

순창군 장류로부터 분리된 황국균의 동정 및 특성

임은미¹ · 이지영¹ · 모하메드² · 한갑훈² · 이보순³ · 조용식⁴ · 김현영^{1*}

¹순창군 장류사업소, ²우석대학교 제약공학과, ³우석대학교 외식산업조리학과, ⁴농촌진흥청 국립농업과학원 발효식품과

Identification and Characterization of *Aspergillus oryzae* Isolated from Soybean Products in Sunchang County

Eunmi Lim¹, Ji Young Lee¹, Mohammed A. Abdo Elgabbar², Kap-Hoon Han², Bo-Soon Lee³, Yong Sik Cho⁴ and Hyoun-Young Kim^{1*}

¹Institute of Sunchang Fermented Soybean Products, Sunchang 595-804, Korea

²Department of Pharmaceutical Engineering, Woosuk University, Wanju 565-701, Korea

³Department of Catering and Culinary Service, Woosuk University, Wanju 565-701, Korea

⁴Fermented Food Science Division, National Academy of Agricultural Science, RDA, Wanju 565-851, Korea

ABSTRACT : In this study, we attempted to isolate fungi from soybean fermented foods produced in Sunchang County and to identify *Aspergillus oryzae* from fungal isolates. Ten fungal isolates were identified with β -tubulin gene. According to the sequences of β -tubulin gene, ten fungal isolates were identified as *A. oryzae/flavus* complex. For further identification of the ten of fungal isolates, *omtA* gene, one gene of the aflatoxin biosynthesis gene cluster, was sequenced and the sequences were compared with those of *A. oryzae* and *A. flavus* strains from the GenBank database. In addition, identification of the ten fungal isolates was further confirmed using the PCR amplicon of *norB* and *cypA* intergenic region, in which a deletion was recognized relative to *A. flavus* and *A. parasiticus*. The amplicon size of the ten fungal isolate strains was smaller than those of *A. flavus* and *A. parasiticus*, but the same as that of the reference *A. oryzae* strain. These results indicated that the ten isolates should be identified as *A. oryzae*. The protease activity in rice koji made with 6, 13, 17, 27, 37 and 38 of strain, respectively was twice higher than that in control. The kojis made with nine of the *A. oryzae* isolates, respectively, did not produce aflatoxin, suggesting that the strains could possibly be used as starters for soybean products.

KEYWORDS : *Aspergillus oryzae*, β -tubulin, Identification, Isolation, Mycotoxin

서 론

우리나라의 된장은 콩메주를 주원료로 하여 자연접종의 형태로 발효되는 재래식 방법이 전통적으로 사용되어 왔

나, 곡물에 황국균(*Aspergillus oryzae*)을 배양하여 제조한 코오지(Koji)로 콩과 함께 혼합, 담금하여 제조한 미소(일본식 된장)의 제조기술과 제조설비의 기계화가 이루어지면서 대량생산이 가능하게 됨에 따라 개량식 된장이 보급되었다[1-5]. 품질과 기호도의 측면에서 보면 전통된장의 깊고 구수한 맛이 일반적으로 기호성에서는 우수하나, 품질의 균일화가 어려워 제조업체에 따라 관능품질의 차이가 많으며 소비자의 연령층이나 취향에 따라 선호도의 차이가 크다[6, 7]. 한편, 공장에서 대량생산하는 개량식 된장은 맛과 풍미를 개선하고자 코지와 메주를 혼합 이용하여 전통풍미를 지닌 개량된장을 제조하고 있으나 업체별, 제품종류별 품질차이가 있으며 품질특성으로는 전통된장과 일본식된장의 중간 형태를 띠고 있다.

우리나라 전통된장 제조시에 메주를 띄우는 동안 수많은 종류의 세균과 곰팡이류가 자연적으로 착생하여 서식하기 때문에, 숙성과정에서 이들 미생물들의 대사작용에 의하여

Kor. J. Mycol. 2014 December, 42(4): 282-288
<http://dx.doi.org/10.4489/KJM.2014.42.4.282>
 pISSN 0253-651X • eISSN 2383-5249
 © The Korean Society of Mycology

*Corresponding author
 E-mail: kangwon01@korea.kr

Received November 3, 2014
 Revised December 18, 2014
 Accepted December 18, 2014

©This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

된장 특유의 품질 특성이 나타나게 된다[8, 9]. 따라서 제조 장소 및 제조시기에 따라 전통메주의 품질이 균일하지 못하고, 잡균의 혼입과 같은 문제점이 나타나고 있으며, 최근 전통 장류에서 과량 섭취 시 식중독 증상을 유발시키고 강력한 발암물질로 전환될 수 있는 잠재성을 갖고 있는 바 이오제닉 아민[10], 발암성과 돌연변이성, 기형발현성 등을 나타내는 독성물질인 곰팡이독소 발생[11], *Bacillus cereus*와 *Clostridium perfringens* 등 식중독균의 증식[12, 13] 등에 대한 문제가 제기되고 있다.

이러한 전통된장의 단점을 보완하기 위해서는 접종균(starter)의 이용이 바람직하며 최근 접종균의 전통식품의 응용연구가 활발히 진행되고 있고, 장류 제조회사에서 장류 제품 품질의 균일성 위생학적 관리를 위해 접종균을 사용하여 메주를 포함한 장류를 제조하고 있으나 사용되고 있는 접종균은 한국형 균주가 아니라 일본에서 종균화 된 균주를 대부분 사용하고 있다[5]. 따라서 우수한 접종균의 개발을 위하여서는 우수 전통 발효식품 수집하고, 식품으로부터 유용 미생물의 분리 및 분리 미생물을 이용한 전통 발효식품 품질급화를 위한 기초적인 연구가 계속적으로 이루어져야 한다.

뿐만 아니라, 다양한 곰팡이가 식품에 존재하며 인간에게 유해 또는 유익하게 작용한다. 대부분의 자낭균은 부생생물로 습한 지역에서 잘 성장하며, 일부 자낭균은 동식물의 병원체로 보고되었으며 다른 곰팡이에 기생하기도 한다. *Rhizopus* 그리고 *Absidia* 중 일부는 저장곡물, 과일, 채소 그리고 공기 및 퇴비에 존재하기도 하나 *Mucor* 그리고 *Rhizopus*는 템페(Tempeh), 쭈쭈(Sufu) 그리고 라오 차오(Lao-chao)와 같은 발효식품에 유기산을 생성한다. 메주로부터는 아래와 같은 *Absidiacorymbifera*(current name: *Lichtheimia corymbifera*), *A. gluaca*, *A. spinosa*, *Mucor abundans*, *M. circinelloides*, *Mucor circinelloides*, f. *griseocyanus*, *M. griseocyanus*(current name: *M. circinelloides* f. *griseocyanus*), *M. hiemalis*, *Mucor hiemalis* f. *silvaticus*(current name: *M. silvaticus*), *M. janssenii*(current name: *M. circinelloides* f. *janssenii*), *M. plumbeus*, *M. racemosus*, *Rhizopus oligosporus*, *R. oryzae*, *R. stolonifer* 그리고 *Syncephalastrum racemosum* 등이 분리되었다[14,15].

Aspergillus 속 곰팡이는 큰 집단으로 구성되어 있으며 비교적 높은 온도, 낮은 수분활성에서 성장 가능하다. 따라서 다양한 *Aspergillus* 종 곰팡이는 경제적 중요한 곰팡이로 인식되어 왔으며, 화학물질 합성, 생합성 변형 그리고 효소 생산 등에 활용되어 왔다. 특히 *A. oryzae*, *A. sojae* 그리고 *A. awamori*(Current name: *A. luchuensis*)와 같은 누룩 곰팡이는 식품에 활용되어 왔으나, *A. flavus* 와 *A. ochraceus* 는 식품오염 및 독소 생성 곰팡이로 알려져 있다. 메주에는 *A. clavatus*, *A. flavus*, *A. flavus* var. *columnaris*, *A. fumigatus*, *A. mellus*, *A. niger*, *A. nidulans*, *A. oryzae*, *A. oryzae* var. *fulvus*, *A. parasiticus*, *A. phoenicis*, *A. sulphureus*, *A.*

terreus 그리고 *A. versicolor* 등이 보고되었다[14-16].

본 연구에서는 순창군에서 조제 및 시판되고 있는 메주 및 전통 장류 제품에서 황국균을 분리 및 선별하고자 하였다. 또한 선별된 황국균을 활용하여 코지를 제조하여 효소 활성 측정하고 이플라톡신 생성 유무 확인하여 보다 안전하고 우수한 황국균을 확보하여 이를 메주 접종균으로 활용할 수 있는 자료를 확보하고자 하였다.

재료 및 방법

시료수집

본 실험에 사용된 시료는 2014년 2월부터 4월까지 순창군 지역에서 유통, 판매되고 있는 메주 56개와 전통 장류(된장, 고추장 등) 20개 제품을 수집하여 곰팡이 분리에 사용하였다. 또한 충무 발효에서 시판되고 있는 중국을 구입하여 곰팡이를 분리하여 대조구로 사용하였다.

곰팡이 분리 및 동정

각각의 시료(메주, 된장, 고추장 등) 10 g을 멸균된 식염수(0.85%) 90 mL에 첨가하여 균질화하였다. 원심분리(4,000 rpm, 5 min)를 하여 상등액을 취하고, 10⁷까지 연속 희석하여 potato dextrose agar (PDA; Difco, Detroit, MI, USA), malt extract agar (MEA; Difco), 그리고 yeast peptone dextrose agar (YPD; Difco)에 각각 도말하였다. 30°C에서 7일간 배양하고 포자를 백금으로 일정량 취하여 멸균된 식염수로 순차적으로 희석하고 희석수 100 μL을 PDA 배지에 도말하여 30°C에서 5일간 배양하였다. 단기 보관으로는 배양된 시료를 4°C에 보관하고 장기보관으로는 포자 일정량을 탈지분유와 실리카겔이 들어 있는 멸균된 균주 보관용 바이알에 넣고 건조기에 보관하였다.

분리 곰팡이를 동정하기 위해 PDA와 MEA 배지에 1점 또는 3점 접종하여 30°C에서 7일간 배양하였다. 배양 후, 집락의 배양특성과 색소형성 등을 기재하며, 분생포자, 균사, 분생포자경 등을 현미경으로 관찰하여 형태학적 동정을 시행하였다. 분자생물학적 동정을 위해 프라이머 Bt2a (5'-GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTT-3')와 Bt2b (5'-ACCCTCAGTGTAG TGACCTTGGC-3')를 사용하여 β-tubulin 유전자의 염기서열을 증폭하였다. DNA 염기서열 분석은 Sol Gent Co., Ltd. (Daejeon, Korea)에 의뢰하였다.

계통 분류

Sequence data를 BioEdit v. 7.0 프로그램으로 최적화한 후, CLUSTAL-X v.1.81을 이용하여 alignment하였고, ME GA v.5.2.2 프로그램을 이용하여 neighbor-joining (NJ) tree를 작성하고, Kimura-2-parameter distance model을 사용하며, Confidence values는 1000 replication bootstrap 분석으로 도출하고, 분리 균주의 종 동정을 위하여 서열 결과를 BLAST 프로그램으로 분석하였다.

코지(Koji) 제조

코지를 제조하기 위하여 멥쌀을 수세 및 선별하고 121°C에서 30분간 증자한 후 실온에서 냉각시켰다. 이후 본 실험에서 분리한 *A. oryzae*를 10⁴ spores/g 되도록 접종하고 항온 항습기(P110123, Jeiotech, Seoul, Korea)에 넣고 7일 동안 발효시켰다. 제국온도는 30°C로 유지하였으며 상대습도는 75%로 유지하였다.

효소활성 측정

단백질분해효소 활성은 Sookkheo 등[17]에 의한 azocasein법을 변형하여 측정하였다. 시료추출액 0.1 mL을 1 mL 기질용액 [0.2% azocasein, 5 mM CaCl₂, 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0)]에 첨가하고 37°C에서 1시간 반응시키고 12%(w/v) trichloroacetic acid (Sigma Co., USA) 2 mL을 첨가하여 반응을 정지시켰다. 4°C에서 30분간 방치한 후, 원심 분리하여 (9,950×g, 10 min, 4°C) 얻은 상등액에 동량의 0.5 M NaOH를 혼합하고 440 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소활성은 1시간 동안 조효소액 1 mL이 효소 반응액을 440 nm에서 0.01 증가 흡광도를 1 unit/mL로 규정하였다.

α-amylase 활성은 김 등[18]의 방법을 변형하여 측정하였다. 시료 추출액 0.1 mL을 1 mL 기질용액 [0.5% soluble starch, 5 mM CaCl₂, 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0)]에 첨가하고 50°C에서 30분간 반응시켰다. 반응액 0.3 mL에

1 mL Lugol's 용액을 첨가하여 발색 반응하였다. 이후, 증류수로 10배 희석하고 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소활성은 1시간 동안 조효소액 1 mL이 효소반응액 흡광도를 50% 감소시켰을 때 1 unit/mL로 규정하였다.

아플라톡신 분석

시료 25 g에 1% NaCl이 첨가된 70% 메탄올 100 mL을 가하여 5분간 균질화한 후, Whatman No.4를 이용하여 여과 한 후 그 여액 10 mL에 1% Tween 20 용액 30 mL을 가하여 희석한 후 유리섬유 여과지를 이용하여 여과한 여액 20 mL을 AflaTest column에 초당 1방울 정도의 속도로 loading한 후 증류수 10 mL로 세척하였다. Column을 acetonitrile 3 mL로 용출한 후 감압 농축하고 200 uL trifluoroacetic acid를 가하고 암소에서 15분간 방치한 후 20% acetonitrile 800 uL를 가하여 0.45 um 실린지 필터로 여과하여 10 uL 시료를 HPLC에 주입하고 Shiseido UG 120 (4.6×250 mm, 5 μm) 컬럼과 FLD (excitation: 360 nm, measurement: 450 nm) detector를 사용하여 분석하였다.

결과 및 고찰

순창지역 시료로부터 곰팡이 균주의 분리

메주를 비롯한 다양한 순창지역 발효제품에서 발효 곰팡

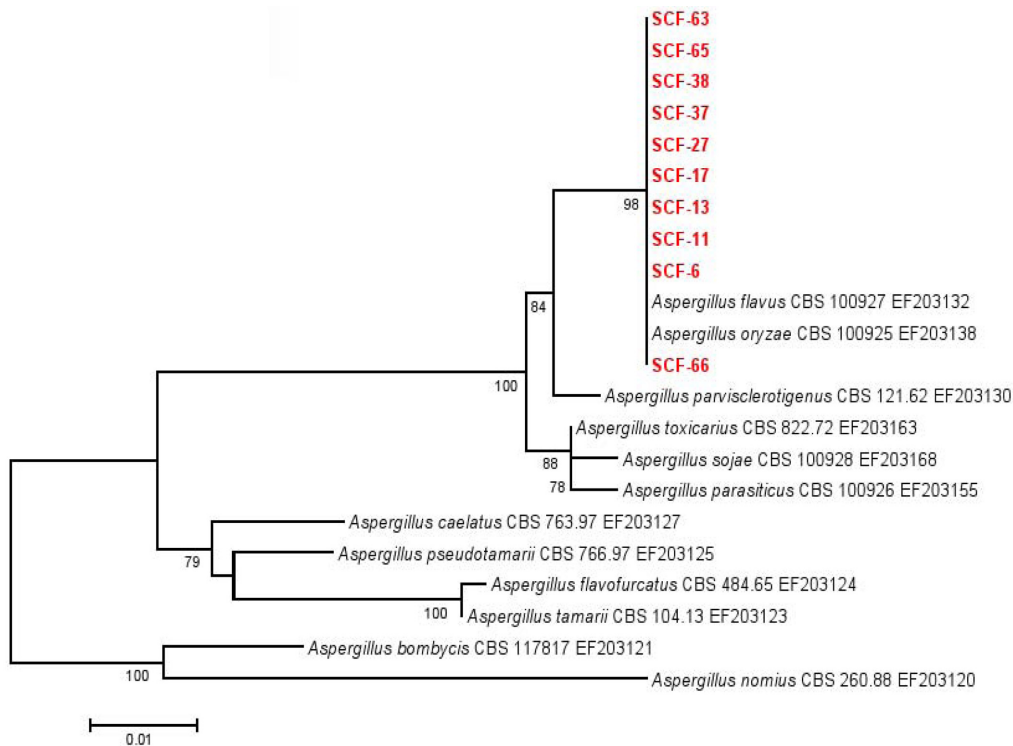


Fig. 1. Taxonomic position of *Aspergillus oryzae/flavus* complex strains isolated from Sunchang county based on partial beta-tubulin gene (primer bt2a and bt2b). They were compared with sequences of Pildain *et al.* [24]. The sequences were first analyzed using the Tamura-Nei parameter distance calculation model with gamma-distributed substitution rates, which were then used to construct the Neighbor-Joining tree with MEGA version 5.2.2. Numbers under nodes are bootstrap values (>0.6).

이를 분리하고자 2014년 2월부터 4월까지 시중에서 유통 판매되고 있는 순창군 지역 메주 및 전통 장류 제품을 순창 장류제조업체로부터 수거하여 곰팡이를 분리하였다. 수집된 시료를 재료 및 방법에 표기한 방법에 따라 potato dextrose agar (PDA), malt extract agar (MEA), 그리고 yeast peptone dextrose agar (YPD)에 도말한 후 25~30°C에서 2일에서 5일간 배양하여 얻어진 집락 (colony)을 다시 새 배지에서 3-7일간 배양하였다. 배양된 시료를 4°C에 단기보관하고, 장기보관으로는 포자 일정량이 들어 있는 카제인 용액을 실리카겔이 들어 있는 멸균된 균주 보관용 바이알에 넣고 건조기에서 보관하였다. 분리한 곰팡이 균주의 특성을 규명하기 위해 이들을 PDA와 MEA 배지에 각각 1 또는 3점 점 접종 (point inoculation)하여 25~30°C에서 7일간 배양하였다. 배양 후 콜로니의 배양특성과 색소형성 등을 기재하였고, 분생포자, 균사, 분생포자 머리, 분생포자경 등을 현미경으로 관찰하여 형태학적 동정을 시행하였다. 이를 통하여 총 67균주를 분리하였으며 분리순서대로 Sun ChangFungi (SCF)라는 균주 번호를 부여하였다. 분리된 균주의 형태학적 관찰을 통해 *Aspergillus*만을 선별하여 이후 실험을 진행하였다.

분자생물학적 동정 및 계통 분류를 통한 *A. oryzae* 균주분석

Aspergillus section Flavi에 속하는 *A. oryzae*와 *A. flavus*는 형태학적으로 분류하기가 매우 어렵고, *A. oryzae*는 아

플라톡신을 생성하지 않으나 *A. flavus*는 아플라톡신을 생성함으로 분류하는 데 있어 신중함을 기해야한다[19]. *A. oryzae*는 곰팡이독소 비생성 곰팡이로서 일본의 경우 사케나 간장에 활용되어 왔다[20, 21]. 따라서, 현미경적 관찰을 통해 *A. oryzae*라고 추정되는 10 균주에 대해 분자생물학적 동정 및 계통 분류를 진행하였다. 형태학적 관찰을 통해 *Aspergillus*속으로 추정되는 SCF-6, 11, 13, 17, 27, 37, 38, 63, 65 그리고 66은 *A. oryzae/flavus*에 속하는 것을 확인하였다(결과 미제시).

Chang 등 [19]은 *A. oryzae*와 *A. flavus*의 *omtA* 유전자를 *omtAF* (5'-CAGGATATCATTGTGGACGG-3')와 *omtAR* (5'-CTCCTCTACCAGTGGCTTCG-3') 프라이머를 이용하여 PCR을 수행한 결과, 594 bp PCR 산물을 얻었으며 염기서열 분석을 한 결과 16개의 인트론과 17개의 엑손으로 구성되어 있음을 밝혔고, 분리한 *A. oryzae* 6 균주와 *A. flavus* 27 균주의 *omtA* 유전자의 다형성 비교했을 때, *A. oryzae* 균주 SRRC304, SRRC493, RIB40, SRRC2044, SRRC2098, 그리고 SRRC2103은 *A. flavus*와 구별할 수 있는 다형성을 보이고 있다고 보고하였다. 이러한 결과는 자연계에서 분리한 곰팡이 균주의 동정에 적용할 수 있는 유전자로 활용할 수 있을 것으로 사료된다. 형태학적으로 *A. oryzae*와 유사한 형태를 보이는 순창에서 분리한 10 균주에 대해 *omtA* 유전자의 다형성을 조사한 결과, SCF-6, 11, 13, 17, 27, 37, 그리고 38은 *A. oryzae* SRRC 2103과 일치하였으며,

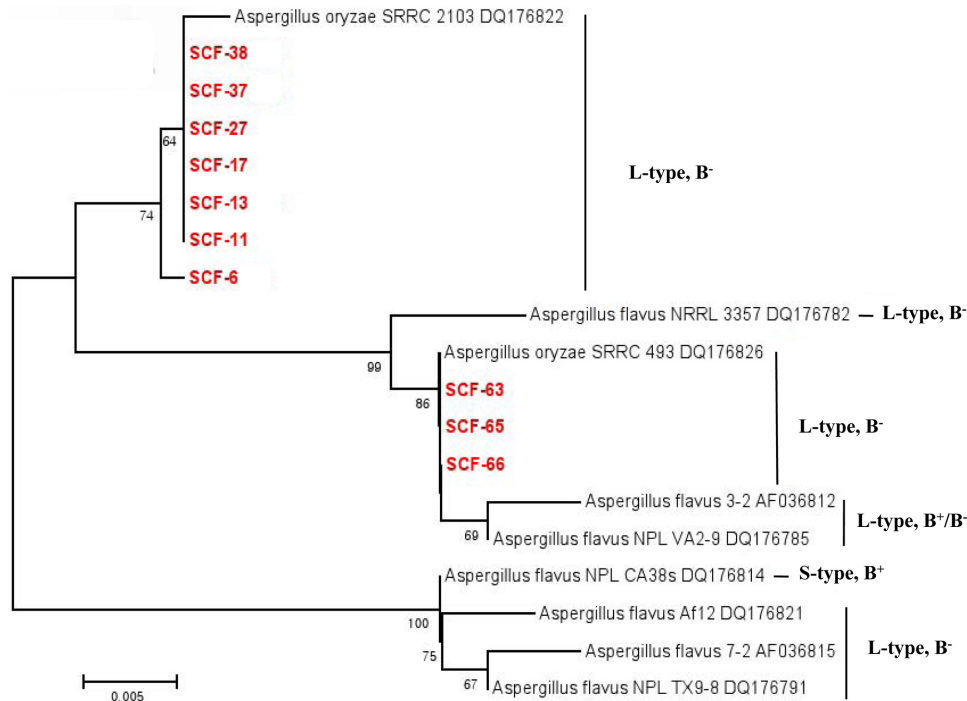


Fig. 2. Taxonomic position of *Aspergillus oryzae/flavus* complex strains isolated from Sunchang based on partial *omtA* gene (primer *omtAF* and *omtAR*). They were compared with sequences of Chang *et al.* [19]. The sequences were first analyzed using the Tamura-Nei parameter distance calculation model with gamma-distributed substitution rates, which were then used to construct the Neighbor-Joining tree with MEGA version 5.2.2. Numbers under nodes are bootstrap values (>0.6).

SCF-63, 65, 그리고 66은 *A. oryzae* 493과 일치하였다(Fig. 2). 따라서 순창에서 분리한 균주는 1차적으로 *A. oryzae*임을 확인하였다.

Tominaga 등[22]은 *A. oryzae*의 이플라톡신 생성 가능성에 대한 이해 접근을 위해 *A. oryzae* RIB40의 이플라톡신 생합성 유전자군 구조를 분석하였다. *A. oryzae* RIB40의 이플라톡신 생합성 유전자군 대부분이 *A. flavus*의 이플라톡신 생합성 유전자군과 97~99% 상동성을 나타내었으나, 세 개의 유전자에서는 93% 이하의 상동성을 보였다. 이 세 유전자는 각각 *afIT*, *norA* 그리고 *verA*으로써 *afIT* 유전자는 257 bp가 결손(deletion)되었으며, *norA* 유전자는 틀전 환돌연변이(frameshift mutation) 그리고 *verA* 유전자는 염기치환 돌연변이(base pair substitution)를 가지고 있다. *afIT* 유전자 프로모터의 경우 두개의 염기치환 돌연변이가 발견되었는데 한 곳은 AreA 단백질이 결합하는 세 부위 중 하나이며, 다른 하나는 FacB 결합 부위라고 밝혔으며, 확보하고 있는 *A. oryzae* 210 균주를 대상으로 *afIT*, *nor-1*, *norA*, *avnA*, *verB* 그리고 *vbs* 유전자를 PCR로 증폭하여 산물을 비교분석하여 분류한 결과 *A. oryzae* RIB 40 균주의 *norB-cypA* 염기서열 길이는 *A. flavus* 것보다 1.5 kb가 결손되어 있다고 보고하였다. 이러한 결손은 *A. oryzae*를 *A. flavus*와 구별되는 특징으로 발효식품을 포함한 각종 장류에서 분류된 곰팡이 중 *A. oryzae*로 추정되는 균주를 확인하는데 유용한 유전정보를 활용될 수 있다. 이에 본 연구에서도 *norB-cypA* 사이에 1.5 kb 정도가 결손되었는지를 확인하고자 PCR을 수행하였다.

Fig. 3에서 볼 수 있듯이 SCF-6, 11, 13, 17, 27, 37, 38, 63, 65, 그리고 66 균주에서 500 bp의 PCR 산물을 확인할 수 있었는데 이러한 결과는 이전 연구에서 밝힌 *A. oryzae*의 PCR 패턴과 동일한 것으로[22], 상기 균주들은 *A. oryzae*로 사료된다. 따라서 본 연구에서는 Tominaga 등[22]과 Ehrlich 등[23]의 방법에 따라 *A. oryzae*와 *A. flavus*를 분류

하기 위해 이플라톡신 유전자 군 중 *omtA*와 *norB-cypA*의 multiplex PCR을 수행하여 확인하였다.

순창에서 분리한 *A. oryzae*를 산업적으로 활용하기 위해서는 protease 및 α -amylase 활성이 높을수록 메주 접종균으로의 활용가능성이 높아 koji의 효소활성을 측정하였다. Protease 활성은 순창에서 분리한 균주로 만든 코지에서 시판되고 있는 종균으로 만든 코지보다 비교적 우수하게 확인 되었는데 이중 SCF-6,13, 17, 27, 37, 그리고 38로 제조된 코지는 대조구(시판되고 있는 종균으로 제작한 코지)보다 2배 정도 높은 protease 활성을 확인할 수 있었다. α -amylase 활성은 257~320 U/mL로 측정되었으며 오염으로 추정되는 63번을 제외한 순창에서 분리한 *A. oryzae*는 현재 종균으로 시판되고 있는 균주와 비교했을 때 α -amylase 효소역가가 떨어지지 않는 것을 확인하였다(Fig. 4).

또한, 곰팡이 독소가 생성되지 않아야 하므로 이플라톡신 생성 유전자의 부분적 결손으로 이플라톡신이 생성되지 않을 것으로 예측되지만 다양한 요인에 의해 발생될 소지가 있어 코지에서 이플라톡신 생성 여부를 재차 확인하였다. 63번을 제외한 *A. oryzae* 모든 균주에서 식품의약품안전처에서 정한 식품허용 기준치(총 15 ug/kg, 단 B1으로는 10 ug/kg)이하로 측정되었다(Table 1).

적 요

본 연구에서는 순창지역에서 만들어지는 장류에서 곰팡이를 분리하고 동정하여 보다 안전하고 기능성이 높은 발효제품을 위한 균주를 확보하고자 하였다. 순창지역에서 생산되는 장류 제품으로부터 곰팡이를 분리하여 β -tubulin 유전자 분석 통해 10개의 균주가 *Aspergillus oryzae/flavus* complex임을 알 수 있었다. 보다 정확한 동정을 위하여 이플라톡신 클러스터 유전자 중에 하나인 *omtA*의 염기서열을 증폭하여 *A. oryzae*와 *A. flavus* 표준 균주의 *omtA* 서열

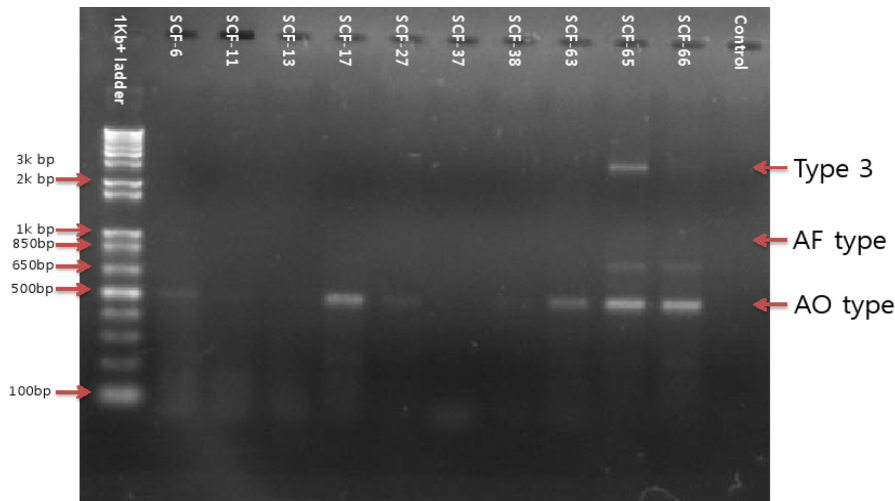


Fig. 3. *Aspergillus oryzae/flavus* complex strains were amplified with *norB-F* and *cypA-R*.

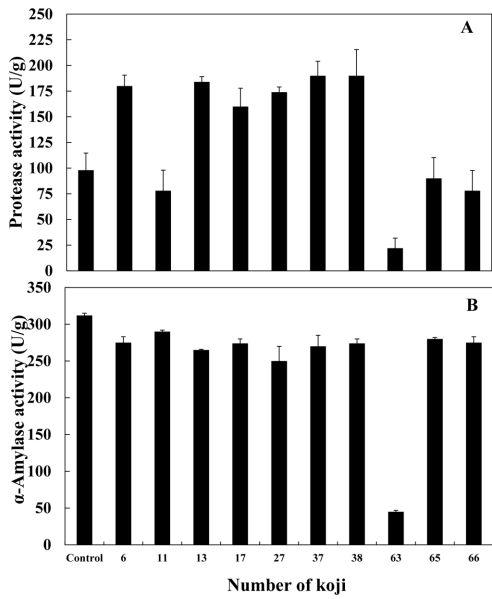


Fig. 4. The measurement of protease activity (A) and α -amylase activity (B) in Koji made by 10 strains of *Aspergillus oryzae* isolated in Sunchang county.

Table 1. Aflatoxin production in Koji made by 10 strains of *Aspergillus oryzae* isolated in Sunchang county

Koji made with <i>Aspergillus oryzae</i> isolated from Sunchang county	Aflatoxin ($\mu\text{g}/\text{kg}$)				
	B1	B2	G1	G2	Total
Control	-	-	-	-	0
6	-	-	0.016	0.002	0.018
11	-	-	-	-	0
13	-	0.003	-	-	0.003
17	-	0.002	-	0.002	0.004
27	-	-	-	-	0
37	-	0.01	-	-	0.01
38	-	-	-	-	0
63	Not Determined				
65	-	0.001	-	-	0.001
66	-	-	-	-	0

- : Not detected.

과 함께 계통 분류한 결과, *A. oryzae*의 표준 균주와의 유연관계가 높음을 알 수 있었다. 또한 *norB-cypA* 사이의 염기서열을 증폭한 결과 500 bp이 증폭 산물이 확인되었는데 이는 표준 균주인 *A. oryzae*의 *norB-cypA* 사이의 염기서열 증폭 산물과 동일한 크기임을 확인할 수 있었다. *A. oryzae*로 확인된 10균주를 활용하여 코지를 제조하고 α -amylase 활성과 protease 활성을 측정하였다. Protease 활성은 6, 13, 17, 27, 37, 그리고 38 균주로 제조된 코지는 대조구(시판되고 있는 중균으로 제작한 코지)보다 2배 정도 높은 protease

활성을 보였으며, α -amylase 활성은 257~320 U/mL로 측정되었다. 식품안전성을 위한 아플라톡신 분비 확인 결과, 63번 균주로 제조된 코지를 제외한 모든 코지에서 아플라톡신을 만들지 않는 것으로 확인되어, 순창에서 분리된 *A. oryzae*는 추후 메주 접종균으로 개발할 수 있음을 보여주었다.

감사의 글

본 논문은 농촌진흥청 연구사업(세부과제명:장류(된장) 제조에 적합한 중균 선발(곰팡이) 및 제조기술 개발, 세부 과제번호:PJ00999002)의 지원에 의해 이루어진 것임.

REFERENCES

- Jung YJ, Chung SH, Lee HK, Chun HS, Hong SB. Isolation and identification of fungi from a Meju contaminated with aflatoxins. *J Microbiol Biotechnol* 2012;22:1740-8.
- Kim JH, Yoo JS, Lee CH, Kim SY, Lee SK. Quality properties of soybean pastes made meju with mold producing protease isolated from traditional meju. *J Kor Soc Appl Biol Chem* 2006;49:7-14.
- Lee CH, Lee SS. Cereal fermentation by fungi. *Appl Mycol Biotechnol* 2002;2:151-70.
- Lee SS, Park KH, Choi KJ, Won SA. Identification and isolation of Zygomycetous fungi found on maeju, a raw material of Korean traditional soy sauces. *Kor J Mycol* 1993;21:172-87.
- Yoo SK, Kang SM, Noh YS. Quality properties on soy bean pastes made with microorganism isolated from traditional soy bean pastes. *Kor J Food Sci Technol* 2000;32:1266-70.
- Park JS, Lee MY, Kim JS, Lee TS. Compositions of nitrogen compound and amino acid in soybean paste(doenjang) prepared with different microbial sources. *Kor J Food Sci Technol* 1994;26:609-15.
- Song JY, Ahn CW, Kim JK. Flavor components produced by microorganism during fermentation of Korea ordinary soybean paste. *Kor J Appl Microbiol Bioeng* 1984;12:147-52.
- Chang M, Chang HC. Characteristics of bacterial-koji and doenjang (soybean paste) made by using *Bacillus subtilis* DJI. *Kor J Microbiol Biotechnol* 2007;35:325-33.
- Lee, GG. Soybean paste with good storage stability and flavor, and preparation method for the same. *Kor Patent* 2004; 10-0457354.
- Lee HT, Kim JH, Lee SS. Analysis of microbiological contamination and biogenic amines content in traditional and commercial Doenjang. *J Fd Hyg Safety* 2009;24:102-9.
- Kang KJ, Kim HJ, Lee YG, Jung KH, Han SB, Park SH, Oh HY. Administration of mycotoxins in food in Korea. *J Fd Hyg Safety* 2010;25:281-8.
- Koo MS. *Bacillus cereus*: An ambusher of food safety. *Bull Food Technol* 2009;22:587-600.
- Lee NH, Jo EJ, Oh SW, Hong SP. Study on the Hurdle technique for the reduction of *Bacillus cereus* spore in Doenjang and Gochujang. *J Kor Soc Food Sci Nutr* 2012;41:1842-6.
- Choi JH, Kim MH, Shon MY, Park SK, Choi SD, Hong H. Production and quality properties of capsule type Meju pre-

- pared with *Rhizopus oligosporus*. Kor J Preserv 2002;9:315-20.
15. Lee SS, Park KH, Choi KJ, Won SA. Identification and isolation of Zygomycota fungi found on meju, a raw material of Korean traditional soy sources. Kor J Mycol 1993;21:172-87.
 16. Sakurai Y, Shioda H, Komagata K, Kim CS. The physical properties and identification of molds isolated from Korean Meju. J Dongguk Univ. 1984;23:273-90.
 17. Sookkheo B, Sinchaikul S, Phutrakul S, Chen ST. Purification and characterization of the highly thermostable proteases from *Bacillus stearmothermophilus* TLS33. Protein Expr Purif 2000;20:142-51.
 18. Kim HJ, Lee JJ, Cheigh MJ, Choi SY. Amylase, protease, peroxidase and ascorbic acid oxidase activity of Kimchi ingredients. Kor J Food Sci Technol 1998;30:1333-8.
 19. Chang PK, Ehrlich KC, Hua SST. Cladal relatedness among *Aspergillus oryzae* isolates and *Aspergillus flavus* S and L morphotype isolates. Int J Food Microbiol 2005;25:172-7.
 20. Glourama, H, Bullerman, LB. *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parastictus*, aflatoxingenic fungi of concern in foods and feeds-a review. J Food Protec 1995;58:1395-404.
 21. Kurtzman CD, Horn BW, Hesselitine CW. *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamari*. J Microbiol 1987;53:147-58.
 22. Tominaga M, Lee YH, Hayashi R, Suzuki Y, Yamada O, Sakamoto K, Gotoh K, Akita O. Molecular analysis of an inactive aflatoxin biosynthesis gene cluster in *Aspergillus oryzae* RIB strain. Appl Environ Microbiol 2006;72:484-90.
 23. Ehrlich KC, Chang PK, Yu J, Cotty PJ. Aflatoxin biosynthesis cluster gene *cypA* is required for G aflatoxin formation. Appl Environ Microbiol 2004;70:6518-624.
 24. Pildain MB, Vaamonde G, Cabral D. Analysis of population structure of *Aspergillus flavus* from peanut based on vegetative compatibility, geographic origin, micotoxin and sclerotia production. Int J Syst Evol Microbiol 2008;58:725-35.