

Quality characteristics and preparing of solid starter using fungal strains for *Takju*

Chang-Ho Baek, Seong Yeol Baek, Ji-Young Mun, Han-Seok Choi, Ji-Eun Kang, Seok-Tae Jung, Soo-Hwan Yeo*

Fermented Food Science Division, Department of Agro-food Resource, NAAS, RDA, Wanju 55365, Korea

탁주용 곰팡이 고체종국 제조 및 품질 특성

백창호 · 백성열 · 문지영 · 최한석 · 강지은 · 정석태 · 여수환*

농촌진흥청 국립농업과학원 농식품자원부 발효식품과

Abstract

In this study, we investigated the effect of fermentation conditions on the amylolytic and proteolytic activities of *Aspergillus luchuensis* strain 74-5 and *Aspergillus oryzae* strain 75-2, which are used in the preparation of the starter culture, for *Takju* (Korean traditional rice wine). The starter culture was optimized using different conditions, such as inoculum size, inoculation temperature, and incubation time. The enzyme activities under each condition were measured. In the *A. luchuensis* strain 74-5 starter culture, the α -amylase and glucoamylase activities increased, however the activity of acidic protease decreased as the diluent to starter culture ratio increased. In the *A. oryzae* 75-2 starter culture, all enzyme activities were maintained at a higher level even at 5% inoculation ratio. Higher enzyme activities were observed in the middle range of inoculation temperature (35, 40°C), than in the lower range (20, 30°C). Enzyme activity in the starter culture varied with incubation time, however it was the highest at 144 and 120 hr, respectively, for *A. luchuensis* strain 74-5 and *A. oryzae* strain 75-2. The spore count of the starter culture was approximately 2×10^7 during fermentation, out of which contamination by aerobic bacteria was about 3×10^3 . The results suggested that the starter culture of each strain could be used as an inoculum for fermentation. However, we need to conduct further research for the selection of suitable diluting agents as well as drying methods to reduce the contamination by aerobic bacteria, while retaining the enzyme activity.

Key words : solid, starter culture, enzyme activity, *Takju*, fermentation

서 론

우리나라의 전통주는 고려시대를 거쳐 조선시대에 다양한 양조법이 정착되어 탁·약주 및 소주 등 다양한 형태의 가양주로 발전하여 현재까지 전해져 왔으며(1), 일반적으로 자연계의 미생물(곰팡이, 효모 및 유산균 등)을 이용한 전통누룩으로 곡물의 전분을 당화시킨 후, 알코올을 생성

하는 병행복발효 방식으로 술을 빚었다(2,3).

누룩은 제조방법에 따라 자연계 미생물을 이용한 전통누룩과 살균한 전분질 원료에 순수 배양한 곰팡이를 접종하여 만든 개량누룩이 알려져 있으며(4-6), 전통누룩은 지역별, 원료별로 다양하며 이들 누룩으로 빚은 탁주는 독특한 맛과 풍미를 가진 것이 특징이다(7,8).

전통누룩은 제조시기에 따라 당화력 차이로 술을 빚을 때 마다 주질이 균일하지 않아 고급화 및 표준화에 어려움이 있어(9-11), 이에 일부 양조장에서는 전통누룩을 대신하여 단일균으로 만든 개량누룩으로 탁·약주를 생산하고 있다(12). 개량누룩은 전통누룩으로 빚은 발효주에 비해 신맛과 시큼한 냄새만 강할 뿐, 특유의 향과 맛을 가진 고품질의 발효주를 빚지 못하는 것으로 평가되고 있다(13,14).

*Corresponding author. E-mail : yeobio@korea.kr
Phone : 82-63-238-3610, Fax : 82-63-238-3843
Received 23 September 2016; Revised 22 November 2016;
Accepted 25 November 2016.
Copyright © The Korean Society of Food Preservation. All rights reserved.

전통누룩에 분포하는 다양한 *Aspergillus*속 균주는 식품 산업뿐만 아니라 의약품의 소재로써 폭넓게 이용되고 있으며, 이들 균주는 산업적으로 유용한 전분가수분해효소를 많이 분비하는 것으로 보고되어져 있다(15-18).

우리나라는 선진국보다 생물자원과 종균개발에 대한 연구와 인프라 투자가 부족하여 외국산 종균을 수입하여 발효 식품을 제조하고 있어 많은 비용을 로열티로 지불하고 있는 실정이며(19), 나고야의정서 체결에 따라 선진국의 발효종균 시장의 규모가 급격히 증가하고 있는 추세이다(20).

따라서, 수입종균을 대체하기 위해, 국내산 토착 발효종균 발굴과 자원화와 더불어 종균제조기술 개발이 무엇보다도 절실히 필요하다(21). 국내산 전통누룩의 미생물학적 연구는 1906년 Uyeno(22)에 의한 사상균 연구가 시작되었고 유 등(23)은 1906년부터 1945년까지 사상균 12속 59종을, 1945년 이후에는 사상균 12속 38종을 추가적으로 보고하였다(24). 1990년대 중반 이후, 미생물의 분류 및 동정기술 발달로 세분화된 종들이 추가적으로 보고되었다(9,25-27).

국내 탁주 및 막걸리 제조에 널리 사용되는 수입산 *A. kawachii* 균주의 유전자 재분석을 통해 *A. luchuensis*로 증명된 바뀐 것이 최근의 연구 결과이다(28). 위와 같이 누룩과 관련하여 많은 연구가 보고 되었음에도 불구하고 종균제조 의 실용화가 이루어지지 못한 것은 시설, 장비 및 유지 등의 초기 인프라 투입 비용이 많고 우수한 특성을 가진 종균을 안정적으로 유지, 공급하는 기술 개발을 해결하지 못한 관계로 한국형 토착 발효종균으로 발전시키지 못하고 외국산 종균을 수입하여 사용하고 있는 실정이다(19).

따라서 본 연구에서는 전분 및 단백질 분해력이 우수한 *A. luchuensis* 74-5 및 *A. oryzae* 75-2 종균을 사용하여 탁주용 고체종균 제조조건과 이들의 품질특성을 규명하여 한국형 토착 발효종균으로서의 가능성을 비교·검토하였다.

재료 및 방법

재료 및 사용균주

본 연구에 사용한 쌀은 경기도 여주에서 생산된 경기미(추청미, 2013년)를, 사상균은 전국에서 수집한 전통누룩으로부터 분리하여 농촌진흥청 발효식품과에서 보관한 *Aspergillus luchuensis* 74-5(KACC93235P)와 *Aspergillus oryzae* 75-2(KACC93236P) 종균을 Malto extract agar(MEA) (Beton, Dickinson and company(BD), Sparks, MD, USA) 배지에 계대배양한 후, 4°C에 보관하면서 사용하였다.

액체종균 제조

탁주제조에 적합한 고체종균은 Malto extract broth(ME) 배지에 2종류의 서로 다른 양조용 곰팡이(*A. luchuensis*

74-5, *A. oryzae* 75-2)를 각각 접종하여 3일간 배양(30°C, 120 rpm)한 전 배양액 5%를 분 배양배지에 접종하여 4일간 배양(30°C, 120 rpm)하고 여과한 것을 액체종균으로 사용하였다.

고체종균 제조

2 종류 곰팡이를 이용한 고체종균 제조는 잡균 오염 등을 방지하기 위해서 소형 제국기(Mini-15, Yaegaki Food Co., Hyogo, Japan)를 사용하였다. 먼저 쌀을 씻어 3시간 동안 침지한 후, 1시간 물 빼기를 하고, 110°C에서 40분간 증자한 후, 40°C가 되도록 고두밥을 냉각시켰다. 각각의 액체종균을 접종하고 40°C에서 제국하여 12시간 후에 1차 뒤집기를 하고, 배양 48시간째 뒤섞기를 하여 12시간 간격으로 확인하면서 곰팡이 포자를 충분히 형성한 후, 제국 120시간에 출국하여 45°C에서 24시간 건조하였다. 이때 액체종균은 쌀 중량(dry base)에 대하여 2, 5, 10% (v/w) 농도별로 접종하여 고체종균을 제조한 후, 이들의 품질 특성을 비교하였다. 또한 고두밥에 최적화된 5% 액체종균을 접종하여 온도별(20, 30, 35, 40°C)로 발효시켜 4종류의 고체종균을 제조하였다.

pH, 적정산도 및 아미노산도 측정

pH는 제조된 고체종균 20 g에 증류수 100 mL를 가하고 실온에서 3시간 침출한 그 여액을 측정하였으며, 적정산도는 시료 10 mL에 phenolphthalein 지시약(1%) 2~3방울 떨어뜨린 후, 0.1 N NaOH로 중화적정하고 소비된 용액의 양을 산도로 표시하였다(25). 아미노산도는 여과지로 여과한 검체 10 mL를 100 mL 삼각 플라스크에 넣고 0.1 N NaOH로 중화시킨 후, 중성 포르말린 용액 5 mL를 넣어 혼합하고 여기에 0.1 N NaOH용액으로 적정하여 pH 8.3이 될 때까지 소요된 0.1 N NaOH의 mL로 표시하였다(29).

포자수 측정

제조된 각각의 고체종균 1 g을 Tween 80 용액(5%) 10 mL에 현탁하고 methylene blue용액(1%) 2~3방울을 가하여 물게 희석 한 후, Hemocytometer에 떨어뜨려 현미경(Axio Imager A2, Carl Zeiss Microimaging GmbH, Gottingen, Germany)으로 검경하였다(30).

효소활성 분석

효소활성 분석은 일본 국제청 소정분석법(30)에 따라 분석하였으며, α-amylase 활성은 검체 10 g에 NaCl용액 50 mL를 넣고 실온에서 3시간 진탕·추출한 후, 여과액을 희석하여 조효소액을 제조하였다. 전분용액(1%) 2 mL를 시험관에 취해, 40°C에서 5분간 예열한 후, 효소액 0.1 mL를 넣고, 반응액 중에서 0.1 mL를 1분 간격으로 iodine 용액 10 mL를 넣어둔 시험관에 넣어 혼합하였다. 생성된 색을

25℃에서 유지하다가 10 mm 비색관을 사용하여 670 nm에서 색을 비교하고 투과율 T%를 측정하였다. 효소활성은 Wohlgemuth value에 준한 다음 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

Glucosylase 활성은 40℃에서 20분간 반응시킨 효소-기질 반응액에 1 mL를 사용하여 Somogi-Nelson법(32)으로 반응액 내에 생성된 포도당량을 측정하였으며, 다음 식에 준하여 효소 활성도를 산출하였다.

$$\text{효소활성}(\text{units/g}) = \text{생성 포도당량}(\text{mg}) \times 60 / 20(\text{반응시간}) \times 1 / 0.1(\text{효소량}) \times 100 / 10(\text{추출률})$$

Acidic protease 활성은 Anson 개량법(33)에 준하여 측정하였다. pH 3.0으로 조정된 0.6% casein 용액을 기질로 하고, 조효소액으로 40℃에서 20분간 효소반응을 시킨 후, 생성된 Folin 발색성 비단백질 물질의 양을 Folin 비색법으로 측정하였다. 효소활성 단위는 37℃에서 효소액 1 mL가 1분에 1 µg의 tyrosine을 유리시키는 것을 1 unit로 하였다.

위해 미생물의 오염유무

시료 10 g을 취하여 멸균 백에 넣고 90 mL의 멸균 생리식염수를 가한 다음 균질기로 현탁하고 멸균 생리식염수로 단계별로 희석한 후, PCA배지에 도말하여 나타난 균체수를 CFU/g로 표시하였다(34).

결과 및 고찰

액체종국 접종량에 따른 고체종국의 이화학적 특성
 양조용 곰팡이 *Aspergillus luchuensis* 74-5와 *A. oryzae* 75-2로 제조한 탁주용 고체종국의 품질 특성을 Table 1에 나타내었다. 누룩 현탁액의 pH를 조사한 결과, *A. luchuensis*

74-5는 각각 3.85, 3.84, 3.82로, *A. oryzae* 75-2는 각각 5.64, 5.75, 5.78 인 것으로 보아 각각의 곰팡이 종균으로 제조한 액체종국(액국) 접종량에 따른 pH 변화는 없는 것으로 보인다. *A. luchuensis* 74-5를 10% 접종한 고체종국의 적정산도는 8.86 mL로 가장 높게 나타났고 *A. oryzae* 75-2를 10% 접종한 고체종국은 2.12 mL로 가장 낮게 나타났다. 또한, 아미노산도는 액국 5% 접종한 *A. luchuensis* 74-5 종국에서 2.7로, *A. oryzae* 75-2의 1.38보다 2배 더 높게 나타난 것으로 보아 *A. luchuensis* 74-5 균주로 술을 빚으면 아미노산이 풍부한 탁주를 제조할 수 있을 것으로 판단되며 액국의 아미노산도가 3.0 이하로 주류 제조시 느끼한 맛은 없을 것으로 보고한 최 등(35)의 내용과 유사한 결과를 보였다.

액체종국에 따른 효소활성 변화

액국 접종량(2, 5, 10%)에 따라 제조한 2종류 고체종국의 효소활성을 분석한 결과, 각각의 효소(α -amylase, glucosylase, acidic protease) 활성은 곰팡이 종류에 따라 다른 양상을 나타내었다(Fig. 1). 백국균인 *A. luchuensis* 74-5를 액국 5% 이하로 접종하였을 때, acidic protease 활성이 높은 반면에, 액국 10% 경우는 glucosylase 활성이 높았고 상대적으로 protease 활성은 낮게 나타났다. 황국균인 *A. oryzae* 75-2로 만든 액국 5%를 접종하였을 때 모든 효소활성이 가장 높은 것으로 나타났고, glucosylase 활성은 액국 10%로 접종한 고체종국에서 효소활성이 가장 낮게 나타났으며, α -amylase의 활성은 액국 접종량의 농도에 따른 차이가 거의 없는 것으로 확인되었다. 액국을 농도별(5, 10%)로 접종하였을 때 가장 높은 효소활성을 보인 최 등(35)의 결과와는 차이가 있었는데 이러한 것은 사용하는 곰팡이 종균에 따라 효소 생성능의 차이가 있는 것을 알 수 있다.

발효온도에 따른 효소활성 변화

탁주 제조용 곰팡이 고체종국을 제조하기 위해, 제국기의 습도를 70%로 일정하게 유지시킨 후, 온도에 따른 고체종국의 효소활성 변화를 조사하였다(Fig. 2). 백국균인 *A. luchuensis* 74-5로 만든 종국은 낮은 온도보다 중온(35℃, 40℃)에서 glucosylase와 acidic protease의 활성이 높았지

Table 1. Properties of solid starter on inoculating concentration of liquid starter

Strain	Inoculating rate of liquid starter (%)	pH	Titrateable acidity (0.1 N NaOH mL/10 mL)	Amino acidity (0.1 N NaOH mL/10 mL)
<i>A. luchuensis</i> 74-5	2	3.85±0.09 ¹⁾	8.54±0.42	2.66±0.21
	5	3.84±0.11	8.68±0.33	2.73±0.39
	10	3.82±0.09	8.86±0.37	2.83±0.32
<i>A. oryzae</i> 75-2	2	5.64±0.11	2.12±0.22	1.15±0.24
	5	5.75±0.12	2.14±0.32	1.38±0.51
	10	5.78±0.14	2.21±0.15	1.34±0.42

¹⁾Values are means±SD (n=3).

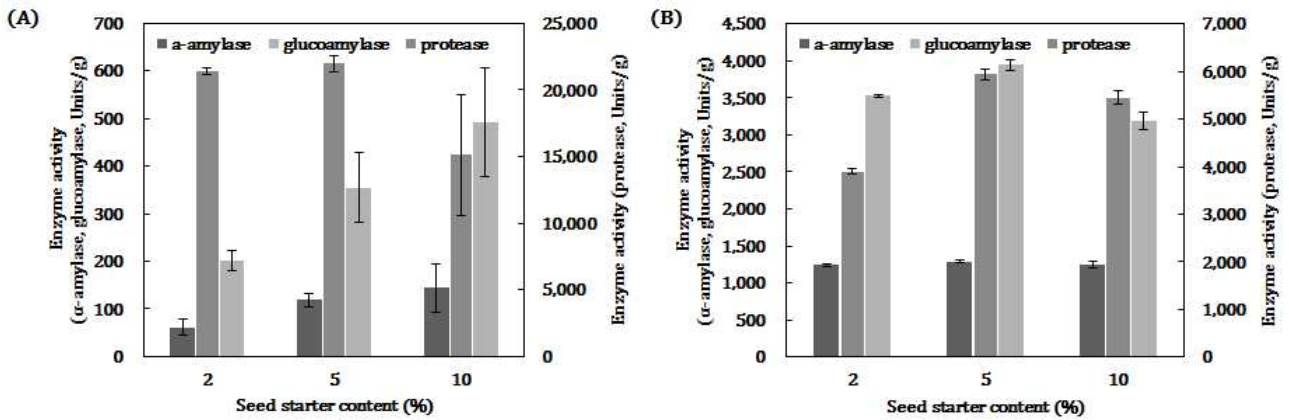


Fig. 1. Effects of enzyme activity on various inoculation rate of liquid starter. A, *A. luchuensis* 74-5; B, *A. oryzae* 75-2.

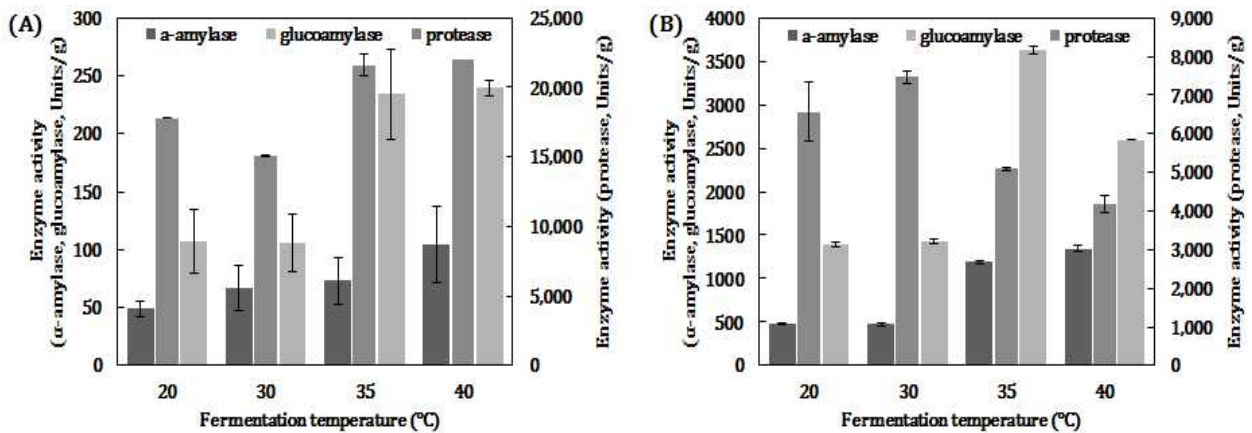


Fig. 2. Effects of enzyme activity on various fermentation temperature of solid starter. A, *A. luchuensis* 74-5; B, *A. oryzae* 75-2.

만 이들 온도에 따른 효소활성 차이는 크지 않았다(Fig 2A).

황국균인 *A. oryzae* 75-2로 제조한 중국은 낮은 온도(20, 30°C)보다 중온(35, 40°C)에서 α -amylase와 glucoamylase 활성이 높은 것으로 보아 *A. luchuensis* 74-5보다 당화력이 우수한 종균임을 알 수 있다(Fig 2B).

발효시간에 따른 효소활성 변화

토착 곰팡이 종균을 이용한 중국제조 최적 발효시간을 구명하기 위해, 7일간(168 hr) 발효하면서 각각의 효소활성 변화를 조사하였다(Fig. 3). 누룩에서 분리한 백국균(74-5)과 황국균(75-2) 2종류 곰팡이는 발효시간이 경과됨에 따라 효소활성은 증가하는 경향이었으나 효소 종류에 따른 증감 패턴이 다르게 나타났다. 종균별로 살펴보면 *A. luchuensis* 74-5가 생산하는 α -amylase 활성은 발효시간이 길어지면서 조금씩 증가하다 144시간 이후부터 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 3A). Glucoamylase도 발효시간에 따라 48시간 이

후부터 급격히 상승하다가 144시간부터 효소활성이 감소하였고, acidic protease는 24시간부터 급격히 증가하여 72시간부터 효소활성이 안정하게 유지되는 것으로 확인되었다(Fig. 3A).

황국균인 *A. oryzae* 75-2 종균은 발효시간이 경과함에 따라 효소활성이 서서히 증가한 후, 감소되는 것으로 나타났다(Fig. 3B). Glucoamylase 및 acidic protease는 발효 120시간까지는 상승하다 이후부터 감소하였다. 이상의 결과에서 높은 효소활성을 가지기 위해, 2종류 곰팡이 종균을 이용한 고체중국 제조시간은 120시간(5일)을 경과하지 않는 것이 효소활성 최적조건으로 확인되었다. 또한 이들 2종류 곰팡이 종균(*A. luchuensis* 74-5, *A. oryzae* 75-2)의 발효시간에 따른 효소활성 차이를 이용하여 탁주용 조제중국도 제조할 수 있다.

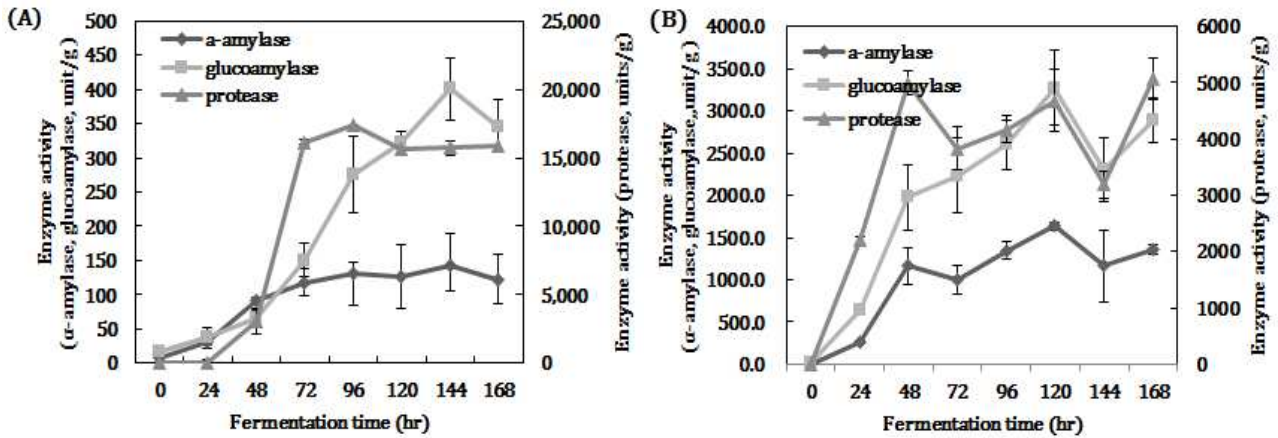


Fig. 3. Change of enzyme activity on fermentation time of solid starter.

A, *A. luchuensis* 74-5; B, *A. oryzae* 75-2.

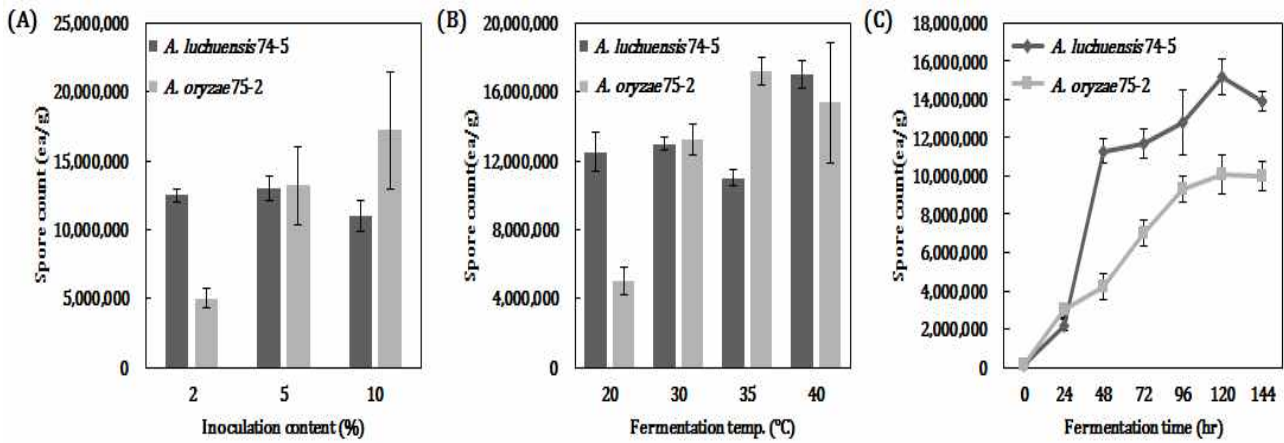


Fig. 4. Comparison in spore count of various fermentation conditions on solid starter.

A, Inoculation ratio (%); B, Fermentation temp. (°C); C, Fermentation time (hr).

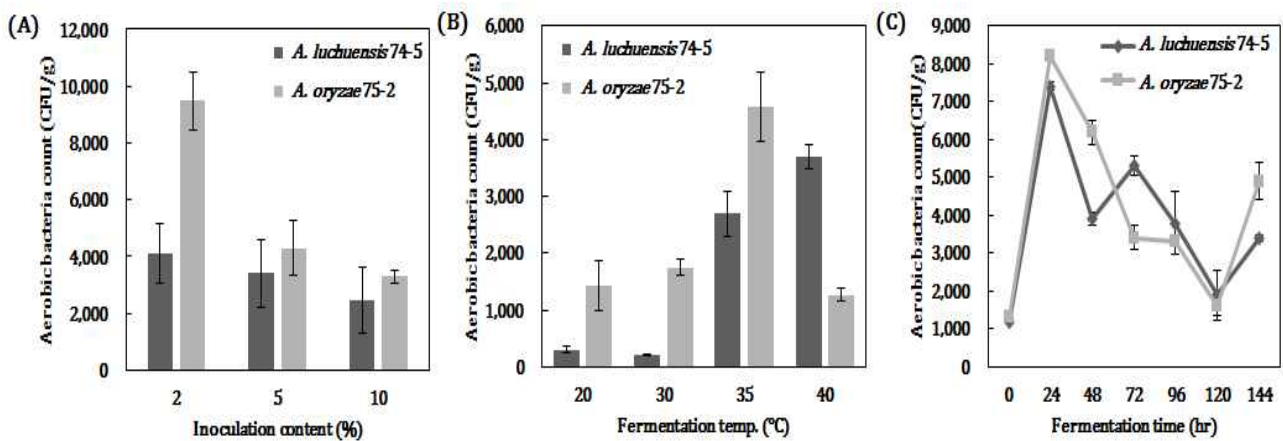


Fig. 5. Comparison in aerobic bacteria count of various fermentation conditions on solid starter.

A, Inoculation ratio (%); B, Fermentation temp. (°C); C, Fermentation time (hr).

발효조건에 따른 고체종국의 포자수 변화

2종류 곰팡이로 제조한 고체종국의 포자수를 Fig. 4에 나타내었다. 첨가하는 액국 접종량이 증가할수록 *A. oryzae* 75-2 포자수는 증가하는 것으로 나타났으나 *A. luchuensis* 74-5는 5% 접종이 1.3×10^7 으로 가장 많은 포자수가 검출되었고 *A. oryzae* 75-2는 10% 접종한 중국에서 1.7×10^7 으로 가장 많은 포자수를 나타내었다. 발효온도에 따른 곰팡이 포자수를 측정된 결과, 2종류 곰팡이 모두 낮은 온도보다 높은 온도(40°C)에서 각각 1.7×10^7 , 1.5×10^7 로 포자가 많이 만들어졌다. 또한, 발효시간에 따른 포자수 변화는 35°C에서 제조한 고체종국의 포자수를 분석한 결과, 발효시간이 경과함에 따라 포자수는 점차적으로 증가하다가 서서히 감소하는 것으로 나타났다.

세균에 의한 오염유무

제조된 고체종국에서 잡균의 오염 유무 등의 위생 상태를 조사하기 위해, 세균수를 조사하였다(Fig. 5). 세균의 오염 수치는 $3.0 \times 10^2 \sim 10^3$ 이었고, 액국 접종량이 증가할수록 세균 오염은 낮은 것으로 나타났다(Fig. 5A). 다양한 발효온도에서 제조한 고체종국의 오염유무를 살펴본 결과, 황국균은 35°C에서 가장 높았고, 백국균은 40°C에서 세균오염이 가장 높게 나타났다(Fig. 5B). 발효시간은 24시간 이후에는 세균수가 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 5C). 제조된 2종류 고체종국의 세균 오염도 저감화 및 효소활성을 유지하기 위하여, 종국 제조시 발효 초기(24 hr)에 소량의 구연산 첨가와 더불어 건조방법 및 부형제 선택 등의 추가적인 연구 수행이 필요하다.

요 약

본 연구에서는 전분 및 단백질 분해력이 우수한 토착 발효종균 *Aspergillus luchuensis* 74-5 및 *Aspergillus oryzae* 75-2로 제조한 고체종국의 품질 특성을 조사하였다. 액체종국 접종량 5%와 10% 접종하였을 때, pH는 각각 5.78 및 3.85 이하로, 적정산도는 2.12와 8.54 이상, 아미노산도는 1.15 및 2.66 이상으로 균주에 따라 차이를 보였다. 효소활성의 변화는 발효종균에 따라 증감 패턴이 특징적으로 나타났다. 액국 접종량에 따라 *A. luchuensis* 74-5는 접종량이 증가할수록 α -amylase와 glucoamylase 활성은 증가하나 acidic protease 활성은 감소하였고, *A. oryzae* 75-2는 5% 접종하였을 때 모든 효소활성이 가장 높게 나타났다.

발효온도는 저온보다 중온(35, 40°C)에서 효소활성이 우수한 것으로 나타났고, 발효시간은 종균에 따라 차이는 있지만 각각 144시간과 120시간일 때 효소활성이 높은 것으로 나타났다. 발효조건에 따른 고체종국의 포자수는 약 2.0×10^7 , 세균의 오염은 약 3.0×10^3 으로 나타났으며, 세균에

의한 오염도 저감화 및 효소활성을 유지하기 위하여, 구연산, 종국의 건조법 및 부형제 등의 추가적인 연구가 필요하다.

감사의 글

This work was carried out with the support of 'Cooperative Research Program for Agriculture Science & Technology Development (Project No. PJ00999803)' Rural Development Administration, Republic of Korea.

References

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 Korean *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* Kor J Appl 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 Di Life, 26, 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 DA, Jeenes DJ, Gou X, Archer DB (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 VG (2013) Antifungal activity of *Streptomyces* sp. VITSTK7 and its synthesized Ag₂O/Ag nanoparticles against medically important *Aspergillus* pathogens. J Mycol Med, 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, Kim HS, Yu TS (2004) Characteristics of α -amylase of, a new species, *Aspergillus coreanus* NR 15-1. 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 Korean "*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 amyolytic 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 RA (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. 12th ed, Osong, Korea, p 18
 31. Brewing society of Japan (1993) The Annotation of the official method of analysis of the national tax administration agency. 4th ed, 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 Publishers, St. Louis, MO, USA, p 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