

Effects of low temperature-adapted *Saccharomyces cerevisiae* Y297 strain and fermentation temperature on the quality characteristics of *Yakju*

Dong-Jun Seo, Soo-Hwan Yeo, Ji-Young Mun, Seong Yeol Baek*
Department of Agro-food Resource, National Institute of Agricultural Science, RDA, Wanju 55365, Korea

저온 적응성 효모와 발효온도에 따른 약주의 품질특성 변화

서동준 · 여수환 · 문지영 · 백성열*
농촌진흥청 국립농업과학원 농식품자원부

Abstract

The objective of this study was to evaluate the effects of low temperature-adapted *Saccharomyces cerevisiae* Y297 and fermentation temperatures on the quality of *Yakju* brewed. Physicochemical properties of *Yakju* brewed were compared pH, total acidity, ethanol, free amino acid, organic acid contents, and volatile flavor compounds in *S. cerevisiae* Y297 with control treatment. Cooked non-glutinous rice and saccharogenic amylase in *koji* were mixed with ethanol-producing yeasts and then fermented at 15°C, 20°C, and 25°C for 20 days. *Yakju* brewed using the Y297 treatment showed the highest ethanol yield (17.9%) at 20°C. Expression of heat shock protein (HSP) 104 was evaluated by immunoblotting as an indication of adaptation to low temperatures (15°C); levels of the HSP104 protein were higher in the Y297 treatment than in the control. Organic acid analysis showed that the lactic acid content of *Yakju* brewed using the control was the highest at 25°C. Finally, free amino acid analysis showed that the Y297 treatment had a higher proportion of essential amino acids than the control. Overall, these results indicate that *S. cerevisiae* Y297 could be used as a suitable yeast for *Yakju* brewed under low temperature (15°C) condition.

Key words : low temperature, *Saccharomyces cerevisiae*, *Yakju*, fermentation, heat shock protein

서론

우리나라 전통주인 탁주와 약주는 발효 과정 중에서 원료인 쌀이 미생물에 의한 효소 작용에 의해 분해되어 lysine, leucine 등과 같은 필수아미노산과 비타민, 생리활성 물질들과 당분, 유기산, 휘발성 향기성분 등을 생산하는 발효주이다(1,2). 약주의 제조 과정은 누룩만을 이용하는 방식과 개량누룩에 효모를 첨가하는 방식으로 나눌 수 있는데(3) 이 제조 과정에서 효모는 발효 과정에서 당을 알코올로 전환하는 것뿐만 아니라 high alcohol, ester, vicinal

diketones(VDKs)등 다양한 휘발성 향미 성분과 대사산물의 생산에 있어서 중요한 역할을 한다고 알려져 있다(4). 최근 들어 술 제조 과정에서 알코올 생산뿐만 아니라 향과 맛에 중요성도 커지고 있다. 이러한 술의 품질의 중요 요소 중 하나인 온도는 효모의 생육과 알코올 생산에 있어서도 영향을 준다. 효모의 저온발효에 대한 연구는 보통 cold shock라 부르는 10~20°C와 10°C 이하(near freezing)에서의 cell growth, 발효 및 스트레스에 대한 실험 등이 보고되고 있다(5). 저온발효(10~15°C)는 primary aroma의 손실을 방지하고 secondary aroma(ethyl과 acetate esters 등)의 합성을 증가시키는 것으로 알려져 있다. 또한, 저온 발효 환경에서 효모는 향기성분 관련 반응뿐만 아니라 단백질 전사, 세포막의 유동성, RNA 구조의 안정성, 효소 활성 등 효모의 성장에 있어서 많은 영향을 준다고 보고되어지고 있다(6-7). 하지만 저온에서의 발효는 향기 성분 증가와 안정성 증가 등의

*Corresponding author. E-mail : dunkbis@korea.kr
Phone : 82-63-238-3609, Fax : 82-63-238-3843
Received 24 August 2016; Revised 15 October 2016; Accepted 24 October 2016.
Copyright © The Korean Society of Food Preservation. All rights reserved.

좋은 점도 있지만 이상발효나 균 성장 저해 등의 좋지 않은 반응이 일어날 수도 있기에 저온에서 생육 및 발효 활성이 우수한 저온 적응성 효모를 분리하여 발효에 이용하는 것이 저온발효에 유리할 것이다. 이러한 저온적응성 효모의 선별은 약주 제조에 있어서 저온에서도 발효 활성이 높고 술의 품질을 높일 수 있는 물질을 생산하여 보다 질 높은 약주를 생산할 수 있을 것으로 기대된다. 효모의 저온적응성에 대한 연구는 *S. cerevisiae* 균주의 저온에 대한 생육 및 효소 반응성과 온도관련 유전자들(CSF1, HSP104, LOT2, LTE1)에 대한 다양한 연구들이 보고되어지고 있다(4,8,9). 다양한 음식의 풍미 성분으로 알려져 있는 유기산과 알코올이 결합하여 만들어지는 ester는 발효주에서는 향기 성분의 주요 지표로서 사용되어진다. Acetate ester 계열인 ethyl acetate는 과일향이 나고 isoamyl acetate는 바나나향 그리고 phenylethyl acetate는 장미의 향기성분을 가지고 있다고 알려져 있다. 또한 고급알코올의 일종인 n-propanol, isobutanol, isoamyl alcohol은 알코올과 달콤함 향을 내는 주요 성분으로 알려져 있다(4,10-12).

사전연구(13)에서 Y297균주는 15°C에서 접종 후 24시간 동안은 25°C에 비해 낮았지만 배양 30시간이후에는 25°C보다 높은 성장곡선을 보였다. 또한 esterase, β -glucanase 등의 향기관련 효소 활성이 다른 균주들에 비해 높은 값을 나타내었다. 이러한 결과 등을 통해 Y297균주를 저온적응성 균주로 선별하여 다양한 발효 조건에서의 약주 품질에 대한 효과를 분석하였다.

재료 및 방법

효모균주 및 원료

본 실험에서 사용한 효모는 전국에서 수집한 메주, 누룩 등의 발효식품에서 분리한 균주들 중에서 저온적응성이 우수한 *Saccharomyces cerevisiae* Y297 균주를 사용하였다(14). 비교균주로 시판효모인 Fermivin(*S. cerevisiae*, Oenobrands SAS, Narbonne, France)를 사용하였다. 실험에 사용된 효모는 yeast extract 1%, peptone 2%, dextrose 2%(YPD, BD, Franklin Lakes, NJ, USA) 액체배지에 배양 후, glycerol을 20% 첨가하여 -80°C에서 보관하여 실험에 사용하였다. 멧쌀은 2014년 9월 경기도 철원에서 재배된 것을 시중에서 구입하여 사용하였다.

담금 및 발효

멧쌀 1 kg을 수세하여 2시간 물에 침지한 후 1시간 물 빼기 후 1시간동안 증자하고 냉각한 후 입국과 물 1.5 L 그리고 대조구와 선발효모를 증자한 쌀에 접종 후 각 온도 별(15°C, 20°C, 25°C)로 20일 발효하였다. 제조된 밑술은 원심분리 후 분석용 시료로 사용하였다.

pH 및 총산

pH는 술덧 여액 10 mL를 취하여 pH meter(Orion star A211, Thermo, Walrham, MA, USA)로 측정하였다. 총산 함량은 상등액 10 mL를 페놀프탈레인 지시약 2~3방울을 넣은 후, 0.1 N NaOH 용액으로 적정한 후 초산으로 환산하였다.

에탄올 및 아미노산도

에탄올 함량은 시료 100 mL를 증류한 후, 주정계를 이용하여 측정하였다(14). 아미노산도는 시료 10 mL에 페놀프탈레인 지시약 2~3방울을 가하고 0.1 N NaOH 용액으로 중화한 후 중성포르말린 용액 5 mL를 넣은 후 0.1 N NaOH 용액으로 담홍색이 될 때까지 적정하여 측정하였다(15).

샘플 준비 및 Western blotting

효모는 YPD 액체배지에서 온도(15°C, 25°C)에 따라 2일간 배양하여 원심분리 후 회수한 균체를 Yeast protein extraction buffer kit(GE healthcare, St. Louis, MO, USA)를 사용하여 단백질을 추출하였다. 추출된 단백질은 2-D Quant kit(GE healthcare, St. Louis, MO, USA)를 사용하여 단백질을 정량한 후 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)로 단백질을 분리하였다. SDS-PAGE 겔은 Electric transfer kit(Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell, Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 100 V에서 50분 동안 사용하여 polyvinylidene Difluoride (PVDF) membrane(Millipore, Billerica, MA, USA)로 단백질을 옮겼다. 그 후 Blocking Solution(ATTO corporation, Tokyo, Japan)에 1시간 반응 후 1차 항체로 Anti-HSP104 ab69549(Abcam, Cambridge, UK)를 이용하여 1:5,000배로 희석하여 4°C에서 8시간동안 반응하였다. 2차 항체는 Goat Anti-rabbit IgG horseradish peroxidase ab6721(Abcam, Cambridge, UK)로 1:10,000배로 희석하여 125도에서 1시간 반응한 후 Amersham imager 600(GE healthcare, St. Louis, MO, USA)을 사용하여 밴드를 확인하였다.

유기산과 유리아미노산 및 향기 성분 분석

샘플은 약주를 원심 분리한 상등액 5 mL을 Sep-pak C₁₈ cartridge에 통과시킨 후 0.2 μ m 실린지 필터로 여과하여 HPLC(Chromaster 5000, Hitachi, Ltd., Tokyo, Japan)로 ODS-100W(4.6 mm \times 250 mm) column을 사용하여 유기산을 측정하였다. 유리아미노산은 충남대 공동실험실습관에 의뢰하여 amino acid analyzer(L-8900, Hitachi Co., Tokyo, Japan)로 분석하였다(16). 향기분석은 0.2 μ m 실린지 필터로 여과된 샘플을 한국기초과학지원연구원 서울서부센터의 GC Chromatograph/Mass Spectrometer(Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)를 이용하여 분석하였다. 샘플은 Solid-phase microextraction (SPME) 방식으로 추출하여 분석

하였다(17).

통계처리

실험결과와 통계처리는 3회 반복하여 평균(mean)과 표준편차(SD)로 표시하였고 SPSS Statistic 24 통계프로그램을 이용하여 일원배치 분산분석을 사용하여 p<0.05 수준에서 Duncan's multiple range test(DMRT)로 평균 간 다중비교를 하였다.

결과 및 고찰

저온적응성

발효식품에서 분리한 효모들을 저온(15℃)에서 배양하여 저온적응성, 내성(알코올, 당, 염)등이 확인된 균주들을 동정하였고 향기관련 효소활성을 사전 연구(13)를 통해 확인하였다. *S. cerevisiae* Y297의 저온적응성 특징을 확인하기 위해 온도관련 단백질인 HSP104의 발현 정도를 확인하였다. 실험균주로는 *S. cerevisiae* Y297와 대조구를 사용하였고 온도는 15℃와 25℃에서 2일간 배양한 후 단백질을 추출하여 5 ug의 단백질 샘플을 SDS-PAGE와 Western

blot을 실시하였다(Fig. 1.) 그 결과, 15℃에서의 *S. cerevisiae* Y297은 대조구에 비해 70%이상 높은 HSP104 단백질을 보였고 25℃에서의 *S. cerevisiae* Y297은 대조구에 비해 15%이상 높은 발현 밴드를 확인할 수 있었다. Chiba 등(6)의 연구에서 *CSF1*, *HSP12*, *HSP26*, *HSP104*, *LOT2*, *LTE1*, *NRS1*, *TCPI1*, *TIP* 및 *TIR2* 유전자들에 대한 저온에서의 RNA 발현정도를 확인한 결과, *CSF1*, *HSP104*, *TIR2* 유전자들이 저온 발효 시 발현정도가 증가하는 것으로 보고되고 있다. 또한 저온에서는 과오폴딩단백질(misfolded protein)이나 응집 등을 유발한다고 보고되고 있는데 HSP104 단백질은 이러한 스트레스를 감소시켜 저온에서 균 성장에 있어서 유용한 유전자로 보고되고 있다(18,19).

온도별 품질특성조사

뱀살과 입국 그리고 효모(대조구, *S. cerevisiae* Y297)를 혼합하여 온도별(15℃, 20℃, 25℃)로 발효하여 성분을 분석하였다(Table 1). pH의 경우, 대조구는 온도가 높아질수록 pH가 낮아졌지만 *S. cerevisiae* Y297 처리구의 경우 큰 차이를 보이지 않았다. 총산도 역시, 대조구는 온도가 높아질수록 산도가 높아졌지만 *S. cerevisiae* Y297 처리구의 경우 큰 차이를 보이지 않았다. Jin 등(20)과 Baek 등(21)의 연구에 의하면 발효 온도가 올라갈수록 산의 생성도 많아진다고 보고되고 있다. 대조구의 경우 비슷한 양상을 보이지만 *S. cerevisiae* Y297 처리구는 통계적인 차이가 거의 없이 비슷한 수치를 보였다. 아미노산도의 경우 *S. cerevisiae* Y297 처리구의 20℃에서 가장 높은 아미노산도를 보였다. 알코올 함량은 전처리구에서 유의적인 차이를 보이지는 않았으나 *S. cerevisiae* Y297로 20℃ 처리구에서 가장 높은 알코올 함량(17.9%)을 나타내었다. Control 효모와 Y297 효모는 15℃, 25℃ 온도 조건에 알코올 함량이 각각 16%, 15% 내외로 나타났으며, 20℃ 온도에서 알코올 함량이 3% 정도 차이가 발생하였다. 다양한 효모를 25℃에서 막걸리 발효한 후의 알코올 함량은 10.0~14.8%이며 이는 효모의 특성으로 보고되었다(22).

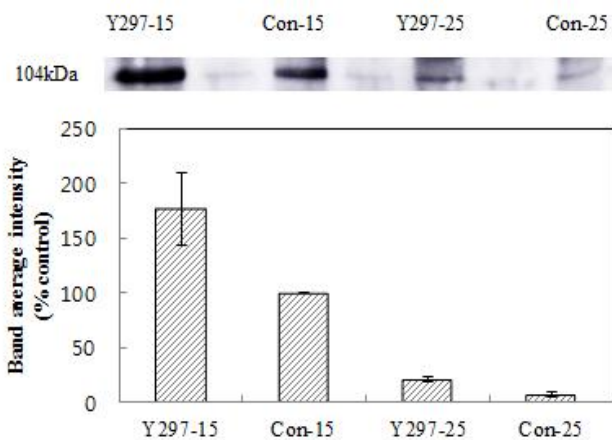


Fig. 1. Low temperature-induced HSP104 expression in *Saccharomyces cerevisiae* strain Y297 in YPD medium.

Primary antibody (HSP104) was tested for its ability to detect horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody in cultured *S. cerevisiae* strain Y297.

온도별 유기산 분석

온도별 유기산 측정 결과(Table 2)는 oxalic acid, lactic acid, acetic acid, succinic acid의 총 4종류의 유기산이 검출

Table 1. Change of physicochemical properties of *Yakju* brewed at different fermentation temperatures (15℃, 20℃, and 25℃)

	Control			Y297		
	15℃	20℃	25℃	15℃	20℃	25℃
pH	4.16±0.03 ^{a,1)}	3.89±0.06 ^a	3.80±0.12 ^a	4.43±0.11 ^a	4.34±0.06 ^b	4.32±0.01 ^b
Total acid (%)	0.30±0.01 ^a	0.47±0.04 ^a	0.53±0.10 ^b	0.25±0.05 ^a	0.31±0.01 ^a	0.28±0.01 ^a
Amino acidity	0.52±0.05 ^a	0.56±0.05 ^a	0.53±0.04 ^a	0.70±0.10 ^b	1.24±0.06 ^b	0.53±0.01 ^a
Ethanol (%)	16.17±0.32 ^a	14.30±0.17 ^a	15.23±0.31 ^a	16.37±0.57 ^a	17.90±0.36 ^b	15.43±0.40 ^a

¹⁾Values are mean±SD (n=3), p<0.05.

Table 2. Change of organic acid of *Yakju* brewed at different fermentation temperatures (15°C, 20°C, and 25°C)

(unit: mg/mL)

Organic acid	Control			Y297		
	15°C	20°C	25°C	15°C	20°C	25°C
Oxalic acid	0.09±0.01 ¹⁾	0.12±0.02 ^a	0.13±0.01 ^a	0.17±0.02 ^a	0.20±0.01 ^b	0.17±0.02 ^b
Lactic acid	1.23±0.01 ^a	2.77±0.01 ^b	3.78±1.13 ^b	1.51±0.41 ^a	0.83±0.21 ^a	1.03±0.04 ^a
Acetic acid	0.27±0.04 ^a	1.91±0.15 ^a	1.81±0.26 ^b	1.96±0.45 ^a	0.24±0.01 ^b	ND ²⁾
Succinic acid	0.98±0.01 ^a	1.15±0.02 ^a	1.15±0.02 ^a	0.59±0.16 ^a	1.13±0.12 ^b	1.2±0.03 ^b

¹⁾Values are mean±SD (n=3).²⁾ND, Not detected, p<0.05

되었다. Lactic acid는 대조구의 15°C에서 1.23±0.01 mg/L이고 20°C와 25°C에서는 각각 2.77±0.01 mg/L과 3.78±1.13 mg/L으로 유의적인 차이는 보이지 않았으나 온도에 따라 증가하는 경향을 보였다. *S. cerevisiae* Y297 처리구에서는 모든 온도에서 유의적인 차이가 보이지 않았다. Baek 등(21)의 실험에서 20°C와 30°C에서 발효한 술덧의 lactic acid 양을 확인한 결과 20°C에서 보다 많은 양이 검출되었는데 이는 온도 조건에 영향을 받은 것으로 보고되고 있다. 본 실험에서는 비슷한 결과를 보인 대조구와 달리 *S. cerevisiae* Y297 처리구는 모든 온도에서 lactic acid의 양이 큰 차이를 보이지 않았다(Table 2). 또한, 대조구의 succinic acid는 lactic acid와 비슷한 경향을 보였지만 *S. cerevisiae* Y297 처리구는 온도에 따라 검출량이 증가하는 경향을 보였다. 약주에서 검출되는 lactic acid는 막걸리의 주요 유기산이며 향미에 좋은 않는 영향을 주는 것으로 보고되었다(23). Bang 등(24)은 효모종류에 따른 막걸리의 유기산 특성에서 사용한 Fermivin 효모는 522.4 mg/L로 보고하였다. 본 연구에서는 lactic acid 함량이 다소 낮았지만 20°C, 25°C에서 대조군보다 Y297 효모의 함량이 약 3배 정도 낮게 검출되어 약주의 향미가 대조군보다 좋을 것으로 판단된다. Acetic acid는 lactic acid와 같이 막걸리 향미에 좋지 않는 영향을 미치는 것으로 알려져 있으며(23), 막걸리의 주요 유기산 중 하나이다. 대조군은 15°C에서 acetic acid 함량이 가장 낮았으며, Y297은 20°C, 25°C에서 함량이 낮았다. 쌀 막걸리의 주된 유기산 중 하나인 succinic acid는 Lee 등(25)이 보고한 연구에서 막걸리 발효 과정 중 주요한 유기산으로 확인되었다. 위 유기산 함량을 종합하였을 때 acetic acid, lactic acid 함량은 낮고 succinic acid 함량은 높은 Y297로 20°C 발효한 것으로 판단된다.

온도별 유리 아미노산 분석

발효온도에 따른 유리아미노산의 생성정도를 분석한 결과(Table 3), 대조구의 경우는 온도에 따른 유리아미노산의 생산량이 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다. *S. cerevisiae* Y297 처리구에서는 20°C에서 발효된 조건에서 1,040.48±64.20 mg/L로 가장 높은 유리아미노산을 생산하

는 것으로 나타났다. Baek 등(21)과 Woo 등(26)의 실험에서는 온도가 높아지면서 유리아미노산의 함량도 높아지는 것으로 나타났지만 *S. cerevisiae* Y297 처리구에서는 20°C 조건에서 가장 높은 유리아미노산 농도를 보였다. 이러한 결과는 품질분석과 유기산 및 유리아미노산의 전반적인 결과에서도 *S. cerevisiae* Y297 처리구의 15°C 및 20°C에서도 비슷한 결과를 확인할 수 있었다. 이러한 결과들을 통해 대조구에 비해 Y297 처리구는 15°C와 20°C에서 발효 과정에서 품질 특성에서 큰 영향을 주지 않는 것으로 확인되었다. 이는 Y297균주가 저온 발효를 통해 술의 품질과 향에 영향을 주는 성분들의 손실을 낮추면서 발효 효율을 유지할 수 있는 저온적응성 균주를 확보하려는 목적에 부합하는 균주임을 확인할 수 있었다.

Kang 등(27)은 쌀 및 쌀 전분을 활용한 약주의 품질특성 연구에서 쌀약주의 유리아미노산이 498.38~5,976.93 ppm 검출된다고 보고하였다. 주류에 아미노산이 적으면 맛이 가뻍고, 많으면 잡미가 증가하여 품질을 저하시키기 때문에 적절한 함량을 유지하는 것이 중요하나 최적 함량에 대해서는 아직 밝혀진 바는 없다. 아미노산은 발효과정 중 효모의 대사에 의하여 고급알코올(fusel oil)로 변환되어 주류의 향기를 부여하기도 하며, 아미노산 산화효소 및 아미노산 탈수효소에 의하여 oxalic acid로 변하여 맛의 변화를 주기도 한다(28).

온도별 향기성분 분석

사전연구를 통해 향기성분에 대한 정성분석결과 처리구 당 50종 내외의 향기관련 물질들이 검출되었다. 본 실험에서는 이 성분들 중 대표적인 6개의 향기성분[ethyl acetate, 1-propanol, 1-butanol(3-methyl-, acetate), 1-propanol(3-methyl-, acetate), phenylethyl alcohol]에 대해 온도별로 향기성분을 측정된 결과(Table 4)이다. *S. cerevisiae* Y297 처리구에서는 약주의 주요 향기성분 중 하나로 과일향이 난다고 알려져 있는 ethyl acetate이 41.46±0.54 mg/L로 가장 높은 수치를 보였고 Higher alcohol 중의 하나이며 감미성의 바나나향을 갖고 있는 1-butanol(3-methyl-)와 phenylethylalanine으로 부터 유래한 성분으로 와인, 위스키등의 다양한 주류

Table 3. Change of free amino acid of *Yakju* brewed at different fermentation temperatures (15°C, 20°C, and 25°C)

(unit: mg/L)

		Control			Y297		
		15°C	20°C	25°C	15°C	20°C	25°C
Essential amino acid	Isoleucine	8.35±2.23 ¹⁾	6.85±0.20	8.61±1.63	17.04±7.59	28.55±2.96	6.96±0.18
	Leucine	25.15±3.59	26.32±2.20	26.68±3.13	50.24±7.19	101.70±8.18	28.97±0.81
	Methionine	5.95±3.33	2.51±0.21	2.07±0.65	7.61±0.95	10.25±1.75	1.36±0.25
	Valine	15.54±1.67	16.67±0.71	19.90±5.31	24.93±5.05	57.82±4.70	14.77±0.73
	Threonine	3.47±0.38	3.19±0.21	3.30±1.62	7.69±3.60	24.08±4.22	4.21±0.71
	Phenylalanine	17.63±1.96	20.34±1.67	17.26±0.64	36.31±7.10	71.21±5.90	20.75±1.07
	Lysine	14.06±0.48	9.55±0.21	5.87±0.35	20.70±2.75	28.79±3.40	15.20±0.25
	Total	90.15±13.48	86.00±5.50	86.04±14.01	154.20±29.65	322.40±25.23	92.23±2.90
Nonessential amino acid	Arginine	73.36±1.62	34.32±3.22	22.88±4.36	73.90±17.96	69.51±4.41	39.76±1.73
	Histidine	11.01±0.87	2.83±0.33	1.06±0.12	11.16±8.55	12.13±0.81	5.93±0.14
	Aspartic acid	8.17±0.69	13.11±2.39	7.46±0.05	26.37±7.95	39.00±5.80	9.93±0.41
	cysteine	11.21±3.33	3.05±0.89	3.52±0.26	12.43±1.01	19.65±1.54	23.79±1.97
	Serine	7.37±0.93	6.85±0.51	5.96±0.83	19.52±8.48	54.89±5.98	10.96±1.27
	Glutamine acid	32.21±1.03	20.82±0.61	44.00±30.65	52.42±19.56	95.76±0.11	35.11±0.23
	Tyrosine	12.96±2.08	16.61±0.63	10.60±1.92	25.16±4.36	58.16±4.55	15.53±1.00
	Total	156.30±9.00	104.07±10.54	128.07±17.70	202.05±49.87	355.03±24.84	137.88±1.39
Amino acid derivative	γ -Amino-n-butyric acid	6.88±1.14	0.90±0.23	3.14±1.27	5.65±2.66	38.16±4.60	8.20±1.04
	Ethanol amine	3.43±0.78	1.87±0.22	1.48±0.04	5.07±0.70	6.33±0.81	8.18±0.57
	Ammonia	3.75±0.26	6.44±0.46	6.70±0.37	6.95±1.04	12.54±0.37	4.28±1.23
	Ornithine	21.35±0.90	7.71±0.87	6.74±0.15	34.16±4.11	50.34±6.74	26.00±3.49
	3-Methylhistidine	2.08±1.80	ND ²⁾	ND	4.75 ± 0.80	ND	ND
	Phospho-serine	7.02±0.19	7.70±0.21	7.62±0.54	7.21±0.66	10.71±0.10	7.99±0.15
	Taurine	72.11±1.52	56.45±0.94	57.74±1.09	72.24±4.26	54.43±1.91	47.91±0.33
	Urea	15.67±2.08	ND	ND	ND	9.62±0.544	ND
	Glycin	17.53±1.33	14.02±0.42	9.39±4.17	22.70±5.36	47.92±3.77	13.56±2.28
	Alanine	45.93±0.66	36.56±1.20	27.28±3.70	92.18±21.33	125.07±6.54	57.26±4.65
	Citruline	1.22±0.13	ND	ND	4.22±5.72	5.57±2.67	ND
	L-Cystathionine	5.13±2.22	0.77±0.11	0.55±0.41	6.51±3.24	2.34±0.76	1.16±0.18
	Total	202.09±6.90	132.42±0.91	126.47±20.16	251.34±32.28	363.04±16.63	174.55±12.07
Total	448.53±29.00	322.49±16.08	349.41±50.27	607.58±111.79	1,040.48±64.20	404.66±16.24	

¹⁾Values are mean±SD (n=3).²⁾ND, Not detected.**Table 4. Change of volatile flavor compounds of *Yakju* brewed at different fermentation temperatures (15°C, 20°C, and 25°C)**

(unit: mg/L)

Compounds	Control			Y297		
	15°C	20°C	25°C	15°C	20°C	25°C
Ethyl Acetate	17.20±4.30 ¹⁾	12.03±1.28	15.42±4.52	41.46±0.54	9.30±2.21	17.20±6.36
1-Propanol	55.59±16.94	21.31±8.81	30.50±3.49	9.21±3.77	15.86±6.12	27.09±8.94
1-Propanol, 2-methyl-	63.30±16.93	68.09±8.61	64.25±18.60	32.19±4.41	84.90±16.60	95.24±61.21
1-Butanol, 3-methyl-, acetate	0.08±0.29	0.04±0.02	0.05±0.01	0.03±0.01	0.07±0.03	0.06±0.01
1-Butanol, 3-methyl-	69.67±11.71	58.96±8.90	55.28±8.30	41.96±0.29	85.09±14.74	58.88±5.26
Phenylethyl Alcohol	14.35±2.35	11.13±3.01	11.83±3.31	13.88±3.28	17.01±6.56	11.05±1.71

¹⁾Values are mean±SD (n=3).

에서 중요한 방향족 알코올 성분으로 알려진 phenylethyl Alcohol은 각각 41.96 ± 0.29 mg/L과 13.88 ± 3.28 mg/L의 수치를 보였다. 안 등(29)의 실험에서 막걸리는 1-butanol (3-methyl-)과 phenylethyl Alcohol이 각각 3.28 mg/L와 225.68 mg/L로 검출된다고 보고하였다.

요 약

본 실험은 약주 제조 과정에서 효모와 발효온도에 따른 약주의 품질을 분석하였다. 약주의 이화학적 특성(pH, 총산, 에탄올, 유리 아미노산, 유기산, 향기 성분)을 조사하였다. 약주는 증자된 멥쌀에 입국과 효모를 넣고 각기 다른 온도(15°C, 20°C, 25°C)에서 20일간 발효하였다. 20°C에서 발효한 *S. cerevisiae* Y297 처리구는 다른 처리구에 비해 높은 알코올 생산성(17.9%)을 보였다. 온도관련 항체인 HSP104를 이용하여 면역반응을 확인한 결과, *S. cerevisiae* Y297 처리구는 대조구에 비해 저온에서 HSP104 단백질의 발현율이 높게 나타났다. 유기산 분석 결과, 대조구의 25°C에서 젓산의 함량이 높게 분석되었다. 유리아미노산 분석 결과, 저온에서 *S. cerevisiae* Y297 처리구는 대조구에 비해 높은 필수 아미노산량을 확인할 수 있었다. 이러한 결과들을 통해 *S. cerevisiae* Y297 균주가 저온에서 제조하는 약주 생산에 사용할 수 있는 효모로써의 가능성을 확인할 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 공동연구사업(과제번호:PJ00999001)의 지원에 의해 이루어진 것이며, 연구비 지원에 감사드립니다.

References

- Huh CK, Lee JW, Kim YD (2013) Comparison of the organic acids, fusel oil contents and antioxidant activities of *Yakju* with the additions of various rice cultivars. *Korean J Food Preserv*, 20, 365-371
- Kim MJ, Kim BH, Han JK, Lee SY, Kim KS (2011) Analysis of quality properties and fermentative microbial profiles of *Takju* and *Yakju* brewed with or without steaming process. *J Food Hyg Safety*, 26, 64-69
- Bae SM, Lee YH, Lee MK, Kang SA, Cheongand C (2008) Effects of traditional Nuruk ration yeast on the fermentation and quality of *Yakju*. *J East Asian Soc Dietary Life*, 18, 41-48
- Pires EJ, Teixeira JA, Branyik T, Vicente AA (2014) Yeast: the soul of beer's aroma-a review of flavour-active esters and higher alcohols produced by brewing yeast. *Appl Microbiol Biotechnol*, 98, 1937-1949
- Beltran G, Rozes N, Mas A, Guillamon JM (2007) Effect of low-temperature fermentation on yeast nitrogen metabolism. *World J Microbiol Biotechnol*, 23, 809-815
- Chiva R, Lopez-malo M, Salvado Z, Mas A, Guillamón JM (2012) Analysis of low temperature-induced gene (LTIG) in wine yeast during alcoholic fermentation. *FEMS Yeast Res*, 12, 831-843
- Torija MJ, Rozes N, poblet M, Guillamon JM, Mas A (2003) Effects of fermentation temperature on the strain population of *Sacchromyces cerevisiae*. *Int J Food Microbiol*, 80, 47-53
- Schade B, Jansen G, Whiteway M, Entian KD, Thomas DY (2004) Clod adaption in budding yeast. *Mol Biol Cell*, 15, 5492-5502
- Aguilera J, Randez-Gil F, Prieto JA (2007) Cold response in *Sacchromyces cerevisiae*: new functions for old mechanisms. *FEMS Microbiol Rev*, 31, 327-341
- Verstrepen KJ, Van Laere SDM, Vanderhaegen BMP, Derdelinckx G, Dufour JP, Pretorius IS (2003) expression levels of the yeast alcohol acetyltransferase genes *ATF1*, *Lg-ATF*, and *ATF2* control the formation of a broad range of volatile esters. *Appl Environ Microbiol*, 69, 5228-5237
- Baek SY, Lee YJ, Kim JH, Yeo SH (2015) Isolation and characterization of wild yeasts for improving liquor flavors style and quality. *Microbiol Biotechnol Lett*, 43, 1-9
- Ichikawa E, Hosokawa N, Hata Y, Abe Y, Suginami K, Imayasu S (1991) Breeding of sake yeast with improved ethyl caproate productivity. *Agric Biol Chem*, 55, 2153-2154
- Seo DJ, Yeo SH, Mun JY, Jung WJ, Cho YS, Baek SY (2015) Characteristics of yeast with low temperature adaptation for *Yakju* brewed. *Korean J Food Preserv*, 22, 908-914
- Jung HK, Park CD, Park HH, Lee GD, Lee IS, Hong JH (2006) Manufacturing and characteristic of Korea traditional liquor, *Hahyangju* prepared by *Sacchromyces cerevisiae* HA3 isolated from traditional *Nuruk*. *Korean J Food Sci Technol*, 38, 659-667
- Park JH, Yeo SH, Choi JH, Jeong ST, Choi HS (2012) Production of *Makgeolli* using rice treated with Gaeryang-*Nuruk* (for Non-steaming Process) extract.

- Korean J Food Preserv, 19, 144-152
16. Shim JS, Jeong YJ (2003) Change in the components of acetic acid fermentation of brown rice using raw starch digesting enzyme. J Korean Soc Food Sci Nutr, 23, 381-387
 17. Martos PA, Pawliszyn J (1997) Calibration of solid phase microextraction for air analyses based on physical chemical properties of the coating. Anal Chem, 69, 206-215
 18. Al-Fageeh MB, Smales CM (2006) Control and regulation of the cellular responses to cold shock: the responses in yeast and mammalian systems. Biochem J, 397, 247-259
 19. Bosl B, Grimminger V, Walter S (2006) The molecular chaperone HSP 104-A molecular machine for protein disaggregation. J Struct Biol, 156, 139-148
 20. Jin TY, Chung HJ, Eun JB (2006) The effect of fermentation temperature on the quality of *Jinyangju*, Korean traditional rice wine. Korean J Food Sci Technol, 38, 414-418
 21. Baek CH, Choi JH, Choi HS, Jeong ST, Kim JH, Jeong YJ, Yeo SH (2013) Quality characteristic of brown rice *Makgeolli* produced under differing conditions. Korean J Microbiol Biotechnol, 41, 168-175
 22. Kang HR, Lee AR, Kwon YH, Kim JH, Kim HR, Ahn BH (2012) Optimization of culture conditions for the yeast and analysis of qualities of *Makgeolli* brewed with the yeast isolated from Korean traditional *Nuruk*. Kor J Mycol, 40, 204-209
 23. Kim DR, Seo BM, Noh MH, Kim YW (2012) Comparison of temperature effects on brewing of *Makgeolli* using uncooked germinated black rice. Korean Soc Biotechnol Bioeng J, 27, 251-256
 24. Bang CM, Moon JK, Hong SK (2016) Characteristics of organic acid of *Makgeolli* by yeast strains type. Korean J Food Cook Sci, 32, 44-49
 25. Lee YJ, Yi HC, Hwang KT, Kim DH, Kim HJ, Jung CM, Choi YH. (2012) The qualities of *Makgeolli* (Korean rice wine) made with different rice cultivars, milling degrees of rice, and *Nuruks*. J Korean Soc Food Sci Nutr, 41, 1785-1791
 26. Woo SM, Shin JS, Seong JH, Yeo SH, Choi JH, Kim TY, Jeong YJ (2010) Quality characteristics of brown rice *Makgeolli* by different *Nuruks*. J Korean Soc Food Sci Nutr, 39, 301-307
 27. Kang JE, Kim JW, Choi HS, Kim CW, Yeo SH, Jeong ST (2015) Quality characteristics of rice and rice starch-based *Yakju*. Korean J Food Preserv, 22, 353-360
 28. Erasmus DJ (2005) Production of acetic acid by *Saccharomyces cerevisiae* during icewine fermentations. Ph D Thesis, University of British Columbia, Vancouver, Canada
 29. Ahn YG, Song YS, Shin JH (2012) Determination of the volatile flavor compounds for the quality characteristics in traditional alcoholic beverages. Korean J Community Living Sci, 23, 199-206