

누룩곰팡이 분리균의 다양성 및 당화능 분석과 독소생산 능 조사

김민식¹ · 김신일¹ · 하병석¹ · 박혜영³ · 백성열³ · 여수환³ · 노현수^{1,2*}

¹경상대학교 응용생명과학부, ²경상대학교 생명과학연구원, ³농촌진흥청 국립농업과학원 농식품자원부

Diversity, Saccharification Capacity, and Toxigenicity Analyses of Fungal Isolates in Nuruk

Min Sik Kim¹, Sinil Kim¹, Byeong-Seok Ha¹, Hye-Young Park³, Seong-Yeol Bae³, Soo-Hwan Yeo³ and Hyeon-Su Ro^{1,2*}

¹Division of Applied Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

²Research Institute for Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

³Fermented Food Science Division, NAAS, RDA, Wanju 565-850, Korea

ABSTRACT : Nuruk samples collected from various regions in Korea were investigated in terms of fungal contents and diversity. In measurement of colony forming unit (CFU) in Nuruk suspensions on DRBC agar, Nuruk samples MS4, MS8, and MS10 were among the highest fungal density, with $1,278.9 \pm 21.6 (\times 10^4)$, $1,868.0 \pm 27.7 (\times 10^4)$, and $775.1 \pm 19.2 (\times 10^4)$ were among the samples showing the highest fungal density. CFU per 20 mg Nuruk, respectively. The majority of fungal components were yeasts, including *Pichia anomala*, *P. kudriavzevii*, *Kluyveromyces marxianus*, and *Saccharomycopsis fibuligera*, whereas *Aspergillus oryzae* and *Rhizopus oryzae*, the representative Nuruk fungi, were predominant only in the low fungal density Nuruks (MS2, MS5, and MS11). Saccharification capability of the fungal isolates was assessed by measurement of amylase activity in the culture broth. The highest amylase activity was found in *A. niger* and *A. luchuensis*, followed by *S. fibuligera*. *A. oryzae* and *R. oryzae* showed fair amylase activity but significantly lower than those of the three fungal species. *R. oryzae* was suggested to play an additional role in degradation of β -glucan in crop component of Nuruk since *R. oryzae* was the only fungus that showed β -glucanase activity among the fungal isolates. To confirm the safety of Nuruk, aflatoxigenicity of the isolated *Aspergillus* was estimated using the DNA markers *norB-cypA*, *aflR*, and *omtA*. All of the isolates turned out to be non-aflatoxigenic as evidenced by the deletion of gene markers, *norB-cypA* and *aflR*, and the absence of aflatoxin in the culture supernatants shown by TLC analysis.

KEYWORDS : Aflatoxin, Fungal diversity, Nuruk, Saccharification, Yeast

서 론

누룩은 우리나라 대표적인 막걸리와 약주 등 전통주를 빚는 발효제로서 사용되고 있으며, 보리나 밀과 같은 곡류를 과쇄하고 수분을 가하여 단단하게 성형한 후, 환경에 노출시켜 다양한 발효 미생물들이 자라게 함으로써 만들어진다. 이러한 이유 때문에 누룩에 들어있는 미생물들의 다양성과 함량은 제조한 지역, 온도 및 원료의 조성 등과 같은 지리적, 물리화학적 환경에 의하여 결정된다. 누룩에는 *Rhizopus oryzae*, *Absidia corymbifera* (*Lichtheimia corymbifera*), *Lichtheimia ramosa*, *Mucor indicus* 등 접합균류(Zygomycota)들과 *Aspergillus oryzae*, *A. niger*, *A. luchuensis* 등 당화능이 높은 *Aspergillus* 균들 및 *A. fumigatus*, *A. flavus*와 같은 병원성 *Aspergillus* 균들도 포함되어 있다.

Kor. J. Mycol. 2014 September, 42(3): 191-200
http://dx.doi.org/10.4489/KJM.2014.42.3.191
pISSN 0253-651X • eISSN 2383-5249
© The Korean Society of Mycology

*Corresponding author
E-mail: rohyeon@gnu.ac.kr

Received September 8, 2014
Revised September 17, 2014
Accepted September 23, 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.

[1, 2]. 이러한 곰팡이들은 α -amylase, glucoamylase 등 여러 가지 amylase 효소들을 분비생산하여 곡류에 저장된 전분을 당화하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 곰팡이의 전분당화능에 의해 만들어진 당류는 효모에 의한 알코올 생산에 사용된다. 주로 누룩에 생육하는 효모로는 *Saccharomyces cerevisiae*를 비롯하여 *Pichia jadinii*[1], *P. anomala* [3, 4] 등이 분리된 바 있으며, 막걸리의 PCR-DGGE 분석을 통하여 *P. kudriavzevii*가 발효초기의 우점균임이 밝혀진 바 있다[5]. *Saccharomycopsis fibuligera*도 다수의 누룩에서 발견되었는데, 특이하게도 알코올발효능 대신 높은 당화능을 가지고 있는 것으로 보고되었다[6]. 이외에도 누룩에는 *Bacillus subtilis*, *B. amyloliquefaciens* 등 우점하는 그람 양성 세균들과, *Pediococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Weissella* spp. 등 유산균들이 포함되어 있는 것으로 보고되고 있다[1].

누룩에서 가장 많이 분리되는 곰팡이는 *R. oryzae*와 *A. oryzae*로서 누룩을 대표하는 곰팡이라 할 수 있다. *R. oryzae*는 접합균증(Zygomycosis)을 일으키는 병원성 곰팡이면서[7], 동양에서는 전통발효식품의 제조에 사용되는 산업적으로 중요한 곰팡이이다. *R. oryzae*는 생태계에서는 죽은 식물체에 초기에 감염되는 개척자 부생균(Pioneer saprotrophic)으로, 쉽게 분해할 수 있는 기질을 이용하여 빠르게 기질내부로 침투하는 능력을 가지고 있다. 최근의 유전체 연구에서도 *R. oryzae*에는 exo-cellulase 유전자, pectin 분해에 필요한 보조유전자, xyloglucan, xylan, inulin 등의 분해에 필요한 유전자가 발견되지 않고 있어서, 단당류나 전분과 같이 쉽게 분해할 수 있는 다당류를 빠르게 점유하여 다른 곰팡이들과 경쟁에서 이기는 전략을 취하는 것으로 밝혀졌다[8]. 누룩에서도 *R. oryzae*는 발효초기에는 1차 침투자(primary colonizer) 역할을 하며 누룩의 구성성분의 분해역할을 할 것으로 추정되지만, 온도에 민감하기 때문에 발효가 진행되어 누룩 내부온도가 올라가면 점차적으로 *A. oryzae*와 같은 고온성 곰팡이와의 경쟁에서 밀려나는 것으로 생각된다[2]. 황국균인 *A. oryzae*는 α -amylase를 분비·생산하는 높은 당화능을 보이는 곰팡이로서[9], 누룩에서도 대표적인 우점균으로서 누룩의 당화 및 액화 기능에 가장 중요한 곰팡이 중 하나이다[1, 2]. 그러나 *A. oryzae*는 aflatoxin 생산균인 *A. flavus*와 전통적인 분류학적 기준으로는 구분할 수 없을 만큼 유연관계가 가까운 균으로 aflatoxin의 생산 유무를 검증하는 것이 필수적이다[10, 11]. Aflatoxin 생합성경로는 25개의 유전자군(gene cluster)으로 구성되어 있으며[12], 이들의 발현은 대부분 전사활성인자(transcriptional activator)인 *aflR*에 의하여 조절된다[13]. 따라서 *aflR*유전자의 polymorphism과 유전자 결실(deletion), *aflR* 결합부위의 존재유무가 aflatoxin 생합성능을 판단하는 중요 지표로 활용되고 있다[10]. 특히 *norB*와 *cypA* 유전자의 사이에 존재하는 *aflR* 결합부위는 전체 유전자군의 발현에 필수적인 부위이다. 일반적으로 *A. oryzae/flavus*

는 *norB-cypA*(1.8 kb)부위의 부분적 결실패턴에 따라 Type I deletion(0.3 kb), Type II deletion(0.8 kb) 그룹으로 나누고, Type I deletion 그룹은 aflatoxin을 생산하지 못하는 것으로 보고되고 있다[11, 14, 15].

본 연구에서는 국내 다양한 경로를 통하여 수집된 누룩이 함유한 효모와 군사상 곰팡이의 함량 및 다양성을 조사하고, 이들의 당화능에 관련된 효소의 활성을 평가하여 누룩의 품질과 관련된 지표를 제시하고자 한다. 또한, 누룩에서 우점균으로 발견되는 *Aspergillus* 균들의 aflatoxin 독소 생산능을 조사하여 누룩을 사용한 전통발효식품의 안전성을 검토하였다.

재료 및 방법

누룩의 수집 및 곰팡이 분리

전국의 양조장, 누룩제조사 및 재래시장 등에서 11종의 누룩을 수집하였다. 누룩에 생육하는 곰팡이를 분리하기 위하여, 수집한 누룩 1 g을 과쇄하여 10 mL의 멸균수에 현탁시킨 후, 상등액을 1/10000로 희석하여 potato dextrose agar(PDA; Ventech Bio Co., Eumseong, Korea)와 DRBC agar(동물조직 효소분해물 5 g/L, 포도당 10 g/L, KH_2PO_4 1 g/L, MgSO_4 0.5 g/L, Rose Bengal 0.025 g/L, dichloran 0.002 g/L, chloramphenicol 0.1 g/L, agar 15 g/L, pH 5.6)에 도말하고 30°C에서 3~4일간 배양한 후 단일 콜로니를 PDA 배지로 옮겨 순수분리를 하였다. 분리된 곰팡이들과의 비교분석을 위하여, 농촌진흥청 발효식품과에서 보유한 *A. oryzae* 7종(82-7, SS1, 59-5, 83-3, 78-5, 40-2, 82-3), *A. luchuensis* 2종(74-5, 34-1), *R. oryzae* 6종(26-4, CN084, CN105, CN174, 58-11)을, aflatoxin 생산능 비교를 위해서는 *A. flavus* KCCM11910, KCCM60330 균주와 *A. parasiticus* KCCM12699, KCCM12701, KCCM35079 균주를 각각 분양받아 사용하였다.

18S rDNA 및 ITS 염기서열분석

분리된 각 곰팡이의 부분동정을 위하여 18S rDNA 및 ITS 염기서열을 분석하였다. 18S rDNA는 NS1 (5'-GTA GTC ATA TGC TTG TCT C-3')과 NS8 (5'-TCC GCA GGT TCA CCT ACG GA-3')를 이용하여 PCR로 증폭하였으며[16], ITS는 NSA3 (5'-AAA CTC TGT CGT GCT GGG GAT A-3')와 NLB4 (5'-GGA TTC TCA CCC TCT ATG AC-3')를 이용하여 증폭하였다. PCR 및 genomic DNA 추출은 이전에 보고된 방법을 사용하였다[17]. 증폭된 PCR 산물은 TA cloning 후 염기서열을 결정하였다. 결정된 염기서열의 Blast 분석을 통하여 해당 곰팡이의 부분동정을 실시하였다.

Amylase 및 β -glucanase 효소활성의 측정

Amylase 활성 측정을 위하여 각 곰팡이 균주들을 starch

(Bio Basic Canada Inc., Ontario, Canada)와 beef extract (BD, MD, USA)가 각각 10 g/L, 3 g/L 포함된 5 mL starch broth에 30°C, 48시간 배양하였다. 배양액을 13,000 rpm에서 5분간 원심분리를 하여 잔여 전분과 균사를 가라앉히고 상등액을 취하였다. 상등액 20 µL에 물 180 µL를 가한 후 30 mM phosphate buffered saline (PBS, pH 6)에 녹인 starch(1 g/L) 200 µL를 섞고 30°C에서 20분간 반응시켰다. 반응 후 유리된 환원당을 DNS 방법[18]으로 정량하여 amylase의 활성을 측정하였다. β-glucanase 활성 또한 위 상등액을 사용하여 측정하였다. 이를 위하여 상등액 20 µL에 물 180 µL를 가한 후, 100 mM sodium acetate (pH 5.0)에 녹인 β-glucan (1 g/L) 200 µL를 섞고 30°C에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 유리된 환원당을 DNS 방법으로 정량하여 β-glucanase의 활성으로 환산하였다. 각 효소의 활성 1 unit은 1분당 1 µM의 포도당을 만드는데 필요한 효소량으로 정의하였다.

Aflatoxin 생합성 유전자 분석

각 균주들에서 aflatoxin 생산에 관여하는 유전자들의 존재 여부를 확인하기 위하여 *norB-cypA*, *omtA*, *aflR*에 대응하는 primer들을 제작하여 PCR을 수행하였다. *norB-cypA* 영역의 증폭에는 AP1729 (5'-GTG CCC AGC ATC TTG GTC CAC C-3')와 AP3551 (5'-AAG GAC TTG ATG ATT CCT C-3') primer를 사용하였다[14]. *omtA*의 증폭은 forward primer, 5'-CAG GAT ATC ATT GTG GAC GG-3'와 reverse primer, 5'-CTC CTC TAC CAG TGG CTT CG-3'

를 사용하였고[10], *aflR*은 F2 (5'-CCG GCG CAT AAC ACG TAC TC-3')와 R2 (5'-GGC GCT TGG CCA ATA GGT TC-3')를 사용하였다[11].

Aflatoxin의 TLC 분석

각 균주를 aflatoxin 생산이 유도되는 YES 배지(sucrose 60 g/L, yeast extract 20 g/L)[19] 10 mL에 분주하고 shaking incubator에서 180 rpm, 30°C, 암실 조건으로 120시간 동안 배양하였다. 배양완료 후 배양액 1 mL에 chloroform 0.1 mL을 가하여 aflatoxin 추출하였다. 추출액 내 aflatoxin을 TLC plate (Silica gel 60 F254; Merck Co., USA)상에서 diethylether-methanol-water(96:3:1)를 이동상으로 사용하여 20분간 전개하여 분석하였다.

결과 및 고찰

누룩의 수집 및 누룩 곰팡이 분리

누룩에 포함된 다양한 종류의 유용 곰팡이 균주를 분리를 위하여 양조장, 누룩제조사, 재래시장 등에서 11종의 누룩을 수집하였다(Table 1, MS1~11). 수집된 누룩으로부터 곰팡이를 분리하기 위하여, 누룩 현탁액을 DRBC 고체배지에 도말하여 25°C에서 5일간 배양하였다. 배양결과 대부분의 누룩에서 효모들이 우점하는 것으로 관찰되었으며, MS2, MS5, MS11 누룩만이 균사상 곰팡이들이 우점하고 있었다(Fig. 1, Table 1). 각 고체배지내 곰팡이균들의 수를 콜로니형성단위(CFU)로 측정한 결과, MS4, MS8, MS10

Table 1. List of the isolated fungal strains from various Nuruk samples

Nuruk Sample No. (Region, Collection date)	Isolated fungal strains	Isolate No.	CFU (×10 ⁴)	
			Individual	Total
MS1 (Sanchung, Feb. 2014)	<i>Rhizopus oryzae</i>	MS1-1, -2	6.0 ± 1.0	53.0 ± 3.7
	<i>Aspergillus oryzae</i>	MS1-5	0.2 ± 0.1	
	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	MS1-S1	8.1 ± 1.2	
	<i>Pichia kudriavzevii</i>	MS1-S3	19.3 ± 3.2	
	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	MS1-Y1, -Y2, -Y3	19.4 ± 3.1	
MS2 (Jinju, Feb. 2014)	<i>Rhizopus oryzae</i>	MS2-1, -2	4.1 ± 0.6	40.3 ± 2.5
	<i>Aspergillus oryzae</i>	MS2-5, -6, -12, -15	20.4 ± 2.4	
	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	MS2-S1, -S2	3.1 ± 0.2	
	<i>Pichia anomala</i>	MS2-Y2	9.5 ± 1.1	
	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	MS2-Y1	3.2 ± 0.5	
MS3 (Hwasung, Feb. 2014)	<i>Rhizopus oryzae</i>	MS3-1, -2, -3, -5	0.8 ± 0.1	7.6 ± 0.9
	<i>Aspergillus oryzae</i>	MS3-4	0.7 ± 0.1	
	<i>Aspergillus fumigatus</i>	MS3-7	0.6 ± 0.1	
	<i>Mucor indicus</i>	MS3-12, -13	0.2 ± 0.1	
	<i>Pichia kudriavzevii</i>	MS3-S3	1.0 ± 0.1	
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	MS3-Y2	4.3 ± 0.3	

Table 1. List of the isolated fungal strains from various Nuruk samples (continued)

Nuruk Sample No. (Region, Collection date)	Isolated fungal strains	Isolate No.	CFU ($\times 10^4$)	
			Individual	Total
MS4 (Yesan, Feb. 2014)	<i>Rhizopus oryzae</i>	MS4-3, -4	3.1 ± 0.5	1279.1 ± 17.8
	<i>Absidia corymbifera</i>	MS4-2	0.3 ± 0.1	
	<i>Aspergillus oryzae</i>	MS4-11	0.1 ± 0.1	
	<i>Aspergillus fumigatus</i>	MS4-6	0.1 ± 0.1	
	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	MS4-S1	436.3 ± 10.5	
	<i>Pichia kudriavzevii</i>	MS4-S3	74.5 ± 5.5	
	<i>Pichia anomala</i>	MS4-Y1	764.7 ± 13.2	
MS5 (Yesan, Feb. 2014)	<i>Rhizopus oryzae</i>	MS5-1, -2, -3	12.5 ± 2.6	26.2 ± 3.1
	<i>Absidia corymbifera</i>	MS5-5, -11	0.2 ± 0.1	
	<i>Trichosporon loubieri</i>	MS5-10	1.8 ± 0.5	
	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	MS5-6, -8, -9	5.5 ± 1.3	
	<i>Pichia anomala</i>	MS5-Y1	6.2 ± 1.6	
MS6 (Yesan, Feb. 2014)	<i>Paecilomyces variotii</i>	MS6-4	0.1 ± 0.1	452.7 ± 20.3
	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	MS6-S1, -S2	241.5 ± 15.1	
	<i>Pichia kudriavzevii</i>	MS6-6	106.6 ± 9.1	
	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	MS6-Y2	104.5 ± 10.1	
MS7 (Chungdo, Feb. 2014)	<i>Aspergillus niger</i>	MS7-1, -2, -3, -4	4.9 ± 0.1	25.1 ± 1.1
	<i>Cyberlindnera fabianii</i>	MS7-Y1	20.2 ± 1.1	
MS8 (Busan, Feb. 2014)	<i>Rhizopus oryzae</i>	MS8-1, -2, -3	1.4 ± 0.1	1868.0 ± 11.6
	<i>Aspergillus oryzae</i>	MS8-4	4.6 ± 0.1	
	<i>Absidia corymbifera</i>	MS8-5	0.2 ± 0.1	
	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	MS8-7, -8, -9	1080.5 ± 25.2	
	<i>Pichia kudriavzevii</i>	MS8-6, -10, -11, -S3	45.1 ± 2.6	
	<i>Pichia anomala</i>	MS8-Y1, -Y2, -Y3	736.2 ± 11.3	
MS9 (Kwangju, Feb. 2014)	<i>Rhizopus oryzae</i>	MS9-1, -2, -3	8.3 ± 0.1	95.3 ± 5.0
	<i>Aspergillus oryzae</i>	MS9-13	2.9 ± 0.1	
	<i>Absidia corymbifera</i>	MS9-5, -11	0.7 ± 0.1	
	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	MS9-6, -7	6.0 ± 0.5	
	<i>Pichia kudriavzevii</i>	MS9-S3	13.1 ± 2.1	
	<i>Pichia anomala</i>	MS9-Y1	64.3 ± 4.5	
MS10 (Sanchung, Mar. 2014)	<i>Rhizopus oryzae</i>	MS10-3	0.8 ± 0.1	775.1 ± 7.9
	<i>Aspergillus oryzae</i>	MS10-11, -13	3.4 ± 0.1	
	<i>Absidia corymbifera</i>	MS10-12	0.7 ± 0.1	
	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	MS10-4, -5, -6, -8	469.1 ± 8.5	
	<i>Pichia kudriavzevii</i>	MS10-7, -9	97.5 ± 4.5	
	<i>Pichia anomala</i>	MS10-Y1, -Y2, -Y3	203.6 ± 6.5	
MS11 (Sanchung, Mar. 2014)	<i>Rhizopus oryzae</i>	MS11-13	16.1 ± 1.5	233.2 ± 7.7
	<i>Aspergillus oryzae</i>	MS11-1, -3, -11, -12	156.7 ± 7.5	
	<i>Absidia corymbifera</i>	MS11-2	2.0 ± 0.1	
	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	MS11-4, -5	36.1 ± 3.1	
	<i>Pichia kudriavzevii</i>	MS11-S3	2.0 ± 0.1	
	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	MS11-Y1	20.3 ± 1.1	

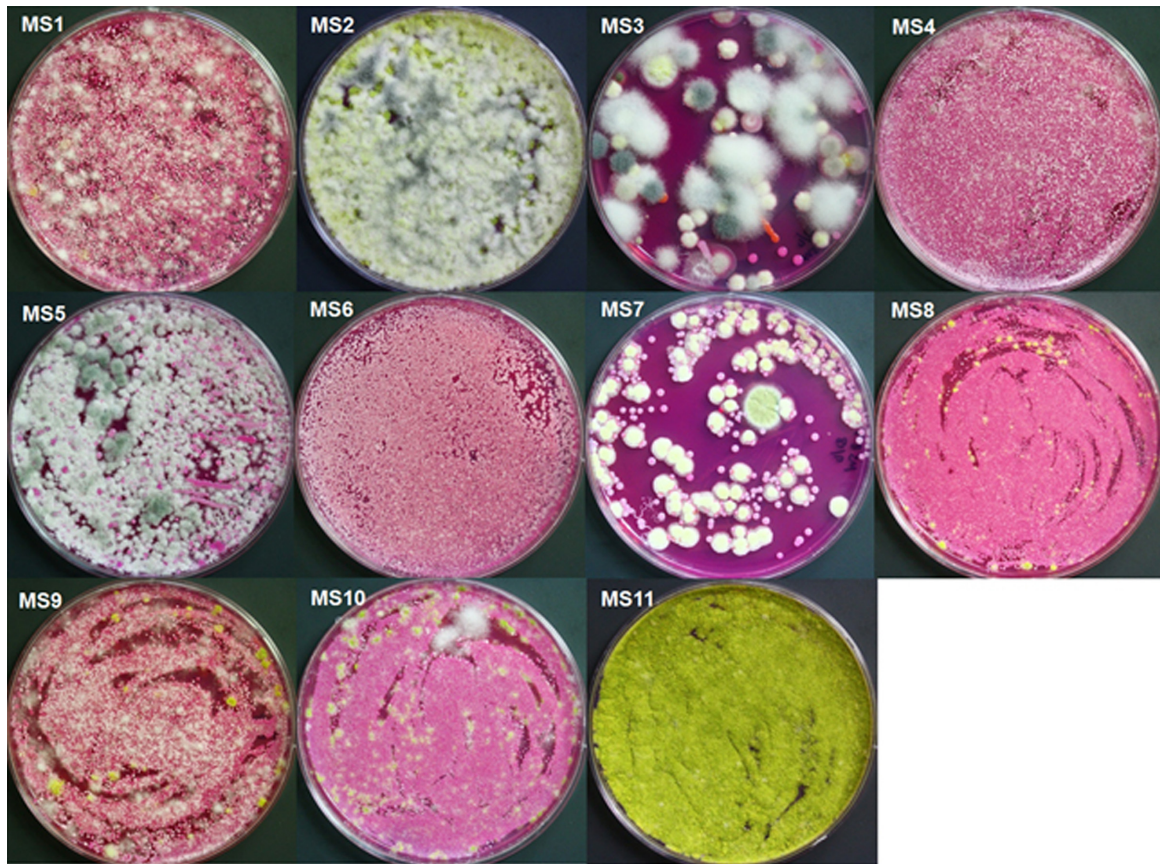


Fig. 1. Diversity of the fungal colonies from different Nuruk samples. Dried Nuruk (1 g) was suspended in 1 mL of water. 0.2 mL of the diluted supernatant (1:1000) was spread on DRBC agar. MS numbers in the pictures are the Nuruk sample numbers described in Table 1.

등 3종의 누룩에서 각각 $1,278.9 \pm 21.6 (\times 10^4)$, $1,868.0 \pm 27.7 (\times 10^4)$, $775.1 \pm 19.2 (\times 10^4)$ CFU (20 mg 누룩당)로 가장 높은 곰팡이균 밀도를 보였으며, 이들의 대부분은 효모균으로 밝혀졌다. 이와 관련하여 최근 연구의 다른 연구에서는 누룩 10 g당 $10^6 \sim 10^8$ 콜로니형성단위(colony forming unit, CFU)의 곰팡이와 10^4 CFU 내외의 효모균이 포함되어 있는 것으로 보고되었다[1]. 본 연구의 결과를 누룩 10 g 당 곰팡이균 수로 환산하면 $10^8 \sim 10^9$ 의 CFU로 기존 연구결과와 유사하다 할 수 있으나, 효모균의 수가 압도적으로 많다는 측면에서는 기존 연구와 차이 나는 결과이다. 차이의 원인은 분리에 사용된 배지에서 기인하는 것으로, PDA 배지나 yeast mold agar+chloramphenicol 배지[1]는 곰팡이의 성장에 유리하여 상대적으로 효모균의 성장이 억제되나, DRBC 배지는 곰팡이의 성장을 억제시켜서 효모의 성장을 상대적으로 부각시켜주는 배지이다[20, 21]. 한편, MS3 누룩은 $7.6 \pm 0.4 (\times 10^4)$ CFU로서 가장 작은 수의 곰팡이균을 가지고 있었다. 곰팡이균의 다양성 측면에서는 MS7을 제외한 대부분의 누룩에서 5종 내외의 곰팡이들이 발견되었다. 이상의 결과는 누룩이 제조지역 및 사용원료에 따라 다양한 곰팡이균을 다양한 비율로 포함하고 있음을 알려 주

는 것이다.

누룩곰팡이균의 분리 및 ITS, 18S rDNA 서열분석을 통한 동정

고체배지에서 생육한 곰팡이들 중 콜로니의 모양과 크기, 균사의 형태, 포자의 색깔 등 형태학적 특징들이 구분되는 각각의 콜로니를 분리하여 PDA 배지에서 배양하였다. 분리된 각 곰팡이균의 부분동정을 위하여, 18S rDNA 및 ITS 염기서열을 결정하였다. 결정된 염기서열을 BLAST로 검색하여 각 곰팡이를 동정하였다. 그 결과, 대부분의 누룩에서 주요 우점균으로 관찰된 효모균들은 *P. anomala*, *P. kudriavzevii*, *Kluyveromyces marxianus*와 이형성 효모(dimorphic yeast)인 *Saccharomycopsis fibuligera*임이 밝혀졌다. *P. kudriavzevii*는 ethanol 발효능이 우수한 효모균으로 바이오매스 자원으로부터 동시당화발효를 통한 ethanol 생산 연구가 진행되고 있는 대표적인 균주이다[22-24]. *P. kudriavzevii*는 일반 효모와 달리 균의 모양이 길쭉하며, 경우에 따라서는 세포질이 연결된 위균사(pseudohyphae)를 만들기도 한다(Fig. 2) *S. fibuligera*는 이형성 효모로서 콜로니의 내부에는 효모형 균체가 다수 관찰되나 가장자리 부

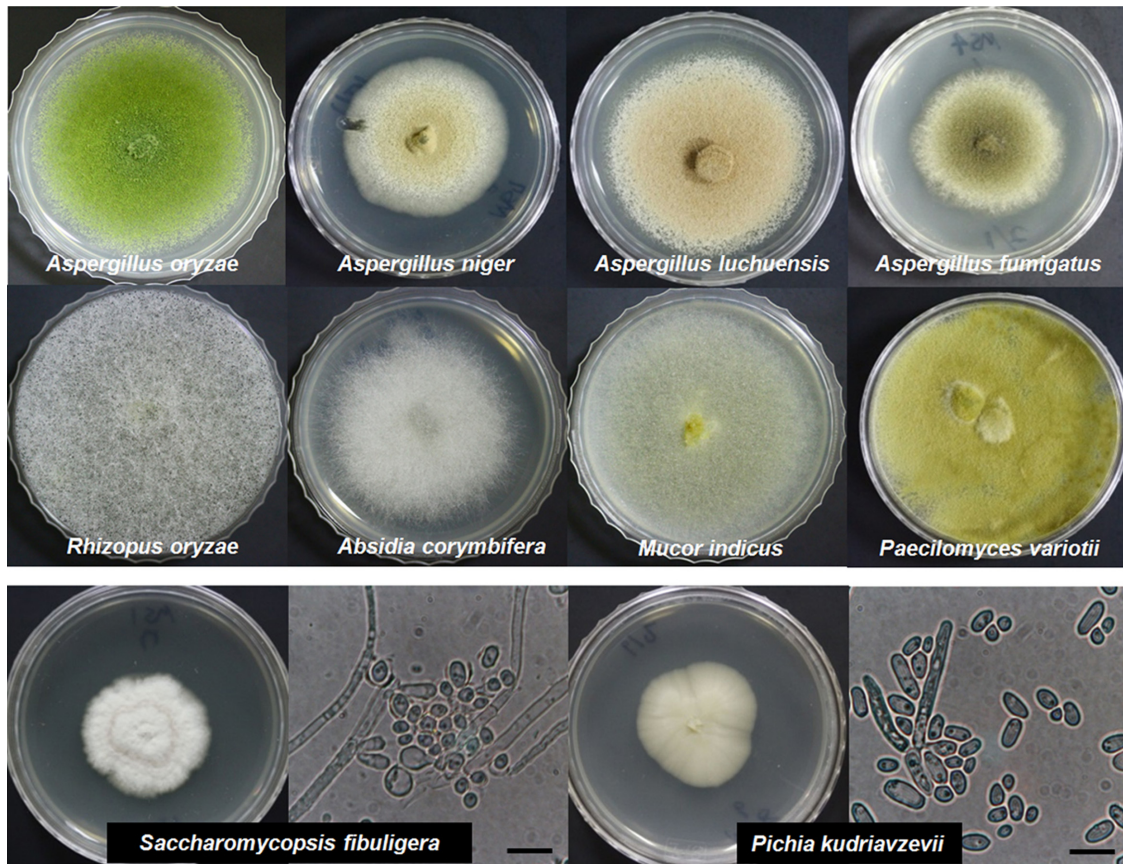


Fig. 2. The filamentous fungi and yeasts isolated from various Nuruk samples. (Scale bar=5 μ m).

분에서는 균사상으로 자라는 것을 관찰하였다(Fig. 2). 전분의 당화관련 효소를 분비생산하는 능력이 우수한 균으로 많은 연구결과가 보고되어 있다[25, 26]. *K. marxianus*는 다양한 종류의 효소를 분비하며, 여러가지 향기성분을 생산하여 발효식품에 풍미를 더하는 효모이면서 고온에서 알코올발효하는 특성을 가지고 있다[27]. *P. anomala*는 특이하게 산소제한조건에서만 알코올을 발효하는 특징을 가지고 있다[28]. 또한 곰팡이를 죽이는 능력이 뛰어나 *A. flavus* 같은 유해균의 생물학적 방제제로도 연구되고 있다[29]. 실제로 *P. anomala*가 우점하는 누룩의 경우에는 균사상곰팡이의 성장이 극도로 억제됨을 확인할 수 있다(Fig. 1).

곰팡이로는 접합균류에 속하는 *R. oryzae*와 자낭균류에 속하는 *A. oryzae*가 주로 검출되었다(Table 1). *R. oryzae*와 *A. oryzae*는 동양에서 전통적으로 발효식품에 사용되어 온 대표적인 당화용 곰팡이이다. 접합균류인 *A. corymbifera* 6개의 누룩에서 각각 발견되어 이들 또한 누룩을 이루는 주요 곰팡이임을 알 수 있었다. 이외에도 *A. fumigatus*, *M. indicus*, *Trichosporon loubieri* 등이 특정 누룩에서 발견되었다. MS6 누룩에서는 *Paecilomyces variotii*가 발견되었는데 이는 다른 연구에서도 보고된 바 있다[30]. 한편, 경북 청도지역에서 수집한 누룩(MS7)에서는 곰팡이로 흑국균인 *A. niger*만이 분리되었다. 분리된 대표적인 곰팡이 및 효모

들은 Fig. 2에 나타내었다.

누룩분리 곰팡이의 배양액의 amylase, β -glucanase, esterase 효소활성

누룩은 전통주 생산과정에서 전분을 분해하여 당화하는 기능을 수행할 뿐 아니라, 발효주의 맛과 향을 좌우하는 성분을 제공한다. 누룩의 이러한 기능과 관련하여 누룩분리 곰팡이가 분비·생산하는 당화효소인 amylase와 휘발성 향기성분 생산에 관련된 esterase, 누룩원료인 밀에 포함된 β -glucan을 β -glucanase 효소활성을 조사하였다. 이를 위하여 각각의 곰팡이를 전분배지에서 25°C에서 5일간 배양한 후, 배양액을 원심분리하여 상등액을 효소조액으로 사용하였다. 곰팡이 배양액의 각 효소활성은 Fig. 3에 나타내었다. p-Nitrophenylbutyrate를 이용한 esterase 활성은 대부분의 곰팡이 배양액에서 유사하게 나타났다.

Amylase 활성은 *A. niger*와 *A. luchuensis*가 가장 높은 것으로 나타났다. 이들 균주는 주로 막걸리제조에 사용되어 왔던 균들로서, 모두 *A. niger* clade에 속하는 균들이다[31]. *A. niger* clade 다음으로 당화능이 높은 곰팡이는 *S. fibuligera*로서 α -amylase, glucoamylase 등 당화효소를 분비생산하는 것으로 알려져 있으며[25, 26, 32], 높은 당화능력으로 인하여 카사바와 같은 전분이 많이 함유된 작물의 당화에

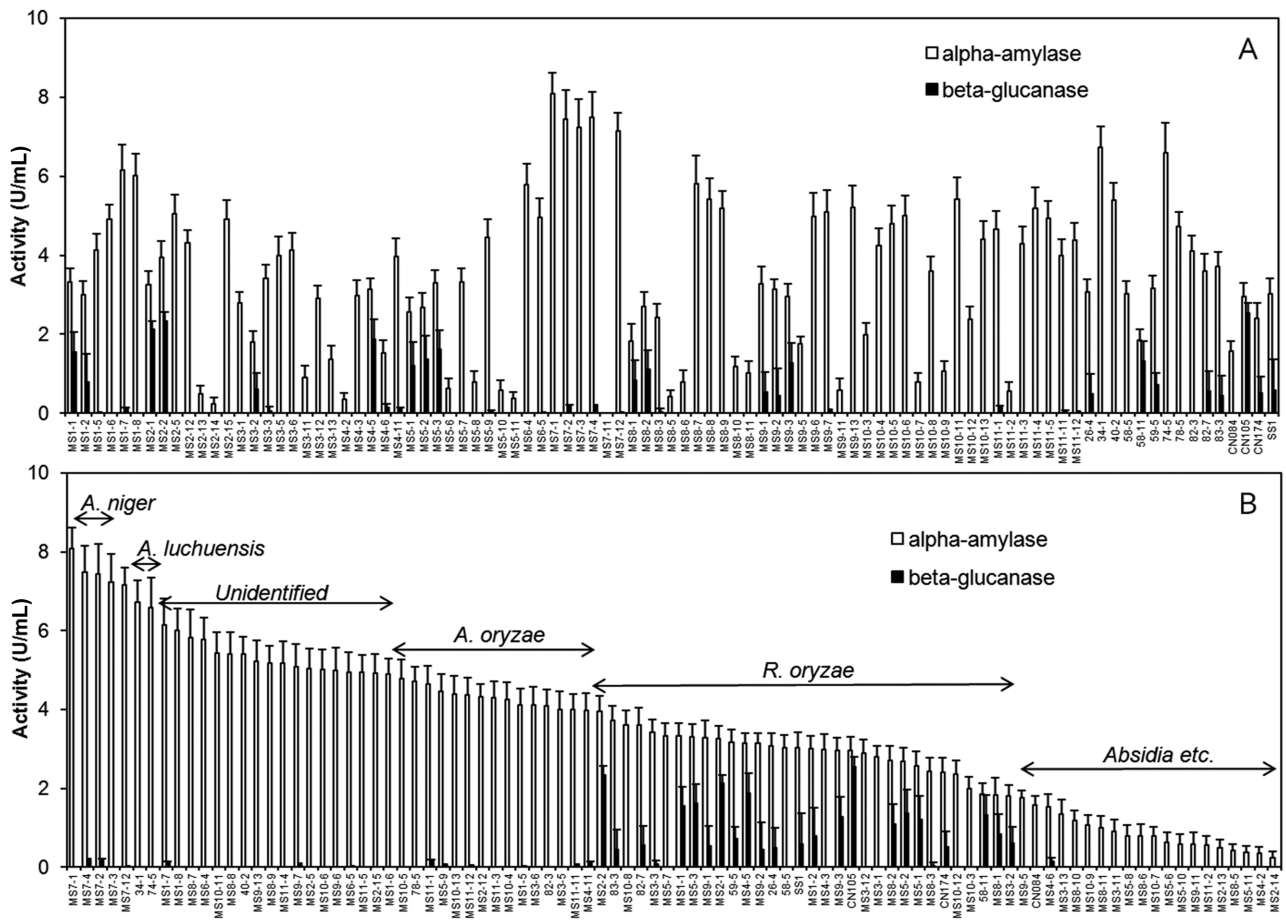


Fig. 3. The α -amylase and β -glucanase activities in culture supernatants of various fungal isolates in the order of Nuruk sample number (A) and in the order of the α -amylase activity (B). The strains including 26-4, 34-1, 40-2, 58-5, 58-11, 59-5, 74-5, 78-5, 82-3, 82-7, 83-3, CN084, CN105, CN174, and SS1 are stock strains in RDA, Korea, independently isolated from different Nuruk samples.

활용되고 있다[33]. *A. oryzae* 와 *R. oryzae*는 누룩이나 메주와 같은 전통발효식품에서 주로 발견되는 곰팡이균으로서, 특히 누룩에서는 주요 당화균이다[1]. 그러나, 당화능력에서는 앞서 소개된 3가지 곰팡이균에 미치지 못하고 있다. 한편, *A. corymbifera*, *P. kudriavzevii*를 포함하는 기타 수종의 곰팡이들 또한 관찰되었으나, 이들의 당화능은 매우 낮아서 전분의 당화 측면에서 큰 기능은 하지 않는 것으로 판단되었다. *Pichia* spp.는 ethanol 발효능이 뛰어난 효모이므로 전분의 당화 후 알코올 생산에 기여할 것으로 생각된다.

누룩의 제조에 사용되는 곡물에는 다량의 비수용성 β -glucan이 포함되어 있다[34]. 이러한 비수용성 β -glucan을 적절히 분해하여 가용화하면, 누룩을 이용하여 만든 막걸리에 면역활성을 높여주는 기능성을 부여할 수 있다. 따라서 누룩곰팡이의 β -glucan 분해능을 확인하기 위하여 배양액내 β -glucanase 활성을 조사하였다. 그 결과 β -glucanase 활성은 일부 *A. oryzae* 균에서 소량 관찰되었으나, 주요활성은 *R. oryzae*의 배양액에서 관찰되었다(Fig. 3B). 농촌진흥청 분리균주인 CN105균주가 가장 활성이 높았으며, 본 연

구에서 분리된 MS2-1, MS2-2 균주도 높은 활성을 보였다.

*Aspergillus oryzae*의 Aflatoxin 생산능 조사

누룩에 존재하는 주요 곰팡이균인 *A. oryzae*는 aflatoxin 생산균인 *A. flavus*와 유전적으로 근연한 종이므로[10], 분리된 *A. oryzae*균들의 aflatoxin 생산여부를 조사하였다. 먼저 본 연구에서는 *norB-cypA*, *aflR* 및 생합성 경로상에 존재하는 *omtA* 유전자 부위를 PCR로 조사하였다. 그 결과 *omtA* 유전자는 모든 *A. oryzae* 분리균주들 및 *A. flavus* (KCCM11910, KCCM60330), *A. parasiticus* (KCCM12699, KCCM12701, KCCM35079)에서 발견되었으나, *A. oryzae*/*flavus* clade에 속하지 않는 *A. fumigatus* (MS4-6), *A. niger* (MS7-1), *A. luchuensis* (74-5, 34-1) 등에서는 발견되지 않았다(Fig. 4A). *aflR* 유전자의 경우에도 종종 deletion이 관찰되는데[15], 본 연구에서도 MS1-5, MS2-5를 포함하는 9종의 분리균주와 농촌진흥청 분리균주인 83-3, 40-2 등 두종의 *A. oryzae* 균주에서 *aflR* 유전자의 deletion이 확인되었다(Fig. 4A). 한편 *norB-cypA* 영역을 조사한 결과, 대조

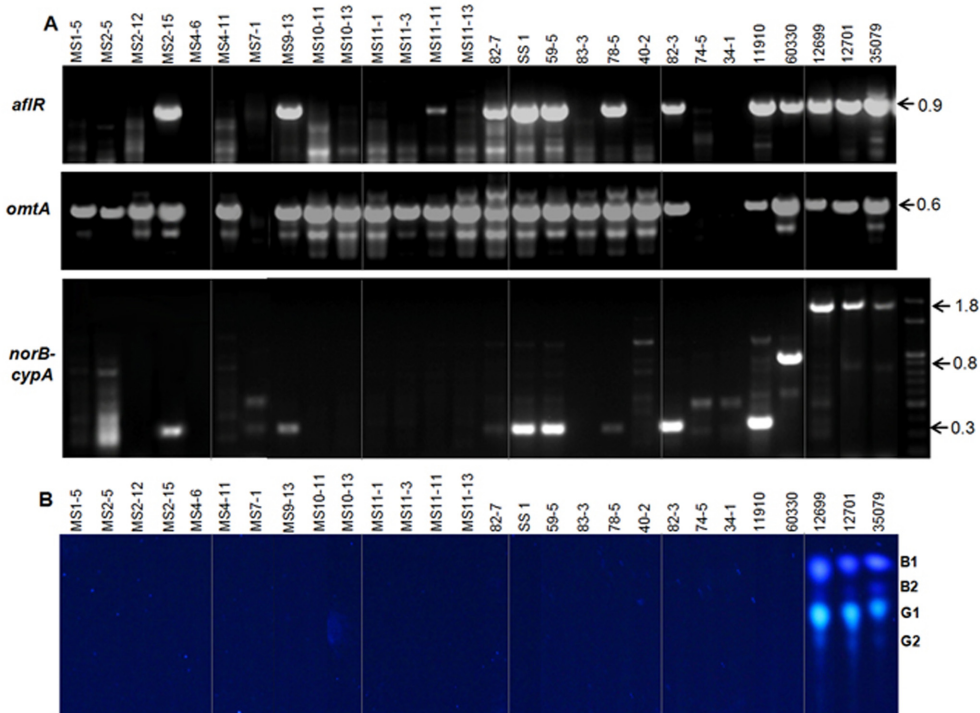


Fig. 4. Analyses of the aflatoxigenic activity of *Aspergillus* isolates. (A) Deletion patterns of aflatoxigenic genes, *aflR*, *omtA*, and *norB-cypA*. (B) TLC analysis of the culture broth extracts. *A. flavus* KCCM11910 and KCCM60330 were included as non-aflatoxigenic control strains, and *A. parasiticus* KCCM12699, KCCM12701, and KCCM35079 were included as aflatoxigenic positive controls. The strains including 34-1, 40-2, 59-5, 74-5, 78-5, 82-3, 82-7, 83-3, and SS1 are stock strains in RDA, Korea.

균주인 *A. parasiticus* (KCCM12699, KCCM12701, KCCM35079)에서는 1.8 kb 길이의 완전한 PCR 산물이 만들어졌다. 또, 대조균주 *A. flavus* KCCM11910과 KCCM60330 균주는 각각 0.3 kb, 0.8 kb 길이의 *norB-cypA* 영역을 나타내어 각각 Type I, Type II deletion 균주임을 알 수 있었다 (Fig. 4A). 반면 MS2-15, MS9-13를 제외한 모든 분리균주에서 *norB-cypA* 영역이 검출되지 않았으며, 이러한 결과를 보이는 균주들에서는 *aflR* 유전자도 deletion되어 있었다. 이렇게 *aflR* 유전자의 deletion이 *norB-cypA* 영역의 deletion과 동반하는 경우가 최근 연구에서 보고되어 있지만 그 원인은 아직 규명되지 않았다[15]. 이상의 결과는 분리된 모든 균주들이 aflatoxin을 생산하지 않는 균주들임을 시사하고 있다. 이는 aflatoxin 생산 유도배지에서 배양한 각 균주들의 상등액을 TLC로 분석한 결과와도 일치하는 것이다. Fig. 4B의 TLC 결과 *A. parasiticus* 균주들만이 aflatoxin들을 생산하고 있으며, Type I, II deletion의 *A. flavus* 균주를 포함한 모든 균주들이 non-aflatoxigenic 균주임을 알 수 있다.

결론적으로, 국내 여러지역 및 생산경로를 통하여 수집된 누룩내 곰팡이의 함량 및 다양성을 조사한 결과 누룩의 제조원에 따라 곰팡이 함량과 다양성이 크게 차이는 결과를 보였으며, 이는 누룩을 이용한 전통주의 품질 및 발효 효율에 크게 영향을 미칠 것으로 판단되었다. 본 연구에서

는 특히 다수의 누룩에서 주요우점균으로 이형성효모인 *S. fibuligera*가 반복적으로 발견되고, *S. fibuligera* 균이 높은 당화능을 보임에 따라, 누룩에 포함된 주요 당화균으로 기존의 *R. oryzae*와 *A. oryzae*에 더하여 *S. fibuligera*가 주요한 역할을 할 가능성이 제기되었다. 다행히도 본 연구에서 분리된 *A. oryzae*에 균은 모두 aflatoxin을 생산하지 않는 안전한 균으로 밝혀졌다. 향후 누룩의 성능과 품질의 유지를 위해서는 누룩 곰팡이균 및 효모의 분리와 동정, 누룩 분리 곰팡이의 적절한 배합비율, 누룩성분에 따른 곰팡이의 천이에 대한 연구가 지속적으로 이루어져야 할 것으로 판단된다.

적 요

다양한 경로를 통하여 수집된 누룩 11종에 들어 있는 효모와 곰팡이의 함량 및 다양성을 조사하였다. 누룩 현탁액을 DRBC 고체배지에서 배양한 후 고체배지상 곰팡이균들의 수를 콜로니형성단위(CFU)로 측정한 결과, MS4, MS8, MS10등 3종의 누룩에서 각각 $1,278.9 \pm 21.6 (\times 10^4)$, $1,868.0 \pm 27.7 (\times 10^4)$, $775.1 \pm 19.2 (\times 10^4)$ CFU (20 mg 누룩당)로 가장 높은 곰팡이 밀도를 보였으며, 이들의 대부분은 *Pichia anomala*, *P. kudriavzevii*, *Kluyveromyces marxianus* 및 *Saccharomycopsis fibuligera* 등 효모가 차지하고 있었다. MS2,

MS5, MS11등 3종의 누룩에서만 곰팡이인 *Aspergillus oryzae*, *A. niger*와 *Rhizopus oryzae*들이 우점균이었다. 각 곰팡이의 누룩에서의 역할을 알기 위하여, 곰팡이의 배양상 등액을 취하여 amylase 및 β -glucanase 활성을 조사하였다. Amylase 활성은 *A. niger*와 *A. luchuensis* 등 *A. niger* clade에 속하는 균이 가장 높았으며, 특이하게도 효모균인 *S. fibuligera*가 *A. niger*에 근접하는 amylase 활성을 보였다. *A. oryzae*와 *R. oryzae*는 당화능면에서 위 세가지 곰팡이에 비하여 뒤쳐지는 것으로 평가되었다. 한편 β -glucanase 활성은 주로 *R. oryzae*에서만 나타나서 *R. oryzae*가 전분의 당화 외에 곡류의 주성분 중 하나인 β -glucan의 분해하는 역할을 하는 것으로 추정되었다. 누룩의 안전성 평가를 위하여 분리된 *Aspergillus* 균들의 aflatoxin 생산능을 *norB-cypA*, *aflR* 및 *omtA* 유전자마커로 조사한 결과, 모든 *A. oryzae* 분리군들은 aflatoxin 생산능이 없는 균주들로 예측되었으며, 이는 배양액의 TLC 분석을 통해서 확인되었다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 공동연구사업(Project No. PJ0099 9304)의 지원에 의해 이루어진 것이며, 김민식, 김신일, 하병석은 BK21 프로그램의 장학금을 지원받았습니다.

REFERENCES

1. Song SH, Lee SH, Lee HJ, Yoon SS, Park YS. Analysis of microflora profile in Korean traditional Nuruk. J Microbiol Biotechnol 2013;23:40-6.
2. Yang S, Lee J, Kwak J, Kim K, Seo M, Lee YW. Fungi associated with the traditional starter cultures used for rice wine in Korea. J Kor Soc Appl Biol Chem 2011;54:933-43.
3. Kim HR, Bai DH. Feasibility of brewing Makgeolli using *Pichia anomala* Y197-13, a non-*Saccharomyces cerevisiae*. J Microbiol Biotechnol 2012;22:1749-57.
4. Kim HR, Kim JH, Bai DH, Ahn BH. Microbiological characteristics of wild yeast strain *Pichia anomala* Y197-13 for brewing Makgeolli. Mycobiology 2013;41:139-44.
5. Kwon SJ, Ahn TY, Sohn JH. Analysis of microbial diversity in Makgeolli fermentation using PCR-DGGE. J life Sci 2012;22: 232-8.
6. Ha DM, Kim DC, Hong SM, Lee CW. Identification and properties of starch utilizing yeasts isolated from Nuruk. J Kor Agr Chem Soc 1989;32:408-16.
7. Ribes JA, Vanover-Sams CL, Baker DJ. Zygomycetes in human disease. Clin Microbiol Rev 2000;13:236-301.
8. Battaglia E, Benoit I, van den Brink J, Wiebenga A, Coutinho PM, Henrissat B, de Vries RP. Carbohydrate-active enzymes from the zygomycete fungus *Rhizopus oryzae*: a highly specialized approach to carbohydrate degradation depicted at genome level. BMC genomics 2011;12:38.
9. Norihiro T, Makoto F, Hiroki N, Norie K, Akio T, Shigezo U. Isolation of a cDNA encoding *Aspergillus oryzae* Taka-amylase A: evidence for multiple related genes. Gene 1989;84:319-27.
10. Chang PK, Ehrlich KC, Hua SS. Cladal relatedness among *Aspergillus oryzae* isolates and *Aspergillus flavus* S and L morphotype isolates. Int J Food Microbiol 2006;108:172-7.
11. Hong SB, Lee M, Kim DH, Chung SH, Shin HD, Samson RA. The proportion of non-aflatoxigenic strains of the *Aspergillus flavus/oryzae* complex from Meju by analyses of the aflatoxin biosynthetic genes. J Microbiol 2013;51:766-72.
12. Bhatnagar D, Cary JW, Ehrlich K, Yu J, Cleveland TE. Understanding the genetics of regulation of aflatoxin production and *Aspergillus flavus* development. Mycopathology 2006; 162:155-66.
13. Bhatnagar D, Ehrlich KC, Cleveland TE. Molecular genetic analysis and regulation of aflatoxin biosynthesis. Appl Microbiol Biotechnol 2003;61:83-93.
14. Ehrlich KC, Chang PK, Yu J, Cotty PJ. Aflatoxin biosynthesis cluster gene *cypA* is required for G aflatoxin formation. Appl Environ Microbiol 2004;70:6518-24.
15. Wei D, Zhou L, Selvaraj JN, Zhang C, Xing F, Zhao Y, Wang Y, Liu Y. Molecular characterization of atoxigenic *Aspergillus flavus* isolates collected in China. J Microbiol 2014;52:559-65.
16. White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor JW. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, editors. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. New York: Academic Press; 1990. p. 315-22.
17. Martin KJ, Rygielwicz PT. Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. BMC Microbiol 2005;5:28.
18. Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal Chem 1959;31:426-8.
19. Reddy KRN, Saritha P, Reddy CS, Muralidharan K. Aflatoxin B1 producing potential of *Aspergillus flavus* strains isolated from stored rice grains. Afr J Biotechnol 2009;8:3303-8.
20. King AD, Hocking AD, Pitt JI. Dichloran-rose bengal medium for enumeration and isolation of molds from foods. Appl Environ Microbiol 1979;37:959-64.
21. Henson OE. Dichloran as an inhibitor of mold spreading in fungal plating media: effects on colony diameter and enumeration. Appl Environ Microbiol 1981;42:656-60.
22. Dhaliwal SS, Oberoi HS, Sandhu SK, Nanda D, Kumar D, Uppal SK. Enhanced ethanol production from sugarcane juice by galactose adaptation of a newly isolated thermotolerant strain of *Pichia kudriavzevii*. Bioresour Technol 2011;102: 5968-75.
23. Oberoi HS, Babbar N, Sandhu SK, Dhaliwal SS, Kaur U, Chadha BS, Bhargav VK. Ethanol production from alkali-treated rice straw via simultaneous saccharification and fermentation using newly isolated thermotolerant *Pichia kudriavzevii* HOP-1. J Ind Microbiol Biotechnol 2012;39:557-66.
24. Sandhu SK, Oberoi HS, Dhaliwal SS, Babbar N, Kaur U, Nanda D, Kumar D. Ethanol production from Kinnow mandarin (*Citrus reticulata*) peels via simultaneous saccharification and fermentation using crude enzyme produced by *Aspergillus oryzae* and the thermotolerant *Pichia kudriavzevii* strain. Ann Microbiol 2012;62:655-66.
25. Itoh T, Yamashita I, Fukui S. Nucleotide sequence of the α -amylase gene (ALP1) in the yeast *Saccharomycopsis fibuligera*. FEBS Lett 1987;219:339-42.
26. Itoh T, Ohtsuki I, Yamashita I, Fukui S. Nucleotide sequence

- of the glucoamylase gene GLU1 in the yeast *Saccharomycopsis fibuligera*. J Bacteriol 1987;169:4171-6.
27. Fonseca GG, Heinze E, Wittmann C, Gombert AK. The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. Appl Microbiol Biotechnol 2008;79:339-54.
28. Waker GM. *Pichia anomala*: cell physiology and biotechnology relative to other yeasts. Antonie van Leeuwenhoek 2011; 99:25-34.
29. Hua SS. Biocontrol of *Aspergillus flavus* by *Pichia anomala*. In Mndez-Vilas A, editor. Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education. Badajoz: Formatex Research Center; 2013. p. 1067-72.
30. Kim HR, Kim JH, Bai DH, Ahn BH. Identification and characterization of useful fungi with α -amylase activity from the Korean traditional Nuruk. Mycobiology 2011;39:278-82.
31. Hong SB, Lee M, Kim DH, Varga J, Frisvad JC, Perrone G, Gomi K, Yamada O, Machida M, Houbraken J, et al. *Aspergillus luchuensis*, an industrially important black *Aspergillus* in East Asia. PLoS One 2013;8:1-9.
32. Chi Z, Chi Z, Liu G, Wang F, Ju L, Zhang T. *Saccharomycopsis fibuligera* and its applications in biotechnology. Biotechnol Adv 2009;27:423-31.
33. Chen L, Chi ZM, Chi Z, Li M. Amylase production by *Saccharomycopsis fibuligera* A11 in solid-state fermentation for hydrolysis of cassava starch. Appl Biochem Biotechnol 2010; 162:252-63.
34. HozoVá B, Kuniak L, Moravcikova P, Gajdosova A. Determination of water-insoluble β -D-glucan in the whole-grain cereals and pseudocereals. Czech J Food Sci 2007;25:316-24.