

Rhizopus Koji 를 이용한 무증자 쌀탁주 양조

손순기 · 노영훈 · 김현진 · 배상면*

배한산업주식회사

Takju Brewing of Uncooked Rice Starch Using *Rhizopus Koji*

Shon, Soon-Ki, Young-Heun Rho, Hun-Jin Kim and Sang-Myun Bae*

Bae Han Ind. Co. Ltd. Suwon 445-890, Korea

The Takju brewing of raw rice starch was carried out by the simultaneous saccharification-fermentation using *Rhizopus sp. koji* and yeast, and compared with the Takju mash brewed by the conventional method. *Rhizopus koji* was prepared with uncooked rice for Takju brewing without cooking of rice starch. Alcohol concentration of Takju mash brewed with uncooked rice was slightly higher of 1.8% than that with cooked one. Amino acid contents was almost double and fusel oil contents was lower in uncooked brewing. The Takju mash prepared after fermentation without cooking of rice had a characteristic odor of raw material and a good quality of taste.

현재 탁주 제조공정은 쌀 또는 밀가루를 증자한 후 粒麴, 粉麴 및 穀子를 단용 또는 혼용하여 액화, 당화, 발효를 동시에 진행시키는 방법을 사용하고 있다(1-3). 탁주는 옛날부터 우리나라의 대표적인 재래주로서 일반대중에 널리 음용되어 왔으나, 최근 소비자의 성향이 고급화됨에 따라 그 소비량이 감소되어가는 추세인데 이러한 현상은 탁주의 품질향상에 대한 연구가 없이는 더욱 가속화될 것으로 보인다. 탁주 제조과정 중 전분의 액화 및 당화를 용이하게 하기 위하여 반드시 증자과정을 거치게 되는데 증자에 소요되는 에너지는 총 생산공정의 약 30%에 달할 것으로 추정된다. 대체에너지로서 최근 biomass로부터 ethanol을 생산하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있으며 특히 전분의 증자시에 소요되는 에너지를 절약하기 위하여 생전분으로부터 ethanol을 생산하기 위한 연구가 이루어지고 있다. Ueda 등(4-6)은 고구마와 카사바의 생전분을 *Rhizopus* 속과 *Aspergillus niger* 의 glucoamylase로 당화시킬 수 있음을 보고하였고 Sandstedt(7), Sochoch 등(8), Mizokami 등(9) Fuwa(10) 등도 생전분 당화를 시도하였고, Svensby

등은 생전분을 0.2% H₂SO₄로 세척, 멸균하여 74% 수율로 13~14% 알콜을 얻었음을 보고하였다.

국내에서도 정 등(11-13), 이 등(14-16), 오 등(17)의 무증자 알콜생산 연구가 있고 배 등(18)의 *Asp. shirousami*을 이용한 카사바 전분의 무증자 알콜발효 연구가 있고 정 등(19)에 의한 *Asp. niger*을 이용한 보고가 있다. 이러한 연구들은 대부분 석유 대체에너지로서 알콜을 생산하기 위한 연구가 대부분이며 탁주발효에 무증자 발효법을 응용한 예는 없다. 전분은 상온에서 formic acid, dimethyl sulfoxide 등과 같은 약품이나 알칼리 용액으로 처리하여도 호화가 일어나지만(18-20), 알콜 발효를 위해서는 중화하거나 별도의 약제를 처리하여야 하므로 음료용으로는 적당한 방법이 되지 못한다. 탁주의 무증자 제조법에 관한 것은 백하주의 제조에서 유래를 찾아 볼 수 있다(21).

본인 등은 *Rhizopus* 속 *koji*를 무증자한 밀기울에 접종하여 제조한 후 증자하지 않은 백미와 혼합하고 주모를 첨가하여 동시 당화발효를 행한 결과, 종래적인 방법으로 제조된 탁주와는 다른 독특한 맛과 원료의 생취(raw flavor)가 발효 술덧으로 이행된 곡물고유의 향기가 있는 탁주를 발효할 수 있었다. 이러한 연구는 아직 보고된 바 없으므로 종래적인 방법으로 제조한 탁주와

Key words: Uncooked rice starch, *Rhizopus koji*, Takju brewing
*Corresponding author

비교실험을 행하였으며 그 결과를 보고한다.

재료 및 방법

재료

탁주 양조용 원료미 및 koji 제조용 쌀은 1988년도산 정부미를 구입하여 무증자 탁주사입용으로 사용하였으며, Roller 분쇄기로서 18mesh 이하로 분쇄하여 사용하였다. 곡자는 일반 양조장에서 구입하였고 효모는 상품화되어 있는 건조효모 *Saccharomyces cerevisiae* (조흥화학공업주식회사 제품)을 사용하였다. Koji 제조용 균으로는 본사 연구실에 보존 중인 *Aspergillus kawachii* BH325와 *Rhizopus* sp. BH256을 사용하였다.

Koji 제조

무증자 탁주용으로는 *Rhizopus* sp. BH256을 3% Malt extract 배지에 접종, 28°C에서 48시간 진탕배양한 것을 종균으로 하고, 0.3N HCl 용액을 80%(w/w) 함유한 생밀기울에 20%(w/w) 수준으로 접종한 다음 30°C 항온실에서 3일간 배양시키고 건조하였다. 증자 탁주용으로는 *Aspergillus kawachii* BH325 포자를 증자된 쌀에 접종하고 30°C 항온실에서 일반 입국 제조공정과 같은 조건으로 제곡하였다(22).

담금방법

종래적인 방법에 의한 탁주의 제조는 *Aspergillus kawachii* koji 400g과 물 600ml 및 양조용 건조효모 5g을 5l 용기에 1단 사입하고, 28°C 항온실에서 48시간 지난 후 증자한 쌀 1600g과 물 2.4l 및 곡자 80g을 2단 사입한 후, 다시 28°C 항온실에서 72시간 발효시킨 후 60mesh 체로 걸러서 물을 첨가하여 탁주의 주정도수인 알콜 7%로 되도록 제성하였다. 무증자 탁주의 제조는 Roller 분쇄기로 18mesh 이하로 분쇄한 정부미 600g을 증자하지 않고 *Rhizopus* sp. koji 18g과 물 900ml 및 건조효모 5g을 5l 용기에 1단 사입하고 28°C 항온에서 48시간 지난 후 분쇄미 1400g과 물 2.7l *Rhizopus* sp. koji 42g을 2단 사입하고, 다시 28°C 항온실에서 72시간 발효시킨 후 증자 탁주와 같이 제성하였다. 무증자 발효의 경우 증자 발효의 경우보다 물 첨가량이 많은 이유는 증자하기 전 수침공정에서 30% 정도의 수분흡수량을 계산한 것이다. 위의 과정을 요약하여 표로 나타내면 Table 1과 같다.

분석방법

Table 1. Brewing method of Takju.

	Cooked		Uncooked	
	1st stage	2nd stage	1st stage	2nd stage
Uncooked rice			600g	1400g
Rice steamed		1600g		
Tap water	600 ml	2.4 l	900 ml	2.7 l
Kug ¹⁾	400g			
<i>Rhizopus</i> Koji			18g	42g
<i>Kokja</i> ²⁾		80g		
Dry yeast	5g		5g	
Ferment. Temp.	28°C	28°C	28°C	28°C
Ferment. Temp.	48 hr.	72 hr.	48 hr.	72 hr.

1) *Aspergillus kawachii* BH 325 Koji prepared with cooked rice by the conventional method

2) Commercialized *Nurook* made of wheat bran by mixed culture of naturally occurred microorganisms.

Ethanol은 일반 증류법에 따라 측정하였고, 산도는 술덧을 여과하여 여액 10ml를 중화하는데 요하는 0.1N NaOH의 ml수로 표시하였다(23). 잔류환원당은 술덧을 여과하여 적당량 희석하고 Fehling 방법으로 정량하였다(23). Fusel oil은 Shimadzu Gas Chromatograph (Model GC-14A)를 이용하여 3.0×200mm의 glass column에 PEG 20M/60~80mesh을 충전시킨 곳에 N₂로 60ml/min로 하여 F.I.D.로 detect하였다. 아미노산은 발효가 끝난 후 술덧을 60mesh체로 여과하고 주세법 기준에 따라 알콜함량을 7% 되게 물을 가하여 제성시키고 제성주 10ml를 8,000×g에서 10분간 원심분리 후 Biotronik LC 5000 아미노산 자동분석기를 이용하여 아미노산함량을 조사하였다.

효모 및 총 세균수 측정은 술덧을 생리식염수에 희석시키고 효모는 Yeast ext.-Malt ext. 배지에, 세균은 Nutrient agar에 도말시킨 다음 효모는 28°C, 세균은 37°C에서 배양시켜 총 균수를 측정하였다.

결과 및 고찰

알콜 및 환원당의 비교

발효시간의 경과에 따른 알콜의 생성량 비교는 Fig. 1과 같다. 무증자 당화발효의 경우가 종래적 방법에 의한 증자 당화발효보다 최종 알콜함량이 1.8% 이상 높았다.

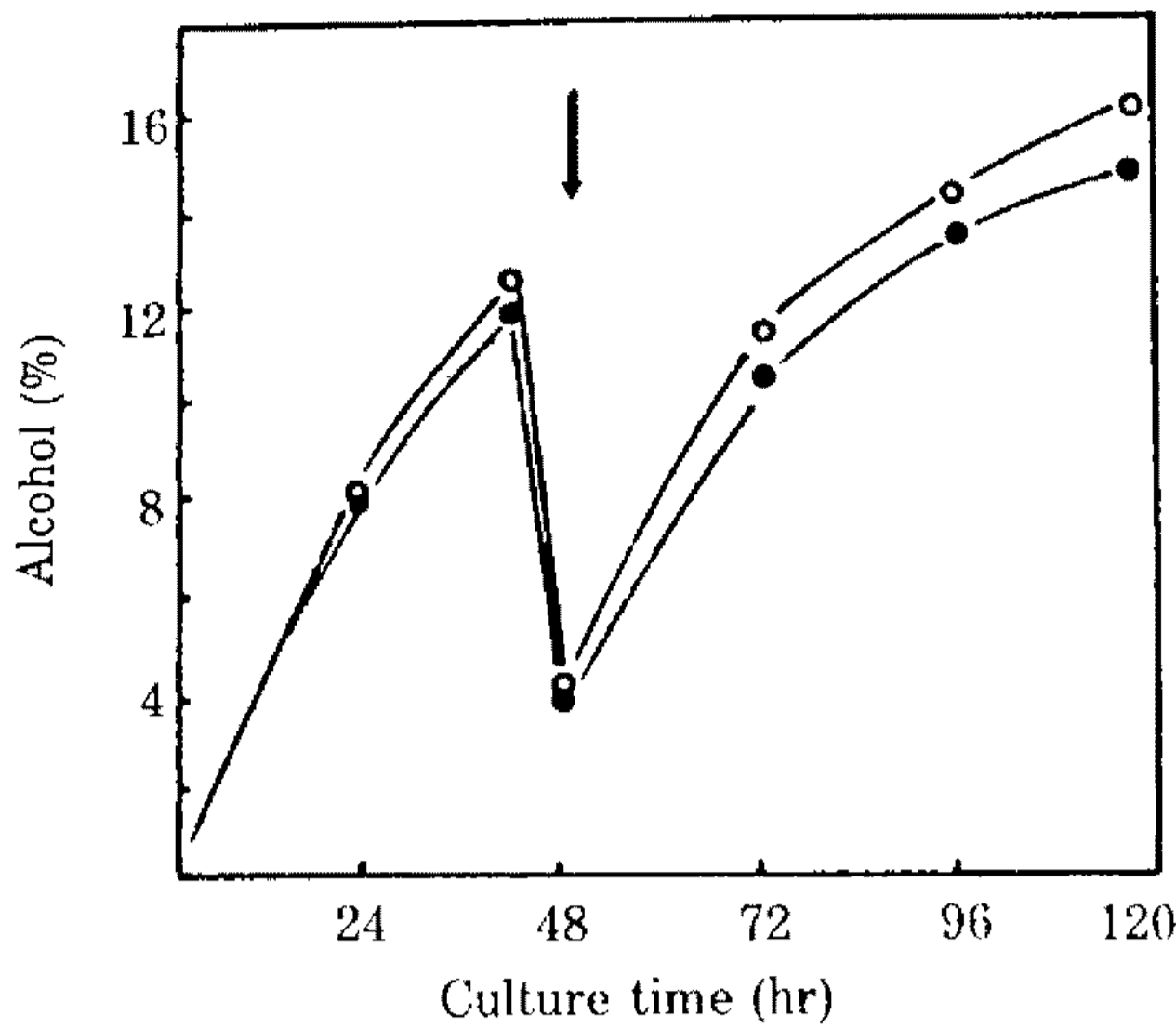


Fig. 1. Alcohol content in Takju mash
 ○—○: Simultaneously saccharification and fermentation with uncooked rice starch by *Rhizopus* sp. koji and yeast
 ●—●: With cooked rice starch by conventional method
 ↓: Second stage addition of materials.

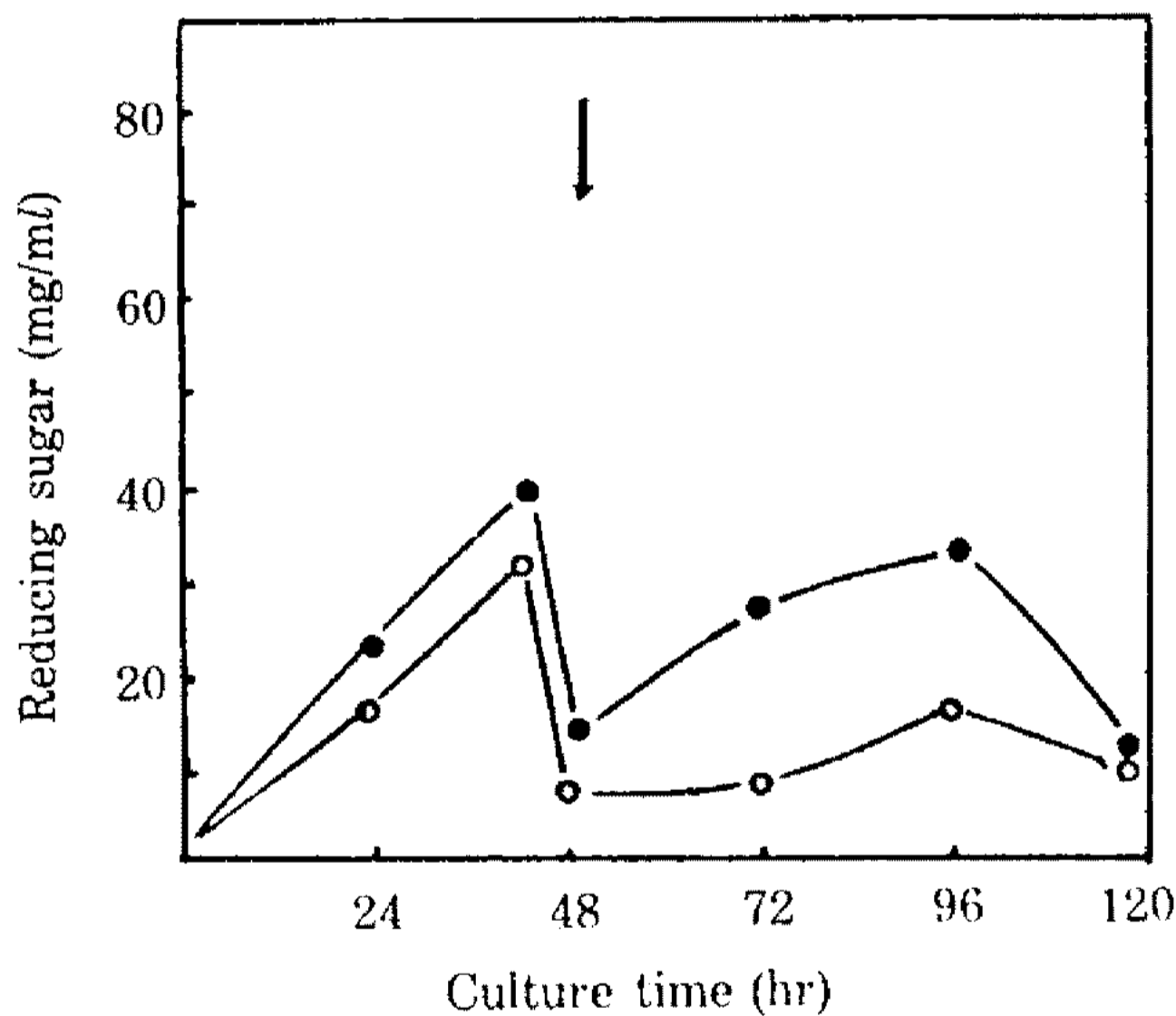


Fig. 2. Residual reducing sugar content in Takju mash
 Symbol mark: same as Fig. 1.

이것은 무증자의 경우 열에 불안정한 비타민과 같은 영양원이 파괴되어 효모 증식에 영향을 미친 때문일 것으로 추정한다. 술덧에 잔존하는 환원당은 Fig.2와 같이 2단 담금 후 48시간까지 즉, 총 발효시간 96시간까지는 증자의 경우가 무증자보다 약 2배 가량 함유되었다가 발효 말기인 120시간 후에는 같은 수준으로 유지되었다. 이것은 증자에 의하여 쌀전분이 쉽게 glucoamylase의 작용을 받았을 것으로 추정되며 생성되는 환원당량에 비하여 효모의 당소모속도가 늦기 때문인 것으로 생각된다.

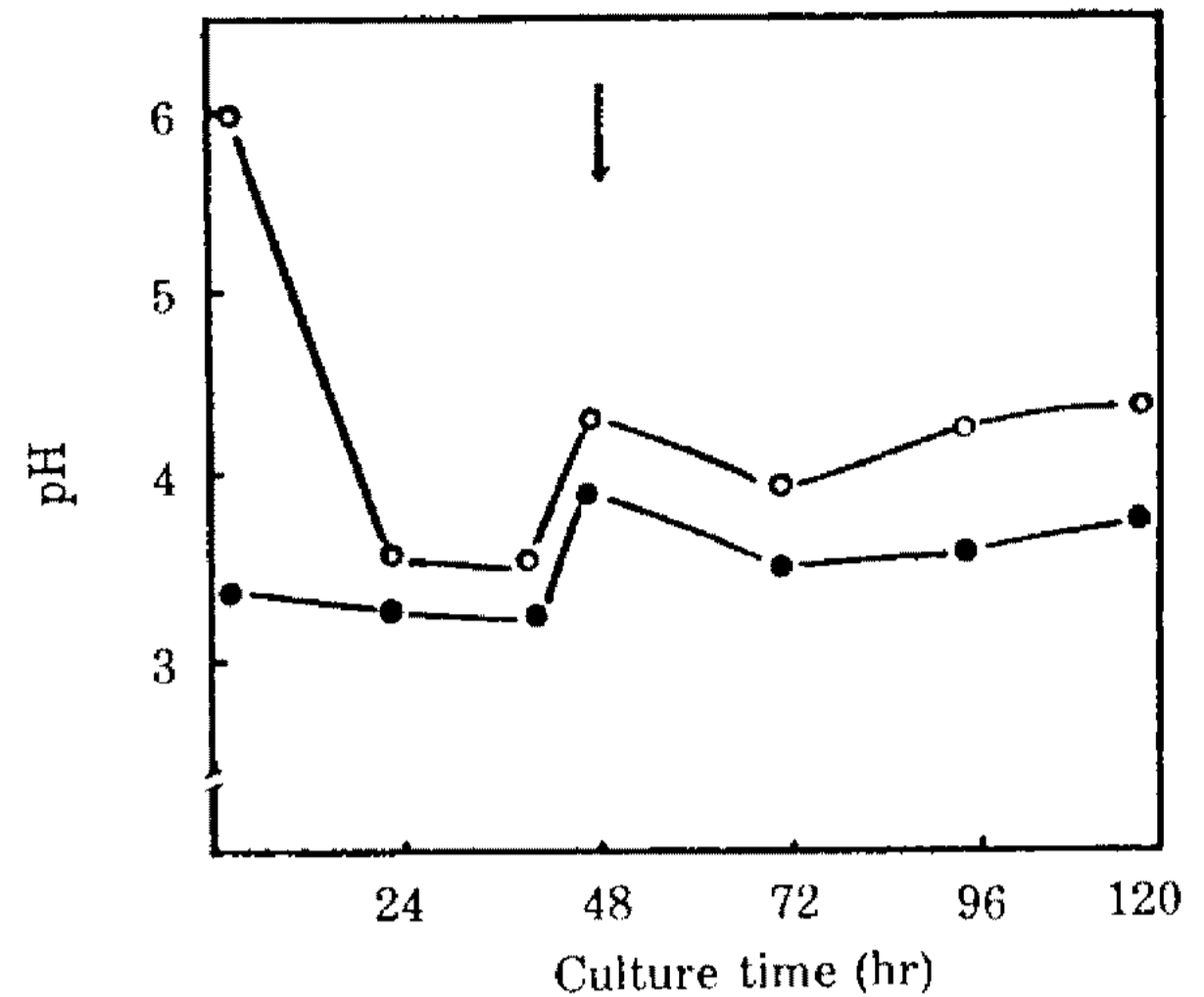


Fig. 3. pH changes of Takju mash during fermentation
 Symbol mark: sample as Fig. 1.

산도 및 pH의 변화

증자 탁주의 경우는 세균오염에 의한 산패를 방지하기 위하여 lactic acid 또는 citric acid를 첨가하고 1단 사입시 입국자체가 함유한 유기산과 주모에 의한 pH 강하로 인하여 초기의 pH가 3.2 부근에서 발효를 시작하는 반면 무증자 탁주의 경우는 *Rhizopus* sp.의 amylase의 최적 pH가 5.0 부근이고 발효시 유기산이 급속히 생성되므로 pH 조절을 위한 별도의 유기산을 첨가할 필요가 없다. 따라서 본 연구에서도 증자의 경우는 종래적인 방법대로 citric acid를 첨가하여 pH3.2 부근에서 발효를 시작하였고 무증자의 경우 pH 조정없이 원래의 pH6.0에서 시작하였다. 발효경과 중 산도의 변화는 Fig.3과 같고 pH의 변화는 Fig.4와 같다. 무증자의 경우 초기 pH6.0에서 24시간 발효 후에 pH가 3.5로 급격히 떨어졌다가 이후는 서서히 상승하여 pH4.5로 되었으며 산도도 24시간 경과 후 5.0으로 증가하였다가 이후 서서히 증가하였다. Sato 등(24)의 보고에 의하면 *Rhizopus* sp.는 발효경과 중 fumaric acid를 생성한다. 따라서 무증자의 경우는 fumaric acid에 의하여 산도가 증가한 것으로 추정된다. 증자의 경우는 초기 pH를 조정하였으므로 pH는 발효경과 중 약간 상승하였고 산도는 2단 사입 후에 급격히 감소하였다가 이후 서서히 증가하여 발효가 끝난 후는 약 5.0 정도에 이른다.

효모 및 세균수의 변화

발효경과시 효모수의 변화는 Fig.5와 같고 총 세균수의 변화는 Fig.6와 같다. 효모의 수는 초기 접종농도인 4.2×10^7 ml에서 24시간 발효 후는 약 10배 가량 증가하다가 이후 큰 변화는 없었으며 증자 및 무증자 발효에

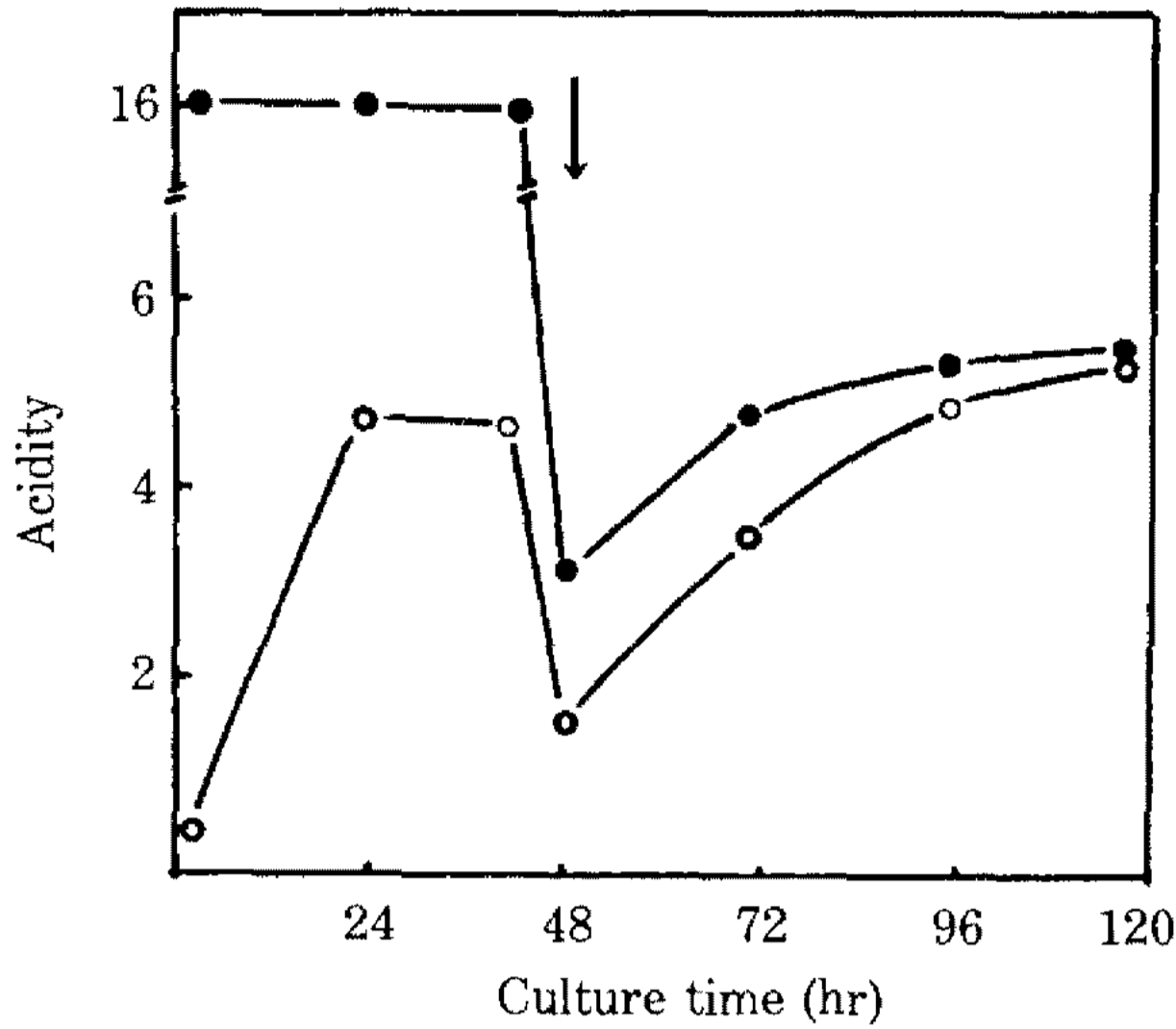


Fig. 4. Acidity changes of Takju during fermentation
Symbol mark: same as Fig. 1.

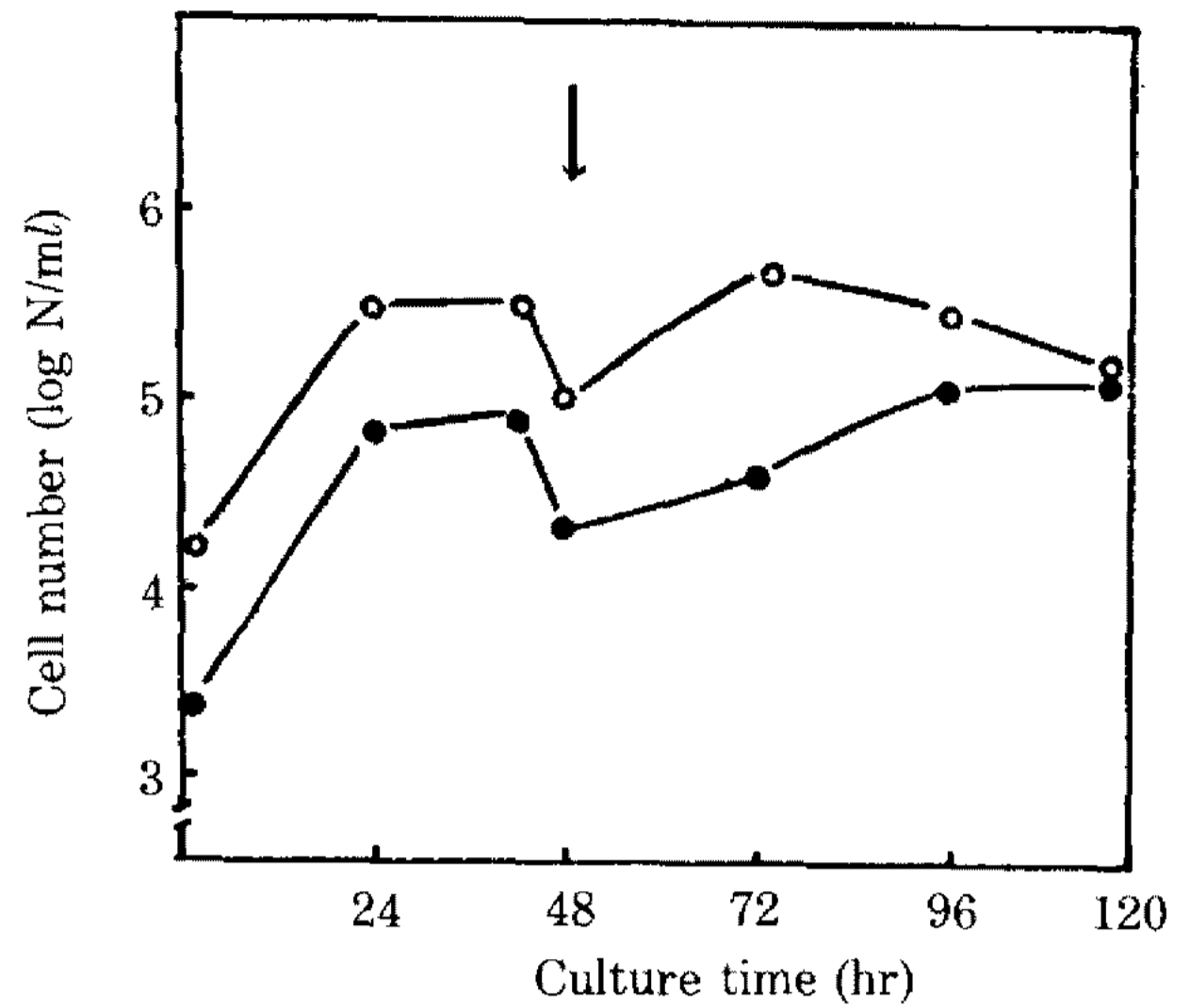


Fig. 6. Total count of bacteria in Takju mash
Symbol mark: same as Fig. 1.

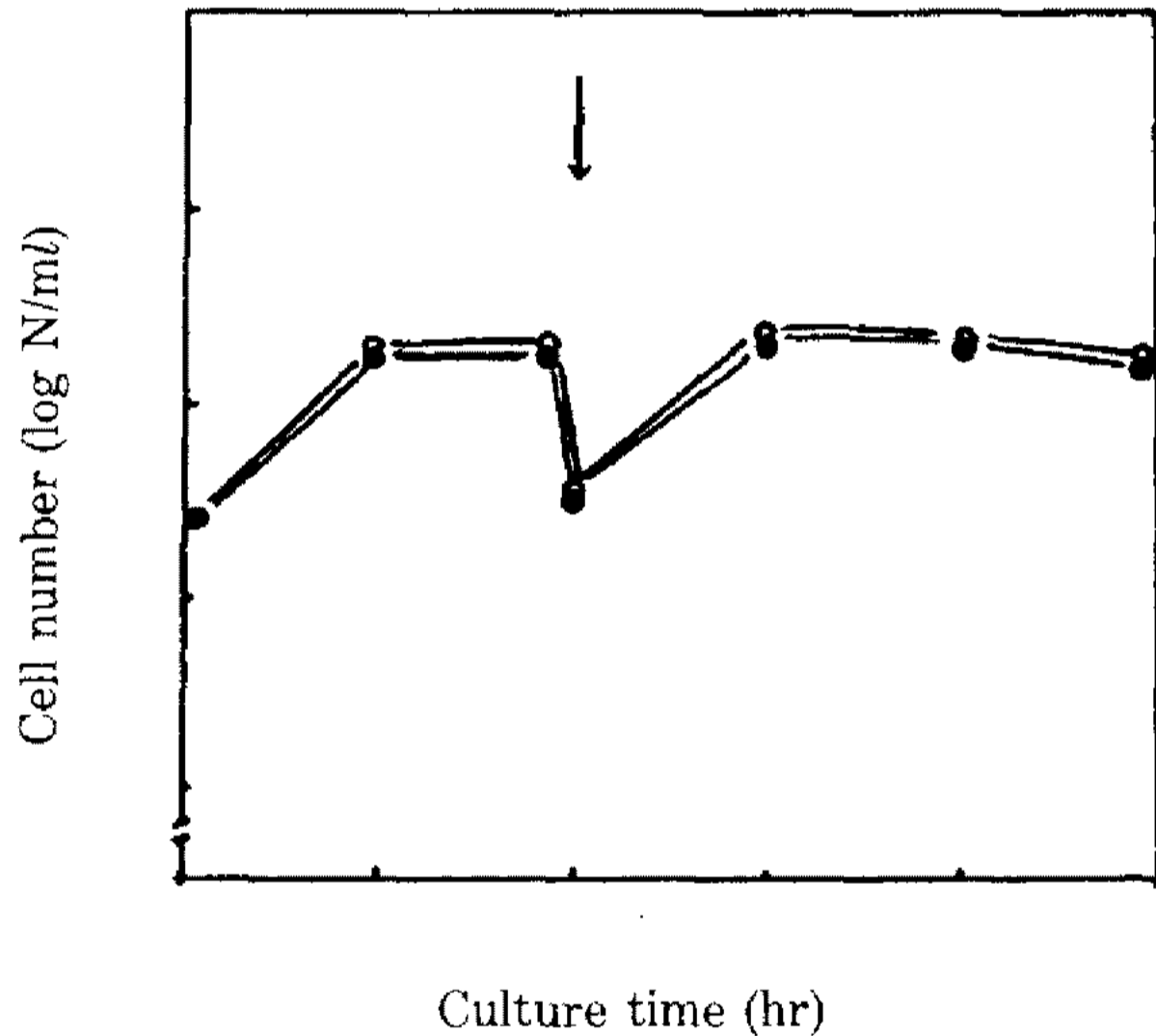


Fig. 5. Total count of yeast in Takju mash
Symbol mark: same as Fig. 1.

따른 차이가 없었다. 총 세균수는 무증자의 경우가 증자한 쪽보다 약 10배 정도 많다가 2단 사입 후 24시간 지난 다음에는 약 20~30배 정도 많다가 발효가 끝날 무렵에는 서로 비슷한 숫자를 유지하고 있다. 즉, 무증자의 경우는 원료미에 존재하는 세균이 증식한 것으로 보이며 *Rhizopus sp. koji*의 효소활성화를 위해서 pH 6.0으로 시작하는데 비하여 증자의 경우 초기 pH가 3.2에서 시작하므로 세균증식을 위한 호조건이 될 수 없다. 발효 말기에 가서 서로 비슷한 총 세균수를 보이는 것은 무증자의 경우 koji로 사용한 *Rhizopus sp.*가 Fumaric acid를 강하게 분비한 때문이며 Fumaric acid에 의한 산도가 증가한 배양 말기에 총균수가 서서히 줄어들었음을 보여준다.

Table 2. Comparison of fusel oil contents in Takju mash brewed with cooked or uncooked rice

Component	μl/ml	
	Uncooked	Cooked
Acetaldehyde	0.04	0.04
Methyl alcohol	0.025	0.034
Propyl alcohol	0.13	0.16
iso-Butyl alcohol	0.047	0.097
iso-Amyl alcohol	0.15	0.19

Fusel oil

대부분의 주류 중에 미량으로 잔존하여 숙취의 원인이 되는 것으로 알려진 fusel oil 및 유해한 methanol의 함량을 비교한 결과는 Table 2와 같다. 즉 무증자 탁주의 경우 iso-butyl alcohol은 증자 탁주보다 1/2 정도이며 alcohol 함량도 약간씩 적었다. 그러나 향미면에서는 무증자 탁주가 훨씬 우수한 것으로 보아 volatile한 ester계통의 함량이 많을 것으로 추정되며 여기에 대한 것은 차후에 보고할 예정이다.

아미노산 함량

탁주발효가 끝난 후 60mesh 체로 거르고 알콜 함량을 조절하기 위하여 물을 가하여 제성주로 만든 다음 아미노산 함량을 조사한 결과는 Table 3과 같다. 전체적으로 proline의 경우를 제외하는 무증자 탁주가 증자 탁주보다 아미노산 함량이 약 2배 정도 많았다. 이것은 koji 자체의 protease 역가가 무증자의 경우 월등히 높았기 때문인 것으로 추정되나 proline의 경우는 확실하지

Table 3. Amino acid contents in Takju mash prepared after brewing

Amino acid	Takju brewing with	
	Cooked	Uncooked
Lysine	5.26	13.9
Histidine	4.64	19.94
Arginine	17.02	25.59
Aspartic acid	4.31	8.59
Threonine	0.85	2.25
Serine	6.81	12.91
Glutamic acid	8.56	16.45
Proline	15.27	7.89
Glycine	3.38	7.79
Alanine	5.89	8.46
Valine	2.64	7.21
Methionine	1.94	4.29
Isoleucine	7.06	17.96
Leucine	9.90	18.59
Tyrosine	8.71	19.98
Phenylalanine	3.54	5.71
Cystein	5.62	12.81

않다. 일반적으로 아미노산 함량과 주질과의 관계는 명확히 확립되어 있지 않으나 탁주는 다른 증류주와는 다르게 발효가 끝난 그 상태에서 음용하게 되므로 아미노산 함량이 높은 것이 유리할 것으로 사료된다.

요 약

쌀 전분을 이용하여 무증자 당화 발효법으로 쌀 탁주를 제조하였으며 증자 당화 발효법에 의한 종래적인 방법과 비교하였다. *Rhizopus* 속 균주를 증자하지 않은 생 쌀에 접종하여 통상적인 방법에 따라 koji를 제조하여 사용하였으며 원료미를 분쇄하여 증자하지 않은 상태로 발효하였다. 무증자 당화 발효의 경우 종래적 방법에 의한 발효의 경우보다 최종 alcohol 함량이 1.8% 높았고 유기산 생성이 급격히 이루어져 별도의 pH 조정이 필요 없었다. 효모의 숫자는 차이가 없었고 세균은 무증자의 경우 2단 사입 후 24시간까지는 증자의 경우보다 많다가 발효가 종료될 시점에서는 비슷하였다. 발효가 끝난 후 제성주로 하였을 때 무증자의 경우는 fusel oil 함량은

증자의 경우보다 적었고 아미노산 함량은 약 2 배로 높았으며 원료미에서 유래된 생취 (raw flavor)가 유지되었다.

감사의 말

이 실험을 위해 조언을 해주신 유전공학센터 고영희 박사, 고려대학교 방원기 교수와 대량사입실험에 협조해주신 부산탁주합동 박효만 회장께 감사드립니다.

참고문헌

1. 임병중 : 새로운 탁주 기술, p.45(1971).
2. 임병중 : 새로운 탁주 기술, p.47(1971).
3. 임병중 : 새로운 탁주 기술, p.66(1971).
4. Ueda, S. and Y. Koba : *J. Ferment. Technol.*, **58**, 237(1980).
5. Ueda, S. and C.T. Zenin, D.A. Monteiro and Y.K. Park : *Biotechnol. Bioeng.*, **23**, 291(1981).
6. Saha, B.C. and S. Ueda : *J. Ferment. Technol.*, **61**, 67(1983).
7. Sandstedt, R.M : *J. Biol. Chem.*, **156**, 203(1937).
8. Sochochi, T.J. and H.W. Beach : *Cereal Chem.*, **38**, 34(1961).
9. Mizokami, K., M. Osaki and K. Kitahara : *J. Agric. Biol. Chem.*, **51**, 299(1977).
10. Fuwa, H. : *J. Biochem.*, **41**, 583(1979).
11. 정만재, 다니구치 하지메, 마루야마 요시하루 : 산업미생물학회지, **9**, 185(1981).
12. 정만재, 다니구치 하지메, 마루야마 요시하루, 이미자 : 산업미생물학회지, **10**, 123(1982).
13. 정만재, 다니구치 하지메, 마루야마 요시하루, 이미자, 정재현 : 산업미생물학회지, **10**, 259(1982).
14. 이용현, 조구형 : 산업미생물학회지, **14**, 29(1986).
15. 이용현, 조구형 : 산업미생물학회지, **14**, 399(1986).
16. 조구형, 이용현 : 산업미생물학회지, **14**, 407(1986).
17. 오평수, 차두중, 서항원 : 산업미생물학회지, **14**, 415(1986).
18. 배 무, 이재문 : 산업미생물학회지, **11**, 181(1983).
19. 한면수, 정동효 : 한국식품과학회지, **17**, 258(1985).
20. Chua, J.W. and N. Fukui : *J. Ferment. Technol.*, **62**, 123(1984).
21. 이성우 : 한국식품, p.239(1984).
22. 국세청 기술연구소, 대한약탁주제조중앙회 : 탁약주 제조강본(1990).
23. 일본경도대학 농학부 농예화학연구실 : 농예화학실험서, 제 2 권 p.527(1964).
24. Sato, M., T. Ohba and R. Yoshida : *J. Brew. Soc. Japan*, **77**, 557(1982).

(Received July 23, 1990)