

발간등록번호

11-1543000-002349-01

전통누룩 유래 자생 미생물 자원의 유용성 연구 최종보고서

2018. 8. 23.

주관연구기관 / 한국식품연구원
협동연구기관 / (주) 국 순 당

포스트게놈다부처유전체사업 R&D Report

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “전통누룩 유래 자생미생물 자원의 유용성 연구” (개발기간 : 2014. 8. 23 ~ 2018. 8. 22)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2018. 8. 23

주관연구기관명 : 한국식품연구원 (대표자) 박 동 준
협동연구기관명 : (주)국순당 (대표자) 배 중 호



주관연구책임자 : 한국식품연구원 김재호
협동연구책임자 : (주)국순당 신우창

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

보고서 요약서

과제고유번호	914003-4	해 당 단 계 연 구 기 간	2017.8.23.- 2018.8.22	단 계 구 분	4/4
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	포스트게놈 다부처 유전체사업			
연구과제명	대 과 제 명	해당 없음			
	세부 과제명	전통누룩 유래 자생미생물 자원의 유용성 연구			
연구책임자	김 재 호	해당단계 참여연구원 수	총: 18명 내부: 10명 외부: 8명	해당단계 연구개발비	정부: 270,000천원 민간: 90,000천원 계: 1,560천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 18명 내부: 10명 외부: 8명	총 연구개발 비	정부: 1,040,000천원 민간: 520,000천원 계: 1,560,000천원
연구기관명 및 소속부서명	한국식품연구원			참여기업명: (주)국순당	
국제공동연구	상대국명: 없음			상대국 연구기관명: 없음	
위탁연구	연구기관명: 없음			연구책임자: 없음	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	일반
-------------------------	----

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호		계 10-186 0409호							#CP0 25097 -CP0 25112 #CP0 23995 -CP0 24010		

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입기관	연구시설· 장비명	규격 (모델명)	수량	구입연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	NTIS 등록번호

보고서 면수

〈요약문〉

연구의 목적 및 내용	전통누룩 유래 자생미생물 및 자원을 확보하고 유용미생물의 유전체 분석을 통해 고품질 및 기능성 증진 전통주를 개발, 제조공정을 표준화 함				
연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> ○ 전통누룩의 재현 및 특성 분석 <ul style="list-style-type: none"> - 음식과 관련된 고문헌 17점에 기록된 46종의 전통누룩을 재현하고 12종의 자가제조 및 상업용 누룩을 수집하여 시료로 활용함 - 재현 및 수집된 누룩의 효소학적, 미생물학적 특성 분석 ○ 전통누룩의 미생물 자원 및 유전자원 분석 <ul style="list-style-type: none"> - 전통누룩에서 분리한 미생물의 양조학적 특성 분석 - 유용미생물 자원의 유전체 및 기능분석을 통해 산업적 활용 가능성 연구 - 우수누룩의 metagenome 분석 및 유용균주 확보 ○ 전통누룩의 양조특성 구명 및 상관성 분석 <ul style="list-style-type: none"> - 58종 재현 및 수집누룩의 양조적성 구명 및 원재료, 부재료, 관능특성 간의 상관관계 분석 - 우수누룩 선발 및 ○ 우수누룩과 이를 사용하여 담금한 술덧의 발효특성 분석 <ul style="list-style-type: none"> - 누룩 및 술덧의 발효기간별 metagenome 및 ¹H NMR, MS 기반 대사체 프로파일링 분석 - 우수누룩의 품질요인 규명 ○ 전통누룩 및 전통주의 안전성 확보를 위한 아플라톡신 및 metagenome 분석 <ul style="list-style-type: none"> - 누룩 60종의 총 아플라톡신 함량 분석 및 아플라톡신 고생성 누룩의 전통주 전이 여부 규명 ○ 선행연구를 통해 확보한 우수균주의 산업화 및 신규 유용균주의 발굴 <ul style="list-style-type: none"> - 기 개발된 균주의 유전체 분석 및 유용 유전자 발굴 ○ 유용 유전자원 확보 및 우수균주의 종균화 <ul style="list-style-type: none"> - 선발 유용균주 양조특성 및 기능 분석 - 유용균주 표준화 및 적용 전통주 개발, 제조 방법 확립 ○ 양조 미생물 자원의 사업화 <ul style="list-style-type: none"> - 기능성 증진을 위한 전통주의 제조방식 확립 - 전통누룩의 양조특성 구명 및 상관성 분석 - 생산공정 확립 및 시제품 생산 선발된 효모와 곰팡이가 적용된 전통주의 대량생산 조건을 확립하고 시제품 생산 				
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 자생 미생물자원 개발로 생물산업의 주 발효제로 사용되는 수입 종균의 대체 자원 발굴이 가능 ○ 국내 전통주의 과학화를 통한 일반 소비자 시장 확대 및 전통주산업의 발전에 따른 농가, 제조업, 유통업 등의 관련 산업에 파급 효과가 기대 ○ 전통누룩 및 전통주의 미생물 지도를 완성하여 미생물 관련 안전성을 입증함으로써 전통주 수출 증대 효과 				
국문핵심어 (5개 이내)	누룩	효모	곰팡이	양조미생물	유전자원
영문핵심어 (5개 이내)	Nuruk	yeast	fungi	brewing microbes	gene resources

〈 목 차 〉

요약문	5
1. 연구개발과제의 개요	11
1-1. 연구개발 목적	11
1-2. 연구개발의 필요성	11
1-3. 연구개발 범위	14
2. 연구수행 내용 및 결과	15
1장. 연구수행 방법	15
1절. 전통누룩의 재현 및 수집	15
가. 전통누룩 재현	15
나. 시판 누룩 수집	25
다. 자가 제조 누룩 수집	25
2절 전통누룩 특성 분석	26
3절 전통누룩 유래 미생물 자원 분리 및 동정	27
4절 전통주 제조 및 특성 분석	28
5절 전통누룩 안전성 평가	32
6절 전략미생물 유전체 분석	35
2장. 연구수행 결과	37
1절. 전통누룩의 복원 및 특성분석	37
1. 전통누룩의 복원	37
가. 전통누룩의 외관	38
2. 전통누룩의 효소학적 특성 분석	43
가. 당화력 및 효소활성	43
3. 양조 특성 분석	45
가. 1차 선별 누룩 전통주들의 세부 관능 분석	50
2절. 전통 누룩의 유래 미생물 자원 확보	54
1. 전통 누룩의 미생물 자원 확보 및 특성 분석	54
가. 전통누룩 유래 효모 분리 동정 및 알코올 발효력 측정	54
나. 전통누룩 유래 곰팡이 분리 동정 및 전분분해 활성 측정	64
다. 전통누룩 유래 유산균 분리 동정	74

3절. 우수 전통누룩의 양조특성	77
1. 우수 누룩 및 술덧의 발효기간별 미생물 군집 분석	77
2. 우수 누룩 및 술덧의 발효기간별 대사체 분석	83
가. 1H NMR 기반 대사체 프로파일링 분석	83
나. GC/MS 기반 향기성분 프로파일링 분석	89
다. 유기산 분석	92
4절. 우수 전통누룩의 산업화	95
1. 우수 누룩의 선정 및 주류품질 요인 분석	95
가. 우수누룩 선별연구	95
2. 주류관능품질 비교 분석	102
3. 시제품 개발 및 상품성 검증	103
가. 주류 제조공정 표준화	103
나. 상품성 검증	111
5절. 전통누룩 유래 유용미생물의 유전체 분석	113
1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 98-5 및 KSD-YC의 유전체 분석	113
가. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 98-5의 균주 특성	113
나. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 균주의 ploidy 분석	114
다. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 98-5의 유전체 분석	115
라. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> KSD-YC 균주의 유전체 분석	118
마. 탁주 효모 균주 표준유전체 분석을 위한 생리적 특징 분석	118
바. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 98-5와 KSD-Yc의 RNA-Seq 분석	119
2. 글루타치온 고생산 균주의 전장유전체 분석	120
가. DNA 추출 및 라이브러리 합성	120
나. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Rey36-3의 전장 유전체 분석	120
다. <i>Saccharomyces</i> 유전체 구조 비교 분석	121
라. <i>S. cerevisiae</i> Rey36-3의 전장 유전체 유전체 해독	123
마. 글루타치온 생산과 관련된 유전자 분석	123
6절. 누룩 및 전통주의 안전성 평가	127
1. 누룩의 총 아플라톡신 함량	129
2. 누룩기반 전통주의 이화학적 특성	130
3. 누룩과 전통주의 미생물 군집	132
가. 미생물 군집의 다양성	132
나. 미생물 군집의 구조	133
다. 누룩 미생물 분리 및 동정 결과	135
4. 아플라톡신 B1, B2, G1, G2의 함량	137

가. 누룩과 전통주의 아플라톡신 함량	137
나. 누룩 유래 곰팡이의 아플라톡신 생성 여부 분석	138
7절 전통누룩 유래 유용 미생물의 개발 및 활용	141
1. 베타글루칸 고생성 효모의 개발 및 활용	141
가. 전통누룩 유래 베타글루칸 고생성 효모 탐색	141
나. 베타글루칸 고생성 효모 선발	142
다. 베타글루칸 고생성 효모를 활용한 고기능성 탁주 제조	143
2. GABA 고생성 효모의 개발 및 활용	146
3. 글루타치온 고생성 효모의 탐색 및 활용	147
가. 글루타치온 고생산 균주 선별	147
나. 회분식 배양에서의 글루타치온 생성능 분석	148
다. Intracellular 및 extracellular 내의 글루타치온 생산량 비교	149
라. 탄소원에 따른 글루타치온 생성능 비교	149
4. 고품질 황국 제조균주 개발 및 활용	150
가. 황국균 선발	150
나. 선발 효모를 활용한 전통주의 양조적성	155
다. 황국균주 <i>Aspergillus oryzae</i> N152-1 균주를 활용한 시제품 생산	169
5. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 98-5의 균주를 활용한 제품화	169
8절. 우수 종균을 활용한 주류 개발	170
1. 선별균주들의 Lab scale 양조 적성 1차 선별	170
가. 우수 양조 적성 효모 선별	170
나. 우수 양조 적성 곰팡이 선별	181
2. 1차 선별균주들의 Pilot scale 양조 적성 연구	184
가. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> KSD-BH의 최적 발효조건 도출 Pilot 시험	184
나. <i>Rhizopus microsporus</i> F19-R1를 이용한 Pilot-scale 양조적성 시험	188
3. 기존 누룩 및 균주 대비 차별성 및 우월성 검증	190
가. 시판 양조효모 대비 선별된 분리효모의 차별성 및 우월성 검증	190
나. 곰팡이를 이용한 제조 배양곡의 차별성 및 우월성 검증	191
4. 우수 유용 균주 선발	193
5. 우수 양조 적성 균주 적용 제품 개발	194
가. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> KSD-YC 효모 적용 신제품 개발 및 출시	194
6. 제형화 종균 효모를 이용한 신제품 개발	195
가. 종균 효모 KSD-YC 및 KSD-BH의 양조 특성 규명	195
나. 목적 주질을 위한 최적 레시피 도출 및 최적 발효조건 확립	198
다. Pilot scale 에서의 시제품 생산 및 제조 공정 확립	199

라. 소비자 관능 평가 및 조사	200
마. 제품 안정성 및 유통기한 평가	201
바. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> KSD-YC 효모 이용 신제품 출시	202
7. 전통누룩 유래 유산균을 활용한 탁주 신제품 개발	203
가. <i>Lactobacillus plantarum</i> KSD-KL4 유산균 고농도 배양 및 평가	203
나. Pilot scale에서의 시제품 생산과 제조 공정 확립	203
다. 소비자 관능 평가 및 조사	203
라. 제품 안정성 및 유통기한 평가	204
마. <i>Lactobacillus plantarum</i> KSD-KL4 이용 신제품 개발 및 출시	205
 참고문헌	 206

1. 연구개발과제의 개요

1-1. 연구개발 목적

○ 최종목표

- 전통누룩의 미생물 자원 및 유전자원 분석
- 양조 미생물(효모, 곰팡이)의 유전체 및 기능 분석
- 유용 유전자원 확보 및 발효균의 표준화
- 양조 미생물 자원의 사업화
- 전통주의 기능성 향상, 표준화를 통한 국제 경쟁력 강화 및 세계화

○ 주요내용

- 첨단 생명공학기법을 이용한 전통누룩 내 미생물체의 유전체 정보 대량 분석을 통한 유용 미생물 균집 분석
- 염기서열 분석을 통해 양조 미생물에 존재하는 고기능 유용 유전자 발굴
- 발효·숙성 각 과정 및 각기 다른 발효 조건 하의 미생물 균집, 유용유전자 발현에 대한 분석
- 기능성 증진을 위한 전통주의 제조방법 확립
- 미생물자원 및 유전정보의 국내외 공인 자원화

1-2. 연구개발의 필요성

○ 전통누룩의 단절과 주류산업 침체

- 현재 우리나라 누룩 생산업체는 4 곳에 불과하며, 이마저도 품질유지에 어려움이 있어 고품질 전통주 제조에 장애물이 되고 있음
- 전통누룩은 제조공정이 복잡하고 다양한 미생물 균총을 포함하고 있어, 규격화된 제품 생산과 품질표준화가 매우 시급한 실정임
- 전통주 산업화를 위해 우리술에 적합한 양조미생물 및 누룩 제조기술의 연구가 필요함

○ 우수한 양조 미생물 자원의 확보 및 연구 필요

- 우리나라는 전통발효 기술을 통한 다양한 발효식품을 보유하고 있는 나라임에도 불구하고 전통식품 관련 발효미생물의 정보를 분석하고 이를 기반한 종균 개발 및 유용 자원 활용 기술 개발 연구는 외국에 비해 상대적으로 미진함
- 국내 양조미생물 및 주류 발효공정 연구는 주로 일본식 입국(koji) 방식과 전통누룩에서 분리한 사상균에 대한 연구가 대부분이며 각 특성에 맞는 전통주에 적합한 효모 개발이나 종균화 연구는 매우 미흡한 실정임
- 따라서 전통주의 세계화, 표준화 및 과학화를 이루기 위해서는 우선적으로 우수 발효

균주 탐색, 균주 개량화 등 스타터에 관한 연구가 선행되어야만 하며, 우수 종균의 선별 및 처리, 최적 발효조건 확립 등의 연구와 함께 관능특성, 기능성 연구까지 종합적으로 이루어져야 함

- 현재 전통주 산업에서 사용되는 발효제는 일본식 입국 형태로 단일균주인 *A. awamori* 또는 *kawahcii* 등의 단일균주가 사용되고 있음. 따라서 2010년 국정감사에서 주질의 획일화를 초래할 수 있다는 지적이 있었으며
- 이에 다양한 유용 미생물 균주를 주류 발효에 활용할 수 있도록 우수 양조미생물의 확보 및 개발이 요구됨
- 이를 위하여 원료, 지역, 제조방법이 서로 다른 많은 전통누룩을 제조하여 우수한 미생물 자원을 다수 확보하는 것이 매우 중요함
- 우수한 전통누룩을 제조하고 이를 기반으로 분리하여 양조 미생물을 활용한 발효주를 대상으로 대사체 분석을 수행하여 우수한 발효능과 기능성을 가진 종균개발에 필요한 유용 자원을 확보하고, 전통주의 표준화 및 고품질화 공정에 활용할 수 있는 기반 기술을 개발하는 것이 바이오산업에서의 국제 경쟁력 제고에 크게 기여할 것임
- 최근 해외 사례에 의하면 주정에 사용되는 특정 미생물 균주의 또 다른 효능 (미백, 탈모 등)이 알려지면서 이와 같은 연구결과를 활용하여 주정 미생물 유래 물질을 활용한 고부가가치 산업의 활성화가 이루어지고 있음.
- 현재 대부분의 누룩은 전통주 제조에만 활용되고 있으나, 본 연구는 전통누룩 유래 미생물과 유용물질의 생리기능성을 부각시켜 고기능성누룩, 유용누룩 미생물로서의 활용을 제고할 것임

○ 전통누룩의 품질고급화 기술 필요

- 전통적으로 누룩은 전통 종균(스타터)을 첨가하지 않고 주원료에 부재료를 첨가, 혼합하여 원료나 공기 중에서 유입된 환경 미생물에 의한 자연발효 과정을 이용하고 있음. 따라서 원료, 계절, 제조방법 등에 따라 발효에 관여하는 미생물이 다르고 이에 따라 발효과정이 다르게 나타나고 누룩의 미생물 군집 및 품질이 일정한 수준을 유지하기가 매우 어려움
- 이는 누룩의 산업화, 표준화, 더 나아가 고기능성 전통주 제조에 걸림돌로 작용함

○ 주류미생물 분야에서의 유전체 연구 필요성

- 최근 발달한 NGS 기술을 통한 미생물 유전체 연구는 생물산업분야와 우수 농림수산물 생산 등 그 활용범위가 확대되고 있음
- 현재 실험실 내에서 배양을 할 수 있는 미생물은 전체 미생물의 1% 내외로 알려져 있으며, 이러한 한계가 큰 어려움으로 작용하고 있음. 따라서 미생물의 16S ribosomal RNA의 염기서열 분석 데이터를 기반으로 한 분자생물학적 분석 방법의 도입으로 유용 미생물의 염기서열에 기반한 데이터 확보에 따라 1,000여종 이상의 미생물 군집의 구조와 기능에 대한 세부연구 및 동정이 가능해졌고 이렇게 축적된 미생물 유전체 데이터는 메타 유전체학적 분석과 더불어 다양한 분야로 적용되고 있음
- 최근 유전체 정보분석에 소요되는 시간과 비용이 감소하고 여기에 생명과학적 연구 접근법이 활용되면서 산업화 단계로의 전환기간이 짧아져 관련 시장의 선점이 매우

우선시 됨

- 기존 단일 미생물 중심의 접근에서 최근에는 집단/복합적 군집에 대한 종합적이고 통합적인 유전체 분석 연구를 시도하는 방향으로 연구 패러다임이 변화하고 있음
- 현재까지 우리나라의 미생물 유전체 연구는 기초학문 분야에서 다양한 환경으로부터 분리한 미생물 종의 분리, 동정 및 유전체 서열 결정에 대한 연구가 주를 이루고 있으나, 주류산업에 활용도가 높은 진균류, 세균류에 대한 유전체 염기서열 생성, 참조 유전체 구축, 메타유전체 연구 등은 크게 미흡한 실정이며 이 분야에 보다 집중적인 연구가 요구됨
- 유전체 연구를 통해 생산된 유전체 정보, 기능유전체, 마커 등은 유용미생물의 발굴 및 고품질 주류개발 연구에 핵심 기술로 작용함
- 산업적으로 활용가치가 높은 미생물 자원의 표준유전체정보는 비교유전체 분석 및 기능연구를 통해 우수형질을 결정하는 유전자원의 정보와 동시에 미생물 자원의 소유권을 확보하는데 매우 중요함
- 이러한 미생물 유전체 기반 분석으로 유용 미생물의 판별과 동정, 분석 등과 같은 확장된 분야로의 응용 가능성이 제시되고 있는 가운데, 유용 미생물의 유전체를 연구하고자 하는 움직임이 제시되고 있음. 특히 전 세계적으로 유용 미생물 관련 연구가 가장 많이 이루어지고 있는 발효 미생물의 유전체 분석을 통하여 좀 더 포괄적이고 실용적인 미생물학 연구로의 도약이 요구됨

○ 전통누룩 및 누룩 유래 미생물의 안전성 확보

- 전통누룩의 원료는 곡류등의 자연발효에 의해 다양한 미생물 생육하고 있으며, 그 중 아플라톡신을 생성하는 *Aspergillus flavus* 등의 유해 미생물에 노출될 수 있음
- 국내 누룩곰팡이의 곰팡이독소 생산능은 0~1.11 ppb 미만으로 보고되어 있으며 대부분의 누룩곰팡이는 아플라톡신 생합성 유전자의 발현부위에서 부분적 결실이 발견되어 아플라톡신 생산능이 없는 균주로 보고 됨. 또한 국외의 쌀 원료 또는 주류는 아플라톡신, 오크라톡신 A, 푸모니신 등의 물질에서 안전성이 입증되었음
- 그러나 최근 기후 변화로 인해 온대 기후에 속한 유럽 일부 국가 및 미국 등에서 곰팡이독소의 발생이 증가될 것이라는 예측이 나오고 있음.
- 즉, 현재온대지역의 기후는 아플라톡신 생산의 최적 기온과 유사한 아열대 기후로 바뀌어 아플라톡신에 민감한 것으로 알려진 농작물들 (옥수수, 땅콩 등)의 오염 가능성이 증가할 수 있다고 예측되고 있음
- *A. flavus*의 아플라톡신 생산량은 유전자형 (genotype), 기질, 지리적 위치, 기후변화, 작물재배 방법에 영향 받음. 이에 유럽은 2003~2004년 기온상승에 의한 심각한 작물 곰팡이오염 사건 이후에 곰팡이독소 안전기준 강화한 바 있음
- 따라서 현재는 아플라톡신이 전통누룩 및 주류에 특별한 문제를 일으키지 않는 상황 이더라도 앞으로 이들 독소가 곡류를 주 원료로 사용하는 전통누룩의 안전성에 위해 요소로 작용할 수 있음
- 이에 본 연구에서는 누룩의 비의도적 유해물질인 곰팡이독소 분석을 통해 전통 누룩의 아플라톡신 함량을 분석하고 전통누룩에서 분리된 미생물의 아플라톡신 생산여부 및 특성 확인을 통해 전통누룩 및 주류의 안전성을 확보하고자 함

1-3. 연구개발 범위

- 전통누룩의 재현 및 특성 분석
 - 음식과 관련된 고문헌 17점에 기록된 46종의 전통누룩을 재현하고 12종의 자가제조 및 상업용 누룩을 수집하여 시료로 활용함
 - 재현 및 수집된 누룩의 효소학적, 미생물학적 특성 분석
- 전통누룩의 미생물 자원 및 유전자원 분석
 - 전통누룩에서 분리한 미생물의 양조학적 특성 분석
 - 유용미생물 자원의 유전체 및 기능분석을 통해 산업적 활용 가능성 연구
 - 우수누룩의 metagenome 분석 및 유용균주 확보
- 전통누룩의 양조특성 구명 및 상관성 분석
 - 58종 재현 및 수집누룩의 양조적성 구명 및 원재료, 부재료, 관능특성 간의 상관관계 분석
 - 우수누룩 선발 및
- 우수누룩과 이를 사용하여 담금한 술덧의 발효특성 분석
 - 누룩 및 술덧의 발효기간별 metagenome 및 ^1H NMR, MS 기반 대사체 프로파일링 분석
 - 우수누룩의 품질요인 규명
- 전통누룩 및 전통주의 안전성 확보를 위한 아플라톡신 및 metagenome 분석
 - 누룩 61종의 총 아플라톡신 함량 분석 및 아플라톡신 고생성 누룩의 전통주 전이 여부 규명
- 선행연구를 통해 확보한 우수균주의 산업화 및 신규 유용균주의 발굴
 - 기 개발된 균주의 유전체 분석 및 유용 유전자 발굴
- 유용 유전자원 확보 및 우수균주의 종균화
 - 선발 유용균주 양조특성 및 기능 분석
 - 유용균주 표준화 및 적용 전통주 개발, 제조 방법 확립
- 양조 미생물 자원의 사업화
 - 기능성 증진을 위한 전통주의 제조방식 확립
 - 전통누룩의 양조특성 구명 및 상관성 분석
 - 생산공정 확립 및 시제품 생산
 - 선발된 효모와 곰팡이가 적용된 전통주의 대량생산 조건을 확립하고 시제품 생산

2. 연구수행 내용 및 결과

1장 연구수행 방법

1절 전통누룩의 재현 및 수집

가. 전통누룩 재현

음식과 관련된 고문헌에 기록된 누룩 제조방법을 조사하여 46종의 전통누룩 재현 완료하였다. 본 연구에서 제조된 전통누룩은 총 46종으로 관련된 고문헌(규곤시의방, 증보산림경제, 임원십육지, 제민요술, 본초강목, 규합총서, 동의보감 등)에 기록된 46종의 전통누룩의 제조방법을 조사하여 현대 도량형으로 수정하여 사용하였다. 제조된 전통누룩은 각 원재료별 보리 6종, 통밀 12종, 밀가루 11종, 찹쌀 10종, 멥쌀 3종, 밀기울 3종, 메밀가루 1종이었으며, 주요 전통누룩의 재현과정은 그림 1-1-1과 1-1-2, 조사된 전통누룩의 제조방법은 표 1-1-1과 같다.



이화곡 성형



곡(연잎과함께 성형)



녹미주곡



오메기곡



이화주곡



성형한 누룩

그림 1-1-1. 주요 전통누룩의 재현 과정



누룩방 발효모습



누룩방 발효모습



누룩방 발효모습



추모곡



이화주곡



오메기곡

그림 1-1-2. 누룩방 발효모습 및 발효 완료된 전통누룩

표 1-1-1. 전통누룩 제조방법

No	누룩명	출처	재료 및 분량		제조방법
1	주곡방문 (酒麴方文)	규곤시의방	밀기울 5되 물 1되 벚짚	밀기울 9.02L 물 1.8L 벚짚	1. 밀기울 5되를 물 1되와 섞어 골고루 버무린다. 2. 누룩틀 안에 면 보자기를 물에 적서 짠 후 깔아 둔다. 3. 밀반죽한 것을 누룩틀 안에 채운 후 보자기로 싼다. 4. 단단히 성형한 후 뺀다. 5. 성형한 누룩을 벚짚에 켜켜이 묻어 20일가량 띄운다.
2	추모곡 (秋麴)	증보산림경제	가을통보리 1섬 물 2말	가을통보리 138kg 물 36.08L	1. 통보리를 깨끗이 씻어 말린 뒤 거칠게 분쇄한다. 2. 체를 이용하여 거친가루만 취한다. 3. 물을 뿌려가면서 반죽한다. 4. 누룩틀에 면 보자기를 깔고 반죽을 단단히 다져 넣는다. 5. 단단히 성형후 뺀다. 6. 벚짚과 애누룩을 층층히 쌓은후 다시 벚짚으로 덮어 20일가량 띄운다.
3	오메기곡 (오메기麴)	제주지방	통보리(두줄보리) 1말 밀가루 약간 물 2되	통보리(두줄보리) 18.04L 밀가루 약간 물 3.6L	1. 통보리는 한번 갈아서 씻은 후 다시 새물에 10시간정도 담가둔다. 2. 물러진 느낌이 들면 물기를 빼고 밀가루를 섞어 오랫동안 치댄다. 3. 한주먹 크기로 떼어 면보자기로 싸고 등글납작하게 단단히 밟는다. 4. 항아리 안에 벚짚을 잘게 썰어 깔고 그 위에 애누룩을 놓는다. 이때 누룩사이에 벚짚을 끼운다. 5. 맨위에 벚짚과 종이를 씌워 띄운다. 6. 3-4일간건조로 벚짚을 갈아주고 뒤집어 준다.
4	죽곡 (粥麴)	경주 교동법주곡	통밀가루 1말 쌀가루 5홉 물 1되5홉	통밀가루 18.04L 쌀가루 0.9L 물 2.71L	1. 통밀을 분쇄한 다음 어레미로 쳐서 밀기울을 일부제거, 1말을 준비한다. 2. 물 1되5홉에 5홉의 쌀가루를 풀어넣고 죽을 끓여 식힌다. 3. 밀가루에 쌀죽을 뿌려가면서 고루 버무린다. 4. 오래 치대서 반죽한 후 누룩틀에 면보자기를 깔고 반죽을 채우고 단단히 성형한다. 5. 자주 뒤집어주어 고루 띄운다.
5	죽곡 (粥麴)	남원 신선주곡	통밀가루 2말 찹쌀가루5홉 물3되5홉	통밀가루 36.08L 찹쌀가루0.9L 물6.31L	1. 통밀을 분쇄한 후 밀기울을 일부 제거한다. 2. 물 3되5홉에 5홉의 찹쌀가루를 풀어 넣고 죽을 끓여 식힌다. 3. 통밀가루에 찹쌀죽을 뿌려가면서 고루 버무린다. 4. 오래 치대서 반죽한 후 누룩틀에 면보자기를 깔고 반죽을 채우고 단단히 성형한다. 5. 자주 뒤집어주어 고루 띄운다.
6	공병곡 (孔餅麴)	신곡 울릉도 옛탁주곡	통밀 1말 물 2되	통밀 18.04L 물 3.6L	1. 통밀을 깨끗이 씻어別に 바짝 말린 뒤 거칠게 분쇄한다. 2. 고운체를 이용하여 하얀 밀가루를 제거한다. 3. 통밀가루에 분량의 물을 빨려가면서 오랜반죽을 한다. 4. 준비한 누룩틀안에 면보자기를 깔고 단단히 성형한다. 5. 보자기를 오므려서 매듭이 가운데로 오게한 후 단단히 성형한다. 6. 틀에서 빼낸 애누룩은 가운데 구멍을 뚫어서 갈무리 한다.

표 1-1-1. 전통누룩 제조방법 (계속)

No	누룩명	출처	재료 및 분량		제조방법
7	곡 (麴)	임원십육지	통밀 10근 피마지잎 적당량 물 1근	통밀 6kg 피마지잎 적당량 물 600g	<ol style="list-style-type: none"> 1. 통밀을 빻아서 가루로 만든다. 2. 체에 내려 밀기울만 취한다. 3. 밀기울에 물을 뿌려가면서 고루 섞고 힘껏 치대서 반죽한다. 4. 누룩틀에 면보자기를 깔고 피마지잎을 놓은 뒤 누룩 반죽을 다져 넣고 그 위를 다시 피마지 잎으로 덮는다. 5. 누룩을 단단히 성형한 후 빼내 벗짚이나 빈가마니를 이용하여 띄운다.
8	면곡 (麵麴)	조선무쌍신 식요리제법	통밀 1말 닥나무잎 2말 물 2되	통밀 18.04L 닥나무잎 36.08L 물 3.61L	<ol style="list-style-type: none"> 1. 통밀을 깨끗이 씻어 물기를 뺀 후 말려 거칠게 빻는다. 2. 밀뜨물을 얻는다. - 멧돌에 간 밀가루 5홵 정도를 물에 풀어 넣고 비벼서 뜨물 같은 물을 얻는다.- 3. 통밀가루에 밀뜨물을 적당량 넣고 반죽한다. 4. 누룩틀에 밀가루 반죽을 채워넣고 단단히 성형한다. 5. 성형한 애누룩을 닥나무잎으로 싼 후 벗짚으로 묶는다. 6. 바람이 잘 통하는 곳에서 70일간 띄운다.
9	신곡 (神麴)	제민요술	통보리 3섬 물 6말	통보리 414kg 물 108.23L	<ol style="list-style-type: none"> 1. 보리 3섬을 물에 깨끗이 씻어 바짝 말린다. 2. 통보리 1섬을 시루에 찌서 벌에 내다 말려 차게 식힌다. 3. 다른 1섬은 술에 볶는다. 4. 나머지 1섬은 날것으로 하여 각각 갈아 가루로 만든다. 5. 각각의 재료를 합하여 물 6말을 섞어 반죽한다. 6. 반죽을 누룩틀에 넣고 성형한다. 7. 가운데 구멍을 뚫은 후 21일간 발효시킨다.
10	진주춘주곡 (秦州春酒麴)	제민요술	소맥(통밀) 1말 물 2되	소맥(통밀) 18.04L 물 3.61L	<ol style="list-style-type: none"> 1. 소맥 1말을 씻어 말린 후 타지않게 볶는다. 2. 볶은 통밀을 가루로 빻는다. 3. 통밀가루에 물을 넣고 반죽한다. 4. 누룩틀에 보자기를 깔고 성형한다. 5. 실내에서 15-21일간 발효시킨 후 햇볕에서 바짝말린 뒤 서늘한 곳에 보관한다.
11	여곡 (女麴)	임원십육지	참쌀 3말 제비쭉 물	참쌀 54.12L 제비쭉 물	<ol style="list-style-type: none"> 1. 참쌀 3말을 씻어 찐다. 2. 참쌀 고두밥을 고루 펼쳐 차게 식힌다. 3. 고두밥을 한덩어리씩 떼어 면보자기에 싸서 성형하여 밀누룩을 만든다. 4. 제비쭉으로 밀누룩의 위아래를 싼다. 5. 벗짚으로 묶어 매달아 21일간 발효시킨다. 6. 발효 후 햇볕 닿는곳에서 건조시킨다.
12	설향곡 (雪香麴)	임원십육지	밀가루 5근 참쌀가루 5근 분곡 6근 물 2근 말린쭉	밀가루 3kg 참쌀가루 3kg 분곡 3.6kg 물 1.2kg 말린쭉	<ol style="list-style-type: none"> 1. 밀가루로 만든 분곡을 체로쳐서 6근을 준비한다. 2. 참쌀을 씻어 하루 불렀다가 분쇄한후 체에 내려 거친가루를 제거하여 5근을 준비한다. 3. 분곡가루, 참쌀가루, 밀가루를 합하여 가루 1되당 물 1홵의 비율로 섞어 반죽한다. 4. 가루를 체에 내려 다시 반죽한 뒤 누룩틀에 담고 성형한다. 5. 누룩을 틀에서 빼내어 말린쭉에 어서 띄운다.
13	연화곡 (蓮花麴)	역주방문	참쌀 3말 물 5-6되 도꼬마리잎	참쌀 54.12L 물 9.02-10.82L 도꼬마리잎	<ol style="list-style-type: none"> 1. 참쌀 3말을 깨끗이 씻어 고두밥을 만든다. 2. 쪼방석을 펴고 그 위에 도꼬마리잎을 펴 놓는다. 3. 고두밥을 떡처럼 뭉쳐서 납작하게 만든 뒤 펼쳐놓은 도꼬마리잎 위에 놓는다. 4. 고두밥 위에 다시 도꼬마리잎을 덮어 7-14일간 띄운다. 5. 발효가 끝난 누룩은 건조시켜 곰팡이를 털어내고 법제하여 사용한다.

표 1-1-1. 전통누룩 제조방법 (계속)

No	누룩명	출처	재료 및 분량		제조방법
14	백곡 (白麴)	본초강목	밀가루 5근 참쌀가루 1말 우물물 닥나무잎 새끼줄	밀가루 3kg 참쌀가루 18.04L 우물물 닥나무잎 새끼줄	<ol style="list-style-type: none"> 1. 밀가루와 참쌀가루를 잘 섞는다. 2. 혼합한 가루에 우물물을 뿌려 잘 섞는다. 3. 곡물가루를 체에 내려 가루와 물이 고루 섞이게 한다. 4. 누룩틀에 면보자기를 깔고 반죽을 채워 단단히 성형한다. 5. 애누룩을 닥나무잎으로 산다. 6. 벗짚이나 새끼로 묶어 매달아 50일동안 띄운다. 7. 분쇄하여 사용한다.
15	백곡 (白麴)	임원십육지	밀가루 1상 참쌀가루 1말 물	밀가루 1상 참쌀가루 18.04L 물	<ol style="list-style-type: none"> 1. 밀가루와 참쌀가루를 잘 섞는다. 2. 혼합한 가루에 우물물을 뿌려 잘 섞는다. 3. 곡물가루를 체에 내려 가루와 물이 고루 섞이게 한다. 4. 누룩틀에 면보자기를 깔고 반죽을 채워 단단히 성형한다. 5. 벗짚이나 새끼로 묶어 매달아 50일동안 띄운다. 6. 분쇄하여 사용한다.
16	여곡 (女麴)	본초강목	통밀가루 3말 물 제비숙 벗짚	통밀가루 54.12L 물 제비숙 벗짚	<ol style="list-style-type: none"> 1. 밀 3말을 갈아 가루를 만든다. 2. 가루밀을 폭 익게 찌고, 밀떡을 차게 식힌다. 3. 밀떡을 반죽하여 밀누룩을 만든다. 4. 밀누룩을 제비숙으로 위아래를 싸서 벗짚으로 묶어 매달아 21일간 띄운다. 5. 사용하기 2-3일 전 햇볕에 내놓아 바짝 말린후 쓴다.
17	분곡 (粉麴)	삼해주곡	흰밀가루 1말 물 1되	흰밀가루 18.04L 물 1.80L	<ol style="list-style-type: none"> 1. 통밀을 3-4회 분쇄한 후 체에쳐서 고운 밀가루만 취한다. 2. 물을 뿌려가며 잘 반죽한다. 3. 누룩틀에 면 보자기를 깔고 반죽을 채운다. 4. 성형한다.
18	병곡 (餅麴)	해남 좁쌀소주곡	흰밀가루 1말 물 1되5홉	흰밀가루 18.04L 물 2.7L	<ol style="list-style-type: none"> 1. 통밀을 3-4회 분쇄한 후 체에쳐서 고운 밀가루만 취한다. 2. 물을 뿌려가며 잘 반죽한다. 3. 반죽을 손으로 뭉쳐서 둥근형태로 애누룩을 만든다. 4. 애누룩에 벗짚을 덮어 뜨거운 햇볕아래에서 띄운다 (일반 제법으로도 가능)
19	이화주곡 (梨花酒麴)	수운잡방	멥쌀 1말	멥쌀 18.04L	<ol style="list-style-type: none"> 1. 멥쌀을 씻어 불렀다가 곱게 가루를 낸다. 2. 멥쌀가루에 물을 약간 뿌려주고 체에 내린다. 3. 쌀가루를 오리알 크기로 만들되 단단히 뭉친다. 4. 공석을 깔고 그 위에 벗짚과 누룩을 켜켜에 쌓아 띄운다. 5. 7일 후 뒤집어 주고 21일 발효를 끝낸다. 6. 누룩에 햇볕과 바람을 쐬우고 종이봉투에 담아 보관한다.
20	이화곡 (梨花麴)	규합총서	멥쌀 3말	멥쌀 54.12L	<ol style="list-style-type: none"> 1. 멥쌀을 씻어 불렀다가 곱게 가루를 낸다. 2. 멥쌀가루에 물을 약간 뿌려주고 체에 내린다. 3. 쌀가루를 달걀 크기로 만들되 단단히 뭉친다. 4. 술잎으로 애누룩을 서로 닿지 않게 싸고 종이봉투에 담는다. 5. 자주 뒤집어주고 황색이 될 때까지 띄운다. 6. 누룩을 햇볕에 건조시켜 겹질을 벗긴다.

표 1-1-1. 전통누룩 제조방법 (계속)

No	누룩명	출처	재료 및 분량		제조방법
21	조곡법 (組麴法)	태상지	밀 15석 녹두6말6되 5홉 물2말	밀 2705.85L 녹두119.95L 물36.08L	<ol style="list-style-type: none"> 1. 밀은 씻어 말린 뒤 거칠게 갈아 놓는다. 2. 밀가루는 체에 쳐서 하얀 가루를 제거하고, 거친가루와 밀기울만을 취한다. 3. 녹두는 맷돌에 갈아 거피한뒤 물에 씻는다. 4. 물기가 빠지면 쪄서 건조시킨다. 5. 밀가루와 녹두를 섞고 분쇄하여 반죽한다. 6. 누룩틀을 이용하여 성형한 뒤 틀에서 뺀다. 7. 쪄고 밀누룩을 쪄켜에 쌓은 후 벗짚으로 덮어준 뒤 2-3일간격으로 바꿔쌓기하여 20일간 띄운다.
22	향은곡 (香醞麴)	고사촬요 임원십육 지	보리 1말 녹두 1되	보리 18.04L 녹두 1.8L	<ol style="list-style-type: none"> 1. 통보리를 갈아 거친가루로 만든다. 2. 거피한 녹두를 물에 4-5시간 불렸다가 건져서 물기가 빠지기 전에 갈아낸다. 3. 녹두 간 것을 걸러 즙액을 취한 후 이 즙액으로 통밀가루를 버무려 반죽한다. 4. 녹두간 것 외에 일체의 물을 넣지 말고 골고루 반죽한다. 5. 누룩틀에 넣어 성형한다. 6. 띄우는 법은 일반 제법과 같다.
23	향은곡 (香醞麴)	규곤시의 방	통밀 1말 통보리 1말 녹두 1홉	통밀 18.04L 통보리 18.04L 녹두 180ml	<ol style="list-style-type: none"> 1. 통밀을 갈아 거친가루로 만든다. 2. 거피한 녹두를 물에 4-5시간 불렸다가 건져서 물기가 빠지기 전에 갈아낸다. 3. 녹두 간 것을 걸러 즙액 1되5홉을 취한다. 4. 이 즙액으로 통밀가루와 통보릿가루를 버무려 반죽한다. 녹두즙을 짤 때 따로 물을 첨가하지 않는다. 5. 누룩틀에 넣어 성형한다. 6. 띄우는 법을 일반 제법과 같다.
24	백수환동 주곡 (白首還 童 酒麴)	양주방	참쌀 5되 거피녹두 1말 물	참쌀 9.02L 거피녹두 18.04L 물	<ol style="list-style-type: none"> 1. 녹두를 갈아 거피한다. 2. 거피한 녹두를 살짝 익을만큼 쪄 후 식힌다. 3. 참쌀을 하룻밤 불려 가루로 만든다. 4. 녹두가루 쪄고 쌀가루를 섞고 골고루 섞어 반죽한다. 5. 반죽을 오리알 크기로 단단히 뭉친다. 6. 애누룩을 솔잎에 재워 따뜻한 곳에서 띄운다. 7. 발효 7일 후 섞어주고 14일 후 햇별이 들고 바람이 부는곳에 내놓았다가 다시 7일 후 꺼내어 건조시킨다.
25	내부비전 곡 (內府祕 傳麴)	임원십육 지	밀가루 100근 녹두 3말 황미 4말 물 3말1되	밀가루 60kg 녹두 54.12L 황미 72.16L 물 55.92L	<ol style="list-style-type: none"> 1. 녹두를 갈아 녹두가루와 껍질을 분리한다. 2. 분량의 물을 붓고 녹두껍질을 불려둔다. 3. 황미를 분쇄하여 가루로 만든다. 4. 황미가루에 녹두가루와 밀가루를 섞는다. 5. 녹두껍질 불린 물과 반죽할 가루를 섞고 반죽한다. 6. 누룩틀에 반죽을 넣어 성형한다. 7. 대광주리에 밀누룩을 담아 펼쳐 놓고 햇별이 드는 곳에 띄워 60일 후 거둬들인다.
26	녹미주곡 (綠米酒 麴)	온주법	거피녹두 1말 참쌀 5되	거피녹두 18.04L 참쌀 9.02L	<ol style="list-style-type: none"> 1. 녹두를 갈아 거피하여 물에 불린다. 2. 물에 불린 녹두를 쪄 후 식힌다. 3. 참쌀을 하룻밤 불린 후 가루로 분쇄한다. 4. 참쌀가루와 녹두가루를 섞은 후 쪄어 반죽을 만든다. 5. 누룩반죽을 오리알 크기로 단단히 뭉친다. 6. 빈 상자에 솔잎을 깔고 애누룩을 서로 닿지 않게 묻는다. 7. 따뜻한 곳에서 띄우며 가끔 햇별과 바람이 부는 곳에 내어두었다가 20일간 띄운후 종이봉투에 보관한다.

표 1-1-1. 전통누룩 제조방법 (계속)

No	누룩명	출처	재료 및 분량		제조방법
27	녹두곡 (綠豆谷)	증보산림경제	거피녹두 1말 멥쌀 1말 말린 약쭉	거피녹두 18.04L 멥쌀 18.04L 말린 약쭉	1. 거피한 녹두와 쌀을 각각 하룻밤 불린다. 2. 물기를 뺀 녹두는 약간 건조시킨 후 분쇄한다. 3. 쌀은 가루로 분쇄한다. 4. 녹두가루와 쌀가루를 누룩틀로 성형한다. 5. 누룩틀에서 빼내 약쭉위에 놓아 발효시킨다.
28	곡 (麴)	산림경제	통밀 10말 밀가루 2말 녹두즙 2말반 연잎 벗짚	통밀 180.4L 밀가루 36.08L 녹두즙 45.10L 연잎 벗짚	1. 녹두를 씻어 불린 후 분쇄한다. 2. 밀은 분쇄하여 거친가루로 만든다. 3. 통밀가루와 밀가루 녹두즙을 섞고 고루 반죽한다. 4. 누룩틀에 면보자기를 깔고 반죽을 채운후 단단히 성형한다. 5. 누룩을 연잎으로 싸고 새끼로 묶는다. 6. 서늘한곳에 매달아 띄운다.
29	미곡 (米麴)	증보산림경제	참쌀 1말 천연여뀌즙 (생여뀌 1석) 술잎	참쌀 18.04L 천연여뀌즙 (생여뀌 180.39L) 술잎	1. 참쌀을 씻어 불린 후 갈아서 체에 내린다. 2. 여뀌를 찹어 2되 가량의 즙을 채취한다. 3. 쌀가루에 여뀌즙을 넣고 골고루 오랫동안 반죽한다. 4. 쌀가루 반죽한 것을 둥글고 단단한 형태로 단단히 성형한다. 5. 시루에 술잎을 깔고 밀누룩을 서로 닿지 않게 넣은 뒤 다시 술잎으로 덮는다. 6. 시루 위를 면보자기로 덮어 30일간 띄운다. 7. 햇볕에 건조시킨 후 종이봉투에 보관한다.
30	면곡 (麵麴)	임원십육지	통밀 5근 녹두 5되 물 2-3되 여뀌 5되 벗짚 말릴쭉	통밀 3kg 녹두 9.02L 물 3.61-5.41L 여뀌 9.02L 벗짚 말릴쭉	1. 통밀을 씻어 건조시킨 후 거친가루로 만든다. 2. 물에 씻어 불린 녹두를 분쇄하여 즙을 짜낸다. 3. 여뀌잎을 짓찧어 둔다. 4. 녹두물에 짓찧은 여뀌잎을 넣고 비벼서 즙을 얻는다. 5. 통밀가루에 녹두즙 여뀌즙을 적당량 넣고 골고루 섞어 반죽을 만든다. 6. 누룩틀에 밀가루 반죽을 채우고 단단히 서형한다. 7. 시렁 위에 벗짚을 깔고 그 위에 말린 쭉을 두텁게 깔고 성형한 밀누룩을 올려둔다. 밀누룩 밑에 쭉을 덮고 그 위에 벗짚을 덮는다. 8. 2-3일 간격으로 바꿔 쌓기를 해주고, 21일간 띄운 후 바람이 잘 통하는 곳에 매달아 둔다.
31	곡 (麴)	온주법	밀기울 1근 녹두 1-2되 여뀌잎 1섬 닥나무잎 잣나무잎	밀기울 600g 녹두 1.8-3.6L 여뀌잎 180.39L 닥나무잎 잣나무잎	1. 녹두와 여뀌를 씻어 불린 후 물기를 뺀다. 2. 녹두와 여뀌를 갈아 즙을 만든다. 3. 밀을 분쇄한후 중간체로 밀가루를 제거한다. 4. 밀기울을 녹두와 여뀌 즙으로 반죽한다. 5. 누룩틀을 이용하여 단단히 성형한다. 6. 닣나무잎으로 애누룩을 싸고 다시 잣잎으로 싸서 벗짚으로 묶는다. 7. 여러날 두고 띄웠다가 햇볕에 보관해 둔다.
32	요곡 (蓼麴)	산림경제	참쌀 3말 밀가루 3되 달인 여뀌즙 3말 (여뀌잎 30kg 물 6말)	참쌀 54.12L 밀가루 5.41L 달인여뀌즙 54.12L (여뀌잎 30kg 물 108.23L)	1. 여뀌에 물을 넣고 증발로 오랜시간 달인다. 2. 물의 양이 절반으로 줄어들면 찌꺼기를 제거하여 식힌다. 3. 참쌀을 씻어 여뀌 달인 물에 하룻밤 불린 후 물기를 빼고 참쌀에 밀가루를 골고루 입힌다. 4. 종이봉투를 두겹으로 만들어 밀가루 붙힌 밀누룩을 담아 채우고 끈으로 잘 묶는다. 5. 끈을 이용하여 바람이 들고 따뜻한 곳에 매달아 둔다. 6. 2개월동안 띄운다.

표 1-1-1. 전통누룩 제조방법 (계속)

No	누룩명	출처	재료 및 분량		제조방법
33	대주백타곡 (大洲白麴)	제민요술	밀 3섬 약재추출물 1말 (썩, 호시잎, 뽕잎 각 5말) 물 1말	밀 541.2L 약재추출물 18.04L (썩, 호시잎, 뽕잎 각 90.2L) 물 18.04L	<ol style="list-style-type: none"> 1. 밀 3섬을 씻어 햇볕에 건조시킨다. 2. 밀 2섬을 찌고 식힌 후 별에 말려 분쇄한다. 3. 밀 1섬은 날것으로 분쇄한다. 4. 썩과 호시잎, 뽕잎을 찢어 줍 1말을 얻는다. 5. 각각 준비된 밀가루를 섞는다. 6. 추출물에 물 1말을 가하고 밀가루에 뿌려가면서 반죽한다. 7. 누룩틀에 넣고 단단히 성형한다. 8. 28일간 띄운다.
34	백료곡 (白膠麴)	제민요술	보리 3섬 도꼬마리잎 6말 제비썩 벗짚	보리 414kg 도꼬마리잎 108.23L 제비썩 벗짚	<ol style="list-style-type: none"> 1. 보리 3섬을 씻어 햇볕에 건조시킨다. 2. 보리 1섬을 찌서 식힌후 분쇄한다. 3. 보리 1섬은 날것으로, 1섬을 볶은 후 각각 분쇄한다. 4. 도꼬마리잎 6말을 찢어 즙액을 얻는다. 5. 누룩틀을 이용해 성형한다. 6. 밀누룩을 제비썩으로 위아래를 싸서 짚으로 묶고 21일간 띄운다.
35	양능곡 (襄陵麴)	임원십육지	밀가루 1말 참쌀가루 1말 꿀 (당밀, 2되) 천초 1되 벗짚	밀가루 18.04L 참쌀가루 18.04L 꿀 (당밀 3.61L) 천초 1.8L 벗짚	<ol style="list-style-type: none"> 1. 물에 씻어 불린 참쌀을 분쇄한 후 분량의 밀가루와 골고루 섞어 버무린다. 2. 버무린 곡물가루에 천초를 넣고 반죽한다. 3. 꿀을 넣고 반죽한다. 4. 반죽을 누룩틀에 담아 성형한다. 5. 밀누룩을 틀에서 빼내어 띄운다. 6. 햇볕에 내어 말린다.
36	백주곡 (白酒麴)	임원경제지	참쌀 1말 약재 (당귀, 측사, 방향, 목향, 영향, 백출, 관계, 천초, 단향, 백지, 오수유, 감초, 행인 각 1냥) 여뀌즙 3되	참쌀 18.04L 약재 (당귀, 측사, 방향, 목향, 영향, 백출, 관계, 천초, 단향, 백지, 오수유, 감초, 행인 각 37.5g) 여뀌즙 5.41L	<ol style="list-style-type: none"> 1. 참쌀 1말을 씻을 후 고운 가루로 분쇄한다. 2. 준비한 분량의 약재를 고운가루로 분쇄한 후 3. 여뀌를 찢어 만든 즙을 가루에 골고루 뿌려 섞는다. 4. 재료가 골고루 섞이도록 쥘는다. 5. 반죽을 주먹밥 형태로 단단히 성형한 후 한가운데를 눌러 오목하게 하여 밀누룩을 만든다. 6. 밀누룩을 짚으로 싸서 대자리에 펴서 띄운지 4일 후 청백색이 곰팡이가 자라면 벗짚을 걸어내고 새로운 풀로 다시 싸서 덮는다. 7. 7일 후 광주리에 담아 서늘한곳에 매달아 둔다. 8. 21일간 건조시킨다.
37	백주곡2 (白酒麴)	임원경제지 별법	참쌀 1말 누룩 1냥 약재 (당귀, 측사, 방향, 목향, 영향, 백출, 관계, 천초, 단향, 백지, 오수유, 감초, 행인 각 1냥) 제비썩즙 2되 백약	참쌀 18.04ml 누룩 37.5g 약재 (당귀, 측사, 방향, 목향, 영향, 백출, 관계, 천초, 단향, 백지, 오수유, 감초, 행인 각 37.5g) 제비썩즙 3.6L 백약	<ol style="list-style-type: none"> 1. 참쌀 1말을 씻을 후 고운 가루로 분쇄한다. 2. 준비한 분량의 약재를 고운가루로 분쇄한 후 참쌀가루와 혼합한다. 3. 제비썩을 찢어 만든 즙을 가루에 골고루 뿌려 섞는다. 4. 재료가 골고루 섞이도록 쥘는다. 5. 반죽을 달걀 형태로 단단히 성형한 후 가운데 구멍을 뚫는다. 6. 애누룩 바탕에 백약을 묻힌다. 7. 애누룩을 짚으로 싸서 2일 새로운 벗짚으로 다시 싸서 덮는다. 8. 7일 후 꺼내고 20일간 건조시킨다.

표 1-1-1. 전통누룩 제조방법 (계속)

No	누룩명	출처	재료 및 분량		제조방법
38	만전향주곡 (滿殿香酒麴)	임원십육지	밀가루 100근 참쌀가루 5근 연화 200타 백지 2냥5전 광령 2냥5전 영향 2냥5전 목향 0.5냥 백단 5냥 곽향 5냥 축사 5냥 감초 5냥 백출 10냥 참외 100개	밀가루 60kg 참쌀가루 3kg 연화 200송이 백지 93.75g 광령 93.75g 영향 93.75g 목향 18.53g 백단 187.5g 곽향 187.5g 축사 187.5g 감초 187.5g 백출 375g 참외 100개	<ol style="list-style-type: none"> 1. 목향, 백출, 백단, 감초, 곽향, 축사, 백지, 정향, 광령, 영향을 가루로 분쇄한다. 2. 참외는 껍질을 벗기로 갈아서 즙을 낸다. 3. 연화는 다듬어서 갈아 즙을 낸다. 4. 밀가루 100근에 참쌀가루 5근 약재가루를 섞고 참외즙과 연화즙으로 반죽을 한다. 5. 반죽을 누룩틀로 단단히 성형한다. 6. 애누룩은 한 덩어리마다 종이로 싸서 바람이 잘 통하는 곳에 매달아 둔다. 7. 49일 후 거둬들인다.
39	정화곡 (精華麴)	임원십육지	밀가루 1되 생강즙 2되	밀가루 1.8L 생강즙 3.6L	<ol style="list-style-type: none"> 1. 통밀을 갈아 고운가루로 만든다. 2. 밀가루를 체로 밀기울과 밀가루를 분리한다. 3. 생강을 씻어 갈아 즙을 짜낸다. (충분히 가라앉혀 녹말을 제거한다.) 4. 밀기울을 제거한 흰밀가루에 생강즙을 넣고 고루 섞은 후 체에 쳐 수분을 맞춘다. 5. 누룩틀을 이용해 단단히 성형한다. 6. 애누룩을 새끼로 묶어 바람이 잘 통하는 곳에 걸어 21일간 띄운다.
40	연화곡 (緣化麴)	임원경제지	녹두 3말 참쌀 3말8냥 백출 150냥 천초 8냥 물 8되-1말	녹두 54.12L 참쌀 54.12L300g 백출 5.63kg 천초 300g 물 14.43-18.04L	<ol style="list-style-type: none"> 1. 참쌀을 씻어 분쇄한다. 2. 녹두는 씻어 불린 후 껍질을 제거하여 갈아둔다. 3. 백출과 천초를 가루내어 준비한 후 참쌀가루와 녹두 찌은 것 백출가루, 천초가루를 모두 섞어 물을 가해가며 반죽을 한다. 4. 누룩틀에 넣고 단단히 성형한다. 5. 닳나무잎이나 약쭉을 펴고 그 위에 연꽃 한 장을 놓는다. 6. 연꽃위에 애누룩을 놓고 연꽃으로 덮는 방법으로 차곡차곡 쌓는다. 7. 애누룩의 맨위와 주변에 약쭉을 넣고 21일간 띄운다.
41	동양주곡 (東陽酒麴)	임원십육지 농정회요	밀가루 100근 도인 3근 행인 3근 비곶 뿌리 1근 녹두 5되 목향 4냥 육계 8냥 여뀌 10근 매화 10근 도꼬마리 10근 도꼬마리잎 1석 물	밀가루 60kg 도인 1.8kg 행인 1.8kg 비곶 뿌리 600g 녹두 9.02L 목향 150g 육계 300g 여뀌 6kg 매화 6kg 도꼬마리 6kg 도꼬마리잎 180.39L 물	<ol style="list-style-type: none"> 1. 도인과 행인은 껍질을 벗겨 갈아 분쇄한다. 2. 바곶 뿌리는 껍질을 벗겨 준비한다. 3. 목향, 육계, 매운 여뀌는 물에 7일간 담가두고 매화잎에 물이 스미게 한다. 4. 도꼬마리와 도꼬마리잎을 찢어 즙을 낸다. 5. 약재 불린 물에 녹두를 넣고 삶는다. 6. 밀가루에 삶은 녹두와 껍질 벗긴 열매가루, 물을 들인 매화, 도꼬마리즙을 섞고 반죽한다. 7. 누룩틀에 반죽을 넣고 단단히 성형한다. 8. 밀누룩을 벗짚과 빈가마니 등을 이용하여 띄운다.
42	미곡 (米麴)	본초강목 임원십육지	참쌀 1말 천연여뀌즙 (여뀌 1석) 다나무잎	참쌀 18.04L 천연여뀌즙 (여뀌 180.39L) 다나무잎	<ol style="list-style-type: none"> 1. 참쌀을 씻어 불린후 찢다음 식혀서 분쇄한다. 2. 여뀌를 찢어 2되가량의 즙을 얻는다. 3. 쌀가루에 여뀌즙을 넣고 골고루 반죽한다. 4. 쌀가루 반죽한 것을 둥글고 납작한 형태로 단단히 뭉친다. (누룩틀 사용) 5. 밀누룩을 닳나무잎으로 싼 다음, 벗짚으로 묶는다. 6. 바람드는 곳에 매달아 49일간 띄운다. 7. 햇볕에 건조시켰다가 종이봉투에 담아 보관한다.

표 1-1-1. 전통누룩 제조방법 (계속)

No	누룩명	출처	재료 및 분량		제조방법
43	신곡 (神麴)	동의보감	메밀가루 25근 도꼬마리즙 1되 여뀌즙 1되3홉 제비썩즙 1되 행인가루 1되3홉 붉은 팔 1되 닥나무잎또는 썩잎	메밀가루 15kg 도꼬마리즙 1.80L 여뀌즙2.34L 제비썩즙 1.8L 행인가루 2.34L 붉은 팔 1.8L 닥나무잎또는 썩잎	<ol style="list-style-type: none"> 1. 메밀을 거칠게 가루낸다. 2. 도꼬마리잎을 찢어 즙 1되를 얻는다. 3. 여뀌잎을 찢어 즙 1되3홉을 얻는다. 4. 제비썩잎을 찢어 즙 1되를 얻는다. 5. 행인을 가루내어 1되3홉을 준비한다. 6. 붉은 팔은 삶아서 찢어 1되를 준비한다. 7. 모든 재료 합하여 반죽한다. 8. 누룩틀에 반죽을 넣어 단단히 성형한다. 9. 애누룩을 빼내어 마잎, 닥잎, 썩을 깔고 덮어 띄운다. 10. 햇볕에 건조시킨다.
44	신곡 (神麴)	본초강목 제민요술	밀가루 100근 제비썩 즙 3되 (제비썩 1석) 붉은 팔 3되 행인 3되 도꼬마리즙 1되 들여뀌즙 1되	밀가루 60kg 제비썩 즙 5.41L (제비썩 180.39L) 붉은 팔 5.41L 행인 5.41L 도꼬마리즙 1.8L 들여뀌즙 1.8L	<ol style="list-style-type: none"> 1. 제비썩을 찢어 즙 3되를 얻는다. 2. 붉은 팔 3되를 삶아 물러지면 쪄어둔다. 3. 행인 3되를 분쇄하여 가루를 준비한다. 4. 도꼬마리잎을 찢어 1되를 준비한다. 5. 들여뀌잎을 찢어 1되를 준비한다. 6. 밀가루 100근에 팔가루와 행인가루를 섞고, 제비썩을 비롱하여 도꼬마리즙, 들여뀌즙을 각각 넣어 반죽한다. 7. 반죽을 누룩틀에 넣고 단단히 성형한다. 8. 애누룩을 마잎이나 닥나무잎에 싸서 띄운다.
45	신곡3 (神麴)	제민요술	밀 1섬 도꼬마리즙 2말 (도꼬마리 10석)	밀 180.39L 도꼬마리즙 36.08L (도꼬마리 180.39L)	<ol style="list-style-type: none"> 1. 밀을 씻어 햇볕에 건조시킨다. 2. 밀을 3등분하여 각각 찌고, 볶고 날것으로 분쇄한다. 3. 도꼬마리잎을 찢어 즙 2말을 준비한다. 4. 가루내어 준비한 밀을 혼합하여 도꼬마리즙으로 반죽한다. 5. 누룩틀에 넣고 성형한다. 6. 26일간 띄운다.
46	하동신곡 (河東神麴)	제민요술	보리 1섬 빵, 도꼬마리, 썩, 수유 각 2근 물 2말5되	보리 138kg 빵, 도꼬마리, 썩, 수유 각 1.2kg 물 45.10L	<ol style="list-style-type: none"> 1. 보리 1섬을 씻어 햇볕에 건조시킨다. 2. 보리를 3말을 찌서 햇볕에 말리면서 식힌 후 분쇄한다. 3. 보리 6말을 볶은 뒤 분쇄한다. 4. 보리 1말을 생것으로 분쇄한다. 5. 빵잎, 도꼬마리잎, 썩, 수유에 물 2말 5되를 넣고 끓여서 자낸 즙 2말을 준비하여 식힌다. 6. 각각의 보릿가루를 합한 후 빵잎 등을 달인 즙으로 반죽한다. 7. 애누룩을 적당한 크기의 방형으로 성형하고 구멍을 뚫는다. 8. 실내에서 28일간 띄운다.

나. 시판 누룩 수집

본 연구에서 구입한 시판누룩은 총 7종으로 표 1-1-2와 같다. 일부업체에서는 원료를 달리 하여 2품목 이상의 누룩을 생산하고 있었으며, 몇몇을 제외한 모든 시판누룩은 100% 밀을 사용하여 제조하고 있었다. 그 외 시판누룩의 역가는 300~350 SP 범위였으며 수분함량은 12% 미만이었다.

표 1-1-2. 시판누룩의 수집

No	누룩명	원료	역가(표기)
47	시판누룩-1	얇은뱅이밀 100% (국내산)	300SP 이상
48	시판누룩-2	금강밀 100% (국내산)	300SP 이상
49	시판누룩-3	미국산 수입밀 100%	300SP 이상
50	시판누룩-4	밀 100% (국내산)	300SP 이상
51	시판누룩-5	밀 100% (국내산)	300SP 이상
52	시판누룩-6	쌀 100% (국내산)	-
53	시판누룩-7	미국산 수입밀 100%	300SP 이상

다. 자가 제조 누룩 수집

본 연구에서 수집한 자가 제조 누룩은 총 5종으로 표 1-1-3과 같다. 수집 자가 제조 누룩은 모두 원료 밀을 사용하였으며 일부 누룩은 발아밀을 사용하였고 그 밖의 누룩은 밀을 100% 사용하였다. 제조과정 상에서 밀을 파쇄하고 성형한 후 발효하는 전체적인 공정은 동일하였으나 온도관리에서 58번 누룩은 최대온도가 42℃를 넘지 않게 관리하였고 55번 누룩은 누룩방의 온도를 따로 조절하지 않았으며 57번 누룩은 고온(39-41℃), 중온(35-38℃), 저온(30℃) 발효를 순차적으로 진행하였다.

표 1-1-3. 자가제조 누룩의 수집

No	누룩명	원료	제조방법
54	자가제조-1		
55	자가제조-2	밀 100%	밀 → 파쇄 → 성형 → 발효 (누룩방이용 발효)
56	자가제조-3	쌀(주), 밀(부)	흡입누룩, 자연발효
57	자가제조-4	발아밀, 녹두즙, 여꾸즙	발아밀 → 파쇄 → 성형 → 발효 (처음 2주 39-41℃ 고온발효, 3주 35-38℃ 중온발효, 3주 30℃ 저온발효)
58	자가제조-5	발아밀 100%	발아밀 → 파쇄 → 성형 → 발효 (발아밀을 사용하며, 품온관리를 하지 않는 것이 특징)

2절 전통누룩 특성 분석

(1) 누룩 당화력 분석

누룩의 당화력은 2% 가용성 전분용액을 기질로 하여 국세청 주류분석 규정에 따라 측정하였다. 기질용액과 침출한 누룩 조효소액을 55°C에서 1시간 당화시킨 후 생성된 환원당의 양을 DNS법을 이용하여 측정 한 후 누룩 1g이 가용성 전분 1g에 작용하여 생성된 포도당을 가용성 전분 1g에 대한 백분율로 계산한 값을 당화력으로 나타내었다.

(2) 누룩의 enzyme activities 분석

전통누룩의 enzyme activities는 megazyme kit를 이용하여 효소학적 방법으로 분석하였다. 누룩추출물에 기질을 첨가하여 반응시킨 후 얻어진 흡광도를 측정하여 enzyme unit/g 누룩으로 표시 하였다. Protease activity는 단백질 가수분해 시 생성되는 free amino-terminal group과 반응하는 TNBSA 시약을 활용하여 분해된 펩타이드를 비색법을 통하여 정량하고 대표적인 protease인 트립신을 standard로 하여 트립신 대비 단백질 분해 활성을 측정하였다.

(3) 입국 품질 분석

입국의 산도는 첨가물 공전에 따라 입국 20g에 물 100ml를 가해 30°에서 3시간이상 침출하고 여과하여 이 여액 10ml에 혼합지시액 2~3방울을 가하여 0.1N 수산화나트륨용액으로 담홍색에서 옅은 청색으로 될 때까지 적정하여 산출하였다. 당화력은 2% 가용성 전분용액을 기질용액으로 하여 입국침출액을 55°C에서 1시간 효소반응 시킨 후 생성된 환원당의 양을 DNS법으로 측정하여 입국 1g이 가용성 전분 1g에 작용하여 생성된 포도당을 가용성 전분 1g에 대한 백분율인 당화율에 희석배수를 곱한 값을 당화력으로 나타내었다.

(4) 전통누룩 metagenome 분석

각 누룩 시료에서 metagenomics DNA를 추출하여 next generation sequencing analysis (NGS)를 이용하여 각 누룩의 미생물 군집을 비교하였다. Illumina MiSeq 시스템을 이용하여 누룩과 전통주의 염기서열분석을 진행하였다. 먼저 short reads 제거 및 extra long tails 손질을 통해 reads의 질을 향상시키고 CD-HIT-DUp로 100% 수준에서 동정을 하였다. Chimeric reads를 확인하고 secondary clusters는 primary clusters에 합쳤다. Clusters에 있는 특정 크기 이하의 noise sequences를 제거하였다. Non-chimeric clusters로부터 남은 대표 reads는 greedy algorithm을 이용하여 97% OUT cutoff 수준에서 조작분류단위 (Operational Taxonomic Units, OTUs)로 군집되었다. 다음으로 Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME)로 미생물을 분류하고 다양성을 계산하였다. 먼저 미생물 분류를 위해 각각의 OTU로부터 대표적인 sequences를 사용하여 계통수 (phylogenetic trees)를 구성하였다. 다음으로 통계분석을 통해 publication-quality graphic results를 시각화 하였다.

3절 전통누룩 유래 미생물 자원 분리 및 동정

(1) 전통누룩으로부터 미생물 자원 분리

재현한 전통누룩의 미생물을 분리하기 위하여 누룩을 10^5 ~ 10^8 희석한 후 분리배지에 도말하였다. 효모의 경우 세균억제와 곰팡이 균사체발육 억제를 위하여 chloramphenicol 0.01%과 sodium propionate 0.3%를 첨가한 PDA(Potato dextrose agar)배지를 사용하여 30°C에서 24±2시간 배양하였고, 유산균분리에는 곰팡이 생성 억제를 위하여 Amphotericin B 0.001% 첨가한 MRS agar(Difco 0881)를 사용하여 30°C의 혐기상태에서 36±2시간 배양하였다.

(2) 전통누룩 유래 미생물 균주의 동정

누룩분말 1 g을 취하여 0.85% 멸균 생리식염수에 넣고 10^6 까지 연속적으로 10진 희석을 하였다. 각 희석배수에서 혼합액 1 mL를 취하여 0.01% chloramphenicol을 함유한 YPD 평판배지에 확산시킨 후 26°C에서 6일 동안 배양하였다. 순수분리가 확인된 분리 균은 16S rRNA와 18S rRNA를 사용하여 동정하였다. 프라이머는 보편적으로 사용되는 ITS1 5' (TCC GTA GGT GAA CCT GCG G) 3', ITS4 5' (TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC)3', 27F 5' (AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG) 3' , 1492R 5' (TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T) 3' 를 사용하였다. 분리 균의 whole genomic DNA는 InstaGene Matrix (BIO-RAD, hercules, CA, USA)를 사용하여 추출한 후 PCR을 이용하여 증폭하였다. 추출된 DNA는 20 ng의 genomic DNA 주형에 대하여 30 µL 반응물에서 EF-Taq (SolGent, Daejeon, Korea)을 사용하여 증폭되었다. Tap polymerase 를 95°C에서 5분 동안 활성화 하였고, 95°C에서 30초 동안 변성, 53°C에서 30 초 동안 annealing, 72°C에서 1분 동안 extension하는 과정을 35 cycle 반복하였다. 뒤이어 final extension은 72°C에서 7분 동안 진행하였다. 증폭된 최종 산물은 multiscreen filter plate (Millipore Corp., Billerica, MA, USA)로 정제되었다. 시퀀싱 반응은 PRISM BigDye Terminator v3.1 Cycle sequencing Kit로 수행하였다. Extension products를 함유한 DNA는 Hi-Di formamide (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)와 혼합하여 95°C에서 5분 동안 배양하고 5분 동안 얼음에 방치하였다. 최종 산물은 ABI Prism 3730XL analyzer (Applied Biosystems)로 분석되었고 Variant Report Software version 11 (Applied Biosystems)로 시퀀싱 데이터를 분석하였다.

(3) 곰팡이 전분분해활성 측정

순수분리한 곰팡이를 전분배지(yeast nitrogen 0.1%, starch 0.2%, agar 1.5%)에 접종하여 30°C에서 24시간 배양한 후 iodine solution(2% potassium iodine, 1% iodine)으로 염색하여 균주를 중심으로 나타나는 clear zone의 크기를 측정하였다.

(4) 베타글루칸 분석

탁주를 동결건조 후, Megazyme β -glucan assay kit(Mushroom and Yeast beta-blucan, Megazyme., Ireland)를 이용하여 β -glucan 함량을 분석하였다. α -Glucan은 동결건조한 탁주 10mg을 뚜껑이 있는 유리 튜브관에 담은 후, 2N KOH를 2 mL넣고 얼음물에서 20분간 균질화하였다. 1.2M sodium acetate buffer(pH 3.8)을 10mL로 mass up 한 후, Bottle 2를 200 µL 넣었다. 40°C의 water bath에서 30분간 항온시키면서 10분마다 vortex하였다. 3000rpm에서 10분간

원심분리 후, 상등액 100 μ l을 유리 튜브관에 넣고, 동량의 200mM sodium acetate buffer(pH 5.0)를 넣어 vortex하였다. 3mL의 GOPOD 용액을 넣고 40 $^{\circ}$ C의 water bath에서 20분간 항온 후, 510nm에서 흡광도를 측정하였다.

Total glucan은 동결건조한 탁주 10mg을 뚜껑이 있는 유리 튜브관에 담은 후, 150 μ l 진한 염산을 넣고 균질화 한 후, 30 $^{\circ}$ C의 water bath에서 45분간 항온시키면서 15분마다 vortex하였다. 1mL의 3차 증류수를 넣고 잘 섞은 뒤, 뚜껑을 살짝 열고 100 $^{\circ}$ C의 water bath에서 5분간 항온 시킨후, 뚜껑을 닫고 2시간 동안 반응시켰다. 실온에서 식힌 후, 2N KOH를 1mL 넣고, 200mM sodium acetate buffer로 10mL mass up 하고 vortex하였다. 3000rpm에서 10분간 원심 분리 후, 상등액 100 μ l를 새로운 유리관에 옮겨, 동량의 bottle 1을 넣어 40 $^{\circ}$ C의 water bath에서 1시간동안 반응시켰다. 3mL의 GOPOD용액을 넣고, 40 $^{\circ}$ C의 water bath에서 20분간 반응한 후, 510nm에서 흡광도를 측정하였다. 최종 베타글루칸 함량은 total glucan함량에서 α -glucan 함량을 차감하여 계산하였다.

4절 전통주 제조 및 특성 분석

가. 전통주 제조

(1) 양조특성 분석을 위한 전통주 제조

누룩 종류에 따른 양조특성 분석을 위한 전통주 제조는 다양한 문헌에 나오는 방법들을 표준화하여 밀술 담금과 덧술 담금을 하는 중앙법을 채택하였다. 아래와 같이 원료 비율은 총 원료의 30%는 밀술, 70%는 덧 술로 하였다. 담금물의 비율은 원료(쌀)의 1.5배(150%)를 기준으로 하였다. 밀술에 사용한 담금물의 비율은 밀술 원료의 3배, 덧술에 사용한 담금물은 총 원료의 150%에서 밀술에 사용한 담금물을 제외한 나머지 물을 사용하였다. 누룩은 1차 시험담금 시 원료의 10%, 2차 시험담금 시에는 20%를 밀술에 전량 투입하였다. 발효 기간은 밀술은 7일간, 덧 술은 14일간 총 21일간 실시하였다(표 1-4-1).

표 1-4-1. 누룩기반 전통주 제조 원료 비율

Raw materials	Base materials	Secondary materials
Rice	300g	700g
Nuruk	100g / 200g	
Water	900ml	600ml

1. 밀술은 백설기, 덧술은 고두밥으로 빻음
2. 누룩은 술 담금 총 원료의 10% & 20% 를 사용하며, 밀술 담금에 전량 사용 함
3. 밀술의 23 $^{\circ}$ C에서 제조 기간은 7일을 기준으로 함
4. 덧술의 발효 기간은 14일을 기준으로 함
5. 모든 술 담금은 1회 3반복씩 병행 진행함
6. 58종 x 3담금 x 2차 진행(누룩함량 10%, 20%) = 총 348회

(2) 유용 곰팡이 선발을 위한 탁주 제조

선발된 효모와 입국을 사용한 탁주의 제조방법은 다음과 같다. 발효제로는 선발한 곰팡이 균을 사용하여 제조 한 입국이 사용되었으며 첨가비율은 30sp/g이었다. 급수량은 200%이고 선발된 효모는 쌀 양의 0.5%를 첨가하였으며, 1단은 48시간, 2단은 72-96시간동안 25℃에서 이루어졌다. 발효가 끝난 원주는 120mesh의 체를 사용하여 제정하였으며 이화학적 특성 분석은 알코올 함량을 6.0%로 조절 한 후에 이루어졌다.

(3) 베타글루칸 고생성 주류제조 기술 확립을 위한 탁주제조

탁주 담금을 위한 모든 재료 및 방법은 지원업체에서 제공받아 사용하였고, 발효효모는 *Saccharomyces cerevisiae* Rey 36-7번을 사용하였다. 발효온도는 25℃와 20℃에서 진행하였으며, 매일 교반하였고, 4단 담금 후 4일간 sampling 하여 분석하였다(표 1-4-2).

표 1-4-2. 글루타치온 고생성 효모를 활용한 탁주의 현장시험을 위한 제조시험 (단위: g)

		1단	2단	3단	4단	계
입국	입국	66				237.5
	백미		171.5			171.5
	전당분				33	33
	팽화미			20(오전) /20(오후)	20	60
누룩			7.5			7.5
정제효소(효모)			0.357			0.357
급수(mL)		115.5	478.5			594

(4) 입국의 제조

전통주 제조를 위한 입국제조방법은 다음과 같다. 쌀 3kg을 수세 후 2시간의 침지와 1시간의 탈기 과정을 거쳐 고온의 스팀기를 사용하여 40분간 증자한 후 품온이 30-32℃가량이 되도록 방냉하였다. 식은 고두밥에 종국을 첨가하여 파종한 후 광목천으로 보습하여 제국기에 넣어 배양하였다. 약 12시간 후 갈아쌓기 하여 품온을 약 28℃까지 낮추었으며 입상한 후 약 8시간 간격으로 갈아쌓기 하여 품온의 과열을 방지하였다. 이러한 갈아쌓기와 입상 과정을 2회 정도 반복 한 후 출국하였으며 4℃에 저장하여 사용하였다. 여기서 종국은 전체 쌀의 약 0.5% 되는 쌀에 포자수가 10g당 108정도 되도록 곰팡이를 접종 후 30℃에서 배양 한 것을 사용하였다.

나. 전통주 분석

주류의 이화학적 분석은 국세청 주류면허지원센터 주류분석규정에 의거하여 실시하였으며, 일부는 기기분석을 실시하였다.

(1) 알코올 함량

알코올 함량은 0.45µm membrane filter를 사용하여 여과한 시료를 DB-ALC2 column (30 m x 0.53 mm I.d x 2 µm film thickness : J & W Scientific, Folsom, CA, USA)이 장착된 GC (Hewlett Packard 6890N, Palo Alto, CA, USA)를 이용하여 oven 70℃, injector 200℃ 그리고 detector 250℃에서 정량 분석하였다.

(2) pH 및 산도 측정

pH는 pH meter(Orino EA 940)를 사용하여 직접 시료에 넣어 측정한다. 산도는 시료 10ml를 100ml 삼각플라스크에 취한 다음, 0.1% phenolphthalein을 가하여 0.1N NaOH 용액으로 담녹색이 나타날 때까지 중화 적정하여 그때까지 소비된 용액의 양을 산도로 표시하였다.

(3) 당도

당도는 당도계(HAND REFRACTOMETER, ATAGO, Japan)를 이용하여 측정하였다.

(4) 유기산

유기산은 Bio-5rex resin을 사용하여 전처리한 시료를 0.45 μ m membrane filter를 사용하여 여과한 후 HPLC(Agilent 1290 Infinity)로 분석하였다. 분석용 column으로 ZORBAX SB-Aq(4.6mm \times 150mm \times 5 μ m)를 사용하였으며 detection wave-length /window 210/8nm를 사용하여 분석하였다. Oven의 온도는 35 $^{\circ}$ C이었으며, 용매는 20mM aqueous phosphate buffer (pH 2.0/acetonitrile=99/1 (v/v))를 사용하였고 flow rate 1.0 mL/min이었다.

(5) 환원당 정량 (R/S 측정, Lane-Eynone 법 및 Betrand법의 변법)

Fehling용액 중에 당액을 뷰렛으로부터 가하면 3분 이내에 반응하여 $\text{Cu}(\text{OH})_4$ 를 완전히 CuO_4 를 적색 침전으로 변화시키는 데 필요한 당액량을 구하여 당농도를 얻는다. 반응의 종말점은 산화환원 지시약인 methylene blue를 가하여 용액의 색이 청색으로부터 탈색되는 점으로 한다. 본 연구소에서는 Lane-Eynonoe 법 및 Betrand 법의 변법을 사용하여 환원당 함량을 측정한다.

(가) 시약 준비

- ① Fehling A 용액 : 황산동 ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 69.28g을 증류수로 1L 정용 후 사용한다. 본 연구에서는 Copper(II) sulfate pentahydrate(SAMCHUN, Lot No. 022615)를 구입하여 사용하였다.
- ② Fehling B 용액 : 주석산 칼륨 나트륨 ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, Rochelle salt) 326g과 NaOH 100 g을 증류수로 1L 정용 후 사용한다. 본 연구에서는 Fehling solution B(SAMCHUN, Lot No. 031214)를 구입하여 사용하였다.
- ③ 1% Methylene Blue 용액 : 메틸렌블루 1g을 증류수로 100ml로 정용하여 사용한다.
- ④ 포도당 표준액 : 무수포도당 2.046 g과 안식향산 1g을 증류수로 1L 정용 후 사용한다.
- ⑤ 소포제

(나) 포도당 blank 측정

- ① 삼각 플라스크에 A 용액, B 용액, 증류수를 각각 5, 5, 20 ml 첨가 후, 소포제를 약간 첨가하여 가열한다.
- ② 메틸렌 블루 용액 1-2 방울 첨가 후, 반응액의 색이 청색에서 투명한 적자색을 나타낼 때 까지 포도당 표준액을 조금씩 첨가한다(15-20 ml).
- ③ 메틸렌 블루 용액을 더 첨가하였을 때에도 반응액의 색변화가 없으면 반응을 종료하고, 이 때 얻은 포도당 소모량을 포도당 blank(B)로 정한다.

(다) 시료 중 환원당 측정

- ① 삼각 플라스크에 A 용액, B 용액, 증류수를 각각 5, 5, 20 ml 첨가 후, 소포제를 약간 첨가하여 가열한다.
- ② 메틸렌 블루 용액 1-2 방울 첨가 후, 시료 적당량을 넣고 가열하면서 포도당 표준액을 조금씩 떨어뜨려 적정을 완료하였을 때까지의 포도당 표준당 용액의 소비 ml 수를 M이라 칭한다.
- $R/S = 2 \times (B - M) / \text{시료 첨가량}$

(6) 유리당

유리당은 시료를 0.45 μ m membrane filter를 사용하여 여과한 후 HPLC(Jasco)로 분석하였다. 분석용 column으로는 SupelcosilTMLC-NH2 (25cm \times 3.0mm)를 사용하여 Jasco RI-930 detector(Jasco)를 이용하여 분석하였다. Oven의 온도는 35 $^{\circ}$ C였으며 사용된 용매는 Acetonitrile : water = 85: 15였고 flow rate는 0.43ml/min이었다.

(7) 휘발성 향기 성분

휘발성 향기성분은 SPME(solid phase microextraction) 방법을 이용하여 분석하였다. 시료 10ml을 60 $^{\circ}$ C에서 20분간 평형시킨 후 100 μ m polydimethylsiloxane이 코팅된 fiber를 이용하여 40분간 향을 포집하여 Stabilwax-DA column (30 m \times 0.25 mm I.d \times 0.25 μ m film thickness : Restek Corp., Bellefonte, USA)이 장착된 Hewlett-Packard 7890A GC / HP-5973N mass selective detector (MSD) (Hewlett-Packard Co., Palo Alto, CA, USA)를 이용하여 분석하였다. 사용된 GC의 oven 온도는 60 $^{\circ}$ C에서 5분간 유지 후 200 $^{\circ}$ C까지 3 $^{\circ}$ C/min의 속도로 상승시켰으며 injector 온도는 250 $^{\circ}$ C, carrier gas로 helium을 사용하였다.

(8) 관능평가

본 연구에서는 제조된 전통주 55종(당화불가 3종 제외)에 대해 1-2차 담금 3반복 330개의 시료들에 대한 관능분석을 시행하였다. 각 누룩들로 제조된 전통주는 살균을 하지 않은 생주임으로 발효가 완료되는 날을 기준으로 3일 내(냉장보관)에 관능검사가 시행되었고, 하루 약 2-3 종의 3반복 시료를 6-9개씩 관능검사를 진행하였다. 관능 인원은 숙련된 연구소 패널들을 대상으로 진행되었다(한 회 총 6-8명, 남녀비율 1:1, 연령 30-50대). 장소는 연구소 관능실(칸막이 검사대)에서 시료의 정보를 전혀 제공하지 않고 난수로 시료번호를 적은 약주잔에 시료를 따라 제공하였다. 시료의 온도는 5-8도로 진행되었다. 관능점수는 각 맛과 향의 강도와 선호점수를 5점 척도법으로 표기하였고, 각 항목을 종합해 최고점수와 최저점수를 제외하고 유의적인 나머지 점수들을 평균화 하였다.

5절 전통누룩 안전성 평가

가. 전통주 제조

전통누룩 유래 자생 미생물 자원 유용성 연구 과제의 일환으로 2015년에 재현 및 수집한 누룩 61종을 대상으로 전통누룩의 안전성을 확인하였다. 누룩 61종 중 46종 (no.1~46)은 우리나라와 중국의 고문헌을 기반으로 재현되었고 누룩 15종 (no. 47~61)은 국내시장과 전통 양조장에서 구매하였다. 총 아플라톡신 함량은 상용 키트 (COKAQ1000, 4/40, AgraQuant, Romer, Austria)로 분석하였다. 누룩과 전통주 중의 아플라톡신은 Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe (QuEChERS) 상용키트 (Agilent Technologies)로 추출하였다. 액체크로마토그래피 질량분석기 (LC-MS)에 사용한 아플라톡신 B₁, B₂, G₁, G₂ 혼합 표준용액 (CRM46304, supelco, USA)은 시그마-알드리치에서 구매하였다. 이외의 모든 시약은 HPLC 분석 등급을 사용하였다. 표준균주 *Aspergillus flavus* (NRRL3357, ATCC200026)와 *Aspergillus oryzae* (RIB40, ATCC42149)는 미국균주은행 (American Type Culture Collection, ATCC)에서 분양 받았다. 누룩 중 곰팡이는 Yeast Extract Peptone Dextrose 배지 (YPD) (Difco)로 분리하였고, 분리 곰팡이 중 *Aspergillus* sp.는 Potato Dextrose Agar (PDA) (Difco)에 배양하였다.

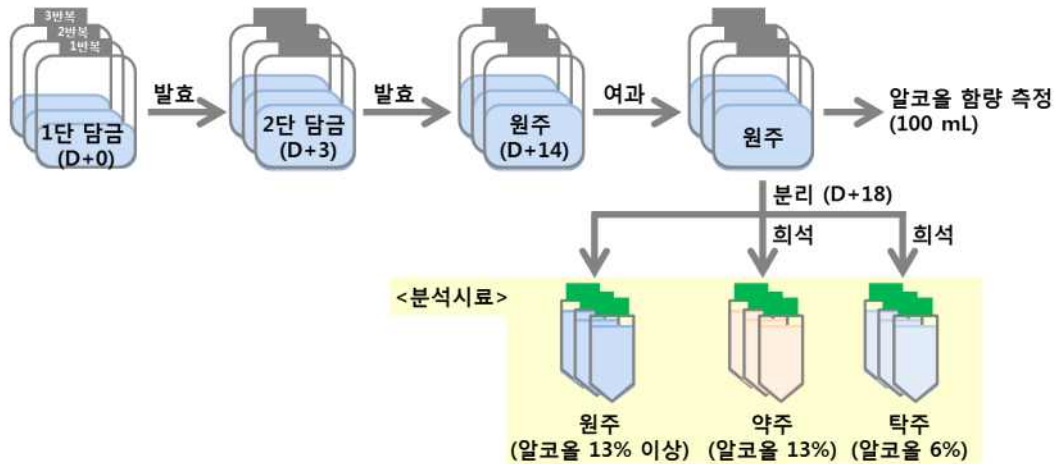


그림 1-5-1. 전통주 제조 및 샘플 확보

표 1-5-1. 전통주 제조 원료와 사용 비율

Sample name	Nuruk No.	Nuruk name	Ingredient						
			Stage 1				Stage 2		
			Rice (g)	Water (mL)	Nuruk (g)*	Purified enzyme (g)*	Yeast (g)	Rice (g)	Water (mL)
S01	17	분곡	111	222	20.6	0.2	0.2	222	444
S02	18	병곡	111	222	29.5	0.2	0.2	222	444
S03	19	이화주곡	111	222	48.3	0.2	0.2	222	444
S04	20	이화곡	111	222	33.2	0.2	0.2	222	444
S05	39	정화곡	111	222	35.9	0.2	0.2	222	444
S06	41	동양주곡	111	222	56.2	0.2	0.2	222	444
S07	40	연화곡	111	222	22.6	0.2	0.2	222	444
S08	44	신곡	111	222	34.2	0.2	0.2	222	444
S09	25	내부비전곡	111	222	20.6	0.2	0.2	222	444
S10	29	미곡	111	222	21.3	0.2	0.2	222	444S
S11	57	자가제조누룩-4	111	222	29	0.2	0.2	222	444
S12	15	백곡	111	222	70.8	0.2	0.2	222	444
S13	13	연화곡	111	222	103.4	0.2	0.2	222	444
S14	34	백료곡	111	222	47.8	0.2	0.2	222	444
S15	0	대조군	111	222	-	0.2	0.2	222	444

* 누룩과 정제효소의 첨가량은 각각 300 SP (당화력, saccharogenic power)와 60000 SP에 해당.

나. 총 아플라톡신 분석

총 아플라톡신 (total aflatoxin)은 상용키트를 이용하여 효소결합면역흡착법 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)으로 분석하였다. 분쇄한 누룩 0.5 g을 칭량하여 5 mL 플라스틱 시험관에 넣고 추출용매 70% 메탄올 (v/v) 2.5 mL를 첨가하였다. 3분 동안 진탕한 후 고형물이 가라앉도록 일정 시간 방치하였다. 분리된 상층 액을 0.8 μ m 시린지 필터 (Advantec, Toyo Roshi Kaisha, Ltd., Tokyo, Japan)로 여과하여 ELISA 분석에 사용하였다.

표준품 또는 시료 100 μ L를 콘주게이트 (conjugate) 200 μ L가 들어있는 microwell에 첨가하였다. 내용물을 혼합한 즉시 100 μ L를 취하여 항체 코팅 microwell로 이동하였다. 상온에서 15분 동안 반응시킨 후에 내용물을 비우고 증류수로 5번 반복 세척하였다. Microwell의 잔여물은 흡수 종이 위에 두드려 제거하였다. 여기에 기질 (substrate) 100 μ L를 넣어 실온에서 5분 동안 방치한 다음 정지 용액 (stop solution) 100 μ L를 첨가하였다. 반응액의 OD 값은 microplate reader (Varioskan flash, Thermo scientific, USA)로 450 nm와 630 differential filter에서 측정하였다. 측정된 OD 값을 5개 농도의 표준품 (0, 4, 10, 20, 40 ppb)으로 작성한 용량-반응 표준곡선에 대입하여 총 아플라톡신 함량을 계산하였다. 검출한계 (limit of detection, LOD)와 정량한계 (limit of quantitation, LOQ)는 각각 3 ppb와 4 ppb이다. 분석 전에 시약과 키트 구성성분의 온도를 실온으로 맞추었고 한 플레이트 당 분석 시료의 개수는 48개 이하로 제한하였다.

다. 아플라톡신 B₁, B₂, G₁, G₂ 분석

(1) 추출을 위한 곰팡이 배양

PDA 평판배지에 배양된 *Aspergillus* sp.의 포자를 취하여 0.1% Tween 80 1 mL에 현탁하였다. 현탁액의 포자수를 hemocytometer (Marienfeld, Lauda-Königshofen, Germany)로 계수하고 10⁶ spores/mL이 되도록 PDB 배지로 희석하였다. 포자 현탁액을 15 mL용량의 PDA 평판배지에 접종하여 spreader로 넓게 확산한 다음 26°C에서 8일 동안 배양하였다.

(2) 아플라톡신 추출

누룩과 술의 아플라톡신은 QuEChERS 상용키트를 사용하여 추출하였다. 누룩 4 g과 술 10 mL를 취하여 50 mL 추출 튜브 (p/n 5982-5755CH)에 각각 넣었다. 누룩에는 물 6 mL를 추가로 첨가하였다. 뒤이어 1% 포름산 (formic acid)을 함유한 아세토나이트릴 (acetonitrile, ACN) 10 mL, magnesium sulfate 6 g과 sodium acetate 1.5 g으로 구성된 QuEChERS 가루 (p/n 5982-0755), ceramic homogenizer (p/n 5982-9313) 2개를 순서대로 넣고 1분 동안 격렬하게 진탕한 다음 5분 동안 4000 rpm으로 원심 분리하였다. 누룩과 술의 상층액 각각 6 mL와 8 mL를 PSA 50.0 mg과 magnesium sulfate 150.0 mg이 들어 있는 dispersive solid phase extraction (dSPE) 시험관 (p/n 5982-5022)로 이동하여 1분 동안 진탕한 다음 3분 동안 6000 rpm으로 원심 분리하였다. 누룩과 술의 상층액 각각 3 mL와 5 mL를 15 mL 시험관으로 옮겼고, refrigerated centriVap. concentrator (Labconco, USA)를 이용하여 추출용매를 50°C에서 증발시켰다. 건조된 누룩과 술에 0.1% formic acid를 함유한 ACN 용매를 각각 300 μ L와 250 μ L를 넣어 재수화한 다음 0.45 μ m syringe filter (Advantec)로 여과하여 HPLC 분석에 사용하였다.

곰팡이 배양배지의 아플라톡신은 1% formic acid를 함유한 methanol : dichloro- methane : ethyl acetate = 1 : 2 : 3 (v/v/v)혼합용매로 추출하였다. 먼저 곰팡이가 배양된 평판배지를 정육면체 형태로 잘라 50 mL 시험관에 넣어 -80°C deep freezer에서 24 시간 동결하였다. 여기에 혼합 추출용매 15 mL를 첨가하고 실온에서 30분 동안 초음파처리를 한 다음 orbital shaker로 100 rpm에서 30분 동안 진탕하였다. 초음파처리와 진탕 과정을 한 번 더 반복하여 4000 rpm에서 10분 동안 원심분리하고 상층 액을 분리하였다. 잔여물에 혼합 추출용매 5 mL를 넣고 추출과정을 한 번 더 반복하였다. 회수한 추출용액은 refrigerated centriVap. concentrator로 50°C에서 하루 동안 증발시켰다. 건조물에 100% methanol 1.5 mL로 넣고 실온에서 10분 동안 초음파 처리를 통해 재 수화 하였다. 재수화물은 0.45 μ m syringe filter (Advantec)로 여과하여 HPLC 분석에 사용되었다.

(3) LC-MS/MS 분석 조건

아플라톡신 B₁, B₂, G₁, G₂는 Agilent 6470 triple quadrupole liquid chromatography mass spectrometry (Agilent Technologies Santa Clara, CA, USA)가 장착된 Agilent 1290 infinity II LC

system으로 분석하였다. 이온화원은 JetStream 기술이 적용된 electrospray ionization (ESI) 방식이다. HPLC 분석에서 이동상은 0.1% formic acid를 함유한 물 (A)과 0.1% formic acid를 함유한 ACN 용매 (B)를 사용하였다. Gradient mode로 9분 동안 B 용매의 비율을 10% (0.0-0.5분), 95% (3.0-7.5분), 60% (7.5-8.0분), 10% (8.0-9.0분)로 변화시켰다. 표준 품과 시료를 5 μ L 주입하여 InfinityLab poroshell 120 EC-C18 컬럼 (2.1 mm \times 100 mm, 2.7 μ m) (Agilent, USA)에서 0.4 mL/min 속도로 분리하였다. Post time은 6분을 주었고 컬럼오븐 온도는 30°C로 유지하였다. 질량분석은 positive 모드에서 수행하여 multiple reactions monitoring (MRM) 에서 정량하였다. 질량분석기 조건은 drying gas와 sheath gas 온도 각각 350°C와 200°C, drying gas와 sheath gas의 유량 10 L/min, nebulizer 압력 40 psi, capillary voltage 4000 V, nozzle voltage 2000 V로 설정하였고, 350-400 m/z 사이의 질량을 스캔 하였다. 개별 아플라톡신 종류에 따라 설정한 fragmentor voltage와 collision energy는 표 1에 기술하였다. 데이터 분석과 아플라톡신 정량은 탑재된 MassHunter Workstation software (Agilent Technologies Santa Clara, CA, USA)로 수행하였다.

표 1-5-2. 아플라톡신 분석을 위한 LC-MS/MS MRM 조건

Compound	Retention time (min)	Fomula	[M]+H (m/z)	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Fragmentor energy (V)	Collison energy (V)
Aflatoxin B1	5.215	C17H12O6	313.0707	313.1	241.0	120	35
Aflatoxin B2	5.162	C17H12O7	329.0656	315.1	259.0	120	32
Aflatoxin G1	5.160	C17H14O6	315.0863	329.1	243.0	100	30
Aflatoxin G2	5.105	C17H14O7	331.0812	331.0	313.1	142	30

6절 전략미생물 유전체 분석

가. 양조효모의 유전체 분석

(1) 회분식 배양 방법

글루타치온생산능이 좋은 Rey 36-3의 회분식 배양은 50 mL YPD배지가 담긴 250 mL flask에서 30°C, 200 rpm 으로 실시하였다. 또한, 탄소원으로는 glucose 20 g/L 대신 ethanol 20 g/L를 첨가한 YP배지에서 YPD 회분식 배양과 동일한 조건으로 수행하였다.

(2) Intracellular 및 extracellular 글루타치온 정량

최종 선별된 ReY36-3 균주의 intracellular 및 extracellular 글루타치온 생산농도를 측정하였다. Intracellular는 세포의 농도를 OD₆₀₀=10 으로 맞춰서 cell-down하고, DDW로 2회 washing한 후, 40% ethanol을 첨가하여 30° C, 200 rpm에서 2 h 반응시켜 EnzyChrom GSH/GSSG Assay

Kit (EGTT-100)으로 측정하였다. 환원형 글루타치온 (GSH) 은 산화형 글루타치온 disulfide (GSSG)으로 산화될 때, 5-5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB)는 2-nitro-5-thiobenzoate anion (TNB²⁻)로 환원된다. 산화된 GSSG는 글루타치온 reductase에 의해서 NADPH를 cofactor로 이용하여 GSH로 환원된다. Glutathione의 농도에 비례적으로 생성된 노란색 생성물 (TNB²⁻)는 spectrophotometer를 이용하여 412 nm에서 측정하였다.

글루타치온 고생산 균주인 Rey36-3의 전장유전체 분석을 위한 DNA 준비 및 PacBio sequencing

Saccharomyces cerevisiae Rey 36-3d의 전장유전체 분석을 위하여 QIAamp DNA mini kit (Qiagen INC, USA)를 이용하여 DNA를 추출하였다. Agilent 2100 Bioanalyzer를 이용하여 DNA의 순도 및 양을 측정하여 PacBio sequencing에 적합한지를 판단하였다. PacBio RSII Sequencer (Pacific Biosciences, Menlo Park, CA, USA)를 이용한 Single Molecule Real Time (SMRT) DNA 시퀀싱 플랫폼 사용하여 Rey36-3의 전장 유전체를 분석하였다. 20kb SMRTbell library가 생성되었으며 시퀀싱을 위하여 이 라이브러리가 SMRT cell에 로딩되었다.

2장 연구수행 결과

1절 전통누룩의 복원 및 특성 분석

1. 전통누룩의 복원

누룩(Nuruk)이란 전분을 원료로 한 술을 만드는데 필요한 발효제(fermenter)로 일반적으로 곡물을 찌서 곰팡이를 번식시킨 것을 의미한다. 술의 발효에 주원료로 사용되는 전분은 당화(saccharification)과정을 통해 효모가 이용 가능한 포도당으로 전환되는데, 이때 발효원으로 누룩이 사용되며 발효의 중요한 원료가 된다. 전통적으로 누룩은 밀과 보리 쌀, 조 등의 곡물을 이용하여 만들어지며 술의 주원료가 되는 전분 중심의 곡물이면 모두 가능하다. 이러한 누룩은 한국에서 ‘kokja’라고 표현되며 야생의 곰팡이, 효모, 젖산균 등의 미생물이 자연적으로 접종되어 증식된 것을 말한다. 한국 전통주의 양조법은 이 누룩을 사용하여 전분의 당화와 발효를 동시에 일으키는 것으로 살균된 배지에 특정 곰팡이를 인공적으로 접종한 일본의 koji와 구별된다. 즉 Nuruk과 koji의 차이는 전분분해효소를 분비하는 곰팡이 외에 효모나 젖산균의 유무로 구별된다고 할 수 있다. 따라서 입국을 이용하여 술을 제조할 때 반드시 효모와 젖산을 첨가해 주어야 하는 이유가 여기에 있으며 한국 고유의 양조방식과는 분명한 차이가 있다. 누룩은 반드시 발효과정을 거쳐야만 그 기능을 발휘하게 되며 누룩으로 제조된 술은 koji나 효소를 이용해 발효시킨 술에 비해 더 많은 향기와 풍미를 가지고 있다.

동양에서 누룩이 처음 만들어진 것은 기원전 5세기경으로 전해오고 있다. 한국에서 누룩을 처음 사용한 시기는 삼국시대 이전인 것으로 추측되며, 1123년경 한국의 술에 누룩을 사용했다는 기록이 남아있다. 한편 한국 고려시대의 ‘한림별곡(hanlimbyulgok)’에 특수한 누룩으로 제조한 술이 등장하여, 이 시기에 이미 한국에서는 다양한 형태의 누룩이 만들어졌음을 추측할 수 있다. 이후 한국 조선 중기 이후의 음식관련 문헌에 각각의 누룩이름과 제조방법이 상세하게 기록되어 다양한 전통누룩이 제조되었음을 알 수 있다. 누룩이 술의 발효에 관여하는 역할은 모두 동일하지만 전통적으로 여러가지 종류가 있고 각각 만드는 방법도 다르다. 예를들어 누룩은 크게 일정한 크기와 모양을 갖는 성형누룩과 곡물을 뭉치지 않고 수분을 주어 그대로 발효하는 흘임누룩이 있는데, 건조한 지역이 많은 중국은 밀을 재료로 한 성형누룩이, 상대습도가 높은 일본은 쌀을 재료로 한 흘임누룩이 발전한 반면, 한국은 중국과 일본의 누룩을 모두 아우르는 밀과 쌀을 이용한 두 가지 형태의 누룩이 모두 발전하였다. 이처럼 누룩은 각 나라마다 독특한 기후의 영향으로 모양과 제조법, 발효기간에서 많은 차이를 보이는데 이는 지리적 환경과 기후에 적응하는 과학적 원리로 증명된다. 중국이 성형누룩, 일본이 흘임누룩으로 발전한 가운데 한국은 매우 다양한 재료와 모양의 누룩이 발전해왔다. 산간지역의 넓고 얇은 누룩부터 평야지역의 두껍고 작은 누룩, 제주지역의 작고 얇은 누룩 등 한국의 지역마다 누룩의 넓이와 두께가 다른 것은 습도와 일조량의 영향이 가장 크다. 또한 각 지역마다 주로 사용하는 누룩의 원재료도 매우 다양하다. 이처럼 한국 누룩의 특성은 그 다양함에서 찾을 있는데 최근 개량식 누룩의 증가로 다양한 제조방법을 따르는 전통누룩이 사라지고 있다. 언급된 바와 같이 우리나라에는 다양한 종류의 누룩이 존재하고 있지만 현재 제조, 사용되는 누룩은 일부 누룩에

국한되어 있다. 따라서 본 연구에서는 “Qi Min Yao Shu (제민요술)과” “Compendium of material Medica, (본초강목)” 등 중국에서 편찬된 고서이지만, 한국에 유입되어 전통주 제조에 사용되어온 누룩을 포함하여 Sanlimkyungjae (산림경제), limwonsibyukji (임원십육지), 규곤시의 방 등 한국 고문헌에 수록된 전통누룩의 제조법을 재현하여 전통누룩의 특성을 과학적으로 규명하는데 그 목적을 두었다. 본 연구는 고문헌의 누룩제조기록을 현대화 기술에 의해 최초로 재현했다는데 그 의미가 매우 높다. 따라서 본 연구에서 재현된 전통누룩의 특성분석연구는 누룩을 기반으로 한 한국의 전통주 연구에 기초자료로 활용될 것이다.

가. 전통누룩의 외관

재현된 누룩 46종과 수집누룩 12종의 외관을 그림 2-1-1에 나타내었다. 대부분의 각 누룩은 원료 고유의 색을 띠었고, 일부 누룩에서는 표면의 곰팡이 균사가 기균사로 성장한 것을 확인 할 수 있었다. 전통누룩의 모양은 지방에 따라 다르지만, 보통 원형, 원판형, 네모형 또는 구멍이 뚫린 모양이다. 잘 발효된 누룩은 표면이 깨끗하고 crack이 없으며 불쾌취가 없다. 누룩의 품질은 당화력과 발효력만으로는 판정할 수 없고, 주류 제조 후 주류품질에 있어서의 향기와 맛 등 복합적인 품질요인으로 판정해야 하기 때문에 외관으로 누룩의 품질을 판정하기는 다소 어렵다. 더욱이 한약제 등 부재료를 사용한 누룩에서는 더더욱 판정이 어렵다. 그러나 일반적으로 향기면에서 이취가 없고 외관상 담황색을 띠며 곰팡이의 포자가 착생하지 않은 누룩이 당화력과 발효력이 우수한 누룩으로 판정받고 있다. 각 누룩은 파쇄 후 4 ℃에 저장하면서 주류제조 및 분석에 사용하였다.



1. 주곡방문



2. 추모곡



3. 오메기곡



4. 죽곡 I



5. 죽곡 II



6. 공병곡



7. 곡 I



8. 면곡



9. 신곡



10. 진주춘주곡



11. 여곡 I



12. 설향곡



13. 연화곡



14. 백곡 I



15. 백곡 II

그림 2-1-1. 재현 및 수집누룩의 외관



16.여곡



17.분곡



18.병곡



19.이화주곡



20.이화곡



21.조곡범



22.향은곡 I



23.향은곡 II



24.백수환동주곡



25.내부비전곡



26.녹미주곡



27.녹두곡



28.곡 II



29.미곡



30.면곡

그림 2-1-1. 재현 및 수집누룩의 외관 (계속)



31. 곡Ⅲ



32. 요곡



33. 대주백타곡



34. 백료곡



35. 양농곡



36. 백주곡 I



37. 백주곡 II



38. 만전향주곡



39. 정화곡



40. 연화곡



41. 동양주곡



42. 미곡



43. 신곡 I



44. 신곡 II



45. 신곡 III

그림 2-1-1. 재현 및 수집누룩의 외관 (계속)



46.하동신곡



47. 시판누룩-1



48.시판누룩-2



49.시판누룩-3



50.시판누룩-4



51.시판누룩-5



52.시판누룩-6



53.시판누룩-7



54.자가제조-1



55.자가제조-2



56.자가제조-3



57.자가제조-4



58.자가제조-5

그림 2-1-1. 재현 및 수집누룩의 외관 (계속)

2. 전통누룩의 효소학적 특성 분석

가. 당화력 및 효소활성

누룩 중에는 여러 종류의 미생물이 존재하며, 이들 미생물이 분비하는 효소 역시 미생물의 종류와 성질에 따라 달라진다. 과거 전통누룩의 효소학적 연구 결과에 따르면 누룩의 당화력은 1.39이며, 이 값은 맥아의 당화력 1.5보다 다소 낮고, 중국의 누룩 11.1에 비해 매우 낮아 누룩의 품질이 낮았다는 것을 알 수 있다. Lee의 연구에 의하면 1900년도 중반 우리나라 각 지방에서 시판되는 누룩과 주류제조 공장에서 사용하고 있는 *Aspergillus kawachii*로 제조한 Backguk과 *Asp. oryzae*로 제조한 Hwangguk의 당화력을 분석한 결과 Bungok(791 SP), Gokja(421 SP), Hwangguk(226 SP), Backguk(195 SP) 순이었다.

46종의 재현된 누룩과 12종의 수집누룩의 당화력과 enzyme activities 측정 결과를 표 2-1-1에 나타내었다. 재현 누룩 중 당화력이 가장 높은 누룩은 분곡(565.5 sp), 내부비전(565.2 sp), 미곡(547.9 sp) 이었고 이는 수집 누룩 중 가장 높은 당화력을 보인 시판누룩-2(460.1sp)와 자가 제조 누룩 중 가장 높은 당화력을 보인 선다리누룩(477.2 sp)보다 높은 값이었음. α -Amylase 활성은 재현누룩 분곡(65.53 U/g), 병곡(53.2 U/g)에서 높게 나타났고 이는 수집 누룩 중 높은 활성을 보인 시판누룩1-3(26-38 U/g)보다 높고 자가제조 누룩-4(55.49 U/g) 보다 분곡에서는 높은 활성을 보인 결과임. β -Amylase 활성은 시판 누룩 시판누룩이 가장 높았고 protease 활성은 자가 제조 누룩 자가제조누룩-4(10.32 ug/mL)이 가장 높았고 재현 누룩 오메기곡(9.9 ug/mL)이 다음으로 높은 활성을 보였음. α -Amylase, β -amylase 활성은 p value가 0.001 이하로 당화력과 상관관계가 높게 나타났고 glucoamylase 활성 또한 0.05 이하로 상관관계가 있게 확인되었음. 반면에 b-glucanase, protease 활성은 p value가 0.05 이상으로 당화력과 상관관계가 없는 것으로 확인되었다.

표 2-1-1. 제조 및 수집 누룩의 당화력 및 효소활성

No. <i>Nuruk</i>	Sacchrification power	Enzyme activity ¹⁾					
		α -Amylase (U/g <i>Nuruk</i>)	β -Amylase (U/g <i>Nuruk</i>)	Protease (mg/ml trypsin)	β -Glucanase (U/g <i>Nuruk</i>)	Glucoamylase (U/g <i>Nuruk</i>)	
1	JuKokBangMun	325.43±50.97	1.58±0.36	2.82±0.17	1.53±0.09	0.048±0.008	0.16±0.10
2	ChuMoGok	194.82±0.10	17.42±1.10	1.44±0.76	1.57±0.07	0.191±0.020	0.17±0.06
3	OMeKiGok	151.44±16.11	17.84±0.86	0.72±0.13	9.90±7.28	0.348±0.022	0.48±0.29
4	JukGok-1	319.34±76.83	10.75±1.81	3.13±0.25	1.77±0.41	0.042±0.001	0.75±0.58
5	JukGok-2	265.93±18.50	6.72±1.02	3.35±0.52	1.61±0.10	0.041±0.004	0.43±0.57
6	KongByungGok	318.83±17.74	39.07±6.70	4.58±0.36	1.42±0.87	0.108±0.014	1.05±0.09
7	Gok-1	346.75±14.76	1.47±0.43	3.83±0.24	1.48±0.36	0.046±0.016	0.05±0.02
8	MyunGok-1	292.22±12.14	8.76±1.77	4.37±0.11	1.75±0.22	0.057±0.008	0.27±0.06
9	SinGok-1	137.46±10.23	6.0251.29	1.01±0.31	2.31±0.61	0.187±0.017	0.16±0.05
10	JinjuchunchuGok	163.53±0.09	16.61±2.85	0.18±0.02	1.76±0.31	0.091±0.007	0.31±0.06
11	YeoGok-1	85.53±6.12	9.45±6.73	0.05±0.01	1.51±0.25	0.082±0.011	0.15±0.03
12	SeolhangGok	211.52±18.21	2.73±1.82	1.83±0.30	1.63±0.07	0.049±0.007	0.04±0.00
13	YeonHwaGok-1	112.67±18.18	2.44±0.57	0.05±0.02	1.43±0.13	0.161±0.052	0.29±0.08
14	BackGok-1	150.76±11.76	11.47±4.56	1.31±0.07	1.59±0.05	0.047±0.008	0.04±0.04

No.	<i>Nuruk</i>	Sacchrification power	Enzyme activity ¹⁾				
			α -Amylase (U/g <i>Nuruk</i>)	β -Amylase (U/g <i>Nuruk</i>)	Protease (mg/ml trypsin)	β -Glucanase (U/g <i>Nuruk</i>)	Glucoamylase (U/g <i>Nuruk</i>)
15	BackGok-1	164.61±4.65	46.09±10.57	1.56±0.20	2.08±0.09	0.047±0.010	0.13±0.01
16	YeoGok-2	370.09±6.05	0.96±0.05	2.74±0.13	1.63±0.08	0.043±0.003	0.03±0.01
17	BunGok	565.54±22.67	65.53±2.42	3.80±0.34	1.82±0.13	0.121±0.043	0.50±0.03
18	ByungGok	395.20±47.49	53.20±7.42	4.58±0.19	1.61±0.26	0.070±0.013	0.37±0.12
19	IWhaJuGok	241.07±12.05	29.61±3.60	0.09±0.02	1.69±0.30	0.334±0.023	0.45±0.06
20	IWhaGok	351.28±10.74	19.90±2.50	0.08±0.00	2.09±0.31	0.255±0.014	0.46±0.02
21	JoGokBeok	283.77±17.23	2.33±1.41	4.31±0.02	1.61±0.08	0.043±0.010	0.10±0.02
22	HyangOnGok-1	353.82±35.81	0.69±0.03	2.05±0.19	1.58±0.09	0.041±0.009	0.04±0.03
23	HyangOnGok-2	408.60±42.88	0.78±0.07	3.44±0.56	1.62±0.02	0.036±0.004	0.03±0.02
24	BakSuHwan-DongJuGok	512.81±6.26	28.09±0.80	0.38±0.07	2.64±0.26	0.070±0.011	1.07±0.07
25	Nebubijeongok	565.20±3.54	33.20±2.24	4.11±0.16	1.76±0.29	0.050±0.011	0.24±0.03
26	NokMiJuGok	217.74±24.29	21.17±4.13	0.40±0.05	3.33±0.90	0.083±0.032	1.09±0.07
27	NokDuGok	210.59±7.15	2.27±1.01	0.10±0.01	1.78±0.12	0.032±0.003	0.17±0.02
28	Gok-2	334.91±21.23	16.42±8.45	4.17±0.26	2.75±0.97	0.043±0.005	0.34±0.30
29	MiGok-1	547.90±18.10	22.18±6.78	4.77±0.36	2.11±0.33	0.041±0.004	0.21±0.07
30	MyunGok-2	265.45±46.99	4.54±0.73	3.78±0.92	1.98±0.20	0.053±0.006	0.18±0.04
31	Gok-3	190.28±7.11	2.32±2.10	4.27±0.15	1.62±0.12	0.042±0.012	0.10±0.07
32	YoGok	143.42±10.75	1.33±0.26	0.07±0.02	1.59±0.12	0.173±0.085	0.04±0.05
33	DaeJuBackTaGok	189.51±0.59	3.62±1.06	2.38±0.07	1.66±0.20	0.077±0.008	0.14±0.07
34	BackRyoGok	244.06±2.56	4.23±0.65	1.12±0.07	1.70±0.15	0.083±0.021	0.07±0.01
35	YangNeungGok	183.92±35.08	0.71±0.09	1.71±0.07	1.64±0.03	0.037±0.004	0.01±0.01
36	BackJuGok-1	214.55±57.45	1.10±0.07	0.04±0.02	1.71±0.27	0.282±0.013	0.04±0.01
37	BackJuGok-2	222.16±20.73	2.69±0.38	0.05±0.02	1.43±0.15	0.046±0.005	0.27±0.05
38	ManJeonHangJuGok	267.99±22.97	0.74±0.03	2.84±0.19	1.65±0.04	0.037±0.003	0.02±0.02
39	JeongHwaGok	324.33±5.46	43.41±8.91	4.64±0.62	2.16±0.94	0.055±0.003	0.47±0.02
40	YeonHwaGok-2	516.06±5.50	63.37±5.13	0.68±0.01	2.12±0.15	0.046±0.003	0.30±0.02
41	DongYangJuGok	207.22±87.05	23.14±3.29	5.28±0.36	2.11±0.22	0.092±0.006	0.21±0.07
42	MiGok-2	101.99±12.02	1.03±0.12	0.05±0.02	1.72±0.06	0.043±0.007	0.03±0.01
43	ShinGok-1	356.61±7.28	2.52±0.63	0.30±0.02	1.69±0.33	0.038±0.005	1.94±0.17
44	ShinGok-2	340.37±36.95	29.52±4.28	4.14±0.70	1.86±0.20	0.174±0.011	0.56±0.12
45	ShinGok-3	215.02±26.57	12.69±0.80	1.79±0.13	1.78±0.22	0.050±0.003	0.48±0.09
46	HaDongShinGok	268.30±8.59	4.29±0.17	1.00±0.06	1.88±0.26	0.163±0.013	0.07±0.01
47	Commercial-1	423.59±8.64	26.02±5.22	4.23±0.26	2.79±1.58	0.150±0.005	0.42±0.08
48	Commercial-2	460.12±18.81	30.33±8.43	5.01±0.47	5.04±1.52	0.186±0.025	0.53±0.06
49	Commercial-3	356.56±40.15	38.23±17.56	5.18±0.52	3.23±2.60	0.133±0.025	0.58±0.33
50	Commercial-4	220.99±23.81	21.98±6.05	3.10±0.20	1.70±0.08	0.116±0.012	0.75±0.12
51	Commercial-5	418.80±15.53	3.54±0.65	0.90±0.79	1.74±0.11	0.047±0.006	0.16±0.06
52	Commercial-6	346.28±57.71	3.46±1.40	0.11±0.03	1.72±0.14	0.042±0.006	0.13±0.06
53	Commercial-7	229.63±14.59	8.01±1.27	1.98±0.06	1.72±0.09	0.083±0.002	0.27±0.02
54	Self-produced-1	255.12±24.15	8.77±3.51	1.45±0.32	1.88±0.73	0.212±0.125	0.35±0.18
55	Self-produced-2	268.78±37.49	12.00±3.67	3.48±0.30	1.78±0.09	0.039±0.006	0.52±0.17
56	Self-produced-3	250.13±26.04	3.87±0.24	1.15±0.14	1.74±0.03	0.155±0.003	0.15±0.01
57	Self-produced-4	402.10±38.38	55.49±27.03	2.97±0.16	10.32±0.36	0.239±0.045	1.52±0.20
58	Self-produced-5	175.49±16.92	6.61±0.26	2.44±0.16	1.69±0.46	0.175±0.031	0.25±0.10

Means ± SD (n=3)

3. 양조 특성 분석

본 연구에 사용된 누룩의 양조적성을 알아보기 위해 제조한 전통주의 이화학적 분석결과는 표 2-1-2와 같다. 재현누룩을 사용한 전통주의 평균 알코올 함량은 15.0%, 발효율은 67.2%이었으며 commercial 누룩은 알코올함량 평균 15.2%, 발효율 68.0%로 두 그룹 간 차이는 없었다.

표 2-1-2. 제조 및 수집 누룩의 양조특성 분석

No	Nuruk	SP	Addition (%)	Alcohol (%)	RS (mg/ml)	Total acidity (%)	pH
1	JuKokBangMun	325.4	20%	12.87	19.0	0.78	4.0
2	ChuMoGok	194.8	20%	17.60	<2	0.43	4.2
3	OMeKiGok	151.4	10%	18.16	5.3	0.37	4.0
4	JukGok-1	319.3	20%	16.96	<2	0.45	4.1
5	JukGok-2	265.9	20%	16.95	9.3	0.50	4.1
6	KongByungGok	318.8	10%	16.09	<2	0.39	4.1
7	Gok-1	346.7	20%	13.44	13.0	0.71	4.1
8	MyunGok-1	292.2	10%	16.45	8.0	0.32	3.9
9	SinGok-1	137.5	10%	12.62	9.8	0.78	3.6
10	JinjuchunchuGok	163.5	10%	16.49	12.6	0.39	4.0
11	YeoGok-1	85.5	10%	15.78	8.4	0.37	3.8
12	SeolhangGok	211.5	20%	9.95	8.5	0.91	3.6
13	YeonHwaGok-1	112.7	20%	17.01	5.8	0.63	3.9
14	BackGok-1	150.8	20%	11.24	14.1	1.02	3.7
15	BackGok-1	164.6	10%	14.59	12.2	0.41	4.2
16	YeoGok-2	370.1	20%	12.52	12.9	0.68	3.8
17	BunGok	565.5	20%	17.24	<2	0.64	4.1
18	ByungGok	395.2	10%	15.34	<2	0.36	4.3
19	IWhaJuGok	241.1	20%	18.20	7.6	0.41	4.3
20	IWhaGok	351.3	20%	17.68	<2	0.42	4.1
21	JoGokBeok	283.8	20%	16.09	19.8	0.40	4.2
22	HyangOnGok-1	358.8	-	-	-	-	-
23	HyangOnGok-2	408.6	20%	13.32	40.6	0.35	4.0
24	BakSuHwan- DongJuGok	512.8	10%	15.47	<2	0.35	3.9
25	Nebubijeongok	565.2	10%	14.68	17.3	0.34	3.8
26	NokMiJuGok	217.7	20%	17.08	<2	0.44	4.4
27	NokDuGok	210.6	-	-	-	-	-
28	Gok-2	334.9	20%	15.22	15.6	0.49	4.2
29	MiGok-1	547.9	20%	17.33	<2	0.37	4.3
30	MyunGok-2	265.5	10%	10.95	25.6	0.45	3.9
31	Gok-3	190.3	20%	14.86	8.3	0.51	4.3
32	YoGok	143.4	20%	17.56	8.5	0.37	4.1
33	DaeJuBackTaGok	189.5	10%	12.67	22.0	0.43	3.8
34	BackRyoGok	244.1	10%	14.74	17.3	0.32	4.0
35	YangNeungGok	183.9	20%	15.22	6.9	0.35	4.2
36	BackJuGok-1	214.5	20%	11.68	5.3	0.74	3.8
37	BackJuGok-2	222.2	20%	14.88	<2	0.59	4.0
38	ManJeonHangJuGok	268.0	20%	11.33	14.5	0.56	3.8
39	JeongHwaGok	324.3	10%	15.68	9.7	0.38	3.9
40	YeonHwaGok-2	516.1	20%	17.31	8.1	0.40	4.4
41	DongYangJuGok	207.2	10%	14.44	7.0	0.31	4.4
42	MiGok-2	102.0	-	-	-	-	-
43	ShinGok-1	356.6	20%	14.02	3.3	1.06	3.8
44	ShinGok-2	340.4	10%	15.55	10.3	0.32	4.3
45	ShinGok-3	215.0	10%	14.23	8.5	0.86	3.5

No	Nuruk	SP	Addition (%)	Alcohol (%)	RS (mg/ml)	Total acidity (%)	pH
46	HaDongShinGok	268.3	20%	13.21	10.0	0.96	3.9
47	Commercial-1	423.6	10%	16.93	10.4	0.31	4.3
48	Commercial-2	460.1	10%	15.63	22.1	0.29	4.3
49	Commercial-3	356.6	10%	16.33	11.9	0.34	4.3
50	Commercial-4	221.0	20%	17.20	5.0	0.43	4.2
51	Commercial-5	418.8	20%	14.10	14.0	0.33	4.2
52	Commercial-6	346.3	20%	9.03	25.1	1.03	3.8
53	Commercial-7	229.6	10%	13.14	13.7	0.32	3.7
54	Self-produced-1	255.1	10%	16.17	4.7	0.41	4.1
55	Self-produced-2	268.8	10%	13.28	10.3	0.46	3.7
56	Self-produced-3	250.1	10%	15.25	<2	0.34	3.9
57	Self-produced-4	402.1	10%	18.82	<2	0.43	4.3
58	Self-produced-5	175.5	10%	15.99	7.6	0.33	4.2

전통누룩을 기반으로 제조한 전통주의 관능 특성을 조사하였다(표 2-1-3). 각 원료별 관능기호도가 높은 28종의 전통주를 선별하여 각각 sweet, acid, body, smooth, bitter, astringency, sweet flavor, acid flavor 항목에 대한 평가 결과를 다변량 분석한 결과를 Figure 2에 나타내었다.

표 2-1-3. 제조 및 수집 누룩의 양조특성 분석

No	Nuruk	누룩함량 (%)	관능 점수	관능 묘사
1	JuKokBangMun	20%	2.3	구수하고 씹싸름하며, 밀기울 특유의 향과 맛이 날카로움
2	ChuMoGok	20%	3.5	향이 독특, 감산미 양호하며, 주질 부드러움
3	OMeKiGok	10%	4.4	사과향, 바이젠의 향미, 알코올이 높지만 맛의 조화도 양호함
4	JukGok-1	20%	3.7	깔끔하며, 부드럽고 후미에 단맛이 미세하게 끌림
5	JukGok-2	20%	3.7	부드럽고 상큼함, 감산미 조화도 양호하고 신맛이 끌림
6	KongByungGok	10%	2.3	일반 약주맛, 맛의 조화도는 양호하나 특징 약함
7	Gok-1	20%	3.0	신맛이 상쾌함, 청량 음료 느낌, 맛은 없지만 신맛이 독특함
8	MyunGok-1	10%	2.0	맛은 양호하나 특징이 약하고 후미에 풀맛, 씹싸름한 맛 남음
9	SinGok-1	10%	2.3	향미 독특, 신맛이 높지만 목넘김 양호
10	JinjuchunchuGok	10%	3.4	풍미 양호, 과실향이 풍부, 새콤한 맛이 뒤에 남음
11	YeoGok-1	10%	2.3	단내와 은은한 들꽃향이 있고 향은 양호함, 맛은 씹싸름한 약재(쑥) 맛과 알코올 쓴맛이 입안에 오래 남고 날카로움
12	SeolhangGok	20%	0.9	독특한 향미 있으나 알콜맛이 약하고 신맛이 계속 끌림
13	YeonHwaGok-1	20%	1.3	맛이 날카롭고 잘못 발효하니 향(아세트)과 불쾌한 맛 있음
14	BackGok-1	20%	1.3	이화곡향미, 아세트 발효취 있고 신맛이 강하게 끌림
15	BackGok-1	10%	3.7	향이 무난, 맛이 부드럽고 깔끔한 것이 특징임
16	YeoGok-2	20%	1.6	부드럽고 밋밋하며, 쑥 약재향이 미세하게 나타남
17	BunGok	20%	3.4	맛 깔끔, 청주 느낌, 맛에 힘이 약하나 부드럽고 조화로우
18	ByungGok	10%	1.6	맛이 쓰고 거칠며, 특징 약함
19	IWhaJuGok	20%	3.4	후미에 끌리는 단맛이 좋고 입안에 감칠맛이 오래 유지됨
20	IWhaGok	20%	1.6	대중 약주 느낌, 알콜맛 강하며, 쓴맛이 남음
21	JoGokBeok	20%	3.7	바디감 좋고 상큼하며, 감산미 양호함
22	HyangOnGok-1			
23	HyangOnGok-2	40.6	4.4	감주같이 부드럽고 감칠맛이 강해 입안에서 감긴다.
24	BakSuHwan-DongJuGok	<2	4.4	열대 과실향, 맛과 향이 잘 어울림, 감칠맛과 향미가 있어 좋음
25	Nebubijeongok	17.3	3.7	과실향, 화학취(아세트) 등 복합적이며, 맛도 신맛, 짠맛 등 다양하게 나타남, 맛 밸런스는 떨어지나 특징 있음
26	NokMiJuGok	<2	3.0	바닐라 향과 맛, 주질이 약간 밋밋하나 부드러움
27	NokDuGok			
28	Gok-2	15.6	0.9	짠맛나고 목넘김이 어렵고 새콤함
29	MiGok-1	<2	3.7	감칠맛과 부드러움, 알코올이 조금 강한듯하나 바디감 좋음

No	Nuruk	누룩함량 (%)	관능 점수	관능 묘사
30	MyunGok-2	25.6	4.4	카라멜 향, 단내 있음, 한산소곡주 처럼 부드럽게 넘어감
31	Gok-3	8.3	3.0	식혜 느낌, 농익은 신맛, 감식초 같은 과일 신맛 올라옴
32	YoGok	8.5	3.7	신도주 느낌으로 깔끔한 약주임, 후미가 부드러움
33	DaeJuBackTaGok	22.0	4.1	풍미 양호, 감산미 양호, 맛이 부드럽고 약재 향이 은은함
34	BackRyoGok	17.3	2.3	부드럽고 향이 약하며 후미에 감칠맛과 누룩 특유의 맛 있음
35	YangNeungGok	6.9	1.3	바디감 약하고 밋밋하다, 알코올의 짙한 맛이 오래 유지됨
36	BackJuGok-1	5.3	1.3	오렌지색, 후르츠 같고 상큼한 과일 신맛이 매우 강함, 목넘김 어려움
37	BackJuGok-2	<2	2.3	약재맛이 강하고 퍽퍽하면서 느끼함, 특징 강하나 맛이 없음
38	ManJeonHangJuGok	14.5	2.0	누룩 특징에 비해 맛이 매우 평범함, 감산미 발란스 양호
39	JeongHwaGok	9.7	1.6	생강향 오래 남고 약 먹는 느낌, 알싸하고 씹싸름함, 기분나쁨
40	YeonHwaGok-2	8.1	1.6	달짝지근한 향미(독특)가 있지만 맛이 가벼움
41	DongYangJuGok	7.0	4.1	부원료 특유 향미 있음/감칠맛/단맛있고 향이 다양함
42	MiGok-2			
43	ShinGok-1	3.3	1.6	맛의 특징없이 신맛만 매우 강함
44	ShinGok-2	10.3	3.7	부원료 특유 향미 있음/알싸한 맛/화한 맛
45	ShinGok-3	8.5	2.0	침이 고이는 신맛과 약재맛이 특징이며, 맛 무난함
46	HaDongShinGok	10.0	1.3	씹싸름하며, 술이 오염된 느낌, 신맛도 매우 강함
47	Commercial-1	10.4	2.3	시판누룩 특유의 단내, 과일향 있음
48	Commercial-2	22.1	1.6	감칠맛이 있고 후미에 쓰고 텁텁한 누룩취 있음
49	Commercial-3	11.9	3.7	꽃향, 과일향 풍부, 맛은 양호함
50	Commercial-4	5.0	3.0	입안에 술의 감칠맛이 감돌지만 신맛이 조금 강하고 밋밋함
51	Commercial-5	14.0	1.6	쿵쿵하고 흠냄새, 오염된 느낌, 감산미는 양호
52	Commercial-6	25.1	1.3	쿵쿵, 새콤, 요거트 같은 바디감있지만, 쓴맛이 강함
53	Commercial-7	13.7	2.0	침이 고이는 신맛, 신맛이 부드럽고 바디감 약함, 밋밋함
54	Self-produced-1	4.7	3.7	향미가 깔끔, 깨끗함, 밀누룩 특유의 향미있고 특징 있음
55	Self-produced-2	10.3	3.7	향 독특(이화주), 꽃향, 부드럽고 진한 감칠맛이 오래 끌림
56	Self-produced-3	<2	1.6	미세한 과일향 있고 맛 발란스는 양호하나 후미가 짙고 밋밋함
57	Self-produced-4	<2	4.8	이화주향이 있고 옛막 풍미처럼 독특한 향미가 특징임
58	Self-produced-5	7.6	4.4	술향, 시원하고 칼칼한 향미가 특징임

통밀을 주원료로 한 누룩은 감산미가 높고 부드러우며 맛이 풍부하였으며 누룩 제조방법에 따라 쓴맛, 떫은맛, 바디감의 차이가 나타났다. 또한 과일향, 단향, 신향 등 복합적으로 풍부하게 나타나고 누룩 제조 특징에 따라 강도의 차이가 있었다. 밀가루는 전통주 특유의 감칠맛 증가에 기여하는 것 같았으며 맛이 부드럽고 쓴맛, 떫은맛이 약하며 깔끔하고 향미가 풍부한 양조특성을 보였다. 특히 부원료로 녹두가 들어가 녹두 주원료 누룩의 전통주와 유사한 과일향을 나타내었다.

통보리를 주원료로 제조한 누룩은 단맛은 약하지만 신맛과 쓴맛, 떫은맛이 조화를 이루어 바디감이 높았으며 맥주와 유사한 곡물 특유의 바디감이 특징으로 나타났다. 향기는 달콤하지 않으나 곡물 특유의 향이 있고 씹싸름한 향이 풍부하여 독특한 향기특성을 나타냈다. 쌀과 찹쌀로 제조한 누룩은 단맛이 강하고 발효가 안정적으로 진행되어 적당한 알코올이 생성되었으며 발효 후 약간의 쓴맛과 떫은맛이 남아있었다. 녹두는 단맛과 신맛이 조화를 이뤄 음용 시 부드럽고 바디감을 가지는 것이 특징으로 떫은맛, 쓴맛이 낮아 음용감도 양호하였다. 특히 과일향이 풍부하며 바디감이 강한 특징을 보였다.

원료별 종합적인 관능 특징을 종합해보면, 밀(통밀/밀가루/밀기울)을 주원료로 한 누룩들은 다른 주원료들과 비교해 전반적으로 양호한 발효과정을 가지며 맛이 풍부하고 일반적인 전통주의 다양한 향미를 가졌다. 그리고 보리(통보리)를 주원료로 한 누룩들은 보리에서 유래되는 독특한 향미와 다소 거친 바디감이 강했으며, 쌀(찹쌀/쌀)을 주원료로 한 누룩들은 맛과 향이 다른 누룩에 비해 부드러운 경향을 보였다. 녹두는 특징적으로 주원료(24

백수환동주곡, 26 녹미주곡)와 부원료(21 조곡법, 23 향온곡, 30 면곡, 31 곡, 25 내분비전곡)로 사용한 누룩으로 제조한 전통주는 과실향이 강했으며 신맛과 단맛의 감산미의 조화로 과실주와 같은 특징을 보였다.

한편 누룩에 사용된 부재료들의 종류에 따른 관능특성을 분석한 결과, 녹두 및 녹두즙이 함유된 누룩으로 제조된 전통주는 과실향 및 꽃향이 강한 특징을 갖고 관능 선호도가 높았다. 또한 여뀌즙이 함유된 누룩으로 제조된 전통주는 감칠맛과 단맛이 부드러운 조화의 맛과 향을 갖는 것으로 나타났다. 반면 식물약재들이 혼합된 누룩들로 제조된 전통주는 발효속도가 느리고 낮은 알코올 생성율을 보였으며 약재에서 유래되는 쓴맛과 거친 성분들로 인해 맛과 향이 강한 특징을 갖는 것으로 나타났다. 본 연구결과를 종합하면, 누룩에 사용된 원재와 부재료의 종류에 따라 전통주의 관능품질이 결정되는 것으로 나타났는데 이와 같은 결과가 재료의 직접적인 영향인지 발효과정 중의 대사사산물의 다양성 차이에서 오는 것인지 향후 발효과정 중 미생물과 대사산물의 상관성 분석 연구를 통해 밝혀져야 할 것이다.

본 연구에서 제조누룩 46종 중 당화가 불가능했던 3종을 제외한 43종의 알코올 수치는 9.95~18.20%(평균 14.99%, 발효비율 67.2%)이었고 시판누룩 12종은 9.03~18.82%(평균 15.16%, 발효비율 67.96%)로 큰 차이는 없었다. 1차 선별에서 제외된 30종은 반복 실험에도 불구하고, 당화불가(3종), 산패(10종), 관능 비선호(17종)의 이유로 제외되었다. 아래 표 2-1-4 주/부원료의 종류에 따라 선별 누룩들과 비선별된 누룩들의 원료 종류를 볼 수 있다.

표 2-1-4. 1차 선별 및 비선별 구분 (주/부원료별 구분)

주원료	부원료	계	선별 (28종)	비선별 (30종)		
				당화 불가	산패	관능 비선호
통밀 (21종)	녹두+여뀌	1	1	1	1	7
	도꼬마리즙	1	0			
	밀가루+녹두	1	0			
	쌀	1	1			
	약재	1	1			
	참쌀	1	1			
	없음	15	8			
	합계	21	12			
밀가루 (9종)	녹두+약재	1	1	1	2	1
	녹두+황미	1	1			
	약재+팥	1	1			
	약재	1	0			
	참쌀+약재	2	0			
	참쌀	1	0			
	없음	2	1			
	합계	9	4			
밀기울 (3종)	녹두+여뀌	1	1	1	1	
	녹두	1	1			
	없음	1	0			
	합계	3	2			
통보리 (7종)	녹두	2	1	1	1	1
	도꼬마리즙	1	0			
	밀가루	1	1			
	약재	1	0			
	없음	2	1			
	합계	7	3			

주원료	부원료	계	선별 (28종)	비선별 (30종)		
				당화 불가	산패	관능 비선호
참쌀 (9종)	밀가루+여뀌	1	1			
	밀가루	2	1		1	
	약재	2	0		1	1
	여뀌	2	1	1		
	없음	2	1		1	
	합계	9	4	1	3	1
쌀 (4종)	없음	4	1		1	2
	합계	4	1		1	2
녹두 (4종)	참쌀+약재	1	0			1
	참쌀	2	2			
	쌀	1	0	1		
	합계	4	2	1		1
메밀 (1종)	약재+팥	1	0		1	
	합계	1	0		1	
총합계		58	28	3	10	17

이는 누룩의 제조방법 뿐만 아니라 사용된 주/부원료의 종류도 전통주의 주질에 직간접인 영향을 주는 것으로 보인다. 주원료로 통밀이 사용되는 누룩들의 양조적성이 상대적으로 높아 선별비율이 높았고, 녹두가 주원료 또는 부원료로 들어간 경우도 선별비율도 높았다 (표 2-1-5).

표 2-1-5. 누룩 주원료별 관능 선별표

주원료	계	선별 (28종)	비선별 (30종)			선별비율
			당화 불가	산패	관능 비선호	
통밀	21	12		1	8	57.1%
밀가루	9	4		1	4	44.4%
밀기울	3	2		1		66.7%
통보리	7	3	1	2	1	42.9%
참쌀	9	4	1	3	1	44.4%
쌀	4	1		1	2	25.0%
녹두	4	2	1		1	50.0%
메밀	1	0		1		0.0%
총계	58	28	3	10	17	48.3%

그리고 부원료들의 종류에 따라 구분해 보았을 때, 녹두 및 녹두(즙)이 함유된 누룩으로 제조된 주질에서 과실향 및 꽃향이 풍부하게 느껴지는 등 관능적 선호도가 높았다. 그리고 여뀌즙이 함유된 누룩들로 제조된 전통주들은 감칠맛과 단맛이 부드러운 조화의 맛과 향을 나타냈다. 반면에 약재들이 혼합된 누룩들로 제조된 전통주들은 약재에서 유래되는 쓰고 거친 맛과 향이 강했다. 그리고 약재들이 함유된 누룩들로 제조된 전통주들은 다른 누룩들과 비교해 발효가 지체되고 알코올 생성이 낮았다. 이는 약재들의 항균활성 등에 기인하는 것으로 생각되며, 전체적으로 주질의 조화도는 떨어지는 것으로 나타났다(표 2-1-6).

표 2-1-6. 누룩 부원료별 관능 선별표

부원료	계	선별	비선별			선별비율
			당화 불가	산패	관능 비선호	
약재 혼합	11	3		3	5	27.3%
녹두(즙)	8	6	1		1	75.0%
여뀌즙	5	4	1			80.0%
도꼬마리즙	2	0		1	1	0.0%
팥	2	0		1	1	0.0%
황미	1	1				100.0%

가. 1차 선별 누룩 전통주들의 세부 관능 분석

1차 선별된 28종의 맛과 향의 세부 관능분석은 아래 표 5과 같이 나타났다. 관능 분석은 훈련된 전통주 전문가들이 단맛, 신맛, 바디감, 부드러움, 쓴맛, 떫은맛의 6가지 맛과 단향, 신향, 과실향, 쓴향, Off-flavor(부정적인 향), 기타향(독특한 향, 약재 및 통보리 원료에 주로 느껴짐)의 6가지 향의 강도를 5점 척도로 나타내었다. 점수가 높을수록 맛과 향의 강도가 높음을 의미한다(표 2-1-7).

표 2-1-7. 1차 선별 누룩 28종 세부 관능 분석

누룩 번호	누룩 명	단맛	신맛	바디감	부드러움	쓴맛	떫은맛	단향	신향	과실향	쓴향	Off-flavor	기타향	관능 점수
2	추모곡	2.5	2.9	4.3	2.6	3.6	2.7	2.3	2.6	2.0	3.2	2.0	3.1	3.5
3	오메기곡	2.5	3.1	4.5	2.7	3.7	2.8	2.4	2.0	2.1	3.0	2.6	3.3	4.4
4	죽곡	2.8	3.4	2.8	3.5	2.4	2.2	3.4	2.8	2.6	2.0	0.0	0.6	3.7
5	죽곡	2.3	4.1	2.7	3.5	2.6	2.4	3.4	3.2	2.5	1.9	1.0	0.4	3.7
7	곡	1.7	4.3	2.9	2.6	2.5	3.2	4.0	3.8	3.2	1.2	0.0	2.6	3.0
10	진주춘주곡	2.2	3.3	3.3	2.7	2.5	3.0	3.0	1.5	3.3	1.1	0.0	0.4	3.4
11	여곡	3.4	2.5	2.8	2.8	3.1	3.2	2.9	2.5	2.8	1.2	0.5	1.6	2.3
15	백곡	3.2	2.4	3.2	4.2	1.6	1.5	3.4	2.4	3.5	1.0	0.5	1.0	3.7
17	분곡	2.7	2.6	2.8	4.1	2.0	1.7	3.6	2.5	3.3	0.8	0.5	0.4	3.4
19	이화주곡	3.8	2.8	3.0	3.2	2.5	2.6	2.5	1.9	3.0	1.0	1.0	1.0	3.4
21	조곡법	2.8	3.4	4.1	3.4	2.4	2.0	3.2	1.7	3.9	1.2	0.5	1.0	3.7
23	향온곡	3.4	2.6	4.5	4.0	3.0	2.5	3.4	1.8	3.5	2.0	0.5	1.3	4.4
24	백수환동주곡	3.3	3.3	3.8	3.9	2.0	1.5	4.0	2.5	4.2	0.7	0.0	1.8	4.4
25	내부비전곡	3.0	2.6	3.7	4.1	1.8	2.5	3.0	2.0	3.8	2.0	0.5	2.3	3.7
26	녹미주곡	3.3	3.2	3.9	3.8	2.5	1.7	3.7	2.4	4.2	1.2	0.5	2.0	3.0
29	미곡	3.4	1.9	3.5	3.3	3.0	2.4	2.8	1.7	2.2	1.8	0.5	1.8	3.7
30	면곡	3.2	2.5	3.8	3.0	1.6	1.5	3.3	1.7	4.0	1.0	0.0	2.3	4.4
31	곡	2.8	2.6	3.5	3.4	2.1	2.4	3.6	2.0	3.9	1.0	0.0	2.2	3.0
32	요곡	2.6	2.7	3.1	3.0	3.7	3.0	3.8	2.0	2.3	1.4	0.0	1.0	3.7
33	대주백타곡	2.1	2.9	3.5	3.2	2.9	3.2	3.0	3.3	2.5	2.2	0.0	2.5	4.1
41	동양주곡	3.0	2.4	3.4	3.7	2.7	2.5	4.0	1.2	3.1	2.4	1.5	2.5	4.1
44	신곡2	2.5	2.4	3.2	3.6	3.7	2.7	4.0	1.6	2.3	2.4	1.0	2.7	3.7
49	시관누룩	2.7	2.8	3.0	2.5	2.6	2.3	3.5	2.0	2.8	1.5	0.5	0.5	3.7
50	시관누룩	2.4	3.4	2.8	2.4	2.3	2.8	4.5	1.5	3.0	1.6	0.0	1.0	3.0
54	자가제조	2.3	2.5	3.2	2.0	2.5	3.7	3.5	1.5	2.6	1.8	0.5	1.0	3.7
55	자가제조	2.0	3.1	3.7	3.6	2.3	2.9	3.0	3.0	3.6	1.3	2.0	2.6	3.7
57	자가제조	2.6	3.2	3.4	3.1	2.6	2.2	4.0	2.0	3.3	1.0	0.5	0.5	4.8
58	자가제조	2.8	2.8	3.3	2.8	2.9	2.7	2.5	1.5	3.2	2.0	0.5	1.6	4.4

본 결과를 기반으로 누룩별 주원료에 따라 관능강도를 분산형 그래프로 표현하였다. 그림 2-1-2에서 볼 수 있듯이 맛의 관능 측면에서의 주원료에 따른 특성은 아래와 같다.

- ① 통밀: 감산미가 높고 부드러우며 맛이 풍부함. 누룩 제조방법에 따라 쓴맛, 떫은맛, 바디감의 차이가 나타남.
- ② 밀가루: 약주 특유의 감칠맛이 있으며 맛이 매우 부드러움. 단맛은 양호하고 쓴맛, 떫은맛이 약하며 맛이 깔끔하여 입안에서 맛이 빨리 사라짐.
- ③ 밀기울: 바디감과 감산미가 조화로움.
- ④ 통보리: 단맛은 약하지만 신맛과 쓴맛, 떫은맛이 조화를 이루어 바디감이 풍부하게 느껴짐. 마치 맥주와 유사한 곡물 특유의 바디감이 두드러짐.
- ⑤ 쌀/찹쌀: 단맛이 높고 발효가 안정적으로 진행되어 알코올이 양호해 쓴맛과 떫은맛이 남음. 깔끔한 바디감은 곡주의 느낌을 줌.
- ⑥ 녹두: 단맛과 신맛이 조화를 이뤄 음용시 부드럽고 바디감을 가지는 것이 특징으로 떫은맛, 쓴맛이 낮아 음용감도 양호.

그리고 향의 관능 측면에서 주원료에 따른 특성은 아래와 같다.

- ① 통밀: 과실향, 단향, 신향 등 복합적으로 풍부하게 나타나고 누룩 제조 특징에 따라 강도의 차이가 있음.
- ② 밀가루: 기존 약주에서 느껴지는 과실향과 단향이 두드러지며, 향이 은은함.
- ③ 밀기울: 풍부한 향미가 조화로움. 부재료로 녹두가 들어가 녹두 주원료 누룩의 전통주와 유사한 과실향이 두드러지는 느낌.
- ④ 통보리: 달콤하지 않으나 곡물 특유의 향이 있고 씹싸름한 향이 풍부하여 거칠고 독특하게 느껴짐.
- ⑤ 쌀/찹쌀: 달콤, 새콤한 향이 있고 향의 강도가 약하게 은은하게 나타남.
- ⑥ 녹두: 자두와 살구처럼 상큼한 과실향이 풍부하며 후기에 꽃향이 은은하게 나타남.

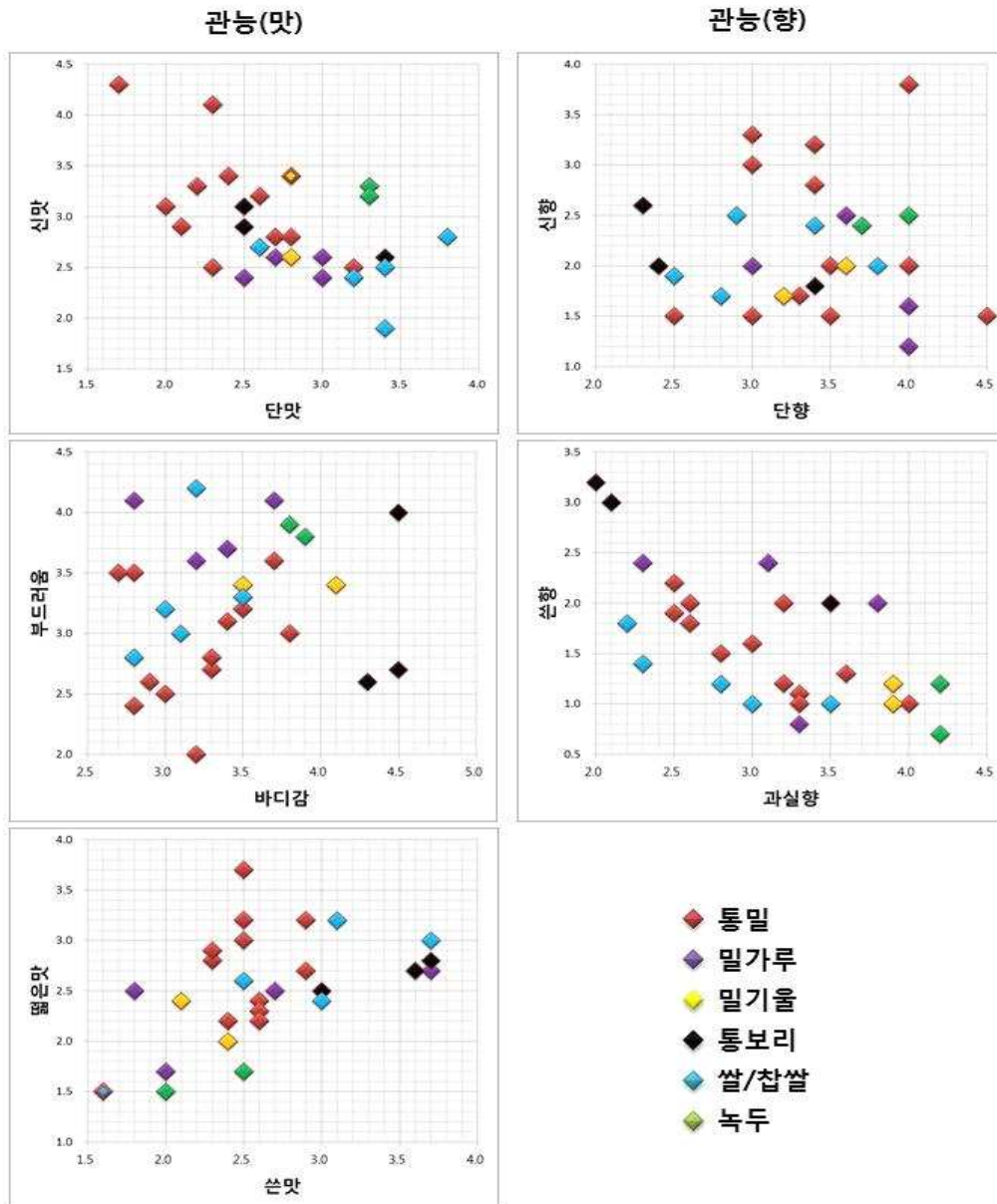


그림 2-1-2. 누룩 주원료별 담금주의 맛과 향의 관능 상관관계

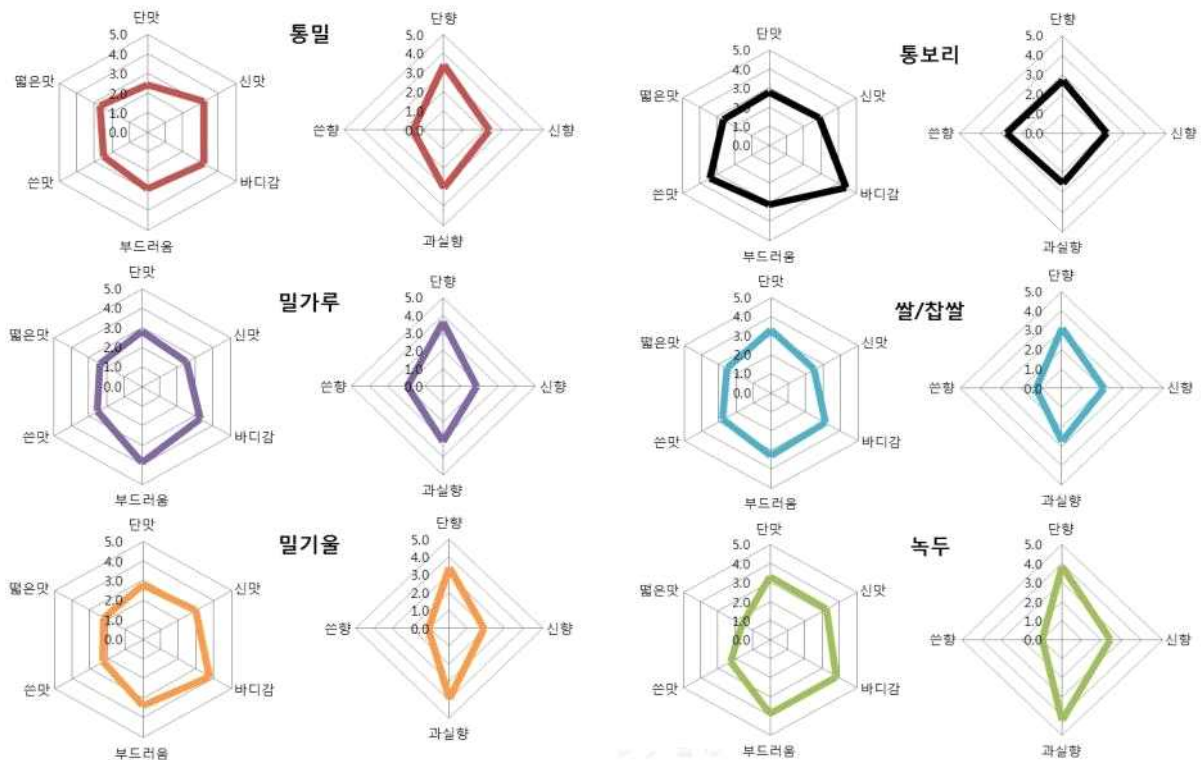


그림 2-1-3. 누룩 원료별 전통주 관능 스파이더맵

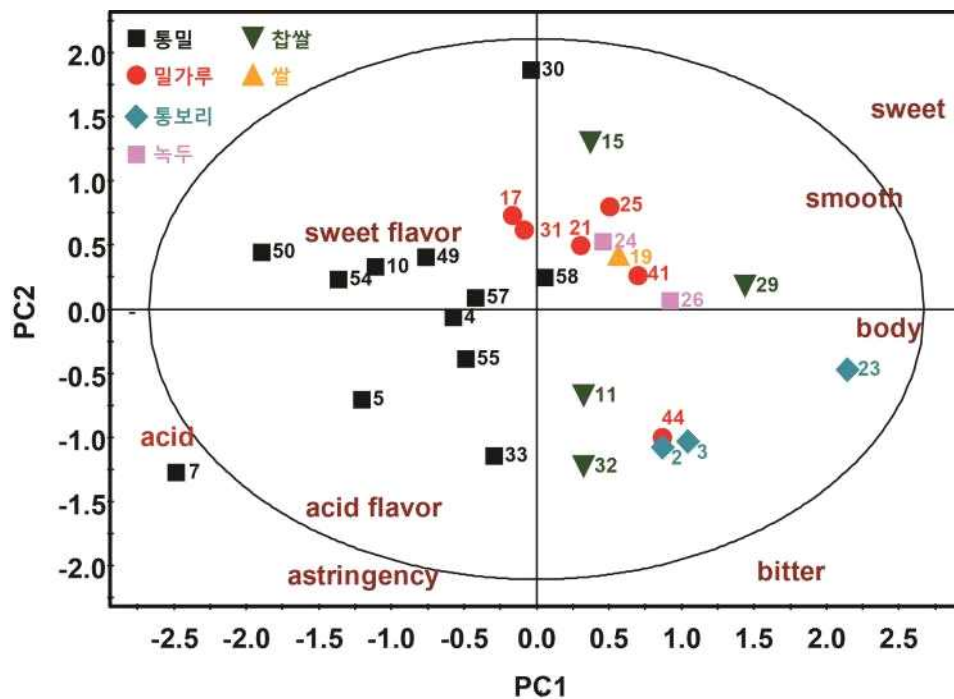


그림 2-1-4. 누룩 주원료에 따른 전통주 관능특성

원료별 종합적인 관능 특징을 종합해보면, 밀(통밀/밀가루/밀기울)을 주원료로 한 누룩들은 다른 주원료들과 비교해 전반적으로 양호한 발효과정을 가지며 맛이 풍부하고 일반적인 약주의 다양한 향미를 가진다. 그리고 보리(통보리)를 주원료로 한 누룩들은 보리에서 유래되는 독특한 향미와 다소 거친 바디감이 풍부했고, 쌀(찹쌀/쌀)을 주원료로 한 누룩들은 부드러운 맛과 향이 은은하고 부드러웠다. 녹두는 특징적으로 주원료(24 백수환동주곡, 26 녹미주곡)와 부원료(21 조곡법, 23 향온곡, 30 면곡, 31 곡, 25 내분비전곡)로 사용한 누룩들에서 공통적으로 과실향미가 두드러지며 새콤달콤한 감산미의 조화가 나타나 과실주 같은 느낌이 살아있었다. 결국 누룩에 사용된 원부재료의 종류에 따라 주질이 특징지어지는 것으로 나타났는데, 이것이 원부재료의 직접적인 영향인지, 원부재료의 다양성에 따른 미생물 군집의 다양성 차이에서 오는 것인지는 현재로서는 명확하지 않고, 추가적인 미생물 군집분석 및 대사체 분석이 필요할 것으로 사료된다.

2절 전통 누룩의 유래 미생물 자원 확보

1. 전통 누룩의 미생물 자원 확보 및 특성 분석

가. 전통누룩 유래 효모 분리 동정 및 알코올 발효력 측정

재현 전통누룩 및 수집/자가 제조누룩에서 분리한 균주의 morphology 특성 및 18S rRNA gene sequence 결과 *Saccharomyces* 250종, *Wickerhamomyces* 66종, *Saccharomycopsis* 28종, *Pichia* 14종, *Clavispora* 7종, *Kluyveromyces* 5종, *Cryptococcus* 5종, *Meyerozyma* 2종, *Ogataea* 2종, *Candida* 1종, *Filobasidiella* 1종 등 381종이 분리되었다.

알코올 발효능이 뛰어난 효모의 선별을 위하여 입국당화액과 듀랍관을 이용하여 시간대별 (24, 48시간) 알코올 발효능을 측정한 결과는 표 2-2-1와 같다. *Saccharomyces* sp. 274균주, *Wickerhamomyces* sp. 98균주, *Saccharomycopsis* sp. 34균주, *Pichia* sp. 17균주, *Clavispora* sp. 7균주 등 총 458개의 효모를 이용하여 실험하였고, 듀랍관의 가스발생정도에 따라 듀랍관이 수면위로 떠오르는 균주를 ++, 듀랍관 안에 가스가 2/3 이상 찬 균주를 +, 2/3 미만인 균주를 - 로 표시하여 나타내었다. 24시간 발효 후 듀랍관이 수면 위로 떠오른 균주는 162균주로 모두 *Saccharomyces* sp. 로 동정된 효모였고 이들 균주의 알코올 함량을 측정하였다.

표 2-2-1. 분리한 효모의 동정결과 및 듀랍관에서의 알코올 발효능

누룩명	Yeast No.	동정결과 (분류명)	similarity (%)	발효시간	
				24 hr	48 hr
No. 1 주곡방문	Reyl-1	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99		+
	Reyl-2	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99		+
	Reyl-3	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99		+
	Reyl-4	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99	+	++
	Reyl-5	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99	+	++
	Reyl-6	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99		+
	Reyl-7	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99		+

누룩명	Yeast No.	동정결과 (분류명)	similarity (%)	발효시간	
				24 hr	48 hr
No. 2 추모곡	ReY2-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++
	ReY2-2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++
	ReY2-3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++
	ReY2-4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++
	ReY2-5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY2-6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++
	ReY2-7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++
	ReY2-8	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++
No. 3 오메기곡	ReY3-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++
	ReY3-2	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99	++	++
	ReY3-3	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99	++	++
	ReY3-4	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99	++	++
	ReY3-5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY3-6	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99	+	++
	ReY3-7	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99	+	++
	ReY3-8	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99	+	++
No. 4 죽곡	ReY4-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY4-2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++
	ReY4-3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY4-4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY4-5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY4-6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY4-7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
No. 5 죽곡 II	ReY5-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY5-2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY5-3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY5-4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY5-5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY5-6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY5-7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
No. 6 공병곡	Y6-2	<i>Pichia guilliermondii</i>	98		+
	BY6-3	<i>Cryptococcus sp.</i>	99		+
	Rey6-1	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99		+
	Rey6-2	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99		+
	Rey6-3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	Rey6-4	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99		+
	Rey6-5	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99		+
	Rey6-6	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99		+
Rey6-7	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99		+	
No. 7 곡	Y7-T1	<i>Pichia burtonii</i>	99		+
	Y7-1	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99		+
	Y7-2	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99		+
	Y7-3	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	100		+
	Y7-4	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99		+
	Rey7-1	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99		+
	Rey7-2	<i>Pichia anomala</i>	99		+
	Rey7-3	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99		+
	Rey7-4	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99		+
	ReY7-5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++
	ReY7-6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
ReY7-7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++		
No. 8	ReY8-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	

누룩명	Yeast No.	동정결과 (분류명)	similarity (%)	발효시간	
				24 hr	48 hr
면곡	ReY8-2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++
	ReY8-3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY8-4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY8-5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY8-6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++
	ReY8-7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
No. 9 신곡	ReY9-1	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99	+	++
	ReY9-2	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99	+	++
	ReY9-3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY9-4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY9-5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY9-6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
No. 10 진주춘추곡	ReY10-1	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99	+	++
	ReY10-2	<i>Pichia anomala</i>	99	+	++
	ReY10-3	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99	+	++
	ReY10-4	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99	+	++
No. 11 여곡	ReY11-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY11-2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY11-3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY11-4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	
	ReY11-5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY11-6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
No. 12 설향곡	ReY11-7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++
	ReY12-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY12-2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY12-3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY12-4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY12-5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY12-6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	
No. 13 설향곡	ReY12-7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++
	ReY13-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY13-2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY13-3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY13-4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY13-5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY13-6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
No. 14 백곡	ReY13-7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	YF14-T1	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	99		+
	YF14-T2	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	99		+
	ReY14-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY14-2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY14-3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++
	ReY14-4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY14-5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
No. 15 백곡 II	ReY14-6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY14-7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY15-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY15-2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY15-3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
ReY15-4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++		
ReY15-5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++		

누룩명	Yeast No.	동정결과 (분류명)	similarity (%)	발효시간	
				24 hr	48 hr
	ReY15-6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY15-7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
No. 16 여곡	ReY16-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY16-2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY16-3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY16-4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY16-5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	
	ReY16-6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY16-7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
No. 17 분곡	ReY17-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY17-2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++
	ReY17-3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY17-4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY17-5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+	++
	ReY17-6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+	++
	ReY17-7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+	++
No. 18 병곡	Y18-T1	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	99		+
	Y18-T2	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	99		+
	Y18-T3	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	99		+
	ReY18-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++
	ReY18-2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++
	ReY18-3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++
	ReY18-4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++
	ReY18-5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++
	ReY18-6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
ReY18-7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++		
No. 19 이화주곡	Y19-1	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99		+
	Y19-2	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99		+
	Y19-3	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	92		+
	Y19-4	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	98		+
	Y19-6	<i>Pichia anomala</i>	99		+
	Y19-8	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99		+
	Y19-9	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	100		+
	Y19-10	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	100		+
	Y19-11	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99		+
	Y19-12	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	97		+
	Y19-14	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99	+	++
	Y19-17	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99	+	++
	Y19-18	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	91	+	++
No. 20 이화곡	Y20-6	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	99		+
	Y20-7	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99		+
	Y20-8	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	99		+
No. 21 조곡법	ReY21-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY21-2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++
	ReY21-4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++
	ReY21-5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++
	ReY21-6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++
	ReY21-7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++
No. 22 향온곡	ReY22-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++
	ReY22-2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++
	ReY22-3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	

누룩명	Yeast No.	동정결과 (분류명)	similarity (%)	발효시간	
				24 hr	48 hr
	ReY22-4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY22-5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++
	ReY22-6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++
	ReY22-7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++
No. 23 향온곡 II	ReY23-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY23-2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++
	ReY23-3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++
	ReY23-4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY23-5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++
	ReY23-6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++
	ReY23-7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++
No. 24 백수환동	Y24-1	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99		+
	Y24-2	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99		+
	ReY24-2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY24-4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY24-6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++
	ReY24-7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++
No. 25 내부비전곡	Y25-T1	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	99		+
	Y25-T2	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	100		+
	ReY25-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++
	ReY25-2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++
	ReY25-3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++
	ReY25-4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY25-5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++
	ReY25-6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++
ReY25-7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+	++	
No. 26 녹미주곡	ReY26-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++
	ReY26-2	<i>Saccharomyces bayanus</i>	99	++	+++
	ReY26-3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY26-4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++
	ReY26-5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	98	++	+++
	ReY26-6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY26-7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++
No. 27 녹두곡	Y27-1	<i>Cryptococcus albidus</i>	100		+
	Y27-2	<i>Cryptococcus albidus</i>	100		+
	ReY27-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
No. 28 곡	Y28-1	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99		+
	Y28-2	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99		+
	Y28-3	<i>Pichia guilliermondii</i>	91		+
	Y28-4	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	96		+
	Y28-T5	<i>Pichia burtonii</i>	99		+
	ReY28-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY28-2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY28-3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY28-4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY28-5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY28-6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
ReY28-7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++		
No. 29 미곡	Y29-3	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99		+
	Y29-4	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	100		+
	ReY29-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++

누룩명	Yeast No.	동정결과 (분류명)	similarity (%)	발효시간	
				24 hr	48 hr
	ReY29-2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++
	ReY29-3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++
	ReY29-4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY29-5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY29-6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++
	ReY29-7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++
	No. 30 면곡	ReY30-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++
ReY30-2		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++
ReY30-3		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++
ReY30-4		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++
ReY30-5		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
ReY30-6		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++
ReY30-7		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++
No. 31 곡	Y31-1	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99		+
	Y31-2	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99		+
	Y31-3	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99		+
	Y31-4	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99		+
	Y31-5	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99		+
	ReY31-4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY31-7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++
No. 32 요곡	Y32-1	<i>Clavispora lusitania</i>	99		+
	Y32-2	<i>Clavispora lusitania</i>	99		+
	Y32-3	<i>Clavispora lusitania</i>	99		+
	Y32-4	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	100		+
No. 33 대주백타곡	Y33-1	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	99		+
	Y33-2	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99		+
	Y33-3S	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99		+
	Y33-4	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99		+
	Y33-5	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99		+
	Y33-6	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99		+
No. 34 백료곡	ReY34-4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY34-6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
No. 35 양농곡	ReY35-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++
	ReY35-2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY35-3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY35-4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++
	ReY35-5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY35-6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY35-7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
No. 36 백주곡	ReY36-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++
	ReY36-2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++
	ReY36-3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY36-4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY36-5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++
	ReY36-6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++
	ReY36-7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
No. 37 백주곡	Y37-1	<i>Cyberlindnera fabianii</i>	100		+
	Y37-2	<i>Cyberlindnera fabianii</i>	100		+
	Y37-T1	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	90		+
	Y37-T2	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	90		+
	Y37-T3	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	90		+

누룩명	Yeast No.	동정결과 (분류명)	similarity (%)	발효시간	
				24 hr	48 hr
	Y37-T4	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	90		+
	Y37-T5	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	90		+
	Rey 37-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	Rey 37-2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	Rey 37-3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	Rey 37-4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
No. 38 만전향주곡	ReY38-1	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	99		+
	ReY38-2	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	99		+
	ReY38-3	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	99		+
	ReY38-4	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	99		+
	ReY38-5	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	99		+
	ReY38-6	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	99		+
	ReY38-7	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99		+
No. 39 정화곡	ReY39-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY39-2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY39-3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY39-4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY39-5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY39-6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY39-7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
No. 40 연화곡	Rey 40-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
No. 41 동양주곡	Rey 41-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	Rey 41-2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
No. 42 미곡	Y42-1	<i>Cryptococcus albidus</i> var. <i>kuetzingii</i>	99		+
	Rey 42-1	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99		+
	Rey 42-2	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99		+
	Rey 42-3	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99		+
	Rey 42-4	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99		+
	Rey 42-5	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99		+
	Rey 42-6	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99		+
No. 43 신곡	ReY43-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY43-2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY43-3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
No. 44 신곡 II	Y44-1	<i>Meyerozyma caribbica</i>	100		+
	Y44-3	<i>Meyerozyma caribbica</i>	100		+
	Y44-T1	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	99		+
	Y44-T2	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	100		+
	Y44-T3	<i>Pichia jadinii</i>	99	+	++
	Y44-T4	<i>Brettanomyces custersianus</i>	90		+
	Rey 44-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++
	Rey 44-2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++
	Rey 44-3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++
	Rey 44-4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	Rey 44-5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	Rey 44-6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	Rey 44-7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
No. 45 신곡 III	Y45-4	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99		+
	ReY45-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY45-2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++
No. 46	ReY46-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++

누룩명	Yeast No.	동정결과 (분류명)	similarity (%)	발효시간	
				24 hr	48 hr
하동신곡	ReY46-4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
No. 47 시판누룩-1	ReY47-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++
	ReY47-3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY47-4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY47-5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
No. 48 시판누룩-2	Y48-1	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99		+
	Y48-2	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99		+
	Y48-3	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	95		+
	Y48-4	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99		+
	Y48-T2	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	95		+
	ReY48-3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++
	ReY48-4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++
	ReY48-5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
No. 49 시판누룩-3	Y49-1	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99		+
	Y49-2	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99		+
	Y49-3	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99		+
	Y49-5	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99		+
	Y49-6	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99		+
	ReY49-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++
	ReY49-2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	98	++	+++
	ReY49-3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++
	ReY49-4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100	+++	
	ReY49-5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY49-6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY49-7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
No. 50 시판누룩-4	Y50-T1	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	100	+	+
	Y50-T2	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	100		+
	Y50-T3	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	100		+
	Y50-T4	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	100		+
	Y50-1	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	95		+
	Y50-2	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	95		+
	Y50-3	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	94		+
	Y50-4	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	95		+
	Y50-5	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	92		+
	Rey 50-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	Rey 50-2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++
	Rey 50-3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++
	Rey 50-5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++
	No. 51 시판누룩-5	Y51-1	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	99	
Y51-2		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	98	++	
Y51-3		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	
ReY51-1		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
ReY51-2		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
ReY51-3		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
ReY51-4		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++
ReY51-5		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	98	++	+++
ReY51-6		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++
ReY51-7		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++
ReY51-8	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++	

누룩명	Yeast No.	동정결과 (분류명)	similarity (%)	발효시간	
				24 hr	48 hr
No. 52 시판누룩-6	Y52-5	<i>Pichia farinosa</i>	99		+
	Y52-S4	<i>Ogataea polymorpha</i>	99	+	++
	Y52-7	<i>Ogataea polymorpha</i>	99	+	++
	Y52-6	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	99	+	++
	Y52-1	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	99	+	++
	Y52-2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	95	++	
	ReY52-3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY52-6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++
No. 53 시판누룩-7	Y53-1	<i>Clavispora lusitaniae</i>	99	+	++
	Y53-3	<i>Clavispora lusitaniae</i>	99	+	++
	Y53-4	<i>Filobasidiella neoformans</i>	99		+
	Y53-5	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99	+	++
	Y53-6	<i>Cryptococcus albidus</i>	99		+
	Y53-T1	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	99	+	++
	Y53-T2	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	99	+	++
	Y53-T3	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	99		+
	Y53-T4	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	99		+
	Y53-T5	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	99		+
	ReY53-2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++
	ReY53-3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY53-4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++
ReY53-5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++	
No. 54 자가제조-1	Y54-1	<i>Clavispora lusitaniae</i>	99		+
	Y54-3	<i>Clavispora lusitaniae</i>	100		+
	Y54-4	<i>Pichia kudriavzevii</i>	99		+
	Y54-5	<i>Pichia kudriavzevii</i>	99		+
	Y54-6	<i>Pichia kudriavzevii</i>	99		+
	ReY54-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY54-2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY54-3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY54-4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++
	ReY54-5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++
	ReY54-6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++
ReY54-7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++	
No. 55 자가제조-2	Y55-1	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99		+
	Y55-3	<i>Pichia anomala</i>	99		+
No. 56 자가제조-3	Y56-1	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99		+
	Y56-2	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99		+
	ReY56-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY56-2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY56-3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++
	ReY56-4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++
	ReY56-5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++
	ReY56-6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++
ReY56-7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++		
No. 57 자가제조-4	Y57-3	<i>Candida parapsilosis</i>	99		+
	F57-W1	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	99		+
	F57-W2	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	99		+
	F57-W3	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	99	+	++
	F57-W4	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	100	+	++

누룩명	Yeast No.	동정결과 (분류명)	similarity (%)	발효시간	
				24 hr	48 hr
	F57-W5	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	99	+	++
	F57-W6	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	99	+	++
	F57-W7	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	99		+
	F57-W8	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	99		+
	F57-W9	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	99	+	++
	F57-P7	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	90	+	++
	ReY57-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY57-2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY57-3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY57-4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY57-5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY57-6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY57-7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++
No. 58 자가제조-5	Y58-1	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99		+
	Y58-2	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99	+	++
	Y58-3	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99	+	++
	Y58-4	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99	+	++
	Y58-5	<i>Pichia kudriavzevii</i>	96	+	++
	Y58-6	<i>Pichia kudriavzevii</i>	96	+	++
	Y58-7	<i>Pichia kudriavzevii</i>	93	+	++
	Y58-T1	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	99	+	++
	Y58-T2	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	99		+
	ReY58-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY58-2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++
	ReY58-3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++
	ReY58-4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY58-5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
ReY58-6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++		
ReY58-7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++	
No. 59 자가제조-6	ReY59-1	<i>Pichia kudriavzevii</i>	98		+
	ReY59-2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100	+++	
	ReY59-3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY59-4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY59-5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY59-6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++
	ReY59-7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
	ReY59-8	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	
No. 60 자가제조-7	ReY60-1	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99	+	++
	ReY60-2	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99	+	++
	ReY60-3	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99	+	++
	ReY60-4	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99		+
	ReY60-5	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99		+
	ReY60-6	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99		+

입국배지와 듀람관을 이용한 알코올발효능 실험에서 24시간 배양 후 높은 알코올 발효능을 보였던 162균주의 알코올 함량을 측정된 결과는 표 2-2-2와 같다. 분석결과 우리밀로 만든 시판누룩-6에서 분리한 ReY51-2 균주가 5.27%로 가장 높은 알코올 함량을 나타내었고, 죽곡에서 분리한 ReY28-6 균주와 백주곡에서 분리한 ReY36-3 균주가 각각 5.20, 5.12%로 높은 알코올 함량을 나타내었다.

표 2-2-2 선발효모의 입국배지에서의 알코올 함량

Yeast No.	Alcohol(%)	Yeast No.	Alcohol(%)	Yeast No.	Alcohol(%)
ReY2-5	1.73	ReY15-4	3.22	ReY39-3	3.57
ReY3-5	1.35	ReY15-5	2.82	ReY39-4	3.07
ReY4-1	1.71	ReY15-6	3.54	ReY39-5	3.14
ReY4-3	1.41	ReY15-7	3.26	ReY39-6	4.93
ReY4-4	3.56	ReY16-1	2.91	ReY39-7	3.00
ReY4-5	2.55	ReY16-2	3.03	ReY40-1	2.66
ReY4-6	3.69	ReY16-3	3.38	ReY41-1	3.48
ReY4-7	4.35	ReY16-4	3.01	ReY41-2	3.57
ReY5-1	3.29	ReY16-6	3.22	ReY43-1	4.05
ReY5-2	4.57	ReY16-7	2.96	ReY43-2	4.06
ReY5-3	4.03	ReY17-1	2.88	ReY43-3	3.45
ReY5-4	3.65	ReY17-3	1.74	ReY44-4	4.41
ReY5-5	4.61	ReY17-4	1.76	ReY44-5	3.33
ReY5-6	3.66	ReY18-6	1.60	ReY44-6	3.46
ReY5-7	3.50	ReY18-7	1.54	ReY44-7	3.33
ReY6-3	3.13	ReY21-1	3.09	ReY45-1	3.62
ReY7-6	3.46	ReY22-3	3.39	ReY46-4	2.33
ReY7-7	3.67	ReY22-4	3.15	ReY47-3	4.14
ReY8-1	3.10	ReY23-1	3.24	ReY47-4	4.20
ReY8-3	2.68	ReY23-4	3.40	ReY47-5	3.03
ReY8-4	3.80	ReY24-2	4.75	ReY48-5	4.56
ReY8-5	2.95	ReY24-4	4.70	ReY48-6	4.10
ReY8-7	3.07	ReY25-4	4.27	ReY49-4	3.45
ReY9-3	3.61	ReY26-3	3.28	ReY49-5	3.47
ReY9-4	2.64	ReY26-6	3.22	ReY49-6	3.63
ReY9-5	4.14	ReY27-1	0.82	ReY49-7	4.02
ReY9-6	3.61	ReY28-1	3.27	ReY50-1	4.38
ReY9-7	2.87	ReY28-2	3.22	ReY51-1	4.78
ReY11-1	3.27	ReY28-3	3.41	ReY51-2	5.27
ReY11-2	3.32	ReY28-4	3.08	ReY51-3	4.78
ReY11-3	2.74	ReY28-5	2.66	ReY52-3	4.39
ReY11-5	3.99	ReY28-6	5.20	ReY53-3	1.83
ReY11-6	3.81	ReY28-7	5.11	ReY54-1	1.99
ReY12-1	2.53	ReY29-4	3.54	ReY54-2	4.18
ReY12-2	2.98	ReY29-5	3.04	ReY54-3	2.19
ReY12-3	3.06	ReY30-1	4.90	ReY56-1	2.07
ReY12-4	3.90	ReY30-5	3.58	ReY56-2	2.78
ReY12-5	3.83	ReY31-4	2.52	ReY56-7	2.44
ReY13-1	2.81	ReY34-4	2.73	ReY57-1	3.00
ReY13-2	3.09	ReY34-6	3.10	ReY57-2	2.83
ReY13-3	3.05	ReY35-2	2.98	ReY57-3	3.10
ReY13-4	3.14	ReY35-3	4.37	ReY57-4	2.82
ReY13-5	4.37	ReY35-5	4.44	ReY57-5	4.00
ReY13-6	3.04	ReY35-6	2.22	ReY57-6	4.00
ReY13-7	2.87	ReY35-7	2.51	ReY58-1	2.73
ReY14-1	3.47	ReY36-3	5.12	ReY58-4	2.46
ReY14-2	3.36	ReY36-4	4.06	ReY58-5	2.44
ReY14-4	3.89	ReY36-7	4.11	ReY58-6	3.05
ReY14-5	3.13	ReY37-1	3.16	ReY59-2	2.50
ReY14-6	3.57	ReY37-2	2.61	ReY59-3	1.74
ReY14-7	2.88	ReY37-3	3.03	ReY59-4	2.27

Yeast No.	Alcohol(%)	Yeast No.	Alcohol(%)	Yeast No.	Alcohol(%)
ReY15-1	2.75	ReY37-4	2.93	ReY59-5	2.83
ReY15-2	3.31	ReY39-1	3.05	ReY59-7	3.80
ReY15-3	3.29	ReY39-2	3.54	ReY59-8	2.00

나. 전통누룩 유래 곰팡이 분리 동정 및 전분분해 활성 측정

재현 전통누룩 및 수집/자가 제조누룩에서 분리한 균주의 morphology 특성 및 18S rRNA gene sequence 결과 곰팡이는 총 252 균주로 *Aspergillus* 136종, *Penicillium* 38종, *Mucor* 20종, *Rhizomucor* 18종, *Rhizopus* 5종, *Syncephalastrum* 3종, *Emericella* 2종, *Biscogniauxia* 2종, *Amylomyces* 1종, *Aureobasidium* 1종, *Bjerkandera* 1종, *Galactomyces* 1종 이었다(표 2-2-3).

각 누룩으로 부터 순수분리한 곰팡이를 전분배지에 접종하여 전분분해 활성을 확인 하였다. 전분분해 활성은 iodine solution으로 염색하여 나타난 clear zone의 지름과 곰팡이가 자란 범위의 차로 나타내었다(표 2-2-4, 그림 2-2-1). 추모곡에서 분리한 F2-YG3균주와 백료곡에서 분리한 F34-YG5T균주의 전분분해 활성이 2cm로 가장 높았다. *phopichia* 1종, *Xylaria* 1종 등 230 종이 분리되었다.

표 2-2-3. 전통누룩에서 분리한 곰팡이 동정결과 및 콜로니 외관

누룩명	sample name	동정결과 (분류명)	similarity (%)	콜로니 외관
No. 1 주곡방분	F1-BG1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	99	곰팡이, 청록색포자
	F1-BG4	<i>Penicillium polonicum</i>	99	곰팡이, 청록색포자, 청록색주위에 뚜렷한 흰색원
	F1-B6	<i>Rhizomucor variabilis</i>	99	곰팡이, 갈색포자
	F1-GW2	<i>Aspergillus oryzae</i>	99	곰팡이, 연두색 포자위로 포슬포슬한 흰색 균사체
No. 2 추모곡	F2-YG1	<i>Aspergillus oryzae</i>	98	곰팡이, 연두색 포자, <i>Aspergillus</i> sp.
	F2-YG2	<i>Aspergillus oryzae</i>	98	
	F2-YG3	<i>Aspergillus oryzae</i>	98	
	F2-YG4	<i>Aspergillus oryzae</i>	98	
	F2-YG5	<i>Aspergillus oryzae</i>	98	
	F2-W8	<i>Mucor circinelloides</i>	99	곰팡이, 갈색 포자
	F2-R6	<i>Rhizopus</i> sp.	99	흰색솜털(<i>Rhizopus</i>)
F2-R7	<i>Rhizopus oryzae</i>	99		
No. 3 오메기곡	F3-YG3	<i>Aspergillus oryzae</i>	99	곰팡이, 연두색 포자, <i>Aspergillus</i> sp.
	F3-BG1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	98	곰팡이, 청록색 포자
	F3-BG2	<i>Aspergillus fumigatus</i>	98	곰팡이, 청록색 포자
	F3-BG3	<i>Xylaria arbuscula</i>	98	곰팡이, 청록색 포자
	F3-B2	<i>Mucor circinelloides</i>	99	곰팡이, 갈색 포자
No. 4 죽곡	F4-GW1	<i>Aspergillus oryzae</i>	99	곰팡이, 초록색 포자위에 흰색 포슬포슬한 균사체
	F4-GW2	<i>Aspergillus</i> sp.	95	
	F4-GW3	<i>Aspergillus oryzae</i>	94	
	F4-GW4	<i>Aspergillus</i> sp.	95	
	F4-GW6	<i>Aspergillus oryzae</i>	97	곰팡이, 연두색 포자, <i>Aspergillus</i> sp.
No. 5 죽곡 II	F5-GW1	<i>Aspergillus</i> sp.	98	곰팡이, 초록색 포자위에 흰색 포슬포슬한 균사체
	F5-GW7	<i>Aspergillus oryzae</i>	95	
	F5-YG3	<i>Aspergillus oryzae</i>	95	

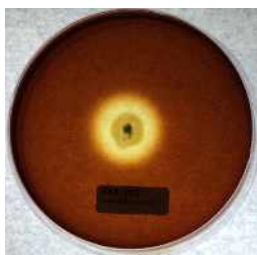
누룩명	sample name	동정결과 (분류명)	similarity (%)	콜로니 외관
	F5-YG6	<i>Aspergillus sp.</i>	95	곰팡이, 연두색 포자, <i>Aspergillus sp.</i>
	F5-YG8	<i>Aspergillus oryzae</i>	98	
No. 6 공병곡	F6-GW1	<i>Aspergillus oryzae</i>	98	곰팡이, 초록색 포자위에 흰색 포슬포슬한 균사체
	F6-GW2	<i>Aspergillus sp.</i>	99	
	F6-GW4	<i>Aspergillus oryzae</i>	93	
	F6-GW5	<i>Aspergillus oryzae</i>	93	
No. 7 곡	F7-BL1	<i>Rhizomucor variabilis</i>	99	곰팡이, 검은색 포자
	F7-BL2	<i>Rhizomucor variabilis</i>	99	
	F7-BL3	<i>Rhizomucor variabilis</i>	99	
No. 8 면곡	F8-W1	<i>Rhizopus oryzae</i>	99	곰팡이, 흰색포자, <i>Rhizopus sp.</i>
	F8-1	<i>Aspergillus oryzae</i>	99	곰팡이, 연두색 포자, <i>Aspergillus sp.</i>
	F8-2	<i>Aspergillus oryzae</i>	99	
	F8-3	<i>Aspergillus oryzae</i>	99	
No. 9 신곡	F9-11-1	<i>Aspergillus oryzae</i>	99	곰팡이, 초록색과 흰색의 포자가 섞여있음
	F9-B1	<i>Emericella sp.</i>	99	곰팡이, 청록색 포자, 뒷면은 갈색
	F9-B2	<i>Emericella nidulans</i>	96	
	F9-BG1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	99	곰팡이, 진청록색 포자, 뒷면은 흰색
	F9-BG2	<i>Aspergillus fumigatus</i>	98	
	F9-BG3	<i>Aspergillus fumigatus</i>	99	
	F9-BG4	<i>Aspergillus fumigatus</i>	99	
	F9-R1	<i>Syncephalastrum racemosum</i>	98	곰팡이, 흰색포자, <i>Rhizopus sp.</i>
	F9-R2	<i>Syncephalastrum racemosum</i>	98	
	F9-R3	<i>Syncephalastrum racemosum</i>	95	
F9-14	<i>Aspergillus terreus</i>	99	곰팡이, 황토색 포자	
No. 10 진주춘추곡	F10-YG1	<i>Aspergillus oryzae</i>	99	곰팡이, 연두색 포자, <i>Aspergillus sp.</i>
	F10-YG2	<i>Aspergillus oryzae</i>	99	
	F10-YG3	<i>Aspergillus oryzae</i>	99	
	F10-YG4	<i>Aspergillus oryzae</i>	99	
	F10-W4	<i>Aspergillus oryzae</i>	99	
No. 11 여곡	F11-BG16	<i>Aspergillus fumigatus</i>	99	곰팡이, 청록색 포자, 뒷면은 흰색
	F11-G1	<i>Aspergillus oryzae</i>	97	곰팡이, 연두색 포자, <i>Aspergillus sp.</i>
	F11-G2	<i>Aspergillus oryzae</i>	99	
	F11-R1	<i>Mucor circinelloides</i>	99	곰팡이, 흰색포자, <i>Rhizopus sp.</i>
	F11-R2	<i>Mucor circinelloides</i>	99	
No. 12 설향곡	F12-BG1	<i>Penicillium chrysogenum</i>	99	곰팡이, 청록색 포자
	F12-BG3	<i>Penicillium chrysogenum</i>	99	곰팡이, 청록색 포자
	F12-1	<i>Aspergillus oryzae</i>	99	곰팡이, 연두색 포자, <i>Aspergillus sp.</i>
	F12-1-1	<i>Aspergillus oryzae</i>	99	
	F12-2	<i>Aspergillus oryzae</i>	99	
	F12-W1	<i>Aspergillus oryzae</i>	99	
	FY12-1	<i>Hyphopichia burtonii</i>	98	털있는 효모 or 흰색곰팡이
No. 14 백곡	F14-B2	<i>Aspergillus oryzae</i>	99	곰팡이, 연두색 포자, <i>Aspergillus sp.</i>
	F14-B3	<i>Aspergillus oryzae</i>	98	항생제배지에서 자라는 모습은 달라 보였으나 B, W, YG 모두 같은 종류의 곰팡이 같음(YG, <i>Aspergillus</i>) 연두색 포자가 자라는 속도가 조금씩틀린거 같음
	F14-W1	<i>Aspergillus oryzae</i>	99	
	F14-W2	<i>Aspergillus oryzae</i>	99	
	F14-YG1	<i>Aspergillus oryzae</i>	99	
No. 15 백곡 II	F15-BG2	<i>Penicillium polonicum</i>	98	곰팡이, 청록색 포자
	F15-BG4	<i>Penicillium polonicum</i>	98	곰팡이, 청록색 포자, 곰팡이주위의 배지가 갈색으로 변함

누룩명	sample name	동정결과 (분류명)	similarity (%)	콜로니 외관
	F15-BG5	<i>Penicillium viridicatum</i>	99	곰팡이, 청록색 포자
	FY15-3	<i>Penicillium citrinum</i>	99	곰팡이, 청록색 포자, 뒷면은 레몬색
	FY15-4	<i>Penicillium citrinum</i>	99	곰팡이, 청록색 포자, 뒷면은 상아색
	F15-YG1	<i>Aspergillus oryzae</i>	98	곰팡이, 연두색 포자, <i>Aspergillus</i> sp., 뒷면은 상아색
	F15-YG3	<i>Aspergillus flavus</i>	99	곰팡이, 연두색 포자, <i>Aspergillus</i> sp., 뒷면은 붉은 빛
	F15-BL1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	99	곰팡이, 검은색 포자
	F15-BG1	<i>Penicillium griseofulvum</i>	99	곰팡이, 청록색 포자
	F15-YG2-1	<i>Aspergillus oryzae</i>	99	곰팡이, 연두색 포자, <i>Aspergillus</i> sp.
No. 16 여곡	F16-GW7	<i>Aspergillus oryzae</i>	98	<i>Aspergillus</i> sp.
	F16-GW8	<i>Aspergillus oryzae</i>	99	초록색 포자위에 황색 포슬포슬한 균사체
	F16-YG5	<i>Aspergillus oryzae</i>	98	<i>Aspergillus</i>
	F16-YG9	<i>Aspergillus oryzae</i>	98	<i>Aspergillus</i>
No. 17 분곡	F17-B7	<i>Rhizomucor variabilis</i> var.	100	곰팡이, 갈색포자
	F17-B8	<i>Rhizomucor variabilis</i> var.	100	
	F17-B9	<i>Rhizomucor variabilis</i> var.	100	
No. 18 병곡	F18-BL1	<i>Amylomyces rouxii</i>	99	곰팡이, 검은색 포자
	F18-GW1	<i>Aspergillus tritici</i>	99	곰팡이, 초록색 포자, 흰색 균사체
	F18-GW2	<i>Penicillium polonicum</i>	96	
	F18-GW3	<i>Aspergillus tritici</i>	100	곰팡이, 연두색 포자, <i>Aspergillus</i> sp.
	F18-YG2	<i>Aspergillus oryzae</i>	99	
F18-YG3	<i>Aspergillus parvisclerotigenus</i>	99		
No. 19 이화주곡	F19-R1	<i>Rhizopus microsporus</i>	98	곰팡이, 흰색포자, <i>Rhizopus</i> sp.
	F19-R2	<i>Rhizopus microsporus</i>	99	
No. 21 조곡법	F21-GW2	<i>Penicillium viridicatum</i>	99	곰팡이, 초록색 포자, 흰색 균사체
	F21-GW3	<i>Penicillium cordubense</i>	99	
	F21-GW4	<i>Penicillium commune</i>	98	
	F21-GW5	<i>Penicillium flavigenum</i>	99	
	F21-GW6	<i>Penicillium griseofulvum</i>	99	곰팡이, 연두색 포자, <i>Aspergillus</i> sp.
	F21-YG1	<i>Aspergillus oryzae</i>	100	
	F21-YG2	<i>Aspergillus oryzae</i>	99	
F21-YG3	<i>Aspergillus minisclerotigenes</i>	100		
No. 22 향온곡	F22-1	<i>Aspergillus</i> sp.	99	곰팡이, 연두색 포자, <i>Aspergillus</i> sp
	F22-2	<i>Aspergillus</i> sp.	99	
	F22-3	<i>Aspergillus oryzae</i>	98	
	F22-5	<i>Aspergillus oryzae</i>	98	
	F22-W1	<i>Bjerkandera adusta</i>	99	곰팡이, 흰색포자
No. 23 향온곡 II	F23-1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	97	곰팡이, 청록색포자
No. 24 백수환동	F24-BG2	<i>Aspergillus fumigatus</i>	97	청록색 곰팡이 위에 흰색 균사체
	F24-BG3	<i>Aspergillus fumigatus</i>	97	갈색 곰팡이
No. 25 내부비전곡	F25-YG1	<i>Aspergillus oryzae</i>	100	팡이, 연두색 포자, 하얀색 균사체가 바닥에 먼저 자라고 초록색포자가 생김
	F25-YG2	<i>Aspergillus oryzae</i>	100	
	F25-YG4	<i>Aspergillus oryzae</i>	96	
	F25-YG5	<i>Aspergillus oryzae</i>	98	
	F25-W3	<i>Aspergillus oryzae</i>	99	
No. 26 녹미주곡	F26-B1	<i>Mucor circinelloides</i>	99	곰팡이, 흰색 균사체
	F26-B2	<i>Mucor circinelloides</i>	99	

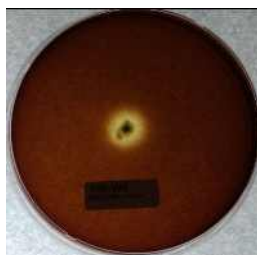
누룩명	sample name	동정결과 (분류명)	similarity (%)	콜로니 외관
	F26-1	<i>Aspergillus sp.</i>	99	곰팡이, 청록색의 포자를 가지나 다른 청록색의 곰팡이와 자라는 모양이 틀림, 일정하지 않고 울퉁불퉁함
	F26-2	<i>Aspergillus sp.</i>	99	
	F26-R1	<i>Mucor circinelloides</i>	100	
No. 27 녹두곡	F27-YG1	<i>Aspergillus nomius</i>	97	곰팡이, 연두색 포자, <i>Aspergillus sp.</i>
	F27-YG2	<i>Aspergillus oryzae</i>	99	
	F27-BL1	<i>Mucor circinelloides</i>	99	
	F27-BL2	<i>Mucor circinelloides</i>	99	
	F27-BL3	<i>Mucor circinelloides</i>	99	
No. 28 곡	F28-BG1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	100	곰팡이, 연두색 포자, <i>Aspergillus sp.</i>
	F28-BG2	<i>Penicillium polonicum</i>	98	
	F28-YG1	<i>Aspergillus sp.</i>	99	
	F28-YG2	<i>Aspergillus sp.</i>	99	
	F28-YG3	<i>Aspergillus oryzae</i>	98	
	F28-YG4	<i>Aspergillus oryzae</i>	98	
	FY28-1	<i>Aspergillus tritici</i>	99	
	FY28-2	<i>Aspergillus tritici</i>	99	
	FY28-4	<i>Aspergillus tritici</i>	99	
	FY28-5	<i>Aspergillus tritici</i>	99	
No. 29 미곡	F29-BG4	<i>Aspergillus fumigatus</i>	98	곰팡이, 청록색 곰팡이 위에 흰색 균사체
	F29-B1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	99	
No. 30 면곡	F30-GW1	<i>Aspergillus sp</i>	95	곰팡이, 초록색 포자위에 황색 포슬포슬한 균사체
	F30-B2	<i>Rhizomucor variabilis var.</i>	99	
	F30-B3	<i>Rhizomucor variabilis var.</i>	100	
No. 31 곡	F31-BG2	<i>Penicillium chrysogenum</i>	95	곰팡이, 갈색포자
	F31-B3	<i>Mucor circinelloides</i>	99	
No. 32 요곡	F32-YG1	<i>Aspergillus oryzae</i>	97	곰팡이, 연두색 포자, <i>Aspergillus sp.</i>
	F32-YG3	<i>Aspergillus oryzae</i>	99	
No. 33 대주백타곡	F33-YG2T	<i>Aspergillus oryzae</i>	98	곰팡이, 연두색 포자, <i>Aspergillus sp.</i>
	F33-YG3	<i>Aspergillus oryzae</i>	97	
	F33-G3	<i>Aspergillus oryzae</i>	93	
	F33-W2	<i>Aspergillus oryzae</i>	99	
No. 34 백료곡	F34-YG1	<i>Aspergillus oryzae</i>	97	곰팡이, 연두색 포자, <i>Aspergillus sp.</i>
	F34-YG2	<i>Aspergillus oryzae</i>	99	
	F34-YG3	<i>Aspergillus oryzae</i>	97	
	F34-YG5T	<i>Aspergillus tamaris</i>	99	
	F34-YG6	<i>Aspergillus oryzae</i>	99	
	F34-YG7	<i>Aspergillus sp.</i>	100	
No. 35 양농곡	F35-B4	<i>Rhizomucor variabilis var.</i>	100	곰팡이, 갈색포자
	F35-B5	<i>Rhizomucor variabilis var.</i>	100	
No. 36 백주곡	F36-B3	<i>Rhizomucor variabilis var.</i>	99	곰팡이, 갈색포자
	F36-B4	<i>Rhizomucor variabilis var.</i>	100	
	F36-B5	<i>Rhizomucor variabilis var.</i>	100	
No. 37 백주곡	F37-1	<i>Byssochlamys spectabilis</i>	100	곰팡이
	F37-2	<i>Byssochlamys spectabilis</i>	100	
	F37-3	<i>Byssochlamys spectabilis</i>	99	
	F37-4	<i>Byssochlamys spectabilis</i>	100	
	F37-6	<i>Byssochlamys spectabilis</i>	99	
No. 38	F38-1	<i>Aspergillus oryzae</i>	99	곰팡이, 연두색 포자, <i>Aspergillus sp.</i>

누룩명	sample name	동정결과 (분류명)	similarity (%)	콜로니 외관
만전향주곡	F38-5	<i>Aspergillus oryzae</i>	99	
No. 39 정화곡	F39-1	<i>Aspergillus oryzae</i>	99	곰팡이, 연두색 포자, <i>Aspergillus</i> sp.
	F39-2	<i>Aspergillus oryzae</i>	99	
No. 40 연화곡	F40-YG2	<i>Aspergillus oryzae</i>	98	곰팡이, 연두색 포자, <i>Aspergillus</i> sp.
	F40-BL1	<i>Rhizomucor variabilis</i>	99	곰팡이, 검은색 포자
	F40-BL2	<i>Mucor</i> sp.	92	
	F40-BL3	<i>Rhizomucor variabilis</i>	99	
No. 41 동양주곡	FY41-1	<i>Biscogniauxia</i> sp.	98	흰색곰팡이
	F41-B1	<i>Rhizomucor variabilis</i>	99	곰팡이, 갈색포자
	F41-B2	<i>Rhizomucor variabilis</i>	99	
	F41-B3	<i>Rhizomucor variabilis</i>	99	
	F41-W1	<i>Aspergillus oryzae</i>	99	곰팡이, 흰색
	F41-W3	<i>Rhizomucor variabilis</i>	99	
	F41-YG1	<i>Aspergillus oryzae</i>	98	곰팡이, 연두색 포자, <i>Aspergillus</i> sp.
	F41-YG2	<i>Aspergillus oryzae</i>	98	
F41-YG3	<i>Aspergillus oryzae</i>	98		
No. 42 미곡	FY42-3	<i>Biscogniauxia</i> sp.	99	털있는 효모 or 흰색곰팡이
	FY42-4	<i>Biscogniauxia</i> sp.	99	
	F42-YG1	<i>Aspergillus oryzae</i>	99	곰팡이, 연두색 포자, <i>Aspergillus</i> sp.
	F42-BL1	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99	곰팡이, 검은색 포자
No. 43 신곡	F43-B1	<i>Mucor circinelloides</i>	99	곰팡이, 갈색포자
	F43-B2	<i>Mucor circinelloides</i>	99	
	F43-B5	<i>Mucor circinelloides</i>	99	
	F43-B9	<i>Rhizomucor variabilis</i>	99	곰팡이 청록색포자
	F43-BG4	<i>Penicillium chrysogenum</i>	99	
	F43-GW8	<i>Aspergillus</i> sp.	99	
No. 44 신곡Ⅱ	F44-YG1	<i>Aspergillus oryzae</i>	99	곰팡이, 연두색 포자, <i>Aspergillus</i> sp.
	F44-YG2	<i>Aspergillus nomiu</i>	99	
No. 45 신곡Ⅲ	F45-B1	<i>Rhizomucor variabilis</i> var.	99	곰팡이, 갈색포자
	F45-B2	<i>Mucor circinelloides</i>	99	
	F45-B3	<i>Rhizomucor variabilis</i> var.	99	
	F45-B4	<i>Rhizomucor variabilis</i> var.	99	
No. 46 하동신곡	F46-YG4	<i>Aspergillus</i> sp.	94	곰팡이, 연두색 포자, <i>Aspergillus</i> sp.
	F46-YG6	<i>Aspergillus oryzae</i>	95	
	F46-YG7	<i>Aspergillus oryzae</i>	99	
No. 47 시판누룩-1	F47-YG1	<i>Aspergillus oryzae</i>	98	곰팡이, 연두색 포자, <i>Aspergillus</i> sp.
	F47-YG2	<i>Aspergillus oryzae</i>	99	
	F47-YG3	<i>Aspergillus oryzae</i>	98	
	F47-GW2	<i>Penicillium polonicum</i>	88	곰팡이, 초록색 포자, 흰색 균사체
	F47-GW3	<i>Penicillium polonicum</i>	97	
No. 48 시판누룩-2	FY48-T3	<i>Penicillium citrinum</i>	97	곰팡이, 초록색 포자, 흰색 균사체
	FY48-T4	<i>Penicillium citrinum</i>	100	
	F48-W1	<i>Aspergillus tritici</i>	100	곰팡이, 연두색 포자
	F48-W2	<i>Penicillium citrinum</i>	99	곰팡이, 청록색 포자
	F48-W3	<i>Aspergillus oryzae</i>	99	곰팡이, 연두색 포자, <i>Aspergillus</i> sp.
	F48-W4	<i>Aspergillus oryzae</i>	99	
	F48-YG1	<i>Aspergillus oryzae</i>	98	
	F48-YG2	<i>Aspergillus oryzae</i>	99	
	F48-YG3	<i>Aspergillus oryzae</i>	98	
	F48-BG1	<i>Penicillium</i> sp.	98	곰팡이, 초록색 포자, 흰색 균사체
F48-BG3	<i>Penicillium polonicum</i>	91		

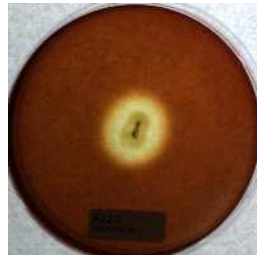
누룩명	sample name	동정결과 (분류명)	similarity (%)	콜로니 외관
	F48-BG4	<i>Penicillium polonicum</i>	97	
No. 49 시판누룩-3	F49-YG1	<i>Aspergillus oryzae</i>	98	곰팡이, 연두색 포자, <i>Aspergillus</i> sp.
	F49-YG2	<i>Aspergillus oryzae</i>	99	
	F49-YG3	<i>Aspergillus oryzae</i>	99	
	F49-BG1	<i>Penicillium chrysogenum</i>	99	곰팡이, 청록색 포자
	F49-BG4	<i>Penicillium mononematosum</i>	99	
	F49-BG5	<i>Penicillium polonicum</i>	98	
	F49-BG6	<i>Penicillium polonicum</i>	98	
	F49-GW1	<i>Penicillium</i> sp.	99	
	F49-GW2	<i>Penicillium</i> sp.	99	
	F49-GW3	<i>Penicillium</i> sp.	99	
F49-W1	<i>Penicillium freii</i>	99		
No. 50 시판누룩-4	F50-BL1	<i>Rhizomucor variabilis</i>	100	곰팡이, 흰색포자, <i>Rhizopus</i> sp.
	F50-BL2	<i>Rhizomucor variabilis</i>	100	
No. 51 시판누룩-5	F53-1	<i>Galactomyces candidum</i>	99	곰팡이, 흰색균사체
	F53-YG1	<i>Aspergillus oryzae</i>	97	곰팡이, 연두색 포자, <i>Aspergillus</i> sp.
	F53-YG2	<i>Aspergillus oryzae</i>	99	
No. 52 시판누룩-6	F55-B4	<i>Mucor circinelloides</i>	99	곰팡이, 갈색포자
	F55-B5	<i>Mucor circinelloides</i>	99	곰팡이, 청록색 포자
	F55-BG2	<i>Penicillium chrysogenum</i>	99	
	F55-BG3	<i>Penicillium chrysogenum</i>	98	
No. 53 시판누룩-7	F56-BL1	<i>Mucor circinelloides</i>	99	곰팡이, 검은색포자
	F56-BG1	<i>Penicillium polonicum</i>	93	곰팡이, 청록색 포자
	F56-YG2	<i>Aspergillus oryzae</i>	100	곰팡이, 연두색 포자, <i>Aspergillus</i> sp.
	F56-YG3	<i>Aspergillus oryzae</i>	93	
No. 54 자가제조-1	F57-4	<i>Penicillium</i> sp.	99	곰팡이, 청록색 포자
	F57-GW1	<i>Aspergillus oryzae</i>	98	곰팡이, 연두색 포자, <i>Aspergillus</i> sp.
	F57-GW2	<i>Aspergillus oryzae</i>	100	
	F57-G1	<i>Aspergillus</i> sp.	99	곰팡이, 초록색 포자
	F57-R1	<i>Mucor circinelloides</i>	99	곰팡이, 라이조푸스와 비슷
	F57-R2	<i>Mucor</i> sp.	90	
No. 55 자가제조-2	F58-BG1	<i>Penicillium steckii</i>	99	곰팡이, 청록색 포자
	F58-BG2	<i>Penicillium steckii</i>	99	
	F58-B1	<i>Rhizomucor variabilis</i>	100	곰팡이, 라이조푸스 처럼 균사체를 뿜으나 검은색 포자를 형성하진 않음



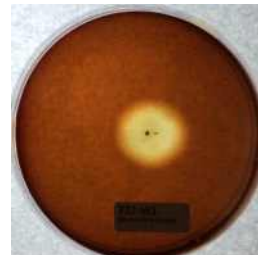
F48-W3



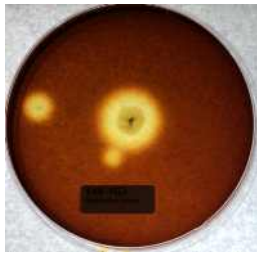
F48-W4



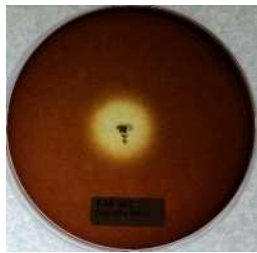
F22-1



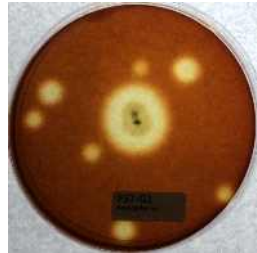
F22-W1



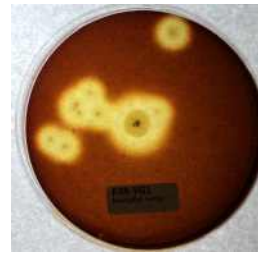
F48-YG3



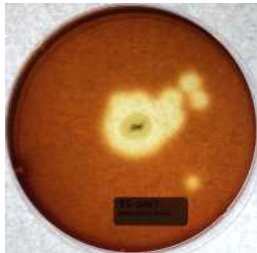
F48-W1



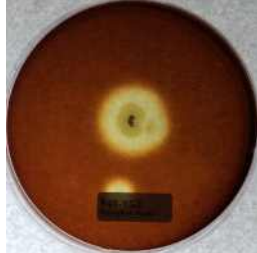
F57-G1



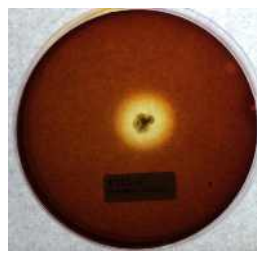
F48-YG1



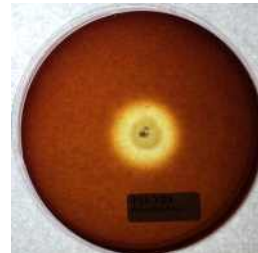
F5-GW7



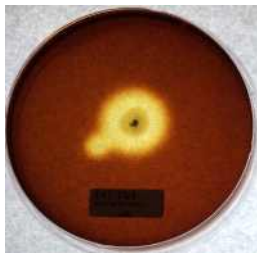
F49-YG3



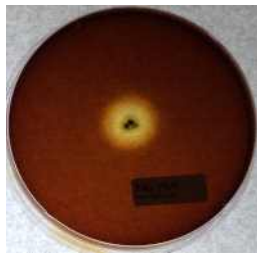
FY15-4



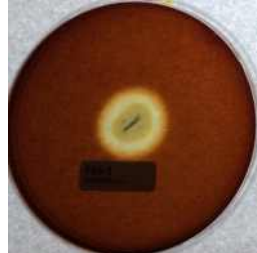
F15-YG3



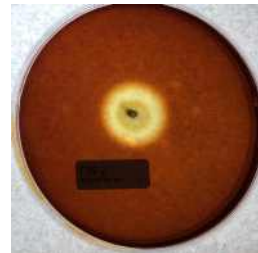
F47-YG3



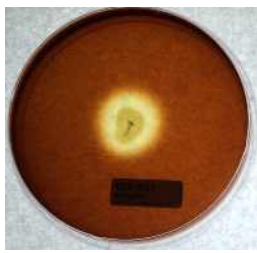
F46-YG4



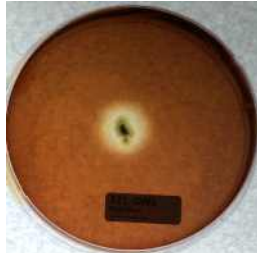
F26-1



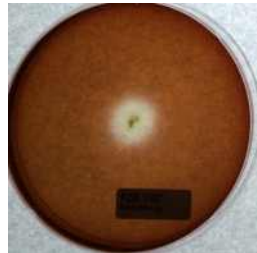
F26-2



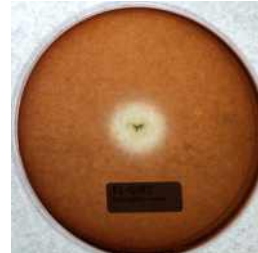
F21-YG3



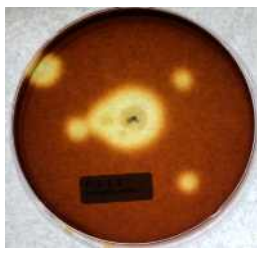
F21-GW6



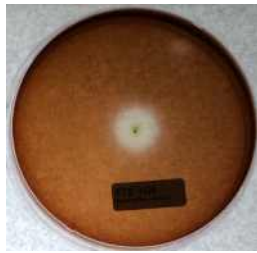
F28-YG2



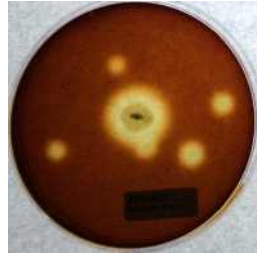
F1-GW2



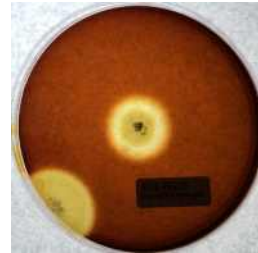
F12-1-1



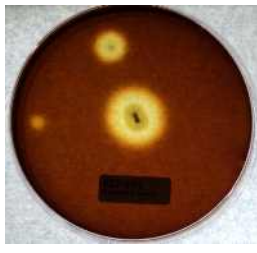
F28-YG4



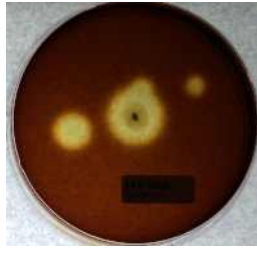
F33-W2



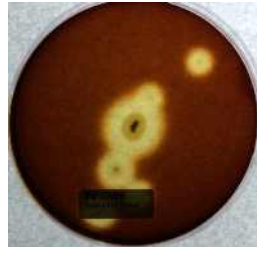
F11-BG16



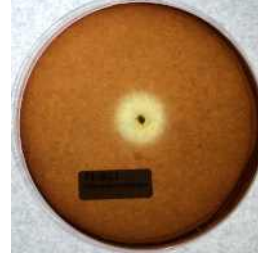
F32-YG1



F43-GW8



F4-GW6



F1-BG1

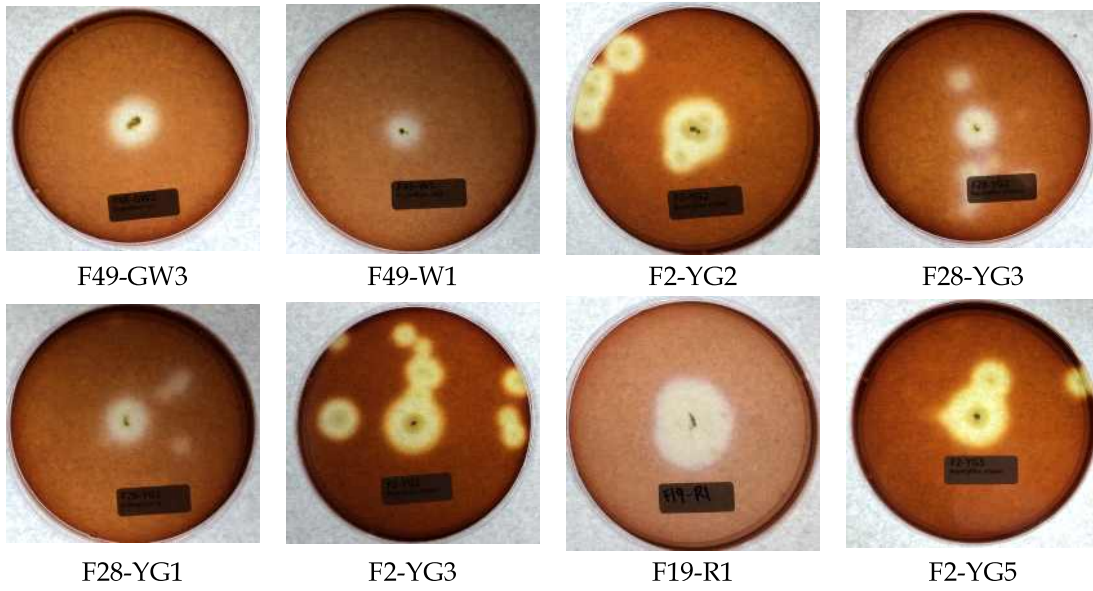


그림 2-2-1. 전통누룩 유래 곰팡이의 전분분해 활성 측정

표 2-2-4. 전통누룩에서 분리한 곰팡이의 전분분해 활성 측정

누룩명	균주명	전분분해활성 (cm)	누룩명	균주명	전분분해활성 (cm)
No. 1 주곡방문	F1-BG1	1.4	No. 26 녹미주곡	F26-B1	0.5
	F1-BG4	1.2		F26-B2	0.7
	F1-GW2	0.9		F26-1	1
F2-YG2	1.1	F26-2		1.1	
F2-YG3	2	F26-R1		1.2	
No. 2 추모곡	F2-YG4	1.6	No. 27 녹두곡	F27-YG1	1.5
	F2-YG5	1.1		F27-YG2	0.9
	F2-W8	0.2		F27-BL1	0.3
	F2-R6	0.5		F27-BL2	0.6
	F2-R7	0.2		F27-BL3	0.6
No. 3 오메기곡	F3-BG2	0.5	No. 28 곡	F28-BG1	1.1
No. 4 죽곡	F4-GW1	1.5		F28-BG2	1.1
	F4-GW2	0.8		F28-YG1	1.3
	F4-GW3	0.8		F28-YG2	1.2
	F4-GW4	0.8		F28-YG3	1.2
	F4-GW6	1.3		F28-YG4	1.1
No. 5 죽곡Ⅱ	F5-GW1	0.7		FY28-1	0.7
	F5-GW7	1.3		FY28-2	0.5
	F5-YG3	1.3		FY28-4	0.8
	F5-YG6	1.5		FY28-5	0.7
No. 7 곡	F5-YG8	1.4	No. 30 면곡	F30-GW1	0.9
	F7-BL1	0.3		F30-B2	0.5
	F7-BL2	1.6		F30-B3	0.5
No. 8 면곡	F7-BL3	1.7	No. 32 요곡	F32-YG1	1.3
	F8-1	1.2		F32-YG3	1.4
	F8-2	1.5	No. 33 대주백타곡	F33-YG2T	1.1
F9-11-1	0.2	F33-YG3		1.2	
F9-B1	0.3	F33-G3		1.3	
F9-B2	0.3	F33-W2		1	
F9-BG1	1	No. 34 백료곡		F34-YG1	1
No. 9 신곡	F9-BG2		1.2	F34-YG2	1
	F9-BG3		1.2	F34-YG3	0.9
	F9-BG4		1	F34-YG5T	2
	F9-R2		0.6	F34-YG6	0.9
	F9-R3		0.6	F34-YG7	1.3
	F9-14		0.8	No. 39 정화곡	F39-1
	F11-BG16	0.9	F39-2		1.3
No. 11 여곡	F11-G2	1.1	No. 43 신곡	F43-B1	0.5
	F11-R1	0.3		F43-B2	0.3
	F11-R2	0.3		F43-B5	0.4
F12-BG1	1.1	F43-B9		0.4	
F12-BG3	0.8	F43-BG4		0.2	
No. 12 설향곡	F12-1	1.2	F43-GW8	1.3	
	F12-1-1	1.2	F45-B1	0.2	
	F12-2	1.5	No. 45 신곡Ⅲ	F45-B2	0.7
	F12-W1	1.5		F45-B3	0.2
	FY12-1	0.8		F45-B4	0.5
No. 15 백곡Ⅱ	F15-BG2	0.6	No. 46 하동신곡	F46-YG4	1.3
	F15-BG4	0.9		F46-YG6	0.1
	F15-BG5	0.9		F46-YG7	1.2
	FY15-3	0.7	No. 47 시판누룩 (얇은뱅이밀)	F47-YG1	1.2
	FY15-4	1.2		F47-YG2	1.3
F15-YG1	0.7	F47-YG3	1.6		

누룩명	균주명	전분분해활성 (cm)	누룩명	균주명	전분분해활성 (cm)
No. 18 병곡	F15-YG3	1.3	No. 48 시판누룩	F47-GW2	0.8
	F15-BL1	0.8		F47-GW3	0.8
	F15-BG1	0.9		FY48-T3	1.1
	F15-YG2-1	0.8		FY48-T4	0.7
	F18-BL1	0.6		F48-W1	1.6
	F18-GW1	1.4		F48-W2	0.5
	F18-GW2	0.7		F48-W3	1.3
	F18-GW3	1.3		F48-W4	0.7
	F18-YG2	1		F48-YG1	1
	F18-YG3	0.5		F48-YG2	0.6
	F18-W1	0.9		F48-YG3	1.4
	F18-W2	0.9		F48-BG1	1
	F18-W3	0.7		F48-BG3	0.9
	FY18-W1	0.8		F48-BG4	1
FY18-W3	1.1	F49-YG1	1.4		
No. 19 이화주곡	F19-R1	1	F49-YG2	1.4	
	F19-R2	0.3	F49-YG3	1.3	
No. 21 조곡법	F21-GW2	0.9	F49-BG1	0.7	
	F21-GW3	0.9	F49-BG4	0.5	
	F21-GW4	1	F49-BG5	0.4	
	F21-GW5	1	F49-BG6	0.7	
	F21-GW6	1.2	F49-GW1	0.6	
	F21-YG1	1.2	F49-GW2	0.7	
	F21-YG2	1.1	F49-GW3	1	
F21-YG3	1.4	F49-W1	0.6		
No. 22 향온곡	F22-1	1.3	No. 53 시판누룩	F53-YG1	1
	F22-2	1.3	F53-YG2	0.7	
	F22-3	1	No. 55 자가제조	F55-B4	0.4
	F22-5	1	F55-B5	0.6	
No. 23 향온곡II	F22-W1	1.5	No. 57 자가제조	F57-4	0.6
	F23-1	0.6		F57-P7	0.5
No. 24 백수환동	F24-BG2	0.2		F57-G1	1.3
	F24-BG3	0.9	F57-R1	0.7	
No. 25 내부비전곡	F25-YG1	1.3	F57-R2	0.7	
	F25-YG2	1.3	No. 58 자가제조	F58-BG1	0.5
	F25-YG4	1.3		F58-BG2	0.9
	F25-YG5	1.5		F58-B1	0.7
F25-W3	1.4				

다. 전통누룩 유래 유산균 분리 동정

분리된 유산균의 동정결과는 다음 표 2-2-5에 제시하였다. 분리된 115균주 중 *Pediococcus* sp. 가 95균주로 가장 많았고, *Enterococcus* sp. 10균주, *Lactobacillus* sp. 5균주, *Lactococcus* sp. 3균주, *Weissella* sp. 2균주였다.

표 2-2-5. 전통누룩에서 분리한 유산균의 분리 및 동정결과

누룩명	Sample name	동정결과(분류명)		Similarity (%)
No. 3 오메기곡	L3-1	<i>Enterococcus faecium</i>	KF535138.1	99
	L3-2	<i>Enterococcus faecium</i>	AB681186.1	99
	L3-3	<i>Enterococcus faecium</i>	KF535138.1	99
	RL3-2	<i>Pediococcus acidilactici</i>	FJ905315.2	99
	RL3-11	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	KJ810576.1	99
	RL3-12	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	LC035128.1	99
	RL3-13	<i>Pediococcus lolii</i>	JX311435.	99
	RL3-14	<i>Pediococcus lolii</i>	KT315923.1	99
No. 6 공병곡	RL6-2	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	LC035128.1	99
	RL6-3	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	KJ810576.1	99
	RL6-4	<i>Pediococcus acidilactici</i>	AB598949.1	99
No. 9 신곡	RL9-1	<i>Pediococcuslolii</i>	JX311435.1	99
	RL9-2	<i>Pediococcus acidilactici</i>	AB598949.1	99
	RL9-3	<i>Pediococcus acidilactici</i>	AJ305322.1	99
	RL9-4	<i>Pediococcus acidilactici</i>	LC097074.1	98
	RL9-5	<i>Pediococcus acidilactici</i>	AB598949.1	99
	RL9-6	<i>Pediococcus acidilactici</i>	LC097074.1	100
	RL9-7	<i>Pediococcus acidilactici</i>	LC097074.1	99
	RL9-8	<i>Pediococcus acidilactici</i>	LC097074.1	100
	RL9-9	<i>Pediococcus acidilactici</i>	LC097074.1	99
	RL9-10	<i>Pediococcus acidilactici</i>	LC097074.1	99
No. 10 진주춘추곡	RL10-1	<i>Pediococcus</i> sp.	JX193618.1	99
	RL10-2	<i>Pediococcus</i> sp.	JX193618.1	99
	RL10-3	<i>Pediococcus acidilactici</i>	KJ531397.1	99
	RL10-4	<i>Pediococcus acidilactici</i>	AB598949.1	99
	RL10-5	<i>Pediococcus</i> sp.	KT906214.1	100
	RL10-6	<i>Pediococcus</i> sp.	JX193618.1	99
	RL10-7	<i>Pediococcus</i> sp.	JX193618.1	99
	RL10-8	<i>Pediococcus</i> sp.	JX193618.1	99
	RL10-9	<i>Pediococcusacidilactici</i>	KJ531397.1	99
	RL11-1	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	KJ810576.1	99
	RL11-2	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	AB550295.1	99
	RL11-3	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	LC035128.1	100
	RL11-4	<i>Pediococcuspentosaceus</i>	LC035128.1	99
	RL11-5	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	LC035126.1	99
	RL11-6	<i>Lactococcus lactis</i> subsp.	AB598935.1	99
	RL11-7	<i>Pediococcuspentosaceus</i>	LC035128.1	99
	RL11-8	<i>Pediococcuspentosaceus</i>	KM668050.1	92
	RL11-9	<i>Pediococcuspentosaceus</i>	LC035128.1	99
	RL11-10	<i>Pediococcuspentosaceus</i>	KJ810576.1	99
	RL10-10	<i>Pediococcus</i> sp.	KT906214.1	99
No. 13 설향곡	RL13-1	<i>Pediococcusacidilactici</i>	LC097074.1	99
	RL13-2	<i>Pediococcuslolii</i>	JX311435.1	99
	RL13-3	<i>Pediococcusacidilactici</i>	KM062019.1	99
	RL13-4	<i>Pediococcuslolii</i>	JX311435.1	99
	RL13-5	<i>Pediococcusacidilactici</i>	KM062019.1	99
	RL13-6	<i>Pediococcusacidilactici</i>	JX311435.1	99
	RL13-7	<i>Pediococcuslolii</i>	JX311435.1	99
	RL13-8	<i>Pediococcusacidilactici</i>	FJ905315.2	99
No. 22 향은곡	L22-1	<i>Weissella cibaria</i>	AB911503.1	99
	L22-2	<i>Weissella cibaria</i>	AB362617.1	99
No. 24 백수환동주곡	L24-1	<i>Enterococcus faecalis</i>	AB362601.1	99
	L24-2	<i>Enterococcus faecalis</i>	JX556411.1	99
	L24-3	<i>Enterococcus faecalis</i>	AB232955.1	99
No. 26 녹미주곡	L26-1	<i>Lactococcus lactis</i> subsp.	AB598935.1	99
	L26-2	<i>Lactococcus lactis</i> subsp.	AB598935.1	99
	L26-3	<i>Enterococcus faecium</i>	JX556411.1	99
No. 48 시판누룩	RL48-1	<i>Lactobacillus rossiae</i>	JN680708.1	100
	RL48-2	<i>Lactobacillusplantarum</i>	KR153313.1	99

누룩명	Sample name	동정결과(분류명)		Similarity (%)
(국산밀)	RL48-3	<i>Lactobacillusplantarum</i>	KR153313.1	99
	RL48-4	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	KJ810576.1	99
	RL48-5	<i>Lactobacillusplantarum</i>	KM497500.1	99
	RL48-10	<i>Lactobacilluscrustorum</i>	AM285453.1	99
No. 51 시판누룩(국산밀)	L51-1	<i>Pediococcus acidilactici</i>	AB680261.1	99
	L51-2	<i>Pediococcus acidilactici</i>	AB598949.1	99
	L51-3	<i>Pediococcus acidilactici</i>	EF059987.1	99
No. 52 시판누룩	L52-1	<i>Pediococcus acidilactici</i>	DQ294960.1	99
	L52-2	<i>Pediococcus acidilactici</i>	DQ294960.1	99
	L52-3	<i>Pediococcus acidilactici</i>	AB018213.1	99
No. 53 시판누룩	L53-1	<i>Pediococcus acidilactici</i>	AB680157.1	99
	L53-2	<i>Pediococcus acidilactici</i>	AB598949.1	99
	L53-3	<i>Pediococcus acidilactici</i>	AB598949.1	99
No. 54 자가제조	RL54-1	<i>Pediococcus acidilactici</i>	KT982251.1	100
	RL54-2	<i>Pediococcus acidilactici</i>	FJ905315.2	99
	RL54-3	<i>Pediococcus acidilactici</i>	KF060270.1	100
	RL54-4	<i>Pediococcus acidilactici</i>	KT906198.1	100
	RL54-5	<i>Pediococcus acidilactici</i>	KJ531397.1	99
	RL54-6	<i>Pediococcus acidilactici</i>	KT906198.1	99
	RL54-7	<i>Pediococcus acidilactici</i>	LC097074.1	100
	RL54-8	<i>Pediococcus acidilactici</i>	KT906198.1	100
	RL54-9	<i>Pediococcus acidilactici</i>	KJ531397.1	99
	RL54-10	<i>Pediococcus acidilactici</i>	KT906198.1	100
No. 57 자가제조	L57-1	<i>Enterococcus faecalis</i>	FJ378672.1	99
	L57-2	<i>Enterococcus faecalis</i>	AB362601.1	99
	L57-3	<i>Enterococcus hirae</i>	NR_075022.1	99
	RL57-1	<i>Pediococcus acidilactici</i>	KT906198.1	99
	RL57-2	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	JX490164.1	99
	RL57-3	<i>Pediococcus acidilactici</i>	KM062019.1	99
	RL57-4	<i>Pediococcus acidilactici</i>	KT906198.1	100
	RL57-5	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	KP119819.1	99
	RL57-6	<i>Pediococcus acidilactici</i>	KT906198.1	99
	RL57-7	<i>Pediococcus lolii</i>	KJ580428.1	99
	RL57-8	<i>Pediococcus acidilactici</i>	KJ531397.1	99
	RL57-9	<i>Pediococcus acidilactici</i>	KT906198.1	99
RL57-10	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	LC035128.1	99	
No. 58 자가제조	L58-1	<i>Pediococcus acidilactici</i>	AB598949.1	99
	L58-2	<i>Pediococcus acidilactici</i>	AJ305322.1	99
	L58-3	<i>Pediococcus acidilactici</i>	EF059987.1	99
No. 59 자가제조	L59-1	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	AB598980.1	100
	L59-2	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	AB598956.1	100
	L59-3	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	AB362605.1	100
	RL59-1	<i>Pediococcus acidilactici</i>	AB598949.1	99
	RL59-2	<i>Pediococcus acidilactici</i>	KT906198.1	99
	RL59-3	<i>Pediococcus acidilactici</i>	AB598949.1	100
	RL59-4	<i>Pediococcus acidilactici</i>	KT906198.1	99
	RL59-5	<i>Pediococcus acidilactici</i>	KT906198.1	99
	RL59-6	<i>Pediococcus acidilactici</i>	KT906198.1	99
	RL59-7	<i>Pediococcus acidilactici</i>	KJ531397.1	99
	RL59-8	<i>Pediococcus acidilactici</i>	DQ294960.1	99
	RL59-9	<i>Pediococcus acidilactici</i>	KT906198.1	100
	RL59-10	<i>Pediococcus acidilactici</i>	KT906198.1	99
	RL59-11	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	LC035128.1	99
	RL59-12	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	AB598980.1	99
RL59-13	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	HG328247.1	99	
RL59-14	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	KJ810576.1	99	

3절 우수 전통누룩의 양조특성

전통누룩 58 종에서 오메기곡, 백수환동주곡, 미곡의 총 3종의 우수누룩을 선발하였다. 선발된 우수누룩 3종과 각 누룩으로 양조한 술덧의 발효기간별 특성을 분석하기 위하여 다음 work flow의 연구를 수행하였다. 누룩과 술덧의 대사체 분석을 위해 비휘발성 대사체 분석은 ^1H NMR을 활용, 휘발성 대사체 분석은 GC/MS를 사용하였으며, 미생물 군집분석을 위해 metagenome 분석을 수행하였다. 얻어진 결과는 PCA, OPLS 등 다변량분석을 통해 각 누룩과 발효기간별 특성을 분석하였다.

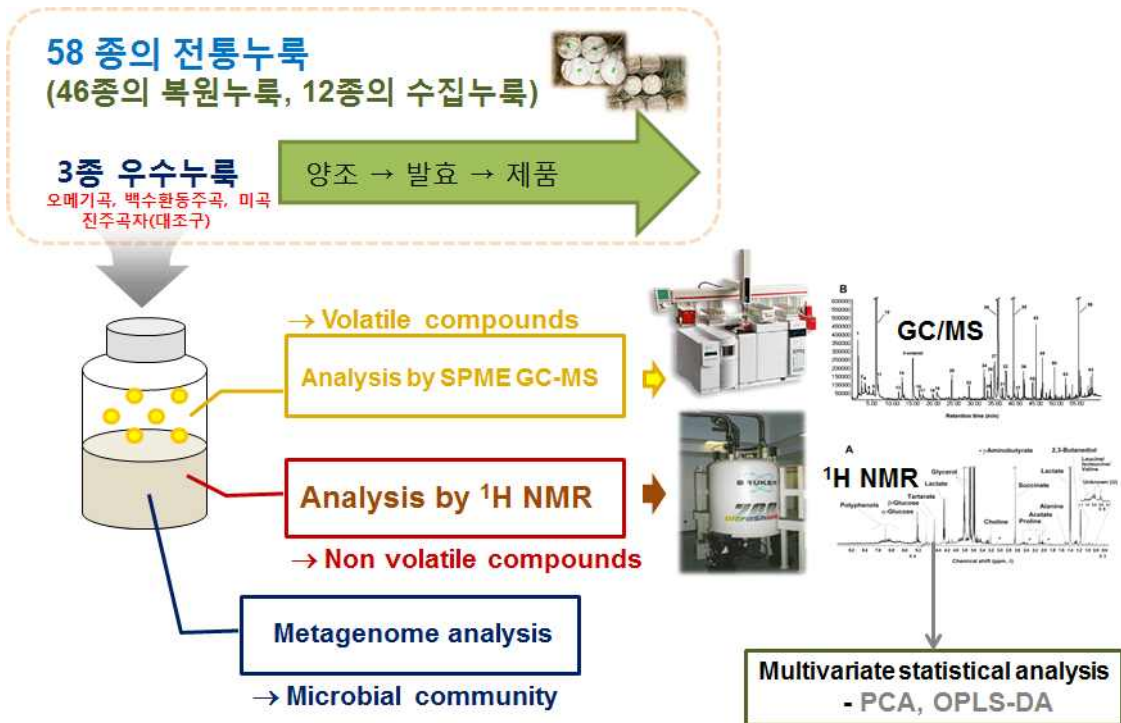


그림 2-3-1. 우수 전통누룩의 양조과정 중 발효특성 구명을 위한 work flow

1. 우수 누룩 및 술덧의 발효기간별 미생물 군집 분석

선별누룩 및 기존누룩을 적용한 경시적 발효시료의 메타게놈 미생물 군집분석을 실시하였다. 샘플은 선별 누룩 3종과 선별 누룩에서 부원료가 제외된 누룩 3종, 시판누룩(J곡자) 1종 및 각 누룩별 최적 함량에 따른 발효 중 8차례의 경시적 시료를 분석하였다. 분석은 진균류(ITS)와 세균류(16S rRNA sequence)를 진행하였다(표 2-3-1).

표 2-3-1. 메타게놈 분석 시료

선별누룩	누룩	밀술 0일차	밀술 2일차	밀술 7일차	덧술 0일차	덧술 2일차	덧술 7일차	덧술 9일차	덧술 14일차
누룩 5% 사용 레시피 (오메기곡 최적)	오메기 (2차년도 제조분)								
	오메기 (부원료 제외)								
	J곡자 (시판누룩)								
누룩 10% 사용 레시피 (백수환동주곡 최적)	백수환동주곡 (2차년도 제조분)								
	백수환동주곡 (부원료 제외)								
	J곡자 (시판누룩)								
누룩 20% 사용 레시피 (미곡 최적)	미곡 (2차년도 제조분)								
	미곡 (부원료 제외)								
	J곡자 (시판누룩)								

우수누룩 3종과 시판누룩인 시판누룩의 metagenome 분석결과를 표 2-3-2에 나타내었다. 시판누룩(J곡자)은 *Aspergillus flavus*와 *Rhizopus oryzae*가 누룩에서 우점하는 곰팡이로 나타난 반면 백수환동주곡과 오메기곡은 *Aspergillus fumigatus*와 *Rhizopus microsporus*가 우점하는 결과를 얻었다. 미곡의 경우는 시판누룩과 같은 곰팡이 종이 우점하지만 미분류된 효모군의 비율이 가장 높게 나타났다. 특히, 부원료가 제외된 누룩에서는 부원료가 포함된 선별누룩에 비하여 누룩 곰팡이보다 미분류된 효모군의 비율이 높게 나타나는 특성을 보였다.

각 누룩은 고유의 미생물 군집을 보였으며 특히 오메기곡과 백수환동주곡의 우점 미생물은 *Aspergillus fumigatus*였으며 미곡과 시판누룩은 *Aspergillus flavus* 인 것으로 나타났다. 각 누룩의 부재료는 미생물 군집변화에 영향을 주었으며, 이러한 원료조성에 따른 미생물 군총변화는 최종 전통주 제품의 향기성분에 많은 영향을 미치는 것으로 나타났다.

부원료 여부에 따라 다르게 제조된 선별누룩 3종을 경시적 발효의 미생물 군집의 변화는 아래와 같이 나타났다. 3가지 누룩 모두 부원료가 포함되어 있는 누룩의 발효적성과 관능품질이 우수 하였다. 고문헌의 레시피를 그대로 재현해 부원료가 들어간 누룩들로 제조된 술들은 발효에 핵심 역할을 하는 것으로 예상되는 *Saccharomyces cerevisiae*의 우점화가 부원료가 없는 것에 비하여 빠르게 진행되는 것으로 볼 수 있다. 부원료를 제외하여 기존 레시피에 변화를 준 누룩들은 초기 *Saccharomyces cerevisiae*와 아직 분류되지 않아 종을 알 수 없는 Saccharomycetales 목의 야생효모와 경쟁구조를 나타내며, *Saccharomyces cerevisiae*의 우점화를 지연시키는 것으로 보인다. 세균의 경우에도 부원료가 들어가 원 레시피로 재현된 누룩으로 담근 술들에서, 발효의 산미 및 관능 품질에 중요한 영향을 줄 것으로 예상되는 유산균 종들의 우점화가 상대적으로 빠르게 진행되는 것을 볼 수 있었다.

또한 오메기곡을 이용한 오메기주는 누룩의 부원료(밀가루) 여부에 따라 미생물 군집의 변

화는 크게 나타나지 않고, 진균은 *Saccharomyces cerevisiae* 효모와 세균은 *Pediococcus* spp.에서 *Lactococcus* spp.로 유산균이 천이되는 현상을 나타냈다. 백수환동주는 누룩의 녹두 유무에 따라 상당히 다른 미생물 군집 변화를 나타내었다. 녹두가 들어간 백수환동주곡으로 발효된 시료는 발효초기부터 *Saccharomyces cerevisiae* 효모와 *Lactococcus* spp. 유산균이 우점했다. 반면, 녹두가 들어가지 않은 시료는 초기 미분류된 *Saccharomycetales* 목의 효모군과 *Enterobacter* spp.가 우전하다가 중후기부터 *Saccharomyces cerevisiae* 효모와 *Lactococcus* spp. 유산균으로 천이되는 현상을 나타내었다. 미곡으로 제조된 미주는 여뀌즙이 있는 경우 미분류된 *Saccharomycetales* 목의 효모군이 *Saccharomyces cerevisiae* 효모로 천이되고 세균은 초기부터 *Pediococcus* spp.가 우점하였다. 반면 여뀌즙이 없는 경우 미분류된 *Saccharomycetales* 목의 효모군이 *Saccharomyces cerevisiae* 효모로 갔다가 다시 *Saccharomycetales* 목의 효모군으로 천이되고, 세균은 *Pediococcus* spp.에서 *Lactococcus* spp.로 유산균이 천이되는 현상을 나타냈다.

표 2-3-2. 우수누룩 3종의 발효기간별 metagenome 분석

Kingdom	Phylum	Species	오메기곡	오메기곡 (밀가루 제외)	백수환동주곡	백수환동주곡 (녹두 제외)	미곡	미곡 (여뀌 제외)	시판 누룩 (J곡자)
Fungi	Ascomycota	Saccharomycetalessp.(unID)	12.67%	23.88%	0.07%	62.35%	43.52%	65.74%	0.00%
Fungi	Ascomycota	Wickerhamomyces anomalus	0.12%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
Fungi	Ascomycota	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.23%
Fungi	Ascomycota	Aspergillus sp.(unID)	0.12%	0.00%	0.13%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
Fungi	Ascomycota	<i>Aspergillus candidus</i>	0.12%	0.06%	0.00%	0.03%	0.00%	0.02%	0.06%
Fungi	Ascomycota	<i>Aspergillus flavus</i>	4.67%	6.23%	0.66%	12.03%	41.43%	20.81%	41.69%
Fungi	Ascomycota	<i>Aspergillus flavus</i> var. <i>oryzae</i>	1.79%	5.30%	0.66%	0.00%	0.00%	0.00%	20.61%
Fungi	Ascomycota	<i>Aspergillus fumigatus</i>	40.90%	24.81%	57.24%	0.14%	0.00%	0.00%	0.00%
Fungi	Zygomycota	<i>Lichtheimia corymbifera</i>	0.00%	0.00%	1.05%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
Fungi	Zygomycota	<i>Lichtheimia ramosa</i>	0.00%	0.00%	1.58%	0.11%	0.00%	0.00%	0.00%
Fungi	Zygomycota	<i>Rhizomucor variabilis</i>	0.17%	0.00%	0.00%	0.00%	0.02%	0.05%	0.00%
Fungi	Zygomycota	<i>Rhizopus microsporus</i>	31.05%	28.83%	38.03%	6.70%	0.61%	0.73%	0.00%
Fungi	Zygomycota	<i>Rhizopus oryzae</i>	8.35%	10.25%	0.59%	18.39%	13.71%	11.37%	17.27%
Fungi	unidentified	Fungisp.(unID)	0.06%	0.64%	0.00%	0.00%	0.00%	0.16%	20.14%
Unassigned	Other	Other	0.00%	0.00%	0.00%	0.25%	0.71%	1.12%	0.00%
Total			100.00%	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%

표 2-3-3. 우수누룩 3종 및 대조군의 발효기간 중 우점 미생물의 변화

누룩	부재료	발효기간 중 우점 미생물의 변화	
		Fungi	Bacteria
백수환동주곡 (녹두+참쌀)	녹두 O	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Lactococcus</i> spp.
	녹두 X	<i>Saccharomycetales</i> (unIDgroup) → <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Enterobacter</i> spp. → <i>Lactococcus</i> spp.
오메기곡 (보리+밀가루)	밀가루 O	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Escherichia/Shigella</i> spp. → <i>Pediococcus</i> spp. → <i>Lactococcus</i> spp.
	밀가루 X	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Escherichia/Shigella</i> spp. → <i>Pediococcus</i> spp. → <i>Lactococcus</i> spp.
미곡 (쌀+여뀌즙)	여뀌즙 O	<i>Saccharomycetales</i> (unIDgroup) → <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Weissella</i> spp. → <i>Pediococcus</i> spp.
	여뀌즙 X	<i>Saccharomycetales</i> (unIDgroup) → <i>Saccharomyces cerevisiae</i> → <i>Saccharomycetales</i> (unIDgroup)	<i>Escherichia/Shigella</i> spp. → <i>Pediococcus</i> spp. → <i>Lactococcus</i> spp.

표 2-3-4. 우수누룩 3종의 발효기간 중 우점 미생물

누 룩	누룩별 발효기간 중 우점 미생물	
	Fungi	Bacteria
백수환동주곡	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Lactococcus sp.</i>
오메기곡	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Escherichia/Shigella sp.</i> → <i>Pediococcus sp.</i> → <i>Lactococcus sp.</i>
미곡	<i>Saccharomycetales sp.(unID)</i> → <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Weissella sp.</i> → <i>Pediococcus sp.</i>

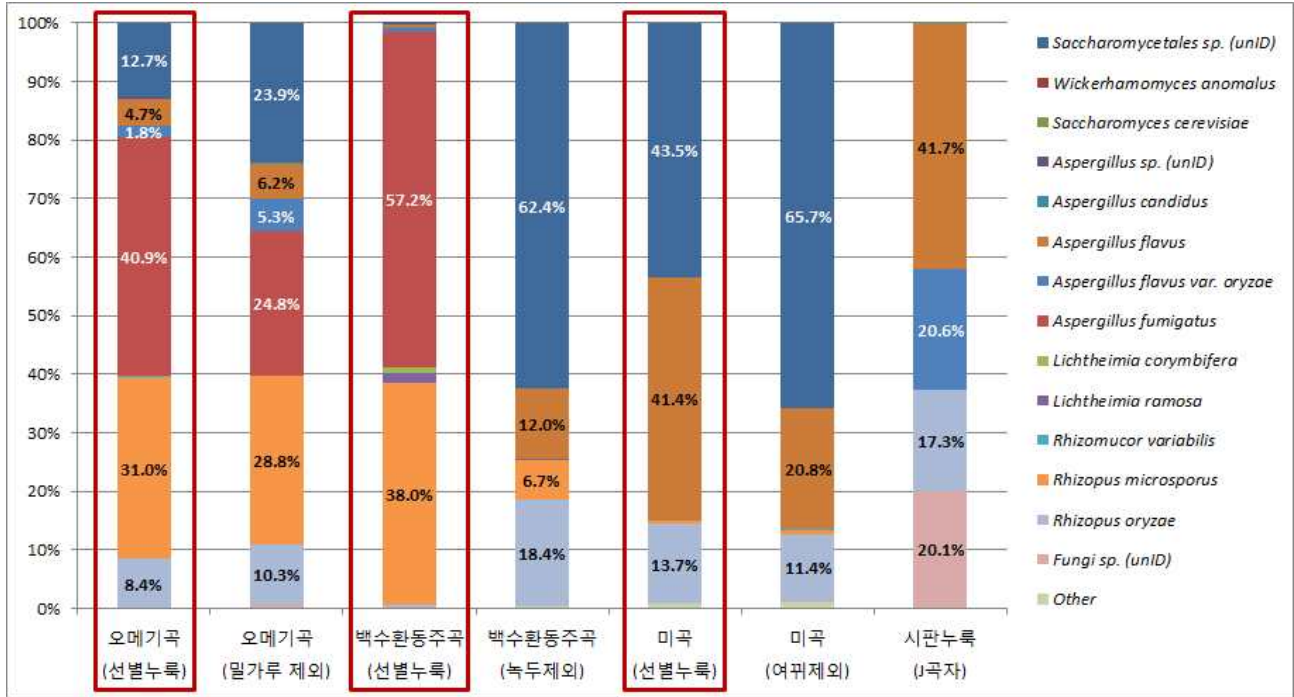
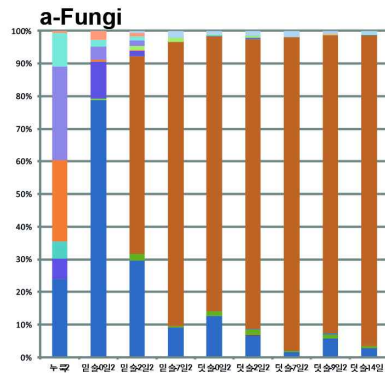
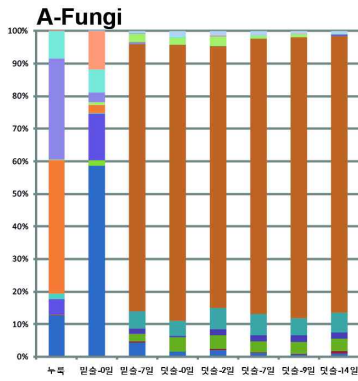
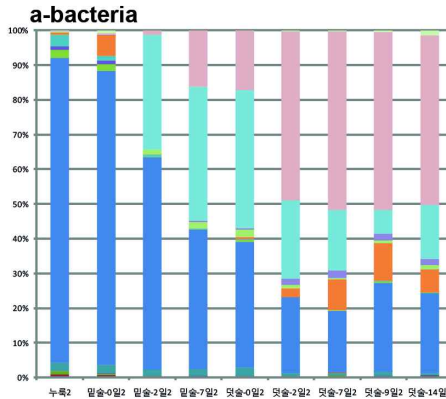
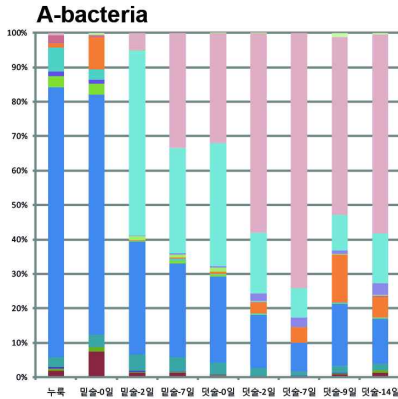


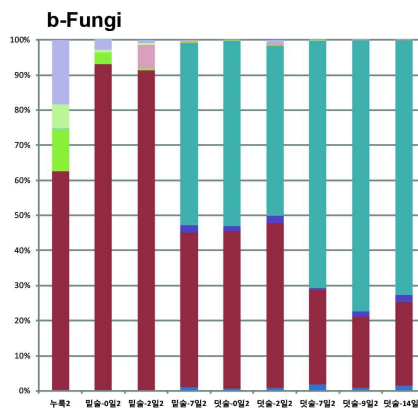
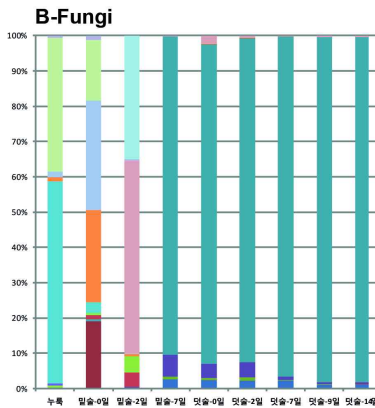
그림 2-3-2. 우수누룩 3종 및 대조구누룩의 미생물 균집 분석



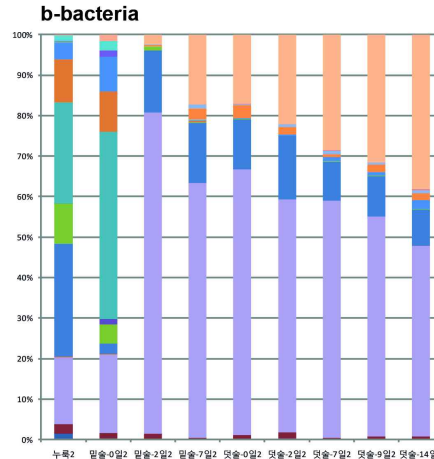
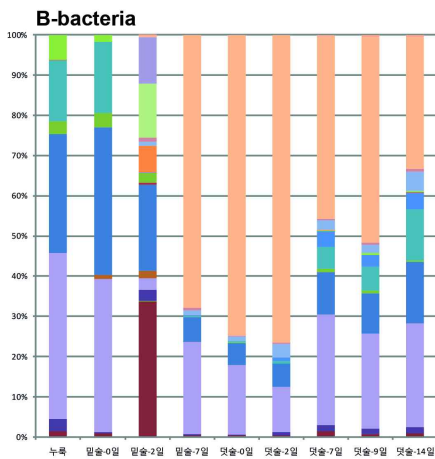
- Other
- uncultured fungus
- Rhizopus oryzae*
- Rhizopus microsporus*
- Rhizomucor variabilis*
- Lichtheimia ramosa*
- Lichtheimia corymbifera*
- Aspergillus fumigatus*
- Aspergillus flavus* var. *oryzae*
- Aspergillus flavus*
- Aspergillus candidus*
- Aspergillus* sp.
- Saccharomyces kudriavzevii*
- Saccharomyces cerevisiae*
- Isatchenia orientalis*
- Isatchenia* sp.
- Wickerhamomyces anomalus*
- Wickerhamomyces* sp.
- Saccharomycetales* sp.



- Sporacetigenium*
- Lactococcus*
- Weissella*
- Leuconostoc*
- Pediococcus*
- Lactobacillus*
- Enterococcus*
- Bacillus*
- Firmicutes* gen.
- Streptophyta*
- Pseudomonas*
- Acinetobacter*
- Pantoea*
- Klebsiella*
- Escherichia/Shigella*
- Erwinia*
- Enterobacter*
- Cronobacter*
- Enterobacteriaceae* gen.
- Enterobacteriaceae* gen.
- Propionibacterium*



- uncultured fungus
- Rhizopus oryzae*
- Rhizopus microsporus*
- Rhizomucor variabilis*
- Lichtheimia ramosa*
- Lichtheimia corymbifera*
- Aspergillus fumigatus*
- Aspergillus flavus* var. *oryzae*
- Aspergillus flavus*
- Aspergillus candidus*
- Aspergillus* sp.
- Saccharomyces kudriavzevii*
- Saccharomyces cerevisiae*
- Wickerhamomyces anomalus*
- Wickerhamomyces* sp.
- Saccharomycetales* sp.
- Other



- Sporacetigenium*
- Lactococcus*
- Weissella*
- Leuconostoc*
- Pediococcus*
- Lactobacillus*
- Enterococcus*
- Paenibacillus*
- Exiguobacterium*
- Bacillus*
- Firmicutes* gen.
- Streptophyta*
- Pseudomonas*
- Acinetobacter*
- Serratia*
- Pantoea*
- Klebsiella*
- Escherichia/Shigella*
- Erwinia*
- Enterobacter*
- Cronobacter*
- Citrobacter*
- Enterobacteriaceae* gen.
- Enterobacteriaceae* gen.

그림 2-3-3. 우수누룩 및 대조군의 발효기간 중 미생물 군집변화 (계속)

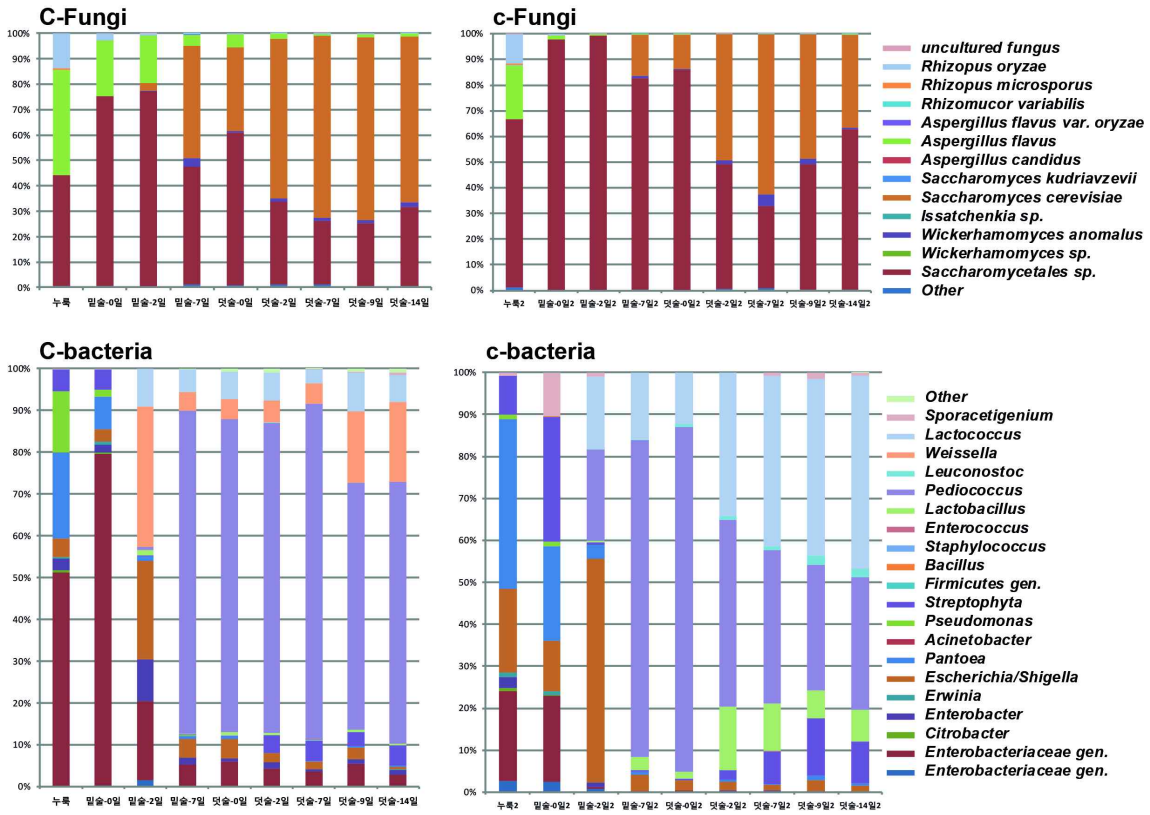


그림 2-3-3. 우수누룩 및 대조군의 발효기간 중 미생물 군집변화

A: 오메기곡, a: 오메기곡(밀가루제외)

B: 백수환동주곡, b: 백수환동주곡(녹두제외)

C: 미곡, c: 미곡(여뀌 제외)

2. 우수 누룩 및 술덧의 발효기간별 대사체 분석

가. ^1H NMR 기반 대사체 프로파일링 분석

(1) 발효기간에 따른 술덧의 대사체 분석

^1H NMR 기반 3종의 우수누룩 및 시판누룩으로 양조한 술덧의 발효기간별 대사체 분석결과를 아래 그림 2-3-4, 그림 2-3-5, 그림 2-3-6, 그림 2-3-7에 나타내었다. 발효 중 술덧 대사체 프로파일링 분석결과, 덧술 후 대사체 프로파일은 누룩 및 밀술과 크게 상이한 것으로 나타나 일부 outlier 및 누룩, 밀술을 제외한 분석결과를 함께 제시하였다(각 그림에 small letter 표기). 오메기곡(A, B), 백수환동주곡(C, D), 미곡(E, F)의 대사체 분석 결과 각 누룩의 부재료인 밀가루, 녹두, 여뀌가 첨가된 누룩은 각 샘플간의 재현성이 미첨가된 누룩에 비해 감소하는 경향을 보여, 누룩에 부재료가 첨가될 경우 동일한 발효 품질을 유지하기 위한 누룩제조 및 양조의 정확한 품질관리가 요구될 것으로 사료된다.

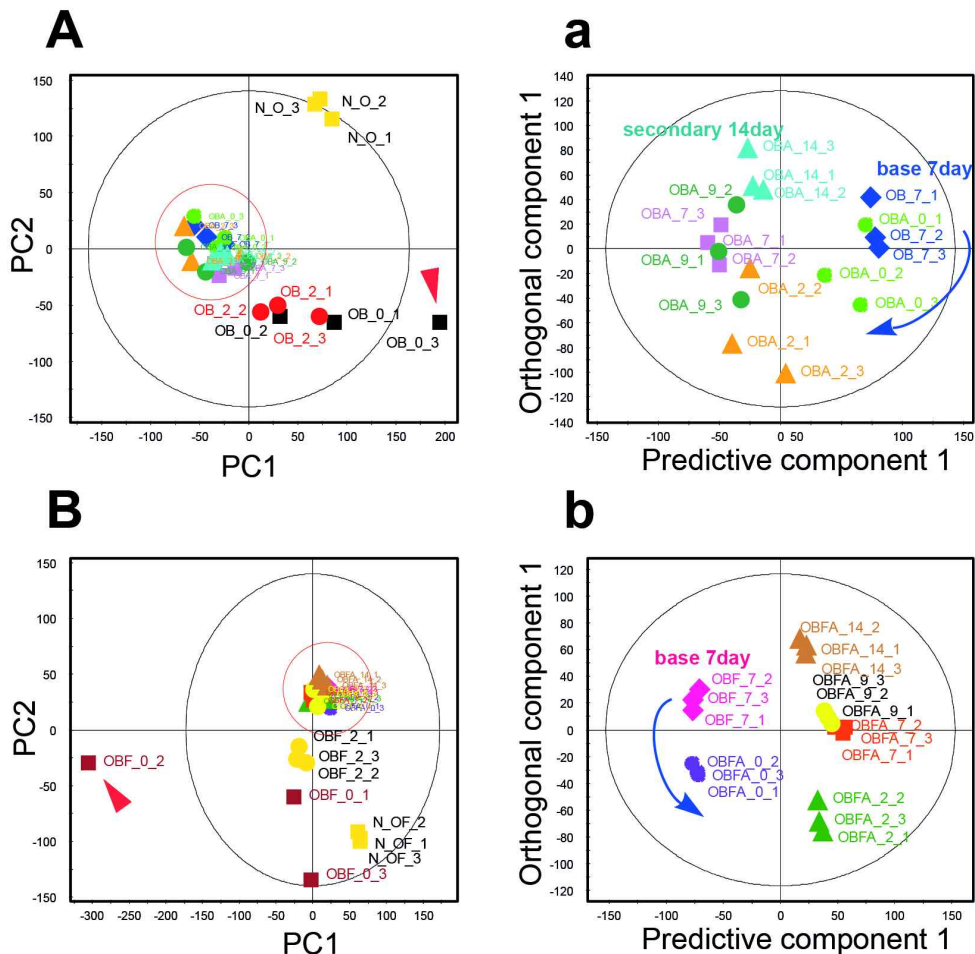


그림 2-3-4. 오메기곡(A, a) 및 밀가루제의 오메기곡(B, b)을 사용한 술덧의 ^1H NMR 기반 발효기간 중 대사체 프로파일

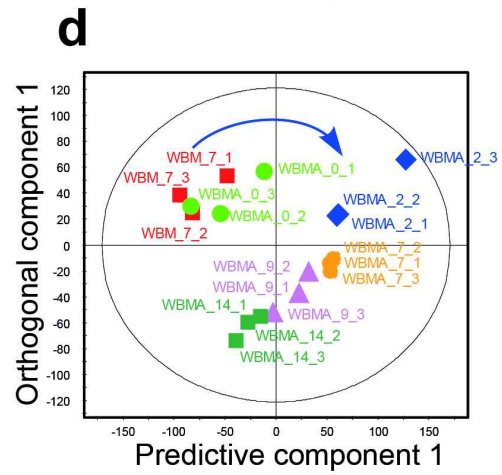
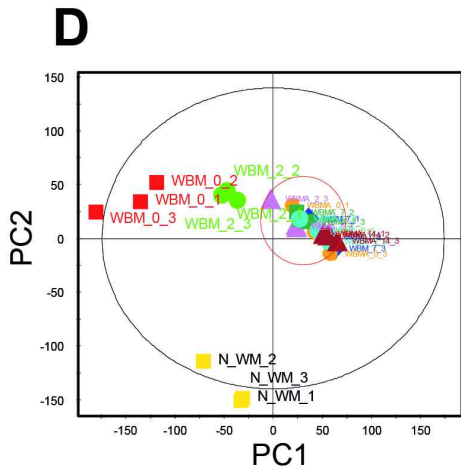
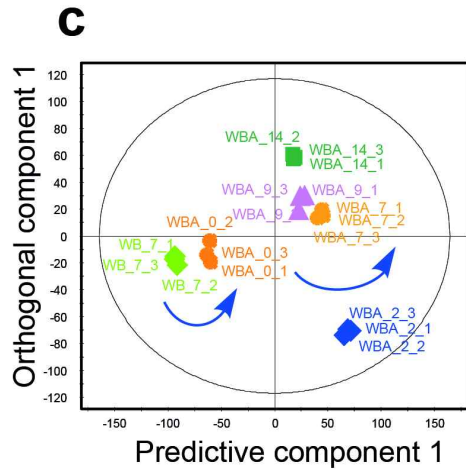
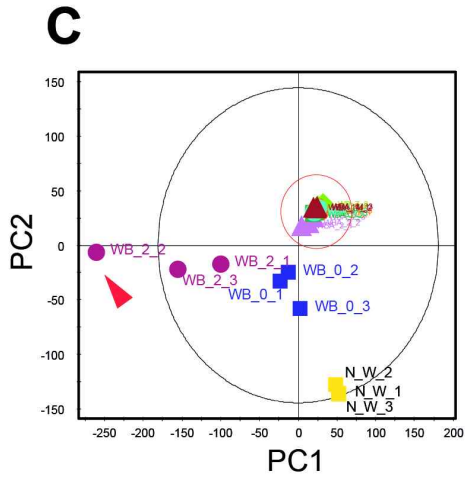


그림 2-3-5. 백수환동주곡(C, c) 및 녹두 제외 백수환동주곡(D, d)을 사용한 술덧의 ^1H NMR 기반 발효기간 중 대사체 프로파일

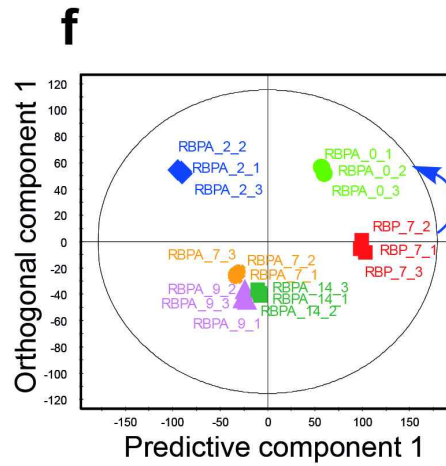
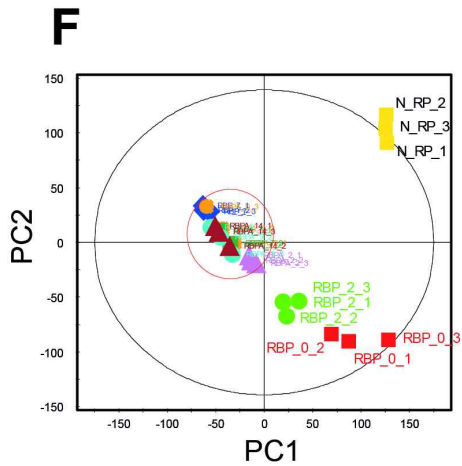
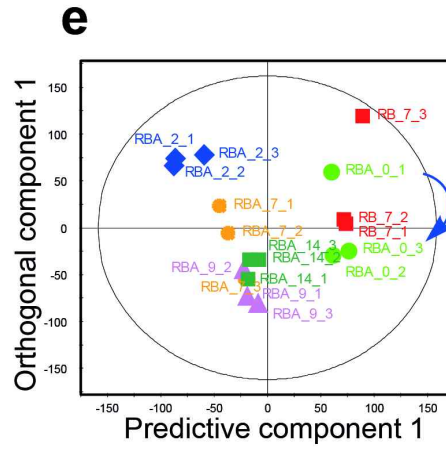
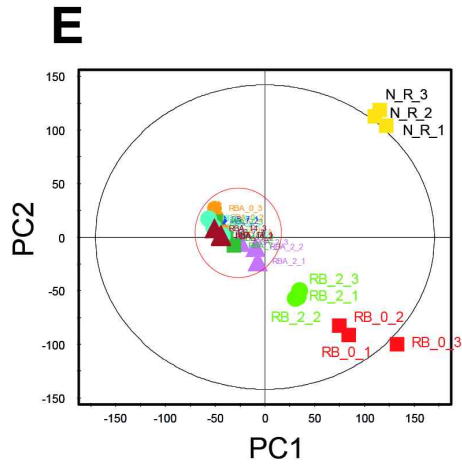


그림 2-3-6. 미곡(E, e) 및 여뀌 제외 미곡(F, f)을 사용한 술덧의 ^1H NMR 기반 발효기간 중 대사체 프로파일

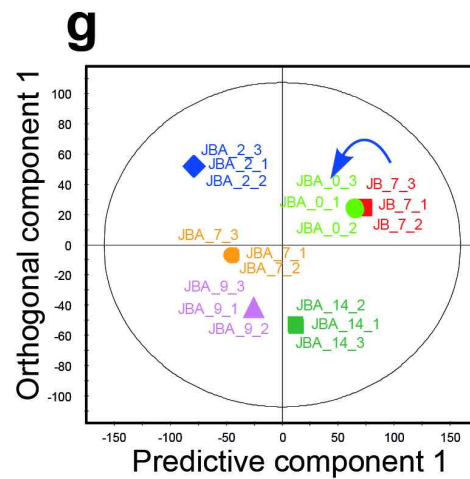
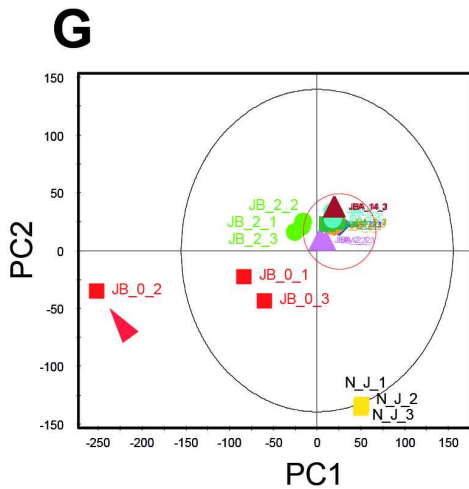


그림 2-3-7. 시판누룩을 사용한 술덧의 ^1H NMR 기반 발효기간 중 대사체 프로파일

밀술 2일차 및 덧술 7일차 술덧의 대사체 분석결과를 아래 그림 2-3-8에 나타내었다. 분석결과 밀술 2일차에는 환원당 및 oligosaccharides의 함량이 매우 높은 반면 발효기간이 길어지면서 발효 후기 술덧에는 tyrosine, tyramine, lactate, proline, glycerol, choline, succinate, alanine, valine, isoleucine, leucine의 함량이 크게 증가하였다. 본 결과는 향후 각 그룹간 차이에 영향을 주는 대사체 추가동정과 metagenome, 향기성분 결과와의 상관관계 통합 분석을 통해 전통누룩 및 이를 활용해 양조한 주류의 품질요인을 구명 연구에 활용될 것이다.

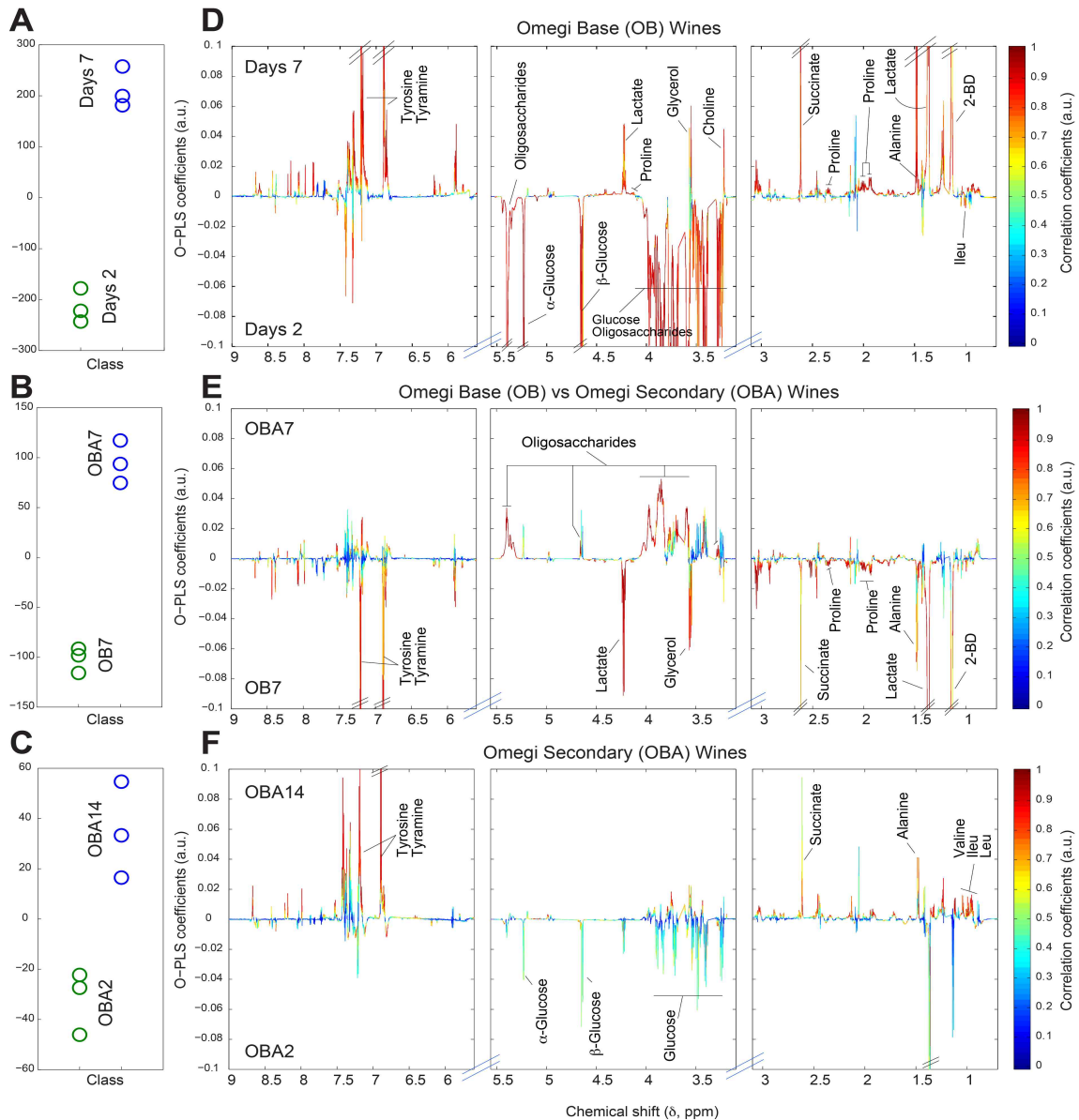


그림 2-3-8. OPLS-DA score (A-C) and loading (D-F) plots generated from ^1H NMR spectra of Omega base(OB) and secondary(OBA) wineS. In the OPLS loading plot to findout themetabolic difference between OB wines collected at days 2 and 7 post fermentation(D), the upper section represents the metabolites that were higher in OB wines fermented for 7 day than those fermented for 2 day, whereas the lower section in indicates the metabolites that were lowed in OB wines fermented for 7 day.

(2) 누룩의 부재료 첨가 여부에 따른 전통주의 대사체 변화

오메기곡, 백수환동주곡, 미곡의 부재료인 각 밀가루, 녹두, 여뀌즙이 누룩과 발효과정 중 술덧의 대사체에 미치는 영향을 알아보기 위하여 1H NMR을 활용한 대사체 프로파일을 분석한 결과를 그림 2-3-9에 나타내었다. 덧술 14일 후 술덧의 각 누룩별 오메기곡(D), 백수환동주곡(F), 미곡(H)의 PCA score plots을 분석한 결과 각 부재료 첨가 유무가 최종 제품의 비휘발성 대사체 프로파일에 영향을 주는 것으로 나타났다.

각 부재료 첨가에 영향을 받는 대사체를 loading plot에 나타낸 결과(J-L), 오메기곡에 밀가루를 첨가하지 않았을 때 tyrosine, lactate, GABA, asparagine, methionine, BCAA, 2,3-Butandiol(2,3-BD)등의 대사체가 증가하였으며, 밀가루를 첨가하였을 때 oligosaccharides, threonine 등의 대사체가 증가하였다. 한편 백수환동주곡에 녹두를 첨가하지 않았을 때 glycerol, succinate, 2,3-BD등의 성분이 증가하였으나, 녹두를 첨가하였을 때 아미노산, oligosaccharides, GABA, proline lactate 등의 많은 대사체 성분이 증가해 단백질 유래의 부재료가 백수환동주곡의 누룩 특성을 결정짓는 것으로 생각된다. 미곡의 경우 부재료인 여뀌를 첨가하였을 때 GABA, 2,3-BD 등을 제외한 아미노산, 유기산류, BCAA 등의 대사물질이 증가하였다.

이러한 누룩 기반 전통주의 비휘발성 대사체는 발효제로 첨가되는 누룩의 원료조성에 의해 많은 영향을 받으며, 반면 전통주의 휘발성 대사체가 누룩의 원료조성보다는 원료에 따른 미생물 community에 더 많은 영향을 받았는데 이러한 결과는 누룩을 사용하는 전통주의 품질특성 규명 면에서 매우 흥미로운 결과이다.

종합하면, 재현된 전통누룩 중 우수 누룩으로 선정된 오메기곡, 백수환동주곡, 미곡으로 양조한 전통주의 휘발성, 비휘발성 대사산물 및 각 발효기간별 미생물 균총을 각각 GC/MS, 1H NMR, metagenome 분석하였다. 분석결과 각 누룩별 미생물 균총과 대사체는 발효기간별 크게 변화하였으며, 이러한 결과를 바탕으로 각 누룩의 특성과 누룩을 활용한 전통주의 발효 중 변화를 규명할 수 있었다. 향후 누룩 및 전통주의 대사체 변화에 영향을 미치는 미생물 균총변화를 추가로 규명할 것이며, 얻어진 결과는 전통주 특성규명 및 품질관리 지표로 활용할 예정이다.

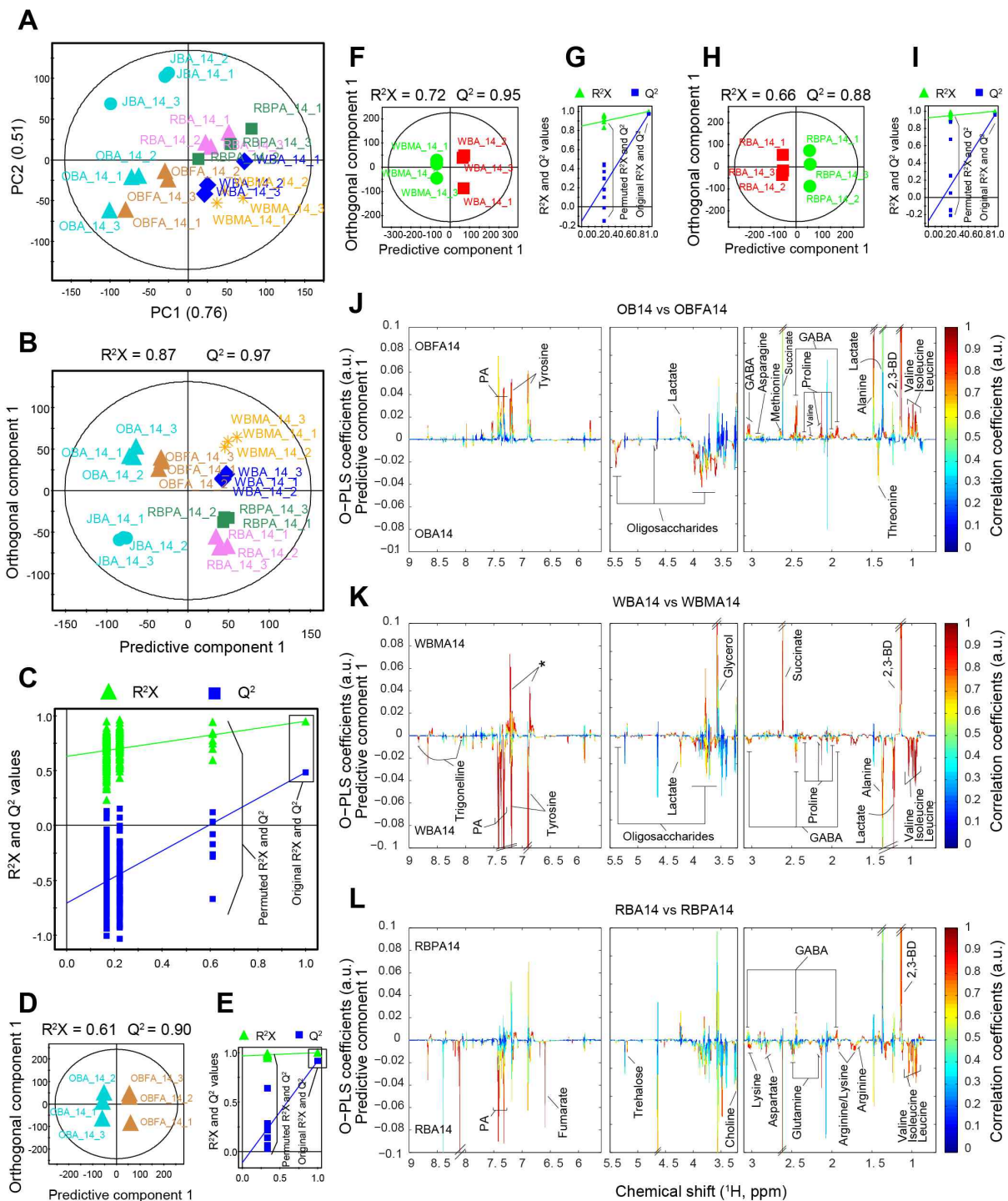


그림 2-3-9. OPLS-DA score (A-C) and loading (J-L) plots generated from 1H NMR spectra of Omega base(OB) and secondary(OBA) wines. In the OPLS loading plot to find out the metabolic difference between OB wines collected at days 2 and 7 post fermentation(D), the upper section represents the metabolites that were higher in OB wines fermented for 7 day than those fermented for 2 day, whereas the lower section in indicates the metabolites that were lowed in OB wines fermented for 7 day.

나. GC/MS 기반 향기성분 프로파일링 분석

전통누룩을 사용한 약주 술덧의 GC/MS 기반 발효기간 중 향기성분 프로파일을 그림 2-3-10에 나타내었다. 총 90종의 향기성분 유래 대사체 프로파일을 분석한 결과 누룩, 밀술 0일, 밀술 2일은 덧술에 비해 매우 상이한 향기성분 패턴을 보이는 것으로 나타나 NMR 활용 대사체 분석결과와 동일한 경향을 보였다. 이는 23종의 주요 향기성분을 기반으로 분석하였을 때도 같은 결과를 보여 전통누룩을 활용한 술덧의 향기성분 패턴은 밀술과 발효 초기 크게 변화하는 것으로 사료된다. 특히 발효가 진행될수록 관여되는 향기성분의 개수와 강도가 증가하고 전통주의 바람직한 향기성분으로 알려진 에스테르류와 알코올류가 크게 증가하였다.

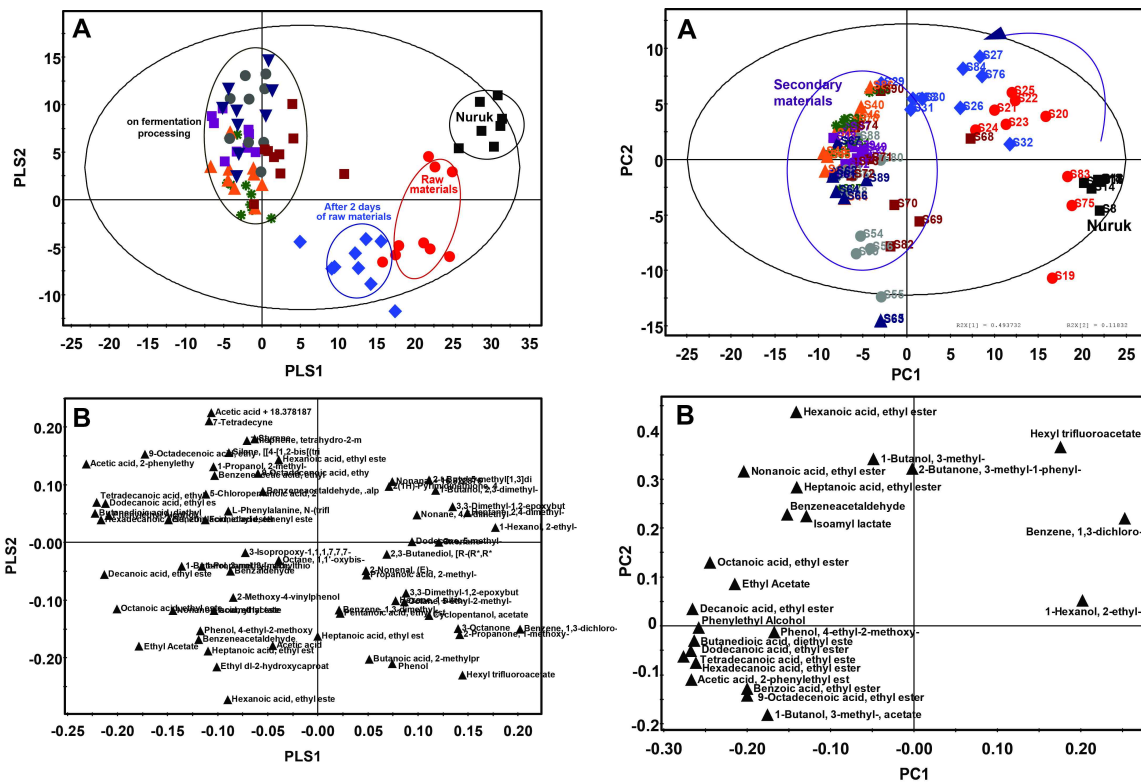


그림 2-3-10. 전통누룩을 사용한 약주 술덧의 GC/MS 기반 발효기간 중 향기성분 프로파일

(1) 누룩의 부재료가 최종 제품의 휘발성 대사산물의 변화에 미치는 영향

우수누룩 3종과 상업용 누룩을 사용하여 담금한 전통주의 휘발성 대사산물 분석결과를 그림 2-3-11에 나타내었다. 분석결과 백수환동주곡의 녹두를 제외한 오메기곡과 미곡은 원료의 조성과 부재료가 최종 전통주 제품의 휘발성 대사체 프로파일에 영향을 주지 않는 것으로 나타났다. 반면 백수환동주곡은 부재료인 녹두의 첨가여부가 최종 제품의 향기성분 패턴을 변화시켰다. 이러한 변화는 백수환동주곡 원료 조성에 따른 미생물 군집변화에 기인한 것으로 여겨지는데, 오메기곡과 미곡의 경우 부재료 첨가는 누룩자체의 미생물 균총을 크게 변화시키지 않는 것으로 나타났다(그림 2-3-12). 종합하면, 누룩기반 전통주의 향기성분 패턴은 사용되는 누룩의 원료조성 보다는 원료에 따른 미생물에 의한 것이며, 반면 최종제품의 비휘발성 대사산물은 누룩자체의 원료에 큰 영향을 받는 것으로 나타났다.

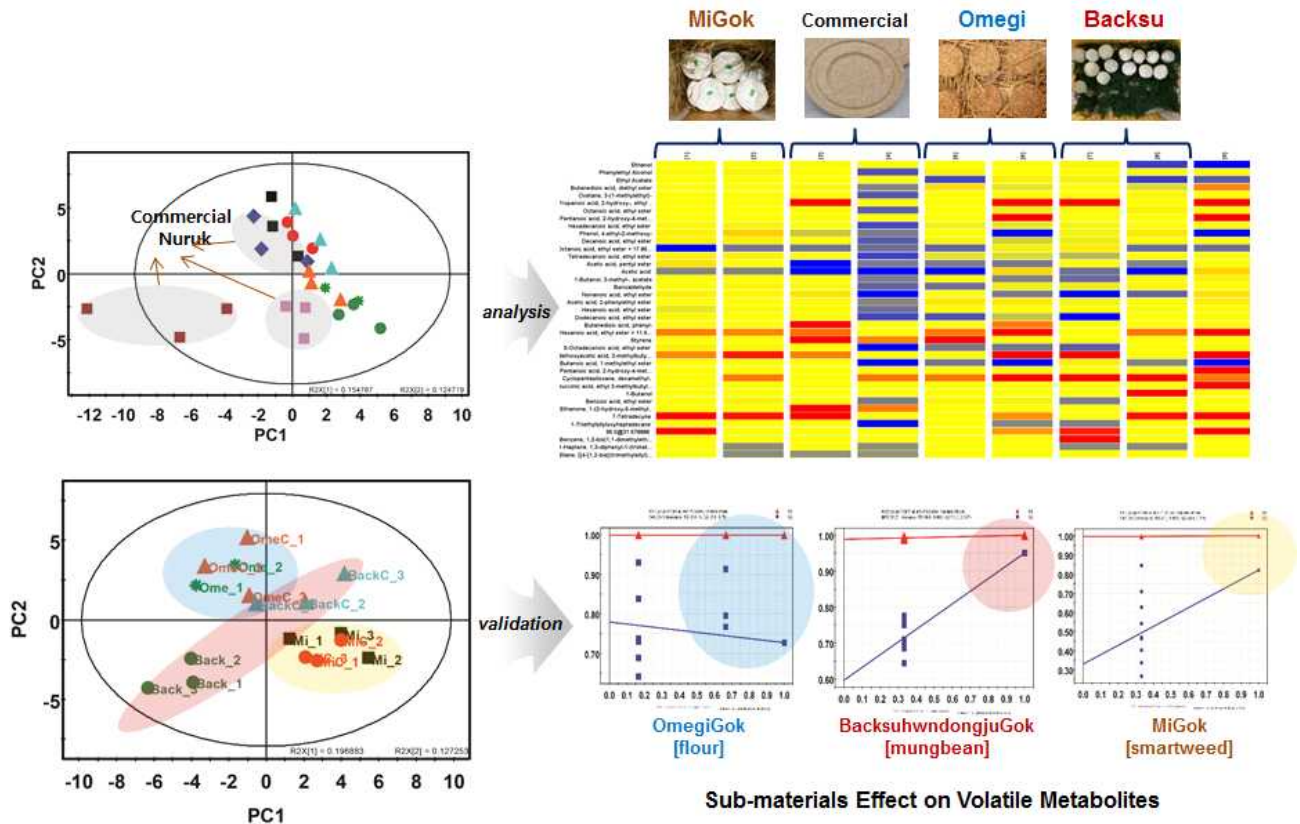


그림 2-3-11. 누룩의 부재료가 최종 제품의 휘발성 대사산물의 변화에 미치는 영향

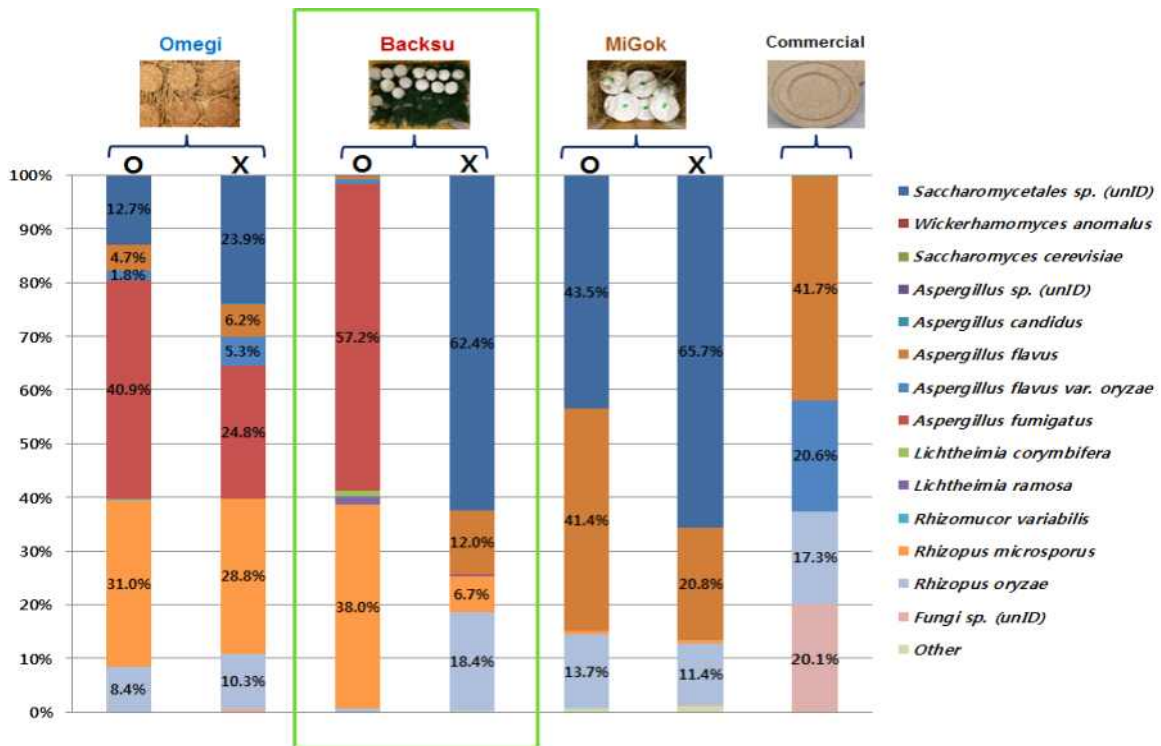


그림 2-3-12. 누룩의 부재료 첨가 유무에 따른 누룩의 미생물 군집분석

표 2-3-5. 우수누룩 3종 및 시판누룩 1종을 사용한 전통주의 향기성분 분석 (unit: %Area)

No.	Compound	RT	RI	S68	S69	S70	S71	S72	S73	S74	S82	S90
				오메기곡	백수환동주곡	미곡	오메기곡 (밀가루제외)	백수환동주곡 (녹두제외)	미곡 (여뀌제외)	시판누룩 (10%)	시판누룩 (5%)	시판누룩 (20%)
1	Ethyl acetate	3.39	<1000	13.77	7.61	12.34	6.19	4.53	13.15	15.74	12.41	10.51
2	Ethyl alcohol	3.91	<1000	41.15	53.73	53.39	42.52	44.81	46.08	32.80	46.02	40.16
3	Isobutyl acetate	5.28	1028	0.45	-	0.24	0.13	-	0.28	0.18	0.19	-
4	Ethyl butanoate	5.77	1049	1.17	0.16	0.13	0.16	0.20	0.14	0.08	0.08	0.14
5	Ethyl isovalerate	6.41	1075	0.23	0.09	-	0.07	0.00	0.00	-	-	-
6	Isobutanol	7.25	1108	2.09	0.84	2.67	2.26	1.07	1.87	0.85	0.40	0.95
7	Isoamyl acetate	8.14	1138	2.56	0.79	1.58	1.47	0.42	1.40	1.56	0.99	1.08
8	1-Butanol	8.80	1159	-	0.21	0.15	0.11	0.39	0.17	0.10	0.05	-
9	Limonene	9.81	1193	0.05	0.11	0.04	0.09	0.04	-	0.02	0.16	-
10	Isoamylalcohol	10.55	1215	17.11	10.85	12.06	13.16	12.55	10.34	7.34	7.50	9.45
11	Ethylhexanoate	11.54	1244	2.32	2.15	1.13	1.78	1.54	1.46	1.44	1.68	2.44
12	Styrene	12.20	1263	0.16	0.09	0.09	0.08	-	-	0.09	0.15	0.12
13	Ethyl heptanoate	14.53	1333	0.04	0.05	0.03	0.09	0.12	0.10	0.06	0.20	0.36
14	Ethyl lactate	14.99	1346	0.29	0.66	0.31	0.21	0.06	0.36	4.89	1.26	0.85
15	1-Hexanol	15.23	1354	0.60	0.33	0.21	0.25	0.05	0.10	0.86	0.54	1.17
16	1,3-Di-tert-butylbenzene	17.80	1432	0.19	0.10	0.17	0.08	0.15	0.20	0.23	0.09	0.04
17	Ethylcaprylate	18.10	1442	2.19	6.72	3.66	4.81	6.72	4.70	5.81	4.89	9.08
18	Acetic acid	18.36	1450	1.20	0.83	1.21	0.85	0.54	1.06	1.26	2.15	0.95
19	2-Ethylhexanol	19.72	1493	0.16	-	0.08	0.09	0.08	0.06	-	-	0.08
20	Benzaldehyde	21.19	1541	0.04	0.03	0.12	0.07	0.06	0.08	0.13	-	0.09
21	Ethyl nonanoate	21.33	1546	0.04	-	0.07	0.13	0.12	0.13	-	0.20	1.01
22	Ethyl dl-2-hydroxycaproate	21.41	1548	0.09	0.24	0.11	0.09	0.08	0.10	4.90	0.60	0.09
23	1-Octanol	21.83	1562	0.08	0.13	0.08	0.09	0.07	-	0.38	0.22	0.44
24	Isoamyl lactate	22.23	1575	0.15	0.28	0.12	0.10	-	0.12	0.64	0.46	0.25
25	Ethyl decanoate	24.30	1646	0.46	1.70	1.14	1.50	2.36	2.10	2.59	1.67	3.75
26	Benzeneacetaldehyde	24.63	1657	0.08	0.11	0.10	0.17	0.17	0.10	0.10	0.13	0.13
27	Ethylbenzoate	25.29	1680	0.03	0.04	0.04	0.07	0.07	0.08	0.04	0.06	0.05
28	Diethyl succinate	25.41	1684	0.20	0.29	0.15	0.72	0.18	0.27	6.48	0.55	0.55
29	3-(Methylthio)-1-propanol	26.46	1721	0.09	0.11	0.07	0.14	0.09	0.07	0.05	0.12	0.06
30	2-Phenylethylacetate	29.28	1824	0.06	0.08	0.08	0.18	0.00	0.14	0.19	0.24	0.16
31	Ethyl laurate	29.95	1850	0.02	0.09	0.06	0.09	0.14	0.15	0.20	0.13	0.28
32	Benzyl alcohol	30.77	1881	0.01	0.02	-	-	0.03	0.01	0.02	0.03	0.02
33	Phenylethylalcohol	31.66	1915	12.45	11.09	7.59	21.40	21.51	11.88	9.96	16.26	14.78
34	4-Ethylguaiacol	34.73	2038	0.34	0.32	0.39	0.51	1.22	2.10	0.20	0.10	0.00
35	Ethylmyristate	35.15	2055	0.04	0.08	0.13	0.14	0.23	0.40	0.29	0.19	0.32
36	4-Ethylphenol	38.06	2178	-	-	0.05	-	0.09	0.12	-	-	-
37	Ethyl palmitate	39.91	2260	0.06	0.08	0.22	0.20	0.31	0.68	0.53	0.25	0.61
				100	100	100	100	100	100	100	100	100

다. 유기산 분석

(1) 전통누룩 기반 약주의 발효일자별 유기산 분석

전통누룩 기반 약주의 발효일자별 술덧의 유기산 함량 변화를 다음 표 2-3-6에 나타내었다. 밀술 후 덧술발효 기간 중 citric acid는 다소 증가하는 경향을 보인 반면, lactic acid, malic acid, oxalic acid, succinic acid는 덧술 발효기간에 따라 증가하였다.

(2) 누룩별 약주의 유기산 분석

우수누룩 3종 및 시판누룩을 사용한 약주의 유기산 분석 결과를 다음 표 2-3-7에 나타내었다. 각 누룩별로 유기산 함량에 유의적인 차이를 보여 미곡을 사용한 약주는 가장 높은 citric acid, lactic acid, malic acid 함량을 가졌다. 상업용 누룩인 시판누룩은 재현 누룩 3종에 비해 가장 낮은 citric acid 함량을 보인 반면 유의적으로 높은 lactic acid, malic acid, oxalic acid 함량을 보였다.

(3) 우수누룩 3종의 부재료 첨가 유무에 따른 약주의 유기산 함량 변화

부재료 첨가에 따른 우수누룩 3종 기반 약주의 유기산 함량 결과를 다음 표 2-3-8에 나타내었다. 각 누룩의 부재료 첨가 유무는 특히 약주의 lactic acid와 malic acid의 함량 변화에 큰 차이를 가져오는 것으로 보여졌다. 오메기곡을 사용한 약주의 경우 부재료인 밀가루는 약주의 lactic acid와 malic acid에 유의적인 차이를 나타내어 밀가루를 첨가하지 않았을 때 각 lactic acid와 malic acid의 유기산 함량이 유의적으로 증가하였다($p < 0.05$). 백수환동주곡을 사용한 약주는 녹두를 첨가하였을 때 lactic acid와 malic acid의 함량이 유의적으로 크게 증가하여 두류의 단백질 성분이 이들 유기산 생성에 크게 작용하는 것으로 나타났다. 반면 녹두를 첨가하지 않은 약주는 succinic acid의 함량이 녹두첨가 누룩에 비해 유의적으로 증가하였음. 미곡을 사용한 약주는 여뀌를 첨가하지 않았을 때 lactic acid와 malic acid의 함량이 유의적으로 크게 증가하여, 여뀌의 첨가가 이들 유기산의 생성을 저해하는 것으로 나타났다.

표 2-3-6. 발효일자별 술덧의 유기산 함량 변화

(unit: mg/L)

	Citric acid*	Lactic acid*	Malic acid*	Oxalic acid*	Succinic acid*
밑술 0일	27.28±17.79a1)	35.99±26.16d	21.92±22.10b	1211.62±546.27b	19.02±10.35f
밑술 2일	1.70±1.84c	4593.69±695.90b	2.88±1.61b	1599.50±382.23a	417.35±93.00e
밑술 7일	5.78±1.78c	5528.48±739.96a	20.33±13.04b	786.27±81.69c	702.95±116.95bc
덧술 0일	5.08±1.18c	4503.78±693.75b	19.02±9.18b	842.25±180.27c	557.59±88.16d
덧술 2일	17.99±3.61b	3774.24±620.04c	30.44±20.62b	1242.95±280.12b	642.84±97.04c
덧술 7일	14.55±5.89b	3639.55±550.30c	116.24±108.32a	927.69±157.77c	736.39±90.04ab
덧술 9일	13.02±5.26b	3771.07±886.15c	142.51±120.16a	863.25±151.37c	761.59±92.40ab
덧술 14일	12.09±4.82b	4001.94±1322.05bc	148.43±130.97a	878.56±174.39c	799.00±84.68a

1)a-f: Different superscripts within columns are significantly different at p<0.05 by Duncan' s multiple range test

표 2-3-7. 누룩별 약주의 유기산 함량 차이

(unit: mg/L)

	Citric acid*	Lactic acid*	Malic acid*	Oxalic acid	Succinic acid
오메기곡	14.10±2.01a1)	3207±232.35b	21.17±3.83b	934.41±48.00	787.44±56.85
백수환동주곡	14.97±1.71a	3358.72±964.96b	133.45±6.79ab	832.43±158.60	859.98±108.19
미곡	12.49±1.53a	4104.71±656.87b	231.94±183.87a	767.42±230.60	810.14±19.38
시판누룩	1.50±0.14b	6671.21±40.32a	265.89±15.05a	1081.43±27.06	677.92±45.21

1)a-b: Different superscripts within columns are significantly different at p<0.05 by Duncan' s multiple range test

표 2-3-8. 부재료 첨가에 따른 약주의 유기산 함량 차이

(unit: mg/L)

오메기곡	Citric acid	Lactic acid*1)	Malic acid*	Oxalic acid	Succinic acid
밀가루 첨가	14.57±2.21	3012.68±81.71	17.89±0.25	921.35±78.01	746.35±36.23
밀가루 무첨가	13.63±2.52	3402.87±55.13	24.46±0.93	947.46±12.05	828.53±40.38

1)*P<0.05

(unit: mg/L)

백수환동주곡	Citric acid	Lactic acid***	Malic acid***	Oxalic acid	Succinic acid*
녹두 첨가	14.74±0.30	4192.97±72.00	138.39±2.23	892.30±18.87	767.93±17.25
녹두 무첨가	15.20±2.91	2524.47±65.92	12.850±5.97	772.57±246.52	952.02±30.50

1)*P<0.05

(unit: mg/L)

미곡	Citric acid	Lactic acid***	Malic acid***	Oxalic acid	Succinic acid
여뀌 첨가	12.11±1.51	3540.20±121.52	72.75±2.64	647.26±25.60	818.63±12.76
여뀌 무첨가	12.86±2.05	4669.22±70.72	391.13±7.42	887.58±318.01	801.66±26.00

1)*P<0.05

4절 우수 전통누룩의 산업화

최종 우수 누룩 선정 및 신제품 3종 개발

제조된 전통누룩 중 우수누룩 선별연구를 통하여 최종 우수누룩 3종을 선발하였다. 선발 우수누룩 3종의 주류 제조공정 표준화 진행하여 시제품 3종(그림 2-4-1)을 개발하였다. 해당 시제품 3종의 유통안정성 및 소비자 조사를 통한 상품성을 확인 후 제조방법 신고를 완료 (2016.6.13) 하였다.



그림 2-4-1. 국순당 오메기주 / 백수환동주 / 미주 시제품

1. 우수 누룩의 선정 및 주류품질 요인 분석

가. 우수누룩 선별연구

(1) 발효적성 및 관능품질 (22종 → 11종)

선별 누룩 28종 중 시판누룩을 제외한 자가제조누룩 22종에 대한 추가 재현 담금을 진행하였다. 통상 누룩의 당화력(역가)는 300Unit 내외로 제조되는 것이 대부분이나, 본 연구에서는 공급받은 전통 누룩의 당화력을 200Unit 미만, 200~400Unit, 400Unit 이상으로 구분하여 누룩을 총 발효 원료량의 10~20% 사용하였을 때 발효 적성과 비교하였다. 발효적성 및 관능품질에 따라 아래 이 중 11종(오메기곡, 진주춘추곡, 요곡, 대주백타곡, 조곡법, 면곡, 동양주곡, 신곡2, 분곡, 백수환동주곡, 미곡)을 선별하였다. 선별된 누룩은 당화력 200Unit 미만 4종, 200~400Unit 4종, 400Unit 이상 3종이었다(표 2-4-1, 표 2-4-2, 표 2-4-3).

표 2-4-1. 당화력 200Unit 미만

누룩명칭	당화력	알코올	pH	산도	R/S	관능 점수
추모곡	194.8	16.6	4.1	7.0	2이하	3.2
오메기곡	151.4	18.57	4	6.0	5.8	4.5
진주춘추곡	163.5	16.38	4	5.5	10.6	3.6
여곡	85.5	14.45	3.7	5.5	8.1	3.3
백곡	164.6	13.23	3.6	9.2	12	3.2
곡	190.3	14.55	4.2	7.5	8.1	3
요곡	143.4	17.56	4.3	5.7	7.5	3.8
대주백타곡	189.5	13.57	3.9	6.1	30	4.2

표 2-4-2. 당화력 200Unit 이상 400Unit 미만

누룩명칭	당화력	알코올	pH	산도	R/S	관능 점수
죽곡	319.3	17.03	4.0	8.9	2이하	3.2
죽곡2	265.9	16.27	4.0	7	9.0	3.2
곡	346.7	13.32	4.1	12.7	25	3
이화주곡	241.1	17.3	4.3	7.2	7.6	3.4
조곡법	283.8	15.09	4.3	6.6	19.0	3.7
녹미주곡	217.7	16.08	4.4	7.4	2이하	3
면곡	265.5	12.83	3.8	5.5	30	4.4
동양주곡	207.2	14.32	4.2	5	7	4.1
신곡2	340.4	15.69	4.3	5.4	8.3	3.7

표 2-4-3. 당화력 400Unit 이상

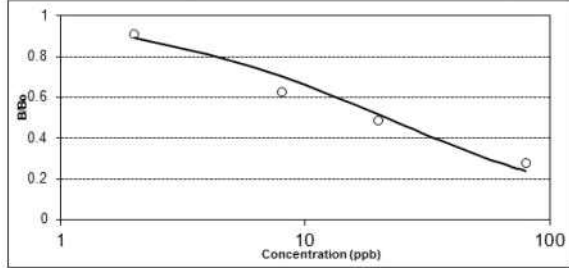
누룩명칭	당화력	알코올	pH	산도	R/S	관능 점수
분곡	565.5	16.09	4.0	9.5	2이하	3.8
향온곡	408.6	14.22	4.1	7.5	40.2	3.5
백수환동주곡	512.8	17.24	4.3	6.2	10	4.4
내부비전곡	565.2	14.58	3.8	5.4	17.0	3.4
미곡	547.9	17.12	4.3	6.3	8.2	3.7

(2) 유해물질 안정성 (11종 → 7종)

발효적성 및 관능품질 재현 선별을 통해 선별된 11종의 누룩에 대한 총 아플라톡신 분석을 진행하였다. 실험은 Total Aflatoxins kit (sigma)를 이용해 진행하였다. 대주백타곡을 제외하고는 법적 기준치 10ppb를 초과하지 않았지만, 위험 수준을 고려하여 1ppb 이하의 선별누룩 7종(오메기곡, 진주춘추곡, 요곡, 신곡, 분곡, 백수환동주곡, 미곡)을 선별하였다(그림 2-4-2).

Standard Curve

Standard	Abs. 1	Abs. 2	B/Bo
Neg. Ctl. Abs =	1.467	1.578	
2 ppb Abs =	1.379	1.399	0.91
8 ppb Abs =	1.035	0.878	0.63
20 ppb Abs =	0.741	0.740	0.49
80 ppb Abs =	0.427	0.416	0.28



Result Calculations

No.	Sample code	Sample abs 1	Sample abs 2	Conc (ppb)
1	오메기곡	1.484	1.460	0
2	진추춘추곡	1.530	1.430	0
3	요곡	1.503	1.522	0
4	대주백타곡	0.978	0.976	11
5	조곡법	1.319	0.805	8
6	면곡	1.291	1.233	4
7	동양주곡	1.226	1.231	4
8	신곡2	1.484	1.422	1
9	분곡	1.440	1.430	1
10	백수환동주곡	1.524	1.520	0
11	미곡	1.530	1.450	0

그림 2-4-2. Total Aflatoxins 실험 결과

(3) 주질 안정성 (7종 → 3종)

유해물질 안정성이 확보된 7종의 누룩으로 제조된 시료의 주질 안정성을 5도 냉장, 40/60도 가혹조건에서 저장하며 색도(L:백색도, a:적색도, b:황색도), 탁도, 흡광도를 측정하였다. 우수 누룩으로 선정된 누룩으로 제조한 술을 68℃에서 순간 살균하여 5℃로 살균하였다. 살균한 각 누룩의 술을 5℃, 40℃, 60℃에 보관하면서 경시적으로 색도, 탁도 및 550nm에서 흡광도를 측정하여 주질 안정성을 검토하였다. 주질 안정성은 전체적으로 양호했으나, 그 중 관능 선호도와 맛과 향 변화의 유지력이 가장 좋았던 오메기곡, 백수환동주곡, 미곡을 최종 선별누룩으로 선정하였다(표 2-4-4, 표 2-4-5, 표 2-4-6, 표 2-4-7, 표 2-4-8, 표 2-4-9, 표 2-4-10).

표 2-4-4. 오메기곡 담금주 주질 안정성

온도	경과일	색도			탁도	흡광도 (550nm)
		L	a	b		
5도	0	83.91	-0.9	19.17	0.238	0.0284
	1	83.91	-0.9	19.17	0.238	0.0284
	2	84.88	-0.94	19.17	0.237	0.0285
	4	86.28	-1	19.16	0.238	0.0284
	7	87.53	-1.05	19.17	0.239	0.0285
	10	89.28	-1.11	19.14	0.238	0.0286
	15	90.56	-1.19	19.18	0.239	0.0285
	21	92.96	-1.22	19.13	0.239	0.0286
	30	92.89	-1.37	19.43	0.24	0.0285
42	92.32	-1.44	20.87	0.239	0.0287	
40도	0	83.91	-0.9	19.17	0.238	0.0284
	1	82.87	-0.81	20.73	0.238	0.0329
	2	89.71	-0.94	20	0.239	0.0356
	4	91.43	-0.93	22.8	0.238	0.0418
	7	86.84	-0.52	26.06	0.239	0.0464
	10	88.26	0.22	28.48	0.238	0.0554
	15	83.8	0.82	31.93	0.239	0.0662
	21	85.4	1.63	34.4	0.239	0.084
	30	83.35	3.01	37.25	0.24	0.0902

온도	경과일	색도			탁도	흡광도 (550nm)
		L	a	b		
	42	75.3	7.8	39.85	0.241	0.1008
60도	0	83.91	-0.9	19.17	0.238	0.0284
	1	82.27	-0.74	22.61	0.239	0.0893
	2	86.97	-0.13	26.01	0.355	0.1055
	4	83.16	3.12	35.44	0.472	0.147
	7	67.57	12.48	38.69	0.716	0.3434
	10	64.96	18.95	40.92	1.06	0.3975
	15	49.02	28.97	33.06	1.41	0.6603
	21	31.71	34.03	21.79	2.64	1.2098

표 2-4-5. 진주층주곡 담금주 주질 안정성

온도	경과일	색도			탁도	흡광도 (550nm)
		L	a	b		
5도	0	87.18	-0.71	9.55	0.269	0.0112
	1	87.18	-0.71	9.55	0.269	0.0111
	2	88.91	-0.73	9.56	0.271	0.0115
	4	90.16	-0.81	9.53	0.275	0.0121
	7	91.73	-0.89	9.58	0.279	0.0132
	10	93.98	-0.88	9.61	0.281	0.0162
	15	94.86	-0.92	9.58	0.286	0.0184
	21	97.91	-1.02	9.51	0.285	0.0193
	30	98.01	-1.13	9.56	0.299	0.0255
	42	97.74	-1.25	9.59	0.305	0.0326
40도	0	87.18	-0.71	9.55	0.269	0.0112
	1	87.61	-0.84	11.15	0.309	0.0114
	2	94.46	-1.19	10.25	0.299	0.0117
	4	96.99	-1.45	12.1	0.313	0.0138
	7	96.46	-1.67	15.2	0.323	0.0152
	10	95.98	-1.69	15.66	0.345	0.0195
	15	95.23	-1.95	15.54	0.367	0.0219
	21	95.65	-1.79	17.18	0.379	0.0258
	30	95.37	-1.8	17.69	0.4	0.0462
	42	94.28	-2.26	23.09	0.489	0.0525
60도	0	87.18	-0.71	9.55	0.269	0.0112
	1	87.95	-0.85	12.42	0.339	0.0184
	2	93.88	-1.2	11.87	0.359	0.0265
	4	96.56	-1.34	15.91	0.39	0.0375
	7	94.36	-1.33	18.95	0.604	0.0456
	10	92.55	-1.12	22.91	0.784	0.0625
	15	87.95	-0.86	28.15	0.919	0.0786
	21	88	0.66	30.08	1.49	0.0876

표 2-4-6. 분곡 담금주 주질 안정성

온도	경과일	색도			탁도	흡광도 (550nm)
		L	a	b		
5도	0	85.59	-0.88	12.47	0.236	0.0207
	1	85.59	-0.88	12.47	0.236	0.0207
	2	86.76	-0.93	12.48	0.237	0.0208
	4	88.05	-1.02	12.51	0.237	0.0208
	7	89.82	-1.09	12.52	0.238	0.021
	10	90.12	-1.17	12.51	0.238	0.0208
	15	93.6	-1.24	12.52	0.237	0.0209
	21	96.3	-1.29	12.53	0.238	0.021
	30	96.31	-1.33	12.87	0.237	0.0208
	42	96	-1.47	13.56	0.236	0.0209
40도	0	85.59	-0.88	12.47	0.236	0.0207
	1	85.81	-1	15.55	0.257	0.0211
	2	92.64	-1.22	14.48	0.26	0.0317
	4	94.92	-1.42	16.44	0.268	0.0335
	7	93.46	-1.56	19.55	0.289	0.0401
	10	92.42	-1.58	21.34	0.315	0.0456
	15	91.66	-1.53	21.01	0.337	0.0472
	21	91.18	-1.53	24.83	0.369	0.0565
	30	90.59	-1.42	26.22	0.389	0.0887
	42	90.28	-1.33	29.93	0.449	0.0925
60도	0	85.59	-0.88	12.47	0.236	0.0207
	1	86.4	-0.94	16.83	0.286	0.0329
	2	91.27	-1.05	17.72	0.557	0.0598
	4	92.05	-0.69	21.83	0.887	0.0722
	7	85.96	0.38	26.77	1.52	0.0974
	10	80.99	2.31	31.35	2.48	0.1292
	15	78.03	4.41	34.14	5.57	0.1861
	21	76.83	6.2	34.54	6.28	0.2053

표 2-4-7. 백수환동주곡 담금주 주질 안정성

온도	경과일	색도			탁도	흡광도 (550nm)
		L	a	b		
5도	0	87.23	-1.33	13.86	0.341	0.0211
	1	87.23	-1.33	13.86	0.341	0.021
	2	88.35	-1.49	13.63	0.342	0.0211
	4	89.98	-1.56	13.48	0.342	0.0211
	7	90.89	-1.63	13.07	0.342	0.021
	10	92.08	-1.68	12.69	0.341	0.0211
	15	94.3	-1.73	12.58	0.341	0.0212
	21	96.88	-1.76	12.55	0.342	0.0212
	30	96.97	-1.83	12.62	0.341	0.0213
	42	96.68	-1.96	12.73	0.342	0.0213
40도	0	87.23	-1.33	13.86	0.34	0.0211
	1	86.72	-1.43	15.38	0.348	0.0234
	2	93.47	-1.69	14.43	0.347	0.0257
	4	95.53	-1.89	16.78	0.374	0.0311
	7	93.71	-1.89	18.62	0.401	0.0387
	10	91.98	-1.73	21.39	0.442	0.0439

	15	91.95	-1.62	22.73	0.451	0.0508
	21	90.22	-1.09	25.04	0.466	0.0694
	30	89.92	-1.01	28.26	0.584	0.0755
	42	89.55	-0.94	34.92	0.697	0.0823
	0	87.23	-1.33	13.86	0.34	0.0211
	1	86.18	-1.33	16.62	0.395	0.0339
	2	92.02	-1.36	18.07	0.423	0.0476
60도	4	90.66	0.27	26.3	0.506	0.0867
	7	82.42	2.58	33.6	0.679	0.1399
	10	77.42	8.1	39.38	0.92	0.2143
	15	61.2	17.76	37.11	1.85	0.4274
	21	40.96	21.77	26.72	2.17	0.6472

표 2-4-8. 미곡 담금주 주질 안정성

온도	경과일	색도			탁도	흡광도 (550nm)
		<i>L</i>	<i>a</i>	<i>b</i>		
	0	82.86	-0.36	16.07	0.406	0.045
	1	82.86	-0.36	16.07	0.406	0.045
	2	84.15	-0.41	16.15	0.406	0.0451
	4	86.12	-0.45	16.12	0.406	0.0453
5도	7	87.18	-0.49	16.32	0.407	0.0453
	10	88.85	-0.63	16.35	0.406	0.0452
	15	90.33	-0.71	16.36	0.407	0.0461
	21	92.92	-0.77	16.72	0.408	0.0458
	30	92.69	-0.83	17.17	0.407	0.0461
	42	92.18	-1.01	18.81	0.409	0.0458
	0	82.86	-0.36	16.07	0.406	0.045
	1	83.23	-0.4	18.03	0.42	0.0488
	2	89.89	-0.55	17.17	0.458	0.0564
	4	92.13	-0.33	18.68	0.47	0.0569
40도	7	89.34	-0.23	22.4	0.556	0.0674
	10	89.26	0.12	22.96	0.662	0.0719
	15	88.59	0.19	25.37	0.667	0.0764
	21	88.61	0.28	25.03	0.747	0.0829
	30	87.97	0.49	26.77	1.06	0.1156
	42	85.86	1.26	30.3	1.11	0.1472
	0	82.86	-0.36	16.07	0.406	0.045
	1	83.67	-0.39	19.15	0.485	0.0608
	2	89.11	-0.45	19.29	0.588	0.0803
	4	88.64	0.35	25.17	0.752	0.0901
60도	7	80.96	2.55	30.36	0.752	0.1508
	10	79.28	5.15	34.84	0.879	0.2179
	15	72.16	8.49	38.11	1.09	0.2724
	21	46.64	20.93	29.35	1.58	0.3931

표 2-4-9. 요국 담금주 주질 안정성

온도	경과일	색도			탁도	흡광도 (550nm)
		L	a	b		
5도	0	85.26	-0.24	11.86	0.376	0.0252
	1	85.26	-0.24	11.86	0.376	0.0252
	2	87.83	-0.32	11.24	0.375	0.0253
	4	90.44	-0.41	10.56	0.377	0.0252
	7	90.95	-0.42	10.39	0.375	0.0251
	10	93.24	-0.54	9.42	0.376	0.0254
	15	94.1	-0.61	8.74	0.378	0.0253
	21	96.55	-0.68	9.58	0.377	0.0254
	30	96.42	-0.76	10	0.377	0.0258
	42	96.08	-0.8	11.02	0.378	0.0251
40도	0	85.26	-0.24	11.86	0.376	0.0252
	1	86.41	-0.28	14	0.385	0.0286
	2	89.49	-0.55	12.53	0.393	0.0299
	4	91.47	-0.68	14.66	0.405	0.0336
	7	92.5	-0.78	15.38	0.397	0.0403
	10	93.47	-0.85	16.92	0.403	0.0436
	15	94.46	-0.9	17.8	0.448	0.0484
	21	93.56	-0.93	20.74	0.509	0.0521
	30	92.3	-0.97	21.14	0.548	0.0678
	42	91.18	-1.04	24.81	0.578	0.0721
60도	0	85.26	-0.24	11.86	0.376	0.0252
	1	88.26	-0.34	14.88	0.441	0.0318
	2	91.66	-0.56	14.79	0.438	0.0614
	4	92.55	-0.43	18.87	0.45	0.0791
	7	87.19	1.13	23.41	0.567	0.1032
	10	83.58	3.14	30.52	0.72	0.1239
	15	79.41	3.75	33.87	0.96	0.1693
	21	78.95	5.84	37.73	1.34	0.1892

표 2-4-10. 신곡2 담금주 주질 안정성

온도	경과일	색도			탁도	흡광도 (550nm)
		L	a	b		
5도	0	83.44	-0.55	13.62	0.264	0.0367
	1	83.44	-0.55	13.62	0.264	0.0367
	2	84.48	-0.78	13.61	0.265	0.0366
	4	85.37	-0.89	13.67	0.263	0.0367
	7	86.03	-0.91	13.65	0.266	0.0367
	10	90.02	-0.99	13.65	0.266	0.0369
	15	92.61	-1.08	13.68	0.269	0.0369
	21	95.17	-1.13	13.7	0.273	0.0371
	30	95.11	-1.23	13.68	0.277	0.0373
	42	94.53	-1.3	13.69	0.282	0.0373
40도	0	83.44	-0.55	13.62	0.264	0.0367
	1	84.33	-0.59	15.43	0.272	0.0443
	2	90.55	-0.76	15.13	0.265	0.0546
	4	92.37	-0.75	17.02	0.285	0.0617
	7	90.59	-0.68	20.06	0.339	0.0645
	10	89.38	-0.5	20.62	0.376	0.0715
	15	88.04	-0.54	22.67	0.416	0.0741
	21	86.87	-0.24	23.12	0.543	0.0819
	30	86.13	1.62	28.38	0.934	0.1405
	42	83.83	1.82	32.29	0.991	0.1546
60도	0	83.44	-0.55	13.62	0.264	0.0367
	1	85.84	-0.68	16.6	0.284	0.0583
	2	90.48	-0.78	16.4	0.358	0.0714
	4	90.07	-0.24	22.41	0.425	0.0843
	7	85.38	0.36	26.17	0.649	0.089
	10	81.29	3.76	32.37	0.932	0.1708
	15	76.95	4.68	34.57	1.7	0.1837
	21	53.45	13.8	30.45	2.24	0.2763

위의 우수 누룩 선별 연구를 통하여 발효적성, 유해물질 안정성, 주질 안정성이 우수한 오메기곡, 백수환동주곡, 미곡 3종을 선정하였다. 각 누룩들은 주원료가 모두 다른 누룩으로 각각의 독특한 맛과 향이 특징적으로 나타났다.

2. 주류관능품질 비교 분석

선별누룩 3종으로 발효된 시료와 선별누룩에서 부원료가 제외되어 발효된 시료 3종, 그리고 시판누룩 1종으로 제조된 발효시료들의 관능 비교(5점 척도)를 하였다. 공통적으로 부원료를 모두 넣어 제조된 선별누룩 3종의 관능점수가 가장 좋았고, 이는 동일한 레시피로 제조된 시판누룩보다도 좋았다. 전체적으로 발효스펙(알코올, 산도, RS 등)의 차이는 거의 없었지만, 부원료가 제외된 누룩으로 제조된 발효시료들의 관능은 공통적으로 주질이 가볍고 멍멍한 맛을 나타내었다.

표 2-4-11. 선별누룩의 관능비교

누룩명	내용	누룩 원료	관능점수	관능 묘사
오메기곡	선별누룩	통보리+밀가루	3.8	보리 향미가 은은히 나타나며, 맛이 깔끔해짐
	부원료제외	통보리	3.1	술에서 누룩 특징이 묻어나지 않음, 일반 정종 느낌, 깔끔하고 지미 약간있으며, 주질 가벼움
백수환동주곡	선별누룩	녹두+찹쌀	4.2	자두향, 꽃향 등 술의 향기가 입안에 오래 머물며, 특히 잡미(세균취)가 없어 주질이 깔끔하면서 묵념감이 좋고 맛이 풍부하여 입안이 즐겁다
	부원료제외	찹쌀	2.8	백수환동주의 특징이 약화됨, 가볍고 알콜맛이 강하며, 후미에 물맛처럼 멍멍한 느낌이 남음
미곡	선별누룩	찹쌀+여뀌즙	3.7	감산미 양호, 곱향같은 과실향 있고 맛이 복합적임, 초기 단맛, 신맛이 풍부하게 올라오며, 후미에 쌉싸름한 맛, 뽕은맛, 쓴맛 등이 은은하게 남아 바디감을 풍부하게 만듦
	부원료제외	찹쌀	3.2	맛은 양호하나 가벼워지며, 쌀 특유의 쓴맛, 거친 맛 등이 남아 부드럽지 않고 거칠게 느껴짐
J곡자	시판누룩	통밀	3.0	밀누룩 특유의 향미 양호, 후미에 지미가 있음

3. 시제품 개발 및 상품성 검증

가. 주류 제조공정 표준화

(1) 원료처리조건 확립

각 누룩을 사용하여 담금함에 있어서, 밀술 원료 증자방식을 죽, 백설기, 고두밥 형태로 다르게 하여 최적 원료처리조건을 도출하였다. 발효 원료의 처리 방법이 죽, 백설기, 고두밥, 범벅 등 다양한 방법이 있으나, 본 실험에서는 죽, 백설기 및 고두밥 3종으로 실시하였다. 통상 죽은 원료량에 대하여 약 5내지 10배수의 물을 가하여 제조하지만, 본 실험에서는 타 실험구인 백설기, 고두밥에 대하여 3배수의 물로 밀술을 제조하는 것을 기준으로 하였기에 죽 제조는 먼저 원료를 침지 후 물 빼기를 한 원료를 곱게 갈아 백설기를 찐 다음 식히지 아니하고 원료의 3배수에 해당하는 끓는 물을 가하여 죽 상태로 제조하였다. 3가지 누룩 모두 죽과 백설기로 원료처리 하였을 때의 차이는 극히 미미하였고, 고두밥이 상대적으로 우수하여 고두밥 증자 방식을 선택하였다. 원료 처리 방식에서 고두밥으로 하는 것이 공정 관리에 있어 다른 처리 방식에 비해 용이한 장점도 있어 고두밥 밀술 원료처리 방식을 결정하였다(표 2-4-12, 13, 14).

표 2-4-12. 오메기곡 밀술 원료 처리 방법에 따른 발효특성

분석항목	밀술			덧술		
	실험1	실험2	실험3	실험1	실험2	실험3
pH	3.69	3.58	3.55	4.09	4.13	4.18
산도	8	8.5	8.9	6.5	6.3	5.8
R/S	11.5	8.5	18	2	2	2
Alc%	9.95	9.45	9.93	17.51	17.51	18.29
A.A.	3.0	3.0	3.0	2.4	2.5	2.5

실험 1 : 밀술 원료 처리 방법 죽

실험 2 : 밀술 원료 처리 방법 백설기

실험 3 : 밀술 원료 처리 방법 고두밥

표 2-4-13. 백수환동주곡 밀술 원료 처리 방법에 따른 덧술 발효 비교

분석항목	밀술			덧술		
	실험1	실험2	실험3	실험1	실험2	실험3
pH	3.59	3.62	3.67	4.19	4.20	4.19
산도	9.8	9.6	9.4	7.6	7.6	7.6
R/S	10	12	11.4	7.4	8.8	7.2
Alc%	10.08	9.96	10.04	17.58	17.49	17.92
A.A.	2.7	2.8	2.7	3.6	3.9	3.5

실험 1 : 밀술 원료 처리 방법 죽

실험 2 : 밀술 원료 처리 방법 백설기

실험 3 : 밀술 원료 처리 방법 고두밥

표 2-4-14. 미곡 밀술 원료 처리 방법에 따른 덧술 발효 비교

분석항목	밀술			덧술		
	실험1	실험2	실험3	실험1	실험2	실험3
pH	3.56	3.63	3.63	4.28	4.3	4.3
산도	9.5	8	8	5.3	5	5
R/S	2	2	2	2	11	10.5
Alc%	10.08	10.61	10.95	18.14	18.3	18.53
A.A.	7.2	7.4	7.2	3.5	4	3.6

실험 1 : 밀술 원료 처리 방법 죽

실험 2 : 밀술 원료 처리 방법 백설기

실험 3 : 밀술 원료 처리 방법 고두밥

(2) 스타터 사용 조건 확립

원료 대비 누룩 사용 비율 및 밀술과 덧술의 최적 누룩 비율을 도출하기 위한 연구를 진행하였다.

(가) 밀술 제조시 누룩 사용 비율

총 원료 사용량 대비 사용되는 누룩량을 밀술 제조시 전량 첨가하는 것과, 사용량의 30% 및 50%를 첨가하고 나머지는 덧술에 첨가하는 방식을 비교하여 검토하였다. 발효는 25°C 에서 밀술은 7일간, 덧술은 14일간 발효 시켰다. 미곡의 경우는 오메기곡에 비해 다소 누룩을 밀술

원료 대비 20%, 즉 총 누룩 사용량의 30% 사용한 실험구 1이 대조구와 실험구 2에 비해 다소 우수하였다(표 2-4-15, 16, 17).

표 2-4-15 24. 오메기곡의 밀술 제조 시 누룩 사용 비율에 따른 발효 특성

분석항목	밀술			덧술		
	대조구	실험 1	실험2	대조구	실험1	실험2
pH	3.54	3.51	3.52	4.04	4.01	4.02
산도	9.5	12.2	10.9	6.0	6.8	6.3
R/S	15	22.4	18.3	6.4	6.0	6.8
Alc%	7.62	7.42	7.58	18.16	17.98	18.12

대조구 : 총 원료량의 10%에 대한 누룩 사용 비율 100%

실험 1 : 총 원료량의 10%에 대한 누룩 사용 비율 30%

실험 2 : 총 원료량의 10%에 대한 누룩 사용 비율 50%

표 2-4-16. 백수환동주곡의 밀술 제조 시 누룩 사용 비율에 따른 발효 특성

분석항목	밀술			덧술		
	대조구	실험 1	실험2	대조구	실험1	실험2
pH	3.74	3.82	3.78	4.23	4.20	4.20
산도	9.3	8.4	8.8	7.0	7.2	7.2
R/S	12	14	13	8.4	8.0	8.2
Alc%	10.01	9.6	9.98	17.84	17.95	17.9

대조구 : 총 원료량의 10%에 대한 누룩 사용 비율 100%

실험 1 : 총 원료량의 10%에 대한 누룩 사용 비율 30%

실험 2 : 총 원료량의 10%에 대한 누룩 사용 비율 50%

표 2-4-17. 미곡의 밀술 제조 시 누룩 사용 비율 결과표

분석항목	밀술			덧술		
	대조구	실험 1	실험2	대조구	실험1	실험2
pH	3.58	3.88	3.65	4.12	4.19	4.15
산도	11.5	9.3	10.3	6.8	5.5	5.9
R/S	8.8	9.2	9	2	2	2
Alc%	10.2	9.84	9.92	17.26	18.95	17.65

대조구 : 총 원료량의 20%에 대한 누룩 사용 비율 100%

실험 1 : 총 원료량의 20%에 대한 누룩 사용 비율 30%

실험 2 : 총 원료량의 20%에 대한 누룩 사용 비율 50%

(나) 밀술 제조시 담금수 비율

사용 밀술의 원료량에 대비하여 200%, 300%, 400% 및 500%의 담금수를 사용하여 밀술을 발효시킨 후 총 담금수의 비율은 총 사용 원료량의 150%가 되도록 조정하여 덧 담금을 진행하였다. 오메기곡의 실험 결과는 밀술의 급수 비율 300%가 우수하였다. 급수 200%와 500%의 경우는 산도의 생성량이 타 실험구에 비하여 높으며 상대적으로 알코올 생성량도 낮았다. 백수환동주곡과 미곡은 밀술 급수비율에 따른 알코올 생산량 등의 발효적성이 전체적으로 유사했으나 300% 급수율이 다소 우수하였다(표 2-4-18, 19, 20).

표 2-4-18. 오메기곡의 밀술 제조시 담금수 비율 결과표

분석항목	밀술				덧술			
	실험1	실험2	실험3	실험4	실험1	실험2	실험3	실험4
pH	3.56	3.62	3.55	3.52	3.81	4.18	4.11	3.96
산도	12.5	10	8	7.5	12	7	7.5	10
R/S	24	13.4	8	6	32	2	2	2
Alc%	11.98	9.53	7.97	6.35	14.46	17.81	17.1	16.5

- 실험 1 : 밀술 원료 대비 급수 비율 200%
- 실험 2 : 밀술 원료 대비 급수 비율 300%
- 실험 3 : 밀술 원료 대비 급수 비율 400%
- 실험 4 : 밀술 원료 대비 급수 비율 500%

표 2-4-19. 백수환동주곡의 밀술 제조시 담금수 비율 결과표

분석항목	밀술				덧술			
	실험1	실험2	실험3	실험4	실험1	실험2	실험3	실험4
pH	3.61	3.69	3.84	3.86	4.22	4.23	4.22	4.19
산도	12.2	9.7	8.9	8.2	7.4	7.2	7.4	7.7
R/S	24	14	2.6	2	6.8	8.0	7.4	7.4
Alc%	12.9	10.07	8.01	6.79	17.42	17.89	17.46	17.34

- 실험 1 : 밀술 원료 대비 급수 비율 200%
- 실험 2 : 밀술 원료 대비 급수 비율 300%
- 실험 3 : 밀술 원료 대비 급수 비율 400%
- 실험 4 : 밀술 원료 대비 급수 비율 500%

표 2-4-20. 미곡의 밀술 제조시 담금수 비율 결과표

분석항목	밀술				덧술			
	실험1	실험2	실험3	실험4	실험1	실험2	실험3	실험4
pH	3.6	3.56	3.48	3.38	4.22	4.19	4.19	4.14
산도	10.5	9.3	7.8	6.8	5	5.5	5.8	6.5
R/S	16	9	2.8	2	2	2	2	2
Alc%	11.67	9.84	8.15	6.78	18.34	18.95	18.27	18.19

- 실험 1 : 밀술 원료 대비 급수 비율 200%
- 실험 2 : 밀술 원료 대비 급수 비율 300%
- 실험 3 : 밀술 원료 대비 급수 비율 400%
- 실험 4 : 밀술 원료 대비 급수 비율 500%

(다) 밀술 발효일 및 밀술 비율에 따른 덧술의 발효 비교

밀술의 비율 및 발효 일수에 따른 덧술의 발효능을 검토하기 위하여 밀술의 비율을 10%, 20% 및 30%를 설정하고, 각각의 비율에 따라 밀술의 발효일수를 3일, 5일 및 7일 경과 후 덧술을 담금하여 숙성 술 덧의 발효능을 비교 검토하였다. 밀술은 함께 담그어 분할하여 사용하였다. 밀술 비율 10%의 경우는 밀술 숙성 술덧의 용량을 약 410ml, 20%는 약 815ml, 30%는 약 1,210ml의 용량으로 사용하였다. 용량 환산 기준은 국제청 기술연구소 기준을 참조하였다. 쌀

의 숙성계수는 1, 누룩은 0.7로 계산되어진다. 오메기곡은 4일차에 백수환동주곡과 미곡은 5일차에 급격히 발효가 진행되어 술덧이 넘치는 현상이 나타난다. 밀술은 모두 7일차까지 진행 후 덧담금을 진행하는 것으로 설정하였다(표 2-4-21, 22, 23).

표 2-4-21. 오메기곡 밀술 발효일/비율 설정

분석 항목	밀술			10%			20%			30%		
	3일	5일	7일	3일	5일	7일	3일	5일	7일	3일	5일	7일
pH	3.65	3.61	3.54	4.13	4.16	4.05	4.24	4.27	4.12	4.25	4.16	4.14
산도	7.5	8.2	9.5	5.5	6.1	6.5	5.4	5.9	6.2	5.3	6.2	6.3
R/S	85	38	15	8	8	7.4	7	8	7	7	7.4	6.8
Alc%	1.02	6.54	9.61	17.49	17.57	17.77	17.81	17.88	17.89	17.93	18.13	18.12

표 2-4-22. 백수환동주곡 밀술 발효일/비율 설정

분석 항목	밀술			10%			20%			30%		
	3일	5일	7일	3일	5일	7일	3일	5일	7일	3일	5일	7일
pH	3.99	3.73	3.69	4.09	4.16	4.17	4.09	4.16	4.20	4.16	4.2	4.21
산도	3.0	8.8	9.7	7.9	7.7	7.6	7.9	7.6	7.4	7.6	7.3	7.2
R/S	77	12	4	4	3.6	3.2	4.8	4.6	4.8	4.2	4.4	4.2
Alc%	0	7.68	10.07	17.24	17.28	17.34	17.78	17.83	17.87	17.79	17.82	17.9

표 2-4-23. 미곡 밀술 발효일/비율 설정

분석 항목	밀술			10%			20%			30%		
	3일	5일	7일	3일	5일	7일	3일	5일	7일	3일	5일	7일
pH	3.66	3.51	3.6	4.28	4.45	4.37	4.35	4.43	4.34	4.3	4.36	4.25
산도	5.5	7.8	7.6	3.5	3.5	4.1	4	3.9	4.3	4.5	4.6	4.8
R/S	120	13	3.2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Alc%	1.02	8.98	10.3	17.91	18.18	18	18.2	18.13	18.27	18.05	17.97	18.2

(라) 밀술의 pH 조절에 따른 덧술의 발효력 비교

밀술의 초기 pH에 대한 영향을 검토하기 위하여 각 실험구에 젓산을 첨가하여 밀술의 pH를 3.5, 4.0, 5.0 및 대조구로 하여 실험을 진행하였다. 밀술의 pH 조절에 따른 발효특성의 유의적인 변화는 없었다(표 2-4-24, 25, 26).

표 2-4-24. 오메기곡 pH 조절

분석 항목	밀술				덧술			
	대조구	실험1	실험2	실험3	대조구	실험1	실험2	실험3
pH	3.50	3.53	3.55	3.53	3.94	4.07	4.12	4.10
산도	12.3	9.5	9.5	8.8	7.4	6.8	6.0	6.5
R/S	14	14	13	14	6	6.2	6.0	5.8
Alc%	8.16	8.31	8.37	7.85	17.04	17.63	17.89	17.63

대조구 : 초기 pH 6.4

실험 1 : 밀술 담금 즉시 pH 5.0

실험 2 : 밀술 담금 즉시 pH 4.0

실험 3 : 밀술 담금 즉시 pH 3.5

표 2-4-25. 백수환동주곡 pH 조절

분석항목	밀술				덧술			
	대조구	실험1	실험2	실험3	대조구	실험1	실험2	실험3
pH	3.71	3.74	3.75	3.81	4.14	4.17	4.19	4.17
산도	9.4	9.0	9.0	8.4	7.4	7.2	6.8	7.2
R/S	4.8	5.2	5.0	5.4	4	4	3	4
Alc%	10.01	9.98	9.79	9.59	17.69	17.89	17.93	17.77

대조구 : 초기 pH 6.4

실험 1 : 밀술 담금 즉시 pH 5.0

실험 2 : 밀술 담금 즉시 pH 4.0

실험 3 : 밀술 담금 즉시 pH 3.5

표 2-4-26. 미곡 pH 조절

분석항목	밀술				덧술			
	대조구	실험1	실험2	실험3	대조구	실험1	실험2	실험3
pH	3.49	3.53	3.53	3.55	4.20	4.22	4.22	4.18
산도	10	9	9	8.5	5.5	5.5	5.2	6.2
R/S	5.3	6	5.5	6.3	2	2	2	2
Alc%	9.27	9.37	9.28	8.76	17.52	17.66	17.94	17.24

대조구 : 초기 pH 6.4

실험 1 : 밀술 담금 즉시 pH 5.0

실험 2 : 밀술 담금 즉시 pH 4.0

실험 3 : 밀술 담금 즉시 pH 3.5

(3) 최적 발효조건 확립

담금시 최적 누룩 비율은 기존 1차년도 연구 결과를 기반으로 각 누룩별 함량차이를 달리하여 담금을 진행하였다. 선별 누룩별 최적 누룩 함량은 오메기곡은 5%, 백수환동주곡은 10%, 미곡은 20%가 발효적성 및 관능품질 평가 결과상 최적 조건임을 도출하였다. 밀술은 25℃에서 7일간 간헐적으로 교반하면서 발효시켰으며, 덧술의 발효 온도는 18℃, 25℃, 30℃에서 실시하였다. 발효 온도는 오메기곡과 미곡의 경우 30도가 적합했고, 백수환동주곡은 25도가 관능품질이 좋았다. 발효 급수율은 모두 150%가 최적 관능품질을 나타내었다(표 2-4-27, 28, 29, 30, 31, 32).

표 2-4-27. 누룩 사용 비율에 따른 제품 특성

누룩	누룩 비율	pH	산도	알코올%	R/S	A.A.
오메기곡	5%	4.29	6.7	16.57	27.6	3.4
	6.75%	4.23	6.4	17.08	38	3.8
	10%	4.26	7.5	18.42	28	5
백수환동주곡	7.5%	4.29	6.9	16.98	5.5	2.7
	10%	4.33	6.6	17.52	12.8	3.2
	12.5%	4.36	6.5	17.66	10	3.6
미곡	15%	4.28	8.5	16.31	6.2	4.3
	20%	4.36	4.8	18.13	7.4	5.1
	30%	4.3	7.6	17.38	4.8	7.5

표 2-4-28. 누룩 함량 별 제품 관능 품질

누룩	급수 비율	관능 점수	관능 표현
오메기곡	5%	4.2	향이 깔끔, 은은한 과실향(석탄향 느낌), 목넘김 좋음
	6.75%	3.1	향이 복잡하고 누룩취 미세, 입안이 약간 텁텁함
	10%	2.8	알콜취, 맛 강하고 입안에 쓴맛, 신맛, 지미가 오래 남음
백수환동주곡	7.5%	3	향, 맛이 깔끔하나 후미가 짧게 끊어지며, 밋밋함
	10%	3.7	향(과실) 양호, 여운이 남고 입안을 상쾌하게 마무리시켜줌
	12.5%	2.8	향은 양호하나 알싸하고 텁텁하고 느끼한 맛이 오래 남음
미곡	15%	2.4	신맛이 목에 걸릴 정도로 강하고 여운은 짧음
	20%	3.7	적당한 감칠맛, 단맛이 있어 목 넘김은 양호. 미세한 과실향 있고 맛 밸런스는 양호하나 지미가 다소 끌림
	30%	2.9	적당한 감칠맛, 단맛이 있어 목 넘김은 양호, 향이 약해 보통 약주 느낌임

표 2-4-29. 발효 온도에 따른 제품 특성

누룩	발효 온도	pH	산도	알코올%	R/S	A.A.
오메기곡	18℃	3.94	8.1	16.9	10	3.3
	25℃	4.17	8	19.08	12	4.8
	30℃	4.23	7.2	17.63	38	5.5
백수환동주곡	18℃	4.02	8.1	13.97	3.3	3
	25℃	4.25	7.4	17.27	4.8	3.1
	30℃	4.37	6.9	17.62	8	4.5
미곡	18℃	4.05	9.3	13.6	5	6.8
	25℃	4.18	9	16.32	8	8.7
	30℃	4.28	8.5	14.47	29.4	9.4

표 2-4-30. 발효 온도에 따른 관능 품질

누룩	발효 온도	관능 점수	관능 표현
오메기곡	18℃	2.8	향(선내), 독특한 향미 有, 후미에 쓴맛 오래 유지됨
	25℃	3.2	독특한 향이 조금 더 강해짐, 신맛, 쓴맛 오래 남음
	30℃	4.3	향 양호, 끌리는 단맛과 감칠맛 있음
백수환동주곡	18℃	2.8	쓴맛, 신맛이 조금 오래 남음, 특징이 약함
	25℃	4.2	자두향, 독특한 향미 있고 맛이 깔끔함
	30℃	3.6	맛이 복잡하고 텁텁하며 지미 오래 끌림
미곡	18℃	2.5	신맛이 불쾌할 정도로 튀며, 머금고 있을 때, 쿵쿵한 맛, 지미 강함
	25℃	3.6	누룩취, 세균취 등 향이 복잡하고 지미가 오래 끌림
	30℃	3.7	감미가 높아서 음용감은 나아졌으나 지미가 강해 입안이 개운하지 않음

표 2-4-31. 급수율에 따른 제품 특성

누룩	급수비율	pH	산도	알코올%	R/S	A.A.
오메기곡	100%	3.94	10.1	16.54	57.5	6.5
	120%	4.12	8.4	18.36	25.6	6
	150%	4.08	8.5	17.86	19	4.9
백수환동주곡	100%	4.23	7.8	16.79	40	5.1
	120%	4.13	8.1	17.92	16.2	4
	150%	4.15	7	17.58	13.4	3.5
미곡	100%	4.22	7.1	16.28	8	6.2
	120%	4.19	7.1	17.16	6	5.4
	150%	4.3	7.1	16.82	4	4.6

표 2-4-32. 급수율에 따른 관능 품질

누룩	급수 비율	관능 점수	관능 표현
오메기곡	100%	3.8	향(선내), 독특한 향미 有, 산/감미는 적당하나 후미에 느끼한 맛이 오래 유지됨
	120%	3.2	독특한 향이 조금 더 강해짐, 신맛, 쓴맛이 다소 있음
	150%	4.4	향 양호, 끌리는 단맛과 감칠맛 있음
백수환동주곡	100%	3.6	산/감미는 다소 적당하나 느끼한 맛이 조금 오래 남음,
	120%	3.8	맛이 복잡하고 텁텁하며 신 맛이 다소 끌림
	150%	4.2	자두향, 독특한 향미 있고 맛이 깔끔함
미곡	100%	2.5	머금고 있을 때, 쿡쿡한 맛, 지미 강함
	120%	3.4	미세한 과실향과 맛 조화도는 양호하나 후미가 짹고 밋밋함
	150%	3.7	과실향과 맛 조화도가 양호하나 후미가 깔끔함

(4) 표준 발효 프로파일 확립

시제품 3종의 제조방법 표준화에 의한 최적 표준발효 프로파일은 다음과 같다(표 2-4-33, 34, 35).

표 2-4-33. 오메기곡의 표준발효 프로파일

구분	날짜	pH	산도	알코올	R/S	AA
밀술	0	6.4	ND			
	2	3.9	4.4	0	92	3
	7	3.48	9	10.37	2.7	3
덧술	0	3.66	3.5	5.72	2	1.2
	2	3.72	5	8.38	6.5	1.6
	7	3.92	7	15.26	11.3	3.2
	9	4	7	16.83	17	3.2
	14	4.09	7	16.84	28.6	3.4

표 2-4-34. 백수환동주곡의 표준발효 프로파일

구분	날짜	pH	산도	알코올	R/S	AA
밀술	0	6.4	ND			
	2	4.1	3	0	147	3.6
	7	3.84	8.9	10.61	2.6	5.8
덧술	0	3.87	3.5	5.81	2	2.3
	2	3.95	5.2	8.27	2	3.4
	7	4.19	6.2	14.8	2	5
	9	4.24	6.3	15.8	5.4	5.3
	14	4.42	6.4	16.85	18	5.6

표 2-4-35. 미주의 표준발효 프로파일

구분	날짜	pH	산도	알코올	R/S	AA
밀술	0	6.43	ND			
	2	3.73	7.3	1.15	127	4
	7	3.7	10	11.27	2	6
덧술	0	3.68	3.9	6.15	2	2.4
	2	3.85	5.2	9.74	6	4
	7	4.11	7	15.43	10.8	5.8
	9	4.15	7.4	16.63	14.4	6.1
	14	4.27	7.7	17.8	22	6.3

나. 상품성 검증

(1) 제품 유통 안정성 검증

제조된 시제품(생주) 3종에 대한 상품성 검증을 위하여 유통 안정성을 진행하였다. 실온에서 유통되는 제품으로 품질지표별 실험구 3온도(5℃, 15℃, 30℃)로부터 유도한 아레니우스 반응식으로부터 국내 유통 온도를 반영하여 유통기한을 산출하였다. 반응속도상수 및 연간변화량 산출 근거로 최소함량과 한계하한선을 계산하여 유통기한을 설정하였다. 안전계수를 적용한 오메기주의 유통기한은 약 7개월, 백수환동주는 약 2개월, 미주는 약 3개월로 설정되었다(표 2-4-36).

표 2-4-36. 시제품 3종의 유통기한 산출

시제품 3종	유통기한(월)	유통기한(월) * 안전계수 (0.7)	유통기한(일) * 안전계수 (0.7)
오메기주	10.22	7.15	214.7
백수환동주	2.67	1.87	56.1
미주	4.25	2.97	89.2

(2) 소비자 조사를 통한 상품성 검증

(가) 훈련된 패널 관능평가

최종 시제품의 관능 평가를 훈련된 10명의 패널을 선정하여 향, 맛, 전체 품질 등의 검사 항목으로 5점 척도법을 이용하여 시료의 품질을 평가하였다. 관능 검사 결과, 오메기주는 누룩의 원료인 보리가 발효를 통해 숙성되어 독특한 부케(bouquet)를 생성하고 씹싸름하고 깔끔한 것이 특징으로 나타났다. 그리고 백수환동주는 발효를 통해 아로마(Aroma)가 풍부한 것이 특징으로 감산미가 높고 감칠맛, 바디감이 좋아 관능 풍미가 가장 우수하였다. 마지막으로 미주는 찹쌀과 쌀의 특유 단맛과 깔끔함을 가진 것이 특징으로 조사되었다(그림 2-4-3).

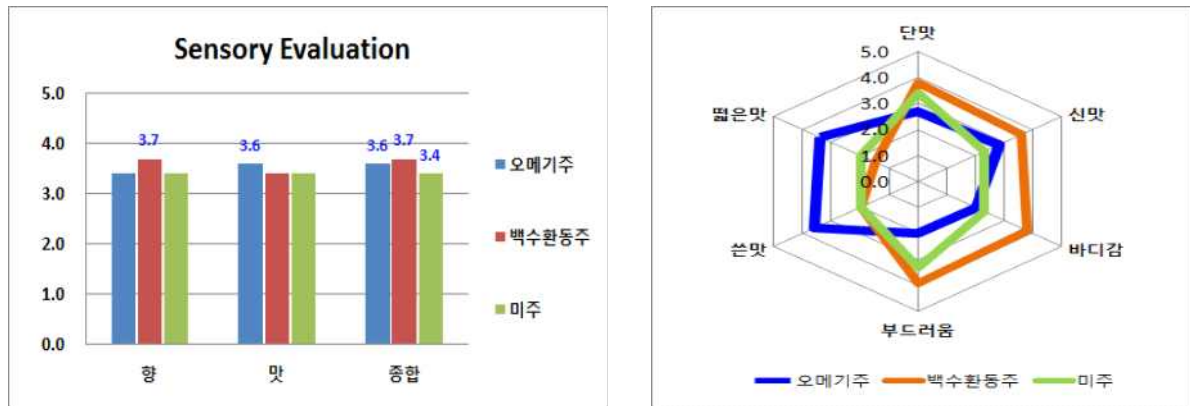


그림 2-4-3. 시제품 3종의 관능 검사

(나) 소비자 기호도

국순당 직영 전통 주점에서 성인 남녀 80명을 대상으로 시제품 선호도 및 구매의사를 조사하였다 (선호도: 5점 매우 좋음, 4점 좋음, 3점 보통, 2점 좋지 않음, 1점 매우 좋지 않음) (구매 의사: 5점 꼭 구입할 것이다. 4점 구입할 것이다, 3점 구입 할 수도 안할 수도 있다 . 2점 구입하지 않을 것이다. 1점 절대 구입하지 않을 것이다).

소비자 기호도 조사 결과 훈련된 패널 관능 평가와 비슷한 결과가 도출되었다. 전체 기호도는 백수환동주(3.69) > 오메기주(3.61) > 미주(3.42) 순으로 나타났고 전체 구매의사도 백수환동주(3.47) > 오메기주(3.40) > 미주(3.10) 순으로 나타났다. 그런데 남성과 여성 소비자를 구분하여 보면, 남성의 경우, 오메기주의 선호도 및 구매의사가 높게 나타나고 여성의 경우, 백수환동주의 선호도 및 구매의사가 높게 나타났다. 반면 미주는 상대적으로 낮은 기호도 및 구매의사가 나타났다(표 2-4-37).

표 2-4-37. 시제품 3종의 선호도& 구매의사

	남성(n=46명)			여성(n=34명)			전체(n=80명)		
	오메기주	백수환동주	미주	오메기주	백수환동주	미주	오메기주	백수환동주	미주
선호도	3.78±0.7	3.61±0.4	3.30±0.4	3.44±0.5	3.76±0.6	3.55±0.6	3.61±0.6	3.69±0.5	3.42±0.5
구매 의사	3.50±0.5	3.42±0.6	3.00±0.6	3.30±0.5	3.52±0.4	3.20±0.6	3.40±0.5	3.47±0.5	3.10±0.6

5절. 전통누룩 유래 유용미생물의 유전체 분석

1. *Saccharomyces cerevisiae* 98-5 및 KSD-YC의 유전체 분석

가. *Saccharomyces cerevisiae* 98-5의 균주 특성

S. cerevisiae 98-5 균주는 전통누룩에서 분리한 양조용 효모균주로, 본 균주로 양조한 탁주는 비교균주에 비해 휘발성 화합물인 에틸카프로에이트, 이소아밀알코올, 에틸카프릴레이트, 이소아밀카프로에이트, 에틸카프레이트, 이소아밀카프릴레이트의 생성률이 매우 높았다. 따라서 본 *S. cerevisiae* 98-5 균주로 발효된 탁주는 살구, 바나나, 파인애플과 같은 과일향을 내는 에스테르 성분이 높아 향기가 풍부한 특징이 있다(표 2-5-1).

표 2-5-1. 각 효모균주로 발효한 전통주의 휘발성 향기성분 특징

Volatile compounds	<i>S. cerevisiae</i> 98-5	비교균주-1	비교균주-2
Ethyl caproate	2.146	1.655	1.944
Isoamylalcohol	0.203	0.068	0.072
Ethyl caprylate	2.568	0.784	1.191
Isoamyl caproate	0.275	-	-
Ethyl caprate	4.605	2.678	4.610
Isoamyl caprylate	4.245	0.530	0.112

본 연구에서는 우수균주로 선발된 *S. cerevisiae* 98-5의 유전체 분석을 통해 전통주 양조 과정에서 생성되는 품질인자를 양조미생물의 유전체 정보로 해독하고, 분석된 본 균주를 향후 양조용 효모의 표준유전체로 활용하고자 하였다(그림 2-5-1).

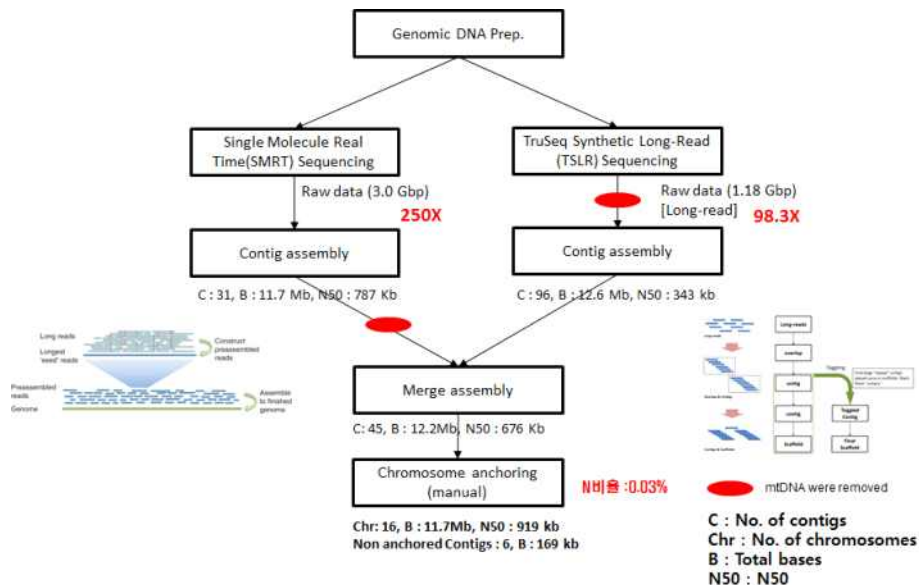


그림 2-5-1. Strategy for whole-genome de novo sequence assembly

나. *Saccharomyces cerevisiae* 균주의 ploidy 분석 결과

S. cerevisiae 98-5와 *S. cerevisiae* KSD-Yc 균주에 대해 FACS 분석을 진행하였다. Control로는 *S. cerevisiae* 의 haploid인 BY4741과 diploid인 BY4743을 이용하였다. 시간대별로 O/N한 cell을 이용하여 OD 1, 5, 9에서 sampling 한 뒤 EtOH fixation, Rnase, Protease를 처리하여 분석한 결과, 그림에서 볼 수 있듯이 diploid control과 같은 peak를 나타내는 98-5와 KSD-Yc는 diploid인 것으로 판단하였다(그림 2-5-2).

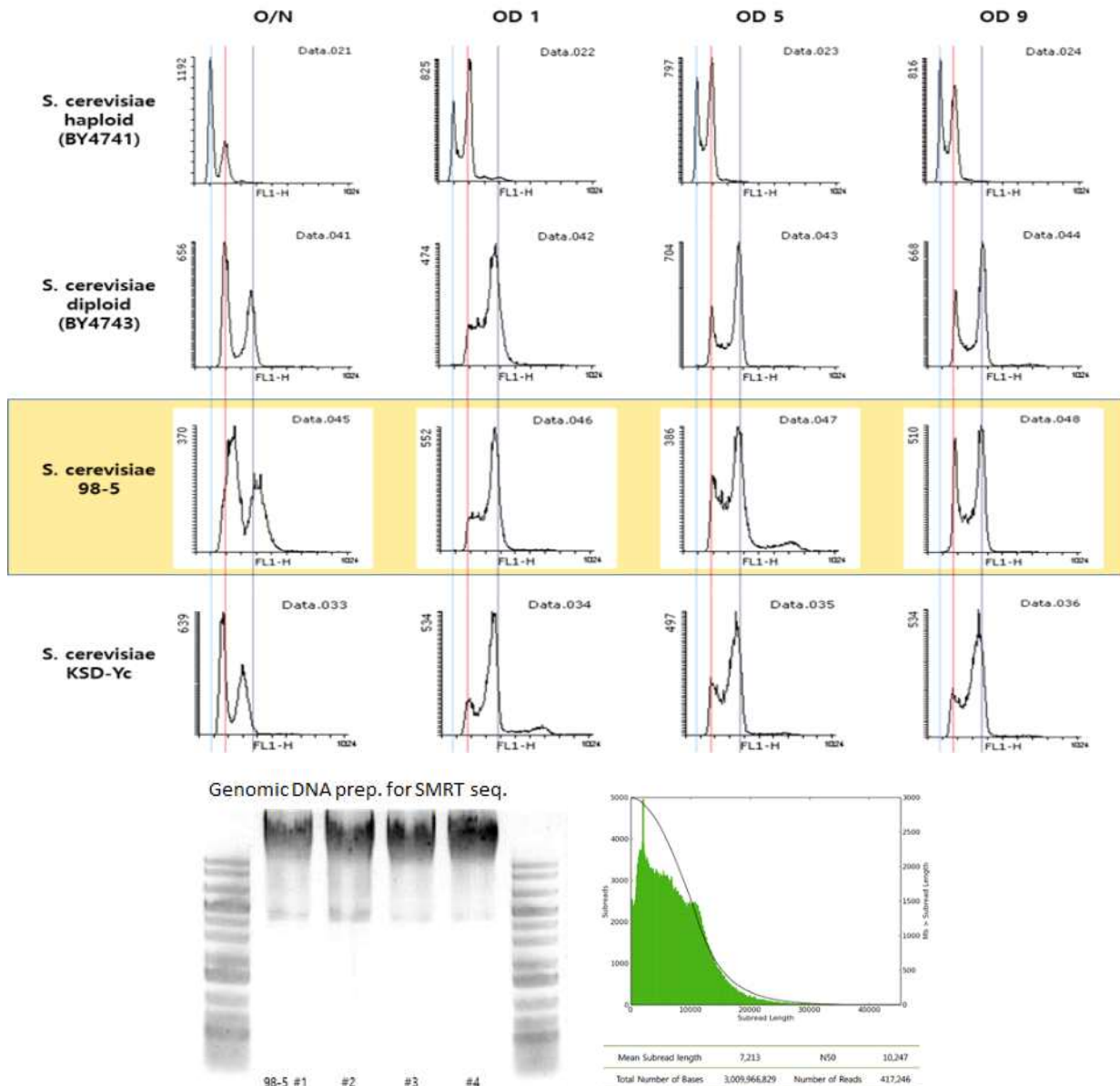


그림 2-5-2. Ploidy analysis of *S. cerevisiae* 98-5 (yellow box) derived from Korean traditional beverages

다. *Saccharomyces cerevisiae* 98-5 의 유전체 분석

FabBio 분석결과 확보된 31 contigs를 대상으로 분석한 결과 *S. cerevisiae* 의 chromosome 에 해당되는 16개의 contigs, mitochondrial genome에 해당되는 contigs, micron plasmid에 해당되는 contigs 2개로 분류할 수 있었으며 세부 contigs 정보는 아래 표 2-5-2과 같다.

표 2-5-2. *S. cerevisiae* 98-5 의 whole genome sequencing

Contig Name	Length (bp)	GC %	Depth
contig1	1,461,227	37.9	113
contig2	1,069,743	38.1	115
contig3	1,022,494	38.1	112
contig4	932,842	38.1	127
contig5	904,026	38.2	114
contig6	787,186	38.3	118
contig7	720,472	38.5	121
contig8	681,592	38.2	118
contig9	571,127	38.4	112
contig10	561,716	38.5	109
contig11	535,976	38.1	111
contig12	499,795	38.4	113
contig13	430,570	38.4	106
contig14	418,215	38.8	178
contig15	251,417	38.8	144
contig16	243,265	38.2	115
contig17	236,264	38.7	108
contig18	204,201	39.3	121
contig19	46,669	37.8	67
contig20	37,004	40.4	114
contig21	30,988	38.2	54
contig22	24,959	38.4	56
contig23	22,668	38.5	84
contig24	21,923	15.7	3128
contig25	19,981	37.5	46
contig26	19,741	36.3	52
contig27	15,442	43.9	1892
contig28	11,756	17.2	3038
contig29	6,925	19.1	3078
contig30	4,619	15.2	1167
contig31	1,514	19.3	2096
Total	11,796,317		

표 2-5-3. *S. cerevisiae* 98-5 의 whole genome sequencing

PAC Contig No.	SC	Sc Length (bp)	SMRTcontigLength(bp)
contig18	Chromosome I	230,218	204,201
contig6	Chromosome II	813,184	787,186
contig20			37,004
contig26 앞쪽	Chromosome III	316,620	19,741
contig16			243,265
contig1	Chromosome IV	1,531,933	1,461,227
contig26 뒷부분			19,741
contig9	Chromosome V	576,874	571,127
contig21			30,988
contig15	Chromosome VI	270,161	251,417
contig2	Chromosome VII	1,090,940	1,069,743
contig12	Chromosome VIII	562,643	499,795
contig23			22,668
contig14	Chromosome IX	439,888	418,215
contig7	Chromosome X	745,751	720,472
contig8	Chromosome XI	666,816	681,592
contig13			430,570
contig27	Chromosome XII	1,078,177	15,442
contig11			535,976
contig5	Chromosome XIII	924,431	904,026
contig17			236,264
contig25	Chromosome XIV	784,333	19,981
contig10			561,716
contig3	Chromosome XV	1,091,291	1,022,494
contig4	Chromosome XVI	948,066	932,842
contig19	Mixed Ch		46,669
contig30			4,619
contig28			11,756
contig31	Mito. chromosome	85,779	1,514
contig24			21,923
contig29			6,925
contig22	plasmid 2 micron	6118	24,959
Total			11,796,317

PacBio와 Illumina sequencing data를 토대로 31개의 contigs를 16개의 chromosome으로 assembly 후 GenBank에 등록하였다(Accession number MLJN00000000) (그림 2-5-3, 왼쪽 패널).

Diploid인 98-5 균주의 경우, 공인된 *S. cerevisiae* 표준유전체 (S288c 유전체)에 비교분석한 경우 흥미롭게도 상동염색체들 간에 heterologous SNP (27,701 sites)와 heterologous Indel (1,818)를 합치게 되면 총 29, 519 heterozygous sites가 존재하여 다른 *S. cerevisiae* diploid 균주에 비해 높은 편으로 분석되었다(표 2-5-4).

일본 Sake 효모의 경우 총 1,347 개의 heterologous sites가 존재하는 경우에 비해

heterozygosity가 상당히 높은 편으로 단순히 homothalic yeast가 자기 자체내 mating을 통해 homozygous diploid를 형성한 것이 아니라 두 개의 다른 strain (즉, subspecies 수준)의 mating을 통해 diploid가 된 후 LOH (Loss of Heterozygosity)에 의해 거의 유사한 sequence로 통일화 되는 과정에 있는 것으로 추정되었다.

표 2-5-4. *S. cerevisiae* 98-5 genome variant calling used reference S288C

Chromosome	Variant (No.)	SNP (No.)	Alterative homozygous SNP (No.)	Alterative heterozygous SNP (No.)	InDel (No.)	Alterative Homozygous InDel (No.)	Alterative heterozygous InDel (No.)
I (214,742)	2,173	2,023	1,132	891	150	91	59
II (803,030)	4,430	4,135	3,144	991	295	225	70
III (323,804)	2,145	2,001	378	1,623	144	36	108
IV (1,461,227)	8,528	7,972	6,502	1,470	556	471	85
V (571,127)	3,849	3,573	2,290	1,283	276	183	93
VI (265,868)	2,388	2,212	1,108	1,104	176	96	80
VII (1,069,743)	7,309	6,803	4,653	2,150	506	372	134
VIII (535,083)	4,172	3,900	1,151	2,749	272	83	189
IX (418,215)	3,937	3,716	1,627	2,089	221	110	111
X (732,462)	5,036	4,716	1,740	2,976	320	133	187
XI (681,592)	4,685	4,346	2,490	1,856	339	207	132
XII (1,012,377)	6,240	5,798	4,115	1,683	442	349	93
XIII (919,486)	4,987	4,636	2,491	2,145	351	186	165
XIV (791,267)	4,811	4,498	2,885	1,613	313	219	94
XV (1,022,494)	6,320	5,894	4,200	1,694	426	316	110
XVI (932,842)	5,038	4,673	3,370	1,303	365	268	97
MT	726	435	354	81	291	280	11
Total	76,774	71,331	43,630	27,701	5,443	3,625	1,818

*extensive allelic differences

표 2-5-5. 일차 드노보 어셈블리 결과

	No. of sequences	Total bases	Longest	N50	N90
Contig	32	12,267,066	1,504,012	728,456	240,059
Quantification					
Total no. of gene models predicted					5,809
Unique gene models (No.)					5,614
Genes with isoforms (No.)					195
Average gene length (bp)					1,476 bp
Total bases of gene models (Mbp)					85.75 Mbp
Genes in the draft genome (%)					69.90

이러한 특이한 구조적 상이성을 재검토하기 위해 Illumina sequencing을 추가적으로 수행하여 *S. cerevisiae* reference 균주인 S288c와 다시 비교한 결과, heterologous SNP가 매우 높은 비율로 존재함이 재차 확인되었다. 결론적으로, S288c reference sequence와 alternate sequence가 heterozygosity를 보이는 지역이 20,955 곳, alternate sequence 들끼리

heterozygosity,를 보이는 지역이 417 곳으로 총 21,372 곳이 확인됨. 특히 heterozygosity를 보이는 지역은 거의 대부분 reference와 alternate가 1:1 비율에 가깝게 분리되는데, 이는 서로 거의 같은 sequence를 가지는 strain들이 diploid를 이루었을 가능성을 강력하게 뒷받침하고 있다.

최근 정밀 분석을 통해 12번 chromosome에 rRNA cluster를 100 copy 추가하고, 일차 assemble 과정에서 생긴 6개의 non-anchored contig들은 모두 false contig들로 제거하여 좀 더 완성된 유전체 지도를 확보함(표 2-5-5). Heterozygosity 분포도를 기반으로 *S. cerevisiae* 98-5 균주 유전체를 대략적으로 A와 B subgenome으로 나눌 수 있었으며, 이를 기반으로 annotation 분석을 진행하고 있다.

라. *Saccharomyces cerevisiae* KSD-YC 균주의 유전체 분석

FacBio sequencing data 기반 assembly 결과, KSD-YC 효모균주는 S288c와 비교해 봤을 때, 3번 염색체 앞부분의 약 90 kb 정도 deletion된 것으로 보이고(repeat 등을 제외하면 75 kb로 추정), 5번 염색체 중간에 inversion이 일어난 것이 확인되었다(그림 2-5-3. 오른쪽 패널).

꽤 큰 크기의 deletion 및 여러 군데 gap에 대한 sequence 정보를 확보하기 위해 Illumina sequencing을 추가로 수행하였음. 효모 KSD-YC 균주의 유전체도 diploid 형태이므로, 현재 heterozygosity에 대한 심화 분석 중이다.

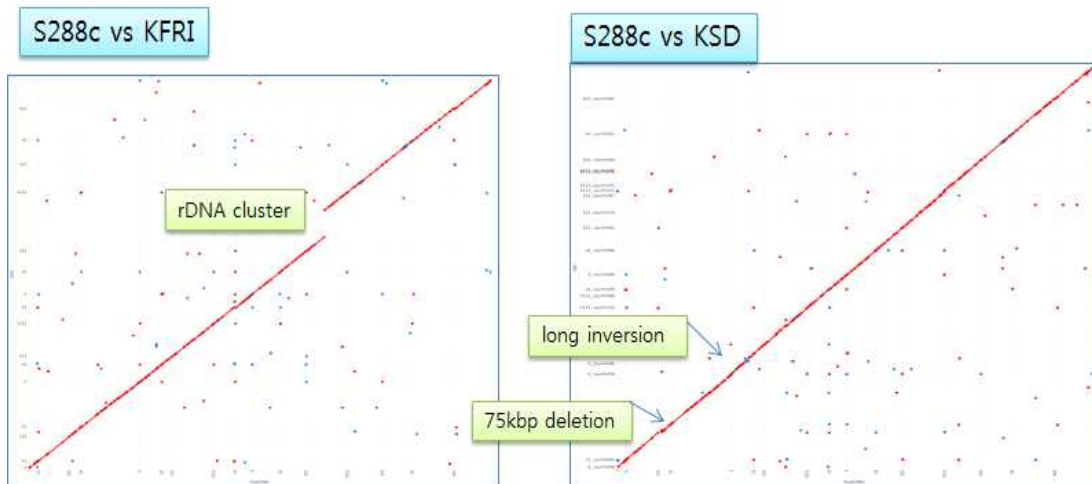


그림 2-5-3. *S. cerevisiae* 표준유전체 (S288c 유전체)와 98-5 효모 균주(왼쪽), KSD-YC 효모 균주(오른쪽) 유전체와의 synteny 비교

마. 탁주 효모 균주 표준유전체 분석을 위한 생리적 특징 분석

(1) *S. cerevisiae* KSD-YC와 98-5 ascospore 생성 실험

Diploid 균주인 SC 98-5와 KSD-Yc의 경우 heterologous SNP가 매우 높은 비율로 존재함이 관찰되어 ascospore 형태로 만드는 sporulation 실험을 수행한 결과, positive control로 쓰인 *S. cerevisiae* strain의 경우 7일 동안의 sporulation 조건에서 대부분 ascospore를 형성하였지만 SC98-5와 KSD-Yc 균주는 ascospore를 전혀 생성하지 못하였다(그림 2-5-4). 이는 SC 98-5와

KSD-Yc 균주들의 경우 거의 동일한 유전체 서열을 지닌 균주들 간의 interstrain mating을 통해 diploid가 형성될 가능성이 높음을 시사하고 있다(그림 2-5-4).

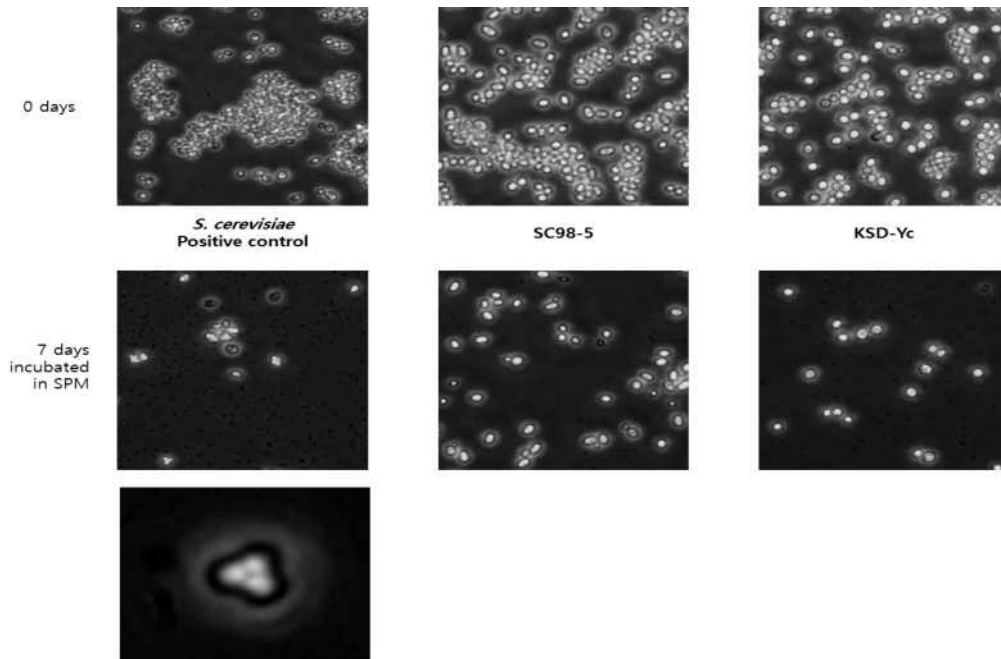


그림 2-5-4. SC98-5와 KSD-Yc 균주의 sporulation efficiency test

바. *Saccharomyces cerevisiae* 98-5와 KSD-Yc의 RNA-Seq 분석

S. cerevisiae 98-5와 KSD-Yc 유전체 정보를 토대로 보다 정확한 gene annotation을 위해 RNA sequencing 분석을 수행하기로 하여 RNA를 획득하고 RNA-Seq 분석을 수행하였다 (표 2-5-6).

표 2-5-6. 토종 효모 유전체 심화 시퀀싱 및 annotation을 위한 RNA-Seq 현황

TBI ID	해독종	라이브러리 (Insert size)	시퀀싱 (생산량)	진행상황
TBD160884	KSD-YC (<i>Saccharomyce scervisiae</i>)	PacBio SMRT (TBI)	4 cells (~1.86G)	Completed
		LMP 5-kb	~2G (실생산 3.16Gb)	Completed (17.01.13)
		LMP 10-kb	~2G (실생산 3.42Gb)	Completed (17.01.13)
		TruSeq Nano DNA 350-bp	~4G (실생산 4.08Gb)	Completed (17.01.13)
		RNA-Seq (stranded)	~3.7G	Completed
TBD160981	SC 98-5 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	PacBio SMRT (CAU)	~3G	Completed
		Illumina TSLR	~1.18	Completed
		TruSeq Nano DNA 350-bp	~2.8G	Completed
		TruSeq Nano DNA 350-bp OD2.5	~4G (실생산 4.56Gb)	Completed (17.01.13)
		TruSeq Nano DNA 350-bp OD10	~4G (실생산 4.52Gb)	Completed (17.01.13)
		RNA-Seq (stranded)	~3.7G	Completed

2. 글루타치온 고생산 균주의 전장유전체 분석

가. DNA 추출 및 라이브러리 합성

PabBio 이용을 위하여 purity와 quality가 높은 DNA와 라이브러리를 확보하였다(그림 2-5-4).

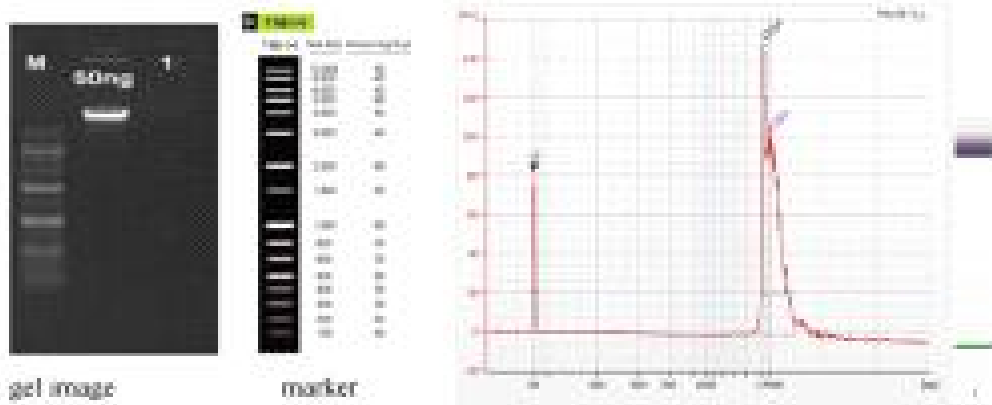


그림 2-5-4. DNA 추출 결과 및 20kb SMRTbell library construction 결과

나. *Saccharomyces cerevisiae* Rey36-3의 전장 유전체 분석

PabBio를 이용하여 *S. cerevisiae* Rey 36-3의 전장 유전체를 시퀀싱한 결과 809,699개의 subreads에서 4,687,953,481 bases(평균길이 5,789 bases, N50 길이 8,711 bases)를 확보였고, 이를 Canu를 이용하여 de novo assembly를 한 결과 19개의 contig가 생성되었다(그림 2-5-5).

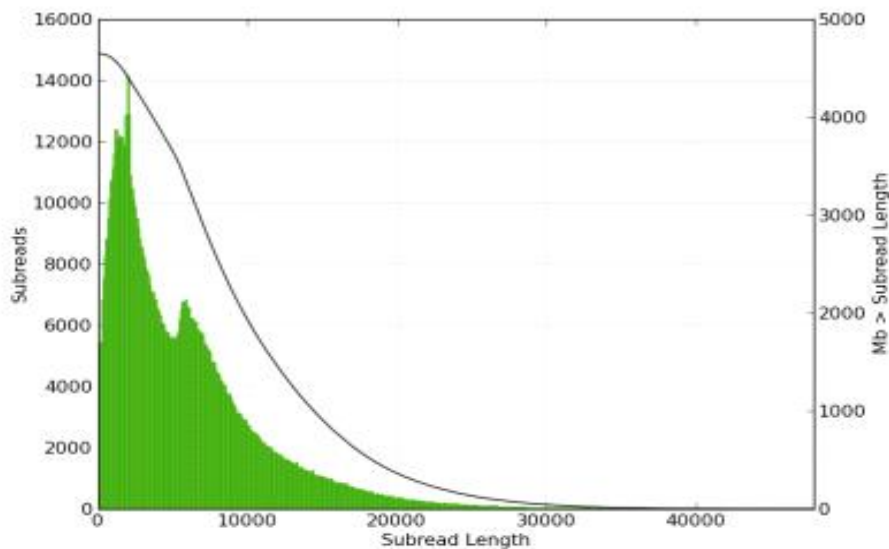


그림 2-5-5. Filtered subread 길이의 분포

Assembly를 위하여 사용된 Canu의 분석 결과 19개의 contig가 확보되었는데, 총 길이는 12,004,830 bp이고 가장 길이가 긴 contig는 contig1로 1,529,546 bp의 길이로 확인되었고, 가장 짧은 contig는 contig19로 72,918 bp인 것으로 확인 되었다(표 2-5-6).

표 2-5-6. Rey 36-3 전장유전체의 assembly 결과

Number of contigs	Total length	N50	Max. Length	Min. Length	Avg. Length
19	12,004,830	814,069	1,529,546	72,918	631,833

PabBio 분석결과 확보된 19 contigs를 대상으로 분석한 결과 *S. cerevisiae* 의 chromosome 에 해당되는 16개의 contigs, mitochondrial genome에 해당되는 contig,로 분류할 수 있었으며 세부 contigs 정보는 아래 표로 정리하였다. Contig들의 시퀀싱 depth는 210-260사이에 주로 분포되어있었으나 contig12의 경우 depth가 $\times 524$ 였고, mitochondrial genome으로 파악된 contig19의 경우는 depth가 $\times 6035$ 에 이르는 것으로 나타났다(표 2-5-7).

표 2-5-7. *S. cerevisiae* Rey36-3의 whole genome sequencing

Contig Name	Length (bp)	GC %	Depth
contig1	1,529,546	38.1	225
contig2	1,074,143	38.1	227
contig3	1,066,801	38.2	233
contig4	911,163	38.1	228
contig5	909,098	38.2	234
contig6	814,069	38.3	235
contig7	783,566	38.5	226
contig8	682,209	38.1	237
contig9	595,483	38.5	228
contig10	572,051	38.3	260
contig11	534,529	38.5	241
contig12	489,660	38.8	524
contig13	431,834	38.7	233
contig14	380,612	38.4	227
contig15	349,303	38.1	229
contig16	286,680	38.9	211
contig17	286,072	38.8	227
contig18	235,093	39.5	237
contig19	72,918	15.8	6035
Total	12,004,830		

다. *Saccharomyces* 유전체 구조 비교 분석

Assembly된 *S. cerevisiae* Rey36-3의 contig들과 기존의 *S. cerevisiae* s288c chromosome 을 분석하였다. 비교분석을 위하여 Circos software를 사용하였다(그림 2-5-6).

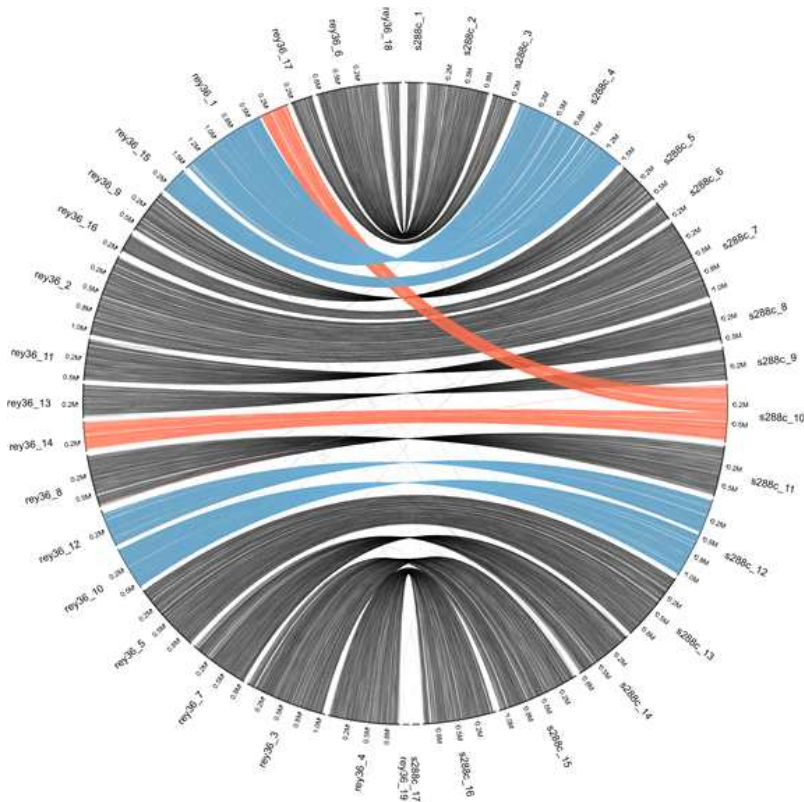


그림 2-5-6. Circos를 이용한 *S. cerevisiae* Rey36-3와 *S. cerevisiae* s288c 유전체 비교 분석

S. cerevisiae s288c의 mitochondrial genome은 *S. cerevisiae* Rey36-3의 contig19에 해당하는 것으로 나타났고, *S. cerevisiae* s288c의 chromosome1은 *S. cerevisiae* Rey36-3의 contig18, s288c의 chromosome2는 Rey36-3의 contig6, s288c의 chromosome3는 Rey36-3 contig17와 각각 매칭되는 것으로 확인되었다. 특이하게도 *S. cerevisiae* s288c의 chromosome4의 경우 *S. cerevisiae* Rey36-3의 contig15와 contig1의 일부(뒤쪽)가 합쳐진 형태인 것으로 확인되어 *S. cerevisiae* Rey36-3의 경우 유전체의 전위(translocation)가 발생하였음을 알 수 있었다. *S. cerevisiae* Rey36-3 contig1의 앞쪽부분은 s288c의 chromosome10에서 유래되는 것으로 확인되었다. 또한, *S. cerevisiae* s288c의 chromosome5은 *S. cerevisiae* Rey36-3의 contig9, s288c의 chromosome6는 Rey36-3의 contig16, s288c의 chromosome7는 Rey36-3 contig2, s288c의 chromosome8는 Rey36-3의 contig11, s288c의 chromosome9는 Rey36-3 contig13와 각각 매칭되는 것으로 확인되었다. 앞서 언급했듯이 s288c의 chromosome10은 Rey36-3 contig1의 앞쪽부분이 포함되어있고, Rey36-3의 contig12의 부분도 포함되어있음을 확인 할 수 있었다.

S. cerevisiae Rey36-3 유전체의 나머지 부분은 *S. cerevisiae* s288c의 chromosome11은 *S. cerevisiae* Rey36-3의 contig8과 매칭됨을 알 수 있었고, s288c의 chromosome12는 Rey36-3의 contig10과 contig12로 분리되어서 나타남을 알 수 있었다. 또, s288c의 chromosome13는 Rey36-3 contig5, chromosome14의 경우 *S. cerevisiae* Rey36-3의 contig7, s288c의 chromosome15은 *S. cerevisiae* Rey36-3의 contig3, s288c의 chromosome16는 Rey36-3의 contig4와 매칭 됨을 확인하였다. 전체적으로 하나의 contig가 하나의 chromosome에 매칭되어 거의 complete sequence에 가까운 높은 quality의 유전체 시퀀싱이 PacBio 플랫폼을 통해 얻어졌음을 확인 할 수 있었다.

라. *S. cerevisiae* Rey36-3의 전장 유전체 유전체 해독

S. cerevisiae Rey36-3의 유전체상에서 유전자의 위치를 파악하기 위해서 Maker (v2.31.8) 이 사용되었다. 또한 UniProt Swiss-Prot(20150214)와 함께 Protein PLAST+ (v2.4.0)을 이용하여 추정된 protein의 기능을 추정하였다. Predicted transcripts의 개수는 5,665개였고, 이들의 총 길이는 8,252,161bp였다. 마찬가지로 Predicted proteins의 개수도 5,665개였고, 이들의 총길이는 2,743,403 aa로 분석되었다(그림 2-5-7).

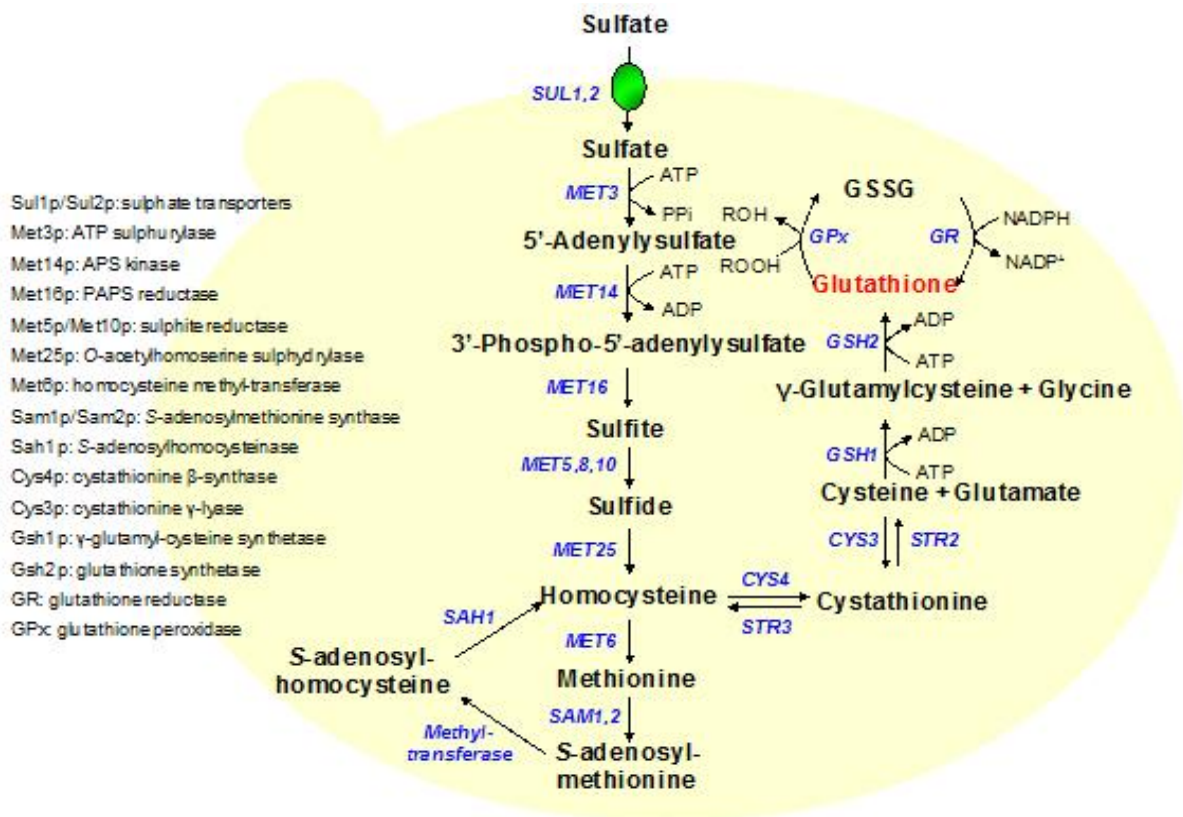


그림 2-5-7. *S. cerevisiae* Rey36-3 전장유전체를 기반으로 분석된 글루타치온 생산과 관련된 21개의 유전자

마. 글루타치온 생산과 관련된 유전자 분석

S. cerevisiae Rey36-3의 genome annotation으로 밝혀진 유전자들을 대상으로 분석하여 글루타치온의 생산과 관련된 생합성 경로를 분석하였다. 21개의 유전자들이 글루타치온 생산과 관련된 것을 확인할 수 있었다. Homocysteine이 생성되고 이로부터 cystathionine이 합성되어 이는 또 STR2에 의해 cysteine으로 전환됨을 알 수 있었다. 이 cysteine이 glutamate와 GSH1에 의해서 gamma-glutamylcysteine이 생성되는데 이 반응이 글루타치온의 생성에서 rate-limiting step이 되는 것으로 파악되었다. 또 이 gamma-glutamylcysteine이 glycine과 GSH2 효소의 반응으로 최종 product인 글루타치온으로 생성됨을 알 수 있었다. 전장유전체를 기반으로 분석된

글루타치온 생산과 관련된 21개의 유전자의 비교유전체 분석 결과 *S. cerevisiae* Rey36-3의 글루타치온의 생산과 관련 21개 생합성 경로를 *S. cerevisiae* s288c와 비교하였다. 대부분의 유전자들은 99정도의 높은 유사도(similarity)를 보였으나, STR2의 경우는 90%정도의 유사도를 보였다(그림 2-5-8).

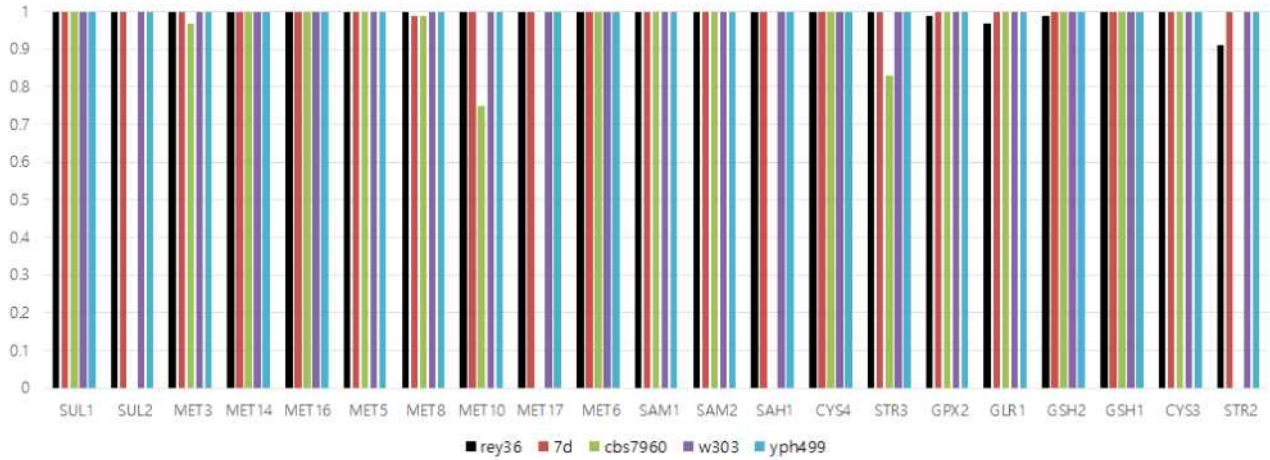


그림 2-5-8. 다양한 효모의 글루타치온 생산과 관련된 21개의 유전자를 *S. cerevisiae* s288c의 유전자와 비교

추가적으로 *S. cerevisiae* 7d, *S. cerevisiae* cbs7960, *S. cerevisiae* w303, *S. cerevisiae* yph499 등의 유전체에서 글루타치온 생산관련 유전자를 불러와서 *S. cerevisiae* s288c 21개 유전자와 비교분석하였다. 분석결과 다른 유전체에서는 *S. cerevisiae* s288c과 글루타치온 생합성 경로 유전자가 매우 유사한 것으로 파악되었으나 *S. cerevisiae* cbs7960의 글루타치온 생합성 관련 유전자는 *S. cerevisiae* s288c와 매우 낮은 유사도를 보였으며, SUL2나 MET17, SAH1, STR2의 경우에는 유사한 유전자가 발견되지 않음을 알 수 있었다. 이는 다른 유전자들이 이들 유전자의 기능을 대체하거나, isozyme들이 기능을 대체할 수도 있고, 이 효모의 경우 다른 경로를 이용할 수도 있을 것으로 사료된다. *S. cerevisiae* Rey36-3의 전장유전체 분석을 기반으로 글루타치온 최적을 위한 타겟 유전자 선택 분석 결과, *S. cerevisiae* Rey36-3의 전장유전체 기반의 annotation 결과를 바탕으로 효모의 대사경로를 분석하고 그를 바탕으로 전체 대사 경로의 flux를 분석하여 deletion 타겟을 분석하였다. 분석결과는 767개의 유전자가 글루타치온 flux에 영향을 미치지 못하는 것으로 드러났고, 26개의 유전자에서는 유전자 제거 시 오히려 글루타치온의 양이 줄어드는 것으로 나타났다. 또한 112개의 유전자는 essential한 유전자로 분류되어 제거가 불가능한 것으로 판단되었다(그림 2-5-9).

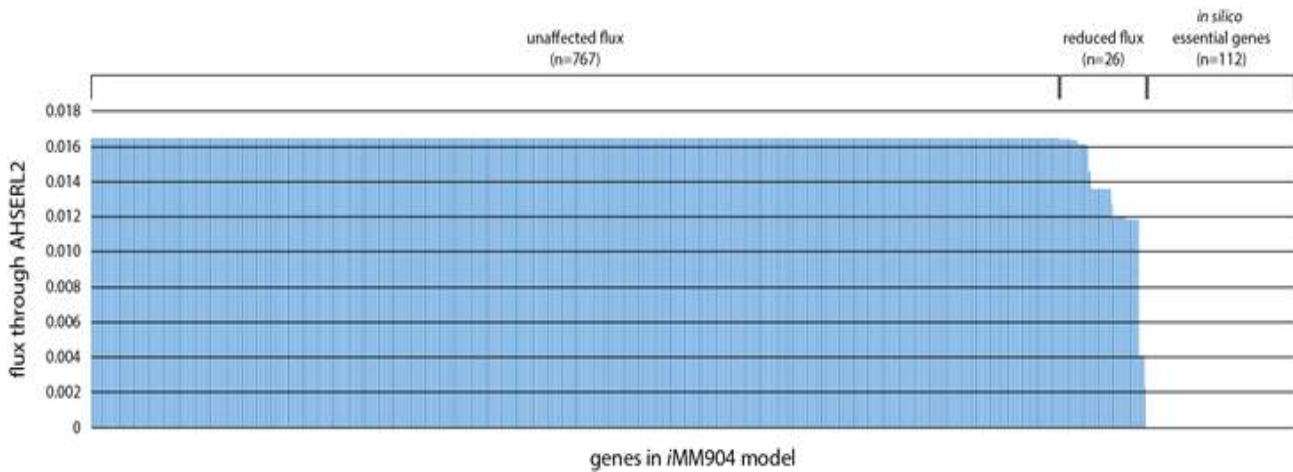


그림 2-5-9. 글루타치온 생성증가를 위한 *S. cerevisiae* Rey36-3의 대사경로에서의 deletion 타겟 분석 결과

글루타치온의 생산량 증가를 위한 추가적인 전략

효모에서의 글루타치온 생합성에서 앞서 언급한 GSH1 효소가 rate-limiting step으로 알려져 있다. 이 효소는 glutathione에 의해서 feedback inhibition을 받는 것으로 알려져 있는데 feedback inhibition이 있는 경우 glutathione 생산량이 제한되기 때문에 inhibition을 약화시키는 전략을 수립했다(그림 2-5-10).

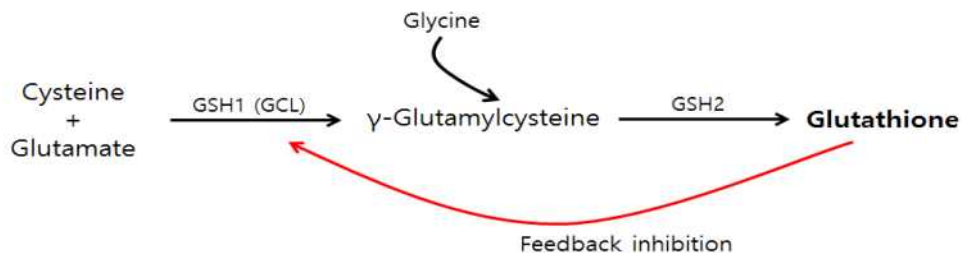


그림 2-5-10. 글루타치온 생성증가를 위한 *S. cerevisiae* Rey36-3의 대사경로에서의 deletion 타겟 분석 결과

S. cerevisiae GSH1 효소의 구조에서 gamma-glutamylcysteine의 합성에는 영향을 미치지 않으면서 글루타치온의 저해를 해제할 수 있는 아미노산을 분석하였다. 이를 위해서 GSH1의 inhibitor인 BSO와 GSH1의 interaction과 GSH1-글루타치온의 interaction을 비교하여 살펴보았다. 그 결과 196번째 아르기닌과 445번째 트립토판이 오직 글루타치온과의 interaction에서 중요 역할을 하는 것으로 나타났다. 그러므로, 이 아미노산을 engineering하여서 gamma-glutamylcysteine의 합성에는 영향을 미치지 않으면서 글루타치온의 저해에만 영향을 미칠 수 있는 효소를 만들어 글루타치온의 생성을 늘릴 수 있다는 것을 예측할 수 있었다(그림 2-5-11).

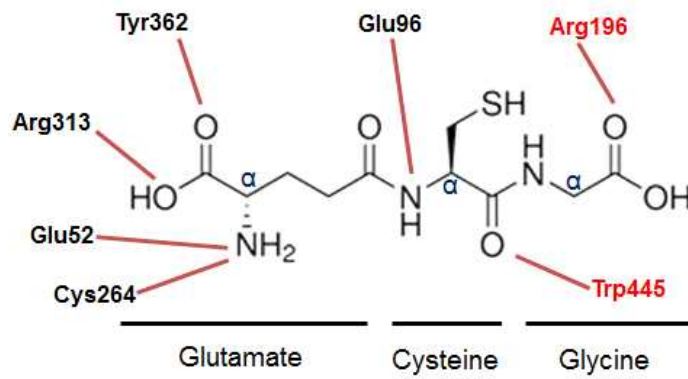
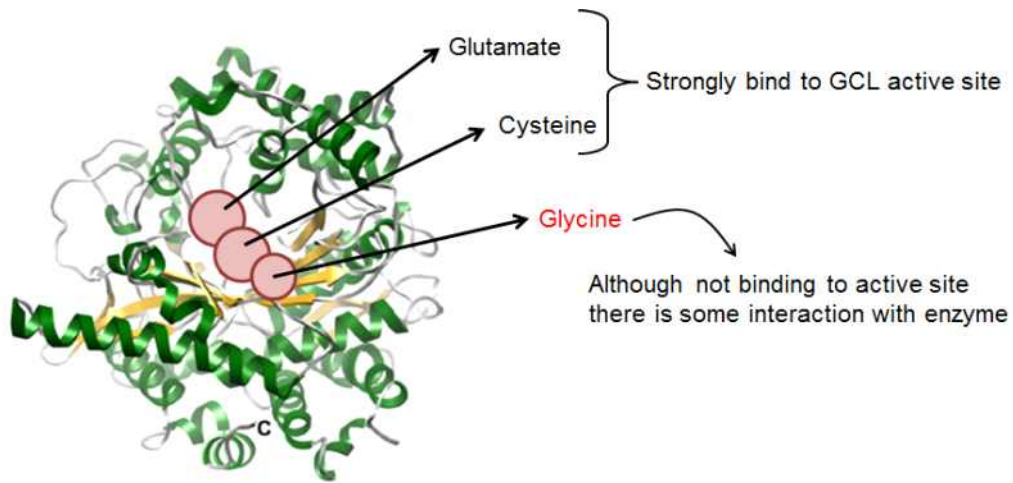


그림 2-5-11. *S. cerevisiae* 의 GSH1과 글루타치온의 interaction에 대한 구조분석. GSH1과 글루타치온의 글라이신부분과 interaction하는 두 개의 아미노산.

6절 누룩 및 전통주의 안전성 평가

곰팡이독소는 곰팡이의 2차 대사물질로 약 300~400개의 형태가 존재한다. 그 중에서도 *Aspergillus* 속이 생성하는 아플라톡신 (aflatoxins)과 오크라톡신 (ochratoxin), *Fusarium* 속이 생성하는 푸모니신 (fumonisins), tricocethenes, 제랄레논 (zeralenone)이 일반적으로 공중보건 문제를 일으킨다. 특히 아플라톡신은 *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius* 3 균주의 2차 대사물질로 주요유형은 B₁, B₂, G₁, G₂이다(그림 2-6-1). 아플라톡신 B₁은 1993년에 국제암연구소 (International Agency for Research on Cancer, IARC)에 의해 1차적으로 인간에 대한 발암성이 확인된 1 군 (Group 1)으로 분류되었다.

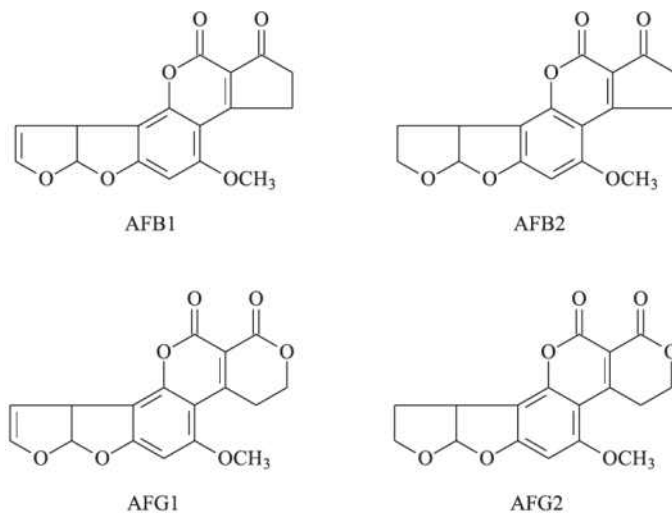


그림 2-6-1. 아플라톡신 B₁, B₂, G₁, G₂의 화학적 구조
(Adapted from Khan et al. 2012. *J. Sep. Sci*)

아플라톡신에 의한 식품 및 사료의 오염 사고는 1974년부터 현재까지 전 세계적으로 종종 발생하였다. 식품 중에서는 주로 곡류, 옥수수, 견과류 등에서 발견되었다 (Kumar et al., 2017). 전통누룩의 원료는 다양한 곡류 및 두류로 자연에 존재하는 곰팡이, 효모, 젖산균 등 야생 미생물이 생육하여 전분을 당화하고 알코올발효 기질인 당류를 생성한다. 따라서 술 제조 시에 발효제로 사용되는 유익한 재료이지만 *A. flavus* 등의 바람직하지 않은 곰팡이가 생산하는 아플라톡신에 오염될 가능성이 있다.

국내 누룩 관련 선행 연구에서 누룩곰팡이의 독소 생산 능력은 0 ~ 1.11 ppb 미만이고 누룩 곰팡이의 아플라톡신 생합성 유전자의 발현부위에서 부분적 결실이 발견되어 아플라톡신 생산 능력이 없는 균주로 보고되었다. 국외 쌀 원료 주류에서도 안전에 영향을 주지 않는 수준의 아플라톡신, 오크라톡신 A, 푸모니신 미량 검출되었다 (Bai et al., 2016). 그러나 *A. flavus*의 아플라톡신 생산량은 유전자형 (genotype), 기질, 지리적 위치, 기후변화, 작물재배 방법에 영향을 받는다. 유럽은 2003 ~ 2004년 기온상승에 의한 심각한 작물 곰팡이오염 사건 이후, 곰팡이독소

안전기준을 강화하였다. 유럽연합은 집행위원회 규칙 (Commission Regulation (EC)) NO 1881/2006에 의거하여 아플라톡신 B₁과 총 아플라톡신의 최대허용량을 각각 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 으로 정하였다. 우리나라에서도 총 아플라톡신을 포함한 아플라톡신 M1, 파툴린, 푸모니신, 오크라톡신 A, 데옥시니발레놀, 제랄레논의 기준을 각 식품별로 정하여 식품의약품안전처 (이하 식약처) 고시에 의거하여 관리한다. 총 아플라톡신 최대허용량은 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 이지만 세부적으로 누룩 및 술의 곰팡이독소 기준은 아직 마련되지 않았다(표 2-6-1).

표 2-6-1. 우리나라의 곰팡이독소 기준

대상식품	기준 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
총 아플라톡신 (B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂ 의 합)	기준 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
곡류, 두류, 땅콩, 견과류 및 그것을 단순 처리한 것(분쇄, 절단 등)	
곡류가공품 및 두류가공품 (규격외 일반가공식품)	
장류 및 고춧가루 및 카레분	15.0 이하
육두구, 심황(강황), 건조고추, 건조파프리카 및 이를 함유한 천연향신료	(단, B ₁ 은 10.0 이하)
밀가루	
건조과일류	
영아용 조제식, 성장기용 조제식, 영·유아용 곡류조제식, 기타 영·유아식	- (B ₁ 은 0.10 이하)
아플라톡신 M1	기준 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
제조·가공직전의 원유 및 우유류	0.50 이하
조제유류(영아용 조제유, 성장기용 조제유), 특수용도식품(영아용 조제식, 성장기용 조제식, 영·유아용 곡류조제식, 기타 영·유아식, 영·아용 특수조제식품) 중 유성분 함유제품	0.025 이하
파툴린	기준 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
사과주스, 사과주스농축액(원료용 포함, 농축배수로 환산하여)	50 이하
영아용 조제식, 성장기용 조제식, 기타 영·유아식	10.0 이하
푸모니신	기준 (mg/kg, B ₁ 및 B ₂ 의 합)
옥수수	4 이하
옥수수를 단순 처리한 것(분쇄, 절단 등)	2 이하
옥수수를 단순 처리한 것이 50% 이상 함유된 곡류가공품 및 시리얼류, 팝콘용옥수수가공품	1 이하
오크라톡신 A	기준 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
곡류 및 그것을 단순 처리한 것(분쇄, 절단 등)	5.0 이하
커피콩, 볶은커피	
인스턴트커피	10.0 이하
메주	20 이하
고춧가루	7.0 이하
포도주스, 포도주스농축액(원료용 포함, 농축배수로 환산하여), 포도주	2.0 이하
건조과일류	10.0 이하
영아용 조제식, 성장기용 조제식, 영·유아용 곡류조제식, 기타 영·유아식	0.50 이하
데옥시니발레놀	기준 (mg/kg)
곡류 및 그것을 단순 처리한 것(분쇄, 절단 등, 다만 옥수수 및 그것을 단순처리한 것은 제외)	1 이하
옥수수 및 그것을 단순 처리한 것(분쇄, 절단 등)	2 이하
시리얼류	0.5 이하
영아용 조제식, 성장기용 조제식, 영·유아용 곡류조제식, 기타 영·유아식	0.2 이하
면류	0.75 이하
제랄레논	기준 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
곡류 및 그것을 단순 처리한 것(분쇄, 절단 등)	200 이하
과자	50 이하
영아용 조제식, 성장기용 조제식, 영·유아용 곡류조제식, 기타 영·유아식	20 이하
시리얼류	50 이하

출처: 식품의약품안전처 고시 제 2016-154호 「식품의 기준 및 규격」

따라서 본 연구는 누룩의 비의도적 유해물질인 곰팡이독소 중에서도 누룩에 대한 오염가능성이 높은 아플라톡신 분석을 통해 전통누룩의 안전성 확보를 위한 기반 자료 확보 및 기준 마련에 기여하고자 한다.

1. 누룩의 총 아플라톡신 함량

전통누룩 61종의 총 아플라톡신 함량은 $3.3 \pm 0.3 \sim 540.4 \pm 89.0$ ppb 범위로 표 2-6-2에 정리하였다. 식약처 고시 ‘곡류가공품 중 총 아플라톡신 최대함량’ 기준인 $15 \mu\text{g}/\text{kg}$ 을 초과한 누룩은 14종으로 아플라톡신 고 함유 그룹 (high-AF group)으로 분류하였다. 분곡 (no. 17)에서 540.4 ± 89.0 ppb로 가장 높았고 이어서 병곡 (no. 18)에서 356.1 ± 70.9 ppb로 두 번째로 높았으며 백료곡 (no. 34)에서 15.8 ± 10.6 ppb로 가장 낮게 측정되었다. 정량한계 (LOQ) 4 ppb 미만인 누룩은 4종으로 여곡 (no. 16), 대주백타곡 (no. 33), 시판누룩10 (no. 56), 설향곡 (no. 12)이 여기에 해당된다. 이중 최하위 누룩 3종 (no. 33, 56, 12)을 아플라톡신 저 함유 그룹 (low-AF group)으로 분류하였다. 누룩 중 아플라톡신이 술로 전이되는 여부를 확인하고자 아플라톡신 고 함유 그룹으로 전통주를 제조하여 개별 아플라톡신을 분석하였다. 더 나아가 누룩의 아플라톡신 생성 원인을 확인하기 위해 아플라톡신 고 함유 누룩과 저 함유 누룩의 미생물 균집을 메타지놈 분석과 미생물 동정을 통해 분석하였다.

표 2-6-2. 전통누룩 61종의 총 아플라톡신 함량

Nuruk no.	Nuruk name	Total AF level (ppb)	Group	Sample name
17	분곡	540.4 ± 89.0	High-AF	N01
18	병곡	356.1 ± 70.9	High-AF	N02
19	이화주곡	253.2 ± 38.8	High-AF	N03
20	이화곡	213.1 ± 94.5	High-AF	N04
39	정화곡	153.0 ± 43.5	High-AF	N05
41	동양주곡	108.5 ± 38.7	High-AF	N06
40	연화곡	37.7 ± 13.3	High-AF	N07
44	신곡	34.3 ± 6.9	High-AF	N08
25	내부비전곡	30.7 ± 12.8	High-AF	N09
29	미곡	26.8 ± 23.1	High-AF	N10
57	시판누룩11	26.2 ± 17.8	High-AF	N11
15	백곡	20.0 ± 4.3	High-AF	N12
13	연화곡	16.9 ± 2.4	High-AF	N13
34	백료곡	15.8 ± 10.6	High-AF	N14
46	하동신곡	14.7 ± 4.3		
4	죽곡	12.2 ± 6.9		
49	시판누룩3	11.8 ± 3.3		
7	곡	10.3 ± 3.8		
28	곡	10.0 ± 4.0		
43	신곡	9.7 ± 3.5		
31	곡	9.0 ± 0.9		
45	신곡3	8.5 ± 3.8		
1	주곡방문	8.4 ± 2.9		
37	백주곡2	8.1 ± 2.2		
55	시판누룩9	8.0 ± 3.7		
6	공병곡	8.0 ± 1.9		

Nuruk no.	Nuruk name	Total AF level (ppb)	Group	Sample name
11	여곡	7.7 ± 1.6		
32	요곡	7.5 ± 1.9		
35	양농곡	7.3 ± 2.1		
5	죽곡	7.1 ± 4.3		
51	시판누룩5	7.1 ± 4.1		
2	추모곡	6.9 ± 0.4		
58	시판누룩12	6.7 ± 2.9		
36	백주곡	6.6 ± 2.3		
59	시판누룩13	6.5 ± 0.6		
61	시판누룩15	6.2 ± 1.4		
47	시판누룩1	6.1 ± 3.0		
60	시판누룩14	5.9 ± 1.7		
3	오메기곡	5.9 ± 0.9		
48	시판누룩2	5.9 ± 2.1		
22	향온곡	5.8 ± 2.6		
24	백수환동주곡	5.8 ± 2.2		
10	진주춘주곡	5.6 ± 0.6		
23	향온곡	5.5 ± 1.0		
27	녹두곡	5.3 ± 1.1		
52	시판누룩6	4.8 ± 1.4		
54	시판누룩8	5.2 ± 1.9		
38	만전향주곡	5.0 ± 0.7		
26	논미주곡	4.9 ± 2.8		
9	신곡	4.9 ± 1.4		
42	미곡	4.8 ± 1.8		
50	시판누룩4	4.7 ± 1.3		
53	시판누룩7	4.7 ± 1.0		
30	면곡	4.5 ± 0.6		
21	조곡법	4.4 ± 0.7		
8	면곡	4.2 ± 1.7		
14	백곡	4.1 ± 0.6		
16	여곡	3.8 ± 1.0		
33	대주백타곡	3.8 ± 0.4	Low-AF	N15
56	시판누룩10	3.7 ± 2.2	Low-AF	N16
12	설향곡	3.3 ± 0.3	Low-AF	N17

1) Data are mean ± S.D. (n=3).

2) Limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ) are 3 ppb and 4 ppb, respectively.

2. 누룩기반 전통주의 이화학적 특성

술의 알코올 함량, pH, 총산도, 당도 등의 이화학적 특성은 표 2-6-3에 나타내었다. 알코올 함량은 14.4±1.5~17.6±1.9% 범위로 분곡을 사용한 술에서 가장 높았고, pH는 pH 4.3±0.0~4.7±0.0 범위, 총산도는 0.2±0.0~0.3±0.0% 범위, Brix는 9.0±0.1~10.5±0.3 ° Bx로 측정되었다. 대조군의 알코올 함량, pH, 총산도, 당도는 각각 14.4±1.5%, pH 4.3±0.0, 0.2±0.0%, 8.8±0.2° Bx로 누룩 첨가 제조 술과 큰 차이는 없지만 알코올 함량과 pH, 당도가 낮게 측정되었다. 또한 아플라톡신이 생성된 누룩의 첨가 유무는 전통주의 이화학적 특성에 큰 영향을 주지 않았다.

표 2-6-3. 전통주의 이화학적 특성

Sample No.	Nuruk No.	Nuruk name	원주			
			Alcohol (%)	pH	Total acidity (%)	Sugar content (° Bx)
1	17	분곡	17.6±1.9	4.6±0.2	0.2±0.0	10.1±0.4
2	18	병곡	15.6±0.9	4.7±0.0	0.2±0.0	9.9±0.3
3	19	이화주곡	15.6±0.1	4.3±0.0	0.2±0.0	9.2±0.1
4	20	이화곡	15.5±0.1	4.3±0.0	0.2±0.0	9.1±0.1
5	39	정화곡	15.8±0.1	4.6±0.0	0.2±0.0	9.9±0.2
6	41	동양주곡	15.8±0.1	4.7±0.0	0.2±0.0	9.7±0.1
7	40	연화곡	15.6±0.2	4.6±0.0	0.2±0.0	9.5±0.2
8	44	신곡	16.1±0.2	4.6±0.0	0.2±0.0	9.8±0.1
9	25	내부비전곡	15.8±0.1	4.6±0.0	0.2±0.0	9.5±0.2
10	29	미곡	16.1±0.2	4.6±0.0	0.2±0.0	9.6±0.3
11	57	자가제조	16.3±0.2	4.5±0.1	0.3±0.0	10.5±0.3
12	15	백곡	15.5±0.2	4.7±0.0	0.2±0.0	9.5±0.1
13	13	연화곡	14.4±0.2	4.0±0.0	0.3±0.0	9.0±0.3
14	34	백료곡	14.4±0.3	4.6±0.0	0.2±0.0	9.0±0.1
15	-	정제효소	14.4±1.5	4.3±0.0	0.2±0.0	8.8±0.2

Sample No.	Nuruk No.	Nuruk name	약주		
			pH	Total acidity (%)	Sugar content (° Bx)
1	17	분곡	4.6±0.0	0.1±0.0	7.8±0.7
2	18	병곡	4.6±0.0	0.1±0.0	8.6±0.2
3	19	이화주곡	4.2±0.1	0.2±0.0	8.2±0.1
4	20	이화곡	4.2±0.0	0.2±0.0	7.8±0.1
5	39	정화곡	4.5±0.1	0.2±0.0	8.6±0.1
6	41	동양주곡	4.6±0.0	0.1±0.0	8.5±0.1
7	40	연화곡	4.6±0.0	0.1±0.0	8.2±0.2
8	44	신곡	4.5±0.0	0.1±0.0	8.4±0.1
9	25	내부비전곡	4.5±0.0	0.1±0.0	8.4±0.1
10	29	미곡	4.5±0.0	0.1±0.0	8.3±0.2
11	57	자가제조	4.4±0.1	0.2±0.0	8.7±0.1
12	15	백곡	4.6±0.0	0.1±0.0	8.5±0.1
13	13	연화곡	3.8±0.1	0.2±0.0	7.9±0.1
14	34	백료곡	4.4±0.1	0.1±0.0	8.5±0.1
15	-	정제효소	4.2±0.0	0.2±0.0	8.3±0.5

Sample No.	Nuruk No.	Nuruk name	탁주		
			pH	Total acidity (%)	Sugar content (° Bx)
1	17	분곡	4.6±0.1	0.1±0.0	5.1±0.4
2	18	병곡	4.6±0.0	0.1±0.0	5.2±0.1
3	19	이화주곡	4.3±0.0	0.1±0.0	5.1±0.0
4	20	이화곡	4.3±0.0	0.1±0.0	5.1±0.1
5	39	정화곡	4.5±0.0	0.1±0.0	5.1±0.1
6	41	동양주곡	4.7±0.0	0.1±0.0	5.1±0.1
7	40	연화곡	4.6±0.0	0.1±0.0	5.2±0.2
8	44	신곡	4.5±0.1	0.1±0.0	5.1±0.1
9	25	내부비전곡	4.5±0.0	0.1±0.0	5.0±0.1
10	29	미곡	4.5±0.0	0.1±0.0	5.1±0.0
11	57	자가제조	4.4±0.1	0.1±0.0	5.2±0.1
12	15	백곡	4.6±0.0	0.1±0.0	5.1±0.0
13	13	연화곡	4.0±0.0	0.2±0.0	5.1±0.1
14	34	백료곡	4.4±0.1	0.1±0.0	5.1±0.1
15	-	정제효소	4.3±0.0	0.1±0.0	5.0±0.1

3. 누룩과 전통주의 미생물 군집

가. 미생물 군집의 다양성

Illumina MiSeq 시스템을 이용하여 아플라톡신 고 함유 및 저 함유 누룩과 전통주의 염기서열 분석을 진행하였다. 유사도 97% 에서 8~68 개의 OTU로 분류되었고, 미생물 군집의 α -다양성 (alpha-diversity) 평가 지표를 표 2-6-4에 나타내었다. Shannon 지수의 평균이 high-AF 누룩과 low-AF 누룩에서 각각 1.68 ± 0.47 와 1.23 ± 0.55 로 유사하였으나 전통주에서는 0.17 ± 0.14 로 누룩에 비해 유의적으로 낮았다 ($p < 0.01$). OTUs와 Chao1 지수 또한 전통주보다 누룩에서 높게 나타났다. 이는 누룩의 미생물 군집이 전통주 보다 정량적으로 다양함을 보여주며, coverage가 100%로 누룩과 술에 있는 대부분의 fungi가 분석되었음을 알 수 있다.

표 2-6-4. Summary of alpha-diversities including OTU counts, Chao1, Shannon and coverage for the fungi in nuruk and alcohol beverage samples.

Sample name	Reads	OTUs	Chao1	Shannon	Coverage (%)
N01	133,412	41	56.6	1.11	100.0
N02	133,924	51	62.0	1.16	100.0
N03	114,404	41	48.0	2.35	100.0
N04	120,430	38	47.0	2.16	100.0
N05	121,547	49	57.7	1.49	100.0
N06	126,860	53	83.0	1.76	100.0
N07	104,023	68	72.5	2.14	100.0
N08	151,400	34	49.0	1.73	100.0
N09	162,319	39	45.4	1.24	100.0
N17	187,987	59	59.0	1.73	100.0
N15	174,750	53	56.3	1.32	100.0
N16	195,526	22	32.5	0.65	100.0
S01	109,021	8	8.0	0.12	100.0
S02	102,294	9	10.0	0.11	100.0
S03	104,233	23	26.0	0.51	100.0
S04	96,228	14	15.5	0.18	100.0
S05	97,466	10	10.5	0.06	100.0
S06	106,803	15	16.0	0.16	100.0
S07	107,143	27	42.0	0.17	100.0
S08	97,376	9	9.0	0.06	100.0
S09	105,826	15	16.0	0.13	100.0

그림 2-6-2에 제시한 alpha rarefaction 곡선의 기울기가 오른쪽으로 갈수록 완만해지므로 species/OTU 확인에 사용된 reads의 수가 적당하며 추가적인 시퀀싱이 필요하지 않음을 알 수 있다.

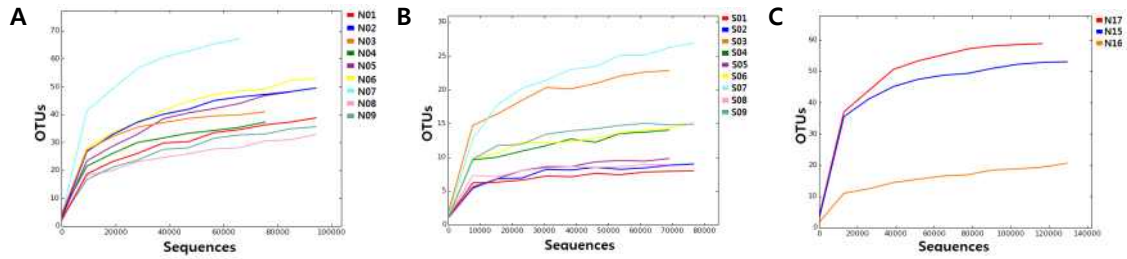


그림 2-6-2. Rarefaction curve graph of high-AF nuruk (A), low-AF nuruk (B) and alcohol beverage made from high-AF nuruk (C).

나. 미생물 군집의 구조

그림 2-6-3은 각 시료의 미생물 군집을 속 (genus) level로 나타내었다. 누룩은 아플라톡신 함량에 상관없이 *Aspergillus* 속과 *Rhizopus* 속이 21.6%~77.3%와 7.4%~76.1%로 우점인 반면 술은 *Saccharomyces* 속이 전체 염기서열분석의 93.0%~99.5%를 차지하였다.

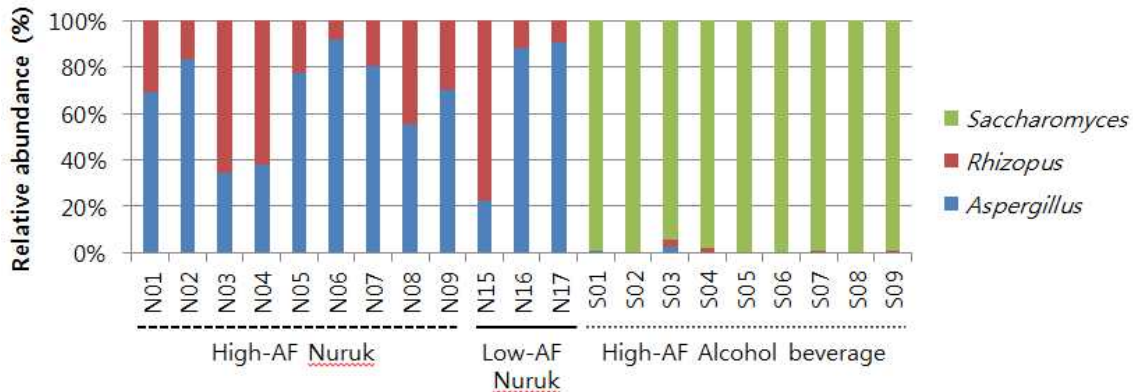
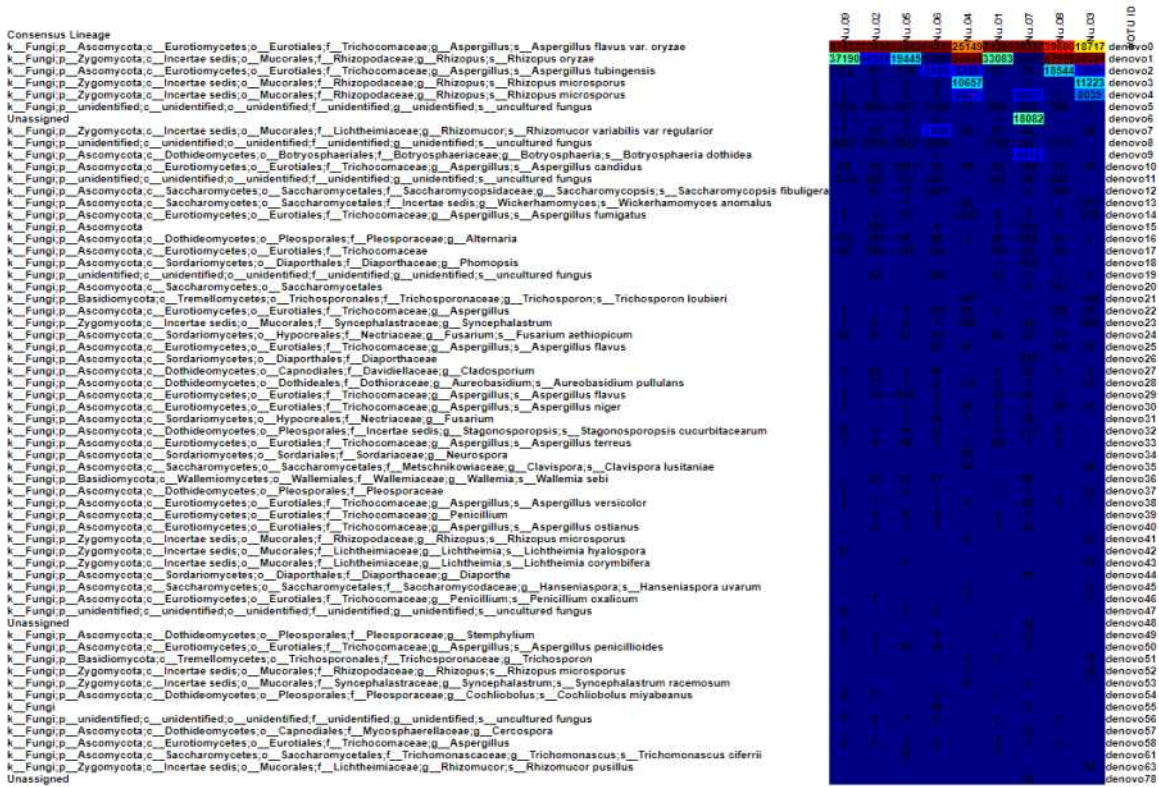


그림 2-6-3. Fungal community profiles of nuruk and rice-based alcohol beverage at the genus level.

그림 2-6-4에 제시한 heat-map을 통하여서 각 시료 별 종 (species) level의 미생물 분포를 확인하였다. 누룩에서는 시료 당 평균적으로 약 45개의 종이 감지되었고 술에서는 약 14개의 종이 감지되었다. OTU heatmap은 각 시료별 OTU counts를 보여주며, 파란색이 진해 질수록 낮은 OUT 백분율을 나타내고 붉은색이 진해 질수록 높은 백분율을 의미한다. High-AF nuruk의 *Aspergillus* 속은 주로 *A. flavus* var. *oryzae*와 *A. tubingensis*로 구성되었고, *Rhizopus* 속은 *R. oryzae*와 *R. microsporus*로 구성되었다. 특히 이화곡 (N04)과 신곡 (N08)에서 *A. flavus* var. *oryzae*의 비율이 높았다. Low-AF nuruk의 경우 *Aspergillus flavus*와 *Rhizopus arrhizus*의 비율이 높았다. 특히 대주백타곡 (N15)은 glucose를 이용하여 lactic acid를 생산하는 것으로 알려진 *R. arrhizus* (Marták et al., 2003)의 비율이 높았다. 술의 경우 *Saccharomyces* 속에 *S. cerevisiae*만 존재 하였다. 이를 통해 전통누룩에서는 곰팡이 중에서도 *Aspergillus* 속과 *Rhizopus* 속이 우점인 반면, 술 발효 과정에서 우점종이 효모인 *S. cerevisiae*로 변환됨을 알 수 있다.

(A) High-AF nuruk



(B) Low-AF nuruk



(C) High-AF alcohol beverage



그림 2-6-4. Heat map of fungi communities of high-AF nuruk (A), low-AF nuruk (B) and alcohol beverage (C).

다. 누룩 미생물 분리 및 동정 결과

총 아플라톡신 함량이 높은 누룩 14종 (high-AF group)과 함량이 낮은 누룩 3종 (low-AF group)의 미생물을 분리하였다. ITS1과 ITS4 영역 및 16S rDNA의 시퀀싱에 의해 총 100개의 균주가 97%이상의 유사도로 동정되었고 이중 93 개의 fungal isolates를 표 2-6-5에 제시하였다. 총 75개의 곰팡이 isolates가 동정되었고 이중 *Aspergillus* 속이 44개로 비중이 가장 높았고 *Rhizopus* 속이 16개로 두 번째로 비중이 높았다. 이는 누룩의 우점 종을 *Aspergillus* 속과 *Rhizopus* 속으로 분석한 메타지놈 결과와 일치하였다. 이어서 *Mycocladus* 속 3개, *Lichtheimia* 속과 *Mucor* 속, *Syncephalastrum* 속이 각각 2 개, *Rhizomucor* 속 1개, 마지막으로 unknown fungal sp.가 5 개 존재하였다. *Aspergillus* 속에서도 *A. flavus*가 23 개로 가장 많았고, 그 외에 *A. niger* 3 개, *A. chevalieri*가 2개, *Aspergillus* sp. 16 개로 구성되었다.

표 2-6-5. ITS1 and ITS4 region sequence analysis of 93 fungal isolates from 17 nuruk sampleS.

Sample No.	Isolate No.	Label	Isolates	Similarity (%)
N17	1	N12-E5-1	<i>Aspergillus</i> sp.	100
	2	N12-E5-3	<i>Syncephalastrum monosporum</i>	99
	3	N12-E5-4	<i>Syncephalastrum monosporum</i>	99
N13	4	N13-E2-1AF	<i>Aspergillus</i> sp.	100
	5	N13-E5-2AF	Uncultured compost	99
	6	N13-E5-3AF	<i>Aspergillus niger</i>	99
N12	7	N15-E2-1AF	Uncultured fungus	99
	8	N15-E2-3AF	Uncultured fungus	100
	9	N15-E3-1AF	<i>Rhizopus oryzae</i>	99
	10	N15-E5-1AF	<i>Rhizopus microsporus</i>	99
N01	11	N15-E5-3AF	<i>Aspergillus</i> sp.	100
	12	N17-E2-1AF	<i>Aspergillus flavus</i>	100
	13	N17-E2-2AF	<i>Aspergillus flavus</i>	100
	14	N17-E3-1AF	<i>Aspergillus flavus</i>	100
	15	N17-E4-1	<i>Aspergillus flavus</i>	99
	16	N17-E5-1	<i>Aspergillus</i> sp.	99
	17	N17-E5-1AF	Fungal sp.	100

Sample No.	Isolate No.	Label	Isolates	Similarity (%)
N02	18	N17-E5-2AF	<i>Aspergillus flavus</i>	100
	19	N17-E5-3AF	<i>Rhizopus</i> sp.	100
	20	N18-E2-1AF	<i>Aspergillus flavus</i>	100
	21	N18-E2-2-1AF	Fungal sp.	99
	22	N18-E2-3AF	Uncultured fungus	100
	23	N18-E3-1	<i>Rhizopus oryzae</i>	99
	24	N18-E3-1AF	<i>Aspergillus flavus</i>	100
	25	N18-E3-3AF	<i>Rhizopus oryzae</i>	100
	26	N18-E5-1AF	<i>Aspergillus</i> sp.	99
	27	N18-E5-2	Fungal sp.	99
N03	28	N19-E2-1AF	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99
	29	N19-E2-2AF	<i>Apiotrichum gracile</i>	97
	30	N19-E2-3AF	Uncultured fungus	100
	31	N19-E3-1AF	<i>Lichtheimia ramosa</i>	100
	32	N19-E5-1AF	<i>Rhizopus oryzae</i>	100
	33	N19-E5-4AF	<i>Aspergillus</i> Uncultured	100
N04	34	N20-E2-4AF	<i>Rhizopus oryzae</i>	100
	35	N20-E2-5AF	<i>Mucor circinelloides</i>	100
	36	N20-E3-1AF	<i>Rhizopus delemar</i>	100
	37	N20-E5-1AF	<i>Rhizopus delemar</i>	100
	38	N20-E5-2AF	<i>Aspergillus</i> Uncultured	100
N09	39	N25-E2-1AF	<i>Aspergillus</i> sp.	100
	40	N25-E3-1AF	<i>Mycocladius corymbiferus</i>	100
	41	N25-E3-2AF	<i>Rhizopus oryzae</i>	100
N10	42	N29-E2-2AF	<i>Aspergillus</i> sp.	99
	43	N29-E3-3AF	<i>Mycocladius corymbiferus</i>	100
	44	N29-E5-1AF	Uncultured compost	100
N15	45	N33-E3-1	<i>Rhizopus oryzae</i>	100
	46	N33-E4-1	<i>Aspergillus</i> sp.	99
	47	N33-E5-1	<i>Aspergillus flavus</i>	100
	48	N33-E5-2	Uncultured compost	100
	49	N33-E7-1	Fungal sp.	99
	50	N33-E7-2	<i>Aspergillus chevalieri</i>	99
N14	51	N34-E2-1AF	<i>Aspergillus</i> sp.	99
	52	N34-E5-1AF	<i>Aspergillus niger</i>	99
N05	53	N39-E2-1AF	<i>Aspergillus flavus</i>	100
	54	N39-E2-2AF	<i>Aspergillus flavus</i>	100
	55	N39-E3-1AF	Uncultured compost	100
	56	N39-E5-1AF	<i>Aspergillus flavus</i>	99
	57	N39-E5-2AF	Uncultured compost	100
N07	58	N40-E1-1AF	<i>Rhizopus oryzae</i>	99
	59	N40-E2-1AF	<i>Aspergillus</i> sp.	99
	60	N40-E2-2AF	Uncultured fungus	100
	61	N40-E2-3AF	Uncultured fungus	99
	62	N40-E3-2AF	<i>Rhizopus microsporus</i>	99
	63	N40-E3-3AF	<i>Aspergillus flavus</i>	100
	64	N40-E5-1	<i>Aspergillus</i> sp.	100
	65	N40-E5-1AF	Uncultured compost	100
	66	N40-E5-2AF	Uncultured fungus	99
	67	N40-E5-3AF	<i>Aspergillus flavus</i>	100
N06	68	N41-E1-1AF	<i>Rhizomucorvariabilis</i>	100
	69	N41-E2-1AF	<i>Aspergillus flavus</i>	100
	70	N41-E2-2AF	<i>Mucor circinelloides</i>	100

Sample No.	Isolate No.	Label	Isolates	Similarity (%)
	71	N41-E2-3AF	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	100
	72	N41-E3-1AF	<i>Aspergillus flavus</i>	100
	73	N41-E3-2AF	<i>Aspergillus flavus</i>	100
	74	N41-E3-3AF	<i>Uncultured fungus</i>	100
	75	N41-E5-1AF	<i>Aspergillus flavus</i>	100
	76	N41-E5-2AF	<i>Aspergillus flavus</i>	100
N08	77	N44-E2-2AF	<i>Aspergillus flavus</i>	100
	78	N44-E3-1AF	Uncultured compost	99
	79	N44-E3-4AF	<i>Rhizopus microsporus</i>	99
	80	N44-E5-1AF	Uncultured compost	99
	81	N44-E5-2AF	<i>Aspergillus niger</i>	99
	82	N44-E5-3AF	<i>Aspergillus</i> sp.	100
N16	83	N56-E4-1	<i>Aspergillus</i> sp.	99
	84	N56-E5-1	<i>Aspergillus flavus</i>	100
	85	N56-E5-2	<i>Aspergillus flavus</i>	100
	86	N56-E5-3	<i>Mycocladus corymbiferus</i>	100
N11	87	N57-E1-1AF	<i>Lichtheimia corymbifera</i>	99
	88	N57-E2-1AF	<i>Aspergillus flavus</i>	100
	89	N57-E3-1AF	<i>Rhizopus oryzae</i>	99
	90	N57-E5-1	<i>Aspergillus</i> sp.	99
	91	N57-E5-1AF	<i>Rhizopus oryzae</i>	99
	92	N57-E5-2AF	<i>Aspergillus flavus</i>	100
	93	N57-E6-1	<i>Aspergillus chevalieri</i>	99

4. 아플라톡신 B1, B2, G1, G2의 함량

가. 누룩과 전통주의 아플라톡신 함량

누룩과 전통주의 개별 아플라톡신 함량을 표 2-6-6에 제시하였다. 아플라톡신 B1과 G1 그리고 B2와 G2는 농도범위가 각각 50~1000 ppb와 15~300 ppb인 표준곡선을 이용하여 정량하였다. LC-MS/MS로 분석한 누룩의 총 아플라톡신 함량은 $0.1 \pm 0.1 \sim 76.6 \pm 51.0$ ppb 범위로 ELISA로 분석한 총 아플라톡신 함량보다 낮았다. 총 아플라톡신 함량이 식약처 고시 기준 $15 \mu\text{g}/\text{kg}$ 이상인 누룩은 분곡 (N01), 병곡 (N02), 이화주곡 (03), 이화곡 (04) 4종 이었다.

아플라톡신 B1이 전통누룩 10종에서 $0.2 \pm 0.4 \sim 63.6 \pm 42.2$ ppb로 가장 많이 검출되었다. 이어서 G1의 함량이 두 번째로 높았으나 두 종의 누룩 이화주곡 (N03)과 이화곡 (N04)에서만 23.1 ± 1.2 ppb와 24.6 ± 18.9 ppb로 검출되었다. 아플라톡신 B2는 B1이 검출된 10개의 누룩에서만 $0.3 \pm 0.4 \sim 12.5 \pm 8.1$ ppb로 검출되었다. G2 또한 G1을 함유한 이화주곡과 이화곡 에서만 2.1 ± 0.8 ppb, 2.5 ± 2.3 ppb로 검출되었다. 이를 통해 전통누룩의 주요 아플라톡신 형태는 B1임을 확인 하였다.

전통누룩 중의 아플라톡신은 술로 거의 이행되지 않았다. 술에서는 유일하게 아플라톡신 G1이 이화주곡으로 만든 전통주 (S03)와 이화곡으로 만든 전통주 (S04)에서 각각 0.3 ± 0.1 ppb와 0.3 ± 0.4 ppb로 검출되었다.

표 2-6-6. LC-MS/MS로 분석한 전통누룩 및 전통주의 아플라톡신 함량

Sample name	Nuruk		Aflatoxin level (ppb)				
	No.	Name	B ₁	B ₂	G ₁	G ₂	Total
N01	17	분곡	63.6±42.2	12.5±8.1	nd	nd	76.1±51.0
N02	18	병곡	32.1±10.2	7.9±2.3	nd	nd	40.0±12.2
N03	19	이화주곡	11.6±2.1	1.7±0.2	23.1±1.2	2.1±0.8	38.4±3.1
N04	20	이화곡	11.3±11.4	1.9±1.2	24.6±18.9	2.5±2.3	40.2±33.7
N05	39	정화곡	3.3±1.3	1.4±0.3	nd	nd	4.6±1.6
N06	41	동양주곡	7.7±2.4	1.7±0.6	nd	nd	9.4±2.8
N07	40	연화곡	0.1±0.2	0.3±0.3	nd	nd	0.6±0.5
N08	44	신곡	1.8±3.1	0.7±0.8	nd	nd	2.4±3.9
N09	25	내부비전곡	0.2±0.3	0.4±0.4	nd	nd	0.6±0.7
N10	29	미곡	0.2±0.4	0.3±0.4	nd	nd	0.5±0.8
N11	57	시판누룩11	nd [*]	nd	nd	nd	nd
N12	15	백곡	nd	nd	nd	nd	nd
N13	13	연화곡	nd	nd	nd	nd	nd
N14	34	백료곡	nd	nd	nd	nd	nd
N15	33	대주백탁곡	nd	nd	nd	nd	nd
N16	56	시판누룩10	nd	nd	nd	nd	nd
N17	12	설향곡	nd	nd	nd	nd	nd
S01	17	분곡	nd	nd	nd	nd	nd
S02	18	병곡	nd	nd	nd	nd	nd
S03	19	이화주곡	nd	nd	0.3±0.1	nd	0.3±0.1
S04	20	이화곡	nd	nd	0.3±0.4	nd	0.3±0.4
S05	39	정화곡	nd	nd	nd	nd	nd
S06	41	동양주곡	nd	nd	nd	nd	nd
S07	40	연화곡	nd	nd	nd	nd	nd
S08	44	신곡	nd	nd	nd	nd	nd
S09	25	내부비전곡	nd	nd	nd	nd	nd
S10	29	미곡	nd	nd	nd	nd	nd
S11	57	시판누룩11	nd	nd	nd	nd	nd
S12	15	백곡	nd	nd	nd	nd	nd
S13	13	연화곡	nd	nd	nd	nd	nd
S14	34	백료곡	nd	nd	nd	nd	nd
S15	-	Control	nd	nd	nd	nd	nd

*nd, not detected.

나. 누룩 유래 곰팡이의 아플라톡신 생성 여부 분석

누룩에서 분리된 *Aspergillus* 44개 중에 30개를 선택하여 아플라톡신 생성 능력을 확인하였다. 실험실 보유 *Aspergillus oryzae* 균주 6개는 비교균으로 사용되었고 *A. flavus* 표준균주 NRRL3357과 *A. oryzae* 표준균주 RIB40은 대조균으로 사용하였다. 총 38개의 *Aspergillus* sp.의 아플라톡신 생성 능력은 표 2-6-7에 제시하였다. 아플라톡신 B1과 G1, B2와 G2는 농도범위가 각각 1~1000 ppb와 0.3~300 ppb인 표준곡선을 이용하여 정량하였다.

Aspergillus 30 isolates 중에서 1/3에 해당하는 10개의 균주만 아플라톡신 B1을 0.1~2.4 ppb 농도로 생산하였고 B2, G1, G2는 생산하지 않았다. 이는 *A. flavus* 표준균주 NRRL3357의 아플라톡신 B1 생산량 1728.9 ppb에 비해 현저하게 낮은 수치이다. High-AF nuruk 중 하나인 신곡 (N08, no. 44)에서 분리한 isolate (M13)의 B1 생성능이 2.4 ppb로 가장 높았으나, low-AF nuruk

인 대주백탁곡 (N15, no. 33)에서도 아플라톡신 생성능이 각각 1.9 ppb와 1.8 ppb로 두 번째로 높게 생산한 2개의 isolates M27과 M28이 분리되었다. *A. oryzae*의 경우 그 어떤 균주도 아플라톡신을 생성하지 않았고 *A. flavus* 표준균주는 아플라톡신 B₂를 45.7 ppb로 생산하였다. *A. flavus*는 일반적으로 아플라톡신 B 그룹 (B₁, B₂)을 생산하지만 G 그룹 (G₁, G₂)은 생성하지 못하는 것으로 알려져 있다.

표 2-6-7. Aflatoxin producibility of *Aspergillus* sp. isolated from nuruk.

Group	Sample name	Label	Isolates	AF B ₁	AF B ₂	Total
High-AF	M01	N17-E2-1AF	<i>A. flavus</i>	nd*	nd	
	M02	N18-E2-1AF	<i>A. flavus</i>	nd	nd	
	M03	N18-E3-1AF	<i>A. flavus</i>	nd	nd	
	M04	N19-E5-4AF	Uncultured <i>Aspergillus</i>	nd	nd	
	M05	N20-E5-2AF	Uncultured <i>Aspergillus</i>	nd	nd	
	M06	N39-E2-1AF	<i>A. flavus</i>	nd	nd	
	M07	N41-E2-1AF	<i>A. flavus</i>	nd	nd	
	M08	N41-E3-2AF	<i>A. flavus</i>	nd	nd	
	M09	N40-E2-1AF	<i>Aspergillus</i> sp.	nd	nd	
	M10	N40-E3-3AF	<i>A. flavus</i>	nd	nd	
	M11	N40-E5-3AF	<i>A. flavus</i>	nd	nd	
	M12	N44-E2-2AF	<i>A. flavus</i>	nd	nd	
	M13	N44-E5-3AF	<i>Aspergillus</i> sp.	2.4	nd	
	M14	N25-E2-1AF	<i>Aspergillus</i> sp.	nd	nd	
	M15	N29-E2-2AF	<i>Aspergillus</i> sp.	nd	nd	
	M16	N57-E2-1AF	<i>A. flavus</i>	nd	nd	
	M17	N57-E5-2AF	<i>A. flavus</i>	0.8	nd	
	M18	N15-E5-3AF	<i>Aspergillus</i> sp.	0.3	nd	
	M19	N13-E2-1AF	<i>Aspergillus</i> sp.	nd	nd	
	M20	N34-E2-1AF	<i>Aspergillus</i> sp.	nd	nd	
Low-AF	M25	N17-E4-1	<i>A. flavus</i>	0.3	nd	
	M26	N17-E5-1	<i>Aspergillus</i> sp.	0.1	nd	
	M29	N40-E5-1	<i>Aspergillus</i> sp.	nd	nd	
	M33	N57-E5-1	<i>Aspergillus</i> sp.	nd	nd	
	M24	N12-E5-1	<i>Aspergillus</i> sp.	0.8	nd	
	M27	N33-E4-1	<i>Aspergillus</i> sp.	1.9	nd	
	M28	N33-E5-1	<i>A. flavus</i>	1.8	nd	
	M30	N56-E4-1	<i>Aspergillus</i> sp.	1.0	nd	
	M31	N56-E5-1	<i>A. flavus</i>	0.5	nd	
	M32	N56-E5-2	<i>A. flavus</i>	nd	nd	
<i>A. oryzae</i>	M21	N152-1	<i>A. oryzae</i>	nd	nd	
	M34	N159-1	<i>A. oryzae</i>	nd	nd	
	M35	CI-5-2-1	<i>A. oryzae</i>	nd	nd	
	M36	CN16,3,1-3	<i>A. oryzae</i>	nd	nd	
	M37	CN12,17,1-3	<i>A. oryzae</i>	nd	nd	
	M38	CN20,3,1-4	<i>A. oryzae</i>	nd	nd	
Standard strain	M23	NRRL3357	<i>A. flavus</i>	1728.9	45.7	1874.1
	M22	RIB40	<i>A. oryzae</i>	nd	nd	

*nd, not detected.

ELISA로 분석한 전통누룩 61종의 총 아플라톡신 함량은 3.3 ~ 540.4 ppb 범위로 14종의 누룩이 식약처 고시 ‘곡류가공품 중 총 아플라톡신 최대함량’ 인 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 을 초과하였다. 그러나 LC-MS/MS로 분석한 경우 누룩의 총 아플라톡신 함량은 0.1 ~ 76.6 ppb 범위로 ELISA 결과에 비해 감소하였고, 4종의 누룩만이 총 아플라톡신 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 이상을 초과하였다. 전통누룩에서 주요한 아플라톡신 형태는 B1으로 확인되었다. 누룩 10종에서 0.2 ~ 63.6 ppb 범위로 다른 세 가지 형태의 아플라톡신 보다 높았다. 두 번째로 G1의 함량이 약 23 ppb로 높았으나 두 종의 누룩에서만 검출되었고, B2는 0.3 ~ 12.5 ppb 범위로 함량은 낮지만 B1이 검출된 10종의 누룩에서 모두 검출되었다. G2 또한 G1을 함유한 두 종의 누룩에서 약 2 ppb로 검출되었다. 누룩 중 아플라톡신은 술로 거의 이행되지 않았다. 아플라톡신 G1이 검출되었던 누룩 2종의 술에서만 약 0.3 ppb로 검출되었다. 즉 전통방법으로 제조한 누룩은 아플라톡신에 대한 오염정도가 낮고 술에서는 아플라톡신 검출되지 않았다. 그러나 누룩 중 아플라톡신의 생성원인을 파악하고 오염 가능성을 제거하기 위해 차세대 염기서열분석 (next generation sequencing, NGS)과 18S rRNA와 16S rRNA 분석을 통해 누룩의 미생물 군집을 분석하였다.

ELISA 분석 결과를 기준으로 총 아플라톡신 함량이 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 을 초과한 누룩 14종과 4 ppb 미만의 최하위 누룩 3종을 각각 아플라톡신 고 함유 그룹 (high-AF nuruk)과 저 함유 그룹 (low-AF nuruk)으로 분류하였다. 메타지놈과 미생물 동정을 통해 누룩의 주요 곰팡이는 *Aspergillus* 속과 *Rhizopus* 속이고 아플라톡신을 생성하는 *A. flavus*가 존재함을 확인하였다. 누룩에서 분리한 *Aspergillus* sp.의 아플라톡신 생성 능력은 LC-MS/MS를 이용하여 *Aspergillus oryzae* 6 균주 (비교균), *A. flavus* 표준균주 NRRL3357, *A. oryzae* 표준균주 RIB40 (대조균)와 비교하였다. *Aspergillus* 30 isolates 중에서 1/3에 해당하는 10 균주가 아플라톡신 B1을 0.1~2.4 ppb 농도로 생산하였고, B2, G1, G2는 생산하지 않았다. High-AF nuruk인 신곡 (N08, no. 44)에서 분리한 isolate (M13)의 B1 생성능이 2.4 ppb로 가장 높았으나 *A. flavus* 표준균주 NRRL3357의 생산량 1728.9 ppb에 비하면 현저하게 낮은 수치였다. 흥미롭게도 low-AF nuruk인 대주백타곡 (N15, no. 33)에서도 아플라톡신 생성능이 각각 1.9 ppb와 1.8 ppb로 두 번째로 높은 2개의 isolates가 분리되었다. 독소를 생산하지 않은 *A. flavus*는 아플라톡신 비생산 균주일 가능성이 있으며 추가적인 확인 실험이 필요하다.

결론적으로 누룩에서 분리한 개별 *Aspergillus* sp. 의 아플라톡신 생산 능력은 낮지만, 누룩 발효 및 저장 과정 중 온도와 습도 등의 외부조건에 의해 아플라톡신 생산에 적합한 환경이 조성되었을 것으로 판단하였다. 따라서 전통누룩의 아플라톡신을 저감 화를 위해 ‘전통누룩의 발효조건 최적화 연구’가 필요하며, 더 나아가 ‘전통누룩에 존재하는 미생물의 상호작용을 통한 아플라톡신 생성 조절 연구’가 필요하다고 판단된다.

7절 전통누룩 유래 유용 미생물의 개발 및 활용

1. 베타글루칸 고생성 효모의 개발 및 활용

베타글루칸은 지금까지 알려진 면역조절제 중 가장 강력한 면역조절능력을 보이면서도, 과도한 염증 반응이나 부작용이 거의 보고되지 않은 우수한 물질임에도 불구하고, 아직까지 훌륭한 임상결과가 부족하고 일반인과 의료현장에서 인지도가 낮은 건강기능성식품임. 베타글루칸은 아직까지 다른 기능성 소재에 비해 상대적으로 고가임에도 불구하고 면역활성과 기능이 높게 평가되어 질병 예방용 건강식품에 대단히 좋은 소재로 손꼽히고 있다. 따라서 베타글루칸 함량이 높고, 기능성 물질 함유량이 높은 효모를 탁주 발효균주로 사용한다면, 효모를 함께 섭취함으로써 탁주의 기능성이 증가될 것으로 보여진다.

본 연구에서는 탁주가 효모 균체를 포함한 주류의 특색을 갖고 있으므로, 베타글루칸 고생성 효모를 양조에 활용, 탁주의 기능향상에 도움을 주고자 균주선발 및 적용연구를 수행 하였다

가. 전통누룩 유래 베타글루칸 고생성 효모 탐색

입국배지에서 높은 알코올 발효능을 보였던 균주 중 알코올 함량이 4% 이상인 34균주를 선발하였으며 이들 균주의 발효특성 및 β -glucan 함량을 알아보기 위하여 탁주를 제조하였다. 제조한 탁주의 일반분석 결과는 표 2-7-1과 같다.

표 2-7-1. 선발된 34종의 효모의 베타글루칸 함량 및 양조적성

No.	Yeast name	β -glucan (dry basis, % w/w)			Mean	SD	Sensory score
		test 1	test 2	test 3			
control	-	-	-	-	-	-	5.1
1	Rey51-2	30.43	27.48	27.52	28.48	1.69	7.6
2	Rey28-6	32.96	27.52	27.48	29.32	3.15	6.5
3	Rey36-3	31.60	31.18	26.08	31.39	0.30	6.1
4	Rey28-7	30.25	28.30	26.97	28.51	1.65	7.1
5	Rey39-6	29.67	28.27	29.41	29.11	0.75	7
6	Rey30-1	27.97	26.91	23.16	26.01	2.53	7.3
7	Rey51-1	27.89	25.46	25.91	26.42	1.29	6.4
8	Rey51-3	28.67	24.25	25.75	26.22	2.25	7.1
9	Rey24-2	29.74	28.67	28.21	28.87	0.79	6.1
10	Rey24-4	30.64	28.40	28.30	29.11	1.32	6.4
11	Rey5-5	27.01	27.16	22.94	27.09	0.11	7.8
12	Rey5-2	28.31	25.94	21.88	25.38	3.25	6.5
13	Rey48-5	28.05	24.04	26.11	26.06	2.00	6.2
14	Rey35-5	29.87	26.46	26.63	27.65	1.92	3.9
15	Rey44-4	28.12	24.84	23.96	25.64	2.19	7.1
16	Rey52-3	27.98	25.23	24.68	25.96	1.77	7
17	Rey50-1	27.16	25.29	22.88	25.11	2.15	6.6
18	Rey35-3	26.11	26.33	24.84	25.76	0.80	6.5
19	Rey13-5	25.96	24.55	18.47	25.25	0.99	6.6
20	Rey4-7	27.98	25.14	18.86	26.56	2.01	6.8

No.	Yeast name	β -glucan (dry basis, % w/w)			Mean	SD	Sensory score
		test 1	test 2	test 3			
21	Rey25-4	26.96	26.58	25.09	26.21	0.99	7.3
22	Rey47-4	28.01	29.71	24.64	27.45	2.58	4.3
23	Rey54-2	28.71	31.88	25.73	28.77	3.08	6.3
24	Rey9-5	30.48	27.95	25.90	28.11	2.29	6.5
25	Rey47-3	30.04	29.03	26.99	28.69	1.55	6.1
26	Rey36-7	33.38	33.81	27.42	31.53	3.57	6.9
27	Rey48-6	28.85	28.31	25.83	27.66	1.61	6.1
28	Rey43-2	30.72	29.39	23.79	30.06	0.94	6.6
29	Rey36-4	21.78	21.24	19.88	20.96	0.98	5.9
30	Rey43-1	30.30	29.57	19.51	29.94	0.51	5.8
31	Rey5-3	29.30	28.44	22.86	26.87	3.49	7
32	Rey49-7	29.19	30.99	24.51	30.09	1.27	4
33	Rey57-5	30.00	29.01	24.43	29.51	0.70	6.5
34	Rey57-6	30.65	27.93	26.11	28.23	2.29	6.5

선발된 34종의 효모의 양조적성과 관능평가를 통해 5종의 우수효모를 선발하였다. 선발된 5개의 효모를 이용해 제조한 탁주의 관능평가와 베타글루칸 함량분석을 통해 최종 *S. cerevisiae* Rey36-7을 선발하였다(표 2-7-2).

표 2-7-2. 베타글루칸 고함유 효모의 최종선발

No.	Yeast name	Beta glucan(dry basis, % w/w)		Moisture (%)	Sensory score
		Yeast	Makgeolli		
control	-	-	7.34±1.69	88.76	5.1
1	Rey51-2	28.48±1.69	10.89±0.60	91.57	7.6
4	Rey28-7	28.51±1.65	11.96±1.47	93.25	7.1
5	Rey39-6	29.11±0.75	13.08±1.93	93.45	7.0
26	Rey36-7	31.53±3.57	13.30±2.63	90.40	6.9
28	Rey43-2	30.06±0.94	10.80±2.09	86.62	6.6

나. 베타글루칸 고생성 효모 선발

β -glucan 함량과 전체적인 관능기호도를 바탕으로 하여 34균주 중 5균주를 선발하여 대용량으로 담금을 실시하였고 발효일별 일반분석 결과는 다음 표 2-7-3과 같다.

표 2-7-3. 효모선발을 위한 탁주 양조특성 분석

Fermentation time (day)	Yeast No.	Alcohol(%)	pH	Total acid(%)	Soluble solid (Brix,%)
7 day	ReY28-7	13.45±0.05	4.17±0.00	0.20±0.00	9.95±0.07
	ReY36-7	13.47±0.04	4.24±0.00	0.23±0.01	10.55±0.07
	ReY39-6	14.40±0.03	4.31±0.00	0.22±0.00	10.15±0.07
	ReY43-2	11.17±0.02	4.17±0.00	0.25±0.00	12.70±0.00
	ReY51-2	14.45±0.07	4.26±0.01	0.23±0.01	10.10±0.00
10 day	ReY28-7	13.45±0.05	4.39±0.01	0.23±0.00	9.90±0.00
	ReY36-7	13.47±0.04	4.38±0.01	0.22±0.00	10.30±0.00
	ReY39-6	14.40±0.03	4.61±0.01	0.21±0.01	9.90±0.00
	ReY43-2	11.17±0.02	4.27±0.01	0.29±0.00	11.20±0.14
	ReY51-2	14.45±0.07	4.55±0.00	0.21±0.00	9.95±0.07

전통누룩에서 분리된 약 237개의 효모 중 알코올 발효력이 우수하고, 양조적성이 뛰어나며, 베타글루칸을 고함유한 효모를 최종 선발하였다. 선발된 효모는 고문헌인 임원경제지에 수록된 찹쌀과 한약제로 제조한 전통누룩 “백주곡”을 재현하여, 재현된 누룩에서 분리한 베타글루칸 고생성 효모인 *Saccharomyces cerevisiae* Rey36-7로 양조특성이 뛰어나며, 베타글루칸 고생성 기능을 가져 고 기능성 탁주 제조에 적합하였다(표 2-7-4).

표 2-7-4. 백주곡

No	누룩명	재료 및 분량		제조방법
36	백주곡 (白酒麴)	찹쌀 1말 약재 (당귀, 측사, 방향, 목향, 영향, 백출, 관계, 천초, 단향, 백지, 오수유, 감초, 행인 각 1냥) 여뀌즙 3되	찹쌀 18.04L 약재 (당귀, 측사, 방향, 목향, 영향, 백출, 관계, 천초, 단향, 백지, 오수유, 감초, 행인 각 37.5g) 여뀌즙 5.41L	찹쌀 1말을 씻을 후 고운 가루로 분쇄한다. 준비한 분량의 약재를 고운가루로 분쇄한다. 여뀌를 찹어 만든 즙을 가루에 골고루 섞는다. 재료가 골고루 섞이도록 짚는다. 반죽을 주먹밥 형태로 단단히 성형한 후 한가운데 를 눌러 오목하게 하여 밑누룩을 만든다. 밑누룩을 짚으로 싸서 대자리에 펴서 띄운지 4일 후 청백색이 곰팡이가 자라면 벗겨내고 새 로운 풀로 다시 싸서 덮는다. 7일 후 광주리에 담 아 서늘한 곳에 매달아 둔다. 21일간 건조시킨다.

누룩명	sample name	동정결과 (분류명)	similarity (%)	콜로니 외관
No. 36 백주곡	F36-B3	<i>Rhizomucor variabilis</i> var.	99	곰팡이, 갈색포자
	F36-B4	<i>Rhizomucor variabilis</i> var.	100	
	F36-B5	<i>Rhizomucor variabilis</i> var.	100	
	ReY36-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	일반적인 효모로 우유빛 콜로니
	ReY36-2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	
	ReY36-3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	
	ReY36-4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	
	ReY36-5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	
	ReY36-6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	
	ReY36-7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	

다. 베타글루칸 고생성 효모를 활용한 고기능성 탁주 제조

선발된 *Saccharomyces cerevisiae* Rey36-7 효모로 담금한 탁주 시제품과 기존 공정에 의해 생산된 제품 및 시판제품의 베타글루칸 함량을 분석한 결과를 표 2-7-5에 나타내었다. 분석결과 선발효모를 이용해 제조한 탁주 시제품의 베타글루칸 함량은 타 제품과 비교해 유의적으로 높은 함량을 보였다 ($p < 0.05$)

표 2-7-5. 탁주 종류별 베타글루칸 함량 (dry basis, % w/w)

No.	탁주	beta glucan(dry basis, % w/w)				편차	탁주 수분함량(%)
		1회	2회	3회	평균		
1	Ray-36-7(시제품)	14.27	15.54	14.69	14.84	0.65	96.47
2	소성주	13.74	13.71	12.94	13.46	0.45	96.38
3	대박	13.71	12.50	15.11	13.77	1.31	97.30
4	장수	11.46	10.00	11.61	11.02	0.89	96.76
5	느린마을	12.38	11.74	9.60	11.24	1.46	97.40

효모 *Saccharomyces cerevisiae* Rey36-7 균주를 이용한 탁주의 발효온도 별 탁주 품질을 알아보기 위하여 각 20℃와 25℃에서 발효한 탁주 시제품의 일반성분과 베타글루칸을 분석한 결과를 표 2-7-6에 나타내었다. 분석결과 탁주의 베타글루칸은 각 온도에서 2일과 4일($p < 0.05$)에서만 유의적인 차이를 보였고 ($p < 0.05$), 온도별 t-test결과, 온도에 따른 베타글루칸의 유의적인 차이를 보였다($p < 0.01$). 또한 발효일자별 베타글루칸 함량을 분석한 결과 20℃에서 발효시에만 발효기간별 유의적인 차이를 보였다($p < 0.05$). 이상의 결과를 종합하였을 때 *Saccharomyces cerevisiae* Rey36-7 균주를 활용한 탁주 제조 시 발효는 20℃의 다소 낮은 온도에서 진행하는 것이 바람직하고, 발효가 진행되면서 다소 베타글루칸의 함량이 감소하는 경향이 있는 것으로 나타났다. 본 연구를 통해 개발된 베타글루칸 고생성 효모를 이용한 탁주제조기술은 기술이전 완료 후 기존제품을 리뉴얼한 신제품으로 출시되었다(그림 2-7-1).



그림 2-7-1. 베타글루칸 고생성 효모를 활용한 고품질 탁주 『소성주플러스』

표 2-7-6. *Saccharomyces cerevisiae* Rey36-7 효모로 발효한 탁주의 발효기간별 일반성분 분석

발효온도 (°C)	발효일 (day)	일반분석				
		Alc.	pH	당(brix)	산도(mL)	
20°C	1	1일	4.14	3.66	15.4	10.5
		2일	11.30	3.73	13.5	10.6
		3일	13.35	3.77	10.9	10.2
		4일	13.76	3.84	10.5	10.5
	2	1일	4.66	3.60	15.2	9.9
		2일	8.71	3.72	14.6	10.5
		3일	9.37	3.82	11.0	9.8
		4일	13.07	3.83	10.9	10.4
	3	1일	6.62	3.60	14.7	10.3
		2일	10.09	3.72	13.2	9.7
		3일	11.22	3.81	10.7	9.9
		4일	11.42	3.84	10.3	10.3
25°C	1	1일	7.48	3.84	14.1	10.8
		2일	10.79	3.88	12.9	10.5
		3일	9.36	3.94	12.0	10.6
		4일	12.03	3.96	11.6	10.9
	2	1일	7.72	3.81	13.7	10.7
		2일	8.19	3.87	11.7	10.8
		3일	11.43	3.91	11.3	10.9
		4일	fin	3.93	11.1	11.1
	3	1일	9.73	3.85	15.1	11.1
		2일	10.05	3.88	14.3	10.6
		3일	10.91	3.94	12.1	10.6
		4일	10.89	3.97	13.1	11.1

표 2-7-7. 발효온도에 따른 발효기간별 시제품의 베타글루칸 함량 (dry basis, % w/w)

발효온도	발효일자	beta glucan
20°C **	1일	1.60±0.20 ^b
	2일*	2.07±0.21 ^a
	3일	1.60±0.09 ^b
	4일*	1.41±0.13 ^b
25°C	1일	1.49±0.07
	2일*	1.31±0.21
	3일	1.50±0.31
	4일*	1.11±0.11

2. GABA 고생성 효모의 개발 및 활용

감마아미노부티르산(γ -amino butyric acid, 이하 GABA라 함)은 자연계에 널리 분포하는 비단백질성 아미노산의 일종으로 뇌와 척수에 존재하는 흥분 억제성 신경전달물질이다. GABA는 흥분억제효과, 항경련작용, 이노작용, 항산화작용, 정신집중, 기억력강화 및 혈압강화와 같은 체내 기능을 가지고 있을 뿐만 아니라 노화에 기인된 시력저하를 회복시켜주는 기능을 갖는 것으로 보고되었다. 또한 성장 호르몬의 분비 조절에도 관여하며 통증 완화에도 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 이와 같은 GABA의 기능이 알려지면서 의약품으로서의 GABA 뿐만 아니라 최근에는 기능성 식품소재로서의 GABA에 대한 관심이 고조되고 있다. 본 연구에서는 전통누룩 유래 GABA 생성능이 우수한 효모 균주를 선발하고 이를 탁주제조에 활용하여 고 기능성 주류제조 기술을 개발하였다.

선발된 *S. cerevisiae* 54-3 균주(KCCM11354P)는 GABA 생성량이 높은 균주로 본 효모를 접종하지 않은 대조구에 비해 탁주제조 시 5배 이상 GABA 함량이 증가하였다. 또한 타 균주 접종 탁주에 비해 2.4-3.7배 높은 함량을 생성함을 확인하였다(표 2-7-8).

표 2-7-8. 효모 균주에 따른 전통주의 GABA 함량 (ug/g, dry basis)

대조군	<i>S. cerevisiae</i> 54-3	<i>S. cerevisiae</i> 113-8	<i>P. anomala</i> 197-13	<i>C. lusitaniae</i> 263-4
138.41 ± 7.68	859.49 ± 15.56	285.70 ± 16.01	229.86 ± 12.91	351.68 ± 19.64

선발된 효모와 탁주제조기술은 국민탁주협동조합에 기술이전 완료하여 제품출시 되었다.



전통 막걸리 생산·효모 기술 이전

한식연, 국민막걸리협동조합과 협약 체결

[전업농신문]



기사입력(2015-10-01 17:13:04)

한국식품연구원(원장 박용곤)과 국민막걸리협동조합(이사장 강환구)은 전통 막걸리용 효모에 대한 기술이전 협약을 지난달 15일 한국식품연구원에서 체결했다.

현재 막걸리의 경우 몇몇 업체를 제외하고는 수입 효모를 사용하고 있는 실정으로 막걸리 양조용 효모에 대한 요구가 많았다.

한국식품연구원이 기술이전 한 효모는 중소 양조업체들이 결성한 '국민막걸리협동조합' 소속 회원사가 제조하는 막걸리에 사용돼 지난월부터 시판에 들어갔다.?



이번 기술이전 효모는 한식연이 '농림축산식품 미생물유전체전략연구사업단(단장 김지현, 연세대) '주류 미생물 유전체 연구'에서 개발한 균주로 국립생물자원관(관장 김상배)과 협업을 통해 자원관이 개발한 누룩곰팡이와 최적의 조합을 이루는 양조용 효모로 선발됐다.

두 기관의 협업을 통해 전통누룩에서 분리한 누룩곰팡이와 효모를 사용한 막걸리를 제조함으로써 진정한 전통 막걸리 생산이 시작됐다는 평가가 나오고 있다

박용곤 원장은 "국가기관 간 협업을 통한 이번 성과는 국내 막걸리 산업 활성화에 크게 기여할 뿐 아니라 감소형 중소기업 육성의 좋은 사례가 될 것이다"고 말했다.

또한 한식연 김재호 박사는 "주류 미생물 유전체 연구를 통해 막걸리 효모의 유전자 지도를 만드는 연구를 진행하고 있어 본 사업이 완료되면 이는 막걸리 종주국으로서의 지위를 확고히 하는데 큰 힘이 될 것이다"고 말했다.

그림 2-7-2. 선발 효모와 탁조제조기술 기술이전 및 제품출시

3. 글루타치온 고생성 효모의 탐색 및 활용

Glutathione은 글루탐산, 시스테인 및 글리신의 세개의 아미노산이 펩티드 결합한 tripeptide로 항산화 효과가 매우 뛰어나고, 암생성 억제, 면역강화 등의 기능이 있는 것으로 알려져 있다. 특히 Glutathione은 자연계에 널리 분포되어 있지만 효모의 세포내에 일부 존재하여 효모 기반 시스템에서 대량생산을 시도하는 연구가 보고된 바 있다. 따라서 본 연구에서는 glutathione-rich 효모를 선발하여 발효종균으로 활용하고자 시도하였다.

가. 글루타치온 고생산 균주 선별

글루타치온 고생산 균주를 선별하기 위하여 효모 library(270종)를 배양하여 글루타치온농도를 측정하였고, 그 중 9개의 균주를 선별하였다(그림 2-7-3). YPD배지에 함유된 글루타치온의 농도를 측정한 결과, 39.91 μ M이 함유되어 있었고, 각각의 균주가 생성한 글루타치온농도 측정값에서 YPD배지에 함유된 글루타치온농도를 감하였다.

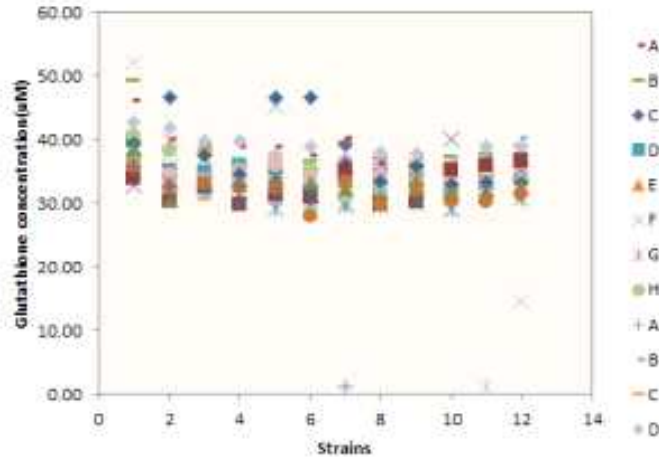


그림 2-7-3. 270종 효모의 글루타치온생산능 비교

나. 회분식 배양에서의 글루타치온 생성능 분석

선별된 9종 균주들의 성장특성 및 글루타치온 생산양상을 확인하고자 flask에서 각각 회분식 배양을 실시하였다(그림 2-7-4). 회분식 배양 결과 9종의 균주 모두 12 h까지는 글루타치온의 농도가 급격히 증가하다가, 점점 생산속도가 느려지는 양상을 보였다(그림 2-7-5).

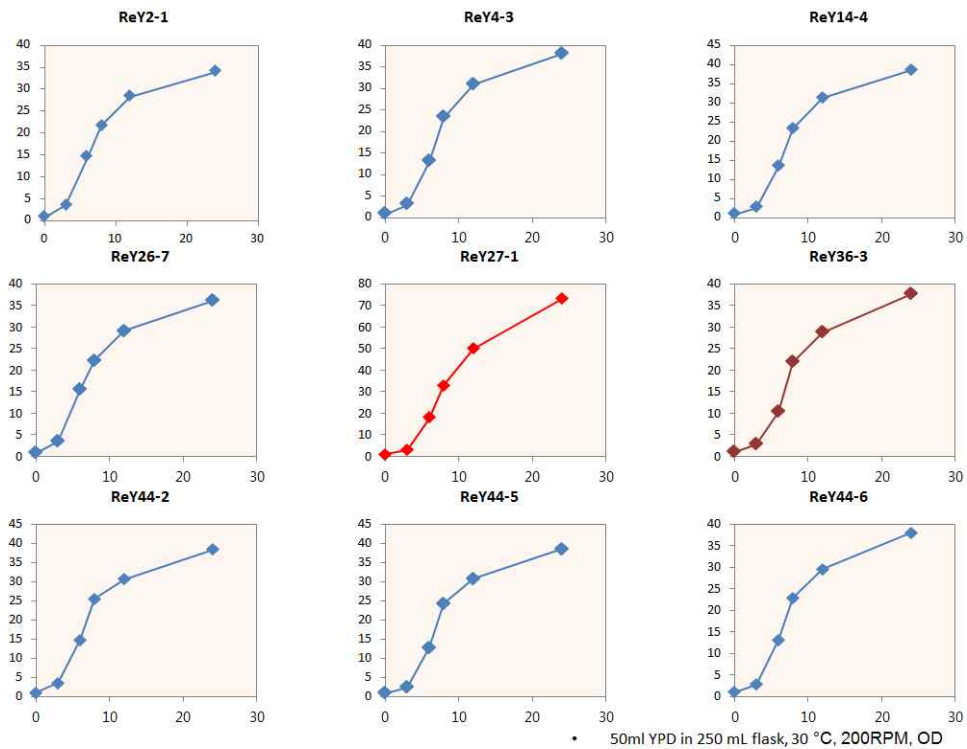


그림 2-7-4. 선별된 9종 효모의 회분식 배양에서의 성장속도 비교

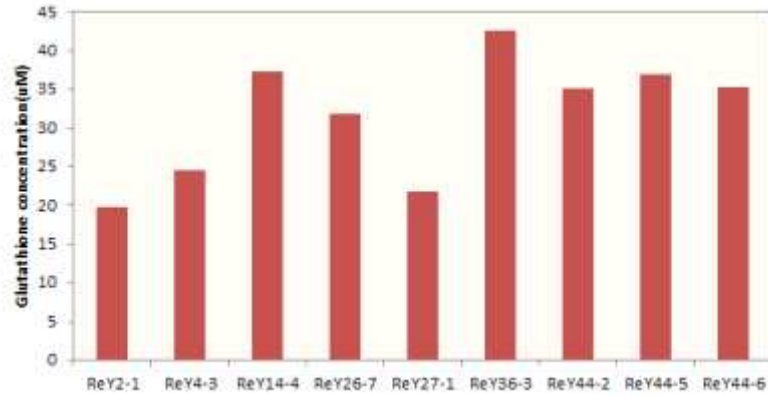


그림 2-7-5. 선별된 9종 효모의 글루타치온 최종농도 비교

다. Intracellular 및 extracellular 내의 글루타치온 생산량 비교

최종 선별된 균주(ReY36-3)의 글루타치온생산 농도를 intracellular와 extracellular로 나누어 분석하였다. 그 결과, 시간이 지남에 따라 ReY36-3균주의 extracellular 글루타치온농도는 증가하였고, intracellular 글루타치온농도는 0 h부터 24 h까지 거의 일정한 값을 유지하였다 (그림 2-7-6).

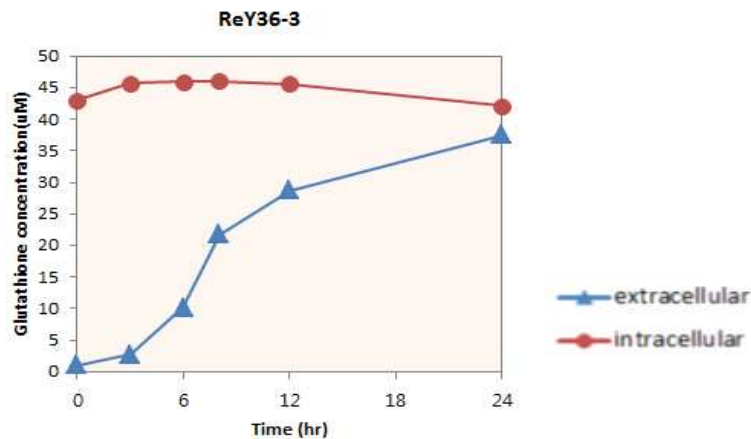


그림 2-7-6. 최종 선별된 ReY36-3균주의 intracellular 및 extracellular 글루타치온 생산양상

라. 탄소원에 따른 글루타치온 생성능 비교

탄소원이 글루타치온 생산에 미치는 영향을 알아보기 위하여 glucose 20 g/L와 ethanol 20 g/L를 각각 넣은 YP배지에 ReY36-3균주를 접종하여 회분식 배양을 실시하였다. 그 결과, glucose를 첨가한 배지에 비하여 ethanol을 첨가한 배지에서 세포성장속도 및 최종균체농도는 감소했지만, 글루타치온의 생산성 및 최종농도는 높아지는 것을 확인 할 수 있었다(그림 2-7-7).

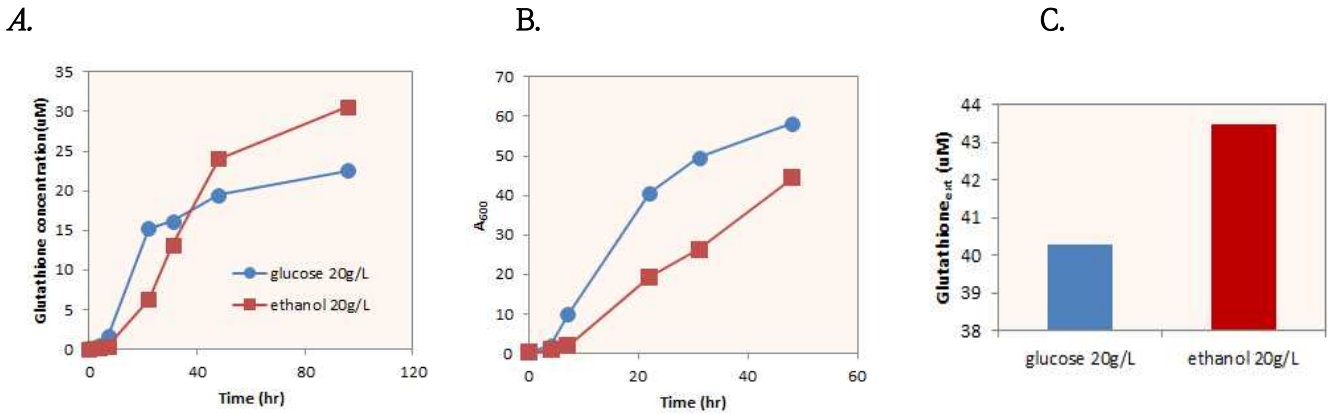


그림 2-7-7. Glucose를 넣어준 배지와 ethanol을 넣어준 배지에서 글루타치온 생산양상(A), 세포성장(B), 및 최종생산농도(C) 비교

4. 고품질 황국 제조균주 개발 및 활용

가. 황국균 선발

전통누룩, 곡물 및 곡물누룩으로부터 분리한 48개의 균주(표 2-7-9)를 사용하여 입국을 제조하였다. 제조한 입국 중 검은색 포자를 생성하는 균주 CN19.7.1-3, N19.2-1 그리고 C16-19와 포자의 생성이 균사체의 생성보다 빠르거나 고두밥에서 균의 생육이 활발하지 못한 균 16균주(N3-2, N16, N76, N83, N105, N181, N176-2, N254-2, C20-7-2, C22-1-1, C30-2-2, N159-1, CN10.11.1-1, CN23.3.1-3, N160-1, N171-2)를 제외한 30개의 균주를 사용하여 대용량의 입국을 제조하여 그 특성을 표 2-7-10에 나타내었다.

시판되는 중국으로 제조한 입국(대조군)의 산도는 5.0 당화력은 149SP로 나타났다. C13-10, CN16.3.1-3, CN18.17.1-2, CN13.1.1-2, CN12.17.1-3 그리고 N36-1균주를 사용하여 제조한 입국은 산도가 5.0 미만으로 나타났으며 당화력은 98-206SP를 나타내었다. 산도가 6.0 이상으로 나타난 입국의 제조에 사용된 균주는 7개로 C1-5-2-2, C21-17, C30-5, CN16.19.1-1, CN19.20.1-2, CN25.14.1-2, CN27.9.1-3 그리고 N152-1이었다. 그 중 CN19.20.1-2를 사용한 입국의 산도는 9.2로 30개의 입국 중 가장 높은 값을 나타내었다. 7개 입국의 당화력은 187-244SP였다. 그 외 16개의 균주를 사용한 입국의 산도는 5.0이상-6.0미만을 나타내었으며 당화력은 134-237SP였다.

이상의 결과 30개의 균주 중 26개 균주를 사용하여 제조한 입국의 당화력이 대조군으로 시판되는 중국을 사용하여 제조한 입국에 비하여 높게 나타나 발효제로서의 능력이 충분함을 보였고, 산도가 5.0미만인 6개의 입국을 제외한 24개의 입국은 첨가물 공전에 명시된 입국의 규격(산도 5.0이상, 당화력 60이상)을 만족하는 것으로 나타났다.

18s RNA sequencing에 의한 동정결과 19균주가 *Aspergillus oryzae*로 동정되었으며 그 외 *Mucor circinelloides*, *Penicillium sp.*, *Aspergillus awamori*, *Rhizomucor variabilis*, *Mycocladius corymbiferus*, *Rhizopus oryzae*, *Lichtheimia corymbifera*, *Paecilomyces sp.*가 동정되었다.

이러한 특성을 지닌 입국 중 규격에 적합하며 이취가 없고 입국 고유의 상쾌한 향과 신맛을 가진 관능이 우수한 9균주(C1-5-2-2, C20-7-3, CN1.3.1-4, CN16.19.1-1, N152-1, N162-2, N20, N21, N220-1)를 선발하였다.

표 2-7-9. 입국의 제조에 사용된 균주

C13-10	CN10.11.1-1	CN30.9.1-1	N19.2-1
C1-5-1	CN12.17.1-3	CN9.16.1-1	N20
C1-5-2-1	CN13.1.1-2	N105	N21
C1-5-2-2	CN16.19.1-1	N122-2	N220-1
C16-19	CN16.3.1-3	N152-1	N245-3
C20-7-2	CN18.17.1-2	N159-1	N252-2
C20-7-3	CN19.20.1-2	N16	N254-2
C21-17	CN19.7.1-3	N160-1	N3-1
C22-1-1	CN20.3.1-4	N162-2 1	N3-2
C30-2-2	CN23.3.1-3	N171-2	N36-1
C30-5	CN25.14.1-2	N176-2	N76
CN1.3.1-4	CN27.9.1-3	N181	N83

표 2-7-10. 선발된 균주를 사용한 입국의 제조 및 특성







<i>Koji</i>			
Strain	control	C13-10	C1-5-1
Acidity	5.0	4.9	5.2
SP	149	205	237
Identification	<i>Aspergillus kawachi</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Mucor circinelloides</i>
Similarity(%)	98	97	98
Accession number	AF183893.1.gb)	FJ654483.1.gb)	EU484195.1.gb)
<i>Koji</i>			
Strain	C1-5-2-1	C1-5-2-2	C20-7-3
Acidity	5.3	6.8	5.8
SP	226	209	188
Identification	<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>
Similarity(%)	98	99	99
Accession number	EU409799.1.gb)	AY373857.1.gb)	EU680476.1.gb)

표 2-7-10. 선발된 균주를 사용한 입국의 제조 및 특성 (계속)







<i>Koji</i>			
Strain	C21-17	C30-5	CN1.3.1-4
Acidity	6.3	6.4	5.7
SP	204	206	187
Identification	<i>Penicillium sp.</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>
Similarity(%)	98	98	98
Accession number	GQ418173.1(gb)	EF488390.1(gb)	FJ654482.1(gb)
<i>Koji</i>			
Strain	CN16.19.1-1	CN16.3.1-3	CN18.17.1-2
Acidity	6.0	3.4	4.8
SP	240	98	244
Identification	<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Aspergillus sp.</i>
Similarity(%)	98	97	98
Accession number	AB000533.1(dbj)	FJ654482.1(gb)	FJ471612.1(gb)

표 2-7-10. 선발된 균주를 사용한 입국의 제조 및 특성 (계속)







<i>Koji</i>			
Strain	CN19.20.1-2	CN20.3.1-4	CN25.14.1-2
Acidity	9.2	5.2	6.2
SP	244	220	228
Identification	<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>
Similarity(%)	97	97	98
Accession number	FJ654482.1(gb)	AB470911.1(dbj)	AP007173.1(dbj)
<i>Koji</i>			
Strain	CN27.9.1-3	CN30.9.1-1	CN9.16.1-1
Acidity	6.2	5.8	5.4
SP	187	163	139
Identification	<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Aspergillus awamori</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>
Similarity(%)	98	96	97
Accession number	EU030350.1(gb)	EU846237.1(gb)	EF136362.1(gb)

표 2-7-10. 선발된 균주를 사용한 입국의 제조 및 특성 (계속)













<i>Koji</i>			
Strain	CN13.1.1-2	CN12.17.1-3	N122-2
Acidity	4.5	4.6	5.4
SP	164	173	188
Identification	<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Rhizomucor variabilis</i>
Similarity(%)	97	98	98
Accession number	EU409799.1.gb)	AB470911.1.gb)	JF904893.1.gb)
<i>Koji</i>			
Strain	N152-1	N162-2	N20
Acidity	6.8	5.1	5.0
SP	241	214	128
Identification	<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Mycodads arynitens</i>	<i>Rhizopus oryzae</i>
Similarity(%)	98	98	98
Accession number	AY373857.1.gb)	JN315032.1.gb)	JQ724500.1.gb)

표 2-7-10. 선발된 균주를 사용한 입국의 제조 및 특성 (계속)

<i>Koji</i>			
Strain	N21	N220-1	N245-3
Acidity	5.1	5.2	5.9
SP	241	201	189
Identification	<i>Lichtheimia corymbifera</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>
Similarity(%)	98	98	97
Accession number	HQ285630.1(gb)	FJ654482.1(gb)	EU409806.1(gb)
<i>Koji</i>			
Strain	N252-2	N3-1	N36-1
Acidity	5.6	5.9	4.2
SP	134	217	206
Identification	<i>Aspergillus oryzae</i>	Unclassified fungi	<i>Paecilomyces sp.</i>
Similarity(%)	96	96	97
Accession number	AB470911.1	AM711482.1(emb)	FR718456.1(emp)

나. 선발 효모를 활용한 전통주의 양조적성

(1) 이화학적 특성

선발된 효모와 입국균을 사용하여 제조한 입국으로 탁주를 제조하여 그 특성을 분석하였다 (표 2-7-11). 입국의 제조에 적합한 9균주와 입국과 발효가 잘 이루어지는 효모3종을 이용하여 탁주를 제조하여 그 특성을 표67에 나타내었다. pH와 총산 그리고 고형분 함량의 분석은 알코올 함량을 6.0%로 조절 한 후에 실시되었다. 약 4-5일간의 발효가 종료 된 후의 알코올 함량은 효모 98-2와 C1-5-2-2, C20-7-3 그리고 CN1.3.1-4 균주를 사용한 입국으로 제조한 탁주가 13.5-15.1%로 나타났으며 효모 98-5는 CN1.3.1-4, 효모 268-1은 C1-5-2-2와 CN1.3.1-4를 각각 사용하였을 때 13.2-14.8%의 함량을 보였다. 알코올 함량을 6.0% 희석한 후 측정 한 pH는 효모 98-2와 효모 268-1를 각각 입국균으로 CN1.3.1-4, CN16.19.1-1을 사용하여 만든 입국으로 제조한 탁주에서 4.05이상의 값을 보였으며 그 외 23개의 탁주의 pH는 4.00이하였다. 초산으로 표현한 총산은 세 효모 모두 공통적으로 입국균으로 N220-1을 사용하였을 때 0.30-0.36%로 높은 값을 보였다. 그 외에 효모 98-2는 C1-5-2-2, N152-1, 효모 98-5는 C1-5-2-2, N20, N152-1

그리고 N162-2 마지막으로 효모 268-1은 C20-7-3과 N20을 사용하여 탁주를 제조하였을 때 0.30% 이상의 총산 함량을 보였다. 고형분 함량은 효모 98-2를 사용한 탁주는 4.9-9.0° Brix, 효모 98-5와 268-1을 사용한 탁주는 각각 5.8-8.1° Brix와 5.5-9.0° Brix의 값을 나타내었다.

표 2-7-11. 선발된 효모와 입국용 곰팡이 균주를 사용한 탁주의 이화학적 특성

효모	곰팡이 균주	Alcohol(%)	pH	Total acidity(%)	Solid degree(° Brix)
98-2	C1-5-2-2	13.5	3.64	0.36	6.2
	C20-7-3	15.1	3.90	0.20	4.9
	CN1.3.1-4	14.5	4.09	0.22	6.1
	CN16.19.1-1	10.3	4.12	0.24	9.0
	N20	10.6	3.78	0.32	7.7
	N21	10.0	3.85	0.26	8.3
	N152-1	10.6	3.67	0.33	8.6
	N162-2	11.1	3.77	0.28	7.5
98-5	N220-1	12.2	3.58	0.36	8.6
	C1-5-2-2	12.7	3.77	0.31	6.3
	C20-7-3	12.8	3.81	0.26	6.1
	CN1.3.1-4	14.6	3.83	0.16	5.8
	CN16.19.1-1	11.0	3.62	0.26	7.9
	N20	12.2	3.57	0.31	8.0
	N21	10.1	3.86	0.26	8.1
	N152-1	11.0	3.68	0.32	6.9
268-1	N162-2	10.9	3.62	0.36	7.6
	N220-1	11.7	3.64	0.36	8.0
	C1-5-2-2	13.2	3.77	0.26	6.3
	C20-7-3	11.5	3.70	0.30	6.8
	CN1.3.1-4	14.8	4.05	0.17	5.5
	CN16.19.1-1	12.4	4.10	0.22	8.3
	N20	11.8	3.66	0.30	9.0
	N21	9.9	3.70	0.25	8.5
	N152-1	11.3	3.76	0.27	7.5
	N162-2	11.1	3.70	0.29	7.6
	N220-1	13.0	3.79	0.30	7.2

(2) 유기산 및 유리당 함량

선발된 효모와 균주를 사용해 만든 탁주의 유기산과 유리당 함량은 표 2-7-12, 13와 같다. 검출된 6종의 유기산 중 oxalic acid, lactic acid, acetic acid 그리고 malic acid가 공통적으로 검출되었으며 lactic acid > acetic acid > malic acid > oxalic acid 순으로 나타났다. Citric acid와 succinic acid는 선발된 3종의 효모와 N152-1과 N162-2를 입국균으로 사용한 탁주에서 공통적으로 나타났으며 효모 중 98-5와 268-1은 CN16.19-1 균주와 함께 탁주를 제조하였을 경우에도 검출되었다. 효모 98-2를 사용한 탁주의 유기산 함량은 N152-1과 N220-1 균주를 입국균으로 사용한 경우 13.85mg/mL과 13.27mg/mL로 높게 나타났으며 CN16.19.1-1과 N162-2를 사용한 탁주에서도 11.00mg/mL 이상의 함량을 보였다. 효모 98-5를 사용한 경우 전체적으로 입국균의 종류에 관계없이 전체적으로 유기산의 함량이 10.81-16.86mg/mL로 높게 나타났다. 그 중 입국균으로 CN16.19.1-1과 N152-1을 사용한 탁주에서 각각 16.01mg/mL 과 16.86mg/mL로 높은 함량을 보였다. 효모 268-1을 사용한 탁주의 유기산 함량은 CN1.3.1-4균주를 입국균으로 사용한 탁주를 제외하고 모두 10.00mg/mL 이상의 함량을 보였는데 8개의 입국균 중 N152-1과 N162-2를 사용한 탁주에서 13.65mg/mL과 13.18mg/mL로 높게 나타났다.

효모 98-2를 사용하여 제조한 탁주의 유리당 중 fructose의 함량은 입국균으로 N152-1과 N162-2를 사용한 경우에 각각 2.22, 2.02mg/mL로 높게 나타났으며 그 외의 균주를 사용한 탁주에서는 0.62-1.86mg/mL의 값을 보였다. Glucose의 함량은 N152-1과 N220-1을 사용한 탁주에서 각각 5.02mg/mL과 5.39mg/mL으로 높게 나타났으며 CN16.19.1-1과 N162-2는 4.91, 4.33mg/mL의 값을 보였다. Sucrose의 함량은 CN16.19.1-1과 N152-1을 사용한 탁주에서 2.00mg/mL 이상으로 높게 나타났으며 그 외의 균주를 입국균으로 사용한 경우에는 1.86mg/mL 이하로 나타났고 maltose는 N220-1 균주를 사용한 탁주에서 1.86mg/mL로 가장 높은 함량을 나타내었다. 효모 98-5와 9개의 입국을 사용하여 제조한 탁주의 유리당은 N162-2를 입국균으로 사용한 탁주에서 fructose, glucose, sucrose 그리고 maltose가 각각 2.29, 5.11, 1.30 그리고 1.22mg/mL로 나머지 8개의 술에 비하여 높게 나타났다. 그 다음으로 N220-1균주를 사용한 탁주의 유리당 함량이 1.74, 4.87, 1.20 그리고 1.15mg/mL로 높은 값을 보였다. 효모 268-1을 사용한 탁주의 경우 fructose는 C20-7-3을 사용한 탁주에서 3.55mg/mL으로 가장 높은 양이 검출되었으며 그 외 8개의 술에서는 1.00mg/mL미만의 함량을 보였다. Glucose는 CN16.19.1-1, N152-1, N162-2 그리고 N220-1을 입국균으로 사용한 탁주에서 5.78-6.76mg/mL의 수준으로 높게 나타났으며 sucrose는 CN16.19.1-1, N20 그리고 N21을 사용한 탁주에서 1.23-1.38mg/mL의 함량을 보였다. Maltose는 CN16.19.1-1, N20, N152-1, N162-2 그리고 N220-1을 입국균으로 사용한 탁주에서 1.00mg/mL 이상을 나타내었는데 그 중 N220-1을 사용한 탁주가 1.35mg/mL로 가장 높은 값을 보였다.

표 2-7-12. 선발된 효모와 입국용 곰팡이 균주 사용한 탁주의 유기산 함량 (mg/ml)

효모	곰팡이 균주	Oxalic acid	Malic acid	Lactic acid	Acetic acid	Citric acid	Succinic acid
98-2	C1-5-2-2	0.11	0.48	4.41	3.23	0.02	-
	C20-7-3	0.16	2.90	2.72	2.68	-	-
	CN1.3.1-4	0.10	1.67	3.57	2.74	-	-
	CN16.19.1-1	0.15	2.60	4.44	3.90	0.02	-
	N152-1	0.02	4.53	5.08	3.79	0.22	0.21
	N162-2	0.01	1.60	3.30	6.35	0.12	0.25
	N20	0.06	1.17	5.41	4.06	-	-
	N21	0.04	0.97	4.35	2.91	-	-
98-5	C1-5-2-2	0.16	1.71	5.75	4.42	-	-
	C20-7-3	0.22	3.24	5.15	4.24	0.03	-
	CN1.3.1-4	0.11	3.31	3.79	3.60	-	-
	CN16.19.1-1	0.19	7.49	4.54	3.62	0.09	0.08
	N152-1	0.01	5.41	4.88	5.62	0.30	0.64
	N162-2	-	1.41	3.74	6.81	0.19	0.46
	N20	0.12	1.50	5.29	4.66	-	-
	N21	0.09	1.26	6.25	4.02	-	-
268-1	C1-5-2-2	0.15	1.11	4.90	4.09	-	-
	C20-7-3	0.24	1.61	6.36	3.25	-	-
	CN1.3.1-4	0.11	1.02	3.61	2.23	0.04	-
	CN16.19.1-1	0.22	3.12	4.07	2.50	0.06	0.06
	N152-1	0.02	4.21	4.96	3.64	0.37	0.45
	N162-2	0.01	3.53	2.83	6.18	0.18	0.45
	N20	0.11	1.06	5.47	3.62	-	-
	N21	0.09	1.04	5.39	3.73	-	-
N220-1	0.17	1.54	5.64	3.26	-	-	

표 2-7-13. 선발된 효모와 입국용 곰팡이 균주 사용한 탁주의 유리당 함량 (mg/ml)

효모	곰팡이 균주	Fructose	Glucose	Sucrose	Maltose
98-2	C1-5-2-2	1.33	3.56	1.09	0.91
	C20-7-3	0.62	2.89	1.20	0.67
	CN1.3.1-4	1.19	3.61	0.90	0.79
	CN16.19.1-1	1.47	4.91	2.01	1.30
	N20	1.38	2.36	1.69	0.06
	N21	1.66	1.93	0.94	0.96
	N152-1	2.22	5.02	2.63	1.29
	N162-2	2.02	4.33	1.86	1.54
98-5	N220-1	1.86	5.39	1.33	1.86
	C1-5-2-2	1.14	2.79	0.93	0.66
	C20-7-3	0.95	2.84	0.83	0.55
	CN1.3.1-4	1.11	3.24	0.89	0.56
	CN16.19.1-1	1.63	4.29	0.95	0.98
	N20	1.19	2.85	0.84	0.90
	N21	1.46	2.84	0.85	0.90
	N152-1	1.59	4.10	0.98	0.65
268-1	N162-2	2.29	5.11	1.30	1.22
	N220-1	1.74	4.87	1.20	1.15
	C1-5-2-2	0.99	3.25	1.06	0.55
	C20-7-3	3.55	3.53	0.89	0.56
	CN1.3.1-4	0.09	4.32	0.84	0.68
	CN16.19.1-1	0.09	6.25	1.33	1.09
	N20	0.09	4.46	1.38	1.01
	N21	0.09	4.79	1.23	0.84
	N152-1	0.09	6.71	0.97	1.01
	N162-2	0.09	6.76	0.98	1.19
	N220-1	0.09	5.78	0.89	1.35

(3) 휘발성 향기 성분

효모 98-2와 9개의 입국균을 사용하여 제조한 입국을 발효제로 사용한 탁주의 향기성분 분석 결과 알코올류는 3종, ester는 15종 그리고 acid는 1종이 검출되었다. Isoamyl alcohol은 입국균으로 N162-2를 사용한 탁주가 2.41%area로 적은 함량을 나타내었으며 파인애플향의 ethyl caprylate는 입국균으로 C20-7-3, CN16.19.1-1 그리고 N220-1을 사용한 탁주에서 각각 3.22, 3.69 그리고 3.84%area 높게 나타났다. 사과와 포도향을 특징으로 갖는 ethyl caprate는 CN16.19.1-1과 N220-1 균주를 사용한 탁주에서 14.00%area 이상의 값을 보였다. 부드러운 향의 ethyl palmitate는 C20-7-3, CN1.3.1-4 그리고 N20 균주를 사용한 탁주에서 16.60-20.60%area 사이의 높은 값을 나타내었다. 술의 향기성분은 ester에 의해 좌우되는데 검출된 ester의 %area는 입국균으로 C20-7-3을 사용한 탁주가 57.67로 가장 높게 나타났으며 C1-5-2-2, CN1.3.1-4, N20 그리고 N220-1균주를 사용한 탁주에서도 50.0%area 이상의 값을 보였다(표 2-7-14, 15).

효모로 98-5를 사용한 탁주의 향기성분은 19개가 검출되었다. 발효취가 나는 isoamyl alcohol은 N21에서 4.81%area로 높게 나타났으며 C20-7-3과 C162-2에서 각각 2.28과 2.29%area로 낮은 함량을 보였다. 과일향이 나는 탄소 10개 이하의 ester 중 ethyl caprylate와 ethyl caprate가 검출되었는데 ethyl caprylate는 입국균으로 N21, N152-1 그리고 N220-1을 사용한 탁주에서 3.61-4.30%area, ethyl caprate는 CN16.19.1-1과 N21, N152-1, N220-1 균주를 사용한 탁주에서 14.30-19.53%area로 높은 함량을 나타내었다. Ethyl palmitate는 C20-7-3과 CN1.3.1-4 그리고 N20 균주를 사용하여 제조한 입국으로 만든 탁주에서 17.40%area 이상의 값을 보였다. 전체 ester의 양은 ethyl caprylate와 ethyl caprate의 함량이 가장 높았던 N220-1 균주를 사용한 탁주가 56.98%area로 높게 나타났으며 ethyl palmitate의 함량이 높았던 CN1.3.1-4를 사용한 탁주도 높은 값을 보였다. 그 외에 N21과 N152-1, C20-7-3 균주를 사용한 탁주의 ester 함량도 다른 균주를 사용한 탁주에 비하여 높은 것으로 나타났다(표 2-7-16, 17).

선발된 9개의 입국균과 효모 268-1을 사용하여 탁주를 제조하여 향기성분을 분석한 결과 알코올류는 3종, ester는 15종 그리고 acid는 1종이 검출되었다. Isoamyl alcohol의 함량은 입국균으로 N162-2를 사용한 탁주에서 1.50%area로 가장 낮게 나타났으며 C1-5-2-2, N20, N21 그리고 N152-1를 사용한 탁주에서 3.40%area 이상으로 높게 나타났다. 15종의 ester 중 ethyl caprylate는 N152-1 균주를 사용한 탁주에서 3.14%area로 가장 높은 함량을 보였으며 입국균으로 C1-5-2-2와 C20-7-3를 사용한 탁주에서도 2.06-2.07%area의 수준을 나타내었다. Ethyl caprate는 ethyl caprylate의 함량이 높았던 N152-1에서 12.65%area로 높게 나타났다. 부드러운 향의 ethyl palmitate는 C20-7-3, CN1.3.1-4, CN16.19.1-1, N162-2 그리고 N220-1을 입국균으로 사용한 탁주에서 20.0%area 이상의 값을 보였다. 전체 ester의 합계를 살펴보면 CN1.3.1-4를 사용한 탁주가 55.15%area로 가장 높은 함량을 보였으며 C20-7-3과 N220-1을 사용한 탁주도 각각 54.93, 54.03%area로 ester의 %area가 50.0%이상인 것으로 나타났다(표 2-7-18, 19).

표 2-7-14. 효모 98-2와 입국용 곰팡이 균주에 따른 탁주의 휘발성 향기성분 TIC

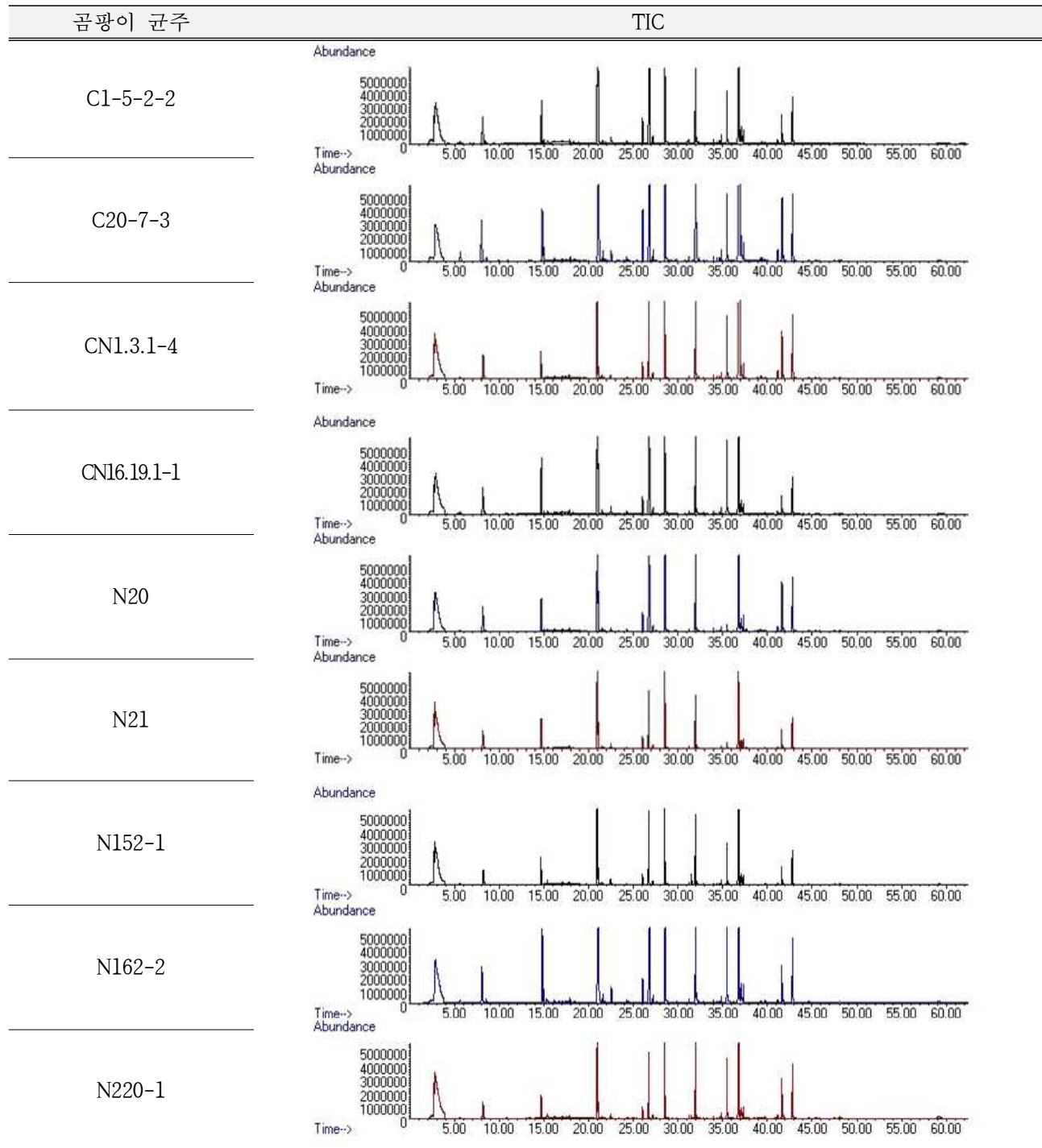


표 2-7-15. 효모 98-2와 곰팡이 균주의 종류에 따른 탁주의 휘발성 향기성분

No	RT	Compound	% Area								
			C1-5-2-2	C20-7-3	CN1.3.1-4	CN16.19.1-1	N20	N21	N152-1	N162-2	N220-1
1	2.97	Ethyl alcohol	18.93	13.32	21.29	24.43	21.96	32.53	28.78	29.59	17.39
2	8.23	Isoamyl alcohol	2.76	3.15	2.66	3.07	3.20	3.74	2.58	2.41	3.08
3	14.49	Ethyl caprylate	2.85	3.22	1.70	3.69	2.05	2.76	2.53	1.65	3.84
4	17.73	Ethyl pelargonate	0.42	0.49	0.22	0.28	0.23	0.23	0.24	0.24	0.45
5	20.84	Ethyl caprate	13.14	11.39	7.63	14.08	10.91	13.76	12.34	8.57	15.02
6	22.16	Dimethyl succinate	0.52	0.39	0.21	0.62	0.26	0.38	0.61	0.32	0.75
7	23.93	Ethyl undecanoate	0.04	0.04	-	0.04	0.03	-	-	-	0.05
8	26.63	Ethyl laurate	7.83	6.80	5.13	7.76	7.64	5.71	6.95	4.93	6.64
9	28.63	Phenylethyl alcohol	8.30	9.23	6.75	8.45	9.67	11.36	7.61	6.58	8.50
10	29.68	Isobutyl laurate	0.05	0.07	0.04	0.06	0.06	0.03	0.07	0.05	0.05
11	31.98	Ethyl myristate	7.53	7.62	8.45	6.52	7.68	4.87	6.54	6.20	7.16
12	32.34	Isoamyl laurate	0.16	0.21	0.16	0.15	0.17	0.10	0.08	0.08	0.06
13	34.37	Ethyl pentadecanoate	0.20	0.20	0.36	0.07	0.11	0.09	0.08	0.10	0.09
14	36.86	Ethyl palmitate	13.83	18.96	20.57	10.40	16.64	8.89	11.57	15.47	12.77
15	38.96	Ethyl heptadecanoate	0.08	0.16	0.11	0.03	0.10	0.05	0.05	0.07	0.08
16	41.16	Ethyl stearate	0.21	0.52	0.46	0.20	0.33	0.16	0.12	0.22	0.16
17	41.62	Ethyl oleate	2.31	3.74	3.36	1.76	4.00	2.45	2.21	3.76	2.34
18	42.79	Ethyl linolate	3.58	3.86	5.45	2.97	4.76	3.47	3.57	5.14	4.28
19	59.10	n-Palmitic acid	0.38	0.40	0.66	0.40	0.44	0.44	0.55	0.98	0.62

표 2-7-16. 효모 98-5와 곰팡이 균주에 따른 탁주의 휘발성 향기성분 TIC

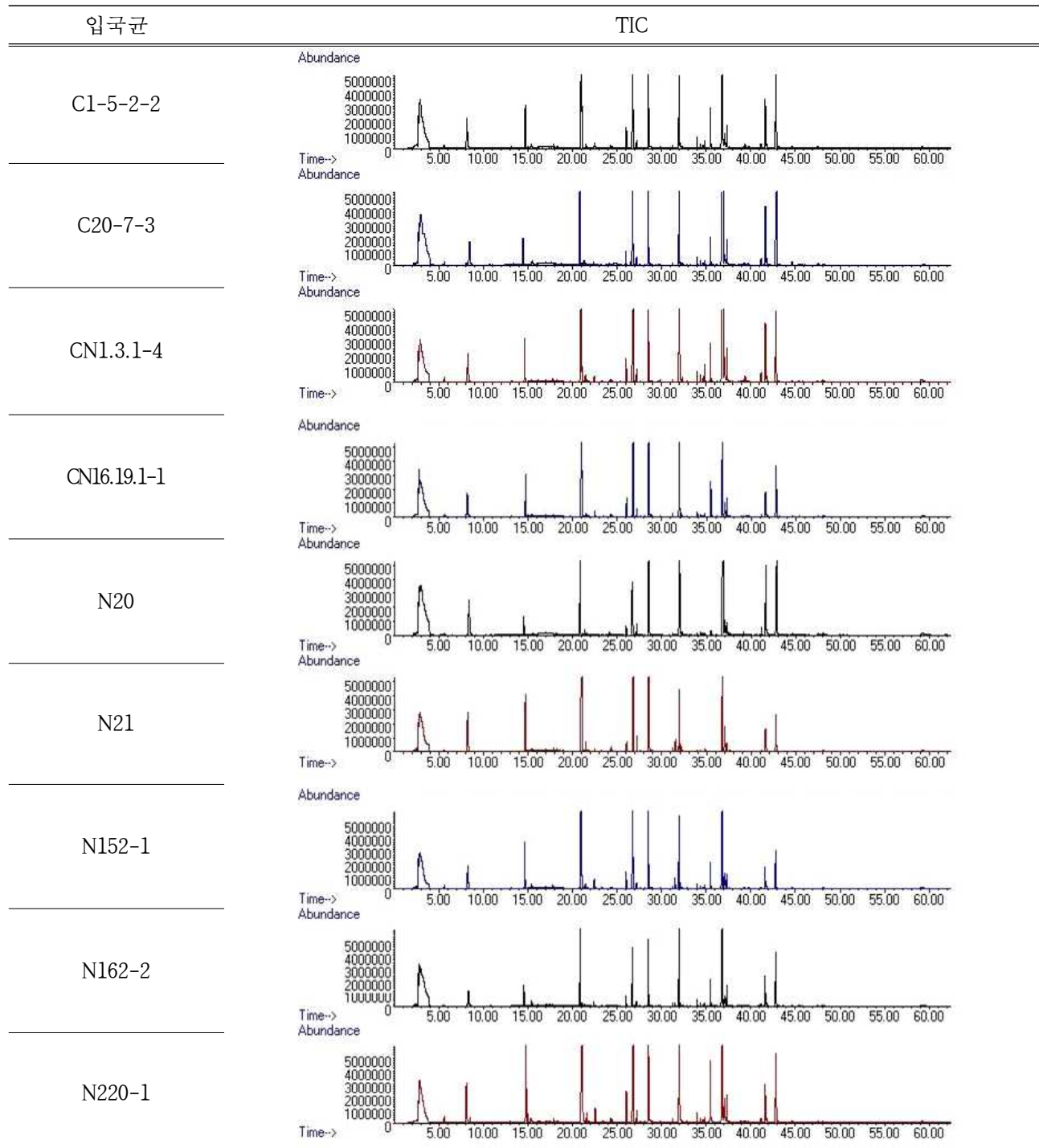


표 2-7-17. 효모 98-5와 곰팡이 균주에 따른 탁주의 휘발성 향기성분

No	RT	Compound	% Area								
			C1-5-2-2	C20-7-3	CN1.3.1-4	CN16.19.1-1	N20	N21	N152-1	N162-2	N220-1
1	2.97	Ethyl alcohol	24.34	17.69	19.28	27.12	30.11	24.26	23.84	32.73	16.25
2	8.23	Isoamyl alcohol	3.00	2.28	2.47	3.32	3.90	4.81	3.22	2.29	3.16
3	14.49	Ethyl caprylate	2.14	1.45	2.13	2.78	1.08	3.86	3.61	1.46	4.30
4	17.73	Ethyl pelargonate	0.20	0.21	0.13	0.16	0.18	0.28	0.24	0.26	0.20
5	20.84	Ethyl caprate	10.46	7.04	10.48	14.30	6.53	19.53	15.39	8.11	16.72
6	22.16	Dimethyl succinate	0.35	0.14	0.21	0.46	0.27	0.65	0.66	0.29	0.87
7	23.93	Ethyl undecanoate	0.05	0.04	0.04	-	0.05	0.07	0.05	0.10	0.06
8	26.63	Ethyl laurate	6.24	5.37	8.22	6.16	5.63	9.37	7.67	5.53	7.30
9	28.63	Phenylethyl alcohol	6.59	4.63	5.81	8.21	6.41	10.29	7.74	5.19	7.34
10	29.68	Isobutyl laurate	0.02	0.03	0.08	0.04	0.04	0.04	0.04	0.06	0.04
11	31.98	Ethyl myristate	7.32	5.84	7.82	5.53	5.78	3.85	5.74	6.37	7.36
12	32.34	Isoamyl laurate	0.17	0.19	0.30	0.12	0.21	0.16	0.11	0.09	0.07
13	34.37	Ethyl pentadecanoate	0.17	0.19	0.27	0.15	0.15	0.11	0.14	0.18	0.16
14	36.86	Ethyl palmitate	16.73	17.45	19.35	10.98	17.78	6.23	10.78	13.81	12.51
15	38.96	Ethyl heptadecanoate	0.15	0.18	0.19	0.14	0.10	0.04	0.07	0.14	0.15
16	41.16	Ethyl stearate	0.24	0.32	0.42	0.16	0.39	0.09	0.11	0.18	0.16
17	41.62	Ethyl oleate	3.09	3.70	3.90	2.38	5.21	2.27	2.21	2.89	2.39
18	42.79	Ethyl linolate	0.33	7.83	4.56	4.46	6.50	2.82	3.32	5.13	4.69
19	59.10	n-Palmitic acid	0.46	0.20	0.90	0.65	0.70	0.50	0.60	0.71	0.44

표 2-7-18. 효모 268-1과 입국용 곰팡이 균주에 따른 탁주의 휘발성 향기성분 TIC

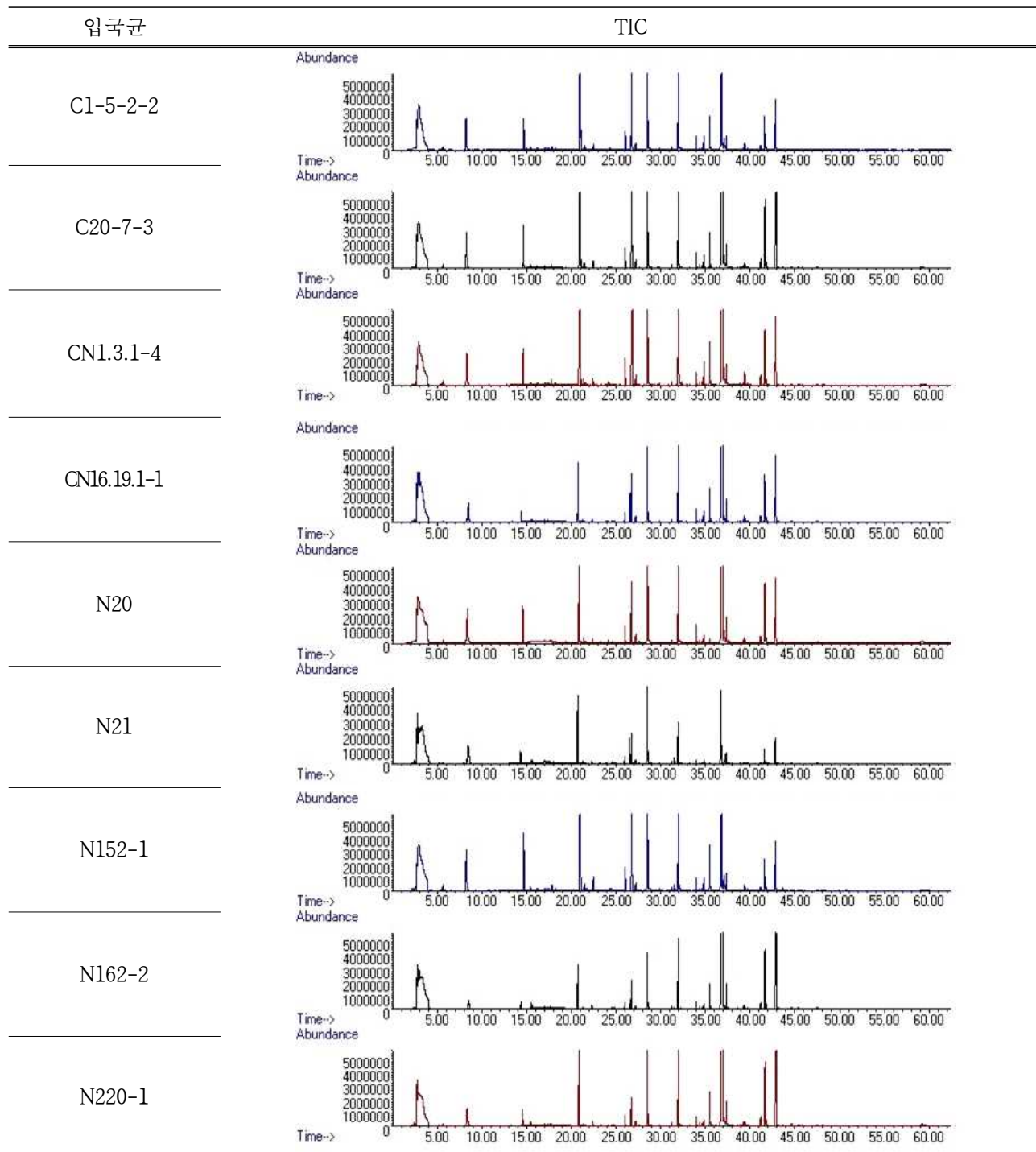


표 2-7-19. 효모 268-1과 입국용 곰팡이 균주에 따른 탁주의 휘발성 향기성분 TIC

No	RT	Compound	% Area								
			C1-5-2-2	C20-7-3	CN1.3.1-4	CN16.19.1-1	N20	N21	N152-1	N162-2	N220-1
1	2.97	Ethyl alcohol	26.31	23.20	21.16	16.90	28.47	17.11	26.82	11.95	25.94
2	8.23	Isoamyl alcohol	3.54	2.94	2.77	2.68	3.49	3.93	4.00	1.50	2.54
3	14.49	Ethyl caprylate	2.06	2.07	1.98	0.55	1.76	1.43	3.14	0.46	0.98
4	17.73	Ethyl pelargonate	0.18	0.18	0.21	0.12	0.44	0.27	0.24	0.12	0.19
5	20.84	Ethyl caprate	10.51	8.86	9.40	4.13	8.03	7.69	12.65	3.16	4.90
6	22.16	Dimethyl succinate	0.34	0.29	0.25	0.12	0.18	0.17	0.67	0.19	0.23
7	23.93	Ethyl undecanoate	0.03	0.03	0.05	0.11	0.09	0.12	0.05	0.04	0.05
8	26.63	Ethyl laurate	5.47	4.99	6.63	4.18	4.59	2.26	5.26	1.69	2.43
9	28.63	Phenylethyl alcohol	7.68	6.26	7.22	5.19	8.75	8.03	9.08	4.09	5.57
10	29.68	Isobutyl laurate	0.04	0.04	0.06	0.10	0.04	0.13	0.04	0.03	0.02
11	31.98	Ethyl myristate	5.74	6.17	7.10	5.88	4.65	3.15	4.73	4.88	5.36
12	32.34	Isoamyl laurate	0.17	0.16	0.19	0.13	0.14	0.09	0.09	0.08	0.13
13	34.37	Ethyl pentadecanoate	0.12	0.15	0.13	0.12	0.11	0.05	0.09	0.16	0.18
14	36.86	Ethyl palmitate	18.00	20.89	20.34	21.27	18.09	6.77	13.52	23.94	25.81
15	38.96	Ethyl heptadecanoate	0.10	0.11	0.18	0.18	0.08	0.05	0.09	0.11	0.14
16	41.16	Ethyl stearate	0.25	0.43	0.47	0.38	0.32	0.08	0.19	0.38	0.53
17	41.62	Ethyl oleate	2.70	4.17	3.56	3.75	3.59	1.25	2.17	4.73	5.00
18	42.79	Ethyl linolate	3.99	6.39	4.60	5.66	4.40	2.44	3.25	8.73	8.08
19	59.10	n-Palmitic acid	0.36	0.44	0.48	0.30	0.68	0.07	0.50	0.41	0.80

(4) 관능검사

3개의 효모와 9개의 입국균을 사용하여 제조한 탁주의 외관, 향, 맛 그리고 전체적인 기호도의 결과는 표 2-7-20에 나타내었다. 27개 탁주의 외관 기호도는 효모와 입국균의 종류에 관계없이 5-6점의 수준을 나타내었다.

효모 98-2를 사용하여 제조한 탁주 기호도는 입국균으로 C1-5-2-2를 사용한 경우 과일의 신향과 상쾌한 신맛과 단맛이 어우러져 향과 맛 기호도에서 8점을 얻었으며 이는 전체 기호도에도 영향을 주어 8점으로 가장 높게 나타났다. 또한 달콤한 단 향과 단맛 그리고 후미의 깔끔한 신맛을 특징으로 갖는 C20-7-3 균주를 사용한 탁주의 전체 기호도도 7점으로 높았으며, 맛 기호도와 전체 기호도에서 7점을 얻은 N162-2를 사용한 탁주는 신향과 단향을 가진 적당한 신맛과 깔끔한 단맛을 나타내었다.

효모 98-5와 9개의 균주를 사용하여 제조한 탁주는 향과 맛 그리고 전체 기호도가 5-8점으로 ‘보통’ 이상의 수준을 나타내었다. 그 중 C20-7-3을 사용한 탁주는 향 기호도는 6점, 맛과 전체 기호도는 7점으로 citrus류의 과일향이 나며 신맛과 단맛이 적당하게 어우러진 맛을 내었다. CN1.3.1-4를 입국균으로 사용한 경우 전체 기호도는 8점으로 9점 척도 중 높은 편이었으며 탄산음료와 같은 청량한 신맛과 부드러운 목넘김 그리고 단맛을 특징으로 하였으며, 맛과 전체 기호도에서 7점을 보인 N220-1은 상쾌한 신향과 단향 그리고 과일의 단맛을 관능 특성으로 나타내었다.

효모 268-1을 사용한 탁주 중 가장 높은 기호도를 보인 C1-5-2-2를 입국균으로 사용한 경우로 상큼한 과일 향과 열대과일의 맛과 청량감을 느낄 수 있었다. CN1.3.1-4를 입국균으로 사용한 경우 달콤한 단향으로 인하여 향기호도는 8점으로 가장 높은 점수를 얻었으며 맛과 전체 기호도에서 7점을 나타내었는데 단맛과 신맛 그리고 후미가 깔끔한 것이 특징이었다. N162-2 균주를 사용한 경우 또한 맛과 전체 기호도에서 7점을 나타내었는데 포도의 단향과 단맛 그리고 적당한 신맛을 관능 특성으로 보였다.

이상의 결과 선발된 3종의 효모와 9균주를 종균으로 사용하여 제조한 입국을 사용하여 탁주를 제조하는 경우 발효는 일반적인 탁주의 발효 양상을 보이며 정상적으로 진행되었으며 완성된 탁주의 향과 맛 또한 입국을 사용하여 제조한 탁주의 특성 이외에 다양한 종류의 신향과 단향 그리고 청량감, 깔끔한 후미, 과일의 단맛 등을 관능 특성으로 나타내었다. 각 효모 별로 살펴보면 효모 98-2는 C1-5-2-2, C20-7-3 그리고 N162-2, 효모 98-5는 C20-7-3, CN1.3.1-4, N220-1 그리고 효모 268-1은 C1-5-2-2, CN1.3.1-4, N152-1을 종균으로 사용한 입국을 발효제로 하여 탁주를 제조하는 것이 가장 적합한 것으로 나타났다.

표 2-7-20. 선발된 효모와 입국을 사용한 탁주의 기호도

(n=10)

효모	입국(균주)	외관 기호도	향 기호도	맛 기호도	전체기호도
98-2	C1-5-2-2	6	8	8	8
	C20-7-3	6	7	7	7
	CN1.3.1-4	6	6	5	5
	CN16.19.1-1	6	6	5	5
	N20	5	4	5	5
	N21	6	5	4	4
	N152-1	6	5	5	5
	N162-2	6	6	7	7
	N220-1	6	5	6	6
98-5	C1-5-2-2	6	6	6	6
	C20-7-3	6	6	7	7
	CN1.3.1-4	6	7	8	8
	CN16.19.1-1	6	5	5	5
	N20	6	6	5	5
	N21	6	5	5	5
	N152-1	6	5	5	5
	N162-2	6	6	6	6
	N220-1	6	6	7	7
268-1	C1-5-2-2	6	7	8	8
	C20-7-3	6	4	5	5
	CN1.3.1-4	6	8	7	7
	CN16.19.1-1	6	5	5	5
	N20	6	6	6	6
	N21	6	5	5	5
	N152-1	6	6	5	5
	N162-2	6	6	7	7
	N220-1	5	5	5	5



다. 황국균주 *Aspergillus oryzae* N152-1 균주를 활용한 시제품 생산

전통누룩에서 분리된 우수 황국균주 *Asp. oryzae* N152-1 균주를 활용한 황국 생산공정 확립을 위해 발효시간에 따른 황국의 당화력 분석을 실시하였다. 분석결과 황국의 색도 및 당화력을 고려하여 최종 과국 후 31-32 시간 후 건조공정을 수행하는 것이 바람직한 것으로 판단하였다(그림 2-7-8). 본 연구를 통해 개발된 우수 황국균을 활용한 황국제조기술은 기술이전 후 프리미엄 탁주 생산에 활용될 예정이다.

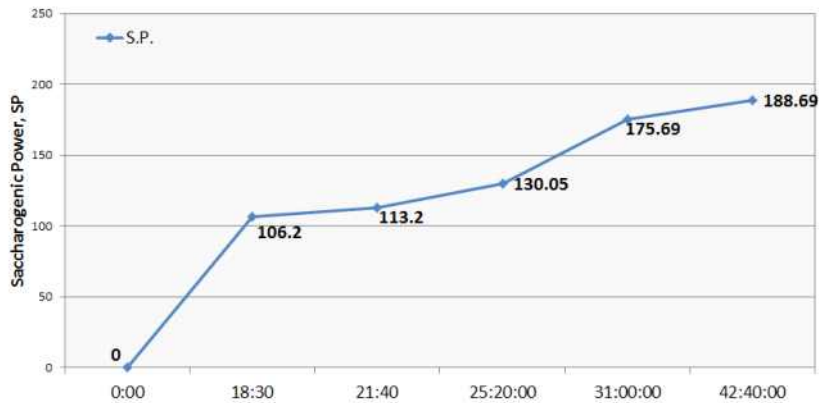


그림 2-7-8. 과국 후 배양 시점 별 당화력

5. *Saccharomyces cerevisiae* 98-5의 균주를 활용한 제품화

표준유전체 분석이 수행된 *S. cerevisiae* 98-5는 탁주 제조시 바람직한 향기성분 고생성 기능을 갖는 우수양조미생물로, ‘전통주 발효제 보급사업’을 통해 전국 21개 전통주 제조장에 무상보급 하였다. 보급된 업체 중 경상북도 소재 청송양조장은 해당 균주를 활용한 탁주 제품(주산지)를 출시하였다(그림 2-7-9)

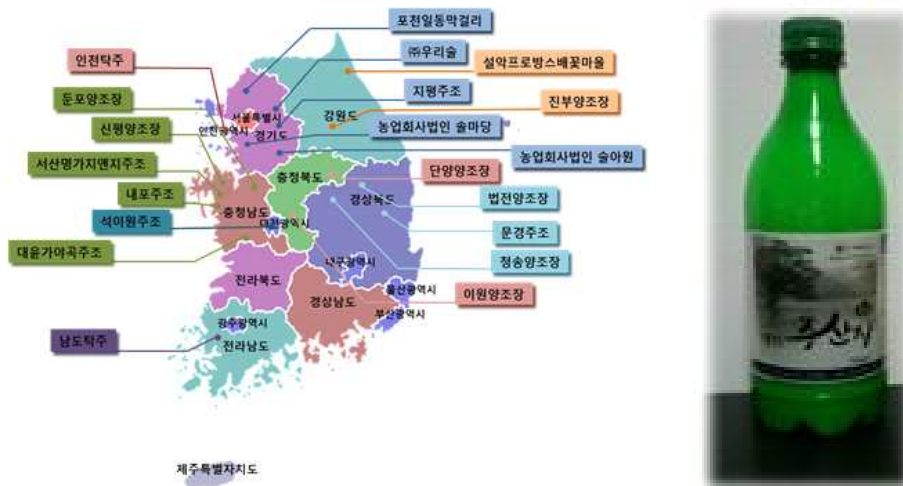


그림 2-7-9. *S. cerevisiae* 98-5 효모의 무상지원 양조장 21개소 (좌) 및 해당 균주를 활용한 제품 출시 (우)

8절. 우수 종균을 활용한 및 주류 개발

1. 선별균주들의 Lab scale 양조 적성 1차 선별

가. 우수 양조 적성 효모 선별

한국식품연구원에서 분리한 신규 효모 균주와 (주)국순당에서 분리한 효모들 중 식용가능하고 안정성이 확인된 효모 중에 속하는 14개 균주를 선별하여 lab scale에서 양조 적성 연구를 진행하였다(표 2-8-1).

표 2-8-1. 양조 적성 연구를 위한 14개 효모균주 후보

No.	Strain	Sp.	누룩이름	분리 기관
1	ReY3-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	오메기곡	한국식품연구원
2	ReY3-5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	오메기곡	
3	ReY24-2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	백수환동주곡	
4	ReY24-4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	백수환동주곡	
5	ReY24-6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	백수환동주곡	
6	ReY24-7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	백수환동주곡	
7	ReY29-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	미곡	
8	ReY29-2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	미곡	
9	ReY29-3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	미곡	
10	ReY29-4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	미곡	
11	ReY29-5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	미곡	
12	ReY29-6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	미곡	
13	ReY29-7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	미곡	
14	KSD-BH	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	백수환동주곡	(주)국순당

(1) 효모 양조적성 담금발효 시험

(가) 쌀 당화액 제조 : 실험에 사용한 당화액은 쌀을 증자하여 당사 제조 효소제를 첨가하고 물을 원료 대비 3배수를 가하여 40℃에서 1시간 방치한 후 60℃로 온도를 높여 overnight 당화시킨 다음 원심분리하여 침전물을 제외한 당화액을 회수하여 사용하였다.

(나) 효모 전배양 : YPD배지 5ml를 시험관에 분주하여 면전하여 멸균한 다음 분리된 실험 효모 14개 균주를 각각 접종하고, 30℃ Rotary shaker에서 150rpm으로 1일간 전배양하였다.

(다) 효모 본배양 : 쌀 당화액 100ml을 진탕 삼각Flask에 분주하여 면전한 후 멸균한 다음 전배양한 효모배양액을 5ml씩 각각 접종하여 30℃ Rotary shaker에서 150rpm으로 1일간 본배양 하였다.

(라)당화 효소제 : 당사에서 사용 중인 효소제(*Rhizopus oryzae* KSD-815 적용 배양곡)를 활용하였다.

(마) 술 담금 배합비율

표 2-8-2. 술 담금 배합비율

구분	밑술	덧술
쌀	300g	700g
효소제	6.7g	-
효모 배양액	20ml	-
담금수	880ml	600ml

(바) 술 담금 조건

밑술과 덧술의 원료비율은 30%, 70%로 하였다. 효소제 사용량은 밑술과 덧술에 사용되는 원료의 총량에 대하여 필요한 효소량을 밑술에 전량 투입하였고, 담금수 비율은 총 원료의 1.5 배를 사용하는 것을 기준하였다. 밑술에는 효모 배양액의 사용량을 제외한 밑술 원료량의 3배수를 가하여 25℃ 배양실에서 2일간 발효시킨 후 덧 담금을 실시하였다. 덧 담금에 사용한 담금수는 총 담금수 사용량에서 밑술에 사용한 효모 배양액과 담금수를 포함하여 첨가하였다. 덧 담금 후 발효는 25℃ 배양실에서 8일간 실시하였다. 모든 실험군은 각 3반복 담금을 진행하였고 분석치는 각 시험군의 평균값으로 기록하였다.

실험 군주에 대한 숙성 술 덧의 일반 분석치 및 관능 평가는 표 2-8-3, 4과 같다. 전반적으로 약 17~19%의 알코올 생성능을 보이고, ReY3-5, ReY29-5와 KSD-BH의 관능이 상대적 좋았다.

표 2-8-3. 술 담금 분석 결과

군주 명	Alc(%)	pH	산도	환원당(mg/ml)	아미노산도
ReY3-1	18.7	4.14	4.5	9	1.8
ReY3-5	18.67	4.14	4.8	4	2
ReY24-2	17.91	4.36	3.6	15	3.7
ReY24-4	17.74	4.37	3.2	13	3.5
ReY24-6	17.53	4.36	3.2	15	3.8
ReY24-7	17.62	4.36	3.2	16	3.6
ReY29-1	19.32	4.39	3.2	2	3
ReY29-2	19.42	4.26	4.2	2	2.3
ReY29-3	18.86	4.42	3.2	2	4
ReY29-4	18.45	4.42	3.4	2	3.4
ReY29-5	19.1	4.29	4.1	2	2.2
ReY29-6	19.41	4.37	3.4	6.5	2.6
ReY29-7	19.21	4.38	3.4	2	3.2
KSD-BH	19.63	4.41	3.6	2	2.5

표 2-8-4. 숙성 술 덧에 대한 관능 평가 결과

균주 명	관능점수 (5점척도)	관능표현
ReY3-1	2.9	향(Fruity) 양호, 맛은 진하고 알콜 쓴맛 강함
ReY3-5	3.3	향(Fruity) 양호, 과실향, 알콜 쓴맛이 #ReY3-1보다 강함
ReY24-2	2.8	향 보통, 맛은 밋밋하고 특징이 약함
ReY24-4	2.8	짠맛, 감칠맛 약간, 불쾌한 지미 끌림
ReY24-6	2.7	# ReY24-2 유사
ReY24-7	2.6	부드러움, 짠맛, 감칠맛 다소 있음
ReY29-1	2.6	# ReY24-7 유사
ReY29-2	2.5	짠맛, 감칠맛 있음, 들쩍지근한 지미 있음, 부드러움
ReY29-3	2.7	# ReY29-3 유사
ReY29-4	2.8	지미 있음, 후미가 약간 밋밋하나 단맛 있어 부드러움
ReY29-5	3.2	향 양호, 과실향 풍부, 부드럽고 짠맛 약간 있음
ReY29-6	2.7	알콜느낌 다소 강함, 짠맛 있음
ReY29-7	2.2	알콜도수 높음, 짠맛 있음
KSD-BH	3.7	부드럽고 특유 과실향미 있음, 단맛 있고 목 넘김 양호함

(2) 효모 내당성 시험

당 농도는 효모 본 배양액 5ml 첨가 후 실험 계획 목적 농도에 맞게 쌀 당화포도당을 추가 하여 조절하여 250ml 삼각 Flask에 95ml씩 분주하여 면전한 다음 멸균하였다. 효모 본 배양액 5ml를 접종한 후 25°C 발효실에 정치 배양하면서 경시적으로 무게 감량을 측정 한 후 21일째 pH, 산도, 알코올 %, R/S를 분석하였다. 내당성 실험의 당 농도는 40%와 50%로 하였다. 모든 실험군은 각 3반복 담금을 진행하였고 분석치는 각 시험군의 평균값으로 기록하였다. 초기 당 농도 40%에서 실험에 사용한 분리 효모 14종에 대하여 발효일수에 따른 경시적인 무게 감량은 표 2-8-5와 같으며, 21일째 발효액의 분석치는 표 2-8-6과 같다.

표 2-8-5. 초기 당 농도 40%일 때 분리효모의 발효 경과일에 따른 무게 감량

균주	days														
	0	2	5	6	7	8	9	12	13	14	15	16	19	20	21
ReY3-1	0	1.8	5.0	6.1	6.9	7.7	8.5	10.8	11.5	12.4	13.2	13.9	16.4	17.2	17.8
ReY3-5	0	2.2	6.1	7.2	8.2	9.1	9.8	12.4	13.1	13.7	14.4	15.1	17.3	18.2	19.6
ReY24-2	0	1.8	6.1	7.3	8.2	9.2	10.0	12.7	13.5	14.3	15.3	15.8	18.1	19.1	19.6
ReY24-4	0	1.6	5.9	6.9	7.8	8.8	9.6	12.4	13.0	13.8	14.6	15.4	17.7	18.5	19.1
ReY24-6	0	2.0	6.1	7.2	8.2	9.3	10.1	12.7	13.5	14.2	15.2	15.7	18.2	18.9	19.4
ReY24-7	0	1.9	6.2	7.3	8.3	9.3	10.2	12.9	13.7	14.5	15.3	16.1	18.5	19.2	19.8
ReY29-1	0	1.9	5.8	6.7	7.8	8.8	9.4	12.0	12.7	13.6	14.4	15.2	17.5	18.4	18.9
ReY29-2	0	1.7	5.8	7.2	7.9	9.3	9.9	12.6	13.3	14.2	15.0	15.7	18.1	19.0	19.5
ReY29-3	0	1.9	5.8	7.0	7.8	9.0	9.6	12.3	13.1	13.7	14.4	15.1	17.5	18.3	18.8
ReY29-4	0	1.7	5.7	6.9	7.7	8.9	9.6	12.2	12.9	13.9	14.5	15.3	17.6	18.6	19.1
ReY29-5	0	2.0	6.1	7.1	8.1	9.3	10.1	12.6	13.4	14.3	15.2	15.7	18.3	19.1	19.8
ReY29-6	0	1.8	4.6	5.3	6.2	7.0	7.5	9.7	10.3	11.0	11.6	12.2	14.1	15.0	15.5
ReY29-7	0	2.1	6.1	7.1	8.1	9.1	9.9	12.5	13.1	14.2	14.8	15.5	18.0	18.8	19.5
KSD-BH	0	2.2	6.5	7.7	8.7	9.8	10.5	13.3	14.2	15.0	15.9	16.5	19.0	19.8	20.5

표 2-8-6. 초기 당 농도 40%일 때 분리효모의 발효 경과 21일째 일반 성분 분석치

분석항목		pH	산도	R/S	Alc%
분리원 및 균주명					
오메기곡	ReY3-1	3.53	4.5	279	6.12
	ReY3-5	3.54	4.5	272	7.45
백수환동주곡	ReY24-2	3.55	4.4	258	7.16
	ReY24-4	3.55	4.3	267	6.67
	ReY24-6	3.55	4.4	260	7.06
	ReY24-7	3.56	4.2	253	7.34
	미곡	ReY29-1	3.57	4	258
미곡	ReY29-2	3.54	4.6	253	7.36
	ReY29-3	3.52	4.8	258	7.11
	ReY29-4	3.56	4	255	7.3
	ReY29-5	3.56	4	251	7.59
	ReY29-6	3.56	4	306	4.8
	ReY29-7	3.56	4	256	7.19
백수환동주곡	KSD-BH	3.54	4.5	247	7.65
효모 무침가		6.2	-	420	-

초기 당 농도 50%에서 실험에 사용한 분리 효모 14종에 대하여 발효일수에 따른 경시적인 무게 감량은 표 2-8-7과 같으며, 21일째 발효액의 분석치는 표 2-8-8와 같다.

표 2-8-7. 초기 당 농도 50%일 때 분리효모의 발효 경과일에 따른 무게 감량

균주	days															
	0	4	5	6	7	8	11	12	13	14	15	18	19	20	21	
ReY3-1	0	2.7	3.3	3.9	4.6	5.2	7.1	7.6	8.2	8.6	9.2	11	11.5	12	12.4	
ReY3-5	0	2.7	3.5	4.1	5	5.5	7.4	8.1	8.7	9.3	9.8	11.6	12	12.5	13.9	
ReY24-2	0	2.5	3	3.8	4.4	5.2	7.4	8	8.7	9.4	9.9	11.8	12.4	12.8	13.4	
ReY24-4	0	2.8	3.4	4.2	5.2	5.8	8	8.4	9	9.9	10.4	12.4	12.9	13.4	14	
ReY24-6	0	3	3.8	4.7	5.5	6.1	8.3	9	9.6	10.2	11.1	12.7	13.3	13.8	14.6	
ReY24-7	0	3	3.8	4.7	5.5	6.2	8.4	9	9.8	10.4	10.9	13	13.6	13.9	14.6	
ReY29-1	0	2.8	3.5	4.1	4.9	5.4	7.7	8.3	9	9.7	10.2	12.1	13	13.2	13.8	
ReY29-2	0	2.8	3.5	4.3	5.2	6	8.2	9.1	9.6	10.4	10.9	13.1	13.7	14.1	14.7	
ReY29-3	0	2.9	3.6	4.2	4.9	5.4	7.8	8.3	9	9.6	10.1	12.1	12.7	13.2	13.7	
ReY29-4	0	2.6	3.4	4.1	4.9	5.7	7.8	8.4	9.1	9.7	10.1	12.1	12.8	13.3	13.8	
ReY29-5	0	2.9	3.5	4.2	4.9	5.7	7.9	8.5	9.2	10	10.5	12.4	13.2	13.6	14.1	
ReY29-6	0	2.6	3.3	3.9	4.8	5.4	7	7.4	8.1	8.7	9.2	10.9	11.5	12	12.4	
ReY29-7	0	2.7	3.3	4.1	4.8	5.5	7.7	8.4	9.1	9.7	10.3	12	12.8	13.3	13.7	
KSD-BH	0	2.7	3.5	4.4	5.3	6	8.2	8.8	9.3	10	10.5	12.4	12.9	13.7	14.1	

표 2-8-8. 초기 당 농도 50%일 때 분리효모의 발효 경과 21일째 일반 성분 분석치

분리원 및 균주명		분석항목	pH	산도	R/S	Alc%
오메기곡	ReY3-1		3.5	5	460	2.48
	ReY3-5		3.5	5	450	3.55
백수환동주곡	ReY24-2		3.55	4.5	440	2.97
	ReY24-4		3.55	4.6	436	3.22
	ReY24-6		3.55	4.5	425	3.76
	ReY24-7		3.54	4.7	426	3.71
미곡	ReY29-1		3.49	5.3	456	2.26
	ReY29-2		3.48	5.5	434	3.29
	ReY29-3		3.48	5.6	447	2.69
	ReY29-4		3.51	5	442	2.95
	ReY29-5		3.49	5.1	439	3.58
	ReY29-6		3.54	4.2	448	2.7
	ReY29-7		3.49	5.1	439	3.04
백수환동주곡	KSD-BH		3.49	5.1	433	3.57
효모 무첨가			6.2	-	523	-

초기 당농도 40%에서는 ReY3-5, ReY29-5, KSD-BH의 내당성이 상대적 높았고, 50%에서는 ReY3-5, ReY24-6, ReY24-7, ReY29-5, KSD-BH의 내당성이 높았다. 두 조건에서 공통적으로는 ReY3-5, ReY29-5와 KSD-BH의 내당성의 높은 것으로 나타났다.

(3) 효모 내산성 시험

당농도는 효모 전배양액 및 젖산 사용량을 첨가하였을 때 당 농도가 30%가 되도록 당 농도를 33%로 조절하여 250ml 삼각 Flask에 90ml씩 분주한 후 면전한 다음 멸균하였다. 젖산은 농도를 30%, 40%, 50%로 희석하여 멸균한 다음 냉각시켜 멸균 냉각된 쌀 당화액에 5ml씩 분주하였다. 젖산을 쌀 당화액에 첨가하여 멸균하지 않은 이유는 젖산에 의해 쌀 당화액의 가수분해 및 갈변을 방지하기 위하여 별도로 멸균하였다.

멸균한 쌀 당화액에 효모 전배양액 및 희석 젖산을 첨가한 후 25℃ 발효실에 정치 배양하면서 경시적으로 무게 감량을 측정 한 후 20일째 pH, 산도, 알코올 %, R/S를 분석하였다. 내산성 실험의 산 농도는 15, 20, 25로 하였다. 1% 젖산의 산도는 10이었다. 모든 실험군은 각 3반복 담금을 진행하였고 분석치는 각 시험군의 평균값으로 기록하였다.

초기 산도 15에서 실험에 사용한 분리 효모 14종에 대하여 발효일수에 따른 경시적인 무게 감량은 표 2-8-9와 같으며, 20일째 발효액의 분석치는 표 2-8-10과 같다.

표 2-8-9. 초기 산도 15일 때 분리효모의 발효 경과일에 따른 무게 감량

days 균주	0	1	2	5	6	7	8	9	12	13	14	15	16	19	20
ReY3-1	0	0.9	3.5	9.8	11.5	12.9	14.5	15.7	20	21.2	22.5	23.5	24.5	27.8	28.7
ReY3-5	0	1	3.7	10.4	12.3	13.9	15.4	16.8	21	22.1	23.3	24.3	25.2	28	28.9
ReY24-2	0	0.6	4.1	12	14	15.6	17.3	18.8	22.6	23.7	24.8	25.6	26.4	28.9	29.5
ReY24-4	0	0.8	3.2	10.3	12.3	14	15.7	17.1	21.1	22.2	23.4	24.2	25.1	27.7	28.6
ReY24-6	0	0.7	3.1	10.3	12.1	13.7	15.3	16.8	20.7	21.7	22.9	24	24.8	27.5	28.3
ReY24-7	0	0.7	3.5	10.9	13	14.3	16.2	17.7	21.6	22.7	23.9	24.9	25.6	28.3	29.2
ReY29-1	0	0.7	2.8	9.3	11.2	12.6	14	15.3	18.9	20.1	21.2	22.3	23.1	25.9	26.7
ReY29-2	0	1.1	3.1	10	11.6	12.9	14.5	15.8	19.6	20.5	21.7	22.9	23.6	26.5	27.5
ReY29-3	0	0.6	2.7	9.6	11.5	12.9	14.6	16	20.1	21.1	22.3	23.5	24.3	27.4	28.3
ReY29-4	0	1	3.4	9.3	11.4	12.8	14.3	15.6	19.5	20.6	21.9	22.7	23.6	26.6	27.5
ReY29-5	0	0.7	2.6	7.7	9.7	11.1	12.8	14.1	18.2	19.4	20.7	21.8	22.7	26	27.1
ReY29-6	0	0.8	2.9	9.7	11.5	13	14.5	15.9	19.5	20.6	21.8	22.8	23.5	26.2	27.1
ReY29-7	0	0.8	3.3	10.4	12.3	13.6	15.3	16.6	20.4	21.6	22.8	23.6	24.4	27.2	27.9
KSD-BH	0	0.9	3.5	10.6	12.7	14.3	15.9	17.4	21.7	23	24.2	25	26.1	29.1	30.1

표 2-8-10. 초기 산도 15일 때 분리효모의 발효 경과 20일째 일반 성분 분석치

분석항목		pH	산도	R/S	Alc%
오메기곡	ReY3-1	3.05	19.7	56	12.18
	ReY3-5	3.05	19.2	45.2	<u>12.59</u>
백수환동주곡	ReY24-2	3.02	19	45.2	<u>12.56</u>
	ReY24-4	3	19	60	11.98
	ReY24-6	3.01	19	60	11.62
	ReY24-7	2.98	18.9	53.2	12.27
	미곡	ReY29-1	3	19.5	77.2
	ReY29-2	2.99	19.3	70	11.59
	ReY29-3	3.02	19.2	55.2	<u>12.43</u>
	ReY29-4	3	19.2	72	11.37
	ReY29-5	2.98	18.2	76	11.04
	ReY29-6	3.05	19	78.2	11.02
	ReY29-7	3.04	19.2	68	11.39
백수환동주곡	KSD-BH	3.04	19.2	38	<u>13.12</u>
효모 무첨가		2.78	15.8	320	-

초기 산도 20에서 실험에 사용한 분리 효모 14종에 대하여 발효일수에 따른 경시적인 무게 감량은 표 2-8-11과 같으며, 20일째 발효액의 분석치는 표 2-8-12와 같다.

표 2-8-11. 초기 산도 20일 때 분리효모의 발효 경과일에 따른 무게 감량

균주 \ days	0	1	4	5	6	7	8	11	12	13	14	15	18	19	20
ReY3-1	0	0.9	5.7	7.1	8.3	9.3	9.6	13.9	14.9	15.8	16.7	17.5	20.5	21.4	22.3
ReY3-5	0	0.9	7.1	9	10.4	11.6	13	16.6	17.7	18.6	19.6	20.4	23.8	24.8	25.8
ReY24-2	0	0.9	7	9.1	10.7	12	13.4	17.2	18.3	19.2	20	20.7	23.4	23.9	24.5
ReY24-4	0	0.8	7.3	9.4	11.1	12.4	13.9	17.4	18.7	19.5	20.6	21.2	24.2	24.9	25.5
ReY24-6	0	0.9	7.1	9.1	10.9	12.4	13.9	17.8	19.1	20.1	21	21.9	24.8	25.8	26.4
ReY24-7	0	0.8	7.4	9.2	10.9	12.2	13.5	16.9	18	18.8	19.5	20.1	22.5	23.1	23.8
ReY29-1	0	0.8	6.7	8.4	9.9	11.3	12.4	15.9	17.1	18.1	18.8	19.7	22.8	23.7	24.5
ReY29-2	0	0.9	6.9	8.7	10.3	11.6	12.9	16.4	17.6	18.5	19.6	20.2	23.7	24.5	25.3
ReY29-3	0	0.9	5.3	7.7	9.5	11.1	12.6	16.6	17.9	19.1	20.2	20.9	24.3	25.3	26.1
ReY29-4	0	0.8	4.8	6.1	7.4	8.2	9.6	13.1	14.1	15.2	16	16.7	19.8	20.8	21.6
ReY29-5	0	0.8	7.2	9.2	10.7	12.2	13.2	16.9	18	18.9	19.9	20.6	23.8	24.5	25.4
ReY29-6	0	1	6.4	8.3	9.8	11.2	12.5	16.4	17.3	18.3	19.3	19.9	23.1	23.9	24.7
ReY29-7	0	0.8	6.8	8.7	10.2	11.6	12.7	16.2	17.2	18.3	19.3	19.8	22.7	23.7	24.4
KSD-BH	0	0.9	7.5	9.2	10.6	12.2	13.3	17	18.1	19.3	20.3	21	24.2	25.1	26

표 2-8-12. 초기 산도 20일 때 분리효모의 발효 경과 20일째 일반 성분 분석치

분리원 및 균주명		분석항목	pH	산도	R/S	Alc%
오메기곡	ReY3-1		2.86	26.3	123	8.8
	ReY3-5		2.86	25.2	100	11.29
백수환동주곡	ReY24-2		2.86	27.1	108	9.2
	ReY24-4		2.86	26.4	93	10.1
	ReY24-6		2.85	26.1	63	11.26
	ReY24-7		2.86	26.2	116	9.15
미곡	ReY29-1		2.86	26.5	105	9.5
	ReY29-2		2.86	26.5	94	10.34
	ReY29-3		2.86	27	66	11.15
	ReY29-4		2.86	25	139	8.22
	ReY29-5		2.86	26.5	94	11.37
	ReY29-6		2.86	25.7	93	10.35
백수환동주곡	KSD-BH		2.86	26.4	66	11.44
효모 무첨가			2.65	22	318	-

초기 산도 25에서 실험에 사용한 분리 효모 14종에 대하여 발효일수에 따른 경시적인 무게 감량은 표 2-8-13과 같으며, 20일째 발효액의 분석치는 표 2-8-14와 같다.

표 2-8-13. 초기 산도 25일 때 분리효모의 발효 경과일에 따른 무게 감량

days 균주	0	3	4	5	6	7	10	11	12	13	14	17	18	19	20
ReY3-1	0	2.5	4.5	5.9	7.1	8.2	11.6	12.7	13.8	14.7	15.4	18.5	19.6	20.6	21.3
ReY3-5	0	2.5	5	6.9	8.6	10	13.4	14.5	15.6	16.4	17.1	20.1	21.1	22.1	22.8
ReY24-2	0	2.8	4.9	6.7	8.4	9.5	13.3	14.4	15.5	16.3	16.9	19.4	20.2	20.9	21.6
ReY24-4	0	2.8	5.5	7.4	9	10.4	14.1	15.2	16.3	17	17.5	19.7	20.6	21.2	21.7
ReY24-6	0	2.7	5.1	6.8	8.4	9.7	13.2	14.4	15.3	16.1	16.6	19.1	19.9	20.6	21.2
ReY24-7	0	2.6	4.9	6.6	8.2	9.5	13.1	14.4	15.3	16.2	16.7	19.4	20.1	20.8	21.4
ReY29-1	0	2.6	3.3	4.9	6.7	8.1	11.6	12.8	13.9	14.7	15.4	18.3	19.2	20	20.7
ReY29-2	0	2.6	5.1	6.9	8.7	10	13.7	15.1	16.1	16.9	17.6	20.9	21.7	22.7	23.4
ReY29-3	0	2.5	5.3	7.3	9.2	10.6	14.3	15.7	16.8	17.6	18.3	21.6	22.3	23.3	24
ReY29-4	0	1.9	3.5	4.9	6.1	7.4	10.4	11.6	12.5	13.2	14	16.9	17.7	18.7	19.4
ReY29-5	0	2.4	5.1	7	8.9	10.3	13.7	15.1	16.1	16.8	17.6	20.8	21.7	22.5	23.2
ReY29-6	0	2.7	5.1	6.9	8.5	9.9	13.3	14.5	15.5	16.2	17.1	20	20.8	21.7	22.3
ReY29-7	0	1.7	3.6	5.5	7	8.2	11.9	13.2	14.1	14.9	15.8	18.6	19.5	20.3	20.9
KSD-BH	0	3.1	5.8	7.8	9.7	11	14.5	15.8	16.8	17.5	18.4	21.3	22.2	23	23.7

표 2-8-14. 초기 산도 25일 때 분리효모의 발효 경과 20일째 일반 성분 분석치

분리원 및 균주명	분석항목	pH	산도	R/S	Alc%
오메기곡	ReY3-1	2.84	28.6	170	7.52
	ReY3-5	2.84	28.4	148	8.41
백수환동주곡	ReY24-2	2.84	28.2	164	7.69
	ReY24-4	2.84	29	164	7.76
	ReY24-6	2.84	29	172	7.41
	ReY24-7	2.84	28.6	170	7.55
	미곡	ReY29-1	2.84	28.9	176
	ReY29-2	2.84	29.8	146	8.75
	ReY29-3	2.84	30	140	9.09
	ReY29-4	2.84	28.6	192	6.39
	ReY29-5	2.84	29.2	146	8.65
	ReY29-6	2.84	29.2	158	8.13
	ReY29-7	2.84	29.6	175	7.26
백수환동주곡	KSD-BH	2.84	30	141	8.96
효모 무첨가		2.65	26	318	-

초기 산도 15/20/25에서 전반적으로 ReY3-5와 KSD-BH의 내산성이 상대적 높았고, 산도 20/25에서 ReY29-5 내산성도 높게 나타났다.

(4) 재현 누룩 대비 우수 양조 적성 효모 선별

앞서 14개 효모 균주 후보군 중 한국식품연구원에서 재현한 오메기곡과 미곡에서 각각 분리된 ReY3-5와 ReY29-5, 국순당에서 재현한 백수환동주곡에서 분리된 KSD-BH 3개 균주가 1차적으로 발효적성/관능/내산&내당성이 우수한 것으로 나타났다. 이 효모 균주들과 각 효모의 분리원인 누룩으로 술을 담그는 것과 양조 적성 비교를 진행하였다.

(가) 오메기곡 대비 분리효모 ReY3-5의 차별성 및 우월성 검증

대조구는 한국식품연구원에서 재현한 오메기곡을 이용하였으며 배양효모를 사용하지 아니하고 발효시켰다. 실험구-1은 분리효모 ReY3-5를 순수 배양하여 활용하고 당화효소제로써는 당사의 당화효소제를 사용하였다. 실험구-2는 실험구-1과 동일하나 추가로 오메기곡 제조에 사용된 보리와 밀가루를 추가하였다. 보리는 세척한 후 40℃에서 건조한 후 분쇄하여 증자하지 아니하고 사용하였다. 발효 조건은 25℃ 배양실에서 밀술은 2일간, 덧술은 8일간 총 10일간 발효시켰다. 모든 실험군은 각 3반복 담금을 진행하였고 분석치는 각 시험군의 평균값으로 기록하였다(표 2-8-15, 16, 17).

표 2-8-15. 오메기곡과 ReY3-5 효모 비교실험 담금 비율

구분	대조구		실험구-1		실험구-2	
	밀술	덧술	밀술	덧술	밀술	덧술
원료						
쌀	300g	700g	300g	700g	300g	700g
오메기곡	100g					
당사 효소제			6.7g		6.7g	
보리					99g	
밀가루					1g	
ReY3-5 배양액			10ml		10ml	
물	900ml	600ml	890ml	600ml	890ml	600ml

대조구 : 당화효소제로써는 오메기곡을 사용, 효모는 사용하지 아니함.

실험구-1 : 당화효소제로써는 당사의 효소제 사용, 효모는 오메기곡에서 분리한 ReY3-5을 순수 액체 배양하여 발효함.

실험구-2 : 실험구 1에 오메기곡 제조에 사용된 원료를 세척/건조/분쇄하여 첨가하여 발효함.

표 2-8-16. 오메기곡과 분리 효모 ReY3-5의 숙성 술 덧의 분석치

시험군	pH	산도	Alc.	R/S	A.A.
대조구	4.17	8	19.08	12	4.8
실험구 1	4.27	3.8	20.23	2	1.7
실험구 2	4.21	4.4	19.15	2	2.6

표 2-8-17. 오메기곡과 분리 효모 ReY3-5의 숙성 술 덧 관능 평가

시험군	관능점수 (5점)	관능 묘사
대조구	2.8	은은한 과실향이 조금 약함, 신맛, 쓴맛 오래 남음
실험구 1	3.4	은은한 과실향이 강함, 맛 조화도 양호함. 후미는 깔끔함
실험구 2	3.2	은은한 과실향은 강하나 밋밋하고 신맛, 쓴맛 있음

선별 효모 ReY3-5를 이용한 실험구 1과 2의 관능점수가 분리원인 오메기곡을 이용한 대조구보다 높고 산도가 낮았다. 공통적으로 은은한 사과 계열의 과실향이 나타났고 재현 누룩을 쓰는 것보다 누룩에서 분리된 선별 효모를 이용하는 것이 향미가 더 강하게 나타나고 맛의 조화도가 좋았다.

(나) 미곡 대비 분리효모 ReY29-5의 차별성 및 우월성 검증

대조구는 한국식품연구원에서 재현한 미곡을 이용하였으며 배양효모를 사용하지 아니하고 발효시켰다. 실험구-1은 분리효모 ReY29-5를 순수배양배양하여 활용하고 당화효소제로써는 당사의 당화효소제를 사용하였다. 실험구-2는 실험구-1과 동일하나 추가로 미곡 제조에 사용된 찹쌀을 세척한 후 40℃에서 건조한 후 분쇄하여 증자하지 아니하고 사용하였다. 25℃ 배양실에서 밀술은 2일간, 덧술은 8일간 총 10일간 발효시켰다. 모든 실험군은 각 3반복 담금을 진행하였고 분석치는 각 시험군의 평균값으로 기록하였다(표 2-8-18, 19, 20).

표 2-8-18. 미곡과 ReY29-5 효모 비교실험 담금 비율

구분	대조구		실험구-1		실험구-2	
	밀술	덧술	밀술	덧술	밀술	덧술
원료						
쌀	300g	700g	300g	700g	300g	700g
미곡	200g					
당사 효소제			6.7g		6.7g	
찹쌀					200g	
ReY29-5 배양액			10ml		10ml	
물	900ml	600ml	890ml	600ml	890ml	600ml

대조구 : 당화효소제로써는 미곡을 사용, 효모는 사용하지 아니함.

실험구 1 : 당화효소제로써는 당사의 효소제 사용, 효모는 미곡에서 분리한 ReY29-5을 순수 액체 배양하여 발효함.

실험구 2 : 실험구 1에 미곡 제조에 사용된 원료인 찹쌀을 세척/건조/분쇄하여 첨가하여 발효함.

표 2-8-19. 미곡과 분리 효모 ReY29-5의 숙성 술 덧의 분석치

시험군	pH	산도	Alc.	R/S	A.A.
대조구	4.36	4.8	18.13	7.4	5.1
실험구 - 1	4.5	2.7	20.44	8	2.2
실험구 - 2	4.89	3.3	19.15	8.5	2.4

표 2-8-20. 미곡과 분리 효모 ReY29-5의 숙성 술 덧의 관능 평가

시험군	관능점수 (5점)	관능 묘사
대조구	3	적당한 감칠맛, 단맛이 있어 목 넘김은 양호. 미세한 과일향 있고 맛 조화도는 양호하나 지미가 다소 끌림
실험구 - 1	3.1	향 양호, 맛은 대조구에 비해 조금 더 풍부, 알콜맛, 쓴맛이 있고 후미에 단맛이 남음
실험구 - 2	2.8	향 양호, 요구르트향(유산균), 알콜맛과 쓴맛이 강함(부정적), 감칠맛 있음

선별 효모 ReY29-5를 이용한 실험구 1과 2이 오메기곡을 이용한 대조구보다 알코올 생성능은 높았으나, 3개 시험군의 관능점수는 크게 차이 나지 않았다.

(다) 백수환동주 대비 분리효모 KSD-BH의 차별성 및 우월성 검증

대조구는 (주)국순당에서 재현한 백수환동주곡을 이용하였으며 배양효모를 사용하지 아니하고 발효시켰다. 실험구-1은 당사 제조 백수환동주곡에서 분리한 분리효모 KSD-BH를 순수배양하여 활용하고 당화효소제로써는 당사의 당화효소제를 사용하였다. 실험구-2는 실험구-1과 동일하나 추가로 백수환동주곡 제조에 사용된 거피녹두와 찹쌀을 추가하였다. 거피녹두는 녹두를 물에 불려 거피한 후 증자하여 사용하였고, 찹쌀은 세척한 후 40℃에서 건조한 후 분쇄하여 증자하지 아니하고 사용하였다. 25℃ 배양실에서 밑술은 2일간, 덧술은 8일간 총 10일간 발효시켰다. 모든 실험군은 각 3반복 담금을 진행하였고 분석치는 각 시험군의 평균값으로 기록하였다(표 2-8-21, 22, 23).

표 2-8-21. 백수환동주곡과 KSD-BH 효모 비교실험 담금 비율

구분	대조구		실험구-1		실험구-2	
	밑술	덧술	밑술	덧술	밑술	덧술
원료						
쌀	300g	700g	300g	700g	300g	700g
백수환동주곡	100g					
당사 효소제			6.7g		6.7g	
녹두					67g	
찹쌀					33g	
KSD-BH 배양액			10ml		10ml	
물	900ml	600ml	890ml	600ml	890ml	600ml

대조구 : 당화효소제로써는 백수환동주곡을 사용, 효모는 사용하지 아니함.

실험구 1 : 당화효소제로써는 당사의 효소제 사용, 효모는 백수환동주곡에서 분리한 KSD-BH를 순수액체 배양하여 발효함.

실험구 2 : 실험구 1에 백수환동주곡 제조에 사용된 원료인 녹두는 거피하여 증자하여 첨가, 찹쌀은 세척/건조/분쇄하여 첨가하여 발효함.

표 2-8-22. 백수환동주곡과 분리 효모 KSD-BH의 숙성 술 덧의 분석치

시험군	pH	산도	Alc.	R/S	A.A.
대조구	4.52	5	20.78	2	5.5
실험구 - 1	4.39	7.5	20.79	2	2.5
실험구 - 2	4.61	3.5	20.89	2	4

표 2-8-23. 백수환동주곡과 분리 효모 KSD-BH의 숙성 술 덧의 관능 평가

시험군	관능점수 (5점)	관능 묘사
대조구	3.1	은은한 자두향, 복합 과실향, 후미에 지미(누룩) 끌림 자두향, 감산미 좋음, 뒷맛 텁텁, 떼은맛 강함
실험구 - 1	4.2	향기로운 단내, 자두향 특유 풍미 있음, 맛 조화도 가장 좋음 알콜취 있으나 맛은 부드럽고 깔끔하며, 풍부한 복합적인 맛
실험구 - 2	3.8	대조구의 향미와 유사, 맛이 조금 더 복합적임. 주질 깔끔

전 시험구의 발효 후 알코올 생성능이 우수하고 전반적으로 자두향 계열의 풍미와 복합적인 맛이 조화가 있었다. 선별 효모 KSD-BH를 이용한 실험구 1과 2의 관능점수가 분리원인 백수환동주곡을 이용한 대조구보다 상당히 높았다.

나. 우수 양조 적성 곰팡이 선별

한국식품연구원 분리한 신규 곰팡이들 중 식용가능하고 안정성이 확인된 효모 종에 속하는 17개 균주를 후보로 선별하여 양조 적성 연구를 진행하였다(표 2-8-24).

표 2-8-24. 양조 적성 연구를 위한 17개 곰팡이 균주 후보

No.	Strain	Sp.	누룩이름
1	F2-YG3	<i>Aspergillus oryzae</i>	추모곡
2	F2-YG4	<i>Aspergillus oryzae</i>	추모곡
3	F3-YG3	<i>Aspergillus oryzae</i>	오메기곡
4	F4-GW1	<i>Aspergillus oryzae</i>	죽곡
5	F5-YG6	<i>Aspergillus sp.</i>	죽곡 2
6	F9-14	<i>Aspergillus terreus</i>	신곡
7	F11-G2	<i>Aspergillus oryzae</i>	여곡
8	F19-R1	<i>Rhizopus microsporus</i>	이화주곡
9	F21-YG1	<i>Aspergillus oryzae</i>	조곡법
10	F25-YG5	<i>Aspergillus oryzae</i>	내분비전곡
11	F26-1	<i>Aspergillus sp.</i>	녹미주곡
12	F26-2	<i>Aspergillus sp.</i>	녹미주곡
13	F32-YG1	<i>Aspergillus oryzae</i>	요곡
14	F32-YG3	<i>Aspergillus oryzae</i>	요곡
15	F33-G3	<i>Aspergillus oryzae</i>	대주백타곡
16	F49-YG1	<i>Aspergillus oryzae</i>	시판누룩
17	F57-G1	<i>Aspergillus sp.</i>	이가수블

선별 곰팡이 균주 17개와 비교 대상으로 한국식품개발연구원에 제공받은 *Aspergillus oryzae* N159-1 균주를 이용해 밀기울 고체 배양곡을 순수하게 제조하여 당화력을 분석하고, 술 담금을 실시하여 발효 숙성 술 더트의 일반 성분 분석과 관능 평가를 실시하였다. 추가 비교 당화효소제로는 현재 당사에서 사용하는 효소제를 활용하였고, 발효 효모 균주로는 앞서 선별 효모들 중 양조적성이 가장 뛰어났던 *S.cer* KSD-BH를 순수 액체 배양하여 사용하였다.

(1) 선별 곰팡이들을 이용한 건조 배양곡 제조 및 당화력 검증

곰팡이 액체 전배양은 곱게 분쇄한 밀기울 4g과 물 40ml을 250ml 진탕 삼각 Flask에 분주하여 멸균한 다음 분리 곰팡이 17종과 한국식품개발연구원에 보유한 *Aspergillus oryzae* N159-1을 1백금이 각각 접종하여 Rotary shaker에서 30°C 150rpm으로 1일간 배양하였다. 이후 고체 배양은 밀기울 100g에 30ml 물을 가하여 혼합한 다음 1 L 삼각 Flask에 넣고 멸균한 후 멸균수 30ml과 곰팡이 전배양액 40ml을 접종하여 30°C 항온기에서 3일간 배양한 후 분쇄 건조하여 당화력을 분석하고 술 담금에 이용하였다. 당화력 측정 방법은 국세청기술연구소 주류분석규정에 준하여 측정하였다.

고체 배양하여 건조시킨 곡들의 당화력은 표 2-8-25와 같다. 당사 효소제는 순수 배양이 아닌 현장 생산되어 현재 당사에서 사용하고 있는 효소제이다.

표 2-8-25. 실험 균주의 건조 배양곡 당화력

No.	Strain	Sp.	당화력(sp.)	비고
1	F2-YG3	<i>Aspergillus oryzae</i>	780	한식연 제공 분리 선별 균주 배양곡
2	F2-YG4	<i>Aspergillus oryzae</i>	760	
3	F3-YG3	<i>Aspergillus oryzae</i>	770	
4	F4-GW1	<i>Aspergillus oryzae</i>	680	
5	F5-YG6	<i>Aspergillus sp.</i>	540	
6	F9-14	<i>Aspergillus terreus</i>	700	
7	F11-G2	<i>Aspergillus oryzae</i>	730	
8	F19-R1	<i>Rhizopus microsporus</i>	1,170	
9	F21-YG1	<i>Aspergillus oryzae</i>	730	
10	F25-YG5	<i>Aspergillus oryzae</i>	740	
11	F26-1	<i>Aspergillus sp.</i>	620	
12	F26-2	<i>Aspergillus sp.</i>	600	
13	F32-YG1	<i>Aspergillus oryzae</i>	680	
14	F32-YG3	<i>Aspergillus oryzae</i>	700	
15	F33-G3	<i>Aspergillus oryzae</i>	700	
16	F49-YG1	<i>Aspergillus oryzae</i>	690	
17	F57-G1	<i>Aspergillus sp.</i>	780	
18	N159-1	<i>Aspergillus oryzae</i>	1,400	대조군: 한식연 제공 비교균주 배양곡
19	당사 효소제		4,500	대조군: (주) 국순당 현장 생산용

(2) 선별 곰팡이의 건조 배양곡을 활용한 술 담금 및 관능 검사

술 담금에 사용한 효모는 앞서 선별된 효모 중 가장 양조적성이 뛰어난 KSD-BH를 순수 액체 배양하여 동량 사용하였고, 담금 방법은 밀술과 덧술을 분리 담금하지 아니하고 단양법으로 담금하였다. 담금수 비율은 원료대비 150%로 하였으며, 배양곡 사용량은 당화력이 각 분리균에 따라 차이가 있음으로 원료g당 30sp가 되도록 중량을 달리하여 사용하였다. 술 담금에 사용한 쌀의 중량은 500g으로 소량 사용하였다. 관능은 숙성 술 덧을 원심분리하여 상등액으로 검사하였다. 모든 실험군은 각 3반복 담금을 진행하였고 분석치는 각 시험군의 평균값으로 기록하였다.

표 2-8-26. 실험 균주 건조 배양곡에 대한 숙성 술 덧 분석치

No	균주 명	pH	산도	Alc%	R/S	A.A.
1	F2-YG3	4.48	3.1	18.92	2	3.6
2	F2-YG4	4.52	2.9	18.88	2	3.7
3	F3-YG3	4.52	2.8	18.79	2	3.6
4	F4-GW1	4.52	2.6	18.72	2	4.0
5	F5-YG6	4.44	3.3	18.56	2	4.6
6	F9-14	4.12	3.5	20.11	2	3.9
7	F11-G2	4.28	3.6	18.69	2	3.8
8	F19-R1	4.12	3.8	20.11	2	1.2
9	F21-YG1	4.46	3.0	18.72	2	3.7
10	F25-YG5	4.52	2.8	18.73	2	3.9
11	F26-1	4.44	3.4	18.48	2	4.1
12	F26-2	4.46	3.3	18.52	2	4.2
13	F32-YG1	4.48	3.1	18.79	2	3.9
14	F32-YG3	4.48	3.1	18.69	2	3.7
15	F33-G3	4.49	3	18.82	2	3.8
16	F49-YG1	4.5	2.9	18.59	2	3.7
17	F57-G1	4.51	2.8	18.63	2	3.3
18	N159-1	4.52	2.6	18.72	2	3.1
19	당사 효소제	4.4	3	20.67	2	1.8

표 2-8-27. 실험 균주 건조 배양곡에 대한 숙성 술 덧의 관능 검사

No.	균주 명	관능 점수 (5점)	관능 표현
1	F2-YG3	2.7	곰팡이 포자 냄새와 유사한 꿈꿈한 향. 지미가 감함
2	F2-YG4	2.7	누룩 향이 강하며 느끼한 맛이 끌림
3	F3-YG3	2.7	노주 향과 비슷한 향. 느끼한 맛. 멍멍함
4	F4-GW1	2.5	노주 향과 비슷한 향이 강함. 느끼한 맛. 멍멍함
5	F5-YG6	2.2	느끼한 맛이 강함. 누룩 향이 강함
6	F9-14	2.5	누룩 향이 강하며 느끼한 맛이 끌림
7	F11-G2	2.5	노주 향과 비슷한 향이 강함. 느끼한 맛.
8	F19-R1	3.7	청량감 있고 상큼한 느낌, 맛이 조화로움
9	F21-YG1	2.7	누룩 향이 강하며 느끼한 맛이 끌림
10	F25-YG5	2.6	누룩 향과 유사한 향. 지미가 감함
11	F26-1	2.4	노주 향과 비슷한 향이 강함. 느끼한 맛. 멍멍함
12	F26-2	2.4	노주 향과 비슷한 향이 강함. 느끼한 맛. 멍멍함
13	F32-YG1	2.4	느끼한 맛이 강함. 누룩 향이 강함
14	F32-YG3	2.5	노주 향과 비슷한 향. 느끼한 맛. 멍멍함
15	F33-G3	2.5	노주 향과 비슷한 향. 느끼한 맛. 멍멍함
16	F49-YG1	2.5	노주 향과 비슷한 향. 느끼한 맛. 멍멍함
17	F57-G1	2.9	느끼한 맛이 강함. 누룩 향이 강함
18	N159-1	3.20	짠맛, 지미가 오래 남고 부드럽지만 멍멍함
19	당사 효소제	3.75	맛이 풍부하면서 향이 좋고 조화로움

우수 곰팡이 균주는 당화력, 발효 담금 분석치 및 관능점수로 보았을 때, *Rhizopus microsporus* F19-R1이 월등히 우수하였기에 본 균주를 선별하였다.

2. 1차 선별균주들의 Pilot scale 양조 적성 연구

Lab scale에서 1차 선별된 효모 ReY3-5, ReY29-5, KSD-BH 3개 균주 들 중 가장 양조적성이 좋았던 KSD-BH의 Pilot scale 발효 조건 도출 시험을 진행하였다. 그리고 곰팡이로는 *Rhizopus microsporus* F19-R1를 이용한 배양곡의 Pilot scale 양조 적성 연구를 연구하였다.

가. *Saccharomyces cerevisiae* KSD-BH의 최적 발효조건 도출 Pilot 시험

Saccharomyces cerevisiae KSD-BH의 최적 발효 조건 도출을 위해 담금원료의 제조 및 효모 배양은 다음과 같다. 당화액은 쌀을 증자하여 당사 제조 효소제를 첨가하고 물은 원료 대비 3배수를 가하여 40°C에서 1시간 방치한 후 60°C로 온도를 높여 하룻밤 당화시킨 다음 원심분리하여 맑은 당화액을 회수하여 사용하였다. 당화제는 당사에서 사용 중인 효소제를 활용하였다. 효모 전배양은 YPD배지 5ml을 시험관에 분주하여 면전한 다음 멸균 후 공시균주를 1백금이 접종하여 30°C Rotary Shaker에서 150rpm으로 24시간 배양하였다. 효모 본배양은 쌀 당화액 100ml을 250ml 진탕 삼각Flask에 분주한 후 면전하여 멸균하고, 효모 전배양액 5ml를 접종한 후 30°C Rotary Shaker에서 150rpm으로 24시간 배양한 후 실험에 사용하였다. 효모 배양액의 효모수 측정은 Hemocytometer로 측정하였다. 모든 실험군은 각 3반복 담금을 진행하였고 분석치는 각 시험군의 평균값으로 기록하였다.

(1) 효모 적정 사용량

발효는 25°C Pilot 에서 발효시켰으며 밀술은 2일간, 덧술은 8일간 총 10일간 발효 시켰다. 배합비율은 표 2-8-28, 발효후 숙성 술 덧의 분석치는 표 2-8-29와 같다.

표 2-8-28. 담금 배합 비율

구분	실험구 1		실험구 2		실험구 3		실험구 4		실험구 5	
원료	밀술	덧술	밀술	덧술	밀술	덧술	밀술	덧술	밀술	덧술
쌀(kg)	12	28	12	28	12	28	12	28	12	28
당사 효소제(g)	268		268		268		268		268	
효모 배양액(ml)	160		400		800		1200		1600	
물(ml)	35,840	24,000	35,600	24,000	35,200	24,000	34,800	24,000	34,400	24,000

* 실험구 1. : 밀술 담금 즉시 효모 수 1.0×10^6 /ml
 실험구 2. : 밀술 담금 즉시 효모 수 2.5×10^6 /ml
 실험구 3. : 밀술 담금 즉시 효모 수 5.0×10^6 /ml
 실험구 4. : 밀술 담금 즉시 효모 수 7.5×10^6 /ml
 실험구 5. : 밀술 담금 즉시 효모 수 1.0×10^7 /ml
 효모 배양액의 효모 수 : 3.2×10^8 /ml

표 2-8-29. 효모 사용량에 따른 숙성 술 덧 분석 결과

구분	덧담금 직전 분석치				숙성 술 덧 분석치				
	pH	산도	알코올	R/S	pH	산도	유리A.A	알코올	R/S
실험구 1	3.06	3.8	8.53	36.6	4.24	3.1	1.5	20.45	2이하
실험구 2	3.14	3.4	10.22	15	4.24	3	1.5	20.62	2이하
실험구 3	3.17	3.2	10.47	8.6	4.26	3	1.5	20.64	2이하
실험구 4	3.37	2.9	10.85	2	4.33	2.9	1.5	20.32	2이하
실험구 5	3.42	2.7	11.02	2	4.33	2.9	1.5	20.38	2이하

표 2-8-29에서 나타난 바와 같이 본 실험에서는 밀술 담금 즉시 효모의 수가 $1.0 \times 10^6/\text{ml}$ 이 되어도 최종적으로 정상적인 발효가 진행되었다. 단, $1.0 \times 10^6/\text{ml}$ 농도에서는 밀술 알코올 수치가 다소 낮게 나오는 것으로 보아 대량 생산 현장 적용시에는 $2.5 \times 10^6/\text{ml}$ 가 적정할 것으로 판단된다. 통상적으로 다른 효모를 이용한 대량 생산시 $2 \sim 4 \times 10^7/\text{ml}$ 의 효모 수를 안전발효를 위해 쓰는데, 본 균주를 이용할 때 1/10 정도를 이용해도 발효 안정성이 높아, 생산 및 설비 이용에 용이하여 경제적인 비용절감 효과가 높을 것으로 사료된다.

(2) 밀술 적정 담금수 비율 실험

전 실험에서는 밀술의 담금수 비율이 밀술 원료대비 300%였으나, 담금 즉시 용량이 커서 배양 효모 등 용량 대비 첨가 물료가 증가될 수 있다. 초기 실험에서는 밀술 원료 처리를 죽으로 실시하고, 누룩을 밀술에 전량 투입하기 위하여 밀술 원료에 대하여 급수 비율이 300%가 불가피하였으나, 원료처리를 고두밥으로 하고 당화력이 높은 당화효소제를 사용할 경우 밀술에 대한 담금수 비율을 낮게 할 수 있을 것으로 판단하여 실험하였다. 밀술의 급수비율을 원료대비 150%, 200%, 250%, 300%로 하여 담금 및 발효를 진행하고 덧 담금에서는 밀술에 사용된 담금수량을 포함한 나머지 물을 첨가하였다. 모든 실험군은 각 3반복 담금을 진행하였고 분석치는 각 시험군의 평균값으로 기록하였다.

담금 배합 비율은 표 2-8-30과 같으며 담금 조건과 발효 조건은 이전 실험과 동일하게 실시하였다. 배양 효모 첨가량은 담금 즉시 효모의 수가 $2 \times 10^6/\text{ml}$ 이 되도록 조절하였다. 밀술의 급수 사용량은 효모 배양액을 급수에 포함시켜 계산하였다.

표 2-8-30. 담금 배합 비율

밀술 급수비율	150%		200%		250%		300%	
	밀술	덧술	밀술	덧술	밀술	덧술	밀술	덧술
원료								
쌀(kg)	12	28	12	28	12	28	12	28
당사 효소제(g)	268		268		268		268	
효모 배양액(ml)	200		240		280		320	
물(ml)	17,800	42,000	23,760	36,000	29,720	30,000	35,680	24,000

표 2-8-31. 밀술 적정 담금수 비율 술 덧 분석 결과

분석항목 밀술 급수비율	pH	산도	Alc%	R/S	A.A.
150%	4.25	2.6	19.92	2	1.7
200%	4.22	2.6	19.98	2	1.7
250%	4.24	2.7	20.02	2	1.7
300%	4.23	3.1	20.08	2	1.7

밀술의 급수 비율에 따른 숙성 술 덧의 차이는 극히 미미하였다. 즉, 담금수의 비율을 최종적으로 150%로 최적화 하였다.

(3) 밀술 최적 산도 도출 실험

현 탁약주 제조회사에서 대부분 안전발효를 위하여 백국균을 이용한 입국을 제조하여 술 담금을 행하고 있는 실정이다. 백국균으로 제조한 입국의 특성은 당화효소뿐만 아니라 산을 함유하고 있어 밀술이나 첫 담금 물료의 pH를 낮추어 잡균의 번식을 최대한 억제시켜 안전발효를 유지하고자 실행하고 있다. 본 실험에서는 젖산을 이용하여 밀술의 초기 산도를 조절함으로 발효에 미치는 영향을 살펴보고 최적의 밀술 산도를 도출하고자 한다. pH조절이 아닌 산도로 한 이유는 원료가 가지는 완충력에 의해 pH 조절이 용이하지 않을 뿐만 아니라 pH 조절과정에서 초기에는 고두밥이 물을 흡수하지 않은 상태로 물과 고체가 다소 분리되어 있어 조절이 용이하나, 시간이 경과하면서 고두밥이 물을 흡수하여 pH 조절이 쉽지 아니하였다.

담금 배합 비율은 표 2-8-32과 같으며 담금 조건과 발효 조건은 이전 실험과 동일하게 실시하였다. 배양 효모 첨가량은 담금 즉시 효모의 수가 $2 \times 10^6/\text{ml}$ 이 되도록 조절하였다. 산도 조절은 밀술 담금 즉시 용량 대비로 하여 각 실험구별로 젖산을 계산하여 첨가하였다. 밀술의 담금수는 밀술의 원료 대비 150%로 하였으며, 효모 배양액과 젖산을 포함하였다. 모든 실험군은 각 3반복 담금을 진행하였고 분석치는 각 시험군의 평균값으로 기록하였다.

표 2-8-32. 담금 배합 비율

구분	대조구		실험구 1		실험구 2		실험구 3		실험구 4	
	밀술	덧술	밀술	덧술	밀술	덧술	밀술	덧술	밀술	덧술
쌀(kg)	12	28	12	28	12	28	12	28	12	28
당사 효소제(g)	268		268		268		268		268	
젖산(ml)	0		320ml		480ml		640ml		800ml	
효모 배양액(ml)	200		200		200		200		200	
물(ml)	17,800	42,000	17,480	42,000	17,320	42,000	17,160	42,000	17,000	42,000

실험구 1 : 밀술 담금 즉시 예상 산도 10

실험구 2 : 밀술 담금 즉시 예상 산도 15

실험구 3 : 밀술 담금 즉시 예상 산도 20

실험구 4 : 밀술 담금 즉시 예상 산도 25

표 2-8-33. 밀술 최적 산도 도출 덧 담금 직후 분석 결과

구분	밀술 담금 직후	덧 담금 직후		
	pH	pH	산도	R/S
대조구	6.27	3.74	1.2	4.5
실험구 1	2.65	3.27	5	20
실험구 2	2.42	3.08	6.6	22
실험구 3	2.28	2.91	8.6	24
실험구 4	2.17	2.82	9	26

표 2-8-34. 밀술 최적 산도 도출 덧 담금 숙성 술 덧 분석 결과

구분	덧 담금 직후			덧 담금 숙성 술 덧				
	pH	산도	R/S	pH	산도	Alc%	R/S	A.A.
대조구	3.74	1.2	4.5	4.44	2.9	19.88	2	2
실험구 1	3.27	5	20	3.81	5.2	19.74	2	1.3
실험구 2	3.08	6.6	22	3.64	7.4	19.95	2	1.3
실험구 3	2.91	8.6	24	3.48	9	19.42	2	1.2
실험구 4	2.82	9	26	3.39	10.6	19.4	2	1.0

표 2-8-34에서 보는바와 같이 밀술의 산도가 증가하여도 알코올 생성능은 크게 영향이 없는 것으로 보이나, 좋은 누룩(효소제)와 배양 효모를 적정하게 사용한다면 안전 발효를 유도하기 위해 산 첨가는 무의미한 것으로 사료된다. 다만, 대량 생산하는 주류 제조업에서는 소량 사용하는 것도 바람직하다고 사료된다.

(4) 최적 발효 온도 설정

담금 배합 비율은 표 2-8-35과 같으며 담금 조건과 발효 조건은 이전 실험과 동일하게 실시하였다. 배양 효모 첨가량은 담금 즉시 효모의 수가 $2 \times 10^6/\text{ml}$ 이 되도록 조절하였다. 발효온도는 15°C, 20°C, 25°C로 설정하였다. 모든 실험군은 각 3반복 담금을 진행하였고 분석치는 각 시험군의 평균값으로 기록하였다.

표 2-8-35. 담금 배합비율

구분	밀술	덧술
쌀(kg)	12	28
당사 효소제(g)	268	
효모 배양액(ml)	200	
물(ml)	17,800	42,000

표 2-8-36. 발효온도 15°C의 KSD-BH 표준 발효 프로파일

발효일	산도	Lactic acid	Alc%	R/S	A.A.	효모	유산균
2일	2.15	0.26	5.9	2	0.4	3.1×10^8	5.8×10^4
5일	2.8	0.45	11.8	2	0.5	3.6×10^8	1.0×10^3
7일	3	0.57	14.43	2	0.65	3.6×10^8	4.0×10^3
10일	3.55	0.60	17.29	2	0.9	3.5×10^8	2.7×10^3
12일	3.55	0.56	18.6	2	1.05	3.2×10^8	5.0×10^2
14일	3.6	0.57	19.25	2	1.15	2.5×10^8	9.0×10^1
16일	2.6	0.58	19.78	2	1.15	2.0×10^8	5.5×10^2

표 2-8-37. 발효온도 20°C의 KSD-BH 표준 발효 프로파일

발효일	산도	Lactic acid	Alc%	R/S	A.A.	효모	유산균
2일	2.45	0.41	8.04	2	0.5	3.8×10^8	8.4×10^3
3일	3.25	0.47	12.45	2	0.65	4.4×10^8	1.9×10^4
4일	3.6	0.46	15.35	2	0.9	4.0×10^8	1.2×10^4
5일	3.7	0.49	16.62	2	1	4.6×10^8	2.0×10^4
7일	3.7	0.55	18.86	2	1.15	4.3×10^8	2.1×10^4
8일	3.8	0.48	19.51	2	1.2	4.0×10^8	3.1×10^4

표 2-8-38. 발효 온도 25°C의 KSD-BH 표준 발효 프로파일

발효일	산도	Lactic acid	Alc%	R/S	A.A.	효모	유산균
1일	3.2	0.19	6.51	2	0.5	3.5×10^8	2.0×10^2
2일	3.5	0.19	10.09	2	0.5	3.3×10^8	1.0×10^2
3일	3.55	0.23	13.82	2	0.8	3.2×10^8	1.0×10^2
6일	4.05	0.29	19.15	2	1.5	2.8×10^8	1.0×10^2
7일	3.95	0.3	19.36	2	1.7	1.9×10^8	8.0×10^1
8일	3.43	0.33	20.38	2	1.9	1.4×10^8	5.0×10^1

발효 온도별 표준 발효 프로파일은 위와 같으며 15~25도에서 전반적으로 발효 온도의 스펙트럼이 넓어서 본 균주를 사용하여 대량 생산 적용시 발효의 안정성이 좋고 알코올 수율과 생산성이 높을 것으로 사료된다.

나. *Rhizopus microsporus* F19-R1를 이용한 Pilot-scale 양조적성 시험

선별 곰팡이 F19-R1를 이용한 당화 효소제의 Pilot 규모 대량 생산을 위하여 곡 제조용 밀기울을 멸균하지 아니하고 물을 혼합한 후 증자하여 냉각시킨 후 분리균 곰팡이 액체 전배양액과 추가 물로 접종 혼합하여 자사 당화 효소제 생산현장에서 이용하는 스텐레스 스틸판(Vat)에 분주하여 30°C에서 수분 증발이 되지 않도록 뚜껑을 덮어 3일간 배양한 후 분쇄 및 건조하였다. 본 배양곡의 양조적성 시험 대조구로는 수분을 가하여 삼각 Flask에 넣어 멸균한 밀기울에 멸균수와 액체 배양액을 추가하여 접종하여 실험구와 동일 온도 및 동일 시간으로 배양한 것과 당사 효소제로 하였다. 모든 실험군은 각 3반복 담금을 진행하였고 분석치는 각 시험군의 평균값으로 기록하였다.

표 2-8-39. 멸균 밀기울과 증자 밀기울에 배양한 분리 곰팡이 F19-R1 곡자 당화력 비교

당화 효소제 구분	제조 방법	당화력(sp)
멸균 수수 배양곡	밀기울을 121°C/cm에서 15분간 멸균하여 Flask 순수 배양 곡	1,170
증자 배양곡	밀기울을 100°C 에서 60분간 증자하여 Vat 배양한 곡	600

표 2-8-40. 곰팡이 분리균 F19-R1의 멸균 순수 배양곡과 증자 배양곡의 담금 배합 비율

재료	멸균 순수 배양곡		증자 배양곡	
	밀술	덧술	밀술	덧술
쌀(kg)	12	28	12	28
멸균 순수 배양곡(g)	1,024			
증자 배양곡(g)			2,000	
효모 배양액(ml)	200		200	
물(ml)	18,000	42,000	18,000	42,000

표 2-8-41. 분리 효모 ReY3-5를 활용한 배양곡 숙성 술 덧 분석치 비교

구분	pH	산도	Alc%	R/S	A.A.
멸균 순수 배양곡	4.2	5.1	<u>20.53</u>	2	1.3
증자 배양곡	4.71	4.4	<u>20.33</u>	2	2.1
당사 효소제	4.21	4.3	<u>20.69</u>	2	1.7

표 2-8-42. 분리 효모 ReY29-5를 활용한 배양곡 숙성 술 덧 분석치 비교

구분	pH	산도	Alc%	R/S	A.A.
멸균 순수 배양곡	3.86	5.3	<u>18.89</u>	9	1.0
증자 배양곡	4.92	3.3	<u>18.59</u>	2	1.6
당사 효소제	4.30	4.2	<u>20.7</u>	2	1.3

표 2-8-43. 분리 효모 KSD-BH를 활용한 배양곡 숙성 술 덧 분석치 비교

구분	pH	산도	Alc%	R/S	A.A.
멸균 순수 배양곡	4.12	3.8	<u>20.11</u>	2	1.2
증자 배양곡	4.81	3.3	<u>19.98</u>	2	2.1
당사 효소제	4.4	3	<u>20.67</u>	2	1.8

밀기울을 Flask에 넣어 멸균하여 배양한 순수 배양 곡에 비해 밀기울을 증자하여 Vat에 담 아 배양한 배양 곡은 당화력이 약 50%로 수준으로 낮았다. 하지만 이를 이용한 양조적성 시험 에서 1차 선별된 효모 *Saccharomyces cerevisiae* ReY3-5, ReY29-5, KSD-BH 3개 균주와 함께 담금 시험을 해본 결과 대조군인 당사효소제보다는 다소 발효능이 적었지만 전반적으로 우수한 발효력을 가지고 있었다.

3. 기존 누룩 및 균주 대비 차별성 및 우월성 검증

가. 시판 양조효모 대비 선별된 분리효모의 차별성 및 우월성 검증

본 연구에서 선별된 효모 *Saccharomyces cerevisiae* ReY3-5, ReY29-5, KSD-BH 3개 균주와 시판 양조효모(S사)를 순수 액체 배양(전배양 및 본배양)을 하여 사용하였고, 담금 배합비율은 이전 Lab scale 시험과 동일하게 하였다. 발효온도는 25℃, 밀술은 2일, 덧술은 8일 총 10일간 발효시켰다. 당화효소제는 당사 사용 중인 효소제를 활용하였다. 실험구간의 차이를 최소화하기 위하여 당화 효소제는 5개 실험구에 해당하는 효소량을 추출하여 5등분하여 담금수에 포함시켜 담금하였다. 모든 실험군은 각 3반복 담금을 진행하였고 분석치는 각 시험군의 평균값으로 기록하였다.

표 2-8-44. 시판 양조효모 및 선별된 분리효모의 숙성 술 덧 분석 비교

효모	pH	산도	Alc%	R/S	A.A.
S사 양조효모	4.33	3.8	18.14	22.5	2.9
ReY3-5	4.21	4.3	20.69	2	1.7
ReY29-5	4.30	4.2	20.7	2	1.3
KSD-BH	4.4	3	20.67	2	1.8

표 2-8-45. 효모별의 숙성 술 덧의 관능 비교

효모	관능점수 (5점)	관능 묘사
S사 양조효모	3.2	곡주 향, 쓴맛 있고 지미가 약간 있음 맛 조화도 있으나 약간 느끼함.
ReY3-5	3.7	과실향 풍부, 감칠맛 좋음, 신맛, 후미에 쓴맛이 다소 남음
ReY29-5	3.2	향이 조금 약함, 쓴맛이 약간 오래 남음
KSD-BH	4.2	단내, 과실향 풍부, 감칠맛도 좋고 깔끔하고 부드러움 맛 조화도 우수

표 2-8-46. 시판 양조효모 및 선별된 분리효모의 발효 경과 일수에 따른 효모 생균수의 변화

발효일	S사 양조효모	ReY3-5	ReY29-5	KSD-BH
1일	3.8×10^8	3.4×10^8	3.3×10^8	3.5×10^8
2일	2.7×10^8	3.3×10^8	3.3×10^8	3.3×10^8
3일	2.0×10^6	3.0×10^8	3.0×10^8	3.2×10^8
6일	1.5×10^5	1.4×10^8	2.5×10^8	2.8×10^8
7일	7.0×10^3	1.5×10^7	1.3×10^7	1.9×10^8
8일	1.4×10^3	1.0×10^7	9.0×10^6	1.4×10^8

앞서, 1차 선별된 분리효모 ReY3-5, ReY29-5 및 KSD-BH는 S사 시판 양조효모에 비하여 알코올 생성능이 우수하고, 효모의 사멸율이 낮고 관능적으로도 비슷하거나 월등히 높은 관능 점수를 보였다. 그리고 느끼한 맛을 기준이 될 수 있는 아미노산도(A.A.)의 생성이 낮아 깔끔한 맛을 내는 주류를 제조할 수 있는 효모로 적합하다고 사료된다.

나. 시판 누룩 대비 선별된 곰팡이를 이용한 제조 배양곡의 차별성 및 우월성 검증

앞서 선별된 *Rhizopus microsporus* F19-R1의 배양곡과 시판 누룩과의 차별성 및 우월성 검증을 위하여 비교 균주로 한국식품연구원에서 제공받은 *Aspergillus oryzae* N159-1도 동일한 방법으로 배양곡을 만들었다. 또한 대조구로 시판누룩인 J사 누룩과 당사 효소제를 이용했다.

술 담금은 본 연구과제의 표 2-8-47의 배합비율로 하였고, 함께 이용한 효모는 1차 선별된 효모 ReY3-5, ReY29-5 및 KSD-BH를 배양하여 사용하였다. 사용한 배양곡의 사용량은 총 당 화력이 동일하게 조절하였다. 모든 실험군은 각 3반복 담금을 진행하였고 분석치는 각 시험군의 평균값으로 기록하였다.

표 2-8-47. 담금 배합비율

효소제 구분	J사 누룩		F19-R1 배양곡		N159-1 배양곡		당사 효소제	
원료	밀술	덧술	밀술	덧술	밀술	덧술	밀술	덧술
쌀	300g	700g	300g	700g	300g	700g	300g	700g
J사 누룩	100g							
F19-R1 배양곡			25.6g					
N159-1 배양곡					21.4g			
당사 효소제							6.7g	
효모 배양액			5ml		5ml		5ml	
물	450ml	1,050ml	445ml	1,050ml	445ml	1,050ml	445ml	1,050ml

표 2-8-48. 효모 ReY3-5를 활용한 발효제의 숙성 술 덧 분석치 및 관능검사

시험군	pH	산도	Alc%	R/S	A.A.
J사 누룩	4.3	5.5	16.74	13.4	3.7
F19-R1 배양곡	4.2	5.1	20.53	2	1.3
N159-1 배양곡	4.32	4.0	18.45	2	2.9
당사 효소제	4.21	4.3	20.69	2	1.7
시험군	관능점수 (5점)	관능 묘사			
J사 누룩	3.0	곡주향, 쓴맛있고 지미가 있으며, 다소 느끼함			
F19-R1 배양곡	3.6	과실취 풍부, 감칠맛 풍부, 깔끔하고 부드러움			
N159-1 배양곡	3.0	곡주향, 쓴맛있고 지미가 있으며, 후미가 멍멍함			
당사 효소제	3.4	단내, 과실취 약간, 감칠맛은 양호하나, 후미에 쓴맛			

표 2-8-49. 효모 ReY29-5를 활용한 발효제의 숙성 술 덧 분석치 및 관능검사

시험군	pH	산도	Alc%	R/S	A.A.
J사 누룩	4.3	5.5	16.74	13.4	3.7
F19-R1 배양곡	3.86	5.3	18.89	9	1.0
N159-1 배양곡	4.23	4.1	18.54	10.2	2.9
당사 효소제	4.30	4.2	20.70	2	1.3
시험군	관능점수 (5점)	관능 묘사			
J사 누룩	3.0	곡주향, 쓴맛있고 지미가 있으며, 다소 느끼함			
F19-R1 배양곡	3.1	청량감과 상큼한 느낌, 과실향 약함. 감칠맛 다소 약함			
N159-1 배양곡	3.2	짠맛, 곡주맛이 오래 남고 조화도 있지만 느끼함			
당사 효소제	3.4	쓴맛 약간, 끝맛은 깔끔하나 향이 단조로움			

표 2-8-50. 효모 KSD-BH를 활용한 발효제의 숙성 술 덧 분석치 및 관능검사

시험군	pH	산도	Alc%	R/S	A.A.
J사 누룩	4.3	5.5	16.74	13.4	3.7
F19-R1 배양곡	4.12	3.8	20.11	2	1.2
N159-1 배양곡	4.52	2.6	18.72	2	3.1
당사 효소제	4.4	3	20.67	2	1.8
시험군	관능점수 (5점)	관능 묘사			
J사 누룩	3.0	곡주향, 쓴맛있고 지미가 있으며, 다소 느끼함			
F19-R1 배양곡	3.7	청량감과 과일향이 풍부하고 상큼한 느낌, 맛이 조화로움			
N159-1 배양곡	3.2	짠맛, 지미가 오래 남고 부드럽지만 멍멍함			
당사 효소제	3.8	맛과 과일향이 풍부하면서 복합적인 맛이 조화로움			

위 시험 결과 선별된 F19-R1 곰팡이로 제조한 배양곡과 1차선별 효모 ReY3-5, ReY29-5 및 KSD-BH으로 발효시킨 시험군의 알코올 생성능 및 관능점수는 당사 효소제를 이용한 대조군과 함께 상대적으로 가장 우수한 양조 적성을 가지는 것을 보였다.

또한 앞서 선별된 효모 3균주 중 F19-R1 배양곡과 양조 적성이 상대적 좋지 않은 ReY29-5를 제외한 ReY3-5와 KSD-BH 2균주를 가지고 F19-R1 배양곡과 함께 추가 담금 시험을 진행하였다. 좀 더 복합적인 비교 시험을 위해 효모 ReY3-5와 KSD-BH의 각 분리원인 오메기곡 및 백수환동주곡도 대조군으로 추가하여 각 효모 순수 배양액을 이용하여 시판 J사 누룩, 오메기곡, 백수환동주곡, F19-R1 효소제 및 당사 효소제를 사용하여 표 2-8-51와 같은 담금 배합비율로 술 담금을 하여 숙성 술 덧의 일반 성분 분석과 관능 평가를 실시하였다. 모든 실험군은 각 3반복 담금을 진행하였고 분석치는 각 시험군의 평균값으로 기록하였다.

표 2-8-51. 담금 배합 비율

구분	J사 누룩		재현누룩 (오메기곡/백수환동주곡)		F19-R1 배양곡		당사 효소제	
	밑술	덧술	밑술	덧술	밑술	덧술	밑술	덧술
원료 쌀	300g	700g	300g	700g	300g	700g	300g	700g
J사 누룩	100g							
오메기곡/ 백수환동주곡			100g					
F19-R1 배양곡					50g			
당사 효소제							6.7g	
효모 배양액 (ReY3-5/KSD-BH)	5ml		5ml		5ml		5ml	
물	445ml	1,050ml	445ml	1,050ml	445ml	1,050ml	445ml	1,050ml

표 2-8-52. 분리효모 ReY3-5의 당화 효소제 종류에 따른 숙성 술덧 일반 성분 분석 및 관능비교

구분	pH	산도	Alc%	R/S	A.A.
시판 J사 곡자	4.58	4.8	19.58	2	3.2
오메기곡	4.38	5.4	19.78	2	2.8
F19-R1 배양곡	4.71	4.4	20.33	2	2.1
당사 효소제	4.21	4.3	20.69	2	1.7
구분	관능점수 (5점)	관능 묘사			
시판 J사 곡자	3.0	곡주 향, 쓴맛 있고 지미가 있으며, 느끼함			
오메기곡	3.0	독특한 사과향이 조금 약함, 신맛, 쓴맛 오래 남음			
F19-R1 배양곡	3.8	과실취 풍부, 감칠맛 풍부, 깔끔하고 부드러움			
당사 효소제	3.2	단내, 과실취 약간, 감칠맛은 양호하나, 후미에 쓴맛이 남음			

표 2-8-53. 분리효모 KSD-BH의 당화 효소제 종류에 따른 숙성 술덧 일반 성분 분석 및 관능비교

구분	pH	산도	Alc%	R/S	A.A.
시판 J사 곡자	4.58	3.8	19.98	2	4.2
백수환동주곡	4.78	3.5	20.12	2	3.8
F19-R1 배양곡	4.81	3.3	20.24	2	2.1
당사 효소제	4.4	3	20.67	2	1.8
구분	관능점수 (5점)	관능 묘사			
시판 J사 곡자	2.8	곡주 향과 약간의 과실향, 쓴맛있고 지미가 있으며, 느끼함			
백수환동주곡	3.2	누룩의 곡취가 과실향을 일부 덮어버림. 누룩맛이 후미에 남고 지미 있음. 떫은 맛이 다소 남음			
F19-R1 배양곡	3.7	청량감 있고 상큼한 느낌, 맛이 조화로우음			
당사 효소제	3.8	맛이 풍부하면서 과실향이 좋고 조화로우음			

4. 우수 유용 균주 선별

앞서 Lab & Pilot scale 양조적성 연구 및 시판 및 기존 누룩&균주와의 비교 연구를 통해서 최종적으로 효모 2균주 (*Saccharomyces cerevisiae* KSD-BH & ReY3-5), 곰팡이 1균주 (*Rhizopus microsporus* F19-R1)를 선별하였다. 특히 KSD-BH는 저 아미노산도 발효가 가능하여 양조용 쌀을 고도 도정하지 않고도 깔끔한 주질을 구현할 수 있어 경제적으로 큰 장점을 지닐 수 있고, 술 발효 시 사멸율이 낮고 발효 비율이 높으며, 발효 온도의 스펙트럼이 넓어 알코올 발효 시 발생하는 발효열을 냉각수로 낮춰 줄 필요가 적기 때문에 발효 시 공정 비용이 적게 들며, 발효의 안정성이 유지되어 알코올 수율과 생산성을 높일 수 있다. 그리고 오메기곡에서 분리한 효모 ReY3-5와 당화효소를 분비하는 곰팡이 F19-R1의 밀기울 배양곡의 조합은 당사의 당화효소제를 사용하여 발효시킨 숙성 술 덧에 비하여 관능적으로 우수한 것으로 평가되어 두 균주간의 복합적인 발효제 조합이 좋을 것으로 사료된다.

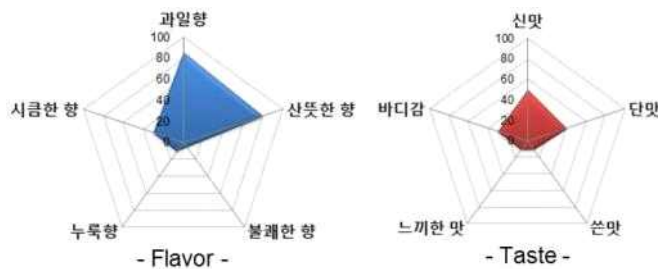
5. 우수 양조 적성 균주 적용 제품 개발

가. *Saccharomyces cerevisiae* KSD-YC 효모 적용 신제품 개발 및 출시

(주) 국순당에서는 기존 누룩에서 양조적합성이 뛰어난 효모 *Saccharomyces cerevisiae* KSD-YC를 분리하여 본 과제 1차년도에 유전체 분석을 진행하였고, 3차년도에 이를 적용한 신제품을 개발하여 출시하였다. KSD-YC는 기존 양조에 사용되고 있던 효모에 비하여 알코올 발효능이 우수하고, 발효 중 유기산과 아미노산 생성이 기존 양조효모 대비 50% 이상 낮아 술맛이 깔끔하다. 또한, 휘발성 에스테르 계열 물질 생성이 높아 산뜻한 과실향을 내는 것이 특징적이다. 이러한 특징은 깔끔한 술맛을 위해 쌀을 많이 도정하지 않아도 되어 경제적인 이점도 지니고 있다. (주)국순당에서는 깔끔한 술맛의 특징을 살릴 수 있는 양조효모(*Saccharomyces cerevisiae* KSD-YC)를 이용해 효모의 배양 조건, 발효 중 원료 배합 비율 등 최적 발효 조건을 탐색하였다. 그 결과 약주임에도 누룩취가 없으면서 산뜻한 향이 감돌아 목넘김이 좋고 뒷맛까지 깔끔한 제품(“잔”)을 개발하여 출시하였다.

- 산뜻한 과실향과 깔끔한 목넘김이 조화로워 편안한 술자리에 어울림이 좋은 술
- SPEC : Alc. 12.5%, 살균약주, 유통기한 2년
- 재료 : 쌀, 전분, 포도당, 주정, 산초, 효모(KSD-YC), 구연산, 액상과당

식품(식품첨가물) 품질재조보고서	
부호	2019년 11월 19일
주요 품명	산뜻한 향이 감돌아 편안한 술
품질재조	국순당
품질재조 목적	품질재조 목적
품질재조 대상	산뜻한 향이 감돌아 편안한 술
품질재조 방법	품질재조 방법
품질재조 결과	품질재조 결과
품질재조 결론	품질재조 결론
품질재조 비고	품질재조 비고



산뜻한 향에 목넘김이 좋고 뒷맛까지 깔끔한... “잔”



그림 2-8-1. “잔” 제품 개발

< “잔” 관능 및 소비자 조사 평가 >

훈련된 25명의 패널을 선정하여 향과 맛, 전체 품질 등의 검사 항목으로 5점 척도법을 이용하여 블라인드 테스트로 시료의 품질을 평가하였다. 잔과 비교한 경쟁 주류는 동가의 L사의 C 제품이며, 패널 관능 평가 결과, 향과 맛 모두 경쟁 제품보다 좋게 평가 되었다. 특히 향의 상대적 평가가 월등히 높아 *Saccharomyces cerevisiae* KSD-YC를 이용한 발효에서 유래되는 특징적인 과실향의 기호가 높은 것을 검증할 수 있었다.

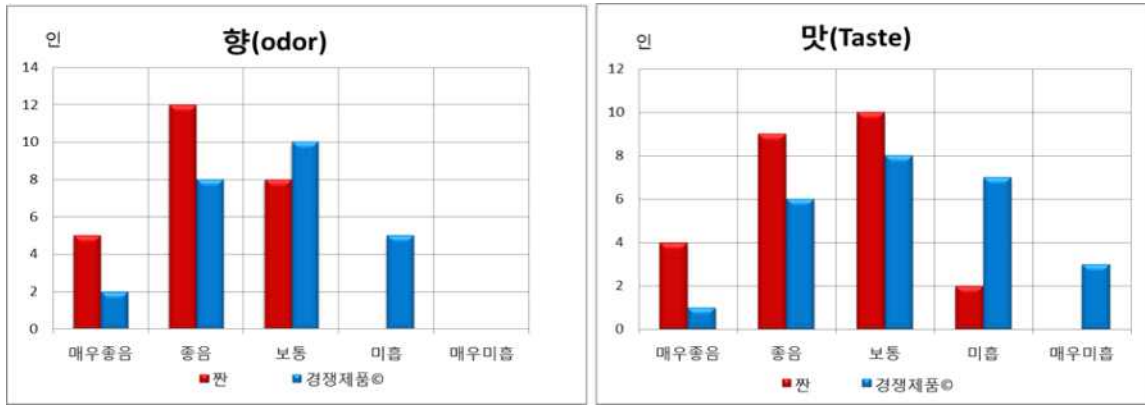


그림 2-8-2. “짠” 소비자 기호도 평가

소비자 기호도 조사는 국순당 직영 전통주 전문 주점에서 성인 남녀 80명을 대상으로 제품 선호도 및 구매의사를 조사하였다.

- 선호도: 5점(매우 좋음), 4점(좋음), 3점(보통), 2점(좋지 않음), 1점(매우 좋지 않음)
- 구매의사: 5점(꼭 구입할 것이다), 4점(구입할 것이다), 3점(구입 할 수도 안할 수도 있다), 2점(구입하지 않을 것이다), 1점(절대 구입하지 않을 것이다)

소비자 조사 결과, 신제품 짠에 대한 전체 선호도는 4.02 ± 0.4 로 나타났고 전체 구매 의사는 3.78 ± 0.5 로 나타났다. 남성 또는 여성 소비자를 연령층으로 구별하여 분석한 결과, 20~30대 여성의 신제품 짠에 대한 선호도 및 구매의사가 다른 연령층에 비해 높게 나타났다. 그 이유는 제품의 과실향과 상큼하고 깔끔한 뒷맛이 젊은 여성의 기호에 적합한 것으로 생각된다. 구매 의사의 경우, 20~30대 남성이 다른 연령층에 비해 높게 나타났고 그 이유는 새로운 술에 대한 젊은 층의 수용도가 높은 것으로 보인다(표 2-8-54).

표 2-8-54. “짠” 소비자 성별/연령별 선호도 및 구매의사

구분	남성				여성				전체
	20~30대	30~40대	40~50대	50대 이상	20~30대	30~40대	40~50대	50대 이상	
선호도	4.02 ± 0.4	4.00 ± 0.3	4.03 ± 0.4	3.70 ± 0.7	4.31 ± 0.5	4.18 ± 0.5	4.10 ± 0.4	3.80 ± 0.2	4.02 ± 0.4
구매의사	4.01 ± 0.5	3.88 ± 0.6	3.70 ± 0.5	3.55 ± 0.4	4.00 ± 0.4	3.80 ± 0.4	3.74 ± 0.5	3.50 ± 0.6	3.78 ± 0.5

6. 제형화 종균 효모를 이용한 신제품 개발

가. 종균 효모 KSD-YC 및 KSD-BH의 양조 특성 규명

(1) 알코올 내성 평가

일반적으로 일정 농도 이상의 알코올 농도에서는 효모의 생육이 저해되어 양조 발효 시 알코올 생성에 부정적인 영향을 미친다. 따라서 알코올에 대한 내성을 갖는 것이 양조효모로서 적합하다.

S. cer. KSD-YC 및 KSD-BH에 대한 알코올 내성을 평가하였다. 먼저 배양된 대수기의 효모를 알코올이 각각 1, 5, 10, 15%(v/v)의 농도로 함유된 YPD(Dextrose 2%, Bacto peptone 1%, Yeast extract 1%) 배지 30mL에 초기 균수 1.0E+05 cells/mL의 농도로 접종한 후, 30°C, 150rpm의 조건으로 24시간 배양한 뒤 배양액을 채취하여 희석한 후 600nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정 결과 알코올 5%의 농도로 첨가한 배지에서는 효모 생육은 전반적으로 양호하였으며, 특히 *S. cer.* KSD-YC는 다른 균주들에 비해 18~42% 더 높은 내성을 보였다. 알코올 10%의 농도로 첨가한 배지에서는 *S. cer.* KSD-BH가 가장 높은 알코올 내성으로 나타나 비교 균주로 사용된 다른 효모에 비해 *S. cer.* KSD-YC와 KSD-BH는 알코올 내성이 우수한 것으로 확인되었다(표 2-8-55)

표 2-8-55. 알코올 내성 평가

Yeast strain	Alcohol Tolerance (OD ₆₀₀)			
	1%	5%	10%	15%
<i>S. cer.</i> KSD-YC	4.03	8.40	0.23	0.03
<i>S. cer.</i> KSD-BH	3.34	8.03	0.42	0.01
비교균주 <i>S. cer.</i> S1	3.34	7.14	0.20	0.00
비교균주 <i>S. cer.</i> S1	3.13	5.96	0.05	0.00
비교균주 <i>S. cer.</i> S1	3.27	5.92	0.04	0.00

(2) 당 내성 평가

양조효모는 고농도의 당(糖)에서 생육하면서 알코올 발효를 할 수 있어야 발효비율 측면에서 유리하다. 그러므로 *S. cer.* KSD-YC 및 KSD-BH에 대한 당 내성(Glucose tolerance)를 평가하였다. 먼저, 배양된 대수기의 효모를 포도당이 각각 2, 10, 30, 40%(w/v)의 농도로 함유된 YPD 배지에 초기 균수 1.0E+05 cells/mL의 농도로 각각 접종한 후 30°C, 150rpm 조건에서 배양하였다. 배양 48시간 경과 후 배양액을 채취하여 적당히 희석한 후 600nm에서 흡광도를 측정하였다. 대부분의 효모 균주들은 대체적으로 포도당이 20% 첨가된 배지에서 양호한 생육을 보였다. 특히, *S. cer.* KSD-YC는 다른 균주에 비해 19~44% 높은 당 내성을 보였다(표 2-8-56).

표 2-8-56. 당 내성 평가

Yeast strain	Glucose Tolerance (OD ₆₀₀)				
	2%	10%	20%	30%	40%
<i>S. cer.</i> KSD-YC	5.86	12.77	14.12	12.11	9.19
<i>S. cer.</i> KSD-BH	4.91	11.57	13.61	11.02	8.14
비교균주 <i>S. cer.</i> S1	4.52	11.05	11.82	11.83	8.52
비교균주 <i>S. cer.</i> S1	5.29	8.48	10.14	9.39	5.92
비교균주 <i>S. cer.</i> S1	4.35	7.77	9.82	8.85	5.85

(3) 온도별 양조발효 특성 규명

S. cer. KSD-YC 및 KSD-BH에 대한 양조학적 특성을 평가하기 위해 쌀을 주원료로 하여 담금 후 온도별로 발효를 진행하였다. 쌀 900g, 물 1,350mL, 개량누룩 8.6g(당사)에 1단 담금 직후 술덧 mL 당 6.5E+07 cells/mL의 농도가 되게끔 배양된 효모를 각각 혼합한 뒤 15°C, 20°C 및 25°C 조건에서 1일간 발효하였다. 발효 후 쌀 2,100g, 물 3,150mL 및 개량누룩 20.1g을 추가로 첨가하여 2단 담금하고 각 15°C, 20°C 및 25°C 조건으로 2단 발효하였다. 1단과 2단 발효 시 온도는 동일하게 하였다. 발효 온도에 따른 이화학적 분석을 진행하였으며, 분석 항목은 발효 술덧 총산(total acid) 함량, 알코올 농도 및 발효 비율을 평가하였다. 발효 비율은 아래의 식에 의거하여 계산하였다.

$$\begin{aligned} \text{발효 비율 (\%)} &= \frac{\text{실제 알코올 생성량 (L)}}{\text{이론 알코올 생성량 (L)}} \times 100 \\ &= \frac{\text{숙성 술덧량 (L)} \times \text{실제 발효 알코올 농도 (\%)}}{\text{쌀 사용량 (kg)} \times \text{쌀 알코올 환산계수 (0.715)} \times \text{쌀 전분가 (78)}} \times 100 \end{aligned}$$

평가 결과, *S. cer.* KSD-YC는 다른 효모에 비해 발효물인 술의 총산도 낮아, 양조용 쌀을 고도 도정하지 않고도 부드럽고 깔끔한 주질을 구현할 수 있는 것으로 판단되었다(표 2-8-57). 또한 고농도로 알코올이 생성되고 발효 비율이 높았다. 특히, 15°C 저온 조건에서 다른 효모에 비해 생성되는 알코올 농도가 높고 효모 사멸율은 낮은 것으로 확인되었다(표 2-8-58).

표 2-8-57. 쌀을 원료로 한 발효 온도별 술 발효 시 총산 변화

(1) 25°C 발효						
발효일	<i>S. cer.</i> KSD-YC	<i>S. cer.</i> KSD-BH	비교균주 <i>S. cer.</i> S1	비교균주 <i>S. cer.</i> S2	비교균주 <i>S. cer.</i> S3	
1	0.216	0.216	0.198	0.252	0.216	
2	0.168	0.192	0.210	0.210	0.192	
3	0.180	0.213	0.258	0.255	0.213	
4	0.174	0.221	0.270	0.258	0.225	
5	0.177	0.228	0.282	0.252	0.234	
6	0.174	0.237	0.297	0.252	0.240	
7	0.168	0.204	0.294	0.246	0.237	
(2) 20°C 발효						
발효일	<i>S. cer.</i> KSD-YC	<i>S. cer.</i> KSD-BH	비교균주 <i>S. cer.</i> S1	비교균주 <i>S. cer.</i> S2	비교균주 <i>S. cer.</i> S3	
1	0.162	0.168	0.150	0.189	0.168	
2	0.117	0.147	0.117	0.144	0.150	
3	0.150	0.198	0.240	0.240	0.213	
4	0.159	0.210	0.252	0.225	0.222	
5	0.168	0.222	0.267	0.234	0.228	
6	0.168	0.222	0.279	0.231	0.232	
7	0.165	0.222	0.291	0.228	0.225	
8	0.165	0.228	0.282	0.222	0.222	

(3) 15℃ 발효

발효일	<i>S. cer.</i> KSD-YC	<i>S. cer.</i> KSD-BH	비교균주 <i>S. cer.</i> S1	비교균주 <i>S. cer.</i> S2	비교균주 <i>S. cer.</i> S3
2	0.114	0.129	0.108	0.120	0.120
5	0.138	0.168	0.174	0.177	0.168
7	0.150	0.180	0.204	0.204	0.198
10	0.159	0.213	0.243	0.246	0.222
12	0.144	0.207	0.240	0.237	0.222
14	0.141	0.216	0.246	0.243	0.228
16	0.150	0.216	0.249	0.246	0.231

표 2-8-58. 쌀을 원료로 한 발효 온도별 최종 알코올 농도와 발효비율 비교

발효 온도	총 발효일	<i>S. cer.</i> KSD-YC		<i>S. cer.</i> KSD-BH		비교균주 <i>S. cer.</i> S1		비교균주 <i>S. cer.</i> S2		비교균주 <i>S. cer.</i> S3	
		알코올 (%)	발효 비율(%)	알코올 (%)	발효 비율(%)	알코올 (%)	발효 비율(%)	알코올 (%)	발효 비율(%)	알코올 (%)	발효 비율(%)
25℃	7일	18.98	85.1	20.38	91.4	18.46	82.8	18.11	81.2	18.14	81.3
20℃	8일	19.57	87.7	19.95	89.4	18.42	82.6	18.27	81.9	18.36	82.3
15℃	16일	20.12	90.2	19.78	88.7	19.54	87.6	19.67	88.2	19.33	86.7

(4) 관능 특성 평가

쌀을 주원료로 하여 20℃에서 발효 및 제조된 양조효모별 최종 발효 술덧에 대한 관능 검사를 실시하였다. 먼저 훈련된 검사 요원 15명을 선발하고 9점 척도법(1-좋지 않다, 3-좋지 않은 편이다, 5-보통이다, 7-좋은 편이다, 9-좋다)을 통해 맛과 향 및 전체적인 선호도를 조사하였다. 평가 결과 *S. cer.* KSD-YC가 향, 맛 및 기호도 측면에서 유사 내지는 높은 것으로 평가되었다(표 2-8-59). 따라서 *S. cer.* KSD-YC를 이용하여 양조할 경우 맛과 향 등 관능적으로 우수한 주질을 부여할 수 있을 것으로 판단되었다.

표 2-8-59. 양조효모 별 20℃ 최종 발효 술덧에 대한 관능 검사 결과

평가항목	<i>S. cer.</i> KSD-YC	<i>S. cer.</i> KSD-BH	비교균주 <i>S. cer.</i> S1	비교균주 <i>S. cer.</i> S2	비교균주 <i>S. cer.</i> S3
향	8.12	7.35	5.95	5.21	6.85
맛	7.15	6.95	5.62	5.85	6.91
기호도	7.61	7.12	5.75	5.50	6.70

나. 목적 주질을 위한 최적 레시피 도출 및 최적 발효조건 확립

깔끔하고 산뜻한 맛과 향을 좋아하는 젊은 소비자들에게 입맛을 사로잡아 침체된 전통주를 부활에 부합하고자 선별된 효모 *S. cer.* KSD-YC를 이용하여 쌀, 옥수수전분, 포도당을 원료로 하여 최적 레시피를 도출하였다. 이 때 식물 부원료로 비수리(야관문)를 사용하여 향긋한 과실 풍미와 약재 특유의 쌉싸름과 부드러운 목넘김을 구현하였다.

다. Pilot scale 에서의 시제품 생산 및 제조 공정 확립

실험실에서 구축된 레시피 및 공정을 바탕으로 Large scale에서 시제품 담금 및 생산을 수행하였다. 시험 생산은 강원도 횡성군 둔내면에 소재한 (주)국순당 횡성공장 내 있는 pilot plant에서 진행하였다. 시험 생산에 대한 모식도는 그림 2-8-3과 같다.

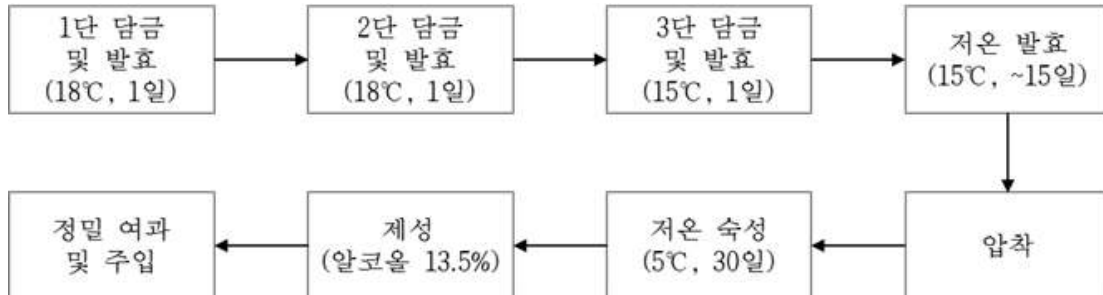


그림 2-8-3. *S. cerevisiae* KSD-YC를 이용한 시제품 제조 공정 모식도

(1) *S. cerevisiae*. KSD-YC 확대 배양 생산 및 평가

대량 담금 시 제형화된 효모 종균을 확대 배양 생산 가능성을 검토하고자 100L fermentor를 이용하여 *S. cerevisiae* KSD-YC를 확대 배양 생산하였다. 이 때 확대 배양 배지는 질소원으로는 밀누룩 5%로 하였으며 탄소원으로는 함수결정포도당 10%로 하여 물에 용해 후 멸균하였다. 접종에 사용된 효모 Seed 제형화된 상태로 사용하였으며 접종량은 접종 직후 1.0E+07 cell/mL의 농도가 되게끔 접종한 뒤 30°C, 1vvm, 100rpm의 조건으로 24시간 Batch type으로 배양하였다. 배양 결과는 그림 2-8-4과 같다. 배양 결과 효모의 농도는 9.13E+08 cfu/mL로 고농도의 효모를 얻을 수 있었다.

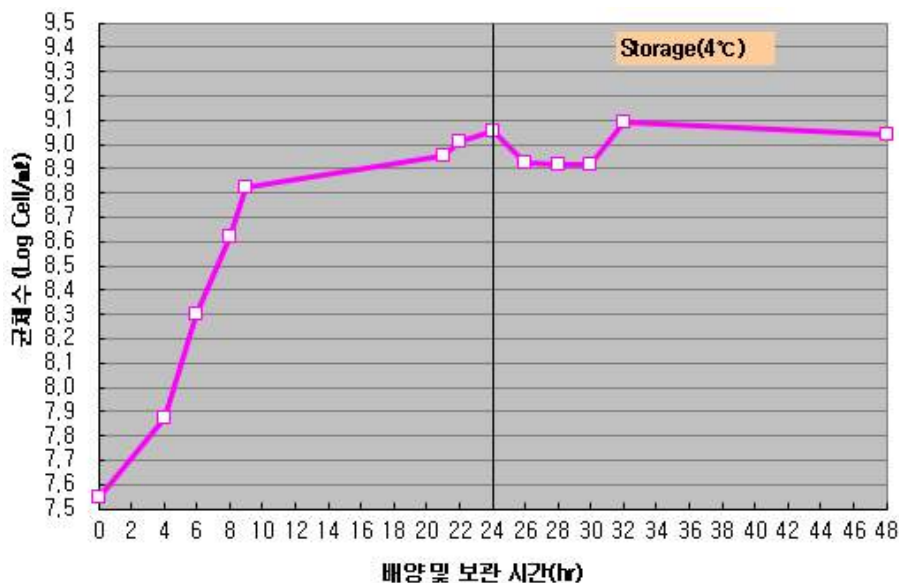


그림 2-8-4. 배양 시간에 따른 *S. cerevisiae* KSD-YC 효모 대량 배양 결과

(2) 담금, 발효 및 시험 생산

담금 및 발효는 온도 조절이 가능한 Jacket type의 200L Pilot tank를 이용하였으며 담금량은 총 용량 대비 80% 수준으로 하였다. 양조용수의 온도는 각 발효 온도와 같은 조건으로 준비하여 사용하였다. Pilot scale에서의 발효 시간에 따른 발효 패턴은 표 2-8-59과 같다.

표 2-8-59. *S. cerevisiae* KSD-YC를 이용한 시제품 발효패턴

발효일수	발효온도 (°C)	알코올 (% v/v)	총산 (% w/v)	환원당 (g/L)	효모 (cfu/mL)
0일_1단 담금 직후	23.1	0.00	0.02	7.8	2.9E+07
1일_2단 담금 직전	23.0	4.06	0.13	13.0	3.3E+08
1일_2단 담금 직후	18.0	2.42	0.05	82.0	1.9E+08
2일_3단 담금 직전	18.0	6.73	0.10	26.4	3.2E+08
2일_3단 담금 직후	18.0	5.35	0.07	78.0	3.0E+08
3일	18.1	8.95	0.10	30.3	3.0E+08
4일	18.1	11.76	0.13	2.2	3.5E+08
5일	15.1	12.55	0.12	3.5	2.5E+08
6일	14.9	13.08	0.12	0.6	3.3E+08
7일	15.0	13.82	0.13	2.4	2.6E+08
8일	15.1	14.28	0.13	2.0	4.2E+08
9일	15.0	14.68	0.14	0.8	4.6E+08
10일	15.1	15.33	0.14	1.8	4.0E+08
11일	15.1	15.83	0.14	1.3	3.8E+08
12일	15.0	15.95	0.14	0.6	3.5E+08
13일	15.1	16.61	0.15	1.0	3.5E+08
14일	15.1	16.65	0.14	1.0	3.3E+08
15일	15.1	17.06	0.14	1.0	3.8E+08

라. 소비자 관능 평가 및 조사

발효가 완료된 발효술덧을 압착 및 여과 한 후 알코올 13.5%가 되도록 제성하여 375mL 유리 용기에 주입 밀봉하여 시제품을 제조하였다. 제성한 시제품은 알코올 13.5%, 산도 3.5 (총산 0.21%), 환원당 27 g/L 였다. 생산된 시제품을 이용하여 맛과 향에 대한 관능 평가를 진행하였다. 관능에 참여한 응답자는 20대에서 50대까지의 남녀를 대상으로 하였으며, 응답자의 성별은 남성과 여성이 각각 47%, 53%였으며 연령은 20대가 13%, 30대가 60%, 40대가 20%, 50대 이상이 7%였다. 관능 평가에 대한 결과는 그림 2-8-5과 같다. 전반적으로 맛과 향에서 긍정적인 응답을 얻었다. 향에서는 과일향과 산뜻한 향을 긍정적으로 평가하였고 맛은 산미가 있으나 부드럽고 깔끔하다고 평가되었다.

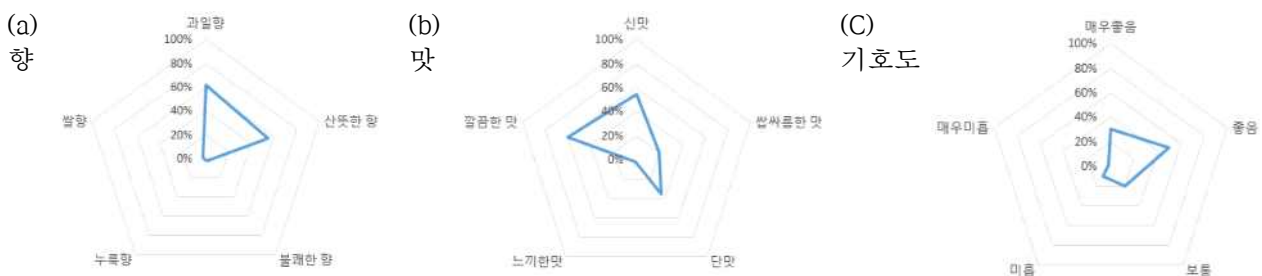


그림 2-8-5. *S. cerevisiae* KSD-YC를 이용한 시제품 관능 평가

마. 제품 안정성 및 유통기한 평가

S. cerevisiae KSD-YC를 이용한 발효 풍미 및 부원료로 사용된 비수리(야관문)의 신선한 맛과 향을 살리기 위해 신제품은 “약주”로 설계하였으며 10℃ 이하 냉장 유통 기간을 설정하기 위해 유리병에 주입한 최종 제품(375mL)을 5℃, 10℃, 15℃ 항온항습기에 저장한 뒤 약 1개월 간격으로 9회 분석 및 평가하였다. 각 품질지표와 품질한계는 각 표 2-8-60, 61과 같다. 각 온도별 분석 결과는 표 2-8-62, 63, 64과 같다.

각 온도별 품질 지표 평가 결과, 알코올, 총산의 변화는 거의 없고 진균수는 시간이 경과함에 따라 감소하고 세균수 및 탁도는 조금 상승하는 것으로 나타났으나 저장 기간 중 품질 기준은 초과하지 않았다. 따라서 품질 지표 중 가장 먼저 한계점에 도달한 관능을 통해 유통기한을 산출하였고 그 결과 유통기한은 10℃에서 248일, 15℃에서 181일로 나타났다. 10℃ 이하 냉장 유통 중 안전을 고려하여 비교 온도 15℃에서 유통기간을 참조하여 안전계수 0.73 (=181/248)을 곱하여 유통 기한을 약 181일 즉, 6개월로 설정하였다.

표 2-8-60. 유통기한 평가 품질지표

구분	품질지표	실험방법
이화학적 분석	총산, 알코올, 탁도	국세청 주류분석 규정
미생물 분석	진균수, 세균수	국세청 주류분석 규정
관능 평가	기호도 척도법	식품의 유통기한 설정 실험 가이드라인 IV. 유통기한 설정을 위한 관능검사 가이드라인

표 2-8-61. 품질한계 지표

품질지표	품질한계	근거
알코올	표시도수 -0.5이상 표시도수 +1.0이상	주세법 기준
총산(w/v%)	0.7 이하	주세법 기준
탁도(EBC)	18이하	주세법 기준
관능	5점 이상(9점 척도)	식품공전 정상시험법 5점 척도 중 3점 이상 적합인 것에 따라 9점 척도 5점 이상을 적합이 것으로 설정

표 2-8-62. 5℃ 저장성 평가 결과

저장 기간 (일)	알코올	총산	진균수	세균수	탁도	관능
0	13.52	0.21	1.3E+03	2.0E+03	0.08	9.0
28	13.53	0.21	1.0E+03	2.0E+03	0.08	8.9
56	13.52	0.20	1.1E+03	3.5E+03	0.07	8.6
88	13.50	0.21	1.3E+03	4.0E+03	0.09	8.5
117	13.52	0.21	9.0E+02	5.0E+03	0.08	8.2
145	13.52	0.21	8.8E+02	4.0E+03	0.12	8.1
181	13.53	0.21	9.0E+02	3.8E+03	0.16	7.8
210	13.50	0.21	9.0E+02	5.5E+03	0.20	7.7
248	13.53	0.21	7.0E+02	6.0E+03	0.22	7.4
272	13.52	0.21	8.0E+02	7.2E+03	0.26	7.3

표 2-8-63. 10°C 저장성 평가 결과

저장 기간 (일)	알코올	총산	진균수	세균수	탁도	관능
0	13.52	0.21	1.3E+03	2.0E+03	0.08	9.0
28	13.51	0.21	1.2E+03	2.5E+03	0.10	8.6
56	13.52	0.21	1.3E+03	4.0E+03	0.10	8.2
88	13.52	0.21	1.0E+03	3.8E+03	0.14	7.8
117	13.52	0.21	9.0E+02	5.5E+03	0.20	7.2
145	13.50	0.21	9.0E+02	6.3E+03	0.33	6.7
181	13.51	0.20	7.0E+02	7.0E+03	0.46	6.4
210	13.53	0.21	5.0E+02	8.8E+03	0.59	6.0
248	13.54	0.21	3.0E+02	1.0E+04	0.77	5.1
272	13.53	0.21	2.0E+02	1.3E+04	0.83	4.2

표 2-8-64. 15°C 저장성 평가 결과

저장 기간 (일)	알코올	총산	진균수	세균수	탁도	관능
0	13.52	0.21	1.3E+03	2.0E+03	0.08	9.0
28	13.50	0.21	1.0E+03	3.0E+03	0.12	8.2
56	13.50	0.21	9.1E+02	6.0E+03	0.20	7.5
88	13.52	0.21	8.0E+02	8.0E+03	0.38	7.0
117	13.54	0.21	5.0E+02	8.5E+03	0.44	6.6
145	13.51	0.21	3.0E+02	1.0E+04	0.68	6.2
181	13.50	0.21	1.0E+02	5.0E+04	0.76	5.3
210	13.50	0.22	9.0E+01	8.6E+04	0.89	4.0
248	13.52	0.22	9.0E+01	1.0E+05	1.00	3.7
272	13.51	0.22	8.0E+01	1.4E+05	1.20	3.0

바. *Saccharomyces cerevisiae* KSD-YC 효모 이용 신제품 출시

식품·식품첨가물 품목제조보고서

* 뒤쪽의 유의사항을 읽고 작성하여 주시기 바랍니다. []에는 해당되는 곳에 표시 합니다. (양쪽)

성명	배 중 호		생년월일(법인등록번호)
보고인	주소	전화번호	휴대전화
영점소	영점소소재지		영점소등록번호
식품의 유형			
제품명			
유통기한			
원재료명 또는 성분명 및 배합비율			
용도 용법			
제조방법			
상상			
고열탕·저열탕 식품 해당 여부			
합합인중 식품 해당 여부			
기타			

「식품위생법」 제37조제5항 및 같은 법 시행규칙 제46조제1항에 따라 식품(식품첨가물) 품목제조 사항을 보고합니다.

2017년 8월 8일
 서울 지방식품의약품안전청장
 특별자치시장·특별자치도지사·시장·군수·구청장



그림 2-8-6. 품목제조보고서 및 제품 외형

7. 전통누룩 유래 유산균을 활용한 탁주 신제품 개발

가. *Lactobacillus plantarum* KSD-KL4 유산균 고농도 배양 및 평가

자사 누룩에서 우점종으로 존재하는 유산균(*Lactobacillus plantarum* KSD-KL4)을 고농도로 존재할 수 있도록 제조 공정 개발 및 평가를 수행하였다. 담금 및 발효는 쌀을 주원료로 하여 자사 누룩 및 양조용수를 이용하여 담금 및 37°C에서 발효하였다. 평가 결과 발효 7일 만에 8.9E+08 cfu/mL의 농도로 고농도 유산균 발효가 가능하였다(표 2-8-65).

표 2-8-65. 자사 누룩 내 우점종 유산균의 고농도 배양 발효 결과

일차	누룩 우점 유산균 증폭 발효		
	총산 (% w/v)	유산균(cfu/mL)	pH
0	0.18	4.30E+03	5.10
1	0.36	2.60E+07	3.28
2	0.39	3.80E+08	3.20
3	0.43	2.50E+08	3.26
4	0.51	1.40E+08	3.15
5	0.44	3.50E+08	3.18
6	0.47	6.40E+08	3.20
7	0.44	8.90E+08	3.15

나. Pilot scale에서의 시제품 생산과 제조 공정 확립

자사 누룩을 활용하여 누룩 내 우점종으로 존재하는 *Lactobacillus plantarum* KSD-KL4 유산균이 최종 제품 내에서 고농도로 존재할 수 있도록 멥쌀과 박력분을 주원료로 하여 최적 레시피를 마련하였고 pilot scale 양조 설비를 통하여 제조 공정 확립 및 시제품을 생산하였다. 생산된 시제품은 타사 생탁주 제품(출고 시점 기준)과 유산균 농도를 비교한 결과 시판 제품보다 고농도로 함유되어 있음을 확인되었다(표 2-8-66).

최종 제품 Spec. : 알코올 5%(w/v), 총산 0.26%(w/v), *Lb. plantarum* 1.4E+08 cfu/mL 이상

표 2-8-66. 당사 시제품과 타사 생탁주 제품 내 유산균 농도 비교

제품	Alc(%)	총산 (% w/v)	유산균 (cfu/mL)
당사 시제품	5.00	0.26	3.40E+08
N사 탁주	5.48	0.15	9.50E+04
G사 탁주	5.00	0.14	6.00E+04
J사 탁주	5.83	0.11	2.50E+05

다. 소비자 관능 평가 및 조사

생산된 시제품을 이용하여 백세주마을 내방 고객을 대상으로 맛과 향, 기호도에 대한 관능 평가를 진행하였다. 관능 평가에 참여한 평가자는 53명으로 20대에서 50대까지의 남녀를 대상

으로 하였으며, 응답자의 성별은 남성과 여성이 각각 63%, 37%였으며 연령은 20대가 18%, 30대가 45%, 40대가 25%, 50대 이상이 12%였다. 관능 조사 결과는 그림 2-8-7와 같다. 향에 대한 평가에서 긍정적인 묘사로는 새콤하면서 산뜻한 향과 과일향, 요구르트 향을 특징적으로 표현하였다. 맛에서는 단맛과 신맛, 부드러운 목넘김을 특징적이라는 응답이 많았다. 전반적인 기호도는 53명 중 42명(80%)이 ‘좋다’ 내지는 ‘매우 좋다’ 라고 응답하였다. 제품 개발 및 출시를 통해 생탁주 내 존재하는 유산균에 대한 긍정적 효익(效益)을 살리고 탁주에 대한 가치를 높일 수 있는 기회를 제공할 수 있을 것으로 판단된다.

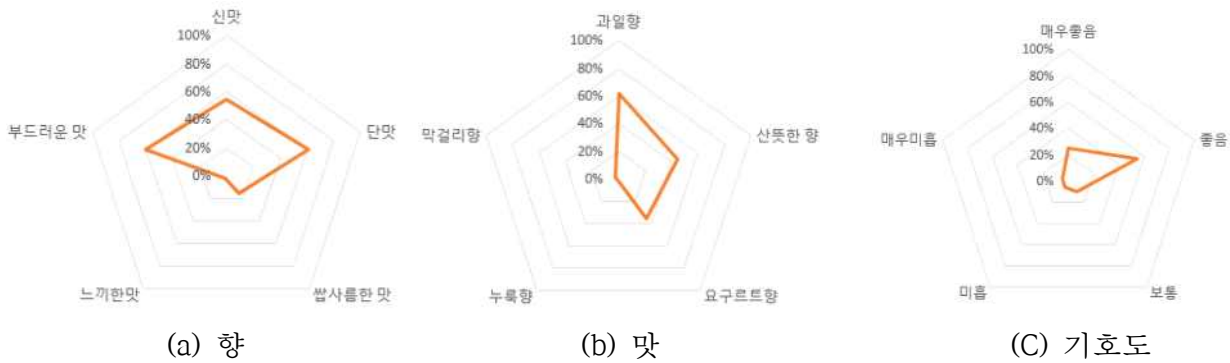


그림 2-8-7. *Lb. plantarum* KSD-KL4를 이용한 시제품 관능 평가

라. 제품 안정성 및 유통기한 평가

유산균 탁주의 유통 안정성 평가 및 유통기한을 설정하기 위해 (주)국순당 횡성공장에서 생산된 최종 제품을 5℃, 10℃, 15℃ 항온항습기에 저장하면서 저장 기간 중 6회 이상이 되도록 샘플링 후 분석 및 평가하였다. 평가 결과 품질 지표 중 결정계수가 가장 높은 관능검사 0차 반응식으로 탁주 품질 한계를 기준으로 국내 냉장 유통 및 소비 온도를 고려하여 안전계수를 설정 적용한 결과 10℃ 이하 냉장 유통기한은 20일로 설정하였다(표 2-8-67).

표 2-8-67. 5℃ 저장성 평가 결과

저장기간(일)	알코올 (v/v %)	총산 (w/v %)	진균수 (cfu/ml)	유산균 (cfu/ml)	관능 (점)
0	5.01	0.25	2.9E+02	2.5E+08	9.0
4	5.02	0.25	2.9E+02	2.8E+08	8.8
7	5.02	0.26	3.2E+02	3.0E+08	8.7
11	5.03	0.27	3.8E+03	3.3E+08	8.1
14	5.02	0.28	6.9E+03	3.5E+08	7.9
20	5.04	0.30	2.4E+04	4.0E+08	7.5
28	5.07	0.32	6.8E+04	4.1E+08	7.2

표 2-8-68. 10℃ 저장성 평가 결과

저장기간(일)	알코올 (v/v %)	총산 (w/v %)	진균수 (cfu/ml)	유산균 (cfu/ml)	관능 (점)
0	5.01	0.25	2.9E+02	2.5E+08	9.0
4	5.02	0.26	3.0E+02	3.0E+08	8.8
7	5.02	0.27	3.8E+02	3.4E+08	8.6
11	5.05	0.30	4.5E+03	4.0E+08	8.1
14	5.08	0.33	8.0E+03	4.2E+08	7.5
20	5.13	0.35	6.2E+04	4.2E+08	7.3
28	5.20	0.40	5.0E+05	5.0E+08	6.9

표 2-8-69. 15℃ 저장성 평가 결과

저장기간(일)	알코올 (v/v %)	총산 (w/v %)	진균수 (cfu/ml)	유산균 (cfu/ml)	관능 (점)
0	5.01	0.25	2.9E+02	2.5E+08	9.0
4	5.03	0.27	8.5E+02	3.8E+08	8.2
7	5.05	0.30	3.0E+03	4.0E+08	7.9
11	5.08	0.36	2.1E+04	4.2E+08	7.0
14	5.10	0.43	7.8E+04	4.1E+08	6.0
20	5.20	0.47	9.0E+05	4.6E+08	5.0
28	5.27	0.49	6.4E+06	5.0E+08	4.0

마. *Lactobacillus plantarum* KSD-KL4 이용 신제품 개발 및 출시

발급번호 : 1ETE-1K1M-BTA1-6J2P-9RJ0

식품(식품첨가물) 품목제조보고서

보고인	성명	생년월일		
	배우자	1953년 05월 18일		
	주소	전화번호	휴대전화	
강원도 횡성군 둔내면 강변로 975				
영업소	명칭(상호)			
	소재지	강원도 횡성군 둔내면 현천리 81-3(강변로 975)		
제품정보	식품의 유형	탁주	영양등록번호	20060015020
	제품명	1000억 유산균 막걸리		
	유통기한	제조일로부터 10℃이하 20일		
	품질유지기법	[첨가물]		
	면제된 모든 성분명, 첨가물	빛장애 거채		
	용도 용법	빛장애 거채		
	보관방법 및 포장재질	10℃ 이하 냉장보관 PET		
	포장방법 및 포장단위	PET 주일 (750ml, 700ml, 500ml)		
	성상	고유의 색택과 향미를 가지고 있고 이미, 이취가 없음		
고열탕, 자외선, 식품첨가물 여부	[]에 []아니오 [O]해당 없음			
기타	매탄율 함량 5%			

「식품위생법」 제37조제5항 및 같은 법 시행규칙 제45조제1항에 따라 식품(식품첨가물) 품목제조 사항을 보고합니다.

2018년 03월 15일
보고인 배명호

서울지방식품의약품안전청장 귀하



그림 2-8-8. 품목제조보고서 및 제품 외형

참고문헌

- Yu TS, Kim HS, Hong J, Ha HP, Kim TY, Yoon{Lee, 2015 #7}{Takamine, 2015 #16} IW. 1996. Bibliographical study on microorganisms of Nuruk (until 1945). J. Kor. Soc. Food and Nutri. 25: 170-179.
- Back SY, Yeo SH, Kim JY, Choi JH, S CJ, Choi HS, Jeong ST. 2012. Assessment of the quality characteristics of mixed-grain nuruk made with different fungal strainS. East Asian Soc. Dietary Life. 22: 103-108.
- Kim MS, Jeon JA, Jeong ST, Choi JH, Choi HS, Yeo S-H. 2011. Characteristics of byeo-nuruk according to the mixing ratio of wheat and the addition rate of moisture. The East Asian Society of Dietary Life. 21: 897-904.
- Lee YS, So MH. 2009. Effects of culture conditions of *Zhizopus* sp. ZB9 on the production of saccharifying amylase during the preparation of rice koji. Kor. J. Food Nutri. 22: 644-649.
- Hong Y, Kim YB, Park SO, Choi EH. 1997. Microflora and physicochemical characteristics of nuruk and main mashes during fermentation of a traditional andong soju. Food Biotechnol. 6: 297-303.
- Kim HS, Hyun JS, Kim J, Pal HH, Yu TS. 1997. Characteristics of useful fungi isolated from traditional Korean nuruk. J. Kor. Soc. Food Sc. Nutri. 26: 767-774.
- Kwon SJ, Shon JH. 2012. Analysis of microbial diversity in nuruk using PCR-DGGE. Kor. J. Life Sci. 22: 110-116.
- Song SH, Lee CH, Lee SH, Park JM, Lee HJ, Bai DH, Yoon SS, Choi JB, Park YS. 2013. Analysis of microflora profile in Korean traditional nuruk. J. Microbiol.Biotechnol. 23: 40-46.
- Yang SY, Choi SJ, Kwak JK, Kim KH, Seo MJ, Moon TW, Lee YW. 2013. *Aspergillus oryzae* strains isolated from traditional Korean nuruk: Fermentation properties and influence on rice wine quality. Food Sci. Biotechnol. 22: 425-432.
- Lee GS, lee JH, Jeong JH, Choi HS, Lee YH, Kim JM. 2015. Quality characteristics of takju, yakju, spirit made by pulse crop nurukS. Kor. J. Culinary ReS. 21: 232-247.
- Lee JW, Kang SA, Cheong C. 2015. Quality characteristics of distilled alcohols prepared with different fermenting agentS. J. Kor. Soc. Appl.Biological Chem. 58: 275-283.
- Park JH, Jeong JH. 2014. Characteristics of takju (a cloudy Korean rice wine) prepared with nuruk (a traditional Korean rice wine fermentation starter), and identification of lactic acid bacteria in nuruk. Kor. J. Food Sci. Technol. 46: 153-164.
- Takamine K, Choi HS, Kang JE, Jeong ST, Kim CW. 2015. Characterization of yeast for soju (distilled spirits) from Korean traditional nuruk. Kor. J. Mycology 43: 196-199.
- Kim MS, Lee YS, Kim JS, Shin WC, Sohn HY. 2014. In-vitro anti-thrombosis activity of ehwa nuruk. Kor. J. Microbiol. Biotechnol. 42: 302-306.
- Kim MS, Lee YS, Kim JS, Shin WC, Sohn HY. 2015. In-vitro anti-thrombosis activity of R4-nuruk made from *Rhizopus oryzae* KSD-815. Kor. Microbiol. Biotechnol. 43: 169-174.
- Lee SJ, Cho SW, Kwon YY, Kwon HS, Shin WC. 2012. Inhibitory effects of ethanol extracts

- from nuruk on oxidative stress, melanogenesis, and photo-aging. *Mycobiology*. 40: 117-123.
- Son JB, Lee SH, Sohn HY, Shin WC, Kim JS. 2015. Anti-adipogenic, anti-inflammatory, and anti-proliferative activities of extracts from lees and nuruk. *J. Life Sci.* 25: 773-779.
- Bal J, Yun SH, Choi MS, Yeo SH, Kim JM, Kim DH. 2015. Pyrosequencing reveals bacterial diversity in Korean traditional wheat-based nuruk. *J. Microbiol.* 53: 812-819.
- Bal J, Yun SH, Song HY, Yeo SH, Kim JH, Kim JM, Kim DH. 2014. Mycoflora dynamics analysis of Korean traditional wheat-based nuruk. *J. Microbiol.* 52: 1025-1029.
- Ponnusamy K, Lee S, Lee CH. 2013. Time-dependent correlation of the microbial community and the metabolomics of traditional barley nuruk starter fermentation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 77: 683-690.
- Yu TS, Yu Hy. 2011. Traditional Korean Fermenter, Nuruk of original form and excellency. World Science Co., Ltd.
- Lee MK, Lee SW, Yoon TH. 1994. The bibliographical study on nuruk. *J. East Asian Soc. Dietary Life.* 4: 19-29.
- Lee SB. 1967. Studies on enzymic sources and method of effective addition in fermentation of yack-tack-Joo Korean liquor. *Kor. Jour. Microbiol.* 5: 43-54.
- Al-Taher F, Banaszewski K, Jackson L, Zweigenbaum J, Ryu D, Cappozzo J (2013) Rapid method for the determination of multiple mycotoxins in wines and beers by LC-MS/MS using a stable isotope dilution assay. *J Agric Food Chem* 61: 2378-2384
- Bai J, Yun SH, Chun J, Kim BT, Kim DH (2016) Taxonomic Characterization, Evaluation of Toxicogenicity, and Saccharification Capability of *Aspergillus* Section Flavi Isolates from Korean Traditional Wheat-Based Fermentation Starter Nuruk. *Mycobiology* 44: 155-164
- Khan MR, Alothman ZA, Ghfar AA, Wabaldu SM. (2012) Analysis of aflatoxins in nonalcoholic beer using liquid - liquid extraction and ultraperformance LC-MS/MS. *J Sep Sci* 36: 572-577
- Kang KJ, Kim HJ, Lee YG, Jung KH, Han SB, Park SH, Oh HY (2010) Administration of mycotoxins in food in Korea. *J Fd Hyg Safety* 25: 281-288
- Kumar P, Mathato DK, Mohanta TK, Kang SG (2017) Aflatoxins: A Global Concern for Food Safety, Human Health and Their Management. *Frontiers in Microbiology* 7: 1-10.
- Sirhan A, Tan GH, Wong RCS (2013) Determination of aflatoxins in food using liquid chromatography coupled with electrospray ionization quadrupole time of flight mass spectrometry. *Food Control* 31: 35-44
- Varga E, Berthiller F, Krska R, Sulyok M, Doppler C (2016) Screening and verifying mycotoxins in food with Q-TOF LC/MS and an accurate mass library. *Agilent technologies* 5991-5667EN
- Marták J, Schlosser Š, Sabolová E, Křištofiková L, Rosenberg M (2003) Fermentation of lactic acid with *Rhizopus arrhizus* in a stirred tank reactor with a periodical bleed and feed operation. *Process Biochemistry* 38: 1573-1583