

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

†소 명 환 · 이 영 숙*

부천대학 식품영양학과, *짐바이오

Effects of Culture Conditions of *Rhizopus* sp. ZB9 on the Production of Organic Acid During the 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 organic acid 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 acidity of each koji was tested. The temperature range suitable for the production of organic acid was 28~32°C, and 36~48 hours of cultivation at that temperature range seemed to produce the optimum results. The production of organic acid increased in proportion to the increase in water content of steamed rice from 25% to 60%. An increase in koji-thickness induced no adverse effects on the production of organic acid, and agitation-work during cultivation showed very beneficial effects.

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

서 론

쌀 입국은 증자한 쌀에 곰팡이를 인위적으로 접종한 후 배양한 것으로 탁주, 약주 및 청주의 양조에 이용되는 대표적인 발효제이다. 곰팡이에 의하여 생성된 각종 아밀라아제를 함유하고 있어서 원료 중의 전분을 발효성 당으로 전환하는 것이 주된 역할이다.

전통적인 탁주와 약주의 제조에서는 누룩이 유일한 발효제로 사용되었으나, 해방 직전에 *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 백색 변이주로 Kawachi(河内) 씨에 의하여 처음으로 발견되었는데, 포자의 색이 희고, 구연산, 당화 아밀라아제, 펙틴 분해효소 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 탁주 제조 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(김중실 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: +82-32-510-3205, E-mail: mhso@bc.ac.kr

우리의 누룩에서 당화 아밀라아제 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 생산하기도 하므로(Banwart GJ 1989; Griffin DH 1994) 안전한 발효 환경을 조성할 뿐만 아니라 술에 적절한 신맛을 줄 수도 있다.

이러한 특성들을 고려하여 *Rhizopus* 속의 곰팡이를 누룩 제조에 인위적으로 접종하여 누룩의 품질을 향상시키려는 연구도 다수 있었다(Lee 등 1969; So MH 1993a; 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 2009) 우량 미생물 접종을 통한 누룩의 품질 개선은 실용화 되지 못하고 있으며, 품질 개선이 뒤따르지 못한 우리의 누룩은 양조업계에서 설 자리를 잃고 말았다.

저자들은 현행법에서 실용화가 가능하고 현재의 양조장 여건에서 쉽게 적용할 수 있는 방법으로 문제의 해결을 시도하였다. 즉, 우리누룩의 주 곰팡이인 *Rhizopus* 속으로 쌀 입국을 제조하면 *Aspergillus kawachii*로 제조한 쌀 입국에 못지않게 입국의 당화력이 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 당화 아밀라아제의 생성에 적합한 배양 조건을 검토하여 보고한 바 있다(So & Lee 2009). 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 유기산 생성에 미치는 영향을 검토하여 유기산 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 제조하여 사용하였다. 먼저 현미를 4시간 침수한 후 110°C에서 30

분간 증자한 다음 *Rhizopus* sp. ZB9를 접종하여 32°C에서 10일간 배양하여 포자가 충분히 형성되게 하였다. 이어서 배양 물을 40°C에서 3일간 건조시켜 수분함량 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 20분간 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, 55 및 60%(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 보존

입국을 시료로 채취할 때는 덩어리를 깨고 흔들어 섞어서 무균작업대에서 정확히 5 g을 취하여 멸균된 비닐 주머니에

넣어 1회의 배양이 끝날 때까지 5°C의 냉장고에 6~18시간 보관하였다.

5. 산도 측정

국세청의 발효제 분석규정(국세청 1990)에 따라 입국 5 g을 100 ml 삼각 플라스크에 넣고 증류수 25 ml를 가한 다음 실온에서 3시간 침출한 후 여과하여 여액 10 ml에 혼합지시약 2방울을 가하고 0.1N 수산화나트륨 용액을 가하여 담홍색이 될 때까지 적정하고, 수산화나트륨 용액의 소비 ml 수에 수산화나트륨 용액의 농도계수를 곱하여 입국의 산도로 하였다.

결과 및 고찰

1. 배양 온도가 유기산 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 산도를 측정할 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 유기산 생성에 가장 유리함을 알 수 있었다. 이와 같은 결과는 So MH(1993b)가 *Aspergillus kawachii*에 의한 쌀 입국 제조시의 유기산 생성은 30~50시간 배양했을 때는 32°C가 가장 좋고, 60시간 이상 배양했을 때는 28°C

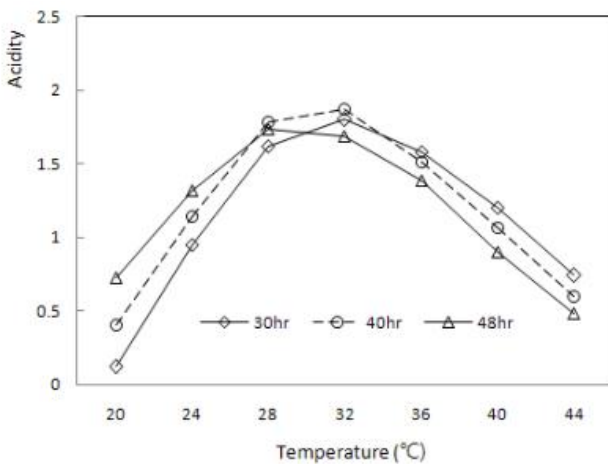


Fig. 1. Influence of culture temperature of *Rhizopus* sp. ZB9 on the production of organic acid during the preparation of rice koji. Rice kojies were cultivated under different temperatures from 20 to 44°C for 30, 40 or 48 hours. Acidity was tested using 0.1N NaOH solution. The results were expressed as ml of 0.1N NaOH solution needed to neutralize 2 g of koji.

가 가장 좋았다는 연구 결과와 잘 일치하며, Youn 등(1974)이 *Aspergillus shirousamii*의 유기산 생성 최적온도가 30°C라고 보고한 것이나, Hannan 등(1973)이 *Aspergillus niger*의 구연산 생성 최적온도가 30°C라고 보고한 것과도 일치하는 경향이 있다. 따라서 양조장에서 본 균주로 입국을 제조할 경우에 유기산 생성을 위한 배양온도는 기존의 입국제조에 사용되고 있는 *Aspergillus kawachii* 등과 유사하게 하면 좋을 것으로 본다.

2. 배양 시간이 유기산 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 산도를 측정할 결과는 Fig. 2와 같았다.

28, 32 및 36°C 모두에서 배양 시간의 경과와 함께 산도가 증가하여 정점에 이르렀다가 서서히 감소하는 경향을 보이는데, 36°C에서 배양할 때는 배양 30시간에, 32°C에서 배양할 때는 배양 36시간에, 28°C에서 배양할 때는 배양 42시간에 정점에 도달하였다. 전반적으로 볼 때 28~32°C의 온도 범위에서 36~48시간 정도 배양하는 것이 가장 적절함을 알 수 있었다. 이와 같은 결과는 So MH(1993b)가 *Aspergillus kawachii*로 실시한 연구에서 유기산 생성은 36°C에서 배양할 때는 40시간에, 32°C에서 배양할 때는 50시간에, 28°C에서 배양할 때는 60시간에 정점에 이르렀다는 보고와 그 경향은 비슷하지만 정점에 도달하는 시간이 10~18시간 빠른데, 이것은 본 곰팡이의 특성인 것으로 생각되며 기존의 입국제조에 사용되고 있는 *Aspergillus kawachii*보다 유리한 점이다.

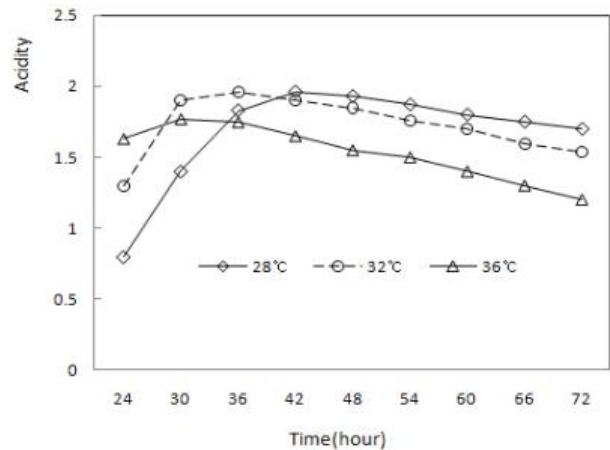


Fig. 2. Influence of culture time of *Rhizopus* sp. ZB9 on the production of organic acid during the preparation of rice koji. Rice kojies were cultivated at 28, 32 or 36°C for different times from 24 to 72 hours.

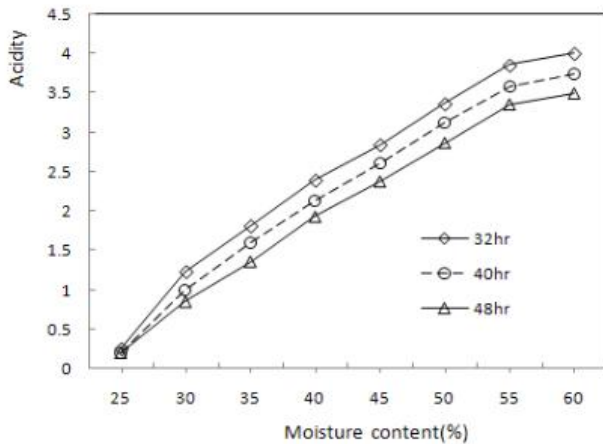


Fig. 3. Influence of moisture content of steamed rice on the production of organic acid during the preparation of rice koji by *Rhizopus* sp. ZB9. Rice kojies were cultivated at 32°C for 32, 40 or 48 hours under different moisture contents from 25 to 60%.

3. 증미의 수분 함량이 유기산 생성에 미치는 영향

증미의 통상적인 수분 함량이 25%인데, 이에 수분을 추가하여 수분 함량을 30, 35, 40, 45, 50, 55 및 60%로 조정된 후 *Rhizopus* sp. ZB9를 접종하여 32°C에서 배양하면서 배양 32, 40 및 48시간에 입국 시료를 채취하여 산도를 측정된 결과는 Fig. 3과 같았다.

32, 40 및 48시간 배양 모두에서 수분 함량을 25%에서 60%로 높임에 따라 유기산 생산은 비례적으로 증가하였다. 이와 같은 결과는 So MH(1993b)가 *Aspergillus kawachii*로 실시한 연구에서 증미의 수분 함량을 30%에서 40%로 높일 때 유기산 생성이 현저히 증가하였다는 결과와는 일치하지 않으나, 40% 이상으로 더욱 높일 경우에는 유기산 생성이 오히려 약간 억제되었다는 결과와는 일치하지 않는다. 이것은 *Rhizopus* 속의 곰팡이는 조상균류이어서 순정균류인 *Aspergillus* 속의 곰팡이보다 생육에 더 많은 수분을 필요로 하기 때문(박 등 2010)인 것으로 생각된다.

4. 입국의 두께가 유기산 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 산도를 측정된 결과는 Fig. 4와 같았다.

30, 40 및 48시간 배양 모두에서 입국의 두께가 8 cm까지 두꺼워지더라도 유기산의 생성에는 아무런 지장을 받지 않았다. 이와 같은 결과는 So MH(1993b)가 *Aspergillus kawachii*로 실시한 연구에서 입국의 두께가 2 cm 이상으로 두꺼워지

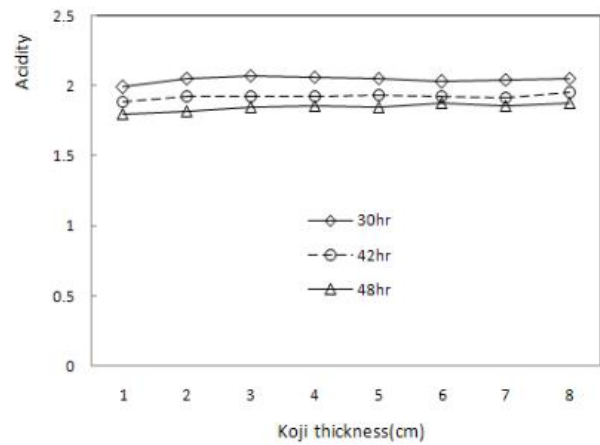


Fig. 4. Influence of koji-thickness on the production of organic acid during the preparation of rice koji by *Rhizopus* sp. ZB9. Rice kojies were cultivated at 32°C for 30, 42 or 48 hours under different koji-thickness from 1 to 8 cm.

면 유기산 생산이 현저히 억제된다는 보고와는 일치하지 않는데, 이것은 본 곰팡이가 조상균류에 속하는 것이어서 순정균류인 *Aspergillus* 속의 곰팡이와는 달리 혐기상태에서도 비교적 잘 증식하는 특성이 있기(이성우 1988) 때문인 것으로 생각된다. 그리고 본 곰팡이를 사용한 저자들의 전 연구(So & Lee 2009)에서 입국의 두께가 8 cm까지 두꺼워지더라도 당화효소 생성에도 아무런 지장을 받지 않음이 확인된 바 있는데, 이와 같은 현상들은 양조장에서 입국을 제조할 때 작업이 용이함을 암시하는 것이어서 대단히 주목할 만한 결과로 생각된다.

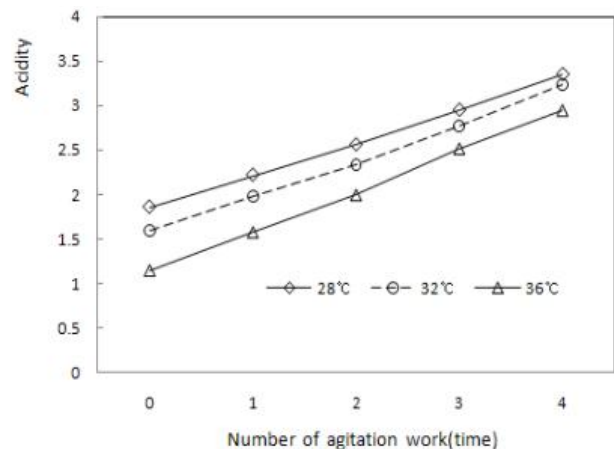


Fig. 5. Influence of the number of agitation-work on the production of organic acid during the preparation of rice koji by *Rhizopus* sp. ZB9. Rice kojies were cultivated at 28, 32 or 36°C for 48 hours under different numbers of agitation-work from 0 to 4 times.

5. 입국 교반 작업이 유기산 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 회수를 달리하여 배양한 후 완성된 입국을 채취하여 산도를 측정 한 결과는 Fig. 5와 같았다.

28°C 배양, 32°C 배양 및 36°C 배양 모두에서 교반 작업을 행한 회수에 비례하여 유기산 생산이 증가하였다. 이와 같이 결과는 본 곰팡이를 사용한 저자들의 전 연구(So & Lee 2009)에서 주기적으로 교반하여 주면 당화효소의 생성이 오히려 억제된다는 결과와는 상반된다. 이는 유기산은 당화효소와는 달리 본 곰팡이가 자기 방어 수단으로 생산하는 것일 수도 있어서(Banwart GJ 1989; Griffin DH 1994) 교반 작업이 유기산 생산을 촉진시킨 것으로 추측한다.

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 유기산 생성에 미치는 영향을 알기 위한 것이다. *Rhizopus* sp. ZB9를 접종하여 배양 조건을 달리하여서 쌀 입국을 제조하고, 각 입국의 산도를 측정하였다. 유기산 생성에 적절한 온도범위는 28~32°C이었으며, 이 온도에서 36~48시간 정도 배양하는 것이 가장 적절하였다. 증미의 수분 함량을 25%에서 60%로 높임에 따라 유기산 생산은 비례적으로 증가하였다. 입국의 두께가 두꺼워지더라도 유기산 생성에 나쁜 영향을 나타내지 않았으며, 배양 중의 교반 작업은 유기산 생성에 매우 효과적이었다.

참고문헌

국세청. 1975. 국 또는 중국 관리규정. 국세청 훈령 제112호. 1975년 2월 10일 공포

국세청. 1990. 국세청기술연구소 주류분석규정. 국세청훈령 제743호. 1990년 11월 28일 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

박현국, 방병호, 소명환, 손홍수, 이재우, 정수현. 2010. 식품 미생물학. 문운당. pp.114-116

식품의약품안전청. 2009. 식품첨가물공전. <http://www.kfda.go.kr>.

2009.10.30 방문

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

北原 覺雄, 久留 島通俊. 1949. 絲狀菌の Diastase 組成に關する 研究. 日本醸酵工學會誌 27:182-183

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.

Hannan MA, Robbin F, Faizur Rahman ATM, Choudhury N. 1973. Analysis of some mutants of *Aspergillus niger* for citric acid production. *J Ferment Technol* 51:606-610

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. 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. Cultural conditions for the production of organic acid during rice-koji making by *Aspergillus awamori* var. *kawachii*. *Korean J Food & Nutr* 6:287-293

So MH. 1999. Characteristics of a modified Nuruk made by inoculation of traditional Nuruk microorganisms. *Korean J Food & Nutr* 12:219-225

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, 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. 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
- Youn BH, Park YJ, Lee SK. 1974. Studies on the formation of organic acid and saccharifying amylase in koji culture by *Aspergillus shirousamii* U2. *Korean J Food Sci Technol* 6:127-132
- 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
-
- (2010년 2월 21일 접수; 2010년 3월 8일 채택)