

전통 누룩으로부터 분리된 *Saccharomyces cerevisiae* HA3을 이용한 하향주의 제조 및 특성

정희경 · 박치덕 · 박환희¹ · 이기동 · 이인선 · 홍주현*
대구신기술사업단 전통생물소재산업화센터, ¹비슬산하향주

Manufacturing and Characteristics of Korean Traditional Liquor, Hahyangju Prepared by *Saccharomyces cerevisiae* HA3 Isolated from Traditional Nuruk

Hee-Kyoung Jung, Chi-Duck Park, Hwan-Hee Park¹, Gee-Dong Lee, In-Seon Lee, and Joo-Heon Hong*
DG-Traditional Bio-Materials Industry Center, ¹Mt. Biseul Hahyangju Co.

Abstract In order to standardize the manufacturing processes of Hahyangju, a traditional Korean liquor, 29 yeast strains were isolated from traditional Nuruk. Strain N8 exhibited a particularly strong resistance to sugar. Strains HA2, HA3 and HA4 grew successfully in medium containing 10% ethanol. In comparison with the growth exhibited by these strains when grown in a yeast malt extract medium, the ethanol production rates for the three strains were 10.8%, 10.45%, and 10%, respectively in a yeast malt extract medium containing 25% glucose. Based on these results, HA3 was the strain selected for use in the manufacturing processes of Hahyangju and it was identified as a *Saccharomyces cerevisiae* strain with 97% ITS sequence similarity. The use of *Saccharomyces cerevisiae* HA3 caused a decrease in the lactic acid content, acidity and growth of lactic acid bacteria in the fermentation mash. Following the addition of *Saccharomyces cerevisiae* HA3 to the manufacturing process of Hahyangju, the second fermentation mash showed a 22% increase in the alcohol production rate associated with traditional fermentation; however, the amino acidity, pH and reducing sugar content showed little change. Sensory evaluation of Hahyangju fermented with *S. cerevisiae* HA3 also showed better scores than Hahyangju mashed by the traditional method.

Key words: Nuruk, *Saccharomyces cerevisiae*, Korean traditional liquor, Hahyangju

서 론

술은 자연적으로 발생되어 지역, 민족, 기후 풍토 및 인간의 문화적 차이에 따라 여러 형태의 개성 있는 술로 발전되었으며, 우리나라도 독특한 주조법을 개발하여 민족 고유의 전통주를 갖게 되었다. 그러나 일체의 주세정책을 이어 받은 정부의 통제행정에 의해 자가양조가 금지되어 일제시대를 거치면서 우리나라 주류는 약주, 탁주, 소주로 획일화되고 민속주의 전승이 단절되었다.

1982년 문공부에서 전통민속주의 지정·조사를 통해 우리나라 전래 민속주에 대한 문헌을 중심으로 그 종류와 주조법상의 주종으로 분류 고찰을 시작으로 1994년도부터 과기처에서 주관하는 G-7 Project가 수행되면서 뒤늦게 전통누룩과 민속주의 품질향상과 산업화 기술에 대한 과학적인 제조방법의 연구가 진행되고 있다.

전통주에 대한 지금까지의 연구들을 살펴보면, 주로 재래식 주

조법으로부터 효율적인 제조기술의 개발(1-3), 술의 각종 이화학 성분 및 미생물학적 분석(4,5), 전통주의 저장성 연장 및 품질개선(6-8), 전통주의 생리기능성 물질 생산 탐색(9) 등이 보고되고 있다. 특히 전통주의 품질을 개량하거나 고급화하기 위하여 기존의 주조법으로 제조된 전통주에 약재를 첨가하거나(10-14) 양조용으로 선발된 균주를 이용하여 전통주를 제조하고자 하는 시도(15,16)도 있었다. 그러나 우리나라 전통주에 대한 연구는 기존의 주조법으로 제조된 전통주의 이화학적 특성 및 생리기능성 규명에만 치중되어 있으며, 이러한 기초연구를 바탕으로 전통주에 대한 주조법에서의 문제점을 파악하고 대량생산을 통해 상품화할 만한 예는 미흡한 실정이다.

특히 대구의 경우, 1996년 대구무형문화재 제11호로 지정된 지역 전통주인 하향주가 민속주으로써 현대까지 구전되어오고 있으며, 주요 문헌에도 등장하는 전통명주를 보유하고 있으나 아직 체계적인 조명이 이루어지지 않고 있으며, 현재 소량 생산을 하고 있다. 또한 양조기술에 대하여 정량화 및 계량화가 되어 있지 않아 균일한 생산이 어려운 실정이다.

따라서 본 연구에서는 지역고유의 전통주인 하향주에 대한 제조 기술을 표준화하고 대량생산을 위한 기초 연구로 주조시 이용되는 전통 누룩으로부터 미생물자원인 효모를 분리, 선발하고 선발된 효모를 이용하여 제조된 하향주의 발효 중 미생물학적 및 이화학적 특성 변화를 조사하고자 한다.

*Corresponding author: Joo-Heon Hong, DG-Traditional Bio-Materials Industry Center, Daegu 704-230, Korea
Tel: 82-53-602-1823
Fax: 82-53-602-1898
E-mail: betabio@empal.com
Received August 1, 2006; accepted October 10, 2006

재료 및 방법

누룩 및 하향주로부터 미생물 분리

대구 무형분화제 제11호인 하향주 제조를 위해 누룩으로부터 하향주 주조를 위한 효모를 분리하고자 하였다. 즉, 분쇄한 누룩 1 g에 멸균증류수 10 mL를 첨가하고 충분히 혼합한 후 10배 희석한 희석액 100 μ L를 yeast malt extract agar(agar 2%, glucose 1%, peptone 0.5%, yeast extract 3%, malt extract 3%, pH 6.0)에 도말하고 24시간 동안 28°C에서 배양시킨 후 생성된 집락을 분리하였다.

분리된 효모의 당 내성 측정

분리된 효모를 대상으로 당에 대한 내성 측정은 glucose를 40%, 50% 첨가한 yeast malt extract broth(glucose 1%, peptone 0.5%, yeast extract 3%, malt extract 3%, pH 6.0)에 분리된 효모를 1 loop 접종하고 28°C에서 180 rpm으로 24시간 동안 진탕배양 시킨 후 spectrophotometer(Ultraspec 2100, Amersham Biosciences, Sweden)를 이용하여 600 nm에서 흡광도를 측정하여 균주의 성장을 비교하였다. 이때 control은 2% glucose를 첨가한 yeast malt extract broth(YM broth)에서 분리된 효모균주의 성장으로 하였다.

분리된 효모의 에탄올 내성 측정

고농도 에탄올 발효 시에도 충분한 내성을 가지는 효모를 분리하기 위하여 ethanol이 각각 0, 5, 10, 15%의 농도로 함유된 YM broth 10 mL에 전 배양한 분리된 효모의 배양액을 0.1% 농도로 접종하고 28°C에서 5일간 배양 후 600 nm에서 흡광도를 측정하여 균의 생육을 조사하였다.

분리된 효모의 산 생성능 측정

분리된 효모의 산 생성능 조사를 위하여 산 생성배지(glucose 5%, yeast extract 0.5%, agar 2%, CaCO₃ 5%, pH 6.0)를 제조하고 분리된 효모를 tooth pick 접종하여 28°C에서 2일간 배양 후 균체 주변에 생성된 clear zone을 측정하였다.

분리된 효모의 에탄올 발효능 측정

분리된 효모의 에탄올 생성량은 25% glucose를 첨가한 100 mL YM broth에 전 배양한 효모 배양액 100 μ L를 접종하고 28°C에서 180 rpm으로 48시간 동안 진탕 배양시킨 후 10,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 배양 상등액을 회수하고 생성된 에탄올 함량을 측정하였다. 에탄올 함량은 비중법을 이용하여 배양상등액 100 mL를 증류한 다음 70%(v/v)를 메스실린더에 회수하고 다시 증류수를 이용하여 100 mL로 정용한 다음 주정계를 이용하여 측정하였다.

선발된 효모의 동정

전통 누룩으로부터 분리된 효모의 동정은 현미경상 형태적 특성 및 Biolog사의 동정시스템(Microlog TM4.0)을 이용하였으며 효모의 ITS sequence의 상동성을 조사하였다. 즉 분리된 효모 배양액으로부터 DNA를 정제하고 rDNA의 universal primer인 ITS 1(forward) ITS 4(reverse)를 이용하여 PCR 증폭하고 증폭된 PCR product를 솔젠트사에 의뢰하여 Applied Biosystems사의 3730XL Capillary DNA Sequencer를 이용하여 DNA 염기서열을 분석하였으며, 분석된 염기서열은 NCBI의 blast search 후 상동성을 조사하고 선발된 효모를 동정하였다.

Table 1. Composition of the Hahyang-ju mash

Materials	First mash	Second mash
Cooked glutinous rice	8 kg	80 kg
Nuruk	5 kg	5 kg
Water	12 L	78 L
Herb extract	-	20 L

Table 2. Condition for analysis of organic acid and amino acid during second fermentation

Organic acid	Instrument: Alliance HT Waters 2975 (Waters Co.)
	Column: Aminex HPX-87H 7.8 \times 300 mm
	Detector: Waters 24828(UV 210 nm)
	Mobile phase: 0.008 N H ₂ SO ₄
Amino acid	Flow rate: 0.4 mL/min
	Oven temp.: 35°C
	Instrument: Biochrom 30 (Biochrom Ltd.)
	Column: U-1631 4.6 \times 200 mm (Biochrom Ltd.)
	Sample processor: MIDAS (Spark Holland BV, Netherlands Loop volume 200 μ L
	Injection volume: 40 μ L
	Buffer: Buffer 1 Lithium citrate buffer A pH 2.8, 0.2 M
	Buffer 2 Lithium citrate buffer B pH 3.0, 0.3 M
	Buffer 3 Lithium citrate buffer CII pH 3.15, 0.5 M
	Buffer 4 Lithium citrate buffer DII pH 3.5, 0.9 M
Buffer 5 Lithium citrate buffer pH 3.55 1.65 M	
Buffer 6 Lithium hydroxide solution 0.3 M	
Reagent: Ultra Ninhydrin reagent Kit (Biochrom Ltd.)	
Flow rate: Buffer 20 mL/h, Ninhydrin 20 mL/h	

선발된 효모를 이용한 하향주 제조

하향주의 원료 조성은 Table 1과 같으며, 대구광역시 달성군 유가지역의 찰쌀만을 이용하여 고두밥을 만들고 냉각 후 밀술과 덧술, 즉 1단 담금만 수행하여 제조 하였다. 덧술 제조 시에는 들국화, 인동초, 약쑥을 각각 300 g씩 1:1:1로 혼합하여 열수 추출한 추출물을 20 L 첨가하여 제조하였으며, 밀술을 5~7일간 발효 한 후 덧술을 제조하여 약 60일 간 발효시켰다. 전통발효 방법의 단점인 초기 발효력 부족을 보완하기 위해 제조된 입국당 화액에 YM broth에서 24시간 배양 시킨 선발효모 *Saccharomyces cerevisiae* HA3 배양액 1.5 L를 밀술 담금시 주모로 첨가하여 전통적인 방법과 비교하여 보았다. 발효과정 중 미생물학적 및 이화학적 특성 조사를 위하여 밀술 발효가 완료되고 덧술 제조 후 30일 간은 3일 간격으로, 그 이후에는 15일 간격으로 시료를 취하였으며 미생물학적 변화, pH, 산도, 환원당함량, 알콜 함량은 국제형 주류분석방법(17)에 의거하여 조사하였다. 즉 산도는 0.1 N NaOH로 중화 적정하여 소비된 0.1 N NaOH의 mL수로 나타내었고, 아미노산도는 formol 적정법으로 측정하였다. pH는 pH meter(Mettler Toledo, Swiss)로 분석하였고, 알콜 함량은 술덧 100 mL를 증류하여 주정계를 이용한 부침법으로 측정한 후 온도 15°C로 보정하여 에틸알콜 함량으로 나타내었다. 환원당 함량은 DNS 법으로 측정하였고, 표준당으로 포도당을 사용하여 환원당량을 나타내었다. 또한 하향주 술덧의 유기산과 아미노산 함량 분석은 시료를 3,000 rpm에서 10분간 원심분리 한 후, 0.45 μ m membrane filter로 여과하여 Table 2와 같은 조건에서 기기분석을 통하여 발효 양상을 분석하였다.

Table 3. Effect of glucose on yeast isolated from traditional Nuruk

Strain No.	Glucose concentration (%)		
	2	40	50
N1	2.693 ¹⁾	1.948	1.557
N2	2.620	1.925	1.708
N3	2.586	2.047	1.757
N4	2.552	1.955	1.691
N5	2.540	2.028	1.769
N6	2.440	1.970	1.750
N7	2.715	1.895	1.572
N8	2.554	2.023	2.009
N9	2.564	1.987	1.672
N10	2.532	2.271	1.672
N11	2.514	2.087	1.603
N12	2.572	1.862	1.810
N13	2.679	1.893	1.554
N14	2.686	1.892	1.590
N15	2.568	1.973	1.728
N16	2.657	1.935	1.563
N17	2.478	1.903	1.844
N18	2.490	1.945	1.596
N19	2.346	2.155	1.573
N20	2.590	1.931	1.681
N22	2.359	2.044	1.709
N23	2.162	1.561	1.271
N24	2.511	1.909	1.593
N25	2.627	1.472	0.084
HA1	2.421	1.739	0.765
HA2	2.537	1.847	0.775
HA3	2.474	1.415	0.742
HA4	2.398	1.365	0.783

¹⁾Cell growth was measured with spectrophotometer at 600 nm.

Table 4. Effect of ethanol on yeast isolated from traditional Nuruk

Strain No.	Ethanol concentration (%)			
	0	5	10	15
N1	2.235 ¹⁾	1.940	0.146	0.098
N2	1.963	1.920	0.228	0.041
N3	1.868	1.792	0.291	0.097
N4	1.947	1.847	0.128	0.036
N5	1.859	1.750	0.224	0.094
N6	1.830	1.887	0.393	0.066
N7	1.945	1.858	0.108	0.105
N8	1.853	1.841	0.207	0.072
N9	1.862	1.840	0.325	0.106
N10	1.995	1.926	0.259	0.045
N11	1.984	1.809	0.241	0.054
N12	2.043	1.966	0.222	0.034
N13	1.943	1.994	0.112	0.090
N14	2.171	1.956	0.108	0.105
N15	1.962	1.922	0.252	0.053
N16	2.131	1.961	0.093	0.118
N17	1.934	1.887	0.222	0.036
N18	1.946	1.839	0.101	0.026
N19	4.961	1.888	0.230	0.047
N20	1.994	1.901	0.256	0.031
N22	1.933	1.901	0.712	0.082
N23	1.935	1.795	0.070	0.023
N24	1.937	1.872	0.275	0.042
N25	2.123	1.971	0.126	0.118
HA1	1.891	1.103	0.227	0.075
HA2	1.980	1.905	0.843	0.059
HA3	1.936	1.878	0.779	0.048
HA4	1.931	1.854	0.634	0.029

¹⁾Cell growth was measured with spectrophotometer at 600 nm.

관능검사

발효 60일째의 하향주의 관능적 기호도 조사는 음주 경험이 있는 전통생물소재산업화센터 소속 연구원 15명을 관능검사 요원으로 선정하여 실시하였다. *S. cerevisiae* HA3를 첨가하여 제조한 하향주와 전통 주조법으로 제조된 하향주를 대상으로 단맛, 신맛, 향기, 알콜 농도 및 전반적인 기호도를 5점 ‘매우좋다’에서 1점 ‘매우싫다’로 5점 Likert 척도를 사용하여 평가하였다. 자료 분석은 SPSS statistical program(v.11.01)을 이용하여 평균과 표준편차를 산출하고 각 변수에 대한 유의성 검증은 dependent sample t-test를 이용하였으며 유의수준은 $p < 0.05$ 수준에서 검증하였다(18).

결과 및 고찰

누룩 및 하향주로부터 미생물의 분리

대구 무형문화재 제11호인 하향주 제조용 전통 누룩으로부터 29개 효모를 분리 할 수 있었으며, 분리된 효모는 yeast malt extract agar(YM agar) 배지에 계대하여 4°C에서 보관하면서 본 연구에 사용하였다.

분리된 효모의 내당성

분리된 효모 29개 균주를 대상으로 glucose 40%, 50%를 첨가

한 YM broth에서의 균주의 생육과 control인 2% glucose를 첨가한 YM broth에서의 균주 생육을 비교한 결과 N25, HA1, HA2, HA3, HA4를 제외하고는 대체적으로 50% glucose가 첨가된 YM broth에서도 양호한 생육을 나타내었으며, 특히 분리된 효모 N8의 경우는 50% glucose 첨가시에도 control에서 균주 생육의 79%를 나타내고 있어 누룩으로부터 분리된 타 효모들(16)에 비해 내당성이 상당히 우수하였다. 주조에 이용되는 효모는 고농도의 당에서 충분히 생육을 하면서 알콜발효를 일으킬 수 있어야 함으로 누룩으로부터 분리한 효모들은 대체적으로 내당성이 우수하여 하향주 주조에 사용 가능성이 충분한 것으로 사료된다(Table 3).

분리된 효모의 에탄올 내성 측정 및 산 생성능

일반적으로 일정 알코올 농도에서는 효모의 생육이 저해되어 더 이상은 에탄올 발효가 일어나지 않는 것으로 알려져 있는데 (19) 고농도의 에탄올 생산을 위하여 주조시 이용되는 효모는 에탄올에 내성을 가지는 것이 필수적인 조건이다. 따라서 분리된 효모들을 대상으로 5, 10, 15%의 농도로 에탄올을 첨가한 YM broth에서의 효모 생육과 에탄올을 첨가하지 않은 YM broth에서의 생육을 비교한 결과, 배양 5일 뒤 5%의 에탄올을 첨가한 YM broth에서 분리된 효모들의 생육은 모두 양호하였으나 10% 에탄올 첨가시에는 N22, HA2, HA3, HA4 균주를 제외하고는 생육이

Table 5. Effect of acid production on yeast isolated from traditional Nuruk

Strain No.	Clear zone size (cm)	Symbol ¹⁾
N1	0.5	+
N2	3.0	+++
N3	1.7	++
N4	2.0	++
N5	1.0	+
N6	4.0	+++
N7	0.5	+
N8	2.0	++
N9	1.7	++
N10	2.0	++
N11	2.0	++
N12	2.0	++
N13	0.5	+
N14	0.5	+
N15	2.0	++
N16	0.5	+
N17	3.5	+++
N18	2.5	++
N19	2.0	++
N20	1.5	++
N22	2.5	++
N23	1.0	+
N24	2.0	++
N25	0.5	+
HA1	1.0	+
HA2	1.0	+
HA3	3.0	+++
HA4	3.0	+++

¹⁾ +++: 3 cm clear zone, ++: 1.5 cm clear zone, +: 0.5 cm clear zone.

급격히 저하되어 Seo와 Ryu의 보고(20)와 일치하였다(Table 4).

분리된 효모를 산 생성능 배지에서 배양 후 균체 주변에 생성된 clear zone을 측정하여 균주의 산생성능을 조사한 결과 N2, N6, N17, HA3, HA4가 산생성능이 가장 우수하였으며, 그 외 분리된 효모들 모두 비교적 산생성능이 양호 하였다(Table 5). 이는 에탄올 발효가 진행됨에 따라 젖산균의 생육은 약화되더라도 효모의 산생성에 의해 발효과정 중 술의 pH를 저하시켜 부패균이나 발효와 관계없는 타 미생물의 오염에 대해 생육을 저해하고 이상발효를 방지 할 수 있을 것으로 생각되어진다.

에탄올 발효능 측정 및 주조용 효모 최종 선발

분리된 효모 29개 균주를 대상으로 에탄올 내성, 산생성능, 내당성의 결과를 토대로 하여 N2, N3, N5, N6, N8, N12, N17, N18, N22, HA1, HA2, HA3, HA4를 하향주의 대량생산을 위해 산업용으로 이용할 수 있는 효모로 1차 선발하였으며, 1차 선발된 13개 균주를 대상으로 25% glucose를 첨가한 YM broth에서 48시간 배양한 후 각 균주의 에탄올 생성량을 주정계로 측정된 결과, HA2, HA3, HA4가 에탄올 생성량이 각각 10.8, 10.45, 10%로 선발된 균주들 중 가장 우수하였다(Table 6). 이들은 Kang 등(21)이 보고한 균주들보다 단 시간에 고농도의 에탄올을 생성하였으며, 전통주 발효뿐만 아니라 에탄올 발효 공업에서도 이용 가능한 산업용 균주로의 가능성을 확인하였다.

Table 6. Alcohol contents of broth fermented by selected yeast strains in YM broth containing 25% glucose for 48 hours

Strain No.	Alcohol contents (%)
N2	2.8
N3	3.0
N5	4.4
N6	7.0
N8	3.6
N12	3.2
N17	7.2
N18	3.2
N22	6.2
HA1	8.4
HA2	10.8
HA3	10.4
HA4	10.0

에탄올 생성능이 우수한 HA2, HA3, HA4는 내당성과 에탄올 발효능은 서로 큰 차이가 없었으나, 산생성능은 HA3, HA4, 내알콜성은 HA2, HA3이 우수하였다. 따라서 하향주 주조를 위한 산업적 이용 효모로 HA3을 최종 선발하였다.

선발된 효모 HA3의 동정

하향주 제조를 위하여 선발된 주조용 효모인 HA3의 동정을 위하여 Biolog사의 동정시스템(MicrologTM 4.0)으로 1차 동정 후 ITS 1 primer (5'-TCCGT AGG TGAACCTGCGG-3'), ITS 4 primer (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')를 이용하여 PCR 증폭 후 partial 18S r DNA sequence를 이용하여 NCBI의 blast search를 수행한 결과, *Saccharomyces cerevisiae*에 97% 상동성을 나타내어 *Saccharomyces cerevisiae* HA3으로 명명하였다(Fig. 1).

선발된 효모를 이용한 하향주의 제조특성

발효시간에 따른 미생물학적 변화: 덧술 발효에서 효모와 젖산균의 개체 수를 조사한 결과(Fig. 2), 담금 직후 효모 개체수의 경우 주모 첨가균은 9×10^5 cfu/mL, 무첨가균은 2.5×10^5 cfu/mL로 발효 초기부터 차이가 나타났다. 또한 전통적인 방법으로 발효한 경우에는 발효 9일째 8.9×10^7 cfu/mL로 개체수가 가장 많았고 9일 이후부터 빠르게 감소하였으나 주모를 첨가한 경우는 효모의 초기 생육 양상은 비슷하였지만 계속적으로 효모 증식이 유도되어 12일째 1.76×10^8 cfu/mL로 개체 수가 가장 많았고, 무첨가균과는 달리 발효 18일까지 감소되지 않고 일정하게 유지된 후 감소되기 시작하였다. 젖산균의 경우에는 담금 직후 주모 첨가균이 2.17×10^6 cfu/mL, 무첨가균이 4.17×10^8 cfu/mL로 개체 수의 차이가 아주 크게 나타났다. 발효 초기에 젖산균의 수가 차이는 것은 주모를 첨가함으로써 밀술 발효시 효모의 생육이 빠르게 유도되어 상대적으로 젖산균의 증식이 억제되었기 때문으로 생각된다.

발효시간에 따른 산도 변화: 술의 발효에서 적정한 산도 유지는 유해 미생물의 오염을 막아주는 역할을 하게 되며, 술의 맛에도 많은 영향을 주게 된다. 하지만 지나치게 높은 산도의 형성은 주질을 나쁘게 하므로 적절하게 관리되어야 한다. 이를 위해서 하향주 덧술의 발효 과정에서 산도를 분석한 결과(Fig. 3), 주모를 첨가하지 않은 전통 방법을 이용한 발효에서는 담금 직후 3.46이었으며, 초기 3일 동안 급격히 증가하여 15일째 8.25를 최고로

Query 27 TTTT TTTG TTTTGGCAAGAGCATGAGAGCTTTACTGGGCAAGAAGACAAGAGATGGAGA 86
 |||
 Sbjct 54 TTTT TTTG TTTTGGCAAGAGCATGAGAGCTTTACTGGGCAAGAAGACAAGAGATGGAGA 113
 Query 87 GTCCAGCCGGGCTGCGCTTAAGTGGCGGTCTTCTAGGCTTGAAGTTCTTTCTTCTGC 146
 |||
 Sbjct 114 GTCCAGCCGGGCTGCGCTTAAGTGGCGGTCTTCTAGGCTTGAAGTTCTTTCTTCTGC 173
 Query 147 TATTCCAACCGTGAAGAGATTCTGTGCTTTGTTATAGGACAATAAAACCGTTTCAAT 206
 |||
 Sbjct 174 TATTCCAACCGTGAAGAGATTCTGTGCTTTGTTATAGGACAATAAAACCGTTTCAAT 233
 Query 207 ACAACACACTGTGGAGTTTTCATATCTTTGCAACTTTTCTTTGGCATTGAGCAATCG 266
 |||
 Sbjct 234 ACAACACACTGTGGAGTTTTCATATCTTTGCAACTTTTCTTTGGCATTGAGCAATCG 293
 Query 267 GGGCCAGAGGTAACAAAACACAACAATTTATTTATTCATTAATTTTGTCAAAAACA 326
 |||
 Sbjct 294 GGGCCAGAGGTAACAAAACACAACAATTTATCTATTCAAATTTTGTCAAAAACA 353
 Query 327 AGAATTTTCTGTAAGTGAATTTTAAAATATAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGT 386
 |||
 Sbjct 354 AGAATTTTCTGTAAGTGAATTTTAAAATATAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGT 413
 Query 387 TCTCGCATCGATGAAGAAGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTAATGCGAATTCGCT 446
 |||
 Sbjct 414 TCTCGCATCGATGAAGAAGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTAATGCGAATTCGCT 473
 Query 447 GAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCCAGGGGGCATGCGCTGT 506
 |||
 Sbjct 474 GAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCCAGGGGGCATGCGCTGT 533
 Query 507 TGAGCGTCAATTCCTTCTCAAACATCTGTGTTGGTAGTGAGTGATACTCTTTGGAGTAA 566
 |||
 Sbjct 534 TGAGCGTCAATTCCTTCTCAAACATCTGTGTTGGTAGTGAGTGATACTCTTTGGAGTAA 593
 Query 567 CTTGAAATGCTGGCCTTTTCAATGGATG-TTTTTTTTCCAAAAGAGAGTTTCTCTGCG 625
 |||
 Sbjct 594 CTTGAAATGCTGGCCTTTTCAATGGATGTTTTTTTTTCCAAAAGAGAGTTTCTCTGCG 653
 Query 626 TGCTTGAGGTATAATGCAAGTACGGTCTGTTTTAGGTTTACCAACTGCGGCTAATCTTT 685
 |||
 Sbjct 654 TGCTTGAGGTATAATGCAAGTACGGTCTGTTTTAGGTTTACCAACTGCGGCTAATCTTT 713
 Query 686 TTATACTGAGCGTATTGGAACGTTATCGATAAGAAGAGAGCGCTAGGGCAACAATGTC 745
 |||
 Sbjct 714 TTATACTGAGCGTATTGGAACGTTATCGATAAGAAGAGAGCGCTAGGGCAACAATGTC 773
 Query 746 TTAAGTTTGACCTCAAATCANGTAGGAGTA-CCGCTGACTTAGCATATC 794
 |||
 Sbjct 774 TTAAGTTTGACCTCAAATCAGGTAGGAGTACCCGCTGACTTAGCATATC 823

Fig. 1. Alignment of partial 18S rDNA sequence of the strain HA3 with *Saccharomyces cerevisiae*. Query: Partial 18S rDNA sequence of strain HA3 amplified with primer ITS-1(5'-CCGTAGG TGAACCTGCGG-3') and primer ITS-4 (5'-TCCCTCCGCTTATTG ATATGC-3'), Subject: *Saccharomyces cerevisiae* strain W36 18S rDNA gene (internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2) from blast result.

큰 변화가 일어나지 않았다. 주모를 첨가한 경우에는 담금 직후 1.94였으며, 발효 18일까지 서서히 증가하여 3.46까지 증가한 후 완만하게 감소하였다. 주모를 첨가하지 않은 전통 발효에서 산도가 높게 나타나는 것은 주모를 첨가한 것과 비교 시 초기의 젖산균 개체수가 많은 것에 기인하는 것으로 생각되며, 산도가 높지 않은 관능적으로 우수한 명주의 개발을 위해 주모 사용을 통해 발효력을 향상 시켜야 한다는 보고(1)와 같이 적절한 산도의 유지를 위해서도 주모 첨가의 필요성을 다시 한 번 확인할 수 있었다.

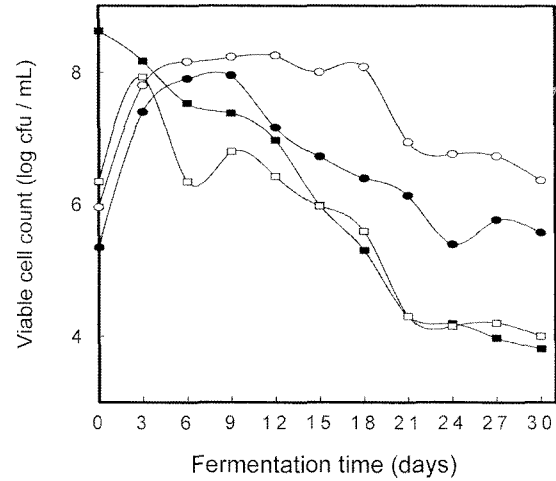


Fig. 2. Change of yeast and lactic acid bacteria counts during fermentation of second mash. ○: yeast (fermentation with yeast), ●: yeast (fermentation without yeast), □: lactic acid bacteria (fermentation with yeast), ■: lactic acid bacteria (fermentation without yeast).

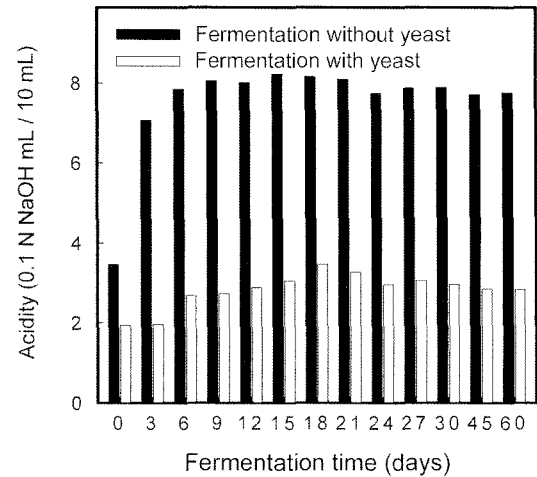


Fig. 3. Change of acidity during fermentation of second mash.

발효시간에 따른 아미노산도 및 pH의 변화: 아미노산은 술의 풍미에 중요한 역할을 하는 반면에 여과 후 침전물을 형성하는 주요 원인이 되기도 한다. 하향주 술덧의 아미노산도를 분석해 본 결과, 주모 무첨가군은 담금 직후 2.55, 첨가군은 1.95로 나타났다. 이후 발효가 진행됨에 따라 60일 까지 서서히 증가하여 각각 3.22, 2.96으로 주모 첨가군이 다소 낮게 유지되었으나 유의적인 차이는 나타나지 않았으며, 발효 전 과정 동안 양호한 수준의 아미노산도를 유지하는 것으로 나타났다(Fig. 4).

pH의 관리는 술의 발효에 있어서 가장 중요한 부분이다. 발효 초기에 pH를 4정도로 감소시킴으로써 유해 미생물의 오염을 방지하면서 안정적인 발효를 유도할 수 있게 된다. 따라서 하향주의 발효과정 동안 pH를 조사 해 본 결과, 주모를 첨가하지 않은 전통 발효에서 담금 직후 4.06으로 적당한 pH를 나타내었고, 주모를 첨가한 경우는 4.88로 다소 높게 분석되었다(Fig. 5). 주모 첨가군은 발효 9일까지 감소하다가 이후 완만하게 증가하였으며, 무첨가군의 경우는 초기 3일간 감소하다가 이후 서서히 증가하는 경향을 나타내어 발효 60일에는 각각 4.56, 3.95로 나타났다. 발효 초기에 주모를 첨가하지 않은 전통발효에서 pH가 낮게 유

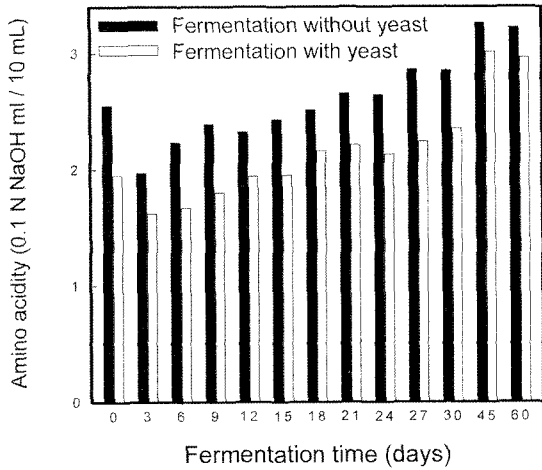


Fig. 4. Change of amino acidity during fermentation of second mash.

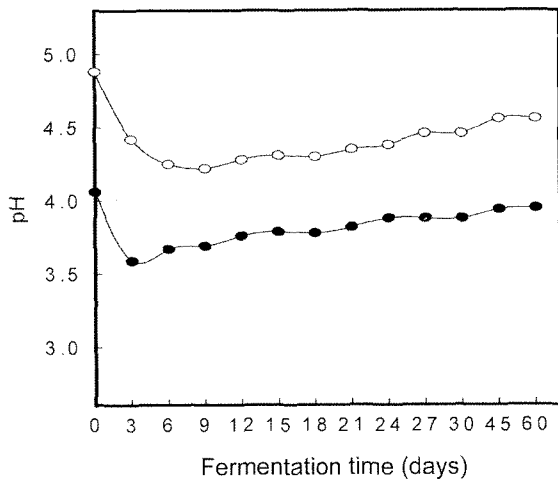


Fig. 5. Change of pH during fermentation of second mash. ○: fermentation with yeast, ●: fermentation without yeast.

지되는 것은 밑술의 발효에서 젖산균의 증식이 주모를 첨가한 경우보다 왕성하게 증식하였기 때문이다.

발효시간에 따른 환원당 함량의 변화: 하향주 덧술 발효 과정 중 환원당 함량의 변화는 주모를 첨가하지 않은 전통 발효에서는 담금 직후 15.3%, 주모를 첨가하여 제조한 경우는 10.3%로 담금 직후 주모를 첨가하지 않은 전통발효에서 환원당이 높게 나타났다. 환원당 함량의 변화 양상은 타 전통주인 소곡주, 백히주, 과하주, 삼해주의 발효 시 환원당 변화 양상(2)과 유사하였는데 주모 첨가군과 무첨가군 모두 초기 6일 동안 급격하게 감소되었고, 18일 이후 1% 미만으로 거의 차이가 없이 유지되었다(Fig. 6). 발효 초기 6~9일 동안 환원당의 급격한 감소는 알콜 발효가 왕성한 시기와 일치하여 효모의 알콜 발효 시 당을 이용함에 따라 환원당이 감소되었다는 것을 알 수 있었다.

발효시간에 따른 알콜 함량의 변화: 덧술 초기에 알콜의 적정한 농도(5~10%)는 pH와 함께 유해 미생물의 오염 방지 효과와 동시에 효모의 알콜 내성 증진 및 발효력 향상에도 영향을 주는 요소이다(22). 하향주 술덧 발효 과정 중 알콜의 함량 변화를 조

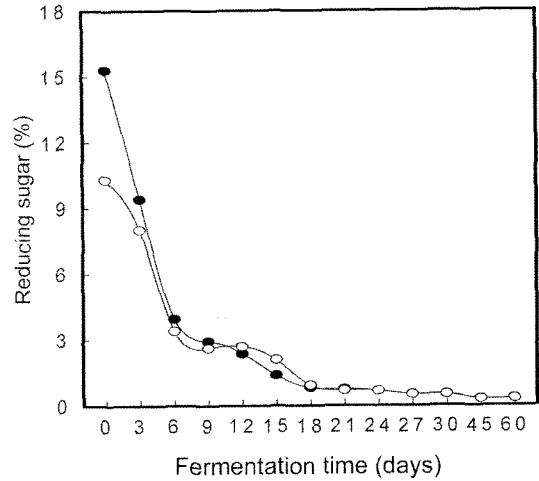


Fig. 6. Change of reducing sugar content during fermentation of second mash. ○: fermentation added yeast, ●: fermentation added none.

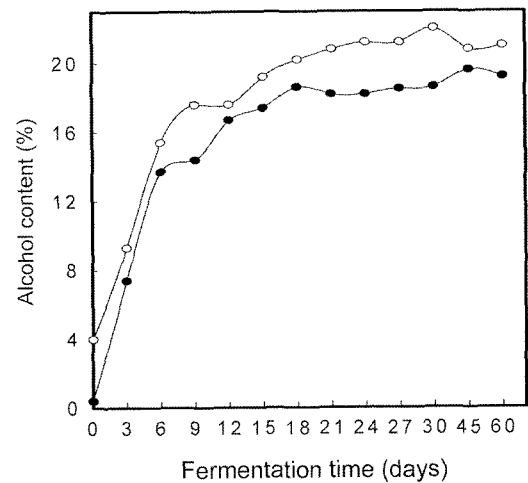


Fig. 7. Change of alcohol content during fermentation of second mash. ○: fermentation with yeast, ●: fermentation without yeast.

사한 결과, 주모첨가를 하지 않은 전통 발효에서는 담금 직후 알콜 함량이 0.4%로 아주 낮게 나타났고, 주모를 첨가한 경우에는 4%로 비교적 양호한 수준으로 나타났(Fig. 7). 발효 9일까지는 알콜 발효가 왕성하게 일어났으며, 주모 무첨가군의 경우에는 발효 18일까지 증가한 이후 거의 변화가 없었으며 60일째는 19.2%로 주모의 첨가 없이 전통적인 방법으로 발효한 타 전통주(1,2)의 알콜 농도와 비교시 상대적으로 높게 나타났다. 그리고 주모를 첨가한 경우는 증가속도는 미미하지만 발효 30일까지 알콜이 증가하였으며, 60일째 21%로 아주 높은 알콜 발효력을 나타내어 주모의 첨가가 전통주의 알콜 생산을 좌우한다는 Kim 등의 보고(1)와 같이 주모의 첨가가 알콜의 생산에 큰 영향을 미칠 수 있었다. 또한 환원당 함량의 변화를 바탕으로 당의 소비 경향은 알콜 생산량 변화와 유사하였다.

발효시간에 따른 유기산 및 유리아미노산 함량의 변화: 유기산은 술 맛을 결정하는데 없어서는 안 되는 중요한 요소 중 하나이다. 하향주 발효 60일 후 유기산 함량의 변화를 분석한 결과, 무첨가군에서 lactic acid(59%)>succinic acid(26%)> malonic

Table 7. Organic acid components during fermentation of second mash

(Unit: mg/100 mL)

Organic acid	Fermentation time (days)							
	None added fermentation				Yeast added fermentation			
	15	30	45	60	15	30	45	60
Citric acid	18	14	11	38	15	-	-	36
Tartaric acid	24	7	5	24	25	2	3	30
Malic acid	82	25	20	49	51	6	4	35
Malonic acid	79	26	25	67	40	32	33	126
Succinic acid	169	202	230	370	169	205	322	657
Lactic acid	602	598	537	794	200	187	183	357

Table 8. Amino acid components during fermentation of second mash

(Unit: mg/100 mL)

Amino acid	Fermentation time (days)							
	None added fermentation				Yeast added fermentation			
	15	30	45	60	15	30	45	60
Asp	10.361	16.745	22.837	25.783	6.002	9.753	19.696	22.804
Thr	3.480	5.191	6.999	8.311	2.853	4.927	8.863	10.366
Ser	5.678	9.377	12.853	14.930	3.954	7.766	17.499	20.789
Glu	18.232	24.719	30.477	32.182	12.575	20.109	29.534	31.573
Pro	35.238	37.971	41.836	43.077	50.025	6.707	57.871	58.931
Gly	8.149	12.205	15.766	16.972	6.406	9.792	16.678	18.995
Ala	14.113	23.467	29.944	31.905	9.307	16.447	29.287	32.994
Val	8.153	10.360	13.663	14.614	7.468	12.479	19.100	20.535
Met	3.642	5.431	7.451	9.065	2.753	4.249	8.586	10.163
Ile	4.476	6.541	8.883	23.989	2.316	7.787	12.265	14.202
Leu	12.259	19.226	26.153	29.378	12.658	20.627	33.403	37.020
Tyr	11.225	14.763	18.322	18.097	11.104	16.591	22.733	22.493
Phe	12.864	15.168	19.718	25.153	12.418	15.745	23.653	29.335
Lys	7.024	13.022	18.883	21.477	8.685	14.464	21.404	24.124
His	4.895	7.342	8.736	8.399	2.675	5.815	8.011	8.902
Arg	18.259	29.756	39.994	42.144	20.271	32.899	43.222	45.856
Total	178.048	251.284	322.5153	65.476	171.465	256.157	371.805	409.082

acid > malic acid > citric acid > tartaric acid 순이었으며, 부드러운 신맛을 나타내는 lactic acid가 가장 많이 존재하였다(Table 7). 그러나 주모 첨가시에는 쌀을 주원료로 한 탁주에서도 흔히 나타나는 주요 맛 성분으로 감칠맛인 succinic acid가 53%로 가장 높게 나타났으며 그 다음으로 lactic acid 28.8%, malonic acid 10% 차지하는 것으로 나타났다. Kim 등(15)은 선발된 효모를 누룩에 처리한 경우에 여전히 lactic acid 함량이 높은 것으로 보고 한 바 있어, 젖산의 함량을 낮추고 산도의 조절을 위해 본 연구와 같이 주모인 효모를 술의 제조과정 중 직접 첨가하는 것이 더 효율적이라 사료된다.

유리아미노산의 변화는 주모 첨가군과 무첨가군에서 유의한 차이를 나타내지는 않았으며, 주모 첨가군과 무첨가군에서 동일하게 proline이 가장 높았고, alanine, leucine, arginine등이 가장 많이 존재하였으며(Table 8), 전반적으로 발효기간이 증가됨에 따라 증가하는 경향이었고, methionine 함량이 전체 아미노산 함량의 약 2%로 상대적으로 낮았다. 이것은 식물체를 주원료로 한 양조술에서는 식물체의 아미노산 중 함유아미노산이 상대적으로 낮아 methionine 함량이 낮다는 연구 결과와 동일하였다(23,24).

타 전통주 분석 결과에 따르면 술에서 생성된 아미노산은 주로 acid protease에 의한 단백질 분해에 기인하며, 시간이 지날수

록 감소한다고 보고되고 있다(24). 그러나 하향주의 경우는 발효기간이 증가하면서 대체적으로 아미노산 함량이 점진적으로 증가하였으며, 이는 하향주 제조시 첨가한 전통 누룩에 있는 acid protease의 높은 활성 때문이라고 사료된다. 또한 아미노산은 아미노산 발효에 의해서 유기산이나 fusel oil 또는 자체 동화물질 등으로 전이 되어 악취를 유발 하는 것으로 알려져 있다(24). 따라서 아미노산의 증가폭이 크지 않은 60일 이후에는 아미노산의 감소가 예상되므로 60일 이후 적정한 시기에 양조는 마치고 제성에 들어가는 것이 바람직 할 것으로 사료된다.

관능적 기호도 조사

하향주의 관능적 기호도 조사결과는 Table 9와 같았다. 신맛의 경우 *S. cerevisiae* HA3을 첨가하여 제조한 하향주가 4.1 ± 0.4 로 기호도가 높았는데, 이러한 결과는 *S. cerevisiae* HA3 첨가하여 발효한 경우 Fig. 2와 같이 발효 중 효모의 빠른 우점화로 젖산균의 증식이 억제됨에 따라 lactic acid 함량이 감소하였을 뿐만 아니라 전체적 유기산 함량이 낮아진 까닭으로 생각된다. 반면 술에서 단맛은 주모를 이용하여 제조한 술과 전통적으로 제조한 술에서 발효완료시 환원당의 차이가 없는 것과 같이 기호도에서도 큰 차이가 없었다. 향기의 경우, 기호도 조사 항목 중 가장

Table 9. Comparison of Hahyangju fermented by *S. cerevisiae* HA3 and traditional method on sensory evaluation¹⁾

Mash method	Sweetness	Sourness	Flavor	Alcohol concentration	Overall acceptability
Fermentation added yeast	3.6 ± 0.5	4.1 ± 0.4	2.8 ± 0.4	3.0 ± 0.7	4.2 ± 0.5
Traditional method	3.4 ± 0.6	2.0 ± 0.5** ²⁾	2.4 ± 0.4	3.2 ± 0.5	3.3 ± 0.8*

¹⁾5: like extremely, 4: like, 3: neither like nor dislike, 2: dislike, 1: dislike extremely.

²⁾Significant difference ($p < 0.05$) between *S. cerevisiae* HA3 and traditional method.

낮은 기호도를 나타내어 향미를 강화하거나 누룩의 이취를 감소시켜 하향주의 향미에 대한 기호도를 증가시키기 위한 연구의 시도가 필요한 것으로 판단되어진다. 알콜 농도는 큰 차이는 없었으나 현재 주류의 시장경향을 반영하여 다소 낮은 알콜 농도를 나타내는 전통 방법으로 제조한 하향주에서 다소 높게 나타났다. 전반적 기호도는 Kim 등(1)의 보고와 같이 주모를 사용하여 제조한 하향주가 높음을 확인하였다.

요 약

대구 무형문화재인 하향주 생산의 표준화를 위하여 전통 누룩으로부터 29균주의 효모를 분리하다. 이들을 대상으로 산 생성능을 측정 한 결과, 분리된 효모들은 산 생성능이 비교적 양호 하였고 분리된 효모들을 50% glucose가 첨가된 YM broth에서도 생육이 우수하였다. 10% 에탄올 농도에서도 내성을 나타내는 HA2, HA3, HA4 균주를 대상으로 주정계를 이용하여 에탄올 생성능을 측정 한 결과, 각각 10.8%, 10.45%, 10%로 단 시간에 고농도의 에탄올을 생산하였다. 분리된 효모 중 내당성, 산생성능, 에탄올 생성능, 에탄올 내성이 우수한 효모 HA3을 하향주 주조를 위한 산업적 이용 균주로 최종 선발하였고 ITS영역 증폭을 통하여 동정한 결과, HA3은 *Saccharomyces cerevisiae*와 97% 상동성을 나타내어 *Saccharomyces cerevisiae* HA3로 명명하였다. 선발된 효모인 *Saccharomyces cerevisiae* HA3를 주모로 첨가하여 하향주를 제조하여 전통적 방법으로 제조되는 하향주 발효와 비교한 결과, 환원당의 함량, 아미노산함량 pH 변화는 큰 차이가 없었으나 주모 첨가는 밀술 발효시 효모의 생육이 빠르게 유도되어 상대적으로 젖산균의 증식이 억제시킴으로써 유기산 중 lactic acid의 함량 및 높은 산도를 낮출 수 있었으며, 22%로 높은 알콜 발효력을 보였다. 또한 주모를 첨가하여 제조한 하향주는 관능적 기호도 평가에서 전반적 기호도가 전통적 제조법으로 제조한 하향주보다 우수함을 확인하였다.

감사의 글

이 논문은 지역산업기술개발사업 예산으로 추진된 연구의 일부분으로서 연구비를 지원하여 주신 산업자원부에 감사를 드립니다.

문 헌

- Kim IH, Park WS. Comparison of fermentation characteristics of Korean traditional alcoholic beverage with different input step and treatment of rice and Nuruk Korean-style bran koji. Korean J. Diet. Cult. 11: 339-348 (1996)
- Kim IH, Park WS, Koo YJ. Comparison of fermentation characteristics of Korean traditional alcoholic beverages prepared by different brewing methods and their quality changes after aging. Korean J. Diet. Cult. 11: 497-506 (1996)
- Lee SS, Kim KS, Eom AH, Sung CK, Hong IP. Production of Korean traditional rice wines made from cultures of the single

- fungus isolates under laboratory conditions. Korean J. Mycol. 30: 61-65 (2002)
- So MH. Changes in the chemical components and microorganisms in Sogokju - mash during brewing. Korean J. Food Nutr. 5: 69-76 (1992)
- So MH, Lee YS, Noh WS. Changes in microorganisms and in components during Takju brewing by a modified nuruk. Korean J. Food Nutr. 12: 226-232 (1999)
- Chung JH, Mok CK, Lim SB, Park YS. Quality improvement of foxtail millet Yakju by ultrafiltration process. Food Engin. Prog. 9: 133-138 (2003)
- Kang YJ, Koh JS. Improvement on the filtration process of foxtail millet Yakju. Korean J. Food Preserv. 10: 482-487 (2003)
- Bae IY, Yoon EJ, Woo JM, Kim JS, Lee HG, Yang CB. The development of Korean traditional wine using the fruits of *Opuntia ficus-indica* var. *saboten-l*, characteristics of mashes and Soju. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. 45: 11-17 (2002)
- Kim JH, Lee DH, Choi SY, Lee JS. Characterization of physiological functionalities in Korean traditional liquors. Korean J. Food Sci. Technol. 34: 118-122 (2002)
- Kim JH, Lee SH, Kim NM, Choi SY, Yoo JY, Lee JS. Manufacture and physiological functionality of Korean traditional liquor by using Dandelion. Korean J. Microbiol. Biotechnol. 28: 367-371 (2000)
- Han KH, Lee JC, Lee GS, Kim JH, Lee JS. Manufacture and physiological functionality of Korean traditional liquor by using purple-fleshed sweet potato. Korean J. Food Sci. Technol. 34: 673-677 (2002)
- Lee DH, Kim JH, Kim NM, Park JS, Lee JS. Manufacture and physiological functionality of Korean traditional liquors by using *Paecilomyces japonica*. Korean J. Mycol. 30: 142-146 (2002)
- Lee DH, Park WJ, Lee BC, Lee JC, Lee DH, Lee JS. Manufacture and physiological functionality of Korean traditional wine by using Gugija. Korean J. Food Sci. Technol. 37: 789-794 (2005)
- Kim JH, Jeong SC, Kim NM, Lee JS. Effect of Indian millet koji and legumes on the quality and angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of Korean traditional rice wine. Korean J. Food Sci. Technol. 35: 733-737 (2003)
- Kim JY, Go JS. Fermentation characteristics of Jeju foxtail millet-wine by isolated alcoholic yeast and saccharifying mold. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. 47: 85-91 (2004)
- Kim JY, Go JS. Screening of brewing yeasts and saccharifying molds for foxtail millet-wine making. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. 47: 78-84 (2004)
- National Tax Service. Analysis, assessment and research of alcoholic beverages and brewing raw materials. Tax Service Institute, Seoul, Korea, pp. 12-63 (1979)
- Park YM, Kim SJ, Hwang IS, Cho KH, Jung ST. Physicochemical and sensory properties of Jinyang-ju prepared with glutinous rice and nonglutinous rice. Korean J. Food Cult. 20: 346-351 (2005)
- So MH. Aptitudes for Takju brewing of wheat flour-Nuluku made with different mold species. Korean J. Food Nutr. 8: 6-12 (1995)
- Seo MJ, Ryu SR. Screening and characteristics of ethanol tolerant strain *Saccharomyces cerevisiae* SE211. Korean J. Microbiol. Biotechnol. 30: 216-222 (2002)
- Kang TY, Oh GH, Kim K. Isolation and identification of yeast strains producing high concentration of ethanol with high viability. Korean J. Microbiol. Biotechnol. 28: 309-315 (2002)
- Rhee CH, Woo CJ, Lee JS, Chung KT, Park HD. Characteristics of ethanol fermentation by a killer yeast, *Saccharomyces cerevisiae* B15-1. Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 24: 331-335

- (1996)
23. Kim SC, Kim HS, Kang YJ. Changes of components in the rice-porridge fermented by nuruk. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 28: 1017-1021 (1999)
24. Lee MK, Lee SW, Yoon TH. Quality assessment of yakju brewed with conventional nuruk. Korean J. Food Nutr. 28: 78-89 (1994)