



## Properties of *Yakju* and pellet *Nuruk* inoculated with *Aspergillus oryzae*

Eui-Hyoun Jung<sup>1</sup>, Yong-Suk Kim<sup>2</sup>, Jin-Ah Jeon<sup>1</sup>, Soo-Whan Yeo<sup>1</sup>, Seok-Tea Jung<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Fermented Food Science Division, Department of Agrogood Resources, NAAS, RDA, Wanju 55365, Korea

<sup>2</sup>Department of Food Science and Technology, Chonbuk National University, Jeonju 54896, Korea

### *Aspergillus oryzae*를 이용한 pellet 누룩 제조 및 약주의 품질특성

정의현<sup>1</sup> · 김용석<sup>2</sup> · 전진아<sup>1</sup> · 여수환<sup>1</sup> · 정석태<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>국립농업과학원 발효식품과, <sup>2</sup>전북대학교 식품공학과

#### Abstract

*Aspergillus oryzae* 83-10 (AO) was inoculated in a wheat pellet with different concentrations of raw materials to produce *Nuruk*. The sterilized raw material (S) was found to be stable in the production of pellet-*Nuruk* and was suitable for the production of high enzyme power; high enzyme activity was obtained after fermentation for 32 h. The characteristics of pellet-*Nuruk* were investigated and the brewing characteristics were compared with those of the commercial SongHak (SH) *Nuruk*. The enzyme activities (dry base, unit/g) of S-AO (sterilized material and inoculated with *A. oryzae*) pellet-*Nuruk* (32 h culture) and the commercial SH *Nuruk* were compared. The activities of glucoamylase,  $\alpha$ -amylase, and acidic carboxypeptidase were significantly higher in S-AO *Nuruk*. In terms of brewing characteristics, the soluble solid ( $^{\circ}$ Brix) and total acid (%) were significantly higher in the SH mesh, and the amino acid content and alcohol content (%) were significantly higher in the S-AO mesh. The amount of *Nuruk* added for *yakju* fermentation was set at 30 unit/g  $\times$  g of rice weight based on the glucoamylase activity. The enzymatic activity immediately after preparation was 26.69 unit/mL and 17.58 unit/mL for S-AO and SH, respectively. Based on these results, preparing pellet-type *Nuruk* should considerably save fermentation time compared with traditional *Nuruk* products.

Key words : *Yakju*, *Nuruk*, pellet *Nuruk*, *Aspergillus oryzae*

#### 서 론

당분과 전분질이 풍부한 원료에 곰팡이의 효소작용이나 효모의 알코올 발효로 의해 만들어지는 것이 발효주이다. 이러한 발효주는 과일이나 곡물 등을 이용하여 만들어지며, 알코올도수가 20% 이하로 저장성은 낮지만 원료에 따라 성분변화와 관능적 특성을 가진다. 와인과 같은 과실주는 과실에 들어있는 환원당을 바로 발효시키는 단발효 방식

이지만 곡류를 이용한 발효주는 누룩에 들어있는 곰팡이가 생산하는 전분분해효소를 이용하여 전분을 환원당으로 바꾸어 주며 동시에 효모가 당을 이용하여 발효시키는 당화와 발효가 동시에 진행되는 병행 복발효를 통하여 곡주가 생산된다(1).

시판되는 재래형태의 재래누룩 또는 자가누룩의 제조는 낱곡류를 거칠게 빻고, 성형하여 원료나 부자재, 주변환경에 존재하는 야생 미생물이 착생, 번식되어 만들어진다. 이러한 재래누룩은 누룩 발효 중에 생육하는 미생물이 다양하며, 이들은 술 발효에 유익한 것과 그렇지 않은 것을 동시에 함유하고 있어 공장규모의 제품생산에 있어서 품질관리와 균일한 주질의 제품 생산이 어렵다. 때문에 술덧의 안전한 발효와 균일한 주질 유지의 필요성으로 인하여 유기산과 당화효소의 생산능이 강한 단일 분리균에 의한 입국이 주발

\*Corresponding author. E-mail : jst@korea.kr  
 Phone : 82-63-238-3615, Fax : 82-63-238-3843  
 Received 17 August 2018; Revised 6 September 2018; Accepted 10 September 2018.  
 Copyright © The Korean Society of Food Preservation. All rights reserved.

효제의 자리를 차지하게 되었다(2).

약주는 담금 시에 발효제로 투입된 곰팡이와 그 대사산물까지 포함되어 함께 음용됨으로 발효제로 사용되는 곰팡이의 특성이 주질의 맛과 향에 중대한 영향을 미치게 된다(3). 누룩의 연구는 시판 재래누룩의 산 생성 균주의 특성과 시중 약주의 유기산 및 생리활성 등에 관한 연구가 활발하며(4,5), 최근에는 전통누룩을 저온 살균하여 잡균을 제거하여 사용하거나(6), 증자 처리한 소맥, 보리, 쌀 등의 전분질에 선별된 단일 또는 복합 미생물을 배양하여 특정 미생물이 대량 번식된 상태의 개량누룩을 주로 제조하여 사용하고 있다(3). 이러한 노력의 일환으로 Yeo 등(7)은 유용 양조 미생물의 자원화 및 종균화를 위해 2009년부터 2012년까지 전국을 4개 권역으로 나누어 민속 5일장과 재래시장 등을 방문하여 현지에서 생산된 누룩을 수집하였고, 이들 누룩에서 481주의 유용한 발효 미생물을 분리·동정하였다고 보고하였다.

본 연구에서는 전통누룩 제조에 주로 사용하는 통밀을 원료로 하여 Yeo 등(7)이 전국에서 수집한 다양한 누룩으로부터 분리·동정한 곰팡이 중 *Aspergillus oryzae* 83-10을 이용하여 가락형태로 성형한 pellet형 개량누룩을 제조하여 시판 재래누룩과의 품질특성을 비교하고자 한다. 기존의 재래누룩 제조방식은 입국과 비교하여 제조기간이 10배 이상이 소요되어 제조효율의 개선과 품질균일화가 요구되어왔다. 또한 현대 양조산업에서의 입국의 사용은 일본식 양조기법의 논란으로 전통주의 정체성에 대하여 지속적으로 문제 제시되고 있음으로 누룩의 정체성을 확보하며, 제조 효율의 상승을 통한 재래누룩의 개선 및 보완을 목적으로 누룩의 성형방법을 pellet형으로 선정함으로써 pellet형 개량누룩의 특징을 파악하고 발효제로서의 기능성을 알아보하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 공시재료

누룩 제조용 통밀과 약주 제조용 오대미는 시중에서 구입하였고, 효모는 라빠리장(La Parisienne, S.I. Lesaffre Co., Marcq-en-Baroeul, Franch)을, 누룩 대조구는 송학곡자(Gwangju, Korea)를 사용하였다. 누룩 접종 종균은 국립농업과학원 발효식품과 Yeo 등(7)이 전통누룩으로부터 분리·동정한 *Aspergillus oryzae* 83-10을 (주)충무발효(Ulsan, Korea)에 의뢰하여 입상종균으로 제조한 것을 사용하였다.

### 누룩 제조

Pellet 누룩 제조를 위하여 통밀 2.5 kg을 2 mm 간극의 롤밀(Daewoo Machine, Seoul, Korea)로 2회 파쇄 후, 수분추정용 저울(MX-50, And Co., Ltd., Tokyo, Japan)을 이용하여

수분함량 측정하고 필요 기수량을 하단의 식으로 산출하여 수분함량을 35%로 조정해 누룩 제조에 사용하였다. 에코로지(Hwasung, Korea)사에서 제작한 직경 6 mm pellet 사출기를 통하여 성형한 원료를 고압살균한 그룹(S)과 비살균 그룹(N)으로 나누어 *A. oryzae* 83-10 종균을 0.01% 접종한 후, 35°C, RH 85% 배양기에서 72시간 발효하였으며, 제국관리는 일본양조협회(8)의 방법을 참고하였다. 발효 중 pellet 누룩 품온이 42°C가 넘지 않도록 하였으며 8시간 간격으로 시료를 채취하였다.

$$\text{기수량} = A \times \frac{B-C}{100-B}$$

A : 원료 중량(g)

B : 목표 수분함량(%)

C : 원료 수분함량(%)

### 누룩 일반분석 및 효소활성

pH, 산도, 아미노산도 측정은 주류분석 규정(16)에 준하여 측정하였다. 분석을 위해 누룩 10 g에 물 50 mL를 첨가하고 실온에서 3시간 추출하였다. 추출물을 여과(Filter paper No.2, Whatman International Ltd., Maidstone, England)한 뒤 10 mL를 취해 0.1 N NaOH로 적정하고 그 mL수를 산도로 표시하였고, 아미노산도는 여과액 10 mL를 0.1 N NaOH 용액으로 중화한 다음, 중성 포르말린 용액 5 mL를 가하여 유리된 아미노산을 0.1 N NaOH 용액으로 적정하여 소요된 0.1 N NaOH의 mL수로 표시하였다. 효소활성 측정을 위한 조효소액은 입국 10 g에 0.5% NaCl 함유 10 mM acetate buffer(pH 5.0) 50 mL로 실온에서 3시간 추출한 뒤 여과하여 제조하였다. Glucoamylase,  $\alpha$ -amylase 및 acidic carboxypeptidase 는 양조용 효소 측정 kit(Kikkoman Co., Tokyo, Japan)를 사용하여 분광광도계 UV-2450(Shimadzu Co., Kyoto, Japan)로 흡광도를 측정된 값을 제조사가 제시하는 계산식으로 산출하였으며, 측정값은 누룩의 수분함량을 제외한 건조중량을 기준으로 표기하였다.

### 약주 담금

약주는 Fig. 1과 같이 제조하였다. 원료 사용 비율은 쌀 1 kg, 기수량은 원료 쌀대비 150%, 효모는 술덧 총량대비 0.01%로 하여, 25°C에서 10일간 발효하였다. 누룩은 glucoamylase 활성(dry base)을 기준으로 쌀 1 g 당 30 unit/g가 되도록 각각 사용하였다.

### 약주 일반성분 분석

발효 중인 술덧을 교반하여 상등액 50 g씩 채취한 뒤, 18,800 ×g에서 15분간 원심분리(Himac CR-22G, R10A3 Rotor, Hitachi, Japan)한 뒤 채취한 상등액을 분석에 이용하였다. 가용성 고형분 함량은 굴절 당도계(Palette, Atago

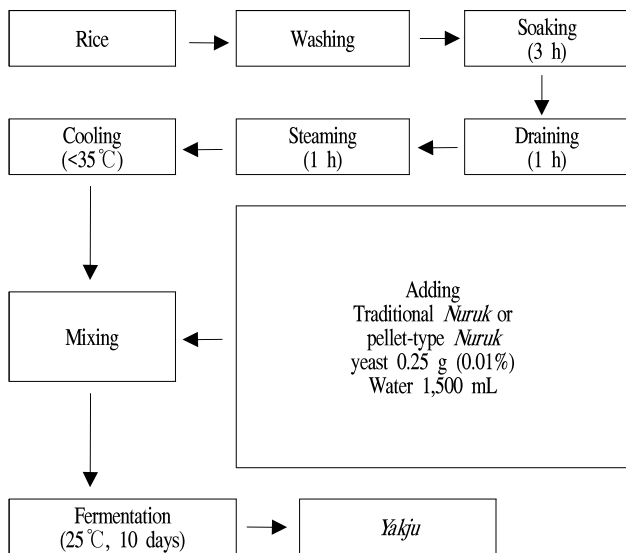


Fig. 1. Preparation procedure of *Yakju*.

Co., Ltd., Tokyo, Japan)를 사용하여 측정하였고, pH는 pH meter(Orion 3 Star Benchtop pH meter, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)를 이용하여 측정하였다. 총산은 여과액 10 mL를 취해 0.1 N NaOH로 적정하여 소요된 0.1 N NaOH 용액의 소비량 또는 젖산 함량(% w/v)으로 표시하였다. 아미노산도는 여과액 10 mL를 0.1 N NaOH 용액으로 중화한 다음, 중성 포르말린 용액 5 mL를 가하여 유리된 아미노산을 0.1 N NaOH 용액으로 적정하여 소요된 0.1 N NaOH의 mL수로 표시하였다. 알코올 함량은 알코올 분석기(AL-3, Riken Keiki Korea Co., Ltd., Busan, Korea)를 이용해 분석하였다.

### 유기산 분석

유기산 분석은 HPLC(LC-20A, Shimadzu Co.)를 이용하여 분석하였다. 분석용 column은 Shodex Rspack KC-G(6.0 mm×50.0 mm) guard column에 RSpak KC-811(8.0 mm×30 mm, Showa Denko, Tokyo, Japan) 2개를 연결하였으며, 이동상은 3 mM perchloric acid(Kanto chemical, Tokyo, Japan)를, flow rate는 0.8 mL/min, column oven의 온도는 63°C로 하였다. 분리물은 반응용액(0.2 mM bromothymol blue(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), 15 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(Sigma Chemical Co.), 2 mM NaOH과 반응한 후, UV 440 nm에서 검출하였다. 이때 반응용액의 flow rate는 1.0 mL/min, 반응온도는 30°C로 하였고, 시료는 여과(0.2 µm, Millipore Co., Cork, Ireland)후, 사용하였다.

### 통계처리

실험에서 얻어진 결과의 독립적인 3회 반복 실험값을 mean±SD로 표시하였고, 유의성은 SPSS(Statistical Package for Social Sciences, Version 20, Chicago, IL, USA)을 이용하였고, 각 실험군 간의 차이는 Duncan's multiple range test를 이용하였으며 p<0.05 수준에서 각 실험군 간의 유의성을 검증하였다.

## 결과 및 고찰

### 원료 처리 및 배양시간에 따른 효소 활성 변화

원료의 호화 유무에 따른 pellet 누룩의 특성을 조사하기 위하여, 중국이 집중된 pellet 누룩을 배양기간별로 분석한 효소활성(units: unit/g, dry base) 결과를 Table 1에 나타내었다.

Table 1. Changes in enzyme activities of pellet-type *Nuruk* by different material conditions during fermentation

(units: unit/g)

Culture time (h)	Glucoamylase		α-Amylase		Acidic carboxypeptidase	
	S <sup>1)</sup>	N	S	N	S	N
0		ND <sup>2)</sup>		ND		ND
8	0.23±0.05 <sup>o3)</sup>	4.47±0.41 <sup>n</sup>	2.29±0.16 <sup>q</sup>	13.02±0.05 <sup>p</sup>	549.07±20.53 <sup>n</sup>	274.67±30.40 <sup>o</sup>
16	10.36±0.71 <sup>m</sup>	6.34±1.67 <sup>n</sup>	48.56±0.19 <sup>n</sup>	24.97±0.22 <sup>o</sup>	1,231.13±0.49 <sup>l</sup>	592.59±12.87 <sup>m</sup>
24	109.89±0.87 <sup>l</sup>	128.96±0.44 <sup>k</sup>	143.34±2.67 <sup>l</sup>	97.78±0.06 <sup>m</sup>	2,115.01±33.46 <sup>j</sup>	1656.85±147.39 <sup>k</sup>
32	325.91±1.02 <sup>a</sup>	141.44±0.43 <sup>j</sup>	421.26±1.16 <sup>a</sup>	189.8±0.14 <sup>j</sup>	3,803.82±10.39 <sup>c</sup>	2577.1±22.57 <sup>h</sup>
40	193.09±1.63 <sup>i</sup>	195.57±1.05 <sup>i</sup>	258.35±4.54 <sup>f</sup>	229.35±0.15 <sup>h</sup>	4,366.55±6.18 <sup>b</sup>	3,133.26±100.55 <sup>f</sup>
48	213.65±1.83 <sup>h</sup>	232.67±1.30 <sup>e</sup>	302.71±1.69 <sup>b</sup>	240.86±0.76 <sup>e</sup>	4,568.67±88.92 <sup>a</sup>	2,691.18±52.80 <sup>e</sup>
56	300.89±2.98 <sup>c</sup>	244.98±0.98 <sup>c</sup>	277.24±1.51 <sup>d</sup>	195.15±1.49 <sup>j</sup>	4,129.89±20.51 <sup>d</sup>	2,232.34±155.98 <sup>i</sup>
64	319.90±2.93 <sup>b</sup>	236.68±0.95 <sup>d</sup>	293.88±2.55 <sup>c</sup>	184.65±1.32 <sup>k</sup>	4,247.12±30.47 <sup>c</sup>	2,494.97±24.79 <sup>h</sup>
72	294.19±3.87 <sup>d</sup>	232.32±0.93 <sup>e</sup>	271.02±1.93 <sup>c</sup>	183.16±1.35 <sup>k</sup>	4,082.36±39.18 <sup>d</sup>	2,329.99±63.18 <sup>i</sup>

<sup>1)</sup>S, sterilized pellet; N, nonsterilized pellet.

<sup>2)</sup>ND not detected.

<sup>3)</sup>Values represent means±SD and values with different superscripts in the columns of same enzyme activity are significantly different at p<0.05.

전분 분해력의 지표인 *glucoamylase* 활성은 8시간 이후부터 활성이 나타나 16시간 이후 급격히 증가하는 것으로 보아 배양 16시간까지는 누룩 곰팡이의 포자가 발아하여 밀 입자에 균사가 착생하는 시기라고 판단된다. 또한 누룩의 배양기간 중 32시간을 기점으로 포자가 생성되기 시작하여 수시간만에 급속히 누룩의 표면을 덮는 것이 관찰되었다. 살균 원료군은 32시간 배양하였을 때 325.9 unit/g로 모든 처리에서 유의적으로 가장 높은 효소활성을 나타내었다. 따라서 32시간을 기점으로 누룩의 출국시기를 조절하여야 한다. 특히, 배양 40시간의 경우, 포자의 생성이 많아 포자 비산으로 인해 작업성이 매우 나쁘고, 효소활성이 193.09 unit/g로 크게 감소되었다. 제국 64시간의 *glucoamylase* 활성이 319.90 unit/g로 32시간과 비슷한 활성을 유지하였으나, 이는 생성된 포자가 다시금 누룩 환경에 적응하여 포자가 발아, 착생함으로써 효소활성이 높아진 것으로 보여진다.

살균 원료군의 *glucoamylase* 활성은 비살균 원료군보다 효소활성이 높게 나타났다.  $\alpha$ -Amylase 활성 또한 살균 원료가 비살균 원료보다 효소활성이 높게 나타났으며, 특히, S-AO 누룩은 32시간 제국하였을 때, 421.26 unit/g로 N-AO 누룩 보다 약 2.2배의 높은 효소활성을 나타내었다. 이러한 결과는 Huh 등(9)이 고압멸균한 통밀에 각각의 종국을 접종하여 성형없이 72시간 발효한 통밀 낱알누룩의 액화력보다 높은 효소활성으로 나타났다.

술덧에 있어서 고두밥을 용해하는 데는 액화효소나 당화효소가 배유세포층의 전분립에 도달하여야 한다. 이 과정에서 배유세포 구성성분에 의하여 장애를 받기 때문에 다른 효소의 보조적 작용이 필요한데 단백질 분해효소는 고두밥의 단백질을 용해시켜 여러 종의 peptide를 생산하며, 단백질과 무효 흡착된 액화효소의 유리에 관여하므로

고두밥의 용해에 대하여 큰 보조작용을 한다(8). 이러한 *acidic carboxypeptidase* 활성은 제국기간 전반적으로 살균 원료가 비살균 원료보다 높은 활성을 나타내었으며 살균 원료에서 32시간 제국한 경우, 3,803.82 unit/g로 비살균 원료 보다 1.48배 높은 효소활성을 나타내었다.

#### 원료 처리 및 발효시간에 따른 일반특성 변화

원료의 살균 유무와 누룩곰팡이의 종류에 따른 발효시간 경과별 일반특성 변화는 Table 2와 같다. 누룩제조 직후의 살균원료의 pH는 6.31로 나타났으며, 포자생성이 이루어지는 배양 32시간까지 pH 5.78으로 서서히 저하되었고, 이후 64시간까지 pH 5.92로 상승하였다. 비살균 원료의 pH는 제조직후 5.84로 배양 16시간에 pH 5.18으로 감소하고 이후 발효경과 동안 pH 5.83까지 상승하였으며, 발효경과중 대체로 살균원료에 비하여 낮은 pH를 유지하였다. Baek 등(10)의 연구에서는 시판누룩 16종의 pH는 대체로 6~7이라고 보고하였고, 본 연구의 pellet 누룩의 pH 값보다 높은 값을 나타내었다.

Pellet 누룩 제조 직후 살균 원료의 산도는 0.47이었으며 16시간을 기점으로 크게 증가하기 시작하여 24-32시간이 경과되었을 때 1.20-1.26을 나타내었고 이후 56시간까지 1.63으로 으로 상승하였다. 비살균 원료의 경우 제조직후 산도 0.62에서 8시간 경과 후 1.12로 발효경과 초반에 살균 원료군보다 빠르게 산이 증가하는 모습을 보였으며, 발효기간 중 대체로 살균원료보다 유의적으로 높은 결과를 나타내었다( $p < 0.05$ ). 이 같은 결과는 비살균 원료에 존재하는 야생균주들의 영향에 의한 것으로 판단된다.

Pellet 누룩 제조직후 살균 원료의 아미노산도(0.1 N NaOH mL/10mL)는 0.41이었으며, 이후 48시간 일 때 3.08로 처리구중 가장 높은 아미노산도 수치를 나타내었다. 비

**Table 2. General components of pellet-type *Nuruk* by different material conditions during fermentation**

Culture time (h)	pH		Acidity (mL)		Amino acidity (mL)		Water content (%)	
	S <sup>1)</sup>	N	S	N	S	N	S	N
0	6.31±0.03 <sup>ad</sup>	5.84±0.03 <sup>cd</sup>	0.47±0.05 <sup>j</sup>	0.62±0.01 <sup>i</sup>	0.41±0.02 <sup>k</sup>	0.36±0.03 <sup>k</sup>	33.43±0.10 <sup>a</sup>	33.43±0.10 <sup>a</sup>
8	6.18±0.07 <sup>b</sup>	5.3±0.010 <sup>k</sup>	0.39±0.03 <sup>j</sup>	1.12±0.17 <sup>h</sup>	0.28±0.05 <sup>l</sup>	0.50±0.03 <sup>j</sup>	31.07±1.03 <sup>b</sup>	31.41±1.03 <sup>b</sup>
16	5.71±0.05 <sup>efg</sup>	5.18±0.05 <sup>l</sup>	0.65±0.05 <sup>i</sup>	1.19±0.03 <sup>gh</sup>	0.55±0.03 <sup>j</sup>	0.56±0.04 <sup>j</sup>	30.85±0.89 <sup>b</sup>	28.79±0.13 <sup>c</sup>
24	5.61±0.03 <sup>gh</sup>	5.41±0.03 <sup>j</sup>	1.20±0.05 <sup>gh</sup>	1.52±0.05 <sup>de</sup>	1.47±0.05 <sup>i</sup>	1.56±0.05 <sup>h</sup>	24.84±1.18 <sup>d</sup>	28.03±0.51 <sup>c</sup>
32	5.78±0.05 <sup>de</sup>	5.51±0.05 <sup>i</sup>	1.26±0.03 <sup>fg</sup>	1.35±0.07 <sup>f</sup>	2.12±0.05 <sup>ef</sup>	1.77±0.03 <sup>g</sup>	24.38±0.86 <sup>d</sup>	25.10±0.89 <sup>d</sup>
40	5.83±0.05 <sup>cd</sup>	5.55±0.10 <sup>hi</sup>	1.48±0.05 <sup>e</sup>	1.37±0.05 <sup>f</sup>	2.35±0.06 <sup>d</sup>	2.07±0.05 <sup>f</sup>	22.17±1.18 <sup>ef</sup>	22.90±1.00 <sup>c</sup>
48	5.83±0.03 <sup>cd</sup>	5.77±0.05 <sup>de</sup>	1.50±0.04 <sup>e</sup>	1.29±0.03 <sup>fg</sup>	3.08±0.05 <sup>a</sup>	2.18±0.05 <sup>e</sup>	20.28±0.78 <sup>e</sup>	20.93±1.03 <sup>fg</sup>
56	5.91±0.05 <sup>c</sup>	5.67±0.03 <sup>fg</sup>	1.63±0.03 <sup>abc</sup>	1.68±0.05 <sup>ab</sup>	2.95±0.03 <sup>b</sup>	2.52±0.02 <sup>c</sup>	18.55±1.18 <sup>h</sup>	19.62±1.18 <sup>gh</sup>
64	5.92±0.10 <sup>c</sup>	5.83±0.04 <sup>cd</sup>	1.62±0.04 <sup>bcd</sup>	1.74±0.05 <sup>a</sup>	2.30±0.01 <sup>d</sup>	2.56±0.03 <sup>c</sup>	15.99±0.13 <sup>i</sup>	16.37±0.51 <sup>i</sup>
72	5.72±0.04 <sup>ef</sup>	5.82±0.05 <sup>cd</sup>	1.56±0.01 <sup>cd</sup>	1.72±0.02 <sup>ab</sup>	2.14±0.01 <sup>ef</sup>	2.50±0.03 <sup>c</sup>	11.56±0.50 <sup>k</sup>	14.23±0.55 <sup>j</sup>

<sup>1)</sup>S, sterilized pellet; N, nonsterilized pellet.

<sup>2)</sup>Values represent means±SD and values with different superscripts in the columns of same component are significantly different at  $p < 0.05$ .

살균 원료 누룩의 제조직후 아미노산도는 0.36으로 나타났으며, 발효경과 24시간 까지는 살균원료 누룩과 비슷한 경향을 나타내었다. 살균원료 누룩은 포자형성이 이루어지는 32-56시간 때에는 다소 낮은 아미노산도 수치를 보이고 이후 64-72시간 때에 수치가 줄어드는 반면 비살균 원료는 유의적 차이가 없었다.

살균원료 누룩의 수분함량은 0-16시간대까지 천천히 감소하다 16-24시간 사이에 급격히 감소하였고, 비살균 원료 누룩보다 8시간 빠르게 수분함량이 감소되었다. 이러한 결과는 누룩균의 증식이 동반되는 발열에 의한 것으로 판단되고, 누룩의 효소활성 분석 결과를 토대로 원료의 살균과 호화가 이루어졌을 때 누룩균의 증식이 더욱 원활하게 이루어지는 것을 알 수 있었다.

### pellet 누룩과 시판누룩의 비교

Pellet 누룩 제조 실험에서 원료의 처리, 배양시간에 따른 누룩의 효소활성이 우수하게 나타났던 살균원료누룩(S-

AO, 32시간 배양)과 시판되고 있는 재래누룩(SH)의 효소활성 비교표를 Table 3에 나타내었다. 시판되고 있는 재래누룩과 비교하였을 때 누룩의 당화력 지표인 glucoamylase활성은 pellet 누룩인 S-AO이 325.91 unit/g으로 시판누룩 SH의 297.44 unit/g보다 높게 나타났다. 이러한 결과는 Kim 등(11)이 전통누룩에서 분리한 45개의 균주로 입국을 제조하여 조사한 결과 생육이 활발한 29개 입국의 당화력이 197.6±36.2(98-244) unit/g 이었다고 보고한 결과보다 높은 당화력을 pellet 누룩이 생산할 수 있는 점을 나타내었다. 시판누룩의 당화력은 Baek 등(10)이 보고한 충청지역에서 수집한 15점 누룩의 당화력 209.1±95.5 unit/g 과 유사함으로 보아 누룩의 품질기준인 glucoamylase활성이 재래형태인 시판 재래누룩이나 낱알누룩인 입국에 비하여 pellet 형태의 누룩의 품질이 떨어지지 않음을 알 수 있었다.

전분을 액화하는 α-amylase 활성은 S-AO 누룩이 421.26 unit/g으로 SH 누룩의 75.12 unit/g보다 5.6배 높은 값을 나타내었다. Acidic carboxypeptidase 활성 또한 S-AO 누룩이

**Table 3. Enzyme activities and general components of pellet-type *Nuruk* and commercial *Nuruk***

<i>Nuruk</i> <sup>1)</sup>	Enzyme activities (unit/g)			pH	Acidity (mL)	Amino Acidity (mL)	Moisture (%)
	Gluco-amyase	α-Amylase	Acidic carboxype-ptidase				
S-AO	325.91±1.02 <sup>2)***3)</sup>	421.26±1.16 <sup>**</sup>	3,803.8±10.4 <sup>***</sup>	5.78±0.05	0.11±0.00	2.12±0.05	24.39±0.77 <sup>***</sup>
SH	297.44±1.17	75.12±0.36	278.6±4.29	6.32±0.04 <sup>***</sup>	0.26±0.01 <sup>***</sup>	3.76±0.03 <sup>***</sup>	9.94±0.04
t-value	31.75	490.46	542.62	-13.23	-22.00	-44.92	29.01

<sup>1)</sup>S-AO, sterile material pellet-type-*Nuruk* inoculate *Aspergillus oryzae* 83-10 fermented while 32 h; SH, Songhak *Nuruk*, traditional *Nuruk*

<sup>2)</sup>Values are mean±SD (n=3).

<sup>3)</sup>p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001.

**Table 4. Changes in properties of *Yakju* prepared with different types of *Nuruk* during fermentation**

<i>Nuruk</i> <sup>1)</sup>	Fermented time (day)	soluble solids (°Brix)	pH	Total acid (%)	Amino acidity (mL)	Alcohol (%)
S-AO	0	1.56±0.05 <sup>2)</sup>	5.72±0.09 <sup>b</sup>	0.02±0.00 <sup>h</sup>	0.21±0.01 <sup>j</sup>	ND <sup>3)</sup>
	1	18.06±0.05 <sup>c</sup>	4.07±0.04 <sup>de</sup>	0.18±0.00 <sup>g</sup>	1.67±0.01 <sup>f</sup>	3.75±0.26 <sup>c</sup>
	3	15.5±0.17 <sup>f</sup>	3.85±0.02 <sup>f</sup>	0.49±0.01 <sup>f</sup>	2.92±0.07 <sup>d</sup>	12.33±0.11 <sup>c</sup>
	5	13.63±0.15 <sup>g</sup>	4.16±0.07 <sup>d</sup>	0.58±0.01 <sup>d</sup>	3.88±0.06 <sup>c</sup>	15.53±0.25 <sup>b</sup>
	7	13.5±0.19 <sup>g</sup>	4.40±0.02 <sup>c</sup>	0.53±0.01 <sup>c</sup>	5.18±0.03 <sup>b</sup>	17.46±0.50 <sup>a</sup>
	9	13.03±0.05 <sup>h</sup>	4.48±0.03 <sup>c</sup>	0.53±0.00 <sup>c</sup>	5.40±0.10 <sup>a</sup>	17.96±0.30 <sup>a</sup>
SH	0	1.50±0.00 <sup>i</sup>	6.08±0.04 <sup>d</sup>	0.03±0.00 <sup>h</sup>	0.34±0.01 <sup>i</sup>	ND
	1	18.33±0.05 <sup>b</sup>	4.06±0.05 <sup>de</sup>	0.18±0.00 <sup>g</sup>	0.30±0.00 <sup>j</sup>	0.91±0.10 <sup>f</sup>
	3	19.46±0.05 <sup>a</sup>	3.87±0.03 <sup>f</sup>	0.60±0.00 <sup>c</sup>	0.58±0.02 <sup>h</sup>	7.16±0.32 <sup>d</sup>
	5	17.40±0.09 <sup>d</sup>	3.98±0.10 <sup>c</sup>	0.70±0.00 <sup>b</sup>	1.10±0.03 <sup>g</sup>	8.03±2.62 <sup>d</sup>
	7	15.93±0.20 <sup>e</sup>	3.98±0.02 <sup>c</sup>	0.71±0.01 <sup>a</sup>	1.74±0.06 <sup>ef</sup>	12.4±0.69 <sup>e</sup>
	9	15.83±0.05 <sup>c</sup>	4.09±0.02 <sup>d</sup>	0.72±0.01 <sup>a</sup>	1.77±0.01 <sup>c</sup>	12.66±0.3 <sup>c</sup>

<sup>1)</sup>S-AO, sterile material pellet-type-*Nuruk* inoculate *Aspergillus oryzae* 83-10 fermented while 32 h; SH, Songhak *Nuruk*, traditional *Nuruk*

<sup>2)</sup>Values represent means±SD and values with different superscripts in the columns of same component are significantly different at p<0.05.

<sup>3)</sup>ND, not detected.

3,803.8 unit/g으로 SH 누룩의 278.6 unit/g보다 높은 수치를 나타냈다.

시판 재래누룩 SH와 pellet 누룩 S-AO의 일반분석결과 pH, 총산, 아미노산도 모두 S-AO누룩보다 SH누룩이 높은 수치를 나타내었는데 pellet 누룩과 시판 누룩간의 pH와 총산 간에는 그 경향이 일치하지 않는 부분이 나타났다. 이는 누룩의 발효에 관여한 미생물이 생성한 유기산의 조성 과 더불어 발효중 원료입자의 붕괴정도나 단백질의 분해로 인해 발생한 아미노산의 2차 대사산물이 증가하여 pH의 변화를 완충하기 때문으로 추정되며 이는 So 등(12)의 연구 결과와 유사하다.

#### 발효기간에 따른 약주의 일반특성 변화

선발된 S-AO pellet 누룩과 시판누룩을 이용하여 제조한 약주의 발효 기간 중 일반특성 변화는 Table 4와 같다. S-AO의 경우 발효경과 1일 차에 가장 높은 가용성 고형물 함량을 나타내고 이후 감소추세를 보였고, SH는 3일차 까지 높은 가용성고형물 함량을 유지하며 발효초기부터 후반까지 pellet 누룩 보다 높은 가용성 고형물 함량을 나타내어, 이를 통해 시판누룩 SH는 pellet 누룩 S-AO보다 발효가 느리게 진행됨을 알 수 있었다.

술덧이 발효하는 동안 생성되는 유기산, CO<sub>2</sub> 등은 발효 중인 술덧의 pH에 영향을 주기 때문에 탁주의 성분변화, 발효진행상황 등을 짐작할 수 있는 중요한 지표로 작용한다 (13,14). 술덧 제조 직후 pH는 S-AO는 5.72, SH가 6.08로 S-AO 술덧이 SH 술덧보다 낮게 나타내었다. 이후 S-AO 술덧은 발효가 진행되면서 3일 차에 pH 3.85까지 감소 후 발효 9일 차에 pH 4.48로 발효기간 동안 완만히 증가하는 모습을 보였으나, SH 술덧은 발효 3일 차에 pH 3.87까지 저하를 보인 뒤 5-9일 차에는 pH 3.98-4.09로 나타나 발효 중 pH 변화가 크지 않았다.

약주의 품질에 있어서 총산 함량은 관능 측면과 술덧 발효초기에 이상발효나 산패 같은 주질의 이상을 조기 진단 할 수 있는 기초자료로 이용할 수 있다. 총산은 배양직후에

는 주로 누룩이나 원료의 영향을 받으며 발효가 진행되면서 효모나 젖산균 등의 미생물의 작용으로 생성되는 각종 유기산들에 의해 총산 함량이 증가한다(14). 술덧의 제조 직후 총산은 0.02-0.03%로 차이가 없었으나 발효가 진행되면서 SH술덧이 S-AO술덧보다 높은 폭의 총산함량의 증가를 나타내어 발효 종료인 9일 차에 S-AO 술덧은 0.53%를 나타내었고, SH술덧은 0.72%의 총산 함량을 나타내었다. S-AO 술덧의 경우 5일 차 발효경과에 0.58%에서 이후 0.53%로 감소되었는데 이는 유기산이 알코올 등과 결합해 ester와 같은 향미 형성 등에 이용되어 발효후기에 들어 감소된 것으로 판단되며, SH 술덧의 총산이 더욱 높게 나타난 것은 재래누룩 자체의 다양한 유기산 생성 균들에 의한 것으로 판단된다.

발효 0일 차 술덧의 아미노산도는 S-AO 술덧이 0.21이었으며 SH 술덧은 0.34로 상대적으로 높은 수치를 나타내었다. 이는 누룩 유래의 아미노산도에 의한 차이로 보이며, 발효가 경과하면서 S-AO 술덧은 아미노산도의 증가가 높게 나타나 발효 9일 차에 5.40의 수치를 나타내었다. SH 술덧의 경우 아미노산도의 증가 폭이 낮게 나타나 발효 종료 후 1.77을 나타내 상대적으로 낮은 아미노산도 함량을 나타내었다. 이러한 차이는 S-AO 술덧의 경우 누룩의 acidic protease 활성이 높아 원료의 단백질이 분해로 높은 아미노산도를 나타낸 것으로 보인다.

발효기간별 알코올 함량을 분석한 결과 발효 1일 차에 S-AO 술덧이 3.75%, SH 술덧은 0.91%로 나타나 상대적으로 적은 알코올 함량을 나타내었으며, 발효가 진행되면서 지속적으로 편차가 늘어나 발효 9일 차에 S-AO 술덧은 17.96%의 알코올 함량을 나타낸 반면 SH 술덧은 12.66%의 알코올 함량을 나타내어 큰 편차를 나타내었다. 이는 Table 5의 술덧중의 효소활성 분석결과 glucoamylase활성이 낮게 나타난 것이 원인으로 볼 수 있다.

#### 발효기간에 따른 약주의 효소활성 변화

약주 술덧의 발효중 각 효소별 활성 변화를 Table 5에

Table 5. Changes in enzyme activities of *Yakju* prepared with different types of *Nuruk* during fermentation

Fermented time (day)	(units: unit/mL)					
	Glucoamylase		α-Amylase		Acidic carboxypeptidase	
	S-AO <sup>1)</sup>	SH	S-AO	SH	S-AO	SH
0	26.97±0.05 <sup>2)</sup>	17.58±0.17 <sup>c</sup>	23.69±0.00 <sup>a</sup>	4.37±0.14 <sup>l</sup>	186.85±0.07 <sup>g</sup>	105.93±0.65 <sup>i</sup>
1	20.69±0.09 <sup>d</sup>	13.65±0.07 <sup>h</sup>	19.20±0.04 <sup>b</sup>	3.01±0.02 <sup>k</sup>	153.07±1.73 <sup>h</sup>	221.02±0.32 <sup>f</sup>
3	28.57±0.77 <sup>a</sup>	12.43±0.09 <sup>j</sup>	18.50±0.03 <sup>c</sup>	7.63±0.05 <sup>f</sup>	115.72±5.30 <sup>j</sup>	278.52±0.89 <sup>e</sup>
5	27.37±0.04 <sup>c</sup>	16.75±0.07 <sup>f</sup>	13.75±0.11 <sup>d</sup>	7.46±0.02 <sup>g</sup>	433.83±5.16 <sup>d</sup>	641.58±3.51 <sup>c</sup>
7	26.95±0.03 <sup>c</sup>	15.94±0.10 <sup>e</sup>	8.27±0.05 <sup>e</sup>	5.20±0.11 <sup>i</sup>	1257.67±2.39 <sup>a</sup>	718.66±4.00 <sup>b</sup>
9	27.87±0.42 <sup>b</sup>	17.73±0.16 <sup>c</sup>	8.39±0.04 <sup>e</sup>	5.54±0.19 <sup>h</sup>	1252.7±33.41 <sup>a</sup>	726.19±7.80 <sup>b</sup>

<sup>1)</sup>S-AO, sterile material pellet-type-*Nuruk* inoculate *Aspergillus oryzae* 83-10 fermented while 32 h; SH, Songhak *Nuruk*, traditional *Nuruk*

<sup>2)</sup>Values represent means±SD and values with different superscripts in the columns of same enzyme activity are significantly different at p<0.05.

나타내었다. 약주 제조를 위해 각각의 처리구별로 사용되는 누룩의 사용량을 쌀 1 g 당 glucoylase 활성을 30 unit/g(dry base) 으로 설정하여 사용하였지만 실제 술덧에서의 효소활성의 발현은 그에 미치지 못하는 경향을 나타내었다. Glucoamylase 활성의 경우 술덧의 발효 전체기간으로 보았을 때 S-AO 술덧은  $26.4 \pm 2.73$  unit/g으로 근소한 차이를 나타냈으나, SH 술덧은  $15.68 \pm 2.08$  unit/g으로 이는 재래누룩의 품질이 균일하지 않은 것이 원인으로 판단된다.

$\alpha$ -Amylase는 모든 발효구간에서 S-AO pellet 누룩이 다른 누룩에 비하여 높은 역가를 나타내었지만 발효시간이 경과하면서 7일차까지 큰 폭으로 효소활성이 떨어졌다. 모든 처리구에서 acidic carboxypeptidase 활성에서 제조 초기에는 큰 차이를 보이지 않았으나 발효가 경과하면서 7일차까지 효소활성이 떨어지는 모습을 관찰할 수 있었다.

Acidic carboxypeptidase 활성에서 술덧 제조 초기에는 큰 차이를 보이지 않았으나 발효가 지속되면서 3일 차 이후에는 발효 7일 차까지 효소활성이 높아지고 이후에 안정화하는 추세를 나타내었다. 이러한 결과는 0.9-3.0% 탈지 대두 및 0.6-2.0% 밀기울을 함유하는 액침배양에서 pH 4.0-5.5일 때 acidic carboxypeptidase 생산 및 효소의 안정성에 유리하며, 최대 효소 생산은 30°C에서 4일 또는 그 이후에 도달되었다는 Ichishima 등(15)의 결과와 유사하였다.

#### 유기산 분석결과

최종 발효 시점인 9일 차 약주 술덧의 유기산 함량은 Table 6과 같다. 본 실험에서 S-AO 술덧이 SH 술덧에 비하여 lactic acid의 함량이 절반정도로 낮게 나타났다. 이는 재래누룩을 사용한 SH 술덧이 발효 중 젖산균에 의한 당의 소모와 산생성이 살균된 원료에 단일 곰팡이만을 접종하여 배양한 S-AO 술덧보다 유산균이 많아 젖산의 생성이 높게 이루어졌음을 알 수 있었다.

**Table 6. Concentration of organic acids in *Yakju* by different types of *Nuruk* at 9 days of fermentation**

Contents (mg.%)	<i>Yakju</i>	
	S-AO <sup>1)</sup>	SH
Tartaric	5.90	12.75
Malic	176.27	3.29
Lactic	336.96	650.72
Acetic	15.68	ND
Citric	7.46	5.32
Succinic	2.10	3.19
Fumaric	3.23	7.05
Total	547.59	682.32

<sup>1)</sup>S-AO, sterile material pellet-type-*Nuruk* inoculate *Aspergillus oryzae* 83-10 fermented while 32 h; SH, Songhak *Nuruk*, traditional *Nuruk*

## 요 약

본 연구는 재래누룩에서 분리 동정한 *Aspergillus oryzae* 83-10(AO)을 활용하여 원료조건에 따른 pellet형 누룩의 특성과 양조특성을 검토하였다. 실험 결과, 원료의 조건은 10분간 증자하여 살균·호화된 원료(S)가 pellet 누룩의 제조에 있어서 안정적이고, 높은 효소력의 생성에 더욱 적합한 것으로 나타났으며, 발효경과 32시간 때에 효소활성이 높고, 포자생성에 의한 포자 날림 등이 없어 작업성이 가장 우수하였다. 제조된 pellet 누룩 S-AO(32시간 배양)과 시판되고 있는 재래누룩 SH의 효소활성(dry base, unit/g)을 비교한 결과, glucoamylase 활성 S-AO(325.92) > SH(297.44),  $\alpha$ -amylase 활성 S-AO(421.26) > SH(75.12) 및 acidic carboxypeptidase 활성 S-AO(3,803.8) > SH(278.6)으로 pellet 누룩이 재래누룩과 비교해 유의적으로 높은 수치를 나타내었으며, 누룩의 일반분석 결과에서는 SH 누룩이 pH, 총산, 아미노산도 모두 유의적으로 높은 수치를 나타내었다. 약주 양조특성 분석 결과 발효가 끝난 시점에 SH 술덧의 가용성고형물과 총산함량이 S-AO 술덧과 비교하여 유의하게 높게 나타났으며, S-AO 술덧은 아미노산 함량과 알코올 함량이 유의적으로 높게 나타났다. 알코올 함량 분석결과 S-AO 17.96%, SH 12.66%으로 큰 차이를 나타내어 발효 안정성과 수율에 있어서 S-AO 술덧이 높은 평가를 받았다. 발효경과 중 술덧의 효소활성은 누룩의 사용량을 쌀 사용량(g)×30 unit/g(glucoamylase)으로 효소활성 수치에 따라 달리 하였지만 그에 못 미치는 결과를 보였다. 술덧제조 직후 S-AO 26.69 unit/mL, SH 17.58 unit/mL으로 S-AO 시료는 비교적 근접한 수치를 나타내었지만 SH 시료는 상당량 부족한 모습을 보여 이러한 결과는 누룩의 품질 균일성에 의한 것으로 판단되어진다. 이러한 결과로 살균된 통밀을 pellet형 누룩으로 가공하여 국균을 배양하면 기존 재래식 누룩이나 입국에 비하여 품질을 떨어뜨리지 않으며, 제조 효율도 상당히 높일 수 있을 것으로 기대할 수 있다.

## 감사의 글

본 연구는 국립농업과학원 농업과학기술 연구개발사업 (과제번호: PJ01260101)의 지원에 의해 이루어진 것입니다.

## References

1. Yoo JH, Byeon YL (2008) Alcoholic liquors, Fermentation engineering. Hyoil, Seoul, Korea, p 256-257
2. Rha KY (1989) Seed mold important in brewing. Korean

- J Food Nutr, 1, 108-110
3. So MH, Lee JW (1996) *Takju* brewing by combined use of *Rhizopus japonicus-Nuruk* and *Aspergillus oryzae-Nuruk*. J Korean Soc Food Sci Nutr, 25, 157-162
  4. Lee SJ, Kim JH, Jung YW, Park SY, Shin WC, Park CS, Hong SY, Kim GW (2011) Composition of organic acids and physiological functionality of commercial *Makgeolli*. Korean J Food Sci Technol, 43, 206-212
  5. Park JH, Chung CH (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*. Korean J Food Sci Technol, 46, 153-164
  6. Park JH, Choi JH, Yeo SH, Jeong ST, Choi HS, Kang JE and Kim SR (2013) A study on the quality characteristics of *Makgeolli* using heat treatment of traditional Korean *Nuruk* extract. J East Asian Soc Diet Life, 23, 620-628
  7. Yeo SH, Back SY, Jeong ST, Choi JH, Choe HS, Park HY, Jo YM, Kim JY, Back CH, Lee YJ, Jeong DH, Yun HJ (2014) Application technology of useful brewing microorganisms. Final Report of Rural Development Administration, p 265
  8. Japan Brewing Association (2008) Koji Management. In: Cheongju manufacturing technology, Bae SM (Editor), Woogok publisher, Seoul, Korea, p 179-204
  9. Huh CK, Kim SM, Kim YD (2014) Comparison for enzymic activity of *Nuruk* and quality properties of *Yakju* by different fungi. Korean J Food Preserv, 21, 573-580
  10. Baek SY, Yun HJ, Choi HS, Hong SB, Koo BS, Yeo SH (2010) Screening and characteristics of useful fungi for brewing from commercial *Nuruk* in chungcheong provinces. Korean J Mycol, 38, 373-378
  11. Kim JH, Kwon YH, Lee AR, Kim HR, Ahn BH (2012) Manufacture of *Koji* using fungi isolation from *Nuruk* and identification of *Koji* molds. Korean J Mycol, 40, 187-190
  12. So MH (1999) Characteristics of a modified *Nuruk* made by inoculation of traditional *Nuruk* microorganism. Korean J Food Nutr, 12, 219-225
  13. Jeong JW, Park KJ, Kim MH, Kim DS (2006) Quality characteristics of *Takju* fermentation by addition of chestnut peel powder. Korean J Food Preserv, 13, 329-336
  14. Song JC, Park HJ, Shin WC (1997) Changes of *Takju* qualities by addition of cyclodextrin during the brewing and aging. Korean J Food Sci Technol, 29, 895-900
  15. Ichishima E, Yamane A, Nitta T, Kinoshita M, Nikkuni S, Oka T, Yokoyama S (1973) Production of a new type of acid carboxypeptidase of molds of the *Aspergillus niger* group. Appl microbiol, 26, 327-358
  16. National tax service (2009) Analysis of liquor regulatory. NTS Liquors license aid center, Seoul, Korea, p 41-42