

【별지 제19호 서식】

## 완결과제 최종보고서

일반과제(○), 보안과제( )

(과제번호 : PJ009998)

주관과제명(한글)

전통누룩 특성평가 및 발효산물 대사체 해석

(주관과제명(영문))

Evaluation studies of a traditional nrurk and metabolomic analysis of fermentation products

주관연구기관명

전북대학교

연구수행기간

2014.02 ~ 2016.12

농촌진흥청

## 제 출 문

농촌진흥청장 귀하

본 보고서를 “전통누룩 특성평가 및 발효산물 대사체 해석”(개발기간 : 2014.02.01 ~ 2016.12.31) 과제의 최종보고서로 제출합니다.

제1세부연구과제 : 전통누룩 발효증 미생물 천이 구명

제2세부연구과제 : 전통누룩 발효증 미생물 대사체 구명

제1협동연구과제 : 전통누룩 제조법 확립 및 품질특성

제2협동연구과제 : 전통누룩 발효증 미생물 단백체 구명

2017. 02. 28.

제1세부/협동연구기관장 : 전북대학교

제1세부/협동연구책임자 : 김대혁

참여연구원 : 죄티란잔발, 윤숙현, 최명숙, 소금강, 고요한, 조명진, 김대혁

제2세부/협동연구기관장 : 전북대학교

제2세부/협동연구책임자 : 김범태

참여연구원 : 이상화, 김준영, 송정섭, 김범태

제1협동/협동연구기관장 : 국립농업과학원

제1협동/협동연구책임자 : 여수환

참여연구원 : 백성열, 문지영, 최한석, 강지은, 정석태, 백창호, 여수환

제2협동/협동연구기관장 : 원광대학교

제2협동/협동연구책임자 : 김정미

참여연구원 : 송하연, 정한샘, 최다혜, 김정미

주관연구책임자 : 김대혁



주관연구기관장 : 전북대학교 산학협력단장



농촌진흥청 농업과학기술 연구개발사업 운영규정 제51조에 따라 보고서  
열람에 동의합니다.

## 보고서 요약서

과제번호	PJ009998		연구기간	2014. 02.0 01 - 2016. 12 .31
연구사업명	단위사업명	현장실용화농업기술		
	세부사업명	농축산물부가가치향상기술개발		
	내역사업명	농가 보급형 발효종균 개발 및 실용화기술		
연구과제명	주관과제명	전통누룩 특성평가 및 발효산물 대사체 해석		
	세부(협동) 과제명	(1세부) 전통누룩발효 중 미생물 천이 구명 (2세부) 전통누룩발효 중 미생물 대사체 구명		
		(1협동) 전통누룩 제조법 확립 및 품질특성 (2협동) 전통누룩발효 중 미생물 단백체 구명		
	구분	연구기관		소속
연구책임자	1세부	전북대학교		생물과학부 김대혁
	2세부	전북대학교		기초교양교육원 김범태
	1협동	국립농업과학원		발효식품과 여수환
	2협동	원광대학교		생물환경화학과 김정미
총 연구기간 참여 연구원 수	총: 22명 내부: 22명 외부: 0명		총 연구개발비	정부 : 555,000천 원 본청 : 176,000천 원 계 : 731,000천 원
위탁연구기관명 및 연구책임자	해당없음		참여기업명	해당없음
국제공동연구	상대국명 : 해당없음			상대국 연구기관명 : 해당없음
요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다)	보고서 면수			

## 〈 국 문 요 약 문 〉

연구의 목적 및 내용	배양온도 변화별 누룩의 품질특성 규명, 미생물 천이조사, 단백체 및 대사체 분석을 통해 누룩 특성 규명				
연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 배양온도 변화에 따른 누룩 발효과정 중의 미생물 천이 분석</li> <li>○ 배양온도 변화에 따른 누룩 발효과정 중의 대사체 규명</li> <li>○ 발효조건에 따른 누룩의 품질특성 구명</li> <li>○ 배양온도 변화에 따른 누룩 발효과정 중 생성되는 단백체 규명</li> </ul>				
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 발효조건에 따른 누룩의 품질특성 구명</li> <li>○ 누룩 발효별 미생물 분리 및 동정을 통한 우수종균 개발</li> <li>○ 우수 발효종균 특성조사를 통한 발효조건 확립</li> <li>○ 발효주 품질 표준화 및 규격과 기술개발에 기반제공</li> <li>○ 누룩제조 기술을 생산업체에 기술이전 및 창업</li> <li>○ 확보한 데이터는 발효단계 측정용 마커시스템 구축에 활용</li> <li>○ 현장 실용화를 통한 전통주 등의 6차 산업 유도</li> <li>○ 우수 종균 개발에 의한 수입 종균의 로얄티 지출 감소 및 소득창출</li> <li>○ 누룩 발효산물 데이터를 기반으로 기능성 신소재 개발 및 기능성 발효주 개발</li> </ul>				
중심어 (5개 이내)	전통누룩	발효	탁주	오믹스	우수종균

## 〈 Summary 〉

Purpose& Contents	To investigate <i>Nuruk's</i> characteristics depending on incubation temperatures, succession of microorganism and proteomic and metabolomic analysis of <i>Nuruk</i> were investigated.				
Results	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Analyzation of microorganism succession during fermentation process depending on incubation time</li> <li>○ Investigation of metabolites during fermentation process depending on incubation temperature</li> <li>○ Investigation of <i>Nuruk's</i> physical and chemical properties.</li> <li>○ Investigation of proteomes fermentation process depending on incubation temperature</li> </ul>				
Expected Contribution	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Charaterization of <i>Nuruk</i> according to fermentation condition</li> <li>○ Identification of microorganism in each fermentation for developing standard starter.</li> <li>○ Establishment of fermentation condition according to analyzed standard starter</li> <li>○ Support of plaform technically for Nuruk fermentation.</li> <li>○ Transference of technology to manufacturer and start-up company</li> <li>○ Construction of markersystem for fermentation process</li> <li>○ Induction of 6<sup>th</sup> industry for commercialization</li> <li>○ Decrease of royalty of imported starter and create new revenue</li> <li>○ Development of new functional material and functionality-starter according to <i>Nuruk</i> fermentation product</li> </ul>				
Keywords	<i>Nuruk</i>	Fermentation	Makgeolli	Omics	Standard starter

## 〈 목 차 〉

제 1 장	연구개발과제의 개요	.....
제 2 장	국내외 기술개발 현황	.....
제 3 장	연구수행 내용 및 결과	.....
제 4 장	목표달성을 및 관련분야에의 기여도	.....
제 5 장	연구결과의 활용계획 등	.....
제 6 장	연구과정에서 수집한 해외과학기술정보	.....
제 7 장	연구개발성과의 보안등급	.....
제 8 장	국가과학기술종합정보시스템에 등록한 연구시설·장비현황	.....
제 9 장	연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적	.....
제 10장	연구개발과제의 대표적 연구실적	.....
제 11장	기타사항	.....
제 12장	참고문헌	.....

# 제 1 장 연구 개발 과제의 개요

## 제1절 연구 개발 목적

탁·약주 등의 발효제로 사용하는 누룩은 전통 발효기술에 의하여 제조공정이 까다롭고 관여 미생물이 균일하지 못해 규격화된 제품생산과 품질 표준화가 시급한 실정이다. 현재, 시판되는 누룩은 품질이 열악한 관계로 주질 열악 등 우리술의 경쟁력 또한 낮은 상태이다. 이를 극복하기 위해, 누룩의 품질 개선과 고급화 및 저장성 향상 등의 과학화 연구뿐만 아니라 우리술의 향미에 영향을 주는 효모, 유산균 등 발효미생물을 이용하여 우리술에 적합한 누룩제조기술의 선점 연구가 무엇보다도 중요하다. 본 연구는 내, 외부 공동과제로서 전통누룩 제조법 및 품질 특성, 누룩의 미생물 천이과정 모니터링, 프로테옴 및 대사체 연구 등을 통해, 우리나라 전통누룩에 대한 기초자료를 확보를 통해, 우리 누룩의 정체성을 구명하고자 한다.

연차	목 표
1차년도 (2014년)	전통적 방법에 따라 제조되는 누룩 발효과정 중의 품질특성 규명, 미생물 분포도 조사, 프로테옴 분석 및 대사체 분석을 통해 누룩에 대한 기초연구자료의 확보
2차년도 (2015년)	원료에 대한 가수비율에 따른 누룩 발효과정 중의 품질특성 규명, 미생물 분포도 조사, 프로테옴 분석 및 대사체 분석을 통해 누룩에 대한 기초연구자료의 확보
3차년도 (2016년)	배양온도 변화에 따른 누룩 발효과정의 품질특성 규명, 미생물 분포도 조사, 프로테옴 분석 및 대사체 분석을 통해 누룩에 대한 기초연구자료의 확보
최종	<p>누룩 발효 중 변화되는 품질특성, 미생물 천이, 단백질 생성, 대사산물 축적 등에 대한 연구를 통하여 누룩발효에 관여하는 미생물의 유연관계를 살펴보고 관련된 단백질 및 대사물질의 상호작용을 해석하여 국내 누룩에 대한 정체성을 확립하고자 함.</p> <pre> graph LR     A["누룩발효 품질특성조사"] --&gt; B["미생물천이 발효조건별 미생물 분포도 조사"]     B --&gt; C["단백체해석 발효조건별 단백질 해석"]     C --&gt; D["대사체해석 발효조건별 대사체 해석"]     D --&gt; E["▪ 누룩발효 - 미생물 유연관계 분석 ▪ 국내누룩 정체성확립 ▪ 우수종균 발굴 ▪ 실용화 및 품질 균질화"]   </pre>

## 제2절 연구 개발의 필요성

- 미생물은 종류가 매우 다양하고 증식이 빠르며 환경에 대한 적응력이 강하여 자연 생태계에 무수히 존재하고 다양한 생리·생화학적 능력을 가지고 있는 생명체이다. 미생물의 이러한 능력들을 이용하여 인류는 오래전부터 현재까지 식품, 의료, 환경, 소재 등의 다양한 산업분야에서 광범위하게 발효미생물을 사용해왔다. 최근 세계 생명공학 시장 및 제품 개발의 상당수는 미생물 자원을 활용하며 특히 발효미생물은 고부가가치의 핵심 생물소재로 각

광받고 있다.



- 미생물 세계시장은 2011년 기준 연간 500억 달러 이상으로 추정되며 주요 분야는 발효식품제조, 생물의약품, 효소, 기능성 식품첨가제, 공중보건 분야이다. 국내 미생물산업은 수입 발효 종균에 의존하는 현실이며 원천기술과 특허가 부족하고 발효과정 및 종균에 대한 과학적, 체계적인 분류 및 분석에 관한 연구가 미흡한 실정이다. 이에 따라 고부가가치 제품의 개발 및 세계 시장 점유에 난관을 겪고 있다.
- 전통주 산업을 활성화시키기 위해, 농식품부에서는 1991년부터 전통문화 보전과 전수를 적극적으로 추진하고 있으며, 1993년 UR협정이후부터 농민단체에 주류제조 참여를 적극 지원함으로써 우리 술 복원을 시도하고 있다. 따라서 새로운 유형의 주류제품 개발 및 품질 향상을 위한 체계적인 발효기술 확립을 통해 대외 경쟁력 향상과 농가 소득증대를 높여야 한다. 향후 FTA 대응 차원에서 농민의 소득증대와 농산물의 부가가치 제고를 위해서라도 전통주산업이 활성화 되어야 한다.
- 전통발효식품은 국균이라는 발효미생물을 이용하여 발효제(누룩, 메주 등)를 곡류에 발효시켜 풍미가 독특하고 건강 기능성이 우수한 발효식품을 제조, 섭취함으로 대체 면역강화 효과를 얻었으며 건강한 Well-being 생활을 영위할 수가 있다.
  - ◆ 우리나라 고유의 전통주 제조법은 당화의 발효제로 고유의 전통누룩을 사용하며, 단일 종균(황국균, *A. oryzae*)을 접종한 일본식 입국과는 관여 미생물뿐만 아니라 효소학적 층면에서도 차별성이 뚜렷하다.
- 누룩으로부터 생전분 당화력 향미 생성 및 발효특성이 우수한 균주 분리 및 개량을 통하여 누룩을 과학화하는 산업적 생산기술 연구가 필요하다. 국내의 연구는 주로 사케(니혼슈) 제조에 이용된 *Aspergillus* 속 및 효모에 관한 연구가 대부분이었으며 전통누룩에 관한 기초연구가 부족하고 우리술에 적합한 미생물 선발이나 균주 개량 연구가 시급한 실정인데도 불구하고 기초연구보다는 주류제조 등의 공정연구에 치중을 하고 있다는 실정이다.
  - ◆ 누룩 발효 중 발효미생물의 역할 규명 및 이용 목적으로 누룩 미생물(곰팡이, 효모, 유산균, 젖산균 등) flora를 분석하여 향미를 증진시키는 최적조건을 구명할 필요가 있으며 아울러 당화성이 좋고 젖산 발효가 효과적으로 일어나는 유산균 분리·동정하여 풍미를 좋게 하고, 산폐를 방지하는 새로운 타입의 누룩을 개발하여 전통주의 품질 고급화로 수입주류에

대한 경쟁력을 강화하여야 한다.

- 탁·약주 등의 발효제로 사용하는 누룩은 전통 발효기술에 의하여 제조공정이 까다롭고 관여 미생물이 균일하지 못해 규격화된 제품생산과 품질 표준화가 시급한 실정이다. 주류제조에 관련된 발효미생물, 제조공정 개발 등의 연구는 코지에서 분리한 곰팡이와 전통누룩의 곰팡이 연구가 대부분이며 우리술에 적합한 발효미생물(곰팡이, 효모, 유산균 등)의 선발이나 개량에 관한 연구가 미흡하다.
- 시판 누룩의 품질이 열악한 관계로 주질이 저하되어 대외 경쟁력이 낮다. 이를 극복하기 위해 서는 누룩 품질 개선과 고급화 및 저장성 향상을 위한 제조기술의 과학화 요구되며 발효식품에 이용 가능한 미생물을 활용하여 곡물 자원별로 제조가 가능한 누룩을 개발하고 이로부터 제품 생산성이 강화된 기능성 발효제품 생산기술 선점을 통해, 우리나라 누룩의 우수성을 널리 알려야 하겠다.

### 제3절 연구 개발 범위

발효과정과 종균에 대한 과학적이고 체계적인 분류 및 분석에 관한 연구와 더불어 미래 환경에 대비한 발효식품의 부가가치 향상 및 경쟁력 강화를 위해, 발효식품의 제조 및 품질관리에 관한 오믹스(Omics)적 접근의 필요성이 제기되고 있다. 우리나라 고유의 전통 누룩균인 *Rhizopus* sp., *Aspergillus* sp., *Lichtheimia* sp. 및 *Lactobacillus* 속 등의 미생물을 이용하여 다양한 발효식품을 만들어 well-being형 식품으로의 이용과 이에 대한 과학적 특성 규명으로 전통누룩 제조법 확립 및 이용성을 제고할 필요가 있겠다. 또한, 누룩 발효 중 변화되는 미생물 천이, 단백질 생성, 대사산물 축적 등에 대한 기초자료 확보로 우리나라 고유의 누룩에 대한 정체성 확립이 무엇보다도 중요하다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제1절 국내 연구 현황

- 쌀누룩의 원료 및 제조방법에 따른 알코올 발효음료 및 기타 발효식품의 품질특성 연구가 주로 진행되고 있으며, 발효 대사체에 관한 연구는 미미한 실정이다.
  - ◆ 시판 무증자용 개량누룩 추출물로 처리한 쌀을 이용한 막걸리 제조, 박지혜 등(한국식품저장유통학회지, 2012, 19(1), p. 144-152)
  - ◆ *Rhizopus oryzae* N174를 이용한 액체종국 저장조건에 따른 밀누룩의 품질특성, 최정실 등(한국미생물생명공학회, 2012, 40(4), p. 319-324.)
  - ◆ 전통누룩으로부터 막걸리용 효모의 선별 및 최적 배양조건, 강향린 등(한국균학회, 2012, 40(4), p. 204-209.)
- 전통누룩은 제조공정이 복잡하고 유용 양조미생물이 다양하여 규격화된 제품 생산과 품질 표준화가 무엇보다도 시급한 실정이다. 국내 전통누룩업체에서는 자연발효와 경험에 의존한 누룩제조로 미생물 생육과 대사계의 과학적 조절과 표준화된 양조공정 확립이 제대로 이루어지지 않아 품질이 열악한 관계로 주질 열악 등 우리술의 경쟁력 또한 낮은 상태이다. 이를 극복하기 위해, 누룩의 품질 개선과 고급화 및 저장성 향상 등의 과학화 연구가 요구된다.
- 따라서 우리술의 향미에 영향을 주는 효모, 유산균 등 발효미생물을 이용하여 우리술에 적합한 누룩제조기술의 선점 연구가 필요하다. 우리술 제조법은 전분의 당화 및 발효제로 누룩을 사용하며, 황국균(*A. oryzae*)으로 제조된 입국(Koji)과는 관여하는 발효미생물뿐만 아니라 효소학적 측면에서도 차이가 있다. 또한, 막걸리의 주재료인 전통누룩은 한방에서도 신국이라 부르며 소화를 돋는데 도움이 되어 그 사용 빈도가 높다. 아래에 기술한 것처럼, 일부 누룩미생물을 이용한 특수 목적 연구도 진행되고 있다.
  - ◆ 누룩으로부터 분리한 알긴산 분해 효소 생산 균주인 *Erwinia tasmaniensis*의 특성, 김현지 등(한국공업화학회, 2012, 23(1), p.100-104.)
  - ◆ 전통누룩으로부터 호산성 urease 생산효모의 분리 및 특성, 이민나 등(한국식품저장유통학회지, 2012, 19(2), p. 308-314)
  - ◆ 누룩의 대사체 분석을 이용하여 국내의 주요 전통주 제조공정 확립 및 표준화 연구도 요구된다.

### 제2절 국외 연구 현황

- 우리술에 대한 외국 연구진의 연구 사례는 거의 없지만, 일본에서는 한국 전통누룩에서 *Lichtheimia* 속을 분리·동정하여 *Lichtheimia ramosa*와 *Lichtheimia corymbifer*로 밝혀내었고, 이를 균주가 생산하는 amylase 활성에 따라 액화와 당화활성을 갖는 두 그룹으로 규명하였다.

- 일본의 국세청 산하의 국립연구기관인 주류총합연구소에서는 발효미생물 선별 및 유전자 조작법을 이용한 균주 개량으로 주질 향상과 국균의 게놈 정보를 양조산업에 이용하고, 양조용 원료뿐만 아니라 주박을 이용한 신상품 개발과 부산물에서 산업적 활용빈도가 높은 산물 추출 등에 관한 연구를 수행하고 있다.
- 대만은 암모니아성분을 첨가한 *Rhizopus oryzae* 배양으로 L-lactic acid 발효에 관한 연구를 2013년부터 수행하면서 발효를 통한 유기산을 대량배양하고 있다.
- 중국은 키토산 대량생산을 위해, *Rhizopus japonicus* 배양 최적화 조건 등을 탐색하고 있고, 호주는 *Rhizopus* sp를 이용한 감자 전분의 당화력 향상 연구를, 이란과 스웨덴은 희석된 산을 전 처리한 쌀을 이용한 *Mucor*, *Rhizopus*, *Saccharomyces* sp. 당화력 향상 연구에 매진하고 있다.
- 국내외 연구 현황 및 연구분야를 조사하여 아래의 표에 기술하였다.

연구수행 기관	연구개발 현황	연구개발 필요분야
영국 Imperial college	- 대사체분석 기초연구	- 새로운 종합분석법 개발
미국 UC-Davis	- GC/MS/MS를 활용한 식품성분 분석 및 대사체학적 접근	- 식품기능성 성분 및 향 분석
일본 주류총합연구소	- 유용 발효미생물의 선별 및 유전공학 기법을 이용한 균주 개량과 주질 향상 - 국균의 게놈정보를 양조산업에 이용 - 양조용 원료에 관한 연구 - 알코올 내성효모 연구	- 우량 균주 보급 및 활용 체계 구축 - 고품질 쌀 청주 및 쌀 식초산업 이용 - 발효공정을 이용한 바이오에너지 개발 - 생분해성 플라스틱 분해효소 과 난탁색 슬러지 등의 물질을 소주박에서 분리
일본 후지세이유사	- 독자적인 효소처리 기술로 세계 최초로 콩 웹타이드 출	- 단백질 강화용 노인식품으로 개발하였지만, 스포츠 및 다이어트 식품에 이용
일본 이화학연구소	- 기능 대사체 library 구축	- 대사체 library 활용
한국 건국대학교	- 농산물 유래 기능 대사체 library 구축	- 농산식품 기능성 물질 규명에 활용, 메타볼룸 chip 적용
미국 UC-Berkeley	- 대두 종자 발육과정에서 항암 웹타이드 분리	- 항암 치료제의 개발 및 연구
농촌진흥청 국립농업과학원	- 개량 누룩제조기술 연구	- (주)한국효소에 기술이전으로 실용화
한국식품연구원	- 원료별 다양한 입국제조에 관한 연구	- 산업현장의 실용화는 미흡한 실정
전남대학교	- 진양주의 양조조건 확립	- 진양주의 품질 고급화 및 상품화

## 제 3 장 연구 수행 내용 및 결과

### 제1절 연구수행 내용

<제1세부과제 : 전통누룩 발효중 미생물 천이 구명(전북대학교, 김대혁)>

#### 1. 재료 및 방법

##### 1) 전통누룩 발효별 미생물 동정 및 다양성 조사

###### (1) 시험 원료

본 연구에 사용한 누룩은 제 1협동 과제팀에서 제공한 시료이다. 각 시료는 발효기간별, 원료 및 가수비율별, 배양온도 및 습도별로 각기 다른 조건을 가지고 만든 시료이다.

###### (2) 누룩발효 단계별 시료 채취 및 pH 조사

(2-1) 누룩 시료 채취 : 누룩 시료는 모두 제 1협동 과제에서 제공받았다. 1년차에는 발효기간별(0, 3, 6, 10, 20, 30일), 발효온도별 전통누룩(A type과 B type) 시료의 정중앙 부분을 멸균된 칼로 잘라 시료를 취하였다. 이 때 사용한 누룩 조각은 바깥부분과 안쪽부분이 모두 포함되도록 하였다. 또한 대조구로 시판누룩인 산성누룩(C1), 송학누룩(C2)을 동일한 방법으로 준비하였다. 2년차에는 발효기간별(0, 3, 6, 10, 20, 30일), 가수비율별(20, 26, 30%), 곡류조합별 전통누룩(C type과 D type)을 제공받았다. 전통누룩 C는 고문현에 기술된 향온곡이라는 전통누룩을 변형시켜 원료를 각각 적당한 비율(보리, 녹두, 통밀=3.3:0.5:3.3)로 제조하였으며, 전통누룩 D는 고문현에 기술된 내부비전곡을 변형시켜 원료를 각각 적당한 비율(보리: 녹두=3.3:0.55)로 혼합하여 제조하였다. 제조된 누룩에서 시료의 정중앙 부분을 멸균된 칼로 잘라 시료를 취하였으며, 이 때 사용한 누룩 조각은 바깥부분과 안쪽부분이 모두 포함되도록 하였다. 3년차에는 발효조건별 전통누룩(E type과 F type)을 제공받았다. 전통누룩E와 F모두 고문현에 기술된 내부비전곡을 변형시켜 보리:녹두 = 3.3:0.55 의 비율로 만들었으며 전통누룩 E는 온도 30°C, 습도 70%에서 3일 동안 발효 후 온도 30°C, 습도 50%, 27일 발효 뒤에 25°C에서 2일 동안 건조하였고, 전통누룩F는 온도 40°C, 습도70%에서 3일 동안 발효 후 온도 40°C, 습도 50%에서 27일 발효 뒤에 25°C에서 2일 동안 건조하였다.

(2-2) pH 조사 : 채취한 시료 1 g을 생리식염수 9 ml을 가하여 균질화 후, 8시간 동안 4°C에서 반응시켰으며, 이를 원심분리한 상층액을 사용하여 pH를 측정하였다 (Beckman Coulter, USA).

###### (3) 세균, 효모, 곰팡이 선별 배양배지 배양 및 누룩 시료별 CFU 값 측정

(3-1) 선별 배양배지 배양 : pH 측정에 사용했던 동일한 시료 5 g에 생리식염수 45ml을 가하여 균질화 후 상층액을 선별 배양배지에 희석 배양하였다. 일반 세균의총균수 및 분리는 LB(Difco™ Luria Bertani, BD, Sparks, MD, USA) 고체배지에 희석 도말한 후 37°C에서 24시간 배양하여 총균수를 측정 하였고, LB 고체배지에 균을 분리하였다. 유산균의 총균수 및 분리는 MRS(Difco Lactobacilli MRS agar, BD, Sparks, MD, USA) 고체배지에 희석 도말한 후 37°C에서 48시간 혼기 배양하여 총균수를 측정하였고, MRS 고체배지에 균을 분리하였다. 효모와 곰팡이의 총균수 및 분리를 위하여 YPD, PDA, 그리고 DRBC 고체배지에 희석 도말한 후 25°C에서 3-4일간 배

양하여 총균수를 측정하였다.

- (3-2) **누룩 시료별 CFU 값 측정** : 각 시료들은 희석 배율별로 적어도 3장 이상의 고체 배지에 배양하였다. 배양 후 고체배지에서 콜로니 수를 센 뒤, 희석 배율을 곱하여 총균수를 측정하였다. 분리된 각 균들은 순수 배양하여 -70°C에 저장하였다.
- (3-3) **순수 분리된 미생물들의 문자유전학적 동정** : 누룩으로부터 분리된 각 세균 균주들의 동정은 각 시료별 형태학적으로 그룹 지어진 콜로니 각 2~3개씩을 선별하여 16s rRNA 유전자 염기서열을 분석하였으며, 분석은 (주) 코스모진텍과 (주) 솔젠티에 의뢰하였다. 염기서열 분석을 통하여 얻은 각 균주의 염기서열은 Chromas Lite(version2.1.1)로 분석된 서열을 확인하고 유효 서열을 결정한 후 Blast Network Service를 이용하여 NCBI GenBank database의 염기서열과 비교함으로써 계통분류학적 유사도를 분석하였다. 누룩으로부터 분리된 곰팡이와 형태학적으로 그룹 지어진 콜로니 2개씩을 선별하여 PDA에 배양 후 genomic DNA를 추출하여 forward ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') 그리고 reverse ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3')로 염기서열을 분석하였으며, 효모의 경우도 형태학적으로 그룹 지어진 콜로니 2개씩을 선별하여 YPD 고체 배지에 배양 후 genomic DNA를 추출하여 NL1 (5'-GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG-3') 그리고 NL4 (5'-GGT CCG TGT TTC AAG ACG G-3')를 이용하여 염기서열을 분석하였다. 또한 *Aspergillus* spp.의 경우 ITS 분석만으로는 정확한 동정이 어렵기 때문에 Calmodulin primer CF1 (5'-GCC GAC TCT TTG ACY GAR GAR-3') 혹은 CF1M (5'-AGG CCG AYT CTY TGA CYG A-3')과 CF4 (5'-TTT YTG CAT CAT RAG YTG GAC-3)를 제작하여 해당부분 염기서열 분석을 통한 정확한 동정방법을 모색하였다. 염기서열 분석은 (주) 코스모진텍과 (주) 솔젠티에 의뢰하였으며 곰팡이의 염기서열 또한 NCBI BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)를 이용하여 분석하였다.
- (3-4) **누룩으로부터 분리된 세균들의 생화학적 분석** : 유산균들은 일반 세균들과는 달리 16s rRNA 유전자 분석으로는 충분히 동정이 되지 않는 한계점이 있다. 이러한 한계점 때문에 본 연구에서 분리된 유산균 중 16s rRNA 유전자 염기서열 동정 결과 불확실한 것들을 골라 동정 결과의 정확도를 높이기 위해 API kit을 이용한 생화학적 분석을 실시하였다. 균을 agar 배지에 활성화 시킨 후, suspension medium을 이용하여 McFarland Standard 2와 비슷하게 탁도를 맞추어 50CHL medium에 0.1 ml 접종하였다. 50 CH kit의 큐플에 0번부터 49번까지 접종하고 종류수를 채운 Incubation box에 순서대로 배치한 후 산소가 들어가지 않게 Mineral Oil로 채운 후 37°C에서 배양하였다. 24시간이 지난 후 색상 변화를 관찰하고, 48시간이 지난 후 두 번째 관찰을 통해 수집한 data를 입력하여 얻은 결과와 16s rRNA 유전자 염기서열 결과를 비교하여 최종 동정하였다.

#### (4) 미생물 분포도 조사

전통누룩으로부터 순수 분리된 세균, 효모, 곰팡이들의 문자유전학적, 생화학적 동정을 통하여 1차적인 누룩 시료별 미생물 분포도를 조사하여 미생물 천이에 대하여 조사한다.

## 2) 전통누룩 시료별 미생물 천이 조사

### (1) 누룩의 DNA 추출

미생물 동정 및 분포도 조사에 사용된 동일한 36개의 시료 1g을 액체질소에 넣고 곱게 빽은 뒤 10ml의 lysis buffer(1M Tris-Cl(pH8.0) 500ul, 0.5M EDTA 1000ul, 10% SDS 1000ul, 2-mercaptoethanol 100ul, 멸균증류수 7.4ml)를 이용하여 genomic DNA를 추출하였다. 해당 방법은 1차년도에 정립된 DNA 추출방법을 보완한 것으로 Phenol : Chloroform : Isoamylalcohol → Chloroform : Isoamylalcohol → Isopropanol을 순서대로 처리하고 RNase 반응과정을 거치므로 보다 순수한 DNA를 얻을 수 있다.

### (2) 추출 DNA를 이용한 미생물 천이조사

본 연구진은 추출 DNA를 이용하여 PCR-DGGE 및 qPCR을 수행하여 발효단계별 미생물 천이조사를 하고자 하였으나, PCR-DGGE로 분별할 수 있는 염기서열 크기보다 차이가 커서 해당 실험진행에 어려움이 있었다. 이에 Metagenomics를 수행함으로써, universal primer와 NGS primer를 이용하여 qPCR을 진행하였고 발효단계별 전체 미생물 천이를 조사하였다.

**(2-1) 누룩 시료 채취 :** 누룩 시료는 모두 제 1협동 과제에서 제공받았다. 1년차에는 발효기간별(0, 3, 6, 10, 20, 30일), 발효온도별 전통누룩(A type과 B type) 시료의 정중앙 부분을 멸균된 칼로 잘라 시료를 취하였다. 이 때 사용한 누룩 조각은 바깥부분과 안쪽부분이 모두 포함되도록 하였다. 또한 대조구로 시판누룩인 산성누룩(C1), 송학누룩(C2)을 동일한 방법으로 준비하였다. 2년차에는 발효기간별(0, 3, 6, 10, 20, 30일), 가수비율별(20, 26, 30%), 곡류조합별 전통누룩(C type과 D type)을 제공받았다. 전통누룩 C는 고문현에 기술된 향온곡이라는 전통누룩을 변형시켜 원료를 각각 적당한 비율(보리, 녹두, 통밀=3.3:0.5:3.3)로 제조하였으며, 전통누룩 D는 고문현에 기술된 내부비전곡을 변형시켜 원료를 각각 적당한 비율(보리: 녹두=3.3:0.55)로 혼합하여 제조하였다. 제조된 누룩에서 시료의 정중앙 부분을 멸균된 칼로 잘라 시료를 취하였으며, 이 때 사용한 누룩 조각은 바깥부분과 안쪽부분이 모두 포함되도록 하였다. 3년차에는 발효조건별 전통누룩(E type과 F type)을 제공받았다. 전통누룩E와 F모두 고문현에 기술된 내부비전곡을 변형시켜 보리:녹두 = 3.3:0.55 의 비율로 만들었으며 전통누룩 E는 온도 30°C, 습도 70%에서 3일 동안 발효 후 온도 30°C, 습도 50%, 27일 발효 뒤에 25°C에서 2일 동안 건조하였으며, 전통누룩F는 온도 40°C, 습도70%에서 3일 동안 발효 후 온도 40°C, 습도 50%에서 27일 발효 뒤에 25°C에서 2일 동안 건조하였다.

**(2-2) Metagenomics 수행 :** 누룩 시료 채취를 통해 얻은 1차년도 총 14개, 2차년도 18개 3차년도 12개의 genomic DNA를 전기영동하여 순도와 농도를 검증하였으며, 순도가 낮은 시료는 폐놀 추출법을 추가로 진행하여 순도를 높여서 사용하였다. 농도의 경우 비교적 낮은 시료에 맞추어 희석하여 동일하게 조정하였다. 세균의 Metagenome library를 구축하였으며, 뒤로 효모를 포함하는 곰팡이들의 Metagenome library를 구축 하였다. 이 후 Metagenome 분석을 시행하였다.

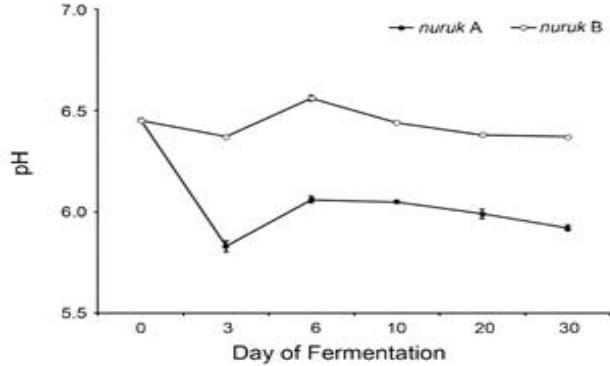
**(2-3) qPCR 수행 :** 전체 균류상을 이루는 균주구성을 추정하기 위하여 제1협동 과제에서 제공한 총 36개의 시료의 순수한 genomic DNA를 추출하였으며, 이를 이용하여

qPCR을 수행하였다. 1ng의 DNA를 주형으로 5pmol의 각 primer(BITS 5'-ACC TGC GGA RGG ATC A-3' and, B58S3 5'-GAG ATC CRT TGY TRA AAG TT-3')를 사용하여 증폭하였다. 실험에는 SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems)를 사용하였으며 초반에 95°C에서 10분 반응 후, 95°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 60초 반응을 40번 반복한다. 각 시료의 ITS gene copy 수를 측정하는 것은 최근 빈번하게 시도 되고 있는 방법(Black et al. 2013)이며, 모든 반응은 ABI Prism 7500 Fast Real-Time PCR system에 최적화 된 96-well plate를 사용하였으며 3반복으로 진행하였다.

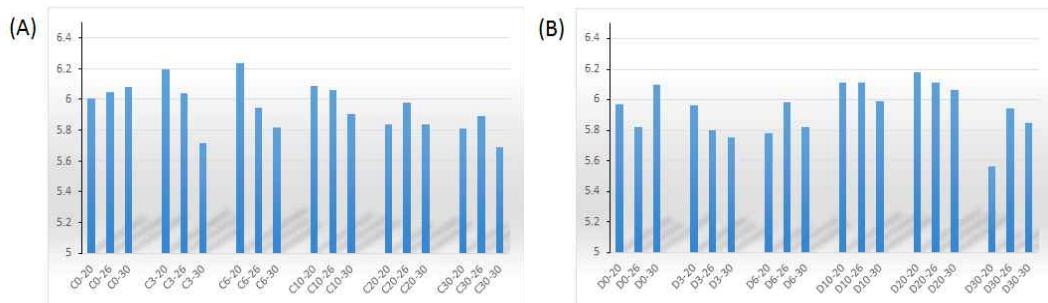
## 2. 실험 결과

### 1) 전통누룩 발효별 미생물 동정 및 다양성 조사

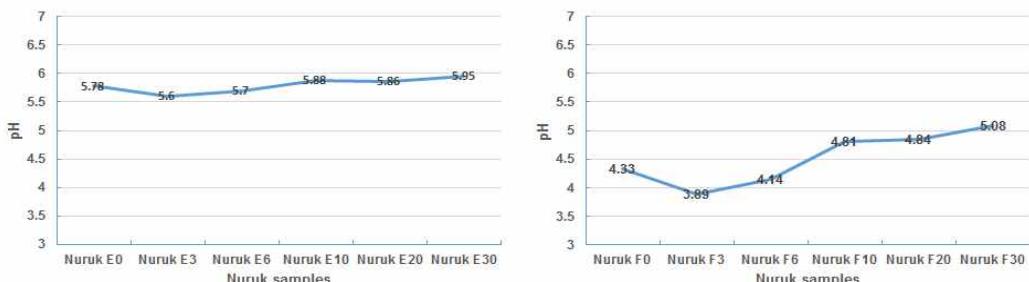
(1) 누룩 발효 단계별 시료 채취 및 pH 조사 : pH는 미생물 생육에 영향을 주는 중요한 물리화학적인 지표이다. 1년차 실험 결과 전통누룩 A, B 시료 모두 발효 3일 시료에서 pH가 감소하였고, 6일에서 pH가 증가하였으며, 6일 이후 시료들에서는 pH가 조금씩 감소하였다(Fig. 1). 전통누룩 A, B는 발효온도에 차이가 있는 시료들로써, 온도의 차이가 pH와 밀접한 관계가 있음을 확인할 수 있었다. 2년차 실험 결과 전통누룩 C, D 시료 모두에서 가수량이 26%인 시료의 발효기간에 따른 pH 변화보다 가수량이 20%, 30%인 시료에서 발효기간에 따른 pH의 변화폭이 극심하게 나타남을 확인하였다. 또한 전통누룩 C에서는 발효기간 10일 이후 시료에서 20%, 26%, 30% 가수비율별 pH가 감소하는 패턴을 보였다(Fig. 2). 전통누룩 C, D는 곡류조합에 차이가 있는 시료들로써, 곡류조합에 따른 pH의 특징적인 변화는 나타나지 않음을 확인할 수 있었다. 전통누룩 E의 경우 발효일자가 지날수록 pH가 급격하게 변하는 모습은 관찰되지 않았으며, 대체적으로 일정한 pH를 유지 하는 것을 볼 수 있다. 전통누룩 F는 전통누룩 E에 비해서 pH가 약간의 변화를 일으키는 것을 관찰 하였다. 발효 시작일로부터 3일까지는 pH가 약간 감소하는 경향을 보이다가 3일이 지난 후부터는 조금씩 증가하였다. 전통누룩 E 와 F를 비교하였을 때는 전체적으로 전통누룩 E에서 pH가 더 높았다.(Fig. 3) 전통누룩E 와 F의 차이는 발효 온도 이다. 즉, 누룩을 발효시킬 때 온도에 의해서 pH가 변할 수 있음을 알 수 있다.



**Fig. 1. Estimation of pH..** Changes in pH estimated in all *nuruk* samples A. *nuruk* A and *nuruk* B after 0, 6, 10, 20, and 30 days



**Fig. 2. Estimation of pH.** Changes in pH estimated in all *nuruk* samples (A). Nuruk C with 20, 26 and 30% moisture content after 0, 6, 10, 20, and 30 days, (B) Nuruk D with 20, 26 and 30% moisture content after 0, 6, 10, 20, and 30 days



**Fig. 3. Estimation of pH.** Changes in pH was estimated in all *nuruk* samples (A) Nuruk E at 0, 6, 10, 20, and 30 days, (B) Nuruk F at 0, 6, 10, 20, and 30 days. The pH was lowest at day 3 in both *nuruk* E and F, whereas highest on day 30.

## (2) 세균, 효모, 곰팡이 선별 배양배지 배양 및 누룩 시료별 CFU 값 측정

**(2-1) 선별 배양배지 배양 :** 세균을 선별하기 위하여 LB 고체배지, 유산균을 선별하기 위하여 MRS 고체배지(Fig. 4), 효모와 곰팡이를 선별하기 위하여 YPD, PDA, DG18, PDA+D 그리고 DRBC 고체배지에 희석하여 도말하여 배양하였다(Fig. 5). YPD 고체배지는 효모를 분리하기에 적합하였으며, 곰팡이는 DRBC 고체배지가 적합하였다. 이때 DRBC를 제외한 4가지 배양배지에서 세균, 효모가 혼재해서 자라 총균수

파악이 어려웠으며 따라서 최종 총균수는 DRBC 고체배지에서 측정하였다. 이후 2년차 부터는 DG18, PDA+D 고체배지는 제외 하였다(Fig. 6). 또한 획득한 세균 군주는 액체배양 후 모두  $-70^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다(Fig. 7).

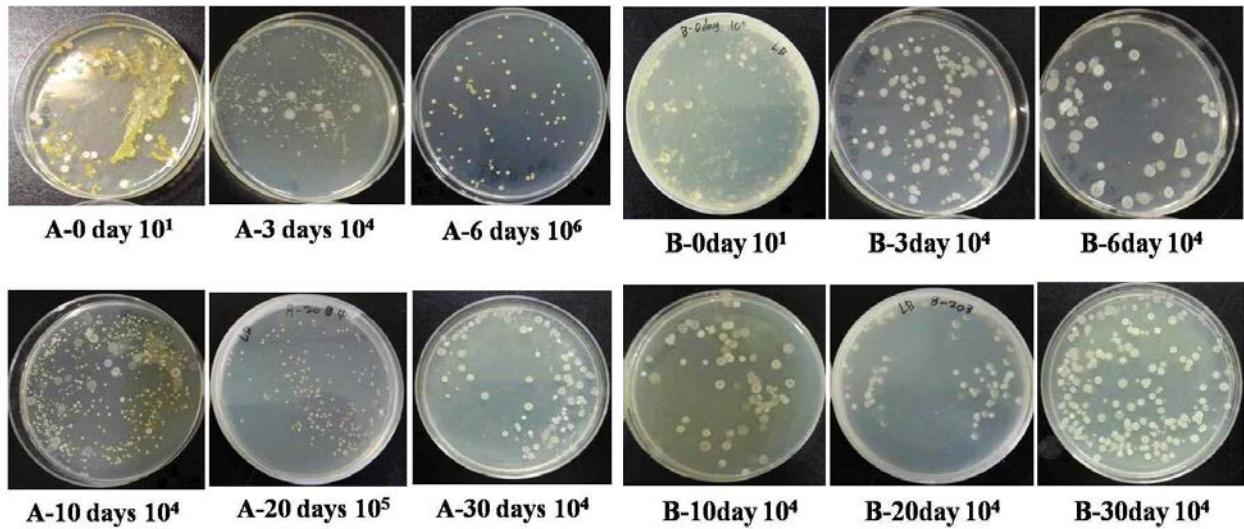


Fig. 4. Enumeration of bacteria isolated from *nuruk* A and *nuruk* B on LB plates

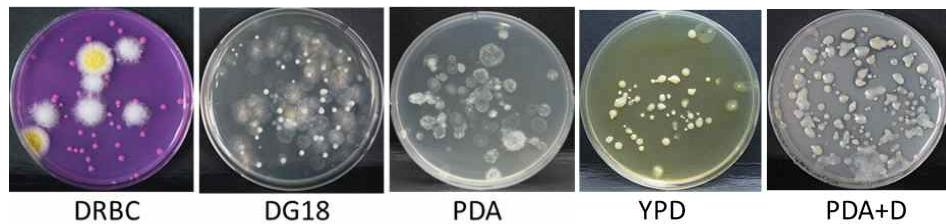


Fig. 5. Evaluation of different media for proper mycoflora enumeration from *nuruk* A and B

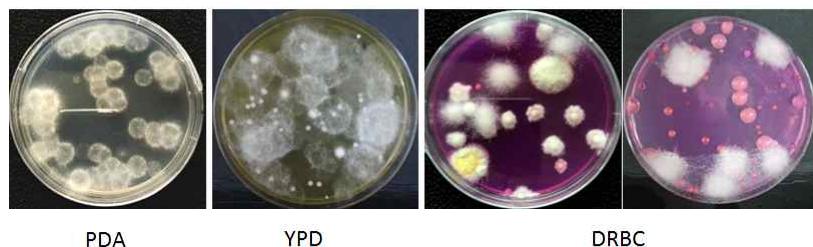


Fig. 6. Evaluation of different media for proper mycoflora enumeration from *nuruk* C,D,E and F

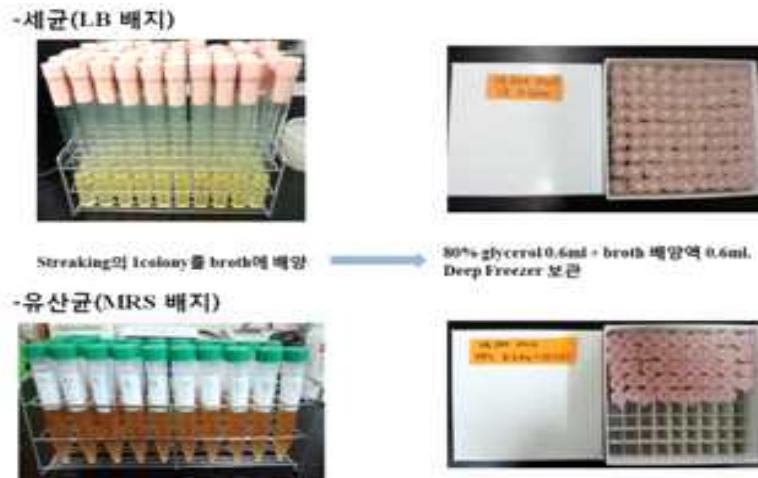


Fig. 7. Preservation of isolated bacterial colonies in 80% glycerol

### (2-2) 누룩 시료별 CFU 값 측정

#### 가. 전통누룩 A, B

일반세균의 경우 LB 고체배지에서 배양 하였을 때, 6일까지는 총균수가 급격하게 증가 하였으며, 전통누룩 A의 경우 발효 6일 시료에서 최대 균수가 검출 된 후 총균수가 감소하였다. 30일 시료에서는 특정 균주가 너무 많이 자라 분리가 불가능하였다. 전통누룩 B의 경우 발효초기 3일 시료에서 총균수가 급격히 증가하였으며 이후 30일 시료까지 비슷한 수준으로 유지되었다(Fig. 8). 반면에 MRS 고체배지에서 배양한 유산균의 경우 균주들이 무작위적으로 너무 많이 자라서 콜로니를 셀 수 없는 경우가 많았다. 따라서 유의성있는 그래프를 얻기 어려웠다(Fig. 9). 곰팡이의 경우 전통누룩 A의 경우 배양초기 3.59 log CFU/g에서 8.39 log CFU/g 급격하게 증가하며, nuruk B의 경우는 7.59 log CFU/g로 증가했다. 이후 7.25 log CFU/g와 7.34 log CFU/g로 감소하였으며 30days 시료까지 거의 비슷한 총균수가 유지 되었다. 시판누룩 pH의 경우 산송 C1, 송학 C2 두 종류 모두 발효과정이 끝난 시료이기 때문에 완성품으로 한 번 확인 하였으며 8.11 log CFU/g와 8.68 log CFU/g로 조금 더 높았다(Fig. 10).

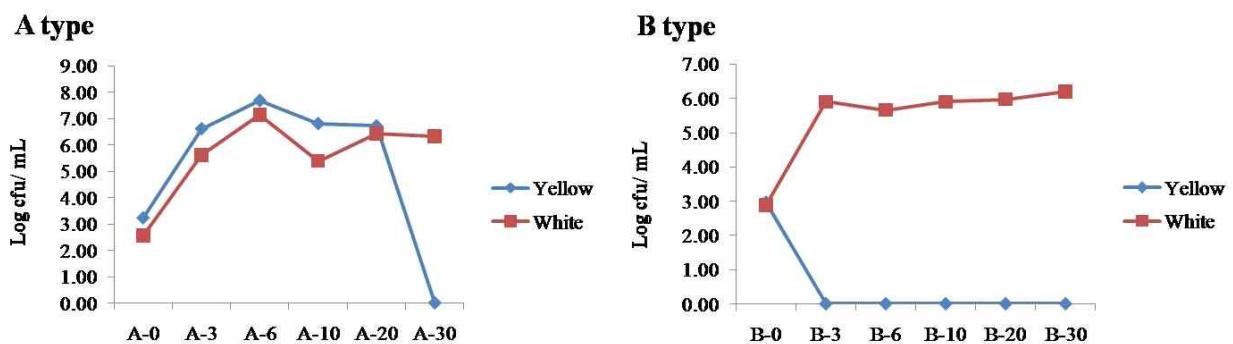


Fig. 8. Enumeration of normal bacteria isolated from *nuruk* A and *nuruk* B on LB plates, respectively.

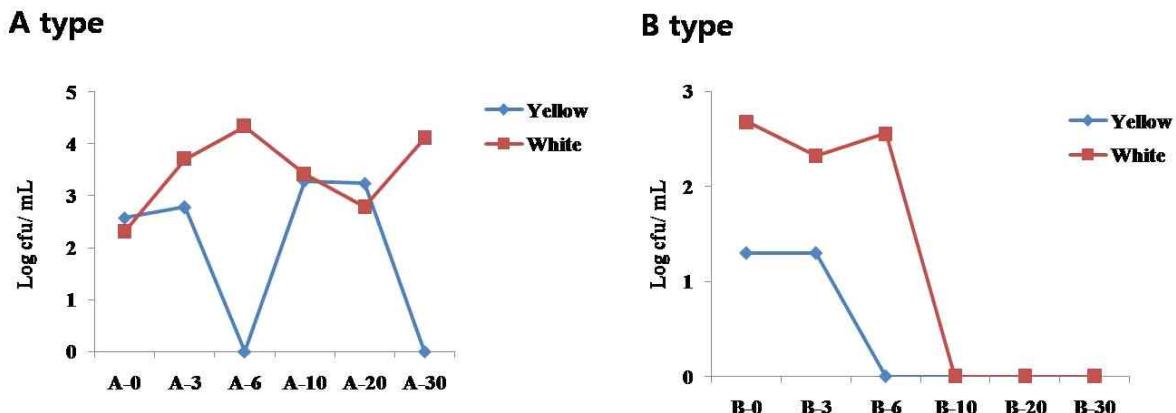


Fig. 9. Enumeration of lactic acid bacteria isolated from *nuruk A* and *nuruk B* on MRS plates, respectively.

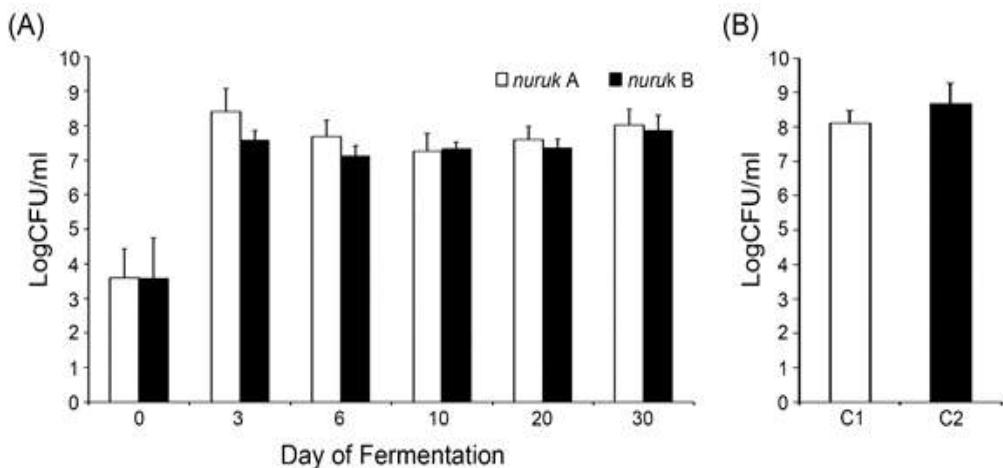


Fig. 10. (A) Enumeration of mycoflora in nuruks prepared under two different conditions (B) Mycofloral load in commercially-available wheat nuruk samples C1 and C2

#### 나. 전통누룩C, D

일반세균의 경우 LB 고체배지에서 배양 하였을 때, 발효 초기에 균수가 급증하여 후기 까지 비슷한 수준을 유지하였다. 전통누룩 C type의 유산균의 경우도 가수 비율 초기에 모두 약 10배 증가하여 중기까지 꾸준히 감소하는 경향을 보이다가 후기에 약간 증가하였다. 전통누룩 D type의 유산균의 가수비율 20, 30%의 경우 일정한 패턴이 나타나지 않고 매우 불안정한 변화를 보였으며, 26%의 경우에는 C type의 유산균과 약간 비슷한 패턴으로 초기에 증가 후 후기까지 꾸준히 감소하는 경향을 나타낸다(Fig. 11). 곰팡이와 효모의 경우 전통누룩 C type 0day 30%의 가수량을 가지는 시료에서는 균이 자라지 않아 결과를 단정할 수는 없다. 하지만 전통누룩 C type과 D type 모두 발효 초기(0day ~ 3day)에 수가 급증하며 이때부터 후기까지는 비슷한 수준의 총균수를 유지한다. 특징적인 것은 그레프를 곡류종류, 가수량, 발효시간으로 그룹을 지어보았을 때, 대부분의 시료에서 동일조건일 경우(발효시간, 곡류종류별) 가수량이 20%인 시료보다 30%인 시료에서

총균수가 더 높게 측정되는 경향을 보인다(Fig. 12). 하지만 20, 26, 30%의 가수량의 증가에 따르는 총균수 변화의 특이점은 찾을 수 없었다.

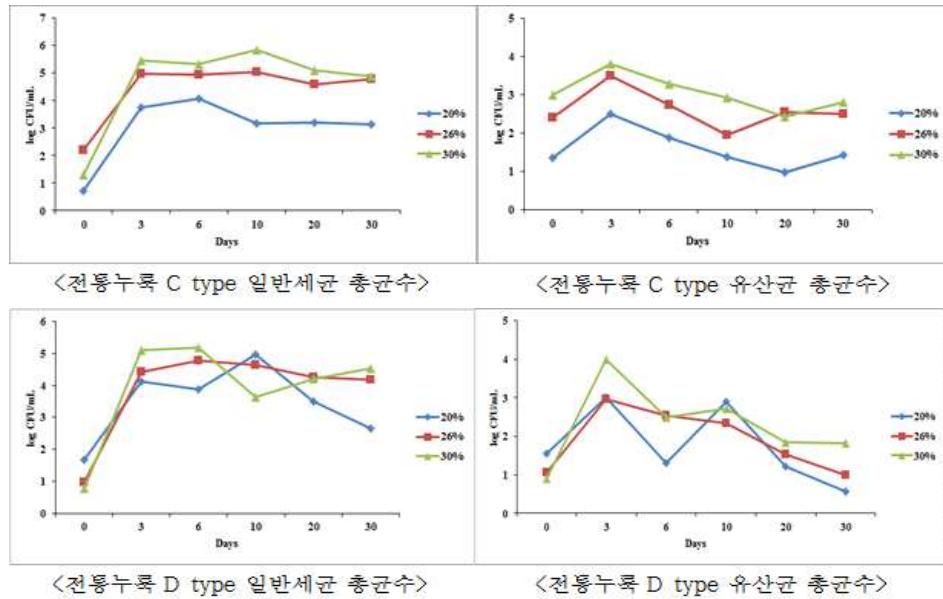


Fig. 11 Enumeration of normal bacteria and lactic acid bacteria isolated from *nuruk* C and *nuruk* D on LB and MRS plates, respectively.

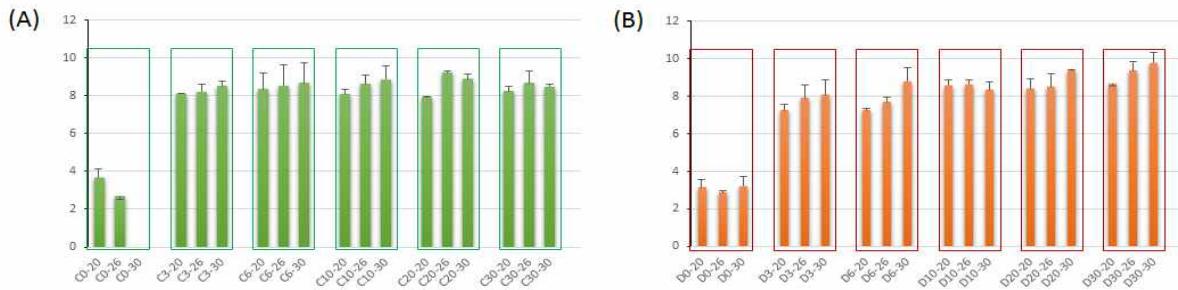
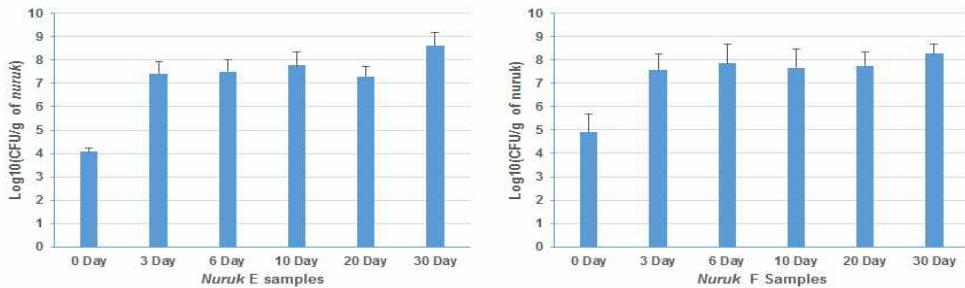


Fig. 12. Enumeration of mycoflora through plate count method. Mycofloral enumeration in (A) *nuruk* C and (B) *nuruk* D was done through resuspending 5g of *nuruk* in 50ml NSS, followed by serial dilution, plating on DRBC medium followed by colony count after 4–5 days.

#### 다. 전통누룩 E, F

전통누룩 E와 F에서는 발효초기에 비하여 3일이 지나면 총균수가 약 2배정도 급증하였다. 또 이렇게 급증한 총균수는 발효일자가 지나도 유지 되었다. 시간이 지남에 따라 약간의 변화는 있지만 눈에 띄는 커다란 변화는 관찰 되지 않았다. 그 중에서 CFU 값이 가장 높을 때는 전통누룩 E와 F 모두 발효일자 30일이다(Fig. 13).

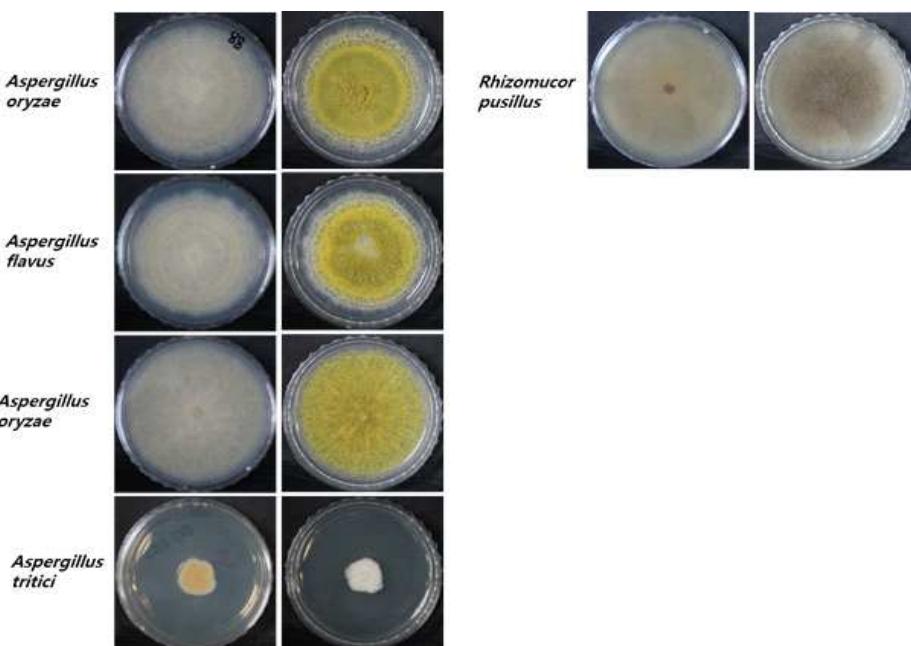


**Fig. 13. Enumeration of mycoflora through plate count method.** Mycofloral enumeration in (A) *nuruk* E and (B) *nuruk* F was done through resuspending 5 gm of *nuruk* in 50ml NSS, followed by serial dilution, plating on DRBC medium and colony count after 4–5 days incubation at 25°C. The highest CFU was recorded at day 30 in both *nuruk* E and F.

### (3) 순수 분리된 미생물들의 분자유전학적 동정

#### (3-1) 전통누룩 A, B

형태학적 분석과 분자생물학적 분석을 통하여 누룩시료의 균류상을 특징지었다. 형태학적 분석이란 colony 모양, 색소형성의 차이, 균사체의 모양을 포함하여 분석하였다(Fig. 14). 총 55종의균주가 분리되었으며, 이것은 9속 15종으로 밝혀졌다(Table 1). 이들 중 우점하고 있는 속은 *Lichtheimia*로 11종이 분리되었고, *Aspergillus*의 경우는 28종이 분리되었다. *Trametes*와 *Rhizomucor*는 각각 5종, 4종이 분리되었다. 현미경으로 세포 형태를 관찰하여 선별한 총 25개의 분리된 효모 균주는, 이 후 26s rRNA 유전자 구역의 D1/D2 도메인의 염기서열 분석을 하였으며, GenBank data를 통하여 6속 7종으로 구분 되었다(Fig. 15).



**Fig. 14. Prominent fungal isolates from traditional wheat *nuruk***

Table 1. Predominant fungal and yeast isolates from traditional wheat nuruk

Fungi isolated from Nuruk Samples	No. of isolates	Yeast isolated from Nuruk Samples	No. of isolates
<i>Lichtheimia corymbifera</i>	8	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	1
<i>Lichtheimia ramosa</i>	3	<i>Pichia anomala</i>	3
<i>Mycocladus corymbiferus</i>	1	<i>Debaryomyces hansenii</i>	14
<i>Penicillium roqueforti</i>	2	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	1
<i>Trametes versicolor</i>	4	<i>Saccharomyces fibuligera</i>	4
<i>Irpex lacteus</i>	1	<i>Pichia burtonii</i>	1
<i>Fusarium oxysporum</i>	1	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	1
<i>Penicillium viridicatum</i>	1		
<i>Aspergillus flavus</i>	3		
<i>Aspergillus niger</i>	1		
<i>Aspergillus ruber</i>	1		
<i>Trametes sp.</i>	1		
<i>Rhizomucor pusillus</i>	4		
<i>Aspergillus oryzae</i>	4		
<i>Aspergillus tritici</i>	19		
<i>Mucor circinelloides</i>	1		

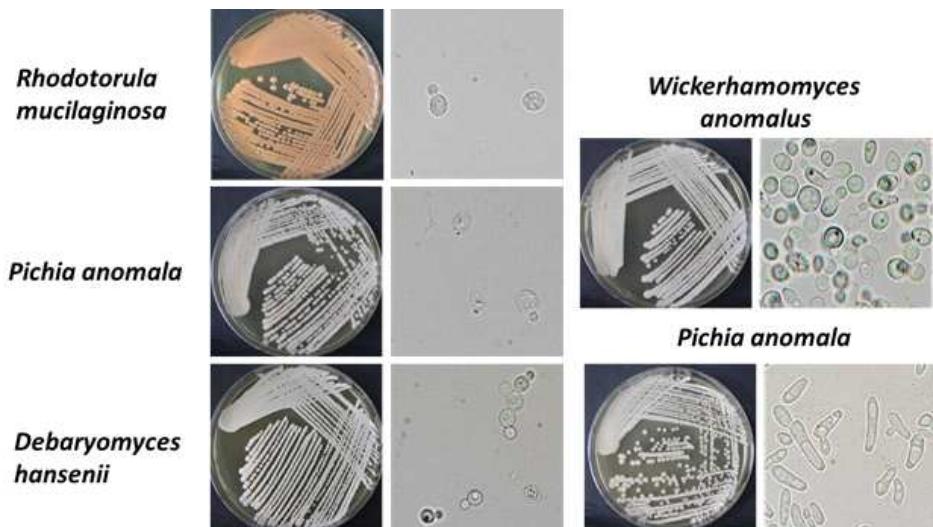


Fig. 15. Prominent yeast isolates from traditional wheat nuruk

## (3-2) 전통누룩 C, D, E and F

전통누룩 A, B와 마찬가지로 전통누룩 C~F도 형태학적 분석을 실시하였다.(Fig. 16). 1차적인 미생물 분포를 조사하기 위하여 전통누룩 C~F type에서 형태적인 차이를 보이는 균주들을 같은 형태별로 적어도 2종씩 순수분리하고 곰팡이의 경우 이들이 PDA와 DRBC에서 나타내는 표현형이 달랐기 때문에 각각의 배지에서 배양 후 배지별 균주의 형태를 익혔다. 곰팡이와 마찬가지로 효모 또한 형태학적 관찰을 통해 isolate를 얻어 분자생물학 동정을 함께 실시하였다(Fig. 17.). 곰팡이의 형태학적 관찰 및 ITS 염기서열 분석 후 *Aspergillus* 속으로 보이는 균주들을 선별하여

CF1M과 CF4 primer를 이용하여 Calmodulin의 염기서열을 분석하였고, 이는 ITS 분석을 통한 동정과 약간의 차이를 보였다(Fig. 18). 해당 실험을 통해 전통누룩 C type에서 52개의 곰팡이 균주와 4개의 효모 균주가 수집되었으며, ITS와 Calmodulin 염기서열을 NCBI Blast search를 통해 동정 하였다(Fig. 19). 전통누룩 C type의 지속적인 형태적 관찰과 정확한 분자생물학적 동정을 통해 전통누룩에 우점하고 있는 곰팡이 3개의 속을 육안으로 구별이 가능하였고, 이를 통해 전통누룩 D type의 1차적인 미생물분포를 확인할 수 있었다(Table. 2). 하지만 발효기간이나 가수량에 따른 미생물 분포의 유의적인 차이는 확인할 수 없었다. 마찬가지로 전통누룩 E type, F type에서도 형태적 관찰과 분자생물학적 동정을 통해 전통누룩에 우점하고 있는 곰팡이들을 구별할 수 있었다(Fig. 20)

NAME	PDA	DRBC	IDENTIFIED AS	NAME	PDA	DRBC	IDENTIFIED AS
C1-1			> <i>Aspergillus flavus</i> strain UOA/HCPF 5774 isolate ISHAM-ITS_ID MITS133	C6			> Uncultured Ascomycota clone 14l1a10
C1-2			> <i>Aspergillus</i> sp. SLN14	C7			> Uncultured Ascomycota clone 14l1a10
C2-1			> Fungal sp. MLN14	C8			> <i>Verticillium dahliae</i> strain F724
C2-2			> <i>Epicoccum nigrum</i> strain SE131CE	C9-1			> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
C3			> <i>Lichtheimia ramosa</i> strain AS-A1	C9-2			> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
C4			> <i>Lichtheimia ramosa</i> strain AS-A1	C12			> <i>Fusarium equiseti</i> strain BaEf
C5			> <i>Lichtheimia corymbifera</i> strain SU-A1	C14			> <i>Aspergillus minisclerotigenes</i> strain G5

Fig. 16. Prominent fungal isolates from traditional wheat nuruk C.

NAME	YPD	IDENTIFIED AS
CY1		> <i>Candida allocerrii</i> strain PH-M17
CY10		> <i>Cryptococcus friedmannii</i> strain KYZYD12
CY15		> <i>Rhodotorula slooffiae</i> strain HB32-3
CY53		> <i>Bulleromyces albus</i> CBS 500

Fig. 14. Prominent yeast isolates from traditional wheat *nuruk* C.

SI #	Isolated from	Morphology (Back)	Morphology (Front)	Identified as (ITS1-4)	Identified as (CFIM-CF4)
C 1-1	<i>Nuruk C</i>			> <i>Aspergillus flavus</i> strain UOA/HCPF 5774 isolate ISHAM-ITS_ID MITS133	> <i>Aspergillus oryzae</i> RIB40
C 1-2	<i>Nuruk C</i>			> <i>Aspergillus</i> sp. SLN14	> <i>Aspergillus oryzae</i> RIB40
C 14	<i>Nuruk C</i>			> <i>Aspergillus minisclerotigenes</i> strain G5	> <i>Aspergillus flavus</i> isolate CBS 100927
C20-1	<i>Nuruk C</i>			> <i>Aspergillus tritici</i> strain BGPUP06	> <i>Aspergillus tritici</i>

Fig. 18. *Aspergillus* isolates from traditional wheat *nuruk* C.

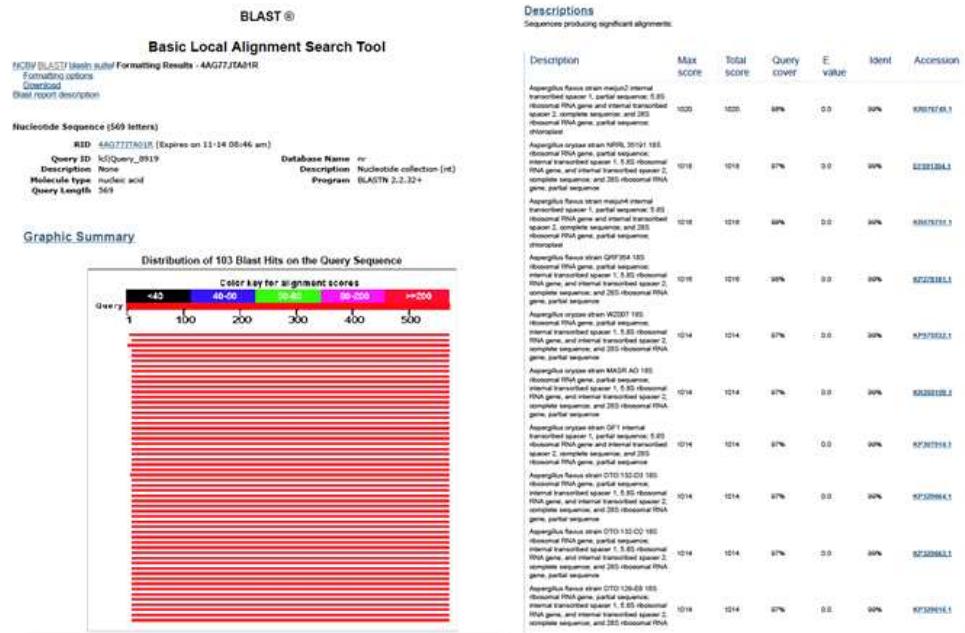


Fig. 19. NCBI Blast search for ITS and Calmodulin sequences of isolates from *nuruk* C.

Table. 2. Genus level characterization of *nuruk* D isolates through comparison of colony morphologies with already characterized isolates of *nuruk* C.

	<i>Aspergillus</i>	<i>Lichtheimia</i>	<i>Saccharomyopsis</i>
D0-20	5	1	1
D0-26	4	0	2
D0-30	2	7	3
D3-20	2	6	7
D3-26	2	18	5
D3-30	3	11	2
D6-20	3	4	4
D6-26	2	2	0
D6-30	5	2	3
D10-20	1	10	1
D10-26	1	8	0
D10-30	0	4	0
D20-20	2	7	0
D20-26	2	8	0
D20-30	2	5	2
D30-20	1	1	1
D30-26	0	6	1
D30-30	2	14	0

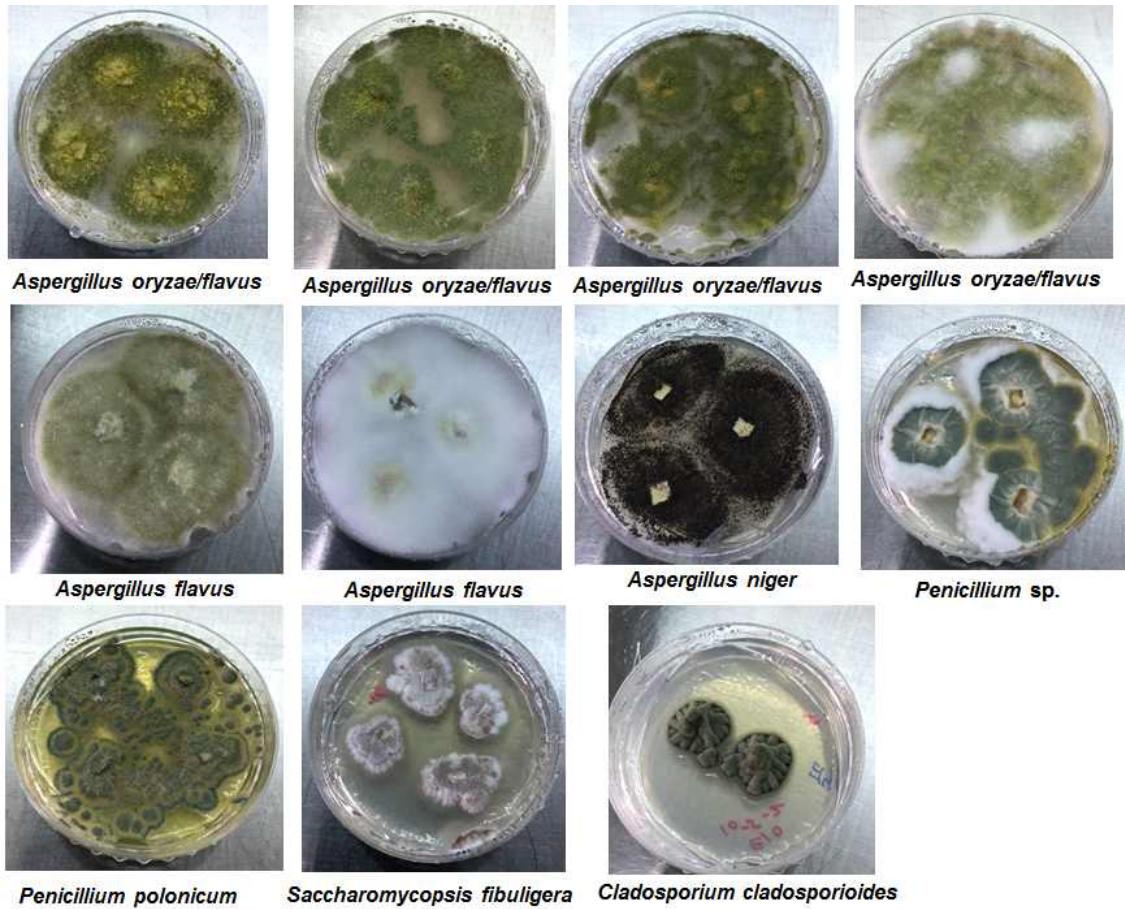


Fig. 20. Prominent fungal isolates from traditional wheat *nuruk* E and F.

#### (4) 미생물 분포도 조사

##### (4-1) 전통누룩 A, B

순수 분리된 미생물들의 분자유전학적, 생화학적 동정을 통하여 1차적인 누룩 시료별 미생물 분포도를 조사하여 미생물 천이에 대하여 조사한다. 세균의 경우 누룩의 발효 기간별 미생물 천이는 형태학적과 16s rRNA 유전자 분석 데이터를 기반으로 분석하였다. 발효기간별 A type과 B type 누룩의 일반 세균 미생물 천이에 있어서, A type은 B type에 비해 발효기간별로 다양한 미생물 천이가 뚜렷하게 나타났다(Fig. 21). 발효 전에는 *Pantoea* 종이 주로 분포되어 있었으나 발효가 시작 되면서(초기) *Staphylococcus* 종, *Enterobacter* 종과 *Bacillus* 종이 나타났으며, 발효 중기(6~20일 차)가 되면서 *Staphylococcus* 종, *Enterobacter* 종과 *Bacillus* 종이 서로 경쟁하다가 발효 후기가 되면 *Bacillus* 종으로 미생물 천이가 일어남을 확인 할 수 있었다. B type에서의 발효 전, 발효 초기, 발효 중기 및 발효 후기 모두 *Bacillus* 종이 우점하고 있어 다양한 미생물들의 천이는 확인할 수 없었다. 누룩의 발효기간별 미생물 천이는 형태학적과 16s rRNA 유전자 분석 데이터를 기반으로 분석하였다. 발효기간별 A type의 유산균 미생물 천이에 있어서 발효 전에는 *Pediococcus* 종과 *Lactobacillus* 종이 분포되어 있었으나 발효 초기, 발효 중기 및 발효 후기 모두 *Pediococcus* 종이 우점하고 있음을 확인할 수 있었다. B type의 유산균 미생물 천이는 발효 전

*Lactobacillus* 종이 우점종으로 시작해서 발효 3일차에는 *Pediococcus* 종으로, 발효 6 일차에는 *Enterococcus* 종으로 천이가 일어남을 확인할 수 있었고, 발효 10일차부터는 유산균이 검출되지 않았다(Fig. 22).

시판 누룩에 있어서는 발효가 완료된 누룩을 이용하여 미생물 분리 및 동정을 수행 하였기에 미생물 천이가 아닌 미생물 분포를 분석하였다. C1 type 누룩에서의 일반 세균은 *Pantoea* 종, *Bacillus* 종과 *Cronobacter* 종이 분포되어 있었으며, C2 type은 곰팡이의 빠른 번식으로 인해 일반 세균을 검출할 수 없었다. 유산균 분포에 있어서는 C1과 C2 type 모두 *Pediococcus* 종이 우점하고 있었으며, C2 type에서는 *Weissella* 종도 관찰됨을 확인할 수 있었다(Fig. 23). 곰팡이의 경우 본 연구진은 각각의 누룩 시료에서 colony 형태 및 균사 생장 형태 그리고 색소형성에 관련된 특징을 모두 관찰하여 50개의 colony를 분리하였다(Fig. 24). 30일간의 시료의 균류상 변화에 온도가 영향을 미치고 있는 것으로 관찰된다. *Lichthemia corymbifera*는 누룩A 와 누룩B에서 각각 48%, 68%를 차지하고 있으며, *Aspergillus*속의 경우 누룩A와 누룩B의 시간대별 시료에서 상당 부분을 차지 하고 있으며, *A. oryzae* 와 *A. tritici*가 주를 이룬다. *R. pusillus* 는 누룩B에서 자주 검출 되었다.

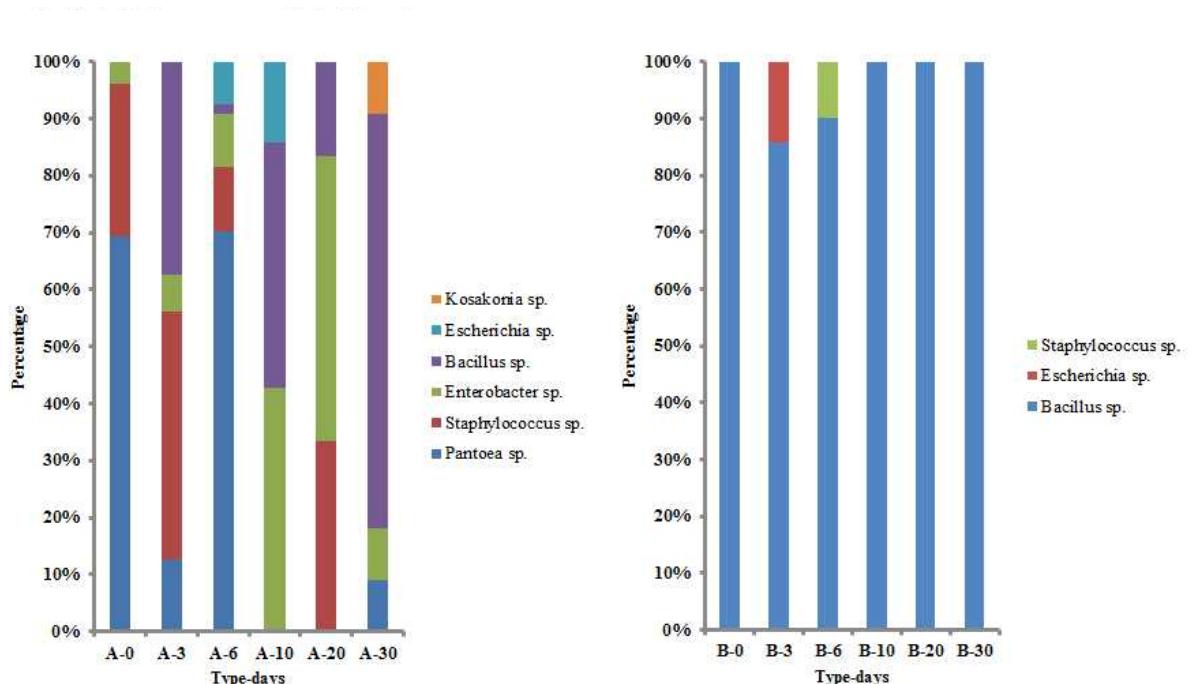
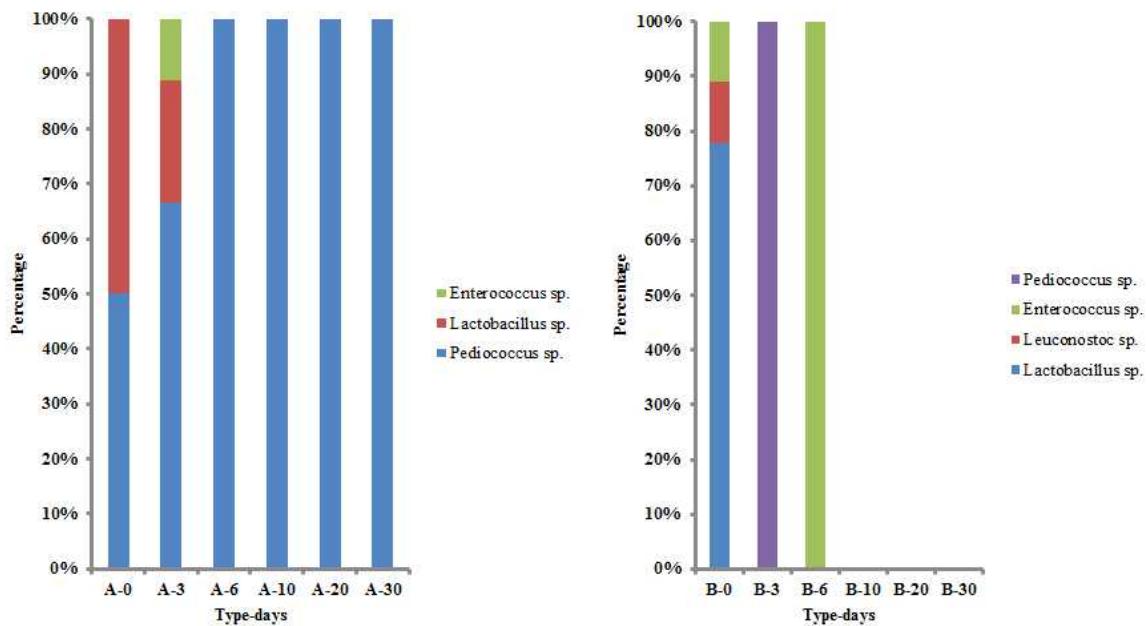
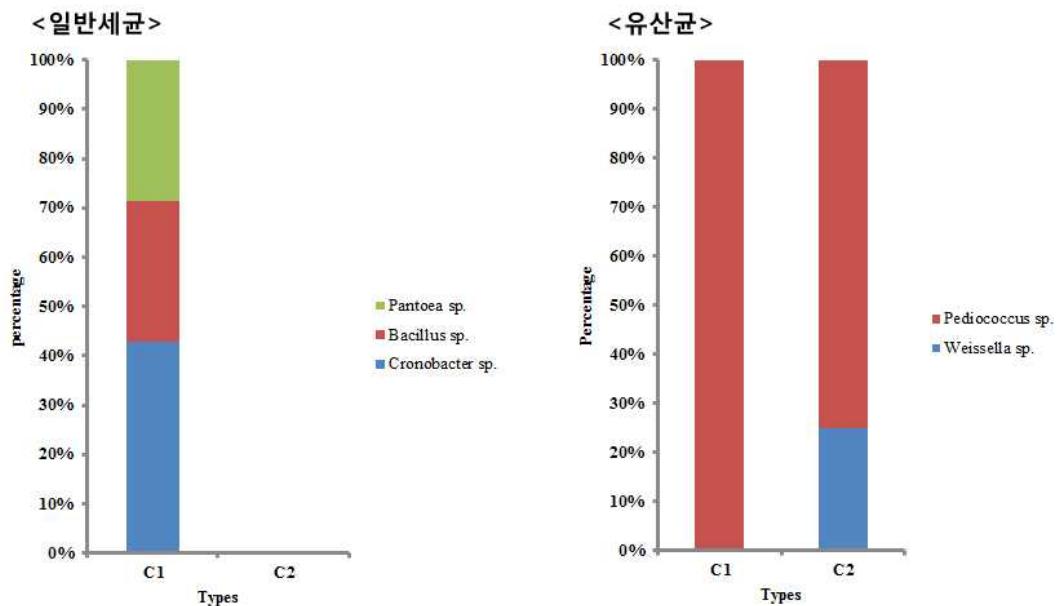


Fig. 21. Normal bacterial community dynamics of *nuruk A*, *nuruk B* over a fermentation period of 30 days



\*B Type: 발효 10일자부터 유산균이 자라지 않음

Fig. 22. Lactic acid bacterial community dynamics of *nuruk A*, *nuruk B* over a fermentation period of 30days



\*C2 Type: 일반 세균이 자라지 않음(곰팡이만 자람)

Fig. 23. Normal as well as lactic acid bacterial community dynamics in commercially available *nuruk C1* and *C2*

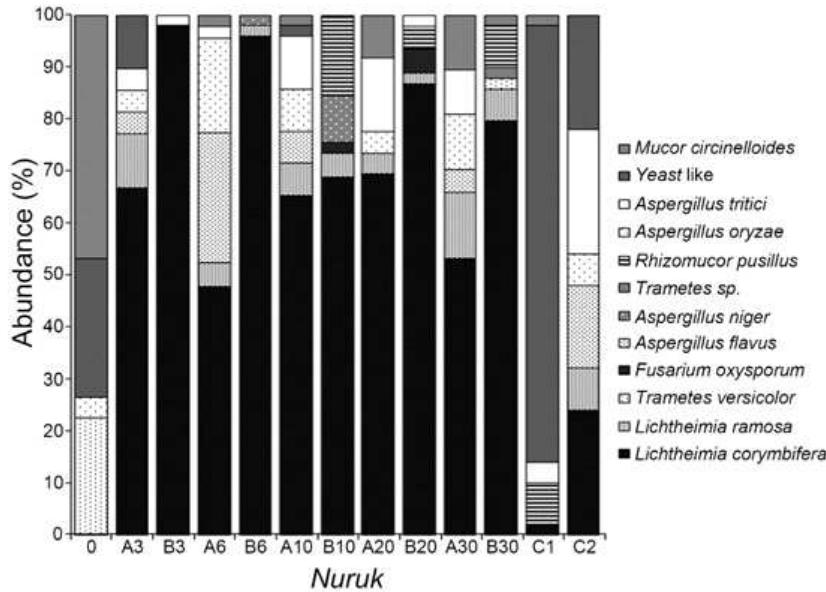


Fig. 24. Mycofloral community dynamics of *nurukA*, *nurukB*, and commercially-available *nuruk* C1 and C2. Comparison of community dynamics in *Nuruk* A, *nuruk* Bat 0, 3, 6, 10, 20 and 30 days of fermentation and commercially-available *nuruks* C1 and C2

#### (4-2) 전통누룩 C, D

전통누룩 C type, D type에서는 일반 세균의 미생물 천이는 가수 비율이 20%일 때 보다 26, 30%일 때 더욱 다양하게 나타났다(Fig. 25). 전통누룩 C type의 가수 비율 20%일 때는 발효 전에 *Pantoea* 종이 우점하다가 초중기에는 *Pediococcus* 종, 중후기에는 *Staphylococcus* 종이 우점종으로의 변화를 보인다. 전통누룩 D type의 가수 비율 20%의 경우에는 발효 전에 *Salmonella* 종과 *Escherichia* 종이 비슷한 비율이다가 초중기에는 *Pediococcus* 종, 후기에는 *Staphylococcus* 종이 우점종으로 변화를 보인다. 전통누룩 C type의 가수 비율 26%의 경우 모든 발효 기간에서 *Pantoea* 종이 꾸준히 존재하고, 초중기에는 *Pediococcus* 종, 중후기에는 *Enterobacter* 종이 우점종으로 나타났다. 전통누룩 D type의 가수 비율 26%에서는 초기에 *Pediococcus* 종이 우점 하다가 중후기에 *Pantoea* 종이 점점 증가하여 더욱 다양한 미생물이 천이를 볼 수 있다. 전통누룩 C type의 가수 비율 30%의 경우 초기에는 *Pediococcus* 종과 *Weissella* 종이 비슷한 비율로 존재하다가, 중기부터 *Pantoea* 종이 다시 나타나기 시작하고 *Weissella*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Salmonella*, *Enterobacter* 종이 모두 비슷한 비율이다가 후기에 *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Erwinia* 종으로 추려지는 패턴을 확인할 수 있다. 전통누룩 D type의 가수 비율 30%의 경우 초기에는 *Pantoea* 종과 *Escherichia* 종이 우점하다가 중기부터 후기까지 *Pediococcus* 종이 우점한다.

#### (4-3) 전통누룩 E, F

세균의 경우 전통누룩 E에서 초기 발효 10일 까지는 굉장히 많이 서식하였지만 그 이후에 30일까지 발효가 진행되면서 부터는 그 수가 점점 감소하였다. 하지만 그에

비해 전통누룩 F에서는 반대로 초기 발효 10일까지는 낮은 수의 세균이 존재 하였지만, 그 이후 30일까지 발효가 진행되면서 부터는 점점 그 수가 증가하였다. *Halospirulina* 속의 경우 전통누룩 E와 F 모두에서 우점하고 있는 것을 알아낼 수 있으며, *Bacillus* 속 또한 전통누룩 E와 F 모두에서 상당수 존재하는 것을 볼 수 있다. 곰팡이균주는 평균적으로 전통누룩 F보다는 전통누룩 E에서 더 많이 나타났다. 발효를 시작한지 6일이 지났을 때에는 *Saccharomylopsis fibuligera*가 우점종으로 나타났다. 또한 *Saccharomylopsis* 속이 전통누룩 E, F 두 곳 모두에서 우점하고 있는데 비해, *Aspergillus* 속은 전통누룩 E, *Rhizopus* 속은 전통누룩 F에서 주로 존재하였다. 전통누룩 E에서 습도 70% 조건에서 발효 시킬 시에는 *Aspergillus* 속이, 습도를 50%로 낮추었을 때는 *Saccharomylopsis* 속이 우점하고 있지만 발효 기간이 지난후에 *Saccharomylopsis* 속의 수는 점점 감소하는데 비해 *Aspergillus* 속의 수는 점점 증가하였다.

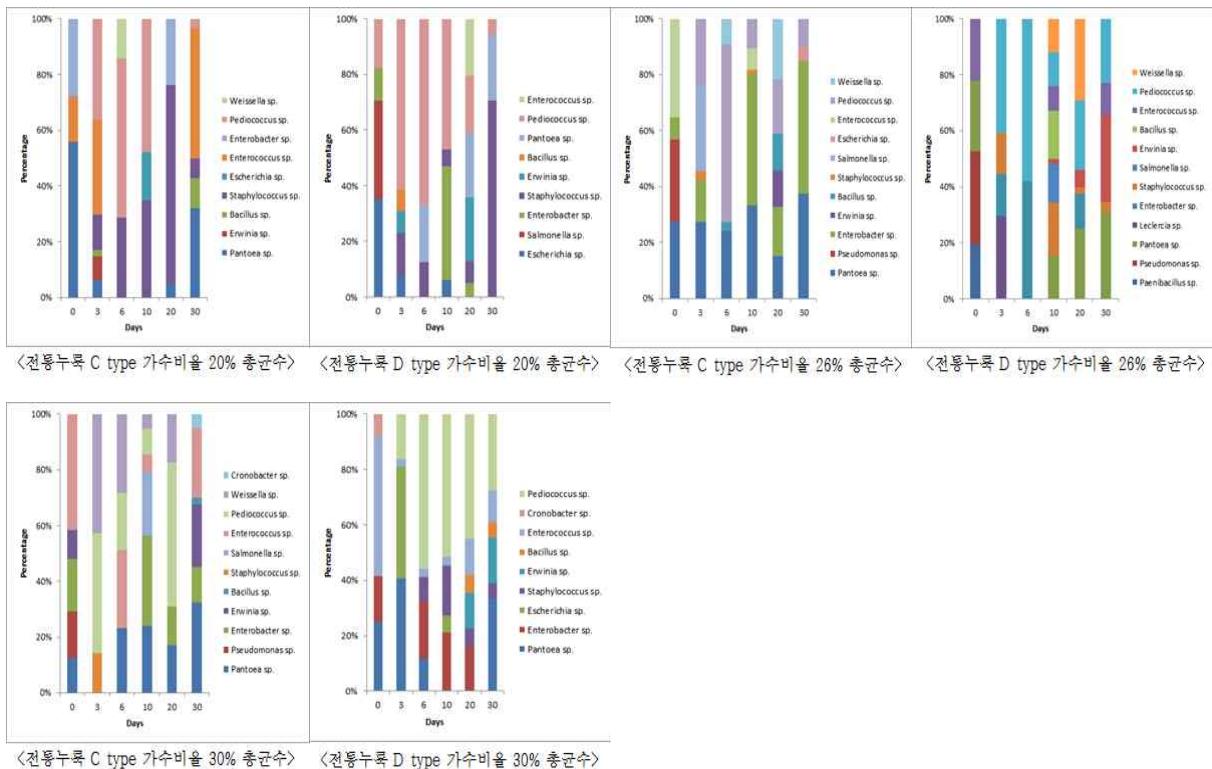


Fig. 25. Normal bacterial community dynamics in *nuruk C*, *nuruk D* over both percentage of moisture content as well as fermentation period of 30 days.

## 2) 전통누룩 시료별 미생물 천이 조사

### (1) 누룩의 DNA 추출

미생물 동정 및 분포도 조사에 사용된 동일 시료 1g을 액체질소에 넣고 곱게 빻은 뒤 large scale genomic DNA 추출방법을 사용하여 순수한 genomic DNA를 추출하였다. 추출

한 genomic DNA는 전기영동을 통해 확인하였다(Fig. 26).

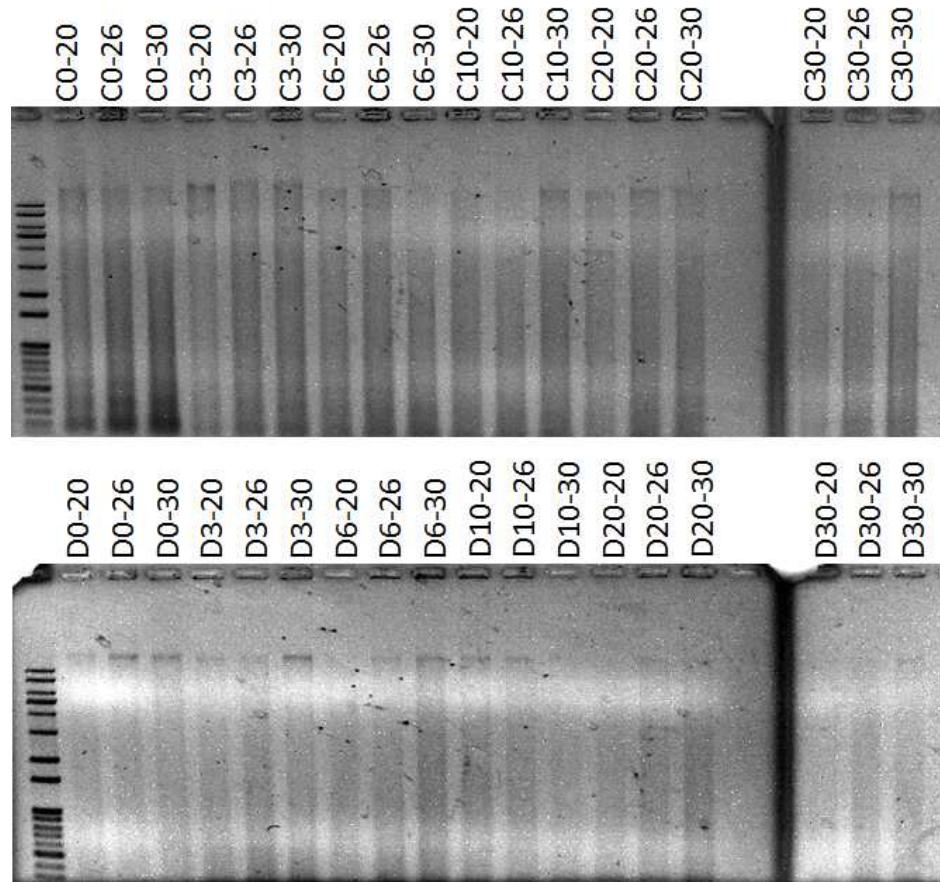
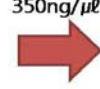


Fig. 26. High quality, and concentrated metagenomic DNA isolated from *nuruk*

## (2) 추출 DNA를 이용한 미생물 천이조사

### (2-1) Metagenomics 수행

전통누룩A, B에서 14개, 전통누룩 C에서 18개, 전통누룩 E, F에서 12개 시료의 genomic DNA의 상태를 확인하기 위하여 UV spectrophotometer를 이용한 순도 측정을 진행하였다. genomic DNA를 평준화 하기 위하여 농도가 가장 낮은 것으로 확인된 전통누룩에 맞추어 모든 시료의 genomic DNA를 희석하였다(Fig. 27). 세균과 곰팡이의 Metagenomic library를 제작하기 위하여 세균의 16S rRNA 유전자(Fig. 28, 29)와 곰팡이의 ITS(Fig. 31, 32)를 Universal primer와 NGS primer를 사용하여 qPCR을 수행하였다. 단, 전통누룩 A, B에서 곰팡이의 경우 ITS1, ITS4 primer를 바탕으로 NGS-ITS qPCR을 수행하였을 때, 원하는 결과를 얻지 못하여 metagenome library를 제작할 수 있는 primer를 새로 선택하였으며(Fig. 30), 새로 제작한 primer로 qPCR을 수행하여 성공하였다. 이 후 세균과 곰팡이의 library PicoGreen을 정량하여 모든 metagenome library 준비를 완료하였다(Fig. 33, 34).



No.	sample name	260nm	280nm	양(ng/μl)	순도	DNA 양(ng/μl)	D.W 양(μl)	350ng/μl
1	A00	0.030	0.021	0.750	1.4	23.3	26.7	50μl
2	A03	0.044	0.027	1.100	1.6	15.9	34.1	50μl
3	A06	0.036	0.026	0.900	1.4	19.4	30.6	50μl
4	A10	0.031	0.019	0.775	1.6	22.6	27.4	50μl
5	A20	0.014	0.017	0.350	0.8	50.0	0.0	50μl
6	A30	0.018	0.022	0.450	0.8	38.9	11.1	50μl
7	B00	0.019	0.017	0.475	1.1	36.8	13.2	50μl
8	B03	0.045	0.027	1.125	1.7	15.6	34.4	50μl
9	B06	0.028	0.020	0.700	1.4	25.0	25.0	50μl
10	B10	0.039	0.028	0.975	1.4	17.9	32.1	50μl
11	B20	0.018	0.016	0.450	1.1	38.9	11.1	50μl
12	B30	0.020	0.016	0.500	1.3	35.0	15.0	50μl
13	C01	0.037	0.021	0.925	1.8	18.9	31.1	50μl
14	C02	0.049	0.027	1.225	1.8	14.3	35.7	50μl

\*양이 가장 적은 5번(A20)의 350ng/μl 기준으로 희석

#	Sample ID	Nucleic Acid Conc.(ng/μl)	260/280	260/230
1	C0-26	144.9	1.91	1.33
2	C3-26	234	1.84	1.14
3	C6-26	203.1	1.92	1.39
4	C10-26	481.3	1.89	1.55
5	C20-26	168.6	1.91	1.35
6	C30-26	271.7	1.94	1.57
7	C0-30	299.4	1.89	1.4
8	C3-30	420.3	1.86	1.28
9	C6-30	450.5	1.85	1.27
10	C10-30	479.3	1.85	1.36
11	C20-30	211.7	1.9	1.34
12	C30-30	439.2	1.84	1.36
13	C0-20	224.8	1.84	1.16
14	C3-20	209.5	1.97	1.64
15	C6-20	457.4	1.56	1.27
16	C10-20	427.2	1.91	1.6
17	C20-20	336.3	1.87	1.38
18	C30-20	209.4	1.89	1.47

\*양이 가장 적은 1번(C0-26)의 144.9ng/μl 기준으로 희석

#	Sample ID	Nucleic Acid Conc.	Unit	A260	A280	260/280	260/230
1	E0	352.4	ng/μl	7.048	3.538	1.99	1.73
2	E3	428.7	ng/μl	8.574	5.066	1.69	0.94
3	E6	930	ng/μl	18.599	9.794	1.9	1.54
4	E10	477.7	ng/μl	9.554	5.071	1.88	1.6
5	E20	492	ng/μl	9.84	5.198	1.89	1.64
6	E30	540.4	ng/μl	10.807	6.124	1.76	1.05
7	F0	275.9	ng/μl	5.518	2.879	1.92	1.56
8	F3	1163.6	ng/μl	23.272	12.049	1.93	1.73
9	F6	783.5	ng/μl	15.669	8.213	1.91	1.49
10	F10	767.8	ng/μl	15.357	7.89	1.95	1.85
11	F20	836.5	ng/μl	16.73	8.57	1.95	1.87
12	F30	1099	ng/μl	21.979	11.26	1.95	1.7

\*양이 가장 적은 7번(F0)의 275.9ng/μl 기준으로 희석

Fig. 27. Quality check and normalization of genomic DNA samples

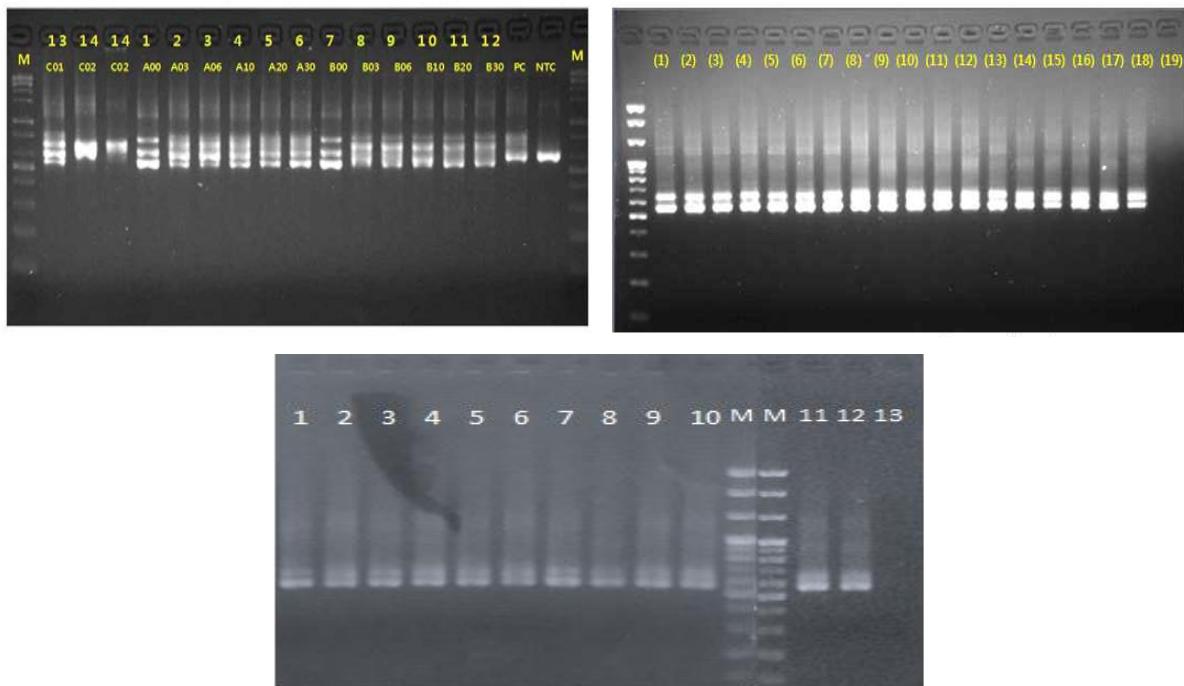
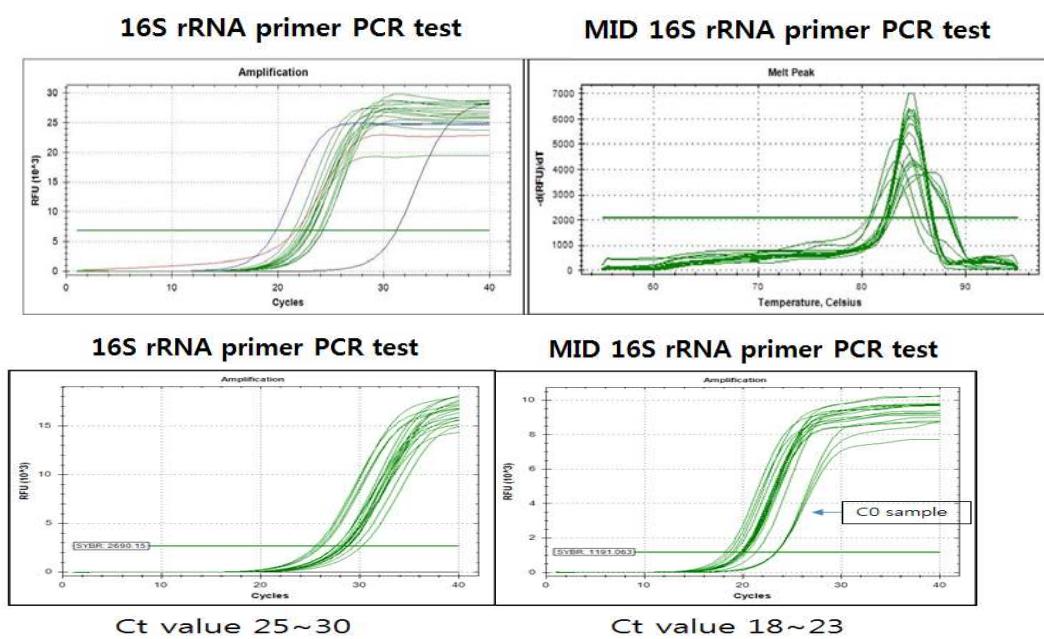


Fig. 28. 16s rRNA gene qPCR of genomic DNA isolates using 16S primer and NGS-16S primer



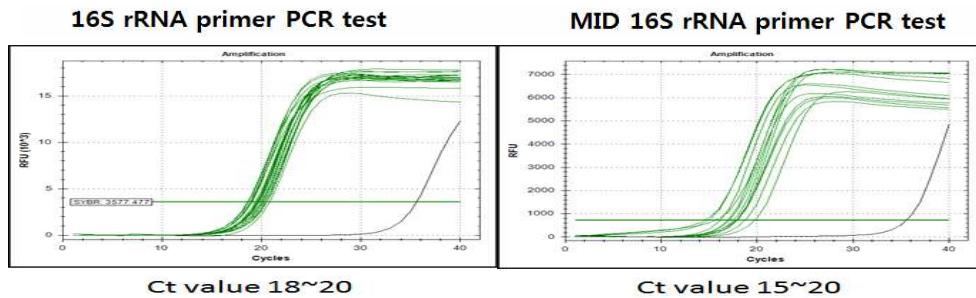


Fig. 29 16S rRNA gene primer PCR test using 16S primer and MID 16S primer

- Fungal Metagenome library primer selection**

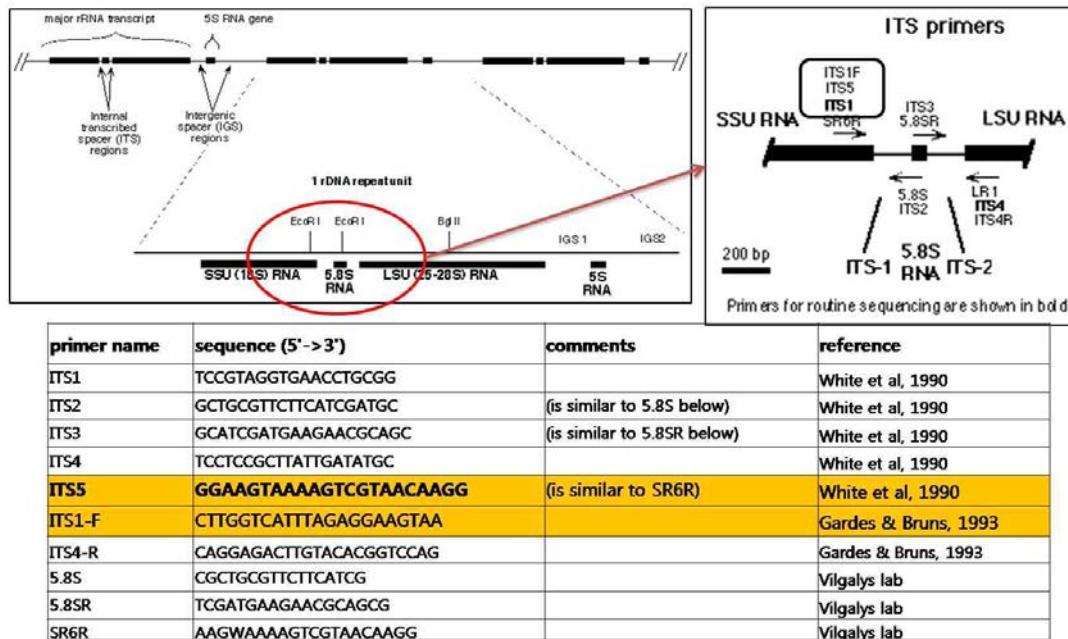


Fig. 30. Selection of primers for metagenomic library construction

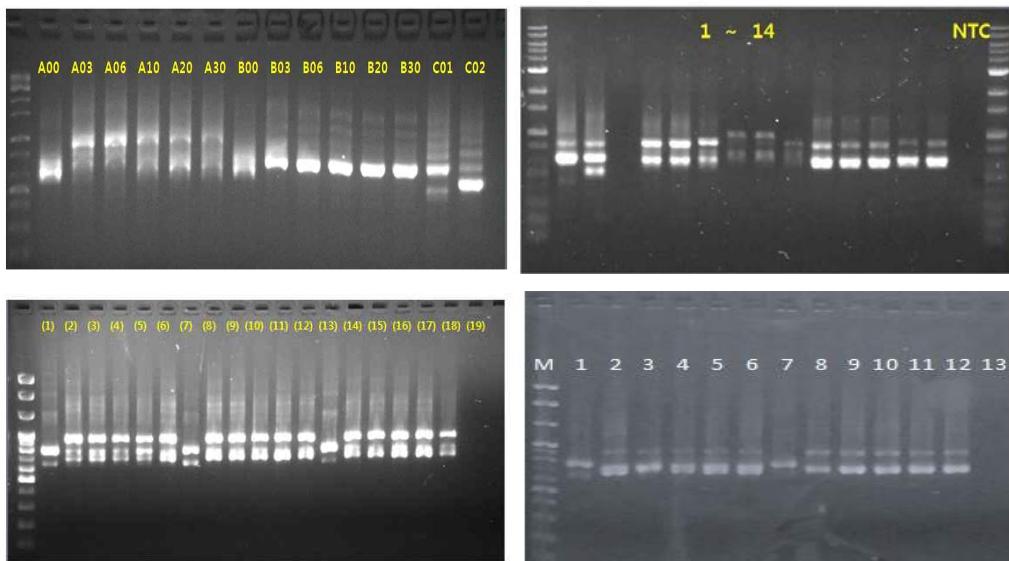


Fig. 31. ITS qPCR of genomic DNA isolates using ITS primers and NGS-ITS primer

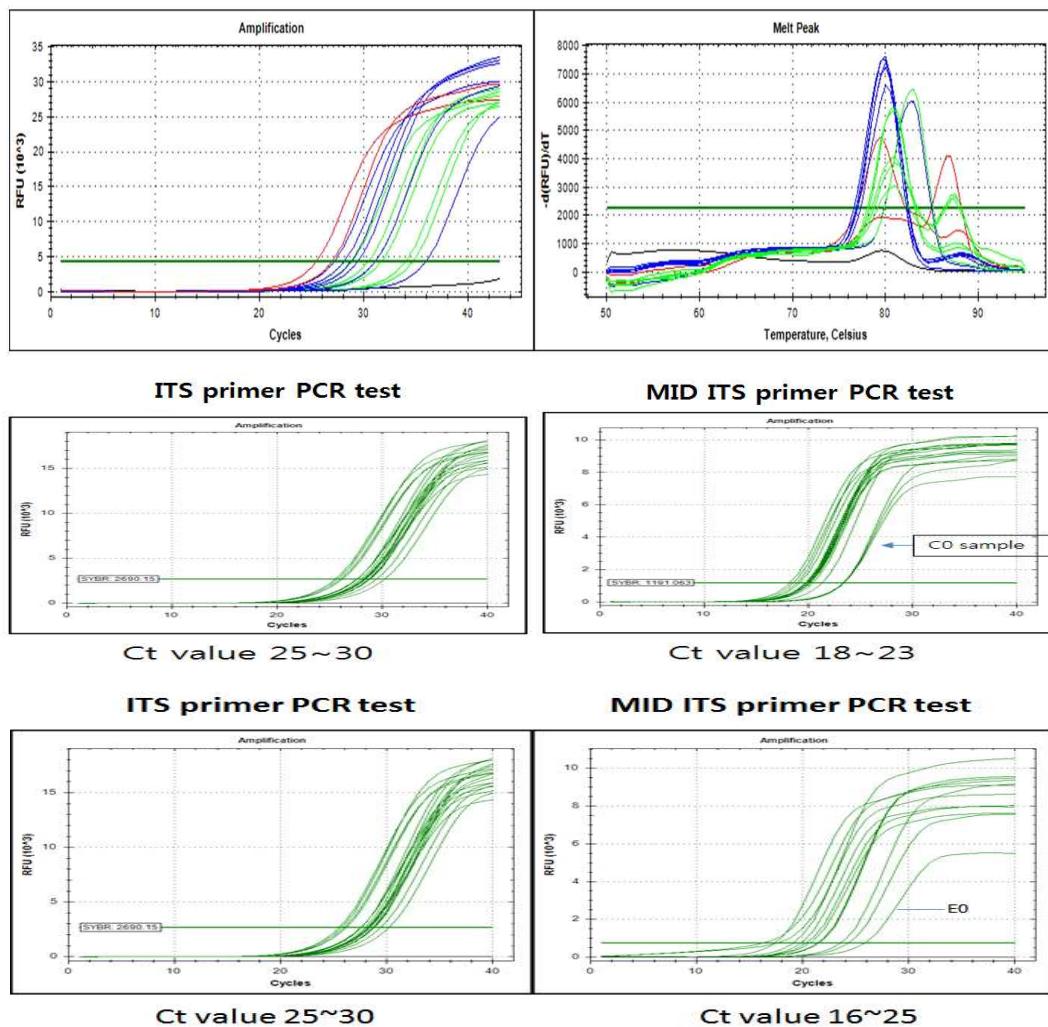


Fig. 32 ITS primer and NGS-ITS priemr qPCR test using ITS primer and MID ITS primer

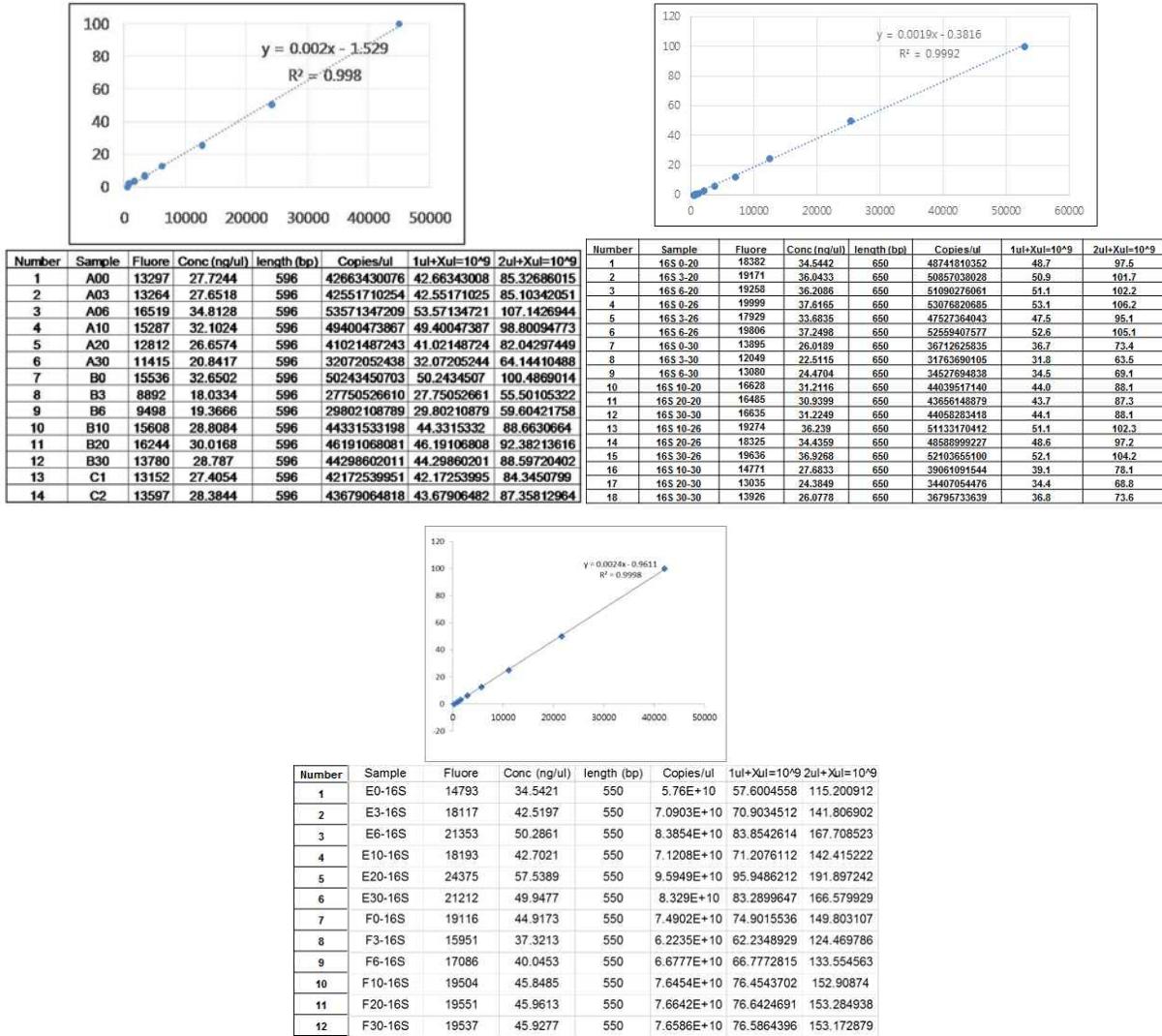


Fig. 33. Quantification and evaluation of bacterial metagenomic library

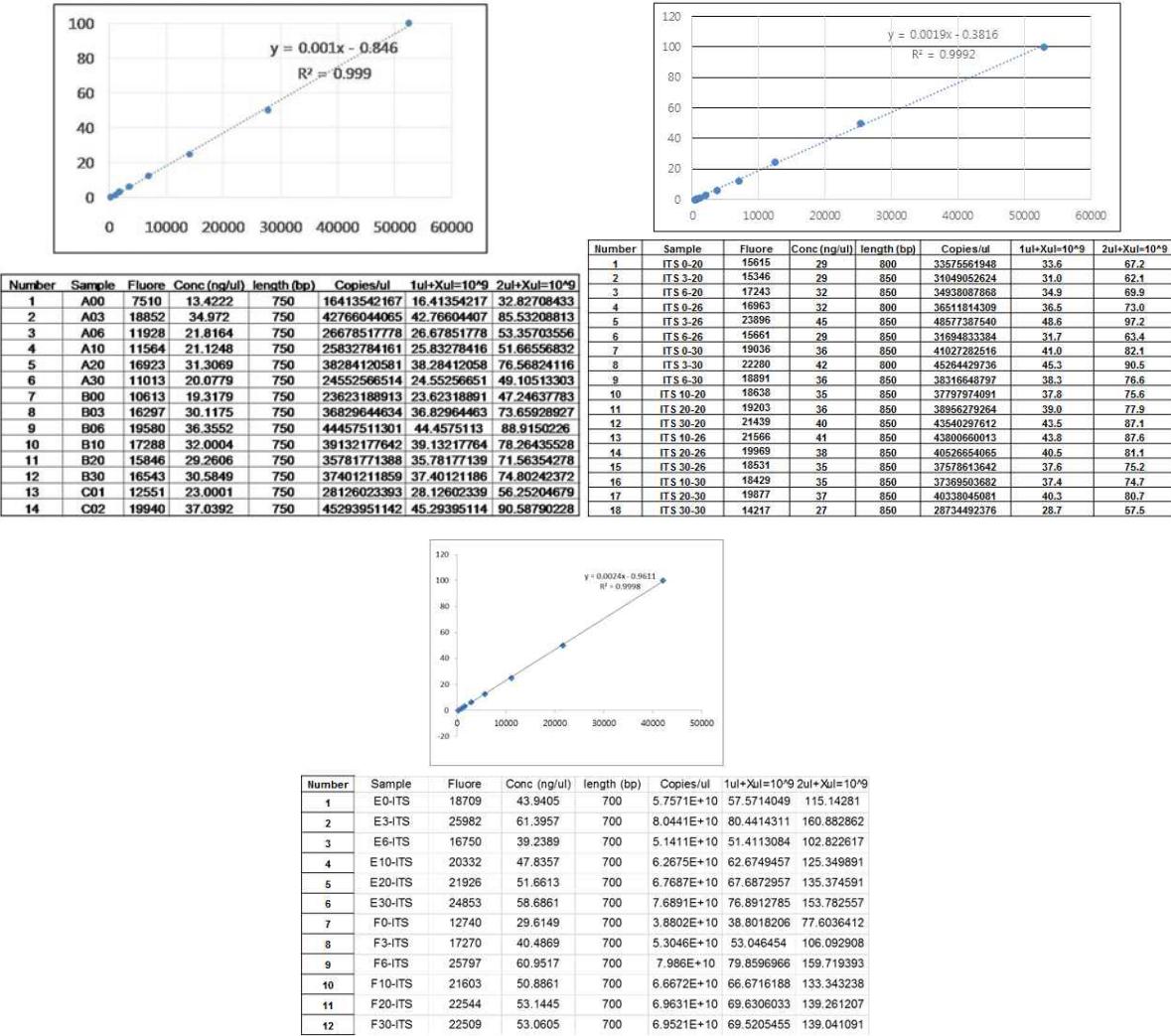


Fig. 34. Quantification and evaluation of fungal metagenomic library

곰팡이와 세균의 모두 short read를 제거 후 bioanalyzation을 수행하였고 이를 정량하고 이를 토대로 전통누룩의 meta-genome library를 제작하였다(Fig. 35). 세균과 곰팡이의 metagenome 분석에 사용한 정보들을 같이 첨부하였다(Fig. 36).

• Metagenome library Summary

Library	Sample No.	Sample name	DNA 양 (350ng/ $\mu$ l)	Cycles	비고
Bacterial library	1	A00	Suf	30	-
	2	A01	Suf	30	-
	3	A06	Suf	30	-
	4	A10	Suf	30	-
	5	A20	Suf	30	-
	6	A30	Suf	30	-
	7	B00	Suf	30	-
	8	B03	Suf	30	-
	9	B06	Suf	30	-
	10	B10	Suf	35	30 cycles에서 음성의 세기 되어 5 cycles 추가하여 채자
	11	B20	Suf	35	30 cycles에서 음성의 세기 되어 5 cycles 추가하여 채자
	12	B30	Suf	30	-
	13	C01	Suf	30	-
	14	C02	Suf	30	-
Fungal library	1	A00	Suf	35	30 cycles에서 음성의 세기 되어 5 cycles 추가하여 채자
	2	A03	Suf	35	30 cycles에서 음성의 세기 되어 5 cycles 추가하여 채자
	3	A06	Suf	30	-
	4	A10	Suf	35	30 cycles에서 음성의 세기 되어 5 cycles 추가하여 채자
	5	A20	Suf	35	30 cycles에서 음성의 세기 되어 5 cycles 추가하여 채자
	6	A30	Suf	35	30 cycles에서 음성의 세기 되어 5 cycles 추가하여 채자
	7	B00	Suf	35	Template Suf/S PCR을 때 음성의 세기 되고, test 해본 결과 Suf (M1) Lat가 음성에 더 잘됨
	8	B03	Suf	35	30 cycles에서 음성의 세기 되어 5 cycles 추가하여 채자
	9	B06	Suf	35	30 cycles에서 음성의 세기 되어 5 cycles 추가하여 채자
	10	B10	Suf	35	Template Suf/S PCR을 때 음성의 세기 되고, test 해본 결과 Suf (M1) Lat가 음성에 더 잘됨
	11	B20	Suf	35	Template Suf/S PCR을 때 음성의 세기 되고, test 해본 결과 Suf (M1) Lat가 음성에 더 잘됨
	12	B30	Suf	35	Template Suf/S PCR을 때 음성의 세기 되고, test 해본 결과 Suf (M1) Lat가 음성에 더 잘됨
	13	C01	Suf	30	-
	14	C02	Suf	30	-
Bacterial library	1	155.5-20	Suf	30	-
	2	155.5-20	Suf	30	-
	3	155.5-20	Suf	30	-
	4	155.5-20	Suf	30	-
	5	155.5-20	Suf	30	-
	6	155.5-20	Suf	30	-
	7	155.5-20	Suf	30	-
	8	155.5-20	Suf	30	-
	9	155.5-20	Suf	30	-
	10	155.5-20	Suf	30	-
	11	155.5-20	Suf	30	-
	12	155.5-20	Suf	30	-
	13	155.5-20	Suf	30	-
	14	155.5-20	Suf	30	-
	15	155.5-20	Suf	30	-
	16	155.5-20	Suf	30	-
	17	155.5-20	Suf	30	-
Fungal library	1	IT5.5-20	Suf	30	-
	2	IT5.5-20	Suf	30	-
	3	IT5.5-20	Suf	30	-
	4	IT5.5-20	Suf	30	-
	5	IT5.5-20	Suf	30	-
	6	IT5.5-20	Suf	30	-
	7	IT5.5-20	Suf	30	-
	8	IT5.5-20	Suf	30	-
	9	IT5.5-20	Suf	30	-
	10	IT5.5-20	Suf	30	-
	11	IT5.5-20	Suf	30	-
	12	IT5.5-20	Suf	30	-
	13	IT5.5-20	Suf	30	-
	14	IT5.5-20	Suf	30	-
	15	IT5.5-20	Suf	30	-
	16	IT5.5-20	Suf	30	-
	17	IT5.5-20	Suf	30	-
	18	IT5.5-20	Suf	30	-

Fig. 35. Summary of bacterial as well as fungal metagenomic libraries

Kingdom	Region	DNA database	File size (k-byte)	Release	Entries
Bacteria	16S	DDBJ	489,343	2014.03.26	452,772
Fungi	ITS	NCBI	78,857	2012.10.30	118,603
Kingdom	Region	DNA database	file size(kb)	Date	Entries
Bacteria	16S	DDBJ, Rel 100	556,860	March, 2015	520,704
Fungi	ITS	UNITE	24,076	Feb, 2015	42,305
Kingdom	Region	DNA database	file size(kb)	Date	Entries
Bacteria	16S	DDBJ, Rel 100	660,326	Mar, 2016	600,421
Fungi	ITS	UNITE	372,997	Feb, 2015	536,641

Fig. 36. Bacterial and Fungal Database details to be used for metagenomic analysis

Metagenome을 수행한 결과 다양한 세균과 곰팡이 균주를 검출하였고 이를 토대로 통계학적 분석을 수행하였다(Table. 3, 4). 세균과 곰팡이에서 모두 low quality sequence (limit=0.05)는 제외하였으며, 세균의 경우 최소 200 nucleotides 이상, 곰팡이의 경우 최소 300 nucleotides 이상을 데이터 분석에 사용하였다.

Table. 3. Statistics of bacterial and fungal metagenomic analysis in *nuruk*  
A and B

• Statistics of Metagenome Results

Sample No.	Sample name	Fungi			
		Reads	Avr. Length	No. of Species	No. of Genus
1	A00	8,241	494.0	101	53
2	A03	5,761	510.1	37	18
3	A06	7,060	515.3	46	19
4	A10	5,262	522.5	36	15
5	A20	7,714	525.1	44	19
6	A30	7,111	523.9	43	17
8	B03	5,877	489.4	18	9
9	B06	5,798	502.0	19	7
10	B10	4,161	503.1	20	10
11	B20	4,529	503.4	22	8
12	B30	3,348	504.2	16	10
13	C01	5,052	483.6	58	28
14	C02	3,875	505.3	24	12
Total		73,789	-	175 <sup>2)</sup>	77 <sup>3)</sup>
Avr.		5,676	505.1	37.2	17.3
					81.1

- 1) Species only  
2) A:137, B:116, C:64  
3) A:64, B:57, C:28

Sample No.	Sample name	Bacteria					
		Reads	A v r . Length	No. of species	No. of Genus	% of Top3	
1	A00	6,296	471.3	24	15	98	
2	A03	5,582	482.4	117	32	81	
3	A06	5,863	485.0	150	35	75	
4	A10	6,891	479.3	91	21	88	
5	A20	6,035	477.9	94	24	89	
6	A30	8,708	477.3	94	24	89	
8	B03	6,675	487.2	128	19	81	
9	B06	7,357	483.8	161	25	72	
10	B10	5,946	487.2	122	20	69	
11	B20	7,599	481.8	113	20	78	
12	B30	7,096	481.7	135	26	78	
13	C01	8,385	479.2	117	30	83	
14	C02	7,348	486.8	119	15	50	
Total		89,781	-	539	71		
Avr.		6,906	480.8	112.7	23.5	79.3	

Table. 4. Statistics of bacterial and fungal metagenomic analysis in *nuruk C, D, E and F*

Sample No.	Sample name	MID	Bacteria				Fungi				Sample No.	Sample name	Bacteria				Fungi										
			RAW	Avg.Length	Trim	Reads	RAW	Avg.Length	Trim	Reads			RAW	Avg.Length	Trim	Reads	RAW	Avg.Length	Trim	Reads							
1	C0-20	1	475.4	458.4	3,174	3,174	13	617.3	597.3	3,535	3,535			1	531.2	511.2	13,432	13,429	13	564.1	544.1	8,955	8,955				
2	C3-20	2	482.2	465.2	9,062	9,062	14	643.1	622.8	3,491	3,490			2	535.7	515.7	11,321	11,317	14	564.7	544.7	14,689	14,686				
3	C6-20	3	481.8	464.9	7,955	7,955	15	638.4	616.4	4,249	4,247			3	538.3	518.4	9,376	9,373	15	572.9	552.9	8,861	8,859				
4	C10-20	1	483.2	466.2	5,125	5,125	13	519.5	499.6	4,921	4,919	2	E3	4	563.2	516.2	11,044	11,042	16	569.1	549.1	10,435	10,429				
5	C20-20	2	481.5	464.5	5,056	5,056	14	525.1	505.2	5,543	5,539	3	E6	5	540.7	520.7	9,047	9,045	17	566.3	546.4	11,320	11,313				
6	C30-20	3	483.2	466.2	6,221	6,220	15	521.7	501.7	5,053	5,051			6	537	517	11,225	11,219	18	567.5	547.5	10,721	10,719				
7	C0-26	4	486.8	469.8	5,051	5,051	16	596.5	576.5	4,258	4,257			7	F0	530.2	510.2	9,741	9,741	19	554.8	534.8	8,434	8,430			
8	C3-26	5	484.8	467.8	8,100	8,099	17	609.7	629.7	5,072	5,068	5	E20	5	540.7	520.7	9,047	9,045	17	566.3	546.4	11,320	11,313				
9	C6-26	6	484.2	467.2	8,386	8,385	18	639.3	619.2	3,693	3,692	6	E30	6	537	517	11,225	11,219	18	567.5	547.5	10,721	10,719				
10	C10-26	4	485.7	468.7	5,101	5,101	16	520.7	500.8	5,600	5,597			7	F0	7	530.2	510.2	9,741	9,741	19	554.8	534.8	8,434	8,430		
11	C20-26	5	485.7	468.6	4,608	4,608	17	521.0	501.0	6,013	6,011	7	F3	8	533.4	513.4	10,513	10,510	20	564.4	544.4	6,914	6,914				
12	C30-26	6	487.4	470.3	5,050	5,050	18	518.1	498.0	6,105	6,104			8	F3	8	533.4	513.4	10,513	10,510	20	564.4	544.4	6,914	6,914		
13	C0-30	7	402.6	465.7	8,452	8,449	19	631.9	612.0	4,064	4,063	9	F6	9	538.1	518.1	9,509	9,504	21	567.7	547.7	8,529	8,525				
14	C3-30	8	483.2	468.1	5,133	5,133	20	648.6	628.9	3,899	3,895	10	F10	1	485.7	506.7	16,565	16,553	13	588.4	568.5	5,082	5,082				
15	C6-30	9	487.0	470.0	7,315	7,314	21	639.5	619.4	4,991	4,989			11	F20	2	485.7	505.2	15,378	15,373	14	584.5	564.5	4,780	4,780		
16	C10-30	7	409.5	472.5	5,047	5,047	19	517.3	497.4	5,736	5,732			12	F30	3	487.4	506.0	14,682	14,676	15	591	570.7	5,124	5,121		
17	C20-30	8	486.4	469.4	4,588	4,587	20	519.2	499.4	6,014	6,009			13	Total												
18	C30-30	9	488.5	471.5	4,230	4,228	21	521.0	501.0	5,612	5,610			14	141,833	141,782											
Total					107,656	107,644				87,849	87,838				Total												
Ave.					484.5	467.5	5,981	5,980		577.0	557.0	4,681	4,678		Average		525.5	513.2	11,819	11,815		571.2	551.2	8,654	8,651		

### 가. 전통누룩 A, B

전통누룩 A, B에서 세균의 경우 총 71속 539종의 균주를 검출하였고, 곰팡이에서는 총 77속 175종의 균주를 검출하였다(Fig. 37).

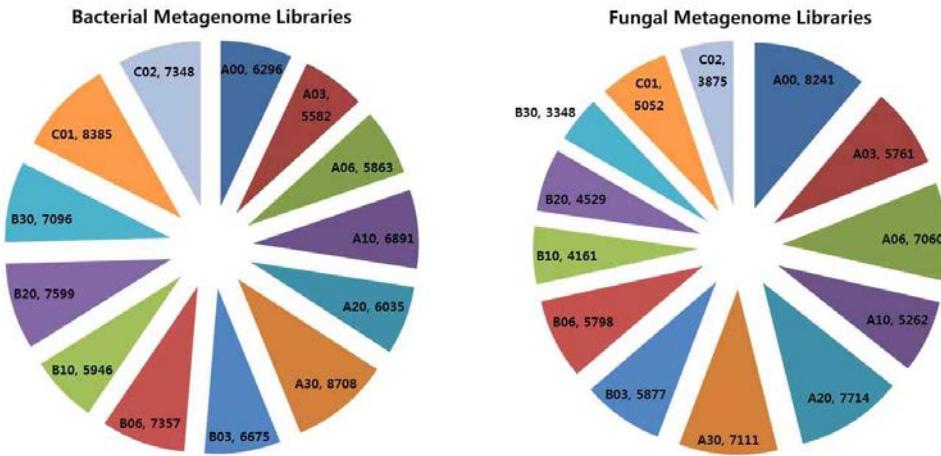


Fig. 37. Pie charts showing the distribution of reads in metagenomic libraries of bacteria and fungi

전통누룩 A, B 모두 발효 3일째 시료에서 *Halospirulina* 속이 우점하고 있으며, 세균에서 개체수는 두 가지 형태의 누룩에서 상당히 다르다. *Bacillus*와 *Saccharopolyspora* 속은 전통누룩 B에 많이 존재하고, *Staphylococcus* 속과 *Novosphingobium* 속은 전통누룩 A에 우점한다(Fig. 38).

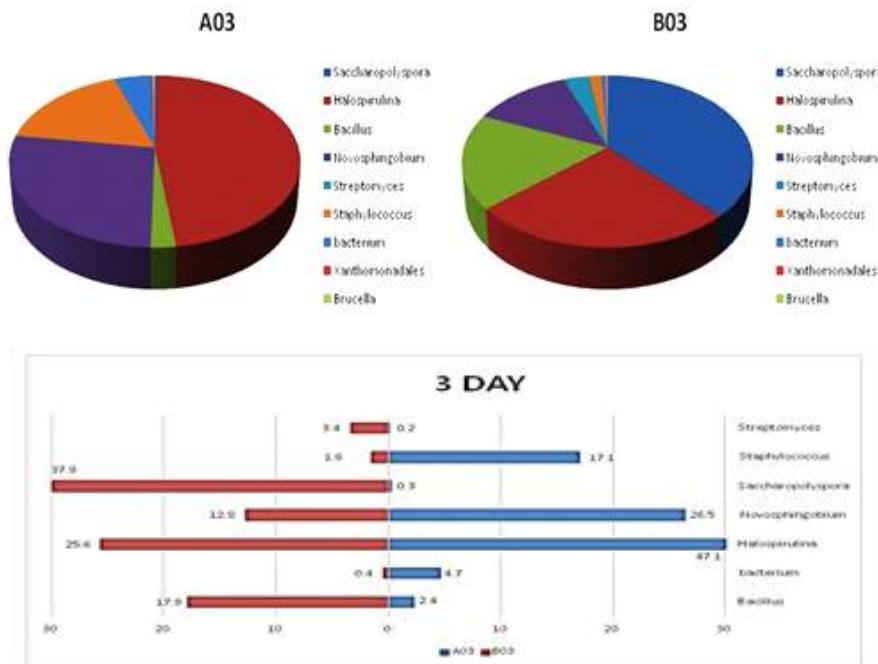


Fig. 38. Comparision of bacterial communities present in *nuruk* A and B at day3 of *nuruk* fermentation

발효 6일째의 전통누룩에서는 *Halospirulina*속이 두 종류의 누룩에서 우점하고 있으며, *Staphylococcus*와 *Novosphingobium* 속은 전통누룩 A에서, 반면에 *Saccharopolyspora*와 *Bacillus*속은 전통누룩 B에서 많이 관찰된다(Fig. 39).

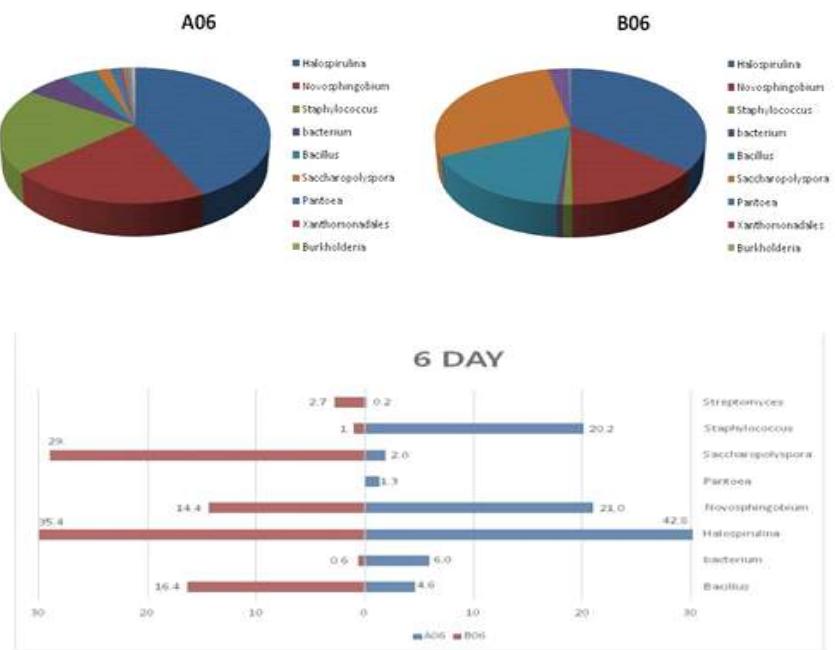


Fig. 39. Comparision of bacterial communities at genus level present in *nuruk* A and B at day6 of *nuruk* fermentation

발효 10-30일째 시료에서는 *Halospirulina* 속이 30일간의 발효기간 중 가장 많이 관찰되었으며, *Novosphingobium* 속 또한 전통누룩 A, B에서 모두 우점한다. 반면에 *Saccharopolyspora*와 *Bacillus*속은 전통누룩 B에서 많이 발견된다. 세균의 경우 누룩의 발효온도(전통누룩 A, B)에 따라 우점종이 상당한 차이를 보인다.(Fig. 40, 41, 42)

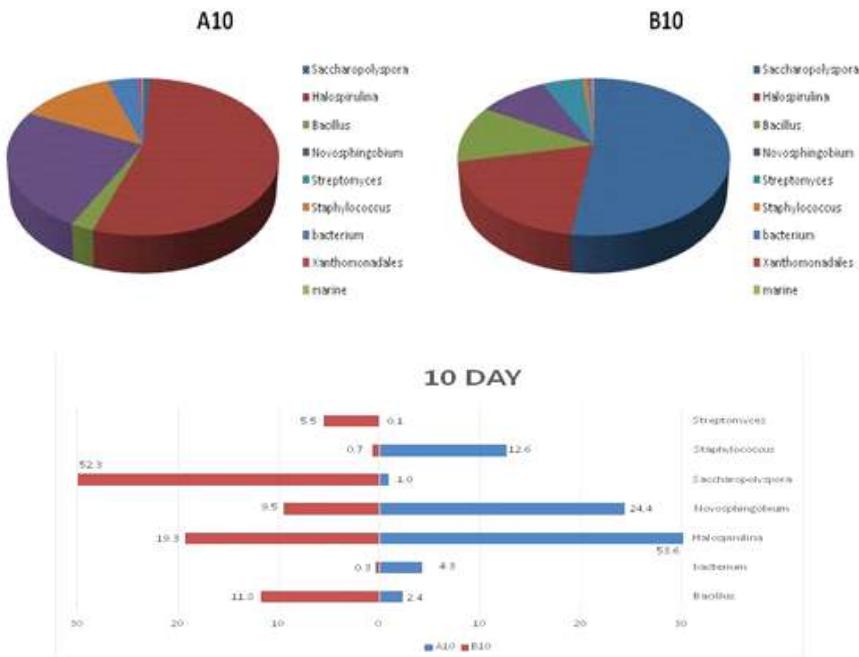


Fig. 40. Comparision of bacterial communities at genus level present in *nuruk* A and B at day10 of *nuruk* fermentation

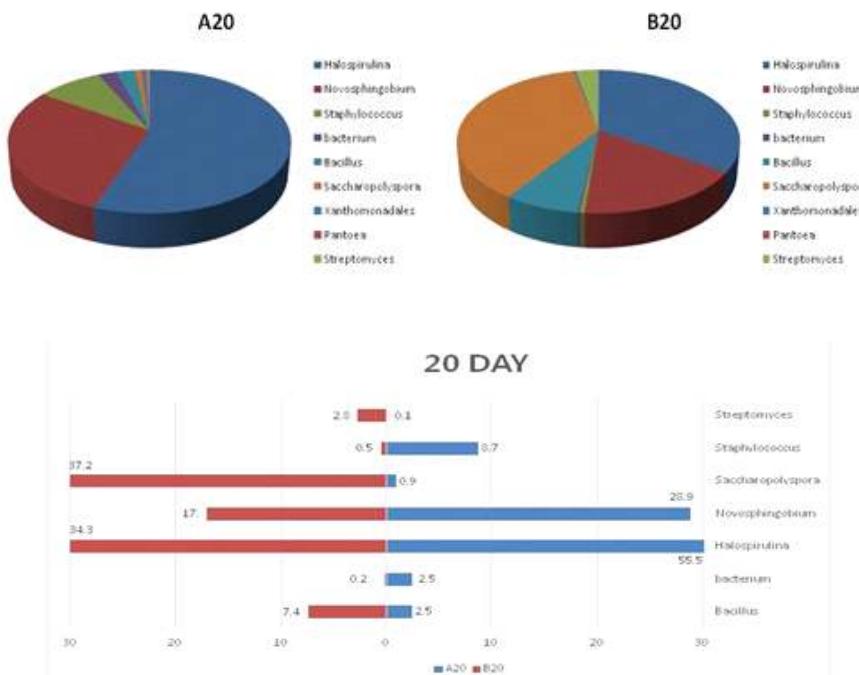


Fig. 41. Comparision of bacterial communities at genus level present in *nuruk* A and B at day20 of *nuruk* fermentation

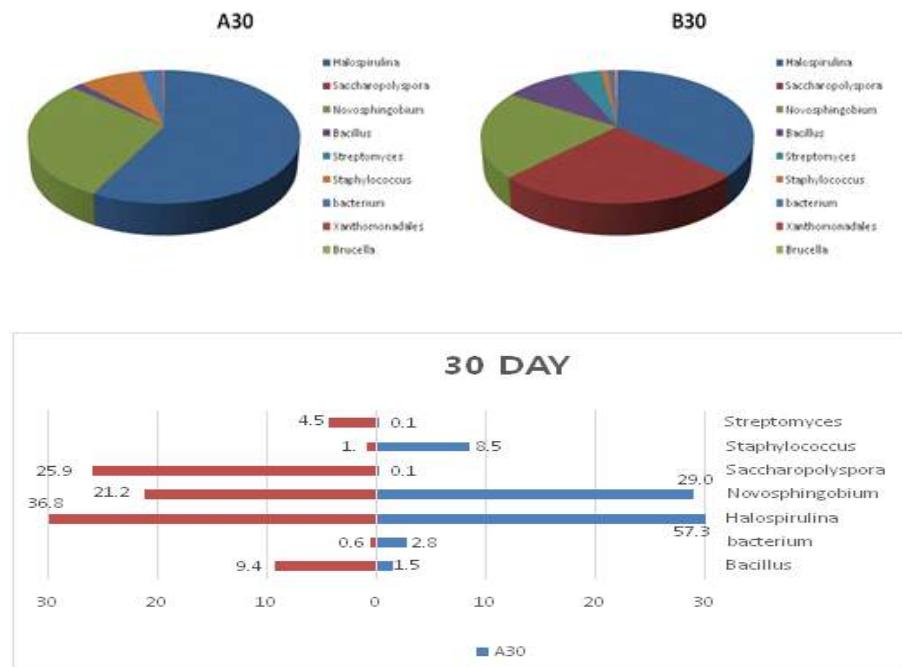


Fig. 42. Comparision of bacterial communities at genus level present in *nuruk* A and B at day30 of *nuruk* fermentation

전통누룩A, B의 발효 0-30일째의 시료는 metagenome 분석 결과 77속 175종이 검출되었다. 전통누룩 A와 시판누룩 C가, 전통누룩 B와 시판누룩 C보다 균류상에 차이가 많았다. 시판누룩 C1은 28속 58종의 균주가 존재한다. *Epicoccum*속은 발효 0일째 시료에서만 관찰되었다. 전통누룩 A에서의 속과 종의 다양성은 누룩 초기 발효가 *Aspergillus* 속에 의해 지배됨을 보여준다. *Aspergillus tritici*, *Aspergillus oryzae*, *Lichtheimia corymbifera*와 *Aspergillus candidus*는 발효시간 별 모든 시료에 존재한다. *Aspergillus flavus*는 발표 3일째 시료에서 검출이 되었지만, 발효기간 동안 서서히 감소한다. 전통누룩 B에서는 초기 발효가 *Rhizomucor*속에 의해 결정되는 양상을 보였다. *Rhizomucor pusillus*는 전통누룩 B의 우점종이며, 뒤이어 *Lichtheimia corymbifera*와 *Thermoascus crustaceus*등도 발효기간 동안 모든 시료에 존재한다.

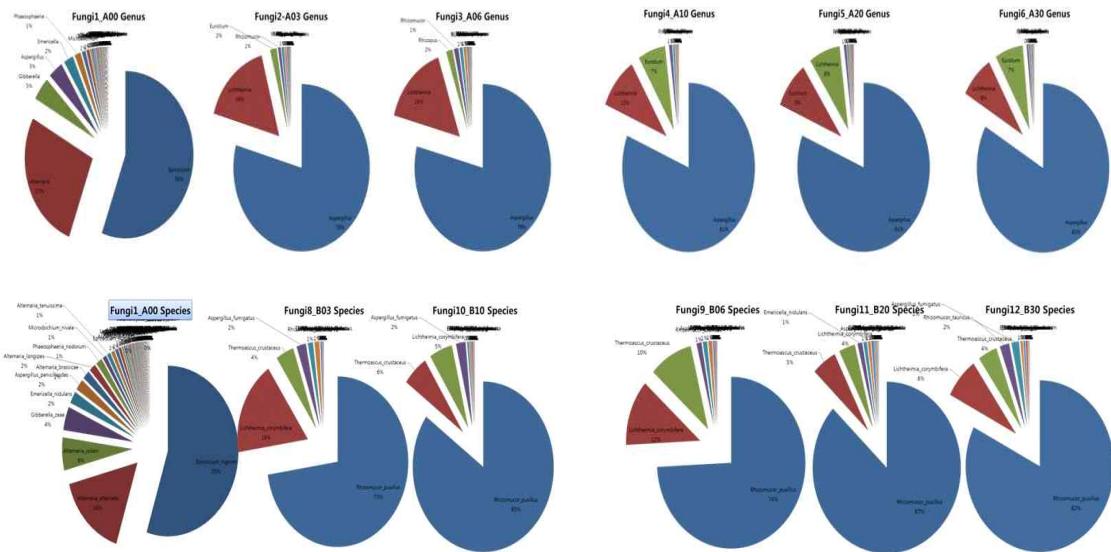


Fig. 43. Mycofloral community diversity (in terms of genus and species) in *nuruk A* at different time-points of *nuruk* fermentation

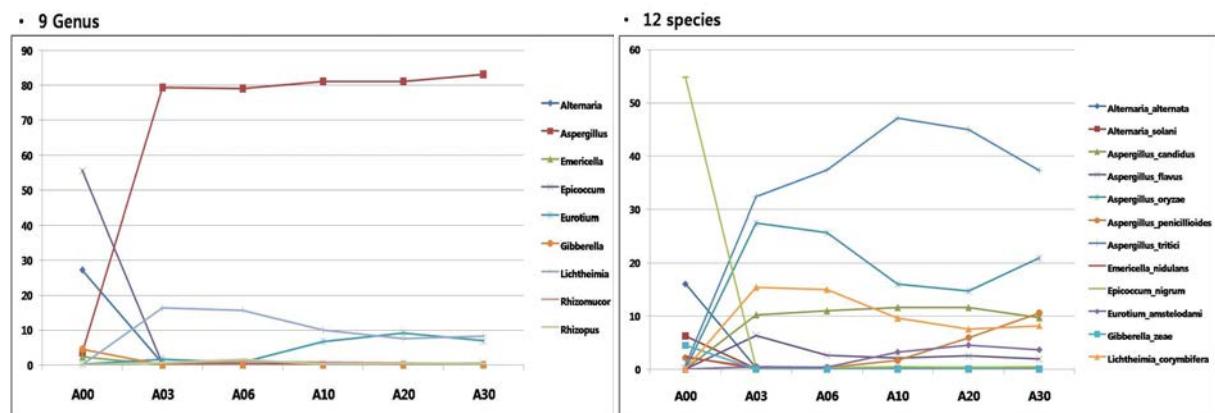


Fig. 44. Distribution of genus and species in *nuruk A* at different time points of *nuruk* fermentation

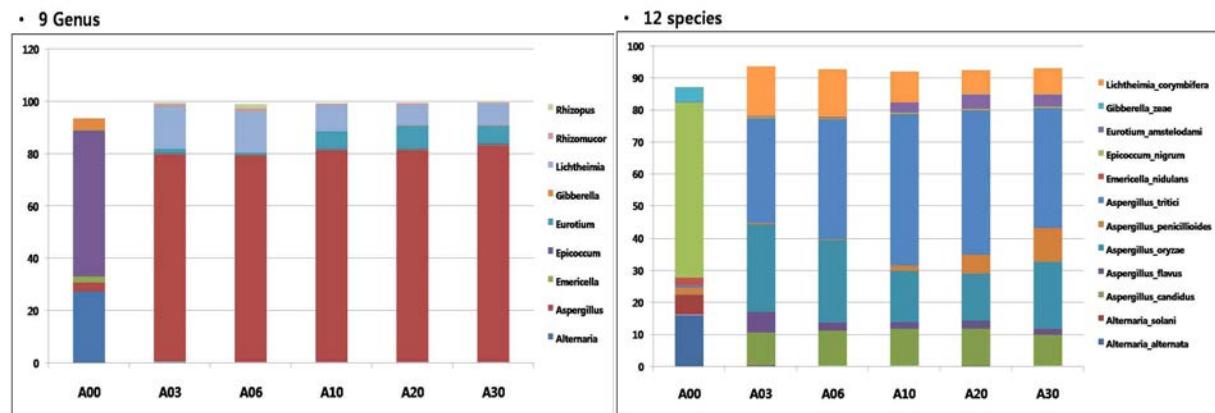


Fig. 45. Mycofloral community dynamics (in term of genus and species) in *nuruk A* at different time points of *nuruk* fermentation

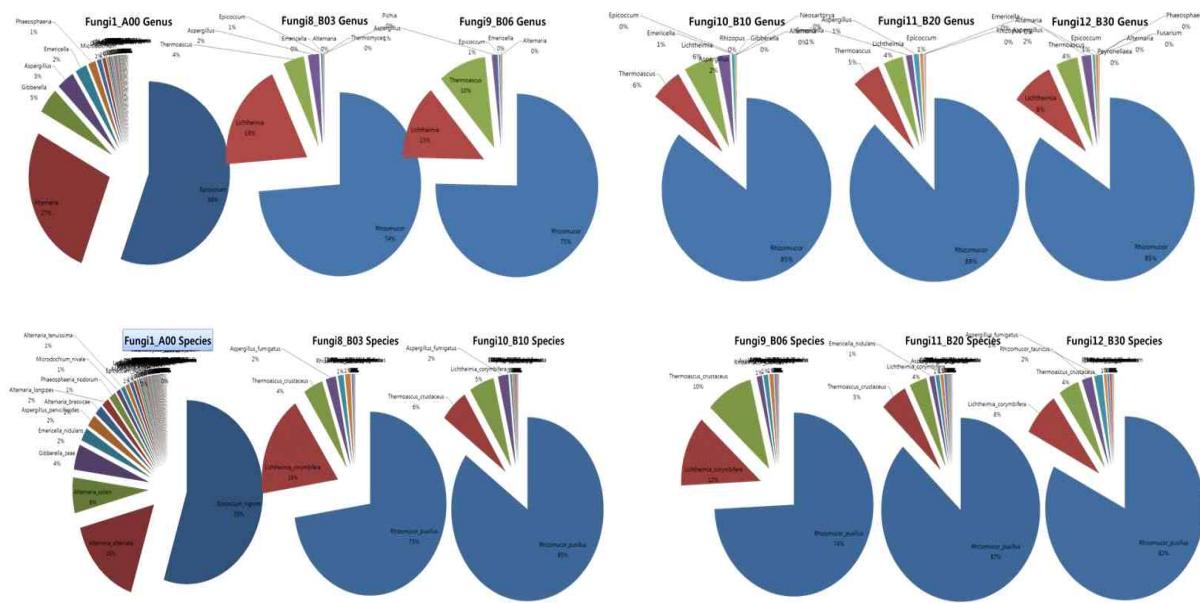


Fig. 46. Mycofloral community diversity (in terms of genus and species) in *nuruk B* at different time-points of *nuruk* fermentation

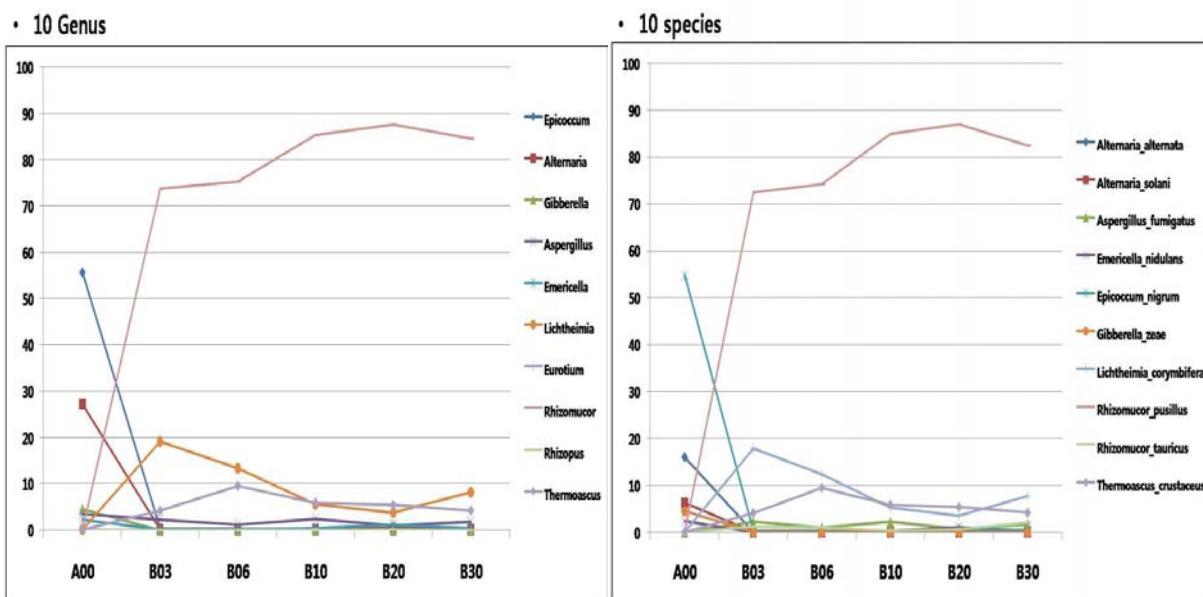


Fig. 47. Distribution of genus and species in *nuruk B* at different time points of *nuruk* fermentation

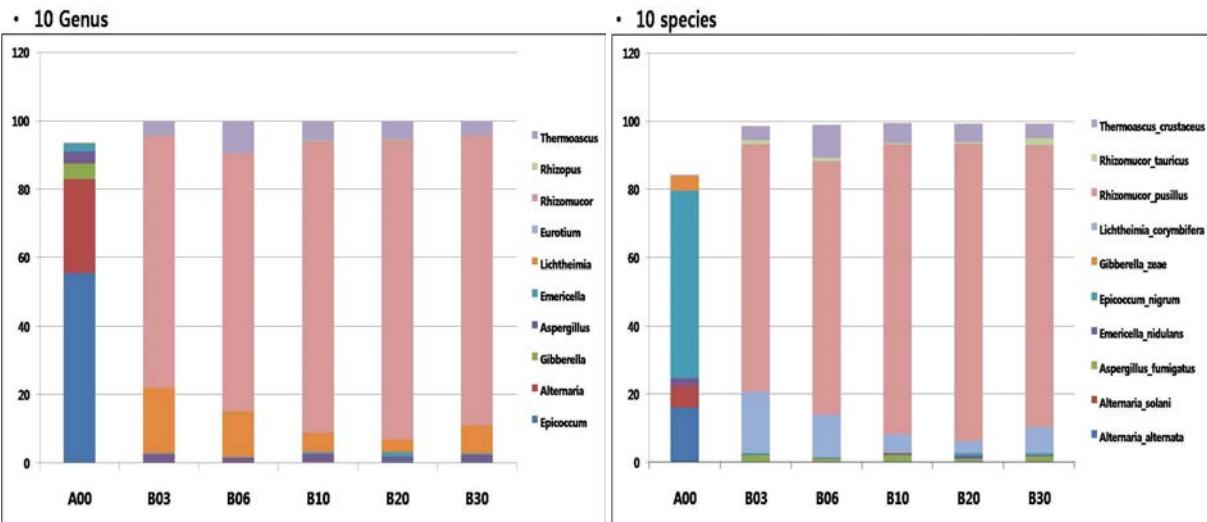


Fig. 48. Community dynamics (in terms of genus and species) in *nuruk B* at different time points of *nuruk* fermentation

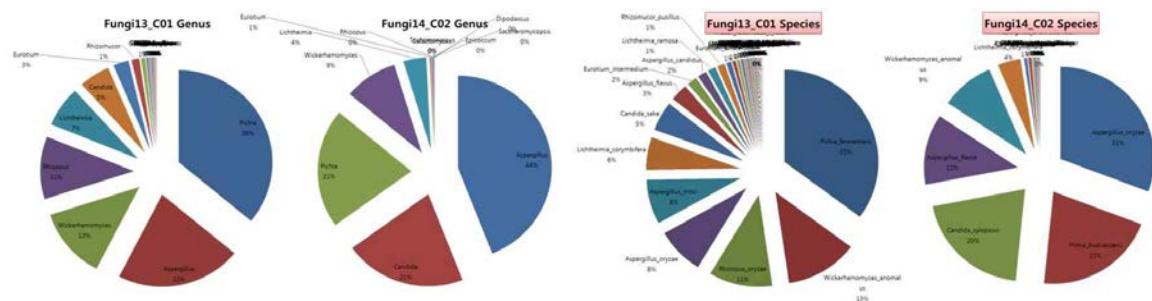


Fig. 49. Mycofloral community diversity in commercially available *nuruk C1* and *C2*

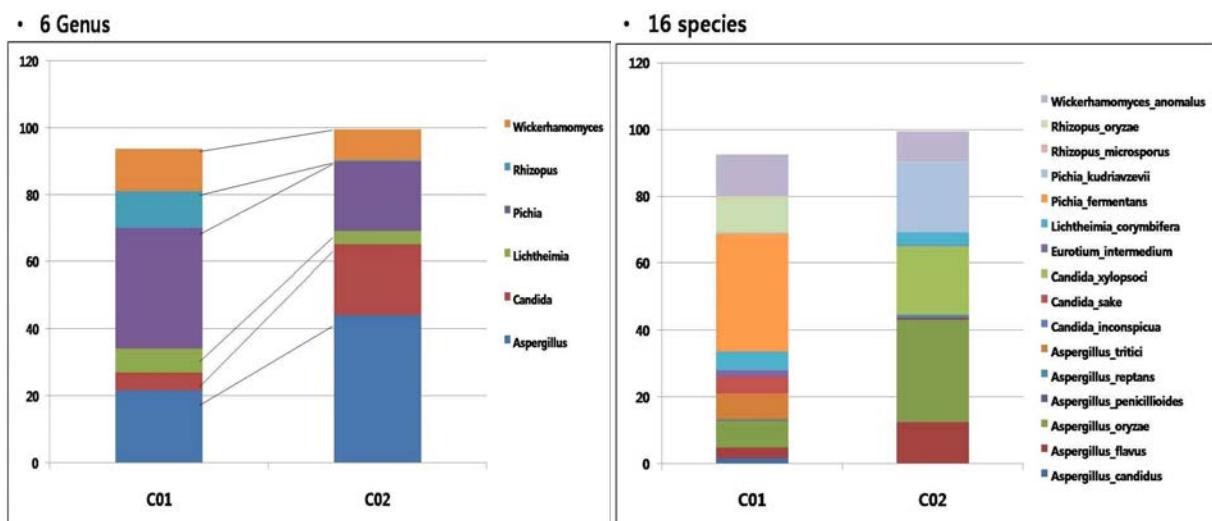


Fig. 50. Community dynamics (in terms of genus and species) in *nuruk C1* and *C2*

#### 나. 전통누룩 C, D

세균과 곰팡이 모두 NGS low data를 통해 각 균주들의 풍부도(Fig. 51, 54), 종다양성(Fig. 52, 55), 관련성(Fig. 53, 56)에 대한 통계학적 분석을 수행하였다. 통계학적 분석에서 풍부도의 경우 완만한 곡선을 이룰수록 신뢰도가 높으며, PCoA 작성을 통해 그룹이 둘이는 것을 관찰하여 통계적인 관련성을 파악할 수 있다. 세균의 경우 전통누룩 C type에서 가수비율, 발효날짜 조건별로 종 풍부도가 좋다는 것을 확인할 수 있었고, 종 역시 다양하게 분포하고 있음을 확인할 수 있었다. 또한 모든 누룩시료에서 *Cyanobacteria* 문과 *Proteobacteria* 문이 우점하고 있음을 확인 할 수 있다. 하지만 세균집단에서 특별하게 cluster를 이루는 그룹은 없었다. 다만 C3-30, C0-26, C3-20가 조금 더 긴밀하게 연관되어 있다는 것을 관찰하였다.

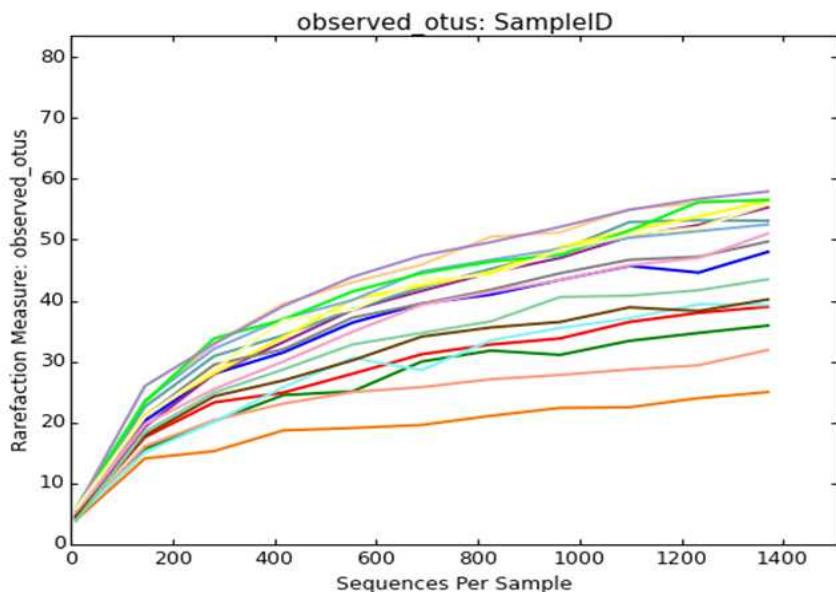


Fig. 51. Rarefaction curves showing bacterial species richness in *nuruk C* under different fermentation conditions

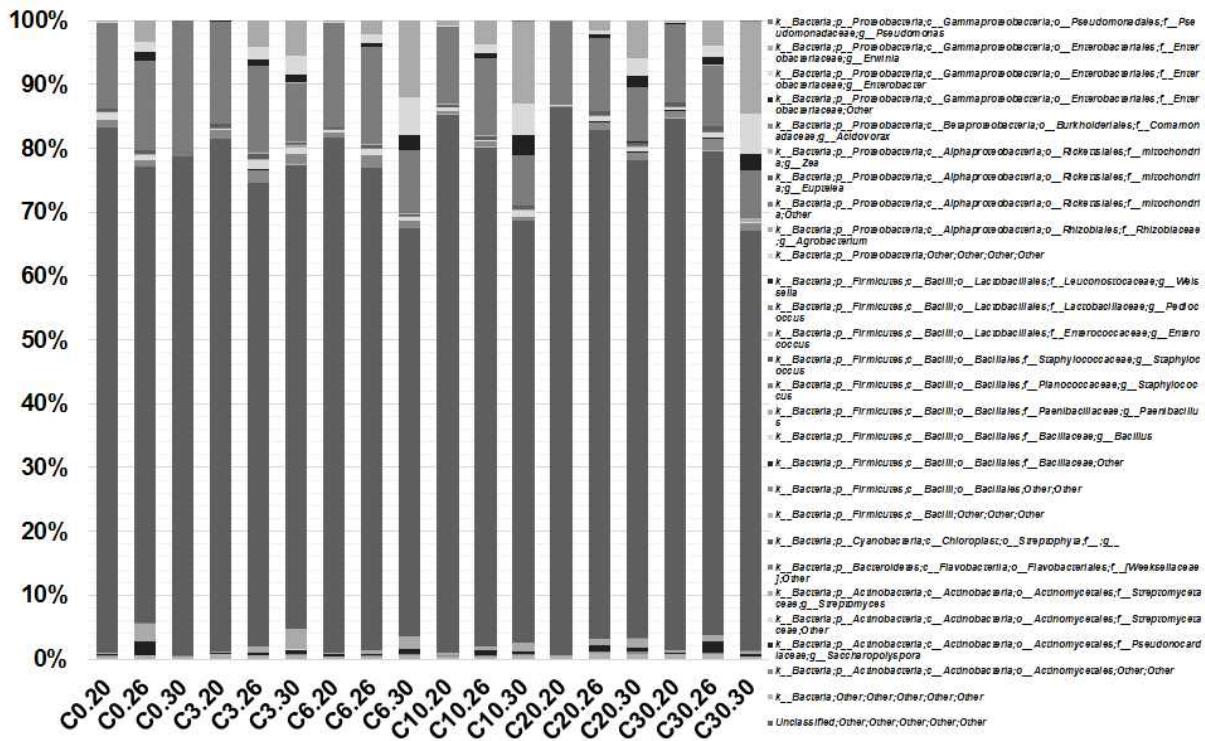


Fig. 52. Bar graphs showing species wise variations as determined from the 16S sequences derived from the metagenome of *nuruk* consisting of varying moisture content on the 3<sup>rd</sup>, 6<sup>th</sup>, 10<sup>th</sup>, 20<sup>th</sup> and 30<sup>th</sup> day of *nuruk* fermentation

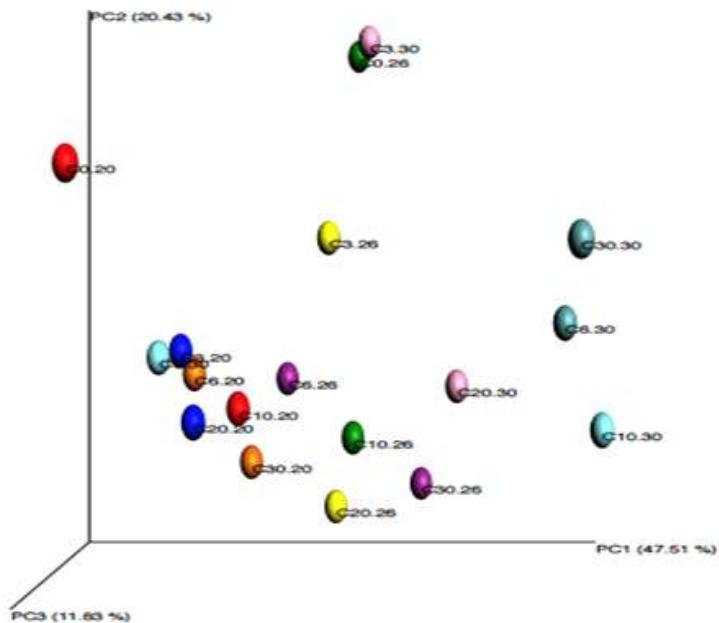


Fig. 53. PCoA plots based on unweighted UniFrac distance matrices. These plots show the putative structural similarities between bacterial communities within *nuruk* C having varied moisture content as well as varied fermentation time.

곰팡이의 경우도 종종부도가 신뢰성을 지닌 형태로 나타났고, 다양한 종들이 발견되었다. 그 중에 *Aspergillus flavus*는 발효날짜별로 3일과 6일에는 우점하고 있으나 발효가 진행되어 감에 따라 10일~30일에 현격히 감소하고, *Aspergillus candidus* 또한 6일~30일 사이의 시료에서 가수비율이 20%~30%로 증가함에 따라 감소하는 경향을 보인다. *Saccharomyctales sp.*는 10일~30일 사이의 시료에서 가수량이 20%~30%로 증가함에 따라 증가하는 패턴을 보인다. 특이한 것은 *Lichthemia corymbifera* 종이 발효날짜 10일 이후에 갑자기 2배 가까이 증가하는 것이다(Fig. 55). 또 한가지 특이한 것은 C3, C6, C10, C20, C30의 시료가 가수비율에 상관없이 그룹이 지어지는데, 이는 가수비율은 미생물 천이에 큰 영향을 끼치지 못하고 다만 발효기간이 늘어남에 따라 균류 집단이 서로 연관된 종끼리 모이게 되는 것을 의미한다(Fig. 56). 추가적으로 각 시료에서 metagenome 분석을 통해 얻은 결과를 정리해 보았다.(Table. 5)

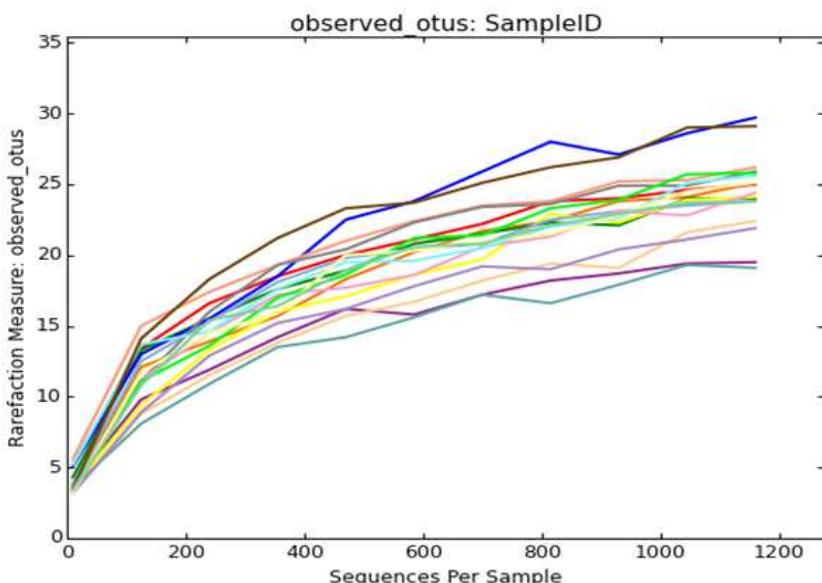


Fig. 54. Rarefaction curves showing mycofloral species richness in *nuruk C* under different fermentation conditions

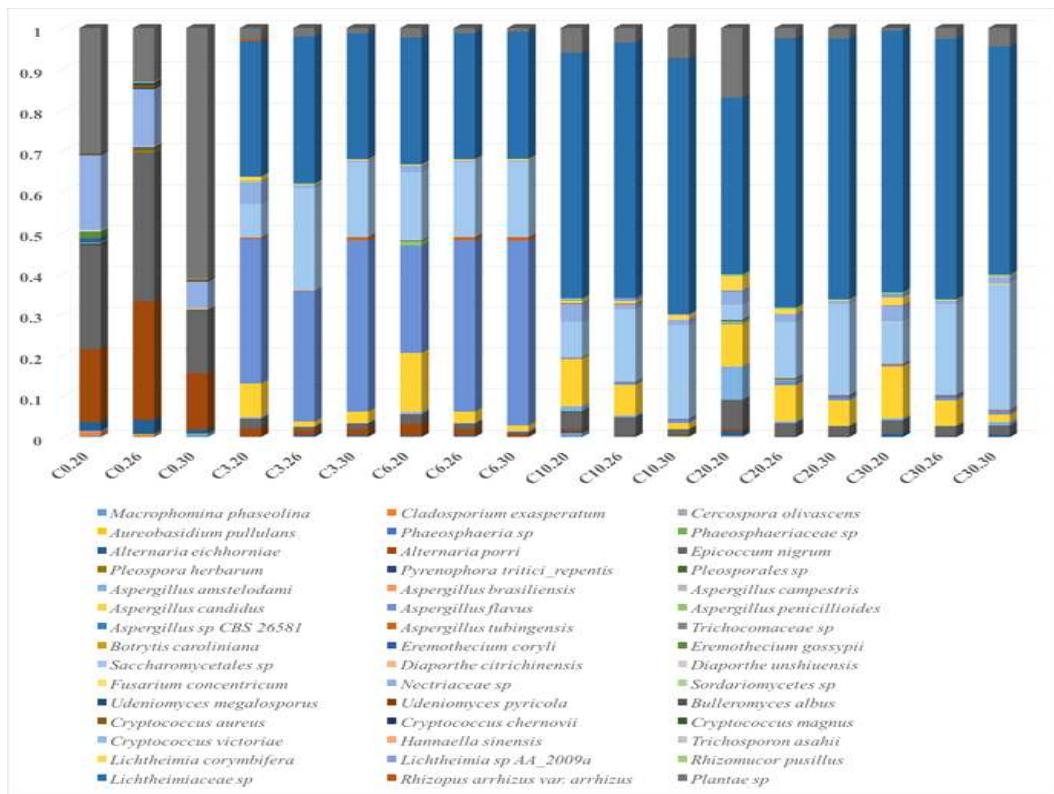


Fig. 55. Bar graphs showing species wise variations as determined from the ITS sequences derived from the metagenome of *nuruk* consisting of varying moisture content on the 3<sup>rd</sup>, 6<sup>th</sup>, 10<sup>th</sup>, 20<sup>th</sup> and 30<sup>th</sup> day of *nuruk* fermentation

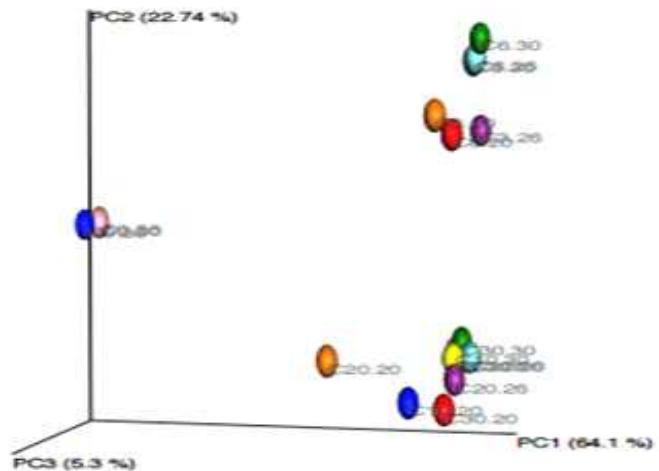


Fig. 56. PCoA plots based on unweighted UniFrac distance matrices. These plots show the putative structural similarities between mycofloral communities within C having varied moisture content as well as varied fermentation time.

Table 5. Table describing the total number of characterized 16S and ITS sequences of the different *nuruks* at genus and species level.

	16S	ITS	
	No. of genus	No. of genus	No.of species
C0-20	12	17	18
C0-26	20	22	18
C0-30	8	17	22
C3-20	17	15	21
C3-26	21	12	22
C3-30	24	15	27
C6-20	21	13	16
C6-26	24	15	22
C6-30	24	11	22
C10-20	18	18	17
C10-26	22	11	18
C10-30	20	15	20
C20-20	18	18	21
C20-26	18	11	17
C20-30	23	13	22
C30-20	17	13	20
C30-26	23	13	17
C30-30	22	10	16

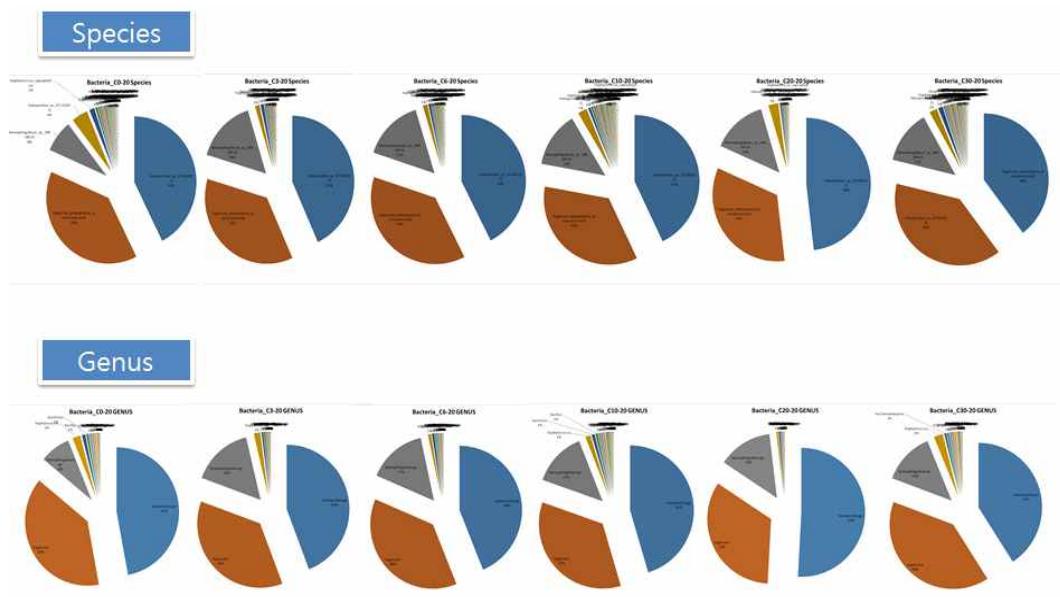


Fig. 57. Bacterial community diversity (in terms of genus and species) in *nuruk* C consisting of 20% moisture content at different time-points of nuruk fermentation

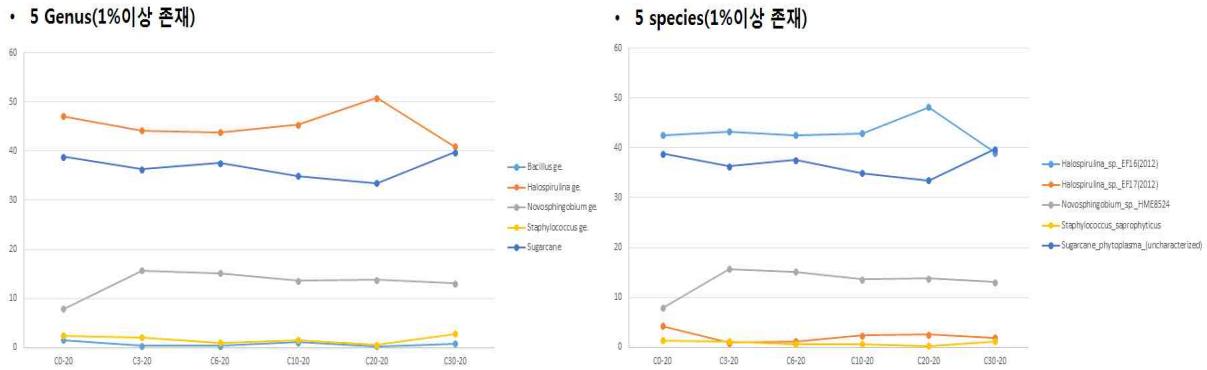


Fig. 58. Distribution of major bacterial communities at genus and species level in *nuruk C* consisting of 20% moisture content fermentation at different time points of *nuruk* fermentation.

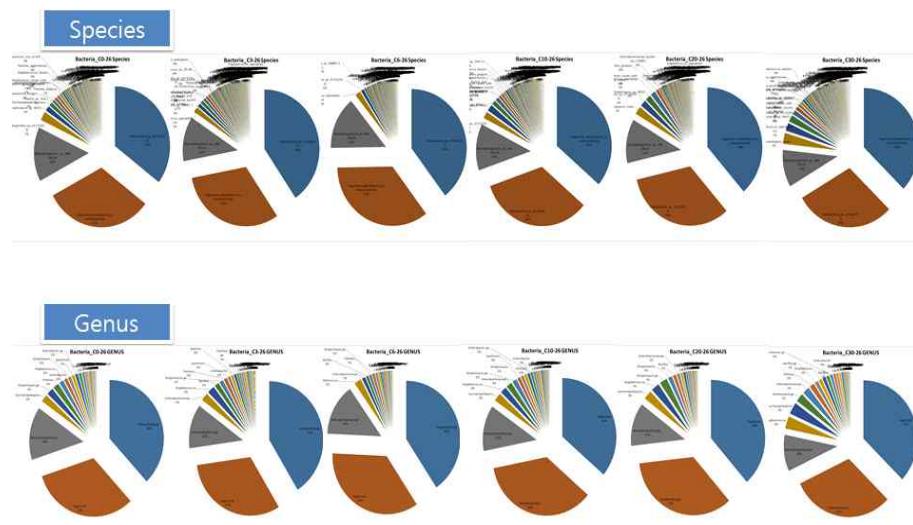


Fig. 59. Mycofloral community diversity (in terms of genus and species) in *nuruk C* consisting of 26% moisture content at different time-points of *nuruk* fermentation.

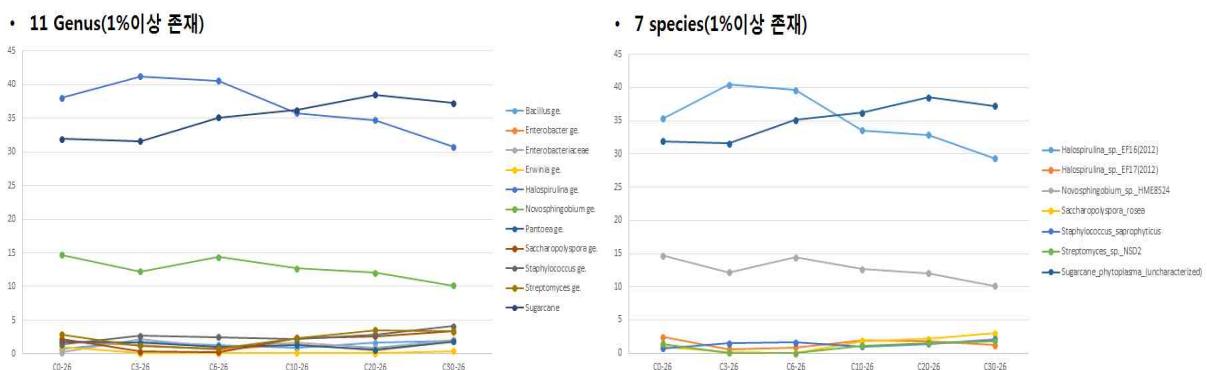


Fig. 60. Distribution of major mycofloral communities at genus and species level in *nuruk C* consisting of 26% moisture content fermentation at different time points of *nuruk* fermentation.

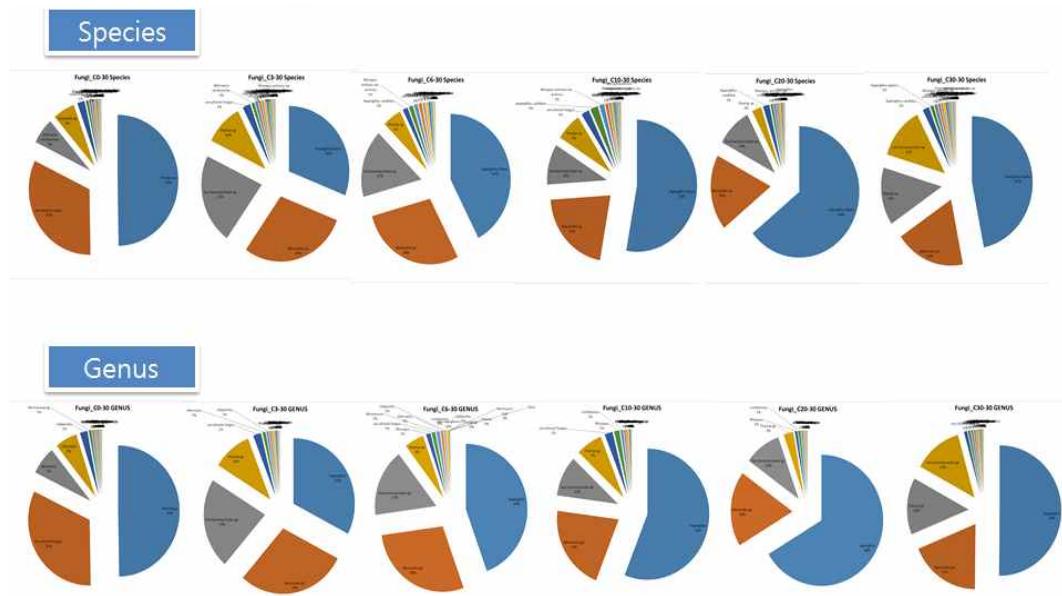


Fig. 61. Mycofloral community diversity (in terms of genus and species) in *nuruk* C consisting of 30% moisture content at different time-points of *nuruk* fermentation.

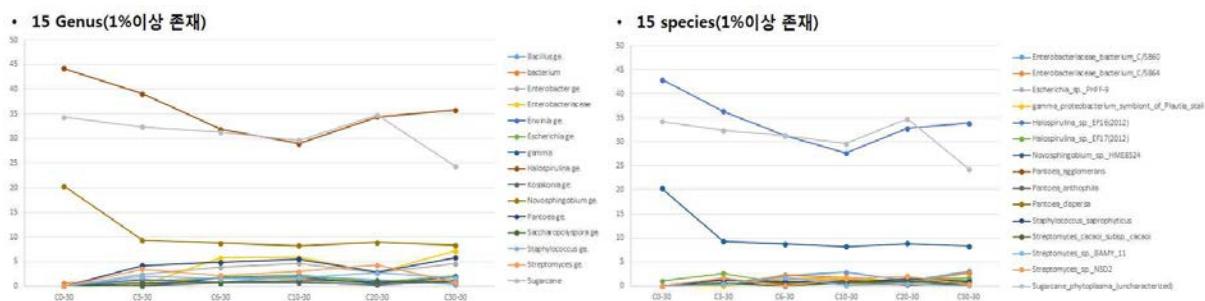


Fig. 62. Distribution of major mycofloral communities at genus and species level in *nuruk* C consisting of 30% moisture content fermentation at different time points of *nuruk* fermentation.

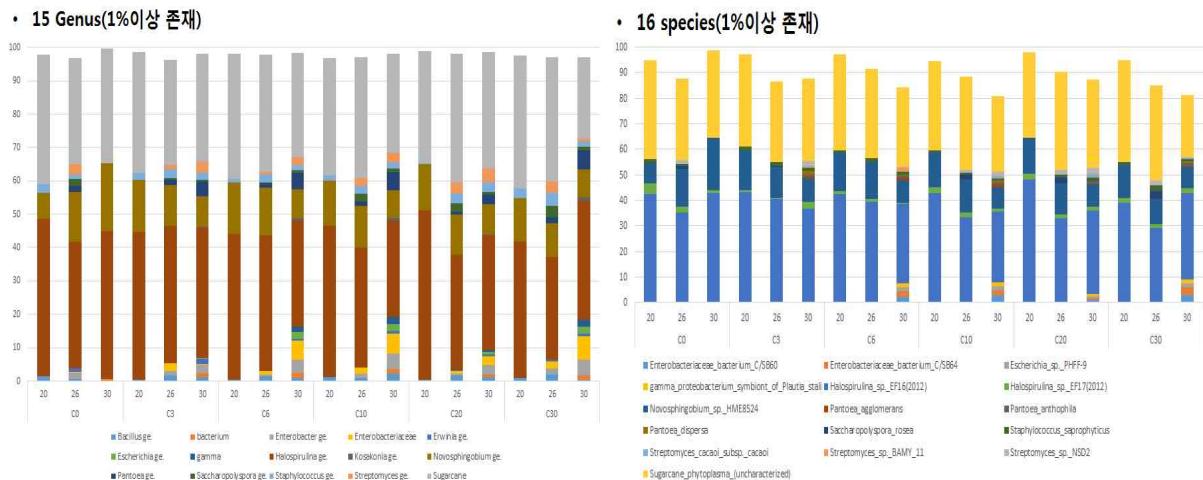


Fig. 63. Bar graph showing bacterial community dynamics (in term of prominent genus and speceis in *nuruk* C at different moisture content as well as different time points of *nuruk* fermentation.

*L. corymbifera*를 주형으로 사용한 ITS와 함께 pGEMT vector를 이용하여 standard curve(Fig. 64)를 작성하고, qPCR을 수행한 결과는 현재 전체적인 균주 분포 패턴은 비슷하지만 정확한 유전자 수를 얻지 못하였다(Fig. 65). 여러 gene specific primer를 사용한 실험이 동시에 진행되어야 하며, 이를 통해 정확한 유전자 수 계측이 가능할 것으로 보인다.

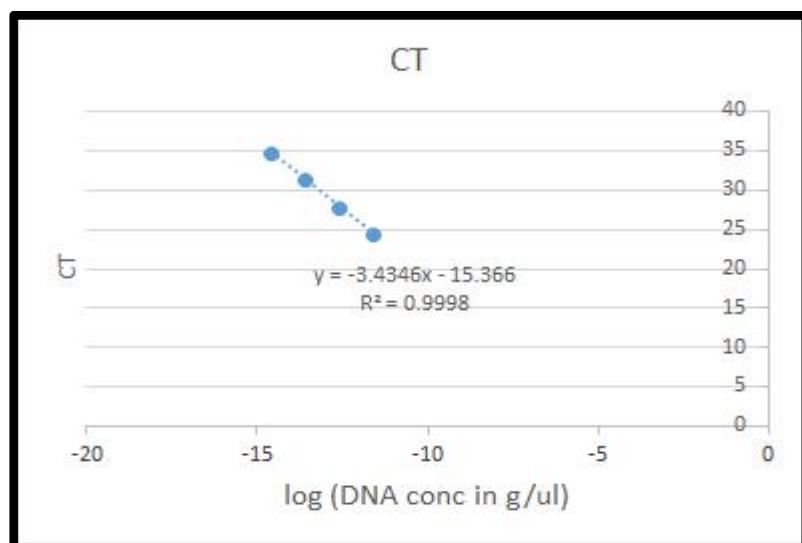


Fig. 64. Standard curve for absolute quantification of gene copy number.

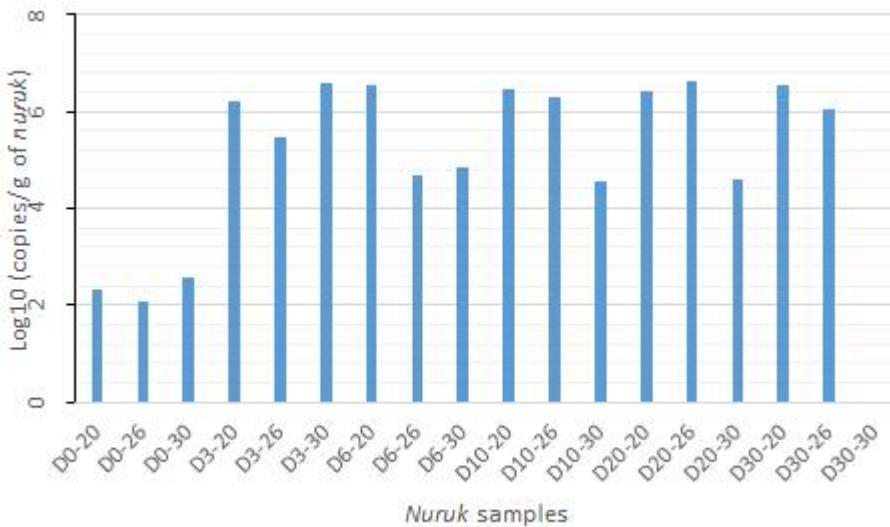


Fig. 65. Bar graphs showing the estimated  $\log_{10}$ (copies/ g of *nuruk*) of *L. corymbifera* as estimated from the CT value and standard curve.

#### 다. 전통누룩 E, F

전통누룩 E와 F에서도 많은 세균과 곰팡이를 분리 할 수 있었다. 세균의 경우 전통누룩 E에서 초기 발효 10일 까지는 굉장히 많이 서식하였지만 그 이후에 30일까지 발효가 진행되면서 부터는 그 수가 점점 감소하였다. 하지만 그에 비해 전통누룩 F에서는 반대로 초기 발효 10일까지는 낮은 수의 세균이 존재 하였지만, 그 이후 30일까지 발효가 진행되면서 부터는 점점 그 수가 증가하였다. 즉, 발효시에 외부의 습도 뿐 아니라 온도의 변화에 의해서도 세균의 종류와 그 수가 달라진다는 것을 의미한다. *Halospirulina* 속의 경우 전통누룩 E와 F 모두에서 우점하고 있는 것을 알아낼 수 있으며, *Bacillus* 속 또한 전통누룩 E와 F 모두에서 상당수 존재하는 것을 볼 수 있다 (Fig. 66, 67).

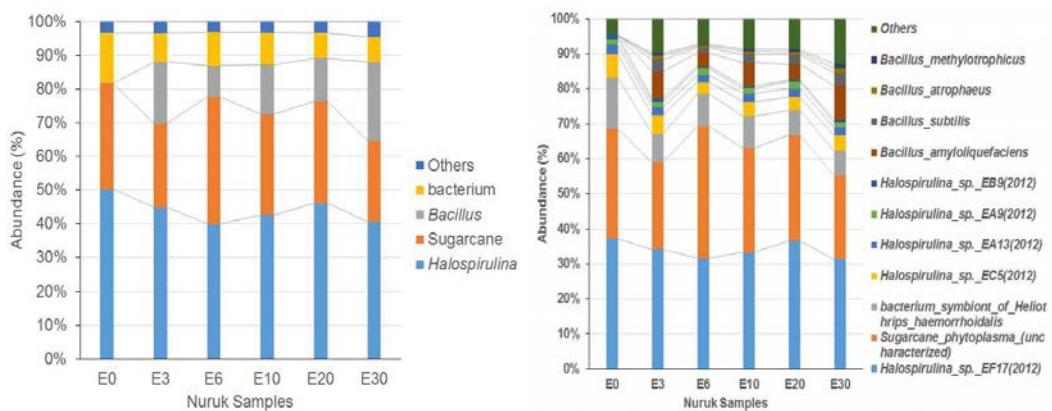


Fig. 66. Bar graphs showing genus and species wise variations as determined from the 16S sequences derived from the metagenome of *nuruk* E on the 0, 3rd, 6th, 10th, 20th and 30th day of *nuruk* fermentation

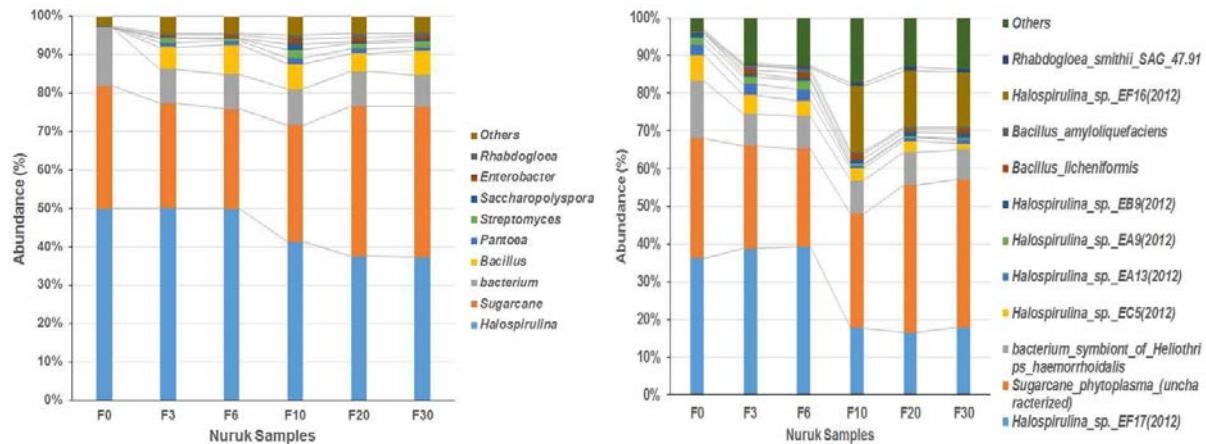


Fig. 67. Figure: Bar graphs showing genus and species wise variations as determined from the 16S sequences derived from the metagenome of *nuruk* F on the 0, 3rd, 6th, 10th, 20th and 30th day of *nuruk* fermentation

전통누룩 E와 F를 30일동안 발효 시켰을 때 곰팡이균주는 평균적으로 전통누룩 F보다는 전통누룩 E에서 더 많이 나타난 것을 볼 수 있었다. 이는 세균 뿐만이 아니라 곰팡이도 외부습도뿐만 아니라 온도의 변화에 의해서 곰팡이의 종류와 숫자 모두 변한라고 말할 수 있겠다.. 발효를 시작한지 6일이 지났을 때에는 *Saccharomyces fibuligera* 가 우점종으로 나타났다. 또한 *Saccharomyces* 속이 전통누룩 E, F 두 곳 모두에서 우점하고 있는데 비해, *Aspergillus* 속은 전통누룩 E(Fig. 69), *Rhizopus* 속은 전통누룩 F(Fig. 70)에서 주로 존재하는 것을 알 수 있었다. 전통누룩 E에서 습도 70% 조건에서 발효 시킬 시에는 *Aspergillus* 속이, 습도를 50%로 낮추었을 때는 *Saccharomyces* 속이 우점 하고 있지만 발효 기간이 지날수록 *Saccharomyces* 속의 수는 점점 감소하는데 비해 *Aspergillus* 속의 수는 점점 증가함을 볼 수 있다(Fig. 69).

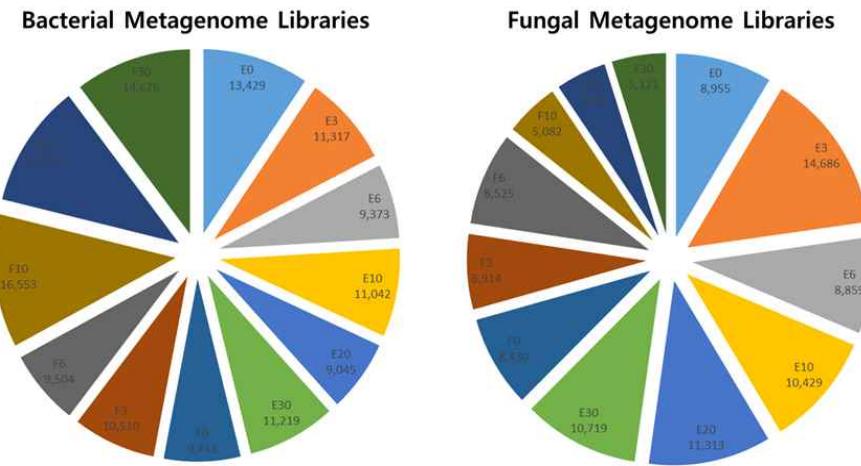


Fig. 68. Pie charts showing the distribution of reads in metagenomic libraries of bacteria and fungi

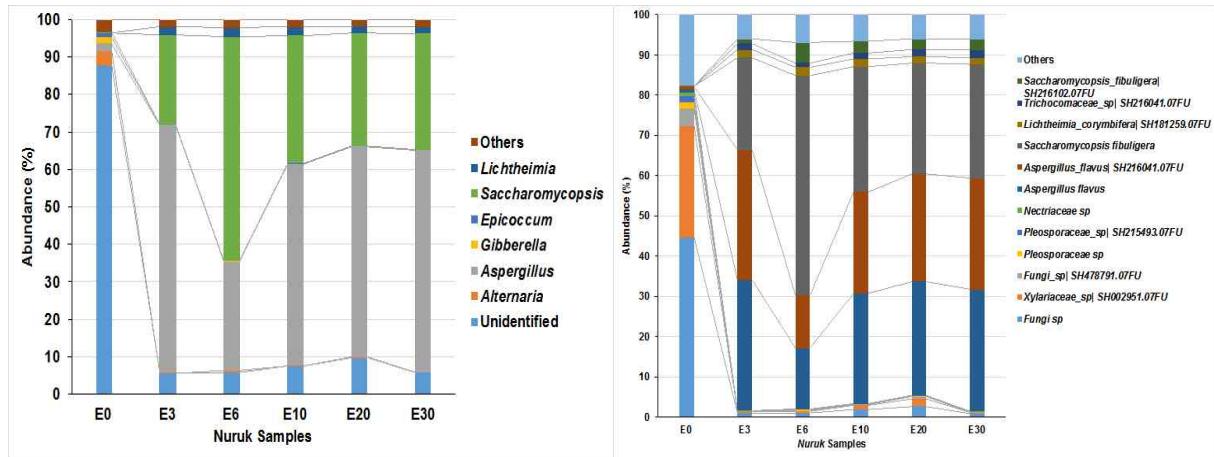


Fig. 69. Bar graphs showing species and species wise variations as determined from the ITS sequences derived from the metagenome of *nuruk E* on the 0, 3rd, 6th, 10th, 20th and 30th day of *nuruk* fermentation

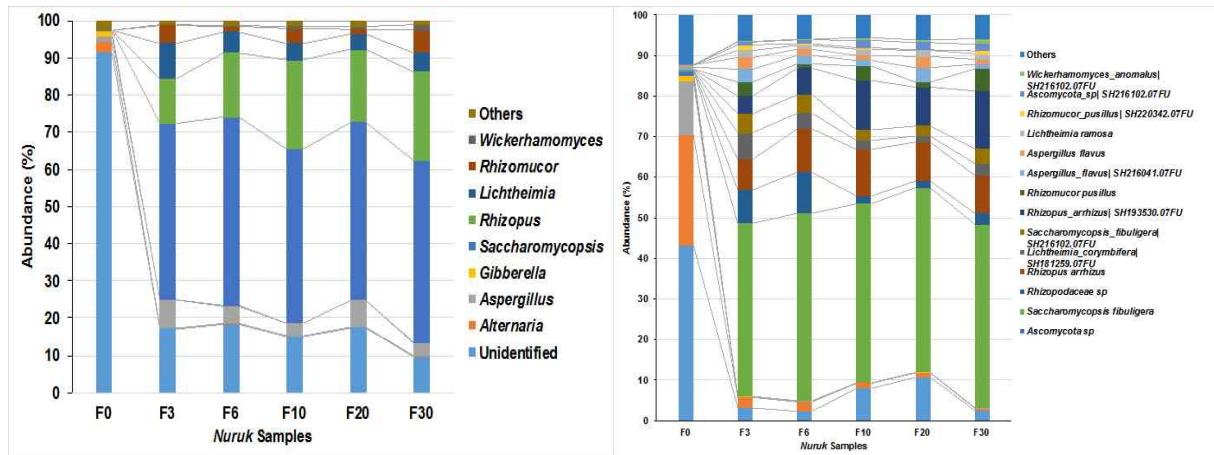


Fig. 70. Bar graphs showing genus and species wise variations as determined from the ITS sequences derived from the metagenome of *nuruk F* on the 0, 3rd, 6th, 10th, 20th and 30th day of *nuruk* fermentation

<제2세부과제 : 전통누룩 발효중 미생물 대사체 구명(전북대학교, 김범태)>

## 1. 재료 및 방법

### 1) 전통누룩 발효시간대별 시료로부터 대사물질 분리 방법 최적화

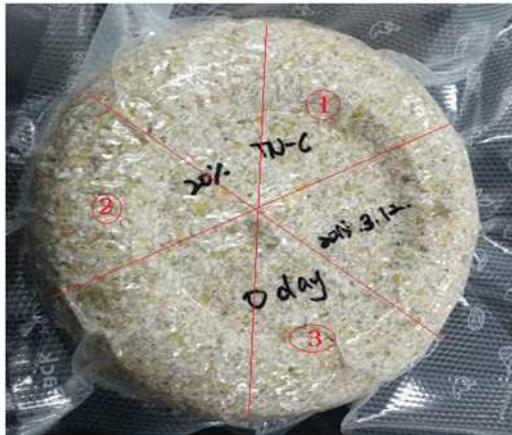
#### (1) 시험 원료

- 본 연구에 사용한 시료는 제 1협동 과제에서 제공한 시료로서 누룩제조에 사용된 원료 물질 및 가수량(20, 26, 30%), 시료위 발효 온도에 따라서 연차별로 제조하여 사용하였다.
- 1년차에는 TN-A, TN-B 및 두 개의 시판 누룩 (산성누룩(부산), 송학누룩(광주)), 2년 차에는 원료 물질 조성에 따른 TN-C(보리:녹두:통밀=3.3:0.52:3.3), TN-D(보리:녹두 =3.3:0.52)와 각 시료의 함수율을 20, 26, 30%로 제조한 6개 누룩 시료, 3년차에는 원료 물질을 보리:녹두(-3.3:0.52)로 하고 가수량을 26%로 한 시료 두 개를 각기 다른 발효온도에서 발효한 누룩시료 TN-E, F를 실험에 사용함, 연차별 사용한 누룩의 원료물질, 가수량, 발효 조건을 Table 1에 나타내었다.
- 각각의 시료는 발효 날짜 별로(0, 3, 6, 10, 10, 30일) 수집하여 얻은 6개의 시료를 분석에 사용하였다.

Table 1. 분석에 사용한 누룩 시료 및 발효조건

연구년도	시료 번호	원료물질	가수량(%)	발효 온도
1차년도	TN-A			36 °C
	TN-B			45 °C
2차년도	TN-C1	보리:녹두:통밀=3.3:0.52:3.3	20	36 °C
	TN-C2		26	
	TN-C3		30	
	TN-D1	보리:녹두=3.3:0.52	20	
	TN-D2		26	
	TN-D3		30	
3차년도	발효조건	습도 70%		
	TN-E	보리:녹두=3.3:0.52	26	30 °C
	TN-F	보리:녹두=3.3:0.52	26	40 °C
	발효조건	습도 70% -> 50% (4일자 변경)		

- 2, 3년차 누룩 시료의 분석 부위는 각각의 누룩 시료에서 표면 (surface part), 내부 (inner part), 전 부위 (whole mass)의 세 가지 부위를 정하고, 또 각 부위별로 세 가지 다른 위치를 선정하여 시료를 채취하여 분석하였다. (Fig 1)



내부 (inner part)



(a) 분쇄 전 누룩 시료, 절단 위치

(b)

누룩 시료 중 시료 선택 부위

**Fig 1. 누룩시료의 분석 위치 선정**

### (2) GC/MS 분석을 위한 시료의 전처리

시료의 분말화를 위하여 분쇄기 사용하였으며, 시료 분말로부터 대사물질을 추출하였다. 시료 100 mg을 80 % ethanol 수용액 1 mL에 녹여 ultrasonicator (Qsonica sonicators. Q500. USA: 본 과제 연구비 지원으로 구입)로 20 kHz power로 30분간 추출하였으며, 5000 rpm에서 10분간 원심분리하고, 상등액 200  $\mu$ L를 취하여 건조하였다 (Speed Vacuum Concentrator : 본 과제 연구비 지원으로 구입). 이후 High vacuum desicator에서 24시간동안 건조하여 잔류 solvent, 수분들을 모두 제거하였다. (Fig 2)

### (3) 건조된 시료의 화학적 변형을 통한 유도체 합성

각각의 시료는 두 개의 순차적인 화학반응, 즉 oximation, silylation을 in situ로 진행하여 유도체를 합성하였다. 즉, 완전히 건조시킨 누룩 시료 추출물에 MeONH<sub>2</sub> · HCl(10 mg/pyridine 1 mL) 50 $\mu$ L을 넣고 30°C에서 90분간 반응하였다. 반응 혼합물에 N-methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide-1%trimethylchlorosilane(50  $\mu$ L)을 첨가하고 37°C에서 30분간 반응하여 얻은 혼합물을 0.45 $\mu$ m PTFE filter로 거른 용액을 GC-MS 분석에 사용하였다. (Fig 3)

## 2) 전통누룩 발효시간대별 대사물질의 GC-MS 실험 수행

### (1) GC/MS 실험 조건의 확립

GC/MS 실험 분석은 전북대학교 환경자원분석인증센터에 의뢰하여 수행하였다. 1년차 누룩 시료 TN-A, B, 108개와 1년차 시료 중 전 부위(whole mass) 시료 57개의 GC/MS를 재측정 하였으며, 2년차에는 TN-C, D, 324 개, 3년차에는 TN-E, F, 108 개의 GC/MS 측정하여 data를 분석하여 대사물질을 확인하였다.

The ground sample (100 mg) was extracted with 1 mL of 80 % methanol using an ultrasonicator (20 kHz) for 30 min



Centrifuged at 5,000 rpm for 10 min



Supernatant (200  $\mu$ L) was dried with a Speed Vacuum concentrator for 12 h, and further dried in high-vacuum desiccator for 24h.

Ultrasonicator : Qsonica sonicators. Q500. USA

Speed Vacuum concentrator : Scan Speed 40 (with Teflon). Korea

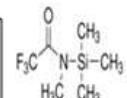
Fig 2. Sample preparation of Nuruk

• Oximation Dried extract + MeONH<sub>2</sub>·HCl (10 mg/pyridine 1mL)

30°C, 90 min

• Silylation Resulting products

Addition of Trimethylchlorosilane aids in the derivatization of amides, secondary amines and hindered hydroxy groups.



*N*-methyl-*N*-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide-1%trimethylchlorosilane(50 $\mu$ L)  
37°C, 30 min

Final derivatives for GC/MS analysis

→ Determination of reliable metabolites produced during nuruk fermentation

: organic acids, amino acids, sugars, sugar alcohols, fatty acids

Fig 3. In-situ chemical derivatization of Nuruk samples

## (2) GC/MS data 확보 및 결과 분석

물질 구조의 확인은 GC/MS data 상에서 유의하게 나타나는 신호 (peak)들을 모두 분석하고 이를 Wiley library와 비교하여 대사물질을 결정하였다.

## 2. 실험 결과

### 1) 전통누룩 시료 유도체의 GC-MS 실험 수행

#### (1) GC/MS 실험 조건의 확립

○ GC-MS data의 일관성을 유지하기 위하여 GC의 일부 분리 조건, 즉 column의 온도와 flow time을 변경하여 최적의 분리 조건을 확립하고자 하였다. GC 분석 조건 중 일부 조건을 변경하여 측정하였다. GC/MS 조건으로 Inlet temperature를 260°C, Column start temperature를 60°C로 조정하였다. Inject volume은 1μl이고, 내부 온도를 60°C로 시작하여 최대 300°C가 되도록 점점 올려준다. 총 run time은 52min이다. 이를 통하여 시료 peak들의 resolution (retention time 일관성 및 peak 간의 간섭 등)의 일관성을 향상된 것을 확인하였다. Table. 2에서 분석 조건을 나타내었다. 주의해야 할 점은 sample 전처리 단계가 끝난 후에 가급적 빨리 GC/MS 측정하여야 한다. 시료 전처리 후 24h정도가 지나면 sample 하단에 당으로 추정되는 물질들이 결정이 생성되어 GC/MS 측정이 불가능하거나 data에 심각한 오류를 가져올 수 있다는 사실을 확인하였다.

Table. 2. GC/MS 분석 조건

Analysis Conditions	
library :	wiley
injection volume :	1 μl
injection type :	split (10:1)
MS mode :	EI scan mode
Mass :	Low 50 High 1000
MS source :	230
MS Quad :	150
inlet temp. :	260 °C
Aux temp. :	280 °C
Column temp. :	<b>100 °C for 2 min. &gt;&gt;&gt; 60 °C for 2 min.</b>
	then 5 °C/min to 300 °C for 10 min (total run time : 52 min)

## 2) GC/MS data 확보 및 분석

확보한 시료 TN-A~F의 전 부위 (whole mass, 발효 20일차)에 대한 GC/MS profiles를 Fig 3에 나타내었다. 각 Peak들을 Standard sample들을 이용하여 그 유도체 구조로 확인하였다. (Table 3) 유도체들을 Organic acid, Amino acid, Sugar, Sugar alcohol, Fatty acid로 분류하였으며, 측정한 Sample의 각 peak마다 area값을 구하여 분석하였다. area 값을 입력하여 막대그래프 작성 및 동향분석을 통하여 누룩데이터베이스 구축을 시도하였다.

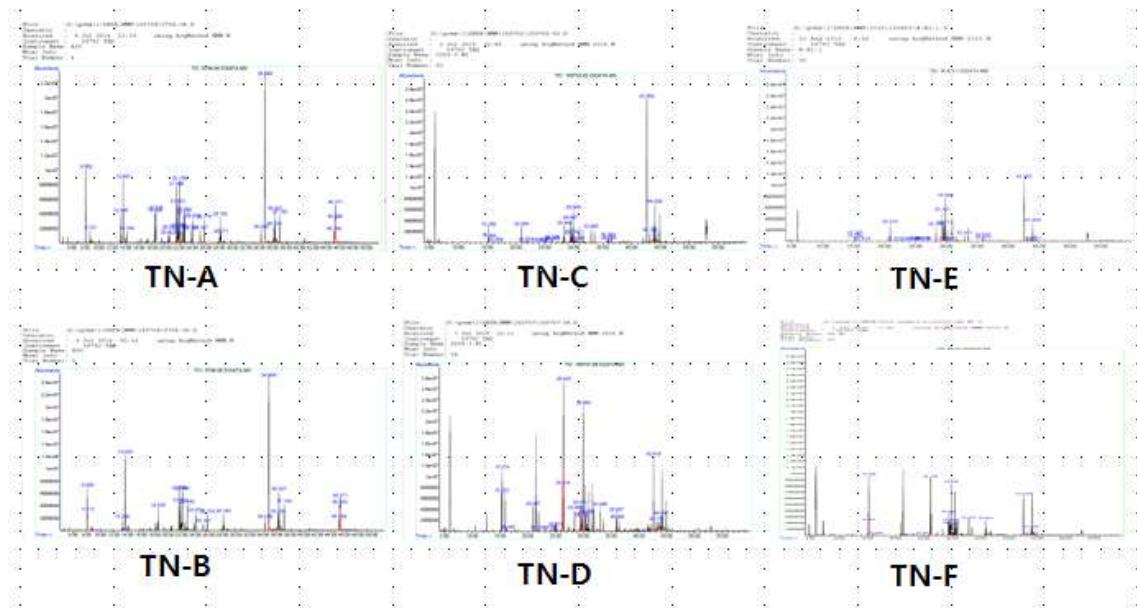


Fig 3. 시료 TN-A~F의 전 부위 (whole mass, 발효 20일차)에 대한 GC/MS profiles

1. Phosphoric acid(TMS)<sub>3</sub>
2. Succinic acid(TMS)<sub>2</sub>
3. Malic acid(TMS)<sub>3</sub>
4. Citric acid(TMS)<sub>4</sub>
5. Glutamine(TMS)<sub>4</sub>
6. Aspartic acid(TMS)<sub>3</sub>
7. Glutamic acid(TMS)<sub>3</sub>
8. Xylose(MeOX(TMS)<sub>4</sub>)
9. Fructose(MeOX(TMS)<sub>5</sub>)
10. Galactose(MeOX(TMS)<sub>5</sub>)
11. Glucose(MeOX(TMS)<sub>5</sub>)
12. Sucrose(TMS)<sub>8</sub>
13. Lactose(TMS)<sub>3</sub>
14. Maltose(TMS)<sub>3</sub>
15. Glycerol(TMS)<sub>3</sub>
16. Aravitol(TMS)<sub>5</sub>
17. Xylitol(TMS)<sub>5</sub>
18. Mannitol(TMS)<sub>6</sub>
19. Palmitic acid(TMS)
20. Linoleic acid(TMS)
21. Oleic acid(TMS)

Table 3. GC/MS 분석을 통한 발효시간대별 대사산물의 확인

시료번호	RT <sup>a</sup>	MW	Metabolites	Derivatization <sup>b</sup>	ID <sup>c</sup>
<b>Organic acids</b>					
1	15.200	314	Phosphoric acid	(TMS) <sub>3</sub>	MS
2	162416	262	Succinic acid	(TMS) <sub>2</sub>	MS
3	20.916	350	Malic acid	(TMS) <sub>3</sub>	MS
4	-	480	Citric acid	(TMS) <sub>4</sub>	MS
<b>Amino acids</b>					
5	-	256	Glutamine	(TMS) <sub>3</sub>	MS
6	-	349	Aspartic acid	(TMS) <sub>3</sub>	MS
7	-	363	Glutamic acid	(TMS) <sub>3</sub>	MS
<b>Sugars</b>					
8	24.909	467	Xylose	MeOX / (TMS) <sub>4</sub>	MS
9	29.351	570	Fructose	MeOX / (TMS) <sub>5</sub>	MS
10	29.711	570	Galactose	MeOX / (TMS) <sub>5</sub>	MS

11	29.866	570	Glucose	(TMS) <sub>5</sub>	MS
12	42.582	919	Sucrose	(TMS) <sub>8</sub>	MS
13	43.959	919	Lactose	(TMS) <sub>8</sub>	MS
14	44.031	919	Maltose	(TMS) <sub>8</sub>	MS
			<b>Sugar Alcohols</b>		
15	15.244	308	Glycerol	(TMS) <sub>3</sub>	MS
16	26.230	513	Arabitol	(TMS) <sub>5</sub>	MS
17	26.136	513	Xylitol	(TMS) <sub>5</sub>	MS
18	29.964	615	Mannitol	(TMS) <sub>6</sub>	MS
			<b>Fatty acids</b>		
19	32.911	328	Palmitic acid	(TMS)	MS
20	35.870	356	Linoleic acid	(TMS)	MS
21	35.973	354	Oleic acid	(TMS)	MS

a : Retention time.  
b : MeOX, Methylloxime. TMS, trimethylsilyl.  
c : MS, mass spectrum, consistent with those of Wiley library.

### 3) GC-MS 결과 분석

#### (1) 시료 TN-A~F, whole의 GC-MS 분석

시료 TN-A~F whole 을 대사체 별로 상호 비교하여 발효 시간에 따른 양적 변화 추세를 조사하였다. 그 결과를 Fig 4~18 에 나타내었고, 각 대사체 별로 그 경향성을 기술하였다.

#### (2) 대사산물 양적 변화 경향의 일반 특성

- Table 3에서 나타난 바와 같이 관찰되는 대사물질의 종류는 기존 Biosci. Biotechnol. Biochem. 2013, 77(4), 683.) 및 1년차 연구 결과에서 관찰된 대사체와 거의 일치하였다. (sugars, sugar alcohols, organic acids, fatty acids, phosphonic acid). 단 연차별 시료에 따라서 특정 대사체가 관찰되지 않는 경우가 있었다.
- 시료 및 발효 시간별 대사체의 종류 변화는 관찰되지 않고 단지 양적인 변화만 관찰되었다. 또한 동일 계열 대사물질들의 시간에 따른 변화 추세가 대사물질마다 그 특성을 달리하여, 공통적인 pattern을 나타내지 않은 경우가 많았다.
- 시료 TN-A, B의 경우, 발효온도 (TN-A: 36, TN-B: 45 °C)에 따라 대사체의 양적 변화 추세는 유사하게 나타나나, 낮은 온도에서 대사체의 양이 비슷하거나 더 많게 관찰되었다.
- 원료성분과 가수량(20, 26, 30 %)을 변화시킨 시료 TN-C(보리, 녹두, 통밀), D(보리, 녹두)의 경우, 누룩 시료의 채취 부위(표면 (surface part), 내부 (inner part), 전 부위 (whole mass))에 따라 대사물질의 양이 다르게 나타났다. 즉, organic acids의 경우는 surface part가 inner part에 비해 그 발효시간별 양이 같거나 많고, sugars, sugar alcohols, fatty acids의 경우는 inner part가 surface part 보다 많게 나타나 오히려 반대 경향을 보였다. succinic acid, xylose 와 같은 일부 대사물질들은 발효시간별 양이 다른 대사물질들에 비하여 현저히 작은 양을 나타내었다. 시료의 가수률과 구조별 대사물질들의 양간의 상관관계는 대사물질별로 다르게 관찰되고 대부분에서 그 경향성의 일관

성이 뚜렷이 관찰되지 않았다.

- 모든 누룩 시료 (whole) 에서 발효초기에 대량 존재하던 이당류는 발효초기 (3일차에) 급격히 감소하고 이후 일정해 진다. 이는 누룩 초기 발효과정에서 이당류의 분해가 일어나는 것으로 생각되며 이는 초기 3일간에 최대치를 이루는 단당의 양을 설명해 준다. glucose, galactose 등의 단당은 발효 초기량이 많거나, 3일 후 최대치에 도달한 후 급격히 소모되는 것이 관찰된다. 이는 발효초기에 당류 대사체들이 발효과정에 대량 사용되는 것을 입증한다.
- 누룩 시료의 발효 과정에서 관여하는 주 미생물들의 생육과 당 대사체의 양적 변화 추세를 비교하였다. *patoea agglomerans*의 경우 6일차 까지 급격히 번식을 하다가 급격히 감소하는 경향을 나타낸다. sugar 부분 그래프에서 0-3일차 부분에서 disaccharides 양이 급격히 감소하는 것을 그래프로 확인할 수 있다. 동시에 monosaccharide의 경우 0-3일차 부분에서 급격히 증가하는 것을 확인할 수 있다. 이 미생물은 disaccharides(sucrose, lactose, maltose)를 monosaccharide(glucose,xylose)로 변환하는 역할 한다고 여겨진다. *Aspergillus oryzae*의 경우 6-9일차에서 급격히 증가하다가 16일차 까지 서서히 감소 경향을 나타낸다. sugar의 경우 6일차 이후 급격히 감소하는 것을 그래프로 확인 할 수 있다. 이에 따라 sugar alcohol, fatty acid, organic acid의 양이 증가는 것을 확인 할 수 있다. 6일 이후 sugar의 급격한 감소는 sugar가 미생물 생육과 기타 대사체 생성에 사용됨을 의미하는 것으로 생각된다. (Ponnusamy K, Lee SR, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 77(4), 683-690, 2013)
- 모두 누룩 시료 (whole) 에서 초기에는 sugar alcohol류 들은 그 초기량이 매우 적으나 발효 3일차에 최대치로 증가하고 이후 양에 큰 변화 없이 유지된다. 또한 지방산류 (palmitic acid, linoleic acid)들도 비슷한 양상을 보인다, 즉, 그 초기량이 적으나 발효 3 일차에 최대치로 증가하고 이후 양에 큰 변화 없이 유지된다.
- 3차년도에는 2차년도에 수행한 누룩 시료 중, 원료물질을 보리:녹두(=3.3:0.52), 가수량 26% 인 시료를 발효 온도를 달리한 시료 TN-E, F의 경우, 각 대사체의 양적 경향을 분석하였다. 발효온도 (TN-E: 30 °C, TN-F: 40 °C)에 따라 대사체의 양적 변화 추세가 다르게 관찰된다. 즉, 전반적으로 낮은 온도에서 유기산과 당은 그 양이 더 많이 관찰되었고 특히 inner part에서 그 경향이 뚜렷이 나타났다. 당의 양적 변화는 다른 시료들에서 관찰되는 전형적인 추세를 보였다. 단당의 경우, whole 부분에서는 모든 단당이 0일 차 초기량이 매우 크게 관찰되고 이후 감소하는 경향을 보인다. 그러나 surface 부분에서는 발효 시간 경과에 따른 양적 변화가 작은 반면 inner part에서는 발효 초기량은 surface와 비슷하나 이후 감소량이 현저히 크다. 이단당의 경우, whole 에서는 발효 0일 차 초기량이 급격히 감소한다. inner 부분에서, lactose, sucrose 는 whole 부분과 비슷한 경향을 나타낸다. surface의 경우에는 발효 과정을 통해 양적 변화가 크게 나타나지 않는다.

#### - Organic acids

전반적으로 whole과 inner part 부분에서 TN-E(30°C)가 TN-F(40°C)의 비해 상대적으로 많은 양이 검출이 된다. 이것으로 미루어 볼 때 발효온도가 낮을수록 organic acid의 생성량이 증가하는 것으로 여겨진다. surface 부분에서는 10일에서 20일차에 급격히

증가하는 구간이 나타났다.

- sugars

sugar 역시 전반적으로 whole과 inner part 부분에서 TN-E가 TN-F의 비해 상대적으로 많은 양이 검출이 된다. sugar의 경우 0일차에서 과량 존재하다가 3일차에 급격히 감소하는 경향으로 미루어 볼 때 누룩 생성시에 소비된다고 여겨진다. 그러나 surface 부분에서는 20일차에 소폭 증가하는 구간이 나타났다.

- sugar alcohols

sugar alcohol 역시 전반적으로 whole과 inner part 부분에서 TN-E가 TN-F의 비해 상대적으로 많은 양이 검출이 된다. sugar의 경우 0일차에서 거의 존재 하지 않다가 3 일차에 급증하는 경향을 나타낸다. 이것으로 미루어 볼 때 발효되는 과정에서 sugar를 소비해서 sugar alcohol을 생성하는 것으로 여겨진다. 그러나 surface 부분에서는 20일 차에 소폭 증가하는 구간이 나타났다.

-fatty acids

fatty acids 역시 전반적으로 whole과 inner part 부분에서 TN-E가 TN-F의 비해 상대적으로 많은 양이 검출이 된다. 0일차에서 일정량 존재하다가 3일차에서 급격히 증가 후 일정해지는 양상을 나타낸다. 그러나 surface 부분에서는 20일차에 소폭 증가하는 구간이 나타났다.

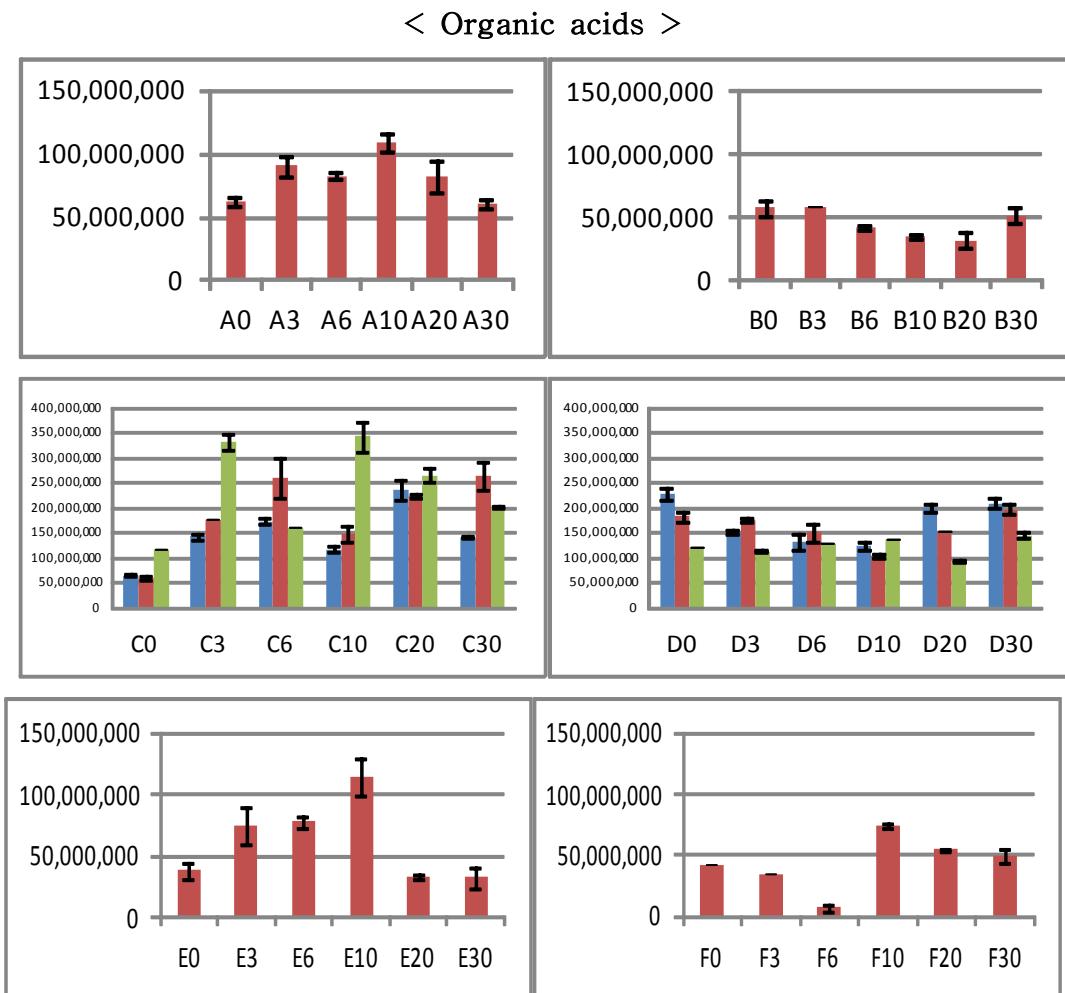
### (3) 발효 과정에서 대사체의 양적 변화와 발효에 관여하는 것으로 알려져 있는 미생물들의 상관관계 분석

- 누룩 시료의 발효 과정에 대사체의 양적 변화와 발효에 관여하는 것으로 알려져 있는 미생물들의 상관관계 분석하였다. (발효 과정에서 발효 시간에 따른 생육 미생물의 생육 정도는 기 보고된 문헌을 참고하였다.) 누룩에 사용되는 주 미생물은 patoea agglomerans, Aspergillus oryzae, saccharomyces fibuligera 외 기타 박테리아가 사용되는데 Aspergillus oryzae와 patoea agglomerans가 누룩 생성에 주 영향을 주는 미생물로 알려져 있다.
- patoea agglomerans의 경우 6일차 까지 급격히 번식을 하다가 급격히 감소하는 경향을 나타낸다. sugar 부분 그래프에서 0-3일차 부분에서 disaccharides 양이 급격히 감소하는 것을 그래프로 확인할 수 있다. 동시에 monosaccharide의 경우 0-3일차 부분에서 급격히 증가하는 것을 확인할 수 있다. 이 미생물은 disaccharides(sucrose, lactose, maltose)를 monosaccharide(glucose,xylose)로 변환하는 역할 한다고 여겨진다. Aspergillus oryzae의 경우 6-9일차에서 급격히 증가하다가 16일차 까지 서서히 감소 경향을 나타낸다. sugar의 경우 6일차 이후 급격히 감소하는 것을 그래프로 확인 할 수 있다. 이에 따라 sugar alcohol, fatty acid, organic acid의 양이 증가는 것을 확인 할 수 있다. 6일 이후 sugar의 급격한 감소는 sugar가 미생물 생육과 기타 대사체 생성에 사용됨을 의미하는 것으로 생각된다. (Ponnusamy K, Lee SR, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 77(4), 683-690, 2013)
- 대사물질들의 일반 특성은 당 대사물의 경우, 0-3일에서 최대로 존재하다가 이후 급격히 감소하고, 다른 대사체들의 경우 초기량은 매우 적고 당의 대사와는 역으로 점점 증가한후 일전한 양을 유지하거나 소폭 감소함

### (4) 1-3년차 년차별 누룩 시료의 구조별 대사산물의 양적 변화 경향 분석

1-3차년도에 수행한 누룩 시료의 GC/MS 분석에서 확인된 대사물질을 구조별로 분류하여 발효시간별 대사물질 양의 변화를 비교하였다. (Fig 4 ~ 18)

(4-1) 시료 TN-A, B, C, D, E, F (whole sample)의 시간경과에 따른 metabolite 양 비교분석



**Figure 4. phosphoric acid**

- 시료 TN-A(36 °C), B(45 °C)의 경우 A의 경우 10일까지 일정히 증가하다가 소폭 감소하는 경향을 보이는데 반해 B의 경우 10일까지 일정하게 감소하다가 소폭 증가하는 경향을 보인다. 높은 발효온도에서보다 상대적으 낮은 발효 온도에서 인산 대사물의 양이 높았다.
- TN-C(보리, 녹두, 통밀), D(보리, 녹두)는 주성분과 가수량(20, 26, 30 %)을 변화시킨 조건인데 TN-C의 경우 가수량이 클수록 인산의 양이 전반적으로 증가한 반면, TN-D의 경우에는 오히려 가수량이 증가함에 따라 인산량이 다소 감소하는 경향을 보인다.
- 특히 TN-C sample의 가수량 30% 경우 다른 TN-A, B, E, F sample에서는 나타나는 양보다 약 2배 이상의 phosphoric acid 검출된다.
- TN-E, F는 발효온도와 습도(70%→ 4일차 이후 50%)를 변화 시킨 조건인데 두 경우 모두 10일차에서 가장 많은 양을 나타냈다.

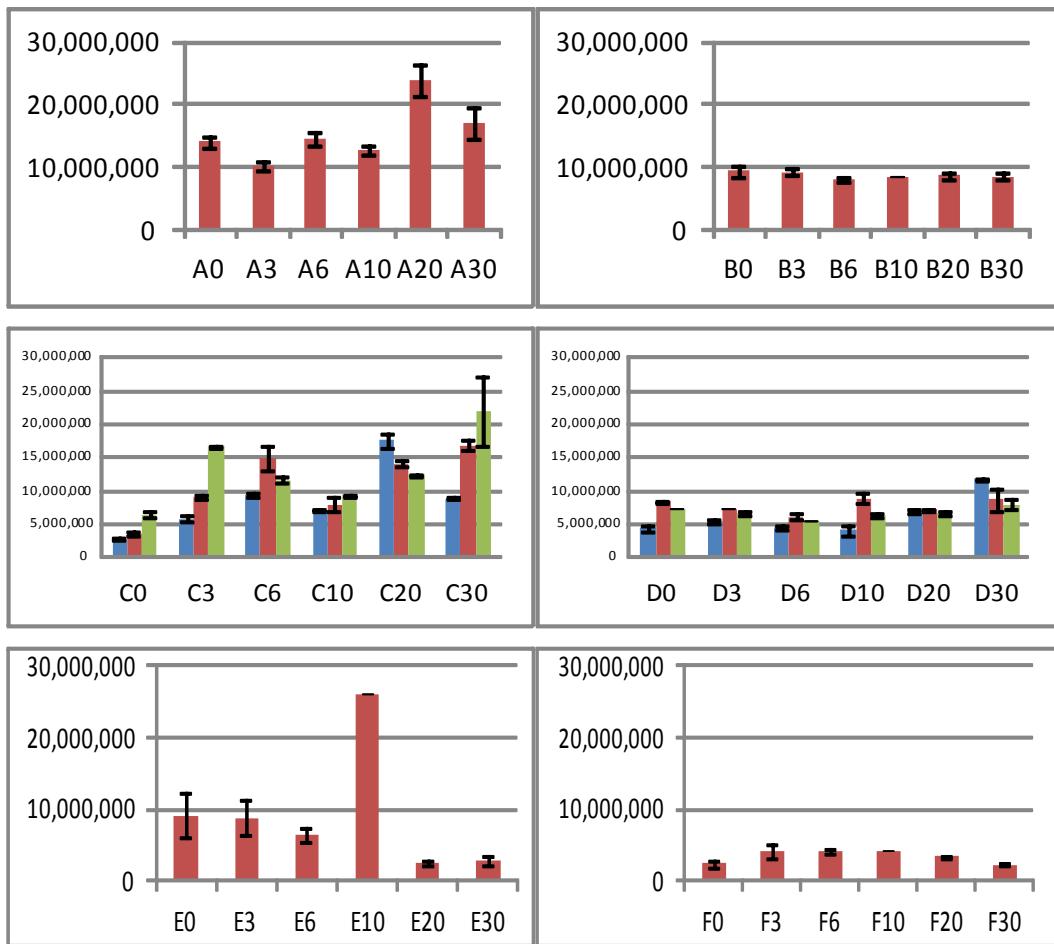
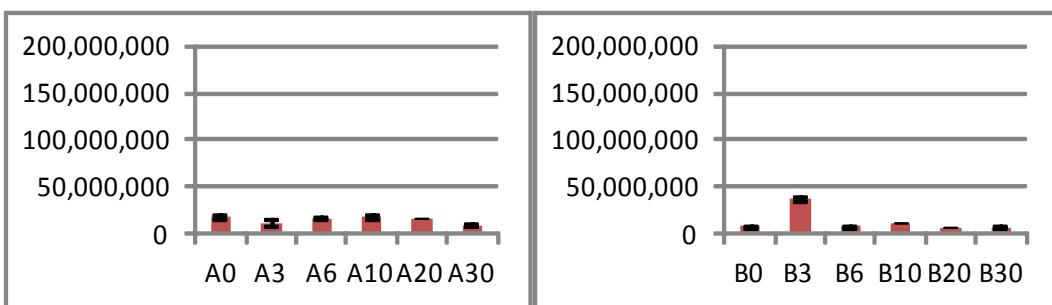


Figure 5. succinic acid

- Sample TN-A(36°C)의 경우 10일까지 일정히 증가하다가 소폭 감소하는 경향을 보이는데 반해 B의 경우 일정하다.
- TN-C의 경우 가수량이 클수록 succinic acid의 양이 전반적으로 증가한 반면, TN-D의 경우에는 오히려 가수량이 증가함에 따라 인산량이 다소 감소하는 경향을 보인다.
- TN-E(30°C), F(40°C)는 발효온도와 습도(70%→ 4일차 이후 50%)를 변화 시킨 조건인데 E의 경우 10일차에서 크게 증가 후 급격히 감소한다. 반면 TN-F에서는 현저한 양적 변화가 관찰되지 않는다.



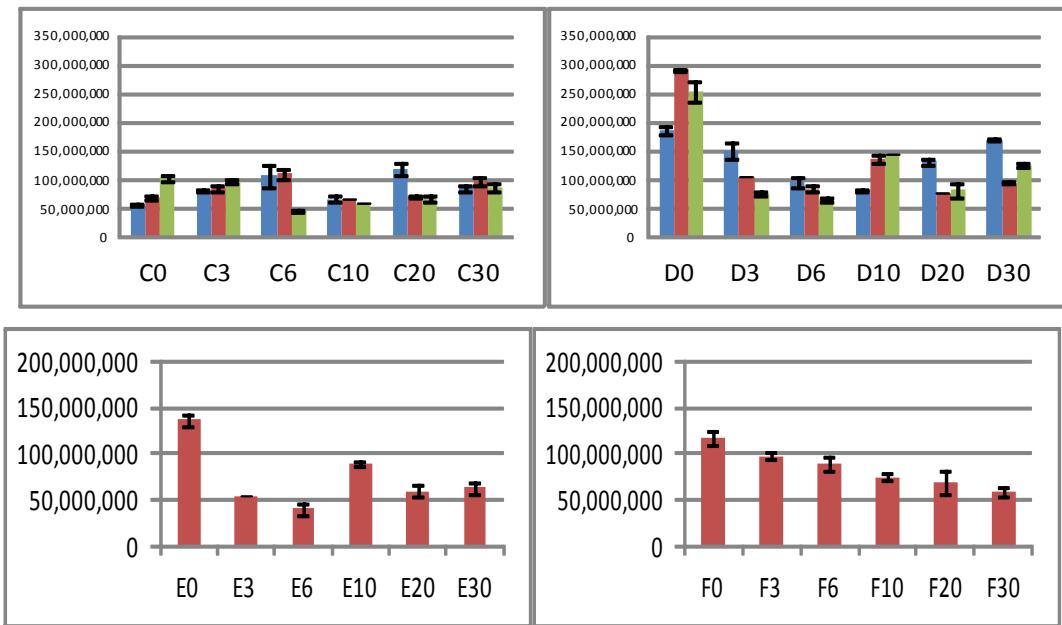
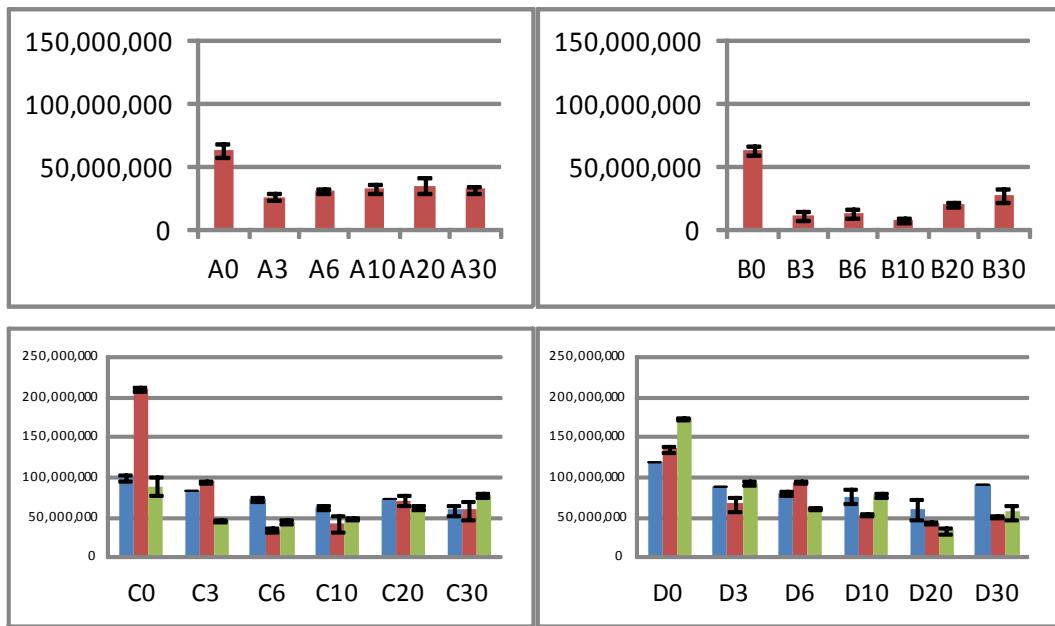
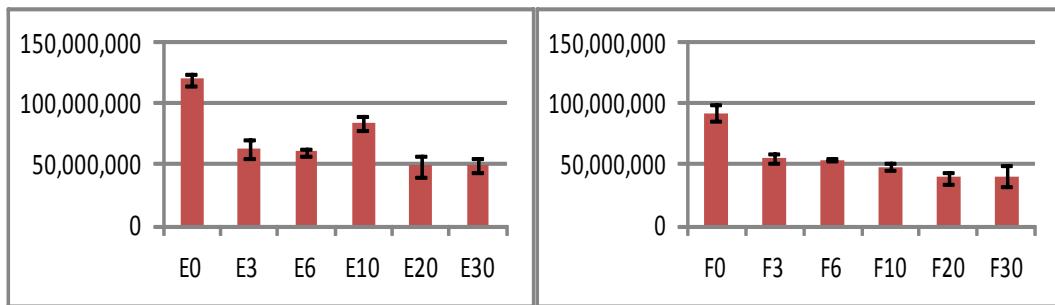


Figure 6. malic acid

- Sample TN-A(36°C), B(45°C)의 경우 발효온도만 다르게 한 조건인데 B의 경우 3일 차에서 크게 증가 후 급격히 감소하는 경향을 나타낸다.
- TN-C는 가수량에 따른 대사체의 양적 변화가 크지 않았다. TN-D의 경우 0일차에서 많이 존재한다.

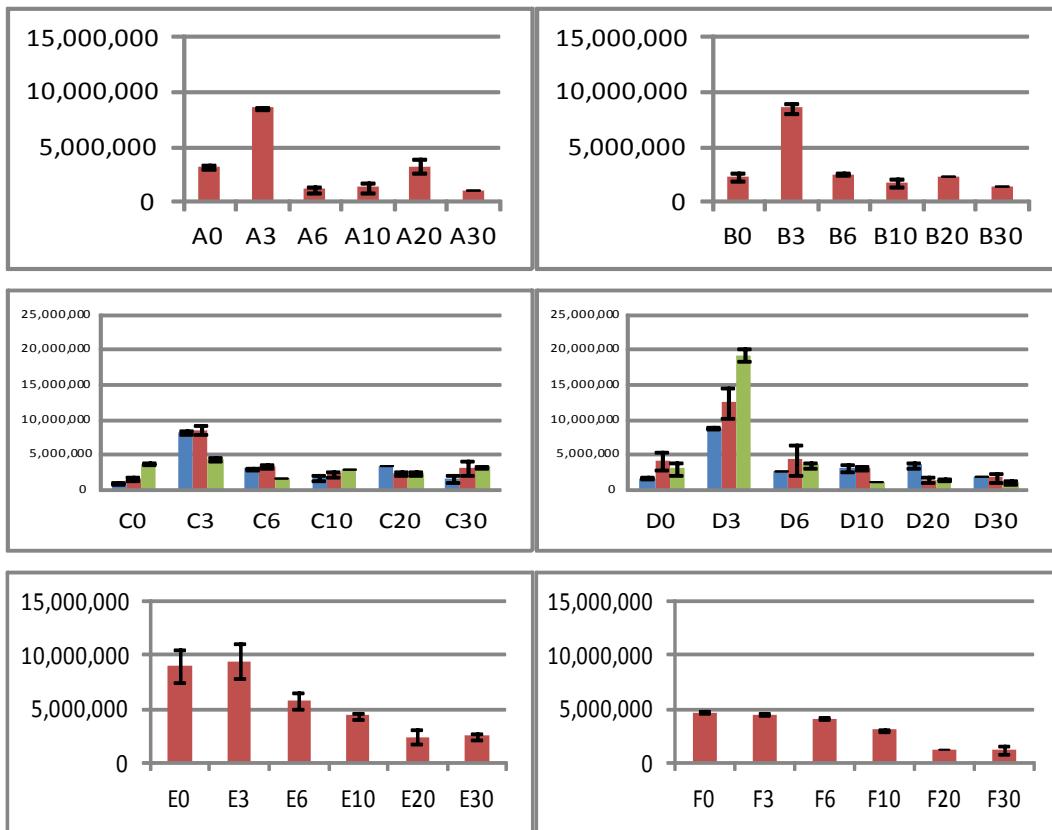
#### <monosaccharide>





**Figure 7. galactose**

- Sample TN-A(36°C)에서는 초기량이 가장 많고 이후 급격히 감소한 후 일정한 양을 유지한다. TN-B(45°C)의 경우 감소 폭이 더 크게 관찰된다.
- TN-C, D, E, F 의 경우에도 위와 비슷한 양상을 보인다. TN-C, D는 가수량에 따른 대사물질의 변화 일관성을 보이지 않는다.



**Figure 8. xylose**

- TN-A(36°C), B(45°C), C, D의 경우, 3일까지 xylose 양이 급격히 증가하고 이후 다시 급격히 감소 후 일정해 진다.
- TN-E(30°C), F(40°C)에서는 초기양이 3일차까지 유지되나 이후 완만히 감소한다.

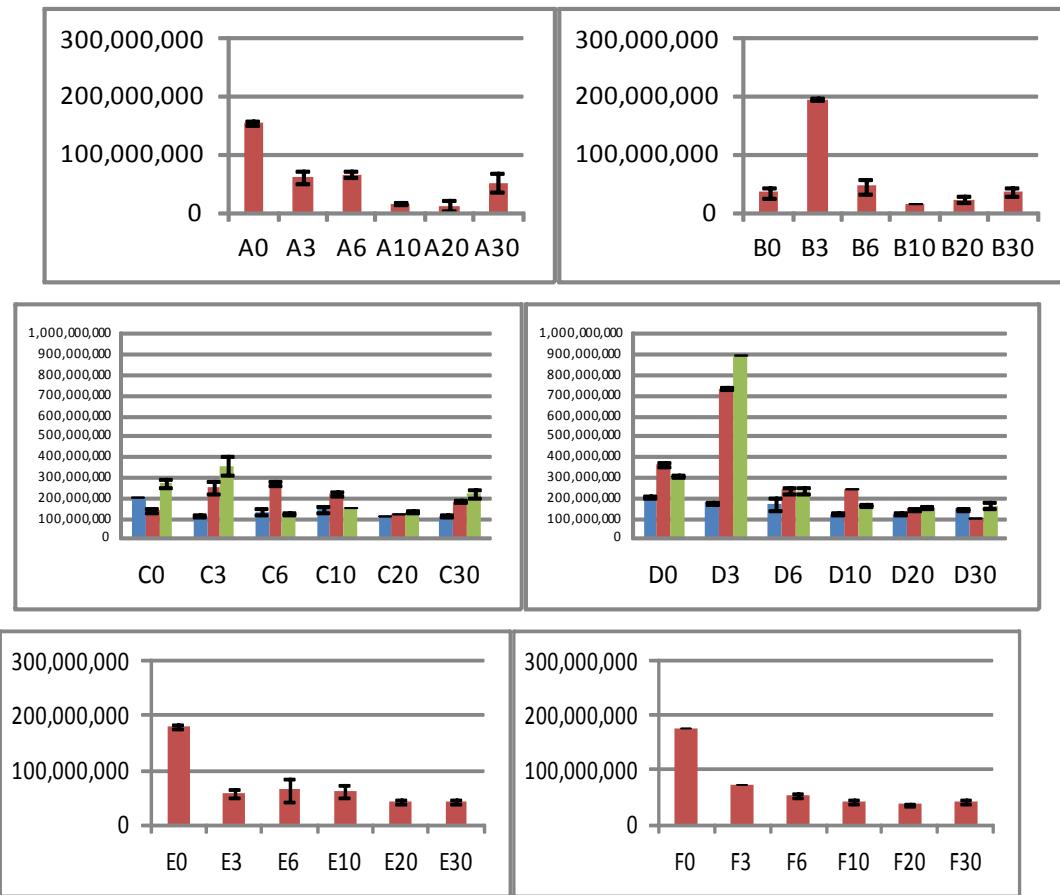


Figure 9. glucose

- Sample TN-A(36°C), E, F의 경우 초기량이 3일 이후부터 급격히 소모되고, TN-B(45°C), C, D의 경우 3일차에 급격히 증가하여 최대치를 이루고 이후 급격히 감소한다.
- TN-C(보리, 녹두, 통밀), D(보리, 녹두)는 가수량이 클수록 대사체 양이 전반적으로 증가한 것으로 관찰된다.
- glucose가 0, 3일차에서 가장 많이 존재하다가 급격히 감소해 일정해 지는 것을 볼 때 누룩 초기 발효과정에서 glucose가 소비된다고 여겨진다.

## &lt;disaccharide&gt;

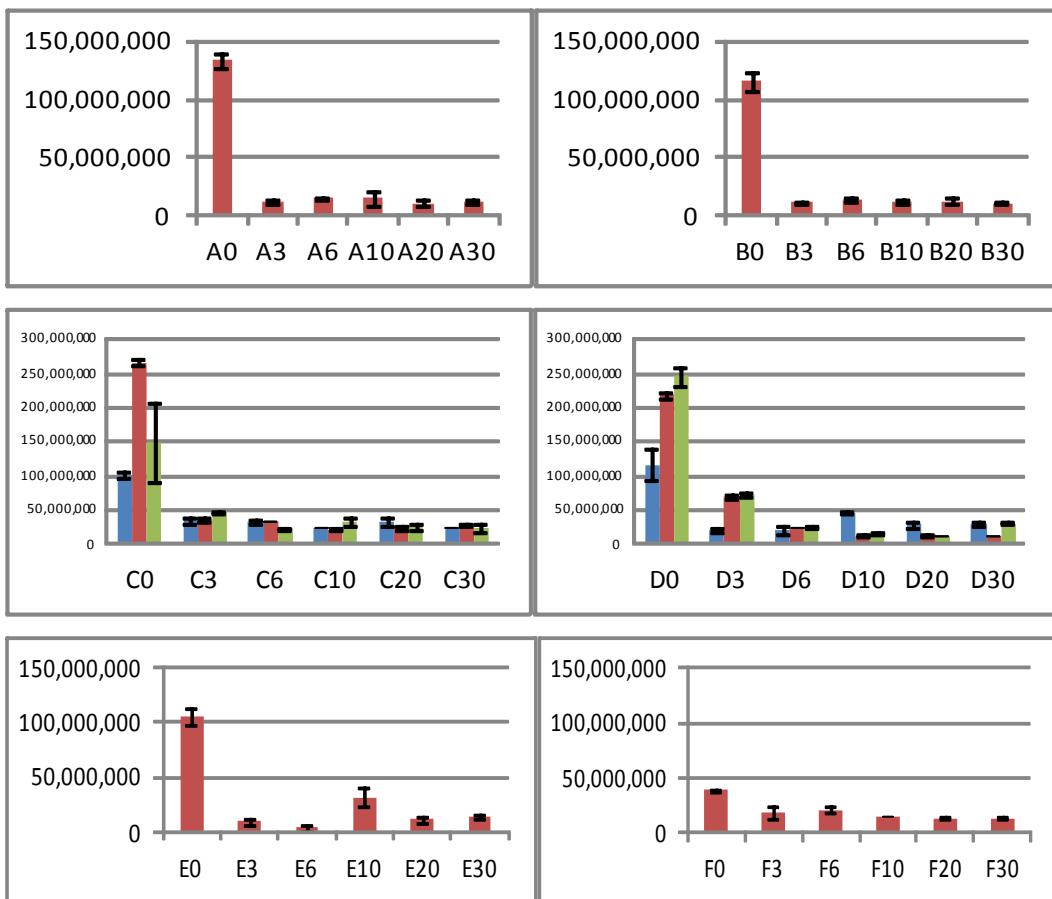


Figure 10. lactose

- 모두 누룩 시료에서 발효초기에 대량 존재하던 이당류는 발효초기 (3일차에) 급격히 감소하고 이후 일정해 진다. 이는 누룩 초기 발효과정에서 lactose가 소비된다고 여겨진다.

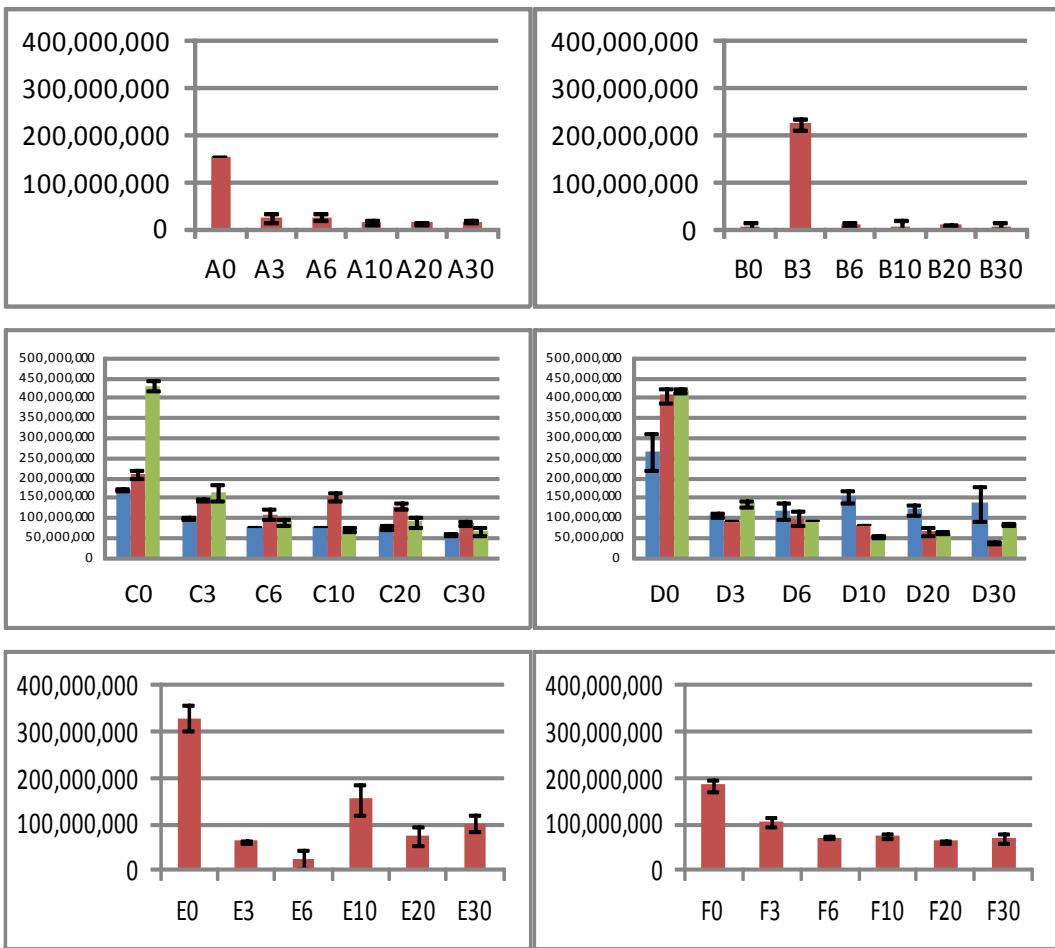


Figure 11. maltose

- 모두 누룩 시료에서 발효초기에 대량 존재하던 이당류는 발효초기 (3일차에) 급격히 감소하고 이후 일정해 진다. 이는 누룩 초기 발효과정에서 maltose가 소비된다고 여겨진다.

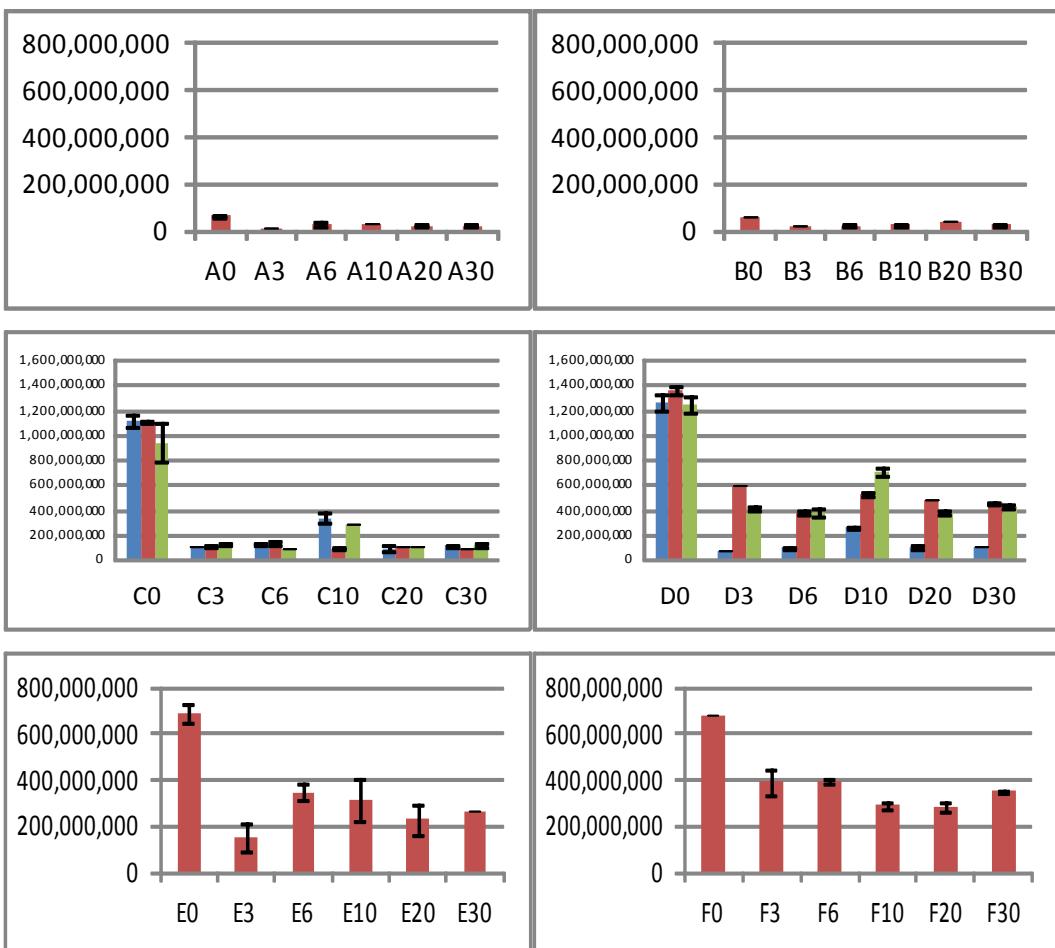


Figure 12. sucrose

- 모두 누룩 시료에서 발효초기에 대량 존재하던 이당류는 발효초기 (3일차에) 급격히 감소하고 이후 일정해 진다. 이는 누룩 초기 발효과정에서 sucrose가 소비된다고 여겨진다.

## &lt;Sugar Alcohols&gt;

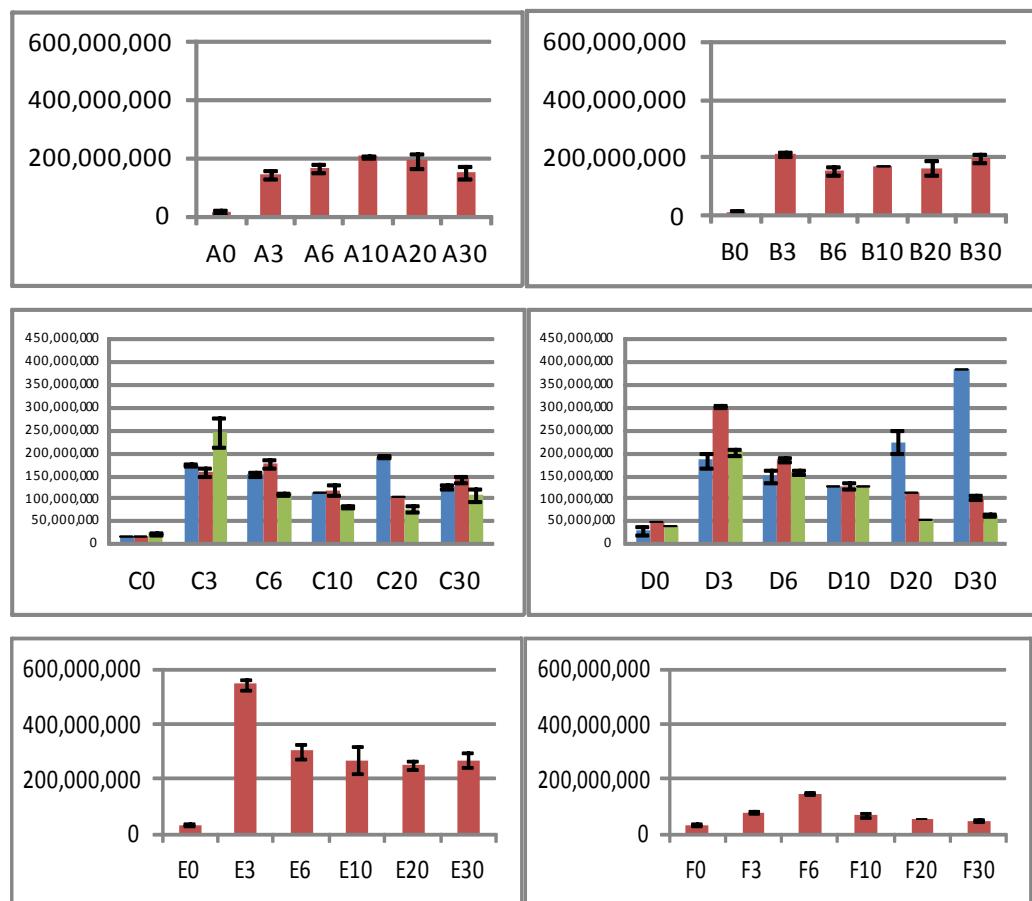
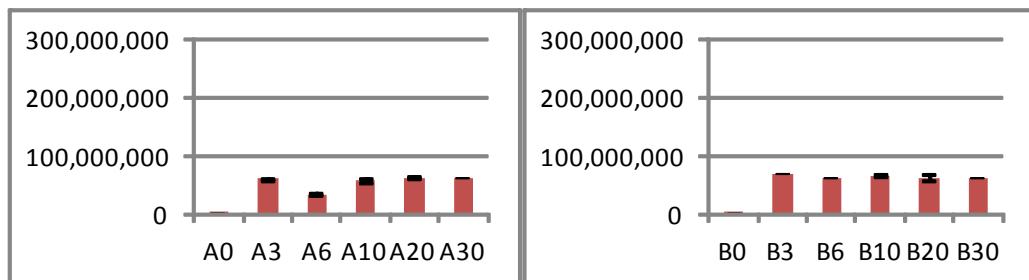


Figure 13. glycerol

- 모두 누룩 시료에서 초기에는 그 양이 매우 적으나 발효 3일차에 최대치로 증가하고 이후 양에 큰 변화 없이 유지된다.



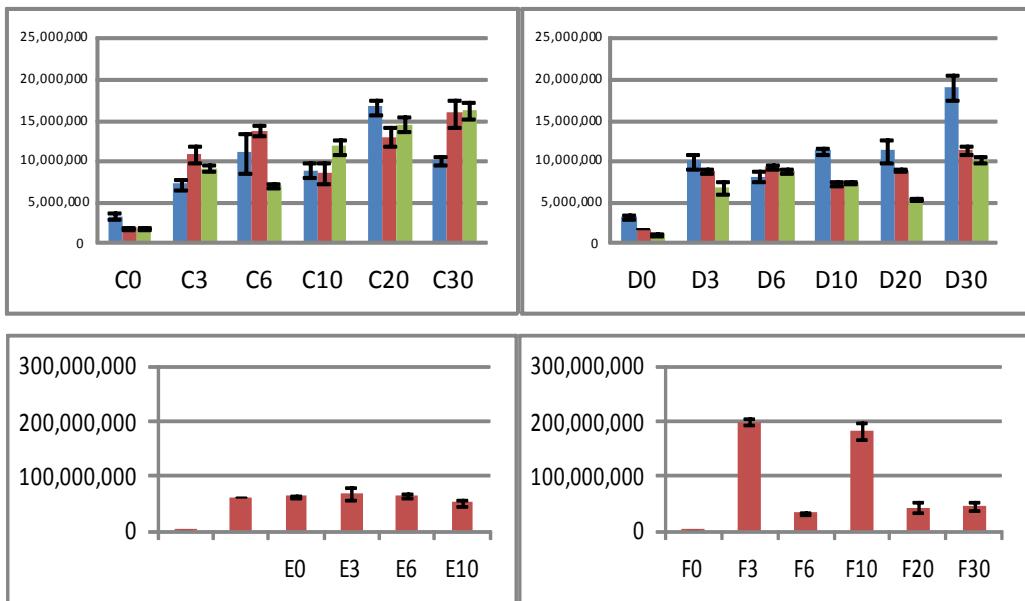


Figure 14. arabitol

- TN-E를 제외한 모두 누룩 시료에서 초기에는 그 양이 매우 적으나 발효 3일차에 최대치로 증가하고 이후 양에 큰 변화 없이 유지된다.

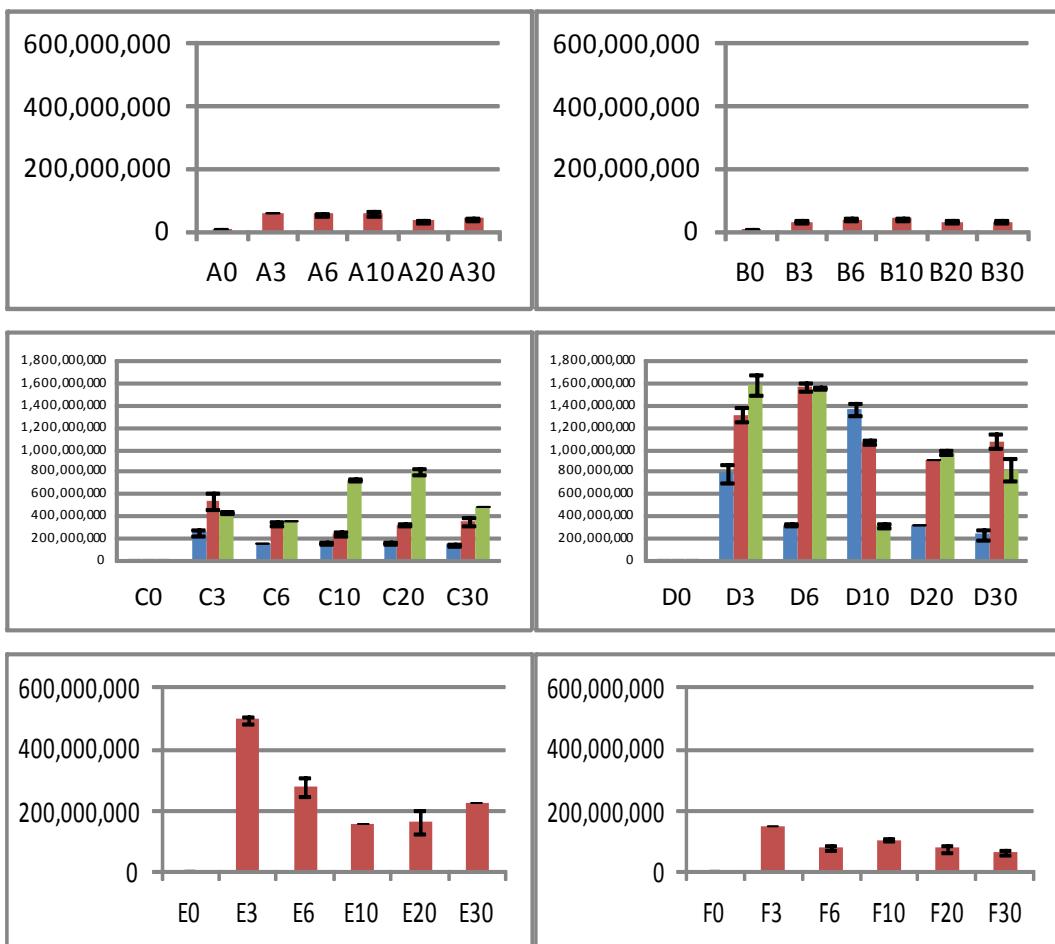


Figure 15. xylitol

- 모두 누룩 시료에서 초기에는 그 양이 매우 적으나 발효 3일차에 최대치로 증가하고 이후 양에 큰 변화 없이 유지된다. 시료 TN-D에서는 생성량이 다른 시료들에 비해 상대적으로 많았다.

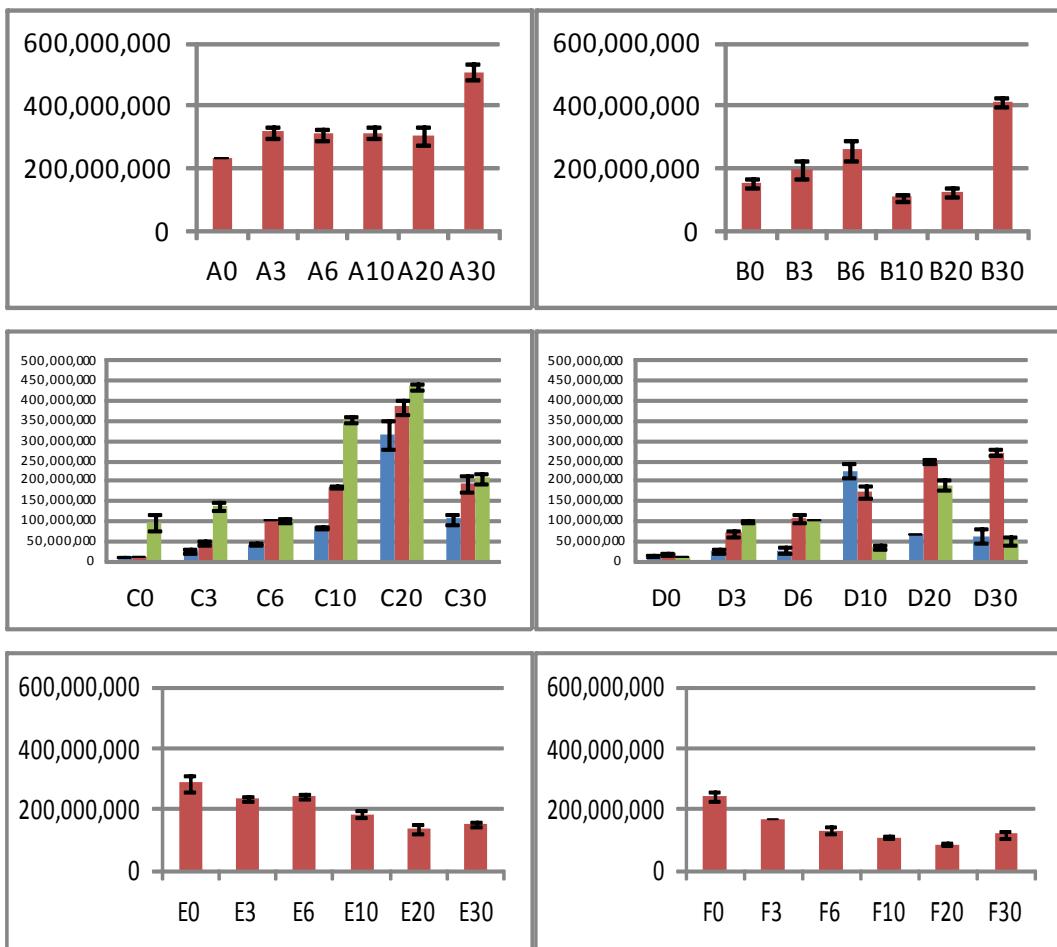


Figure 16. mannitol

- 모두 누룩 시료에서 초기에는 그 양이 매우 적으나 발효 3일차에 최대치로 증가하고 이후 양에 큰 변화 없이 유지된다. 시료 TN-A, B, C, D에서는 생성량이 발효시간 경과에 따라서 계속 증가하는 경향을 보인다.

## &lt; Fatty acid &gt;

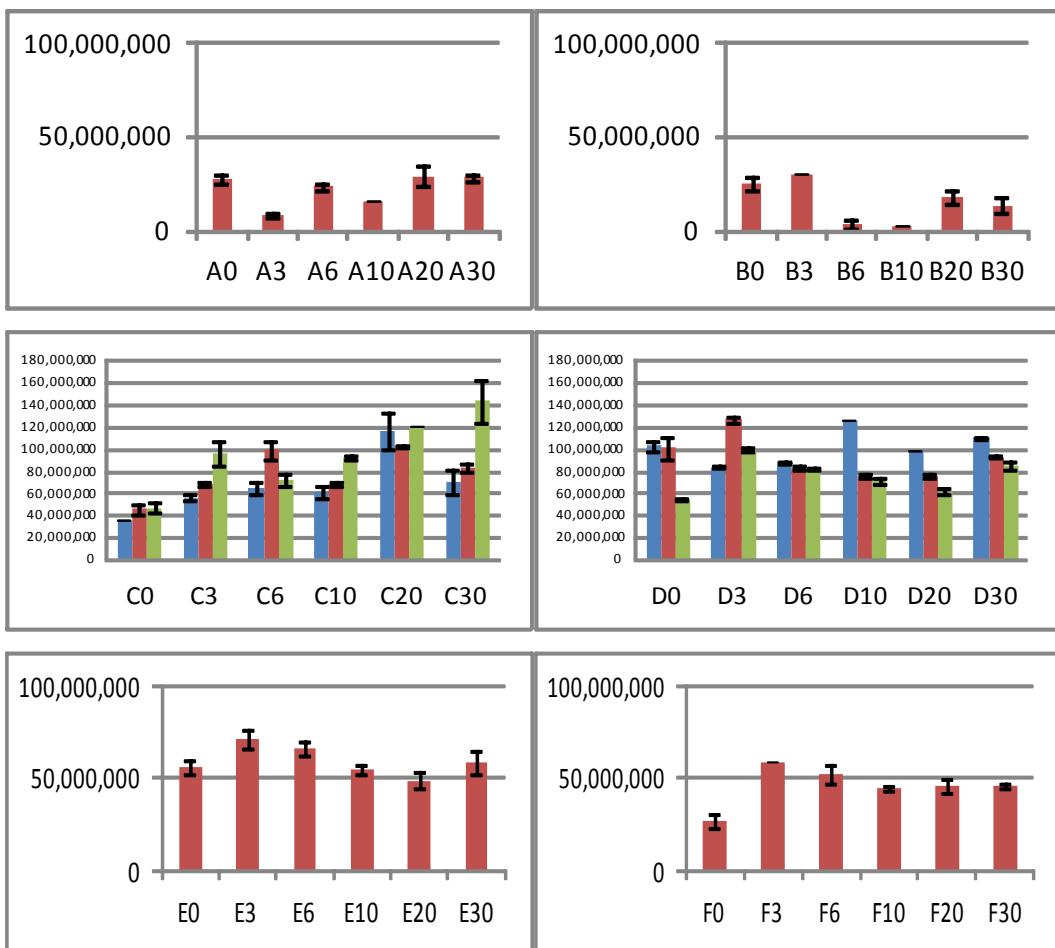


Figure 17. palmitic acid

- 모두 누룩 시료에서 초기에는 그 양이 적으나 발효 3일차에 최대치로 증가하고 이후 양에 큰 변화 없이 유지된다.
- TN-C, D의 가수량 30% 시료의 경우 다른 시료에서 관찰된 양보다 약 2배 이상의 palmitic acid 검출된다.

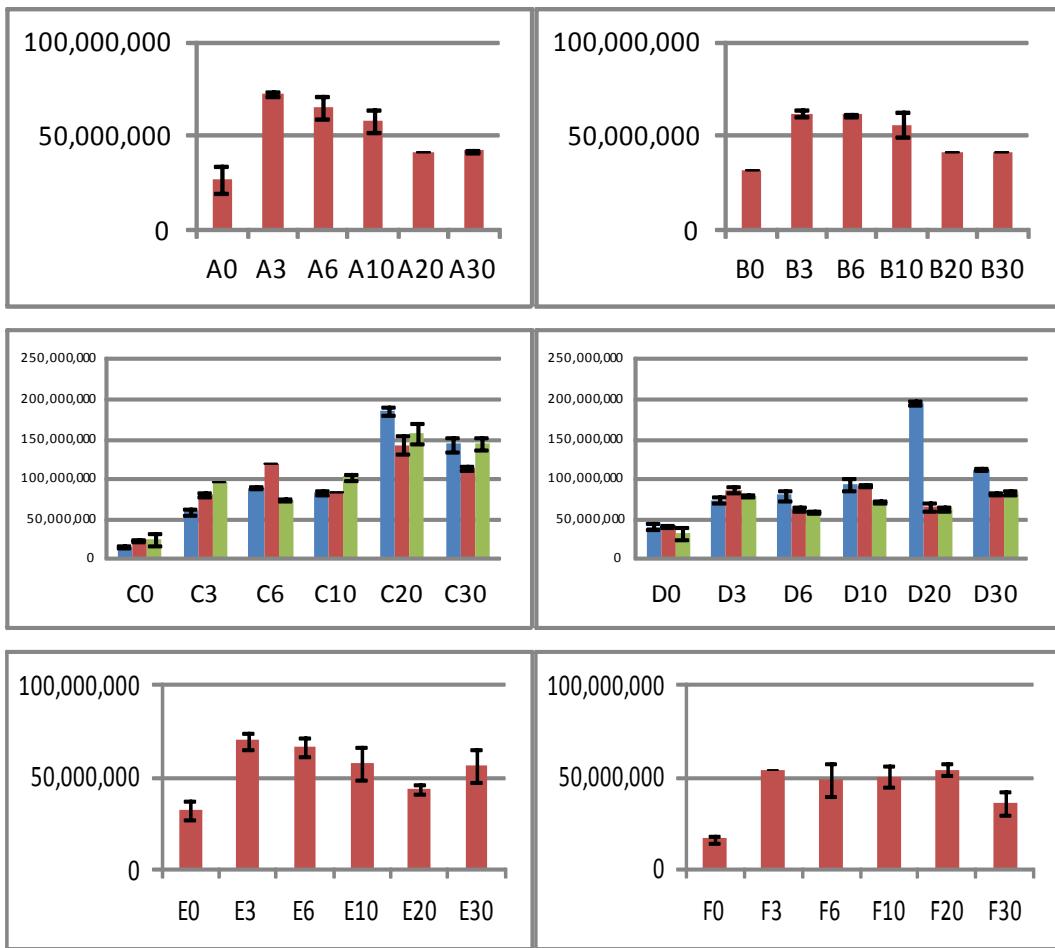


Figure 18. linoleic acid

- 모두 누룩 시료에서 초기에는 그 양이 적으나 발효 3일차에 최대치로 증가하고 이후 양에 큰 변화 없이 유지된다.
- TN-C, D의 가수량 30% 시료의 경우 다른 시료에서 관찰된 양보다 약 2배 이상의 palmitic acid 검출된다.

#### (4-2) 시료 TN-C, D (surface, inner part, whole)의 시간경과에 따른 metabolite 양 비교분석

- 구조별 대사체에 대하여 surface, inner part, whole 세 부위에서 나타나는 대사체 양적 변화 경향을 상호 비교하였다.

##### (4-2-1) 시료 TN-C (surface, inner part, whole)의 시간경과에 따른 metabolite 양 비교분석

###### ○ Organic acids

세 부위에서 전반적으로 metabolite의 양적 변화 경향이 크게 나타나지 않는다. malic acid의 inner 부분의 경우 0일차에서 초기량이 매우 크나 이후 폭으로 감소한다.

###### ○ sugars

단당의 경우, whole 부분에서는 0일차 초기량이 매우 크게 관찰된 galactose, 3일차에서 최대량을 보이는 xylose, fructose, glucose는 이후 감소하는 경향을 나타내는데

반해, surface 부분에서는 발효 시간 경과에 따른 양적 변화가 작다. inner part에서는 surface에 비해 대사량이 상대적으로 현저히 작고 3 일차에 최대치를 이룬 후 급격히 감소한다.

이단당의 경우, whole 에서는 3일차에 최대치를 이룬 후 급격히 감소한다. inner 부분에서, sucrose, lactose는 whole 부분과 비슷하게 0일차, 3일차에서 과량 존재하다가 급격히 감소하는 경향을 나타내나, maltose는 유사한 경향을 보이지 않는다. surface 의 경우, lactose, maltosesms 발효 3일차에 최대치를 이루고 이후 급격히 감소하나, sucrose는 양에 변화가 관찰되지 않는다. 이것으로 미루어 볼 때 대부분의 sugar들은 누룩 발효 과정에서 소비되는 것으로 여겨진다.

### ○ sugar alcohols

전체적으로 0일차에서 거의 존재하지 않다가 3일차 이후에 급격히 증가하고 이후 그 양이 유지되거나 조금 증가하는 양상을 보인다. 경향을 나타낸다. surface와 inner 부분에서 큰 차이가 관찰되지 않는다. 누룩 초기 발효과정에서 sugar alcohol들이 생성된 후 이후 이 대사체에 대한 또 다른 대사 과정이 진행되지 않는 것으로 판단된다.

### ○ fatty acids

전반적으로 0일차에서 소량 존재하다가 발효 시간 경과에 따라 점차적으로 증가하는 경향을 나타낸다. surface와 inner 부분에서 큰 차이가 관찰되지 않는다. fatty acid 도 sugar alcohol과 같이 발효 초기에 생성되는 대사체로서 생성 후 더 이상의 대사가 진행되지 않는 것으로 생각된다.

## < Organic acids >

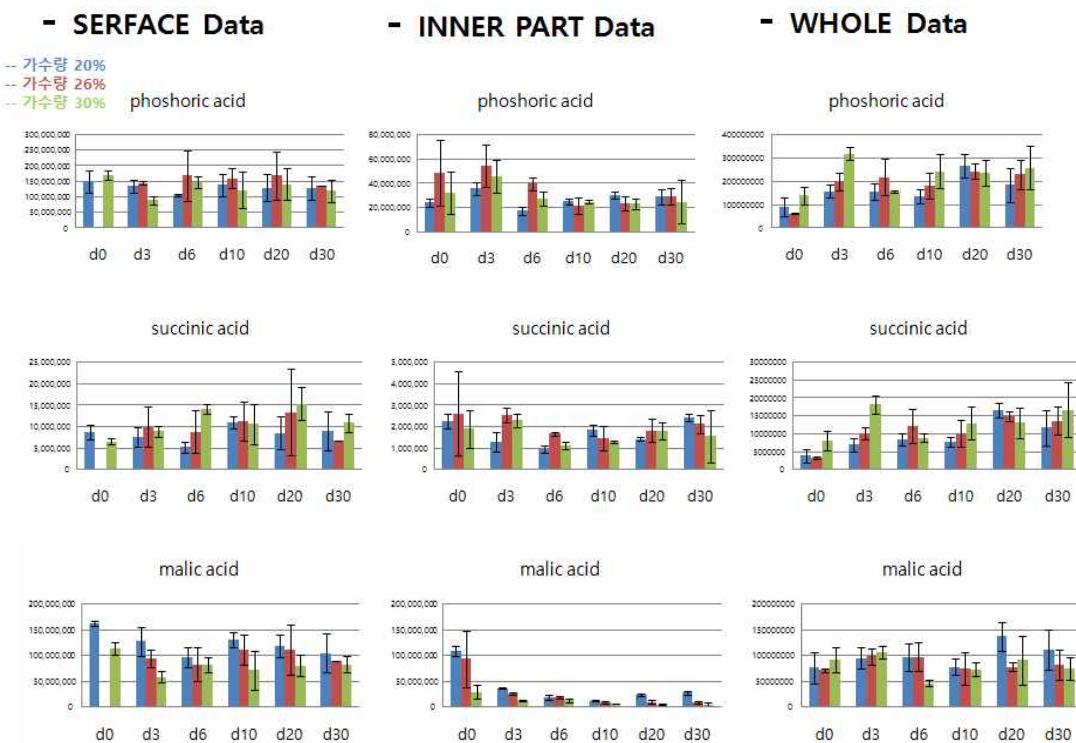
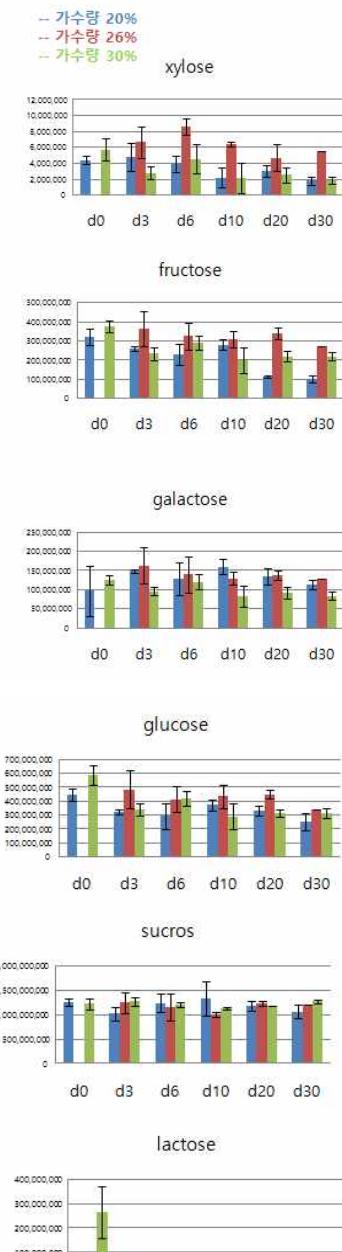


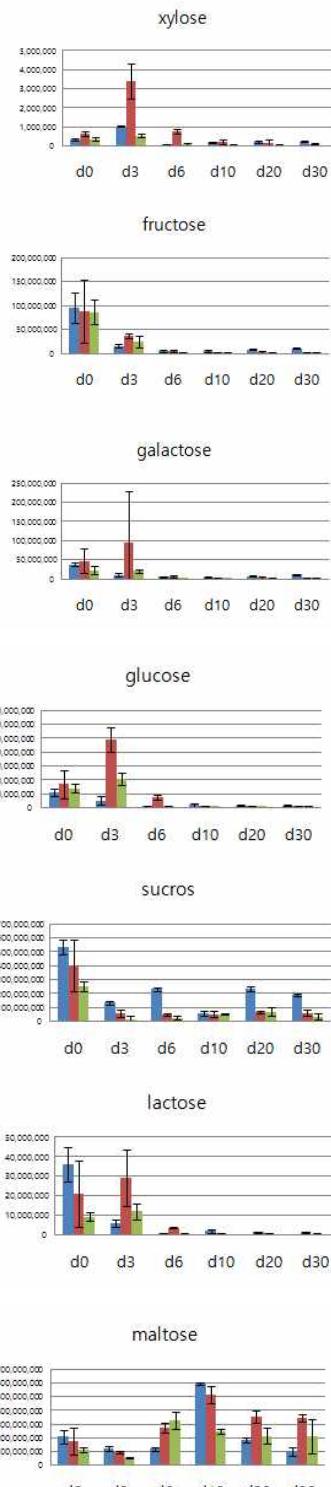
Figure 19. TN-C organic acids

## < Sugars >

### - SERFACE Data



### - INNER PART Data



### - WHOLE Data

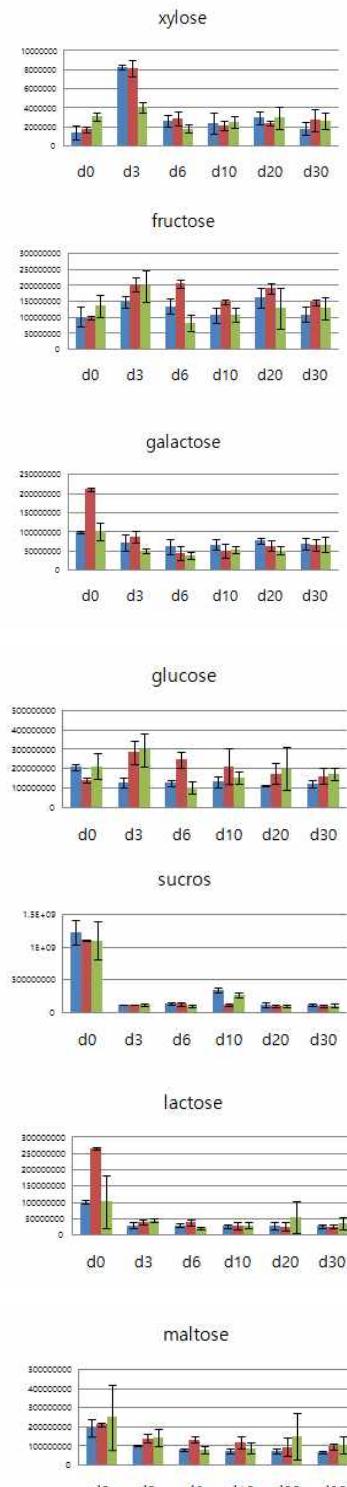
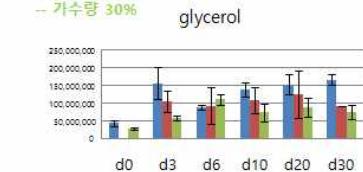


Figure 20. TN-C sugars

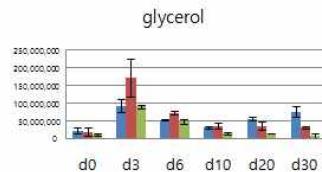
## < Sugar Alcohols >

### - SURFACE Data

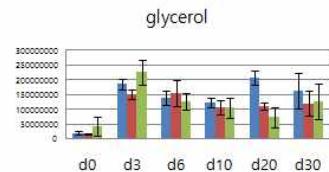
-- 가수량 20%  
-- 가수량 26%  
-- 가수량 30%



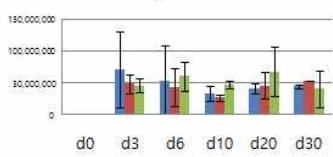
### - INNER PART Data



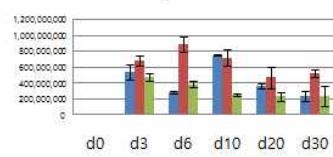
### - WHOLE Data



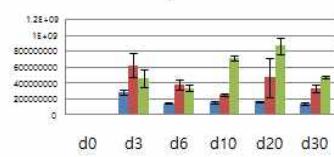
xylitol



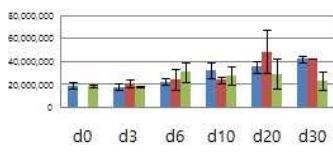
xylitol



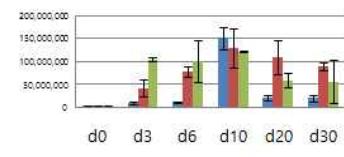
xylitol



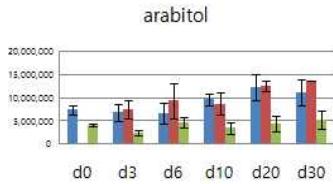
mannitol



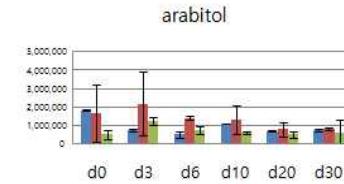
mannitol



mannitol



arabitol



arabitol

Figure 21. TN-C sugar Alcohol

## < Fatty acids >



Figure 22. TN-C fatty acids

(4-2-1) 시료 TN-D (surface, inner part, whole)의 시간경과에 따른 metabolite 양 비교분석

- Organic acids

세 부위에서 전체 발효시간대에서 metabolite의 양적 변화 경향이 전반적으로 크게 나타나지 않는다. 단, malic acid의 inner 부분의 경우 0일차에서 초기량이 매우 크나 이후 폭으로 감소한다.

- sugars

단당의 경우, whole 부분에서는 0일차 초기량이 매우 크게 관찰된 galactose, 3일차에서 최대량을 보이는 xylose, glucose는 이후 감소하는 경향을 나타내는데 반해, surface 부분에서는 발효 시간 경과에 따른 양적 변화가 작다. inner part에서는 surface에 비해 대사량이 상대적으로 현저히 작고 3 일차에 최대치를 이룬 후 급격히 감소한다.

이 단당의 경우, whole 에서는 발효 0일차 초기량이 급격히 감소한다. inner 부분에서, lactose, maltose, sucrose 모두는 whole 부분과 비슷하게 0일차, 3일차에서 과량 존재 하다가 급격히 감소하는 경향을 나타낸다. surface의 경우에도 초기량이 감소하는 유사한 경향을 보이나, 감소 정도는 완만하다. 이것으로 미루어 볼 때 대부분의 sugar들은 누룩 발효 초기 과정에서 소비되는 것으로 여겨진다.

### ○ sugar alcohols

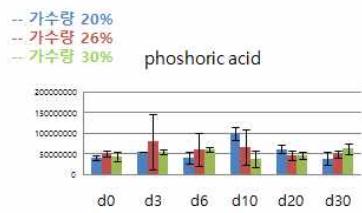
전체적으로 0일차에서 거의 존재하지 않다가 3일차 이후에 급격히 증가하고 이후 그 양이 유지되거나 조금 증가하는 양상을 보인다. 경향을 나타낸다. surface와 inner 부분에서 큰 차이가 관찰되지 않는다. 누룩 초기 발효과정에서 sugar alcohol들이 생성된 후 이후 이 대사체에 대한 또 다른 대사 과정이 진행되지 않는 것으로 판단된다.

### ○ fatty acids

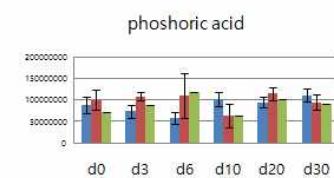
전반적으로 0일차에서 소량 존재하다가 발효 시간 경과에 따라 점차적으로 증가하는 경향을 나타낸다. surface와 inner 부분에서 큰 차이가 관찰되지 않는다. fatty acid도 sugar alcohol과 같이 발효 초기에 생성되는 대사체로서 생성 후 더 이상의 대사가 진행되지 않는 것으로 생각된다.

## < Organic acids >

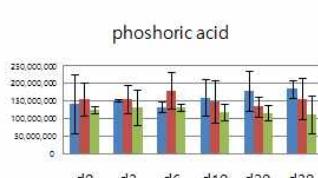
### - SURFACE Data



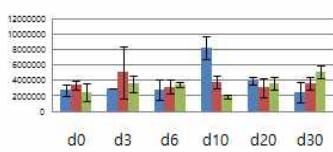
### - INNER PART Data



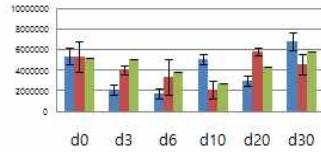
### - WHOLE Data



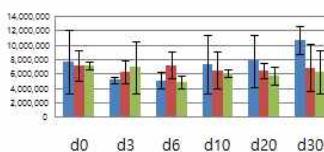
### succinic acid



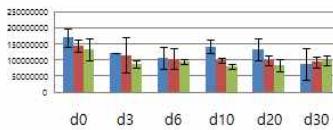
### succinic acid



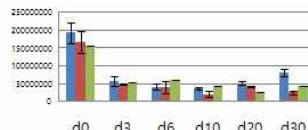
### succinic acid



### malic acid



### malic acid



### malic acid

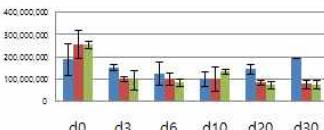
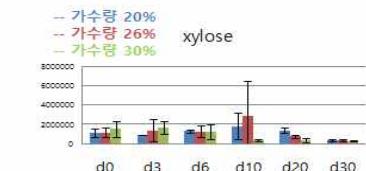


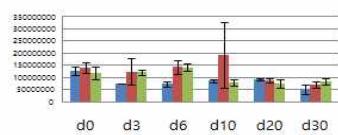
Figure 23. TN-D organic acids

## < Sugars >

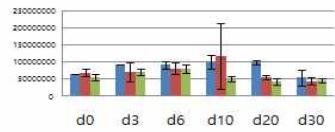
### - SURFACE Data



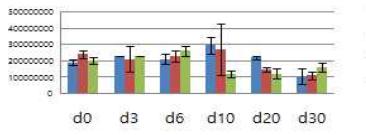
fructose



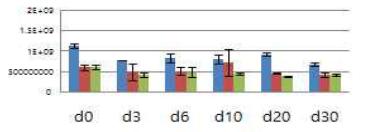
galactose



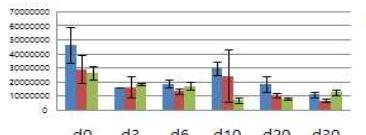
glucose



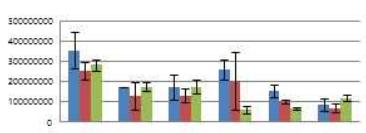
sucros



lactose

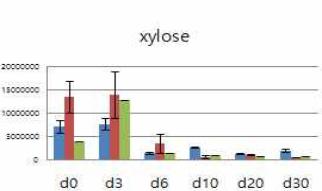


maltose

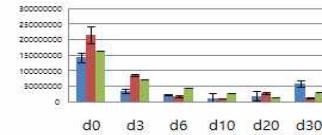


### - INNER PART Data

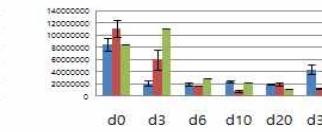
xylose



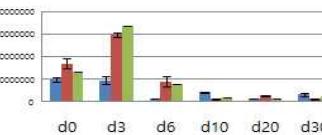
fructose



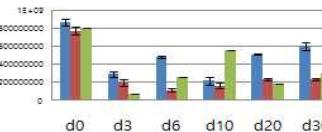
galactose



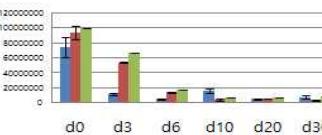
glucose



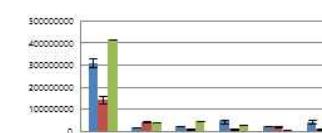
sucros



lactose

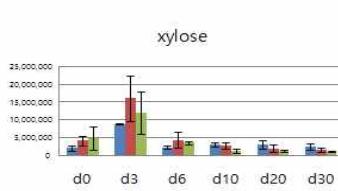


maltose

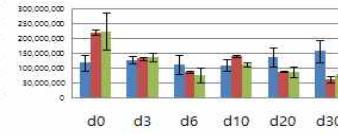


### - WHOLE Data

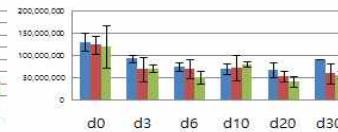
xylose



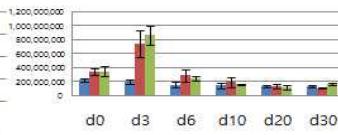
fructose



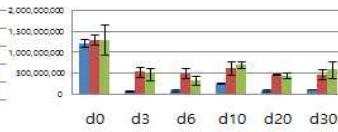
galactose



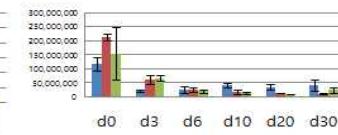
glucose



sucros



lactose



maltose

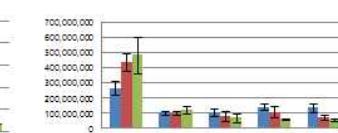


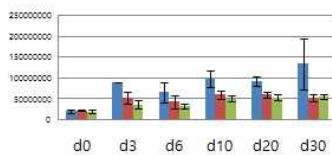
Figure 24. TN-D sugars

## < Sugar Alcohols >

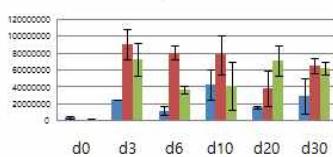
### - SURFACE Data

- 가수량 20%
- 가수량 26%
- 가수량 30%

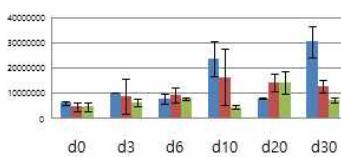
glycerol



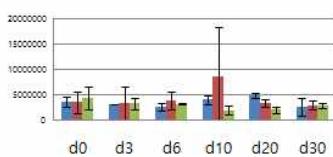
xylitol



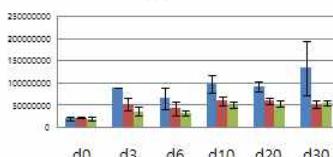
mannitol



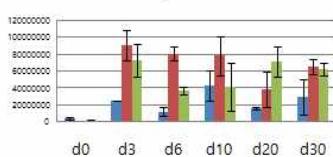
arabitol



glycerol

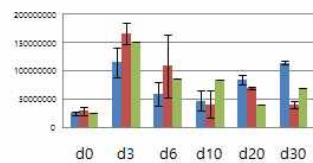


xylitol

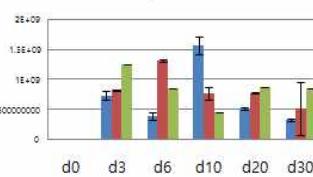


### - INNER PART Data

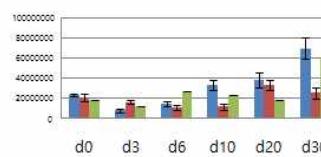
glycerol



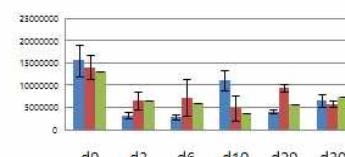
xylitol



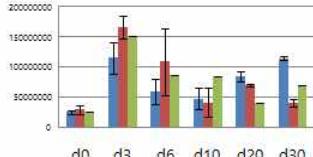
mannitol



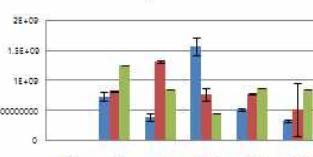
arabitol



glycerol

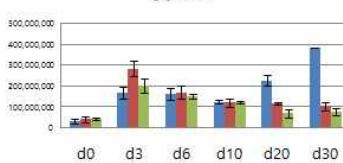


xylitol

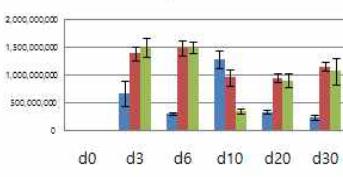


### - WHOLE Data

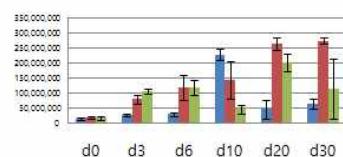
glycerol



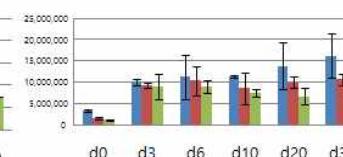
xylitol



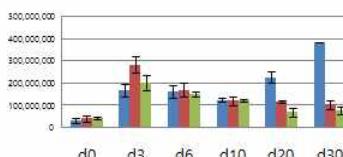
mannitol



arabitol



glycerol



xylitol

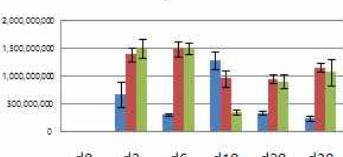
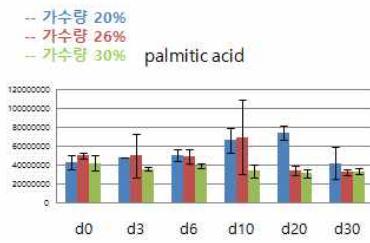


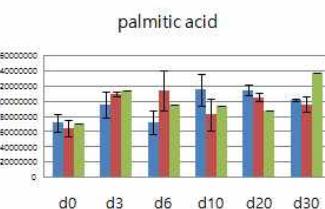
Figure 25. TN-D sugar alcohol

## < Fatty acids >

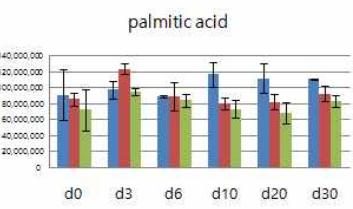
### - SURFACE Data



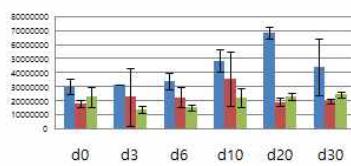
### - INNER PART Data



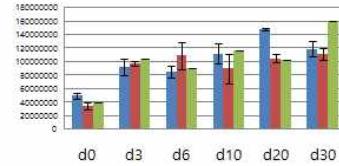
### - WHOLE Data



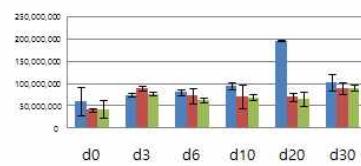
### linoleic acid



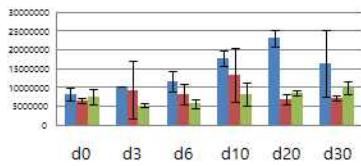
### linoleic acid



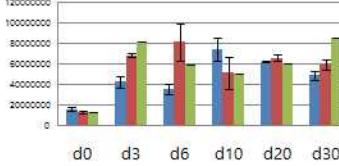
### linoleic acid



### oleic acid



### oleic acid



### oleic acid

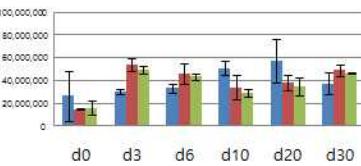


Figure 26. TN-D fatty acids

### (4-3) 시료 TN-E, F (surface, inner part, whole)의 시간경과에 따른 metabolite 양 비교분석

- 구조별 대사체에 대하여 surface, inner part, whole 세 부위에서 나타나는 대사체 양적 변화 경향을 상호 비교하였다.

#### Organic acids

TN-E가 TN-F의 surface에서 대사체의 양이 inner part 부분에서 보다 다소 높게 관찰되었다. 발효온도가 30°C 인 TN-E에서 40°C에서 발효된 TN-F에서 보다 대사체의 양이 더 높게 나타난다. 즉, 발효온도가 낮을수록 organic acid의 생성량이 많아지는 것으로 여겨진다. whole, surface 부분에서 발효경과 10일에서 최대치를 이루고 이후 완만히 감소한다.

#### sugars

단당의 경우, whole 부분에서는 모든 단당이 0일차 초기량이 매우 크게 관찰되고 이 후 감소하는 경향을 나타내는데 반해, surface 부분에서는 발효 시간 경과에 따른 양적 변화가 작다. inner part에서는 발효 초기량은 surface와 비슷하나 이후 감소량이 현저히 크다.

이단당의 경우, whole 에서는 발효 0일차 초기량이 급격히 감소한다. inner 부분에서, lactose, sucrose 는 whole 부분과 비슷한 경향을 나타낸다. surface의 경우에는 발효

과정을 통해 양적 변화가 크게 나타나지 않는다.

○ **sugar alcohols**

sugar alcohol 역시 전반적으로 whole과 inner part 부분에서 TN-E가 TN-F의 비해 상대적으로 많은 양이 검출이 된다. sugar의 경우 0일차에서 거의 존재 하지 않다가 3일차에 급증하는 경향을 나타낸다. 이 현상은 발효 과정에서 sugar를 소비해서 sugar alcohol을 생성하는 것에서 기인하는 것으로 생각된다. surface 부분에서는 20일차에 소폭 증가하는 구간이 나타난다.

○ **fatty acids**

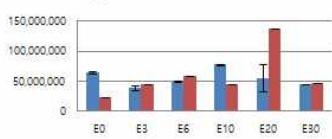
fatty acids 역시 전반적으로 세 부위에서 TN-E가 TN-F의 비해 상대적으로 많은 양이 검출이 된다. 0일차에서 일정량 존재하다가 3일차에서 급격히 증가 후 일정해지는 양상을 나타낸다. 그러나 surface 부분에서는 20일차에 소폭 증가하는 구간이 나타난다.

## < Organic acids >

### - SURFACE Data

-- E sample  
-- F sample

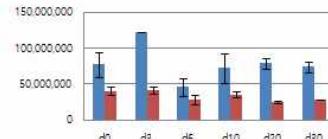
#### phoshoric acid



- phosphoric acid 의 경우 E sample에서는 10일자 까지 일정하게 증가하다가 감소하는 데 반해 F sample의 경우 20일자에서 대폭 증가한 후 감소한다.

### - INNER PART Data

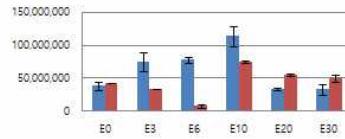
#### phosphoric acid



- phosphoric acid 의 경우 E sample에서는 3일자에서 소폭 증가 후 일정해 지는데 반해 F sample의 경우 큰 변화를 관찰 할 수 없다..

### - WHOLE Data

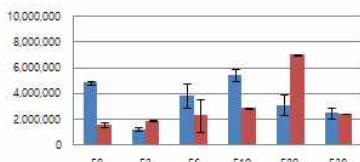
#### phosphoric acid



- phosphoric acid 의 경우 E sample에서는 10일자 까지 일정하게 증가하다가 감소하는 데 반해 F sample의 경우 E sample에 비해 양도적을 뿐만 아니라 6일자 10일자에서 변화를 제외하고는 일정하게 유지 된다.

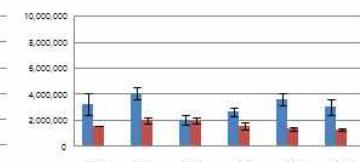
-- E sample  
-- F sample

#### succinic acid



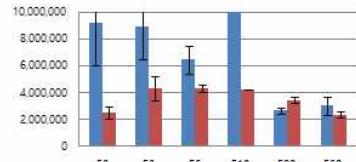
- Succinic acid의 경우 E sample에서는 10일자까지 소폭 증가하다가 감소한다.
- F sample의 경우 일정하다가 20일자에서 급증한 후 일정해진다.

#### succinic acid



- Succinic acid의 경우 E sample이 F sample에 비해 많은 양이 측정이 된다. 전체적으로 큰 변화를 나타내지 않는다.

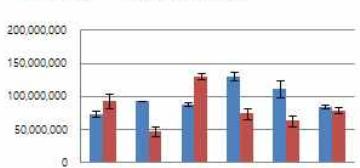
#### succinic acid



- Succinic acid의 경우 E sample의 10일차에 급격히 증가 하는 경우를 제외하고 거의 일정한 수치를 나타난다.

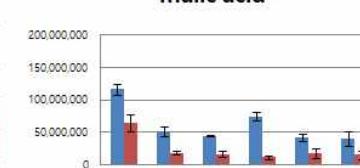
-- E sample  
-- F sample

#### malic acid



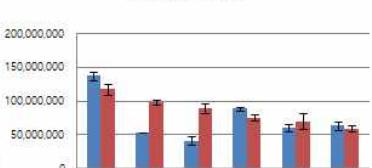
- E sample에서는 10일자까지 소폭 증가하다가 소폭 감소한다.
- F sample의 경우 일정하다가 6일자에서 급증한 후 일정해진다.

#### malic acid



- Malic acid의 경우 0일자에서 많은 양이 존재하다가 급격히 감소하는 경향을 나타낸다.

#### malic acid

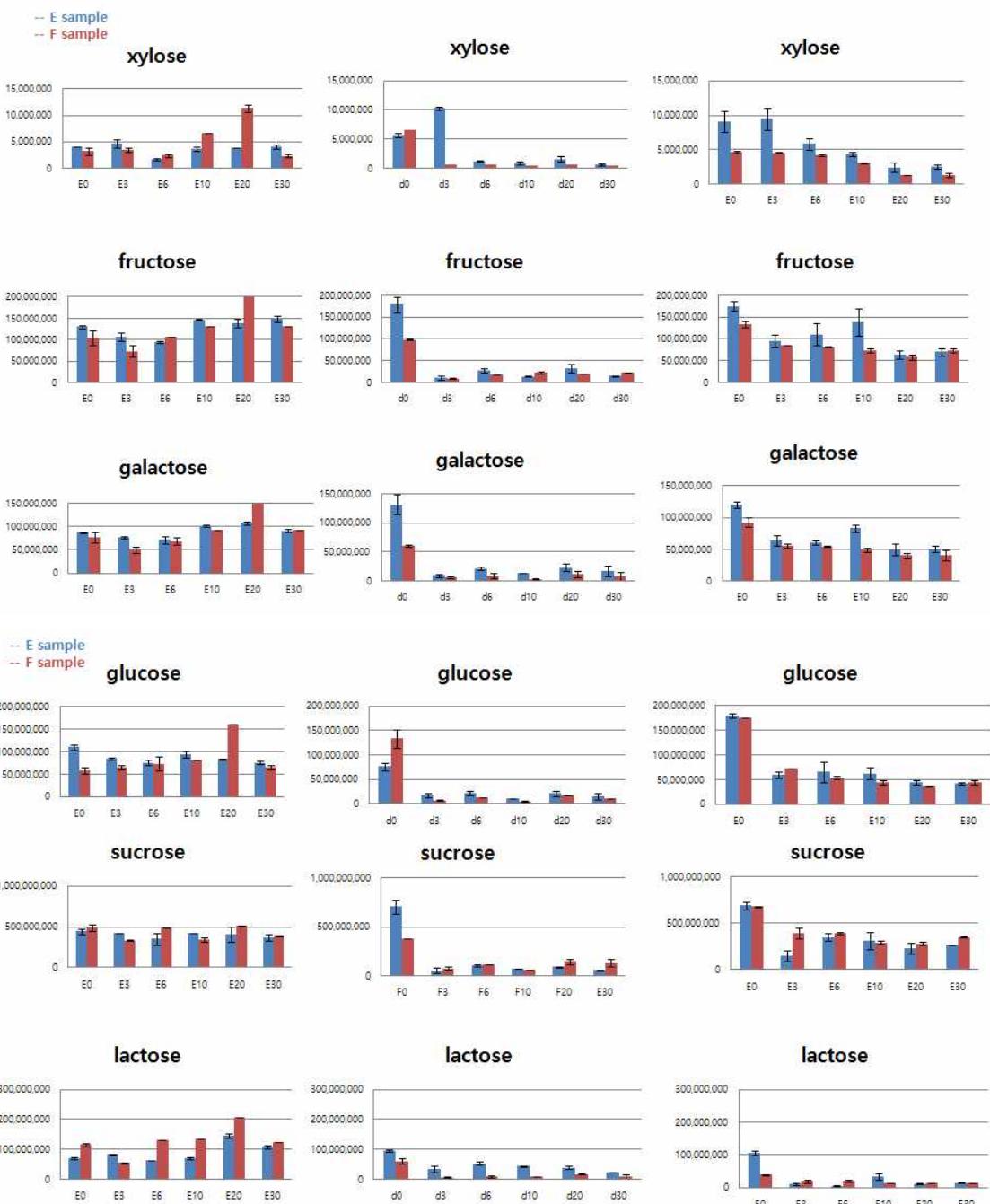


- 0일자에 과량 존재하다가 일정하게 감소 한다.

Figure 27. TN-E와 TN-F sample organic acid

## < Sugars >

### - SURFACE Data

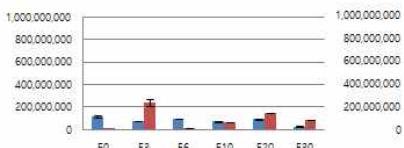
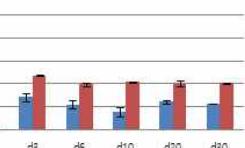


### - INNER PART Data

### - WHOLE Data

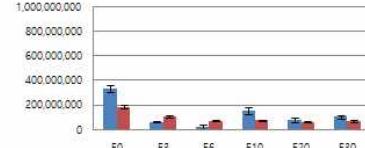
**- SURFACE Data****- INNER PART Data****- WHOLE Data**

-- E sample  
-- F sample

**maltose****maltose**

- whole data와 다르게 거의 변화가 없거나 20일차에서 급증한 후 일정해진다.

- maltose를 제외하고는 모두 0일차에서 가장 높은 값은 가지고 3일차 이후 급격히 감소하는데 maltose의 경우 0일차에서 소량 존재하다가 급격히 증각한다.

**maltose**

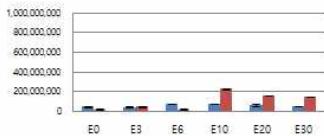
- whole sample의 경우 전반적으로 0일차 (E0,F0)에 높다가 점점 낮아지다가 일정해진다.

## < Sugar Alcohols >

### - SURFACE Data

-- E sample  
-- F sample

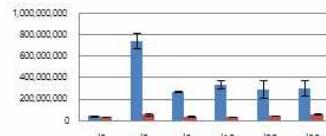
#### Glycerol



- E sample의 경우 거의 일정하게 유지된다.
- F sample의 경우 10 일자에서 소폭 증가 후 점점 감소한다.

### - INNER PART Data

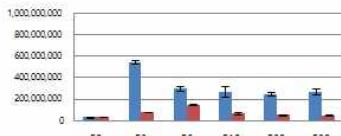
#### Glycerol



- E sample의 경우 거의 일정하게 유지된다.
- F sample의 경우 10 일자에서 소폭 증가 후 점점 감소한다.

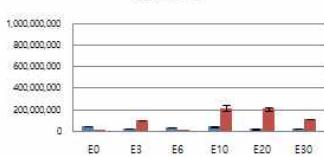
### - WHOLE Data

#### Glycerol



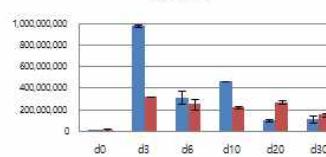
- E sample의 경우 3일자에서 급증한 후 소폭 감소 후 일정해진다.
- F sample의 경우 6일자에서 소폭 증가 후 일정해진다.

#### xylitol



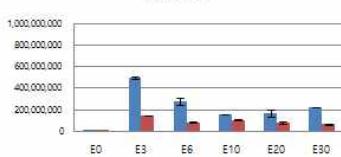
- E sample의 경우 거의 일정하게 유지된다.
- F sample의 경우 10 일자에서 소폭 증가 후 점점 감소한다.

#### xylitol



- E sample의 경우 거의 일정하게 유지된다.
- F sample의 경우 10 일자에서 소폭 증가 후 점점 감소한다.

#### xylitol



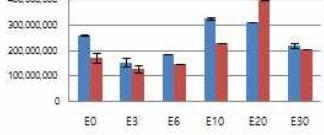
- 0일자 거의 존재하지 않다가 3일자에 급증한 후 일정하게 감소하다가 일정해진다.
- F sample이 상대적으로 수치가 낮다

#### mannitol

-- E sample

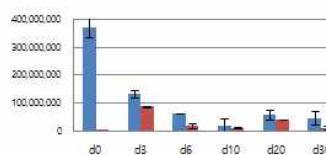
-- F sample

#### mannitol



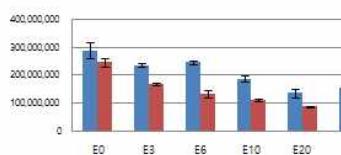
- E sample의 경우 10일자에서 소폭 증가 후 거의 일정하게 유지된다.
- F sample의 경우 20일자에서 소폭 증가 후 거의 일정하게 유지된다.

#### mannitol



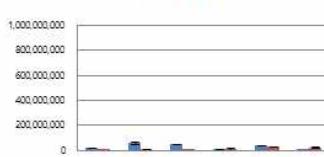
- E sample의 경우 10일자에서 소폭 증가 후 거의 일정하게 유지된다.
- F sample의 경우 20일자에서 소폭 증가 후 거의 일정하게 유지된다.

#### mannitol



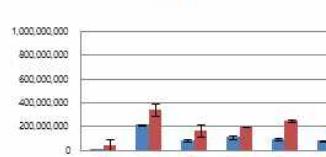
- 0일자에서 다양한 존재하다가 일정하게 감소한다.
- F sample이 상대적으로 수치가 낮다

#### arabitol



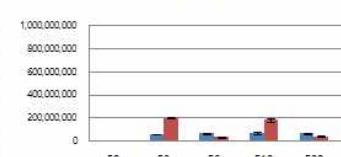
- 3일자에서 급증한 후 급격히 감소한다.

#### arabitol



- 3일자에서 급증한 후 급격히 감소한다.

#### arabitol



- 0일자에 미량 존재하다가 점차 증가한다.

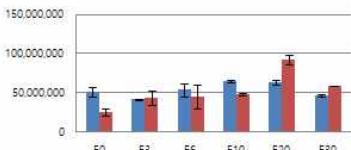
Figure 29. TN-E와 TN-F sample sugar alcohols

## < Fatty acids >

### - SURFACE Data

-- E sample  
-- F sample

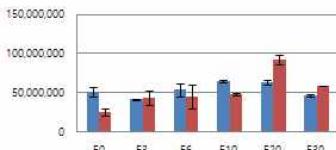
#### palmitic acid



- 거의 일정한 수치를 나타낸다.

### - INNER PART Data

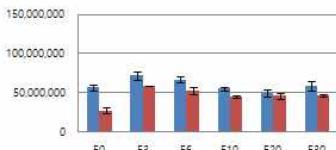
#### palmitic acid



- 거의 일정한 수치를 나타낸다.

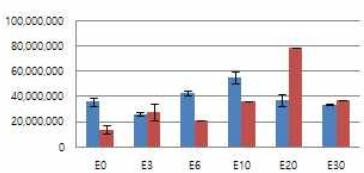
### - WHOLE Data

#### palmitic acid



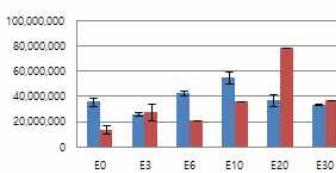
- 6일자 까지 일정하게 증가하다가 소폭 감소 한다.
- E data가 F data보다 상대적으로 높게 나타난다.

#### linoleic acid



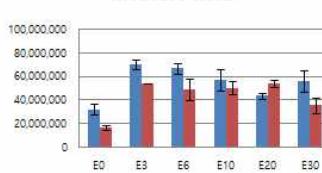
- 10일자 까지 꾸준히 증가하다 소폭 감소 한다.

#### linoleic acid



- 10일자 까지 꾸준히 증가하다 소폭 감소 한다.

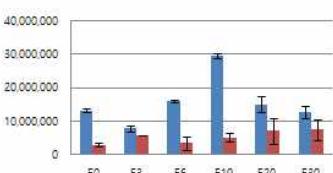
#### linoleic acid



- 3일자째 급증한 뒤 점차 감소한다.
- E data가 F data보다 상대적으로 높게 나타난다.

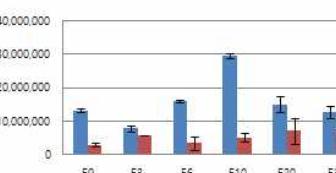
-- E sample  
-- F sample

#### oleic acid



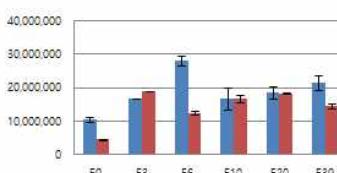
- E sample data가 상대적으로 F sample data 보다 높을 값을 가진다.

#### oleic acid



- E sample data가 상대적으로 F sample data 보다 높을 값을 가진다.

#### oleic acid



- 6일자까지 급증하다가 점차 감소한다.
- F sample 3일자 재 측정 필요

Figure 30. TN-E와 TN-F sample fatty acids

### (5) 본 연구 수행의 문제점 및 한계

- 누룩 시료 자체가 매우 복잡한 complex system으로 판단되며, 누룩 disk의 위치별, 부분별로 누룩 재료의 혼합 균일성이 유지되기 쉽지 않고, 발효시에 미생물들의 종류 (제조시 이미 유입된 미생물과 발효시에 표면에 부착하는 미생물)와 분포 및 이들의 생육 조건의 균일함이 유지되기 쉽지 않을 것으로 판단됨. 실제 누룩 시료별, 대사체별, 대사체 group내에서도 양적 변화의 일관성이 뚜렷이 나타나지 않고, 또한 표준 편차가 경우에 따라서 매우 큼.
- 이 문제점을 해결하기 위해서 보다 시료 수를 늘리거나, 혹은 반복실험, 재실험을 통해서 오차를 최대한 줄이고자 시도 하였으며, GC-MS 실험 수행 여건상 (의뢰) 용이하지 않았음. 또한 GC-MS 실험 수행을 위한 시료의 화학적 전처리 후 시간에 따른 시료의

불안정이 관찰됨. 따라서 유도체 합성 후 신속한 GC-MS 실험 수행이 필요하였음

<1협동 : 전통누룩 제조법 확립 및 품질특성(국립농업과학원, 여수환)>

## 1절 : 전통누룩 발효과정별 품질특성 규명

### (1) 재료 및 방법

#### 1. 누룩 제조공정 및 발효법 확립

1-1) 누룩 전처리 : 우리 밀을 둘러 밀로 분쇄한 후, 7-mesh (2.8 mm, 3번 내림) 채로 내려서, 가수량 26%(온도 40°C)로 살수 혼합하여 1시간 동안 실온에서 침윤을 시켰다.

1-2) 전통누룩 A(TN-A) : 침윤시킨 밀을 혼합한 다음, 340 g씩 무게를 달고 누룩 성형틀에 넣는다. 성형장치를 이용하여 동일한 크기와 무게로 누룩을 성형한 후, 발효(조건: 36°C, 2일 간격으로 뒤집기) 시켰다. 건조 장치를 이용하여 45°C에서 7일 동안 건조시킨 후 발효기간(0, 3, 6, 10, 20, 30일)에 따른 품질특성의 분석 시료로 사용하였다. 또한 각 발효기간별로 sampling하여 1, 2세부 및 2협동과제의 연구 시료로 분양하였다.

1-3) 전통누룩 B(TN-B) : 침윤시킨 밀을 혼합한 다음, 340 g씩 무게를 달고 누룩 성형틀에 넣는다. 성형장치를 이용하여 동일한 크기와 무게로 누룩을 성형한 후, 발효(조건 : 주발효 45°C, 10일 발효 → 후발효 35°C, 20일 발효, 2일 간격으로 뒤집기) 시켰다. 건조장치(건조기)를 이용하여 45°C에서 7일 동안 건조시킨 후 발효기간(0, 3, 6, 10, 20, 30일)에 따른 품질특성을 분석하였다. 또한 각 발효기간별로 sampling하여 1, 2세부 및 2협동과제 연구 시료로 분양하였다.

1-4) 자연 발효누룩(TN-N) : 침윤시킨 밀을 혼합한 다음 340 g씩 무게를 재서 성형장치를 이용하여 누룩을 성형한 후 발효 (발효조건: 20~25°C, 2일 간격으로 뒤집기) 시킨다. 이 누룩(TN-N)은 대조구로써 일반적으로 온도 조절을 하지 않았을 경우의 누룩의 품온 변화를 살펴보기 위해서 추가적으로 조사하였다.



Table 1. Process for making traditional *nuruk*



## 2. 저장성 실험

제조된 누룩의 저장조건에 따른 효소활성을 조사하기 위해, 우선, 저장 온도(4, 15, 30°C)와 저장 기간(0, 8, 12주)에 따른 효소 잔존능을 조사·분석하였다.

## 3. 분석 방법

### 3-1) 발효기간에 따른 품온 측정

발효 중 품온 변화는 HOBO<sup>®</sup>사의 data logger U12-013를 이용하여 발효기간(0, 3, 6, 10, 20, 30일)에 따른 누룩의 품온 변화를 6시간 간격으로 측정하였다.

### 3-2) 무게, 크기, 수분함량 등의 외형적 특성 분석

무게는 micro weighing scale (MW-II 6000N, CAS Co.)로 측정하고, 크기는 digimatic caliper (CD-20CPX, Mitutoyo Co.)로 측정하였다. 누룩의 수분함량은 moisture analyzer (MX-50, AND Co.)로 측정하였다.

### 3-3) 이화학적 특성 및 효소 분석용 시료 조제

이화학적 특성 분석을 위한 누룩 시료는 검사시료 20 g에 증류수 100 mL을 가하고 실온에서 3시간 침출하여 그 여과 용액을 준비하였다. 효소활성 분석을 위한 시료는 시료 10 g에 염화나트륨 용액 50 mL을 가해서 저온실(4°C)에서 하룻밤 또는 실온(15~20°C)에서 3시간 때때로 흔들어 침출한 후, 여과하여 사용하였다. 이액을 본 실험의 조효소액으로 하였다.

#### 4. pH, 총산도, 아미노산도 등의 이화학적 특성 분석

pH는 pH meter (Orion 3 star, Thermo scientific Co.)로 실온에서 측정하였다. 총 산도는 일정량의 시료를 취하여 여과지로 여과한 검체 10 mL를 100 mL 삼각 플라스크에 취한 다음, 0.5% phenolphthalein 지시약을 2~3방울 떨어뜨리고 0.1 N-NaOH로 적색이 될 때까지 중화 적정하였으며 소비된 용액의 양을 lactic acid(%)로 환산하였다.

아미노산도는 여과지로 여과한 검체 10 mL에 0.5% phenolphthalein 지시약을 2~3방울 떨어뜨린 다음, 0.1 N-NaOH로 담홍색이 될 때까지 중화한 후, 여기에 중성포르말린 용액 5 mL을 가하여 유리된 산을 0.1 N-NaOH로 적정하여 담홍색이 될 때까지 소요된 0.1 N-NaOH의 mL 수로 표시하였다.

#### 5. 효소 역가 측정

##### 5-1) $\alpha$ -amylase activity

$\alpha$ -amylase 활성은 1% 전분용액 2 mL을 시험관에 취해, 40°C에서 5분간 예열한 후, 효소액 0.1 mL을 가해서 반응을 개시하고, 반응액 중에서 0.1 mL씩 피펫으로 1분 간격으로 미리 요오드용액을 10 mL를 넣어둔 시험관에 넣어 혼합하여 생성된 색을 25°C에서 유지하다가 두꺼운 10 mm을 통과하여 670 nm색을 비교하고, 투과율 T%를 측정하였다. 효소활성(unit)은 Wohlgemuth value에 준한 아래 식으로 산출하였다.

$$U(\text{units/g}) = \{(12.75 \times (T_{30 \text{ min}} - T_{0 \text{ min}})/30 \text{ min})\} \times \text{희석배수}$$

$T_{30 \text{ min}}$  : 30분간 효소반응을 시킨 후의 투과도

$T_{0 \text{ min}}$  : 효소반응을 시키기 전의 투과도

##### 5-2) Acidic protease activity

Acidic protease 활성은 카제인 용액 1.5 mL에 pH 3.0 맥바인 완충액 1.0 mL와 조효소액 0.5 mL를 넣고 40°C에서 60분간 반응시킨 후, TCA용액 3 mL을 가해 반응을 정지시키고 침전을 제거하였다. 이 액 1 mL에 탄산나트륨용액 5 mL와 폐놀시약 1 mL을 가해서 40°C에서 30분간 발색시킨 후, 660 nm에서 흡광도를 측정하였고, 별도로 대조구로는 TCA용액을 가하기 직전에 효소액을 첨가하여 이하 위의 방법과 동일하게 하여 흡광도를 측정하여 아래 식에 의해서 효소활성을 산출하였다.

$$\text{효소활성(unit/g)} = y \times 6/1(\text{반응액량}) \times 1/0.5(\text{효소액량}) \times \text{희석배수}$$

##### 5-3) Glucoamylase activity

Glucoamylase 활성은 2% 전분용액 1 mL에 0.2 M 초산 완충액 0.2 mL를 가해서 40°C에서 5분간 예열한 후, 효소액 0.1 mL를 가해서 40°C에서 20분간 반응시키고, 1 N NaOH용액 0.1 mL을 첨가하여 반응을 정지시킨 후, 30분간 방치하고 1 N 염산용액 0.1 mL를 가해 중화하였다.

본 실험에 사용한 대조구는 전분용액 1 mL에 0.2 M 초산 완충액 0.2 mL을 가해 40℃에서 5분간 예열하였다. 대조구는 시료와 동일하게 1 N 염산용액 0.1 mL를 가해 중화시켰고, 효소 활성은 DNS법으로 환원당을 측정하여 생성된 포도당량으로 하였다. Glucoamylase 활성은 가용성 전분으로부터 40℃에서 60분간 1 mg의 포도당을 생성하는 활성을 1 unit로 하였으며, 시료 1 g의 glucoamylase 활성은 다음의 식으로 산출하였다.

$$\text{효소활성(unit/g)} = \frac{\text{생성 포도당량(mg)}}{\text{반응시간}} \times \frac{60}{20} \times \frac{1}{0.1(\text{효소량})} \times \text{희석배수}$$

#### 5-4) Saccharogenic power (SP)

##### 5-4-1) 효소작용

SP는 효소액을 희석배수 2개, 최소 10 mL씩 희석한 후, 조효소액으로 사용하였다. 2% 전분 용액 50 mL과 식초산 완충용액 30 mL을 100 mL 용량 플라스크에 취한 다음 55℃로 예열시킨 항온수조에서 10분 동안 예열시키고, 효소액 10 mL (대조구는 증류수 10 mL)을 넣고 60분 동안 당화시켰다. 0.5 N-NaOH 10 mL을 넣고 효소반응을 정지시키고, 급냉시킨 후, 증류수를 위하여 100 mL로 조정하였다.

##### 5-4-2) 당분정량

펠링 A시약 5 mL, 펠링 B시약 5 mL과 증류수 40 mL를 250 mL 삼각 플라스크에 넣고 준비한 후, 대조구로서 증류수 10 mL를 펠링시약 넣은 삼각플라스크에 넣고 삼각 플라스크를 끓여가며 표준 포도당 용액으로 적정하였다(초반에 22 mL 정도 넣고 끓임. 24~26 mL정도 소비됨).

황산구리의 청색이 점차 없어지면 메틸렌블루용액 4방울을 떨어뜨리고 용액을 계속 끓이면서 표준 포도당 용액을 떨어뜨려 청색이 없어진 때를 종말점으로 하고, 이때 표준 포도당 용액의 소비 mL수를 B라 하였다. 다음 효소액 10 mL을 펠링시약을 넣은 삼각 플라스크에 넣은 후, 끓여가며 표준 포도당 용액으로 적정하는데, 초반에는 표준포도당 용액을 넣지 않고 청색이 없어질 때쯤 메틸렌블루용액 4방울을 가하고 청색이 없어질 때까지 적정하였다. 적정을 완료하였을 때까지의 표준 포도당 용액의 소비 mL수를 M이라 하면 당화율은 다음과 같이 산출하였다.

$$\text{포도당(mg)} = \frac{2(B-M)}{\text{효소반응 채취량 (mL)}} \times 100$$

$$\text{SP} = \frac{\text{당화율}}{\text{희석배수}}$$

#### 6. 생균수 측정

시료 10 g을 취하여 멸균 백에 넣고 90 mL의 멸균 생리식염수를 가하여 균질기로 용해하고 멸균 생리식염수로 단계별로 희석한 후, PCA배지에 도말하고 나타난 균체수를 CFU/g로 표기하였다.

#### 7. 유기산 분석

누룩 시료 1 g에 20% ethanol 5 mL을 가한 후, 20분 동안 sonicator에서 초음파하면서(3

0°C) 추출하고, 원심분리기에서 3,000 rpm, 10분 동안 원심여과한 후, 20% ethanol 5 mL을 가하고 위와 같은 방법으로 3회 반복하여 총 20 mL이 되게 하였다. 상등액을 취하여 0.2 μm membrane filter (Mullepore Cp., Ireland)로 여과한 후, 분석하였고, 유기산 분석은 HPLC (LC-20A Prominence, Shimadzu Co., Japan)을 사용하고, column은 KC-811 (7.8×300 mm, Shodex Co.), mobile phase는 4 mM surfuric acid를 사용하였으며 flow rate는 0.6 mL/min, injection volume은 10 μL, detector는 PDA (210 nm) 사용하였다.

## 8. 유리아미노산 분석

시료 1 g에 80% ethanol 25 mL를 넣고 homogenizer로 균질화한 후, 30°C에서 15분 추출하였다. 추출물을 원심분리(4°C, 3,000 rpm, 10분)하여 상등액을 1 mL 또는 2 mL 취하여 증발건조(농축기 or dry oven 사용)시킨 다음, 0.02 N HCl 1 mL 또는 2 mL를 가하여 잘 녹이고, 0.2 μm Syringe filter (Whatman Co., USA)로 여과한 후, amino acid analysis system (L-8900, Hitachi Co., Japan)을 이용하여 분석하였다. 유리아미노산 분석조건은 Table 2에 나타내었다.

Table 2. Conditions of amino acid analysis

Content	Condition
Amino acid analysis	L-8900
Column	Cation separation Lithum. 4.6×150 mm Cation Lithum filter. 4.6×100 mm
Detector	UV-Vis (440 nm ~ 570 nm)
Buffer flow rate	0.45 mL/min
Ninhydrin flow rate	0.25 mL/min
Injection volume	100 μL
Mobile phase	A(pH 2.85) : Lithium citrate 1.41% + citric acid 0.7% + methanol 5% + HCl 0.9% B(pH 4.20) : Lithium citrate 1.41%+citric acid 0.7%+HCl 0.6% C(pH 3.30) : Lithium citrate 1.88% + lithium chloride 5.07% + HCl 1%

## 9. 향기성분 분석

시료 10 g에 에테르-펜탄 혼합용액(1:1) 100 mL를 넣고 150 rpm, 20°C에서 하룻밤 동안 추출한 후, 여과하고 걸러진 시료에 에테르-펜탄 혼합용액(1:1) 50 mL를 넣고 150 rpm, 20°C에서 1시간 동안 재 추출하였다. 두 추출용액을 혼합하여 sodium sulfate를 첨가하여 물이 전부 흡수될 때까지 흔들어준 다음, 이 액을 여과하고 농축한 후, 0.2 μm Syringe filter (Whatman Co., USA)로 여과하여 GCMS (GCMS-QP 2010 plus)을 이용하여 분석하였다(Table 3).

**Table 3. Conditions of GC-MS**

Content	Condition				
GC-MS	QP 2010 plus				
Column	HP-INNOWAX (60 m × 0.25 mm i,d × 0.25 μm film thickness)				
Injection temp.	250°C				
Column flow	1.0 cm/sec (linear velocity, N <sub>2</sub> )				
Split ration	20				
Column temp.	<table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <tr> <td>40°C</td> <td>230°C</td> </tr> <tr> <td>2 min</td> <td>30 min</td> </tr> </table>	40°C	230°C	2 min	30 min
40°C	230°C				
2 min	30 min				
Detection	FID 250°C				
Injection volume	1 μL				

## 10. 통계 분석

모든 시료의 품질특성 분석은 실험군의 오차를 줄이기 위해, 3회 반복하여 평균과 표준편차로 나타내었다.

### (2) 실험결과

#### 1. 발효조건에 따른 누룩의 외형적 특성 구명

본 연구에서 제조 개발한 전통누룩의 외형적 변화를 Table 4에 나타내었다. 대조구로서 현재 시판중인 부산의 산성누룩과 광주의 송학누룩을 사용하였다. 전통방식을 이용하여 제조한 누룩의 발효기간에 따른 외형적 특성을 살펴본 결과, 발효 0일차의 전통누룩 A와 B의 외형적 차이는 크게 보이지 않았으며, 발효 초기에는 전통누룩 A와 B에서 당화능력을 가진 활털 곰팡이(*Lichthemia* spp.)가 관찰되었고, 발효기간이 길어짐에 따라 45°C에서 후 발효시킨 전통누룩 B의 경우에는 누룩 내부와 표면에 텔곰팡이(*Mucor* spp.)와 거미줄곰팡이(*Rhizopus* spp.) 외 다수의 곰팡이를 관찰할 수 있었다.

Table 4. Change of traditional *nuruk* by fermentation period

	Sansung	Songhak	
Control			
1			
TN-A	TN-B	TN-A	TN-B
0 d			
6 d			
20 d			

\*A : Traditional *nuruk* A (Fermentation condition: 36°C), B : Traditional *nuruk* B (Main fermentation: 45°C, After fermentation: 35°C)

전통누룩의 무게, 크기와 수분함량을 분석한 결과를 Table 5에 나타내었다. 누룩의 무게와 크기는 발효기간에 따라 전체적으로 감소하는 경향을 보였고, 이는 발효기간이 길어짐에 따라 발효과정 중 수분이 증발하기 때문인 것으로 생각되었다. 수분함량 분석 결과, 대조구인 산성누룩과 송학누룩은 11.9%와 8.66%였고, 전통누룩 A, B의 수분함량은 1~2%였다.

보통 시판 누룩의 경우 8~10%의 수분함량을 보이나, 본 실험에서는 45°C에서 7일 동안 건조하는 과정을 거쳤기 때문에 전체적으로 수분함량이 1~2%로 낮은 수치를 보였다. 본 연구에서 누룩의 건조과정을 인위적으로 거친 이유는 수분함량을 인위적으로 낮춤으로 해서 다른 미생물 생육을 저해하고, 누룩의 저장성을 높이기 위함이다.

Table 5. Configurational property of traditional *nuruk* by fermentation period

<i>Nuruk</i>	Fer. time (day)	Weight (g)	Size (diameter×height mm)	Moisture content (%)
C 1	<i>Sansung</i>	-	-	11.9±0.1 <sup>1)</sup>
C 2	<i>Songhak</i>	-	-	8.7±0.2
TN-A	0	247.7	118.1×31.7	1.8±0.1
	3	241.4	118.4×31.9	1.5±0.1
	6	241.5	118.8×30.5	1.6±0.0
	10	242.8	118.6×31.6	1.9±0.2
	20	242.1	118.6×31.5	1.3±0.1
	30	241.3	117.5×30.0	2.0±0.2
	0	247.7	118.1×31.7	1.7±0.1
TN-B	3	240.3	117.9×31.5	1.6±0.1
	6	239.4	119.8×32.4	1.4±0.2
	10	240.3	116.2×31.6	2.1±0.2
	20	242.1	117.2×30.6	1.5±0.1
	30	241.3	116.9×30.6	2.0±0.1

<sup>1)</sup>values are mean±SD (n=3).

## 2. 발효기간에 따른 품온 변화

제조한 전통누룩의 발효기간에 따른 품온 변화를 Fig. 1에 나타내었다. 전통누룩 A의 경우, 36°C에서 전발효를 진행하였으며, 0일부터 누룩미생물이 활동을 시작하여 2일째 가장 왕성한 번식을 하면서 최고 품온이 45°C까지 올라갔으며 3일째부터 발효가 정체되면서 누룩의 품온이 36°C로 발효 30일까지 일정하게 유지되었다.

전통누룩 B의 경우, 45°C에서 전발효를 진행하였으며, 발효 초기단계인 3일 동안 높은 온도에서 발효가 진행되면서 최고 품온은 47°C까지 올라갔으며, 3일부터 발효가 정체되면서 누룩의 품온이 일정하게 유지되었고, 발효 10일부터는 35°C로 온도를 낮춰 후발효를 진행하였다. 이에 따라 발효 30일까지 품온은 35°C로 일정하게 유지되었다.

온도와 품온 조절을 전혀 하지 않은 상태로 자연발효를 시킨 누룩의 경우, 외기 온도가 20~25°C의 조건에서 발효를 진행하였고, 0일부터 누룩미생물이 활동을 시작하여 2일째 가장 왕성한 생육을 하면서 최고 품온이 27°C까지 증가하였고, 3일 이후부터는 24±1°C로 품온이 일정하게 유지되었고, 이는 발효온도 차이는 있지만 전체적으로 전통누룩 A, B와 동일한 미생물 생육과 품온 변화를 나타내었다.

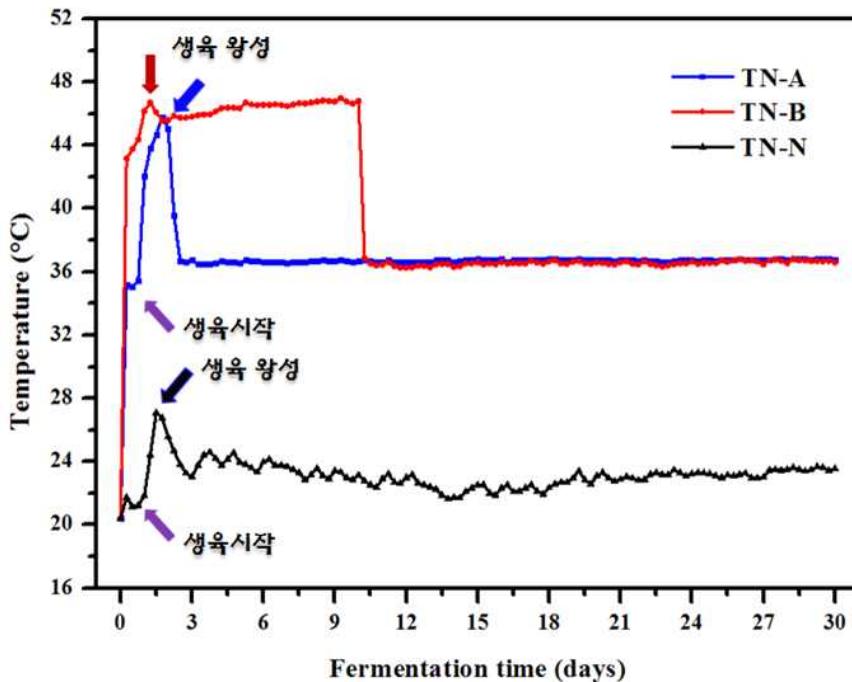


Fig. 1. Material temperature change of traditional *nuruk*.

### 3. 발효기간에 따른 밀 누룩 품질 변화

#### 1) 이화학적 특성

발효기간에 따른 누룩의 이화학적 특성은 Table 6과 Fig. 2에 나타내었다. 대조구인 산성누룩과 송학누룩의 추출물 pH는 6.64와 6.29이었고, 전통누룩 A(TN-A)의 경우, 발효기간에 따라 pH가 6.18에서 5.84로 감소하였고, 전통누룩 B(TN-B)의 경우에는 6.18에서 발효 6일째 6.52로 증가하였다가 발효 30일째 6.36으로 감소하였다. 시판 및 제조한 전통누룩의 추출물 pH는 약한 중성으로서 이들 간의 변화는 크지 않았다.

대조구인 산성누룩과 송학누룩의 산도는 0.19%와 0.15%이었고, 전통누룩 A(TN-A)는 발효기간에 따라 산도가 0.046%에서 0.078%로 증가하였고, 전통누룩 B(TN-B)의 산도는 0.046%에서 0.042%로 감소하였다. 시판누룩보다 제조한 전통누룩의 산도가 2~5배 낮았는데 이는 누룩 발효 초기에 위해 미생물 등의 잡균의 오염방지에 효과적일 것으로 예상되었다.

아미노산도의 경우, 산성누룩과 송학누룩은 1.28 mL로 같은 값이었고, 전통누룩 A는 발효기간에 따라 아미노산도가 증가하다 발효 10일부터 발효기간에 따라 0.48 mL로 감소하였다. 전통누룩 B는 초기 아미노산도가 0.36 mL에서 발효 3일째 0.49 mL로 증가하였다가 발효 10일부터 0.42 mL로 감소하였다.

따라서 제조한 전통누룩 A, B의 아미노산도는 대조구로 사용한 시판누룩보다 약 3배 정도 낮기 때문에 택·약주를 제조하였을 때, 후미의 느끼한 맛이 많이 상쇄 될 것이다. 이는 맛의 변화에 영향을 줄 것으로 생각되었다.

Table 6. Physicochemical property of traditional *nuruk* by fermentation period

<i>Nuruk</i>	Fer. time (day)	pH	Acidity (%, lactic acid)	Amino acidity (0.1N-NaOH mL/10mL)
C 1	<i>Sansung</i>	6.64±0.03 <sup>1)</sup>	0.1881±0.0068	1.28±0.10
C 2	<i>Songhak</i>	6.29±0.02	0.1518±0.0143	1.28±0.01
	0	6.18±0.05	0.0462±0.0019	0.36±0.01
	3	5.90±0.01	0.0708±0.0027	0.68±0.02
TN-A	6	5.88±0.01	0.0786±0.0018	0.70±0.02
	10	5.86±0.02	0.0735±0.0014	0.59±0.02
	20	5.85±0.01	0.0699±0.0014	0.48±0.03
	30	5.84±0.01	0.0783±0.0009	0.48±0.03
	0	6.18±0.05	0.0462±0.0019	0.36±0.01
	3	6.46±0.00	0.0429±0.0014	0.49±0.03
TN-B	6	6.52±0.01	0.0405±0.0016	0.45±0.02
	10	6.47±0.01	0.0393±0.0010	0.44±0.05
	20	6.47±0.01	0.0384±0.0023	0.42±0.02
	30	6.36±0.01	0.0420±0.0019	0.42±0.02

<sup>1)</sup>values are mean±SD (n=3).

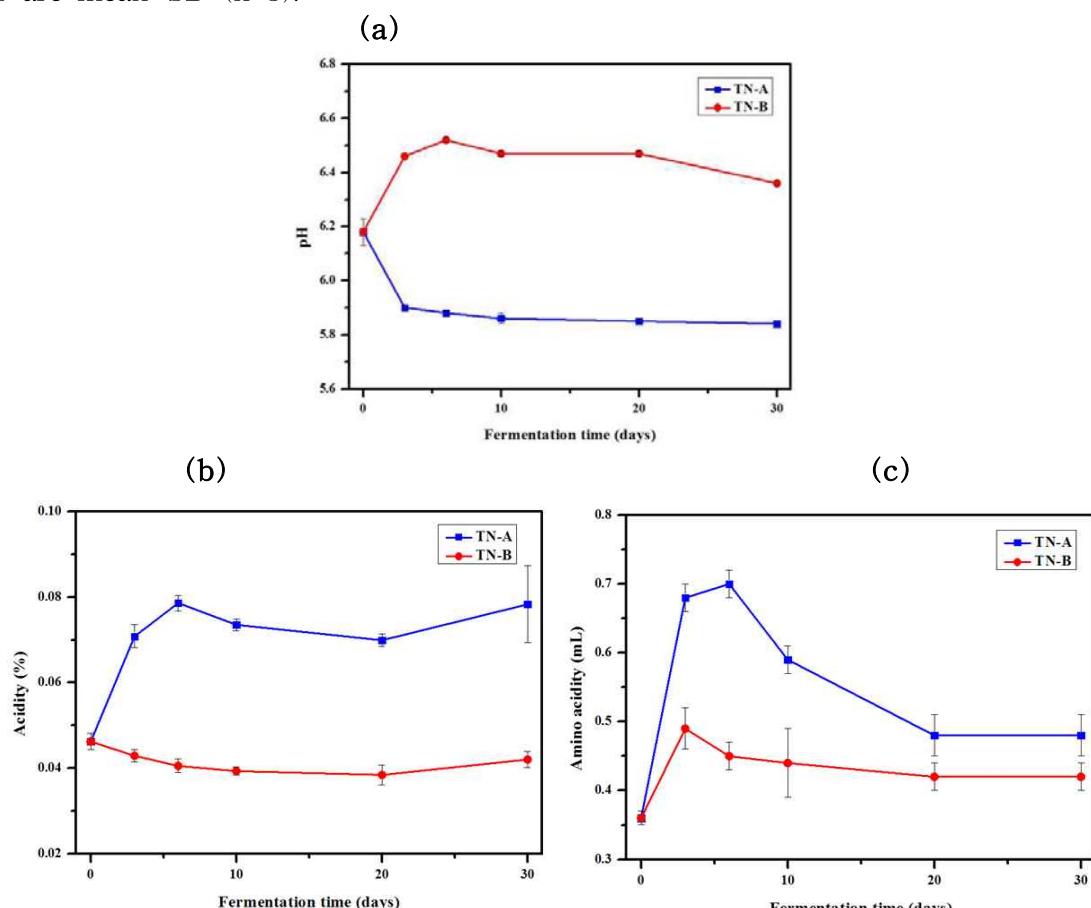


Fig. 2. Changes of physicochemical property on traditional *nuruk* by fermentation period. Symbols: (a) pH, (b) Acidity, (c) Amino acidity

## 2) 효소학적 특성

시판 및 제조한 전통누룩의 효소 종류별 활성을 Table 7과 Fig. 3에 나타내었다.  $\alpha$ -amylase 활성은 대조구인 산성누룩과 송학누룩은 175.1과 280.5 units/g이었다. 전통누룩 A(TN-A)는 발효기간에 따라 활성이 증가하였고, 전통누룩 B(TN-B)는 활성이 증가하다 10일 째 감소하였다. 전통누룩 A의  $\alpha$ -amylase activity는 310.3 units/g으로 전통누룩 B (222.9 units/g)보다 활성이 높았다. 그리고 대조구인 시판누룩보다 전통누룩의 활성이 1.2배 높은 것을 볼 수 있었다.

Glucoamylase 활성은, 산성누룩과 송학누룩은 908과 3,372 units/g이었고, 발효기간에 따라 전통누룩 A와 B 둘 다 활성이 감소하다 증가하는 경향을 보였다. 발효 30일차에 전통누룩 A와 B의 활성은 5,592과 4,628 units/g로 대조구인 시판누룩보다 2.3배 높은 활성을 보였다. 결론적으로 제조한 누룩의 당화력이 시판누룩보다 높다는 것은 술을 빚을 때, 날곡류인 누룩의 효소활성으로 쌀 전분을 당으로 분해시키는 효과가 크다는 것을 나타낸다.

산성 단백질 활성은 산성누룩과 송학누룩은 4,779.8과 4,212.5 units/g이었다. 발효기간에 따라 전통누룩 A, B 둘 다 활성이 증가하다 감소하는 경향을 보였고, 발효 30일차에 효소활성은 1,928.5과 1,397.3 units/g로 대조구인 시판누룩보다는 3배정도 낮은 값을 보였다. 특히, 누룩은 메주와 구성성분이 다른 관계로 지나칠 정도로 단백질 분해력이 높으면 단백질이 분해되어 아미노산으로 전환되는데, 이때 주질의 맛 차이가 결정되기 때문에 단백질 분해력이 낮은 것이 유익하다.

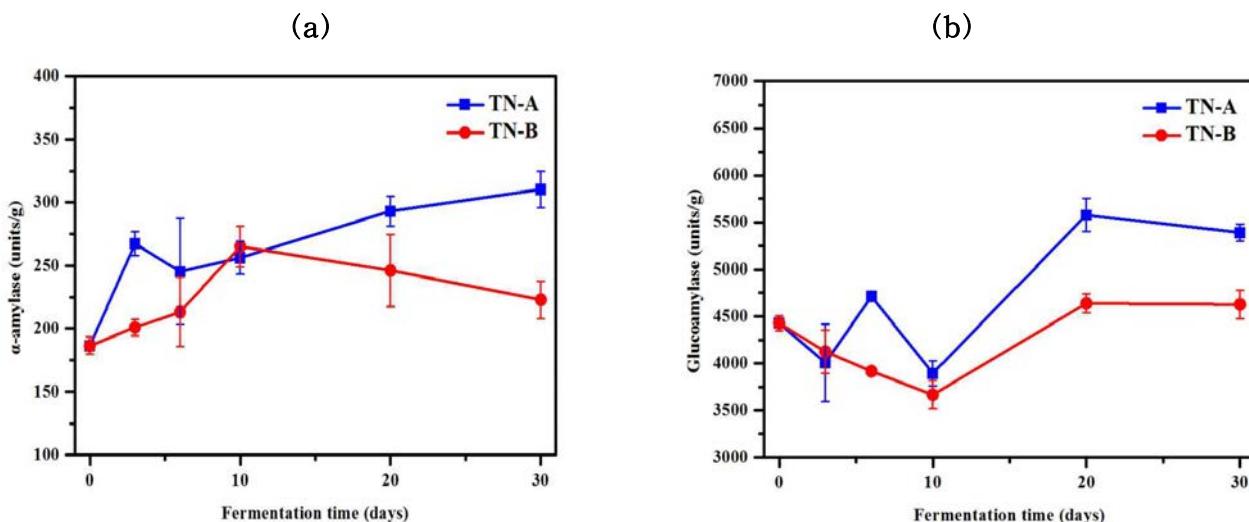
당화력(SP) 측정 결과, 산성누룩과 송학누룩은 467.3과 915.5 SP이었고, 전통누룩 A와 B 모두 발효 3일째 당화력이 증가한 후, 그 이후에는 일정하게 유지되는 것을 볼 수 있었다. 발효 30일의 전통누룩 A, B의 당화력은 1055.6과 1003.7 SP로 대조구인 시판누룩보다 1.5배 우수한 것을 볼 수 있었다. 당화력(SP)의 경우, 발효 0일에도 719.33 SP 값을 보였는데 이는 45°C에서 7일 동안 건조하는 과정 중에서 누룩의 발효가 진행된 것으로 생각되었다.

전체적으로 시판누룩보다 전통누룩의  $\alpha$ -amylase, glucoamylase활성과 당화력이 뛰어나고, 시판누룩의 경우 산성단백질 분해력이 뛰어난 것을 알 수 있었다.

Table 7. Enzyme activity of traditional *nuruk* by fermentation period

NO.	Fer. time (day)	Enzyme activity (units/g)			Saccharogeni c power (SP)
		$\alpha$ -amylase	Glucoamylase	Acid protease	
C 1	<i>Sansung</i>	175.07±7.63	908.00±147.50	4779.76±325.73	467.35
C 2	<i>Songhak</i>	280.51±17.90	3372.00±39.34	4212.48±77.12	915.52
	0	186.50±6.91	4428.00±78.17	288.02±57.43	719.33
	3	267.44±9.37	4007.50±411.17	1340.28±20.08	952.42
TN-	6	245.32±41.96	4713.75±23.42	2467.20±29.43	978.02
A	10	256.29±13.17	3895.50±130.91	1500.00±37.58	961.74
	20	293.22±11.82	5580.75±173.49	1684.96±30.64	1041.68
	30	310.28±14.37	5392.00±90.07	1928.52±89.81	1055.64
	0	186.50±6.91	4428.00±78.17	288.02±57.43	719.33
	3	201.14±6.60	4125.00±229.67	1292.40±36.39	951.32
TN-	6	213.36±27.45	3916.25±44.74	752.48±66.03	920.00
B	10	265.16±16.06	3667.50±149.18	1478.64±20.36	931.41
	20	246.17±28.63	4639.25±99.38	2012.88±24.34	934.35
	30	222.93±14.75	4628.00±151.00	1397.30±30.54	1003.74

<sup>1)</sup>values are mean±SD (n=3).



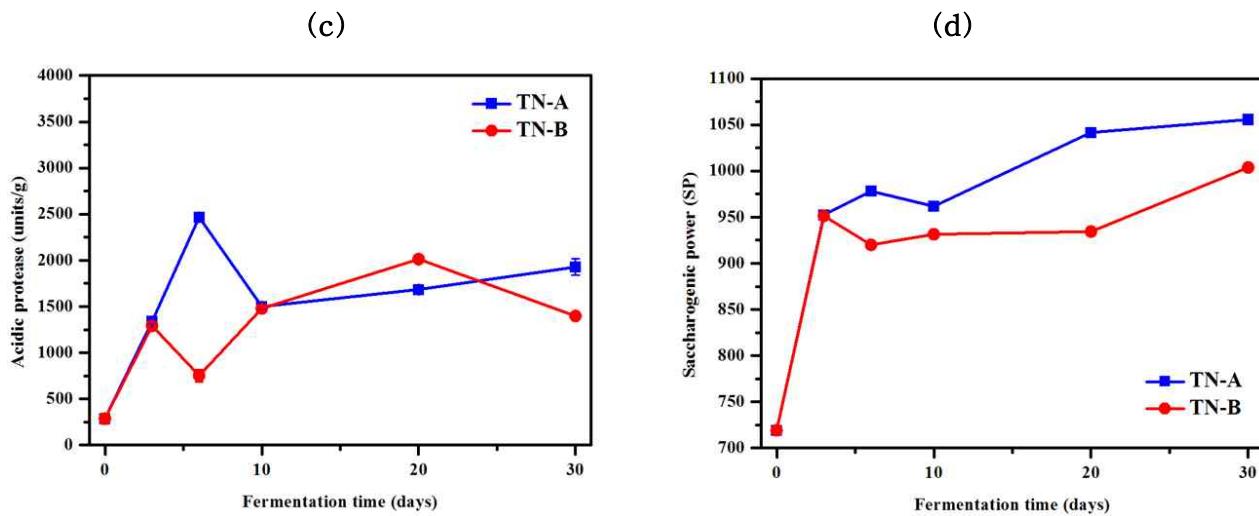


Fig. 3. Change of enzyme activity on traditional *nuruk* by fermentation period. Symbols: (a); $\alpha$ -amylase (b); glucoamylase (c); acidic protease (d); saccharogenic power.

### 3) 생균수 측정

제조한 전통누룩에서 세균의 생균수를 측정한 결과를 Table 8에 나타내었다. 대조구인 시판 누룩과 제조 누룩의 생균수는  $10^9\sim10^{10}$ 이었고, 발효기간에 따른 전통누룩의 생균수는 발효 초기에 생육이 왕성하다가 발효기간이 길어짐에 따라 감소하는 경향을 볼 수 있었다. 그리고 텔 곰팡이류(*Lichethemia* sp., *Rhizopus* sp., *Mucor* sp. 등)는 이 실험에서 제외를 하였다.

Table 8. Determination of viable count of traditional *nuruk* by fermentation period

Nuruk	Fer. time (day)	Viable cell count (cfu/g)
C 1	Samsung	$1.8\pm0.2\times10^{101}$
C 2	Songhak	$3.7\pm0.3\times10^9$
TN-A	0	$7.2\pm1.7\times10^9$
	3	$3.6\pm0.2\times10^{10}$
	6	$1.2\pm0.6\times10^{10}$
	10	$1.8\pm0.5\times10^{10}$
	20	$1.3\pm0.3\times10^{10}$
TN-B	30	$8.4\pm1.1\times10^9$
	0	$7.2\pm1.7\times10^9$
	3	$1.7\pm0.3\times10^{10}$
	6	$1.4\pm0.2\times10^{10}$
	10	$1.9\pm0.1\times10^{10}$
	20	$7.3\pm1.5\times10^9$
	30	$9.4\pm1.9\times10^9$

<sup>1)</sup>values are mean $\pm$ SD (n=3).

### 4) 유기산 분석

대조구로서 시판 중인 산성 및 송학누룩과 본 연구에서 제조한 전통누룩 A, B의 유기산 분

석 결과를 Table 9에 나타내었다. 산성누룩(부산)의 경우, citric acid (구연산)가 주요 유기산으로 검출되었고, 송학누룩(광주)은 citric acid (구연산), malic acid (사과산)와 lactic acid (젖산)가 주요 유기산으로 분석되었다.

전통누룩 A의 경우, citric acid, malic acid, oxalic acid가 분석되었으며, 주요 유기산으로 citric acid (구연산)은 발효초기에 증가하였다가 10일부터 일정하게 유지되었다. 전통누룩 B의 경우, citric acid, oxalic acid, fumaric acid와 formic acid가 주요 유기산으로 검출되었다. 누룩 별로 유기산의 양과 종류는 차이가 있었는데 이는 원재료, 관여 발효미생물 및 발효조건에 따른 차이로 생각되었다.

Table 9. Analysis of organic acid in traditional *nuruk*

Organic acid	Contents (mg%)						
	Control 1		TN-A (day)				
	Sansung	0	3	6	10	20	30
Oxalic	n.d <sup>2)</sup>	23.43±5.09	n.d	n.d	n.d	<b>2.63±1.05</b>	10.49±0.99
Citric	<b>298.52±45.89</b> 1)	145.89±22.03	<b>205.95±29.9</b> 6	189.35±29.23	174.83±4.32	<b>164.66±2.66</b>	155.56±76.64
Tartaric	n.d	n.d	2.03±1.05	n.d	n.d	<b>2.57±0.23</b>	n.d
Malic	n.d	41.04±4.21	36.19±15.26	35.09±1.05	29.65±6.40	<b>28.78±12.72</b>	22.20±1.05
Succinic	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Fumaric	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Lactic	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Formic	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Acetic	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Pyroglutamic	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Total	<b>298.52</b>	210.36	244.17	224.44	204.49	<b>198.65</b>	188.25
Organic acid	TN-B (day)						
	Control 2		TN-B (day)				
	Songhak	0	3	6	10	20	30
Oxalic	n.d	23.43±5.09	8.20±1.05	n.d	n.d	9.14±1.05	<b>10.60±1.05</b>
Citric	<b>186.65±71.53</b>	145.89±22.03	149.85±23.99	<b>152.66±27.6</b> 3	<b>159.19±41.7</b> 8	147.95±6.06	<b>142.91±21.3</b> 4
Tartaric	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Malic	57.23±19.74	41.04±4.21	16.74±1.05	n.d	n.d	n.d	n.d
Succinic	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Fumaric	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	<b>1.70±1.05</b>
Lactic	33.28±11.37	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Formic	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	<b>1.03±1.05</b>
Acetic	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Pyroglutamic	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Total	<b>277.16</b>	210.36	174.79	152.66	159.19	157.09	<b>156.24</b>

<sup>1)</sup>values are mean±SD (n=3).

<sup>2)</sup>n.d is not detected.

## 5) 유리아미노산 분석

대조구로서 시판 중인 산성 및 송학누룩과 본 연구에서 제조한 전통누룩 A, B의 유리아미노산 분석 결과를 Table 10에 나타내었다. 시판중인 산성누룩의 유리아미노산 분석결과, 주요 아

미노산은 proline (단맛/쓴맛), alanine (단맛), valine (약한 쓴맛), glutamic acid (감칠맛),  $\gamma$ -aminobutyric acid 등 14개 유리 아미노산으로 구성되었고, 총 아미노산의 함량은 602.92  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이었고, 이 중 필수아미노산의 함량은 21.14  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이었다.

송학누룩은 주요 유리아미노산은 proline (단맛/쓴맛), alanine (단맛), valine (약한 쓴맛), urea,  $\alpha$ -aminobutyric acid 등 24개 유리아미노산으로 구성되었고, 총 아미노산의 함량은 929.98  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이었고, 이 중 필수아미노산의 함량은 103.63  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이었다.

전통누룩 A의 발효 30일차 주요 유리아미노산은 proline (단맛/쓴맛), valine (약한 쓴맛), taurine, alanine,  $\gamma$ -aminobutyric acid 등 8개 유리 아미노산으로 구성되었고, 총 아미노산의 함량은 107.23  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이었고, 이 중 필수아미노산의 함량은 12.27  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이었다.

전통누룩 B의 발효 30일차 누룩의 주요 유리아미노산은 proline, valine, alanine, phosphoserine, glycine 등 12개의 유리 아미노산으로 구성되었고, 총 아미노산의 함량은 224.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이었고, 필수아미노산의 함량은 10.37  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이었다. 유리아미노산 분석 결과, 전통누룩보다 시판누룩의 유리아미노산의 함량이 높고 다양한 아미노산으로 구성되어 있는 것을 볼 수 있었다. 이는 원재료, 제조 지역의 기후환경 및 발효조건의 차이로 생각되었고, 이 발효제로 택주를 제조하였을 때 이들의 주질 특성은 뚜렷할 것으로 추측되었다.

Table 10. Analysis of free amino acid in traditional *nuruk*

Free amino acid	Control							Traditional <i>nuruk</i> A ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ , day)						
	<i>Sansung</i>	0	3	6	10	20	30	<i>Sansung</i>	0	3	6	10	20	30
P-Ser	8.71 $\pm$ 0.65 <sup>1)</sup>	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Tau	n.d <sup>2)</sup>	10.47 $\pm$ 1.55	6.67 $\pm$ 0.38	6.25 $\pm$ 1.68	5.04 $\pm$ 2.26	<b>9.78<math>\pm</math>1.48</b>	6.17 $\pm$ 2.65	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Urea	18.49 $\pm$ 3.84	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Asp	10.03 $\pm$ 1.72	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Thr <sup>c</sup>	1.58 $\pm$ 0.12	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Ser	2.53 $\pm$ 0.73	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Glu	<b>20.43<math>\pm</math>3.64</b>	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Gly	13.38 $\pm$ 2.52	3.00 $\pm$ 0.40	2.26 $\pm$ 1.01	2.50 $\pm$ 0.84	3.81 $\pm$ 1.05	2.04 $\pm$ 0.53	1.44 $\pm$ 0.10	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Ala	<b>36.57<math>\pm</math>8.47</b>	2.47 $\pm$ 0.66	2.68 $\pm$ 0.51	2.98 $\pm$ 1.57	<b>4.25<math>\pm</math>0.87</b>	2.57 $\pm$ 0.80	3.35 $\pm$ 0.32	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Cit	n.d	n.d	n.d	n.d	6.77 $\pm$ 1.05	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
a-ABA	n.d	15.91 $\pm$ 3.52	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Val <sup>c</sup>	<b>22.56<math>\pm</math>0.81</b>	12.38 $\pm$ 0.58	13.80 $\pm$ 4.74	12.14 $\pm$ 2.35	8.74 $\pm$ 4.32	<b>13.35<math>\pm</math>4.75</b>	12.27 $\pm$ 7.89	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Cys	n.d	7.67 $\pm$ 0.40	10.01 $\pm$ 1.05	10.58 $\pm$ 0.92	8.94 $\pm$ 1.05	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Ile <sup>c</sup>	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Leu <sup>c</sup>	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Phe	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
b-Ala	17.17 $\pm$ 3.04	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
b-AiBA	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
g-ABA	19.80 $\pm$ 4.32	4.00 $\pm$ 0.93	1.53 $\pm$ 0.20	1.38 $\pm$ 0.54	1.72 $\pm$ 0.28	<b>3.07<math>\pm</math>0.72</b>	2.01 $\pm$ 1.05	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
NH3	68.89 $\pm$ 3.53	71.02 $\pm$ 5.93	42.14 $\pm$ 6.76	21.65 $\pm$ 3.90	31.29 $\pm$ 2.17	19.70 $\pm$ 1.59	36.36 $\pm$ 3.08	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Lys <sup>c</sup>	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
His <sup>c</sup>	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Arg <sup>c</sup>	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Hypro	2.10 $\pm$ 1.05	n.d	n.d	n.d	2.40 $\pm$ 1.05	1.10 $\pm$ 0.15	4.17 $\pm$ 1.28	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Pro	<b>360.69<math>\pm</math>9.49</b>	1.18 $\pm$ 0.78	39.72 $\pm$ 1.05	<b>43.54<math>\pm</math>5.23</b>	<b>49.53<math>\pm</math>1.58</b>	17.15 $\pm$ 0.91	44.08 $\pm$ 8.16	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
<b>Totals</b>	<b>602.92</b>	128.10	118.82	103.41	<b>127.15</b>	71.83	107.23	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Essential amino acid <sup>3)</sup>	24.14	12.38	13.80	12.14	8.74	13.35	12.27	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d

<sup>1)</sup>values are mean $\pm$ SD (n=3).<sup>2)</sup>n.d is not detected.<sup>3)</sup>Essential amino acids.

(b)

Free amino acid	Traditional nuruk B ( $\mu\text{g/mL}$ , day)						
	Control <i>Songhak</i>	0	3	6	10	20	30
P-Ser	<b>16.49<math>\pm</math>1.05</b>	n.d	<b>7.38<math>\pm</math>1.05</b>	<b>7.45<math>\pm</math>1.05</b>	n.d	n.d	<b>7.17<math>\pm</math>1.05</b>
Tau	n.d	10.47 $\pm$ 1.55	2.68 $\pm$ 0.17	n.d	n.d	3.07 $\pm$ 0.16	1.85 $\pm$ 0.05
Urea	<b>34.41<math>\pm</math>4.77</b>	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Asp	7.67 $\pm$ 4.05	n.d	4.86 $\pm$ 1.28	4.95 $\pm$ 1.14	4.66 $\pm$ 1.15	1.81 $\pm$ 0.93	2.49 $\pm$ 0.49
Thr <sup>c</sup>	8.11 $\pm$ 4.91	n.d	1.99 $\pm$ 0.74	1.40 $\pm$ 0.05	1.14 $\pm$ 0.05	n.d	n.d
Ser	9.29 $\pm$ 5.89	n.d	4.00 $\pm$ 1.43	2.63 $\pm$ 0.54	2.56 $\pm$ 0.51	n.d	1.24 $\pm$ 0.25
Glu	15.78 $\pm$ 1.13	n.d	13.44 $\pm$ 4.05	10.32 $\pm$ 1.05	15.19 $\pm$ 6.42	n.d	5.39 $\pm$ 0.05
Gly	9.30 $\pm$ 0.74	3.00 $\pm$ 0.40	4.50 $\pm$ 0.63	5.23 $\pm$ 0.72	<b>6.81<math>\pm</math>0.43</b>	n.d	5.52 $\pm$ 0.05
Ala	<b>44.02<math>\pm</math>2.61</b>	2.47 $\pm$ 0.66	<b>11.13<math>\pm</math>2.13</b>	5.35 $\pm$ 0.70	9.71 $\pm$ 2.43	4.24 $\pm$ 1.09	7.48 $\pm$ 0.55
Cit	1.70 $\pm$ 1.05	n.d	n.d	n.d	18.51 $\pm$ 1.05	n.d	n.d
a-ABA	<b>28.84<math>\pm</math>4.85</b>	15.91 $\pm$ 3.52	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Val <sup>c</sup>	<b>38.66<math>\pm</math>2.15</b>	12.38 $\pm$ 0.58	18.22 $\pm$ 6.93	13.78 $\pm$ 1.10	<b>15.75<math>\pm</math>3.38</b>	<b>15.58<math>\pm</math>6.27</b>	10.37 $\pm$ 8.30
Cys	4.09 $\pm$ 1.05	7.67 $\pm$ 0.40	n.d	12.33 $\pm$ 0.92	8.93 $\pm$ 1.95	n.d	n.d
Ile <sup>c</sup>	<b>22.47<math>\pm</math>5.65</b>	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	1.80 $\pm$ 0.05
Leu <sup>c</sup>	19.09 $\pm$ 2.95	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Phe	21.64 $\pm$ 0.39	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
b-Ala	4.89 $\pm$ 0.55	n.d	1.02 $\pm$ 0.37	n.d	0.65 $\pm$ 0.15	n.d	n.d
b-AiBA	1.64 $\pm$ 0.15	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
g-ABA	16.45 $\pm$ 9.16	4.00 $\pm$ 0.93	3.02 $\pm$ 0.92	2.22 $\pm$ 0.46	4.09 $\pm$ 0.96	1.42 $\pm$ 0.50	2.79 $\pm$ 0.25
NH3	62.20 $\pm$ 4.16	71.02 $\pm$ 5.93	18.03 $\pm$ 0.29	22.07 $\pm$ 3.60	31.43 $\pm$ 3.53	20.55 $\pm$ 0.73	52.05 $\pm$ 2.36
Lys <sup>c</sup>	2.13 $\pm$ 0.15	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
His <sup>c</sup>	5.63 $\pm$ 0.15	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Arg <sup>c</sup>	6.36 $\pm$ 0.67	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Hypro	2.04 $\pm$ 1.26	n.d	3.10 $\pm$ 1.10	2.03 $\pm$ 0.05	n.d	1.30 $\pm$ 0.05	1.98 $\pm$ 0.05
Pro	<b>547.07<math>\pm</math>4.83</b>	1.18 $\pm$ 0.78	<b>265.17<math>\pm</math>6.62</b>	105.27 $\pm$ 6.02	117.09 $\pm$ 8.77	70.67 $\pm$ 4.44	124.28 $\pm$ 7.09
Totals	<b>929.98</b>	128.10	<b>358.54</b>	195.03	236.53	118.63	224.40
Essential amino acid	103.63	12.38	20.21	15.18	16.89	15.58	10.37

<sup>1)</sup>values are mean $\pm$ SD (n=3).<sup>2)</sup>n.d is not detected.<sup>3)</sup>Essential amino acids.

## 6) 향기성분 분석

대조구로서 시판 중인 산성 및 송학누룩과 본 연구에서 제조한 전통누룩 A, B의 향기성분 분석 결과를 Table 11에 나타내었다. 분석한 결과, hydrocarbone 계열의 32종, ester 계열이 10 종, acid 계열이 4종, alcohol류가 2종으로 총 48종의 향기성분이 검출되었다.

분석한 4종류 누룩의 공통 향기성분은 octane, formic acid ethyl ester, (E)-6-methyl-3-undecene, decane, methyl benzene, undecane, metyhlaurate, 1,3-dimethyl-benzene, 1,2-dimethyl-benzene, 1-ethyl-3-methyl-benzene, acidic acid, n-hexadecanoic acid의 12개 성분으로 구성되어져 있었다.

누룩별 주요성분은 산성누룩은 (9Z,12Z)-9,12-octadecadienoate ethyl, ethyl palmitate, n-hexadecanoic acid, 8-heptadecene, 9-octadecenoic acid 등 총 22개 성분으로, 송학누룩은 acetic acid ethyl ester, n-hexadecanoic acid, octadec-9-enoic acid, methyl octadeca-9,12-dienoate, 1-tricosene 등 27개 성분, 전통누룩 A(TN-A)는 acetic acid ethyl ester, n-hexadecanoic acid, 4-ethoxy-benzoic acid ethyl ester, 1,3-dimethyl-benzene, 2-methyl-octane 등 총 25개 성분, 전통누룩 B(TN-B)는 acetic acid ethyl ester, n-hexadecanoic acid, 8-heptadecene, (9Z,12Z)-9,12-octadecadienoate ethyl, 9-octadecenoic acid ethyl ester 등 총 27개 성분으로 분석되었다. 특히 시판 누룩과 제조한 누룩 A·B와의 향기의 구성성분은 큰 차이는 보이지 않는다.

시판누룩과 전통누룩의 향기성분 분석결과, acetic acid ethyl ester와 n-hexadecanoic acid 가 누룩의 향기성분 중 30~40% 이상으로 가장 많은 비중을 차지하였는데, acetic acid ethyl ester는 천연으로는 파인애플 등 과일 속에 존재하는 향기의 한 성분으로, 포도주나 청주 등에 도 미량 함유되어 있는 향기성분이다.

n-hexadecanoic acid는 waxy하면서 부드럽고 달콤한 향을 내는 향기성분 인식되는 성분이며, Octadec-9-enoic acid은 시큼한 향을 가지는 향기성분으로 송학누룩의 특징적인 향기성분으로 분석되었고, 4-Ethoxy-benzoic acid ethyl ester은 간장의 구수한 향기를 내는 성분으로 전통누룩 A의 특징적인 향기성분으로 분석되었다. 또한 ethyl palmitate와 ethyl stearate는 맥주와 청주의 향기성분으로 인식되는 ester로 산성누룩과 전통누룩 B의 특징적인 향기성분의 지표로서 분석되었다.

**Table 11. Comparison of volatile compounds in traditional *nuruk***

(unit: peak area, %)

Peak	RT (min)	Compounds	Nuruk			
			Samsung	Songhak	TN-A	TN-B
1	5.467	Octane	0.72	0.81	1.03	0.69
2	5.861	3-Methyl-octane		0.29		
3	5.982	Formic acid ethyl ester	0.48	0.6	0.66	0.78
4	6.445	Dodecane		1.12		
5	6.448	2-Methyl-octane			1.45	1.06
6	6.574	(E)-6-Methyl-3-undecene	0.57	0.63	0.75	0.6
7	6.793	Tetrahydro-2-methyl-furan			0.25	
8	7.344	Nonane		0.6	0.86	0.69
9	9.151	2-Methyl-nonane			0.35	0.3
10	10.76	Decane	0.34	0.4	0.69	0.61
11	11.322	3,3-Dimethyl-octane			0.28	0.3
12	12.574	3,7-Dimethyl decane			0.39	0.38
13	12.805	Methyl benzene	0.93	0.98	1.35	0.86
14	15.876	Undecane	0.17	0.2	0.33	0.33
15	17.57	Methyl laurate	0.35	0.39		0.41
16	17.593	Ethyl-benzene			0.51	
17	18.467	1,3-Dimethyl-benzene	1.07	1.17	1.65	1.21
18	21.236	1,2-Dimethyl-benzene	0.48			
19	21.249	Xylene		0.5	0.69	0.55
20	23.861	1-Ethyl-3-methyl-benzene	0.52	0.59	0.86	0.76
21	25.12	1,3,5-Trimethyl-benzene	0.21			0.33
22	27.637	1,2,4-Trimethyl-benzene	0.78			
23	27.649	1,3,5-Trimethyl-benzene		0.85	1.28	1.12
24	38.34	3-Hexadecene		0.6		
25	39.584	Acetic acid	0.43	0.69	1.07	0.92
26	44.157	Acetic acid ethyl ester		23.55	33.8	34.15
27	45.258	2,3-Butanediol		0.61		
28	47.947	n-Pentadecane		0.46	0.31	0.23
29	50.651	1-Hexadecene	0.53	2.45		
30	50.671	9-Octadecene			0.95	
31	61.891	9-Eicosene			1.04	
32	61.909	1-Octadecene		2.97		
33	66.855	8-Pentadecanone		0.52		
34	72.137	3-Eicosene			0.84	
35	72.14	1-Nonadecene				1.24
36	72.314	Ethyl tetradecanoate	0.56			
37	78.364	4-Ethoxy-benzoic acid ethyl ester			1.7	
38	81.908	Ethyl palmitate	7.7			1.64
39	90.247	1-Tricosene		4.3		
40	90.694	Methyl octadeca-9,12-dienoate		7.99		
41	90.745	Ethyl stearate	1.03			0.25
42	91.598	9-Octadecenoic acid ethyl ester	5.37			2.5
43	93.605	(9Z,12Z)-9,12-Octadecadienoate ethyl	8.05			3.13
44	98.297	1-Eicosanol		0.5		
45	100.562	1,2-Benzenedicarboxylicacid,dibutylester	0.18			
46	110.209	n-Hexadecanoic acid	7.36	10.4	7.67	9.08
47	128.877	8-Heptadecene	6.43			4.84
48	128.935	Octadec-9-enoic acid		8.29		

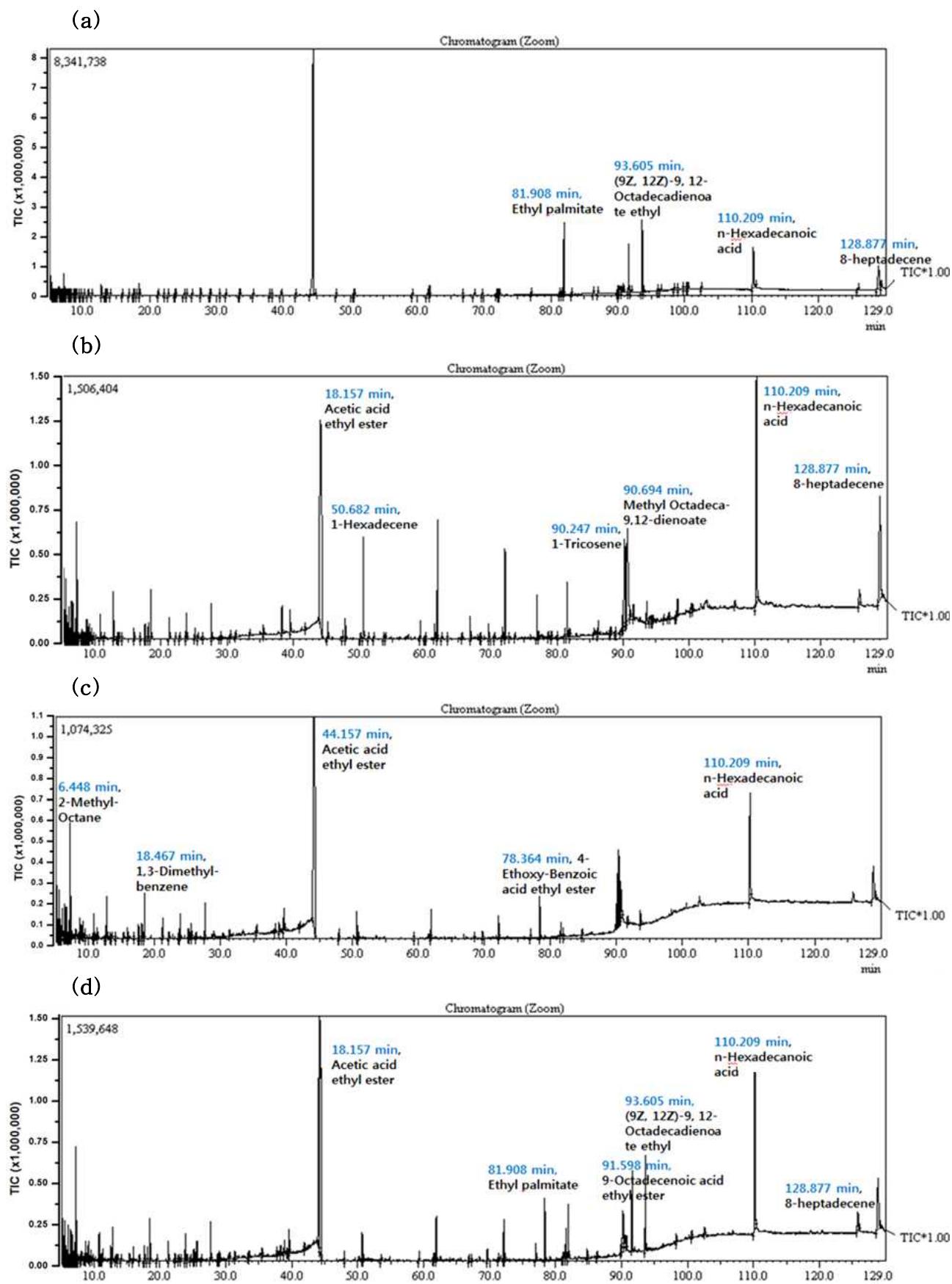


Fig. 4. GC-MS chromatograms of volatile flavor compounds identified from traditional *nuruk*. Symbols: (a); Sansung, (b); Songhak, (c); TN-A, (d); TN-B.

## 7) 저장성 실험

개발 누룩의 저장성에 따른 품질관리를 유지하기 위해, 우선 저장기간(0, 8, 12주)과 온도( $4^{\circ}\text{C}$ ,  $15^{\circ}\text{C}$ ,  $30^{\circ}\text{C}$ )에 따른 누룩 효소의 잔존능을 분석하였다(Table 12, Fig. 5).

4종류의 누룩의  $\alpha$ -amylase 활성을 비교·분석한 결과, 전통누룩 A와 B의 저장 12주 효소활성은  $4^{\circ}\text{C}$  저장조건에서 310과 204.1 units/g로 저장 0주의 효소활성을 100%로 보았을 때 99.9%, 91.5% 유지되었고, 다시 말하면 TN-A는 0.1%, TN-B는 8.5% 효소가 실활되었다.  $5^{\circ}\text{C}$  저장조건에서는 271과 199.1 units/g로 87.3%, 89.3% 유지되었으며, 실제 12.7%, 10.7% 효소가 실활 되었고,  $30^{\circ}\text{C}$  저장조건에서는 257.4와 197.7 units/g로 83%, 88.7% 유지되었고, 실제 17%와 11.3% 효소가 실활되었다.

Glucoamylase 활성을 비교·분석한 결과, 전통누룩 A와 B의 저장 12주 효소활성은  $4^{\circ}\text{C}$  저장 조건에서 5,136과 4,550 units/g로 95.2%, 98.3% 유지되었지만 실제 4.8%와 1.7% 효소가 실활되었다.  $15^{\circ}\text{C}$  저장조건에서는 5038과 4364 units/g로 93.4%, 94.3% 유지되었으며, 실제 6.6%, 5.7% 효소가 실활 되었고,  $30^{\circ}\text{C}$  저장조건에서는 4776와 4208 units/g로 88.6%, 90.1% 유지되었고, 실제 11.4%와 9.9%의 효소가 실활되었다.

Acidic protease 활성을 분석한 결과, 전통누룩 A와 B의 저장 12주 효소활성은  $4^{\circ}\text{C}$  저장조건에서 2,776.3과 1,258.8 units/g로 94.8%, 91.3% 유지되었고 실제 5.2%, 8.7% 효소가 실활되었다.  $15^{\circ}\text{C}$  저장조건에서는 2708.8과 1179.8 units/g로 92.5%, 85.5% 유지되었으며, 실제 7.5%, 14.5% 효소가 실활 되었고,  $30^{\circ}\text{C}$  저장조건에서는 2629.9와 1111.4 units/g로 89.8%, 80.6% 유지되었고, 실제 10.2%와 19.4%의 효소가 실활되었다.

일반적으로 국내에서 많이 통용되는 당화력을 SP(Saccharogenic power) 단위로 분석한 결과, 전통누룩 A와 B의 저장 12주 효소활성은  $4^{\circ}\text{C}$  저장조건에서 1025.3와 930.1 sp로 97.1%, 92.7% 유지되었다. 누룩을 제조한 그 시점에서 분석해보면 누룩 A와 B는 각각 2.9%와 7.3% 실활되었다.  $15^{\circ}\text{C}$  저장조건에서는 959.2와 925.3 units/g로 90.9%, 92.2% 유지되었으며, 실제 9.1%, 7.8% 효소가 실활 되었고,  $30^{\circ}\text{C}$  저장조건에서는 902.9와 919.7units/g로 85.5%, 91.6% 유지되었고, 실제 14.5%와 8.4%의 효소가 실활되었다.

이들 효소의 잔존능을 분석한 결과, 12주 (90일)의 저장기간 동안  $\alpha$ -amylase, glucoamylase, acidic protease, saccharogenic power 모두  $4^{\circ}\text{C}$  저장조건에서 효소 잔존능이 가장 우수한 것으로  $4^{\circ}\text{C} > 15^{\circ}\text{C} > 30^{\circ}\text{C}$  순으로 효소의 잔존능이 우수하였다. 이는  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 미생물의 증식 및 효소의 분해 작용이 억제되어 12주의 저장기간에도 효소활성이 90% 이상 유지되는 것으로 생각되어진다.

Table 12. Enzyme activity of traditional *nuruk* by storage period

Temperature Storage time	TN-A(℃)			TN-B(℃)		
	4	15	30	4	15	30
$\alpha$ -amylase (units/g, weeks)	0	310.28±14.3 7 <sup>1)</sup>	310.28±14.3 7	310.28±14.3 7	222.93±14.7 5	222.93±14. 75
	8	309.17±11.0 8	290.30±14.9 0	278.69±11.0 3	213.92±16.6 6	209.01±10. 16
	12	310.03±3.11	271.00±9.06	257.44±6.58	204.08±13.5 5	199.09±14. 38
Glucoamylase (units/g, weeks)	0	5392±90.07	5392±90.07	5392.±90.07	4628±51.00	4628±51.00
	8	5230±81.02	5258±86.56	5160±32.79	4574±11.66	4460±89.78
	12	5136±76.91	5038±77.78	4776±10.49	4550±32.40	4364±66.90
Acidic protease (units/g, weeks)	0	2928.52±89. 81	2928.52±89. 81	2928.52±89. 81	1379.30±30. 54	1379.30±30. .54
	8	2921.48±8.6 3	2859.58±71. 97	2779.12±27. 01	1259.58±71. 97	1219.20±31. 68
	12	2776.32±21. 70	2708.76±6.8 5	2629.92±63. 79	1258.84±26. 69	1179.76±27 .99
Saccharogenic power (sp, weeks)	0	1055.64	1055.64	1055.64	1003.74	1003.74
	8	1045.27	1009.25	1002.34	990.08	975.34
	12	1025.26	959.15	902.94	930.06	925.31

<sup>1)</sup>values are mean±SD (n=3).

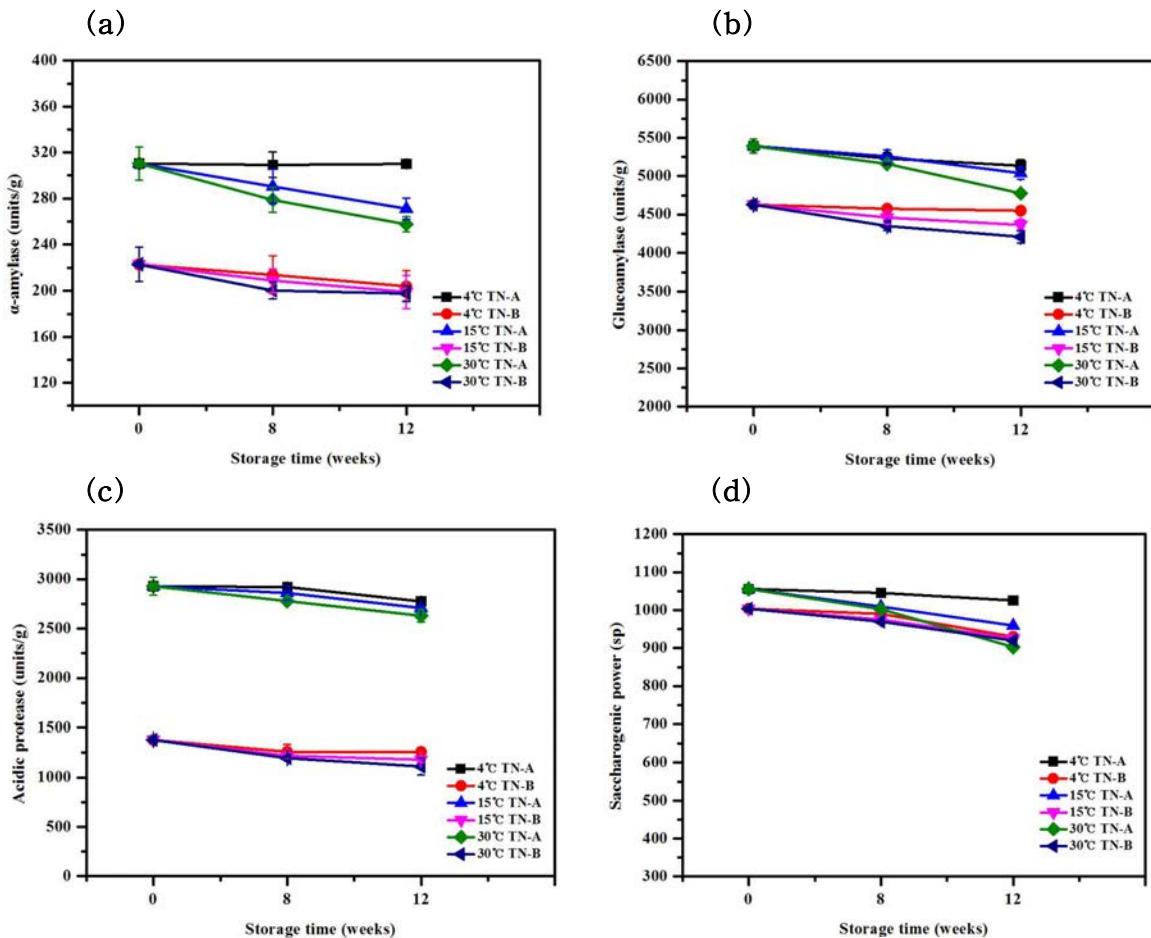


Fig. 5. Change of enzyme activity on traditional *nuruk* by storage period. Symbols: (a);  $\alpha$ -amylase (b); glucoamylase (c); acidic protease (d); saccharogenic power.

## 2절 : 전처리 조건에 따른 누룩의 품질특성 규명

### (1) 재료 및 방법

#### 1) 시험 원료

본 연구에 사용한 우리 밀은 전남 광주지역에서 재배(2014年產)된 우리 밀(금강밀)을 구입하여 사용하였고, 보리 및 녹두도 전남 해남지역에서 재배된(2014年產) 것을 구입하여 사용하였다.

#### 2) 누룩 제조공정 및 발효법 확립

##### 가) 누룩 전처리

본 연구에서 누룩 제조를 위해, 사용한 원료인 우리 밀(금강밀), 보리 및 녹두를 롤러 밀로 분쇄한 후, 7-mesh (2.8 mm) 채로 3회 내린 후, 혼합된 원료에 첨가하는 가수량을 각각 20%, 26%, 30%(40°C)로 살수 혼합하여 1시간 동안 실온에서 침윤시켜 사용하였다.

##### 나) 전통누룩 C(TN-C)

고문현(고사찰요 등) 등에 기술된 향온곡을 변형시켜 누룩-C를 제조하였다. 우선, 누룩 전처리 과정에서 침윤시킨 원료를 각각 적당한 비율(보리, 녹두, 통밀=3.3:0.5:3.3)로 혼합한 다음, 340 g씩 무게를 측정하여 누룩 성형 틀에 넣는다. 성형장치(프레스 성형기)를 이용하여 동일한

크기와 무게로 누룩을 성형한 후, 발효( $36^{\circ}\text{C}$ , 2일 간격으로 뒤집기, 습도 70%, 30일) 시켰다. 건조 장치를 이용하여  $35^{\circ}\text{C}$ 에서 24시간 건조시킨 후 저장 2개월 후, 법제하여 발효기간(0, 3, 6, 10, 20, 30일)에 따른 누룩-C의 품질특성 분석 시료로 사용하였다. 또한 누룩 제조시 각 발효기간별로 sampling하여 1, 2세부 및 2협동과제의 연구 시료로 제공하였다(Fig 1).

#### 다) 전통누룩 D (TN-D)

고문헌(고사찰요 등) 등에 기술된 내부비전곡을 변형시켜 누룩-D를 제조하였다. 우선, 누룩 전처리 과정에서 침윤시킨 원료를 각각 적당한 비율(보리: 녹두=3.3:0.55)로 혼합한 다음, 340 g 씩 무게를 측정하여 누룩 성형 틀에 넣는다. 성형장치(프레스 성형기)를 이용하여 동일한 크기와 무게로 누룩을 성형한 후, 발효( $36^{\circ}\text{C}$ , 2일 간격으로 뒤집기, 습도 70%, 30일) 시켰다. 건조 장치를 이용하여 24시간 건조시킨 후 저장 2개월 후, 법제하여 발효기간(0, 3, 6, 10, 20, 30일)에 따른 누룩-D의 품질특성 분석 시료로 사용하였다. 또한 누룩 제조시 각 발효기간별로 sampling하여 1, 2세부 및 2협동과제의 연구 시료로 제공하였다(Fig 1).

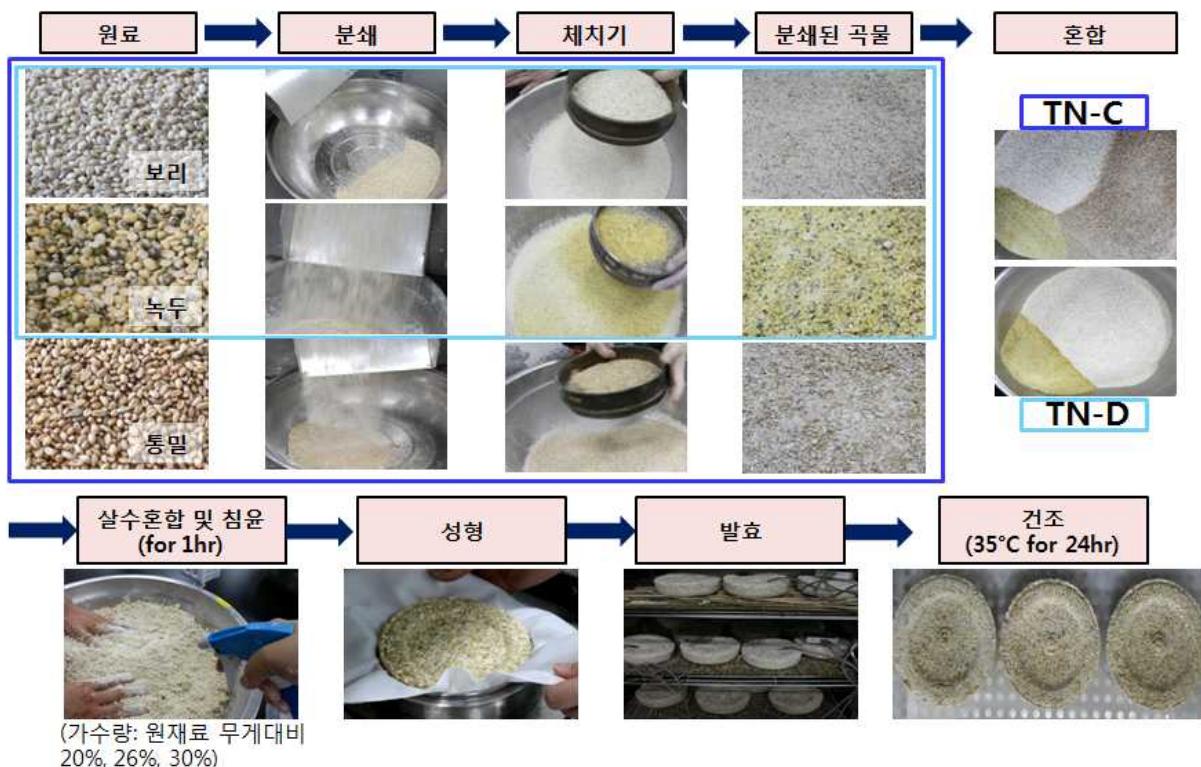


Fig 1. 원료 및 가수량 조절에 따른 누룩제조 공정

#### 3) 발효조건에 따라 제조된 누룩의 외형적 특성 구명

두 종류 누룩(TN-C 및 TN-D)의 원료 및 가수량에 따른 외형적 특성을 분석하기 위하여 무게, 두께, 지름 및 수분함량 등을 측정하여 비교하였다.

#### 4) 발효기간에 따른 누룩의 품질특성

제조된 두 종류 누룩(TN-C 및 TN-D)의 발효기간에 따른 품질의 변화를 0, 3, 6, 10, 20, 30일마다 측정하여 비교하였다.

## 5) 저장기간에 따른 누룩의 품질변화

제조된 2종류 누룩의 저장조건에 따른 효소활성( $\alpha$ -amylase, glucoamylase 및 acidic protease 등)을 조사하기 위해, 우선, 저장 온도(4, 15, 30°C)와 저장 기간(0, 8, 12주)에 따른 효소 잔존능을 분석하였다.

## 6) 분석방법

### 가) 발효기간에 따른 누룩의 품온 측정

누룩 발효 중 발효미생물에 의해 생성되는 품온 변화는 HOBO<sup>®</sup>사의 data logger U12-013을 이용하여 발효기간(0, 3, 6, 10, 20, 30일)에 따른 품온 변화를 6시간 간격으로 측정하였다.

### 나) 제조된 누룩의 무게, 크기, 수분함량 등의 외형적 특성 분석

무개는 micro weighing scale (MW-II 6000N, CAS Co., Korea)로 측정하고, 크기는 digimatic caliper (CD-20CPX, Mitutoyo Co., Kawasaki, Japan)로 측정하였다. 특히, 24시간 건조시킨 누룩의 수분함량은 moisture analyzer (MX-50, AND Co., Tokyo, Japan)로 측정하였다.

### 다) 이화학적 및 효소활성 분석을 위한 누룩 시료조제

이화학적 특성을 분석하기 위해, 우선 제조된 누룩 시료로부터 20 g을 채취한 후, 중류수 100 mL을 가하고 실온에서 3시간 침출하여 그 여과 용액을 준비하였다. 효소활성 분석을 위한 시료는 시료 10 g에 염화나트륨 용액 50 mL를 가해서 저온실(4°C)에서 하룻밤 또는 실온(15~20°C)에서 3시간 때때로 흔들어 침출한 후, 여과하여 사용하였다. 여과된 액을 본 실험의 조효소액으로 사용하였다.

### 라) 제조 누룩으로부터 이화학적 특성(pH, 산도, 아미노산도 등) 분석

pH는 pH meter (Orion 3 star, Thermo scientific Co.)로 실온에서 측정하였다. 총 산도는 일정량의 시료를 취하여 여과지로 여과한 검체 10 mL를 100 mL 삼각 플라스크에 취한 다음, 0.5% phenolphthalein 지시약을 2~3방울 떨어뜨리고 0.1 N-NaOH로 적색이 될 때까지 중화 적정하였으며 소비된 용액의 양을 mL로 표시하였다.

아미노산도는 여과지로 여과한 검체 10 mL에 0.5% phenolphthalein 지시약을 2~3방울 떨어뜨린 다음, 0.1 N-NaOH로 담홍색이 될 때까지 중화한 후, 여기에 중성포르말린 용액 5 mL을 가하여 유리된 산을 0.1 N-NaOH로 적정하여 담홍색이 될 때까지 소요된 0.1 N-NaOH의 mL 수로 표시하였다.

### 마) 효소 역가 측정

#### 마-1) $\alpha$ -amylase 활성

$\alpha$ -amylase 활성은 누룩 10 g에 5% NaCl 용액 50 mL를 가하여 실온에서 1시간 흔들어 침출한 후, 여과한 여액을 희석하여 조효소액을 제조하였다. 2% starch 용액 0.04 mL에 조효소액 0.04 mL를 첨가하고 40°C에서 30분간 반응시킨 후, 1N HCl 0.02 mL를 분주하여 반응을 정

지시키고 iodine 용액 0.1 mL 첨가하여 발색시킨 후, 580 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구로는 중류수를 조효소액과 같은 동량으로 첨가하여 사용하였다. 효소활성(UNIT)은 아래 방정식으로 산출하였다.

$$U(\text{units/g}) = \{((A_{2\% \text{ starch}} - A_{\text{sample}})/A_{2\% \text{ starch}})\}/0.04$$

$A_{2\% \text{ starch}}$  : 2% starch 용액의 흡광도 값

$A_{\text{sample}}$  : 조효소액과 반응시킨 용액의 흡광도 값

### 마-2) Glucoamylase 활성

Glucoamylase 활성은 2% starch 용액 1 mL에 0.2 M acetate buffer 0.2 mL를 가해서 40°C에서 5분간 예열한 후, 효소액 0.1 mL를 넣고 40°C에서 20분간 반응시키고, 1N NaOH 용액 0.1 mL를 첨가하여 반응을 정지시킨 후, 30분간 방치하고 1N HCl용액 0.1 mL를 가해 중화하였다.

본 실험에 사용한 대조구는 starch 용액 1 mL에 0.2 M acetate buffer 완충액 0.2 mL을 넣고 40°C에서 5분간 예열하고 시료와 동일하게 1 N HCl 용액 0.1 mL를 가해 중화시킨 후, DNS법으로 환원당을 측정하여 생성된 포도당량으로 하였다. Glucoamylase 활성은 가용성 전분으로부터 40°C에서 60분간 1 mg의 포도당을 생성하는 활성을 1 unit로 하였으며, 시료 1 g의 glucoamylase 활성은 다음의 방정식으로 산출하였다.

$$\text{효소활성}(\text{unit/g}) = \text{생성 포도당량}(\text{mg}) \times 60/20(\text{반응시간}) \times 1/0.1(\text{효소량}) \times \text{희석배수}$$

### 마-3) Acidic protease 활성

Casein용액 0.15 mL에 pH 3.0 macIlvaine buffer 0.1 mL를 넣고 40°C에서 5분간 반응시키고 조효소액 0.05 mL를 넣고 40°C에서 60분간 반응시킨 다음, trichloroacetic acid 용액 0.3 mL을 가해 반응을 정지시킨 후, 원심분리로 침전을 제거시켰다. 이 액 0.1 mL에 NaCO<sub>3</sub>용액 0.5 mL와 folin-ciocalteu's phenol 시약 0.1 mL을 가해서 40°C에서 30분간 발색시킨 후, 660 nm에서 흡광도를 측정하였고, 별도로 대조구로는 TCA용액을 가하기 직전에 효소액을 첨가하여 이하 위의 방법과 동일하게 하여 흡광도를 측정하여 아래 방정식에 의해서 효소활성을 산출하였다.

$$\text{효소활성}(\text{unit/g}) = y \times 0.6/0.1(\text{반응액량}) \times 0.151/0.05(\text{효소액량}) \times \text{희석배수}$$

### 마-4) Saccharogenic power (SP)

#### 가) 효소반응 당액 제조

2% 전분용액 50 mL과 식초산 완충용액 30 mL을 100 mL 용량 플라스크에 취한 다음 55°C로 예열시킨 항온수조에서 10분 동안 예열시키고, 효소액 10 mL을 넣고 60분 동안 당화시켰다. 당화가 끝난 다음, 0.5 N-NaOH 10 mL을 넣어 효소반응을 정지시키고, 급랭시켜 중류수를 가하여 100 mL로 조정하였다(이때 사용된 효소액은 희석배수를 2 구간으로 하고, 최소 볼륨을 10 mL씩 희석하여 사용하였다).

#### 나) 당분 정량

웰링 A시약 5 mL, 웰링 B시약 5 mL과 중류수 40 mL를 250 mL 삼각 플라스크에 넣어 준

비한 후, 효소반응당액 10 mL(대조구는 중류수 10 mL : B)를 첨가하여 삼각 플라스크를 끓인다. 이때 청색이 옅어질 때 쯤 메틸렌블루 용액 4방울을 떨어뜨린 후, 계속 끓이면서 표준 포도당 용액을 떨어뜨려 청색이 적갈색으로 변하는 시점을 종말점으로 하여, 이때 표준 포도당 용액의 소비 mL수를 B라 하고, 아래 식을 통해 당화율을 계산하고, 두 구간의 희석배수와 당화율과의 관계를 그래프로 나타내어, 당화율 15%일 때의 희석배수(D)를 구하여 당화력을 계산하였다.

$$\text{포도당}(\text{mg}) = 2(B-M) \times 100 / \text{효소반응 채취량} (\text{mL})$$

$$\text{당화율}(\%) = \text{누룩 } 1 \text{ g} \text{으로 전분질 } 1 \text{ g} \text{을 분해하여 생성된 포도당을 비율로 나타냄}$$

$$\text{당화력}(S \cdot P) = 15 \times \text{희석배수}(D)$$

#### 바) 생균수 및 포자수 측정

시료 10 g을 취하여 멸균 백에 넣고 90 mL 멸균 생리 식염수를 가하여 균질기로 용해하고 멸균 생리 식염수로 단계별로 희석한 후, PCA배지에 도말하여 나타난 균체수를 CFU/g로 표기하였다.

포자수는 시료 1 g에 5% Tween 80 용액 10 mL로 포자를 추출하고 1% methylene blue 용액으로 염색한 다음, 희석하여 haematometer를 이용하여 현미경(Axio Imager A2, Carl Zeiss Microimaging GmbH, Germany)으로 검정하였다.

#### 사) 유기산, 유리아미노산, 당류 성분분석

발효 시기 별 샘플링 된 건조 누룩 분말을  $^1\text{H-NMR}$  (Proton Nuclear Magnetic Resonance)을 사용하여 유기산, 유리아미노산, 당류를 분석하였다.  $^1\text{H-NMR}$  전처리 과정으로, 누룩 추출물을 NaOH나 HCl을 사용하여 pH를 6.0으로 일정하게 맞추고 1 mL씩 동결건조 하였다. NMR peak annotation 및 농도분석에 요구되는 내부 표준물질인 DSS (3-(trimethylsilyl)-1-propane-sulfonic acid)를 5 mM 농도로 용매인  $\text{D}_2\text{O}$  (detrium oxide)에 용해하였다. 이 용액 1 mL를 동결건조 누룩에 첨가하고 용해 원심분리(13,200 rpm, 10 min)하여 비용해체를 분리시켜 상등액을 취하였다. 상등액을 600 MHz NMR 전용 tube에 넣어 Varian 600 Mhz NMR 분석기기를 통해 분석하였고 Chenomx NMR suit ver 8.12 (Chenomx Inc, Edmonton, Canada)를 사용하여 분석을 수행하였다.

#### 아) 향기성분 분석

##### 아-1) 다중 향기분석

제조한 누룩의 다중향기성분 분석은 시료 0.5 mL을 10 mL vial에 넣고, 40°C에서 30분간 500 rpm으로 교반하고 전자코(Fast GC based HERACLES flash electronic nose, Alpha Mos, Toulouse, France)를 이용하여 측정하였다. 시료분석에는 2개의 column (DB-5 polar, DB-1701 slightly polar)을 사용하였으며 FID로 검출하였다.

Injection은 syringe type (5.0 mL, headspace)으로 column 온도가 25°C로 유지된 상태에서 column head pressure 1.0 psi로 주입하였다. 분석 시 injector 온도는 200°C, detector 200°C, injector pressure 1.0 psi, detector pressure 39.0 psi로 하였다. 시료분석 전 kovats (Custom

alkanes blend standard)를 이용하여 C6~C16까지의 peak 값을 얻어 standard로 이용하였다. 또한 분석 결과는 R project (ver 3.2.1) 프로그램을 이용하여 결과 값을 그래프로 나타내었다.

### 아-2) GC-MS 정량분석

시료 10 g에 에테르-펜탄 혼합용액(1:1) 100 mL을 넣고 150 rpm, 20°C에서 15시간 동안 추출한 후, 여과하고 걸러진 시료에 에테르-펜탄 혼합용액(1:1) 50 mL을 넣고 150 rpm, 20°C에서 1시간 동안 재 추출하였다. 두 추출 용액을 혼합한 후, sodium sulfate를 첨가하여 물이 전부 흡수될 때까지 흔들어준 다음, 이 액을 여과하고 농축한 후, 0.2 µm Syringe filter (Whatman Co., USA)로 여과하여 GC-MS (GC-MS-QP2010 plus)을 이용하여 분석하였다 (Table 1).

Table 1. GC-MS 분석조건

Content	Condition		
GC-MS	QP2010plus		
Column	HP-INNOWAX (60 m × 0.25 mm i,d × 0.25 µm film thikness)		
Injection temp.	250°C		
Column flow	1.0 cm/sec (linear velocity, N <sub>2</sub> )		
Split ration	20		
Column temp.	<table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <tr> <td>230°C</td> </tr> <tr> <td>30 min</td> </tr> </table>	230°C	30 min
230°C			
30 min			
Detection	FID 250°C		
Injection volume	1 µL		

### 자) 통계 분석

모든 시료의 품질 특성 분석은 실험군의 오차를 줄이기 위해, 3회 반복하여 평균과 표준편차로 나타내었다.

## 2. 주요 결과

### 1) 발효조건에 따른 누룩의 외형적 특성 구명

#### 가) 제조된 밀 누룩의 품온 변화

제조된 누룩의 발효기간에 따른 품온 변화를 Fig 2에 나타내었다. TN-C 누룩은 발효 0일부터 누룩 미생물이 활동을 시작하여 2일째 가장 왕성한 번식을 하면서 최고 품온이 39.7°C까지 올라갔으며 4일째부터 발효가 정체되면서 누룩의 품온이 36°C로 발효 30일까지 일정하게 유지되었다. 또한, 첨가한 가수량별로 살펴보면 가수량이 낮을수록(20%) 품온은 높은 경향으로 나타났으며, 상대적으로 가수량을 많이 첨가한 26%와 30%의 경우는 20%보다 발효기간이 1~2 일 늦게 품온이 올라가는 경향을 띠고 있다.

TN-D 누룩은 발효 초기단계인 3일째 높은 온도에서 발효가 진행되면서 최고 품온은 39°C 까지 올라갔으며, 발효 5일부터 품온의 변화가 정체되면서 품온이 일정하게 유지되었고, 가수량별로 살펴보면 가수량의 차이에 따라 품온의 차이는 거의 없는 것으로 나타났다.

제조한 누룩별(TN-C, TN-D)의 품온 차이는 있지만 전체적으로 이들 누룩에서 발효 초기에 나타나는 세균과 5일 이후 나타나는 곰팡이 및 효모 등의 발효미생물의 생육과 품온 변화는 유사한 것으로 나타났다.

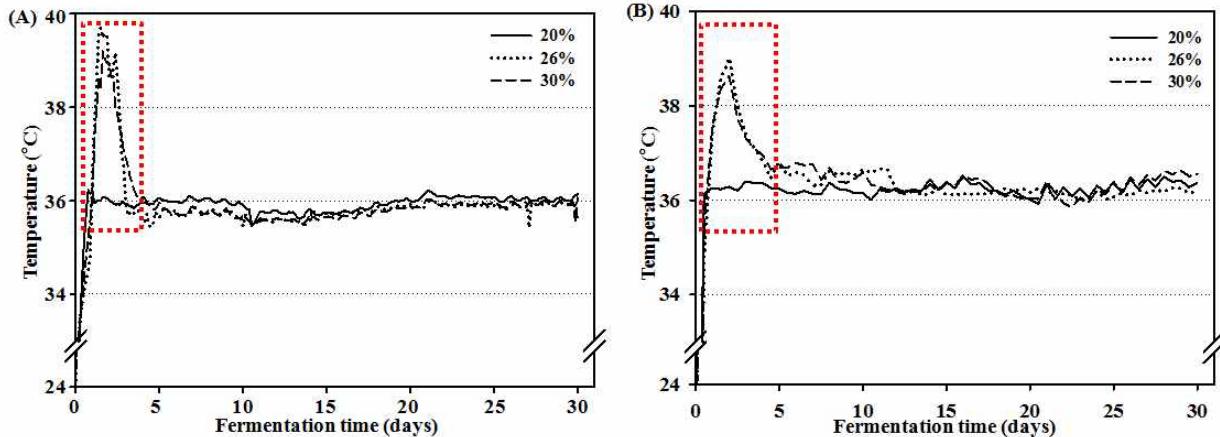


Fig 2. 원료별, 가수량에 따른 TN-C(A), TN-D(B) 누룩의 품온변화

#### 나) 제조된 누룩의 외형적 특성

제조된 누룩 2종류(TN-C, TN-D)는 발효기간에 따라 중량, 크기 및 수분함량은 감소되었지만 누룩 종류에 따른 차이는 거의 없는 경향으로 나타났다. 먼저 누룩의 외형적 변화를 살펴보면 TN-C와 TN-D 누룩은 발효기간이 경과함에 따라 곰팡이의 균사(황국균 및 백국균)가 확장되어 누룩의 내부까지 침투하여 생육하는 것을 확인할 수 있었다(Fig 3, 4).

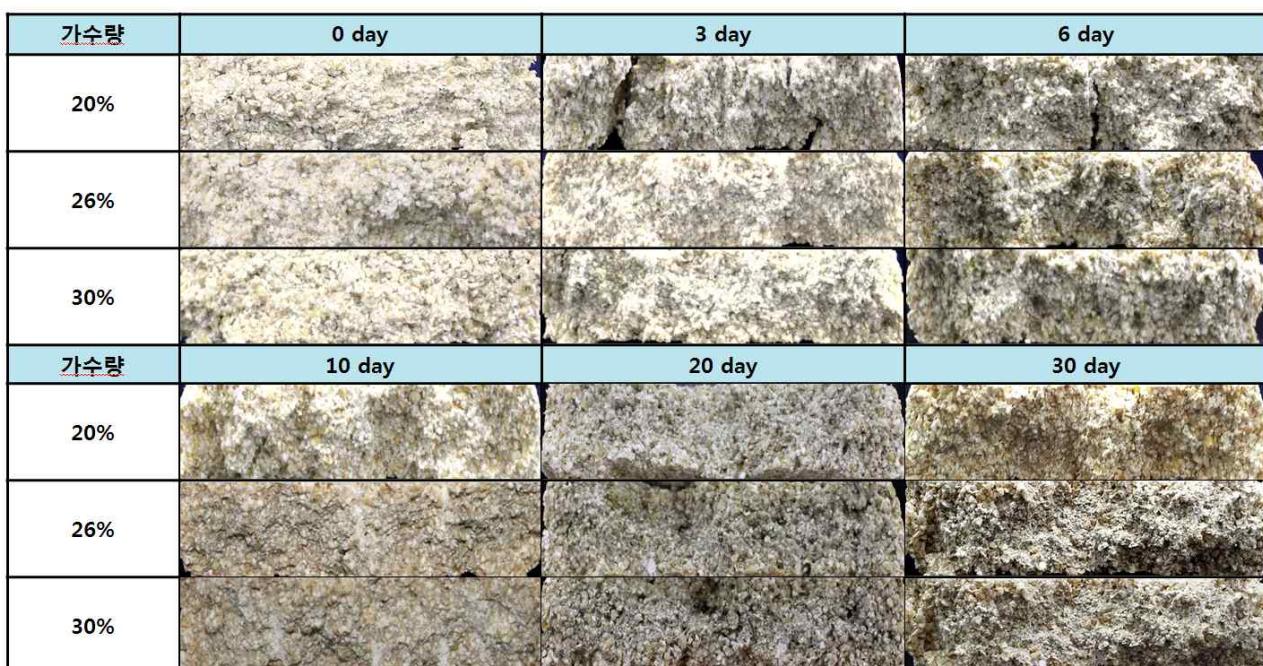


Fig 3. 발효 중의 누룩의 외형적 변화(TN-C)

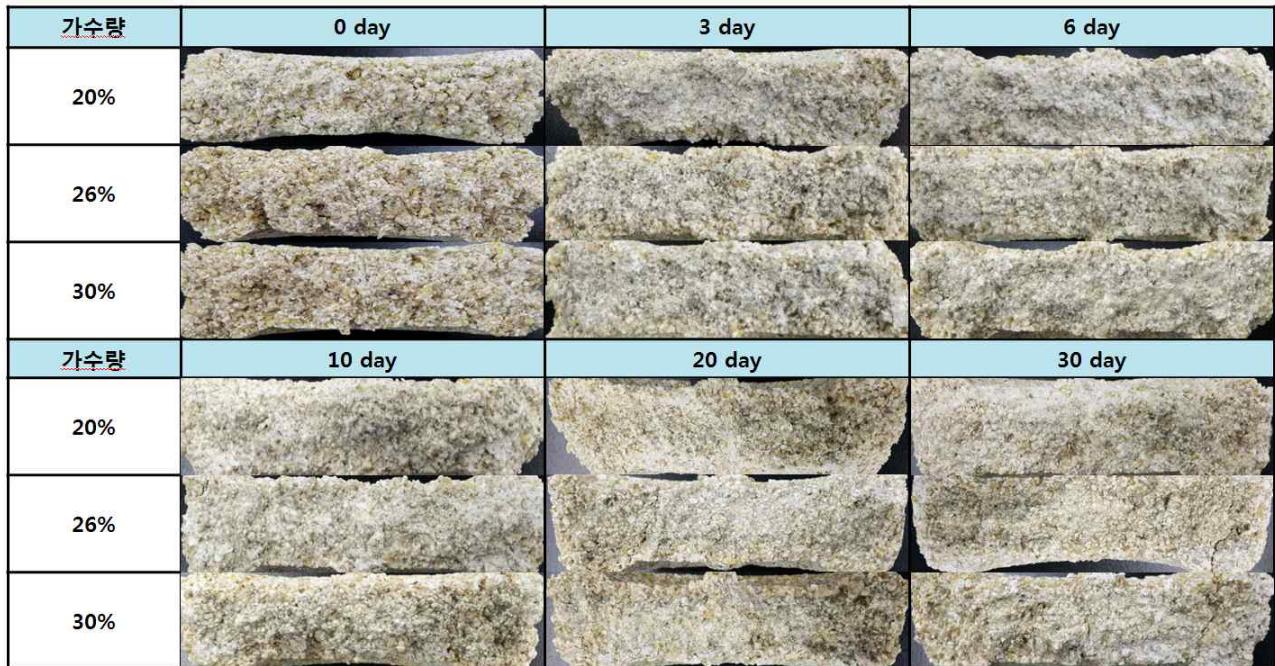


Fig 4. 발효 중의 누룩의 외형적 변화(TN-D)

발효과정 중의 누룩의 중량과 수분함량의 변화를 살펴보면, 수분함량의 감소폭은 누룩 제조 시 침윤공정에서 초기 가수량이 높게 제조된 누룩이 가수량이 낮은 누룩보다 큰 것으로 나타났으며, 발효 종료시에는 가수량의 차이와는 상관없이 제조한 모든 누룩의 수분함량이 비슷한 것으로 나타났다(Table 2). 그 이유는 제조 누룩의 품질을 일정하게 유지하기 위한 일환으로 건조 후, 낮은 온도에서 보존하기 위함이다.

외형적 크기는 누룩에 따라 약간의 차이는 있으나 발효기간 중의 변화는 거의 없는 것으로 확인되었고, 중량의 변화는 누룩의 종류와 발효기간과는 상관없이 유사하게 감소하는 경향이었다(Table 2).

Table 2. 제조된 누룩의 무게, 크기 및 수분함량 비교

<i>Nuruk</i> water content (%)	Days	Weigh (g)	Size (mm) (D/H)	Moisture content(%)
(20%)	0	308.4	123.25 / 33.63	17.97
	3	293.4	118.90 / 34.69	12.0
	6	288.9	118.47 / 34.25	9.47
	10	285.1	118.33 / 34.84	8.25
	20	290.6	116.7 / 32.95	8.49
	30	281.7	118.52 / 33.37	9.11
TN-C (26%)	0	301.5	122.56 / 34.83	19.34
	3	278.2	108.87 / 32.71	12.93
	6	270.3	116.35 / 33.25	8.83
	10	267.1	116.22 / 31.05	8.22
	20	257.8	115.67 / 31.37	8.96
	30	249.7	115.64 / 31.82	9.94
(30%)	0	300.0	121.82 / 35.42	21.48
	3	268.0	105.77 / 32.47	13.52
	6	259.6	116.45 / 32.96	10.35
	10	253.7	111.02 / 31.86	8.34
	20	257.7	114.28 / 32.27	8.84
	30	251.5	115.52 / 32.13	9.25
(20%)	0	308.2	121.36 / 34.19	18.90
	3	293.5	118.56 / 33.91	10.13
	6	289.0	117.17 / 33.12	9.08
	10	284.5	111.39 / 33.13	8.76
	20	290.4	116.12 / 33.11	8.61
	30	281.1	117.53 / 33.47	7.17
TN-D (26%)	0	301.3	121.15 / 33.45	23.29
	3	278.3	116.18 / 34.09	14.23
	6	270.4	114.83 / 32.05	10.63
	10	267.2	114.93 / 31.79	9.88
	20	257.2	114.57 / 31.7	8.27
	30	249.8	115.34 / 31.92	8.29
(30%)	0	299.8	120.55 / 32.49	25.32
	3	267.4	116.11 / 32.01	13.12
	6	259.7	115.28 / 32.28	10.59
	10	253.1	116.01 / 32.68	8.88
	20	257.5	114.9 / 31.58	8.88
	30	251.6	114.72 / 31.39	7.43

## 2) 제조된 누룩의 품질특성 구명

### 가) 이화학적 및 효소활성 특성

발효기간에 따른 누룩의 이화학적 특성은 Table 3과 Fig 5에 나타내었다. 먼저, 제조한 누룩 별 pH를 살펴보면 TN-C 누룩은 가수량에 따라 초기 pH 차이가 발생하였고 가수량이 낮을수록 pH는 더 높게 나타났다. 또한 발효기간이 경과함에 따라 pH가 0.5~1.0 범위내로 감소하는 것으로 나타났다.

TN-D 누룩은 초기 pH는 거의 차이가 없었으며, pH 감소폭은 가수량 30% 누룩이 큰 것으로 나타났다. 제조한 전통누룩의 추출물 pH는 약한 산성으로서 이들 간의 변화는 크지 않았다.

발효과정 중의 산도 변화를 살펴보면 누룩의 종류와는 상관없이 발효가 진행될수록 증가하다가 발효 30일째는 감소하는 것으로 나타났으며, 가수량이 높을수록 산도는 높은 것으로 나타났다. TN-D 누룩이 TN-C 누룩보다 낮은 산도를 보였으며 이는 원료의 차이로 인해 나타나는 결과로 여겨진다.

아미노산도의 경우, 누룩의 종류와는 상관없이 발효가 진행될수록 증가하다가 감소하는 것으로 나타났으며, 가수량이 많을수록 아미노산도도 높은 경향으로 나타났다.

제조된 누룩의 원료 및 가수량에 따른 TN-C와 TN-D 누룩의 품질 특성을 살펴보면, 2 종류 모두 가수량이 많을수록, 시간에 따라서 pH는 감소하고, 산도와 아미노산도가 적정하게 증가하는 것으로 보아 이 누룩을 이용하여 탁주 또는 약주를 빚어도 느끼한 맛이 없을 것으로 생각된다.

Table 3. 발효 기간 중 누룩의 이화학적인 특성 변화

Nuruk	Water content(%)	Days	pH	Acidity(%)	Amino acidity
TN-C	20%	0	6.31	0.16	0.30
		3	5.74	0.21	1.31
		6	5.83	0.34	1.48
		10	6.19	0.17	1.14
		20	6.13	0.20	0.97
		30	6.21	0.18	0.63
TN-C	26%	0	6.13	0.20	0.31
		3	5.45	0.26	2.00
		6	5.29	0.42	2.37
		10	5.29	0.36	2.32
		20	5.06	0.42	1.60
		30	5.52	0.19	1.09
TN-C	30%	0	5.84	0.20	0.28
		3	5.37	0.29	2.60
		6	5.29	0.44	3.49
		10	5.17	0.38	2.65
		20	5.07	0.41	2.10
		30	5.06	0.22	1.56
TN-D	20%	0	5.71	0.12	0.38
		3	6.05	0.12	0.58
		6	5.45	0.26	0.85
		10	6.07	0.18	0.79
		20	5.72	0.21	1.56
		30	5.68	0.16	0.47
TN-D	26%	0	5.58	0.13	0.33
		3	5.47	0.22	1.08
		6	4.86	0.44	1.42
		10	5.85	0.35	1.31
		20	5.22	0.32	1.75
		30	5.45	0.22	1.39
TN-D	30%	0	5.51	0.14	0.33
		3	5.46	0.21	0.91
		6	4.94	0.46	1.66
		10	5.09	0.39	1.55
		20	4.93	0.37	1.93
		30	5.17	0.26	1.51

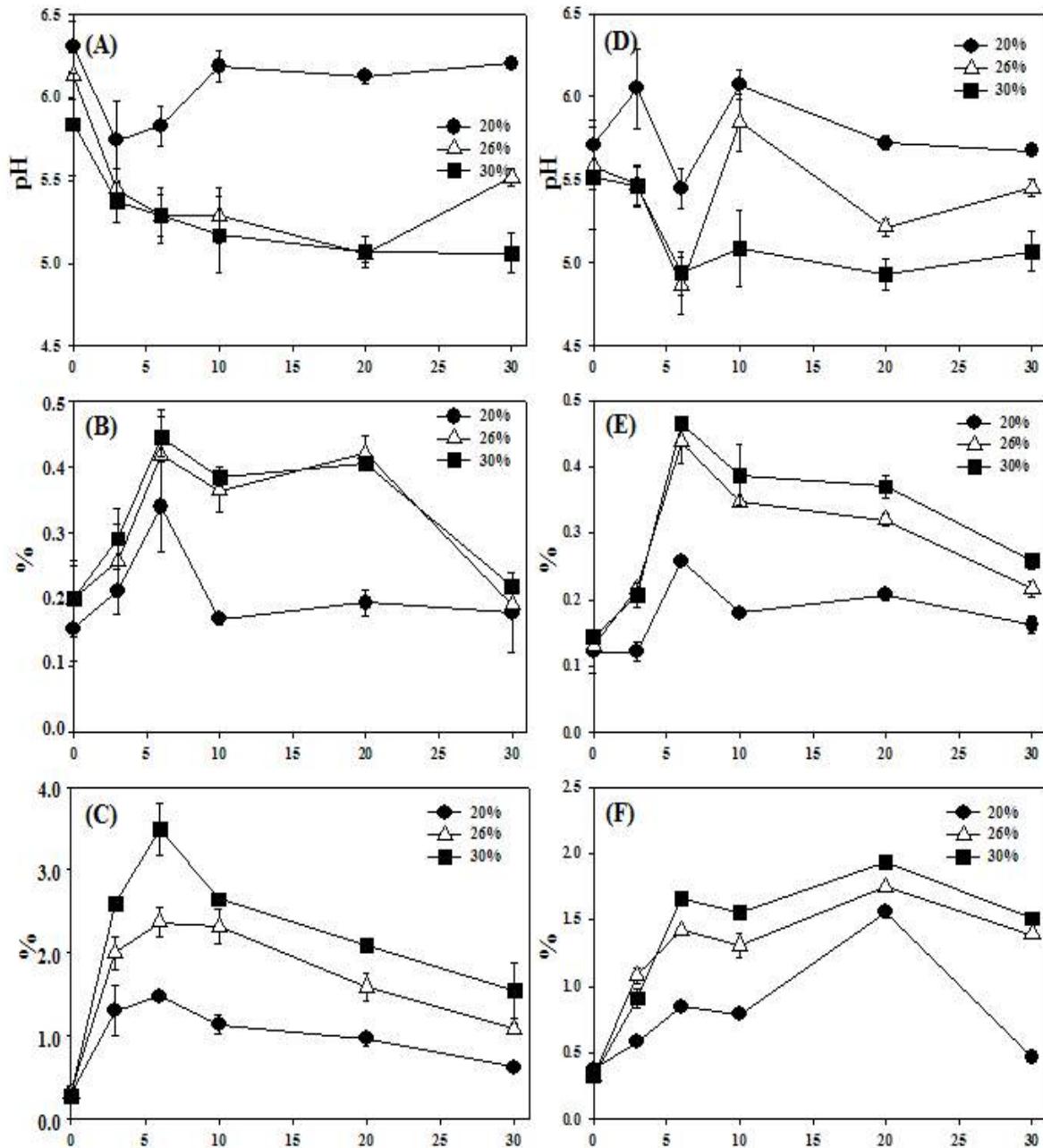


Fig 5. 원료 및 가수량별 제조한 누룩(TN-C, TN-D)의 이화학적 특성

Symbols : pH(A, D), 산도(B, E), 아미노산도(C, F)변화, TN-C : ABC, TN-D : DEF

#### 나) 생균수 및 포자수 측정

발효기간에 따른 누룩에 존재하는 발효미생물의 생균수 변화를 Table 4와 Fig 6에 나타내었다. 먼저 세균수의 변화를 살펴보면 발효 초기에 생육이 왕성하다가 발효기간이 길어짐에 따라 감소하거나 유지하는 경향으로 나타났으며, 제조한 원료에 따른 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다. 또한, 곰팡이 포자수 변화는 세균수와 유사한 경향으로 발효기간이 지날수록 포자수가 증가한 후, 유지되는 경향으로 나타났다.

Table 4. 발효기간 중의 누룩의 생균수 및 포자수 변화

Nuruk	Water content(%)	Day	Viable cell count (cfu/g)	
			Bacteria	Fungi
TN-C	20%	0	$1.6 \times 10^5 \pm 8.0 \times 10^4$	-
		3	$9.0 \times 10^5 \pm 2.8 \times 10^5$	$9.8 \times 10^5 \pm 2.5 \times 10^5$
		6	$3.2 \times 10^8 \pm 3.3 \times 10^8$	$3.7 \times 10^8 \pm 1.5 \times 10^8$
		10	$7.5 \times 10^7 \pm 2.2 \times 10^7$	$6.0 \times 10^8 \pm 4.6 \times 10^8$
		20	$1.2 \times 10^8 \pm 1.3 \times 10^7$	$5.2 \times 10^8 \pm 4.0 \times 10^6$
		30	$1.5 \times 10^8 \pm 6.4 \times 10^7$	$7.1 \times 10^8 \pm 8.5 \times 10^7$
TN-C	26%	0	$3.9 \times 10^7 \pm 1.9 \times 10^7$	-
		3	$1.5 \times 10^7 \pm 1.3 \times 10^7$	$1.4 \times 10^6 \pm 8.8 \times 10^5$
		6	$6.8 \times 10^8 \pm 5.4 \times 10^8$	$4.4 \times 10^8 \pm 2.6 \times 10^8$
		10	$4.7 \times 10^{10} \pm 2.0 \times 10^{10}$	$2.2 \times 10^{10} \pm 1.8 \times 10^{10}$
		20	$5.7 \times 10^{10} \pm 4.2 \times 10^9$	$5.0 \times 10^{10} \pm 3.0 \times 10^8$
		30	$8.1 \times 10^{10} \pm 6.1 \times 10^{10}$	$1.9 \times 10^{11} \pm 1.1 \times 10^{11}$
TN-C	30%	0	$9.3 \times 10^7 \pm 4.6 \times 10^7$	-
		3	$3.4 \times 10^7 \pm 1.6 \times 10^7$	$5.2 \times 10^6 \pm 3.3 \times 10^6$
		6	$2.8 \times 10^9 \pm 3.5 \times 10^8$	$7.0 \times 10^{10} \pm 4.0 \times 10^8$
		10	$1.1 \times 10^{11} \pm 7.0 \times 10^{10}$	$2.4 \times 10^{10} \pm 3.5 \times 10^9$
		20	$3.1 \times 10^{12} \pm 1.8 \times 10^{11}$	$7.8 \times 10^{11} \pm 4.0 \times 10^{10}$
		30	$1.5 \times 10^{12} \pm 3.2 \times 10^{11}$	$1.8 \times 10^{11} \pm 3.5 \times 10^{10}$
TN-D	20%	0	$7.6 \times 10^7 \pm 2.6 \times 10^7$	-
		3	$4.9 \times 10^8 \pm 1.9 \times 10^8$	$4.9 \times 10^8 \pm 1.9 \times 10^8$
		6	$1.7 \times 10^9 \pm 1.2 \times 10^9$	$1.7 \times 10^9 \pm 5.0 \times 10^7$
		10	$7.6 \times 10^8 \pm 6.3 \times 10^8$	$7.0 \times 10^8 \pm 5.0 \times 10^7$
		20	$3.7 \times 10^8 \pm 1.8 \times 10^8$	$2.7 \times 10^9 \pm 1.5 \times 10^9$
		30	$2.5 \times 10^6 \pm 5.0 \times 10^5$	$3.3 \times 10^7 \pm 1.6 \times 10^7$
TN-D	26%	0	$7.7 \times 10^8 \pm 7.0 \times 10^6$	-
		3	$1.3 \times 10^{10} \pm 7.2 \times 10^9$	$1.3 \times 10^{10} \pm 7.2 \times 10^9$
		6	$2.0 \times 10^{11} \pm 1.7 \times 10^{11}$	$2.0 \times 10^{11} \pm 1.7 \times 10^{11}$
		10	$8.5 \times 10^{10} \pm 9.1 \times 10^{10}$	$1.4 \times 10^{11} \pm 1.6 \times 10^{11}$
		20	$5.0 \times 10^9 \pm 1.0 \times 10^9$	$2.9 \times 10^{10} \pm 1.4 \times 10^{10}$
		30	$5.6 \times 10^8 \pm 2.1 \times 10^8$	$4.1 \times 10^9 \pm 2.9 \times 10^9$
TN-D	30%	0	$3.0 \times 10^9 \pm 4.0 \times 10^8$	-
		3	$1.0 \times 10^{12} \pm 8.0 \times 10^{11}$	$1.0 \times 10^{12} \pm 8.0 \times 10^{11}$
		6	$6.4 \times 10^{12} \pm 3.6 \times 10^{12}$	$3.4 \times 10^{12} \pm 3.6 \times 10^{12}$
		10	$1.5 \times 10^{12} \pm 1.1 \times 10^{12}$	$1.1 \times 10^{12} \pm 1.2 \times 10^{12}$
		20	$4.6 \times 10^{11} \pm 3.2 \times 10^{11}$	$5.5 \times 10^{11} \pm 3.4 \times 10^{11}$
		30	$1.1 \times 10^{11} \pm 1.0 \times 10^{10}$	$2.0 \times 10^{12} \pm 1.1 \times 10^{12}$

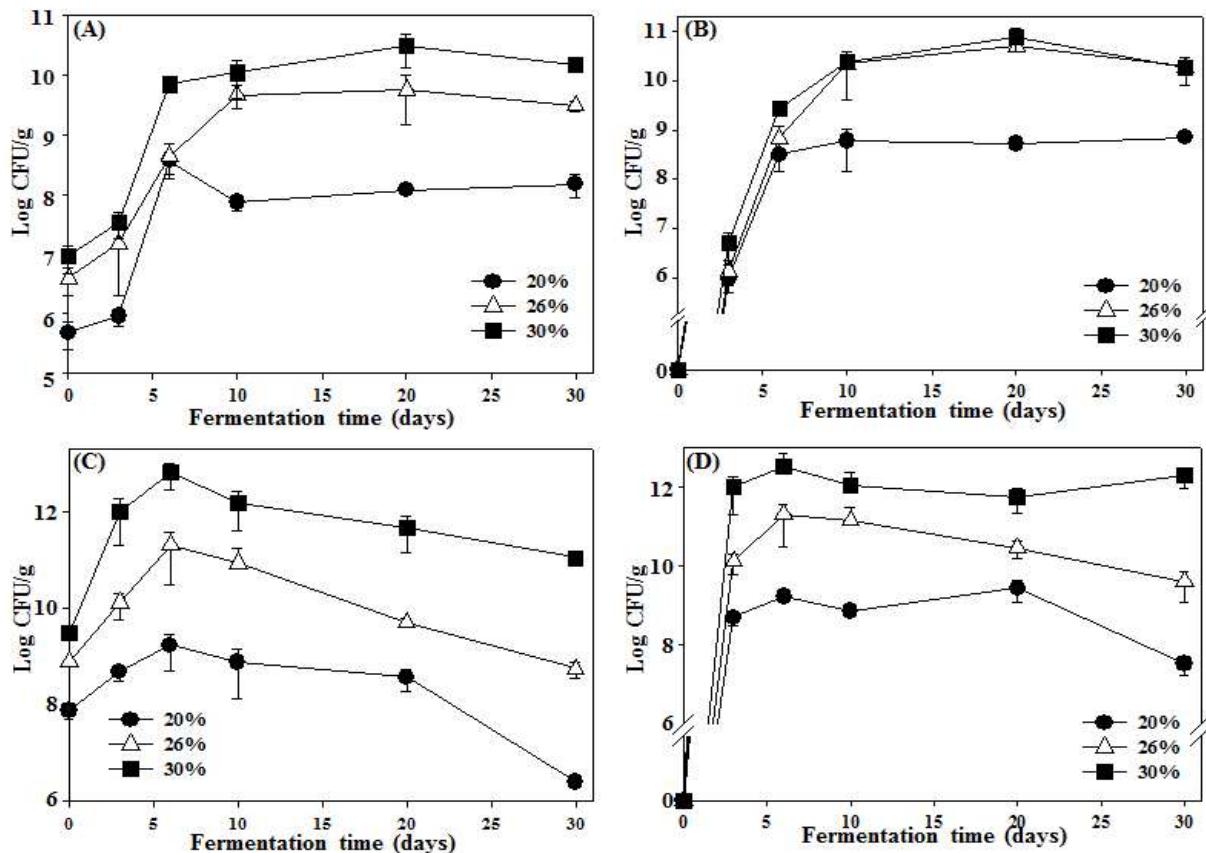


Fig 5. 가수량별 제조된 TN-C누룩의 발효시기별 세균(A : TN-C, C : TN-D) 생균수, 곰팡이 포자수(B : TN-C, D : TN-D) 변화

#### 다) 제조된 누룩의 효소활성 변화

제조한 2종류 누룩(TN-C, TN-D)의 효소 종류별 활성을 Table 5에 나타내었다. TN-C와 TN-D 누룩의  $\alpha$ -amylase 활성은 전반적으로 발효기간이 진행됨에 따라 활성이 증가하다 10일 째 감소하였다. 가수량이 증가(30%) 할수록 활성이 높게 나타났고 누룩 종류에 따라서는 큰 차이가 없는 것으로 나타났다.

Glucoamylase 활성은 발효기간에 따라 TN-C와 TN-D 누룩 둘 다 활성이 감소하다 증가하는 경향을 보였다. 누룩의 종류에 따라서는 TN-D가 TN-C보다 조금 더 높은 활성을 보였으며, 가수량별로 비교해보면 가수량이 증가할수록 높은 활성을 보이는 것으로 확인되었다.

산성 단백질 활성은 발효기간에 따라 TN-C와 TN-D 누룩 둘 다 활성이 증가하다 감소하는 경향을 보였고, 누룩의 종류에 따라서는 큰 차이는 없는 것으로 나타났으나 가수량에서는 가수량이 높을수록 산성 단백질 분해 활성이 조금 더 높은 것으로 나타났다.

특히, 누룩은 단백질 분해력이 높으면 단백질이 분해되어 아미노산으로 전환되는데, 이때 제조된 주류의 맛이 결정하기 때문에 단백질 분해력이 낮은 것이 유리할 것으로 생각된다.

Table 5. 발효 중인 누룩의 효소활성 분석

Nuruk	Water content(%)	Fer. time (days)	Enzyme activity (units/g)		
			$\alpha$ -amylase	Glucoamylase	Acid protease
TN-C	20%	0	3.3±0.85	3222.3±21.08	299.0±55.93
		3	54.0±2.84	3744.8±324.2	1392.4±36.49
		6	52.3±2.76	3913.6±23.51	1152.8±62.03
		10	46.0±2.35	4198.2±61.83	1578.6±30.36
		20	46.1±1.67	4421.6±61.33	1412.9±44.38
		30	47.4±6.91	3782.8±67.54	1397.3±33.52
TN-C	26%	0	3.9±0.12	2928.2±48.71	288.70±67.88
		3	63.4±1.85	4025.0±229.67	1292.40±36.39
		6	70.3±2.16	4151.5±45.34	752.48±66.03
		10	68.7±3.79	4217.4±19.38	1478.64±20.36
		20	68.4±1.29	4139.5±79.83	1312.88±24.34
		30	70.1±1.15	3851.0±112.30	1254.06±55.45
TN-C	30%	0	3.7±1.15	3981.2±84.33	278.22±47.35
		3	69.2±1.11	4015.0±168.24	1460.83±45.12
		6	75.0±1.74	4243.3±63.68	1597.06±24.18
		10	71.8±6.46	4312.6±49.87	1589.03±54.55
		20	72.5±1.32	4139.5±113.54	1779.62±31.33
		30	75.3±3.93	3825.0±84.28	1112.53±99.18
TN-D	20%	0	3.8±1.21	3795.9±21.08	299.08±55.93
		3	48.3±4.48	4012.6±324.2	1392.43±36.49
		6	67.6±6.53	4377.2±23.51	1152.82±62.03
		10	59.7±8.69	4433.6±61.83	1378.26±30.36
		20	53.8±3.67	4237.4±61.33	1312.98±44.38
		30	57.4±4.63	3904.8±67.54	1007.3±41.28
TN-D	26%	0	5.3±2.33	3113.6±48.71	288.34±67.88
		3	42.3±2.66	3779.6±229.67	1292.40±36.39
		6	66.2±1.98	4062.7±45.34	1752.48±66.03
		10	59.6±3.89	4267.9±19.38	1478.64±20.36
		20	72.6±1.29	4183.6±79.83	1612.88±24.34
		30	77.6±1.15	3793.1±112.30	1417.03±44.77
TN-D	30%	0	5.6±2.15	3312.6±86.12	278.26±12.57
		3	39.7±6.11	4166.9±123.54	1460.18±34.29
		6	48.6±3.74	4422.4±71.22	2597.33±97.13
		10	76.7±4.57	4367.9±36.87	1589.54±103.51
		20	77.1±6.58	4227.1±97.34	1679.65±74.57
		30	78.5±7.13	3992.3±46.82	1512.5±83.42

### 3) 제조 누룩의 유기산, 유리아미노산, 당류 및 향기성분 분석

#### 가) 유기산 분석

원료별, 가수량에 따른 2종류 누룩의 발효기간에 따른 유기산 변화를 Fig 6에 나타내었다. 두 누룩의 대표적 유기산은 acetate, citrate, butyrate, lactate 검출되었다.

TN-C보다 TN-D 누룩에서 더 많은 유기산이 검출되었으며 특히, acetate, citrate 및 butyrate는 발효가 진행됨에 따라 증가하다가 10일 이후에는 감소하는 경향으로 나타났고 lactate는 발효가 진행될수록 증가하는 경향으로 나타났다.

가수량별로 살펴보면 가수량 20% 누룩의 유기산 함량은 발효시간에 따른 뚜렷한 변화는 없었고 발효 초기와 비슷한 함량을 유지하는 경향으로 나타났지만 그 외 가수량 26%와 30% 누룩에서는 발효시간에 따른 유기산 함량이 증가하는 것으로 나타났다. 또한 TN-C보다 TN-D 누룩에서 유기산의 생성량이 더 높은 것으로 나타났는데 이는 가수량에 따른 발효미생물의 생육과 원재료 및 발효조건과 상관관계가 있는 것으로 보인다.

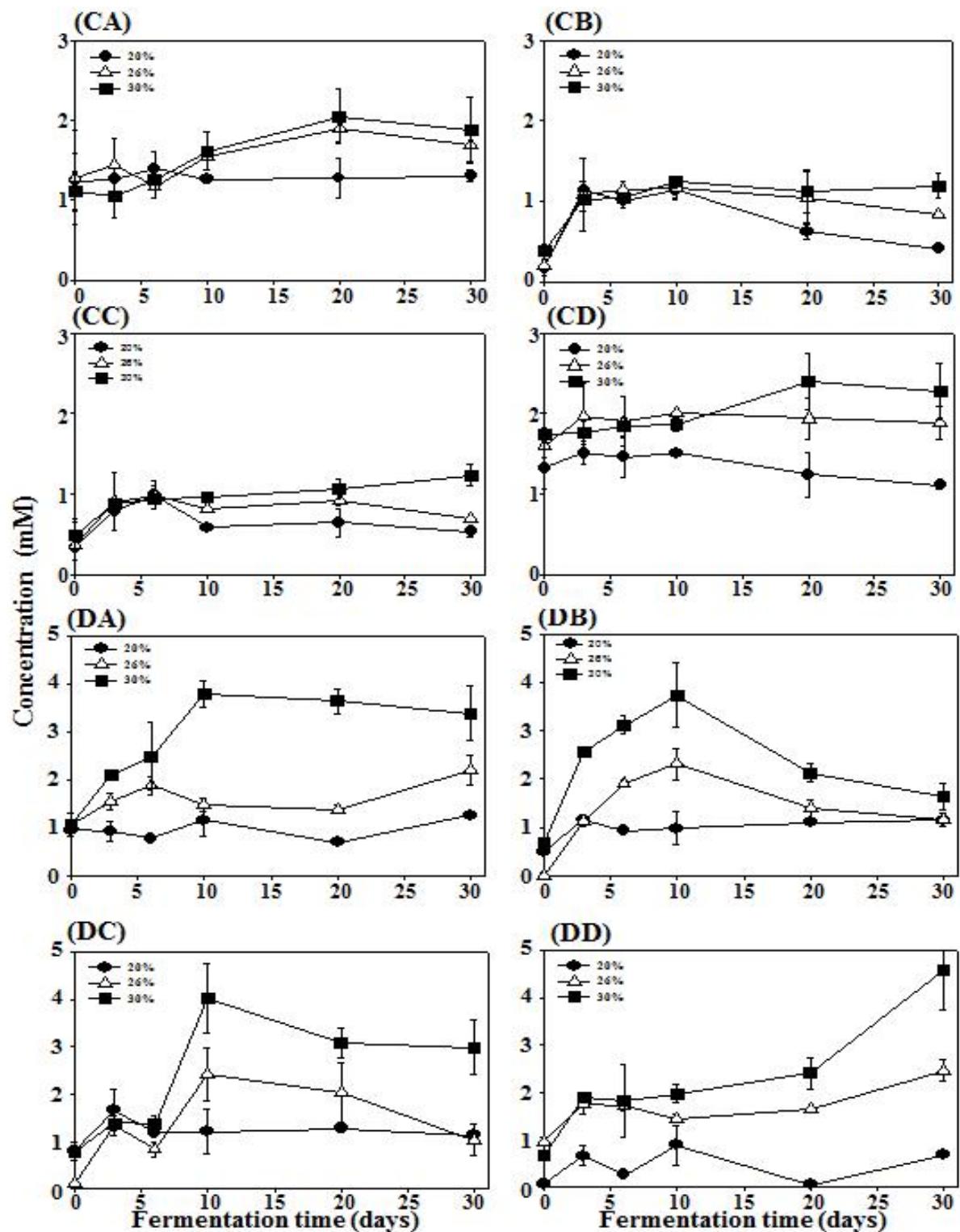


Fig 6. 제조된 TN-C, TN-D누룩의 발효시기별 유기산 생성량

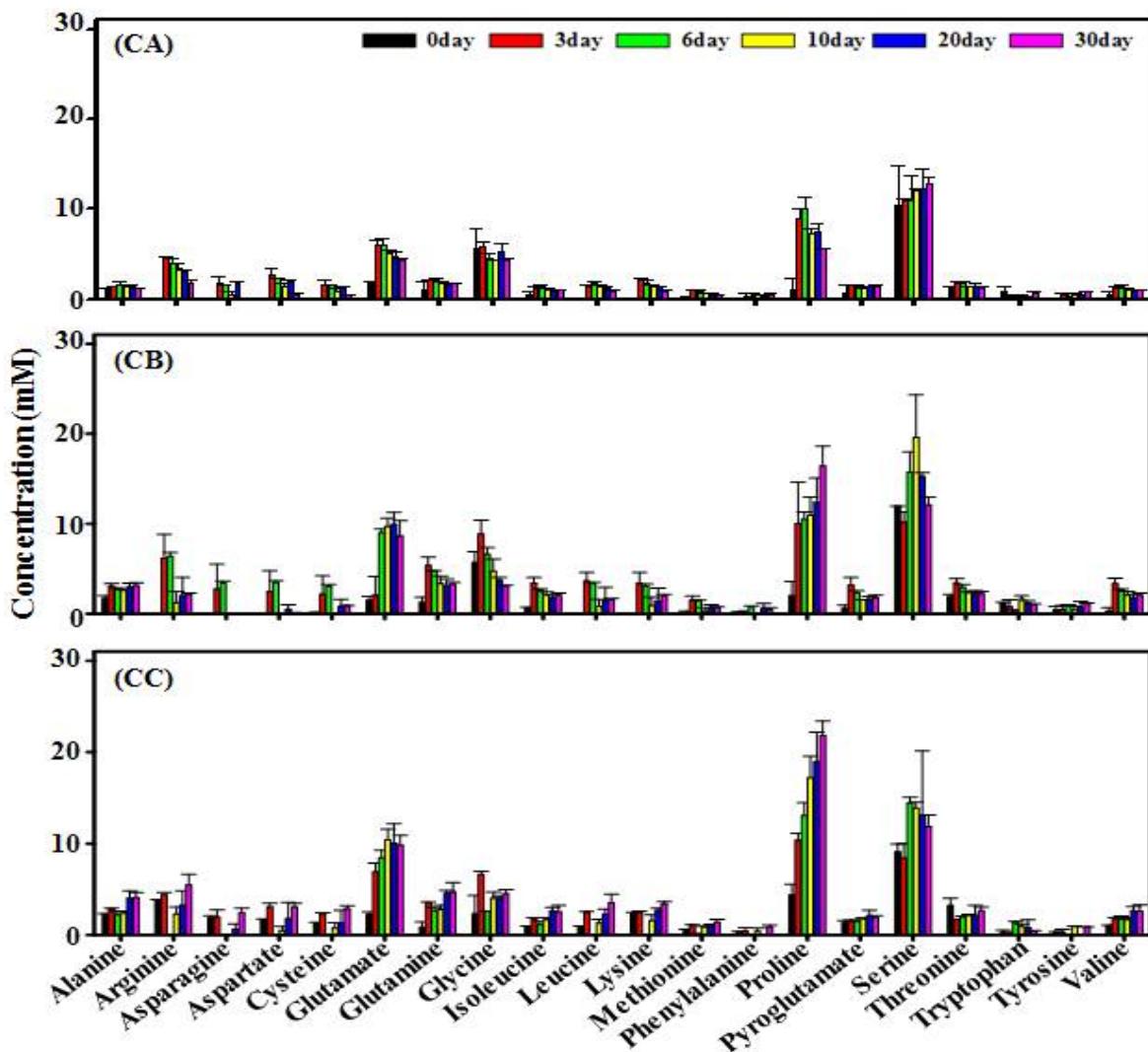
Symbols : TN-C 누룩 acetate (CA), TN-C 누룩 citrate (CB), TN-C 누룩 butyrate (CC),  
 TN-C 누룩 lactate (CD), TN-D 누룩 acetate (DA), TN-D 누룩 citrate (DB),  
 TN-D 누룩 butyrate (DC), TN-D 누룩 lactate (DD)

#### 나) 유리아미노산 분석

원료별, 가수량에 따른 2종류 누룩의 발효기간에 따른 유리아미노산 변화를 Fig 7에 나타내었다. TN-C와 TN-D 누룩에서 필수 아미노산이 9개(leucine 등), 비필수 아미노산이 11개(serine 등) 등 총 20개 아미노산이 검출되었으며, 대표적인 아미노산은 arginine, glutamate, glycine, proline, serine 등으로 검출되었다.

3종류의 원료(보리, 녹두, 통밀)로 만든 TN-C보다는 2종류 원료(보리, 녹두)로 만든 TN-D 누룩에서 검출된 주요 아미노산 함량이 더 높은 것을 확인할 수 있었다. 이러한 차이는 누룩제조시 사용하는 원재료 차이와 더불어 관여 발효미생물 생육이 다른 것으로 추측된다.

대부분의 아미노산들이 발효시간이 경과됨에 따라 증가하였다가 감소하는 경향을 확인할 수 있었다. 특히, 가수량 20%보다는 26%와 30%에서 감칠맛과 관련된 glutamate와 단맛과 관련된 proline도 증가하는 것으로 보아 탁주보다 약주 제조에 적합한 누룩으로 여겨진다.



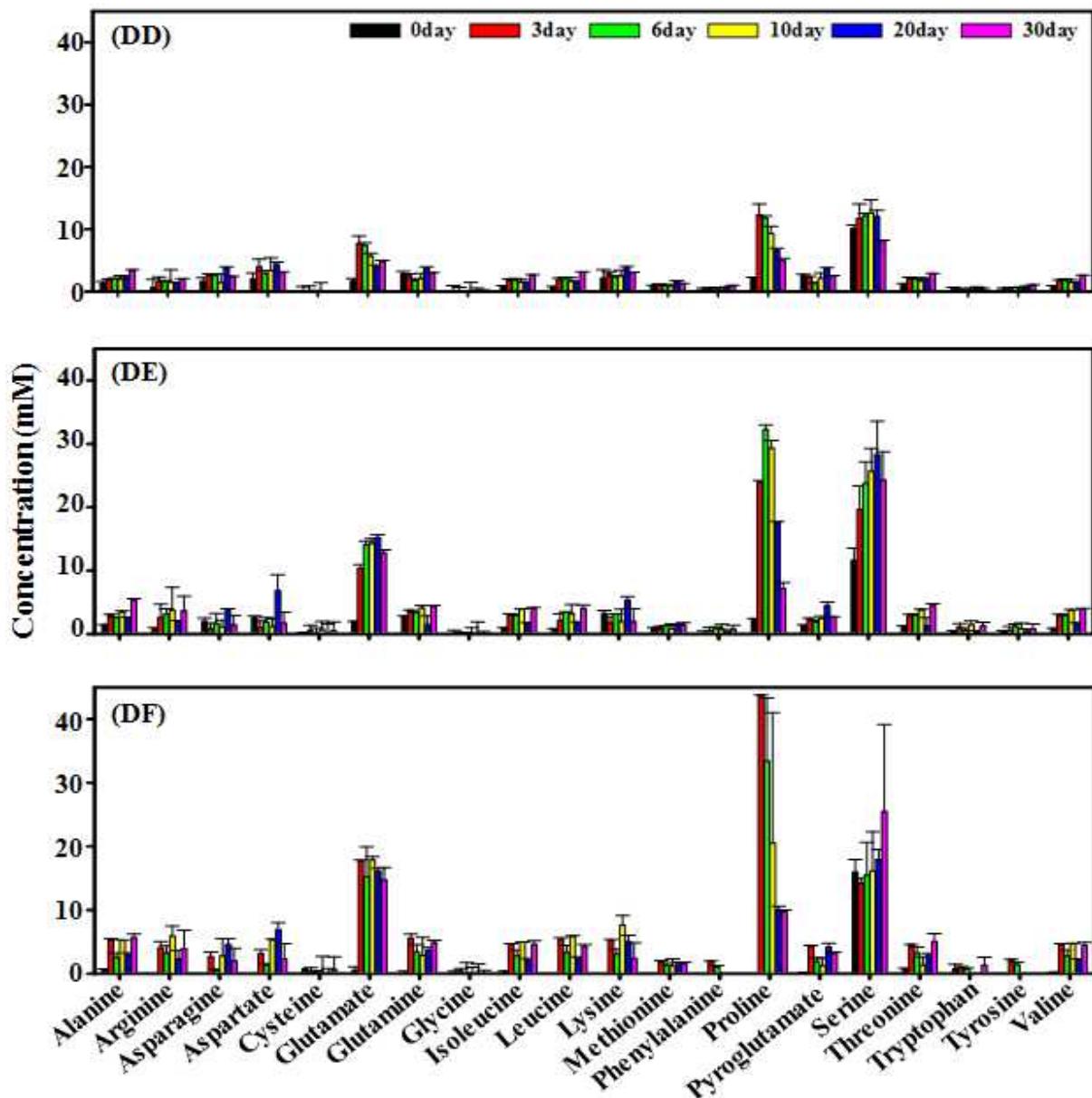


Fig 7. 제조된 TN-C, TN-D 누룩의 발효시기별 유리아미노산 생성량 변화

Symbols : TN-C 누룩, 가수량 20% (CA); TN-C 누룩, 가수량 26% (CB); TN-C 누룩, 가수량 30% (CC); TN-D 누룩, 가수량 20% (DA); TN-D 누룩, 가수량 26% (DB); TN-D 누룩, 가수량 30% (DC)

#### 다) 누룩의 당류 분석

원료별, 가수량에 따른 2종류 누룩의 발효기간에 따른 당류의 생성변화를 Fig 8에 나타내었다. 제조한 2종류 누룩(TN-C, TN-D)의 당류 성분은 발효시간이 경과됨에 따라서 대부분 증가하였다가 감소하는 경향을 확인할 수 있었다.

또한, 가수량이 많은 누룩(30%)일수록 생산된 당류의 양 또한 증가하는 것으로 나타났다. TN-C보다는 TN-D 누룩에서 glycerol을 제외한 당류의 생성이 높은 것을 확인할 수 있었고, 이는 관여하는 발효 미생물 활성 차이로 전분을 당으로 전환시키는 당화력 차이와 더불어 누룩 원재료 차이인 것으로 추측된다.

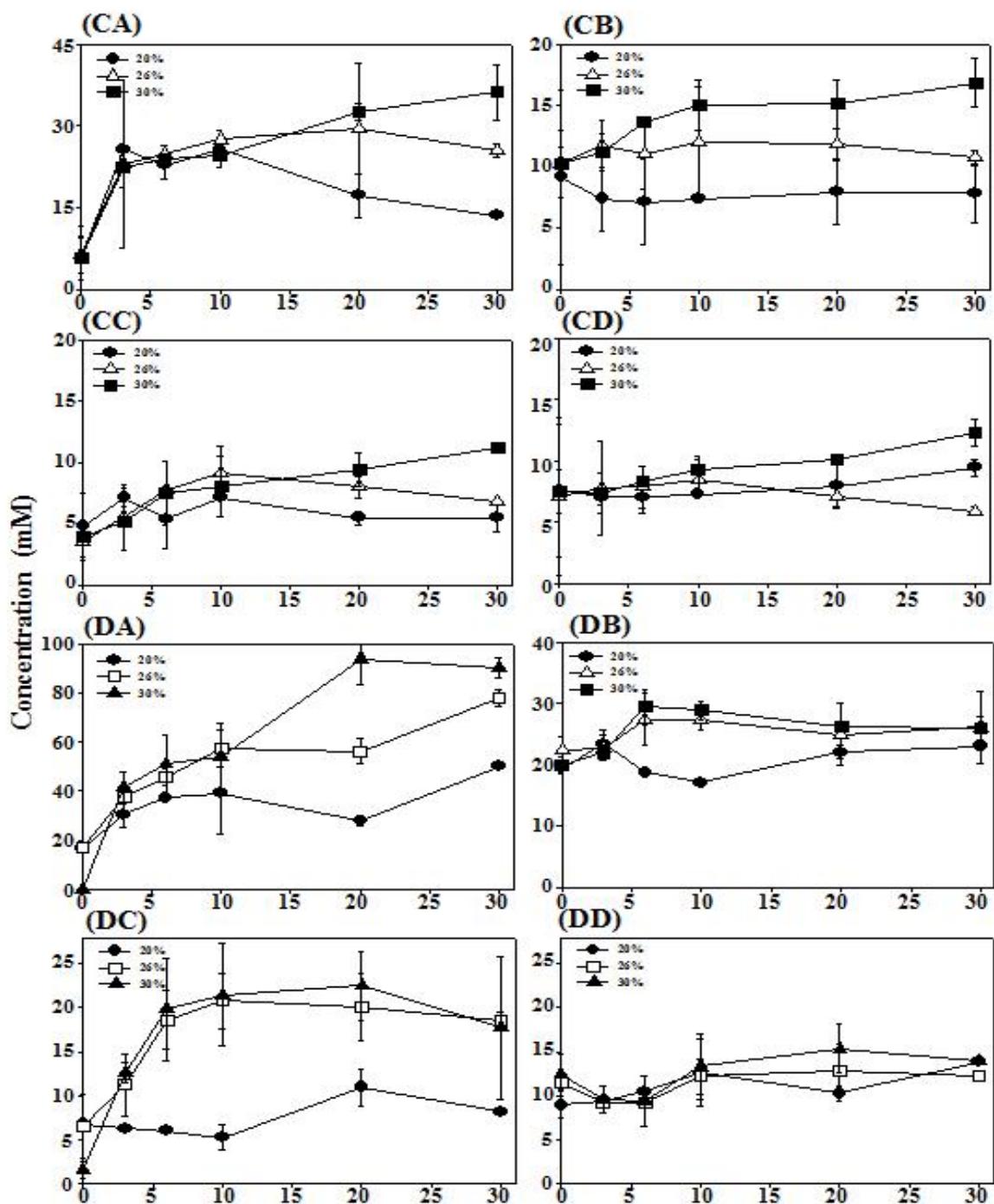


Fig 8. 가수량별로 제조된 누룩의 발효시기별 당류의 생성량 변화

Symbols : Glucose (A), Fructose (B), Galactose (C), Glycerol (D)생성량 변화

#### 라) 누룩의 향기성분 분석

##### 라-1) 전자코를 이용한 누룩의 향기성분 패턴 분석

원료별, 가수량에 따른 누룩(TN-C, TN-D)의 발효기간에 따른 향기성분 패턴 변화를 전자코를 이용하여 조사하였다(Fig 9). 2종류 누룩(TN-C, TN-D)의 발효 초기(0 day)에는 가수량에 따라서 다른 패턴으로 분포하였다. 특히, 가수량이 많은 누룩(26%, 30%)일수록 0일에서 3일 사이에 향기성분이 빠르게 변화하는 것을 확인하였다.

제조한 누룩의 향기성분을 가수량별로 살펴보면, 원료에 물을 20% 첨가한 경우, 2종류 누룩 모두 발효기간이 경과되면서 왼쪽 상단에서 중앙으로 이동하였고, 26%와 30%의 경우는 발효가 경과되면서 오른쪽 상단에서 하단으로 향기성분 패턴이 이동하였으며 20%와는 다른 그룹을 형성하고 있는 것으로 보아 향기를 만드는 구성성분이 다른 것으로 보인다.

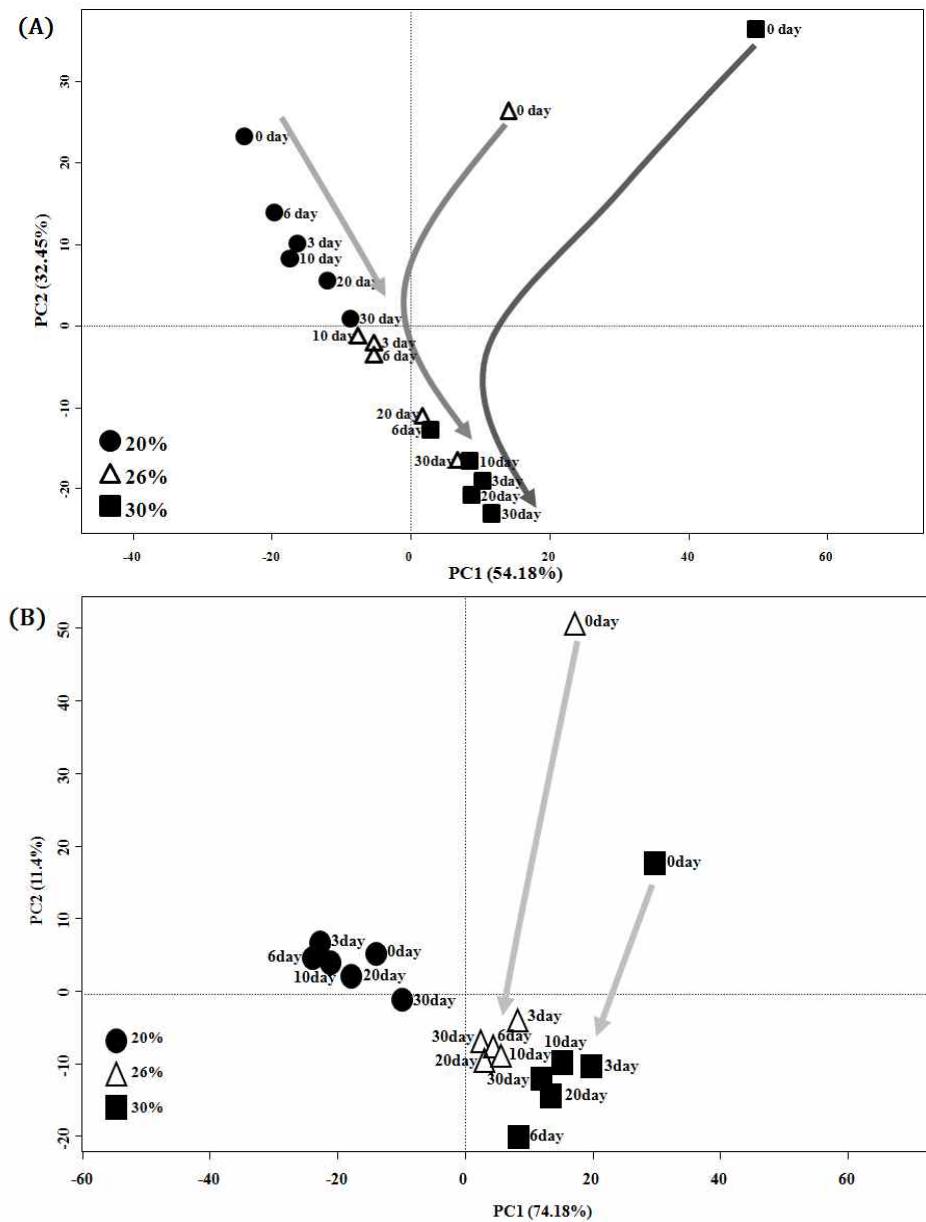


Fig 9. 가수량별로 제조된 누룩의 향기성분 변화

Symbols : TN-C누룩 (A), TN-D누룩 (B), 가수량 20% (●), 가수량 26% (△), 가수량 30% (■)

이것으로 보아 각 가수량별 3일에서 30일 사이 발효된 누룩 시료의 향기성분은 가수량에 의해 구분되는 것을 확인할 수 있었다. 결론적으로 살펴보면 누룩을 발효시킬 때 생성되는 향기성분의 패턴은 사용한 원료를 증자하지 않은 날곡류 상태와, 첨가한 가수량 및 관여 발효 미생물에 의해 형성되는 것으로 여겨진다(Fig 9).

현재, 이들 향기성분의 정량적 분석은 GC-MS를 이용하여 분석하고 있어 그 결과가 주목되고 있다.

#### 4) 저장기간에 따른 누룩의 품질변화

##### 가) 누룩의 효소활성 변화

원료 및 가수량별 제조한 누룩의 저장기간 중 품질관리를 유지하기 위해, 저장온도 및 저장기간에 따른 각종 효소활성의 변화를 조사하였다(Table 6~9).

Table 6. 저장기간에 따른 누룩의  $\alpha$ -amylase 활성

		$\alpha$ -amylase activity (Units/g)		
Nuruk	Water content	Storage temp.	0 week	8 weeks
TN - C	20%	-20°C		23.0±1.3
		4°C	47.4±0.9	22.9±2.8
		30°C		23.1±1.7
	26%	-20°C		23.2±3.1
		4°C	70.1±1.2	23.2±2.6
		30°C		23.0±1.9
TN - D	30%	-20°C		23.1±2.6
		4°C	75.3±0.93	23.0±3.3
		30°C		23.0±1.8
	20%	-20°C		23.1±2.1
		4°C	57.4±4.63	23.2±6.2
		30°C		23.1±3.8
TN - D	26%	-20°C		23.3±2.1
		4°C	77.6±1.15	23.2±1.9
		30°C		23.3±2.6
	30%	-20°C		23.3±2.3
		4°C	78.5±7.13	25.0±1.6
		30°C		23.0±1.8

원료 종류와 첨가한 가수량 및 저장온도에 따른 2종류 누룩(TN-C, TN-D)의  $\alpha$ -amylase 활성을 Table 6에 나타내었다. TN-C와 TN-D 누룩의 가수량(3 type)과 온도별(3 type)로 12주 동안 저장한 결과,  $\alpha$ -amylase 활성(Table 6)은 저장 0주에는 가수량이 큰 누룩(26, 30%)에서 효소활성이 높았으나, 저장 8주부터 2배 정도 큰 폭으로 실활된 후, 12주가 되었을 때 대조구에 비해 효소활성이 2.8배 실활되었다. 특히, 가수량이 높은 누룩이  $\alpha$ -amylase 실활의 폭이 큰

것으로 나타났다.

누룩 종류에 따른  $\alpha$ -amylase 활성은 큰 차이가 없었고, 저장온도에 따른 차이는 누룩마다 조금씩 차이는 있지만 전반적으로 저온에서 저장하는 것이 효소활성의 실활이 더 적은 것으로 확인되었다.

Table 7. 저장기간에 따른 누룩의 glucoamylase 활성변화

		Glucoamylase activity (Units/g)		
Nuruk	Water content(%)	Storage temp.	0 week	8 weeks
TN - C	20%	-20°C		2554.0±48.3
		4°C	3782.8±67.5	2604.0±36.2
		30°C		2592.0±26.0
	26%	-20°C		2556.0±32.3
		4°C	3851.0±112.3	2538.0±29.2
		30°C		2646.0±46.2
TN - D	30%	-20°C		2322.0±31.8
		4°C	3825.0±84.3	2526.0±34.5
		30°C		2418.0±18.6
	20%	-20°C		2148.0±29.6
		4°C	3904.8±67.5	2472.0±27.1
		30°C		2970.0±23.6
TN - D	26%	-20°C		2490.0±45.1
		4°C	3793.1±112.3	2772.0±26.3
		30°C		2520.0±43.3
	30%	-20°C		2622.0±35.3
		4°C	3992.3±46.8	3222.0±22.6
		30°C		3066.0±35.8
				2637.3±26.6

각 누룩별 glucoamylase 활성을 비교·분석한 결과를 Table 7에 나타내었다. 누룩 TN-C와 TN-D 누룩은 저장 8주에 효소활성은 약 40%의 실활을 보였으며, 12주에는 저장 8주보다 glucoamylase 활성이 조금 더 실활되는 경향으로 나타났다.

제조된 2종류 누룩의 가수량에 따른 효소활성 차이를 살펴본 결과, 가수량이 높을수록 효소활성 감소폭이 적은 것으로 나타났고 누룩 종류에 따라서는 TN-D 누룩의 효소활성이 더 높게 유지되는 것으로 나타났다. 저장온도에 따라서는 크게 영향을 받지 않는 것으로 나타났다.

Table 8. 저장기간에 따른 누룩의 acidic protease 활성변화

Acidic protease activity (Units/g)					
Nuruk	Water content(%)	Storage temp.	0 week	8 weeks	12 weeks
TN - C	20%	-20°C		298.8±24.6	224.8±35.6
		4°C	1397.3±33.5	500.4±27.9	431.5±41.1
		30°C		559.2±33.4	389.4±61.3
	26%	-20°C		282.0±35.3	199.1±34.5
		4°C	1254.0±55.5	538.8±26.3	343.5±54.2
		30°C		624.0±34.9	449.3±31.6
	30%	-20°C		541.2±47.8	384.5±27.9
		4°C	1112.5±99.2	524.4±51.2	365.5±33.7
		30°C		271.2±3.7	199.7±24.5
TN - D	20%	-20°C		199.2±6.3	164.3±28.1
		4°C	1007.3±41.3	553.2±8.1	377.3±12.9
		30°C		582.0±9.5	364.7±21.6
	26%	-20°C		334.8±10.8	211.6±26.1
		4°C	1417.0±44.8	470.4±7.3	348.2±18.2
		30°C		332.4±2.9	271.6±21.1
	30%	-20°C		376.8±4.8	302.9±64.0
		4°C	1512.5±83.4	667.2±5.3	454.6±34.9
		30°C		718.8±7.2	431.0±23.3

각 누룩별 acidic protease 활성을 비교·분석한 결과를 Table 8에 나타내었다. TN-C와 TN-D 누룩의 저장 8주에 40%에서 60% 이상 acidic protease 활성이 감소하는 것으로 나타났고, 원료 및 가수량별로 제조한 2종류 누룩(TN-C, TN-D)은 저장온도 및 저장기간에 따라 acidic protease 활성이 실활 되고 있었다.

따라서 누룩 저장성에서 효소활성의 실활의 폭이 큰 것으로 나타나 산성 단백질의 저장성 증대를 위한 포장기법이나 제조 후 건조공정 또는 법제공정의 표준화가 필요할 것으로 생각된다. 다양한 원료를 이용하여 만든 혼합누룩이 금강밀 단독으로 제조한 누룩(병곡)보다 각각의

효소활성이 떨어지는 것은 원료와 더불어 누룩 제조시 사용한 발효온도 등이 중요한 요소로 작용한 것은 아닌지, 이 부분에 대한 연구가 필요하다.

Table 9. 저장기간에 따른 누룩의 Saccharogenic power (SP) 변화

Saccharogenic power (S·P)					
Nuruk	Water content	Storage temp.	0 weeks	8 weeks	12 weeks
Commercial nuruk	SS SH	상온 유통	234.0 345.3	30일 발효 후, 판매중인 제품을 대조구로 사용	
		-20°C		377.3	345.3
	20%	4°C	379.5	370.5	345.3
		30°C		383.8	313.3
TN - C		-20°C		346.4	400.2
	26%	4°C	365.4	333.7	355.4
		30°C		343.5	355.4
		-20°C		383.8	335.7
	30%	4°C	406.2	388.2	507.8
		30°C		373.4	409.4
		-20°C		333.0	389.4
	20%	4°C	372.7	331.5	364.9
		30°C		349.9	383.8
TN - D		-20°C		347.5	381.8
	26%	4°C	366.7	318.2	348.7
		30°C		349.9	383.8
		-20°C		363.6	370.5
	30%	4°C	389.6	343.5	428.1
		30°C		334.6	414.1

각 조건별 제조한 2종류 누룩(TN-C, TN-D)의 당화력(SP)을 비교·분석한 결과를 Table 9에 나타내었다. 대조구로 사용한 시판누룩은 SS 및 SH로써 30일 발효 후 상온에서 유통되는 누룩을 사용하였다.

TN-C 누룩의 경우, 가수량과 저장기간에 따른 당화력(SP)은 가수량 20% 첨가시, 저장 0주보다 8~12주가 9~17%정도 효소활성이 실활되었다. 이러한 활성은 상온(30°C)보다 저온(4, -20°C)에 보존할수록 효소활성의 실활이 2.1~2.7배 적었다. 또한 가수량 26%는 상온에서 2.7%, 30%는 17.3% 실활 되는 것으로 보아 TN-C 누룩은 26% 가수량을 첨가하여 저온(-20,

4)에서 12주 동안 보존하는 것이 당화력 실활이 가장 적은 것을 알 수 있었다.

TN-D 누룩의 경우, 가수량과 저장기간에 따른 당화력(SP)은 가수량 20%, 26%, 30% 첨가시, 저장 0주 보다 8~12주가 최소 2~5%정도 효소활성이 실활되었다. 특이한 것은 저장 온도가 높은 상온과 기간이 길어질수록 당화력은 실활 되지 않고 높아진 것은 누룩 속에 당화와 관련된 누룩곰팡이가 생육하여 이를 효소를 계속 만드는 것으로 추측된다.

결론적으로 가수량과 원료별로 개발한 TN-C와 TN-D 누룩의 당화력(SP)는 TN-C 보다 TN-D 누룩이 더 높게 나타난 것은 관여 발효미생물과 누룩 원료에 따른 차이도 있었다. 또한, 대조구로 사용한 시판누룩 SS와 SH와의 비교에서도 약 1.2~2배정도 당화력 차이가 나는 것으로 보아 원료별, 가수량별로 개발한 TN-C와 TN-D 누룩의 우수성을 나타내고 있다.

### 3절 : 발효조건에 따른 누룩의 품질특성 규명

#### (1) 재료 및 방법

##### 1) 시험 원료

본 연구에 사용한 보리 및 녹두는 전남 해남지역에서 재배된 (2014年產)것을 구입하여 사용하였다.

##### 2) 누룩 제조공정 및 발효법 확립

###### 가) 누룩 전처리

본 연구에서는 누룩 제조를 위해, 사용 원료인 보리 및 녹두를 롤로밀로 분쇄한 후7-mesh 채로 내린 후, 혼합된 원료에 첨가하는 가수량을 26%로 살수 혼합하여 1시간 동안 침윤시켜 사용하였다.

###### 나) 누룩(TN-E)

고문헌 (고사찰요 등) 등에 기술된 내부비전곡을 변형시켜 제조하였다. 우선, 누룩 전처리 과정에서 침윤시킨 원료를 각각 적당한 비율(보리, 녹두=86.4%(6.048 kg):13.6%(0.952 kg))로 혼합한 다음, 340 g씩 소분하여 누룩 성형장치(프레스 성형기)를 이용하여 동일한 크기와 무게로 누룩을 성형한 후, 발효(전발효 30℃, 습도 70%, 후발효 : 발효 3일 sampling 후 습도 50%, 2일 간격으로 뒤집기, 30일) 시켰다.

건조장치를 이용하여 25℃에서 48시간 건조시킨 후 발효기간(0, 3, 6, 10, 20, 30일)에 따른 누룩-E의 품질특성 분석 시료로 사용하였다. 또한 누룩 제조시 각 발효기간별로 sampling하여 1, 2세부과제의 연구 시료로 제공하였다(Fig 1).

###### 다) 누룩(TN-F)

고문헌 (고사찰요 등) 등에 기술된 내부비전곡을 변형시켜 누룩 TN-F를 제조하였다. 우선, 누룩 전처리 과정에서 침윤시킨 원료를 각각 비율(보리, 녹두=86.4%:13.6%)로 혼합한 다음, 340 g씩 소분하여 누룩 성형장치(프레스 성형기)를 이용하여 동일한 크기와 무게로 누룩을 성

형한 후, 발효(전발효 : 40°C, 습도 70%, 후발효: 발효 3일 sampling 후 습도 50%, 2일 간격으로 뒤집기, 30일) 시켰다.

건조장치를 이용하여 25°C에서 48시간 건조시킨 후 발효기간(0, 3, 6, 10, 20, 30일)에 따른 누룩-E의 품질특성 분석 시료로 사용하였다. 또한 누룩 제조시 각 발효기간별로 sampling하여 1, 2세부 및 2협동과제의 연구 시료로 제공하였다(Fig 1).

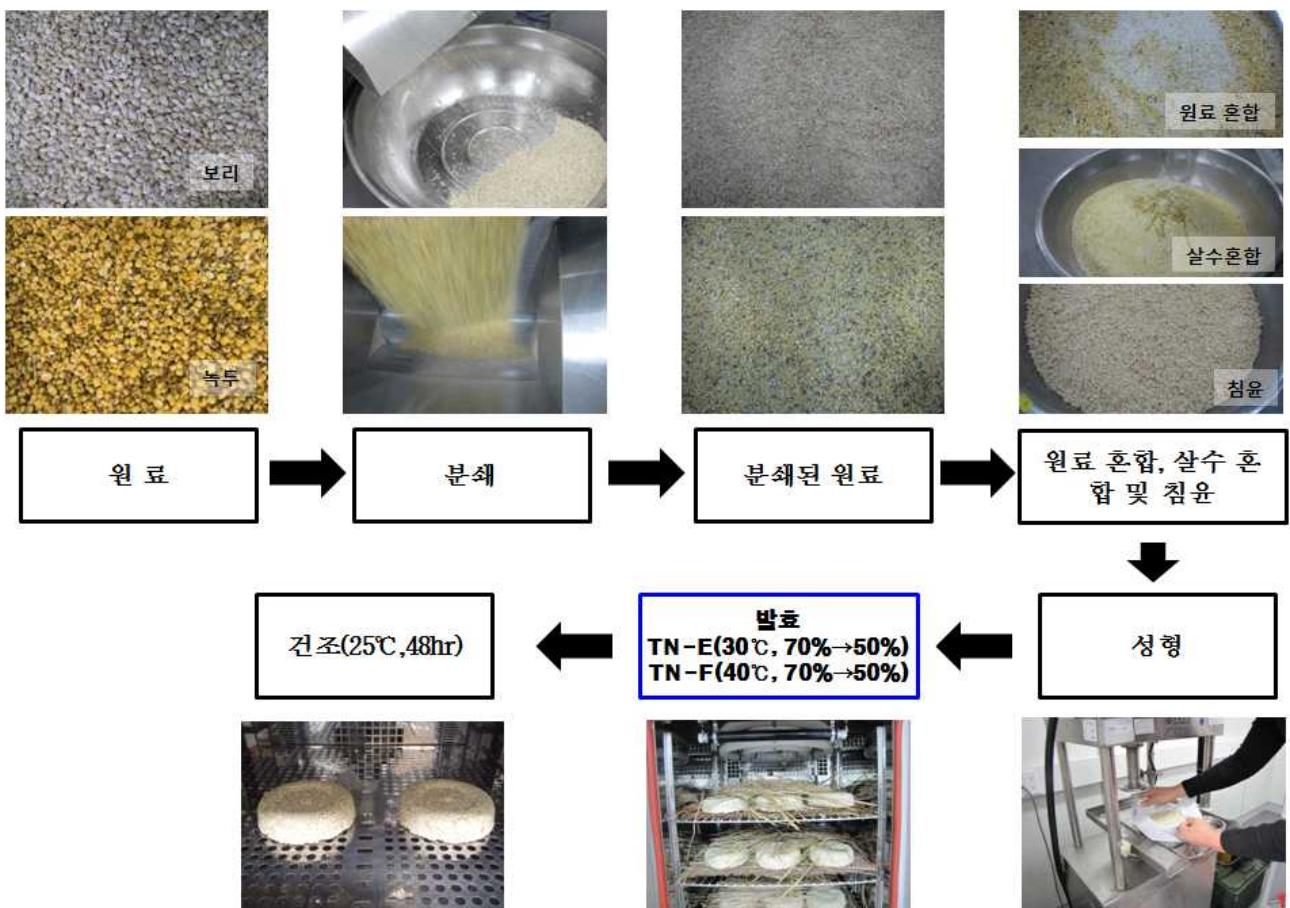


Fig 1. 발효조건에 따른 누룩 제조 공정

### 3) 발효조건에 따라 제조된 누룩의 외형적 특성 구명

제조된 두 종류 누룩(TN-E 및 TN-F)의 발효조건에 따른 외형적 특성을 분석하기 위하여 중량, 크기(지름), 두께 및 수분함량을 측정하여 비교하였다.

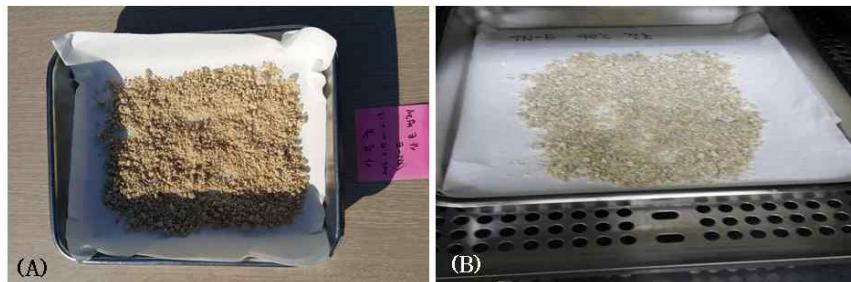
### 4) 발효조건에 따른 누룩의 품질특성

제조된 두 종류 누룩(TN-E 및 TN-F)의 발효기간에 따른 품질의 변화를 0, 3, 6, 10, 20, 30일마다 측정하여 비교하였다.

### 5) 건조방법에 따른 누룩의 품질특성

제조된 두 종류 누룩(TN-E 및 TN-F)의 건조조건에 따른 누룩의 품질을 비교하기 위하여 Fig 2와 같이 볍제(상온, 그늘 7 hr/2 day)와 열풍건조 (40°C, 24hr)하여 이화학적 특성 및 효

소활성( $\alpha$ -amylase, glucoamylase 및 acidic protease) 등을 조사하였다.



**Fig 2. 제조된 누룩의 건조방법: (A) 법제, (B) 열풍건조**

#### 6) 저장기간에 따른 누룩의 품질변화

제조된 2종류 누룩의 저장조건에 따른 효소활성( $\alpha$ -amylase, glucoamylase 및 acidic protease 등)을 조사하기 위해, 우선, 저장 온도(4, 15, 30°C)와 저장 기간(0, 8, 12주)에 따른 효소 잔존능을 분석하였다.

#### 7) 분석방법

##### 가) 발효기간에 따른 누룩의 품온 측정

누룩 발효 중 발효미생물에 의해 생성되는 품온 변화는 Fig 3과 같이 HOBO<sup>®</sup>사의 data logger U12-013을 이용하여 발효기간(0, 3, 6, 10, 20, 30일)에 따른 품온 변화를 6시간 간격으로 측정하였다.



**Fig 3. 누룩의 품온측정 방법**

##### 나) 제조된 누룩의 중량, 크기(지름), 두께 및 수분함량 등의 외형적 특성 분석

제조된 누룩의 중량은 Micro weighing scale (MW-II 6000N, CAS Co., Korea)로 측정하고, 크기 및 두께는 Digimatic caliper (CD-20CPX, Mitutoyo Co., Kawasaki, Japan)로 측정하였다. 또한, 48시간 건조시킨 누룩의 수분함량은 moisture analyzer (MX-50, AND Co., Tokyo, Japan)로 측정하였다.

##### 다) 이화학적 및 효소활성 분석을 위한 누룩 시료조제

이화학적 특성을 분석하기 위해, 우선 제조된 누룩 시료로부터 10 g을 채취한 후, 중류수 50 mL을 가하고 실온에서 3시간 침출하여 그 여과 용액을 사용하였다. 효소활성 분석을 위한 시료는 시료 10 g에 염화나트륨 용액 50 mL을 가해서 실온(15~20°C)에서 3시간 때때로 흔들어 침출한 후, 여과하여 여과된 액을 본 실험의 조효소액으로 사용하였다.

### 라) 제조 누룩으로부터 이화학적 특성(pH, 산도, 아미노산도 등) 분석

pH는 pH meter (Orion 3 star, Thermo scientific Co.)로 실온에서 측정하였다. 총 산도는 일정량의 시료를 취하여 여과지로 여과한 검체 10 mL를 100 mL 삼각 플라스크에 취한 다음, 0.5% phenolphthalein 지시약을 2~3방울 떨어뜨리고 0.1 N-NaOH로 적색이 될 때까지 중화 적정하였으며 소비된 용액의 양을 젓산으로 환산하여 표시하였다.

아미노산도는 여과지로 여과한 검체 10 mL에 0.5% phenolphthalein 지시약을 2~3방울 떨어뜨린 다음, 0.1 N-NaOH로 담홍색이 될 때까지 중화한 후, 여기에 중성포르말린 용액 5 mL을 가하여 유리된 산을 0.1 N-NaOH로 적정하여 담홍색이 될 때까지 소요된 0.1 N-NaOH의 mL 수로 표시하였다.

### 마) 효소 역가 측정

#### 마-1) $\alpha$ -amylase 활성

$\alpha$ -amylase 활성은 2% starch 용액 0.04 mL에 조효소액 0.04 mL를 첨가하고 40°C에서 30분간 반응시킨 후, 1N HCl 0.02 mL를 분주하여 반응을 정지시키고 iodine 용액 0.1 mL 첨가하여 발색시킨 후, 580 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구로는 증류수를 조효소액과 같은 동량으로 첨가하여 사용하였다. 효소활성(UNIT)은 아래 방정식으로 산출하였다.

$$U(\text{units/g}) = \{((A_{2\% \text{ starch}} - A_{\text{sample}})/A_{2\% \text{ starch}})\}/0.04$$

$A_{2\% \text{ starch}}$  : 2% starch 용액의 흡광도 값

$A_{\text{sample}}$  : 조효소액과 반응시킨 용액의 흡광도 값

#### 마-2) Glucoamylase 활성

Glucoamylase 활성은 2% starch 용액 1 mL에 0.2 M acetate buffer 0.2 mL를 가해서 40°C에서 5분간 예열한 후, 효소액 0.1 mL를 넣고 40°C에서 20분간 반응시키고, 1N NaOH 용액 0.1 mL를 첨가하여 반응을 정지시킨 후, 30분간 방치하고 1N HCl용액 0.1 mL를 가해 중화하였다.

본 실험에 사용한 대조구는 starch 용액 1 mL에 0.2 M acetate buffer 완충액 0.2 mL를 넣고 40°C에서 5분간 예열하고 증류수 0.1 mL를 넣고 시료와 동일하게 1 N HCl 용액 0.1 mL를 가해 중화시킨 후, DNS법으로 환원당을 측정하여 생성된 포도당량으로 하였다. Glucoamylase 활성은 가용성 전분으로부터 40°C에서 60분간 1 mg의 포도당을 생성하는 활성을 1 unit로 하였으며, 시료 1 g의 glucoamylase 활성은 다음의 방정식으로 산출하였다.

$$\text{효소활성}(\text{unit/g}) = \frac{\text{생성 포도당량}(\text{mg}) \times 60}{20(\text{반응 시간})} \times \frac{1}{0.1(\text{효소량})} \times \text{회석 배수}$$

#### 마-3) Acidic protease 활성

Casein용액 0.15 mL에 pH 3.0 macIlvaine buffer 0.1 mL를 넣고 40°C에서 5분간 반응시키고 조효소액 0.05 mL를 넣고 40°C에서 60분간 반응시킨 다음, trichloroacetic acid 용액 0.3 mL을 가해 반응을 정지시킨 후, 원심분리로 침전을 제거시켰다. 이 액 0.1 mL에 NaCO<sub>3</sub>용액 0.5

mL와 folin-ciocalteu's phenol 시약 0.1 mL을 가해서 40°C에서 30분간 발색시킨 후, 660 nm에서 흡광도를 측정하였고, 별도로 대조구로는 TCA용액을 가하기 직전에 효소액을 첨가하여 이하 위의 방법과 동일하게 하여 흡광도를 측정하여 아래 방정식에 의해서 효소활성을 산출하였다.

$$\text{효소활성(unit/g)} = \frac{\text{생성 tyrosin량(y)}}{\text{반응 액량}} \times 0.6 / 0.1 \times 0.15 / 0.05 \times 0.05 / \text{효소액량}$$

#### 마-4) Saccharogenic power (SP)

##### 마-4-가) 효소반응 당액 제조

당화력 측정은 주류분석규정에 따라 2% 전분용액 50 mL과 식초산 완충용액 30 mL을 100 mL 용량 플라스크에 취한 다음 55°C로 예열시킨 항온수조에서 10분 동안 예열시키고, 효소액 10 mL(대조구는 중류수 10 mL)을 넣고 60분 동안 당화시켰다. 당화가 끝난 다음, 0.5 N-NaOH 10 mL을 넣어 효소반응을 정지시키고, 급랭시켜 중류수를 가하여 100 mL로 조정하였다(이때 사용된 효소액은 희석배수를 2 구간으로 하고, 최소 볼륨을 20 mL씩 희석하여 사용하였다).

##### 마-4-나) 당분정량

펠링 A시약 5 mL, 펠링 B시약 5 mL와 중류수 40 mL를 250 mL 삼각 플라스크에 넣어 준비한 후, 효소반응당액 10 mL(대조구는 중류수 10 mL : B)를 첨가하여 삼각 플라스크를 끓인다. 이때 청색이 옅어질 때쯤 메틸렌블루 용액 4방울을 떨어뜨린 후, 계속 끓이면서 표준 포도당 용액을 떨어뜨려 청색이 적갈색으로 변하는 시점을 종말점으로 하여, 이때 표준 포도당 용액의 소비 mL수를 B라 하고, 아래 식을 통해 당화율을 계산하고, 두 구간의 희석배수와 당화율과의 관계를 그래프로 나타내어, 당화율 15%일 때의 희석배수(D)를 구하여 당화력을 계산하였다.

$$\text{포도당(mg)} = 2(B-M) \times 100 / \text{효소반응 채취량 (mL)}$$

$$\text{당화율(\\%)} = \frac{\text{누룩 } 1 \text{ g으로 전분질 } 1 \text{ g을 분해하여 생성된 포도당}}{\text{비율로 나타냄}}$$

$$\text{당화력(S·P)} = 15 \times \text{희석배수(D)} \times 0.5 \times (\text{추출배수})$$

#### 바) 생균수 및 포자수 측정

시료 10 g을 취하여 멸균 백에 넣고 90 mL 멸균 생리 식염수를 가하여 균질기로 용해하고 멸균 생리 식염수로 단계별로 희석한 후, PCA배지에 도말하여 나타난 균체수를 CFU/g로 표기하였다.

포자수는 시료 1 g에 5% Tween 80 용액 10 mL로 포자를 추출하고 1% methylene blue 용액으로 염색한 다음, 희석하여 hematocytometer를 이용하여 현미경(Axio Imager A2, Carl Zeiss Microimaging GmbH, Germany)으로 검정하였다.

#### 사) 유기산 및 유리당 성분분석

유기산 및 유리당 분석에 앞서 누룩의 전처리는 시료 10 g에 0.85% NaCl 50 mL를 분주하고 실온에서 3시간 동안 간헐적으로 흔들어주어 추출한 후, filter paper로 여과한 여액을 0.2 μ

m membrane filter (Millipore Co. Ireland)로 여과하여 분석시료로 사용하였다. 이 때 유기산 분석은 HPLC (LC-20A, Shimadzu Co., Kyoto, Japan)를 이용하였으며, post column 방법을 사용하여 분석하였다. Column은 Shodex Rspcak KC-G(6.0 mm × 50.0 mm) guard column에 RSpak KC-811(8.0 mm × 300 mm, Showa Denko, Toko, Japan) 2개를 연결하여 사용하였다. mobile phase는 1% phosphoric acid (Sigma-aldrich)를, flow rate는 0.8 mL/min, column oven의 온도는 63°C로 하였다. 분리물은 반응 용액(0.2 mM Bromothymol blue, 15 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM NaOH)과 반응한 후 UV 440 nm에서 검출하였다. 이때 반응용액의 flow rate는 1.0 mL/min, 반응온도는 30°C로 하였다.

유리당 분석은 HPLC (Waters HPLC e2695, Waters, Milford, USA)로 하였으며, 분석조건으로 column은 YMC pack polyamine II(S-5 μm, 12nm, 250×4.6 mmI.D.)를 사용하였고 column oven의 온도는 25°C로 하였다. mobile phase는 50% acetonitrile을, flow rate는 1.0 mL/min, detector는 RI detetcter(RI2414, waters)로 검출하였다.

#### 아) 유리아미노산 성분 분석

제조된 누룩의 유리아미노산을 분석하기 위하여 시료 1 g에 70% ethanol 10배수를 넣고 homogenizer로 균질화한 후, 80°C에서 15분간 진탕 가열하였다. Filter paper (No.2, Whatman, Maidstone, UK)를 사용하여 여과한 후, 남은 잔사에 2회에 걸쳐 70% ethanol을 넣어 재추출한 다음, 가열 및 여과하였다. 여과액을 모두 합하여 45°C이하에의 온도에서 감압 농축하여 ethanol을 제거한 후, 이 농축물에 0.02 N HCl 2 mL를 가하여 잘 녹이고 0.2 μm membrane filter로 여과한 후, amino acid analysis system (L-8900, Hitachi Co., Japan)을 이용하여 분석하였으며, 분석조건은 Table 1에 나타내었다.

Table 1. 유리아미노산 분석 조건

Content	Condition
Amino acid analysis	Hitachi L-8900
Column	Cation separation Lithium, 4.6×150 mm Cation Lithium filter. 4.6×100 mm
Detector	UV-Vis(440 ~570 nm)
Buffer flow rate	0.45 mL/min
Ninhydrin flow rate	0.25 mL/min
Injection volume	100 μL
Mobile phase	A (pH 2.85) : Lithium citrate 1.41% + citric acid 0.7% + methanol 5% + HCl 0.9% B (pH 4.20) : Lithium citrate 1.41% + citric acid 0.7% + HCl 0.6% C (pH 3.30) : Lithium citrate 1.88% + lithium chloride 5.07% + HCl 1%

## 아) 향기성분 분석

### 아-1) GC-MS를 이용한 패턴 분석

시료 10 g에 에테르-펜탄 혼합용액(1:1) 100 mL을 넣고 150 rpm, 20°C에서 15시간 동안 추출한 후, 여과하고 걸러진 시료에 에테르-펜탄 혼합용액(1:1) 50 mL을 넣고 150 rpm, 20°C에서 1시간 동안 재 추출하였다. 두 추출 용액을 혼합한 후, sodium sulfate를 첨가하여 물이 전부 흡수될 때까지 흔들어준 다음, 이 액을 여과하고 농축한 후, 0.2 μm Syringe filter (Whatman Co., USA)로 여과하여 GC-MS (GC-MS-QP2010 plus)을 이용하여 분석하였다 (Table 2).

Table 2. GC-MS 분석조건

Content	Condition		
GC-MS	QP2010plus		
Column	HP-INNOWAX (60 m × 0.25 mm i.d × 0.25 μm film thikness)		
Injection temp.	250°C		
Column flow	1.0 cm/sec (linear velocity, N <sub>2</sub> )		
Split ration	20		
Column temp.	<table border="1"> <tr> <td>230°C</td> </tr> <tr> <td>30 min</td> </tr> </table>	230°C	30 min
230°C			
30 min			
Detection	FID 250°C		
Injection volume	1 μL		

## 자) 통계 분석

모든 시료의 품질 특성 분석은 실험군의 오차를 줄이기 위해, 2~3회 반복하여 평균과 표준편차로 나타내었고. 통계처리는 SPSS( )에 의한 분산분석(ANOVA)에 의해 검증하였으며, Duncan's multiple range test로 유의성을 검증하였다.

## 2. 주요 결과

### 1) 발효조건에 따른 누룩의 외형적 특성 구명

#### 가) 제조된 누룩의 품온 변화

제조된 누룩의 발효기간에 따른 품온의 변화를 Fig 4에 나타내었다. TN-E 누룩은 발효초기 20°C에서 발효가 진행됨에 따라 품온은 미생물의 활발한 활동으로 인해 30°C보다 조금 높은 온도에서 발효가 진행되어 이후에는 품온을 지속적으로 유지되는 것으로 나타났고, TN-F 누룩은 발효초기 25°C에서 급격히 상승하여 42°C까지 상승한 후 발효 20일째 품온이 0.5°C가량 떨어지는 것으로 나타났으나 제조한 누룩의 품질에 미치는 영향은 없었다.

2종류 누룩 모두 발효 초기에 급격한 온도 상승을 보였으나 이는 발효온도 조건과 미생물의

활동과 연관이 있는 것으로 생각되어지며, 습도 조절에 의한 품온의 변화에는 영향을 거의 미치지 않는 것으로 나타났다.

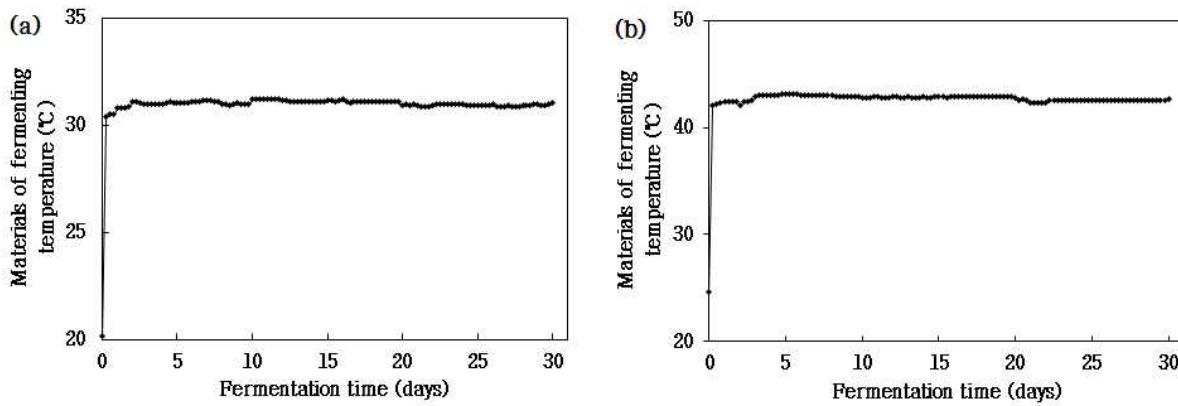


Fig 4. 발효조건에 따른 누룩의 품온 변화

#### 나) 제조된 누룩의 외형적 특성

먼저 누룩의 외형적 변화를 살펴보면 TN-E, TN-F 누룩은 발효가 진행됨에 따라 곰팡이 균사가 확장하여 누룩 내부까지 침투한 것을 확인할 수 있었고(Fig 5), 제조된 누룩의 성형 후 중량은 337.4 g으로 소분 후 성형공정에서 수분의 손실과 더불어 원료의 손실이 일부 발생하는 것으로 나타났으나 큰 영향을 줄 정도는 아니었으며, 제조된 2종류 누룩 (TN-E, TN-F)은 발효기간에 따라 중량 및 수분함량은 발효 초기에 크게 감소하는 것으로 나타났고, 발효 6일 이후부터는 조금씩 감소하거나 유지되는 것으로 나타났다.

특히 TN-F 누룩의 중량 및 수분함량이 TN-E 누룩보다 감소폭이 더 큰 것으로 확인되었다 (Table 3, Fig 6). 외형적 크기는 누룩에 따라 약간의 차이는 있는 것으로 나타났으나 발효기간 중의 변화는 거의 없는 것으로 나타났다.

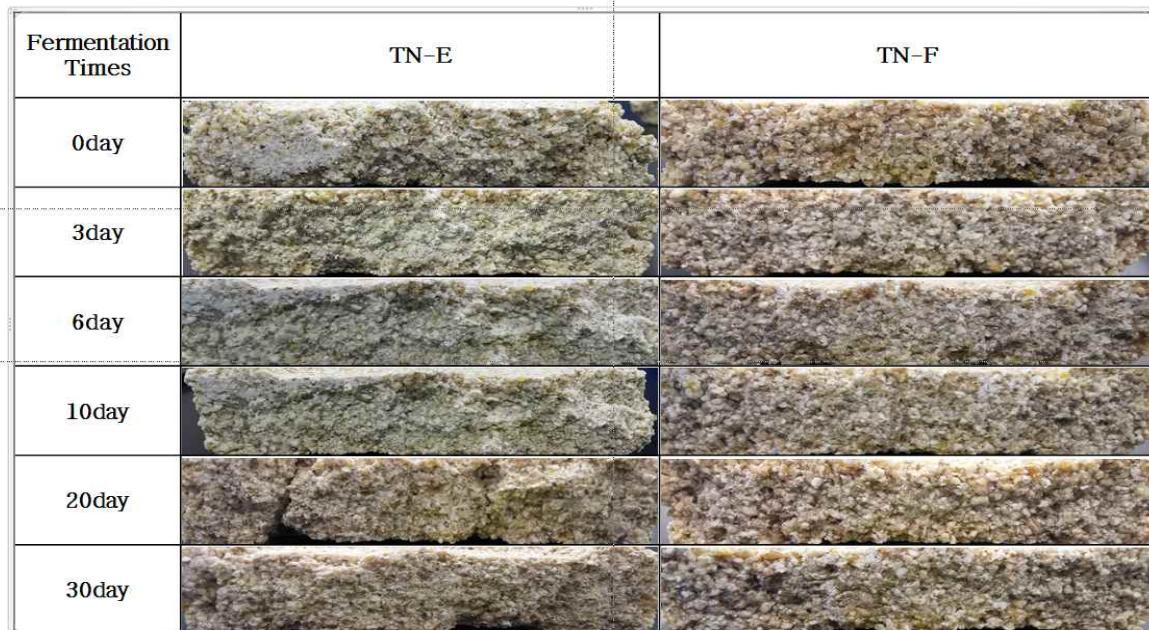


Fig 5. 제조된 누룩 단면의 변화

Table 3. 제조된 누룩의 무게, 크기 및 수분함량 비교

Nuruk	Days	Weight (g)	Size (mm, D / H)	Moisture content (%)
TN-E	0	275.0±1.4 <sup>1)</sup>	118.16±0.10 / 33.15±0.20	11.78±0.23
	3	263.5±2.1	115.46±0.48 / 33.07±0.90	8.12±0.18
	6	256.5±3.5	116.06±1.06 / 31.69±0.75	6.05±0.10
	10	252.5±3.5	116.02±0.08 / 31.88±0.77	6.23±0.34
	20	251.5±0.9	116.05±0.74 / 31.92±0.86	6.33±0.09
	30	251.5±0.9	114.41±0.11 / 31.63±0.24	6.46±0.00
TN-F	0	282.9±0.5	119.36±0.74 / 30.79±0.38	13.02±0.18
	3	261.8±0.1	117.20±0.27 / 31.70±0.40	7.73±0.12
	6	255.2±0.2	115.81±0.81 / 31.52±0.06	7.08±0.04
	10	255.9±0.1	115.36±1.23 / 31.91±0.68	7.29±0.02
	20	258.9±1.4	115.49±1.41 / 32.03±0.74	7.19±0.28
	30	258.4±0.0	115.14±0.46 / 31.85±0.30	7.16±0.19

<sup>1)</sup>Values are mean±SD (n=2).

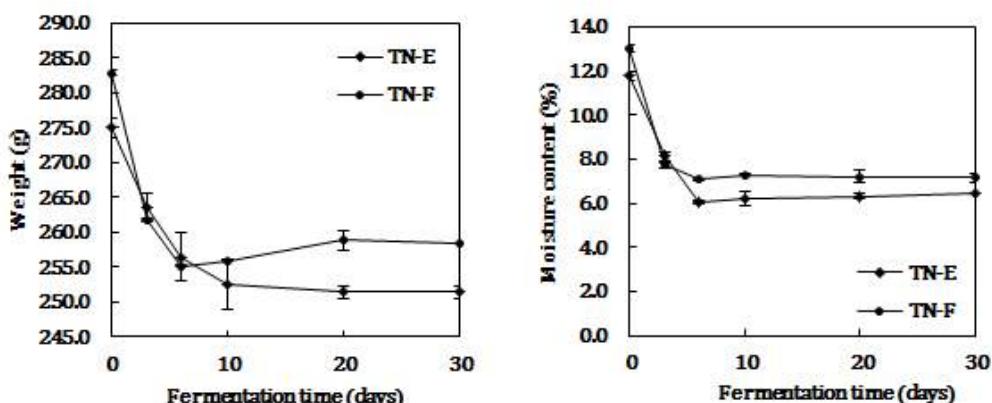


Fig 6. 발효기간에 따른 누룩의 중량 및 수분함량의 변화

## 2) 제조된 누룩의 품질특성 구명

### 가) 이화학적 및 효소활성 특성

발효조건을 달리하여 제조한 누룩의 품질 특성을 구명하고자 이화학적 변화와 효소학적 특성을 비교하였다(Table 4, Fig 7). 먼저 pH의 경우, 발효가 진행됨에 따라 누룩 제조조건에 따른 영향을 받아 2종류 누룩의 pH 패턴 변화가 약간 차이가 있는 것으로 나타났으며, 두 누룩 모두 중성인 pH 6.0에서 발효가 진행된 것을 확인할 수 있었다.

산도의 경우, TN-E 누룩은 발효가 진행됨에 따라 발효 초기보다 산도가 상승한 후, 일정하게 유지되는 경향으로 나타났고, TN-F 누룩은 발효가 종료될 때까지 유지되는 것으로 나타났으며, 아미노산도의 경우 TN-E 누룩은 발효 진행 동안 지속적으로 상승하는 것으로 나타났고, TN-F 누룩은 발효초기에는 조금 상승하다 감소한 후 유지되는 것으로 나타났다.

Table 4. 발효기간 중 누룩의 이화학적 특성 변화

Nuruk	Days	pH	Acidity (% lactate)	Amino acidity
TN-E	0	5.82±0.03	0.084±0.06	0.73±0.09
	3	6.21±0.02	0.089±0.05	1.01±0.15
	6	5.91±0.01	0.120±0.06	1.48±0.06
	10	5.97±0.01	0.120±0.07	1.49±0.07
	20	6.08±0.01	0.122±0.05	1.58±0.12
	30	6.16±0.01	0.120±0.06	1.87±0.06
TN-F	0	5.78±0.01	0.077±0.08	0.64±0.07
	3	5.91±0.01	0.086±0.09	0.95±0.09
	6	6.11±0.01	0.079±0.06	0.90±0.07
	10	6.23±0.01	0.073±0.11	0.68±0.11
	20	6.11±0.01	0.075±0.09	0.74±0.09
	30	5.97±0.01	0.082±0.12	0.82±0.11

<sup>1)</sup>Values are mean±SD (n=2).

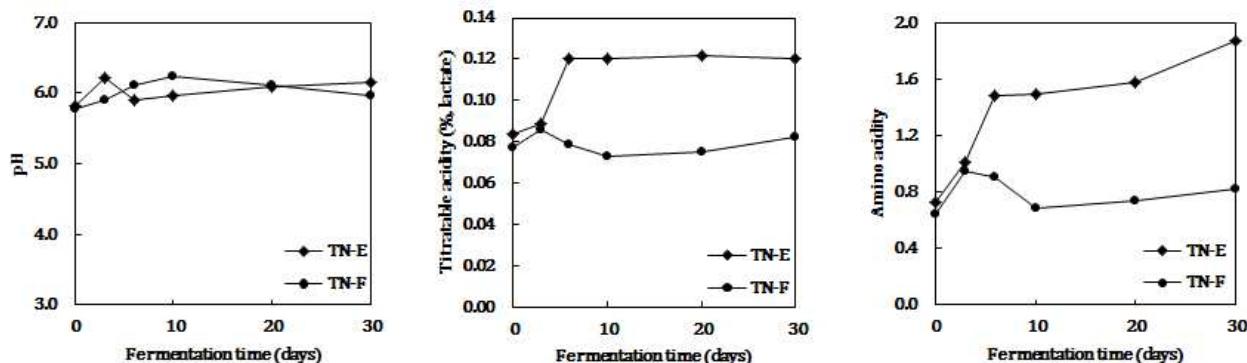


Fig 7. 발효과정 중 누룩의 이화학적 변화.

#### 나) 생균수 및 포자수 측정

발효조건을 달리한 누룩의 발효기간에 따른 발효 미생물의 생균수(세균) 및 포자수(곰팡이)의 변화를 비교한 결과(Table 5, Fig 8), 세균의 생균수 변화를 살펴보면 발효 초기에 생육이 왕성하다가 발효 10일 이후부터는 조금씩 감소하는 경향으로 나타났지만 발효조건에 따른 차이는 크게 나타나지 않았다.

곰팡이 포자수 변화는 발효 초기에 조금 상승한 후, 발효기간이 지날수록 포자수는 일정하게 유지되는 경향으로 나타났으며, TN-E 누룩의 포자수가 TN-F 누룩보다 더 많은 포자수를 보

이는 것으로 보아 서로 다른 발효 조건들이 곰팡이 생육에 영향을 주기 때문에 이러한 차이가 발생하는 것으로 여겨진다.

Table 5. 발효기간 중의 누룩의 생균수 및 포자수 변화

Nuruk	Day	Viable cell count (aerobic bacteria, cfu/g)	Fungi spore count (ea/g)
TN-E	0	$8.2 \times 10^6$	$1.1 \times 10^8$
	3	$4.7 \times 10^7$	$2.4 \times 10^8$
	6	$2.9 \times 10^7$	$2.8 \times 10^8$
	10	$1.8 \times 10^7$	$2.9 \times 10^8$
	20	$2.5 \times 10^5$	$1.3 \times 10^7$
	30	$8.3 \times 10^5$	$9.4 \times 10^6$
TN-F	0	$2.0 \times 10^5$	$2.0 \times 10^6$
	3	$2.4 \times 10^8$	$7.0 \times 10^6$
	6	$5.0 \times 10^7$	$1.5 \times 10^7$
	10	$8.3 \times 10^6$	$1.1 \times 10^7$
	20	$4.6 \times 10^5$	$5.6 \times 10^6$
	30	$3.9 \times 10^5$	$4.8 \times 10^6$

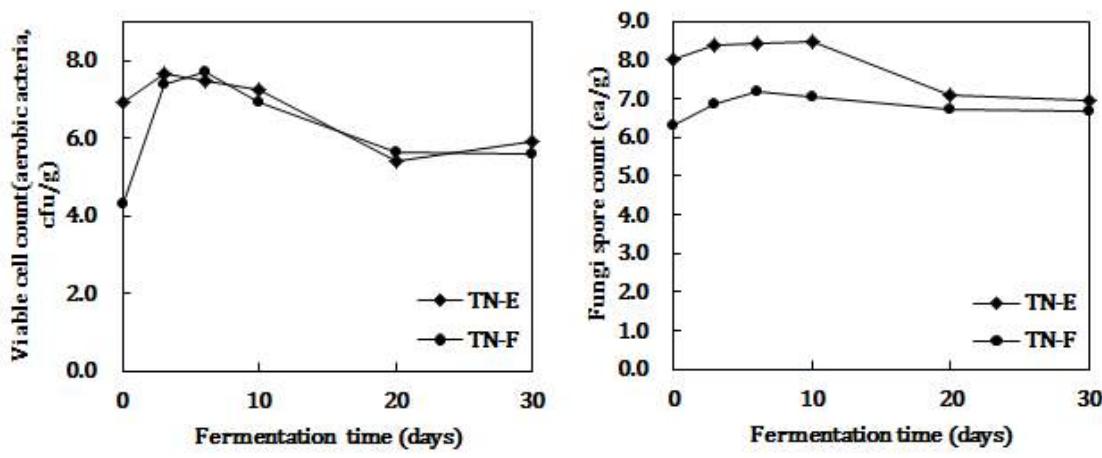


Fig 8. 발효기간 중의 누룩의 생균수 및 포자수 변화

#### 다) 제조된 누룩의 효소활성 변화

제조한 2 종류 누룩의 다양한 효소 활성을 Table 6에 나타내었다.  $\alpha$ -amylase 활성 변화는 2 종류 누룩 모두 발효기간 내내 활성 변화의 폭이 미미한 것으로 나타났고, TN-F 누룩의 활성이 조금 더 높은 것으로 나타났다.

Glucoamylase 활성은 2 종류 누룩의 발효조건에 따라 큰 차이를 보였으며 TN-E 누룩의 경우, 발효 초기에 glucoamylase 활성이 급격히 증가 한 후, 발효기간이 경과함에 따라 일정하게

유지한 반면, TN-F 누룩은 서서히 증가하다가 유지되는 경향으로 나타났다.

Acidic protease 활성의 변화는 2 종류 누룩 모두 발효 초기에는 활성이 높았지만 발효 3-10 일 이후에는 효소활성이 유지 또는 감소하는 경향으로 나타났다. 또한 SP 활성을 살펴보더라도 TN-E 누룩은 TN-F 누룩보다 3배 정도의 효소활성을 갖고 있다. 전반적으로  $\alpha$ -amylase를 제외한 2 종류의 효소활성은 TN-E 누룩이 더 높게 나타났으며, 이는 발효조건인 온도에 따라 크게 영향을 받은 것으로 여겨진다.

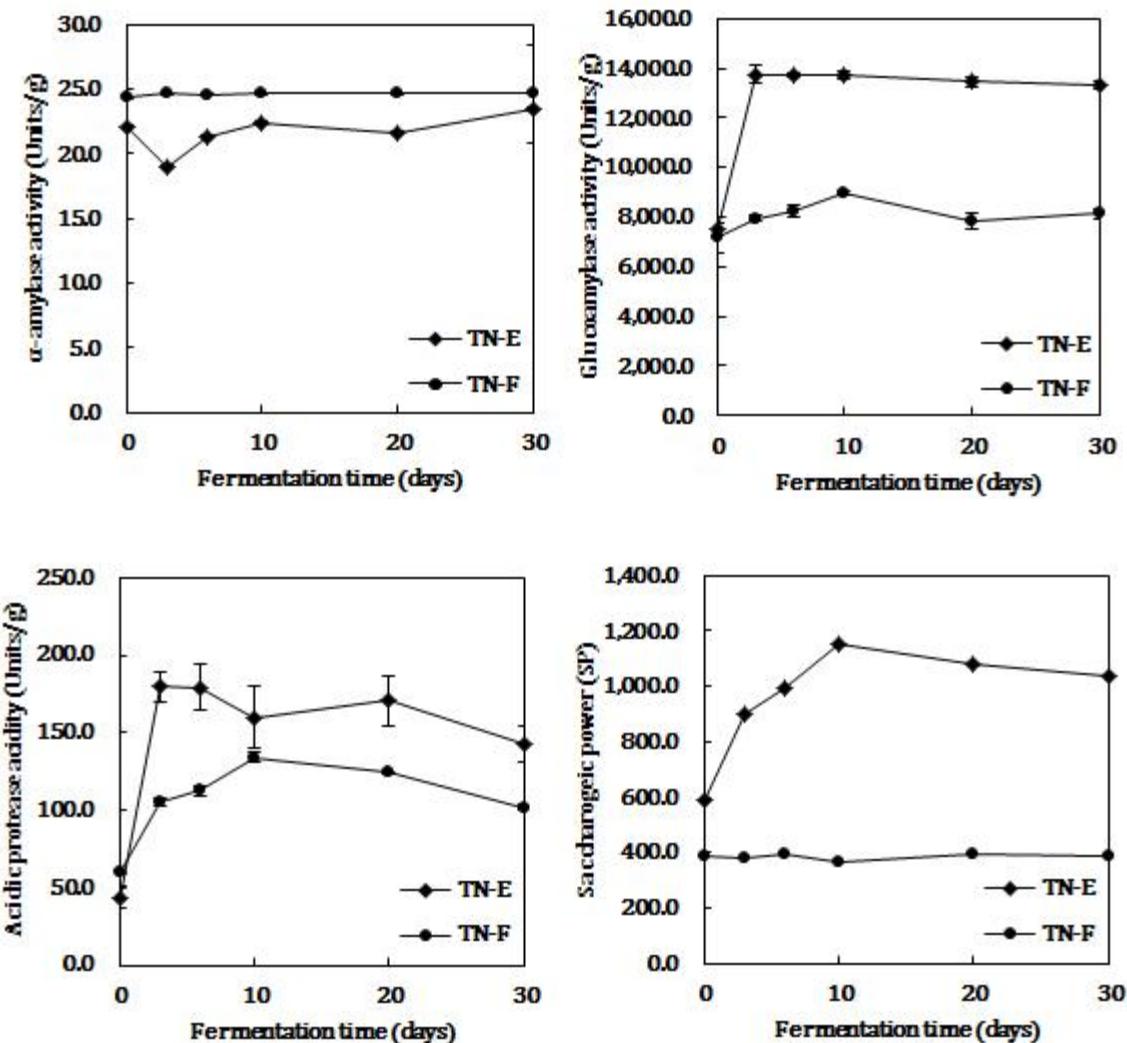


Fig 9. 누룩 발효기간 중 4종류 효소의 활성 변화

Table 6. 발효 기간 중인 누룩의 효소활성 분석

Nuruk	Fer. time (days)	Enzyme activity (units/g)			Saccharogeni c power (SP)
		$\alpha$ -amylase	Glucoamylase	Acid protease	
TN-E	0	22.11±0.05 <sup>1)</sup>	7,536.35±235.64	43.82±6.84	590.4±18.68
	3	18.99±0.07	13,752.44±372.94	179.95±9.79	901.2±49.66
	6	21.34±0.09	13,699.44±98.15	179.26±15.24	992.6±48.26
	10	22.44±0.04	13,712.12±128.48	159.94±19.68	1155.4±39.12
	20	21.67±0.06	13,448.69±213.65	170.55±16.62	1079.7±65.29
	30	23.51±0.12	13,312.54±147.69	142.66±11.77	1040.2±43.57
TN-F	0	24.33±0.03	7,149.21±636.36	59.55±0.44	390.8±16.33
	3	24.65±0.03	7,949.21±153.07	105.14±2.26	377.5±23.54
	6	24.59±0.05	8,250.79±239.68	112.39±3.83	393.2±18.34
	10	24.67±0.05	8,949.21±99.13	134.26±2.91	368.1±19.77
	20	24.67±0.07	7,822.22±317.06	85.01±1.05	391.5±25.21
	30	24.64±3.73	8,123.81±190.48	102.04±1.31	384.7±14.29

<sup>1)</sup>Values are mean±SD (n=3).

### 3) 제조 누룩의 유기산, 유리아미노산, 당류 및 향기성분 분석

#### 가) 유기산 분석

2 종류 누룩의 발효기간에 따른 유기산 성분변화를 Table 7에 나타내었다. 주요 유기산으로는 malic, lactic, acetic, citric acid가 검출되었고 누룩의 종류, 즉 발효온도와 습도조건에 따라 2종류 누룩의 유기산 생성 패턴이 다르게 나타났다. 먼저 TN-E누룩은 malic, lactic, succinic acid는 감소하는 반면에 citric, fumaric acid는 증가하는 경향이었으며 acetic acid는 유지하는 것으로 나타났다.

40°C에서 발효시킨 TN-F누룩은 malic, lactic acid는 감소하는 반면에 acetic, fumaric acid의 증가하는 경향으로 나타났고, succinic과 citric acid의 생성량은 유지되는 경향으로 나타났다. 그러나 2 종류 누룩의 총 유기산 생성량은 발효조건에 따라 큰 차이는 보이지 않았다.

Table 7. 발효기간에 따른 누룩의 유기산 변화

Nuruk	Organic acid	Fermentation time (days, mg/100 mL)					
		0	3	6	10	20	30
TN-E	Tartaric	ND <sup>1)</sup>	ND	ND	ND	ND	ND
	Malic	106.8±8.1 <sup>2)</sup>	95.9±6.6	63.8±8.3	112.8±10.0	89.3±5.7	61.8±5.8
	Lactic	66.7±10.1	110.3±9.2	48.7±7.4	94.1±8.3	33.2±5.8	21.8±2.9
	Acetic	57.1±5.8	45.1±3.7	21.6±1.8	58.3±5.9	69.1±5.2	58.0±8.1
	Citric	86.9±7.6	170.1±7.4	97.7±4.0	148.7±4.9	175.5±6.6	149.0±9.2
	Succinic	7.3±7.6	6.4±4.8	6.7±2.9	14.8±1.7	4.4±1.1	5.8±0.8
	Fumaric	5.5±1.2	12.8±0.0	2.1±0.0	12.2±0.0	13.0±2.4	10.6±0.0
	Total	330.3	440.6	240.5	441.0	384.5	307.0
TN-F	Tartaric	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	Malic	69.4±8.0	72.4±9.0	59.8±8.6	55.9±9.0	55.4±6.3	45.3±7.2
	Lactic	142.0±24.0	73.9±10.6	80.6±6.5	54.8±9.5	81.1±14.0	28.6±5.0
	Acetic	49.4±7.6	63.0±6.2	73.0±8.8	75.8±10.8	56.4±8.4	55.7±7.3
	Citric	136.2±8.0	115.1±4.3	103.3±4.9	141.7±12.3	121.6±6.6	134.5±9.3
	Succinic	6.5±0.9	9.2±5.5	6.4±4.4	8.5±4.8	3.7±2.9	5.3±3.7
	Fumaric	2.4±0.0	16.6±0.0	16.8±0.0	3.4±0.0	7.4±0.0	7.0±0.0
	Total	406.0	350.1	339.8	339.0	325.5	276.2

<sup>1)</sup>ND is not detected.<sup>2)</sup>Values are mean±SD (n=3).

#### 나) 유리당 분석

발효 중인 누룩의 유리당 생성 변화를 Table 8에 나타내었다. 검출된 주요 유리당으로는 fructose, glucose이며 sucrose 및 maltose도 일부 검출되었다. 발효온도와 습도를 달리한 2 종류 누룩 간의 유리당 패턴이 다르게 나타났다. 30°C(습도 70% → 50%)에서 발효한 TN-E 누룩의 glucose 변화는 발효기간 동안 서서히 증가하여 발효 초기에 비해 3배 이상 생성되었다.

40°C(습도 70% → 50%)에서 발효한 TN-F 누룩의 유리당은 발효 초기에 비해 조금 상승하다가 감소하는 경향으로 다른 패턴으로 나타났고 glucose 함량은 TN-E 누룩이 TN-F 누룩에 비해 2배 더 높은 것으로 확인되었다. 이는 서로 다른 발효조건에서 생육하는 균총의 차이에 기인한다고 판단된다.

Table 8. 발효기간 중 누룩의 유리당 변화

Nuruk	Organic acid	Fermentation time (days, µg / µL)					
		0	3	6	10	20	30
TN-E	Rhamnose	ND <sup>1)</sup>	ND	ND	ND	ND	ND
	Xylose	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	Fructose	1.1	1.4	1.2	1.2	1.2	1.1
	Glucose	1,023.1	2,734.8	3,044.3	3,245.1	3,248.1	3,067.5
	Sucrose	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace
	Maltose	Trace	ND	ND	ND	ND	ND
	Lactose	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TN-F	Rhamnose	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	Xylose	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	Fructose	1.1	1.0	1.0	1.0	1.0	0.9
	Glucose	1,264.4	1,713.8	1,814.2	1,703.1	1,496.6	1,480.5
	Sucrose	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace
	Maltose	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	Lactose	ND	ND	ND	ND	ND	ND

<sup>1)</sup> ND is not detected.

<sup>2)</sup> Values are mean±SD (n=3). data in now shown

#### 다) 유리아미노산 분석

원료별, 가수량에 따른 2 종류 누룩의 발효기간에 따른 유리아미노산 변화를 Table 9와 Table 10에 나타내었다. TN-E와 TN-F 누룩에서 필수 아미노산이 5종(leucine 등), 비 필수 아미노산이 19종(Ethanolamine 등) 등 총 24종의 아미노산이 검출되었고 대표적인 아미노산은 aspartic acid, ethanolamine, sarcosine, proline 등으로 나타났다.

대부분의 아미노산들은 발효시간이 경과함에 따라 증가 후 감소하는 경향을 확인할 수 있었다. 발효조건에 따라 30°C에서 제조된 TN-E 누룩이 40°C에서 제조된 TN-F 누룩에서 검출된 주요 아미노산 함량이 더 높게 나타났고 이는 발효 온도에 대한 곰팡이의 생육에 따른 특징적인 차이인 것으로 추측된다.

Table 9. 발효기간 중 TN-E 누룩의 유리 아미노산 변화

Free amino acid	Fermentation time (days, µg/µL)					
	0	3	6	10	20	30
Phosphoserine	0.00 <sup>1)</sup>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Taurine	0.91	1.18	0.72	1.07	0.51	0.41
Phosphoethanolamine	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Urea	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Aspartic acid	31.15	17.54	5.21	12.09	2.89	2.98
Threonine <sup>◎</sup>	11.62	6.70	3.38	5.04	1.54	1.14
Serine	2.62	2.23	0.84	1.17	0.41	0.40
Glutamic acid	2.79	2.12	0.80	1.67	0.40	0.50
Sarcosine	7.05	4.90	1.80	3.65	1.12	1.14
<i>a</i> -Aminoadipic acid	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Glycine	2.94	2.32	0.78	1.00	0.26	0.00
Alanine	3.35	2.37	0.94	1.47	0.53	0.52
Citrulline	3.26	3.00	1.11	1.68	0.60	0.62
<i>a</i> -aminobutyric acid	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Valine <sup>◎</sup>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Cystine	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Methionine <sup>◎</sup>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Cystathione	1.52	1.28	0.56	0.61	0.33	0.34
Iso-leucine <sup>◎</sup>	0.69	0.03	0.01	0.26	0.08	0.05
Leucine <sup>◎</sup>	0.71	0.09	0.23	0.32	0.00	0.00
Tyrosine	0.92	0.81	0.25	0.35	0.10	0.00
Phenylalanine <sup>◎</sup>	1.84	1.65	0.63	0.76	0.00	0.00
$\beta$ -Alanine	1.77	1.42	0.30	0.60	0.00	0.00
$\beta$ -Amino-i-butyric acid	1.00	0.68	0.20	0.31	0.00	0.00
$\gamma$ -Aminobutyric acid	0.27	0.21	0.04	0.11	0.00	0.00
Ethanolamine	9.03	8.25	310.01	1.62	174.72	163.15
Tryptophan <sup>◎</sup>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Ammonia	3.45	4.07	5.66	8.00	0.00	7.55
Hydroxylysine	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Ornithine	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Lysine <sup>◎</sup>	0.32	0.20	0.00	0.33	0.00	0.00
1-Methylhistidine	3.64	2.67	0.91	1.41	0.39	0.30
Histidine <sup>◎</sup>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
3-Methylhistidine	3.07	2.37	0.57	0.96	0.00	0.00
Anserine	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Carnosine	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Arginine	5.69	5.98	0.00	0.00	0.00	0.00
Hydroxyproline	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Proline	1.46	4.32	2.52	3.76	0.00	1.76
Total	101.071	76.39	337.47	48.24	183.88	180.86

<sup>◎</sup> symbol is Essential amino acid

<sup>1)</sup>Values are mean±SD (n=3). data in now shown

Table 10. 발효기간 중 TN-F 누룩의 유리아미노산 변화

Free amino acid	Fermentation time (days, µg/µL)					
	0	3	6	10	20	30
Phosphoserine	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Taurine	0.30	0.46	0.72	0.44	0.25	0.35
Phosphoethanolamine	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Urea	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Aspartic acid	1.58	4.32	4.29	0.93	0.81	2.13
Threonine <sup>◎</sup>	0.66	1.88	2.47	0.60	0.48	0.96
Serine	0.13	0.78	0.89	0.21	0.18	0.37
Glutamic acid	0.24	0.79	0.89	0.27	0.17	0.41
Sarcosine	0.28	2.32	2.48	0.34	0.38	0.64
<i>a</i> -Aminoadipic acid	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Glycine	0.00	0.82	0.78	0.00	0.00	0.22
Alanine	0.32	0.90	1.08	0.36	0.30	0.54
Citrulline	0.23	1.25	1.42	0.38	0.27	0.61
<i>a</i> -aminobutyric acid	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Valine <sup>◎</sup>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Cystine	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Methionine <sup>◎</sup>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Cystathioneine	0.19	0.44	0.49	0.26	0.16	0.27
Iso-leucine <sup>◎</sup>	0.06	0.04	0.05	0.05	0.07	0.15
Leucine <sup>◎</sup>	0.00	0.19	0.16	0.00	0.00	0.00
Tyrosine	0.00	0.24	0.30	0.00	0.00	0.00
Phenylalanine <sup>◎</sup>	0.00	0.48	0.52	0.00	0.00	0.00
<i>B</i> -Alanine	0.00	0.32	0.46	0.00	0.00	0.00
<i>B</i> -Amino-i-butyric acid	0.00	0.17	0.23	0.00	0.00	0.00
<i>g</i> -Aminobutyric acid	0.00	0.10	0.13	0.00	0.00	0.07
Ethanolamine	63.61	2.16	3.63	85.40	87.81	141.74
Tryptophan <sup>◎</sup>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Ammonia	3.27	2.88	4.45	3.24	0.00	3.69
Hydroxylysine	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Ornithine	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Lysine <sup>◎</sup>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1-Methylhistidine	0.00	0.97	1.17	0.00	0.15	0.38
Histidine <sup>◎</sup>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
3-Methylhistidine	0.00	0.72	0.95	0.00	0.00	0.00
Anserine	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Carnosine	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Arginine	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Hydroxyproline	0.00	0.00	0.00	0.00	0.07	0.00
Proline	0.00	2.74	3.72	0.34	0.26	1.76
Total	70.87	24.97	31.28	92.82	91.36	154.29

◎ symbol is Essential amino acid

<sup>1)</sup>Values are mean±SD (n=3). data in now shown

#### 라) 향기성분 분석

##### 라-1) GC-MS를 이용한 패턴 비교

제조방법에 따른 누룩(TN-E, TN-F)의 발효기간에 따른 향기성분을 GC-MS를 이용하여 조사하여 비교하였다. TN-E 누룩의 향기성분은 silanol의 알코올류, propanoic acid, acetic acid 등의 유기산류, phenol, 1, 4, 7, 10, 13-pentaoxacyclopentadecaen, 1, 4, 7, 10-tetraoxacyclododecan, 2, 6-diosopropylnaphthalene, 1, 3-di-iso-propynaphthalene 등의 alkanes 화합물이 검출되었다. 이외에도 16-hexadecanoyl hydrazide, octaethylene glycol monododecyl ether, steatic acid hydrazide, semioxamazide, hydrazinecarboxamide, 4-phenylsemicarbazide, 4-hydroxybutric acid hydrazide 등의 유기화합물이 발효기간 동안 총 19종이 검출되었다.

TN-F 누룩의 향기성분은 acetic acid, propanoic acid 등의 유기산류, silanol, 1-butanol 등의 알코올류, 2-n-butyl furan, phenol 유기 화합물류 및 hydrazinecarboxamide, semioxamazide, carbohydrazide, 4-hydroxybutyric acid hydrazide, 16-hexadecanoyl hydrazide, 4-phenylsemicarbazide, aminomethanesulfonic acid, hydrazinecarboxylic acid, 1, 2-hydrazinedicarboxamide, 1, 4, 7, 10-tetraoxyacyclododecane 등의 유기 화합물류가 발효기간 동안 총 16종이 검출되었다.

위의 결과로 발효 온도에 따라 누룩의 향기성분 종류도 다르게 검출되었고 특히 전통누룩에서 주된 향기성분인 dodecane은 간장과 된장 및 택주의 향기성분으로 잘 알려져 있다.

#### 4) 건조방법에 따른 누룩의 품질특성

##### 가) 누룩의 이화학적 품질 비교

제조된 누룩을 전통적 방법인 법제와 열풍건조 조건에 따른 이화학적 특성을 비교·검토한 결과를 Table 11에 나타내었다.

먼저 TN-E 누룩의 경우, pH는 법제(shade, 상온, 그늘 7 hr/2 day))와 열풍건조(40°C, 24 hr) 한 누룩의 pH가 각각 6.01, 5.95로 대조구에 비해 조금 낮은 것으로 나타났으며, 산도 또한 대조구에 비해 조금 높은 것으로 나타났다. 아미노산도의 경우, 열풍 건조한 누룩이 1.63으로 가장 낮게 나타났고 법제한 누룩이 1.95로 가장 높게 나타났다.

TN-F 누룩의 경우, pH는 대조구가 5.97로 가장 낮은 반면에 법제 및 열풍 건조한 누룩에서 각각 6.10, 6.05로 나타났고, 산도는 법제한 누룩이 가장 낮은 0.071%로, 대조구에 비해 낮은 수치를 보였다. 아미노산도는 열풍건조가 높게 나타났고 법제와 대조구는 유사한 수치를 보이는 것으로 나타나 건조조건에 따른 이화학적 품질특성의 차이는 유의적으로 없는 것으로 생각되어진다.

Table 11. 건조조건에 따른 누룩의 품질특성

Nuruk	Drying condition	pH	Acidity (%, lactate)	Amino acidity
TN-E	25°C, 48hr	6.16±0.01 <sup>a</sup>	0.120±0.06 <sup>b</sup>	1.87±0.06 <sup>a</sup>
	Shade(2day)	6.01±0.02 <sup>ab</sup>	0.149±0.05 <sup>a</sup>	1.95±0.09 <sup>a</sup>
	40°C, 24hr	5.95±0.01	0.130±0.04 <sup>ab</sup>	1.63±0.12 <sup>b</sup>
TN-F	25°C, 48hr	5.97±0.02 <sup>b</sup>	0.082±0.09 <sup>a</sup>	0.82±0.13 <sup>b</sup>
	Shade(2day)	6.10±0.01 <sup>a</sup>	0.071±0.06 <sup>b</sup>	0.83±0.10 <sup>b</sup>
	40°C, 24hr	6.05±0.02 <sup>a</sup>	0.087±0.03 <sup>a</sup>	0.96±0.09 <sup>a</sup>

<sup>a,b</sup> values in the same column with different superscript letters were significant differences ( $\gamma<0.05$ ) by ANOVA with Duncan's multiple range test. and results were expressed with mean ± SD of triplicate experiments.

#### 나) 누룩의 효소활성 비교

건조조건을 달리한 2종류 누룩의 효소활성을 비교·검토한 결과를 Table 12에 나타내었다. 먼저  $\alpha$ -amylase 활성은 누룩의 종류와 건조조건에 따른 영향은 거의 없는 것으로 나타났고, glucoamylase은 2 종류 누룩 모두 법제(shade)로 건조한 조건에서 활성이 가장 높은 것으로 나타났다. Acidic protease은 대조구보다 법제(상온, 그늘 7 hr/2 day) 및 열풍건조(40°C, 24 hr)한 누룩이 더 높은 활성을 가지는 것으로 확인되었다.

Table 12. 건조조건에 따른 누룩의 효소활성

Nuru k	Drying condition	Enzyme activity (units/g)			Saccharogeni c power (SP)
		$\alpha$ -amylase	Glucoamylase	Acid protease	
TN-E	25°C, 48hr	24.39±1.02 <sup>a</sup>	13,724.79±234.56 <sup>b</sup>	133.64±2.54 <sup>b</sup>	1040.2±36.58 <sup>b</sup>
	Shade(2day)	20.16±3.05 <sup>b</sup>	14,212.27±282.53 <sup>a</sup>	216.44±1.26 <sup>a</sup>	1007.6±51.09 <sup>b</sup>
	40°C, 24hr	24.14±1.17 <sup>a</sup>	13,133.52±156.97 <sup>b</sup>	142.59±2.34	1053.8±46.65 <sup>a</sup>
TN-F	25°C, 48hr	22.64±3.73 <sup>b</sup>	8,123.81±190.48 <sup>b</sup>	102.04±1.31 <sup>b</sup>	384.7±15.41 <sup>b</sup>
	Shade(2day)	24.12±1.09 <sup>a</sup>	8,774.60±495.63 <sup>a</sup>	136.30±0.60 <sup>a</sup>	408.1±13.78 <sup>a</sup>
	40°C, 24hr	24.65±0.14 <sup>a</sup>	8,457.14±218.22 <sup>a</sup>	139.59±2.30 <sup>a</sup>	410.0±11.39 <sup>a</sup>

<sup>a,b</sup> values in the same column with different superscript letters were significant differences ( $\gamma<0.05$ ) by ANOVA with Duncan's multiple range test. and results were expressed with mean ± SD of triplicate experiments.

#### 5) 저장기간에 따른 누룩의 품질변화

##### 가) 누룩의 효소활성 변화

###### 5-1) $\alpha$ -amylase 활성의 변화

발효조건에 따른 2종류 누룩(TN-E, TN-F)의  $\alpha$ -amylase 활성을 Table 13에 나타내었다. 제조된 누룩을 비닐포장과 진공포장을 하여 온도별 (3 types) 12주 동안 저장한 결과,  $\alpha$ -amylase 활성은 저장 8주에 약 5%의 실활이 진행된 후, 12주가 되었을 때 약 25% 실활이

되는 것으로 나타났다.

누룩의 종류에 따라서는 TN-E 누룩보다 TN-F 누룩이 효소 실활이 더 크게 나타났고 저장 온도가 높을수록 실활의 폭이 전반적으로 큰 것으로 확인되었다. 포장방법에 따라서는 진공 포장법이 비닐 포장법보다  $\alpha$ -amylase 활성을 유지시키는데 더 효과적인 것으로 확인되었다.

Table 13. 저장방법에 따른 누룩의  $\alpha$ -amylase 활성 변화

Nuruk	Packing method	Storage temp.( $^{\circ}$ C)	$\alpha$ -amylase activity (Units/g)		
			0	8	12
TN-E	Vinyl packing	-20		22.42 $\pm$ 0.43 <sup>a</sup>	20.22 $\pm$ 0.32 <sup>b</sup>
		4		22.10 $\pm$ 0.38 <sup>a</sup>	18.97 $\pm$ 0.64 <sup>b</sup>
		30	24.39 $\pm$ 1.02 <sup>a</sup>	22.55 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	15.33 $\pm$ 0.26 <sup>c</sup>
	Vacuum packing	-20		21.89 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	20.89 $\pm$ 0.38
		4		22.30 $\pm$ 0.14 <sup>a</sup>	18.27 $\pm$ 0.63 <sup>b</sup>
		30		22.47 $\pm$ 0.17 <sup>a</sup>	16.34 $\pm$ 0.12 <sup>b</sup>
TN-F	Vinyl packing	-20		19.64 $\pm$ 0.18 <sup>b</sup>	17.95 $\pm$ 0.36 <sup>b</sup>
		4		17.64 $\pm$ 0.24 <sup>b</sup>	16.44 $\pm$ 0.75 <sup>b</sup>
		30	22.64 $\pm$ 3.73 <sup>a</sup>	15.28 $\pm$ 0.44 <sup>c</sup>	14.29 $\pm$ 0.67 <sup>c</sup>
	Vacuum packing	-20		21.08 $\pm$ 0.22 <sup>a</sup>	18.33 $\pm$ 0.54 <sup>b</sup>
		4		20.74 $\pm$ 0.38 <sup>a</sup>	15.33 $\pm$ 0.48 <sup>c</sup>
		30		20.02 $\pm$ 0.43 <sup>a</sup>	15.26 $\pm$ 0.54 <sup>c</sup>

<sup>a,b,c</sup> values in the same column with different superscript letters were significant differences ( $\gamma < 0.05$ ) by ANOVA with Duncan's multiple range test. and results were expressed with mean  $\pm$  SD of triplicate experiments.

### 5-2) glucoamylase 활성의 변화

각 누룩별 glucoamylase 효소활성을 결과를 Table 14에 나타내었다. 누룩 TN-E와 TN-F은 저장 8주에 약 15%의 실활을 보였으며 12주에는 저장 8주보다 효소활성이 약 10% 더 실활되는 경향으로 나타났다.

제조된 2종류 누룩의 발효온도에 따른 glucoamylase 활성은 큰 차이는 없었고 저장의 차이를 살펴본 결과, 포장방법에 따라 진공포장이 비닐포장보다 효소활성의 실활이 더욱 적게 나타났고 저장 온도에 따른 저장성은 저온에서 저장하는 것이 효소활성의 실활이 더 적은 것으로 확인되었다.

Table 14. 저장방법에 따른 누룩의 glucoamylase 활성 변화

Nuruk	Packing method	Storage temp.(°C)	Glucoamylase activity (Units/g)		
			0	8	12
TN-E	Vinyl packing	-20		10,992.86±343.39 <sup>b</sup>	9,866.48±467.57 <sup>b</sup>
		4		13,270.63±571.59 <sup>a</sup>	9,632.33±561.28 <sup>b</sup>
		30	13,724.79±234.56 <sup>a</sup>	10,223.02±1,421.0 <sup>b</sup>	8,984.69±982.48 <sup>c</sup>
	Vacuum packing	-20		11,999.21±112.52 <sup>a</sup>	11,857.08±843.25 <sup>a</sup>
		4		12,088.10±1,552.0 <sup>a</sup>	11,076.27±799.31 <sup>b</sup>
		30		11,429.37±637.25 <sup>a</sup>	10,548.46±646.88 <sup>b</sup>
TN-F	Vinyl packing	-20		7,135.36±645.85 <sup>a</sup>	6,489.88±874.69 <sup>b</sup>
		4		7,106.08±789.83 <sup>a</sup>	6,223.77±766.65 <sup>b</sup>
		30	8,123.81±190.48 <sup>a</sup>	6,894.87±991.54 <sup>b</sup>	5,788.32±1,032.5 <sup>b</sup>
	Vacuum packing	-20		7,266.58±685.14 <sup>a</sup>	6,988.46±646.37 <sup>b</sup>
		4		7,206.27±547.16 <sup>a</sup>	6,689.34±899.71 <sup>b</sup>
		30		6,984.41±398.65 <sup>a</sup>	6,121.23±1,521.6 <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup> values in the same column with different superscript letters were significant differences ( $\gamma < 0.05$ ) by ANOVA with Duncan's multiple range test. and results were expressed with mean ± SD of triplicate experiments.

### 5-3) acidic protease 효소활성의 변화

각 누룩별 acidic protease 효소활성 결과를 Table 15에 나타내었다. 저장 8주에 TN-E와 TN-F누룩은 약 10% 정도 감소하였고 저장 12주에는 약 15%이상 acidic protease 활성이 감소하는 것으로 나타났다.

또한 진공 포장하여 저온에 저장하는 것이 누룩의 효소활성 실활을 막는 가장 좋은 방법인 것으로 확인되었다.

Table 15. 저장방법에 따른 누룩의 acidic protease 효소활성 변화

Nuruk	Packing method	Storage temp.(°C)	Acidic protease activity (Units/g)		
			0 week	8 weeks	12 weeks
TN-E	Vinyl packing	-20		126.22±8.45 <sup>a</sup>	116.45±12.14 <sup>b</sup>
		4		118.28±11.44 <sup>b</sup>	110.63±11.68 <sup>b</sup>
		30	133.64±12.54 <sup>a</sup>	110.22±16.28 <sup>b</sup>	97.32±14.74 <sup>c</sup>
	Vacuum packing	-20		130.39±15.20 <sup>a</sup>	121.02±13.32
		4		120.06±9.74 <sup>b</sup>	115.43±9.51 <sup>b</sup>
		30		111.58±12.65 <sup>b</sup>	102.75±15.69 <sup>b</sup>
TN-F	Vinyl packing	-20		94.55±7.54 <sup>a</sup>	87.89±11.65 <sup>b</sup>
		4		92.68±6.98 <sup>a</sup>	85.25±13.34 <sup>b</sup>
		30	102.04±11.31 <sup>a</sup>	87.79±8.23 <sup>b</sup>	86.12±11.25 <sup>b</sup>
	Vacuum packing	-20		96.69±6.94 <sup>a</sup>	91.21±16.32 <sup>a</sup>
		4		91.26±7.23 <sup>a</sup>	90.32±15.68 <sup>a</sup>
		30		82.31±3.58 <sup>b</sup>	83.37±17.32 <sup>b</sup>

<sup>a,b,c</sup> values in the same column with different superscript letters were significant differences ( $\gamma < 0.05$ ) by ANOVA with Duncan's multiple range test. and results were expressed with mean ± SD of triplicate experiments.

#### 5-4) Saccharogenic power (SP, 당화력) 변화

각 조건별 제조한 2 종류 누룩(TN-E, TN-F)의 당화력(SP) 결과를 Table 16에 나타내었다. 대조구로 사용한 시판누룩은 SS 및 SH로써 30일 발효 후, 상온에서 유통되는 누룩을 사용하였다.

TN-E누룩의 경우, 저장기간에 따른 당화력(SP)은 저장 0주보다 8~12주가 약 30~40% 정도 효소활성이 실활 되었고, TN-F누룩의 경우, 당화력은 저장 8~12주에서 약 10~15%정도 효소활성이 실활되는 것으로 나타났다.

누룩 TN-E의 경우, 대조구로 사용한 시판누룩 SH와 당화력이 비슷한 것으로 나타났으나 저장기간 동안 당화력이 저하되는 것으로 보아 다양한 원료를 이용하여 만든 혼합누룩이 밀누룩(병곡)보다 당화력이 떨어지는 것은 glucoamylase 활성의 실활과 연관이 있는 것으로 사료되며 원료와 더불어 저장 중에 glucoamylase 활성을 유지시키는 추가적인 연구수행도 필요할 것으로 여겨진다.

Table 16. 저장방법에 따른 누룩의 Saccharogenic power 변화

		Saccharogenic power (Units/g)		
Nuruk	Packing method	Storage temp.(°C)	Storage periods (weeks)	
			0	8
Commercial nuruk	SS SH	상온유통	437.4 1,053.8	30일 발효 후, 판매중인 제품을 대조구로 사용
TN-E	Vinyl packing	-20		689.5±2.3 <sup>c</sup>
		4		823.8±2.6 <sup>b</sup>
		30	1,040.2±6.2 <sup>a</sup>	722.8±2.3 <sup>c</sup>
	Vacuum packing	-20		761.4±3.2 <sup>bc</sup>
		4		733.6±2.6 <sup>c</sup>
		30		707.8±3.3 <sup>c</sup>
TN-F	Vinyl packing	-20		366.5±7.5 <sup>a</sup>
		4		347.6±6.4 <sup>b</sup>
		30	384.7±6.4 <sup>a</sup>	338.4±8.9 <sup>b</sup>
	Vacuum packing	-20		352.6±9.2 <sup>a</sup>
		4		334.2±6.4 <sup>b</sup>
		30		311.8±2.8 <sup>c</sup>
312.0±7.2 <sup>c</sup>				

<sup>a,b,c</sup> values in the same column with different superscript letters were significant differences ( $\alpha<0.05$ ) by ANOVA with Duncan's multiple range test. and results were expressed with mean  $\pm$  SD of triplicate experiments.

<제2협동과제 : 전통누룩 발효중 미생물 단백체 구명(원광대학교, 김정미)>

## 1. 재료 및 실험기술 확립 방법

### 1) 전통누룩 단백질 분리기술 확립

#### (1) 1차년도 전통누룩 발효시간대별 단백질 분리기술 확립

(1-1) 누룩분양 : 본 연구에 사용한 밀누룩 시료는 제1협동과제팀(국립농업과학원)에서 제작·분양되었다.

#### (1-2) 분양된 전통누룩 특성

해당 시료는 국내에서 재배된 금강밀을 분쇄한 후 살수, 침윤단계를 거쳐 동일크기, 무게로 성형 후 2가지 방식의 전통발효방법으로 제작하였다.

- 전통누룩 A : 전처리로 침윤시킨 원료를 성형 후 1단계의 발효( $36^{\circ}\text{C}$ , 30일간, 2일 간격으로 뒤집기)를 시켰으며, 발효기간별(0, 3, 6, 10, 20, 30일) 전통누룩 A를 연구시료로 확보하였다.
- 전통누룩 B : 전처리로 침윤시킨 원료를 성형 후 주발효( $45^{\circ}\text{C}$ , 10일간, 2일 간격으로 뒤집기) 및 후발효( $35^{\circ}\text{C}$ , 20일간, 2일 간격으로 뒤집기) 2단계의 과정을 거쳐 제작되었다. 발효기간별(0, 3, 6, 10, 20, 30일) 전통누룩 B 연구시료를 확보하였다.

(1-3) 누룩파쇄 : 밀누룩으로부터 단백질 회수를 위하여 막자의 물리적인 힘만으로 누룩 제조 당시의 분쇄밀 상태로 파쇄하는 1차 방법과 액체질소를 사용하여 완전한 powder 형태로 파쇄하는 2차 방법으로 발효단계별 누룩시료를 파쇄하였다.

(1-4) 파쇄누룩의 단백질회수 : 2가지 방법으로 파쇄된 누룩시료 10 g에 추출용액(50 mM acetate buffer-pH 5.0, 90 mM NaCl, 1 mM PMSF, 1X protease inhibitor cocktail) 40 ml을 첨가하여 1분 동안 vigorous voltexing을 수행한 후  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 8시간 동안 soaking하였다. 반응 후 원심분리를 수행하여(13,000 rpm,  $4^{\circ}\text{C}$ , 10분) 단백질을 포함한 상층액을 회수한 후 여분의 시료를 제거하기 위하여 동일한 조건으로 2차 원심분리를 수행하였다. 위의 단백질 회수용 추출용액 선정을 위하여 누룩시료와 추출용액의 비율(1:1, 1:2, 1:4, 1:10)과 추출용액 내의 NaCl 농도별로 test하여 최종 결정하였다.



**Fig. 1. Smashing and soaking of wheat-based nuruk to purify extracellular proteins**

(1-5) 누룩단백질의 농축 : 누룩단백질의 저농도 문제를 해결하기 위하여 ammonium sulfate,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 을 이용한 염석방법으로 단백질을 농축하였다. 80%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  saturated 누룩용액을 제조하여 원심분리하여(13,000 rpm, 4°C, 30분) 농축된 단백질을 확보한 후 5 ml의 50 mM acetate buffer에 단백질 pellet을 녹여 농축액을 준비하였다.

(1-6) 누룩단백질의 정제 : 전분의 함유율이 높은 밀누룩을 사용한 본 연구의 단백질시료는 전분 오염률이 높아 단백체 연구에 부적합하므로 cleaning 단계를 추가로 수행하였다. 투석원리를 이용한 amicon ultra membrane filter(10 kDa, size cutting)와 sephadex resin을 이용한 G-25 column을 이용하여 농축에 사용되었던  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  염을 제거하고 단백질 이외의 불순물을 제거하기 위하여 두 시스템 모두 사용하였다.

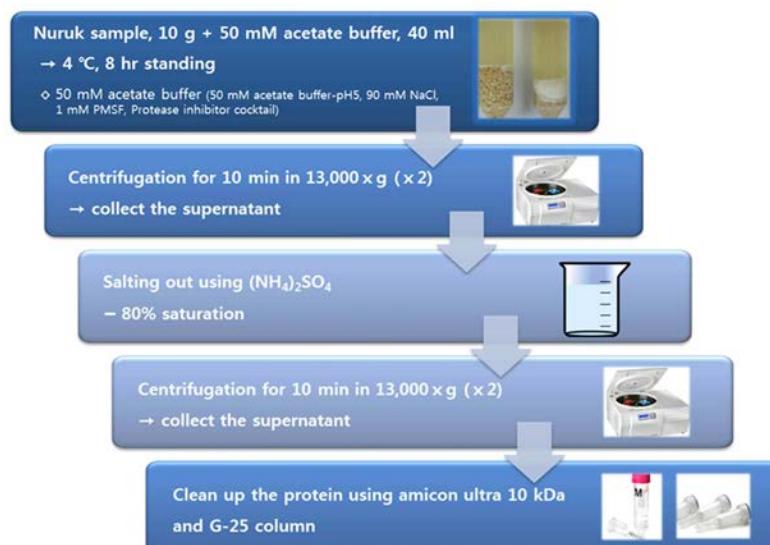


Fig. 2. Strategy of extracellular protein purification method from wheat-based nuruk

## (2) 2차년도 원료 및 가수비율별 제조된 누룩 단백질 분리기술 확립

(2-1) 누룩분양 : 본 연구에 사용한 밀누룩 시료는 제1협동과제팀(국립농업과학원)에서 제작·분양되었다.

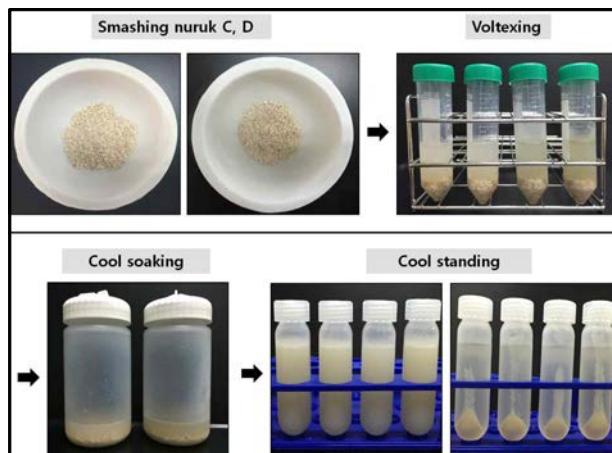
### (2-2) 분양된 전통누룩 특성

분양된 전통누룩 C와 D 특성 해당누룩의 전처리는 국내에서 재배된 우리 밀(금강밀), 보리 및 녹두를 둘러로 분쇄하여 채로 내린 후 혼합된 원료에 첨가하는 가수량을 각각 20%, 26%, 30%(40°C)로 살수 혼합하여 실온에서 침윤 후 사용하였다.

- 전통누룩 C : 전처리로 침윤시킨 원료를 각각 정해진 비율(보리, 녹두, 통밀 =3.3:0.5:3.3)로 혼합하여 형성 후 발효(36°C, 2일 간격으로 뒤집기, 습도 70%, 30일)시켰다. 발효기간별(0, 3, 6, 10, 20, 30일) 전통누룩 C를 연구시료로 확보하였다.
- 전통누룩 D : 전처리로 침윤시킨 원료를 각각 정해진 비율(보리, 녹두=3.3:0.55)로 혼합하여 형성 후 발효(36°C, 2일 간격으로 뒤집기, 습도 70%, 30일)시켰다. 발효기간별(0, 3, 6, 10, 20, 30일) 전통누룩 D를 연구시료로 확보하였다.

(2-3) 누룩파쇄 : 전통누룩 C와 D로부터 단백질 회수를 위하여 막자의 물리적인 힘만으로 누룩제조 당시의 분쇄밀 상태로 파쇄하는 방법을 제조된 누룩 C의 18가지(발효기 간별 - 0, 3, 6, 10, 20, 30일; 가수비율별 - 20, 26, 30%)와 누룩 D의 18가지(C와 동일 조건) 제조된 36가지의 모든 시료를 파쇄하였다. 1차년에 추가로 수행하였던 액체질소를 사용하여 완전한 powder 형태로 파쇄하는 2차 방법은 지나친 전분으로 인해 단백질 전기영동을 제한하여 수행하지 않았다.

(2-4) 파쇄누룩의 단백질 회수 : 막자 파쇄 방법으로 파쇄된 누룩시료 10 g에 추출용액 (50 mM acetate buffer-pH 5.0, 90 mM NaCl, 1 mM PMSF, 1X protease inhibitor cocktail) 40 ml을 첨가하여 1분 동안 vigorous voltexing을 수행한 후 단면적이 넓은 tube에 transfer한 후 4°C에서 8시간 동안 soaking하였다. 반응 후 원심분리를 수행하여 (13,000 rpm, 4°C, 20분) 단백질을 포함한 상층액을 회수한 후 여분의 시료를 제거하기 위하여 동일한 조건으로 2차 원심분리를 수행하였다. 1차년도 밀 누룩에 비해 다량 증가한 starch 등의 물질 제거를 위하여 4°C에서 3시간 동안 standing 후 원심분리를 수행하여 (13,000 rpm, 4°C, 20분) 최종 단백질 혼합액을 회수하는 과정을 추가 수행하였다(Fig. 1). 위의 단백질 회수용 추출용액 선정을 위하여 누룩시료와 추출용액의 비율(1:1, 1:2, 1:4, 1:10), 추출용액 내의 NaCl 농도별(50, 90 mM), 원심분리 시간대별(10, 20분), 단백질 회수액의 전분침강 시간대별(1, 3, 5시간)로 test하여 최종 결정하였다.



**Fig. 3. Strategy of extracellular protein purification method from wheat/green gram-based nuruk**

(2-5) 누룩단백질의 농축 : 누룩단백질의 저농도 문제를 해결하기 위하여 ammonium sulfate,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 을 이용한 염석방법으로 단백질을 농축하였다. 80%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  saturated 누룩용액을 제조하여 원심분리하여(13,000 rpm, 4°C, 20분) 농축된 단백질을 확보한 후 1.5 ml의 50 mM acetate buffer에 단백질 pellet을 녹여 농축액을 준비하였다.

(2-6) 누룩단백질의 정제 : 전분 등의 물질 함유율이 높은 전통누룩을 사용한 본 연구의 단백질시료는 전분 오염률이 높아 단백체 연구에 부적합하므로 cleaning 단계를 추가로 수행하였다. 전분제거와 같이 제거되는 단백질의 손실을 최소화하기 위하여 PD-10 gel filtration system과 sephadex G-25 medium을 사용하여 단백질을 정제하였다(Fig. 4). Fig. 2의 전 과정을 거쳐 누룩 단백질을 회수하였다.

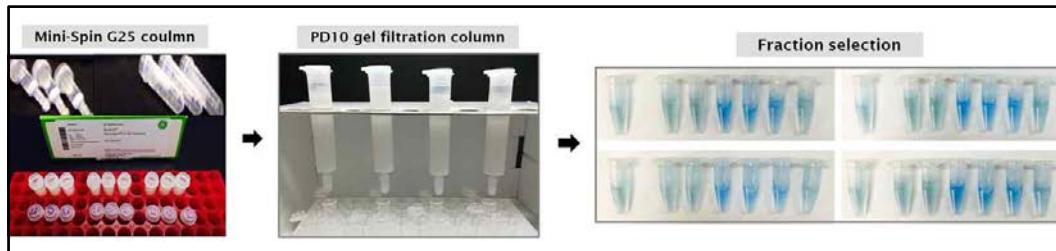


Fig. 4. Gel filtration for purity of extracellular proteins from wheat/green gram-based nuruk

### (3) 3차년도 전통누룩 배양온도 및 습도별 누룩 단백질 분리기술 확립

(3-1) 누룩분양 : 본 연구에 사용한 밀누룩 시료는 제1협동과제팀(국립농업과학원)에서 제작·분양되었다.

#### (3-2) 분양된 전통누룩 특성

해당 시료는 보리와 녹두를 재료로 하여 각각 30°C와 40°C에서 습도를 조절하여 30일 간 발효하였다.

- 전통누룩 E : 원료를 전처리 후 성형하여 1단계 발효(30°C, 습도 70%, 3일), 2단계 발효(30°C, 습도 50%, 27일)를 거쳐 발효기간별(0, 3, 6, 10, 20, 30) 전통누룩 E를 연구 시료로 확보하였다.
- 전통누룩 F : 원료를 전처리 후 성형하여 1단계 발효(40°C, 습도 70%, 3일), 2단계 발효(40°C, 습도 50%, 27일)를 거쳐 발효기간별(0, 3, 6, 10, 20, 30) 전통누룩 F를 연구 시료로 확보하였다.

(3-3) 누룩파쇄 : 전통누룩 E와 F의 단백질 회수를 위하여 막자사발에 물리적인 힘만을 가하여 완전한 powder형태가 아닌 누룩제조 당시의 분쇄밀상태로 파쇄하였다.

(3-4) 파쇄누룩의 단백질 회수 : 분쇄밀상태로 파쇄된 누룩시료 10 g에 추출용액(50 mM acetate buffer-pH 5.0, 90 mM NaCl, 1 mM PMSF, 1X protease inhibitor cocktail) 40 ml을 첨가하여 1분 동안 vigorous voltexing을 수행한 후 단면적이 넓은 tube에 transfer한 후 4°C에서 8시간 동안 soaking하였다. 반응 후 원심분리를 수행하여 (4,000 rpm, 4°C, 20분) 단백질을 포함한 상층액을 회수한 후 여분의 시료를 제거하기 위하여 2차 원심분리(13,000 rpm, 4°C, 20분)를 수행하였다. 3시간 동안 4°C에서 standing 후 동일한 조건으로 3차 원심분리를 수행하여 최종 단백질 혼합액을 회수

하였다.

(3-5) 누룩단백질의 농축 : 누룩단백질의 저농도 문제를 해결하기 위하여 ammonium sulfate,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 이용한 염석방법으로 단백질을 농축하였다. 80%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  saturated 누룩용액을 제조하여 원심분리하여(13,000 rpm, 4°C, 20분) 농축된 단백질을 확보한 후 NaCl이 포함되어 있지 않은 50 mM acetate buffer(50 mM acetate buffer-pH 5.0, 1 mM PMSF, 1X protease inhibitor cocktail) 1.5 ml에 단백질 pellet을 녹여 농축액을 준비하였다.

(3-6) 누룩단백질의 정제 : 전분 등의 물질 함유율이 높은 전통누룩을 사용한 본 연구의 단백질시료는 전분 오염률이 높아 단백체 연구에 부적합하므로 cleaning 단계를 추가로 수행하였다. 전분제거와 함께 제거되는 단백질의 손실을 최소화하기 위하여 sephadex G-25 medium와 PD-10 gel filtration system을 사용하여 단백질을 정제하였다.

## 2) 전통누룩 단백질 분리, 1D-PAGE 수행

### (1) 전통누룩 단백질분리

#### (1-1) 1차년도 전통누룩 발효시간대별 단백질분리

본 연구에서 확립된 누룩시료 단백질 분리기술을 이용하여 전통누룩 A(36°C, 30일간, 2일 간격으로 뒤집기; 발효기간별 0, 3, 6, 9, 10, 20, 30일), 전통누룩 B(주발효 - 45°C, 10일간, 2일 간격으로 뒤집기; 후발효 - 35°C, 20일간, 2일 간격으로 뒤집기; 발효기간별 0, 3, 6, 9, 10, 20, 30일), 시판누룩으로부터 단백질을 모두 분리하였다.

#### (1-2) 2차년도 전통누룩 원료 및 가수비율별 단백질분리

본 연구에서 확립된 누룩시료 단백질 분리기술을 이용하여 전통누룩 C(보리, 녹두, 통밀=3.3:0.5:3.3; 발효기간별 - 0, 3, 6, 10, 20, 30일; 가수비율별 - 20, 26, 30%), 전통누룩 D(보리, 녹두=3.3:0.55; 발효기간별 - 0, 3, 6, 10, 20, 30일; 가수비율별 - 20, 26, 30%)으로부터 단백질을 모두 분리하였다.

#### (1-3) 3차년도 전통누룩 배양온도별 누룩 단백질 분리

본 연구에서 확립된 누룩시료 단백질 분리기술을 이용하여 전통누룩 E(1단계 - 30°C, 습도 70%, 3일; 2단계 - 30°C, 습도 50%, 27일; 발효 0, 3, 6, 10, 20, 30일), 전통누룩 F(1단계 - 40°C, 습도 70%, 3일; 40°C, 습도 70%, 27일; 발효 0, 3, 6, 10, 20, 30)로부터 단백질을 모두 분리하였다.

### (2) 누룩단백질의 1D-PAGE 수행

분리된 모든 전통누룩시료(누룩A, B, C, D, E, F)의 단백질들은 one-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis(1D-PAGE, 10% gel) 수행 후 brilliant blue R250 단백질 염색시약을 이용하여 coomassie blue 염색법으로 단백질의 분리성공 여부 및 단백체

작업 가능성 여부를 확인하였다.

### 3) 2D-PAGE layout 조건 구축 및 수행

#### (1) Isoelectronic focusing(IEF) - 전하분리

(1-1) 누룩단백질 clean-up : 1D-PAGE에서 확인한 누룩단백질 400 ul(500 ug)을 2DE clean up kit를 사용하여 순수한 단백질만을 회수하는 전처리 과정(20단계)을 거쳤다.

(1-2) 누룩단백질 IEF 수행 : IPG box에 cleaning된 단백질 시료를 넣고 IPG strip(13 cm, pH 3-10 NG)을 16시간 이상 rehydration 한 후 focusing machine에서 15시간 동안 작업을 수행하여 총 20,000 volt 이상의 전압을 가하여 pI 차에 의해 단백질을 1차 분리하였다(Fig. 5).

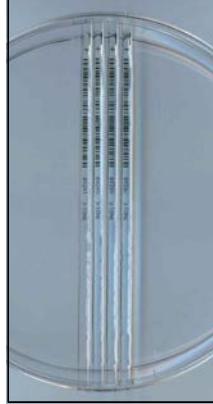
Focusing	IPG strip
 <p><b>2-DE Isoelectric focusing</b></p> <p>Isoelectric focusing unit</p> <p>Tracking dye</p> <p>Direction of migration</p> <p>Progress is followed by means of tracking dye Protein's separated according to respective pI</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>Step: 500 V 500 vhr</li> <li>Gradient: 1,000 V 800 vhr</li> <li>Gradient: 8,000 V 12,000 vhr</li> <li>Step: 8,000 V 8,000 vhr</li> <li>Step: 50 V</li> </ol>	

Fig. 5. Isoelectronic focusing condition of extracellular protein purification.

#### (2) 2D-PAGE 수행 - 크기분리

2D-PAGE는 대형 acrylamide gel( $20 \times 20 \text{ cm}^2$ , 10%)을 제작하고 젤 상단부위에 10단계에 걸쳐 전처리가 완료된 IEF-strip을 고정시킨 후 cooling 시스템이 장착된 대형 단백질 전기영동기에서 80 volt로 15시간 전기영동을 수행하였다.

#### (3) 단백질 spot 염색

전기영동 수행이 완료된 대형 gel을 고정단계를 거쳐 Destain-free G250 PAGE Gel Staining Solution으로 shaker에 올려놓은 후 1일간 염색한 한다. 물을 수차례 교환하면서 gel의 염색시약이 모두 빠지도록 1일간 탈색을 수행하였다.

### 4) 누룩시료별 2D-PAGE 결과 비교분석

단백질 spot들이 확인된 gel들을 image scanning 수행 후 확보된 image를 활용하여 Samespot과 Delta 2D 2D spot 분석 프로그램을 이용하여 각 누룩시료별 대표 spot들을 비교 분석하였다.

- (1) 1차년도 전통누룩 발효시간대별 비교분석 : 전통누룩 A(발효 0, 3, 6, 10, 20, 30일), 전통누룩 B(발효 0, 3, 6, 10, 20, 30일), 시판누룩 모두의 PAGE gel 각각을 프로그램으로 분석하였다.
- (2) 2차년도 전통누룩 원료 및 가수비율별 비교분석 : 전통누룩 C 18 시료(보리, 녹두, 통밀=3.3:0.5:3.3; 발효기간별 - 0, 3, 6, 10, 20, 30일; 가수비율별 - 20, 26, 30%), 전통누룩 D 18 시료(보리, 녹두=3.3:0.55; 발효기간별 - 0, 3, 6, 10, 20, 30일; 가수비율별 - 20, 26, 30%) 전체의 PAGE gel 각각을 프로그램으로 분석하였다.
- (3) 3차년도 전통누룩 배양온도별 비교분석 : 전통누룩 E(30°C; 발효 0, 3, 6, 10, 20, 30 일), 전통누룩 F(40°C; 발효 0, 3, 6, 10, 20, 30일) 모두의 PAGE gel 각각을 프로그램으로 분석하였다.

## 5) 누룩발효 중 발효시간대별 변화하는 단백질 연구

Delta 2D 프로그램의 calibration/warping/matching 등의 작업을 통해 각 누룩 발효시간대별 2D gel을 비교하여 누룩발효 중 변화하는 단백질들의 분포도 및 발현비율을 비교분석하였다.

## 6) Target 단백질 분리 후 Q-TOF 수행을 통한 단백질 동정

전통누룩 발효과정 중 변화양상을 비교분석하여 확인된 관심 spot을 tryptic in-gel digestion하여 절단된 peptide 혼합물을 quadrupole-quadrupole-time-of-flight mass spectro- meter를 이용하여 MS/MS 데이터를 수집하고 해당 데이터를 이용하여 NCBI database/bacteria database/fungal database를 이용하여 MASCOT search program으로 단백질을 동정하였다. 추가작업은 MALDI-TOF/TOF Mass Spectrometer를 이용하고 있다.

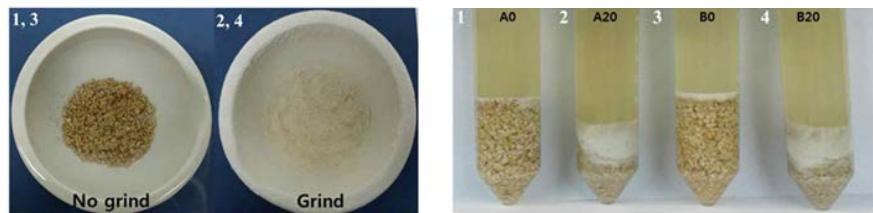
## 2. 실험결과

### 1) 전통누룩 원료 및 가수비율별 단백질 분리 및 1D-PAGE 확인(1차년도)

#### (1) 누룩단백질 분리방법 구축

본 연구진은 시판누룩, 전통누룩A와 전통누룩B의 발효시간대별(0, 3, 6, 10, 20, 30일), 전통누룩C와 전통누룩D의 원료별(C: 보리, 녹두, 통밀=3.3:0.5:3.3, D: 보리, 녹두=3.3:0.55), 가수비율별(20, 26, 30%), 발효시간대별(0, 3, 6, 10, 20, 30일), 전통누룩E와 전통누룩F의 온도별(30°C, 40°C,), 발효시간대별(0, 3, 6, 10, 20, 30일) 시료로부터 누룩단백질을 성공적으로 분리하고 단백질체학에 이용하고자 다양한 조건을 시도하여 최종적인 누룩단백질 분리기술을 구축하였다.

Fig. 6에서 관찰되는 바와 같이 누룩전체를 grinding하여 사용하는 경우(2, 4번 시료)에는 대량의 글루텐 단백질과 지나친 전분의 함유로 인해 단백질체 실험을 원활히 수행할 수 없었다. 그러므로 누룩시료 전체의 grinding이 아닌 누룩의 굽은 입자 파쇄 후(1, 3번) 입자 전체를 장시간 추출용액에 고정상태에서 soaking함으로써 발효단계별로 발효미생물 세포 밖으로 생산분비되는 extracellular proteins를 주단백질로 하여 추출하였다.

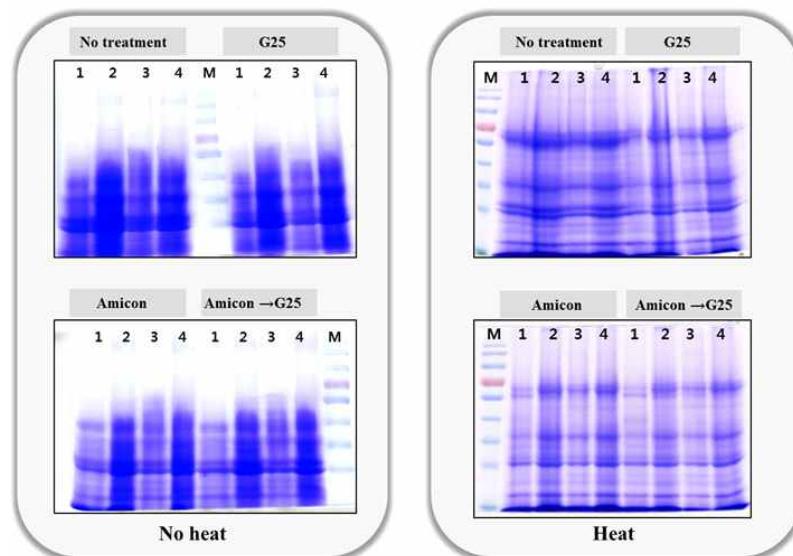


**Fig. 6. Selection of extraction method for extracellular proteins**

## (2) 누룩단백질 정제과정 개선

### (2-1) 누룩단백질 정제과정

전통누룩A와 전통누룩B의 누룩단백질 추출 후 단백질의 quality 및 quantity를 확인하고자 1D-PAGE를 수행한 후 그 결과를 Fig. 7에 나타내었다. 장시간 soaking 후 원심 분리하여 염석방법으로 농축한 단백질(no treatment), sephadex resin을 이용한 G-25 column 처리하여 회수한 단백질은 불순물의 잔여로 인하여 1D-PAGE 전개가 정상적으로 이루어지지 않았다. 그러나 membrane filter 원리인 amicon을 사용하여 회수한 단백질 및 amicon 사용 후 G25 column을 사용하여 회수한 단백질은 불순물, 특히 전분 등이 효과적으로 제거되어 1D-PAGE layout이 성공적으로 수행됨을 확인하였다.

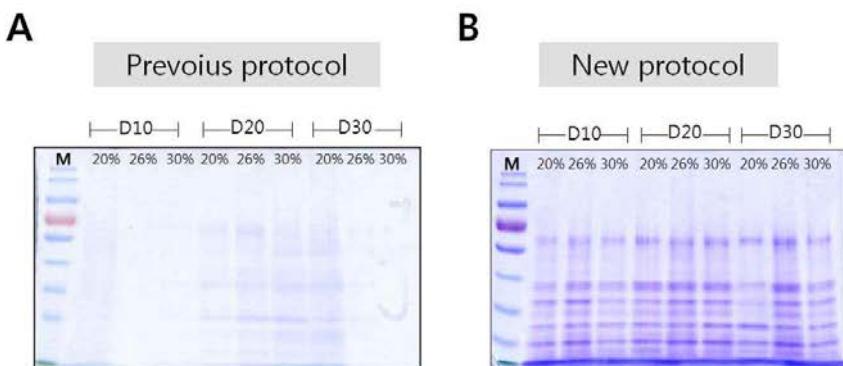


**Fig. 7. 1D-PAGE of purified nuruk proteins**

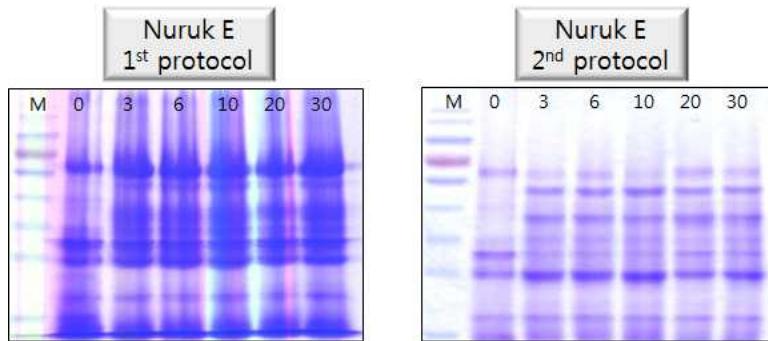
## (2-2) 누룩단백질 정제과정 개선

전통누룩C와 전통누룩D는 Fig. 8에서 관찰되는 바와 같이 1차년도 구축된 누룩단백질 분리기술로는 추가된 누룩재료의 단백질 분리 저해물질로 인하여 단백질의 정상적인 분리가 어려우며 원활한 단백질 분석 작업을 수행할 수 없었다. 2차년도에 1차년도와 동일하게 투석원리를 이용한 amicon ultra membrane filter(10 kDa, size cutting)를 이용하였으나 다량의 전분으로 인하여 전분 제거와 동시에 제거되는 단백질의 손실량이 너무 커(Fig. 8A) 단백질 정제 방법으로 새로운 시스템(PD-10 gel filtration system; sephadex G-25 medium)을 도입하였다. 염석법에 의하여 농축된 단백질을 MiniSpin G-25 column을 1차 통과시켜 단당과 혼산 등의 미립자를 제거 시킨 후, PD-10 gel filtration column을 2차 통과시켜  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  염 및 단백질 이외의 전분과 같은 불순물을 제거하여 단백질을 정제하였다.

재구축된 기술로 누룩단백질 추출 후 단백질의 quality 및 quantity를 확인하고자 1D-PAGE를 수행한 결과 밀누룩보다 더 증가한 전분량과 그 외 불순물들이 효과적으로 제거되어 1D-PAGE layout이 성공적으로 수행됨을 확인하였고(Fig. 8B) 또한 보리와 녹두를 재료로 하여 만들어진 전통누룩E와 전통누룩F에서도 재구축된 기술로 누룩단백질을 효과적으로 확보할 수 있었다(Fig. 9). 이 결과는 본 연구진이 누룩단백질의 회수에 중요한 단계인 정제과정의 개선으로 누룩단백질 분리기술이 구축되었으며, 누룩제조에 이용된 재료에 따라 누룩단백질 분리기술도 재구축되어야함을 확인할 수 있었다.



**Fig. 8. 1D-PAGE of purified nuruk proteins.** Purification from wheat/ green bean-based nuruk D, using previous protocol, 1st year (A) and new protocol, 2nd year (B).

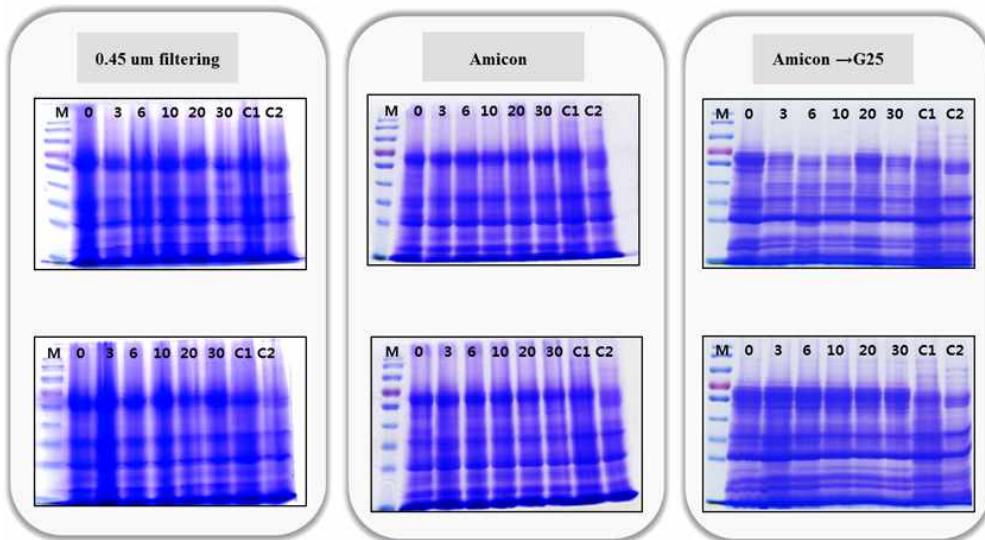


**Fig. 9. 1D-PAGE of purified nuruk proteins.** Purification from wheat/ green bean-based nuruk E, using previous protocol, 1st year (A) and new protocol, 2nd year (B).

### (3) 누룩단백질 분리기술

#### (3-1) 누룩단백질 분리기술 확립

전통누룩A와 전통누룩B의 누룩단백질 분리기술은 Fig. 2에 나타내었다. 또한 시판누룩, 전통누룩A와 전통누룩B의 발효시간대별(0, 3, 6, 10, 20, 30일) 시료들 모두로부터 새롭게 구축된 분리기술을 이용하여 누룩단백질을 분리한 후 1D-PAGE를 수행하여 Fig. 10에 나타내었다. 분리된 시판누룩(C1, C2), 전통누룩A(0, 3, 6, 10, 20, 30일), 전통누룩B(0, 3, 6, 10, 20, 30일)의 단백질은 후속실험이 가능한 상태로 분리되었으며 amicon column과 G25 resin을 연속 사용한 누룩단백질이 가장 단백질 layout 상태가 양호하였으며 본 실험단계로 최종 분리방법을 구축하였다.



**Fig. 10. 1D-PAGE of purified nuruk proteins from all samples**

### (3-2) 누룩단백질 분리기술 재학립

전통누룩C, 전통누룩D, 전통누룩E, 전통누룩F 에서는 누룩재료의 변화로 이전 누룩단백질 분리기술에서 amicon ultra membrane filter를 이용하였을 때 손실량이 크고 정상적인 분리에 어려움이 있었다. 따라서 전통누룩 C와 전통누룩 D의 원료별(C: 보리, 녹두, 통밀=3.3:0.5:3.3, D: 보리, 녹두=3.3:0.55), 가수비율별(20, 26, 30%), 발효시간대별(0, 3, 6, 10, 20, 30일) 제조된 총 36가지의 누룩시료를 PD10 gel filtration을 통해 정제한 후 각 fraction들의 단백질로 1D-PAGE를 수행하였다(Fig. 11, 12). 각 fraction들 중 단백질 분석, 2D-PAGE에 사용 가능한 단백질 시료로 1D-PAGE를 수행하였다(Fig. 13).

전통누룩 E와 전통누룩 F의 발효기간별(0, 3, 6, 10, 20, 30일) 제조된 12가지의 누룩시료를 PD10 gel filtration을 통해 정제한 후 각 fraction들의 단백질로 1D-PAGE를 수행하였다(Fig. 14, 15). 각 fraction들 중 단백질 분석, 2D-PAGE에 사용 가능한 단백질 시료로 1D-PAGE를 수행하였다(Fig. 16).

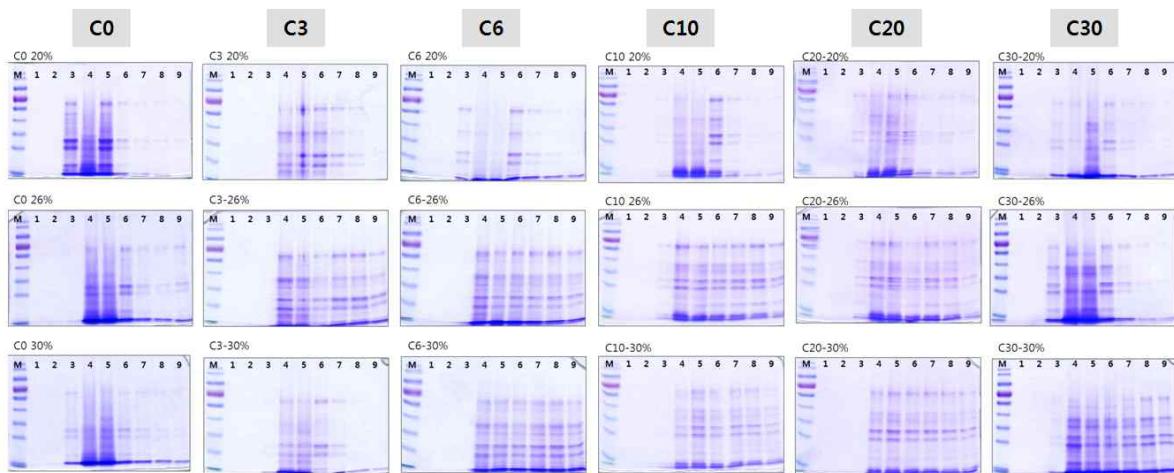


Fig. 11. 1D-PAGE of each nuruk C protein fractions from PD10 gel filtration

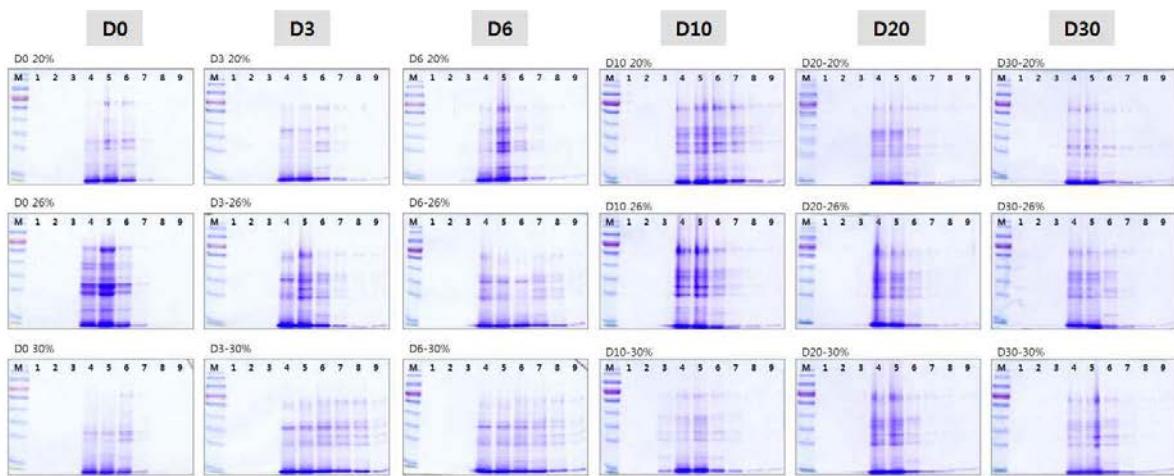


Fig. 12. 1D-PAGE of each nuruk D protein fractions from PD10 gel filtration

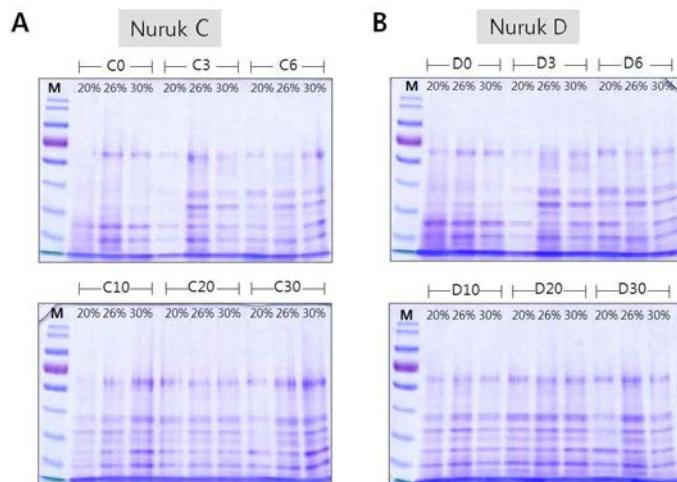


Fig. 13. 1D-PAGE of each nuruk C and D proteins from wheat/green bean-based nuruk

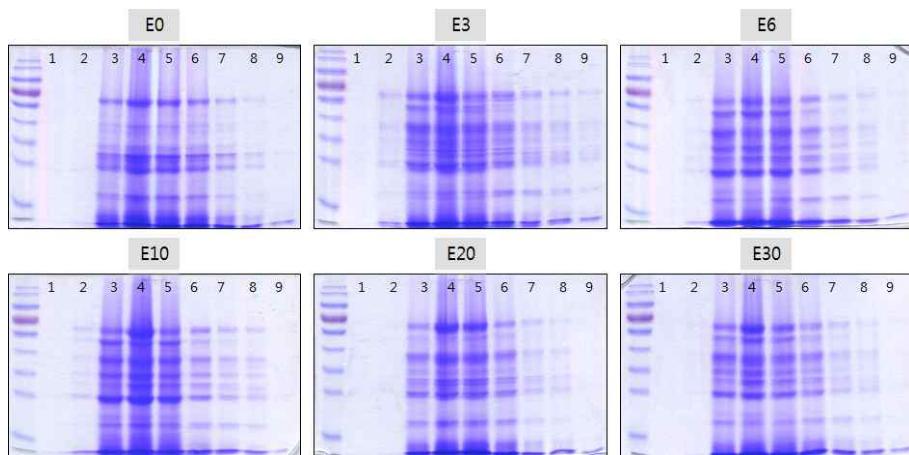


Fig. 14. 1D-PAGE of each nuruk E protein fractions from PD10 gel filtration

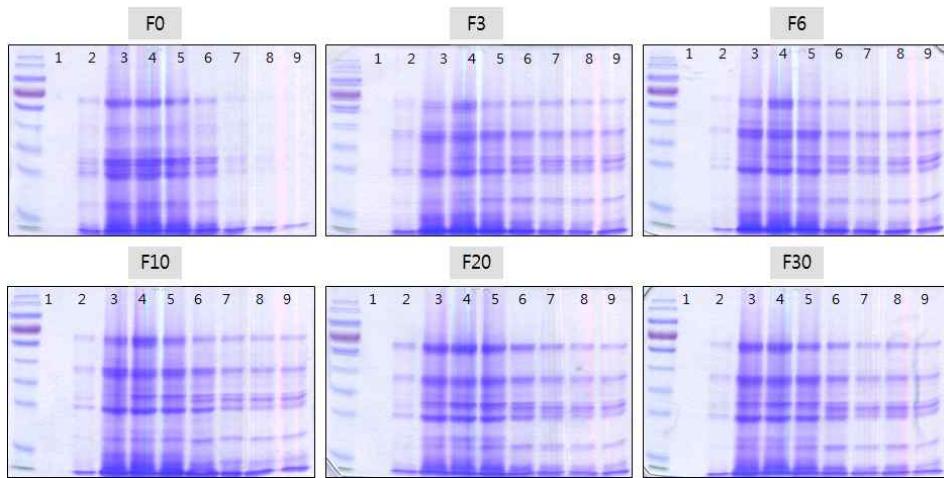


Fig. 15. 1D-PAGE of each nuruk F protein fractions from PD10 gel filtration

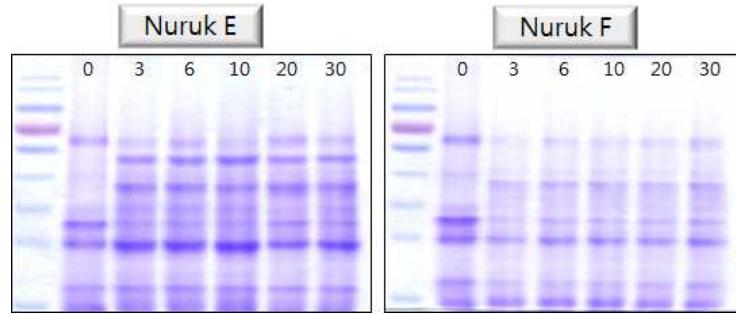


Fig. 16. 1D-PAGE of each nuruk E and F proteins from wheat/green bean-based nuruk

#### (4) 1D-PAGE에 의한 누룩단백질 발현양상 확인

발효조건별 분리된 누룩단백질이 2D-PAGE layout 수행에 적합한지 확인하기 위하여 Phoretix 1D 를 이용하여 1D-PAGE 결과 gel들을 분석하였다.

##### (4-1) 1차년도 전통누룩 발효시간대별 누룩단백질 발현양상 확인

각 시료의 단백질들 중 단백질 양상의 차이가 큰 부분을 선정하여 Fig. 17에 나타내었고 이 부분들에 대한 dendrogram을 비교 분석하여 Fig. 18, Fig. 19에 나타내었다. 그 결과 시판누룩 C1/C2, C1/전통누룩A, C1/전통누룩B, C2/전통누룩A, C2/전통누룩B 사이에 발현양상의 차이를 보이는 단백질이 다소 존재하는 것을 관찰할 수 있으며 전통 누룩A와 B의 dendrogram을 비교한 결과 동일한 재료에서 시작이 되나 발효조건에 따라 생성되는 단백질의 종류가 변화하거나 또는 발현량에 차이가 나타나는 것을 확인하였다. 또한 발효과정을 전발효와 후발효로 작업한 누룩A0, A3, A6, A9 시간대별 큰 변화추이를 보이지 않으나 누룩 B3, B6, B9 사이에는 단백질 발현의 변이가 더 나타남을 그래프로 확인할 수 있었다.

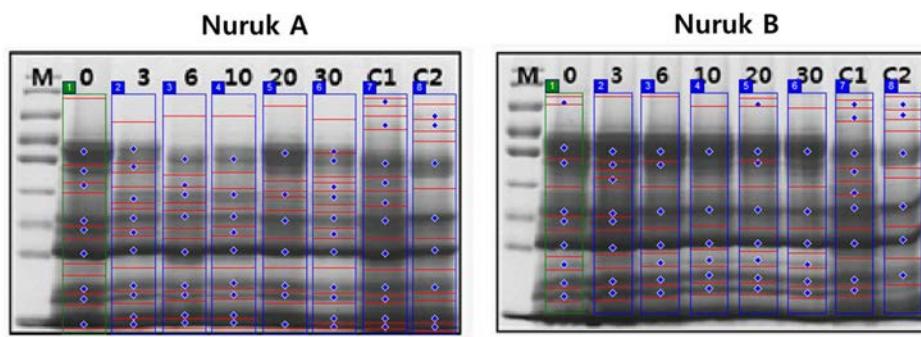


Fig. 17. Phoretix 1D program analysis of 1D-PAGE of purified nuruk proteins

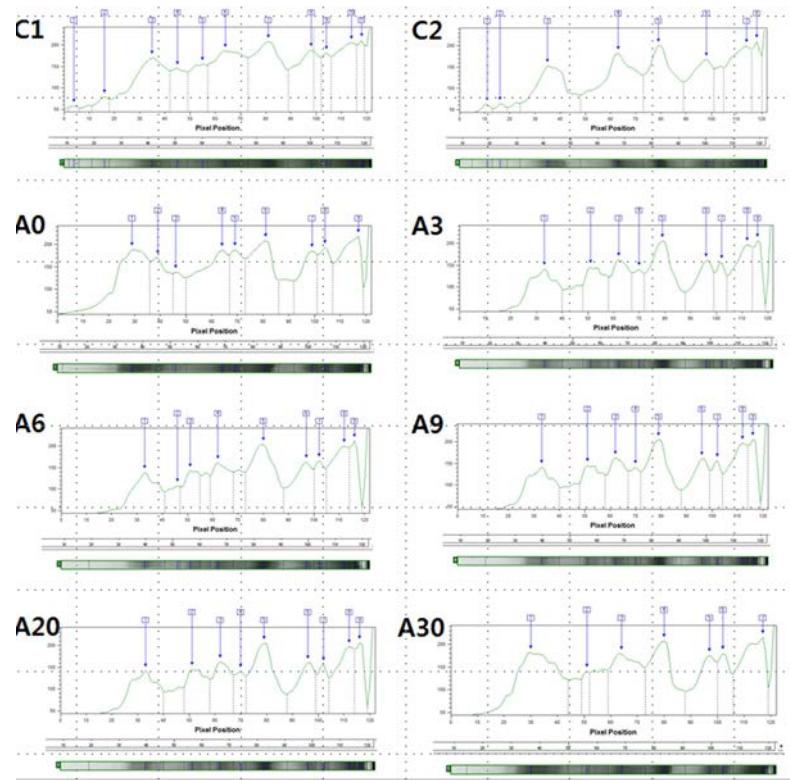
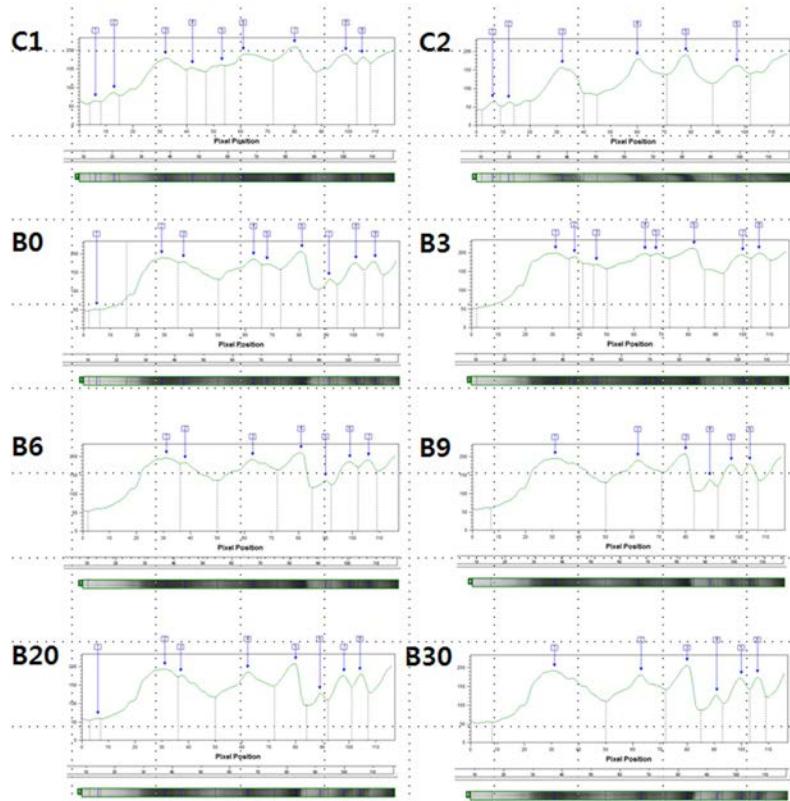


Fig. 18. Dendrogram of each purified nurukA protein using Phoretix 1D program analysis



**Fig. 19. Dendrogram of each purified nurukB protein using Phoretix 1D program analysis**

#### (4-2) 2차년도 전통누룩 원료 및 가수비율별 누룩단백질 발현양상 확인

각 시료의 단백질들 중 단백질 양상의 차이가 큰 부분을 선정하여 Fig. 20에 나타내었고 이 부분들에 대한 dendrogram을 비교 분석하여 Fig. 21, Fig. 22에 나타내었다. 그 결과 원료별(C: 보리, 녹두, 통밀=3.3:0.5:3.3, D: 보리, 녹두=3.3:0.55), 가수비율별(20, 26, 30%), 발효시간대별(0, 3, 6, 10, 20, 30일) 사이에 발현양상의 차이를 보이는 단백질이 다수 존재하는 것을 관찰할 수 있었다.

Phoretix 1D program을 활용한 전통누룩 C 시료 내에서의 dendrogram 비교 결과 동일한 재료에서 발효가 시작되나 발효조건에 따라 생성되는 단백질의 종류가 변화하거나 또는 발현량에 차이가 나타나는 것이 관찰되었다. 가수비율 20% 처리한 군보다는 26% 또는 30% 가수 처리한 누룩에서 더 많은 분비단백질이 형성되었다. 26% 가수 처리 누룩은 발효 초기(3일)부터 중반까지(10일) 활발하게 분비단백질이 생성되다가 발효후기에 미비하게 줄어들기는 하나 발효후기까지 지속적으로 유사한 단백질들을 포함하고 있는 것으로 관찰되었다(Fig. 21). 30% 가수처리 누룩은 26% 가수처리 시료에 비해 발효 중기(6일) 부터 풍부하게 단백질이 분비되는 것으로 판단된다.

동일한 프로그램을 이용하여 분석한 전통누룩 D 시료 내에서의 dendrogram 비교

결과 누룩 C와 마찬가지로 발효조건에 따라 생성되는 단백질의 종류가 변화하거나 발현량에 차이를 보였다. 가수비율 26%에서 분비단백질의 생성량이 발효초기, 중반에 상대적으로 높은 것으로 관찰되었다(Fig. 22). 하지만 발효후기에는 가수비율이 큰 영향을 미치지 않는 것으로 판단된다.

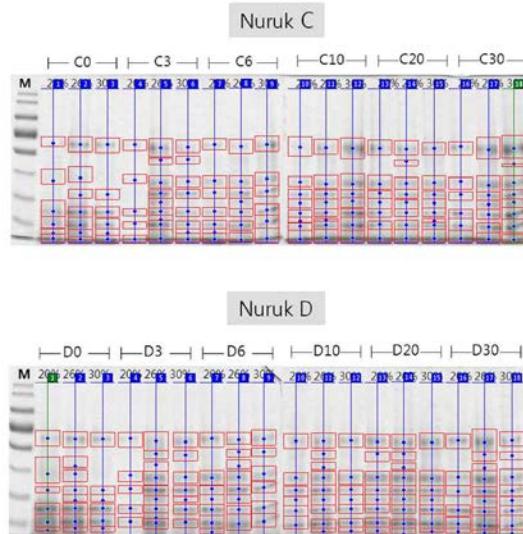


Fig. 20. Phoretix 1D program analysis of 1D-PAGE of purified nuruk proteins

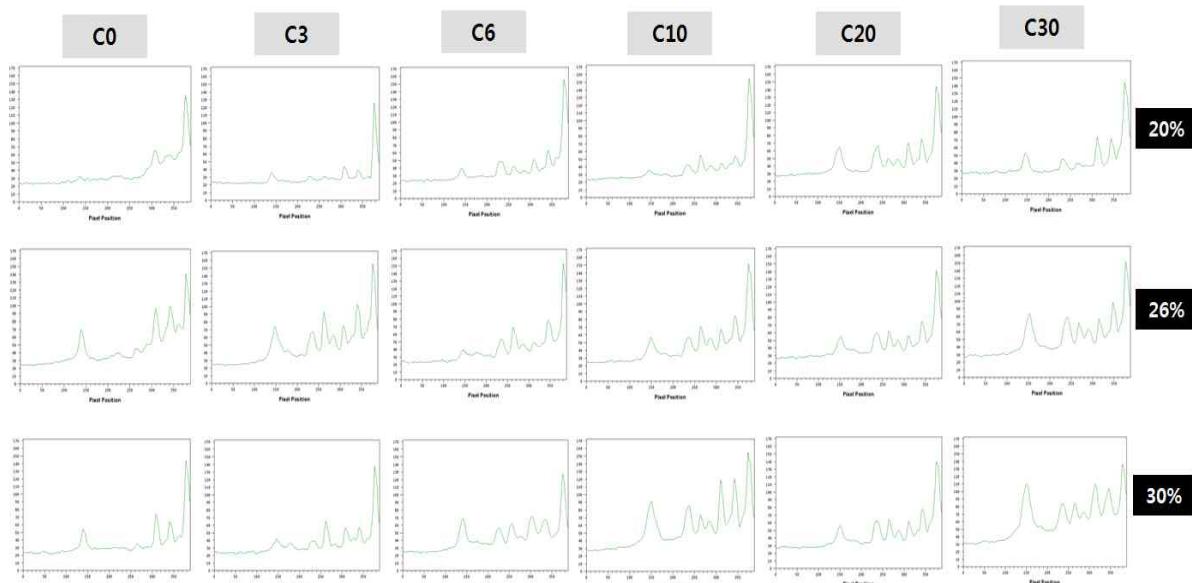
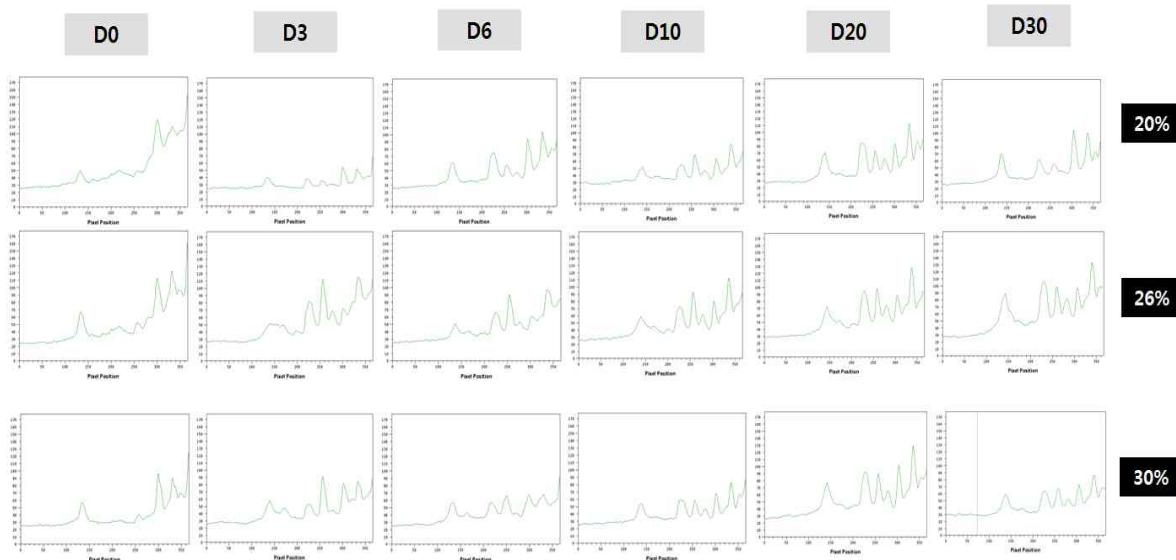


Fig. 21. Dendrogram of each purified nurukC protein using Phoretix 1D program analysis

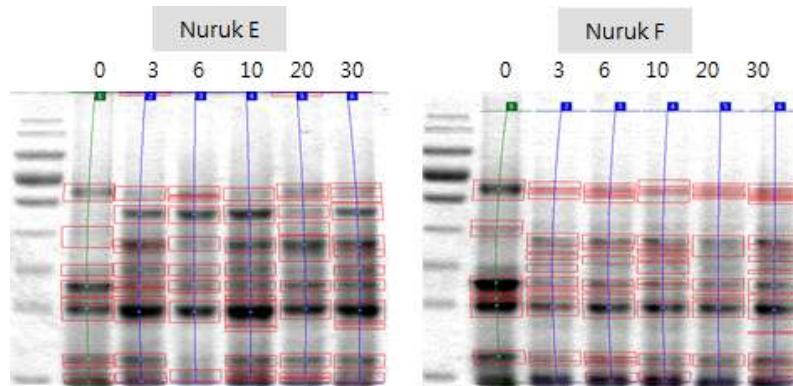


**Fig. 22. Dendrogram of each purified nurukD protein using Phoretix 1D program analysis**

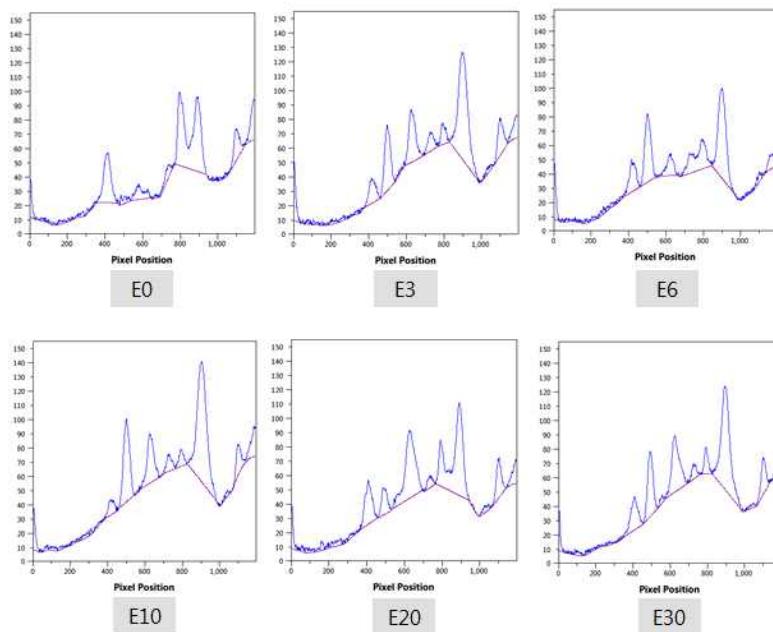
#### (4-3) 3차년도 전통누룩 배양온도별 누룩단백질 발현양상 확인

각 시료의 단백질들 중 단백질 양상의 차이가 큰 부분을 선정하여 Fig. 23에 나타내었고 이 부분들에 대한 dendrogram을 비교 분석하여 Fig. 24, Fig. 25에 나타내었다. 그 결과 전통누룩 E(발효온도 30°C; 발효 0, 3, 6, 10, 20, 30일), 전통누룩 F(발효온도 40°C; 발효 0, 3, 6, 10, 20, 30일) 사이에 발현양상의 차이를 보이는 단백질이 존재하는 것으로 관찰되었다.

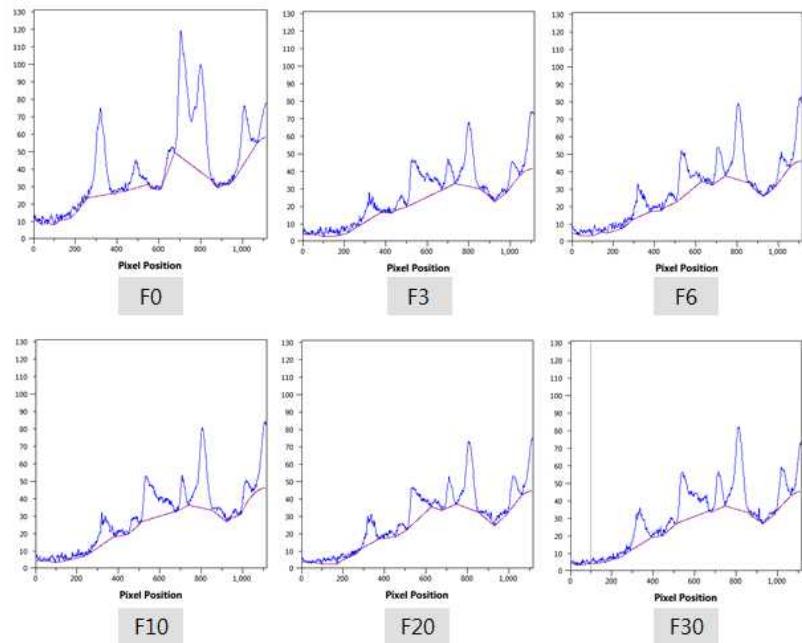
CLIQS 1D program을 활용한 전통누룩 E 시료 내에서의 dendrogram 비교 결과 동일한 재료에서 발효가 시작되나 발효조건에 따라 생성되는 단백질의 종류가 변화하거나 또는 발현량에 차이가 나는 것이 관찰되었다. 온도 40°C에서 발효한 전통누룩 F보다는 30°C에서 발효한 전통누룩 E가 단백질 발현의 변이가 더 나타남을 확인할 수 있고, 발효 시작(0일)에서 초기(3일)로 진행 되었을 때 단백질 종류의 큰 변화추이를 보였지만 발효 초기(3일) 이후로는 발현량의 차이는 보이나 단백질 종류에는 큰 변화가 나타나지 않는 것으로 판단된다. 또한 전통누룩E와 전통누룩F 모두에서 습도 70%로 유지되는 발효초기(3일)와 습도 50%로 유지되는 발효후기(27일)를 비교하였을 때 단백질 종류는 큰 차이를 보이지 않았으나 density의 변화가 있는 것으로 관찰되었다.



**Fig. 23.** Phoretix 1D program analysis of 1D-PAGE of purified nuruk proteins



**Fig. 24.** Dendrogram of each purified nurukE protein using Phoretix 1D program analysis



**Fig. 25. Dendrogram of each purified nurukF protein using Phoretix 1D program analysis**

## 2) 전통누룩단백질 2D-PAGE 수행

### (1) 1차년도 전통누룩 발효시간대별 누룩단백질 2D-PAGE 수행

2D layout 확립을 위하여 1차적으로 대표 시료 전통누룩 A 2개, 전통누룩 B 2개를 이용하여 2D 조건을 성공적으로 확립하였으며 Fig. 26에 나타내었다. 분석결과 시료당 약 200-230개 정도의 단백질 spots이 관찰되었다. 누룩발효과정별, 누룩시료 발효시간대별 발현의 차이를 보이는 단백질이 존재할 것이라 관찰된 1D-PAGE 결과를 토대로 동일한 각각의 누룩단백질을 이용하여 모든 시료별 2D-PAGE를 수행하였으며 Fig. 27, 28, 29에 그 결과를 나타내었다. Fig. 27은 각 2D-PAGE의 spot intensity를 나타내며 이 결과를 통해 수행한 2D-PAGE 결과의 신뢰성 여부를 결정할 수 있는 분석이다. 수행된 모든 2D 실험결과를 후속 비교분석 작업에 활용할 수 있음을 확인하였다.

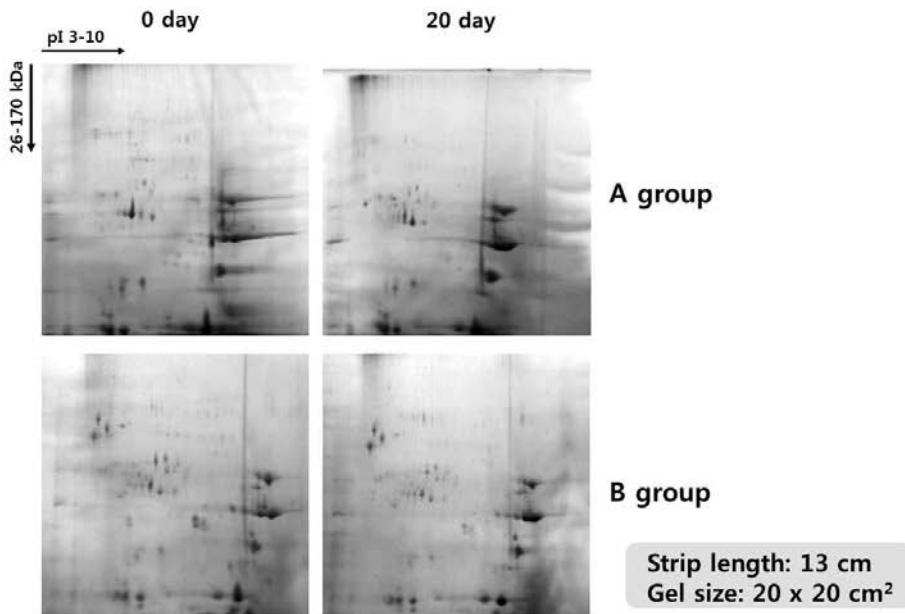


Fig. 26. 2D-PAGE gel images of nuruk A0, A20, nuruk B0, B30

1차적으로 발효마지막 단계의 전통누룩 A30, 전통누룩 B30, 시판용 누룩 C2의 2D gel image를 Samespot에서 calibration 한 후 Delta2D를 통해서 비교분석하여 Fig. 28에 나타내었다. 단백질의 pI 값과 크기가 유사한 단백질들은 밀집되어있어 counting 하지 않았으며 각각 분리 가능한 spot은 전통누룩 A30, B30, C2 각각 208개, 209개, 182개의 순으로 확인되었다. 시판용 누룩의 단백체 경우 본 연구과제에서 제작된 전통누룩과 발현양상이 뚜렷하게 다른 단백질들이 관찰되었다. 전통누룩 A, B와 시판누룩단백질이 보이는 가장 큰 단백질들의 차이점은 분포하는 단백질의 pI 값이 크게 다른 점이었다. 시판누룩은 모든 pI 값에서 골고루 나타나지만 반면 전통누룩A, B의 경우는 pI값이 높은 단백질의 수가 훨씬 다량 존재하는 것으로 관찰되었다.

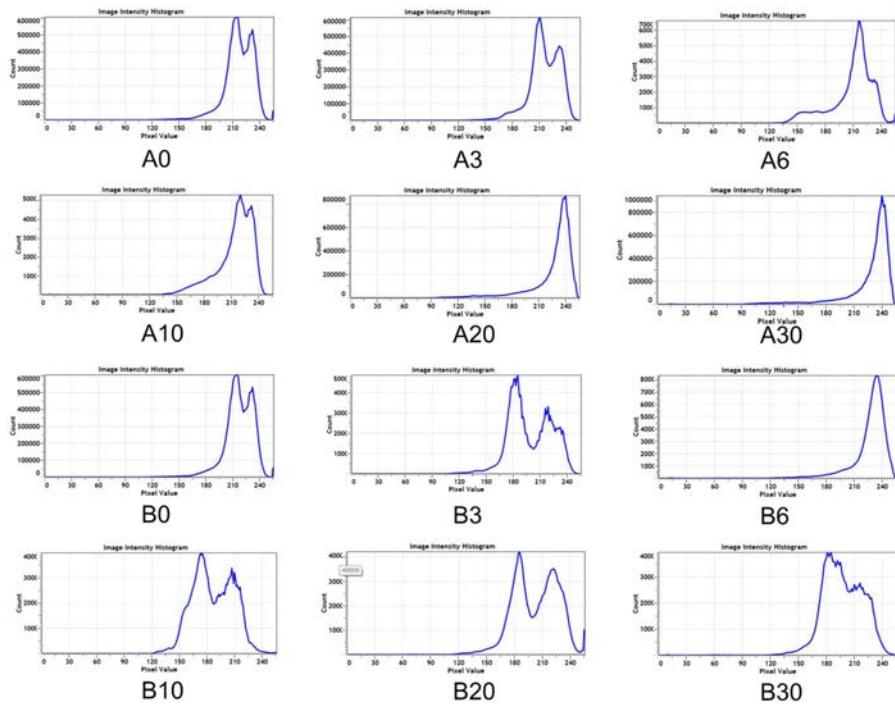


Fig. 27. Intensity value of each 2D-PAGE gel image to confirm quality of spots

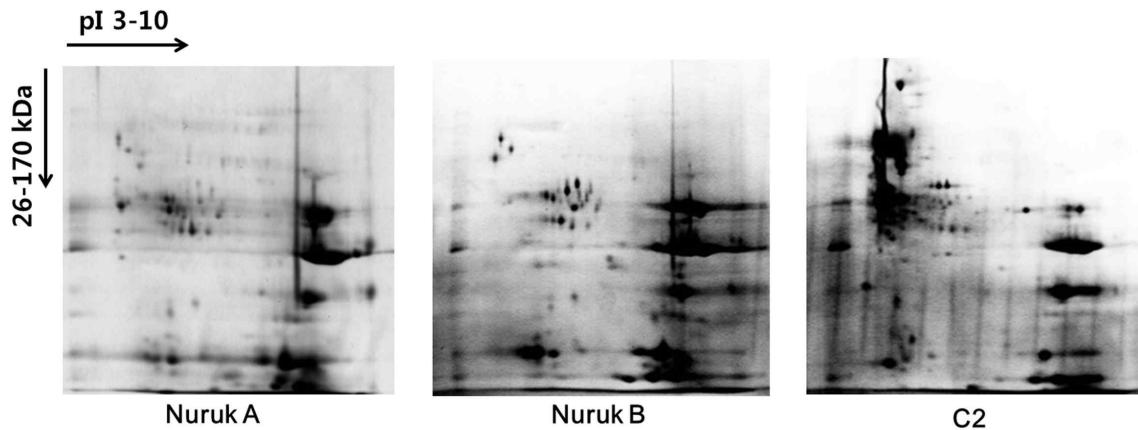
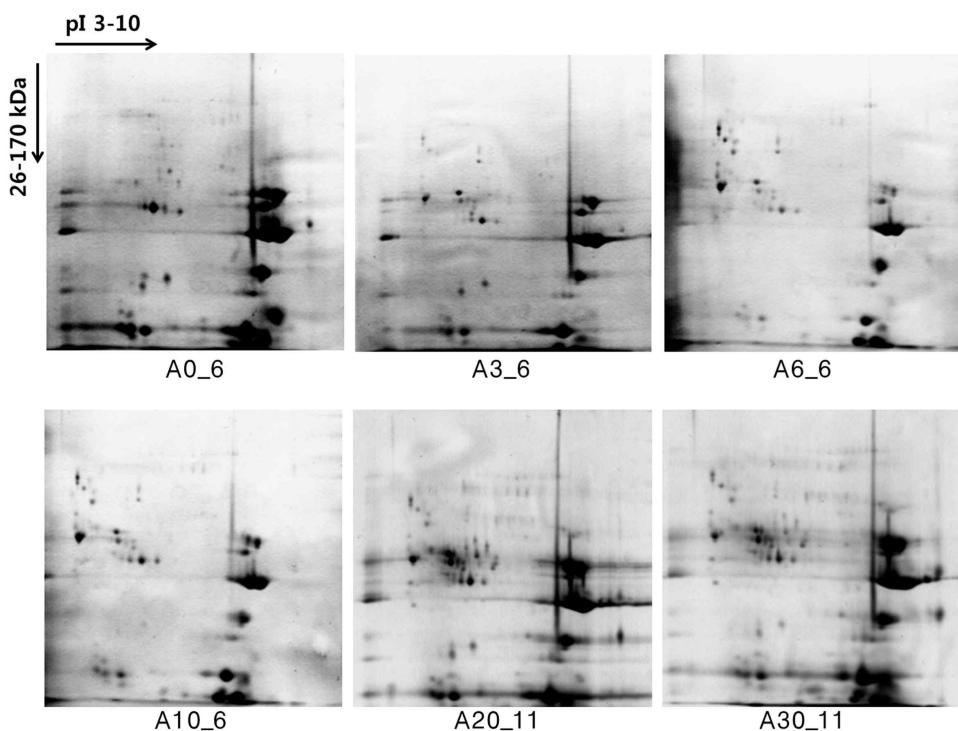


Fig. 28. 2D-PAGE gel images of nuruk A30, nuruk B30, commercial nuruk C2

전통누룩 발효시간별(A0, A3, A6, A10, A20, A30) 단백질의 발현양상을 비교하기 위한 전체 시료들의 2D-PAGE의 결과는 Fig. 29에 나타내었다. 동일 발효조건 내에서는 타 발효조건(전통 누룩B 및 시판누룩)과의 차이만큼 크게 나타나지는 않지만 발효 시간이 지날수록 단백질 spot의 수가 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. Dendrogram의 결과와 상반되게 실제 단백체 layout에서는 A 누룩단백질의 경우 발효 0, 3일에 비해 발효 3일과 6일 사이 1차 증가, 10일과 20일 사이 급격한 증가를 추세를 보였다.



**Fig. 29. 2D-PAGE gel images of proteins from fermented Nuruk A (0,3,6,10,20,30 D)**

전통누룩 발효시간별(B0, B3, B6, B10, B20, B30) 단백질의 발현양상을 비교하기 위한 전체 시료들의 2D-PAGE의 결과는 Fig. 30에 나타내었다. B3의 결과가 뚜렷하지는 않아 결과를 유추하기가 어려우나 다른 시간대별 양상은 누룩 A발효의 경우와 유사하였다. 그러나 누룩B의 경우 흥미롭게도 발효 6일 째부터 발효 후반부와 큰 차이가 없는 단백질 spot이 관찰되었고 특히 전발효에서 후발효로 전환되기 직전 B10 시료에서 가장 많은 단백질들이 생성되는 것을 확인하였다.

전통누룩A와 전통누룩B의 육안 구분 가능한 단백체 spots을 비교하였을 때 B가 A보다 이른 발효시기부터 더 많은 단백질 spot이 존재함을 확인할 수 있었다. 이 결과 또한 **누룩B가 발효에 긍정적 영향을 줄 가능성성이 높은 단백질들을 더 많이 생성함을 예측할 수 있으며** 발현차를 보이는 spot과 새롭게 생성되는 spot의 동정이 완료되면 뚜렷한 정보를 제공받을 수 있을 것으로 사료된다.

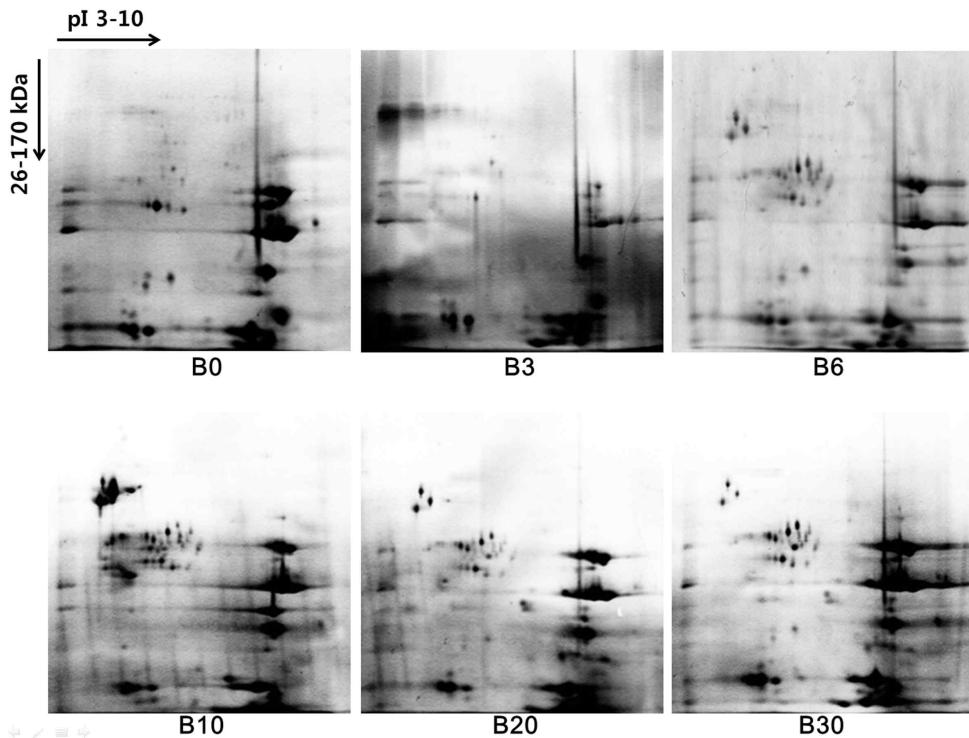


Fig. 30. 2D-PAGE gel images of proteins from fermented Nuruk B (0,3,6,10,20,30 D)

## (2) 2차년도 전통누룩 원료 및 가수비율별 누룩단백질 2D-PAGE 수행

2D layout 확립을 위하여 1차적으로 전통누룩 C의 가수비율별(20, 26, 30%, 발효 0 일) 시료들의 단백질을 이용하여 2D layout 조건을 성공적으로 확립하였으며 Fig. 31에 나타내었다. 분석결과 시료당 약 100-200개 정도의 단백질 spots<sup>o</sup> 관찰되었다. 누룩제조 원료별, 가수비율별, 발효시간대별 발현의 차이를 보이는 단백질이 존재할 것이라 조사된 1D-PAGE 결과를 토대로 동일한 각각의 누룩단백질을 이용하여 모든 시료별 2D-PAGE를 수행하였으며, 누룩 C 18 시료의 2D-gels(Fig. 32, 34)과 누룩 D 18 시료의 2D-gels(Fig. 33, 35) 결과를 확보하였다. Fig. 32 와 33은 각 2D-PAGE의 spot intensity를 나타내며 이 결과를 통해 수행한 2D-PAGE 결과의 신뢰성 여부를 결정할 수 있는 분석이다. 수행된 모든 2D 실험결과를 후속 비교분석 작업에 활용할 수 있음을 확인하였다.

전통누룩의 2D-PAGE의 spot의 수와 density가 약한 이유는 분비하는 단백질의 양이 적은 것이 아니라 통밀의 재료가 추가됨으로써 증가한 클루텐 함유량 및 전분량으로 인한 단백질 회수율 감소인 것으로 추정된다. 하지만 전통누룩 C 내에서의 원료별, 가수분해별, 발효시간대별 분비되는 또는 포함하는 단백질의 발현량 차이를 분석하는 것은 원만하게 진행되었다. 1D dendrogram에서 예상했던 바와 동일한 결과를 보였으며 관심 spot 들의 발현차를 확인하였다. 가수처리비율 20%는 발효단계 전반적으로 단백질의 종류와 양이 적었으며 이는 보리/녹두/통밀을 이용한 발효의 경우 가수처리 20%가 적합하지 않은 조건임을 알 수 있었으며 30% 가수처리의 경우는 발효초기 0-3일에 생성된 단백질의 양이 다른 조건에 비해 급격히 낮았으므로

발효초기 가수비율 30%도 적합하지 않은 조건인 것으로 판단된다. 그러나 발효 중반, 후반으로 갈수록 가수비율 30% 처리의 경우 가장 풍부한 발효관련 단백질이 생성되는 것으로 관찰되었다(Fig. 34).

전통누룩 D 발효 전 시료(0일)와 비교분석할 경우 **발효초기(3일)** 가수비율과 무관하게 급격히 발효관련 단백질의 수가 급증하였으며 이 중 가수분해 26% 때가 가장 풍부하게 생성되는 것으로 관찰되었다. 상대적으로 가수분해 30%는 발효중반(0-6일)까지 타 조건에 비하여 관찰되는 단백질의 생성량이 저조한 편이었다. 보리/누룩으로 제조하는 누룩의 경우도 누룩 C와 유사하게 가수분해 26% 처리가 가장 적합한 것으로 사료된다. 전통누룩 C에 비하여 발효단계별 변화하는 단백질의 량과 수의 변화 빈도는 낮은 것으로 나타났다(Fig. 35). 위의 결과들은 발효가 진행됨에 따라 발효미생물에 의해 새로운 단백질이 증가함을 의미하며 급격히 증가하는 시기와 미생물분포도와 비교하면 더 흥미로운 결과를 도출할 수 있을 것이라 사료된다.

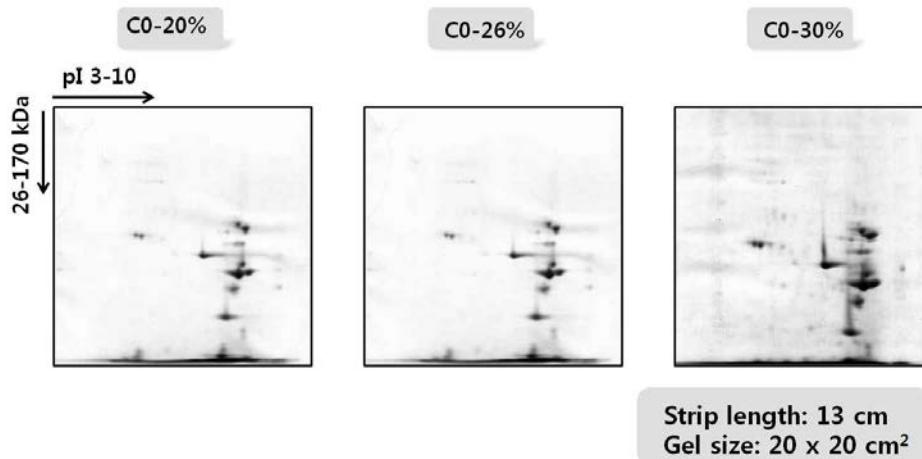


Fig. 31. 2D-PAGE gel images of nuruk C (classified by water contents, 20%, 26%, 30%)

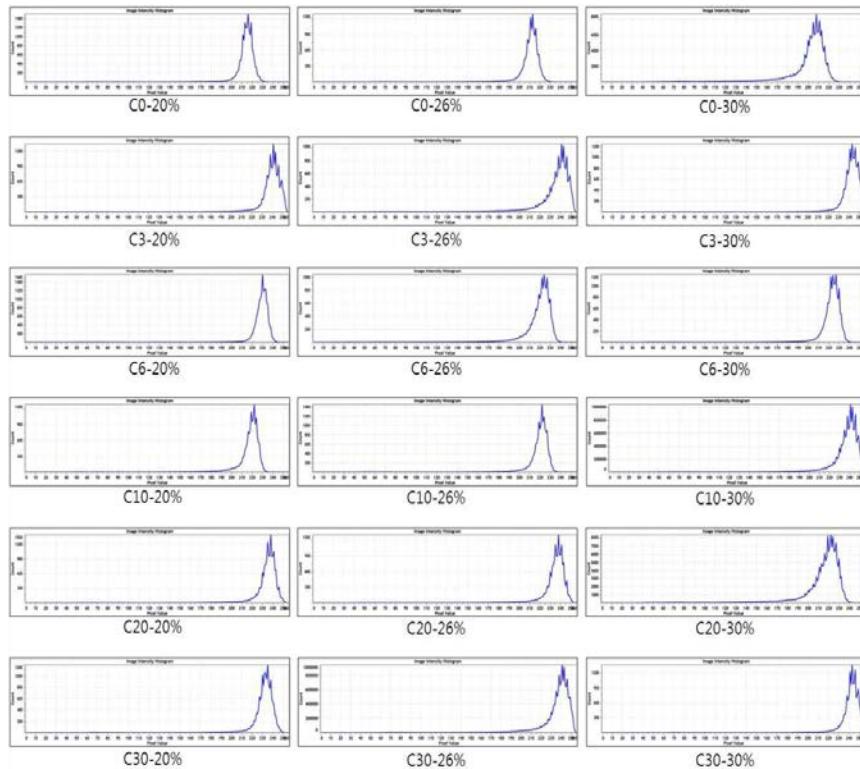


Fig. 32. Intensity value of each 2D-PAGE gel image of nuruk C to confirm quality of spots

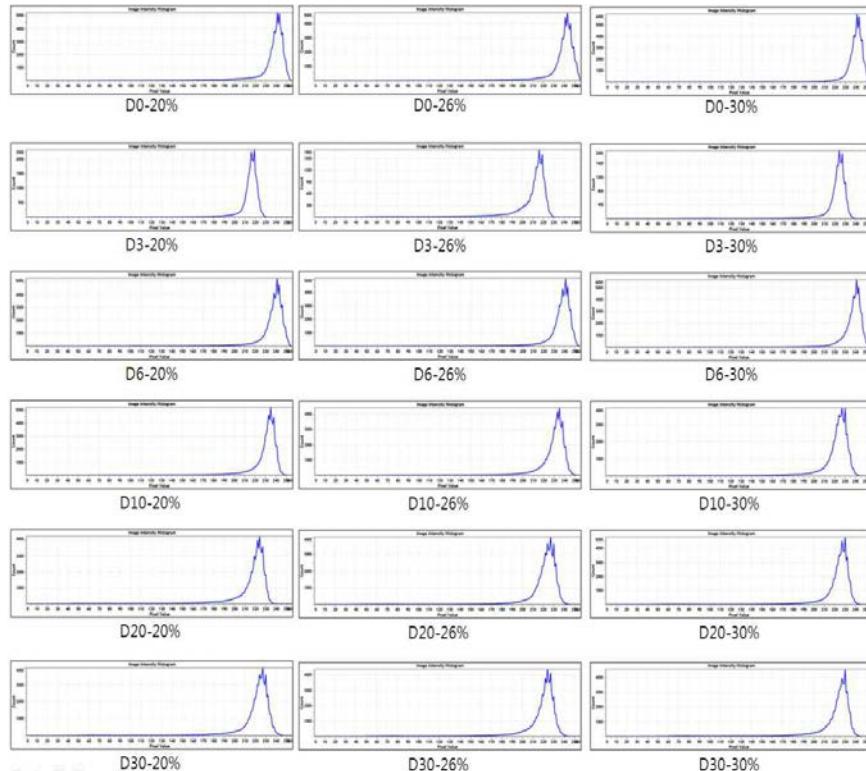


Fig. 33. Intensity value of each 2D-PAGE gel image of nuruk D to confirm quality of spots

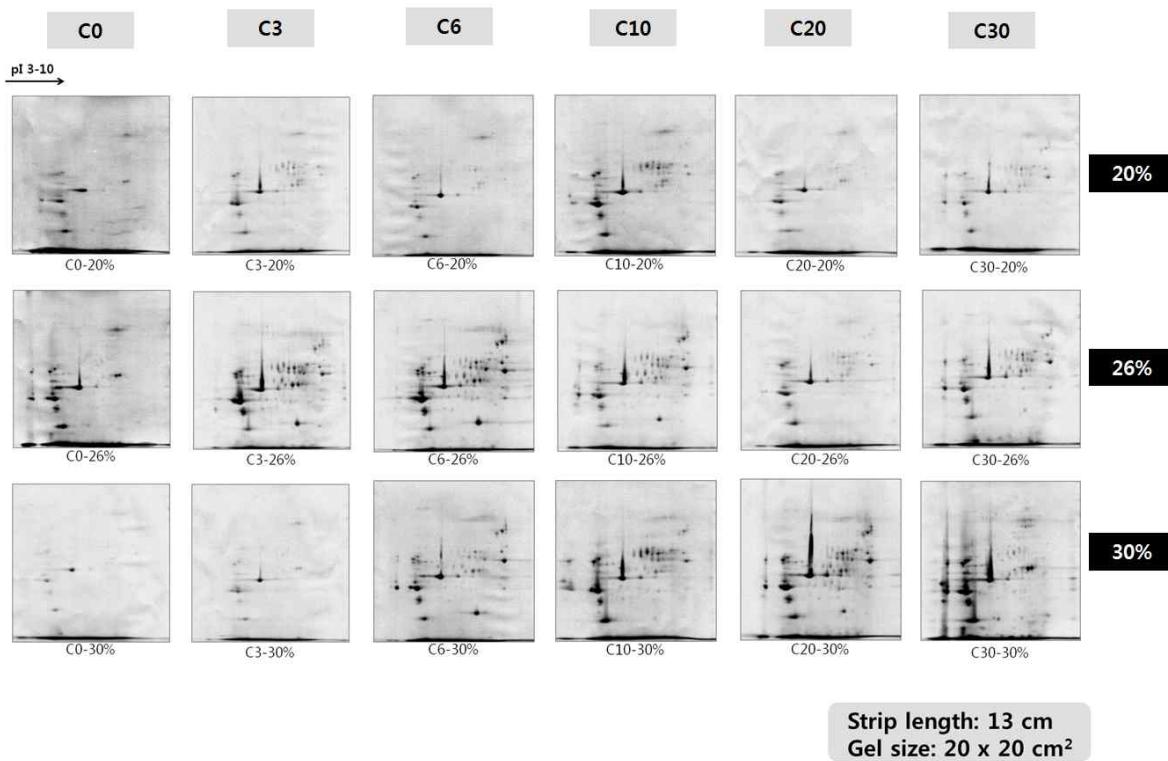


Fig. 34. 2D-PAGE gel images of nuruk C (classified by water content 20%, 26%, 30% ; fermentation time 0, 3, 6, 10, 20, 30 days)

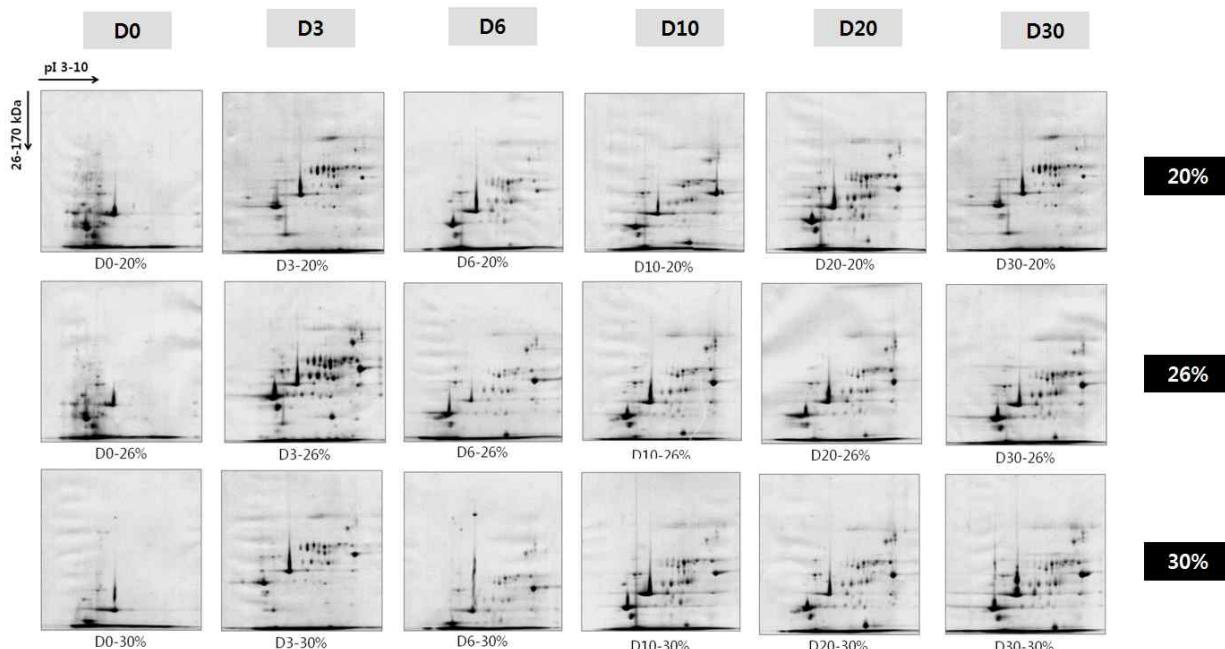


Fig. 35. 2D-PAGE gel images of nuruk D (classified by water content 20%, 26%, 30% ; fermentation time 0, 3, 6, 10, 20, 30 days)

### (3) 3차년도 전통누룩 배양온도별 누룩단백질 2D-PAGE 수행

2D layout 확립을 위하여 1차적으로 전통누룩 E와 F의 발효온도별 30, 40°C, 발효기간별(0, 3, 6, 10, 20, 30일) 시료들의 단백질을 이용하여 2D layout 조건을 성공적으로 확립하였으며 Fig. 36에 나타내었다. 분석결과 시료당 약 100-200개 정도의 단백질 spots이 관찰되었다. 누룩제조 온도별, 발효시간대별 발현의 차이를 보이는 단백질이 존재할 것이라 조사된 1D-PAGE 결과를 토대로 동일한 각각의 누룩단백질을 이용하여 모든 시료별 2D-PAGE를 수행하였으며, 누룩E 6개 시료의 2D-gels(Fig. 38)과 누룩F 6개 시료의 2D-gels(Fig. 39) 결과를 확보하였다. Fig. 37은 각 2D-PAGE의 spot intensity를 나타내며 이 결과를 통해 수행한 2D-PAGE 결과의 신뢰성 여부를 결정할 수 있는 분석이다. 수행된 모든 2D 실험결과를 후속 비교분석 작업에 활용할 수 있음을 확인하였다.

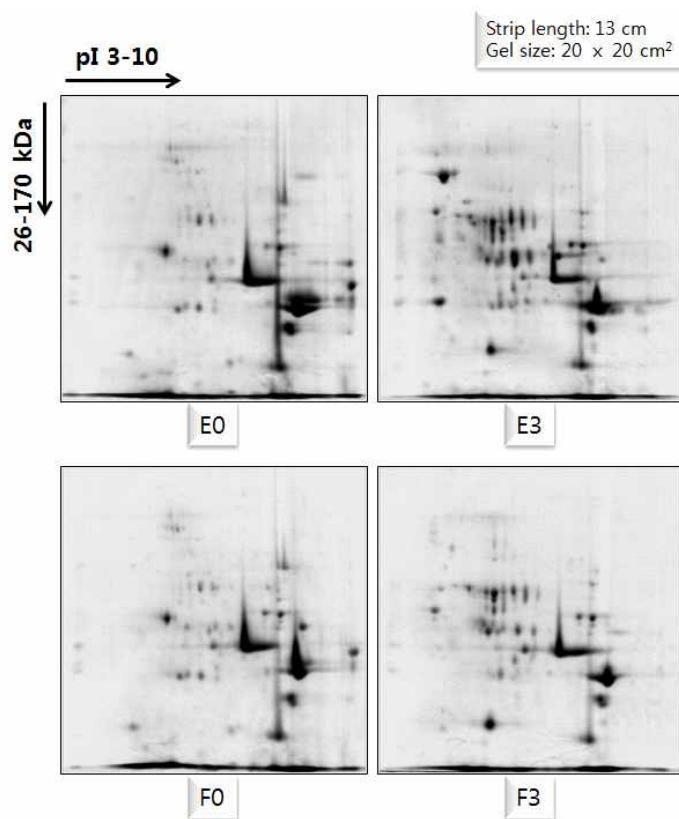
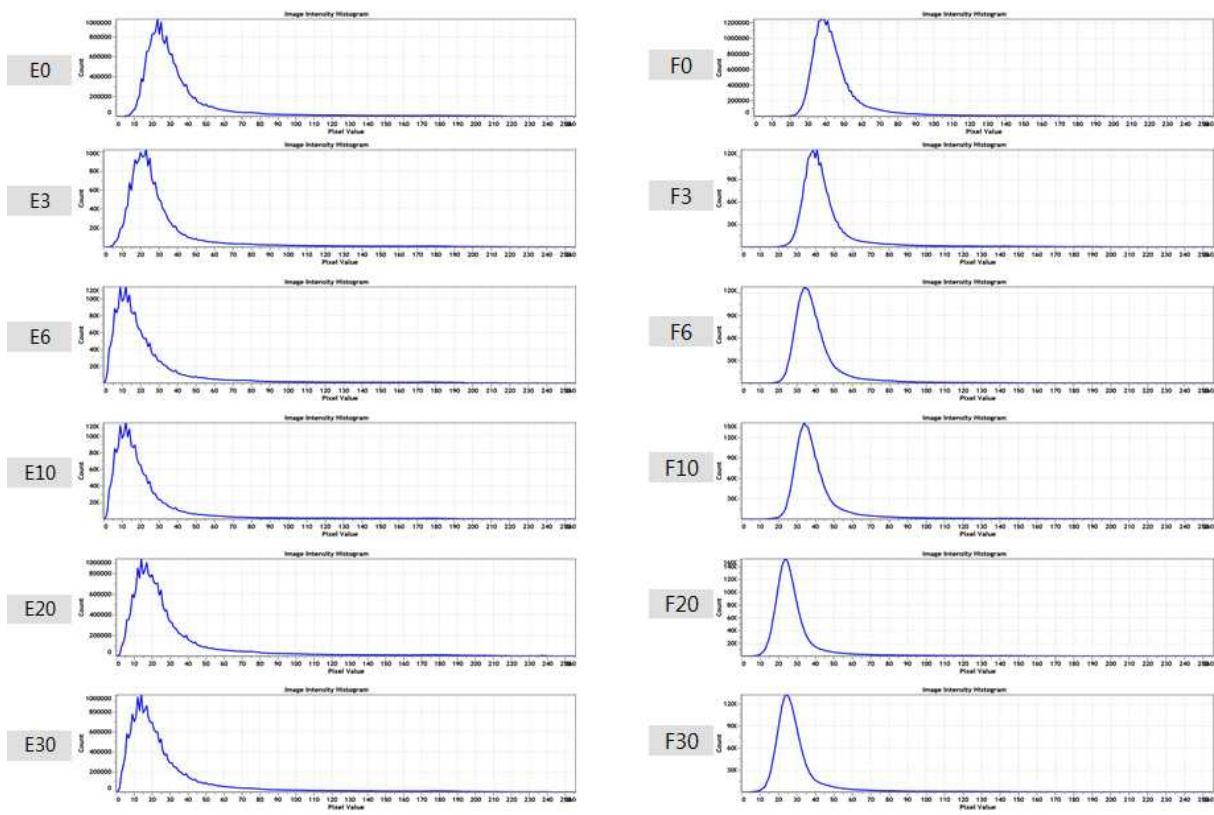
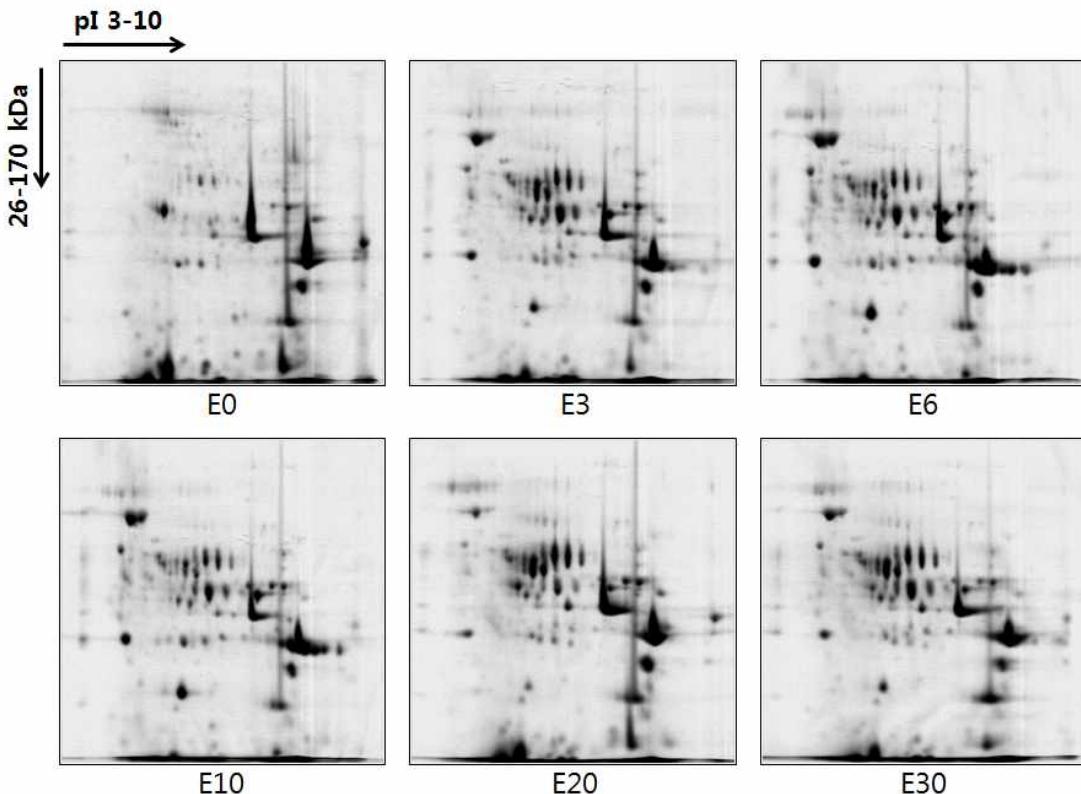


Fig. 36. 2D-PAGE gel images of nuruk E (0, 3 D), F (0, 3 D)



**Fig. 37. Intensity value of each 2D-PAGE gel image of nuruk E,F to confirm quality of spots**

전통누룩 발효온도 30°C에서 발효시간별(E0, E3, E6, E10, E20, E30) 단백질의 발현양상을 비교하기 위한 전체 시료들의 2D-PAGE의 결과는 Fig. 38에 나타내었다. 전통누룩 E 발효 전 시료(0일)와 비교분석하였을 때 1D dendrogram에서 보았던 결과와 동일하게 발효초기(3일)부터 급격히 단백질의 수가 급증하였으며 특히 낮은 PI값에서 새로운 종류의 단백질이 다량 관찰되었으며 습도 70%인 발효초기 E3보다 습도 50%인 조절 후 E6에서 spot의 density가 약간 높아진 것이 확인되었다. 또한 발효중기(10일) 이후 발효관련 단백질의 종류 및 density가 미비하게 줄어든 것을 확인하였고 발효 6일 째와 발효 10일째에는 큰 차이가 없었으며 이 시기에 가장 많은 단백질들이 생성되는 것을 확인하였다.



**Fig. 38. 2D-PAGE gel images of proteins from fermented Nuruk E (0,3,6,10,20,30 D)**

전통누룩 발효온도 40°C에서, 발효시간별(F0, F3, F6, F10, F20, F30) 단백질의 발현양상을 비교하기 위한 전체 시료들의 2D-PAGE의 결과는 Fig. 34에 나타내었다. 전체적인 시간대별 양상은 전통누룩 E와 마찬가지로 발효 전 시료(0일)와 발효초기(3일)를 비교분석 하였을 때 단백질의 수가 급격히 많은 종류로 관찰되었으며 발효중기(10일) 이후에 단백질 종류와 density가 서서히 감소되는 것으로 확인하였다. 또한 습도 누룩E와 같은 양상으로 70%인 발효초기 E3보다 습도 50%인 조절 후 E6에서 spot의 density가 약간 높아진 것이 확인되었다. 이러한 결과로 단백질의 종류가 급격히 증가하는 시기와 미생물분포도를 비교분석 하면 더 흥미로운 결과를 도출할 수 있을 것이라 사료된다.

전통누룩 E와 전통누룩 F를 비교하였을 때 발효온도 40°C인 누룩F 샘플보다 발효온도 30°C인 누룩E에서 더 많은 종류의 단백질 spot이 관찰되었고 발효초기(3일)부터 발효후기(30일)까지 단백질의 종류 및 density 변화의 폭이 더 크게 나타났으며 이러한 결과는 전통누룩 F의 조건인 온도 40°C보다 전통누룩 E의 조건인 온도 30°C에서 발효에 관여하는 유용단백질이 더 많이 존재 할 것이라고 예측되어진다.

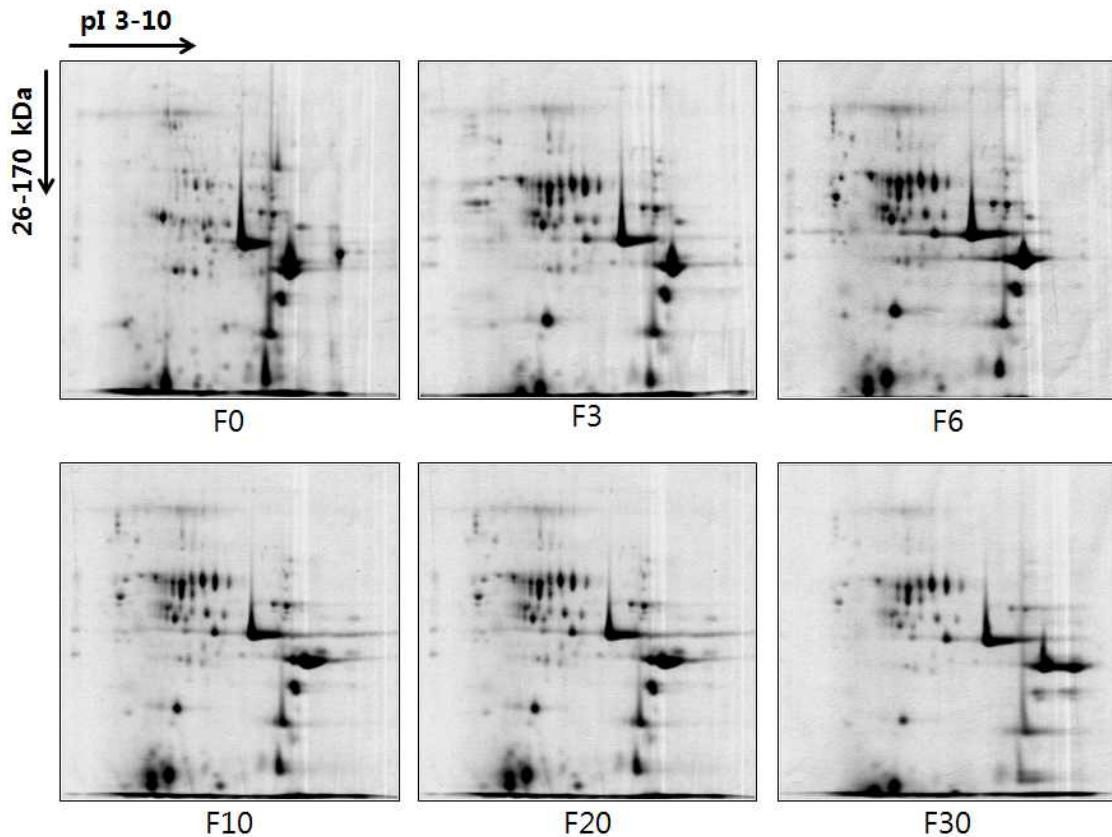


Fig. 39. 2D-PAGE gel images of proteins from fermented Nuruk F (0,3,6,10,20,30 D)

### 3) 전통누룩발효 중 조건별 변화하는 단백질 연구

#### (1) 1차년도 전통누룩 발효시간대별 변화하는 단백질 연구

1차 작업에서 발현차 3배 이상의 단백질 spot 10개를 선발한 후 Q-TOF을 통해 단백질의 mass를 측정하여 단백질의 일부 아미노산 서열 분석 확보하고 NCBI genbank database를 활용한 mass data 매칭 원리로 동정을 하는 Mascot 분석결과 일치하는 아미노산 서열 검색에 나타나지 않았다 (Fig. 40, 41). 이유는 현재 작업된 단백질의 양과 순도 저하가 원인이기보다는 선발한 단백질과 100% 일치하는 단백질 database가 genbank에 없기 때문일 것으로 사료되었다.

1차 작업의 문제점을 해결하기 위하여 지금까지 수행된 모든 누룩시료의 단백질을 모두 재분리 하였으며 2D-PAGE 또한 3반복으로 다시 모두 수행하였다. 확보된 모든 시료에서 관심있는 20개의 spots의 분석하였으며 그 이외에 크기와 density가 낮았던 단백질 spots 모두 7개 이상의 반복 spot의 gel 조각을 회수하였고 이 샘플들을 직접 in gel digestion 한 후 MALDI-TOF분석을 진행하였다. 또한 delta 2D를 이용하여 전체 단백질들의 발현변화를 profiling하기 위하여 분석을 실시하였다. 1차 작업의 10개 보다 현저히 증가한 spots 20개를 분석한 결과 15개의 단백질 spot의 MALDI-TOF 분석 결과를 확보하였다(Fig. 43). 확보된 단백질의 일부 아미노산 서열을 이용하여

NCBI/fungi/bacteria/plant genbank database를 활용한 mass data 매칭 원리로 동정을 하는 Mascot 분석결과를 Fig. 44, 45, 46, 47, 48, 49에 나타내었고 Table. 1에 정리하였다. 또한 delta 2D를 이용하여 전체 단백질들의 발현변화를 profiling하기 위하여 분석하였다.

발효미생물에 의해 분비되는 대표 당분해효소 **alpha-amylase**의 한 종류가 발효 3일째까지 단백질이 거의 생성되지 않다가 이후 발효시간이 진행됨에 따라 전통누룩 A, B 모두에서 발현량이 증가하였다. 2종류의 **amylase inhibitor** 단백질이 발효과정 중 생성이 되어 발효과정 중 amlyase 효소 생성량 조절에 관여하는 것으로 추정되었다. 추가적으로 물질대사에 관여하는 L-alanine exporter, phosphotransferase, glutathione S-transferase, enoyl-CoA hydratase/isomerase, glucose-1-dehydrogenase, 3-dehydroshikimate dehydratase, ribulose biphosphate carboxylase, alpha-galactosidase, lytic transglycosylase, haloacid dehalogenase, glucose-6-phosphate-1-dehydrogenase, lipopolysaccharide core heptose kinase, tryptophan dimethylallyl transferase, mannitol-1-phosphate-5-dehydrogenase, pyruvate oxidase, maltose O-acetyltransferase, copper amine oxidase homolog 단백질들이 발효과정 중 발현량에 변화를 보이며 전통누룩 제조과정의 온도 또한 발현량에 영향을 주는 것으로 관찰되었다(Fig. 47, 48).

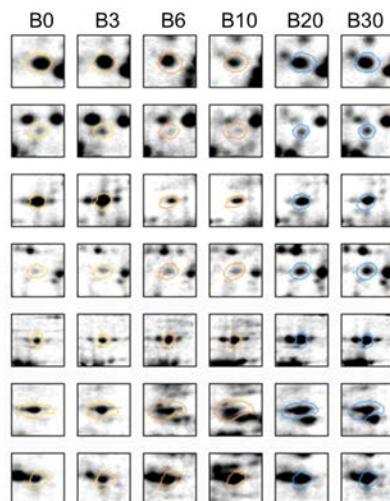


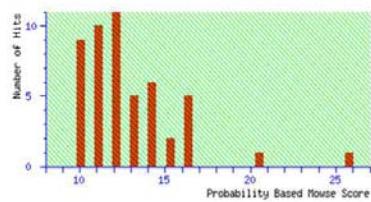
Fig. 40. Comparison of spot density of nuruk B from 2D-PAGE gel

## (MATRIX) (SCIENCE) Mascot Search Results

User : yjchong

### Probability Based Mowse Score

Ions score is  $-10 \times \log(P)$ , where P is the probability that the observed match is a random event.  
Individual ions scores > 40 indicate identity or extensive homology ( $p < 0.05$ ).  
Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



### Peptide Summary Report

Format As Peptide Summary Help

Significance threshold  $p < 0.05$  Max. number of hits AUTO

Standard scoring  MudPIT scoring  Ions score cut-off 0 Show sub-sets

Show pop-ups  Suppress pop-ups  Sort unassigned Decreasing Score  Require bold red

Select All Select None Search Selected Error tolerant Archive Report

No significant hits to report

Fig. 41. Failed Mascot data of a purified protein from 2D-PAGE

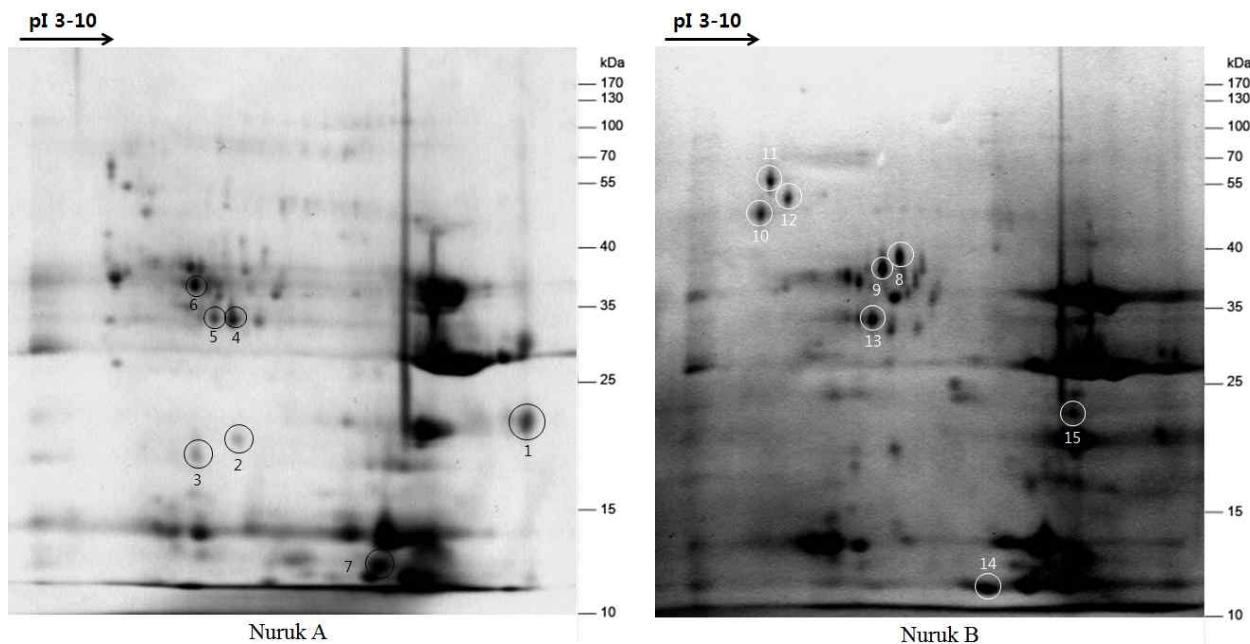


Fig. 42. 누룩A와 누룩B의 단백질체학 수행 후 발현차를 보이는 spot의 분석

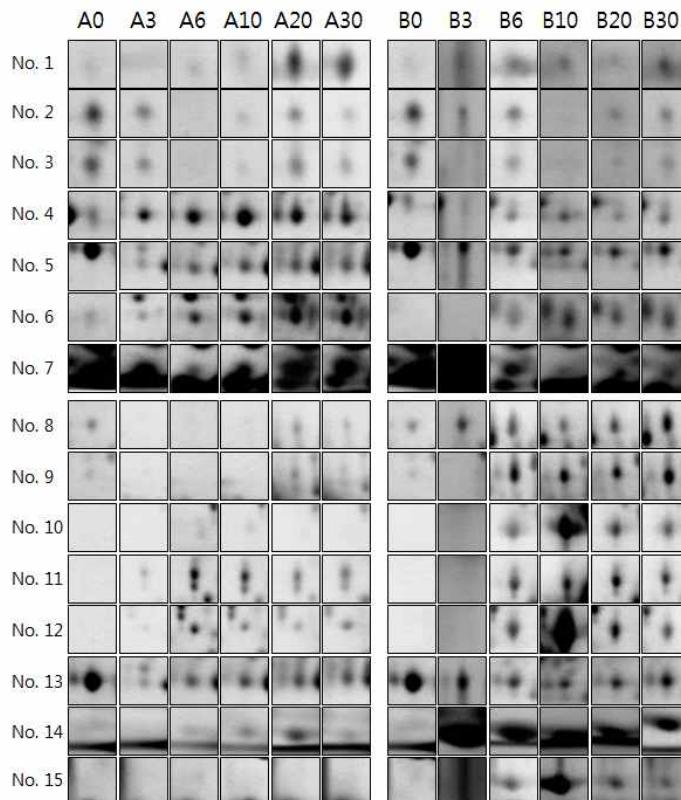


Fig. 43. 누룩A와 누룩B의 발효시간별 단백질 발현의 차이를 보이는 후보군 분석

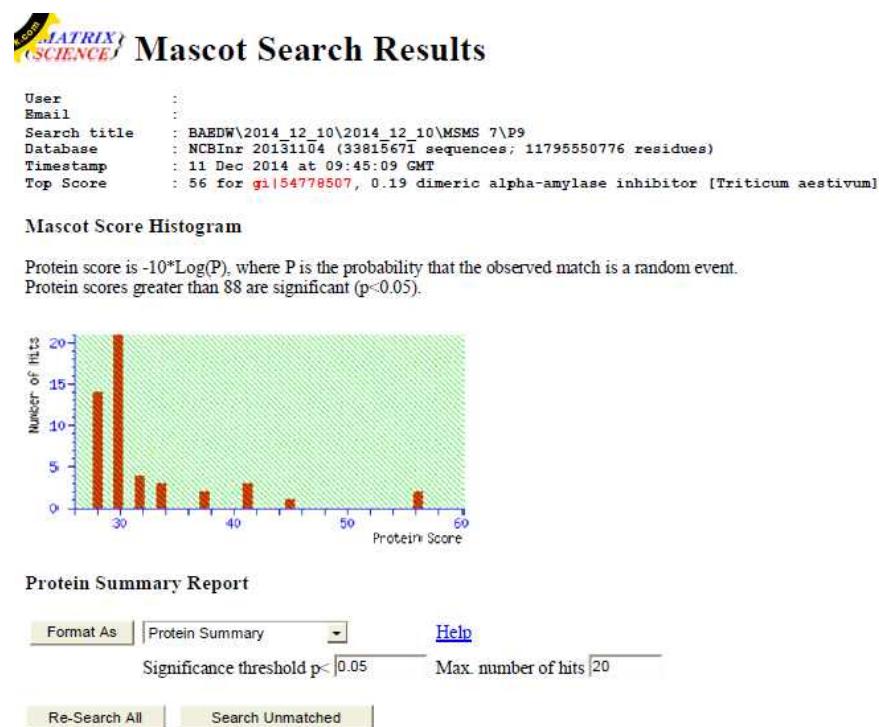


Fig. 44. 2D-PAGE에서 분리한 대표 spot No.7의 Mascot data

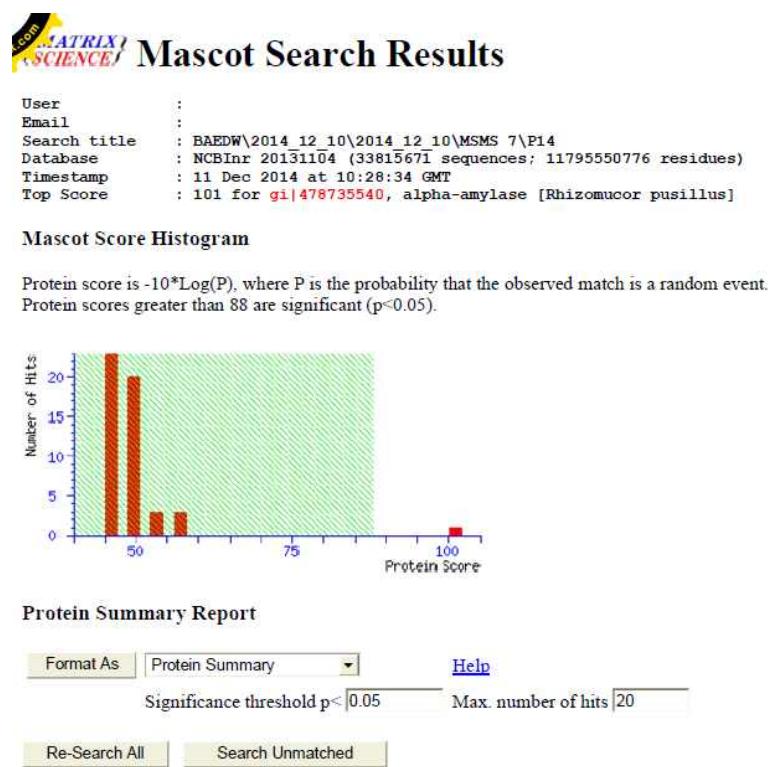


Fig. 45 2D-PAGE에서 분리한 대표 spot No.12의 Mascot data

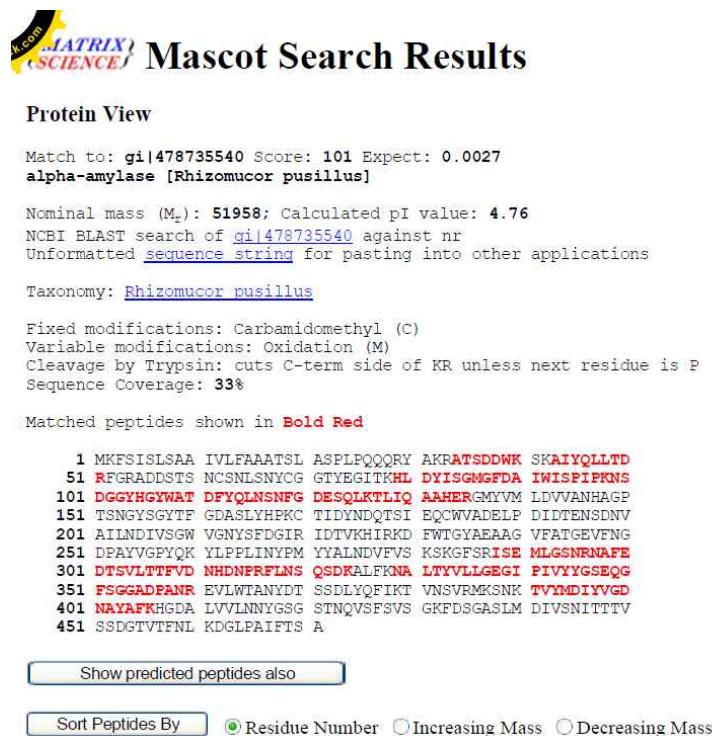


Fig. 46. 2D-PAGE에서 분리한 대표 spot No. 12의 Mascot 아미노산 matching data

	Accession	Mass	Score	Description
No. 1	1. <a href="#">gi 108706207</a>	6342	29	hypothetical protein LOC_Os03g05580 [Oryza sativa Japonica Group]
	2. <a href="#">gi 489595040</a>	17064	28	hypothetical protein [Clostridium symbiosum]
	3. <a href="#">gi 544617719</a>	6777	28	hypothetical protein [Haloquadratum valsyi]
	4. <a href="#">gi 198638636</a>	13898	28	hypothetical protein [Saccharomonospora halophila]
	5. <a href="#">gi 168060455</a>	7563	28	predicted protein [Physcomitrella patens subsp. patens]
	6. <a href="#">gi 523693457</a>	5062	28	hypothetical protein [Agrobacterium tumefaciens]
	7. <a href="#">gi 402590451</a>	5303	27	hypothetical protein WUBQ_04709 [Wuchereria bancrofti]
	8. <a href="#">gi 1163839261</a>	18805	27	HNH endonuclease [Renibacterium salmoninarum ATCC 33209]
	9. <a href="#">gi 496675546</a>	6552	27	hypothetical protein [Tannerella]
	10. <a href="#">gi 159462568</a>	18438	26	predicted protein [Chlamydomonas reinhardtii]
	Accession	Mass	Score	Description
No. 2	1. <a href="#">gi 550326955</a>	9869	59	hypothetical protein POPTR_0012s12140q [Populus trichocarpa]
	2. <a href="#">gi 224104941</a>	9926	47	predicted protein [Populus trichocarpa]
	3. <a href="#">gi 531865958</a>	8986	45	hypothetical protein OCS_01470 [Ophiocordyceps sinensis CO18]
	4. <a href="#">gi 548211770</a>	17342	43	putative uncharacterized protein [Eubacterium sp. CGG:381]
	5. <a href="#">gi 493870036</a>	8975	38	preprotein translocase subunit TatA [Yokenella regensburgei]
	6. <a href="#">gi 333919363</a>	9845	38	XRE family transcriptional regulator [Amycolicicoccus subflavus DQ83-9A1]
	7. <a href="#">gi 494112638</a>	18737	36	hypothetical protein [Bifidobacterium longum]
	8. <a href="#">gi 489856419</a>	18500	34	ATP-dependent metalloprotease FtsH [Neisseria sicca]
	9. <a href="#">gi 487835261</a>	3753	34	transposase [Vibrio cholerae]
	10. <a href="#">gi 293356676</a>	7178	33	PREDICTED: metallothionein-2-like [Rattus norvegicus]
	Accession	Mass	Score	Description
No. 3	1. <a href="#">gi 113477633</a>	12426	24	HmIR family transcriptional regulator [Trichodesmium erythraeum IMS101]
	2. <a href="#">gi 125561658</a>	23671	20	hypothetical protein Ost_2925t [Oryza sativa Indica Group]
	3. <a href="#">gi 75133829</a>	23685	20	RecName: Full=Zinc finger A20 and AN1 domain-containing stress-associated protein 12; Short=0
	4. <a href="#">gi 149031298</a>	1644	18	rCGS9942 [Rattus norvegicus]
	5. <a href="#">gi 12126211</a>	2348	17	hypothetical protein 2 - <i>Versinia pseudotuberculosis</i> (fragment)
	6. <a href="#">gi 497565752</a>	2071	17	30S ribosomal protein S3, partial [Bacillus anthracis]
	7. <a href="#">gi 497821136</a>	3223	16	hypothetical protein [candidate division TM7 single-cell isolate TM7a]
	8. <a href="#">gi 386628926</a>	2133	16	hypothetical protein i02_1444 [Escherichia coli str. 'clone D 12']
	9. <a href="#">gi 521988515</a>	2366	16	hypothetical protein [Scissicella marina]
	10. <a href="#">gi 518712454</a>	2355	16	hypothetical protein [Sporichthys polymorpha]
	Accession	Mass	Score	Description
No. 4	1. <a href="#">gi 12649728</a>	17022	38	membrane protein [Enterobacter sp. R4-368]
	2. <a href="#">gi 493476646</a>	9074	34	hypothetical protein [Natrinema versiforme]
	3. <a href="#">gi 492516007</a>	4199	30	hypothetical protein, partial [Actinomycetes georgiae]
	4. <a href="#">gi 497856612</a>	5462	29	hypothetical protein [Bacillus coahuilensis]
	5. <a href="#">gi 496092460</a>	8613	28	hypothetical protein [Erysipelotrichaceae bacterium 6_1_45]
	6. <a href="#">gi 340794931</a>	12856	28	QoR DNA-binding transcription regulator [Corynebacterium variabile DSM 44702]
	7. <a href="#">gi 77549297</a>	10881	28	hypothetical protein LOC_Os11g1310 [Oryza sativa Japonica Group]
	8. <a href="#">gi 490408334</a>	5782	27	predicted protein [Acinetobacter lwoffii]
	9. <a href="#">gi 496450129</a>	6475	27	DNA gyrase inhibitor VacG [Thallassicibium sp. R2A62]
	10. <a href="#">gi 257791884</a>	7416	27	hypothetical protein Elen_2130 [Eggerthella lenta DSG 2249]
	Accession	Mass	Score	Description
No. 5	1. <a href="#">gi 496874735</a>	6066	49	conserved domain protein [Actinomycetes sp. oral taxon 171]
	2. <a href="#">gi 471261328</a>	15305	35	hypothetical protein A11Q_356 [Edelvibrio exovorus JSS]
	3. <a href="#">gi 538380998</a>	13151	34	hypothetical protein SIR_1714 [Streptococcus intermedius BI86]
	4. <a href="#">gi 171907210</a>	16579	34	hypothetical protein Zeta_1578 [Dechloromonas aromatica RCB]
	5. <a href="#">gi 1292487184</a>	3690	34	hypothetical protein ZMY_0690 [Erwinia amylovora CFBP1430]
	6. <a href="#">gi 1194276831</a>	26238	33	gag protein [Human immunodeficiency virus 1]
	7. <a href="#">gi 149058080</a>	8910	33	hypothetical protein [Xanthomonas vasiconsula]
	8. <a href="#">gi 1223588292</a>	30039	32	gag protein [Human immunodeficiency virus 1]
	9. <a href="#">gi 187242076</a>	30005	32	gag protein [Human immunodeficiency virus 1]
	10. <a href="#">gi 187242112</a>	30491	32	gag protein [Human immunodeficiency virus 1]
	Accession	Mass	Score	Description
No. 6	1. <a href="#">gi 475584530</a>	20742	54	hypothetical protein F775_22491 [Regilops tauschii]
	2. <a href="#">gi 498146994</a>	9571	47	hypothetical protein [Acidovorax radicis]
	3. <a href="#">gi 483506499</a>	35818	46	hypothetical protein Anapl_10862 [Anas platyrhynchos]
	4. <a href="#">gi 402083753</a>	10465	46	hypothetical protein GG7G_E2889 [Geummannomyces graminis var. tritici Rd-11la-1]
	5. <a href="#">gi 495205680</a>	5475	45	hypothetical protein [Pelosinus]
	6. <a href="#">gi 495228014</a>	5475	45	hypothetical protein [Pelosinus fermentans]
	7. <a href="#">gi 49775842</a>	40921	45	3'-phenylpropionate lyase [Burkholderia ubonensis]
	8. <a href="#">gi 1393909595</a>	37174	45	beta-lactamase [Leu leu]
	9. <a href="#">gi 497693345</a>	11934	44	probable RNA polymerase sigma-E factor protein (sigma-24), ECF family, partial [Rhinobium e
	10. <a href="#">gi 482807940</a>	41283	44	hypothetical protein SETTUPRAFT_197029 [Setosphaeria turcica Et28A]
	Accession	Mass	Score	Description
No. 7	1. <a href="#">gi 54778507</a>	13815	56	0.19 dimeric alpha-amylase inhibitor [Triticum aestivum]
	2. <a href="#">gi 54778511</a>	13757	56	0.19 dimeric alpha-amylase inhibitor [Triticum aestivum]
	3. <a href="#">gi 114215762</a>	13743	44	dimeric alpha-amylase inhibitor [Triticum dicoccoides]
	4. <a href="#">gi 65993852</a>	16558	41	dimeric alpha-amylase inhibitor [Triticum aestivum]
	5. <a href="#">gi 65993807</a>	15888	41	dimeric alpha-amylase inhibitor [Triticum aestivum]
	6. <a href="#">gi 65993941</a>	15631	41	dimeric alpha-amylase inhibitor [Triticum aestivum]
	7. <a href="#">gi 517571608</a>	5244	38	hypothetical protein [Salinispora pacifica]
	8. <a href="#">gi 497273595</a>	5186	37	hypothetical protein [Clostridium sp. HGF2]
	9. <a href="#">gi 169609110</a>	4597	33	hypothetical protein SNOG_07640 [Phaeosphaeria nodorum SN16]
	10. <a href="#">gi 4456604</a>	13738	33	immunoglobulin heavy chain variable region [Homo sapiens]

Fig. 47. MALDI-TOF 결과 확보된 단백질 절편의 아미노산 서열 및 그 정보를 활용한 MATSCOT 결과리스트(spot 1-7)

No.	Accession	Mass	Score	Description
No. 8	1. <a href="#">gi 544631673</a>	15746	33	hypothetical protein [ <i>Exiguobacterium pavilionensis</i> ]
	2. <a href="#">gi 32477374</a>	5052	33	hypothetical protein RB12196 [ <i>Rhodopirellula baltica</i> SH 1]
	3. <a href="#">gi 228811</a>	11236	32	propiomelanocortin N-terminal part
	4. <a href="#">gi 424706943</a>	11760	32	paratrin family [ <i>Streptomyces coelicoflavus</i> ]
	5. <a href="#">gi 489363895</a>	5061	31	hypothetical protein [ <i>Bacillus thuringiensis</i> ]
	6. <a href="#">gi 545423450</a>	6754	30	hypothetical protein [ <i>Porphyromonas gingivalis</i> ]
	7. <a href="#">gi 544715889</a>	5065	30	hypothetical protein [ <i>Streptococcus</i> sp. MS1852]
	8. <a href="#">gi 497550092</a>	11210	29	COG0718: Uncharacterized protein conserved in bacteria [ <i>Magnetospirillum magnetotacticum</i> ]
	9. <a href="#">gi 163851287</a>	11296	29	hypothetical protein MexT_1860 [ <i>Methylobacterium extorquens</i> PAL]
	10. <a href="#">gi 240138440</a>	11269	29	hypothetical protein MexAM1_METAlp1792 [ <i>Methylobacterium extorquens</i> AM1]
No. 9	Accession	Mass	Score	Description
	1. <a href="#">gi 495367121</a>	41821	55	putative maltose ABC transporter ATP-binding protein [ <i>Haloferax prahovense</i> ]
	2. <a href="#">gi 486058055</a>	18215	52	hypothetical protein [ <i>Bacillus cereus</i> ]
	3. <a href="#">gi 1544715889</a>	50265	50	hypothetical protein [ <i>Streptococcus</i> sp. MS1852]
	4. <a href="#">gi 511000767</a>	29416	49	hypothetical protein HMREF1544_10962 [ <i>Nucor circinelloides</i> f. <i>circinelloides</i> 1006PhL]
	5. <a href="#">gi 389652762</a>	4149	42	hypothetical protein SSUST1_1987 [ <i>Streptococcus suis</i> ST1]
	6. <a href="#">gi 498146994</a>	9871	47	hypothetical protein [Aridovorax radicis]
	7. <a href="#">gi 495954468</a>	20179	46	topology modulation protein [ <i>Clostridium</i> sp. 7_2_49FAR]
	8. <a href="#">gi 149028855</a>	10711	46	general transcription factor IIa 2, isoform CRA_b [ <i>Watson norvegicus</i> ]
	9. <a href="#">gi 494630363</a>	21217	46	transcriptional regulator [ <i>Streptomyces coelicoflavus</i> ]
No. 10	10. <a href="#">gi 300423385</a>	13871	45	putative halocaid dehalogenase, group II [uncultured bacterium]
	Accession	Mass	Score	Description
	1. <a href="#">gi 490913323</a>	4553	30	hypothetical protein [ <i>Lepospira kirschneri</i> ]
	2. <a href="#">gi 488888946</a>	7575	27	hypothetical protein [ <i>Microcystis aeruginosa</i> ]
	3. <a href="#">gi 1514909340</a>	4825	27	hypothetical protein [ <i>Enterococcus faecalis</i> ]
	4. <a href="#">gi 551583271</a>	16576	26	hypothetical protein EMHMDRAFT_435422, partial [ <i>Emiliania huxleyi</i> CCMP1516]
	5. <a href="#">gi 447040308</a>	8925	24	hypothetical protein [ <i>Escherichia coli</i> ]
	6. <a href="#">gi 495812251</a>	9258	24	organic hydroperoxide resistance protein, partial [ <i>Phizobium</i> sp. PopS]
	7. <a href="#">gi 511823846</a>	9231	24	major outer membrane lipoprotein [ <i>Agarivorans albus</i> ]
	8. <a href="#">gi 495891109</a>	8153	24	hypothetical protein [ <i>Yostella marina</i> ]
	9. <a href="#">gi 410991768</a>	21478	24	[FeFe]-hydrogenase, partial [uncultured bacterium]
No. 11	10. <a href="#">gi 494722120</a>	7056	24	hypothetical protein [ <i>Microomonospora lupini</i> ]
	Accession	Mass	Score	Description
	1. <a href="#">gi 446757711</a>	4577	21	hypothetical protein [ <i>Leptospira interrogans</i> ]
	2. <a href="#">gi 312079637</a>	6816	20	hypothetical protein LOAG_06678 [ <i>Loa loa</i> ]
	3. <a href="#">gi 488484060</a>	4369	20	hypothetical protein [ <i>Propionibacterium acnes</i> ]
	4. <a href="#">gi 446821476</a>	7206	20	Hypothetical protein [ <i>Leptospira interrogans</i> ]
	5. <a href="#">gi 446821476</a>	7145	20	hypothetical protein [ <i>Leptospira interrogans</i> ]
	6. <a href="#">gi 446821477</a>	7201	20	hypothetical protein [ <i>Leptospira interrogans</i> ]
	7. <a href="#">gi 406909694</a>	7175	20	hypothetical protein ACD_68C0020G0003 [uncultured bacterium]
	8. <a href="#">gi 156033177</a>	6982	20	predicted protein [ <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> 1980]
	9. <a href="#">gi 225621862</a>	7542	20	hypothetical protein BSV1_G28 [ <i>Borrelia</i> sp. SV1]
No. 12	10. <a href="#">gi 545337538</a>	6269	20	hypothetical protein [ <i>Actinomyces johnsonii</i> ]
	Accession	Mass	Score	Description
	1. <a href="#">gi 478735540</a>	51955	101	alpha-amylase [ <i>Rhizomucor pusillus</i> ]
	2. <a href="#">gi 193386718</a>	52579	57	Coh-transferase [ <i>Rhodococcus opacus</i> ]
	3. <a href="#">gi 545438484</a>	4961	56	hypothetical protein [Peptostreptococcaceae bacterium oral taxon 113]
	4. <a href="#">gi 13933621</a>	21674	56	hypothetical protein ZEMOMB72_228808 [ <i>Zea mays</i> ]
	5. <a href="#">gi 547921135</a>	21615	55	ABC transporter transmembrane region [ <i>Ruminococcus</i> sp. CAG:382]
	6. <a href="#">gi 343470244</a>	25909	52	unnamed protein product [ <i>Trypanosoma congoense</i> IL3000]
	7. <a href="#">gi 496509282</a>	21223	52	lipid hydroperoxide peroxidase [ <i>Bacteroidetes</i> oral taxon 274]
	8. <a href="#">gi 496864916</a>	9249	51	preprotein endopeptidase subunit TatA [ <i>Capnocytophaga</i> sp. oral taxon 929]
	9. <a href="#">gi 168983523</a>	26168	50	hypothetical protein [ <i>Thiobacillus libiobrio</i> ]
No. 13	10. <a href="#">gi 518401671</a>	26172	50	hypothetical protein [ <i>Thiobacillus libiobrio</i> sp. ALMg9]
	Accession	Mass	Score	Description
	1. <a href="#">gi 68062408</a>	4453	28	hypothetical protein [ <i>Plasmodium berghei</i> strain ANKA]
	2. <a href="#">gi 1518410281</a>	5251	27	hypothetical protein [ <i>Pseudomonas mandelii</i> ]
	3. <a href="#">gi 1517757307</a>	5309	27	hypothetical protein [ <i>Pseudomonas</i> ]
	4. <a href="#">gi 1518479960</a>	5279	27	hypothetical protein [ <i>Pseudomonas</i> sp. 45MFC013.1]
	5. <a href="#">gi 4227719167</a>	13000	26	HxLR family transcriptional regulator [ <i>Calothrix</i> sp. PCC 7507]
	6. <a href="#">gi 549055527</a>	4985	26	Protein of unknown function [ <i>Pyronema omphalodes</i> CBS 100304]
	7. <a href="#">gi 1490101681</a>	4271	25	hypothetical protein [ <i>Streptomyces viridochromogenes</i> ]
	8. <a href="#">gi 11703150</a>	1033	25	RecName: Full=Actin
	9. <a href="#">gi 1257125970</a>	6972	24	hypothetical protein Lebu_1202 [ <i>Leptotrichia buccalis</i> C-1013-b]
No. 14	10. <a href="#">gi 33668773</a>	1825	24	tax protein [ <i>Simian T-lymphotropic virus 1</i> ]
	Accession	Mass	Score	Description
	1. <a href="#">gi 226949123</a>	6327	47	hypothetical protein CLM_2041 [ <i>Clostridium botulinum</i> A2 str. Kyoto]
	2. <a href="#">gi 340517939</a>	22596	44	predicted protein [ <i>Trichoderma reesei</i> QM6a]
	3. <a href="#">gi 1518935491</a>	9027	43	hypothetical protein [ <i>Methylobacterium</i> sp. 285MFTsu5.1]
	4. <a href="#">gi 134034615</a>	13617	41	monomeric alpha-amylase inhibitor [ <i>Triticum aestivum</i> ]
	5. <a href="#">gi 134034537</a>	13699	41	monomeric alpha-amylase inhibitor [ <i>Triticum monococcum</i> ]
	6. <a href="#">gi 1255633556</a>	22892	40	unknown [ <i>Glycine max</i> ]
	7. <a href="#">gi 134034643</a>	13587	40	monomeric alpha-amylase inhibitor [ <i>Triticum aestivum</i> ]
	8. <a href="#">gi 134034521</a>	13717	40	monomeric alpha-amylase inhibitor [ <i>Triticum monococcum</i> ]
	9. <a href="#">gi 134034506</a>	13659	40	monomeric alpha-amylase inhibitor [ <i>Triticum monococcum</i> ]
No. 15	10. <a href="#">gi 134034508</a>	13658	40	monomeric alpha-amylase inhibitor [ <i>Triticum monococcum</i> ]
	Accession	Mass	Score	Description
	1. <a href="#">gi 531985643</a>	39386	66	hypothetical protein BDFG_02200 [ <i>Ajellomyces dermatitidis</i> ATCC 26199]
	2. <a href="#">gi 261194010</a>	47726	61	conserved hypothetical protein [ <i>Ajellomyces dermatitidis</i> SLH14091]
	3. <a href="#">gi 239607012</a>	47716	61	conserved hypothetical protein [ <i>Ajellomyces dermatitidis</i> ER-3]
	4. <a href="#">gi 1327354521</a>	47743	61	hypothetical protein BDDG_06922 [ <i>Ajellomyces dermatitidis</i> ATCC 16188]
	5. <a href="#">gi 255540473</a>	5719	60	conserved hypothetical protein [ <i>Ricinus communis</i> ]
	6. <a href="#">gi 116488040</a>	16317	57	40S ribosomal protein S3 [ <i>Scophthalmus maximus</i> ]
	7. <a href="#">gi 1410865310</a>	32533	57	Fructose-1,6-bisphosphate aldolase [ <i>Propionibacterium acidipropionici</i> ATCC 4875]
	8. <a href="#">gi 128189875</a>	16243	55	similar to S3 ribosomal protein [ <i>Bos taurus</i> ]
	9. <a href="#">gi 128189869</a>	16443	55	similar to ribosomal protein S3 [ <i>Bos taurus</i> ]
	10. <a href="#">gi 190076128</a>	16453	55	unnamed protein product [ <i>Macaca fascicularis</i> ]

Fig. 48. MALDI-TOF 결과 확보된 단백질 절편의 아미노산 서열 및 그 정보를 활용한 MATSCOT 결과리스트(spot 8-15)

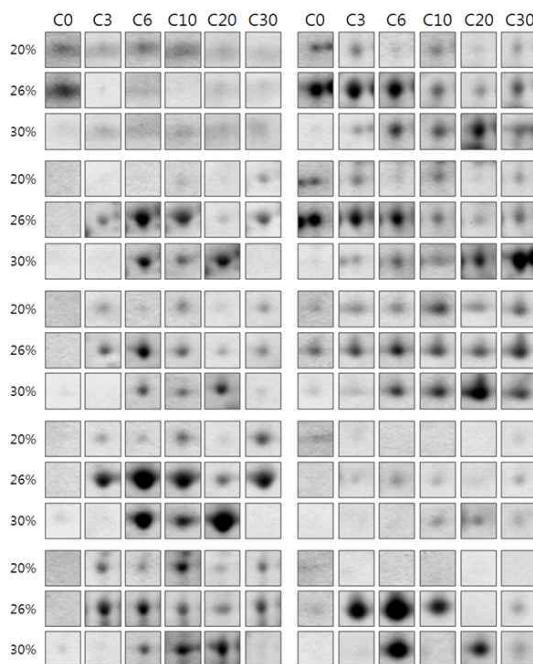
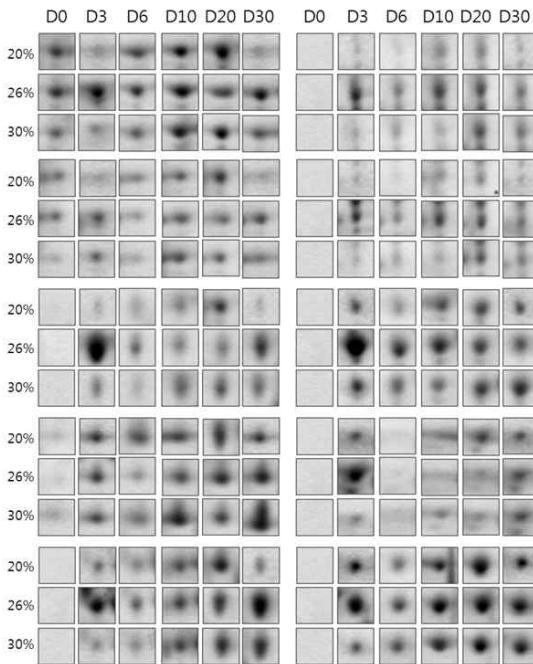
Table 1. 전통누룩으로부터 분리한 단백질 동정 리스트

Spot no. <sup>a</sup>	Protein name	Species	Accession no.
A1	Dihydrofolate reductase Fungal family protein DUF 575 domain protein	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Schizosaccharomyces pombe</i> <i>Aspergillus oryzae</i>	E7QKX1 Q9C108 Q2UGY1
A2	Translocase Hypothetical protein	<i>Yokenella regensburgei</i> <i>Saccharomyces rouxii</i>	G9YXW2 C5DZ10
A4	Carboxymuconolactone decarboxylase	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	L2GDK9
A5	Hypothetical protein	<i>Actinomyces</i> spp.	E7N6C4
A6	Glutathione S-transferase-like protein Enoyl-CoA hydratase Septum formation inhibitor Metalloprotease NADH dehydrogenase	<i>Rhodopseudomonas palustris</i> <i>Bordetella bronchiseptica</i> <i>butyrate-producing bacterium</i> <i>Colletotrichum higginsianum</i> <i>Exophiala dermatitidis</i>	Q2IV00 A0A08YC15 D7GW85 H1VD68 H6BP13
A7	$\alpha$ -amylase	<i>Triticum aestivum</i>	54778507
A16	$\alpha$ -amylase $\alpha$ -galactosidase Apolipoprotein Methylglutaconyl-CoA hydrolase	<i>Rhizopus oryzae</i> <i>Ophiostoma piceae</i> <i>Chaetomium globosm</i> <i>Exophiala dermatitidis</i>	E2G4G0 S3BTP9 Q2HFL7 H6BTZ4
A17	$\alpha$ -amylase $\beta$ -1,3-glucanase Endo-1,3- $\beta$ -glucosidase FMN-linked oxidoreductase	<i>Rhizopus oryzae</i> <i>Triticum aestivum</i> <i>Triticum urartu</i> <i>Clarea lozoyensis</i>	E2G4G0 W5GB4 M7ZZC3 S3CM76
A30	Superoxide dismutase Dimeric $\alpha$ -amylase	<i>Tricum dicoccoides</i> <i>Aegilops speltoides</i>	H9NAV2 A4GFT4
A31	NAD dependent epimerase	<i>Talaromyces stipitatus</i>	B6MCV6
A43	Zinc knuckle transcription fac. Glucose repression, kinase	<i>Talaromyces stipitatus</i> <i>Magnaporthe oryzae</i>	B6M9F8 G4MRT7
A46	SH2B adaptor protein Rho-GAP protein	<i>Rhizophagus irregularis</i> <i>Ophiocordyceps sinensis</i>	A0A015LCQ9 T5AM91
A47	Sarcoglycan protein GADPH	<i>Camponotus floridanus</i> <i>Megalurus palustris</i>	E2AGV5 J9VE52

Spot no. <sup>a</sup>	Protein name	Species	Accession n
A60	Class II chitinase Nucleolin Oleosin SCP-Like extracellular protein	<i>Triticum aestivum</i> <i>Cyprinus carpio</i> <i>Arabidopsis lyrata</i> <i>Necator americanus</i>	Q4Z6L7 Q7T049 Q6WEQ9 W2SPK2
B1	Enoyl-CoA hydratase 3'-5' exonuclease Glucose 1-dehydrogenase	<i>Colletotrichum orbiculare</i> <i>Aspergillus oryzae</i> <i>Thanatephorus cucumeris</i>	N4V5Q3 I8TMS1 M5BU26
B2	Lytic transglycosylase 3-dehydroshikimate dehydratase Maltose transporter binding protein Sugar transporter	<i>Rhodobacter capsulatus</i> <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> <i>Haloferax prahovense</i> <i>Streptomyces acidiscabies</i>	V8AKV7 L2FD28 495367121 498040589
B3	Dipeptidase Halocid dehalogenase	<i>Lactobacillus casei</i> <i>Trichophyton equinum</i>	K6QNX0 F2Q347
B4	ATPase catalytic subunit A HlyD secretion family protein Hypothetical protein	<i>Pleospora paludicirri</i> <i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Leptospira interrogans</i>	Q6EQU4 A0A014RAY8 M3H756
B5	$\alpha$ -amylase Tryptophan dimethylallyltransferase lipopolysaccharide core heptose(l) kinase CoA-transferase	<i>Rhizomucor pusillus</i> <i>Aspergillus oryzae</i> <i>Pseudomonas veronii</i> <i>Rhodococcus opacus</i>	M9TI89 Q2UTK0 516460965 491386718
B6	Transcriptional regulator	<i>Amycolatopsis decolorans</i>	M2Z7N9
B7	Mannitol-phosphate 5dehydrogenase Pyruvate oxidase Carbohydrate O-acetyltransferase $\alpha$ -amylase inhibitor	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Pseudoalteromonas agarivorans</i> <i>Triticum monococcum</i>	A0A061BNL8 W1AW28 N6V5X5 134034537
B8	Fructose-1,6-bisphosphate aldolase Fatty acid activator	<i>Propionibacterium acidipropionici</i> <i>Penicillium mameeffei</i>	410865310 B6QD28

## (2) 2차년도 전통누룩 원료 및 가수비율별 변화하는 단백질 연구

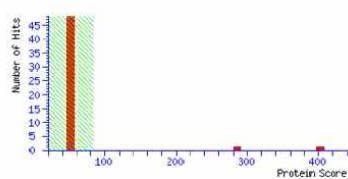
1차 작업에서 delta 2D를 이용하여 전체 단백질들의 발현변화를 profiling하기 위하여 분석을 실시한 후, 전통누룩 C set(18 가지 누룩시료), 전통누룩 D set(18가지 누룩시료) set 간에 발현차 5배 이상을 나타내는 타겟단백질 spot 각 10개, 총 20개 spots을 선별하였다(Fig. 49). 크기와 density에 따라 동일한 5-10개, 반복 spot의 gel 조각을 회수하고 이 샘플들을 직접 in gel digestion 한 후 Q-TOF 분석을 진행하였다. 또한 1차 작업의 10개 보다 현저히 증가한 spots 20개를 분석한 결과 15개의 단백질 spot의 MALDI-TOF 분석 결과를 확보하고 있다. 1차적으로 확보된 단백질의 일부 아미노산 서열을 이용하여 NCBI/fungi/bacteria/plant genbank database를 활용한 mass data 매칭 원리로 동정을 하는 Mascot 분석결과, 대표 분비효소단백질인 alpha-amylase가 조사되었으며(Fig. 55) 발현 차이를 보이는 추가 단백질들에서도 amylase의 빈도가 가장 높게 나타났다. 단백질 동정을 위한 Mascot 분석데이터는 Fig. 51부터 Fig. 63에 나타내었으며 그 결과는 Table. 2에 정리하였다. 추가 단백질 동정결과 alpha-amylase, alpha-galactosidase, apolipoprotein, methylglutaconyl-CoA hydrolase, beta-1,3-glucanase, endo-1,3-glucosidase, FMN-linked oxidoreductase, superoxide dismutase, dimeric-amylase, NAD dependent epimerase, Zinc knuckle transcription factor, glucose repression kinase, SH2B adaptor protein, rho-GAP protein, sarcoglycan protein, GADPH homolog 단백질 들이 누룩제조 원료별, 가수비율별, 발효시간별 분비에 차이를 보이는 것을 확인하였다. 이 결과는 2차년도의 발효조건에 따라 대사과정 중 분해에 관여하는 효소들 (amylase, glucosidase, protease, glucanase, galactosidase, peptidase, chitinase 등)과 발효미생물들이 대사조절을 위하여 분비하는 조절효소 그리고 기능성 단백질들의 발현 양상에 변화가 일어나는 것을 확인할 수 있었다.

**A****B**

**Fig. 49. Comparison of spot density of nuruk C and D from 2D-PAGE gel**

#### Mascot Score Histogram

Protein score is  $-10^{\log(P)}$ , where P is the probability that the observed match is a random event.  
Protein scores greater than 83 are significant ( $p < 0.05$ ).  
Protein scores are derived from ion scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



#### Protein Summary Report



**Fig. 50. Mascot data of a purified protein from 2D-PAGE**

## Mascot Search Results

```
User      :
Email     :
Search title : KYS\2015_4_23\2015_4_23\MSMS 5\I22
Database   : eukaryota euка_20140801 (11111489 sequences; 4486590737 residues)
Timestamp  : 23 Apr 2015 at 06:18:16 GMT
Warning    : A Peptide summary report will usually give a much clearer picture of MS/MS search results.
Top Score  : 403 for E2G4G0, A-amylase OS=Rhizopus oryzae PE=2 SV=1
```

### Mascot Score Histogram

Protein score is -10\*Log(P), where P is the probability that the observed match is a random event.  
 Protein scores greater than 33 are significant ( $p < 0.05$ ).  
 Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.

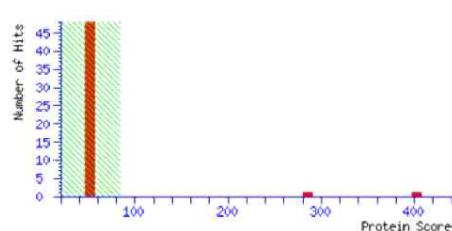


Fig. 51. 2D-PAGE에서 분리한 대표 spot No. 16의 Mascot data

## Mascot Search Results

### Protein View

```
Match to: E2G4G0 Score: 403 Expect: 5.6e-034
A-amylase OS=Rhizopus oryzae PE=2 SV=1

Nominal mass (Mr): 51149; Calculated pI value: 5.70
NCBI BLAST search of E2G4G0 against nr
Unformatted sequence string for pasting into other applications

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)
Variable modifications: Oxidation (M)
Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P
Sequence Coverage: 47%

Matched peptides shown in Bold Red

1  MKSFLSLLCS VFLLPLVVQS VEVVIKPASAS DWENRVIYQL LTDRFAKSTD
51 DTNGCSNLSD YCGGTQGII NLHLDVIAGMG FDATWISIP KVNNGGVHGY
51 WASDFQSCINE HFGTADDLKK LVAAAAHAKNN YVMLDVVANH AGTSSSGDY
151 SOYTFQGSSE YHRAACDINYN DQNSIEQCWI SOLPDINTED SAIVSHLNSI
201 VSGWVSDYGF DGLRIDTVRH VRKDFWDGIV SAAVGFAFGE VLSGDVSVVS
251 FYQQHVFSLLI NYFLYYFPVID VFTKSRTMSR LSSGFSDIKN GNFKNIDVLV
301 NFIDNHQPFRL LLSKADQSLV KNALAYSPMV QGIFVLYIYT EQSFKGGNDP
351 NNREVLWTTG YSTTSDMYKF VTTLVKARKG SNSTVNNGIA QTDNVXVQR
401 GGSILVVNNY GQGSTNTITV KAGSFENGDT LTDVFSNKS VTVQNNQITFQ
451 LQNGNPAIFQ KN
```

Fig. 52. 2D-PAGE에서 분리한 대표 spot No. 16-1의 Mascot data

## Mascot Search Results

```
User      :
Email     :
Search title : KYS\2015_4_23\2015_4_23\MSMS 5\I23
Database   : eukaryota euка_20140801 (11111489 sequences; 4486590737 residues)
Timestamp  : 23 Apr 2015 at 06:20:15 GMT
Warning    : A Peptide summary report will usually give a much clearer picture of MS/MS search results.
Top Score  : 334 for E2G4G0, A-amylase OS=Rhizopus oryzae PE=2 SV=1
```

### Mascot Score Histogram

Protein score is -10\*Log(P), where P is the probability that the observed match is a random event.  
 Protein scores greater than 33 are significant ( $p < 0.05$ ).  
 Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.

Fig. 53. 2D-PAGE에서 분리한 대표 spot No. 17의 Mascot data

**MATRIX SCIENCE** Mascot Search Results

**Protein View**

Match to: E2G4G0 Score: 334 Expect: 4.4e-027  
**A-amylase** OS=Rhizopus oryzae PE=2 SV=1

Nominal mass ( $M_r$ ): 51149; Calculated pI value: 5.70  
 NCBI BLAST search of E2G4G0 against nr  
 Unformatted sequence string for pasting into other applications

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)  
 Variable modifications: Oxidation (M)  
 Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P  
 Sequence Coverage: 38%

Matched peptides shown in **Bold Red**

```

1 MKSFLSLLCs VFLLPLVVQs VPVIKRASAS DWENRVIYQL LTDRFAKSTD
51 DTNGCSNLSD YCGGTFQGII NHLDYIAGMG FDAIWISPIF KNVNNGGYHGY
101 WASDFSQINE HFGTADDLKK LVAAAHARNNN YVMLDVVANV AGTPSSGGDY
151 SGYTFGQSE YHRACDINYN DQNSIEQCWI SGLPDINTED SAIVSKLNSI
201 VSGGWVSDYGF DGLRIDTVKH VRKDWFWDGVV SAAGVFAATGH VLSGGDVSYVS
251 PYQQHVPSLI NYFLYYPVYD VFTKSRITMSR LSSGFSDIKN QNFKMIDVVL
301 NFIDNHQDQFR LLSRADQSLV KNALAYSFMV QCIPVLYYGT EQSFKEGGNDP
351 NNREVWLWTG YSTTSMDYKF VTTLVKARKG SNSTVNMIA QTDNVXVFQR
401 GGSLVUVVNNY GQGSTNTITV KAGSFNSNGDT LTDVFSNKSV TVQNNQITFQ
451 LQNQHNPAIFQ KN

```

Fig. 54. 2D-PAGE에서 분리한 대표 spot No. 17-1의 Mascot data

**MATRIX SCIENCE** Mascot Search Results

User :  
 Email :  
 Search title : KYS\2015\_4\_23\2015\_4\_23\MSMS 5\I24  
 Database : eukaryote\_euka\_20140801 (11111489 sequences; 4486590737 residues)  
 Timestamp : 23 Apr 2015 at 06:21:43 GMT  
 Warning : A Peptide summary report will usually give a much clearer picture of MS/MS search results.  
 Top Score : 326 for H9NAV2, Superoxide dismutase [Cu-Zn] (Fragment) OS=Triticum aestivum PE=2 SV=1

**Mascot Score Histogram**

Protein score is  $-10 \log(P)$ , where P is the probability that the observed match is a random event.  
 Protein scores greater than 38 are significant ( $p < 0.05$ ).  
 Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.

Protein Score Range	Number of Hits
~250	~18
~260	~10
~270	~5
~320	~3

Fig. 55. 2D-PAGE에서 분리한 대표 spot No. 30의 Mascot data

## Mascot Search Results

### Protein View

Match to: H9NAV2 Score: 326 Expect: 2.8e-026  
**Superoxide dismutase [Cu-Zn] (Fragment)** OS=Triticum aestivum PE=2 SV=1  
 Nominal mass ( $M_z$ ): 17640; Calculated pI value: 5.20  
 NCBI BLAST search of [H9NAV2](#) against nr  
 Unformatted sequence string for pasting into other applications  
 Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)  
 Variable modifications: Oxidation (M)  
 Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P  
 Sequence Coverage: 29%  
 Matched peptides shown in **Bold Red**

```

1 RIVSTPGGAT AAARALVVAD ATKKAVAVLK GTSQVEGVVT LTQEDDGPTT
51 VNVVITGLAP GLHGFLHHEF GIMTNGCIST GPHFNPNGLT HGAPEDEVRL
101 AGDLGNIVAN AEGVAETTIV DSQIPLTGPN AVVGRAFVNH ELEDDLGKGG
151 HELSLSTGNA GGRLAGGVVG LTPL
  
```

Fig. 56. 2D-PAGE에서 분리한 대표 spot No. 30-1의 Mascot data

## Mascot Search Results

User :  
 Email :  
 Search title : KYS\2015\_4\_23\2015\_4\_23\MSMS 5\J1  
 Database : eukaryota euка 20140801 (11111489 sequences; 4486590737 residues)  
 Timestamp : 23 Apr 2015 at 06:23:07 GMT  
 Warning : A Peptide summary report will usually give a much clearer picture of MS/MS search results.  
 Top score : 38 for **W5JXSL**, uncharacterized protein OS=Astyanax mexicanus PE=4 SV=1

### Mascot Score Histogram

Protein score is  $-10^{\circ}\log(P)$ , where P is the probability that the observed match is a random event.  
 Protein scores greater than 33 are significant ( $p<0.05$ ).  
 Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.

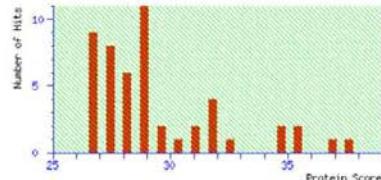


Fig. 57. 2D-PAGE에서 분리한 대표 spot No. 31의 Mascot data

## Mascot Search Results

User :  
 Email :  
 Search title : KYS\2015\_4\_23\2015\_4\_23\MSMS 5\J2  
 Database : eukaryota euка 20140801 (11111489 sequences; 4486590737 residues)  
 Timestamp : 23 Apr 2015 at 06:24:25 GMT  
 Warning : A Peptide summary report will usually give a much clearer picture of MS/MS search results.  
 Top Score : 32 for **Q39304**, Protein kinase BNPK-7 (Fragment) OS=Brassica napus PE=2 SV=1

### Mascot Score Histogram

Protein score is  $-10^{\circ}\log(P)$ , where P is the probability that the observed match is a random event.  
 Protein scores greater than 33 are significant ( $p<0.05$ ).  
 Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.

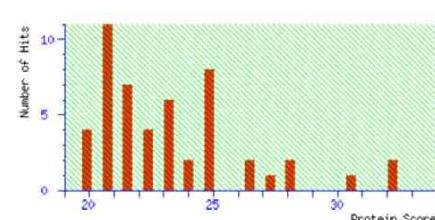


Fig. 58. 2D-PAGE에서 분리한 대표 spot No. 43의 Mascot data

**Mascot Search Results**

```
User      :
Email     :
Search title : KYS\2015_4_23\2015_4_23\MSMS 5\J3
Database  : eukaryota_euka_20140801 (11111489 sequences; 4486590737 residues)
Timestamp : 23 Apr 2015 at 06:25:48 GMT
Warning   : A Peptide summary report will usually give a much clearer picture of MS/MS search results.
Top Score : 59 for W9Y9P9, Uncharacterized protein OS=Capronia epimyces CBS 606.96 GN=Alo3_08620 PE=4 SV=1
```

**Mascot Score Histogram**

Protein score is  $-10^{\log(P)}$ , where P is the probability that the observed match is a random event.

Protein scores greater than 33 are significant ( $p<0.05$ ).

Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.

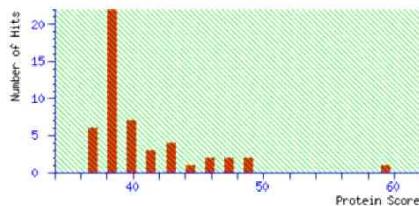


Fig. 59. 2D-PAGE에서 분리한 대표 spot No. 46의 Mascot data

**Mascot Search Results**

```
User      :
Email     :
Search title : KYS\2015_4_23\2015_4_23\MSMS 5\J4
Database  : eukaryota_euka_20140801 (11111489 sequences; 4486590737 residues)
Timestamp : 23 Apr 2015 at 06:27:12 GMT
Warning   : A Peptide summary report will usually give a much clearer picture of MS/MS search results.
Top Score : 51 for M3WRQ0, Uncharacterized protein OS=Felis catus PE=4 SV=1
```

**Mascot Score Histogram**

Protein score is  $-10^{\log(P)}$ , where P is the probability that the observed match is a random event.

Protein scores greater than 33 are significant ( $p<0.05$ ).

Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.

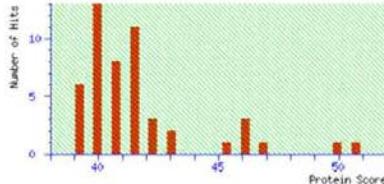


Fig. 60. 2D-PAGE에서 분리한 대표 spot No. 47의 Mascot data

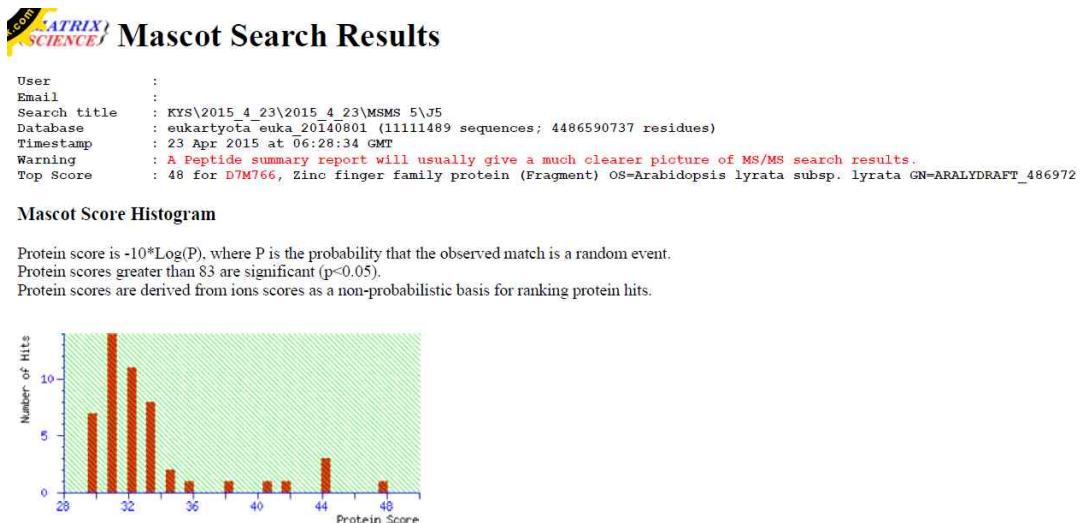


Fig. 61. 2D-PAGE에서 분리한 대표 spot No. 60의 Mascot data

No.16

Accession	Mass	Score	Description
1. <a href="#">EG2460</a>	51149	403	A-amylase OS=Rhizopus oryzae PE=2 SV=1
2. <a href="#">I1BMM7</a>	44403	257	Uncharacterized protein OS=Rhizopus delemar (strain RA 99-880 / ATCC MYA-4621 / FGSC 9543
3. <a href="#">RTG4V5</a>	23211	61	Stackhouse genomic scaffold, scaffold_95 OS=Chondrus crispus GN=CNC_T00008170001 PE=4 SV=1
4. <a href="#">AOA024G285</a>	36617	60	Albugo candida WGS project CAX00000000 data, strain Ac Nc0, contig AcnC2_CONTIG_13_length
5. <a href="#">BBLFD4</a>	14907	60	Putative uncharacterized protein OS=Picea sitchensis PE=2 SV=1
6. <a href="#">S3BTP9</a>	31974	59	Alpha-galactosidase A OS=Ophiostoma piceae (strain UAMH 11346) GN=F503_08539 PE=2 SV=1
7. <a href="#">Q2HFL7</a>	18547	59	Putative uncharacterized protein OS=Chaetomium globosum (strain ATCC 6205 / CBS 148.51 / D
8. <a href="#">RTM036</a>	47633	58	Putative disease resistance protein RG1 OS=Aegilops tauschii GN=F775_18750 PE=4 SV=1
9. <a href="#">LTMEV7</a>	59484	58	Putative rna polymerase II accessory factor cdc73p (Fragment) OS=Rhipicephalus pulchellus
10. <a href="#">GZXS62</a>	113596	58	Similar to TPR domain protein OS=Botryotinia fuckeliana (strain T4) GN=bofut4_P011750_1 PE
11. <a href="#">W6M9M9</a>	36991	57	Genomic scaffold, Kuraishia capsulata_scaffold_1 OS=Kuraishia capsulata CBS 1993 GN=KUCA_T
12. <a href="#">Q8WHL9</a>	60558	57	Maturase K OS=Moffia arrhiza GN=matK PE=3 SV=1
13. <a href="#">B6K6B0</a>	62429	57	Alpha-amylase Aahl OS=Schizosaccharomyces japonicus (strain yFS275 / FY16936) GN=SJAG_0423
14. <a href="#">MTTQ95</a>	115455	57	Putative tpr domain protein OS=Botryotinia fuckeliana (strain BcDW1) GN=BcDW1_B059 PE=4 SV
15. <a href="#">H6BZT4</a>	32729	57	Methylglutaconyl-CoA hydratase OS=Exophiala dermatitidis (strain ATCC 34100 / CBS 525.76 /
16. <a href="#">WZZL02</a>	70590	56	Uncharacterized protein OS=Phytophthora parasitica PL0297 GN=F442_05923 PE=4 SV=1
17. <a href="#">F4NRR5</a>	66992	56	Putative uncharacterized protein OS=Batrachochytrium dendrobatidis (strain JAM81 / FGSC 10
18. <a href="#">NAV5R5</a>	119359	55	Cytoskeleton assembly control protein OS=Colletotrichum orbiculare (strain 104-T / ATCC 96
19. <a href="#">EZOFD2</a>	57697	55	Predicted protein OS=Hordeum vulgare var. distichum PE=2 SV=1
20. <a href="#">Y9L616</a>	20663	54	60S ribosome subunit biogenesis protein NIP7 homolog OS=Callirhynchus millii PE=2 SV=1

No.17

Accession	Mass	Score	Description
1. <a href="#">EG2460</a>	51149	334	A-amylase OS=Rhizopus oryzae PE=2 SV=1
2. <a href="#">I1BMM7</a>	44403	232	Uncharacterized protein OS=Rhizopus delemar (strain RA 99-880 / ATCC MYA-4621 / FGSC 9543 / NR
3. <a href="#">W5H4L6</a>	48955	132	Uncharacterized protein OS=Triticum aestivum PE=3 SV=1
4. <a href="#">W5GDB4</a>	35979	128	Uncharacterized protein OS=Triticum aestivum PE=3 SV=1
5. <a href="#">W5GBN7</a>	48799	114	Uncharacterized protein OS=Triticum aestivum PE=3 SV=1
6. <a href="#">W5GCR1</a>	44451	108	Uncharacterized protein OS=Triticum aestivum PE=3 SV=1
7. <a href="#">W5GQ07</a>	48728	106	Uncharacterized protein OS=Triticum aestivum PE=3 SV=1
8. <a href="#">MTZCZ3</a>	59495	105	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase OS=Triticum urartu GN=TRIUR3_09478 PE=3 SV=1
9. <a href="#">MBC218</a>	60851	105	Uncharacterized protein OS=Aegilops tauschii GN=F775_52596 PE=3 SV=1
10. <a href="#">R7W0J6</a>	47633	74	Putative disease resistance protein RG1 OS=Aegilops tauschii GN=F775_18750 PE=4 SV=1
11. <a href="#">G4ZC35</a>	50196	68	Putative uncharacterized protein OS=Phytophthora sojae (strain P6497) GN=PHYSDRAFT_329295 PE=
12. <a href="#">B6K6B0</a>	61429	65	Alpha-amylase Aahl OS=Schizosaccharomyces japonicus (strain yFS275 / FY16936) GN=SJAG_04238 PE
13. <a href="#">B6JU27</a>	65330	65	Alpha-amylase OS=Schizosaccharomyces japonicus (strain yFS275 / FY16936) GN=SJAG_00096 PE=4 SV
14. <a href="#">L1FV28</a>	59918	65	Uncharacterized protein OS=Amphimedon queenslandica GN=LOC1000639552 PE=4 SV=1
15. <a href="#">D3BKM7</a>	56572	65	Putative alpha-amylase OS=Polysphondylium pallidum GN=amyA PE=4 SV=1
16. <a href="#">RTG4V5</a>	23211	64	Stackhouse genomic scaffold, scaffold_95 OS=Chondrus crispus GN=CNC_T00008170001 PE=4 SV=1
17. <a href="#">S3CM76</a>	46215	62	FMN-linked oxidoreductase OS=Glaresa lozoyensis (strain ATCC 20866 / MFS171) GN=GLAREA_02211 PE
18. <a href="#">N1CCT8</a>	106696	61	AKR kinase OS=Mycosphaerella fijiensis (strain CIRAD86) GN=NYCFTRAFT_201401 PE=4 SV=1
19. <a href="#">B6ADP2</a>	33285	61	U3 small nucleolar ribonucleoprotein IMP4, putative OS=Cryptosporidium muris (strain RN66) GN=
20. <a href="#">K1QVY8</a>	61940	60	Armadillo repeat-containing X-linked protein 1 OS=Crassostrea gigas GN=CGI_10020994 PE=4 SV=1

No.30

Accession	Mass	Score	Description
1. <a href="#">H9NAV2</a>	17640	326	Superoxide dismutase [Cu-Zn] (Fragment) OS=Triticum aestivum PE=2 SV=1
2. <a href="#">Q9E123</a>	20424	324	Superoxide dismutase [Cu-Zn] OS=Triticum aestivum GN=SOD1_1 PE=2 SV=1
3. <a href="#">Q24400</a>	20352	324	Superoxide dismutase [Cu-Zn] OS=Triticum aestivum GN=SOD1_2 PE=2 SV=1
4. <a href="#">K4KC13</a>	19696	313	Superoxide dismutase [Cu-Zn] (Fragment) OS=Hordeum vulgare var. distichum GN=Sod1 PE=3 SV=1
5. <a href="#">K7R153</a>	20377	313	Superoxide dismutase [Cu-Zn] OS=Hordeum vulgare var. distichum GN=Sod1 PE=2 SV=1
6. <a href="#">F8R513</a>	20377	313	Superoxide dismutase [Cu-Zn] OS=Hordeum vulgare PE=2 SV=1
7. <a href="#">A4GF24</a>	13948	268	Dimeric alpha-amylase inhibitor (Fragment) OS=Aegilops speltoides PE=4 SV=1
8. <a href="#">A4GF29</a>	13891	262	Dimeric alpha-amylase inhibitor (Fragment) OS=Aegilops longissima PE=4 SV=1
9. <a href="#">A4GG16</a>	13863	262	Dimeric alpha-amylase inhibitor (Fragment) OS=Aegilops longissima PE=4 SV=1
10. <a href="#">A4GF00</a>	13863	262	Dimeric alpha-amylase inhibitor (Fragment) OS=Triticum dicoccoides PE=4 SV=1
11. <a href="#">A4GF01</a>	13922	262	Dimeric alpha-amylase inhibitor (Fragment) OS=Triticum dicoccoides PE=4 SV=1
12. <a href="#">A4GF09</a>	13863	262	Dimeric alpha-amylase inhibitor (Fragment) OS=Triticum dicoccoides PE=4 SV=1
13. <a href="#">A4GFX3</a>	13891	262	Dimeric alpha-amylase inhibitor (Fragment) OS=Aegilops sharicensis PE=4 SV=1
14. <a href="#">A4GF4X</a>	13962	262	Dimeric alpha-amylase inhibitor (Fragment) OS=Aegilops sharicensis PE=4 SV=1
15. <a href="#">L7P027</a>	147932	261	Dimeric alpha-amylase inhibitor (Fragment) OS=Aegilops longissima GN=AAI PE=4 SV=1
16. <a href="#">L7P0X4</a>	147119	261	Dimeric alpha-amylase inhibitor (Fragment) OS=Aegilops longissima GN=AAI PE=4 SV=1
17. <a href="#">C3VWJ0</a>	15678	259	Dimeric alpha-amylase inhibitor OS=Triticum dicoccoides GN=AAI PE=4 SV=1
18. <a href="#">C3VWH8</a>	15722	259	Dimeric alpha-amylase inhibitor OS=Triticum dicoccoides GN=AAI PE=4 SV=1
19. <a href="#">C3VWR4</a>	15716	259	Dimeric alpha-amylase inhibitor OS=Triticum dicoccoides GN=AAI PE=4 SV=1
20. <a href="#">C3VWR3</a>	15694	259	Dimeric alpha-amylase inhibitor OS=Triticum dicoccoides GN=AAI PE=4 SV=1

No.31

Accession	Mass	Score	Description
1. <a href="#">M5JX1</a>	88513	38	Uncharacterized protein OS=Astyanax mexicanus PE=4 SV=1
2. <a href="#">M5JX2</a>	95512	37	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Astyanax mexicanus PE=4 SV=1
3. <a href="#">F107L9</a>	97223	35	Uncharacterized protein OS=Danio rerio GN=Nkrkf PE=4 SV=1
4. <a href="#">B3DJM2</a>	97577	35	Similar to NF-kappa-B-repressing factor (NFkB-repressing factor) (Transcription factor NRF)
5. <a href="#">V7D1X3</a>	14700	35	Uncharacterized protein OS=Phaeosulfus vulgaris GN=PHAVU_0016242900g PE=4 SV=1
6. <a href="#">E3KYA3</a>	11895	34	Putative uncharacterized protein OS=Puccinia graminis f. sp. tritici (strain CRL 75-36-700-3
7. <a href="#">C5GNM6</a>	20203	32	Zinc knuckle domain-containing protein OS=Ajellomyces dermatitidis (strain ER-3 / ATCC MYA-25
8. <a href="#">T5C2X1</a>	20712	32	Cellular nucleic acid-binding protein OS=Ajellomyces dermatitidis ATCC 26198 GN=BDFG_02731 PE
9. <a href="#">F2TE57</a>	20712	32	Putative uncharacterized protein OS=Ajellomyces dermatitidis (strain ATCC 18188 / CBS 674.68) GN=BDFG_02731 PE
10. <a href="#">C5JVM9</a>	20712	32	Zinc knuckle domain-containing protein OS=Ajellomyces dermatitidis (strain SLH4001) GN=BDFG_02731 PE
11. <a href="#">A7ANA3</a>	24603	32	Putative uncharacterized protein OS=Babesia bovis GN=BBOV_II1004740 PE=4 SV=1
12. <a href="#">E21003</a>	7672	31	Three-finger toxin (Fragment) OS=Naja atrox PE=3 SV=1
13. <a href="#">Q6GYX6</a>	4842	31	Metallothionein OS=Homo sapiens GN=MTHB PE=2 SV=2
14. <a href="#">T1HNK0</a>	28451	30	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
15. <a href="#">G6CYT5</a>	4566	30	Uncharacterized protein OS=Danus plexippus GN=KGN_10390 PE=4 SV=1
16. <a href="#">B8MCV6</a>	35674	29	NAD dependent epimerase/dehydratase, putative OS=Talaromyces stipitatus (strain ATCC 10500 /
17. <a href="#">W4MM97</a>	10543	29	Uncharacterized protein OS=Atta cephalotes PE=4 SV=1
18. <a href="#">Q725D6</a>	9805	29	Medulloblastoma antigen MU-MB-2.32 (Fragment) OS=Homo sapiens PE=1 SV=1
19. <a href="#">G3SVX4</a>	18523	29	Uncharacterized protein OS=Loxodonta africana GN=LOC100667847 PE=4 SV=1
20. <a href="#">M4CP93</a>	9426	29	Uncharacterized protein OS=Brassica rapa subsp. pekinensis GN=BRA000922 PE=4 SV=1

Fig. 62. MALDI-TOF 결과 확보된 단백질 절편의 아미노산 서열 및 그 정보를 활용한 MATSCOT 결과리스트 (spot 16, 17, 30, 31)

No.43

Accession	Mass	Score	Description
1. Q39304	7597	32	Protein kinase BNPK-7 (Fragment) OS=Brassica napus PE=2 SV=1
2. D4P817	4735	32	Nasonin-4 (Fragment) OS=Nasonia vitripennis PE=2 SV=1
3. C3YT62	14610	30	Putative uncharacterized protein (Fragment) OS=Branchiostoma floridae GN=BRAFLDRAFT_237351 PE=4
4. M9CS16	19663	28	Uncharacterized protein OS=Aegilops tauschii GN=F775_04328 PE=4 SV=1
5. E4U218	21088	28	Putative uncharacterized protein OS=Arthroderra gypseum (strain ATCC MYA-4604 / CBS 118893) GN=M
6. AOA022X004	15003	27	Uncharacterized protein OS=Trichophyton rubrum MR850 GN=H100_00094 PE=4 SV=1
7. AOA022XA02	16728	27	Uncharacterized protein OS=Trichophyton rubrum CBS 285.86 GN=H104_00078 PE=4 SV=1
8. R0HLX9	42890	27	Uncharacterized protein OS=Capsella rubella GN=CARDB_v1_0013850mg PE=4 SV=1
9. T115X4	25772	25	Uncharacterized protein OS=Brachypodium distachyon GN=BRADI3C32650 PE=4 SV=1
10. Q34187	9030	25	Putative metallothionein-like protein type 2B OS=Atropa belladonna PE=2 SV=1
11. B8MF8B	51619	25	Zinc knuckle transcription factor (CnB1), putative OS=Talaromyces stipitatus (strain ATCC 10500
12. B6CP6	7977	25	Putative uncharacterized protein OS=Zea mays PE=2 SV=1
13. M1AE64	9621	25	Uncharacterized protein OS=Solanum tuberosum GN=PGSC00032MNG403008136 PE=4 SV=1
14. D78ZG5	8846	25	Putative uncharacterized protein OS=Vitis vinifera GN=WIT_05a0048g00990 PE=4 SV=1
15. F4Q98E	3319	25	Putative uncharacterized protein OS=Dictyostelium fasciculatum (strain 3H3) GN=DFA_03726 PE=4 S
16. AOA059B11B	30538	24	Uncharacterized protein OS=Eucalyptus grandis GN=EUGRSUZ_H03674 PE=4 SV=1
17. W5AP9P	6197	24	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Triticum aestivum PE=4 SV=1
18. A7J382	2591	24	CARD15 (Fragment) OS=Mytilobates lar GN=CARD15 PE=4 SV=1
19. GAMBT7	61225	23	Uncharacterized protein OS=Magnaporthe oryzae (strain 70-15 / ATCC MYA-4617 / FGSC 8958) GN=MGG
20. H0XL04	8738	23	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Ustuleneus garnettii PE=4 SV=1

No.46

Accession	Mass	Score	Description
1. W5YWP9	66927	59	Uncharacterized protein OS=Capromys epimyces CBS 606.96 GN=A103_08620 PE=4 SV=1
2. N2RA23	9211	49	Uncharacterized protein OS=Phytophthora capsici GN=L915_04571 PE=4 SV=1
3. AOA014MUE1	47379	49	Reverse transcriptase domain protein OS=Metarhizium robertsii GN=X757_012177 PE=4 SV=1
4. AOA059ZBD0	80569	48	Uncharacterized protein OS=Fonticula alba GN=HE66_01151 PE=4 SV=1
5. ULMC15	29093	47	Uncharacterized protein OS=Ascaris suum GN=ASU_09532 PE=4 SV=1
6. E4YQ06	47922	46	Whole genome shotgun assembly, allelic scaffold set, scaffold scaffold_6 OS=Oikopleura dioic
7. J0DAU2	29501	46	Uncharacterized protein OS=Auricularia delicata (strain TFB10046) GN=AURDERDRAFT_116715 PE=4 S
8. KJPF15	16504	44	Rps11 (Fragment) OS=Medusagyna oppositifolia GN=rps11 PE=3 SV=1
9. B9HR45	51773	43	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Populus trichocarpa GN=POPTR_0008s13900g PE=4 SV=1
10. W3X4P4	17967	42	Uncharacterized protein OS=Cladophialophora psammophila CBS 110553 GN=A105_04799 PE=4 SV=1
11. AOA015LQ09	13707	42	Uncharacterized protein OS=Rhizophagus irregularis DAOM 197198w GN=Riro_086560 PE=4 SV=1
12. TSAM91	129655	42	RhGAP domain-containing protein OS=Ophiocordyceps sinensis (strain Col8 / CGMCC 3.14243) GN=
13. XIXJ08	8095	42	Uncharacterized protein OS=Acythosiphon pisum PE=4 SV=1
14. C0HG29	26403	42	Uncharacterized protein OS=Zea mays PE=2 SV=1
15. U6KNW8	8600	41	Uncharacterized protein OS=Elmeria tenella GN=ETH_00036165 PE=4 SV=1
16. M2OD31	46175	40	Uncharacterized protein OS=Ceriporiopsis subvermispora (strain B) GN=CERSUDRAFT_75269 PE=4 S
17. M4GD84	200238	40	Uncharacterized protein OS=Magnaporthe poae (strain ATCC 64411 / 73-15) PE=4 SV=1
18. AVW391	108506	40	Predicted protein OS=Monesiga brevicollis GN=26746 PE=4 SV=1
19. EXIE1	30436	40	Whole genome shotgun assembly, reference scaffold set, scaffold scaffold_7 OS=Oikopleura dio
20. B5X32B	47291	40	Casein kinase I isoform epsilon OS=Salmo salar GN=KC1E PE=2 SV=1

No.47

Accession	Mass	Score	Description
1. M3WBC0	14833	51	Uncharacterized protein OS=Felis catus PE=4 SV=1
2. U6D8K3	47095	50	Coiled-coil domain-containing protein 51 (Fragment) OS=Neovison vison GN=OCDS1 PE=2 SV=1
3. S8DRB8	62202	47	Uncharacterized protein OS=Fomitopsis pinicola (strain FP-58527) GN=FOMPFDRAFT_155953 PE=4 SV=
4. E2AGV5	12940	46	Putative uncharacterized protein OS=Camponotus floridanus GN=EAQ_04830 PE=4 SV=1
5. G7XLM5	163224	46	DEAD/DEAH box RNA helicase OS=Apergillus kawachi (strain NBRC 4308) GN=AKAW_06038 PE=4 SV=1
6. E9ID69	11955	46	Putative uncharacterized protein (Fragment) OS=Eucalyptus grandis GN=EUGRSUZ_C00956 PE=4 SV=1
7. AOA058CMJ6	59507	46	Uncharacterized protein OS=Eucommia queenslandica PE=4 SV=1
8. 11F0B8	3549	43	Uncharacterized protein OS=Amphimedon queenslandica PE=4 SV=1
9. G7YN43	763875	43	Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein OS=Clonorchis sinensis GI
10. M0NYQD	31728	42	Uncharacterized protein OS=Hordeum vulgare var. distichum PE=4 SV=1
11. J9VE52	2490	42	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Fragment) OS=Malurus pulalstris GN=GAPDH PE=4 SV=1
12. Q385QB	105459	42	Putative uncharacterized protein OS=Trypanosoma brucei brucei (strain 927/4 GUat10.1) GN=Tb1:
13. F0Y4Z8	14146	42	Putative uncharacterized protein (Fragment) OS=Aureococcus anophagefferens GN=AURANDRAFT_8515
14. D3VN24	7266	42	Metallothionein OS=Austinograea rodiguezensis GN=AstPE4 SV=1
15. A2D8U7	27000	41	Putative uncharacterized protein OS=Trichomonas vaginalis GN=TVAG_150450 PE=4 SV=1
16. L2IJU5	79908	41	Uncharacterized protein OS=Rhipicephalus pulchellus PE=2 SV=1
17. L2LZ47	76094	41	Uncharacterized protein OS=Rhipicephalus pulchellus PE=2 SV=1
18. AOA022PN44	70493	41	Putative armadillo repeat-containing protein (Fragment) OS=Ambylyomma cajennense PE=2 SV=1
19. V3TDJ0	49008	41	Putative membrane coat OS=Ixodes ricinus PE=2 SV=1
20. Y5HMW6	63692	41	Putative membrane coat (Fragment) OS=Ixodes ricinus PE=2 SV=1

No.60

Accession	Mass	Score	Description
1. D7MT66	13035	45	Zinc finger family protein (Fragment) OS=Arabidopsis lyrata subsp. lyrata GN=ARALYDRAFT_466972 PE
2. M7YBY6	28559	44	Basic endochitinase C OS=Triticum urartu GN=TRIUR1_19310 PE=4 SV=1
3. Q4ZBL7	28641	44	Class II chitinase OS=Triticum aestivum PE=4 SV=1
4. Q4ZBL8	28599	44	Class II chitinase OS=Triticum aestivum PE=4 SV=1
5. S9WB55	15001	41	Uncharacterized protein OS=Camellia feru GN=CB1_002656003 PE=4 SV=1
6. G2XYV2	30473	40	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit J OS=Botryocinaria fuckeliana (strain T4) GN=hcr
7. KTU489	30815	38	Uncharacterized protein OS=Zea mays GN=ZEAAMB73_454986 PE=4 SV=1
8. H2XTV5	35213	35	Uncharacterized protein OS=Ciona intestinalis PE=4 SV=1
9. G5M0H4	6772	35	Uncharacterized protein OS=Hypocreavirens (strain Gv29-8 / FGSC 10586) GN=TRIVIDRAFT_175991 PE=4
10. Q7TQ43	68162	34	Nucleolin OS=Cyprinus carpio L PE=2 SV=1
11. Q4WQ99	50433	34	Oleosin OS=Arabidopsis lyrata subsp. lyrata GN=GRP17 PE=3 SV=1
12. K2SSK2	17028	34	SCP-like protein (Fragment) OS=Necator americanus GN=NECAME_19417 PE=4 SV=1
13. M1DA29	17130	34	Uncharacterized protein OS=Solanum tuberosum GN=PGSC0003DMG400035265 PE=4 SV=1
14. S9WHC7	57113	34	Signal recognition particle subunit SRP54 OS=Streptomyces culicis GN=STCU_01190 PE=3 SV=1
15. T1P0H6	40390	34	LIM domain protein OS=Musca domestica PE=2 SV=1
16. F0HV13	56378	33	Putative uncharacterized protein OS=Vitis vinifera GN=VIT_14s0066g01590 PE=4 SV=1
17. A2ETD4	50470	33	Putative uncharacterized protein OS=Trichomonas vaginalis GN=TVAG_203580 PE=4 SV=1
18. R0JH94	37958	33	Uncharacterized protein OS=Anas platyrhynchos GN=Anapl_09432 PE=4 SV=1
19. B3MV07	16157	32	GFP1870 OS=Drosophila ananassae GN=Dana/GFP1870 PE=4 SV=1
20. L1JLQ1	10761	32	Uncharacterized protein OS=Guillardia theta CCMP2713 GN=GUITHRAFT_151603 PE=4 SV=1

Fig. 63. MALDI-TOF 결과 확보된 단백질 절편의 아미노산 서열 및 그 정보를 활용한 MATSCOT 결과리스트 (spot 43, 46, 47, 61)

Table 2. 전통누룩으로부터 분리한 단백질 동정 리스트

Spot no. <sup>a</sup>	Protein name	Species
C1	<i>AlgE</i> Exonuclease family protein Alkyl hydroperoxide reductase	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Chlamydia psittaci</i> <i>Mycobacterium xenopi</i>
C2	ilvGM operon attenuation leader peptide Membrane protein	<i>Shewanella oneidensis MR-1</i> <i>Enterobacteriaceae</i>
C3	<i>insA</i> N-terminal domain protein Transposase Insertion element protein	<i>Escherichia coli</i> <i>Salmonella enterica subsp.</i> <i>Escherichia coli</i>
C4	Photosystem II subunit H AcetylCoA acetyltransferase 40S ribosomal protein S25-like Pyridoxamine 5-phosphate oxidase-related FMN-binding protein	<i>Xyris jupicai</i> <i>Pseudomonas syringae</i> <i>Cricetulus griseus</i> <i>Thermuncola potens JR</i>
C6	Lactoylglutathione lyase Glyoxalase	<i>Aegilops tauschii</i> <i>Oryza sativa Japonica Group</i>
C7	Lactoylglutathione lyase Glyoxalase I	<i>Triticum urartu</i> <i>Oryza sativa Japonica Group</i>
C8	Mung bean seed albumin Pyruvate phosphate dikinase <i>PpdK1</i> ABC transporter ATPbinding protein NADH dehydrogenase 1 alpha subcomplex 9 Recombinase <i>RecA</i> Dedicator of cytokinesis protein 4 Pyruvate phosphate dikinase Protein kinase domain protein FAD-linked oxidase	<i>Vigna radiata var radiata</i> <i>Acetobacterium woodii</i> <i>Rhodospirillum centenum SW</i> <i>Spathaspora passalidarum</i> <i>Oceanibulbus indolicus</i> <i>Mesocricetus auratus</i> <i>Oribacterium sinus</i> <i>Ichthyophthirius multifiliis</i> <i>Desulfospira joergensenii</i>
C9	Triosephosphate isomerase (S)-tetrahydropyroberberine oxidase	<i>Brachypodium distachyon</i> <i>Corydalis saxicola</i>
C10	Mung bean seed albumin Enoyl-CoA hydratase Arginyl-tRNA synthetase Lipoplysaccharide heptosyltransferase FAD-linked oxidase Acyl-CoA dehydrogenase Aubergine Alpha/beta-hydrolase DNA polymerase <i>LigD</i>	<i>Vigna radiata var. radiata</i> <i>Streptomyces avermitilis</i> <i>Roseobacter sp.</i> <i>Ralstonia syzygii</i> <i>Desulfospira joergensenii</i> <i>Achromobacter xylosoxidans A8</i> <i>Drosophila melanogaster</i> <i>Gloeocephalum trabeum</i> <i>Microbacterium yannicci</i>
C11	Peroxidase BP 1 ATP-dependent chaperone <i>ClpB</i> Transposase Dehydrogenase	<i>Hordeum vulgare</i> <i>Mesorhizobium ciceri</i> <i>Thermus islandicus</i> <i>Mycobacterium rhodesiae</i>
C12	Peroxidase ATP-dependent chaperone <i>ClpB</i>	<i>Hordeum vulgare</i> <i>Mesorhizobium ciceri</i>
C13	Formate acetyltransferase Pf1 Sporulation protein	<i>Clostridium saccharoperbutylacetonicum</i> <i>Thermoplasma acidophilum</i>
C14	Mung bean seed albumin Isoaspartyl dipeptidase	<i>Vigna radiata</i> <i>Clostridium botulinum</i>
C15	Lactoylglutathione lyase Glyoxalase/Bleomycin resistance protein/Dioxygenase Kinase	<i>Triticum urartu</i> <i>Theobroma cacao</i> <i>Fomitiporia mediterranea</i>
C16	Homoserine dehydrogenase Long-chain-fatty-acid-CoA ligase Phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthase	<i>Nitrospina gracilis</i> <i>Pyrenophora tritici</i> <i>Pseudoramibacter alactolyticus</i>
C17	Homoserine dehydrogenase Long-chain-fatty-acid-CoA ligase Phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthase	<i>Nitrospina gracilis</i> <i>Pyrenophora tritici</i> <i>Pseudoramibacter alactolyticus</i>
C18	Carboxypeptidase Lactate dehydrogenase Adenyl cyclase 3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase	<i>Absidia zychae</i> <i>Labrenzia alexandrii</i> <i>Salinispora arenicola</i> <i>Orcinus orca</i>
C19	Glutamate synthase Tryptophan 2,3-dioxygenase Aminopeptidase <i>ypdE</i> Cytoplasmic protein Glutamate-ammonia ligase 6-phosphofructokinase	<i>Kordia algicida</i> <i>Streptomyces sp.</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Streptococcus oligofermentans</i> <i>Flavobacterium psychrophilum</i> <i>Lactobacillus delbrueckii</i>
C20	Transcriptional regulator, <i>PucR</i> Sn-glycerol-3-phosphate dehydrogenase Hydroxylamine reductase	<i>Clostridium butyricum</i> <i>Prevotella bivia</i> <i>Clostridium saccharobutylicum</i>

<sup>a</sup>Spot number as indicated in Fig. 1.

### (3) 3차년도 전통누룩 배양온도별 변화하는 단백질 연구

전체 단백질들의 발현변화를 profiling하기 위하여 분석을 실시하기 위하여 delta 2D를 이용하여 분석을 실시한 후, 전통누룩 E set(6가지 누룩 시료)와 전통누룩 F set(6가지 누룩시료) 간에 발현차가 나타나는 관심단백질, 또는 발효기간 중 계속적으로 발견되는 관심단백질 spot 40개를 선별하였다(Fig. 64, 65). 크기와 density에 따라 spot의 gel 조각을 확보하여 직접 tryptic in-gel digestion 한 후 Q-TOF 분석을 진행하였다. 또한 1차(10개) 와 2차(20개) 작업 보다 현저히 많은 40개의 spot을 분석하여 MALDI-TOF 분석결과를 확보하였고 현재까지 확보된 단백질의 일부 아미노산 서열을 이용하여 NCBI/SWISSPROT/UNIREF를 활용한 mass data 매칭 원리로 동정을 하는 Macot 분석 결과를 Fig. 70,71에 나타내었고 Table. 3에 정리하였다. 또한 대표 분비효소 단백질인 alpha-amylase, chitinase, serine protease inhibitor, alpha-amylase inhibitor, quinolinate synthetase, lactoylglutathion lyse, glutamate synthase, nitroreductase, peptidase, toluene hydroxylase가 조사되었으며(Fig. 67) 전통누룩 E와 전통누룩 F의 원료인 보리의 chitinase와 녹두의 albumin이 확인되었다(Fig. 68,69). 그 외에 추가적으로 전통누룩 E(0, 3, 6, 10, 20, 30일)와 전통누룩 F(0, 3, 6, 10, 20, 30일)의 12개 gel 전체에서 확인된 spot 모두를 확보하였으며 추가적으로 관심 spot들을 분석하여 발효과정에 관여하는 단백질 조사를 통해 누룩발효의 온도별, 기간별 분비에 차이가 나타나는 단백질을 알 수 있을 것으로 사료된다.

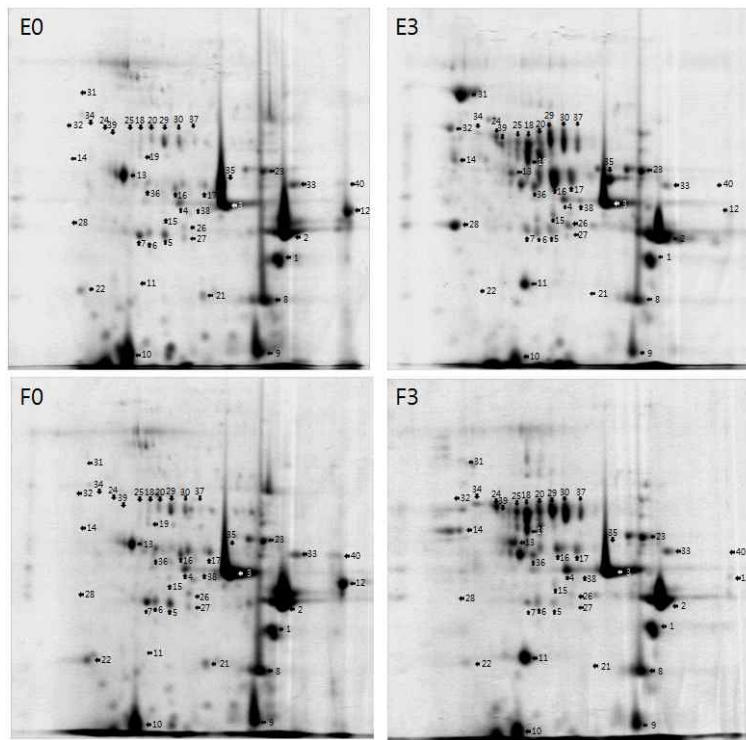


Fig. 64. 누룩E와 누룩F의 단백질체학 수행 후 발현차를 보이는 spot의 분석

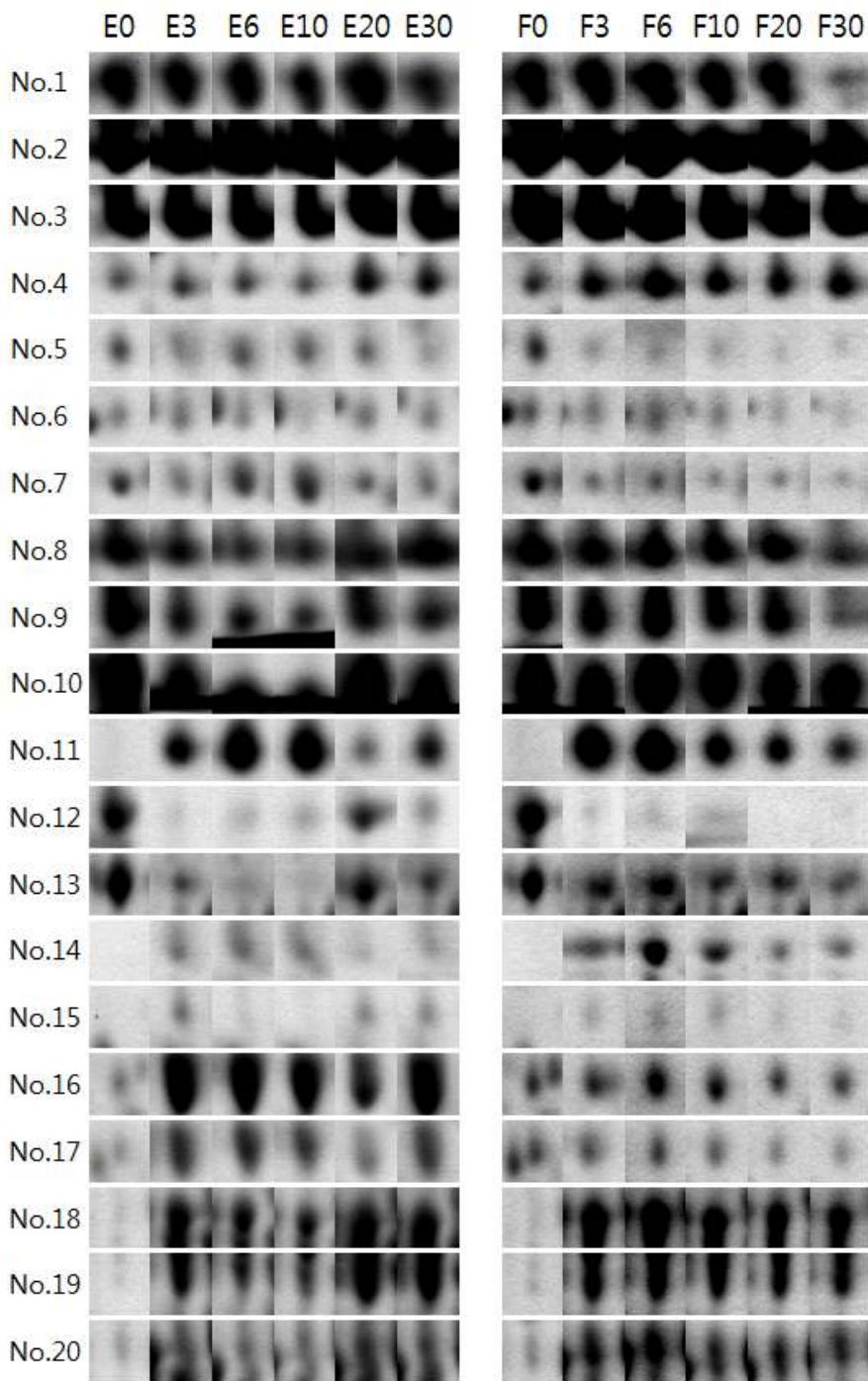


Fig. 65. Comparison of spot density of nuruk E and F from 2D-PAGE gel

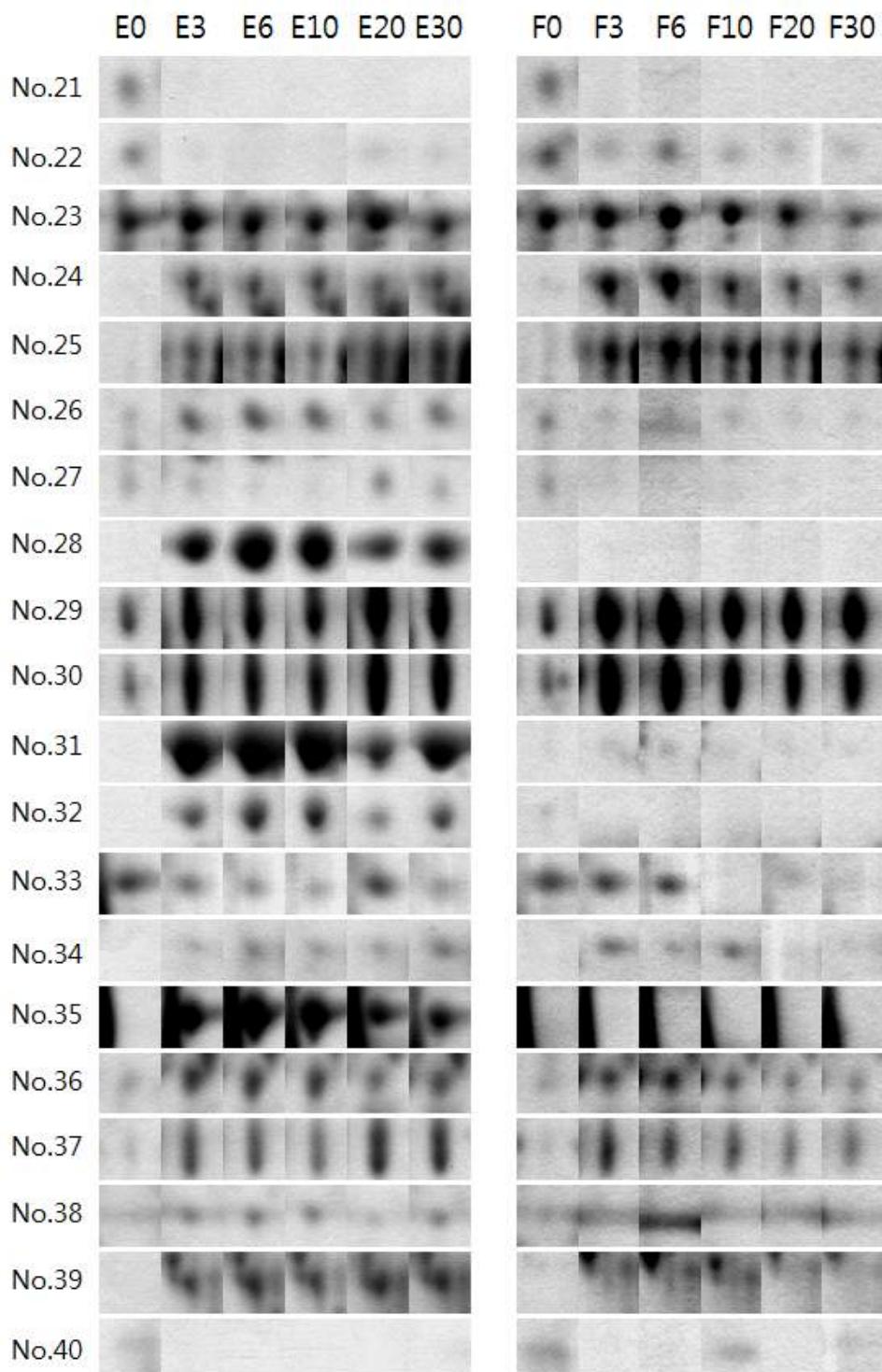


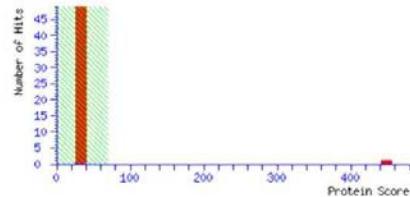
Fig. 66. Comparison of spot density of nuruk E and F from 2D-PAGE gel

## Mascot Search Results

```
User      : 
Email     : 
Search title : BAEDW\2016_10_31\2016_10_31\MSMS 7\IS
Database  : SwissProt 20131104 (541561 sequences; 192480382 residues)
Timestamp : 31 Oct 2016 at 04:57:40 GMT
Warning   : A Peptide summary report will usually give a much clearer picture of MS/MS search results.
Top Score : 449 for IAAS_HORVU, Alpha-amylase/subtilisin inhibitor OS=Hordeum vulgare PE=1 SV=2
```

### Mascot Score Histogram

Protein score is  $-10^{\circ}\log(P)$ , where P is the probability that the observed match is a random event.  
 Protein scores greater than 70 are significant ( $p<0.05$ ).  
 Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



### Protein Summary Report

Format As	Protein Summary (deprecated) <input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Help</a>	
Significance threshold p<	0.05	Max. number of hits <input type="text" value="20"/>	
<a href="#">Re-Search All</a> <a href="#">Search Unmatched</a>			
<b>Index</b>			
Accession	Mass	Score	Description
1. IAAS_HORVU	22378	449	Alpha-amylase/subtilisin inhibitor OS=Hordeum vulgare PE=1 SV=2
2. Y1269_HAEIN	4559	44	Uncharacterized protein HI_1269 OS=Haemophilus influenzae (strain ATCC 51907 / DSM 11121 / KW20 / Rd) GN=Y1269_HAEIN PE=1 SV=2
3. KLP1_SCHPO	96733	43	Kinesin-like protein 1 OS=Schizosaccharomyces pombe (strain 972 / ATCC 24843) GN=klp1 PE=2 SV=2
4. RF2_MYCG1	41503	42	Peptide chain release factor 2 OS=Mycobacterium gilvum (strain PYR-GCK) GN=prfB PE=3 SV=2
5. SG01_SCHPO	37568	42	Shugoshin-1 OS=Schizosaccharomyces pombe (strain 972 / ATCC 24843) GN=sgol PE=1 SV=1
6. Y2463_PECGP	55695	42	UPF0061 protein PCI_2463 OS=Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum (strain PCI) GN=PCI_2463 PE=3 SV=2
7. SPT4_GIBZE	14195	41	Transcription elongation factor SPT4 OS=Gibberella zeae (strain PH-1 / ATCC MYA-4620 / FGSC 9075 / NRRL 3333) GN=SPT4_GIBZE PE=3 SV=1
8. EXPFA_ACRCH	36798	40	Cephalosporin biosynthesis expandase/hydroxylase OS=Acromonium chrysogenum GN=CEFEF PE=3 SV=1
9. IAAS_WHEAT	19849	40	Endogenous alpha-amylase/subtilisin inhibitor OS=Triticum aestivum PE=1 SV=1
10. KAD2_DANRE	26884	40	Adenylate kinase 2, mitochondrial OS=Danio rerio GN=ak2 PE=2 SV=1
11. RECFC_HAEPS	41907	40	DNA replication and repair protein RecF OS=Haemophilus parasuis serovar 5 (strain SH0165) GN=recF PE=3 SV=1
12. ISCS_VIBVU	45201	40	Cysteine desulfurase OS=Vibrio vulnificus (strain CMCP6) GN=iscS PE=3 SV=1
13. ISCS_VIBVU	45157	40	Cysteine desulfurase OS=Vibrio vulnificus (strain YJ016) GN=iscS PE=3 SV=1
14. ISCS_VIBHV	45164	40	Cysteine desulfurase OS=Vibrio harveyi (strain ATCC BAA-1116 / BB120) GN=iscS PE=3 SV=1
15. FEOC_PRMH	8807	39	Ferrous iron transport protein C OS=Proteus mirabilis (strain HT4320) GN=feoC PE=3 SV=1
16. CYPC_BACSU	48363	39	Fatty-acid peroxygenase OS=Bacillus subtilis (strain 168) GN=cypc PE=1 SV=1
17. MNMA_MYCBP	38439	39	tRNA-specific 2-thiouridylase Mnma OS=Mycobacterium bovis (strain ATCC BAA-935 / AF2122/97) GN=mnmA PE=3 SV=1
18. MNMA_MYCBP	38439	39	tRNA-specific 2-thiouridylase Mnma OS=Mycobacterium bovis (strain BCG / Pasteur 1173P2) GN=mnmA PE=3 SV=1
19. MNMA_MYCBT	38439	39	tRNA-specific 2-thiouridylase Mnma OS=Mycobacterium bovis (strain BCG / Tokyo 172 / ATCC 35737 / TMC 101) GN=mnmA PE=3 SV=1
20. MNMA_MYCTA	38439	39	tRNA-specific 2-thiouridylase Mnma OS=Mycobacterium tuberculosis (strain ATCC 25177 / H37Ra) GN=mnmA PE=3 SV=1

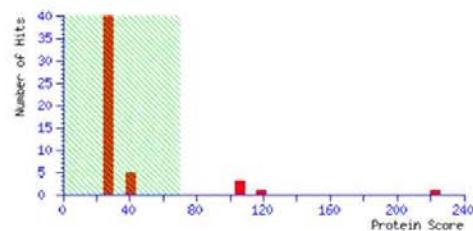
Fig. 67. Mascot data of a purified protein from 2D-PAGE

## MASCOT Search Results

```
User      :
Email     :
Search title : BAEDW\2016_10_31\2016_10_31\MSMS 7\I2
Database   : SwissProt 20131104 (541561 sequences; 192480382 residues)
Timestamp  : 31 Oct 2016 at 04:57:18 GMT
Warning    : A Peptide summary report will usually give a much clearer picture of MS/MS search results.
Top Score  : 223 for CHI2_HORVU, 26 kDa endochitinase 2 OS=Hordeum vulgare PE=1 SV=1
```

### Mascot Score Histogram

Protein score is  $-10^6 \log(P)$ , where P is the probability that the observed match is a random event.  
 Protein scores greater than 70 are significant ( $p < 0.05$ ).  
 Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



### Protein Summary Report

<input type="button" value="Format As"/>	<input type="button" value="Protein Summary (deprecated)"/>	<input type="button" value="Help"/>
Significance threshold $p < 0.05$		Max. number of hits <input type="text" value="20"/>
<input type="button" value="Re-Search All"/>	<input type="button" value="Search Unmatched"/>	

### Index

Accession	Mass	Score	Description
1. CHI2_HORVU	28537	223	26 kDa endochitinase 2 OS=Hordeum vulgare PE=1 SV=1
2. CHIC_SECCE	28683	114	Basic endochitinase C OS=Secale cereale GN=rsc2 PE=1 SV=1
3. IAMY_COILA	14638	112	Alpha-amylase inhibitor/endochitinase (Fragments) OS=Coix lachryma-jobi PE=1 SV=1
4. CHI1_HORVU	34350	107	26 kDa endochitinase 1 OS=Hordeum vulgare PE=2 SV=4
5. CHIA_SECCE	34589	107	Basic endochitinase A OS=Secale cereale GN=rsc2 PE=1 SV=1
6. RL31B_CUPNH	9841	36	50S ribosomal protein L31 type B OS=Cupriavidus necator (strain ATCC 17699 / H16 / DSM 428 /
7. RL31B_CUPPJ	9888	36	50S ribosomal protein L31 type B OS=Cupriavidus pinatubonensis (strain JMP134 / LMG 1197) GN=
8. RL31B_CUPTR	9814	36	50S ribosomal protein L31 type B OS=Cupriavidus taiwanensis (strain R1 / LMG 19424) GN=rpmE2
9. CYAS_METPS	47471	35	Cysteate synthase OS=Methanococcus paludicola (strain DSM 17711 / JCM 13418 / NBRCC 101707 / SA
10. Y2178_VIBPA	12015	34	Nucleoid-associated protein VP2178 OS=Vibrio parahaemolyticus serotype O3:K6 (strain RIMD 221
11. MED7_ASPNC	29618	34	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 7 OS=Aspergillus niger (strain CBS 513.88
12. RBS_SACHY	19252	33	Ribulose bisphosphate carboxylase small chain, chloroplastic OS=Saccharum hybrid GN=RBCS PE=3
13. ATT_BOMMO	22656	32	Attacin OS=Bombyx mori PE=2 SV=1
14. NAUT_NAUMA	33147	32	Nautilin-63 (Fragments) OS=Nautilus macromphalus PE=1 SV=1
15. CPKS_THEEB	20578	32	Chromophore lyase CpcS/Cpes OS=Thermosynechococcus elongatus (strain BP-1) GN=cpcS PE=1 SV=1
16. GBG4_HUMAN	8554	31	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) subunit gamma-4 OS=Homo sapiens GN=GNG4 PE=
17. GBG4_MOUSE	8570	31	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) subunit gamma-4 OS=Mus musculus GN=Gng4 PE=
18. GBG4_PONAB	8554	31	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) subunit gamma-4 OS=Pongo abelii GN=GNG4 PE=
19. YRB2_YEAST	36090	31	Ran-specific GTPase-activating protein 2 OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S2
20. RL2_TREPA	30019	31	50S ribosomal protein L2 OS=Treponema pallidum (strain Nichols) GN=rplB PE=3 SV=1

Fig. 68. Mascot data of a purified protein from 2D-PAGE

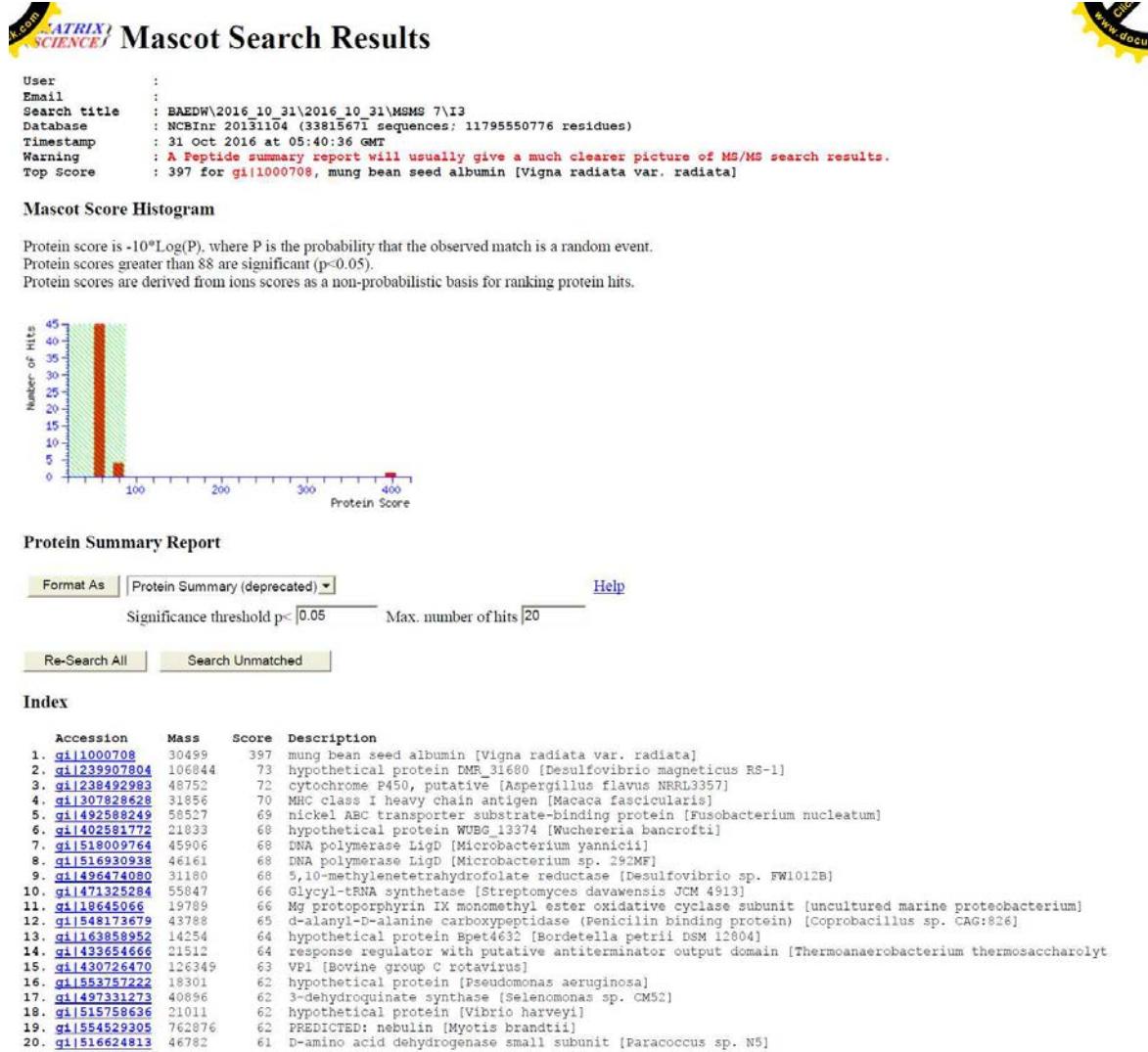


Fig. 69. Mascot data of a purified protein from 2D-PAGE

Accession	Mass	Score	Description
1. <a href="#">gi 2454602</a>	23554	240	amylase [Hordeum vulgare subsp. vulgare]
2. <a href="#">gi 14164981</a>	24541	239	thiamatin-like protein TLPL [Hordeum vulgare]
3. <a href="#">gi 14164983</a>	25213	170	thiamatin-like protein TLPL [Hordeum vulgare]
4. <a href="#">gi 326230430</a>	25203	170	predicted protein [Hordeum vulgare subsp. vulgare]
5. <a href="#">gi 14164978</a>	34623	169	thiamatin-like protein TLPL [Hordeum vulgare]
6. <a href="#">gi 2344818</a>	26010	168	basic pathogenesis-related protein PR5 [Hordeum vulgare subsp. vulgare]
7. <a href="#">gi 20297409</a>	24495	153	thiamatin-like protein [Triticum aestivum]
8. <a href="#">gi 326491955</a>	24626	121	predicted protein [Hordeum vulgare subsp. vulgare]
9. <a href="#">gi 1371392</a>	24573	110	permatin precursor [Avena sativa]
10. <a href="#">gi 1417986</a>	4507	70	RecName: Full=Antifungal protein R
Accession	Mass	Score	Description
1. <a href="#">gi 155784480</a>	26131	225	Chain A, The Refined Crystal Structure Of An Endochitinase From Hordeum Vulgare L. Seeds To 1.8 Angstrom
2. <a href="#">gi 17435349</a>	26327	225	chitinase (E.C.3.2.1.14) - two-rowed barley
3. <a href="#">gi 326510141</a>	28563	223	predicted protein [Hordeum vulgare subsp. vulgare]
4. <a href="#">gi 1316316</a>	28537	223	RecName: Full=26 kDa endochitinase 2; AltName: Full=CHI-26; Flags: Precursor
5. <a href="#">gi 13310888</a>	26407	213	Chain A, Crystal Structure Of A Chitinase From Rye Seeds At 1.91 Å Resolution
6. <a href="#">gi 162465314</a>	28599	189	chain II chitinase [Triticum aestivum]
7. <a href="#">gi 136490894</a>	34150	115	chitinase [Hordeum inaequale]
8. <a href="#">gi 13648959</a>	34590	115	predicted protein [Hordeum vulgare subsp. vulgare]
9. <a href="#">gi 140097743</a>	26609	114	Chain A, Crystal Structure Of A Family Chitinase From Rye Seeds
10. <a href="#">gi 1550344508</a>	26493	114	Chain A, Crystal Structure Of A Family Chitinase (w72a/e7q Mutant) From Rye Seeds In Complex With
Accession	Mass	Score	Description
1. <a href="#">gi 11000708</a>	30499	397	mung bean seed albumin [Vigna radiata var. radiata]
2. <a href="#">gi 1239907804</a>	106844	73	hypothetical protein IMB_31680 [Desulfovibrio magnetius RS-1]
3. <a href="#">gi 1238492881</a>	48752	70	cytchrome P450, putative [Aspergillus flavus NRRL3357]
4. <a href="#">gi 1307828626</a>	31856	70	MHC class I heavy chain antigen [Macacus fascicularis]
5. <a href="#">gi 1492588249</a>	58527	69	nickel ABC transporter substrate-binding protein [Vysobacterium nucleatum]
6. <a href="#">gi 140258172</a>	21833	68	hypothetical protein WUSC_13374 [Wuchereria bancrofti]
7. <a href="#">gi 1518009764</a>	45906	68	DNA polymerase LigD [Microbacterium yannicini]
8. <a href="#">gi 1516930938</a>	46161	68	DNA polymerase LigD [Microbacterium sp. 292MP]
9. <a href="#">gi 1496474080</a>	31180	68	5,10-methylenetetrahydrofolate reductase [Desulfovibrio sp. FW10128]
10. <a href="#">gi 1473252884</a>	55847	66	Glycyl-tRNA synthetase [Streptomyces davavensis JCM 4913]
Accession	Mass	Score	Description
1. <a href="#">PRVB_SCOPJ</a>	11652	26	Parvalbumin beta OS=Scomber japonicus PE=1 SV=2
2. <a href="#">GRG_LNKED</a>	9224	25	Guanine nucleotide-binding protein subunit gamma OS=Lentinula edodes GN=ggl PE=3 SV=1
3. <a href="#">TAG2Q_AEGOR</a>	7996	25	U2-agaktonin-Aolg OS=Agelena orientalis PE=2 SV=1
4. <a href="#">BL37_TREAC</a>	6510	24	50S ribosomal protein L37e OS=Thermoplasma acidophilum (strain ATCC 25905 / DSM 1728 / JCM 9062 / NBRC 1'
5. <a href="#">URED_STREO</a>	32375	24	Urease accessory protein UreB OS=Streptococcus thermophilus (strain ATCC BAA-491 / LMD-9) GN=ureD PE=3 SV=1
6. <a href="#">HOM12_DENAN</a>	7914	24	Moscarinic m1-toxin 2 OS=Dendroaspis angusticeps PE=1 SV=1
7. <a href="#">VPU_CAVF</a>	8662	24	Protein Vpu OS=Capsiprotein arthritis encephalitis virus GN=vpu PE=4 SV=1
8. <a href="#">NOM11_DENAN</a>	10278	23	Moscarinic m1-toxin 1 OS=Dendroaspis angusticeps PE=1 SV=1
9. <a href="#">PA21B_STYRCA</a>	2680	22	Phospholipase A2 (Fragment) OS=Struthio camelus GN=PLA2G1B PE=1 SV=1
10. <a href="#">EXTS_DECAP</a>	8838	22	Exodeoxyribonuclease 7 small subunit OS=Dechloromonas aromatic (strain KCB) GN=xssb PE=3 SV=1
Accession	Mass	Score	Description
1. <a href="#">gi 75282567</a>	42851	183	RecName: Full=Surp-E7; AltName: Full=Surp7; AltName: Full=Horvul7
2. <a href="#">gi 1397589709</a>	34319	70	hypothetical protein THAOC_25579 [Thalassiosira oceanica]
3. <a href="#">gi 13310677</a>	43307	67	protein x-type antigen [Hordeum vulgare subsp. vulgare]
4. <a href="#">gi 185543847</a>	3280	65	putative bacteriophage sigma peptide protein [Pseudomonas fluorescens]
5. <a href="#">gi 1494371052</a>	27024	65	NADPH-dependent PMN reductase [Homolea phototrophica]
6. <a href="#">gi 1494138499</a>	11763	62	hypothetical protein [Bifidobacterium longue]
7. <a href="#">gi 191778912</a>	10615	59	hypothetical protein Bxe_B1186 [Burkholderia xenovorans LB400]
8. <a href="#">gi 1514252529</a>	10253	57	MHC class I antigen, partial [Thriops episcopus]
9. <a href="#">gi 1295667737</a>	20653	56	conserved hypothetical protein [Paracoccidioides sp. 'Iutzzii' #B01]
10. <a href="#">gi 131450543</a>	16147	56	hypothetical protein DAPPUDRAFT_270289 [Daphnia pulex]
Accession	Mass	Score	Description
1. <a href="#">H183_METHY</a>	15281	18	Phosphoribosyl-AMP cyclohydrolase OS=Methanospirillum hungatei JP-1 (strain ATCC 27890 / DSM 864 / NBRC 1'
2. <a href="#">RIBFA_RUEPO</a>	14992	18	Ribosome-binding factor A OS=Ruegeria pomoreyli (strain ATCC 700808 / DSM 15171 / DSM 8-2) GN=rbfA PE=3 SV=1
3. <a href="#">Y978_MTCVA</a>	17010	17	Uncharacterized protein MJ9978 OS=Methanococcoides jannaschii (strain ATCC 43067 / DSM 2661 / JAL-1 / J
4. <a href="#">SS9G_BAC92</a>	3267	17	Hmab, acid-soluble spore protein G OS=Bacillus subtilis (strain 169) GN=sspg PE=1 SV=3
5. <a href="#">BL14_MYC52</a>	3501	17	50S ribosomal protein L34 OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155) GN=rpmB PE=3 SV=1
6. <a href="#">BL14_MYC54</a>	3502	17	50S ribosomal protein L34 OS=Mycobacterium smegmatis GN=rpmC PE=3 SV=1
7. <a href="#">MRB_BETEV</a>	1623	17	Methyl basic protein OS=Heterodontus francisci CN=mfp PE=2 SV=2
8. <a href="#">Y193_BETEV</a>	4751	17	Gene 19.3 protein OS=Enterobacteria phage Z-19.3 CN=19.3 PE=4 SV=1
9. <a href="#">BL12_SACD2</a>	6830	16	50S ribosomal protein L32 OS=Saccharophagus degradans (strain Z-40 / ATCC 43981 / DSM 17024) GN=rpmE PE=3
10. <a href="#">BFR_BRUMC</a>	18704	16	Bacterioferritin OS=Sphaerotilus melleitus biotype 1 (strain 16M / ATCC 23456 / NCTC 10094) GN=bfr PE=3 SV=1
Accession	Mass	Score	Description
1. <a href="#">SSPP_BACCH</a>	5119	18	Small, acid-soluble spore protein F OS=Bacillus cereus (strain ATCC 14579 / DSM 31) GN=sspF PE=3 SV=1
2. <a href="#">Y193_BPT3</a>	6751	17	Gene 19.3 protein OS=Enterobacteria phage T3 CN=19.3 PE=4 SV=1
3. <a href="#">BL35_EX12</a>	7329	16	50S ribosomal protein L35 OS=Escherichia albertii (strain DSM 17290 / JCM 13490 / 255-15) GN=rpmE
4. <a href="#">BL28_PORG3</a>	9118	14	50S ribosomal protein L28 OS=Porphyromonas gingivalis (strain ATCC 33277 / DSM 20709 / JCM 12257) GN=rpmB
5. <a href="#">BL28_PORG4</a>	9118	14	50S ribosomal protein L28 OS=Porphyromonas gingivalis (strain ATCC 16993 / mc(2)155) GN=rpmB PE=3 SV=1
6. <a href="#">COMP_ECOLI</a>	23803	14	HTN-type transcriptional repressor ComR OS=Escherichia coli (strain K12) GN=corR PE=1 SV=2
7. <a href="#">BL23_SULTO</a>	9410	14	50S ribosomal protein L33P OS=Sulfolobus tokodaii (strain ATCC BAA-304 / W83) GN=rpmD PE=3 SV=1
8. <a href="#">BL23_SCEOB</a>	10496	13	50S ribosomal protein L23, chloroplastic OS=Scenedesmus obliquus GN=rpl12 PE=3 SV=2
9. <a href="#">Y508_STRT1</a>	9757	13	UFPO291 protein str0508 OS=Streptococcus thermophilus (strain CNRZ 1066) GN=st0508 PE=3 SV=1
10. <a href="#">Y508_STRT2</a>	9757	13	UFPO291 protein str0508 OS=Streptococcus thermophilus (strain ATCC BAA-250 / IMG 18311) GN=st0508 PE=3 SV=1
Accession	Mass	Score	Description
1. <a href="#">IAAS_HORVO</a>	22378	449	Alpha-amylase/subtilisin inhibitor OS=Hordeum vulgare PE=1 SV=2
2. <a href="#">Y1269_HAKIN</a>	4559	44	Uncharacterized protein H1_1269 OS=Haemophilus influenzae (strain ATCC 51907 / DSM 11121 / KWD-1) GN=hki
3. <a href="#">ELP1_SCRCO</a>	96733	43	Kinesin-like protein 1 OS=Schizosaccharomyces pombe (strain 972 / ATCC 24843) GN=klp1 PE=2 SV=2
4. <a href="#">FP2_MYCG1</a>	41503	42	Peptide chain release factor 2 OS=Mycobacterium Gilvum (strain PYR-GCK) GN=prfB PE=3 SV=1
5. <a href="#">SG01_SCRCO</a>	37568	42	Shugoshin-1 OS=Schizosaccharomyces pombe (strain 972 / ATCC 24843) GN=sgol PE=1 SV=1
6. <a href="#">Y2463_FECPPC</a>	55695	42	UFPO061 protein PC1_2463 OS=Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum (strain PC1) GN=PC1_2463 PE=3
7. <a href="#">SPT4_GIBRE</a>	14195	41	Transcription elongation factor SPT4 PH-1 / ATCC MYA-4620 / FGSC 9075 / NRRL 3679
8. <a href="#">EXPA_ACRCB</a>	36798	40	Cephalocaprin biosynthesis expandase/hydroxylase OS=Acromyces chrysogenum GN=CEFEF PE=3 SV=1
9. <a href="#">IAAS_SWHEAT</a>	19849	40	Endogenous alpha-amylase/subtilisin inhibitor OS=Triticum aestivum PE=1 SV=1
10. <a href="#">KAD2_DANRE</a>	26884	40	Aldo-keto kinase 2, mitochondrial OS=Danio rerio GH-ak2 PE=2 SV=1
Accession	Mass	Score	Description
1. <a href="#">gi 2707922</a>	16924	162	BTI-CM2.1 [Hordeum vulgare subsp. vulgare]
2. <a href="#">gi 2707924</a>	16849	162	BTI-CM2.1 [Hordeum vulgare subsp. vulgare]
3. <a href="#">gi 1405736</a>	16741	107	trypsin inhibitor cmc precursor [Hordeum vulgare]
4. <a href="#">gi 185662780</a>	16695	107	RecName: Full=Trypsin inhibitor Bpe1; AltName: Full=Alpha-amylase/trypsin inhibitor; AltName: Full=BTI-C
5. <a href="#">gi 390478612</a>	151809	79	PREDICTed: zinc finger protein Bl [Callithrix jacchus]
6. <a href="#">gi 28755518</a>	16826	66	trypsin inhibitor [Hordeum vulgare]
7. <a href="#">gi 663344721</a>	16825	66	BTI-CM2.1 [Hordeum vulgare subsp. vulgare]
8. <a href="#">gi 1337265945</a>	34441	65	DNase polymerase sigma-32 subunit PspN [Mesorhizobium opportunistum WSM2075]
9. <a href="#">gi 14337272819</a>	34455	65	alternative sigma factor Rp01 [Mesorhizobium australicum WSM2073]
10. <a href="#">gi 1493371665</a>	34441	65	sigma H (sigma 32) factor of RNA polymerase; transcription of heat shock and stress proteins [Mesorhizobium australicum WSM2073]
Accession	Mass	Score	Description
1. <a href="#">gi 2506771</a>	16376	243	RecName: Full=Alpha-amylase inhibitor BMAJ-1; AltName: Full=Alpha-amylase flour inhibitor; AltName: Al
2. <a href="#">gi 1516447893</a>	54047	85	Fe-S cluster assembly protein SufB [Dietzia sp. UC-DTP]
3. <a href="#">gi 1376242887</a>	54290	79	Fe-S cluster assembly ABC transporter permease [Corynebacterium diphtheriae CDCE 8392]
4. <a href="#">gi 1489630812</a>	57104	71	beta-glucosidase [Bryoxipeltrochaceae]
5. <a href="#">gi 382233880</a>	51649	68	hypothetical protein DifP1295 [Corynebacterium diphtheriae NCTC 13129]
6. <a href="#">gi 121970298</a>	42171	67	hypothetical protein [Streptosporangium roseum DSM 43021]
7. <a href="#">gi 376251366</a>	54278	67	Fe-S cluster assembly ABC transporter permease [Corynebacterium diphtheriae NC03]
8. <a href="#">gi 375290952</a>	54277	67	ABC transporter involved in Fe-S cluster assembly permease protein [Corynebacterium diphtheriae 241]
9. <a href="#">gi 1375293164</a>	54248	67	ABC transporter involved in Fe-S cluster assembly permease protein [Corynebacterium diphtheriae INCA 4]
10. <a href="#">gi 376290492</a>	54277	67	Fe-S cluster assembly ABC transporter permease C7 (beta)

Fig. 70. MALDI-TOF 결과 확보된 단백질 절편의 아미노산 서열 및 그 정보를 활용한 MATSCOT 결과리스트(spot 1-10)

No. 11

Accession	Mass	Score	Description
1. <a href="#">gi 493894578</a>	37301	73	quinalinate synthetase [ <i>Corynebacterium lipophiloflavum</i> ]
2. <a href="#">gi 284033099</a>	23257	71	ECF subfamily RNA polymerase sigma-24 subunit [ <i>Kribbella flavida</i> DSM 17836]
3. <a href="#">gi 1517020936</a>	67379	69	ATP-dependent DNA helicase RecQ [ <i>Salinispora pacifica</i> ]
4. <a href="#">gi 1547279122</a>	44433	69	uncharacterized protein [Bacteroides fragilis CAG:558]
5. <a href="#">gi 146137189</a>	34806	65	hypothetical protein PGJ0110_1 [ <i>Pusarium graminearum</i> PH-1]
6. <a href="#">gi 1517557106</a>	67249	63	ATP-dependent DNA helicase RecQ [ <i>Salinispora pacifica</i> ]
7. <a href="#">gi 1517653105</a>	67265	63	ATP-dependent DNA helicase RecQ [ <i>Salinispora pacifica</i> ]
8. <a href="#">gi 1517659052</a>	67347	63	ATP-dependent DNA helicase RecQ [ <i>Salinispora pacifica</i> ]
9. <a href="#">gi 1518043445</a>	34133	61	hypothetical protein [Clostridiales bacterium 3401234]

No. 12

Accession	Mass	Score	Description
1. <a href="#">gi 132577</a>	39954	259	RecName: Full=Protein synthesis inhibitor I; AltName: Full=Ribosome-inactivating protein I; AltName: Fu
2. <a href="#">gi 1410562855</a>	29715	259	Chain A, Structure Of Mutant Rip From Barley Seeds
3. <a href="#">gi 1410562859</a>	29795	259	Chain A, Structure Of Mutant Rip From Barley Seeds In Complex With Adenine
4. <a href="#">gi 1204307504</a>	29513	228	trig [Hordeum vulgare]
5. <a href="#">gi 132580</a>	29845	213	RecName: Full=Protein synthesis inhibitor II; AltName: Full=Ribosome-inactivating protein II; AltName:
6. <a href="#">gi 1325256599</a>	72629	70	PREDICTED: influenza virus NS1-binding protein homolog [Melpotitacus undulatus]
7. <a href="#">gi 482571400</a>	29708	59	hypothetical protein CARUB_v10020800ng [Capsella rubella]
8. <a href="#">gi 493657627</a>	25194	58	TetR family transcriptional regulator [Bradyrhizobium sp. ORS 285]
9. <a href="#">gi 269139202</a>	4346	58	hypothetical protein ETAE_1855 [Edwardiella tarda EIB202]
10. <a href="#">gi 19113442</a>	43081	54	cytochrome c heme lyase (predicted) [Schizosaccharomyces pombe 372h-]

No. 13

Accession	Mass	Score	Description
1. <a href="#">gi 326493416</a>	32811	177	predicted protein [Hordeum vulgare subsp. vulgare]
2. <a href="#">gi 4792808</a>	32581	124	PREDICTED: lactoylglutathione lyase-like isoform XI [Setaria italica]
3. <a href="#">gi 340628491</a>	17106	73	hypothetical protein NCAN_153H [Mycobacterium canettii CIFT 140010059]
4. <a href="#">gi 40684468</a>	28091	67	glutamate synthase [NADPH] [Marssonina brunnea f. sp. "multigermtubi" MBL_m1]
5. <a href="#">gi 95069140</a>	11771	67	Phage shock protein A [Cronobacter]
6. <a href="#">gi 15125347</a>	13801	67	Phage shock protein A [Cronobacter sakazakii]
7. <a href="#">gi 148826848</a>	11594	63	hypothetical protein CGSNLGE_00590 [Haemophilus influenzae PittGG]
8. <a href="#">gi 174125336</a>	32841	62	Lactoylglutathione lyase [ <i>Triticum urartu</i> ]
9. <a href="#">gi 29827371</a>	8179	62	hypothetical protein GAV_830 [Streptomyces avermitilis MA-4680]
10. <a href="#">gi 487714376</a>	43212	61	aminotransferase [Staphylococcus aureus]

No. 14

Accession	Mass	Score	Description
1. <a href="#">gi 37149073</a>	28227	76	chitin binding domain protein [Aspergillus oryzae RIB40]
2. <a href="#">gi 83771852</a>	31694	75	unnamed protein product [Aspergillus oryzae RIB40]
3. <a href="#">gi 1555547063</a>	15286	75	conserved hypothetical protein [Ricinus communis]
4. <a href="#">gi 134043935</a>	11670	49	hypothetical protein [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]
5. <a href="#">gi 13887117</a>	35178	48	hypothetical protein [Arachis hypogaea L.]
6. <a href="#">gi 11661457</a>	35193	47	hypoprotein [Chilli viral mottle virus]
7. <a href="#">gi 521043090</a>	9633	46	hypothetical protein [Sulfovibacillus thermosulfidooxidans]
8. <a href="#">gi 236494426</a>	28183	45	conserved hypothetical protein [Aspergillus flavus NRRL3357]
9. <a href="#">gi 495166886</a>	12406	45	hypothetical protein [Thalassospira profundimaris]
10. <a href="#">gi 1414342793</a>	4447	43	hypothetical protein B932_1814 [Gluconobacter oxydans H24]

No. 15

Accession	Mass	Score	Description
1. <a href="#">gi 37149073</a>	28227	227	protein z-type serpin [Hordeum vulgare subsp. vulgare]
2. <a href="#">gi 1331091</a>	43363	214	RecName: Full=Serpin-24; AltName: Full=B8Z4; AltName: Full=Horvz4; AltName: Full=Major endosperm albu
3. <a href="#">gi 19079</a>	19910	196	protein Z (I80 AA) [Hordeum vulgare]
4. <a href="#">gi 1224339</a>	23364	109	protein Z
5. <a href="#">gi 157869196</a>	71848	83	conserved hypothetical protein [Leishmania major strain Frieden]
6. <a href="#">gi 126795305</a>	100235	81	2-oxo-acid dehydrogenase XI subunit, homodimeric type [Mucoromonas mediterranea MBII-1]
7. <a href="#">gi 151226225</a>	165574	78	DMT homology (DN-domain) [Glaresis leyseniana ATCC 20868]
8. <a href="#">gi 1521236106</a>	41479	76	toluene hydroxylase [Amycolatopsis balhimycina]
9. <a href="#">gi 151857946</a>	40703	69	hypothetical protein [Fromicimonospora sukmooe]

No. 16

Accession	Mass	Score	Description
1. <a href="#">gi 1310677</a>	43307	173	protein z-type serpin [Hordeum vulgare subsp. vulgare]
2. <a href="#">gi 131091</a>	43363	164	RecName: Full=Serpin-24; AltName: Full=B8Z4; AltName: Full=Horvz4; AltName: Full=Major endosperm albu
3. <a href="#">gi 19079</a>	19910	108	protein Z (I80 AA) [Hordeum vulgare]
4. <a href="#">gi 1224339</a>	23364	121	protein Z
5. <a href="#">gi 157869196</a>	71848	78	enoyl-CoA hydratase [Frankia sp. CH3]
6. <a href="#">gi 126795305</a>	100235	77	TFA_inf: HUCL1545 [Drosophila melanogaster]
7. <a href="#">gi 151226225</a>	165574	71	hypothetical protein [Crocospheara watsonii]
8. <a href="#">gi 139720267</a>	39829	71	CHISPP-associated RAM3 Cam5 family protein [Thermofilum pendens Nrk 5]
9. <a href="#">gi 255605123</a>	18378	70	conserved hypothetical protein [Ricinus communis]
10. <a href="#">gi 483382918</a>	53684	69	CEN domain-containing protein 1B, partial [Anas platyrhynchos]

No. 17

Accession	Mass	Score	Description
1. <a href="#">gi 1310677</a>	43307	139	protein z-type serpin [Hordeum vulgare subsp. vulgare]
2. <a href="#">gi 131091</a>	43363	138	RecName: Full=Serpin-24; AltName: Full=B8Z4; AltName: Full=Horvz4; AltName: Full=Major endosperm albu
3. <a href="#">gi 19079</a>	19910	108	protein Z (I80 AA) [Hordeum vulgare]
4. <a href="#">gi 1224339</a>	23364	102	protein Z
5. <a href="#">gi 133248576</a>	80104	84	putative Alpha-glucosidase [Clostridium botulinum BTX015925]
6. <a href="#">gi 144760461</a>	69114	80	transcriptional terminator [Lactococcus lactis]
7. <a href="#">gi 136441403</a>	92130	70	hypothetical protein BAX100_0001 [Branchiostoma floridanum]
8. <a href="#">gi 1364443254</a>	71100	70	hypothetical protein BAX26_gpl1 [Staphylococcus phage SAP-26]
9. <a href="#">gi 1446072854</a>	71116	70	peptidase [Staphylococcus aureus]
10. <a href="#">gi 154394946</a>	75423	75	GNC domain/PTR system component TIA domain-containing protein [Lactococcus lactis subsp. cremoris K12]

No. 19

Accession	Mass	Score	Description
1. <a href="#">gi 15282562</a>	42851	330	RecName: Full=Serpin-27; AltName: Full=B8Z7; AltName: Full=Horvz7
2. <a href="#">gi 1497290085</a>	22409	83	nitroreductase [SAR11 cluster alpha proteobacterium RIMB100]
3. <a href="#">gi 496259382</a>	108400	77	membrane protein [Bradyrhizobium sp. STM 3843]
4. <a href="#">gi 1297625215</a>	100805	77	DNA gyrase subunit A [Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii CIRM-B1A1]
5. <a href="#">gi 470728154</a>	494923	75	hypothetical protein ACD_200014G0001 [uncultured bacterium (code 4)]
6. <a href="#">gi 498187395</a>	25162	73	hypothetical protein [Paenihacillus migil]
7. <a href="#">gi 495032322</a>	11512	72	membrane protein [Bacteroides finegoldii]
8. <a href="#">gi 1494633870</a>	31298	72	pyruvate formate lyase-activating protein [Megaphaera]
9. <a href="#">gi 488282517</a>	102131	71	phage tail tape measure protein [Enterococcus faecium]
10. <a href="#">gi 144690745</a>	130862	70	hypothetical protein, partial [Escherichia coli]

No. 20

Accession	Mass	Score	Description
1. <a href="#">gi 1310677</a>	43307	227	protein z-type serpin [Hordeum vulgare subsp. vulgare]
2. <a href="#">gi 75282567</a>	42851	215	RecName: Full=Serpin-27; AltName: Full=B8Z7; AltName: Full=Horvz7
3. <a href="#">gi 131091</a>	43363	209	RecName: Full=Serpin-24; AltName: Full=B8Z4; AltName: Full=Horvz4; AltName: Full=Major endosperm albu
4. <a href="#">gi 1547279122</a>	44433	104	ATP-dependent helicase [ <i>Halstonia solanacearum</i> ]
5. <a href="#">gi 493636209</a>	149536	92	hypothetical protein JCM768_1739 [Paracoccus aminophilus JCM 7686]
6. <a href="#">gi 496602431</a>	68644	87	hypothetical protein [Bacteroides sp. Z_156FAI]
7. <a href="#">gi 492266156</a>	68679	87	hypothetical protein [Bacteroides fragilis]
8. <a href="#">gi 214626532</a>	71940	83	heat shock protein 90 [Ralstonia pickettii 120]
9. <a href="#">gi 339443409</a>	32711	82	chorismate mutase [Clostridium sp. SY8519]
10. <a href="#">gi 357388416</a>	37850	81	phosphate starvation-inducible ATPase PhoH with RNA binding motif protein [Pelagibacter halotolerans]

Fig. 71. MALDI-TOF 결과 확보된 단백질 절편의 아미노산 서열 및 그 정보를 활용한 MATSCOT 결과리스트(spot 11-20)

Table 3. 전통누룩으로부터 분리한 단백질 동정 리스트

Spot no. <sup>a</sup>	Protein name	Species
1	Barperm1 Thaumatin-like protein YtfJ	<i>Hordeum vulgare</i> <i>Hordeum vulgare</i> <i>Bacillus subtilis</i>
2	Chitinase Alpha-amylase inhibitor	<i>Barley, Triticum aestivum, Bromus inermis, Hordeum vulgare</i> <i>Barley</i>
3	Albumin Cytochrome P450 Glycine Diphosphomevalonate decarboxylase	<i>Mung bean</i> <i>Aspergillus flavus</i> <i>Streptomyces avermitilis</i> <i>Ashbya gossypii</i>
4	Transposase TnpC Ferredoxin Parvalbumin	<i>Pseudomonas mandelii</i> <i>Burkholderia cenocepacia</i> <i>Scomber japonicus</i>
5	Serine protease inhibitor 6-phospho-5-dehydro-2-deoxy-D-gluconate aldolase	<i>Hordeum vulgare</i> <i>Bacillus subtilis</i>
6	Phosphoriboyl-AMP cyclohydrolase	<i>Methanospirillum hungatei</i>
7	Amy2BASI	<i>Barley</i>
8	Alpha-amylase Cephalosporin biosynthesis expandase/hydroxylase	<i>Hordeum vulgare</i> <i>Acremonium chrysogenum</i>
9	<i>BTI-CMe1</i> <i>Trypsin inhibitor cme precursor</i>	<i>Hordeum vulgare</i> <i>Hordeum vulgare</i>
10	Alpha-amylase inhibitor SufB	<i>Hordeum vulgare</i> <i>Hordeum vulgare</i>
11	Quinolinate synthetase	<i>Corynebacterium lipophiloflavum</i>
12	trig7	<i>Hordeum vulgare</i>
13	Lactoylglutathion lyase Glutamate synthase(NADPH) Aminotransferase	<i>Setaria italica, Triticum urartu</i> <i>Marsaponina brunnea</i> <i>Staphylococcus aureus</i>
14	Chitin binding domain protein Cytochrome P450	<i>Aspergillus ozyzae</i> <i>Triticum urartu</i>
15	Serine protease inhibitor Toluene hydroxylase	<i>Hordeum vulgare</i> <i>Amycolatopsis balhimycina</i>
16	Serine protease inhibitor	<i>Hordeum vulgare</i>
17	Serine protease inhibitor Peptidase Transcriptional antiterminator	<i>Hordeum vulgare</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Lactococcus lactis</i>
18	Nitroreductase Serine protease inhibitor Integrase	<i>Proteobacterium</i> <i>Hordeum vulgare</i> <i>Neisseria gonorrhoeae</i>
19	Serine protease inhibitor	<i>Hordeum vulgare</i>
20	Serine protease inhibitor Chorismate mutase	<i>Hordeum vulgare</i> <i>Clostridium sp.</i>

<sup>a</sup>Spot number as indicated in Fig. 1.

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야 기여도

### 제1절 : 목표대비 달성도

	당초 목표	가중치(%)	개발 내용	달성도(%)
제1세부과제 전통누룩 발효중 미생물 천이 구명	1)다양한 전통누룩의 미생물 동정 및 다양성 조사	50	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 발효기간별 전통누룩 미생물 동정 및 다양성 조사</li> <li>○ 원료 및 가수비율별 전통누룩 미생물 동정 및 다양성 조사</li> <li>○ 배양온도 및 습도별 전통누룩 미생물 동정 및 다양성 조사</li> </ul>	100
	2)전통누룩의 미생물 천이 조사	50	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 발효기간별 전통누룩 미생물 천이 조사</li> <li>○ 원료 및 가수비율별 전통누룩 미생물 천이 조사</li> <li>○ 배양온도 및 습도별 전통누룩 미생물 천이 조사</li> </ul>	100
		100		
제2세부과제 전통누룩 발효중 미생물 대사체 구명	1)전통 제조법에 따른 누룩 발효 중 생성되는 대사체 조사	33.4	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 전통누룩 발효시간별 시료로부터 대사물질 분리 방법 구축</li> <li>○ 전통누룩 발효시간별 대사물질 분리(추출 및 in situ 화학적 변형)</li> <li>○ 대사물질 분리 후 농축, GC-MS 실험 수행</li> <li>○ GC-MS 결과 분석을 통하여 발효 시간별 대사체의 양적 변화 추세 분석</li> </ul>	100
	2)원료에 대한 가수비율에 따른 누룩 발효과정 중 생성되는 대사체 분석	33.3	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 전통누룩 발효시간별 시료로부터 대사물질 분리 방법 최적화 방법 재구축</li> <li>○ 전통누룩 발효시간별 대사물질 분리(추출 및 in situ 화학적 변형)</li> <li>○ GC-MS 실험 조건의 최적화 및 GC-MS 실험 수행</li> </ul>	100

제1협동과제 전통누룩 제조법 확립 및 품질특성	3) 배양온도 변화에 따른 누룩 발효과정 중 생성되는 대사체 분석	33.3	○ GC-MS 결과 분석 (구조별 대사물질의 규명 및 발효 시간별 대사물질의 상대적 양 변화 추세 조사 완료)	100
			○ 배양 온도에 따른 누룩 시료로부터 대사물질분리 방법 구축	
			○ GC-MS 실험 수행 : 3년 차 시료에 대한 실험 수행 및 1, 2년차 일부 시료에 대한 GC-MS 실험 수행	
			○ GC-MS 결과 분석을 통하여 발효 시간별 대사체의 양적 변화 추세 분석 ○ 1-3년차 결과의 분석	
100	1) 전통누룩 제조 및 품질 특성 구명	30	○ 전통누룩 제조 및 품질특성 구명 - 전통방식을 이용한 누룩제조 기술 - 제조된 누룩의 품질특성 구명 - 개발 누룩의 저장관리기술 개발 - 시료를 1, 2세부 및 2협동과제 제공	100
			○ 전처리 조건에 따른 누룩의 품질 특성 구명 - 원료 및 가수량에 따른 누룩제조 기술 - 발효기간별 외형적 특성 및 품온 변화 - 제조된 누룩의 품질특성 구명 - 시료를 1, 2세부 및 2협동과제 제공	
			○ 발효조건에 따른 누룩의 품질 특성 구명 - 온도 및 습도조절에 따른 고품질 누룩제조기술 개발 - 제조된 누룩의 품질 특성 구명 - 건조조건에 따른 누룩의 품질 특성	

			- 시료를 1, 2세부 및 2협동과제 제공	
		100		
제2협동과제 전통누룩 발효중 미생물 단백체 구명	다양한 전통누룩의 단백체 분석기술 확립	25	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 발효기간별 누룩단백질 분리방법 탐색 및 기술구축</li> <li>○ 원료 및 가수비율별 누룩단백질 분리방법 탐색 및 기술구축</li> <li>○ 배양온도 및 습도별 누룩단백질 분리방법 탐색 및 기술구축</li> </ul>	100
		35	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 모든 누룩단백체의 1D, 2D-PAGE 분석</li> </ul>	100
	전통누룩 발효조건에 따른 단백체 구명	25	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 발효기간별 단백체 발현차이 분석</li> <li>○ 원료 및 가수비율별 단백체 발현 차이 분석</li> <li>○ 배양온도 및 습도별 단백체 발현 차이 분석</li> </ul>	100
		15	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 발효기간에 따른 단백체 분석 및 해독</li> <li>○ 원료 및 가수비율별 단백체 분석 및 해독</li> <li>○ 배양온도 및 습도별 단백체 분석 및 해독</li> </ul>	100
		100		

## 제2절 : 정량적 성과(논문게재, 특허출원, 기타)를 기술

성과지표명	연도	당초 목표 (전체)	실적	달성도 (%)	가중치 (%)
논문게재	SCI	8	9	113	20
	비SCI	4	3	75	15
산업 재산권	출원	4	7	175	10
	등록				
학술발표	국제	8	11	137.5	5
	국내	12	21.5	179.2	5
품종	출원				
	등록				
발효식품 실용화기술 개발			2		
대외협력 건수			5		
농가기술지도/컨설팅			6		
기술이전	1	1	100	10	
영농기술·정보 기관제출	3	3	100	10	
영농기술·정보 채택		2			
생물자원 등록 · 기탁	6	36	600	5	
유전자원 등록	4	32	800	5	
홍보성과	3	24.8	826.7	15	
계	53	161.3			100

\* ATIS 승인 기준

\* 달성도(%) = (실적소계/당초목표전체) × 100

## 제 5 장 연구 결과의 활용 계획

<제1세부과제 : 전통누룩 발효중 미생물 천이 구명 >

### ○ 연구개발결과의 활용방안

본 연구는 전통누룩 발효 중 누룩 제조시 적용되는 다양한 조건에 의한 미생물 천이를 조사하여 기초 자료를 확보함으로써 국내 누룩에 대한 정체성을 확립하는 부가가치 향상기술개발의 바탕이 되고자함.

- 누룩발효와 미생물과의 유연관계에 대한 본 연구결과를 활용하여 최적의 생산조건을 확립한 후 약주, 탁주 생산업체에 기술이전을 실시함으로써 발효주 품질 표준화 및 규격화를 지원
- 발효능이 우수한 발효스타터를 개발하여 장류 및 발효주 품질의 표준화에 활용
- 연구과정 중 확보하는 우수발효종균의 특성을 규명하고 발효조건을 확립하고 연구진의 기능성, 안정성 조사 시스템을 거쳐 검증한 후 국내 발효주 생산업체에 공급
- 누룩발효미생물 및 발효 대사물질을 이용하여 건강과 관련된 기초자료를 확보한 후 기능성 발효식품 접목기술을 개발하여 기능성 발효주를 개발, 향후 기능성 소재를 개발 생산

### ○ 기대성과

#### (1) 기술적 측면

- 국내에서 생산되는 전통곡류발효식품인 탁주, 약주로부터 발효와 관련된 미생물들의 다양성과 분포도 조사를 통해 발효와 미생물과의 유연관계를 연구할 수 있으며 추가적으로 우수발효종균도 확보할 수 있을 것으로 사료됨.
- 발효단계별, 조건별 누룩발효 미생물의 품질특성조사 결과를 활용하여 발효주 제조 공정과정을 개선시키고 제품의 품질을 균일화시키는 기술의 개발이 가능하며 이는 실용화기술과 관련됨. 또한 분리 동정한 우수균주를 활용하여 기능성이 부가된 새로운 발효식품산 기술의 개발이 가능해짐.
- 발굴한 누룩발효미생물의 단백질과 대사물질 해석을 통해 고 생산균주 개발 및 품질표준화 생산기술을 확보하여 산업화의 기반기술을 구축함.
- 향후 본 연구과제의 결과를 활용하여 수입에 의존하는 우수발효 종균 및 유용물질 생산 종균을 확보하거나 개량하여 기능성 유용물질 등을 발굴할 수 있으며 본 연구진의 효능검색 및 안정성 조사 시스템 기술과 함께 국내 미생물산업 강화의 기반이 될 것으로 사료됨.

## (2) 경제적·산업적 측면

- 전라북도는 전통발효식품의 대표지로써 풍부한 발효미생물 자원을 가지고 있으며 본 연구진의 연구결과를 바탕으로 다양한 발효미생물을 확보할 뿐만 아니라 관련 새로운 생물소재 개발이 가능해지므로 향후 수입대체효과도 기대할 수 있을 것으로 사료됨.
- 누룩발효별 생성되는 단백질과 대사물질의 데이터구축 및 해석을 통해 산업체에서 발효주 제조시 발효과정과 상품의 품질을 단계별로 신속히 조사 가능한 마커시스템 등의 도입이 가능해지므로 품질 균질화와 생산성 증대를 통해 발효식품의 부가가치를 높일 수 있을 것으로 판단됨.
- 본 연구수행으로 인해 확보한 기반정보 및 기술을 국내 대기업이나 발효식품 생산업체에 이전하여 국내 전통발효식품의 품질 표준화, 규격화, 산업화에 이바지함으로써 세계 경쟁력을 높일 수 있을 것으로 사료됨.
- 혁신도시 이전기관인 농촌진흥청과 본 연구진의 소속대학은 서로의 연구역량을 활용하여 지역 인프라를 구축하고, 향후 발효미생물을 이용한 기능성 유용물질 및 기능성 부여 미생물 등의 개발도 가능할 것으로 예상됨. 또한 본 연구과제를 통해 교육된 연구원들을 통해 농식품 관련기업체에 전문인력과 기술을 지원함으로써 전북지역특화산업을 강화하고 지역 내 신규인력채용기회를 제공할 수 있을 것으로 사료되며 기관 이전으로 인한 농촌진흥청의 비정규직 인력공급란을 해소할 수 있는 추가적인 효과가 기대됨.

### <제2세부과제 : 전통누룩 발효증 미생물 대사체 구명>

- 연구 기간을 통하여 대사물질의 추출 분리 최적화, in-situ 화학적 구조 변형법, 그리고 GC/MS 분석을 통한 누룩 시료의 대사체 분석의 기술적 부분을 확립하였으며, 이 결과를 타 세부과제에서 도출한 미생물 천이 등의 자료와 상관관계 구축이 가능할 것으로 판단되고, 이는 최적의 누룩 시료의 생산조건 표준화에 기여하는 데 활용이 가능할 것으로 판단됨.
- 최종 발효된 누룩의 대사물질 profile 및 양적 관계를 품질기준으로 적용하여 품질이 유지되는 발효스타터의 생산에 활용 가능.
- 이후 누룩 스타터를 사용한 탁주 및 약주 생산에 개발 기술을 적용하여 발효 시간별 대사체 분석을 통하여 누룩의 대사체 발효 특성과의 비교를 통하여 최종 상품인 탁주의 품질 기준 설정 및 향상에 기여
- 본 연구에서 정립된 누룩 발효시 대사체 표준화 기준을 이 후 약주, 탁주 생산업체에 기술 이전을 실시함으로써 발효주 품질 표준화 및 규격화를 지원.

### <제1협동과제 : 전통누룩 제조법 확립 및 품질특성>

- 시판되는 자가 누룩 또는 공장형 누룩의 품질 열악으로 인해, 주질이 뛰어난 탁·약주를 제조 할 수 없다. 본 연구에서는 전통주(탁·약주 한정) 제조에 적합한 새로운 유형의 누룩(곡자) 개발로 차별화된 맛과 향의 주질 특성을 가진 프리미엄급 탁·약주 생산에 기여하고자 한다.
- ◆ 학술논문 추진 예정 : 3건
  - 중온 및 고온 발효누룩의 품질특성(1협동 : 한국미생물생명공학회)
  - 원료 및 가수량 조절에 따른 혼합곡류누룩의 품질특성(1협동 : 한국미생물생명공학회)
  - 발효온도 및 습도 조절에 따른 곡류누룩의 품질특성(1협동 : 한국식품저장유통학회)
- ◆ 홍보 및 기술이전 추진 예정
  - 다양한 조건에서 제조한 누룩을 농산업체에 기술이전을 통한 농가소득 증진 기여
  - 개발 누룩의 우수성을 농업 전문지 등에 기고 및 홍보할 예정임.
- ◆ 추가 연구의 필요성
  - 산업적 측면에서 개발한 곡류누룩을 이용한 탁·약주제조에 적합한지의 유무 등 양조적 성 구명을 통한 품질의 우수성과 수출을 위한 현장 맞춤형 실용화 연구가 필요하다.

### <제2협동과제 : 전통누룩 발효중 미생물 단백체 구명>

#### 1. 연구개발 결과의 활용방안

- 본 연구는 전통누룩 발효 중 미생물에 의해 변화되는 단백질 생성 연구를 통해 누룩발효에 관여하는 미생물과 단백질의 상호작용을 이해하고 국내 누룩의 기반기술개발의 바탕이 되고자함.
  - ◆ 본 과제는 기반연구 중심이며 미생물 발효별 변화하는 단백체를 연구(논문제재 가능)
  - ◆ 확보한 발효별 단백체분석 데이터를 **발효단계 측정용 마커시스템** 구축에 활용, 기술이전 가능
  - ◆ **발효주 품질 표준화 및 규격화** 기술개발에 기반제공
  - ◆ 기능성 바이오소재 발굴 및 기능성 발효주 개발에 정보활용, 기능성 바이오소재 활용의지가 있는 기업체 선정하여 기술이전 및 산업화 지원
  - ◆ 누룩발효 과정 중 생성되는 유용 단백질의 최적 생산조건 구축에 기반 제공

#### 2. 기대성과 및 파급효과

##### 1) 기술적 측면

- ◆ 누룩 제조법, 미생물 천이, 오믹스 분야의 선도적인 **산학연관 네트워크 시스템** 구축
- ◆ 국내 고유의 누룩관련 데이터베이스 확보 및 생리활성물질 연구에 이용
- ◆ 단백체 해석을 통한 품질표준화 생산기술 개발에 이용

- ◆ 생산품의 기능성 향상 및 발효 신기술 개발에 응용
- ◆ 기능성 유용물질의 발굴을 통한 새로운 생물소재 개발 검사 및 안정성 조사 시스템 기술 구축을 위한 기반정보 확보

## 2) 경제적 · 산업적 측면

- ◆ 발효조건별 누룩성분 변화 규명을 통한 제조공정 개선
- ◆ 생산공정의 표준화 기능성소재 개발 및 기능성 발효주 개발로 인한 특성화
- ◆ 탁·약주 생산업계의 안정적 제품 생산으로 인한 농가소득 증대
- ◆ 누룩발효단계 측정 마커시스템 도입가능성, 시스템에 의한 품질 균질화
- ◆ 농식품 관련기업체에 기술지원으로 인한 산업 활성화 유도
- ◆ 농촌진흥청의 전북 혁신도시 이전으로 인한 비정규직 인력공급란 해결
- ◆ 과제참여를 통한 지역인프라 구축 및 취업 기회제공

## 제 6 장 연구 과정에서 수집한 해외 과학 기술 정보

- 우리 술에 대한 외국 연구진의 연구 사례는 거의 없지만, 일본에서는 한국 전통누룩에서 *Lichtheimia* 속을 분리·동정하여 *Lichtheimia ramosa*와 *Lichtheimia corymbifer*로 밝혀내었고, 이들 균주가 생산하는 amylase 활성에 따라 액화와 당화활성을 갖는 두 그룹으로 규명하였다.
- 일본 (독)주류총합연구소에서는 발효미생물 선별 및 유전자 조작법을 이용한 균주 개량으로 주질 향상과 국균의 계놈정보를 양조산업에 이용하고, 양조용 원료에 관한 연구를 수행
- 암모니아 성분을 첨가하여 *Rhizopus oryzae* 배양으로 L-lactic acid 발효에 관한 연구 진행 중(대만, 2013)
- 키토산 생성을 위한 *Rhizopus japonicus* 배양 조건 탐색(중국, 2014.)
- *Rhizopus* sp.를 이용한 감자 전분의 당화력 향상 연구(호주, 중국, 2005)
- 희석된 산을 전처리한 쌀을 이용한 *Mucor*, *Rhizopus*, *Saccharomyces* sp. 당화력 향상 연구(이란,스웨덴, 2006)
- 누룩효모 *Galactomyces*의 배양액을 이용한 기능성소재개발(일본)
- 발효곰팡이의 발효단계별 단백질체분석(일본, 2014)

## 제 7 장 연구 개발 결과의 보안 등급

보안 등급 분류	보안	일반
		✓

## 제 8 장 국가과학기술종합정보시스템에 등록한 연구시설·장비 현황

구입 기관	연구 시설/ 연구 장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입 가격 (천 원)	구입처 (전화번호 )	비고 (설치장소 )	NTIS장비 등록 번호
	해당없음							

## 제 9 장 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

<제1세부과제 : 전통누룩 발효중 미생물 천이 구명>

- 전북대학교 안전관리규정 준수

### ○ 안전점검 및 정밀안전진단

- 1) 점검내용 및 실시주기 등

구 분	점 검 내 용	점검주기	점검주체
안전점검	일상점검 1) 다음 각호의 사항을 육안으로 점검 2) 보호장비의 관리실태를 육안으로 점검 1) 기계·기구·전기·가스 등의 실험기자재와 약품·병원체 등 실험재료의 이상유무 2) 보호장비의 관리실태	매일 1회	연구실 책임자
	정기점검 1) 다음 각 호의 사항을 장비를 이용하여 점검 2) 보호장비의 관리실태 1) 기계·기구·전기·가스 등의 설비기능의 이상유무 2) 보호장비의 관리실태	매년 1회	연구주체의 장
정밀안전진단	외관 육안점검 및 점검장비를 사용하여 연구실 내·외의 안전보건과 관련된 사항을 진단·평가	2년마다 1회	연구주체의 장

- 2) 점검(진단) 결과에 따른 개선

가. 관리주체별로 다음과 같이 개선시행

구 분	개 선 내 용	개선주체
시설 · 설비측면	가스누설경보기 설치 가스용기 전도방지장치 설치 흄후드 등 배기장치 보수 세안/샤워설비 설치 등	대학본부
유지관리 측면	안전수칙 미게시, 소화기 위치표시 미비 일상점검 미실시, 정리정돈 불량 등 구급용구 미비치, 가스용기 충전기한 경과 등	학장 해당 실험실

나. 2016년 대학본부 개선사항

- 가스누설경보기 등 구매설치, LP가스사용 실험실 시설개선
- 개인보호구(보안경 및 보안면 구매)
- 실험실 장기 미사용 시약류 위탁처리

### ○ 보험가입 등

- 1) 가입내용

연구활동종사자의 상해·사망에 대비하여 연구활동종사자를 피보험자 및 수의자로 하는 보험에 가입하고 있음

- 2) 가입현황

- 공과대학 외 8개 기관, 총 11,839명(대학생 9,484명, 대학원생 등 2,355명)
- 가입기간 : 2015. 9. 16. ~ 2016. 9. 15.

○ 안전교육 등

구 분	실시주체	실시시기	교육내용
집체교육	연구실 책임자	매월 1시간 이상	연구실 안전환경 법령에 관한 사항
	대학본부	연 2회	연구실 내 유해 · 위험요인에 관한 사항
온라인 교육	대학본부	연 6회	안전분야별 총 23차시

○ 주무 부서 : 전북대학교 시설관리과(담당 조홍식)

나. LMO 연구시설 및 수입신고 현황

(유전자변형생물체(LMO)를 이용하는 연구과제의 경우에는 「유전자변형생물체의 국가간 이동에 관한 법률」에 따른 연구시설 설치 · 운영신고확인서 및 시험 · 연구용 LMO 수입 신고확인서에 기재된 내용을 기술)

시설 번호	LML08-240호	안전 관리 등급	1등급
시설 번호	LML16-56호	안전 관리 등급	1등급
수입 신고(최근 1년간)	해당사항없음		

<제2세부과제 : 전통누룩 발효중 미생물 대사체 구명>

○ 전북대학교 안전관리규정 준수

<제1협동과제 : 전통누룩 제조법 확립 및 품질특성>

○ 국립농업과학원 안전관리규정 준수

<제2협동과제 : 전통누룩 발효중 미생물 단백체 구명>

○ 원광대학교 안전관리규정 준수

○ 연구실에 관한 관리

1) 연구실안전점검(연안법 제7조 ~ 10조) : 3회 실시

- |                            |         |       |
|----------------------------|---------|-------|
| 가) 일반점검 시행시기               | (1차 점검) | ~ 6월  |
| 나) 점검결과 안내 및 조치사항 통보       |         | ~ 7월  |
| 다) 조사사항 이행결과 점검            | (2차 점검) | ~ 9월  |
| 라) 점검결과 조치가 안 된 사항 (3차 점검) |         | ~ 10월 |
| 마) 조치가 불성실한 부서 및 실험실 인터넷공지 |         | ~ 11월 |

## ○ 연구활동종사자에 관한 사항

### 1) 연구활동종사자 현황 파악

- 가) 교수, 학부생, 대학원생은 인원관리부서와 협조하여 파악
- 나) 가)의 인원을 제외한 연구활동종사자 중 급여가 나가거나 4대보험에 가입된 인원 확인
- 다) 가),나)에 제외된 인원 파악하여 보험사에 자료 제공: 4월, 10월

### 2) 연구활동종사자 교육

가) 학기마다 연구특성별 6시간 선택 온라인(안전교육센터) 교육실시

- 연구실안전 및 일반적 위험성(4차시)
- 연구실내 위험요인 및 예방대책(4차시)
- 화재 및 폭발(4차시)
- 유해화학물질 취급과 관리(4차시)

나) 학기마다 연구실 안전교육(집합) 실시

연구실 안전환경 조성에 관한 법률 제18조(교육·훈련 등)에 따라 사고예방에 필요한 교육을 실시하였으며 또한 미래창조과학부고시(연구실 사전유해인자위험분석 실시)에 따라 연구실책임자가 연구실의 유해인자에 대한 실태를 파악하고 이에 대한 사고예방 등을 위하여 사전 유해인자위험분석 실시

다) LMO 안전교육

생물안전관리책임자 및 생물안전관리자를 대상으로 한국생명공학연구원 국가연구 안전관리본부와 원광대학교의 공동주관으로 진행하는 LMO 안전교육 이수

### 3) 연구실 안전보험

고시 연구실 사고에 대한 보상기준에 의하여 보험을 가입

가) 보험가입기간 : 2012년 12월 22일 ~ 2016년 12월 22일

나) 공제가입금액 : 사망/후유장해(1급시) : 100,000,000원

상해 : 10,000,000원

### 4) 건강검진

-2014년 6월중 1학기 교육 완료자중 선별하여 실시

-2015년 6월중 1학기 교육 완료자중 선별하여 실시

-2016년 6월중 1학기 교육 완료자중 선별하여 실시

## ○ LMO 연구시설 및 수입신고 현황

(유전자변형생물체(LMO)를 이용하는 연구과제의 경우에는 「유전자변형생물체의 국가간 이동에 관한 법률」에 따른 연구시설 설치·운영신고확인서 및 시험·연구용 LMO 수입신고

확인서에 기재된 내용을 기술)

시설 번호	제LML15-269호	안전 관리 등급	1등급
수입 신고(최근 1년간)		해당없음	

## 제 10 장 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	과제	구분 (논문/ 특허/ 기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국가	Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사 사 또는 중복사사 )	특기 사항 (SCI 여부/ 인용회 수 등)
1	제1세부	논문	Mycoflora and Enzymatic Characterization of Fungal s in Commercial Meju, Starter for a Korean Traditional Fermented Soybean Product	전북대	교신 저자	Mycrobiology	0.573	2014.09.30	단독	SCI
2		논문	Characterization of NpgA, a 4'-phosphopantetheinyl transferase of Aspergillus nidulans, and evidence of its involvement in fungal growth and formation of conidia and cleistothecia for development	전북대	공저 자	Journal of Microbiology	1.621	2015.01.04	단독	SCI
3		논문	Pyrosequencing Reveals Bacterial Diversity in Korean Traditional Wheat-based Nuruk	전북대	교신 저자	Journal of Microbiology	1.621	2015.12.02	단독	SCI
4		논문	온도를 달리 한 누룩 발효 기간별 배양 유산균 변화 및 분리 유산균들의 효소 활성	전북대	공저 자	Korean Journal of Food Preservation		2015.11.11	단독	비SCI
5		논문	Metagenomic analysis of fungal diversity in Korean traditional wheat-based fermentation starter nuruk	전북대	교신 저자	Food Microbiology	3.682	2016.07.02	단독	SCI
		논문	Effects of initial moisture content of Korean traditional wheat-based fermentation starter nuruk on microbial abundance and diversity	전북대	교신 저자	Applied Microbiology and Biotechnology	3.376	2016.12.14	단독	SCI
6		산업 재산 권	M-세포 특이적 리간드 융합의 랭기 바이러스 4가 에피토프 EDIII-Co1 합성 단백질 및 이의 용도	전북대	발명 자	대한민국		2014.02.13	중복	
7		산업 재산 권	화학합성 유도체를 이용한 진균 유래의 플레이크롬을 대량 생산하는 방법	전북대	발명 자	대한민국		2014.03.10	중복	
8		산업 재산 권	알파-아밀라아제, 글루코아밀라아제 및 프로테아제 분비능이 우수한 아스퍼길러스 오리제 TNA15 및	전북대	발명 자	대한민국		2016.11.17	단독	

			TNA24 균주 및 이의 용도							
9	제2세부	논문	Taxonomic Characterization, Evaluation ofToxicogenicity, and Saccharification Capability of Aspergillus Section Flavi Isolates from Korean Traditional Wheat-Based Fermentation Starter Nuruk	전북대	공동	Mycobiology	0.573	2016.09.01	단독	SCI
10	제1협동	논문	Cloning of the LEU2 gene from the amylolytic yeast <i>Saccharomyces fibuligera</i>	농과원	공저자	Food Science and Biotechnology	0.653	2015.12.30	단독	SCI
		논문	Effects of temperature on enzymatic activity and metabolites change during <i>nuruk</i> fermentation	농과원	교신	한국미생물생명 공학회지		2015.12.28	단독	비SCI
		논문	탁주용 곰팡이 고체종국 제조 및 품질 특성	농과원	교신	한국식품저장유통학회지		2016.11.30	단독	비SCI
11		특허	고온 발효누룩 및 이의 제조방법	농과원	주별명자	대한민국		2015.11.09	단독	
12		특허	아스페질러스 오리재 75-2 종균 보호용 부형제	농과원	주별명자	대한민국		2015.11.09	단독	
13		특허	중온 발효누룩 및 이의 제조방법	농과원	주별명자	대한민국		2015.11.09	단독	
14		특허	(PCT) 중온 발효누룩 및 이의 제조방법	농과원	주별명자	대한민국		2016.05.20	단독	
15		기술이전	중온 발효누룩 및 이의 제조방법(PCT)_오파드	농과원	주별명자	대한민국		2016.07.01	단독	
16		영농기술	고온발효를 통한 속성 밀 누룩 제조법	농과원	주담당	농촌진흥청		2014.11.11	단독	
17		영농기술	원료 및 가수량 조절에 따른 혼합누룩 제조기술	농과원	주담당	농촌진흥청		2015.11.11	단독	
18		영농기술	발효온도 및 습도조절에 따른 곡류누룩(병곡) 제조기술	농과원	주담당	농촌진흥청		2016.11.	단독	
19	제2협동	논문	Mycoflora Dynamics Analysis of Korean Traditional Wheat-based Nuruk	원광대	공저자	Journal of Microbiology	1.621	2014.11.01	단독	SCI
20		논문	Viral Effects of dsRNA Mycovirus (PoV-ASI2792) on the Vegetative Growth of the Edible Mushroom <i>Pleurotus ostreatus</i>	원광대	주저자	Mycobiology	0.573	2016.12.30	단독	SCI
21		특허	<i>npgA</i> 리포터 유전자를 포함하는 진균 프로모터 분석을 위한 리포터 벡터 및 이의 용도	원광대	발명자	한국		2015.11.10	단독	

## 제 11 장 기타사항

### 변경사항

<제1세부과제 : 전통누룩 발효중 미생물 천이 구명>

연차	당초계획	변경내용	변경사유(근거문서 포함)
2년차 (2015)	논문게재 - SCI : 1건 - 비SCI : 2건	논문게재 - SCI : 2건 - 비SCI : 1건	논문게재 성과목표 상향조정 (기획조정과-6109(2015.10.1 4))
	김대혁, 이남근, 염은지, 윤숙현, 소금강, 고요한, 남강, 죠티란잔발 (1년차 연구원)	김대혁, 이남근, 김미나, 윤숙현, 조명진, 최명숙, 남강, 죠티란잔발 (2년차 연구원)	학생연구자들의 진학 및 졸업으로 참여연구원 변경
3년차 (2016)	김대혁, 이남근, 김미나, 윤숙현, 조명진, 최명숙, 남강, 죠티란잔발 (2년차 연구원)	김대혁, 죠티란잔발, 윤숙현, 최명숙, 소금강, 고요한, 조명진 (3년차 연구원)	학생연구자들의 진학 및 졸업으로 참여연구원 변경

<제2세부과제 : 전통누룩 발효중 미생물 대사체 구명>

연차	당초계획	변경내용	변경사유(근거문서 포함)
3년차 (2016)	2세부과제 국내학회 1회	국내학회 1회, 국제학회 1회	정량적목표 국제학회 추가달성 연구운영과-27호(2016.01.04)

<제1협동과제 : 전통누룩 제조법 확립 및 품질특성>

연 차	항 목	당초 계획	변경 사항	근거 문서
2년차 (2015)	참여 연구원	여수환, 최지호, 정석태, 최한석, 강지은, 조용식, 백성열, 박혜영,	여수환, 정석태, 최한석, 강지은, 백성열, 이세희, 김주연, 백창호	기획연구실 업무분장(가공 이용과-1704, '14.9.15), 직 제개편 인사발령(운영지원 과-51, '15.01.02), 신규채용

		김주연, 백창호 (1년차 연구원)	(2년차 연구원)	기획조정과7493호('14.12.30), 세부과제 참여연구원 변경 (발효식품과-50, '15.01.13)
	참여 연구원	여수환, 정석태, 최한석, 강지은, 백성열, 이세희, 김주연, 백창호 (2년차 연구원)	여수환, 정석태, 최한석, 강지은, 백성열, 백창호 (2년차 연구원)	세부과제 참여 연구원 변경 ( 발효식품과 - 923 , '15.08.17, 퇴직 및 출산·육아 휴직)
3년차 (2016)	참여 연구원	여수환, 정석태, 최한석, 강지은, 백성열, 백창호 (2년차 연구원)	여수환, 정석태, 최한석, 강지은, 백성열, 백창호, 윤영 (3년차 연구원)	세부과제 참여 연구원 채 용( 기획조정과 - 6381 , '15.10.28)
3년차 (2016)	참여 연구원	여수환, 백성열, 문지영, 최한석, 강지은, 정석태, 윤영, 백창호, (3년차 연구원)	여수환, 백성열, 문지영, 최한석, 강지은, 정석태, 백창호, (3년차 연구원)	박사후연구원 연수 계약 해지 ( 발효식품과 - 334 , '16.3.21, 임신 및 육아), (기 획조정과-1759('163.21))

<제2협동과제 : 전통누룩 발효중 미생물 단백체 구명>

연차	항목	당초계획	변경사항	근거문서
1년차 (2014)	성과 목표	논문게재 비SCI	논문게재 SCI 상향조정	2014 결과평가 정량적 목표상향조정신청 결과공문 (기획조정과-6171, '14.10.24.)
3년차 (2016)	성과 목표	논문게재 비SCI	논문게재 SCI 상향조정	2016년 공동연구사업 협약변경(성과목표상향) 승인 공문 (기획조정과-6599, '16.11.01.)

□ 평가시 지적사항에 대한 반영 현황

연차	지적사항	반영사항
1년차 (2014)	<p>○ 선정평가위원회 지적사항</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 정량적 성과 상향 조정</li> <li>- 전통 및 개량누룩 제조</li> <li>- 내외부과제의 연계 중요성</li> <li>- 전통누룩 활용성</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 정량적 성과 상향함</li> <li>- 전통방식을 통한 누룩제조로 미생물 천이등의 다양성과 품질 특성 규명에 서 개량방식은 적절하지 못함</li> <li>- 내부연구팀의 누룩 제작 후 외부연구 팀 연구진행. 긴밀한 연계성 계획</li> <li>- 본 과제는 술 제조보다는 전통누룩 제조법 확립을 통한 품질 특성을 구</li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 기능성 식품 개발원료 개발과 지역 특성화 전통식품 연구에 활용</li> <li>- 양조 전문가 연구참여</li> <li>- 대사체 연구의 산업적 응용</li> </ul>	<p>명함과 동시에 세부 및 협동과제에 누룩을 제공함으로서 파생된 미생물 천이, 프로테오믹스, 메타볼로믹스 등에 포커스를 둠</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 주관기관에서 전통발효식품제조업체에 기술이전 계획. 본 과제는 기능성 식품의 원료 개발과는 계연성이 낮음.</li> <li>- 주관기관의 “바이오식품 소재개발 및 산업화연구센터”의 정용섭 센터장이 본 연구과제 자문위원이며 선임연구원은 실제 제 1세부 연구원으로 연구 참여</li> <li>- 대사체 연구는 2세부 과제에서 추진 예정</li> </ul>
1년차 (2014)	<p>○ 연차평가위원회 지적사항 (1년차)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 3년차 연구 중 1차년도 사업으로 당초 추진계획 대비 잘 진행되고 있는 것으로 판단됨. 과제의 내용이 매우 난이도가 높지만 연구진의 역량으로 충분히 달성을 할 수 있는 것으로 사료됨.</li> <li>- 계획대로 잘 추진되고 있음.</li> <li>- 제시한 정량성과 목표에 대해서는 양호하게 목표를 달성하였으나, 그 내용에 있어서는 다소 미흡한 것으로 판단됨.</li> <li>- 단순한 분석에 머물지 말고 특별히 제조공정상의 품질 표준화, 규격화를 위한 정량적 연구목표 제시 및 달성을 위한 노력이 많이 필요한 것으로 보임.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 제시한 정량성과목표 비SCI 1건을 SCI 상향조정 달성, 국내학술발표 1건을 2건으로 200% 달성함. 정량성과 목표에 대해 우수하게 목표를 달성한 것으로 판단됨. 내용이 다소 미흡한 부분이 있다고 지적한 사항은 어떤 부분이 미흡한 것인지 불분명함.</li> <li>- 본 과제는 우리술 제조에 없어서는 안 되는 발효제인 누룩을 보다 과학적으로 접근하기 위해, 1협동에서 조건별 누룩을 제조 및 품질특성을 규명함과 동시에 각 과제별로 누룩 샘플을 제공하고 1세부과제는 토착 발</li> </ul>

		효미생물의 분포 및 천이 패턴을, 프로테오믹스(2협동) 및 메타볼루믹스(2세부) 분석을 통한 우리 누룩의 우수성과 정체성을 구명하고, 향후, 우리 술 제조에 활용할 기초적인 자료와 정보를 제공하기 위한 과제로 구성됨.
2년차 (2015)	<p>○ 연차평가위원회 지적사항 (2년차)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 연구수행내용 중 누룩시료별 총균수 및 유산균수의 CFU 값 측정에 있어서 반복실험을 통한 data 확보 및 경향분석을 추가 및 보완하는 것이 필요함.</li> <li>- LC-MS를 이용한 시간별 누룩에 생성되는 기능성 대사물질의 확인에 대한 보안 연구 필요</li> <li>- 연구수행은 적절하게 이루어졌으나, 누룩제조기술 확립을 통한 다른 세부 및 협동과제에 누룩을 공급하는 체계로 누룩에 대한 발효특성 및 품질에 대한 검토 및 확립 후 제2세부 및 제2협동에 공급하여 연구수행이 이루어져야 하는데 사업 계획서의 추진일정에 제시한 근거로는 적합하지 않음(추진일정을 유기적으로 조절하여 수행 필요).</li> </ul>	<p>본 과제는 여러 발효 조건별 전통 누룩을 제조하여 세부적 경향을 분석하고 이를 데이터베이스화 하여 전통 누룩의 표준화, 규격화에 기여 하고자함. 제1세부는 시료별 총균 수 및 유산균수의 CFU 값 측정을 위하여 반복실험을 수행 하였으며 이를 통해 data 확보가 되어있음. 심사위원이 지적하시는대로 경향 분석을 추가 보완 예정</p> <p>막걸리에서 항암효과가 있다고 발표한 스쿠알렌, 휘발성물질 farneol 등의 분석을 LC-MS 및 GC-MS로 분석을 본 실험과 병행 계획임. 단, 분석 조건의 확립에 필요한 시간과 휘발성 물질의 분석을 위한 장비 구축 시간이 다소 필요함.</p> <p>1협동과제에서 제조한 누룩의 품질 특성을 규명한 후, 각 세부과제에 누룩 샘플을 보내게 되면, 통상 10월경에 1협동과제가 추구하는 목적이 80-90% 완료되는데, 그 이후 각 과제 책임자에게 샘플을 보내면 타과제는 연구수행을 할 수 없는 상황이다. 따라서 본 연구는 1협동과제에서 연차별 조건을 달리하여 제조한 누룩을 각 세부 및 협동과제에 제공하여 누룩 속의 발효미생물 천이(1세부), 대사체(2세부) 및 단백체(2협동)를 규명할 수 있다. 개량된 누룩제조기술</p>

	<ul style="list-style-type: none"><li>- 본 과제의 경우 세부과제별 유기적인 연계협력이 반드시 필요함.</li><li>- 본 과제의 연구진행은 제1협동팀에서 제조된 누룩샘플을 이용해서 각 샘플별, 실험조건별 변화하는 미생물천이, 대사체, 단백체의 변화양상을 조사하는 과제로써 3차년도 실험조건도 1,2 차년도 각 팀의 연구결과를 기반으로 하여 가장 발효미생물 분포, 대사체 및 단백체 생성이 최적인 조건을 설정함. 이와같이 세부, 협동팀들의 지속적인 연구결과 공유, 샘플공유, 회의진행 등 유기적인 협력관계가 있었기 때문에 현재까지 성공적인 연구 수행이 가능했던 것으로 판단되며 3 차년도에도 지속적인 과제별 유기적인 협력관계를 유지하도록 노력할 계획임.</li></ul>
--	---

## 제 12 장 참고문헌

1. Lee SJ, Ahn BH (2010) Sensory profiling of rice wines made with *nuruks* using different ingredients. Korean J Food SCI Technol, 42, 119–123
2. Lee SS, Kim KS, Eon AH, Sung CK, Hong IP (2002) Production of Korean traditional rice-wines made from cultures of the single fungal isolates under laboratory conditions. Korean J Microbiol, 30, 61–65
3. Lee DH, Kang HY, Lee YS, Cho CH, Kim SJ, Lee JS (2011) Effects of yeast and *nuruk* on the quality of Korean *Yakju*. Korean J Microbiol, Biotechnol, 39, 274–280
4. Park CS, Lee TS (2002) Quality characteristics of *Takju* prepared by wheat flour *nuruks*. Korean J Food Sci Technol, 34, 296–302
5. Bae SM, Lee YH, Lee MK, Kang SA, Cheong C (2008) Effect of traditional *nuruk* ratio and yeast on the fermentation and quality of *Yakju*. J East Asian Soc Dietary Life, 18, 41–48
6. Han EH, Lee TS, Noh BS, LEE DS (1997) Quality characteristics in mash of *Takju* prepared by using different *nuruk* during fermentation. Korean J Food Sci Technol, 29, 555–562
7. Yu TS, Kim J, Kim HS, Hyun JS, Ha HP, Park MG (1998) Bibliographical study on microorganisms of traditional Koran *nuruk* (Since 1945), J Korean Soc Food Sci Nutr, 27, 789–799
8. Lee HH, Lee JH, Ko YJ, Park MH, Lee JO, Ryu CH (2009) Changes in allergenicity and quality of *nuruk* during fermentation. J Korean Soc Food Sci Nutr, 38, 76–82
9. Kim HS, Hyun JS, Kim J, Ha HP, Yu TS (1998) Enzymological characteristics and identification of useful fungi isolated from traditional Korean *nuruk*. Korean J Microbiol Biotechnol, 26, 456–464
10. Choi JS, Jeong ST, Choi JH, Choi HS, Baek SY, Yeo SH (2012) Quality Characteristics of wheat *nuruk* by storage conditions of liquid starters using *Rhizopus oryzae* N174. Korean J Microbiol Biotechnol, 40, 319–324
11. Kim MS, Jeon JA, Jeong ST, Choi JH, Choi HS, Yeo SH (2011) Characteristics of *Byeo-nuruk* according to the mixing ratio of wheat and the addition rate of moisture. J East Asian Soc Dietary Life, 21, 897–904
12. So MH (1991) Improvement in the quality of *Takju* by the combined use of *Aspergillus kawachii* and *Aspergillus oryzae*. Korean J Food Nutr, 4, 115–124

13. Mun JY, Baek SY, Park HY, Ro HS, Yeo SH (2016) Cultural characteristics of fungi strains isolated from Korean *nuruk*. J East Asian Soc Dietary Life, 4, 125–140
14. So MH, Lee JW (1996) *Takju* brewing by combined use of *Rhizopus japonicus-nuruk* and *Aspergillus oryzae-nuruk*. J Korean Soc Food Nutr, 25, 157–162
15. MacKenzie D A, Jeenes D J, Gou X, Archer D B (2000) Molecular basis of glucoamylase overproduction by a mutagenised industrial strain of *Aspergillus niger*. Enzyme Microbial Technol, 26, 193–200
16. Thenmozhi M, Kannabiran K, Kumar R, Khanna V G (2013). Antifungal activity of *Streptomyces* sp. VITSTK 7 and its synthesized Ag<sub>2</sub>O/Ag nanoparticles against medically important *Aspergillus* pathogens. J Medical Mycol, 23, 97–103
17. Park IS, Chung YH (1989) Some factors affecting glucoamylase production from *Aspergillus* sp. Kor J Appl Microbiol Bioeng, 17, 519–523
18. Lee SH, Jung HJ, Yeo SH, Yu TS (2004) Characteristics of α-amylase of, a new species, *Aspergillus coreanus* NR15-1. Korean J Biotechnol Bioeng, 19, 301–307
19. SO MH (1993) Characteristics of *koji* molds isolated from *koji*-starters for brewing in Korea and Japan. Korean J Food Nutr, 6, 1–7
20. Marketsandmarkets. (2014) Starter culture market by type (yeast, bacteria, molds), application [alcoholic beverages (beer, wine, whisky), non-alcoholic beverages (dairy-based, cereal-based, kombucha)] & geography–Global Trends & Forecast to 2018, Magarpatta city, Pune, India, 1–240.
21. Jeon CO (2014) Industrial application and starter development for traditional fermentation food using lab evolution method. E-bioindustry, 27, 1–4
22. Uyeno K (1906) Report of examination of Corean “*koji*”( I ). Yakugaku Zasshi 277, 203–212
23. Yu TS, Kim HS, Hong J, Ha HP, Kim TY, Yoon IH (1996) Bibliographical study on microorganisms of *nuruk* (until 1945), J Korean Soc Food Sci Nutr, 25, 170–179
24. Yu TS, Kim J, Kim HS, Hyun JS, Ha HP, Park MG (1998) Bibliographical study on microorganisms of traditional Koran *nuruk* (Since 1945), J Korean Soc Food Sci Nutr, 27, 789–799
25. Park JW, Lee KH, Lee CY (1995) Identification of filamentous molds isolated from Korean traditional *nuruk* and their amylolytic activities. Kor J Appl Microbiol Biotechnol, 23, 737–746

26. Kim HS, Hyun JS, Kim J, Ha HP, Yu TS (1997) Characteristics of useful fungi isolated from traditional Korean *nuruk*. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 26, 767–774
27. Jo GY, Lee CW (1997) Isolation and identification of the fungi from *nuruk*. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 26, 759–766
28. Hong SB, Yamada O, Samsone R. A (2014) Taxonomic re-evaluation of black *koji* molds. *Appl Microbiol Biotechnol*, 98, 555–561
29. Joung EJ, Paek NS, Kim YM (2004) Studies on Korean *takju* using the by-product of rice milling. *Korean J Food Nutr*, 17, 199–205
30. NTS liquors license support center. (2014) Liquors Analysis Code 12<sup>th</sup> edition, Osong, Korea, 18
31. Brewing society of japan. 1993. The Annotation of the official method of analysis of the national tax administration agency. 4<sup>th</sup> edition(in Japanese), Tokyo, Japan, 218–226
32. Somogyi M (1952) Notes on sugar determination. *J Biol Chem*, 195, 19–23
33. So MH, Lee YS (2010) Effects of culture conditions of *Rhizopus* sp. ZB9 on the production of protease during preparation of rice *koji*. *Korean J Food Nutr*, 23, 399–404
34. Atlas RM, Park LC, Brown AE (1995) Laboratory manual of experimental microbiology. Mosby Publlishers, St. Louis MO, USA, 119–127
35. Choi JS, Jeong ST, Kim JY, Choi JH, Choi HS, Yeo SH (2011) Quality characteristics of wheat *nuruk* and optimum condition of liquid starters of *Aspergillus* sp. *Korean J Microbiol Biotechnol*, 39, 357–363
36. K. Ponnusamy, S. Lee, C. H. Lee. 2013. Time-Dependent Correlation of the Microbial Community and the Metabolomics of Traditional Barely Nuruk Starter Fermentation. *Biocsci, Biotechnol. Biochem.* 77(4): 683–690
37. 심상민·이종훈. 2008. Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism 분석을 이용한 김치발효 관련 유산균 군집의 평가. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 36(4): 247–259
38. J. W. Bae, S. K. Rhee, J. R. Park, W. H. Chung, Y. D. Nam, I. Lee, H. Kim, Y. H. Park. 2005. Development and Evaluation of Genome-Probing Microarrays for Monitoring Lactic Acid Bacteria. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*. 71: 8825–8835
39. M. Majumder, A. K. Shukla, A. Arunachalam. 2008. Nutrient release and fungal succession during decomposition of weed residues in a shifting cultivation system. *Communications in Biometry and Crop Science*. 3: 45–59
40. H. W. Chang, K. H. Kim, Y. D. Nam, S. W. Roh, M. S. Kim, C. O. Jeon, H. M. Oh, J. W. Bae. 2008. Analysis of yeast and archaeal population dynamics in kimchi using

denaturing gradient gel electrophoresis. International Journal of Food Microbiology. 126: 159–166

41. 박정아, 혀건영, 이정숙, 오윤정, 김보연, 민태익, 김치경, 안종석. 2003. 김치의 저온 발효 중 미생물 변화 양상. The Korean Journal of Microbiology. 39: 45–50

## 주         의

1. 이 보고서는 농촌진흥청에서 시행한 「농축산물부가가치향상기술개발사업」의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농촌진흥청에서 시행한 「농축산물부가가치향상기술개발사업」의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.