

## 쌀막걸리의 微生物學的 研究

(第 1 報) 分離菌株 M-80 의 쌀막걸리 製麴用으로서의 利用性

趙 鏞鶴 · 成 洛癸 · 鄭 德和 · 尹 漢大

慶尙大學 食品加工學科  
(1979. 11. 12. 수리)

## Microbiological Studies on the Rice Makkulli

(Part I) Utilization of Rice Makkulli Koji with the Isolated Strain M-80

Yong Hoak Jo, Nack Kie Sung, Duck Hoa Chung and Han Dae Yun

Department of Food Processing, Gyeongsang National Univ., Jinju, Korea  
(Received November 12, 1979)

### Abstract

Six strains of mold which had high saccharifying and acid-productive ability were isolated from wild sources. The strain M-80 among them and *Aspergillus kawachii* which was generally used as rice makkulli koji were used for this studies.

The results obtained were summarized as follows.

- 1)  $\alpha$ -amylase activities of the strain M-80 and *Asp. kawachii* showed similarly as about 140W. V., while  $\beta$ -amylase activity of M-80 was 54 A. U. and *Asp. kawachii* was 40 A. U.
- 2) Acid protease activity of M-80 was higher than *Asp. kawachii* but alkaline protease activity was lower *Asp. kawachii* respectively.
- 3) The contents of total acid, ethanol and fusel oil in makkulli brewing with M-80 were higher those of *Asp. kawachii* and methanol contents of the tested two strains were about 33mg/%.
- 4) Fifteen kinds of free amino acid were detected from makkulli brewing of two strains, and free amino acid contents of M-80 were 10% higher than those of *Asp. kawachii*.

### 서 론

우리나라 전통주류인 막걸리는 삼국시대 이전부터 제조되어 온 것으로 믿어지며 이조시대 이후는 농민의 술로 애용되어 그 소비량도 막대하였으나 최근에 와서는 국민경제수준의 향상으로 인하여 동물성식품의 소비증가와 서구식 주류의 범람, 그리고 그 자체가 지닌 산패의 원인등으로 그 수요가

점차 감소되고 있다. 그 동안 막걸리에 대한 연구는 1906년 上野<sup>(1)</sup>가 한국곡자의 당화력과 당화생성 및 곡자 중에서 3종의 *Mucor. sp*를 발견한 것을 시초로 하여 1945년 이후 많은 연구가 이루어졌다. 韓<sup>(2)</sup>등은 전국 14개소 곡자에서 42종의 효모를 분리하여 초발효력과 당발효성 및 Colony의 특징에 의하여 유별한 바 있으며 鄭<sup>(3)</sup>등은 단일균종을 사용하지 않고 이중균종인 *Aspergillus awa-*

*mori var fumeu*, *Aspergillus usami*, *Aspergillus niger* 등을 혼합배양하여 전분당화력과 액화력이 단일균주로 배양하였을 때보다 상승되었다고 보고하였다. 李<sup>(4)</sup> 등은 *Saccharomyces cerevisiae* 의 생장에 미치는 각종 파장에 대한 광선의 영향을 검토한 바 있으며 金<sup>(5)</sup> 등도 탁주효모에 자외선을 조사하여 변이주육성에 대한 연구를 하였다. 鄭<sup>(6)</sup> 등은 소맥분과 백미를 사용하여 담금한 막걸리 술덧 중의 유기산 및 당류를 P. P. C. 法으로 검출하였으며 金<sup>(7)</sup> 등은 백미, 현미 및 옥수수를 원료로 하여 담금한 술덧에서 fusel oil 의 消長을 조사하였고 黃<sup>(8)</sup> 등은 각종 막걸리의 riboflavin 함량을 검토한 바 있다.

그러나 과학적인 제조방법과 유통과정으로 전통주류로서의 쌀막걸리를 보호육성하기 위하여서는 더욱 체계적이고 광범위한 연구가 이루어져야 할 것이다. 따라서 저자들은 쌀막걸리에 대한 일련의 실험을 행하고 있으며 본보에서는 제국용균종을 개량하기 위하여 자연계에서 산생성력이 강한 6 균주를 분리하고 그 중 전분을 가장 잘 자화하는 1 균주를 선정하여 쌀막걸리 제국용균주로서 이용가능성을 검토하여 그 결과를 보고하는 바이다.

## 實驗材料 및 方法

### 1. 實驗材料

본 실험에 사용된 막걸리 제조원료는 경상남도 농촌진흥원에서 입수한 밀양23호를 9분도로 도정하여 사용하였으며, 제국용 균종으로는 경상 대학 식품공학과에서 분리하여 선별한 분리균주 및 현재 막걸리 제국용 균종으로 사용되고 있는 *Aspergillus Kawachi* 를 술덧 발효용 효모는 막걸리 효모인 *Saccharomyces coreanus* 를 사용하였고, 양조용수로는 晋州市 上大洞 井水를 사용하였다.

### 2. 제국 및 담금방법

두 균주를 각각 접종하여 常法에 따라 제국하여 출국된 粒麴을 담금온도 22°C 에서 蒸米 : 粒麴 : 沒水를 3 : 2 : 7로 하여 배양효모를 접종한 후 7일간 발효시키면서 경시적으로 각종 분석을 하였다.

### 3. 各種酵素 力價測定法

1)  $\alpha$ -amylase : 1% NaCl 20ml 을 경시적으로 채취한 입국 10g 에 가하고 homogenizer 로 마쇄한 후 다시 1% NaCl 20ml 을 첨가하여 30°C 에서 3 시간 정치 후 여과한 것을 효소액으로 하여 Wohl-gemuth 法<sup>(9)</sup>에 의하여 力價를 측정하고 Wohl-gemuth 價로 나타내었다. (단 술덧은 여액을 효소액

으로 사용하였다)

2)  $\beta$ -amylase :  $\alpha$ -amylase 를 측정시와 동일하게 조제한 것을 효소액으로 하여 金<sup>(10)</sup>의 방법으로 力價를 측정하고 A. U 로 표시하였다.

3) Protease : McIlvain buffer (acid protease 측정시는 pH3, alkali protease 측정시는 pH 7) 50ml 을 국 10g 에 부어 잘 마쇄한 후 30°C 에서 3 시간 추출하고 그 여액을 protease 측정용 효소액으로 하였으며 (술덧의 경우는 여과하여 각각 pH3, pH7 로 조정하여 사용) milk casein 을 기질로 하여 Folin 비색법<sup>(11)</sup>에 의해 力價를 측정한 후 O. D. 로 나타내었다.

## 4. 一般成分分析

1) 總酸 및 揮發酸 : 총산은 시료 20g 에 30% ethanol 50ml 을 가하여 2 시간 추출한 후 여과하여 그 여액 25ml 을 N/10 NaOH 로 적정하여 0.009 를 곱하여서 lactic acid 로 표시하였다. (단 술덧의 경우는 homogenizer 로 마쇄한 후 여과한 액을 사용하였다.) 또한 휘발산은 위의 여액 25ml 을 300ml 가 되도록 수증기로 증류하여 N/10 NaOH 로 적정한 값에 0.006 을 곱하여 acetic acid 로 표시하였다.

2) Ethanol : 증류법에 의하여 정량하였다.

3) 환원당 : Homogenizer 로 마쇄한 술덧 20ml 을 일정용량이 되게 희석하여 somogyi 變法으로 정량하여 glucose 로 환산하여 표시하였다.

4) Fusel oil : isoamyl alcohol, isobutyl alcohol 을 4 : 1 의 혼합액으로 하여 0.001~0.01% (V/V) 로 표준곡선을 만든 후 vanilline sulfate 法<sup>(12)</sup>에 의하여 570nm 에서 비색정량하였다.

5) Methanol : 5% ethanol 용액에 methanol 이 0.001~0.03% 함유하는 표준곡선과 ethanol 이 5±1% 되도록 조절한 시료액을 fuchsin 法<sup>(13)</sup>으로 발색시킨 다음 570nm 에서 비색정량하였다.

6) 유리 아미노산 : 시료 10ml 에 물 30ml 을 가하여 마쇄한 후 물로써 씻어 50ml 로 하고 3000rpm 에서 10분간 원심분리하여 상등액 20ml 을 취하고 이것을 amberite CG 120 수지칼럼에 흡착시킨 다음 물로써 세척하여 2N-NaOH 로써 탈착시켜 rotary evaporator 로써 농축시킨 다음 citrate buffer (pH2.2) 로 씻어서 25ml 을 만들어 Spackman 등의 방법<sup>(14)</sup>에 의하여 아미노산 자동분석기 (JLC-6AH NO. 310) 로 정량하였다.

## 實驗結果 및 考察

### 1. 분리균의 효소활성

50%의 물을 첨가하여 살균한 밀기울배지에 분리한 6 균주를 각각 접종하여 40시간 배양한 후 각종 효소의 力價를 측정하였다.

Table 1 Enzymes activities with various strains

Strain	Enzyme $\alpha$ -amylase (W. V.)	$\beta$ -amylase (A. U.)	Acid protease (O. D.)	Alkali protease (O. D.)
M-1	128	16.2	0.560	0.314
M-2	128	28.8	0.214	0.258
M-3	64	24.8	0.317	0.184
M-4	256	16.9	0.156	0.217
M-5	128	32.6	0.279	0.371
M-80	256	48.2	0.325	0.214

Table 1.에서 보는 바와 같이 이들 균주중 M-80이  $\alpha$ -amylase 및  $\beta$ -amylase 力價가 가장 높았다. 그런데 acid protease는 M-1이, alkaline protease는 M-5가 높았으나 막걸리제조에 중요한 역할을 하는 것은 amylase 계의 효소이므로 M-80을 선정하여 현재 막걸리 제조용 균종으로 많이 사용되고 있는 백국균과 비교하여 이후의 실험을 계속하였다.

### 2. Amylase 活性

일반적으로 막걸리제조 공정중의 amylase는 대부분 국에서 유리되는 것으로 원료의 빠른 당화 및 액화를 위하여서는 amylase 활성이 강한 균주를 선

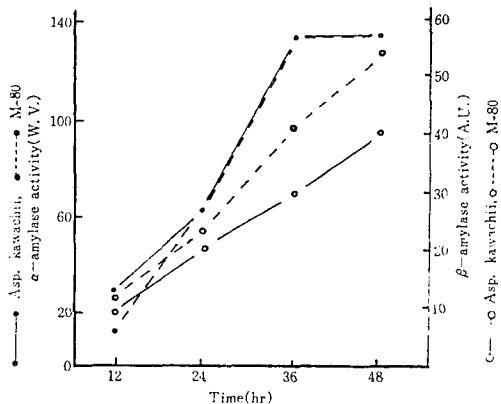


Fig. 1. Comparisons of  $\alpha$ ,  $\beta$ -amylase activities during rice makkulli koji making.

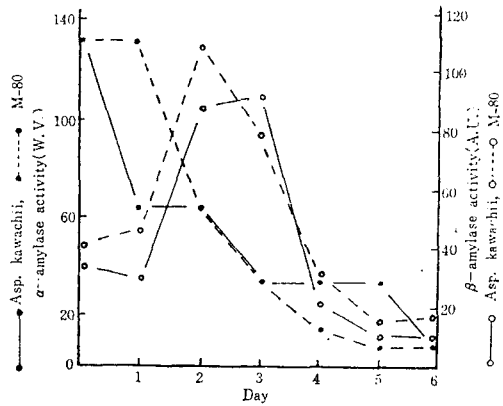


Fig. 2. Comparisons of  $\alpha$ ,  $\beta$ -amylase activities during rice makkulli crewing.

정하는 것이 무엇보다도 중요하다. 이와 같은 amylase 力價를 제국 및 술덧 중에서 비교한 결과는 Fig. 1, 2와 같다.

제국중의  $\alpha$ -amylase 활성은 두 균주 모두 30시간까지 비슷하게 증가하다가 그 이후 큰 변화가 없었고  $\beta$ -amylase 활성은 전과정을 통하여 분리균이 백국균보다 강하게 나타났다.

술덧중에서  $\alpha$ -amylase 활성은 두 균주가 시간의 경과에 따라 비슷하게 감소하였고  $\beta$ -amylase는 모두 담금 1일째까지 커다란 변동이 없다가 2~3일 경에 최고의 활성을 보였으며 대체로 분리균의 활성이 다소 높았다.

그런데  $\beta$ -amylase의 活性이 담금초기에 약한 이유는 국으로부터  $\beta$ -amylase의 용출이 늦은데 기인된다고 생각되나 金<sup>(15)</sup> 등은 acid protease가 amylase를 파괴하기 때문이라고 하였는데 이는 좀더 연구할 문제인 것 같다.

### 3. Protease 活性

분리균과 백국균의 Protease 활성을 측정된 결과 Fig. 3, 4와 같이 두 균주 모두 시간의 경과에 따라 제국중에는 증가하였다가 술덧중에서는 감소하는 현상을 보였는데 막걸리제조 공정중에 분리균은 백국균보다 acid protease 활성이 강하게 나타나는 반면 alkaline protease 활성은 약했다. 그런데 일반적으로 막걸리 제조중 작용하는 protease는 대부분이 acid protease로서 이는 술덧중의 아미노산과 fusel oil의 생성, amylase 활성 및 발효중의

효모증식에 영향을 미칠 뿐만 아니라 청주 술덧에 서는 peptide를 생성하여 *Lactobacillus sake*의 생육을 촉진하는 중요한 역할을 한다고 한다.<sup>(16)</sup>

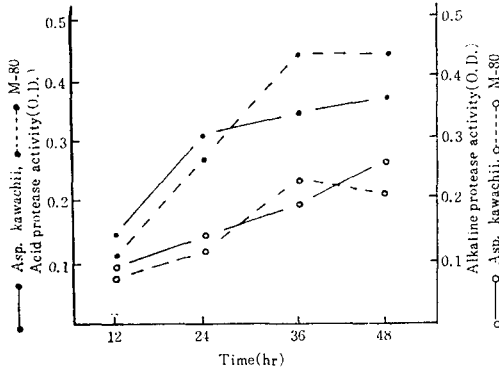


Fig. 3. Comparisons of acid, alkaline protease activities during rice makkulli koji making.

#### 4. 總酸 및 揮發酸

막걸리의 중요한 맛성분의 하나인 산을 총산 및 휘발산의 함량으로 구분하여 측정한 결과 Table 2, 3과 같이 시간의 경과에 따라 그 함량이 증가하였는데 분리균이 백국균보다 다소 높은 산생성력을 보였으며 이를 일반 시판주류의 성분변화와

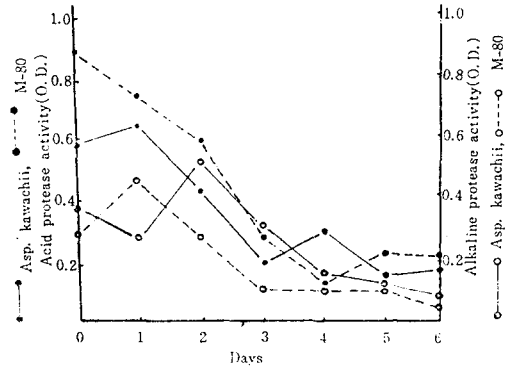


Fig. 4. Comparisons of acid, alkaline protease activities during rice makkulli brewing.

비교하면 미곡을 이용한 국자단용법으로 제조한 것의 산함량과 거의 비슷하였다.<sup>(17)</sup> 鄭<sup>(6)</sup> 등은 시중의 막걸리와 입국, 누룩 및 분국중의 유기산을 조사한 결과 막걸리, 누룩 및 분국중에는 lactic, oxalic, malonic, fumaric, Succinic, maleic, malic, citric acid, 입국에서는 lactic, oxalic, fumaric, succinic, malic 및 citric acid를 검출하였다. 또한 밀가루를 원료로 하여 만든 막걸리중에 들어있는 대표적인 酸은 succinic acid이며 입국에서는 대부분이 citric acid라고 보고 되었다.<sup>(18)</sup>

Table 2. Comparisons of total acid volatile acid during koji making

(unit : %)

Strains	Acids	Times			
		12	24	36	48
<i>Asp. kawachii</i>	Total acid	0.812	1.109	1.626	1.699
	Volatile acid	0.009	0.014	0.022	0.024
M-80	Total acid	0.913	1.412	1.631	1.708
	Volatile acid	0.012	0.019	0.021	0.020

Table 3. Comparisons of total acid and volatile acid during makkulli brewing

(unit : %)

Strains	Acids	Days						
		0	1	2	3	4	5	6
<i>Asp. kawachii</i>	Total acid	0.618	1.052	1.067	1.048	1.071	1.091	1.102
	Volatile	0.009	0.018	0.030	0.056	0.057	0.063	0.052
M-80	Total acid	0.927	1.016	1.123	1.109	1.104	1.110	1.112
	Volatile acid	0.024	0.030	0.056	0.060	0.065	0.067	0.071

5. Ethanol 및 환원당의 經時的 比較

두 균주를 종국으로 사용한 술덧중에서 ethanol 생성 및 환원당의 소비를 경시적으로 측정비교한 결과 분리균의 술덧중에서 백국균의 술덧보다 ethanol 생성량이 많았고 특히 발효초기에 ethanol의 생성이 급격하였다. 이는 분리균의  $\beta$ -amylase 力價가 백국균보다 높아 당을 많이 생성시킨 것으

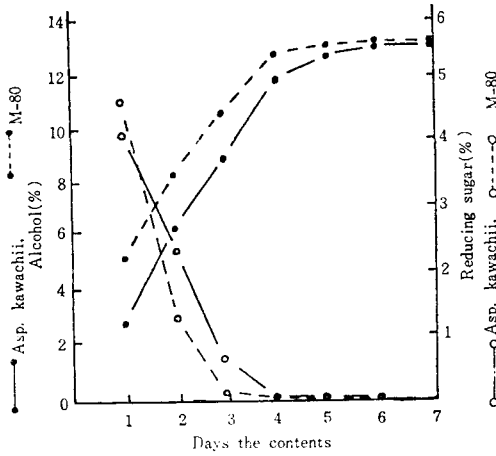


Fig. 5. Comparisons of alcohol and reducing sugar during rice makkulli brewing.

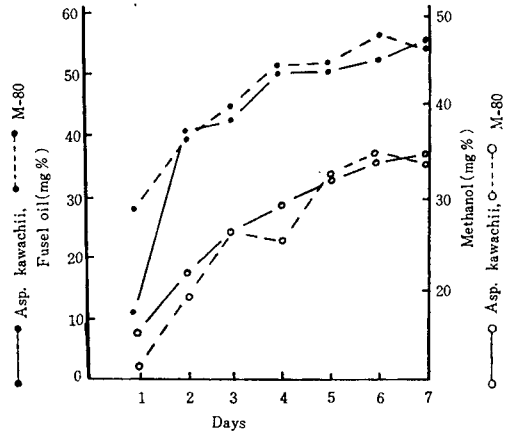


Fig. 6. Comparisons of the contents fusel oil and methanol during rice makkulli brewing.

로 생각된다. 金<sup>(17)</sup>은 재래법에 따른 미곡을 이용한 곡자단용법과 곡자, 미곡혼용법에 의한 막걸리 일반성분의 消長에 대하여 보고하였는데 이에 따르면 모두 담금 3~4일만에 전체 酒精의 80%가 생성되었다는 결과와 일치하여 또한 洪<sup>(19)</sup>등은 환원당이 12~24시간만에 급격히 감소하였다는 결과와는 약간 상이한 경향을 보이고 있다.

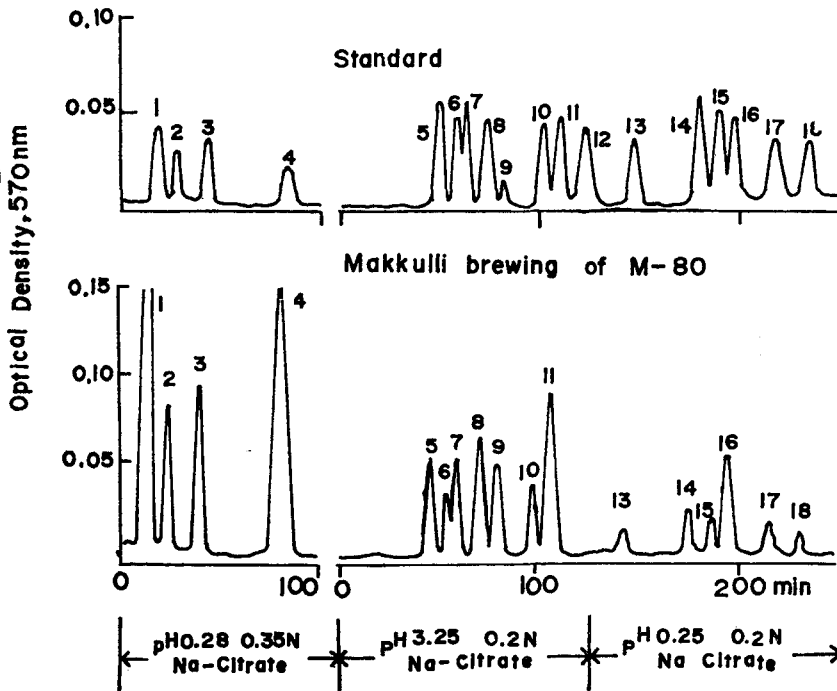


Fig. 7. Chromatograms of authentic amino acid mixture, free amino acid in makkulli brewing of M-80. 1. Lys 2. His 3. NH<sub>3</sub> 4. Arg 5. Asp 6. Thr 7. Ser 8. Glu 9. Pro 10. Gly 11. Ala 12. Cys 13. Val 14. Met 15. Ileu 16. Leu 17. Phe

## 6. Fusel oil 과 Methanol

대부분의 주류중에서 미량으로 잔존하여 숙취의 원인이 되는 것으로 알려져 있는 fusel oil 과 有害成分인 methanol 의 함량을 비교한 결과는 Fig. 6 과 같다.

Fig. 6에서 처럼 담금 2일째부터 다소 많은 량의 fusel oil 을 생성하여 그 후에도 커다란 변동없이 증가하는 경향을 볼 때 초기의 강한 acid protease 에 의해 생성된 아미노산이 탈탄산, 탈 amino 작용에 의해 fusel oil 로 변환 것이 아닌가 생각된다. 또 methanol 의 함량은 두가지 술덧에서 모두 비슷하게 증가하는 경향을 보였는데 미량으로 함유되어있어 酒質에는 크게 영향을 미치지 않을 것으로 생각된다.

## 7. 유리 아미노산의 定量

술덧중의 유리 아미노산을 spackman 등의 방법<sup>(4)</sup>으로 분석한 chromatogram 은 Fig. 7과 같이 15종의 유리 아미노산이 존재하는 것으로 나타났다. 다른 報告者도 미곡을 원료로 하여 숙성시킨 술덧

**Table 4.** The contents of free amino acid in makkulli brewing (unit : mg/100g)

Amino acids	Strains	
	<i>Asp. kawachii</i>	M-80
Lys	59.625	59.109
His	19.375	13.031
NH <sub>3</sub>	7.062	4.171
Arg	87.562	61.406
Asp	—	121.406
Thr	61.312	44.531
Ser	99.000	82.500
Glu	161.875	120.000
Pro	134.000	140.156
Gly	38.313	40.312
Al <sub>2</sub>	163.000	131.250
Cys	—	—
Val	40.375	44.531
Met	22.625	37.968
Ileu	25.375	38.437
Leu	71.062	104.062
Tyr	45.937	75.468
Phe	37.187	53.437
Total	1073.748	1171.775

중에서 14~16종의 amino acid 를 檢出하였고<sup>(20)</sup>, 옥수수등을 이용한 술덧에서는 12종의 유리 아미노산을 설온에서 30개월 숙성시킨 蛇酒中에서는

22종의 유리 아미노산을 檢출하였다는 보고가 있다.<sup>(21)</sup> 본 실험에서 나타난 각종 유리 아미노산을 정량한 결과는 Table 4 와 같이 분리균의 술덧중에서 다소 높았으며 이는 분리균의 강한 acid protease 작용에 의한 것이 아닌가 생각된다.

## 要 約

자연계에서 분리한 곰팡이 중 전분을 잘 당화하며 산생성력이 강한 한 균주를 선별하여 현재 막걸리 계국용 균종으로 많이 사용되고 있는 백국균 (*Aspergillus Kawachii*) 과 비교하여 각종 성분을 경시적으로 分析한 결과는 다음과 같다.

- 1) 분리균중 당화력 및 액화력이 비교적 강한 M-80을 공시균으로 선별하였다.
- 2) 백국균과 분리균의  $\alpha$ -amylase 力價는 140W. V. 로 비슷하였으나  $\beta$ -amylase 力價는 54 A. U. 로 분리균이 높았다.
- 3) acid protease 力價는 분리균이, alkaline protease 力價는 백국균이 높았다.
- 4) 總酸, ethanol, fusel oil 의 생성량은 분리균이 약간 높았으며 methanol 함량은 비슷하였다.
- 5) 술덧중의 유리 아미노산의 함량은 분리균이 백국균보다 약 10% 정도 높았으며, 15종의 유리 아미노산이 확인되었다.

## 參 考 文 獻

- 1) 上野敏勇 : 조선총독부 중앙시험소보고, 9, 44 (1927).
- 2) 韓容錫, 金奇珠 : 研究報告(工研), 9, 131 (1959).
- 3) 鄭基澤, 俞大植 : 경북대학교 논문집, 12, 44 (1968).
- 4) 李周植, 李泰雨 : 韓國微生物學會誌, 8, 116 (1970).
- 5) 金燦祚 : 韓國農化學會誌, 18, 10(1975).
- 6) 鄭址炊 : 韓國農化學會誌, 8, 39 (1967).
- 7) 金燦祚 : 충남대학 논문집(자연과학), 6, 1 (1967).
- 8) 黃祐翊 : 종합의학, 12(1), 43(1967).
- 9) 上田化學工業株式會社 : 各種酵素力價測定法, 2.
- 10) 金浩植, 李瑞來, 田南秀 : 韓國農化學會誌, 3, 9(1962).
- 11) 上田化學工業株式會社 : 各種酵素力價測定法,

- 8.
- 12) 山田正一：醸造分析法，産業圖書株式會社，145 (1948).
- 13) 山田正一：醸造分析法，産業圖書株式會社，159 (1948).
- 14) Spackman D.H., W.H. Stein and Moore: *Anal. Chem.*, **30**, 1190(1958).
- 15) 金燦祚：韓國農化學會誌，**10**, 69(1968).
- 16) 신용두, 조덕현：微生物學會誌，**8**, 53(1970).
- 17) 金燦祚：韓國農化學會誌，**4**, 33(1963).
- 18) 조덕현, 신용두：기술연구소보，**2**, 1(1969).
- 19) 洪淳佑, 河永七, 閔庚喜：韓國微生物學會誌，**8**, 197(1967).
- 20) 韓容錫, 李琦鍾：研究報告(工研)，**10**, 119 (1960).
- 21) 朴允仲, 鄭舞亮：韓國食品科學會誌，**1**, 74 (1969).