

## Protease 무첨가 약주의 가속 숙성에 따른 이화학적 특성 변화

노종민 · 강지은 · 최지호 · 정석태 · 최한석\*  
농촌진흥청 국립농업과학원 발효식품과

### Changes in Physicochemical Properties of *Yakju* Prepared by Accelerated Aging without Protease

Jong-Min Noh, Ji-Eun Kang, Ji-Ho Choi, Seok-Tae Jeong, and Han-Seok Choi\*

Fermented Food Science Division, National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration

**Abstract** Normal alcoholic fermentation took place at 20-25°C in *yakju* (traditional Korean rice wine) prepared without the addition of protease (non-addition group). The total concentration of organic acids increased by 1.0-2.7 fold in the non-addition group. While the concentration of lactic acid and acetic acid increased, the pyroglutamic acid concentration decreased by 51.1 fold. Consequently, the total acidity and volatile acid concentration increased, and the overall pH decreased. Compared to the addition group, the non-addition group showed a 3.0-5.2 fold increase in the amount of amino acids; however, the total estimated concentrations of free-form amino acids were 5.2-11.9 times lower than those in the latter group. The major amino acids found in the non-addition group were alanine, arginine, leucine, and phenylalanine. The *yakju* preparation from the non-addition group showed a 1.2-3.0 fold decrease in the final color intensity as compared to that from the addition group.

**Keywords:** *yakju*, aging, protease, free amino acid, Korean rice wine

## 서론

한국의 전통술은 탁주, 약주, 소주로 구분할 수 있는데 약주는 주로 찹쌀이나 멥쌀에 누룩을 넣고 발효한 다음 발효가 끝날 때 쪄, 술덧에 용수를 박아 맑은 액체만을 걸러내서 만든 것이 전통적인 방법이다(1). 우리나라 전통술은 대부분 당화와 알코올 발효가 동시에 일어나는 병행발효주로 누룩을 사용하기 때문에 곰팡이와 효모에 의해 생성되는 당류, 유기산, 아미노산 이외에 젖산균 등에 의해서 만들어지는 휘발성 풍미 성분들도 함유되어 있다(2). 경제 발전과 함께 전통식품에 대한 관심이 높아지면서 1990년대 후반 국순당의 백세주를 비롯한 다양한 종류의 약주가 제조되고 판매되어 왔다. 약주의 출고량은 2000년 1월 1,688 kL에서 2003년 12월 4,588 kL로 142.5%의 높은 성장률을 보여주었고(3), 지속적인 성장세를 유지하기 위해 가능성을 가진 약주의 개발이 시도되기도 하였다(4). 하지만 지속적으로 변하는 소비자의 요구에 대응하지 못하면서 국내 약주 시장은 2004년 이후 급격하게 판매량이 감소하였고 2010년 기준 출고량 18.67 kL, 출고액 약 1,000억 원으로 규모가 대폭 축소되었다(5). FTA 시장 개방에 따른 외국산 주류 소비에 의하여 시장이 점차 위축되어

가고 있는 상황에서 우리 술을 지키기 위한 노력이 필요한 때이다.

약주와 유사한 알코올 함량을 가지고 있는 와인은 숙성을 통하여 부가가치를 향상시켰고 사케는 정교한 품질관리를 통하여 시장을 확보하고 있다. 숙성이 주류의 풍미향상과 제품의 마케팅에 중요한 요소로 작용되면서 중국은 국립 황주 품질인증 센터를 건립하여 숙성주에 관한 연구를 하고 있고(6,7) 일본에서는 사케 100년 저장 프로젝트를 진행하며 국제적 명주를 만들기 위하여 노력하고 있다(8). 그러나 숙성 전 약주의 상태에 따라서 숙성 후 품질이 저하될 수도 있다. 주류의 숙성 중에는 산화, 가수분해, 탈수병합 등의 다양한 화학반응이 일어나는데(Fig. 1) 당과 아미노산의 Maillard reaction에 의해 생성된 일부 carbonyl 화합물 및 pyrazine류는 주류를 오래 저장했을 때 발생하는 숙성취(노주취), 탄내 등을 유발하며, 주류의 색을 변하게 만든다(9). 또한, 아미노산의 광산화에 의해서 생성된 indol 화합물 및 harmane 화합물은 주류의 색을 갈변시키고 아미노산의 변화에 의해서 만들어지는 polysulfide 화합물은 주류에 좋지 않은 냄새를 부여하기도 한다(9). 일본의 사케는 도정도를 높은 쌀을 사용, 원료의 단백질 함량을 낮춤으로써 술의 아미노산 함량을 줄이는 방법을 선택하였다. 우리나라 약주는 문화적으로 전곡을 사용하여 왔고 중소기업의 경우 산업적으로 영세하기 때문에 도정기의 보급 및 폐기물 처리 등의 문제로 도정곡을 사용하기에는 부담이 된다.

본 연구팀은 숙성을 통하여 우리나라 약주의 품질을 증대시키고자 하고 있으며, 첫 번째로 단백질 분해를 제어하면 숙성과정에서 발생할 수 있는 노주취의 생성을 저감화하고 변색을 억제할 수 있을 것이라 가설을 세우고 protease 무첨가 약주를 가속 숙성한 다음 주류의 성분변화를 조사하여 보고하는 바이다.

\*Corresponding author: Fermented Food Science Division, National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration, Wanju, Jeonbuk 565-851, Korea  
Tel: 82-63-238-3618  
Fax: 82-63-238-3843  
E-mail: coldstone@korea.kr  
Received August 7, 2014; revised September 13, 2014;  
accepted October 23, 2014

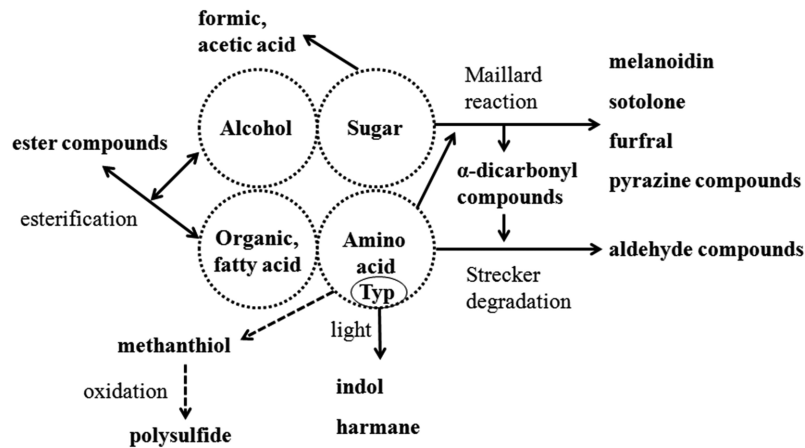


Fig. 1. Changes in the chemical characteristics of rice-based alcoholic beverage during aging.

### 재료 및 방법

#### 실험재료

본 실험에 사용된 쌀은 경기도에서 수확한 맵쌀로 경기미 효원쌀(Suwon Agricultural Cooperative, Suwon, Korea)을 사용하였다. 효모는 (주)비전바이오켐(Seongnam, Korea)에서 구매한 라빠리장(S.I. Lesaffre Co., Marcq-en-Barœul, France)을 사용하였고, 전분 분해 효소는 α-amylase와 gluco-amylase가 혼합되어 있는 당화력 15,000 SP의 충무정제효소(Chung-Moo Fermentation Co., Ltd., Ulsan, Korea)를 사용하였다. 단백질 분해 효소는 *Aspergillus oryzae*로부터 분리한 제품을 Sigma-Aldrich사(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

#### 숙성약주 제조

쌀 3 kg을 깨끗하게 씻어서 하루 전날 수침한 다음, 다음날 1 시간 동안 물빼기를 수행하였다. 쌀을 증자기(MS-30, Yaegaki Food & System Inc., Himeji, Japan)에 넣고 김이 올라오기 시작한 후부터 40분간 수증기를 더 가해 고두밥을 제조하였다. 10 L 플라스틱 병에 수침 전 백미 무게기준 160% 물과 0.2% 효모 및 0.2% 전분분해 효소를 순서대로 넣은 다음 protease 처리구에만 0.2% protease를 첨가하고 증자미를 넣었다. 발효온도는 incubator (VS-1203PFHLN, Vision Scientific, Co., Ltd., Daejeon, Korea)를 이용 10, 15, 20, 25, 30°C로 설정하여 발효시켰다. 경시적으로 알코올 함량을 확인하여 알코올 함량이 더 이상 증가하지 않으면 발효를 종료한 다음 여과(Filter paper No. 2, Advantec Co., Tokyo, Japan)하여 냉장보관 하였다. 모든 온도 조건에서 발효가 된 후 약주의 숙성을 가속화하기 위하여 50°C incubator (DS-80-3, Dasol Scientific Co., Suwon, Korea)에서 7일간 가온하여 시료를 제작하였다.

#### 이화학성분

pH는 pH meter (Orion 3 Star, Thermo Scientific Co., Singapore, Singapore)를 이용하여 측정하였다. 산도, 아미노산도, 알코올 함량은 주류분석 규정(10)에 준하여 측정하였으며, 산도는 시료 10 mL를 중화시키는데 필요한 0.1 N Sodium Hydroxide (NaOH) 용액이 소비된 mL수로, 아미노산도는 총산을 측정한 시료에 formalin 용액 5 mL를 첨가한 다음 0.1 N NaOH로 적정한 값으로 나타내었다.

색도는 color meter (Ultra Scan PRO, Hunter Lab Inc., Reston,

VA, USA)를 사용하여 측정하였다. 색차는 색도계에서 제공하는 delta CMC<sub>2:1</sub>로 나타내었다.

#### 유기산

유기산 분석을 위해서 HPLC (LC-20A, Shimadzu Co., Kyoto, Japan)를 이용하였으며 post column방법을 사용하여 분석하였다. 유기산 분석용 column은 Shodex Rspack KC-G (6.0×50.0 mm) guard column에 RSpak KC-811 (8.0×300 mm, Showa Denko Co., Tokyo, Japan) 2개를 연결하여 사용하였다. 이동상은 3 mM perchloric acid를 이용하였으며, flow rate는 0.8 mL/min, column oven의 온도는 63°C로 하였다. 분리물은 반응용액(0.2 mM bromothymol blue, 15 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM NaOH)과 반응한 후 UV 440 nm에서 검출하였다. 이때 반응용액의 flow rate는 1.0 mL/min, 반응온도는 30°C로 하였다. 시료는 여과(0.2 μm, Millipore Co., Cork, Ireland)후 사용하였다.

#### 유리 아미노산

유리 아미노산은 아미노산 자동분석기(L-8900, Hitachi Co., Tokyo, Japan)를 사용하였다. 시료 5 mL에 5% trichloroacetic acid 5 mL를 첨가한 후 원심분리(4°C, 12,000×g, 15 min)하였다. 상등액을 회수한 다음 여과(0.2 μm, Millipore Co.)한 것을 post column 방법으로 분석하였다. 분석에는 PF #2622 (4.6×60 mm, Hitachi Co.) column을 사용하였으며 column oven의 온도는 57°C, reactor의 온도는 136°C로 설정하였고 발색에는 ninhydrine 용액을 사용하였다(11).

### 결과 및 고찰

#### 알코올 생산 및 발효기간

Protease 무첨가가 알코올 생산(Fig. 2a) 및 발효기간(Fig. 2b)에 미치는 영향을 살펴보았다. 발효온도별 술덧의 알코올 농도를 조사한 결과(Fig. 2a), protease 첨가구의 알코올 농도는 각각 17.7, 18.7, 17.8, 17.4, 18.0%로 발효온도 15°C에서 가장 높은 알코올 농도를 나타내었다. 그러나 모든 온도에서 17.0% 이상의 알코올을 생산하는 것으로 나타나 발효온도에 따라 큰 폭의 차이는 없었다. 반면, 무첨가구의 알코올 농도는 각각 14.6, 17.1, 17.9, 17.4, 15.9%로 발효온도가 20-25°C 구간보다 낮거나 높은 온도에서는 알코올 생산성이 낮아지는 것으로 나타났으며, 발효온도 10°C에서는 첨가구보다 21.3%, 15°C에서는 9.4%, 30°C에서는 13.2% 낮



**Table 1. Concentration of organic acids in *yakju* prepared with addition of protease**

Compounds	Organic acids concentration (mg/100 mL)				
	10°C	15°C	20°C	25°C	30°C
Oxalic	0.92±0.23	0.80±0.28	0.74±0.05	n.d.	n.d.
Citric	17.90±1.09	16.35±0.16	17.30±0.01	12.87±0.48	10.32±0.81
Tartaric	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Malic	29.41±2.22	26.21±0.19	35.77±0.32	43.50±0.04	41.63±1.13
Succinic	73.98±4.74	84.32±0.89	92.13±0.40	77.84±1.11	69.87±1.36
Fumaric	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Lactic	30.58±1.68	51.1±0.87	65.93±0.19	56.39±0.83	37.29±0.70
Formic	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Acetic	1.43±2.02	n.d.	5.11±0.15	16.20±0.55	34.46±2.52
Pyroglutamic	23.73±0.26	24.03±0.21	45.25±1.40	68.61±3.87	132.70±5.29
Total	177.95±7.23	202.81±2.27	262.24±0.38	275.40±5.92	326.28±11.81

n.d.: not detected

Values represent means±standard deviations.

**Table 2. Concentration of organic acids in *yakju* prepared without addition of protease**

Compounds	Organic acids concentration (mg/100 mL)				
	10°C	15°C	20°C	25°C	30°C
Oxalic	0.91±1.28	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Citric	14.75±0.21	20.84±3.67	20.71±4.50	15.91±0.22	26.66±0.27
Tartaric	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Malic	7.25±0.13	16.71±6.19	16.71±6.46	34.99±0.59	49.97±0.02
Succinic	86.91±0.03	101.89±1.55	101.98±2.10	134.59±2.93	149.30±1.20
Fumaric	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.05±0.07
Lactic	216.20±0.56	234.34±69.68	234.54±69.87	145.67±3.30	30.00±0.25
Formic	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Acetic	142.92±1.23	125.55±8.65	126.70±9.48	22.87±0.09	59.98±3.18
Pyroglutamic	6.44±1.31	3.38±1.23	3.52±0.63	1.34±1.90	8.90±1.79
Total	475.39±0.52	502.70±71.20	504.17±72.83	355.37±9.02	324.87±3.20

n.d.: not detected

Values represent means±standard deviations.

의 확보가 어려웠기 때문에 알코올 생산이 지연되면서 발효기간도 증가한 것으로 생각된다. 그러나 30°C에서 발효한 시료의 경우 일반적인 효모 생육에 적절한 온도이고 아미노산도도 25°C 시료보다 높음에도 불구하고 알코올 생산성(Fig. 2a)이 낮고 발효기간도 긴 것으로 나타났는데, 30°C 시료의 발효기간별 알코올 생산량을(Fig. 2b, inset) 살펴보면 발효 10일 부근까지는 정상적인 발효가 진행되었으나 이 후 알코올이 경미하게 상승되면서 전체적인 발효기간의 증가를 가져왔다. 이러한 이유는 아직 명확하지 않다. 현재까지의 결과를 요약해보면, protease를 첨가하지 않을 경우 발효온도에 따라 알코올 생산성 및 발효기간이 민감하게 반응하는 것으로 해석될 수 있다.

#### pH, 산도, 유기산, 휘발산

각 처리구의 발효온도에 따른 pH 변화를 살펴본 결과(Fig. 3a), 발효온도에 따른 protease 첨가구의 pH는 5.22-4.90이었으며, 무첨가구는 4.13-4.56으로 무첨가구의 pH가 낮게 나타났다. 또한, 첨가구는 발효온도의 증가에 따라 pH가 낮아지지만 무첨가구는 발효온도에 의존적으로 높아졌다. 이러한 결과로 발효온도 10°C에서는 두 처리구가 26.5% 차이를 보였으나 발효온도 30°C에서는 7.3%의 차이를 나타내어 발효온도가 높아질수록 두 처리구의

차이가 좁아지는 경향이였다. 이는 산도(Fig. 3b) 및 유기산(Table 1, 2)의 분석결과로 설명될 수 있다. Protease 무첨가구의 산도는 각각 5.39, 4.48, 4.54, 4.20, 4.30으로 발효온도의 증가에 따라 산도가 감소했지만 protease 첨가구의 산도는 각각 1.96, 2.29, 3.21, 3.48, 3.72로 온도에 의존적으로 증가하면서 pH의 변화를 유도한 것으로 해석될 수 있다. 약주 제조에 있어 산도의 변화는 누룩 또는 주모로 첨가되는 산을 제외하면 대부분 효모의 대사로부터 생산되는데 succinic, lactic, malic, citric, acetic acid가 주로 생성된다(16). Protease 첨가구의 유기산 총량은(Table 1) 각각 177.95, 202.81, 262.24, 275.40, 326.28 mg/100 mL이었던 반면, 무첨가구의 유기산 총량(Table 2)은 각각 475.39, 502.70, 504.17, 355.37, 324.87 mg/100 mL로 protease 무첨가에 의해 유기산 총량이 1.0-2.7배 증가하였다. 이는 protease 무첨가에 의해서 lactic acid와 acetic acid 함량이 크게 증가했기 때문이다. Protease 무첨가구의 lactic acid 함량은 30°C 시험구를 제외하면 첨가구에 비하여 2.6-7.1배, acetic acid는 최고 99.9배(10°C)까지 함량이 증가하였다. Lactic acid와 acetic acid는 효모의 glycolytic pathway를 통하여 생산되는 한편 acetic acid는 영양, 삼투압, 알코올 스트레스 등에 의해서 생성량에 상당한 영향을 받는다(16). 따라서 영양 스트레스에 발효온도 스트레스가 복합적으로 작용하면서 protease 무첨

**Table 3. Free amino acid concentrations in yakju prepared with addition of protease**

Compounds	Free amino acids concentration (mg/100 mL)				
	10°C	15°C	20°C	25°C	30°C
Alanine	26.15 (18.1)	25.05 (14.9)	28.53 (11.7)	37.65 (12.1)	47.44 (9.9)
Ammonia	2.33 (1.6)	1.99 (1.2)	2.64 (1.1)	3.45 (1.1)	5.39 (1.1)
Anserine	2.51 (1.7)	2.89 (1.7)	4.45 (1.8)	7.46 (2.4)	5.28 (1.1)
Arginine	22.26 (15.4)	22.43 (13.3)	33.46 (13.8)	45.63 (14.7)	71.80 (15.0)
Aspartic acid	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
$\alpha$ -Aminoadioc acid	0.56 (0.4)	0.49 (0.3)	1.14 (0.5)	n.d.	1.20 (0.2)
$\alpha$ -Aminobutyric acid	2.10 (1.5)	2.30 (1.4)	n.d.	2.47 (0.8)	2.90 (0.6)
$\beta$ -Alanine	0.57 (0.4)	0.23 (0.1)	1.08 (0.4)	1.34 (0.4)	2.99 (0.6)
$\beta$ -Aminoisobutyric acid	1.62 (1.1)	1.11 (0.7)	2.37 (1.0)	2.14 (0.7)	2.62 (0.5)
$\gamma$ -Aminobutyric acid	3.82 (2.6)	4.38 (2.6)	4.98 (2.0)	5.23 (1.7)	4.63 (1.0)
Carnosine	0.21 (0.1)	0.44 (0.3)	0.75 (0.3)	0.32 (0.1)	n.d.
Citrulline	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Cysteine	3.86 (2.7)	3.50 (2.1)	3.96 (1.6)	4.47 (1.4)	7.22 (1.5)
Ethanolamine	n.d.	n.d.	0.29 (0.1)	0.39 (0.1)	0.13 (0.0)
Glutamic acid	8.30 (5.7)	8.36 (5.0)	12.47 (5.1)	17.01 (5.5)	26.77 (5.6)
Glycine	0.31 (0.2)	0.06 (0.0)	11.13 (4.6)	0.22 (0.1)	24.81 (5.2)
Histidine	5.13 (3.5)	4.62 (2.7)	5.87 (2.4)	8.83 (2.8)	15.72 (3.3)
Hydroxylysine	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Isoleucine	n.d.	10.61 (6.3)	14.47 (6.0)	19.44 (6.3)	33.80 (7.1)
Leucine	11.87 (8.2)	17.51 (10.4)	25.81 (10.6)	33.56 (10.8)	52.39 (10.9)
Lysine	16.93 (11.7)	15.29 (9.1)	22.11 (9.1)	29.44 (9.5)	40.15 (8.4)
Methionine	n.d.	0.31 (0.2)	0.51 (0.2)	0.79 (0.3)	10.68 (2.2)
1-Methylhistidine	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
3-Methylhistidine	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ornithine	1.92 (1.3)	1.56 (0.9)	1.21 (0.5)	1.24 (0.4)	1.96 (0.4)
Phenylalanine	11.25 (7.8)	11.50 (6.8)	18.83 (7.8)	24.33 (7.8)	37.71 (7.9)
Phosphoethanolamine	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Phosphoserine	0.60 (0.4)	0.61 (0.4)	0.66 (0.3)	0.85 (0.3)	1.25 (0.3)
Sarcosine	n.d.	n.d.	n.d.	0.17 (0.1)	n.d.
Cystathionine	10.84 (7.5)	9.41 (5.6)	12.28 (5.1)	16.69 (5.4)	2.24 (0.5)
Serine	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Taurine	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Threonine	n.d.	n.d.	0.36 (0.1)	n.d.	0.65 (0.1)
Tryptophan	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Tyrosine	11.13 (7.7)	10.13 (6.0)	16.06 (6.6)	22.81 (7.3)	36.49 (7.6)
Urea	0.21 (0.1)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Valine	0.14 (0.1)	13.28 (7.9)	17.51 (7.2)	24.96 (8.0)	42.91 (9.0)

n.d.: not detected

The numbers in parentheses indicate the percentage distribution of each compound.

가구의 lactic acid와 acetic acid의 함량을 높인 것으로 분석된다. 이외에 protease 무첨가에 의해서 citric acid와 succinic acid가 소폭 증가되었으며 malic acid는 소폭 감소되었고 pyroglutamic acid의 함량이 3.7-51.1배 낮아지는 것으로 조사되었다. Citric, succinic, malic acid는 주로 효모의 TCA cycle에 의해서 생성되는 것이 일반적이거나 succinic acid와 malic acid는 glyoxylate cycle 등의 bypath 경로에 의해서도 생성되는 것으로 알려져 있다(17). Pyroglutamic acid는 glutamic acid의 일부가 비효소적으로 변한 것으로 특이적인 맛은 없으나(18), pyroglutamic acid 함량이 높다는 것은 아미노산의 함량이 상대적으로 높다는 것을 의미한다(Table 3).

이런 유기산 변화가 산도와 pH의 변화를 가져왔다고 판단되며 acetic acid의 함량 증가는 휘발산의 함량 증가로 이어졌다(Fig. 3c). 무첨가구의 acetic acid 함량은 각각 142.92, 125.55, 126.70,

22.87, 59.98 mg/100 mL로 휘발산의 경시적 변화와 일치하고 있다. 술덧의 산 함량은 술덧의 pH를 조절하여 잡균의 번식을 억제하나 너무 낮은 pH는 기호적으로 좋지 않은 냄새 성분인 diacetyl의 함량을 증가시킬 수 있기 때문에 pH 4.0-6.0을 유지하는 것이 좋은 것으로 알려져 있다(19). 또한, 각각의 유기산은 주류의 맛, 냄새 및 휘발성 향기성분과 관련이 있으며 보존성에도 영향을 주기 때문에(20) 적절한 관리가 필요하다. 이러한 측면에서 protease 무첨가구의 저온발효는 acetic acid를 다량 생산하여 자극적인 향을 낼 수 있기 때문에 약주제조에 있어서는 다소 부정적이라고 생각될 수도 있다.

#### 아미노산도, 유리 아미노산, 색도

아미노산도 분석결과(Fig. 4a), protease 첨가구가 무첨가구에 비

**Table 4. Free amino acid concentrations in *yakju* prepared without addition of protease**

Compounds	Free amino acids concentration (mg/100 mL)				
	10°C	15°C	20°C	25°C	30°C
Alanine	0.72 (3.7)	4.43 (13.6)	3.35 (16.5)	6.35 (16.8)	6.64 (10.4)
Ammonia	0.99 (5.1)	1.17 (3.6)	0.87 (4.3)	0.87 (2.3)	1.41 (2.2)
Anserine	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Arginine	2.99 (15.5)	2.77 (8.5)	3.16 (15.6)	2.35 (6.2)	7.67 (12.0)
Aspartic acid	n.d.	n.d.	n.d.	1.69 (4.5)	n.d.
$\alpha$ -Aminoadipic acid	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
$\alpha$ -Aminobutyric acid	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
$\beta$ -Alanine	n.d.	0.62 (1.9)	n.d.	0.67 (1.8)	0.62 (1.0)
$\beta$ -Aminoisobutyric acid	0.15 (0.8)	1.35 (4.1)	0.15 (0.8)	0.34 (0.9)	2.07 (3.2)
$\gamma$ -Aminobutyric acid	0.36 (1.9)	0.46 (1.4)	0.33 (1.6)	0.82 (2.2)	0.57 (0.9)
Carnosine	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Citrulline	6.09 (31.5)	0.22 (0.7)	n.d.	n.d.	n.d.
Cysteine	2.14 (11.1)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ethanolamine	n.d.	n.d.	n.d.	0.14 (0.4)	0.31 (0.5)
Glutamic acid	1.11 (5.8)	1.03 (3.2)	1.18 (5.8)	0.87 (2.3)	2.86 (4.5)
Glycine	0.02 (0.1)	1.55 (4.8)	1.12 (5.5)	2.14 (5.7)	1.96 (3.1)
Histidine	0.43 (2.2)	0.27 (0.8)	0.46 (2.3)	0.64 (1.7)	0.54 (0.8)
Hydroxylysine	n.d.	n.d.	0.02 (0.1)	n.d.	n.d.
Isoleucine	n.d.	1.18 (3.6)	0.57 (2.8)	1.12 (3.0)	3.70 (5.8)
Leucine	0.42 (2.2)	4.32 (13.3)	1.97 (9.7)	4.04 (10.7)	10.11 (15.8)
Lysine	0.79 (4.1)	1.26 (3.9)	0.98 (4.8)	1.43 (3.8)	3.54 (5.5)
Methionine	n.d.	0.63 (1.9)	0.19 (1.0)	0.56 (1.5)	2.67 (4.2)
1-Methylhistidine	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
3-Methylhistidine	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ornithine	1.45 (7.5)	2.45 (7.5)	1.65 (8.1)	3.54 (9.4)	1.28 (2.0)
Phenylalanine	0.73 (3.8)	3.50 (10.7)	1.25 (6.2)	3.07 (8.1)	6.73 (10.5)
Phosphoethanolamine	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Phosphoserine	n.d.	0.44 (1.4)	0.36 (1.8)	0.45 (1.2)	n.d.
Sarcosine	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Cystathionine	0.24 (1.2)	0.13 (0.4)	0.32 (1.6)	0.20 (0.5)	n.d.
Serine	n.d.	n.d.	n.d.	1.17 (3.1)	n.d.
Taurine	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Threonine	n.d.	n.d.	n.d.	0.72 (1.9)	n.d.
Tryptophan	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Tyrosine	0.67 (3.5)	2.28 (7.0)	0.96 (4.7)	1.93 (5.1)	4.79 (7.5)
Urea	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.27 (0.4)
Valine	n.d.	2.55 (7.8)	1.42 (7.0)	2.65 (7.0)	6.35 (9.9)

n.d.: not detected

The numbers in parentheses indicate the percentage distribution of each compound.

하여 3.0-5.2배 높은 수치를 보여주었다. Protease 첨가구의 아미노산도는 발효온도별로 각각 5.01, 4.94, 6.36, 8.68, 12.35로 발효온도 20°C 이상에서는 10°C 대비 26.9, 73.2, 146.3% 증가하면서 급격한 증가곡선을 나타내었다. 반면, 무첨가구의 아미노산도는 각각 1.10, 1.67, 1.21, 1.69, 2.36으로 발효온도 증가에 의해서 소폭 증가하는 데 그쳤다. 유리 아미노산 총량(Table 3, 4)도 이와 유사하게 무첨가 protease 첨가구에 비하여 5.2-11.9배 낮았다. Protease첨가구의 유리 아미노산 총량은 각각 144.62, 168.05, 242.92, 310.89, 479.13 mg/100 mL로 발효온도 20°C 이상부터 급격한 증가가 관찰된 반면, 무첨가구는 각각 19.30, 32.60, 20.33, 37.73, 64.06 mg/100 mL로 발효온도에 따라 큰 변화를 보이지 않았다.

Protease 첨가구에서 많은 함량을 차지하고 있는 주요 유리 아

미노산(Table 3)은 alanine, arginine, leucine, lysine으로 유기산 총량의 10% 이상씩 차지하고 있었다. 이외에 glutamic acid, isoleucine, phenylalanine, cystathionine, tyrosine, valine이 5% 이상씩 함유되어 있는 것으로 조사되었다. 반면 무첨가구(Table 4)의 경우 alanine, arginine, leucine, phenylalanine이 가장 많이 함유되어 있었으며, glutamic acid, glycine, lysine, ornithine, tyrosine, valine이 그 다음을 차지하고 있는 것으로 나타나 함량 차이뿐만 아니라 분포에도 영향을 미치는 것으로 확인되었다. 주류에 있어 아미노산은 원료 쌀에 함유된 protein body-II (PB-II)의 분해 및 발효 후반기 효모의 자가분해에 의해서 주로 생성된다(16). 아미노산은 주류의 맛, 색, 향 등에 관여하기 때문에 중요한 성분이다. Aspartic acid와 glutamic acid는 감칠맛이 있으며, alanine, glycine, lysine, proline, serine, threonine은 단맛이 arginine, histi-

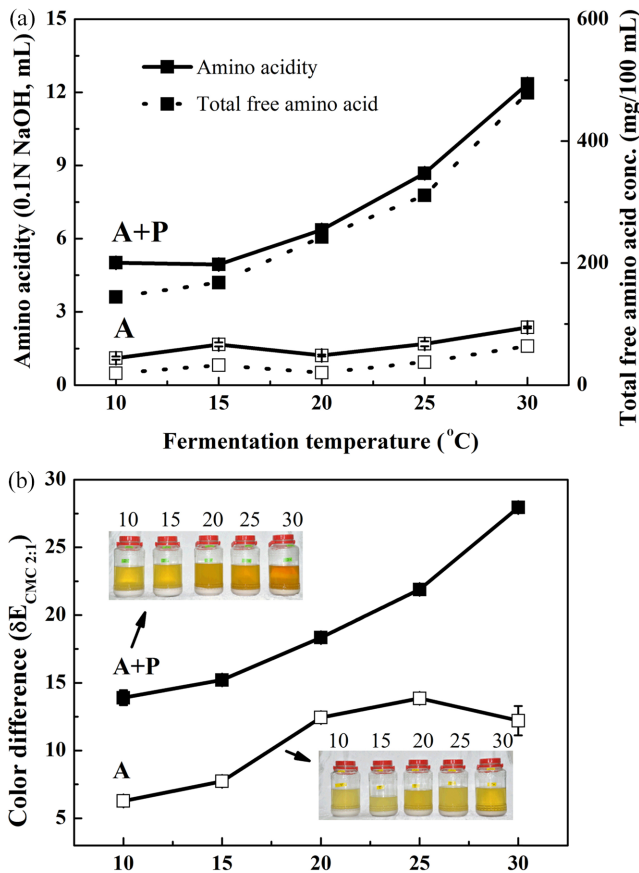


Fig. 4. Changes in amino acid level (a), total free amino acid concentration (a), and color intensity (b) in *yakju* prepared with protease (A+P) and without protease (A) at each fermentation temperature.

dine, isoleucine, leucine, methionine, phenylalanine, threonine, valine는 쓴맛이 있는 것으로 알려져 있다(21). 주류에 아미노산이 적으면 맛이 가뽀고, 많으면 잡미가 증가하여 품질을 저하시키기 때문에 적절한 함량을 유지하는 것이 중요하나 최적함량에 대해서는 아직 밝혀진 바 없다. 아미노산은 발효과정 중 효모의 대사에 의하여 고급알코올(fusel oil)로 변환되어 주류의 향기를 부여하기도 하며, 아미노산 산화효소 및 아미노산 탈수효소에 의하여 oxo acid로 변하여 맛의 변화를 주기도 한다(16). 또한, 아미노산은 주류의 숙성과정에도 관여 하는데, threonine은 3-hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanone (HDME, sotolone)성분으로 methionine은 dimethyl disulfide (DMDS)로 변하여 주류에 숙성취(노주취)를 발생시키고(16), 환원당과의 메일라드 반응에 의하여 furfural, aldehyde 류 등으로 변하면서 숙성주의 향에 영향을 끼친다. 이외에 숙성 주류의 색에도 많은 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. Tyrosine과 tryptophan은 일광 조건에서 mangahese (II) ion의 촉매작용 또는 촉매작용 없이 phenol 화합물과 반응하여 착색물질을 형성하는 반응계가 있으며, 환원당과 amino carbonyl reaction에 의해서 melanoidine계의 착색물질인 3-deoxyglucosone 및 3-deoxy-D-pentosone을 생성시킨다(16). 따라서 주류의 아미노산 함량이 높으면 색이 진하게 변하는 것이 일반적이다.

두 처리구의 색도변화(Fig. 4b)를 살펴보면 아미노산도(Fig. 4a)와 유사한 경향을 가지고 있음을 확인할 수 있다. Protease 첨가구의 색차는 각각 13.90, 15.21, 18.34, 21.89, 27.94로 무첨가구의 6.28, 7.73, 12.44, 13.85, 12.21보다 1.2-3.0배 높은 색차를 보이고

있는데 색차가 높을수록 색조가 진하게 변한다는 것을 의미하기 때문에 발효온도 증가에 의해서 아미노산이 증가하였고 이 때문에 주류의 색도 짙은 갈색으로 변하였다고 해석될 수 있으며, protease 무첨가가 약주의 색도 변화를 감소시킬 수 있는 방법으로 기대된다.

아미노산 이외에 주류의 색에 영향을 미치는 요소는 다양하다. Riboflavin, flavin mononucleotide, flavine adenine dinucleotide 등의 flavin 화합물에 의한 착색, ferrichysin 등의 철의 결합에 의한 착색, kynurenic acid 및 idoleacetic acid 등의 헵타물질에 의한 착색 등이 있으나 일본 청주에 함유된 착색물질을 조사한 결과 melanoidine계 화합물이 40-80%로 가장 높은 비중을 차지하고 있어(16) 아미노산이 주류의 색 변화에 중요한 요소라고 생각된다.

지금까지의 결과로부터 주류 제조에 있어 protease를 첨가하지 않을 경우 유기산과 휘발산의 함량을 증가시키고 아미노산 함량을 낮추어 색 변화를 저감화할 수 있었으나 정상적인 발효를 위해서는 발효온도를 20-25°C 구간에서 할 필요가 있는 것으로 나타났다. 주류의 맛은 개별적인 성분의 함량차이보다는 이들 성분의 상호작용에 의해 영향을 받기 때문에 향, 색, 맛 등 종합적인 평가가 필요하므로 protease 무첨가가 향기성분 및 관능 등에 미치는 영향에 대한 추가적인 조사가 있어야 할 것으로 판단된다.

## 요 약

Protease 무첨가가 숙성약주의 이화학적 특성에 미치는 영향을 조사하였다. 발효온도 20-25°C에서는 정상적으로 알코올 생산을 하였으나 발효온도 10°C에서는 첨가구보다 21.3%, 15°C에서는 9.4%, 30°C에서는 13.2% 낮은 알코올 생산성을 보여주었다. 발효 기간은 발효온도 25°C를 제외하고 protease 첨가구 대비 증가하는 것으로 나타났다. 총 유기산 함량은 1.0-2.7배 증가하였으며, lactic acid와 acetic acid가 증가된 반면 pyroglutamic acid의 함량이 최대 51.1배 감소되었다. 산도와 휘발산은 증가되었고 pH는 감소되는 것으로 나타났다. 아미노산도는 protease 첨가구에 비하여 3.0-5.2배, 유리 아미노산 총량은 5.2-11.9배 낮게 나타났다. Protease 첨가구의 주요 유리 아미노산은 alanine, arginine, leucine, lysine인 반면 무첨가구는 alanine, arginine, leucine, phenylalanine이었다. 색차는 protease 첨가구에 비해 1.2-3.0배 낮아졌다.

## 감사의 글

본 연구는 국립농업과학원 농업과학기술 연구개발사업(과제번호: PJ008600)의 지원에 의해 이루어진 것입니다.

## References

- Kim YT, Kim JH, Yeo SH, Lee DH, Im JU, Jeong ST, Choi JH, Choi HS, Hwang HJ. Uri Sul Bomulchang-go. The treasure houses of Korean liquor. The Foundation of Agri. Tech. Commercialization and Transfer, Suwon, Korea. pp. 146-181 (2011)
- Seo MY, Lee JK, Ahn BH, Cha SK. The Changes of microflora during the fermentation of *takju* and *yakju*. Korean J. Food Sci. Technol. 37: 61-66 (2005)
- Kim TJ. Korea liquor industry: trends, issue and implication. pp. 12-27. In: KIS Credit Monitor. Korea Investor Service, Seoul, Korea (2010)
- Shin JH, Choi DJ, Sung NJ. Nutritional properties of *yakju* brewed with natural plants. Korean J. Food Nutr. 17: 18-24 (2004)
- Lee SJ. Study of fermentation characteristics and quality change

- by aging period in *yakju*. MS thesis, Seoul Venture University, Seoul, Korea (2013)
6. Shen F, Ying Y, Li B, Zheng Y, Zhuge Q. Multivariate classification of rice wines according to ageing time and brand based on amino acid profiles. *Food Chem.* 129: 565–569 (2011)
  7. Jeong YS. Alcoholic beverage market trends in China – *Huangjiu, Baijiu*, Chinese health wine and grape wine. *Alcoholic Beverage Industry.* 28: 60-69 (2008)
  8. National Research Institute of Brewing. About a hundred years sake storage project. Available from: <http://www.nrib.go.jp/annai/sake100Y.htm>. Accessed Aug. 2, 2014.
  9. Isogai A. Aged flavor of sake and its precursor. Available from: [http://www.kitasangyo.com/e-Academy/b\\_tips/back\\_number/BFD\\_28.pdf](http://www.kitasangyo.com/e-Academy/b_tips/back_number/BFD_28.pdf). Accessed Aug. 2, 2014.
  10. National Tax Service Liquors Licence Aid. Analysis provisions of alcoholic beverages. Available from: [http://i.nts.go.kr/menu/data\\_board/data\\_view.asp?tax\\_code=700&board\\_seq=2](http://i.nts.go.kr/menu/data_board/data_view.asp?tax_code=700&board_seq=2). Accessed Aug. 2, 2014.
  11. Hitachi High-Technologies Corporation. L-8900 Amino Acid Analyzer. Available from: <http://www.hitachi-hitec.com/global/science/lc/l8900.html#jump2>. Accessed Aug. 2, 2014.
  12. NAAS. Standard Food Composition Table. 8th ed. Available from: [http://koreanfood.rda.go.kr/fct/NewFctFoodSrch\\_Detail.aspx?idx=14&compIdxList](http://koreanfood.rda.go.kr/fct/NewFctFoodSrch_Detail.aspx?idx=14&compIdxList). Accessed Aug. 2, 2014.
  13. Ogawa Y. Characters of the ethanol-tolerant mutant of sake yeast. *J. Brew. Soc. Japan* 96: 730-735 (2011)
  14. Bae SM (eds.). *Cheong-ju jejo gisul*. Sake manufacturing technology. Woogok Publisher, Seoul, Korea. pp. 166-217 (2008)
  15. Watanabe D. Genetic study of high fermentation ability of sake yeast. *Japanese Soc. Biotechnol. Japan.* 91: 2–9 (2013)
  16. Erasmus DJ. Production of acetic acid by *Saccharomyces cerevisiae* during icewine fermentations. PhD thesis, University of British Columbia, Vancouver, Canada (2005)
  17. Brewing Society of Japan. Component of the alcoholic beverages. Shin Nippon Printing Co. Ltd., Tokyo, Japan. pp. 50-62 (1999)
  18. Yoshizawa Y, Ishikawa TA, Tadenuma M, Nagasawa M, Nagami K. Encyclopedia of brewing and fermentation food. Asakura Publishing Co. Ltd., Tokyo, Japan. pp. 410-417 (2004)
  19. Park CW, Jang SY, Park EJ, Yeo SH, Jeong YJ. Quality characteristics of rice *makgeolli* prepared by mashing types. *Korean J. Food Sci. Technol.* 44: 207-215 (2012)
  20. Choi GI, Kim HJ, Kim HJ, Kim HR, Kim DH. Changes of organic acids in *takju* during storage conditions. *J. Food Hyg. Safety* 27: 127-132 (2012)
  21. Kato H, Rhue MR, Nishimura T. Role of free amino acids and peptides in food tasted. American Chemical Society, Washington, DC. USA. pp. 158-174 (1989)