

구기자 잎 막걸리 제조용 효모의 선발 및 최적 알코올 발효조건

김영현¹ · 주정일² · 이봉춘² · 김현호² · 이종수^{1*}

¹배재대학교 바이오 · 의생명공학과, ²충남농업기술원 청양 구기자 시험장

Screen of a Novel Yeast for Brewing of *Gugija* Leaf *Makgeolli* and Optimal Alcohol Fermentation Condition

Young-Hun Kim¹, Jeong-Il Joo², Bong-Chun Lee², Hyun-Ho Kim² and Jong-Soo Lee^{1*}

¹Department of Biomedical Science and Biotechnology, Paichai University, Daejeon 302-735, Korea

²Cheongyang Boxthorn Experiment Station, Chungnam Agricultural Research and Extension Service, Cheongyang 345-872, Korea

ABSTRACT : The goal of this study was to screen a useful alcohol fermentative yeast for *Gugija* leaf *makgeolli* (GI *makgeolli*) brewing and establish its optimal fermentation condition. *Gugija* leaves with various alcohol fermentative yeasts were added into the mixture of cooked non-glutinous rice and *koji*, and then fermented at 25°C for 7 days. Among several GI *makgeolli*, ethanol contents was the highest in GI *makgeolli* made by *S. cerevisiae* F-1. Therefore, we selected *S. cerevisiae* F-1 as suitable yeast for brewing of GI *makgeolli*. GI *makgeolli* with the best total acceptability and high antihypertensive action was obtained when cooked non-glutinous rice (120 g), boiled D.W (100 mL) and JJ *koji* (60.5 g/300 sp) were mixed and fermented for 2 days at 30°C with *S. cerevisiae* F-1 (5%), and added again cooked non-glutinous rice (150 g), glutinous rice (100 g), D.W (500 mL) and *Gugija* leave (0.1%/cooked rice) and further fermented for 5 days at 25°C.

KEYWORDS : Commercial *Saccharomyces cerevisiae* F-1, *Gugija* leaf *Makgeolli*

서론

근래에 막걸리의 숙취문제 해결에 따른 기호도 증가와 저장성 연장 및 막걸리 중의 다양한 생리기능성들이 일부 보고되면서 순수 막걸리와 더불어 다양한 과일이나 약용 식물 등을 첨가한 혼합형 막걸리들이 속속 상품화되고 있으며 이로 인해 막걸리 국내 수요와 외국 수출이 지난 몇

년에 걸쳐 크게 증가하여 왔다(Min *et al.*, 2011). 그러나, 이들의 무분별한 생산에 따른 과학적인 품질 관리의 부실과 새로운 품질 특성이나 우수성 규명 등에 관한 미진한 연구 등으로 수요 증가가 최근 둔화되고 있는 실정이다.

한편, 구기자(*Lycium chinensis* Miller)는 가지과(Solana-ceae)에 속하는 낙엽덩굴성 관목으로 우리나라를 비롯하여 중국 동북부, 대만, 일본 등지에서 재배 및 자생되고 있다. 구기자에 관한 연구는 주로 구기자 열매(*Lycii fructus*)와 뿌리(지골피, *Lycii cortex*)의 약리효능을 중심으로 연구가 진행되어(Park *et al.*, 2007), 자양강장 효과와 눈을 밝게 해주는 효능 외에도 간, 신장 질환과 소갈 등에 대한 치료 효과 등 다양한 효능들이 보고되었다(Song *et al.*, 2009). 또한 구기자 잎(*Lycii folium*) 역시 열을 내리고 당뇨와 눈을 맑게 하는 등의 효능이 있어서 허약으로 인한 발열과 목마름 등의 치료에 사용하고 있다(Lee *et al.*, 2008).

본 연구자들은 구기자 표준 품종과 교배종에는 심혈관 질환 예방과 항산화 활성 등 다양한 생리기능성 물질들이 함유되어 있음을 확인하였고(Park *et al.*, 2007), 이들 구기자를 이용하여 제조한 가공품들 중 구기자 차와 구기자 약주는 항고혈압 활성이 우수하였음을 동물 실험을 통하여

Kor. J. Mycol. 2013 June, 41(3): 167-171
<http://dx.doi.org/10.4489/KJM.2013.41.3.167>
 pISSN 0253-651X
 © The Korean Society of Mycology

*Corresponding author
 E-mail: biotech8@pcu.ac.kr

Received April 21, 2013
 Revised July 19, 2013
 Accepted July 22, 2013

©This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

검증하여 보고한 바 있다(Lee *et al.*, 2008). 또한, 전통 구기자 약주 제조 시 1%의 구기자를 첨가하여 제조한 약주가 76%의 항고혈압 활성을 보였음을 보고하였고(Kim *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2005), 지골피 0.1%와 구기자 잎 0.1%, 두충 0.1% 감초와 민들레 각각 1.0%를 덧밥에 첨가하여 알코올 발효시켜 제조한 구기자 약주가 전체적인 기호도가 우수하면서 항고혈압성 엔지오텐신 전환효소 저해 활성이 68.5%로 높았음을 보고하였다(Lee *et al.*, 2005).

구기자 잎 막걸리에 관한 연구는 미흡하여 송 등(Song *et al.*, 2009)이 구기자 엑기스를 덧밥에 1.0% 첨가하여 제조한 막걸리가 기호성이 우수 하면서 항고혈압활성이 있음을 보고 하였고 백 등(Baek *et al.*, 2011), 민 등(Min *et al.*, 2012)은 구기자-맥문동 막걸리의 제조 및 품질 특성을 보고하였을 뿐이다. 그러나 이들 역시 대체로 경제성이 적어 산업화에 어려움이 있으므로 실질적인 구기자 잎 막걸리의 상품화를 위해서는 값이 저렴한 구기자 잎을 이용한 구기자 잎 막걸리의 개발이 실시되어야 할 것으로 생각 된다.

본 연구에서는 고품질 막걸리 개발의 일환으로 가공에 거의 이용되고 있지 않은 구기자 잎을 이용한 고급 막걸리를 경제적으로 생산하고자 먼저 구기자 잎 막걸리용 최적 발효효모를 선정하고 구기자 잎 막걸리 발효 최적 조건으로 막걸리 발효에 미치는 구기자 잎의 첨가 농도와 최적 발효일수 등을 검토하였다.

재료 및 실험 방법

원료, 균주 및 시약

멤쌀은 2011년 9월에 경기도 이천에서 재배된 것을 시중에서 구입하여 사용하였고 찹쌀도 2011년도에 재배된 것을 시중에서 구입하여 사용하였다.

주모제조용 효모로는 시판 알코올 발효용 효모 7종(*S. coreanus* C-1, *S. cerevisiae* F-1, M-2, K-3, R-4, *S. bayanus* E-1, P-2)과 배재대학교 생물공학 실험실에서 보관중인 우수 알코올 발효 효모 2종(*S. cerevisiae* K-7, *S. cerevisiae* K-10)을 사용하였고 발효제(누룩)는 JJ곡자(역가, 300 sp)를 사용하였다. 항고혈압활성 측정용 시약으로 Hip-His-Leu 과 표준 안지오텐신 전환효소(Angiotensin I-converting enzyme; ACE)를 함유한 rabbit lung acetone powder는 Sigma사(St. Louis, MO, USA)제품을 사용하였고 그 밖의 시약은 분석용 특급을 사용하였다.

담금 및 발효

주모 제조 및 담금은 송 등(Song *et al.*, 2009)의 전통 구기자 탁주 담금법을 일부 변형시켜 다음과 같이 실시하였다. 증자 멤쌀 120 g을 끓는 물 100 mL에 넣고 반죽한 후 10분간 냉각시킨 다음 누룩 60.5 g과 30°C에서 120분간 1% 설탕물에서 활성화시킨 시판 알코올 발효용 효모액 또는

배재대학교 보관효모들의 YPD 배양액을 각각 20 mL 첨가한 다음 30°C에서 2일간 발효시켜 주모를 제조하였다(Lee *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2007).

담금은 증자 멤쌀 150 g과 찹쌀 100 g을 물 500 mL에 넣고 구기자 잎을 첨가한 다음 위에서 제조한 주모를 첨가하여 25°C에서 5일간 발효시킨 후 사별제성하여 분석용 시료로 하였다(Lee *et al.*, 2005).

성분분석 및 관능검사

에탄올 함량은 원심 분리한 발효액을 수증기 증류한 다음 주정계로 측정하였고, pH는 pH meter로 측정하였으며, 총산과 휘발산은 1% 페놀프탈레인을 지시약으로 하여 0.1 N NaOH용액으로 적정한 후 호박산으로 표시하였다(Song *et al.*, 2009).

구기자 잎 막걸리의 관능검사는 백 등(Baek *et al.*, 2011)의 방법을 일부 변형시켜 30~40대의 훈련된 관능 평가원에 의하여 정량적 묘사 분석 방법(Quantitative descriptive analysis: QDA)으로 다음과 같이 실시하였다. 먼저 관능평가원들로 하여 구기자 잎 막걸리에서 느낄 수 있는 향과 맛 특성을 묘사하게 하고 이들 중에서 공통적으로 묘사된 특성을 선정하였다. 선정된 향과 맛 특성에 대하여 1~10의 강도로 표시하게 한 후 그 평균값을 구하여 다각형 그림으로 나타내었고, 향과 맛을 고려한 전체적인 기호도는 가장 싫다 1, 가장 좋다 10의 점수로 표시하여 그 평균값을 QDA 그래프로 도시하였다.

안지오텐신 전환효소 저해활성 측정

항고혈압성 안지오텐신 전환효소(angiotensin I-converting enzyme, ACE) 저해 활성은 먼저 추출물 1 mg을 함유한 시료 50 μ L에 rabbit lung acetone powder에서 추출한 ACE 용액 150 μ L(2.8 Unit)와 100 mM sodium borate 완충용액(pH 8.3) 100 μ L를 가한 후 37°C에서 10분간 pre-incubation시켰다. 여기에 기질인 Hip-His-Leu 용액 50 μ L를 가하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후 1 N HCl 250 μ L를 가하여 반응을 정지시켰다. 여기에 ethyl acetate 1 mL를 가하여 30초간 vortexing한 다음 3,000 rpm \times g로 15분 동안 원심분리한 후 상등액 0.8 mL을 취하였다. 이 상등액을 speed vac concentrator (EYELA Co., Japan)을 이용하여 건조시킨 후 sodium borate 완충용액 1 mL를 가하여 용해시켜 유리되어 나온 hippuric acid의 양을 228 nm에서 흡광도를 측정하여 산출하였고 시료 무첨가구를 대조구로 하여 저해율을 구하였다(Kim *et al.*, 2006; Cushman and Cheung, 1971).

ACE 저해활성(%) = $\frac{[C(\text{대조구 흡광도}) - T(\text{시료 처리구 흡광도})]}{[C(\text{대조구 흡광도}) - B(\text{기질 처리구 흡광도})]} \times 100$

결과 및 고찰

구기자 잎 막걸리 제조용 효모의 선발 및 특성

구기자 잎 막걸리 제조에 적합한 알코올 발효 효모를 선발하기 위하여 시판 주류 제조용 효모 7종과 본 연구자들이 전통주 제조용으로 분리, 사용해오고 있는 효모 2종 등 9종류의 알코올 발효 효모들을 이용하여 위와 같이 구기자 잎 첨가 막걸리를 제조하여 이들의 에탄올 함량을 조사한 결과는 Table 1과 같다.

덧밥에 구기자 잎을 첨가하여 9종의 시료효모들로 25°C에서 7일 발효시켰을 때 4.3~14.0%의 에탄올을 생성하여 효모 간에 큰 차이를 보였고 특히 시판 *S. cerevisiae* F-1 효모로 제조한 구기자 잎 막걸리가 14.0%의 가장 많은 에탄올을 함유하고 있었다. 또한 에탄올 생성 우수효모로 본 연구진이 보관해 오고 있는 *S. cerevisiae* K-7과 K-10 효모로 제조한 막걸리들도 각각 12.2%와 11.5%의 비교적 높은 에탄올을 함유하고 있었다. 따라서 에탄올 생성량이 가장

Table 1. Ethanol content of various *Gugija* leaf *Makgeolli* made by different yeasts

Yeasts	Ethanol content (%)
<i>S. coreanus</i> C-1 ¹⁾	9.0
<i>S. cerevisiae</i> F-1	14.0
<i>S. cerevisiae</i> M-2	4.3
<i>S. cerevisiae</i> K-3	12.7
<i>S. cerevisiae</i> R-4	11.5
<i>S. cerevisiae</i> E-1	5.3
<i>S. cerevisiae</i> P-2	7.1
<i>S. cerevisiae</i> K-7 ²⁾	12.2
<i>S. cerevisiae</i> K-10	11.5

¹⁾C-1, F-1, M-2, K-3, R-4, E-1 and P-2; commercial yeasts for brewing of alcohol beverages.

²⁾K-7 and K-10; alcohol fermentation yeasts from Lab. of Biotechnol. Paichai Univ. Korea.

Table 2. Effect of addition ratio of *Gugija* leaves on the physicochemical properties and antihypertensive ACE inhibitory activity of *Gugija* leaf *Makgeoll*

Addition ratio of leaves (%)	Ethanol (%)	pH	Total acid (%)	Volatile acid (%)	Residual sugar (mg/mL)	ACE ¹⁾ inhibitory activity (%)
0.1 ²⁾	13.4±0.4	4.43	0.19	0.0024	4.0	55.8±0.6
0.3	13.3±0.1	4.53	0.15	0.0030	4.8	56.4±0.1
0.7	14.2±0.8	4.47	0.15	0.0030	4.3	66.0±0.8
1.0	14.5±0.3	4.49	0.15	0.0030	4.5	65.3±0.7
3.0	14.3±0.4	4.63	0.15	0.0024	4.6	60.8±0.5
Control ³⁾	13.8±0.1	4.59	0.16	0.0023	4.0	55.8±0.8

¹⁾ACE; angiotensin I-converting enzyme.

²⁾Various *Gugija* leaf *Makgeolli* were brewed by 5 days of fermentation at 25°C after addition of *Gugija* leaves at different ratio.

³⁾Control; brewed by 5 days of fermentation at 25°C without addition of *Gugija* leaf.

우수했던 *S. cerevisiae* F-1를 구기자 잎 막걸리 제조용 효모로 최종 선발하였다. *S. cerevisiae* F-1효모는 시판되고 있는 주류 제조용 효모로서 특히 향미가 우수하여 포도주 등의 과일주 제조에 많이 이용되고 있다.

구기자 잎 첨가 농도에 따른 막걸리 품질과 생리기능성

구기자 잎의 첨가 농도가 막걸리의 품질과 생리기능성에 미치는 영향을 조사한 결과 Table 2와 같이 구기자 잎 첨가 농도의 증가에 따라 에탄올 함량은 13.3~14.5%로 큰 차이가 없었으나 항고혈압성 ACE 저해활성은 구기자 잎을 덧밥에 0.7% 첨가하였을 때 66.0%로 가장 우수하였다.

또한, 구기자 잎 첨가 농도별 막걸리들의 기호도를 측정 한 결과 Fig. 1과 같이 구기자 잎을 0.1% 첨가하여 제조한 막걸리가 기호도가 제일 우수하였다. 비록, Table 2의 0.1% 구기자 잎 첨가 막걸리의 항고혈압성 ACE 저해활성이 55.8%로 0.7% 첨가 시(66.0%)보다 약 10% 정도 낮았지만 기호도가 훨씬 더 좋았으므로 기호도와 항고혈압성 및 에탄올 함량 등을 고려하였을 때 구기자 잎 막걸리 제조 시 구기자 잎 첨가 농도는 0.1%가 적합한 것으로 사료된다.

구기자 잎 막걸리의 최적 발효일수

구기자 잎을 덧밥에 0.1%를 첨가하여 막걸리를 발효시키면서 발효경과에 따른 에탄올 생성량과 항고혈압성 ACE 저해활성을 측정한 결과는 Table 3과 같다. 에탄올 함량은 발효 7일에 13.3%로 가장 높았고 발효 12일까지 큰 변화가 없었다. 또한 관능특성에서도 발효 9일 막걸리에서 신맛이 강했던 점과 에탄올 생성량이 미량이지만 낮아졌던 점 등으로 보아 발효 9일 이후 일부 초산 발효가 진행되는 것으로 사료된다. 항고혈압성 ACE 저해활성도 발효 7일에 55.4%를 보인 후 발효 12일까지 큰 변화가 없었다.

이상의 결과들을 종합하였을 때 고품질의 구기자 잎 막걸리 제조를 위해서는 먼저 증자 땀쌀 120 g에 끓는물 100 mL를 첨가하여 반죽을 하고 냉각 후 시판 JJ곡자(300 sp) 60.5 g과 시판 *S. cerevisiae* F-1 활성액 5%를 첨가하여

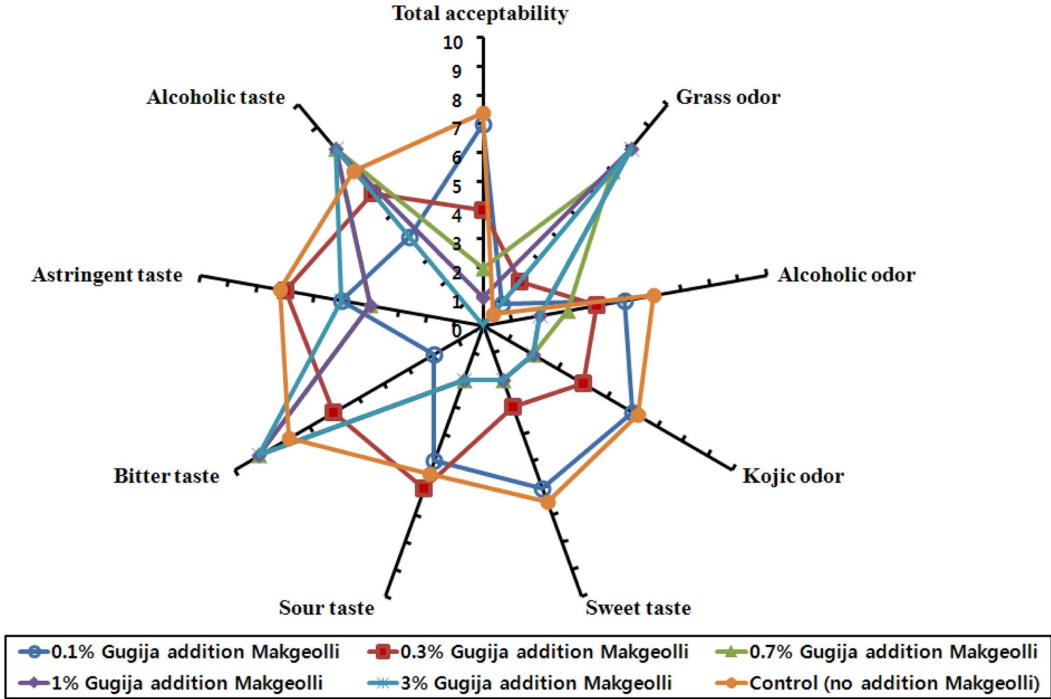


Fig. 1. The quantitative descriptive analysis profiles for taste and odor of the *Gugija* leaf *Makgeolli*.

Table 3. Effect of fermentation periods on the physicochemical properties and ACE inhibitory activity of *Gugija* leaf *Makgeolli*

Fermentation period (days)	Ethanol (%)	pH	Total acid (%)	Volatile acid (%)	Residual sugar (mg/mL)	ACE ¹⁾ inhibitory activity (%)
2	4.6±0.5	5.2	0.07	0.0009	1.8±0.2	22.8±0.6
7	13.3±0.3	4.4	0.15	0.0012	3.8±0.2	55.4±0.1
9	12.8±0.2	4.6	0.15	0.0013	2.0±0.5	56.6±0.8
12	11.3±0.3	4.2	0.17	0.0013	2.1±0.6	58.6±0.7

¹⁾ACE; angiotensin I-converting enzyme.

30°C에서 2일간 발효시켜 밑술을 제조한다. 이렇게 제조한 밑술에 증자 멥쌀 150 g과 찹쌀 100 g을 첨가하고 담금용수 500 mL와 구기자 잎 0.1%를 첨가하여 본 담금을 실시하여 25°C에서 5일간 발효시켜 여과하므로 에탄올 함량이 높고 총 기호도가 우수하며 동시에 항고혈압성 ACE저해 활성도 55.4%로 비교적 우수한 기능성 구기자 잎 막걸리를 제조할 수 있었다. 추후 대량생산을 위한 일부 발효 조건의 조정과 브랜딩 등을 통하여 기호도만 조절하면 바로 산업화가 가능할 것으로 사료된다.

적 요

구기자 잎의 이용 범위 확대를 통한 폐기처리 비용 경감과 구기자 잎 약리효능의 부가적 이용 등을 목적으로 구기자 잎의 첨가가 전통 막걸리의 품질과 항고혈압활성에 미치는 영향을 조사하였다. 먼저 구기자 잎 막걸리 제조용

최적 효모를 선발한 결과, 우수 알코올 발효 효모로 시판 *Saccharomyces cerevisiae* F-1을 최종 선발하였다. 최적 알코올 발효조건을 검토한 결과 먼저 증자 멥쌀 120 g을 끓는물 100 mL로 호화시킨 후 시판 JJ곡자(300 sp) 60.5 g과 위에서 선발한 *Saccharomyces cerevisiae* F-1 활성액 5%를 첨가하여 30°C에서 2일간 발효시켜 밑술을 제조하였다. 여기에 다시 증자 멥쌀 150 g과 찹쌀 100 g, 담금용수 500 mL을 혼합한 다음 구기자 잎을 증자미의 0.1%를 첨가하여 25°C에서 5일간 발효시켜 여과했을 때 기호도가 우수하면서 항고혈압성 안지오텐신 전환효소 활성이 55.4%로 비교적 높은 구기자 잎 막걸리를 제조할 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 연구사업(과제번호: PJ0094362013)의 연구비 지원에 의해 수행된 연구의 일부임.

참고문헌

- Baek, S. Y., Nam, Y. G., Ju, J. I. and Lee, J. S. 2011. Changes of quality characteristics during storage of *Gugija-Liriope tuber Makgeolli* made by *Saccharomyces cerevisiae* C-2. *Kor. J. Mycol.* 39:122-125. (in Korean).
- Cushman, D. W. and Cheung, H. S. 1971. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochem. Pharm.* 20:1637-1648.
- Kim, J. H., Lee, D. H., Choi, S. Y., Park, J. S. and Lee, J. S. 2006. Effect of *Lycii fructus* and edible mushroom, *Pholiota adiposa*, on the quality and angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of Korean traditional rice wine. *Food Biotechnol.* 20:183-191. (in Korean).
- Lee, D. H., Park, W. J., Lee, B. C., Lee, J. C., Lee, D. H. and Lee, J. S. 2005. Manufacture and physiological functionality of Korean traditional wine by using *Gugija (Lycii fructus)*. *Kor. J. Food. Sci. Technol.* 37:789-794. (in Korean).
- Lee, E. N., Lee, D. H., Kim, S. B., Lee, S. W., Kim, N. M. and Lee, J. S. 2007. Effects of medicinal plants on the quality and physiological functionalities of traditional *Ginseng* wine. *J. Ginseng. Res.* 31:102-108. (in Korean).
- Lee, J. S., Park, Y. C., Paik, S. W., Lee, S. S., Ahn, Y. K. and Lee, J. S. 2008. Physiological functionality of *Gugija* products and an In vivo examination on anti-hypertension effects. *Kor. J. Food. Nutr.* 21:115-120. (in Korean).
- Min, J. H., Baek, S. Y., Lee, J. S. and Kim, H. K. 2011. Changes of yeasts and bacterial flora during the storage of Korean traditional *Makgeolli*. *Kor. J. Mycol.* 39:151-153. (in Korean).
- Min, J. H., Nam, Y. G., Ju, J. I., Jung, J. H., Lee, J. S. and Kim, H. K. 2012. Changes in yeasts and bacterial flora during fermentation and storage of *Gugija-Liriope tuber Makgeolli* using PCR-DGGE. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 40:111-116. (in Korean).
- Park, W. J., Lee, B. C., Lee, J. C., Lee, E. N., Song, J. E., Lee, D. H. and Lee, J. S. 2007. Cardiovascular biofunctional activity and antioxidant activity of *Gugija (Lycium chinensis Mill)* species and its hybrids. *Kor. J. Med. Crop. Sci.* 15:391-397. (in Korean).
- Song, J. W., Lee, J. S., Lee, E. N., Lee, S. W., Kim, J. H. and Lee, J. S. 2009. Manufacture and quality characteristics of Korean traditional *Gugija (Lycii fructus) Tagju*. *Kor. J. Food. Nutr.* 22:86-91. (in Korean).