

# 濁酒의 Microflora 에 關한 研究

李 周 植 · 李 泰 雨

(서울大學校 師範大學)

## Studies on the Microflora of Takju Brewing

Zoo Shik LEE and Tai Woo RHEE

(Dept. of Biology, College of Education, Seoul National University)

### ABSTRACT

The microfloral survey was performed from Kokja, mashes and commercial Takju, Korean wine, in order to serve as the basic materials for the study of Takju brewing. The cutlines were summarized as follows:

#### A) Microflora of Kokja

1. The complex microflora was shown in Kokja, an enzymic source which is made from raw wheat inhabiting the miscellaneous microorganisms.
2. The following microorganisms were detected in Kokja:

Molds		Yeast		Aerobic bacteria	
Genus	(No. of Sp.)	Genus	(No. of Sp.)	Genus	(No. of Sp.)
<i>Mucor</i>	2	<i>Saccharomyces</i>	7	<i>Micrococcus</i>	2
<i>Rhizopus</i>	6	<i>Pichia</i>	2	<i>Bacillus</i>	3
<i>Aspergillus</i>	2	<i>Candida</i>	3	<i>Aerobacter</i>	1
		<i>Torulopsis</i>	2	<i>Pseudomonas</i>	1
		<i>Hansenula</i>	2		

3. In for the investigation of *Fungus* distribution in Kokja specimens, *Rhizopus* group was mostly found out on the surface of Kokja, but only 2 species of *Mucor* were identified in the other parts except for the surface. *Aspergillus* group regarded as a saccharogenic microorganisms was distributed in a few cases of the Kokja samples.
4. The highest acid saccharogenic potency (a-S.P.) of *Fungus* group separated from Kokja was 187.3 in *Aspergillus*, 152.3 in *Rhizopus* and 70.8 in *Mucor*. Although some species of *Rhizopus* appeared strong a-S.P., low a-S.P. of *Mucor* group is considered to correspond with low a-S.P. in Kokja. *Aspergillus oryzae* separated from Kokja produced also low a-S.P.
5. Bacteria species detected in Kokja were proved *Micrococcus conglomeratus*, *M. flavus*, *Bacillus subtilis* or its variation types, and *Aerobacter cloaca*. Among these flora, Micrococcus groups were predominant in so me cases.
6. 14 out of 32 species of yeast group separated from Kokja could be identified in this.

study. *Hansenula* group was distributed as the highest level and the dominant species was *H. anomala*. Even though *Saccharomyces* group to serve alcohol fermentation was appeared in the low level, *S. cerevisiae* was able to separate in Kokja. *S. acidifaciens*, which decomposes actively  $\text{CaCO}_3$  in the Henneberg's medium, was easily detected in the most cases of Kokja specimens.

7. *Pichia* group identified with *P. delftensis* was distributed unexpectedly in low level. In the case that Kokja was cultivated in malt extract broth, the microflora of *Candida* group identified with *C. macedonensis*, *C. krusei* and *C. rugosa* was remarkably inhabited in the media. In addition to *Pichia* and *Candida* groups, *Rhodotorula minuta* and *Endomycopsis capsularis* was also detected in the media.

#### B) Microflora of Mash

1. The number of bacteria to contain the strong acidified ability was about  $10^8$ – $10^9$  before manufacturing the mash, but decreased directly after the manufacturing ( $10^2$ – $10^3$ ). Population variance of *Micrococcus* group was entirely different between in mash using Kokja and in mash omitted it.
2. In case of utilization of Kokja, *Micrococcus* group was easily detected directly after immersing in the immature mash ( $10^4$ – $10^5$ ), but not in the mature mash.
3. *Bacillus* species isolated in the mash of Takju were chiefly *B. subtilis* and its variants, *B. megatherium* and *B. cereus* var. *mycoides*. But no propagation of these *Bacilli* was able to prove in the mash fermented normally.
4. When the raw mash was put in the sterilized flask and let it at room temperature ( $25^\circ\text{C}$ ), acetification by *Acetobacter* group was not observed in this experiment.
5. In case of utilization of Sake yeast as an enzymic source, *Saccharomyces cerevisiae* was prevalent in the mash and *Torulopsis sake* was the dominant species in some cases. However, *Hansenula* and *Candida* groups were vigorously multiplied along the progress of time. Especially for the isolation of black yeast, yeast-like fungi were dominantly detected in mash.
6. *S. cerevisiae* played an important part in the alcohol fermentation process. The fact that *Torulopsis sake* joins in alcohol fermentation of Takju may serve at the production of enzymic source.

#### C) Microflora of commercial Takju

1. In the commercial Takju which is diluted with tap water about twice quantity of mash, the rapid growth of *Micrococcus* group ( $10^6$ – $10^7$ ) and putrefaction phenomena were appeared.
2. Acid production bacteria and *Bacillus* group was prevalent in the commercial Takju.
3. *Bacillus subtilis* and *B. megatherium* were remarkably increased in Takju with inhabitation of *Pseudomonas* sp.
4. Gradual diminution of Sake yeast was observed as time goes on after manufacturing Takju. Secondly, pellicle formation yeasts were increased more or less in Takju, but the dominant species of yeast in the mash was transformed to different ones.
5. *Salmonella*, *Streptococcus* and *Escherichia* groups was not isolated from mash at all, so that catching a disease by Takju in summer is considered due to secondary putrefaction of it.

## 結 論

濁酒는 蒸米에 5割의 麴子와 10割의 물을 加하여 20°C 内外에서 仕込, 전혀 攪拌하지 않고 5~10일간 放置하면 술덧(膠)이 熟成된다. 이것을 漚(筍)에 넣어 손으로 덩어리들을 부수면서 濾過하고 남은 찌꺼기에 다시 後水를 넣어 즙(汁)을 짜내어 製成한 술이고 酸味와 臭味가 강하고 酒精分 6~7%가 含有되어 있는 것이 濁酒라는 具體的인 記錄이 1936年 發刊의 朝鮮酒造史(1936)에 있었다. 濁酒의 製造는 麴子製造의 發展에 따라 發展하였고 1920~1930年代의 麴子에 對한 研究는 長西(1929)에 의한 報告等으로 알수 있다. 그 發表 題目은 “朝鮮麴子の 研究 및 그 製造法의 變遷 調査”이다. 濁酒 製造에 있어서 重要な 要素로 첫째 麴子, 둘째 酒母, 셋째 술덧(膠)으로 生覺하여 麴子의 開發이 顯著하였다. 이 時代의 麴子中の 微生物 動態와 現在의 微生物 動態와의 差異는 크다고 보며 製造에 쓰여지는 原料, 環境條件에 따라 麴子의 品質이 달라지므로 酒質에 差異가 있는 製品이 생기는 것이다. 酵素劑인 麴子 100%使用은 1960年代에 쌀을 쓰지 않고 밀가루 原料 代替條件에 따라 淸酒 製造法에 쓰여지는 製麴法(粒麴)을 導入하게되어 麴子의 濁酒 製造에의 活用이 低下되었다.

그후 李(1967)는 濁酒 製造에 있어서의 酵素源 및 그의 效率的 添加方法을 發表하여 粒麴 20% 麴子 5%, 粉麴 1.25%의 세가지의 酵素劑를 使用하는 濁酒 製造가 現行되고 있다. 같은 酒母로 세가지의 酵素劑를 함께 쓰지 않아도 濁酒를 製造할수 있다는 理論이 나오고 單一 酵素劑를 索出하는 研究가 옥수수, 고구마 등의 代替原料 問題와 함께 대두되고 있다. 古來로 부터 오는 韓國 固有酒인 濁酒 製造에 麴子를 使用한 歷史的 事實을 無視하고 淸酒製造法에 따르는 過程으로 濁酒를 製造함은 麴子에서 오는 風味와 香臭를 抹殺시키는 경우가 되며, 在來式

麴子를 쓰는 것이 濁酒라는 古來의 舊習을 그대로 이어 받지 않도록 새로운 開發이 있어야 할 것이다.

草道(1925)는 麴子(酵母가 多量 含有된 것)를 選擇하여 酒母를 따로 만들어 製造時에 添加하였다. 現在는 培養 酒母를 많이 活用하고 있으나 酵母는 單一性보다는 多酵母性이 있는 酒母(2種類以上)를 쓰는 것이 ester로 인한 特殊한 맛을 가져 오는 것 같다. 이 酒母에는 有用한 乳酸菌도 含有되어 있어야 할 것이다. 武田는 麴子中の *Saccharomyces* (1930)와 술덧(膠)中の *Saccharomyces* (1937)에 關해 報告하였고 金(1968)은 濁酒酒造에 關한 微生物學的 및 酵素學的 研究에서 各種 麴子를 酵素源으로 하여, 여러 微生物(絲狀菌, 乳酸菌, 酵母, 細菌類等)을 分離하였고 特別히 4種類의 酵母를 分離하여 그 性能調査와 아울러 麴子中の 液化型, 糖化型의 amylase 生産能을 調査하였으며 그 性能은 仕込 24時間에서 最高였다고 하였다. 洪等(1968)은 市中 濁酒의 成分을 쌀로서 製造한 것과 比較하여 澱粉, 水溶性糖, 還元糖, alcohol, 아미노酸, 熱量, 酸度等을 製成酒를 相對로 調査한 바 있다. 李(1969)등은 술덧의 成分 動態에 關한 研究에서 여러 角度로 成分 分析을 한 것이 있다.

酵素劑에 있어서 種麴, 粉麴에 있어서의 微生物의 動態는 單一의 種類만이 使用되고 있으므로 그 自體의 microflora는 問題가 되지 않으나 麴子는 그 製造時 自然의 菌株가 關係하므로 製造過程의 microflora, 製造後의 microflora等 麴子의 microflora가 問題되고, 이 麴子, 種麴, 粉麴, 酒母等을 使用하여 濁酒를 製造하는 過程의 產物인 술덧(膠)의 microflora도 問題가 될 것이며, 濁酒製造의 마지막 工程인 製成을 끝내고 市販酒로서 販賣되고 있는 製成酒(市販酒)의 microflora가 問題될 것임으로 이와같이 製造工程上의 microflora와 麴子의 microflora等에 대한 微生物學的인 面을 中心으로 調



査 研究하여 報告코저 한다.

### 實驗材料 및 方法

#### 1. 實驗材料

- (1) 酵素劑: 各 製造工場에서 分讓 받은 麴子, 粉麴, 種麴과 實驗室에서 製造한 酒母等
- (2) 實驗釀造酒: 各種의 實驗 釀造에서 얻은 술덧(膠), 實驗室에서 製成한 製成酒, 實驗 釀造에 使用한 用水(水道)等
- (3) 市販 濁酒: 市內 各 酒店에서 任意로 蒐集한 濁酒, 特酒라고 販賣되고 있는 密造酒等

#### 2. 實驗 方法

- (1) Fungi (Molds)의 分離: 培地는 malt extract agar, Czapek's solution agar, Pfeffer's media, potato-malt extract agar, malt infusion Czapek's solution agar 에 Penicillin, Streptomycin 을 加한 培地를 사용 회석법에 依에 分離하였다.
- (2) Yeast 群의 分離: 培地는 potato-glucose agar, Y.M. media, malt extract agar 에 Penicillin, streptomycin 을 加한 鑑別培地를 使用하여 회석법에 依한 single colony 蒐集法으로 分離하였다.
- (3) 好氣性細菌의 分離: 培地는 nutrient agar I (beef extract 5g, peptone 10g, D.W.1%), nutrient agar II (beef extract 5g, peptone 10g, NaCl 5g, D.W.1%), nutrient agar III (beef extract 5g, yeast extract 3g, glucose 10g, D.W. 1%), potato glucose agar, E.M.B. agar 등을 使用하여 30°C, 37°C, 42°C의 溫度에서 single colony 法에 依해 分離하였다.
- (4) 酸生成 細菌의 分離: 培地는 tomato juice agar(B.C.P. 添加 鑑別 培地), liver infusion agar, Henneberg 의 釀造用乳酸菌 培地 a.b.等을 使用하고 眞空 desiccator 를 利用하여 25°C, 37°C, 42°C에서 single colony 법에 依해 分離 했다.
- (5) 菌數의 計算: Yeast 數의 計算은 Thoma

haemocytometer 法과 鑑別培地에 회석 培養한 colony 를 Quebec colony counter로 算定하였다.

死滅 yeast 數의 計算은 methylene blue 染色法을 利用하였다. bacteria 數의 計算은 회석법에 依한 single colony 法과 회석法에 依한 直徑 1 mm<sup>2</sup> loop 를 利用한 顯微鏡下 總 菌體數 計算法에 依하여 算定하였다.

- (6) 有害 細菌의 檢査: 培地는 EMB lactose broth, BGLB 등의 大腸菌群 鑑別培地와 S.S agar, Mac Conkey agar, DHL agar, Staphylococcus medium No. 110 등의 食中毒細菌類의 鑑別培地를 使用하여 檢査하고 다소 의심스러운 것은 Kligler Iron agar, Sulfide Indol Motility agar medium 에 이식하여 *Escherichia coli*, *Salmella*, *Staphylococcus* 의 存否를 調査하였다.
  - (7) 微生物의 同定: 酵母의 同定은 Iizuka *et al.*의 酵母의 分類同定法(1969)과 酵母의 同定法(1963) 및 Lodder *et al.*의 The Yeasts, Taxonomie study(1952)에 依해 分類 同定 하였다. 實驗方法中 炭素의 資化性 實驗은 paper chromatography 法을 應用하여 phenylamine 과 aniline alcohol phosphoric acid 溶液으로 發色시켜 對照하였다. vitamine 要求性 實驗은 Burkholder medum 을 使用 하였다. Pseudomycelium, truemycelium 등의 調査는 slide culture method 로 하였다. 酸生成能의 調査는 Henneberg 釀造用 乳酸菌 培地 b medium 을 사용 하였다. 酸酵能 實驗은 Karoly 의 micro-method 에 依하였다. Potassium nitrates의 資化性 實驗은 auxanographic method 로 調査하였고, 對照區로서 基本培地에 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 使用한 培地를 使用하였다.
- 細菌의 同定은 Bergey's manual of determinative bacteriology 7 ed. 을 主軸으로 Merchant *et al.*의 Laboratory manual for verterinary bacterioloy, Salle

의 Laboratory manual on fundamental principles of bacteriology, Stewart의 Bigger's Handbook of bacteriology, Levin의 Laboratory technique in bacteriology에 의해 동정하였고 同時에 分讓 받은 菌株와 比較하여 同定하였다.

- (8) 濁酒 醱酵産物의 調査: pH의 測定은 Beckman pH meter로, acidity는 濾過液 10 cc에 phenolphthalein 0.5 cc를 넣고 N/10 NaOH로 微紅色이 되기 직전의 點으로 標示 하였다. ethanol의 定量은 釀造分析法中 蒸溜法에 依해 蒸溜하여 Gay Lusac의 alcohol 환산표에 依해 ethanol percentage를 決定 하였다. Fusel

oil의 定量은 日本 釀造試驗所 酒類分析 法에 依據 iso-butyl alcohol과 iso-amyl alcohol(10:1)의 混合液으로 0.01~0.001 Wt./Wt.의 標準液系列를 만든 후 electrophotometer를 사용하여 比色 定量 하였다. methanol의 定量은 日本 釀造試驗所 酒類 分析法에 따라 標準液系列에 의한 標準曲線을 만들고 electrophotometer를 使用하여 比色 定量하였다. 還元糖의 定量은 Bertrand法에 依해 定量하여 glucose로서 환산하였다. 酵素 試驗法中 saccharogenic power의 測定은 小野法으로 測定 하였다. 糖量은 Bertrand法에 의거하여 glucose로서 환산 하였

Table 1. Distribution of Fungi in Kokja.

Kokja samples	1	2	3	4	5	6
	<i>Asp. Rh. M.</i>	<i>Asp. Rh. M.</i>	<i>Asp. Rh. M.</i>	<i>Asp. Rh. M.</i>	<i>Asp. Rh. M.</i>	<i>Asp. Rh. M.</i>
Out layer	+ # -	+ # -	- # -	+ # -	- # -	- # -
Inner layer	- - #	- - #	- - #	- + #	- - #	- + #

*Asp.*.....*Aspergillus* group      *Rh.*.....*Rhizopus* group      *M.*.....*Mucor* group

Table 2. Fungi isolated from each enzyme sources and its amylolytic activities.

Source	Strain's number	Genus name of fungi	S.P	a-S.P
Kokja	RK-PG-1	<i>Rhizopus</i> sp.	181.7	152.3
	RK-PG-2	<i>Rhizopus</i> sp.	70.7	20.0
	RK-PG-6	<i>Rhizopus</i> sp.	108.0	72.4
	RK-Cz-4	<i>Rhizopus</i> sp.	57.3	50.5
	RK-Cz-9	<i>Rhizopus</i> sp.	156.2	112.4
	RK-CM-2	<i>Rhizopus</i> sp.	168.0	123.5
	MK-PG-1	<i>Mucor</i> sp.	173.5	70.8
	MK-PG-8	<i>Mucor</i> sp.	140.6	57.3
	AK-PG-1	<i>Asp. niger</i> sp.	211.0	187.3
	AK-PG-2	<i>Asp. oryzae</i> sp.	168.8	38.2
	AK-Cz-4	<i>Asp. niger</i> sp.	210.3	184.7
Koji	AKJ-1	<i>Asp. kawachii</i> sp.	330.0	308.2
	AKJ-2	<i>Asp. kawachii</i> sp.	278.4	245.0
	AKJ-3	<i>Asp. kawachii</i> sp.	205.2	179.4
	AKJ-11	<i>Asp. oryzae</i> sp.	240.0	48.0
	AKJ-12	<i>Asp. oryzae</i> sp.	162.0	24.0
	AKJ-13	<i>Asp. oryzae</i> sp.	156.3	20.0
Bun-Kuk	AKJ-2	<i>Asp. usamii</i> (shiro) sp.	417.2	392.5

다. Acid saccharogenic power의測定은 5%酵素液 50ml를 N/10 HCl로 pH 2.5로 하여 40°C의 water bath 속에 30분간處理한 다음 30分後 N/10 NaOH로서 pH 5.0으로補正한後測定하였다.

- (9) 實驗釀造의方法: 現行許可되고 있는 밀가루濁酒釀造方法을對照로하여各種酵素劑別로釀造試驗을하였다. 또開放式(從來의方法)과 gas排出이容易하게되어있는密閉式의容器를使用하여釀造하였다.

### 實驗結果

#### 1. 糖化劑에關한調査

現在使用되고 있는酵素劑인麴子, 粉麴, 種麴으로부터糖化菌을分離하였다. 特히麴子에分布하는糖化菌의分離는外層(표면층)과內層(속층)으로區分하여分離하였으며顯著한分布의差異를發見하였다. 麴子內糖化菌의分布狀態와各酵素劑에서分離한糖化菌의 amylolytic activity는 Table 1, 2와 같다.

以上の結果에서麴子の內層에分布하는糖化菌은 주로 *mucor* group이었다.

外層에分布하는糖化菌은 *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Mucor* group의順이었고特히 *Aspergillus* group의分布는內外層區別없이顯著히 적었으며 *Rhizopus* group 역시內層에서의分布가 적었다. 濁酒製造過程에있어서의 amylolytic activity는 S.P. 特히 a-S.P.가優秀한 것이安全하다. *Rhizopus* group에서는 RK-PG-1, RK-Cz-9, RK-CM-2가優秀하였다.

*Aspergillus* group은 AK-PG-1과 AK-Cz-4가 우수하였다. *Mucor* group에서는 S.P.는優秀하였으나 a-S.P.가 낮은成績이었다. 種麴에서는 *Aspergillus kawachii*가優秀하였다. 各酵素劑에對한 amylolytic activity는 Table 3과 같다.

Table 3. Range of amylolytic activities of each enzymes

Enzyme \ Exp.	S.P.	a-S.P.
Kokja (Hankuk)	300~500	52~100
Lip-kuk of <i>Asp. oryzae</i>	70~100	low~40
Lip-kuk of <i>Asp. kawachii</i>	80~120	60~110
Bun-kuk (Samkong)	450~600	413~568
Bun-kokja	80~150	70~120

麴子の amylolytic activity는 S.P.는優秀하나 a-S.P.가 낮은所見이었고種麴의 경우 *Aspergillus oryzae*는 a-S.P.가 아주 낮은所見이었으며 *Aspergillus kawachii* group은良好하였다.

#### 2. 酸酵劑에關한調査

麴子 및 市販濁酒를 Penicillin 100γ/ml, streptomycin 20γ/ml를添加한 Y.M media에平板培養하여 서로 다른 colony를蒐集하고 다시 이들을 회석하여 malt extract agar에培養하여分離한後 potato-glucose agar 平板上의 colony로서特徵있는 colony 50株를蒐集하였다. 이 50株를同定한結果는 Table 4와 같다.

以上에서分離한菌株中 alcohol fermentation potency가 높은菌株를 별도로 조사選定하였다.

選定方法은 밀가루의 엿기름糖化液에다 다시種麴을 넣고 끓여 가제로 걸른液을滅菌 flask에分注하여 넣고 malt extract broth에서培養한各菌株를 1試驗管씩接種하여 25°C에서 3日間培養한後 alcohol量을測定하였다. alcohol fermentation potency가 강한菌株는 KY-3, MY-5, KY-15, MY-49 등이었는데 이들은大部分 *Saccharomyces cerevisiae*이었으며市販酒에서分離한 MY-29의 *Torulopsis sake*가 높았다. 한편 ethanol의資化性은 *Hansenula*, *Candida*, *Pichia*等産膜酵母가 ethanol sole carbon source에서顯著히 잘 자라는所見이었다. 麴子에서分離되는 yeast colony의大部分은 alcohol fermentation potency가 낮거나가



Table 4. Various properties of yeasts

Strain number	Vegetative cell	Liquid medium	Ps, Tr, Ch, Ar, Bl, As, Ba	V.R
KY-1	Round, 3~4.5 $\mu$ , budding	Ring, not turbidic, sediment block	+ + - - + - -	-
KY-3	Round, ovoid, 1.5~3.0 $\mu$ , budding	Ring YM media 1 after a month, slightly turbidic, sediment	- - - - - + -	+
KY-4	Round, ovoid, 1.5~3.0 $\mu$ budding	Ring in YM media 1, 2 after 1 month, slightly turbidic, sediment	+ - - - + + -	-
MY-5	Round, ovoid 4.5~6.0 $\mu$ , budding	Slightly ring in YM 1 after a month, not turbidic, sediment	- - - - - + -	+
KY-7	Ovoid <sup>1</sup> 4.5~7.5 $\mu$ , multipular, budding	Creeping, not turbidic, sediment	+ - - - + - -	-
KY-9	Round, ovoid, 5~6 $\mu$ , budding	islets, sediment, not turbidic	- + - - + + -	+
KY-13	Ovoid, cylindrical, 3 $\times$ 4.5~7.5 $\mu$ budding	Creeping, sediment	+ + - - - - -	-
KY-14	Ellipsoid, 4.4 $\times$ 7.3~2.8 $\times$ 13 $\mu$	Creeping, sediment	+ - - - - + -	-
KY-15	Round, ellipsoid, 2.8~2.8 $\times$ 3.5 $\mu$ , budding	Ring in YM 1, 2 after a month, mediately turbidic, sediment	+ - - - + + -	+
KY-17	Ellipsoid, cylindrical, 4.2 $\times$ 5.6 or 2.8 $\times$ 7.2 $\mu$ budding	Creeping, sediment	+ - - - + + -	-
MY-20	Round, 3.8~5.7, 2 $\mu$ , budding	Ring and turbidic after a month sediment	- - - - - - -	+
MY-39	Round, ellipsoid, 2.5~4 or 1.6~7.8 $\mu$	Creeping, sediment, moderately tubidic	+ + - - + + -	-
KY-25	Ovoid, cylindrical, 3.0~5.5 $\mu$	Creeping, sediment, none pellicle	+ + - - + + -	+
KY-26	Round, ovoid, 2.5~3.0. $\times$ 4.5 $\mu$	Sediment	- - - - - - -	+
KY-34	Round, 3.4~5.6 $\mu$ , multipular budding	Creeping, moderately turbidic, sediment	- - - - - + -	+
MY-36	Cylindrical, 3.2 $\times$ 7.0 $\mu$	Islets, sediment	- + - - + + -	+
KY-42	Ellipsoid 5.4 $\times$ 7.6 $\mu$ , budding	Ring, not turbidic, sediment	- - - - - + -	+
MY-48	Round, 5.6~7.2 $\mu$	Islets after a month, slightly turbidic after a month, sediment	+ - - - - + -	+
MY-49	Round, 4.8~7.4	Ring in YM 1 after a month, sediment	- - - - - + -	+

Remarks : Ps: Pseudomycelium

Tr: Truemycelium

Ch: Chlamydospore

VR: Vitamine requirements

Gl: Glucose

Ga: Galactose

의 없는産膜酵母로서 *Saccharomyces cerevisiae* group 이 相當히 적었다. 現在 販賣되고 있는 酵素劑에 있어 yeast의 分離는 麴子 이외에는 分離되지 않았다. 그러나 麴子 역시 alcohol 醱酵能이 높은 yeast 를 添加하지 않으면 alcohol 醱酵가 低調하였으며 安定

性이 없었다. 市販 濁酒를 BGLB medium 에 agar 2%를 添加한 培地에 다 接種했을때 略稱 black yeast로 통하는 不完全菌이 多數 分離 되었다.

### 3. 細菌에 關한 調査

麴子 등의 酵素劑, 用水, 슬릿(膠) 및 市

isolated from Kokja and Takju.

Assimilation of Gl, Ga, S. M, L. A, KNO <sub>3</sub>	Fermentation of Gl, Ga, S. M. L. R	Special properties	Identification of strains
+ + + - + - -	+ + + - - 1/3	Litmus milk unchanged	<i>Candida macedoniensis</i>
+ + + + - + -	+ + + + - 1/3	Oval shaped spore	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
+ + + + - + -	+ + + - - 1/3	Undeveloped pseudo-mycelium	<i>Saccharomyces fructuum</i>
+ + + + - + -	+ + + + - 1/3	Globose shaped spore	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> group
+ - - - - + -	+ - - - - -	Irregularly round colony	<i>Candida krusei</i>
+ - + + - + +	- - - - - -	Hat shaped spore	<i>Hansenula canadensis</i>
+ + - - - + -	- - - - - -	Litmus milk Alkaline	<i>Candida rugosa</i>
+ ± - - - + -	+ - - - - -	Undeveloped pseudomycelium, production of excess acid	<i>Saccharomyces acidifaciens</i>
+ + + + - ± -	+ + + + - 1/3	Hemispherical shaped spore	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>ellipsoideus</i>
+ - - - - + -	- - - - - -	Hat-shaped spore	<i>Pichia delftensis</i>
+ + + + - + -	+ + + + - -	Litmus milk redish	<i>Torulopsis sake</i>
+ - + + - + +	+ + + + - 1/3	Hat-shaped spore	<i>Hasenula anomala</i>
+ - - + - + -	+ - - + - +	Hat-shaped spore	<i>Endomycopsis capsularis</i>
+ + + - - + -	- - - - - -	Production of carotinoid	<i>Rhodotorula minuta</i>
+ - + + - + +	+ - - - - -	Hemispherical shaped spore	<i>Hansenula augusta</i>
+ + + + + + -	+ + + + - -	Trehalose fermented	<i>Pichia scolyti</i>
+ + + + - - -	+ - - + - +	Tetra spore	<i>Schizosaccharomyces maldevorans</i>
+ + + - - + -	+ - + - - +	Undeveloped pseudomycelium	<i>Saccharomyces elegans</i>
+ + + + ± - -	+ + + + - 1/3	Globose shaped spore	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> group

Ar: Arthrospore  
S: Sucrose,

Bl: Blastospore  
M: Maltose,

As: Ascospore, Ba: Ballistospore.  
L: Lactose, A: Arabinose, R: Raffinose

販 濁酒로 부터 段階別로 分離하여 各種實驗을 통해 菌株을 分類 同定하였다. 그러나 아직 變異種等 同定치 못한 菌株이 많이 있으며 同定한 菌株도 standerd form의 菌株을 전부 갖추고 있지 않아 일부만 個別的으로 比較 同定하였다. 그 分類 同定の 成績은

Table 5 와 같다.

麹子內에서 分離되는 細菌中에는 *Micrococcus* group 이多數 나타난다. 그러나 濁酒의 製成時에는 *Micrococcus* group 의 出現은 드물다. 또한 麹子內에서 分離한 菌株中 많지는 않지만 *Aerobacter* group 과 *Bacillus*



group 도 쉽게 나타난다. 製成後에 빈번히 나타나는細菌은 *Bacillus subtilis*의 variation group 이顯著하게增加되었다. 또한水道水에서分離되는 *Bacillus cereus* var. *mycoides* 역시濁酒內에서 많이發見되었다.

製成하지 않은 술덧을 오래두면 一般的으로醋酸菌에 의한醋酸醱酵가 일어날 것으로生覺되나本實驗期間中醋酸菌의分離를爲한試圖中 여러貯藏 술덧중에서醋酸醱酵의發生이 없었다. 그러나 *Lactobacillus* group의生長은 오랜期間旺成하였으나 *Bacillus* group의發育은 없었다.

#### 4. 製造過程에 있어서微生物의動態

濁酒製造過程에 있어서 나타나는酸量, ethanol 量 및 bacteria, yeast 數의增減關係와實驗釀造한方法은 Table 6, 7, 8과 같다.

製造方法:原料에對해製麴(粒麴) 20%, 麴子 5%, 粉麴 1.5%의酵素劑를添加하는國稅廳長 公示 17호 2의方法을使用하였다.

(1) 1段仕込(酒母의製造):粒麴 1kg, 麴子 250g, 粉麴 75g, 麥芽汁培養酵母 300ml 給水 1.5l 하여 25°C를維持하였다. 이를

Table 6. Compare with 3 samples of mash after 24 hours passed

Brewing method Sample	Open system		Closed system
	a	b	c
Contents			
Acidity	15.1	8.7	23.6
Ethanol(%)	2.7	0.8	1.8
Cells of bacteria	$1.3 \times 10^7$	$5.2 \times 10^7$	$2.2 \times 10^8$
Cells of yeast	$4.7 \times 10^8$	$1.8 \times 10^8$	$4.2 \times 10^8$

Table 8. Compared total cell of bacteria with yeasts among 3 samples of Takju diluting itself during 3 days in 30°C incubator

Sample Cultured hours	a			b			c		
	24	48	72	24	48	72	24	48	72
Contents									
Acidity	3.8	3.6	3.6	2.7	2.7	2.4	8.1	8.0	8.1
Ethanol(%)	4.6	4.2	3.5	4.3	3.7	2.9	4.5	4.5	4.0
Total cells of bacteria	$1.5 \times 10^8$	$2.0 \times 10^8$	$1.2 \times 10^8$	$2.7 \times 10^8$	$6.9 \times 10^7$	$2.5 \times 10^8$	$1.2 \times 10^8$	$1.3 \times 10^8$	$8.3 \times 10^7$
Total cells of yeast	$1.3 \times 10^8$	$1.8 \times 10^8$	$2.2 \times 10^8$	$9 \times 10^7$	$1.6 \times 10^8$	$2.1 \times 10^8$	$1.6 \times 10^8$	$1.0 \times 10^8$	$1.4 \times 10^8$

Remarks; a, b: open system c: closed system

密閉式과 開放式의方法으로 24時間經過시킨後의成績은 Table 6과 같으며

Bacteria와 yeast의菌體量은  $10^7 \sim 10^8$ 으로增殖은顯著하였다.

(2) 2段仕込:酒母에다原料 4kg과水道水 6.5l를넣었다. 2段仕込後 24時間經過한 48時間에 있어서의成績은 Table 7과 같으며

ethanal의量이 10.5~11.1%로 현저한

Table 7. Compared total cell of Bacteria with yeast among 3 samples of mash after 48 hours passed. Temp. 25°C

Sample	a	b	c
Contents			
Acidity	9.2	6.5	20.5
Ethanol (%)	11.1	10.3	10.5
Total cells of bacteria	$3.2 \times 10^8$	$4.5 \times 10^8$	$1.2 \times 10^9$
Total cells of yeast	$2.6 \times 10^8$	$2.4 \times 10^8$	$3.4 \times 10^8$

※ a, b: open system c: closed system

增加를보여주었고 bacteria와 yeast의數亦是 상당히增加되었다.

(3) 製成:製成의方法은 술덧을 漉(篩)에 걸른 다음 150% 給水한다. Table 8에서製成한 술의 ethanol 含量은 24時間經過時 다소增加되는所見이나時間이經過함에 따라顯著히減少된다. 初期 ethanol의含量變化는 一般的으로酸度가 높으면 높을수록比較的安定되었다. 製成酒內의 yeast의動向은 24時間經過에 따라多少增加하는所見이었으나開放式製造方法에서는 24時間經過時부터產膜酵母가發生하여 ring을形成하였고 72時間經過時에서는 완전히上層部에被膜이 이루어진다. 그러나

Table 5. Various properties of bacteria isolated from Takju, enzyme sources and water

Identification of bacteria	Form and size( $\mu$ )	Gram stain	Flagella	Motile	Endospore	Capsule	Chain	Colony			Culture in tube			Indole	V.P.	M.R.	Relation of free oxygen	In nitrate medium	Hydrogen sulfide	Chromogenesis	Indicator	Casein	Catalase	Acid	Starch hydrolyse	Other characters
								Nutrient agar	PG-agar	Gelatin	Nutrient agar	Nutrient broth	Gelatin stab													
<i>Micrococcus conglomeratus</i> KB-2 MB-22	Spheres 0.65~1.4	Gram variable	—	—	—	—	Single, pairs, fours and large clumps	Sulfur yellow, luxuriant, moist	None	Small, circular, yellow with radiate margin	Turbid with light orange, ring, sediment	Growth light yellow plumose slightly margin	Liquified	—			Aerobic	+	—	Yellow pigment produced	Litmus milk red	—	+	Acid from glucose, lactose, sucrose	—	Ammonia produced from peptone, utilize $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ as a source of nitrogen
<i>Micrococcus flavus</i> KB-6	Spheres 0.7~9.0	Gram variable	+	+	—	—	Single, pairs, fours	Small, entire, yellowish white	Slight, yellow	Small, circular, yellowish brown, granulate	Yellow, dry, wrinkled, radiated, entire	Turbid with yellowish ring and sediment	Yellow, wrinkled surface, creniform, liquefaction	—			Aerobic	—	—	Yellow pigment produced	Litmus milk red, reduction soft coagulum	—	+	Acid from glucose, lactose, sucrose not fermented	—	Ammonia produced from peptone, utilize $\text{N-H}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ as a source of nitrogen
<i>Bacillus megaterium</i> MB-31	Rod 2.5~4.2 × 0.97~1.25	+	+	+	+	—	Single or short chain, variation occurring in filaments or long chained	Large, smooth, glistening, round, convex, entire, creamy white to yellow	Abundant, smooth, soft to sling, spreading, creamy white	Wide zone of hydrolysis	Abundant, smooth, soft to butyrous, opaque, glistening, creamy white to yellow	Turbidity medium to heavy, uniform, sediment, scanty	Slow liquefaction	—			Aerobic	—	—	—	Litmus milk red	+	+	Acid but no gas from glucose, sucrose, mannitol,	+	Citrates utilize as a carbon source, milk peptonize
<i>Aerobacter cloacae</i> KB-9	Rod 1~2 × 0.5~1	—	+	+	—	—	Single	Circular, thick, opaque with white center, entire	Yellowish, moist, glistening growth	Thin circular, bluish, translucent	Porcelain white, smooth, glistening, spreading growth	Turbid, thin, pellicle, odor, decided sediment	Slow liquefaction	+	+	—	Aerobic	+	—	Large lipid granule 2~4	Litmus milk unchanged coagulate	+	+	Acid from glucose, sucrose no acid from xylose, mannitol	+	Citrates utilize as a sole source of carbon
<i>Bacillus cereus var. mycoides</i> WB-1 MB-14	Rod 2.0~4.4 × 1.2~2.0	+	—	—	+	—	Twisted long chained of cells	Greyish white, thin	Greyish, circular, granular	Wide zone of liquefaction	Growth thin, rhizoid, greyish, widely spreading	Heavy, uniform, sediment, soft ring, pellicle	Rapid liquefaction	—	+	—	Aerobic	+	—	—	Litmus milk acid coagulation, gas, litmus milk not reduced, methylene blue reduced	—	+	Acid and gas from fructose, galactose, arabinose, xylose, mannitol, raffinose, maltose, trehalose	+	Citric acid and salts may be utilize as a sole source of carbon
<i>Bacillus subtilis</i> KB-12 MB-16 MB-18 MB-25	Rod 0.7~0.8 × 2.0~3.0	+	+	+	+	—	Single	Rough, opaque, dull, spreading, white	Growth heavy, wrinkled to coarsely folded, spreading, pink, brown, yellow	Wide zone of hydrolysis, yellow brown greyish white	Growth abundant, rough, opaque, dull, waxy spreading, cream colored to light brown	Heavy, wrinkled, waxy, tough, pellicle	Liquefaction, creniform to stratiform	+			Aerobic	+	—	—	Litmus milk slowly peptonized becoming alkaline	+	+	Acid but no gas from arabinose, xylose, glucose, sucrose, mannitol, no acid lactose.	+	Citrates utilize
<i>Pseudomonas caviae</i> MB-8 MB-37	Rod 0.6~1.0 × 1.5~3.0	—	+	+	—	+	Single, pairs	Circular, convex, smooth iridescent and translucent, translucent, entire	Growth, not filamentous, glistening, light yellow to light orange, becoming light brown	Yellow, circular, convex, smooth	Growth abundant greyish white butyrous, filamentous, glistening, iridescent, translucent, medium changed to brownish yellow	Cloudy, pellicle, abundant, light yellow granular, sediment	Infundibuliform liquefaction	+	—	+	Aerobic	+	—	Yellow pigment produced	Methylene blue reduced and coagulated, peptonized, partially reduced	—	—	Acid but no gas from glucose, starch, fructose, lactose, maltose, galactose	—	No growth in citrate broth

Remarks: P G agar, Potato-Glucose agar  
V.P., Voges Proskauer test  
M.R., Methyl red test

密閉式製造의 경우에는 72時間 經過時부터 産膜酵母의 出現이 나타 났다. 이는 酸量의 多少가 産膜酵母群의 出現에 關係가 있음을 나타낸 것이다. 實際 다른 많은 實驗에 있어서도 酸의 量이 많은 경우에는 産膜酵母의 出現을 抑制하는 現象이 나타난다. 開放式과 密閉式에서 発酵후 출현하는 yeast와 bacteria의 종류는 상당한 차이를 나타내는데 이는 酸量의 多少에 크게 영향을 받는 것으로 思料되며 Bacteria의 경우 製成直後에는 크게 變化가 없으나 時間의 經過에 따라 腐敗 細菌의 增加現象이 두드러지게 나타남을 쉽게 鑑別 할수 있었다.

#### (4) 微生物의 動向

濁酒 製造 過程과 販賣 過程에서의 acid production bacteria group과 *Bacillus* group 및 *Micrococcus* group의 動向을 調査하였다.

Acid production bacteria group의 動向 調査는 B.C.P를 添加한 tomato juice media (Difco)를 使用하여 酸生成이 있는 colony 數로서 計算하였다. *Bacillus* group의 動向 調査는 potato glucose agar와 tomato juice agar 培地上的 colony 形態와 菌體의 性狀으로 判定하였다.

*Micrococcus* group의 調査는 potato glucose agar 上에 나타나는 colony의 特徵으로 判定하였다. 製造過程과 製成後 이들의 動向은 Fig. 1과 같다.

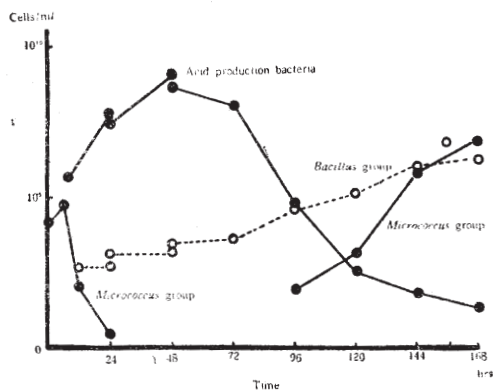


Fig. 1. Changes of microflora of bacteria during the brewing Takju.

Acid production bacteria group의 動向은 72時間(製成後 24時間) 經過時부터 顯著하게 減少되는 傾向을 나타내며 培養 120時間以上の 經過群에서는 極히 적은 數의 colony를 나타내거나 전혀 나타나지 않았다. 一般的으로 random sampling 한 市販酒에서의 acid production bacteria의 出現은 볼 수 없었다.

*Bacillus* group의 動向은 製成을 계기로 해서 漸次 增加되는 現狀을 나타내는 傾向이었고 製成後 濁酒를 30°C의 incubator內에 두었을 때 2~3日後엔 特有의 腐敗香을 나타낸다. random sampling 한 市販酒에서는 平均 10<sup>5</sup>~10<sup>6</sup>/ml의 colony를 얻을 수 있었다. *Micrococcus* group의 動向은 麴子를 添加했을 경우 仕込後 24時間 以內에는 그 存在가 確認되었으나 熟成酒에서는 分離되지 않았다, 그러나 製成後 48時間以上 經過된 濁酒에서 다시 增殖하는 現象을 볼 수 있었다. 一般的으로 腐敗한 濁酒속에서는 *Micrococcus* group이 많이 檢出 되었으나 이들이 腐敗醱酵에 어떻게 關係하는지는 調査하지 못하였다. 濁酒 製造過程과 販賣過程에서의 濁酒內 yeast群의 動向은 Fig. 2와 같다.

Sake yeast를 酒母로서 添加하였을 경우 製成後 24~48時間 經過時부터 漸次 死滅하여 그 數가 減少하였으나 産膜酵母는 製成

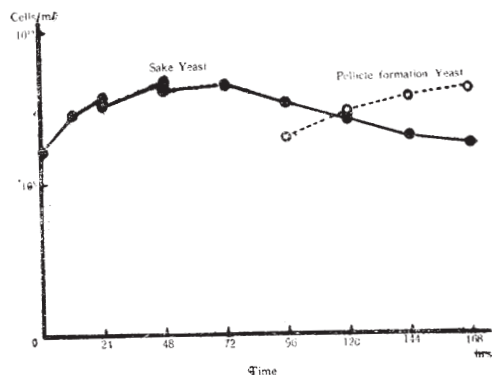


Fig. 2. Changes of microflora of yeasts during the brewing Takju.



後 48~72 時間 經過時부터 왕성히 繁殖하므로 總 酵母數는 增加를 나타내었다. Sake yeast의 動向 調査는 methylene blue 染色法에 依하였고 産膜酵母의 動向 調査는 直徑 5cm의 廣口瓶에다 濁酒를 一定量씩 넣고 每 24 時間마다 上層의 被膜을 조심스럽게 걷어 내서 잘 씻어낸 다음 회석하여 Thoma haemocytometer 로서 算定하였다. 産膜酵母의 出現은 腐敗現象의 始作이라고 할 수 있었고 一般的으로 産膜酵母의 出現이 있으면 바로 腐敗現象이 나타난다고 볼 수 있었다. 産膜酵母의 增殖이 腐敗細菌의 繁殖에 關係가 있는지 腐敗現象이 産膜酵母의 增殖을 促

進하는지는 調査치 못하였으나 産膜酵母와 腐敗와는 密接한 關係를 갖는 것 같다. 그러나 腐敗現象은 産膜酵母의 增殖 없이도 일어나지만 酸量과 ethanol 含量이 많으면 産膜酵母의 成長이 抑制되며 아울러 腐敗現象도 적었다.

濁酒 製造工程에 있어서의 密閉 醱酵方式과 開放 醱酵方式에 따른 微生物의 動態를 調査한 結果는 Table 9와 같다.

濁酒 製造 方法에서 醱酵工程을 開放式 醱酵工程과 密閉式 醱酵工程으로 區分하였을 때 酸生成量에 큰 差異를 나타냈다. ethanol 이나 microorganisms 의 數的 變化는 開放

Table 9. Compared cells of bacteria with yeast in the mash of open and closed fermented system after 60 hours at ordinary temperature.

Sample No.	Ethanol	Acidity	Cells of bacteria	Cells of yeast	Brewing method
M-1(C)	12.1	20.5	$3.2 \times 10^8$	$3.4 \times 10^8$	Lip-kuk 20%, Kokja 5%
M-1(O)	11.8	15.2	$3.5 \times 10^8$	$3.2 \times 10^8$	Bun-kuk 1.25%
M-2(C)	10.6	20.0	$4.5 \times 10^8$	$2.4 \times 10^8$	"
M-2(O)	11.0	16.3	$4.2 \times 10^8$	$2.9 \times 10^8$	"
M-3(C)	9.3	23.5	$3.5 \times 10^8$	$2.2 \times 10^8$	Lip-kuk 20%
M-3(O)	9.6	13.7	$2.4 \times 10^8$	$2.4 \times 10^8$	"
M-4(C)	8.4	22.0	$2.8 \times 10^8$	$1.2 \times 10^8$	"
M-4(O)	8.5	14.2	$3.0 \times 10^8$	$2.0 \times 10^8$	"
M-5(C)	12.5	7.8	$6.2 \times 10^7$	$5.1 \times 10^8$	Bun-kuk 5%
M-5(O)	12.1	5.3	$8.6 \times 10^7$	$5.8 \times 10^8$	"
M-6(C)	7.2	7.4	$1.2 \times 10^8$	$4.2 \times 10^8$	"
M-6(O)	6.8	4.6	$2.2 \times 10^8$	$3.7 \times 10^8$	"

Remarks: O : open fermented system C : closed fermented system

Table 10. Relationships between Takju of dilution with water on temperature and hours.

Sample	Temp. Passing hours Exp.	20°C					25°C					30°C				
		24	48	72	96	120	24	48	72	96	120	24	48	72	96	120
1	P. A.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±
	P. Y.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	±
2	P. A.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	P. Y.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	P. A.	-	-	±	+	+	-	-	+	+	±	-	+	+	±	±
	P. Y.	-	+	+	±	±	-	+	+	±	±	±	+	±	±	±
4	P. A.	-	-	±	+	+	-	-	+	+	±	-	±	+	±	±
	P. Y.	-	-	+	+	±	-	-	+	+	±	-	+	±	±	±

Remarks; P.A.: Putrefaction and bad odor P.Y.: Pellicle formation yeast



式工程과 密閉式 工程間에 뚜렷한 差異는 없으나 酸生成量은 모든 實驗에서 密閉式 工程이 開放式 工程보다 120~170%나 많았다. 特히 粉麴 單一 酵素劑 使用의 경우 開放式에 있어서 가장 不足되는 酸生成量이 147~160%의 높은 差異點을 보였다. 現在 使用되고 있는 粒麴法에 依한 製造 方法으로는 密閉式 製造工程에서 酸生成量이 지나치게 많았다.

(5) 製成과 腐敗: 濁酒의 腐敗와 製成과의 關係는 Table 10과 같다.

濁酒의 腐敗여부의 結定은 24時間 經過時마다 腐敗 特有의 냄새로서 判定하였다. Sample 1, 2와 sample 3, 4는 150%의 水道水로 製成한 것이다. 製成한 濁酒의 腐敗現象은 30°C에 가까워 질수록 顯著히 나타났으며 産膜酵母의 出現은 腐敗보다 다소 빨리 나타났으며 그러나 製成하지 않은 濁酒의 경우 腐敗形象은 나타나지 않았다. 産膜酵母의 出現 역시 製成하지 않은 濁酒에서는 그 增殖이 顯著히 抑制되고 있음을 보여 주었다.

腐敗濁酒中 細菌의 關與如否의 調查에서 이들 細菌은 한屬도 檢出되지 않았다.

## 考 察

### 1. 麴子의 microflora

麴子의 microflora에 對한 調查는 여러 學者에 依해 斷片的으로 調查된 바 있다. 麴子是 一般酵素劑와는 달리 15~30日間 生小麥被에 自然 發生하는 各種 微生物의 棲息體이고 各 微生物間에 複雜한 生態系를 나타내고 있다. 우리가 調查한 結果 *Mucor* 2種을 비롯한 *Rhizopus* 6種 *Aspergillus* 2種 등의 곰팡이가 棲息하고 *Saccharomyces* 7種, *Phichia* 2種, *Candida* 3種, *Torulopsis* 2種, *Hansenula* 2種 등의 各 酵母와 *Micrococcus*, *Bacillus*, *Aerobacter* 등의 好氣性細菌類의 繁殖이 證明되었다.

(1) Molds: 곰팡이에 對한 調查로는 李(1968)는 全國 麴子에서 分離한 *Aspergillus*를 同定하였으며 崔(1961)는 麴子內에 分布하는 各種 molds를 調查하였다. 李는

그 報告에서 *Aspergillus flavus*의 分布가 總 33株中 27株에 該當하고 그 밖에 *Asp. niger*, *Asp. fumigatus*, *Asp. clavatus* 등이 나타난다고 報告하였는데 本 實驗에서는 *Aspergillus flavus-oryzae* group과 *Asp. niger* group만이 分離되었다. 麴子內의 molds의 分布는 內外層을 區別하여 調査했을 때 表層 이외의 部分에서는 거의 *Mucor* 2種만이 分離 되었다. 麴子糖化菌으로 生覺되는 *Aspergillus*의 分布는 적었고 表層部에는 *Rhizopus* group이 大部分이었다. 李(1967)는 濁藥酒 製造에 있어서 酵素源의 效率의 添加 方法에 對해 調查하였고 李(1967)는 麴子에서 分離한 molds의 生澱粉에 對한 糖化能을 調査한 바 있으나 糖化能中 酸性 糖化能에 對해서는 報告된바 없다. 本 實驗에서 分離된 各種 molds의 酸性 糖化能(a-S.P.)은 *Aspergillus* 187.3, *Rhizopus* 152.3, *Mucor* 70.8이었고 *Mucor*菌의 酸性 糖化能이 낮은 것과 附合되는 條件이며 麴子에서 分離한 *Asp. oryzae* group(黃麴) 역시 酸性 糖化能은 낮았다. 그러나 種麴, 粉麴菌으로 使用되는 *Aspergillus Kawachii*, *Aspergillus usarii*는 각기 179.4, 392.5로 강한 酸性 糖化能을 나타냈다. 또한 麴子에서 分離한 *Rhizopus* 中에서 Rh-PG-1, Rh-CM-2, Rh-Cz-9은 a-S.P가 強했다.

(2) Yeasts: 麴子에 있어서 yeast의 調査는 韓(1959, '60, '65) 등이 全國 各地에서 蒐集한 麴子로부터 42株의 酵母를 分離하여 그 性狀을 調查한 바 있고 金(1948)에 依해서는 2, 3, 5-Triphenyltetrazolium Chloride (T.T.C) agar 重層法을 利用한 生態的인 調查가 있었다. 그러나 各種 yeast에 對한 仔細한 分類學的인 報告는 볼수 없었다. 本 實驗에서 麴子로부터 分離한 yeast菌株 32株中 14株를 同定하였다. 麴子內에서 가장 높은 分布를 보이는 것은 *Hansenula* group으로서 *H. anomala*가 優點種이라 고할 수 있으며 濁酒 醱酵能을 支配하는 *Saccharomyces* group의 分布는 높지 않았

다. 그러나 이들中 *Sacch. cerevisiae* group을分離하였고 Hennebergs medium 上에서  $\text{CaCO}_3$  分解性이 강한 *Sacch. acidifaciens*의分離가容易하였다. *Sacch. acidifaciens*는濁酒 술덧內에서도容易하게分離되었다. Potassium nitrate 資化性이 없는 *Pichia* group의分布는 예상보다 적게 나타나는 것 같으며 *P. delftensis*로同定하였다. 無孢子酵母類의 *Candida* group의分布는麴子를 malt extract broth에前培養한經遇 많이分離되었으며 분리한 *Candida* group은 *C. macedoniensis*, *C. krusei*, *C. rugosa*의3種으로同定하였다. *Rhodotorula* group의 *Rho. minuta*와 *Endomycopsis capsularis*를同定하였으나 그分布는相當히 적었다.

(3) Bacteria: 麴子內 bacteria에對한調査로는金(1961)은麴子에서10株의細菌中 *Micrococcus varians* var. KC, *M. conglomeratus*, *M. epimetheus*, *M. subflavescens* No. 1, No. 2 및 *Bacillus ambignus*, *Bacillus leutus*의7株를同定하였다. *Bacillus* group에는역시 *Bacillus subtilis*와이의 variation type이 많이 나타나고 있었으며 *Aerobacter cloacae*가同定되었다. 그러나 麴子內에分布하는 bacteria는 *Micrococcus*가 가장勢優하였다.

## 2. 술덧(膠) 및濁酒內의 microflora

濁酒 술덧內의 microflora에關한研究로는金(1968)이 T.T.C agar를利用한酵母의動態調査와乳酸菌 및好氣性細菌의動向에對해報告한바있다.

(1) Bacteria: 우리들의成績에서는 *Lactobacillus*의動態에關한所見에서 그消長은仕込時부터完熟時까지發育이繼續되고密閉式製造에서는酸生成能이 높아지는것같았다. 酸生成能이 강한細菌의 술덧內의關係를 보면製成時까지는  $10^8 \sim 10^9$  程度の分布를 보이나製成直後에는急激한減少現象( $10^2 \sim 10^3$ )이 나타났다. *Micrococcus* group의消長關係를 보면麴子를使用한것과麴子를使用치 않은것과는判異하게

다른現象을 보인다. 麴子使用의 경우 담금(仕込)直後에는 *Micrococcus*의檢出이容易하나, ( $10^4 \sim 10^5$ ) 熟成된 술덧內에서의 *Micrococcus* group의分離는容易하지 않았다. 그러나製成後時間의經遇에 따라 다시增殖( $10^5 \sim 10^7$ ) 하는所見을 보였으며腐敗濁酒에서는麴子使用有無에關係없이 쉽게分離되었다.濁酒 술덧內에서分離되는 *Bacillus* group은 주로 *Bacillus subtilis*와 이들의變異株가 많이 나타나며 *Bacillus megatherium*이나 用水中에包含되는 *Bacillus cereus* var. *mycoides*도 많이分布된다. 그러나 이들의消長關係를 보면正常醱酵한 술덧內에서는增殖를認定할 수 없었으나製成後의增殖는顯著하였다. 이 밖에도 *Pseudomonas* group中 gelatin 液化能이 있는 *Ps. caviae*가同定되었으나 그增殖는顯著하지 않았다. *Aerobacter cloacae*를 麴子內에서分離하였으므로濁酒 술덧內에서도 그存在를確認하려고 하였으나分離되지 않았다.

(2) Yeasts:濁酒 술덧內에서의 yeast의消長關係는金(1968)의調査報告에서仕込後 156時間까지繼續的인增殖를 나타낸다고報告하였으나本實驗에서 Sake yeast를酒母로使用한 경우製成後時間이經遇됨에 따라 Sake yeast의死滅程度는 높아졌다. 그러나二次的으로 pellicle formation yeast(産膜酵母)의出現이顯著하게 나타나는 즉存在하는酵母는多少增加를 보이거나 술덧內의優點種의種類는全히 다른것으로遷移되었다. 麴子와 술덧內의酵母와는수직順位에 있어 훨씬 다른所見을 보인다.市販濁酒, 술덧內에分布하는大部分의 yeast는 *Saccharomyces cerevisiae*가優秀한種이었으며 드물게는 *Torulopsis sake*가優點種으로分離된 경우가 있었으나時間의經遇에 따라서 이들의分布樣相에는 큰差異가 일어나서 *Hansenula* group, *Candida* group의繁殖이旺盛하고 *Pichia* group의增殖도認定할 수 있었다. 특異한 것은 black

yeast 로 불리우는 yeast like fungi 가 많이 나타나 고있었다. *Saccharomyces cerevisiae* group 이 濁酒 醱酵 過程에서 酒精醱酵에 主로 關與 한다는 李(1963) 等의 報告와 本 實驗에서 수적으로 *Saccharomyces* group 의 分離가 優秀했던것은 부합되는 事實이다. 그러나 *Torulopsis sake* 가 濁酒 酒精醱酵의 主菌으로 調査된 것은 새로운 事實이다. 이러한 事實은 酒母 製造工程에서 主醱酵 酵母로서 이들을 添加할때 起因하는 것으로 生覺된다.

### 3. 有害細菌의 檢査

濁酒內 有害微生物群中 大腸菌群에 關해

서는 柳等(1968)의 調査와 李等(1968)의 調査가 있으나 食中毒細菌類의 調査는 처음 시도 되었다. 일반 적으로 食中毒細菌類로 알려진 *Salmonella* group 이나 *Streptococcus* group 이 곡류에 서식하는 것으로 알려져 있으나 本實驗에서 市販濁酒나 麴子 등에서 이들과 類似한 細菌類는 전혀 分離되지 않았다. 이러한 結果 夏節期 濁酒로 因한 腸疾患은 이들에 의한것이 아니라 腐敗로 因한 二次的인 生産物에 의해 惹起되는 것으로 思料된다.

## 摘 要

濁酒의 microflora 調査는 麴子等 各種 酵素劑의 microflora 및 술덧(膠)과 製成酒의 microflora 로 區分하여 調査 하였다.

1. 麴子の microflora 는 麴子の 製造工程에 따라 差異가 있고 關與하는 菌株의 種類와 數에 差異가 甚하며, 一定한 標準 製品을 얻기는 매우 困難하였다. 많은 種類의 yeast 즉 *Saccharomyces* 7 種, *Pichia* 2 種, *Candida* 3 種, *Torulopsis* 2 種, *Hansenula* 2 種類 等의 發育과 *Aspergillus* 群, *Mucor* 群, *Rhizopus* 群의 分布가 證明되었으며 麴子の 內層에는 主로 *Mucor* 群, 表層에는 *Rhizopus* 群과 *Aspergillus* 群이 分布되고 있었다.

Bacteria 로서는 그 大部分이 *Bacillus subtilis* group 과 *Micrococcus* group 이었고 *Aerobacter* 도 證明되었다.

麴子에서 直接 分離된 Molds 의 a-S.P. 는 *Aspergillus* 187.3, *Rhizopus* 152.3, *Mucor* 70.8 의 成積이었다.

2. 술덧(膠 mash)의 microflora 는 麴子內에 있었던 *Micrococcus* 가 1 段 仕込에 依해 그 數가 줄어지고 酸生成細菌類의 增殖은 活潑해졌으며, Sake yeast 를 酒母로 使用했을 경우 *Saccharomyces* 의 繁殖이 活潑해지고 1 段仕込時부터 顯著히 增加하는 것을 본다. 이밖에 *Torulopsis*, *Hansenula*, *Candida*, *Pichia* 等의 yeast 의 繁殖이 證明되는 것으로 보아 濁酒의 alcohol 醱酵에는 單一種의 yeast 作用이 아니라 多種類가 關與하고 있었다.

3. 製成酒의 microflora 는 술덧을 約 2 倍로 희석하면 不在하던 *Micrococcus* 의 增殖이 活潑해지고 Sake yeast 의 增殖은 없어지는 代身 pellicle formation yeast(産時酵母)의 增加가 顯著해지고 腐敗細菌인 *Bacillus* group 의 增殖이 旺盛해 졌다. acid production bacteria(乳酸菌群)의 發育은 抑制되었고 2 倍 또는 2 倍半 以上으로 희석하는 方法의 製成은 腐敗現象을 招來 하였다.

4. 有害細菌인 大腸菌 및 食中毒細菌類의 檢出은 各種酵素劑 및 濁酒內에서 分離할 수 없었다.



## REFERENCES

- 張在統, 1962. 改良 濁酒製造法, 發明特許公報 第 31 號 公番 3193 號.
- 鄭基澤, 1967. 韓國在來酒 改良에 關한 研究, 慶北大論文集(自) 11
- 鄭淳泰, 1964. 약탁주의 제조법 특허공보 제 106 호 공번 64, 106
- 鄭址圻, 1967. 原料를 달리하는 濁酒熟成醪中の 有機酸 및 糖類의 檢索에 關한 研究, 農化學會誌 8., (39), 43
- 朝鮮酒造協會, 1936. 朝鮮酒造史, 朝鮮酒造協會 21., 122
- 曹惠鉉, 1970. 酵母의 生態學, 韓國微生物學會誌 8., (1), 41
- 조덕현, 신용두, 1969. Gas chromatography 에 의한 한국산주류중의 유기산 검색, 기술연구 소보 2., 1
- 崔淑熙, 1961. 韓國麴子中の 微菌學的 研究, 成均館大 碩士學位論文集, 234
- 總督府酒類試驗所, 1929. 白酒製造試驗, 釀造學雜誌 總督府 6., 44
- 總督府酒類試驗所, 1928. 朝鮮麴子の 研究並に該製造法の變遷調査 (十六), 朝鮮酒造協會雜誌 5. (2), 17
- 朝鮮總督府酒類試驗所, 1926. 藥酒貯藏試驗報告, 朝鮮酒造協會雜誌 3., (2),
- 朝鮮總督府酒類試驗室, 1929. 試釀藥酒貯藏報告, 朝鮮酒造協會誌
- 朝鮮總督府酒類試驗所, 1927. 藥酒貯藏試驗報告 朝鮮酒造協會誌 4., (4),
- Chung. J.H. 1967. Studies on the identification of organic acids and sugar in the fermented mash of the Takjoo made from different raw materials Jour. of Kor. Agri. Chem. Soc. 8., 39
- Ernest Athearn Bessey, 1961. Morphology and Taxonomy of Fungi, Hafner Publishing Company ed, 1., 150
- Fukamoto J., Yamamoto T., Tsuru D., 1957. Studies on bacterial amylase Report XXI Formation of bacterial amylase and Proteinase J., Agri. Chem. Soc Japan 31., 506
- 洪淳佑, 河永七, 임병중, 1968. 시중막걸리의 성분과 동태 양조시험소보 1., 18
- 洪淳佑, 河永七, 尹權相, 1968. 濁酒醪中の 糖化作用과 Amylase Activity 의 變化에 對하여, 韓國微生物學會誌 6. (4), 141
- 홍순우, 하영칠, 윤원상, 1969. 막걸리의 성분과 그 보존성에 관한 연구(제 1 보), 기술연구소보 1., 46
- 韓容錫, 全炅植, 1959. 韓國產酸酵菌에 關한 研究(第一報) 工研報告 9., 100
- 韓容錫, 全炅植, 1960. 韓國產酸酵菌에 關한 研究(第二報), 工研報告 10., 112
- 韓容錫, 金奇珠( 1965. 韓國產酸酵微生物에 關한 研究 (第三報) 工研報告 19., 22
- Ingram M.T.A. Robert, 1966. Microbiological Principles in food irradiation(SM-73/14) Food. irradiation p267 procceeding of Symposium. Karlsruhe 6., 10
- 印鉉周, 李培成, 1968. 韓國 Rhizopus 屬의 分類學的 研究 (第一報), 韓國微生物學會誌 6. (3), 100
- Katkura K.C. Hatanaka, 1959. Studies on the Production of enzymes by rice Koji, J. Soc. brew. Japan 54, 438
- 全昊燮, 1961. 韓國麴子中の 細菌學的研究, 成均館大 碩士學位論文集, 292
- 金燦祚, 1968. 濁酒 釀造에 關한 微生物學的 및 酵素學的 研究, 農化學會誌 10., 69
- 金燦祚, 1959. 韓國酒類成分에 關한 研究(第2報), 農化學會誌 9. (59)
- 金燦祚, 1967. 韓國酒類에 關한 研究 (第3報), 忠南大論文集 (自) 6. 3
- 김익영, 1964. 주류제조방법, 특허공보 제 133 호 공번 제 133 호
- 金光駿, 1968. 改良藥濁酒製造法, 發明特許公報第 40 號 公番 第 9025 號
- 김승태, 1968. 탁주제조법, 特許公報 第 15 號 公番 250 號
- 김성태, 1967. 탁주제조법, 特許公報 第 144 號 公番 136 號
- 加來天民, 西川不二男, 1925. 朝鮮人飲食物及嗜好品の研究(第一報), 朝鮮醫學會雜誌 55, 33
- 草道常春, 1925. 朝鮮酒酒母に就て 朝鮮酒造協會雜誌 2., 1
- 草道常春, 1926. 夏でき腐う好釀造方法, 釀造



- 學雜誌 3. (4), 63
37. 李周植, 李泰雨, 1968. 막걸리의 Microflora, 酒類開發에 관한 研究發表抄錄, 2., unpublished.
  38. 李根培, 金鍾協, 1969. 放射線照射에 의한 韓國產濁酒 및 藥酒의 shelf-life 延長에 관한 研究 韓國微生物學會誌 7. (2), 45
  39. 李斗永, 1968. 리조프스속균의 중국 또는 국을 이용한 탁약주의 제조법, 特許公報 第 11 號 公番 第 11 號
  40. 李斗永, 1967. 韓國麴子の 醱酵生産力에 관한 研究, 韓國微生物學會誌 5. (2), 51
  41. 李培成, 丁聖九, 1969. 막걸리 대체원료에 따른 고성능 발효균주 개발에 관한 연구, 기술연구소보 2., 4
  42. 李培成, 1968. 우리나라 발효제에서 분리된 미생물의 분리 및 생리학적 조사연구 (제 1 보), 양조시험소보 1., 39
  43. 이성범, 최계환, 임동순, 김덕치, 1969. 막걸리에 제조를 위한 효소제의 개발 연구 (제 1 보) 기술 연구소보 2., 72
  44. 이성범, 임동순, 1968. 막걸리증 대장균군의 오염에 관한 문제, 양조시험소보 1., 7  
이성범, 장원길, 임병중, 김덕치 1969. 막걸리 제조시 슬릿(mash)의 성분 동태에 관한 연구 (제 1 보), 韓國微生物學會誌 7., 153
  46. 李星範, 1967. 濁藥酒 製造에 있어서의 酵素源 및 그의 效率的 添加方法에 관한 研究, 韓國微生物學會誌 5. (2), 43
  47. 李炳宇, 1956. 改良濁酒製造法, 發明特許公報 第29號 公番 第 683 號
  48. 李炳宇, 1958. 改良藥酒製造法, 發明特許公報 第42號 公號 第1, 118 號
  49. 이춘녕, 장지현, 1969. 한국고유주조기술의 사적인 연구, 기술연구소보 2., 40
  50. 문명현, 김영준, 1968. 탁탁주제조법, 特許公報 第 370 號
  51. 文明顯, 金元鎬, 李武性, 1962. 藥濁酒製造法, 特許公報 第 86 號 公番 3, 460 號
  52. 長西廣輔, 1929. 朝鮮麴子の 研究並に 該製造法の 變遷調査, 釀造學雜誌 6. (10), 43
  53. 長西廣輔, 1929. 朝鮮麴子の 研究並に 該製造法の 變遷調査 (八), 釀造學雜誌 6. (7),
  54. 長西廣輔, 1929. 朝鮮麴子の 研究並に 該製造法の 變遷調査 (九), 釀造學雜誌 6. (10), 50
  55. 長西廣輔, 1929. 朝鮮麴子の 研究並に 該製造法の 變遷調査 (六), 釀造學雜誌 6. (10), 33
  56. 長西廣輔, 1929. 朝鮮麴子の 研究並に 製造法の 變遷調査 (七), 釀造學雜誌 6. (10)
  57. 小原殿, 1939. 朝鮮產麴子に關する研究, 釀造學雜誌 17., 660
  58. 齊藤賢道, 1928. 朝鮮麴子の 研究並に 該製造法の 變遷調査 (十五), 朝鮮酒造協會誌 5. (1)
  59. 佐田生, 1929. 麴子の製造に對する研究 (一), 朝鮮酒造協會誌 3. (6)
  60. 孫泰華, 1961. 濁酒釀造에 미치는 抗生物質의 影響 (第一報), 慶北大論文集 (自) 5., 157
  61. Sthelik G.K. Kaindle, 1966. Microbiological studies on the influence of combined process of heat and irradiation on the survival of *Sacch. cerevisiae* var. *ellipsoideus* (SM-7 2/43), Food irradiation (p 229 proceedings of a symposium Karlsruhe. 6., 10
  62. 武田義人, 1927. 朝鮮麴子の 研究並に 該製造法の 變遷調査 (十四), 朝鮮酒造協會 雜誌 4. (5)
  63. 武田義人, 1928. 朝鮮麴子の 研究並に 該製造法の 變遷調査 (十三) 朝鮮酒造協會 雜誌 4. (4)
  64. 武田義人, 1279. 朝鮮麴子の 研究並に 該製造法の 變遷調査 (十一), 朝鮮酒造協會 雜誌 4., 2
  65. 武田義人, 1934. 朝鮮產醱酵菌類의 研究 (第二報), 日本農化學會誌 10., 281
  66. 武田義人, 1927. 朝鮮麴子の 研究並に 該製造法の 變遷調査 (十二), 朝鮮釀造協會 雜誌 4. (3)
  67. 武田義人, 1930. 朝鮮產醱酵菌類의 研究 (第一報), 日本農化學會誌 6., 1, 023
  68. Takeda. Z, 1935. Studies on *Rhizopus* species-III, J. Agri. Chem. Soc. Japan 11, 845
  69. Taiji I., Yoshito T., Hiroshi I., 1965. Taxonomical studies on genus *Rhizopus*. The Journal of general and applied Microbiology II. Supplement Tokyo Japan
  70. Yang Hyung Ho., 1959. Studies on the separation and identification of free amino acids in liquors by means of paper chromatography, 中央大 論文集 4
  71. 양조시험소, 1968. 서울시내 탁주제조장 정수 분석, 양조시험소보 1., 1
  72. Yamada S.I 1966. Analysis of Alcohols.

- Analytical method for brewing, Japanese 4th ed. Sangyo Tosho KK Tokyo Japan, 99, 178, 108
- XXV Japan Jour. of Ferment. Technology 39. (1), 34
73. Yoshio Otani Satoru Takahashi, 1961. Studies on the improvement of alcohol mash
73. 유준, 장학래, 1968. 막걸리에 있어서의 병원성세균에 관한연구, 양주시험소보 1., 113