apophysis가 잘 발달하였으며 sporangiophore는 기는 균사에서 뻗고, sporangium은 *Rhizopus* sp.의 경우보다 크기가 비교적 작으며 서양배의 모양을 하는 등의 특징들이 발견되는 균주를 *Absidia* sp.로 1차 동정하였다.

분류된 균주중 콜로니가 밝은 회색을 띠며 2 cm 이상의 높이로 자라고 sporangiophore가 sympodial branch 혹은 whorl-like branch를 이루는 균주를 *Absidia corymbifera*로 동정하였고 *Absidia corymbifera* 유사한 형태적 특징을 가지나 apophysis 밑에 존재하는 균주를 *Absidia ramosa*로 동정하였다(Table 5).

#### *Rhizopus* sp.

균사에 격벽이 발견되지 않으며 가근, 기는 균사, apophysis가 존재하고, sporangiophore가 가근으로부터 직접 뻗으며 sporangium은 구형, columella는 둥근 형태이거나 접시모양인 특징이 발견되는 균주를 *Rhizopus* sp.로 1차 동정하였다.

1차 동정된 균주중에서 콜로니는 갈색을 띠며 sporangiophore가 가근 이외에 팽배된 sporangiophore

Table 2. Ratio of molds isolated from Nuruk

Region	Sample	Abs. sp.	Rhi. sp.	Asp. sp.	Cir. sp.	Act. sp.	Cla. sp.	Bot. sp.
Chung-Cheong	A	60%	13%	27%	—	—	—	—
	B	50%	19%	29%	12%	—	—	—
	C	38%	—	52%	—	—	—	10%
	D	18%	46%	27%	—	9%	—	—
	E	53%	7%	13%	27%	—	—	—
	F	62%	19%	19%	—	—	—	—
Kyung-In	H	25%	17%	41%	—	—	17%	—
	I	75%	—	—	25%	—	—	—
Cheol-La	J	40%	10%	50%	—	—	—	—
	K	62%	13%	25%	—	—	—	—
Kyung-Sang	L	68%	—	32%	—	—	—	—
	ML	25%	12%	63%	—	—	—	—

Abs: *Absidia* Rhi: *Rhizopus* Asp: *Aspergillus* Cir: *Circinella*  
Act: *Actinomucor* Cla: *Cladosporium* Bot: *Botryotrichum*

에서도 형성되는 균주를 *Rhizopus arrhizus*와 유사하지만 콜로니가 짙은 갈색을 띠며 sporangium의 크기가 비교적 작은 균주를 *Rhizopus cohnii*로 동정하였으며, 콜로니가 희색을 띠고 빠른 성장을 통해 2 cm 이상으로 자라며 가근으로 부터 여러개의 sporangiophore가 형성되는 균주를 *Rhizopus oryzae*로 동정하였다(Table 6).

#### *Circinella* sp.

가근, 기는 균사, apophysis가 발견되지 않으며 sporangium이 구형이고 sporangiophore가 굽은 형태를 나타내는 특징이 있어 *Circinella* sp.로 동정하였다.

#### *Actinomucor* sp.

기는 균사, apophysis가 발견되지 않으며 sporangiophore의 선단부에서는 커다란 sporangium이 형성되고 중간부위에서는 여러개의 비교적 작은 sporangium이 형성되는 특징이 발견되므로 *Actinomucor* sp.로 동정하였다. *Circinella* sp.와 *Actinomucor* sp.의 형태적 특징은 Table 7과 같다.

#### *Aspergillus* sp.

균사에 격벽이 존재하며 분생자가 정낭위의 phialide에 착생하는 phialospore이고 foot cell이 존재하는 균주를 *Aspergillus* sp.로 1차 동정하였고 동정된 균주는 우선 콜로니가 녹색과 노란색계통의 색을 띠는 균주군과 콜로니가 그 이외의 색을 띠는 균주군으로 크게 분류하였다.

콜로니의 색이 녹색과 노란색 계통의 색을 띠는 균주군 콜로니가 녹색을 띠며 conidial head는 방사형, phialide는 double 혹은 single layer인 균주를 *Aspergillus oryzae*로 동정하였고 *Aspergillus oryzae*와 유사한 형태적 특징을 나타내지만 콜로니의 색이 10일 이상의 배양후에도 갈색을 띠지 않는 균을 *Aspergillus flavus*로 동정하였으며, *Aspergillus flavus*와 유사하지만 conidial head가 원주상이고 phialide는 single layer이며 정낭이 비교적 작은 균주를 *Aspergillus flavus* var. *columnaris*로 동정하였다. 또한 콜로니가 청녹색을 띠고 매우 낮게 생육하며 conidial head는 원주상이고 phialide는 single layer인 균주를 *Aspergillus fumigatus*로 동정 하였다.

콜로니의 색이 녹색과 노란색 계통 이외의 색을 띠는 균주군 콜로니가 흰색을 띠며 conidial head는 방사형이고 phialide는 double layer인 균주를 *Aspergillus candidus*로 동정하였고, 콜로니가 양모형태의 texture를 가지고 흰색과 노란색을 띠며 conidial head는 방사형이고 분생자는 타원형인 균주를 *Aspergillus wentii*로 동정하였다. 또한 콜로니가 검은색을 띠고 conidial head는 비교적 큰 방사형이며 phialide는 double layer인 균주를 *Aspergillus niger*로 동정하였고, 형태적 특징이 *Aspergillus niger*와 유사하지만 콜로니의 밀집정도가 비교적 희박하고 배지에 노란색을 띠게 하는 균주를 *Aspergillus foetidus*로 동정하였다. *Aspergillus* sp.의 형태학적 특성은 Table 8에 나타내었다.

**Table 3. The lists of isolated molds from Korean traditional Nuruk**

Nuruk sample A total: 15 strains	
A01 (7)	<i>Absidia</i> sp.
A02 (2)	<i>Rhizopus cohnii</i>
A03 (2)	<i>Absidia</i> sp.
A04 (2)	<i>Aspergillus flavus</i>
A05 (1)	<i>Aspergillus fumigatus</i>
A06 (1)	<i>Aspergillus niger</i>
Nuruk sample B total: 16 strains	
B01 (1)	<i>Rhizopus cohnii</i>
B02 (2)	<i>Rhizopus cohnii</i>
B03 (1)	<i>Aspergillus oryzae</i>
B04 (2)	<i>Circinella</i> sp.
B05 (5)	<i>Absidia corymbifera</i>
B06 (2)	<i>Aspergillus oryzae</i>
B07 (1)	<i>Absidia</i> sp.
B08 (2)	<i>Absidia corymbifera</i>
Nuruk sample C total: 21 strains	
C01 (6)	<i>Aspergillus candidus</i>
C02 (1)	<i>Aspergillus flavus</i>
C03 (1)	<i>Aspergillus flavus</i> var. <i>columnaris</i>
C04 (1)	<i>Aspergillus flavus</i> var. <i>columnaris</i>
C05 (2)	<i>Aspergillus wentii</i>
C06 (3)	<i>Absidia</i> sp.
C07 (1)	<i>Absidia</i> sp.
C08 (2)	<i>Absidia</i> sp.
C09 (2)	<i>Botryotrichum</i> sp.
C010 (2)	<i>Absidia ramosa</i>
Nuruk sample D total: 11 strains	
D01 (3)	<i>Aspergillus flavus</i> var. <i>columnaris</i>
D02 (3)	<i>Rhizopus arrhizus</i>
D03 (2)	<i>Absidia</i> sp.
D04 (1)	<i>Actinomucor</i> sp.
D05 (1)	<i>Rhizopus cohnii</i>
D06 (1)	<i>Rhizopus oryzae</i>
Nuruk sample E total: 15 strains	
E01 (1)	<i>Rhizopus cohnii</i>
E02 (2)	<i>Absidia corymbifera</i>
E03 (1)	<i>Absidia ramosa</i>
E04 (2)	<i>Aspergillus wentii</i>
E05 (4)	<i>Absidia</i> sp.
E06 (1)	<i>Absidia corymbifera</i>
E07 (4)	<i>Circinella</i> sp.
Nuruk sample F total: 16 strains	
F01 (3)	<i>Absidia corymbifera</i>
F02 (2)	<i>Aspergillus oryzae</i>
F03 (1)	<i>Absidia</i> sp.
F04 (2)	<i>Rhizopus arrhizus</i>

**Table 3. Continued**

Nuruk sample F total: 16 strains (continue)	
F05 (1)	<i>Aspergillus niger</i>
F06 (1)	<i>Absidia ramosa</i>
F07 (1)	<i>Rhizopus oryzae</i>
F08 (1)	<i>Absidia</i> sp.
F09 (1)	<i>Absidia ramosa</i>
F10 (2)	<i>Absidia corymbifera</i>
F11 (1)	<i>Absidia</i> sp.
Nuruk sample H total: 12 strains	
H01 (2)	<i>Absidia corymbifera</i>
H02 (2)	<i>Rhizopus cohnii</i>
H03 (1)	<i>Absidia</i> sp.
H04 (1)	<i>Aspergillus niger</i>
H05 (2)	<i>Cladosporium</i> sp.
H06 (4)	<i>Aspergillus candidus</i>
Nuruk sample I total: 8 strains	
I01 (3)	<i>Absidia</i> sp.
I02 (2)	<i>Circinella</i> sp.
I03 (2)	<i>Absidia ramosa</i>
I04 (1)	<i>Absidia corymbifera</i>
Nuruk sample J total: 10 strains	
J01 (1)	<i>Absidia</i> sp.
J02 (1)	<i>Rhizopus cohnii</i>
J03 (2)	<i>Aspergillus candidus</i>
J04 (1)	<i>Aspergillus oryzae</i>
J05 (2)	<i>Absidia</i> sp.
J06 (1)	<i>Absidia corymbifera</i>
J07 (2)	<i>Aspergillus foetidus</i>
Nuruk sample K total: 8 strains	
K01 (4)	<i>Absidia corymbifera</i>
K02 (1)	<i>Rhizopus cohnii</i>
K03 (2)	<i>Aspergillus oryzae</i>
K04 (1)	<i>Absidia</i> sp.
Nuruk sample L total: 19 strains	
L01 (6)	<i>Absidia</i> sp.
L02 (2)	<i>Absidia corymbifera</i>
L03 (5)	<i>Absidia</i> sp.
L04 (2)	<i>Aspergillus fumigatus</i>
L05 (1)	<i>Aspergillus oryzae</i>
L06 (3)	<i>Aspergillus candius</i>
Nuruk sample M total: 8 strains	
M01 (2)	<i>Aspergillus candius</i>
M02 (1)	<i>Absidia</i> sp.
M03 (1)	<i>Absidia</i> sp.
M04 (1)	<i>Aspergillus oryzae</i>
M05 (1)	<i>Rhizopus cohnii</i>
M06 (2)	<i>Aspergillus oryzae</i>

Table 4. Number of molds isolated from Nuruk

Identified name	Chung-Cheong						Kyung-In		Cheol-La		Kyung-Sang		Total numbers
	A	B	C	D	E	F	H	I	J	K	L	M	
<i>Asp. foavus</i>	2	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3
<i>Asp. foavus</i> var. <i>columnaris</i>	—	—	2	3	—	—	—	—	—	—	—	—	5
<i>Asp. oryzae</i>	—	3	—	—	—	2	—	—	1	2	1	3	12
<i>Asp. wentii</i>	—	—	2	—	2	—	—	—	—	—	—	—	4
<i>Asp. candidus</i>	1	—	6	—	—	—	4	—	2	—	3	2	18
<i>Asp. fumigatus</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	—	2
<i>Asp. niger</i>	1	—	—	—	—	1	1	—	—	—	—	—	3
<i>Asp. foetidus</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	2	—	—	—	2
<i>Rhi. cohnii</i>	2	3	—	1	1	—	2	—	1	1	—	1	12
<i>Rhi. arrhizus</i>	—	—	—	3	—	2	—	—	—	—	—	—	5
<i>Rhi. oryzae</i>	—	—	—	1	—	1	—	—	—	—	—	—	2
<i>Abs. corymbifera</i>	—	7	—	—	3	5	2	1	1	4	2	—	25
<i>Abs. ramosa</i>	—	—	2	—	1	2	—	2	—	—	—	—	7
<i>Abs. sp.</i>	9	1	6	2	4	3	1	3	3	1	11	2	46
<i>Actinomucor</i> sp.	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	1
<i>Circinella</i> sp.	—	2	—	—	4	—	—	2	—	—	—	—	8
<i>Cladosporium</i> sp.	—	—	—	—	—	—	2	—	—	—	—	—	2
<i>Botryotrichum</i> sp.	—	—	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2

Table 5. Morphological characteristics of *Absidia* spp.

Identified name		<i>Absidia ramosa</i>	<i>Absidia corymbifera</i>
Colony	Diameter	6~7 cm	6~7 cm
	Texture	cottony	cottony
Front color	Reverse color	grey white	bright grey
	Reverse color	colorless	colorless
Sporangium	Shape	pyriform	pyriform
	Color	hyaline or grey	grey
	Size (μm)	30~40	40~70
Columella	Shape	hemispherical	hemispherical
	Size (μm)	30~40	40~50
Sporangiospore	Shape	cylindrical	cylindrical
	Size (μm)	2~4×3~5	2~4×3~5

***Botryotrichum* sp.**

균사에 격벽이 존재하고 conidiophore에 포도상의 Aleuriospore와 연쇄상의 분생자를 형성하며 연녹색의 낮은 콜로니를 보이는 특징이 있는 균주를 *Botryotrichum* sp.로 동정하였다.

***Cladosporium* sp.**

균사에 격벽이 존재하고 분지된 연쇄상의 사출포자를 형성하며 녹갈색의 콜로니를 보이는 특징이 있는 균주를 *Cladosporium* sp.로 동정하였다.

*Botryotrichum* sp.와 *Cladosporium* sp.의 형태학적

특성은 Table 9와 같다.

이상의 결과에서와 같이 *Absidia* spp.는 *Absidia corymbifera* 25균주, *Absidia ramosa* 7균주, 종명은 확인되지 않은 *Absidia* sp. 46균주로 총 78균주가 분리되었고 *Rhizopus* spp.는 *Rhizopus cohnii* 12균주, *Rhizopus arrhizus* 5균주, *Rhizopus oryzae* 2균주로 총 19균주가 분리되었으며 *Circinella* spp.가 8균주, *Actinomucor* sp.가 1균주씩 각각 분리되었다. 그리고 *Aspergillus* sp., *Aspergillus oryzae* 12균주, *Aspergillus flavus* 3균주, *Aspergillus flavus* var. *columnaris* 5균주, *Aspergillus wentii* 4균주, *Aspergillus candidus* 18

**Table 6. Morphological characteristics of *Rhizopus* sp.**

Identified name		<i>Rhi. arrhizus</i>	<i>Rhi. cohnii</i>	<i>Rhi. oryzae</i>
Colony	Diameter(cm)	4~5	3~4	6~7
	Texture	cottony	cottony	cottony
	Front color	brown	black brown	grey
	Reverse color	bright brown	dark brown	colorless
Sporangium	Shape	globose	globose	globose
	Color	dark brown	black	black
	Size	70~130 $\mu$ m	50~90 $\mu$ m	100~200 $\mu$ m
Columella	Shape	hemispherical	hemispherical	hemispherical
	Size	40~100 $\mu$ m	40~70 $\mu$ m	90~150 $\mu$ m
Sporangiospore	Shape	globose	globose	irregularly oval
	Size	4~10 $\mu$ m	4~10 $\mu$ m	5~15 $\mu$ m

**Table 7. Morphological characteristics of *Circinella* sp. and *Actinomucor* sp.**

Identified name		<i>Circinella</i> sp.	<i>Actinomucor</i> sp.
Colony	Diameter	5~6 cm	5~6 cm
	Texture Front color Reverse color	cottony brown white colorless	cottony grey white colorless
Sporangium	Shape Color	globose dark brown	globose grey
	Size ( $\mu$ m)	50~80	50~100 $\times$ 20~50
Columella	Shape Size ( $\mu$ m)	pyriform 30~50	ovoid 30~60 $\times$ 10~20
Sporangiospore	Shape Size ( $\mu$ m)	subglobose 3~7	globose 4~6

**Table 8. Morphological characteristics of *Aspergillus* spp.**

Identified name	Dimeter	Texture	Front color	Reverse color
<i>Asp. oryzae</i>	4~5 cm	floccose	brown green	creamy yellow
<i>Asp. flavus</i>	4~5 cm	floccose	green yellow	creamy yellow
<i>Asp. flavus</i> var. <i>columaris</i>	3~4 cm	velvet	green yellow	creamy green
<i>Asp. wentii</i>	3~4 cm	lanose	white yellow	dark brown
<i>Asp. candidus</i>	2~3 cm	velvet	white	creamy green
<i>Asp. fumigatus</i>	3~4 cm	velvet	blue green	bright green
<i>Asp. niger</i>	3~4 cm	floccose	black	creamy yellow
<i>Asp. foetidus</i>	3~4 cm	floccose	black	yellow

**Table 8. Continued**

Identified name	Conidial head		Stipe		Conidium	
	Shape	Size*	Marking	Length	Shape	Size ( $\mu$ m)
<i>Asp. oryzae</i>	radiate	200~400	rough	long	globose	3~5
<i>Asp. flavus</i>	radiate	150~400	rough	long	globose	3~5
<i>Asp. flavus</i> var. <i>columaris</i>	columnar	80~120	rough	short	globose	2~4
<i>Asp. wentii</i>	radiate	300~500	smooth	long	ellipsoidal	4~6
<i>Asp. candidus</i>	radiate	100~200	smooth	long	globose	2~4
<i>Asp. fumigatus</i>	columnar	50~100	smooth	short	globose	2~3
<i>Asp. niger</i>	radiate	300~500	smooth	long	globose	4~5
<i>Asp. foetidus</i>	radiate	200~300	smooth	long	globose	4~5

Table 8. Continued

Identified name	Vesicle			Phialide
	Shape	Fertile area	Size ( $\mu\text{m}$ )	
<i>Asp. oryzae</i>	globose	upper 2/3	30~50	double, single
<i>Asp. flavus</i>	globose	upper 2/3	40~50	double, single
<i>Asp. flavus</i> var. <i>columaris</i>	globose	upper half	10~20	single
<i>Asp. wentii</i>	globose	entire surface	40~60	double
<i>Asp. candidus</i>	globose	entire surface	20~30	double
<i>Asp. fumigatus</i>	club-shaped	upper half	10~20	single
<i>Asp. niger</i>	globose	entire surface	30~60	double
<i>Asp. foetidus</i>	globose	entire surface	30~50	double

Table 9. Morphological characteristics of *Botryotrichum* sp. and *Cladosporium* sp.

Identified name	Diameter	Texture	Front color	Reverse color	Conidia	
					Shape	Size ( $\mu\text{m}$ )
<i>Botryotrichum</i> sp.	3~4 cm	velvet	yellow-grey	brown	ellipsoidal	1~2×3~4
<i>Cladosporium</i> sp.	3~4 cm	floccose	dark-green	olive-green	ellipsoidal	2~3×4~6

균주, *Aspergillus fumigatus* 2균주, *Aspergillus niger* 3균주, *Aspergillus foetidus* 2균주로 총 48균주가 분리되었고 *Cladosporium* sp.가 2균주, *Botryotrichum* sp.가 2균주씩 각각 분리되었다.

#### 분리된 균주의 Amylolytic 효소활성비교

분리균주의 amylase 활성측정 결과  $\alpha$ -amylase는 *Rhizopus* sp.와 *Aspergillus* sp.가 비교적 높은 효소활성을 나타내었고 pH 3.5에서도 안정성을 보였으며, glucoamylase의 경우 *Rhizopus* sp.가 *Aspergillus* sp.보다 대체로 더 높은 효소활성을 나타내었고 pH 3.5에서는 pH 5.5보다 효소활성이 조금 낮게 나타났다.

$\alpha$ -amylase 활성이 높은 우수균주로는 A06(*Aspergillus niger*), J04(*Aspergillus oryzae*)가 선발되었고, glucoamylase의 경우 D06(*Rhizopus oryzae*)가 월등히 높은 효소활성을 나타내었다. 또한 이들 균주와 함께  $\alpha$ -amylase 활성과 glucoamylase 활성이 비교적 높고 pH 3.5에서도 안정성을 보이는 F07(*Rhizopus oryzae*), J07(*Aspergillus foetidus*), F05(*Aspergillus niger*) 등에서와 같이 실제 양조 발효중의 조건에서도 활성을 나타낼 수 있는 균주가 선발되었다(Table 10).

#### 선발된 균주의 산생성능력

Bromocresol purple이 함유된 Potato dextrose agar 배지의 색을 노랗게 변화시켜서 일차선발된 균주와 위에서 기술한 amylase의 활성이 우수한 균주들로 실험한 결과 F05(*Aspergillus niger*)가 산생성능

이 가장 우수했고 J04(*Aspergillus oryzae*), A06(*Aspergillus niger*), J07(*Aspergillus foetidus*) 등이 비교적 높은 수치를 보였다(Table 11).

#### 분리된 곰팡이의 분포

동정된 곰팡이의 분포는 *Absidia* sp.가 모든 지역의 누룩시료로부터 가장 높은 빈도로 분리되었고 *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus candidus*, *Rhizopus cohnii*가 고른 분포를 보였다. 이러한 결과는 *Absidia* sp.가 높은 빈도로 분리되었다는 신 등(7)의 보고와 일치하지만 *Aspergillus candidus*와 *Rhizopus cohnii*가 고른 분포를 보였다는 점과, 특히 *Penicillium* sp.와 *Mucor* sp.가 분포되지 않았으며, 그리고 지금까지 누룩으로부터 보고된 바 없는 *Actinomucor* sp., *Aspergillus foetidus*, *Botryotrichum* sp., *Cladosporium* sp. 등이 분리되었다. 또한 amylases의 효소활성과 산생성능이 우수하고 발효시의 산성조건에서도 효소활성을 잃지 않는 균주의 선발을 통해 한국인의 기호도에 맞는 산미가 강한 전통주의 개발에 이용될 수 있다고 생각된다. 그러나 분리균중 aflatoxin을 생성하는 것으로 알려진 *Aspergillus flavus* 등의 바람직하지 못한 균주들이 발견되었으며 효모와 혐기성세균 등의 역할에 관한 종합적인 연구가 더욱 요청되므로 고품질의 약주제조를 위해서는 재래식 누룩중의 중요미생물에 관한 보다 체계적인 연구가 필요하다고 생각된다.

수집한 모든지역의 누룩에서 *Absidia* sp. 78주, *Aspergillus* sp. 49균주, *Rhizopus* sp. 19균주가 분리되



**Table 10. Amylase activity of molds isolated from Nuruk**

Isolated number	Identified name	Glucoamylase activity		α-amylase activity	
		pH 3.5	pH 5.5	pH 3.5	pH 5.5
A03	<i>Absidia</i> sp.	40	80	8	8
B07	<i>Absidia</i> sp.	40	80	8	8
E05	<i>Absidia</i> sp.	40	40	8	8
C10	<i>Absidia ramosa</i>	40	80	8	8
I03	<i>Absidia ramosa</i>	40	40	—	8
B05	<i>Absidia corymbifera</i>	40	80	8	16
K01	<i>Absidia corymbifera</i>	80	160	8	8
B01	<i>Rhizopus cohnii</i>	160	320	8	16
B02	<i>Rhizopus cohnii</i>	160	640	8	8
D05	<i>Rhizopus cohnii</i>	160	320	16	16
K02	<i>Rhizopus cohnii</i>	80	320	16	16
M05	<i>Rhizopus cohnii</i>	160	160	16	16
D02	<i>Rhizopus arrhizup</i>	80	320	8	8
F04	<i>Rhizopus arrhizup</i>	320	320	16	16
D06	<i>Rhizopus oryzae</i>	5120	5120	16	16
F07	<i>Rhizopus oryzae</i>	1280	2560	16	16
B03	<i>Aspergillus oryzae</i>	80	160	8	16
B06	<i>Aspergillus oryzae</i>	160	160	16	16
F02	<i>Aspergillus oryzae</i>	160	80	8	8
J04	<i>Aspergillus oryzae</i>	160	160	16	32
M04	<i>Aspergillus oryzae</i>	40	80	8	8
C05	<i>Aspergillus wentii</i>	40	40	8	8
E04	<i>Aspergillus wentii</i>	80	160	—	16
J07	<i>Aspergillus foetidus</i>	1280	640	16	8
A06	<i>Aspergillus niger</i>	640	1280	32	32
F05	<i>Aspergillus niger</i>	1280	1280	16	16
C02	<i>Aspergillus flavus</i>	80	160	16	8
C04	<i>Aspergillus flavus</i> var. <i>columnaris</i>	90	80	16	16
L04	<i>Aspergillus fumigatus</i>	80	80	8	8
H06	<i>Aspergillus candidus</i>	160	320	8	16

**Table 11. Acidity and pH of the culture broth which is cultivated 10 days**

Isolate number	Identified name	Acidity	pH
B06	<i>Aspergillus oryzae</i>	7.1	4.38
M04	<i>Aspergillus oryzae</i>	6.2	4.58
J04	<i>Aspergillus oryzae</i>	6.3	4.47
C05	<i>Aspergillus wentii</i>	4.8	4.75
C03	<i>Aspergillus flavus</i> var. <i>columnaris</i>	4.9	4.50
C04	<i>Aspergillus flavus</i> var. <i>columnaris</i>	4.3	4.76
A06	<i>Aspergillus foetidus</i>	6.9	4.39
F05	<i>Aspergillus niger</i>	7.4	3.77
J07	<i>Aspergillus niger</i>	6.5	3.66
D06	<i>Rhizopus oryzae</i>	4.2	4.26
F07	<i>Rhizopus oryzae</i>	4.4	4.41

었으므로 우리나라 누룩곰팡이는 접합균류에 속하는 *Absidia*, *Rhizopus*가 주요 미생물임을 알 수 있었다. 이들의 amyolytic enzyme으로 전분의 액화 당화가 진행됨을 확인하였다.

**요 약**

전국에서 재래식 누룩 12개를 지역별로 수집하여 사상균을 분리, 동정한 결과 *Absidia* sp.가 *Absidia corymbifera*, *Absidia ramosa*, 종명은 확인되지 않은 *Absidia* spp. 등 총 78균주, *Rhizopus* spp.가 *Rhizopus cohnii*, *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus oryzae* 등 19균주, *Circinella* spp.가 8균주, *Actinomucor* sp.가 1균주, *Aspergillus* spp.가 *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus flavus* var. *columnaris*, *Aspergillus*

*wentii*, *Aspergillus candidus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus foetidus* 등 49균주, *Cladosporium* spp.가 2균주, *Botryotrichum* spp.가 2균주, 따라서 총 159균주가 분리되었으며 수집지역과 누룩 시료에 따라 착생된 사상균의 수와 분포는 많은 차이를 보였다.

사상균의 분포는 *Absidia* spp.가 모든지역의 누룩 시료로 부터 가장높은 빈도로 분리되었고 *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus candidus*, *Rhizopus cohnii*가 비교적 고른분포를 보였으며 *Penicillium* sp.와 *Mucor* sp.는 분리되지 않았고 지금까지 보고된 바 없는 *Actinomyces* sp., *Aspergillus foetidus*, *Botryotrichum* sp., *Cladosporium* sp.가 분리되었다.

또한 분리균주의 amylase 활성과 pH 안정성 그리고 산생성능을 비교한 결과, A06(*Aspergillus niger*), F05(*Aspergillus niger*), J04(*Aspergillus oryzae*), J07(*Aspergillus foetidus*), D06(*Rhizopus oryzae*), F07(*Rhizopus oryzae*) 등이 우수하였다.

### 참고문헌

1. 한용석, 박병득. 1957. 간장제조에 관한 연구(제 1보), 메주 및 곡자 중의 *Asp. oryzae*에 대한 연구. 중앙공업연구소보고 7: 51-55.
2. 김왕준. 1981. 재래식 누룩으로 부터 사상균의 분리 및 동정. 동국대학교 석사학위논문.
3. Oyashiki, H. and A. Obayashi. 1989. Evaluation of koji prepared with various molds for Mirin-making. *J. Ferment. Bioeng.* 67: 163-168.
4. Kendra, D.F. and L.A. Hadwiger. 1984. Characterization of the smallest chitosan oligomer that is maximally antifungal to *Fusarium solani* and elicits pisatin formation in *Pisum sativum*. *Exp. Mycol.* 8: 276-281.
5. 정호권. 1970. 곡자의 개량에 관한 연구(제 1보), 개량곡자의 제조 및 그 능력. 한국식품과학회지 2: 88-92.
6. 이주식, 이태우. 1970. 탁주의 Microflora에 관한 연구. 한국미생물학회지 8: 116-133.
7. 신용두, 조덕현. 1970. 탁주발효에 있어서 발효미생물군의 변동에 대하여. 한국미생물학회지 8: 53-64.
8. 정기택, 유대식. 1971. 고구마 전분질원료를 이용한 주류제조에 관한 연구. 한국미생물학회지 9: 103-120.
9. 조용학, 성낙계, 정덕화, 윤한대. 1979. 쌀막걸리의 미생물학적 연구(제 1보), 분리균주 M-80의 쌀막걸리 제국용으로서의 이용성. 한국산업미생물학회지 7: 217-223.
10. 정덕화, 성낙계. 1980. 쌀막걸리의 미생물학적 연구(제 2보), 쌀막걸리 제국용 핵산분해효소 및 핵산 관련물질. 한국산업미생물학회지 8: 1-8.
11. 이배함, 김상재, 이호원. 1968. 한국산 *Aspergillus*에 대한 분류학적 연구. 한국미생물학회지 6: 6-11.
12. 이두영. 1967. 한국곡자의 발효생산력에 관한 연구(제 1보), 곡자중 함유사상균의 분리와 그 성상. 한국미생물학회지 5: 51-54.
13. 이두영. 1969. 한국곡자의 발효생산력에 관한 연구(제 2보), 증자소맥을 재료로 한 곡자의 제조에 대하여. 한국미생물학회지 7: 41-44.
14. 김상재. 1971. 한국산 *Aspergilli*에 관한 분류학적 연구. 한국미생물학회지 9: 1-26.
15. 김철우. 1989. 소맥 및 누룩중의 곰팡이의 동정과 그 amylase 활성. 동국대학교 석사학위논문.
16. Olgafassatiova. 1986. Moulds and filamentous fungi in technical microbiology, SNTL Pub., Prague.
17. 성찬용. 1992. 생전분 분해성 *Rhizopus* sp. cy-7 koji를 이용한 전통약주제조. 서울대학교 석사학위논문.
18. Harold, J.B. Microbiological applications 5th. ed., Wm. C. Brown Pub.
19. Raper, K.B. and D.I. Fennell. 1973. The genus *Aspergillus*, Krieger Pub. Co., New York.
20. Smith, G. 1954. Industrial mycolgy 4th ed., Edward Arnold Pub. Ltd., London.
21. Kulwant, S., Jens, C.F., Ulf, T. and S.B. Mathur. 1991. An illustrated manual on identification of some seed-borne *Aspergilli*, *Fusaria*, *Penicillia* and their mycotoxins, Danish Government Institute of Seed Pathology, Denmark.
22. Von Arx, J.A. 1981. The genera of fungi sporulating in pure culture, J. Cramer Pub.
23. Barnett, H.L. and B.B. Hunter. 1972. Illustrated genera of imperfect fungi. Pp. 78-91. 3rd. ed., Burgess Pub. Co.
24. Sharma, O.P. 1989. Textbook of fungi. Pp. 113-143. Tata McGraw-Hill Co. Ltd., New Delhi.
25. Ono, K., Shigeta, S. and S. Oka. 1988. Effective purification of glucoamylase in Koji, a solid culture of *Aspergillus oryzae* on steamed rice, by affinity chromatography using an immobilized acarbose (BAY g-5421). *Agric. Biol. Chem.* 52: 1707-1714.
26. Oyashiki, H. and M. Uchida. 1987. Mirin-making using long life Koji with low water content. *J. Ferment. Technol.* 65: 643-649.
27. 유주현, 양한철, 정동훈, 양용. 1975. 식품공학실험 II. Pp. 472-474. 탐구당.

(Received 20 July 1995)