

***Rhizopus japonicus* T2 에 의한 밀가루 누룩 제조시 Amylase와 Protease의 생산조건**

소 명 환

부천전문대학 식품영양과

Conditions for the Production of Amylase and Protease in Making Wheat Flour Nuluk by *Rhizopus japonicus* T2

Myung-Hwan So

Department of Food and Nutrition, Bucheon Junior College, Bucheon 421-735, Korea

Abstract

A Nuluk, a Korean traditional koji for brewing, was made with wheat flour and *Rhizopus japonicus* T2 which had a good aroma and strong abilities in producing saccharogenic and proteolytic enzymes, and cultural conditions for the production of those two enzymes were tested. The productivity of saccharogenic enzyme was markedly improved when Nuluk was made with unsteamed wheat flour as compared with that with steamed one, but that of acid protease was reduced. The addition of water containing 0.5% hydrochloric acid was unfavorable for the production of saccharogenic enzyme and neutral protease. The optimum ratio of water added to wheat flour for the production of saccharogenic enzyme and proteolytic enzyme was 28% on the basis of wheat flour.

The productivity of saccharogenic enzyme was enhanced when the Nuluk was molded after 10~20 hours' precultivation but that of proteolytic enzyme was reduced as compared with no molding. The optimum temperature for the production of saccharogenic enzyme was 28°C and that of proteolytic enzyme was also 28°C. The optimum cultural time for the production of saccharogenic enzyme was 36~72 hours at 30°C and that of proteolytic enzyme was 36 hours.

Key words : *Rhizopus japonicus*, Nuluk, Koji, amylase, protease.

서 론

누룩은 빵은 밀에 물을 가하고 성형한 것을 배양실에서 배양하여 *Aspergillus*속, *Rhizopus*속, *Mucor*속, *Absidia*속, *Saccharomyces*속 등의 미생물이 자연적으로 번식하게 한 것이다¹⁾. 우리의 전통적인 주류 제조 방법에서는 반드시 누룩이 발효제로 사용되었는데 탁주와 소주의 양조시에는 조곡이, 약주의 양조시에는 분곡 또는 백곡이 사용되었다²⁾. 조곡은 밀을 기칠게 빻아서 만든 누룩이고 분곡은 밀을 곱게 빻아서 만든

것이며 백곡은 밀기울이 포함되지 않은 밀가루로 만든 것이다.

그러나 8·15해방 이후부터 탁·약주 양조에 사용되는 발효제에 일대 변혁이 있었다. 이³⁾에 의하여 *Aspergillus awamori* var. *kawachii*의 중국이 일본으로부터 도입되고 이것이 그 당시 양조장의 당면과제이었던 산패방지와 발효수율의 향상에 크게 도움을 줄 수 있었다. 그래서 탁·약주 양조장에서는 누룩의 사용량이 급격히 줄어들게 되었고 대신 *Aspergillus awamori* var. *kawachii*에 의한 입국의 사용이 늘어나게 되었다. 이에 더하여 근년에는 값이 싸고 효소력가가 매우 높은 조효소제와 정제효소가 양조에 적용되면서 누룩의 사용은 더욱 줄어들게 되었다. 이러한 흐름속에서 우

리의 탁·약주는 전통적인 양조방법으로부터 벗어나게 되었고 술의 맛과 향도 또한 그에 따라 많이 달라졌을 것으로 생각된다. 이와 때를 같이하여 양조업자들은 탁·약주의 판매구역제의 보호하에서 주질은 고려치 않고 알콜수율만을 앞세운 이윤추구에 몰두해 왔다. 생활수준의 향상으로 소비자들의 기호도는 날로 향상되고 있는데 탁·약주는 그 품질이 오히려 퇴보를 하고 있으니 탁주를 찾던 소비자들이 맥주를 찾고, 약주를 찾던 소비자들이 청주를 선호하게 되는 것은⁴⁾ 너무나 당연한 일이다.

요즘의 양조방법에서는 누룩이 거의 사용되지 않으며 구연산과 당화효소의 생산능력이 강한 *Aspergillus awamori* var. *kawachii*의 입국만을 발효제로 사용하는 방법이나 *Aspergillus awamori* var. *kawachii*의 입국에 *Aspergillus usami* mut. *shirousamii* 와 *Rhizopus* 속의 조효소제나 정효소를 보충하는 방법이 적용되고 있다⁵⁾. 이러한 방법으로 술을 제조하였을 때에는 입국의 구연산에 의한 신맛이 너무 강하고⁶⁾, 비발효성 잔당이 남지 않고, 단백질분해물의 생성량도 적어서⁷⁾ 술에서 조화로운 맛과 순한 향을 느낄 수 없다. 이러한 결점을 보완하는 가장 좋은 방법은 *Aspergillus awamori* var. *kawachii*입국의 사용량을 줄이고 양질의 누룩을 사용하는 것이다⁸⁾.

누룩의 제조와 개량에 관한 연구는 1950년대와 1960년대에는 비교적 활발하여 *Rhizopus*속, *Aspergillus*속 또는 *Saccharomyces*속의 미생물을 접종하는 누룩 제조방법이⁹⁻¹⁴⁾ 개발되었으나 근년에 이르기까지 누룩제조의 신규면허를 철저히 제한해 왔고, 누룩 제조에 미생물을 인위적으로 접종하는 것도 금지하였기 때문에 1970년대 중반 이후부터 이 분야의 연구가 거의 단절되고 말았다. 오늘날 미생물 분야의 신기술이 눈부시게 발전하고 있는데 유독 우리의 누룩만은 과학적으로 발전할 수 있는 기회마저 송두리째 박탈당해왔으니 실로 답답한 일이다.

현재의 누룩은 효소력이 높지 못하고 향도 좋지 않아서 이를 양조에 사용했을 때 그 효과를 크게 기대할 수 없을 뿐만 아니라 양조에 유해한 미생물과 불순물인 소맥피도 포함하고 있기 때문에 양조업자들로부터 외면 당하고 있다.

본 연구에서는 보다 개량된 누룩의 제조에 필요한

기초자료를 얻기 위하여 누룩의 중요한 곰팡이로¹⁵⁻¹⁷⁾ 알려져 있는 *Rhizopus*속 중에서 효소생산능력과 향이 좋은 균주를 선발하였고, 이를 이물질이 없는 밀가루에 접종하여 배양할 때에 amylase와 protease의 생산에 미치는 여러 배양조건을 영향을 검토하였다.

재료 및 방법

1. 사용균주

본 실험에 사용된 곰팡이 균주는 *Rhizopus delemar* 5개, *Rhizopus japonicus* 3개이며 모두 한국의 누룩에서 저자가 분리·동정한 후 부천전문대학 식품영양과 미생물실험실에 보관하고 있는 것이다.

2. 밀가루

누룩제조에 사용한 밀가루는 1993년 3월에 제일제당에서 제분한 박력분 1등급이었다.

3. 누룩의 제조

밀가루에 급수비율이 28%되게 물을 첨가한 후 곰팡이의 포자를 소량 접종하고 30℃에서 일정시간 전배양을 한 다음 성형없이 입상하여 배양하였으며, 누룩의 성형실험시에는 직경 15cm 두께 3cm 되게 성형하여 배양하였다. 배양실의 온도는 30℃, 습도는 85%로 유지하여 48시간 배양한 후에 30℃에서 수분함량 10% 내외가 되게 건조하였다. 단, 밀가루의 열처리 실험시에는 물을 첨가한 밀가루를 수증기로 30분간 증

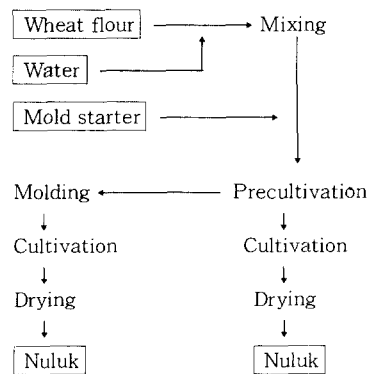


Fig. 1. Flow diagram for the preparation of Nuluk.

자하였고, 산처리 실험시에는 염산 0.5%를 함유하는 물을 밀가루에 급수하였다(Fig. 1).

4. 당화 효소력의 측정

국제청의 발효제 분석규정에¹⁸⁾ 따라 누룩 10g에 1% NaCl 용액 200ml를 가하고 가끔 흔들면서 실온에서 3시간 침출하여 침출액을 얻는다. 초산완충액으로 pH를 3.5 및 5.0으로 조정한 2% 가용성 전분용액을 기질로, 누룩 침출액을 효소액으로 하여 55℃에서 60분간 효소반응을 시킨 후 생성된 환원당의 양을 Lane-Eynon법으로¹⁹⁾ 측정하여 당화율을 산출하고 이에 효소의 회석배수를 곱하여 누룩의 당화력으로 하였다.

5. 단백질 분해 효소력의 측정

Anson 개량법에²⁰⁾ 따라 pH를 7.0 또는 3.0으로 조정한 0.6% casein 용액을 기질로, 누룩 침출액을 효소액으로 하여 40℃에서 10분간 효소반응을 시킨 후 생성된 Folin 발색성 비단백성 물질의 양을 Folin 비색법으로 측정하여 누룩 1g이 1분간에 생성하는 tyrosine의 mg수로 나타내었다.

6. 냄새의 검사

누룩의 냄새는 저자의 주관적인 판단에 기준하여 향 또는 불쾌한 냄새의 유무를 검사하였다.

결과 및 고찰

1. 균주의 선발

*Rhizopus*속의 곰팡이 중에서 누룩제조에 적합한 균주를 선발하기 위하여 누룩에서 분리하여 *Rhizopus*속으로 동정된 8개의 균주로써 밀가루누룩을 각각 제조하여 amylase와 protease의 효소활성, 향기로운 냄새 또는 불쾌한 냄새의 존재 유무를 조사해 본 결과는 Table 1과 같았다. 당화효소의 생산능력은 *Rhizopus delemar* 보다 *Rhizopus japonicus*가 높았고 단백질분해효소의 생산능력은 두 종류의 곰팡이가 서로 비슷하였다. 두 종류의 곰팡이 모두 균주에 따라 구수한 누룩 냄새를 나타내는 것과 퀴퀴한 냄새를 나타내는 것이 있었다. 8개의 균주 중에서 당화효소와 단백질분해효소의 생산능력이 좋고 냄새도 좋은 *Rhizopus japonicus* T2를 누룩제조를 위한 실험용 균주로 선발하였다.

2. 열처리 및 산처리의 영향

앞의 실험에서 선발된 *Rhizopus japonicus* T2로써 밀가루누룩을 제조할 때에 밀가루의 가열처리 또는 산 첨가가 당화효소와 단백질분해효소의 생산에 미치는 영향을 검토해 본 결과는 Fig. 2와 같았다. 가열처리의 영향을 보면 산성 protease의 생산은 가열처리를 한 쪽이 높았으나 당화효소와 중성 protease의 생산은 가열처리를 하지 않은 쪽이 훨씬 높았다. 또 산 첨가의 영향에서는 산성 protease의 생산은 산 첨가를 한 쪽

Table 1. Properties of wheat flour Nulukus made by different mold strains

Mold strains used	Saccharogenic activity		Proteolytic activity			
	pH3.5	pH5.0	pH3.0	pH7.0	Aroma*	Off-flavor*
<i>Rhizopus delemar</i> T1	200	520	44.5	21.9	-	+
<i>Rhizopus delemar</i> U1	800	3440	36.7	14.9	-	-
<i>Rhizopus delemar</i> V1	520	2480	41.2	16.6	+	-
<i>Rhizopus delemar</i> V2	240	360	43.3	17.9	+	-
<i>Rhizopus delemar</i> W1	560	2400	41.5	15.8	+	-
<i>Rhizopus japonicus</i> T2	1840	5600	42.1	19.2	+	-
<i>Rhizopus japonicus</i> U2	1640	5520	40.9	18.4	+	-
<i>Rhizopus japonicus</i> W2	480	5880	42.7	36.0	-	+

* Presence(+) or absence(-) of aroma and off-flavor in Nuluk.

이 높았으나 당화효소와 중성 protease의 생산은 산 첨가를 하지 않은 쪽이 훨씬 높았다. 이러한 현상은 전보²¹⁾에서 *Aspergillus oryzae*를 낱밀가루에 배양할 때에도 나타났으며 그 경향은 *Rhizopus japonicus*를 사용한 본 실험쪽이 훨씬 뚜렷하다. 본 실험에서 낱밀가루가 가열처리를 한 밀가루보다 당화효소의 생산에 훨씬

의 생산에 미치는 영향을 검토해 본 결과는 Fig. 3과 같았다. 당화효소와 단백질분해효소의 생산에 가장 적절한 급수비율은 밀가루의 무게에 대하여 28%이었으나 24~32%의 급수비율 범위에서는 급수비에 따른 현저한 차이가 나타나지 않았다. 이러한 결과는 *Rhizopus japonicus* 및 *Rhizopus oryzae*를 밀기울 배지에 배양하면서 protease 및 amylase 생산을 위한 최적 급수비율을 조사한 정²²⁾ 및 김 등²³⁾의 연구 결과보다 훨씬 낮은 수치인데 이는 배양기질이 다르기 때문에 나타나는 차이인 것으로 해석된다.

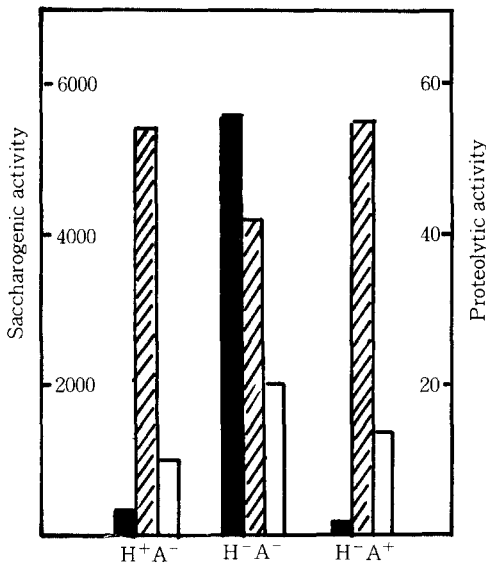


Fig. 2. Influence of heat or acid treatment of wheat flour on enzyme production of Nuluk by *Rhizopus japonicus* T2.

H⁺A⁻ : heat treatment and acid no treatment, H⁻A⁻ : heat no treatment and acid no treatment, H⁻A⁺ : heat no treatment and acid treatment.

■ : glucoamylase, ▨ : acid protease, □ : neutral protease.

Nuluk was made by 48 hours' incubation at 30°C.

좋은 결과를 보인 것은 매우 흥미있는 현상인데 이는 본 실험에 사용된 곰팡이가 낱밀가루를 함유하고 있는 누룩에서 분리되었다는 점을 고려해 볼 때 본 곰팡이의 생리적인 특성이므로 생각된다.

3. 수분첨가량의 영향

낱밀가루에 *Rhizopus japonicus* T2를 접종하고 배양할 때에 수분의 첨가량이 당화효소와 단백질분해효소

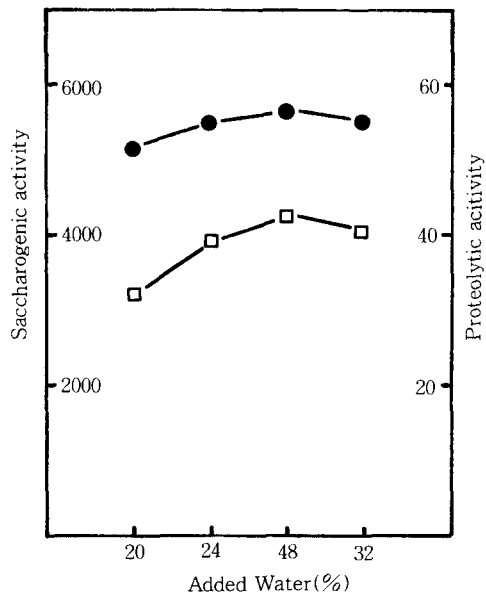


Fig. 3. Influence of the quantity of water added to wheat flour on enzyme production of Nuluk by *Rhizopus japonicus* T2.

●—● : glucoamylase, □—□ : acid protease. Nuluk was made by 48 hours' incubation at 30°C.

4. 성형 및 성형시기의 영향

낱밀가루에 *Rhizopus japonicus* T2를 접종하여 누룩을 제조할 때에 누룩의 성형 여부와 성형시기가 당화효소와 단백질분해효소의 생산에 미치는 영향을 조사해 본 결과는 Table 2와 같았다. 성형의 여부와 성형시기가 효소생산에 약간의 영향을 미치고 있음을 알수

Table 2. Influence of cultural time before or after molding on enzyme production of Nuluk by *Rhizopus japonicus* T2.

Cultural time(hr.)		Saccharogenic activity (pH 5.0)	Proteolytic activity (pH 3.0)
Before molding	After molding		
0	50	5580	42.5
10	40	5680	44.0
20	30	5680	44.0
30	20	5560	42.8
40	10	5430	41.8
50	0*	5600	45.3

* Zero hour of cultural time after molding means no molding practically.

있는데 당화효소의 생산은 곰팡이 접종 후 10~20시간 전배양을 한 후에 성형을 하는 것이 가장 좋았고, 단백질분해효소의 생산은 성형을 하지 않는 것이 가장 좋았으며 성형을 한다면 곰팡이 접종 후 10~20시간 후에 성형하는 것이 좋았다. 곰팡이 접종 후 바로 성형을 한 것은 당화효소의 생산과 단백질분해효소의 생산이 모두 좋지 않았다. 당화효소와 단백질분해효소의 생산을 동시에 고려한다면 곰팡이를 접종하고 10~20시간 전배양을 한 후에 누룩을 성형하는 것이 좋은 것으로 판단되었다. 이러한 결과는 *Aspergillus oryzae*를 사용한 전보²¹⁾의 결과와 일치하는 것으로 볼 수 있다. 곰팡이 접종 후 전배양을 한 후에 성형을 한 것이 좋게 나타난 이유는 전배양으로 곰팡이의 발아와 증식이 고루 이루어졌기 때문인 것으로 생각된다.

5. 배양온도의 영향

Rhizopus japonicus T2를 낱밀가루에 접종하고 배양할 때에 배양온도가 당화효소와 단백질분해효소의 생산에 미치는 영향을 조사해 본 결과는 Fig. 4와 같았다. 당화효소의 생산에 가장 적합한 배양온도도 28°C 이었고 단백질분해효소의 생산에 가장 적합한 배양온도도 28°C이었다. 이러한 결과는 *Rhizopus oryzae*를 밀기울에 배양하면서 당화효소생산의 최적온도를 조사한 김 등²³⁾의 연구결과와는 일치하나, 윤 등²⁴⁾의 *As-*

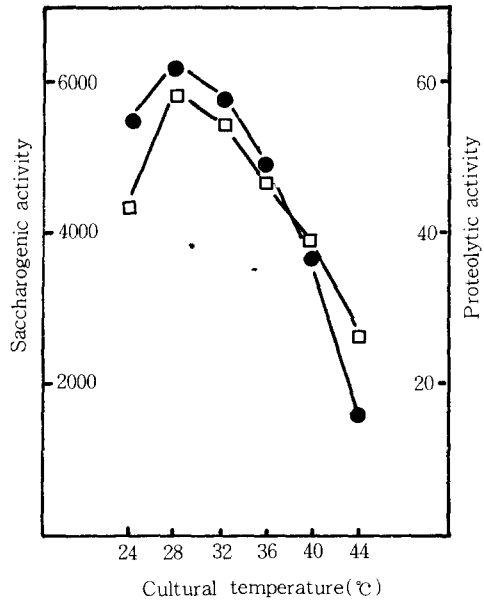


Fig. 4. Influence of cultural temperature on enzyme production of Nuluk by *Rhizopus japonicus* T2.

●—● : glucoamylase, □—□ : acid protease.

Nuluk was made by 30 hours' incubation at 30°C

pergillus usamii mut. *shirousamii*, 소²⁵⁾의 *Aspergillus awamori* var. *kawachii*, 박 등²⁶⁾의 *Aspergillus niger*의 amylase 생산최적온도보다는 5~8°C 정도가 낮다.

6. 배양시간의 영향

Rhizopus japonicus T2를 낱밀가루에 접종하고 28°C에서 배양할 때에 배양시간의 경과에 따른 당화효소와 단백질분해효소의 활성을 조사한 결과는 Fig. 5와 같았다. 당화효소는 12시간 배양시에 이미 상당히 높은 수준을 나타내었으며 36시간 배양시에 최고치에 도달한 후 72시간까지 계속 그 수준을 유지하였고, 단백질분해효소는 12시간 배양시에는 그 수준이 매우 낮았으나 36시간 배양시에 최고치에 도달하였고 그 이후 급격히 감소하였다. 당화효소와 단백질분해효소의 생

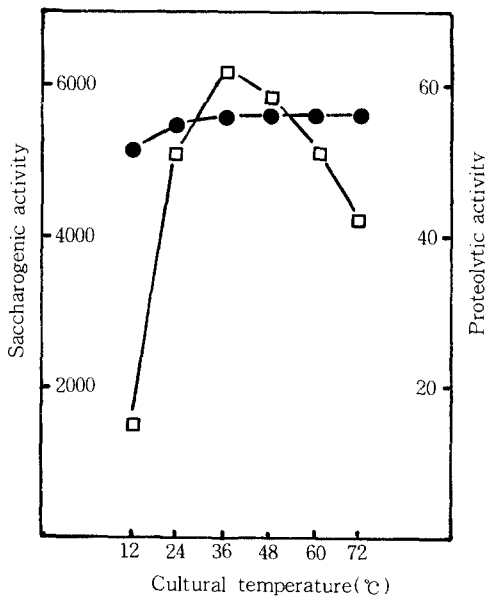


Fig. 5. Influence of cultural time on enzyme production of Nuluk by *Rhizopus japonicus* T2.

●-● : glucoamylase, □-□ : acid protease. Nuluk was made at 28°C

산을 동시에 고려한다면 28°C에서는 36~48시간 배양하는 것이 좋을 것으로 판단되었다. 이러한 결과는 *Rhizopus japonicus*의 단백질분해효소 생산을 위한 최적배양시간을 조사한 정²²⁾의 결과보다는 12시간 정도가 빠르며, *Rhizopus oryzae*의 당화효소 생산을 위한 최적배양시간을 조사한 김 등²³⁾의 결과보다는 36시간 정도가 빠르다. 또 본 실험의 결과에서 당화효소의 생산이 36시간 배양시에 최고치를 이룬 후 그 후에도 감소하지 않고 오래도록 그 수준을 유지하고 있는 점도 김 등²³⁾의 결과와 다른 점이며 이는 누룩제조에 관점에서 볼 때 매우 바람직한 현상이다.

요 약

당화효소와 단백질분해효소의 생산능력이 높고 향도 좋은 *Rhizopus japonicus* T2와 밀가루로써 누룩을 제조할 때에 당화효소와 단백질분해효소의 생산을 위

한 배양조건을 검토하였다. 날밀가루로 누룩을 만들었을 때에는 가열처리한 밀가루로 만들었을 때보다 당화효소의 생산은 현저하게 높아졌으나 산성 protease의 생산은 감소하였다. 밀가루에 0.5%의 염산을 함유하는 물을 급수했을 때에는 당화효소와 중성 protease의 생산이 감소하였다. 당화효소와 단백질분해효소의 생산에 가장 적합한 급수비율은 밀가루에 대하여 28%이었다. 곰팡이를 접종한 후 즉시 성형을 하는 것보다 10~20시간 전배양을 한 후에 성형을 하는 것이 당화효소의 생산에 좋았고 단백질분해효소의 생산은 성형을 하지 않은 것이 좋았다. 당화효소 생산의 최적온도도 28°C이었고 단백질분해효소 생산의 최적온도도 28°C이었다. 28°C에서 배양할 때에 당화효소 생산을 위한 최적배양시간은 36~72시간이었고 단백질분해효소 생산을 위한 최적배양시간은 36시간이었다.

참고문헌

1. 김호식 : 발효공학, 향문사, p.103~106(1975)
2. 김재욱 : 농산가공학, 향문사, p.267~269(1975)
3. 이두영 : 백국균 *Aspergillus kawachii kitahara*의 생태학적 연구, 한국미생물학회지, 6(4), 113 (1968)
4. 정호권, 김만근, 백운화 : 주류산업의 현황과 전망, 생물산업, 6(1), 16(1993)
5. 정동호 : 발효와 미생물공학, 선진문화사, p.257 (1985)
6. 소명환 : *Aspergillus kawachii*와 *Aspergillus oryzae*의 병용에 의한 탁주의 품질개선, 한국식품영양학회지, 4(2), 115(1991)
7. 이원경, 김정림, 이명환 : 국균을 달리한 탁주양조 중 유리아미노산 및 유기산의 소장, 한국농화학회지, 30(4), 323(1987)
8. 배상면 : 탁주양조기술, 배한산업주식회사 부설 효소연구소, p.133~135(1988)
9. 이두영 : 곡자제조방법, 한국특허 제272호 (1950)
10. 이병우 : 강력한 효소를 보유한 곡자제조법, 한국특허 제682호(1956)
11. 이성범 : 탁·약주류 제조에 있어서 효소원 및 그의 효율적인 첨가방법, 한국미생물학회지, 5(2), 43

- (1967)
12. 이두영 : 한국곡자의 발효생산력에 관한 연구(제2보), 증강소맥을 재료로 한 곡자제조, 한국미생물학회지, 7, 41(1969)
 13. 정기택, 유대식 : 고구마 전분질원료를 이용한 주류제조, 국세청기술연구소보, 제2호, 19(1969)
 14. 정호권 : 곡자의 개량에 관한 연구(제1보), 개량곡자의 제조 및 그 능력, 한국식품과학회지, 2, 88(1970)
 15. 이두영 : 한국곡자의 발효생산력에 관한 연구(제1보), 곡자중 함유 사상균의 분리와 그 성장, 한국미생물학회지, 5(2), 51(1967)
 16. 김찬조 : 탁주양조에 관한 미생물학적 및 효소학적 연구, 한국농화학회지, 10, 69(1968)
 17. 정기택, 유대식 : 고구마 전분질을 원료로 이용한 주류제조, 한국미생물학회지, 9, 103(1971)
 18. 국세청기술연구소 : 국세청기술연구소 주류분석규정, 국세청훈령 제743호, p.12~24(1979)
 19. Horwitz, W. : *Method of Analysis of the A.O. A.C.*, 12th ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington, p.189(1975)
 20. 유주현, 양한철, 정동효, 양용 : 식품공학실험, 제2권, 탐구당, p.474~479(1977)
 21. 소명환 : *Aspergillus oryzae* L2에 의한 밀가루누룩 제조시 amylase와 protease의 생산조건, 한국식품영양학회지, 6(2), 89(1993)
 22. 정만재 : *Rhizopus japonicus* S-62가 생성하는 단백질분해효소에 관한 연구, 한국식품과학회지, 9(1), 31(1977)
 23. 김찬조, 오만진, 이종수 : *Rhizopus oryzae*에 의한 생전분 분해에 관한 연구, 분리균주에 의한 효소생산조건 및 에탄올 발효, 한국산업미생물학회지, 13(4), 329(1985)
 24. 윤복현, 박윤중, 이석근 : *Asp. usamii shirousamii* U2의 국식배양에 의한 유기산 및 당화효소의 생성, 한국식품과학회지, 6(3), 127(1974)
 25. 소명환 : *Aspergillus kawachii kitahara*에 의한 탁주용 입국 제조시 유기산과 당화효소의 생성조건, 부천전문대학논문집, 제6집, 247(1986)
 26. 박윤중, 손천배 : 흑국균의 인공변이에 관한 연구, 한국식품과학회지, 14(1), 72(1982)

(1993년 5월 6일 수리)