발 간 등 록 번 호
11-1541000-001766-01

재래누룩 발효 젖산균과 이들 균주의 기능성 탄수화물에 관한 연구

(Study of Lactic Acid Bacteria Producing Functional Carbohydrate Isolated from Nuruk)

세종대학교 산학협력단

농 림 수 산 식 품 부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “재래누룩 발효 젖산균과 이들 균주의 기능성 탄수화물에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2012 년 12 월 29 일

주관연구기관명 : 세종대학교 산학협력단
주관연구책임자 : 정 장 호
연 구 원 : 박 지 희
연 구 원 : 안 효 주
연 구 원 : 민 경 아
보 조 원 : 이 용 선

요 약 문

Ⅰ. 제 목

재래누룩 발효젖산균과 이들 균주의 기능성 탄수화물에 관한 연구

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 필요성

한식 발효식품 중 전통주의 당화 및 발효제로 사용되는 누룩들로부터 기능성 다당이나 올리고당 생성이 가능한 발효 젖산 균주를 분리하고 분리된 균주가 기존의 type culture 균주들과의 미생물 분류학적으로 차이가 있는지를 확인하며 분리 균주가 probitic특성과 기능성 당 물질 생산가능성 확인에 목적을 두었다.

Ⅲ. 연구개발의 최종 목표 및 주요내용

□ 연구개발의 최종목표는 다음과 같다.

○ 한국 전통방식으로 누룩을 생산하는 4개 곡자의 누룩으로부터 기능성 다당류나 올리고당류를 생산해 낼 수 있는 균주의 군집분석 및 분리·동정

○ Pyrosequencing 기법을 통한 전통누룩의 미생물군집 확인 및 발효 우수성 확인

○ 전통누룩과 일반개량누룩를 이용한 단양주 특성비교 조사

○ 전통누룩으로부터 분리한 다당 생성균주의 probiotic 특성조사

○ 생산된 다당류, 올리고당류의 기능성 확인과 기능성 당류의 특성 연구

□ 주요 내용으로는 다음과 같다.

○ 전통누룩의 발효 우수성 확인

○ 상업적 시 생산되는 전통누룩제품과 일반 개량누룩을 이용한 단양주 특성 조사

○ 전통누룩으로부터 분리한 다당생성 균주의 probiotic 특성 조사

○ 생산된 다당류, 올리고당류의 기능성 확인과 기능성 당류의 특성 연구

Ⅳ. 연구개발결과

○ Pyrosequencing을 이용한 미생물 군집 분석을 통해 전통누룩에는 다양한 미생물군집이 존재하며 이들 미생물군집을 통해 이들 미생물 군집의 metabolites 중 대표적인 맛 성분인 유기산과 유리아미노산 등이 발효과정을 통해 풍부해 짐을 과학적으로 연결 지어 확인하였음

○ 배지를 이용하여 현재 남은 4종류 전통누룩 생산제품에서 젖산균 분리하고 동정하였으며 분리동정 된 젖산균들의 phylogenetic tree작성을 통해 전통누룩제품에 존재하는 젖산균의 계통을 보고하였음

○ 현재 상업적 막걸리생산에서 가장 많이 사용하고 있는 일반 개량누룩과 전통누룩을 이용하여 발효한 탁주를 이용하여 제품품질 특성을 확인함

○ 이를 통하여 전통누룩의 탁주제조 시 당, 알코올, 유리아미노산, 유기산과 같은 화학적 특성과 미생물균총의 변화 및 관능검사를 통해 이들 metabolites들과 맛의 강도를 연결하여 확인하였음

○ 전통누룩에서 젖산균을 배지법을 통해 분리 동정하였으며 이들 균주 중 기능성 다당 및 올리고당 생성이 가능한 *Leuconostoc*과 *Weissella*균주들을 분리 동정하였으며 내산성, 내담즙성 및 유해미생물 (*E. coli*와 *S. typimurium*)에 대한 생육억제능을 측정하여 probiotic의 기능성을 확인하였음

○ 전통누룩에서 분리동정된 다당생성 젖산균의 dextransucrase의 활성과 이소말토올리고당 생성능을 확인하였으며 이들 생성된 올리고당의 분리방법에 대한 기초자료를 제시하였음

Ⅴ. 연구성과 및 기대효과

□ 연구성과

○ 전통누룩의 우수성 확인

미생물 군집 분석을 통해 전통누룩에는 다양한 미생물군집이 존재하며 대표적인 맛 성분인 유기산과 유리아미노산 등이 발효과정을 통해 풍부해 짐을 확인

○ 상업적 시 생산되는 전통누룩제품과 일반개량누룩를 이용한 단양주 특성 조사

전통누룩의 탁주제조 시 당, 알코올, 유리아미노산, 유기산과 같은 화학적 특성과 미생물균총의 변화 및 관능검사를 통해 이들 metabolites들과 맛의 강도를 연결하여 확인

○ 전통누룩으로부터 분리한 다당생성 균주의 probiotic 특성 조사

전통누룩의 젖산균주 중 기능성 다당 및 올리고당 생성이 가능한 *Leuconostoc*과 *Weissella* 균주들을 분리 동정하고 내산성, 내담즙성을 측정하여 probiotic의 기능성을 확인

○ 생산된 다당류, 올리고당류의 기능성 확인과 기능성 당류의 특성 연구

전통누룩에서 분리 동정 된 다당 생성 젖산균의 dextransucrase의 활성과 이소말토올리고당 생성능을 확인

○ 상기 연구결과의 일부는 '국제 기능성소재 및 기능성식품 학회 (International Society for Nutraceuticals and Functional Foods)'의 연차회의인 2012 International conference and exhibition on nutraceuticals and functional foods 에 참가하여 'Study of exopolysaccharide producing *Leuconostoc* and *Weissella* for a yogurt starter (Poster Number; P176)' 발표하였음

□ 기대효과

○ 누룩에 존재하는 미생물의 다양성의 확인은 한국전통주의 우수성과 기능성을 알리는데 학문적 가치 뿐 아니라 한식의 건강기능성과 우수성을 알리는 자료를 제공

○ 차후 다른 생물신소재가 될 수 있는 기능성 종균들을 찾아내고 분리해 내는 시스템적 연구모델로 활용가능

○ 기능성 당 물질의 생산을 통해 차후 식품, 화장품, 의약등 바이오산업에 활용

○ 분리된 당물질을 이용한 비만억제 연구의 재료로 사용이 가능

○ ' 한식의 세계화 '에 과학적 연구 홍보자료로 사용

○ 차후 기능성 식품이나 식음료 개발 등 차후 산업연계가 가능

SUMMARY

This study included general characteristics and microbial ecology for 4 traditional *Nuruk* (SS, SH, SJ, and JJ) and 1 commercial *Nuruk* (MN) using the pyrosequencing. It also compared the characteristics of five *Takju* prepared with the *Nuruk* measuring pH, titratable acidity, sugars, alcohol, amino acids, organic acid, and microbial changes. *Pedioccoccus, Lactobacillus, Leuconostoc and Weissella* were predominant genuses in the traditional *Nuruks*. In the analysis result of the microbial communities of traditional *Nuruk* by pyrosequencing, SJ showed the most number of reads, and SS had the highest OTU value. The dominant genuses of each samples are *Clostridium* for JJ, *Lactobacillus* genus for SH, *Leuconostoc* genus for SS, and *Bacillus* genus for SJ. In the Eukarya analysist, in addition, JJ had the most number of reads, and SS showed the most diversified features. From JJ, where the most and various bacteria contained, *Aspergillus* genus detected by the highest number of 73.33%. while *Saccharomycopsidaceae* genus was the highest number of 85.27% and 97.46% for SH and SS respectively. *Mucorales* genus was the highest number of 56.73% for SJ. The saccharogenic power of traditional *Nuruk*, JJ, SS, SJ, and SH was 222.4 sP in average, while that of MN was 1135.89 sP, about 5.1 times higher. The pH of *Takju* brewed from each *Nuruk* has shown rapid declining tendency for 24 hours right after the brewing, while titratable acidity acid increased rapidly with the decrease of maltose and glucose. Ethanol concentration increased from 12 hours after the brewing. Major organic acids of raw rice wine in the fermenting process were lactic acid, citric acid, succinic acid, and acetic acid, but tartaric acid, malic acid, and oxalic acid contents were less than 60mg/100g at the completion of fermenting process, relatively very small amount. In free amino acid contents, total amount of glutamic acid, threonine, serine and glycine was highest from T-JJ, while T-SJ was the lowest value. Total microbial counts, lactic acid bacteria number, and yeast cell numbers showed similar tendency of increasing rapidly as fermentation started, then reducing and increasing slowly thereafter in the 1'st day after fermentation, and gradually reduced until 21 days, till fermentation finished. From the sensory result, fruit flavor was the highest in T-SH, sweet taste in T-SS, and vinegary taste in T-SS. there was no significant difference among the samples for the alcohol flavor, alcohol taste, and bitter taste. Exopolysaccharide (EPS)

producing lactic acid bacteria were isolated from *Nuruk* (Korean koji for rice wine). The isolates were identified as the strain of *Leuconostoc* and *Weissella*. The strains showed more sensitive when exposed to pH 2.5 than the type culture strains but more resistant to 0.3% Ox-gall.

목 차 (Contents)

I. 서 론 (Introduction)

Ⅱ. 연구 개발 목적의 필요성 (Justification of Study)

1. 국내외 기술개발 현황 ····2
2. 문제점과 전망 ····4
3. 국내 연구개발의 필요성 ····5

Ⅲ. 연구개발의 최종 목표 및 주요내용 (Goals of Study)

1. 연구개발의 최종목표 (Goal of Study) ····11
2. 연구의 주요 내용 (Major target goals) ····11
   2.1 전통누룩의 발효 우수성 확인 ····11
   2.2 상업적 시 생산되는 전통누룩제품과 일반 개량누룩을 이용한 단양주 특성 조사 ····11
   2.3 전통누룩으로부터 분리한 다당생성 균주의 probiotic 특성 조사 ····11
   2.4 생성된 다당류, 올리고당류의 기능성 확인과 기능성 당류의 특성 연구 ····12
3. 실험 재료 및 방법 (Materials and Methods) ····12
   3.1 실험 재료 ····12
   3.2 탁주의 제조 ····13
   3.3 누룩 ····14
      1) pH 측정 ····14
      2) 수분 측정 ····14
      3) 적정산도 측정 ····14
      4) 회분 측정 ····15
      5) 당화력 측정 ····15
      6) 색도 측정 ····15
      7) 당 함량 측정 ····15

8) 누룩에 존재하는 젖산균 분리 동정 ·····16
9) Pyrosequencing을 이용한 미생물 군집 분석 ·····17
3.4 탁주 ·····17
1) pH, 적정산도 및 당과 알코올 함량 측정 ·····17
2) 유리 아미노산 함량 분석 ·····17
3) 유기산 함량 분석 ·····18
4) 미생물 균총의 측정 ·····18
5) 관능검사 ·····19
3.5 통계분석 ·····20
3.6 분리균주로부터 생성된 기능성 탄수화물의 특성 ·····20
1) Dextransucrase 활성능 측정 ·····20
2) 기능성 당류의 수율 측정 ·····20
3) 기능성 탄수화물의 분리 ·····21
3.1) 생성 당류의 수율 측정 ·····21
3.2) 분리 균주의 배양상등액 제조 ·····21
3.3) 분리균주의 유해미생물 생육억제능력 시험 ·····21

Ⅳ. 연구개발결과 (Results)

1. 전통누룩 ·····23
1.1 일반특성 ·····23
1.2 당함량 ·····25
1.3 미생물 선택배지를 이용한 젖산균 분리 동정 ·····26
1.4 Pyrosequencing을 이용한 각 누룩의 bacteria 군집분석 ·····35
1.5 Pyrosequencing을 이용한 각 누룩의 eukarya 군집분석 ·····39
2. 전통누룩과 일반개량 누룩으로 제조 된 탁주의 품질특성 ·····43
2.1 pH ·····43
2.2 적정산도 ·····44
2.3 당과 알코올 함량 ·····45
2.4 유리아미노산 함량 ·····47
2.5 유기산 함량 ·····52
2.6 총균수 ·····54
2.7 총효모수 ·····55

2.8 총젖산균수 ·····56
2.9 관능검사 ·····57
2.10 누룩에서 분리된 균주의 probiotic 특성 조사 ·····58
2.11 *Escherichia coli* 생육 억제 ·····62
2.12 Dextransucrase 활성능 측정 ·····63
2.13 분리균주의 이소말토올리고당 생성능 ·····64
2.14 Crude Exopolysaccharides(EPS)와 올리고당의 생성 ·····66
2.15 이소말토올리고당 생산 ·····68

Ⅴ. 연구성과 및 기대효과 (Achievements and Applications)
1. 연구성과 ·····70
1.1 전통누룩의 우수성 확인 ·····70
1.2 상업적 시 생산되는 전통누룩제품과 일반개량누룩을 이용한 단양주 특성 조사 ·····70
1.3 전통누룩으로부터 분리한 다당생성 균주의 probiotic 특성 조사 ·····70
1.4 생산된 다당류, 올리고당류의 기능성확인과 기능성 당류 특성연구 ·····70
1.5 국제 기능성 소재 및 기능성식품 학회 참가 ·····70
2. 기대효과 ·····71

Ⅵ. 참고문헌 (References)

Tables and Figures

Table 1. 젖산균 관련 12,596개의 논문의 국가 및 지역별분포 ·····17
Table 2. Linkages in different dextrans as obtained by methylation analysis ·····23
Table 3. Characteristics of 5 tested Nuruk samples ·····27
Table 4. Formulas of *Takju* ·····29
Table 5. HPLC operating parameters for sugar and ethanol analysis in *Nuruk* ·····31
Table 6. Operating conditions of amino acid auto-analyzer ·····33
Table 7. HPLC operating parameters for organic acid analysis ·····33
Table 8. Define of Sensory Properties and Standard recipe on the descriptive analysis for *Takju* ·····34
Table 9. General properties of *Nuruk* ·····39
Table 10. Hunters color parameters of Nuruk ·····39
Table 11. Glucose, fructose, maltose and ethanol concentration of *Nuruk* ·····40
Table 12. List of bacteria isolated from SH ·····42
Table 13. List of bacteria isolated from JJ ·····42
Table 14. List of bacteria isolated from SS ·····43
Table 15. List of bacteria isolated from SJ ·····44
Table 16. List of bacteria isolated from MN ·····44
Table 17. Lactic acid bacteria from traditional *Nuruk* ·····45
Table 18. Amino acid concentration of *Takju* during fermentation ·····66
Table 19. Organic acid concentration of *Takju* during fermentation ·····69
Table 20. Profile of sensory characteristics of *Takju* ·····73
Table 21. Exopolysaccharide producing Lactic acid bacteria isolated from traditional *Nuruk* 75
Table 22. Antimicrobial activity of LAB isolated from Nuruk on the grow of *E. coli* by paper disc method ·····77
Table 23. Dexransucrase specific activities of the selected strains isolated from Korean traditional Nuruks ·····79
Table 24. Production yields of crude EPS and isomaltooligosaccharide of lactic acid bacteria isolated from *Nuruk* ·····82

Fig 1. web of Science 내 'prebiotic'을 관심어로 갖고 있는 논문들의 연구현황 ·····18
Fig 2. Mechanisms for the synthesis a-1,6 glucan by *L. mesenteroides* B-512F (ATCC10830). ·····22
Fig 3. Diagrammatic representation of the structures of the different glucans synthesised by different glucansucrases from various *Leuconostoc mesenteroides* and *Streptococcus mutans*. ·····23
Fig 4. Schematic representation of carbon flow by *Leuconostoc mesenteroides* ATCC13146 during metabolism. ·····24
Fig 5. Structures of typical isomaltooligosaccharides. ·····25
Fig 6. Preparation procedure of *Takju*. ·····28
Fig 7. The phylogenetic consensus tree of the composition of the *Leuconostoc.* Numbers at the nodes indicated the bootstrap values on neighbor-joining analyses of 1000 resampled data sets. Bar 1 % sequence divergence. ·····46
Fig 8. The phylogenetic consensus tree of the composition of the *Weissella.* Numbers at the nodes indicated the bootstrap values on neighbor-joining analyses of 1000 resampled data sets. Bar 1 % sequence divergence. ·····47
Fig 9. The phylogenetic consensus tree of the composition of the *Pediococcus.* Numbers at the nodes indicated the bootstrap values on neighbor-joining analyses of 1000 resampled data sets. Bar 2 % sequence divergence. ·····48
Fig 10. The phylogenetic consensus tree of the composition of the *Lactobacillus.* Numbers at the nodes indicated the bootstrap values on neighbor-joining analyses of 1000 resampled data sets. Bar 0.5 % sequence divergence. ·····49
Fig 11. Rarefaction curve of *Nuruk* in bacteria ·····51
Fig 12. Phylogenetic classification found in JJ traditional *Nuruk* by pyrosequencing (Bacteria) ·····52
Fig 13. Phylogenetic classification found in SH traditional *Nuruk* by pyrosequencing (Bacteria) ·····52
Fig 14. Phylogenetic classification found in SS traditional *Nuruk* by pyrosequencing (Bacteria) ·····53
Fig 15. Phylogenetic classification found in SJ traditional *Nuruk* by pyrosequencing (Bacteria) ·····54
Fig 16. Rarefaction curve of *Nuruk* in eukarya ·····55

Fig 17. Phylogenetic classification found in JJ traditional *Nuruk* by pyrosequencing (Eukarya) ·····56
Fig 18. Phylogenetic classification found in SH traditional *Nuruk* by pyrosequencing (Eukarya) ·····56
Fig 19. Phylogenetic classification found in SJ traditional *Nuruk* by pyrosequencing (Eukarya) ·····57
Fig 20. Phylogenetic classification found in SS traditional *Nuruk* by pyrosequencing (Bacteria) ·····57
Fig 21. pH changes of *Takju* during fermentation ·····58
Fig 22. Titratable acidity changes of *Takju* during fermentation ·····59
Fig 23. Changes in maltose concentration of *Takju* during fermentation ·····61
Fig 24. Changes in glucose concentration of *Takju* during fermentation ·····61
Fig 25. Changes in Ethanol concentration of *Takju* during fermentation ·····62
Fig 26. Total amino acid concentration of *Takju* during fermentation ·····67
Fig 27. Changes in total viable cell counts of *Takju* during fermentation ·····70
Fig 28. Changes in yeast cell counts of *Takju* during fermentation ·····71
Fig 29. Changes in lactic cell counts of *Takju* during fermentation ·····72
Fig 30. Acid tolerance of bacteria isolated from *Nuruk* ·····75
Fig 31. Bile resistance of bacteria isolated from *Nuruk* ·····76
Fig 32. Antimicrobial activity of LAB strains isolated from Nuruk against *E. coli (B)* and *S. typhimurium* (A) ·····78
Fig 33. Thin layer chromatogram of oligosaccharides formation with sucrose to maltose ····80
Fig 34. TLC of isomatooligosaccharide production as a function of time. ·····83
Fig 35. Purification of isomatooligosaccharides from a *Leuconostoc* using a preparative HPLC ·····84

연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 재래누룩 발효젖산균과 이들 균주의 기능성 탄수화물에 관한 연구			
	(영문) Study of lactic acid bacteria producing functional carbohydrate isolated from Nuruk			
연 구 기 관	세종대학교 산학협력단		연 구 책 임 자	(소속) 세종대학교
참 여 기 관				(성명) 정 장 호
연구비	계	70,000,000	총 연 구 기 간	2011. 12. 30 ~ 2012. 12. 29. (1년)
참여연구원	5명 (연구책임자: 1명, 책임연구원: 명, 연구원: 3명, 보조원 1명)			

○ 연구개발 목표 및 내용

미생물 중에는 젖산(lactic acid)을 대사산물로 많이 생산하는 세균을 통칭하여 유산균 (Lactic acid bacteria)또는 젖산균이라고 하는데 현대에 이르러서는 이러한 유산균을 이용하여 기능성식품, 의약품, 화장품, 화학제품에 이르기까지 그 사용범위가 넓혀져 가고 있다. 이들 유산균들을 잘 이용할 수 있다면 유산발효를 통한 식품의 안전 및 저장성 증대, 식품의 풍미증진 및 기능성식품, 의약품, 화장품, 화학제재와 같은 소재의 개발, 체의 건강성을 증대, Dextran, 기능성 올리고당, 비타민등과 같은 건강기능성 물질에서부터 젖산, 아세트산과 같은 유기산 등을 생산해 낼 수 있는 Bioreactor 역할로의 그 기능을 이해하고 이용할 수 있는 장점들을 가지고 있다.

우리나라에서 생산되는 대부분의 종균들은 이미 기존에 외국으로부터 확립된 균주들이 대부분이여서 일본, 프랑스, 독일, 덴마크 등의 낙농선진국의 유산균 균주들을 대부분 수입해서 사용하고 있는 실정이며 균주를 이용한 기능성물질을 생산에 대한 연구들은 크게 미흡한 실정이다. 이에 dextran이나 기능성 올리고당과 같은 기능성 당물질을 생산해 낼 수 있는 *Leuconostoc* 속이나 *Wissella* 속 세균들을 한식 전통주의 당화 및 발효제로 쓰이는 누룩으로부터 분리 동정하여 기능성 당 물질 생성능력을 확인하고 차후 기능성 소재로 사용할 수 있는 종균으로 활용할 수 있도록 하는데 연구의 필요성을 갖고자 한다.

○ 연구결과

전통누룩 4종류와 개량누룩 1종류의 일반 특성 및 젖산균 분포를 알아보고 pyrosequencing을 이용하여 전통누룩의 미생물 군집에 대해 알아보았다. 또한 각 누룩으로 탁주를 제조하여 발효기간 동안 pH, 총산, 당과 알코올 함량, 아미노산 함량, 유기산 함량, 미생물 균총을 측정하였고, 발효가 끝난 후 각 특성에 대한 강도측정을 실시하였다.

개량누룩인 MN의 침출액의 pH 및 산도는 5.86, 1.46 %로 가장 높은 값을 나타내었으며 전통누룩인 SH, JJ, SS, SJ 는 6.18-6.81, 0.40-0.74 %의 값을 나타내었다. 전통누룩 4종류의 수분함량은 유의적인 차이를 나타내지 않았으며 MN이 유의적으로 가장 낮은 값을 나타내었다. 회분 함량은 MN이 3.68%로 가장 높은 값을 나타내었으며 1.41% 로 SJ가 유의적으로 가장 낮은 값을 나타내었다. 전통누룩인 JJ, SS, SJ, SH 의 당화력은 평균 222.4 sP를 나타내었고 MN의 당화력은 1135.89 sP로 약 5.1배 높은 값을 나타내었다. 색도 측정 결과 L값은 SJ가, a값과 b값은 MN이 가장 높은 값을 나타내었

다. 각 누룩 추출액의 당 함량 측정 결과 maltose는 MN에서만 검출되고 glucose, fructose 모두 MN에서 가장 높은 값을 나타내었다.

순수 분리법으로 젖산균을 동정한 결과 JJ에서는 *Pediococcus* 속 4종과 *Weissella* 속 1종을 확보하였고, SS 에서는 총 30종의 균주가 분리되었으며 Weissella 속 12종, *Leuconostoc* 속 3종, *Lactobacillus* 속 15 종이었다. SH에서는 총 9종의 균주가 분리되었으며 *Pediococcus* 속 8종, *Leuconostoc* 속 1종이었으며 SJ 에서는 6종의 균주 중 *Pediococcus* 속 4종, *Lactobacillus* 속 2종이 발견되었다. 개량누룩인 MN에서는 총 14종의 균주 중 *Leuconostoc* 속 3종과 *Weissella* 속 11종이 동정되었다.

최신 환경 미생물 군집 분석 방법인 pyrosequencing으로 전통누룩의 bacteria 군집을 분석한 결과 SJ가 가장 많은 reads 수를 나타내었고, SS가 가장 높은 OTU 값을 나타내었다. 각 누룩의 우점속은 JJ에서는 *Clostridium* 속, SH에서는 *Lactobacillus* 속, SS에서는 *Leuconostoc* 속, SJ 에서는 *Bacillus*속 이었다. 또한 Eukarya 군집분석 결과 JJ가 가장 많은 reads 수를 나타내었으며 SS가 가장 많은 다양성을 나타내었다. 가장 많고 다양한 균이 검출된 JJ에서는 *Aspergillus* 속이 73.33 %로 가장 많이 검출되었다. SH과 SS에서는 모두 *Saccharomycopsidaceae* 속이 각각 85.27 %, 97.46 %로 가장 많이 검출 되었으며 SJ에서는 *Mucorales* 속이 56.73%로 가장 많이 검출되었다.

각 누룩으로 제조한 탁주의 pH는 담금 직후부터 24시간 까지 급격히 감소하는 경향을 보였고, 총산은 급격히 증가하였다. Maltose 함량은 담금 직후에는 0.49~2.68 %(w/v)였고, Glucose의 함량은 1.03~2.07 %(w/v)으로 나타났으며 전체적인 Ethanol의 함량은 12시간부터 Ethanol의 함량이 증가하기 시작했다. 발효과정 중 탁주의 유기산으로 lactic acid, citric acid, succinic acid, acetic acid가 주요 유기산으로 나타났으며 tartaric acid, malic acid, oxalic acid 모두 발효 완료 시점에서의 검출량이 60mg/100g 미만으로 상대적으로 미량 검출되었다. 유리아미노산 함량 분석 결과 glutamic acid, threonine, serine 및 glycine의 총량은 T-JJ가 가장 높았으며 T-SJ가 가장 낮은 값을 나타내었다. 단맛과 쓴맛을 동시에 나타내는 proline과 methionine, 쓴맛을 나타내는 leucine, isocleucine, phenylalanine 및 arginine의 함량 역시 T-JJ가 가장 높고 T-SJ가 가장 낮은 값을 나타내었다. 총균수, 젖산균수, 효모수 모두 시간이 지날 수 록 급격히 증가하다가 발효 1일에 감소하다 완만한 증가 후 발효가 끝나는 21일 까지 점차 감소하는 비슷한 경향을 나타내었다. 관능검사 결과 과일향은 T-SH, 단맛은 T-SS, 신맛은 T-SS가 가장 높았으며 알코올향, 알코올맛, 쓴맛은 시료간 유의적으로 차이가 나타나지 않았다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때, Pyrosequencing을 이용한 방법이 미생물 다양성 연구와 전체적인 미생물 양상 추적에 있어서는 훨씬 효율적이라는 결론을 얻을 수 있었고, 전통누룩으로 담근 탁주의 다양성에 대한 잠재력을 확인할 수 있었다.

○ 연구성과 및 성과활용 계획

누룩에 존재하는 미생물의 다양성의 확인은 한국전통주의 우수성과 기능성을 알리는데 학문적 가치뿐 아니라 한식의 건강기능성과 우수성을 알리는 자료를 제공할 수 있을 것으로 보이며 관련된 기능성 유산균주를 분리동정할 수 있는 모델을 확립함으로서 차후 다른 생물신소재가 될 수 있는 기능성 종균들을 찾아내고 분리해 내는 시스템적 연구모델로 활용가능하다. 기능성 당 물질의 생산을 통해 차후 식품, 화장품, 의약등 바이오산업에 활용될 수 있다. 일반적으로 기능성 당들을 인체나 동물의 장내의 유익균을 증가시키는데 이러한 장내균총변화가 비만억제와도 관련이 있으므로 분리된 당물질을 이용한 미만억제 연구의 재료로 사용이 가능하다. 이를 통해 ' 한식의 세계화 '에 과학적 연구 홍보자료로 사용될 수 있으며 차후 기능성 식품이나 식음료 개발 등 차후 산업연계가 가능하다.

Ⅰ. 서 론

미생물 중에는 젖산(lactic acid)을 대사산물로 많이 생산하는 세균을 통칭하여 유산균(Lactic acid bacteria)또는 젖산균이라고 하는데 과학이 진보하기 전부터도 유산균은 인간에 의하여 의식적으로든 무의식적으로는 사용되어 왔다. 유산균은 인간에게 가장 유익한 미생물의 한 종류로서 인류와 함께 공존하였는데 유럽이나 중앙아시아 목축민족에 의해서는 발효소세지 등 을 포함하는 발효 육제품, 치즈나 발효요구르트와 같은 발효유제품으로 사용되었으며 또한 우리나라와 같은 민족에게는 장류, 전통주, 김치와 같은 채소발효식품 등 한식발효와 대단히 밀접히 관계하며 이용되어 왔다. 현대에 이르러서는 이러한 유산균을 이용하여 기능성식품, 의약품, 화장품, 화학제품에 이르기까지 그 사용범위가 넓혀져 가고 있다. 또한 유산균은 사람이나 포유동물의 장을 포함하는 소화관, 여성의 질, 구강 안에도 존재하며 인간의 건강과도 밀접한 관계를 형성하고 있다.

유산균이란 명칭은 세균의 학술적인 분류방법은 아니지만 일반적으로 소비하는 당의 약 50%이상을 유산으로 대사하는 균들 중 식품이나 사람 또는 포유류동물의 장내에서 질소를 포함하는 유해산물들 예를 들면 amine이나 암모니아 또는 indole, skatole, phenol등과 같은 물질을 생성하지 않고 인간이나 숙주동물에게 유익한 작용을 하는 균들을 말할 수 있다. 통상적인 미생물학적 분류방법은 Gram양성 구균이나 간균이고, catalase 음성 (혐기성발효), 포자를 형성하지 않고 운동성이 없는 균을 이야기 한다.

현재 유산균은 미생물 분류학상 12개 속에 속하여 나누어져 있으나 일반적으로 인간에게 식품이나 건강과 관련된 속은 간균인 *Lactobacillus*속과 구균인 *Lactococcus*속, *Streptococcus*속, *Leuconostoc*속 그리고 *Pediococcus*속 등을 들 수 있다.

이들 유산균들을 잘 이용할 수 있다면 첫째 유산발효를 통한 식품의 안전 및 저장성을 증대시킬 수 있어 식품 보존성 증대에 기여 할 수 있으며, 둘째 대사산물의 효과적인 이용을 통해 식품의 풍미증진 및 기능성식품, 의약품, 화장품, 화학제재와 같은 소재의 개발로 이어 나갈 수 있으며, 셋째 최근 장내 균총의 불균형이 비만을 가져올 수 있다는 연구와 장내 유익균이 인체의 건강을 향상시킨다는 보고에서 나타난 바와 같이 인체의 건강성을 증대시킬 수 있으며 마지막으로 Dextran, 기능성 올리고당, 비타민등과 같은 건강기능성 물질에서부터 젖산, 아세트산과 같은 유기산 등을 생산해 낼 수 있는 Bioreactor 역할로의 그 기능을 이해하고 이용할 수 있는 장점들을 가지고 있다.

우리나라에서 생산되는 대부분의 종균들은 이미 기존에 외국으로부터 확립된 균주들이 대부분이여서 일본, 프랑스, 독일, 덴마크 등의 낙농선진국의 유산균 균주들을 대부분 수입해서 사용하고 있는 실정이며 균주를 이용한 기능성물질을 생산에 대한 연구들은 크게 미흡한 실정이다. 이에 dextran이나 기능성 올리고당과 같은 기능성 당물질을 생산해 낼 수 있는 *Leucostoc* 속이나 *Wissella* 속 세균들을 한식 전통주의 당화 및 발효제로 쓰이는 누룩으로부터 분리 동정하여 기능성 당 물질 생성능력을 확인하고 차후 기능성 소재로 사용할 수 있는 종균으로 활용할 수 있도록 하는데 연구의 필요성을 갖고자 한다.

Ⅱ. 연구 개발 목적의 필요성

1. 국내외 기술개발 현황

- 현재 Web of Science에서 조사된 결과에 의하면 젖산균과 관련된 연구논문들은 총 12,596개(2011.11월현재) 로 조사되었으며 매년 연구관련 논문이 지속적으로 증가하고 있으며 그 인용빈도도 계속 증가하고 있음.

- Web of Science에서 조사된 12,596개 연구논문들의 국가 및 지역별 분포로 구분한 결과 상위인용논문이 가장 많은 나라는 미국이고 아시아의 경우는 일본으로 가장 높게 나타났으며 한국의 경우도 7위로 나타나 있고 이는 전통발효식품이 주된 식단을 갖고 있는 우리나라의 유산균 연구의 인용빈도가 인접국가보다 높지 않음을 알 수 있음(Table 1).

Table 1. 젖산균 관련 12,596개의 논문의 국가 및 지역별분포

Field: Countries/Territories	Record Count	% of 12596	Bar Chart
USA	1277	10.138 %	
SPAIN	1113	8.836 %	
FRANCE	1100	8.733 %	
JAPAN	963	7.645 %	
ITALY	944	7.494 %	
SOUTH KOREA	680	5.399 %	
CANADA	552	4.382 %	
GERMANY	512	4.065 %	
NETHERLANDS	498	3.954 %	
PEOPLES R CHINA	441	3.501 %	

Source from *Web of Science*

-한국 논문 680개 중 “Korean“ 또는 ” Wine“을 중심어로 하였을 경우 11개의 논문이 검색되었으며 이들의 연구논문들의 대개 탁주에서 분리되는 유산균 연구에 집중되어 있는 것으로 나타남.

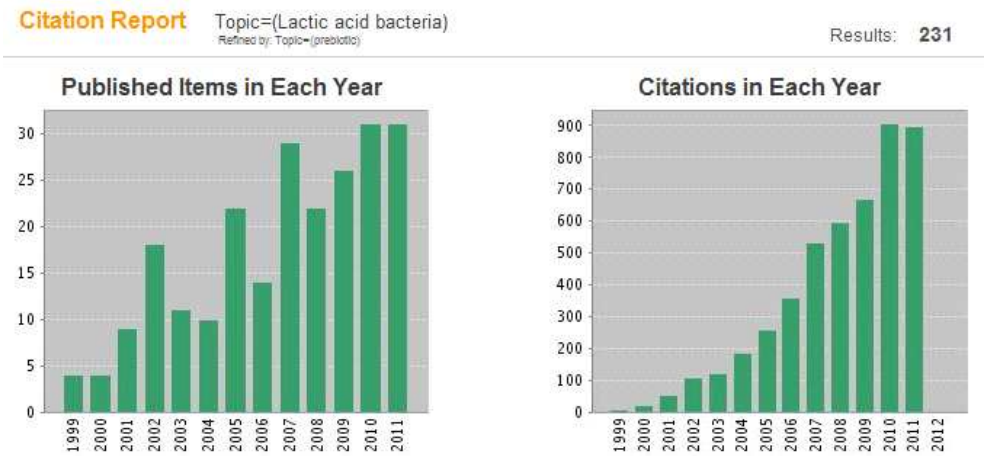
예) Effects of storage temperature and time on the biogenic amine content and microflora in Korean turbid rice(Kim 등 2011).

Diversity Analysis of Lactic Acid Bacteria in Korean Rice Wines by

Culture-independent Method Using PCR-denaturing Gradient Gel Electrophoresis(Kim 등 2010).

Diversity Analysis of Lactic Acid Bacteria in Takju, Korean Rice Wine(Jin 등 2008).

- Web of Science에서 조사된 젖산균관련 논문에서 기능성당을 의미하는 "prebiotic"을 주제어로 조사하였을 때 관련 연구논문들은 총 231개로 조사되었으며 매년 연구관련 논문이 대체적으로 증가하고 있으며 그 인용빈도도 계속 증가하고 있음. (Fig 1.)



Source from *Web of Science*

Fig 1. Web of Science 내 'prebiotic'을 관심어로 갖고 있는 논문들의 연구현황

- 국내는 국가과학기술지식정보서비스(NITS) 웹사이트(www.ntis.go.kr)를 이용하여 전통주과제들에 대한 과제검색결과 '전통주'를 키워드로 하여 조사하였을 시 대학 및 연구공기업 중심으로 조사된 과제는 2002년부터 2011년까지 총 35개의 과제가 수행 또는 완료되었으며 과제에 대한 주제를 조회한 결과 젖산균에 대한 연구과제는 논문은 많지 않았으며 대부분은 전통주의 생산최적화, 저장성향상, 이화학적 품질특성과 관련된 연구논문으로 조사되었음.

예) 전통주의 저장성 향상 기술개발 및 상품화 (2011,전남도립대학)

발효식품의 향미개선효과가 뛰어난 Oenococcus oeni대사공학기술 개발 (2009, 충북대)

지역농산물을 원료로 하는 증류주의 제조방법 개발(2011, 서남대)

고품질 막걸리 생산을 위한 현장적용형 실시간 품질 모니터링 시스템 개발(2010, 충남대)

전통주의 양조기반기술 구축 및 과학화(한식세계화) (2009, 농진청)

유용 양조미생물의 활용기술개발(한식세계화) (2009, 농진청)

전통누룩 유래미생물 및 전통주의 생리 기능활성 탐색 및 이를 이용한 웰빙식품개발 (2006,국순당)

- NIST에서 조사에서 ‘누룩’이란 키워드를 이용해 조사된 연구과제는 총18건이 있으며 이들의 연구과제는 대부분이 전통주와 관련된 연구과제와 겹쳐있었으며 미생물이나 기능성당 생성과 연관된 연구과제는 없는 것으로 파악되었음.

예) 민속주 품질향상을 위한 전용누룩 제조 및 고품질 민속주 개발 (2007, 한국식품개발연구원)

2. 문제점과 전망

- 한식의 세계화의 당위성 중에는 한식 레스토랑의 국제화를 통한 한국 문화의 확산, 한식 식재료 확대를 통한 수출증대가 있을 수 있다. 하지만 이러한 식재료의 경우는 한식이 대부분 식물성재료에 많이 의존하므로 이동 중 미생물 성장이나 부패가 일어날 수 있다는 점에서 일반 한식재료를 수출하기는 쉽지 않음.

- 레스토랑의 주요 수입원은 해외 유명레스토랑의 경우에서 볼 수 있듯이 와인과 같은 주류에 기인할 수 있는데 그동안 한국의 전통주는 국가의 연구지원이나 연구에 있어 소외되어 와서 일부 중견기업을 제외하고는 500여 생산업체가 영세성과 생산의 체계성이 미흡하다고 할 수 있음.

- 또한 전통 누룩을 이용한 전통주 생산에 있어 현재 전통방식으로 누룩을 생산하는 곳은 4개 생산업체(진주곡자, 상주곡자, 산성누룩, 송학곡자)가 대표적이고 나머지 탁주 생산업체의 경우는 일본식 입국방식의 당화와 발효형식을 빌려 탁주를 제조하고 있음.

- 그 동안의 국내의 유산균의 연구과제는 김치관련과제가 가장 많았으며 그 중에서도 김치 숙성연장에 초점이 맞추어져 있어 상대적으로 동형젖산 발효균인 *Lactobacilli* 균의 생육억제와 관련된 연구에 집중되어 있어 한식 중 중요한 위치를 차지한다고 할 수 있는 전통주에 대한 연구가 상대적으로 적었음.

- 정장작용을 하거나 장내 유익 균의 개체수를 증가할 수 있는 기능성 당 물질들은 주로 전분원료를 이용하여 정제된 효소들의 합성 과정을 통해 이를 분리 정제하는 과정으로 생산되고 있는데 이들의 대부분은 일본의 식품업계 및 당 관련 제조 업계에서 효소생산을 하는 균이나 종균 등을 확보하고 있는 실정임.

- 현재까지 국내에서는 이러한 기능성 당 물질과 관련된 연구가 많지 않았으며 또한 전통

누룩에 있는 미생물에 대한 조사도 연구가 미흡한 실정으로 과학을 바탕으로 한 한식의 세계화에 전통주의 연구, 그 중에서도 전통주의 종균을 제공하는 누룩에 대한 연구가 필요하며 국가경쟁에서도 우수한 균주의 확보가 각국의 산업적 중요균주 확보 경쟁에서도 그 필요성이 증가될 것으로 전망됨.

- 전통식품이나 식재료를 통해 분리된 균주를 통하여 GRAS (Generally Recognized As Safe) 물질로 균주를 확보하고 이들 균주를 통하여 기능성 당물질 생산과 더불어 이를 이용한 식품의 향미증진, 기능성 및 보존성 증대, 신개념 발효식품 개발 등으로 응용을 확대 할 수 있을 것으로 사료됨.

3. 국내 연구개발의 필요성

- 현재 국내에서 김치에서 분리된 *Leuconostoc mesenteroides*를 이용하여 dextran이나 isomaltooligosaccharides에 대한 연구는 효소에 관한 연구이거나 이미 분리 동정 되었던 균주를 이용한 연구였음(김 2002; 김 2004).

- 국내 발효식품에 대한 미생물 자원에 대한 조사와 확보가 미흡하여 미생물 자원 확보나 차후 균주의 특이성에 대한 응용연구 활성화 차원에서 산업 활용성이 높은 균주의 확보가 필요함.

- *Leuconostoc mesenteroides*의 경우는 우리나라 김치의 초기 발효나 일반 채소 발효에 관여하는 유산균으로 이 균이 설탕이 존재하는 환경에서 dextran 이나 기능성 올리고당을 생산해 낼 수 있는 능력이 있으며 또한 발효과정을 통해 설탕의 과당을 mannitol, lactic acid, acetic acid와 같은 발효산물을 만들어 냄으로서 이를 분리 정제 할 수 있을 경우 산업적으로 그 활용도가 높아질 수 있음.

- 현재 정부의 한식의 세계화는 일반적으로 전통한식을 외국에 알리려는 노력을 하고 있으나 서양인들의 입맛에 한국의 음식을 알리는 데는 막대한 예산과 시간이 필요로 함. (2009년도 예산, 100억원; 2010년 239.5억원) 그러나, 단기간에 한식의 우수성을 알리는 길은 과학적인 연구를 통하여 한식 또는 이와 관련된 식재료나 관련 발효 미생물들의 건강기능성을 알리는 것이 더 효과적으로 판단됨.

- 이미 서양인에게 건강식품으로 알려진 김치나 마늘과 같은 그 원료들에서 탄수화물을 생산해 낼 수 있는 유산균인 *Leuconostoc mesenteroides* 균주를 분리, 동정하고 생산된 기능성 당 물질이 장내 유익균을 증가시킬 수 있는지에 대한 건강기능성과 식품의 첨가할 수 있는 자연 첨가제로 활용할 수 있다면 본 연구를 통해 한식과 그 재료들의 우수성을 알릴 수 있어 국가의 정책 추진에도 도움이 됨.

- 따라서 본 연구에서는 전통누룩 4종류와 개량누룩 1종류의 일반 특성 및 젖산균 분포를 알아보고 pyrosequencing을 이용하여 전통누룩의 미생물 군집에 대해 알아봄. 또한, 전통누룩과 일반 시중에서 사용하고 있는 개량누룩을 이용하여 탁주를 제조하여 발효기간 동안 pH, 총산, 당과 알코올 함량, 아미노산 함량, 유기산 함량, 미생물 균총을 측정하였고, 발효가 끝난 후 각 특성에 대한 강도측정을 실시. 또한, 전통누룩에서 분리된 젖산균을 동정하였으며 이들 젖산균들의 probiotic특성을 확인하고 이들 균주들 중 dextran이나 isomaltooligosacchride 생산 가능성을 가진 균주를 분리하는데 그 목표를 둠.

- 전통방식으로 제조된 누룩에 기능성 다당류나 올리고당류를 생산하는 미생물들이 존재함 (Lee 와 Tae 2000; Yu 등 1998).

-기능성 다당류의 종류인 Dextran은 전분이나 셀룰로스와 같이 포도당으로만 이루어진 복합다당류이며 그 구조와 가지친 결합형태가 다양하고 복잡하며 그 크기가 10내지 150 킬로달톤(kd)정도임.

- Dextran은 일부 다른 젖산균에 의하여도 생산될 수 있으나 이형 젖산발효균인 *Leuconostoc* 균주가 설탕이 존재할 경우 생산하는 것이 일반적임(Fig. 2).

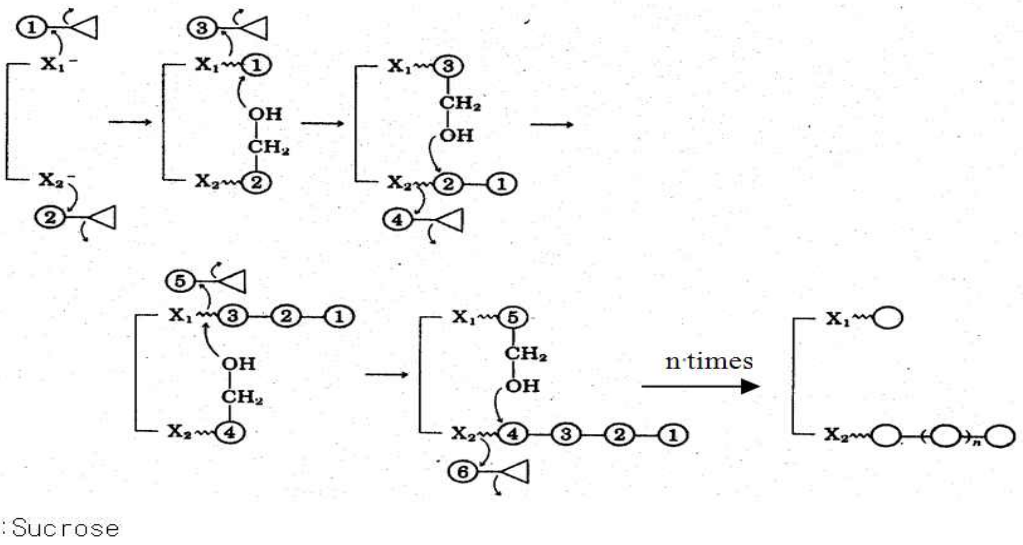


Fig 2. Mechanisms for the synthesis a-1,6 glucan by *L. mesenteroides* B-512F (ATCC10830). X_1 and X_2, nucleophiles of active site in enzymes

(Robyt J.F. 1986).

- 외국 (미국, 유럽)의 경우 *Leconostoc* 속 에 대한 미생물학적 접근을 통해 기능성 다당류인 Dextran을 상업적으로 활용하고 있음.

- 현재까지 상업적인 Dextran의 생산은 주로 *Leuconostoc mesenteroides* B-512로 생산되고 있음.

- Dextran은 의약제로도 이용되는데 Dextran-40 (MW: 40,000 Da)의 경우는 의약제로 주로 사용되어서 anticoagulation 치료제나 volume expander로 사용되고 있음.

- Dextran의 구조는 일반적으로 α-1,6 당결합을 기본 구조로 갖고 있으며 그 가지 구조는 Dextan을 생산해내는 균주의 특성에 따라 α-1,4, α-1,2, α-1,3의 당결합을 가질수 있음(Fig 3 and Table 2).

- Dextran은 또한 size-exclusion chromatography matrices로 사용될 수 있으며 이미 상업화된 제품으로 Sephadex가 있고 이외에도 bead를 만들어 bioreactor로 사용되거나 형광물질과 결합하여 생물학적 검출반응에 사용되는 등 다양한 생물학적 연구에서 많이 이용되고 있음.

- Dextran이 일부 젖산발효식품이나 산양유에서도 발견되어 미국에서는 안전한 식품첨가제로 사용할 수 있는 GRAS (Generally Recognized As Safe) 물질임.

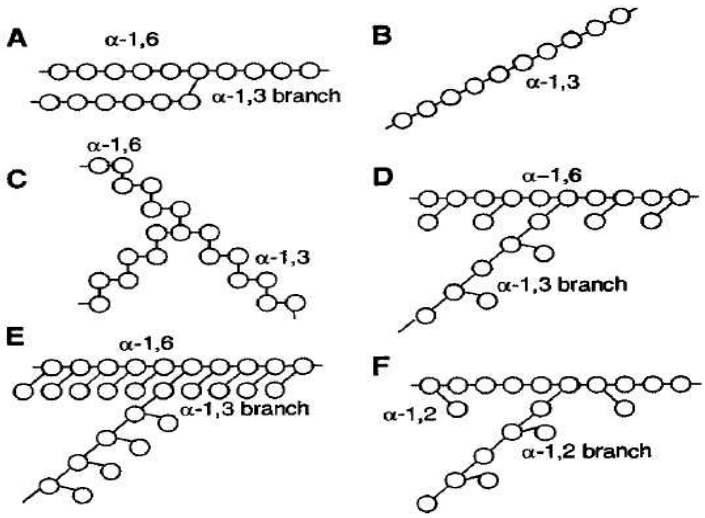


Fig 3. Diagrammatic representation of the structures of the different glucans synthesised by different glucansucrases from various *Leuconostoc mesenteroides* and *Streptococcus mutans*

(A) *L mesenteroides* B-512F; (B) *S mutans* insoluble mutan; (C) *L mesenteroides* B-1355 alternan; (D) *S mutans* soluble dextran; (E) *L mesenteroides* B-742 S-dextran; (F) *L mesenteroides* B-1299 dextran.

(Robyt J.F. 1986).

Table 2. Linkages in different dextrans as obtained by methylation analysis

Dextran from different *Leuconostoc* strains[a]	Solubility	Linkages %				
		a-1→-6	a-1→3	a-1→3 Br [b]	a-1→2 Br [b]	a-1→4 Br [b]
L. m. B-512F	Soluble	95	*5*			
L. m. B-742	Soluble	50		50		
L. m. B-742	Less soluble	87				13
L. m. B-1299	Soluble	65			35	
L. m. B-1299	Less soluble	66		1	27	
L. m. B-1355	Soluble	54	35	11		
L. m. B-1355	Less soluble	95		5		
S. m. 6715	Soluble	64		36		
S. m. 6715	Insoluble	4	94	2		

[a] *L. m.*, *Leuconostocmesenteroides*;S.m.,*Streptococcusmutans*.

[b] Br, Branch linkage

(Robyt J.F. 1986).

- 기능성다당류 생성 중 maltose, cellobiose, glucose등과 같은 다른 당 (receptors)이 같은 환경에 존재할 경우 글루코올리고당 (Glucooloigosaccharides)을 형성하게 되며 생성되는 글루코

올리고당의 구조는 다당류의 하나인 Dextran의 경우와 마찬가지로 관여하는 *Leuconostoc mesenteroides*균주의 특성에 따라 변화됨 (Fig 4). 또한 이형젖산발효균의 특징으로 mannitol, lactic acid, acetic acid, CO_2 등도 발효산물로 생산해 냄.

- mannitol의 경우는 정제용 talblets이나 주사용 제재에 이뇨작용을 촉진시키는 의약첨가제, 자일리톨 등과 같은 치아우식균의 생육을 저해제하는 당알콜 제재, 고급생체 플라스틱 제조에 사용되는 가소제로도 사용이 가능한 고부가가치 제품임.

- 이렇게 생산된 올리고당류의 건강기능성들은 발표된 논물들의 의하여 장내 유익균들을 증가시킬 수 있는 prebiotic물질로서 그 기능성들이 확인된 바 있음.

- 이러한 과정을 통하여 생산된 올리고당류의 경우는 그 구조가 특이하나 일반적으로 isomaltooligosaccharides(이소말토올리고당)의 형태를 띠고 있음(Fig 5).

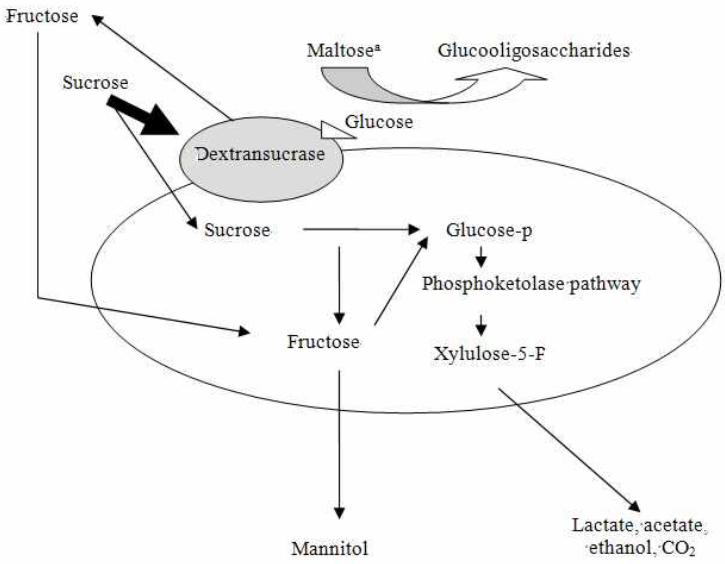


Fig 4. Schematic representation of carbon flow by *Leuconostoc mesenteroides* ATCC13146 during metabolism. The large circle and triangle represent a cell and active site of polymerization, respectively. a. Maltose is an example of an acceptor.

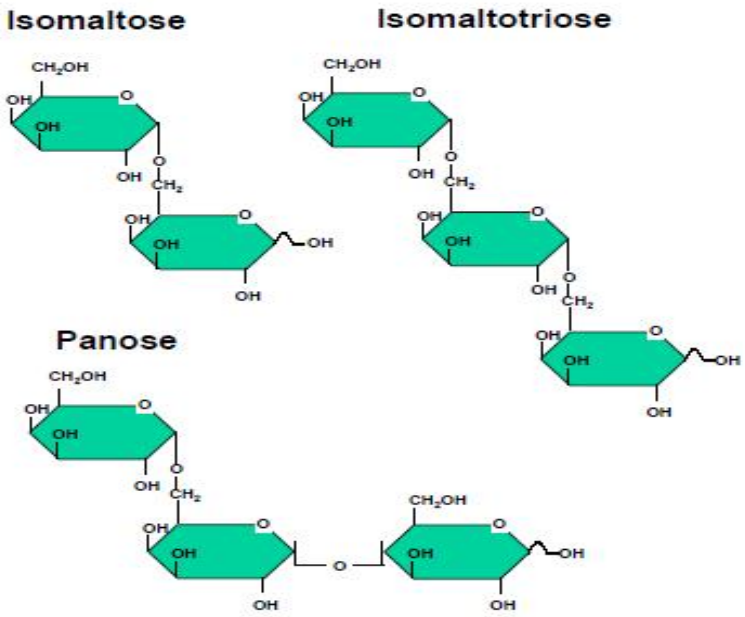


Fig 5. Structures of typical isomaltooligosaccharides.

- 이소말토올리고당의 식품기능성으로는 장내 *bifidobacteria* 균을 선택적으로 증식시키는 정장작용개선효과, 설탕과 달리 치아에서 치석을 발생시키는 *S. mutans*균에 이용되지 않으며, 수분보유능력이 뛰어나 전분질의 노화를 억제할 수 있으며, 고온이나 낮은 pH와 같은 식품제조 조건에서도 설탕보다 안정하며, 낮은 수분활성을 갖고 있어 식품저장성을 증대시킬 수 있음.

- 이소말토올리고당은 전분을 이용하여 효소적 생산방식으로도 생산할 수 있는데 현재 국내업계 (대상, 상품명:헬스리고)에서도 생산되고 있으며 올리고당의 함유율이 약 50%(w/v)내외임.

- Dextran이나 이소말토올리고당과 같은 기능성 당류를 생산해 낼 수 있는 균주를 전통방식으로 제조된 누룩에서 분리하며 분리된 균주의 동정을 전문가나 전문기관의 협조를 통하여 진행하였음.

Ⅲ. 연구개발의 최종 목표 및 주요내용

1. 연구개발의 최종목표

(1) 한국 전통방식으로 누룩을 생산하는 4개 곡자의 누룩으로부터 기능성 다당류나 올리고당류를 생산해 낼 수 있는 균주의 군집분석 및 분리・동정.

(2) Pyrosequencing 기법을 통한 전통누룩의 미생물군집 확인 및 발효 우수성 확인.

(3) 전통누룩과 일반개량누룩를 이용한 단양주 특성비교 조사.

(4) 전통누룩으로부터 분리한 다당 생성균주의 probiotic 특성조사.

(5) 생산된 다당류, 올리고당류의 기능성 확인과 기능성 당류의 특성 연구.

2. 연구의 주요 내용

2.1 전통누룩의 발효 우수성 확인

-Pyrosequencing을 이용한 미생물 군집 분석을 통해 전통누룩에는 다양한 미생물군집이 존재하며 이들 미생물군집을 통해 이들 미생물 군집의 metabolites 중 대표적인 맛 성분인 유기산과 유리아미노산 등이 발효과정을 통해 풍부해 짐을 과학적으로 연결 지어 확인하였음.

-배지를 이용하여 현재 남은 4종류 전통누룩 생산제품에서 젖산균 분리하고 동정하였으며 분리동정 된 젖산균들의 phylogenetic tree작성을 통해 전통누룩제품에 존재하는 젖산균의 계통을 보고하였음.

2.2 상업적 시 생산되는 전통누룩제품과 일반 개량누룩을 이용한 단양주 특성 조사

-현재 상업적 막걸리생산에서 가장 많이 사용하고 있는 일반 개량누룩과 전통누룩을 이용하여 발효한 탁주를 이용하여 제품품질 특성을 확인함.

-이를 통하여 전통누룩의 탁주제조 시 당, 알코올, 유리아미노산, 유기산과 같은 화학적 특성과 미생물균총의 변화 및 관능검사를 통해 이들 metabolites들과 맛의 강도를 연결하여 확인하였음.

2.3 전통누룩으로부터 분리한 다당생성 균주의 probiotic 특성 조사

-전통누룩에서 젖산균을 배지법을 통해 분리 동정하였으며 이들 균주 중 기능성 다당 및 올리고당 생성이 가능한 *Leuconostoc*과 *Weissella*균주들을 분리 동정하였으며 내산성, 내담즙성 및 유해미생물 (*E. coli*와 *S. typimurium*)에 대한 생육억제능을 측정하여 probiotic의 기능성을 확인하였음.

2.4 생산된 다당류, 올리고당류의 기능성 확인과 기능성 당류의 특성 연구

-전통누룩에서 분리동정된 다당생성 젖산균의 dextransucrase의 활성과 이소말토올리고당 생성능을 확인하였으며 이들 생성된 올리고당의 분리방법에 대한 기초자료를 제시하였음.

3. 실험 재료 및 방법

3.1 실험 재료

재료는 전통방식으로 누룩을 제조하는 곳에서 법제된 밀 누룩 4종류(SH, JJ, SS, SJ)와 한국효소(주)에서 제조한 개량누룩(MN) 및 효모(*Saccharomyces cerevisae*)를 사용하였으며 찹쌀은 경기도 남양주시에서 2012년 3월 29일에 도정된 찹쌀을 구입하고 물은 생수(농심, 제주 삼다수, 제주특별자치도개발공사)를 끓인 후 식혀서 사용하였다. 선정된 누룩들 간에도 제조법에 차이는 Table 3과 같다.

Table 3. Characteristics of 5 tested Nuruk samples

	원료	사용수	누룩특성	제조방법	비고
JJ	수입밀	지하수	실리콘누룩틀(1450g, 22cm(밑지름)x20cm(윗지름) x5cm(높이))사용	15일간 발효, 45일 건조 및 숙성	
SH	수입밀	지하수	20.5(D)x2.5(H), 750g (건조후 중량)	3-4주 발효, 30일 이상 건조 및 숙성	
SJ	수입밀	수돗물 사용	33cm(밑지름)x21cm(윗지름) 누룩틀 사용, 누룩틀에 누룩을 넣고 중년여성이 3-4번 발로 디뎌 성형	7-10일 발효 (온도 섭씨 37-40도) 및 7-10일 건조 (40도), 건조 및 숙성과정 없이 판매	
SS	국산통밀	지하수	1kg정도의 밀반죽을 35cm(지름)x2.0-2.5cm(두께) 원형판에 올려놓고 노인들이 발로 디뎌 성형, 제품 (34x2.0-2.5, 약 1kg)	선반위 왕골 돗자리 사용, 7일간 1차 (섭씨 38도) 발효 후 7일간 2차 발효(섭씨 30도 누룩방)	*Aspergillus sp.* 와 *Rhizopus sp.* 가 동시 존재하는 것으로 보고 됨
MN			국수(누들)형	찐 소맥에 *Aspergillus* 접종	소맥피, 밀가루 동량 사용

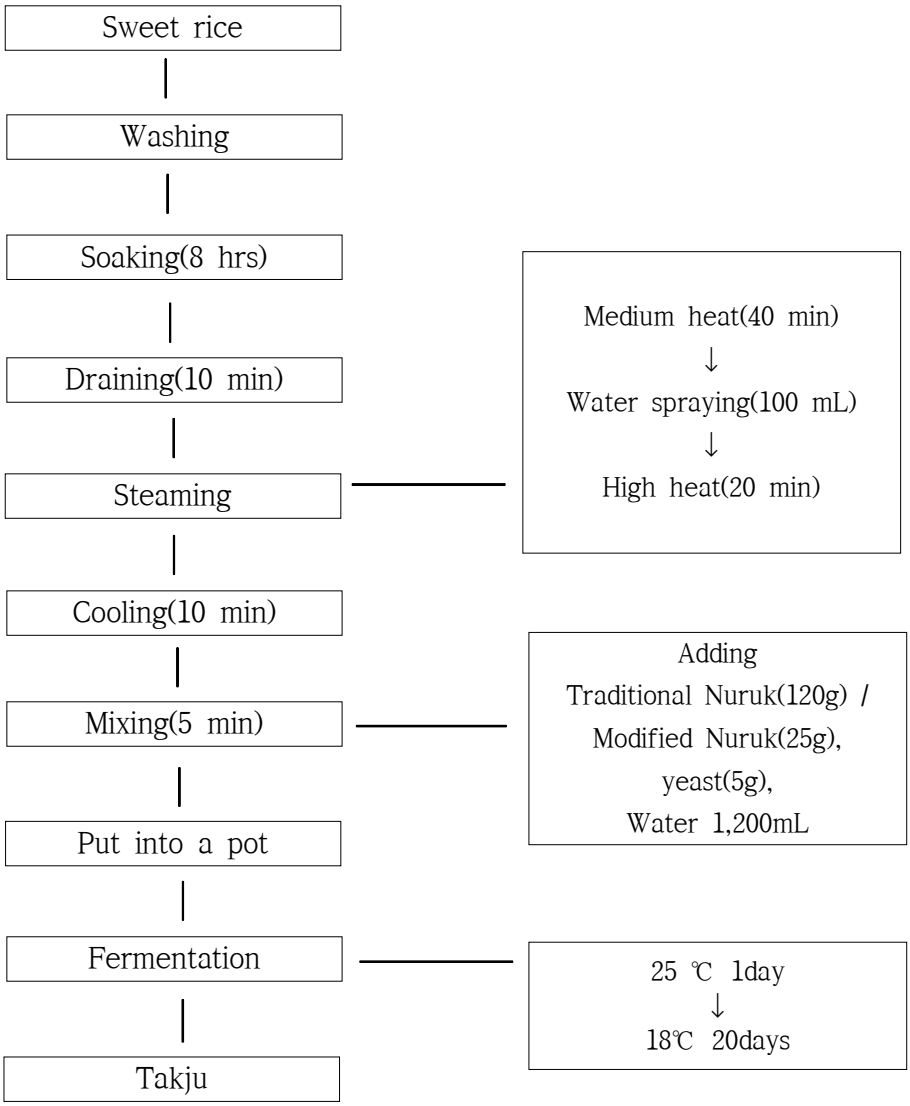


Fig 6. Preparation procedure of *Takju*

3.2 탁주의 제조

탁주를 만드는 방법과 재료의 비율은 술빚기의 기본이 되는 탁주류 중 부의주 만드는 방법을 응용하여 만들었으며(박록담. 2005. 다시쓰는 주방문. p20-25, 76, 82-83) 탁주의 재조 방법은 Fig 6과 같으며, 탁주에 첨가할 재료의 비율은 Table 4와 같다. 탁주의 제조를 위해 쌀을 한 방향으로 300번 돌려주면서 씻은 후 맑은 물이 나올 때 까지 헹굼을 한 후 8시간 쌀을 수침하였다. 수침이 끝난 후 맑은 물이 나올 때까지 다시 헹굼을 한 후에 체에 밭쳐서 10분 동안 물 뺐다. 그 후 시루에 담아 중불에서 40분 찐 후 쌀 무게의 10%의 양을 살수 후 밥을 저어주었다. 그리고 센 불에서 20분 더 쪄준 후 꺼내어 10분 동안 식힌 다음 식힌 밥, 물, 누룩, 효모를 넣어 5분 동안 혼합하였다. 저장용기에 담고, 담금 시작부터 25℃의 항온기에서 1일간 발효시킨 후 숙성을 위해 18℃로 온도를 바꾼 후 저장하며 실험하였다.

Table 4. Formulas of *Takju*

Takju	Ingredients			
	Nuruk / amount(g)	Yeast(g)	Rice(g)	Water(mL)
T-SH	전통누룩 SH / 120	5	1,000	1,200
T-JJ	전통누룩 JJ / 120	5	1,000	1,200
T-SS	전통누룩 SS / 120	5	1,000	1,200
T-SJ	전통누룩 SJ / 120	5	1,000	1,200
T-MN	개량누룩 MN / 25	5	1,000	1,200

3.3 누룩

각 누룩을 분쇄기(FM-909W, Hanil, Seoul, Korea) 로 분쇄 한 후 20mesh 체(test sieve 850um, Chung gye inderstrial co. Seoul, Korea) 에 내린 후 사용하였다.

1) pH 측정

시료 10g에 증류수 90 mL를 가하여 homogenizer (Bag mixer 400 W, interscience, Japan) 로 1분 동안 균질화 시킨 후 pH meter(TOA HM-7E, TOA Electrocin Ltd, Japan)를 사용하여 측정하여 3회 반복 측정한 후 그것의 평균값으로 하였다.

2) 수분 측정

각 누룩의 수분측정은 A.O.A.C방법에 의하여 시료 2 g을 칭량한 후에 항량된 용기에 담아 105 ℃ Drying oven(세기, DI-0560, Korea)에서 24시간 건조하여 방냉기에서 30분간 방냉 한 후 항량이 될 때까지 반복 측정하고 3회 반복 측정하여 그 평균값과 표준편차를 나타내었다.

3) 적정산도 측정

시료 10g에 증류수 90 mL를 가하여 homogenizer (Bag mixer 400 W, interscience, Japan) 로 1분 동안 균질화 시킨 후 0.1 N NaOH를 pH 8.2가 될 때 까지 적정하였으며 적정에 소비되는 0.1 N-NaOH 용액의 소비량을 유기산함량으로 환산하여 초산 함량(%, w/v)으로 표시하였고, 계산식은 다음과 같다.

적정산도(%, w/v) = $\frac{0.006 \times V \times f}{S} \times 100$

V = 0.1N NaOH 소비량
F = 0.1N NaOH의 factor
S = 시료량(mL)

* 0.006 : N/10 수산화나트륨용액 1 mL에 해당하는 초산량

4) 회분 측정

각 누룩을 각각 3 g씩 항량값을 알고 있는 도가니에 정밀히 달아 전기난로에서 충분히 예열 후 550℃ 회화로에서 뚜껑을 덮고 회화 시킨다. 충분히 회화된 후 회화로에서 꺼내어 데시케이터에서 실온까지 냉각시킨 후 무게를 측정한 후 이를 3회 반복 측정한 후 평균값과 표준편차를 나타내었다.

5) 당화력 측정

각 누룩의 당화력 측정은 2% 가용성전분용액을 기질로 하여 국세청 주류분석규정(국세청 기술연구소. 2008. 주류분석규정(7차 개정), 서울, pp.12-15)에 따른 방법에 따라 측정하였다. 즉, 20% 가용성 전분용액 50mL을 55℃항온수조에서 30분간 예열한 다음 효소용액을 10mL를 가하여 60분간 당화시킨 후 0.5N NaOH 10mL를 가하고 급냉시켜 효소작용을 정지시켰으며, 이 효소 반응액의 포도당 함량은 dinitrosalicylic acid법(73)으로 측정하여 정량하였다. 당화력은 누룩 1g이 가용성 전분 1 g에 작용하여 생성된 포도당을 가용성 전분 1g에 대한 백분율로 당화율을 나타내었다.

6) 색도 측정

색차계(Minolta, CR-300, Japan)를 사용하여 측정하고, 이 때 시료의 명도(L-value, lightness), 적색도(a-value, redness) 및 황색도(b-value, yellowness) 값을 3회 반복 측정하여 평균값으로 나타내었으며, 백색판의 Hunter Scale은 Y=0.9450, X=0.3032, Y=0.3193 이다.

7) 당 함량 측정

각 누룩을 분쇄 후 증류수에 10% 희석 후 3시간 동안 추출하여 측정하였다. 표준용액의 제조는 표준시약급 제품인 maltose, fructose, glucose, ethanol (w/w)을 사용하였다. 시료들의 당 농도는 각각의 성분의 HPLC 면적 값을 표준용액의 검량곡선을 이용하여 농도를 측정하였다. 분석조건은 Table 5과 같다.

Table 5. HPLC operating parameters for sugar and ethanol analysis in *Nuruk*

Parameters	Condition
Column	Aminex HPX-87c
Detertor	Waters RI- 2414
Flow rate	0.6 mL/min
Mobile phase	Water
Oven temp	83℃
Injection Vol	20 uL

8) 누룩에 존재하는 젖산균 분리 동정

각 누룩에 존재하는 젖산균을 분리, 동정 하기위해 각 누룩을 분쇄 후 증류수에 10% 희석 후 3시간 추출하여 시료로써 사용하였다. *Lactobacilli* MRS broth에 agar 2%와 sodium azide 0.005%를 첨가한 배지에 도말, 계대배양 후 순수 colony를 획득하였다. DNA 추출을 위해 순수분리 된 균체에 5% Chelex 100 Resin (Bio-Rad, CA)를 첨가하여 10분 동안 가열한 후, 원심분리 된 상등액을 PCR의 주형 DNA로 사용하였다. Boiling DNA 추출법으로 얻어진 DNA로부터 PCR 반응이 이루어지지 않은 경우에는 genomic DNA 추출하여 16S rRNA gene 염기서열 결정에 사용하였다. 고체 MRS배지에서 배양된 균체로부터 MO BIO사의 UltraClean® Microbial DNA Isolation Kit를 사용하였으며 제조사의 protocol에 따라 DNA를 추출하였다. 추출된 DNA의 농도는 spectrophotometer (NanoDrop, ThermoScientific)으로 측정하였다. 16S rRNA gene의 염기서열은 SolGent 에 의뢰하였으며 염기서열 결정을 위하여 ABI 3730XL DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA)와 BigDye® terminator cycle sequencing ready reaction kit를 사용했다. 분리된 유산균으로부터 얻어진 16S rRNA gene의 부분 염기서열은 길이가 500-600 bp이었다. 이를 이용하여 분리된 유산균을 NCBI(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) BLAST 분석을 통하여 가장 높은 유사성(similarity)를 나타낸 종으로 잠정적으로 동정하고 참조균주의 16S rRNA 염기서열을 확보하였다. 염기서열의 편집은 BioEdit ver.4.0 프로그램을 사용하였으며 정렬은 ClustalX 프로그램을 이용하였다. Evolutionary distance matrices들은 MEGA 5.0 프로그램을 이용하여 Neighbor-Joining method 에 의해 염기서열간의 유전적인 거리와 계통도(phylogenetic tree)를 추론하였다. 계통도내 분지의 안정도를 조사하기 위하여 1000번의 bootstrap 재구성(resampling) 분석을 실시하여 500 이상의 값을 표시하였다.

9) Pyrosequencing을 이용한 미생물 군집 분석

각 누룩의 군집분석은 천연구소에서 수행되었다. 여러 개의 샘플들을 구분하기 위해 PCR primer에 포함된 barcode 별로 sequence를 나누고(barcode sorting), 길이가 짧거나 unambiguous base(N)이 발생한 sequence를 제거한다(prescreen by quality). Primer는 pairwise alignment 알고리즘을 이용해서 인지하고 잘라내며(Trimming primer sequences) Reads 가운데서 target gene(16 rRNA gene)이 아닌 reads를 제외시키는 과정 (Removing non target sequence)을 진행하였다. 이 때 BLASTN을 실행하여 Alignment Score(최소 100)와 E-value(최대 1.0)기준을 만족 시키는 reads를 찾아내며 이 과정에서 사용되는 BLAST 데이터베이스는 EzTaxon-e를 이용하였다. genomic DNA로 PCR을 수행하는 과정에서 나올 수 있는 artificial 한 fragment로 실제로 template 에 존재하지 않는 sequence가 multitemplate로부터 증폭되어 나오는 산물인 Chimera를 제거한 후 Assembly 과정에서 만들어진 contig sequence를 Similarity search를 통해 분류학적인 동정을 하였다(Taxonomic assignment). 군집 정보를 가지고 있는 이들 파일은 cm파일로 부르며, 천연구소의 CLCommunity 프로그램으로 결과를 비교분석 하였다 (*지 74* Chunlab. 2011. Microbial community analysis. p7-10 *지 75* Chunlab. 2011. CLcommunityTM. p11-207).

3.4 탁주

담금 시작부터 25℃ 항온기에서 0, 6, 12, 24 시간 저장하며 측정 후 18℃로 온도를 바꾼 후 2, 7, 14, 21일 간격으로 저장하며 실험하였다.

1) pH, 적정산도 및 당과 알코올 함량 측정

H, 적정산도 및 당과 알코올 함량 측정은 누룩 측정방법과 동일하게 측정하였다.

2) 유리 아미노산 함량 분석

탁주 0.5g을 증류수로 현탁시켜 10mL로 정용한 후, 8,000rpm에서 10분간 원심분리(centrifuge 5415C, Brinkmann Instruments Inc, Germany)하여 얻은 상징액 중 일부를 0.2㎛ membrane filtere에 통과시킨 후 여액을 분석하였다. 분석조건은 Table 6과 같다.

Table 6. Operating conditions of amino acid auto-analyzer

Parameters	Condition
Instrument	S430 (SYKAM)
Column	Cation separation column (LCA K07/Li)
Column size	4.6 × 150mm
Column temperature	37 ~ 74℃
Flow rate	Buffer 0.45㎖/min, reagent 0.25㎖/min
Buffer pH range	2.90 ~ 7.95
Wavelength	440nm and 570nm

3) 유기산 함량 분석

탁주 0.5g을 증류수로 현탁시켜 10mL로 정용한 후, 3,000rpm에서 20분간 원심분리(centrifuge 5415C, Brinkmann Instruments Inc, Germany)하여 얻은 상등액 중 일부를 0.45㎛ membrane filter에 통과시킨 후 여액 20 ㎖를 HPLC로 분석하였다. 분석조건은 Table 7과 같다.

Table 7. HPLC operating parameters for organic acid analysis

Parameters	Condition
Model	LC-10Avp Shimadzu Co., JAPAN
Column	Rezex ROA-Organic Acid (300×7.8mm)
Mobile phase	0.005N H_2SO_4
Oven temperature	30 °C
Flow rate	0.5 mL/min
Inj.Volume	20 ㎕
Detection	UV-VIS Detector(210nm)

4) 미생물 균총의 측정

각 시료를 균일하게 혼합한 후 무균적으로 1mL을 취하였다. 이를 멸균수를 이용하여 10배 희석법으로 일정 농도로 희석하고, 총 균수는 PCA(plate count agar, Difco, USA)배지, 총 효모수는 PYGA(peptone 1%, yeast 0.5%, glucose 2%, agar 2%)배지, 총 젖산균수는 *Lactobacilli* MRS broth에 agar 2%와 sodium azide 0.005%를 첨가한 배지에 평판주가법에 의해 접종하여 28℃에서 48시간 배양 시킨 후 생산된 colony forming units(CFU/mL)로 나타내었다.

5) 관능검사

검사원은 SJ 대학교 학생 남성 10명, 여성 10명으로 총 20명을 대상으로 이루어졌다. 패널 훈련은 한 시간 동안 선정된 향 특성 및 맛 특성에 대해 standard를 제시하여(Lee와 Ahn. 2010) 패널요원의 이해 정도를 파악하였다. 본 실험에서는 각 시료에 세 자리 난수표로 코드화 한 후 Williams' latin square 법에 의해 random화 하여 제시하였다. 시료는 먼저 코로 향을 입으로 맛을 보는 순서로 하였으며, 한 개의 시료를 먹고 나면 반드시 물로 입안을 헹군 후 다음 시료를 평가하도록 하였다. 검사원에게 채점표가 나누어지고 과일향(fruit flavor), 곡물향(grain aroma), 누룩향(Nuruk aroma), 단맛(sweet taste), 신맛(sour taste), 곡물맛(grain taste), 알코올맛(alcohol taste)의 각각의 항목에 대하여 9점 척도(1 : 대단히 약함, 5 : 보통, 9 : 대단히 강함)에 의해 각 측정 항목의 강도를 측정하도록 하였다. 각 특성의 정의와 사용된 standard는 Table 8과 같다.

Table 8. Define of Sensory Properties and Standard recipe on the descriptive analysis for *Takju*

Sensory characteristic	Definition	Standard recipes
Aroma attributes		
Fruit aroma	The smell associated with ripe fruits similar to pears	Crushed pear 15 g/100 mL distilled water
Grain aroma	The smell associated with crushed barley and other grains	Crushed unpolished rice and barely 4 g/20 mL distilled water
Nuruk aroma	The smell associated with *Nuruk*	Crushed Nuruk 10 g/100 mL distilled water
Flavor/taste attributes		
Sweet taste	Basic taste descriptor characterized by a solution of sucrose	Sucrose 6%(w/v)
Bitter taste	Basic taste characterized by a solution of caffein	Anhydride caffeine 0.1%(w/v)
Sour taste	Basic taste descriptor characterized by a solution of organic acid	Citric acid 0.25%(w/v)
Grain taste	Flavor similar to Crushed barley and other grains	Crushed unpolished rice and barley 4 g /20 mL distilled water
Alcohol taste	Alcohol	25%(w/v) Ethanol

3.5 통계분석

누룩과 탁주에 대한 실험결과는 SPSS(Statistics Package for the Social Science, Ver. 17.0 for Window) program을 이용하여 통계 처리하여 분석하였다. 실험은 3회 반복실험을 하였으며 분석 방법으로 평균과 표준편차 및 분산분석 등을 실시하였으며 Duncan의 다중 범위 검정(Duncan’s multiple range test)을 이용하여 유의성 검사를 실행하였다.

3.6. 분리균주로부터 생성된 기능성 탄수화물의 특성

1) Dextransucrase 활성능 측정

Arun(1994) 의 방법 을 사용하여 분리균주의 배양액의 dextransucrase의 활성을 측정하였다. Sucrose 액체배지에서 28℃, 24시간 배양한 배약액을 원심분리하여 상등액을 조효소액으로 사용하였다. 0.2M sodium acetate buffer 2mL과 1.75M sucrose 0.5mL를 혼합하여 기질액으로 사용하고 0.5mL의 조효소액을 넣어 30℃에서 1시간 반응시킨 후 0.5M NaOH로 반응을 정지시켰다. DNS method에 따라 DNS 시약 150μL와 sample 50μL을 바로 vortex하고 끓는 물에서 3분간 반응을 시킨다. 2분간 ice-hold하고 증류수 800μL을 첨가하여 520nm에서 흡광도를 측정하여 fructose standard curve로부터 환원당을 정량하였다. 1 DSU는 30℃에서 1시간 반응시킬 때 sucrose 1 mg을 dextran으로 전환시키는 효소의 양으로써 반응 중에 생성되는 fructose 0.52 mg에 해당한다. 단백질은 Bradford method(Bradford 1976)에 의해 sample 1mL에 염료시약 dye reagent concentrate을 1mL 첨가하여 vortex한 후 5분간 실온에 방치하고 590nm에서 흡광도를 측정하여 bovine serum albumin standard curve로부터 정량하여 dextransucrase 활성을 specific activity로 나타냈다.

2) 기능성 당류의 수율 측정

2.1) 기능성 탄수화물의 분리

분리균주로부터 생성된 EPS 및 oligosaccharides의 분리는 균체 배양액을 4℃, 10,000rpm에서 30분간 원심분리하여 균체를 제거하고, EPS 침전을 위해서는 2배가량의 냉각된 2-propanol을 서서히 가하고, olidosaccharides의 침전을 위해서는 4배가량의 냉각된 2-propanol을 서서히 가하여 4℃에서 15시간 침전시켰다. 침전물은 회수하고, 남은 2-propanol을 건조시킨 후 이를 crude EPS 및 crude oligosaccharides로 하였다(T. Smitinont 등 1999).

2.2) 생성 당류의 수율 측정

Sucrose 액체배지 및 maltose를 첨가한 SM 합성 액체배지에 분리균주를 접종하여 28℃에

서 72시간 배양 후 회수한 crude EPS 및 crude oligosaccharides 을 100℃의 드라이오븐에서 건조하여 건조중량을 측정하였다.

3) 기능성 당류의 수율 측정

4 ℃, 24 hours 안정화 단계가 끝난 후 시료를 원심분리하여 얻어진 상등액에 2배 또는 4배가량의 2-propanol을 첨가하여 4℃에서 15시간 방치하였다. 침전물을 회수하여 드라이오븐에서 건조하여 건조중량을 측정하였다.

3.1) 사용 유해미생물 및 배양배지

Escherichia coli 와 *Salmonella typimurium*은 한국 농업미생물자원센터(KACC)에서 분양받았으며 배양배지는 각각 Luria Bertani(Difco Laboratorried, Detroit, MI, USA), Trypic Soy 한천배지(Difco Laboratorried, Detroit, MI, USA)를 사용하였다.

3.2) 분리 균주의 배양상등액 제조

내산성 시험과 내담즙성 시험을 통해 선발된 균주들에 의한 병원성 미생물 억제 능력을 시험하기 위해 10 mL MRS broth에 접종하여 28℃에서 24시간, 2회 계대배양하여 균의 활성을 높인 배양액을 10,000 rpm에서 10분간 원심분리하고 상등액을 취하여 0.45 *u*m syringe filter로 제균하여 배양 상등액을 사용하였다(Schillinger U. 와 Lucke F.K. 1989).

3.3) 분리균주의 유해미생물 생육억제능력 시험

분리균주의 병원 미생물에 대한 생육억제 능력의 측정을 위해 paper disc method(Tagg J. R. 와 Mcgiven A. R. 1971; Lee 와 Lee 1997; Kim 등 1998; Chun 등 2005; Lee 등 2010)를 사용하여 screening하였다. *E. coli, S. typhimurium*은 각각 LB배지, Trypic Soy 한천배지에 10^8 cfu/mL수준으로 도말한 뒤 멸균된 paper disc(diameter 6 mm, advantec, Tokyo, Japan)를 배지에 얹은 후 배양 상등액을 40 ㎕씩 paper disc에 떨어뜨렸다. 37℃, 24시간 동안 배양하면서 paper disc 주위에 병원성 미생물에 대한 생육저해환(clear zone)의 생성유무를 관찰하여 크기(mm)를 측정하였다.

Ⅳ. 연구개발결과

우리나라에는 전통적으로 수많은 누룩제조법이 존재하였으며 이러한 차이들로 인하여 우리나라 술의 다양성을 보존하였으나 술에 대한 통제가 있었던 일제시대를 기점으로 누룩을 제조방법이나 다양한 누룩제품들은 사라지게 되어 현재는 일반적인 특성이나 제조법에 대해서 그동안 술제조에 관심이 있거나 가문에서 전해오는 전통주를 생산해 왔던 일반인, 고문헌이나 전통주에 관심을 갖는 연구자, 일부 전통주 생산기업 또는 일부 과학자들에 의해 전통누룩 제품을 연구하고 있는 실정이다. 이러한 실정은 전통누룩의 제조방법이 누룩이 제조되는 수많은 환경들의 차이, 즉 원료생산 및 누룩제조지의 기후풍토의 차이, 원료의 차이, 생산자의 생산시설과 제조시설의 환경의 차이, 사용되는 수질의 차이, 또는 공기 중 존재하는 미생물의 차이 등 여러 제어되지 못하는 이런 환경들로부터 오는 연구의 어려움으로 인해 식품과학자나 미생물학자들의 연구대상에서 제외 된 면이 있다. 현재 누룩을 기업형으로 제조하고 시판하는 회사는 1980년대 6곳이었으나 누룩판매량 감소로 인한 경영상태의 악화로 3곳은 문을 닫았으며 현재는 상주곡자 주식회사, 진주곡자 공업연구소, 송학곡자 3곳이 있으며 기업형의 아니지만 전통방식에 가까운 방식으로 누룩을 제조하여 판매하고 있는 부산 금정산성토산주에서 제조하는 산성곡자가 대표적이다(유대식, 유현영 2010).

전국적으로 다양한 누룩제조법이 존재하였으나 이러한 누룩제조법이 전통주제조에 있어 당화와 발효에 필요한 미생물 또는 효소들을 제공하는 제공원이라는 관점으로 이해하게 된다면 전통누룩의 제조방법을 정리하여 아래의 순서로 소개한 1941년 출판된 곡자제조강본(유대식, 유현영 2010)의 제조방법이 우리나라의 전통누룩의 제조순서를 파악하는데 도움이 될 것이다.

전통누룩의 제조방법에서의 원료는 지역에 따라 밀, 쌀, 수수, 보리 등 다양하나 밀의 사용이 일반적 이였으며 이를 이용하여 제조하는 순서는 다음과 같았다.

1) 정선: 소맥을 물로 씻고 오염물을 제거
2) 분쇄: 소맥을 기계적으로 눌러 압맥으로 만든 후 분쇄기로 분쇄
3) 성형: 분쇄한 소맥분에 물을 넣어 혼합하여 일정한 틀에 넣어 곡자의 모양을 만듦
4) 발효(띄움):

전발효 (생 곡자를 곡자실에 넣어 3-4일간 곡자균들이 곡자의 표면에 증식하는 시기)

주발효 (발효 4일째부터 6일 정도 진행되며 균들이 곡자 내부로 증식과 더불어 균의 증식이 가장 왕성하여 곡자 중에 각종 효소류가 생성되는 시기)

후발효 (누룩을 적당히 건조시키는 시기로 10일 정도 진행되며 곡자의 건조가 충분히 일

어나고 향기나 액화력을 완성하는 시기)

5) 저장 및 숙성: 저장고에서 약 60일간 완전한 건조를 시키면서 곡자를 숙성시키면서 곰팡이의 이취를 제거

이들 방법은 일반적으로 단일 곰팡이만을 이용한 국(Koji)이라고 하는 입국과는 원료를 첫째, 생 전분을 이용하고 둘째, 천연의 자연환경에 존재하는 모든 미생물의 접종으로 제조된다는 것에서 차이점이 있다. 따라서 본 연구에서는 생전분과 자연 미생물을 이용하여 생산되어 시판되는 네 가지 제품 (상주, 진주, 송학, 산성)과 밀기울과 밀가루를 혼합하고 물 배합 후 증자하여 *Aspergillus* 속 균을 접종시켜 표면적을 넓히기 위해 밀가루반죽을 국수(누들)형으로 성형하여 효소력가를 높인 개량누룩 제품을 연구대상으로 선정하여 누룩의 미생물의 다양성, 젖산균분포 및 탁주 제조 시의 차이점과 다당 생성 유산균의 분리동정 및 이들 유산균의 다당생성능과 올리고당 생성에 관한 연구를 진행하였다.

1. 전통누룩

1.1 일반특성

본 연구에서 각 누룩의 일반적인 특성을 비교한 결과는 Table 9-10와 같다. 각 누룩을 증류수에 10% 가하여 침출했을 때 MN의 침출액의 pH는 5.86으로 가장 낮은 값을 나타내었으며 전통누룩인 SH, JJ, SS, SJ 는 6.18-6.81의 값을 나타내었다. 산도는 1.46%로 MN이 가장 높은 값을 나타내었으며 SH가 0.40으로 가장 낮은 값을 나타내었다. 침출액의 pH로 볼 때 개량누룩인 MN을 탁주제조에 사용할 경우에는 초기부터 술덧의 pH가 산성을 유지하여 비교적 안전한 양조가 이루어지겠지만, 전통누룩을 사용할 경우에는 산의 보충이나 미생물에 의한 유기산 생성이 초기에 이루어져야 할 것으로 본다(So 1999).

전통누룩 4종류의 수분함량은 11.34-12.49%로 유의적인 차이를 나타내지 않았으며 MN이 5.31%로 유의적으로 가장 낮은 값을 나타내었다. 누룩의 수분함량이 14% 이상일 경우 발효가 지연되거나 저장성을 감소시키는 문제점을 가질 수 있는데(Lee 와 Ahn 2010) 본 실험에 사용된 시료는 모두 14% 미만으로 저장성엔 문제가 없을 것으로 사료된다.

회분 함량은 MN이 3.68%로 가장 높은 값을 나타내었으며 1.41% 로 SJ가 유의적으로 가장 낮은 값을 나타내었다. 이는 쌀 누룩을 이용한 곡류 막걸리의 품질특성(Cho 등 2012)에서 보고된 바와 유사한 결과이며 회분 함량은 탁주의 맛에 좋지 않은 영향을 주는 요소로써 차후 막걸리의 품질에 영향을 미칠 것으로 추정된다.

전통누룩인 JJ, SS, SJ, SH 의 당화력은 각각 236.89 sP, 230.57 sP, 191.57 sP, 230.57 sP 로

평균 222.4 sP를 나타내었고 MN의 당화력은 1135.89 sP로 약 5.1배 높은 값을 나타내었다. 이상의 결과에서 알 수 있듯이 개량누룩은 전분 당화력, 전분 액화력 및 단백질 분해력이 기존 발효제인 전통누룩보다 현저히 높으므로 실제 양조에 사용할 경우에는 기존의 발효제를 사용할 때보다 훨씬 적은 양을 사용하여야 할 것으로 보인다.

각 누룩의 색도값은 Table 10과 같다. 명도를 나타내는 L값은 SJ가 71.53으로 가장 높았으며 MN이 59.87로 유의적으로 가장 낮은 값은 나타내었다. 적색도를 나타내는 a값은 개량누룩인 MN이 4.99로 가장 높은 값을 나타내었으며 황색도를 나타내는 b값 역시 MN이 16.43으로 유의적으로 가장 높은 값을 나타내었다.

Table 9. General properties of *Nuruk*

Sample	pH	Acidity(%)	Moisture (%)	Ash(%)	Saccharifying activity (sP)
SH	6.81±0.01^{e}	0.40±0.02^{d}	11.34±0.32^{b}	1.59±0.03^{c}	230.57 ±15.89^{b}
JJ	6.34±0.00^{d}	0.41±0.03^{d}	12.49±0.27^{b}	1.62±0.05^{c}	236.89 ±25.93^{b}
SS	6.18±0.01^{c}	0.74±0.05^{b}	12.22±0.38^{b}	1.78±0.02^{b}	230.57 ±3.78^{b}
SJ	6.02±0.02^{b}	0.64±0.02^{c}	12.10±1.96^{b}	1.41±0.01^{d}	191.57 ±12.06^{c}
MN	4.86±0.00^{a}	1.46±0.02^{a}	5.31±0.03^{a}	3.68±0.01^{a}	1135.89 ±15.89^{a}
F-value	6607.389***	671.786**	33.328***	3794.841***	2210.839*

1) Mean±S.D. *P<0.05 **P<0.01 ***P<0.001

2) ^{abcde}Means in a column by different superscripts are significantly different at 5% significance level by Duncan's multiple range test.

Table 10. Hunters color parameters of Nuruk

Sample	Color Value		
	L	a	b
SH	67.37±2.33[b]	2.02±0.006[c]	14.03±0.23[b]
JJ	70.95±2.08[a]	2.53±0.07[b]	14.35±0.46[b]
SS	69.63±2.16[a]	1.41±0.19[d]	10.99±0.59[c]
SJ	71.53±1.12[a]	1.52±0.17[d]	12.19±0.87[c]
MN	59.87±0.06[c]	4.99±0.02[a]	16.43±0.03[a]
F-value	30.807*	364.516***	52.469***

1) Mean±S.D. *P<0.05 **P<0.01 ***P<0.001

2) [abcde]Means in a column by different superscripts are significantly different at 5% significance level by Duncan's multiple range test.

1.2 당 함량

누룩 추출액의 당 함량을 측정한 결과는 Table 11과 같다. Maltose는 MN에서만 2.54 % 검출되고 나머지 누룩에서는 검출되지 않았다. Glucose 함량은 MN에서 3.52 % 로 가장 높은 값을 나타내었고 SH에서 0.82%로 가장 낮은 값을 나타내었다. Fructose 역시 MN에서 3.52 %로 가장 높은 값을 나타내었으며 SJ에서 0.15 %로 가장 낮은 값을 나타내었다. 이는 MN에서 사용된 전분이 당화효소에 의해 일부 maltodextrin이나 maltose로 전환된 것으로 보이며 다른 누룩에서는 누룩자체에 있는 당화가 MN보다 덜 진행된 것으로 판단된다. 알코올 함량은 MN이 3.07 %로 가장 높은 값을 나타내었으며 SH, JJ, SS, SJ 는 0.14-0.72%를 나타내었다. 이는 추출과정에서 미생물, 특히 곰팡이에 의해 생성되는 전분 분해효소의 활성이 증가되어 누룩의 전분이 당으로 전환되어 그것을 기질로 한 알코올 발효가 형성되었으며 당화력의 차이로 인해 MN이 높은 값을 나타낸 것으로 사료된다. 정동효(2012)의 문헌에 따르면 누룩에 존재하는 당류로서는 xylose, glucose, fructose, kojibiose, maltose, isomaltose, pentose 등이 존재하고, fructose와 glucose는 거의 같은 양이 존재한다. 본 실험에서 glucose와 fructose의 함량이 다른 것은 정동효의 저서와는 다른 경향을 나타냈지만 Kim 등(1997)의 연구와는 같은 경향을 나타냄으로써 이는 누룩의 제조방법 및 누룩에 존재하는 미생물에 의한 차이로 사료된다. 이들 당은 누룩으로 술을 양조할 때 효모 등의 미생물의 초기 영양 공급원으로 이용된다. 동일 누룩 첨가 조건이 아닌 경우 누룩에 포함된 당 성분이 발효에 영향을 미칠 수 있으나 누룩에서 유래한 당량은 쌀 전분에서 당화되는 양에 비해 미비하며(Lee 등 2011) 본 연구에서는 동일 조건의 당화력의 누룩 제공량과 재료를 이용하여 누룩이 첨가 되었으므로 발효에 미치는 영향은 크지 않은 것으로 생각된다.

Table 11. Glucose, fructose, maltose and ethanol concentration of *Nuruk*

(%,w/w)

Sugar	Samples				
	JJ	SS	SJ	SH	MN
Maltose	0.00	0.00	0.00	0.00	2.54
Glucose	1.54	1.45	0.90	0.82	3.52
Fructose	0.34	0.30	0.15	0.30	3.52
Ethanol	0.21	0.48	0.73	0.14	3.07

1.3 미생물 선택배지를 이용한 젖산균 분리 동정

각 누룩으로부터 미생물의 계수에 사용된 MRS 와 PYSA 배지로부터 성장된 균을 분리하여 총 223개의 순수 배양체를 확보하였으며 분리균주들을 대상으로 16S rRNA gene 염기서열을 기준으로 총 64종의 젖산균을 분리, 동정하였다. 누룩으로부터 얻어진 균은 NCBI Blast search 를 통하여 유사성을 갖는 종의 염기서열을 포함하여 계통분석을 시행하였으며 그 결과는 Fig. 7-10과 Table 12-17과 같다.

JJ 에서는 *Pediococcus* 속 4종과 *Weissella* 속 1종을 확보하였고, SS 에서는 총 30종의 균주가 분리되었으며 *Weissella* 속 12종, *Leuconostoc* 속 3종, *Lactobacillus* 속 15 종이었다. SH에서는 총 9종의 균주가 분리되었으며 *Pediococcus* 속 8종, *Leuconostoc* 속 1종이었으며 SJ 에서는 6종의 균주 중 *Pediococcus* 속 4종, *Lactobacillus* 속 2종이 발견되었다. 개량누룩인 MN에서는 총 14종의 균주 중 *Leuconostoc* 속 3종과 *Weissella* 속 11종이 동정되었다.

기존에 보고된 자료에 의하면 누룩에서 분리한 발효 관련성 세균으로는 Jo 등(1995)이 누룩으로부터 *Lactococcus* 속, *Pediococcus* 속, *Enterococcus* 속 등을 분리하였고 Lee 등(2000)은 전국 각지의 누룩을 수집하여 종균으로 이용이 적합한 젖산균의 특성에 대한 연구를 수행하여 *Lactococcus lactis, Leuconostoc mesenteroides, Pediococcus pentosaceus* 등을 동정한 바 있으며 또한 Kim(2010)의 연구에서 *Weisseilla koreensis* 종을 분리한 바 있는데 본 연구에서는 총 22종의 다양한 *Weissella* 속이 검출되었음을 확인할 수 있었다.

특히 *Leuconostoc, Pediococcus, Lactococcus* 속 등은 발효에 관련된 유기산 생성 미생물 군집으로도 알려져 이를 이용한 연구로써 다양한 방면으로 연구되고 있는 실정이다. SS의 경우

가 가장 많은 젖산균종을 갖고 있는 것으로 나타났는데 이는 Kwon(2010)의 연구에서 SS 누룩을 미생물 다양성의 측면에서 비교했을 때 다른 누룩보다 약 2배 정도 다양성이 높게 분포 한다는 결과와 유사한 경향을 나타내었다.

Table 12. List of bacteria isolated from SH

Strain No.	Accesion No.	Identified speceis	Similarity(%)
SH1	CP000422.1	*Pediococcus pentosaceus*	98%
SH2	AB598975.1	*Pediococcus pentosaceus*	97%
SH3	JX272058.1	*Pediococcus pentosaceus*	99%
SH4	JX232607.1	*Pediococcus pentosaceus*	97%
SH5	JQ446471.1	*Pediococcus pentosaceus*	97%
SH6	FR873989.1	*Pediococcus pentosaceus*	98%
SH7	AB682485.1	*Pediococcus sp. NBRC 107186*	97%
SH8	JX490164.1	*Pediococcus pentosaceus*	99%
SH9	HM218732.1	*Leuconostoc mesenteroides*	97%

Table 13. List of bacteria isolated from JJ

Strain No.	Accesion No.	Identified speceis	Similarity(%)
JJ1	JX272058.1	*Pediococcus pentosaceus*	98%
JJ2	AB598975.1	*Pediococcus pentosaceus*	98%
JJ3	CP000422.1	*Pediococcus pentosaceus*	99%
JJ4	JX402126.1	*Weissella sp. Wikim SH005*	97%
JJ5	FR873989.1	*Pediococcus pentosaceus*	97%

Table 14. List of bacteria isolated from SS

Strain No.	Accesion No.	Identified speceis	Similarity (%)
SS1	JX402126.1	*Weissella sp. Wikim SH005*	98%
SS2	AB671281.1	*Weissella sp. A52*	97%
SS3	AB682328.1	*Weissella sp. NBRC 106026*	99%
SS4	AB682568.1	*Weissella sp. NBRC 107272*	97%
SS5	FJ611786.1	*Weissella sp. PSMS4-4 16S*	97%
SS6	JX402125.1	*Weissella sp. Wikim SH004*	98%
SS7	JX270774.1	*Lactobacillus sp. PC-3 16S*	97%
SS8	JX134607.1	*Lactobacillus plantarum*	99%
SS9	HQ728334.1	*Lactobacillus sp. SXVIII10(2011)*	97%
SS10	JN247633.1	*Lactobacillus plantarum*	99%
SS11	JN247629.1	*Lactobacillus plantarum*	97%
SS12	HQ293067.1	*Lactobacillus plantarum*	97%
SS13	HQ259237.1	*Lactobacillus sp. 70811*	98%
SS14	AB510751.1	*Lactobacillus plantarum*	97%
SS15	JX545342.1	*Lactobacillus brevis*	99%
SS16	JN247629.1	*Lactobacillus plantarum*	97%
SS17	AY383631.1	*Lactobacillus plantarum*	97%
SS18	JQ228531.1	*Lactobacillus plantarum*	98%
SS19	JF268321.1	*Lactobacillus paraplantarum*	97%
SS20	JQ046409.1	*Lactobacillus sp. WX212*	98%
SS21	JQ013418.1	*Lactobacillus sp. THK-W4*	99%
SS22	JX402126.1	*Weissella sp. Wikim SH005*	97%
SS23	AB671281.1	*Weissella sp. A52*	97%
SS24	GU138598.1	*Weissella cibaria*	98%
SS25	AB510746.1	*Weissella cibaria*	97%
SS26	GQ117000.1	*Weissella sp. NTU-112*	99%
SS27	AB510745.1	*Weissella cibaria*	97%
SS28	JX536122.1	*Leuconostoc mesenteroides*	97%
SS29	JN853602.1	*Leuconostoc mesenteroides*	98%
SS30	JN128641.1	*Leuconostoc sp. THK-W39*	97%

Table 15. List of bacteria isolated from SJ

Strain No.	Accesion No.	Identified speceis	Similarity(%)
SJ1	GQ359860.1	*Lactobacillus sp. 0-C-2*	98%
SJ2	JF268321.1	*Lactobacillus paraplantarum*	97%
SJ3	JX232607.1	*Pediococcus pentosaceus*	99%
SJ4	JX134608.1	*Pediococcus pentosaceus*	97%
SJ5	AB682485.1	*Pediococcus sp. NBRC 107186*	97%
SJ6	JQ446485.1	*Pediococcus pentosaceus*	98%

Table 16. List of bacteria isolated from MN

Strain No.	Accesion No.	Identified speceis	Similarity(%)
MN1	JX026036.1	*Leuconostoc sp. MEC9*	98%
MN2	AB494723.1	*Weissella confusa*	97%
MN3	JX402126.1	*Weissella sp. Wikim SH005*	99%
MN4	EF107614.1	*Weissella sp. Rrt5*	97%
MN5	JX188072.1	*Weissella confusa*	97%
MN6	AB425970.1	*Weissella confusa*	98%
MN7	HQ009757.1	*Weissella cibaria*	97%
MN8	EU807755.1	*Weissella confusa s*	99%
MN9	JX026037.1	*Leuconostoc sp. MEBE2 16S*	97%
MN10	JQ805675.1	*Weissella confusa*	99%
MN11	AB671281.1	*Weissella sp. A52*	97%
MN12	AB510746.1	*Weissella cibaria*	97%
MN13	EU807756.1	*Weissella confusa*	98%
MN14	JX026035.1	*Leuconostoc sp. MEC8*	97%

Table 17. Lactic acid bacteria from traditional *Nuruk*

	JJ	SS	SJ	SH	NN
Pediococcus	4	-	4	8	
Lactobacillus	-	15	2	-	
*Leuconostoc**	-	3	-	1	3
*Weissella**	1	12	-	-	11

* Dextran producing isolates

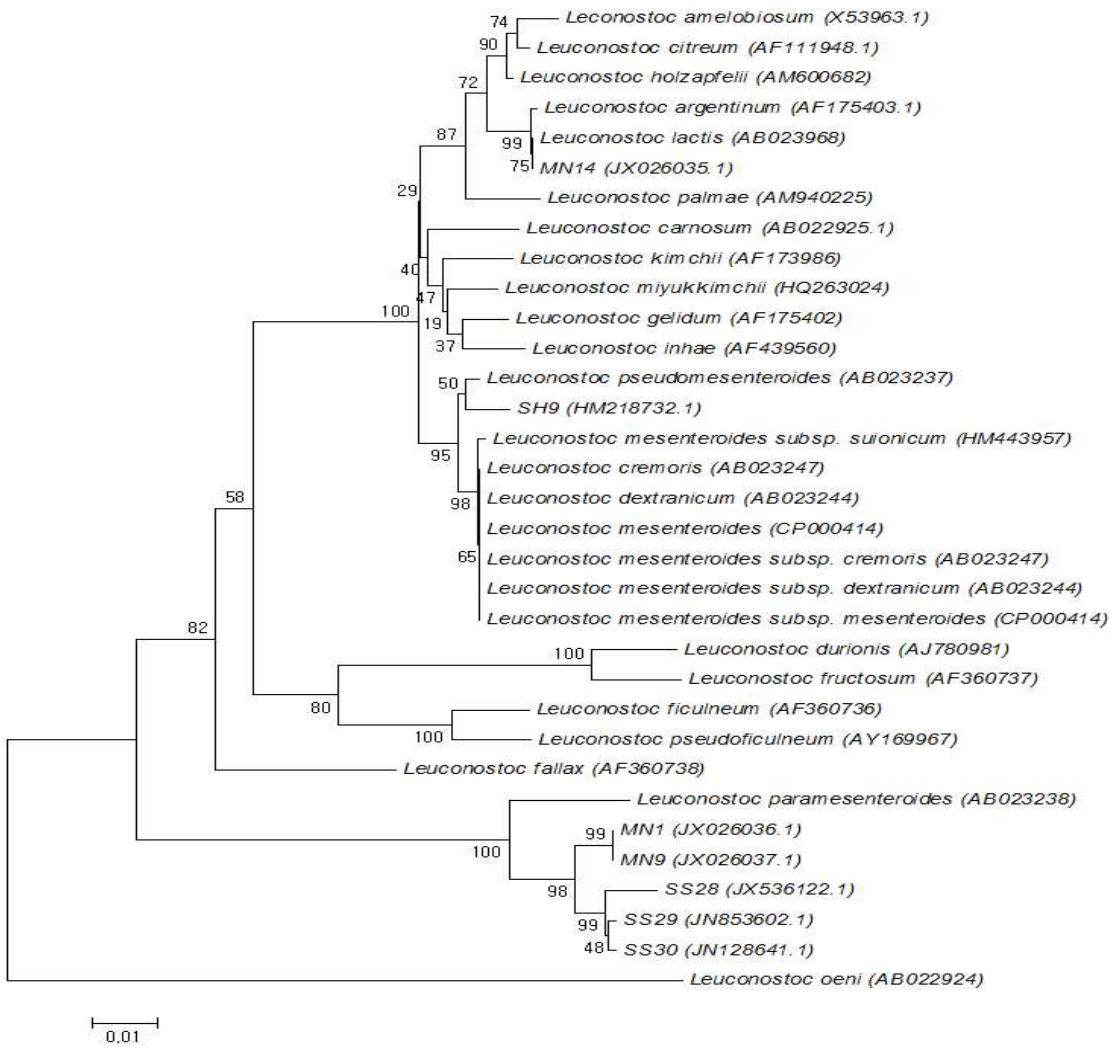


Fig 7. The phylogenetic consensus tree of the composition of the *Leuconostoc.* Numbers at the nodes indicated the bootstrap values on neighbor-joining analyses of 1000 resampled data sets. Bar 1 % sequence divergence.

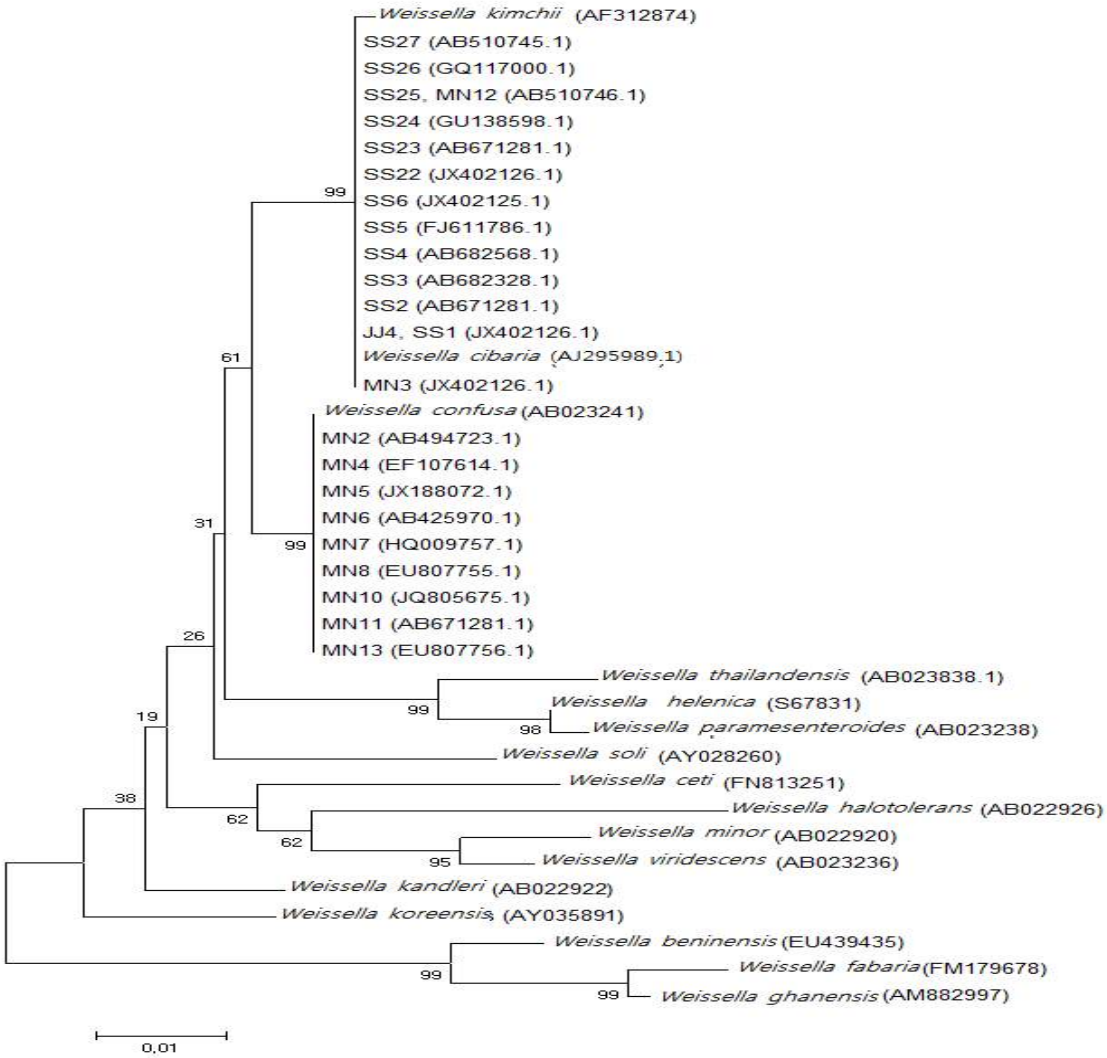


Fig 8. The phylogenetic consensus tree of the composition of the *Weissella.* Numbers at the nodes indicated the bootstrap values on neighbor-joining analyses of 1000 resampled data sets. Bar 1 % sequence divergence.

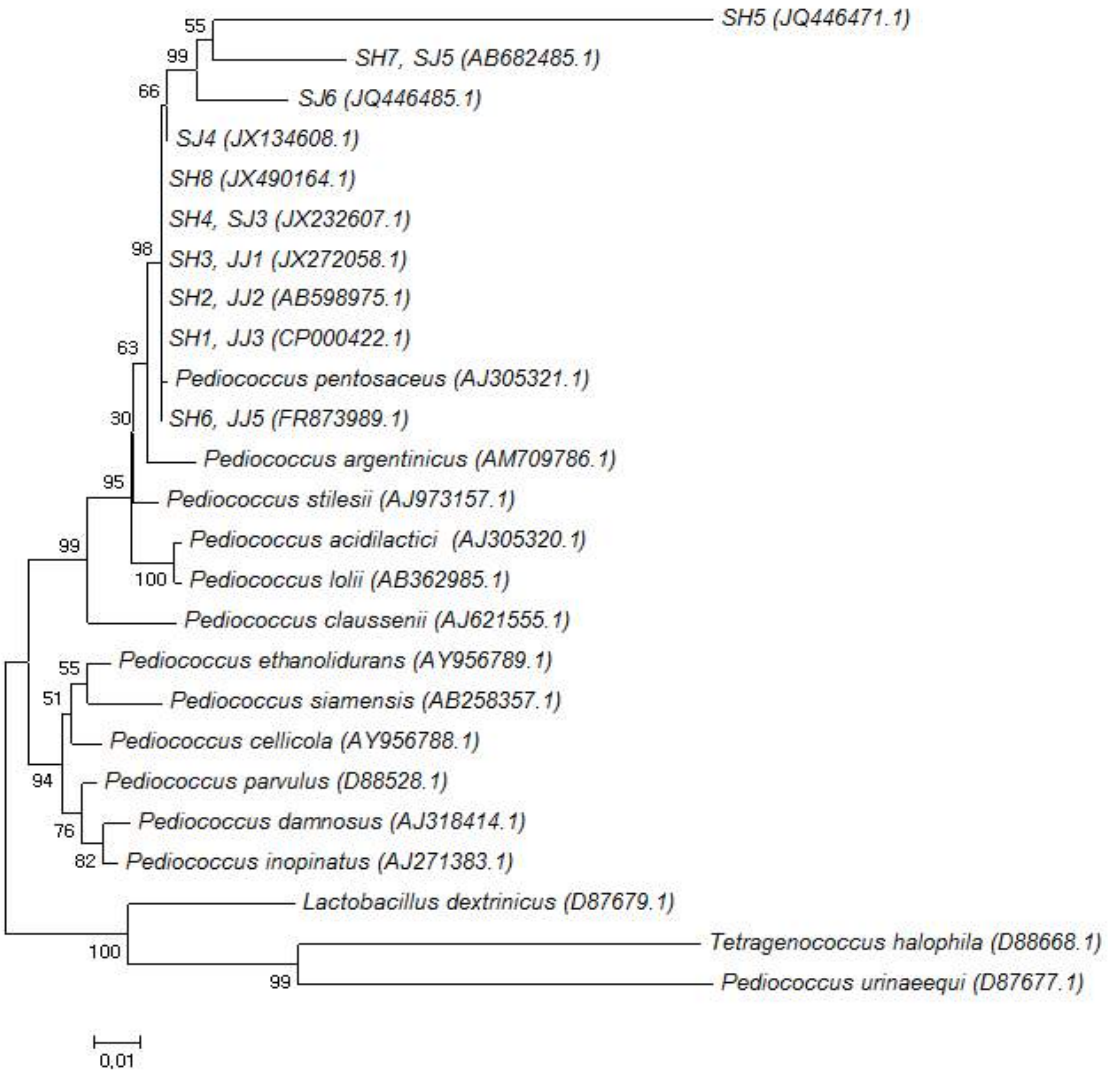


Fig 9. The phylogenetic consensus tree of the composition of the *Pediococcus.* Numbers at the nodes indicated the bootstrap values on neighbor-joining analyses of 1000 resampled data sets. Bar 2 % sequence divergence.

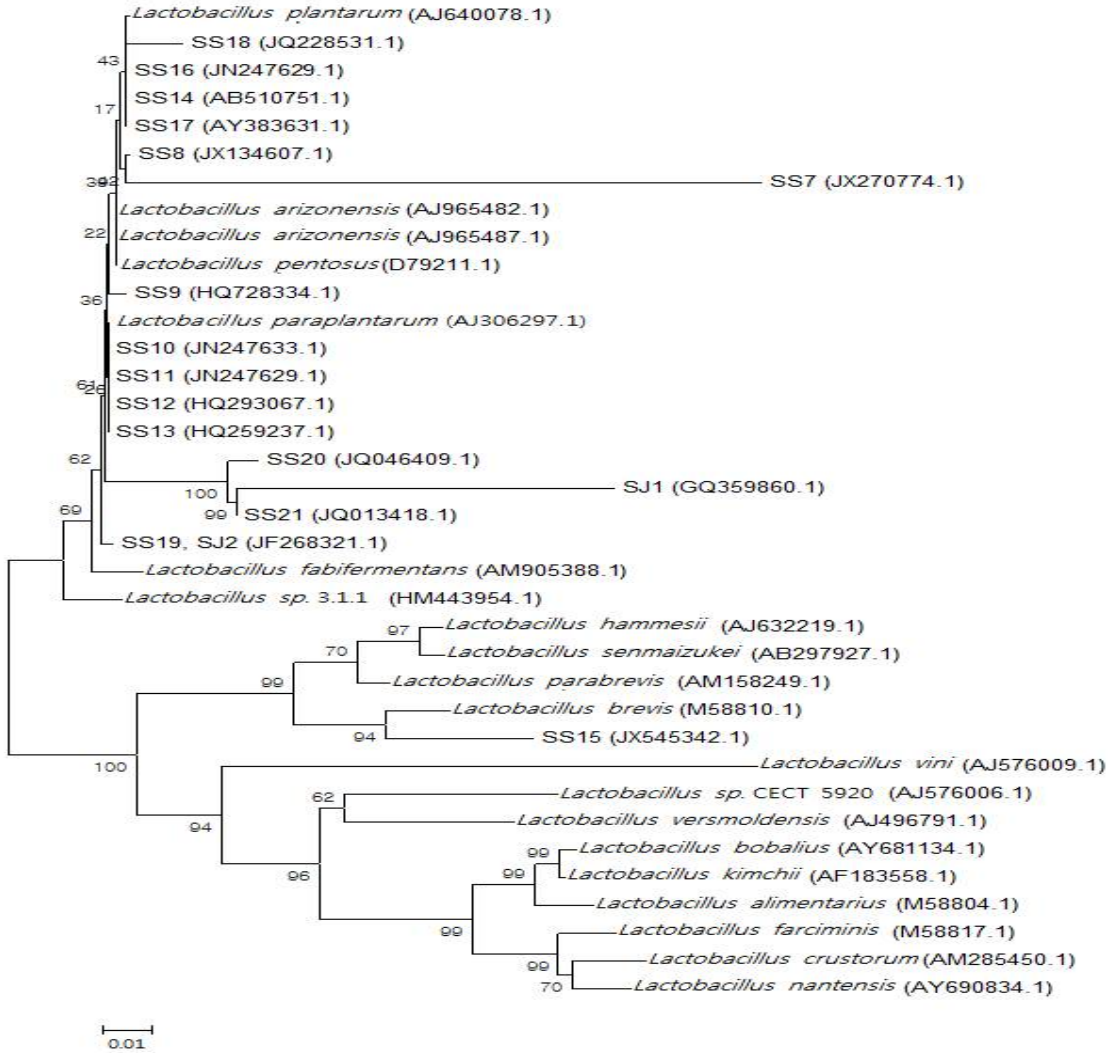


Fig 10. The phylogenetic consensus tree of the composition of the *Lactobacillus.* Numbers at the nodes indicated the bootstrap values on neighbor-joining analyses of 1000 resampled data sets. Bar 0.5 % sequence divergence.

1.4 Pyrosequencing을 이용한 각 누룩의 bacteria 군집분석

Pyrosequencing을 이용한 각 누룩의 Bacteria 군집분석은 Fig. 11-15 과 같다. 개량누룩인 MN의 경우 Bacteria의 read수는 64개, Eukarya의 read 수는 87개로 매우 적은 값을 나타내었다. 총 read 수가 1000미만인 경우 동정된 미생물의 결과 값을 신뢰할 수 없다(*Personal communication and the lab manual from* Chunlab. 2011. Microbial community analysis. p7-10). MN은 샘플내의 미생물 군집이 적어서 read 수가 적게 나올 수 있는 가능성이 있다고 사료되며 본 연구에서는 전통누룩의 미생물 군집 분석을 실시하였다.

시료 내의 종의 수(Number of species)를 의미하는 Species richness는 JJ가 3300 reads, SH가 5656 reads, SS가 9553 reads, SJ가 12267 reads 로써 SJ가 가장 많은 reads 수를 나타내었다. 분류의 대상이 되는 생물체의 개체 또는 군을 의미하는 Operational Taconomic Unit(OTU)는 JJ가 611 OTU, SH가 335 OTU, SS가 1416 OTU, SJ가 143 OTU 로써 SS가 가장 많은 다양성을 나타내었으며 이는 젖산균 분리 동정의 결과와도 유사하다. 각각의 시료로부터 분석된 OTU의 숫자를 증가곡선으로 표현한 그래프인 rarefraction curve는 Fig. 11와 같다.

국내 누룩에서 분리된 세균으로는 1945년 이후 국내 누룩 세균에 대한 고찰에서(Yu 등 1998) 누룩으로부터 *Bacillus pumilus, Lactobacillus casei* 와 *Leuconostoc mesenteroides*의 3속, 3종이 분리·동정되었으며 현재까지 누룩으로부터 분리된 세균은 6속 19종이라고 보고된 바 있다(정동효. 2012). 그러나 이들의 술덧 발효 중에 어떤 역할을 하는지는 밝혀지지 않고 있으므로 추후 연구가 필요할 것으로 여겨진다.

JJ의 우점속은 *Clostridium* 속이며 이는 대표적인 부티르산균으로써 당 또는 녹말을 대사하여 부티르산을 생성하는 발효에 관여하는 미생물이다. 부티르산은 불쾌한 냄새가 나는 유상 액체로써 차후 탁주의 품질에 영향을 미칠 것으로 생각되며 편성혐기성의 성격으로 인해 지금까지 보고된 누룩에 대한 연구에서의 배양조건으로는 검출되지 않은 것으로 사료된다 (Fig. 12). SH에서는 *Lactobacillus* 속이 63.88%로 가장 많이 검출되었고 *Leuconostoc* 속이 13.67%로 그 다음으로 많이 검출되었다 (Fig. 13). 가장 다양한 균종이 검출된 SS에서는 *Leuconostoc* 속이 69.39%를 차지 하였고 *Lactobacillus* 속이 9.17 %를 차지하였다 (Fig. 14). SJ 에서는 *Bacillus*속이 95.45 %를 차지하고 있어 Fig. 15 에서 보이는 바와 같이 다양성 면에서 떨어지는 것을 알 수 있었다.

Kwon (2010)의 연구에 따르면 PCR로 16SrRNA gene을 증폭한 다음에 전기영동을 하는 방법인 DGGE로 전통누룩에 존재하는 세균을 동정하였을 때 *Lactobacillus*속, *Weissella*속 그리고 *Escherichia*속, *Pantoea*속, *Staphylococcus*속 이렇게 5가지로 grouping이 되었다. 이러한 DGGE 결과는 전통누룩에서 분리된 세균 종을 포함하고 있으며 순수분리법 보다 약 4배 정도 다양한

결과가 도출할 수 있어, DGGE를 이용한 분자학적 기법이 누룩내 세균 군집구조를 설명하는데 유리하다는 것을 알 수 있다고 보고하였다. Pyrosequencing을 이용한 본 연구에서는 *Lactobacillus*속, *Weissella*속 그리고 *Escherichia*속, *Pantoea*속, *Staphylococcus*속 외에도 *Pediococcus*속, *Clostridium*속, *Turicivacter*속 등 평균 626종이 검출되었다. 이는 Clone library 방법의 약점을 극복하여 NGS 방법의 일종인 pyrosequencing을 이용하여 극복된 결과이다. 배양법과 pyrosequencing을 이용하여 bacteria 군집을 분석한 경우에 서로 많은 차이를 보였다. Pyrosequencing 결과를 통해서 아직 배양법으로 분리, 동정되지 못했던 미생물이 높은 비율로 존재하고 있는 것을 알 수 있다.

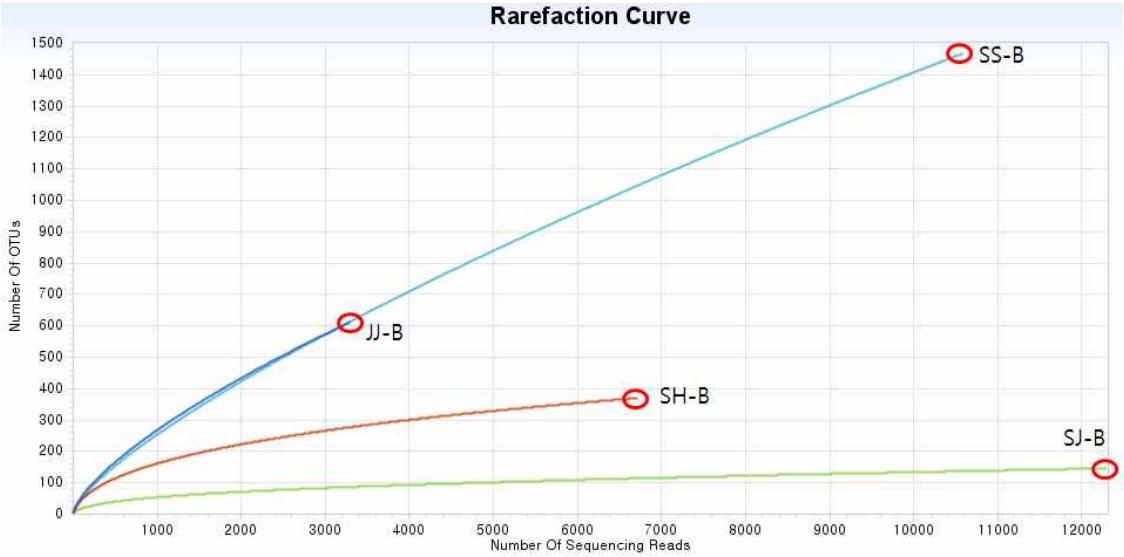


Fig 11. Rarefaction curve of *Nuruk* in bacteria

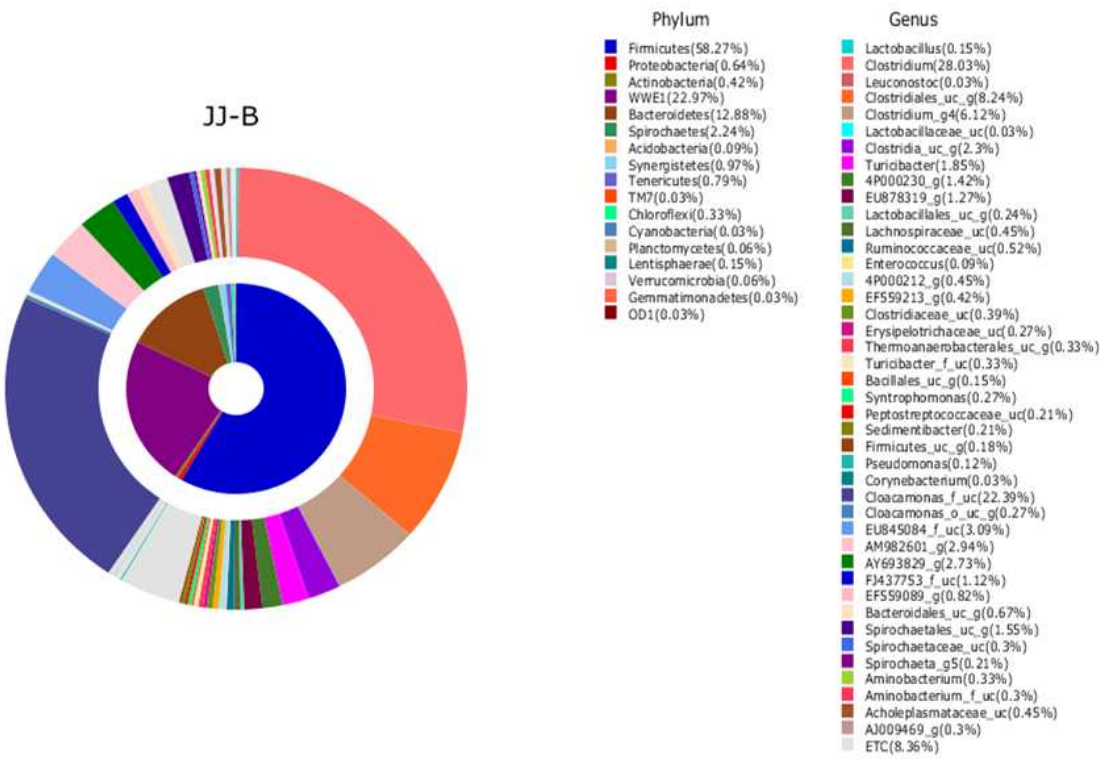


Fig 12. Phylogenetic classification found in JJ traditional *Nuruk* by pyrosequencing (Bacteria)

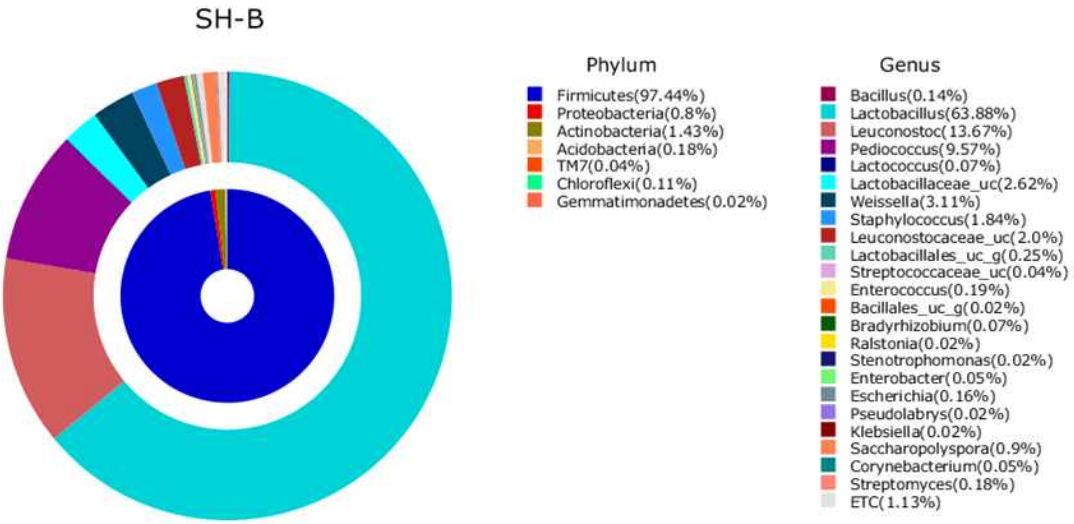


Fig 13. Phylogenetic classification found in SH traditional *Nuruk* by pyrosequencing (Bacteria)

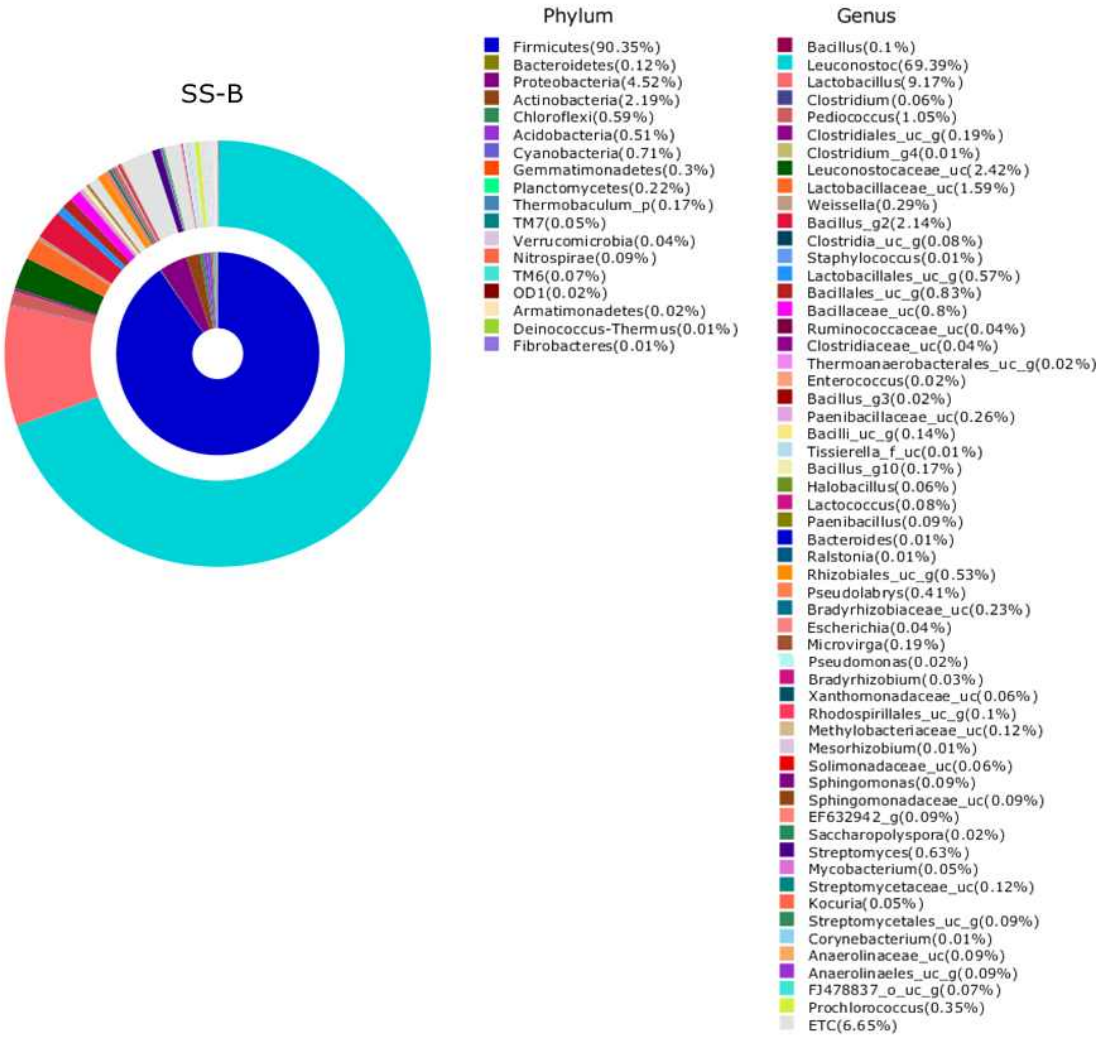


Fig 14. Phylogenetic classification found in SS traditional *Nuruk* by pyrosequencing (Bacteria)

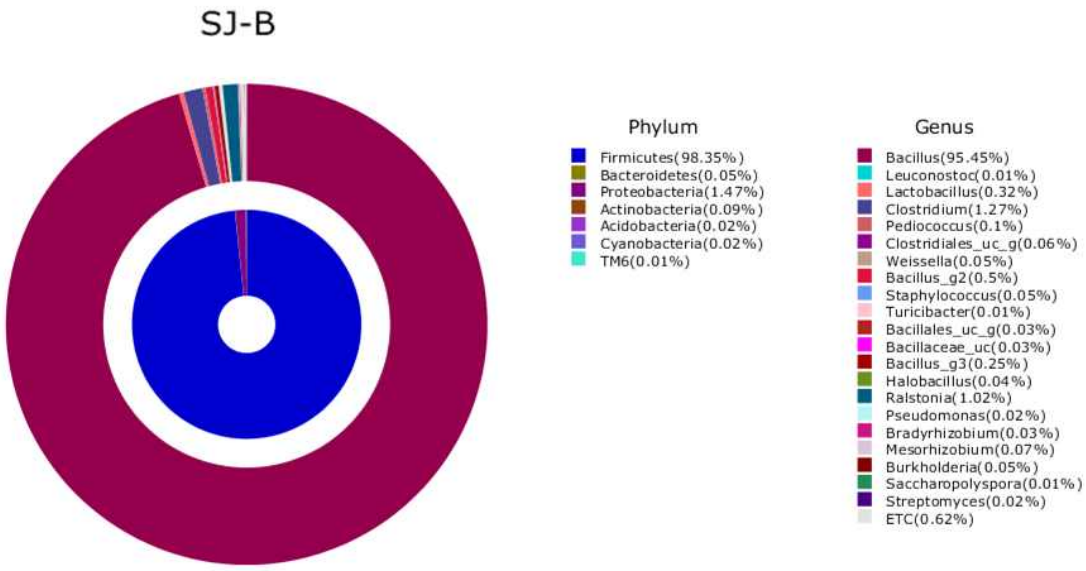


Fig 15. Phylogenetic classification found in SJ traditional *Nuruk* by pyrosequencing (Bacteria)

1.5 Pyrosequencing을 이용한 각 누룩의 eukarya 군집분석

Pyrosequencing을 이용한 각 누룩의 Eukarya 군집분석은 Fig. 16-20 과 같다. Species richness는 JJ가 5370 reads, SH가 4319 reads, SS가 3581 reads, SJ가 1530 reads 로써 JJ가 가장 많은 reads 수를 나타내었다. Operational Taconomic Unit(OTU)는 JJ가 859 OTU, SH가 220 OTU, SS가 248 OTU, SJ가 171 OTU 로써 SS가 가장 많은 다양성을 나타내었으며 이는 차후 탁주의 품질에 영향을 미칠 것이라 사료된다. 각각의 시료로부터 분석된 OTU의 숫자를 증가곡선으로 표현한 그래프인 rarefraction curve는 Fig. 16과 같다.

일반적으로 곰팡이는 액화력과 당화력을 가지므로 술 담금 시 전분을 가수분해하여 발효성 당류를 생성하며, 효모는 알코올 발효력을 가지므로 당류(포도당)로부터 알코올을 생성하는 역할을 한다(정동효. 2012). 1955년 한국 전통누룩으로부터 *Absidia, Rhizopus, Circinella, Actinomucor, Aspergillus, Cladosporium* 및 *Botryotridhum* 속의 7속 17종의 사상균이 분리, 동정되었다. 누룩 중의 사상균의 분포는 *Absidia* spp.가 전국 모든 지역에서 가장 높은 빈도로 분리되었고, *Asp. oryzae, Asp. condidus* 와 *Rhi. cohnii*가 비교적 고른 분포를 나타냈다. 더욱이 *Penicillium sp.*와 *Mucor sp., Asp. foetidus, Botryotricum sp.* 와 *Cladosporium sp.*가 분리되었다 (Yu 등 1998).

가장 많고 다양한 균이 검출된 JJ에서는 *Aspergillus* 속이 73.33 %로 가장 많이 검출되었다 (Fig. 17). SH (Fig. 18)과 SS (Fig. 19)에서는 모두 *Saccharomycopsidaceae* 속이 각각 85.27 %, 97.46 %로 가장 많이 검출 되었으며 SJ (Fig. 20)에서는 *Mucorales* 속이 56.73%로 가장 많이 검출되었다.

Kwon(2010)의 연구에 따르면 산성누룩에서 분리된 진균류로써 *Aspergillus*속, *Saccharomycopsis*속, *Wickerhamomyces*속, *Torulapora*속, *Trichosporon*속 그리고 *Pichia*속으로 크게 6개의 group이 발견되었다. 이는 순수분리법보다 2종 더 많은 도출된 결과로써 배지의 조성이 적합하지 않거나 배양하기 어려운 미생물들도 DGGE 방법을 통하여 검출되었기 때문이라고 사료된다. Pyrosequencing을 이용하여 진균류를 분석한 본 실험에서는 *Aspergillus*속, *Saccharomycopsis*속, *Wickerhamomyces*속 및 *Pichia*속 외에도 *Saccharomyces*속, *Clostridium*속, *Monascaceae*속 등 평균 375종의 진균류가 검출되었다. DGGE를 이용하여 분석한 방법에서는 생물양이 검출가능 최소량에 미치지 못하는 이유로 알코올 발효를 하는 *Saccharomyces*속이 검출되지 않았지만 Pyrosequencing에 의한 방법에서는 검출된 것을 알 수 있다.

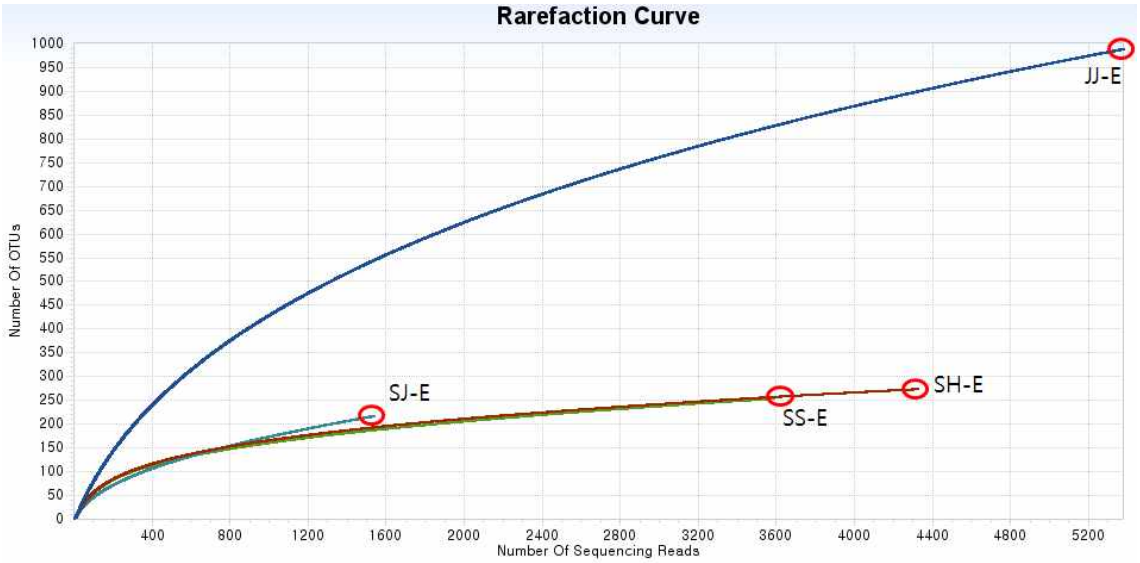


Fig 16. Rarefaction curve of *Nuruk* in eukarya

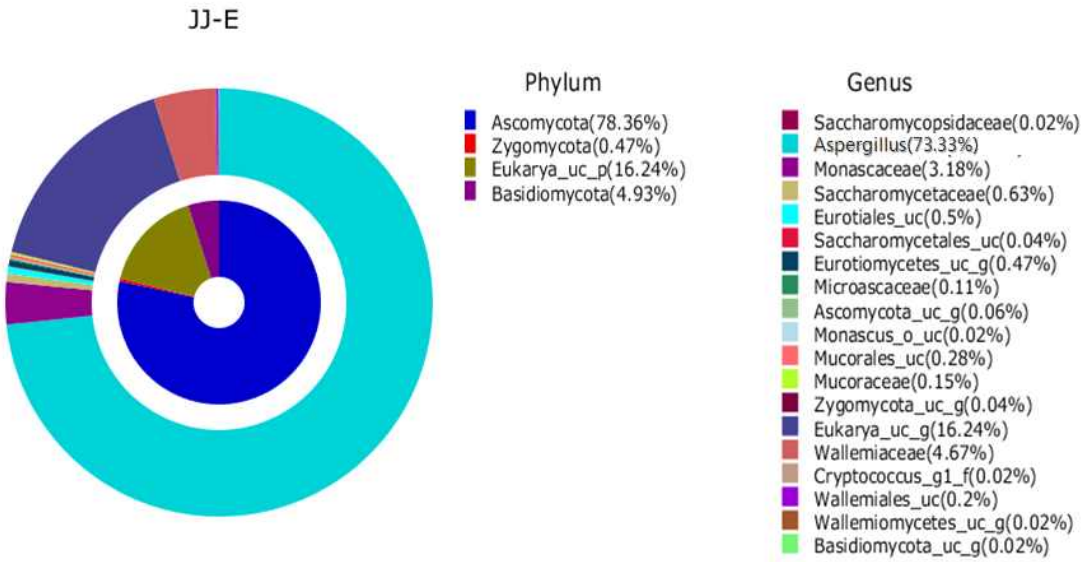


Fig 17. Phylogenetic classification found in JJ traditional *Nuruk* by pyrosequencing (Eukarya)

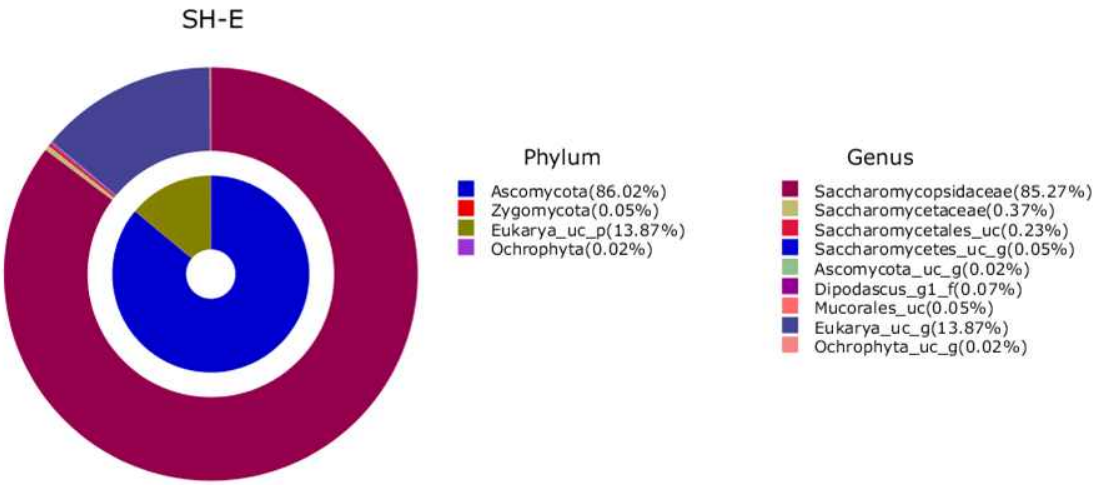


Fig 18. Phylogenetic classification found in SH traditional *Nuruk* by pyrosequencing (Eukarya)

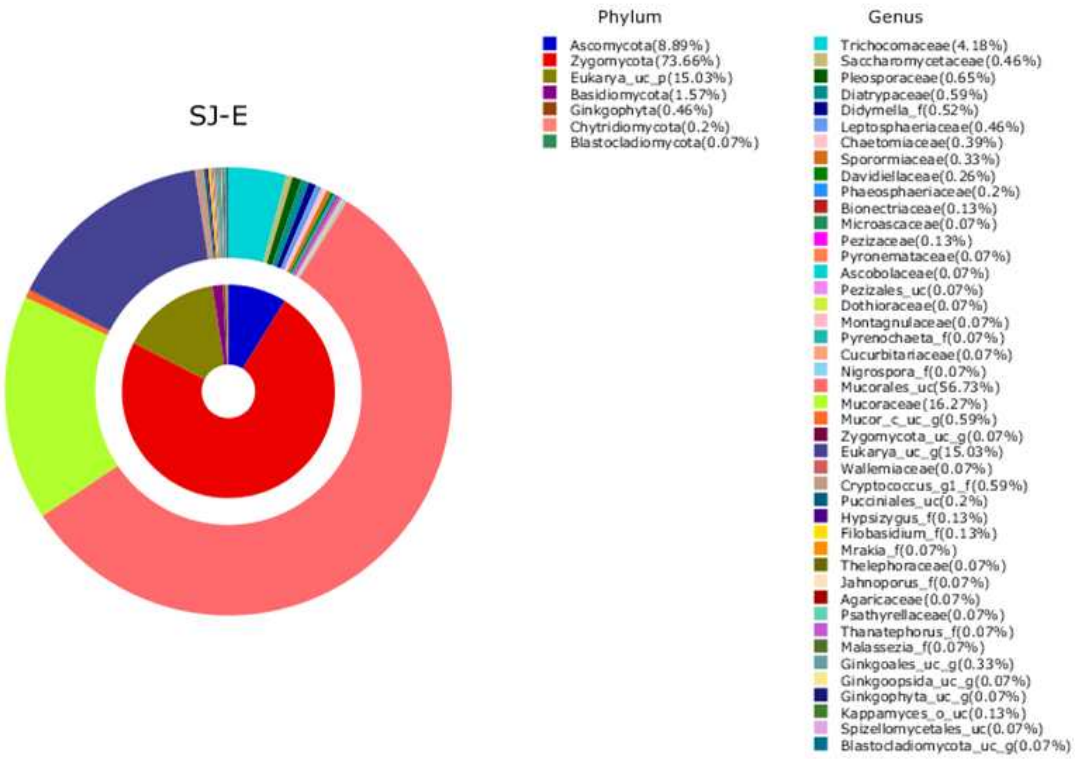


Fig 19. Phylogenetic classification found in SJ traditional *Nuruk* by pyrosequencing (Eukarya)

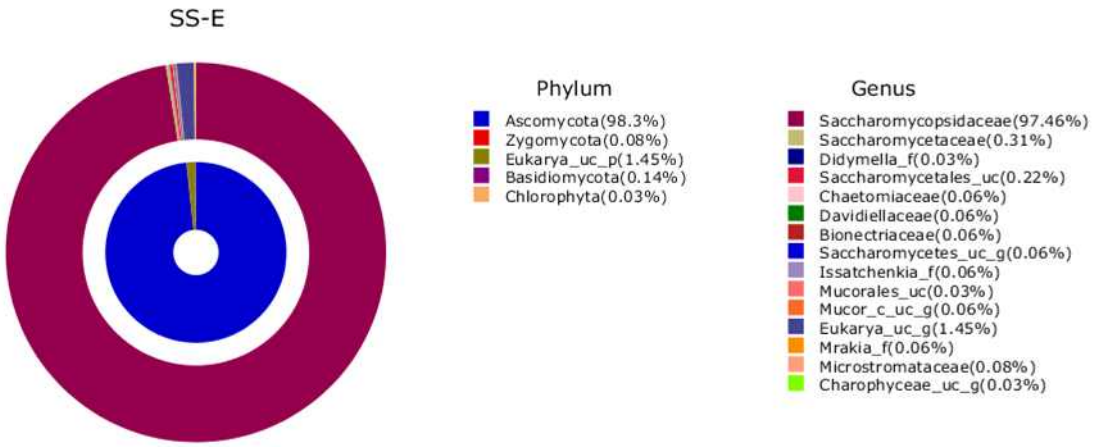


Fig 20. Phylogenetic classification found in SS traditional *Nuruk* by pyrosequencing (Eukarya)

2. 전통누룩과 일반개량 누룩으로 제조 된 탁주의 품질특성

2.1 pH

탁주의 발효과정 중에 생성되는 유기산, 탄산가스 및 기타 산 물질은 pH에 영향을 주기 때문에 탁주의 성분변화, 발효진행상황 등을 짐작할 수 있는 중요한 지표가 된다(Jeong 등 2006; Park 과 Lim 2007).

누룩의 종류를 달리하여 21일 동안 발효과정 중의 pH 변화는 Fig. 21 와 같다.

담금 직후에는 5.55 ~ 5.80을 나타내었고 24시간 까지 급격히 감소하는 경향을 보이며 3.85 ~ 4.27을 나타내었다. 24시간에 개량누룩으로 제조한 탁주인 T-MN의 pH가 3.85로 유의적으로 가장 낮은 값을 나타낸 것은 높은 당화력으로 인해 포도당 생성이 초기에 증가되고 이를 이용하여 미생물들이 산생성물들을 빨리 만들어 냈기 때문인 것으로 사료된다. 발효기간의 경과에 따라 탁주 술덧에 생육하는 미생물의 작용으로 유기산 생성량이 증가되어 담금일 보다 pH가 저하된 것으로 판단되었다. 7일 이후부터는 pH가 큰 변화 없이 완만히 증가하고 있음을 알 수 있었다. 탁주 제조시 효모 외의 다른 세균을 억제하기 위해 pH 4.0~6.0을 유지하는 것이 적합하며 본 실험과 같은 경향은 Kim 등(2008), Yu 등(2002)의 연구에서 담금을 끝낸 직후에서 다음날 급격히 감소했다가 점차 증가하는 경향과 유사함을 알 수 있었다.

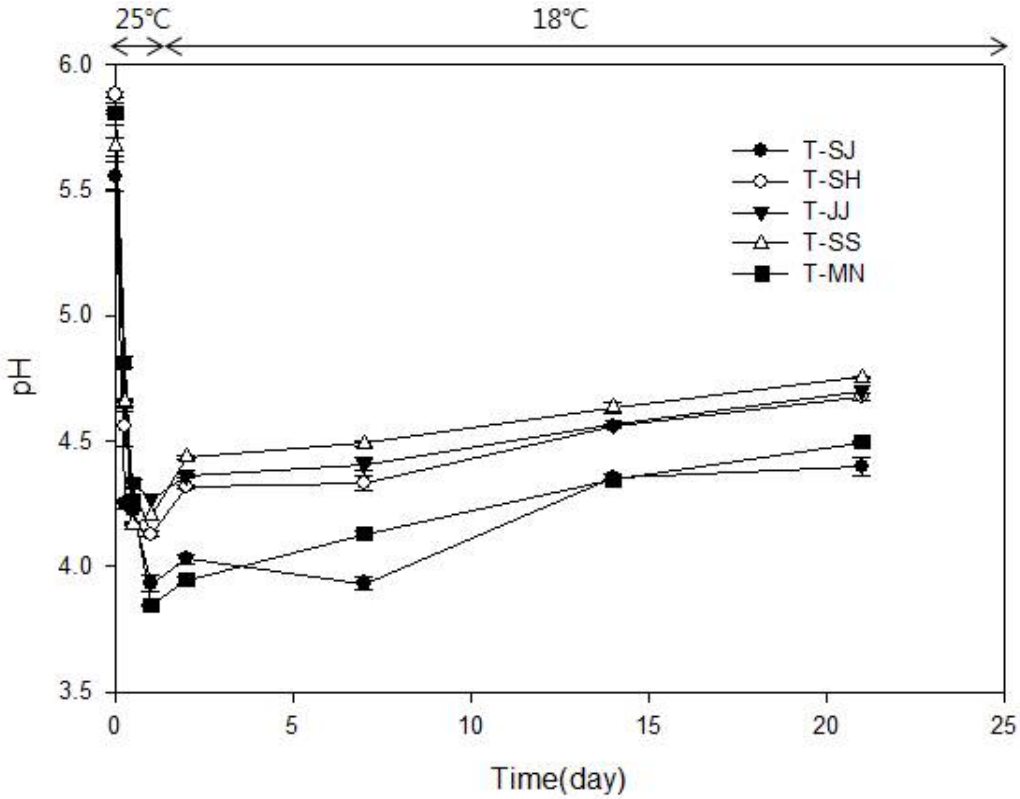


Fig 21. pH changes of *Takju* during fermentation

2.2 적정산도

탁주의 품질에 있어서 총산 함량의 의의는 관능적인 면에서 다른 주류에서는 잘 찾아 볼 수 없는 산미의 원인물질이며 산패현상을 조기 진단할 수 있는 기초자료로서 이용된다. 또한 발효가 진행되면서 효모나 젖산균 등의 미생물 작용으로 각종 유기산이 생성되므로 총산의 함량이 증가한다(Han 등 1997). 일반적으로 총산의 함량이 너무 적으면 제성주에서 특유의 산미를 잘 느낄 수 없게 되고 총산의 함량이 너무 많으면 이상 발효에 의해 탁주가 산패되고 있는 것으로 짐작할 수 있다(Jung 2010).

누룩의 종류를 달리하여 제조한 탁주의 21일 동안 발효과정 중의 적정산도의 변화는 Fig. 22 과 같다. 담금 직후에는 0.07 ~ 0.17 %를 나타냈으며 24시간에 0.45 ~ 0.67 %까지 급격하게 증가하는 경향을 나타내었다. 7일 이후부터는 0.39 ~ 0.45 % 를 나타내며 큰 변화 없이 유지되는 경향을 보였다.

pH가 떨어지는 시점과 산도가 올라가는 시점이 24시간으로 일치하는 것을 알 수 있었으며, 이 때 산도가 증가하는 요인은 젖산이나 효모 발효로 생성되는 유기산들이 영향을 준 것으로 보여 진다.

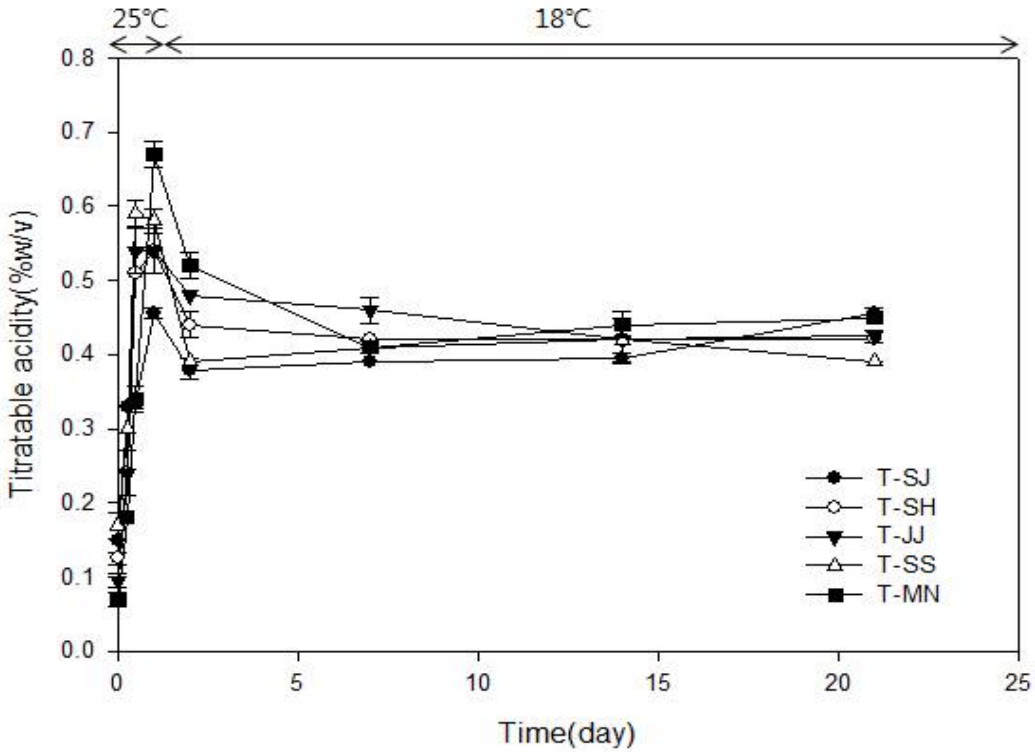


Fig 22. Titratable acidity changes of *Takju* during fermentation

2.3 당과 알코올 함량

발효과정 중 당과 알코올 함량을 HPLC로 분석한 결과 Maltose 함량은 Fig. 23, Glucose 함량은 Fig. 24, Ethanol 함량은 Fig. 25 과 같다.

전통 누룩을 사용하여 만든 탁주의 경우 병행복발효가 일어나므로 발효 정도를 아는 데에 당과 알코올의 함량 변화는 주요한 요인이다(Yu, 2011). Maltose 함량은 담금 직후에는 0.49~2.68 %(w/v)였고, Glucose의 함량은 1.03~2.07 %(w/v)으로 나타났다. 백미와 누룩의 원료를 기질로한 당화작용으로 인해 Maltose와 Glucose가 생성된 것으로 보여진다. Maltose는 12시간까지 1.46~2.96 %(w/v) 으로 급격하게 증가하다가 1일째 감소한 후 21일까지 유지하는 경향을 나타내었다. Glucose의 경우도 마찬가지로 12시간까지 1.63~2.30 %(w/v)으로 증가하다가 완만하게 감소하는 경향을 나타내었다. Mltose와 Glucose는 비슷한 경향을 보였으며 이 때, 원료중의 전분질은 amylase 작용으로 인해 당분으로 분해, 효모의 영양원, 발효의 기질로 이용이 되어 감소된 것으로 사료된다. Kang 등(Kang 등, 2000)의 연구에 따르면 알코올 생성이 우수한 효모 균주의 분리 및 동정에서 4~5%의 알코올을 생성한 균주로 *Saccharomyces*속을 동정하였으며, 50%의 포도당에서 좋은 성장을 보인 내당성이 강한 균주를 선발하였다. 본 연구에서 pyrosequencing 결과 *Saccharomycopsidaceae*과의 분포도가 높았던 T-SH와 T-SS의 Ethanol 함량이 7일까지 높은 경향을 나타내었다. 전체적인 Ethanol의 함량은 12시간부터 Ethanol의 함량이 증가하기 시작했으며, 발효 7일부터 21일까지 13.08 ~ 14.96 %(w/v)로 유지되었다. 젖산균의 증식에 의한 pH의 저하는 잡균에 의한 오염방지 역할을 함으로써 활발한 효모균의 증식을 가져오고 정상적인 알코올 발효가 일어나게 한다는 연구 결과(Chung, 1974)와 같이 pH의 저하, Glucose 와 Maltose가 감소, 젖산균과 효모의 증가 시점이 알코올 발효가 일어나는 시점으로 보여 진다.

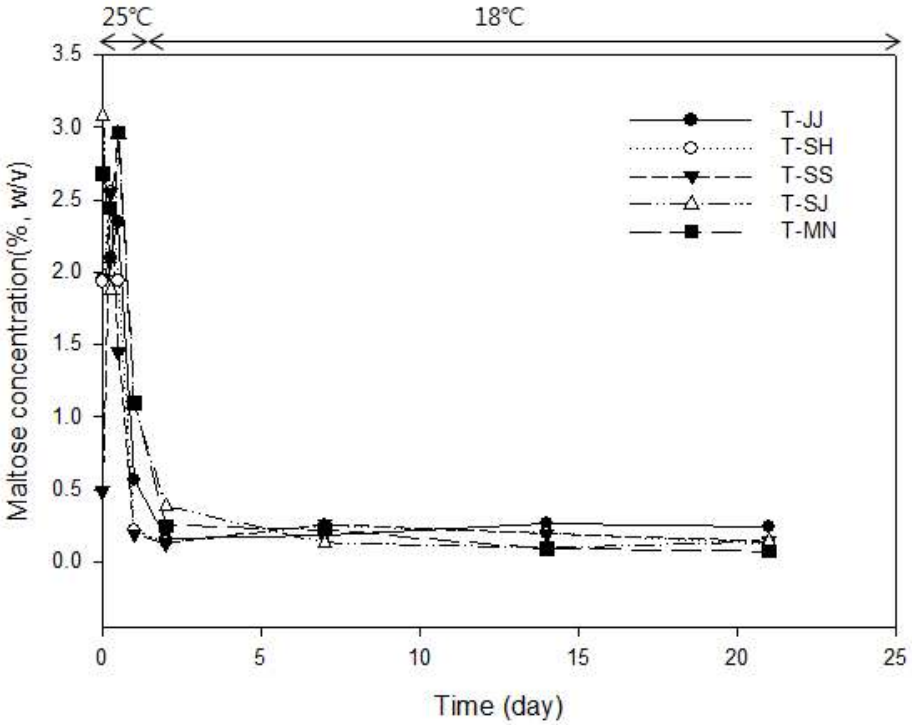


Fig 23. Changes in maltose concentration of *Takju* during fermentation

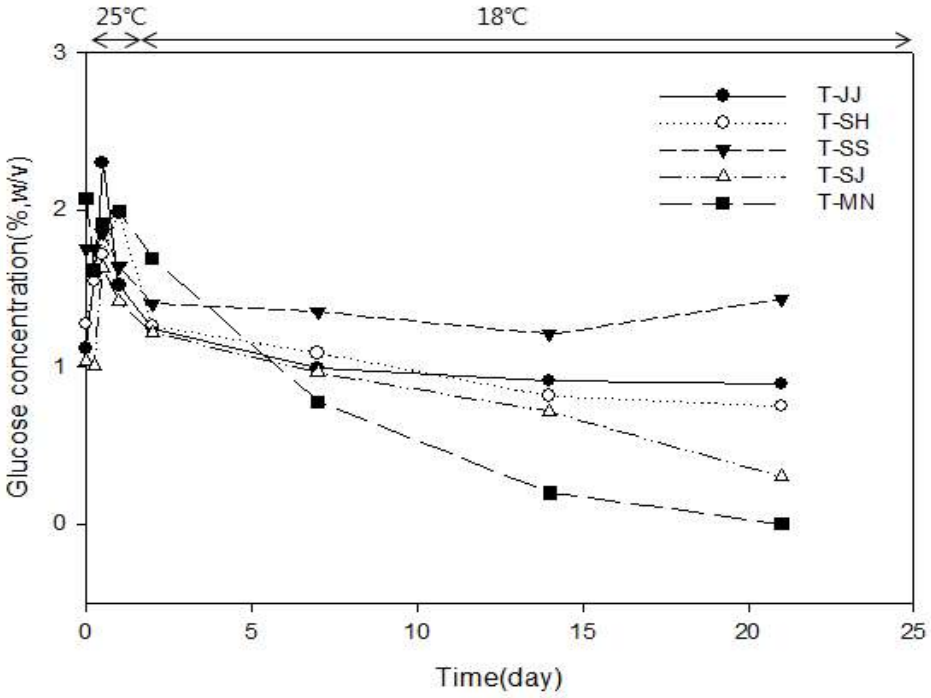


Fig 24. Changes in glucose concentration of *Takju* during fermentation

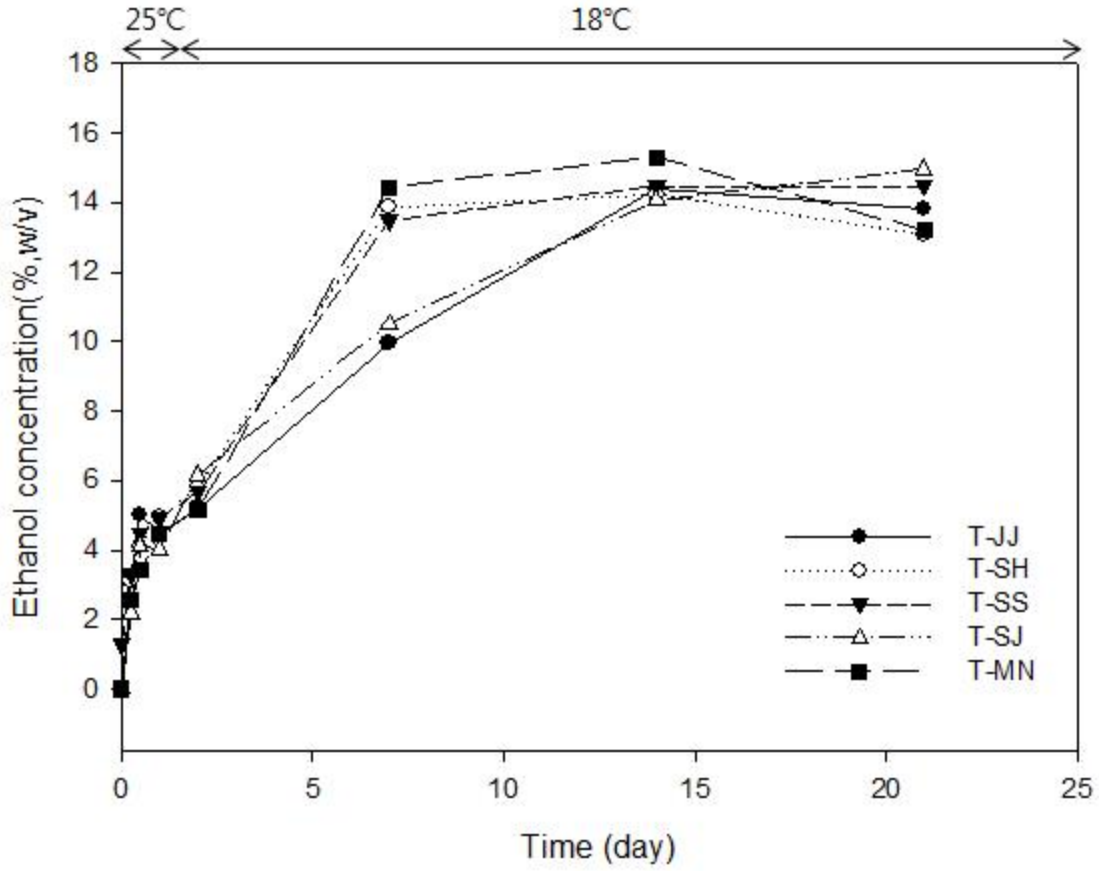


Fig 25. Changes in Ethanol concentration of *Takju* during fermentation

2.4 유리 아미노산 함량

막걸리는 다른 주류에 비해 발효 부산물 중에 필수아미노산의 함량이 높아 건강에 유익하고, 막걸리속의 아미노산은 술에 담백한 맛을 부여하는 성분으로 술맛을 상승시키는 효과를 한다(Lee, 2008). 또한 막걸리에는 신맛, 감칠맛, 단맛 및 쓴맛을 나타내는 유리아미노산들이 균형 있게 함유되어 있어야 하고 그 함량이 높을수록 좋은 것으로 알려지고 있다 (Shon 등, 1990). 누룩의 종류를 달리하여 제조한 탁주의 총 유리아미노산 총량에 대한 결과는 Fig. 26과 같다. 총 29종의 유리아미노산이 검출되었으며 21일째 검출량이 10 mg/100g 이상인 아미노산의 조성은 Table 18과 같다. 총량은 T-JJ, T-SS, T-SH, T-MN, T-SJ 순이었으며 주요 아미노산은 Valine, Glutamicacid, Alanine, Proline, Tyrosine, Phenylalanine, Arginine, Leucine 등이 검출되었다. 필수 아미노산인 Threonine, Histidine, Tryptopan, Lysine, Methionine 등도 검출되었으며 Lysine은 체내조직의 합성에 유효하며, Methionine은 인지질 합성을 촉진해 간의 지방을 적절히 운반, 지방간이나 간경화를 예방하는 힘을 가지고 있다.

유리아미노산 종류별 함량은 Table 12와 같다. 감칠맛을 내는 glutamic acid, 단맛을 나타내는 threonine, serine 및 glycine의 총량은 T-JJ가 104.157 mg/100g, 42.855 mg/100g, 69.715 mg/100g, 53.035 mg/100g으로 가장 높았으며 T-SJ가 48.212 mg/100g , 16.707 mg/100g, 28.338 mg/100g, 24.963 mg/100g 으로 가장 낮은 값을 나타내었다. 단맛과 쓴맛을 동시에 나타내는 proline과 methionine, 쓴맛을 나타내는 leucine, isocleucine, phenylalanine 및 arginine의 함량 역시 T-JJ가 가장 높고 T-SJ가 가장 낮은 값을 나타내었다. 이상과 같은 결과는 소주, 양주, 맥주 등과 차별화 되는 성분으로 보다 구체적인 연구가 된다면 탁주의 차별화 전략에 효과적일 것으로 생각된다. 또한 균주이 다양성이 적었던 SJ를 제외한 전통누룩 3종의 발효 7일째 아미노산 함량은 발효 1일째와 비교하여 2배 증가하였지만 개량누룩의 차이는 미비한 것으로 나타났다. 이는 발효의 초기에 탁주의 맛 성분의 일부인 유리아미노산이 미생물군집이 다양한 전통누룩에서 더 많이 생성되는 것으로 나타나고 있어 단일균주를 사용하여 생성한 국(Koji) 형태의 MN의 경우 보다 풍부한 맛을 확보할 수 있다는 것을 보여주고 있다.

Pyrosequencing 결과와 비교해 볼 때 Eukarya에서 가장 많은 reads 수와 OTU 값을 나타낸 JJ로 제조한 T-JJ의 아미노산 함량이 가장 높음을 알 수 있으며 Eukarya의 reads 수와 OTU 값이 가장 낮았던 SJ로 제조한 T-SJ의 아미노산 함량이 가장 낮은 것을 알 수 있다. 이는 누룩에 존재하는 진균의 균수와 다양성이 탁주의 맛이 영향을 미치며 추 후 탁주의 품질과도 직접적인 연관성을 가지는 것으로 사료된다.

Table 18. Amino acid concentration of *Takju* during fermentation

(mg/100g)

Sample	Time (day)	content						
		Valine	Cystine	Aspartic acid	Threoni-ne	serine	Aspara gine	Glutamic acid
T-JJ	0	2.321	0.163	0.741	0.469	0.547	0.253	2.997
	1	11.256	0.357	3.826	4.165	5.686	8.072	24.233
	7	34.902	5.953	17.774	16.027	26.099	28.849	51.789
	21	79.892	16.852	57.907	42.855	69.715	59.961	104.157
T-SS	0	2.321	0.163	0.741	0.469	0.547	0.253	2.997
	1	9.682	0.848	3.504	3.416	4.257	7.165	21.707
	7	28.685	4.705	13.055	13.031	20.84	24.092	43.179
	21	74.797	11.649	46.106	41.533	64.533	69.361	91.869
T-SJ	0	2.321	0.163	0.741	0.469	0.547	0.253	2.997
	1	3.462	0.421	1.614	1.541	1.987	3.342	10.985
	7	8.373	3.612	2.472	3.033	4.347	15.802	19.725
	21	32.141	7.908	20.29	16.707	28.338	39.383	48.212
T-SH	0	2.321	0.163	0.741	0.469	0.547	0.253	2.997
	1	6.432	0.437	2.645	2.631	3.293	4.641	17.797
	7	23.061	3.911	10.149	10.162	16.084	17.556	34.724
	21	71.182	12.696	47.448	39.789	62.893	56.348	83.452
T-MN	0	1.341	0.055	0.624	0.23	0.258	0.113	1.267
	1	10.392	0.303	3.289	4.067	5.022	8.224	18.541
	7	8.818	1.902	2.685	2.35	3.402	14.698	19.546
	21	47.612	6.934	34.218	24.321	44.303	53.922	73.231

Table 18. Amino acid concentration of *Takju* during fermentation (Continued)

(mg/100g)

Sample	Time (day)	content					
		Tyrosine	phenylalanine	Arginine	Leucine	Isoleucine	Total
T-JJ	0	1.855	2.108	3.702	1.731	0.796	39.345
	1	7.947	7.892	23.398	11.945	4.916	201.58
	7	26.031	29.726	47.747	40.947	19.015	532.647
	21	61.737	69.104	99.261	98.682	48.722	1,208.38
T-SS	0	1.855	2.108	3.702	1.731	0.796	39.345
	1	7.885	8.768	22.392	12.276	4.344	194.297
	7	23.528	27.297	34.437	38.689	16.703	458.944
	21	58.193	63.347	72.004	93.092	47.197	1,100.24
T-SJ	0	1.855	2.108	3.702	1.731	0.796	39.345
	1	2.179	2.42	10.578	3.77	1.414	81.649
	7	8.485	8.261	21.198	10.406	3.69	195.264
	21	28.086	31.528	50.662	42.791	18.616	567.177
T-SH	0	1.855	2.108	3.702	1.731	0.796	39.345
	1	3.963	4.041	15.283	6.454	2.528	134.621
	7	18.795	20.763	28.21	30.178	12.582	373.707
	21	55.772	60.749	67.929	89.529	45.443	1,061.37
T-MN	0	1.155	1.406	0.607	1.093	0.476	16.247
	1	7.1	7.429	28.193	10.964	4.847	177.803
	7	8.785	8.31	30.572	10.832	3.627	201.647
	21	42.963	49.308	75.062	65.698	27.077	814.483

Table 18. Amino acid concentration of *Takju* during fermentation (Continued)

(mg/100g)

Sample	Time (day)	content						
		Histidine	Trypto -pan	Methio -nine	Lysine	Glycine	Alanine	Proline
T-JJ	0	0.574	0.893	0.239	0.656	1.221	3.599	9.392
	1	3.445	1.836	2.911	7.874	6.311	21.148	26.55
	7	8.854	7.032	11.263	22.444	20.56	44.887	45.277
	21	20.385	17.833	26.774	59.29	53.035	96.345	85.858
T-SS	0	0.574	0.893	0.239	0.656	1.221	3.599	9.392
	1	2.779	3.903	2.36	8.883	6.526	21.153	23.316
	7	6.475	8.076	9.519	22.274	17.156	43.162	35.437
	21	16.982	15.952	24.577	57.723	49.514	98.483	65.466
T-SJ	0	0.574	0.893	0.239	0.656	1.221	3.599	9.392
	1	1.653	0.631	1.108	3.243	3.127	6.372	13.382
	7	4.171	2.283	1.985	10.007	7.844	20.278	22.015
	21	10.611	7.53	12.437	26.753	24.963	47.514	38.455
T-SH	0	0.574	0.893	0.239	0.656	1.221	3.599	9.392
	1	2.701	1.235	1.62	5.613	4.93	13.777	20.756
	7	6.416	5.621	6.425	17.845	14.166	34.088	36.251
	21	18.138	14.408	23.382	54.601	48.334	91.257	74.801
T-MN	0	0.031	0.306	0.202	0.121	0.648	1.861	1.621
	1	4.078	2.495	2.047	6.297	7.455	19.813	12.321
	7	4.512	2.863	1.746	10.471	9.009	18.84	22.891
	21	12.751	10.722	17.476	39.076	37.019	64.44	48.043

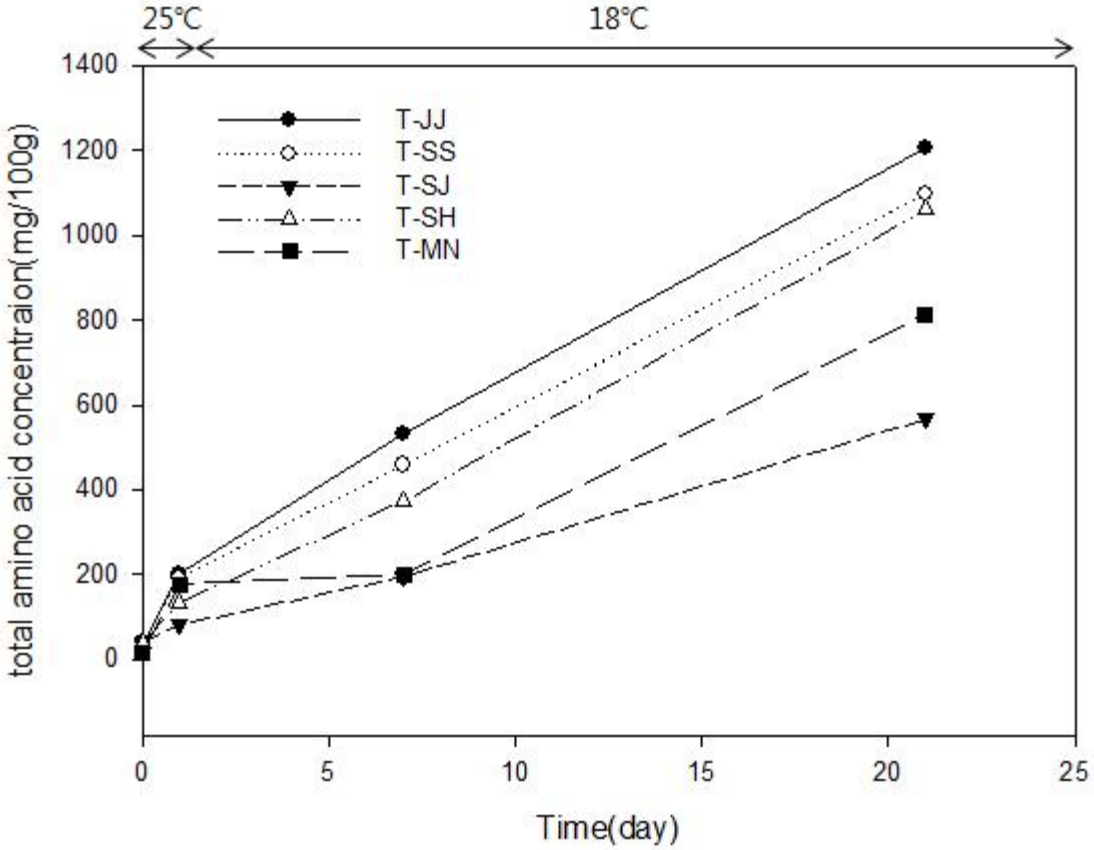


Fig 26. Total amino acid concentration of *Takju* during fermentation

2.5 유기산 함량

발효과정 중 탁주의 유기산으로 lactic acid, citric acid, succinic acid, acetic acid가 주요 유기산으로 나타났으며 그 결과는 Table 19와 같다. Tartaric acid, malic acid, oxalic acid 모두 발효 완료 시점에서의 검출량이 60mg/100g 미만으로 상대적으로 미량 검출되었다.

Lactic acid의 경우 모든 탁주가 발효가 진행됨에 따라 증가하였으며 T-SS가 가장 높은 값인 1537.38 mg/100g 으로 나타났다. 막걸리 발효에서 malo-lactic fermentation(MLF)은 알코올 발효 후 *Lactobacillus* sp.와 *Leuconostoc* sp. 등과 같은 특정 유산균에 의해 일어나는 발효로서 이로 인하여 malic acid가 lactic acid로 전환된다. 막걸리 발효에서의 MLF가 적절히 이루어지면 산도의 감소로 주질의 부드러움과 입에서 느껴지는 감촉을 강화시켜 주며 발효 중 미생물학적 안정성을 높여주는 긍정적인 효과를 제공하는 역할을 한다(Lee 등, 2011). 이는 본 연구에서 Pyrosequencing 결과 bacteria의 reads 수가 가장 많고 구성 미생물 중 *Leuconostoc* 속과 *Lactobacillus*속의 비율이 가장 높았던 T-SS가 가장 높은 lactic acid 함량을 나타내고 bacteria reads 수가 가장 적게 나타났고 *Bacillus*속이 높았던 T-SJ의 lactic acid 함량이 전 발효 과정에

있어서 가장 낮게 나타났는데 이는 초기 젖산균의 분포가 적어 젖산발효가 활발히 일어나지 않았기 때문으로 생각된다.

또한 malic acid의 경우 발효 완료 시점에서 39.25-77.90 mg/100g으로 미량 검출되었으며 lactic acid의 함량이 가장 낮았던 T-SJ의 malic acid 함량이 가장 높았다.

Succinic acid의 경우 발효 완료시점에서 T-SS가 179.71 mg/100g 으로 가장 높게 나타났으며 T-SH가 134.68 mg/100g으로 가장 낮게 나타났다. 발효 전 과정에서 증가하는 경향을 나타냈으며 이는 쌀누룩을 이용한 탁주발효 특성에서 succinic acid의 함량이 발효기간 중 대체로 증가하는 경향을 보인 Lee(2000) 의 결과와 같게 나타났다.

Citric acid의 경우 발효 1일째까지 급격히 증가하다가 약간 감소했으며 발효완료시점 까지 다시 증가하는 경향을 나타냈다. Citric acid 또한 Lactic acid, Succinic acid와 마찬가지로 가장 많고 다양한 bacteria를 지니고 있는 SS로 제조한 T-SS가 94.19 mg/100g 으로 가장 높았다.

유기산들은 술에서 신맛을 나타내는 중요한 성분이며 미량 존재할 경우 탁주의 맛과 향을 높이는 역할을 하지만 acetic acid가 다량 존재하게 되면 발효과정에서 오염되어 알코올성분의 산화로 인해 초산발효 단계로 진행되므로 주질을 저하시키는 요인이 된다. 본 연구에서의 acetic acid 함량은 발효기간이 진행될수록 증가하는 경향을 나타내었으며 이는 Woo(2010)등의 연구에서 일부 탁주에서 500 mg/100g 이상 검출된 결과보다는 낮은 값으로써 안정된 발효가 일어난 것을 알 수 있다. Oxalic acid, tartaric acid 는 전 발효 과정에서 검출되었으며 그 양은 미량이었다.

유기산 함량의 총량은 누룩시료 중 미생물 군집이 다양하였던 T-SS, T-JJ 가 2286.21 mg/100g, 1983.5 mh/100g 순으로 가장 높은 값을 나타내었으며 이에 비해 상대적으로 미생물 군집의 다양성이 작았던 T-SJ의 총 함량은 1621.55 mg/100g 으로 아미노산 총 함량과 같이 가장 낮은 값을 나타내었다. Pyrosequencing의 결과 bacteria와 eukarya에서 가장 높은 OTU를 나타낸 SS, JJ로 제조한 탁주인 T-SS와 T-JJ가 가장 높은 총 유기산 함량을 나타내었으며 가장 낮은 OTU를 나타낸 SJ로 제조한 탁주인 T-SJ의 총 유기산 함량이 가장 낮은 것으로 나타났다. 이는 아미노산 함량 측정 결과와 같은 결과로써 누룩에 존재하는 bacteira와 eukarya 의 다양성이 탁주의 맛에 영향을 미치는 것을 알 수 있었다. 또한 bacteria와 Eukarya의 종류가 가장 적은 SJ를 제외한 전통누룩인 JJ, SS, SH 로 제조한 탁주의 유기산 함량이 T-MN 보다 높은 것으로 보아 전통누룩으로 담근 탁주의 다양성에 대한 잠재력을 확인할 수 있었다.

Table 19. Organic acid concentration of *Takju* during fermentation

(mg/100g)

Sample	Time (day)	content						
		Oxalic acid	Citric acid	Tartaric acid	Malic acid	Succinic acid	Lactic acid	Acetic acid
T-JJ	0	14.10	29.92	15.08	41.07	49.72	95.03	50.31
	1	7.12	77.01	36.46	57.98	127.03	361.04	267.78
	7	6.21	58.03	8.98	43.38	123.21	762.26	278.71
	21	6.02	76.90	16.73	45.79	166.38	1306.40	365.28
T-SS	0	14.10	29.92	15.08	41.07	49.72	95.03	50.31
	1	4.25	88.06	37.22	30.12	106.71	398.59	185.59
	7	4.28	72.56	39.81	36.72	103.31	981.74	219.57
	21	4.43	94.19	41.92	53.98	179.71	1537.38	374.60
T-SJ	0	14.10	29.92	15.08	41.07	49.72	95.03	50.31
	1	5.73	85.37	35.95	72.88	132.35	202.90	259.26
	7	5.38	62.37	30.92	55.26	150.19	415.19	296.60
	21	5.22	81.29	29.28	77.90	146.94	907.29	373.63
T-SH	0	14.10	29.92	15.08	41.07	49.72	95.03	50.31
	1	4.79	68.88	47.85	44.35	125.71	210.53	243.51
	7	5.55	54.59	34.84	73.84	126.59	588.07	253.88
	21	4.12	71.22	30.25	39.25	134.68	1102.65	300.67
T-MN	0	14.10	29.92	15.08	41.07	49.72	95.03	50.31
	1	5.88	54.66	38.75	53.81	109.96	199.11	175.50
	7	4.43	44.45	14.90	60.19	92.78	489.66	247.23
	21	4.01	50.81	22.68	41.61	141.96	1230.31	346.15

2.6 총균수

탁주 담금 후 측정한 일반 총세균수 결과는 Fig. 27 과 같다. 발효과정 중 일반세균수의 경향은 시간이 지날 수 록 급격히 증가하다가 발효 1일에 감소하다 완만한 증가 후 발효가 끝나는 21일 까지 점차 감소하는 경향을 나타내었다. 발효 1일 째 생균수는 증가하여 7.8×10^{7} ~

1.2×10^8 CFU/mL 으로 나타난 후 발효 2일 째엔 총균수가 감소하여 1.7×10^7 ~ 5.1×10^7 CFU/mL 으로 나타나고 발효 14일째 1 log cycle 정도 감소한 뒤 발효 21일 째는 최저 7.5×10^5 CFU/mL을 나타내었다. 발효초기에는 유산균이외 세균이 다수 존재하지만 발효가 진행되면서 유산균의 수가 증가는 것으로 보인다. 이와 같은 결과는 Seo 등(2005)의 연구에서 담금 초기에 4.5×10^5 CFU/mL 이었으나 24시간 발효 후 1.0×10^9 CFU/mL 으로 증가되고 그 후 10^8 CFU/mL 수준의 일반세균수가 측정되었다는 보고와 일치하는 경향을 나타내었다.

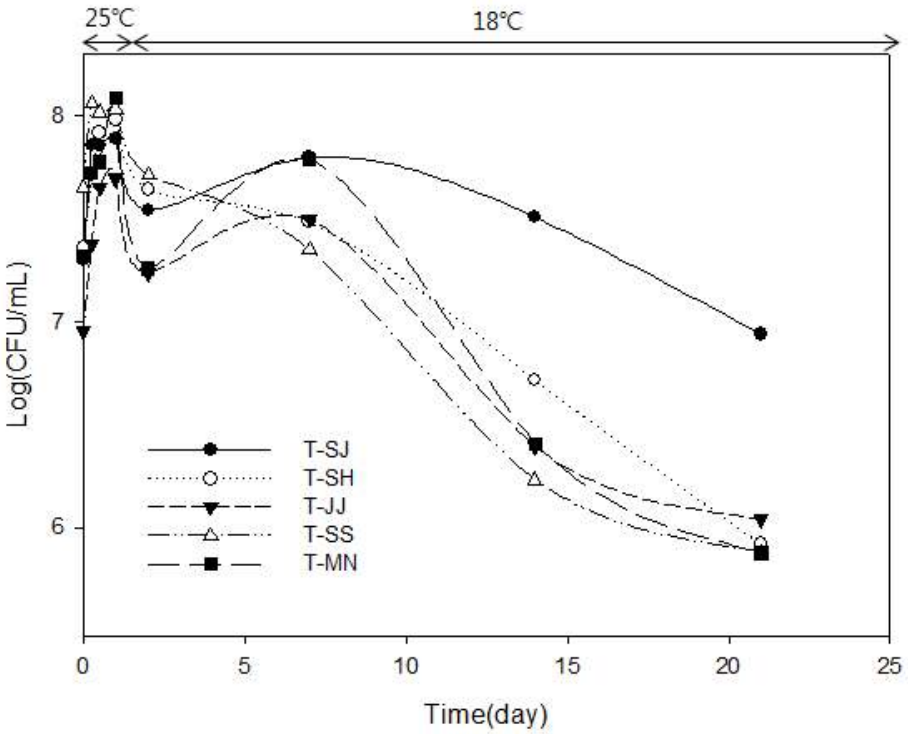


Fig 27. Changes in total viable cell counts of *Takju* during fermentation

2.7 총효모수

탁주 발효 과정 중 총 효모수의 측정 결과는 Fig. 28 과 같다. 담금 초기에는 1.6×10^7 ~ 4.9×10^7 CFU/mL을 나타내었고 발효 1일 째까지 급격히 증가하다가 48시간에 약간 증가 후 점차 감소하는 경향을 나타내었다. 이는 Seo 등(2005)의 연구에서 1일부터 총 효모수가 증가하기 시작하여 12일 까지 효모수가 증가하고 24일째부터 감소하였다는 보고와 같은 결과이다. 효모수가 증가하다가 알코올 생성이 시작되는 24시간부터 감소하는 것으로 보아 안정적인 발효가

이루어졌음을 알 수 있다.

군집분석 결과 가장 높은 비율의 *Saccharomycopsidaceae*의 비율을 나타내었던 SS와 SH로 제조한 T-SS와 T-SH의 초기 효모 균수가 2.1×10^7 CFU/mL, 2.4×10^7 CFU/mL 으로 가장 높은 결과 값을 나타내었다.

발효 말기의 에탄올이 18~20%에 이르면 효모가 사멸하기 쉽고, 효모 균체가 자기소화에 의해서 아미노산이 증가하여 착색과 품질의 원인이 된다. 또한 김의 연구에서는 초기 알코올 농도 10% 까지는 효모수가 증식하였으나, 12% 에서는 효모의 증식이 관찰되지 않아 생육한계의 초기 알코올 농도는 12% 정도라 하였다(김상희, 1999). 이는 본 실험에서 담금 후 7일째 효모의 수가 감소하는 경향을 나타내며 알코올 농도가 12% 증가하는 시점으로써 김의 결과와 일치하는 결과를 나타내었다.

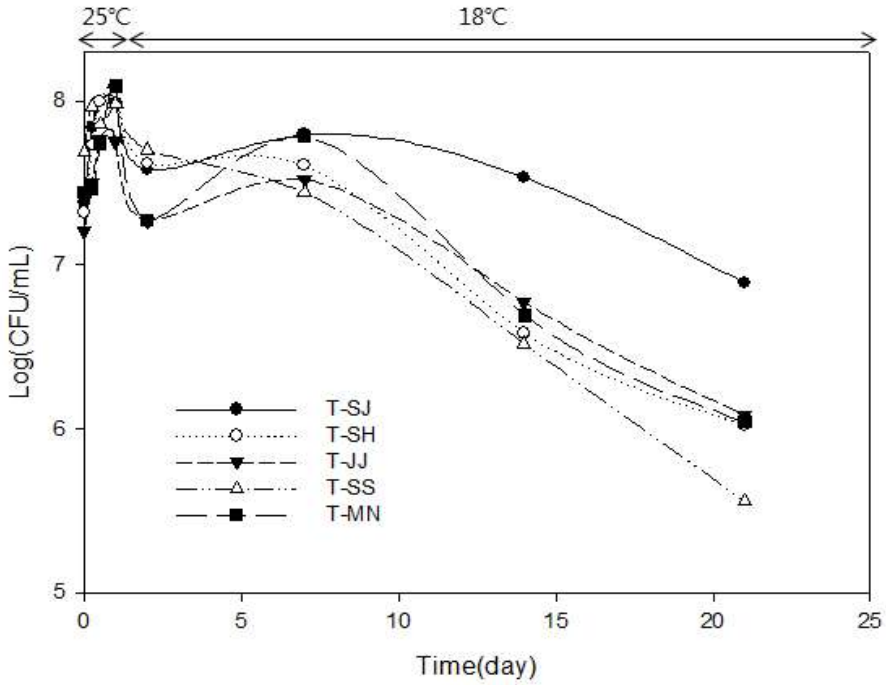


Fig 28. Changes in yeast cell counts of *Takju* during fermentation

2.8 총젖산균수

탁주 발효 과정 중 총 젖산균수 측정 결과는 Fig. 29 과 같다. 담금 직후에는 9.5×10^4 ~ 2.6×10^5 CFU/mL 이었으며 24시간까지 젖산균수가 증가하였다. 7일 이후에 감소하는 경향을 나타냈으며 발효가 끝난 21일 에는 1.2×10^5 ~ 5.3×10^6 CFU/mL 로 나타났으며 시료 간에 비슷한 경향을 나타내었다. 젖산균이 최대로 증가 했을 때, pH는 감소하였고, 총산도는 증가하여 연관성을 유추할 수 있다.

배양법에서도 가장 다양한 젖산균을 포함하고 있으며 Pyrosequencing 결과 가장 많은 Bacteria reads 수와 높은 비율의 *Leuconostoc*속과 *Lactobacillus*속을 포함하고 있는 SS로 제조한 T-SS의 초기 젖산 균수가 2.6×10^5 CFU/mL 로 가장 높은 것을 알 수 있다. So 등(1999)의 보고에 따르면 전통누룩으로 탁주를 담금 하였을 대 발효 2일에 최고치를 보인 후 서서히 감소하였지만 8일까지도 그 수가 매우 높았다는 결과와 비슷한 경향을 보였으나, 개량누룩을 사용하였을 때 3일 이후에 급격히 사멸하여 4일 이후에는 검출되지 않았다는 결과와는 다른 결과를 나타내었다.

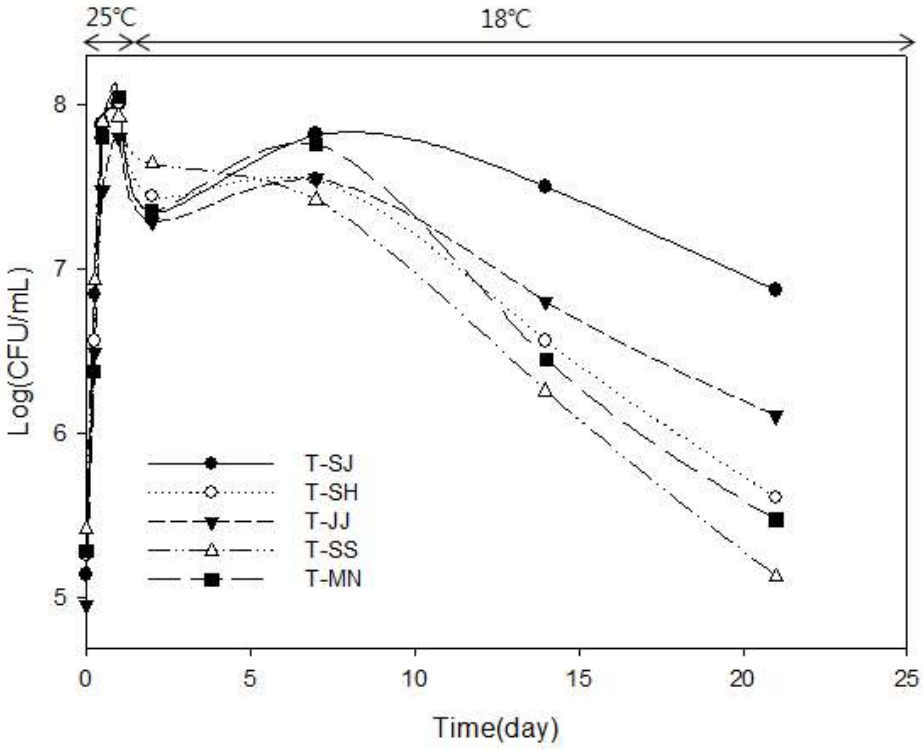


Fig 29. Changes in lactic acid bacteria cell counts of *Takju* during fermentation

2.9 관능 검사

각 누룩을 달리하여 제조한 탁주의 관능검사에 대한 결과는 Table 20과 같다. 과일향은 T-SH가 유의적으로 가장 높은 값을 나타내었으며 나머지 시료에서는 유의적인 차이가 없었다. 구수한 향은 모든 시료 간에 유의적 차이가 나타나지 않았으며 누룩향은 T-SS가 가장 높은 값을 나타내고 MN이 유의적으로 가장 낮은 값을 나타내었다. 단맛은 T-SS가 유의적으로 가장 높은 값을 나

타내었고 MN의 값이 가장 낮았다. 신맛은 T-MN이 가장 높았으며 JJ가 유의적으로 가장 낮은 값을 나타냈다. 곡물맛은 SS의 값이 유의적으로 가장 높았으며 T-JJ, T-SJ가 유의적으로 가장 낮은 값을 나타내었으며 알코올맛과 쓴맛은 시료 간에 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 알코올맛과 쓴맛은 관능특성 중 가장 높은 값을 나타내며 높은 양의 상관관계를 나타내었는데 실제 시료의 알코올 수준이 높을수록 쓴맛의 관능특성도 강하게 자극되어 높은 강도로 평가되는 것으로 사료된다.

Table 20. Profile of sensory characteristics of *Takju*

Sensory characteristic	T-JJ	T-SS	T-SJ	T-SH	T-MN	F-value
Fruit aroma	4.44^{b}	5.00^{b}	4.50^{b}	6.72^{a}	5.17^{b}	4.252**
Grain aroma	5.78^{a}	5.39^{a}	6.28^{a}	6.06^{a}	5.83^{a}	0.515*
Nuruk aroma	5.11^{ab}	6.11^{a}	5.39^{ab}	5.33^{ab}	4.61^{b}	1.551*
Sweet taste	4.00^{ab}	4.50^{a}	4.06^{ab}	4.22^{ab}	3.17^{b}	1.996*
Bitter taste	6.61^{a}	6.83^{a}	6.28^{a}	6.78^{a}	6.28^{a}	2.909**
Sour taste	4.38^{b}	4.44^{b}	5.00^{ab}	4.50^{b}	6.39^{a}	2.106*
Grain taste	5.56^{b}	6.94^{a}	5.61^{b}	6.17^{ab}	5.78^{ab}	4.259**
Alcohol taste	7.56^{a}	6.94^{a}	7.22^{a}	7.06^{a}	5.56^{b}	0.416*

1) 9 point scale (1: very weak, 5: normal, 9: very strong)

2) Mean±S.D. *P<0.05 **P<0.01 ***P<0.001

3) ^{abcde}Means in a column by different superscripts are significantly different at 5% significance level by Duncan's multiple range test.

2.10 누룩균에서 분리된 균주의 probiotic 특성 조사

누룩에서 분리된 젖산균 중 다당 생성능을 가지는 *Leuconostoc* 및 *Weissella* 균주를 선택하였다 (Table 21). 이들 다당생성균들의 기능성을 확인하기 위하여 Probiotic 생균으로서의 조건 중 산의 내성과 담즙액에서의 생존력을 측정하였는데 이는 구강으로 섭취하게 되는 유산균은 강한 산성인 위액에서 대한 내산성이 있어야 하고 위를 통과하였을 시 담즙에 노출되기 때문이다. 따라서 본

연구에서 내산성은 pH 2.5 로 조정된 MRS 배지에서 균주를 노출시켜 pH를 조정하지 않은 MRS 배지에 노출시킨 균주를 비교하여 균수를 측정하여, 그 결과는 Fig. 30 에 나타내었다. pH를 조정하지 않은 배지에 접종한 균주들은 모두 10^9 CFU/mL 수준으로 나타났으며, pH 2.5 로 조정한 액체 배지에 접종한 균주 중 표준균주인 A12와 A45는 10^8 CFU/mL 으로 가장 높은 생균수를 유지하였고, SS25, SS2 는 10^6 CFU/mL, SH9, SS1, SS24, SS29 는 10^5 CFU/mL, SS26, SS27, SS28, SS30 은 10^4 CFU/mL 으로 균수가 측정되었다. 순수한 위액의 pH는 1.4-2.0 정도로 대부분의 미생물은 위액에서 사멸하지만 음식물을 섭취하게 되면 이에 따른 완충작용으로 인해 위의 pH는 높아지며 또한 사람마다 개인차는 있지만 공복 시 평균 pH 4.0 이며 일반적으로 음식물을 섭취한 뒤 2시간 이상 지나야 pH가 3.0 으로 떨어지는 것을 고려한다면 누룩에서 분리한 균주를 probiotic 생균주로 사용하여 섭취할 경우 균의 생존율은 더 높아질 것으로 판단된다.

누룩에서 분리한 다당 생성 균주들은 내산성 시험에서 높은 생존율로 인해 섭취 시 위를 통과하여 장으로 이동할 것으로 예측되며 장에 도달하기 전에 췌장과 십이지장을 통과하게 되는데 이때 분비되는 담즙에 영향을 받는다. 또한 인공 담즙산에 대한 내성을 가진 균주는 콜레스테롤 대사와도 밀접한 관련이 있기 때문에 내담즙성은 probiotics 특성을 가지기 위해 필요하다. 본 연구에서는 oxgall을 0.3% 첨가한 MRS 액체에 분리균주를 접종하여 24시간 노출하여 균수를 측정하여 Fig. 31 에 나타내었다. 실험 결과 누룩에서 분리한 모든 균주는 10^7 CFU/mL 수준으로 표준균주보다 높은 생균수를 나타냈으며, 표준균주인 A12는 10^6 CFU/mL, A45는 10^5 CFU/mL 수준으로 생균수를 나타내었다. 이러한 결과로 미루어 보아 누룩에서 분리한 균주는 내산성의 기능을 지닌 동시에 내담즙성에 대한 높은 저항성을 나타내어 probiotics 로서의 기능을 갖추어 목적부위인 장에 도달하여 인체에 정장작용을 할 수 있을 것으로 예상되어진다.

Table 21 Exopolysaccharide producing Lactic acid bacteria isolated from traditional *Nuruk*

Strain No.	Accession No.	Strain Name
A12	KACC.12312	*Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides*
A45	KACC.11845	*Weissella cibaria*
SH9	HM218732.1	*Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides* strain NM178-1
SS1	JX402126.1	*Weissella SP.Wikim* SH005
SS2	AB671281.1	*Weissella SP.* A52
SS24	GU138598.1	*Weissella cibaria* IMAU-10270
SS25	AB510746.1	*Weissella cibaria* strain H041717
SS26	GQ117000.1	*Weissella SP.* NYU-112
SS27	AB510745.1	*Weissella cibaria* strain H041710
SS28	JX536122.1	*Leuconostoc mesenteroides* strain THK-D433
SS29	JN853602.1	*Leuconostoc mesenteroides* strain YML003
SS30	JN128641.1	*Leuconostoc SP.* THK-W39

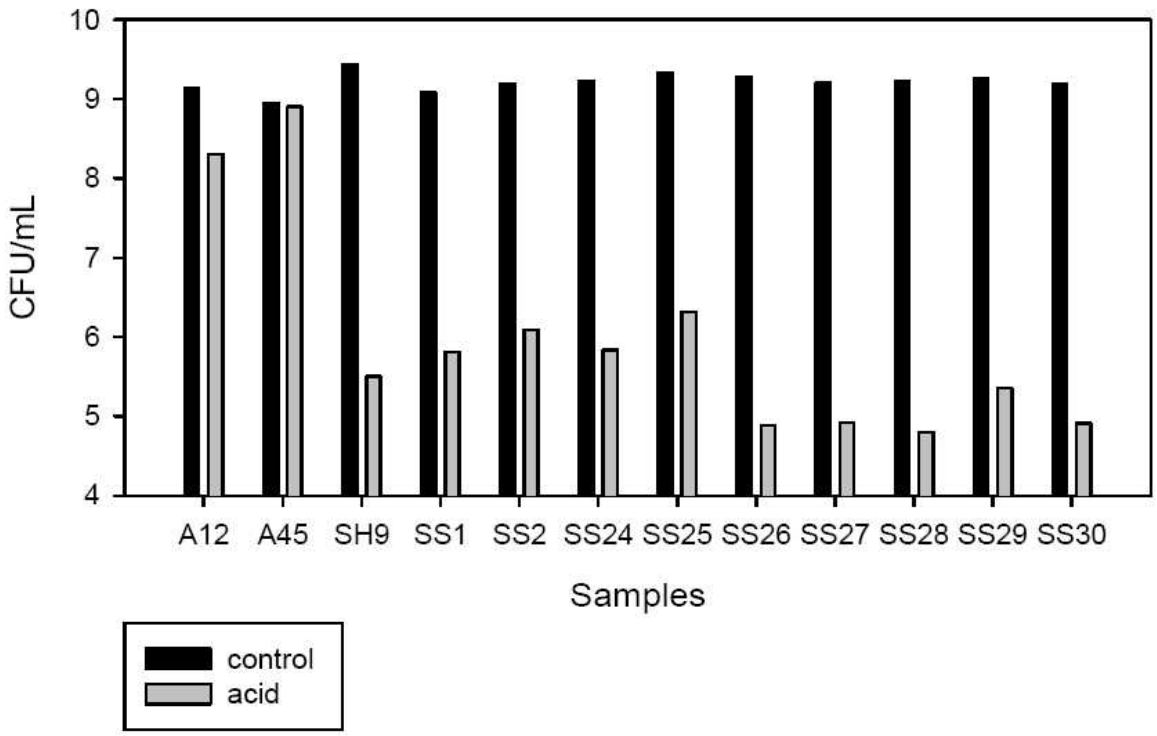


Fig 30. Acid tolerance of bacteria isolated from *Nuruk*

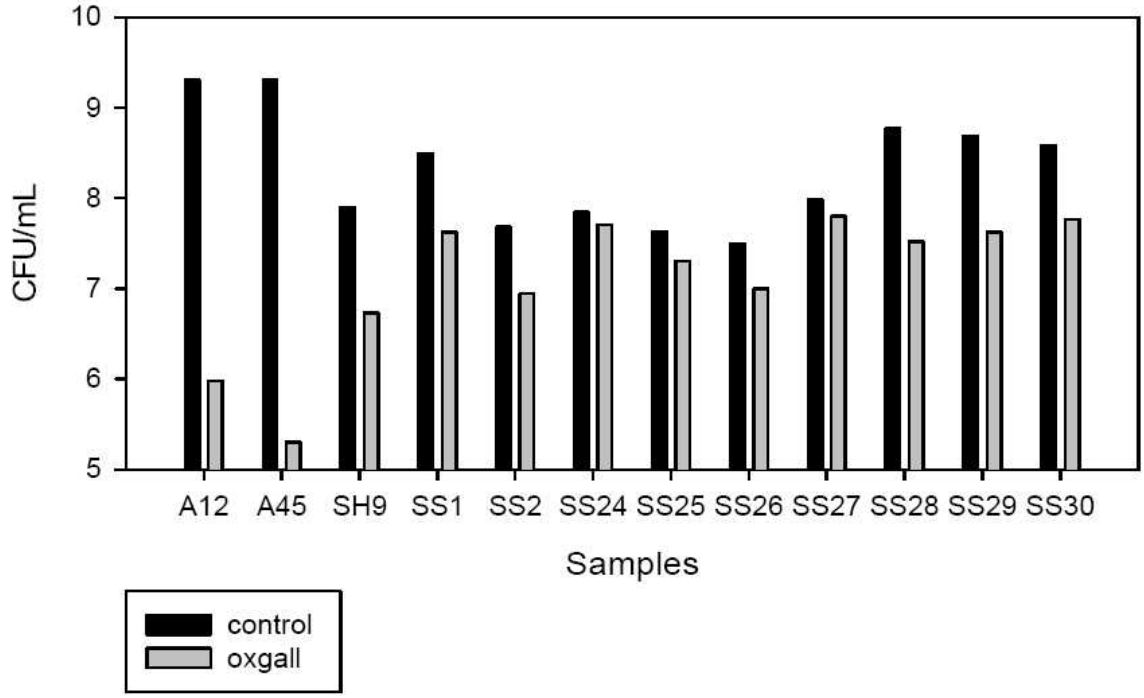


Fig 31. Bile resistance of bacteria isolated from *Nuruk*

2.11 *Escherichia coli* 생육억제

Probiotics 생균제는 위산과 담즙산에 대한 내성이 있어 위장관 서식과 동시에 상피세포에 정착하여 증식하면서 정상 장내 세균총의 균형을 유지하고 유해미생물에 대한 길항력이 있어야 한다(Schilinger 등, 2005). 따라서 내산성과 내담즙성이 양호한 5 분리균주(SS1, 2, 24, 25, 29)를 선택하여 장관계 병원성 세균인 *E. coli*와 *S. typhimurium*에 대한 생육억제 능력에 대한 시험을 Paper disc method를 이용하였다. 농축되지 않은 배양액의 처리에서 *E. coli*에 대한 억제능력이 *S. typhimurium*에 대한 억제능력보다 더 우수하였는데 S. typhimurium의 경우는 저해능을 보이지는 못하였다(Fig 32). 이는 김치에서 분리한 젖산균들의 probiotics 특성을 살펴본 Kim(2005)의 연구 중에서 *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides* KM37, KM 64가 *E. coli*에 대해서는 각각 10, 12 mm의 clear zone 형성을 보였고 *S. typhimurium*에 대한 억제능은 보이지 않는 결과와 Lee(2011)의 연구에서 *Leuconostoc mesenteroides* CK0122가 *S. typhimurium*에 대한 항균활성을 보이지만 *E. coli*에 대해서는 억제능력이 나타나지 않은 결과와 비교하였을 때 분리균주들이 병원성 미생물에 대한 억제능력이 있는 것을 확인할 수 있었다.

유산균의 유익한 작용 중 하나는 lactic acid, acetic acid 등의 유기산 생성 및 과산화수소, diacetyl, bacteriocin, 이산화탄소, 에탄올, 저분자 항생물질과 같은 발효생성물로 인해서 이에 민감한 *Salmonella, E.coli, Staphylococcus* 등의 장내 병원성 세균의 성장을 억제함으로써 장질환의 예방 및 면역력 증강을 높여준다고 보고된 바 있다(Ahn 등, 2003; Herich와 Levkut, 2002; Adam과 Nicolaides, 1997). 그리고 여러 연구에서 *Leu .paramesenteroides, Leu. grlidium, Leu. mesenteroides, Leu. carnosum* 등의 *Leuconostoc* 종에 의해 mesenteriocin 5, leuconocin S, leucosin A, carnocin와 같은 bacterionin이 생산된다고 보고되었으며 (Klaenhammer, 1988; Nettles와 Barefoot, 1993) 이러한 결과는 후속적인 연구를 통해 규명 될 필요가 있어 보인다.

Table 22. Antimicrobial activity of LAB isolated from Nuruk on the grow of *E. coli* by paper disc method

Sensitive strains	Clear zone (mm)				
	SS1	SS2	SS24	SS25	SS29
Escherichia coli	10	13	13	14.6	15

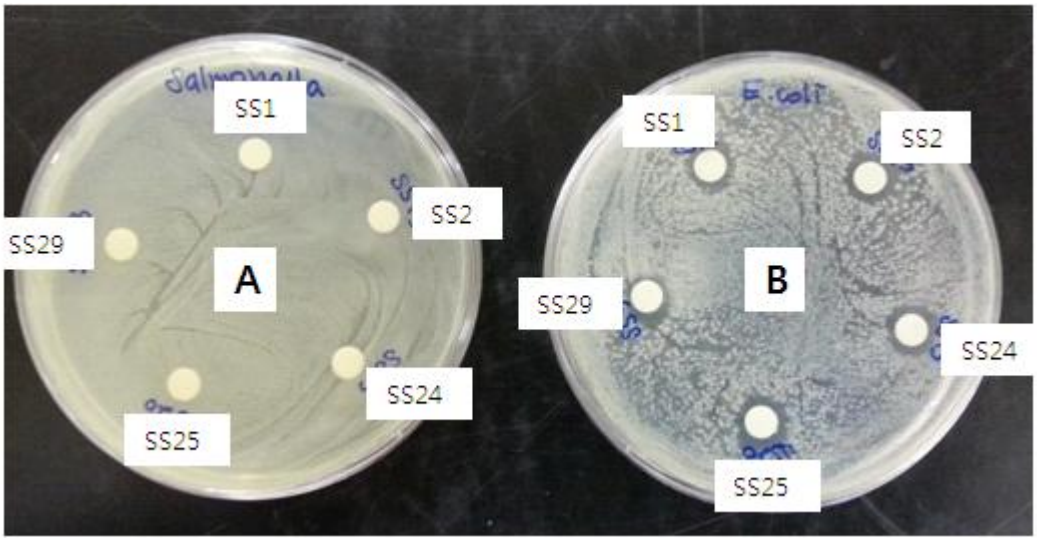


Figure 32. Antimicrobial activity of LAB strains isolated from Nuruk against *E. coli (B)* and *S. typhimurium* (A)

2.12 Dextransucrase 활성능 측정

김치에서 분리한 EPS생성이 가능한 유산균들을 sucrose 액체배지에 1% 접종 후 28℃, 48시간 배양하여 dextransucrase 활성을 측정하였다(Table 23). 분리균주의 DSU는 표준균주 (A12, A45)보다 비슷하거나 낮게 나타났으며 분리균주의 경우는 SS26이 0.677로 가장 높았다. protein의 양 역시 DSU 와 같이 표준균주보다 낮았으나 dextransucrase의 specific activity는SH 9을 제외하고는 모든 분리균주에서 높게 나타났다. 엄 등(2002) 의 연구에 따르면 저온성 발효식품의 starter로 사용하기위하여 동치미에서 분리한 균주들을 배양하여 효소활성을 측정한 결과 분리균주인 *L. mesenteroides* HJ-D3와 *L. mesenteroides* HJ-D12의 효소활성이 11.3 DSU/mg protein, 10.12 DSU/mg protein 으로 가장 높게 나타났다고 보고하였으며, 이 등(2006) 은 증편 제조 stater로 사용하기 위한 균주를 증편 반죽에서 분리하여 dextransucrase 활성을 측정한 결과 *L. mesenteroides subsp mesenteroides* 2-9의 효소활성이 28.5 DSU/mg protein, *L. mesenteroides subsp dextranicum* 5-13의 효소활성이 14.5 DSU/mg protein 으로 가장 높게 나타났다고 보고하였다. 본 실험 결과에서 가장 높은 효소활성을 나타낸 SS26은 40.72 DSU/mg protein이였으며 SH9을 제외한 분리균주들이 상대적으로 높은 효소활성을 나타낸 점을 고려하며 본 실험에서 분리한 유산균이 발효식품의 starter나 dextran과 같은 다당류 생산에 이용될 수 있을 것으로 판단된다.

Table 23. Dexransucrase specific activities of the selected strains isolated from Korean traditional Nuruks

Culture No.	Enzyme activity (DSU)	Protein (mg)	Specific acivity (DSU/mg protein)
A12	0.790±0.007	0.060±0.001	14.18±0.13
A45	0.660±0.005	0.070±0.003	9.67±0.44
SH9	0.048±0.026	0.011±0.001	4.54±2.84
SS1	0.510±0.026	0.026±0.011	21.78±7.52
SS2	0.637±0.040	0.017±0.000	36.83±2.53
SS24	0.591±0.069	0.029±0.011	21.66±6.23
SS25	0.359±0.026	0.016±0.007	27.24±14.64
SS26	0.699±0.018	0.018±0.005	40.72±8.93
SS27	0.659±0.026	0.018±0.002	36.07±5.48
SS28	0.518±0.017	0.014±0.000	37.13±1.20
SS29	0.240±0.008	0.011±0.005	26.23±15.98
SS30	0.629±0.016	0.025±0.003	25.79±2.62

2.13 분리균주의 이소말토올리고당 생성능

Sucrose 이외에 다른 당 (수용체)을 첨가할 경우 sucrose의 구성당인 포도당을 수용체인 다른 당에 전달하는 반응을 촉매하여 새로운 구조의 올리고당을 형성하는데, 이때 첨가해준 탄수화물 수용체 중 maltose가 가장 효율적인 수용체로 알려져 있다. (Selbmann 등, 2002; Leathers, 2005; Moon, 1998) Sucrose와 maltose를 2:1의 비율로 함께 첨가한 배지에서 누룩분리균을 반응시켰을 때 이소말토올리고당의 생성을 확인할 수 있었다 (Fig 33).

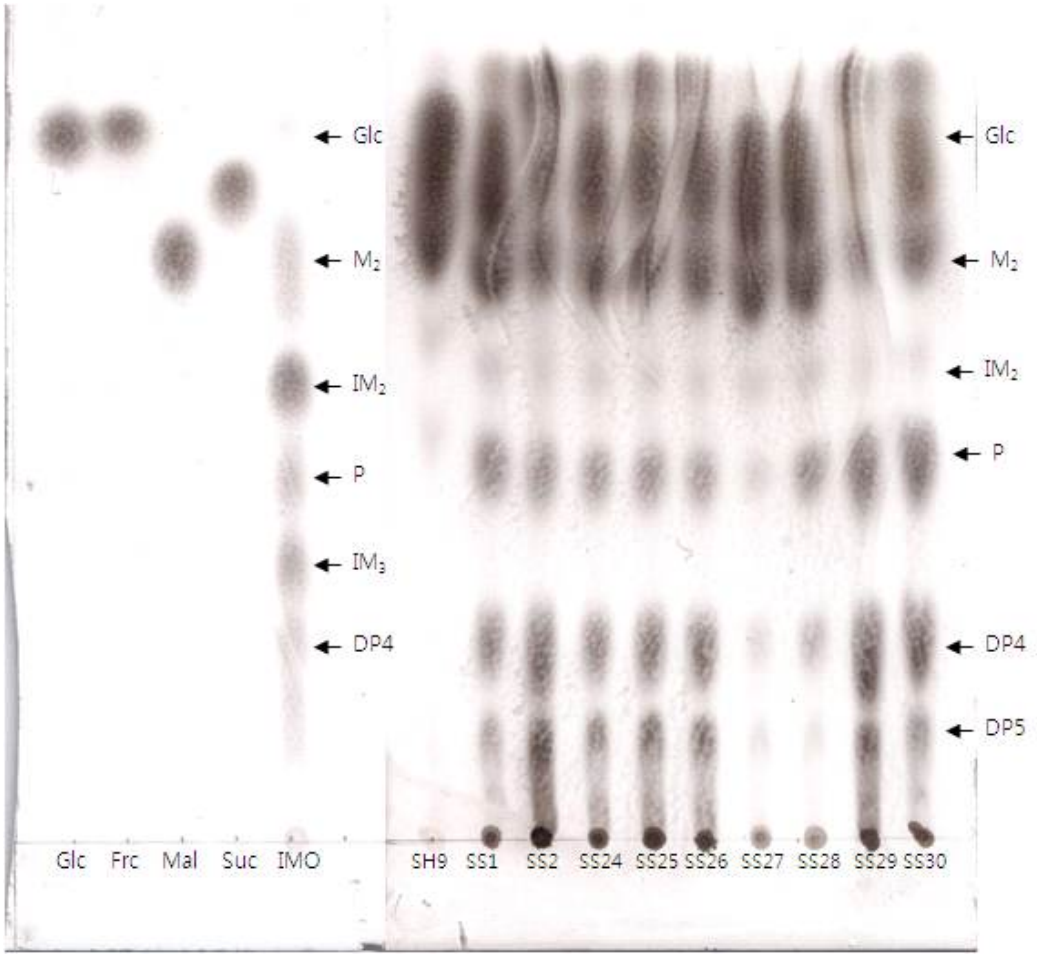


Fig. 33. Thin layer chromatogram of isomaltooligosaccharides formation with sucrose to maltose by *Leuconostoc* and *Weissella* strains isolated from Nuruk

*Glc; 2% glucose, Frc; 2% fructose, Mal; 2% maltose, Suc; 2% sucrose, IMO; 2% isomaltooligosaccharides (Wako Pure Chemical Industry Ltd., Osaka, Japan)

*The carbohydrate of compositions of the reaction products were analyzed by TLC, TLC Silica gel 60 F254 (Merck, Germany) with two ascents of 2:5:1.5(v/v/v) nitromethane/1-propanol/water. The carbohydrate were visualized by dipping the plates into 5% H2SO4 in methanol containing 0.3% naphtha, followed by drying and heating for 10 min at 121℃.

2.14 Crude Exopolysaccharides(EPS)와 올리고당의 생성

생성하는 *Leuconostoc*속이나 *Weissella*속 유산균은 sucrose가 존재할 경우 dextransucrase를 분비하여 fructose를 유리하고 점질의 다당을 생성하는데 isopropanol을 이용하여 침전시킨 crude EPS 건조중량을 이용하여 수율을 확인하였다. (Table 24). 생성된 crude EPS의 수율은 11 - 68 %로, crude oligosaccharide 수율의 경우는 8 - 59%이였으며 두 경우 모두 SS29 분리균주가 가장 높게 나타났다. 생성능 수율의 결과들과 dextransucrase 효소활성 결과(Table 24)와 비교하였을 때 dextransucrase specific activity (DSU/mg protein) 의 결과와는 다른 경향성을 보였다. 김치에서 분리한 유산균의 수용체 반응에 관한 연구로는 한 등(2002)이 김치제조시 설탕과 맥아당을 함께 추가하였을 때 김치 유산균에 의해 isomaltooligosaccharides의 주요 성분인 panose 가 생성되었다고 보고하였으며, 엄 등(2002)은 김치에서 panose를 다량으로 생산하는 stater를 얻기 위해 김치가 발효되는 저온에서 빠른 생육속도를 보이는 동시에 높은 dextransucrase 활성을 보이는 *Leuconostoc*속 젖산균을 선발하는 과정에서 수용체반응을 이용하였다고 보고하였다. 이러한 연구들을 토대로 김치에서 분리된 KC균주들도 sucrose과 maltose를 2:1의 비율로 함께 추가하였을 때 dextransucrase의 수용체 반응에 의한 고가의 기능성 식품첨가물인 올리고당을 발효과정 중에 가장 효과적으로 생성시킬 수 있다고 판단된다.

Table 24. Production yields of crude EPS and isomaltooligosaccharide of lactic acid bacteria isolated from *Nuruk*

Culture	Yield (%)	
	EPS [1)]	Oligosaccharides [2)]
SH9	11.27±3.67	8.83±1.03
SS1	59.72±2.75	21.42±3.99
SS2	35.46±3.20	38.27±3.91
SS24	65.15±0.70	28.56±3.98
SS25	47.97±2.29	29.49±3.95
SS26	62.29±6.96	31.75±2.73
SS27	67.40±6.14	24.46±3.38
SS28	27.55±8.70	11.45±1.17
SS29	68.44±7.33	59.88±6.01
SS30	31.66±2.48	36.03±0.80

1), 2) Calculated by the equation of Yield(%) = $\frac{\text{product(g)}}{\text{(maltose(g) + 0.48}\times\text{sucrose(g))}} \times 100$

Oligosaccharide production was conducted with sucrose and maltose (sucrose: maltose=2:1 , w:w). Crude EPS and isomatooligosaccharides precipitated with 67% and 80% isopropano respectivelyl, and weighed after drying.

2.15 이소말토올리고당 생산

분리균주 중 하나인 SS2를 이용하여 발효시간 경과에 따라 단당이나 이당이 포함되지 않는 이소말토올리고당의 생성을 Fig 34 에 확인할 수 있었다. 14시간이 경과됨에 따라 sucrose와 maltose를 이용하여 이소말토올리고당이 생성되는 것을 확인되었는데 sucrose에서 분리된 fructose의 경우는 24시간 안에 사라지는 것을 확인 할 수 있었다. 따라서 누룩에서 분리된 균주들을 이용하고 수용체반응을 유도한다면 기능성 prebiotic으로 알려진 기능성 이소말토올리고당을 생산해 낼 수 있으며 또한 이온교환 column을 이용할 경우 순도가 높은 올리고당의 생성도 가능할 것으로 판단된다.

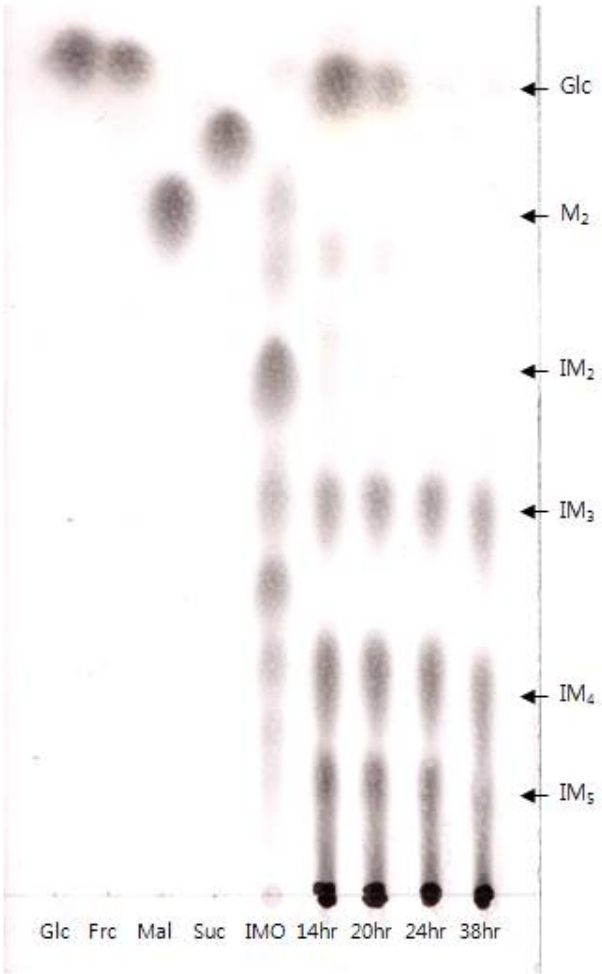


Fig 34. TLC of isomatooligosaccharide production by SS2 as a function of time.

*Glc; 2% glucose, Frc; 2% fructose, Mal; 2% maltose, Suc; 2% sucrose, IMO; 2% isomaltooligosaccharides (Wako Pure Chemical Industry Ltd., Osaka, Japan)

*The carbohydrate of compositions of the reaction products were analyzed by TLC, TLC Silica gel 60 F254 (Merck, Germany) with two ascents of 2:5:1.5(v/v/v) nitromethane/1-propanol/water. The carbohydrate were visualized by dipping the plates into 5% H2SO4 in methanol containing 0.3% naphtha, followed by drying and heating for 10 min at 121℃.

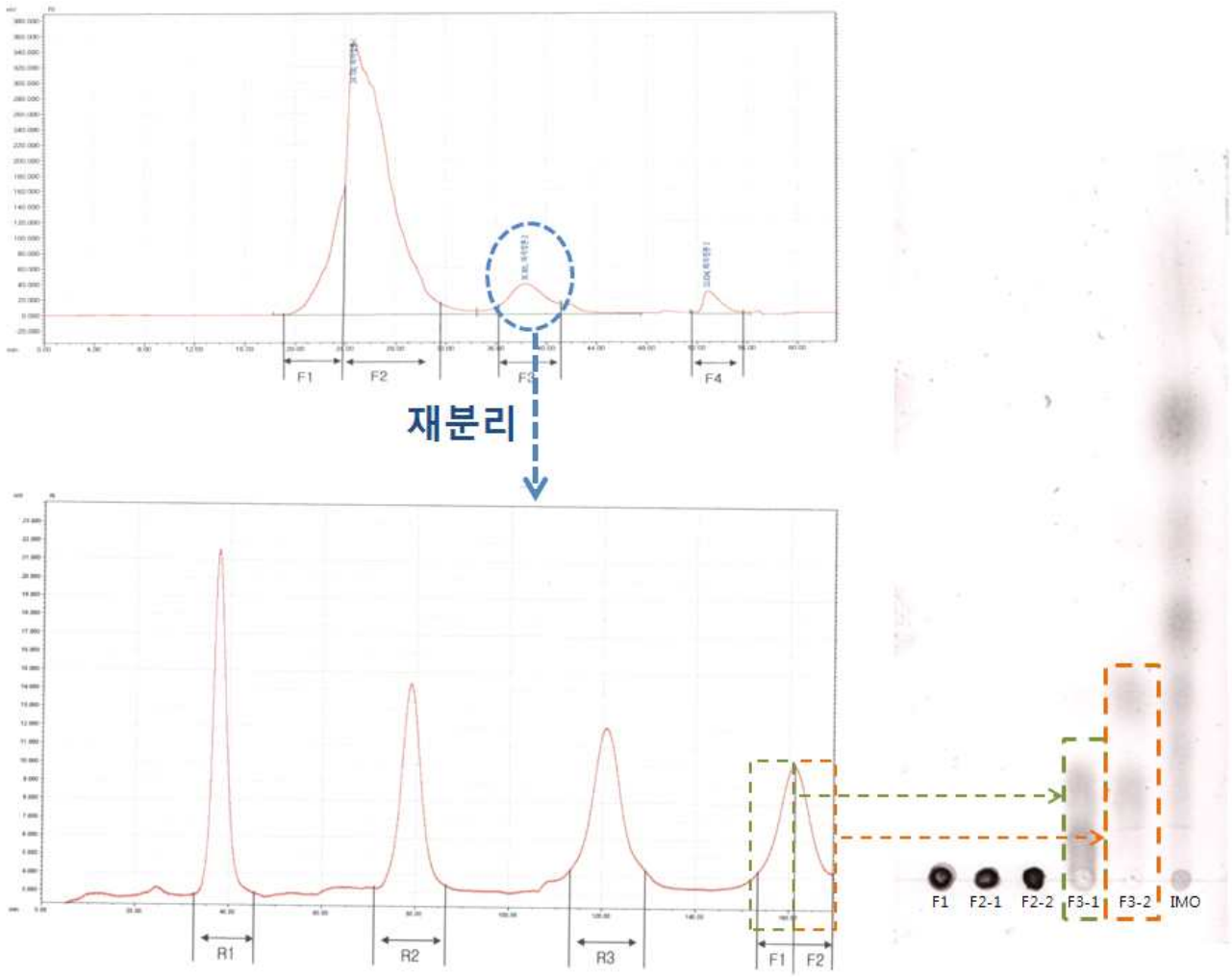


Fig 35. Purification of isomatooligosaccharides from a *Leuconostoc* using a preparative HPLC

* IMO; 2% isomaltooligosaccharides (Wako Pure Chemical Industry Ltd., Osaka, Japan)

*The carbohydrate of compositions of the reaction products were analyzed by TLC, TLC Silica gel 60 F254 (Merck, Germany) with two ascents of 2:5:1.5(v/v/v) nitromethane/1-propanol/water. The carbohydrate were visualized by dipping the plates into 5% H2SO4 in methanol containing 0.3% naphtha, followed by drying and heating for 10 min at 121℃.

Ⅴ. 연구성과 및 기대효과

1. 연구성과

1.1 전통누룩의 우수성 확인

-pyrosequencing을 이용한 미생물 군집 분석을 통해 전통누룩에는 다양한 미생물군집이 존재하며 이들 미생물군집을 통해 이들 미생물 군집의 metabolites 중 대표적인 맛 성분인 유기산과 유리아미노산 등이 발효과정을 통해 풍부해 짐을 과학적으로 연결 지어 확인하였음

-배지를 이용하여 현재 남은 4종류 전통누룩 생산제품에서 젖산균 분리하고 동정하였으며 분리동정 된 젖산균들의 phylogenetic tree작성을 통해 상업적 시 생산되는 전통누룩제품에 존재하는 젖산균의 계통을 보고하였음

1.2 상업적 시 생산되는 전통누룩제품과 일반개량누룩를 이용한 단양주 특성 조사

-현재 상업적 막걸리생산에서 가장 많이 사용하고 있는 일반 개량누룩과 전통누룩을 이용하여 발효한 탁주를 이용하여 제품품질 특성을 확인함

-이를 통하여 전통누룩의 탁주제조 시 당, 알코올, 유리아미노산, 유기산과 같은 화학적 특성과 미생물균총의 변화 및 관능검사를 통해 이들 metabolites들과 맛의 강도를 연결하여 확인하였음

1.3 전통누룩으로부터 분리한 다당생성 균주의 probiotic 특성 조사

-전통누룩에서 젖산균을 배지법을 통해 분리 동정하였으며 이들 균주 중 기능성 다당 및 올리고당 생성이 가능한 *Leuconostoc*과 *Weissella*균주들을 분리 동정하였으며 내산성, 내담즙성을 측정하여 probiotic의 기능성을 확인하였음

1.4 생산된 다당류, 올리고당류의 기능성 확인과 기능성 당류의 특성 연구

-전통누룩에서 분리동정된 다당생성 젖산균의 dextransucrase의 활성과 이소말토올리고당 생성능을 확인하였으며 이들 생성된 올리고당의 분리방법에 대한 기초자료를 제시하였음

1.5 상기 연구결과의 일부는 ‘국제 기능성소재 및 기능성식품 학회 (International Society for Nutraceuticals and Functional Foods)’의 연차회의인 2012 International conference and exhibition on nutraceuticals and functional foods 에 참가하여 ‘Study of exopolysaccharide producing *Leuconostoc* and *Weissella* for a yogurt starter (Poster

Number; P176)’ 발표하였음

상기 실험결과를 고려할 때 전통 누룩을 이용한 제품을 개발하기 위한 전략으로는 현재 탁주나 막걸리 생산업체에서 사용하고 있는 당화 수율을 높이고 대량생산을 목표로 하는 *A. kawachii*와 같은 단일균주를 이용하는 국균(koji)방식보다는 위생적인 방식을 통한 생전분이나 각 지방 또는 제조자나 업체의 특색이 있는 천연발효 미생물을 가지고 있는 전통누룩생산 방식으로 제조된 누룩을 확보하여 이들 누룩을 통해 전통주를 다양한 전통주를 제조하고 이를 통하여 맛의 고급화를 통한 고부가가치 제품을 개발하는 방향이 필요할 것이다. 이는 막걸리의 낮은 상업적 가격경쟁력을 극복할 수 방법인 동시에 전통누룩 사용을 통하여 소량생산이라도 일반 상업적 대량생산되는 제품의 차별화가 가능함으로 전통제조법을 이용하여 맛의 다양성과 우수성을 강조할 수 있기 때문이다. 이는 전통주의 고급품의 이미지 제고에 필수적이며 이러한 일이 가능하기 위해서는 본 연구 뿐 아니라 전통주에 대한 더 다양하고 과학적인 실험과 분석 및 이들 정보들이 생산자에게 제공되는 것이 필수적이라 하겠다.

2. 기대효과

누룩에 존재하는 미생물의 다양성의 확인은 한국전통주의 우수성과 기능성을 알리는데 학문적 가치 뿐 아니라 한식의 건강기능성과 우수성을 알리는 자료를 제공할 수 있을 것으로 보이며 관련된 기능성 유산균주를 분리동정할 수 있는 모델을 확립함으로서 차후 다른 생물신소재가 될 수 있는 기능성 종균들을 찾아내고 분리해 내는 시스템적 연구모델로 활용가능하다. 기능성 당 물질의 생산을 통해 차후 식품, 화장품, 의약등 바이오산업에 활용될 수 있다. 일반적으로 기능성 당들을 인체나 동물의 장내의 유익균을 증가시키는데 이러한 장내균총변화가 비만억제와도 관련이 있으므로 분리된 당물질을 이용한 비만억제 연구의 재료로 사용이 가능하다. 이를 통해 ’ 한식의 세계화 ‘에 과학적 연구 홍보자료로 사용될 수 있으며 차후 기능성 식품이나 식음료 개발 등 차후 산업연계가 가능하다.

Ⅵ. 참고문헌

김도만. 2002. 기능성올리고당 생산특성을 갖는 Leuconostoc mesenteroides dextransucrase와 enolase형질전환체 개발 및 효소특성연구. 한국학술진흥재단 과제.

김상희, 1999. 약,탁주 발효에 적절한 효모의 선발 및 특성, 박사학위논문, 고려대학교 대학원

김정환. 2004년. Leuconostoc mesenteroides의carbon catabolite repression기작구명 및 CCR해제변이주에서 유용효소 생산. 교육과학기술부 과제.

유대식, 유현영. 2010. 우리누룩의 전통성과 우수성. 월드 사이언스.

정동효. 2012. 누룩의 과학. 유한문화사. P176.

Adam M. R. and Nicolaides L. 1997. Review of the sensitivity of different foodborne pathogens to fermentation. Food control 8:227-23

Ahn DK, Han TW, Shin HY, Jin IN and Ghim SY. 2003. Diversity and antibacterial activity of lactic acid bacteria isolated from Kimchi. Kor. J. Microbiol. Biotechnol. 31:191-196

Arun G., Sarvagya S.K. 1994. Fractionation of Leuconostoc mesenteroides NRRL B-512F dextran sucrase by polyethylene glycol: a simple and effective method of purification. JOURNAL OF MICROBIOLOGICAL METHODS. 20: 225-231.

Bradford M.M. 1976. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, ANALYTICAL BIOCHEMISTRY. 72: 248-254.

Cho HK, Seo WT, Lee JY, Cho KM. 2012. Quality Characteristics of Cereal Makgeolli Rice Nuruk prepared Rhizopus oryzae CCS01. J Korean Soc. Food Sci Nutr. 41(7):1002-1008.

Chun JW, Ma CW, Oh KH. 2005. Physiological characterization of Lactobacillus sp. JK-8 isolated from shrimp aquaculture pond. Kor. J. Microbiol. 41:18-23.

Chung DH. 1974. Fermentation and microbial technology. Sunjun munhwasa. 228-275

Eom HJ, Seo DM, Yoon HS, Lee HB and Han NS. 2002. Strain selection Psychrotrophic Leuconostoc mesenteroides producing a highly active dextransucrase from kimchi. Korean J. Food Sci. Technol. vol. 34, No. 6, pp.1085-1090

Eom HJ, Seo DM, Yoon HS, Lee HB and Han NS. 2002. Strain selection Psychrotrophic Leuconostoc mesenteroides producing a highly active dextransucrase from kimchi. Korean J. Food Sci. Technol. vol. 34, No. 6, pp.1085-1090

Han EH, Lee TS, Noh BS, Lee DS. 1997. Volatile flavor components in mash of Takju prepared by using different Nuruks. Korean J. food sci. Technol. 29(3):563-570

Han NS, Jung Y, Eom H, Koh Y, Robyt J.F, and Seo J. 2002. Simultaneous biocatalytic synthesis of panose during lactate fermentation in kimchi. J. Microbiol. Biotechnol. 12: 46-52

Herich R. and Levkut M. 2002. Lactic acid bacteria, probiotics and immune system. Vet. Med. 47:169-180

Jeong JW, Park KJ, Kim MH, Kim DS. 2006. Quality characteristics of Takju fermentation by addition ofchestnut peel powder. Korean J.Food Preserv. 13:329-336.

Jin JB, Kim SY, Jin Q, Eom HJ, Han NS. 2008. Diversity Analysis of Lactic Acid Bacteria in Takju, Korean Rice Wine. JOURNAL OF MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY. 18(10): 1678-1682.

Jo KY,Ha DM. 1995. Isolation and identification for the lactic acid bacteria from *Nuruk* .J. KoreanSoc.Agric.Chem.Biotechnol.38:95-99.

Jung W. 2010. Characteristic of traditional Nuruk ratio on the fermentation and quality of germinated brown rice Takju. A thesis. Kyungpool National University

Kang TY, Oh KH, K K. 2000. Isolation and identification of yeast strains producing high concentration of ethanol with high viability. Kor. J. Microbiol. Biotechnol. 28(6):309-315

Kim HR, Jo SJ, Lee SJ, Ahn BH. 2008. Physicochemical and sensory characterization of a Korean traditional rice wine prepared from different ingredients. Korean J. Food Sci. Technol. 40(5):551-557.

Kim JY, Kim D, Park P, Kang HI, Ryu EK, Kim SM. 2011. Effects of storage temperature and time on the biogenic amine content and microflora in Korean turbid rice wine, Makgeolli. FOOD CHEMISTRY. 128(1): 87-92.

Kim OM, Kim MK, Lee SO, Lee KR, Kim SD. 1998. Antimicrobial effect of ethanol extracts from spices against Lactobacillus plantanum and Leuconostoc mesenteroides isolated from Kimchi. J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr. 27: 455-460.

Kim SJ. 2005. Potential probiotic properties of Lactic acid bacteria isolated from Kimchi. Food Sci. Biotechnol. 14(4):547-550

Kim SY, Yoo KS, Kim JE, Kim JS, Jung JY, Jin Q, Eom HJ, Han NS. 2010. Diversity Analysis of Lactic Acid Bacteria in Korean Rice Wines by Culture-independent Method Using PCR-denaturing Gradient Gel Electrophoresis. FOOD SCIENCE AND

BIOTECHNOLOGY. 19(3): 749-755.

KimTH.2010.Microbialdiversityanalysisof*Makgeolli*and*Nuruk.*Athesis.PaichaiUniversity.

Kim TY, Yoon IH. 1997. Fermentation characteristics of traditional alcoholic beverages brewed with improved-Nuruk. Journal of the east asian of dietary life. 7(3):399-404.

Klaenhammer T. R. 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. Biochimie. 70:337-349

Kwon SJ. 2010. Analysis of Microbial Diversity in Makgeolli Fermentation. A thesis. Dankook University.

Leathers, T. D. 2005. Dextran. In biotechnology and Bioploymer. pp.575-597, Vol. 1, Wiley-VCH

Lee AY, Park JY and Hahn YS. 2006. Study on the improvement of quality in Jeung-pyun prepared with lactic bacteria having high dextransucrase activity as starters. Korean J. Food Sci. Technol. vol. 38, No. 3, pp.400-407

Lee DH, Kang HY, Lee YS, Cho CH, Kim SJ, Lee SJ. 2011. Effects of yeast and Nuruk on the quality of Korean Yakju. Korean J. Microbiol. biotechnol. 39(3):274-280.

Lee DS. 2008. Analysis of nutritive elements of a local Makgeolli. A thesis. Chonnam national university

Lee HS. 2000. Quality characteristics of Takju using rice Nuruk during fermentation. A thesis. Seoul women's university

Lee JH, Tae SK. 2000. Identification and Characteristics of Lactic Acid Bacteria Isolated from Nuruk. Korean J Biotechnol Bioeng. 15(4): 350-365.

Lee JH,Yu TS. 2000. Identification and characteristics of lactic acid bacteria isolated from *Nuruk.* Korean J. Biotechnol. Bioeng. 15: 359-365.

Lee KH, Lee JH. 2011. Characterization of the bacteriocin produced by a Leuconostoc mesenteroides strain inhibiting the growth of Lactobacillus sakei. Kor. J. Microbiol. Biotechnol. 39(4):390-396

Lee SG, Han KS, Jeong SG, Oh MH, Jang A, Kim DH, Bae IH, Ham JS. 2010. A study on the sensory characteristic of yogurt and antimicrobial activity of Lactobacillus plantanum LHC52 isolated from Kimchi. Kor. J. Food sci. 30(2): 328-335.

Lee SH, Lee MJ. 1997. Viability in artificial gastric and bile juice and antimicrobial activity of some lactic acid bacteria isolated from Kimchi. Kor. J. Microbiol. Biotechnol. 25: 617-622.

Lee SJ, Kim JH, Jung YW, Park SY, Shin WC, Park CS, Hong SG, Kim GW. 2011.

Composition of organic acids and physiological functionality commercial Makgeolli. Korean J. food SCI. Technol. 43(2):206-212

Lee,SJ, Ahn BH 2010. Sensory profiling of rice wine made with Nuruk using different ingredients. Korean Journal of Food Science and Technology. 42(1):119-123.

Moon, J. W. 1998. Production technology functional products in recent dairy industry. Kor. J. Ami. Sci. 40(1): 120-133

Nettles C. G. and Barefoot S. F. 1993. Biochemical characteristics of bacteriocins of food associated lactic acid bacteria. J. Food Prot. 50:338-356

Park SH, Lim SI. 2007. Quality Characteristicsofmuffin added red yeast riceflour. Korean J. Food Sci.Technol.39:272-275.

Robyt, J.F. 1986. Dextran. In: H.F. Mark, N.M. Bikales, C.G. Overberger, and G. Menges (eds.) Encyclopedia of Polymer Science and Engineering. JOHN WIIEY & SONS, NEW YORK, NY. 4: 752- 767.

Schilinger U., Guigas C. and Holzapfel W. H. 2005. In vitro adherence and other properties of Lactobacilli used in probiotic yoghurt-like products. Int. Dairy J. 15:1289-1297

Schillinger U., Lucke F. K. 1989. Antibacterial activity of Lactobacillus sake isolated from meat. APPL. ENVIRON. MICROBIOL. 55: 1901-1906.

Selbmann L., Silvano Onofri, Massimiliano Fenice, Federico Federici and Maurizio Petruccioli. 2002. Production and structural characterization of the exopolysaccharide of the Antarctic fungus Phoma herbarum CCFEE 5080. Research in Microbiology. 153:585-592

Seo MY, Lee JK, Ahn BH, Cha SK. 2005. The changes of microflora during the fermentation of Takju and Yakju. Korean J. Food. Sci Technol. 37(1):61-66

Shon SK, Rho YH, Kim HJ, Bae SM. 1990. Takju brewing of uncooked rice starch using Rhizopus koji. Korean J App. Microbio. Biotech 18: 506-510

So MH, Lee YS, Noh WS. 1999. Changes in microorganism and main components during Takju Brewing by a modified nuruk. Korean J. Food & Nutr. 12:226-232

So MH. 1999. Characteristics of a modified nuruk made by inoculation of traditional Nuruk microorganism. KOREAN J. FOOD & NUTR. 12(3):219-225.

T. Smitinont, C. Tansakul, S. Tanasupawat, S. Keeratipibul, L. Navarini, M. Bosco and P. Cescutti. 1999. Exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria strains from

traditional thai fermented foods: isolation, identification and exopolysaccharide characterization. International Journal of Food Microbiology. 51: 105-111.
Tagg J. R. and Mcgiven A. R. 1971. Assay system for bacteriocin. Appl. Microbiol. 21: 943.
Woo SM, Shin JS, Seong JH, Yeo SH, Choi JH, Kim TY, Jeong YJ. 2010. Quality characteristics of brown rice Takju by defferent Nuruk. Korean Soc Food Sci Nurt. 39(2):301-307
Yu CH, Hong SY, Koh JS. 2002. Zymological properties of foxtail millet wine-making by isolated strains from Nuruk. J. Korean. Soc. Agric. Chem. Biotechnol. 45(3):138-144.
Yu HN. 2011. Fermentation characteristics of Yeonip(Lotus leaf) Takju. A thesis. Sejong University
Yu TS, Kim J, Kim HS, Hyun JS, Ha HP, Park MG. 1998. Bibliographical study on microorganims of traditional Korean Nuruk (Since1945). J Korean Soc. Food Sci Nutr. 27(4):789-799.
Yu TS, Kim J, Kim HS, Hyun JS, Ha HP, Park MG. 1998. Biobliographical Study on Microorganims of Traditional Korean Nuruk(Since 1945). J Korean Soc Food S챠 Nutr. 27(4): 789-799.

[별첨1] 〈 연 구 성 과 〉

대표 연구성과 요약문			
연구업적 제목	Study of exopolysaccharide producing *Leuconostoc* and *Weissella* for a yogurt starter		
연구업적 유형	국제학회 Poster 발표 (2012 International conference and exhibition on nutraceuticals and functional foods, Poster Number; P176)		
장소 및 일시	Kona, HI, USA; 2012년 12월 1일~6일		
연구책임자 또는 공동연구원 성명	민경아, 정장호	참여자수	2

The purpose of this study was to produce a yogurt with a lactic acid bacterium that has probiotic properties and ability to produce exopolysaccharide giving a yogurt texture. Exopolysaccharide (EPS) producing *Leuconostoc* and *Weissella* in this study were isolated from *Kimchi* and *Nuruk* (Korean koji for rice wine). The isolated were tested for acid and bile tolerance, and antimicrobial activity for probiotic properties. *Leuconostoc mesenteroides* K. 3-2 and *Weissella cibaria* K. 9 showed a higher acid tolerance in an artificial gastric juice as well as a higher bile resistance. On the paper disc method, it was evident that two isolates showed antibacterial effect against *E. coli* and *S. typhimurium*. Fermented milk prepared with two strains had similar viscosities and syneresis when compared to those of the yogurt added with pectin. The exopolysaccharide yield was highest in the yogurt inoculated K. 9. These results were similar viscosities and syneresis. Application of K. 3-2 and K. 9, synbiotic fermented foods manufactured at the same time having the probiotic and prebiotic characteristics to be more likely to be considered.

주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 한식세계화 사업의 연구보고서입니다.

2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 한식세계화 사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.

3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.