

효모 첨가 유무에 따른 막걸리의 발효 중 미생물 군집 및 이화학적 특성 변화

최지혜^{1,3} · 임보라¹ · 강지은² · 김찬우^{1,*} · 김영수³ · 정석태¹

¹국립농업과학원 발효가공식품과, ²국립농업과학원 기획조정과, ³전북대학교 식품공학과

Changes in microbial community and physicochemical characterization of Makgeolli during fermentation by yeast as a fermentation starter

Ji-Hae Choi^{1,3}, Bo-Ra Lim¹, Ji-Eun Kang², Chan-Woo Kim^{1,*},
Young-Soo Kim³, and Seok-Tae Jeong¹

¹Fermented & Processed Food Science Division, National Institute of Agricultural Sciences

²Planning & Coordination Division, National Institute of Agricultural Sciences

³Department of Food Science & Technology, Chonbuk National University

Abstract This study was carried out to confirm changes in the microbial community and physicochemical characteristics of Korean traditional Makgeolli during fermentation by yeast as a fermentation starter. We demonstrate that the microbial community during fermentation affects the quality of Makgeolli. At the species level, *Pediococcus pentosaceus*, *Weissella confusa*, *Pantoea vagans*, and *Lactobacillus graminis* were dominant on fermentation mix, after 1-2 days, in the control group without yeast treatment. Acid production in the control group was higher than that in the yeast-treated group. *P. pentosaceus* was dominant throughout the fermentation process, and the proportion of *P. vagans* remarkably decreased following yeast addition. Considering quality characteristics, the alcohol content rapidly increased after yeast addition, and the lactic acid content was lower in the yeast-treated group than in the control. These results suggest that the rapid increase in alcohol at the start of fermentation inhibits the growth of lactic acid-producing bacteria. The addition of yeast may contribute to the reduction in the high amount of lactic acid, which can be one of the causes of changes in Makgeolli quality.

Keywords: Makgeolli, nuruk, yeast, microbial community, quality characterization

서 론

막걸리는 전분질을 원료로 누룩곰팡이가 분비한 효소에 의해 당화가 이루어지며 분해된 당은 효모에 의해 알코올로 전환되는 병행발효주이다(Kim, 2000). 막걸리의 품질은 일반적으로 알코올 농도, 총산, 유기산, 향미성분, 잔존 당 성분에 의하여 결정되며, 이러한 요인들은 발효제나 발효 조건에 따라 크게 달라진다(Lee, 2006). 전통적으로 사용하는 누룩은 당화 효소를 분비하는 곰팡이와 에탄올 발효를 담당하는 효모 및 향미에 기여하는 다양한 세균이 혼합된 일종의 발효제(fermentation starter)이다(Lee 등, 2016). 막걸리 발효 시 누룩을 사용하면 미생물에 의한 효소 작용에 의해 전분질의 당화와 함께 일부 원료 성분이 분해되어 생성되는 유리당, 아미노산이 효모나 젖산균 등의 미생물 대사로 알코올, 유기산, 휘발성 성분으로 전환되어 품질의 조화를 이루게 된다(Kwon, 2010). 일반적으로 막걸리를 제조할 때 발효기간 단축과 안정적인 제품 생산을 위해 효모를 별도로 첨가

해주기도 한다. 재래누룩의 경우 지역마다 자연에서 유래한 토착 미생물의 종류가 매우 다양하고 그 비율이 달라(Lee 등, 2016), 풍부한 맛과 향을 내지만 제품의 균일성을 유지하는데 어려움이 있다(Jung 등, 2012). 따라서 산업체에서 재래누룩을 사용한 우리술의 품질을 지속적으로 관리할 수 있도록 품질 모니터링 연구가 필요하며, 발효 과정에서 미생물이 생성하는 대사산물에 의해 막걸리의 품질이 크게 결정되기 때문에 미생물 군집에 대한 정보가 품질특성을 규명하는 중요한 요소가 될 수 있다.

기존에 미생물을 동정하는 방법은 선택배지에 세균, 유산균, 효모 등을 배양하여 주요 미생물의 균총 변화를 확인할 수 있었지만, 발효과정 동안 미생물 군집의 구조와 다양성을 특성화하는데 한계가 있었다. 미생물 군집 분석을 위한 분자생물학적 방법으로 PCR로 16S rRNA gene을 증폭한 다음에 전기영동을 하는 denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), temperature gradient gel electrophoresis (TGGE), terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP), systems security certified practitioner (SSCP) 등의 방법이 개발되기는 하였으나, 데이터베이스를 만들거나 보다 정확한 미생물 종(species)의 정보를 밝히지 못하였다(Park, 2012). 최근에는 차세대 염기서열 분석(next generation sequencing, NGS)법의 개발로 매우 긴 DNA 가닥의 염기서열을 한번에 읽을 수 있다는 장점이 있어 효율적이며, 미생물 분포에 대한 보다 정확한 분석이 가능해졌다(Koo 등, 2018). 현재까지 pyrosequencing을 이용한 막걸리 발효 중 미생물 군집 분석(Jung 등, 2012), 시판 탁주의 NGS 기술을 활용한 미생물 군집 분석

*Corresponding author: Chan-Woo Kim, Fermented & Processed Food Science Division, National Institute of Agricultural Sciences, Wanju, Jeonbuk 55365, Korea
Tel: +82-63-238-3627
Fax: +82-63-238-3843
E-mail: kcw5142@korea.kr
Received August 6, 2020; revised September 8, 2020;
accepted September 8, 2020

(Koo 등, 2018) 등의 연구들이 수행되었지만, 효모 첨가 유무에 따른 막걸리의 발효 중 미생물 군집 변화와 이화학적 특성 평가 관련 연구는 부족한 실정이다. 따라서 본 논문에서는 막걸리 제조에 일반적으로 많이 사용되는 알코올 발효력이 우수한 효모인 *Saccharomyces cerevisiae* 첨가에 따른 재래누룩 막걸리의 발효 중 미생물 군집 구조를 분석하여, 알코올, 유기산 함량 등 품질특성에 미치는 영향을 이해하고자 한다.

실험재료 및 방법

사용 원료

막걸리 제조용 원료는 2017년산 삼광(Asan, Korea) 쌀을 사용하고, 발효제는 역가 300 SP 이상의 소울곡(Songhak, Gwangju, Korea), 효모는 *S. cerevisiae* (La Parisienne, S.I. Lesaffre Co., Marcq-en-Baroeul, France)를 사용하였다. 물은 일반 수도물을 이용하였다.

재래누룩을 이용한 막걸리의 제조

1단 담금은 쌀 7.5 kg을 2시간 침지하고, 1시간 탈수한 후 1시간 증자한 고두밥과 송학곡자 2.5 kg, 물 12 kg을 넣고 혼합하여 25°C에서 3일간 발효하였고, 첨가구는 스타터로 효모 38.5 g(전체 원료량의 0.05%)을 첨가하였다. 2단 담금은 쌀 17.5 kg을 증자하고 물 37.5 kg을 추가하여 발효를 진행하였다. 발효제 비율은 쌀 대비 10%, 급수 비율은 원료(쌀, 발효제) 대비 1단 담금에서 120%, 2단 담금에서 214%, 통합 180%로 제조하였다. 막걸리는 25°C에서 31일 동안 발효하였으며, 발효 과정에서 경시적인 시료의 채취는 발효액을 균일하게 혼합해주고 일정 분량을 취해 거름망으로 여과한 뒤 분석 시료로 사용하였다.

pH 및 가용성 고형분

pH는 pH meter (Orion 3 star, Thermo Scientific Co., Waltham, MA, USA)를 사용하였으며, 가용성 고형분 함량은 굴절당도계 (Refractometer PAL-1, ATAGO Co., Ltd., Tokyo, Japan)를 이용하여 측정하였다.

총산 및 아미노산 함량

총산은 막걸리 발효액 10 mL를 0.1 N NaOH 용액으로 pH 8.2까지 중화시키는데 소요되는 0.1 N NaOH의 소비 mL을 lactic acid 함량으로 환산하여 total acid (% w/v)로 표시하였다. 아미노산은 막걸리 발효액 10 mL를 0.1 N NaOH 용액으로 pH 8.2까지 중화한 다음 중성 포르말린 용액 5 mL를 가하여 유리된 아미노산을 0.1 N NaOH 용액으로 적정하여 pH 8.2가 될 때까지 소요된 0.1 N NaOH의 소비 mL을 glycine으로 환산하여 amino acid (g/100 mL) 함량으로 표시하였다.

알코올 및 환원당 함량

알코올 함량은 증류 플라스크에 막걸리 발효액 100 mL와 증류수 60 mL를 혼합 후 증류하여 100 mL 메스실린더에 90 mL까지 증류액을 받은 후 증류수로 정용하여 알코올 분석기(Digital Alcohol Meter DA-155, Kyoto Electronics Manufacturing Co., Ltd., Tokyo, Japan)를 이용해 측정하였다. 환원당 함량은 DNS (dinitrosalicylic acid)법을 이용하였다. 희석한 시료 용액 0.2 mL에 DNS 시약 0.6 mL를 넣고 끓는 물에서 5분 동안 중탕한 다음 냉각하여 증류수 4.2 mL를 넣고 혼합한 뒤 분광광도계(UV spectrophotometer JP/UV-2450, Shimadzu Co. Ltd., Kyoto, Japan)를 이

용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 환원당 함량(% w/v)은 포도당(glucose) 표준 검량선을 이용하여 계산하였다.

유기산 및 유리당 함량

유기산과 유리당은 HPLC (LC-20A, Shimadzu Co., Kyoto, Japan)로 post column 방법을 활용하여 분석하였으며, 시료는 원심분리(3,000×g, 15 min) 후 여과(0.2 µm, Millipore Co., Cork, Ireland)하여 사용하였다. 유기산 분석용 column은 TSKgel ODS-100V (5 µm, 4.6 mm ID×25.0 cm, Tosoh Co., Tokyo, Japan)를 사용하였다. 이동상은 8 mM perchloric acid (Kanto chemical Inc., Tokyo, Japan)를 사용하였고, 반응용액(0.2 mM bromothymol blue, 15 mM Na₂HPO₄, 7mM NaOH)과 반응시킨 후 UV 440 nm에서 검출하였다. Flow rate는 이동상 1 mL/min, 반응용액 1 mL/min이며, column oven의 온도는 40°C, 반응용액의 온도는 25°C로 하였다. 유리당 분석용 column은 Asahipak NH₂P-50 4E (4.6 mm ID×25.0 cm, Shodex Co., Tokyo, Japan)을 사용하였다. 이동상은 75% acetonitrile (Mallinckrodt Baker Inc., Phillipsburg, MT, USA)를 사용하였고, flow rate 1.0 mL/min, column oven 35°C, injection volume은 10 µL로 설정하여 RI detector (2414, Waters Co., Milford, MA, USA)로 검출하였다.

미생물 군집 분석

미생물 군집 분석은 차세대 염기 서열 분석법인 NGS를 이용하였으며, Macrogen (Seoul, Korea)에 의뢰하여 분석하였다. 시료의 라이브러리 구성을 위해 제조사의 프로토콜에 따라 DNeasy PowerSoil Kit (Qiagen Inc., Hilden, Germany)를 사용하여 시료에서 DNA를 추출하였고, 각각의 시퀀싱된 시료는 illumina 16S metagenomic sequencing library 프로토콜에 따라 준비하였다. DNA의 정량과 품질은 PicoGreen 및 Nanodrop을 이용하여 측정하였다. Bacteria의 군집 분석은 16S rRNA 유전자의 V3-V4 영역을 증폭하는 프라이머(forward: 5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCCTACGGGNGGCWGCAG-3', reverse: 5'-GTCTCTGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC-3'), fungi의 군집 분석은 internal transcribed spacer (ITS) 유전자의 ITS3-ITS4 영역을 증폭하는 프라이머(forward: 5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGCATCGATGAAGAACGCAGC-3', reverse: 5'-GTCTCTGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC-3')를 사용하여 PCR 증폭하였으며 PCR mixture는 herculase II fusion DNA polymerases (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA)를 사용하였다. 다음 단계는 multiplexing indices와 illumina sequencing adapters 부착을 위해 limited-cycle amplification을 수행하였다. 최종 산물은 PicoGreen을 이용하여 정규화 및 통합하였고, TapeStation DNA screentape D1000 (Agilent Technologies Inc.)을 이용하여 라이브러리 크기를 확인하였다. 그런 다음 MiSeq™ Platform (Illumina, San Diego, CA, USA)을 사용하여 시퀀싱하였다. 각 시료별 paired-end data는 FLASH 1.2.11를 사용하여 분류하였고 고품질 서열을 취하여 얻어진 시퀀스는 CD-HIT-OTU를 사용하여 Clustering, 즉 시퀀스 에러로 간주되는 낮은 품질의 시퀀스, 모호한 시퀀스, 키메라 시퀀스 등을 제거하고 97% 이상의 서열 유사도를 바탕으로 군집화하여 종 수준의 OTU (operational taxonomic units)를 선별하였다. 각 OTU의 대표서열은 유사성이 가장 높은 것의 유기체 구분 정보로 분류 할당하여 이를 바탕으로 QIIME v1.8.0을 이용하여 미생물 군집 분석을 수행하였고, order에서 genus 수준까지의 분류학적 조성을 나타내었다.

결과 및 고찰

미생물 군집 분석-세균류

Figure 1에 재래누룩 막걸리의 발효 과정에서 bacteria 군집의 조성 변화를 생물 분류 체계로 나누었으며, bacteria species의 분포율 변화를 상대적인 비율로 나타낸 결과는 Table 1에 나타내었다. NGS 분석 결과 두 시험구에서 발견된 미생물의 종은 유사하였으나 군집의 분포율은 상이하였다. *Lactobacillales* 목의 대부분은 *Lactobacillaceae*과, 그 중에 *Pediococcus* 속, *Lactobacillus* 속이 포함되어 있었다. 발효 0일에는 *Leuconostoc holzapfelii*가 67.7-79.7%로 다량 분포되어 있었지만, 발효가 진행되면서 *Pediococcus* 속, *Lactobacillus* 속, *Weissella* 속이 우점을 이루며 *Leuconostoc* 속의 군집 분포율은 매우 낮게 나타났다. 또한, 발효 0일에는 *Pantoea* 속이 4.5% 분포되어 있었으나 무첨가구에서는 발효 초기에 분포율이 급격히 증가하다 2일 이후 감소되었고, 7일 이후 다시 증가하는 경향을 보이며 발효 경과 전체에 걸쳐

5.2-26.5%의 분포율을 보였다. 반면, 효모 첨가구에서는 발효가 시작되면서 1% 미만의 분포율을 보였다. Yun 등(2016)에 따르면 *Pantoea* 속은 토양, 물 등 자연환경에 널리 분포하며 일부 종들이 무기 인산 분해 능력, 식물 생장 촉진 및 식물 병 저항성 증진 등의 유익한 기능을 보이는 것으로 알려져 있으며, 특히 본 연구에서 확인된 *Pantoea vagans*는 다양한 유기산 생성으로 pH를 감소시키면서 무기 인산 분해 활성을 나타낸다고 보고하였다 (Yun 등, 2016). 무첨가구의 발효 1-2일의 주요 우점종은 *Pediococcus pentosaceus*, *Weissella confusa*, *Pantoea vagans*이었으며, 이후 *Pediococcus pentosaceus*가 급격히 증식하여 7일에 77.6%의 분포율을 보였으나 7일 이후 증식한 *Lactobacillus plantarum*, *Pantoea vagans*, *Lactobacillus graminis*, *Lactobacillus coryniformis*, *Weissella confusa*, *Leuconostoc holzapfelii*에 의해 분포율이 감소하는 양상을 나타내었다. 특히, 2단 담금 이후 *Lactobacillus plantarum*은 발효 경과에 따라 점진적으로 분포율이 증가하여 발효 20일에 44.4%로 우점하였으며, 이와 반대로 *Pediococcus pentosa-*

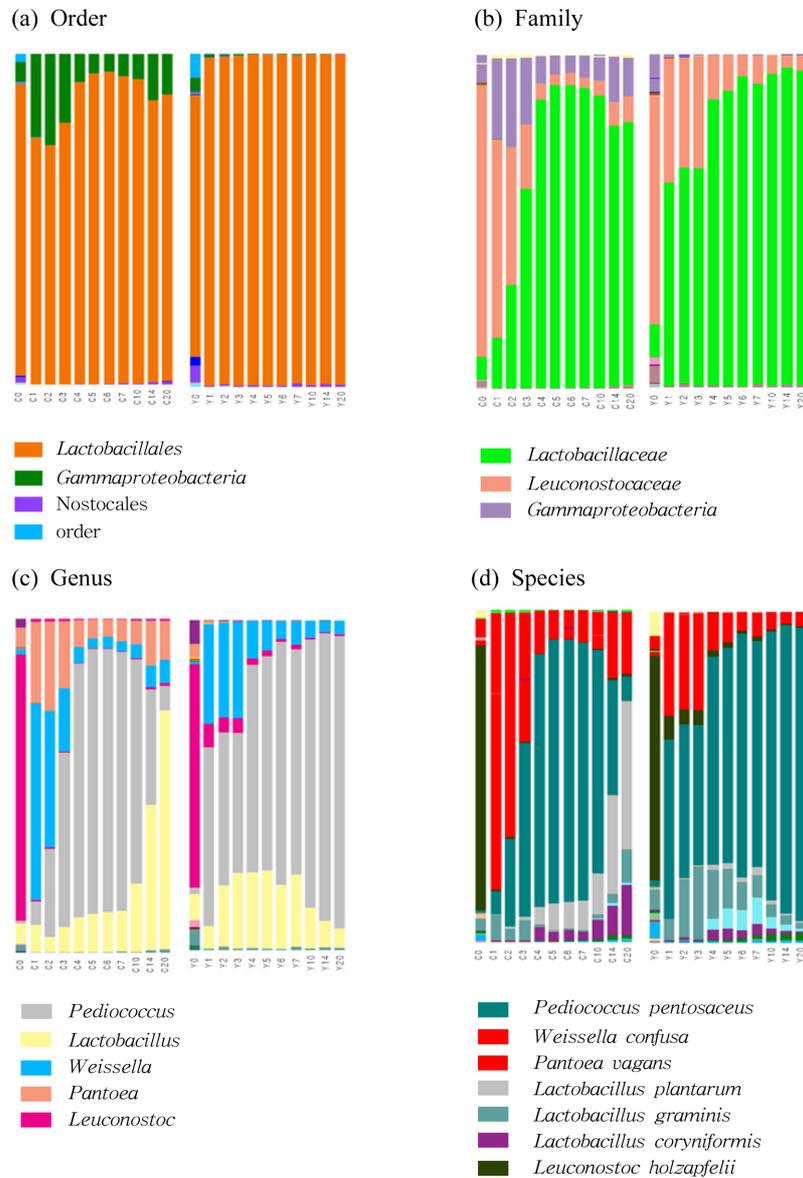


Fig. 1. Taxonomic composition analysis of the bacterial community during Makgeolli fermentation by yeast addition (left: control, right: yeast addition).

Table 1. Relative abundance of bacterial and fungal species during Makgeolli fermentation by yeast addition

(a) Bacterial species		Unit: ratio (%)													
Fermentation time (days)		<i>P. pentosaceus</i>		<i>W. confusa</i>		<i>P. vagans</i>		<i>L. plantarum</i>		<i>L. graminis</i>		<i>L. coryniformis</i>		<i>L. holzapfelii</i>	
		C ¹⁾	Y ²⁾	C	Y	C	Y	C	Y	C	Y	C	Y	C	Y
First mashing	0	0.8	1.9	1.6	0.9	5.6	4.0	0.2	0.2	3.6	6.2	0.1	0.3	79.7	67.7
	1	7.0	54.1	58.8	30.1	24.2	0.9	0.1	0.1	7.7	6.3	0.3	0.4	0.5	7.2
	2	26.3	46.4	40.8	28.6	26.5	0.5	0.6	0.1	3.6	17.6	0.3	0.5	0.6	4.6
Second mashing	3	52.1	42.2	18.8	29.2	19.9	0.3	1.0	0.2	6.1	22.0	0.4	0.5	0.5	4.6
	4	76.0	63.0	4.6	11.2	8.1	0.2	5.1	1.4	0.8	14.9	4.3	3.0	0.3	1.9
	5	79.3	64.9	2.9	8.9	5.6	0.1	7.9	1.7	0.5	11.9	2.7	3.1	0.2	1.8
	6	78.8	73.6	3.4	5.6	5.2	ND ³⁾	7.8	1.2	0.5	8.5	3.1	2.5	0.2	1.0
	7	77.6	68.3	2.9	7.1	6.5	0.1	8.7	2.4	0.5	6.8	2.4	3.5	0.2	1.3
	10	67.3	81.3	4.0	5.2	7.0	ND	12.3	1.2	1.1	3.9	6.0	1.7	0.3	0.5
	14	34.6	87.1	6.4	3.4	13.4	ND	29.4	0.6	2.9	2.8	9.1	0.9	0.7	0.4
	20	7.3	88.6	6.9	4.3	11.5	ND	44.4	0.6	10.1	1.6	15.1	0.5	0.9	0.4

¹⁾C: Control, yeast non-added Makgeolli with Korea traditional nuruk

²⁾Y: Yeast addition, yeast added Makgeolli with Korea traditional nuruk

³⁾Not detected

(b) Fungal species		Unit: ratio (%)							
Fermentation time (days)		<i>S. cerevisiae</i>		<i>S. fibuligera</i>		<i>W. anomalus</i>		<i>P. fermentans</i>	
		C ¹⁾	Y ²⁾	C	Y	C	Y	C	Y
First mashing	0	0.1	75.3	74.4	22.7	17.3	1.0	7.2	0.6
	1	3.9	88.5	91.4	11.0	3.6	0.4	0.7	0.1
	2	33.4	91.5	65.3	8.1	1.0	0.2	0.2	0.1
Second mashing	3	46.6	90.9	52.2	8.7	0.9	0.3	0.2	0.1
	4	75.6	98.2	23.7	1.7	0.5	0.1	ND ³⁾	ND
	5	73.3	99.5	25.8	0.5	0.8	ND	ND	ND
	6	71.6	99.4	27.4	0.5	0.8	0.1	0.1	ND
	7	75.2	99.5	23.9	0.5	0.8	0.1	0.1	ND
	10	87.3	99.3	12.1	0.6	0.5	0.1	0.1	ND
	14	80.2	99.1	19.1	0.8	0.6	0.1	ND	ND
	20	92.1	98.5	7.3	1.2	0.6	0.1	ND	ND

¹⁾C: Control, yeast non-added Makgeolli with Korea traditional nuruk

²⁾Y: Yeast addition, yeast added Makgeolli with Korea traditional nuruk

³⁾Not detected

*ceus*의 분포율은 급격히 감소되어 20일에 7.3%로 나타났다. 효모 첨가구에서는 발효 1일에 *Pediococcus pentosaceus*의 분포율이 급격하게 증가하여 우점하였고, 발효 경과에 따라 증가하는 경향으로 20일에는 88.6%의 분포율을 보였다. Lim (2019)의 연구에 따르면 김치에서 분리한 *Lactobacillus plantarum*의 내산성을 평가한 결과, pH 3.0에서 86%의 생존율을 보였으며 pH 2.5-3.5에서 90% 이상의 내산성을 보이는 것으로 알려진 *L. acidophilus* 균종과 거의 유사한 수준의 우수한 내산성을 보였다고 보고하였다. *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* 속과 같은 유산균은 대부분 식품첨가물로서 미국 식품의약품안전청(USA Food and Drug Administration)의 승인을 받은 GRAS (generally recognized as safe) 균주이다(Cowri와 Asit, 2010; Ozlem 등, 2011). Shin 등(2012)에 따르면 김치로부터 분리한 *Pediococcus pentosaceus*는 pH 2.5-9.0의 넓은 범위에서 생육 가능하며 glucose, fructose, lactose, mannose, raffinose 등의 탄소원 자화능을 가지는 것으로 확인된 바 있다. 유산균의 항균 능력은 주로 lactic acid에 의한 pH 감소와 항균 물질인 bacteriocin 때문인 것으로 알려져 있으며(Nakajo 등, 2006), *Pediococcus* 속 균주 중 *P. pentosa-*

ceus, *P. acididactici*, *P. parvulus* 등은 다양한 bacteriocins을 생산한다고 알려져 있다(Bennick 등, 1997). 효모 첨가구에서 *Pantoea vagans*이 현저하게 낮은 분포율을 보인 것은 알코올 농도나 *Pediococcus pentosaceus*의 항균 물질 분비 등으로 인해 생육이 억제된 것으로 판단되지만 좀 더 심도 있는 연구가 필요하다.

미생물 군집 분석-진균류

Figure 2에 채래누룩 막걸리의 발효 과정에서 fungi 군집의 조성 변화를 생물 분류 체계로 나누었으며, fungi species의 분포율 변화를 상대적인 비율로 나타낸 결과는 Table 2에 나타내었다. 공통적으로 발효 경과 전체에 걸쳐 목(Order) 수준에서 *Saccharomycetales*가 99% 이상 분포되어 있었고 그 중에서 *Saccharomyces* 속, *Saccharomycopsis* 속이 포함되어 있었다. 효모 첨가구에서는 발효가 시작되면서 *Saccharomyces cerevisiae*가 우점하였고, 무첨가구 발효 0일에 각각 17.3, 7.2%의 분포율을 보인 *Wickerhamomyces anomalus*와 *Pichia fermentans*는 누룩에서 유래된 효모로 발효가 시작되면서 분포율이 감소되었다. 무첨가구의 발효 0-3일에는 *Saccharomycopsis fibuligera*가 우점하였으나 2단 담금 이후

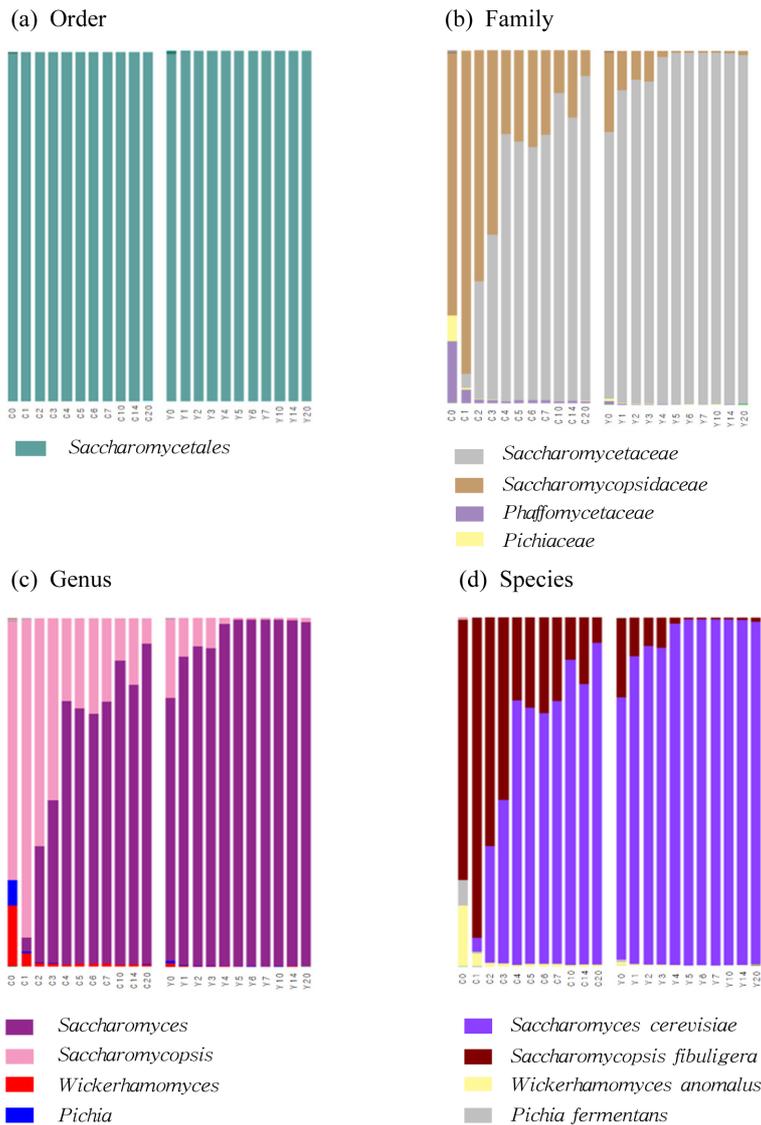


Fig. 2. Taxonomic composition analysis of the fungal community during Makgeolli fermentation by yeast addition (left: control, right: yeast addition).

*Saccharomyces cerevisiae*의 분포율이 급격히 증가되는 경향이며 71.6-92.1% 수준으로 나타났다. 무첨가구 발효 0일에 각각 17.3, 7.2%의 분포율을 보인 *Wickerhamomyces anomalus*와 *Pichia fermentans*는 누룩에서 유래된 효모로서 발효가 시작되면서 분포율이 급격히 감소되었다. Choi 등(2019)의 연구에서 재래누룩에서 분리 동정한 *Wickerhamomyces anomalus*의 경우 기존의 시판 효모와 비교하여도 높은 알코올 발효능을 가지는 것으로 보고되었는데, 이는 시판 효모와 비슷한 알코올 내성을 가지고 있지만, 술덧 내에 *Saccharomyces* 속, *Saccharomycopsis* 속에 의한 생육 저해 가능성 이외에도 알코올 함량의 증가에 따른 *S. cerevisiae*의 저항성 증가와 함께 기인하여 분포율이 감소한 것으로 판단된다. *Pichia* 속은 이취의 원인이 될 수 있는 산막효모로서 산소 요구도가 높기 때문에 막걸리 술덧의 발효 과정 중 미생물의 호흡에 의해 용존산소량이 감소되어 생육이 저해되었거나, 알코올 발효력이 우수한 *Saccharomyces* 속의 영향으로 생육이 저해된 것으로 판단된다. *Saccharomyces cerevisiae*의 경우 포도당이나 과당 등 단당류를 대사하여 알코올을 생성하지만 전분질을 분해할 수 없는 특징이 있으며(Tubb, 1986), *Saccharomycopsis fibuligera*는

누룩에서 분리되며 glucoamylase, α -amylase와 같은 전분분해효소를 분비하고 에탄올을 생산할 수 있는 효모로 알려져 있다 (Gonzalez 등, 2008; Yoo 등, 2016). 따라서 재래누룩 막걸리는 발효가 시작되기 전에는 당분이 없어 *Saccharomycopsis fibuligera*에 의해 전분 분해가 이루어진 후 *Saccharomyces cerevisiae*가 증식하여 알코올 생성이 이루어진 것으로 판단된다.

막걸리 발효 과정 중 품질 특성

재래누룩 막걸리의 발효 과정 중 일반적인 품질 특성의 변화를 Table 3과 4에 나타내었다. 알코올 함량의 변화는 Fig. 3에 제시하였으며 발효 3일에 7.8, 13.4%로 알코올 상승률이 효모 첨가구에서 높았다. 무첨가구에서는 알코올 발효가 서서히 진행되면서 7-14일에 급격한 상승을 보였고, 14일에 14.4%의 함량을 나타냈다. 반면, 효모 첨가구에서는 담금 이후 가파른 상승을 보이며 발효 10일에 15%, 14일에 16%로 나타났다. 발효 14일 이후 알코올 생성 속도는 둔화되었으며, 최종 알코올 생성량 또한 효모 첨가구에서 높았다. 이러한 결과는 발효 스타터로 효모를 첨가함에 따라 *Saccharomyces cerevisiae*가 발효 시작 전 우점종으

Table 2. Changes of quality characteristics during Makgeolli fermentation**(a) Control**

Fermentation time (days)	pH	Soluble solids (°Bx)	Total acid (%)	Amino acid (%)	Reducing sugar (%)	
First mashing	0	6.16±0.04 ¹⁾	1.00±0.06	0.07±0.01	0.08±0.00	2.92±0.03
	1	4.11±0.03	23.2±0.01	0.61±0.02	0.19±0.01	17.61±0.02
	2	3.76±0.02	22.9±0.01	1.01±0.02	0.26±0.02	12.01±0.42
Second mashing	3	3.78±0.01	18.9±0.01	1.08±0.02	0.34±0.02	7.39±0.10
	4	4.28±0.04	13.7±0.01	0.40±0.01	0.09±0.01	6.31±0.11
	7	4.33±0.04	12.7±0.10	0.53±0.01	0.16±0.01	4.11±0.08
	10	4.51±0.15	11.9±0.06	0.59±0.01	0.20±0.01	2.82±0.03
	14	4.32±0.02	10.7±0.01	0.60±0.01	0.21±0.01	1.73±0.01
	20	4.41±0.02	10.3±0.01	0.65±0.01	0.25±0.01	0.86±0.08
	31	4.37±0.04	9.8±0.01	0.66±0.01	0.31±0.02	0.33±0.01

¹⁾Values are presented as mean±SD (n=3).

(b) Yeast addition

Fermentation time (days)	pH	Soluble solids (°Bx)	Total acid (%)	Amino acid (%)	Reducing sugar (%)	
First mashing	0	4.94±0.01 ¹⁾	4.0±0.02	0.13±0.01	0.06±0.01	2.26±0.01
	1	4.62±0.01	14.7±0.01	0.33±0.02	0.16±0.01	6.37±0.11
	2	4.33±0.01	15.6±0.02	0.44±0.01	0.20±0.01	5.56±0.03
Second mashing	3	4.76±0.01	15.0±0.01	0.48±0.01	0.24±0.01	4.63±0.01
	4	4.60±0.01	9.6±0.02	0.19±0.02	0.07±0.01	3.02±0.01
	7	4.43±0.01	10.7±0.01	0.34±0.01	0.13±0.00	2.17±0.03
	10	4.41±0.01	9.9±0.01	0.39±0.00	0.17±0.01	1.04±0.01
	14	4.33±0.01	9.3±0.01	0.40±0.00	0.19±0.01	0.38±0.01
	20	4.57±0.06	9.7±0.00	0.42±0.01	0.24±0.01	0.27±0.00
	31	4.59±0.01	10.0±0.01	0.46±0.01	0.30±0.02	0.42±0.01

¹⁾Values are presented as mean±SD (n=3).

로 자리하여 알코올 생성 속도가 빠르고 알코올 농도를 높이는 데 영향을 준 것으로 판단된다.

가용성고형분 및 환원당 함량은 발효 20일까지 효모 첨가구에서 낮았으며, pH는 무첨가구에서 발효 초기 급격하게 감소한 반면, 효모 첨가구에서는 pH가 서서히 감소하는 양상이었다. 아미노산 함량은 발효 경과에 따라 증가하는 경향이며, 2단 담금 이후 0.07-0.31 g/100 mL 수준으로 두 시험구간 비슷하였다.

막걸리의 품질에 있어서 총산 함량은 관능적인 면에서도 중요하지만, 발효 초기에 이상발효나 산패와 같은 품질의 이상을 조기 진단할 수 있는 기초 자료로써 이용된다. 발효가 진행되면서 술덧 중의 효모, 젖산균 등의 발효로 생성되는 각종 유기산에 의해 증가되며, 적절한 총산 함량은 막걸리의 풍미와 보존성에 영향을 준다. 이러한 산 생성물은 휘발성 향기 성분과 함께 탁주의 맛과 보존성에 직접 관련되며, 또한 효모가 생육하기에 적당한 환경을 조성하여 효모의 증식 및 알코올 발효를 원활하게 한다 (Cheon, 2017). 발효 0-3일에 총산 함량의 증가폭은 효모 첨가구에서 낮았고, 약 15.4, 3.7배의 증가율을 보여 3일에 각각 1.08, 0.48%로 나타났다. 총산 함량은 발효 경과에 따라 증가하는 경향이며, 2단 담금 이후부터 31일까지 무첨가구가 0.40-0.66%, 효모 첨가구는 0.19-0.46%의 수준을 나타내었다. 이러한 결과로 발효 초기에 증가된 총산 함량은 발효 종료 시점까지도 영향을 주는 것으로 사료된다. 발효 초기, 무첨가구의 높은 총산 함량은 발효 1-2일의 주요 우점종인 bacteria에 기인한 것으로 확인되며, 발효 후기에는 발효 7일 이후 증가한 bacteria, 그중에서도 분포율이 급격히 증가하고 20일의 주요 우점종인 *Lactobacillus plantarum*

이 총산 증가에 많은 영향을 준 것으로 판단된다. 효모 첨가구에서 산 생성 bacteria 중 *Pantoea vagans*의 생육이 억제된 것은 발효 초기, 높은 알코올 농도에 의해 억제되었거나 *Pediococcus pentosaceus*가 분비한 항균 물질인 bacteriocin에 의한 것으로 사료된다.

유기산 함량 변화

재래누룩 막걸리의 발효 과정 중 유기산 함량 변화를 Table 5와 6에 나타내었다. 유기산은 탁주에서 산미를 담당하는 성분으로 관능적으로 청량한 맛이나 새콤한 맛뿐만 아니라 신진대사를 원활히 하여 우리 몸속의 피로물질을 제거해주는 역할을 한다 (Song 등, 1997). 또한, 술의 맛, 향, 산도를 조정하는 역할을 하지만 lactic acid와 acetic acid 함량이 과다하면 탁주가 시어질 수 있고, 특히 acetic acid의 증가는 알코올의 산화로 인한 초산발효가 진행되고 있다는 것을 의미하며 품질을 저하시키는 큰 요인으로 작용한다(Choi 등, 1992). 분석된 유기산은 총 7종으로 그 중 propionic acid, formic acid는 거의 검출되지 않았다(data not shown). 무첨가구의 주요 유기산은 lactic acid, succinic acid, acetic acid 순으로 확인되었고, 효모 첨가구는 malic acid를 포함한 4종이 검출되었다. 이러한 결과는 Lee(2011)가 재래누룩을 이용한 막걸리의 발효 중 주요 유기산을 lactic acid, succinic acid, acetic acid 순으로 보고한 결과와 일치하였다. 총 유기산 함량은 발효 경과에 따라 증가하는 경향으로 그 중 lactic acid가 가장 비중이 높았으며, 그 증가폭은 효모 첨가구에서 낮게 나타났다. 이는 발효 초기 높은 알코올 농도로 인해 bacteria 분포의 다양성이

Table 3. Changes of organic acids during Makgeolli fermentation

(a) Control

Fermentation time (days)	Organic acid (mg/100 mL)						
	Citric acid	Malic acid	Acetic acid	Succinic acid	Lactic acid	Total	
First mashing	0	42.60±2.28 ¹⁾	ND ²⁾	38.79±4.01	42.10±1.94	92.37±2.10	215.86
	1	ND	ND	42.13±0.60	51.80±1.76	258.87±4.98	352.80
	2	ND	ND	39.04±1.71	36.80±2.61	285.46±14.92	361.30
Second mashing	3	ND	ND	45.44±0.60	40.27±0.83	292.58±5.96	378.29
	4	ND	ND	11.67±0.63	17.61±0.23	163.25±11.29	192.53
	7	ND	ND	13.67±0.08	28.17±1.71	188.63±3.43	230.47
	10	ND	ND	12.02±1.15	36.47±1.64	207.20±8.68	258.30
	14	ND	ND	13.01±1.15	31.04±1.18	191.71±16.42	234.77
	20	ND	ND	13.01±1.94	31.58±2.72	202.40±13.71	246.99
31	ND	ND	18.52±0.60	39.26±1.67	257.89±6.66	315.67	

¹⁾Values are presented as mean±SD (n=3).

²⁾Not detected

(b) Yeast addition

Fermentation time (days)	Organic acid (mg/100 mL)						
	Citric acid	Malic acid	Acetic acid	Succinic acid	Lactic acid	Total	
First mashing	0	64.95±2.20 ¹⁾	42.75±2.86	54.11±3.08	52.39±1.67	83.62±3.87	297.82
	1	77.59±0.97	45.91±0.52	42.23±1.98	80.65±2.13	84.48±1.82	330.96
	2	66.43±0.82	28.08±0.48	34.52±1.19	70.05±3.49	76.87±1.19	275.95
Second mashing	3	40.93±2.47	ND ²⁾	35.36±1.22	73.46±0.78	76.26±1.51	226.01
	4	10.48±1.22	8.20±2.14	4.85±0.76	28.46±2.29	41.97±1.82	93.96
	7	ND	8.66±0.87	7.98±1.45	32.93±0.18	51.13±0.25	100.70
	10	ND	11.51±0.26	10.34±0.01	39.22±1.93	59.18±2.39	120.25
	14	ND	11.63±1.18	10.34±2.00	36.94±2.66	62.48±4.35	121.39
	20	ND	11.25±0.49	11.44±0.77	39.38±4.30	66.84±6.84	128.91
	31	ND	11.60±0.57	12.13±0.98	39.78±1.78	66.99±7.50	130.50

¹⁾Values are presented as mean±SD (n=3).

²⁾Not detected

낮았으며, 이로 인해 젖산 생성 bacteria의 생육이 억제되어 lactic acid 함량의 증가폭이 낮게 나타난 것으로 사료된다. 대부분의 박테리아는 산성(酸性) 환경을 좋아하지 않기 때문에 lactic acid가 적절하게 있으면 잡균에 의한 식품의 부패를 막아주는 역할을 하지만 과다하면 술이 시어질 수 있으므로 주의가 필요하다.

유리당 및 glycerol 함량 변화

재래누룩 막걸리의 발효 과정에서 유리당 함량 및 glycerol 변화를 Table 7과 8에 나타내었다. 무첨가구에서는 주로 glycerol, glucose, sucrose이 확인되었고, 효모 첨가구는 fructose를 포함한 4종이 확인되었다. 총 유리당 함량은 발효 초기 무첨가구에서 매우 높게 나타났는데, 이러한 결과는 발효 초기에는 당분이 없으므로 *Saccharomycopsis fibuligera*에 의해 전분 분해가 이루어졌으나, 알코올 발효 효모인 *Saccharomyces cerevisiae*의 개체수가 부족하여 효모 첨가구보다 당 소모율이 낮았던 것으로 판단된다. Glucose 함량 역시 발효 14일까지 효모 첨가구에서 낮게 나타났는데, 이는 glucose가 미생물의 영양원이나 효모의 알코올 발효 기질로서 이용률이 높았던 것으로 판단된다. 2단 담금 이후 glycerol 함량은 증가하는 경향이며, 효모 첨가구에서 높게 나타났다. glycerol은 효모의 대사산물로서 glucose로부터 생성되고, 포도주에서 질감을 부드럽게 하고 목넘김을 좋게 하며 포도주의 쓴맛, 산미를 완화시켜주는 역할을 한다고 보고(Jackson 등, 2000)

한 바 있어, 효모 첨가구의 높은 glycerol 함량은 쓴맛을 감소시키고 감미에 영향을 줄 것으로 판단된다.

요 약

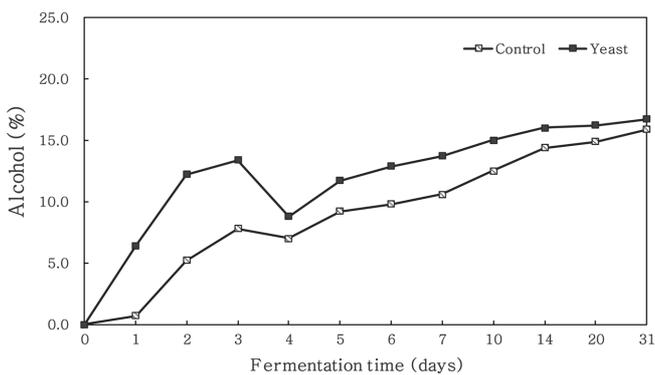
본 연구에서는 재래누룩을 사용한 막걸리의 미생물 군집을 차세대 염기서열 분석기법(NGS)을 활용하여 조사하고, 미생물 군집이 막걸리의 품질에 미치는 영향을 구명하고자 효모 첨가에 따른 품질특성을 확인하였다. 발효 스타터로 효모의 첨가는 재래누룩 막걸리의 미생물 군집 분포에 영향을 주어 결과적으로 막걸리의 품질 차이를 나타냈다. 무첨가구의 경우 발효 초기의 진균류는 *Saccharomycopsis fibuligera*가 대부분이었고, 세균류는 *Pediococcus pentosaceus*, *Weissella confusa*, *Pantoea vagans*의 증식으로 인하여 총산 및 젖산 함량이 높게 나타났다. 첨가구는 발효 시작 전부터 *Saccharomyces cerevisiae*가 우점하여 알코올 생성 속도가 빠르고, 발효 초기의 높은 알코올 농도로 인해 재래누룩에서 기인한 젖산 생성 bacteria의 생육을 억제하는 것으로 나타났다. 따라서 재래누룩으로 막걸리를 제조할 때, 알코올 생성능이 우수한 효모의 첨가가 막걸리 시어짐의 원인이 되는 젖산균의 성장을 억제함으로써 산미를 낮추고 제품의 균일성을 확보할 수 있을 것으로 판단된다.

Table 4. Changes of free sugars and glycerol during Makgeolli fermentation**(a) Control**

Fermentation time (days)	Free sugars and glycerol (mg/100 mL)						
	Glycerol	Glucose	Fructose	Maltose	Sucrose	Total	
First mashing	0	23.47±9.33 ¹⁾	928.90±4.66	15.13±0.16	ND ²⁾	ND	967.50
	1	79.16±0.80	7529.14±21.02	90.45±1.14	8772.19±29.73	17.18±0.72	16488.11
	2	411.70±19.09	4940.07±9.43	18.41±0.90	6617.59±5.70	47.62±0.73	12035.40
Second mashing	3	372.46±8.80	2721.66±16.89	120.22±9.56	1857.44±4.09	105.82±0.54	5177.60
	4	244.50±4.78	1016.08±11.17	ND	2825.88±12.14	ND	4086.46
	7	270.46±13.74	764.79±3.28	ND	361.57±8.43	32.56±1.81	1429.08
	10	341.79±6.32	528.13±3.72	ND	ND	54.45±6.34	924.37
	14	339.75±1.07	394.71±4.95	ND	ND	39.84±3.80	734.46
	20	374.05±2.07	118.50±11.08	ND	ND	28.08±6.87	520.63
	31	448.51±2.45	35.83±1.81	ND	ND	25.76±1.13	510.10

¹⁾Values are presented as mean±SD (n=3).²⁾Not detected**(b) Yeast addition**

Fermentation time (days)	Free sugars and glycerol (mg/100 mL)						
	Glycerol	Glucose	Fructose	Maltose	Sucrose	Total	
First mashing	0	42.53±2.80 ¹⁾	3268.46±14.92	45.70±0.66	ND ²⁾	ND	3356.69
	1	401.60±12.00	2218.56±15.96	21.46±1.57	ND	ND	2641.61
	2	442.51±16.64	2541.90±10.76	90.25±13.37	479.68±13.04	46.06±4.49	3600.40
Second mashing	3	419.87±1.19	2369.30±6.96	77.97±8.78	124.02±21.57	55.06±7.60	3046.21
	4	304.28±0.19	554.10±2.09	21.07±0.81	843.15±10.52	ND	1722.61
	7	364.61±0.82	656.98±4.70	44.22±2.10	268.20±10.61	25.62±2.09	1359.62
	10	373.87±1.12	336.64±4.38	52.06±2.02	121.96±5.31	31.18±3.13	915.70
	14	394.44±2.71	206.51±3.04	36.66±2.61	ND	28.35±1.87	665.96
	20	432.62±0.93	218.64±1.74	17.33±0.98	ND	26.68±1.91	695.27
	31	477.89±3.90	395.20±4.66	23.00±1.25	ND	29.73±1.52	925.81

¹⁾Values are presented as mean±SD (n=3).²⁾Not detected**Fig. 3. Changes of alcohol content during Makgeolli fermentation by yeast addition.****감사의 글**

본 연구는 국립농업과학원 기관고유사업(과제번호: PJ013430)의 지원에 의해 이루어진 것이며, 연구비 지원에 감사드립니다.

References

- Bennick MH, Verheul A, Abee T, Naaktgeboren-Stoffels G, Gorris LG, Smid EJ. Interactions of nisin and pediocin PA-1 with closely related lactic acid bacteria that manifest over 100-fold differences in bacteriocin sensitivity. *Appl. Environ. Microb.* 63: 3628-3636 (1997)
- Cheon JW. A study on the quality characteristics of Takju based on input timing of yeast(Nuruk) and the preferences of Takju consumers in Korea. MS thesis, Chungwoon University, Hongsung, Chungnam, Korea (2017)
- Choi SH, Kim OK, Lee MW. A study on the Gas Chromatographic Analysis of Alcohols and Organic Acids during Takju Fermentation. *Korean J. Food sci. Technol.* 24: 272-278 (1992)
- Choi JH, Kim GW, Lee HY, Park CS, Shim JY. Brewing Characteristics of *Wickerhamomyces anomalus* SC-1 Isolated from Korean Traditional Nuruk. *Food Eng. Prog.* 23: 223-228 (2019)
- Cowri S, Asit RG. *Pediococcus* spp. - A potential probiotic isolated from Khadi (an Indian fermented food) and identified by 16S rDNA sequence analysis. *Afr. J. Food. Sci.* 4: 592-602 (2010)
- Jackson RS. *Wine science: Principles, practice, perception.* 2nd ed. Academic press. San diego, CA, USA. pp. 324-327 (2000)
- Jung MJ, Nam YD, Roh SW, Bae JW. Unexpected convergence of

- fungal and bacterial communities during fermentation of traditional Korean alcoholic beverages inoculated with various natural starters. *Food Microbiol.* 30: 112-123 (2012)
- Kim KS. Studies on fungal isolated collected from Korean traditional nuruk. MS thesis. Korea National University of Education, Cheongwon, Korea (2000)
- Koo OK, Lim ES, Lee AR, Kim TW. Microbial diversity and physicochemical properties of takju and yakju. *Korean J. Food Sci. Technol.* 50: 400-406 (2018)
- Kwon SJ. Analysis of Microbial Diversity in Makgeolli Fermentation. MS thesis, Dankook University, Cheonan, Chungnam, Korea (2010)
- Lee DP. Policy Issues for the Globalization of Korean Traditional Liquer. *Food Industry and Nutrition* 11: 1-9 (2006)
- Lee HS. Quality Characteristics of Red Yeast Rice Makgeolli Brewed with Different Added Ratio of Red Yeast Rice and Different Kind of Nuruk. MS thesis, Myongji University (2011)
- Lee YG, Seol JM, Jeong DY, Kim SR. Application of Functional Microbial Strains Isolated from Traditional Rice Wine in Korea. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* 44: 229-235 (2016)
- Lim YS. *Lactobacillus plantarum* B19 isolated from kimchi and Characteristics of Organic Acid Production in Fermented Soymilk. *J. East Asian Soc. Diet. Life* 29: 198-208 (2019)
- Nakajo K, Komori R, Ishikawa S, Ueno T, Suzuki Y, Iwami Y, Takahashi N. Resistance to acidic and alkaline environments in the endodontic pathogen *Enterococcus faecalis*. *Oral Microbiol. Immunol.* 21: 283-288 (2006)
- Ozlem O, Fadime K, Ingolf FN. A probiotic bacterium, *Pediococcus pentosaceus* OZF, isolated from human breast milk produces pediocin AcH/PA-1. *Afr. J. Food. Sci.* 10: 2070-2079 (2011)
- Park JH, Yeo SH, Jeong ST, Choi HS, Jeon JA, Choi JH. Characteristics of Byeok-hyang-ju made by various processing methods originated from ancient documents. *Korea J. Food Preserv.* 17: 826-834 (2012)
- Shin HJ, Choi HJ, Kim DW, Ahn CS, Jeong YK, Joo WH. Probiotic Potential of *Pediococcus pentosaceus* BCNU 9070. *J. Life Sci.* 22: 1194-1200 (2012)
- Song JC, Park HJ, Shin WC. Changes of takju qualities by addition of cyclodextrin during the brewing and aging. *Korean J. Food Sci. Technol.* 29: 895-900 (1997)
- Tubb RS. Amylolytic yeasts for commercial applications. *TIBITECH* 4: 98-104 (1986)
- Yun CY, Cheong YH. Isolation and Characterization of Phosphate Solubilizing Bacteria *Pantoea* Species as Plant Growth Promoting Rhizobacteria. *J. Life Sci.* 26: 1163-1168 (2016)