



Quality characteristics of solid starters manufactured with *Aspergillus oryzae* OF5-20

Joo-Yeon Kim, Hee-Min Gwon, So-Yeong Kim, Soo-Hwan Yeo*

Fermented and Processed Food Science Division, Department of Agrofood Resource, NIAS, RDA, Wanju 55365, Korea

누룩곰팡이 *Aspergillus oryzae* OF5-20를 이용한 쌀 품종별 고상종국 제조 및 품질특성

김주연 · 권희민 · 김소영 · 여수환*

농촌진흥청 국립농업과학원 농식품자원부 발효가공식품과

Abstract

The quality characteristics of solid starters manufactured from two types of rice samples have been reported herein. The rice samples were inoculated with *Aspergillus oryzae* OF5-20. It was isolated from ‘Nuruk’, a traditional fermentation starter, and exhibited high enzyme activity. The water absorption rate of rice, the raw material, reached the maximum within 160 min at ‘Samgwang’ and in 10 min at ‘Jeonju 615’. The quality evaluation tests revealed that among the for two solid starters, ‘Samgwang’ and ‘Jeonju 615’, Samgwang exhibited a higher acidity and amino acidity. As a result of the enzyme activity according to the inoculation ratio of *A. oryzae* OF5-20, the α -amylase showed the highest activity in ‘Samgwang’ solid starter inoculated with 4% of *A. oryzae* OF5-20 and ‘Jeonju 615’ solid starter with 6% inoculation. The glucoamylase activity was 1.4 times higher when the solid starter was inoculated with 4% of the liquid fungus (‘Samgwang’, 1,592.8 unit/g) than the enzyme activity when the solid starter was inoculated with 2% of the liquid fungus (1,137.8 unit/g). Since organic acids have a high ratio of citric acid and amino acids are composed of 20 kinds, such as glutamic acid, alanine, and phenylalanine, the solid starter, according to rice varieties, showed a difference in the formation of organic acids and free amino acids. Therefore, this research is expected to contribute to the improvement of the depressed starter industry and the quality of our ‘Yakju’ by the quality uniformity of solid starter manufacture using the brewing fungus with having good enzyme activity.

Key words : starter, rice, Nuruk, enzyme activity, quality analysis

서론

발효제는 다양한 종류의 효소를 분비하고 있으며, 이들 효소작용으로 대사산물을 생산하며 주세법상으로 국(麴)과 밀술로 구분된다. 국은 녹말과 기타 물료를 혼합한 것에 곰팡이를 번식시킨 것이지만 효소로서 녹말을 당화시킬 수도 있다. 아밀라아제와 글루코아밀라아제는 전분을 분해시켜 당분을

만들고 프로테아제는 단백질을 분해시켜 아미노산을 만든다(NTS, 2010).

우리나라 전통누룩은 종균을 첨가하지 않고 원료나 공기 중에서 유입된 자연 미생물인 곰팡이, 효모 등을 주로 이용하고 있다. 자연계의 미생물을 이용하는 방법은 미생물이 균일하지 못하여 제조 공정의 표준화가 어려울 뿐만 아니라, 우리 술의 세계화 및 산업적 경쟁력을 저하시키는 요인 중의 하나

*Corresponding author. E-mail : yeobio@korea.kr, Phone : +82-63-238-3609, Fax : +82-63-238-3843

Received 21 October 2020; Revised 11 November 2020; Accepted 16 November 2020.

Copyright © The Korean Society of Food Preservation.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

이다. 따라서 주질이 균일화된 우리 술을 제조하기 위해서는 품질특성이 우수한 양조용 미생물 사용이 강조된다. 국내 대부분의 주류업체에서는 수입산 종균을 구입하여 자체적으로 국을 만들어 사용하고 있다. 특히, 수입 종균 사용에 따른 로열티 지불은 1,800억 원 수준이고, 일본으로부터 200억 원의 곰팡이 종균을 수입하면서 연간 120억 원 정도 로열티를 지불하고 있다(Mun 등, 2016). 따라서, 이를 대체하기 위해, 국산 토착 발효종균 발굴과 자원화와 뿐만 아니라 종균 제조기술 개발이 무엇보다도 절실히 요구된다(Jeon, 2014). 우리 술을 빚기 위해 사용하는 누룩 미생물은 각각의 특성이 있는데, *Aspergillus* 속 균주는 증자한 쌀(고두밥)에서 강력한 당화효소를 생산하는 것으로 알려져 있다(Huh 등, 2014). 특히, 황국균으로 알려진 *Aspergillus oryzae*는 전통누룩에서도 대표적 우점균으로서 술덧의 당화 및 액화능에 미치는 중요한 곰팡이 중 하나이다(Song 등, 2013; Yang 등, 2011). 전분의 효소학적 가수분해는 전분의 종류와 사용하는 종균의 특성에 따라 크게 영향을 받는다. 최근까지 전통누룩에 관한 연구는 주로 누룩에 서식하는 유용 곰팡이와 효모 분리·동정에 관한 연구(Jo와 Lee, 1997; Lee 등, 2004)와 원료에 따른 누룩 제조와 막걸리의 이화학적 특성 연구(In 등, 2014), 품종별, 균주별로 제조한 쌀누룩의 특성(Jeong 등, 2015)과 관련된 연구이며, 우수한 발효 특성을 가진 종균을 제조하는 기술 개발 연구는 아직도 부족한 실정이다. 본 연구에서는 토착 발효종균을 이용한 약주용 발효제 개발을 위해, 국내 전통 누룩에서 분리한 *A. oryzae* OF5-20을 이용하여 2종류 쌀(삼광미 및 전주 615) 품종으로 고상종국을 제조하였으며, 이들의 품질특성을 평가하여 산업적 사용 가능성을 검토하고자 하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 원료

본 연구에 사용한 균주는 수집한 전통누룩에서 분리하여 농촌진흥청 발효가공식품과에서 보관 중인 *Aspergillus oryzae* OF5-20을 사용하였다. 한편, 고상종국제조에 사용된 원료미는 2019년 충청도에서 수확한 삼광미와 국립식량과학원에서 육성한 전주 615를 사용하였다.

원료미의 수분흡수율 측정

삼광미와 전주 615를 각각 20 g을 여과포에 감싸 증류수가 담겨 있는 250 mL 비커에 수침시킨 다음 10분 단위로 꺼내 무게를 측정하였다. 수분 흡수율은 원료미의 수침 전후의 무게 증가비로 나타내었다.

수분 흡수율(%) =

$$\frac{\text{수침 후 쌀 중량(g)} - \text{수침 전 쌀 중량(g)}}{\text{수침 전 쌀 중량(g)}} \times 100$$

액체종균 및 고상종국 제조

액체종균은 다음과 같이 제조하였다. 증류수 100 mL에 대한 무게 비율로 분쇄된 밀기울을 5%(w/v) 되게 첨가하여 121°C에서 20분간 고압 멸균하였다. 황국균인 *A. oryzae* OF5-20을 같은 포자수(10^7 cells/mL)로 밀기울 배지에 접종하여 5일간 배양(28°C, 120 rpm)한 후, 이들 배양액을 여과하여 액체종균으로 사용하였다.

곰팡이를 이용한 고상종국 제조(Fig 1)는 잡균의 오염 등을 방지하기 위하여 소형 제국기(Mini-15, Yaegaki Co., Hyogo, Japan)를 사용하였다. 2종류 원료미를 각각 씻어 3시간(삼광미) 또는 10분(전주 615)간 수침한 후, 1시간 물 빼기를 하였다. 이들 원료미를 증자기(MS-30, Yaegaki Food & System Inc., Himeji, Japan)에 넣고 수증기가 올라오기 시작한 후부터 50분간 더 증자하여 고두밥을 제조하였다. 고두밥에 액체종균을 농도별(2, 4 및 6%(v/w))로 접종한 후, 36°C에서 제국하였다. 제국 20시간과 25시간째 뒤집기를 하여 종국의 내외부를 고르게 혼합 후, 파종한 단일 곰팡이가 고루 자라도록 하였으며, 24시간 간격으로 포자 형성을 확인한 후, 제국 9일에 출국하여 35°C에서 24시간 건조하였다(Fig. 1).

이화학적 분석

pH는 pH meter(Orion 3 stsr, Thermo Scientific Co., Singapore)로 측정하였다. 산도는 주류분석규정(NTS, 2014)에 준하여 추출하였다. 산도 측정은 고상종국 20 g에 증류수 100 mL를 첨가하여 20°C에서 3시간 추출하였다. 추출물을 여과(Filter paper No.2, Whatman International Ltd., Maidstone, England)한 뒤, 10 mL를 취해 0.1 N NaOH로 적정하고, 그 mL 수를 산도로 표시하였다. 아미노산도는 총산을 측정할 시료에 중성 포르말린 용액 5 mL를 가하여 유리된 산을 0.1 N NaOH 용액으로 담홍색이 될 때까지 적정하고, 그 적정 mL 차이를 아미노산도로 표시하였다.

고상종국의 효소활성 분석

제조한 2종류 고상종국의 효소활성을 측정하기 위해 각각의 고상종국 10 g에 0.5% NaCl이 함유된 10 mM 초산 완충액 50 mL로 추출한 후, 여과하여 조효소액을 제조하였다. α -amylase, glucoamylase 및 acid protease 분석은 양조용 효소 측정 kit(Kikkoman Corp., Tokyo, Japan)를 사용하였다.

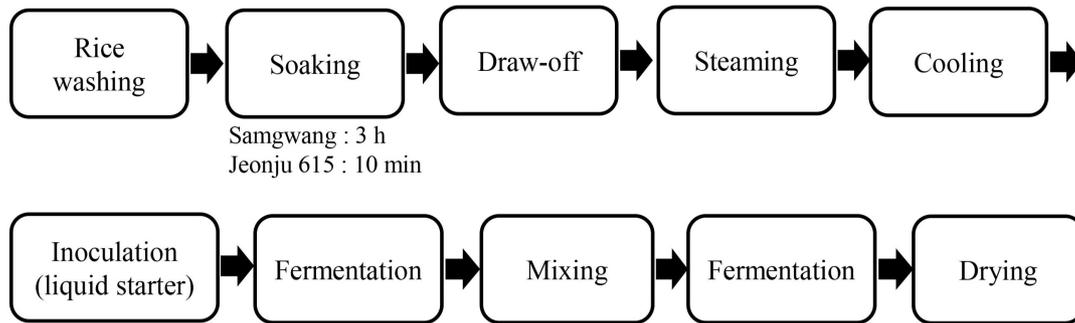


Fig. 1. Manufacturing process of solid starter.

α -Amylase 활성 측정

α -Amylase 활성은 시험관에 0.5 mL 기질용액(N3-G5- β -CNP)과 0.5 mL 효소용액(glucoamylase, β -glucosidase)을 분주한 후, 37°C에서 약 5분간 예열하였다. 각각의 조효소액 0.1 mL를 넣고 혼합하여 10분간 반응시킨 후, 반응 정지액(sodium carbonate) 2 mL를 가하여 중지시켰다. 이 종료액을 400 nm에서 흡광도(UV Spectrophotometer, JP/UV-2450, Shimadzu, Kyoto, Japan)를 측정하여 α -amylase의 활성으로 환산하였다.

Glucoamylase 활성 측정

Glucoamylase 활성은 시험관에 0.5 mL 기질용액(G2- β -PNP)과 0.5 mL 효소액(β -glucosidase)을 분주하여 37°C에서 5분간 예열하였다. 각각의 조효소액 0.1 mL를 혼합하여 10분간 반응시킨 후, 반응 정지액(sodium carbonate) 2 mL를 가하여 중지시켰다. 이 종료액을 400 nm에서 흡광도(UV Spectrophotometer, JP/UV-2450, Shimadzu)를 측정하여 제조사가 제시하는 계산식으로 glucoamylase 활성을 산출하였다.

Acidic protease 활성 측정

Acidic protease 활성은 시험관에 1.0 mL 기질 용액(Cbz-Tyr-Ala + NAD + 초산 완충액)을 첨가하여 잘 혼합한 후, 37°C에서 20분간 정량반응을 하였다. 정량 발색액(PMS)을 0.1 mL 넣고 혼합하여 다시 10분간 반응시킨 후, 반응 종료액을 460 nm에서 흡광도를 측정하여 acidic protease 활성을 계산식으로 산출하였다.

포자수 측정

제조된 각각의 고상종국 1 g을 5% Tween 80 용액 10 mL에 현탁하고 1% methylene blue 용액 2-3방울을 가하여 묽게 희석한 후, Hemocytometer를 이용하여 현미경(Axio Imager A2, Carl Zeiss Microimaging GmbH, Gottingen, Germany)으로 검정하였다(NTS, 2014).

$$\text{CFU/mL} = \text{Average count per square} \times \text{dilution factor} \times \text{volume factor}$$

유기산 분석

제조된 고상종국의 유기산 정량은 HPLC(LC-20A, Shimadzu Co., Kyoto, Japan)를 이용하여 분석하였다. 각각의 고상종국 1 g에 8 mM perchloric acid를 5배로 추출한 후, 추출액 1 mL를 취하여 0.2 μ m membrane filter(Millipore Co., Cork, Ireland)로 여과하여 분석시료를 조제하였다. 제조된 2종류 고상종국의 유기산을 분석하기 위해 Tosoh TSKgel ODS-100V(4.6 mm \times 250 mm, Tokyo, Japan) 칼럼을 사용하였다. 이동상은 8 mM 과염소산(perchloric acid)을, 유속은 1.0 mL/min, 오븐 온도는 40°C로 조정하였다. 추출물을 반응용액 0.2 mM 브로모티몰블루(Bromothymol blue, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), 15 mM 인산수소이소소듐(Na_2HPO_4 , Sigma-Aldrich Co.), 7 mM 수산화나트륨과 반응한 후, UV 440 nm에서 각각의 유기산을 검출하였다. 이때 반응액의 유속은 1.0 mL/min, 반응온도는 25°C로 하였다.

유리아미노산 분석

유리아미노산은 amino acid analyzer(L-8900, Hitachi Co., Tokyo, Japan)로 분석하였다. 분석조건은 PF#2622SCPF(4.6 \times 60 mm, Hitachi Co.) 칼럼을 사용하였으며, 오븐 온도는 50°C, 반응장치의 온도는 135°C로 설정하였고, 닐하이드린(Ninhydrin, Wako Pure Chemical Industrial Ltd., Osaka, Japan) 용액을 사용하여 발색시켰다.

통계 분석

모든 데이터는 3회 반복 측정하였으며, 평균 \pm 표준편차로 표시하였다. 통계 처리는 분산분석(ANOVA)에 의해 실시하였으며, 유의성 비교는 Duncan's multiple range test로 $p < 0.05$ 수준에서 검증하였다.

결과 및 고찰

원료미의 흡수력

고상종국 제조에서 수침시간의 결정은 중요한 요소 중의 하나이다. 원료미의 침지 특성은 수분함량, 도정률, 품종, 수침온도 등에 영향을 받기 때문에 고상종국의 발효 특성과 연관성이 있다(Kim 등, 2004; Mizuma, 2009). 특히, 수침시간이 짧으면 원료미 내부까지 수분이 흡수되지 않는 단점이 있고, 장시간 수침하면 쌀에 있는 인(P)이 빠져 곰팡이 생육에 좋지 않은 영향(Chun 등, 2012)을 미치게 된다. 고상종국 제조용 삼광미와 전주 615의 수침시간에 따른 수분 흡수율의 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 제국 시, 증자미(고두밥)의 적정 수분함량은 쌀이 서로 엉겨 붙지 않고 곰팡이 생육에 적합하고, 효소활성을 확보할 수 있는 35-38%로 유지하는 것이 보고되어 있다(Choi 등, 2017). 증미의 수분함량이 당화효소 생성에 미치는 영향을 분석한 결과, 당화효소 생산량은 증미의 수분함량이 30% 이하일 때는 낮았으나, 35% 이상에서는 같은 수준으로 높았다는 연구가 보고된 바 있다(So, 1993). 경질미인 삼광미의 수침시간에 따른 수분 흡수율은 40분에 21.5%로 급격하게 증가한 후, 90분 후에 완만하며, 160분에 24.2%로 최대 흡수량에 도달하였다(Fig. 2A). 연질미인 전주 615는 수침 5분에 17.8%로 증가하였고, 수분함량은 제국에 적절한 32.2%에 도달하였다(Fig. 2B). 따라서 경질미인 삼광미의 수침시간은 3시간, 연질미인 전주 615는 10분이 가장

적합한 것으로 확인되었다.

접종량에 따른 고상종국의 이화학적 특성

2종류 쌀 품종(삼광미, 전주 615)으로 제조한 고상종국의 이화학적 특성을 Table 1에 나타내었다. pH는 삼광미를 이용한 고상종국에서 5.56-5.78이었고, 전주 615 종국은 5.73-5.96에서 제국시간이 경과함에 따라 액체중균 접종량이 4%와 6%(v/w) 일 때 낮았으며, 삼광미보다 전주 615 종국이 높았다. 산도는 제국이 진행되면서 pH가 감소하는 시점에서 산도가 증가하였다(Table 1). 액체중균 4%(v/w)를 접종하였을 때, 0.65, 0.60로 가장 낮고 접종량에 따라 유의적인 차이를 보였으며, 전주 615 고상종국은 삼광미 종국보다 1.1-1.4배 이상 높았다. 아미노산도는 접종량 6%(v/w) 일 때, 1.54로 가장 높았으며, 전주 615 종국이 삼광미보다 1.2-1.7배 높았다. 이러한 결과는 쌀 품종에 따라 *A. oryzae* OF5-20 곰팡이의 특이성이 다른 것을 알 수 있었으며, 이들 품종으로 제조한 고상종국으로 누룩을 만들어 약주를 빚으면 원료미에 따른 주질의 다양성이 예상된다. 종국으로 Koji를 만들고 이를 활용하여 술을 만들기 때문에 종국 곰팡이의 특성이 주류의 품질에 결정짓는 중요한 인자가 되며(So, 1993a), 아미노산도는 누룩 중에 함유된 단백질이 발효과정 중 미생물이 생산하는 acidic protease와 peptidase 등의 단백질 분해로 생성되면서 발효주의 감칠맛 등에 영향을 주는 것으로 보고된 바 있다(Park 등, 2010).

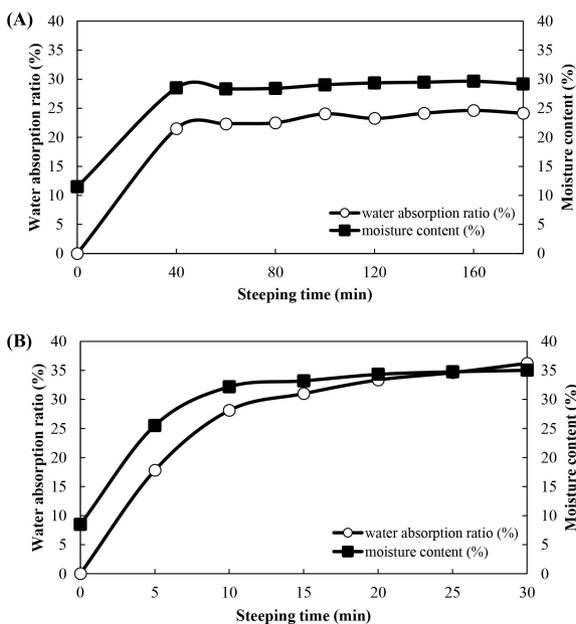


Fig. 2. Water absorption ratio of rice, 'Samgwang' and 'Jeonju 615' during steeping.

A, 'Samgwang'; B, 'Jeonju 615'.

접종량에 따른 고상종국의 효소활성

약주 제조용 고상종국을 제조하기 위해, 밀기울 배지에 배양한 액체중균을 각각의 농도(2%, 4%, 및 6%)로 접종하여 고상종국을 제조한 후, 접종량에 따른 최적 효소활성을 분석하였고, 그 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 누룩에 생육하는 주요 곰팡이 중, 당화 과정에 핵심적 역할을 하는 종균은 *Aspergillus* sp.를 들 수 있다. 이들 곰팡이는 α -amylase, glucoamylase로 곡류의 전분을 당화시키는 중요한 역할을 한다(Kim 등, 1985). 농도별 α -amylase 활성을 비교한 결과, 통계적 유의성은 없으나 경질미인 삼광미로 제조한 종국은 4%(v/w)에서 636.3 ± 13.4 units/g으로 가장 높은 활성을 보였고, 연질미인 전주 615 종국은 6%(v/w)에서 가장 높은 692.93 ± 56.9 units/g의 효소활성을 보였다. Kim 등(1996)의 연구에서 분리균의 단일배양에 따른 액화력은 100-735 units/g으로 보고된 것과 유사한 결과를 나타내었다. 황국균인 *A. oryzae* OF5-20으로 제조한 삼광미 종국의 액화력은 제국 6일에 가장 높았으나 제국기간이 경과할수록 활성이 줄어드는 반면에, 전주 615 종국은 경시적으로 증가하였다. 전분 분해능에서 단당류인 glucose 생산에 관여하는 glucoamylase 활성을 분석한 결과(Fig. 3B, E),

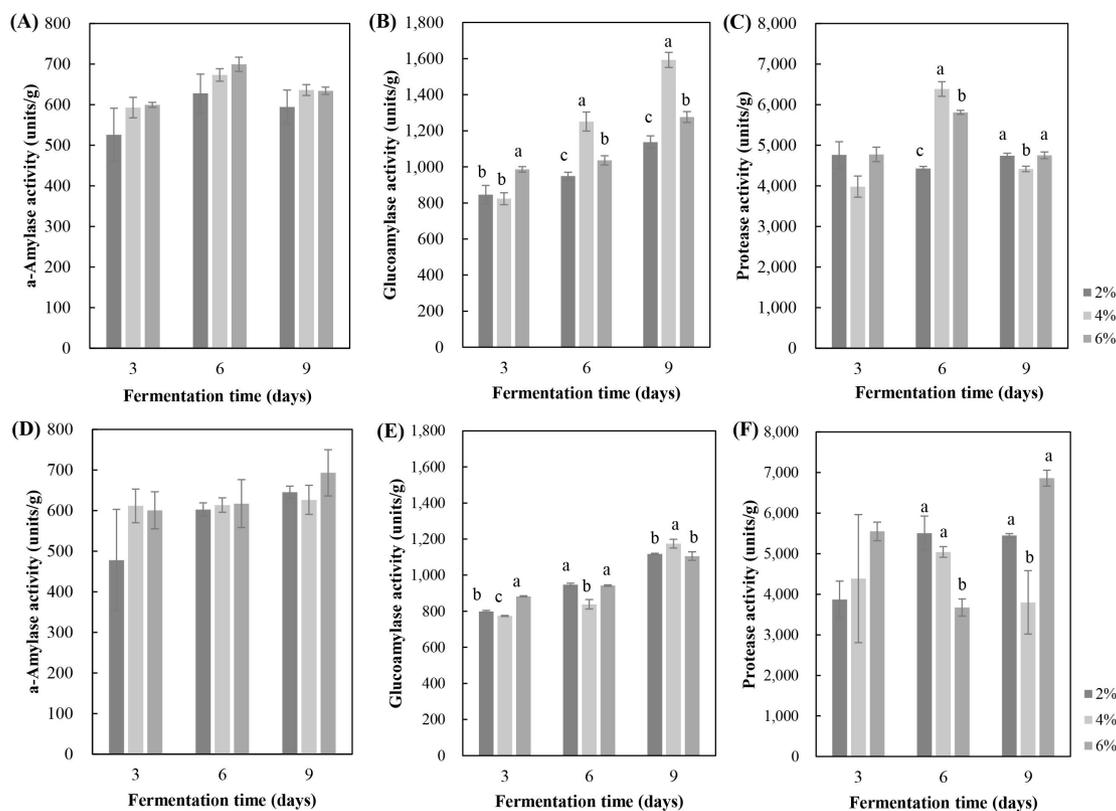
Table 1. Physicochemical characteristics of solid starter manufacture by using different kinds of rice

Contents	Time (days)	SG-2 ¹⁾	SG-4	SG-6	J615-2	J615-4	J615-6
Acidity (mL/10 mL)	3	0.39±0.00 ^b	0.42±0.04 ²⁾	0.41±0.04 ^a	0.75±0.03 ^b	0.69±0.02 ^a	0.72±0.02 ^a
	6	0.80±0.07 ^c	0.64±0.01 ^a	0.69±0.06 ^a	1.00±0.12 ^a	0.91±0.00 ^b	0.88±0.04 ^a
	9	0.70±0.00 ^b	0.65±0.01 ^{c3)}	0.80±0.03 ^a	0.99±0.08 ^a	0.60±0.00 ^b	0.91±0.04 ^a
pH	3	5.56±0.01 ^c	5.78±0.01 ^a	5.72±0.00 ^b	5.73±0.00 ^c	5.96±0.01 ^a	5.93±0.01 ^b
	6	4.84±0.02 ^b	5.03±0.01 ^a	5.01±0.01 ^a	5.40±0.01 ^a	5.75±0.01 ^a	5.47±0.01 ^a
	9	4.90±0.01 ^c	4.98±0.01 ^b	5.35±0.02 ^a	5.87±0.01 ^a	4.86±0.01 ^c	5.45±0.01 ^b
Amino acid (mL/10 mL)	3	1.08±0.01 ^b	1.18±0.00 ^a	1.11±0.04 ^b	1.54±0.06 ^c	1.65±0.04 ^c	1.70±0.00 ^b
	6	0.89±0.01 ^c	0.97±0.01 ^b	1.01±0.01 ^a	0.99±0.72 ^c	1.47±0.04 ^c	1.35±0.03 ^b
	9	0.85±0.02 ^c	0.91±0.01 ^b	1.25±0.01 ^a	1.46±0.33 ^c	0.82±0.03 ^b	1.54±0.14 ^c

¹⁾SG-2, 'Samgwang'-liquid starter 2% (v/w); SG-4, 'Samgwang'-liquid starter 4% (v/w); SG-6, 'Samgwang'-liquid starter 6% (v/w); J615-2, 'Jeonju 615' liquid starter 2% (v/w); J615-4, 'Jeonju 615' liquid starter 4% (v/w); J615-6, 'Jeonju 615' liquid starter 6% (v/w).

²⁾Values are mean±SD (n=3).

^{3)a-c}Means with different superscript are significantly different Duncan's multiple test (p<0.05).

**Fig. 3.** Effect of enzyme activity on various inoculation ratio of liquid starter.

(A), (B) and (C) show the enzyme activity of α -amylase, glucoamylase and protease for 'Samgwang'-*A. oryzae* OF5-20, respectively. (D), (E) and (F) show the enzyme activity of α -amylase, glucoamylase and protease for 'Jeonju 615'-*A. oryzae* OF5-20, respectively. Data are presented as the mean for 3 independent experiments. Error bars indicate SD (p<0.05). Significance comparison was performed at Duncan's multiple range test at p<0.05 level.

삼광미로 제조한 종국은 1,592.8±41.83 units/g(4%), 1,276.1±30.38 units/g(6%) 및 1,137.8±34.48 units/g(2%) 순으로 높은 당화력을 보였고, 전주 615로 종국은 1,174.5±24.32 units/g(4%), 1,117.6±3.52 units/g(2%) 및 1105.4±23.39 units/g(6%) 순으로 유의적인 차이가 나타났다. 제국 9일째는 액체종균 4%(v/w)를 접종한 것이 2%(v/w)와 6%(v/w)보다 1.1-1.4배 높은 효소활성을 나타내었다. 액체종균을 농도별 (5, 10%)로 접종하였을 때 가장 높은 효소활성을 보인 Choi (2011) 등의 결과와 차이가 있으며, *A. oryzae*의 당화효소 생산이 36°C에서 48시간 배양하였을 때, 높았다가 이후에 감소한다고 보고(So, 1993b)되었다. 본 연구에서는 효소활성이 꾸준히 증가하는데, 이는 사용한 곰팡이의 특성이나 원료에 따른 차이라고 여겨진다.

액체종균 4%(v/w)로 접종하여 제국한 삼광미 종국의 단백질 분해력은 4,419.84±65.11 units/g, 전주 615 종국은 3,798.3±78.1 units/g으로 액체종균 2%(v/w)와 6%(v/w)보다 가장 낮은 활성을 나타내었다. 주류 제조에 있어서 높은 protease 활성(Fig. 3C, F)은 주질의 잡미와 텃텃함에 관여하기 때문에(Jeong 등, 2015; Park와 Lee, 2002), 단순히 효소활성이 높은 종군보다 액화력과 당화력이 우수하고 단백질 분해력이 상대적으로 낮은 종군이 주류 제조에 적합하다. 따라서 액체종균 4%(v/w) 접종한 고상종국이 α -amylase, glucoamylase 활성은 우수하고 단백질 분해 활성이 낮아 고상종국 제조용 액체종균 접종량은 4%(v/w)가 가장 적합한 것으로 선정하였다.

고상종국의 포자수

2종류 원료미로 고상종국을 제조하기 위해 액체종균을 농도별로 접종한 고상종국의 포자수를 Fig. 4에 나타내었다. 포자수는 고상종국 1 g을 용액 10 mL에 현탁하여 측정된 수(CFU/mL)로 나타내었다. 삼광미 종국은 3종류 농도(2, 4 및 6%)별로 각각 2.7×10^8 (2%), 2.5×10^8 (6%), 2.2×10^8 (4%) CFU/mL로 포자수를 보이지만, 전주 615 종국은 2.0×10^8 (2%), 1.9×10^8 (4%), 1.7×10^8 (6%) CFU/mL 순으로 삼광미 종국보다 적은 포자수를 나타내었다. 발효 6일에 삼광미 종국은 전주 615 종국보다 1.2-1.5배 높았는데, 이는 원료미의 품종에 따른 차이로 여겨진다. 제국기간에 따른 고상종국의 *A. oryzae* OF5-20 포자수는 발효 6일에 최대치를 보이다가 감소하였고, 액체종균의 농도가 높을수록 감소하는 격차가 크게 나타났다. 포자수는 액체종균의 접종량에 반비례하였고, 4%(v/w) 접종량에서 가장 높은 효소활성 결과와는 차이를 보였다. 접종한 곰팡이는 원료미의 표면에 대부분 생육하는 총파정으로서 빠른 균체 생육으로 포자생성은 많지만, 상대적으로 균사가 덜 발달한 것으로 여겨진다.

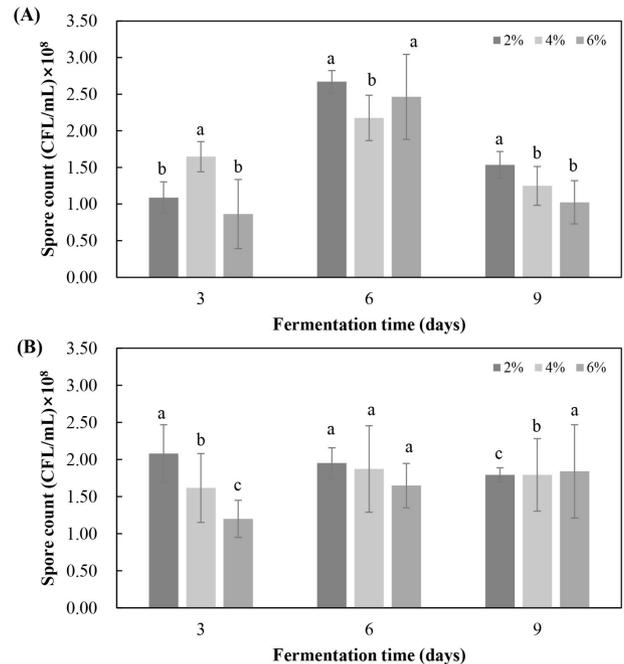


Fig. 4. Comparison in spore count of inoculation ratio on solid starter.

A, 'Samgwang'-*A. oryzae* OF5-20; B, 'Jeonju 615'-*A. oryzae* OF5-20. Data are presented as the mean for 4 independent experiments. Error bars indicate SD ($p < 0.05$). Significance comparison was performed at Duncan's multiple range test at $p < 0.05$ level.

고상종국의 유기산 함량

쌀 품종별로 제조한 2종류 고상종국의 유기산 분석 결과를 Fig. 5에 나타내었다. 주요 유기산으로 ascorbic, citric, lactic 및 malic acid가 검출되었고, 총 유기산 함량은 삼광미로 제조한 고상종국은 제국 6일에 365.32 mg%로 가장 높았으며, 전주 615는 제국 3일에 355.23 mg%로 높았다. 이들 유기산은 제국기간이 길어지면서 감소하였는데, 삼광미보다는 전주 615 종국에서 전체 제국기간 동안 높은 유기산 함량을 나타내었다. Baek 등(2012)은 밀, 쌀, 녹두에 황곡균인 *A. oryzae* 단일균을 접종한 누룩에서 citric, formic, lactic, malic acid 등을 확인하였다. 전주 615 종국은 citric acid가 전체 유기산에서 50-55%로 가장 높은 비율을 보였고, ascorbic acid, malic acid 순서로 검출되었다. 쌀누룩의 유기산 중 citric acid가 주요 유기산으로 함유된 Yu(1998) 등의 연구 결과와 유사하였지만, 원료와 사용하는 종균에 따라 유기산 함량은 차이가 있었다. 따라서 원료미와 미생물의 상호작용으로 생성되는 유기산은 술에서 감미와 산미에 영향을 주는 주요 성분이며(Jin 등, 2007), 효모의 대사과정에서 알코올류와 반응하여 방향족 에스테르 물질로 바뀌어져 술의 풍미에 많은 영향을 미치는 중요한 요소로 알려졌다(Kang 등, 2016).

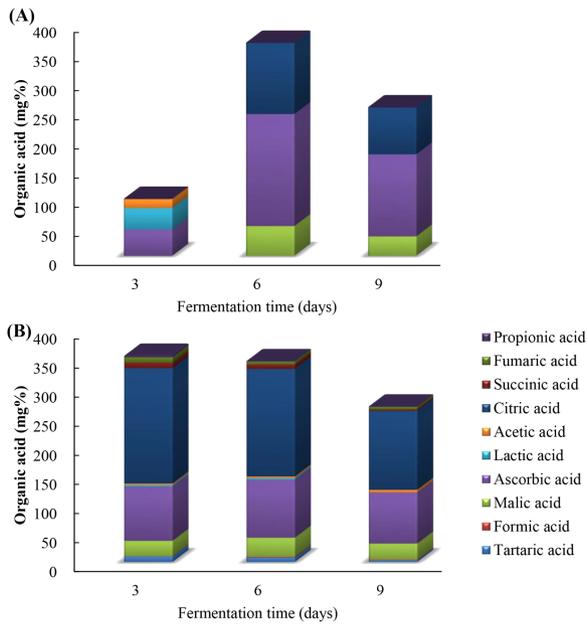


Fig. 5. Organic acid content of solid starter by 'Samgwang' and 'Jeonju 615'.

This picture shows the organic acid content of (A) 'Samgwang'-*A. oryzae* OF5-20, (B) 'Jeonju 615'-*A. oryzae* OF5-20.

고상종국의 유리아미노산 함량

아미노산은 세포 성장대사와 극심한 환경에서 세포 생존에 중요한 역할을 한다. 특히, 맛에 관여하는 것으로서 감칠맛에는 aspartic acid와 glutamic acid가, 단맛에는 alanine, glycine, lysine, proline, serine, threonine이, 쓴맛에는 arginine, histidine, isoleucine, leucine, methionine, phenylalanine, threonine, valine 등이 관여하는 것으로 알려져 있다(Kato 등, 1989). *A. oryzae* OF5-20 종균과 쌀 품종별(삼광미, 전주 615)로 제조한 고상종국의 유리아미노산 분석 결과를 Table 2에 나타내었다. 이들 고상종국은 9종의 필수아미노산 (glycine, arginine, proline 등)과 7종의 비필수아미노산 (serine 등) 및 7종의 아미노산 유도물질을 각각 가지고 있었다. 또한 주요 유리아미노산은 glutamic acid, tyrosine, alanine으로 구성돼 있었다. 품종별 총 유리아미노산 함량은 각각 $326.97 \pm 5.74 \mu\text{g/mL}$, $378.98 \pm 0.51 \mu\text{g/mL}$ 로 제국 6일에 가장 높게 나타났으며, 전주 615 종국이 삼광미보다 1.2배의 높은 유리 아미노산 함량을 나타내었다. 주요 유리아미노산을 조사한 결과, 삼광미와 전주 615 종국은 glutamic acid(감칠맛), tyrosine(무미), alanine(단맛), phenylalanine(쓴맛) 순으로 전체함량의 7-15%를 차지하면서 높게 분포

Table 2. Composition of free amino acid in solid starter

Free amino acid ($\mu\text{g/mL}$)	Fermentation time (days)					
	'Samgwang'			'Jeonju 615'		
	3	6	9	3	6	9
Phosphoserine	$7.23 \pm 0.00^{1)c2}$	8.40 ± 0.02^b	10.16 ± 0.03^a	5.01 ± 0.04^b	10.93 ± 0.00^a	11.66 ± 0.05^a
Urea	32.13 ± 4.54	ND ³⁾	ND	ND	ND	ND
Aspartic acid	7.23 ± 0.02	6.95 ± 0.16	6.47 ± 0.02	4.11 ± 0.03^c	11.74 ± 0.01^a	8.65 ± 0.02^b
Threonine	4.07 ± 0.00^b	4.77 ± 0.05^b	7.59 ± 0.06^a	2.29 ± 0.00	5.75 ± 0.01	7.58 ± 0.30
Serine	6.85 ± 0.05^b	5.97 ± 0.03^b	8.21 ± 0.05^a	3.00 ± 0.01^b	7.88 ± 0.03^a	10.77 ± 0.20^a
Glutamic acid	38.82 ± 0.03^b	49.83 ± 0.09^a	48.52 ± 0.11^a	26.07 ± 0.04^c	52.62 ± 0.02^a	37.17 ± 0.18^b
Glycine	1.12 ± 0.00^c	3.32 ± 0.01^a	2.59 ± 0.02^b	0.62 ± 0.00^c	4.27 ± 0.05^a	3.23 ± 0.03^b
Alanine	18.98 ± 0.07^b	35.15 ± 0.08^a	19.30 ± 0.07^b	11.53 ± 0.03^c	32.49 ± 0.05^a	19.02 ± 0.03^b
Valine	2.53 ± 0.01^b	6.50 ± 0.04^a	1.75 ± 0.01^c	1.20 ± 0.00^c	9.97 ± 0.07^a	2.53 ± 0.01^b
Methionine	0.91 ± 0.06^b	3.83 ± 0.07^a	ND	ND	5.38 ± 0.15^a	ND
Cystathionine	ND	ND	2.66 ± 0.02	ND	ND	ND
Isoleucine	1.33 ± 0.00^b	10.02 ± 0.26^a	1.03 ± 0.00^b	0.56 ± 0.01^b	15.44 ± 0.12^a	1.79 ± 0.00^b
Leucine	2.02 ± 0.05^b	12.27 ± 0.31^a	2.08 ± 0.00^b	1.00 ± 0.02^c	21.64 ± 0.07^a	4.34 ± 0.02^b
Tyrosine	4.03 ± 0.09^b	46.70 ± 1.17^a	15.63 ± 0.00^b	1.64 ± 0.00^c	49.49 ± 0.09^a	12.99 ± 0.07^b
Phenylalanine	5.09 ± 0.04^b	22.28 ± 0.68^a	5.85 ± 0.03^b	4.11 ± 0.04^c	29.66 ± 0.09^a	6.57 ± 0.02^b

(continued)

Free amino acid ($\mu\text{g/mL}$)	Fermentation time (days)					
	'Samgwang'			'Jeonju 615'		
	3	6	9	3	6	9
β -Alanine	15.22 \pm 0.05	18.39 \pm 0.41	9.95 \pm 0.02	9.00 \pm 0.04 ^b	18.13 \pm 0.05 ^a	8.96 \pm 0.08 ^b
β -Amino isobutyric acid	ND ³⁾	7.43 \pm 0.56	ND	ND	2.82 \pm 0.02	ND
γ -Amino-n-butyric acid	15.29 \pm 0.03 ^b	25.89 \pm 0.04 ^a	8.21 \pm 0.01 ^c	6.67 \pm 0.00 ^c	19.27 \pm 0.00 ^a	8.87 \pm 0.02 ^b
Ethanol amine	2.06 \pm 0.11	1.34 \pm 0.00	1.07 \pm 0.01	ND	1.24 \pm 0.00 ^a	ND
Hydroxylysine	17.95 \pm 2.54	12.43 \pm 1.76	ND	ND	13.49 \pm 1.91	13.29 \pm 1.88
Ornithine	0.35 \pm 0.01 ^c	1.33 \pm 0.00 ^b	1.51 \pm 0.00 ^a	0.23 \pm 0.02 ^b	0.77 \pm 0.01 ^a	0.68 \pm 0.01 ^c
Lysine	2.80 \pm 0.02 ^b	12.79 \pm 0.05 ^a	12.11 \pm 0.05 ^a	1.69 \pm 0.00 ^c	10.51 \pm 0.04 ^a	4.54 \pm 0.01 ^b
1-Methylhistidine	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Histidine	7.89 \pm 0.07 ^a	3.23 \pm 0.01 ^b	1.74 \pm 0.00 ^c	3.62 \pm 0.02 ^b	4.51 \pm 0.02 ^a	2.17 \pm 0.00 ^c
Arginine	16.47 \pm 0.20 ^b	23.96 \pm 0.17 ^a	13.56 \pm 0.12 ^b	8.62 \pm 0.01 ^b	22.35 \pm 0.04 ^a	8.60 \pm 0.06 ^b
Hydroxy proline	ND	ND	ND	ND	1.33 \pm 0.19	ND
Proline	3.68 \pm 0.06	4.21 \pm 0.05	2.17 \pm 0.15	ND	27.33 \pm 0.13 ^a	20.79 \pm 0.13 ^b
Total	214.07 \pm 7.01	326.97 \pm 5.74	182.16 \pm 2.46	90.96 \pm 8.83	378.98 \pm 0.51	194.20 \pm 6.10

¹⁾Values are mean \pm SD (n=3).

^{2)a-c}Means with different superscript are significantly different Duncan's multiple test (p<0.05).

³⁾Not detected.

하였고, 그 외 aspartic acid(감칠맛), serine(단맛), leucine(쓴맛), arginine(쓴맛) 순으로 분포하였다. 또한, 쌀 품종에 따라 단맛을 내는 proline 함량에 차이가 있었다. 술에 있어서 아미노산은 쌀이나 누룩에 함유된 단백질이 누룩의 효소작용에 의해 생성되며(Kang 등, 2016), 맛 형성에도 중요한 역할을 하는 지표물질이다. *A. oryzae* OF5-20과 쌀 품종별로 제조한 발효제는 향후 이양주로 빛은 약주의 특성에 따라 독특한 향과 맛을 제공할 것으로 여겨진다.

요 약

본 연구에서는 전통누룩에서 분리하여 전분 분해력이 높은 *A. oryzae* OF5-20 액체종균으로 2종의 쌀(삼광미 및 전주 615)에 농도별로 접종하여 고상종국을 제조하고 이들의 품질 특성을 평가하였다. 고상종국 제조시 원료미에 따른 수분 흡수율은 삼광미는 160분에, 전주 615는 10분에 최대 흡수량에 도달하였다. 액체종균 농도별 고상종국의 효소활성을 측정된 결과, 액화력은 삼광미를 이용한 고상종국은 4%(v/w)일 때, 전주 615는 6%(v/w) 접종량에서 가장 높은 효소활성을 보였고, 당화력은 삼광미를 이용한 종국은 4%(1,592.4 \pm 41.83 units/g)일

때 가장 높았으며 2%(1,137.4 \pm 34.48 units/g)보다 1.4배 높은 활성을 나타내었다. 또한 유기산은 citric acid가 높은 비율을 보이고, 아미노산은 glutamic acid, alanine, phenylalanine 등 20종으로 구성돼 있으며, 쌀 품종에 따른 고상종국은 유기산과 유리아미노산 조성에도 차이를 보였다. 따라서 본 연구는 효소활성이 우수한 양조 곰팡이를 이용한 중국제조 품질 균일화로 침체된 중국산업과 우리 술의 품질 향상에 기여할 것으로 기대한다.

감사의 글

이 논문은 농촌진흥청 농업과학기술개발사업(과제번호: PJ01455001)의 지원에 의해 이루어진 것이며, 연구비 지원에 감사드립니다. 특히, 국립식량과학원에서 육성한 전주 615 지원에 감사드립니다.

Conflict of interests

The authors declare no potential conflict of interest.

ORCID

Joo-Yeon Kim <https://orcid.org/0000-0002-9208-6803>
 Soo-Hwan Yeo <https://orcid.org/0000-0001-7722-7447>

References

- Baek SY, Kim JY, Choi JH, Choi JS, Choi HS, Jeong ST, Yeo SH. Assessment of the quality characteristics of mixed-grain Nuruk made with different fungal strains. *J East Asian Soc Dietary Life*, 21, 103-108 (2012)
- Chun AR, Kim DJ, Yoon MR, Oh SK, Choi IS, Hong HC, Kim YG. Effect of milling degree on the physicochemical and sensory quality of Sogokju. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 41, 136-142 (2012)
- Choi HS, Kang JE, Jeong ST, Kim CW, Baek SY, Yeo SH. Soju brewing characteristics of yeast strains N4 and N9 isolated from Korea traditional Nuruk. *Korea J Food Preserv*, 24, 714-724 (2017)
- Choi JS, Jung ST, Kim JY, Choi JH, Choi HS, Yeo SH. Quality characteristics of wheat Nuruk and optimum condition of liquid starters for *Aspergillus* sp. *Korean J Microbiol Biotechnol*, 39, 357-363 (2011)
- Choi JS, Jeong ST, Choi JH, Baek SY, Yeo SH. Quality characteristics of wheat Nuruks by storage conditions of liquid starters using *Rhizopus oryzae* N174. *Korean J Microbiol Biotechnol*, 40, 319-324 (2012)
- Han EH, Lee TS, Noh BS, Lee DS. Quality characteristics in mash of Takju prepared by using different Nuruk during fermentation. *Korean J Food Sci Technol*, 29, 555-562 (1997)
- Huh CK, Kim SM, Kim YD. Comparison for enzymic activity of Nuruk and quality properties of Yakju by different fungi. *Korea J Food Preserv*, 21, 573-580 (2014)
- Im SY, Baek CH, Baek SY, Park HY, Choi HS, Choi JH, Jeong ST, Shin WC, Park HD, Yeo SH. Quality characteristics of Takju according to different rice varieties and mixing ratio of Nuruk. *Korean J Food Preserv*, 21, 892-902 (2014)
- Jo GY, Lee CW. Isolation and identification of the fungi from Nuruk. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 26, 759-766 (1997)
- Jin TY, Kim ES, Eun JB, Wang SJ, Wang MH. Changes in physicochemical and sensory characteristics of rice wine, Yakju prepared with different amount of red yeast rice. *Korean J Food Sci Technol*, 39, 309-314 (2007)
- Jeon CO. Industrial application and starter development for traditional fermentation food using lab evolution method. *E-bioindustry*, http://www.e-bioindustry.or.kr/board/list.html?num=134&start=50&sort=top_desc,pos_asc,num_desc&code=ori_con&title=01 (accessed November 2014)
- Jeong JH, Chai HS, Lee YH, Kim JM, Lee JH. Quality characteristics of Takju, Yakju, spirit made by cereal Nuruks. *Korean J Culinary Research*, 21, 267-280 (2015)
- Kim CJ, Oh MJ, Lee JS. Studies on digestion of raw starch by *Rhizopus oryzae*: Optimum condition of enzyme production and ethanol fermentation. *Kor J Appl Microbiol Bioeng*, 13, 329-337 (1985)
- Kato H, Rhue MR, Nishimura T. Role of Free Amino Acids and Peptides in Food Tasted. American Chemical Society, Washington DC, USA, p 158-174 (1989)
- Kim IH, Park WS, Kim YJ. Comparison of fermentation characteristics of Korean traditional alcoholic beverage with different input step and treatment of rice and Nuruk (Korean-style bran koji). *Korean J Dietary Culture*, 11, 339-348 (1996)
- Kim SR, Ahn JY, Lee HY, Ha TY. Various properties and phenolic acid contents of rices and rice brans with different milling fractions. *Korean J Food Sci Technol*, 36, 930-936 (2004)
- Kang JE, Choi HS, Kim JW, Kim CW, Yeo SW, Jung ST. Quality characteristics of Yakju with Nuruk extracts. *Korean J Food Sci Technol*, 48, 223-230 (2016)
- Lee SH, Jung HJ, Yeo SH, Kim HS, Yu TS. Characteristics of α -amylase of, a new species, *Aspergillus coreanus* NR 15-1. *Korean J Biotechnol Bioeng*, 19, 301-307 (2004)
- Mizuma T. Analysis of water absorption characteristics of rice for Sake brewing. *J Brew Soc Japan*, 104, 322-330 (2009)
- Mun JY, Baek SY, Park HY, RO HS, Yeo SH. Cultural characteristics of fungi strains isolated from Korean Nuruk. *J East Asian Soc Diet Life*, 26, 125-140 (2016)
- Nam K, Lee NK, Yum EJ, Kim YS, Kim DH, Yeo SH, Jeong YS. 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 (2015)
- National Tax Service (NTS). Analysis of Liquor Regulatory. National Tax Service, Seoul, Korea, p 17-18 (2014)
- NTS Liquors Licence Aid Center. Coursebook on the Preparation of Takju and Yakju. NTS Liquors Licence Aid Center, Seoul, Korea, p 89-90 (2010)
- Park CS, Lee TS. Quality characteristics of Takju prepared by wheat flour Nuruk. Korea J Food Sci Technol, 34, 296-302 (2002)
- Park JH, Yeo SH, Jeong ST, Choi HS, Jeon JA, Choi JH. Characteristics of Byeok-hyang-ju made by various processing methods originated from ancient documents. Korea J Food Preserv, 17, 826-834 (2010)
- So MH. Characteristics of koji molds isolated from koji-starters for brewing in Korea and Japan. Korean J Food Nutr, 6, 1-7 (1993a)
- So MH. Conditions for the production of amylase and protease in making wheat flour Nuruk *Aspergillus oryzae* L2. Korean J Food Nutr, 6, 89-95 (1993b)
- Song SH, Lee CH, Lee SH, Park JM, Lee HJ, Bai DH, Yoon SS, Choi JB, Park YS. Analysis of microflora profile in Korean traditional Nuruk. J Microbiol Biotechnol, 23, 40-46 (2013)
- Yu TS, Kim J, Kim HS, Hyun JS, Ha HP, Park MG. Bibliographical study on microorganisms of traditional Korean Nuruk (since 1945). J Korean Soc Food Sci Nutr, 27, 789-799 (1998)
- Yang SY, Lee JK, Kwak JK, Kim KH, Seo MJ, Lee YW. Fungi associated with the traditional starter cultures used for rice wine in Korea. J Korean Soc Appl Biol Chem, 54, 933-943 (2011)