

탁주발효에 있어서 발효미생물군의 변동에 대하여

신 용 두 · 조 덕 현  
(서울대학교 농과대학 식품공학과)

A Study on the microflora changes during Takju brewing

Yong Doo SHIN, and Duck Hiyon CHO

(Dept. of Food Technology, College of Agriculture, Seoul National University)

ABSTRACT

In order to study ecology of microorganisms during Takju brewing, microflora changes were examined from the start to the sixth day of Takju fermentation in 24 hours intervals.

Takju made from rice, flour and dried sweet potato in a liter volume open container at the laboratory and a sample of Takju mash of a Takju brewing factory were studied for their microflora and their changes during fermentation, together with a sample of Kokja. Results obtained were as follows;

1. The followings were the identified microorganisms in Kokja.

The molds;

*Absidia spinosa*, *Aspergillus parasiticus*.

The yeasts;

*Candida melinii*, *Candida solani*, *Hansenula anomala*.

The bacteria;

*Lactobacillus casei*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*.

2. *Torulopsis inconspicua*, *Lactobacillus casei*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus* were isolated from main mash of laboratory-made Takju samples. The yeast, *Torulopsis inconspicua* which was not present in Kokja and, probably of a contaminant yeast, dominated the yeast flora of Takju mash of rice, flour, and sweet potato of laboratory brewing. The laboratory brewing lots also always showed large population of lactic acid bacteria flora.

3. None of the wild yeasts which were present in Kokja appeared in Takju mashes. The Kokja appears to be of no use as the yeast source for Takju fermentation. Also the Kokja appears to be of not so effective amyolytic and proteolytic enzyme sources considering the microflora characteristics.

Probably the major role of Kokja in Takju fermentation may be to contribute in taste formation.

4. Inoculation of *Saccharomyces cerevisiae* into the mash to the level of  $10^7/ml$  at the start of fermentation greatly changed the ecological aspects eliminating conditions of rather slow rising of natural contaminant yeast population and fermentation which might give

rise to prosperity of lactic acid and *Bacillus* bacteria that would be avoidable.

5. Examination of microflora of the large factory scale Takju fermentation showed the quite similar pattern of microflora and their changes to that of the cultured yeast-inoculated laboratory batch Takju fermentation. The cultured yeast dominated as the only predominant microflora, and the lactic acid bacteria flora were completely suppressed and aerobic bacteria, greatly. Probably this may be the regular microflora pattern of normal Takju fermentation. The role of lactic acid bacteria and aerobic bacteria in Takju fermentation may not be clear yet from this experiment alone.

## 緒 論

한국 고유의 술인 탁주는 옛날 부터 우리나라 사람들이 담그어 마셨던 것으로 알려져 있고 현재에도 일반대중이 널리 즐기고 있어 그 소비량이 많다. 그러나 이에 대한 과학적인 연구는 많지 않다. 최근 金(1968)은 탁주제조에 관한 연구에서 곡자미생물군 및 담금시의 미생물군의 변동에 대하여 연구했고, 관련효모의 동정, 발효력비교, 유산균, 호기성 세균의 수적 변화, 액화 효소, 당화 효소 및 단백질 분해효소의 변화를 조사하여 탁주 양조에 관한 미생물학적, 효소학적인 검토를 한 보고를 볼 수 있을 정도이다. 다만, 한국 탁주와는 다르겠으나 비슷한 제법으로 만들어지는 일본 청주에 있어서 미생물에 관한 연구로는 百瀬(1965, 1967) 등의 연구가 있어서 한국 탁주 보다는 훨씬 많은 연구가 되어 있고 또 山崎(1961)는 조선 곡자 미생물에 관한 것을 조사한 바 있다.

그러나 탁주발효를 발효미생물의 생태학적인 면에서 자세하게 연구한 바는 없으며 실제로 탁주발효가 잘 되고 못 되는 것은 발효에 관여하는 미생물군의 flora의 변화가 정상적이거나 아니냐에 따라 결정되는 것인 바 과연 한국탁주 발효의 정상적인 microflora의 변화는 어떤 것이며 여러가지 외부 조건으로 이 microflora의 변화는 어떤 영향을 받을 것인지 등의 문제는 해결되어 있지 않으므로 이에 필자는 탁주양조의 기초적인 연구의 하나로 실험실 규모의 소량 탁주발효에 있어서 담금 원료를 쌀, 밀가루, 고구마로 하

였을 때의 주 발효 미생물들인 효모, 유산균 호기성세균의 종류 및 이들의 수적 변화를 조사하고 이러한 flora의 변화에 대하여 영향을 주는 외부 조건 중 특히 주모의 사용 등이 이에 미치는 영향들을 조사하였다.

또한 실험실적인 탁주제조의 경우와 실제로 양조장에서 제조하는 규모의 탁주발효의 경우에 있어서 발효미생물군의 flora의 변화에 대하여도 조사하여 실험실에서 얻은 결과를 실용면과 결부시키려고 하여 탁주발효의 미생물학적 특히 생태학적인 면에서의 첫 번째 단계의 한 연구를 시도코자 한 바 다음과 같은 결과를 얻었으므로 여기에 보고하는 바이다.

## 材料 및 方法

### 1. 탁주의 제조

#### (1) 재 료

본 실험에서 사용한 재료들은 각각 다음과 같은 것이었다.

쌀, 밀가루(중력분) : 시장에서 구입한 것임.

절간고구마 : 풍한산업주식회사의 주정제조용 원료를 사용하였음.

곡 자 : 한국곡자주식회사 서울공장 제품

분 곡 : 수원외의 탁주양조장 제품

배양효모 : 국제청기기술연구소 보존

*Saccharomyces cerevisiae*

탁주 mash 81 : 수원의 양조장제품

#### (2) 탁주원료의 배합비

실험에 사용한 탁주는 각각 다음과 같은 배합비로 만들었다.

쌀 탁주 : 재래식 방법에 의하여 쌀 250 gm,

곡자 60 g, 분곡 15 g, 곡자주모 12 ml 수  
도물 450 ml를 사용하여 만들었다.

밀가루 탁주: 현재 시중 탁주양조장에서 채  
택하고 있는 2회 담금법에 의하여 밀가루  
에 물을 뿌려 분상으로 하고 쪄 다음 중국  
술 찹종 30°C에서 40시간 배양 입국을 만  
들고 곡자, 주모와 물을 넣어 20°C정도에  
서 다음과 같이 2회에 나누어 담그었다.

1회: 입국 50 g, 곡자주모 12 ml, 수도물  
90 ml

2회: 밀가루 200 g, 곡자 20 g, 분곡 5 g,  
수도물 410 ml.

고구마 탁주: 절간 고구마를 분상으로 해서  
쪄 다음 절간 고구마 250 g, 밀가루 입국  
주모 50 ml, 곡자 25 g, 수도물 450 ml로  
담그었다.

순수배양 효모 첨가—밀가루 탁주: 밀가루  
입국 50 g, 밀가루 200 g, 곡자 25 g, 맥즙  
주모(Balling 10°의 맥즙에 *Saccharomyces*  
*cerevisiae*를 25°C에서 48시간 배양한 것)  
150 ml, 수도물 650 ml를 써서 담그었다.

수원의 양조장의 탁주: 밀가루를 사용 입국  
을 만들고 주모와 곡자 및 밀가루를 사용  
하여 2회 담금법으로 제조한 것임.

### (3) 발 효

25°C 정도에서 개방식으로 하되, 쌀, 밀  
가루, 고구마 탁주 및 순수배양효모 첨가 탁  
주에서는 1/정도, 수원의 양조장의 경우는  
10 l 정도의 용기를 사용하였다.

## 2. 미생물 실험

### (1) Media

Mold; **Peptone dextrose agar**

Dextrose 10 g, Peptone 5 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
1 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g, Agar 20 g,  
Distilled water 1,000 ml, Rosebengal 1:  
30,000, Streptomycin 30  $\gamma$ /ml

Yeast; **Wort agar**

Wort (Balling 10°), Na-propionate 0.25%,  
Agar 1.5%

T.T.C. agar

T.T.C. 0.05 g, Glucose 0.5 g, Agar 1.5 g,

Distilled water 0.1 ml

**Akiyama B medium**

Glucose 10 g, Peptone 2 g, Yeast Extract  
1.5 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.4 g,  
Agar 30 gm, Distilled water 1,000 ml, pH  
5.5~5.7, Na-propionate 2 g,

Lactic acid bacteria; **Liver infusion agar**

Liver infusion 500 ml, Tryptone 5 g, Dis  
tilled water 500 ml, Agar 18 g, Na-thio-  
glycolate 0.1%,  $\text{CaCO}_3$  1.5%, pH 7.0

Aerobic bacteria; **Nutrient broth agar**

Beef extract 3 g, Peptone 5 g, Distilled  
water 1,000 ml, pH 7.0~7.2, Agar 1.5%

### (2) Viable count

매일 탁주 mash 0.5 ml를 취하여 dilution  
shake plate method에 의하여 희석액과  
media를 petri-dish에 부었다. 단 유산균의  
경우는 1회 pour-plate한 다음 동일배지를  
그 위에 다시 부어 굳혔다.

순수배양효모 첨가탁주 및 수원의 양조장  
탁주의 yeast 조사에서는 Akiyama B medi-  
um으로 plate를 만든 다음 희석액 0.1 ml  
를 glass-spreader로 도말하였다. 곡자미생  
물 조사에서는 곡자 1g을 살균수에 넣고  
15분간 잘 흔들어서 현탁액을 만들고 현탁  
액을 10 배씩 차례로  $10^{-2}$ ~ $10^{-6}$ 으로 한 다음  
mold, yeast는 각각의 배지에 희석액 0.1 ml  
를 도말했고, bacteria는 희석액 1 ml과 배  
지 10 ml을 같이 pour-plate 하였다. 이와  
같이 하여 얻은 plate를 배양기에서 배양하  
여 발생한 colony를 균종별로 세었다.

Viable count는 가급적 colony 수가 30~  
200개가 되게 하여 세었고 희석배수를 곱하  
여 1 ml중의 미생물수로 하였다.

### (3) 배 양

25°C에서 효모는 3일간, 유산균은 4일간  
호기성 세균은 2일간 배양하였다.

### (4) T.T.C. red 효모 순도 %

T.T.C. agar overlay technique(Akiyama,  
1967)에 의하여 Akiyama B medium에서 2  
~3일 자란 yeast colony에 T.T.C. agar를

부어 overlay 를 만들고 25°C에서 2~3 시간 배양한 후 red 염색을로 부터 호모 순도를 결정하였다.

(5) 미생물군의 동정

Petri-dish 에 나타난 단일 colony 에서 순수분리하고 streak dilution method 및 dilution shake plate method 에 의거 재차 순수분리를 행한 후 각각의 미생물들을 동정하였다.

미생물의 동정은 yeast 는 Lodder(1952) 등의 방법에 의했고 bacteria 는 American Bacteriologists Association 의 Manual of microbiological Method(1957)에 준하고 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology

(1957) 및 Skerman 의 A Guide to the Identification of Genera of Bacteria(1957)에 의거했으며 mold 는 Guilman's 의 A Manual of Soil Fungi(1957) 및 Fennel & Rapper 의 The Genus *Aspergillus* (1965) 등에 의거하여 동정하였다.

實驗結果

1. 곡자 및 발효중의 Takju mash 중의 발효 미생물군에 대한 조사.

곡자 및 담금중의 Takju mash 중의 발효미생물을 조사한 결과는 Table 1 과 같다.

Table 1. Microflora in Kokja and Takju mash during fermentation

	Microflora in Kokja		Microflora in Takju mash	
	Strains	Viable Count	Takju	Strains
Mold	<i>Absidia spinosa</i> <i>Aspergillus parasiticus</i>	10×10 <sup>5</sup> 10×10 <sup>4</sup>		
Yeast	<i>Candida melinii</i>	8×10 <sup>4</sup>	R F S	<i>Torulopsis inconspicua</i>
	<i>Candida solani</i>	1×10 <sup>3</sup>	F'	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	<i>Hansenula anomala</i>	5×10 <sup>3</sup>	F''	
Lactic acid bacteria	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	3×10 <sup>3</sup>	R F S	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> (50%)
	<i>Lactobacillus casei</i>	9×10 <sup>3</sup>	F'	<i>Lactobacillus casei</i> (50%)
			F''	<i>Lactobacillus casei</i>
Aerobic bacteria	<i>Bacillus subtilis</i>	5×10 <sup>5</sup>	R F S	<i>Bacillus subtilis</i> (90%)
	<i>Bacillus pumilus</i>	5×10 <sup>4</sup>	F' F''	<i>Bacillus pumilus</i>

Remarks:

- R: Rice Takju of laboratory batch
- F: Flour Takju of laboratory batch
- S: Sweet Potato Takju of laboratory batch
- F': Flour Takju with pure cultured yeast inoculation
- F'': Flour Takju of a factory scale fermentation

이 결과를 보면 곡자와 발효중인 Takju mash 에 있어서 lactic acid bacteria 와 aerobic bacteria 는 그 미생물 종류에 있어서 큰 차이가 없으나 yeast 에 있어서는 그 microflora 가 전혀 다른 것을 알 수 있다. 즉 곡자중의 호모는 담금중에 전혀 나타나지 않고 다른 야생호모가 오염되거나 순수배양

호모만 나타났다.

(2) 탁주발효중의 main-mash 의 온도 및 총 산의 변화.

실험실에서 담근 쌀 탁주와 양조장에서 담근 대규모의 탁주에 있어서 발효에 따른 온도, pH 및 총 산의 변화를 조사한 결과는 각각 Fig. 1, 2 및 3 과 같았다.

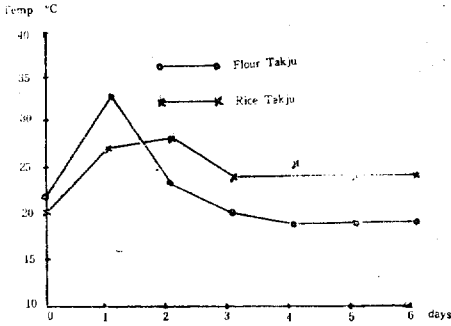


Fig. 1. Temperature changes during Takju brewing.

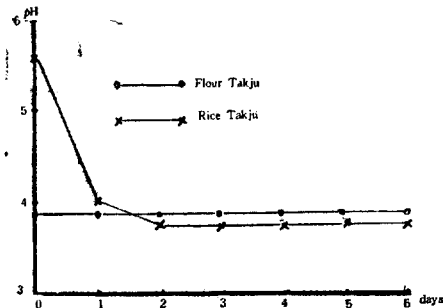


Fig. 2. pH changes during Takju brewing.

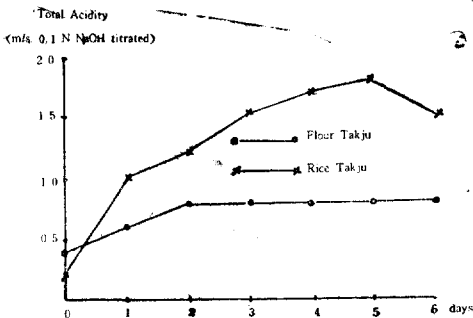


Fig. 3. Total acidity changes during Takju brewing.

이들 결과를 보면 탁주발효에 따른 온도의 변화는 쌀 탁주 및 양조장 밀가루 탁주의 두 가지 경우에 있어서 다 2일경까지는 온도가 상승하였다가 3일에 다시 내려와 그 이후 거의 일정한 온도를 유지하였다.

pH 변화에 있어서는 쌀 탁주의 경우 담금 초에 pH 5.6이었던 것이 발효 1일만에 3.9로 내려왔고 양조장 탁주의 경우는 시초부터 3.9로 되었고 2일 이후는 이 두가지 탁주가 다 pH 3.9의 일정한 pH를 유지하고

있었다.

총 산의 변화에 있어서는 쌀 탁주는 발효 초부터 5일까지 계속 증가하였다가 감소하는 경향을 보여주었으며 양조장 탁주는 2일까지만 증가하고 그 이후는 변화하지 않았다.

(3) 실험실에서 제조한 쌀, 밀가루 및 고구마 탁주 발효에 있어서 미생물군의 변동.

실험실에서 담근 쌀, 밀가루, 고구마 탁

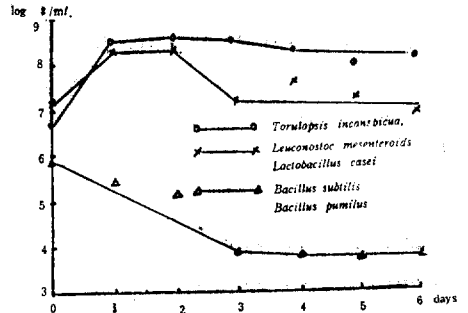


Fig. 4. Microflora changes during fermentation of rice Takju.

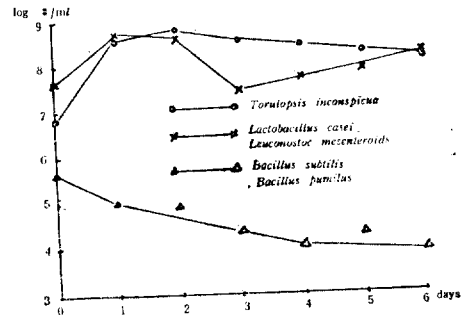


Fig. 5. Microflora changes during fermentation of flour Takju.

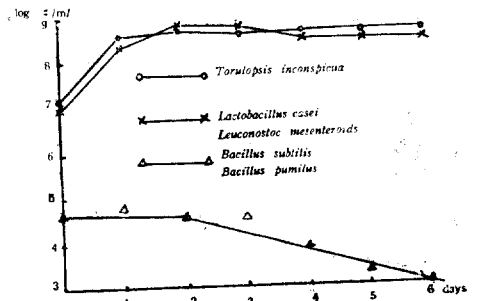


Fig. 6. Microflora changes during fermentation of sweet potato Takju.

주의 발효에 있어서 미생물군의 변동을 조사한 바 Fig. 4, 5 및 6 과 같은 결과를 얻었다.

Fig. 4 및 5 의 결과를 보면 쌀과 밀가루의 탁주발효에 있어서는 microflora 의 균종이나 flora 변동의 모양이 비슷하였고 Fig. 6 에서 볼 수 있는 바와 같이 고구마는 발효후반기에 있어서 유산균의 감소를 보이지 않는 것이 특징이라고 하겠다.

이 세 경우에 있어서 yeast 는 꼭자중에 없었던 야생효모인 *Torulopsis inconspicua* 만이 단 1종의 우세한 yeast 로서 발효를 시종 지배하고 있음은 주목할 만 한 사실이라고 하겠다.

쌀, 밀가루, 고구마 탁주 (어느 경우나 *Lactobacillus casei* 가 *Leuconostoc mesenteroides* 보다 약간 많았었다. Flora 의 변동에 있어서는 쌀과 밀가루 탁주에 있어서 3일 이후 감소하였다가 다시 증가하는 경향을 보였는데 비해, 고구마 탁주에 있어서는 전혀 감소하지 않고 있었다.

호기성 세균은 이 들 세 가지 경우에 있어서 모두 *Bacillus subtilis* 가 90% 이상을 차지하고있었으며 *Bacillus pumilus* 는 이 따금 검출될 정도로 그 수가 매우 적었다.

(4) 탁주발효에 있어서 순수 배양한 yeast 를 첨가했을 때의 미생물군의 변동.

맥즙에 배양한 *Saccharomyces cerevisiae* 를 주모로 사용하여 밀가루 탁주를 담그었을 경우의 미생물군 변화는 Fig. 7 과 같았다.

밀가루 탁주의 발효에 있어서 순수 배양한 yeast 를 주모로서 첨가했을 때는 Fig. 7 에 나타난 바와 같이 그 microflora 와 그 변화의 양상이 주모를 첨가하지 않았을 경우에 비하여 현저하게 상이함을 볼 수 있다. 즉 우세한 효모로서 배양효모인 *Saccharomyces cerevisiae* 1종 만이 야생효모인 *Torulopsis inconspicua* 를 대신하여 발효를 지배하고 있었으며 lactic acid bacteria 가 그 존재를 무시할 수 있을 정도로 크게 억제되고 있음을 볼 수 있다.

(5) 수원시내의 양조장 밀가루 탁주 발효에 있어서의 미생물군의 변동.  
실제로 양조장에서 큰 규모 탁주발효에 있어서 미생물군의 변화를 조사한 결과는 Fig. 8 과 같았다.

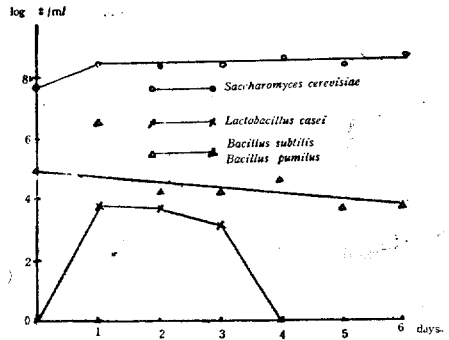


Fig. 7. Microflora changes during fermentation of flour Takju with pure cultured yeast inoculation.

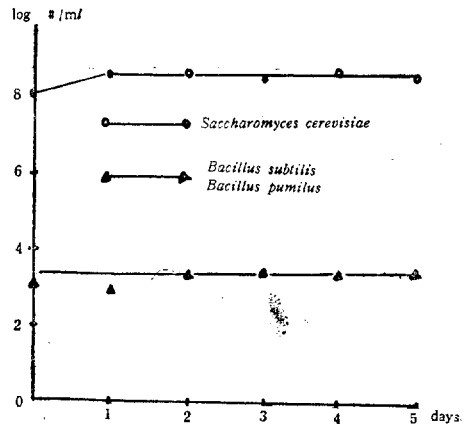


Fig. 8. Microflora changes during a factory scale fermentation of flour Takju.

Fig. 8 을 보면 microflora 나 그 변동이 일견하여 Fig. 7 의 그것들과 비슷함을 볼 수 있다. 즉 양조장에 있어서 실제로 탁주를 생산하는 경우에 발효에 있어서의 미생물군의 변동은 필자가 소규모로 실험실에서 주모를 첨가하여 탁주를 발효시켰을 경우에 있어서의 미생물군의 변동과 그 양상이 일치함을 알 수 있었다. 다만 양조장에 있어서의 대규모 탁주발효에 있어서는 lactic acid bacteria 의 생장이 극심하게 억제되었음인지 전혀

lactic acid bacteria 를 분리할 수가 없었던 것이 실험실 규모 탁주발효의 경우와 약간 다른 점이다.

곡자 및 발효중의 탁주에서 분리 동정된 미생물들의 형태 및 생리적 특징은 각각 다음과 같았다.

*Saccharomyces cerevisiae*

Growth in wort: After 3 days at 25°C cells are oval (4.0~5.0)×(5.5~6.5) $\mu$ , single or in pairs, after 10 days at 25°C only sediment is formed.

Streak culture on wort agar: After 10 days smooth, semiglossy, soft, convex, border straight.

Slide culture: No pseudomycelium.

Sporulation: 1~4 spores are formed in the ascus.

Fermentation: Glucose+, Sucrose+, Maltose+, Galactose+, Lactose-, Raffinose+  $\frac{1}{3}$ ,

Sugar assimilation: Glucose+, Sucrose+, Maltose+, Galactose+, Lactose-.

Assimilation of potassium nitrate: Negative.

Ethanol as a sole source of carbon: No growth.

Splitting of arbutin: Negative.

*Torulopsis inconspicua*

Growth in liquid wort: After 3 days at 25°C, cells round to oval (2.0~3.0)×(3.0+4.0) $\mu$ , single or in pairs, after 10 days at 25°C only sediment is formed.

Streak culture on wort agar: Smooth, semiglossy, convex, border straight.

Slide culture: No pseudomycelium.

Fermentation: Glucose+, Sucrose-, Maltose-, Galactose-, Lactose-, Raffinose-.

Sugar assimilation: Glucose+, Sucrose-, Maltose-, Galactose-, Lactose-, Raffinose-, Assimilation of KNO<sub>3</sub>: Negative.

Ethanol as a sole source of carbon: Slight growth.

Splitting of arbutin: Absent.

*Candida melinii*

Growth in liquid wort: After 3 days at 25°C cells are oval (3.5~6.0)×(5.0~9.0) $\mu$ , after 10 days sediment and ring are formed.

Streak culture on wort agar: After 10 days rugous, dull, chalky, tuft, raised, border pseudomycelium.

Slide culture: Pseudomycelium.

Fermentation: Glucose+, Sucrose+, Maltose-, Lactose-, Raffinose-.

Sugar assimilation: Glucose+, Sucrose+, Maltose+, Galactose-, Lactose-.

Assimilation of potassium nitrate: Positive  
Ethanol as a sole source of carbon: No growth.

Splitting of arbutin: Positive.

*Candia solani*

Growth in liquid wort: After 3 days at 25°C cells are oval (2.5~3.5)×(3.0~5.0) $\mu$ , single or in pairs, after 10 days at 25°C ring and sediment are formed.

Streak culture on wort agar: Corrugate, semiglossy, slimy, raised, border pseudomycelium.

Slide culture: Pseudomycelium.

Fermentation: Glucose+, Sucrose+, Maltose-, Galactose-, Lactose-.

Sugar assimilation: Glucose+, Sucrose+, Maltose+, Lactose-.

Assimilation of potassium nitrate: Absent.

Ethanol as a sole source of carbon: Growth, pellicle formed.

Splitting of arbutin: Positive.

*Hansenula anomala*

Growth in liquid wort: After 3 days at 25°C cells are round to oval (2.5~4.0)×(4.0~6.0) $\mu$ , single or in pairs, after 10

days at 25°C sediment and pellicle are formed.

Streak culture on wort agar: After 10 days, smooth, highly glossy, slimy, flat, border straight.

Slide culture: No pseudomycelium.

Sporulation: Spores are hat shaped, 1~4 per ascus.

Fermentation: Glucose+, Sucrose+, Maltose+, Galactose+, Lactose-, Raffinose+.

Sugar assimilation: Glucose+, Sucrose+, Maltose+, Galactose+, Lactose-.

Assimilation of potassium nitrate: Positive. Ethanol as a sole source of carbon: Growth, pellicle is formed.

Splitting of arbutin: Positive.

#### *Leuconostoc mesenteroides*

Spheres, 0.5 to 0.7 $\mu$  in diam., occurring in pairs and short or long chains. Gram-positive. Non-motile.

Glucose gelatin stab, no liquefaction, indole not produced.

Nitrite not produced from nitrates.

Acid from sucrose, acid from pentoses.

Optimum temperature: Between 21 and 25°C. Heterofermentative.

#### *Lactobacillus casei*

Short or long rods, occurring in short or long chains. Non-motile. Gram-positive. Homofermentative.

Optimum temperature: Between 28 and 32°C

Acid from glucose, fructose, mannose, galactose, maltose, lactose, mannitol and salicin.

#### *Bacillus subtilis*

Rods, 0.5 to 0.6 by 1.5 to 3.0 $\mu$ , single or in pairs. Motile. Gram-positive.

Spores 0.3 by 0.8 $\mu$ , ellipsoidal to cylindrical, central to paracentral, formed in 48 hours.

Sporangia not definitely swollen.

Growth in 7 per cent NaCl broth.

Starch hydrolyzed.

Good growth under anaerobic conditions in glucose broth; pH of culture is 5.2 or below.

#### *Bacillus pumilus*

Almost all the morphological and physiological characteristics are same as those of *Bacillus subtilis* except starch not hydrolyzed and nitrites not produced from nitrates.

#### *Absidia spinosa*

Sporangia pyriform.

Sporangiophore occurring.

Internodal.

Spores elongate, cylindrical.

Spores 2 $\times$ 5 $\mu$ .

#### *Aspergillus parasiticus*

Conidial heads in pale or intense yellow or yellow green shades when young.

Colonies not shifting to brown on Czapek's agar. Conidia definitely crenulate. Sterigmata typically in a single series.

Heads radiate: Sterigmata uniseriate.

### 考 察

곡자의 microflora 중 molds는 *Absidia spinosa*와 *Aspergillus parasiticus*였는데 이는 조선 곡자중에 *Absidia*가 많다고 한 山崎(1961)의 보고와 일치하는 것이며 일반적으로 당화력이 우수하다고 하는 *Rhizopus*나 곡자중에 있을 것이라고 예측되는 *Mucor*, *Penicillium*은 나타나지 않았다.

Yeast는 *Candida melinii*, *Hansenula anomala* 및 *Candida solani* 등 야생 효모가 발견되었다.

세균은 lactic acid bacteria인 *Lactobacillus casei*, *Leuconostoc mesenteroides*와 *Bacillus subtilis* 및 *Bacillus pumilus*가 분리되었다.

이들 결과로 미루어 보아 본 실험에서 사



용한 곡자중의 미생물군은 이들이 모두 인위적으로 접종된 것 같지는 않고 자연상태에서 발생한 미생물군들이었다.

탁주발효에 있어서 곡자의 역할에 대한 과학적인 근거는 아직 철저히 연구된 바 없으나 우선 다음과 같은 것을 생각할 수 있을 것이다. 즉, 탁주발효에 관여하는 효모 기타 미생물군의 접종을 하여주는 역할, 둘째는 탁주발효에 필요한 여러가지 enzyme를 공급하여 주는 역할 및 곡자에 특유한 성분으로써 탁주 특유의 맛을 내는 성분의 공급원으로서의 역할을 한다는 것 등이다.

그러나 필자가 지금 조사한 곡자중의 발효미생물군의 양상을 보면 탁주발효에 필요한 발효미생물 집종의 역할을 하는 데는 곡자는 별로 효과가 없는 것 같으며 enzyme의 공급이라는 점에서는 *Bacillus subtilis*의 amylase 및 protease가 탁주발효중 유용하지 않을가 하는 가능성이 생각될 뿐 현재 분리된 molds의 이러한 역할에 대한 것은 기대하기 어려운 것이 아닌가 생각이 된다.

곡자중의 미생물군이 탁주발효에 필요한 미생물을 접종하여 준다는 역할을 하여 주지 못하는 것은 곡자중의 효모와 발효중에 나타나는 효모의 종류가 전연 다른 것이었다는 실험결과를 보면 명백하다. 순수배양 효모를 주모로 사용하지 않고 쌀, 밀가루 및 고구마를 원료로 하여 만든 탁주에서는 야생효모인 *Torulopsis inconspicua*만이 우세한 효모로서 발효를 지배하고 있었는데 이는 곡자중에 없었던 yeast로서 외부에서 오염된 것이 분명하다.

이 결과로 보아 곡자중에 있었던 yeast가 반드시 그 곡자를 사용한 발효중의 탁주에서 발효를 지배하는 yeast가 되는 것은 아니며 발효 초기에 여러 경로를 통하여 들어간 각종 yeast 중에서 가장 그때의 생태학적인 조건에 적합한 yeast 종류가 결국 발효를 지배하는 yeast가 되는 것이 분명하다. 본 실험에 있어서도 어떠한 생태학적인 조건 때문인지는 확실치 않으나 아마 외부

에서 오염되어 들어간 *Torulopsis inconspicua*가 곡자중의 yeast인 *Candida*나 *Hansenula*보다 더욱 좋은 생태학적인 조건하에 놓여있기 때문에 단일종의 우세한 yeast로서 발효를 지배한 것이 아닌가 생각된다.

이러한 점으로 보아 곡자의 yeast를 탁주발효의 yeast source라고 믿고 탁주를 제조하려고 하는 것은 발효를 정상적인 방향으로 이끌 수 있는 확실성이 없는 것이므로 심히 비과학적인 방법이라고 하지 않을 수 없다.

이러한 난점을 극복할 수 있는 한 가지 방법은 본 실험 Fig. 7에 나타나 있는 바와 같이 다량의 배양효모를 발효초에 발효물에 투입하여 주는 것이라 하겠다. Fig. 7의 결과를 보면 배양효모인 *Saccharomyces cerevisiae*를 주모로서 사용했을 때는 탁주의 발효는 오로지 이 1종의 배양에 의하여 지배되고 있었음을 볼 수 있다.

秋山(1959, 1962, 1963) 등도 일본 청주의 개방식 발효에서의 야생효모 오염문제를 연구한 바, 야생 효모의 오염은 자연법칙 즉 호모상호간의 antagonism 때문이라고 하였고 오염방지책 중의 제일 좋은 방법은 강력한 주모를 다량 사용하는 것이라고 보고한 바 있다.

실험실에서 주모를 첨가하지 않고 만든 쌀, 밀가루, 고구마 탁주들의 microflora의 특징의 하나는 또 lactic acid bacteria가 왕성하게 증식되어 있다는 점일 것이다. 주모로서 배양효모를 사용한 탁주발효에 있어서는 lactic acid bacteria의 flora가 심히 억제된다는 Fig. 7의 결과와 비교 고찰한다면 lactic acid bacteria와 적어도 배양 yeast 사이에는 어떤 antagonism의 관계가 있을 것 같다. 이러한 antagonism의 원인이 무엇인지 현재로서는 잘 알 수 없으나 lactic acid bacteria는 그 발육에 필요한 영양분의 요구조건이 까다로우므로 아마도 주모로서 가해준 수적으로 압도적으로 우세한 yeast가 왕성하게 생육하면 lactic acid bacteria가 그 발육에 필요한 어떤 영양분을 yeast가 다 소

모하여 버리기 때문에 bacterial crisis 현상이 나타나는데 한 원인이 되지 않는가 생각된다.

이러한 점으로 보아 주모의 사용이 탁주 제조에 있어서 alcohol fermentation을 정상적으로 이끄는 데 꼭 필요할 뿐 아니라 lactic acid bacteria의 flora를 억제함으로써 lactic acid fermentation을 억제하여 탁주에 신맛을 주는 lactic acid의 생성을 억제하는데에도 중요한 의의가 있지 않는가 생각된다.

쌀, 밀가루, 고구마를 원료로 하여 실험실에서 소규모로 탁주를 만들었을 때의 이들 탁주들의 발효에 있어서의 microflora나 그 flora changes를 상호 비교하면 비슷하다고 하겠으나 고구마탁주 발효에 있어서는 쌀이나 밀가루의 경우보다 lactic acid bacteria의 수가 약간 많은 것을 볼 수 있다. 고구마가 그 화학성분이 쌀이나 밀가루와 크게 상이하여, yeast가 고구마 원료에서는 쌀이나 밀가루에서처럼 잘 생육하지 못하는 대신 lactic acid bacteria는 잘 생육하기 때문이 아닌가 생각된다. Aerobic bacteria는 그 수의 90% 이상을 *Bacillus subtilis* 한 종류가 차지하고 있는데 발효탁주 중에는 어느 경우에 있어서나 그 수가 미미하며 또 탁주발효 기간을 통하여 그 수의 증가를 볼 수 없었다. 이런 점으로 보아 곡자에서 이미 효소를 대부분 생성한 다음 포자상태로 당금중에 존재하나 anaerobic한 조건, 낮은 pH, 온도등의 불리한 조건때문에 증식하지 않고 그대로 존재하기 때문에 이같은 결과를 보여준 것이 아닌가 생각된다.

百瀬(1965) 등도 청주술뎛(moromi)의 변질(부패)에 관한 연구에서 정상 및 변질 술뎛의 microflora의 pattern을 제시하였는데 aerobic bacteria는 담금초에  $10^7$ /ml이었던 것이 발효 6일경에  $10^2$ /ml로 생균수가 감소는 하나 사멸하지 않고  $10^2$ /ml로 20일까지도 생존하고 있었다는 것을 보고하였다. 이에 비하면 한국탁주는 aerobic bacteria의

수가  $10^3$ /ml 정도로 남아있게 되어 일본청주 보다는 생존수가 약간 많은 편이다. 이런 점으로 보아 aerobic bacteria는 탁주 발효에 있어서 어떤 역할을 하는것 같지는 않다.

양조장에서 대규모로 탁주를 제조하는 경우의 탁주발효에 있어서의 microflora와 그 변화의 양상은 실험실에서 소규모로 주모를 접종하여 만드는 탁주의 발효에 있어서의 microflora와 flora 변동의 모양이 대략 같으나 다만 양조장에서의 대규모 발효의 경우는 lactic acid bacteria의 flora가 극심하게 억제되었음 인지 전연 lactic acid bacteria를 검출할 수 없었다는 점이 소규모 실험실 탁주발효의 경우와 다른 점이다.

이는 이미 말한 타와 같이 강력한 배양효모의 주모를 과다할 정도로 발효에 사용하였기 때문에 yeast와 lactic acid bacteria의 antagonism의 관계가 극단적으로 발전하여 lactic acid bacteria의 flora의 억제가 완벽하게 이루어졌기 때문이 아닌가 생각된다.

여하간 탁주 발효에 있어서 강력한 배양효모의 주모로써의 사용이 탁주의 yeast에 의한 alcohol fermentation을 정상적으로 이끌고 lactic acid bacteria의 flora를 억제하는 데 필수불가결한 것이며 이와 같은 상태하에서 이루어지는 탁주발효가 금일에 있어서의 탁주발효의 가장 정상적인 fermentation pattern이 아닌가 생각된다.

결국 이상의 고찰을 종합하던 금일에 있어서의 한국탁주의 정상적인 발효는 강력한 주모효모가 lactic acid bacteria나 기타 미생물을 거의 완전히 억제 하면서 이루어지는 alcohol fermentation이 아닌가 생각된다.

곡자는 미생물원으로서의 역할을 못하며 enzyme 원으로서의 역할도 그리 큰 효능을 갖고 있지 못하는 것이 아닌가도 생각되며 아마 곡자 특유의 어떤 화학성분으로써 탁주의 맛에 기여하는 것이 그 주요 역할이 아닌가 생각 되나 이점은 앞으로의 연구

에 기대하여야 할 것이다. 아마도 금일의 탁주는 입국을 사용하는 식의 탁주제조에 있어서는 입국이 amylase 나 protease 같은

enzyme의 주요 공급원이 되지 않는가 생각된다.

### 摘 要

탁주발효에 있어서의 발효미생물군의 생태학적인 연구를 하기 위하여 발효미생물군의 변화를 담금초에서부터 6일 까지 매일 조사하였다. 탁주는 쌀, 밀가루, 및 고구마를 사용하여 실험실에서 1l 정도의 용기를 사용 개방식으로 담금했고, 양조장탁주 미생물군의 조사는 담금 약 8l를 양조장에 놓아두고 실험하였다. 또 이 실험과 병행하여 곡자중의 미생물군도 조사하였으며 이들 얻은 결과는 다음과 같았다. □

1. 곡자에서 분리 동정된 미생물군중 mold는 *Absidia spinosa*, *Aspergillus parasiticus* 이었고 yeast는 *Candida melinii*, *Candida solani*, *Hansenula anomala* 이었으며 bacteria는 lactic acid bacteria인 *Lactobacillus casei* 및 *Leuconostoc mesenteroides*, aerobic bacteria인 *Bacillus subtilis* 및 *Bacillus pumilus* 이었다.

2. 소규모로 실험실에서 쌀, 밀가루 및 고구마를 원료로하여 제조한 탁주에서는 *Torulopsis inconspicua*, *Lactobacillus casei*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Bacillus subtilis* 및 *Bacillus pumilus* 가 분리되었다.

이 발효에 있어서는 *Torulopsis inconspicua* 가 단일종의 yeast로써 외부에서 오염되어 들어간 것이라고 생각된다. 주모를 사용하지 아니한 소규모 실험실 탁주발효에 있어서는 lactic acid bacteria의 flora가 크게 우세하였다.

3. 곡자중에 있었던 yeast는 발효하고 있는 탁주에는 전연 발견할 수 없었다. 따라서 곡자는 탁주발효에 있어서 호모원으로서의 역할을 하지 못하는 것 같다. 또 곡자는 그 곡자중의 microflora 양상으로 보아 amylase 나 protease의 효소원을 공급하여주는 데 큰 역할을 하는 것 같지도 않고 곡자의 탁주에 있어서의 주요역할은 맛에 기여하는 것이라고 추정된다.

4. *Saccharomyces cerevisiae*를 사용하여 주모를 만들고 이것을 담금초 효모수가  $10^7/ml$ 가 되게 첨가하여 탁주를 발효 시켰을 때는 탁주발효의 미생물군의 생태의 양상이 크게 이 yeast에 의하여 변하여 이 배양 yeast가 다른 양생효모나 lactic acid bacteria의 flora를 크게 억제하고 단 하나의 미생물 군종으로써 탁주발효를 지배하였다.

5. 양조장에 있어서의 대 규모 탁주 발효에 작용하는 microflora나 flora의 변동은 주모를 첨가하여 만든 소규모 실험실 탁주발효의 경우와 그 양상이 같아서 주모로 사용한 배양효모의 flora만이 발효를 지배하였고, lactic acid bacteria는 나타나지 않았다. 이러한 탁주발효의 microflora pattern이 금일에 있어서의 정상적인 탁주발효의 형식이라고 인정되었다. 탁주발효에 관여하는 lactic acid bacteria 및 aerobic bacteria의 역할은 분명치 않다.

### REFERENCES

1. 金燦祚, 1968. 韓國農化誌, 10, 69.
2. 百瀬, 小林, 小泉, 外池, 1965. 日釀協誌, 60, 539.
3. 蘆澤長, 1965. *ibid*, 60, 900.
4. 仙台國稅局鑑定官室, 1965. *ibid*, 60, 822.
5. 菅間誠之助, 1963. *ibid*, 58, 587.
6. 百瀬洋夫, 外池良三, 1964. *ibid*, 59, 368.
7. 下出谷, 福井, 1965. *ibid*, 60, 846.
8. 出崎百治, 1962. 日釀工誌, 40, 315.
9. 小玉健吉, 京野忠司, 1963. *ibid*, 41, 113.
10. 小玉健吉, 京野忠司, 松山茂, 1966. *ibid*, 44, 8.
11. 竹田正欠, 塚原寅次, 1967. *ibid*, 45, 898.
12. 山崎百治, 1961. *ibid*, 39, 167.
13. 秋山裕一, 1959. *ibid*, 37, 586.
14. 秋山裕一, 古川敏郎, 1962. 日農化誌, 36, 358.

15. 秋山裕一, 1963. 日釀協誌, **58**, 1155.
16. 國稅廳, 1966. 釀造學講本.
17. Akiyama, H. and Sugano, 1967. *J. Ferment. Tech.*, **45**, 1093.
18. Breed, S. R., E.E.G. Murray, and N. R. Smith, 1957. *Bergey's manual of Determinative Bacteriology*, 7th ed., William and Wilkins Co.
19. Guilman, J. C., 1957. *A Manual of Soil Fungi.*, Iowa State College Press.
20. Lodder, J. R., Kreger van Rij and N.J.W., 1952. *The yeasts, A Taxonomic Study.* Interscience Publisher, Inc.
21. Rapper, K. B., and D. I. Fennel, 1965. *The Genus Aspergillus*, William and Wilkins Co.
22. Skerman, V. D. B., 1957. *A Guide to the Identification of Genera of Bacteria.* William and Wilkins Co.
23. Society of American Bacteriologists, *Manual of Microbiological Methods*, Mc Graw-Hill Book Co., New York.