

소곡주 공장의 공기로부터 곰팡이의 분리 및 동정

박지은 · 전영재 · 김지혜 · 김성환*
단국대학교 미생물학과 및 기초과학연구소

Isolation and Identification of Filamentous Fungi from Indoor Air of a Sogokju Traditional Rice Wine Factory

Ji Eun Park, Young Jae Jeon, Ji Hye Kim and Seong Hwan Kim*

Department of Microbiology and Institute of Basic Sciences, Dankook University, Cheonan 330-714, Korea

(Received June 17, 2008. Accepted June 24, 2008)

ABSTRACT: To investigate the mycoflora of indoor air in a Sogokju, traditional rice wine, factory, fungi were sampled and analyzed from the air of several rooms in the factory using an Anderson air sampler and from two kinds of Nuruk. Twelve fungal species belonging to the genera of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Gibberella*, *Cladosporium*, and *Talaromyces* were isolated. Species belonging to *Aspergillus* and *Penicillium* genera were the major species. Seven different species of *Penicillium* were isolated from each different room of the factory. The *Aspergillus* species found from indoor air of the factory was also found from Nuruk. *Rhizopus* sp. was commonly isolated from Nuruk but not from indoor air of the factory. This is first report of fungi present in indoor air of a traditional rice wine factory in Korea.

KEYWORDS: *Aspergillus*, Indoor air, Mycoflora, Nuruk, *Penicillium*, Sogokju rice wine factory

우리의 전통 민속주는 일제시대를 거치면서 약주, 탁주, 소주가 획일적으로 대량 공장 생산되면서 그 질과 품위를 영속시키지 못하였고 1962년 양곡관리법공포에 의하여 그나마 명맥을 유지해오던 쌀을 이용한 전통주 생산이 어려움을 겪었다. 그 후 1994년 법인 주류 면허 개방과 1995년 농민 및 생산자 단체의 주류제조면허 취득허가로 인하여 많은 전통주 제조장이 생겨났으나 전통주 제조 기능보유자의 노령화와 더불어 양조 방식도 서구적 양조방식과 외래주류의 모방에 치중하면서 전통주 생산을 위한 기술력의 부족을 가져와 전통주의 주질이 떨어지면서 경쟁력에 어려움을 겪어오고 있다. 현재 전국의 전통주 제조장은 45 여 개소에 이르고 있으나 이중 10 여개 업체를 제외하고는 영세성을 면치 못하고 있으며 경영의 어려움을 겪고 있는 실정이다.

전통민속주에 대한 미생물 연구는 민속주 제조방법이 주로 백미를 재료로 사용하고 기타 약제 첨가나 누룩을 이용하여 발효시키는 관계로 주로 누룩을 대상으로 미생물을 분리하여 좋은 술을 만드는데 이용하는 쪽으로 진행되어왔다(김, 1999, 2000). 그리고 주정 발효 중 탁주, 약주, 소주 까지 발효에 관여 하는 미생물의 조사 분포 연구를 통하여 우수 분리균주를 얻어 혼합배양을 통한 기존

민속주의 제조 및 품질을 개선하려는 시도가 이루어져왔다(최, 1997; 김, 1999).

소곡주는 국내 전통민속주 가운데 가장 오랜 역사를 지니는 것으로 알려져 있으며 백제 왕조때 부터 그 기원을 가지고 전통적 생산방식으로 제조되고 있는 것으로 지금의 시장에서도 볼 수 있는 주류이다. 한산 지방에서 널리 알려진 소곡주는 밀술 담금과 시루떡 찜기, 고두밥 사입 등의 과정을 전통 방식 그대로 고수하고 희박사입과 불완전발효를 통해 소곡주 특유의 감칠맛을 내고 있다. 최근 소곡주의 주질 개선을 위해 여러 가지 요소들이 제안되고 있는바, 제조 과정에 발생하는 곡주의 주질을 저하시키는 시어짐(이 등, 1996)을 해결하는 문제를 포함하여 주원료인 찹쌀 품종에 대한 개량 및 육종을 통해 수율증대를 꾀하고 육성된 품종에 대한 효율적인 발효 능력을 지닌 미생물 균주의 이용이 중요시 되고 있다. 곡주 제조 공정 중 요구되는 중요 미생물 자원은 사용되는 좋은 누룩과 제조 공장의 공기 중에 존재하는 미생물상에서 유래되는바 이에 대한 연구가 필요하나 국내에 연구 조사된 보고는 극히 드문 실정이다.

따라서 본 연구는 소곡주 제조에 영향을 미칠 수 있는 균류에 대한 기초 정보를 얻고자 소곡주 제조 공장에서 소곡주 제조에 사용되는 누룩과 함께 공장의 여러 시설 내의 공기로부터 균류를 분리하여 어떠한 균류가 존재하

*Corresponding author <E-mail : piceae@dankook.ac.kr>

는지 조사 분석 하였다.

재료 및 방법

공기 포집 및 균류 분리

2005년 10월부터 12월 사이 충청남도 한산지역에 소재한 소곡주 공장을 방문하여 소곡주 제조 과정의 순서에 따라 사용되는 사입실, 밀술실, 증자실, 여과실, 숙성실, 실험실 등에서 공기를 채집하였다. 공기 채집은 오후 2시경에 충돌식 미생물채집기인 앤더슨 채집기(Anderson sampler, 켈익 코리아)를 이용하여 2단으로 감자한천배지(PDA plate, Difco)를 설치한 후 각각 1분간 3회 반복으로 채집하였다. PDA plate에는 항생제인 ampicillin을 50~100 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 첨가하여 세균 성장을 억제함으로써 균류의 순수분리를 꾀하였다. 포집된 공기 시료는 즉시 실험실로 가져와 25°C 배양기에 설치 후 매일 오전 10시 및 오후 4시에 2회에 걸쳐 자라나오는 균사의 분리를 실시하였다.

누룩에서의 균류 분리

소곡주 공장에서 사용되는 누룩은 원래 경상도 지역의 누룩공장에서 제조되어 상업적으로 공급된 것으로 오랫동안 공장에서 사용되어져 왔었던 누룩을 사용하였다. 누룩 자체는 밀로 제조하는 것으로 소곡주공장의 경우 과거에는 국내에서 생산된 밀로 제조 되다가 국내 밀 재배가 줄어들면서 국외에서 수입된 밀(수입밀)을 이용하여 누룩을 제조한 것을 공급 받아 사용하고 있었다. 본 실험을 위해서는 국외에서 수입된 수입밀과 우리나라에서 재배하여 수확된 밀(우리밀)을 재료로 하여 동일한 누룩제조공장에서 동일한 방법으로 제조된 것을 사용하였다. 누룩에서의 균류분리는 아래와 같이 두 가지 방법으로 나누어 분리를 시도하였다.

1. 누룩 표면에서의 분리

균류를 분리하기 위해서 가루 형태로 도착한 2가지(우리밀, 수입밀) 누룩으로부터 각각 2g을 취하여 PDA 배지에 직접 균일하게 퍼지게 뿌린 후 25°C에 배양하였으며 매일 10시, 16시 시각에 2회에 걸쳐 자라나오는 균사를 분리하였다.

2. 누룩 내부에서의 분리

내부로부터 균을 분리하기 위해서 앞서 기술한 2가지 누룩 2g을 멸균된 유발에 넣고 유봉으로 고르게 분쇄 후 PDA 배지에 직접 균일하게 퍼지게 뿌린 후 25°C에 배양하면서 매일 10시 및 16시 시각에 2회에 걸쳐 자라나오는 균사를 분리하였다.

현미경 관찰 및 ITS rDNA 분석

순수 분리된 균류의 균사는 PDA, 또는 맥아추출한천배지(MEA), 귀리추출한천배지(OA) 등에 접종하여 실온에서 배양하면서 접종 3일 후부터 10일간 배양하면서 배지

에 자란형태 및 균총의 모양과 색, 균사의 특징 등을 관찰하였고 미세구조는 광학현미경(Karl Zeiss, Axioskop 40 모델)을 사용하여 균사 및 포자형태 등을 관찰하였다. 균류의 형태적 동정은 The Identification of Fungi(Dugan, 2006), Illustrated Genera of Imperfect Fungi(Barnett and Hunter, 1998), Atlas of Clinical Fungi(de Hoog *et al.*, 2000), Introduction to Food-and Airborne Fungi Seventh Edition(Samson *et al.*, 2004), Identification of common Aspergillus Species(Klich, 2002), Penicillium subgenus Penicillium: new taxonomic schemes, mycotoxins and other extrolites(Samson and Frisvad, 2004) 등의 서적을 참조로 하였다.

분자적 동정을 위해서는 셸로판지를 깔은 PDA 배지에 균을 접종 후 25°C에서 5일간 배양한 다음 셸로판지 위에 자란 균사를 살균된 메스를 이용하여 수확한 후 드릴을 이용하여 Kim 등(1999)의 방법에 따라 genomic DNA를 분리하여 사용하였다.

Nuclear rDNA 상에 존재하는 ITS1-5.8S-ITS2 rDNA 부위에 대한 PCR 증폭은 universal primer pairs인 ITS1-ITS4(White *et al.*, 1990) 보다 18S rDNA region이 약간 더 증폭되는 ITS1F-ITS4 primer(Kim *et al.*, 1999)를 이용하였고 PCR 반응조성은 총 50 μl 반응용액에 대해 fungal genomic DNA 200 ng, 각 primer 20 pmol, 4종의 각 deoxynucleotide triphosphates(dNTPs) 10 mM, 1 \times PCR buffer(10 mM Tris-Cl[pH 8.0], 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl), 1 unit Thermostable polymerase(Solgent Corp.)를 사용하였다. 반응은 Gene Amp-950 thermal cycler (ABI, USA)를 이용하여 앞서 수행한 Kim 등(1999)의 조건에 따라 수행하였다. 증폭된 PCR 반응산물은 1% agarose gel에서 밴드를 확인 후 겔 분리키트(Qiagen)를 사용하여 다시 분리한 후 Topo-T vector(Invitrogen)에 클로닝하고 Macrogen 사에 염기서열분석을 의뢰하여 분석결과를 얻었다. 결정된 염기서열은 GenBank DNA database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)에 있는 blastN 프로그램을 이용하여 그 유사도를 검색 비교하였다.

결과 및 고찰

소곡주 공장의 여러 방에서의 공기 중 균류 분리

공기는 여러 균류가 존재하는 전파매체로서 실내 환경에서는 그 환경조건에 따라 균류상이 달라지기도 한다. 특히 특정한 환경조건이 주어지는 상황에서는 특별한 종류의 균류가 계속해서 서식함으로써 공기 중에 흔히 존재할 수 있게 된다. 주정공장의 공기 중에 존재하는 균류는 경제적 측면으로 볼 때 두 가지 부류로 볼 수 있다. 한 부류는 곡주를 만드는데 바람직한 영향을 주는 균류이고 다른 하나는 오염을 통해 부정적인 영향을 주는 균류이다. 보다 나은 곡주를 제조하고자 하거나 균류에 의

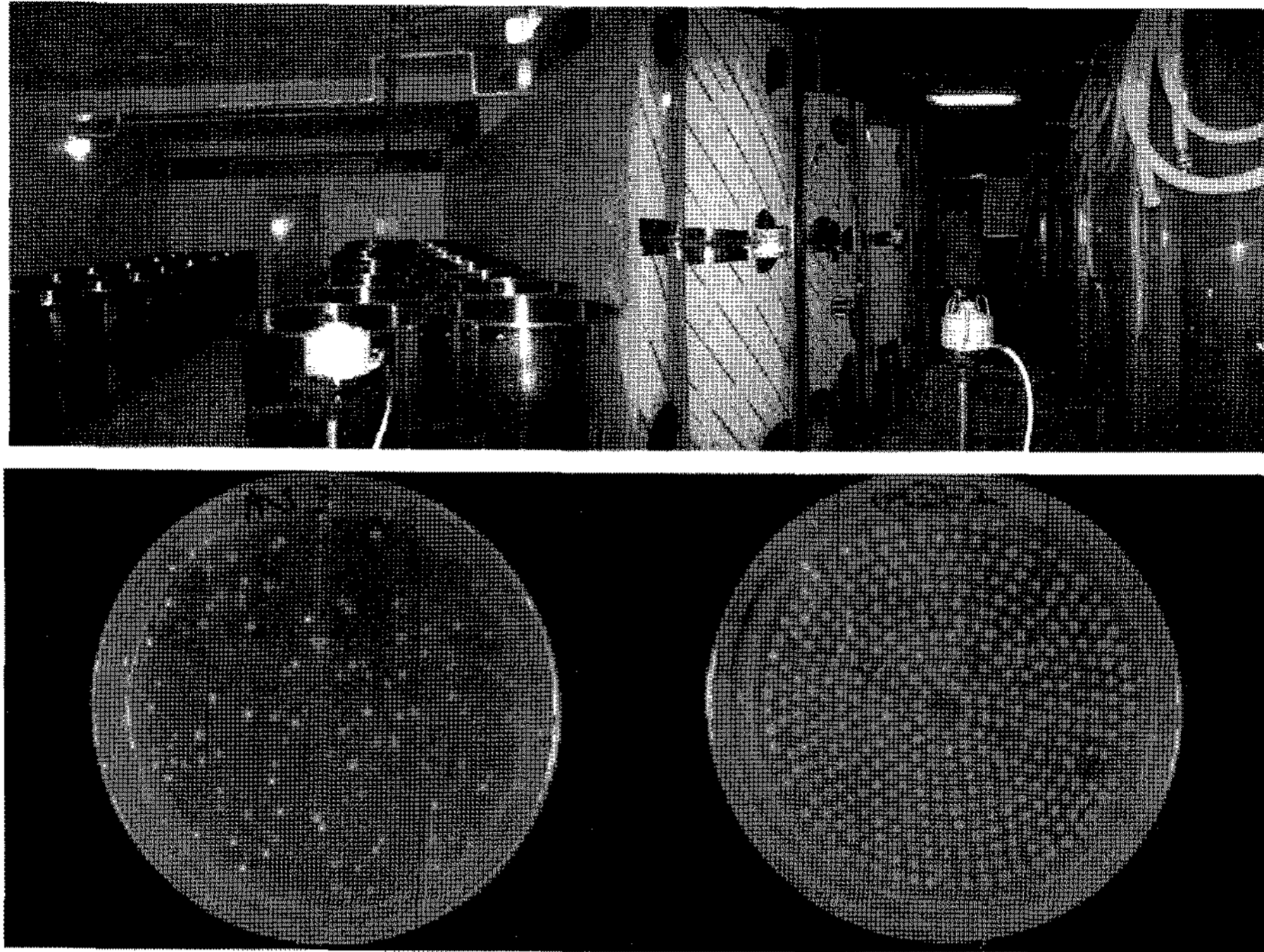


Fig. 1. Examples of air sampling (top) using an Anderson air sampler in two different rooms of a Sogokju rice wine factory and fungal colonies (bottom) detected from indoor air of the two rooms. White spots in the two plates indicate fungal colonies. Anderson sampler used is shown in the center of the top photos.

한 오염을 줄이고자 할 경우 공기 중에 존재하는 균류에 대한 정보는 매우 중요하다. 그러나 국내에서 주정공장에 존재하는 균류에 대한 연구보고는 극히 부족한 실정이다.

본 연구에서는 우리나라 전통술의 하나로서 충남지방 무형문화재로 지정되었고 여러 문헌에서 대체로 으뜸으로 평가 받는 소곡주를 대상으로 그 제품이 만들어지는 과정을 따라 공장의 여러 공간에 존재하는 공기 중의 균류를 조사하였다. Fig. 1은 소곡주 공장의 조사된 여러 방중에 두 개의 방에서 포집한 결과를 예로 나타낸 것이다. Fig. 1에 나타난 바와 같이 앤더슨 포집기를 이용하여 공기를 포집하여 장착된 MEA 배지에 노출시킨 후 배지를 3일간 배양시킨 결과 균류의 집락이 형성된 것을 볼 때 공기 중에 균류의 포자가 존재함을 추정할 수 있었다. 한 개의 plate 배지에 검출된 균류의 집락이 유사하면서 많은 관계로 계수하기가 곤란하여 plate 면적을 8등분 한 후 1등분 면적에 존재하는 균류를 분리하여 균주 수를 계수하였으며 3반복으로 진행된 결과의 평균값을 Table 1에 나타내었다. 균류의 분리는 밑술실(crude liquor-making room), 여과실(filtering room), 증자실(hard-boiled rice-making room) 등에서 사입실(mixing room), 저장실(storage & aging room), 실험실(laboratory) 등 보다 더 높게 분리되었다. 이는 서로 다른 방에서 포집한 공기를 노출시킨 배지에 형성된 균류의 집락 수가 차이가 있음을 알 수 있다. 이러한 차이는 Table 1의 소곡주 공장의 여러 방의 공기로부터 분리한 균주의 수에서 볼 수 있듯이 소곡주 공장

Table 1. Fungal species identified from indoor air of several rooms in a Sogokju rice wine factory

Indoor air sampled rooms	Number of isolate obtained ^a	Fungal species grouped
Filtering room	19	<i>Aspergillus</i> sp1 <i>Cladosporium</i> sp1 <i>Fusarium</i> sp1 <i>Penicillium</i> sp1 <i>Penicillium</i> sp2
Mixing room	8	<i>Aspergillus</i> sp2 <i>Aspergillus</i> sp3 <i>Penicillium</i> sp3
Storage & aging room	10	<i>Aspergillus</i> sp2 <i>Cladosporium</i> sp1 <i>Penicillium</i> sp4
Crude liquor-making room	21	<i>Aspergillus</i> sp1 <i>Penicillium</i> sp5
Hard-boiled rice-making room	17	<i>Aspergillus</i> sp1 <i>Aspergillus</i> sp3 <i>Penicillium</i> sp6
Laboratory	13	<i>Penicillium</i> sp7

^aAfter exposure to indoor air, the area of MEA medium in a plate was divided into eight sectors and fungal colonies formed in one sector were isolated and counted. The average of the counted numbers from three replicate plates was displayed.

의 공기 중에 존재하는 균류의 포자 농도가 서로 다른 방간에 차이가 있음을 보여준다.

분리 균주의 동정

이들 균주들을 순수 분리하여 배지 상에서 자라는 형태와 현미경 관찰을 수행한 결과 일반적으로 공기 중에 빈도가 높게 나타나는 *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium* 속 등에 속하는 균류와 *Fusarium* 속에 속하는 균류가 존재하였다. 이들 균류들은 배지 상에서 나타나는 모양과 색에 따라 형태적으로 유사한 균주들을 묶어서 몇 개의 그룹으로 나눌 수 있었다. *Aspergillus* 속은 3개의 그룹으로 나누었으며 이에 따라 *Aspergillus* sp1, sp2, sp3로 임시 표시하였다(Table 1). *Penicillium* 속은 7개 그룹으로 나누어 졌으며 이에 따라 *Penicillium* sp1부터 sp7으로 표시하였다. *Cladosporium* 속과 *Fusarium* 속은 모두

동일한 형태를 가지는 그룹으로 나타나 *Cladosporium* sp1와 *Fusarium* sp1으로 각각 표시하였다(Table 1). 그 후 그룹으로 나누어진 균주들을 대상으로 분자적 동정을 실시하였다. 형태적으로 유사한 각 그룹에서 균주 2개씩을 대표로 선정하여 ITS rDNA를 분석하였다. 실험에 사용한 primer를 이용하여 PCR 반응 후 증폭된 band의 크기는 대략 540 bp에서 580 bp에 이르는 단일 밴드였다. 증폭된 각각의 단일밴드를 sequencing 한 결과 각 그룹에서 선정한 2개의 균주는 동일한 염기서열을 가지고 있었다. 이에 따라 각 그룹 당 1개 균주의 염기서열만 Fig. 2에 나타내었다. 전체적으로 결정된 ITS rDNA의 크기는 작게는 535 bp에서 부터 크게는 595 bp였다. *Aspergillus* 속에 속하는 그룹의 경우는

Aspergillus sp1. 595bp

GGTGACCTGCGGAGGATCATTACCGAGTGCCTTGGGCCAACCTCCCATCCGTCTATTATAC
CCTGTGCTTCGGCGGGCCCGCCTTTCGGCCCGCGGGGGGCGCCCTTTCGCCCGGGCCCGTGC
GCCGAGACCCCAACACGAACACTGTCTGAAAGCGTGCAGTCTGAGTTGATTGAATGCAATCAGTAAAA
CTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCGGGCATCGATGAAGAAGCAGCGAAATGCGATAACTAATGTAAT
TGCAGAAATCAGTGAATCATCGAGTCTTGAACGCACATTGCGCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCT
GTCCGAGCGTATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTGCGCCCTCCCTCTCCGGGGGACG
GGCCGAAAGGCGAGCGGGCCCGGTCGATCTCGAGCGTATGGGGCTTGTACATGCTCTGTAGG
ATTGCCGCGCCCTTTCGACGCACATTGCAACCCCTGGTATTCCGGGGGGTATGCTGTCGAGCGTCAT
GCTGAACCTAAGCATATCAATAAGCGCGAGGAAA

Aspergillus sp2. 574bp

CGTAGGTGACCTGCGGAGGATCATTACTGAGTGGGTCCTCGGGGCCAACCTCCACCCGTGATAC
CGTACCTTGTGCTTCGGCGAGCCCGCCCTTCTTAGGGTGGCACAGCGCTCGCCGGAGACCCAA
CGTGAACACTGTCTGAAGTTTGTGCTGAGTTCGATGATCGCAATCAGTAAAACTTCAACAATGG
ATCTCTGGTTCGGGCATCGATGAAGAAGCAGCGAAATGCGATAATTAATGTAATGCAAGTTCAGT
GAATCATCGAGTCTTGAACGCACATTGCAACCCCTGGTATTCCGGGGGGTATGCTGTCGAGCGTCAT
TGCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGTGCTGCTCCCGCCCGGGGACGGGCGGAAAGGACGCG
CGGCACCGCTCGGTCCTCGAGCGTATGGGGCTTGTACCCGCTCTGTAGGCGCGCCGCTGCTGG
CCGACGCTGAAAGCAACCAATCTATTTTATCATAGTTGACCTCGGATCAGGTAGGATACCCGCTGAAC
TAAGCATATCATAA

Aspergillus sp3. 582bp

TTCGTAGTGACCTGCGGAGGATCATTACCGAGTGTAGGGTTCCTAGCGAGCCCAACCTCCACCCGT
TACTGTACCTTAGTTGCTTCGGCGGGCCCGCATTTCATGGCCCGGGGGCTCTCAGCCCGGGCCCGC
GCCCGCCGGAGACACCAGAACTCTGTCTGATCTAGTGAAGTCTGAGTTGATTGATCGCAATCAGTAA
AACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCGGGCATCGATGAAGAAGCAGCGAAATGCGATAACTAGTGTGA
ATTGCAAGATTCCGTGAATCATCGAGTCTTGAACGCACATTGCGCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGC
CTGTCCGAGCGTATTGCTGCCATCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGTGCTGCTCCCTCTCCGGGGGG
ACGGGCCCCAAGGCGAGCGGGCCCGGTCGATCTCGAGCGTATGGGGCTTGTACCCGCTCTGT
AGGCCCGCCCGGCTTTCGCAACGCAAAATCAATCTTTTCCAGTTGACCTCGGATCAGGTAGGATAC
CCGCTGAACCTAAGCATATCAA

Cladosporium sp1. 535bp

GGTGACCTGCGGAGGATCATTACAAGTACCCCGGCTAACCCCGGGATGTCATAACCCCTTGTGTG
CCGACTCTGTGCTTCGGCGGACCCCTGCCTTCGGCGGGGGCTCCGGGTGGACACTTCAAACCTTCTGC
GTAACCTTTCAGTCTGAGTAACTTAATAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA
ATCGATGAAGAAGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTAATGCAAGTTCAGTGAATCATCGAATCTTT
GAACGCACATTTCGGCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCTGTTTCGAGCGTATTTCACCACTCAAGCCT
CGCTTGGTATTGGGCATCGCGGTCCCGCGCTGCTCAAACTCGACCGGCTGGGTCTTCTGCCCTCAAGC
GTTGTGAAACTATTCCGTAAGGGTGTTCGGGAGGCTACGCCGTAABACAACCCATTTCTAAGGTTGA
CCTCGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTAAGCATATCATA

Fusarium sp1. 549bp

TTGGTGACCGAGCGGAGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCAAACCCCTGTGAACATACCTTAATGTTG
CCTCGGGGATCAGCCCGCCCGTAAACGGGACGGCCCGCCAGAGGACCCAACTTAATGTTTCTT
ATTGTAACCTTCGAGTAAACAAACAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA
GATGAAGAAGCAGCAAAATGCGATAAGTAATGTAATGCAAGTTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAA
CGCACATTGCGCCCGTGGTATTCCGGCGGGCATGCTGTTTCGAGCGTATTTCACCCCTCAAGCCCGG
GGTTTGGTGTGGGATCGGCTCTGCTTCTGGCGGTGCGCCCGGAAATACATTGGCGGTCTCGCTGC
AGCTCCATTGCGTAGTAGTAAACCTCGCAACTGGAACGCGGGCGCGGCTATGCGCTAAACCCCAACT
CTGAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACCTAAGCATATCAATAAG

Penicillium sp1. 571bp

GGTTCGTAGTACTGCGGAGGATCATTACCGAGTGGGGCCCTCTGGGTCCAACCTCCACCCGTGTTT
ATTTTACCTTGTGCTTCGGCGAGCTGCCTTCGGGCTGCGGGGGGCATGCCCCGGGTCCGCGCTC
GCCGAGACACCTTGAACCTCTGCTGAAAGATTGAGTCTGAGACAAAATAAATAAATAAATAAATAA
ACAACGGATCTCTTGGTTCGGGCATCGATGAAGAAGCAGCGAAATGCGATAACTAATGTAATGCAAA
ATTGAGTGAATCATCGAGTCTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGTATTCCGGAGGGCATGCCTGTCCGA
GCGTATTGCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGTGCTGCTCCCTCTTGGGGGGACGGGCCGAA
AGGCAGCGCGCGCCCGCTCCGGTCCGCTCGAGCGTATGGGGCTTGTACCCGCTCTGTAGGACTGGCC
GCGCTGCCGATCAACCAACTTTTTCCAGTTGACCTCGGATCAGGTAGGATACCCGCTGAACCTAA
GCATATCAATA

Penicillium sp2. 572bp

CGTAGGTGACCTGCGGAGGATCATTACCGAGTGGGGCCCTCTGGGTCCAACCTCCACCCGTGTTTAT
TTACCTTATTGCTTCGGCGGGCCCGCCTTCACTGGCCCGCGGGGGCTCACGCCCCGGGCCCGCGCCCG
CCGAAGACACCCGAACCTCTGCTGAAAGATGAAGTCTGAGTGAATAATAAATAAATAAATAAATAA
CAACGGATCTCTTGGTTCGGGCATCGATGAAGAAGCAGCGAAATGCGATAACTAATGTAATGCAAA
TCAGTGAATCATCGAGTCTTGAACGCACATTGCGCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGC
GTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGCTCGTCTCCGATTCCGGGGGACGGGCCGAAA
GGCAGCGCGGCACCGCTCCGGTCCCGAGCGTATGGGGCTCTGTACCCGCTCTGTAGGCGCGCCGCG
CGCTTGGCGATCAACCAAAATTTTTTCCAGTTGACCTCGGATCAGGTAGGATACCCGCTGAACCTAA
GCATATCATAAG

Penicillium sp3. 584bp

GTTCGTAGGTGACCTGCGGAGGATCATTACCGAGTGGGGCCCTCGGGGCCAACCTCCACCCGTGTC
TCTATACCTTGTGCTTCGGCGGGCCCGCCTTGGTCCGGGGGACATCCGTCCCGGGGCG
CCGCGCCCGGAGCGCTCTGTGAACCTGATGAAGATGGGCTGCTGAGTATTATGAAAATGTCAAA
ACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCGGGCATCGATGAAGAAGCAGCGAAATGCGATAAGTAAATGTGAA
TTGCGAAGATTCCGTGAATCATCGAATCTTGAACGCACATTGCGCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCC
TGTCGAGCGTCAATTTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGTGCTGCTCCCGGGGACCTGCCG
AAAGGCGAGCGGACGCTCGTCTGGTCCCGAGCGTATGGGGCTCTGTACTCGCTCGGAAGGACCTGC
GGGGTTGGTCCACCACATTTTACCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGATACCCGCTGAACCTAA
GCATATCATAAAGGGAAAGAAA

Penicillium sp4. 572bp

TTCGTAGTGACCTGCGGAGGATCATTACCGAGTGGGGCCCTCTGGGTCCAACCTCCACCCATGTTTA
TTGTACCTTGTGCTTCGGCGGGCCCGCCTCACGGCCCGCGGGGGCTTCTGCCCTTTCGGCCCGCGCCCG
CCGAAGACACCATTGAACACTGTCTGAAGATTGAGTCTGAGCAATAGCTAAATAAGTTAAAATTTCA
ACAACGGATCTCTTGGTTCGGGCATCGATGAAGAAGCAGCGAAATGCGATAACTAATGTAATGCAAA
ATTGAGTGAATCATCGAGTCTTGAACGCACATTGCGCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCGTCCGGA
GCGTATTGCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGCCCCCTCTCCCTTCCCGGGGACGGGCCGAA
AGGCAGCGCGGCACCGCTCCGGTCCCGAGCGTATGGGGCTTGTACCCGCTCTGTAGGCGCGCCG
GGCGTTGCCGATCAACCAAAATTTTTTCCAGTTGACCTCGGATCAGGTAGGATACCCGCTGAACCT
AAGCATATCATA

Penicillium sp5. 570bp

TTCGTAGGTGACCTGCGGAGGATCATTACTGAGTGGGGCCCTCTGGGTCCAACCTCCACCCGTGTTTA
TTGTACCTTGTGCTTCGGCGGGCCCGCCTCACGGCCCGCGGGGGCTTCTGCCCTTTCGGCCCGCGCCCG
CCGAAGACACCATTGAACACTGTCTGAAGATTGAGTCTGAGCAATAGCTAAATAAGTTAAAATTTCA
ACAACGGATCTCTTGGTTCGGGCATCGATGAAGAAGCAGCGAAATGCGATAACTAATGTAATGCAAA
AATTCAGTGAATCATCGAGTCTTGAACGCACATTGCGCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCGTCCG
AGCGTATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGCTTGTGCCCTTTCGGGGGACGGGCCGAAAG
GCAGTGGCGGCACCGTCCGATCTCGAGCGTATGGGGCTTGTACCCGCTCTGTAGGCGCGCCGCTG
CTTCCGACCCCATCAATCTTTTTTCCAGTTGACCTCGGATCAGGTAGGATACCCGCTGAACCTAA
GCATATCATAA

Penicillium sp6. 573bp

CGTAGGTGACCTGCGGAGGATCATTACCGAGTGGGGCCCTCTGGGTCCAACCTCCACCCGTGTTTAT
TTACCTTGTGCTTCGGCGGGCCCGCCTTACCTGGCCCGGGGGGCTTACGCCCCGGGCCCGCGCCCG
CCGAAGACACCTTCGAACCTGTCTGAAGATTGAAGTCTGAGTGAATAATAAATAAATAAATAAATAA
ACAACGGATCTCTTGGTTCGGGCATCGATGAAGAAGCAGCGAAATGCGATAACTAATGTAATGCAAA
TTCAGTGAATCATCGAGTCTTGAACGCACATTGCGCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCGTCCGAG
CGTATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGCCCCCTCCCGGATCTCCGGGGGACGGGCCGGA
AAGGCAGCGCGGCACCGCTCCGGTCCCGAGCGTATGGGGCTTGTACCCGCTCTGTAGGCGCGCCG
GGCGTTGCCGATCAACCAAAATTTTTTCCAGTTGACCTCGGATCAGGTAGGATACCCGCTGAACCT
AAGCATATCATA

Penicillium sp7. 558bp

ACCTGCGGAGGATCATTACTGAGTGGGGCCCTCTGGGTCCAACCTCCACCCGTGTTTATTGTACCTTG
GTGCTTCGGTGCGCCCGCTCACGGCCCGGGGGGCTTCTGCCCGGGTCCGCGCGCACCGGAGACA
CTATTGAACCTCTGCTGAAAGATTGAGTCTGAGCATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA
TCTTGGTTCGGGCATCGATGAAGAAGCAGCGAAATGCGATAACTAATGTAATGCAAAATTGAGTGA
TCATCGAGTCTTGAACGCACATTGCGCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCGTCCGAGCGTATTG
TGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGCTCCGTCGCCCGGGGACGGGTCGAAAGGCGAGCGCGCAC
CGAGTCCCGTCTCGAGCGTATGGGGCTTGTACCCGCTCTGTAGGCGCGCCGCGCACAAAC
CAATCATCTTTTTTCCAGTTGACCTCGGATCAGGTAGGATACCCGCTGAACCTAAGCATATCAATA

Fig. 2. Determined nucleotide sequences and length (bp) of ITS rDNA regions in the different isolate groups of *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, and *Penicillium* obtained from indoor air of a Sogokju rice wine factory.

Table 2. GenBank search results of sequence similarity between known fungal ITS rDNAs and the ITS rDNAs of the different isolate groups of *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, and *Penicillium* obtained from indoor air of a Sogokju rice wine factory

Grouped species ^a	Max score	Species ^b /GenBank no.	Grouped species	Max score	Species/GenBank no.
Asp1	1074	<i>A. awamori</i> /DQ235784	Psp2	1048	<i>P. paneum</i> /EU128612
	1074	<i>A. niger</i> /AB369898		1048	<i>P. paneum</i> /DQ339571
	1070	<i>A. tubingensis</i> /EF621571		1048	<i>P. paneum</i> /DQ339554
Asp2	1046	<i>A. ochraceus</i> /AY373854	Psp3	1037	<i>Talaromyces flavus</i> /U18354
	1027	<i>A. westerdijkiae</i> /DQ682565		979	<i>P. pinophilum</i> /AB369480
	1026	<i>A. westerdijkiae</i> /EF634412		979	<i>P. verruculosum</i> /AF510496
Asp3	1062	<i>A. oryzae</i> /EU301638	Psp4	1040	<i>P. corylophilum</i> /AY373906
	1062	<i>A. oryzae</i> /AY373848		1031	<i>P. corylophilum</i> /EU128646
	1062	<i>A. flavus</i> /DQ46981		1022	<i>P. corylophilum</i> /AF034457
Csp1	974	<i>C. cladosporioides</i> /DQ810182	Psp5	976	<i>P. sclerotiorum</i> /AY373930
	974	<i>C. coralloides</i> /AF393695		966	<i>P. sp.</i> /EU076956
	974	<i>C. tenuissimum</i> /AJ00331		957	<i>P. grabrum</i> /EU644087
Fsp1	1014	<i>Gibberella avenacea</i> /EU255802	Psp6	1044	<i>P. crustosum</i> /AY373907
	1009	<i>Gibberella avenacea</i> /AY147285		1044	<i>P. expansum</i> /AY425984
	1009	<i>Gibberella avenacea</i> /AJ279478		1044	<i>P. commune</i> /AF455527
Psp1	1033	<i>P. olsonii</i> /AY373925	Psp7	1020	<i>P. grabrum</i> /AY373915
	1022	<i>P. olsonii</i> /EF634440		1020	<i>P. grabrum</i> /EU128643
	1022	<i>P. olsonii</i> /DQ123662		1018	<i>P. grabrum</i> /EU128622

^aGrouped species; Asp: *Aspergillus* sp., Csp: *Cladosporium* sp., Fsp: *Fusarium* sp., Psp: *Penicillium* sp. ^bSpecies; A: *Aspergillus*, C: *Cladosporium*, P: *Penicillium*.

574, 582, 592 bp 크기를 가지고 있었고 *Penicillium* 속에 속하는 그룹의 경우는 558, 570, 571, 572, 573, 584 bp의 크기를 가지고 있었다. *Cladosporium*과 *Fusarium* 그룹은 각각 535 bp와 549 bp 크기를 가지고 있었다.

이에 따라 Table 2에 얻어진 ITS rDNA 염기서열을 GenBank database에 등록된 균류의 염기서열과 유사도 비교를 수행하였다. 유사도 검색은 highly similar sequence option을 사용하였고 그 결과 유사도가 높을수록 max score 값이 높게 나타나는 결과를 얻었다(Table 2). 이중 가장 수치가 높게 나온 3개의 ITS rDNA 유전자 부위에 대해 순서대로 해당 균류의 이름과 GenBank accession number를 Table 2에 제시하였다. Table 2에 나타난 결과에 의하면 *Aspergillus* sp2는 *A. ochraceus*로 *Fusarium* sp1은 *Gibberella avenacea*로 그리고 *Penicillium* sp1은 *P. olsonii*로 *Penicillium* sp2는 *P. paneum*로, *Penicillium* sp3는 *Talaromyces flavus*로 *Penicillium* sp4는 *P. corylophilum*으로 *Penicillium* sp5는 *P. sclerotiorum*으로 *Penicillium* sp7은 *P. grabrum*으로 각각 동정되었다. *Aspergillus* sp1은 *A. awamori* 및 *A. niger*, *A. tubingensis*와 동일한 유사도값을 나타내었고 *Aspergillus* sp3는 *A. oryzae*, *A. flavus* 등과 동일한 유사도 값을 나타내어 분자적 동정을 내리기 어려웠다. 따라서 *Aspergillus* sp1과 *Aspergillus* sp3 그룹에 대해서는 calmodulin 유전자 분석이나 여러 배지에 키운 성상을 비교하는 연구를 통하여 추가적인 연구가 필요하다. *Penicillium*의 경우는 *Penicillium* sp6가 *P. crustosum*, *P. expansum*, *P. commune* 등과 동일한 유사도를 보여

이들에 대한 분석도 elongation 1- α 유전자 분석을 비롯한 좀 더 연구가 필요하다. *Cladosporium*의 경우도 3개의 종이 같은 값을 보여 ITS rDNA 분석으로는 구분이 어려워 다른 부분의 유전자 분석이 병행되어야 할 것이다.

소곡주 공장의 시설을 살펴보면 여과실은 발효주정을 거르고 난 찌꺼기를 밖으로 보내는 경로를 갖추어 외부 공기와 접촉이 많은 특성을 가지고 있다. 이런 환경 조건의 영향인지는 몰라도 다른 방에 비하여 여과실에서 더 다양한 균류가 검출되었다. 분리 동정된 균주 중 *Aspergillus*와 *Penicillium* 속에 속하는 균류는 조사된 대부분의 방에서 존재하고 있음을 볼 수 있다. 따라서 이들 두 속의 균류는 소곡주 공장의 공기 중에 존재하는 주요 속으로 추정된다. 종별로 보면 *Aspergillus* 속에서는 *A. awamori*, *A. oryzae*, *A. niger* 등이 존재할 것으로 추정된다(Table 1, 2). 이중 흑국균인 *A. awamori*는 Asian food fermentation과 연관이 높은 균이며 황국균인 *A. oryzae*는 청주나 약주 주조에 쓰이는 누룩을 비롯하여 간장 된장 용 누룩에서도 많이 분리되는 것으로 전분의 당화에 중요한 역할을 하는 균들로 알려져 있다(소, 1991, 1995). *A. niger* 또한 주정 발효에 관여하는 것으로 알려져 있다. 특히 *Aspergillus oryzae*는 일반적으로 누룩곰팡이로 잘 알려져 있다. 소곡주가 찹쌀과 맵쌀을 주원료로 하여 담가지는 것을 볼 때 *A. awamori*와 *A. oryzae*가 이들 쌀 종류의 기질이 많이 노출된 증자실, 밑술실, 사입실, 여과실 등에서 나타나는 것으로 보여 진다. 즉 이들 균류가 많이 번식할 수 있는 조건을 소곡주 공장이 가지고 있는 것으로 사료된다. 한

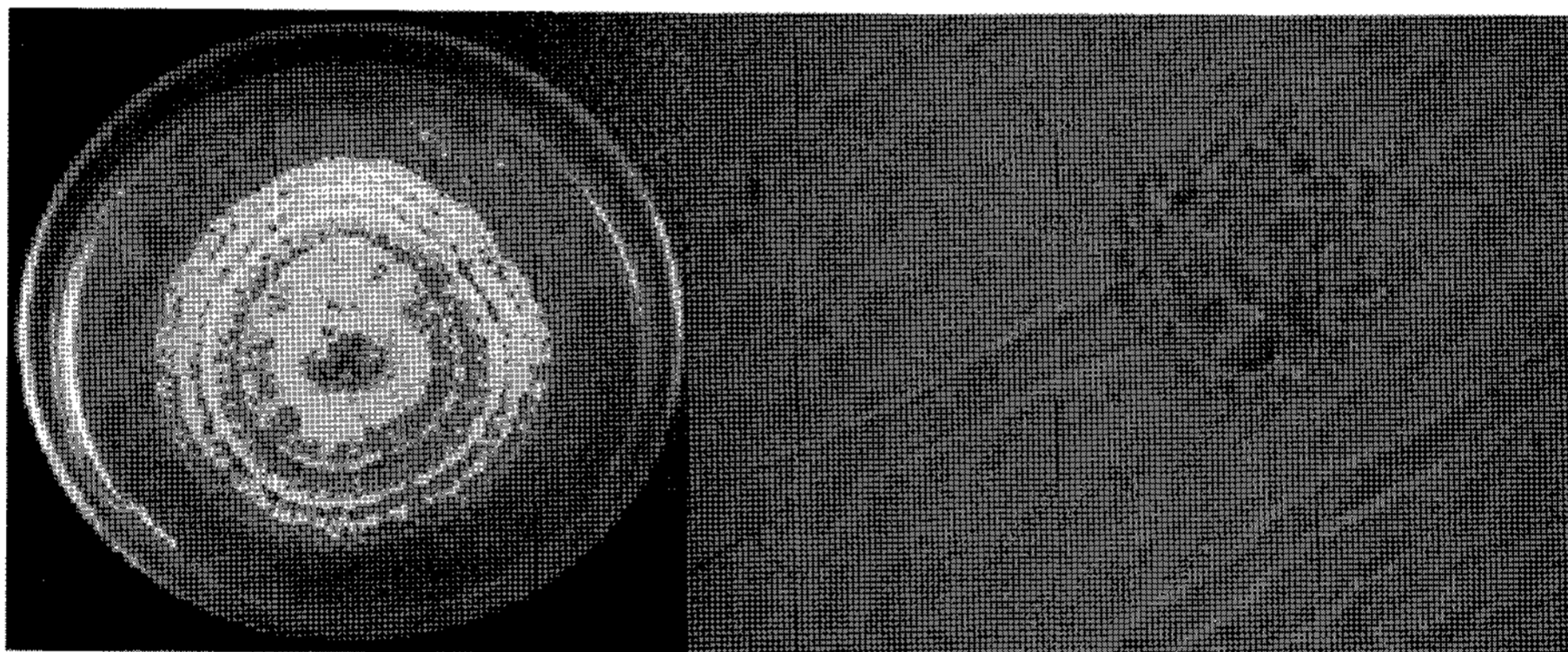
편 ochratoxin A 균독소를 내는 균으로 알려진 *A. ochraceus*(Klich, 2002)은 상대적으로 제한되게 저장실과 사입실에서 나타났다(Table 1).

Penicillium 속에서는 *P. olsonii*, *P. paneum*, *P. corylophilum*, *P. sclerotiorum*, *P. glabrum* 등 5종이 검출되었다. 이들 종들은 사입실을 제외하고는 다른 조사된 모든 방에서 검출되었는데 사입실에서 검출된 *Talaromyces flavus*가 *Penicillium dangeardii*의 완전세대임을 고려하면 조사된 6개 방 모두에서 *Penicillium*이 검출된 셈이다. 흥미롭게도 각 방마다 존재한 *Penicillium*종은 모두 서로 상이하였다. 이는 *Aspergillus* 균류에 비하여 *Penicillium* 균류가 종 수준에서 상당히 다른 분포를 소곡주 공장 실내에서 하고 있음을 알 수 있다. 이중에 *P. glabrum*은 조·이(1997) 등이 조사한 국내 42개 지역에서 수집한 주정용 누룩에서 분리 빈도는 낮지만 분리된 바 있다. 나머지 5종의 *Penicillium*은 주정과 관련하여서는 특별히 보고된 사항이 없으며 *P. olsonii*는 육가공 공장에서 오염을 일으키는 균으로 알려져 있다. 한편 *Talaromyces flavus*는 식물 병원균인 *Sclerotium rolfii*와 *Verticillium dahliae* 등에 생물학적 방제균으로 많이 연구가 되어왔으며(Madi *et al.*, 1997), 최근 국내에서는 apple stem grooving virus를

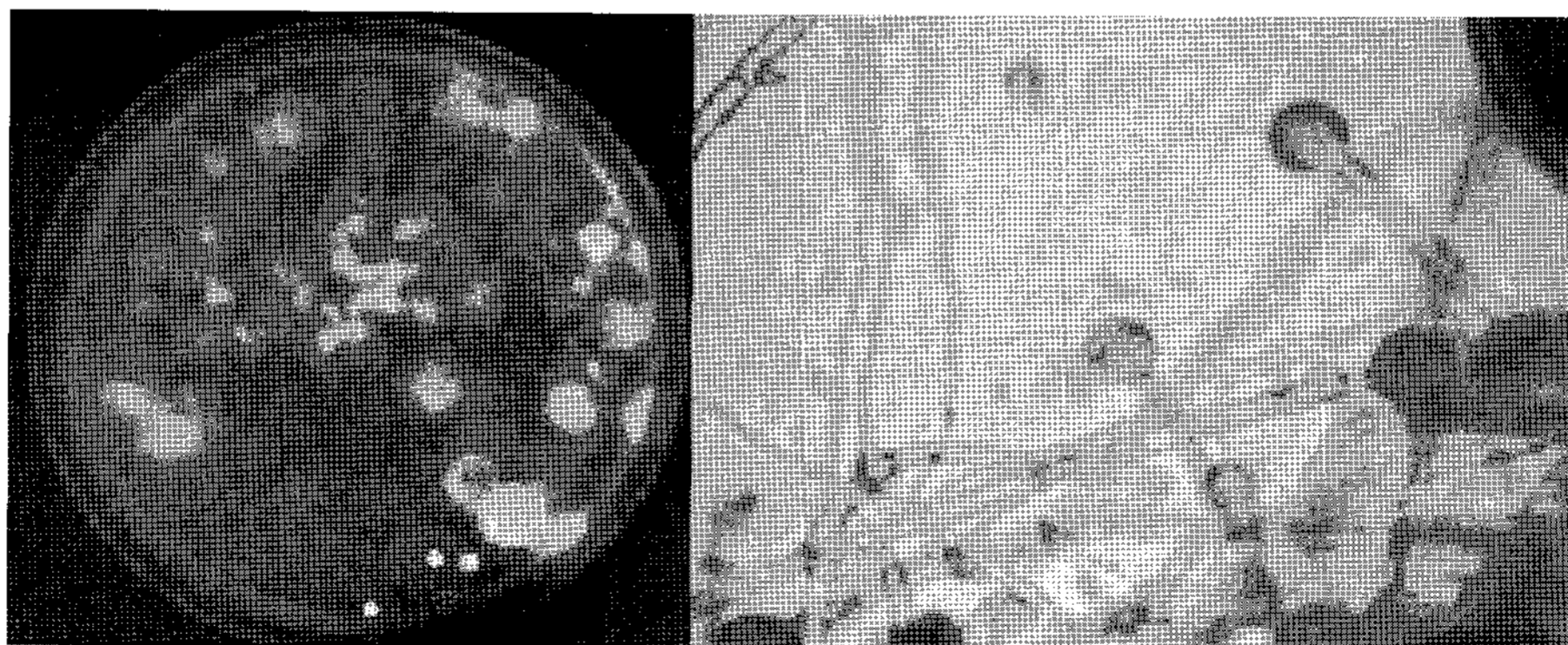
매개하는 균류로 보고 된 바 있다(Shim 등, 2006).

누룩으로부터 진균의 분리 및 동정

곡주를 제조하기 위하여 사용되는 발효제인 누룩을 오랫동안 사용하면 누룩에 존재하던 균류가 소곡주 공장의 공기 중에 존재할 가능성이 있어 이를 알아보려고 공장에서 보통 주문하여 쓰는 누룩으로부터 균류의 분리를 시도하였다. 배지에 접종된 누룩으로부터 피어나는 균류는 기균사를 대부분 형성 하였다(Fig. 3). 1개 plate 당 뚜렷하게 자라나와 분리된 균류의 평균 균주의 수는 Table 3과 같다. 균류 조사 때 plate에 뚜렷하게 집락을 보인 세균의 집락도 같이 조사하였다. 균류의 분리 빈도는 수입밀 보다 우리나라에서 재배한 밀로 만든 누룩에서 다소 높았다. 이와 반해 세균 분리 빈도는 수입밀로 만든 누룩에서 다소 높았다. 이러한 성향은 누룩을 곱게 갈아서 분리하던 알갱이로 분리하던 비슷한 양상이었다. 누룩에서 분리된 균주를 순수 배양하여 본 결과 사상균 균총을 이룬 배지에서 관찰된 균류는 모두가 형태적으로는 *Aspergillus* 또는 *Rhizopus* 균류의 성상으로 나타났다. 이들 두 가지 성상의 균류에 대하여 종 수준까지 알아보려고 임의적으로 8개 균주씩을 각각 선택하여 ITS rDNA 염기서열을 조사



<*Aspergillus* sp3>



<*Rhizopus* sp.>

Fig. 3. Colony morphology (left), and microscopic image (right) of *Aspergillus* sp3 and *Rhizopus* sp. that were dominantly isolated from both Nuruk made with domestically produced wheat and imported wheat.

Table 3. Comparison of the number of fungal isolates obtained from the Nuruk made with domestically produced wheat and imported wheat

	Fermented malt made with domestically produced wheat	Fermented malt made with imported wheat
Isolated from non-ground malt	35 ^a /7 ^b	23/11
Isolated from ground malt	30/6	24/10

^aNumber of fungal isolate.

^bNumber of bacterial isolates.

한 결과 모두 *Aspergillus* sp3 그룹과 *Rhizopus* sp.로 동정되었다(Fig. 3). 따라서 수입밀로 제조하나 우리밀로 제조하나 누룩에 존재하는 균류의 종류는 비슷함을 알 수 있었다. 이는 같은 누룩제조 공장에서 제조되기 때문에 같은 균류가 나오는 것으로 사료된다. 이 결과로 볼 때 소곡주 공장의 공기 중에 고루 분포하는 *Aspergillus* 균류는 소곡주 제조 과정에 사용하는 누룩에서 유래할 가능성이 높아 보인다. 또 하나의 흥미로운 사실은 밀로 제조한 누룩에 *Rhizopus* sp.가 누룩에 많이 존재하는데 본 연구 조사에서는 Table 1과 2에서 보여주듯이 공기 중에서 이들 균류가 검출되지 않은 사실이다. 왜 *Rhizopus*균이 검출되지 않았는지에 대한 이유는 현재 확실치 않다. 기존에 알려진 바에 의하면 밀을 포함하는 맥류에 서식하는 사상균은 *Rhizopus*균이 우세하다고 한다. 그러나 맥류가 아닌 쌀에서는 그 증식이 느린데 이에 대한 이유로는 주정과정에서 증자를 하면 가열에 의해 쌀에 들어있는 단백질이 변성됨으로서 균류의 효소작용이 어렵게 되기 때문에 acidic carboxypeptidase 활성이 낮은 *Rhizopus*균은 결국 이용할 질소원이 부족해지기 때문에 그 증식이 정지된다고 알려졌다. 소곡주는 찹쌀과 멥쌀로만 주정을 하고 장기간 저온 숙성을 하기 때문에 *Aspergillus*균에 비하여 *Rhizopus*균이 증식할 환경이 다소 제한되어 공기 중에 *Rhizopus*균이 분포할 가능성이 적어진 것으로 사료된다. 밀로 누룩을 제조하는 누룩공장에서의 공기 중에는 어떠한 균상이 존재하는지 조사한다면 재미있는 비교 정보가 될 것으로 보여 진다.

결론으로, 소곡주 공장의 공기 중에 곡자에 유용한 것으로 알려진 누룩균류들이 널리 존재하고 있음을 알 수 있었다. 좋은 곡자는 좋은 술을 만드는데 귀중한 재료이므로 장기간 주정을 해온 곳의 공기 중에 존재하는 좋은 곡자를 만드는 균류에 대한 정보는 주정공장에서 누룩을 자가제조하거나 주정 제조과정 중 오염균이 있는지 모니터링 하는데 유용한 기초 자료가 될 것으로 기대된다. 더불어 주정공장의 실내공기가 유용한 발효 미생물 자원을 얻을 수 있는 환경임을 본 연구는 시사하였다.

적 요

전통주인 소곡주 공장의 실내공기에 존재하는 균류상을

조사하기 위하여 앤더슨 공기 포집기를 이용하여 소곡주 공장의 여러 방으로부터 포집된 공기와 이곳에서 주정제조를 위해 사용해온 누룩으로부터 균류를 분리하고 분석하였다. *Aspergillus*, *Penicillium*, *Gibberella*, *Cladosporium*, *Talaromyces* 속에 속하는 12가지 균류종이 분리되었다. 이들 중 주요 균류는 *Aspergillus*와 *Penicillium*에 속하는 균종이 다수를 차지하였다. 특히 *Penicillium* 속에 속하는 종으로는 7개의 종이 분리 되었으며 조사된 방마다 각각 서로 다른 종이 분리되었다. 누룩으로부터는 공기 중에서 검출된 *Aspergillus* 그룹과 동일한 그룹이 검출되었고 동시에 공기중에서는 존재하지 않았던 *Rhizopus* sp.가 분리되어졌다. 본 연구는 국내에서는 처음으로 전통주 제조 공장의 실내 공기 중에 존재하는 균류상에 대한 보고이다.

감사의 글

이 연구는 2006학년도 단국대학교 대학연구비의 지원으로 연구되었음.

참고문헌

김교숙. 2000. 한국 전통주에 사용되는 누룩의 균에 대한 연구. 석사학위논문. 한국교원대학교, 충청북도, 청주.

김승환. 1999. 우리나라 전통주 발효에 관여하는 알코올 효모의 분리 및 특성. 석사학위논문. 경북대학교 대학원, 경상북도, 대구.

김태영. 1997. 전통주의 특성 및 연구동향(2); 전통누룩과 민속주의 양조특성. 생물산업 10:17-26.

소명환. 1991. *Aspergillus kawachii*와 *Aspergillus oryzae*의 병용에 의한 탁주의 품질개선. 한국식품영양학회지 4:115-124.

소명환. 1995. 곰팡이 균종을 달리한 밀가루 누룩의 탁주양조 적성. 한국식품영양학회지 8:6-12.

이찬용, 김태욱, 성창근. 1996. 한산소곡주의 시어짐에 관한 연구. 한국식품과학회지 28:117-121.

조갑현, 이창우. 1997. 한국재래식 누룩 중의 곰팡이의 분리 동정. 한국식품영양학회지 26:759-766.

최언호. 1997. 민속증류주의 발효미생물분포와 품질개선에 관한 연구. 과학기술부 연구보고서 951-0603-048-2.

Barnett, H. L. and Hunter, B. B. 1998. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. APS Press, St. Paul. Minnesota, U.S.A.

de Hoog, G., Guarro, S. J., Gené, J. and Figueras, M. J. 2000. Atlas of clinical fungi. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands.

- Dugan, F. M. 2006. The Identification of Fungi; an illustrated introduction with keys, glossary, and guide to literature. APS Press, St. Paul, Minnesota, U.S.A.
- Kim, S. H., Uzunovic, A. and Breuil, C. 1999. Rapid detection of *Ophiostoma piceae* and *O. quercus* in stained wood by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:187-190.
- Klich, M. A. 2002. Identification of common *Aspergillus* species. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands.
- Madi, L., Katan, T., Katan, J. and Henis, Y. 1997. Biological control of *Sclerotium rolfsii* and *Verticillium dahliae* by *Talaromyces flavus* is mediated by different mechanisms. *Phytopathology* 87:1054-1060.
- Samson, R. A., Hoekstra, E. S. and Frisvad, J. C. 2004. Introduction to Food-and Airborne Fungi. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands.
- Samson, R. A. and Frisvad, J. C. 2004. Penicillium subgenus Penicillium: new taxonomic schemes, mycotoxins and other extrolites. Stud. Mycol. No. 49. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands.
- Shim, H.-K., Hwang, K.-H., Shim, C.-K., Son, S.-W., Kim, D., Cho, Y.-M., Chung, Y., Kim, D.-H., Jee, H.-J. and Lee, S.-C. 2006. Molecular characterization of apple stem grooving virus isolated from *Talaromyces flavus*. *The Plant Pathology Journal* 22:260-264.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR protocol: a guide to methods and applications, ed. by M. A. Innis, D. H. Gelfand and J. J. Sninsky, pp. 315-322. Academic Press, London, U.K.