

석사학위논문

좁쌀주 생산용 효모 및 당화균의
분리와 양조특성



제주대학교 중앙도서관
제주대학교 대학원 LIBRARY

농화학과

김 지 용

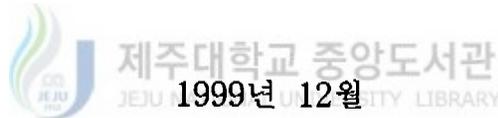
1999년 12월

좁쌀주 생산용 효모 및 당화균의 분리와 양조특성

지도교수 고 정 삼

김 지 용

이 논문을 농학 석사학위 논문으로 제출함



김지용의 농학 석사학위 논문을 인준함

심사위원장	인
위 원	인
위 원	인

제주대학교 대학원

1999년 12월

Isolation of Brewing Yeasts and Saccharogenic
Strains and its Characteristics
for Foxtail Millet-wine Making.

Ji-Yong Kim

(Supervised by professor Jeong-Sam Koh)

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF MASTER OF
AGRICULTURE.

DEPARTMENT OF AGRICULTURAL CHEMISTRY
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

1999. 12

목 차

Summary -----	6
I. 서론 -----	8
II. 재료 및 방법	
1. 미생물 분리 -----	12
2. Koji 제조 및 효소활성 측정 -----	12
1) Koji 제조 -----	13
2) 효소활성 측정 -----	13
3. 좁쌀주용 누룩의 제조 및 양조 -----	15
1) 누룩의 제조 -----	15
2) 누룩의 일반성분 분석 -----	15
4. 좁쌀주 양조 -----	16
1) 좁쌀주 성분분석 -----	16
2) 관능검사 -----	18
III. 결과 및 고찰	
1. 전분 당화균주의 분리와 우수 효모 분리 -----	18
2. 전분 당화균주 효소활성 -----	21
3. 알코올 발효균주 활성 -----	22
4. 좁쌀주용 누룩제조 및 일반성분 -----	22

1) 누룩의 제조 -----	22
2) 원료에 따른 누룩의 원료별 처리 -----	28
3) 누룩의 일반성분 분석 -----	29
5. 좁쌀주 제조 -----	30
6. 좁쌀주 성분분석 -----	36
1) 유기산 -----	37
2) 유리당 -----	38
3) 향기성분 -----	39
4) 에탄올 및 향기성분 변화 -----	40
5) 관능검사 -----	41
IV. 요약 및 결론 -----	43
V. 참고문헌 -----	45



Summary

In order to improve millet wine which is one of the traditional Cheju cereal wines, yeasts and molds from 35 kinds of Nuruk collected from all over the country, were isolated and screened. Isolated strains were screened for saccharification of starch and brewing millet wine. Fermentation characteristics of millet wine with different types of Nuruk were also investigated. The results are as follows;

1. The average number of microbial populations in the Nuruks were $6.4 \times 10^5 \sim 10^7$ molds and $1.4 \times 10^4 \sim 10^7$ yeasts. Among 169 strains of molds and 103 strains of yeasts, 16 molds which were screened for saccharifying activity on starch as a substrate, and one yeast was screened for brewing of millet wine.
2. A8-3 strain, identified as *Aspergillus* sp. was the highest on enzyme activities of glucoamylase, α -amylase, and xylanase, and B23-3 strain identified as *Rhizopus* sp. was the best on saccharifying activity.
3. A10-4 identified of as *Saccharomyces* sp. was the best on pH changes of broth, weight loss from CO₂ evolution, sugar and alcohol tolerance during fermentation.
4. When the Nuruk was made and inoculated with selected strains, saccharifying activity was higher on cocultivation of A8-3 and B23-3 than separate cultivation of each.
5. Similar saccharifying activities were shown in both disk type and

koji type Nuruk. It was suggested that koji-type Nuruk could improve fermentation yield and would be easier to be made.

6. The collected Nuruk was consisted of 10~13% moisture, 55~70% total sugar, 10~18% crude protein, 0.2~1% crude fat, and 1.8~2.1% ash. The Nuruk made in this study was consisted of 12~15% moisture, 61~71% total sugar, 15~20% crude protein, 0.4~1.5% crude fat, and 1.1~1.5% ash, respectively.

7. When the millet wine was brewed from the Nuruk made in this study, wheat flour : barley : wheat bran : millet = 8:1:1:0(koji) management in showed the highest in alcohol concentration, and showed more favorable score than Kuksundang Nuruk management in sensory evaluation.

8. The main organic acids in millet wine were lactic acid and acetic acid, and minor organic acids were fumaric acid, oxalic acid, citric acid and malic acid. In analysis of carbohydrates, glucose, arabinose, and maltose were contained in decreasing order, and xylose was also detected.

9. Flavor components of millet wine were mainly *i*-amyl alcohol, *i*-butyl alcohol, and *n*-propyl alcohol. Ethylacetate and acetadehyde was also detected. The contents of *i*-butyl alcohol and *n*-propyl alcohol showed higher in the Kuksundang Nuruk management than in the other treatments, and the content of *i*-amyl alcohol was showed higher in the wheat flour : barley : wheat bran : millet = 8:1:1:0(koji) management.

I. 서 론

한국의 전통적인 주류는 약주와 탁주로서 이를 발효시키는 주 효소제인 누룩은 오랜 역사를 가지고 있는데 비하여, 품질이 좋은 새로운 개량 누룩 개발에 대한 연구는 많지 않다.

예전에는 약주와 탁주를 제조할 경우, 밀을 분쇄하여 물과 혼합하고 일정한 크기로 성형한 다음 숙성과정에서 여러 종류의 미생물을 증식시킨 자연 발효법으로 제조되었다. 이 경우 누룩에는 많은 종류의 사상균, 효모, 세균이 증식하게 되며, 누룩을 사용하는 경우 누룩에 증식된 미생물에 의한 독성이 생성될 가능성과 병원성 세균이 오염될 가능성을 생각하지 않을 수 없다. 이에 따라 미생물학적으로 위험성이 없고 위생적이며, 당화력도 높고 주정 발효력이 강한 누룩의 제조 연구가 필요하다.

누룩의 원료는 주로 밀이며, 이외로 보리, 옥수수, 콩, 팥, 귀리 등을 섞어 만들기도 하며 지방에 따라 그 형상, 크기, 품질 등이 각각 다르다. 누룩은 분국(粉麴)과 조국(粗麴)으로 나누고, 분국은 약주, 합주, 과하주 등을 제조하는데 사용하는 것으로서 밀을 가루로 빻아 만든다.

조국은 탁주, 약주의 제조에 사용하는 것으로서 약간 거칠게 부순 밀로 만들며, 소주용에는 증류 관계로 밀을 곱게 부순 다음 제조함으로써 탁주용 조국과 구분된다. 또한, 탁주용 조국은 분쇄한 밀에서 밀가루를 분리하여 녹말질을 줄이거나 밀기울을 혼합하여 제조하였다. 소주용 누룩은 밀 이외에 옥수수, 콩, 팥, 보리 등을 혼합하여 제조하기도 하였다.

누룩을 만들 때는 분쇄한 밀에 알맞게 물을 가하여 잘 비벼서 보자기에 쌓아 누룩 성형틀에 밟아 굳힌다. 보자기를 빼고 꼭자실이나 팡에 알맞게 배열하여 짚이나 쭉 등 생초로 싸서 자연적으로 누룩균이 자라도록 한다. 누룩균이 자라면 피복한 풀을 제거하고 배열 간격을 넓게 하여 서서히 건조시키면서 제국하는 방법으로 제조기간은 짧게는 1주일, 길게는

40일 이상 걸렸다.

누룩은 자연발효 상태에서 미생물을 증식시킨 것이므로 경우에 따라 당화력이 낮고 발효력이 조금 떨어지는 단점이 있다. 누룩의 단점을 보완하기 위하여 저온담금법(2~3단 담금)이 이루어졌으며, 각종 가향(加香) 약용재료 또는 식용재료를 부원료로 첨가하여 다양한 풍미를 갖는 술을 양조하였다. 전통누룩의 형태는 원형, 구형, 사각형, 요철형, 장방형 등으로 지역과 용도에 따라 다양하다.

조국은 제조시기에 따라 춘곡(1~3월), 하곡(4~6월), 추곡(8~10월), 동곡(11~12월)으로 구분하기도 한다. 누룩을 만들 때 누룩의 직경이 너무 작으면 수분이 쉽게 증발하여 건조되기 때문에 누룩 속까지 미생물의 증식이 어려워진다. 이에 따라 숙성도 불량하며, 너무 얇으면 단시일에 숙성되어 빛깔은 좋지만 향미가 좋지 않을 뿐만 아니라 술지게미(酒粕)가 많아 수율이 떨어진다. 이와 반대로 너무 두꺼우면 내부의 수분발산이 어려워 품질이 높아져 세균 증식이 많아질 가능성이 있고 제조 후 건조가 어렵다(배, 1995).

누룩에 관한 문헌으로 정조 11년(1878년)에 간행한 『攷事十二集』에 의하면 누룩 제조법은 밀, 밀가루, 녹두즙, 여귀즙을 섞어 반죽하여, 이를 잘 성형한 후 연잎, 창잎에 꼭꼭 싸서 바람이 잘 드는 서늘한 곳에 매달았다가 10월에 갈무리 해둔다. 이들을 잘 디디기 위해서는 반죽을 되게 하여 꼭꼭 밟아야 한다. 이와 같이 누룩제조는 곰팡이를 자연적으로 번식시키기 위하여 고온 다습한 여름철을 이용하고 있어서 초복 후가 가장 좋으며, 중복 후 말복 전은 그 다음의 절기라고 하였다. 그리고 누룩을 제조할 때 연잎이나 창잎 등으로 싸서 두는 것은 이들에 부착된 야생효모를 이용하기 위한 수단이라 하였다(유 등, 1998).

전통적인 누룩에서 조금 개량되어 해방 후부터 점차 사용이 확대되어 온 누룩으로는 *Aspergillus*속, *Rhizopus*속 등의 곰팡이를 인위적으로 접종하여 만든 누룩과 1960년대 이후에 개발되어 실용화한 분곡류가 있고, 1970년대에 이르러서는 주류 제조에 알맞은 고단위 순수 효소제품 등이 개발되었다(정, 1993).

현재 시판되고 있는 누룩은 일부 제조회사를 제외하고는 민가에서 소규모로 제조되고 있어서 제조자에 의한 누룩의 품질 향상은 실제적으로 어려운 실정이다. 더욱이, 서구문명이 일반화되면서부터 학자들도 전통적인 의미의 의미가 비과학적이고 비합리적이라는 인식이 커서 전통적인 민족 고유의 문화를 외면한 때도 있었다. 이에 따라 전통적인 누룩에 관한 학문적 연구는 초보 단계를 벗어나지 못하고 있는 실정이다. 전통 주류의 과학화를 위한 한 단계로서 누룩을 체계적으로 연구할 필요성이 요구되고 있다(유 등, 1998).

전통누룩의 발효에 관계되는 미생물은 *Rhizopus* sp., *Mucor* sp., *Absidia* sp., *Monascus* sp. 등의 곰팡이이며, 미생물의 분류학적으로 *Phycomycetes*가 주요균이며, 이 밖에 *Ascomycetes*속에 속하는 *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp. 등의 곰팡이에 의해 호화된 쌀녹말의 액화와 당화 과정이 주로 이루어지며, 여러 종류의 *Saccharomyces* sp. 효모가 알코올 발효에 관여한다.

한국에서 누룩에 관한 미생물학적 연구로서는 해방 후에 누룩에서 *Aspergillus oryzae*, *Rhizopus*속, *Mucor*속 균주를 분리하여 그 형태와 당화력을 비교한 결과 *Rhizopus*속 균주가 *Mucor*속 균주에 비하여 당화력이 강하다고 하였다(한 등, 1957). 누룩으로부터 분리한 대부분의 곰팡이 균주가 *Asp. flavus*이고, 그 외 약간의 *Asp. niger*, *Asp. clavatus*, *Asp. fumigatus* 등이 분리된다고 보고하였다(한 등, 1959).

또한, 누룩에서 *Rhizopus*속, *Mucor*속, *Penicillium*속, *Endomyces*속, *Asp. niger*, *Asp. oryzae*, 불완전 균류 등의 균주를 분리하였으며, 생전분에 대한 당화 작용은 이들 중 *Rhizopus*속 균주가 가장 강력한 곡자의 주요 균이라고 하였고, 밀에 좋은 발육과 향을 나타내었다고 보고하였다. 이처럼 누룩 중의 곰팡이, 효모, 세균에 대한 동정과 이들의 발효에 관여되는 특성이 검토되었으며, 누룩 중의 주요 곰팡이는 *Rhizopus*속과 *Aspergillus*속으로 주장하는 보고와 *Absidia*속으로 주장하는 보고 등 연구에 차이를 나타내었다(조 등, 1997).

제주지역에서는 좁쌀, 메밀, 수수, 맥류 등이 많이 재배되어, 이들을

이용한 누룩이 많이 만들어지고 술이 빚어졌다. 대부분 좁쌀을 원료로 하여 술을 빚었으며, 토속주 중에는 한주(소주), 좁쌀약주(오메기술), 탁배기(탁주), 강술이 있었고, 약용주 또는 기타 제제주로 생이족발술, 생지황술, 토사자술, 소앵이술, 목마작쿨술, 강이술, 뱀술, 오미자술, 감귤주 등이 구전 또는 개인비법으로 전해지고 있다(양, 1991). 그러나 지금은 그 전통이 많이 사라져가고 있음에 따라, 제주 토속주를 상품화하고 고품질화하여 관광상품화 하기 위해서는 토속주에 알맞은 누룩의 개발의 필요한 실정이다.

이에 따라, 본 실험은 제주 토속주인 좁쌀주 제조를 위한 우수 당화균주를 선별하고 이를 누룩의 제조에 이용하여 독특한 맛과 향이 있는 균일한 고품질의 좁쌀주를 생산함으로써 전통 토속주가 관광상품으로 자리매김 할 수 있는 기초적인 연구자료를 확립하기 위하여 실험을 수행하였다.



II. 재료 및 방법

1. 우수균주의 분리

한국식품개발연구원에서 보관 중인 전국 각 지역의 시판누룩 30점과 본 실험실에서 구입한 5점의 누룩을 미생물 분리원으로 사용하였다. 분쇄한 누룩 1g을 생리식염수로 현탁하여, 희석한 다음 상정액 100 μ l를 분리용 평판배지에 도말하여 28 $^{\circ}$ C에 3일간 정치배양하면서 나타난 곰팡이와 효모 colony를 순수분리 하였다.

순수분리 배지로는 각각 rose bengal agar 배지(soytone 0.5%, dextrose 1.0%, monopotassium phosphate 0.1%, magnesium sulfate 0.05%, rose bengal 0.005%, agar 1.5%, chloramphenicol 0.005%)와 YPD(yeast extract 0.5%, polypeptone 1.0%, dextrose 2.0%, ampicilin 3mg, sodium propionate 0.1%)/1 l를 사용하였다. 한편, 분리한 곰팡이와 효모의 배양은 PDA(potato dextrose agar) 배지에서 배양하였다.

2. Koji의 제조와 효소활성 측정

밀기울과 좁쌀을 누룩 원료로 사용하였다. 이 원료에 수집한 누룩에서 분리한 균을 접종하여 배양한 다음 각각의 누룩에 대하여 당화력, glucoamylase 활성, 액화력, xylanase 활성 등을 비교하였다. 누룩 제조와 좁쌀주 양조 시험에 알맞은 것으로 인정된 분리균을 밀기울과 좁쌀을 혼합한 누룩에 배양한 후 효소활성과 성분조성 등을 검토하였다.

1) 코지의 제조

코지(koji)는 밀기울과 좁쌀을 8 : 2 비율로 섞고, 중량의 0.8배 양의 수도물을 첨가하여 잘 혼합한 후 500ml들이 삼각 플라스크에 50g씩 넣고, 121℃에서 20분간 가열 살균한 후 국균을 접종하였다. 30℃에서 3일간 정 치배양하여 효소활성의 측정 및 분석 시료로 사용하였다.

2) 효소활성의 측정

(1) 효소액의 조제

당화력의 경우 누룩 및 코지 1g을 1% NaCl 용액 20ml에 현탁하여 30℃에서 3시간 동안 진탕시킨 뒤 그 상정액을 여과하여 사용하였다. Glucoamylase activity(GA) 측정에는 배양체 1g을 0.5% NaCl 용액 5ml에 현탁하여 5℃에서 12시간 동안 방치한 다음 실온에서 3시간 교반시켜 추출한 상정액을 사용하였다.

액화력은 코지 2g을 10ml의 40mM Na-acetate buffer(pH 5.0)로 현탁하여 25℃에서 1시간 진탕시킨 후 8,000rpm에서 10분간 원심분리 한 상정액을 조효소액으로 사용하였다. Xylanase는 코지 1g에 멸균수 10ml를 가하고 30℃에서 5시간 교반시킨 다음 6,000rpm에서 10분간 원심분리 한 후 상정액을 취하여 이를 조효소액으로 하였다.

(2) 당화력(Saccharifying power, SP)

당화력은 2% 가용성 전분용액을 기질로 하여 국제청 주류 분석규정(1993)에 따라 측정하여 비교하였다. SP는 기질용액을 55℃에서 1시간 효소반응을 시킨 다음 생성된 환원당의 양을 DNS변법(이, 1996)으로 측정하여, 기질의 당화율이 15% 되는 범위에서의 당화율에 회석배수를 곱하여 산출하였다.

$$\text{당화율}(\%) = \frac{\text{전분당화액 중의 당분}(\%) - (\text{회석효소액 중의 당분} \times 1/10)}{(\text{2\% 가용성 전분 중의 총당} \% - \text{회석효소액 중의 환원당}) \times 1/10} \times 100$$

(3) Glucoamylase activity

Glucoamylase의 활성은 2% 가용성 전분용액을 기질로 하여 40℃에서 20분간 반응시킨 효소-기질 반응액 1ml를 사용하여 DNS변법으로 반응액 내에 생성된 포도당 양을 측정하였다.

GA Unit = 생성된 포도당량(mg) × 60/20(반응시간) × 1/0.1(효소량) × 100/10(추출율)

(4) 액화활성

액화활성(dextrinogenic activity, DA)은 40℃에서 5분간 예열한 1% 가용성 전분용액(40mM Na-acetate buffer, pH 5.0) 2ml를 기질용액으로 하여 희석효소액 0.1ml를 넣고 40℃에서 30분간 반응시킨 다음 효소반응액 0.1ml에 0.00025N 요오드용액(0.0025N KI 함유) 10ml를 가하여 670nm 파장에서 투과도(T%)를 측정한 후 다음 식에서 활성도를 산출하였다(김 등, 1997).



$$DA(\text{unit/ml}) = 12.75(T_{30\text{min}} - T_{0\text{min}}) / 30\text{min}$$

(5) Xylanase activity

Xylanase의 활성은 0.1M Na-acetate buffer(pH 5.0)의 1% xylan 현탁액 0.5ml에 멸균수 0.5ml와 조효소액 0.1ml를 가하고 40℃에서 15분간 반응시킨 후 100℃에서 5분간 끓임으로써 반응을 정지시켰다. 반응액을 원심분리하고 상정액 중의 유리환원당을 DNS변법으로 정량하였다.

이 때 당화력, glucoamylase, 액화력의 효소활성 단위는 누룩 및 코지 1g당의 활성으로 표시하였고, xylanase 활성은 1분당 1mg의 xylose를 생성하는 효소의 양으로 정하였다.

(6) 발효력 및 내당성, 내알콜성

발효력은 YPD(glucose 2%, yeast extract 0.5%, polypeptone 1%) 액

체배지에서 CO₂ 생성에 따른 중량감소로 계산하였다. 내당성은 20% glucose가 함유된 YPD 액체배지를 이용하여, 30℃에서 48시간 배양 후 660nm에서의 흡광도를 측정하여 비교하였다. 내알콜성은 YPD 액체 배지에 접종 직후 무수 에탄올을 20% 되도록 첨가하여, 30℃에서 48시간 배양 후 660nm에서의 흡광도를 측정하여 비교하였다. 이 때 대조구는 같은 조건에서 본 연구실에 보관 중인 *Saccharomyces sake*와 *S. cerevisiae* IAM4274 균주를 사용하였다.

3. 좁쌀주용 누룩의 제조

1) 누룩의 제조

좁쌀주용 곡자는 당화력 및 glucoamylase 활성을 검정하여 우수균주로 선발한 *Aspergillus* sp., *Rhizopus* sp.를 전분 당화균으로, 그리고 발효력을 검정하여 우수균주로 선발한 *Saccharomyces* sp.를 양조효모로서 사용하여 액체배지에 접종시켜 종균배양을 한 다음 3%(w/v) 혼합 종균 분무액을 조제하였다.

본 실험에서 제조한 곡자는 재래법으로 하지 않고, 배(1995)의 방법을 변형하여 밀가루, 보리, 밀기울, 차조를 원료로 급수율 35%로 처리하여 일반 원반형 누룩과 개량형 누룩의 형태로 나누어 각각 직경 18cm와 두께 1.8cm, 직경 2.0~2.5cm와 두께 0.6~0.8cm의 형태로 나누어 만들었다. 단일 또는 혼합 종균을 분무한 누룩을 제조한 후 그 중 당화력이 좋은 누룩으로 원료배합 비율별로 처리하여 25℃에서 배양하면서 품온을 45℃ 이상 오르지 않도록 갈아쌓기를 실시하면서 6~8일간 발효시켜 45℃에서 2일간 건조하여 분곡형 곡자를 제조하였다.

2) 누룩의 일반성분 분석

전국 35개 지역에서 수집한 누룩과 본 연구에서 제조한 누룩을 비교

하였다. 수분은 105℃ 상압 건조법으로 측정하였고, 총당은 1N HCl를 가하여 환류냉각하면서 3시간 동안 산가수분해 한 후 1N NaOH 용액으로 중화시켜 정용 여과한 후 DNS 변법(이, 1996)으로 550nm에서 흡광도를 측정하였다. 유리당은 분석시료를 회석시켜 원심분리한 후 상정액을 분취하여 DNS 시약을 가해 비등속 중에서 5분간 가열 후 급냉시켜 550nm에서 흡광도를 측정하여 포도당 함량으로 나타내었다.

조단백질은 켈달법을 이용하여 총질소량을 구하여 이 값에 질소계수를 곱하여 구하였다. 조지방은 Soxhlet 지방추출기를 이용하여 지질성분을 에테르로 추출한 후, 에테르를 증발시켜 건조하여 남는 물질을 칭량하였다. 회분은 전기로에서 550℃에 4시간 동안 회화시킨 다음 함량을 구하였다(고, 1998).

4. 좁쌀주의 양조

1) 좁쌀주의 양조



본 연구에서 제조한 누룩 또는 시판누룩을 사용하여 2단 사입하고, 8일 동안 발효시키면서 성분변화를 비교하였다. 차조를 15시간 동안 20℃에서 침지하여 충분히 흡수하도록 하였으며, 증자기에서 120℃, 30분간 증자하여 전분질을 호화시켰다. 증자 후에 고두밥이 잘 풀어지도록 하여 차조 : 물 : 누룩을 2 : 2.5 : 0.75의 비율로 혼합하였으며, 원료의 0.05% 효모배양액을 1단 사입한 다음 접종하여 마개를 하고 20℃에서 2일간 발효시켰다. 2단 사입은 1단 원료 좁쌀의 1.5배, 물은 1.2배 가량 사입하여 술덧 담금을 하였다.

발효기간 중에 양조실의 온도는 23℃±1을 유지하였으며, 2단 담금 후 1일 간격으로 시료를 채취하여 당 농도, pH, 총산을 측정하였으며, 주정 농도, 유기산, 유리당, 향기성분은 발효가 끝난 후 술덧을 여과하여 측정하였다. 대조구로는 시판누룩 처리구와 비교하여 그 특성을 비교하였다.

2) 좁쌀주의 성분분석

(1) 좁쌀주의 물리화학적 특성

알코올 함량은 시료 100ml에 증류수 50ml를 가하여 증류하였으며, 증류액이 70~80ml가 되면 증류수를 가하여 100ml로 정용한 다음 주정계로 측정 후 15℃에서의 주정도로 환산하였다. 색도 변화는 color meter(JP 7200F/C, Japan)로 발효 8일 동안 황색도(b)의 변화를 측정하였다. pH는 pH meter (model 310, Orion, USA)로, 가용성고형물(°Brix)은 refractoanalyzer(model RA-510, Kyoto Electronics, Japan)를 사용하였으며, 총산 함량은 AOAC법에 준하여 각각 분석하였다.

(2) 유기산

유기산은 누룩 원료별 처리구와 대조구를 각각 양조하여 발효 마지막 날의 술덧을 0.45µm filter로 여과한 후 HPLC(Waters 540, USA)로 분석하였다. 분석조건은 이 등(1995)이 사용한 방법을 변형하였으며, Column은 Altech IOA-1000 organic acid 30cm×7.8mm, Mobilphase는 0.01N H₂SO₄, Flow rate는 0.4ml/min, Injection volume은 20µl, Detector는 UV 210nm에서 측정하였다.

(3) 유리당

유리당은 누룩 원료별로 처리한 것과 대조구를 양조하여 발효 마지막 날의 술덧을 착즙한 후 0.45µm filter로 여과하여 HPLC(Waters 540, USA)로 분석하였다. Column은 Supercosil LC-NH₂, 25cm×4.6mm ID, Mobile phase는 acetonitrile : water(75 : 25), Flow rate는 1.5ml/min, Detector는 Refractive index 를 사용하였다.

(4) 향기성분

누룩 원료별로 처리한 것과 대조구를 각각 양조하고, 담금 마지막날의

숯덧을 착즙하여 0.45 μ m filter로 여과한 후 생성된 향기성분 함량을 gas chromatography (HP5890 series II, USA)로 분석하였다. 분석조건은 양 (1991)의 방법을 변형하여 사용하였으며, column은 100/120 carbowax-20M, 6" x 1/8" stainless steel, detector는 FID를 이용하였다. Column 온도는 120 $^{\circ}$ C, injection port 온도는 195 $^{\circ}$ C, detector 온도를 220 $^{\circ}$ C로 하였으며, injection volume은 0.5 μ l, carrier gas로 수소를 사용하였다

5) 관능검사

제주대학교 학생 및 대학원생 중에서 15명의 관능검사자로 정하고, 본 연구에서 제조한 누룩으로 제조한 좁쌀주와 시판누룩으로 제조한 좁쌀주를 시료로 관능검사를 실시하였다. 평가항목은 외관, 향기, 맛으로 구분하여 7단계 기호척도법으로 제조한 좁쌀주를 평가하였다. 표준시료는 제주도내에 판매되고 있는 좁쌀약주(W사 제품)를 시료로 하여 표준시료보다 '매우 좋다'를 7점 '좋지도 싫지도 않다'를 4점 '대단히 싫다'를 1점으로 표시하고 평균치를 구하여 비교하였다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 전분 당화균의 분리와 우수 효모의 분리

누룩은 생곡류 자체가 함유하고 있는 효소와 여기에 *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Absidia*, *Mucor* 속 등의 사상균, 효모, 기타 균류가 번식하여 각종 효소를 생성하고 있는 발효제의 일종이다(정, 1993). 이러한 누룩에서 좁쌀주에 알맞은 미생물을 분리하기 위해 전국 35개 지역에서 수집된 누룩을 이용하여 미생물을 분리하였다.

수집된 누룩 1g을 생리 식염수에 1,000배 희석한 후 상징액 100 μ l를 취하여 곰팡이 선택배지(rose bengal agar)와 효모 선택배지(YPD)에 도말 후 각각 28 $^{\circ}$ C, 30 $^{\circ}$ C에서 2일간 배양한 다음 나타나는 colony의 형태가 다른 곰팡이 169균주, 효모 103균주를 분리하였다. 누룩별 균수는 나타나는 colony에 희석배수를 곱하여 구하였는데, 곰팡이는 $6.4 \times 10^5 \sim 4.5 \times 10^7$ 개, 효모는 $1.4 \times 10^4 \sim 7.7 \times 10^7$ 개 정도로 나타났다(Table 1). 우선 분리균주 중에서 곰팡이는 전분당화액 중 유리 환원당 생성량이 많은 16균주를 선발하였다. 2차에 걸쳐 당화력, glucoamylase 활성, 액화력, xylanase 활성을 시험하여 사상균 A15-1, A8-3, A7-1, B23-3 균주를 선발하였다. 효모는 향기가 좋다고 여겨지는 12개 균을 선발한 다음 발효력, 내당성, 내알콜성을 시험하여 최종적으로 1개 균주를 선발하였다.

Table 1. Microbial colony counts isolated from commercial Nuruk.

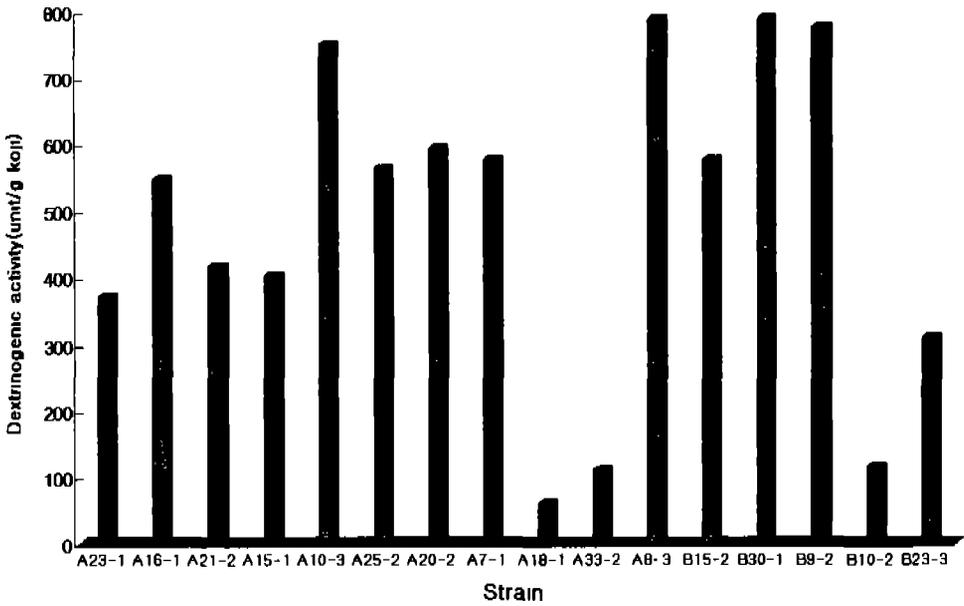
Nuruk sample	Collected area	Mold	Yeast
1	Taeon	3.2×10^7	1.9×10^8
2	Kumsan	1.9×10^8	1.9×10^8
3	Pyunghae	6.4×10^8	1.3×10^8
4	Iksan	5.1×10^8	5.1×10^8
5	Sangju	3.2×10^8	1.3×10^7
6	Asan	9.6×10^8	1.9×10^8
7	Kumi	1.7×10^7	5.1×10^8
8	Haenam	9.6×10^8	5.8×10^8
9	Hapchon	7.0×10^8	3.1×10^7
10	Danyang	3.8×10^8	8.3×10^8
11	Kunsan	1.5×10^7	1.3×10^7
12	Mukho	5.8×10^8	1.3×10^8
13	Kimcheon	3.8×10^8	4.5×10^8
14	Tonghae	2.3×10^7	1.7×10^7
15	Anmeyndo	4.5×10^7	6.4×10^8
16	Koryung	1.7×10^7	1.2×10^8
17	Boryung	1.6×10^7	1.0×10^7
18	Youngchun	6.4×10^8	6.4×10^8
19	Yechun	5.8×10^8	1.0×10^7
20	Andong	3.2×10^8	7.7×10^7
21	Yesan	1.9×10^8	3.2×10^8
22	Hapdeog	7.7×10^8	1.3×10^8
23	Boeum	1.1×10^7	9.0×10^8
24	Kangnung	6.4×10^8	2.6×10^8
25	kwangchun	1.9×10^7	1.8×10^7
26	Chonju	4.5×10^8	3.2×10^8
27	Jinju	2.0×10^7	1.3×10^7
28	Pyongtaek	1.3×10^8	3.8×10^8
29	Chungpyung	7.7×10^8	1.9×10^8
30	Taegu	5.1×10^8	3.6×10^7
31	Kuksundang	6.4×10^8	1.9×10^8
32	Jungang	6.4×10^8	1.9×10^8
33	Songhak	6.4×10^8	1.3×10^8
34	Cheju	1.5×10^7	1.2×10^7
35	Pusan	2.9×10^7	1.4×10^4

2. 전분 당화균주의 효소활성

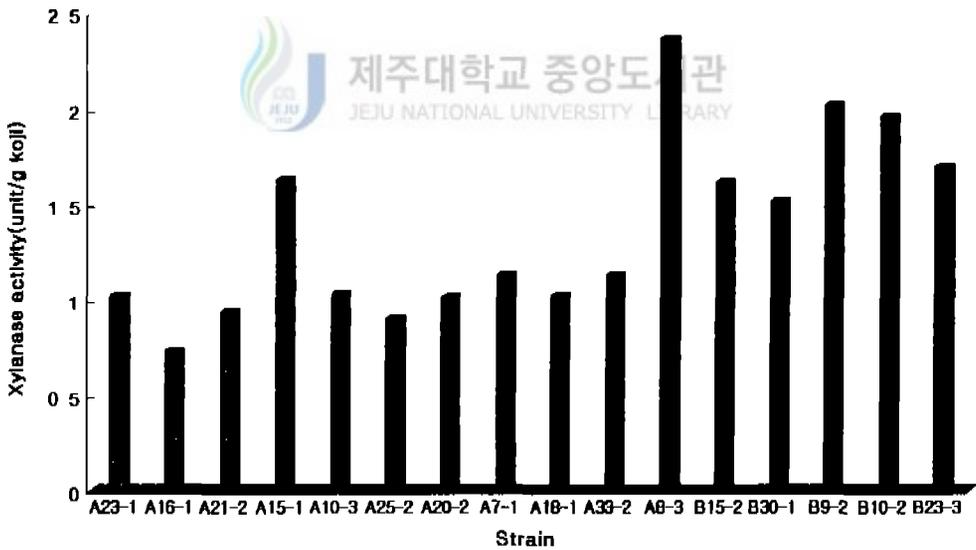
미생물 발효제에는 여러 종류의 성분을 함유하고 있으며, 이 효소는 슬릿 중에서 발효제 자체와 사용원료에 작용한다. Amylase는 녹말을 분해시켜 당분을 만들고, xylanase는 난분해성 섬유질을 분해한다. 이 때 슬릿 중의 효모는 이들 생성 물질을 영양분으로 하여 증식하고, 당분에서 알코올을 생산한다(정, 1993). 선발된 16종의 곰팡이와 12종의 효모에 대한 Saccharifying power(SP), Glucoamylase activity(GA), Dextrinogenic activity(DA), xylanase 활성, 발효력, 내당성, 내알콜성 등을 실험한 결과를 Fig. 1, Fig. 2, 그리고 Fig. 3에 각각 나타내었다.

SP의 경우는 *Aspergillus* sp., *Rhizopus* sp.로 확인된 A7-1, B23-3 이 우수하였으며, GA의 경우 *Rhizopus* sp., *Mucor* sp.인 A15-1, A8-3 균주가 높은 활성을 나타냈다. DA는 *Aspergillus* sp.인 A8-3, B30-1 과 *Mucor* sp.인 B15-2가 높은 활성을 나타냈고, 섬유질을 분해하는 xylanase 활성은 A8-3, A15-1, B23-3, A7-1 순으로 높은 활성을 나타내었다.





(a)



(b)

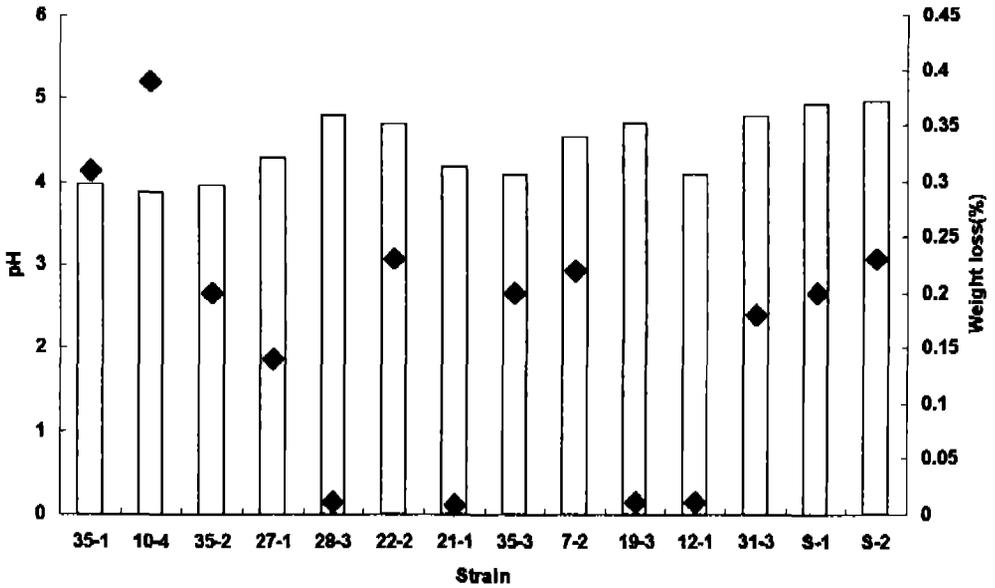
Fig. 2. Dextrinogenic activity(a) and xylanase activity(b) of selected isolates;

Strain name refers to Fig. 1.

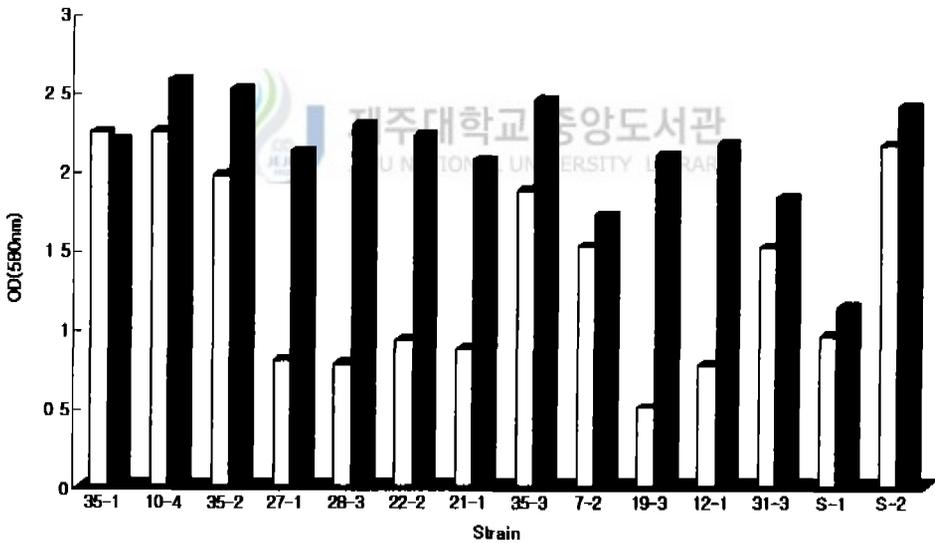
3. 알코올 발효균주의 활성화

분리한 효모 중 우수한 균주를 선발하기 위해서 103균주 중 관능적으로 향기가 좋은 12균주를 선발하여 발효력, 내당성, 내알콜성 등을 검토하여 선발하였다. 대조구로는 본 실험실에 보관 중인 감귤발효주의 생산(고 등, 1989)과 제주토속 좁쌀약주의 양조특성(고 등, 1993)에 있어서도 우수 균주로 선정되었던 *Saccharomyces cerevisiae* IAM4274와 *Saccharomyces sake*를 사용하였다. 최종 선발된 10-4 균주는 *Saccharomyces* sp.으로 보이며, 발효력과 내당성, 내알콜성에서 대조구보다 높은 활성을 나타내었다(Fig. 3).





(a)



(b)

Fig. 3. pH and weight loss(a), sugar resistance and alcohol resistance(b) after fermentation at 30°C for 48hrs on selected strains;

(a) □: pH, ◆: Weigh loss(%). (b) ■: Sugar resistance(OD), □: Alcohol resistance(OD). 35-1, 35-2, 35-3: yeast from Pusan Nuruk, 10-4' yeast from Danyang Nuruk, 27-1 yeast from Jinju Nuruk, 28-3: yeast from Pyongtaek Nuruk, 22-2 yeast from Hapdeog Nuruk, 21-1 yeast from Yesan Nuruk. 7-2' yeast from Kumi Nuruk. 19-3: yeast from Yechun Nuruk 12-1: yeast from Mukho Nuruk, 31-3: yeast from Kuksundang Nuruk, S-1: *Saccharomyces sake*, S-2' *Saccharomyces cerevisiae* IAM 4274

4. 좁쌀주용 누룩제조와 일반성분

누룩의 원료는 본래 밀인데 밀의 생산이 부족한 지방에서는 밀에 보리를 섞기도 하고, 그 외로 옥수수, 콩, 팥, 귀리, 호밀을 섞기도 하였다. 일반적으로 밀을 분쇄하여 원반형으로 만들어 미생물을 증식시켜 건조시킨다. 본 실험에서는 누룩의 형태를 달리하여 종전 방식의 원반형(직경 18cm, 두께 1.8cm)을 만들고, 또 이를 개량한 코지형(직경 2.0~2.5cm, 두께 0.6~0.8cm)의 개량형을 만들어 비교하였다.

원료는 중력분 밀가루와 보리, 밀기울, 차조를 사용하였으며(Fig. 4), 분리한 곰팡이를 단일 또는 혼합 접종하여 누룩의 당화력을 측정한 결과, *Aspergillus* sp.인 A8-3과 *Rhizopus* sp.인 B23-3을 혼합 접종한 누룩의 당화력이 가장 좋게 나타났다. 원반형과 개량형의 비교에서는 단일 미생물일 때는 원반형의 B23-3이 가장 높았으나, 개량형에서는 A15-1이 가장 높게 나타났다. 그러나 혼합 미생물을 사용할 때에는 원반형과 개량형 모두 A8-3, B23-3 혼합 처리구가 가장 높게 나타났으며, 당화균주로 많이 알려져 있는 *Aspergillus* sp.와 *Rhizopus* sp.가 본 실험에서도 당화 균주로 적당함을 알 수 있었다.

1) 균주에 따른 누룩제조

당화력과 glucoamylase 활성이 좋은 미생물을 이용하여 밀가루 : 보리 : 밀기울 : 차조(7 : 1 : 1 : 1)의 원료에 3% 종균 배양액을 분무하여 원반형의 누룩과 코지형의 개량누룩을 제조한 결과, 원반형에서와 개량형에서 모두 A8-3, B23-3을 혼합 처리한 누룩의 당화력이 가장 높았다. 이는 B23-3, A7-1 균이 당화력과 GA가 우수하면서도 서로 경쟁하지 않고 활성이 유지되었기 때문으로 보여지는 반면, *Mucor* sp.인 A15-1과 *Aspergillus* sp.인 A7-1은 당화력이나 GA는 좋으나 혼합할 경우 서로 경쟁적 관계로 활성이 저해된 것으로 보여진다.

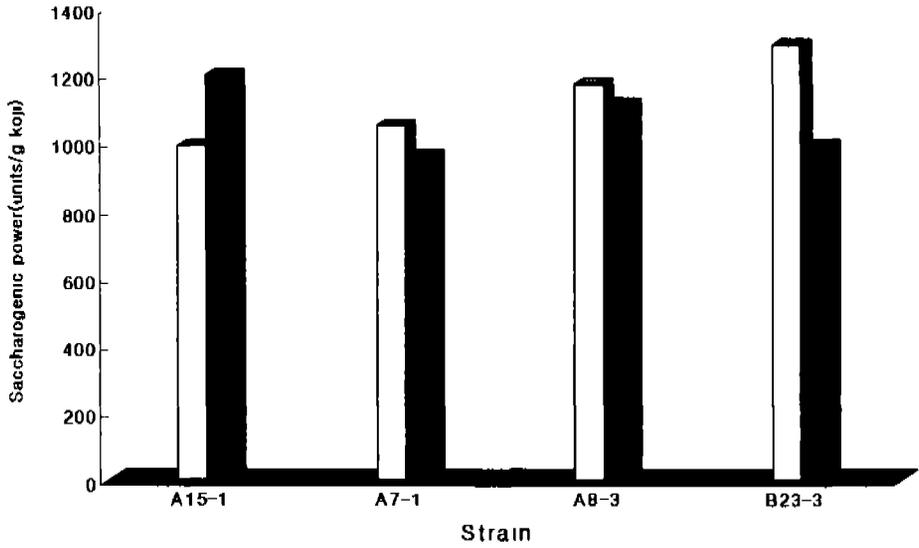
2) 누룩의 원료별 처리

미생물별 처리에서 당화력이 우수하다고 판단된 A8-3과 B23-3을 접종한 누룩에 원료별 처리 후 당화력과 전분당화액의 환원당을 측정하였다.

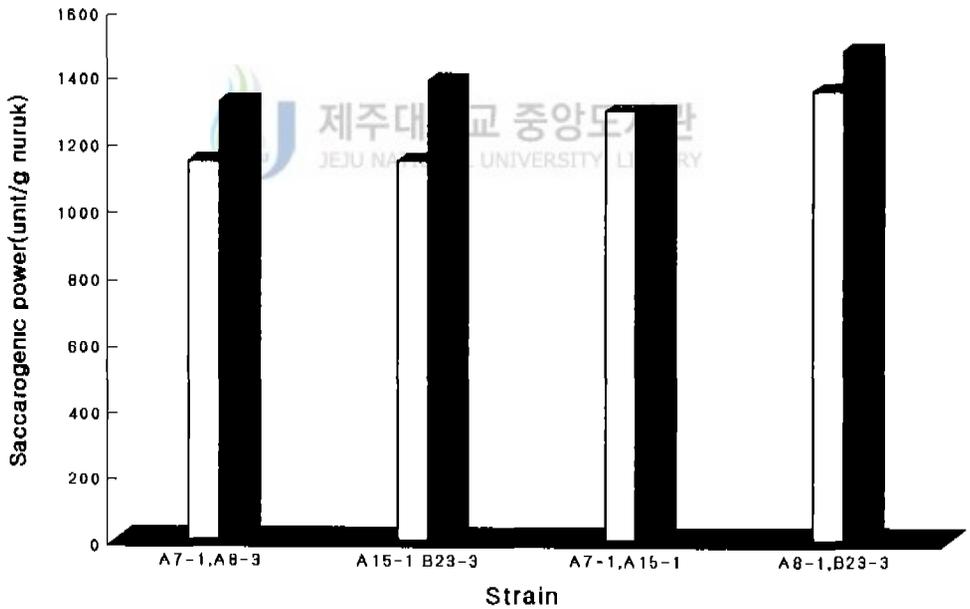
원료를 다음과 같이 처리하여 조사하였다.

1. 밀가루 : 보리 : 밀기울 : 차조 = 4 : 1 : 1 : 4 (원반형, J1)
2. 밀가루 : 보리 : 밀기울 : 차조 = 5 : 1 : 1 : 3 (원반형, J2)
3. 밀가루 : 보리 : 밀기울 : 차조 = 6 : 1 : 1 : 2 (원반형, J3)
4. 밀가루 : 보리 : 밀기울 : 차조 = 7 : 1 : 1 : 1 (원반형, J4)
5. 밀가루 : 보리 : 밀기울 : 차조 = 8 : 1 : 1 : 0 (원반형, J5)
6. 밀가루 : 보리 : 밀기울 : 차조 = 4 : 1 : 1 : 4 (개량형, K1)
7. 밀가루 : 보리 : 밀기울 : 차조 = 5 : 1 : 1 : 3 (개량형, K2)
8. 밀가루 : 보리 : 밀기울 : 차조 = 6 : 1 : 1 : 2 (개량형, K3)
9. 밀가루 : 보리 : 밀기울 : 차조 = 7 : 1 : 1 : 1 (개량형, K4)
10. 밀가루 : 보리 : 밀기울 : 차조 = 8 : 1 : 1 : 0 (개량형, K5)

로 처리하여, 측정된 결과, 원반형의 경우는 차조를 20%~30% 처리한 누룩의 당화력이 높게 나타났으나, 개량형 누룩의 경우는 차조 함량이 많아질수록 당화력이 감소하는 경향이었다. 또한, 유리환원당 함량도 같은 경향을 보였다(Fig. 5).



(a)



(b)

Fig. 4. Saccharifying power of single strain treatment(a) and mixed strain treatment(b).

(a) ■ : disk shape, □ : Koji

(b) ■ : disk shape, □ : Koji.

A15-1 : mold from Anmeydo Nuruk. A7-1 : mold from Kumi Nuruk.

A8-3 : mold from Haenam Nuruk. A23-3 : mold from Boeum Nuruk

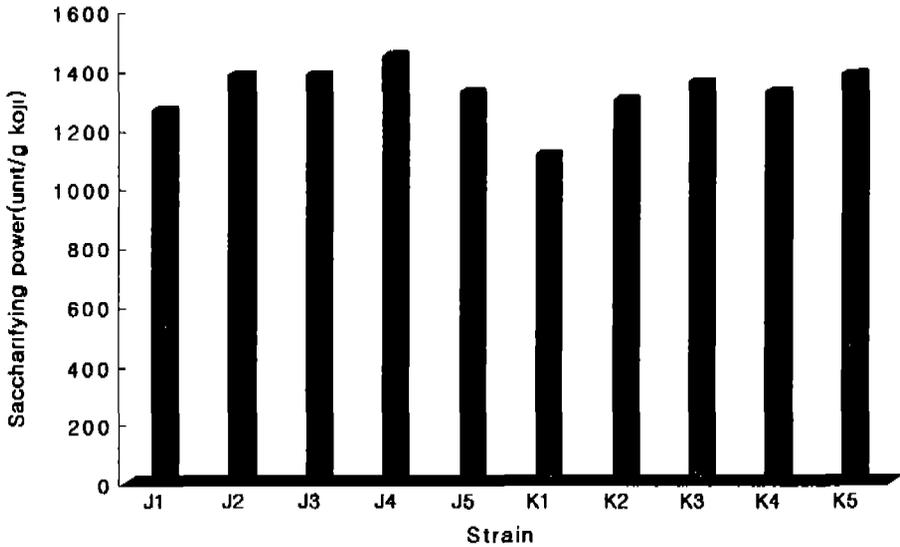


Fig. 5. Saccharifying power by raw material combination ratio;

- J1 - wheat flour : barley : wheat bran : millet = 4:1:1:4(disk shape)
- J2 - wheat flour : barley : wheat bran : millet = 5:1:1:3(disk shape)
- J3 - wheat flour : barley : wheat bran : millet = 6:1:1:2(disk shape)
- J4 - wheat flour : barley : wheat bran : millet = 7:1:1:1(disk shape)
- J5 - wheat flour : barley : wheat bran : millet = 8:1:1:0(disk shape)
- K1 - wheat flour : barley : wheat bran : millet = 4:1:1:4(koji)
- K2 - wheat flour : barley : wheat bran : millet = 5:1:1:3(koji)
- K3 - wheat flour : barley : wheat bran : millet = 6:1:1:2(koji)
- K4 - wheat flour : barley : wheat bran : millet = 7:1:1:1(koji)
- K5 - wheat flour : barley : wheat bran : millet = 8:1:1:0(koji)

3) 누룩의 일반성분 분석

전국에서 수집한 누룩과 본 연구에서 제조한 누룩의 일반성분을 분석하여 비교하였다(Table 3). 수집된 누룩의 경우 수분은 10~13%, 총당은 55~70%, 조단백질은 10~18%, 조지방은 0.2~1.0%, 회분은 1.8~2.1%이었다. 본 연구에서 제조한 누룩은 12~15%, 총당은 61~70%, 조단백질은 15~20%, 조지방은 0.4~1.5%, 회분은 1.1~1.5%으로 나타나 수집누룩보다 수분 함량이 2% 정도 높았고, 총당은 같은 원료를 사용하여 제조한 누룩이 편차가 적었다.

본 연구에서 제조한 누룩이 조단백질은 2% 정도 높았다. 조지방도 높게 나타났으나, 이에 비해 회분은 상대적으로 적게 나타났다. 조단백질과

조지방이 수집한 누룩보다 높게 나타난 이유는 차조 자체가 다른 곡류에 비해 조단백질이나 조지방 함량이 높기 때문으로 보인다. 수분은 건조기간이 짧고 숙성기간이 짧은 관계로 다른 누룩들에 비해 비교적 많이 함유하고 있었고, 회분도 차조 자체가 다른 원료에 비해 회분 함량이 낮아 낮게 나타난 것으로 보인다(Table 3).



Table 2. Proximate chemical composition of collecting nuruk(%).

Nuruk sample	Moisture	Total sugar	Reducing sugar	Crude protein	Crude fat	Ash
1	12.77	74.86	1.26	8.03	0.10	1.95
2	11.67	60.03	1.16	14.26	0.33	3.16
3	9.03	77.30	2.47	10.94	0.60	1.68
4	12.16	73.03	0.99	14.00	0.32	2.04
5	11.90	69.99	1.06	12.78	0.21	1.64
6	13.40	73.84	1.10	9.36	0.20	1.08
7	14.05	75.88	0.98	6.78	0.11	2.21
8	13.19	72.63	1.25	13.48	0.87	1.81
9	12.83	64.50	1.33	11.90	0.43	2.11
10	5.74	72.83	1.63	12.38	0.89	1.82
11	20.01	56.17	0.67	14.79	0.65	2.30
12	10.95	75.27	1.44	13.31	0.88	1.78
13	12.82	69.17	1.72	11.38	1.61	3.36
14	11.65	72.83	1.32	19.08	1.25	1.67
15	12.50	56.62	1.92	14.66	0.21	2.10
16	11.85	68.36	1.73	18.71	1.07	1.68
17	15.55	65.92	0.77	19.13	1.90	3.05
18	12.29	69.38	1.83	15.79	1.04	1.60
19	12.22	69.38	1.64	14.56	0.33	2.01
20	11.98	55.36	1.49	18.11	0.32	1.78
21	13.43	50.49	0.66	11.92	0.90	2.60
22	12.60	63.49	0.43	17.20	0.42	2.01
23	13.79	66.74	0.50	18.11	0.50	1.78
24	11.13	54.14	3.30	18.79	0.97	2.60
25	12.18	69.58	1.92	14.57	1.38	1.63
26	12.37	71.41	0.58	12.83	0.50	1.83
27	8.84	62.06	0.53	12.56	0.51	4.42
28	12.36	67.55	0.40	16.91	1.11	2.10
29	11.60	63.08	0.46	17.45	0.76	2.38
30	11.48	63.89	0.69	13.50	1.16	1.51
31	11.62	48.45	4.09	11.18	0.41	1.76
32	11.86	67.95	1.56	16.58	0.18	2.79
33	11.90	65.31	1.27	17.38	0.85	1.89
34	15.00	55.97	1.61	16.58	0.43	3.02
35	12.07	63.89	2.77	10.07	0.26	2.01

* Nuruk No refers to Fig. 1.

본 연구에서 제조한 누룩이 조단백질은 2% 정도 높았다. 조지방도 높게 나타났으나, 이에 비해 회분은 상대적으로 적게 나타났다. 조단백질과 조지방이 수집한 누룩보다 높게 나타난 이유는 차조 자체가 다른 곡류에 비해 조단백질이나 조지방 함량이 높기 때문으로 보인다. 수분은 건조기간이 짧고 숙성기간이 짧은 관계로 다른 누룩들에 비해 비교적 많이 함유하고 있었고, 회분도 차조 자체가 다른 원료에 비해 회분 함량이 낮아 낮게 나타난 것으로 보인다(Table 3).

Table 3. Proximate chemical compositions of manufactured nuruk(%).

	Strain No	Moisture	Total sugar	Reducing sugar	Crude protein	Crude fat	Ash	
Single mold	A15-1	13.42	71.61	1.08	16.05	0.42	1.19	
	disk shape	A7-1	14.55	68.56	1.14	16.43	1.52	1.18
		A8-3	13.10	68.56	1.14	16.35	1.61	1.16
		B23-3	12.63	69.99	1.65	17.12	0.96	1.18
		A15-1	12.24	67.34	1.76	18.75	1.13	1.08
	koji	A7-1	12.37	71.00	1.83	17.69	0.71	1.36
		A8-3	12.53	69.78	1.86	18.45	0.64	1.29
		B23-3	12.04	61.05	2.07	18.55	0.69	1.18
		A8-3+A7-1	15.70	63.89	1.24	16.05	0.22	1.12
	Mixed molds	disk shape	B23-3+A15-1	8.15	68.97	1.41	16.15	0.18
A8-3+A15-1			12.64	71.00	1.32	17.69	0.31	1.15
koji		B23-3+A7-1	14.53	68.56	1.30	17.40	0.55	1.57
		A8-3+A7-1	13.23	62.88	1.87	19.80	0.75	1.19
		B23-3+A15-1	13.15	68.97	2.18	24.69	1.02	1.32
		A8-3+A15-1	13.03	64.09	1.50	20.67	0.12	1.27
	B23-3+A7-1	12.89	61.45	1.53	20.67	0.89	1.28	

5. 좁쌀약주의 제조

좁쌀약주의 제조는 양조실의 온도를 20~22℃에서 유지하며 술덧의 품온이 30℃ 이상 되지 않도록 하여 발효시켰다. 품온은 발효 초기에 급속히 상승하지만 그 이후 일정한 품온을 유지하게 되며, 품온이 30℃ 이상 되면 효모의 노쇠현상이 일어나기 때문에(국세청 기술연구소, 1997) 냉각수를 사용하여 품온을 유지하였다. 효모는 생리적으로 호기적 조건에서는 균체의 증식을 주로 하며, 산소의 공급이 원활하지 못하는 혐기적 상태에서는 알코올 발효를 함으로 1일 2~3회 정도 제어주었다. 2단 담금 후 술덧의 pH에는 큰 차이는 없었으나, 처리구 모두 1일째보다 발효 후기에 조금씩 높아졌다(Table 4).

Table 4. pH changes during fermentation.

Management	1day	2day	3day	4day	5day	6day	7day	8day
J1	3.25	3.14	3.16	3.26	3.23	3.36	3.33	3.34
J2	3.24	3.20	3.32	3.26	3.23	3.34	3.30	3.37
J3	3.26	3.26	3.22	3.25	3.24	3.33	3.29	3.39
J4	3.27	3.28	3.24	3.24	3.23	3.31	3.32	3.36
J5	3.28	3.31	3.28	3.29	3.26	3.33	3.29	3.35
K1	3.29	3.33	3.29	3.31	3.30	3.38	3.37	3.43
K2	3.31	3.34	3.31	3.32	3.29	3.41	3.43	3.49
K3	3.33	3.36	3.35	3.36	3.32	3.43	3.42	3.49
K4	3.34	3.38	3.37	3.37	3.33	3.43	3.46	3.50
K5	3.38	3.47	3.36	3.47	3.43	3.50	3.51	3.51
D1	3.13	3.30	3.37	3.45	3.44	3.56	3.58	3.60
D2	3.21	3.34	3.34	3.36	3.36	3.47	3.44	3.50
D3	3.24	3.35	3.35	3.37	3.36	3.45	3.48	3.55
D4	3.28	3.35	3.36	3.39	3.37	3.49	3.52	3.57

*J1~K5. management raw refers to fig 5.

D1:Kuksundang Nuruk. D2:Jinju Nuruk. D3:Jungang Nuruk. D4:Songhak Nuruk.

총산 함량은 초기보다 발효 중에 높아지다가 발효 후기에 다시 감소하였고, 가용성 고형물은 처리구 모두 발효 기간 중 계속 낮아졌다(Table 5와 Table 6). 발효원료인 찰조에 함유되어 있는 녹말이 당화되면서 바로 알코올 발효가 일어나기 때문에 가용성 고형물의 감소가 매우 느리게 이루어지는 것으로 판단된다. 총산 함량은 2단 사입이 이루어지는 발효 개시 3~4일 후에 증가하였다가 점차 감소하는 경향을 보였다.

Table 5. Soluble solids(Brix) changes during fermentation.

Management	Fermentation day							
	1	2	3	4	5	6	7	8
J1	9.63	8.88	7.58	7.16	6.31	6.45	6.12	5.20
J2	9.14	8.31	7.47	7.16	6.37	6.60	6.40	5.52
J3	9.88	9.23	7.58	7.48	6.67	6.62	6.33	5.26
J4	10.21	9.36	7.58	7.30	6.81	6.69	6.41	5.51
J5	9.30	8.46	7.60	7.72	7.01	7.68	7.57	6.36
K1	8.30	7.89	7.01	6.65	5.83	6.01	5.82	4.69
K2	9.16	8.48	7.70	7.41	6.45	6.45	6.22	5.15
K3	9.11	8.31	7.83	7.32	6.83	6.83	6.65	5.40
K4	8.24	7.69	7.38	7.13	6.55	6.55	6.31	5.28
K5	8.12	7.59	7.40	7.52	7.23	7.23	7.21	6.13
D1	9.10	6.73	8.10	8.82	9.54	9.54	8.77	8.17
D2	6.53	5.75	5.75	5.79	5.23	5.23	5.40	5.17
D3	7.64	6.93	6.33	6.45	6.47	6.47	6.45	6.45
D4	7.80	6.88	6.45	6.51	5.78	5.78	5.71	5.30

*J1~K5: management raw refers to fig 5.

D1:Kuksundang Nuruk. D2:Jinju Nuruk. D3:Jungang Nuruk. D4:Songhak Nuruk.

총당 및 유리당 함량은 가용성 고형물과 같이 점점 감소하였다. 본 연구에서 제조한 누룩 처리구가 대조구에 비해 총당 및 유리당 함량이 초기에 높은 반면, 후기에는 효모의 발효에 의해 소비됨으로써 유리당 함량

이 낮아짐을 알 수 있었다. 황색도(b)는 계속적으로 상승하는 경향을 보여 색깔이 진해짐을 알 수 있었다(Table 7과 Table 8).

Table 6. Total acid changes during fermentation(%).

Management	Fermentation day							
	1	2	3	4	5	6	7	8
J1	0.73	0.98	1.03	1.00	0.93	0.88	0.79	0.71
J2	0.78	1.02	1.06	1.05	1.04	0.97	0.88	0.67
J3	0.63	0.76	0.91	0.96	0.91	0.85	0.82	0.61
J4	0.67	0.87	1.04	1.06	1.01	0.96	0.90	0.72
J5	0.75	0.87	1.15	1.23	1.02	1.32	1.24	0.84
K1	0.66	1.04	0.10	1.00	0.87	0.87	0.79	0.75
K2	0.73	0.96	1.06	1.08	1.04	0.93	0.78	0.72
K3	0.72	0.91	1.02	1.10	1.04	0.98	0.88	0.76
K4	0.72	0.90	0.99	1.06	0.97	0.95	0.86	0.73
K5	0.75	0.84	0.92	0.99	0.97	1.19	0.95	0.71
D1	0.78	0.89	0.89	0.94	0.99	0.94	0.93	0.98
D2	0.62	0.73	0.75	0.72	0.69	0.67	0.71	0.67
D3	0.70	0.81	0.81	0.76	0.80	0.79	0.70	0.66
D4	0.70	0.65	0.75	0.72	0.68	0.62	0.93	0.59

*J1~K5: management raw refers to fig 5.

D1:Kuksundang Nuruk. D2:Jinju Nuruk. D3:Jungang Nuruk. D4:Songhak Nuruk.

Table 7. Total sugar and reducing sugar changes during fermentation(%).

Management	Fermentation day							
	1		2		3		4	
	Total sugar	Reducing sugar	Total sugar	Reducing sugar	Total sugar	Reducing sugar	Total sugar	Reducing sugar
J1	3.86	2.51	2.87	1.22	1.78	0.67	0.80	0.28
J2	2.53	1.19	1.87	0.87	1.22	0.55	0.46	0.26
J3	3.46	2.18	2.99	1.34	1.99	0.73	1.17	0.36
J4	3.95	2.52	2.79	1.28	1.81	0.76	1.06	0.40
J5	2.89	2.67	1.65	0.88	1.26	0.59	0.45	0.33
K1	2.38	1.33	2.06	0.81	1.03	0.61	0.34	0.23
K2	1.91	1.92	1.71	0.93	1.19	0.80	0.52	0.23
K3	1.82	1.43	1.70	0.87	1.28	0.69	0.45	0.23
K4	1.54	1.08	1.83	0.99	1.18	0.49	0.29	0.23
K5	1.40	1.36	1.52	0.67	0.93	0.38	0.30	0.27
D1	1.38	0.48	0.55	0.37	0.49	0.34	0.44	0.35
D2	0.68	0.44	0.79	0.31	0.66	0.27	0.60	0.28
D3	1.37	0.54	1.04	0.48	0.88	0.32	0.32	0.30
D4	1.35	0.71	1.74	0.57	1.34	0.44	0.74	0.33

*J1 ~ K5: management raw refers to fig 5.

D1:Kuksundang Nuruk. D2:Jinju Nuruk. D3:Jungang Nuruk. D4:Songhak Nuruk.

Table 8. Color changes during fermentation(b value).

Management	1day	2day	3day	4day	5day	6day	7day	8day
J1	10.11	9.57	10.02	7.09	9.80	11.02	11.36	15.08
J2	10.61	9.05	6.88	6.05	8.86	13.03	12.38	15.02
J3	11.79	7.76	6.31	5.66	8.98	7.82	10.07	13.90
J4	13.19	13.23	6.15	6.03	7.03	8.73	5.44	16.69
J5	10.47	9.37	8.17	7.77	10.03	12.00	12.20	6.46
K1	7.35	8.90	12.11	8.08	10.28	11.38	12.45	15.99
K2	15.19	8.92	10.58	7.90	10.45	9.57	8.89	16.05
K3	13.70	10.98	10.98	8.11	12.99	6.40	8.87	17.04
K4	10.23	8.60	10.62	8.76	12.70	10.17	4.95	16.07
K5	10.93	10.01	9.09	6.21	13.35	12.96	9.72	10.78
D1	37.20	38.22	36.56	21.90	35.12	26.42	35.07	35.41
D2	6.51	16.96	17.35	13.12	14.25	13.15	16.26	17.43
D3	9.37	18.19	17.09	16.67	16.93	14.88	5.21	16.98
D4	13.11	18.20	17.34	7.71	13.11	16.64	11.53	18.30

*J1~K5: management raw refers to fig 5.

D1:Kuksundang Nuruk. D2:Jinju Nuruk. D3:Jungang Nuruk. D4:Songhak Nuruk.

6. 좁쌀주의 성분분석

누룩처리구별 발효 후 좁쌀약주의 알코올 함량은 밀가루 함량을 최대로 하고 차조를 넣지 않은 누룩으로 담금한 술덧이 가장 높게 나타났으며, 차조를 가장 많이 첨가한 처리구와는 많은 함량 차이를 내었다(Fig. 6). 따라서 알코올 발효에는 차조가 다른 원료보다 발효원으로서 좋지 않음을 알 수 있었다.

이는 차조에 조단백질 함량이 많아 젖산균과 초산균 증식이 쉬우며,

조지방이 많아 지질산화에 의한 산패가 일어날 우려가 있다. 따라서 좁쌀의 증자 시간을 다른 원료보다 길게 잡아 차조를 충분히 호화시켜 당화효소에 의한 당화를 빠르고 쉽게 함으로써 알코올 발효에 지장이 없도록 해야 하며, 다른 원료와 혼용하여 사용하는 것이 미생물이 술덧 적응에 좋을 것으로 판단되었다.

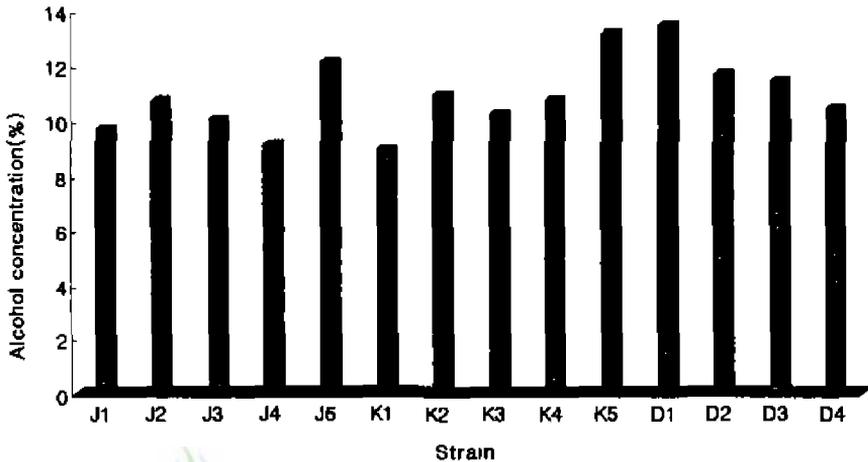


Fig. 6. Alcohol content of millet wine from different nuruk after brewing.

- J1 - wheat flour : barley : wheat bran : millet = 4:1:1:4(disk shape)
- J2 - wheat flour : barley : wheat bran : millet = 5:1:1:3(disk shape)
- J3 - wheat flour : barley : wheat bran : millet = 6:1:1:2(disk shape)
- J4 - wheat flour : barley : wheat bran : millet = 7:1:1:1(disk shape)
- J5 - wheat flour : barley : wheat bran : millet = 8:1:1:0(disk shape)
- K1 - wheat flour : barley : wheat bran : millet = 4:1:1:4(koji)
- K2 - wheat flour : barley : wheat bran : millet = 5:1:1:3(koji)
- K3 - wheat flour : barley : wheat bran : millet = 6:1:1:2(koji)
- K4 - wheat flour : barley : wheat bran : millet = 7:1:1:1(koji)
- K5 - wheat flour : barley : wheat bran : millet = 8:1:1:0(koji)
- D1:Kuksundang Nuruk, D2:Jinju Nuruk.
- D3:Jungang Nuruk, D4:Songhak Nuruk.

1) 유기산

약주의 신맛을 내는 주요 유기산을 측정 한 결과, 약주의 주 성분을 이루고 있는 유기산은 lactic acid와 acetic acid이었으며, citric acid는 소량

함유하고 있었다(Table 9). Oxalic acid와 tartaric acid도 미량 검출되었고, malic acid와 fumaric acid는 검출되지 않거나 미량 검출되었다. Lactic acid는 식물체에 존재하거나 산패에 의해 생성되며, fumaric acid, oxalic acid, citric acid 등도 식물체에 유리상태로 존재하였다가 이용된다 (김, 1993).

Table 9. Organic acid contents after fermentation(mg/100g).

Management	Oxalic acid	Citric acid	Tartaric acid	Mallic acid	Lactic acid	Acetic acid	Fumaric acid
J1	0.49	20.41	3.45	2.80	722.90	120.70	0.05
J2	0.31	11.88	0.39	2.49	783.13	149.93	tr*
J3	0.24	18.23	1.27	1.26	822.45	139.21	0.01
J4	0.38	15.14	1.91	1.21	776.78	150.55	tr
J5	0.17	10.39	1.19	3.95	727.48	251.77	tr
K1	1.32	16.10	4.15	4.82	750.84	141.62	tr
K2	0.09	16.08	2.20	3.98	742.44	153.25	0.03
K3	0.11	6.86	4.71	6.87	700.95	141.62	0.05
K4	0.12	12.79	6.19	2.56	772.71	133.58	0.04
K5	0.22	25.88	4.53	tr	845.60	168.58	tr
D1	0.19	17.16	6.83	4.85	1004.35	56.66	0.20
D2	0.37	14.83	4.50	tr	673.99	51.90	tr
D3	0.58	41.22	18.20	34.83	817.75	104.42	0.13
D4	0.28	7.65	53.84	1.67	657.41	45.92	0.03

* tr : trace.

*J1~K5: management raw refers to fig 5.

D1:Kuksundang Nuruk. D2:Jinju Nuruk. D3:Jungang Nuruk. D4:Songhak Nuruk.

2) 유리당

발효기간 동안 미생물이 분해하거나 남아 있는 여러 종류의 당이 효모가 발효에 이용하게 되고 단맛을 느끼는 성분이 되기도 한다. 발효 후

유리당의 함량을 측정한 결과 glucose가 대부분을 차지하고, 나머지는 arabinose와 maltose가 함유되어 있었으며, xylose는 대부분의 처리구에 미량 검출되었다(Table 10).

Table 10. Carbohydrate contents after fermentation(mg/100g).

Management	Xylose	Arabinos	Glucose	Maltose
J1	9.71	46.84	172.32	55.70
J2	tr*	78.41	254.50	89.24
J3	7.43	49.33	231.80	80.41
J4	tr	90.44	380.90	149.44
J5	11.93	96.30	420.12	138.52
K1	11.60	83.83	259.90	110.92
K2	13.01	92.12	388.53	100.40
K3	12.92	153.83	435.83	220.42
K4	15.60	179.42	396.40	184.83
K5	tr	159.72	308.62	175.72
D1	20.11	136.12	205.90	143.94
D2	tr	155.62	175.43	83.51
D3	tr	128.90	317.52	75.11
D4	74.90	72.64	259.60	53.30

* tr . trace

*J1~K5: management raw refers to fig 5.

D1:Kuksundang Nuruk D2 Jinju Nuruk. D3:Jungang Nuruk. D4:Songhak Nuruk.

3) 향기성분

대부분의 주류 중에 미량으로 남아 있으며, 색깔과 함께 약주의 품질에 많은 영향을 주는 향기성분을 비교한 결과 Table 11과 같다 향기성분의 대부분을 차지하고 있는 것은 *i*-amyl alcohol과 *i*-butanol, *n*-propyl alcohol 순으로 나타났다. 이들은 원료 중 함유되어 있는 아미

노산으로부터 효모에 의한 탈아미노 반응과 탈카르복실 반응에 의해 생성된다. 휴젤유가 많을 경우는 향미가 나빠지고 숙취의 원인이 되기도 하는데, 소량 존재할 경우 약주의 향미를 좋게 한다.

i-buthanol 및 *n*-propyl alcohol 함량은 대조구인 D1이 다른 처리구보다 높게 나타났다. *i*-amyl alcohol은 K5 처리구가, methanol 함량은 K1 처리구가 높게 나타났다. 다른 함량에서는 대조구와 처리구간에 많은 차이를 보이지 않았다.

Table 11. Flavor contents after fermentation(mg/100g).

Management	Acetaldehyde	Methanol	Ethylacetate	<i>n</i> -Propyl alcohol	<i>i</i> -Butyl alcohol	<i>i</i> -Amyl alcohol
J1	2.19	30.16	1.13	7.34	23.65	18.32
J2	6.08	25.34	2.35	7.16	14.08	2.02
J3	2.41	18.33	1.21	5.42	11.32	12.33
J4	1.09	9.37	1.01	3.22	6.18	3.22
J5	8.36	9.41	1.29	6.36	13.22	25.37
K1	2.21	1.18	1.27	1.06	2.08	17.16
K2	2.07	19.11	1.18	7.03	16.22	13.35
K3	2.02	16.18	1.01	6.32	14.22	17.48
K4	4.36	22.45	2.11	7.32	17.21	24.46
K5	4.01	10.32	2.01	5.09	16.44	40.11
D1	6.11	2.32	7.04	15.11	33.26	18.19
D2	3.31	6.21	2.04	5.22	17.31	19.44
D3	3.16	9.22	3.02	6.41	14.38	8.09
D4	6.12	10.32	2.02	6.32	18.43	18.10

*J1~K5 management raw refers to fig 5.

D1:Kuksundang Nuruk. D2:Jinju Nuruk. D3:Jungang Nuruk. D4:Songhak Nuruk.

4) K5 균주의 향기성분 및 ethanol 함량 변화

누룩처리구 중 알코올 함량이 가장 높은 K5 균주를 사용하여 2단 담균 8일 동안 향기성분 및 ethanol의 함량 변화를 분석하였다(Table 12와 Table 13). Ethanol은 발효 3일 이후 급속히 증가하기 시작하여 6일째 최고 함량을 나타냈는데, 향기성분도 발효일수 동안 ethanol의 함량이 증가와 더불어 계속적으로 증가함을 알 수 있었다. 그러나 *i*-amyl alcohol은 발효 3일까지 높아지다가 그 이후 점차 감소하는 경향이였다.

Table 12. Flavor content changes during fermentation on K5 strain(mg/100g).

Flavor compound	Fermentation day							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Acetaldehyde	4.12	4.16	4.1	7.07	9.11	7.32	4.01	5.24
Methanol	1.12	1.12	4.41	5.34	5.12	8.38	10.32	11.18
Ethylacetate	0.12	1.06	1.38	2.16	2.11	3.23	2.01	2.22
<i>n</i> -Propyl alcohol	2.21	1.41	2.04	4.37	3.32	5.42	5.09	7.08
<i>i</i> -Butyl alcohol	5.31	3.06	8.11	10.22	8.09	14.48	16.44	14.38
<i>i</i> -Amyl alcohol	48.36	60.12	63.22	62.41	36.22	48.32	40.11	30.16

Table 13. Ethanol content changes during fermentation on K5 strain(%).

	Fermentation day							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Ethanol	1.87	1.49	4.35	5.45	7.08	8.96	8.78	8.68

5) 관능검사

알코올 함량이 가장 좋은 K5와 다른 누룩으로 제조한 대조구들의 맛, 색깔, 향기에 대하여 제주대학교 학생을 대상으로 관능검사 한 결과 모든 조건에서 '좋지도 싫지도 않다'라는 응답하였다(Fig. 7)

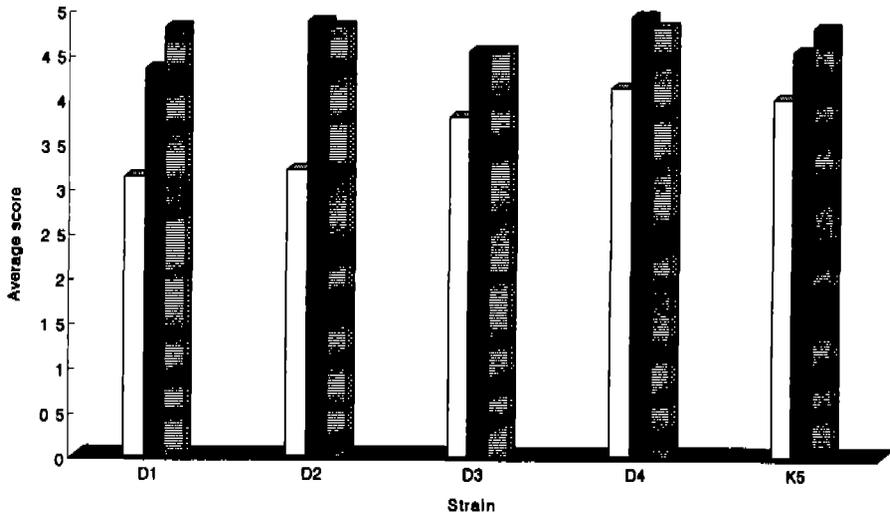


Fig. 7. Sensory evaluation between K5 and standard sample;

□ : Taste, ■ : Flavor, ▨ : Color



이는 약주에 익숙하지 않은 젊은 학생들을 대상으로 조사한 결과로 판단될 수 있으나, 기존에 생산되어 시판하는 대조구의 품질이 우수하여 관능적으로 차이가 없는 것으로 추정된다. 따라서 본 연구를 통하여 우수 균주로 분리하여 제조한 누룩을 사용하여 좁쌀주를 양조하는 경우 품질을 유지하면서 수율을 향상시킬 수 있다는 점에서 의의가 있을 것으로 여겨진다.

IV. 요약 및 결론

제주 전통주로서 좁쌀 약주를 제조하기 위하여 전국에서 수집된 35종의 누룩으로부터 우수 곰팡이와 효모를 분리하였다. 선발된 균주를 사용하여 균주와 원료에 따른 누룩을 제조한 후 양조하여 그 술덧의 발효특성을 분석한 결과는 다음과 같다.

1. 수집된 누룩의 평균 균수는 곰팡이가 $6.4 \times 10^5 \sim 10^7$ 개, 효모는 $1.4 \times 10^4 \sim 10^7$ 개로 나타났고, 그 중 곰팡이 169균주, 효모 103균주를 분리하였으며 전분 당화력이 좋은 곰팡이 16균주와 효모 1개 균주를 선발하였다.
2. 전분당화 균주의 효소활성을 분석한 결과 *Aspergillus*속으로 동정된 A8-3이 glucoamylase 활성, 액화력, xylanase 활성이 가장 높았고, *Rhizopus*속으로 동정된 B23-3은 당화력이 가장 우수하였다.
3. 우수효모를 선발하기 위하여 pH, 무게 감량, 내당성, 내알콜성 등을 측정된 결과, *Saccharomyces*속인 A10-4가 가장 우수하였다.
4. 같은 원료비율로 만든 누룩에 우수균주를 접종하였을 때, 단일 균주를 처리할 때보다 A8-3과 B23-3인 두 균주를 혼합하여 처리한 경우가 당화력이 높게 나타났다.
5. 누룩을 원반형의 누룩과 코지(개량형) 형태로 만들어 혼합종균 배양액을 접종한 후 당화력을 측정된 결과, 비슷한 당화력을 나타내었다. 개량형 누룩을 사용하여 양조하는 경우, 누룩을 제조하거나 좁쌀주 양조에 효율을 높일 수 있을 것으로 판단되었다.
6. 수집된 누룩은 수분이 10~13%, 총당은 55~70%, 조단백질은 10~18% 조지방은 0.2~1.0%, 회분은 1.8~2.1%이었다. 본 연구에서 제조한 누룩은 수분이 12~15%, 총당은 61~71%, 조단백질은 15~20%, 조지방은 0.4~1.5%, 회분은 1.1~1.5%이었다.

7. 본 연구에서 제조한 누룩으로 좁쌀주를 양조하였을 경우 대조구 D1을 제외한 나머지 처리구보다 K5 처리구가 가장 높은 주정도수를 나타내었고, 관능평가결과는 D1보다 양호하였다.

8. 좁쌀주의 유기산 및 유리당의 분석결과 유기산은 lactic acid와 acetic acid가 대부분이었고, 그 외 citric acid, oxalic acid, tartaric acid, malic acid, fumaric acid도 일부 검출되었다. 유리당은 glucose와 arabinose, maltose가 많은 함량을 나타내었고, 그 외 xylose도 일부에서 검출되었다.

9. 향기성분은 *i*-amyl alcohol, *i*-butyl alcohol, *n*-propyl alcohol 등이 주를 이루고 있었으며, 그 외에 ethylacetate, acetaldehyde가 검출되었다. *i*-butyl alcohol과 *n*-propyl alcohol은 대조구인 D1이 다른 처리구보다 높게 나타났고, *i*-amyl alcohol은 K5 처리구가 높게 나타났다.

본 연구를 통하여 우수 균주로 분리하여 제조한 누룩을 사용하여 좁쌀주를 양조하는 경우, 품질을 유지하면서 수율을 향상시킬 수 있다는 점에서 의의가 있을 것으로 여겨진다.



V. 참고문헌

- 고정삼, 1998. 식품분석실험, 제주대학교 출판부, p. 10-67.
- 고정삼, 1999. 생물산업의 이해, p. 105-106
- 고정삼, 고남권, 강순선, 1989. 제주도산 감귤발효주의 양조특성, 한국농화학회지, 32(4), 70-84.
- 고정삼, 양영택, 고영환, 강영주, 1993. 제주토속 좁쌀약주의 양조특성. 한국농화학회지, 36(4), 277-283.
- 국제청기술연구소, 1997. 주류제조교본, p. 317-339.
- 김재열, 1975. 酒稅實務要覽, 韓國稅政新報社, p. 188.
- 김현수, 현지숙, 김정, 하현팔, 유대식, 1997. 한국전통누룩에서 분리한 유용곰팡이의 특성, 한국식품영양과학회지, 26(5), 767-774.
- 박정웅, 이계호, 이찬용. 1995. 한국전통누룩에 존재하는 사상균의 분리 동정 및 Amyloytic 효소 활성. 산업미생물학회지, 23(6), 737-746.
- 배상면, 1995. 전통주 제조기술. (주)국순당부설효소연구소, pp. 77-81, 126-128.
- 소명환, 이재우, 1996. *Rhizopus japonicus* 누룩과 *Aspergillus oryzae* 누룩의 병용에 의한 탁주 양조. 한국영양식량학회지. 25(1), 157-162.
- 손호용, 1997. 고온성 알콜발효효모의 Alcohol Dehydrogenase의 특성. 산업미생물학회지, 25(1), 389-394.
- 신철승, 1996. 청주의 주질개선을 위한 국 및 효모의 선정과 그 발효 특성. 한국농화학회지, 39(1), 9-15.
- 신철승, 1996. 청주의 주질개선을 위하여 분리된 효모의 균학적 성질. 한국농화학회지, 39(1), 16-19.
- 양영택, 1991. 제주토속 좁쌀약주의 양조특성. 석사학위논문, 제주대학교 대학원.
- 유대식, 김정, 김현수, 현지숙, 하현팔, 박문근, 1998. 한국 전통누룩 미생물의 문헌적고찰. 한국식품영양과학회지, 27(4), 789-799.
- 유진영, 이성, 1997. 탁주 발효에 대한 Nisin의 이용. 산업미생물학회지, 25(2),

203-206.

- 이계호, 1995. 생전분 분해성 누룩미생물을 이용한 전통약, 탁주의 고품질화 및 최적화 공정 개발. 한국음식문화연구원논문집, Vol. 6, p. 325-336.
- 이두영, 1969. 한국곡자의 발효생산력에 관한 연구(제1보). 한국미생물학회지, 5(2),51-54.
- 이두영, 1969. 한국곡자의 발효생산력에 관한 연구(제2보). 한국미생물학회지, 7, 41-44.
- 이창호, 1996. Killer효모 *saccharomyces cerevisiae* B15-1의 에탄올 발효특성. 산업미생물학회지, 24(3), 331-335.
- 인혜영, 이택수, 이동선, 노봉수, 1995. 전통 방법으로 제조한 소주 술덧의 품질 특성. 한국식품과학회지, 27(1), 134-140.
- 인혜영, 이택수, 이동선, 노봉수, 1995. 전통 방법으로 담금한 소주 제조중의 퓨젤 유 및 향기성분. 한국식품과학회지, 27(2), 235-240.
- 정동효, 1993. 발효와 미생물공학. 선진문화사, p. 236-238.
- 조갑연, 이철우, 1997. 한국 재래식 누룩 중의 곰팡이의 분리 및 동정. 26(5), 759-766.
- 주현규 외 5명, 식품분석법, 학문사, p. 159-333.
- 하덕모, 김동찬, 홍석민, 이철우, 1989. 누룩중의 전분자화성효모의 동정과 그 성질. 한국농화학회지, 32(4), 408-415.
- 한은혜, 이택수, 노봉수, 이동선, 1997. 누룩 종류를 달리하여 담금한 탁주 술덧의 휘발성 향기성분. 29(3), 563-570.
- 長谷川武治, 1984. 微生物の分類と同定. p. 154.
- 福井三郎, 別府輝彦, 1985. スクリーニング技術. p. 55.
- A.O.A.C., 1995. Official methods of analysis, 16th ed., Chapter 44. 1.21.
- Hawksworth, D. L., P. M. Kirk, B. C. Sutton, D. N. Pegler, Dictionary of the fungi. 6th ed., p. 35.
- Seeley, H. W., JR., P. J. Vandemark, J. J. Lee, Microbes in action. p. 49.

감사의 글

본 논문이 완성되기까지 아낌없는 지도와 격려를 하여주신 고정삼 교수님께 진심으로 감사드리며, 심사를 하여 주신 김찬식 교수님, 공과대학 식품공학과 고영환 교수님의 지도, 조언에 깊은 감사를 드립니다. 평소 가르침을 이끌어주신 강순선 교수님, 유장걸 교수님, 류기중 교수님, 현해남 교수님께 감사드립니다.

그리고 식품 생물공학실험실 선배님과 학부생, 대학원생 및 조교 선생님께 고마움을 전합니다.



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY