

Soju brewing characteristics of yeast strains N4 and N9 isolated from Korean traditional *Nuruk*

Han-Seok Choi*, Ji-Eun Kang, Seok-Tae Jeong, Chan-Woo Kim,
Seong-Yeol Baek, Soo-Hwan Yeo

Fermented Food Science Division, National Institute of Agricultural Sciences, RDA, Wanju 55365, Korea

재래누룩에서 분리한 N4와 N9 효모의 증류식 소주 양조특성

최한석* · 강지은 · 정석태 · 김찬우 · 백성열 · 여수환
농촌진흥청 국립농업과학원 발효식품과

Abstract

Soju is a Korean traditional distilled alcoholic beverage produced from mashes various crops and *Nuruk* which is cultured with wild microorganisms. This study was conducted to investigate rice-*Soju* brewing characteristics of yeasts isolated from Korean traditional *Nuruk*. The general components of rice (*Hanarumbyeo*) raw materials were 14.7 g of water, 6.8 g of crude protein, 0.9 g of crude lipid, 0.4 g of crude ash, and 76.5 g of carbohydrate in 100 g. Saccharifying and proteolytic activities in *Hanarumbyeo ipguk* (solid-state culture of *Aspergillus luchuensis*) were also determined. The alcohol content of the fermented wash from isolates was 15.37-16.58% (v/v), which is 16.7-36.0% higher than that of industrial yeasts (12.33-13.19%). Reducing sugar contents were 2.04-3.92 and 7.92-8.78 g/100 mL in the isolates and industrial yeasts, respectively. The isolated yeasts showed 25.2-52.7% higher yield of distillates (41% alcohol) compared to industrial yeasts. Forty-one components were detected in the rice distilled *Soju* (25% alcohol) and principal component analysis revealed differences between the isolated and industrial yeasts with respect to the contents of i-BuOH, isobutanol diethyl acetal, ethyl caprate, and tetradecanoic acid.

Key words : *Nuruk*, *Soju*, *Saccharomyces cerevisiae* N4, *Saccharomyces cerevisiae* N9, brewing characteristics

서론

인류가 농경을 시작하면서 각 문명은 자연스럽게 그 지역에서 얻기 쉬운 농작물로 술을 만들기 시작하였다. 메소포타미아와 이집트에서는 보리를 싹 틔워 쓰거나 포도, 사과 등을 이용하였고 잉카는 옥수수나 사탕수수를 사용하였다(1). 반면 한국, 중국, 일본, 인도네시아, 인도, 네팔 등 아시아권에서는 쌀과 잡곡에 누룩을 첨가하는 양조법으로 발전되어 왔다(2). 발효주에 증류기술이 적용되면서 위스키, 브랜디, 꼬냑, 럼, 보드카 등의 다양한 증류주가 만들어

지기 시작하였고 우리나라와 중국, 일본은 각각 소주(燒酒), 백주(白酒, *báijiǔ*), 쇼추(燒酎, *shochu*)로 분류하였으며(2) 현재까지도 널리 음용되고 있다.

우리나라의 주류시장에서 소주가 차지하는 비중은 2015년 출고금액기준, 희석식 소주가 3조 4,666억 원으로 전체 주류의 37%를 차지하고 있으나 증류식 소주는 195억 원으로 0.21%에 불과하다(3). 우리나라에서 증류식 소주가 쇠퇴한 이유는 일제강점기 시대 주세법에 따른 다양성의 축소와 한국전쟁으로 경제가 어려워지면서 값싼 술을 찾을 수밖에 없었던 역사적 배경을 들 수 있다. 이외에 쌀을 주류제조에 사용하지 못하게 하는 양곡관리법 등의 조치가 이어지면서 1976년 증류식 소주 제조장은 국내에서 완전히 사라지게 되고 희석식 소주는 꾸준히 성장하게 된다(4). 이후 1990년 쌀 사용이 허용되면서 증류식 소주도 다시 생산되기 시작하였고 2015년 국내에 55개 제조장이 운영 중이다(4,5).

그러나 제품경쟁력이 외국산 증류주에 밀리면서 2015년

*Corresponding author. E-mail : coldstone@korea.kr
Phone : 82-63-238-3639, Fax : 82-63-238-3843
Received 8 August 2017; Revised 20 August 2017; Accepted 23 August 2017.
Copyright © The Korean Society of Food Preservation. All rights reserved.

31,402 kL(2,683억원)의 증류주가 수입되었다(6). 2015년 국내 증류식 소주 생산량이 954 kL(6)이므로 국내생산량의 33배가량이 수입되었다. 주류의 수입은 단순히 무역수지 악화로 끝나는 문제가 아니라 주류를 만드는 농산물을 포함한 일자리 및 문화 등이 국내에 유입되는 의미도 가지고 있다. 1 L의 위스키를 생산하는데 약 1.13 kg의 곡물이 사용되므로(7) 2015년 수입된 16,963 kL(6)의 위스키는 술과 더불어 2만톤의 보리가 국내로 유입된 것이다.

이러한 문제를 극복하기 위해서는 다양한 노력이 필요하겠지만 품질경쟁력 확보가 시급한 문제로 판단된다. 증류주 제조에 필요한 기술은 원료처리, 누룩제조, 발효, 증류, 숙성, 폐수처리 및 기계설비 제작기술 등을 꼽을 수 있다. 현재까지의 연구를 살펴보면, 원료영역에 있어서는 쌀(8), 고구마(9), 감자(10), 잡곡(11) 등이 소재로 이용되었고, 누룩제조 분야에서는 누룩 미생물의 분포 및 특성(12-14), 제조법 최적화(15) 등의 연구가 있고, 발효기술연구로는 누룩과 국균의 증류에 따른 특성의 변화(16,17), 가수량(18), 미생물 혼합배양(19), 유기산 첨가(20) 등이 시도되었다. 증류 분야에서는 유기산 에스테르화(21) 및 증류방법에 따른 품질변화 조사(22) 등이 있으며 숙성, 폐수처리, 기계설비에 대한 연구는 찾아보기 어려운 실정이다. 증류식 소주의 품질을 높이기 위해서는 보다 근본적이고 제조현장에 부합한 체계적인 연구가 시급하다.

우리나라와 일본의 증류식 소주는 산 생성이 높은 백국균(*Aspergillus luchuensis*)을 사용하기 때문에(23) 산도가 높은 환경에서 안정적인 발효를 할 수 있는 효모가 필요하다. 그러나 국내에서는 증류식 소주용 효모가 판매되고 있지 않기 때문에 많은 양조장에서 막걸리용 효모나 수입 빵효모를 사용하고 있는 실정이다. 본 연구팀은 국내 10개 지역에서 수집한 누룩으로부터 내산성이 높은 효모 2종을 분리하였고(24,25) 증류식 소주 제조특성에 대하여 조사하였기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

공시재료

효모는 재래누룩에서 분리한 N4(KACC93224P), N9(KACC93234P) 및 국내 증류식 소주 양조장에서 사용되고 있는 효모를 사용하였다. 건조효모는 (주)충무발효(Ulsan, Korea)에서 생산하고 있는 충무 중효모(CM)와 빵효모(La Parisienne, S.I. Leasaffre Co., Marcq-en-Baroeul, France; LP)를 구매한 후 순수 분리한 다음 사용하였다. 대조구로는 일본의 증류식 소주용 효모 C4(26)를 사용하였다. 중국은 (주)충무발효의 백국을 사용하였다. 쌀은 한아름 품종을 시중에서 구입하여 이용하였다.

전배양

전배양은 YPD 배지(Difco-BD, Sparks, MD, USA)에서 수행하였다. 삼각플라스크에 배지 10 mL를 분주하고 1백 금이를 접종한 뒤 30°C, 150 rpm에서 24시간 배양하였다.

입국제조

쌀 3 kg을 세척시간을 합쳐 60분간 수침하고 60분간 물빼기 한 뒤 60분간 증자하였다. 증자미를 40°C까지 냉각시키고 중국 0.3 g을 접종한 다음 제국기(Mini-15, Yaegaki Food Co., Hyogo, Japan)에서 43시간동안 배양시켰다. 배양시간 19, 24, 28시간째 뒤집기를 하여 외부의 공기를 주입시키고 곰팡이가 고루 자라도록 하였으며 품온은 38°C로 유지시켰다. 배양 28시간 이후에는 품온을 35°C로 낮추어 산 생성이 증가되도록 하고(27) 배양 43시간 째 회수하여 -20°C에 보관하면서 사용하였다.

술덧제조

밀술은 물 480 mL에 효모 전배양액 8.8 mL를 넣은 다음 입국 400 g을 첨가하고 30°C 수욕 상에서 5일간 발효하여 제조하였다. 본 발효는 밀술에 백미 800 g 상당량의 증자미와 물 1,920 mL를 첨가한 다음 30°C 수욕 상에서 발효시켰다. 발효기간은 전날과의 무게 차이가 0.5 g이하로 될 때까지 하였다. 이때 첨가된 입국과 백미의 무게는 수분 12.5% 일 때의 무게로 제국 및 증자과정에서 흡수되는 수분량은 첨가되는 물 양에서 제외하였다. 전체적으로는 입국사용량은 전분질 원료의 1/3, 급수비율은 160% 모델을 사용하였다. 발효경과는 매일 무게를 측정하여 그 변화량으로 산출하였다.

증류

증류는 상압증류를 수행하였다. 술덧 700 g을 유리용기에 넣고 스팀발생기에서 생성된 증기가 술덧에 직접 주입되도록 제작된 기구를 이용하였다(28). 증류 종말점은 받아들인 증류액(원주)의 알코올 농도가 41%가 될 때로 하였다.

쌀 일반성분

수분은 적외선 수분측정기(MX-50, A&D Co., Ltd., Tokyo, Japan)를 사용하였으며 조지방, 조단백질, 조회분 및 탄수화물 함량은 식품공전(29)에 준하여 실시하였다.

쌀 수분흡수율

한아름 품종 백미 50 g을 밖으로 이탈되지 않도록 거즈로 잘 감싸고 증류수가 담겨있는 250 mL 비이커에 수침시킨 다음 10분 단위로 꺼내 세계 흔들어 쌀에 붙어 있는 수분을 잘 제거한 다음 무게를 측정하였다. 수분흡수율은 원료에 대한 무게 증가율로 나타내었다. 이때 물 양은 쌀이 충분히 잠길 만큼 조절하여 실시하였다.

입국 산도 및 효소활성

산도 측정을 위해 입국 20 g에 물 100 mL를 첨가하고 20°C에서 3시간 추출하였다. 추출물을 여과(Filter paper No. 2, Whatman International Ltd., Maidstone, England)한 뒤 10 mL를 취해 0.1 N NaOH로 적정하고 그 mL수를 산도로 표시하였다. 효소활성 측정을 위한 조효소액은 입국 20 g에 0.5% NaCl 함유 10 mM acetate buffer(pH 5.0) 100 mL로 추출한 뒤 여과하여 제조하였다. 추출조건과 여과조건은 산도 측정용 시료 제작과 동일하게 하였다. 당화력, α -amylase, gluco-amylase, α -glucosidase 및 acidic carboxypeptidase는 양조용 효소 측정 kit(Kikkoman Co., Tokyo, Japan)를 사용하였다.

당화력

당화력은 기질인 4-nitro-phenyl- β -maltoside(G2- β -PNP)를 4-nitro-phenyl- β -glucoside(G1- β -PNP)로 분해시키는 활성으로 구하였다. 기질에 조효소액을 반응시킨 후 분해된 G1- β -PNP에 β -glucosidase를 작용시켜 유리된 4-nitrophenol(PNP)를 440 nm에 측정 후 제조사가 제시하는 계산식으로 산출하였다(30).

α -Amylase

조효소액이 2-chloro-4-nitrophenyl 6^s-azido-6^s-deoxy- β -maltopentaoside(N3-G5- β -CNP)를 2-chloro-4-nitrophenyl β -maltotrioside(G3- β -CNP)와 2-chloro-4-nitrophenyl β -maltoside(G2- β -CNP)로 분해시키는 활성으로 하였다. 기질용액에 조효소액을 첨가하여 반응을 개시시키고 동시에 gluco-amylase와 β -glucosidase를 첨가하여 분해생성물인 G3- β -CNP와 G2- β -CNP로부터 2-chloro-4-nitrophenol(CNP)를 유리시켰다. 최종 생성된 CNP의 400 nm에서 정량하여 α -amylase의 활성으로 환산하였다(31).

α -Glucosidase, gluco-amylase

α -Glucosidase는 4-nitro-phenyl- α -glucoside(PNPG)에서 glucose를 분해시켜 PNP를 생성시키는 활성으로 하였고 gluco-amylase는 당화력과 α -glucosidase의 반응속도와 활성차이로 산출하였다(32).

Acidic carboxypeptidase

Carbobenzoxy-L-tyrosyl-L-alanine(Cbz-Tyr-Ala)에서 L-alanine을 분해시키는 활성으로 측정하였다(33).

β -Glucosidase

기질용액(1 mM p-nitrophenol- β -D-glucoside/50 mM sodium acetate buffer, pH 5.0) 0.5 mL를 37°C에서 5분간 예열한 후 조효소액 50 μ L를 첨가하였다. 이 후 37°C에서 10분간 반응시킨 다음 200 mM Na₂CO₃용액 1 mL를 첨가하여 반응

을 정지시키고 410 nm에서 흡광도를 측정하여 유리된 p-nitrophenol을 측정하였다. β -Glucosidase 활성은 PNPG에서 37°C, 1분간에 1 nmol의 p-nitrophenol을 만드는 활성을 1 unit로 하였다.

술덧분석

효모수는 methylene blue(0.01% w/v methylene blue, 2% w/v sodium citrate)로 염색한 후 현미경으로 계수하였고(34) 알코올, 산도, pH, 휘발산도, 환원당, 총당 함량은 주류분석 규정을 따랐다(35).

향기성분 분석

증류된 알코올 농도 41% 원주에 증류수를 첨가하여 알코올 농도를 25%로 조절한 후 4°C에서 3일간 방치하여 불용성 성분의 석출을 유도하였다. Membrane filter(5 μ m, Whatman International Ltd.)로 여과하여 불용성 물질을 제거한 후 유리병에 담고 호일로 감싼 다음 15°C 암소에서 1달 동안 숙성시켜 소주를 제조하였다. 소주 10 mL와 10 mg/L(25% EtOH)농도로 제조된 methyl tridecanoate(internal standard) 100 μ L를 vial에 넣었다. 이후 polydimethylsiloxane(PDMS)이 0.5 mm 코팅된 15 mm twister(Gerstel Co., Tokyo, Japan)를 넣고 실온에서 1,200 rpm으로 1시간 동안 교반시켜 twister에 향기성분이 흡착되도록 하였다. 그런 다음 twister를 꺼내어 증류수로 세척하여 불순물을 제거시키고 여분의 물은 종이 타올로 닦아내었다. 가열탈착장치(GERSTEL TDS3, CIS4)에 장착한 후 흡착된 성분을 260°C로 탈착시켰다(36). 성분분석은 GC-MS(Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)로 분석하였다. 분리용 컬럼은 DB-WAX(60 m \times 0.25 mm I.D., 0.25 μ m film thickness, Agilent Technologies Inc.)를 사용하였고 헬륨을 1.0 mL/min의 속도로 흘려주면서 분석하였다. 컬럼온도는 40°C에서 5분 동안 유지시킨 다음 분당 3°C씩 240°C까지 승온시켰다. 성분확인에는 NIST05a MS spectral library data 및 AromaOffice(Nishikawa Keisoku Co., Ltd., Tokyo, Japan) database에 수록된 retention index를 참고하여 수행하였다. 정량은 각 성분의 peak area값을 internal standard의 area값으로 나누어 internal standard 농도에 대한 상대농도로 나타내었다.

통계처리

통계처리는 유의수준 5%(p<0.05)로 설정하여 일원배치 분산분석을 하였으며 Minitab 16(Minitab Inc., State College, PA, USA) 프로그램을 사용하였다. 각 효모별 향기성분에 대한 주성분 분석은 XLSTAT(version 2014, Addinsoft, Paris, France)를 활용하였다.

결과 및 고찰

한아름 품종의 제국 특성

한아름 품종(백미)의 일반성분은 Table 1에 제시한 바와 같이 수분 14.7, 조단백질 6.8, 조지방 0.9, 조회분 0.4, 탄수화물 76.5 g/100 g으로 Park 등(37)의 조사결과와 유사하였다. 한편 일반 멥쌀 백미의 조성은 각각 13.4, 6.4, 0.4, 0.4, 79.5%(38)로 한아름벼는 일반미에 비해 단백질, 회분, 탄수화물의 함량은 유사하였으나 지질의 함량이 2배 정도 높은 것으로 나타났다.

Table 1. Proximate compositions of polished (white) rice, *Hanarumbyeo*

Moisture	Composition (g/100 g, fresh weight)			Carbohydrate
	Crude			
	Protein	Lipid	Ash	
14.7±0.1 ¹⁾	6.8±0.1	0.9±0.0	0.4±0.0	76.5±0.1

¹⁾Values represent means±SD.

쌀의 흡수특성은 백미의 수분함량, 도정율, 품종, 수침온도 등에 영향을 받으며, 수침시간이 짧으면 쌀 내부까지 수분이 흡수되지 않고, 장시간 수침할 경우 쌀에 있는 인(P)이 유출되어 곰팡이 생육에 좋지 않은 영향을 미치게 되기 때문에(40) 수침시간 결정은 제국에서 중요한 요소이다.

한아름 품종의 수침시간에 따른 수분흡수율은 Fig. 1과 같다. 제국시 증자미의 적정 수분 함량은 쌀이 서로 엉겨 붙지 않으면서 곰팡이 생육에 영향을 받지 않고 효소활성을 확보할 수 있는 35-38%로 조정하는 것이 일반적이다(39). 한아름 품종의 수침시간에 따른 수분흡수율은 10분에 17.5%로 급격하게 증가한 후 20분부터는 완만해지기 시작하여 60분에 30.1%로 최대 흡수량에 도달하였다. 수침 60분 후 수분함량은 33.6%이었고 증자 후 수분함량은 35.2%

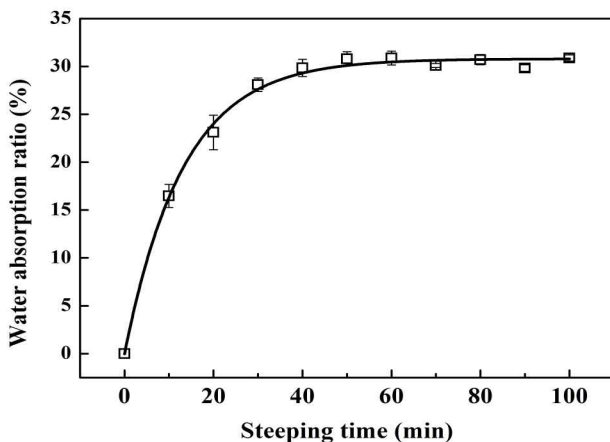


Fig. 1. Water absorption ratio of white rice, *Hanarumbyeo* during steeping.

(data not shown)로 제국에 적절한 수분함량에 도달하였다. 따라서 한아름 품종의 적정 수침시간은 60분이 적절할 것으로 판단되었다.

한아름 품종으로 제조한 입국의 산도는 7.80으로서 구연산 함량으로 환산하면 2.92 g/100 g dry base 상당량이 함유되어 있었다. 효소활성에 있어 당화력은 926.72, α-amylase는 52.40, gluco-amylase는 887.71, α-glucosidase는 0.14, acidic carboxypeptidase는 17,335.73, β-glucosidase는 174.46 U/g dry base로 조사되었다(Table 2). 일본의 소주제조용 코지의 평균 효소활성은 α-amylase 159, gluco-amylase 282, acidic carboxypeptidase 9,224 U/g dry base로서(41) α-amylase 활성은 3.0배 낮은 반면, gluco-amylase의 활성은 3.1배, acidic carboxypeptidase의 활성은 1.9배 높은 것으로 나타나 일본 입국과는 차이가 있었다. 국내에서 유통되는 백국균은 수원발효에서 생산되는 SW201과 (주)충무발효에서 판매하고 있는 CF1005 두 종뿐이며 *Aspergillus luchuensis*(또는 *A. luchuensis* mut. kawachii)이다(42). 본 균주는 *A. niger*의 변종으로 동아시아에 많이 분포하고 있고 산 생성능력이 높아 한국과 일본에서 증류식 소주나 막걸리 제조에 사용되어 왔으나(23), 제조사에 따라 효소활성의 차이가 있는 것으로 알려져 있다. 일본에서 유통되고 있는 8종의 백국균을 대상으로 효소활성을 분석한 결과 최대활성과 최소활성의 차이가 α-amylase는 2.6배, gluco-amylase 1.9배, α-glucosidase 2.1배, acidic carboxypeptidase 1.3배 나타나는 것으로 확인되었다(43). 또한 동일 제조사의 제품도 원료곡의 품종과 도정율에 따라서 효소활성의 차이가 나타났다(44). 한국과 일본 입국의 효소활성 차이는 균주 개량 등의 영향과 품종의 차이가 복합적으로 작용되었을 가능성이 있다.

누룩분리 N4, N9효모의 발효 및 증류 특성

발효가 완료된 술덧을 분석한 결과(Table 3) 산도는 10.95-11.70, pH는 3.59-3.79 범위로 효모별로 큰 차이를 보이지 않았다. 그러나 알코올 함량은 N9(16.58%), C4(15.98%), N4(15.37%), LP(13.19%), CM(12.33%)순으로

Table 2. Acidity and enzyme activities in *Ippuk* made with white rice, *Hanarumbyeo*

Component	Value
Acidity (0.1 N NaOH mL, fresh weight)	7.80±0.00
Enzyme activities (U/g, <i>ippuk</i> dry basis)	
Glucose-forming	926.72±6.07
α-Amylase	52.40±1.30
Gluco-amylase	887.71±5.89
α-Glucosidase	0.14±0.00
Acidic carboxypeptidase	17,335.73±786.50
β-Glucosidase	174.46±4.99

Table 3. Comparison of final fermented wash by isolated and industrial yeasts

	N4	N9	C4	LP	CM
General components					
Alcohol (%)	1,5.37±0.06 ^{1)(c2)}	16.58±0.05 ^a	15.98±0.05 ^b	13.19±0.07 ^d	12.33±0.07 ^e
Acidity	11.70±0.00 ^b	11.65±0.07 ^b	11.10±0.14 ^c	10.95±0.07 ^c	12.45±0.07 ^a
pH	3.74±0.04 ^{ab}	3.80±0.01 ^a	3.67±0.03 ^{bc}	3.73±0.01 ^{ab}	3.61±0.03 ^c
Volatile acidity	4.95±0.00 ^d	6.83±0.04 ^a	2.30±0.00 ^e	6.13±0.04 ^b	5.85±0.00 ^e
Reducing sugar (%)	3.92±0.00 ^e	2.04±0.04 ^e	2.88±0.00 ^d	7.92±0.00 ^b	8.78±0.00 ^a
Total sugar (%)	5.11±0.04 ^e	3.10±0.17 ^c	4.04±0.08 ^d	9.07±0.10 ^b	9.92±0.10 ^a
Enzyme activities (U/mL)					
Glucose-forming	258.39±2.62 ^a	253.45±0.87 ^a	225.32±3.06 ^b	251.28±6.56 ^a	244.48±0.44 ^a
α-Amylase	8.20±0.35 ^{bc}	7.85±0.28 ^c	8.74±0.14 ^{abc}	9.19±0.49 ^{ab}	9.84±0.00 ^a
Number of yeasts (×10 ⁷ cells/mL)					
Total	10.67±0.63 ^a	8.22±1.57 ^a	10.56±2.47 ^a	6.72±2.32 ^a	7.94±2.65 ^a
Live	4.22±1.57 ^{ab}	2.22±0.63 ^{ab}	5.00±2.33 ^a	4.33±1.68 ^a	1.72±0.55 ^b
Dead	6.44±0.94 ^{ab}	6.00±2.20 ^a	5.56±0.26 ^{ab}	2.39±1.03 ^b	6.22±2.67 ^a
Viability (%)	39.2±12.4 ^{bc}	28.3±13.0 ^{bc}	45.7±9.6 ^b	64.2±9.3 ^a	23.7±8.7 ^c
Distillation					
Distillate alcohol (%)	41.29±0.32 ^a	41.21±0.04 ^d	41.21±0.13 ^a	41.05±0.05 ^a	41.24±0.16 ^a
Volume (mL)	242.23±3.91 ^b	265.55±0.64 ^c	252.07±1.09 ^b	193.43±1.16 ^d	173.81±1.59 ^e
Yield (%)	93.2±0.8 ^a	94.5±0.3 ^a	93.2±0.8 ^a	86.3±0.4 ^b	84.2±0.4 ^b

¹⁾Values represent means±SD.

²⁾Values with different superscripts in the same row are significantly different at p<0.05.

누룩에서 분리한 N4, N9 효모 및 일본 증류식 소주용 효모인 C4의 알코올 생산량은 유사하였고, 국내 상업용 효모는 누룩분리 효모에 비해 16.7-36.0% 낮은 것으로 확인되었다. 이러한 이유는 세 가지 원인을 먼저 생각해 볼 수 있다. 첫째는 발효기간 입국의 효소활성 저하로 쌀의 전분이 분해되지 못하면서 알코올 생산이 낮아지는 경우이다. 발효 종료 후 각 효모별 술덧의 당화력은 225.32-258.39 U/mL이고 α-amylase의 활성은 7.85-9.84 U/mL로 충분한 활성을 가지고 있었기 때문에 효소활성 저하에 따른 당화불량이 원인은 아니라고 판단된다. 둘째는 발효에 충분한 효모수가 확보되지 못한 경우이다. 술덧에 포함된 효모의 총균수는 누룩분리 효모가 8.98-11.08, 상업용 효모가 7.06-8.34×10⁷ cells/mL로 통계적 유의성이 없었다. 생균수는 각각 1.52-3.15, 1.81-4.55×10⁷ cells/mL이었으며 생존율은 각각 28.3-39.2%, 23.7-64.2%로 상업용 효모가 높았다. 발효가 정상적인 술덧에 포함된 효모수는 10⁷-10⁸ cells/mL로(45) 각 처리구별로 발효에 충분한 효모수가 확보되었기 때문에 효모 개체수에 대한 영향도 아닌 것으로 판단된다. 셋째는 효모의 당 이용률이 낮아 알코올 생산량이 떨어지는 경우이다. 각 효모별 술덧의 환원당 함량은 각각 N9 2.04, C4 2.88 N4 3.92, LP 7.92, CM 8.78 g/100 mL 순으로 알코올 생산량과 반비례하며 환원당과 알코올 함량과의 상관계수(r)가

0.997(data not shown)로 매우 높게 나타났다. 결론적으로 동일조건에서 누룩분리 효모가 상업용 효모에 비해 술덧의 당을 보다 많이 이용함으로써 알코올 생산이 증가된 것으로 이해된다.

이러한 현상은 술덧의 발효경과(Fig. 2)에서도 관찰된다. 누룩에서 분리한 N4, N9 효모는 발효 11일에 CO₂발생이 완만해지고 19일에 발효가 종료되는 반면 상업용 효모는 발효 9일에 CO₂발생이 완만해진 다음 누룩분리 효모보다 2일 빠른 17일에 발효가 종료되었다. 발효종료일 누적 CO₂ 발생량은 N4와 N9이 각각 418.9, 452.1 g/mash로 상업용 효모 LP와 CM의 345.3, 327.6 g/mash에 비하여 21.3-38.0% 높은 것으로 확인되었다. 발효가 완만해지는 시기의 누적 CO₂생산량은 누룩분리효모가 333.0-350.5 g/mash, 국내상업용 효모가 256.5-250.4 g/mash로 모든 CO₂생산량이 알코올 대사과정에서 만들어졌다고 가정하면 알코올 생산량은 각각 394.7-407.8, 268.0-261.7 g/mash로 예측할 수 있다. 이때의 술덧양은 각각 3,926.9-3,939.5, 4,001.2-4,005.0 g/mash이므로 술덧의 알코올 농도는 11.2-11.8, 8.3-8.5% (v/v)로 계산된다.

한편, 입국의 산 함량은 건물량으로 2.92%(Table 2)이고 쌀을 물에 넣었을 때 용적의 변화를 나타낸 원료계수가 1.15(46)이므로 입국 100 g(수분함량 12.5%)에 물 120 mL를

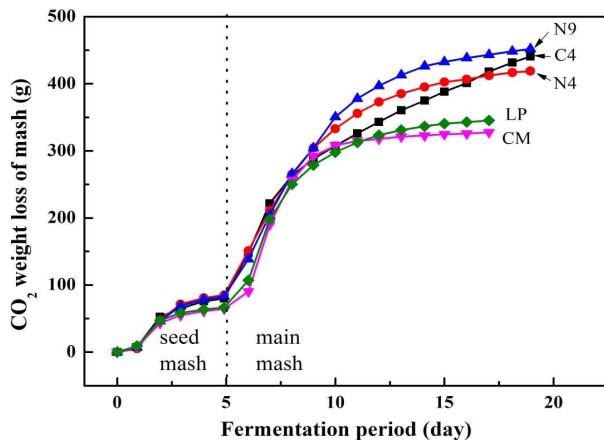


Fig. 2. Time profile of CO₂ evolution during *Soju* brewing using isolated and industrial yeasts.

첨가하였다면 부피는 235 mL($100 \times 1.15 + 120$)가 되며 밀술의 산 함량은 1.24%가 된다. 이때 pH(citric acid의 $P_{K_{a1}}=3.13$)는 3.0-3.3 범위가 일반적이다. 이러한 환경에서 시험에 이용된 효모는 발효에 충분한 개체수를 확보하였으나(Table 3) 국내상업용 효모는 술덧의 알코올 농도 8.3-8.5% 부근에서 효모 세포내로 당 흡수가 저하되면서 지속적인 발효로 이어지지 못하고 CO₂ 발생량(Fig. 2)과 알코올 함량이 낮게 나타난 것으로 해석된다.

각 효모별 총당의 함량은 3.10-9.92 g/100 mL범위로 환원당 함량 2.04-8.78 g/100 mL를 제외하면 1.06-1.19 g/100 mL의 전분이 분해되지 않은 난분해성으로 남아있는 것으로 나타났다. 백미 사용량 등을 고려하여 계산하면 한아름 품종은 본 시험 조건에서 4.0%가량의 난분해성 전분을 함유한 것으로 나타났다.

각 효모별 증류액(원주)의 알코올 함량은 41.05-41.29%로 유사하게 증류되었으며 증류수율은 누룩 분리균이 93.2-94.5%, 국내상업용 효모가 86.3-84.2%로 누룩분리 효모로 제조한 술덧이 7.9-12.2% 높은 것으로 조사되었다. 증류효율은 술덧에 함유된 알코올 함량에 대한 원주의 알코올 함량비로 수율이 낮을수록 술덧에 증류되지 못한 알코올이 많이 남아있다는 의미이다. 이로 인해 획득된 원주의 양은 누룩분리 효모가 242.23-265.55 mL이었던 반면 상업용 효모는 173.81-193.43 mL로 25.2-52.7%가량 낮게 나타났다.

증류식 소주에 있어 알코올 생산량은 생산비용과 직결되어 있기 때문에 매우 중요한 요소로 여겨진다. 동일한 쌀 양에 대해 누룩분리효모가 일반적으로 사용되고 있는 상업용 효모보다 알코올 생산량이 최대 36% 높게 나타났고 증류효율도 최대 12.2%까지 높은 결과로 원주의 생산량을 25.2-52.7%까지 증가시켰기 때문에 제품의 생산비용을 낮출 수 있을 것으로 기대된다.

소주의 향기성분

원주에 물을 첨가하여 25%로 조절한 후 1달 동안 숙성시킨 각 쌀 증류식 소주의 향기성분은 Table 4에 나타내었고, 주성분분석 결과는 Fig. 3에 나타내었다.

각 효모 N4, N9, C4, LP, CM의 알코올류 성분의 함은 각각 26.76, 23.07, 33.33, 20.79, 27.86 $\times 100$ $\mu\text{g/L}$ 로 C4에서 다소 높게 나타났다. 알코올 중 butanol 및 isoamyl alcohol은 양적으로 많이 존재하고 있지만 약한 알코올 향 이외에 특별한 향이 없고 분별역치 값도 50-600 mg/L로 높아 관능에는 많은 영향을 미치지 못한다(47). 반면, phenethyl alcohol은 장미향을 가지고 있으며 역치 값도 40-70 mg/L로 비교적 낮아 증류식 소주에서 중요한 성분이다(47). 각 소주별 phenethyl alcohol 함량은 누룩분리 효모가 1.17-1.51 $\times 100$ $\mu\text{g/L}$ 로 상업용 효모의 0.75-1.06보다 1.1-2.0배 높은 함량을 나타내었다.

에스테르류는 과일향, 꽃향 등의 화려한 향을 가지고 있고 역치가 낮아 소량으로도 소주의 향기에 많은 영향을 줄 수 있는 성분이다. 각 효모별 분포를 살펴보면 양적으로 많이 함유된 성분은 ethyl acetate(과일향) 6.25-12.35, isoamyl acetate(바나나향) 4.22-16.59, ethyl caproate(사과향) 4.29-6.28, ethyl caprylate(과일향) 37.20-44.71, ethyl caprate(포도주향, 꼬냑향, 장미향) 11.55-12.08, phenylethyl acetate(장미향) 1.14-6.77 $\times 100$ $\mu\text{g/L}$ 등으로 나타났다. Table 3에서 술덧의 휘발산도가 N4 4.95, N9 6.83, C4 2.30, LP 6.13, CM 5.85로 N9과 LP에서 높게 나타났다. 휘발산의 주성분은 acetic acid로서(47) N9과 LP가 acetic acid 생산력이 높았다고 추정되며 이들 효모로 제조된 소주에서 ethyl acetate의 함량이 다소 높았던 이유로 판단된다. Isoamyl acetate는 isoamyl alcohol이 acetyl CoA와 alcohol acetyltransferase의 작용에 의해 생성되는 성분으로서 isoamyl alcohol의 농도에 의존적이다(48). Isoamyl alcohol의 농도가 높았던 N4와

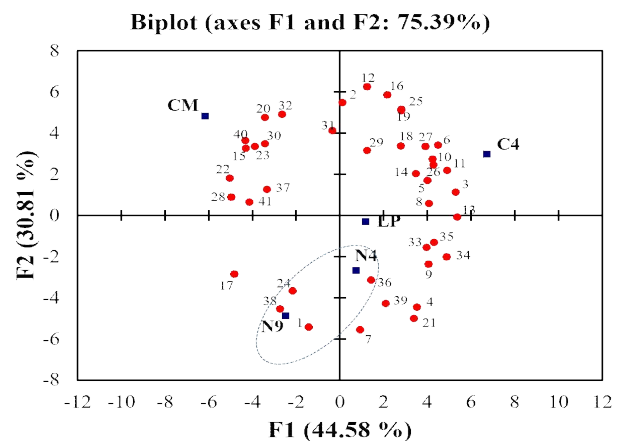


Fig. 3. Principal component analysis (PCA) of volatile compounds of *Soju* prepared by isolated and industrial yeasts.

The figure displays volatile compounds as numbers, and these numbers are displayed with the corresponding compounds in Table 4.

Table 4. The peak ratio of distilled *Soju* (alcohol 25%) prepared with isolated and industrial yeasts

No.	Compounds	Retention index ¹⁾	Relative concentration ($\times 100 \mu\text{g/L}$) ²⁾				
			N4	N9	C4	CM	LP
	(Alcohol)						
1	i-BuOH	1099	4.37	4.63	3.30	3.64	4.62
2	1-Butanol	1152	0.07	0.06	0.11	0.12	0.12
3	i-AmOH	1234	20.48	16.98	26.62	15.72	21.97
4	2-Ethyl-1-hexanol	1474	0.06	0.07	0.06	ND ³⁾	0.08
5	Phenethyl alcohol	1867	1.51	1.17	2.64	1.06	0.75
6	Farnesol	2316	0.27	0.17	0.62	0.25	0.31
	(Ester)						
7	Ethyl acetate	932	9.28	12.35	8.66	6.52	11.17
8	Isobutyl acetate	1015	0.23	ND	0.27	ND	ND
9	Ethyl butyrate	1036	1.61	0.55	1.19	ND	1.39
10	Ethyl isovalerate	1066	ND	ND	0.01	ND	ND
11	Isoamyl acetate	1128	6.68	4.79	16.59	4.22	7.30
12	Isoamyl propionate	1210	0.05	0.03	0.10	0.10	0.06
13	Ethyl caproate	1263	5.39	4.85	6.28	4.29	5.60
14	Isoamyl butyrate	1297	0.07	ND	0.07	0.03	0.02
15	Propyl caproate	1341	0.01	0.01	0.01	0.02	0.01
16	Ethyl heptanoate	1358	0.02	0.01	0.03	0.03	0.02
17	Isobutyl caproate	1374	0.03	0.04	0.02	0.04	0.03
18	Ethyl caprylate	1450	39.43	37.20	42.89	40.39	44.71
19	Isoamyl caproate	1460	0.13	0.10	0.16	0.14	0.15
20	Propyl caprylate	1501	0.03	0.03	0.04	0.10	0.06
21	Ethyl nonanoate	1518	0.17	0.15	0.13	ND	0.15
22	Isobutyl caprylate	1536	0.06	0.08	0.05	0.10	0.06
23	Ethyl methyl succinate	1604	0.01	0.03	0.02	0.05	0.02
24	Ethyl caprate	1632	17.53	15.07	11.55	13.94	12.08
25	Isopentyl octanoate	1644	0.08	0.06	0.10	0.09	0.09
26	Diethyl succinate	1648	0.33	0.39	3.64	0.21	0.21
27	Phenethyl acetate	1783	2.55	1.14	6.77	2.32	1.32
28	Ethyl laurate	1824	0.20	0.18	0.14	0.22	0.18
	(Aldehyde)						
29	Nonanal	1404	0.07	0.05	0.07	0.07	0.08
30	Furfural	1448	0.14	0.22	0.20	0.27	0.19
31	Decanal	1482	0.04	0.05	0.06	0.08	0.09
32	2-Nonenal	1507	0.04	0.04	0.04	0.05	0.04
	(Fatty acid)						
33	Caprylic acid	2018	0.15	0.27	0.32	0.11	0.23
34	Capric acid	2229	1.61	1.14	1.64	0.72	1.46
35	Lauric acid	2438	0.52	0.42	0.57	0.29	0.66
36	Tetradecanoic acid	2634	0.40	0.42	0.36	0.31	0.55
	(Phenol)						
37	4-Vinylguaiacol	2142	0.05	0.07	0.06	0.07	0.07
	(Ketone)						
38	2-Undecanone	1575	0.07	0.06	0.01	0.04	0.05
	(Acetal)						
39	Isobutanol diethyl acetal	992	0.29	0.40	0.33	0.15	0.19
40	PADA ⁴⁾	1692	0.25	0.20	0.15	0.57	0.28
41	Isovaleraldehyde diethyl acetal	1075	0.73	0.73	0.26	1.13	ND

¹⁾Retention index calculated on a DB-WAX capillary column with a series of n-alkanes (C7-C33).²⁾Volatile compounds were calculated with the relative peak ratio of their peak areas to that of internal standard.³⁾ND means not detected.⁴⁾PADA means phenyl acetaldehyde diethyl acetal.

LP소주에서 isoamyl acetate의 함량이 높은 이유로 생각된다. 지방산 에스테르 화합물인 ethyl caproate, ethyl caprylate, ethyl caprate는 효모별로 큰 차이를 보이지 않는 것으로 확인되었다.

에스테르 성분 중 ethyl acetate, isobutyl acetate, ethyl caproate 등의 저비점 성분은 마시기 전 술향에 기여하고 고비점 성분인 phenethyl acetate, ethyl caprylate, ethyl laurate 등은 마신 후 입안에 남는 잔향으로 작용한다(47).

각 소주에 함유된 알데히드류는 nonanal 0.05-0.08, furfural 0.14-0.19, decanal 0.04-0.09, 2-nonenal 0.04-0.05 ×100 µg/L범위로 양적으로는 furfural의 함량이 높았다. Furfural은 탄내(49)를 가지고 있기 때문에 그 함량이 많을 경우 증류식 소주에 좋지 않은 영향을 미치게 된다. 발효과정 중에는 거의 생성되지 않고 증류 시 술덧에 함유된 당류가 열을 받아 아미노카르보닐 반응을 거쳐 생성된다(50). Table 3에 나타난 바와 같이 상업용 효모인 LP와 CM효모로 제조한 술덧의 환원당 함량은 각각 7.92, 8.78 g/100 mL로 누룩분리 효모로 제조한 술덧의 함량 2.04-3.92 g/100 mL보다 높았기 때문에 furfural의 함량도 높을 것으로 예상했으나 큰 차이를 보이지 않았다. Pentose는 산성조건에서 가열되면 3분자의 물이 탈수되어 furfural이 생성되지만 hexose는 동일 조건에서 3-deoxy glucosone을 거쳐 hydroxy methyl furfural(HMF)이 되고 더욱 가열되면 levulinic acid, formic acid로 분해되는 과정에서 중간생성물로 소량 만들어 진다(51). 이외에 증류방법 및 증류기 금속의 종류, 술덧에 함유된 유기산 종류, pH의 영향과 더불어 잔당의 종류와 양에 의해서 그 생성이 다른 것으로 알려져 있다(47). 효모별 술덧의 pH 및 산도는 유사하고(Table 3) 증류방법 및 증류기의 종류는 동일하므로 술덧을 구성하고 있는 당의 종류에 많은 영향을 받을 수 있다. 술덧을 구성하고 있는 당은 원료인 쌀의 분해 산물이며 glucose, maltose, isomaltose 및 polysaccharide가 주성분이고 pentose 성분은 쌀의 hemicellulose가 분해되어 생성된 xylose, arabinose가 소량 함유되어 있다(52,53). 누룩 분리 효모를 포함한 일반적인 효모는 xylose와 arabinose를 이용하지 못하므로(53) 술덧에 함유된 pentose양은 유사할 것으로 추측되고 furfural의 생성에는 주로 hexose가 작용할 것으로 생각된다. 본 증류조건인 술덧에 스팀을 주입하는 상압증류방식은 술덧의 최대 온도가 100℃를 초과하지 못하므로 각 hexose의 furfural변환이 높지 않았기 때문에(54) 각 효모별로 furfural의 함량 차이가 적은 것으로 이해된다. 다만, 시중에 유통되고 있는 제품의 탄내는 직화방식의 증류식 소주에서 불꽃이 달는 부분의 온도가 비교적 높기 때문에 hexose가 furfural로 많이 변환되었을 것으로 추측된다. 상업용 효모를 사용한 술덧을 직화방식으로 증류할 경우 누룩분리 효모를 사용한 술덧에 비해 탄내가 높을 가능성이 있다.

4-vinylguaiacol의 함량은 0.05-0.07×100 µg/L로 높지 않

았으며, 효모별로도 큰 차이를 나타내지 않았다. 4-vinylguaiacol은 술덧에 함유된 ferulic acid의 일부가 증류 중 산 및 열에 의해 4-vinylguaiacol로 변환되어 유출되고 저장 중에 산화되어 바닐라향을 가지고 있는 vanillin 및 vanillic acid로 바뀌게 된다(49).

주성분 분석(Fig. 3)은 전체 분산의 75.39%를 설명하고 있으므로 비교적 적합한 모델로 나타났다. 전체 분산의 44.58%를 설명하고 있는 제 1주성분(F1)의 각 효모별 적재 값은 N4, N9, C4, LP, CM가 각각 0.025, 0.162, 0.773, 0.617, 0.056으로 일본 상업용 효모인 C4와 국내 상업용 효모인 CM이 변동을 이끌었다. 전체의 30.81%를 설명하고 있는 제 2주성분(F2)은 N9의 적재값이 0.628을 가지면서 다른 효모의 적재 값 0.03-0.321보다 높게 나타났다. 즉, 시험에 사용된 5종의 효모 중 C4와 CM소주의 향기성분 차이가 가장 많았고 다음은 N9과 다른 4종의 효모의 분포차이가 큰 것으로 해석된다. 누룩에서 분리한 N4, N9 효모로 만든 증류식 소주가 다른 상업용 효모와 차이가 나는 성분은 1번(i-BuOH), 38번(isobutanol diethyl acetal), 24번(ethyl caprate), 36번(tetradecanoic acid) 성분으로 나타났다.

이외에 C4소주에는 ethyl isovalerate, isoamyl acetate, diethyl succinate 등의 향기성분이 다른 소주에 비해 2.3-9.3 배 높게 나타나(Table 4, Fig. 3) C4소주의 특징을 줄 수 있는 성분으로 판단되었다. 이 중 사과향을 가지고 있는 ethyl isovalerate의 역치는 3 µg/L(55)이고 isoamyl acetate의 역치값 역시 1.6 mg/L(47)로 낮은 편에 속하므로 너무 과다할 경우 전체적인 향의 균형을 깰 수 있다. CM은 phenylacetaldehyde diethyl acetal과 propyl caproate 등의 성분이 주요하게 다른 소주와 차이가 있는 것으로 나타났다(Fig. 3). Acetal 성분은 aldehyde 성분이 알코올과 반응하여 생성되는 물질로 부드럽고 고급스러운 향을 부여하고(47), propyl caproate는 파인애플향을 가지고 있으나(56) isobutyl caprylate, ethyl laurate 등의 고비점 에스테르 성분함량 등도 높아 마시고 난 후 입안에 잔여감이 오래 머물면서 맛에 있어 좋지 않은 영향을 미칠 수 있다.

누룩분리 효모인 N4와 N9은 알코올 생산수율을 증대시켜 제품의 생산비용을 감소시킬 수 있으며 향기성분에 있어서도 적절한 균형을 이루고 있기 때문에 산업용으로 검토해 볼 가치가 있다고 판단된다.

요 약

재래누룩에서 분리한 효모인 N4와 N9에 대해 쌀 증류식 소주제조 특성을 살펴보았다. 원료 쌀(한아름 품종)의 일반 성분은 수분 14.7, 조단백질 6.8, 조지방 0.9, 조회분 0.4, 탄수화물 76.5 g/100 g이었다. 제조된 입국의 총산 함량은 2.92%(citric acid, dry base)였으며 효소활성에 있어 당화력

은 926.72, α -amylase 52.40, gluco-amylase 887.71, α -glucosidase 0.14, acidic carboxypeptidase 17,335.73, β -glucosidase 174.46 U/g dry base로 나타났다. 술덧의 알코올 함량은 재래누룩 분리 효모가 15.37-16.58%로 상업용 효모 12.33-13.19%보다 16.7-36.0% 높은 것으로 나타났다. 반면, 환원당 함량은 각각 2.04-3.92, 7.92-8.78 g/100 mL로 상업용 효모의 당 이용률이 누룩분리 효모보다 낮았다. 이러한 결과로 증류 후 원주의 획득량이 누룩분리 효모에서 25.2-52.7% 높았다. 쌀 증류식 소주(알코올 25%)에서 41개의 휘발성 성분이 검출되었으며, 주성분 분석 결과 누룩분리 효모와 상업용 효모는 i-BuOH, isobutanal diethyl acetal, ethyl caprate, tetradecanoic acid 성분의 함량 차이가 있는 것으로 나타났다.

감사의 글

본 연구는 국립농업과학원 농업과학기술 연구개발사업 (과제번호: PJ011984)의 지원에 의해 이루어진 것입니다.

References

- Miyazaki M (2015) History of Alcoholic Drinks. Translated by Bang WK, Jeong YK, Korea University Press, Seoul, Korea, p 52-83
- Pae KH (1999) Literature review for transmission of the *Andong Soju*. MS Thesis, Andong National University, Andong, Korea, P 29-36
- National Tax Statistics. http://stats.nts.go.kr/national/major_detail.asp?year=2016&catecode=A06001#. (Accessed July 2017)
- Choi HS, Jeong ST, Kang JE, Yeo SH, Kim CW, Song GC (2016) The water of life, spirit. RDA Interrobang 168. Rural Development Administration, Jeonju, Korea, p 1-20
- National Tax Statistics. http://stats.nts.go.kr/national/major_detail.asp?year=2016&catecode=A06004#. (Accessed July 2017)
- National Tax Statistics. http://stats.nts.go.kr/national/major_detail.asp?year=2016&catecode=A06008#. (Accessed July 2017)
- Irish Whiskey Association. [http://www.abfi.ie/Sectors/ABFI/ABFI.nsf/vPagesSpirits/Home/\\$File/Vision+for+Irish+Whiskey+May+2015.pdf](http://www.abfi.ie/Sectors/ABFI/ABFI.nsf/vPagesSpirits/Home/$File/Vision+for+Irish+Whiskey+May+2015.pdf). (Accessed July 2017)
- Min YK, Yun HS, Jeong HS, Jang YS (1992) Changes in compositions of liquor fractions distilled from *Samil-ju* with various distillation conditions. Korean J Food Sci Technol, 24, 440-446
- Park JS, Chung BW, Bae JO, Lee JH, Jung MY, Choi DS (2010) Effects of sweet potato cultivars and *koji* types on general properties and volatile flavor compounds in sweet potato *Soju*. Korean J Food Sci Technol, 42, 468-474
- Jeong YJ, Seo JH (2012) Volatile compounds of potato *Soju*s produced by different distillation condition. Korean J Food Preserv, 19, 433-437
- Lee DH, Jung JW, Lee YS, Seo JS, Park IT (2014) Fermentation characteristics for preparation of distilled liquor made of mixed grains. Korean J Food Sci Technol, 46, 446-455
- Bae KH, Shin KS, Ryu HY, Kwon CS, Sohn HY (2007) Identification and fermentation characteristics of lactic acid bacteria isolated from the fermentation broth of Korean traditional liquor, *Andong-Soju*. Kor J Microbiol Biotechnol, 35, 310-315
- Hong Y, Kim YB, Park SO, Choi EH (1997) Microflora and physicochemical characteristics of *Nuruk* and main mashes during fermentation of a traditional *Andong Soju*. Food Sci Biotechnol, 6, 297-303
- Chung WH, Kang SH, Jung JH (1987) Microbial studies on the Korean traditional *Soju*-Part 1. characteristics of fungal amylases produced by the isolate from the native Youngkwang *koji*-. Appl Biol Chem, 30, 250-257
- Bae KH, Ryu HY, Kwun IS, Kwon CS, Sohn HY (2007) Optimization of thickness and maturation period of *Andong-Soju Nuruk* for fermentation of *Andong-Soju*. Korean J Microbiol Biotechnol, 35, 231-237
- Lee DS (2013) Physicochemical characteristic of distilled spirits by *Nuruk* type. Ph D Thesis, Seoul Venture University, Korea
- Min SR (2014) Quality characteristics of distilled *Soju* with various *Aspergillus species*. MS Thesis, Suncheon National University, Korea
- Choi HS, Kim EG, Kang JE, Choi JH, Yeo SH, Jeong ST (2014) Effect of varying the amount of water added on the characteristics of mash fermented using modified *Nuruk* for distilled-*Soju* production. Korean J Food Preserv, 21, 908-916
- Hong Y, Park SO, Choi EH (1998) Quality characteristics of *Andong Soju* type mashes produced by the co-culture of wild microorganisms Isolated from *Nuruk* and mashes for *Soju* (Korean traditional distilled liquor). Food Sci Biotechnol, 7, 236-241

20. Choi HS, Kim EG, Kang JE, Yeo SH, Jeong ST, Kim CW (2015) Effect of organic acids addition to fermentation on the brewing characteristics of *Soju* distilled from rice. *Korean J Food Sci Technol*, 47, 579-585
21. Ryu LH, Kim YM (2002) Esterification of alcohols with organic acids during distilled spirit distillation. *Korean J Food Nutr*, 15, 295-299
22. Lee YH, Eom TK, Cheong C, Cho HC, Kim IY, Lee YS, Kim MS, Yu SR, Jeong YH (2013) Quality characteristics of spirits by different distillation and filtrations. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 42, 2012-2018
23. Hong SB, Lee MN, Kim DH, Varga J, Frisvad JC, Perrone G, Gomi K, Yamada O, Machida M, Houbraken J, Samson RA (2013) *Aspergillus luchuensis*, an industrially important black *Aspergillus* in East Asia. *PLoS One*, 28, e63769
24. Yoshizaki Y, Kin HM, Okutsu K, Ikenga M, Tamaki H, Takamine K (2015) "*Nuruk*", Korean traditional *koji*, as a possible material for producing Japanese *Shochu*. *J Brew Soc Japan*, 110, 170-178
25. Choi HS, Kang JE, Jeong ST, Kim CW, Takamine K (2015) Characterization of yeast for *Soju* (distilled spirits) from Korean traditional *Nuruk* *Kor J Mycol* 43, 196-199
26. Takamine K, Yoshizaki Y, Shimada S, Takaya S, Tamaki H, Ito K, Sameshima Y (2011) Estimation of the mechanism for cis and trans rose oxides formation in sweet potato *Shochu*. *J Brew Soc Japan*, 106, 50-57
27. Kirimura K, Kobayashi K, Ueda Y, Hattori T (2016) Phenotypes of gene disruptants in relation to a putative mitochondrial malate-citrate shuttle protein in citric acid-producing *Aspergillus niger*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 80, 1737-1746
28. Okutsu K, Yoshizaki Y, Kojima M, Yoshitake K, Tamaki H, Takamine K (2016) Effects of the cultivation period of sweet potato on the sensory quality of *imo-Shochu*, a Japanese traditional spirit. *J Inst Brew*, 122, 168-174
29. MFDS (2010) Korean Food Standards Codex. Ministry of Food and Drug Safety, Cheongwon, Korea
30. Imai Y, Tokutake S, Yamaji N, Suzuki M (1996) A new method of measuring glucose-forming activity in rice *koji*. *J Brew Soc Japan*, 91, 51-57
31. Shirokane Y, Tokutake S, Tobe K, Suzuki M (1996) Simple measurement of α -amylase activity in rice *koji*. *J Brew Soc Japan*, 91, 889-894
32. Imai Y, Tokutake S, Yamaji N, Suzuki M (1997) An improved method for measuring of α -glucosidase activity in rice *koji*. *J Brew Soc Japan*, 92, 296-302
33. Suzuki H, Imai Y, and Suzuki M (1999) A new assay for acid carboxypeptidase activity in *sake koji*. *J Brew Soc Japan*, 94, 588-592
34. Lee SS, Robinson FM, Wang HY (1981) Rapid determination of yeast viability. *Biotechnol Bioeng Symp*, 11, 641-649
35. NTS (2008) Official methods of analysis for alcoholic beverages. National Tax Service. Sejong, Korea, p 19-60
36. Rahayu YYS, Yoshizaki Y, Yamaguchi K, Okutsu K, Futagami T, Tamaki H, Sameshima Y, Takamine K (2017) Key volatile compounds in red *koji-Shochu*, a *Monascus*-fermented product, and their formation steps during fermentation. *Food Chem*, 224, 398-406
37. Park SJ, Park KW, Shin MS (2011) The cooking characteristics of high-yielding *Japonica* and *Tongil* type rice. *Korean J Food Cookery Sci*, 27, 35-743
38. RDA (2011) Standard food composition table, 8th revision. Rural Development Administration, Suwon, Korea, p 28
39. Narahara H (1994) *Koji*-mold and its product *koji*. *J Brew Soc Japan*, 89, 873-881
40. Mizuma T (2009) Analysis of water absorption characteristics of rice for *sake* brewing. *J Brew Soc Japan*, 104, 322-330
41. Shimoda M (1988) *Mugi Shochu*. *J Brew Soc Japan*, 94, 365-371
42. Hong SB, Hong SY, Jo KH, Kim YS, Do JH, Do JY, Noh SB, Yoon HH, Chung SH (2015) Taxonomic characterization and safety of *Nuruk* molds used industrially in Korea. *Kor J Mycol*, 43, 149 - 157
43. Iwano K, Fukuda K, Mikami S, Shinok S (1989) Difference in enzyme production by *Shochu koji* made with various commercial *Shochu* seed-*koji*. *J Brew Soc Japan*, 84, 179-182
44. Iwami A, Kajiwarra Y, Takashita H, Omori T (2005) Effect of the variety of barley and pearling rate on the quality of *Shochu koji*. *J Inst Brew*, 111, 309 - 315
45. Lewis MJ, Young, TW (2012) *Brewing* (second edition). Springer Science & Business Media. New York, USA, p 279-293
46. Bae SM (2003) Korean distilled beverage (*Soju*) brewing technology. Bae Sang Myun Brewery Institute, Seoul, Korea, p 115
47. Lee JK, Moon SH, Bae KH, Kim JH, Choi HS, Kim TW, Jeong C (2016) Distilled spirits. Kwangmoonkag Co, Paju, Korea, p 367-485

48. Yoshimoto H, Fukushige T, Yonezawa T, Sone H (2002) Genetic and physiological analysis of branched-chain alcohols and isoamyl acetate production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 59, 501-508
49. Kanauchi M (2012) Characteristics and Role of Feruloyl esterase from *Aspergillus awamori* in Japanese Spirits, 'Awamori' Production. In: Scientific, Health and Social Aspects of the Food Industry, Valdez B (Editor), InTech Co, Rijeka, Croatia, p 145-162
50. Nakama A, Kim EH, Shinohara K, Omura H (1993) Formation of furfural derivatives in amino-carbonyl reaction. *Biosci Biotech Biochem*, 57, 1757-1759
51. Holme HK, Lindmo K, Kristiansen A, Smidsrod O (2003) Thermal depolymerization of alginate in the solid state. *Carbohydr Polym*, 54, 431-438
52. Goto R, Thomas BR, Rodriguez RL, Kajiwara Y, Takashita H, Omori T (2002) Analysis of saccharides in barley *Shochu* mash using a fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis method. *J Brew Soc Japan*, 97, 143-149
53. Soga T, Serwe M (2000) Determination of carbohydrates in food samples by capillary electrophoresis with indirect UV detection. *Food Chem*, 69, 339-344
54. Ameer LA, Mathieu O, Lalanne V, Trystram G, Birlouez-Aragon I (2007) Comparison of the effects of sucrose and hexose on furfural formation and browning in cookies baked at different temperatures. *Food Chem*, 101, 1407-1416
55. Ferreira V, Lopez R, Cacho JF (2000) Quantitative determination of the odorants of young red wines from different grape varieties. *J Sci Food Agric*, 80, 1659-1667
56. Chin ST, Nazimah SAH, Quek SY, Man YBC, Rahman RA, Hashim DM (2007) Analysis of volatile compounds from Malaysian durians (*Durio zibethinus*) using headspace SPME coupled to fast GC-MS. *J Food Compos Anal*, 20, 31-44