

## 쌀 입국 제조시 *Rhizopus* sp. ZB9의 배양 조건이 프로테아제 생성에 미치는 영향

†소 명 환 · 이 영 숙\*

부천대학 식품영양학과, \*집바이오

### Effects of Culture Conditions of *Rhizopus* sp. ZB9 on the Production of Protease during Preparation of Rice Koji

†Myung-Hwan So and Young-Sook Lee\*

Dept. of Food and Nutrition, Bucheon University, Bucheon 420-735, Korea

\*Zymbio Institute, Seosan 356-861, Korea

#### Abstract

This study was conducted to determine the influence of culture conditions such as temperature, time, water content, koji-thickness, and agitation on the production of protease by *Rhizopus* sp. ZB9, isolated from Korean *Nuruk*, during the preparation of rice koji, which is used in brewing the Korean rice wines, *Takju* and *Yakju*. Rice koji was made under different culture conditions, and the proteolytic activity of each koji was tested. The temperature range suitable for the production of protease was 28~32°C. Based on the protease and color, 60 hours of cultivation at 28°C was shown to produce optimum results. The production of protease increased in proportion to the increase in water content of steamed rice from 25% to 35%. An increase in koji-thickness induced no adverse effects on the production of protease, and agitation during cultivation showed beneficial effects.

Key words: *Rhizopus* sp., rice koji, koji, culture conditions, protease.

#### 서 론

쌀 입국은 증자한 쌀에 곰팡이를 인위적으로 접종한 후 배양한 것으로 탁주, 약주 및 청주의 양조에 이용되는 대표적인 발효제이다. 곰팡이에 의하여 생성된 아밀라아제와 프로테아제를 함유하고 있어서 원료 중의 전분과 단백질을 발효성 당과 아미노산으로 전환하는 것이 주된 역할이다.

전통적인 탁주와 약주의 제조에서는 누룩이 유일한 발효제로 사용되었으나, 1938년에 *Aspergillus kawachii* 균이 일본에서 도입되어 입국의 형태로 탁주 및 약주의 제조에 이용되어 오늘에 이르고 있다(Rha KY 1989). *Aspergillus kawachii*는 1927년경 일본의 가고시마에서 흑국균인 *Aspergillus awamori*

의 백색변이주로 Kawachi(河内) 씨에 의하여 처음으로 발견되었는데 포자의 색이 희고, 구연산, 당화아밀라아제, 펙틴분해효소 등을 생산하는 특성이 있어 일본에서는 고구마 소주 제조시의 코오지 균으로 쓰이고 있다(北原 & 久留 1949).

최근에 탁주의 국내 소비량뿐만 아니라 일본으로의 수출량도 급격히 늘어나고 있는 시점에 우리의 탁주제조 방법이 한국적이지 못하다는 지적이 강력히 제기되고 있다(박록담 2009). 전통적인 탁주와 약주의 고유한 발효제는 누룩인데, 일본에서 개발한 곰팡이로서 우리의 전통술을 만들어서야 되겠느냐는 것이다. 이 문제를 해결하기 위하여 우리의 누룩에서 우수한 곰팡이를 분리하여 탁주와 약주의 발효제 제조에 사용하여야 한다는 방안도 새롭게 제기되고 있다(김종실 2009).

† Corresponding author: Myung-Hwan So, Dept. of Food and Nutrition, Bucheon University, 424 Simgok-dong, Wonmi-gu, Bucheon-si, Gyeonggi-do 420-735, Korea. Tel: +82-32-610-3442, Fax: +82-32-610-3205, E-mail: mhso@bc.ac.kr

우리의 누룩에서 당화아밀라아제와 프로테아제의 생성을 주도하는 미생물이 *Rhizopus* 속의 곰팡이라는 사실은 오래 전부터 잘 알려져 있다(이성우 1988; 이계호 1994; Park 등 1995; Yu 등 1996). 또한, *Rhizopus* 속의 곰팡이는 젖산이나 푸마르산을 생산하여(Banwart GJ 1989; Griffin DH 1994) 발효에 안전한 산성 pH를 조성할 뿐만 아니라 술에 적절한 신맛을 줄 수도 있다.

이러한 특성들을 고려하여 *Rhizopus* 속의 곰팡이를 누룩제조에 인위적으로 접종하여 누룩의 품질을 향상시키려는 연구도 다수 있었다(Lee 등 1969; So MH 1993; So MH 1999; So 등 1999a; So 등 1999b; So 등 1999c). 그러나 누룩을 제조할 때 미생물을 인위적으로 접종하는 것이 오래 전부터 법으로 금지되어져 있어서(국세청 1975; 식품의약품안전청 2010) 우량 미생물 접종을 통한 누룩의 품질 개선은 실용화 되지 못하고 있으며, 품질 개선이 뒤따르지 못한 누룩은 양조업계에서 설 자리를 잃고 말았다.

저자들은 현행법에서 실용화가 가능하고 현재의 양조장 여건에서 쉽게 적용할 수 있는 방법으로 문제의 해결을 시도하였다. 즉, 우리 누룩의 주 곰팡이인 *Rhizopus* 속으로 쌀 입국을 제조하면 *Aspergillus kawachii*로 제조한 쌀 입국에 못지 않게 입국의 당화력과 단백질 분해력이 높고 유기산의 함량도 적절하여 발효가 잘 진행되고 탁주의 품질도 좋음을 확인하고(So & Lee 2003), *Rhizopus* 속의 쌀 입국 생산에 필요한 기초 자료를 얻기 위한 일련의 연구를 수행하였다.

그 첫 연구로서 저자들은 한국의 누룩에서 분리한 *Rhizopus* sp. ZB9로서 쌀 입국을 제조할 때 당화아밀라아제의 생성에 적합한 배양 조건(So & Lee 2009)과 유기산 생성에 적합한 배양 조건(So & Lee 2010)을 검토하여 보고한 바 있다. 본 연구는 이의 후속 연구로 *Rhizopus* sp. ZB9로서 쌀 입국을 제조할 때 배양 온도, 배양 시간, 증미 수분 함량, 입국 두께, 교반 작업 등의 배양 조건이 프로테아제 생성에 미치는 영향을 검토하여 프로테아제 생성에 적합한 배양 조건을 제시하기 위한 것이다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

본 실험에 사용된 *Rhizopus* sp. ZB9는 전통 누룩에서 분리하여 김바이오연구소에 보존 중인 것이며, 쌀은 농협 창고에 2년간 보존 후 도정한 추청 경질미로 인천합동탁주에서 구하였다.

### 2. 종국의 제조

쌀 입국 제조에 필요한 곰팡이는 다음과 같이 종국을 제조

하여 사용하였다. 먼저 현미를 4시간 침수한 후 110°C에서 30분간 증자한 다음 *Rhizopus* sp. ZB9를 접종하여 32°C에서 10일간 배양하여 포자가 충분히 형성되게 하였다. 이어서 배양물을 40°C에서 3일간 건조시켜 수분 함량 10% 되게 한 후 건열 멸균한 전분을 동량 첨가하고 고루 혼합한 다음 멸균된 100 mesh 체로 쳐서 곰팡이 포자를 다량 함유한 전분을 회수하였다.

### 3. 쌀 입국의 제조

쌀을 2시간 침수하여 물기를 빼고 105°C에서 30분간 1차 증자한 후 쌀 무게의 10%에 해당하는 물을 첨가하여 105°C에서 20분간 2차 증자하였다. 증자한 쌀을 250 ml의 삼각 플라스크에 30 g씩 무균적으로 취해 넣고 중국 0.1 g을 가한 후 솜 마개를 하고 흔들어 혼합한 다음 28, 32 및 36°C의 항온기에서 48시간 배양하였다.

다만 배양 온도의 영향을 검사할 때에는 배양 온도를 20, 24, 28, 32, 36, 40 및 44°C로 하였고, 배양 시간의 영향을 검사할 때에는 배양 시간을 24, 30, 36, 42, 48, 54, 60, 66 및 72시간으로 하였다.

또한, 증미 수분 함량의 영향을 검사할 때에는 1차 증자한 증미의 수분 함량이 25%(w/w) 되게 하고, 이에 물을 가하여 증미 수분 함량이 30, 35, 40, 45, 50 및 55%(w/w) 되게 한 후 삼각 플라스크에 넣고 알루미늄 포일로 밀봉하여 2차 증자하였다.

입국 두께의 영향을 검사할 때에는 중국을 접종한 증미를 직경 15 mm, 높이 100 mm의 시험관에 증미 두께가 각각 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 및 8 cm 되게 넣은 후 시험관의 입구를 멸균된 무명천으로 가볍게 덮고 90%의 습도가 유지되는 항온기에서 배양하였다. 시험관을 사용한 이유는 입국을 두껍게 하여 배양할 때 곰팡이의 호흡열로 품온이 높아지는 것을 방지하기 위해서이다.

교반의 영향을 검사할 때는 배양 24시간에 1차 교반, 30시간에 2차 교반, 36시간에 3차 교반, 42시간에 4차 교반을 각각 실시하되, 실험구 배치는 교반을 하지 않은 무교반구, 1차 교반만 실시한 1회 교반구, 1차 및 2차 교반을 실시한 2회 교반구, 1차, 2차 및 3차 교반을 실시한 3회 교반구, 1차, 2차, 3차 및 4차 교반을 실시한 4회 교반구로 하였다. 교반 작업은 멸균된 유리봉으로 입국의 덩어리를 깬 후 입국이 든 삼각 플라스크를 옆으로 45도 기울인 상태에서 천천히 삼각 플라스크를 5바퀴 회전시켜 입국이 혼합되게 하였다.

### 4. 시료의 채취 및 보관

입국을 시료로 채취할 때는 덩어리를 깨고 흔들어 섞어서 무균 작업대에서 정확히 5 g을 취하여 멸균된 비닐 주머니에 넣어 1회의 배양이 끝날 때까지 5°C의 냉장고에 6~18시간 보관하였다.

5. 프로테아제 활성도 측정

Anson 개량법(유주현 등 1977)에 따라 pH 3.0으로 조정된 0.6% casein 용액을 기질로 하고, 입국침출액을 효소액으로 하여 40°C에서 20분간 효소반응을 시킨 후 생성된 Folin 발색성 비단백질 물질의 양을 Folin 비색법으로 측정하여 입국 1g이 1분간에 생성하는 tyrosine mg 수로 나타내었다.

결과 및 고찰

1. 배양 온도가 프로테아제 생성에 미치는 영향

증미에 *Rhizopus* sp. ZB9를 접종하여 배양 온도를 20, 24, 28, 32, 36, 40 및 44°C로 각각 조정하여 배양하면서 30, 40 및 48시간 경과했을 때 입국의 프로테아제 활성도를 측정된 결과는 Fig. 1과 같았다.

배양 30시간 및 40시간에서 측정했을 때는 32°C에서의 배양이 가장 좋았고, 배양 48시간에서 측정했을 때에는 28°C에서의 배양이 가장 좋았다. 전반적으로 볼 때 28~32°C의 온도 범위에서 배양하는 것이 프로테아제 생성에 가장 유리함을 알 수 있었다. 이와 같은 결과는 *Rhizopus japonicus*를 사용한 So MH(1993a)의 연구, *Aspergillus oryzae*를 사용한 So MH(1993b)의 연구 및 *Aspergillus shirousamii*를 사용한 So 등(1994)의 연구 결과와도 일치한다. 그리고 본 균주의 프로테아제 생성 최적온도는 본 균주의 아밀라제 생성 최적 온도(So & Lee 2009) 및 유기산 생성 최적 온도(So & Lee 2010)와

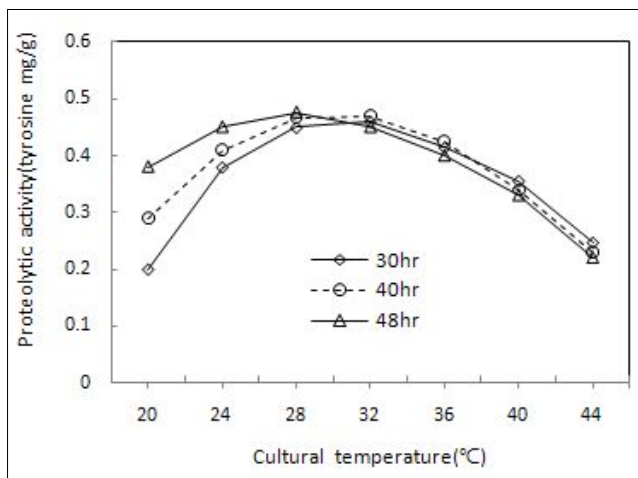


Fig. 1. Influence of culture temperature of *Rhizopus* sp. ZB9 on the production of protease during the preparation of rice koji. Rice kojies were cultivated under different temperatures from 20 to 44°C for 30, 40 or 48 hours. Proteolytic acidity was tested using 0.6% solution of casein at 40°C and pH 3.0. The results were expressed as tyrosine mg produced from 1 g of sample koji for 1 minute.

도 거의 일치하고 있다.

2. 배양 시간이 프로테아제 생성에 미치는 영향

증미에 *Rhizopus* sp. ZB9를 접종하여 28, 32 및 36°C에서 배양하면서 배양 24, 30, 36, 42, 48, 54, 60, 66 및 72시간에 입국 시료를 채취하여 프로테아제 활성도를 측정된 결과는 Fig. 2와 같았다.

28, 32 및 36°C 모두에서 배양 시간의 경과와 함께 프로테아제의 활성도가 증가하였는데, 배양 초기에는 36°C 또는 32°C에서의 배양이 유리하였으나, 배양 후기로 갈수록 28°C에서의 배양이 유리하였다. 이와 같은 결과는 *Rhizopus japonicus*

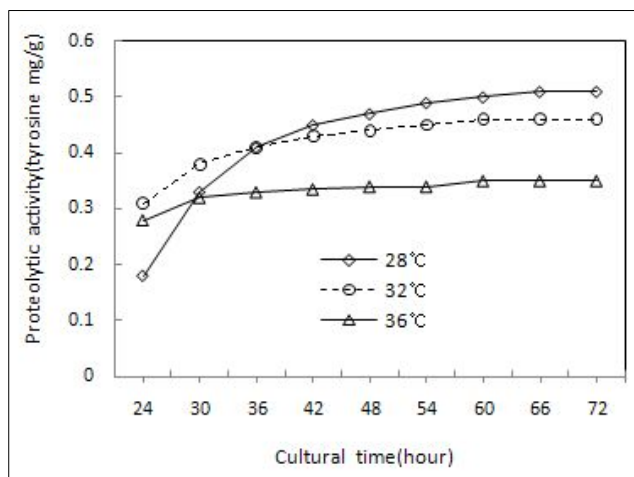


Fig. 2. Influence of culture time of *Rhizopus* sp. ZB9 on the production of protease during the preparation of rice koji. Rice kojies were cultivated at 28, 32 or 36°C for different times from 24 to 72 hours.

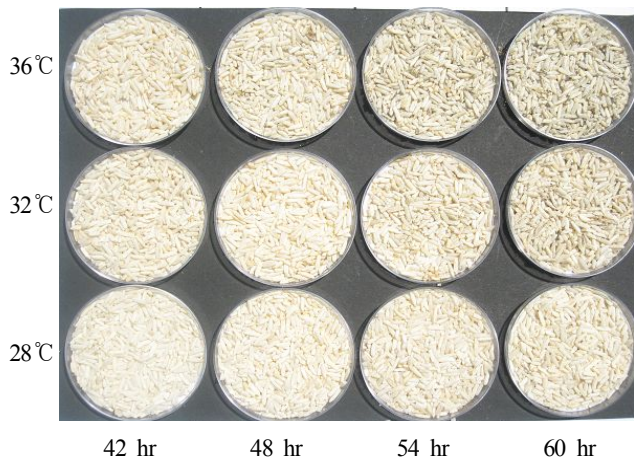


Fig. 3. Photograph of rice kojies prepared by *Rhizopus* sp. ZB9. Rice kojies were cultivated at 28, 32 or 36°C for 42, 48, 54 or 60 hours.

를 사용한 So MH(1993a)의 연구 결과와 유사하지만, *Aspergillus oryzae*를 사용한 So MH(1993b)의 연구 결과 및 *Aspergillus shirousamii*를 사용한 So 등(1994)의 연구 결과와는 다른데, 이것은 균종의 차이에 의한 것으로 생각된다. 한편, 본 균주로 쌀 입국을 제조할 때 배양 시간이 경과하면 포자가 형성되어 배양 초기에는 백색, 중기에는 회색, 후기에는 흑색을 나타내어 입국의 색이 나빠지는데 28, 32 및 36°C에서 배양하면서 배양 42, 48, 54 및 60시간에 입국 시료를 채취하여 사진을 찍은 것은 Fig. 3과 같았다.

Fig. 3에서 보는 바와 같이 36°C에서 배양할 때는 48시간부터, 32°C에서 배양할 때는 54시간부터, 28°C에서 배양할 때는 60시간부터 연한 회색을 나타내기 시작하였으므로 입국의 색과 프로테아제 모두를 고려한다면 28°C에서 60시간 정도 배양하는 것이 가장 좋을 것으로 생각된다.

### 3. 증미의 수분 함량이 프로테아제 생성에 미치는 영향

증미의 통상적인 수분 함량이 25%인데, 이에 수분을 추가하여 수분 함량을 30, 35, 40, 45, 50 및 55%로 조정된 후 *Rhizopus* sp. ZB9를 접종하여 32°C에서 배양하면서 배양 24, 32, 40 및 48시간에 입국 시료를 채취하여 프로테아제 활성도를 측정된 결과는 Fig. 4와 같았다.

24, 32, 40 및 48시간 배양 모두에서 수분 함량을 25에서 30 및 35%로 높임에 따라 프로테아제 생성이 거의 비례적으로 증가하였다. 입국의 배양 시간을 40~48시간으로 한다면 증미의 수분 함량은 적어도 35% 이상으로 유지하여야 프로테아제 생성이 잘 이루어짐을 알 수 있다. 이와 같은 결과는

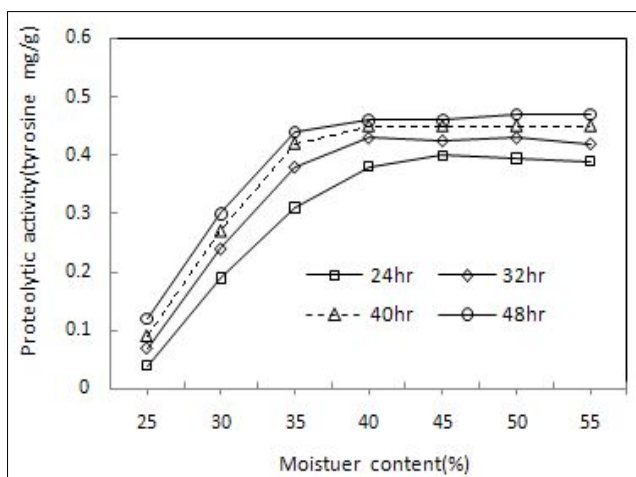


Fig. 4. Influence of moisture content of steamed rice on the production of protease during the preparation of rice koji by *Rhizopus* sp. ZB9. Rice kojies were cultivated at 32°C for 24, 32, 40 or 48 hours under different moisture content from 25 to 55%.

*Rhizopus japonicus*를 사용하여 밀가루 누룩을 제조한 So MH (1993a)의 연구 결과와는 다소 다르지만 *Aspergillus oryzae*를 사용한 So MH(1993b)의 연구 결과 및 *Aspergillus shirousamii*를 사용한 So 등(1994)의 연구 결과와는 유사하다.

### 4. 입국의 두께가 프로테아제 생성에 미치는 영향

증미에 *Rhizopus* sp. ZB9를 접종하여 입국의 두께가 각각 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 및 8 cm 되게 하여 32°C에서 30, 40 및 48시간 배양한 후 입국 시료를 채취하여 프로테아제 활성도를 측정한 결과는 Fig. 5와 같았다.

30, 40 및 48시간 배양 모두에서 입국의 두께가 8 cm까지 두꺼워지더라도 프로테아제 생성에는 아무런 지장을 받지 않았다. 본 균주로서 아밀라아제 생성의 최적조건과 유기산 생성의 최적조건을 연구한 저자들의 전 연구(So & Lee 2009; So & Lee 2010)에서도 입국의 두께가 8 cm까지 두꺼워지더라도 당화효소 생성과 유기산 생성에 아무런 지장을 받지 않음이 확인된 바 있는데, 이와 같은 현상들은 양조장에서 입국을 제조할 때 작업이 용이함을 암시하는 것이어서 대단히 주목할 만한 결과로 생각된다. 그리고 이와 같은 결과는 본 곰팡이가 조상균류에 속하는 것이어서 혐기 상태에서도 비교적 잘 증식하는 특성이 있기(이성우 1988; 소 등 2006) 때문인 것으로 생각된다.

### 5. 입국 교반 작업이 프로테아제 생성에 미치는 영향

증미에 *Rhizopus* sp. ZB9를 접종하여 28, 32 및 36°C에서 48시간 동안 배양하면서 배양 24시간부터 42시간까지 6시간 간격으로 입국에 교반 작업을 가하되 교반 작업을 가한 회수

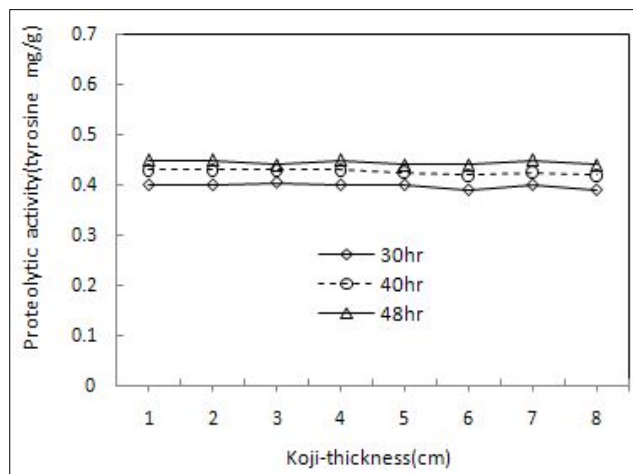
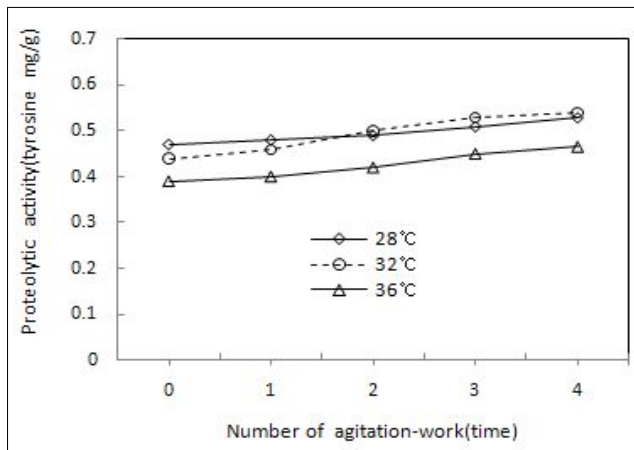


Fig. 5. Influence of koji-thickness on the production of protease during the preparation of rice koji by *Rhizopus* sp. ZB9. Rice kojies were cultivated at 32°C for 30, 40 or 48 hours under different koji-thickness from 1 to 8 cm.





**Fig. 6. Influence of the number of agitation-work on the production of protease during the preparation of rice koji by *Rhizopus* sp. ZB9.** Rice kojies were cultivated at 28, 32 or 36°C for 48 hours under different numbers of agitation-work from 0 to 4 times.

를 달리하여 배양한 후 완성된 입국을 채취하여 프로테아제 활성도를 측정한 결과는 Fig. 6과 같았다.

28, 32 및 36°C 배양 모두에서 교반 작업이 프로테아제 생성에 약간 효과적이었는데, 교반 작업을 3회 정도 하여주는 것이 좋았다. 이와 같은 결과는 본 균주를 사용한 저자들의 전 연구(So & Lee 2010)에서 주기적인 교반이 유기산 생성에 상당히 효과적이었다는 결과와도 일치하는 경향이다. 입국을 제조할 때에 주기적으로 교반을 하면 곰팡이 균사가 절단된 후 절단된 부위에서 균사가 다시 증식하여 입국의 전면에 균사가 더욱 골고루 증식하게 되므로 프로테아제 생성에 도움을 준 것으로 사료된다.

## 요 약

본 연구는 한국의 누룩에서 분리한 *Rhizopus* sp. ZB9로서 탁주 및 약주 양조에 필요한 쌀 입국을 제조할 때에 배양 온도, 배양 시간, 증미 수분 함량, 입국 두께, 교반 작업 등의 배양 조건이 입국의 프로테아제 생성에 미치는 영향을 알기 위한 것이다. *Rhizopus* sp. ZB9를 접종하여 배양 조건을 달리 하여서 쌀 입국을 제조하고, 각 입국의 프로테아제 활성도를 측정하였다. 프로테아제 생성에 적절한 온도 범위는 28~32°C 이었다. 프로테아제와 입국의 색을 고려한다면 28°C에서 60 시간 배양하는 것이 가장 좋았다. 증미의 수분 함량을 25%에서 35%로 높임에 따라 프로테아제 생성이 비례적으로 증가하였다. 입국의 두께가 두꺼워지더라도 프로테아제 생성에 나쁜 영향을 나타내지 않았으며, 배양 중의 교반 작업은 프로테아제 생성에 효과적이었다.

## 참고문헌

- 국세청. 1975. 국 또는 중국 관리규정. 국세청 훈령 제112호. 1975년 2월 10일 공포
- 김종실. 2009. 우리 술 산업 경쟁력 강화 방안. 전통주 산업 진흥 및 명품화 전략을 위한 세미나. pp.5-24. 한국전통주 진흥협회
- 박록담. 2009. 만인의 술이라야. 전통주 산업 진흥 및 명품화 전략을 위한 세미나. pp.25-33. 한국전통주 진흥협회
- 北原 覺雄, 久留 島通俊. 1949. 絲狀菌のDiastase組成に關する研究. 日本醸造工學會誌 27:182-183
- 소명환, 이호, 이효구, 홍재훈, 황한준. 2006. 현대식품미생물학. 도서출판 효일. pp.91-92
- 식품의약품안전청. 2010. 식품첨가물공전. <http://www.kfda.go.kr>. 2010.6.30 방문
- 유주현, 양한철, 정동효, 양용. 1977. 식품공학실험 제2권. 탐구당. pp.474-479
- 이계호. 1994. 한국 약주 탁주의 특성과 신기술. 주류산업의 현황과 신기술 개발 심포지움. pp.51-73. 한국산업미생물학회
- 이성우. 1988. 한국 전통발효식품의 역사적 고찰. 한국 전통 발효식품 연구의 현황과 전망 심포지움. pp.1-12. 한국산업미생물학회, 한국식문화학회, 한국식품과학회
- Banwart GJ. 1989. Basic Food Microbiology. 2nd ed. pp.72-73. An AVI Book
- Griffin DH. 1994. Fungal Physiology. 2nd ed. pp.218-219. Wiley-Liss Inc.
- Lee SB, Choe KH, Im DS, Kim DC. 1969. Studies on improvement of manufacturing method of enzymic source for Makkulli brewing. *Report of the Technical Research Institute of Tax Office* 2:62-69
- Park JW, Lee KH, Lee CY. 1995. Identification of filamentous molds isolated from Korean traditional *Nuruk* and their amylolytic activities. *Korean J Appl Microbiol Biotechnol* 23:737-746
- Rha KY. 1989. Seed mold, important in brewing. *Korean J Food & Nutr* 1:108-110
- So MH, Lee YS, Han SH, Noh WS. 1999b. Analysis of flavor compounds in *Takju* mash brewed with a modified *Nuruk*. *Korean J Food & Nutr* 12:421-426
- So MH, Lee YS, Noh WS. 1999a. Changes in microorganisms and main components during *Takju* brewing by a modified *Nuruk*. *Korean J Food & Nutr* 12:226-232
- So MH, Lee YS, Noh WS. 1999c. Improvement in the quality

- of *Takju* by a modified *Nuruk*. *Korean J Food & Nutr* 12:427-432
- So MH, Lee YS. 2003. *Takju* making by rice koji of *Rhizopus* sp. and *Aspergillus kawachii*. Research Note of Zymbio Institute. pp.5-10
- 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: 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* 23:70-75
- So MH, Park SY, Kim SH, Oh HJ. 1994. Conditions for the production of amylase and protease in making wheat flour *Nuruk* by *Aspergillus usamii* mut. *shirousamii* S1. *Korean J Food & Nutr* 6:96-102
- So MH. 1993a. Conditions for the production of amylase and protease in making wheat flour *Nuruk* by *Rhizopus japonicus* T2. *Korean J Food & Nutr* 6:96-102
- So MH. 1993b. Conditions for the production of amylase and protease in making wheat flour *Nuruk* by *Aspergillus oryzae* L2. *Korean J Food & Nutr* 6:89-95
- So MH. 1999. Characteristics of a modified *Nuruk* made by inoculation of traditional *Nuruk* microorganisms. *Korean J Food & Nutr* 12:219-225
- Yu TS, Kim HS, Hong J, Ha HP, Kim TY, Yoon IW. 1996. Bibliographical study on microorganisms of *Nuruk*. *J Korean Soc Food Nutr* 25:170-179

---

접 수 : 2010년 7월 29일  
 최종수정 : 2010년 8월 12일  
 채 택 : 2010년 9월 9일