

약·탁주 발효과정 중 미생물 균총의 변화

서미영 · 이종경 · 안병학 · 차성관*

한국식품연구원 전통식품연구본부

The Changes of Microflora During the Fermentation of *Takju* and *Yakju*

Mi-Young Seo, Jong-Kyung Lee, Byung-Hak Ahn, and Seong-Kwan Cha*

Traditional Food Research Division, Korea Food Research Institute

Korean traditional rice wine *Takju* and *Yakju* were manufactured using 2-step-brewing method. To investigate microflora involved in fermentation step, number of microorganisms, pH, titratable acidity, and alcohol contents of *Takju* and *Yakju* were measured. In *Takju* and *Yakju*, although not significantly, 1.1×10^8 and 2.0×10^6 CFU/mL lactic acid bacteria at initial stage of second fermentation decreased to 8.3×10^6 and 1.0×10^4 CFU/mL at the end of second fermentation, respectively. For *Takju*, micrococci and yeast occupied 80 and 20% at initial stage of second fermentation, whereas bacteria and yeast occupied 35 and 65% at the end of second fermentation, respectively. Yeast occupied 88% throughout the second fermentation of *Yakju*. The main yeast isolated from both *Takju* and *Yakju* was identified as *Saccharomyces cerevisiae* using API 20C AUX kit. The yeast strain *Candida magnoliae* was also detected during fermentation of *Takju* and *Yakju*

Key words: Changes of microflora, *Takju*, *Yakju*, fermentation

서 론

우리나라 술 가운데 탁·약주는 삼국시대 이전부터 이들 제조법이 발달하여 오랜 세월 거치는 동안 발전을 한 것으로 보여지며, 탁·약주의 주종이 명문화되기 시작한 것은 고려 중기이다(1). 우리나라 전통재래의 탁주나 약주는 주로 찹쌀이나 멥쌀을 원료로 하고 누룩을 발효제로 사용하여 만들어지는데, 현재 우리나라의 주세법으로는 약주는 주정도 13% 이하의 맑게 거른 술이고, 탁주는 주정도 6% 이상으로 거칠게 거른 술로 분류하고 있다(2,3). 국세청 기술연구소의 주류제조교본(1)에 의하면 고온(25-28°C)에서 단기간 발효했을 경우 탁주라고 하고, 저온(10-20°C)에서 장기간 발효한 것을 약주라 한다. 탁·약주는 담금 후 누룩중의 미생물에 의한 효소작용에 의해 일반 원료 성분이 분해 되어 생성되는 당분, 아미노산, 유기산 등의 맛 성분과 효모나 젖산균 등의 미생물에 의한 알코올 발효로 휘발성 풍미 성분이 생성되어 색과 함께 품질의 조화를 이루게 된다(4). 탁·약주의 담금 과정 중 미생물학적 변화에 대한 연구는 지금까지 많은 연구자들에 의하여 이루어졌는데, Kim(5)은 누룩과 탁주의 미생물 분석을 시도하였으며, Jung과

Jung(6)은 탁주의 저장 중 미생물군의 변화에 대하여 그리고 Han 등(7)은 재래누룩으로 제조한 탁주의 품질특성을 조사하였다. Park 등(8)은 시판 막걸리로부터 효모 297주를 분리하여 발효능력에 따라 7균주를 선별하고, 담금 실험한 결과 13.2-15.2%의 알콜 생성도를 나타내었고, 동정결과 5균주는 *Saccharomyces cerevisiae*로 나머지 2균주는 *Saccharomyces pretoriensis*와 *Saccharomyces rouxii* 균주로 동정되었다고 보고하였다. 탁주 발효에서 물과 효모를 첨가한 2단계 발효단계에서 발효 10일까지 *Saccharomyces cerevisiae* 수가 10^6 CFU/mL 이었으나, 이 후 *Bacillus*와 *Staphylococcus*의 급격한 출현으로 탁주가 변질되기 시작하였다고 Koh 등(9)이 보고하였고, Kim과 Lee(10)는 시중 탁주공장의 시료로부터 11주의 효모를 분리하여 동정한 결과 *Saccharomyces*, *Hansmulla*, *Pichia* 속으로 밝혀졌으며, *Saccharomyces* 속이 알콜발효에 관여하는 우점종 효모이고 *Hansmulla* 속은 탁주의 향취에 중요한 역할을 한다고 보고하였다. Lee와 Lee(11)는 탁주의 제조과정 중 미생물 균총 조사를 한 결과 탁주의 알콜발효에 단일종의 효모작용이 아니라 *Saccharomyces*, *Torulopsis*, *Hansmulla*, *Candida*, *Pichia* 등 여러 가지 종류의 효모가 관여하고 있다고 보고하였다. 또한 Shin과 Cho(12)는 탁주 발효에 관여하는 주요 효모로 *Saccharomyces* 속 이외에 *Torulopsis inconepicua*를 열거하였고, 주요 세균으로는 *Lactobacillus casei*, *Leuconostoc mesenteroides*와 *Bacillus subtilis*이었다고 보고하였다. 본 연구는 우리나라 전통 술인 탁주와 약주를 2단 담금 방법으로 제조하였을 때 발효 단계별 미생물 균수, pH, 적정산도, 알콜함량의 변화를 측정하고, 각 발효 단계 시

*Corresponding author: Seong-Kwan Cha, Traditional Food Research Division, Korea Food Research Institute, San 46-1, Baekhyun-dong, Songnam, Kyonggido 463-420, Korea
Tel: 82-31-780-9108
Fax: 82-31-780-9234
E-mail: skcha@kfri.re.kr

료의 미생물을 분리, 동정하여 탁·약주의 담금 과정 중 미생물 균총의 변화를 조사함으로써, 기존 연구결과와 확인 및 탁주 및 약주발효에 있어서의 미생물 균총변화의 차이점을 조사하기 위하여 수행되었다.

재료 및 방법

제조원료

탁주 및 약주 제조를 위한 쌀은 (주)라이스텍(성남, 한국)에서 씻어 나온 쌀을 구입하여 사용하였고, 누룩은 진주곡자(2003년 8월 제조, 300 SP, 진주, 한국)를 사용하였다.

탁·약주의 밀술 담금

탁·약주의 밀술 담금에서는 쌀 100 g을 5시간 동안 물에 침지한 후, 물을 뺀 다음 100°C에서 40분간 증기하였고, 30°C로 방냉한 후, 76.92 g의 증미에 누룩 15.38 g(300 SP)을 섞어 500 mL-Bottle에 넣은 후, 물 107.69 mL를 부어 잘 섞어준 후, 25°C에서 1일 개방식으로 발효하였다.

탁주 및 약주의 담금

탁주의 1단 담금은 밀술 발효가 끝난 후, 밀술에 누룩 253.85 g(300 SP), 증미 1269.23 g, 물 2046.15 g을 함께 넣어 잘 섞고, 25°C에서 2일간 개방식으로 발효하였다. 탁주의 2단 담금은 1단 담금 후 누룩 76.93 g, 증미 2500 g, 물 4000 mL을 함께 잘 섞어, 25°C에서 5일간 아침저녁으로 교반하면서 개방식으로 발효하였다.

약주의 1단 담금은 밀술 발효가 끝난 후, 밀술에 누룩 253.85 g(300 SP), 증미 1269.23 g, 물 2046.15 g을 함께 넣어 잘 섞고, 15°C에서 24일간 개방식으로 발효하였다. 약주의 2단 담금은 1단 담금 후 누룩 76.93 g, 증미 2500 g, 물 4000 mL을 함께 잘 섞어, 15°C에서 24일간 개방식으로 발효하였다.

탁주 및 약주의 일반성분 분석

탁주 및 약주 발효 과정 중 발효 각 단계에서 술덧을 채취하여 일반성분분석을 하였다. pH의 측정에는 pH-meter(Coming 530, USA)로 측정하였고, 적정산도는 1% phenolphthalein을 지시약으로 하여 0.1 N NaOH로 적정하여 이 때의 NaOH 소비량을 lactic acid(%)로 환산하여 계산하였다. 알콜함량은 시료의 청징을 위하여 microcentrifuge에서 3000 rpm으로 10분간 원심분리 한 후 gas chromatography(Varian, vista 6000, USA)를 이용하여 분석하고, 표준 곡선과의 비교하여 알콜함량을 계산하였다.

탁주 및 약주 발효 중 미생물 균수의 측정

탁주 및 약주 발효 중 미생물 균수의 측정은 채취된 시료를 멸균 희석액(0.1% peptone, 0.85% NaCl, 0.03% KH₂PO₄, 0.04% Na₂HPO₄)으로 10진 희석법에 따라 희석한 후, 일반세균수는 각 희석 단계의 희석액을 standard plate count(SPC) agar에 100 µL 도말하여 37°C에서 24시간 배양한 후 식품공전(13) 방법에 따라 집락을 계수한 후 측정하였고, 젖산균수는 bromocresol purple agar에 희석액 100 µL 도말하여 37°C에서 24시간 배양 후 집락을 계수하여 측정하였다. 효모, 곰팡이 균수의 측정은 효모, 곰팡이 측정용 petrifilm(3M, USA)에 희석액 1 mL를 도말하여, 25°C에서 72시간 배양한 후, 핑크 및 녹색의 빛깔을 띄우는 colony를 효모균수로, 다양한 색상을 나타내는 colony수를 곰팡이로 계수하였다.

탁주 및 약주 발효 중 미생물 균총 변화 조사

탁주 및 약주의 발효 중 미생물 균총의 변화를 조사하기 위하여 미생물 균수 측정에 이용되었던 SPC 배지 중 25-50개의 균락이 자란 plate를 1개 혹은 2개 선정하여 plate의 모든 집락을 분리하는 방법으로 시료 당 약 50개의 집락을 순수 분리하였다. 순수 분리된 미생물을 SPC 배지 위에서의 집락형성 모양과 색을 관찰하였으며, wet mount 방법으로 미생물 세포 모양을 광학현미경으로 관찰하였고, Cappuccino와 Sherman(14)의 방법으로 Gram 염색을 수행하였다. Catalase 시험은 Macfaddin(15) 방법에 따라 슬라이드 글라스 위에 시험미생물을 도말한 후, 3% 과산화수소 용액을 균체 위에 떨어뜨려 기체 발생 유무를 관찰하였다. Oxidase 시험은 Macfaddin(15) 방법에 따라 시험 미생물 균체를 여과지에 도말한 후, oxidase 측정시약(N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenyldiamine-dihydrochloride 0.2%, sodiummethylenediamine tetraacetate 0.1%, sodium thiosulfate 0.05%)을 균체에 떨어뜨려 30초 이내에 푸른색으로 변하는지 여부를 확인하였다. 이상과 같은 미생물의 형태적인 그리고 생리, 생화학적인 성질의 조사결과를 토대로 Bergey's manual(16)을 참조하여 각각의 발효단계에서 분리한 전체 균수에 대한 1차 동정결과에 따라 분류한 미생물 그룹의 비율(%)로 나타내어 1차적인 미생물 균총변화 조사를 수행하였으며, 이후 모든 분리된 효모균주들은 19가지 탄수화물의 이용성으로 동정하는 API 20 C AUX kit(bio-Merieux, France)를 사용하여 동정하였는데, 효모 균체를 멸균 swap을 이용하여 1차 동정결과에 따라 선택된 지시약이 포함된 kit medium에 접종 후 strip에 분주하여 48시간 동안 배양하였다. 배양 후 결과를 판독하였고, API 동정용 프로그램으로 해석한 결과로 효모균을 동정하여 탁주 및 약주 발효 중의 미생물 균총 변화를 조사하였다.

결과 및 고찰

탁주 발효 중의 미생물 균수, pH, 산도 및 알콜함량 측정결과

제조된 탁주 발효 중의 미생물 균수, pH, 산도 및 알콜함량 측정 결과는 Table 1에서 보여 주는 것과 같다. 탁주 제조 과정 중 일반세균수는 밀술 담금 초기에 4.5×10⁵ CFU/mL이었으나 24시간 발효 후 1.0×10⁹ CFU/mL으로 증가되었고, 1단 및 2단 발효 전 과정 중에는 10⁸ CFU/mL 수준의 일반세균수가 측정되었다. 젖산균수는 밀술과 1단 담금에서는 일반세균수와 동일한 수준이었으나, 2단 담금에서는 발효 과정 중 점차 감소하여 2단 담금 최종 단계에서는 10⁶ CFU/mL으로 조사되었다. 효모균수는 발효과정을 거치면서 점차 증가하여 발효 마지막 단계인 2단 담금 최종 단계에서는 10⁸ CFU/mL까지 증가하는 것을 볼 수 있었으며, 발효초기 10⁶ CFU/mL로 나타났던 곰팡이균 수는 점차 감소하여 2단 담금 final 단계에서 10² CFU/mL로 조사되었다(Table 1). 탁주 발효 중의 일반성분 분석결과는 Table 1에서 보여주는 것과 같이 pH의 측정값은 밀술 초기에 6.33이었으나 발효 1일만에 3.94로 내려갔고, 1단 담금에서는 담금 초기에 5.42이었으나 2일의 발효기간이 지난 후 3.55로 내려갔고, 이 후 2단 담금에서는 초기 3.70에서 발효 2일 후 3.69 그리고 발효 마지막 5일 후에는 3.84로 조사되었다. 적정 산도의 측정값은 밀술 담금 초기 0.14이었으나 발효 1일 후에 1.35로 올라갔고, 1단 담금 초기에 0.38이었으나 발효 2일 후 1.50으로 그리고 2단 담금 초기에는 0.63이었으나 5일 발효 후에는 1.04로 조사되었다. 탁주의 2단 담금에서 젖산균수는 감소되고 있지만 적정산도의 값은 오히려 증가하는 측정

Table 1. Analysis of microbial cell counts, pH, titratable acidity and alcohol content during the fermentation of *Takju*

Fermentation (days)	Microbial cell counts (CFU/mL)				pH	Titratable acidity (%)	Alcohol content (%)
	Aerobic bacteria	Lactic acid bacteria	Yeast	Mold			
Seed mash (0 day)	4.5×10^5	3.1×10^5	8.5×10^5	6.0×10^6	6.33	0.14	0
Seed mash (1 day)	1.0×10^9	1.1×10^9	2.6×10^7	1.5×10^6	3.94	1.35	3.63
1st fermentation (0 day)	7.8×10^8	7.0×10^8	7.4×10^5	5.0×10^5	5.42	0.38	1.63
1st fermentation (2 days)	5.0×10^8	3.5×10^8	3.4×10^8	3.2×10^4	3.55	1.50	9.10
2nd fermentation (0 day)	3.3×10^8	1.1×10^8	1.6×10^8	2.5×10^3	3.70	0.63	4.83
2nd fermentation (2 days)	2.6×10^8	5.0×10^7	4.4×10^8	3.0×10^3	3.69	0.88	7.72
2nd fermentation (5 days)	2.4×10^8	8.3×10^6	3.2×10^8	2.0×10^2	3.84	1.04	11.97

Table 2. Analysis of microbial cell counts, pH, titratable acidity and alcohol content during the fermentation of *Yakju*

Fermentation (days)	Microbial cell counts (CFU/mL)				pH	Titratable acidity (%)	Alcohol content (%)
	Aerobic bacteria	Lactic acid bacteria	Yeast	Mold			
Seed mash (0 day)	8.7×10^6	1.2×10^8	1.5×10^5	9.5×10^5	6.66	0.1	0
Seed mash (1 day)	1.1×10^9	1.8×10^9	2.3×10^6	2.0×10^6	4.66	0.45	1.18
1st fermentation (0 day)	6.6×10^8	4.5×10^8	2.5×10^5	6.0×10^5	6.17	0.09	0.97
1st fermentation (12 days)	1.2×10^8	5.0×10^7	8.5×10^7	7.0×10^4	3.72	0.55	6.29
1st fermentation (24 days)	9.5×10^6	8.7×10^8	6.6×10^7	2.0×10^4	3.78	0.59	11.28
2nd fermentation (0 day)	1.1×10^6	2.0×10^6	8.3×10^6	5.5×10^3	3.81	0.61	4.93
2nd fermentation (12 days)	5.8×10^7	2.0×10^6	1.6×10^8	2.0×10^3	3.85	0.69	9.76
2nd fermentation (24 days)	8.7×10^5	1.0×10^4	1.7×10^7	ND ¹⁾	3.98	0.69	10.85

¹⁾ND: No CFU was detected in 1 mL of undiluted sample.

치를 보여주었는데, 이것은 지속적인 젖산균의 생장으로 인한 젖산의 누적과 효모균의 증식에 의한 산 생성으로 추측할 수가 있다. 알콜함량은 밀술 담금 1일 발효 후 3.63%이었고, 1단 담금에서는 1.63%에서 2일 발효 후 9.10%이었으며, 2단 담금에서는 초기 4.83%에서 5일 발효 후 11.97%의 알콜함량을 보여주었다. 이러한 탁주 제조과정 중의 미생물 균 수, pH, 적정 산도 및 알콜함량의 분석 결과는 발효 초기 젖산균의 증식으로 인한 pH의 저하 및 적정산도의 증가를 유추할 수가 있고, 또한 활발한 효모의 증식과 알콜 발효에 의하여 2단 담금 후 최종적으로 11.97%의 알콜을 함유한 탁주의 제조가 가능하였다. 이러한 탁주의 알콜생성은 탁주 담금 직후에 알콜함량이 2.0-3.0%이었고, 발효 마지막 단계에서는 8.2-12.6%이었다고 보고한 Han 등(7)의 연구와 유사한 결과이었다.

약주 발효 중의 미생물 균 수, pH, 산도 및 알콜함량 측정결과

전통식 방법에 의해 제조된 약주 발효 중의 미생물 균 수, pH, 산도 및 알콜함량 측정 결과는 Table 2에서 보여주는 것과 같다. 약주 제조 과정 중 일반세균수는 밀술 담금 초기에 8.7×10^6 CFU/mL이었으나 24시간 발효 후 1.1×10^9 CFU/mL으로 증가되었고, 1단 담금 초기의 10^8 CFU/mL 일반세균수가 12일 발효중에는 유지되었으나 24일 발효 후에는 10^6 CFU/mL으로 감소되었다. 2단 발효 초기의 10^6 CFU/mL 일반세균수는 12일 발효 후에 10^7 CFU/mL으로 증가되었고, 24일 발효 후에는 10^5 CFU/mL으로 일반세균수가 감소되었다. 젖산균수는 1단 담금 초기에는 일반세균수와 동일한 수준이었고, 발효 12일째에는 일반세균수보다 적은 균수를 보여주었으나 24일 발효 후에는 오히려 log 2 정도의 높은 값을 보여주었다. 2단 담금에서는

12일간의 발효 과정 중 젖산균수가 변하지 않았으나 24일 발효 후에는 급격한 젖산균수의 감소를 보여주었다. 효모균수는 밀술 담금과정에서 10^5 에서 10^6 으로 그리고 1단 담금에서는 10^5 에서 10^7 으로 균수가 증가하였고, 2단 담금 12일 발효 후에는 10^6 에서 10^8 으로 효모균수가 증가하였으나, 24일 발효 후에는 다시 10^7 으로 효모균수가 감소하였다. 곰팡이 균수는 밀술 담금 과정에서는 약간의 균수 증가를 보여주었으나 1단 및 2단 담금과정에는 발효과정을 거치면서 곰팡이 균수가 점차로 감소하였음을 알 수 있다(Table 2). 약주 발효 과정 중 pH의 분석결과는 Table 2에서 보여주는 것과 같이 밀술 담금 초기에 6.66이었으나 발효 1일만에 4.66로 내려갔고, 1단 담금 초기에는 6.17이었으나 12일 그리고 24일 발효 후에는 각각 3.72 그리고 3.78로 조사되었다. 2단 담금에서는 초기 3.81에서 발효 12일 후 3.85 그리고 발효 24일 후에는 3.98로 조사되었다. 약주 발효 과정 중 적정 산도의 측정값은 밀술 담금 초기 0.1이었으나 발효 1일 후에 0.45로 올라갔고, 1단 담금 초기에 0.09이었으나 발효 12일 후와 24일 후에 각각 0.55와 0.59의 값을 보여주었다. 2단 담금에서는 초기에 0.61, 12일과 24일 발효 후에는 0.69의 값을 보여주었다. 탁주 발효의 경우 밀술 담금 1일 후, 1단 담금 2일 후 그리고 2단 담금 5일 후에 적정산도가 각각 1.35, 1.50 그리고 1.04이었음에도 불구하고, 약주 발효에서는 밀술 담금 1일 후, 1단 담금 24일 후 그리고 2단 담금 24일 후에 각각 0.45, 0.59 그리고 0.69와 같이 산생성이 높지 않은 결과를 보여주었는데, 이러한 결과의 원인이 발효온도에 기인한 것인지 혹은 젖산균과 효모 생육의 복합적인 관계에 의한 것인지 그 원인 규명을 위한 추가적인 실험이 필요하다 할 수 있다. 약주 발효 과정 중 알콜함량은 밀술 담금 초기

Table 3. Distribution (%) of microflora during the fermentation of Takju

Fermentation (days)	Identification of strains	Gram positive, catalase positive, oxidase negative, cocci	Gram positive, catalase negative, oxidase negative, cocci	Yeast
	Seed mash (1 day)		21	75
1st fermentation (0 day)		56	44	ND ¹⁾
1st fermentation (2 days)		69	2	29
2nd fermentation (0 day)		80	ND	20
2nd fermentation (2 days)		31	ND	69
2nd fermentation (5 days)		35	ND	65

¹⁾ND: not detected.

Table 4. Identification of yeast strains isolated from Takju

Fermentation (days)	Identification ¹⁾ of yeast strains	No. of colonies
Seed mash (1 day)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2
1st fermentation (2 days)	<i>Candida magnoliae</i>	1
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	14
2nd fermentation (0 day)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10
2nd fermentation (2 days)	<i>Candida magnoliae</i>	1
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	34
2nd fermentation (5 days)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	34

¹⁾Identification: identification on API 20 C AUX.

0%에서 1일 발효 후 1.18%이었고, 1단 담금에서는 초기 0.97%에서 12일 발효 후 0.55% 그리고 24일 발효 후에 6.29%의 알콜함량을 보여주었다. 2단 담금에서는 초기 4.93%에서 12일 발효 후 9.76% 그리고 24일간의 발효 후에는 10.85%의 알콜함량을 보여주었다. 이러한 약주 발효과정중의 미생물 균 수, pH, 적정산도 및 알콜함량의 분석 결과에 의하면 발효 과정중의 젖산균의 증식으로 인한 pH의 저하 및 적정산도의 증가가 일반 세균수와 젖산균수 그리고 효모균수의 변화에 영향을 미침을 유추할 수가 있는데, 젖산균의 증식에 의한 pH의 저하는 잡균에 의한 오염방지 역할을 함으로서 활발한 효모균의 증식을 가져오고 정상적인 알콜발효가 일어나게 한다는 Chung(17)의 설명과 같이 본 실험에서도 pH의 저하와 활발한 효모의 증식에 의한 알콜 발효에 의하여 2단 담금 후 최종적으로 10.85%의 알콜을 함유한 약주의 제조가 가능하였음을 알 수 있다.

탁주 발효 과정중 미생물 균총 변화의 조사

Table 3에서는 탁주 발효단계 별로 균수 측정에 이용되었던 SPC 배지를 이용하여 25-50개의 집락이 있는 한 개 혹은 두 개의 plate로부터 50여개의 모든 집락을 순수 분리한 후, 분리 미생물의 집락 및 세포의 형태학적인 특성조사, gram 염색, catalase 시험 및 oxidase 시험에 의거하여 균총 분포도를 작성한 결과를 보여주고 있다. 담금 초기의 plate에서는 곰팡이의 성장으로 인하여 미생물을 순수 분리할 수 없었고, 밀술 24시간 발효 후에는 96%의 세균과 4%의 효모가 동정되었으며, 세균 중에는 간균은 발견되지 않았고, 젖산균으로 추정되는 gram positive, catalase negative, oxidase negative 구균이 75% 차지하고 있음을 알 수 있다. 탁주의 1단 담금 초기에는 젖산균이 44% 차지하고 있었으나 2일 발효 후에는 2%로 줄어들었고, 반면에 효모가 발효 초기에는 0% 이었으나 2단 담금 2일 후에는 29% 차지하고 있음을 알 수 있다(Table 3). 탁주의 2단 담금에서는 발효 초기에 20% 차지하던 효모의 비율이 2일 발효

후에 69% 차지하고 있었고, 발효 초기에 80% 차지하던 gram positive, catalase positive, oxidase negative 구균이 발효 2일 이후에는 31%로 줄어들었다. Table 4는 순수분리된 모든 효모를 API 효모동정 kit를 이용하여 동정한 결과를 보여주고 있다. 밀술 담금, 1단 담금 그리고 2단 담금의 모든 탁주 제조 공정에서 분리된 효모균주들은 1단 담금 말기와 2단 담금 발효 2일 후에 *Candida magnoliae*가 각각 한 균주씩(약 2% 비율) 분리된 이외에는 분리된 모든 효모는 *Saccharomyces cerevisiae*로 동정된 것을 Table 4에서 알 수가 있다. 이러한 결과는 탁주의 주 발효 효모를 *Saccharomyces* 속이라고 발표한 문헌들(8-11)과 일치하는 결과였고, 본 실험의 탁주 발효 과정 중 계속적으로 발견되어지는 *Candida magnoliae* 종은 문헌들에 의하여 아직까지 보고되지 않은 균주로 밝혀졌다(Table 4).

약주 발효 과정중 미생물 균총 변화의 조사

Table 5에서는 약주 발효단계 별로 균수 측정에 이용되었던 SPC 배지를 이용하여 25-50개의 집락이 있는 한 개 혹은 두 개의 plate로부터 50여개의 모든 집락을 순수 분리한 후, 분리 미생물의 집락 및 세포의 형태학적인 특성조사, gram 염색, catalase 시험 및 oxidase 시험에 의거하여 균총 분포도를 작성한 결과를 보여주고 있다. 탁주에서와 마찬가지로 약주의 밀술 담금 초기의 plate에서는 곰팡이의 성장으로 인하여 미생물은 순수분리할 수 없었고, 밀술 24시간 발효 후에는 98%의 세균과 2%의 효모가 동정되었으며, 세균 중에는 젖산균으로 추정되는 gram positive, catalase negative, oxidase negative 구균이 50%를 차지하고 있었고, gram negative, oxidase negative 구균이 32%를 그리고 gram negative, catalase positive 간균이 16% 차지하고 있었다. 약주의 1단 담금 초기에는 젖산균이 37.7% 차지하고 있었으나 24일간의 발효 후에는 8%로 줄어들었고, 반면에 효모가 발효 초기에는 0% 이었으나 2단 담금 24일 후에는 92%를 차지하고 있음을 알 수 있다(Table 5). 약주의 2단

Table 5. Distribution(%) of microflora during the fermentation of Yakju

Fermentation (days)	Identification of strains			
	Gram positive, oxidase negative, cocci	Gram negative, oxidase negative, cocci	Gram negative, catalase positive, rod	Yeast
Seed mash (1 day)	50	32	16	2
1st fermentation (0 day)	37.7	30.2	32.1	ND ¹⁾
1st fermentation (24 days)	8	ND	ND	92
2nd fermentation (0 day)	12	ND	ND	88
2nd fermentation (24 days)	4.7	ND	7	88.3

¹⁾ND: not detected.

Table 6. Identification of yeast strains isolated from Yakju

Fermentation (days)	Identification ¹⁾ of yeast strains	No. of colonies
Seed mash (1 day)	<i>Candida guilliermondii</i>	1
1st fermentation (24 days)	<i>Candida magnoliae</i>	1
	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	1
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	45
	<i>Candida magnoliae</i>	1
2nd fermentation (0 day)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	42
	<i>Candida magnoliae</i>	1
2nd fermentation (24 days)	<i>Candida magnoliae</i>	1
	<i>Candida utilis</i>	1
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	31
	unidentified strains	3

¹⁾Identification: identification on API 20 C AUX.

담금에서는 발효 초기부터 발효 24일째까지 효모의 비율이 88% 차지하고 있었고, 발효 초기에 12% 차지하던 gram positive, oxidase negative 균은 발효 24일 이후에 4.7%로 줄어들었고, gram negative, catalase positive 균이 발효 24일째에 7% 출현하는 결과를 보여주었다(Table 5). Table 6은 약주의 제조과정 중 순수 분리된 모든 효모를 API 효모동정 kit를 이용하여 동정한 결과를 보여주고 있다. 밀술 담금 발효에서는 *Saccharomyces* 균주가 아닌 *Candida guilliermondii* 1균주가 출현되었고, 1단 담금 발효 초기에는 *Saccharomyces cerevisiae* 균주가 전혀 출현하지 않았으나 24일 발효 후에는 90%를 차지하고 있었고, 이외에 *Candida magnoliae* 균주와 *Rhodotorula mucilaginosa*가 각각 한 균주씩(2% 비율) 분리되었다. 약주의 2단 담금 발효에서는 발효 초기에 *Saccharomyces cerevisiae* 균주가 42균주를 차지하여 84%를 차지하고 있었는데, 발효 24일째에는 *Saccharomyces cerevisiae* 효모는 31균주를 차지하여 77%로 줄어들었고 이외에 *Candida magnoliae* 균주와 *Candida utilis*가 균주가 각각 한 균주씩(2.3% 비율) 그리고 미동정 효모가 3균주이었다. 탁주와 마찬가지로 약주 발효에 관여하는 주 발효 효모는 *Saccharomyces* 속 중 *Saccharomyces cerevisiae* 종으로 밝혀졌고, *Candida magnoliae* 종은 약주의 발효 과정 중에서도 계속적으로 발견되어지는 효모로 밝혀졌으나 지금까지의 문헌들에 의하여 보고되지 않은 균주로 밝혀졌다(Table 6).

동정하였다. 탁주의 2단 담금 발효초기에는 젖산균수와 효모균수가 모두 10⁸ CFU/mL로 수준이었으나, 발효말기로 가면서 젖산균수는 8.3×10⁸ CFU/mL, 효모균수는 3.2×10⁸ CFU/mL로 측정되었고, 약주의 경우 2단 담금 발효초기에 젖산균수와 효모균수가 모두 10⁶ CFU/mL로 수준이었으나, 발효말기에는 젖산균수는 1.0×10⁴ CFU/mL, 효모균수는 1.7×10⁷ CFU/mL로 측정되었다. 탁·약주의 제조과정 중 미생물 균총변화는 1차 적인 간이동정을 통하여 분류한 결과, 탁주의 2단 담금에서 발효 초기에 micrococci로 추정되는 세균이 80% 이었고 효모가 20% 차지하였으나, 발효말기에는 세균이 35% 그리고 효모가 65%를 차지하고 있었다. 약주의 2단 담금에서는 효모가 발효초기부터 발효말기까지 88%를 차지하고 있었다. API 20 C AUX 효모동정 kit를 이용하여 분리된 모든 효모 균주들을 동정한 결과 탁주와 약주 모두 *Saccharomyces cerevisiae*가 주점종을 이루고 있었고, 약·탁주의 모든 발효과정에서 *Candida magnoliae*가 계속적으로 발견되었다.

감사의 글

본 연구는 Biogreen 21 사업 연구결과의 일부로서 연구비 지원에 깊은 감사를 드립니다.

문 헌

1. Technical Service Institute of National Tax Service. Manufacturing guideline of alcoholic beverages. pp. 83-176 (1997)
2. Song HI, Shin JY. Modern fermentation technology. p. 193 (1995)
3. Lee SR. Korean Fermentative Food. Ewha Women's University publishing department. p. 205 (1986)

요 약

우리나라 전통 술인 탁주와 약주를 2단 담금 방법으로 제조하였을 때 발효 단계별 미생물 균총의 변화를 조사하기 위하여 탁·약주 제조 과정 중의 미생물 균수, pH, 적정산도, 알콜 함량의 변화를 측정하였고, 담금 단계별 시료의 미생물을 분리,

4. Shin KR, Kim BC, Yang JY, Kim YD. Characterization of *Yakju* prepared with yeasts from fruits. 1. Volatile components in *Yakju* during fermentation. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 28: 794-800 (1999)
5. Kim CJ. Microbiological and enzymological studies on *Takju* brewing. J. Korean Agric. Chem. Soc. 10: 69-100 (1968)
6. Jung JH, Jung ST. The changes of quality and microflora during the preservation of Korean *Takju*. J. Korean Agric. Chem. Soc. 28: 252-260 (1985)
7. Han EH, Lee TS, Noh BS, Lee DS. Quality characteristics in mash of *Takju* prepared by using different *Nuruk* during fermentation. Korean J. Food Sci. Technol. 29: 555-562 (1997)
8. Park YJ, Lee SK, Oh MJ. Studies on *Takju* yeasts. Part 1. Isolation and identification of *Takju* yeasts. J. Korean Agric. Chem. Soc. 16: 78-84 (1973)
9. Koh, CM, Choi, TJ, Lew, J. Microbiological studies on the *Takju* brewing: The Korean local wine. Korean J. Microbiol. 11: 167-174 (1973)
10. Kim JO, Lee BH. Taxonomical studies of yeasts in Korea-On yeasts isolated from *Takju*. Korean J. Microbiol. 8: 77-84 (1970)
11. Lee ZS, Rhee TW. Studies on the microflora of *Takju* Brewing. Korean J. Microbiol. 8: 116-133 (1970)
12. Shin YD, Cho DH. A study on the microflora changes during *Takju* brewing. Korean J. Microbiol. 8: 53-64 (1970)
13. KFDA. Code Food, Korea Food and Drug Association. Seoul, Korea (2003)
14. Cappuccino JG, Sherman N. Microbiology, a laboratory manual. 2nd ed. Benjamin Cummings. pp. 31-35 (1987)
15. Macfaddin JF. Biochemical test for identification of medical bacteria. 2nd ed. Williams and Wilkins (1980)
16. Sneath PHA. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2. Williams and Wilkins (1986)
17. Chung DH. Fermentation and microbial technology. Sunjin Munhwa. pp. 228-275 (1974)

(2004년 11월 9일 접수; 2005년 2월 4일 채택)