

Rhizopus oryzae CCS01로 제조된 쌀누룩을 이용한 쌀-밀 막걸리의 품질 특성

서원택¹ · 조현국² · 이주영² · 김바오로¹ · 조계만^{1*}

¹경남과학기술대학교 식품과학부
²영농조합법인 오름주가

Quality Characteristics of Wheat-Rice *Makgeolli* by Making of Rice *Nuruk* Prepared by *Rhizopus oryzae* CCS01

Weon Taek Seo¹, Hyeon Kook Cho², Ju Young Lee²,
Baolo Kim¹, and Kye Man Cho^{1*}

¹Department of Food Science, Gyeongnam National University of Science and Technology, Jinju 660-758, Republic of Korea

²Farming Corporation OrumJooga Winery, Sacheon 664-070, Republic of Korea

(Received April 16, 2012 / Accepted June 11, 2012)

To improve of the quality of Korea traditional wheat-rice wine (*makgeolli*) production, we used a rice fermentation starter (rice *nuruk*) made by inoculation of *Rhizopus oryzae* CCS01 which was isolated and selected from commercial *nuruk*. Amylase activity of a rice *nuruk* was 1.8-2.4 times higher than those of commercial *nuruks*. The best acceptability of wheat-rice wine in a sensory test was observed at 4 : 6 ratio of wheat-rice mash at experimental condition. During the fermentation period, pH of wheat-rice *makgeolli* made with a rice *nuruk* was higher compared to those made with commercial *nuruks* such as Sanseong, Jinju, and Songhak. Acidity of *makgeolli* mash was lower in case of using a rice *nuruk* and birx and alcohol production were higher compared to those of *makgeolli* mash using commercial *nuruks*. Highest alcohol production was observed at *makgeolli* mash using a rice *nuruk* and 12% of alcohol was produced at fermentation end. These results suggest that production of a new type of wheat-rice *makgeolli* using a rice *nuruk* was possible.

Keywords: *Rhizopus oryzae* CCS01, alcohol fermentation, *makgeolli*, rice *nuruk*, wheat

막걸리는 우리나라의 전통주로 천여 년 이상 양조되어 왔으며 탁주 또는 농주라고도 한다(Yang *et al.*, 2011). 막걸리는 일반 술과 달리 각종 영양원이 풍부하게 함유되어 있다. 특히, 인체 신진대사에 관여하는 비타민 B군을 비롯하여 lysine, leucine 및 arginine 등의 필수 아미노산, 풍미물질인 ethylacetate 및 amylocetate, ethylcaproate 등의 ester (Lee, 1994; Lee and Han, 2001)와 새콤한 맛을 내어 갈증을 해소시켜주는 유기산, 그리고 간 기능을 도와주는 acetylcholine 등이 함유되어 있으며(Woo *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2011a), 이외에도 장내 유용균인 젖산균이 막걸리 700 ml에 약 7×10^{10} 이상을 함유하고 있고 최근 항암성이 보고됨에 따라 이들의 국내 소비는 물론 외국 수출이 급증하고 있다(Min *et al.*, 2011).

막걸리는 쌀, 옥수수, 고구마 및 밀 등의 전분질을 원료로 하

고 발효제로서 누룩이 있다. 누룩은 거칠게 빻은 낱말에 물을 가하고 성형하여 배양실에서 자연의 미생물을 번식시킨 것으로, 막걸리 발효 과정에서 전분질을 분해해서 포도당으로 만들어 주는 주요 효소원이 된다(Lee and Shim, 2010). 누룩의 종류와 제조장에 따라 다양한 미생물이 생육하게 됨에 따라 효소활성, 유기산 생성력 및 알코올 발효능 등이 달라지므로 막걸리의 휘발성 풍미 성분, 맛 및 색상 등의 품질특성에 큰 영향을 미치는 것으로 보고되어 있다(Han *et al.*, 1997; So and Lee, 2009; Woo *et al.*, 2010). 이러한 특성은 일정한 품질을 지닌 막걸리 생산관리에 어려운 점으로 대두되고 있다. 한편 막걸리의 국내 소비량뿐만 아니라 일본 수출량도 급격히 늘어나고 있는 시점에 막걸리 제조 방법이 한국적이지 못하다는 지적이 강력히 제기되고 있다. 전통 막걸리의 발효제는 누룩이나, 현재에는 대부분 일본에서 도입된 입국(koji) 방식으로 막걸리를 제조하고 있다(So and Lee, 2009). 최근 이런 문제들을 해결하기 위하여 전통누룩에서 우수한 곰팡이를 분리하고 이를 이용하여 입국의 주원료인 쌀로 제조한

*For correspondence. E-mail: kmcho@gntech.ac.kr; Tel.: +82-55-751-3272; Fax: +82-55-751-3279

개량누룩을 사용하여야 한다는 방안도 새롭게 제기되고 있다.

최근 경제 성장과 더불어 생활수준의 향상으로 식생활에도 많은 변화를 가져왔으며, 건강에 대한 관심이 높아지면서 소비자들은 안전하고 우수한 품질의 농산물을 선호하고 있으며, 특히 국내산 농산물을 외국산에 비해 상대적으로 안전하다고 인식하여 소비가 늘어나고 있다. 우리밀은 당질, 단백질 및 비타민 등이 우수한 영양 식품이고 신라, 백제시대의 유적 등에서 발견될 정도로 우리나라에서 오래된 작물이다(Kim et al., 2010, 2011c). 국내 소비되는 밀의 대부분이 수입에 의존하고 있는 실정이며, 2007년 기준 우리나라 쌀 자급률이 92.5%에 비해 밀의 자급률은 0.2%에 불과한 실정이다(Kim et al., 2010). 이에 정부의 노력과 농민 관련 단체를 중심으로 국내산 밀의 자급률을 높이기 위한 “우리밀 살리기 운동”이 추진되기 시작하여 우리밀 재배면적이 2005년 2395 ha에서 2010년에는 1만 2000 ha로 5배 이상 증가하였으며, 한국농어촌공사에서는 ‘식량위기’에 대응하고 녹색성장산업차원에서 유흥지를 활용하여, 밀 재배면적을 늘려 2017년에는 자급률 10%를 목표로 하고 있다(Kim et al., 2010). 그러나 현재 우리밀을 활용한 가공품으로는 제빵, 국수 및 파스타 제조가 대부분으로 우리밀 자급률 증대에 따른 소비 촉진을 위한 새로운 가공품 개발이 필요한 시점이다(Kim et al., 2008, 2011c; Park et al., 2009).

본 연구에서는 쌀 위주의 막걸리 제조에서 벗어나 밀을 혼용하여 양조하는 양질의 막걸리를 개발하기 위해 시판누룩에서 *Rhizopus* sp.를 분리하고 동정하여 *Rhizopus oryzae* CCS01로 명명하고 이 균주로 밀이 아닌 개량누룩인 쌀누룩을 제조하여 쌀-밀 혼합 막걸리 양조에 미치는 영향을 조사하였으며, 그 품질 특성을 보고하는 바이다.

재료 및 방법

재료 및 시약

쌀(일반미)은 함양군 소재 함양농협미곡처리장에서 구입하였고 밀은 하동군에서 재배된 우리밀(품종명: 금강밀)을 껍질만 약간 제거하여 도정한 도정밀을 사용하였다. 한편 시판누룩은 송화곡자(Gwangju, Korea) 및 진주곡자(Jinju, Korea), 산성누룩(Pusan, Korea)을 구입하여 사용하였다. 한편 막걸리 발효를 위한 효모는 한국종균협회(KCCM)에서 분양 받아 보관하고 있는 *Saccharomyces cerevisiae* KCCM 12684을 사용하였다.

일반성분 분석

쌀 및 도정밀의 수분, 회분, 조지방과 조단백 등 일반성분 함량은 식품공전의 일반시험법(KFSC, 2010)에 따라 분석하였다. 수분함량은 상압가열건조법으로 측정하였으며, 회분은 550°C에서 회화로를 사용한 건열회화법으로 회분함량을 분석하였다. 조지방 함량은 시료를 분쇄한 후 diethyl ether를 이용하여 Soxhlet법으로 측정하였으며, 조단백질의 함량은 Kjeldahl법으로 측정하였다. 탄수화물의 양은 전체 100%에서 상기 각 성분의 합을 뺀 값을 산술적으로 계산하였다. 각 실험은 3회 반복하여 수행하여 평균값으로 나타내었다.

R. oryzae CCS01 균주 분리 및 동정

시중에 판매되고 있는 시판누룩을 수집하여 분쇄하고 분쇄된 시료 10 g을 달아 90 ml 멸균 증류수에 넣고 강하게 흔든 후 1시간 동안 정치하고 상등액을 Potato dextrose agar (PDA, Difco, USA)에 chloramphenicol (1.5 mg/ml)이 함유된 배지에 도말하여 일주일간 배양한 후 전형적인 *Rhizopus* 형태의 포자를 선택하여 다시 순수분리 하였다. 순수 분리된 균주 CCS01의 포자를 PDA 배지 중앙에 접종하여 30°C 항온기에서 7일간 배양하여 균주 및 포자낭의 형태를 관찰하였다. 한편, CCS01 포자를 멸균증류수에 현탁시킨 후 원심분리하여 포자를 수집하였고 DNAzol kit (Invitrogen, USA)를 이용하여 genomic DNA를 분리하였다. 분리된 genomic DNA를 주형으로 하여 26S rDNA (0.6 kb)를 증폭하였다. 증폭은 94°C에서 1분간 변성, 52°C에서 30초간 풀림, 72°C에서 30초 신장으로 30 cycle로 수행하였다. 26S rDNA 단편 증폭을 위한 PCR primer는

5'-ACCCGCTGAAYTTAAGCATAT-3' (forward)과

5'-CTCCTTGGTCGTGTTCAAGAC-GG-3' (reverse)을 사용하였다(Joo et al., 2011). 증폭된 26S rDNA PCR 산물은 1% agarose에 전기영동하고 0.6 kb 단편을 회수 및 정제하고 pGEM-T Easy (Promega, USA)를 사용하여 클로닝하여 *Escherichia coli* DH5α에 형질전환 후 형질전환체를 무작위로 선정하여 순수 분리하였다. 순수 분리된 형질전환체를 50 µg의 ampicillin인 함유된 LB 액체배지에 접종하여 37°C에서 16시간 배양한 후 균체를 모집하고 Plasmid Purification Kit (Intron, Korea)에 기술된 대로 plasmid를 분리·정제하였다. 분리된 plasmid를 주형가닥으로 사용하여 DNA 염기서열을 결정하였다. 핵산 염기서열은 PRISM Ready Reaction Dye terminator/primer cycle sequencing kit를 사용한 dideoxy chain termination method를 이용하여 분석하였다. 26S rDNA 염기서열은 BLAST network service와 the nonredundant DNA sequence database를 제공하는 미국 국립생물정보센터(NCBI)에서 얻은 다른 균종의 26S rDNA와 비교·분석하였다. 26S rDNA 유사성 값은 DNAMAN analysis system (Lynnon Biosoft, Canada)를 사용하여 alignments, evolutionary distance로부터 계산하였다. Phylogenetic tree는 neighbour-joining method와 distance matrix data를 사용하여 확인하였다.

누룩 제조

25°C에서 7일간 배양한 *R. oryzae* CCS01의 배양 plate를 100 ml 멸균증류수에 현탁시키고 살균 탈지면에 여과하여 포자를 수집(6.0 log spores/ml)하여 누룩 제조를 위한 종균으로 사용하였다. 누룩의 제조는 멧쌀 3 kg을 달아 물로 세척한 다음 충분한 물을 공급하여 실온에서 12시간 침지한 후 30분간 물빼기하였다. 물기가 제거된 각각의 시료에 미리 준비한 *R. oryzae* CCS01 종균 100 ml (5%, v/w)과 멸균증류수 200 ml를 가하여 반죽하였다. 누룩틀에 500 g 누룩 반죽을 채우고 다진 후 성형된 누룩을 트레이에 넣고 한지로 덮은 후 20°C에서 균사가 완전히 성장하도록 5일간 발효를 시켰다. 발효가 끝난 누룩은 실온에서 자연건조시킨 후 균사를 제거한 후 분쇄하여 분말을 제조하였다. 분쇄된 누룩은 4°C 냉장고에 보관하면서 이 후 실험에 사용하였다.

Table 1. Proximate composition of rice and polishing wheat

	Contents (g/100 g) ^a				
	Moisture	Ash	Crude protein	Crude fat	Carbohydrate
Rice	13.62±0.07	0.56±0.01	7.31±0.03	0.63±0.01	77.88±0.08
Polishing Wheat	12.93±0.04	1.28±0.02	13.79±0.05	1.47±0.02	70.53±0.11

^a Values indicate the mean's of three replications (n=3).

한편 누룩의 pH와 산도 측정을 위해 누룩 5 g에 증류수 100 ml를 가하고 수화시킨 다음 30℃에서 3시간 동안 침출시켜 4겹의 여과천으로 여과한 후 사용하였다.

누룩의 α-amylase 활성

분말 누룩 시료 5 g을 250 ml 삼각 플라스크에 넣고 0.5% 식염수 100 ml 가한 다음 실온(20℃)에서 20분 간격으로 흔들여 주면서 3시간 동안 침출한 후 원심분리하여 그 상등액을 조효소액(5% 효소액)으로 사용하였다. 가용성 전분을 끓는 물에 녹여 2% 가용성 전분 용액을 만든 다음 이에 동량의 0.1 N 초산완충용액(pH 6.0)을 가하여 pH 6.0인 1% 전분용액을 만들어 기질로 사용하였다. 1% 가용성 전분 0.5 ml와 40 mM 인산완충용액(pH 6.0) 0.5 ml를 시험관에 넣고 37℃에서 예열하였다. 시험관에 효소액 50 µl 넣고 37℃에서 5분간 반응시킨 후, 0.1 N HCl 1 ml 가하여 반응을 정지시켰다. 반응액의 포도당 함량은 DNS (dinitrosalicylic acid)법으로 측정하여 정량하였다(Miller, 1959). α-Amylase 1 unit는 1분간에 가용성전분 1 µg을 분해하는 효소의 양으로 정의하였다(Kim and Koh, 2004).

막걸리 제조

쌀과 도정밀 각각을 2,000 g 달아 물로 세척한 다음 충분한 물을 부은 후 실온에서 12시간(쌀) 혹은 4시간(도정밀) 침지하였고 30분간 물기를 제거하였다. 물기가 제거된 각각의 시료를 100℃에서 1시간 동안 증자하여 냉각하였다. 쌀과 밀의 최적 비율선정을 위한 막걸리 제조는 누룩과 용수를 1.2 L 발효조에 넣고 누룩 56 g 및 정제수 80 ml에 효모 4 ml을 접종하고 25℃에서 1일 동안 발효하여 밀술제조(1단 담금)하고 증자한 곡류 200 g 및 누룩 20 g, 정제수 410 ml을 1단 담금한 발효조에 넣고 2단 담금하여 25℃에서 7일 동안 발효시켰다. 한편 쌀-밀 혼합 막걸리의 발효 중 품질특성 확인 위한 막걸리 제조는 누룩과 용수를 10 L 발효조에 넣고 누룩 560 g 및 정제수 800 ml에 효모 40 ml을 접종하고 25℃에서 1일 동안 발효하여 밀술제조(1단 담금)하고 증자한 곡류 2,000 g 및 누룩 200 g, 정제수 4,100 ml을 1단 담금한 발효조에 넣고 2단 담금하여 25℃에서 7일 동안 발효하였다. 7일 발효된 막걸리는 4겹의 여과천으로 여과하여 이후 실험에 사용하였다.

pH와 총산

pH는 여과한 막걸리 시료 50 ml을 그대로 pH meter (model 3510, Jenway, UK)를 사용하여 측정하였다. 총산은 여과한 시료 10 ml에 0.1N-NaOH 용액으로 pH 8.3±0.1까지 중화시키게 소요된 ml 수인 산도를 구한 후 초산(acetic acid)으로 환산하였다.

당도(Brix)와 알코올 함량

당도는 여과한 시료를 원심분리기(Hanil micro-12, Korea)로 원심분리한 후 상등액을 취하여 굴절당도계(N-1α, Atago Co., Japan)를 이용하여 당도를 측정하였다. 알코올 함량은 여과한 시료 100 ml에 동량의 증류수를 가한 후 증류한 다음 주정계를 이용하여 측정하였으며 Gay Luccac Table을 이용하여 15℃로 보정하였다.

젖산균수와 효모균수

젖산균수는 여과한 시료를 멸균생리수로 적당히 희석하여 bromocresol purple (BCP) 0.02%를 함유한 MRS 평판배지에 도말하고 30℃에서 48시간 배양 후 황색 집락을 계수하여 젖산균으로 계수하였고 효모균수는 PDA에 chloramphenicol (1.5 mg/ml)이 함유된 배지에 도말하여 30℃에서 48시간 배양한 후 흰색의 탁한 전형적인 효모 집락을 계수하였다. 각 실험은 3회 반복하여 수행하여 평균값으로 나타내었으며 시료 ml당 colony forming unit (CFU/ml)로 표시하였다.

관능평가

관능평가는 색(color), 풍미(flavor), 맛(taste) 및 종합적 기호도(overall acceptability)에 대하여 매우 좋다(5점), 좋다(4점), 보통이다(3점), 나쁘다(2점) 및 매우 나쁘다(1점)의 5점 척도법을 이용하여 실시하였다. 관능검사원은 다양한 기호도를 평가하기 위하여 경남과학기술대학교 식품과학부 재학생 및 교직원 15명, 영농조합법인 으뜸주가 직원 5명을 대상으로 실시하였다.

결과 및 고찰

일반성분 분석

본 실험에 사용한 쌀과 도정밀의 일반성분 함량은 Table 1과 같았다. 쌀은 수분 13.62 g/100 g, 회분 0.56 g/100 g, 조단백질 7.31 g/100 g, 조지방 0.63 g/100 g 및 탄수화물 77.88 g/100 g이었고 도정밀은 수분 12.93 g/100 g, 회분 1.28 g/100 g, 조단백질 13.79 g/100 g, 조지방 1.47 g/100 g, 탄수화물 70.53 g/100 g로 나타났다. 쌀은 도정밀보다 수분 및 탄수화물 함량이 높았으며, 회분, 조단백질 및 조지방 함량은 낮게 나타났다.

Kum 등(1995)은 우리나라에서 양질미로 알려져 있는 5가지 품종(계화벼, 추청벼, 동진벼, 오대벼 및 일품벼)에 대한 일반성분 분석에서 수분 13.2–14.2 g/100 g, 조지방 0.4–0.5 g/100 g, 조단백질 6.1–8.7 g/100 g, 조회분 0.6–0.7 g/100 g 및 탄수화물 76.6–79.1 g/100 g의 함량을 나타내는 것으로 보고한 바 있으며,

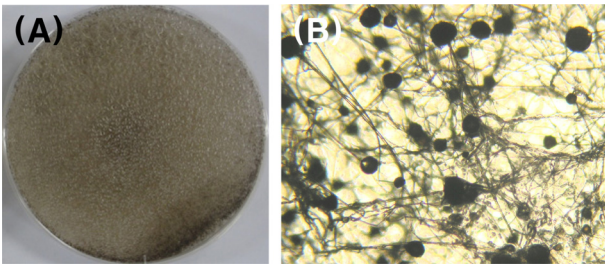


Fig. 1. Morphological characteristics of the strain CCS01. (A) Colony on PDA 7 days after incubation, (B) Sporangium and sporangiophore.

우리밀의 경우 수분 11.6–14.2 g/100 g, 조지방 0.9–1.1 g/100 g, 조단백질 11.5–12.2 g/100 g, 조회분 0.4–0.5 g/100 g 및 탄수화물 74.2–75.2 g/100 g 함량을 나타내는 것으로 보고하였다(Kim et al., 2008, 2011c). 본 연구에 사용한 쌀의 경우 기존의 연구와 유사하였으나, 도정밀의 경우 탄수화물 함량이 이전의 보고와 달리 함량이 낮게 나타났다.

R. oryzae CCS01 균주의 분리 및 동정

시판누룩으로부터 *Rhizopus* 형태의 곰팡이인 CCS01 균주를 분리한 후 표현형적 및 분자생물학적 특징을 이용하여 동정하였다. 순수 분리된 균주 CCS01은 PDA 배지상에서 균사생장이 아주 빠르고 균층이 연한 갈색이며, 포자낭을 많이 형성하여 검은색으로 나타났으며(Fig. 1A), 포자낭은 생육초기에 흰색을 띠다가 점차 성숙되어지면 검은색으로 되어지고 모양은 구형으로 전형적인 *Rhizopus* 속의 표현형적인 특성을 지니고 있었다(Fig. 1B). 균주 CCS01의 26S rDNA의 염기서열을 분석한 결과 699 bp로 결정되었고 phylogenetic tree 분석한 결과 *Rhizopus oryzae* UWFP 846과 100% 일치하여 최종적으로 본 연구에서 분리한 곰팡이를 *Rhizopus oryzae* CCS01로 명명하였다(Fig. 2).

누룩의 α-amylase 활성

R. oryzae CCS01로 제조한 쌀누룩(이하 쌀누룩)과 시판누룩의 α-amylase 활성을 살펴본 결과 Fig. 3과 같았다. 시판누룩의 α-amylase 활성은 산성이 205.8 unit, 송학이 254.5 unit 및 진주가 288.7 unit인데 비해 쌀누룩의 α-amylase 활성은 498.2 unit으로 시판누룩보다 약 1.8–2.4배 정도 높았다.

전통적인 재래누룩에는 *Rhizopus* 속, *Mucosr* 속, *Penicillium* 속, *Endomyces* 속, *Asperigllus* 속 및 불완전 균류 등의 다양한 곰팡이들이 존재하나 당화작용은 이들 중 *Rhizopus* 속 균주가 가장 강력한 곡자의 주요균으로 알려져 있다(Jo and Lee, 1997; Lee and Han, 2000; So and Lee, 2009). 이전의 연구자들에 의해 *Rhizopus* 속의 곰팡이를 누룩 제조에 인위적으로 접종하여 누룩의 품질을 향상시키려는 연구가 시도되었다(So, 1993, 1999; So et al., 1999). 한편 Woo 등(2010)은 7종의 시판 재래누룩에서 α-amylase 활성과 관련된 당화율을 확인한 결과 300 mg%로 보고하였고 Kim과 Koh (2004)은 시판 재래누룩에서 분리한 곰팡이의 glucoamylase 활성을 확인한 결과 *Rhizopus* sp.가 *Aspergillus* sp.보다 우수한 것으로 보고하였다.

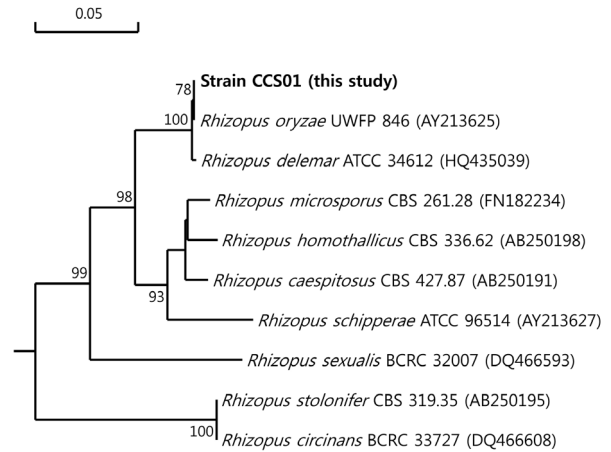


Fig. 2. Phylogenetic relationships of the strain CCS01 and other closely related *Rhizopus* species based on 26S rDNA gene sequences. Numbers above each node are confidence levels (%) generated from 1,000 bootstrap trees.

쌀-밀 혼합 막걸리의 최적비율 선정

쌀과 밀의 비율을 달리하여 7일간 발효한 막걸리의 pH, 산도, 당도, 알코올 함량, 생균수 및 관능평가를 살펴본 결과 Tables 2–4와 같았다.

쌀과 밀의 비율을 달리하여 제조한 막걸리의 pH는 3.85에서 3.88 수준이었으며, 총산은 0.68%에서 밀 함량이 증가할수록 증가하여 1.04%(밀 100%) 수준이었다. 당도는 7.2 °brix에서 7.8 °brix 수준이었고 알코올 함량은 밀 함량이 80%와 100%에서 각각 11.8±0.05% 및 11.2±0.06% 생성되었으며, 밀 함량 60% 이하에서는 각각 13.4% (밀 함량 0%), 13.0% (밀 함량 20%), 12.8% (밀 함량 40%), 12.6% (밀 함량 50%) 및 12.4% (밀 함량 60%)의 알코올이 생성되었다(Table 2). 한편 젖산균수는 7.30 log CFU/ml (쌀:밀=10:0)에서 7.57 log CFU/ml (쌀:밀=4:6) 수준이었고 효모균수는 6.20 log CFU/ml (쌀:밀=10:0)에서 6.34

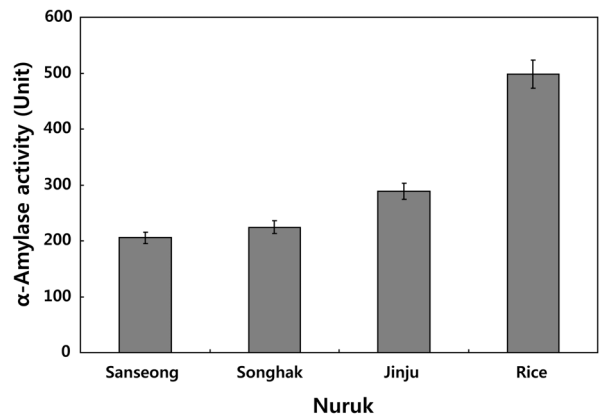


Fig. 3. Comparisons of α-amylase activities of three commercial nuruk and rice nuruk of *R. oryzae* CCS01. The α-amylase activities were assayed at pH 6.0 and 37°C for 5 min. Values indicate the mean's of three replications (n=3).

Table 2. Comparison of pH, total acidity, brix, and alcohol contents of the wheat-rice *makgeolli* by rice *nuruk* of *R. oryzae* CCS01^a

Ratio (Rice : Wheat)	Contents			
	pH	Total acidity (%, as acetic acid)	Brix(°)	Alcohol (%, v/v)
10:0	3.86±0.01	0.68±0.02	7.8±0.05	13.4±0.11
8:2	3.86±0.02	0.89±0.04	7.8±0.06	13.0±0.10
6:4	3.85±0.00	0.90±0.04	7.6±0.09	12.8±0.09
5:5	3.88±0.03	0.91±0.03	7.4±0.05	12.6±0.08
4:6	3.87±0.02	0.92±0.01	7.2±0.04	12.4±0.10
2:8	3.85±0.01	1.03±0.05	7.2±0.07	11.8±0.05
0:10	3.88±0.02	1.04±0.02	7.2±0.05	11.2±0.06

^a *Sacch. cerevisiae* KCCM 12684 was inoculated from 5.0% (v/v) into *makgeolli* and fermented at 25°C for 7 days.

^b Values indicate the mean's of three replications (n=3).

Table 3. Comparison of actic acid bacteria and yeast cell numbers of the wheat-rice *makgeolli* by rice *nuruk* of *R. oryzae* CCS01^a

Ratio (Rice : Wheat)	Viable cell numbers (log CFU/ml)	
	Lactic acid bacteria	Yeast
10:0	7.30±0.02	6.20±0.00
8:2	7.43±0.00	6.32±0.02
6:4	7.43±0.04	6.30±0.02
5:5	7.43±0.03	6.30±0.01
4:6	7.57±0.03	6.34±0.03
2:8	7.54±0.04	6.32±0.03
0:10	7.51±0.02	6.28±0.04

^a *Sacch. cerevisiae* KCCM 12684 was inoculated from 5.0% (v/v) into *makgeolli* and fermented at 25°C for 7 days.

^b Values indicate the mean's of three replications (n=3).

Table 4. Comparison of sensory evaluation of the wheat-rice *makgeolli* by rice *nuruk* of *R. oryzae* CCS01^a

Ratio (Rice : Wheat)	Contents ^b			
	Flavor	Taste	Color	Overall acceptability
10:0	3.90±0.03	4.55±0.04	4.05±0.02	4.40±0.03
8:2	3.85±0.04	4.50±0.05	3.98±0.05	4.42±0.04
6:4	3.95±0.04	4.55±0.04	3.94±0.03	4.40±0.05
5:5	4.25±0.03	4.50±0.04	3.98±0.01	4.50±0.04
4:6	4.30±0.02	4.70±0.03	4.00±0.04	4.55±0.04
2:8	4.15±0.01	3.95±0.02	3.88±0.03	4.10±0.02
0:10	3.75±0.04	3.80±0.01	3.86±0.03	4.05±0.03

^a *Sacch. cerevisiae* KCCM 12684 was inoculated from 5.0% (v/v) into *makgeolli* and fermented at 25°C for 7 days.

^b Values indicate the mean's of three replications (n=3).

log CFU/ml (쌀:밀=4:6) 수준이었다(Table 3).

쌀과 밀의 비율을 달리하여 제조한 막걸리의 관능평가를 실시한 결과 밀 함량이 60%인 막걸리가 풍미와 맛에서 각각 4.30 및 4.70 가장 높았으나, 색의 경우 쌀과 밀의 비율적인 면에서는 크게 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 전체적인 기호도 면에서도 밀 함량이 60%인 막걸리가 4.50로 좋은 것으로 나타났다 (Table 4).

쌀과 밀의 비율을 달리하여 제조한 막걸리의 알코올 함량 차이는 탄수화물 함량과 효모의 기질 이용성의 차이에 기인한 것으로 판단되었다. 한편 관능적인 면에서는 쌀보다는 도정밀이

단백질 함량이 높아 단백질 등의 분해에 의해 다양한 풍미와 맛 성분 등이 생성된 것으로 판단되었다. 알코올 생성량과 관능평가를 고려하여 최적의 혼합비율은 쌀과 밀의 비율을 4:6으로 최종 선정하였고 이후 실험을 진행하였다.

쌀-밀 혼합 막걸리의 발효 특성

쌀-밀 혼합 막걸리의 발효 특성을 살펴본 결과는 Figs. 4-7 및 Table 5와 같았다.

막걸리에서 pH는 발효진행 상황과 알코올 생성 정도를 짐작할 수 있는 중요한 지표의 하나로 이용된다(Kim and Yi, 2010).

Table 5. Change of lactic acid bacteria and yeast cell numbers during the wheat-rice *makgeolli* fermentation^a

Fermentation time (day)	<i>Nuruks</i>	Viable cell numbers (log CFU/ml) ^b	
		Lactic acid bacteria	Yeast
0	Sanseong	5.9±0.02	4.6±0.02
	Songhak	5.9±0.03	4.4±0.04
	Jinju	5.9±0.04	4.4±0.04
	Rice	5.4±0.01	4.7±0.03
1	Sanseong	7.6±0.01	6.7±0.02
	Songhak	7.4±0.05	6.3±0.04
	Jinju	7.6±0.02	6.7±0.03
	Rice	7.2±0.03	6.8±0.01
2	Sanseong	7.8±0.04	6.9±0.04
	Songhak	7.7±0.01	6.9±0.02
	Jinju	7.9±0.01	6.9±0.01
	Rice	7.3±0.04	7.0±0.03
3	Sanseong	7.9±0.02	7.5±0.01
	Songhak	7.9±0.02	7.3±0.03
	Jinju	8.1±0.01	7.4±0.01
	Rice	8.0±0.02	7.7±0.04
4	Sanseong	8.0±0.02	7.7±0.05
	Songhak	8.1±0.02	7.7±0.06
	Jinju	8.2±0.04	7.8±0.04
	Rice	8.0±0.03	8.0±0.02
5	Sanseong	8.3±0.01	7.7±0.02
	Songhak	8.4±0.06	7.7±0.01
	Jinju	8.5±0.03	7.8±0.05
	Rice	8.4±0.04	7.9±0.03
6	Sanseong	7.9±0.05	7.0±0.02
	Songhak	7.9±0.05	6.9±0.01
	Jinju	8.0±0.01	7.0±0.02
	Rice	7.8±0.04	6.9±0.03
7	Sanseong	7.4±0.05	6.6±0.02
	Songhak	7.3±0.07	6.3±0.01
	Jinju	7.6±0.01	6.4±0.04
	Rice	7.0±0.02	6.0±0.05

^a *S. cerevisiae* KCCM 12684 was inoculated from 5.0% (v/v) into *makgeolli* and fermented at 25 °C for 7 days.

^b Values indicate the mean's of three replications (*n*=3).

시판누룩(산성, 송학 및 진주)은 발효 초기 pH 4.39(산성), 4.98(송학) 및 4.71(진주)에서 발효가 진행됨에 따라 낮아져 발효 중

기(7일째)에는 pH 3.71(산성), 3.77(송학) 및 3.65(진주) 수준이 었으나, 쌀누룩은 발효 초기 pH 3.98에서 발효 중기 pH 4.20으

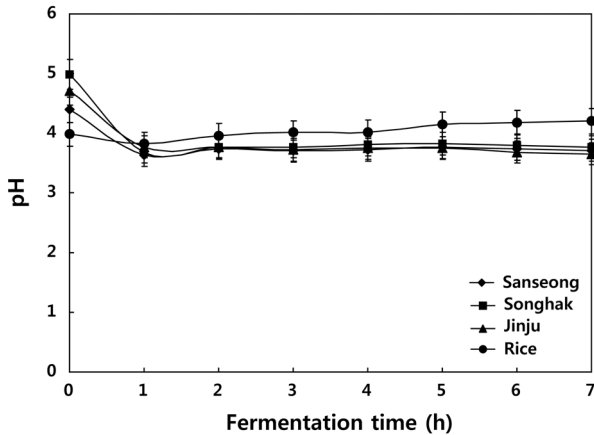


Fig. 4. Change of pH during the wheat-rice *makgeolli* fermentation. *S. cerevisiae* KCCM 12684 was inoculated from 5.0% (v/v) into *makgeolli* and fermented at 25 °C for 7 day. Values indicate the mean's of three replications (n=3).

로 약간 증가하였다(Fig. 4). 담금 직후 pH 차이는 누룩의 차이에 기인한 것으로 판단되었으며, 쌀누룩의 경우 초기 pH가 낮아 잡균의 오염 등에서 좀 더 안전할 것으로 판단되었다. 한편 770 ml 소량 담금에서의 쌀과 밀(4:6) 혼합 막걸리 pH는 3.87이었으나(Table 2), 7,700 ml 대량 담금에서의 pH 4.2이었다. 막걸리의 품질은 전분질 원료, 누룩, 용수, 용기 및 발효규모 등에 의해서 좌우되며, 이들에 따라 막걸리의 유리당, 유기산, 아미노산 및 향기 성분 등의 생성과 이들의 상호작용 차이에 의해 기인하는 것으로 보고되고 있다(So and Lee, 2009). 본 연구에서는 특히 발효용기와 발효규모의 차이에 의해 발효 중기 pH 차이가 큰 것으로 추측되어지나, 향후 유리당, 유기산, 아미노산 및 향기 성분 등의 분석을 통하여 이에 대한 규명이 필요할 것으로 판단되었다. Choi 등(2011)은 시판누룩을 이용한 석탄주 발효 중 발효 초기 pH는 급격히 감소한 후 발효 중기부터 완만히 증가한다고 보고하여 본 연구 결과와 일치하였다. 또한 Jin 등(2007)은 발효가 진행되면서 유기산과 알코올이 상호 반응하여 ester와 같은 향형성에 이용되어 pH가 증가된 것으로 보고하였고 So 등(1999)은 단백질 분해로 인한 아미노산과 peptide의 완충작용에 의해 pH가 증가한 것으로 추정하였다.

총산은 발효 초기 진주누룩이 0.23%로 가장 낮았으며, 산성 누룩이 0.41%로 가장 높았고 발효 1일째 모든 누룩에서 총산이 급격히 증가하였고 이후에는 서서히 증가하였다. 쌀누룩의 경우 발효 초기 0.25%에서 발효 중기 0.62%로 증가하였다. 발효 7일째 산도는 시판누룩이 쌀누룩보다 약 2.0배 정도 높았다(Fig. 5). 발효가 진행되면서 효모나 젖산균 등 미생물의 작용으로 생성된 각종 유기산에 의해 총산 함량이 증가된 것으로 판단되었다. 이러한 총산의 변화는 막걸리의 성분 변화를 쉽게 알 수 있는 요인일 뿐 아니라 알코올 생성 과정에서 복합적으로 생성되므로 막걸리의 발효 진행 상황을 알 수 있는 중요한 지표성분이 되며, 휘발성 향기 성분과 함께 막걸리의 맛, 냄새와 직접 관련되어 있으며, 보존성에도 영향을 준다(Kim et al., 2011b). 한편 pH의 경우 수소이온농도 측정을 통하여 산의 세기 정도를 나타내는 것이

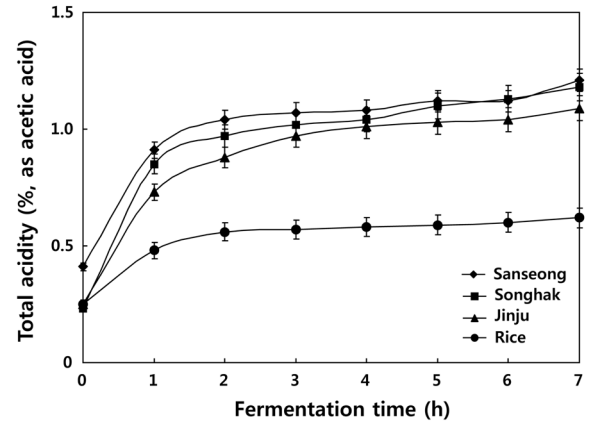


Fig. 5. Change of total acidity during the wheat-rice *makgeolli* fermentation. *S. cerevisiae* KCCM 12684 was inoculated from 5.0% (v/v) into *makgeolli* and fermented at 25 °C for 7 day. Values indicate the mean's of three replications (n=3).

며, 총산은 중화적정법에 의하여 산의 양을 나타내는 것으로 일반적으로 pH가 감소함에 따라 총산은 증가한다. 그러나 발효식품의 경우 발효 초기에는 pH가 감소함에 따라 총산이 증가하나, 발효 중기에는 발효 산물인 아미노산과 peptide의 완충작용에 의해 초기보다 pH와 총산 모두 증가하는 경우가 보고되고 있어(So and Lee, 2009; Jeon and Lee, 2011; Kim et al., 2011b), 본 연구 결과 유사하였고 향후 아미노산 및 향기 성분 등의 분석을 통하여 pH와 총산의 관계에 대한 규명이 필요할 것으로 판단되었다. Kim 등(2011b)의 오이 첨가 막걸리 및 Jeon과 Lee (2011)의 블루베리 첨가 막걸리 발효 중 발효초기 총산이 급격히 증가하고 이후에는 서서히 증가한다고 보고하여 본 연구 결과와 일치하였다.

당도는 발효 초기 1.4 °brix (쌀), 1.6 °brix (송학) 및 2.0 °brix (산성 및 진주)에서 발효 1일째 급격히 증가하여 5.0 °brix (쌀), 6.2 °brix (송학), 및 7.0 °brix (산성 및 진주) 수준이었으며, 이후에 서서히 증가하여 발효 중기에는 8.2 °brix (송학), 8.4 °brix (진주), 8.6 °brix (산성) 및 9.2 °brix (쌀) 수준이었다(Fig. 6). 발효주 내의 당 함량은 효모의 알코올 생성을 결정짓고 주류의 향기 성분과 단맛에 영향을 주는 것으로 알려져 있다(Kim and Yi, 2010; Choi et al., 2011). 발효 초기 쌀누룩이 시판누룩보다 당도는 낮았으나, 발효 중기에는 쌀누룩이 시판누룩보다 높게 나타났다. 이는 누룩의 α-amylase 활성 차이에 의한 당 생성력에 의한 것으로 판단되었다. Kim 등(2011a)의 설기떡을 이용한 흑미 쌀 막걸리 발효 중 당도는 발효 1일째까지 급속히 증가한 후 발효 중기까지 서서히 증가한다고 보고하여 본 연구결과 동일하였다.

시판누룩 3종과 쌀누룩으로 제조한 막걸리의 알코올 함량은 Fig. 7에서 보는 바와 같이 산도와 당도의 변화와 동일하게 발효 1일까지 급격히 증가하여 4.0% (송학), 5.0% (산성), 6.0% (진주) 및 6.8% (쌀) 증가하였고 발효가 계속 진행됨에 따라 각각의 누룩에 따라 증가의 양상은 다소 차이가 있었으며, 발효 중기(발효 7일) 각각 8.0% (산성 및 송학), 11.6% (진주) 및 12.0% (쌀)

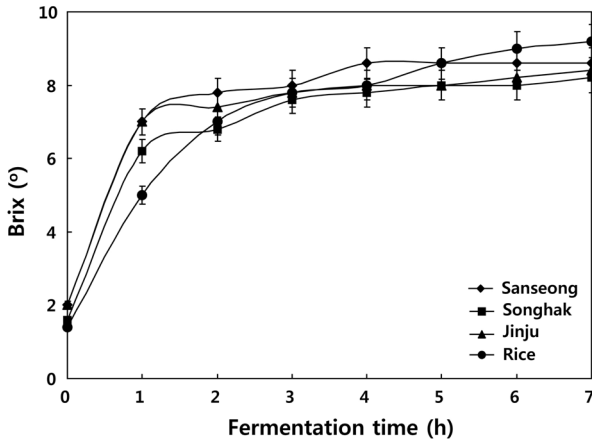


Fig. 6. Change of brix during the wheat-rice wine *makgeolli* fermentation. *S. cerevisiae* KCCM 12684 was inoculated from 5.0% (v/v) into *makgeolli* and fermented at 25°C for 7 day. Values indicate the mean's of three replications (n=3).

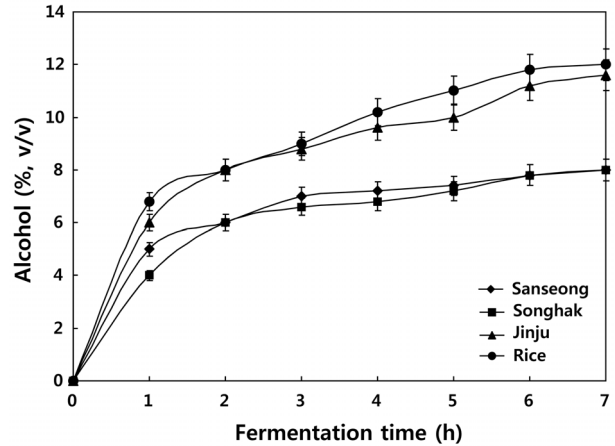


Fig. 7. Change of alcohol contents during the wheat-rice wine *makgeolli* fermentation. *S. cerevisiae* KCCM 12684 was inoculated from 5.0% (v/v) into *makgeolli* and fermented at 25°C for 7 day. Values indicate the mean's of three replications (n=3).

생성이 되었다. 알코올 함량은 술의 보존성이나 향미에 영향을 주는 중요한 성분으로 술덧 중 알코올 함량은 다소 높아야 한다고 보고되고 있다(Jin et al., 2000). 역시 알코올 함량의 차이는 α -amylase 활성 차이에 의한 당도의 생성력에 의한 것으로 추정되었다.

젖산균수와 효모균수를 측정 한 결과 Table 4에 나타내었다. 발효 기간 동안 균수의 생육정도는 동일한 경향을 보였고, 발효 1일까지는 대수적으로 증가한 후 발효 5일째까지 서서히 증가하였고 발효 중기에 약간 감소하였다. 젖산균수는 발효 초기 5.4–5.9 log CFU/ml 수준에서 발효 중기 7.0–7.6 log CFU/ml 수준이었으며, 효모균수는 4.4–4.7 log CFU/ml에서 6.0–6.6 log CFU/ml 수준이었다. 막걸리 발효가 진행됨에 따라 유기산이 생성되어 pH가 감소하고 알코올과 아미노산, 유기산이 상호반응을 하여 ester 등의 향미성분이 생성되며, 이때 알코올, 유기산 및 아미노산 등의 생성에 중요한 역할을 하는 것이 미생물이다(Kim et al., 2008). 발효 전 기간 동안 실험기간에 젖산균수와 효모균수는 차이가 미비하였으며, 젖산균수가 효모균수에 비해 높게 측정되었다.

시판누룩으로부터 *R. oryzae* CCS01 균주를 분리하고 이를 이용하여 쌀누룩을 제조하고 시판누룩과 α -amylase 활성을 비교한 결과 시판누룩보다 1.8–2.4배 정도 높았다. 한편, 제빵 및 국수 등의 제조에 국한되어 있는 우리 밀의 활용성 증대 일환으로 *R. oryzae* CCS01로 제조한 쌀누룩을 이용하여 쌀-밀 막걸리를 제조하고 발효 중 품질특성을 확인하였다. 쌀과 밀의 비율이 4:6일 때 알코올 생성량과 관능적인 면에서 우수하였다. 최적의 쌀-밀 혼합비율에서 쌀누룩으로 제조한 막걸리와 시판누룩으로 제조한 막걸리보다 알코올 함량이 높게 나타났다. 한편 균 접종량, 발효 온도 및 담금 방법 등의 발효조건 설정 등에 대한 연구가 앞으로 진행되어야 될 것으로 사료되나, 쌀과 밀을 이용한 새로운 막걸리 개발의 기초자료로서 활용이 가능할 것으로 판단되었다.

적 요

본 연구에서는 시판누룩에서 분리한 *Rhizopus oryzae* CCS01로 쌀누룩을 제조하고 이를 이용하여 쌀-밀 막걸리 제조하였다. 쌀누룩은 시판누룩보다 α -amylase 활성은 약 1.8–2.4배 정도 높게 나타났다. 쌀과 밀의 비율이 4:6일 때 알코올 생성량은 12.4% 있었으며, 전체적인 기호도면에서 가장 우수하였다. 시판누룩(산성, 진주 및 송학)으로 제조한 쌀-밀 막걸리의 pH는 발효가 진행됨에 따라 감소하였으나, 쌀누룩으로 제조한 쌀-밀 막걸리의 pH는 증가하였다. 한편 산도 및 당도, 알코올 함량은 발효가 진행됨에 따라 증가하였다. 특히 발효 중기 알코올 함량은 쌀누룩으로 제조한 쌀-밀 막걸리가 12.0%로 시판 누룩으로 제조한 막걸리보다 높게 나타났다.

감사의 말

본 연구는 (재)산학협동재단 학술연구사업 및 지식경제부 지역산업기술개발사업 (과제번호: 70008597)의 지원에 의하여 수행되었기에 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Choi, J.H., Jeon, J.A., Jung, S.T., Park, J.H., Park, S.Y., Lee, C.H., Kim, T.J., Choi, H.S., and Yeo, S.H. 2011. Quality characteristics of *seoktanju* fermented by using different *nuruks*. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **39**, 56–62.
- Han, E.H., Lee, T.S., Noh, B.S., and Lee, D.S. 1997. Volatile flavor components in mash of *takju* prepared by using different *nuruks*. *Korean J. Food Sci. Technol.* **29**, 563–570.
- Jeon, M.H. and Lee, W.J. 2011. Characteristics of blueberry added *makgeolli*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **40**, 444–449.
- Jin, T.Y., Chung, H.J., and Eun, J.B. 2000. The effect of fermentation temperature on the quality of *jinyangju*, a Korean traditional rice

- wine. *Korean J. Food Sci. Technol.* **38**, 414–418.
- Jin, T.Y., Kim, E.S., Wang, S.J., and Wang, M.H.** 2007. Changes in physicochemical and sensory characteristics of rice wine, *yakju* prepared with different of red yeast rice. *Korean J. Food Sci. Technol.* **39**, 309–314.
- Jo, G.Y. and Lee, C.W.** 1997. Isolation and identification of the fungi from *nuruk*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **26**, 759–766.
- Joo, O.S., Kang, S.T., Jeong, C.H., Lim, J.W., Park, Y.G., and Cho, K.M.** 2011. Manufacturing of the enhances antioxidative wine using a ripe daebong persimmon (*Dispyros kaki* L.). *J. Appl. Biol. Chem.* **54**, 126–134.
- Kim, C.A., Lee, W.G., Lee, I.S., and Wang, M.H.** 2008. Changes of phytochemical, sensory, and antioxidant activity characteristics in rice wine. *yakju* added with different ratio of *Codonopsis lanceolata*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **37**, 201–206.
- Kim, G.M., Jung, W.J., Shin, J.H., Kang, M.J., and Sung, N.J.** 2011a. Preparation and quality characteristics of *makgeolli* made with black garlic extract and *sulgidduk*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **40**, 759–766.
- Kim, J.Y. and Koh, J.S.** 2004. Screening of brewing yeasts and saccharifying molds for foxtail millet-wine making. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **47**, 78–84.
- Kim, J.Y. and Yi, Y.H.** 2010. pH, acidity, color, amino acids, reducing sugars, total sugars, and alcohol in puffed millet powder containing millet *takju* during fermentation. *Korean J. Food Sci. Technol.* **42**, 727–732.
- Kim, S.Y., Kim, E.K., Yoon, S.J., Jo, N.J., Jung, S.K., Kwon, S.H., Chang, Y.H., and Jeong, Y.H.** 2011b. Physicochemical and microbial properties of Korean traditional rice wine, *makgeolli* supplemented with cucumber during fermentation. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **40**, 223–228.
- Kim, Y.J., Ju, J.C., Kim, R.Y., Kim, W.T., Park, J.H., and Chun, S.S.** 2011c. Cooking properties of fresh pasta using Korean wheat and durum rimachinata. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **40**, 1474–1481.
- Kim, Y.J., Kim, R.Y., Park, J.H., Ju, J.C., Kim, W.T., and Chun, S.S.** 2010. Physicochemical characteristic of Korean wheat semolina. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **39**, 837–842.
- Kim, Y.S., Kim, M.Y., and Chun, S.S.** 2008. Quality characteristics of domestic wheat white bread with substituted *Nelumbo nucifera* G. tea powder. *Korean J. Food Nutr.* **21**, 448–456.
- Korean Food Standard Codex.** 2010. KFDA, 10. General test methods, Korea Food Drug Administration, Seoul, Korea.
- Kum, J.S., Lee, C.H., Baek, K.H., Lee, S.H., and Lee, H.Y.** 1995. Influence of cultivar on rice starch and cooking properties. *Korean J. Food Sci. Technol.* **27**, 365–369.
- Lee, G.H.** 1994. The properties and new technologies of Korean medicinal wine and *takju*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **7**, 4036–4046.
- Lee, J.W. and Shim, J.Y.** 2010. Quality characteristics of *makgeolli* during freezing storage. *Food Eng. Prog.* **14**, 328–334.
- Lee, T.S. and Han, E.H.** 2000. Volatile flavor components in mash of *takju* prepared by using *Rhizopus japonicus nuruks*. *Korean J. Food Sci. Technol.* **32**, 691–698.
- Lee, T.S. and Han, E.H.** 2001. Volatile flavor components in mash of *takju* prepared by using *Aspergillus oryzae nuruks*. *Korean J. Food Sci. Technol.* **33**, 366–372.
- Miller, G.L.** 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for the determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**, 426–428.
- Min, J.H., Baek, S.Y., Lee, J.S., and Kim, H.K.** 2011. Changes of yeasts and bacterial flora during the storage of Korean traditional *makgeolli*. *Korean J. Mycol.* **39**, 151–153.
- Park, K.T., Kim, M.Y., and Chun, S.S.** 2009. Quality characteristics of Korean wheat wet noodles with pomegranate cortex powder. *Korean J. Cul. Res.* **15**, 128–136.
- So, M.H.** 1993. Conditions for the production of amylase and protease in making wheat flour *nuruk* by *Rhizopus japonicus* T2. *Korean J. Food Nutr.* **6**, 96–102.
- So, M.H.** 1999. Characteristics of a modified *Nuruk* made by inoculation of tractional *Nuruk* microorganisms. *Korean J. Food Nutr.* **12**, 219–225.
- So, M.H. and Lee, Y.S.** 2009. Effects of culture conditions of *Rhizopus* sp. ZB9 on the production of saccharifying amylase during the preparation of rice koji. *Korean J. Food Nutr.* **22**, 644–649.
- So, M.H., Lee, Y.S., and Noh, W.S.** 1999. Improvement in the quality of *Takju* by a modified *nuruk*. *Korean J. Food Nutr.* **12**, 427–432.
- Woo, S.M., Shin, J.S., Seong, J.H., Yeo, S.H., Choi, J.H., Kim, T.Y., and Jeong, Y.J.** 2010. Quality characteristics of brown rice *Takju* by different *Nuruks*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **39**, 301–307.
- Yang, H.S., Hwang, S.J., Lee, S.H., and Eun, J.B.** 2011. Fermentation characteristics and sensory characteristics of *makgeolli* with dired citron (*Citrus junos* SIEB ex TANAKA) peel. *Korean J. Food Sci. Technol.* **43**, 603–610.