

과제번호
119112-
01

보안 과제(), 일반 과제(0) / 공개(0), 비공개()발간등록번호(0)
고부가가치식품기술개발사업 2021년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-003411-01

막걸리의
쓴맛
원인
규명
및
저감화
기술
개발

2021

농림식품기술기획평가원
농림축산식품부

막걸리의 쓴맛 원인 규명 및 저감화 기술 개발

2021. 02. 26.

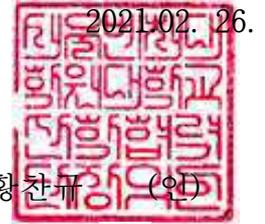
주관연구기관 / 서울벤처대학원대학교 산학협력단
협동연구기관 / 농업회사법인 (주)솔샘
농업회사법인 (주)장희
농업회사법인 (주)화천주가

농림축산식품부
(전문기관)농림식품기술기획평가원

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “막걸리의 쓴맛 원인 규명 및 저감화 기술 개발” (개발기간 : 2019. 12. 2~ 2020. 12. 1)과제의 최종보고서로 제출합니다.



주관연구기관명 : 서울벤처대학원대학교 산학협력단	황찬규 (인)
협동연구기관명 : 농업회사법인 (주)술샘	정경순 (인)
농업회사법인 (주)장희	장정수 (인)
농업회사법인 (주)화천주가	이창규 (인)

주관연구책임자 : 정철

협동연구책임자 : 정경순, 장정수, 이창규

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

보고서 요약서

과제고유번호	119112-01	해 당 단 계 연구 기 간	2019. 12. 2.~ 2020. 12. 1	단 계 구 분	1차년도/1차년도
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	고부가가치식품기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	막걸리 쓴맛 원인규명 및 저감화 기술 개발			
	세 부 과 제 명	막걸리 쓴맛 원인규명 및 저감화 기술 개발			
연구책임자	해당단계 참여연구원 수	총: 9 명 내부: 7 명 외부: 2 명	해당단계 연구개발비	정부 : 150,000 천원 민간 : 50,000 천원 계 : 200,000 천원	
	총 연구기간 참여연구원 수	총: 9 명 내부: 7 명 외부: 2 명	총 연구 개발비	정부 : 150,000 천원 민간 : 50,000 천원 계 : 200,000 천원	
연구기관명 및 소속부서명	서울벤처대학원대학교 산학협력단		참여기업명 농업회사법인 (주)솔샘 농업회사법인 (주)장희 농업회사법인 (주)화천주가		
국제공동연구	상대국명: 해당없음		상대국 연구기관명: 해당없음		
위탁연구	연구기관명: 해당없음		연구책임자: 해당없음		
※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음					
연구개발성과 의 보안등급 및 사유					

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호											

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입기관	연구시설· 장비명	규격 (모델명)	수량	구입연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	NTIS 등록번호

요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다) 보고서 면수

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<input type="checkbox"/> 막걸리 쓴맛의 학술적 원인 규명 연구 <input type="radio"/> 막걸리의 쓴맛 원인규명을 위한 원료(쌀)분석 <input type="radio"/> 막걸리의 쓴맛 원인규명을 위한 국(입국, 누룩)분석 <input type="radio"/> 막걸리 제조공정 연구 <input type="checkbox"/> 막걸리 쓴맛 저감화를 위한 기술 개발 연구 <input type="radio"/> 원료처리 기술 개선 연구 <input type="radio"/> 쓴맛 흡착제 또는 은폐제 처리 기술 연구 <input type="radio"/> 효소제를 이용한 쓴맛 제거 기술 연구 <input type="radio"/> 쓴맛 제거를 통한 신 공정도 및 레시피 개발																																						
<p>연구개발성과</p>	<p>정량적 성과</p> <table border="1" data-bbox="480 763 1404 994"> <thead> <tr> <th rowspan="2">구분</th> <th rowspan="2">논문</th> <th rowspan="2">특허</th> <th rowspan="2">보고서 원문</th> <th rowspan="2">연구 시설 · 장비</th> <th rowspan="2">기술 요약 정보</th> <th rowspan="2">소프 트웨 어</th> <th rowspan="2">화합 물</th> <th colspan="2">생명자원</th> <th colspan="2">신품종</th> </tr> <tr> <th>생 명 정 보</th> <th>생 물 자 원</th> <th>정 보</th> <th>실 물</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>예상성과 (N/Y)</td> <td>N</td> <td>N</td> <td>Y</td> <td>N</td> <td>N</td> <td>N</td> <td>N</td> <td>N</td> <td>N</td> <td>N</td> <td>N</td> </tr> </tbody> </table>											구분	논문	특허	보고서 원문	연구 시설 · 장비	기술 요약 정보	소프 트웨 어	화합 물	생명자원		신품종		생 명 정 보	생 물 자 원	정 보	실 물	예상성과 (N/Y)	N	N	Y	N	N	N	N	N	N	N	N
구분	논문	특허	보고서 원문	연구 시설 · 장비	기술 요약 정보	소프 트웨 어	화합 물	생명자원		신품종																													
								생 명 정 보	생 물 자 원	정 보	실 물																												
예상성과 (N/Y)	N	N	Y	N	N	N	N	N	N	N	N																												
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<input type="checkbox"/> 양조기술적 측면 <input type="radio"/> 프리미엄급 막걸리 제조기술 확보에 따른 전통주 시장확대 <input type="checkbox"/> 경제적·산업적 측면 <input type="radio"/> 프리미엄급 막걸리 제조기술 확보에 따른 전통주 시장확대 <input type="radio"/> 고품질의 막걸리 개발을 통한 소비자의 막걸리 선호도 제고 <input type="radio"/> 막걸리의 판매호조에 따른 전통주산업 활성화 및 수출활성화 <input type="radio"/> 국내 쌀소비 촉진에 따른 지역농산물 소비 진작																																						
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>막걸리</p>	<p>쓴맛</p>	<p>발효제</p>	<p>숙성</p>	<p>효소제</p>																																		
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>Makgolli</p>	<p>Bitter taste</p>	<p>Fermenter</p>	<p>Matutstion</p>	<p>Enzyme</p>																																		

요약문

○ 연구개발 목표 및 성과

1. 막걸리 쓴맛의 학술적 원인 규명 연구

- 막걸리의 쓴맛 원인규명을 위한 원료(쌀)분석
- 막걸리의 쓴맛 원인규명을 위한 국(입국, 누룩)분석
- 막걸리 제조공정 연구

2. 막걸리 쓴맛 저감화를 위한 기술 개발 연구

- 원료처리 기술 개선 연구
- 쓴맛 흡착제 또는 은폐제 처리 기술 연구
- 효소제를 이용한 쓴맛 제거 기술 연구
- 쓴맛 제거를 통한 신 공정도 및 레시피 개발

3. 성과

- 기술이전(3건), 학술발표(1건)

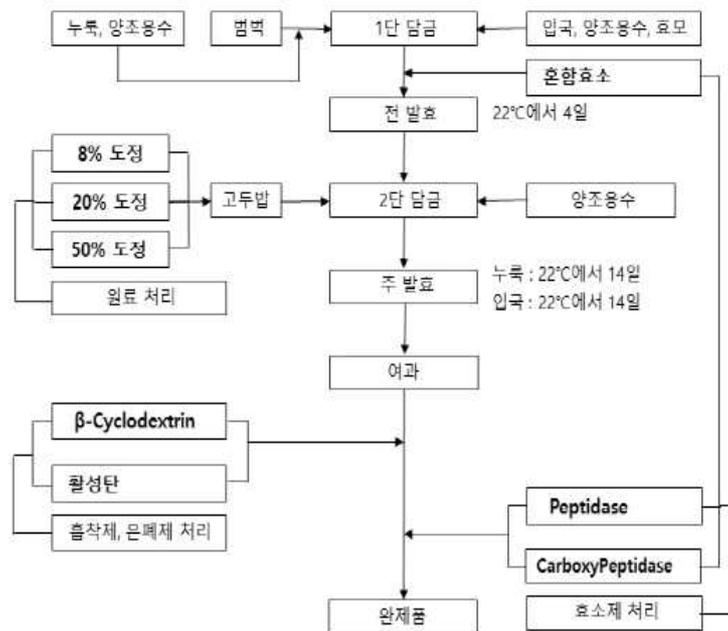
○ 연구내용 및 결과

1. 막걸리 쓴맛의 학술적 원인 규명

- 곡물(쌀, 밀 등) 자체 효소 또는 미생물의 단백질 분해효소(엔도펩티다아제, 카르복시펩티다아제, 아미노펩티다아제, 디펩티다아제)에 의해 곡물의 단백질이 일차적으로 분해가 되면서 펩타이드 등의 분해산물이 생성되고 이때 다양한 맛이 생성된다.
- 이후 펩타이드 등은 효소 또는 화학반응에 의해 2차적으로 아미노산과 그 유도체 등으로 다시 분해된다. 아미노산의 유도체(락토일 아미노산, 숙시닐 아미노산, 피로글루탐산 펩타이드, 감마 글루타밀 펩타이드, 마이알반응 부산물)는 감칠맛을 부여한다.
- 1, 2차 단백질 분해에 관여하는 미생물은 세균과 곰팡이이며, 특히 세균 중에는 젖산균(스타펠로코커스)이 그리고 곰팡이 중에는 아스퍼질러스속이 주로 관여한다. 이 미생물들은 펩타이드와 아미노산 생성과 관련 있는 효소를 분비한다.
- 누룩과 입국으로 제조한 막걸리내 쓴맛 규명을 위해 아미노산 서열을 분석한 결과, 선행연구에서 밝혀진 쓴맛 펩타이드로 측정값의 오차값 이내로 들어오는 네 개의 펩타이드를 확인하였고 쓴맛을 유발하는 펩타이드로 판단된다. 4 개의 펩타이드는 LPFNQL(Leu-Pro-Phe-Asp-Iu-Leu), RLL(Arg-Leu-Leu), RRPF(Arg-Arg-Pro-Pro-Phe), RPF(Arg-Pro-Phe) 등이다
- 선행연구에 사용된 식품의 재료와 가공 방법과 이번 실험의 재료와 가공 방법의 차이가 있을 것으로 보인다. 가령 일본의 Sake는 쌀과 koji라는 발효제를 사용하지만, 국내에서는 누룩과 입국을 발효제를 사용한다. 이에 따라 사용하는 원료나 가공공정에 따라 술에 쓴맛을 부여하는 펩타이드의 종류는 다양할 것으로 판단되며, 본 연구에서는 선행연구에서 밝혀진 펩타이드 질량값을 기준으로 분석치가 오차내 들어오는 아미노산 서열을 쓴맛을 나타내는 펩타이드로 분류하였다.

2. 막걸리 쓴맛 저감화 연구

- 본 연구에서 막걸리 쓴맛 원인 규명 및 저감화를 위한 방안으로는 아래 그림과 같이 쌀을 50% 이상 도정하는 방안과 효소제 투입 및 은폐제 투입이 제시되었다. 각 효소제별 최적 투입량은 본 보고서 연구결과에 제시되었으며, 시제품과 관능평가를 통해 막걸리의 쓴맛 원인과 저감화를 달성하였다.



○ 연구성과 활용실적 및 계획

- 프리미엄급 막걸리 제조기술 확보에 따른 전통주 시장확대
- 프리미엄급 막걸리 제조기술 확보에 따른 전통주 시장확대
- 고품질의 막걸리 개발을 통한 소비자의 막걸리 선호도 제고
- 막걸리의 판매호조에 따른 전통주산업 활성화 및 수출활성화
- 국내 쌀소비 촉진에 따른 지역농산물 소비 진작

< 목 차 >

제1장 연구개발과제의 개요	1
1절 연구개발의 필요성	1
1. 연구개발의 개요	1
2. 연구개발 대상의 국내·외 현황	3
2절 연구개발의 목표 및 내용	4
1. 연구개발의 최종목표	4
2. 연차별 개발목표 및 내용	5
3절 연구개발의 추진전략·방법 및 추진체계	6
1. 연구개발 추진전략	6
2. 추진 일정	7
제2장 연구수행 내용 및 결과	8
1절 연구수행 내용	8
1. 선행연구	8
2. 분석방법	16
2절 연구수행 결과	19
1. 막걸리 쓴맛 원인 규명을 위한 원료(쌀) 분석	19
2. 막걸리 쓴맛 원인 규명을 위한 국(누룩, 입국) 분석	19
3. 막걸리 제조공정 연구	21
4. 교반 시간에 따른 연구	21
5. 막걸리 쓴맛의 학술적 원인 규명 연구	29
6. 원료처리 개선 연구	46
7. 쓴맛 흡착제 또는 은폐제 처리 기술 연구	57
8. 효소제를 이용한 쓴맛 제거 기술 연구	68
9. 쓴맛 제거를 통한 신 공정도 및 레시피 개발 사업화 성과 및 매출실적	87 89
제3장 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	90
1절 목표	90
2절 목표 달성 여부	90
3절 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후 대책(후속 연구의 필요성 등)	91
제4장 연구결과의 활용 계획 등	91
참고문헌	92
연구개발보고서 초록	98
자체평가의견서	100
연구성과 활용계획서	104

제1장 연구개발과제의 개요

1절 연구개발의 필요성

1. 연구개발의 개요

가. 주류산업 개요

- 국내 전체 주류시장은 2017년도 기준 출고금액과 출고량은 각각 9조2천억, 350만kl에 달하며, 그중 막걸리는 각각 4,500억(4.9%), 40만kl(11.4%)를 차지하고 있음
 - 전체 주류제조 면허수는 2,130개이며, 그중 막걸리 면허가 857개로 40.2%를 차지하여 전체 주종 가운데 가장 많은 면허수를 보유하고 있음
- 한편 전체 주류에서 사용된 쌀 사용량은 약 51,190톤으로 나타났으며, 이 중 국내 비율은 41.4%, 수입 비율은 58.6%로 국내산 원료 사용이 상대적으로 높게 나타남
 - 주종별 쌀을 사용하는 비중은 막걸리가 76.5%로 가장 많은 비중을 차지하여 쌀 소비에 막걸리가 기여하는 바가 매우 큼. 막걸리 다음으로는 청주 13.1%, 약주 3.8%의 비율로 나타남
 - [2017년 전체 주류 쌀 사용량] [단위: 톤, %]

구분	전체	비율	국내	수입	국내비율	수입비율
탁주	39,164	76.5	12,639	26,525	32.3	67.7
청주	6,717	13.1	4,187	2,530	62.3	37.7
약주	1,940	3.8	1,814	126	93.5	6.5
증류식소주	1,789	3.5	1,789	0	100.0	0.0
맥주	652	1.3	645	7	99.0	1.0
일반증류주	73	0.1	73	0	100.0	0.0
리큐르	56	0.1	42	14	75.0	25.0
기타주류	800	1.6	13	787	1.6	98.4
계	51,190	100.0	21,201	29,989	41.4	58.6

- 최근에는 전통주의 온라인 판매 및 소규모 주류제조 면허의 허용에 따라 막걸리 산업분야로의 진출이 젊은층을 중심으로 창업이 활발하며, 이와 더불어 전통주점 등의 창업 등 전후방산업에도 긍정적인 영향을 미치고 있음

□

나. 소비자의 막걸리 소비행태

- 주류산업정보실태조사(농식품부)에 따르면 소비자층은 전통주별 구매요인으로는 공통적으로 부드럽고 순하며 깔끔한 맛을 상대적으로 우선시하는 경향이 있는 것으로 조사됨



- 또한 전통주 소비조사에 따르면, 전체 전통주 중 막걸리를 소비하는 층이 54%에 달해 전통주중에 가장 많이 소비하는 주종으로 나타남



- 한편 주류소비자는 막걸리를 비롯한 전통주의 개선사항으로 홍보, 가격 및 맛 개선을 꼽아 막걸리의 품질향상이 막걸리에 소비에 주요한 요소인 것으로 조사됨



- 최근 술 소비가 홉술, 혼술의 트렌드로 확산되고 있으며, 소비자의 막걸리 소비패턴도 고품질의 우수한 제품을 선호하는 소비추세로 보아 현재 시중 막걸리 제품의 맛에 걸림돌이 되는 쓴맛 등의 저감화 기술이 절실히 요구되는 시점임

2. 연구개발 대상의 국내·외 현황

가. 국내 기술 수준 및 시장 현황

○ 기술현황

- 식약처 주류 위생 안전관리 주관기관으로서 5년간(2015년~2019년) 150여 개의 업체 대상 품질관리 관련 컨설팅을 수행한 결과, 막걸리 업체들의 쓴맛 관련 공통적인 품질관리 애로사항을 토로
- 우리술 품평회 현장심사를 통해 막걸리 업계에서의 쓴맛에 대한 공통적인 기술적인 해결방안이 필요성 인식
- 특히 국을 많이 사용하는 소규모 영세업체들로부터 쓴맛에 대한 애로사항 문제 제기
- 쓴맛 원인이 원료 상의 문제인지 공정 상의 문제인지 업계에서는 관련 자체 연구 시설 미비로 인해 쓴맛에 대한 원인과 저감화를 해결방안을 찾지 못하고 있는 실정임
- 전통주를 주로 판매하는 전통주 주점에서 소비자들이 막걸리들의 쓴맛에 대한 품질평가가 많음
- 특히 숙성기간이 짧고 누룩을 많이 사용하는 막걸리에서 쓴맛이 많다는 의견이 다수임
- 국내 유명 전통주를 전시·판매하는 전통주 개러리 방문시 소비자들의 막걸리 쓴맛에 대한 의견 개진
- 쓴맛에 대한 문제점은 제조자와 소비자 모두가 공통으로 느끼는 품질문제이며 이에 대한 학술적인 연구가 필요한 시점임

○ 시장 현황

- 2017년 기준 전통주 탁주(막걸리) 생산 업체의 총 출고 수량은 5,647kl이고, 총 출고금액은 약 89억원 규모로 조사됨
- 업체별 시장 현황을 살펴보면 시장 1위인 금정산성토산주의 출고수량이 1,791kl, 출고금액이 약 27억원으로 나타남
- 또한 상위 10개 업체의 출고수량이 4,850kl, 출고금액이 약 66억원으로 시장점유율 74.2%로 나타남

주종	출고수량 (kl)	출고금액 (백만원)	점유율 (%)	원료 사용 현황					
				사용원료량 (kg)	국내 (kg)	수입 (kg)	국내 비율 (%)	수입 비율 (%)	
탁주(막걸리)	5,647	8,897	22.4	쌀	868,106	868,106	0	100.0	0.0
				밀	7,039	7,039	0	100.0	0.0
				기타	14,032	14,032	0	100.0	0.0
				소계	889,176	889,176	0	100.0	0.0

○ 경쟁기관 현황

- 해당 사항 없음

○ 지식재산권 현황

- 본 연구과제 관련 지식재산권 사항 없음

○ 표준화 현황

- 막걸리 업체의 대부분이 완성품의 쓴맛으로 인한 표준화 문제의 현장 애로사항 토로
- 쓴맛 저감화를 위해 불가피하게 숙성기간 연장 및 인공감미료 등을 첨가하는 등의 문제점 토로
- 쓴맛 관련 연구한 사례가 없어 쓴맛 원인 규명 및 저감화 방안에 대한 요구 증대
- 그간 연구 관련 사회 기반 시설이 없어 학술단체와의 연계를 통한 쓴맛 제거를 위한 연구는 전무한 실정임

나. 국외 기술 수준 및 시장 현황(막걸리의 경우 우리나라에서만 제조되는 술로서 국외사례는 없음)

2절 연구개발의 목표 및 내용

1. 연구개발의 최종목표

가. 최종목표

- 국내 막걸리 제조 시 자주 발생하는 쓴맛에 대한 원인 규명과 저감화를 위한 기술개발
 - 막걸리의 쓴맛 저감화 및 숙성기간 단축을 통한 생산공정 효율화 및 공정개선
 - 막걸리 쓴맛 제거를 통한 전통주 품질향상 및 소비자 선호도 제고

나. 세부목표

- 막걸리 쓴맛의 학술적 원인 규명 연구
 - 막걸리의 쓴맛 원인 규명을 위한 원료(쌀)분석
 - 막걸리의 쓴맛 원인 규명을 위한 국(입국, 누룩) 분석
 - 막걸리 제조공정 연구

- 막걸리 쓴맛 저감화를 위한 기술개발 연구
 - 원료처리 기술 개선 연구
 - 쓴맛 흡착제 또는 은폐제 처리 기술 연구
 - 효소제를 이용한 쓴맛 제거 기술 연구
 - 쓴맛 제거를 통한 신공정도 및 레시피 개발

2. 연차별 개발목표 및 내용

<1차년도>

- 연구개발 목표
 - 국내 막걸리 제조 시 자주 발생하는 쓴맛에 대한 원인 규명과 저감화를 위한 기술개발
 - 막걸리의 쓴맛 저감화 및 숙성기간 단축을 통한 생산공정 효율화 및 공정개선
 - 막걸리 쓴맛 제거를 통한 전통주 품질향상 및 소비자 선호도 제고



- 주관연구기관(서울벤처대학원대학교 산학협력단)
 - 막걸리 쓴맛의 학술적 원인 규명 연구
 - 막걸리의 쓴맛 원인 규명을 위한 원료(쌀)분석
 - 막걸리의 쓴맛 원인 규명을 위한 국(입국, 누룩) 분석
 - 막걸리 제조공정 연구

- 제1협동 연구기관(술샘)

- 막걸리 쓴맛 저감화를 위한 기술 개발 연구
- 원료처리 기술 개선 연구

○ 제2협동 연구기관(장희)

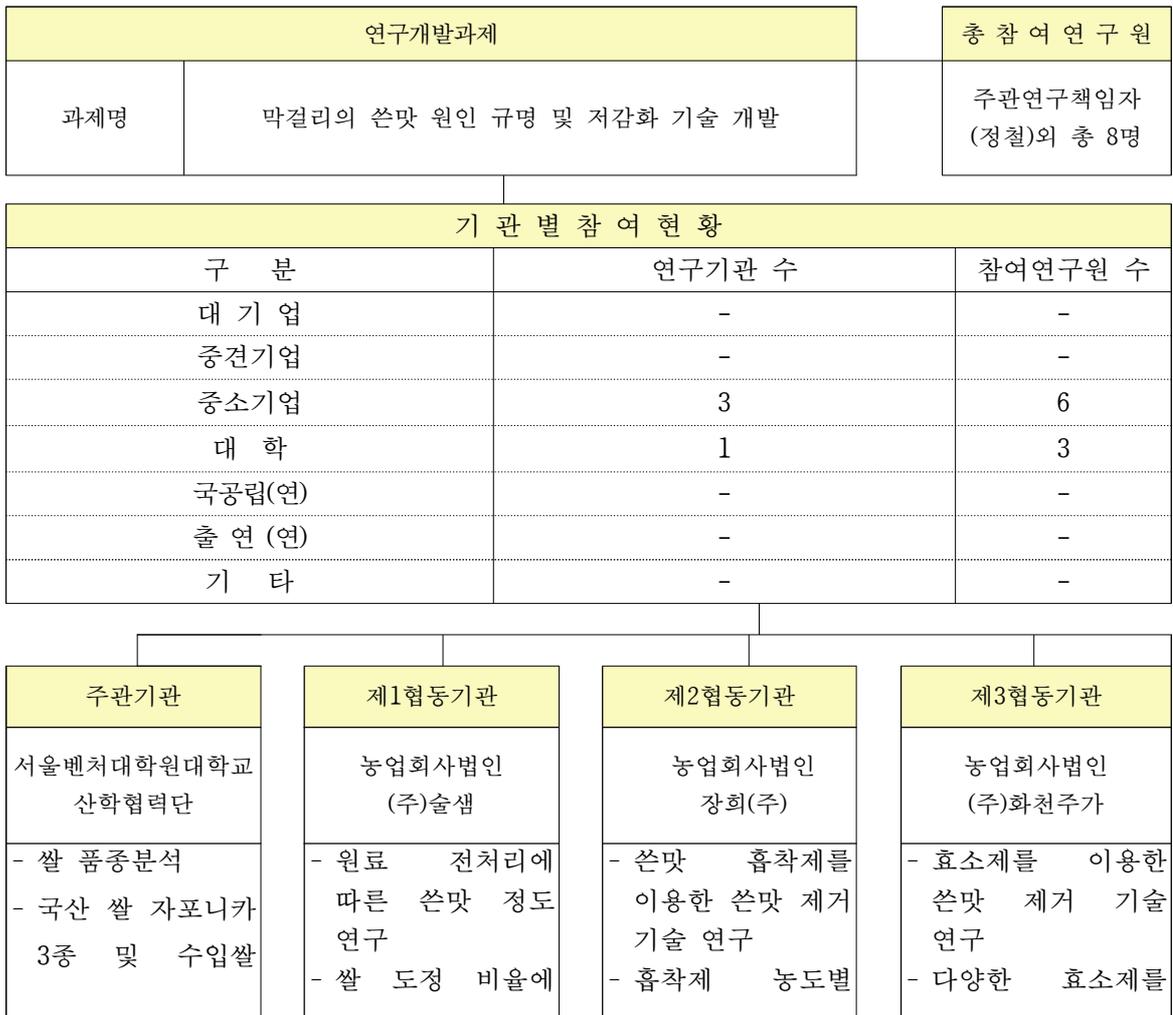
- 막걸리 쓴맛 저감화를 위한 기술 개발 연구
- 쓴맛 흡착제 또는 은폐제 처리 기술 연구

○ 제3협동 연구기관(화천주가)

- 막걸리 쓴맛 저감화를 위한 기술 개발 연구
- 효소제를 이용한 쓴맛 제거 기술 연구
- 쓴맛 제거를 통한 신공정도 및 레시피 개발

3절 연구개발의 추진전략·방법 및 추진체계

1. 연구개발 추진체계



인디카 3종 성분 분석 비교

- 전통누룩 및 판누룩 미생물 분포 및 역가 측정
- 제조 입국과 시판 입국의 산도 및 역가 비교
- 쓴맛 흡착제 또는 은폐제 처리 기술 연구
- 막걸리 분석 연구

따른 막걸리 쓴맛 비교 연구

- 도정률에 따른 쌀 성분 변화 및 쓴맛과의 연계성 분석
- 쌀 전처리에 따른 막걸리 쓴맛 비교 연구

쓴맛 제거 효과 비교 연구

- 은폐제를 이용한 쓴맛 제거 기술 연구
- 은폐제 농도별 쓴맛 제거 비교 연구

이용한 쓴맛 제거 기술 연구

- 효소제 종류별 투입량과 펩타이드 및 아미노산 농도 분석
- 첨가물(글루탐산 배이스 펩타이드)을 이용한 쓴맛 제거 기술 연구
- 쓴맛 제거 후의 완제품 관능평가

2. 추진 일정

		코드번호		B-06-03											
1차년도															
일련 번호	연구내용	월별 추진 일정												연구 개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속 기관)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
1	원료 및 발효제 분석	■	■	■										30,000	정철 (서울벤처대학원대 학교)
2	원료 전처리에 따른 쓴맛 정도 연구		■	■	■	■	■							30,000	정경순 (술샘)
3	쓴맛 흡착제 또는 은폐제 처리 기술 연구			■	■	■	■	■	■	■				30,000	장정수 농업회사법인 (주)장희
4	효소제를 이용한 쓴맛 제거 기술 연구				■	■	■	■	■	■	■			15,000	홍정의 농업회사법인 (주)화전주자
5	막걸리 이화학적 분석										■	■		15,000	정철 (서울벤처대학원대 학교)
6	쓴맛 제거를 통한 신 공정도 및 레시피 개발											■	■	15,000	홍정의 농업회사법인 (주)화전주자

제2장 연구수행 내용 및 결과

1절 연구수행 내용

1. 선행 연구<주관기관-서울벤처대학원대학교 산학협력단>

인간은 짠맛, 신맛, 단맛, 쓴맛과 감칠맛의 5가지 맛을 식별하며(Lindemann 2001), 쓴맛은 혐오감을 유발한다. 그중에 쓴맛은 5가지의 맛 중에서 가장 복잡하고 이해하기 어렵다(drewnowski, 2001). 단맛은 일반적으로 몸의 에너지원이어서 누구나 좋아하지만, 쓴맛은 독성화합물의 섭취로부터 보호하도록 진화했다. 인간은 쓴맛에 대해 타고난 혐오가 있지만, 음식의 쓴맛은 무조건 거절하지 않는다(Temussi, 2012). 동물은 삼키기 전에 잠재적으로 독성이 있는 화합물을 선별하는 것으로 쓴맛을 발전시켰으며, 식물은 소비를 억제하기 위해 쓴맛을 내는 화합물을 진화시켰다(Coupland & Hayes, 2014). 대다수 동물은 쓴맛이 나는 물질을 본능적으로 싫어하며, 쓴맛의 독성을 섭취하는 것을 방지하려는 것이다. 인간에게는 타고난 쓴맛 혐오감이 있지만, 어떤 동물들보다 쓴맛을 선호한다. 예를 들어 맥주, 커피, 그리고 차는 아마도 쓴맛에 대한 호감 때문일 것이다.(Maehashi & Huang, 2009)

미생물 발효는 종종 쓴맛이 나는 화합물을 생성하며, 대부분 불쾌한 맛으로 작용한다. 그러나 그 쓴맛은 음식이나 음료수의 기호성과 소화성에 긍정적인 경우도 있다(Schönberger, 2006).

Murray & Baker (1952)는 최초로 단백질 효소 가수분해 결과물의 맛에 관심을 가졌다. 그 후로 상업적 단백질 분해효소에서 얻은 카제인과 락트알부민의 효소 가수분해물 안에서 쓴맛을 확인하였으며, 단백질이 풍부한 식품은 단백질 분해효소의 단백질 가수분해로 인한 펩타이드에 의해 종종 매우 쓴 물질을 동반한다는 연구(Guigoz et al., 1976)로 이어졌다. 즉, 쓴맛이 에이징 과정인 효소의 단백질 가수 분해물을 생성하는 발효제품에서 자주 발생한다(Maehashi & Huang, 2009)는 것이다.

단백질에서 파생된 펩타이드는 다양한 식품 즉 된장(Takeuchi et al., 1969), 간장(Oka et al., 1974), 치즈(Yamasaki, 1987; Hamilton et al., 1994; Fernandez et al., 1998), Sake(Takahashi et al., 1974; Hashizume et al., 2007)등의 발효제품에서 쓴맛의 원인이 된다. 코코아와 숙성된 Sake에는 일반적으로 5가지 미각(단맛, 쓴맛, 감칠맛, 신맛, 짠맛)을 느낄 수 있으며(Temussi, 2012), 쓴맛이라고 보고된 환상 디펩타이드도 들어있다.

펩타이드는 3개 그룹으로 분류하는데, 산성 잔류물이 풍부한 I 그룹의 화합물은 신맛, 소수성 잔기가 풍부한 그룹 II는 쓴맛, 균형 잡힌 조성을 가진 그룹 III은 맛이 전혀 없었다(kirimura et al., 1969). 카제인의 트립신 가수분해물에서 3개의 쓴 펩타이드를 분리했으며(Matoba et al., 1970), 펩타이드의 소수성 사이의 관계를 조사한 연구에서는 작은 펩타이드는 주로 소수성 아미노산 잔기를 함유하는 경우 쓴맛이 나타나는 것을 확인하였다(Ney 1971).

아미노산, 펩타이드 및 그 유도체의 분자 간 연결 지수가 매우 중요하며, 그러한 관계는 화합물에서 쓴맛 임계값을 예측하는 데 유용하다(Gardner, 1980). 아르기닌, 프롤린, 페닐

알라닌을 함유한 디-트리펩타이드를 합성한 실험에서는 쓴맛을 가지는 두 가지 조건이 있는데, (I)페닐알라닌이 잔류물에 많은 경우, (II)페닐알라닌 잔기가 C-말단, 혹은 C-말단 부근에 위치할 때이며, 이 경향은 루신, 이소루신을 비롯하여 소수성 아미노산을 포함한 모든 올리고 펩타이드의 공통점으로 나타났다(Otagiri et al., 1985). 쓴맛과 펩타이드의 화학 구조와의 관계를 밝히기 위해 아르기닌, 프롤린 및 페닐알라닌을 포함하는 다양한 종류의 쓴 펩타이드 모델을 합성한 연구결과, 디 펩타이드 및 트리 펩타이드의 쓴맛을 강화하기 위한 소수성 아미노산은 C-말단에 위치해야 하며, 반대로 염기성 아미노산은 N-말단에 있었다. 더욱이 아르기닌이 첨가되었을 때 강한 쓴맛이었는데, Arg-Pro, Gly-Arg-Pro 및 Arg-Pro-Gly와 같은 프롤린에 인접하며, 쓴맛에 대한 상승 효과 구조가 (Arg) z-(Pro) m-(Phe) (/=1,2;m,n=1-3)인 펩타이드에서 관찰되었다. 그중 옥타 펩타이드는 (Arg-Arg-Pro-Pro-Pro-PhePhe-Phe) 002mM의 역치로 극도의 쓴맛을 가졌으며, 펩타이드 중 가장 쓴맛을 가지고 있었다(Otagiri et al., 1985).

Lin & Lee, (1987)는 효소적 가수분해에서 생성되는 쓴맛 펩타이드(Arg-Lue, Arg-Lue-Lue, Lue-ys)를 감소시킴으로써 기능성이 향상된 단백질을 제조하였으며, 특히 효소 가수분해를 조절하여 회분 함량이 낮은 단백질을 제조하였다.

펩타이드의 쓴맛에서 프롤린 잔기의 역할을 조사하기 위해 프롤린을 함유한 일부 올리고 펩타이드를 합성하고 맛을 평가했으며(Ishibashi et al., 1988a), 일부 올리고 펩타이드에 함유되어 있는 페닐알라닌 또는 티로신의 맛을 평가했다. 페닐알라닌 또는 티로신 분자의 소수성은 페닐알라닌이 C-말단 및 페닐알라닌 또는 피로신의 함량이 펩타이드에서 증가 된 경우 쓴맛을 보였다(Ishibashi et al., 1987a). 소수성 루신 잔기도 상당한 펩타이드의 쓴맛을 유발하였는데, 항상 루신 잔기가 펩타이드의 C-말단에 위치하였다(Ishibashi et al., 1987). 펩타이드의 맛에 대한 루신 잔기의 효과를 알아보기 위해 루신 잔기를 포함한 몇 가지 올리고 펩타이드를 합성하여 맛을 평가했는데, 루신 잔기의 소수성은 펩타이드의 쓴맛을 두드러지게 하였다. 특히 루신 잔기가 펩타이드의 C-말단에 위치할 경우 더 강한 쓴맛이 있었으며(Ishibashi, 1987), 결과는 표 1에 나타나 있다.

표 1. 류신 및 류신 올리고머의 맛

화합물	맛	TH.V(mM) ^a	Rcaf ^b
L-Leu	Bitter	20	0.05
L-Leu · Na	Bitter	25	0.04
D-Leu	Sweet	6.0	—
DL-Leu	Sweet/Bitter	19.0	
DL-Leu · OMe · HCl	Bitter/sour	3.1	
Leu-Leu	Bitter	2.5	0.4
Leu-Leu-Leu	Bitter	1.2	0.83
Leu-Leu-Leu-Leu	Bitter	0.6	1.7
Leu-Leu-Leu-Leu-Leu	Insoluble in water		
Leu-Leu-Leu-Leu-Leu-Leu	Insoluble in water		

^a TH · V : 역치 농도.

^b Rcaf : 카페인과 쓴맛의 비율.

Ishibashi et al. (1987)는 펩타이드의 쓴맛 결정 인자를 추정하기 위해 몇 가지 환상 디펩타이드를 합성하여 맛을 평가하여 23종류의 합성 환상 디펩타이드 및 대응하는 선형 디펩타이드의 맛을 연구하였으며, 표 2에 소개하고 있다.

표 2. 류신과 글리신을 포함하는 펩티드의 맛

화합물	맛	TH.V (mM) ^a	Rcaf ^b
Leu	Bitter	20	0.05
Gly	Sweet		-
Gly-Gly	No taste	-	-
Leu-Gly	Bitter	20	0.05
Gly-Leu	Bitter	25	0.04
Leu-Leu	Bitter	2.5	0.4
Gly-Gly-Gly	No taste	-	-
Leu-Gly-Gly	Bitter	75	0.01
Gly-Leu-Gly	Bitter	10	0.1
Gly-Gly-Leu	Bitter	10	0.1
Leu-Leu-Gly	Bitter	5	0.2
Leu-Gly-Leu	Bitter	5	0.2
Gly-Leu-Leu	Bitter	1.5	0.67
Leu-Leu-Leu	Bitter	1.2	0.83
Leu-Gly-Gly-Gly	Bitter	13	0.08
Gly-Leu-Gly-Gly	Bitter	19	0.05
Gly-Gly-Leu-Gly	Bitter	25	0.04
Gly-Gly-Gly-Leu	Bitter	4.5	0.22
Leu-Gly-Gly-Gly-Gly	Bitter	13	0.08
Gly-Leu-Gly-Gly-Gly	Bitter	13	0.08
Gly-Gly-Leu-Gly-Gly	Bitter	13	0.08
Gly-Gly-Gly-Leu-Gly	Bitter	13	0.08
Gly-Gly-Gly-Gly-Leu	Bitter	2.2	0.45

^a TH·V : 역치농도.

^b Rcaf : 카페인과 쓴맛의 비율.

펩타이드의 쓴맛에서 아미노산 측쇄의 역할을 조사하기 위해 펩타이드를 합성하고 그 맛을 평가한 연구에서도 펩타이드의 C-말단이나 N-말단에 발린이 함유한 펩타이드에서 쓴맛이 느껴졌다(Ishibashi et al., 1988). 분명 쓴맛에는 소수성 아미노산 잔기가 필수적인데, 펩타이드의 전체적인 소수성은 쓴맛에 직접적 영향을 주지는 않았다. 펩타이드의 말단 부위는 각각 결합 유닛(BU) 및 자극 유닛(SU)이라고 불린다. 쓴맛 강도는 결합유닛과 자극 유닛의 특징 및 유닛 간의 거리에 의존하는 것으로 보인다(Ishibashi-1988). 즉 환상의 하이드로기 또는 소수성 그룹이 필요하며, 그 그룹들은 서로 가까이 있어야 한다는

것이다. 전형적으로 쓴 아미노산, 펩타이드, O-Aminoacyl Sugars는 표 3에 나타나 있으며, 아미노산 중에서 페닐알라닌, 발린, 루신, 이소루신은 쓴맛으로 잘 알려져 있다 (Tamura et al., 1990).

표 3. 아미노산과 펩타이드의 쓴 샘플

화합물	농도 (mM) ^a	T.V (mM) ^b	R_{caf} ^c
Arginine (Arg)	200	25	0.04
Phenylalanine (Phe)	200	20	0.05
Valine (Val)	300	19	0.05
Leucine (Leu)	200	20	0.05
Isoleucine (Ile)	250	25	0.04
Methyl 2,3-di-O-(phenylalanyl)- α -D-glucopyranoside (di-O(H-Phe)-Glc-OMe)	0.125	0.05	20
Phenylalanyl-phenylalanine (Phe-Phe)	8	0.83	0.83
Arginyl-prolyl-phenylalanyl-phenylalanine (Arg-Pro-Phe-Phe)	0.4	25	25
Valyl-valyl-valine (Val-Val-Val)	50	0.22	0.22

^a 카페인 10mM과 동일한 쓴맛을 가진 것으로 밝혀진 농도.

^b 입계값.

^c R_{caf} 는 아미노산이나 펩타이드의 쓴맛이다. R_{caf} 는 문턱값이 카페인보다 얼마나 낮거나 더 높은지를 보여 준다. 카페인의 R_{caf} 는 1이다.

2000년 3월, 미국 샌디에고 대학의 Zuker 교수 등이 쓴맛을 감지하는 수용체로 작용하는 새로운 계통의 유전자를 동정하여 TAS2R로 명명한 이래(Chandrashekar et al, 2000), 다양한 쓴맛 화합물을 감지하는 수용체들이 밝혀졌다. 인간의 유전자들은 수용체와 결합한 TAS2As(이전에는 T2Rs 또는 TRBs라 불려진)를 암호화하는데, 쓴맛 미각 수용체가 발현하도록 선택되어 왔다(Adler et al., 2000; Matsunami et al., 2000). 인간의 쓴맛 수용체 유전자 계열(hTAS2A)은 G-단백질 연관 수용체의 커다란 집단에 속하는 25개로 구성되어 있고(Kuhn et al., 2004; Meyerhof et al., 2010), 이들 중 21개에 대해 리간드가 확인되었다(Coupland et al., 2014). TAS2Rs가 인간의 쓴맛 감각기관을 나타낸다는 증거는 무엇인가? 기능적 증거로 TAS2R 수용체를 활성화 되게 하는 모든 화합물은 쓴맛이 난다는 점이다(Meyerhof et al., 2005).

G-단백질 결합의 TAS2R 계열은 쓴맛을 매개하는 것으로 생각된다(Kuhn et al., 2004). 분자 연구에 따르면 T2R이 미각 수용체 세포에서 쓴맛으로 기능하는 수용체(Maehashi et al., 2009) hTAS2A46과 mOR-EA 사이의 커다란 유사점은, 비교적 작은 결합으로 추정되는 소수성 잔기의 수가 많다는 것이다(Brockhoff et al., 2010).

미맹 관련 연구에서는 7번 염색체의 장완 31-32 부위에 존재하는 후보유전자 분석을 수행하여 TAS2R38(또는 PCT gene)이라 불리는 미맹을 결정하는 유전자를 발견하기도 하였다(Kim et al., 2003).

쓴맛을 가리는 방안을 합리적으로 설계하려면 쓴맛의 원인과 구조, 그리고 나타나게 되는 경로를 이해하는 물리 화학적인 측면과 관능평가를 통한 감각적 특성이라는 측면의 이해가 필요하다. 따라서 쓴맛 마스킹에서의 중요한 의미는 관능에서의 변화를 이해하는 것이다(van Aken et al., 2007, Vingerhoeds et al., 2005),

여러 경구 의약품 및 수많은 식음료 제품에는 불쾌한 쓴맛이 나는 성분이 있으며, 좋은 맛을 가진 의약품은 경쟁사보다 유리하다(Sohi et al., 2004). 그러므로 식품에서 쓴맛을 줄이려는 노력은 수없이 진행되어왔다. 하지만 식품 또는 제약은 쓴 성분이나 약물 없이는 제품화가 가능하지 않을 것이기 때문에, 단순히 쓴 물질을 제거하기보다는 조리나 조제 하는 동안에 쓴맛을 억제하는 방법을 찾아야 한다(Coupland et al., 2014). 짠맛은 쓴맛을 억제하며, 쓴맛은 맛의 혼합물에 의해 줄어들 수 있다. 맛 수용체 수준의 쓴맛과 감칠맛의 상호작용 연구에서 감칠맛은 쓴맛을 억제한다는(Kim et al., 2015) 사례가 보고되었다. 맛의 상호작용으로 쓴맛을 감소시키는 영역에서 벗어나 은폐제나 흡착을 시도한 연구도 있었다.

β -Cyclodextrin는 복잡한 함유물을 위한 착화제이며, 전분에서 얻은 달콤하고 독성이 없는 고리형 올리고당이다(Sohi et al., 2004). 활성탄 및 β -Cyclodextrin은 쓴 펩타이드를 흡착하는데 효과적이었으며(helbig et al., 1980), 특히 β -Cyclodextrin은 쓴맛을 줄이고 제거하는데 유용한 것으로 보고되었다. Cyclodextrin은 가장 널리 사용되며, 약물과 음식의 쓴맛을 쉽게 가린다. 예를 들어 Cyclodextrin의 약 0.5%를 첨가하면 Naringin 및 Limonin의 쓴맛이 절반으로 줄어들었다(Konno et al., 1982).

펩타이드에서 쓴맛을 제거하기 위한 연구에서 Cyclodextrin, Starch, Proteins and Peptides, Fatty substances, Acidic amino acids를 사용하였으며(Tamura et al., 1990), 표 4와 같다.

국내에서는 썸바귀(임, 1996), 인삼(김 등, 2012), 도라지(장 등, 2015), 여주차(Kim et al., 2016), 오징어(김 등, 2020) 관련 쓴맛을 감소시키는 연구가 진행되었다. 대두 단백질 분해효소의 분해 물질 관련 연구에서 No 4(*Aspergillus oryze* M4)와 No 95(*Bacillus subtilis* YG95)가 가장 쓴맛을 나타내었고, 관능검사에서 *Aspergillus oryze* M4 효소와 조합된 것의 대두 단백질 분해물이 비교적 강한 쓴맛을 나타내었다(Choung et al., 2003). 단백질 기질과 효소의 조합에 의해 생성된 가수분해물의 용해성과 쓴맛에 대해 비교연구도(김, 2010) 진행되었다.

된장의 대두 단백질의 가수분해물은 분해 정도, 펩타이드의 구조, 크기 및 아미노산의 염기 배열 등에 따라 기호성 및 기능성이 다르게 나타나고 그 특성 또한 다양하였다(Kim et al., 1990). 재래식 된장과 *Aspergillus oryze*를 이용한 개량식 된장의 쓴맛 펩타이드를 추출하여 그 특성을 알아본 연구(홍 & 이, 1994)도 있었다.

저장 또는 숙성 중에 발생하는 치즈의 쓴맛을 줄이기 위해 그 형성 과정이나 식별 및 마스킹 방법(Lemieux et al., 1992), 병아리콩 단백질 가수분해물의 생산에 향료의 사용으로 쓴맛을 감소시키기 위한 제안(Real Hernandez et al., 2019) 등 다양한 연구가 시도되었다.

표 4. 마스킹 효과 물질

1. Cyclodextrin
α -Cyclodextrin (1/3 eq., 1.0 eq. and 1.5 eq.)
α -Cyclodextrin (33.3 gil, 100 gil and 150 gil)
2. Starch
Starch-A (without heating, 33.3 gil, 100 gil and 150 gil)
Starch-B (gelatinated, solidified and re-dissolved, 33.3 gjl, 100 gil and 150 gil)
3. Proteins and peptides
Skim milk (33.3 gjl, 100 gil and 150 gjl)
Soybean casein (33.3 gjl, 66.7 gjl and 100 gjl)
Whey protein concentrate (33.3 gil, 66.7 gil and 100 gil)
Casein hydrolyzate (33.3 gjl, 66.7 gjl and 100 gil)
4. Fatty substances
Creaming powder (33.3 gil, 100 gil and 150 gil)
Margarine (33.3 gjl, 100 gil and 150 gjl)
Vegetable oil (33.3 gil, 100 gil and 150 gjl)
5. Acidic amino acids
Asp (1/3 eq., 1.0 eq. and 1.5 eq.)
Asp (67mM, 200mM and 300mM)
Glu (1/3 eq., 1.0 eq. and 1.5 eq.)
Glu (67mM, 200mM and 300mM)
Tau (1/3 eq., 1.0 eq. and 1.5 eq)
Tau (67mM, 200mM and 300mM)

특정 쓴 펩타이드는 대두 단백질의 가수분해물(Yamashita et al., 1969; Arai et al., 1970; Kukman et al., 1995; Kim et al., 1999)이었으며, 치즈의 카제인 가수 분해물 관련 연구도 광범위하게 진행되었다. 대부분의 이들 펩타이드는 소수성인 것으로 나타났다(Takahashi et al., 1974; Hashizume et al., 2007).

맥주에서 흡은 α -산 또는 β -산을 가지고 있고(Sakamoto, 2003), 방부제 속성을 가지고 있으며, 쓴맛을 제공하여 제품에 균형감이 있는 만족스러운 맛을 준다(Malowicki et al., 2005). 쓴맛의 원인은 이소알파산이며, 그 역치는 5mg/L이다(Schönberger, 2006). 맥주에도 쓴맛 나는 아미노산이 있으며, 디-펩타이드와 환상 Diketopiperazine은 쓴맛으로 나타날 수 있다(Engel et al., 2001).

숙성하고 있는 Sake에서 클로로포름 추출물 함량이 증가하는 것을 발견하고, 연구하는 과정에서 그 원인 물질이 발견되었다. 쓴맛이 있는 결정물질인 화합물 B-1이 분리되었으며, 그 물질은 L-prolyl-L-Ieucine 무수화물로 확인되었다(Takahashi et al., 1974). 다양한 조건에서 숙성된 Sake 샘플에 함유된 이 화합물의 함량은 표 5와 같으며, 저장 시간에 따라 증가하고 있음을 확인할 수 있다.

표 5. 사케 양조와 숙성 사케의 다양한 단계를 형성하는 사케 샘플에서 나타난 쓴맛의 강도.

샘플	값 (평균)	쓴맛 강도 (Cone. of quinine sulfa to (ppm))
Koji extract ^a	0.5	400
Autolysate of yeast ^b	0.6	480
Filtrate (early stage of fermentation)	0.6	480
Filtrate (last stage of fermentation)	3.8	5,760
Fresh sake (soon after filtration)	4.1	7,040
Stored sake (21 days at 40° C)	4.3	8,320
Stored sake (8.5 months at 40° C)	5.0	12,800

^a Koji(50g)를 2°C에서 20시간 동안 증류수(150ml)로 추출했다.

^b Autolysate(1g)를 증류수(25ml)에 녹여 추출했다.

‘zatsumi’ 라는 불쾌한 맛으로 알려진 Sake의 아린 맛은 저농도에서 발견된 쓴맛 화합물이 원인이다(Sato, 1977). ‘egumi’ 라고 불리는 Sake의 맛은 쓴맛이나 떫은맛이 나는 불쾌한 맛이다. Sake 양조에서 일반적으로 단백질 함량이 높은 백미는 종종 ‘zatsumi’ 맛이 나기 때문에 품질이 낮은 술이 생산된다. 특정 쌀 단백질이 함유된 제품은 이 불쾌한 맛의 원인이 될 수 있지만, 원인이 되는 화합물은 명확하지 않다. 5’-methylthioadenosine, 티로졸, 디펩타이드, 특정 아미노산 등은 모두 쓴맛이 나는 화합물이지만 개별 농도는 쓴맛 임계값보다 낮다(Sato, 1977).

Sake 속의 펩타이드는 Koji 효소에 의한 쌀 단백질의 가수분해로 생산되며, 발효 후에도 일부는 술에 남아 있다. 짧은 펩타이드는 일반적으로 바람직한 맛을 나타내고(Blinkovsky et al., 1999), 일부 디펩타이드 또는 그 무수물은 Sake에서 쓴 화합물로 확인되었다(Takahashi et al., 1974). HPLC를 통한 연구에서 역상 크로마토그램의 220nm에서 흡수되는 펩타이드가 긴조형 Sake의 관능 품질과 관련이 있는 것으로 최근에 보고되었다(Iwano et al., 2005).

Sake에 들어있는 소수성 화합물은 종종 불쾌한 쓴맛 혹은 떫은맛을 보여주며, 과도하게 함유되어 있으면 맛의 조화를 저해한다. 따라서 Sake의 최종 단계에서는 이런 혼합물을 효과적으로 흡수하기 위해 숯을 이용해 정제하는 것이 보통이다. 활성탄은 불쾌한 맛을 없애는 데 효과적이지만(Hashizume et al., 2007), Sake의 조화로운 맛이 줄어들어 좋은 맛을 감소시키는 것으로 알려져 있다(Hashizume et al., 2012). Hashizume(2007) 등은 미각에 쓴맛을 주는 소수성 화합물을 추출하는 연구를 하였는데, Sake 샘플에서 두 개의 새로운 미각 활성 에틸 에스테르화 된 펩타이드를 발견했고, 확인된 화합물의 정도를 측정하였다. 더불어서 활성탄 처리가 소수성 화합물의 농도에 미치는 영향에 대한 조사도 진행하였다. RP-HPLC를 이용한 조사에서 20분 후에 나타난 피크는 소수성 특성을 갖는 것으로 보고되었다. 그중에서 쓴맛 화합물의 다수를 선별하였으며, 그림 1에 나타나 있다. 표 6에는 Hashizume(2007) 등이 분리한 5개의 쓴맛 펩타이드가 나열되어 있다.

표 6. 그림에서 표시한 사케 샘플의 피크 및 검출된 펩타이드들의 서열 및 분자량

번호	맛	아미노산 서열	계산된 분자량	실험적 분자량
2	unpleasant taste, bitter			
5	unpleasant taste, bitter			
9	bitter, astrinbent	<QLFNPNP	687.0	687.5 ^a
13	unpleasant taste	<QLFNPTNP	999.1	999.4 ^a
17	unpleasant taste, bitter	<QLFNPTNPWH	1322.4	1322.6 ^b
18	unpleasant taste, bitter	<QLFNPTVNPWHSP	1506.6	1506.7 ^b
19-2	bitter			
20	bitter, unpleasant taste	<QLFGPNVNPWHNP	1501.6	1501.7 ^b

^a : LC-MS. ^b : MALDI/TOF-MS.

피크 번호 17, 18 및 20번의 펩타이드는 활성탄 처리되지 않은 모든 샘플에서 검출되었지만,

3개의 상업적 Sake 샘플에서는 검출되지 않았다. 활성탄 처리된 Jyunmai 유형 Sake 샘플에서는 피크번호 17, 18 및 20번이 발견되지 않았으며, 13번은 보다 적게 나타났다 (Hashizume et al., 2007).

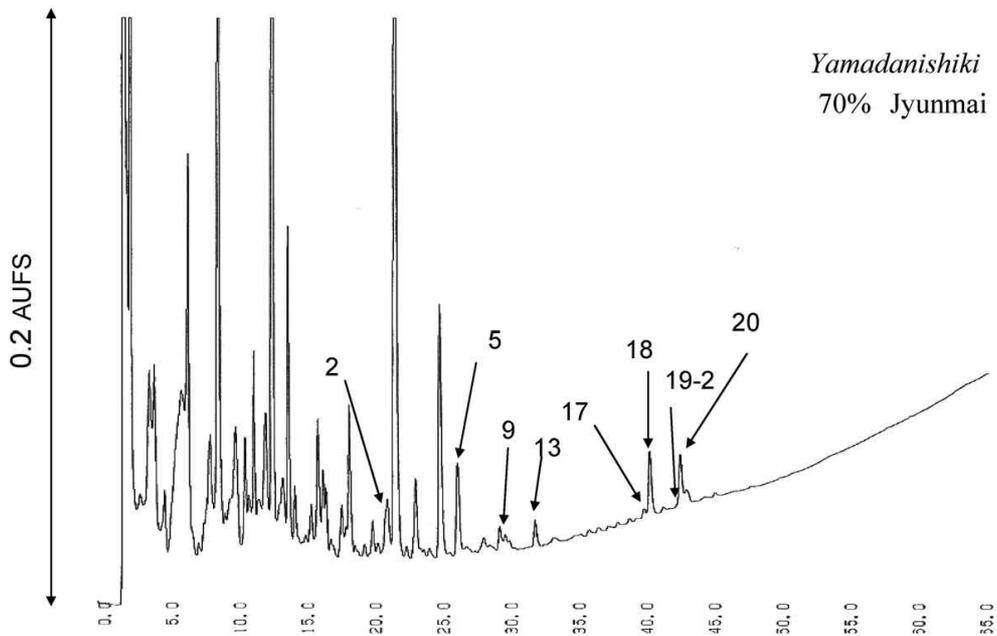


그림 1. RP-HPLC에 의한 70% 도정 Yamadanishiki 백미(20 μ l)를 사용한 준마이 타입 사케 샘플(20 μ l)의 용출 프로파일. 100 μ l의 개별 피크를 3명의 패널이 테스트했다. 맛의 특징은 그 맛이 분명히 감지될 때 표현하였다. 화살표로 표시된 피크(2번부터 20번)는 표 6에 요약된 것과 같이 뚜렷한 감각 특성을 가진 것으로 확인되었다.

2. 분석방법

가. 당도

알코올 실험 플라스크에 남은 검사 시료를 100ml 눈금실린더에 넣은 후 15ml의 물로 2회 씻은 용액을 눈금실린더에 합친다. 눈금실린더 100ml까지 정확하게 물을 넣고 잘 흔들어 섞은 후 취하여 굴절 당도계를 사용하여 측정한다.

나. 산도

검사 시료 10ml를 정확히 취하여 비이커에 넣고 1% 페놀프탈레인 지시약 2~3방울을 가한다. 0.1% 수산화나트륨 용액으로 옅은 홍색을 나타낼 때까지 적정한 후 다음 식에 따른다.

$$\text{초산(W/V\%)} = \frac{0.1N \text{ 수산화나트륨 소비량}(ml) \times 0.006 \times f}{\text{검사시료량}(ml)} \times 100$$

다. 에탄올

검사 재료를 15°C에서 눈금실린더의 100ml 눈금까지 취한 후 300~500ml 플라스크에 옮긴다. 이 눈금실린더에 약 15ml의 물로 2회 씻은 용액을 플라스크에 합친다. 플라스크를 냉각기에 연결한 다음 눈금실린더에 합친 후 증류한다. 증류액이 70ml가 되면 증류를 중지하고 물을 가하여 눈금실린더의 100ml 눈금까지 채운다. 잘 흔들어 실린더에 옮긴 후 15°C에서 주정계를 사용하여 측정한다.

라. pH

안정된 것을 확인한 pH 교정기의 검출부를 시료에 담그고 안정된 지시값을 확인한 다음 그 값을 읽는다.

마. 유기산 분석

발효 중에 생성되는 발효부산물인 10개의 유기산을 분석하기 위해 시료를 채취하여 0.2 μm membran filter로 여과한 후 HPLC(Waters 2489, UV/Visible Detector)로 분석하였다. 컬럼은 TSKgel ODS-100V(4.6mm×250mm× 5μm, JAPAN)를 사용하였다. Column oven의 온도는 35°C로 설정하였고, 이동상은 150mM NaH₂PO₄ Phosphate buffer PH 2.0을 1.0ml/min으로 흘려주었다.

바. 국의 역가 측정법

(1) 효소액의 제조

(가) 국(입국, 누룩) 10g(80~100 mesh 정도로 분쇄. 정제효소는 1g)을 마개 있는 플라스크에 취한 후 1% 염화나트륨 용액 200mL를 가한다.

(나) 30°C에서 가끔 흔들어 주면서 3시간 추출한다.

(다) 추출액을 여과한다(Whatman No. 4).

(라) 여과한 효소액을 묽게 희석하여 희석액 1ml가 1~2SP를 함유하도록 조제한다.

(2) 전분 - 효소반응(환원당의 생성)

- (가) 2% 전분기질용액 50mL에 초산완충액 30mL를 가하고 55℃ 항온조에서 10분간 예열한다.
- (나) 예열된 기질용액에 효소액 10mL를 넣고 55℃에서 60분간 반응(당화)한다.
- (다) 0.5N 수산화나트륨용액 10mL를 가하여 효소반응을 중지시킨다.
- (라) 급랭 후 증류수로 100mL까지 맞춘다(mess up).

(3) DNS 반응

- (가) 뚜껑 달린 시험관 6개를 준비한다.
 - 공시험(blank) 1개
 - 포도당 표준용액 3개(0.3mL, 0.6mL, 1.0mL)
 - 검체 2개(0.1mL, 1.0mL)
- (나) 각 시험관에 증류수 7.0mL씩 넣는다.
- (다) 여기에 공시험액 1mL, 포도당 표준용액 0.3mL, 0.6mL, 1.0mL, 검체(환원당 생성용액) 0.1mL, 1.0mL를 각각 넣는다.
- (라) 부피를 일정하게 하기위해 증류수를 넣어 전체 투입량이 1.0mL가 되게 한다.
 - 공시험(blank) 0.0mL
 - 포도당 표준용액 3개(0.7mL, 0.4mL, 0.0mL)
 - 검체 2개(0.9mL, 0.0mL)
- (마) 각 시험관에 DNS 시약을 2mL씩 넣고 뚜껑을 닫은 후 섞어준다.
- (바) 끓는물에서 5분간 가열한 후 즉시 냉각한다.
- (사) 분광광도계(575nm)로 흡광도를 측정한다.

사. 향기성분 분석

발효 중 생성되는 Acetaldehyde류와 Ethyl acetate 등의 에스테르류, 그리고 fusel oil 등 주류의 향기성분을 구성하는 발효부산물은 국제청기기술연구소 주류분석규정[13]에 따라 시료 100ml에 증류수 30ml를 넣고 heating mantle에서 가열한다. 눈금실린더에 증류액 95ml를 취하여 증류수를 넣어 눈금까지 채운 후 가스크로마토그래피를 이용하여 분석하였다. Agilent 7890B GC System(Agilent 7697A headspace Sampler, Flame Ionization Detector(FID))로, 컬럼은 HP-INNOWAX (30m*0.25mm, 0.5um)를 사용하였다. 온도는 Injection-200℃, Detection-250℃로 설정하였고, Carrier gas는 N2 gas를 1ml/min으로, H2 gas와 Air는 각각 30ml/min과 300ml/min으로 흘려주었다.

아. 펩타이드 분석

(1) 분리정제

(가) 시료의 전처리

① 원심분리

50mL Conical tube 또는 15ml Conical tube에 담아 8000rpm에서 15분, 다시 10,000rpm에서 20분 진행하였다

② 에탄올 제거

원심분리한 Sample의 상층액을 0.45 μ l syringe filter 이용하여 필터 한 후 온도 25 $^{\circ}$ C에서 30분간 감압농축을 진행하여 8mL인 샘플의 경우 5mL가 되도록 농축하였다.

(나) 분석조건

① 분석조건 1)

전처리 한 Sample에서 소수성 펩타이드로 예상되는 물질을 확인하기 위해 HPLC(Agilent 1260)로 분석하였다. 컬럼은 YMC Triart C18(4.6mmi.d. X 250mm, 5 μ m, 12nm)을 사용하였고, oven 온도는 25 $^{\circ}$ C로, Flow rate는 1ml/min으로 설정하였다. 이동상은 A) 0.1% TFA water/B) Acetonitrile을 사용하였다.

②. 분석조건 2)

HPLC(Agilent 1260)로 분석하였으며. 컬럼은 YMC Triart C18(4.6mmi.d. X 250mm, 5 μ m, 12nm)을 사용하였고, oven 온도는 25 $^{\circ}$ C로, low rate는 0.5 ml/min으로 설정하였다. 시료는 2 μ l를 주입하였으며, 이동상은 A) 0.1% TFA DW/B)Acetonitrile을 사용하였다.

③ 분리조건

HPLC(YMC K-prep LAB 300)로 분석하였으며. YMC DAU column Triart C18(50.0mmi.d. X 500mm, 10 μ m, 12nm) 컬럼을 사용하였고, oven 온도는 상온에서 Flow rate는 59 ml/min으로 설정하였다. 시료는 6ml(원액 24ml를 6ml로 4배 농축)를 주입하였고, 이동상은 A)0.1% TFA DW / B)Acetonitrile을 사용하였다.

(3) LCMS/MS

LC/MS/MS 분석은 Thermo LTQ-orbitrap elite, Waters사의 nano aquity를 사용하였고, 컬럼은 Waters seppac C18 50mg을 이용하였다. 용출한 시료는 진공건조기로 건조하고, 2% ACN/0.1%FA에 녹여 사용하였다.

자. 쌀의 이화학적 분석

수분은 상압가열건조법, 단백질은 Kjeldahl법, 지방은 Soxhlet법 그리고 회분은 직접회화법으로 각각 측정하였다.

차. 관능평가

본 실험의 목적은 쓴맛의 원인과 저감하는 방법을 알아내는 것이다. 따라서 관능평가는 외관(appearance), 맛(taste), 향(odor), 종합적 기호(overall preference) 등의 종합적 평가보다는 쓴맛(bitterness)의 유무, 강도, 쓴맛 저감 정도를 파악하려고 하였다. 평가항목은 매우 그렇다(5점), 그렇다(4점) 보통이다(3점), 그렇지 않다(2점), 매우 그렇지 않다(1점)로 평가하는 5점 척도법을 이용하여, 참여연구원과 협동 연구기관으로 구성된 양조 전문패널 10명을 대상으로 하였다.

2절 연구수행 결과

<주관기관-서울벤처대학원대학교 산학협력단>

1. 막걸리 쓴맛 원인 규명을 위한 원료(쌀) 분석

막걸리 쓴맛 원인 규명을 위해 우선 국내에서 주로 막걸리 제조에 사용되는 시판 쌀(국내산 5종, 수입산 1종)의 이화학적 분석을 실시하였다.

표7에서 보는 바와 같이 국내산 쌀 5종의 수분은 11.0~13.1%를 나타내었고, 단백질은 5.3~6.5%를, 지질은 0.81~0.94%를 나타내었다. 그리고 무기질은 0.37~0.43%를 나타내었다. 반면 수입쌀은 이화학적 분석치가 국내산의 평균치를 보였다.

국내 막걸리 제조에 사용되는 쌀의 이화학적 특성에서는 유의적으로 거의 없는 것으로 나타나 쌀의 품종 자체가 막걸리 쓴맛에 직접적인 영향을 주지 않을것으로 판단된다.

표7. 쌀 품정에 따른 이화학적 특성(%)

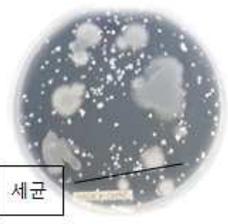
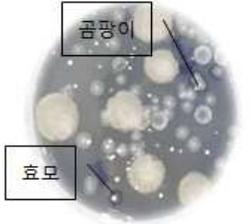
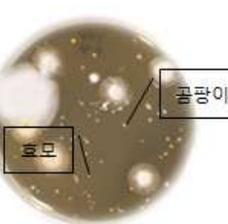
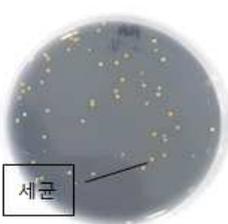
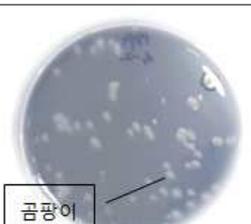
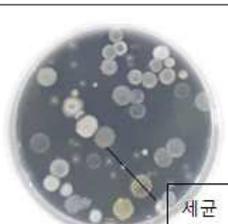
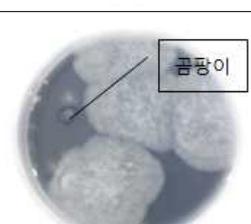
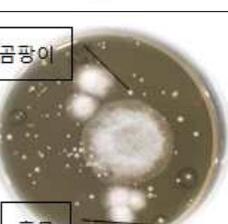
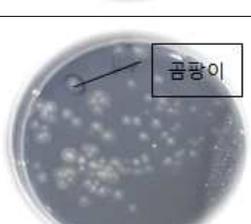
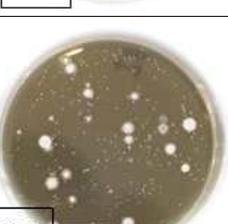
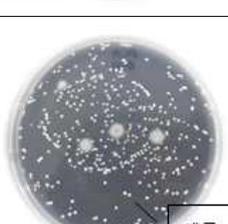
구분	수분	단백질	지질	무기질
추정	13.1	5.4	0.90	0.37
삼광	12.7	6.5	0.89	0.38
일품	11.0	5.6	0.81	0.41
호평	13.1	6.2	0.93	0.40
일미	12.5	5.3	0.94	0.43
수입쌀(미국)	13.5	5.1	0.92	0.40

2. 막걸리의 쓴맛 원인 규명을 위한 국(누룩, 입국) 분석

막걸리 제조에 사용되는 주 원료중의 하나인 국 특성 역시 막걸리 쓴맛에 영향을 미치므로 본 연구에서는 누룩과 입국의 미생물 분포와 역가를 분석하였다.

6개 누룩중 야생효모가 존재하는것으로 판정된 누룩은 내분비전국, 송학곡자, 백수환동주국이며, 향온국, 진주곡자, 연화주국에서는 효모가 존재하지 않았다. 누룩에서 분리동정된 야생효모로서는 주로 *Pichia anomala*가 우점종으로 나타났고, 이 효모는 고삼투압, 낮은 pH, 낮은 산소환경에서도 증식이 가능한 효모이다. 그리고 6개 누룩 모두 곰팡이가 존재하는 것으로 판정되었으며 내분비전국, 향온국에서는 *Aspergillus flavus*로 판명되었고, 연화주국에서만 정상적인 주류 곰팡이인 *Aspergillus niger*로 판명되었다. *Aspergillus*는 다양한 기후에서 발견되는 수백의 곰팡이를 포함하는 한 속(屬)이다. *Aspergillus flavus*는 암을 유발할 수 있는 Aflatoxin을 생성하기 때문에 *A. oryzae*와의 감별이 필요하다. *A. niger*는 주로 특정 과일이나 채소 등의 표면에 오염되어 검게 나타나지만 식품 산업에서 구연산, 글루콘산 등, 많은 물질을 만드는 데 쓰이는 유용한 곰팡이다. *Penicillium*은 자연 환경에서뿐만 아니라 음식과 의약품 생산에 있어서도 매우 중요한 Ascomycetes의 곰팡이류의 한 속(屬)이다. 이 속의 몇몇 종들은 인체 내에서 균의 성장을 억제하거나 균을 죽이는 항생제로서 사용되는 페니실린을 생산한다. 그리고 다른 종들은 치즈를 만드는데 사용된다. 한편 6종의 누룩은 557~904sp를 나타내어 정상적인 역가를 보였고, 입국의 경우도 50sp 이상을 나타내어 국의 전분분해력에는 문제가 없는 것으로 판단된다. 본 연구에 사용된 시판 국(소율곡, 쌀입국)의 역가 역시 정상적인 수치를 보였다.

표 8. 국에서 분리한 미생물 분포도

구분	미생물분포도			역가
	PDA (곰팡이, 효모배지)	YPD (곰팡이, 효모배지)	PCA (세균배지)	
이화곡				648
내부 비전곡				748
향온곡				557
신곡				847
송학 곡자				904
진주 곡자				648
제조입국	자체 제조 입국			58
시판입국	좋은곡식(쌀입국)			63

3. 막걸리 제조공정 연구

본 연구에서 막걸리 쓴맛 원인 규명 및 저감화를 위한 방안으로는 그림2와 같이 쌀을 50% 이상 도정하는 방안과 효소제 투입 및 은폐제 투입이 제시되었다. 각 효소제별 최적 투입량은 본 보고서 연구결과에 제시되었으며, 시제품과 관능평가를 통해 막걸리의 쓴맛 원인과 저감화를 달성하였다.

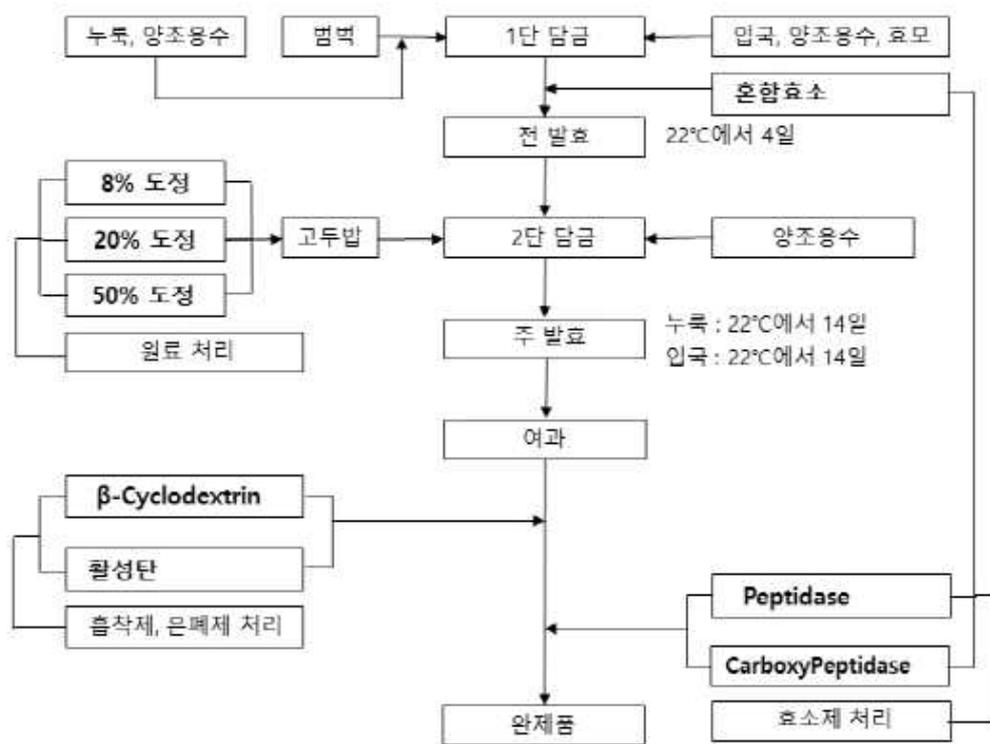


그림2. 막걸리 쓴맛 저감화를 위한 공정 모식도

4. 교반 시간에 따른 쓴맛 연구

가. 실험재료

원료 쌀은 2020년 생산된 판매장에서 추정을 구매하여 사용하였다, 누룩은 시판되고 있는 전통 누룩 중에서 2019년 주류산업정보 실태조사 결과를 참조하여 주류 제조장에서 가장 많이 사용하고 있는 송학곡자(소울곡)를 사용하였으며, 입국은 협력업체에서 추천한 좋은곡식의 쌀입국을 구매하였다. 효모는 활성건조 효모(*Saccharomyces cerevisiae*)를 사용하였고, 시약은 분석용 특급을 사용하였다.

나. 실험방법

(1) 쌀의 전처리

쌀은 범벅과 고두밥 2가지의 방법으로 구분하여 사용하였다. 곡물을 가루로 내어 끓는 물을 부어 가며 익히면 범벅이 된다. 범벅은 전분 소화도가 낮아 효소 분해에 의한 당

생성력이 낮아 발효 기간은 다른 전처리법보다 길고 비교적 높은 알코올 함량이 있는 것으로 알려져 있다.

범벅을 제조하기 위하여 멥쌀을 30분간 세미하여 3시간 동안 실온의 물에서 침지 후 30분간 물빼기를 하고 stone roller mill로 분쇄한 후 20mesh 체로 균질화하여 사용하였다. 범벅은 100℃로 끓는 물을 쌀가루에 4회 나누어 첨가하면서 나무주걱으로 반죽을 하여 반숙이 되도록 저은 후 실온에서 냉각하였다.

고두밥은 불린 쌀을 수증기를 이용하여 찌는 것으로 쌀의 전처리 방법 중 가장 많이 이용되는 방법이다. 불린 쌀을 수증기로 찌면 호화가 되면서 미세한 기공이 생겨나고, 기공을 통해 효소의 작용이 원활해진다. 병행복발효 방식의 술빚기에서 당화와 발효의 균형을 유지할 수 있는 전처리 방법이다. 고두밥을 만들 때는, 속은 충분히 호화가 되고 겉은 고실고실한 상태가 이상적으로 알려져 있다. 고두밥 제조는 쌀을 30분간 깨끗이 씻어 3시간 동안 물에 불려 30분간 물빼기를 한 후 전기 찜기로 120℃에서 40분간 증자하였다. 10분간 뜸을 들인 후 우레탄 망 위에 펼쳐 실온에서 냉각하였다.

표 9. 쌀의 전처리 과정

구분	세미	침지	물빼기	쌀 가공방식	호화도(%)	냉각
범벅	30분	3시간	30분	쌀가루	63	1시간
고두밥	30분	3시간	30분	-	100	20분

(2) 주류의 제조

병행 복발효를 하는 발효주에 있어서 당화와 발효는 효소와 효모의 작용으로 이루어진다. 밀술은 호기적 조건이 우세한 상황으로, 효소에 의해 전분이 분해되며 생성되는 당분은 주로 효모의 증식에 사용된다. 덧술은 완성된 밀술에 추가로 전분을 공급하는데, 혐기적 조건이 우세하여 생성된 당은 밀술에서 증식된 효모에 의해 알코올로 변하게 된다.

누룩은 소맥 등을 분쇄하여 반죽 성형한 후, 대기 중에 있는 곰팡이를 자연 번식시켜 각종 효소를 생성 분비하는 국의 일종이다. 다양한 야생효모의 작용으로 복잡한 풍미가 생성되기도 한다. 누룩에는 전분에 작용하여 전분의 α -1, 4-glucoside 결합을 무작위로 가수분해하여 포도당과 텍스트린으로 분해하여 최종적으로는 맥아당을 생성하는 α -amylase, 전분의 비환원성 말단부터 포도당(glucose)을 분리하는 당화 효소 glucoamylase, 단백질을 가수분해하여 펩타이드나 아미노산을 생성하는 효소 protease, 지방에 작용하여 지방산과 글리세롤을 생성하는 효소 lipase 등이 들어있다. 누룩에는 효소를 생성시키는 *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Absidia*, *Mucor* 등의 곰팡이 외에 효모, 세균, 방선균 등 자연에 존재하는 미생물을 다수 포함하고 있다. 이러한 다양한 미생물의 작용은 깊고 풍부한 풍미와 연관이 있으며, 다양한 대사산물을 생성한다.

누룩에 들어있는 효소와 효모가 작동하므로 밀술에서 투입한 양으로 당화와 발효가 진행된다.

입국은 전분질 원료를 증자한 후 순수배양한 *Aspergillus* 혹은 *Rhizopus* 등의 누룩곰팡이를 인위 조작으로 번식시켜 효소를 생성하는 국이다. 입국은 곰팡이가 생성하는 효소에

의한 전분질 분해, 단백질 분해와 특정 향기 성분 부여, 구연산 생성으로 술덧 오염을 줄일 수 있다. 입국은 단시일에 제조할 수 있으며, 순수 배양한 균을 접종하므로 잡균 오염이 적다. 따라서 종균과 배양조건의 조절로 발효 후 품질특성을 예측할 수 있으며, 여러 종류의 입국을 조합하여 맞춤형 제조를 할 수 있다는 장점이 있다. 입국은 효소 작용만을 하며, 효모가 들어있지 않아 효모를 첨가해주어야 한다. 발효제는 시중에서 구매한 송학곡자의 누룩과 좋은곡식의 쌀입국을 사용하였다.



그림 3. 누룩과 입국

병행 복발효에서는 담금 방식이 주류의 특성에 미치는 영향이 크며, 누룩을 발효제로 사용하는 단양주의 경우는 산도가 높을 가능성이 있어서 이양주 방식으로 제조하였다.

누룩을 발효제로 사용하는 경우 밀술은 1의 전처리 방법으로 멍쌀 180g, 물 540ml, 누룩 57.6g을 넣어 제조하였다. 가수는 곡물의 120%, 발효제는 곡물 사용량의 8%로 하였다. 22℃의 온도조절이 가능한 발효실에서 7일간 발효를 한 후 덧술을 하였다. 덧술은 멍쌀 540g, 물 320ml를 술덧에 섞어 제조하였다. 덧술에서는 10%, 20%, 50% 도정을 한 쌀을 1의 전처리 방법으로 각각 고두밥을 지어 냉각 후 밀술과 잘 섞어 22℃의 온도조절이 가능한 발효실에서 14일간 발효를 하였다. 밀술에서 충분히 효모의 성장이 이루어졌으므로 덧술에는 효모를 투입하지 않았다.

입국의 경우에는 밀술은 1의 전처리 방법으로 입국 110g, 물 170ml, 효모 0.55g의 비율로 제조하였다. 가수는 곡물의 140%, 발효제는 곡물 사용량의 15%로 하였다. 22℃의 온도조절이 가능한 발효실에서 7일간 발효를 한 후 덧술을 하였다. 덧술은 멍쌀 720g, 물 840ml를 밀술에 섞어 제조하였다. 덧술에서는 8%, 20%, 50% 도정을 한 쌀을 1의 전처리 방법으로 각각 고두밥을 지어 냉각 후 밀술과 잘 섞어 22℃의 온도조절이 가능한 발효실에서 14일간 발효를 하였다. 밀술에서 첨가한 효모의 충분한 성장이 이루어졌으므로 덧술에는 효모를 투입하지 않았다.

표 10. 교반 시간에 따른 밀술과 덧술의 비교

구분		밀술				덧술		합계		비율(%)	
		쌀 (g)	물 (ml)	발효제 (g)	효모 (g)	쌀 (g)	물 (ml)	쌀 (g)	물 (ml)	물/쌀 (%)	발효제/쌀 (%)
누룩	0분	180	540	57.6	-	540	320	720	860	120	8
	10분	180	540	57.6	-	540	320	720	860	120	8
	30분	180	540	57.6	-	540	320	720	860	120	8
	60분	180	540	57.6	-	540	320	720	860	120	8
입국	0분	-	170	110	55	610	840	720	1010	140	15
	10분	-	170	110	55	610	840	720	1010	140	15
	30분	-	170	110	55	610	840	720	1010	140	15
	60분	-	170	110	55	610	840	720	1010	140	15

밀술의 가공법은 다음과 같다.

범벅은 누룩을 발효제로 이용하는 시료에 적용하였다. 쌀을 3시간 침지하고, 30분 물빼기를 거쳐 가루를 내어 무게를 측정하였다. 가능한 균일한 호화를 유도하기 위해 비교적 넓은 용기에 쌀가루를 넣고 3등분을 한 후 각 등분당 용량의 1/4 정도의 끓는 물을 부어 잘 저어주면서 된죽 형태를 만들었다. 나머지도 같은 방법으로 한 후 한데 모아 나머지 물을 넣고 잘 섞어 반죽을 완성하였다. 25℃로 냉각되면 준비한 누룩을 넣고 골고루 섞어 발효조에 넣고 22℃에서 7일간 충분히 발효하였다.

입국은 이미 호화된 재료에 곰팡이가 생성한 효소가 들어있는 상태이므로 열을 가하면 변성이 된다. 따라서 입국을 이용한 밀술은 다른 가공 형태를 하지 않고 바로 발효조에 입국과 물을 넣고 효모를 투입한 후 골고루 섞은 다음 22℃에서 7일간 충분히 발효하였다.



그림 4. 가공 방식에 따른 재료의 형태

누룩

입국



그림 5. 밀술의 형상

1단 담금은 누룩의 경우에는 쌀을 가루내어 범벅의 형태로 하였으며, 재료의 분배는 필요한 쌀을 3시간 침지하고 30분 물빼기를 거쳐 가루내어 무게를 측정하였다. 측정 후 무게를 3등분하여 정확히 분배하는 방식으로 재료를 취했다. 범벅은 가능한 균일한 호화를 유도하기 위해 용기에 들어있는 쌀가루를 3등분하여 끓는물을 넣어 교반하였다. 나머지 2개소도 교반을 한 후 남아 있는 물로 전체 교반하는 방식으로 반죽을 하였다. 반죽을 한 후 최대한 공기에 닿는 면적이 많게 골고루 펼치는 방식으로 자연냉각을 시도하였다. 25℃로 냉각되면 준비한 누룩을 넣고 교반한 후 발효조에 넣고 22℃에서 7일간 충분히 발효하였다.

입국은 이미 호화된 재료에 곰팡이가 생성한 효소가 들어있는 상태이므로 열을 가하면 효소가 불활성되어 작동을 할 수 없다. 따라서 입국을 이용한 밀술은 다른 가공 형태를 하지 않고 바로 발효조에 입국과 물을 넣고 효모를 투입한 후 교반하였다.



그림 6. 가공 방식에 따른 재료의 형태



그림 7. 교반이 끝난 밀술의 형상

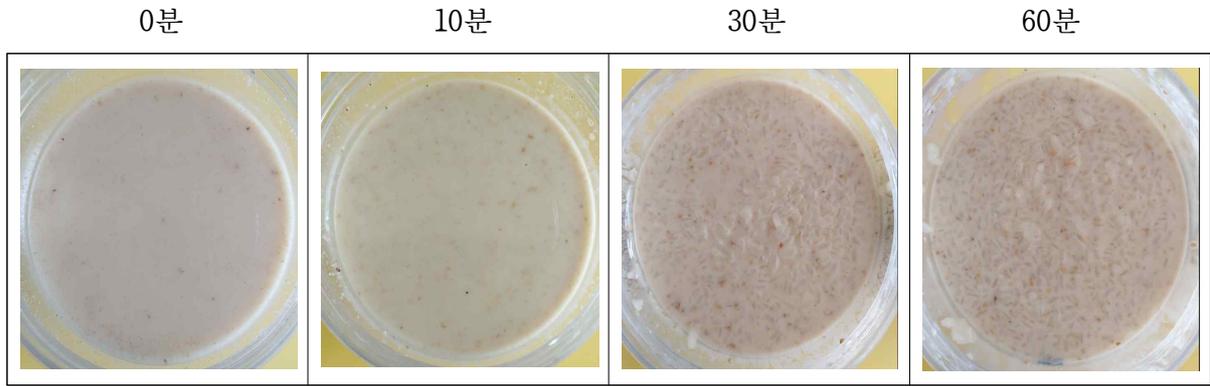


그림 8. 교반 시간에 따른 형상(누룩-교반 직후)

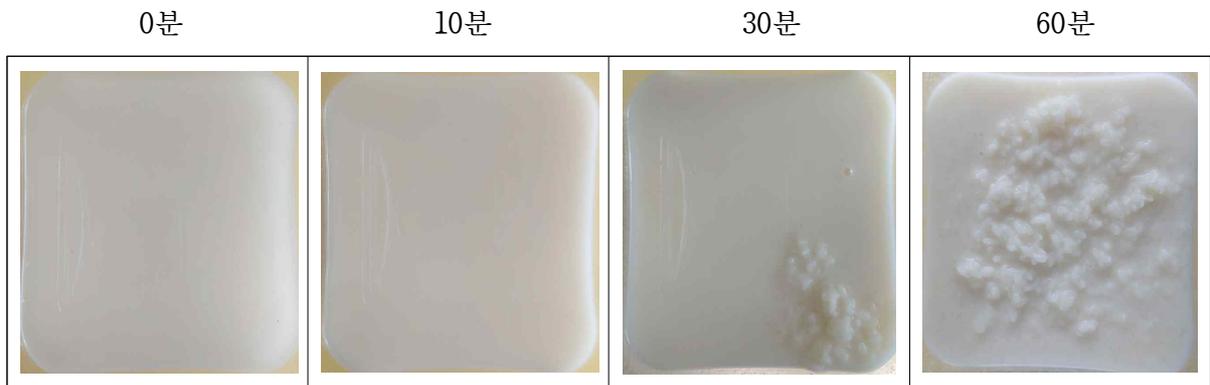


그림 9. 교반 시간에 따른 형상(입국-교반 직후)

덧술은 고두밥을 이용하였다. 고두밥은 원료를 3시간 수침한 다음 30분 물빼기를 한 후 전기증자기를 이용하였다. 수증기가 올라오면 40분간 증자를 한 후 25℃로 냉각하여 밀술과 섞어주었다. 1단 담금 7일 후에 2단 담금을 하여 22℃에서 14일간 발효하였다.



그림 10. 교반 시간에 따른 형상(누룩-여과 직전)

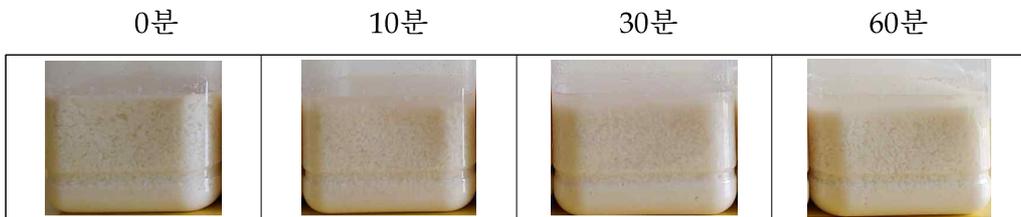


그림 11. 교반시간에 따른 형상(입국-여과 직전)

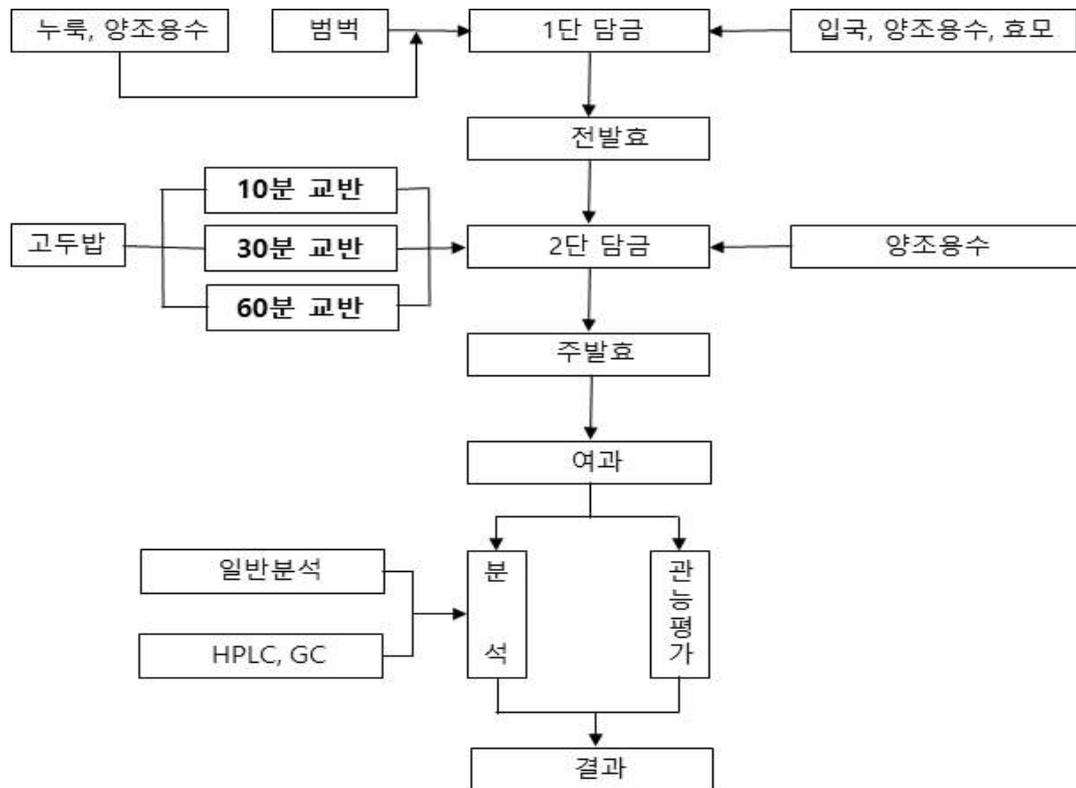


그림 12. 교반 시간 공정도

다. 분석결과

(1) 이화학적 분석

교반 정도를 달리하여 제조한 발효주의 알코올은 모두 15~17% 정도로, 다른 실험보다 알코올 함량이 낮게 생성된 것으로 나타났다. pH의 경우, 누룩에서는 4.6으로 다른 실험보다 높은 수치였고, 입국은 변화가 없었다. 총산도의 경우, 누룩은 교반 시간이 길수록 낮아지는 경향을 보였으며, 다른 실험보다는 높게 나타났다. 입국에서는 특이한 변화가 나타나지 않았다.

표 11. 교반 시간에 따른 이화학적 함량

구분		Alcohol(%)	당도(Brix)	pH	총산도(W/V%)
누룩	0분	15.8	8.8	4.6	0.798
	10분	15.0	7.8	4.6	0.672
	30분	15.5	8.6	4.4	0.540
	60분	17.0	9.9	4.6	0.432
입국	0분	16.2	6.6	4.0	0.612
	10분	16.3	6.2	3.9	0.618
	30분	16.3	6.3	4.0	0.630
	60분	16.4	5.9	4.0	0.636

(2) 유기산 분석

유기산 함량 측정 결과는 표12에 나타내었다. 누룩이나 입국에서 Lactic acid(8272.74~1445.54mg%)가 가장 많은 함량을 나타내었고, 다음으로 Acetic acid(4839.82~1553.78mg%) 순이었다. Lactic acid의 경우 젖산균에 의해 생성되는 것으로 추측되며, Acetic acid의 경우 Bacillus의 작용으로 증가되는 것으로 보고되었다. 유기산 총량은 누룩의 경우 입국보다 2배 정도 높았으며, 10% 도정에서 50% 도정 방향으로 대부분의 유기산과 전체 함량이 낮아지는 추세를 보였다. 입국의 경우에는 도정률과 유기산의 함량과 특별한 연관이 없는 것으로 보였다.

표 12. 교반시간에 따른 유기산 함량(mg%)

구분		Oxalic acid	Formic acid	Malic acid	Lactic acid	Acetic acid	Cirtic acid	Succinic acid
누룩	0분	-	-	-	4,729.26	835.04	-	3,588.98
	10분	-	-	-	4,307.96	744.70	-	3,340.64
	30분	-	-	-	5,505.16	700.68	-	2,768.56
	60분	-	-	-	4,827.42	996.38	511.74	2,773.84
입국	0분	-	-	583.52	3,101.12	852.72	850.80	-
	10분	-	85.84	1,207.38	2,594.12	2,140.16	1,733.84	672.22
	30분	-	-	92.70	2,689.26	839.86	788.76	-
	60분	-	-	158.04	2,703.60	959.14	854.92	-

(3) 관능평가

교반시간에 따른 쓴맛 관련 관능평가 결과 누룩과 입국 모두에서 비교적 유사한 결과가 나타났다. 교반을 하지 않은 시료의 경우 공통적으로 비교적 강한 쓴맛을 느낀 것으로 나타났다. 10분 교반한 경우에 쓴맛이 약간 감소하였으나, 교반을 하지 않은 시료와 큰 차이는 나타나지 않았다. 교반시간이 30분의 경우에는 쓴맛이 비교적 감소한 것으로 나타났으며, 60분을 교반한 시료와는 큰 차이를 보이지 않았다. 누룩의 경우에 입국보다 쓴맛이 조금 더 감소한 것으로 나타났다.

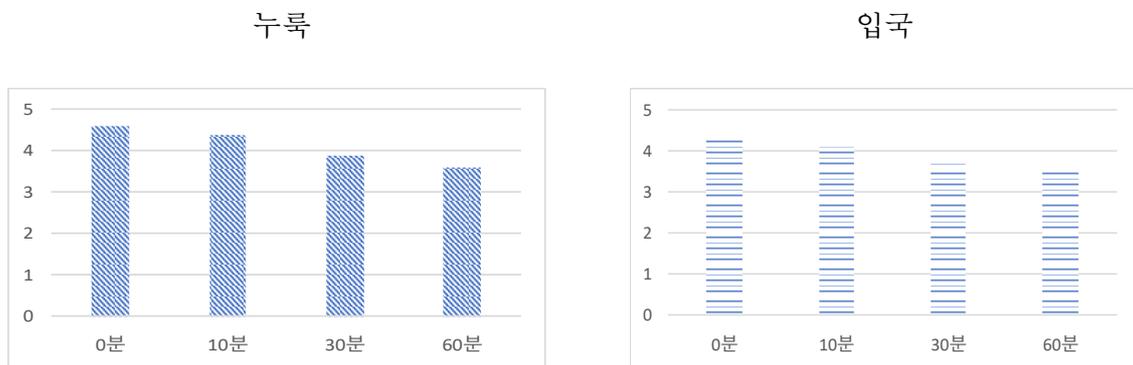


그림 13. 관능평가

5. 막걸리 쓴맛의 학술적 원인 규명 연구

가. 분석방법

술의 성분 중에서 쓴맛에 관여하는 성분이 소수성 펩타이드라는 선행연구(Hashizume et al., 1987 등)의 결과에 따라 소수성 펩타이드를 분석하려는 분석방법을 결정하였는데, 그 내용은 다음과 같다.

먼저, 표준물질을 이용하여 Organic acid의 검출되는 영역을 알아보고, 실제 시료를 측정하여 검출되는 영역을 비교·분석한다. 분석 데이터를 바탕으로 펩타이드 분석에 필요한 분석조건을 설정하고, 측정을 통해 분석조건을 교정하였다. 교정 후 펩타이드 분석에 필요한 분석조건을 확정하고, 확정된 분석조건에 따른 분석을 통해 펩타이드로 예측되는 물질을 분리·정제하고 분취를 하였다.

분취를 한 물질은 LCMSMS 분석을 통해 질량값을 알아내고, 선행연구에서 언급한 쓴맛이 나는 펩타이드(Fujimaki et al., 1971; Otagiri et al., 1985 등)와 비교하여 질량값이 소수점 첫째 자리까지 일치하는 표적 펩타이드를 선택하였다. 이후 선택한 펩타이드와 실제 아미노산의 서열이 같은지 MSMS 분석을 하여 유사도를 확인한 후 확정하였다.

분취를 하지 않은 시료는 전처리 후 1차 LCMS를 하고 mass list(maxquant 프로그램 사용)를 확인 후 선행연구에서 밝혀진 쓴맛 펩타이드 분자량의 이론값과 측정값의 일치 여부(10ppm 이내)를 확인하여 target list를 만들었다. MSMS 분석을 통해 peptide fragment spectrum을 확인하고, peptide fragment mass calculator를 사용하여 이론값과 spectrum 상의 mass 값과 일치 여부를 확인하였다.

나. 분석결과

(1) 분취

먼저 유기산이 검출되는 영역을 알아보기 위해 유기산 분석에 사용하는 10가지 성분의 표준품으로 분석을 진행하여, 15분 전에 검출되는 것을 확인하였다.

분석에 이용되는 장비에 따른 유기산의 분석결과와 분석조건은 다음과 같다.

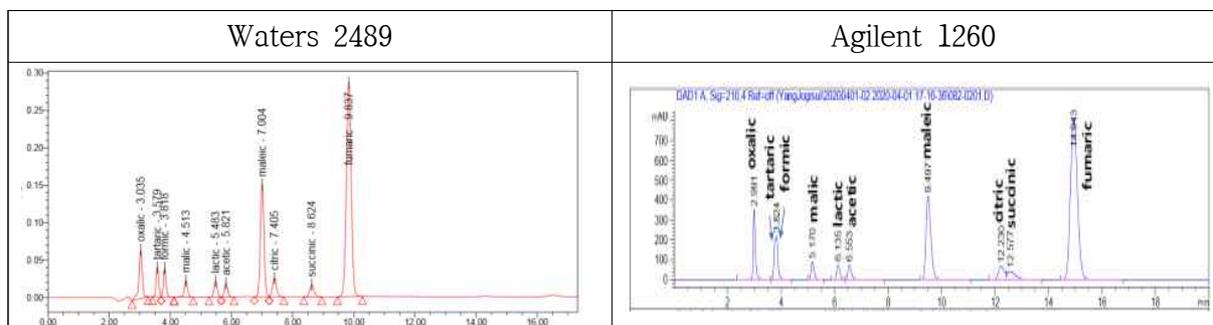


그림 14. 유기산 분석결과

표 13. 유기산 분석조건

	Waters 2489	Agilent 1260
Column	TSK-GEL ODS 100V (4.6mmi.d. X 250mm, 5 μ m, 12nm)	YMC Triart C18 (4.6mmi.d. X 250mm, 5 μ m, 12nm)
Temperature	30 $^{\circ}$ C	30 $^{\circ}$ C
Flow rate	1 ml/min	1 ml/min
UV	210, 220 nm	210, 220 nm
Eluent	150mM NaH ₂ PO ₄ phosphoric acid	20mM phosphoric acid
Injection volume	2 μ l	5 μ l

분석조건을 설정하기 위해 Blank, Organic acid, Sample 순으로 검출을 시도하였으며, 동일한 분석조건으로 진행한 결과는 그림 15, 16, 17과 같다.

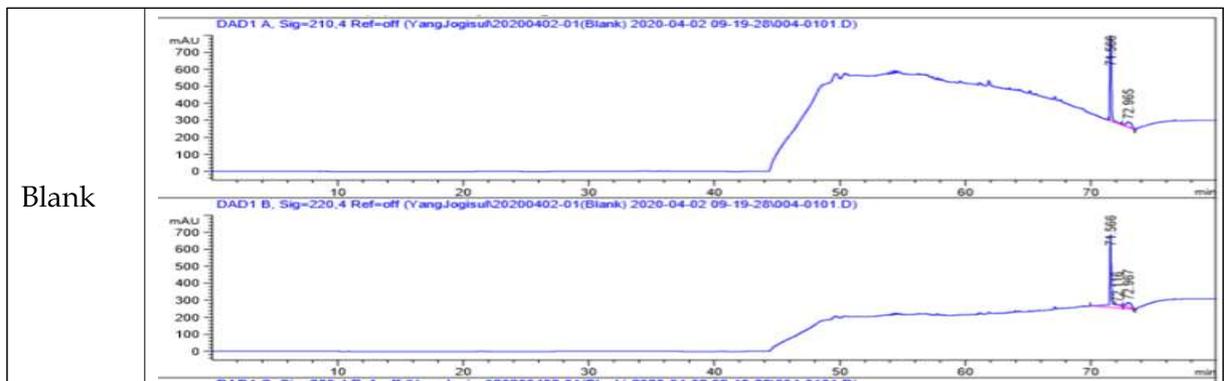


그림 15. 분석조건 설정을 위한 분석 결과(Blank)

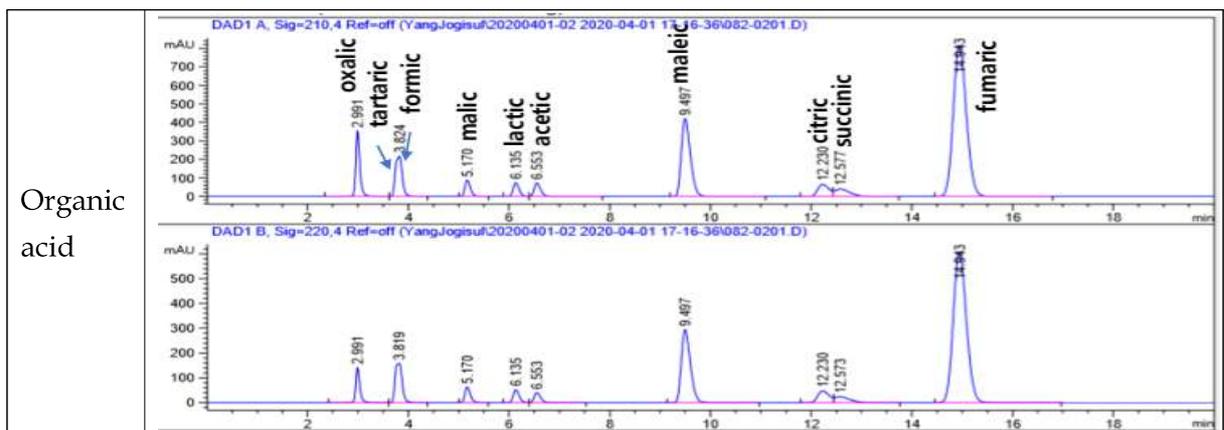


그림 16. 분석조건 설정을 위한 분석 결과(유기산)

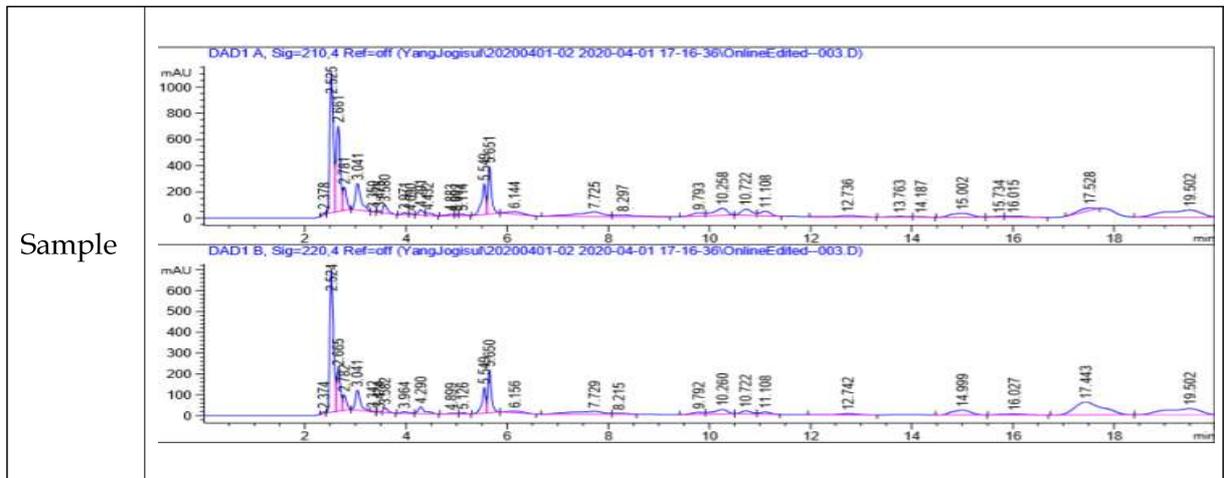


그림 17. 분석조건 설정을 위한 분석 결과(샘플)

분석조건을 설정하기 위해 샘플과 유기산 표준품을 분석하였으며, 유기산이 검출되는 영역과 명확히 구별되게 나타나고 있다. 유기산은 15분대에서 피크가 확인되었으며, 샘플 분석 크로마토그램에서 0~15분에 다수의 피크가 겹치기 때문에 각 유기산 표준품에 상응하는 피크를 찾기가 어려웠다. 유기산이 용출되는 0~15분 이외의 영역에서 다수의 피크가 관측되었다. 분석 결과는 다음과 같다.

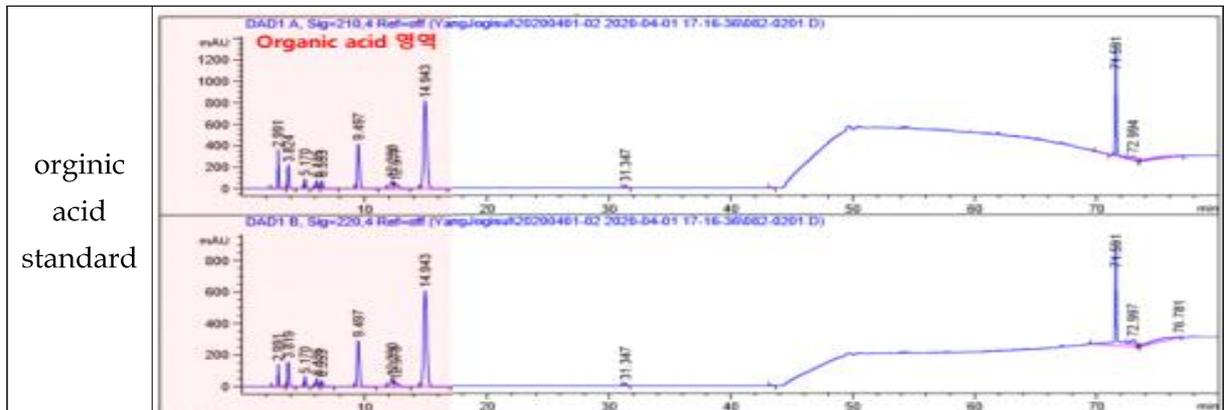


그림 18. 유기산 표준품

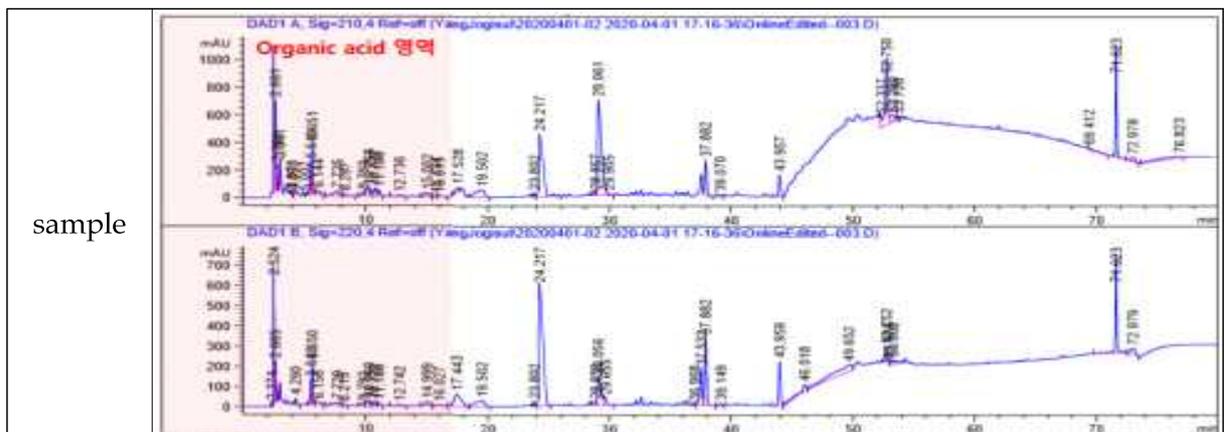


그림 19. 샘플

분석조건을 설정하기 위한 분석조건과 전계 조건은 아래와 같다.

표 14. 분석조건을 설정하기 위한 분석조건과 전계 조건

분석조건		전계 조건			
Equipment	Agilent 1260				
Column	YMC Triart C18 (4.6mmi.d. X 250mm, 5µm, 12nm)				
Temperature:	30°C				
Flow rate	1 ml/min	0.00	100	0	0
UV at	210, 220, 280, 254 nm	15.00	100	0	0
Eluent	A) 20mM phosphoric acid	40.00	0	100	0
	B) Acetonitrile : 20mM phosphoric acid = 20 : 80	45.00	0	0	100
	C) 20% Acetonitrile+0.1% TFA	70.00	0	0	100
	D) Acetonitrile+0.1% TFA	80.00	0	0	100
Injection volume	sample 10 µl (시료원액 사용) organic acid 5 µl Blank DW 5 µl				

분석 결과에 의하면 설정된 조건에서 약 15분 이후에 용출된 피크를 펩타이드로 보고 분리를 진행하였다. 선행연구에서 보여주는 쓴맛의 원인이 소수성 펩타이드라는 결과를 적용하면 소수성 펩타이드는 15분대 이외의 영역에서 검출될 것으로 보인다. 쓴맛이 나는 펩타이드가 20분대 후에 추출되었다는 결론을 적용하여 15분대 이후의 검출영역에 맞는 분석조건을 마련하는 분석결과를 데이터로 활용하였다. 아래 그림은 기존 분석조건으로 분리한 데이터이며, 노랑 바탕은 유기산 영역, 적색 화살표를 펩타이드로 판단하고, 분석조건 마련과 분취를 하려는 대상으로 선정하였다.

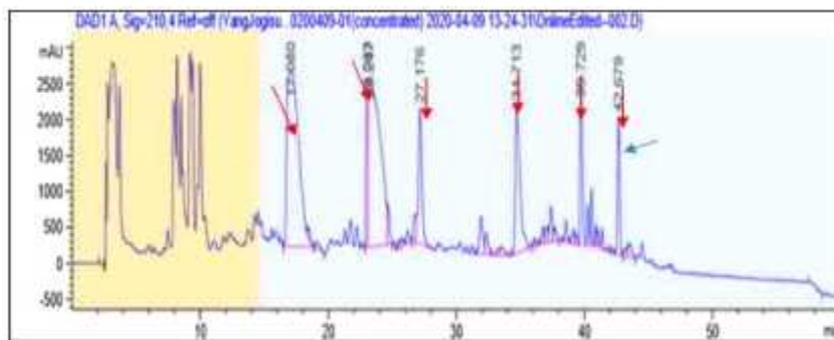


그림 20. 펩타이드 피크 선정

샘플의 전처리는 탁주임을 고려하여 진행하였다. 먼저 원심분리를 통해 컬럼의 전단에 막혀 분리를 좋지 않게 하는 원인이 되는 불용성 물질을 제거하였고, 증류하여 이동상과

의 상호작용이 틀어져 분리 재현성이 떨어질 수 있는 에탄올을 제거한 후 사용하였다. 분석조건1)을 이용하여 총 11개의 샘플을 분석했을 때 각 샘플의 분석 비교 결과는 표와 같다. 누룩을 사용한 샘플에서 17분대의 피크는 증가가 되고 있으며, 약 39분경의 피크는 모두 상대적으로 낮아져 있는 것을 확인할 수 있다.

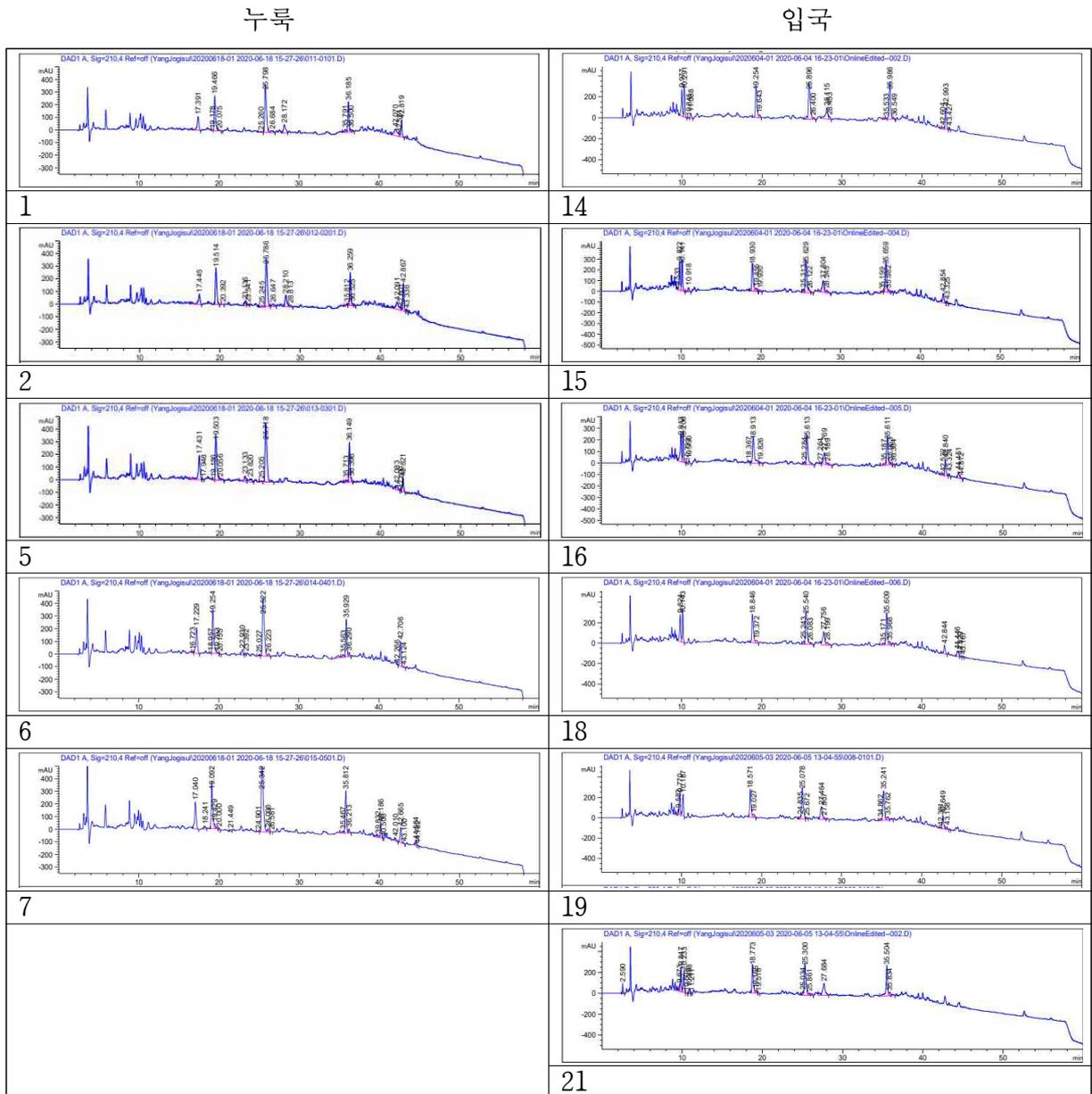


그림 21. 분석조건1)을 이용한 샘플의 분석자료

표 15. 분석조건1)의 분석조건과 전계 조건

분석조건		전계 조건		
Equipment	Agilent 1260		A	B
Column	YMC Triart C18 (4.6mmi.d. X 250mm, 5 μ m, 12nm)	0.00	100	0
Temperature	25 $^{\circ}$ C	30.00	85	15
Flow rate	1 ml/min	55.00	40	60
UV	210, 220, 280, 254 nm	55.01	0	100
Injection volume	5 μ l (시료원액 사용)	60.00	0	100
Eluent	A) 0.1% TFA water B) Acetonitrile			

위의 샘플중에서 국내에서 막걸리를 제조할 때 주로 이용하는 10% 도정된 쌀로 누룩을 사용한 샘플 1번과 입국을 사용한 샘플 14번을 최종 샘플로 선정하여 분석조건2)로 분석을 하였다. 분석조건을 새로 설정한 이유는 앞의 분석조건은 분석을 위한 조건이었고, 분취를 효율적으로 진행하기 위해 분리조건을 새로 설정할 필요가 있기 때문이다. 아래 분석조건 2)는 새로 설정하여 최적화한 분석조건이다.

표 16. 새롭게 설정한 분석조건2)의 분석조건과 전계 조건

분석조건		전계 조건		
Equipment	Agilent 1260		A	B
Column	YMC Triart C18 (4.6mmi.d.X 250mm, 5 μ m, 12nm)	0.00	100	0
Temperature	25 $^{\circ}$ C	30.00	80	20
Flow rate	0.5 ml/min	55.00	35	65
UV	210 nm	65.00	0	100
Injection volume	2 μ l			
Eluent	A) 0.1% TFA DW / B) Acetonitrile			

1번 샘플

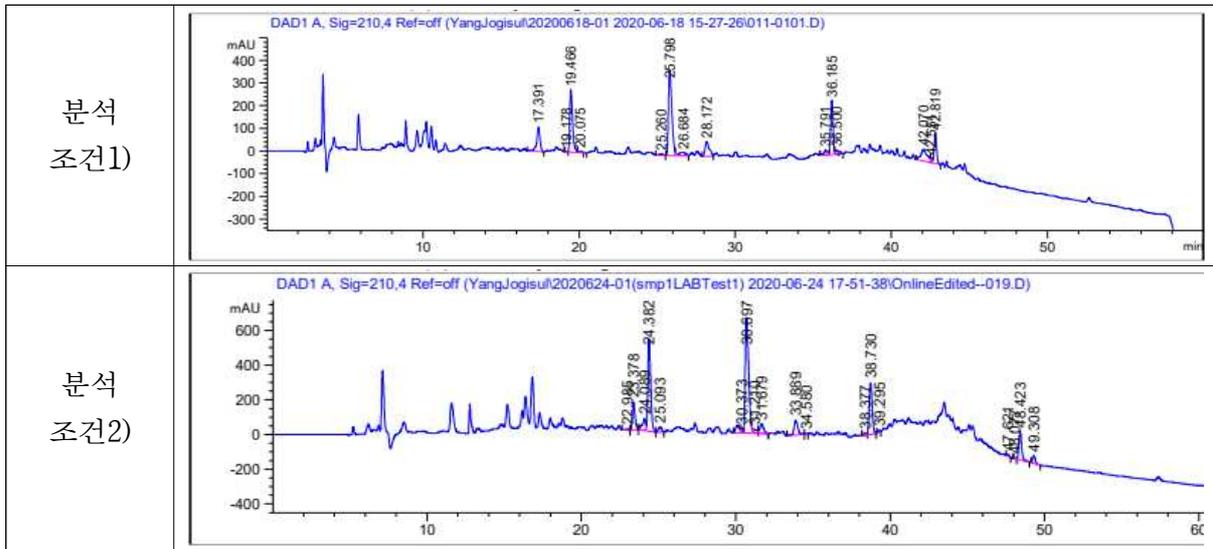


그림 22. 분석조건1)과 분석조건 2의 비교

14번 샘플

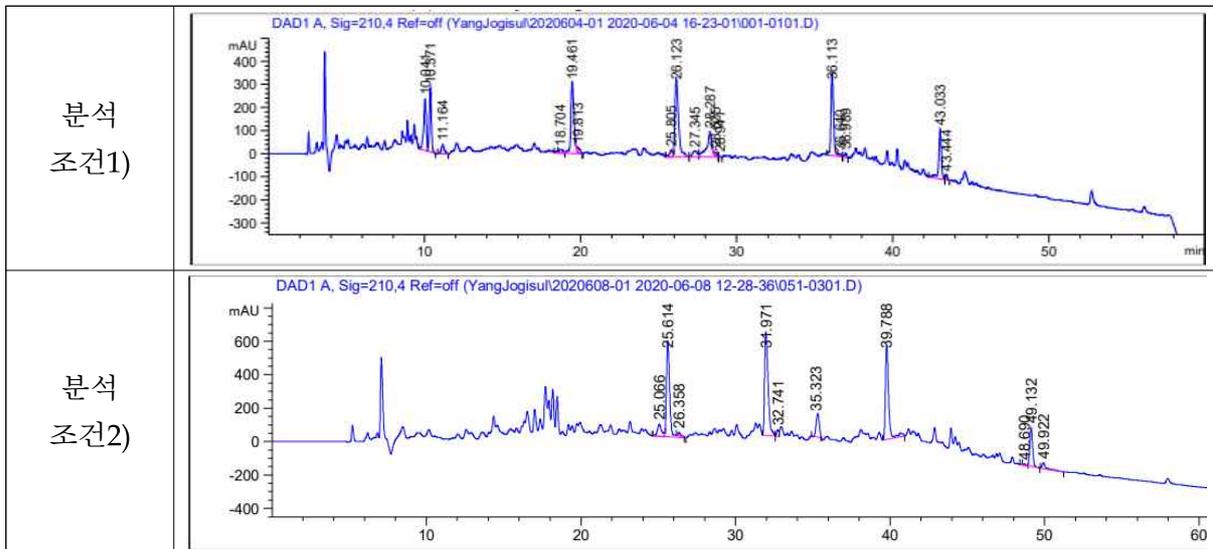


그림 23. 분석조건1)과 분석조건 2의 비교

위의 그림 22와 23을 보면 새로 설정한 분취용 분석조건에서 피크의 위치가 뒤로 밀리면서 분리가 최적화된 것을 확인할 수 있다.

분석조건2)를 바탕으로 아래와 같이 분리조건1)을 설정하여 분리를 진행하였다. 분리 후 2차 분석을 위해서는 각 피크별로 많은 양이 필요했다. 한 번에 많은 양을 주입하여 분리하기 위해 Preparative HPLC system 과 50mmI.D. DAC Column을 이용하여 분리, 정제를 시도하였다.

표 17. 분리조건1)의 분석조건과 전계 조건

분석조건		전계 조건	
Equipment	YMC K-Prep LAB 300		
Column	YMC DAU column Triart C18 (50.0mmi.d.X 500mm, 10 μ m, 12nm)		
Temperature	Ambient		
Flow rate	59ml/min		
UV	210nm		
Injection volume	6ml(원액 24ml을 6ml로 4배 농축하여 주입)		
Eluent	A) 0.1% TFA DW / B) Acetonitrile		

	A	B
0.00	100	0
60.00	80	20
110.00	35	65
110.03	0	100
120.00	0	100
120.03	100	0
145.00	100	0

분리조건1)의 분석조건으로 분리 정제한 데이터는 아래 그림 24와 같다.

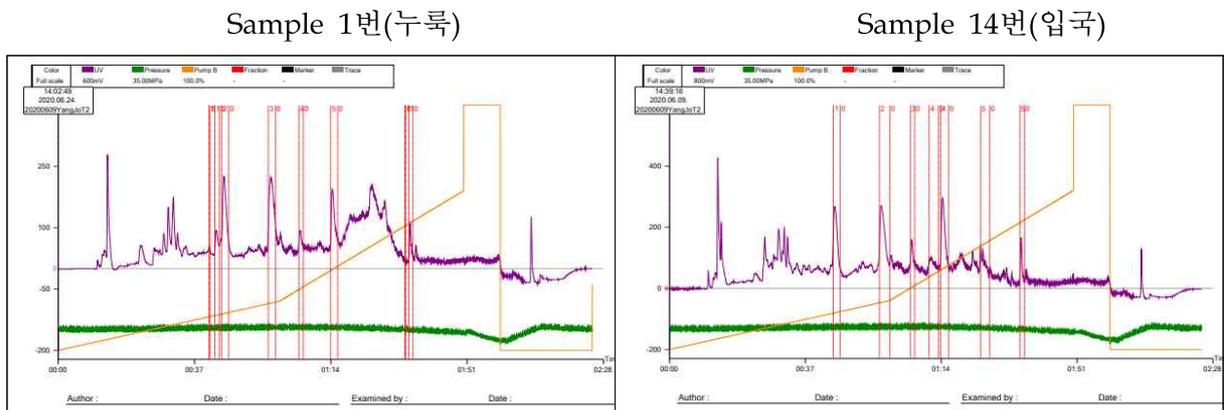


그림 24. 분리조건1)의 분석조건으로 분리 정제한 데이터

분석으로 확인했던 샘플의 분석조건을 분취를 위한 최적화로 설정하기 위해 분석조건 2)로 진행하였다. 분석과 동등한 데이터가 나오고 있으며, 의도한 대로 각 피크를 분리하였다. 각 fraction은 분석조건 2)를 이용하여 분석하였으며, 분석조건 2)를 바탕으로 샘플 1번과 14번의 분리정제에 활용할 분리조건을 설정하였다. 분석과 동일한 패턴을 확인하여 각 피크를 분리 진행하였다. 분리한 피크는 현재 얻어진 패턴에서 피크가 큰 순서대로 1번 시료에서 6개, 14번 시료에서 5개의 피크를 선정하여 분취 진행하였다.

샘플 1번(누룩)

샘플 14번(입국)

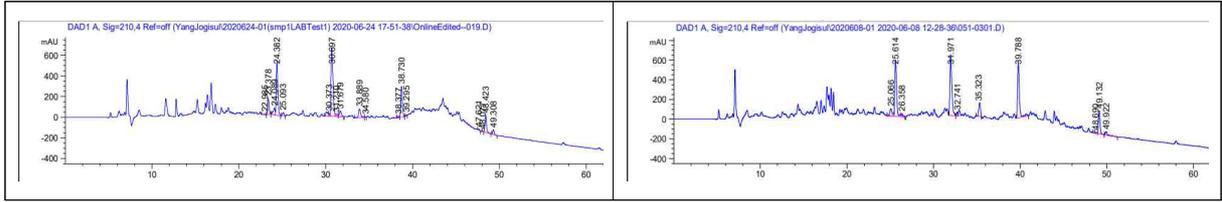


그림 25. 분취를 위한 분석 샘플

샘플 1번(누룩)

샘플 14번(입국)

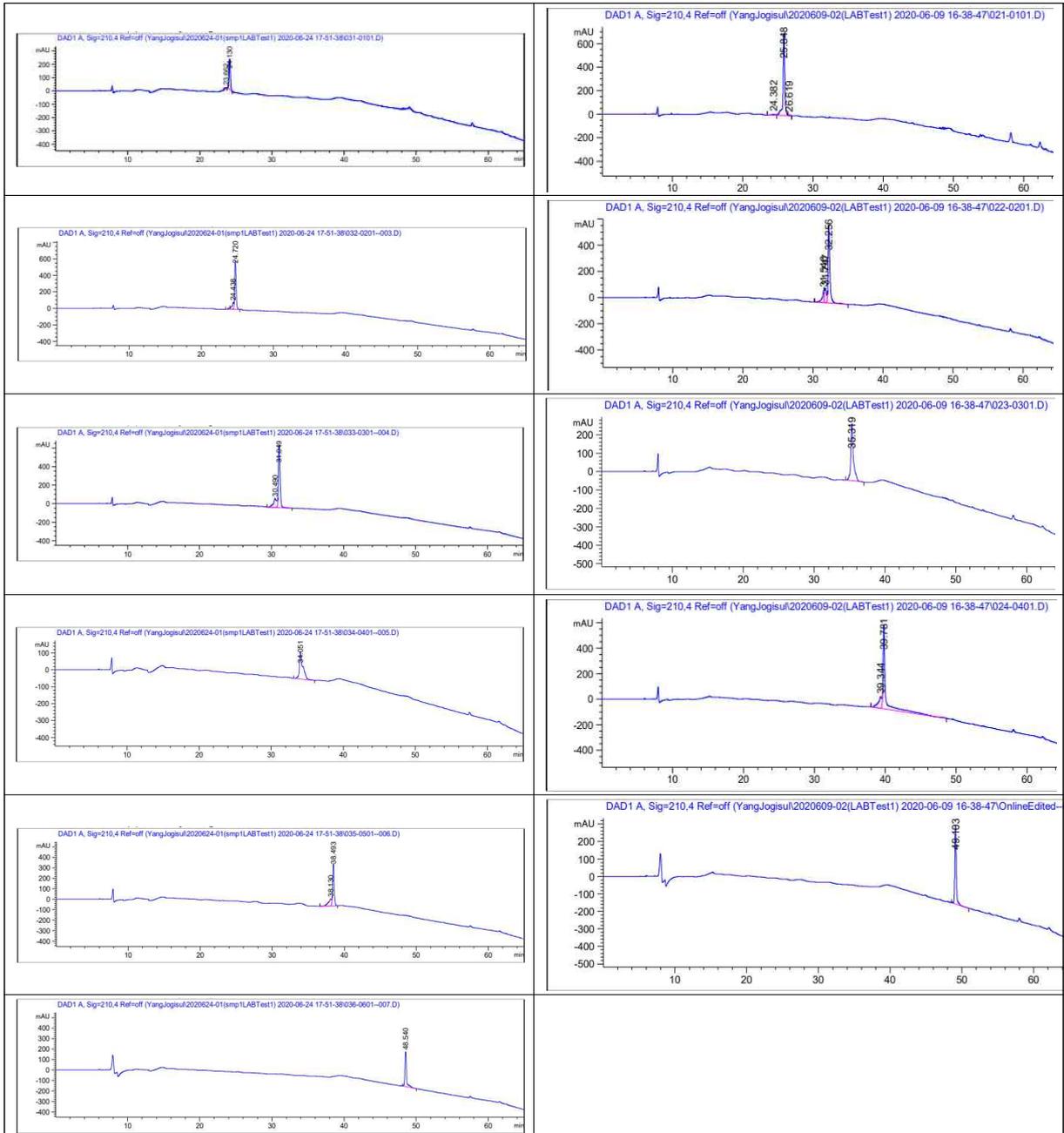


그림 26. 분취를 위한 개별 부분

그림 27처럼 샘플 1번과 14번에서 각각 6개, 5개의 부분을 분취하였다. 분취를 한 부분은 LCMS를 이용하여 질량분석을 실시하였다.



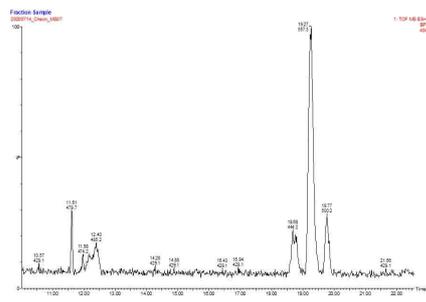
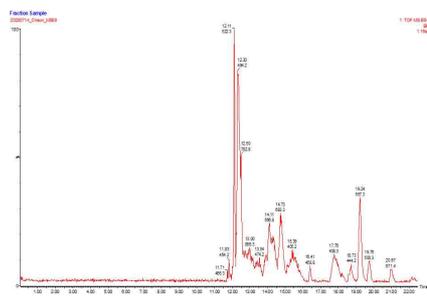
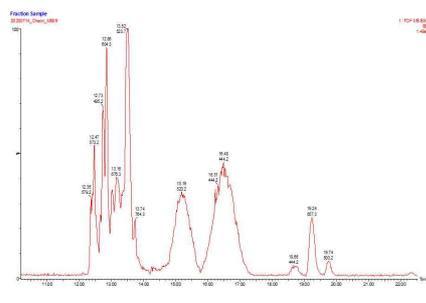
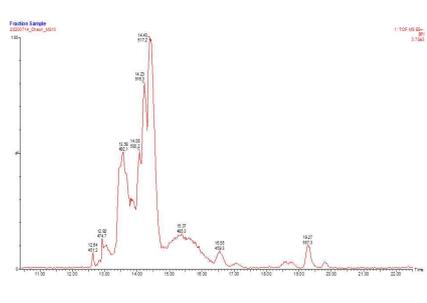
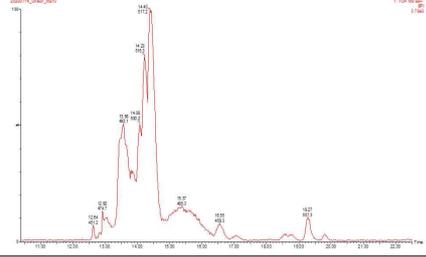
그림 27. 분취한 개별 부분

(2) LCMS 분석

위에서 분취한 개별 부분을 분석하였는데, 특징적으로 두드러진 피크가 나타나는 것이 아니라 작은 peak이 몇 개 나타나서 물질의 혼합물처럼 보였다. 이것은 분취 용액 그대로 주입을 한 것이라 보통 직접 주입을 하는 조건과는 조금 다를 수도 있고, HPLC에서 분석한 것과 질량분석과는 약간의 차이가 있기 때문으로 보인다. 질량스펙트럼을 보는 것과 UV 흡광을 재는 것의 차이로 유추할 수 있다. 대부분은 일치하지만, 분취는 가장 두드러진 피크를 기반으로 진행했다고 해도, 실제 질량분석에서 그 피크가 가장 크게 나오지 않을 수도 있다는 것이다. 그래서 직접 주입을 계속 진행하는 것은 무의미하다고 생각되어 LC-MS 분석을 진행해 보았더니 예상대로 하나의 부분에서 몇 개의 피크가 검출되었다. 이온의 전하수도 2가가 2가 이상보다 많이 나타났으며, 부분별 크로마토그램 상에 나타나는 시간대도 달랐다.

표 18, LC/MS 분석조건

구분	분석조건
Equipment	nanoAquity LC
Column	seppac C18 50mg
Temperature	50°C
Flow rate	0.3µl/min
Injection volume	2µl
Eluent	A : water/0.1% formic acid B : ACN/0.1% formic acid

LCMS 크로마토그램	질량/전하	LCMS 크로마토그램	질량/전하
	479.7242 ²		522.2566 ² 885.3336 ² 782.7758 ² 856.3568 ² 566.7531 ² 458.7808 ² 674.9237 ³
fraction 7		fraction 8	
	573.2305 ² 495.1779 ² 533.7622 ² 604.2796 ² 523.6859 ² 764.3402 ² 578.8953 ³		474.6808 ² 451.2231 ⁴
fraction 9		fraction 10	
	474.6808 ² 451.2213 ⁴		
fraction 11			

²:2가 이온, ³:3가 이온, ⁴:4가 이온

그림 29. LCMS Chromatogram fraction. (샘플 14번)

선행연구에서 참고한 펩타이드의 질량값과 검출된 피크의 질량값을 비교하였다. 일치하거나, 소수점 둘째 자리까지 같은 분자량은 나타나지 않았다.

(3) LCMSMS 분석

이번에는 Fraction을 하지 않은 시료 6개(누룩-No 1~3, 입국-No 4~6)를 선정하여 LCMSMS 분석을 시도하였다. 시료는 와류하면서 섞어 분순물을 포함한 400ul 정도를 1.5 ml 튜브로 옮긴 후 원심분리기(13,000g)를 10분 작동하고, 상층액을 1.5ml 튜브에 받았다. 진공건조기로 건조하고, 마른 시료는 2% acetonitrile/0.1 % TFA 100ml에 녹여주었다. 용출한 시료는 진공건조기로 건조하고, 2% ACN/0.1%FA에 녹여 사용하였다. 시료에 들어있는 물질이 너무 복잡해서 일일이 수작업으로 피크를 찾기가 불가능하여 피크 리스트의 구분은 maxquant 프로그램을 이용하였다.

표 19. 구분별 질량값

구분	질량 /전하	전하	분자량	구분	질량 /전하	전하	분자량
1	590.1923	2	1178.38	5	681.7122	2	1361.419
	683.2296	2	1364.454		555.2158	2	1108.427
2	531.2341	2	1060.463		682.3363	2	1362.668
	590.2012	2	1178.397		493.1919	3	1476.568
3	456.67	2	911.335	7	479.7242	2	957.4434
	409.6759	2	817.3468	8	522.2566	2	1042.508
	565.7207	2	1129.436		885.3336	2	1768.662
	696.8171	2	1391.629		782.7758	2	1563.547
	1006.937	2	2011.87		856.3568	2	1710.709
	448.2042	2	894.4034		566.7531	2	1131.501
4	459.7104	2	917.4158		458.7808	2	915.5566
	500.2465	2	998.488		674.9237	3	2021.764
	684.845	2	1367.685	9	573.2305	2	1144.456
	523.6522	2	1045.299		495.1779	2	988.3508
705.315	2	1408.625	533.7622		2	1065.519	
	514.8645	3	1541.586		604.2796	2	1206.554
	464.452	4	1853.798		610.7311	2	1219.457
	425.432	4	1697.718		523.6859	2	1045.367
	535.7175	4	2138.86		764.3402	2	1526.675
5	497.7336	2	993.4622		578.8953	3	1733.678
	555.7617	2	1109.518		10	474.6808	2
	459.1983	2	916.3916		451.2213	4	1800.875
	508.5774	2	1015.15				

프로그램에서 보여주는 피크가 가짜인 것을 거르기 위해 일부 데이터를 비교하였고, 아래와 같은 기준으로 실험을 진행하였다.

1. 전하 2가 이상인 것
2. 동위원소가 3개 이상인 것
3. 강도 100만 이상인 것(No 1~3), 강도 10만 이상인 것(No 14~16)

표 20. LCMSMS 분석조건

구분	분석조건
Equipment	nanoAquity LC/LTQ-orbitrap elite
Column	seppac C18 50mg
Temperature	50°C
Flow rate	0.3ul/min
Injection volume	2ul
Eluent	A : water/0.1% formic acid B : ACN/0.1% formic acid

표 21. 초기 기준에서의 분석으로 나타난 물질 수

구분	물질수	
누룩	No 1	117
	No 2	148
	No 3	154
입국	No 4	47
	No 5	66
	No 6	64

선행연구에서 밝혀진 전하/질량 범위가 200~1600이어서 전하/질량 범위를 400~1600으로 다시 지정하여 얻은 결과는 표 22와 같다.

표 22. 전하/질량비 범위 400~1600에서의 물질 수

구분	물질수	
누룩	No 1	422
	No 2	486
	No 3	455
입국	No 4	916
	No 5	1124
	No 6	1140

mass값은 5ppm 이상 틀리지 않아, 전하/질량과 측정값의 오차를 계산해서 5ppm 이상 틀리지 않는 펩타이드 질량값과 실험값을 비교하였고, 원시 데이터에서 해당 피크를 확인하여 분석 가능 여부를 조사하였다. 시료는 분석 직전에 보정을 진행하였고, 오차가 10ppm 이상 벗어나는 것은 해당 펩타이드가 아닌 것으로 생각하고 제외하였다. 조사결과 5ppm 이내로 들어오는 5개의 질량값을 확인하였다. No 1~3번 시료에서 RLL과 No 3~4번 시료의 RPF는 오차범위 내로 들어왔고, No 2의 RRPFF는 5ppm 이내로 들어오고 피크의 강도가 높아서 분석이 가능할 것으로 판단하였다. No 3~5번의 LPFNQL도 분석이 가능하지만, No15~16 시료의 RLL은 1ppm 이내로 들어오나 대상 피크 주변으로 다른 피크가 섞여 있어 분석이 어려울 것으로 판단된다.

표 23. 분석 가능한 아미노산 서열에 따른 질량값과 오차값

아미노산 서열	질량값	오차값					
		누룩 술덧			입국 술덧		
		A	B	C	D	E	F
RLL	400.296	0.700	0.450	1.099		0.650	0.774
RRPFF	721.391		-3.798				
RPF	418.222			5.046	5.046		
LPFNQL	730.390				2.600	1.0616	2.3959

F : Phe, L : Leu, N : Asn, P : Pro, Q : Gln, R : Arg.

누룩과 입국으로 제조한 막걸리내 쓴맛 규명을 위해 아미노산 서열을 분석한 결과, 선행 연구에서 밝혀진 쓴맛 펩타이드로 측정값의 오차값 이내로 들어오는 네 개의 펩타이드를 확인하였고 쓴맛을 유발하는 펩타이드로 판단된다. 4 개의 펩타이드는 LPFNQL(Leu-Pro-Phe-Asp-Ileu-Leu), RLL(Arg-Leu-Leu), RRPFF(Arg-Arg-Pro-Pro-Phe), RPF(Arg-Pro-Phe) 등이다

선행연구에 사용된 식품의 재료와 가공 방법과 이번 실험의 재료와 가공 방법의 차이가 있을 것으로 보인다. 가령 일본의 Sake는 쌀과 koji라는 발효제를 사용하지만, 국내에서는 누룩과 입국을 발효제를 사용한다. 이에따라 사용하는 원료나 가공공정에 따라 술에 쓴맛을 부여하는 펩타이드의 종류는 다양할것으로 판단되며, 본 연구에서는 선행연구에서 밝혀진 펩타이드 질량값을 기준으로 분석치가 오차내 들어오는 아미노산 서열을 쓴맛을 나타내는 펩타이드로 분류하였다.

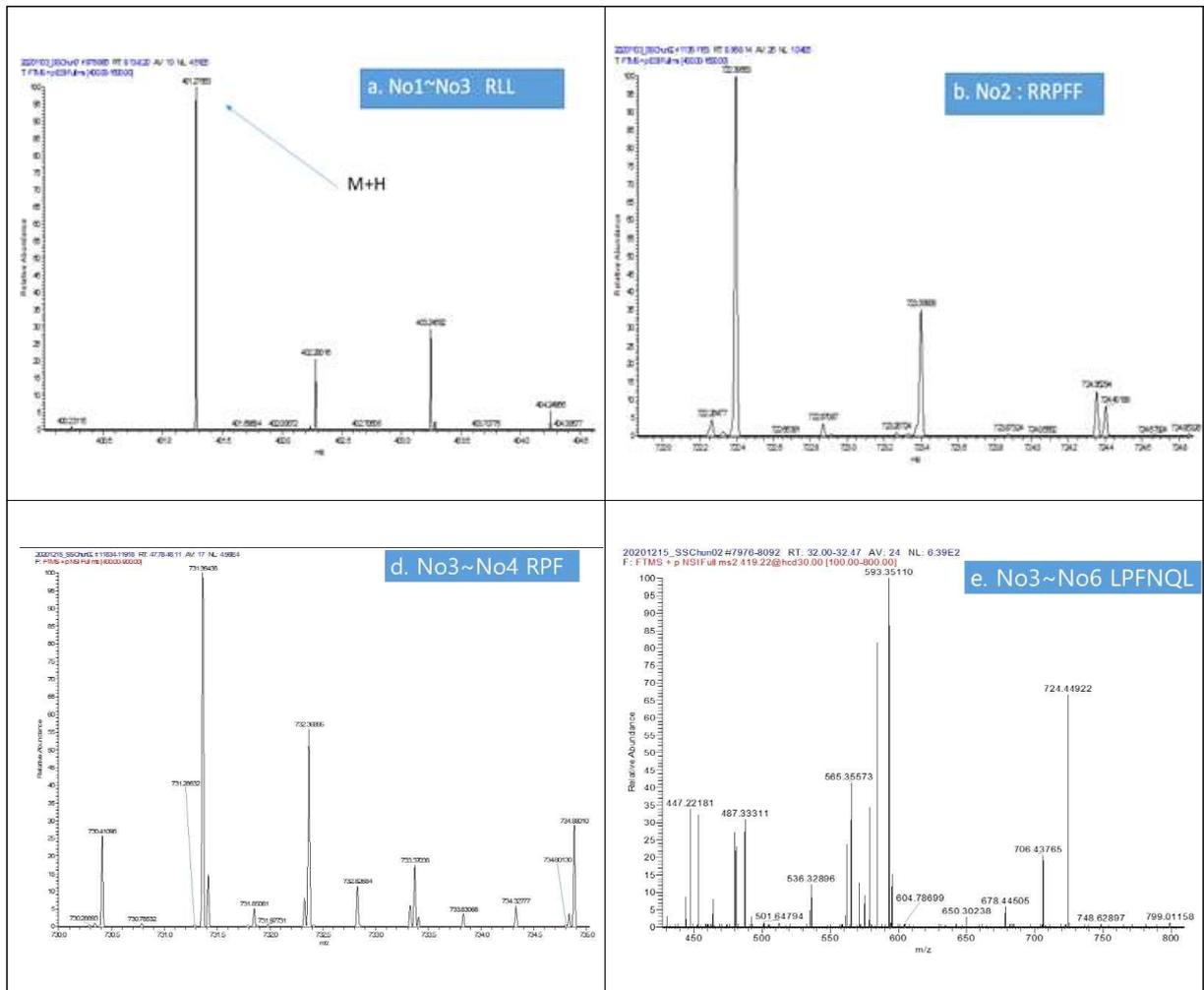


그림 30. 쓴맛 펩타이드로 추정되는 피크

표 24. 질량값과 실험적 질량값의 비교

피크 번호	아미노산 서열	계산된 질량값	실험적 질량값	오차값*	참고문헌
No 1	RLL	400.269	400.2692	0.4497	Fujimaki et al., 1971
	SKGL	403.232	403.2552	39.4562	Fujimaki et al., 1971
	PRPFF	662.343	662.3762	50.1704	Otagiri et al., 1985
No 2	RLL	400.269	400.2692	0.4497	Fujimaki et al., 1971
	PRPFF	662.343	662.3761	49.9439	Otagiri et al., 1985
	RRPFF	721.391	721.3889	-3.7982	Otagiri et al., 1985
	RPFFGPIHN	1033.535	1033.565	21.7699	Otagiri et al., 1985
No 3	RLL	400.269	400.2694	1.0992	Fujimaki et al., 1971
	RPF	418.22	418.224	5.0451	Otagiri et al., 1985
	PRPFF	662.343	662.3767	50.8799	Otagiri et al., 1985
	RPFFGPIHN	1033.535	1033.558	22.2537	Otagiri et al., 1985
No 4	RLL	400.269	400.2807	29.1553	Fujimaki et al., 1971
	SKGL	403.232	403.248	39.7785	Fujimaki et al., 1971
	LPW	414.216	414.2276	27.8840	Matsusita and Ozaki, 1993
	RPF	418.222	418.224	5.0451	Otagiri et al., 1985
	RPFP	515.275	515.2502	-48.0908	Otagiri et al., 1985
	EIVPN	570.29	570.2832	-11.9938	Toelstede & Hofman, 2008
	LPFNQL	730.390	730.3919	2.600	Guigoz et al., 1976
	RGPPFIV	784.449	784.4136	-45.1272	Minamiura et al., 1972b
	RRPPPPFF	915.497	915.4682	-31.4583	Otagiri et al., 1985
No 5	RLL	400.269	400.2693	0.6495	Fujimaki et al., 1971
	SKGL	403.232	403.248	39.6546	Fujimaki et al., 1971
	LPW	414.216	414.2273	27.3770	Matsusita and Ozaki, 1993
	RPFP	515.275	515.2501	-48.343	Otagiri et al., 1985
	EIVPN	570.29	570.2826	-13.046	Toelstede & Hofman, 2008
	LPFNQL	730.390	730.3912	1.0616	Guigoz et al., 1976
	RRPPPPFF	915.497	915.4679	-31.819	Otagiri et al., 1985
	PRPPPPFF	1003.517	1003.536	18.8338	Otagiri et al., 1985
No 6	RLL	400.269	400.2693	0.7744	Fujimaki et al., 1971
	SKGL	403.232	403.2480	39.7042	Fujimaki et al., 1971
	LPW	414.216	414.2274	27.6184	Matsusita and Ozaki, 1993
	EIVPN	570.29	570.2835	-11.24	Toelstede & Hofman, 2008
	LPFNQL	730.390	730.3999	2.3959	Guigoz et al., 1976

*:((실험적 질량값-질량값)/질량값)*10⁶

F:Phe, G:Gly, H:His, I:Ile, K:Lys, L:Leu, N:Asn, P:Pro, Q:Gln, R:Arg, S:Ser, V:Val, W:Trp.

<제1협동기관-술샘>

6. 원료처리 기술 개선 연구

가. 실험재료

(1) 쌀

쌀은 탁주 제조에 사용되는 가장 중요한 원료이며, 현미의 호분층과 배아 모두 제거한 것이다. 일반적으로 양조 원료로 적합한 쌀은 쌀알이 굵고 흡수성이 좋으며, 증자(蒸煮)가 잘 되고, 발효하는 동안 당화가 양호하며, 조 단백질과 조 지방의 함량이 적고, 심백이 높은 것을 말한다. 쌀 자체는 술의 품질에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 알려져 있다. 오히려 막걸리를 만드는 공정이 매우 복잡하므로 품질은 주로 공정관리로 결정된다. 쌀은 2020년 생산된(10분도-8% 도정) 추정을 판매장에서 구매하여 사용하였으며, 20% 도정은 연구소의 도정기를 이용하여 도정을 하였다. 50% 도정은 농업진흥청의 도정기를 이용하였다.

(2) 양조 용수

물은 탁주의 80% 이상을 차지하며 직접 술의 일부가 되어 술 품질에 영향을 줄 뿐만 아니라 양조과정 중 모든 원료와 효소의 용제가 된다. 물에 들어 있는 미량의 무기성분은 미생물의 영양분과 자극제로 중요한 역할을 하며, 효소 작용의 완충 역할을 한다. 세미와 칩미 시에 백미 중량의 30~30%의 물을 흡수하므로 물의 선택이 중요하다. 양조 용수로 갖추어야 할 필수조건은 먹는 물 수질 기준에 적합해야 한다. 수돗물은 물 수질 기준에 적합한 용수이므로, 양조 용수로 수돗물을 사용하였다.

(3) 발효제

(가) 누룩

누룩은 일반적으로 생전분인 밀을 거칠게 빻아서 물을 적절히 가하여 성형하고, 자연상태에서 배양, 건조 및 숙성시킨 것이다. 여기에는 라이조푸스 속(*Rhizopus* sp.), 아스페르길루스 속(*Aspergillus* sp.), 무코르 속(*Mucor* sp.), 압시디아 속(*Absidia* sp.) 등의 자연 곰팡이, 그리고 사카로마이세스 속(*Saccharomyces* sp.)의 양조효모와 락토바실러스 속(*Lactobacillus* sp.)의 젖산균도 생육하고 있는 것으로 알려져 있다. 누룩에는 전분에 작용하여 전분의 α -1, 4-glucoside 결합을 무작위로 가수분해하여 포도당과 덱스트린으로 분해하여 최종적으로는 맥아당을 생성하는 α -amylase, 전분의 비 환원성 말단부터 포도당(glucose)을 분리하는 당화 효소 glucoamylase, 단백질을 가수분해하여 펩타이드나 아미노산을 생성하는 효소 protease, 지방에 작용하여 지방산과 글리세롤을 생성하는 효소 lipase 등이 들어있다. 누룩에는 다양한 야생효모도 들어있어 깊고 풍부한 풍미를 제공하고, 다양한 대사산물을 생성하기도 한다. 따라서 누룩만으로도 양질의 탁주를 제조할 수 있다. 누룩은 시판되고 있는 전통 누룩 중에서 2019년 주류산업정보 실태조사 결과를 참조하여 주류 제조장에서 가장 많이 사용하고 있는 송학곡자(소울곡)를 사용하였다.

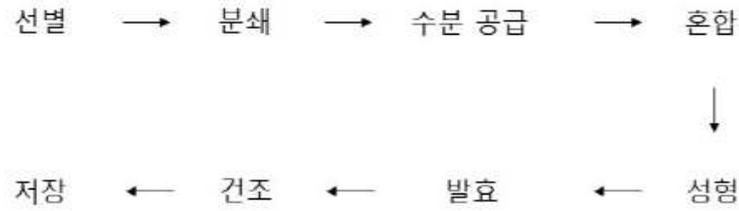


그림 31. 누룩 제조 공정도

(나) 입국

입국은 쌀 등 입자 형태의 전분질 원료를 침수한 후 증자하여 아스페르길루스 속 (*Aspergillus* sp.)의 곰팡이 포자를 접종하여 배양한 것이다. 백국은 아스페르길루스 카와치(*Aspergillus kawachii*) 균을 접종하여 배양한 것으로, 다량의 아밀라제(aAmylase)와 유기산(구연산)이 함유되어 있다. 전분의 당화뿐만 아니라 산 생성력이 높아 술덧의 오염 방지 능력이 뛰어나 현재 우리나라에서 탁주 제조용 발효제로 많이 쓰이고 있다.

황국균은 아스페르길루스 오리제(*Aspergillus oryzae*)를 접종하여 배양한 것으로 당화효소만 많이 함유하고 있고 유기산은 거의 함유되어 있지 않다. 우리나라에서는 주로 청주 제조용으로 사용하고 있다. 입국은 단시일에 제조할 수 있으며, 순수 배양한 균을 접종하므로 잡균 오염이 적다. 따라서 종균과 배양조건의 조절로 발효 후 품질특성을 예측할 수 있으며, 여러 종류의 입국을 조합하여 맞춤형 제조를 할 수 있다는 장점이 있다.

입국에는 효모가 전혀 들어있지 않으므로 반드시 별도의 효모를 첨가해주어야 한다.

입국은 협력업체에서 추천한 좋은곡식의 쌀입국을 구매하였고, 효모는 활성건조 효모 (*Saccharomyces cerevisiae*)를 사용하였다.



그림 32. 입국 제조 공정도



그림 33. 누룩과 입국

나. 실험방법

(1) 쌀의 전처리

쌀은 범벅과 고두밥 2가지의 방법으로 구분하여 사용하였다. 곡물을 가루로 내어 끓는 물을 부어 가며 익히면 범벅이 된다. 범벅은 전분 호화도가 낮아 효소 분해에 의한 당 생성력이 낮아 발효 기간은 다른 전처리법보다 길고 비교적 높은 알코올 함량이 있는 것으로 알려져 있다.

범벅을 제조하기 위하여 멍쌀을 30분간 세미하여 3시간 동안 실온의 물에 담가둔 후 30분간 물빼기를 하고 stone roller mill로 분쇄한 후 20mesh 체로 균질화하여 사용하였다. 범벅은 100℃로 끓는 물을 쌀가루에 4회 나누어 첨가하면서 나무주걱으로 반죽을 하여 반숙이 되도록 저은 후 실온에서 냉각하였다.

고두밥은 불린 쌀을 수증기를 이용하여 찌는 것으로 쌀의 전처리 방법 중 가장 많이 이용되는 방법이다. 불린 쌀을 수증기로 찌면 호화가 되면서 미세한 기공이 생겨나고, 기공을 통해 효소의 작용이 원활해진다. 병행 복발효 방식의 술빚기에서 당화와 발효의 균형을 유지할 수 있는 전처리 방법이다. 고두밥을 만들 때는, 속은 충분히 호화가 되고 겉은 고실고실한 상태가 이상적으로 알려져 있다. 고두밥 제조는 쌀을 30분간 깨끗이 씻어 3시간 동안 물에 불려 30분간 물빼기를 한 후 전기 찜기로 120℃에서 40분간 증자하였다. 10분간 뜸을 들인 후 우레탄 망 위에 펼쳐 실온에서 냉각하였다.

표 25. 쌀의 전처리 과정

구분	세미	침지	물빼기	쌀 가공방식	호화도(%)	냉각
범벅	30분	3시간	30분	쌀가루	63	1시간
고두밥	30분	3시간	30분	-	100	20분

(2) 주류의 제조

병행 복발효를 하는 발효주에 있어서 당화와 발효는 효소와 효모의 작용으로 이루어진다. 밀술은 호기적 조건이 우세한 상황으로, 효소에 의해 전분이 분해되며 생성되는 당분은 주로 효모의 증식에 사용된다. 덧술은 완성된 밀술에 추가로 전분을 공급하는데, 혐기적 조건이 우세하여 생성된 당은 밀술에서 증식된 효모에 의해 알코올로 변하게 된다.

병행 복발효에서는 단금 방식이 주류의 특성에 미치는 영향이 크므로, 누룩을 발효제로 사용하는 1단 단금은 산도가 높을 가능성이 있어서 2단 단금 방식으로 제조하였다.

누룩을 발효제로 사용하는 경우 밀술은 1의 전처리 방법으로 멍쌀 180g, 물 540ml, 누룩 57.6g을 넣어 제조하였다. 가수는 곡물의 120%, 발효제는 곡물 사용량의 8%로 하였다. 22℃의 온도조절이 가능한 발효실에서 7일간 발효를 한 후 덧술을 하였다. 덧술은 멍쌀 540g, 물 320ml를 술덧에 섞어 제조하였다. 덧술에서는 8%, 20%, 50% 도정을 한 쌀을 1의 전처리 방법으로 각각 고두밥을 지어 냉각 후 밀술과 잘 섞어 22℃의 온도조절이 가능한 발효실에서 14일간 발효를 하였다. 밀술에서 충분히 효모의 성장이 이루어졌으므로 덧술에는 효모를 투입하지 않았다.

입국의 경우에는 밀술은 1의 전처리 방법으로 입국 110g, 물 170ml, 효모 0.55g의 비율로

제조하였다. 가수는 곡물의 140%, 발효제는 곡물 사용량의 15%로 하였다. 22℃의 온도조절이 가능한 발효실에서 7일간 발효를 한 후 덧술을 하였다. 덧술은 멥쌀 720g, 물 840ml를 밑술에 섞어 제조하였다. 덧술에서는 8%, 20%, 50% 도정을 한 쌀을 1의 전처리 방법으로 각각 고두밥을 지어 냉각 후 밑술과 잘 섞어 22℃의 온도조절이 가능한 발효실에서 14일간 발효를 하였다. 밑술에서 첨가한 효모의 충분한 성장이 이루어졌으므로 덧술에는 효모를 투입하지 않았다.

표 26. 도정률에 따른 밑술과 덧술의 비교

구분	밑술				덧술			합계		비율(%)		
	쌀 (g)	물 (ml)	발효제 (g)	효모 (g)	쌀 (g)	물 (ml)	도정률 (%)	쌀 (g)	물 (ml)	물/쌀 (%)	발효제 (%)	
누 룩	8%	180	540	57.6	-	540	320	10	720	860	120	8
	20%	180	540	57.6	-	540	320	20	720	860	120	8
	50%	180	540	57.6	-	540	320	50	720	860	120	8
입 국	8%	-	170	110	55	610	840	10	720	1010	140	15
	20%	-	170	110	55	610	840	20	720	1010	140	15
	50%	-	170	110	55	610	840	50	720	1010	140	15

쌀을 각각 8%, 20%, 50%로 도정을 한 후, 발효제는 누룩과 입국으로 2단 담금을 하여 쌀의 도정률과 쓴맛의 관련 연구를 진행하였다.



그림 34. 재료의 도정에 따른 형태.



그림 35. 도정기

쌀을 3시간 동안 물에 담가둔 후 밀술과 덧술의 재료로 사용하였는데, 덧술에서는 8%, 20%, 50% 도정을 한 쌀을 이용하였다. 도정률에 따라 수분흡수율이 달랐는데, 8% 도정보다는 20% 도정이, 20% 도정보다는 50% 도정을 한 쌀이 수분흡수가 더 빨랐다. 수침 후 쌀의 색상 변화도 다르게 나타났는데, 50% 도정을 한 쌀이 물을 충분히 흡수하면 나타나는 찹쌀과 비슷한 백색 성상으로의 변화가 가장 빨리 이루어졌다.

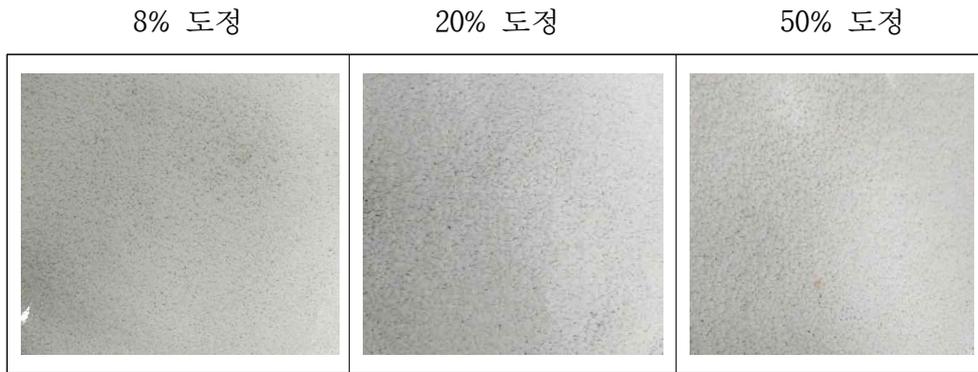


그림 36. 쌀의 수침 중 모습.

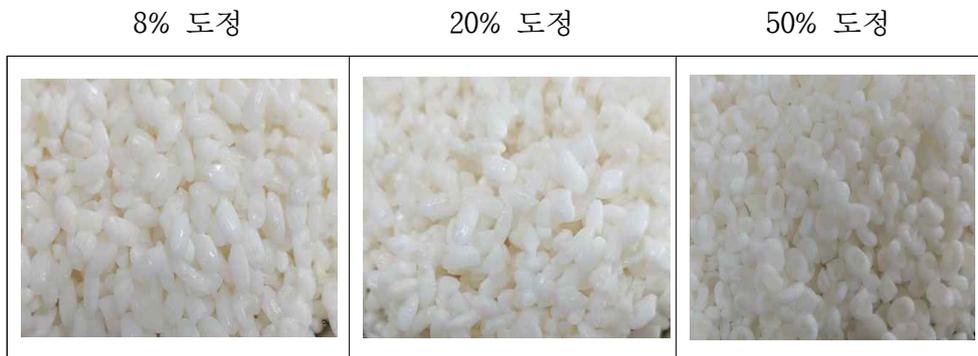


그림 37. 쌀의 물빼기 중 모습

밀술의 가공법은 다음과 같다. 범벅은 누룩을 발효제로 이용하는 시료에 적용하였다. 쌀을 3시간 수침하고, 30분 물빼기를 거쳐 가루를 내어 무게를 측정하였다. 가능한 균일한 호화를 유도하기 위해 비교적 넓은 용기에 쌀가루를 넣고 3등분을 한 후 각 등분당 용량의 1/4 정도의 끓는 물을 부어 잘 저어주면서 된죽 형태를 만들었다. 나머지도 같은 방법으로 한 후 한데 모아 나머지 물을 넣고 잘 섞어 반죽을 완성하였다. 25℃로 냉각되면 준비한 누룩을 넣고 골고루 섞어 발효조에 넣고 22℃에서 7일간 충분히 발효하였다. 입국은 이미 호화된 재료에 곰팡이가 생성한 효소가 들어있는 상태이므로 열을 가하면 변성이 된다. 따라서 입국을 이용한 밀술은 다른 가공 형태를 하지 않고 바로 발효조에 입국과 물을 넣고 효모를 투입한 후 골고루 섞은 다음 22℃에서 7일간 발효하였다.



그림 38. 가공 방식에 따른 재료의 형태



그림 39. 밀술의 형상



그림 40. 밀술 후 2일까지의 변화

덧술은 고두밥을 이용하였다.

고두밥은 원료를 3시간 수침한 다음 30분 물빼기를 한 후 전기증자기를 이용하였다. 수증기가 올라오면 40분간 증자를 한 후 25℃로 냉각하여 밀술과 섞어주었다. 1단 담금 7일 후에 2단 담금을 하여 22℃에서 14일간 발효하였다.

8% 도정

20% 도정

50% 도정



그림 41. 도정별 술덧의 변화. (누룩, 덧술 5일째)

8% 도정

20% 도정

50% 도정



그림 42. 도정별 술덧의 변화. (입국, 덧술 5일째)

8% 도정

20% 도정

50% 도정



그림 43. 도정별 밑술의 변화(누룩, 압착 전)

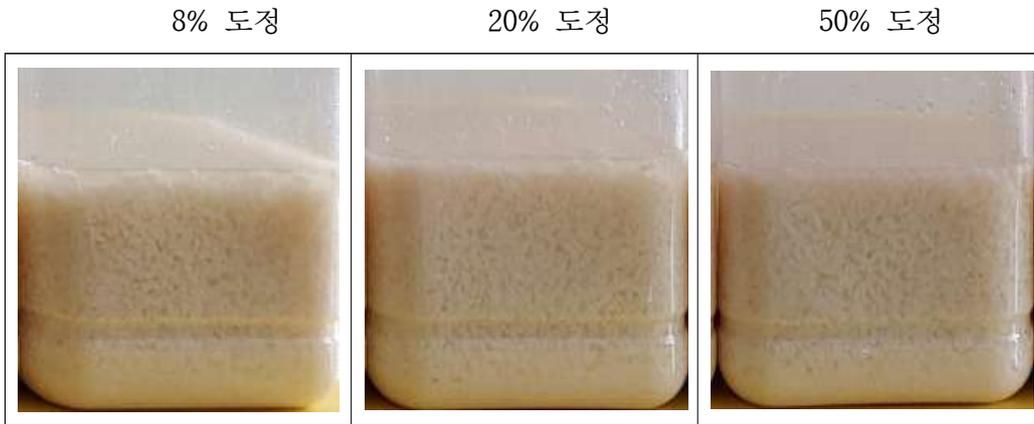


그림 44. 도정별 밑술의 변화(입국, 압착 전)

완성된 샘플은 압착하여 냉장 보관을 한 후 이화학적 분석과 유기산 분석을 하였고 향기 성분 분석과 관능평가를 진행하였다.

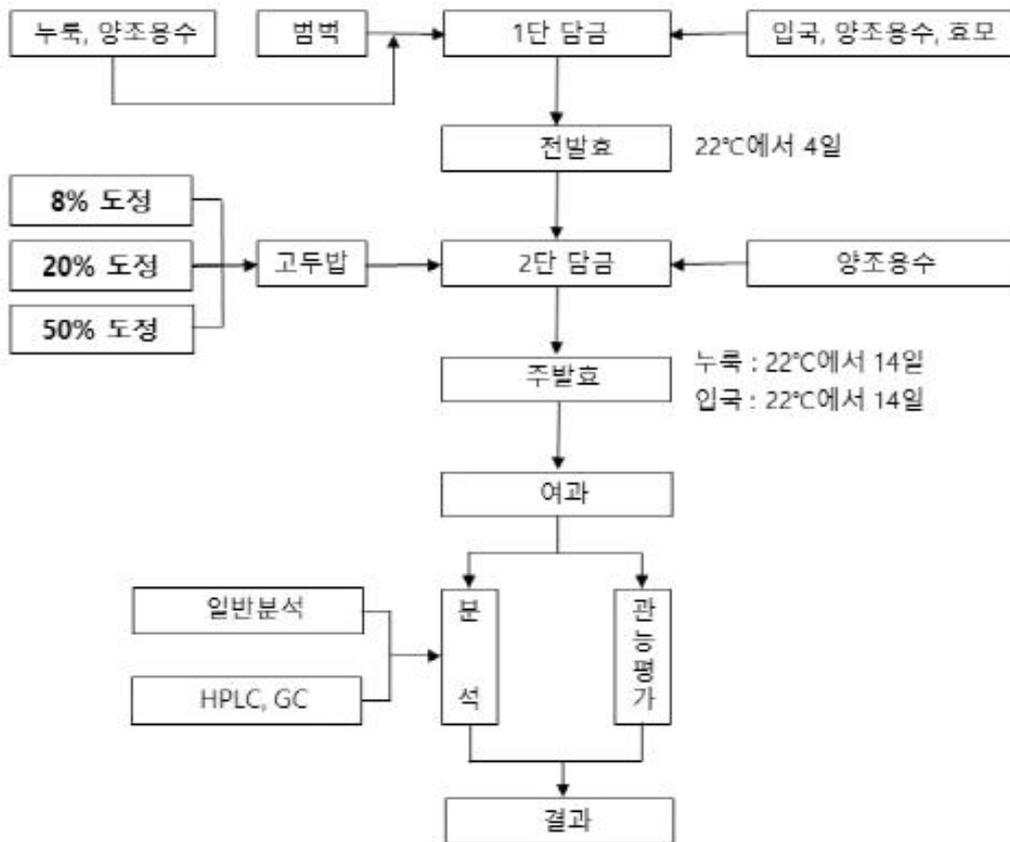


그림 45. 도정별 공정도

다. 분석결과

(1) 이화학적 분석

발효제에 따른 쌀의 도정 정도를 달리하여 제조한 발효주의 알코올은 모두 18~19% 정도로, 발효제와 도정 정도와는 큰 관련이 없는 것으로 나타났다. Ph 변화는 누룩과 입국

모두 4~4.1로 차이가 없었다. 당도는 입국보다 누룩이 많은 것으로 나타났고, 누룩과 입국 모두 10% 도정의 경우는 높고, 20%와 50% 도정은 낮았으며, 20%와 50% 도정 사이에서는 큰 변화가 없었다. 총산도는 누룩의 경우에는 8% 도정에서 50% 도정의 방향으로 낮아지는 추세를 보였으며, 입국에서는 큰 변화가 없었다.

표 27. 도정률에 따른 이화학적 함량

구분		Alcohol(%)	당도(Brix)	pH	총산도(W/V%)
누룩	8%	18	13.5	4.1	0.52
	20%	18.5	8.8	4.1	0.48
	50%	18.9	8.8	4	0.43
입국	8%	19.9	8.3	4.1	0.636
	20%	19	5.2	4.1	0.636
	50%	19	5.9	4	0.63

(2) 유기산 분석

유기산은 누룩이나 입국에서 Lactic acid(8272.74~1445.54 mg%)가 가장 많은 함량을 나타내었고, 다음으로 Acetic acid(4839.82~1553.78 순이었다. Lactic acid의 경우 젖산균에 의해 생성되는 것으로 추측되며, Acetic acid의 경우 *Bacillus*의 작용으로 증가가 되는 것으로 보고되었다. 유기산 총량은 누룩의 경우 입국보다 2배 정도 높았으며, 8% 도정에서 50% 도정 방향으로 대부분의 유기산 함량이 낮아지는 추세를 보였다. 입국의 경우에는 도정률과 유기산의 함량과 특별한 연관이 없는 것으로 보였다.

표 28. 도정률에 따른 유기산 함량

mg%	Oxalic acid	Formic acid	Malic acid	Lactic acid	Acetic acid	Cirtic acid	Succinic acid	
누룩	8%	163.86	1656.9	1974.92	8272.74	4839.82	1071.4	370.68
	20%	171.98	-	-	5123.14	3749.86	804.56	195.64
	50%	159	66.96	-	4005.40	2433.36	392.20	265.94
입국	8%	398.34	-	-	1445.54	2369.46	748.92	38.60
	20%	383.6	-	-	2620.64	2373.40	379.46	18.64
	50%	102.18	-	-	2487.40	1553.78	510.72	-

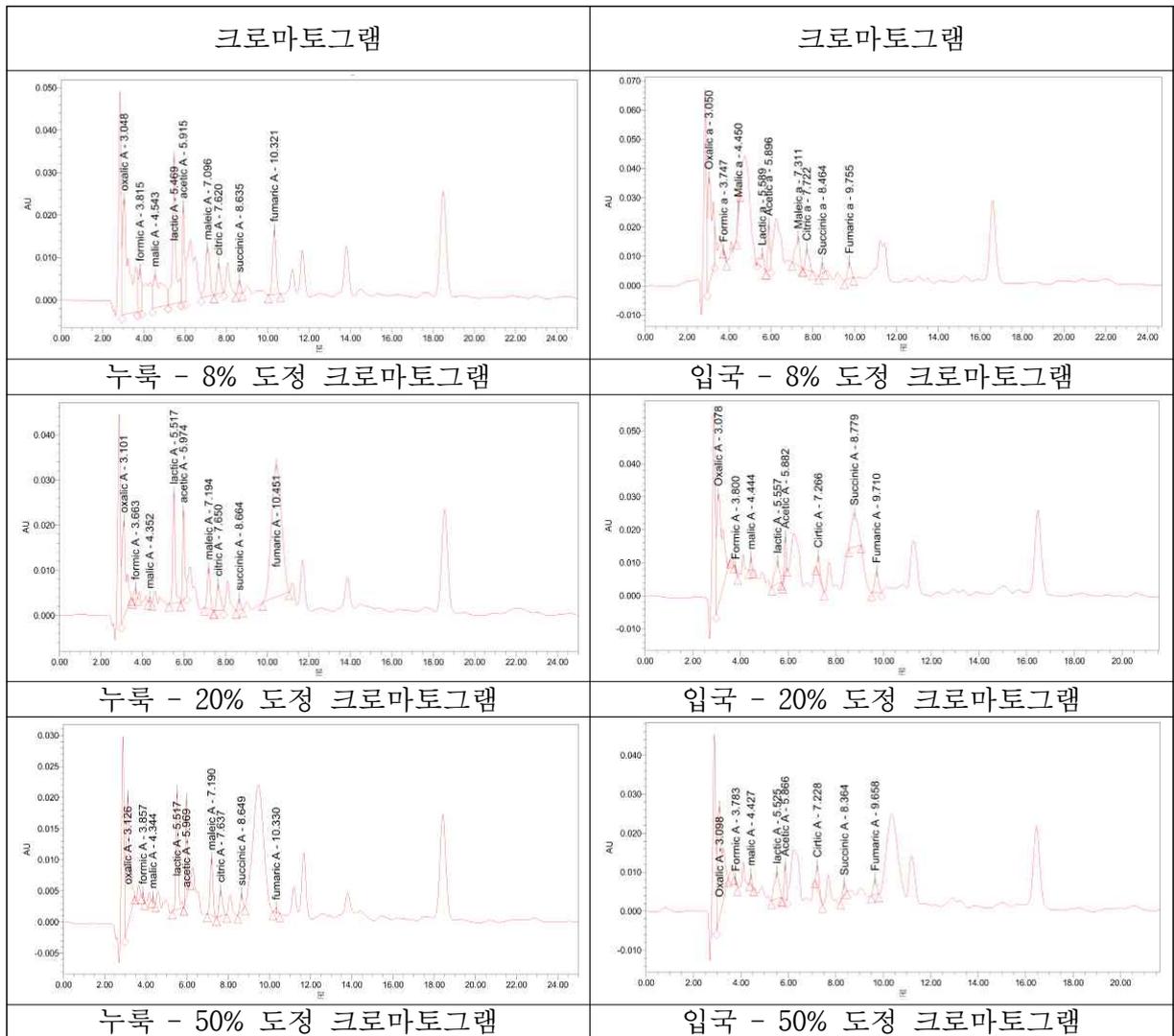


그림 46. 도정률에 따른 유기산 크로마토그램

(3) 향기 성분 분석

표 29는 도정률에 따라 술덧을 제조 후 국 종류별 향기성분을 분석한 것이다. 풋사과 향을 풍기는 아세트알데히드는 국의 종류에 관계없이 도정률이 높을수록 증가하는 경향을 보였다. 또한 누룩을 이용하여 제조하여 제조한 술덧에서보다 입국을 이용하여 제조한 술덧에서 도정률에 관계없이 높게 나타났다.

메니퀴어취를 부여하는 아세톤의 경우 국 종류별 큰 차이는 보이지 않았고, 도정률에 따른 유의적 차이도 나타나지 않았다. 탄냄새를 부여하는 푸르푸랄의 경우 누룩과 8%와 30% 도정한 쌀을 이용하여 제조한 술덧에서 각각 12.41%, 5.2%를 나타낸 반면, 입국을 이용하여 제조한 술덧에서는 8% 도정한 제조한 술덧에서만 4.24%를 나타내었다.

견과류향을 부여하는 벤즈알데히드의 경우는 도정률과 국 종류에 관계없이 유의적인 차이가 없었다. 술덧에 버터취를 부여하는 디아세틸의 경우 누룩을 이용한 술덧에서 8% 도정 시험구에서 20%, 50% 시험구에서 보다 유의적으로 높게 나타난 반면, 입국을 이용한 술덧에서는 도정률에 따른 유의적 차이를 나타내지 않았다.

한편 술덧에 과일향을 부여하는 에스터류는 누룩과 8% 도정한 쌀을 이용하여 제조한 술

덧에서 에스터류가 20%, 50% 도정한 시험구보다 유의적으로 더 높게 나타났고, 이와같은 결과는 동일한 조건에서 입국을 사용한 시험구에서도 같은 결과를 보였다. 술덧에서 알코올향을 나타내는 고급알코올류는 누룩과 20% 도정한 시험구에서 8%, 50% 도정한 시험구보다 유의적으로 높게 나타난 반면, 입국을 이용하여 제조한 술덧에서는 8% 도정 시험구에서 유의적으로 높게 나타났다.

표 29. 도정률에 따른 국 종류별 향기 성분 함량

분석항목(ppm)	누룩 술덧			입국 술덧		
	8%도정	20%도정	50%도정	8%도정	20%도정	50%도정
Acetaldehyde	29.92	32.84	32.74	38.77	59.87	61.00
Acetone	1.50	2.74	2.00	1.39	1.44	1.51
Furfural	12.41	5.20	0.00	4.24	0.00	0.00
Benzaldehyde	2.36	2.53	2.21	1.83	2.05	2.25
Diacetyl	10.20	5.30	3.50	8.59	9.02	9.69
Esters						
Methyl acetate	1.12	0.90	0.90	0.91	0.54	0.63
Ethyl acetate	102.70	87.88	89.13	110.79	94.69	99.45
Isoamyl acetate	3.28	0.65	0.63	16.58	10.41	9.85
Ethyl caproate	1.24	1.03	0.94	2.20	1.42	1.47
Ethyl caprylate	1.07	1.58	1.16	1.14	0.98	0.99
Σ Esters	109.41	92.04	92.76	131.62	108.04	112.39
Higher alcohols						
Methyl alcohol	16.91	17.38	15.82	11.42	0.00	0.00
2-butanol	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>n</i> -propanol	262.85	153.60	164.46	239.14	207.14	208.33
Isobutanol	263.85	399.96	380.99	391.32	293.29	288.04
<i>n</i> -butanol	6.21	6.32	6.43	5.25	4.04	3.29
Isoamyl alcohol	967.12	1109.33	1077.94	1066.79	822.40	819.66
<i>n</i> -amyl alcohol	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Σ Higher alcohols	1,516.94	1,686.59	1,645.64	1,713.92	1,326.87	1,319.32

(4) 관능평가

도정률에 따른 쓴맛 관련 관능평가 결과 누룩과 입국 모두에서 비교적 유사한 결과가 나타났다. 누룩의 경우 8% 도정에서 50% 도정 방향으로 쓴맛의 강도가 줄어드는 것으로 나타났으며, 특히 20% 도정에서 50% 도정의 경우에는 줄어드는 폭이 더 큰 것으로 나타났다. 입국의 경우에도 유사한 패턴을 보여주었다. 이는 쌀의 표면에 많이 존재하는 단

백질 성분이 도정으로 인해 깎여 나가 전체 함량이 줄어들어 펩타이드 생성을 감소시킨 것에서 기인하는 것으로 보인다.

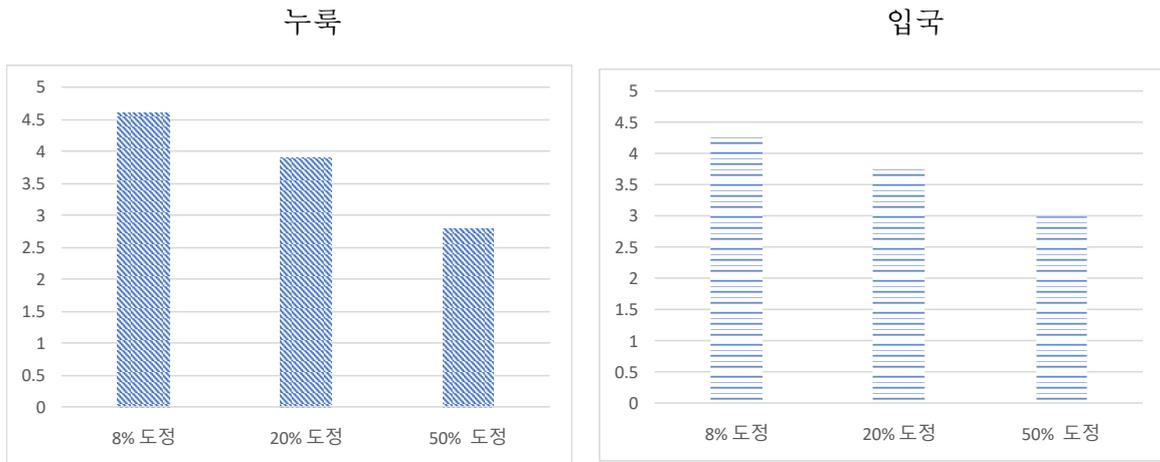


그림 47. 도정률에 따른 관능평가

<제2협동기관-장희>

7. 쓴맛 흡착제 또는 은폐제 처리 기술 연구

가. 실험재료

(1) 쌀

쌀은 탁주 제조에 사용되는 가장 중요한 원료이며, 현미의 호분층과 배아 모두 제거한 것이다. 일반적으로 양조 원료로 적합한 쌀은 쌀알이 굵고 흡수성이 좋으며, 증자(蒸煮)가 잘 되고, 발효하는 동안 당화가 양호하며, 조 단백질과 조 지방의 함량이 적고, 심백이 높은 것을 말한다. 쌀 자체는 술의 품질에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 알려져 있다. 오히려 막걸리를 만드는 공정이 매우 복잡하므로 품질은 주로 공정관리로 결정된다. 쌀은 2020년 생산된(10분도, % 도정) 추정을 판매장에서 구매하여 사용하였으며, 20% 도정은 연구소의 도정기를 이용하여 도정을 하였다. 50% 도정은 농업진흥청의 도정기를 이용하였다.

(2) 양조 용수

물은 탁주의 80% 이상을 차지하며 직접 술의 일부가 되어 술 품질에 영향을 줄 뿐만 아니라 양조과정 중 모든 원료와 효소의 용제가 된다. 물에 들어 있는 미량의 무기성분은 미생물의 영양분과 자극제로 중요한 역할을 하며, 효소 작용의 완충 역할을 한다. 세미와 칩미 시에 백미 중량의 30~30%의 물을 흡수하므로 물의 선택이 중요하다. 양조 용수로 갖추어야 할 필수조건은 먹는 물 수질 기준에 적합해야 한다. 수돗물은 물 수질 기준에 적합한 용수이므로, 양조 용수로 수돗물을 사용하였다.

(3) 발효제

(가) 누룩

누룩은 일반적으로 생저분인 밀을 거칠게 빻아서 물을 적절히 가하여 성형하고, 자연상태에서 배양, 건조 및 숙성시킨 것이다. 여기에는 라이조푸스 속(*Rhizopus* sp.), 아스페르길루스 속(*Asperbillus* sp.), 무코르 속(*Mucor* sp.), 압시디아 속(*Absidia* sp.) 등의 자연 곰팡이, 그리고 사카로마이세스 속(*Saccharomyces* sp.)의 양조효모와 락토바실루스 속(*Lactobacillus* sp.)의 젖산균도 생육하고 있는 것으로 알려져 있다. 누룩에는 전분에 작용하여 전분의 α -1, 4-glucoside 결합을 무작위로 가수분해하여 포도당과 텍스트린으로 분해하여 최종적으로는 맥아당을 생성하는 α -amylase, 전분의 비 환원성 말단부터 포도당(glucose)을 분리하는 당화 효소 glucoamylase, 단백질을 가수분해하여 펩타이드나 아미노산을 생성하는 효소 protase, 지방에 작용하여 지방산과 글리세롤을 생성하는 효소 lipase 등이 들어있다. 누룩에는 다양한 야생효모도 들어있어 깊고 풍부한 풍미를 제공하고, 다양한 대사산물을 생성하기도 한다. 따라서 누룩만으로도 양질의 탁주를 제조할 수 있다. 누룩은 시판되고 있는 전통 누룩 중에서 2019년 주류산업정보 실태조사 결과를 참조하여 주류 제조장에서 가장 많이 사용하고 있는 송학곡자(소울곡)를 사용하였다.

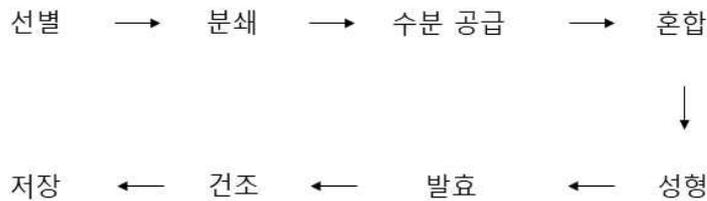


그림 48. 누룩 제조 공정도

(나) 입국

입국은 쌀 등 입자 형태의 전분질 원료를 침수한 후 증자하여 아스페르길루스 속(*Aspergillus* sp.)의 곰팡이 포자를 접종하여 배양한 것이다. 백국은 아스페르길루스 카와치(*Aspergillus kawachii*) 균을 접종하여 배양한 것으로, 다량의 아밀라제(amylase)와 유기산(구연산)이 함유되어 있다. 전분의 당화뿐만 아니라 산 생성력이 높아 술덧의 오염방지 능력이 뛰어나 현재 우리나라에서 탁주 제조용 발효제로 많이 쓰이고 있다.

황국균은 아스페르길루스 오리제(*Aspergillus oryzae*)를 접종하여 배양한 것으로 당화 효소만 많이 함유하고 있고 유기산은 거의 함유되어 있지 않다. 우리나라에서는 주로 청주 제조용으로 사용하고 있다. 입국은 단시일에 제조할 수 있으며, 순수 배양한 균을 접종하므로 잡균 오염이 적다. 따라서 종균과 배양조건의 조절로 발효 후 품질특성을 예측할 수 있으며, 여러 종류의 입국을 조합하여 맞춤형 제조를 할 수 있다는 장점이 있다.

입국에는 효모가 전혀 들어있지 않으므로 반드시 별도의 효모를 첨가해주어야 한다.

입국은 협력업체에서 추천한 좋은곡식의 쌀입국을 구매하였고, 효모는 활성건조 효모(*Saccharomyces cerevisiae*)를 사용하였다.



그림 49. 입국 제조 공정도



그림 50. 누룩과 입국

(4) 흡착제 및 은폐제

(가) 활성탄

양조용 활성탄은 주로 침엽수가 사용되며, 비교적 다양한 성분을 흡착한다. 일반적으로 활성탄은 가루 상태나 입자 상태로 제조되는데, 용도는 주로 흡착제로서 소수성 화합물을 흡착하는 능력이 있어서 쓴맛과 떼은맛을 내는 물질을 제거하기도 한다.

(나) β -Cyclodextrin

α -1,4 glycoside 결합에 의한 포도당 서브 유닛의 거대 환형으로 구성된 올리고당이다. 사이클로 텍스트린은 효소 전환의 결과로 전분 에서 생산되며 쓴맛의 은폐제로 사용된다.



그림 51. 은폐제와 흡착제

나. 실험방법

(1) 쌀의 전처리

쌀은 범벅과 고두밥 2가지의 방법으로 구분하여 사용하였다. 곡물을 가루로 내어 끓는 물을 부어 가며 익히면 범벅이 된다. 범벅은 전분 호화도가 낮아 효소 분해에 의한 당 생성력이 낮아 발효 기간은 다른 전처리법보다 길고 비교적 높은 알코올 함량이 있는 것으로 알려져 있다.

범벅을 제조하기 위하여 멍쌀을 30분간 세미하여 3시간 동안 실온의 물에 담가둔 후 30분간 물빼기를 하고 stone roller mill로 분쇄한 후 20mesh 체로 균질화하여 사용하였다. 범벅은 100℃로 끓는 물을 쌀가루에 4회 나누어 첨가하면서 나무주걱으로 반죽을 하여 반숙이 되도록 저은 후 실온에서 냉각하였다.

고두밥은 불린 쌀을 수증기를 이용하여 찌는 것으로 쌀의 전처리 방법 중 가장 많이 이용되는 방법이다. 불린 쌀을 수증기로 찌면 호화가 되면서 미세한 기공이 생겨나고, 기공을 통해 효소의 작용이 원활해진다. 병행 복발효 방식의 술빚기에서 당화와 발효의 균형을 유지할 수 있는 전처리 방법이다. 고두밥을 만들 때는, 속은 충분히 호화가 되고 겉은 고실고실한 상태가 이상적으로 알려져 있다. 고두밥 제조는 쌀을 30분간 깨끗이 씻어 3시간 동안 물에 불려 30분간 물빼기를 한 후 전기 찜기로 120℃에서 40분간 증자하였다. 10분간 뜸을 들인 후 우레탄 망 위에 펼쳐 실온에서 냉각하였다.

표 30. 쌀의 전처리 과정

구분	세미	침지	물빼기	쌀 가공방식	호화도(%)	냉각
범벅	30분	3시간	30분	쌀가루	63	1시간
고두밥	30분	3시간	30분	-	100	20분

(2) 주류의 제조

병행 복발효를 하는 발효주에 있어서 당화와 발효는 효소와 효모의 작용으로 이루어진다. 밀술은 호기적 조건이 우세한 상황으로, 효소에 의해 전분이 분해되며 생성되는 당분은 주로 효모의 증식에 사용된다. 덧술은 완성된 밀술에 추가로 전분을 공급하는데, 혐기적 조건이 우세하여 생성된 당은 밀술에서 증식된 효모에 의해 알코올로 변하게 된다.

병행복발효에서는 단금 방식이 주류의 특성에 미치는 영향이 크므로, 누룩을 발효제로 사용하는 1단 단금은 산도가 높을 가능성이 있어서 2단 단금 방식으로 제조하였다.

누룩을 발효제로 사용하는 경우 밀술은 1의 전처리 방법으로 멍쌀 180g, 물 540ml, 누룩 57.6g을 넣어 제조하였다. 가수는 곡물의 120%, 발효제는 곡물 사용량의 8%로 하였다. 22℃의 온도조절이 가능한 발효실에서 7일간 발효를 한 후 덧술을 하였다. 덧술은 멍쌀 540g, 물 320ml를 술덧에 섞어 제조하였다. 덧술에서는 10분도 한 쌀을 1의 전처리 방법으로 각각 고두밥을 지어 냉각 후 밀술과 잘 섞어 22℃의 온도조절이 가능한 발효실에서 14일간 발효를 하였다. 밀술에서 충분히 효모의 성장이 이루어졌으므로 덧술에는 효모를 투입하지 않았다.

입국의 경우에는 밀술은 1의 전처리 방법으로 입국 110g, 물 170ml, 효모 0.55g의 비율로

제조하였다. 가수는 곡물의 140%, 발효제는 곡물 사용량의 15%로 하였다. 22℃의 온도조절이 가능한 발효실에서 7일간 발효를 한 후 덧술을 하였다. 덧술은 멥쌀 720g, 물 840 ml를 밑술에 섞어 제조하였다. 덧술에서는 10분도 한 쌀을 1의 전처리 방법으로 각각 고두밥을 지어 냉각 후 밑술과 잘 섞어 22℃의 온도조절이 가능한 발효실에서 14일간 발효를 하였다. 밑술에서 첨가한 효모의 충분한 성장이 이루어졌으므로 덧술에는 효모를 투입하지 않았다.

표 31. 흡착제 또는 은폐제 처리에 따른 밑술과 덧술의 비교

구분	밑술				덧술		합계		비율(%)	
	쌀 (kg)	물 (L)	발효제 (g)	효모 (g)	쌀 (kg)	물 (L)	쌀 (kg)	물 (L)	물/쌀 (%)	발효제/쌀 (%)
누룩 a	1.25	3.75	400	-	3.75	2.25	5	6	120	8
입국 a	-	1.07	750	3.75	4.25	5.94	5	7	140	15

a : β -Cyclodextrin과 활성탄 처리할 샘플

밑술의 가공법은 다음과 같다.

범벅은 누룩을 발효제로 이용하는 시료에 적용하였다. 쌀을 3시간 수침하고, 30분 물빼기를 거쳐 가루를 내어 무게를 측정하였다. 가능한 균일한 호화를 유도하기 위해 비교적 넓은 용기에 쌀가루를 넣고 3등분을 한 후 각 등분당 용량의 1/4 정도의 끓는 물을 부어 잘 저어주면서 된죽 형태를 만들었다. 나머지도 같은 방법으로 한 후 한데 모아 나머지 물을 넣고 잘 섞어 반죽을 완성하였다. 25℃로 냉각되면 준비한 누룩을 넣고 골고루 섞어 발효조에 넣고 22℃에서 7일간 충분히 발효하였다.

입국은 이미 호화된 재료에 곰팡이가 생성한 효소가 들어있는 상태이므로 열을 가하면 변성이 된다. 따라서 입국을 이용한 밑술은 다른 가공 형태를 하지 않고 바로 발효조에 입국과 물을 넣고 효모를 투입한 후 골고루 섞은 다음 22℃에서 7일간 충분히 발효하였다.



그림 52. 가공 방식에 따른 재료의 형태



그림 53. 밀술의 형상

덧술은 고두밥을 이용하였다. 고두밥은 원료를 3시간 수침한 다음 30분 물빼기를 한 후 전기증자기를 이용하였다. 수증기가 올라오면 40분간 증자를 한 후 25℃로 냉각하여 밀술과 섞어주었다. 1단 담금 7일 후에 2단 담금을 하여 22℃에서 14일간 발효하였다.

술덧이 완성되면 압착한 시료에 β -Cyclodextrin과 활성탄을 처리하였다.

β -Cyclodextrin의 예비실험을 진행하였다. 누룩과 입국 각 1개의 시료에 β -Cyclodextrin을 각각 100ppm, 1,000ppm, 5,000ppm, 10,000ppm의 4가지 샘플을 제조하여 관능평가를 하였다. 관능평가 결과 10,000ppm에서 쓴맛이 감소하는 경향이 있어서 본 실험에서는 5,000ppm, 10,000ppm, 15,000ppm, 20,000ppm의 4가지 대조군을 만들어 본 실험을 하였다. β -Cyclodextrin은 처리 후 22℃에서 2시간 후에 분석하였고, 활성탄은 압착한 시료에 처리한 후 48시간 후에 관능평가를 하였다.

표 32. β -Cyclodextrin 투입량과 비율

구분	투입량(mg)	시료 200ml 당 β -Cyclodextrin 투입량 비율(ppm)
누룩	0	0
	1,000	5,000
	2,000	10,000
	3,000	15,000
	4,000	20,000
	입국	0
입국	1,000	5,000
	2,000	10,000
	3,000	15,000
	4,000	20,000

활성탄의 경우 알갱이(ϕ 는 1~1.5mm) 상태의 활성탄을 이용하였다. 분말 형태의 활성탄을 막걸리의 흡착제로 상용할 경우 공정상의 문제가 있기 때문이다. 분말 형태의 활성탄을 막걸리에 투입하게 되면 여과를 할 때 막힘 현상이 발생하며, 여과하여도 막걸리 특유의 고형물이 사라지고 약주 형태의 결과물이 나오기 때문이다.

완성된 샘플은 압착한 다음 β -Cyclodextrin를 처리한 2일 후에 이화학적 분석과 유기산 분석, 향기성분 분석과 관능평가를 하였고, 활성탄을 처리한 샘플은 관능평가를 하였다.

표 33. 활성탄 투입량과 비율

구분	투입량(mg)	시료 200ml 당 활성탄 투입량 비율(ppm)
누룩	0	0
	10	50
	40	200
	100	500
	200	1,000
	입국	0
입국	10	50
	40	200
	100	500
	200	1,000

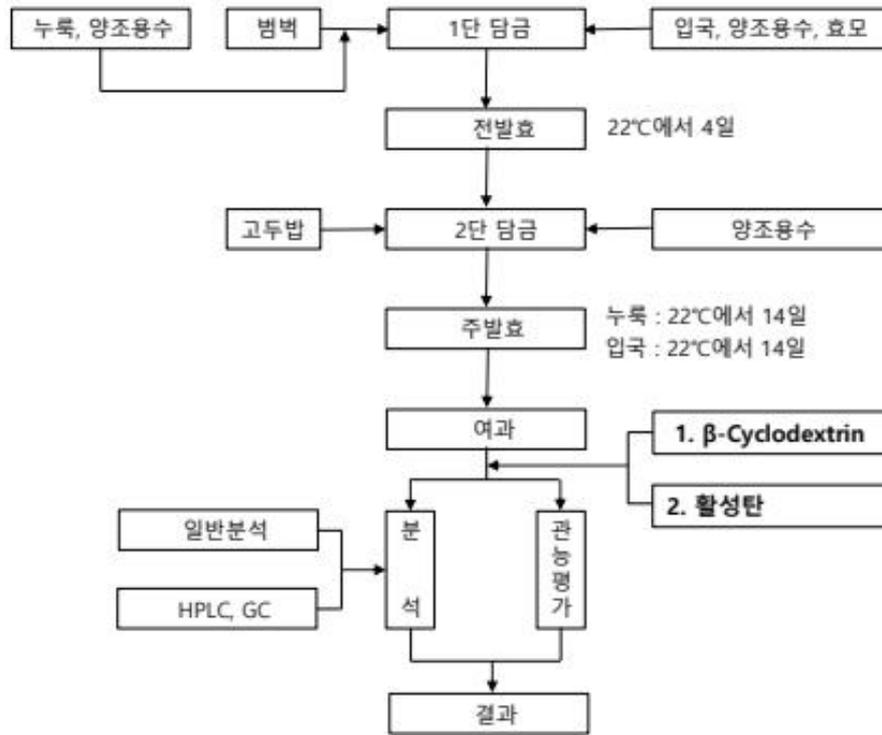


그림 54. 은폐제와 흡착제 처리 공정도

다. 분석결과

(1) 이화학적 분석

발효제에 따른 은폐제를 처리한 발효주의 알코올은 모두 18~20% 정도로, 발효제와 은폐제 처리 여부와는 큰 관련이 없는 것으로 나타났다. Ph 변화는 누룩과 입국 모두 4.3~4.5로 차이가 없었다. 당도는 입국보다 누룩이 많은 것으로 나타났고, 총산도는 누룩과 입국 모두 특이한 경향은 없는 것으로 나타났다.

표 34. β -Cyclodextrin 처리에 따른 이화학적 함량

구분	투입량 (ppm)	Alcohol(%)	당도(Brix)	PH	총산도 (W/V%)
누룩	0	18.0	13.2	4.3	0.480
	5,000	17.4	15.2	4.5	0.480
	10,000	16.8	16.8	4.5	0.456
	15,000	16.8	17.0	4.5	0.486
	20,000	16.7	17.5	4.5	0.450
입국	0	20.1	5.2	4.1	0.630
	5,000	20.2	5.4	4.3	0.630
	10,000	20.0	5.4	4.3	0.564
	15,000	19.8	5.6	4.3	0.654
	20,000	19.9	5.8	4.3	0.642

(2) 유기산 분석

유기산 함량 측정 결과는 Table 35에 나타내었다. 누룩이나 입국에서 Lactic acid(8272.74~1445.54 mg%)가 가장 많은 함량을 나타내었고, 그다음으로 Acetic acid(4839.82~1553.78 순이었다. Lactic acid의 경우 젖산균에 의해 생성되는 것으로 추측되며, Acetic acid의 경우 *Bacillus*의 작용으로 증가되는 것으로 보고되었다. 유기산 총량은 누룩의 경우 입국보다 2배 정도 높았으며, 10% 도정에서 50% 도정 방향으로 대부분의 유기산과 전체 함량이 낮아지는 추세를 보였다. 입국의 경우에는 도정률과 유기산의 함량과 특별한 연관이 없는 것으로 나타났다.

표 35. β -Cyclodextrin 처리에 따른 유기산 함량

구분	투입량 (ppm)	Oxalic acid	Formic acid	Malic acid	Lactic acid	Acetic acid	Cirtic acid	Succinic acid
누룩	0	132.18	-	-	3972.84	3519.58	1089.18	119.12
	5,000	-	-	-	3313.62	1157.62	2201.28	-
	10,000	-	-	-	3342.40	1126.54	315.44	-
	15,000	-	-	-	4762.32	2796.28	508.26	-
	20,000	-	-	-	3560.78	864.94	392.48	34799.54
입국	0	331.94	-	-	677.92	2373.40	605.96	-
	5,000	42.14	-	-	2282.32	3348.70	1498.42	-
	10,000	-	-	-	228.64	522.46	1469.94	-
	15,000	6.56	-	-	3419.80	1828.28	894.84	-
	20,000	16.06	-	-	3103.10	1716.40	1167.14	-

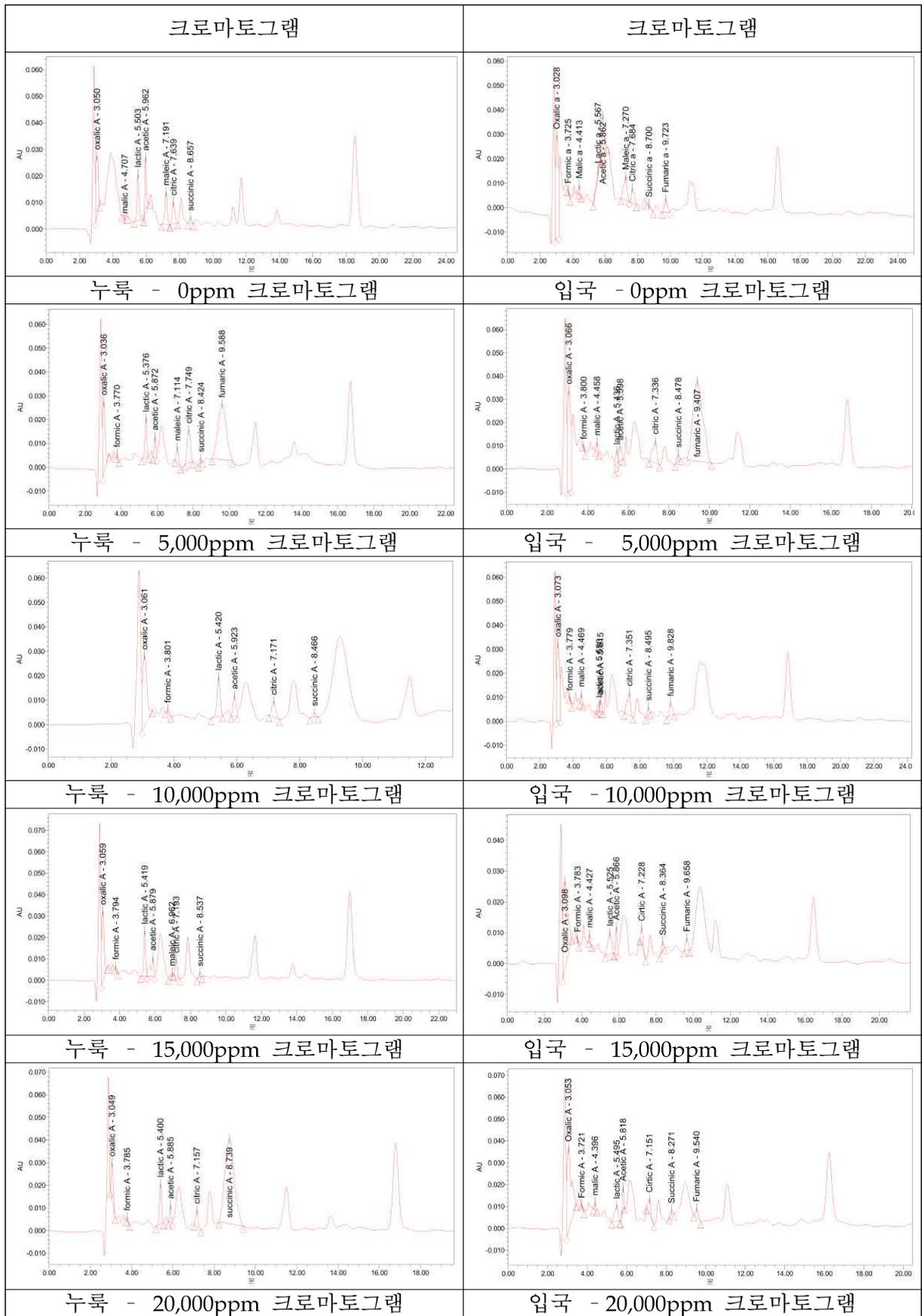


그림 55. β -Cyclodextrin 처리에 따른 크로마토그램

(3) 향기성분 분석

쓴맛 은폐제인 β -Cyclodextrin 투입에 따른 막걸리의 향기성분 변화를 파악하기 위해 술덧의 주요 아로마 분석 결과는 표36과 같다.

누룩과 β -Cyclodextrin을 농도를 달리하여 제조한 술덧에서는 아세트알데히드의 함량은 유의적인 차이가 나타나지 않았으며, 입국과 β -Cyclodextrin을 농도를 달리하여 제조한 술덧에서는 아세트알데히드의 함량은 β -Cyclodextrin을 50ppm 투입한 술덧에서 100ppm과 500ppm을 투입한 술덧에서보다 유의적으로 적게 나타났다.

디아세틸의 경우 국의 종류에 관계없이 β -Cyclodextrin의 투입량이 많을수록 그 농도가 높아지는 것을 알 수 있다. 에스터류의 경우는 누룩과 입국 시험구 모두에서 β -Cyclodextrin을 100ppm 투입한 술덧에서 유의적으로 높은 수치를 나타내었다.

고급 알코올류의 경우는 누룩과 β -Cyclodextrin을 500ppm 투입한 술덧에서 유의적으로 가장 높은 농도를 보인 반면, 입국을 사용하여 제조한 술덧에서는 β -Cyclodextrin의 투입량이 많을수록 고급 알코올의 농도가 증가하는 추세를 보였다.

표 36. β -Cyclodextrin 투입량에 따른 국 종류별 향기 성분

분석항목	누룩 술덧			입국 술덧		
	β -Cyclodextrin 투입량(ppm)					
	50	100	500	50	100	500
Acetaldehyde	34.28	31.37	35.25	27.25	53.65	54.12
Acetone	1.08	1.55	2.91	1.27	2.01	1.68
Furfural	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Benzaldehyde	0.00	1.36	1.24	0.00	1.29	1.24
Diacetyl	1.35	2.54	4.34	3.66	8.99	10.63
Esters						
Methyl acetate	0.55	0.56	0.43	0.48	0.60	0.76
Ethyl acetate	85.93	111.20	86.27	131.21	128.71	119.86
Isoamyl acetate	3.04	3.49	3.02	3.31	17.00	12.69
Ethyl caproate	0.80	0.48	0.48	0.54	0.67	0.31
Ethyl caprylate	0.35	0.84	0.94	0.38	0.84	0.78
Σ Esters	90.32	115.73	90.2	135.54	146.98	133.62
Higher alcohols						
Methyl alcohol	21.57	19.76	19.28	18.12	0.00	0.00
2-butanol	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>n</i> -propanol	140.48	145.93	134.40	130.43	311.13	314.01
Isobutanol	286.33	278.55	307.37	243.06	348.50	377.43
<i>n</i> -butanol	6.71	5.25	5.95	4.70	2.78	3.73
Isoamyl alcohol	989.04	954.25	1043.65	878.28	956.65	1080.12
<i>n</i> -amyl alcohol	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Σ Higher alcohols	1,444.13	1,403.74	1,510.65	1,274.59	1,619.06	1,775.29

(4) 관능평가

누룩과 입국의 β -Cyclodextrin 투입에 따른 쓴맛의 변화도를 알아보기 위해 관능평가를 실시하였다. 누룩과 입국 모두에서 5000ppm에서 쓴맛의 감소가 확인한 것으로 나타났으며, 10,000ppm에서도 감소가 나타났다. 하지만 10,000ppm이 초과되면 쓴맛의 감소보다는 관능적으로 부정적인 효과를 보였다. β -Cyclodextrin 투입의 경우 5,000ppm에서 10,000ppm을 투입하는 경우 쓴맛 감소의 효과가 가장 좋은 것으로 보인다.

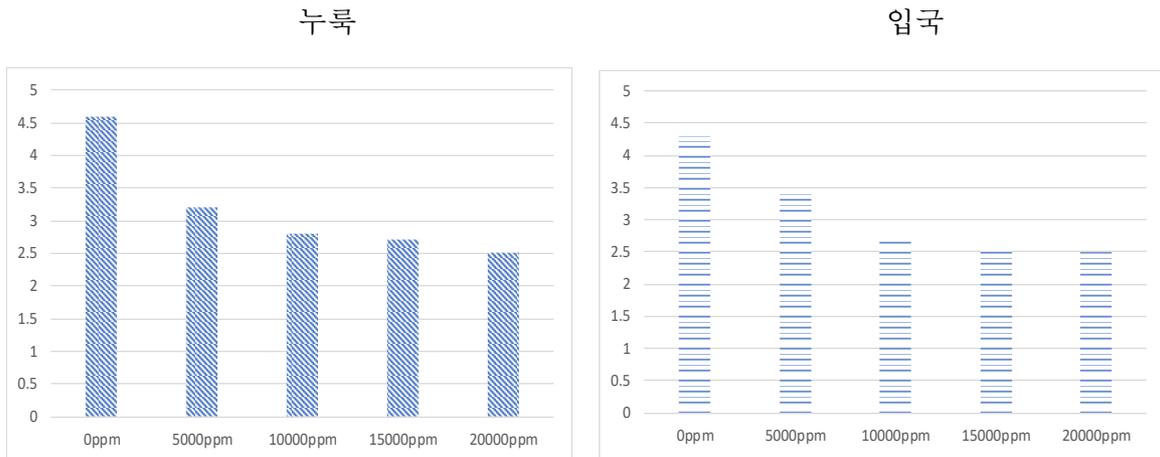


그림 56. β -Cyclodextrin 투입에 따른 관능평가

활성탄 처리에 따른 쓴맛 감소의 영향은 미미한 것으로 나타났다. 분말 활성탄을 사용한 후 여과를 하면 막걸리의 특성이 사라지기 때문에 알갱이 활성탄을 사용에 따른 결과로 판단된다.

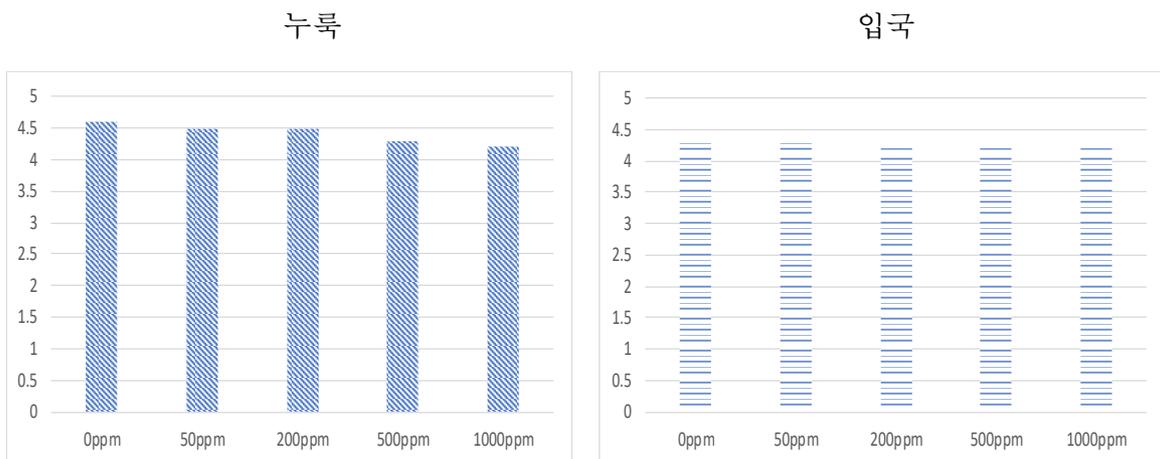


그림 57. 활성탄 처리에 따른 관능평가

<제3협동기관-화천주가>

8. 효소제를 이용한 쓴맛 제거 기술 연구

가. 실험재료

(1) 쌀

쌀은 탁주 제조에 사용되는 가장 중요한 원료이며, 현미의 호분층과 배아 모두 제거한 것이다. 일반적으로 양조 원료로 적합한 쌀은 쌀알이 굵고 흡수성이 좋으며, 증자(蒸煮)가 잘 되고, 발효하는 동안 당화가 양호하며, 조 단백질과 조 지방의 함량이 적고, 심백이 높은 것을 말한다. 쌀 자체는 술의 품질에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 알려져 있다. 오히려 막걸리를 만드는 공정이 매우 복잡하므로 품질은 주로 공정관리로 결정된다. 쌀은 2020년 생산된(10분도, % 도정) 추정을 판매장에서 구매하여 사용하였으며, 20% 도정은 연구소의 도정기를 이용하여 도정을 하였다. 50% 도정은 농업진흥청의 도정기를 이용하였다.

(2) 양조 용수

물은 탁주의 80% 이상을 차지하며 직접 술의 일부가 되어 술 품질에 영향을 줄 뿐만 아니라 양조과정 중 모든 원료와 효소의 용제가 된다. 물에 들어 있는 미량의 무기성분은 미생물의 영양분과 자극제로 중요한 역할을 하며, 효소 작용의 완충 역할을 한다. 세미와 수침을 하면 백미 중량의 30~30%의 물을 흡수하므로 물의 선택이 중요하다. 양조 용수로 갖추어야 할 필수조건은 먹는 물 수질 기준에 적합해야 한다. 수돗물은 물 수질 기준에 적합한 용수이므로, 양조 용수로 수돗물을 사용하였다.

(3) 발효제

(가) 누룩

누룩은 일반적으로 생저분인 밀을 거칠게 빻아서 물을 적절히 가하여 성형하고, 자연상태에서 배양, 건조 및 숙성시킨 것이다. 여기에는 라이조푸스 속(*Rhizopus* sp.), 아스페르길루스 속(*Aspergillus* sp.), 무코르 속(*Mucor* sp.), 압시디아 속(*Absidia* sp.) 등의 자연 곰팡이, 그리고 사카로마이세스 속(*Saccharomyces* sp.)의 양조효모와 락토바실루스 속(*Lactobacillus* sp.)의 젖산균도 생육하고 있는 것으로 알려져 있다. 누룩에는 전분에 작용하여 전분의 α -1, 4-glucoside 결합을 무작위로 가수분해하여 포도당과 덱스트린으로 분해하여 최종적으로는 맥아당을 생성하는 α -amylase, 전분의 비 환원성 말단부터 포도당(glucose)을 분리하는 당화 효소 glucoamylase, 단백질을 가수분해하여 펩타이드나 아미노산을 생성하는 효소 protease, 지방에 작용하여 지방산과 글리세롤을 생성하는 효소 lipase 등이 들어있다. 누룩에는 다양한 야생효모도 들어있어 깊고 풍부한 풍미를 제공하고, 다양한 대사산물을 생성하기도 한다. 따라서 누룩만으로도 양질의 탁주를 제조할 수 있다. 누룩은 시판되고 있는 전통 누룩 중에서 2019년 주류산업정보 실태조사 결과를 참조하여 주류 제조장에서 가장 많이 사용하고 있는 송학곡자(소울곡)를 사용하였다.

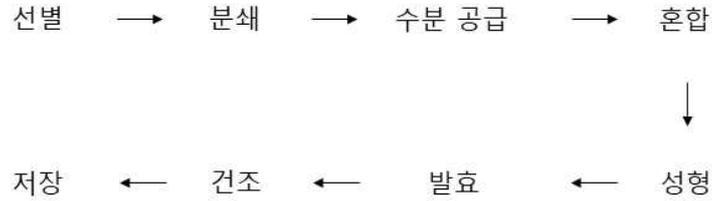


그림 58. 누룩 제조 공정도

(나) 입국

입국은 쌀 등 입자 형태의 전분질 원료를 침수한 후 증자하여 아스페르길루스 속 (*Aspergillus* sp.)의 곰팡이 포자를 접종하여 배양한 것이다. 백국은 아스페르길루스 카와치(*Aspergillus kawachi*) 균을 접종하여 배양한 것으로, 다량의 아밀라제(amylase)와 유기산(구연산)이 함유되어 있다. 전분의 당화뿐만 아니라 산 생성력이 높아 술덧의 오염방지 능력이 뛰어나 현재 우리나라에서 탁주 제조용 발효제로 많이 쓰이고 있다.

황국균은 아스페르길루스 오리제(*Aspergillus oryzae*)를 접종하여 배양한 것으로 당화효소만 많이 함유하고 있고 유기산은 거의 함유되어 있지 않다. 우리나라에서는 주로 청주 제조용으로 사용하고 있다. 입국은 단시일에 제조할 수 있으며, 순수 배양한 균을 접종하므로 잡균 오염이 적다. 따라서 종균과 배양조건의 조절로 발효 후 품질특성을 예측할 수 있으며, 여러 종류의 입국을 조합하여 맞춤형 제조를 할 수 있다는 장점이 있다.

입국에는 효모가 전혀 들어있지 않으므로 반드시 별도의 효모를 첨가해주어야 한다.

입국은 협력업체에서 추천한 좋은곡식의 쌀입국을 구매하였고, 효모는 활성건조 효모 (*Saccharomyces cerevisiae*)를 사용하였다.



그림 59. 입국 제조 공정도



그림 60. 누룩과 입국

(4) 효소제

(가) 혼합효소(Endopeptidase와 Exopeptidase)

Endopeptidase는 비 말단 아미노산 (즉, 분자 내)의 펩티드결합을 파괴하는 단백질 분해성 펩티다아제이고, Exopeptidase는 아미노산의 말단부로부터 펩티드결합을 끊는 펩티다아제로, 펩타이드 사슬로부터 단일 아미노산 또는 디 펩타이드를 방출한다.

혼합효소는 중성 또는 약산성 조건에서 단백질 가수분해를 위한 복합체로 낮은 수준의 가수분해에서 쓴 단백질 다수 분해물을 분해하는 기능이 있다.

(나) Protease

단백질 및 여러 가지 단백질 분해 산물의 펩티드결합을 가수분해하여 최종산물로 작은 펩타이드와 아미노산을 생성하는 효소류의 총칭이다. 생리활성 펩타이드의 방출, 불필요한 단백질의 분해제거 등의 기능이 있으며, 작용양식에 따라 폴리펩타이드 사슬의 말단에서 펩티드결합을 절단하는 펩타이드 말단 가수분해효소와 내부에서 절단하는 펩타이드 내부 가수분해효소로 분류된다.

(다) Carboxypeptidase

단백질 가수분해효소의 하나로 폴리펩타이드 사슬의 카르복실 말단에 위치하는 아미노산 잔기를 분리하는 작용을 하는 펩티드결합 가수분해효소를 말하며, 펩타이드의 카르복실산 말단으로부터 단일 아미노산을 절단하여 단백질에서 카복실기 말단 아미노산의 펩타이드 결합을 가수분해한다.



그림 61. 효소제의 종류

나. 실험방법

(1) 쌀의 전처리

쌀은 범벅과 고두밥 2가지의 방법으로 구분하여 사용하였다. 곡물을 가루로 내어 끓는 물을 부어 가며 익히면 범벅이 된다. 범벅은 전분 소화도가 낮아 효소 분해에 의한 당 생성력이 낮아 발효 기간은 다른 전처리법보다 길고 비교적 높은 알코올 함량이 있는 것으로 알려져 있다.

범벅을 제조하기 위하여 멥쌀을 30분간 세미하여 3시간 동안 실온의 물에 담가둔 후 30분간 물빼기를 하고 stone roller mill로 분쇄한 후 20mesh 체로 균질화하여 사용하였다.

범벅은 100℃로 끓는 물을 쌀가루에 4회 나누어 첨가하면서 나무주걱으로 반죽을 하여 반숙이 되도록 저은 후 실온에서 냉각하였다.

고두밥은 불린 쌀을 수증기를 이용하여 찌는 것으로 쌀의 전처리 방법 중 가장 많이 이용되는 방법이다. 불린 쌀을 수증기로 찌면 호화가 되면서 미세한 기공이 생겨나고, 기공을 통해 효소의 작용이 원활해진다. 병행 복발효 방식의 술빚기에서 당화와 발효의 균형을 유지할 수 있는 전처리 방법이다. 고두밥을 만들 때는, 속은 충분히 호화가 되고 겉은 고실고실한 상태가 이상적으로 알려져 있다. 고두밥 제조는 쌀을 30분간 깨끗이 씻어 3시간 동안 물에 불려 30분간 물빼기를 한 후 전기 찜기로 120℃에서 40분간 증차하였다. 10분간 뜸을 들인 후 우레탄 망 위에 펼쳐 실온에서 냉각하였다.

표 37. 쌀의 전처리 과정

구분	세미	침지	물빼기	쌀 가공방식	호화도(%)	냉각
범벅	30분	3시간	30분	쌀가루	63	1시간
고두밥	30분	3시간	30분	-	100	20분

(2) 주류의 제조

병행 복발효에서 쌀의 전처리가 주류의 특성에 미치는 영향이 상당하다. 누룩을 발효제로 사용하는 단양주의 경우는 산도가 높은 시료의 가능성이 있어 2단 담금법으로 제조를 하였다. 누룩을 발효제로 사용하는 경우 밀술은 1의 전처리 방법으로 멍쌀 180g, 물 540ml, 누룩 57.6g의 비율로 제조하였다. Endopeptidase와 Exopeptidase가 섞여있는 혼합효소는 각각 129.60mg, 259.20mg, 518.40mg, 1036.80mg, 2592.00mg씩을 넣은 5개의 시료로, Peptidase는 0.85mg, 1.44mg, 4.46mg, 8.64mg, 20.88mg씩을 넣은 5개의 시료로 실험을 하였다. 가수량은 곡물의 120%, 발효제는 곡물 사용량의 8%로 하였다. 22℃의 온도조절이 가능한 발효실에서 7일간 발효를 한 후 덧술을 하였다.

덧술은 멍쌀 540g, 물 320ml 비율로 밀술에 섞어 제조하였다. 덧술에서는 쌀을 1의 전처리 방법으로 각각 고두밥을 지어 냉각 후 밀술과 잘 섞어 22℃의 온도조절이 가능한 발효실에서 14일간 발효를 하였다. Carboxypeptidase는 발효를 마치고 술을 걸러, 0.012g을 음용수 10ml에 녹인 다음 시료 20ml에 각각 0.05ml, 0.5ml, 25ml, 5ml 넣어 희석 후 관능평가를 하였다. 입국의 경우에는 밀술은 1의 전처리 방법으로 입국 110g, 물 170ml, 효모 0.55g의 비율로 제조하였다. Endopeptidase와 Exopeptidase가 섞여 있는 혼합효소는 각각 129.60mg, 259.20mg, 518.40mg, 1036.80mg, 2592.00mg씩을 넣은 5개의 시료로, Peptidase는 0.85mg, 1.44mg, 4.46mg, 8.64mg, 20.88mg씩을 넣은 5개의 시료로 실험을 하였다. 가수량은 곡물의 140%, 발효제는 곡물 사용량의 15%로 하였다. 22℃의 온도조절이 가능한 발효실에서 7일간 발효를 한 후 덧술을 하였다.

덧술은 멍쌀 720g, 물 840ml 비율로 밀술에 섞어 제조하였다. 덧술에서는 쌀을 1의 전처리 방법으로 각각 고두밥을 지어 냉각 후 밀술과 잘 섞어 22℃의 온도조절이 가능한 발효실에서 14일간 발효를 하였다. Carboxypeptidase는 발효를 마치고 술을 걸러, 0.012g을 음용수 10ml에 녹인 다음 시료 20ml에 각각 0.05ml, 0.5ml, 25ml, 5ml 넣어 희석 후 관능평가를 하였다.

표 38. 혼합효소 처리에 따른 밀술과 덧술의 비교

구분	혼합효소 (mg)	밀술				덧술		합계		비율(%)	
		쌀 (g)	물 (ml)	발효제 (g)	효모 (g)	쌀 (g)	물 (ml)	쌀 (g)	물 (ml)	물/쌀 (%)	발효제/쌀 (%)
누룩	129.6	180	540	57.6	-	540	320	720	860	120	8
	259.2	180	540	57.6	-	540	320	720	860	120	8
	518.4	180	540	57.6	-	540	320	720	860	120	8
	1036.8	180	540	57.6	-	540	320	720	860	120	8
	2592.0	180	540	57.6	-	540	320	720	860	120	8
입국	129.6	-	170	110	55	610	840	720	1010	140	15
	259.2	-	170	110	55	610	840	720	1010	140	15
	518.4	-	170	110	55	610	840	720	1010	140	15
	1036.8	-	170	110	55	610	840	720	1010	140	15
	2592.0	-	170	110	55	610	840	720	1010	140	15

표 39. 혼합효소 투입량

구분	투입량(쌀 720g당)(mg)	비율(ppm)
누룩	129.60	180
	259.20	360
	518.40	720
	1036.80	1440
	2592.00	3600
입국	129.60	180
	259.20	360
	518.40	720
	1036.80	1440
	2592.00	3600

표 40. Peptidase 처리에 따른 밑술과 덧술의 비교

구분	Peptidase	밑술				덧술		합계		비율(%)	
		쌀 (g)	물 (ml)	발효제 (g)	효모 (g)	쌀 (g)	물 (ml)	쌀 (g)	물 (ml)	물/쌀 (%)	발효제/쌀 (%)
누룩	0.58	180	540	57.6	-	540	320	720	860	120	8
	1.44	180	540	57.6	-	540	320	720	860	120	8
	4.46	180	540	57.6	-	540	320	720	860	120	8
	8.64	180	540	57.6	-	540	320	720	860	120	8
	20.88	180	540	57.6	-	540	320	720	860	120	8
입국	0.58	-	170	110	55	610	840	720	1010	140	15
	1.44	-	170	110	55	610	840	720	1010	140	15
	4.46	-	170	110	55	610	840	720	1010	140	15
	8.64	-	170	110	55	610	840	720	1010	140	15
	20.88	-	170	110	55	610	840	720	1010	140	15

표 41. Peptidase 투입량 비교

구분	투입량(쌀 720g당)(mg)	비율(ppm)
누룩	0.58	0.8
	1.44	2
	4.46	6.2
	8.64	12
	20.88	29
입국	0.58	0.8
	1.44	2
	4.46	6.2
	8.64	12
	20.88	29

표 42. Carboxypeptidase 처리 따른 밀술과 덧술의 비교

		밀술				덧술		합계		비율(%)	
		쌀 (kg)	물 (L)	발효제 (g)	효모 (g)	쌀 (kg)	물 (L)	쌀 (kg)	물 (L)	물/쌀 (%)	발효제/쌀 (%)
누룩	a	1.25	3.75	400	-	3.75	2.25	5	6	120	8
입국	a	-	1.07	750	3.75	4.25	5.94	5	7	140	15

표 43. Carboxypeptidase 투입량

구분	투입량(ml/20ml)
누룩	0
	0.050
	0.50
	2.50
	5.0
입국	0
	0.050
	0.50
	2.50
	5.0

밀술의 가공법은 다음과 같다. 범벅은 누룩을 발효제로 이용하는 시료에 적용하였다. 쌀을 3시간 수침하고, 30분 물빼기를 거쳐 가루를 내어 무게를 측정하였다. 가능한 균일한 호화를 유도하기 위해 비교적 넓은 용기에 쌀가루를 넣고 3등분을 한 후 각 등분당 용량의 1/4 정도의 끓는 물을 부어 잘 저어주면서 된죽 형태를 만들었다. 나머지도 같은 방법으로 한 후 한데 모아 나머지 물을 넣고 잘 섞어 반죽을 완성하였다. 25℃로 냉각되면 준비한 누룩을 넣고 골고루 섞어 발효조에 넣고 22℃에서 7일간 충분히 발효하였다. 입국은 이미 호화된 재료에 곰팡이가 생성한 효소가 들어있는 상태이므로 열을 가하면 변성이 된다. 따라서 입국을 이용한 밀술은 다른 가공 형태를 하지 않고 바로 발효조에 입국과 물을 넣고 효모를 투입한 후 골고루 섞은 다음 22℃에서 7일간 충분히 발효하였다.



그림 62. 가공 방식에 따른 재료의 형태



그림 63. 교반이 끝난 밀술의 형상



그림 64. 혼합효소 처리한 밀술(누룩)



그림 65. 혼합효소 처리한 밀술(입국)

덧술은 고두밥을 이용하였다. 고두밥은 원료를 3시간 수침한 다음 30분 물빼기를 한 후 전기증자기를 이용하였다. 수증기가 올라오면 40분간 증자를 한 후 25℃로 냉각하여 밀술과 섞어주었다. 1단 담금 7일 후에 2단 담금을 하여 22℃에서 14일간 발효하였다.

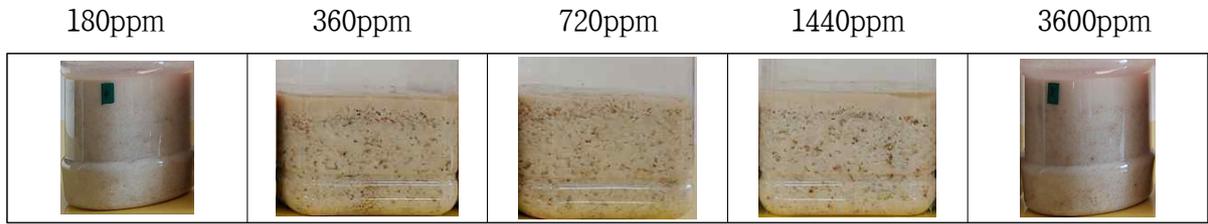


그림 66. 혼합효소 처리한 술덧의 변화(누룩 - 압착 전)



그림 67. 혼합효소 처리한 술덧의 변화(입국 - 압착 전)



그림 68. Peptidase를 처리한 밀술(누룩)



그림 69. Peptidase를 처리한 밀술(누룩)

고두밥은 원료를 3시간 침지하여 30분 물빼기를 거쳐 전기증자기를 이용하여 제조하였다. 1단 담금 4일 후에 2단 담금을 하여 22℃에서 14일간 발효하였다.



그림 70. Peptidase 처리한 술덧의 변화(누룩-압착 전)

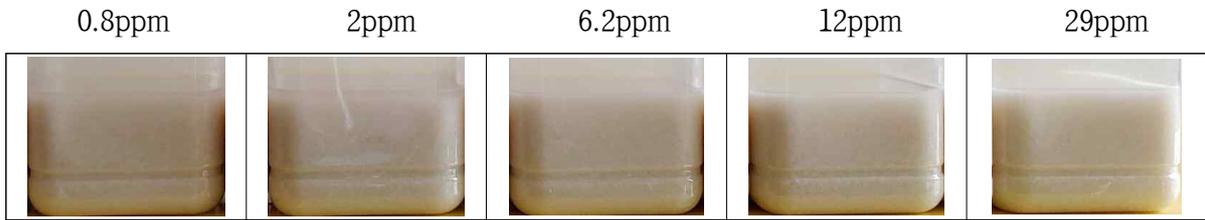


그림 71. Peptidase 처리한 술덧의 변화(입국-압착 전)

효소제를 처리한 전체 공정은 다음과 같다.

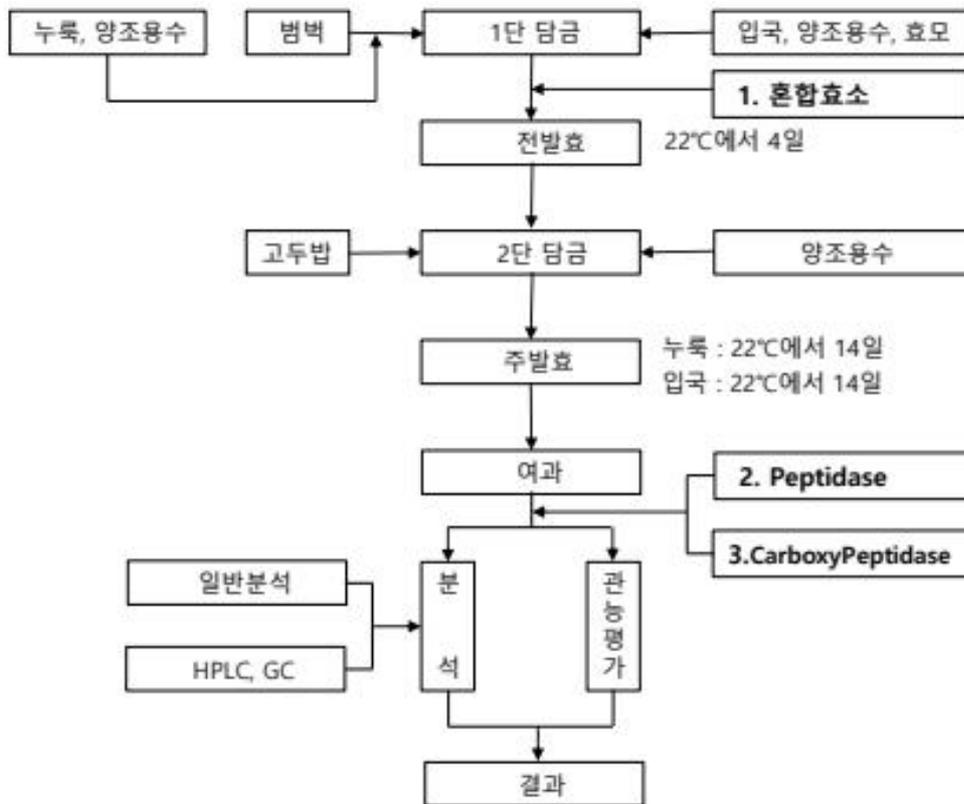


그림 72. 효소제 처리 공정도

다. 분석결과

(1) 혼합효소 처리

(가) 이화학적 분석

발효제에 따른 혼합효소를 처리한 발효주의 알코올은 모두 18~20% 정도로, 발효제와 혼합효소를 처리하는 큰 관련이 없는 것으로 나타났다. pH 변화는 누룩과 입국 모두 4~4.3으로 차이가 없었다. 당도는 입국보다 누룩이 많은 것으로 나타났고, 이것은 공통의 성향으로 보인다. 누룩과 입국의 총산도는 누룩의 경우 혼합효소를 처리하지 않은 샘플에서 0.480으로 낮았으며, 다른 시료에서는 특별한 변화가 없었다.

표 44. 혼합효소 투입량에 따른 이화학적 함량

구분	투입량(ppm)	Alcohol(%)	당도(Brix)	pH	총산도(W/V%)
누룩	0	18.0	13.2	4.3	0.480
	180	18.6	9.7	4.1	0.618
	360	17.6	12.9	4.2	0.540
	720	17.4	12.7	4.1	0.560
	1,440	17.2	13.0	4.2	0.610
	3,660	18.1	10.3	4.2	0.672
	입국	0	20.1	5.2	4.1
180		20.4	6.8	4.2	0.582
360		18.8	8.5	4.1	0.654
720		18.8	7.7	4.1	0.618
1,440		18.9	7.7	4.1	0.624
3,660		20.5	6.1	4.2	0.576

(나) 유기산 분석

유기산 함량 측정 결과는 표 49에 나타내었다. 누룩이나 입국에서 Lactic acid(8272.74~1445.54 mg%)가 가장 많은 함량을 나타내었고, 다음으로 Acetic acid(4839.82~1553.78 순이었다. Lactic acid의 경우 젖산균에 의해 생성되는 것으로 추측되며, Acetic acid의 경우 Bacilius의 작용으로 증가되는 것으로 보고되었다. 유기산 총량은 누룩의 경우 입국보다 2배 정도 높았으며, 10% 도정에서 50% 도정 방향으로 대부분의 유기산과 전체 함량이 낮아지는 추세를 보였다. 입국의 경우에는 도정률과 유기산의 함량과 특별한 연관이 없는 것으로 보였다.

표 45. 혼합효소 투입량에 따른 유기산 함량

구분	투입량 (ppm)	Organic acid(mg%)						
		Oxalic acid	Formic acid	Malic acid	Lactic acid	Acetic acid	Cirtic acid	Succinic acid
누룩	0	132.18	-	-	3972.84	3519.58	1089.18	119.12
	180	222.64	160.32	-	6431.54	5832.30	951.48	9.13
	360	256.56	160.41	-	9032.14	6023.90	1077.82	12.62
	720	87.48	-	-	6760.80	5975.16	1207.28	7.43
	1,440	197.56	140.68	-	7043.76	4416.40	1298.02	11.98
	3,660	223.26	206.04	-	9932.44	5490.56	1397.62	6.96
	입국	0	331.94	-	-	677.92	373.40	05.96
180		398.34	-	-	1445.54	2369.46	748.92	38.60
360		331.94	-	-	677.92	2999.52	605.96	-
720		383.60	-	-	2620.64	2373.40	379.46	18.64
1,440		102.18	-	-	2487.40	1553.78	510.72	-
3,660		395.82	-	-	3266.20	1171.76	1145.4	-

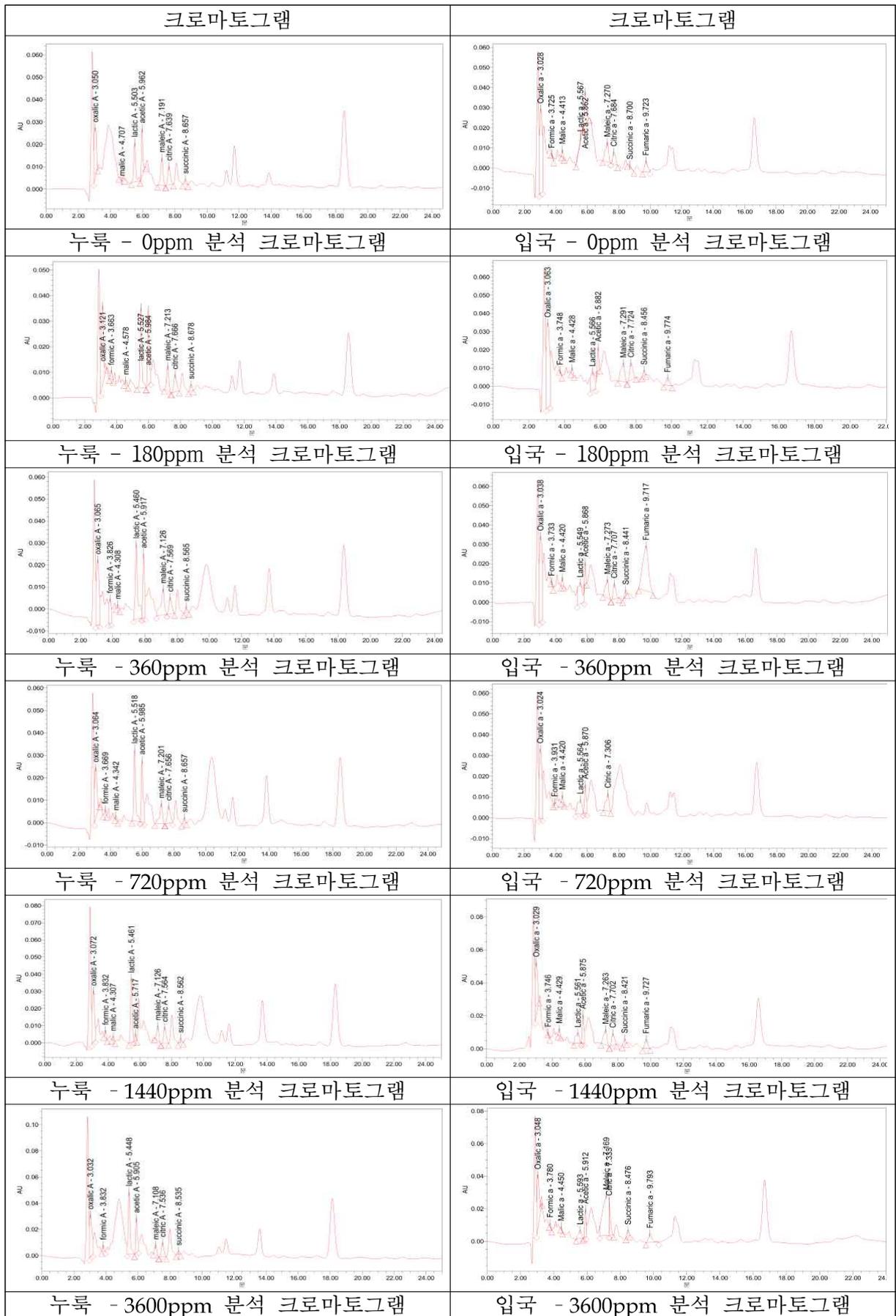


그림 73. 혼합효소 처리에 따른 크로마토그램

(다) 향기 성분 분석

혼합효소 투입량에 따른 술덧의 향기성분의 변화는 표46과 같다. 누룩과 혼합효소 180ppm를 투입한 술덧의 아세트알디히드가 혼합효소 무첨가 시험구와 360ppm 투입한 시험구에 비해 유의적으로 낮게 나타났다. 그리고 혼합효소 1,440ppm 투입한 술덧에서 가장 높은 농도를 보였다. 벤즈알데히드는 혼합효소 첨가량에 따라 증감이 일정하지 않았다. 한편 에스터류의 경우 혼합효소 1440ppm 투입한 술덧에서 유의적으로 가장 높은 농도를 보인 반면, 혼합효소 180ppm을 투입한 술덧에서 유의적으로 가장 낮은 농도를 나타내었다.

고급 알코올의 경우에는 혼합효소 180ppm을 투입한 술덧에 유의적으로 가장 높은 농도를 보인 반면, 혼합효소 1,400ppm을 투입한 술덧에서 유의적으로 가장 낮은 농도를 나타내었다.

표 46. 혼합효소 투입량에 따른 누룩 술덧의 향기성분 함량

구분(ppm)	누룩 술덧					
	혼합효소 투입량(ppm)					
	0	180	360	720	1,440	3,660
Acetaldehyde	41.55	26.86	41.15	41.94	54.71	37.57
Acetone	1.35	1.48	1.31	1.48	1.22	1.69
Furfural	0.00	0.00	0.00	4.34	0.00	0.00
Benzaldehyde	1.30	1.86	2.07	1.74	2.48	2.40
Diacetyl	6.41	0.80	3.00	4.47	5.11	5.43
Esters						
Methyl acetate	0.62	0.34	0.67	0.59	0.60	0.26
Ethyl acetate	150.39	51.59	148.46	125.06	216.68	82.74
Isoamyl acetate	1.50	0.35	1.49	1.02	2.60	0.51
Ethyl caproate	0.91	0.57	1.01	0.90	0.61	0.44
Ethyl caprylate	0.49	0.55	0.99	0.81	0.64	0.82
Σ Esters	153.42	52.85	151.63	127.57	220.49	83.95
Higher alcohols						
Methyl alcohol	0.86	16.73	19.60	18.40	18.74	17.77
2-butanol	0.00	1.63	0.00	0.00	0.00	2.74
<i>n</i> -propanol	157.25	139.14	121.47	148.11	92.74	131.30
Isobutanol	324.70	399.90	266.49	209.59	226.49	384.72
<i>n</i> -butanol	9.45	5.04	5.78	5.44	2.90	5.78
Isoamyl alcohol	958.80	1102.33	815.17	843.68	708.25	995.68
<i>n</i> -amyl alcohol	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Σ Higher alcohols	1,451	1,664	1,228	1,225	1,049	1,537

한편 혼합효소 투입량에 따른 입국 술덧에서의 향기 성분 변화는 표47과 같다. 아세트알데히드는 혼합효소 투입량에 관계없이 입국 술덧에서 유의적 차이를 보이지 않았고, 벤즈알데히드의 경우는 혼합효소 360ppm과 720pp를 투입한 술덧에서 유의적으로 가장 높은 수치를 보였다.

에스터류의 경우 혼합효소를 1440ppm 투입한 입국 술덧에서 유의적으로 가장 높은 농도를 보인 반면, 혼합효소를 무첨가한 입국 술덧에서 유의적으로 가장 낮은 농도를 나타내었다.

고급 알코올의 경우는 혼합효소 3660ppm을 투입한 입국 술덧에서 유의적으로 가장 높은 농도를 보인 반면, 혼합효소 180ppm을 투입한 입국 술덧에서 유의적으로 가장 낮은 농도를 보였다.

표 47. 혼합효소 투입량에 따른 입국 술덧의 향기성분 함량

구분(ppm)	입국 술덧					
	혼합효소 투입량(ppm)					
	0	180	360	720	1,440	3,660
Acetaldehyde	45.10	46.13	42.67	42.21	41.20	45.25
Acetone	1.62	2.14	1.68	1.64	1.72	2.06
Furfural	0.00	3.97	0.00	0.00	0.00	0.00
Benzaldehyde	0.00	2.03	1.75	1.60	1.52	1.25
Diacetyl	10.13	10.60	10.44	7.52	10.51	5.95
Esters						
Methyl acetate	0.47	0.71	0.79	0.87	1.13	0.85
Ethyl acetate	104.38	126.46	119.37	121.45	135.20	135.57
Isoamyl acetate	16.41	10.19	16.85	19.94	20.97	14.66
Ethyl caproate	1.82	0.56	2.67	2.61	2.77	0.93
Ethyl caprylate	1.26	0.34	1.41	1.92	1.67	0.53
Σ Esters	123.08	137.92	139.68	144.87	160.07	152.01
Higher alcohols						
Methyl alcohol	11.23	13.59	12.71	12.17	12.88	16.14
2-butanol	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>n</i> -propanol	226.95	224.11	261.76	255.20	272.24	322.11
Isobutanol	378.79	302.21	379.99	406.66	419.85	400.41
<i>n</i> -butanol	9.63	5.68	5.54	8.07	6.64	6.65
Isoamyl alcohol	1037.96	892.28	1111.66	1109.04	1170.79	1158.17
<i>n</i> -amyl alcohol	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Σ Higher alcohols	1,664	1,437	1,771	1,791	1,882	1,903

(라) 관능평가

누룩과 입국의 혼합효소 투입에 따른 쓴맛의 변화도를 알아보기 위해 관능평가를 실시하였다. 혼합효소를 180ppm에서 7,200ppm 투입한 경우에 쓴맛의 효과가 서서히 감소하였으며, 14,400ppm을 투입하고부터 쓴맛의 감소가 두드러지게 나타났다. 3,600ppm의 경우에는 1,440ppm보다 쓴맛의 감소는 조금 감소하였으나, 부정적인 관능으로 나타나는 경우도 있었다.

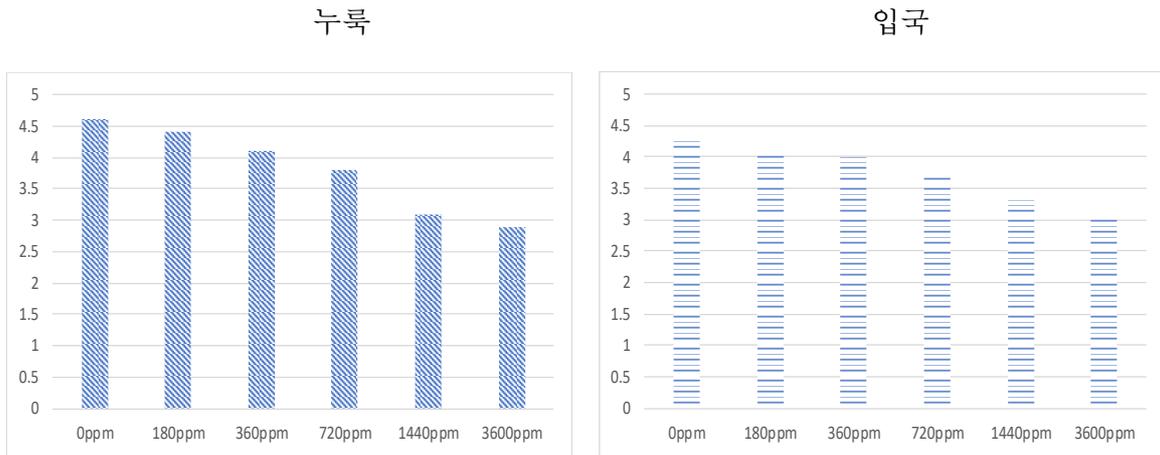


그림 74. 혼합효소 투입량에 따른 관능평가 그래프

(2) Peptidase 처리

(가) 이화학적 함량

발효제에 따른 Peptidase를 처리한 발효주의 알코올은 모두 18~20% 정도로, 발효제와 Peptidase 처리와는 큰 관련이 없는 것으로 나타났다. Ph 변화는 누룩과 입국 모두 4.1에서 4.3으로 비슷하였다. 당도는 입국보다 누룩이 많은 것으로 나타났고, 이것은 공통의 성향으로 보인다. 특이한 부분은 다른 실험법보다 누룩의 당도가 낮게 나온 점이다. 누룩과 입국의 총산도는 누룩의 경우 Peptidase를 처리하지 않은 샘플에서 0.48로 낮았으며, 다른 실험구에서는 특별한 차이가 없었다.

표 48. Peptidase 처리에 따른 이화학적 함량

구분	투입량(ppm)	Alcohol(%)	당도(Brix)	pH	총산도(W/V%)
누룩	0	18.0	13.2	4.3	0.48
	0.8	18.4	9.5	4.2	0.57
	2	18.8	9.0	4.1	0.55
	6.2	19.0	9.0	4.1	0.58
	12	19.0	8.6	4.1	0.59
	29	19.0	8.5	4.1	0.55
입국	0	20.1	5.2	4.1	0.63
	0.8	20.6	5.8	4.2	0.54
	2	20.4	6	4.2	0.54
	6.2	20.5	5.9	4.3	0.54
	12	20.6	5.8	4.2	0.54
	29	20.6	5.8	4.2	0.55

(나) 유기산 함량

유기산 함량 측정 결과는 표 49에 나타내었다. 누룩이나 입국에서 Lactic acid(8272.74~1445.54 mg%)가 가장 많은 함량을 나타내었고, 다음으로 Acetic acid(4839.82~1553.78 순이었다. Lactic acid의 경우 젖산균에 의해 생성되는 것으로 추측되며, Acetic acid의 경우 Bacillus의 작용으로 증가되는 것으로 보고되었다. 유기산 총량은 누룩의 경우 입국보다 2배 정도 높았으며, 10% 도정에서 50% 도정 방향으로 대부분의 유기산과 전체 함량이 낮아지는 추세를 보였다. 입국의 경우에는 도정률과 유기산의 함량과 특별한 연관이 없는 것으로 보였다.

표 49. Peptidase 처리에 따른 유기산 함량

구분	투입량(ppm)	Organic acid(mg%)						
		Oxalic acid	Formic acid	Malic acid	Lactic acid	Acetic acid	Cirtic acid	Succinic acid
누룩	0	132.18	-	-	3972.84	3519.58	1089.18	119.12
	0.8	9.94	-	-	6253.00	6111.76	1017.26	56.02
	2	1.3	-	-	6864.20	2608.08	1720.20	188.38
	6.2	-	-	-	6424.46	1178.10	1178.10	-
	12	-	-	-	4692.72	2532.60	1253.70	-
	19	-	-	-	5049.84	1789.46	1607.36	-
입국	0	331.94	-	-	677.92	2373.40	605.96	-
	0.8	3.23	-	-	2129.78	2918.42	2000.42	-
	2	9.28	-	-	1159.26	1128.18	1099.84	-
	6.2	9.82	-	-	1584.74	1762.94	1346.12	-
	12	4.28	-	-	1820.52	3314.28	2204.16	-
	19	6.03	-	-	2562.38	4697.78	970.32	-

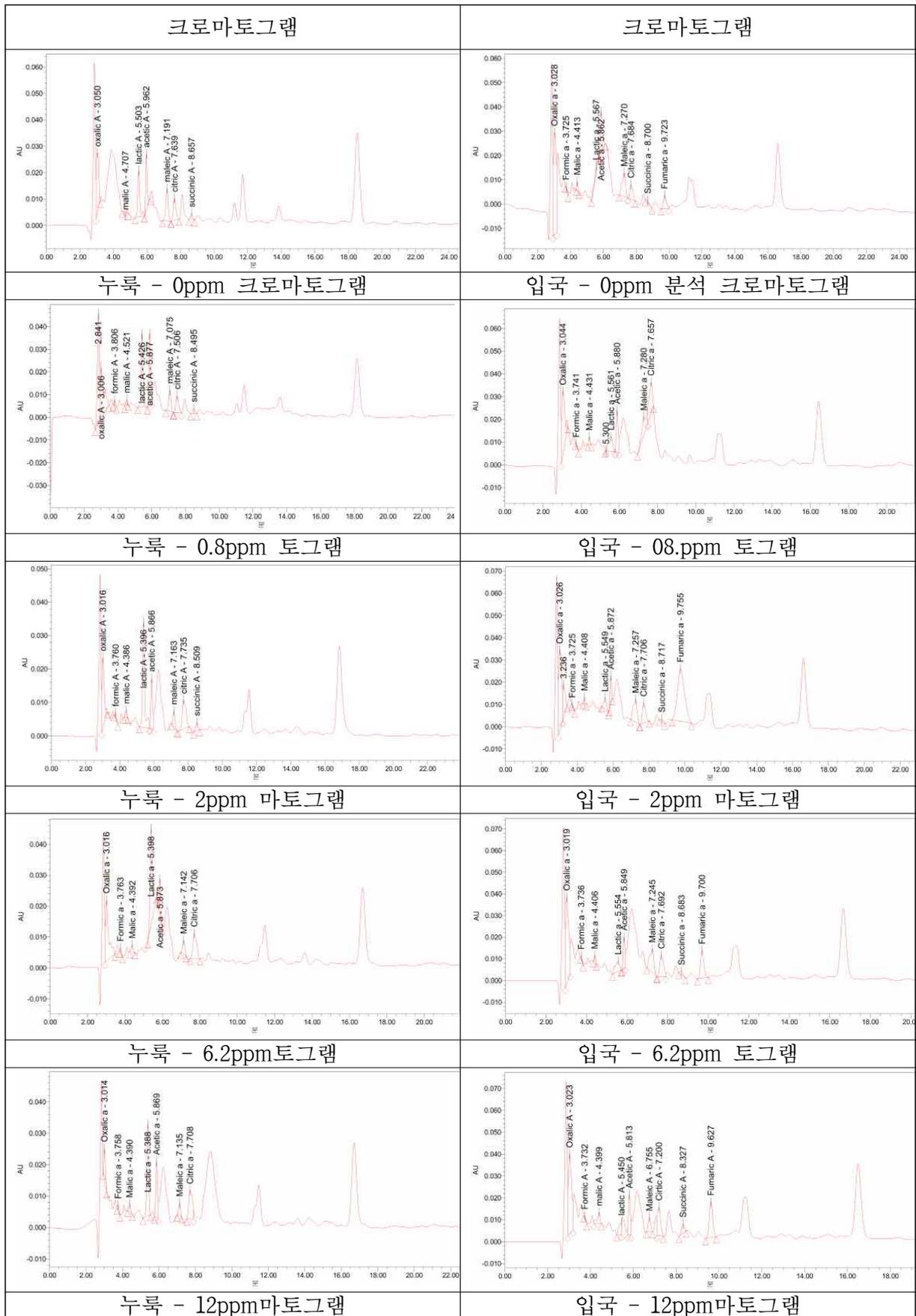


그림 75. Peptidase 처리에 따른 크로마토그램

(다) 향기 성분 함량

표50은 peptidase 투입량에 따른 누룩 술덧의 향기 성분 변화를 나타낸 것이다. 아세트알데히드의 경우 peptidase를 첨가한 누룩 술덧에서보다 효소 무첨가 누룩 술덧에서 유의적으로 높은 수치를 보였고, peptidase 효소 첨가량에 따른 누룩 술덧에서의 아세트알데히드 농도는 유의적으로 차이가 없었다.

벤즈알데히드와 디아세틸의 경우는 효소 첨가량에 따른 일정치 않은 농도를 나타내었다. 한편 에스터류의 경우 효소 무첨가 누룩 술덧에서 유의적으로 가장 높은 수치를 보인 반면, 효소를 첨가한 누룩 술덧 시험 구간의 유의적 차이는 나타나지 않았다. 그리고 고급 알코올의 경우는 효소 첨가한 누룩 술덧중 peptidase 2ppm을 첨가한 시험구에서 유의적으로 가장 높은 수치를 나타내었다.

표 50. Peptidase 투입량에 따른 누룩 술덧의 향기성분 함량

구분(ppm)	누룩 술덧					
	Peptidase 투입량(ppm)					
	0	0.8	2	6.2	12	29
Acetaldehyde	45.10	22.63	21.84	23.88	25.35	25.43
Aetone	1.62	1.74	2.01	1.97	2.08	1.79
Furfufural	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Benzaldehyde	0.00	2.62	2.69	2.20	1.89	1.88
Diacetyl	10.13	0.00	0.00	5.46	4.52	4.93
Esters						
Methyl acetate	0.47	0.36	0.30	0.37	0.32	0.34
Ethyl acetate	104.38	48.17	45.48	49.84	48.24	51.10
Isoamyl acetate	16.41	0.34	0.32	0.37	0.30	0.33
Ethyl caproate	1.82	0.66	0.78	0.96	0.69	0.60
Ethyl caprylate	1.26	0.60	0.89	1.44	0.78	0.85
Σ Esters	123.08	49.53	46.88	51.54	49.55	52.37
Higher alcohols						
Methyl alcohol	11.23	16.68	16.79	16.50	17.62	16.31
2-butanol	0.00	1.72	1.98	1.69	1.38	0.97
<i>n</i> -propanol	226.95	146.01	160.32	132.56	141.23	130.65
Isobutanol	378.79	487.91	572.58	485.16	478.02	476.96
<i>n</i> -butanol	9.63	5.22	5.11	4.44	5.84	6.81
Isoamyl alcohol	1037.96	1168.76	1257.35	1127.80	1143.90	1104.74
<i>n</i> -amyl alcohol	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Σ Higher alcohols	1,664.56	1,826.3	2,014.13	1,768.15	1,787.99	1,736.44

표51은 peptidase 투입량에 따른 입국 술덧의 향기성분 변화를 나타낸 것이다. 아세트알데히드의 경우 peptidase를 첨가량에 관계없이 모든 시험구간의 유의적 차이가 나타나지 않았다. 벤즈알데히드는 효소 첨가량에 따라 일정하지 않은 농도를 보였으며, 디아세틸의 경우는 peptidase 6.2ppm 투입 입국 술덧에서 유의적으로 가장 낮은 농도를 보였다. 에스터류의 경우는 효소 첨가량에 따른 유의적 차이를 보이지 않았고, 고급 알코올류의 경우는 효소 무첨가 입국 술덧에서 유의적으로 가장 높은 농도를 조인 반면, 효소 첨가량이 가장 많은 시험구에서 고급 알코올류의 농도가 유의적으로 가장 낮게 나타났다.

표 51. Peptidase 첨가량에 따른 입국 술덧의 향기 성분 함량

구분(ppm)	입국 술덧					
	Peptidase 투입량(ppm)					
	0	0.8	2	6.2	12	29
Acetaldehyde	45.10	43.64	44.68	46.00	45.19	44.76
Acetone	1.62	1.95	2.10	2.00	1.61	1.78
Furfural	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Benzaldehyde	1.00	1.68	1.34	3.45	1.39	2.50
Diacetyl	10.13	10.53	10.33	4.72	10.61	3.28
Esters						
Methyl acetate	0.47	0.78	0.99	0.88	0.87	0.79
Ethyl acetate	104.38	124.24	119.16	112.60	122.17	114.84
Isoamyl acetate	16.41	10.47	9.25	8.93	10.33	10.17
Ethyl caproate	1.82	0.60	0.44	0.49	0.56	0.58
Ethyl caprylate	1.26	0.33	0.42	1.01	0.95	0.61
Σ Esters	123.08	136.09	129.84	122.9	133.93	126.38
Higher alcohols						
Methyl alcohol	11.23	14.25	13.18	14.26	13.59	11.60
2-butanol	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>n</i> -propanol	226.95	257.56	240.66	254.47	244.99	203.48
Isobutanol	378.79	313.07	312.94	330.36	324.73	303.80
<i>n</i> -butanol	9.63	7.25	6.22	7.19	7.13	5.16
Isoamyl alcohol	1037.96	948.38	894.97	950.02	948.91	876.32
<i>n</i> -amyl alcohol	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Σ Higher alcohols	1,664.56	1,540.51	1,467.97	1,556.3	1,539.35	1,400.36

(라) 관능평가

누룩과 입국의 Peptidase 첨가량에 따른 쓴맛의 변화도를 알아보기 위해 관능평가를 실시하였다. 누룩과 입국 모두에서 Peptidase를 6.2ppm 첨가한 경우 쓴맛의 감소가 확연히 나타났다. 29ppm의 경우에는 부정적 관능인 느끼한 맛이 느껴지는 경우도 있었다. Peptidase 첨가는 6.2ppm의 경우가 가장 좋은 것으로 나타났다(그림 76).

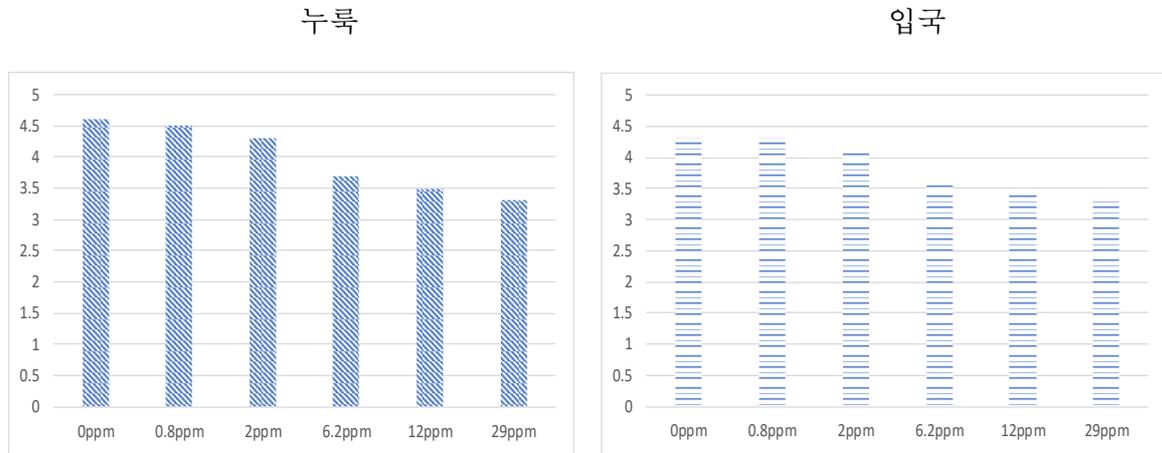


그림 76. Peptidase 첨가량에 따른 관능평가 그래프

(3) Carboxypeptidase 처리

(가) 관능평가

누룩과 입국의 Carboxypeptidase 처리의 경우에는 쓴맛 감소의 폭이 5ml를 처리한 누룩의 경우에 감소의 경향을 보였으나 전체적으로 미미한 감소를 보이는 것으로 나타났다 (그림 77).

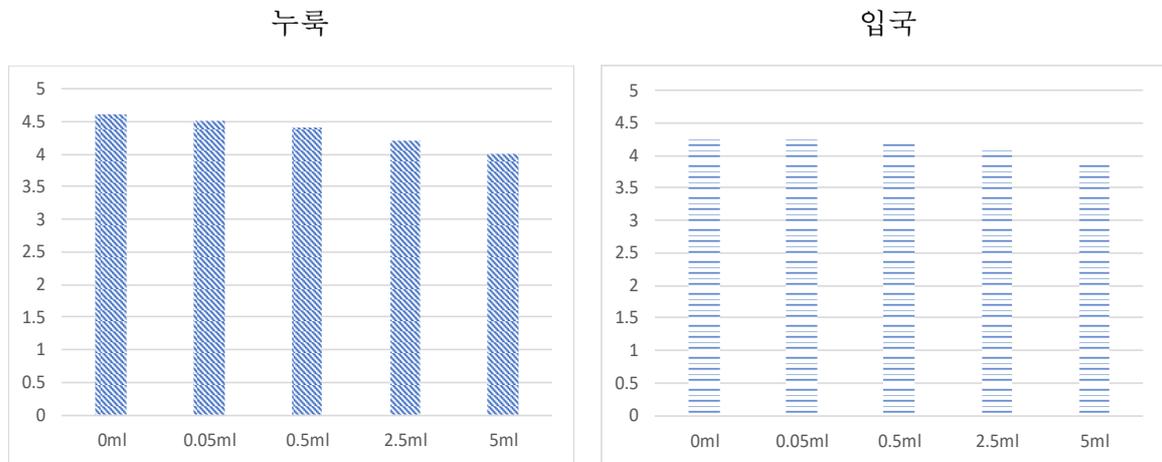


그림 77. Carboxypeptidase 처리에 따른 관능평가

9. 맛 제거를 통한 신 공정도 및 레시피 개발

본 연구를 통해 도출된 결과를 요약하여 정리하면 다음과 같다. 곡물(쌀, 밀 등) 자체 효소 또는 미생물의 단백질 분해효소(엔도펩티다아제, 카르복시펩티다아제, 아미노펩티다아제, 디펩티다아제)에 의해 곡물의 단백질이 일차적으로 분해가 되면서 펩타이드 등의 분해산물이 생성되고 이때 다양한 맛이 생성된다. 이후 펩타이드 등은 효소 또는 화학반응에 의해 2차적으로 아미노산과 그 유도체 등으로 다시 분해된다. 아미노산의 유도체(락토일 아미노산, 숙시닐 아미노산, 피로글루탐산 펩타이드, 감마 글루타밀 펩타이드, 마이알

반응 부산물)은 감칠맛을 부여한다.

1, 2차 단백질 분해에 관여하는 미생물은 세균과 곰팡이이며, 특히 세균 중에는 젖산균(스타필로코커스)이 그리고 곰팡이 중에는 아스퍼질러스속이 주로 관여한다. 이 미생물들은 펩타이드와 아미노산 생성과 관련 있는 효소를 분비하는데, 그 예로서 젖산균은 다양한 효소(글루타미나아제, 글루탐산탈탄산효소, 글루타치온환원효소, 피로글루타밀 시클라아제)를 생성하고 곰팡이도 다양한 효소(γ -글루타밀 전이효소, 숙시닐 전이효소)를 분비하여 아미노산 유도체를 생성한다. 따라서 막걸리의 쓴맛은 1, 2차에 걸쳐 단백질 분해 시 생성된 불균형적이고 과도한 분해산물이 원인이다. 즉 소수성 아미노산(hydrophobic amino acid) 또는 소수성 아미노산으로 구성되어 있는 곡물(쌀)유래의 저분자 펩타이드의 과도한 생성이 쓴맛의 주된 원인으로 볼수 있다.

물론 펩타이드에 의한 쓴맛은 펩타이드를 구성하고 있는 각 아미노산의 조합과 서열에 의해 영향을 받는다. 예를 들면 프롤린은 쓴맛에 가장 영향을 많이 주는 아미노산인데, 이는 프롤린을 함유한 펩타이드가 혀의 미각 수용기에 쉽게 결합을 할 수 있기 때문이다. 그 외 글리신, 알라닌, 발린, 류이신, 트립토판, 페닐알라닌 등을 함유하는 펩타이드(글루타민-류이신, 글루타민-트립토판, 글루타민-페닐알라닌)도 같은 이유로 쓴맛의 원인이 된다.

일반적으로 아미노산 2개로 연결된 디펩타이드와 3개로 연결된 트라이펩타이드에서는, 쓴맛과 관계된 소수성 아미노산은 그 조합이나 배열에 상관없이 쓴맛을 나타내는 것으로 알려져 있다. 반면에 폴리펩타이드에서는 소수성 아미노산이 N-말단에 결합되어야 쓴맛을 나타나게 된다

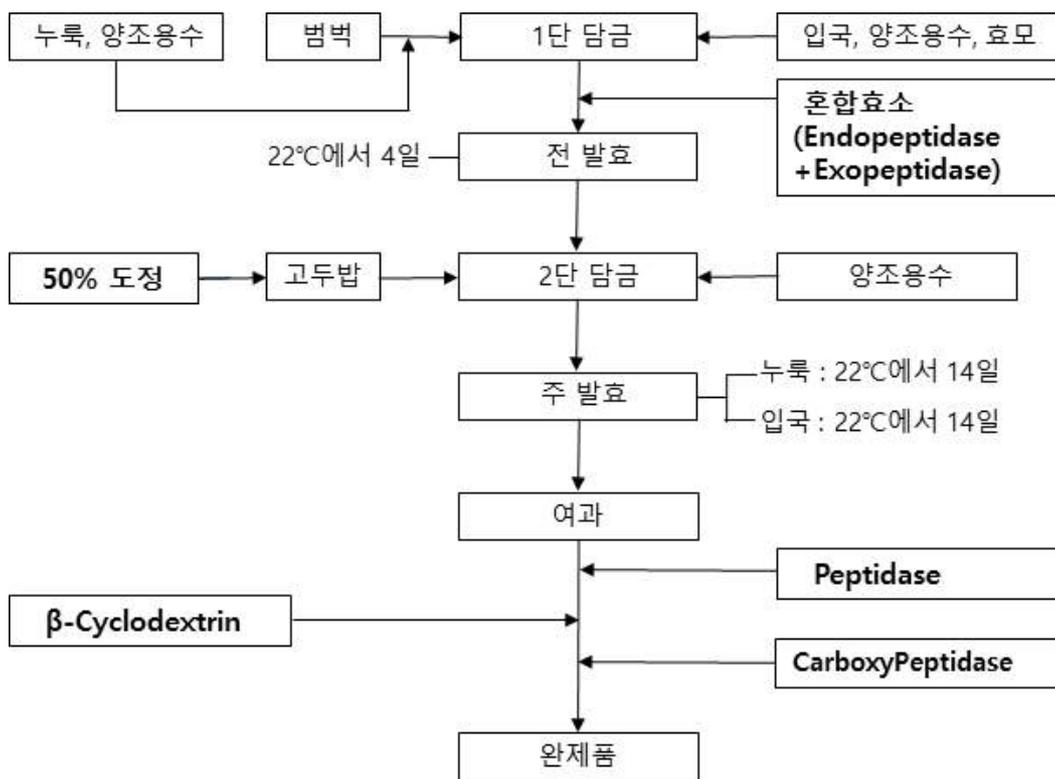


그림 78. 쓴맛 제거를 위한 신 공정도

○ 사업화성과 및 매출실적

- 사업화 성과

항목	세부항목			성 과
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	억원
			향후 3년간 매출	3천만원
		관련제품	개발후 현재까지	억원
			향후 3년간 매출	억원
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : % 국외 : %
			향후 3년간 매출	국내 : 5% 국외 : %
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : % 국외 : %
			향후 3년간 매출	국내 : % 국외 : %
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위		위
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위		위

- 사업화 계획 및 매출 실적

항 목	세부 항목		성 과		
사업화 계획	사업화 소요기간(년)		1		
	소요예산(백만원)		200		
	예상 매출규모 (억원)		현재까지	3년후	5년후
				3천만원	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
			국내	5	
국외					
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획		본 연구결과를 기반으로 약주와 청주에 응용하여 제품군 을 확대할 계획			
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)		현재	3년후	5년후
	수입대체(내수)				
	수 출				

제3장 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

1절 목표

가. 최종목표

- 국내 막걸리 제조 시 자주 발생하는 쓴맛에 대한 원인 규명과 저감화를 위한 기술개발
 - 막걸리의 쓴맛 저감화 및 숙성기간 단축을 통한 생산공정 효율화 및 공정개선
 - 막걸리 쓴맛 제거를 통한 전통주 품질향상 및 소비자 선호도 제고

나. 세부목표

- 막걸리 쓴맛의 학술적 원인 규명 연구
 - 막걸리의 쓴맛 원인 규명을 위한 원료(쌀)분석
 - 막걸리의 쓴맛 원인 규명을 위한 국(입국, 누룩) 분석
 - 막걸리 제조공정 연구

- 막걸리 쓴맛 저감화를 위한 기술개발 연구
 - 원료처리 기술 개선 연구
 - 쓴맛 흡착제 또는 은폐제 처리 기술 연구
 - 효소제를 이용한 쓴맛 제거 기술 연구
 - 쓴맛 제거를 통한 신공정도 및 레시피 개발

2절 목표 달성 여부

구분	달성여부	달성도(%)
○ 막걸리의 쓴맛 원인 규명을 위한 원료(쌀)분석	o	100
○ 막걸리의 쓴맛 원인 규명을 위한 국(입국, 누룩) 분석	o	100
○ 막걸리 제조공정 연구	o	100
○ 원료처리 기술 개선 연구	o	100
○ 쓴맛 흡착제 또는 은폐제 처리 기술 연구	o	100
○ 효소제를 이용한 쓴맛 제거 기술 연구	o	100
○ 쓴맛 제거를 통한 신공정도 및 레시피 개발	o	100

3절 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후 대책

-해당사항 없음

제4장 연구결과의 활용 계획 등

양조기술적 측면

- 프리미엄급 막걸리 제조기술 확보에 따른 전통주 시장확대

경제적·산업적 측면

- 프리미엄급 막걸리 제조기술 확보에 따른 전통주 시장확대
- 고품질의 막걸리 개발을 통한 소비자의 막걸리 선호도 제고
- 막걸리의 판매호조에 따른 전통주산업 활성화 및 수출활성화
- 국내 쌀소비 촉진에 따른 지역농산물 소비 진작

참고문헌

김미령. (2010). 효소종류에 따른 대두단백, 카제인, 글루텐, 젤라틴 단백질 가수분해물의 쓴맛과 용해도 특성. 한국식품영양과학회지, 39(4), 587-594.

김진수, 이정석, 윤인성, 강상인, 박선영, 정우철, & 허민수. (2020). 살 오징어 (*Todarodes pacificus*) 간취장 유래 한외여과 Aminopeptidase Retentate Fraction 의 특성과 쓴맛 개선효과. Korean J Fish Aquat Sci, 53(1), 112-122.

김해중, 박세호, 이종철, & 이민호. (2012). 인삼의 특유향과 쓴맛을 감소시킨 인삼음료 제조방법. 대한민국 특허출원 제, (110667).

임숙자. (1996). 관능검사를 통한 썸바귀의 쓴맛 연구. 한국식품조리과학회지, 12(1), 115-121.

장운제, 김은미, 최윤상, 전기홍, & 김영봉. (2015). 도라지 쓴맛 개선을 위한 공정개발 연구. 한국식품영양과학회지, 44(10), 1550-1557.

홍혜정, & 이혜수. (1994). 된장의 쓴맛 펩타이드 특성. 한국식품조리과학회지, 10(1), 45-50.

Adler, E., Hoon, M. A., Mueller, K. L., Chandrashekar, J., Ryba, N. J., & Zuker, C. S. (2000). A novel family of mammalian taste receptors. *Cell*, 100(6), 693-702.

Arai, S., Yamashita, M., Kato, H. and Fujimaki, M. (1970). Applying proteolytic enzymes on soybean part V.A nondialyzable bitter peptide in peptic hydrolyzate of soybean protein and its bitterness in relation to the chemical structure. *Agric. Biol. Chem.*, 34, 729-738.

Blinkovsky, A.M., Byun, T., Brown, K.M. and Golightly, E. J. (1999). Purification, characterization, and heterologous expression in *Fusarium venenatum* of a novel serine carboxypeptidase from *Aspergillus oryzae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 3298-3303.

Brockhoff, A., Behrens, M., Niv, M. Y., & Meyerhof, W. (2010). Structural requirements of bitter taste receptor activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(24), 11110-11115.

Chandrashekar, J., Mueller, K. L., Hoon, M. A., Adler, E., Feng, L., Guo, W., ... & Ryba, N. J. (2000). T2Rs function as bitter taste receptors. *Cell*, 100(6), 703-711.

Choung, N. H., Shin, Y. S., Kim, S. H., & Yim, M. H. (2003). Characteristics of soy

protein hydrolysates with enzymes produced by microorganisms isolated from traditional Meju. *Korean J. Food Preserv.*, 10, 80–88.

Coupland, J. N., & Hayes, J. E. (2014). Physical approaches to masking bitter taste: lessons from food and pharmaceuticals. *Pharmaceutical research*, 31(11), 2921–2939.

Drewnowski, A. (2001). The science and complexity of bitter taste. *Nutr. Rev.* 59(6), 163–169.

Engel, E., Tournier, C., Salles, C., & Le Quéré, J. L. (2001). Evolution of the composition of a selected bitter Camembert cheese during ripening: Release and migration of taste-active compounds. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(6), 2940–2947.

Fernandez, M., Singh, T. K., Fox, P. F. (1998) Isolation and identification of peptides from the diafiltration permeate of the water-soluble fraction of cheddar cheese. *J. Agric. Food Chem.* 46, 4512 – 4517.

Fujimaki, M., Kato, H., Arai, S., & Yamashita, M. (1971). Application of microbial proteases to soybean and other materials to improve acceptability, especially through the formation of plastein. *Journal of Applied Bacteriology*, 34(1), 119–131.

Gardner, R. J. (1980). Correlation of bitterness thresholds of amino acids and peptides with molecular connectivity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 31(1), 23–30.

Guigoz, Y., & Solms, J. (1976). Bitter peptides, occurrence and structure. *Chemical Senses*, 2(1), 71–84.

Hamilton, J. S., Hill, R. D., Van-Leeuwen, H., (1994) A bitter peptide from cheddar cheese. *Aric. Biol. Chem.* 38, 375 – 379.

Hashizume, K., Okuda, M., Numata, M., & Iwashita, K. (2007). Bitter-tasting sake peptides derived from the N-terminus of the rice glutelin acidic subunit. *Food science and technology research*, 13(3), 270–274.

Hashizume, K., Ito, T., Shimohashi, M., Kokita, A., Tokiwano, T., & Okuda, M. (2012). Taste-guided fractionation and instrumental analysis of hydrophobic compounds in sake. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 120046.

Helbig, N. B., Ho, L., Christy, G. E., & Nakai, S. (1980). DEBITTERING OF SKIM MILK

HYDROLYSATES BY ADSORPTION FOR INTO INTO ACIDIC BEVERAGES. *Journal of Food Science*, 45(2), 331-335.

Ishibashi, N., Arita, Y., Kanehisa, H., Kouge, K., Okai, H., & Fukui, S. (1987). Bitterness of leucine-containing peptides. *Agricultural and Biological Chemistry*, 51(9), 2389-2394.

Ishibashi, N., Sadamori, K., Yamamoto, O., Kanehisa, H., Kouge, K., Kikuchi, E & Fukui, S. (1987a). Bitterness of phenylalanine-and tyrosine-containing peptides. *Agricultural and Biological Chemistry*, 51(12), 3309-3313.

Ishibashi, N., Kouge, K., Shinoda, I., Kanehisa, H., & Okai, H. (1988). A mechanism for bitter taste sensibility in peptides. *Agricultural and Biological Chemistry*, 52(3), 819-827.

Ishibashi, N., Ono, I., Kato, K., Shigenaga, T., Shinoda, I., OKAi, H., & Fukui, S. (1988a). Role of the Hydrophobia Amino Acid Residue in the Bitterness of Pep tides. *Agricultural and Biological Chemistry*, 52(1), 91-94.

Iwano, K., Ito, T. and Nakazawa, N. (2005). Correlation analysis of a sensory evaluation and the chemical components of Ginjyosyu. *J. Brew. Soc. Japan*, 100, 639-649 (in Japanese).

Kim, B. H., Jo, M. R., Kim, D. W., Kang, K. U., Kim, S. G., Kim, J. S., & Lee, S. Y. (2016). 여주차 쓴맛 개선을 위한 전처리 및 제다공정. 한국약용작물학회 심포지엄 및 추계학술발표회, 84-84

Kim, M. J., Son, H. J., Kim, Y., Misaka, T., & Rhyu, M. R. (2015). Umami-bitter interactions: The suppression of bitterness by umami peptides via human bitter taste receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 456(2),

Kim, M.R., Cho, S.Y., Kim, C.S., Kim, C.W., Utsumi, S. and Lee, C.H. (1999). Amino acid sequence analysis of bitter peptides from a soybean proglycinin subunit synthesized in *Escherichia coli*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 63, 2069-2074.

Kim, S. Y., Park, P. S., & Rhee, K. C. (1990). Functional properties of proteolytic enzyme modified soy protein isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38(3), 651-656.(1-2)

Kim, U. K., Jorgenson, E., Coon, H., Leppert, M., Risch, N., & Drayna, D. (2003). Positional cloning of the human quantitative trait locus underlying taste sensitivity to phenylthiocarbamide. *Science*, 299(5610), 1221-1225.

Kirimura, J., Shimizu, A., Kimizuka, A., Ninomiya, T., & Katsuya, N. (1969). Contribution

of peptides and amino acids to the taste of foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 17(4), 689-695.

Konno, A., Misaki, M., Toda, J., Wada, T., & Yasumatsu, K. (1982). Bitterness reduction of naringin and limonin by β -cyclodextrin. *Agricultural and Biological Chemistry*, 46(9), 2203-2208.

Kuhn, C., Bufe, B., Winnig, M., Hofmann, T., Frank, O., Behrens, M., ... & Meyerhof, W. (2004). Bitter taste receptors for saccharin and acesulfame K. *Journal of Neuroscience*, 24(45), 10260-10265.

Kukman, I.L., Zelenik-Blatnik, M. and Abram, V. (1995). Isolation of low-molecular-mass hydrophobic bitter peptides in soybean protein hydrolysates by revers-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatography A*, 704, 113-120.

Lin, C. F., & Lee, C. R. (1987). U.S. Patent No. 4,636,388. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office. (1-12)

Lindemann B (2001) Receptors and transduction in taste. *Nature* 413:219-225.

Lemieux, L., & Simard, R. E. (1992). Bitter flavour in dairy products. II. A review of bitter peptides from caseins: their formation, isolation and identification, structure masking and inhibition. *Le Lait*, 72(4), 335-385.

Maehashi, K., & Huang, L. (2009). Bitter peptides and bitter taste receptors. *Cellular and molecular life sciences*, 66(10), 1661-1671.

Malowicki, M.G. Shellhammer, T.H. (2005). Isomerization and degradation kinetics of hop (*Humulus lupulus*) acids in a model wort-boiling system. *J. Agric. Food Chem.* 53, 4434-4439.

Matsunami, H., Montmayeur, J. P., & Buck, L. B. (2000). A family of candidate taste receptors in human and mouse. *Nature*, 404(6778), 601-604.

Matoba, T., Hayashi, R., & Hata, T. (1970). Isolation of bitter peptides from tryptic hydrolysate of casein and their chemical structure. *Agricultural and Biological Chemistry*, 34(8), 1235-1243.

Matsusita, I. (1993). Bitter peptide from beer yeasts extracts. *Peptide Chem.* 31, 165-8

Meyerhof, W., Behrens, M., Brockhoff, A., Bufe, B., & Kuhn, C. (2005). Human bitter taste perception. *Chemical senses*, 30(suppl_1), i14-i15.

Meyerhof, W., Batram, C., Kuhn, C., Brockhoff, A., Chudoba, E., Bufe, B., ... & Behrens, M. (2010). The molecular receptive ranges of human TAS2R bitter taste receptors. *Chemical senses*, 35(2), 157-170.

Minamiura, N., Matsumura, Y., Fukumoto, J., & Yamamoto, T. (1972). Bitter Peptides in Cow Milk Casein Digests with Bacterial Proteinase: Part I. Isolation and Determination of Amino Acid Sequence of a Bitter Peptide. *Agricultural and Biological Chemistry*, 36(4), 588-595.

Murray, T. K., & Baker, B. E. (1952). Studies on protein hydrolysis. I-preliminary observations on the taste of enzymic protein-hydrolysates. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 3(10), 470-475.

Ney, K. H. (1971). Voraussage der bitterkeit von peptiden aus deren aminosäurezu-sammensetzung. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 147(2), 64-68.

Oka, S., Nagata, K. (1974) Isolation and characterization of neutral peptides in soy sauce. *Agric. Biol. Chem.* 38, 1185-1194.

Otagiri, K., Noshio, Y., Shinoda, I., Fukui, H., & Okai, H. (1985). Studies on a model of bitter peptides including arginine, proline and phenylalanine residues. I. Bitter taste of di- and tripeptides, and bitterness increase of the model peptides by extension of the peptide chain. *Agricultural and Biological chemistry*, 49(4), 1019-1026.

Real Hernandez, L. M., & Gonzalez de Mejia, E. (2019). Enzymatic Production, Bioactivity, and Bitterness of Chickpea (*Cicer arietinum*) Peptides. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18(6), 1913-1946.

Sakamoto, K. (2003). Beer spoilage bacteria and hop resistance. *Int. J. Food Microbiol.* 89, 105-124.

Sato, S. (1977). Jyukusei wo saguru. *Shokunokagaku*, 36, 102-109.

Sohi, H., Sultana, Y., & Khar, R. K. (2004). Taste masking technologies in oral pharmaceuticals: recent developments and approaches. *Drug development and industrial pharmacy*, 30(5), 429-448.

Schönberger, C. (2006). Bitter is better. *Monatsschrift für Brauwissenschaft*, 3(4), 56-65.

Takahashi, K., Tadenuma, M., Kitamoto, K., & Sato, S. (1974). L-Prolyl-L-Leucine anhydride a bitter compound formed in aged sake. *Agricultural and Biological Chemistry*, 38(5), 927-932.

Takeuchi, T., Yoshii, H. (1969) Studies on peptides in miso and soy-sauce (VI). Group separation of lower peptides in mame-miso and their properties. *J. Ferment. Technol.* 47, 496 - 501.

Tamura, M., Mori, N., Miyoshi, T., Koyama, S., Kohri, H., & Okai, H. (1990). Practical debittering using model peptides and related compounds. *Agricultural and biological chemistry*, 54(1), 41-51.

Temussi, P. A. (2012). The good taste of peptides. *Journal of Peptide Science*, 18(2), 73-82.

Toelstede, S., & Hofmann, T. (2008). Sensomics mapping and identification of the key bitter metabolites in Gouda cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(8), 2795-2804.

Yamasaki, Y. (1987) The bitter taste in natto. *J. Home Econ. Jpn.* 38, 93 - 97.

Yamashita, M., Arai, S. and Fujimaki, M. (1969). Applying proteolytic enzymes on soybean part IV. A ninhydrin-negative bitter peptide in peptic hydrolyzate of soybean protein. *Agric. Biol. Chem.*, 33, 321-330.

연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 막걸리의 쓴맛 원인규명 및 저감화 기술 개발 (영문) A Study on the cause and development of reducing technology of the bitter taste in Makgolli				
주관연구기관	서울벤처대학원대학교 산학협력단		주 관 연 구 책 임 자	(소속)서울벤처대학원대학교	
참 여 기 업				(성명)정철	
총연구개발비 (200,000천원)	계	200,000	총 연 구 기 간	2019.12.02.~2020.12.01.(12개월)	
	정부 출연연구 개발비	150,000	총 참 여 연 구 원 수	총 인 원	9
	기업부담금	50,000		내부인원	7
	연구기관부담 금	-		외부인원	2

○ 연구개발 목표 및 성과

1. 막걸리 쓴맛의 학술적 원인 규명 연구
 - 막걸리의 쓴맛 원인규명을 위한 원료(쌀)분석
 - 막걸리의 쓴맛 원인규명을 위한 국(입국, 누룩)분석
 - 막걸리 제조공정 연구
2. 막걸리 쓴맛 저감화를 위한 기술 개발 연구
 - 원료처리 기술 개선 연구
 - 쓴맛 흡착제 또는 은폐제 처리 기술 연구
 - 효소제를 이용한 쓴맛 제거 기술 연구
 - 쓴맛 제거를 통한 신 공정도 및 레시피 개발
3. 성과
 - 기술이전(3건), 학술발표(1건)

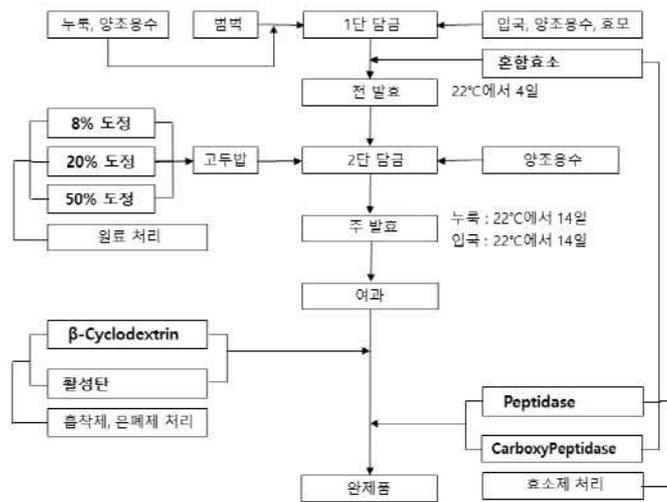
○ 연구내용 및 결과

1. 막걸리 쓴맛의 학술적 원인 규명
 - 곡물(쌀, 밀 등) 자체 효소 또는 미생물의 단백질 분해효소(엔도펩티다아제, 카르복시펩티다아제, 아미노펩티다아제, 디펩티다아제)에 의해 곡물의 단백질이 일차적으로 분해가 되면서 펩타이드 등의 분해산물이 생성되고 이때 다양한 맛이 생성된다.
 - 이후 펩타이드 등은 효소 또는 화학반응에 의해 2차적으로 아미노산과 그 유도체 등으로 다시 분해된다. 아미노산의 유도체(락토일 아미노산, 숙시닐 아미노산, 피로글루탐산 펩타이드, 감마 글루타밀 펩타이드, 마이알반응 부산물)는 감칠맛을 부여한다.
 - 1, 2차 단백질 분해에 관여하는 미생물은 세균과 곰팡이이며, 특히 세균 중에는 젖산균(스타필로코커스)이 그리고 곰팡이 중에는 아스퍼질러스속이 주로 관여한다. 이 미생물들은 펩타이드와 아미노산 생성과 관련 있는 효소를 분비한다.

- 누룩과 입국으로 제조한 막걸리내 쓴맛 규명을 위해 아미노산 서열을 분석한 결과, 선행연구에서 밝혀진 쓴맛 펩타이드로 측정값의 오차값 이내로 들어오는 네 개의 펩타이드를 확인하였고 쓴맛을 유발하는 펩타이드로 판단된다. 4 개의 펩타이드는 LPFNQL(Leu-Pro-Phe-Asp-Iu-Leu), RLL(Arg-Leu-Leu), RRPFF(Arg-Arg-Pro-Pro-Phe), RPF(Arg-Pro-Phe) 등이다
- 선행연구에 사용된 식품의 재료와 가공 방법과 이번 실험의 재료와 가공 방법의 차이가 있을 것으로 보인다. 가령 일본의 Sake는 쌀과 koji라는 발효제를 사용하지만, 국내에서는 누룩과 입국을 발효제를 사용한다. 이에 따라 사용하는 원료나 가공공정에 따라 술에 쓴맛을 부여하는 펩타이드의 종류는 다양할 것으로 판단되며, 본 연구에서는 선행연구에서 밝혀진 펩타이드 질량값을 기준으로 분석치가 오차내 들어오는 아미노산 서열을 쓴맛을 나타내는 펩타이드로 분류하였다.

2. 막걸리 쓴맛 저감화 연구

- 본 연구에서 막걸리 쓴맛 원인 규명 및 저감화를 위한 방안으로는 아래 그림과 같이 쌀을 50% 이상 도정하는 방안과 효소제 투입 및 은폐제 투입이 제시되었다. 각 효소제별 최적 투입량은 본 보고서 연구결과에 제시되었으며, 시제품과 관능평가를 통해 막걸리의 쓴맛 원인과 저감화를 달성하였다.



○ 연구성과 활용실적 및 계획

- 프리미엄급 막걸리 제조기술 확보에 따른 전통주 시장확대
- 프리미엄급 막걸리 제조기술 확보에 따른 전통주 시장확대
- 고품질의 막걸리 개발을 통한 소비자의 막걸리 선호도 제고
- 막걸리의 판매호조에 따른 전통주산업 활성화 및 수출활성화
- 국내 쌀소비 촉진에 따른 지역농산물 소비 진작

자체평가의견서

1. 과제현황

		과제번호		119112-01	
사업구분	농식품기술개발사업				
연구분야	기술개발			과제구분	단위
사업명	고부가가치식품기술개발사업				주관
총괄과제	기재하지 않음			총괄책임자	기재하지 않음
과제명	막걸리 쓴맛 원인규명 및 저감화 기술 개발			과제유형	(개발)
연구기관	서울벤처대학원대학교 산학협력단			연구책임자	
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차연도	19.12. 2.~20. 12. 1	150,000	50,000	200,000
	2차연도				
	3차연도				
	4차연도				
	5차연도				
	계		150,000	50,000	200,000
참여기업					
상대국		상대국연구기관			

※ 총 연구기간이 5차연도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성
요망

2. 평가일 : 2021년 1월 11일

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
서울벤처대학원대학교 산학협력단	조교수	정철

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

본인은 평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확
약하며, 본 자료가 전문가 및 전문기관 평가 시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

확 약	정철 
-----	--

I. 연구개발실적

※ 다음 각 평가항목에 따라 자체평가한 등급 및 실적을 간략하게 기술(200자 이내)

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- 본 연구는 국내 최초로 막걸리의 쓴맛 원인을 규명하고, 현장 실무차원에서 막걸리의 쓴맛을 저감화하는 기술적 최적 방안을 제시하여 학술적 가치가 매우 큰 것으로 판단됨

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- 본 연구는 그간 쓴맛으로 인해 막걸리 산업계에서 막걸리 품질저하 및 소비자의 크레임을 유발하였으나 원인 규명 및 저감화기술 확립에 따라 소비자의 막걸리 품질 인식제고 및 판매촉진에 기대효과가 클것으로 판단됨

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- 본 연구는 곡류를 이용한 다른 발효주(약주, 청주)와 증류주의 경우에도 같은 원인으로 인해 쓴맛이 유발되므로 본 연구에서 도출된 연구결과를 활용하면 다른 주류에도 쓴맛 저감화를 달성할수 있을것으로 판단됨

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- 본 연구에서는 쓴맛 원인과 저감화 기술개발을 단기간에 확립하기 위해 원료부터 공정개선을 위한 광범위한 연구를 진행하였으며, 특히 펩타이드분석을 위해 HPLC 등 각종 첨단 분석 장비와 박사급 연구원들의 투입하였음

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지식소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- 본 연구에서는 일차적으로 쓴맛 원인규명과 현장에서 활용가능한 실무차원의 저감화기술 개발에 많은 시간을 할애하였고, 본 사업계획서상 제시된 정량목표를 달성하였음. 특히 ○ 저감화기술을 산업계로의 기술이전이 큰 성과로 볼수 있음

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
○ 막걸리의 쓴맛 원인 규명을 위한 원료(쌀)분석	10	100	막걸리 원료 사용되는 쌀 6종의 이화학적분석과 비교를 통해 쓴맛 원인 요인을 규명하는데 활용
○ 막걸리의 쓴맛 원인 규명을 위한 국(입국, 누룩) 분석	15	100	쓴맛 원인의 하나로 지목되는 국의 미생물 특성과 역가 등을 분석함으로써 쓴맛 원인 규명에 활용
○ 막걸리 제조공정 연구	15	100	현장 실무에서 쓴맛 저감화기술에 적용하도록 제조공정 제공
○ 원료처리 기술 개선 연구	15	100	쌀 도정 연구를 통한 쓴맛 원인 규명과 저감화에 활용
○ 쓴맛 흡착제 또는 은폐제 처리 기술 연구	15	100	쓴맛 제거를 위해 은폐제 종류와 최적 투입량을 제시하여 현장 활용하도록 구체적 수치 제시
○ 효소제를 이용한 쓴맛 제거 기술 연구	20	100	쓴맛 제거를 위해 각종 효소들의 효과와 투입량을 제시하여 산업 현장에서 활용하도록 구체적 수치 제시
○ 쓴맛 제거를 통한 신공정도 및 레시피 개발	10	100	막걸리 쓴맛 제거 또는 저감화를 위해 제시된 새로운 레시피 및 공정 확립
합계	100		

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

○ 막걸리 쓴맛에 대한 소비자의クレ임이 빈번한 상황에서 쓴맛의 원인을 학술적으로 규명하고 저감화를 위한 현장 활용가능한 해결방안을 수치로 제시하여 막걸리의 품질개선과 판매촉진에 효과가 매우 클것으로 판단됨
○ 또한 다른 주류(약주, 청주, 증류식소주)에서도 본 연구에서 제시된 쓴맛 저감화 기술을 적용하면 품질을 개선하고 소비자의 전통주에 대한 인식이 개선될것으로 판단됨

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

- 본 연구에서는 단순한 제품개발이 아니라 그간 문제시된 막걸리의 쓴맛 규명과 저감화기술 개발을 단기간에 확립해야하는 과제로서 특히 쓴맛 원인물질인 미량의 펩타이드 분석 경험이 많지 않은 국내 연구진이 성과도출을 위해 첨단장비를 이용한 많은 반복실험을 통해 과학적인 결과도출에 대한 객관적인 평가를 해주시기 희망함
- 또한 술의 쓴맛 규명에 대한 학술적 연구가 국내에서는 시도된 바가 없고, 해외 문헌에 의하면 쓴맛 유발 펩타이드의 종류가 매우 다양하여 일부 특정 펩타이드만으로는 술의 쓴맛 전체를 학술적으로 원인 규명하는데는 한계가 있어 국내 술 제조특성을 감안한 쓴맛 원인 규명에 대한 추후 후속연구가 필요함

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

- 본 연구에서 도출된 쓴맛 원인은 막걸리뿐만아니라 타 주류에서도 나타나는 현상으로 다른 주류의 쓴맛 저감화에 본 연구에서 도출된 과학적인 연구결과를 활용 가능할것으로 판단함
- 한편으로는 본 연구에서 밝혀진 펩타이드뿐만아니라 다른 형태의 펩타이드도 쓴맛의 원인이 될수 있으므로 보다 확장된 후속 연구가 필요함

IV. 보안성 검토

해당사항 없음

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

1. 연구책임자의 의견

2. 연구기관 자체의 검토결과

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input checked="" type="checkbox"/> 자유응모과제 <input type="checkbox"/> 지정공모과제	분 야	식품	
연구과제명	막걸리 쓴맛 원인규명 및 저감화 기술 개발			
주관연구기관	서울벤처대학원대학교 산학협력단	주관연구책임자	정철	
연구개발비 (천원)	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	150,000	50,000		200,000
연구개발기간	2019. 12. 2.~2020. 12. 1			
주요활용유형	<input checked="" type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input type="checkbox"/> 기타() <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:)			

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과	달성도(%)
○ 막걸리의 쓴맛 원인 규명을 위한 원료(쌀)분석	막걸리 원료 사용되는 쌀 6종의 이화학적분석과 비교를 통해 쓴맛 원인요인을 규명하는데 활용	100
○ 막걸리의 쓴맛 원인 규명을 위한 국(입국, 누룩) 분석	쓴맛 원인의 하나로 지목되는 국의 미생물 특성과 역가 등을 분석함으로써 쓴맛 원인 규명에 활용	100
○ 막걸리 제조공정 연구	현장 실무에서 쓴맛 저감화기술에 적용하도록 제조공정 제공	100
○ 원료처리 기술 개선 연구	쌀 도정 연구를 통한 쓴맛 원인 규명과 저감화에 활용	100
○ 쓴맛 흡착제 또는 은폐제 처리 기술 연구	쓴맛 제거를 위해 은폐제 종류와 최적 투입량을 제시하여 현장 활용하도록 구체적 수치 제시	100
○ 효소제를 이용한 쓴맛 제거 기술 연구	쓴맛 제거를 위해 각종 효소들의 효과와 투입량을 제시하여 산업현장에서 활용하도록 구체적 수치 제시	100
○ 쓴맛 제거를 통한 신공정도 및 레시피 개발	막걸리 쓴맛 제거 또는 저감화를 위해 제시된 새로운 레시피 및 공정 확립	100

3. 연구목표 대비 성과

성과 목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍 보		기 타 (타 연구 활용 등)
	특 허 출 원	특 허 등 록	품 종 등 록	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논 문	SC I	비 SC I			논 문 평 균 IF	학 술 발 표	
											건				건	건			
단위	건	건	건	건	백 만 원	백 만 원	백 만 원	백 만 원	백 만 원	명	건	건	건	건	명	건	건		
가중치				60	30									10					
최종목 표				3	1.5									1					
연구기간 내 달성실 적				3	1.5									1					
달성율(%)				100	100									100					

4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	쌀 도정비율 조정에 따른 막걸리 쓴맛 제거 기술
②	은폐제를 이용한 막걸리 쓴맛 저감화 기술
③	효소제를 활용한 막걸리 쓴맛 제거 기술

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술복제	외국기술소화·흡수	외국기술개선·개량	특허출원	산업체이전(상품화)	현장애로해결	정책자료	기타
①의 기술		√						√		
②의 기술		√						√		
③의 기술		√						√		

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	쌀 도정비율 조정에 따른 막걸리 쓴맛 제거 기술을 이용한 품질 향상 및 제품개발
②의 기술	은폐제를 이용한 막걸리 쓴맛 저감화 기술을 이용하여 쓴맛 및 판매촉진
③의 기술	효소제를 활용한 막걸리 쓴맛 제거 기술을 이용한 쓴맛 제거를 통한 소비자 만족도 제고

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식재산권			기술실시(이전)		사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책활용·홍보		기타(타연구활용등)
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문 SC I	비 SC I	논문 평균 IF			학술발표	정책활용	
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명				
가중치																			
최종목표	1					3	30					1							
연구기간 내 달성실적																			
연구종료 후 성과창출 계획	1					3	30					1							

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명 ¹⁾	쌀 도정 비율조정에 따른 막걸리 쓴맛 제거 기술		
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input checked="" type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	500천원
이전방식 ²⁾	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input checked="" type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타()		
이전소요기간	1년	실용화예상시기 ³⁾	2021년
기술이전시 선행조건 ⁴⁾	해당사항 없음		

핵심기술명 ¹⁾	은폐제를 이용한 막걸리 쓴맛 저감화 기술		
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input checked="" type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	500천원
이전방식 ²⁾	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input checked="" type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타()		
이전소요기간	1년	실용화예상시기 ³⁾	2022년
기술이전시 선행조건 ⁴⁾	해당사항 없음		

핵심기술명 ¹⁾	은효소제를 활용한 막걸리 쓴맛 제거 기술		
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input checked="" type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	500천원
이전방식 ²⁾	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input checked="" type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타()		
이전소요기간	1년	실용화예상시기 ³⁾	2023년
기술이전시 선행조건 ⁴⁾	해당사항 없음		

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품 기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.