ISSN (Print) 1225-9918
ISSN (Online) 2287-3406
Journal of Life Science 2020 Vol. 30. No. 2. 162~168 DOI : https://doi.org/10.5352/JLS.2020.30.2.162

Effects of Isoamyl Acetate Production in *Makgeolli* According to Fermentation Conditions

Choong Sung Song[1], Hyun-Mok Ju[2] and Jin Man Kim[1,2]*

[1]*Department of Biotechnology, Chonnam National University, Chonnam 59626, Korea*
[2]*Bluegreenkorea Co. Ltd., Chonnam 57209, Korea*

Received December 5, 2019 / Revised February 11, 2020 / Accepted February 11, 2020

Because of a continual reduction in its domestic market share, the quality of the Makgeolli, a Korean traditional liquor, needs to be upgraded. Among the several options for quality improvement, sufficient organoleptic expression of flavor is very important. We analyzed production changes of isoamyl acetate, which has a banana smell, based on fermentation temperature and sugar content through the cultivation of S. cerevisiae 98-5 KCCM 11396P using generally polished rice. The banana flavor of that fermentation mash was organoleptically high at 20℃, but a larger amount of isoamyl acetate was obtained with a higher sugar content at 10℃, based on analysis by GC-MS. Consequently, sufficient production of banana flavor from isoamyl acetate was based on the concentration of isoamyl alcohol as a substrate compound of isoamyl acetate, and the production depended highly on the maintenance of heat stability, since it is unstable in temperature and the minimized inhibition of alcohol acetyl transferase by unsaturated fatty acids. We also found that production of the flavor component required the addition of sugar and a slightly higher temperature of 20~25℃ at the beginning stage of fermentation, with additional mash fermentation and a gradual decrease in temperature to 10~15℃.

Key words : Glucose, isoamyl acetate, *makgeolli*, temperature, yeast

서 론

막걸리(탁주)는 전분질을 원료로 하여 병행복발효 방식으로 만들어지는 전통주의 한 가지 종류로 오랜 세월 즐겨 마셔온 술이다[1]. 현재도 주세법상으로 분류되는 모든 주종 가운데 2018년 기준 전체 출고량의 11.7%를 차지하고 있으며 특히 폭넓은 의미로 전통주로 분류될 수 있는 주류(탁주, 약주, 청주, 증류식소주, 일반증류주, 리큐르)의 출고량 중 91.5%를 차지하여 국민들에게 가장 사랑을 받는 전통주라고 할 수 있다[2].

2014년 430,896 KL였던 탁주 출고량은 지속적인 감소세를 보여 2018년 402,580 KL에 이른다. 전체 주류 출고량의 감소세 속에 막걸리 출고량의 감소 또한 피할 수 없는 현실로 다가와 이에 대한 전통주 업계의 적극적인 대응이 절실한 상황이며 막걸리의 고급화 또는 프리미엄화를 통해 부가가치를 높이는 방향으로 전환하는 것이 필요하다[3, 4].

쌀 등 유사한 전분질을 원료로 사용하여 병행복발효 방식으로 만드는 일본 사케의 경우에도 한국보다 훨씬 빠른 시기인 1975년 출고량 최고치를 달성한 이후에 지속적으로 출고량이 줄어들었으나[5] 프리미엄 사케 즉 고급화로 대응했던 제품군인 준마이슈(純米酒), 준마이긴죠슈(純米吟釀酒)에서 준마이슈는 2013년 50,000 KL에서 2017년 60,000 KL로 준마이긴죠슈는 2013년 35,000 KL에서 2017년 50,000 KL로 출고량이 반등하는 등 괄목할 만한 성과를 거두고 있다[6].

막걸리 뿐 아니라 대부분 주류 고급화에서 가장 중요한 요소는 술의 향기이며, 일본 프리미엄급 사케의 경우 오래 전부터 이른바 긴죠향의 존재 여부에 따라 사케 품질을 평가하였으며, 바나나향이라고 하는 isoamyl acetate와 서양배향이라고 하는 ethyl caproate가 긴죠향을 구성하는 대표적인 향기성분으로 알려져 있다[7]. 국외 주류의 향기 성분에 관한 연구로는 향기성분을 생산하는데 관여하는 단백질 합성의 유전자 정보와 발현 및 기작에 관한 연구는 이미 2000년대 초반에 확립이 되어 있으며[8-10] 최근에는 효모를 돌연변이 시켜 향기성분을 생산하는 방향으로 연구가 활발히 진행되고 있다[11, 12].

그러나 한국의 전통주 특히 대부분 막걸리의 경우에는 향기성분이 존재하지만[13] 소비자들이 관능적으로 인식할 수 있는 정도의 향기가 나타나지 않고 있다. 또한 대부분 보고된 연구에서는 탁주의 향기성분에 관련된 연구나[1, 3, 7, 14] 향기생성능력이 있는 효모의 분리·동정에 관한 연구만 있을 뿐[14-17], 이미 분리한 향기생성 능력이 우수한 효모를 이용하여 발효조건이 특정한 향기성분 생성량에 미치는 영향에 관한

*Corresponding author
Tel : +82-61-393-4141, Fax : +82-61-393-4140
E-mail : jinmank@jnu.ac.kr
This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

연구는 전무한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 한국식품연구원에서 분리한 바나나향기 생성 능력이 우수한 효모를 사용하여 상업적 생산 방식을 기준으로 발효조건에 따른 isoamyl acetate 생산의 효과를 확인하였다.

재료 및 방법

재료

막걸리 제조용 원료는 2018년산 조명1호(Jangseong Nonghyup, Jangseong, Korea)를 밀입국은 시중에 판매하는 밀입국(Ju Hyang Co. Ltd., Chungju, Korea)을 사용하였다. 사용한 효모는 *Saccharomyces cerevisiae* 98-5KCCM11396P (Korea Food Research Institute, Wanju, Korea)을 사용하였다. *S. cerevisiae* 98-5 KCCM11396P는 한국식품연구원에서 국산 전통누룩을 수집하여 분리 동정한 것으로 바나나향기의 생성 능력이 탁월한 것으로 알려져 있다. 쌀입국은 농업회사법인㈜청산녹수(Bluegreenkorea Co. Ltd., Jangseong, Korea)에서 실제 상업생산 현장에서 사용하기 위해 제작한 것으로 사용하였다.

담금 및 발효

S. cerevisiae 98-5 KCCM11396P는 Potato Dextrose Broth (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) 500 ml에 30℃에서 200 rpm으로 21시간 진탕 배양하여 0.5 ml씩 접종하였다.

담금은 농업회사법인㈜청산녹수에서 실제 상업생산에 사용하는 방법에서 효모 확대배양을 위한 1단 담금을 기초로 하여 Table 1-Table2와 같이 온도와 당농도를 달리 하여 7일간 발효하였다. 온도는 10℃, 15℃, 20℃와 25℃에서 발효하면서 당농도는 양조장에서 쉽게 구할 수 있는 설탕(Daehan Flour Mills Co., Ltd., Seoul, Korea)을 사용하여 0 g/l, 25 g/l, 50 g/l와 100 g/l로 각각 담금 하였다.

관능평가

관능평가는 Lee 등[18]의 방법을 일부 변형시켜 전남대학교 생명산업공학과 대학원생 10명을 훈련시켜 막걸리에서 향기 성분의 특성을 묘사하게 하고 강도를 1-5로 표시하게 하여 평균값을 구해 다각형 그림으로 나타냈고 강도 낮음1, 강도 높음5의 점수로 표시하여 그 평균값을 정량적 묘사 분석방법(quantitative descriptive analysis: QDA)으로 도식하였다. 향기 성분의 특성은 바나나향, 과일향, 너티향으로 분류하였다. 주류 업계에서 중요하게 생각하는 향은 과일향으로 알려져 있는데 이 과일향을 사케에서 중요시하는 바나나향과 달콤함을 표현하는 너티향으로 세분하고 나머지 향을 과일향이라고 명명하였다. 바나나향은 사케 및 여러 주종에서 중요하게 생각하는 향기로 isoamyl acetate가 가지는 특성으로 알려져 왔다. 과일향은 ethyl caproate로 대표되는 향인데 긴죠향의 대표 성분이며 상큼하고 서양배향으로 묘사되나 본 연구에서는 의미를 넓게 잡아 과일향으로 명명하였다[7]. 너티향은 주로 커피나 와인 맛을 표현하는 의미 중 하나로 널리 쓰이며 달콤하고 견과류 향을 표현한다[19].

Isoamyl acetate 정량분석

막걸리 시료는 10 ml을 원심분리관에 넣고 6,000 rpm (650 × g)으로 30분간 원심분리한 후, 상등액 4 ml를 취하여 0.45 μm membrane filter로 여과하고 gas chromatography의 분석 시료로 사용하였다.

Isoamyl acetate 분석은 gas chromatography (Shimadzu GC-2010, Shimadzu Co, Ltd. Kyoto, Japan)를 사용하였으며 column은 HP-1 (50 m × 0.20 mm id, × 0.50 μm film thickness, Agilent, Santa Clara, CA, USA)과 oven의 온도는 60℃에서 5분간 머물고 3℃/min로 상승시켜 200℃에서 5분간 유지한 후 다시 10℃/min로 상승시켜 240℃에서 20분간 머물렀다. 운반기체는 helium을 사용하여 21.7cm/sec로 유속을 설정하였으며 split rate는 1:5으로 하였다. FID (Flame Ionization Detector)로 isoamyl acetate를 검출하였고 이때 injection port와 FID의 온도는 각각 250℃와 280℃로 하였다. Isoamyl acetate 표준물질은 에탄올에 용해시켜 0.1~10 μg/ml 범위의 표준용액을 조제하여 peak area로부터 검량선을 작성하여 정량하였다.

이화학적 분석

관능평가에서 우수한 샘플을 중심으로 이화학적 분석을 실시하였다. 이는 실제 현장에서는 현실적으로 직접 향기를 맡는 관능적 평가에 의지할 수밖에 없기 때문이다. 에탄올 함량은 국세청 소정 방식에 따라 원심분리한 발효액을 증류한 다음 주정계(Dongmyong Measury Co. Ltd., Seoul, Korea)로 측정하였고, 총 산은 시료 10 ml를 0.1N NaOH (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)으로 중화적정한 후 소비 ml를 초산(acetic acid)로 측정하였다. 당도(brix)는 당도계(ATAGO, RX-

Table 1. Formulas for *Makgeolli* with difference temperature and glucose concentration

Sample	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Temperature (℃)	10	15	20	25	10	15	20	25	10	15	20	25	10	15	20	25
Wheat koji (g)	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200
Rice koji (g)	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200
Sucrose (g)	0	0	0	0	25	25	25	25	50	50	50	50	100	100	100	100
Water (g)	600	600	600	600	600	600	600	600	600	600	600	600	600	600	600	600

500a, Saitama, Japan)로 측정하였다.

결 과

온도에 따른 향기 성분 관능평가

당농도는 0 g/l로 일정하고 발효온도에 따른 향기 성분 관능평가는 Fig. 1과 같다. 발효온도 25℃에서 발효된 샘플에서 전체적인 평가가 4.8±0.42로 가장 높은 결과를 보여주지만 바나나향은 3.8±0.63로 4.5±0.52를 기록한 발효온도 20℃에 비해 낮은 평가를 받았다. 발효온도 10℃와 15℃에서는 전반적으로 향기 성분 평가는 낮은 결과를 보여준다. 발효온도 20℃에서는 전체적인 평가가 25℃에서보다 약간 낮은 4.6±0.69를 기록하였지만 기타 과일향이나 너트향의 평가가 상대적으로 낮아 바나나향의 순도면에서는 가장 높은 평가를 받았다. 발효온도 15℃의 경우도 전체적인 평가는 25℃에 비해 낮은 3.5±0.52를 기록했지만 기타 과일향이나 너트향의 평가가 20도나 25도에 비해 낮게 나와 바나나향이 4.2±0.91로 평가되어 오히려 바나나향의 순도면에서는 25℃에 비해 높은 평가를 받았다.

발효 온도 20℃에서 당농도에 따른 향기 성분 관능평가

가장 높은 순도의 바나나향의 관능평가를 받은 발효온도 20℃에서 당농도를 달리하여 향기성분 관능평가를 진행하였다(Fig. 2). 20℃에서 발효된 막걸리는 당농도 변화에 따라 향기성분에 대한 관능평가의 변화를 보여주지 못했다.

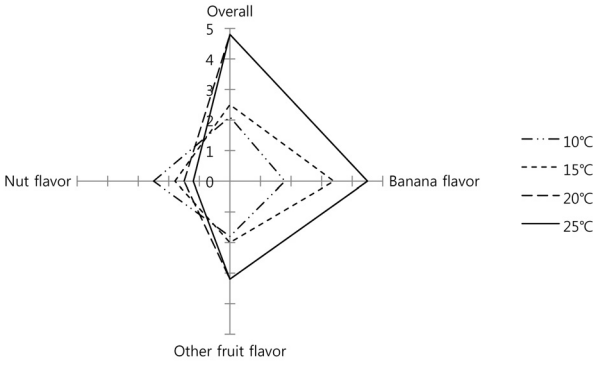

Fig. 1. Sensory evaluation of volatile flavor in the *Makgeolli* with difference temperature.

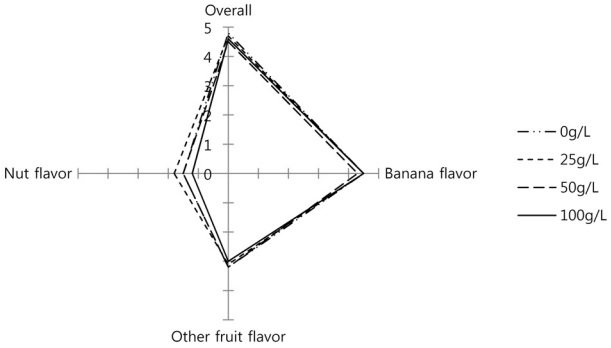

Fig. 2. Sensory evaluation of volatile flavor in the *Makgeolli* with difference sugar concentration (at 20℃).

발효조건에 따른 최종 이화학 분석

가장 높은 바나나향기로 평가받은 발효온도 20℃에서만 당농도 변화에 따른 막걸리의 최종 이화학 분석을 실시하였다(Table 2). 당농도 0 g/l에서는 에탄올 17.3±0.20%, 총산도 0.21±0.06, 잔당 14.43±0.38 brix였으며 당 농도 25 g/l에서는 에탄올 20.2±0.26%, 총산도 0.22±0.06, 잔당 15.47±0.21 brix를 각각 확인하였다. 당 농도50g/l에서는 에탄올 19.07±0.92%, 총산도 0.23±0.01, 잔당 15.7±0.10 brix로 분석되었으며 당 농도100 g/l에서는 에탄올 19.13±0.15%, 총산도 0.03±0.01, 잔당 16.43±0.05 brix로 분석되었다.

발효조건에 따른 isoamyl acetate 정량분석

발효조건에 따른 isoamyl acetate 정량분석은 Table 3과 같다. 모든 샘플에서 isoamyl acetate가 검출되었고, 발효온도 10

Table 2. Physicochemical components analysis of final selective *Makgeolli*

Sugar concentrations (g/L)	Ethanol content (%)	Total acidity	Sugar content (Brix)
10	17.3±0.20	0.21±0.01	14.43±0.38
15	20.2±0.26	0.22±0.01	15.47±0.21
20	19.07±0.92	0.23±0.01	15.70±0.10
25	19.13±0.15	0.03±0.01	16.43±0.05

Table 3. Quantitative analysis of isoamyl acetate according to fermentation conditions

Fermentation temperature (℃)	Sugar concentrations (g/l)	Isoamylacetate concertation (μg/ml)
10	0	5.97±0.031
	25	6.32±0.033
	50	6.65±0.035
	100	5.21±0.027
15	0	1.78±0.009
	25	1.52±0.007
	50	1.19±0.006
	100	0.73±0.004
20	0	3.54±0.018
	25	3.71±0.018
	50	3.80±0.019
	100	4.19±0.021
25	0	2.33±0.011
	25	2.93±0.014
	50	4.25±0.020
	100	5.22±0.026

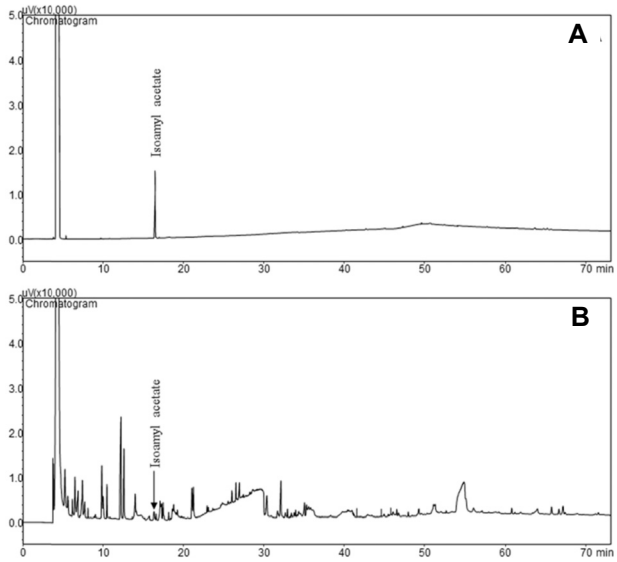

Fig. 3. Quantitative analysis of maximum isoamyl acetate concentration according to fermentation conditions. A) Isoamyl acetate standard, B) 10-50 makgeolli sample

℃에서 5.21~6.65 μg/ml로 가장 높게 나타났고 발효온도 25℃에서 2.33~5.22 μg/ml 발효온도 20℃ 3.54~4.19 μg/ml 발효온도 15℃에서 0.73~1.78 μg/ml로 가장 낮게 분석되었다. 특히 발효온도 10℃ 당 농도 50 g/l에서 6.65 μg/ml로 가장 높게 분석되었고(Fig. 3) 모든 발효온도 조건에서 당농도의 변화에 따라 isoamyl acetate 생성량의 변화가 나타난 것으로 분석되었다.

고 찰

대표적인 바나나향기 성분으로 알려져 있는 isoamyl acetate는 효모발효과정 중 isoamyl alcohol과 acetyl CoA와 alcohol이 acetyltransferase에 의해 생산되는 성분이다[20]. Alcohol acetyltransferase를 발현하는 유전자인 *ATF1*은 고온(heat)과 불포화지방산(unsaturated fatty acids) [11], 산소(oxygen) [21] 그리고 에탄올(ethanol) 스트레스[22] 등에 의해 발현에 제한을 받는 것으로 알려져 있다. Isoamyl acetate를 사케의 중요한 향기성분으로 인식하는 일본에서는 불포화지방산이 *ATF1*의 발현을 억제하는 것을 방지하기 위해 사케 제조과정에서 필수적으로 쌀을 60% 이하(40% 이상을 깎아 냄)로 도정하여 불포화지방산이 많은 쌀의 외곽층을 제거하고 불포화지방산에 의한 *ATF1*의 저해를 적게 받는 Yeast mutant를 사용하며[12] 장기간 저온에서 사케를 제조하는 것을 기본으로 한다[12]. 반면에 막걸리의 경우에서는 쌀의 도정을 많이 하고 저온에서 장기간 발효할수록 급격한 생산원가 상승요인으로 작용하기 때문에 도정을 통해 쌀에 존재하는 불포화지방산을 제거하는 것과 저온발효는 매우 곤란한 것으로 받아들여지고 있다.

농업회사법인㈜청산녹수에서는 2018년 2월부터 신제품 막걸리 개발과정에서 한국식품연구원에서 분양 받은 효모인 *S. cerevisiae* 98-5 KCCM11396P를 막걸리 발효에 사용해왔다. 이 과정에서 도정을 많이 하지 않은 일반적인 주식용 쌀을 막걸리 제조에 사용했음에도 불구하고 수 차례 총 4번으로 나누어 담금 하는 발효과정과 25℃ 내외의 발효 초반기에 매우 강렬한 바나나 향기가 발생하는 것에 주목해왔다. 그러나 이 바나나 향기 발생량의 정도가 일정하지 않고, 발효 초반보다 후반으로 갈수록 향기가 적어져, 실제 제품화 단계에서는 관능적으로 느낄 수 있을 정도의 향기로 남는 경우보다 그렇지 않은 경우가 많았다.

이번 연구에서는 동일한 효모를 사용하되, 양조장에서 현실적으로 제어 가능한 변수인 발효 온도와 당 농도 조건을 달리하여 isoamyl acetate 발생량을 비교하였다. 그 결과 관능평가에서는 당 농도 조건에 따라서 바나나향기 생성량의 변화를 느낄 수 있을 정도의 차이는 나타나지 않았으나, 발효 온도에 따라서는 관능적으로 구분할 수 있는 차이가 나타났다. 전체적인 막걸리의 향기에서는 발효온도 25℃ > 20℃ > 15℃ > 10℃의 순서로 향기가 강하게 느껴지는 것으로 분석되었는데, 이는 7일간의 발효기간 동안 온도가 높을수록 발효가 빠르고 왕성하게 진행되며 여러 복합적 향기성분이 다량 생성되기 때문이다. 반면에 순수한 바나나향기로 인식되는 발효온도는 20℃ > 15℃ > 25℃ > 10℃의 순서로 강하게 느껴지는 것으로 분석되었는데, 발효온도 25℃가 20℃와 15℃보다 낮게 나타나는 것은 발효온도가 높아 발효가 왕성하여 너티향과 과일향이 바나나향기와 섞여 순수한 바나나 향기로 인식되기가 어렵기 때문인 것으로 판단된다.

GC-MS 분석결과는 관능평가와는 차이를 보인 것으로 분석되었는데, 발효온도 10℃ > 25℃ > 20℃ > 15℃의 순서로 isoamyl acetate 성분이 많이 검출되었다. 정량분석 결과 발효온도 10℃에서 관능평가와는 상이하게 가장 높은 결과가 나타난 것은 isoamyl acetate의 역치가 와인이 0.03 ppm 맥주가 1.2 ppm이지만[23], 그에 반해 고형분을 다량 함유하고 있는 막걸리의 경우는 역치가 이보다 높을 수 있지만 발효온도 15℃의 isoamyl acetate가 0.73~1.78 ppm임에도 관능적으로 바나나향기로 인식한 것은 낮은 온도에서 발효가 천천히 진행되어 바나나향기 이외의 다른 향기 성분의 생성량이 적어 바나나향기를 높게 인식한 것으로 추정된다.

또한 GC-MS 분석결과에서 관능평가 분석결과와는 반대로 발효온도 20℃보다 25℃에서 isoamyl acetate가 많은 것으로 나타났는데, 관능평가에서 너티향과 과일향으로 인식되는 향기들이 지나치게 많을 경우에는 오히려 바나나향기로 인식되는데 방해가 될 수 있는 것으로 판단된다. 즉 바나나 향기의 대표 성분으로 알려진 isoamyl acetate는 역치 이상이 되더라도 다른 향기와 함께 혼재되어 있는 경우에 바나나 향기로

관능적으로 인식되기 쉽지만, 다른 향기가 일정량을 넘게 되면 오히려 인식에 저해를 줄 수도 있을 것으로 추정된다.

GC-MS 분석결과발효온도 10℃ > 25℃ > 20℃ > 15℃의 순서로 isoamyl acetate 성분이 높게 분석되었다. 이와 관련하여 Matsuura 등[24]에 의하면 동일 발효조건에서 온도를 달리한 발효 결과 isoamyl acetate의 생성 량 최고치가 발효온도 20℃(6.10 ppm) > 25℃(5.50 ppm) > 15℃(4.20 ppm)> 10℃(2.50 ppm)의 순서로 많았던 보고와 차이를 보인다. 이는 각각의 조건에서 isoamyl acetate 축적량이 최고치에 달한 시점에서 정량 한 것을 보고한 것으로 본 연구에서는 동일 시점에서 샘플을 채취하여 분석한 결과여서 차이가 발생한 것으로 추정된다.

본 GC-MS 분석결과에서 발효온도 10℃ > 25℃ > 20℃ > 15℃의 순서로 isoamyl acetate가 높게 분석된 것은 isoamyl acetate 합성의 기질인 isoamyl alcohol의 축적량과 발효가 진행되면서 isoamyl acetate가 분해되었을 가능성이 높은 것으로 보인다. Matsuura 등[24]의 같은 연구에 의하면 isoamyl alcohol 축적량은 ethanol 축적량과 정비례하지만 isoamyl acetate 축적량은 일관된 경향을 보이지 않고 오히려 생성 수율이 ethanol 축적량이 증가할수록 감소하는 것으로 보고한 것과 유사하다. 본 연구에서는 발효온도 10℃에서 가장 높게 isoamyl acetate가 정량 된 것은 발효가 원활한 온도인 발효온도 25℃ > 20℃ > 15℃의 순서로 발효 초반 isoamyl alcohol이 다량 발행하게 된다. 그리고 isoamyl acetate가 합성된 이후 발효가 진행되며 온도와 불포화지방산 등에 의해 급격히 alcohol acetyltransferase의 안정도가 떨어지며 불활성화되어 추가적인 isoamyl acetate가 생성되지 않고 오히려 가수분해된다는 보고와 일치한다. 특히나 막걸리의 경우 도정을 많이 하지 않은 쌀을 원료로 사용하기에 불포화지방산과 열에 의한 저해가 더욱 심했을 것으로 추정된다. 반면 완만한 발효 온도이고 열에 의한 alcohol acetyltransferase 활성 저해를 덜 받는 발효조건 10℃에서는 발효초반 보다 후반으로 갈수록 서서히 isoamyl alcohol의 축적량이 증가하면서 isoamyl acetate가 지속적으로 축적된 것으로 보인다. Kuriyama 등[25]의 연구에서도 alcohol acetyltransferase의 활성이 20℃~30℃에서 가장 높게 나타났으나 20℃부터 급격하게 안정성이 떨어지는 것으로 보고하였다.

GC-MS 분석결과에서 관능평가 분석결과와는 다르게 발효조건 15℃를 제외하고는 당농도의 증가에 따라 isoamyl acetate가 증가하는 것으로 분석되었는데 이는 Plate 등[26]의 연구에서 포도와인 제조 시 glucose 추가함에 따라 isoamyl acetate의 생성량이 증가한 보고와 일치한다. 다만 본 연구에서 발효온도 15℃에서는 당 농도 증가와 isoamyl acetate량이 반비례하는 것으로 분석되었는데 전반적인 isoamyl acetate 생성량이 낮기 때문인 것으로 추정되며, 발효온도 10℃에서는 가장 높은 당농도가 가장 낮게 정량 되었는데 이는 낮은 온도와 높은 당 저해로 인해 발효가 상대적으로 더디게 진행된 것으로 생각된다.

이상의 분석결과 *S. cerevisiae* 98-5 KCCM11396P는 막걸리 제조에 사용되는 일본처럼 도정을 많이 하지 않은 일반적인 도정율의 쌀로도 바나나향기를 합성할 가능성이 높다고 판단되어진다. 최근 Takahashi 등[12]은 불포화지방산에 의해 *ATF1*의 발현이 억제되지 않는 Yeast mutant를 발견하여 도정을 많이 하지 않은 쌀로도 높은 isoamyl acetate를 생성할 수 있다고 보고하였는데, *S. cerevisiae* 98-5 KCCM11396P도 유사한 특성을 가지고 있어 막걸리 제조에 사용하는 일반 쌀로도 소비자가 관능적으로 바나나향기를 느낄 수 있을 정도의 isoamyl acetate 생성이 가능할 것으로 판단된다.

다만 발효 초반 isoamyl alcohol 생성 량 및 alcohol acetyltransferase의 열에 의한 안정성 및 불포화지방산에 의한 저해, 저온발효로 인한 원가 부담을 감안하여 발효 초반 당농도와 온도 20℃~25℃로 높게 유지하며 소비자들이 관능적으로 바나나 향기를 인식할 수 있도록 isoamyl acetate 이외의 향기성분을 생성시키면서 연속적으로 추가 담금을 해가며 단계적으로 온도를 10℃~15℃까지 낮추는 Matsuura 등[24]이 제안한 방법을 적용하면 보다 효과적으로 막걸리에서 바나나 향기를 생성시킬 수 있을 것으로 기대된다.

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

1. Chang, K. J. and Yu, T. J. 1981. Studies on the components of Sokokju, and commercial Yakju. *Kor. J. Food Sc.i Technol.* **13**, 307-313.
2. Liquor Tax Report, National Tax Service of Korea [https://stats.nts.go.kr/early/major_detail.asp?year=2019&catecode=A10001]
3. Kim, S. H., Kang, J. G. and Jung, B. W. 2016. A Study on Makgeolli characteristics which is consumers prefer by types of premium Makgeolli. *KJAMP* **43**, 511-538.
4. Kim, H. R., Jo, S. J., Lee, S. J. and Ahn, B. H. 2008. Physicochemical and sensory characterization of a Korean traditional rice wine prepared from different ingredients. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **40**, 551-557.
5. Kazuoka, T. 2015. Isolation of sake brewing yeast and its practical use. *J. Brew. Soc. Japan* **110**, 298-305.
6. Liquor Tax Report, National Tax Service of Japan [https://www.nta.go.jp/taxes/sake/shiori-gaikyo/seizojokyo/07.htm]
7. Yoshizawa, K. 1999. Sake: Production and flavor. *Food Rev. Int.* **15**, 83-107.
8. Fujii, T., Yoshimoto, H. and Tamai, Y. 1996. Acetate ester production by Saccharomyces cerevisiae lacking the ATF1

gene encoding the alcohol acetyltransferase. *J. Ferment. Bioeng.* **81**, 538-542.
9. Fukuda, K., Kuwahata, O., Kiyokawa, Y., Yanagiuchi, T., Wakai, Y., Kitamoto, K., Inoue, Y. and Kimura, A. 1996. Molecular cloning and nucleotide sequence of the isoamyl acetate-hydrolyzing esterase gene (EST2) from Saccharomyces cerevisiae. *J. Ferment. Bioeng.* **82**, 8-15.
10. Fukuda, K., Yamamoto, N., Kiyokawa, Y., Yanagiuchi, T., Wakai, Y., Kitamoto, K., Inoue, Y. and Kimura, A. 1998. Brewing properties of sake yeast whose EST2 gene encoding isoamyl acetate-hydrolyzing esterase was disrupted. *J. Ferment. Bioeng.* **85**, 101-106.
11. Hirooka, K., Yamamoto, Y., Tsutsui, N. and Tanaka, T. 2005. Improved production of isoamyl acetate by a sake yeast mutant resistant to an isoprenoid analog and its dependence on alcohol acetyltransferase activity, but not on isoamyl alcohol production. *J. Biosci. Bioeng.* **99**, 125-129.
12. Takahashi, T., Ohara, Y., Sawatari, M. and Sueno, K. 2017. Isolation and characterization of sake yeast mutants with enhanced isoamyl acetate productivity. *J. Biosci. Bioeng.* **123**, 71-77.
13. Lee, J. S., Lee, T. S., Park, S. O. and Noh, B. S. 1996. Flavor components in mash of Takju Prepared by different raw materials. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **28**, 316-323.
14. Kim, H. R., Baek, S. H., Seo, M. J. and Ahn, B. H. 2006. Feasibility of Cheonghju brewing with wild type yeast strains from Nuruks. *Kor. J. Microbiol.* **34**, 244-249.
15. Kim, H. R., Kwon, Y. H., Jo, S. J., Kim, J. H. and Ahn, B. H. 2009. Characterization and Volatile flavor components in glutinous rice wines prepared with different yeasts of Nuruks. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **41**, 296-301.
16. Baek, S. Y., Lee, Y. J., Kim, J. H. and Yeo, S. H. 2015. Isolation and Characterization of wild yeasts for improving liquor flavor and quality. *MBL* **43**, 56-64.
17. Shin, K. R., Kim, B. C., Yang, J. Y. and Kim, Y. D. 1999. Characterization of Yakju prepared with yeasts from fruits - 1. volatile components in Yakju during fermentation. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **28**, 794-800.
18. Lee, D. H., Kim, J. H. and Lee, J. S. 2009. Effect of pears on the quality and physiological functionality of Makgeoly. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **22**, 606-611.
19. Choi, J. H. 2004. Etude des mots du vin de la langue française au point de vue sémiotico-culturel. *REVUE D'ETUDES FRANCO-COREENNES* **28**, 435-456.
20. Kang, J. E., Jeong, S. T., Kim, C. W., Baek, S. Y. and Yeo, S. H. 2017. Soju brewing characteristics of yeast strains N4 and N9 isolated from Korean traditional Nuruk. *Kor. J. Food Preserv.* **24**, 714-724.
21. Fujii, T., Kobayashi, O., Yoshimoto, H., Furukawa, S. and Tamai, Y. 1997. Effect of aeration and unsaturated fatty acids on expression of the Saccharomyces cerevisiae alcohol acetyltransferase gene. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 910-915.
22. Verstrepen, K. J., Derdelinckx, G., Dufour, J. P., Winderickx, J., Pretorius, I. S., Thevelein, J. M. and Delvaux, F. R. 2003. The Saccharomyces cerevisiae alcohol acetyl transferase gene ATF1 is a target of the cAMP/PKA and FGM nutrient-signalling pathways. *FEMS Yeast Res.* **4**, 285-296.
23. Saerens, S. M., Delvaux, F. R., Verstrepen, K. J. and Thevelein, J. M. 2010. Production and biological function of volatile esters in Saccharomyces cerevisiae. *Microb. Biotechnol.* **3**, 165-177.
24. Matsuura, K., Hirotsune, M., Hamachi, M. and Nunokawa, Y. 1992. Thermal control strategy for isoamylacetate formation in sake brewed with a saccharified rice solution. *J. Ferment. Bioeng.* **74**, 112-116.
25. Kuriyama, K., Ashida, S., Saito, Y., Suginami, K. and Imayasu, S. 1986. Alcohol acetyltransferase of sake yeast. : The enzymatic studies of sake brewing (IV). *Hakkokogaku Kaishi* **64**, 169-173.
26. Plata, C., Mauricio, J. C., Millán, C. and Ortega, J. M. 2005. Influence of glucose and oxygen on the production of ethyl acetate and isoamyl acetate by a Saccharomyces cerevisiae strain during alcoholic fermentation. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **21**, 115-121.

초록 : 막걸리 발효조건에 따른 isoamyl acetate 생성 비교

송충성[1] · 주현목[2] · 김진만[1,2]*
([1]전남대학교 공학대학 생명산업공학과, [2]농업회사법인㈜청산녹수)

전통주를 대표하는 주종인 막걸리는 최근 지속적인 출고량의 감소세를 보여 막걸리의 고급화 또는 프리미엄화가 필요한 시점이다. 고급화를 위해서는 술의 향기가 중요한데 대부분 막걸리의 경우에 소비자들이 관능적으로 인식할 수 있는 정도의 향기가 나타나지 않고 있다. 이에 본 연구에서는 *Saccharomyces cerevisiae* 98-5KCCM11396P 효모와 isoamyl acetate의 합성을 저해하는 unsaturated fatty acid가 존재하는 일반적인 도정율의 쌀을 사용하여 발효온도와 당농도를 달리하여 대표적인 바나나 향기인 isoamyl acetate 생성량의 변화를 분석하였다. 그 결과 발효온도 20℃에서 관능적으로 바나나향기를 가장 잘 느낄 수 있었으며 GC-MS 분석결과에는 발효온도 10℃와 당농도가 높을수록 isoamyl acetate가 다량 정량 되었다. 이에 막걸리 담금 과정에서 발효 초반 isoamyl acetate의 기질인 isoamyl alcohol 생성량을 증가시키고 alcohol acetyltransferase의 열에 의한 안정성 및 불포화지방산에 의한 저해를 최소화해야 한다. 또한 저온발효로 인한 생산 원가 부담을 감안하여, 발효 초반 당성분을 보충해주고 발효 온도를 20℃~25℃로 높게 유지해야한다. 이후 관능적으로 바나나 향기를 인식할 수 있도록 isoamyl acetate 이외의 향기성분을 생성시키면서 연속적으로 추가 담금을 해가며 단계적으로 온도를 10℃~15℃까지 낮추는 방법을 통해 효과적으로 막걸리에서 바나나 향기를 생성시킬 수 있을 것으로 기대된다.