

누룩으로부터 전분 분해 활성이 우수한 *Rhizopus oryzae* 균주의 분리

최영환¹, 최다혜², 박은희², 김명동^{2*}

¹(주)국순당

²강원대학교 식품생명공학과

Received: June 21, 2016 / Accepted: July 18, 2016

Isolation of Potent Amylolytic Fungus *Rhizopus oryzae* from Nuruk

Yeong-Hwan Choi¹, Da-Hye Choi², Eun-Hee Park², and Myoung-Dong Kim^{2*}

¹Kooksoondang Brewery Co. Ltd., Samsung-dong, Seoul 06083, Republic of Korea

²Department of Food Science and Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Republic of Korea

The amylolytic enzyme activities of nuruks collected or produced in this study were examined. A maximum α -amylase activity of $24,747.1 \pm 777.7$ units/mg protein was obtained for a nuruk incubated at a relative humidity of 40% at 30°C. A nuruk matured at a relative humidity of 50% at 25°C showed the highest glucoamylase activity. Among the 98 fungal strains isolated from the nuruk exhibiting the highest amylolytic enzyme activities, 26 strains of *Aspergillus oryzae* and 18 strains of *Rhizopus oryzae* were identified. *Rhizopus oryzae* MBF345 showed an α -amylase activity of $36,724.9 \pm 10.2$ units/mg protein and a glucoamylase activity of $4,911.8 \pm 48.1$ SP. These values were 1.7-fold and 1.4-fold greater, respectively, than those of the control strain. Strain MBF345 was deposited as KCTC46312 in the Korean Culture Type Collection.

Keywords: Nuruk, α -amylase, glucoamylase, glucoamylase, *Rhizopus oryzae*

서론

우리나라의 대표적인 전통 주류인 탁주의 경우 2000년대 후반을 기점으로 효모와 유산균 생존, 낮은 알코올 농도 등의 특성과 쌀을 주식으로 하는 유사한 문화 등으로 일본을 포함한 동아시아 지역을 중심으로 각광받는 주류로서 재조명되었다[16]. 그러나 최근 주요 수출 대상국에서의 사회적 이슈 뿐 만 아니라, 다양한 주류의 등장과 소비 형태의 변화로 소비가 급격하게 감소하고 있는 것이 현실이다[13]. 탁주를 포함한 전통 주류의 소비 감소는 여러 가지 요인이 반영된 결과이나, 제품의 다양성 및 품질 수준의 미흡 등도 간과할 수 없는 부분이며, 일제 강점기를 거치면서 획일화된 약, 탁주 양조 관련 미생물 및 발효공정 등이 주요한 요인으로 사료된다[7].

우리 술의 전통적인 양조 특성은 밀을 중심으로 쌀, 녹두, 보리 등의 전분질 원료를 분쇄한 후 찌거나 가열하지 않은 상태로 성형 및 자연접종으로 만들어진 누룩을 사용하는 것이다[14]. 누룩에는 사용 원료, 지역적 환경과 기후, 제조 시기에 따라 다양한 미생물이 존재하게 되고, 그 결과 유기산 등의 함유량도 달라진다[20]. 누룩에 존재하는 대표적인 미생물은 *Rhizopus* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Mucor* sp., *Saccharomyces cerevisiae* 등이며, 누룩의 제조 과정의 특성상 생전분 분해능력이 우수한 *Rhizopus oryzae*가 주요 균주로 분리되고 있다[10, 11, 27]. 그러나 일제강점기를 거치면서 일본식 누룩인 “코지”가 대부분의 탁주 생산에 주요 발효제로 사용되고 더불어 전통 주류 소비의 감소로 누룩의 제조 또한 감소하여 최근 상업용 전통 누룩을 생산하는 업체는 전국적으로 극소수에 불과한 상황에 이르렀다[7]. 누룩의 종류에 따라 생육하는 미생물이나 이들이 생산하는 전분질 및 단백질 분해효소, 알코올 발효능 및 유기산 생산 등의 차이가 있어 완성된 주류의 맛과 향, 색 등의 관능적 품질에 큰 영향을 미치기도 한다[17, 20]. 누룩에 생

*Corresponding author

Tel: +82-33-250-6458, Fax: +82-33-259-5565

E-mail: mdkim@kangwon.ac.kr

© 2016, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

육하는 주요 곰팡이 중 발효 과정에 핵심적인 역할을 하는 것으로는 *Rhizopus* sp., *Aspergillus* sp.를 들 수 있으며, 이들 곰팡이는 α -amylase, glucoamylase 등 전분을 분해하는 활성이 있는 효소를 분비하여 곡류에 저장된 전분을 당화하는 역할을 한다[10]. 이들 곰팡이의 전분당화능에 의해 생성된 당류는 효모에 의한 알코올 생산에 사용된다. 따라서, 전분을 분해하는 활성이 우수한 균주의 확보는 막걸리를 비롯한 전통주 생산에 매우 중요하다고 할 수 있다.

본 연구에서는 수집되거나 직접 제작한 누룩의 전분 분해 효소 활성을 평가하고 전분 분해와 관련된 효소의 활성을 평가하고, 전분 분해 효소 활성이 우수한 곰팡이 균주를 선별하고자 하였다.

재료 및 방법

누룩의 수집 및 제작

누룩은 경기도 용인시, 충청남도 예산군, 경상북도 상주시, 광주광역시, 경상남도 진주시, 부산광역시 및 제주시를 포함한 7개 지역에서 수집하거나 배양온도와 습도를 달리하여 직접 제조하였다. 밀(원주농업협동조합, Korea), 물(평창수, Korea) 및 벧짚(Korea)은 구매하여 누룩 제조에 사용하였다. 밀은 수돗물로 3회 세척하고 12시간 동안 건조한 후 분쇄기(Hanil, Korea)를 사용하여 분쇄하였다. 밀 중량의 14%에 해당하는 물을 첨가하여 반죽한 후 직경 250 mm의 원형틀을 이용하여 성형하였다. 성형한 누룩은 벧짚 위에 올린 후 온도와 습도 조건을 조절할 향온향습기(BioFree, Korea)에서 15일간 배양하였다. 온도와 습도를 조건별로 제작한 누룩을 강원 A-F로 각각 명명하였으며(Table 1), 배양 후 서늘한 곳에서 3일 동안 건조한 후 분쇄기로 분쇄하여 미생물 분리와 효소 활성 측정에 사용하였다.

곰팡이 균주 분리 및 동정

분쇄한 누룩을 펩톤수[12]에 현탁한 후 상등액을 적정농도로 희석하여 potato dextrose agar (PDA, BD, USA) 배지에 도말하였다. 도말한 배지는 25°C에서 3일 동안 배양한 후 집락을 형성한 곰팡이를 분리하였다. *A. oryzae*는 농촌진흥청 농업유전자원센터에서 분양받은 KACC44246 균주를 *R.*

*oryzae*는 ATCC1026 균주를 대조군 균주로 사용하였다. 효소 활성은 2% (w/v)의 가용성 전분을 함유하고 있는 potato dextrose broth (PDB, BD) 배지에서 24시간 동안 배양한 후 측정하였다.

분리한 곰팡이는 PDB 배지에 접종하여 25°C에서 3일 동안 배양한 후 여과지(Advantec, USA)를 사용하여 균체를 회수하였다. 회수한 균체는 액체 질소를 이용하여 급속동결한 후 DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Germany)를 사용하여 제조사가 제공한 방법으로 genomic DNA를 추출하였다.

곰팡이 균주의 동정은 internal transcribed spacer (ITS) 영역을 증폭할 수 있는 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') 및 ITS2 (5'-TCCTCCGCTGATTGATATGC-3') 프라이머 [8]를 사용하여 유전자 단편을 증폭한 후 염기서열을 분석하였다. 분석한 염기서열은 National Center for Biotechnology Information (NCBI, USA)의 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) [1]를 사용하여 기존에 보고된 균주와의 상동성을 근거로 동정하였다.

누룩의 전분분해 효소활성 측정

누룩의 α -amylase 효소 활성. α -Amylase 효소 활성은 Park 등[23]의 방법을 수정하여 측정하였다. 분쇄한 0.03 g의 누룩을 3 ml의 인산염 완충액(0.05 M, pH 6.0)에 현탁하고 1 g의 glass bead (Sigma-Aldrich, USA)를 첨가하여 3분간 교반(Bohemia, USA) 한 후 원심분리(16,100 × g, 5분)하여 얻은 상등액을 조효소액으로 사용하였다. 인산염 완충액(0.8 ml)과 0.2 ml의 조효소액을 혼합한 후 1 ml의 가용성 전분(0.5%, w/v)을 첨가하여 37°C에서 30분간 반응하였다. 효소 반응액(0.1 ml)과 1 ml의 3,5-dinitrosalicylic acid 용액을 혼합하여 100°C에서 10분간 가열한 후 570 nm에서 흡광도를 측정하였다[3]. 1 unit의 α -amylase 효소 활성은 pH 6.0, 37°C에서 1분당 1 μ mole의 환원당을 생산하는 효소의 양으로 정의하였다.

누룩의 glucoamylase 효소 활성. Glucoamylase 효소 활성 (SP)은 Choi 등[3]의 방법을 수정하여 사용하였으며, 분쇄한 2.5 g의 누룩을 50 ml의 증류수에 현탁하여 30°C에서 1시간 동안 교반한 후, 여과지(Advantec)로 거른 여과액을 조효소액으로 사용하였다. 가용성 전분(2%, w/v) 20 ml에 2.5 ml의 조효소액을 첨가하고 55°C에서 1시간 동안 반응한 후 2.5 ml의 NaOH (0.5 N) 용액을 첨가하여 반응을 종결하였다. 누룩의 glucoamylase 효소 활성은 55°C에서 누룩 1 g이 가용성 전분 1 g에 작용하여 생성되는 포도당을 기질에 대하여 백분율로 표시하는 것으로 대한민국 국제청 주류 분석규정의 환원당 분석법을 기준으로 정의하였다[24].

Table 1. Incubation conditions for nuruks manufactured in this study.

Relative humidity (%)	Temperature (°C)		
	20	25	30
40	Kangwon A	Kangwon B	Kangwon C
50	Kangwon D	Kangwon E	Kangwon F

단백질 농도. 조효소액과 동량의 Bradford dye reagent (Bio-Rad, USA)를 혼합하고 실온에서 5분간 반응한 후 595 nm에서 흡광도를 측정하였다. 적정농도로 희석한 bovine serum albumin (Bio-Rad)을 사용하여 검량선을 작성하였다.

통계처리

모든 측정은 3회 반복 수행하였으며 측정값은 SPSS (v 20.0 SPSS, IBM, USA)를 사용하여 통계처리 하였으며, 유의성 검증은 일원배치 분산 분석법[28]을 이용하였다.

결과 및 고찰

누룩의 수집 및 제작

경기도 용인시(3점), 충청남도 예산군(2점), 경상북도 상주시(1점), 광주광역시(2점), 경상남도 창원시(2점), 부산광역시(1점), 제주시(1점) 등 전통방식으로 제작하는 12점의 누룩을 수집하였다. 누룩은 기후, 원료 등에 따라서 다양한 미생물

의 종류가 나타나므로[8, 9, 22] 수집된 누룩의 제조 시기, 기간, 원료 등을 조사하였다. 진주 B 누룩은 수분이 12% 이하로 2013년 4월에 제작되었으며, 용인 C와 상주 누룩은 이화주 제조용으로 제작되었다. 대부분의 누룩이 밀로 만들어졌으나, 용인 A와 B 누룩은 원료로 쌀을 사용하였으며, 당화력이 우수하여 이양주 등의 청주를 제조하는 누룩으로 판매 중이었다. 용인 C 누룩은 찹쌀과 녹두를 원료로 사용하였으며 배수환동주와 이화주를 제조할 때 사용하는 누룩이었다. 광주 A, B 누룩의 경우 제조방법은 동일하지만 누룩 제조 시기가 각각 초겨울(2014년 11월)과 여름(2015년 8월)으로 달랐다. 강원도에서 전통방식으로 제조된 누룩을 수집하기 위하여 강원도 춘천시 풍물시장, 정선군 오일장, 양양군 오색약수장 등 전통시장과 전통주 생산업체를 대상으로 조사하였으나 직접 누룩을 제조하지 않고 다른 지역에서 구매하여 사용하고 있어서 기상청 자료에 근거한 최근 30년간 강릉 지역의 8월 기후를 바탕으로 온도와 습도를 조절하여 누룩을 직접 제조하였다.

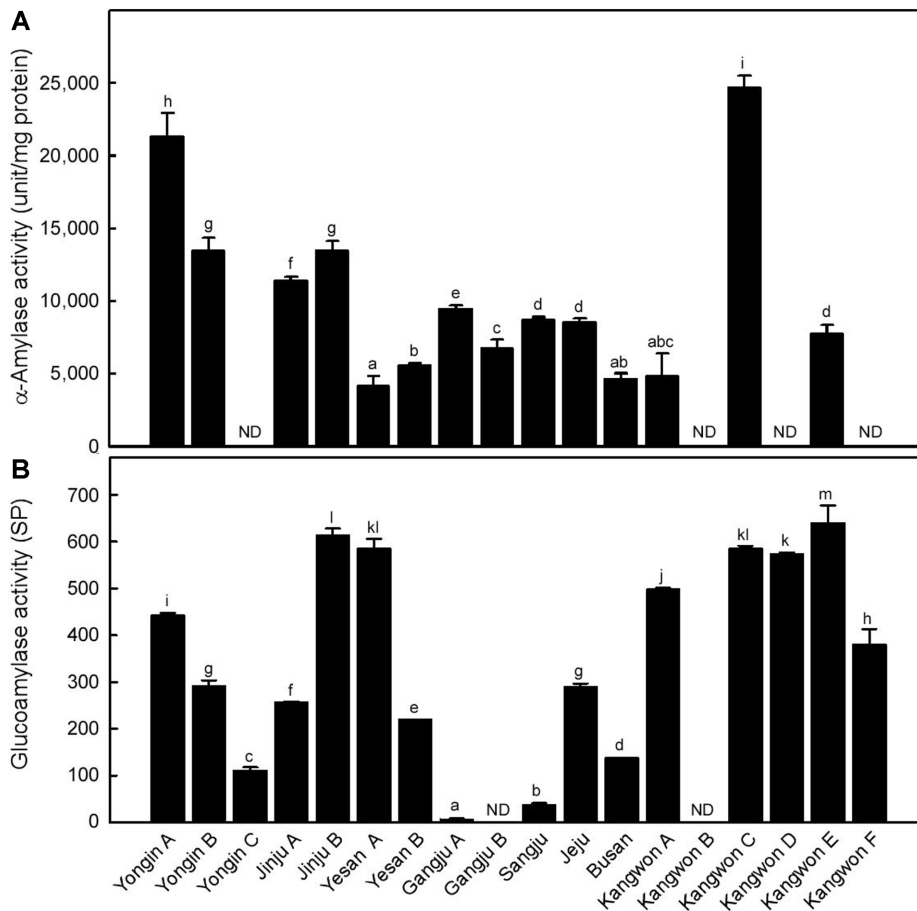


Fig. 1. Enzyme activity of α -amylase (A) and glucoamylase (B) of nuruks. Averages were determined from three independent experiments, and standard errors are shown. Different letters mean significant difference between means. ND: Not detected.

누룩의 α -amylase 효소 활성

전국에서 수집한 누룩과 본 연구에서 온도와 습도 조건을 달리하여 직접 제조한 누룩의 α -amylase 효소 활성을 측정하였다(Fig. 1A). 경기도 용인시에서 수집한 누룩 C와 강원 B, 강원 D, 강원 F 누룩에서는 α -amylase 효소 활성이 거의 나타나지 않았으며, 예산 A 누룩이 $4,233.9 \pm 662.0$ units/mg protein으로 가장 낮은 활성을 나타냈다. 상대습도 40%, 30°C에서 15일간 배양한 강원 C 누룩이 가장 높은 α -amylase 효소 활성($24,747.1 \pm 777.7$ units/mg protein)을 나타냈으며, 그 다음으로 용인A 누룩이 $21,382.4 \pm 1583.0$ units/mg protein으로 우수한 활성을 나타냈다. 광주광역시에서 수집된 A, B 누룩의 경우, 동일한 재료와 방법으로 제조되었으나 2015년

8월에 제작한 광주 B 누룩의 α -amylase 효소 활성이 $6,799.4 \pm 593.0$ units/mg protein으로 2014년 11월에 제조된 광주 A 누룩($9,531 \pm 237.0$ units/mg protein) 보다 상대적으로 낮게 나타났다. 경상남도 진주에서 수집된 누룩의 효소 활성으로부터 동일지역에서 제조된 누룩도 제조시기에 따라 효소 활성의 차이가 크다는 것을 알 수 있었다. 또한 경기도 용인시에서 수집한 누룩의 효소 활성을 근거로 비슷한 지역과 시기에 제작된 누룩도 사용 원료에 따라 효소 활성이 유의적으로 상이한 것으로 나타났다[18].

Kim 등[15]의 보고에 따르면 누룩 반죽시 첨가되는 수분의 양에 의해서 전분 분해 효소 활성은 달라지며, 25%의 수분을 첨가한 누룩이 가장 우수한 효소 활성을 나타냈다. 또

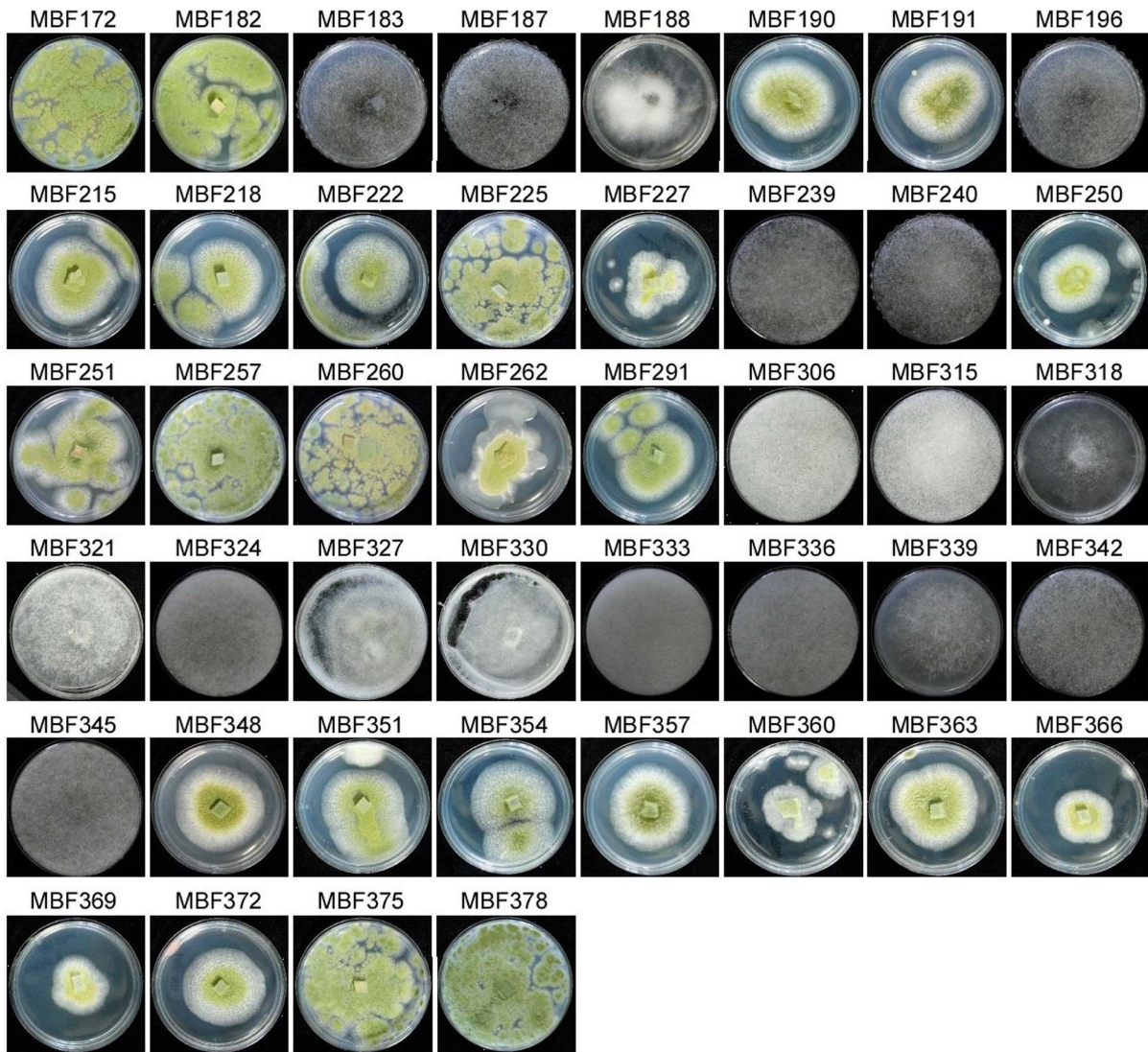


Fig. 2. *A. oryzae* and *R. oryzae* strains isolated from nuruk, Kangwon C, which was matured for 15 days at 30°C. Cells were incubated on PDA plate at 25°C and photographed after 3 days.

한, Lee 등[17]은 누룩의 배양온도를 다르게 설정하였을 때, mannitol, glycerol, galactose, malate, lactate 등의 함량이 달라지며 36°C에서 전분분해와 단백질분해 활성이 가장 우수한 누룩이 만들어진다는 것을 보고하였다. 누룩을 제조하는 환경과 조건에 따라서 미생물의 분포와 대사체 등이 변화한다는 연구결과가 보고된 바 있으므로[4, 20], 누룩의 배양온도와 습도의 차이가 효소 활성의 차이를 나타내는 원인으로 추정된다. 따라서 사용하는 원료와 시기에 따라 누룩에 분포하는 미생물군의 차이에 대한 보다 체계적인 연구가 수반되어야 할 것으로 사료된다.

누룩의 glucoamylase 효소 활성

누룩을 제조할 때 주로 사용하는 원료가 생밀기울이므로 누룩의 당화력은 매우 중요하다[5]. 누룩의 당화력은 주로 glucoamylase 활성을 지표로 나타내므로 전국에서 수집한 누룩과 본 연구에서 직접 제조한 누룩의 glucoamylase 효소 활성을 측정하였다(Fig. 1B). 제조시기가 8월인 광주 B 누룩과 배양온도 25°C, 상대습도 40%에서 제조된 강원 B 누룩에서는 glucoamylase 활성이 나타나지 않았으며, 광주 A 누룩은 7.9 ± 0.9 SP, 상주 누룩은 39.1 ± 1.9 SP로 다른 누룩들과 비교하여 유의적으로 낮은 glucoamylase 효소 활성을 나타냈다. 충청남도 예산의 두 지역에서 수집된 누룩은 전반적으로 전분의 액화력보다는 당화력이 상대적으로 우수한 것으로 나타났으며, 광주광역시에서 수집된 누룩의 경우는 당화력보다는 액화력이 상대적으로 우수하였다. 강원 E 누룩은 641.6 ± 35.7 SP로 가장 우수한 glucoamylase 효소 활성을 나타냈으며, 진주 B (615.1 ± 13.1 SP), 강원 C (586.5 ± 4.7 SP), 예산 A (586.5 ± 19.7 SP) 누룩의 순으로 나타났다. 강원 B 누룩의 경우, α-amylase와 glucoamylase 효소 활성이 모두 나타나지 않은 반면, 강원 C 누룩은 배양 온도만 차이 있음에도, 우수한 α-amylase와 glucoamylase 효소 활성을 나타냈다. 따라서, 누룩을 배양하는 온도가 미생물군의 분포에 매우 큰 영향을 미친 것으로 추정된다. 또한, 기존의 연구보고에 따르면, 원료의 종류[18], 수분 첨가율[15], 배양 온도[17]에 의해서 누룩의 전분 분해 효소 활성이 변화하는 것을 확인하였으나, 두 가지 이상의 조건을 동시에 조절하여 누룩의 효소 활성을 조사한 연구는 여전히 미흡한 것으로 판단된다. 이상의 결과를 바탕으로 같은 지역에서도 누룩을 제조하는 원료, 시기 및 방법이 누룩의 전분 분해력에 매우 큰 영향을 미치는 것으로 판단하였다.

곰팡이 균주 분리 및 동정

전분 분해력이 우수한 곰팡이 균주를 선별하기 위하여 전분 분해력이 우수한 강원 C 누룩으로부터 98점의 곰팡이 균주를 분리하고 동정하였다(Fig. 2). 동정결과 98점의 곰팡이

중에서 *A. oryzae* 균주는 26점, *R. oryzae* 균주는 18점으로 나타났으며, 이외에도 *Mucor circinelloides*, *Syncephalastrum monosporum*, *Syncephalastrum racemosum*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus terreus* 등의 균주가 동정되었다. *Rhizopus* 속 곰팡이는 누룩으로부터 비교적 분리가 쉽고, 균주의 생육 속도 및 효소 생성도가 높으며[4], *Aspergillus*는 증자한 쌀에서 성장이 용이하며 강력한 전분 당화효소를 생산하는 것으로 알려져 있다[6]. 따라서 전분 대사와 관련된 효소의 활성이 보고된 *A. oryzae*와 *R. oryzae* 균주 44점을 선별하였다.

곰팡이 균주의 전분 분해 효소 활성

본 연구에서 직접 제조한 누룩으로부터 분리된 *A. oryzae*와 *R. oryzae* 균주의 α-amylase와 glucoamylase 효소 활성을 조사하기 위하여 2%의 가용성 전분을 탄소원으로 함유한 PDB 배지를 사용하여 25°C에서 24시간 배양한 후 상등액을 회수하여 효소 활성을 측정하였다. 곰팡이 균주 중에서 *R. oryzae* MBF345가 36,724.9 ± 10.2 units/mg protein으로 가장 우수한 α-amylase 효소 활성을 나타냈으며, MBF333 균주는 32,090.8 ± 527.7 units/mg protein으로 두번째로 높은 α-amylase 효소 활성을 나타냈다(Fig. 3A). 대조구 균주로 사용한 *R. oryzae* ATCC10260 균주와 *A. oryzae* KACC44246 균주는 각각 21,191.0 ± 621.5 units/mg protein과 13,832.5 ± 1,627.4 units/mg protein의 α-amylase 효소 활성을 나타냈다. *R. oryzae* MBF345 균주가 대조구와 비교하여 1.7배 높은 효소 활성을 나타냈으며, 상대적으로 낮은 효소 활성을 나타낸 MBF190, MBF191, MBF257 및 MBF363 균주들은 *A. oryzae*로 확인되었다.

선별한 44점의 곰팡이 균주의 glucoamylase 활성을 측정하였는데(Fig. 3B) MBF345 균주의 활성이 4,911.8 ± 48.1 SP로 가장 우수하였고, MBF324 (4,595.4 ± 33.3 SP), MBF375 (4,556.7 ± 33.8 SP) 균주의 순서로 나타났다. *A. oryzae* 균주로 동정된 MBF222 (59.7 ± 0.9 SP) 및 MBF257 (152.9 ± 0.8 SP) 균주는 상대적으로 낮은 glucoamylase 효소 활성을 나타냈다. 대조구로 사용한 *R. oryzae* ATCC10260 균주와 *A. oryzae* KACC44246 균주는 각각 3,510.7 ± 150.9 SP와 322.9 ± 18.0 (SP)로 나타났다. MBF191, MBF222, MBF257, MBF348, MBF351, MBF354 MBF366 및 MBF372 등의 낮은 glucoamylase 효소 활성을 나타낸 균주들은 대부분 *A. oryzae* 균주였으며, 대조구로 사용한 *A. oryzae* KACC44246 균주도 비슷한 수준의 glucoamylase 효소 활성을 나타냈다.

전분분해 활성과 밀접한 연관성을 갖는 α-amylase와 glucoamylase의 활성이 우수한 것으로 나타난 *R. oryzae* MBF345 균주를 최종 선별하였다. *R. oryzae* MBF345 균주는 *R. oryzae* G-195 균주[19]의 ITS 부위(GenBank Accession

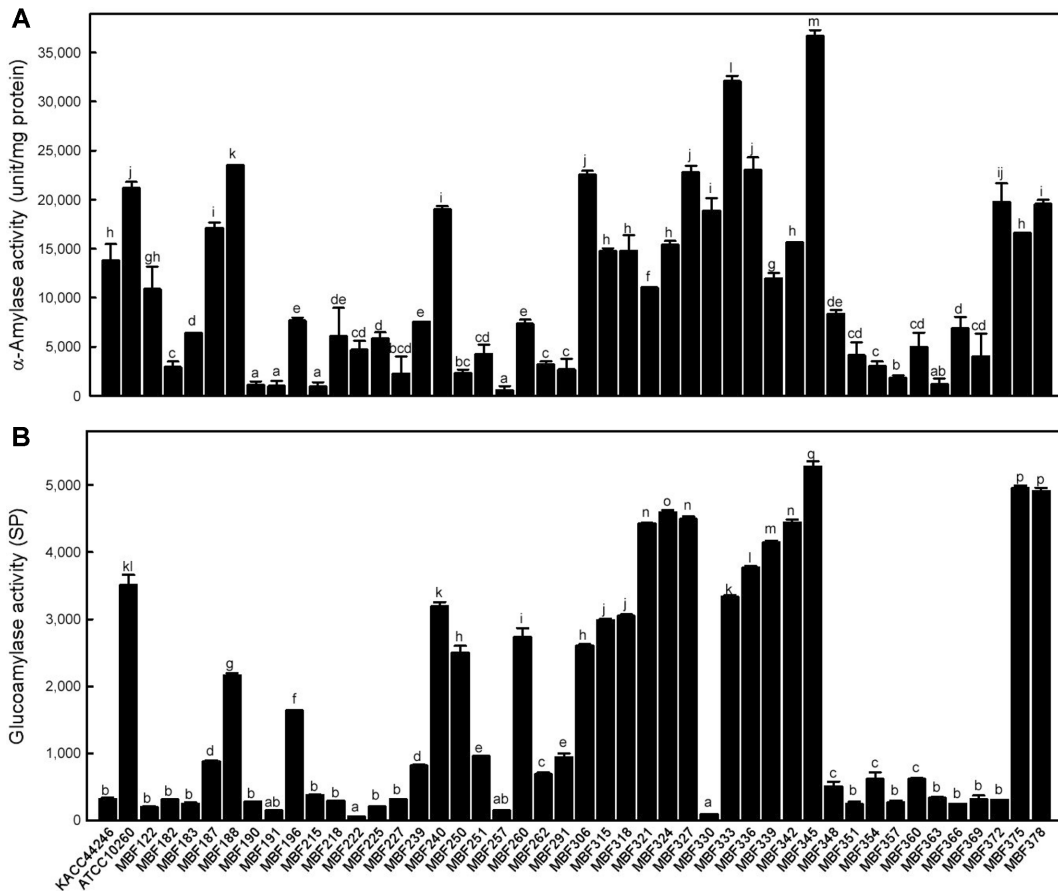


Fig. 3. Enzyme activity of α-amylase (A) and glucoamylase (B) of fungal strains isolated from nuruk, Kangwon C. Cultures were grown in PDB containing 2% soluble starch at 25 °C for 3 days. Results were obtained from three independent experiments, and standard errors are shown. Different letters mean significant difference between means.

No. KP172533)와 96.5%의 상동성을 나타냈으며, 대한민국 미생물자원센터(KCTC)에 *R. oryzae* KCTC46312 균주로 등록하였다.

*R. oryzae*는 서양에서는 접합균증(zygomycosis)을 일으키는 병원성 곰팡이로 알려지고 다루어지는 반면 우리나라를 비롯한 동양에서는 발효식품의 제조에 사용되는 산업적으로 중요한 곰팡이 균주이다[21]. 증자하지 않은 생전분을 분해하는 효소를 분비하는 *R. oryzae* 균주는 특히 누룩 제조 초기에 성장이 우수한 것으로 보고되고 있으며[2], Shon 등[26]은 *Rhizopus* 균주를 이용하여 증자하지 않은 생쌀에 접종하면 알코올 함량이 더 높으며 유기산 생성이 빨라진다고 보고하였다. 국내 일부 주류업체에서는 생쌀발효법을 사용하는 주류 제조가 증자 및 냉각에 필요한 에너지가 절감되는 친환경적인 특성과, 제조된 주류의 우수한 영양성분과 숙취 감소의 장점을 가지고 있다는 점을 강조하고 있다[26]. 원료를 찌지 않는 무증자 발효 시 생전분 분해능이 강한 특성을 고려되어 주요 균주로 사용되고 있기도 하다[5, 10]. Choi 등

[4]은 *R. oryzae* N174 균주를 사용하여 5–15%의 밀기울 배지를 사용하여 액체증류 제조 조건을 최적화한 바 있으며, Seo 등[25]은 *R. oryzae* CCS01 균주가 쌀-밀 막걸리 제조 시에 12.0%의 알코올을 생산한다고 보고하였다.

R. oryzae 균주는 *A. oryzae* 균주와 달리 생전분을 분해하는 활성이 매우 우수하며[10] 우리나라 전통 발효제인 누룩에서 발견되는 산업적으로 이용 가능성이 매우 유망한 균주로서, 향후 유전체, 전사체 및 대사체 차원의 연구가 필요할 것으로 판단된다.

요 약

전국에서 수집 또는 직접 제작한 누룩의 전분 분해 효소 활성을 조사하였다. 전분을 액화시키는 효소인 α-amylase 활성은 상대습도 40%, 30°C 조건에서 제조된 누룩이 24,747.1 ± 777.7 units/mg protein으로 가장 우수하였고, glucoamylase 효소 활성은 상대습도 50%, 25°C 조건에서 제조된 누룩이 가

장 우수하였다. 전분을 분해하는 활성이 가장 우수한 누룩으로부터 곰팡이 98점을 분리하고 동정한 결과, *A. oryzae* 균주 26점, *R. oryzae* 균주 18점을 확인하였다. MBF345 명명된 *R. oryzae* 균주는 α -amylase 활성이 $36,724.9 \pm 10.2$ units/mg protein이었고, glucoamylase 효소활성은 $4,911.8 \pm 48.1$ SP로 대조구 균주 보다 각각 1.7배, 1.4배 효소 활성이 우수한 것으로 나타났으며, 이 균주를 미생물보존센터에 *R. oryzae* KCTC46312 균주로 기탁하였다.

Acknowledgments

This research was financially supported by the Ministry of Trade, Industry and Energy (MOTIE) and Korea Institute for Advancement of Technology (KIAT) through the Research and Promoting Regional Specialized Industry.

References

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**: 403-410.
- Bal J, Yun SH, Song HY, Yeo SH, Kim JH, Kim JM, et al. 2014. Mycoflora dynamics analysis of Korean traditional wheat-based nuruk. *J. Microbiol.* **52**: 1025-1029.
- Choi DH, Park EH, Kim MD. 2014. Characterization of starch-utilizing yeast *Saccharomycopsis fibuligera* isolated from nuruk. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **42**: 407-412.
- Choi JS, Jung ST, Choi JH, Baek SY, Yeo SH. 2012. Quality characteristics of wheat nuruks by storage conditions of liquid starters using *Rhizopus oryzae* N174. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **40**: 319-324.
- Chung MJ, Hou WN, Jeon JH. 1990. Studies on the development and of three powerful raw starch digesting glucoamylase. *J. Agr. Sci. Chungbuk Nat. Univ.* **8**: 151-163.
- Huh CK, Kim SM, Kim YD. 2014. Comparison for enzymic activity of nuruk and quality properties of *Yakju* by different fungi. *Korean J. Food Preserv.* **21**: 573-580.
- Jang JH. 1991. A history of Korean traditional liquors. *Food Sci. Indust.* **24**: 61-63.
- Jo GY, Lee CW. 1997. Isolation and identification of the fungi from nuruk. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **26**: 759-766.
- Kang HR, Lee AR, Kwon YH, Kim HR, Ahn BH. 2012. Optimization of culture conditions for the yeast and analysis of qualities of *Makgeolli* brewed with the yeast isolated from Korean traditional nuruk. *Korean J. Mycol.* **40**: 204-209.
- Kim CJ, Oh MJ, Lee JS. 1985. Studies on digestion of raw starch by *Rhizopus oryzae*. *Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **13**: 329-337.
- Kim HS, Hyun JS, Kim J, Ha HP, Yu TS. 1997. Characteristics of useful fungi isolated from traditional Korean nuruk. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **26**: 767-774.
- Kim JH, Kwon YH, Lee AR, Kim HR, Ahn BH. 2012. Manufacture of *Koji* using fungi isolation from nuruk and identification of *Koji* molds. *Korean J. Mycol.* **40**: 187-190.
- Kim JY, Park GS. 2014. Analysis of consumer's present use and future demand of traditional Korean liquors. *Korean J. Food Cook Sci.* **30**: 41-50.
- Kim MJ. 2002. The study about traditional nuruk. *J. Natural.* **9**: 291-310.
- Kim MS, Jeon JA, Jeong ST, Choi JH, Choi HS, Yeo SH. 2011. Characteristics of *Byeo-nuruk* according to the mixing ratio of wheat and the addition rate of moisture. *J. East Asian Soc. Dietary Life* **21**: 897-904.
- Lee JH, Jwon YJ, Song HG. 2012. Relationships between consumers well-being recognition and Korean traditional liquor selection properties. *J. Foodserv. Manage. Soc. Kor.* **15**: 163-183.
- Lee SH, Beak SY, Kang JE, Jeon CO, Kin DH, Kim MD, et al. 2015. Effects of temperature on the changes of enzymatic activities and metabolite during wheat nuruk fermentation. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* **43**: 378-384.
- Lee SJ, Ahn BH. 2010. Sensory profiling of rice wines made with nuruks using different ingredients. *Korean J. Food Sci. Technol.* **42**: 119-123.
- Meussen BJ, de Graaff LH, Sanders JP, Weusthuis RA. 2012. Metabolic engineering of *Rhizopus oryzae* for the production of platform chemicals. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **94**: 875-886.
- Nam K, Lee NK, Yum EJ, Kim YS, Yeo SH, Jeong YS. 2015. Change in the composition and enzyme activity of culturable lactic acid bacteria in nuruk during fermentation at different temperatures. *Korean J. Food Preserv.* **22**: 920-925.
- Nawange SR, Singh SM, Naidu J, Jain S, Nagpal T, Behrani DS, et al. 2012. Zygomycosis caused by *Rhizopus microsporus* and *Rhizopus oryzae* in Madhya Pradesh (M.P.) Central India: a report of two cases. *Mycopathologia* **174**: 171-176.
- Park JH, Chung CH. 2014. Characteristics of *Takju* (a cloudy Korean rice wine) prepared with nuruk (a traditional Korean rice wine fermentation starter), and identification of lactic acid bacteria in nuruks. *Korean J. Food Sci. Technol.* **46**: 153-164.
- Park JW, Kim BJ, Lee JW, Kim YB. 2002. Purification and characterization of maltopentaose-producing amylase from *Bacillus megaterium* KSM B-404. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **30**: 352-358.
- Pesze M, Bartos J. 1974. *Colorimetric and fluorimetric analysis of organic compound and drugs*. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Seo WT, Cho HK, Lee JY, Kim BJ, Cho KM. 2012. Quality characteristics of wheat-rice *Makgeolli* by making of rice nuruk prepared by *Rhizopus oryzae* CCS01. *Korean J. Microbiol.* **48**: 147-155.
- Shon SK, Rho YH, Kim HJ, Bae SM. 1990. *Takju* brewing of uncooked rice starch using *Rhizopus koji*. *Korean J. Appl. Microbiol. Biotech.* **18**: 506-510.
- Song SH, Lee C, Lee S, Park JM, Lee HJ, Bai DH, et al. 2013. Analysis of microflora profile in Korean traditional nuruk. *J. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 40-46.
- Wu G, Nie L, Freeland SJ. 2007. The effects of differential gene expression on coding sequence features: analysis by one-way ANOVA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **358**: 1108-1113.