

## 전통누룩 진균류를 이용한 입국의 제조 및 입국곰팡이의 동정

김재호 · 권영희 · 이애란 · 김혜련 · 안병학\*

한국식품연구원 우리술연구센터

### Manufacture of *Koji* Using fungi Isolation from *Nuruk* and Identification of *Koji* Molds

Jae-Ho Kim, Young-Hee Kwon, Ae-Ran Lee, Hye-Ryun Kim and Byung-Hak Ahn\*

Korea Food Research Institute, Seongnam 463-746, Korea

(Received 16, November 2012., Revised 21, November 2012., Accepted 27, November 2012)

**ABSTRACT :** Various *koji* were prepared by fungi isolated from traditional *nuruk* and their quality characteristics were investigated. Acidity and saccharification power of their *koji* were ranged in 5.0~6.8 and 128sp~241sp. Nine fungi which were showed good quality and sensory evaluation were identified by analysis of their nucleotide sequences with PCR-amplified 18S rDNA internal transcribed spacer-1(ITS-1) and ITS-4 genes. Among them, six strains were identified as *Aspergillus oryzae* and the other strains were identified as *Mycocladius corymbiferus*, *Rhizopus oryzae*, *Lichtheimia corymbifera*.

**KEYWORDS :** *Aspergillus oryzae*, *Koji*, *Lichtheimia corymbifera*, *Mycocladius corymbiferus*, *Nuruk*, *Rhizopus oryzae*

## 서 론

술의 제조를 위한 발효방식에는 과실에 들어 있는 당을 직접 효모가 이용하여 에탄올을 생성하는 단발효와 전분질원료로부터 전분을 당화시켜 당을 생성한 후 이를 효모가 이용하는 복발효의 두 가지 양식이 있다(Jung, 1983; So, 1991). 복발효에는 맥주와 같이 당화공정과 발효공정이 구분되어 진행되는 단행복발효와 막걸리, 약주, 청주와 같이 당화·발효공정이 같은 공간에서 동시에 진행되는 병행복발효가 있다. 병행복발효로 주류를 제조할 경우 발효제가 필요하다.

발효제는 국과 밀술로 구분된다. 밀술은 발효에 필요한 효모를 확대 배양한 것을 말한다. 현재 많은 제조장에서 밀술의 제조과정을 생략하고 건조효모 등을 직접 투입하는 제조공정을 채택하고 있다.

국은 전분질 원료를 당으로 전환시킬 수 있는 당화효소의 생성을 목적으로 제조하며, 곡자, 입국, 조효소제, 정제 효소제가 있다. 곡자는 누룩이라고도 하며, 생곡류 자체가 함유하고 있는 효소와 여기에 거미줄 곰팡이속, 털곰팡이속 등의 사상균과 효모 및 기타 균류가 번식하여 각종 효소를 생성 분비하고 있는 국의 일종이다. 주로 통밀을 분쇄하여 성형한 후 자연배양하여 만든다.

입국은 전분질 원료를 증자한 후 곰팡이류를 번식시킨

것으로서 전분질을 당화시킬 수 있는 것을 말한다. 주로 쌀과 밀가루가 많이 사용되며, 약·막걸리용 입국은 백국을 사용하고 있다. 현재 널리 사용되고 있는 백국균은 흑국균에서 변이된 변이주의 일종인 *A. kawachii* 이다.

조효소제는 개량 누룩이라고도 하며, 피질 또는 전분질을 함유한 것을 원료로 하여 증자하거나 생피를 그대로 살균한 다음 당화효소 생성균을 번식시킨 것을 말한다.

정제효소제는 고체 및 액체 배지에 곰팡이, 세균, 효모 등이 당화효소 생성균을 배양시킨 것과 맥아를 사용하여 전분질을 당화 분해시키는 효소를 추출 분리하여 조제한 것으로 주류제조에 사용할 것을 목적으로 제조한 것을 말한다.

국 중에서 특히 입국의 경우 막걸리 제조장에서 가장 널리 사용하고 있다. 현재 입국 제조에 *A. kawachii* 만이 사용됨으로 다양한 향미 특성을 가진 막걸리의 제조가 이루어지지 않고 전국적으로 유사한 단점이 있다. 또한 일반적으로 입국만으로 제조한 막걸리는 독특한 향이 없고(Choi *et al.*, 1992; Han *et al.*, 1997; So and Lee, 2010), 아미노산의 함량이 낮으며(Lee *et al.*, 1987), 유기산의 신맛이 강하여 조화로운 향미를 나타내지 못하는 것으로 평가되고 있다(Han *et al.*, 1997; So, 1999).

따라서 본 연구에서는 다양한 향미를 가진 막걸리 제조용 입국을 제조하기 위해 전통 누룩으로부터 분리한 곰팡이들을 이용하여 입국을 제조한 후 품질을 조사하여 우수입국들을 선발하고 이들 우수입국제조 균들을 동정하였다.

\*Corresponding author <E-mail : bhahn@kfri.re.kr>

## 재료 및 방법

### 실험재료, 균주 및 시약

입국 제조용 쌀은 2011년산 철원 오대쌀을 시중에서 구입하여 사용하였으며, 대조구용 균주는 S사의 조제중국(白麴)을 사용하였다. 전통누룩으로부터 곰팡이를 분리 및 배양에 사용한 배지는 Difco사의 PDA(Potato Dextrose Agar)와 PDB(Potato Dextrose Broth)를 사용하였으며, 그 밖의 시약은 분석용 특급을 사용하였다.

### 입국의 제조

입국은 쌀 3 kg을 수세한 후 2시간의 침지와 1시간의 탈기 과정을 거쳐 고온의 증자기를 사용하여 20분간 증자한 후 품온이 30-32°C 가량이 되도록 방냉하였다. 식은 고두밥에 중국을 첨가하여 파종한 후 광목천으로 보습하여 제국기에 넣어 배양하였다. 약 12시간 후 갈아쌍기를 수행하여 품온을 약 28°C까지 낮추었으며 입상한 후 약 8시간 간격으로 갈아쌍기를 반복하여 품온의 과열을 방지하였다. 갈아쌍기와 입상 과정을 2회 정도 반복 한 후 출국하였으며 4°C에 저장하여 사용하였다.

### 입국의 품질분석

입국의 산도는 식품첨가물 공전에 따라 입국 20 g에 물 100 mL를 가해 30°C에서 3시간 침출하고 여과하여, 여액 10 mL에 혼합지시액 2~3방울을 가하여 0.1N 수산화나트륨용액으로 담홍색에서 옅은 청색으로 될 때까지 적정하여 산출하였다. 당화력은 2% 가용성 전분용액을 기질용액으로 하여 입국 침출액을 55°C에서 1시간 효소반응시킨 후 생성된 환원당의 양을 DNS법으로 측정하여 입국 1 g이 가용성 전분 1 g에 작용하여 생성된 포도당을 가용성 전분 1 g에 대한 백분율인 당화율에 희석배수를 곱한 값을 당화력으로 나타내었다.

### 미생물의 동정

Denaturing gradient gel 상에서 다른 위치에 존재하는 DNA 단편들을 회수하기 위하여 각각의 밴드를 선택한 후, 각각 잘라내어 3차 증류수 50  $\mu$ l 첨가하고 4°C에서 하룻밤 동안 방치한 후 원심분리(6,300  $\times$  g, 5분)하여 상등액을 취하였다. 각 밴드에서 회수한 DNA를 주형으로 효모와 곰팡이의 경우 ITS2R, ITS1F primer, 세균의 경우 B357F, U519R primer를 사용하여 PCR한 후 마크로젠에 염기서열 분석을 의뢰하였다. 분석된 염기서열은 BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 프로그램을 이용하여 동정하였다.

## 결과 및 고찰

### 입국의 품질 특성 및 균주 선발

우수 균주를 선발하기 위하여 전통누룩으로 분리하여

보관 중인 45개의 균주를 사용하여 입국을 제조하였다. 제조한 입국 중 검은색 포자를 생성하는 균주 CN19.7.1-3, N19.2-1 그리고 C16-19와 포자의 생성이 균사체의 생성보다 빠르거나 고두밥에서 균의 생육이 활발하지 못한 균 16균주(N3-2, N16,N76, N83, N105, N181, N176-2, N254-2, C20-7-2, C22-1-1, C30-2-2, N159-1, CN10.11.1-1, CN23.3.1-3, N160-1, N171-2)를 제외한 29개의 균주를 사용하여 입국을 다시 제조한 후 그 특성을 조사하였다(Table 1). 그 결과 시판되는 중국으로 제조한 입국(대조균)의 경우 산도는 5.0, 당화력은 149 sp로 나타났다. C13-10, CN16.3.1-3, CN18.17.1-2, CN13.1.1-2, CN12.17.1-3 그리고 N36-1균주를 사용하여 제조한 입국은 산도가 5.0 미만으로 나타났으며 당화력은 98~206 sp를 나타내었다. 산도가 6.0 이상으로 나타난 입국의 제조에 사용된 균주는 7개로 C1-5-2-2, C21-17, C30-5, CN16.19.1-1,

**Table 1.** Quality characteristics of *koji* using fungi isolated from *nuruk*

Koji No.	Isolated No.	Acidity	Saccharification power (sp)
1	C13-10	4.9	205
2	C1-5-1	5.2	237
3	C1-5-2-1	5.3	226
4	C1-5-2-2	6.8	209
5	C20-7-3	5.8	188
6	C21-17	6.3	204
7	C30-5	6.4	206
8	CN1.3.1-4	5.7	187
9	CN16.19.1-1	6.0	240
10	CN16.3.1-3	3.4	98
11	CN18.17.1-2	4.8	244
12	CN19.20.1-2	9.2	244
13	CN20.3.1-4	5.2	220
14	CN25.14.1-2	6.2	228
15	CN27.9.1-3	6.2	187
16	CN30.9.1-1	5.8	163
17	CN9.16.1-1	5.4	139
18	CN13.1.1-2	4.5	164
19	CN12.17.1-3	4.6	173
20	N122-2	5.4	188
21	N152-1	6.8	241
22	N162-2	5.1	214
23	N20	5.0	128
24	N21	5.1	241
25	N220-1	5.2	201
26	N245-3	5.9	189
27	N252-2	5.6	134
28	N3-1	5.9	217
29	N36-1	4.2	206
30	Control	5.0	149

**Table 2.** Identification of fungi isolated from *nuruk*

Isolated No.	Identification	Similarity(%)	Accession number
C13-10	<i>Aspergillus oryzae</i>	97	FJ654483.1(gb)
C1-5-1	<i>Mucor circinelloides</i>	98	EU484195.1(gb)
C1-5-2-1	<i>Aspergillus oryzae</i>	98	EU409799.1(gb)
C1-5-2-2	<i>Aspergillus oryzae</i>	99	AY373857.1(gb)
C20-7-3	<i>Aspergillus oryzae</i>	99	EU680476.1(gb)
C21-17	<i>Penicillium</i> sp.	98	GQ418173.1(gb)
C30-5	<i>Aspergillus oryzae</i>	98	EF488390.1(gb)
CN1.3.1-4	<i>Aspergillus oryzae</i>	98	FJ654482.1(gb)
CN16.19.1-1	<i>Aspergillus oryzae</i>	98	AB000533.1(dbj)
CN16.3.1-3	<i>Aspergillus oryzae</i>	97	FJ654482.1(gb)
CN18.17.1-2	<i>Aspergillus</i> sp.	98	FJ471612.1(gb)
CN19.20.1-2	<i>Aspergillus oryzae</i>	97	FJ654482.1(gb)
CN20.3.1-4	<i>Aspergillus oryzae</i>	97	AB470911.1(dbj)
CN25.14.1-2	<i>Aspergillus oryzae</i>	98	AP007173.1(dbj)
CN27.9.1-3	<i>Aspergillus oryzae</i>	98	EU030350.1(gb)
CN30.9.1-1	<i>Aspergillus awamori</i>	96	EU846237.1(gb)
CN9.16.1-1	<i>Aspergillus oryzae</i>	97	EF136362.1(gb)
CN13.1.1-2	<i>Aspergillus oryzae</i>	97	EU409799.1(gb)
CN12.17.1-3	<i>Aspergillus oryzae</i>	98	AB470911.1(gb)
N122-2	<i>Rhizomucor variabilis</i>	98	JF904893.1(gb)
N152-1	<i>Aspergillus oryzae</i>	98	AY373857.1(gb)
N162-2	<i>Mycocladus corymbiferus</i>	98	JN315032.1(gb)
N20	<i>Rhizopus oryzae</i>	98	JQ724500.1(gb)
N21	<i>Lichtheimia corymbifera</i>	98	HQ285630.1(gb)
N220-1	<i>Aspergillus oryzae</i>	98	FJ654482.1(gb)
N245-3	<i>Aspergillus oryzae</i>	97	EU409806.1(gb)
N252-2	<i>Aspergillus oryzae</i>	96	AB470911.1
N3-1	Unclassified fungi	96	AM711482.1(emb)
N36-1	<i>Paecilomyces</i> sp.	97	FR718456.1(emp)
Control	<i>Aspergillus kawachi</i>	98	AF183893.1(gb)

CN19.20.1-2, CN25.14.1-2, CN27.9.1-3 그리고 N152-1 이었다. 그 중 CN19.20.1-2를 사용한 입국의 산도는 9.2 로 30개의 입국 중 가장 높은 값을 나타내었다. 7개 입국의 당화력은 187~244 sp이었다. 그 외 16개의 균주를 사용한 입국의 산도는 5.0~6.0을 나타내었으며 당화력은 134-237 sp이었다.

이상의 결과 29개의 균주 중 25개 균주를 사용하여 제조한 입국의 당화력이 대조군으로 시판되는 종국을 사용하여 제조한 입국에 비하여 높게 나타나 발효제로서의 능력이 충분함을 보였고, 산도가 5.0미만인 6개의 입국을 제외한 23개의 입국은 식품첨가물 공전에 명시된 입국의 규격인 산도 5.0이상, 당화력 60이상을 만족하는 것으로 나타났다.

제조한 입국의 품질특성과 미생물 동정 결과를 바탕으로 식품첨가물공전의 규격에 적합하며 이취가 없고 입국 고유의 상쾌한 향과 신맛을 가진 관능이 우수한 9균주(C1-5-2-2, C20-7-3, CN1.3.1-4, CN16.19.1-1, N152-1,

N162-2, N20, N21, N220-1)를 최종 선발하였다.

**미생물의 동정**

29균주들의 18s RNA sequencing에 의한 미생물 동정 결과 19균주가 *Aspergillus oryzae*로 동정되었으며 그 외 *Mucor circinelloides*, *Penicillium* sp., *Aspergillus awamori*, *Rhizomucor variabilis*, *Mycocladus corymbiferus*, *Rhizopus oryzae*, *Lichtheimia corymbifera*, *Paecilomyces* sp.로 동정되었다(Table 2).

**적 요**

다양한 향미를 가진 막걸리의 개발을 위해 전통누룩으로부터 분리한 곰팡이로 입국을 제조한 후 품질특성을 분석하여 입국의 규격에 적합하며 이취가 없고 관능이 우수한 9균주를 입국 제조용 우수균주로 최종 선발하였다. 선발된 균주는 *Aspergillus oryzae*(C1-5-2-2, C20-7-3, CN1.3.1-4,

CN16.19.1-1, N152-1, N220-1), *Mycocladus corymbiferus* (N162-2), *Rhizopus oryzae*(N20), *Lichtheimia corymbifera* (N21)로 동정되었으며, 제조한 입국의 산도는 5.0~6.8, 당 화력은 128~241sp이었다.

### 참고문헌

- Choi, S. H., Kim, O. K. and Lee, M. W. 1992. A study on the gas chromatographic analysis of alcohols and organic acids during Takju fermentation. *Korean J. Food Sci. Technol.* 24:272-278.
- Han, E. H., Lee, T. S., Noh, B. S. and Lee, D. S. 1997. Quality characteristics in mash of *Takju* prepared by using different *Nuruk* during fermentation. *Korean J. Food Sci. Technol.* 29:555-562.
- Han, E. H., Lee, T. S., Noh, B. S. and Lee, D. S. 1997. Volatile flavor components in mash of *Takju* prepared by using different *Nuruks*. *Korean J. Food Sci. Technol.* 29:563-570.
- Jung, D. H., 1983. Fermentation and microbiology engineering. pp. 228-275. Sunjinmunwhasa, Seoul, Korea.
- Lee, W. K., Kim, J. R. and Lee W. M. 1987. Studies on the changes in free amino acids and organic acids of Takju prepared with different Koji strains. *J. Korean Agricultural Chemical Society.* 30:323-327.
- So, M. H. 1991. *Takju* Brewing by combined use of *Rhizopus japonicus-Nuruk* and *Aspergillus oryzae-Nuruk*. *Korean J. Food & Nutr.* 4:115-124.
- So, M. H. 1999. Characteristics of a modified nuruk made by inoculation of traditional Nuruk microorganisms. *Korean J. Food & Nutr.* 12:219-225.
- So, M. H. and Lee, Y. S. 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, M. H. and Lee, Y. S. 2010. Effects of culture conditions of *Rhizopus* sp. ZB9 on the production of protease during preparation of rice *Koji*. *Korean J. Food & Nutr.* 23:399-404.