

발간등록번호

11-1543000-002052-01

수출용 국산 프리미엄 맥주의 유통기한 제어기술 개발

주관연구기관 / 동국대학교
협동연구기관 / 우석대학교

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “수출용 국산 프리미엄 맥주의 유통기한 제어기술 개발”(개발기간 : 2014. 09.25 ~ 2017.09.24)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2017. 09. 24.

주관연구기관명 : 동국대학교	(대표자) 홍 광 원 (인)
	김 왕 준 (인)
	신 한 승 (인)
	이 승 주 (인)
협동연구기관명 : 우석대학교	(대표자) 권 영 안 (인)
참여기관명 : 한국홍삼맥주(주)	(대표자) 이 용 선 (인)

주관연구책임자 : 홍 광 원

협동연구책임자 : 권 영 안

참여기관책임자 : 이 용 선

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의 합니다.

보고서 요약서

과제고유번호	114088-3	해당단계 연구기간	2014.09.25. ~ 2017.09.24	단계구분	총단계
연구사업명	단위사업	농식품기술개발사업			
	사업명	수출전략기술개발사업			
연구과제명	대과제명	수출용 국산프리미엄맥주의 유통기한 제어기술 개발			
	세부과제명	1세부 : 국산보리맥아를 이용한 당화조건의 최적화 2세부 : 젖산균 starter를 이용한 맥아 (bio-acidified malt)제조 및 이를 이용한 맥주 오염균의 생물학적 제어 3세부 : 맥주 발효중 protein 및 polyphenols 침전 가속화에 따른 응집 방법 개발 1협동 : shelf life 증진을 위한 침전 및 여과기술 개발 4세부 : 국산보리맥주의 살균공정 최적화			
연구책임자	홍광원	해당단계 참여 연구원 수	총: 22명 내부: 22명 외부: 00명	해당단계 연구개발비	정부: 840,000천원 민간: 282,000천원 계: 1,122,000천원
		총연구기간 참여 연구원 수	총: 22명 내부: 22명 외부: 00명	총연구개발비	정부: 840,000천원 민간: 282,000천원 계: 1,122,000천원
연구기관명 및 소속부서명	동국대학교 산학협력단 우석대학교 산학협력단			참여기업명 한국홍삼맥주주식회사	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	
요약(요약문으로 대체)				보고서 면수	

국문 요약문

	코드번호	D-01
<p>연구의 목적 및 내용</p>	<p><연구 목적></p> <p>○ 국산보리 광맥을 이용한 수출용 프리미엄맥주 제조를 위해 장기 보관 및 유통이 가능한 shelf life 제어기술들을 개발하고 중소규모의 지역 맥주제조시설 현장에 적용하여 홍삼맥주 및 복분자맥주 생산 조건의 최적화를 목표로 함</p> <ul style="list-style-type: none"> - 제맥공정에 젓산균 starter를 사용하여 bio-acidified malt를 제조하고 맥주오염균을 제어하는 기술을 개발 - 광맥의 맥즙 품질 개선을 위해 당화공정에 효소를 이용하는 기술을 개발 - 발효공정에 단백질 및 폴리페놀 침전가속화에 따른 응집기술을 개발 - shelf life 증진을 위한 침전 및 여과기술을 개발 - 맥주 살균공정을 최적화 <p>○ 본 과제 수행을 통해 개발한 기술을 참여기업에 이전하여 사업화를 추진함</p> <ul style="list-style-type: none"> - 참여기업에 기술이전 후 홍삼맥주 및 복분자 맥주의 국내 판매 추진 - shelf life 제어기술들을 개발하여 참여기업에 기술이전 : 1건 - 홍삼/복분자 맥주 제조에 관한 특허 출원 : 1건 - 홍삼/복분자 맥주 살균 조건 최적화에 관한 특허 출원 : 1건 - 홍삼맥주 및 복분자 맥주의 국내 판매 및 필리핀, 중국 등 해외수출 추진: 제품화 2건 - 레스토랑, 맥주 전문점 판매를 시작으로 하여 추후 전국적인 franchise 사업으로 확대 	

	<p><연구 내용></p> <ul style="list-style-type: none"> ● 제맥공정에 젖산균 starter를 사용하여 bio-acidified malt를 제조하고 맥주오염균을 제어하는 기술을 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 국산보리(광맥) 맥아로부터 부패균 제어 젖산균 starter를 분리 - pilot scale 에서 분리균을 적용하고 보완 - 홍삼, 복분자맥주 맥주제조에 분리균을 적용하고 보완 ● 광맥의 맥즙 품질 개선을 위해 당화공정에 효소를 이용하는 기술을 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 국산보리(광맥) 맥아를 이용한 당화조건을 최적화 - 최적화된 당화조건을 현장적용에 적용하고 문제점을 보완 - 기능성원료로 홍삼/복분자 맥주 품질향상을 위한 당화조건을 보완 ● 발효공정에 단백질 및 폴리페놀 침전가속화에 따른 응집기술을 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 맥주 발효 중 응집 방법 개발 및 환경변수에 따른 응집 생성을 예측. - 맥주 발효 중 환경변수에 따른 최적화된 응집 생성공정을 현장에 적용 - 홍삼/복분자/ 함유 국산보리맥주 응집 최적화를 완성 ● shelf life 증진을 위한 침전 및 여과기술 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 국산보리 맥주의 침전, 여과 특성을 규명 - 침전, 여과 기술의 국산보리 맥주 생산현장 적용 및 보완 - 침전, 여과 기술의 수출용 홍삼/복분자 맥주 적용 및 보완 ● 맥주 살균공정을 최적화 <ul style="list-style-type: none"> - 살균 중 맥주 미생물 및 품질 변수 변화를 모델링 - 미생물 살균 및 품질 변화가 최적화된 현장 살균공정을 완성 - 홍삼/복분자/ 국산보리맥주 살균공정 최적화를 완성
연구개발성과	<p><1차년도></p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 맥아로부터 spoilage 젖산균을 억제하는 젖산균 분리 <ul style="list-style-type: none"> - Bacteriocin 생성균주를 분리하기 위해 맥아로부터 Bacteriocin-Like-Inhibitory Substances(BLIS)를 생성하는 젖산균 <i>Pediococcus acidilactici</i> HW01 (32.1) 과 <i>Leuconostoc citreum</i> HW02 (64.1) 확인 - 맥아로부터 분리된 젖산균 중 <i>Leuconostoc citreum</i> HW02의 경우 hop에 저항성이 있음을 확인하였고, 맥주를 오염시킬 가능성이 없음을 확인 - <i>Leuconostoc citreum</i> HW02의 BLIS 생산을 확인

○ 국산 맥아의 당화조건의 최적화

- 당화효소인 amylase와 amyloglucosidase를 처리하였을 때 환원당량이 효소를 처리하지 않은 광맥의 맥즙 보다 약 15 % 증가하여 발효성 당을 더 증가시킴
- β -glucanase를 처리 하였을 때 점도의 경우 약 21 % 가량 감소하였으며 마찬가지로 filtration time도 50 % 감소하여 맥즙의 여과 성능을 증가시킴

○ 후발효 중 단백질 및 폴리페놀 침전 응집 방법을 개발

- 맥주 발효 중 응집 방법 개발 및 환경변수에 따른 응집생성을 예측함
- PVPP가 Silica xerogel A,B 보다 응집생성량의 효과가 큰 것을 확인함
- 응집 여과 후 폴리페놀 및 단백질 함량 확인결과 각각 응집제에 따라 함량이 감소한 것을 확인하였으며, 거품안정성에 영향을 미치는 단백질 보다 폴리페놀을 제거하는 응집제를 사용하는 것이 효과적임

○ 국산보리 맥주의 침전, 여과 특성 규명

- 맥주 교질용액 중 공정에서 형성된 입자의 물성에 따른 침강특성 규명
- 입자의 물성에 따른 여과특성 규명

○ 살균 중 맥주 미생물 및 품질 변수 변화 모델링

- 맥주 품질 저하 원인 균의 가열 살균 특성에 관하여 연구하기 위해, 살균 kinetics 모델링을 실시하고 풍미 변화를 관찰하여 품질 변화 kinetics 모델링을 개발.
- 살균 kinetics 모델링을 통해 맥주 부패균의 D값 Z값을 규명
- 맥주 살균과 품질변화 kinetic 모델을 접목하여 최적의 살균 조건을 산출
- 각 살균 조건을 도식화하여 이취발생도 방지하고 살균도 충분한 조건을 최적 조건으로 결정

<2차년도>

○ pilot scale에서 맥아에서 분리한 균의 적용 및 보완

- 맥주 대표 오염균인 *Pediococcus damnosus*, *P. claussenii*를 강하게 저해하는 균을 선발 (*Pediococcus acidilactici* HW01 (32.1))
- Bio-acidified 맥아를 제조 공정 중 대표적인 gram negative bacteria인 *Pseudomonas* spp. 미생물을 강하게 저해함.
- Bio-acidified 맥아의 enzyme activity가 높아져 맥즙 제조시 filtration time 및 viscosity가 감소되어 맥주 제조 공정에 좋은 영향을 줄 것으로 기대됨.

- Bio-acidified 맥아를 사용하여 맥주를 제조하였을 경우 알콜 함량이 28 % 증가하였으며 거품안정성도 높게 나타나 맥주 품질이 개선됨을 확인함.

○ **당화조건의 현장적용 및 보완**

- 데이터 로거를 통해 얻은 온도 profile을 적용하여 맥즙 제조 적성을 분석한 결과 효소사용으로 맥아사용량 25 %를 절약 할 수 있다는 것을 확인
- 당화과정 촉진 또는 여과 성능 향상을 위한 분해효소를 사용한 결과 맥즙의 reducing sugar를 15 % 증가시키면서 여과시간을 19 % 감소시켜 당화 적성을 향상시킴
- 효소 처리한 맥즙을 발효하여 맥주를 제조하여 분석한 결과 발효능이 28 %, 알코올 함량이 27 % 증가하여 발효 적성을 향상시킴

○ **맥주 후발효 중 폴리페놀 및 단백질 응집 현장적용 및 보완**

- 응집처리 및 제거에 따른 맥주의 유통기한을 감소시키는 Haze 유발성분인 폴리페놀 및 단백질의 함량을 분석함
- 쓴맛, 알코올 함량, 색도, 거품의 안전성, 관능평가 등 맥주의 품질 평가를 실시하여, 응집처리 시 맥주의 품질 저하를 일으키지 않음을 확인함
- 응집제를 처리한 맥즙에서 응집제 PVPP A와 Silica xerogel A를 사용하였을 때 단백질과 폴리페놀의 제거 효율이 좋았으며, 응집제 선정에 따른 최적 응집 조건을 확립하여 응집 능력을 개선함

○ **교질용액의 침전 및 여과특성 규명을 통한 맥주 침전 및 여과방법 개발**

- 맥주 교질용액의 침강기 가동조건 개발
- Whirlpool type의 원심침강 장치를 이용하여 침강시킨 결과 펄스너 타입의 맥아보다 약 15분 정도를 감소시킴
- 보조여과제로 glass bead를 선택하여 맥주 교질용액의 점도에 미치는 영향들을 규명

○ **미생물 살균 및 품질 변화가 최적화된 현장 살균공정 완성**

- 현장 살균기 가동 조건에 따른 공정변수를 모니터링하고 현장 살균기 가동 조건에 따른 살균/품질 예측에 의한 최적 조건을 완성
- 살균조 가동 중 온도/시간 모니터링을 통하여 50, 60, 70°C 온도 profile을 도출하고 해당 온도에서 소속도를 이용한 퍼지추론을 적용하여 시간/온도 이력 산출. 해당 온도에서 결과를 실측온도와 비교하여

가장 최적화된 modeling 설정

<3차년도>

○ 홍삼/복분자 맥주제조에 적용 및 보완

- Wort에서 *Pediococcus acidilactici* HW01이 bacteriocin을 생성하는 것이 확인됨.
- bacteriocin 생성 균주를 맥즙(wort)에 적용하는 것이 맥주 유해균 저해와 새로운 한국형 sour beer의 개발 가능성이 있다고 판단됨.
- 맥아로부터 분리된 bacteriocin 생산 균주 중 *Pediococcus acidilactici* HW01을 맥즙에 적용 후, bacteriocin 맥주를 제조하여 맥주의 주 발효 단계까지의 유해균 억제 확인.
- Bacteriocin 맥주의 관능평가 결과, 과즙을 첨가하지 않았음에도 젓산균에 의한 산생성으로 인해 신맛, 과일향 등이 높게 측정, 전체 기호도도 일반 맥주보다 높게 나타남.

○ 홍삼/복분자 맥주 품질개선을 위한 당화조건 보완

- 기능성 소재 첨가에 따른 맥즙의 품질을 분석한 결과 홍삼을 첨가한 맥주의 경우 FAN값이 7% 증가하였고 복분자를 첨가한 맥주의 경우에는 환원당량이 6 % 증가하였으며 FAN또한 증가하여 발효성 당의 추출률을 증가시켰다.
- protease 효소 사용에 따른 복분자 맥주의 맥즙 제조 적성 평가한 결과 펩타이드 결합 분해로 인해 유리아미노산(FAN)이 증가하였고 이는 haze 감소에 영향을 줄 것으로 기대됨

○ 수출용 홍삼/복분자 맥주의 응집제 적용 및 보완

- 홍삼/복분자 첨가액을 맥주제조에 사용 시 일반맥주의 최적응집조건을 적용하여도 응집생성량에 영향을 미치지 않음을 확인함
- 최적 응집조건에 따른 홍삼/복분자 맥주의 알코올함량, 쓴맛, 거품안정성, 탁도 등의 품질평가를 실시하여 홍삼/복분자 첨가액이 맥주의 품질저하를 일으키지 않음을 확인함
- 홍삼/복분자 첨가액 함유 맥주의 기호도 조사결과 후 최적 첨가 농도를 설정함

○ 침전, 여과 기술의 수출용 맥주 적용

- 홍삼 맥주 교질용액의 유효성분을 분석한 결과 생리활성은 홍삼맥주의 경우 알코올분해효소 등의 알코올과 관련된 효소활성을 정상군으로 거의 회복시키는 기능과 더불어 간기능지표 효소활성에 있어서도 간장보호 활성이 있을 것으로 추정되며 항비만효과도 함께 관찰됨
- 맥주 교질용액의 원심분리 조건을 완성함

	<p>○ 복분자 맥주의 살균공정 최적화 완성</p> <ul style="list-style-type: none"> - 복분자 맥주의 여러 가지 살균 방법에 따른 미생물 및 품질 변화를 규명하고 살균 공정 최적화를 완성함. - 복분자 맥주의 살균 방법에 따라, 미생물의 사멸과 품질의 변화가 나타나는 것을 확인함. 그 결과, 복분자를 살균 후 맥주에 섞어 다시 맥주를 살균하는 방법이 가장 살균 시간이 짧았으며, 품질의 변화가 적었음. 또한 관능평가 결과에서 선호도가 가장 높은 것을 확인. - 복분자 맥주의 미생물의 사멸과 품질변화를 관찰한 결과, 복분자 맥주의 살균 공정은 복분자를 60°C에서 32.54분 미리 살균한 뒤, 맥주에 섞어 복분자 맥주는 50°C에서 11.79분 살균하여 총 살균 시간은 44.33분으로 최적화함.
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<p>< 활용계획 ></p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 참여기업인 (주)한국홍삼맥주에 기술이전을 진행하였으며 상품화하여 판매 진행 중 ○ 프리미엄 하우스맥주/지역맥주 프랜차이즈용 제품 및 수출용제품을 생산하는데 활용 ○ 수출용 맥주의 기본 속성인 장기간의 shelf-life를 보장할 수 있는 제품의 제조에 필수적인 살균이 가능하고 실제 현장에서 살균기 특성에 맞는 맥주의 살균 스케줄이 가능하게 되어 타 주류의 살균에 효과적으로 적용 가능 ○ 맥주 제조 현장에서 사용되는 살균곡선에 대한 미생물 불활성화 곡선을 simulation하여 생산관리에 활용 ○ 지역 특화된 지역맥주 또는 하우스맥주 생산을 기반으로 주변관광지, 지역축제, 지역행사 등을 연계하여 점차 수도권 franchise 사업화로 거점을 확대 가능 ○ 국내 뿐만 아니라 한류의 영향으로 한국 맥주의 선호도가 높아짐에 따라 필리핀, 중국을 거점으로 동남아 지역에 수출 가능 ○ 국내 식량소비구조의 변화로 인한 지속적인 보리소비 감소에 대비하여 국내 농업보호 측면에서 안정적인 국산보리원맥 수급과 국내산 보리의 생산기반 유지 대책 마련에 활용 <p>< 기대효과 ></p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 국산맥아의 사용으로 맥주의 품질향상, shelf-life 연장 및 홍삼, 복분자 등 기능성맥주의 수출에 많은 도움을 줄 수 있을 것으로 기대 ○ 맥주 제조 현장의 발효 과정 중 응집력 가속화를 통한 국산보리 이용 맥주의 품질 향상 기술 개발 및 맥주의 생산관리 조건 확립 ○ 맥주 후발효 과정 중의 교질용액의 단백질 분자량에 따른 침강 특성

	<p>및 침전속도의 규명, 단백질 분획별 침전 및 분리 조건 확립, 원심침전기 및 가압여과기의 최적 가동조건 확립</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 맥주 제조 현장에서 사용되는 살균곡선에 대한 미생물 불활성화 곡선을 simulation하여 생산관리 조건을 확립하고 살균온도에 의한 simulation으로 온도 스케줄을 최적화 ○ 중소 맥주 생산공정에서 단백질 등의 원인에 의한 맥주 혼탁 원인을 규명하고 맥주 교질용액 및 이와 유사한 주스류 등에서 분리 및 여과에 대한 기본적 가동조건 제공 ○ 고품격 국산보리맥주의 생산으로 다양하고 특색 있는 고급 맥주를 선호하는 소비자의 기대에 부응하고 최근 국내 맥주시장의 4.5%를 차지하며 가파르게 국내시장을 잠식하고 있는 수입맥주의 대체효과 및 외국산 맥주보리 원맥수입 감소효과 기대 ○ 산업화 측면에서 다양하고 차별화된 지역맥주를 생산하는 기반기술의 보급 및 확대를 통해 향후 고품질 국산맥주의 해외 수출에 따른 외화획득 ○ EU, 미국 등과 체결한 FTA의 발효 및 보리 수매제도의 폐지 등에 따른 국내 보리재배 농가의 경제적 손실 보전도 기대 ○ 국내 보리농업의 자생력 강화와 제조업 활성화를 통한 일자리 창출 및 지역 경제 활성화에 기여 				
중심어 (5개 이내)	국산맥주보리	유통기한 연장기술	프리미엄맥주	수출	

<SUMMARY>

	코드번호	D-02
Purpose& Contents	<p><R&D Purpose></p> <ul style="list-style-type: none"> ○ This study attempted to develop shelf-life extension technologies in order to produce premium domestic beer for export. This R&D also aimed to optimize Red ginseng and Bokbunja beer production process by applying the developed technologies to the domestic small medium-size manufacturer. - Development of the beer spoilage bacteria inhibition technologies by applying bio-acidified malt to the malting process. - Development of the enzyme treatment technologies in mashing process for improving the wort quality - Development of the coagulation technologies in fermentation process - Development of the precipitation and filtration technologies for the shelf-life extension - Optimization of the sterilization process of beer ○ This study aimed to promote industrialization through technology transfer to the manufacturer - Promoting sales of the Red ginseng beer and Bokbunja beer on the domestic market - A technology transfer of the shelf-life extension technologies - Applying for a patent about producing of Red ginseng and Bokbunja beer - Applying for a patent about optimized sterilization technologies for Red ginseng and Bokbunja beer - Promoting overseas exports of the Red ginseng beer and Bokbunja beer to the countries in Southeast Asia. - Expanding the business to the national franchise started with the sales in local restaurant and pub 	

	<p><R&D Contents></p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Development of the beer spoilage bacteria inhibition technologies by applying bio-acidified malt to the malting process. <ul style="list-style-type: none"> - Isolation of lactic acid bacteria (LAB) from malt - Application and supplement of bacteriocin producer on pilot scale - Application and supplement for the production of Red ginseng beer and Bokbunja beer ○ Development of the enzyme treatment technologies in mashing process <ul style="list-style-type: none"> - Optimization of the mashing process with enzyme treatment - Supplement of the mashing process for field application - Supplement of the mashing process for the Red ginseng and Bokbunja beer ○ Development of the coagulation technologies in fermentation process <ul style="list-style-type: none"> - Development of protein and polyphenol precipitation and coagulation method - Supplement of the polyphenol and protein coagulation - Application of coagulant on Red ginseng and Bokbunja beer ○ Development of the precipitation and filtration technologies for shelf life extension <ul style="list-style-type: none"> - Investigation of the precipitation and filtration characteristics of beer - Development of the precipitation and filtration methods - Application of the precipitation and filtration technologies ○ Optimization of the sterilization process of beer <ul style="list-style-type: none"> - Modeling of microbial and quality variable changes - Completion of optimized sterilization process - Optimization of the sterilization process of the Bokbunja beer
Results	<p><1st year></p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Screening of bacteriocinogenic lactic acid bacteria (LAB) from malt to inhibit beer spoilage bacteria <ul style="list-style-type: none"> - <i>Pediococcus acidilactici</i> HW01 (32.1) and <i>Leuconostoc citrium</i> HW02 (64.1) producing bacteriocin like inhibitory substance (BLIS) were isolated from malt. To isolate bacteriocin producing LAB, <i>Leuconostoc citreum</i> HW02 was found to be resistant to hop, and it also confirmed that there was no possibility of contamination of beer.

○ **Optimization of mashing procedure of domestic barley**

- To investigate the effect of enzyme treatment on the characteristics of beer during mashing procedure, the properties of wort were evaluated. The α -amylase and amyloglucosidase treatments increased 15 % of the reducing sugar content of Gwangmaek. The β -glucanase treatment was also found to be effective in decreasing viscosity and filtration time. It suggested that the addition of diverse enzymes during the mashing would be helpful in brewing beer through the improvement of its wort properties.

○ **Development of protein and polyphenol precipitation and coagulation method after fermentation**

- The coagulation method during fermentation was developed and the production of coagulation depending on environmental variables was predicted. As a result, PVPP had a great effect on aggregate generation. The content of polyphenol and protein decreased after the coagulation-filtration. It confirmed that it was effective to use polyphenol-removing coagulant rather than protein-removing coagulant which adversely affects the foam stability.

○ **Investigation of the precipitation and filtration characteristics of beer**

- To increase the precipitation velocity of the beer, the precipitation characteristics of different particle size in the colloidal beer were investigated. Filtration characteristics depending on the different size particles were also investigated.

○ **Modeling of microbial and quality variable changes in beer during sterilization**

- In order to investigate the heat sterilization characteristics of microbes that cause quality changes, kinetics modeling for the inhibition of the microbes was developed. The kinetic modeling of the quality changes related with flavor was also developed. With these kinetic modeling, the optimum condition of sterilization was derived.

<2nd year>

○ **Application and supplement of bacteriocin producer isolated from malt on pilot scale**

- *Pediococcus acidilactici* HW01 (32.1) was selected due to strong inhibitory ability of beer spoiler (*Pediococcus dammnosus*, *P. claussenii*). In the process of producing bio-acidified malt, *Pseudomonas* spp. strongly inhibited by strain HW01. Enzyme activity in bio-acidified malt enhanced, and it reduced filtration

time and viscosity of wort during mashing and filtration. Alcohol content increased by 28% and foam stability was improved. This results are expected to give a positive effect on beer qualities.

○ **Supplement of the mashing procedure for a field application**

- Applying the temperature profile of the virtual mash tun on the enzyme treated wort resulted in conserving the 25 % of malt. To investigate the effect of thermal condition change, the properties of wort and the final beer product were evaluated. As a result, the enzyme treatment increased the amount of reducing sugar and decreased filtration time during mashing. The fermentability of the final beer also increased by 28 %.

○ **Application and supplement of the polyphenol and protein coagulation during beer fermentation**

- The contents of polyphenol and protein which are haze-inducing components were measured. According to the quality assessment of beer, no deterioration of beer quality was detected during coagulation treatment. Applying the coagulants PVPP A and Silica xerogel A to the coagulant treated wort improved removal efficiency of protein and polyphenol. The coagulation ability was enhanced with the optimized coagulation condition.

○ **Development of the precipitation and filtration methods through the investigation of the characteristics of the colloidal beer**

- Operating condition of the centrifuge settler for colloidal beer was developed. Precipitation using whirlpool type centrifuge settler decreased filtration time compared with Pilsner. The effects of the usage of glass bead as a filtering agent on the viscosity of the colloidal beer was investigated.

○ **Completion of optimized sterilization process for microbial sterilization and quality change**

- The process variables in the field sterilizer was monitored. The optimum condition was completed by the sterilization and quality prediction model. The time and temperature condition was derived by fuzzy reasoning. From this condition, optimized modeling was established.

<3rd year>

○ **Application and supplement for the production of red ginseng and bokbunja beer**

- *Pediococcus acidilactici* HW01 was found to produce bacteriocin in wort. The bacteriocin activity produced by strain HW01 in wort remained until primary fermentation. In other words, beer spoiler would be inhibited by bacteriocin until the primary fermentation. Application of *Pediococcus acidilactici* HW01 to beer has potential for the development of Korean sour beer. As a result of sensory evaluation of bacteriocin beer, preference was higher than beer without additives.

○ **Application and supplement of the mashing process for the Red ginseng beer and Bokbunja beer**

- The effect of addition of Red ginseng and Bokbunja extracts on the characteristics of beer was investigated. Regarding the Red ginseng beer, free amino nitrogen (FAN) increased by 7 %. In the case of Bokbunja beer, the amounts of reducing sugar and FAN were increased by 6% and 30%, respectively. Furthermore, protease treatment on the Bokbunja beer increased FAN value, and it implied that protease had a positive effect on the haze reduction.

○ **Application and supplement of coagulant on Red ginseng and bokbunja beer**

- The optimized coagulation condition of general beer did not affect the amount of coagulation. The quality evaluation of Red ginseng beer and Bokbunja beer depending on the optimum coagulation conditions was confirmed. The addition of Red ginseng and Bokbunja did not cause deterioration of beer quality. The amount of Red ginseng and Bokbunja extract added was determined by sensory evaluation.

○ **Application of the precipitation and filtration technologies to the beer for export**

- As a result of analyzing the active ingredients in beer, various biological activities were observed. In case of Red ginseng beer, enhancement of alcohol related enzyme activity was observed. In addition, intestines protection and anti-obesity effects were observed. The centrifugal condition of the colloidal beer was completed.

○ **Optimization of sterilization process of Bokbunja beer**

- According to the sterilization method of Bokbunja beer, microbial death and

	<p>changes in quality were observed. As a result, the sterilization process of Bokbunja beer was optimized. It was most preferable to sterilize the Bokbunja at 60°C for 32.54 minutes and then mix the beer, and finally the Bokbunja beer sterilize at 50 ° C for 11.79 minutes.</p>				
<p>Expected Contribution</p>	<p><Application plan></p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Sales of the technology intensive beer manufactured through the technology transfer from this R&D to Korea Red ginseng Beer Corporation in progress ○ Application of the technologies to beer production for franchise and export ○ Application of the sterilization technology to other alcoholic beverages ○ Expanding localized beer franchise to the metropolitan area by connecting local festivals and tourist attractions ○ Export of the beer to the countries in Southeast Asia with the increasing attention to the Korean beer ○ Reducing the dependency on barley import to encourage the domestic barley industries <p><Expected effect></p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Improving export performance of domestic barley beer with the enhanced quality and the shelf-life extension technologies ○ Establishing the production management condition and the quality improvement technologies by accelerating the coagulation process in beer fermentation ○ Optimizing the precipitation and filtration condition in the after-fermentation process for the shelf-life extension ○ Optimizing the sterilization temperature for inhibition of the microbes in the beer manufacturer ○ Reducing the consumption of imported beer and malt by promoting the consumption of domestic beer ○ The acquisition of foreign currencies by export the premium domestic beer which is manufactured through intensive technology and differentiation with functional additives ○ Contribution to regional economic vitalizations and job creation by strengthening reinforcement of the domestic agricultural industries 				
<p>Keywords</p>	<p>domestic 2-row barley</p>	<p>shelf-life extension technologies</p>	<p>premium beer</p>	<p>export</p>	

CONTENTS

I. Summary and objectives

1. R&D Goals
2. R&D necessity
 - 1) Current conditions and problems
 - 2) Market trends in Korea
3. R&D performance goals

II. Recent development in the related fields

1. Comparison in R&D between domestic and foreign countries
2. Patent analysis
3. Scientific paper analysis
4. Commodity and market analysis

III. R&D outcomes

1. Development of the beer spoilage bacteria inhibition technologies by applying bio-acidified malt to the malting process.
 - 1) Isolation of lactic acid bacteria (LAB) from malt
 - 2) Application and supplement of bacteriocin producer on pilot scale
 - 3) Application and supplement for the production of red ginseng and bokbunja beer
2. Development of the enzyme treatment technologies in mashing process
 - 1) Optimization of mashing process with enzyme treatment
 - 2) Supplement of the mashing process for field application
 - 3) Supplement of the mashing process for the Red ginseng and Bokbunja beer
3. Development of the coagulation technologies in fermentation process
 - 1) Development of protein and polyphenol precipitation coagulation method
 - 2) Supplement of the polyphenol and protein coagulation
 - 3) Application of coagulant on Red ginseng and bokbunja beer
4. Development of the precipitation and filtration technologies for shelf life extension
 - 1) Investigation of the precipitation and filtration characteristics of beer
 - 2) Development of the precipitation and filtration methods
 - 3) Application of the precipitation and filtration technologies
5. Optimization of the sterilization process of beer
 - 1) Modeling of microbial and quality variable changes

- 2) Completion of optimized sterilization process
- 3) Optimization of sterilization process of Bokbunja beer

IV. R&D achievements and contributions

V. Plans for applications of R&D achievements

VI. International R&D information and sources

VII. Security level

VIII. Equipments and facilities

IX. Laboratory safety management

X. Accomplished research list

XI. References

< Appendixes >

Documentations: technology transfer, patents, poster presentations

〈 목 차 〉

제 1 장 연구개발과제의개요	
제 1 절 연구개발의 목적	
1. 국산 프리미엄 맥주의 사업성 확보	
2. 국내 농산물을 원료로 한 지역특화 맥주의 개발 및 상품화	
제 2 절 연구개발의 필요성	
1. 국내외 현황 및 문제점	
2. 국내 맥주시장의 전망	
제 3 절 연구개발의 성과 목표	
제 2 장 국내외 기술개발 현황	
제 1 절 제품 및 시장 분석	
1. 본 연구관련 국내외 기술수준 비교	
2. 특허 분석	
3. 논문 분석	
4. 제품 및 시장분석	
5. 3P(특허,논문,제품)분석을 통한 연구추진계획	
제 3 장 연구수행 내용 및 결과	
제 1 절 맥아에서 분리한 젖산균을 이용한 맥주오염균 제어 제맥 공정 개발	
1. 맥아로부터 spoilage 젖산균을 억제하는 젖산균 분리	
가. 맥아로부터 BLIS 젖산균 분리	
나. 분리된 젖산균의 hop 내성 및 맥주 오염균 여부 확인	
다. 분리된 젖산균의 BLIS 생산 조사	
2. pilot scale 에서 분리균의 적용 및 보완	
가. 분리된 맥아를 이용한 제맥	
나. Bio-acidified 맥아의 맥즙 및 당화 적성 분석	
다. Bio-acidified 맥아를 이용한 맥주의 발효 적성 분석	
3. 홍삼/복분자 맥주제조에 적용 및 보완	
가. 1차년도에서 분리한 젖산균의 당화 및 발효 중 미생물 분석 및 보완에 적용	
나. 홍삼/복분자 맥주의 발효 최적 첨가시기 규명	
제 2 절 국산일반보리 맥아 당화기술 개발	
1. 국산 맥아의 당화조건의 최적화	
가. 맥즙의 제조 적성 분석	
나. 당화효소 처리가 광맥의 맥즙 제조적성에 미치는 영향	
다. 여과 증진 효소 처리가 광맥의 맥즙 제조 적성에 미치는 영향	

2. 당화조건의 현장적용 및 보완
 - 가. 현장적용을 위한 맥즙의 제조 적성 분석
 - 나. 당화과정 촉진을 위한 당화효소 사용 및 조건 확립
 - 다. 여과 성능 향상을 위한 여과증진효소 사용 및 조건 확립
 - 라. 확립된 효소조건의 현장적용 및 맥즙 제조 적성 분석
3. 홍삼/복분자 맥주 품질개선을 위한 당화조건 보완
 - 가. 홍삼/복분자 맥주제조를 위한 당화 조건 보완
 - 나. 홍삼/복분자 맥주제조를 위한 haze 생성 최소화

제 3 절 맥주 발효 공정에 단백질 및 폴리페놀 침전가속화에 따른 응집기술 개발

1. 맥주 발효 중 응집 방법 개발 및 환경변수에 따른 응집생성 예측
 - 가. 응집 방법 개발
 - 나. 응집 여과 후 폴리페놀 및 단백질 함량 확인
 - 다. 공정된 맥주 퀄리티 확인
2. 맥주 발효 중 환경변수에 따른 최적화된 응집 생성공정 현장적용
 - 가. 후발효 중 다양한 응집제의 현장조건 및 환경변수 개발
3. 홍삼/복분자 함유 국산보리맥주 응집 최적화 완성
 - 가. 홍삼/복분자 맥주용액의 최적 응집조건 개발
 - 나. 응집제 처리 홍삼/복분자 맥주의 품질평가 및 보완

제 4 절 국산보리 맥주 침전, 여과특성의 홍삼/복분자 맥주의 적용

1. 국산보리 맥주의 침전, 여과 특성 규명
 - 가. 맥주 교질용액 중 공정에서 형성된 입자의 물성에 따른 침강특성 규명
 - 나. 입자의 물성에 따른 여과특성 규명
2. 교질용액의 침전 및 여과특성 규명을 통한 맥주 침전 및 여과방법 개발
 - 가. 맥주 교질용액의 침강기 가동조건 개발
 - 나. 교질용액에 대한 여과기 가동조건 개발
3. 침전, 여과 기술의 수출용 맥주 적용
 - 가. 홍삼맥주 교질용액의 유효성분 분석
 - 나. 맥주 교질용액의 원심분리 및 여과

제 5 절 국산 보리맥주의 살균공정 최적화

1. 살균 중 맥주 미생물 및 품질 변수 변화 모델링
 - 가. 살균 kinetics 모델링
 - 나. 품질 변화 kinetics 모델링
 - 다. 최적의 살균 온도/시간 결정
2. 미생물 살균 및 품질 변화가 최적화된 현장 살균공정 완성
 - 가. 살균기 가동조건에 따른 공정변수 모니터링
 - 나. 현장 살균기 가동 조건에 따른 살균/품질 예측에 의한 최적 조건 완성

- 3. 복분자/국산보리맥주 살균공정 최적화 완성
 - 가. 복분자/국산보리맥주 살균 특성 분석
 - 나. 살균공정의 최적화

제 6 절 개발한 맥주 제조 공정 기술을 적용한 맥주

- 1. 개발한 기술을 적용한 맥주의 제조 및 평가
- 2. 가속화 실험을 통한 품질 평가 및 관능평가

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 목표 달성도

제 2 절 관련분야에서의 기여도

제 5 장 연구결과의 활용계획 등

제 6 장 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 7 장 연구개발성과의 보안등급

제 8 장 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황

제 9 장 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

제 10 장 연구개발과제의 대표적 연구실적

제 1 절 연구개발 성과

- 1. 기술이전
- 2. 학회지 등재
- 3. 사업재산권 (특허)
- 4. 학술발표
- 5. 인력양성 (석사논문)

제 11 장 기타사항

제 12 장 참고문헌

<별첨> 자체평가의견서, 기술이전, 논문, 특허, 포스터 발표

제 1 장 연구개발과제의 개요

코드번호

D-03

제 1 절 연구개발의 목적

1. 국산 프리미엄 맥주의 사업성 확보

본 연구에서는 국산보리를 이용한 수출용 프리미엄맥주 제조를 위해 장기 보관 및 유통이 가능한 shelf life 제어기술을 개발하고 현장에 적용하여 홍삼맥주 및 복분자맥주 생산조건의 최적화를 목표로 한다. 국산일반보리(광맥)를 이용한 프리미엄맥주 제조기술의 개발은 기술이전을 통해 중소규모의 양조시설에서 지역 특화된 다양한 맛과 고품질의 맥주 생산이 가능하고 지역 특화된 하우스맥주 생산을 기반으로 주변관광지, 지역축제, 지역행사 등을 연계하여 점차 수도권 franchise 사업화로 거점을 확대 할 수 도 있다. 고품격 국산보리맥주의 생산으로 다양하고 특색 있는 고급 맥주를 선호하는 소비자의 기대에 부응하고 최근 국내 맥주시장의 4.5%(주류산업협회2012)를 차지하며 가파르게 국내시장을 잠식하고 있는 수입맥주의 대체효과 및 외국산 맥주보리 원맥수입의 감소를 기대한다. 다양하고 차별화된 지역맥주를 생산하는 기반기술의 보급 및 확대를 통해 향후 고품질 국산맥주의 해외 수출 가능성을 기대한다.

2. 국내 농산물을 원료로 한 지역특화 맥주의 개발 및 상품화

현재 국내 맥주 생산량은 매년 증가함에 따라 외국산 맥주보리 원맥 및 맥아의 수입도 점차 증가하는 추세에 있는 반면, 국내보리의 자급률은 해마다 감소하고 있다. 또한 한미 FTA의 발효로 인하여 맥주보리에 대한 관세가 철폐되고, 매년 2%의 수입량이 의무적으로 증가할 예정으로 있어 국내 보리 생산농가의 침체를 더욱 가속화 시킬 전망이다. 국내 보리농업의 자생력 강화와 제조업 활성화를 통한 일자리 창출 및 지역 경제 활성화 기여와 EU, 미국 등과 체결한 FTA의 발효 및 보리 수매제도의 폐지 등에 따라 예상되는 국내 보리재배 농가의 경제적 손실 보전을 기대한다. 또한 국내 농산물을 기능성원료로 사용하여 고품질의 차별화된 지역특화 맥주를 제조하고 내수확대 및 해외수출을 지향하여 소규모맥주산업의 발달과 지역경제의 활성화에 기여하고자 한다.

제 2 절 연구개발의 필요성

1. 국내의 현황 및 문제점

가. 현황

- 보리는 밀, 쌀, 옥수수과 더불어 세계 4대 식량작물의 하나이다. 최근 FTA의 발효, 2012년부터 보리수매제도의 중단은 국산보리의 수급에 큰 차질을 가져올 것이고 국내 보리재배 농가의 경제적 손실이 클 것으로 예상되어 수매중단에 따른 안정적인 원맥활용 대책 마련이 시급하다.
- 보리의 품종개량과 더불어 보리를 이용한 다양한 가공제품(보리쌀, 압맥, 할맥, 제분, 맥아 등)의 품질을 개선하고 새로운 소비처를 개발하는 등 국내산 보리의 소비를 촉진하는 다양한 방법을 모색함으로써 보리생산농가의 소득보전과 위축된 보리 재배 의욕을 회복시키는 것이 필요하다.
- 국산 맥주보리(2조맥)는 농협과 계약재배 후 대부분 수매되므로 농가의 겨울철 중요한 소득원의 하나이었으나 최근 국내맥주회사들의 수매량이 급격히 감소하면서 새로운 용도 개척이 필요한 실정이다. 따라서 국내 맥주보리산업의 활로를 찾기 위해 지역별로 차별화된 국산 프리미엄 맥주를 제조하고 유통기한을 연장할 수 있는 제어기술의 개발을 통해 수출을 통한 해외시장에서 판로개척이 필요하다.
- 지역별 농가소득 향상 및 특성화를 위해 현재 중소규모 맥주제조의 문제점은 전문인력 양성, 기술개발, 유통채널 등과 같은 인프라가 취약하며 국산원료를 주로 사용할 경우 수입보리를 주로 사용하는 대기업에 비해 원가부담이 가중되고 품질 및 제조공정 개선을 위한 체계적인 연구개발이 부족하고 짧은 유통기한(수출하기 위해서는 최소 1년의 유통기한 필요)으로 보관 및 품질향상 기술이 매우 미흡한 실정이다.
- 이러한 문제점들을 해결하기 위한 방편의 하나로 맥주제조에 가장 적합한 국산보리 품종을 선정하고, 효율성과 품질관리를 위한 제조공정의 개선, shelf-life 연장을 위한 다양한 품질향상 기술을 개발하고 현장에 적용하여 완성된 최종 제품을 국내소비뿐 만아니라 해외, 특히 한류열풍이 불고 있는 중국과 같은 거대시장으로의 수출을 시도할 필요가 있다.



- 현재 세계 술 산업의 동향은 건강(Health), 포장의 편리성(Convenience), 고급화(Premiumization)와 같은 3대 메가 트렌드로 낮은 도수의 저칼로리 유기농 주류, 신선도를 유지시키는 포장, 순수하며 고급스럽고 감성적인 이미지의 주류를 선호하는 것으로 보고되고 있다.
- 최근 맥주에 대한 소비자 기호 다양화, 고급 맥주에 대한 수요 확대, 가정내 소비 중심으로의 음주문화 변화 등으로 국내 및 수입 맥주시장이 큰 폭의 성장세를 나타내고 있다. 또한, 2013년 8월 경 정부가 주세법 개정안을 통해 맥주 제조 및 유통기준 완화를 예고하여 국내 맥주시장에 변화의 조짐이 나타나는 모습이다.
- 국내 주류시장은 출고량 기준 소주와 맥주가 전체의 98.5% 내외를 차지하고 있으며, 2012년 연간 기준 소주 및 맥주가 각각 전체 출고량의 40.3% 및 58.2%를 나타내는 등 양대 주종 위주로 시장이 구성되어 있다. 맥주 출고 현황을 살펴보면, 2012년 출고량 및 매출액이 전년대비 각각 3.9% 및 7.1% 증가한 891천kl 및 2조 3천억원 내외를 기록하고 있다.
- 수입맥주는 국내 맥주시장에서 약 4% 내외를 차지하는 등 점유율은 아직 미미한 수준이나, 최근 큰 폭의 성장세를 나타내면서 시장 규모가 확대되는 추세이다. 맥주 수입액 규모는 2012년 연간전년대비 약 26% 증가한 74백만달러를 나타냈으며, 2013년 상반기 기준 전년 동기대비 약 21% 증가한 40백만달러를 기록하는 등 최근 3년 외국 문화 경험이 증가하면서 다양한 맥주에 대한수요가 확대된 점과 가정내 맥주소비가 증가하는 소비패턴의 변화, 소득수준 상승에 따른 고급맥주 선호 증가 등이 영향을 미친 것으로 파악된다.간 연평균 25% 이상의 높은 성장세가 이어지는 모습을 보이고 있다.
- 수입맥주 시장의 성장에는 젊은층을 중심으로 외국 문화 경험이 증가하면서 다양한 맥주에 대한수요가 확대된 점과 가정내 맥주소비가 증가하는 소비패턴의 변화, 소득수준 상승에 따른 고급맥주 선호 증가 등이 영향을 미친 것으로 파악된다.
- 2013년 상반기 국내 업체의 맥주 수출액은 천억원이 넘었다. 업체별로는 오비맥주가 736억원, 하이트진로가 372억원이었다. 해마다 국산 맥주의 수출 증가세도 꾸준하다. 2009년에는 1150여억원이었는데, 지난해에는 2320억원이 넘었다. 국산 맥주는 전세계 30여개 국가에 현지인의 기호와 입맛에 맞는 제품을 직접 개발해서 해외 현지 유통업체에 직접 공급하는 ODM 방식으로 수출되고 있다 (그림 1).



그림 1. 2013년 8월 YTN뉴스 보도 ‘국산맥주 수출, 수입의 2배’

나. 문제점

- 맥주의 제조과정은 다음 그림 2와 같이 대략 맥아제조(malting), 맥즙제조(mashing), 발효(fermentation), 여과(filtration), 포장 및 살균(packaging and pasteurization) 공정으로 나눌 수 있다.

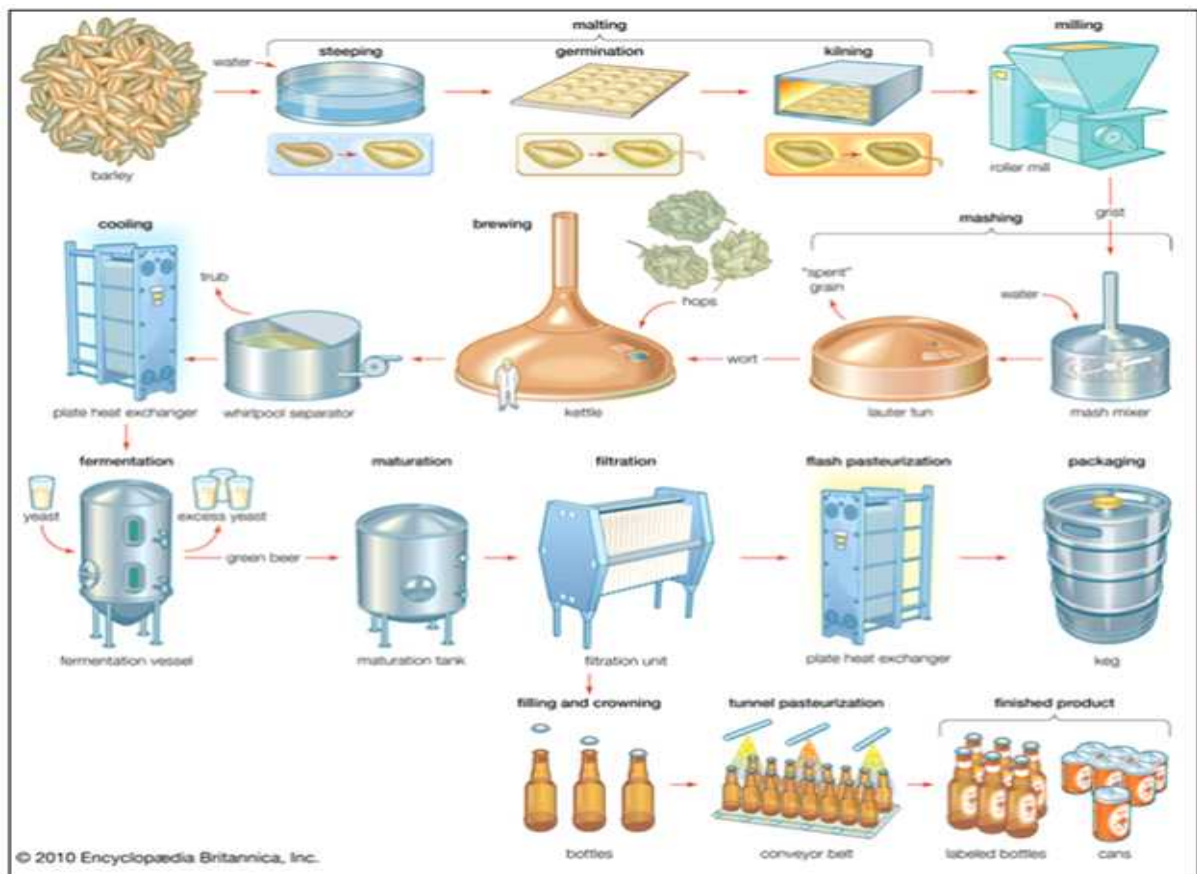


그림 2. 맥주의 제조공정

- 맥주의 제조과정 중 각 공정별로 미생물의 오염으로 인한 생물학적 요인, 맥주품종에 따라 또는 공정이 최적화되지 않았을 경우 대사산물의 과다생성으로 인해 haze를 만들거나 여과성능을 저하시키는 화학적 요인, 발효 및 숙성과정 중 haze나 침전물이 생성되는 여러 물리적 요인들이 존재한다. 이러한 요인들이 맥주의 품질저하, 장기유통 곤란, 생산비용 상승 등의 여러 문제들을 일으킬 수 있다.
- 따라서 맥주제조 과정 중 품질저하 등과 관련하여 발생할 수 있는 문제점들과 본 과제 의 수행을 통해 해결할 방안(shelf-life 제어기술)을 다음 그림에 도시하였다(그림 3).

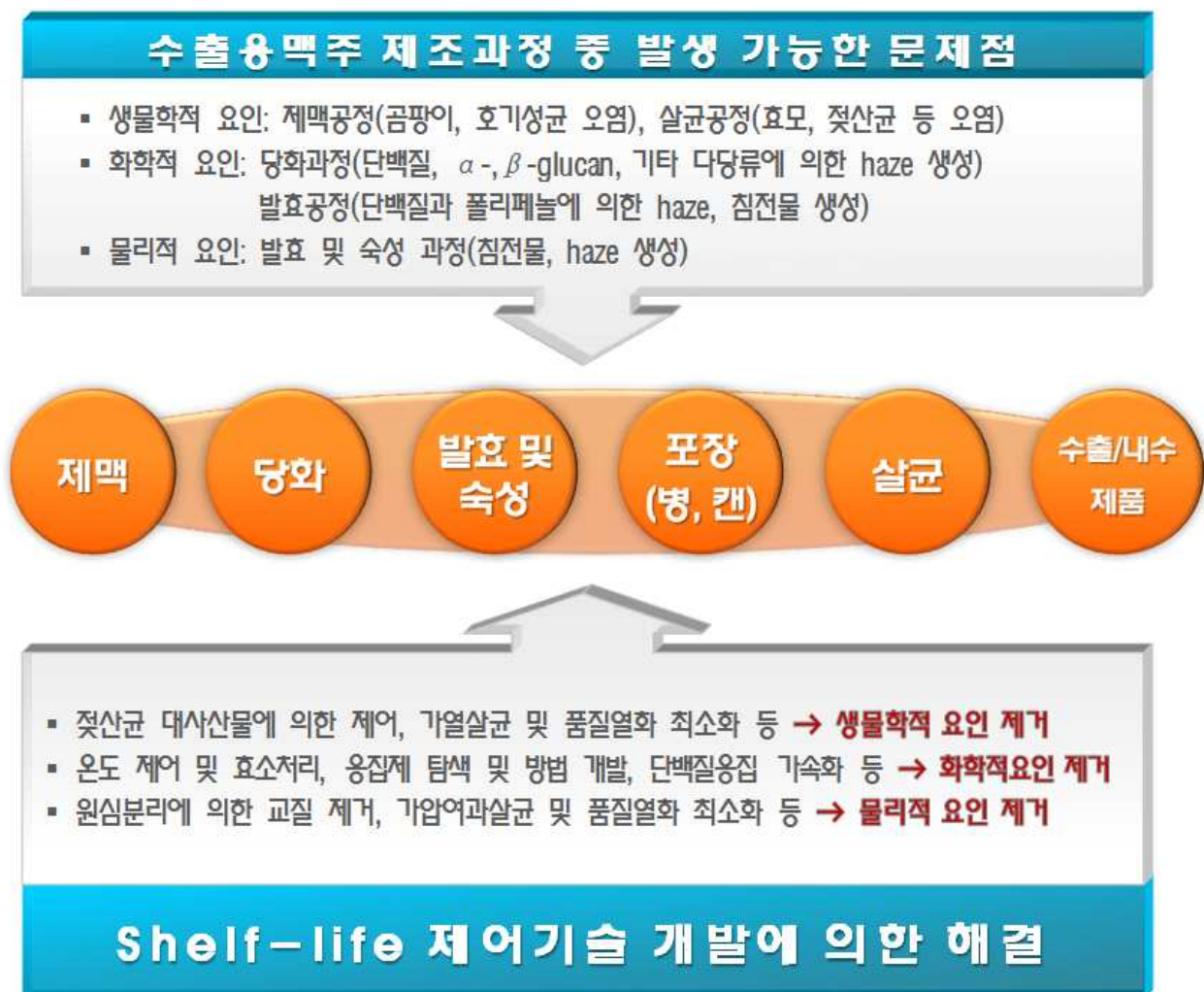


그림 3. shelf-life 제어기술 도식화

2. 국내 맥주시장의 전망

- 주세법 개정 이래, 기존 대형 맥주업체와 차별화된 맥주 생산을 통해 다양하고 특색 있는 지역맥주를 구축 한다는 국내 소규모 맥주(하우스 맥주)제조 업체는 양적으로는 매년 높은 증가세를 보여 왔다. 그러나 여전히 제도적 및 구조적 문제로 인하여 괄목할만한 성장을 이루지 못하고 있는 실정이다.
- 2011년부터 하우스 맥주의 연간 생산량이 2,000kl를 넘을 경우 일반유통이 가능하도록 규정이 변경됨으로서 맥주산업 진입제한이 대폭 완화되었고, 2012년 7월부터 주종에 관계없이 국내산 농산물을 주원료로 사용하는 주류는 전통주로 인정하여(국산보리를 사용할 경우 맥주도 포함) 주세를 50% 감면하는 정책이 시행될 예정으로 있어 국내산 농산물을 이용한 고품질 지역특화 맥주 제조기술 및 유통기한 연장 기술의 개발은 시기적으로 매우 적절하다고 할 수 있다.
- 소규모 맥주제조에 대한 규제완화와 소규모 맥주 시장의 활성화 및 질적, 양적 성장을 위하여 국내산 맥주보리를 이용한 차별화된 지역 프리미엄급맥주를 개발 한다면 감소 추세에 있는 국내 보리의 생산량의 증대와 함께 농가소득 증대 및 국내뿐만 아니라 중국 수출과 같은 새로운 시장의 형성을 통하여 침체된 국내 지방경제에 큰 활력소가 될 것으로 보인다.
- 독일의 옥토버 페스트, 일본의 삿포로 축제 등 각국의 맥주와 관련된 축제에는 이를 즐기 기 위한 외국 관광객들로 성황을 이루고 있으며 독일 옥토버 페스트의 경우 연간 650만 명이 참가하고 700만 리터의 맥주를 소비하는 국제적인 행사로 널리 알려져 있다.
- 국산보리로 맥주를 제조하여 유통하는 경우의 경제성을 전망하여 다음의 표에 나타내었다. 국산 프리미엄 맥주를 수출로 활로를 모색할 경우 주세가 면제되고 제조비용이 낮아져 가격경쟁력을 갖게 된다. 또한 내수용과 수출용을 포함하여 장기 유통용으로 하기 위해서는 현재 소규모 맥주제조기술에 shelf-life를 제어하고 품질을 향상시키는 기술의 개발이 반드시 필요한 것으로 보인다.

표 1. 국산보리로 제조한 맥주의 유통 경제성을 전망

	단기 유통용 (생맥주)	장기 유통용 (병, 캔)	
		내수용	수출용
원료 (맥아) ^{a)}	비용 동일	비용 동일 (대규모 구매 시 가격 하락)	비용 동일 (대규모 구매 시 가격 하락)
제조 비용	고비용 (소규모)	저비용 (대규모)	저비용 (대규모)
세금 (주세)	전통주 지정 시 주세 50% 감세	전통주 지정시 주세 50% 감세	주세 없음
장점	다양한 제품의 출시 및 고품질 맥주의 제공	유통 기간의 연장	국산 프리미엄맥주의 해외로 브랜드 창출 및 지역 이미지 홍보 (생산자와 지자체 간의 협력 ^{b)})
단점	냉장유통에 따른 시장확대 제 한과 유통경로에 따른 품질관리의 어려움	살균에 따른 맥주 품질의 변화 및 대기업 장벽에 의한 시장진입의 어려움 ^{c)}	해외 현지 지식 부재 및 현지의 입맛 등 정보 부재와 마케팅 기획력 부족

a) 국산 맥아: 2000원/kg (보리수매가 1000원 + 맥아 제조비용 1000원)

수입 맥아: 2000원/kg (단 대량구매 시 1000원/kg까지 할인 가능)

b) 한국홍삼맥주(주)의 예: 현재 중국 상해에서 중국 상류층을 겨냥한 특화된 지역 홍삼맥주의 수출을 준비 중임(전라북도 및 고창군과 협력)

c) 수출 시장의 개척을 통한 해외에서의 브랜드 활동을 통해 장벽이 높은 국내시장으로의 역진입(逆進入) 가능성이 커짐

○ 맥주 산업계의 세계적 추세를 볼 때 국내에서도 맥주의 품질이 다양화 될 수 있는 산업적 구조가 형성 되어야 한다. 이에 부응하는 시도가 소규모 맥주라 할 수 있다. 소규모 맥주의 특징은 원료, 공정, 맛의 다양화가 가능한 것으로 그 지역에 특화된 기능성원부재료가 포함된 상품이 있는 것이 바람직하다.

○ 소규모 맥주제조에 새로운 유통기한의 연장 및 품질향상 기술이 추가되면, 국산보리로 만든 프리미엄 맥주를 개발하여 지방자치단체별 맥주 축제를 개최하고 외국인 관광객을 유입하는 것은 내수 활성화에 크게 기여할 것이며 해외로의 수출 및 판매 확장에 긍정적인 영향을 미칠 수 있을 것이다.

제 3 절 연구개발의 성과 목표

1. 정량적 성과 목표

성과목표	사업화지표			연구기반지표			인력양성
	지식 재산권	기술 실시 (이전)	사업화	학술성과		학술발 표	
	특허출 원	건수	제품화	논문			
				SCI	비 SCI		
최종목표	2	1	2	2	3	6	6
1차 년도				1		2	2
2차 년도	1			2		6	2
3차 년도	1	1	1	3		2	2
달성율(%)	100	100	100	100	100	100	100

2. 정성적 성과 목표

- 국산보리(광맥) 맥아를 이용한 당화조건을 최적화한다.
 - 맥즙 제조 적성 분석
 - 당화과정 촉진을 위한 α -glucan 분해효소 사용
 - 여과성능 향상을 위해 β -glucan 분해효소 사용 및 맥즙 여과성능 분석
- 최적화된 당화조건을 현장적용에 적용하고 문제점을 보완한다.
 - 당화공정 현장적용 후 맥즙 품질 모니터링
 - 당화과정 촉진 또는 여과 성능 향상을 위한 다양한 분해효소 사용 및 조건 확립
- 기능성원료로 홍삼/복분자 맥주 품질향상을 위한 당화조건을 보완한다.
 - 홍삼/복분자 맥주제조를 위한 당화조건 보완
- 국산보리 및 맥아로부터 부패균 제어 젖산균 starter를 분리한다.
 - 보리 및 맥아로부터 젖산균 분리, 맥주부패균 억제 여부 조사, Hop내성 조사
 - BLIS 생산 조사, diacetyl 생성 여부 조사
- pilot scale 에서 분리균을 적용하고 보완한다.

- 젖산균을 첨가한 제맥, 맥아 적성 분석, 맥아의 미생물분석 및 효소분석
 - wort의 physico-chemical/미생물분석, 주발효적성 및 후발효적성 분석
 - 균주 동정
- 홍삼, 복분자맥주 맥주제조에 분리균을 적용하고 보완한다.
- mashing후의 미생물분석 및 보완, 주발효 및 후발효 중 오염미생물 분석 및 보완
 - 저온살균과 hurdle effect 규명
- 맥주 발효 중 응집 방법 개발 및 환경변수에 따른 응집 생성을 예측한다.
- 맥주 발효 중 응집방법 및 응집소재 탐색
 - 환경변수 (온도, 용액, 물성등)으로 응집 생성 예측 개발
- 맥주 발효 중 환경변수에 따른 최적화된 응집 생성공정을 현장에 적용한다.
- 발효 중 환경변수 모니터링
 - 환경변수 (온도, 용액, 물성 등)에 의한 응집도 예측 및 평가
- 홍삼/복분자/ 함유 국산보리맥주 응집 최적화를 완성한다.
- 홍삼/복분자 맥주의 제조 중 사용 가능한 응집 소재 및 응집방법에 대한 개발
- 국산보리 맥주의 침전, 여과 특성을 규명한다.
- 맥주 교질 용액 중 공정에서 형성된 입자(proteins, polyphenols, glucans, inorganic matters 등)의 물성에 따른 침강 특성 규명
 - 침강분리 후 용액에 남아있는 입자의 물성에 따른 여과 특성 규명
- 침전, 여과 기술의 국산보리 맥주 생산현장 적용 및 보완한다.
- 후발효 중 용액의 물성 변화 모니터링
 - 맥주 교질 용액에 대한 원심침강기의 가동 최적조건 확립과 적용
 - 맥주 교질 용액에 대한 여과기의 구성 및 가동 최적조건 확립과 적용
 -
- 침전, 여과 기술의 수출용 홍삼/복분자 맥주 적용 및 보완한다.
- 홍삼/복분자 맥주 용액의 교질입자 물성에 대한 특성 분석
 - 홍삼/복분자 맥주 용액 물성에 대한 원심분리 및 여과 조건 완성
- 살균 중 맥주 미생물 및 품질 변수 변화를 모델링한다.
- 미생물 사멸 kinetics 개발
 - 품질 변화 kinetics 개발
 - 최적의 살균 온도/시간 탐색
- 미생물 살균 및 품질 변화가 최적화된 현장 살균공정을 완성한다.

- 현장 살균기 가동 조건에 따른 공정변수 모니터링
 - 현장 살균기 가동 조건에 따른 살균/품질 예측에 의한 최적 조건 완성
- 홍삼/복분자/ 국산보리맥주 살균공정 최적화를 완성한다.
- 홍삼/복분자 맥주 살균/품질 예측함수 완성
 - 살균/품질의 현장 살균기 가동 최적 조건 완성



그림 8. 수출용 국산프리미엄맥주 self-life 제어기술개발 도식화

제 2 장 국내외 기술개발 현황

코드번호	D-04
------	------

제 1절 제품 및 시장 분석

1. 본 연구관련 국내외 기술수준 비교

개발기술명	관련기술 최고보유국	현재 기술수준		기술개발 목표수준	비고
		우리나라	연구신청팀		
효소를 이용한 맥주제조	미국	40	70	100	
bioacidified malt	Netherlands	30	50	100	
nisin 이용	UK	30	50	100	
맥주교질 침전 및 여과	미국	50	70	100	
맥주살균 최적화	미국	50	70	100	

- 1) 개발기술명은 본 연구과제 최종 연구개발 목표기술을 의미
- 2) 현재 기술수준은 선진국 100% 대비 우리나라 및 신청한 연구팀의 기술수준 표시
- 3) 기술개발 목표수준은 당해과제 완료 후 선진국 100% 대비 목표수준 제시
- 4) 부가설명이 필요한 경우 비교란에 작성

2. 특허분석

가. 특허분석 범위

대상국가	국내, 국외(미국, 일본, 유럽)
특허 DB	특허정보원 DB(www.kipris.or.kr), Aureka DB
검색기간	최근 5년간
검색범위	제목 및 초록

나. 특허분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

개발기술명	당화	맥즙여과
Keyword	barley, mashing enzyme	wort, filtration
검색건수	4	56
유효특허건수	1	3

핵심특허 및 관련성	특허명	METHOD OF PRODUCING FOAMING ALCOHOLIC DRINK AND FOAMING ALCOHOLIC DRINK PRODUCED BY USING THE METHOD	METHOD FOR PRODUCING FERMENTED ALCOHOLIC BEVERAGE HAVING HIGH beta-GLUCAN CONTENT
	보유국	미국	일본
	등록년도	US-0142446 (2009)	JP-0083239 (2011)
	관련성(%)	60	70
	유사점	거품형성 알코올 음료 생산	효소를 이용한 여과성능 향상
차이점	barley wheat와 malt 미사용	cellulose 분해효소 사용	

개발기술명		<i>bio-acidified malt</i>	<i>nisin</i> 이용
Keyword		beer spoilage, lactic acid bacteria, beer,	nisin, beer
검색건수		211 건	196 건
유효특허건수		2 건	3 건
핵심특허 및 관련성	특허명	Beer spoilage reducing methods and compositions	Prevention of lactic acid bacteria spoilage of beer through use of bacteriocin-containing fermented wort
	보유국	유럽	미국
	등록년도	EP 01012225 (2006년)	US 07186426 (2007년)
	관련성(%)	40%	50%
	유사점	발효 제품에서 부패 미생물의 성장 억제	박테리오신을 이용한 beer-spoilage 젖산균 저해
차이점	lysozyme 첨가에 의한 억제	nisin-producing culture 이용	
핵심특허 및 관련성	특허명	Preventing spoilage in alcohol fermentations	Antibacterial composition for control of gram positive bacteria in food applications
	보유국	미국	미국
	등록년도	US 20120308538 (2012년)	US 06620446 (2003년)
	관련성(%)	30%	30%

	유사점	맥주에 존재하는 부패 미생물의 성장 억제	박테리오신 등 항균물질을 이용한 그람양성균 생육 저해
	차이점	효모를 이용한 부패 미생물 성장 억제	고형 식품에 적용
핵심특허 및 관련성	특허명		Nisin derivatives and the use thereof
	보유국		유럽
	등록년도		EP 02338904 (2011년)
	관련성(%)		40%
	유사점		박테리오신의 항균활성 이용
	차이점		Nisin derivatives 혹은 variant 이용에 초점

개발기술명	맥주 응집제	Beer coagulant	
Keyword	응집제, 정화용, 혼탁 [또는 coagulant, haze, purify]	flocculant, 정화용, 혼탁 [또는 coagulant, haze, purify]	
검색건수	130	98	
유효특허건수	1	1	
핵심특허 및 관련성	특허명	맥주 정화용 예비혼합 조성물	맥주의 금속오염과 혼탁방지를 위한 조성물 및 방법
	보유국	미국	미국
	등록년도	1006052020000 (2006.07.19)	1000496620000 (1992.03.05)
	관련성(%)	100%	60%
	유사점	PVPP, SILICA GEL로 인한 응집방법	SILICA GEL 응집방법
	차이점	-	맥주뿐만 아니라 다른 음료수의 혼탁을 없애주는데 이용하고 특히 금속을 없애주는것에 이용함.

개발기술명		(맥주의 침전)	(맥주의 여과)
Keyword		beer sedimentation	beer filtration
검색건수		13	207
유효특허건수		0	7
핵심특허 및 관련성	특허명	Method for rapidly measuring premature yeast flocculating factor of malt and measuring apparatus therefor	Method and device for settling filtration of fluids
	보유국	Japan	USA
	등록년도	2008	2010
	관련성(%)	0	10
	유사점	없음	맥주의 여과 효율 증진
차이점	효모에 의한 응집 및 측정을 목적으로 하고 있으며, 본 연구는 발효 중 단백질 전체의 응집과 침전에 대해서 살펴봄	새로운 방법의 여과 방법으로, 본 연구는 전통적인 방식으로 맥주의 여과 진행	
핵심특허 및 관련성	특허명	Method of quickly measuring factor causing early flocculation of yeast	Beer filter
	보유국	Japan	USA
	등록년도	2005	2010
	관련성(%)	0	0
	유사점	없음	없음
차이점	효모에 의한 응집 및 측정을 목적으로 하고 있으며, 본 연구는 발효 중 단백질 전체의 응집과 침전에 대해서 살펴봄	새로운 소재를 이용한 여과 방법을 채택하고 있음	
핵심특허 및 관련성	특허명		Cellulose-based microporous membrane
	보유국		USA
	등록년도		2008
	관련성(%)		0
	유사점		없음
차이점		여과의 효율을 높이기 위해 새로운 소재의 여과방법 채택	

개발기술명		맥주 살균 최적화	
Keyword		beer, pasteurization	
검색건수		29	
유효특허건수		2	
핵심특허 및 관련성	특허명	Method of pasteurizing with monitoring and controlling of the number of uptaken pasteurization units and apparatus therefor	
	보유국	유럽	
	등록년도	EP-0610018(2000-02-04)	
	관련성(%)	60%	
	유사점	맥주 살균 장치 및 방법에 관한 특허로서 장치 개선과 운전 조건을 최적화함	
차이점	본 연구에서 계획된 캔 또는 병입한 맥주를 수조식 장치에서 행하는 저온살균과는 장치적으로 관련 열교환기를 대상으로 하였음		
핵심특허 및 관련성	특허명	Process and apparatus for pasteurizing liquid contained in containers	
	보유국	미국	
	등록년도	US-5750174(1998-05-12)	
	관련성(%)	60%	
	유사점	캔 또는 병입된 음료의 저온살균 공정 및 장치를 개발	
차이점	맥주의 구체성과 맥주의 제품 성질인 미생물 농도, 품질 변수의 kinetics함수, 장치의 공정 변수가 고려되지 않았음		

- 1) 개발기술명은 본 연구과제 최종 연구개발 목표기술을 의미
- 2) keyword는 검색어를 의미하며, 검색건수는 keyword에 의한 총 검색건수를, 유효특허건수는 검색한 특허 중 핵심(세부)개발기술과 관련성이 있는 특허를 의미
- 3) 핵심특허는 개발기술과의 관련성이 높고 인용도가 높은 특허를 기준으로 분석

3. 논문분석

가. 논문분석 범위

대상국가	미국, 일본, 유럽
논문 DB	Aureka DB, pubmed DB(www.ncbi.nlm.nih.gov), 국회도서관(www.nanet.go.kr)
검색기간	최근 5년간
검색범위	제목, 초록 및 키워드

나. 논문분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

개발기술명		당화	맥즙여과
Keyword		barley, mashing enzyme	wort, filtration
검색건수		91	66
유효논문건수		3	2
핵심논문 및 관련성	논문명	Improving mashing yields from low grade barley with added enzymes	Exogenous β -glucanases and pentosanases and their impact on mashing
	학술지명	New Biotechnology	Enzyme and Microbial Technology
	저자	Preben Hansen	A. Scheffler
	게재년도	2012	2005
	관련성(%)	60	70
	유사점	효소를 이용한 mashing 수율 향상	효소를 이용한 여과성능 향상
	차이점	현장적용이 아닌 lab scale에 제한	xylanase 사용

개발기술명		<i>bio-acidified malt</i>	<i>nisin</i> 이용
Keyword		beer spoilage, lactic acid bacteria, beer	nisin, beer
검색건수		97 건	700 건
유효논문건수		1 건	2 건
핵심논문 및 관련성	논문명	Bioprotective potential of lactic acid bacteria in malting and brewing	The bacteriostasis study of nisin for the raspberry health beer
	학술지명	Journal of food protection	Physics procedia

	저 자	Rouse	Sun, J.
	게재년도	2008	2012
	관련성(%)	50%	40%
	유사점	맥주 제조 단계 중 malting과 brewing 단계에서 맥주 부패균 저해	박테리오신을 이용한 맥주의 shelf life 연장
	차이점	곰팡이를 주된 부패균으로 연구	draft beer를 대상으로 연구
핵심논문 및 관련성	논문명		Exploring the use of natural antimicrobial agents and pulsed electric fields to control spoilage bacteria during a beer production process
	학술지명		Revista Argentina de microbiologia
	저 자		Galvagno, MA
	게재년도		2007
	관련성(%)		50 %
	유사점		맥주 제조 중 nisin에 의한 beer spoilage bacteria 저해
	차이점		nisin producer가 아닌 nisin 첨가

개발기술명		맥주 응집제	Beer coagulant
Keyword		맥주 응집제, PVPP, PVP, Silica-gel [또는 beer coagulant]	beer clearly, haze
검색건수		92	103
유효논문건수		1	1
핵심논문 및 관련성	논문명	A Comparison of PVPP, Silica Xerogl and a PVP-Silica Co-Product for their ability to remove polyphenols from beer.	Beer stabilization Technology-clearly a matter of Choice
	학술지명	-	-
	저 자	Alyson E. Mitchell	Mustafa Rehmanji
	게재년도	2005	2005
	관련성(%)	100%	70%
	유사점	맥주 응집제로 haze 없애줌	응집제 종류
	차이점	-	맥주 응집제의 종류 및 결과

개발기술명		(맥주의 침전)	(맥주의 여과)
Keyword		beer sedimentation	beer filtration
검색건수		31	314
유효논문건수		0	5
핵심논문 및 관련성	논문명	Fractionation and characterization of brewers' spent grain protein hydrolysatation	Transient critical flux due to coupling of fouling mechanisms during crossflow microfiltration
	학술지명	J of Agricultural and Food Chemistry	J Membrane Science
	저자	Celus, I. et al.	van der Sman et al.
	게재년도	2009	2013
	관련성(%)	0	20
	유사점	맥주 혼탁의 원인 물질인 단백질을 다루고 있음	맥주 여과의 메카니즘을 연구함
	차이점	논문은 단백질을 가수분해하여 분석에 주안점을 두고 있으나 본 연구는 단백질 응집에 의한 제거에 목표가 있음	논문은 관석과 연결된 맥주의 흐름성을 다루는데 비해 본 연구는 여과 효율성을 다루게 됨
핵심논문 및 관련성	논문명	Net effect of wort osmotic pressure on fermentation course, yeast vitality, beer flavor, and haze	Turbidimetric behavior of colloidal particles in beer before filtration process
	학술지명	App. Microbiology Biotechnology	Food & Bioprocess Technology
	저자	Sigler K. et al.	Bencitez E. I. et al.
	게재년도	2009	2013
	관련성(%)	0	50
	유사점	혼탁의 원인 물질 중 하나인 맥아즙의 조절을 다룸	여과 전 교질물질의 흐름 특성 중 하나를 연구
	차이점	논문은 맥아즙의 삼투압 증가가 맥주 전체에 미치는 영향을 다루고 있으나 본 연구는 단백질 등 혼탁물질의 침전과 여과에 목표가 있음	논문은 여과 전 흐름을 연구하였으나 본 연구는 여과 전 공정을 다루게 됨

핵심논문 및 관련성	논문명	The identification of a barley haze active protein that influences beer haze stability	Influence of the malting parameters on the haze formation of beer after filtration
	학술지명	J of Cereal Science	European Food Research Technol.
	저자	Robinson L. H. et al.	Steiner E. et al.
	게재년도	2007	2011
	관련성(%)	0	40
	유사점	맥주 단백질 혼탁물질	맥주 혼탁의 원인 물질 탐색
	차이점	논문을 분석기술만을 다룸	논문을 여과 후 일어나는 혼탁에 대해 연구하였으나 여과 시 주의해야 할 물질 검색에 유용

개발기술명		맥주 살균 최적화	
Keyword		beer, pasteurization	
검색건수		36	
유효논문건수		2	
핵심논문 및 관련성	논문명	Effect of Pasteurization on the Protein Composition and Oxidative Stability of Beer during Storage	
	학술지명	Journal of agricultural and food chemistry v.60 no.50 , pp.12362 - 12370	
	저자	Lund Marianne N. ; Hoff Signe ; Berner Torben S.	
	게재년도	2012	
	관련성(%)	60%	
	유사점	저온살균은 맥주의 저장성을 높이는데 효과적임	
	차이점	실제 현장 적용을 위한 살균기와의 관련성은 전무함	

핵심논문 및 관련성	논문명	A suitable model of microbial survival curves for beer pasteurization	
	학술지명	Lebensmittel-Wissenschaft Technologie v.40 no.8 , pp.1330 - 1336	
	저자	Buzrul S.	
	게재년도	2007	
	관련성(%)	60%	
	유사점	맥주 저온살균시 미생물의 사멸 kinetic 함수 개발	
	차이점	실제 현장 적용을 위한 살균기와의 관련성은 전무함	

- 1) 개발기술명은 본 연구과제 최종 연구개발 목표기술을 의미
- 2) keyword는 검색어를 의미하며, 검색건수는 keyword에 의한 총검색건수를, 유효논문 건수는 검색한 논문 중 핵심(세부)개발기술과 관련성이 있는 논문을 의미
- 3) 핵심논문은 개발기술과의 관련성이 높고 인용도가 높은 논문을 기준으로 분석

4. 제품 및 시장 분석

가. 생산 및 시장현황

1) 국내 제품생산 및 시장 현황

- 국내주류시장에서 출고량 기준으로 맥주, 소주가 전체 출고량의 대부분인 98.5%를 차지하고 있으며 각각 전년대비 0.8%, 2.1% 상승하였고, 매출액 역시 1조 8천9백억원으로 전년대비 1.0% 증가하였다. 맥주는 전체 주류 출고량의 57.2%을 차지하고 있다.

2012년 주류 출고 수량

단위 : kl, %

구분	2012년			2011년	
	출고량	전년대비	점유비		
증류주	희석식소주	1,308,622	104.8	40.3	1,248,363
	증류식소주	163	116.4	0.0	140
	일반증류주	4,108	121.4	0.1	3,384
	리큐르	628	91.5	0.0	686
	위스키	2,390	71.2	0.1	3,355
	브랜드	102	136.0	0.0	75
발효주	맥주	1,887,486	102.1	58.2	1,849,023
	청주	22,489	96.2	0.7	23,367
	과실주	12,540	83.1	0.4	15,099
	기타주류	5,166	116.2	0.2	4,446
합 계	3,243,694	103.0	100.0	3,147,938	

※ 자료 : 한국주류산업협회(비회원사 제외, 면세포함)

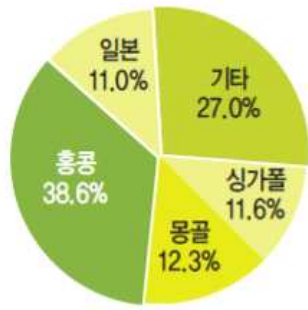
- 면세 출고는 약 11만5천kl로 전년대비 2.2%가 감소했다. 면세용 중 수출의 점유율은 76.1%를 차지하고 있으며 전년대비 0.7% 소폭 감소했다. 주요 수출국은 홍콩 38.6%, 몽골 12.3%, 싱가포르 11.6% 순이며 그 외의 31개국으로 판매되고 있다.

2012년 맥주 면세용 현황

단위 : kl, 백만원

구분	수량	점유율	전년대비	매출액	점유율	전년대비
수출	88,163	76.1	99.3	85,834	67.0	100.1
군납	23,682	20.4	92.2	36,513	28.5	84.4
기타	4,058	3.5	101.1	5,715	4.5	117.5
합계	115,903	100	97.8	128,062	100	95.7

맥주 주요 수출국 점유율(%)

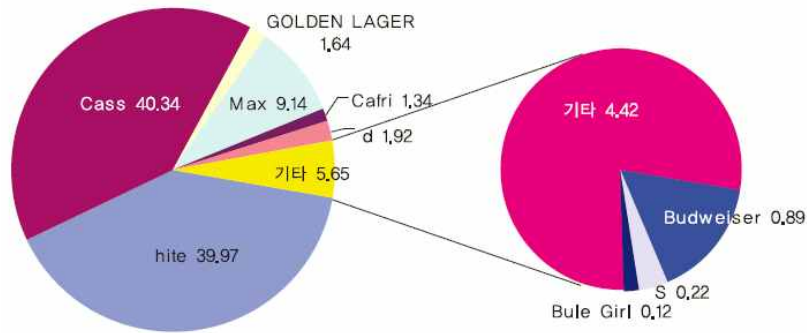


면세용 수량 점유율(%)



- 2012년 맥주 제조업체 별로 점유율을 보면 Hite와 Cass가 각각 약 40% 정도로 비슷하게 보이며 그 뒤를 Max(9.4%), Hite d(1.9%), GOLDEN LAGER(1.6%), Cafri(1.3%) 등이 따르고 있다.

상반기 제품별 점유비(%)



2) 국외 제품생산 및 시장 현황

- 세계적으로 주류시장은 와인 40%, 맥주40%, 증류주(spirits) 20% 시장으로 수렴화 하는 것으로 나타나고 있으며 최근에는 전반적으로 맥주시장의 활성화, 와인시장의 정체, 증류주시장의 침체 현상을 보이고 있다.
- 판매량 기준 상위 15개 맥주업체 중 작년 5% 이상의 판매 증가를 기록한 곳은 중국의 CRE, 칭타오, 베이징 양징 맥주, 필리핀의 산미구엘 맥주, 일본의 산토리오 모두 아시아 지역 업체들이다.

| 2012 세계 상위 15개 맥주 제조사 |

단위 : 백만 헥토리터

순위	제조사	본사위치	판매량			증감(%)	
			2010	2011	2012	10-11	11-12
1	Anheuser-Busch Inbev	벨 기 에	405.6	408.8	411.6	0.8%	0.7%
2	SABMiller	영 국	227.6	229.2	241.9	0.7%	5.5%
3	Heineken	네 덜 란 드	157.4	164.6	171.7	4.6%	4.3%
4	Carlsberg Breweries	덴 마 크	114.2	118.7	120.4	3.9%	1.4%
5	China Resources	중 국	92.8	102.4	106.4	10.3%	3.9%
상위 5개사 소계			997.6	1,023.7	1,052.0	2.6%	2.8%
6	Tingdao Brewing	중 국	63.5	71.5	79.0	12.6%	10.5%
7	Molson Coors Brewing	미 국	64.5	64.2	62.9	-0.5%	-1.9%
8	Beijing Yanjing Beer Group	중 국	50.3	54.1	54.9	7.5%	1.5%
9	Kirin Brewery	일 본	51.8	50.7	49.3	-2.1%	-2.7%
10	Asahi Brewery	일 본	34.5	35.5	36.6	3.0%	3.1%
상위 10개사 소계			1,262.1	1,299.6	1,334.7	3.0%	2.7%
11	Efes Beverage Group	터 키	30.0	30.5	29.3	1.5%	-3.9%
12	Guinness Brewing(Diageo)	영 국	23.0	23.9	24.3	3.9%	1.9%
13	San Miguel Brewery	필 리 핀	15.6	17.2	17.2	10.0%	0.4%
14	Suntory Ltd	일 본	13.7	13.6	14.4	-0.3%	5.6%
15	Grupo Petropolis	브 라 질	11.5	13.2	14.2	14.6%	8.1%
상위 15개사 소계			1,355.9	1,397.9	1,434.2	3.1%	2.6%

(자료: Impact Databank)

- 2011년 세계맥주 소비량은 약 18억 6400만 헥토리터로 2010년에 비해 2.4% 증가하였다. 상위 10개 맥주소비국 중 미국, 독일, 영국과 같은 전통적인 맥주 소비국들의 소비가 감소한 반면, 중국, 브라질, 멕시코 등 신진 맥주소비국들에서는 지속적으로 소비가 증가하고 있다.

2011 상위 10개 맥주 소비국

단위 : 백만 헥토리터

순위	국가	소비량						증감(%)
		1990	1995	2000	2005	2010	2011	10-11
1	중 국	69.2	155.4	223.2	309.3	449.6	490.1	9.0%
2	미 국	226.5	218.2	229.9	235.0	233.1	229.4	-1.6%
3	브 라 질	54.5	80.0	82.6	91.4	116.1	123.0	6.0%
4	러 시 아	33.4	19.8	55.3	87.2	93.3	95.4	-3.0%
5	독 일	113.6	111.0	103.1	95.0	87.9	87.7	-0.2%
상위 5개국 소계		497.2	584.3	694.0	817.9	984.9	1,025.5	4.1%
6	멕 시 코	37.0	40.8	50.4	57.5	63.5	65.5	3.0%
7	일 본	66.5	71.4	71.0	63.3	58.1	56.0	-3.7%
8	영 국	65.2	59.1	57.0	57.6	46.8	45.2	-3.5%
9	폴 란 드	11.3	15.2	22.3	30.7	34.3	34.9	1.6%
10	스 페 인	28.3	27.0	29.2	34.6	32.5	32.8	1.0%
상위 10개국 소계		705.4	797.8	923.8	1,061.6	1,220.2	1,259.9	3.3%
기타국가		404.9	413.3	440.5	497.1	554.1	556.5	0.4%
세계 총계		1,110.3	1,216.1	1,364.3	1,558.7	1,774.3	1,816.4	2.4%

○ 세계맥주 제조사들은 맥주의 신선함을 장기적으로 유지하는 기술 중 맥주산화를 촉진하는 기존살균기법을 비살균맥주 공법으로 전환하고 맥주 공정상의 산소혼입을 최소화하여 맥주의 신선하고 깨끗한 맛을 장기간 유지한다.

나. 개발기술의 산업화 방향 및 기대효과

1) 산업화 방향(제품의 특징, 대상 등)

○ 자국의 농산물소비, 농가소득 창출 및 국민경제에 미치는 영향이 매우 큰 산업으로 볼 수 있다. 국가 세수확보 및 관련 산업의 고용창출에도 큰 기여를 할 것이다. 선진국에 비해 아직 국내 소비자들의 맥주 음용량은 적은 편임을 감안하면 향후 다양한 고품질의 맥주가 시장에서 선보인다면 맥주시장은 한층 커질 것이며 이에 따라 국내 맥주산업 경쟁력도 한층 강화될 것으로 전망된다.

○ 건강한 삶을 추구하는 웰빙, 로하스 열풍과 더불어 부드럽고 도수가 낮은 술을 선호하는 경향에 비추어 국산보리를 이용한 고품질 프리미엄 맥주제조 기술의 개발은 시의적절하며 기술개발 후 실용화를 위해 지역맥주산업으로 연계시키는 것이 바람직할 것이다.

○ 한류 열풍으로 해외 시장에서 국산 술의 소비가 늘고 있으므로 기존의 맥주와 차별화된 고급맥주를 생산하여 해외 시장에도 진출을 고려해야 한다. 정부에서도 국내농산물을 주원료로 제조하는 전통주 사업의 경쟁력 강화를 위해 주세율 인하, 규제완화, 품질인증제 시행, 새로운 제조기술의 개발 등 정부차원의 지원이 강화될 필요가 있다.

2) 산업화를 통한 기대효과

(단위 : 백만원)

항 목 \ 산업화 기준	1차년도	2차년도	3차년도	4차년도	5차년도	계
직접 경제효과	0	50	100	500	1,000	1,650
경제적 파급효과	0	100	200	1,000	2,000	3,300
부가가치 창출액	0	200	400	2,000	4,000	6,600
합 계	0	350	700	3,500	7,000	11,550

- 1) 직접 경제효과 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 제품의 매출액 추정치
- 2) 경제적 파급효과 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통한 농가소득효과, 비용절감효과 등 추정치
- 3) 부가가치 창출액 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 수출효과, 브랜드가치 등 추정치

5. 3P(특허,논문,제품)분석을 통한 연구추진계획

가. 분석결과 향후 연구계획(특허, 논문, 제품 측면에서 연구방향 제시)

(1) 특허분석 측면

- 기존 특허는 수입맥아를 이용한 전통적인 당화과정에 치중되어 있으므로, 본 연구과제에서는 국산맥아에 대해 다양한 효소를 사용하는 방향으로 연구를 추진하여 이와 관련된 특허 등을 국내 및 국외에 출원할 계획임
- 기존 특허는 bacteriocin 을 첨가하는 분야에 치중되어 있으므로, 본 연구과제에서는 균주가 생산하는 (*in situ* production) 방향으로 연구를 추진하여 제조특허 등을 국내 및 국외에 출원할 계획임
- 기존 특허는 침전의 경우 침전물질의 분석 등 화학적 분야에 치중되어 있고 여과의 경우에는 주로 여과의 효율을 높이기 위하여 새로운 여과기 또는 여과포의 개발 및 여과보조제의 사용에 치중되어 있으므로, 본 연구과제에서는 침전과 여과의 물성적 특성을 규명하는 방향으로 연구를 추진하여 이와 관련된 특허 등을 국내 및 국외에 출원할 계획임
- 기존 특허는 보통 맥주(ale, lager)분야 응집제에 치중되어 있고, 본 연구 과제에서는 복분자의 펙틴, 홍삼의 사포닌과 같은 유용한 물질과 응집제의 관계에 대한 연구를 최초로 추진할 계획이다. 여과 과정에서 복분자 및 홍삼 맥주의 폴리페놀을 응집함으로써 탁도를 개선하고 유용한 성분들이 많이 남아 있게 기술을 개발함으로써 특허 등을 국내 및 국외에 출원할 계획이다.

(2) 논문분석 측면

- 해외에서는 효소를 이용하여 맥아의 당화과정과 여과능 향상을 시도하고 있으며 국내에서는 국산보리를 이용한 시도가 드물어 당화효소나 세포벽 분해효소, 단백질분해효소 등의 사용으로 수입맥아에 비해 비교적 품질이 부족한 것으로 알려진 국산보리의 맥주제조 가능성을 확인하는 방향으로 연구를 추진하여 국내외 저명 학술지 등에 게재할 계획임
- 기존 논문은 단지 맥아제조 시 젖산균을 접종하여 낮아진 pH를 이용한 논문 뿐이나 본 연구과제에서는 맥아와 보리의 ecosystem에 적합한 고유미생물을 사용하며 BLIS를 생산하며, hop에 내성이 없는 젖산균을 사용하여 맥주발효 전반에 걸쳐 오염을 제거하는 방향으로 연구를 추진하여 SCI급 학술지 등에 게재할 계획임

- 기존 논문은 맥주의 여과 분야, 특히 여과 시 맥주의 흐름성에 치중되어 있으므로, 본 연구과제에서는 여과 공정 자체와 함께 여과의 효율성을 높일 수 있는 침전의 mechanism과 침강 속도와 시간 등에 관한 연구를 추진하여 침전과 여과를 하나의 공정으로 하는 논문 등을 산업식품공학과 같은 학술지 등에 게재할 계획임
- pvpp, pvp, silica-gel등을 이용한 맥주의 폴리페놀을 응집하는 논문이 2005년도에 발표된 정도이며 복분자 및 홍삼맥주에 관련한 응집제에 대한 연구는 검색되지 않아 본 연구과제에서는 복분자 및 홍삼맥주에 펙틴 및 사포닌이 응집에 미치는 영향에 대한 연구를 추진하여 국내 및 국외 저명 학술지 등에 게재할 계획임

(3) 제품 및 시장분석 측면

- 주류시장의 최근 트렌드는 건강, 고급, 편의성이며 젊은 수요층에서 저알코올의 고급 음료를 선호하고 수입맥주의 증가폭이 점차 확대되고 있다. 따라서 순수 국산 원료만으로 제조한 고품격 프리미엄 맥주를 개발과 기능성을 부여하는 방향으로 소비자의 관심을 유도할 필요가 있음
- 국내 및 국외시장 분석결과, 국내 주류시장(2009년)은 출고액 기준으로 7조4000억 원이며 이중에서 맥주 비중이 48.7%로 가장 크다. 세계적으로도 독일, 영국 등은 주점 내 금연 및 기후변화 등으로 소비가 감소하는 반면에 러시아, 브라질, 중국은 소비가 증가하는 추세임
- 국산일반보리 프리미엄 맥주 제조기술의 개발을 차별화된 지역맥주 사업화에 활용하여 지역경제에 활성화를 일으킨다. 추후 전국적인 franchise 사업으로 확대하고 품질인증제를 통한 고급화와 상품화로 한식의 세계화 및 한류의 열풍과 더불어 해외시장으로의 진출 및 판매할 계획임

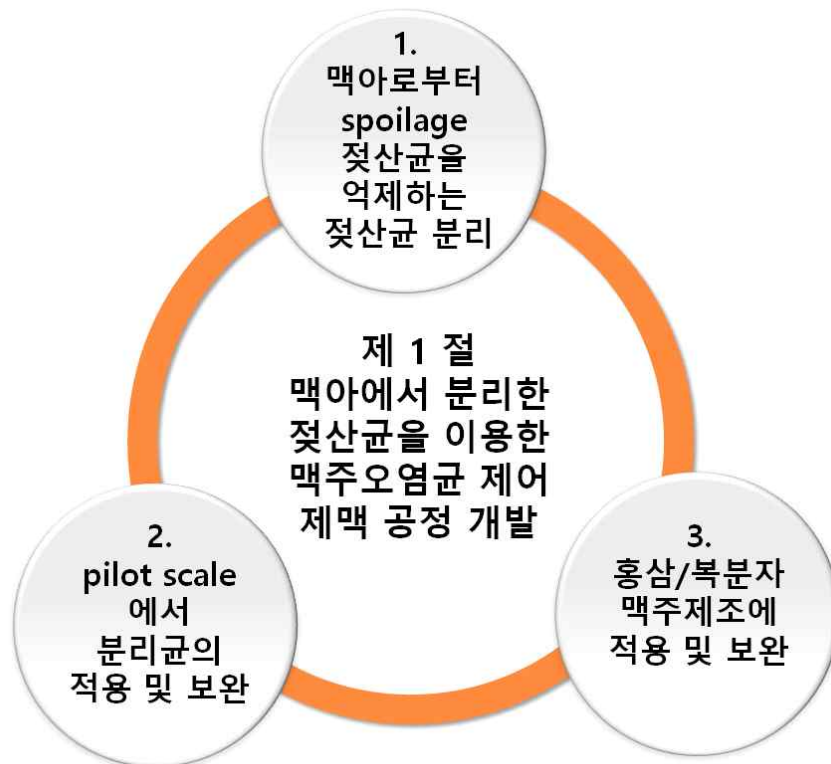
제 3 장 연구수행 내용 및 결과

코드번호

D-05

제 1 절 맥아에서 분리한 젖산균을 이용한 맥주오염균 제어 제맥 공정 개발

- 맥아로부터 분리한 bacteriocin 생산 균주를 맥주 제조 과정에 적용하여 bacteriocin 맥주의 제조 기술을 개발하였다. 발효 기간 중 유해균 제어능력을 확인하였으며 품질 및 관능평가를 통해 sour 맥주로써의 가능성을 보여주었다. 이 제조 기술에 홍삼/복분자의 최종 적용을 위한 이들의 첨가시기를 규명하였으며, 대조구로 광맥으로 제조된 맥주를 선택하였다. 홍삼/복분자의 첨가 시기는 발효가 완료된 후로 선택되었다.
- 국산 보리로 만들어진 맥아의 단점 중의 하나인 효소 활성의 증가 및 제맥 과정 중 유해균 저해를 위한 방법으로 제맥 과정에서 bacteriocin 생산균주를 starter로 적용하여 bio-acidified 맥아를 제조하였다. 무처리 맥아와 비교하여 wort quality 및 미생물 변화를 측정하였을 때 bacteriocin 생산 균주가 제맥 과정의 starter로서 사용가능성이 있다고 확인하였다.



1. 맥아로부터 spoilage 젖산균을 억제하는 젖산균 분리

가. 맥아로부터 BLIS 젖산균 분리

(1) 요약

Bacteriocin 생성균주를 분리하기 위하여 국내산 광맥과 수입산 Pilsner 맥아로부터 BLIS 생산 균주 분리를 시도하였다. BLIS 생산균을 분리하기 위해 사용된 방법은 triple agar layer method를 사용하였으며 생육억제환을 보인 colony는 백금이를 이용하여 새로운 MRS agar에 re-streaking 하여 독립된 colony를 얻었다. 약 2100 여장의 plate에서 116개의 BLIS 생산 의심 균이 선별 되었다. 선별된 균의 single colony를 각각 취해 master plate method를 실시하였고, BLIS 생산이 재확인된 colony만 취해 배양하여 25% glycerol stock 상태로 -80°C에 보관하였다. BLIS 선별된 균들 중 항균 spectrum이 가장 큰 32.1 과 64.1을 최종적으로 선택하였다. 이를 동정한 결과 *Pediococcus acidilactici* HW01 (32.1) 과 *Leuconostoc citrium* HW02 (64.1)로 확인되었다.

(2) 재료 및 방법

(가) 재료

실험에 사용된 맥아는 Pilsner type(Weyermann, 독일)과 국내산 2조맥인 광맥(국립식량과학원)을 이용하였다. Indicator로 사용된 균은 *Lactobacillus plantarum* NCDO 955을 MRS agar와 broth (De Man, Rogosa and Sharpe)에서 37°C, 1일간 배양 후 사용하였다.

BLIS 생산균을 분리하기 위해 triple agar layer method를 이용 하였다. 맥주의 대표적인 오염균인 *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus lindneri*, *Lactobacillus damnosus*, *Pediococcus clausenii*는 모두 KCTC (Korean Collection for Type Cultures)로부터 분양받아 실험에 사용되었다.

(나) BLIS(Bacteriocin Like Inhibitory Substance) 생산 균주 분리

맥아 (국산 및 수입산) 10 g을 90 mL의 4/1배 Ringer's solution과 섞어, stomacher로 30초간 균질화 한다. 균질액 100 μ l를 10mL의 modified MRS broth (mMRS broth)에 분주하여 30°C, 200 rpm의 조건으로 24시간 배양하는 enrichment culture를 실시한다.

배양된 시료는 serial dilution을 이용하여 10² cfu/ml로 조절한다. BLIS 생산균을 분리하기 위해 사용된 방법은 triple agar layer method로, 희석액을 mMRS agar (glucose 대신 maltose로 대체, 1% cyclohexide 10 μ l/mL, 1.5% agar) 5 mL에 섞어 pour plating한다. 그 위에 MRS agar (1% agar)를 5 mL 중층하고 혐기상태로 배양한다 (Gas Pack, 30°C, 24 h). 24시간 배양된 plate에 indicator(106 cfu/mL)를 5 mL의 MRS agar (1.5% agar)에 분주해 잘 섞은 후, pour plating 하여 30°C에서 24시간 배양한다. 생육억제환을 보인 colony는 백금이를 이용하여 새로운 MRS agar에 re-streaking 하여 독립된 colony를 얻는다.

(다) BLIS 생산 균주 확인

얻어진 colony는 단일 균임을 확인 하고, BLIS 생산 균임을 재확인하기 위해 Master plate method를 실시하였다. Master plate method는 BLIS 생성균이라고 확인되는 균을 streaking 하여 얻어진 single colony를 tooth picking을 통해 같은 2개의 배지에 같은 위치에 옮겨 심어 1개의 plate는 실험용, 1개의 plate는 보관용으로 준비한다. 실험용 배지위에 Indicator를 10^6 CFU/mL을 5mL의 MRS agar(10^6 CFU/ml)에 넣고 잘 섞은 후, pour plating하여 30°C에서 24h 배양하여 생육억제 환을 보인 colony만 보관용 plate에서 취해서 향후 실험을 위해 25% glycerol stock 한다.

(라) Broth에서 BLIS 생산 여부 확인

Master plate method를 이용하여 BLIS 생산 균주임이 확인된 균은 mMRS broth에 접종하여 30°C에서 48시간 배양하여 13,000 rpm, 15 min, 4°C의 조건으로 원심분리하여 상등액을 취해 5N NaOH를 이용하여 pH를 6.5로 조절하여 0.20 μ m filter로 filtration 한다. 하루동안 배양된 *Lb. plantarum* NCDO 955를 10^6 CFU/ml이 되게 접종하여 균힌 plate에 8mm의 well 뚫어 준비한다. pH 6.5로 조절된 상등액을 100 μ l 분주하고 4°C에서 8시간동안 diffusion 시킨 후, 37°C에서 24시간 배양하여 생육억제환의 생성 여부를 확인하는 agar well diffusion assay를 실시한다.

(마) 항균 spectrum 측정

맥주 spoilage 균으로 알려진 Gram positive (*Lb. brevis*, *Lb. lindneri*, *Ped. damnosus*), Gram negative 균 (*Pectinatus* spp., *Zymomonas* spp.) 및 진균류 (*Fusarium*, wild yeast) 들을 대상으로 위에서 설명한 agar-well diffusion assay를 실시한다.

(바) BLIS 생산 균주 동정

Agar와 Broth 상에서 모두 BLIS를 생성하는 것으로 확인된 균주는 당 발효 여부에 따라 동정이 가능한 API 50 CHL kit (bioMerieux Inc., Marcy l'Etoile, France)를 이용하여 1차 동정하였다. 그 후, 유전학적으로 동정이 가능한 16S rRNA sequencing을 실시하였고 NCBI의 BLAST를 이용하여 균을 동정하였다.

(3) 결과 및 고찰

(가) 국내산 광맥과 수입산 Pilsner 맥아로부터 BLIS 생산 균주 분리

광맥을 이용하여 Bacteriocin Like Inhibitory Substance 생산 균주 분리한 결과는 다음과 같다

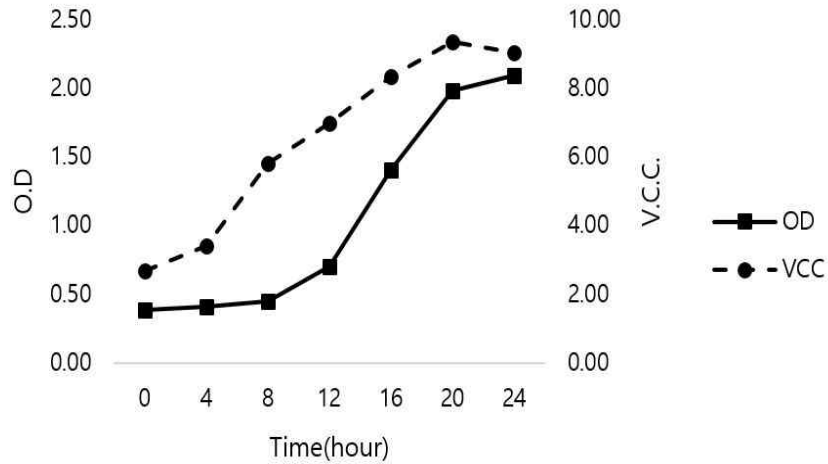


Fig. 1-1. 광맥 맥아 유래 젖산균의 생육 곡선

Fig.1-1은 국내산 광맥에 존재하는 젖산균 수를 enrichment culture method를 통해 증균 시킨 결과 이다. 초기에 광맥에 존재하는 젖산균의 수는 2 log cfu/mL로 존재했으며, 30°C에서 200 rpm으로 20시간 배양 된 후부터 9 log cfu/mL로 존재 하는 것을 확인 할 수 있다. 이는 Laitila et al에서 보고된 바와 같이 맥아의 초기 젖산균 수가 2 log cfu/g인 것을 확인 할 수 있었다.

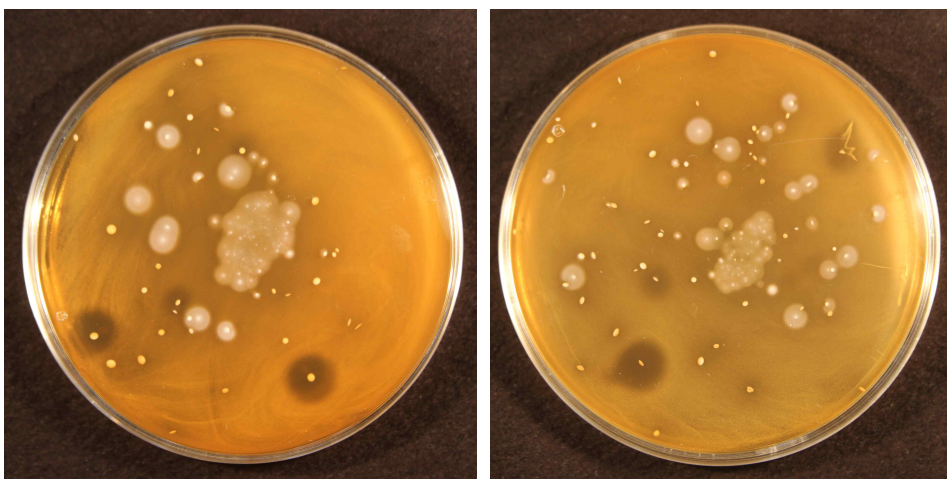


Fig. 1-2. 광맥을 이용한 triple agar layer method 결과

위의 결과는 광맥을 이용하여 Bacteriocin Like Inhibitory Substance 생산 균주 분리하기 위해 triple agar layer method를 실시하여 얻은 결과 사진이다. Bottom layer에 존재하는

colony가 BLIS을 생산하여, top layer에 위치하는 indicator인 *Lb. plantarum* NCDO 955를 저해하는 colony를 계수한 결과, 약 2100 여장의 plate에서 116개의 BLIS 생산 의심 균이 선별 되었다. 생육억제환을 보인 colony는 새로운 mMRS agar에 re-streaking하였다. 그 후, single colony를 각각 취해 master plate method를 실시하였고, BLIS 생산이 재확인된 colony만 취해 배양하여 25% glycerol stock 상태로 -80℃에 보관하였다.

Pilsner를 이용하여 Bacteriocin Like Inhibitory Substance 생산 균주 분리한 결과는 다음과 같다.

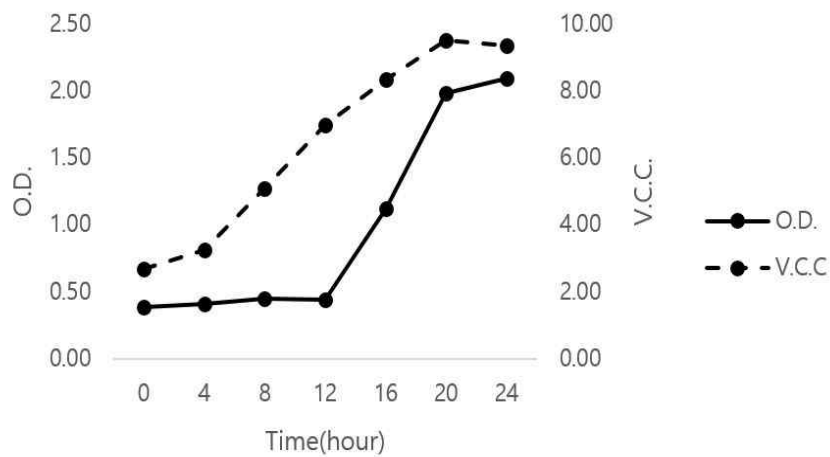


Fig. 1-3. Pilsner 맥아 유래 젖산균의 생육 곡선

위의 결과는 수입 맥아인 Pilsner에 존재하는 젖산균 수를 enrichment culture method를 통해 증균 시킨 결과이다. 초기에 광맥에 존재하는 젖산균의 수는 2 log cfu/mL로 존재했으며, 30℃에서 200 rpm으로 20시간 배양 된 후부터 9 log cfu/mL로 존재 하는 것을 확인 할 수 있다. 광맥과 마찬가지로 pilsner 역시 Laitila et al에서 보고된 바와 같이 맥아의 초기 젖산균 수가 2 log cfu/g인 것을 확인 할 수 있었다.

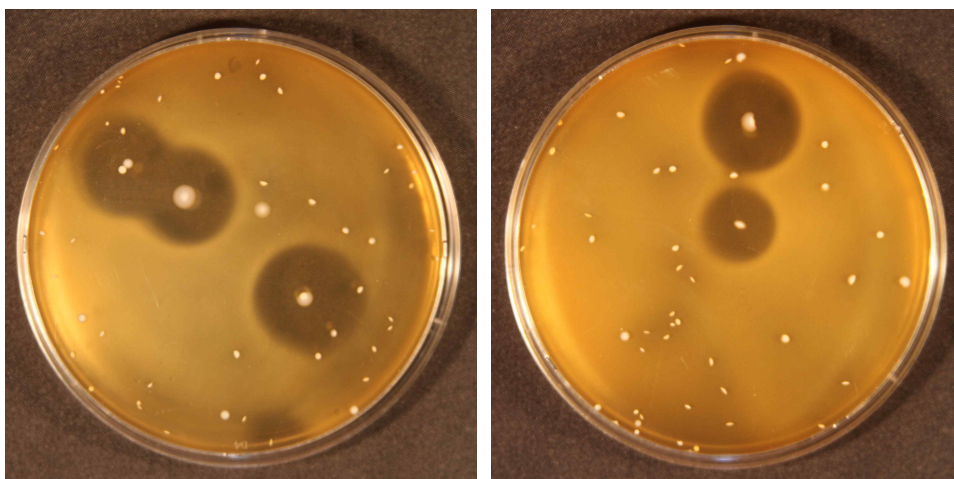


Fig. 1-4. Pilsner 맥아를 이용한 triple agar layer method 결과

Fig. 4는 pilsner를 이용하여 Bacteriocin Like Inhibitory substance 생산 균주 분리하기 위해 triple agar layer method를 실시하여 얻은 결과 사진이다. Bottom layer에 존재하는 colony가 BLIS을 생산하여, top layer에 위치하는 indicator인 *Lb. plantarum* NCDO 955를 저해하는 colony를 세분 결과, 약 1700 여장의 plate에서 120개의 BLIS 생산 의심 균이 선별 되었다. 생육억제환을 보인 colony는 새로운 mMRS agar에 re-streaking하였다. 그 후, single colony를 각각 취해 master plate method를 실시하였고, BLIS 생산이 재확인된 colony만 취해 배양하여 25% glycerol stock 상태로 -80℃에 보관하였다.

(나) Broth 상에 BLIS 생산 여부 확인

총 236개의 배양액을 agar well diffusion assay로 확인 한 결과, 22개의 배양액에서 indicator를 저해하는 생육 억제환을 확인 할 수 있었다. 배양액의 pH와, 생육저해환의 크기에 따라 낮은 pH와 가장 큰 생육 억제환을 보인 3종(32.1, 49, 64.1번)을 선별 하였다.

(다) 항균 spectrum 확인

Table 1-1. 맥아로부터 분리된 BLIS 생성균의 항균 spectrum

Strain	Species	Inhibition ^a		
		32.1	49	64.1
Gram positive bacteria	<i>Lactobacillus plantarum</i> NCDO 955	++	++	+++
	<i>Lactobacillus lindneri</i> KCTC 5088	-	-	-
	<i>Lactobacillus brevis</i> KCTC 3498	-	-	-
	<i>Pediococcus damnosus</i> KCTC 3770	++	++	+++
	<i>Pediococcus claussenii</i> KCTC 3811	-	+	+++
Gram negative bacteria	<i>Pectinatus cerevisiiphilus</i> ATCC 29359	-	-	-
	<i>Zymomonas mobilis</i> subsp. <i>mobilis</i> KCTC 2414	-	-	-
Eumycetes	<i>Fusarium</i> sp. KCTC 26761	-	-	-
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 13264	-	-	-

Abbreviations : MRS, Lctobacilli MRS agar; Zymomonas, Zymomonas medium; Malt Extract, Malt Extract agar; YM, YM agar

^a : -, absence of inhibition zond; +, 1 to 10 mm; ++, 11 to 20 mm; +++, above 21 mm (diameter of inhibition zone)

Table 1-1은 최종 선정된 분리균 3종의 향균 spectrum을 한 결과이다. Gram 양성균 중 *Lb. plantarum*, *Ped. damnosus*는 3균주 모두 저해하였으나 그 활성은 64.1번이 가장 큰 활성을 가졌고, 32.1번과 49번은 그보다는 작은 활성을 가졌다. *Pediococcus clausenii*의 경우, 64.1이 가장 큰 활성을 가졌으며, 49번의 경우 작은 활성을 가졌고 32.1의 경우 저해하지 못하였다. 선발된 균들 중 향균 spectrum이 가장 큰 64.1을 최종적으로 선택하였다.

(라) 분리 균의 동정

Table 1-2. API 50 CHL을 이용한 동정

No.	test	Sugar substrate	64.1	No.	test	Sugar substrate	64.1
0	CTRL	CONTROL	-	25	ESC	Esculin ferric citrate	+
1	GLY	GLYcero	-	26	SAL	SALicin	+
2	ERY	ERYthritol	-	27	CEL	D-CELLobiose	+
3	DAR A	D-ARAbinose	-	28	MAL	D-MALtose	+
4	LAR A	L-ARAbinose	+	29	LAC	D-LACtose	-
5	RIB	D-RIBose	+	30	MEL	D-MELibiose	-
6	DXY L	D-XYLose	-	31	SAC	D-SACcharose	+
7	LXY L	L-XYLose	-	32	TRE	D-TREhalose	+
8	ADO	D-ADOnitol	-	33	INU	INUlin	-
9	MDX	Methyl-βD-Zylopyranoside	-	34	MLZ	D-MeLeZitose	-
10	GAL	D-GALactose	+	35	RAF	D-RAFfinose	-
11	GLU	D-GLUcose	+	36	AMD	AMiDon	-
12	FRU	D-FRUctose	+	37	GLY G	GLYcoGen	-
13	MNE	D-MaNosE	+	38	XLT	XyLiTol	-
14	SBE	L-SorBosE	-	39	GEN	GENitobiose	+
15	RHA	L-RHAmnose	-	40	TUR	D-Turanose	+
16	DUL	DULcitol	-	41	LYX	D-LYXose	-
17	INO	INOsitol	-	42	TAG	D-TAGatose	-
18	MAN	D-MANnitol	+	43	DFU C	D-FUCose	-
19	SOR	D-SORbitol	-	44	LFUC	L-FUCose	-
20	MDM	Methyl-αD-Mannopyranoside	-	45	DAR L	D-ARAbitoL	-
21	MDG	Methyl-αD-Glucopyranoside	+	46	LAR L	L-ARAbitoL	-
22	NAG	N-AcetylGlucosamine	+	47	GNT	potassium GlucoNaTe	+
23	AMY	AMYgdalin	+	48	2KG	potassium 2-ketoGluconate	+
24	ARB	ARButin	+	49	5KG	potassium 5-KetoGluconate	-

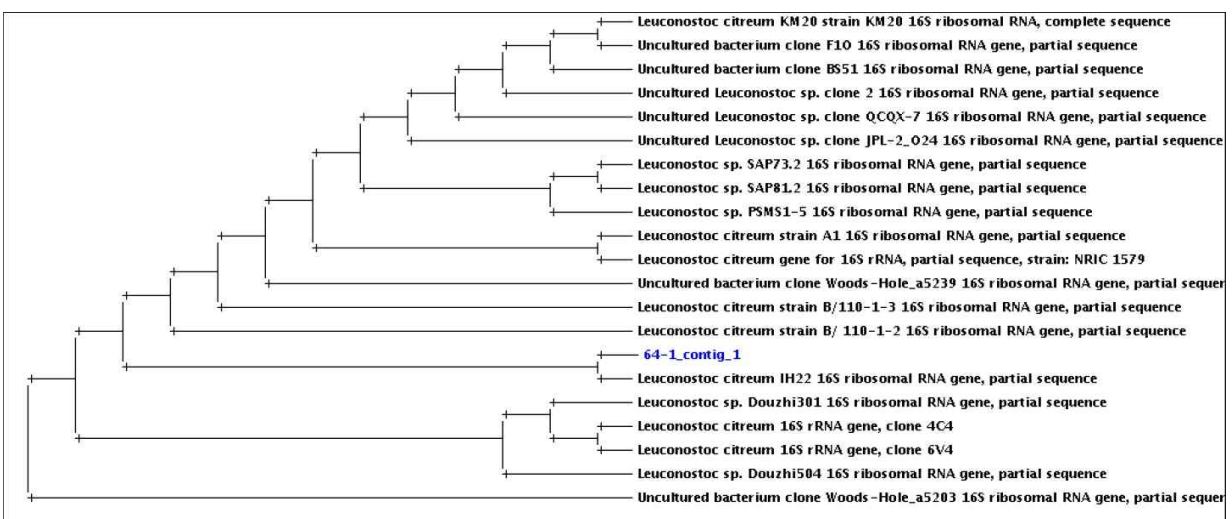


Fig. 1-5 64.1번 균주의 16s rRNA sequence이용한 계통수

최종 선발된 64.1을 Gram test와 catalase test, 현미경 관찰을 통한 형태학적특성을 확인하였다. Gram 양성, catalase 음성 그리고 포자를 형성하지 않은 비 운동성의 coccobacilli 형태로 확인되었다. 그리고 API 50 CHL kit을 이용하여 당 이용성(Table 2)에 따라 동정한 결과, *Lactobacillus brevis*(96.4%)와 매우 유사한 것으로 판정 되었다. 보다 정확한 동정을 위해 균의 16s rRNA 염기서열을 분석하고, NCBI(National Center for Biotechnology Information)의 blast program을 이용하여 GenBank에 등록된 다른 16s rRNA 유전자들과 그 상동성을 비교하였다. 그 결과 64.1은 *Leuconostoc citreum*과 99.9% 상동성을 갖는 것으로 판정되어 *Leuconostoc citreum* HW 02이라 명명하였다.

나. 분리된 젖산균의 hop 내성 및 맥주 오염균 여부 확인

(1) 요약

BLIS로 분리된 균들 중 64.1인 *Leuconostoc citreum* HW02의 hop 내성 여부를 확인하였다. 분리균을 30% iso- α -acid으로 제조된 mMRS broth에 접종하여, 25°C에서 30일간 배양 후 turbidity, ropiness 생성을 분석한다. 또한 맥주 오염 여부의 확인이 가능한 ABD medium을 통한 오염가능 여부를 확인하였다. 분리된 균의 경우 hop에 저항성이 ABD 배지에서 자라지 않아 맥주를 오염시킬 가능성은 없었다.

(2) 재료 및 방법

(가)재료

맥주의 대표적인 오염균인 *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus lindneri*, *Lactobacillus damnosus*, *Pediococcus clausenii*는 모두 KCTC (Korean Collection for Type Cultures)와 BLIS 분리 균인 *Leuconostoc citreum* HW02의 hop의 내성실험을 위해 30% iso- α -acid는 독일의 Barthhaas group으로부터 얻은 Isohop®을 이용하여 실험하였다. ABD medium 제조를 위하여 MRS broth (powder), sodium acetate, cycloheximide, agar, beer를 사용하였다.

(나) 분리균의 hop 내성 확인

분리균을 30% iso- α -acid(Isohop®, BarthHaas Group, Germany)를 이용하여 15IBU (International Bitterness Unit)으로 제조된 mMRS broth에 접종하여, 25°C에서 30일간 배양 후 turbidity, ropiness 생성을 분석한다. 필요한 30% iso- α -acid의 양은 업체에서 제공한 다음 식을 통해 구한다.

$$BU \times \frac{100}{80} \times \frac{100}{1000} \times \frac{100}{30} \times \frac{1}{1.075} mL/hL$$
$$= BU \times 0.39 mL/hL$$

(다) 맥주 오염균 여부 확인

맥주 오염균 분별 배지인 ABC 배지를 이용하여 맥주 오염 균 여부를 확인한다. 분리균을 접종한 ABD 배지는 25°C에서 14일간 배양시켰으며 colony의 생성 여부로 맥주 오염균인지 확인 한다. 배지의 조성은 Table 1-3 과 같다.

Table 1-3. ABD배지 조성

ABD media	
MRS broth (powder)	2.61 g
Sodium acetate	0.5 g
Cycloheximide ¹	10 mg
Agar	15.0g
Beer	1000 mL
Final pH	5.0

배지는 1L의 증류수에 녹여 사용한다.

¹⁾ Cycloheximide는 양조효모의 생육을 억제하기 위해 첨가하며, 목적에 맞게 선택하여 사용할 수 있다.

(3) 결과 및 고찰

(가) 분리균의 hop 내성 확인 및 맥주 오염균 여부 확인

Table 1-4. ABD 배지에서 BLIS 생성균과 맥주 오염균의 생육확인

Strain	Species	detection time ¹⁾	Beer spoilage ability
BLIS producer strain	<i>Leuconostoc citreum</i>	ND ²⁾	-
Beer spoilage strains	<i>Pediococcus damnosus</i> KCTC 3770	4	+
	<i>Pediococcus claussenii</i> KCTC 3811	3	+
	<i>Lactobacillus lindneri</i> KCTC 5088	4	+
	<i>Lactobacillus brevis</i> KCTC 3498	3	+

¹⁾ Detection time on ABD medium is shown in days. Experiments were conducted in triplicate.

²⁾ Not detected

15 BU으로 제조된 mMRS broth에 *Leu. citreum* HW 02을 접종하여 배양시킨 결과, hop에 내성이 있어 생육이 가능한 것을 확인 할 수 있었다. Table 1-4은 분리된 *Leu. citreum* HW 02과 맥주 오염균으로 알려진 4가지 균주를 맥주 오염균 분별 배지인 ABD 배지에 접종하여 생육을 확인한 결과이다. 맥주 오염균에 비해, 분리균은 생육하지 않은 것으로 미뤄 보아 hop에는 내성이 있지만 맥주 환경에서는 생육이 어려운 것으로 볼 수 있다.

다. 분리된 젖산균의 BLIS 생산 조사

(1) 요약

분리균을 mMRS broth에 접종하여 다양한 온도범위 (5, 30, 60℃)에서 배양하면서 균주의 성장에 따른 pH 변화와 생균수, pH의 변화 및 BLIS 생산 (arbitrary unit, AU)을 측정한다. 확인된 Kinetics를 통하여 30℃에서 배양한 경우 최대 160 AU/ml의 활성을 보였으며 pH감소폭이 가장 컸다. 또한 고온의 조건에서는 생육이 불가능 한 것으로 볼 때 맥주의 제조 과정 중에 당화 단계에서 사멸이 가능할 것으로 추측된다.

(2) 재료 및 방법

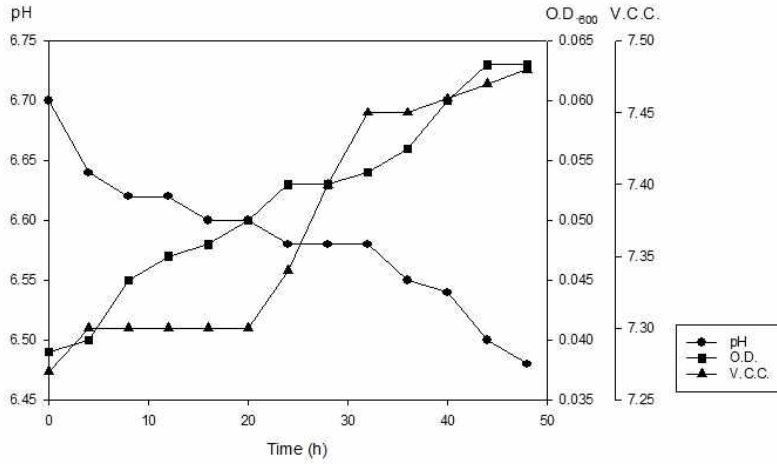
(가) BLIS 생산 Kinetics 확인

Leuconostoc citrium HW02는 MRS agar와 broth (De Man, Rogosa and Sharpe)에서 30℃, 1일간 indicator로 사용된 균은 *Lactobacillus plantarum* NCDO 955을 MRS agar와 broth 37℃, 1일간 배양 후 사용하였다. 분리균을 mMRS broth에 접종하여 다양한 온도범위 (5, 30, 60℃)에서 배양하면서 균주의 성장에 따른 pH변화와 생균수, pH의 변화 및 BLIS 생산 (arbitrary unit, AU)을 측정한다. AU는 생육억제를 보인 최고 희석배수의 역수/ml로 나타낸다.

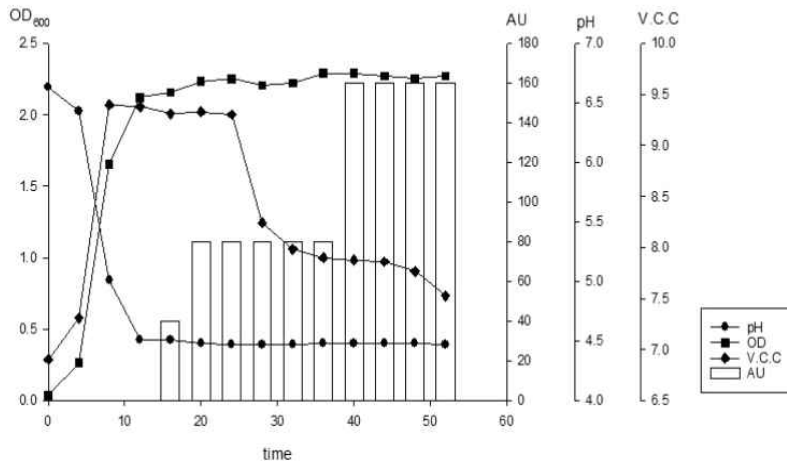
(3) 결과 및 고찰

(가) BLIS 생산 Kinetics 확인

(a)



(b)



(c)

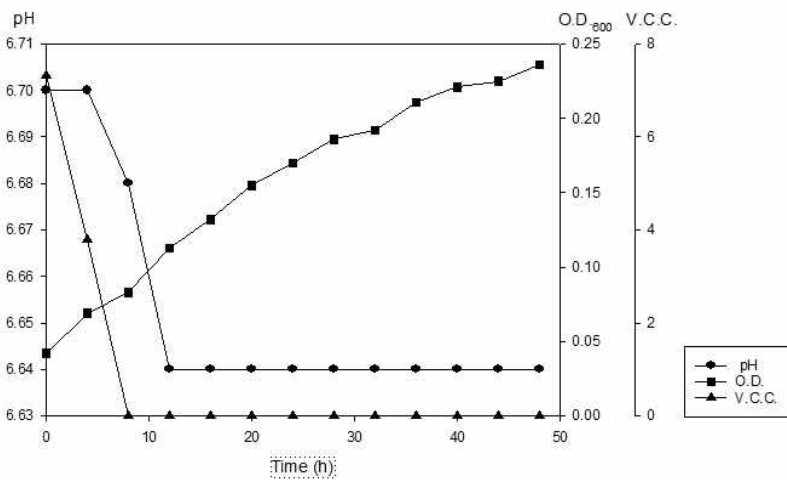


Fig. 1-6 온도별 *Leu. citreum* HW02의 성장 및 BLIS 생산 조사, (a); 5°C, (b); 30°C, (c); 60°C.

Leu. citreum HW 02의 초기 접종량은 약 7 log cfu/ml 이었다. 5℃에서 배양한 경우, 배양 시간 48시간동안 7 log cfu/ml을 유지하였으나, 성장 속도가 더디었고 pH 또한 6.70에서 6.44로 그 감소폭이 0.26으로 매우 적음을 확인 할 수 있었으며, BLIS 생산 정도를 파악 할 수 있는 arbitrary unit도 측정이 불가능 하였다. 30℃에서 배양한 경우, 배양시간 8시간 때에 9 log cfu/ml까지 자랐음을 확인 할 수 있었고, pH는 초기 6.63에서 4.47로 감소 한 것을 확인 할 수 있었다. BLIS 생산은 배양 16시간 때 40 AU/ml로 측정되어, 40시간에서 최대 활성인 160 AU/ml을 보였으며 배양 종료까지 그 활성이 유지 되었다. 60℃에서 배양한 경우, 배양 8시간째 3 log cfu/ml로 큰 폭 감소하며 사멸하였다. 즉 고온의 배양조건에서는 cell death를 초래한다는 결과를 보여준다.

국산 광맥 맥아와 수입산 pilsner 맥아로부터 최종 분리된 *Leu. citreum* HW 02은 hop에 내성을 가지고 있지만, 맥주환경과 비슷한 ABD배지에서 자라지 않아 맥주를 오염시킬 가능성은 없으며, 고온의 조건에서는 생육이 불가능 한 것으로 판단 할 수 있었다.

2. pilot scale 에서 분리균의 적용 및 보완

가. 분리된 맥아를 이용한 제맥

(1) 요약

맥아에서 분리한 Bacteriocin Like Inhibitory Substance 생산 균주 중 동정이 완료된 64.1과 32.1균주 중에서 32.1 균주인 *Pediococcus acidilactici* HW01을 실험에 사용하였다. *P. acidilactici* HW01을 이용하여 만들어진 젖산균 배양액을 제맥 과정 중 steeping 과정에 적용하여 bio-acidified malt의 제조를 하였다. 보리 제맥 적성 평가 및 bio-acidified 맥아 품질 평가를 실시하였다. 원료보리 및 bio-acidified 맥아의 pH, 미생물, 효소분석에는 pH meter, plate count agar (PCA), MRS agar, YM agar, Pseudomonas agar, 곰팡이의 번식을 억제 하기 위한 0.001%의 cycloheximide, α , β -amylase, β -glucanase activity 분석을 위한 megazyme kit가 사용되었다. 실험결과 제맥과정 중 유해균의 감소가 확인되었으며 원료보리에 비해 germination 직후, kilning 직후 모두 enzyme activity가 증가한 것을 확인되었다. 이는 당화효율 증진 및 맥주 점도의 감소에 도움을 줄 것으로 추측된다.

(2) 재료 및 방법

(가) 분리균 선별

1차년도에서 맥아에서 분리한 32.1번 균주(*Pediococcus acidilactici*)와 64.1번 균주(*Leuconostoc citreum*) 중에서 32.1번 균주를 사용하였다. *Pediococcus acidilactici* 경우, 맥주 대표 오염균인 *Pediococcus damnosus*, *P. clausenii*를 강하게 저해하고, hop에는 내성이 있으나 맥주환경으로 구성되어 있는 ABD배지에서는 증식하지 않아 맥주를 오염시킬 가능성은 없으며, 고온의 조건에서 생육이 불가능하며, 미생물학적으로 안정적인 활성을 가지므로 bio-acidified 맥아를 제조하는 starter로서 사용이 가능하다고 판단되었다.

(나) 젖산균 배양액을 이용한 제맥 방법

우선 Malting 방법은 다음과 같다. 맥아를 만들기 전에 잡초, 돌 등 이물질을 제거하고, 증류수를 이용하여 깨끗하게 세척하며 위에 뜨는 쪽정(혹은 껍질)등을 고운 망을 이용하여 제거한다. 보리 1kg 기준 젖산균 배양액과 증류수 1L를 혼합한 후 2일간 12℃에서 steeping 하고, 침맥과정 중 두 번 air rest를 각각 12시간 실시한다. 침맥 후 국산 2조 맥주보리에 수분함량이 45-46% 되었는지 확인한다.

침맥 후 14℃, 98% RH(Relative humidity)에서 6일간 발아 시킨다. 곰팡이의 증식을 막기 위해 중간 중간 잘 섞어주었으며, 뿌리가 보리의 75-100% 길이로 자란 것을 확인하고 발아를 종료한다.

보리 발아의 진행을 멈추기 위해서 standard kilning condition에 따라 45℃에서 85℃로 단계적으로 상승시켜 건조시킨다. 26.5시간 kilning한 후 수분이 약 4% 되었는지 확인하고 kilning을 종료한다. Kilning후 건조된 맥아를 roller mill로 분쇄한다. Standard kilning condition는 다음과 같다.

Table 1-5 Standard kilning condition for manufacturing of malt

Step	Time(hr)	Temperature(℃)
Kilning 1	0.5	45
Kilning 2	1.0	50
Kilning 3	2.5	55
Kilning 4	3.5	60
Kilning 5	7.5	63
Kilning 6	3.5	68
Kilning 7	2.5	75
Kilning 8	2.0	78
Kilning 9	1.0	83
Kilning 10	1.0	85
Kilning 11	0.5	70
Kilning 12	1.0	40

(다) 보리 제맥 적성 평가 및 bio-acidified 맥아 품질 평가

보리 제맥 적성 평가는 다음 방법을 사용하였다. 2조 광맥 보리를 American Society of Brewing Chemists (ASBC) 방법에 준하여 thousand grain weight, germination rate(발아율)을 측정하고, moisture analyzer를 이용하여 moisture content를 측정하고 Kjeldahl법을 이용하여 조단백질 함량을 산출한다.

Bio-acidified 맥아 품질 평가는 다음과 같이 진행하였다. 젖산균 배양액을 steeping과정에서 첨가하여 제맥한 bio-acidified 맥아를 American Society of Brewing Chemists (ASBC) 방법에 준하여 thousand grain weight, moisture content, 조단백질 함량을 측정한다.

(마) 원료보리 및 bio-acidified 맥아의 pH, 미생물, 효소 분석

제맥 과정 중 원료보리, steeping이후, germination이후, kilning이후로 4단계로 나누어 pH와 미생물 분석을 실시하였고, 이 결과를 종합하여 가장 좋은 효과를 나타낸 젖산균 배양액 비율을 결정하였다. 모든 실험은 젖산균 배양액을 steeping water에 넣지 않고 같은 방법으로 제맥한 맥아를 control로 비교하여 실험하였다.

① pH 측정

보리 10g과 3차 증류수 90mL을 stomacher bag에 넣어 균질화 시킨다. Stomacher bag의 filter를 통해 나온 용액을 시료액으로 하여 pH meter(ORION 3 STAR, Thermo, Singapore)를 사용하여 3반복 측정하였다.

② 미생물 분석

대상미생물 균은 호기성균, 젖산균, 효모, *Pseudomonas* spp.이며 이들은 각각 plate count agar (PCA), MRS agar, YM agar, Pseudomonas agar에서 배양하여 plate counting하여 생균수를 측정한다. 이때 곰팡이의 번식을 억제하기 위해 0.001%의 cycloheximide 첨가하여 조제한다.

③ 효소 분석

각 단계별로 보리를 분쇄해 megazyme kit를 이용하여 α , β -amylase, β -glucanase activity를 측정한다.

(3) 결과 및 고찰

(가) 보리 제맥 적성 평가 및 bio-acidified 맥아 품질 평가

국산 보리 2조 광맥의 제맥 적성을 평가하기 위해서 thousand grain weight, germination rate, percentage of germination, barley moisture, barley protein을 선정하였으며, 그 결과는 다음 Table 1-6에 나타내었다.

Table 1-6. 2조 광맥 보리 제맥 적성 평가 실험 결과

분석항목	광맥
Thousand grain weight (g)	42.9 ± 2.0
Germination rate (%)	96.9 ± 1.1
Percentage of germination (%)	98.9 ± 0.2
Barley moisture (%)	10.7 ± 0.4
Barley protein (%)	11.5 ± 2.6

Bio-acidified malt의 품질평가를 위해서 yield, thousand grain weight, malt moisture, malt protein, germination energy를 선정하여 분석을 실시하였다. 그 결과는 다음 Table 1-7에 나타내었다

Table 1-7. Bio-acidified malt의 맥아 품질 평가 실험 결과

분석항목	Bio-acidified malt
Yield (%)	85.13
Thousand grain weight (g)	41.8
Malt moisture (%)	3.6
Malt protein (%)	11.2
Germination energy (%)	38

맥아 수율 원맥 건물중(dry weight)에 대한 제맥 후 맥아(뿌리를 제거한 맥아) 건물중의 비율로 계산한다. 일반적으로 80% 이상이면 양호한 것으로 보는데, bio-acidified malt의 경우 85.13%로 80%를 넘는 수율을 보였다. Germination energy의 경우 일반 보리의 경우 98% 이상의 결과를 보이거나, bio-acidified malt의 경우 아주 낮은 germination energy를 갖는다. 이는 젖산균을 침맥 과정 중에 첨가하였을 때, 젖산균이 보리가 발아하는 것을 어느정도 방해한다고 볼 수 있다. 하지만 젖산균을 침맥 과정 중에 사용했을 때 malting 과정 중 일어날 수 있는 미생물 오염을 방지할 수 있다. Malting 과정은 침맥, 발아 과정 중 수분이 다량 동반되므로 수분을 좋아하는 곰팡이가 자라기 좋은 조건이다. 보리가 잘 발아하는 것도 중요하지만, 그 과정에서 일어날 수 있는 오염을 방지하여 보리의 품질을 유지하는 것 또한 중요하다. 발아는 총 6일간 진행되기 때문에, germination energy가 낮더라도 6일 기간 동안에 모든 보리가 발아함을 확인할 수 있었다.

(나) 원료보리 및 bio-acidified 맥아의 pH, 미생물, 효소 분석

보리 1kg 기준 증류수 1L만을 넣고 제맥한 sample을 control이라하고, 증류수 1L와 함께 젖산균 배양액 150ml을 함께 넣고 제맥한 sample을 150이라고 하였다.

① pH 측정

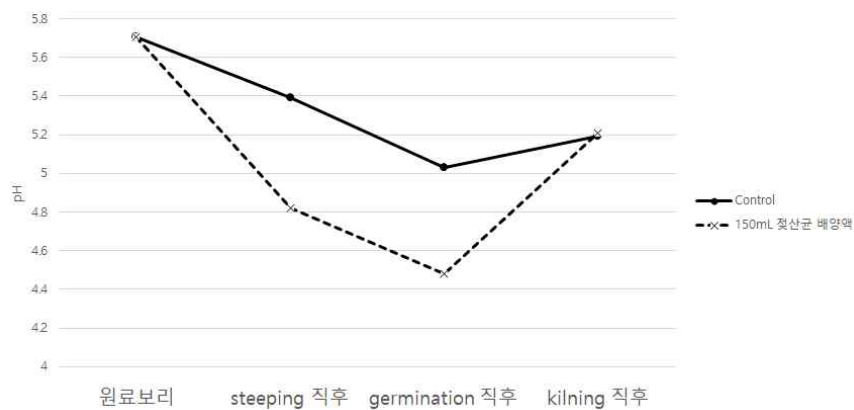


Fig. 1-7. 제맥 과정 중 pH의 변화

침맥 과정 중 젖산균 배양액을 인위적으로 첨가하였기 때문에 steeping 직후의 pH와 germination 직후의 pH가 control에 비해 낮아진 것을 확인할 수 있다. 이는 젖산균이 생성하는 다양한 유기산이 첨가한 배양액 안에 존재하였기 때문이다. 하지만 kilning 이후 pH를 측정하였을 때 control과 bio-acidified malt간의 차이가 없었다. 이는 건조과정 중에 보리 표면에 있었던 유기산 성분들이 수분과 함께 같이 증발한 것으로 보인다.

② 미생물 분석

제맥 과정 중 미생물 분석을 위해 대상미생물군으로 삼은 미생물은 aerobic bacteria, lactic acid bacteria, yeasts, *Pseudomonas* spp. 이며, 그 결과는 아래와 같다.

(A)의 경우 aerobic bacteria로 plate count agar를 사용하여 plate counting을 실시하였다. Steeping 직후 150mL sample의 균수가 2log 정도로 크게 증가하였는데, 이는 젖산균 배양액 속에 존재하는 젖산균에 의한 것으로 보인다. Germination 직후와 kilning 직후에는 균수에 크게 차이를 보이지 않는 것도 확인할 수 있었다.

(B)의 경우 lactic acid bacteria로 MRS agar를 사용하여 plate counting을 실시하였다. Steeping 직후, germination 직후, kilning 직후에서 모두 control 보다 2~4log 정도 높은 값을 보였다. 이는 인위적으로 넣어준 젖산균 배양액 안에 존재하는 젖산균들에 의한 것이다. Steeping 과정에서 젖산균들이 보리 표면에 존재하는 것으로 보여진다.

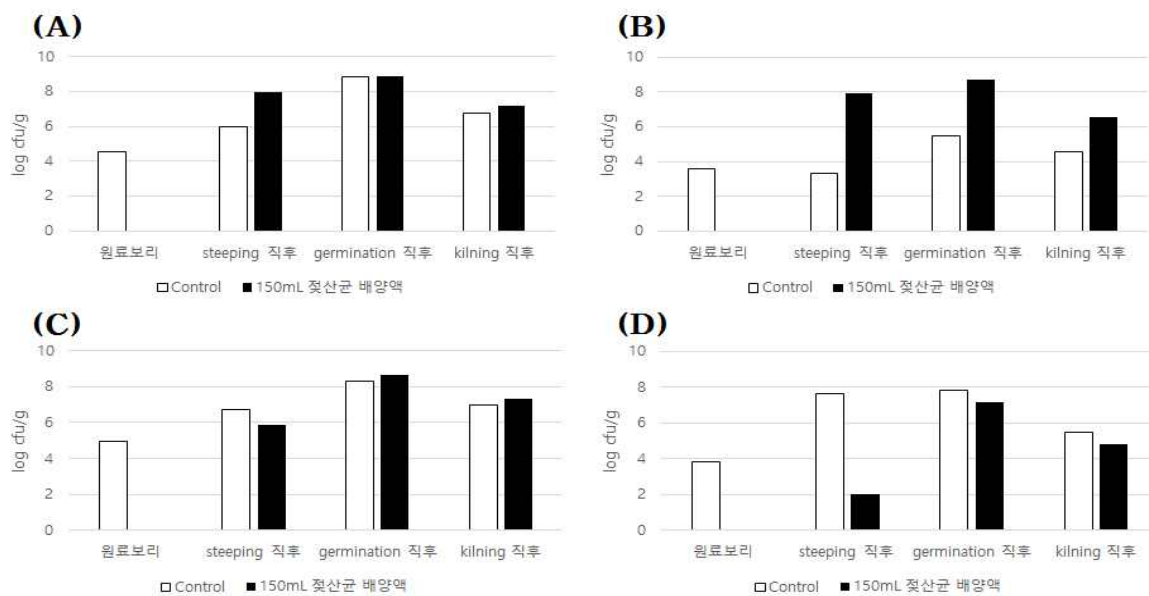


Figure 8. 제맥 과정 중 미생물의 변화, (A) : Aerobic bacteria, (B) : Lactic acid bacteria, (C) : Yeasts, (D) : *Pseudomonas* spp.

(C)의 경우 yeasts로 실험결과를 보면 steeping 직후에 150mL sample의 생균수가 더 적은 것을 확인하였으나, germination과 kilning 직후 yeast의 균수는 차이를 보이지 않았다.

(D)의 경우 *Pseudomonas* spp.로 대표적인 gram(-) 균이다. 실험 결과를 보면, steeping 직후 눈에 띄게 *Pseudomonas* spp. 미생물이 6log 이상 감소한 것을 확인할 수 있다. 이는 제맥 시 이용한 젖산균(*Pediococcus acidilactici*)이 gram(+)균 뿐만 아니라 gram(-)균 중

Pseudomonas spp. 미생물을 효과적으로 억제할 수 있다는 것을 의미한다. 제맥 과정은 수분이 다량 동반되는 과정이기 때문에 수분이 있는 곳에서 잘 자랄 수 있는 미생물의 오염을 동반할 수 있다. 그렇기 때문에 젖산균을 이용하여 젖산균이 생성하는 다양한 유기산, BLIS(Bacteriocin-Like Inhibitory substances)와 같은 물질들이 맥주 제조 공정 중 일어날 수 있는 오염 미생물을 억제할 것이라고 예상된다.

③ 효소 분석

제맥 과정 중 enzyme activity의 변화는 다음과 같다. 분석항목은 α -amylase, β -amylase, β -glucanase로 선정하였다.

Table 1-8. 제맥 과정 중 enzyme activity의 변화

		원료보리	steeping 후	germination 후	kilning 후
α -amylase (unit/g)	Control	6.312	6.6276	89.946	112.3536
	150 mL		7.2588	46.3932	93.102
β -amylase (unit/g)	Control	9.95	10.8941	21.5518	17.812
	150 mL		11.9973	22.8717	18.9711
β -glucanase (unit/kg)	Control	47.45	36.6525	165.1877	53
	150 mL		31.7466	154.3946	61.97

α -amylase의 경우 endoglycosidase로 전분의 α -1,4 결합을 내부에서 끊는 효소이다. 그렇기 때문에 당도에는 영향을 적게 주지만, 점도를 증가시키는 dextrin을 생성하기 때문에 점도에 영향을 크게 미치는 액화효소(liquefying enzyme)이다. β -amylase의 경우 exoglycosidase로 전분의 α -1,4 결합을 외부에서 끊어 결과적으로 glucose unit을 생성한다. 그렇기 때문에 당도에는 영향을 크게 미치나 점도에는 영향을 미치지 않는 당화효소(saccharifying enzyme)이다. β -glucanase는 보리의 endosperm을 두르고 있는 세포벽을 약 75%정도 구성하고 있는 β -glucan을 분해시켜주는 효소이다. β -glucan의 함량이 증가할 경우 맥즙의 점도가 높아져 맥주 제조 공정에서 문제를 일으킬 수 있다. 그렇기 때문에 맥주의 점도를 줄이기 위해서 β -glucanase를 인위적으로 넣어주기도 한다.

원료보리에 비해 germination 직후, kilning 직후 모두 enzyme activity가 증가한 것을 확인할 수 있었다. 특히 germination 직후 두 sample 모두 효소 활성이 크게 증가하였는데, 그 이유는 발아 과정에서 보리 자체의 호르몬 작용으로 인해서 모든 효소가 활성화되기 때문이다. 최종적으로 kilning 이후 측정된 효소활성을 보면, 젖산균 배양액을 넣지 않고 제맥한 control에서 크게 증가된 항목은 α -amylase이며, 150mL 젖산균 배양액을 넣고 제맥한 sample이 증가된 항목은 β -amylase, β -glucanase이다. α -amylase의 경우 점도에 영향을 미치는 액화효소이므로, control wort에서 높은 점도를 보일 것이라고 예상할 수 있다. β -amylase의 경우 당화효소이므로, 효모의 먹이가 될 수 있는 단일 glucose unit을 더 잘 생성할 것임을 예상할 수 있다. β -glucanase의 경우 역시 control 맥즙에 비해 150mL sample이 더 효소 활성이 증가하였으므로, 이는 wort의 점도를 낮출 것이라고 예상된다.

나. Bio-acidified 맥아의 맥즙 및 당화 적성 분석

(1) 요약

Bio-acidified 맥아를 이용한 맥즙 및 당화적성 평가를 실시하였다. pH, extract content, free amino nitrogen 등의 항목을 측정하였으며 실험결과 대조구인 광맥으로만 제조된 맥아와 wort quality를 비교하여 유의적 차이를 보이지 않았고 대신 filtration time이 대조구에 비하여 크게 감소하였다. 최종 wort에 균이 존재하지 않았으므로 *P. acidilactici* HW01 균주가 제맥과정의 starter로서 사용가능성이 있다고 생각되어진다.

(2) 재료 및 방법

(가) 재료

담금과정 후 맥즙 분석 및 품질평가와 발효분석에서는 milling을 위하여 디스크형 분쇄기가 사용되었으며, 당화를 위해서 당화조, 주름진 여과지 No.597 1/2 (Whatman, Germany)가 사용되었으며, 소모품으로는 blue pipet tip, petri dish, 메스실린더 등이 사용되었다. 각 분석항목별 필요한 재료 및 기구들은 실험방법과 함께 아래 기술하였다.

(나) 당화 과정

당화 과정은 grinding, mashing procedure, cooling, filtration의 순서로 진행되었으며 방법은 다음과 같다.

① Grinding

EBC와 ASBC에서는 이러한 목적에 맞도록 특별히 고안된 DLFU (Buhler) 디스크형 분쇄기(disk mill)을 이용하고 있다.

② Mashing procedure

광맥 맥아를 각 50g을 400ml 의 52℃ 증류수에 넣고 당화조로 옮긴 뒤 52℃에서 20분간 셰이킹하면서 당화시킨다. 다음으로 분당 1℃씩 상승시켜 62℃까지 올린 다음 1시간 더 당화시킨다. 그 다음 마찬가지로 1℃/min 속도로 10분간 온도를 10℃ 증가시켜 맥즙의 온도를 72℃까지 올린 다음 15분간 당화시킨다. 그 다음 4분간 온도를 4℃ 증가시켜 76℃에서 10분간 당화를 하여 당화를 완료한다.

Table 1-9. 홍삼맥주에서 사용하는 mashing 방법

단계	1	2	3	4
온도(℃)	52	62	72	76
시간(min)	20	60	15	10

③ Cooling and filtration

1시간 이후, wort는 10~15분 이내에 상온으로 냉각하고 젖는 것을 멈추고, 온도계를 제거한 후, 비이커에 증류수를 부어 $450.0 \pm 0.05\text{g}$ 으로 맞춘다.

저울에 무게를 재기 전에 유리막대를 이용하여 한번 저어주고, 여과 전에 한 번 더 저어준 후(5분 이상 15분 이하) 전체 내용물을 지름 20cm의 깔때기로 주름진 여과지(아래)를 이용하여 여과하고 지름 20cm 관찰용 유리커버를 여과 동안에 덮는다. 첫 번째 맥아즙 100ml을 다시 부어서 여과하며 여과지 위의 잔유물이 갈라지기 시작하면 여과를 종료한다. 여과가 느리게 진행될 때는 2시간 이후에 여과를 종료한다. 거친 맥아의 경우 $200 \pm 2\text{ml}$ 맥아즙을 정확히 추출한다. 여과시간은 100ml 맥아즙을 다시 여과하였을 때 1시간 이내에 여과가 종료되는 것이고, 더 오래 걸리면 느린 것이다. 투명도를 15분 이내로 관찰하여 맑음, 약간 탁함, 탁함으로 표현한다.

이러한 전통적인 당화방법을 실험 규모를 줄여 수행하였다. 구체적인 맥즙을 얻기 위한 당화 방법은 다음과 같다. 곱게 분쇄한 맥아 5 g을 250 mL Duran laboratory bottle (SCHOTT DURAN, Germany)에 넣고 52°C 증류수 40 mL와 잘 섞은 다음 효소를 첨가하고 Shaking water bath (BF-46SB, Biofree, Korea)를 이용하여 52°C, 100 rpm으로 20분간 1차 당화를 시킨다. 1°C/min 속도로 10분간 온도를 10°C 증가시켜 맥즙의 온도를 62°C까지 올린 다음 1시간 더 당화시킨다. 그 다음 마찬가지로 1°C/min 속도로 10분간 온도를 10°C 증가시켜 맥즙의 온도를 72°C까지 올린 다음 15분간 당화시킨다. 그 다음 4분간 온도를 4°C 증가시켜 76°C에서 10분간 당화를 하여 당화를 완료한다. 당화가 완료되면 맥즙을 20°C로 식히고 증류수로 최종 무게를 45 g으로 맞춘 다음 주름진 여과지 No.597 1/2 (Whatman, Germany)를 4등분하여 접은 다음 유리깔대기(지름 85mm)를 사용하여 여과하며, 초기 10 mL 맥즙을 재 여과한 것을 시료로 사용하였다.

Mashing후 cooling을 하고, 여과지 No.597 1/2 (Whatman, Germany)에 맥즙을 여과하면 hop을 첨가하지 않은 상태의 맥즙(wort)이 얻어진다. 맥즙 분석 항목은 pH, extract content, color, free amino nitrogen (FAN), β -glucan, filtration rate 등이며 ASBC방법에 준하여 측정한다. 또한 wort에 남아있는 미생물이 있는지 미생물 분석(aerobic bacteria, lactic acid bacteria)또한 실시한다. 모든 실험은 젖산균 배양액을 steeping water에 넣지 않고 malting한 맥아를 이용하여 제조한 wort를 control로 비교하여 실험한다.

(다) Wort 분석항목 및 분석법

실험항목은 pH, extract content, color, free amino nitrogen(FAN), β -glucan, filtration time, viscosity와 미생물분석(aerobic bacteria, lactic acid bacteria)이며, 모든 실험은 젖산균 배양액을 넣지 않고 제맥한 맥아와 젖산균 배양액을 넣고 제맥한 bio-acidified 맥아의 맥즙을 비교분석하였다. 항목에 대한 실험방법은 다음과 같다.

① pH 측정

제조된 맥즙 10mL을 취하여 pH meter(ORION 3 STAR, Thermo, Singapore)를 사용하여 3반복 측정하여, 젖산균 배양액을 넣어 제조한 bio-acidified 맥아를 이용하여 만든 맥즙과 젖산균 배양액을 넣지 않고 제조한 맥아를 이용하여 만든 맥즙의 pH를 비교하였다.

② Extract content(추출율) 측정

맥아에서 추출율이 높을수록 품질이 좋다. 추출율은 specific gravity를 측정하여 Plato표를 이용하여 구한다. 50g malt에 400g의 물을 첨가하는데, 이는 800g/100g malt으로 바꾸고 맥아즙의 specific gravity로부터 'g extract/100g 맥아즙'을 결정한다. 맥아의 추출율(%)은 다음 식으로 산출한다.

$$\text{추출율, as-is (\%)} = \{ P (M + 800) \} / (100 - P)$$

식에서 P = 맥즙의 추출율 (% Plato)

M = 맥아의 수분 함량 (%)

800 = 당화 시 맥아 100 g에 사용된 증류수의 양

③ 색도 측정

색도계(CR-300, Minolta Co., Ltd., Osaka, Japan)을 이용하여 맥즙의 색도를 L, a, b 값으로 측정하여 부원료 종류 및 함량별 영향을 분석하였다. L 값은 lightness(명도)를 나타내며 1부터 100까지 표시되며, 100에 가까울수록 흰색에 가까움을 의미한다. a 값의 경우 green-red 값을 나타내며, 양수의 값을 가지면 빨간색, 음수의 값을 가지면 초록색에 가까움을 의미하며, 절대 값이 증가할수록 그 색의 강도는 높아진다. b 값의 경우 yellow-blue 값을 나타내며, 양수의 값을 가지면 노란색, 음수의 값을 가지면 초록색에 가까움을 의미하며, 절대 값이 증가할수록 그 색의 강도는 높아진다.

④ Free amino nitrogen (FAN) 함량측정

- Ninhydrin color reagent 제조법

증류수 100mL 기준 10.0g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 6.0g KH_2PO_4 , 0.5g 1,2,3-indantrione· H_2O , 0.3g fructose를 100mL의 증류수와 섞어 제조한다.

- Dilution solution 제조법

KIO_3 2.0g과 증류수 600mL을 400mL의 ethyl alcohol에 섞어서 제조한다. 제조된 dilution solution은 냉장보관해서 사용한다.

- Glycine standard solution 제조법

Stock solution으로 제조한 뒤 사용시에 working solution을 만들어서 사용한다. Stock solution은 107.2 mg glycine· H_2O 을 100mL 증류수로 희석해서 냉장보관한다. Working solution은 stock solution을 증류수에 100배 희석해서 사용한다.

- 실험방법

100배 희석된 sample 2.0mL, 증류수(blank) 2.0mL, standard solution 2.0mL을 각 test tube에 넣는다. 1.0mL ninhydrin color reagent를 첨가하고, 증발을 막기 위해서 마개를 씌운다. 16분 동안 끓는 물에서 가열하고, 24분 동안 cooling한 다음 dilution solution을 각각 5.0mL씩 넣고 vortexing 하여 완벽하게 섞는다. 증류수로 auto-zero를 잡고, spectrophotometer를 이용하여 570nm에서 흡광도를 측정한다. 3반복하여 측정된 흡광도의 평균에서 평균 blank 흡광도 값을 뺀다. 그 식은 다음과 같다.

$$\text{Free amino nitrogen}(mg/L) = \frac{(\text{측정된 흡광도} - \text{blank 흡광도}) \times 2 \times 100}{(\text{Standard 흡광도} - \text{blank 흡광도})}$$

⑤ β-glucan

Malt(dry sample) 및 wort의 β-glucan 함량은 megazyme kit를 이용하여 측정하였다.

⑥ 여과시간 측정

ASBC법에 따라 여과지 No.597 1/2 (Whatman, Germany)에 맥즙을 여과를 시작한 후 100ml의 맥즙이 여과되면 다시 한번 나머지 맥즙과 섞어 여과 시켜 시간을 측정하였다.

⑦ Viscosity

Sine-wave vibro viscometer(SV-10, AND, Japan)을 이용하여 20℃에서 맥즙의 점도를 측정하였다.

⑧ 미생물 분석

대상미생물군은 aerobic bacteria와 lactic acid bacteria이다. 흡을 넣지 않은 상태의 맥즙 1.0mL을 시료로 하여, Plate count agar(PCA)배지 MRS agar에 각각 plate counting 한다. 이때 곰팡이의 번식을 억제하기 위해 0.001%의 cycloheximide 첨가하여 조제하였다.

(3) 결과 및 고찰

(가) 담금과정(mashing)후 맥즙 분석 및 품질 평가

Table 1-10. Bio-acidified malt의 wort 분석결과 비교

분석항목		Control	150
Malt			
β-glucan (%)		2.90	2.68
Wort			
pH		5.74	5.37
extract content (%)		70.28	70.26
Free amino nitrogen (mg/L)		193.90	174.07
Viscosity (cP)		1.60	1.51
Filtration time (min)		51.22	34.40
color	L value	39.68	39.82
	a value	0.31	0.53
	b value	9.92	10.21
Bacteria			
Aerobic bacteria (cfu/mL)		<10	<10
Lactic acid bacteria (cfu/mL)		0	0

Wort의 분석 결과는 Table 1-10에 표기되어져 있다. β-glucan은 보리의 endosperm을 들

러싸고 있는 세포벽을 약 75%이상 구성하고 있는 물질로, 그 함량이 많아질 경우 맥즙의 점도를 높여, 맥주 공정에 안 좋은 영향을 주게 된다. β -glucan의 경우 건조된 상태의 malt와 액체 상태인 wort를 sample로 하여 모두 측정을 하였는데, 건조된 malt의 경우 150mL sample이 더 낮은 값을 보였다. 이는 150mL sample에서 β -glucan을 분해하는 β -glucanase의 활성이 더 높았기 때문이라고 볼 수 있다.

pH의 경우 150mL sample에서 0.4 point 정도로 낮은 값을 보였으며, 이는 인위적으로 첨가한 젖산균 배양액에 의한 것이며, 젖산균이 생성해내는 유기산에 의해 맥즙의 pH가 낮아진 것으로 보인다.

Extract content이나, color부분에서는 control과 150mL sample의 큰 차이는 없었으나, free amino nitrogen(FAN)의 경우 control wort에서 더 높은 값을 보였다. Viscosity의 경우에는 150mL sample의 맥즙이 0.1cP 정도 낮게 측정되었는데, 이는 점도에 영향을 주는 β -glucanase와 β -amylase의 효소 활성이 control에 비해서 더 컸기 때문이라고 볼 수 있다. 주목할만한 것은 filtration time인데, 같은 방법으로 mashing과 cooling, 그리고 filtration을 거쳤을 때 걸리는 filtration time이 약 20분가량 차이가 났다. 이 역시 β -glucanase와 β -amylase의 효소 활성이 control에 비해서 더 컸기 때문에 맥주의 점도에 영향을 주었고, 점도가 낮아짐으로 인해서 filtration time이 단축된 것으로 보인다. 여과시간을 단축시키는 것은 맥주제조를 원활하게 하며, 생산력을 높이기 때문에 bio-acidified malt를 사용하여 맥주를 제조하게 되면 filtration time이 단축되어 좋은 효과를 낼 것으로 예상된다.

미생물 분석의 경우에는 두 wort sample모두 aerobic bacteria를 측정하는 plate count agar에서는 10이하의 cfu/mL을 가지고 있었으며, lactic acid bacteria를 측정한 MRS agar에서는 단 한 개의 colony도 측정되지 않았기 때문에 젖산균 배양액을 제맥과정에 인위적으로 첨가하여도 미생물 오염은 일어나지 않는다는 것을 알 수 있다. 그 이유는 맥주 제조 과정 중 mashing 과정에서 장시간 가열하고, wort boiling 과정에서 100°C 이상으로 가열하기 때문에 이 과정에서 균이 다 사멸하게 되고, 본래 미생물은 높은 brix를 가진 곳에서 살아남기 힘들기 때문이다.

다. Bio-acidified 맥아를 이용한 맥주의 발효 적성 분석

(1) 요약

젖산균 배양액을 넣어 제조한 bio-acidified 맥아를 이용하여 만든 맥주와 젖산균 배양액을 넣지 않고 제조한 맥아 (control)를 이용하여 만든 맥주는 같은 방법으로 제조하였으며, 주 발효, 후 발효, 완성 맥주의 특성 분석을 진행하였다. 분석항목으로는 specific gravity, pH, yeast viability, alcohol 함량, turbidity, diacetyl 등을 분석하였다. Control과 bio-acidified 맥아를 가지고 만들어진 맥주들의 특성을 분석한 결과 유의적 차이를 보이지 않았다. 또 diacetyl 함량의 경우 bio-acidified 맥아를 이용하여 만든 맥주가 더 낮아서 bio-acidified 맥아를 이용하는 것이 맥주 제조를 효율적으로 만들고 맥주 제조에 적합하다고 생각된다.

(2) 재료 및 방법

(가) 재료

발효분석에서는 milling을 위하여 디스크형 분쇄기가 사용되었으며, 당화를 위해서 당화조, 주름진 여과지 No.597 1/2 (Whatman, Germany)가 사용되었으며, 소모품으로는 blue pipet tip, petri dish, 메스실린더 등이 사용되었다. 각 분석항목별 필요한 재료 및 기구들은 실험방법과 함께 아래 기술하였다.

(나) bio-acidified 맥아를 이용하여 제조한 맥주의 발효 분석

사용된 홉은 Saaz(AA 2.6%)이며, 효모는 비전바이오켄 맥주발효용 효모 Saflager W-34/70을 사용하였다. 홉과 효모 모두 참여기업에서 실제 이용하는 것이다. 맥즙에 hop을 1/2, 1/4, 1/4로 3회 나누어 넣으며, 각각 10분, 5분, 5분씩 끓여주었다. 이후 맥즙의 온도를 20℃까지 급속 냉각시켰다. 그 후 알코올 도수 예측 및 당화의 정도를 파악하기 위한 초기 비중을 측정하였다. 여기에 효모를 1.0×10^7 cells/mL이 되도록 주입한 뒤, 공기 차단기(air lock)를 설치하여 전 발효는 14℃에서 7일간, 후 발효는 4℃에서 15일간 실시하였다.

젖산균 배양액을 넣어 제조한 bio-acidified 맥아를 이용하여 만든 맥주와 젖산균 배양액을 넣지 않고 제조한 맥아를 이용하여 만든 맥주는 같은 방법으로 제조하였으며, 주발효 분석은 2일 간격으로 7일간 총 4회 실시하였으며, 후 발효 분석은 2일 간격으로 15일간 총 7회 측정하였다.

(자) 주 발효 및 후 발효 분석항목 및 분석법

모든 실험은 젖산균 배양액을 넣지 않고 제맥한 맥아와 젖산균 배양액을 넣고 제맥한 bio-acidified 맥아의 wort를 이용하여 발효한 맥주로 실험 결과를 비교분석하였다. 주발효 분석은 2일 간격으로 7일간 총 4회 실시하였으며, 후 발효 분석은 2일 간격으로 15일간 총 7회 측정하였다. 분석항목 및 분석방법은 다음과 같다.

① Specific gravity

발효액 100mL를 메스실린더에 넣고, 비중계(200-DK-6, Daekwang, Seoul, Korea)를 이용하여 비중의 변화를 측정하였다. 비중의 변화는 당화 후의 맥즙의 original gravity(O.G.), 전 발효 종료 후 specific gravity(S.P.1), 후 발효 종료 후 final gravity(S.P.2)를 측정하였다.

② Yeast viability

효모의 생육 변화는 ASBC 방법을 기준으로 하였다. 효모 생육수를 측정하기 위해 methylene blue 염색법을 기준으로 하였고 haemocytometer를 사용하여 측정하였다. 1차 발효 4일 및 2차 발효 7일, 총 11일 동안의 생육 변화 양상을 확인하여 부원료 종류 및 첨가량별 영향을 비교하였다.

③ Reducing sugar

환원당의 양은 DNS법을 기준으로 하여 측정하였다. DNS시약은 10.0g의

3,5-dinitrosalicylic acid, 2.0g phenol과 200.0g rochelle salt를 1000mL의 sodium hydroxide(10g/L)와 Sodium carbonate(0.5g/L)에 용해시켜 준비하였다. 환원당을 함유하고 있는 시료는 100배 희석하여 사용했으며, 희석된 시료 1mL과 DNS시약 3mL을 끓는 물에서 5분간 반응시킨 후 상온에서 5분간 식혀 spectrophotometer(UVmini-1240, Shimadzu, Kyoto, Japan)를 이용하여 550nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도 값은 standard curve를 이용하여 환원당량으로 산출한 뒤 희석배수를 곱하였다.

④ Free amino nitrogen

Wort 분석과 같은 방법으로 발효가 끝난 맥주의 free amino nitrogen 함량을 분석하여, 젖산균 배양액을 넣어 제조한 bio-acidified 맥아를 이용하여 만든 맥주와 젖산균 배양액을 넣지 않고 제조한 맥아를 이용하여 만든 맥주의 free amino nitrogen을 비교하였다.

(차) 최종 맥주의 분석 항목 및 분석법

후 발효 단계가 완료된 젖산균 배양액을 넣지 않은 control 맥주와 젖산균 배양액을 넣어 제조한 bio-acidified 맥아를 이용하여 만든 맥주의 color, pH, alcohol content 등의 측정을 통하여 최종 맥주의 quality 측정을 하였다. 분석항목과 분석법은 다음과 같다.

① 색도 측정

Wort 분석과 같은 방법으로 발효가 끝난 맥주의 color를 분석하여, 젖산균 배양액을 넣어 제조한 bio-acidified 맥아를 이용하여 만든 맥주와 젖산균 배양액을 넣지 않고 제조한 맥아를 이용하여 만든 맥주의 색도를 비교하였다.

② pH 측정

발효가 끝난 맥주를 pH meter(ORION 3 STAR, Thermo, Singapore)를 사용하여 3반복 측정하여, 젖산균 배양액을 넣어 제조한 bio-acidified 맥아를 이용하여 만든 맥주와 젖산균 배양액을 넣지 않고 제조한 맥아를 이용하여 만든 맥주의 pH를 비교하였다.

③ 알코올 함량 측정

알코올 함량은 알코올 증류장치를 이용하여 측정하였다. 알코올을 증류시킨 후 주정계(211-DK-12, Daekwang, Seoul, Korea)를 이용하여 측정하였으며, 이를 주정분 온도 환산표를 통해 알코올 함량을 환산하였다. 젖산균 배양액을 넣어 제조한 bio-acidified 맥아를 이용하여 만든 맥주와 젖산균 배양액을 넣지 않고 제조한 맥아를 이용하여 만든 맥주의 알코올 함량을 비교하였다.

④ 거품 안정성 측정

맥주의 거품 안정성의 경우 ASBC에 제시된 방법을 이용하여, 젖산균 배양액을 넣어 제조한 bio-acidified 맥아를 이용하여 만든 맥주와 젖산균 배양액을 넣지 않고 제조한 맥아를 이용하여 만든 맥주의 거품안정성을 비교하였다. 하부에 cock이 있는 유리 칼럼 높이 직경

을 사용하여 시료 50 mL를 붓고 30초 후에 거품이 외의 하층액을 제거하였다. 그 후 230초 간 거품이 꺼지는 시간으로 깨진 거품의 양(b)과 남은 거품 양(c)을 측정하여 거품안정성 (sigma)을 측정하였다. 거품안정성을 산출하는 식은 아래와 같다.

$$\Sigma = \frac{230}{2.303 \log \left[\frac{b+c}{c} \right]}$$

⑤ 탁도 측정

맥주의 탁도(turbidity)는 spectrophotometer(UVmini-1240, Shimadzu, Kyoto, Japan)를 이용하여 측정하였다. 700 nm에서의 흡광도가 430 nm에서 측정한 흡광도 보다 ≤ 0.039 배라면 탁도가 “없음(none)”으로, 아니라면 “있음(exist)”으로 결정하였다. 젖산균 배양액을 넣어 제조한 bio-acidified 맥아를 이용하여 만든 맥주와 젖산균 배양액을 넣지 않고 제조한 맥아를 이용하여 만든 맥주의 turbidity를 비교하여 분석하였다.

⑥ Diacetyl 함량 측정

Diacetyl 함량 측정은 spectrophotometer(UVmini-1240, Shimadzu, Kyoto, Japan)를 이용한 비색법으로 측정하였다. 0.175 M iso-niazide 용액 10 mL에 acetic acid 몇 방울을 넣어 산성화시킨다. 여기에 2.9×10^{-4} M diacetyl solution 5mL과 0.15M ZR(IV)염 1 mL를 더해 주었다. 3 M HCl과 4 M NaOH로 pH를 1.7 ± 0.1 로 조정시킨 후 제조한 용액을 50 mL 부피 플라스크에 옮겨서 물로 희석하였다. 약 30분 뒤, diacetyl의 농도를 20-200 ppb 사이로 나타내어 calibration curve를 작성하였다(Rafael et al., 1993). 시료 25mL을 NaCl 포화용액 70 mL과 섞어준 뒤, 이 혼합물을 iso-niazide 용액 20 mL에 30 mL이 포집될 때까지 증류시킨다. 이 값을 calibration curve와 대조하여 diacetyl의 양을 측정하였다. 젖산균 배양액을 넣어 제조한 bio-acidified 맥아를 이용하여 만든 맥주와 젖산균 배양액을 넣지 않고 제조한 맥아를 이용하여 만든 맥주의 diacetyl 함량을 비교하여 분석하였다.

⑦ 관능평가

관능검사는 attribute difference test를 수행하였다. 동국대학교 식품공학과 대학생 30명 중에서 10명을 선발하였다. 패널 선택을 위하여 각 패널의 관능검사 결과의 ANOVA가 수행되었으며, 맥주의 주된 taste인 bitterness를 고려하였다. 5개의 Reference로는(20, 40, 60, 80, and 100 mg/L-water of isohumulone solution)이 사용되었다. 묘사적 언어는 ASBC[5]를 기준으로 선택된 패널들에 의해 채택되었다. 관능적 특성은 Odor(O), Taste(T), Mouthfeel(M)과 afterflavor(Af)로 구성되었으며, 다음과 같이 세분화되었다. Oily(OTM), Carbonation(M), Body(OTM), Mouthcoating(MAf), Alcoholic(OTW), Malty(OT), Fruity(OT), Bitter(TAf), Astringent(MAf)에 더하여 Overall preference로 구성하였다. 선택된 패널들은 기술어를 사용하기 위하여 reference material를 사용하여 훈련되었다.

각 시료마다 평가해야 할 특성이 많기 때문에 실험은 랜덤화 블릭법을 이용하여 설계되었다. 각 특성 당 강도는 0-10점 척도로 평가되었다(0: 없음, 1-2: 약함, 3-4: 보통, 5-6: 강함, 7-8: 더 강함, 9-10: 매우 강함) (Kim et al., 1996). 맥주 샘플은 test전에 4°C에서 하루 보관 후 사용하였다. 검사는 20°C의 tasting booth에서 실행되었다. 10 mL의 시료는 random

three digit code로 labeling 된 유리컵에 담겼으며, 9개의 시료가 패널에게 주어졌다. 처음에는 odor에 대한 것을 평가하고, 그 후 마셨을 때 taste, mouthfeel, aftertaste를 평가하였다. 한 시료 당 모든 질문을 평가한 후 다른 설문지에 다른 시료를 평가하게 했다. 패널요원들은 시료 당 30초의 휴식시간을 가졌으며, 물과 unsalted cracker로 입을 헹군 후 검사를 시행했다.

(3) 결과 및 고찰

(가) Bio-acidified 맥아를 이용하여 제조한 맥주의 발효 분석

① 비중 측정

맥주 발효에서 비중은 순수한 물의 밀도에 대한 용액의 밀도라고 볼 수 있는데, mashing과정에서 malt와 물을 주입해서 끓이게 되면, malt가 가지고 있는 당을 물이 흡수하여 비중이 상승한다. 이렇게 해서 얻은 wort를 발효시키게 되면 효모가 당을 분해하여 알콜발효하기 때문에 비중이 감소하게 된다. 일반적으로 맥주제품의 비중은 1.010정도이며 순수한 물의 경우 1.000이다. 이번 실험에서는 control과 150mL sample malt를 이용하여 mashing하여 얻은 wort의 original gravity(O.G.1), wort boiling이후 효모를 접종하기 전의 original gravity(O.G.2) 그리고 전 발효 종료 후 발효액의 specific gravity(S.P.1), 그리고 발효가 끝난 최종 맥주의 specific gravity(S.P.2)를 측정하였다. 그 결과는 다음과 같다.

Table 1-11. 맥주의 비중 결과 비교

	O.G.1	O.G.2	S.P.1	S.P.2
Control	1.025	1.054	1.034	1.008
150	1.02	1.052	1.032	1.008

초기 wort의 비중은 1.02-1.025정도이나, 전발효 종료 후 비중이 증가하였는데 그 이유는 wort boiling과정에서 맥즙을 100℃로 끓이기 때문에 이 과정에서 농축이 되었기 때문이다. 전발효 종료 후 비중과 비교해 본다면 주발효과정과 후발효 과정에서 비중이 감소한 것을 확인할 수 있다. 이는 발효과정 중 맥즙에 있는 당 성분을 효모가 알콜 발효하는데 이용하기 때문이다. Control과 150mL의 specific gravity는 큰 차이를 보이지 않는 것으로 보인다.

② 효모 생육 측정

발효 기간 중 yeast viability 변화는 다음 그림과 같다.

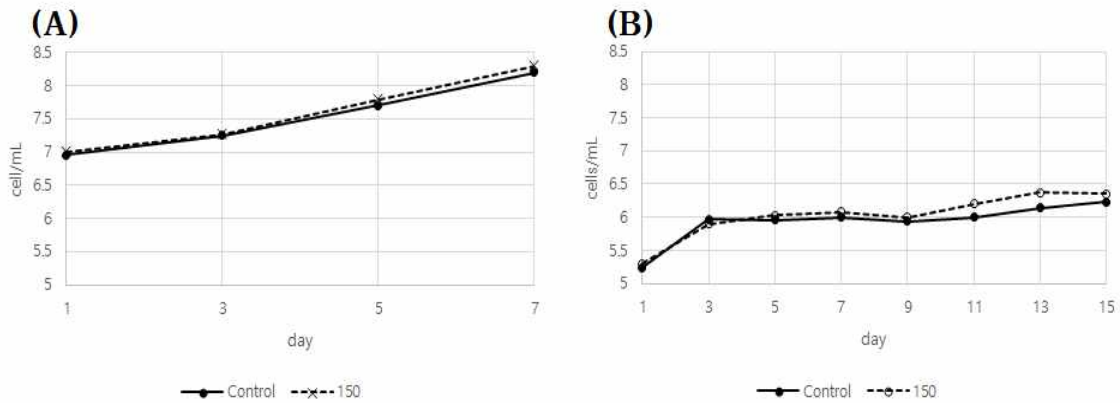


Fig. 1-9. 발효기간 중 yeast viability의 변화; (A) : Primary fermentation, (B) : Secondary fermentation

초기 1.0×10^7 cells/mL에 맞게 접종하였으며, 그 뒤로 주 발효가 진행될수록 그 양이 log 8.3 까지 증가하였다. 맥즙에 있는 단당류와 peptides들에 의해서 효모의 cell mass가 증가하고, 그 결과 효모에 의한 알코올 발효가 진행되기 때문이다. 효모의 양이 많아질수록 발효는 수월하게 진행된다. 후발효로 진행 때, 효모가 혼입되지 않도록 갈색병에 병입을 하기 때문에 후 발효에 들어가게 되면 효모의 수는 급격하게 줄어든다. 하지만 후 발효 기간 동안에도 남아있는 단당류나 peptides 들이 존재하기 때문에 효모의 양은 소량 증가한다. Control과 150mL sample의 wort에서 효모의 수는 큰 차이를 보이지 않았다.

③ Reducing sugar 함량 측정

Reducing sugar는 환원당을 뜻하는 말로, 이번 실험에서는 glucose를 standard로 하기 때문에 시료에 포함되어있는 당류의 양을 간접적으로 알 수 있다. 실험 결과는 다음과 같다.

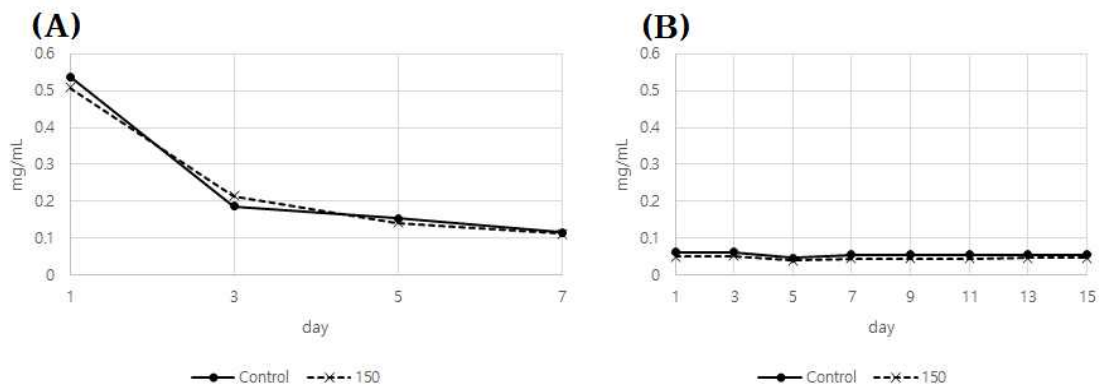


Fig. 1-10. 발효기간 중 reducing sugar의 변화; (A) : Primary fermentation, (B) : Secondary fermentation

효모가 당당류를 이용하여 발효를 하기 때문에 주 발효 기간 동안 급격하게 환원당 함량이 감소한 것을 확인할 수 있다. 하지만 후 발효 기간 동안에는 환원당 함량에는 큰 변화가 없었다. 그 이유는 알코올 발효는 주로 주 발효 기간 동안 일어나고, 후 발효 기간에는 알콜발효가 크게 일어나지 않기 때문이다. 150mL sample 맥아의 β -amylase의 활성이 높았기 때문에 맥주에서의 glucose의 양이 많았을 것으로 기대했으나 초기 환원당량에서 control 맥주와 차이를 보이지 않았고, 주 발효와 후 발효 기간 동안 일정하게 유지되었다.

④ Free amino nitrogen 함량 측정

Free amino nitrogen (FAN) 함량은 맥주 양조에서 wort나 맥주에 녹아있는 small peptide나 amino acid의 함량을 뜻한다. FAN은 맥주 발효용 효모가 FAN을 이용해 증식하여 알콜 발효가 진행된다. FAN 함량이 지나치게 많게 되면 fusel alcohol같이 맥주에 좋지 않은 향을 만들어 낼 수 있고, 맥주를 탁하게 만드는 haze를 발생시키기 때문에 적당량 존

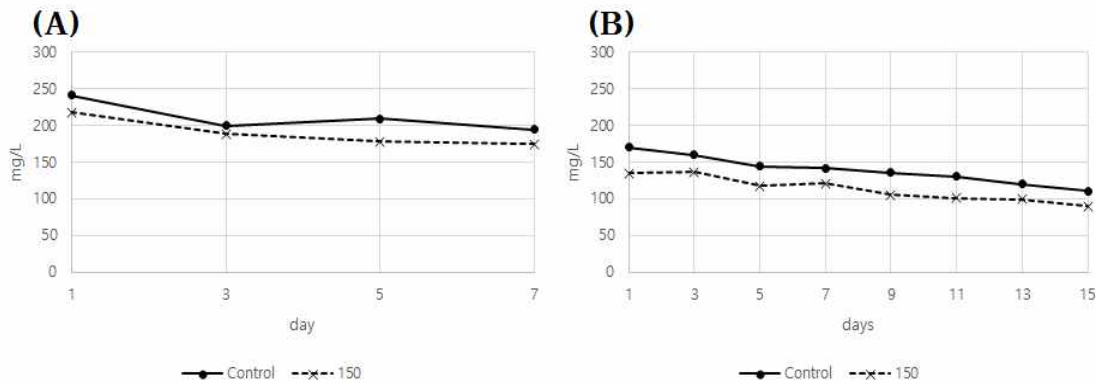


Fig. 1-11. 발효기간 중 free amino nitrogen의 변화; (A) : Primary fermentation, (B) : Secondary fermentation

재하는 것이 중요하다. 발효기간 중 FAN 함량 변화는 다음과 같다.

Control 맥주와 Bio-acidified 맥주를 비교해 본다면 FAN함량에서 크게 차이는 나지 않으나, Control 맥주가 조금 높은 함량을 보인다. Bio-acidified malt로 만든 맥주의 경우 초기 wort에서 control 맥주보다 FAN함량이 낮았는데, 이러한 차이가 맥주 발효에도 그대로 유지된 것을 볼 수 있다. 전반적으로 전 발효 기간 동안 FAN함량이 크게 감소하였고, 후 발효기간에는 일정하게 유지되는 것을 볼 수 있다. Wort boiling 이후 발효 1일차에서 wort보다 FAN 함량이 증가하였는데, 이는 wort를 끓인 결과 농축이 되어 FAN 함량이 증가한 것으로 보인다.

⑤ 색도측정

L value는 lightness를 뜻하며 100에 가까울수록 흰색에 가까움을 의미한다. a value는 green-red를 뜻하며 양수의 값이 red를 뜻하며 그 절대값이 높아질수록 그 색이 진해진다. b value는 yellow-blue를 뜻하며 양수의 값이 yellow를 뜻하며 그 절대값이 높아질수록 그 색이 진해진다. 색도의 실험 결과는 다음과 같다.

Table 1-12. 맥주의 color 분석 결과

	L value	a value	b value
Control	33.22	3.18	19.23
150	33.97	2.76	18.25

결과적으로 맥주의 color를 분석해보았을 때 L value에서는 큰 차이를 보이지 않았다. a value와 b value에서 150mL sample 맥주가 조금 낮은 값을 보였으나 이는 외관으로 보았을 때 구별이 불가능한 정도였다. 맥주의 색은 주로 kilning 과정에서 결정되므로, 모든 과정을 같은 방법으로 진행하였기 때문에 젓산균을 첨가하더라도 맥주의 색도에 큰 영향을 주지 않는 것을 알 수 있었다.

⑥ pH, 알코올 함량, 거품안정성, 탁도, diacetyl 측정

최종 맥주가 제조되었을 때 맥주 품질 평가를 위해서 실험한 항목 pH, alcohol content, foam stability, turbidity, diacetyl이며 그 결과는 다음과 같다.

Table 1-13. 맥주의 pH, alcohol content, foam stability, turbidity, diacetyl 분석 결과

	pH	Alcohol content(%)	Foam stability	Turbidity	diacetyl(mg/L)
Control	4.81	3.5	179.52	Exist	14.50
150	4.54	4.5	191.00	Exist	4.35

맥주 발효가 진행될수록 효모의 수는 증가하다 감소하고, 에탄올 함량은 증가하며, CO₂ 함량이 증가하기 때문에 pH는 감소한다. pH결과는 맥즙 분석 때보다 낮은 값을 보였고, 그 때와 마찬가지로 150mL sample 맥아로 만든 맥주에서 낮은 값을 보였다. 이는 사용된 맥아가 bio-acidified malt였기 때문에 맥주의 pH에 영향을 미친 것으로 보인다.

일반적으로 맥주는 5%정도의 알코올함량을 갖는다. 이번 실험에서는 control 맥주는 3.5%, 150mL sample 맥주에서는 4.5%로 측정이 되었는데 두 맥주 모두 일반적인 맥주보다는 낮은 값을 보인다. 두 맥주를 비교해보았을 때 1% 높아진 것을 확인할 수 있다. FAN함량에서는 150mL sample 맥주가 낮은 값을 보였고, reducing sugar 함량에서는 큰 차이를 보이지 않았는데, 알코올함량이 높게 나온 이유는 바로 FAN과 reducing sugar의 ratio 때문으로 보인다. 너무 높거나 혹은 너무 낮은 FAN함량 또는 reducing sugar함량을 갖게 되면 두 성분의 ratio가 맞지 않기 때문에 알코올발효가 제대로 진행되지 않고, 맥주 품질에 악영향을 미치기 때문이다.

Foam stability는 150mL sample 맥주에서 높은 값을 보였고, 맥주의 foam stability에 영향을 주는 glycoprotein의 함량으로 인한 것으로 보인다. Turbidity는 두 맥주 모두 살균과정을 거치지 않았기 때문에 탁함이 존재하였다.

Diacetyl은 맥주에 buttery flavor를 내는 물질로, 맥주 품질에 안좋은 영향을 주는 물질이다. 효모는 알코올발효시에 alcohol과 α-acetolactate 같은 물질을 생성하는데, 이 물질이

diacetyl로 전환되고 diacetyl rest기간동안 효모가 재흡수 하여 acetoin으로 전환된다. 그렇기 때문에 발생한 diacetyl은 숙성기간에 사라지게되므로, diacetyl의 수치는 맥주가 얼마나 숙성되었는지 알려주는 척도로서 사용된다. 실험결과를 보면 150 맥주의 diacetyl 함량이 더 낮은 것을 알 수 있다. 따라서 맥주에 버터 향을 내는 diacetyl함량이 적은 150 맥주가 더 적절하다고 할 수 있다.

⑦ 관능평가

식품생명공학과 대학원생들을 상대로 한 관능평가 결과는 다음과 같다.

Table 1-14. 관능평가 결과

	Con	150
Oily	5.15±1.66	4.77±1.48
Carbonation	4.03±1.71	3.89±1.76
Body	4.67±1.98	4.10±1.60
Mouthcoating	4.62±2.27	4.66±2.04
Alcoholic	5.69±1.85	5.55±1.86
Malty	4.72±1.33	5.79±1.42
Fruity	4.41±1.97	4.66±1.99
Bitter	4.78±1.85	5.33±2.15
Astringent	4.52±1.57	5.14±2.07
Overall preference	5.14±1.53	5.97±1.74

관능평가 결과는 bio-acidified 맥아로 만든 맥주가 과일향이 나며 새콤한 맛이 난다는 평을 받았다. 새콤한 맛은 과일향에 의한 것이라고 볼 수 있는데, 과일향의 경우 젖산균을 제 맥과정에 적용하였기 때문에 젖산균이 생성해내는 여러 유기산들에 의한 것이라고 볼 수 있다. 전체기호도에서는 bio-acidified 맥아로 만든 맥주에서 높은 값을 보이나, 전체적으로 유의적인 차이는 없었다.

결과적으로 낮은 pH로 인한 미생물적 안전성, 높은 효소활성으로 인한 빠른 여과시간, 높은 알콜함량, 제맥과정에서 유해균을 억제할 수 있다는 것, 또한 최종 맥주에서 미생물적으로 안전하다는 것 그리고 기존 맥주와의 맛의 차이가 크게 없다는 점 등을 포함하여 여러 가지 측면을 생각해 보았을 때, bio-acidified 맥아를 이용하는 것이 맥주 제조를 효율적으로 만들고 맥주 제조에 적합하다고 생각된다.

3. 홍삼/복분자 맥주제조에 적용 및 보완

가. 1차년도에서 분리한 젖산균의 당화 및 발효 중 미생물 분석 및 보완에 적용

* Bio-acidified malt를 사용하지 않는 이유

: wort에서 *Pediococcus acidilactici* HW01이 bacteriocin을 생성하는 것이 확인됨. Bio-acidified malt는 mashing의 효율을 좋게 해주지만 이미 그 부분은 1세부에서 효소처리를 통하여 충분하게 보완이 가능하다. 그렇기에 malt적용 보다 wort에 균을 적용하는 것이 맥주 유해균의 저해측면과 새로운 한국형 sour beer의 개발성이 있다는 장점을 가지므로 bio-acidified malt로 진행하지 않았음.

(1) 요약

먼저, 맥아로부터 분리된 bacteriocin 생산 균주 중 맥주에 적용되어질 균을 선택하였다. 이를 wort에 적용하여 이 발효된 wort를 통하여 bacteriocin 맥주를 제조하여 맥주 유해균 억제력을 확인하였다.

(2) 재료 및 방법

(가) 맥주 제조를 위한 실험재료

먼저 국산 보리 광맥 맥아는 농촌진흥청 벼맥류부의 협조에 의하여 전라북도 익산에서 수확된 것을 사용하였다. 광맥은 2010년 개발된 맥류 품종으로, 대립, 다수성이며 도복, 습해, 한해 등에 강하고 보리호위축병에 저항성이 있으며 기후변화에 따른 불시출수에 안정적인 특성이 있다. 효소는 (주)Bision Biochem에서 세가지 액화 효소를 구입하여 사용하였다. 당화효소 α -amylase (from *Bacillus licheniformis*)와 amyloglucosidase (or glucoamylase, from *Aspergillus niger*)는 각각 Almylex BT2, GA-L New 제품을 사용하였고 여과증진효소 β -glucanase (from *Trichoderma reesei*, pentosanase 활성 포함)는 Laminex BG2 제품을 사용하였다. 홉(hop)은 Czech Saaz(AA 2.2%) pellet을 이용하였고, 효모는 비전바이오켄 맥주발효용 효모 Saflager W-34/70을 이용하였다.

(나) 미생물(유해균) 분석을 위한 실험재료

실험에 사용된 균주로는 *Pediococcus damnosus* KCTC 3370, *Lactobacillus lindneri* KCTC 5088, *Lactobacillus brevis* KCTC 3498, *Lactobacillus brevis* DF 01, *P. acidilactici* HW 01, *Leuconostoc citrium* HW 02, *Pediococcus pentosaceus* KFRI 834, *Lactobacillus curvatus* KCTC 3767, *Lactobacillus plantarum* NCDO 955, *Lactobacillus plantarum* KFRI 814있다.

Modified hop-gradient agar with ethanol (m-HGA+E) 제조에는 MRS (De Man, Rogosa and Sharpe, Difco Laboratories, Spark, MD, USA) agar, hop extract (Isohop®, 30% w/w iso- α -acid produced from carbon dioxide hop extract; John I. Haas Inc., Washington, DC), 원형 petri dish (85 x 14.2 mm)가 사용되었다.

Hop-resistant genes의 탐색을 위해 **DNA추출에 사용된 것**은 genomic DNA extraction kit (DNA Extraction from food and feed kit, Kogenebiotech, Seoul, Korea)와 plasmid

DNA extraction kit (Plasmid DNA purification kit, Intron, seongnam , Korea)이다. PCR 분석 시에는 i-Taqtm DNA polymerase (Intron, seongnam, Korea)를 사용하였다. Primer 는 표와 같이 바이오니어 (Bioneer, Alamenda, CA, USA)에서 제작하여 사용하였다.

맥주에서 유해균 분석 실험에 bacteriocin 생성균주인 *P. acidilactici* HW 01가 사용되었다. 제조에 사용된 맥아는 국내산 2조 맥인 광맥(국립식량과학원)을 이용하였다. 맥주 제조 방법은 한국홍삼맥주(주)와 동일하게 진행하였다. Bacteriocin의 항균활성을 보기위하여 사용된 Indicator균은 *Lactobacillus plantarum* NCDO 955를 사용하였다. 이 균은 MRS agar 와 broth (De Man, Rogosa and Sharpe)에서 37℃, 1일간 배양 후 사용하였다.

(다) 맥주 제조 방법

① 당화(Mashing)과정

㉠ 효소 처리

당화 전 당화효소 α -amylase와 amyloglucosidase, 여과증진효소 β -glucanase를 각각 맥아 사용량의 0.1 % 로 첨가하였다.

㉡ Mashing procedure

광맥 맥아 각 50g을 400mL 의 증류수에 넣고 당화조로 옮긴 뒤 52℃에서 20분간 세이킹 하면서 당화시킨다. 다음으로 분당 1℃씩 상승시켜 10분 동안 62℃까지 올린 다음 1시간 더 당화시킨다. 그 다음 마찬가지로 1℃/min 속도로 10분간 온도를 10℃ 증가시켜 맥즙의 온도를 72℃까지 올린 다음 15분간 당화시킨다. 그 다음 4분간 온도를 4℃ 증가시켜 76℃에서 10분간 당화를 하여 당화를 완료한다.

㉢ Cooling and filtration

1시간 이후, 맥아즙은 10~15분 이내에 상온으로 냉각하고 젓는 것을 멈추고, 온도계를 제거한 후, 비이커에 증류수를 부어 450.0±0.05g으로 맞춘다.

저울에 무게를 재기 전에 유리막대를 이용하여 한번 저어주고, 여과 전에 한 번 더 저어 준 후(5분 이상 15분 이하) 전체 내용물을 지름 20cm의 깔때기로 주름진 여과지(아래)를 이용하여 여과하고 지름 20cm 관찰용 유리커버를 여과 동안에 덮는다. 첫 번째 맥아즙 100ml을 다시 부어서 여과하며 여과지 위의 잔유물이 갈라지기 시작하면 여과를 종료한다. 여과가 느리게 진행될 때는 2시간 이후에 여과를 종료한다. 거친 맥아의 경우 200±2ml 맥아즙을 정확히 추출한다. 여과시간은 100ml 맥아즙을 다시 여과하였을 때 1시간 이내에 여과가 종료되는 것이고, 더 오래 걸리면 느린 것이다. 투명도를 15분 이내로 관찰하여 맑음, 약간 탁함, 탁함으로 표현한다.

② 발효(Fermentation)과정

당화과정을 거쳐 나온 맥즙에 hop을 1/2, 1/4, 1/4로 3회 나누어 넣으며, 각각 10분, 5분, 5분씩 끓여주었다(Wort boiling). 이후 맥즙의 온도를 20℃까지 급속 냉각시켰다. 그 후 알코올 도수 예측 및 당화의 정도를 파악하기 위한 초기 비중을 측정하였다. 홉이 들어간 맥즙(hopped wort)에 효모를 5.0×10^6 cells/mL이 되도록 주입한 뒤, 공기 차단기(air lock)

를 설치하여 전 발효는 14°C에서 7일간, 후 발효는 4°C에서 21일간 실시하였다. 또한, 홍삼 extract는 발효홍삼 G21(명장홍삼, ㈜바산고려홍삼)을 사용하였고, 복분자 과즙은 복분자 순액 700mL(선운산 농협, 베리웰)을 사용하였다.

(라) 미생물(유해균) 분석 방법

① Modified hop-gradient agar with ethanol (m-HGA+E) 제조 및 유효성 검증

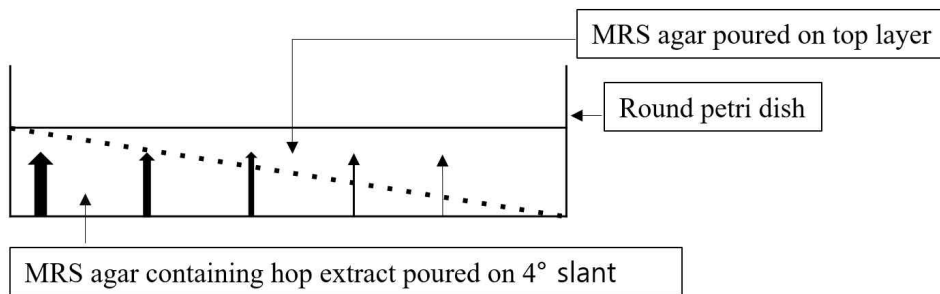


Fig. 1-12. HGA+E과 m-HGA+E의 원리

m-HGA+E은 기존에 hop-gradient agar with ethanol paltes (Haakensen et all., 2009)의 방법을 변형하여 원형의 petri dish에 적용하여 제조하는 것이다. 300mL MRS (MRS, Difco Laboratories, Spark, MD, USA) agar (agar, 1.5%) 와 300mL 100BU가 되도록 MRS agar (agar, 1.5%)에 hop extract (Isohop®, 30% w/w iso- α -acid produced from carbon dioxide hop extract; John I. Haas Inc., Washington, DC) 126 μ l를 주입한다. Hop extract양의 계산은 제조사의 계산법에 의하여 계산한다. 효모와 곰팡이의 증식을 억제하기 위해 0.001%의 cycloheximide 첨가하여 조제한다. 제조된 nomal MRS agar는 60도의 Dry Oven에 보관하고 100 BU의 MRS Agar는 60도까지 식힌 후 알코올 94.5% 15 mL (1.5% v/v)을 넣는다. 그런 후 원형 petri dish의 경사도 4.04°를 갖도록 설계된 장치에 plates를 올려놓고 17 mL을 넣어 사면이 되는 배지가 되도록 한다. 이를 완전히 굳혀준다. 완전히 굳은 후에 petri dish의 아랫면에 다음과 같이 기입한다. bottom layer의 경사가 가장 높은 부분에 hop이라는 문구를 적어주고 가장 경사가 낮은 부분에 MRS라고 적어 hop 농도가 높고 낮은 부분을 표기한다. 완전히 굳은 사면배지 위에 Dry Oven에 보관되어진 nomal MRS agar에 94.5 % alcohol 17 mL (1.5% v/v)를 넣고 혼합해 준다. 사면이 형성된 petri dish에 평판배지가 되도록 agar를 pouring 한다. 이 배지를 완전히 굳힌 뒤에 파라필름과 호일로 밀봉 후 up-side-down하여 혐기적 조건에서 4°C에 보관한다. Hop의 제대로 된 확산을 위하여 최소 5일 이상 정치 후 사용한다. (Fig. 2에서 보이는 것과 같이 정치 시 확산에 의한 hop gradient가 생겨 hop이라고 표시한 부분이 가장 높은 hop 농도를 가지며 MRS가 표기된 부분으로 갈수록 낮은 hop 농도를 지닌다.)

위에서 100 BU가 되도록 hop extract 양을 정한 실험은 다음과 같다. m-HGA+E의 bottom layer의 BU level이 각각 20, 40, 60, 80, 100 BU가 되도록 제조한다. 대표적으로 hop에 내성을 지니는 대표 맥주 오염균인 *P. damnosus* KCTC 3370과 내성이 없는 *P. acidilactici* HW 01을 실험균으로 사용했다. 이 균주의 배양액을 각각의 BU level을 갖는 m-HGA+E에 적절하게 희석하여 m-HGA+E에 spreading하여 30 °C에서 36시간 배양한다. 실험에서 사용

된 균의 배지와 배양온도는 Table 2에 표시되어있다. 여기서 제조한 m-HGA+E은 Fig.2 과 같이 양성 (+)과 음성 (-)의 판단을 할 수 있도록 BU의 level결정이 필요하다.

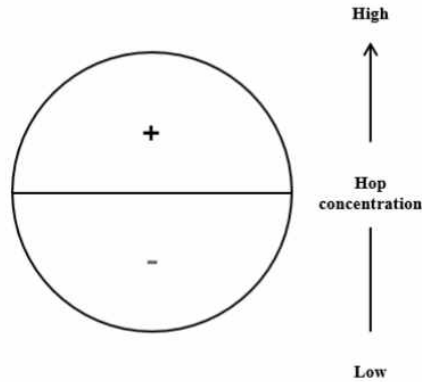


Fig. 1-13 m-HGA+E의 유해균 확인방법

여러 맥주 오염균으로 의심되는 균을 m-HGA+E에서 hop내성을 지니는지 여부를 확인한 실험은 다음과 같다. 실험에 사용된 균은 *P. damnosus* KCTC 3370, *Lb. lindneri* KCTC 5088, *Lb. brevis* KCTC 3498 , *P. acidilactici* HW01, *Lb. plantarum* NCDO 955이다. 결정된 hop extract 양을 적용하여 제조한 m-HGA+E에 5개의 균주를 배양한 borth를 적절하게 희석하여 m-HGA+E에 spreading하여 30 °C 에서 36시간 배양한다. 실험에서 사용된 균의 배지와 배양온도는 Table 15에 표시되어있다. 배양 후 m-HGA+E에서의 colony distribution을 확인하여 위의 BU 결정 실험에 사용된 균과 동일하게 적용이 가능한 여부를 확인한다.

Table 1-15. 실험에서 사용된 균의 배양 조건

Microorganisms	Medium	Temp(°C)
<i>Lactobacillus brevis</i> KCTC 3498	MRS	30
<i>Lactobacillus brevis</i> DF 01	MRS	30
<i>Lactobacillus curvatus</i> KCTC 3767	MRS	30
<i>Lactobacillus lindneri</i> KCTC 5088	MRS	30
<i>Lactobacillus plantarum</i> KFRI 814	MRS	37
<i>Lactobacillus plantarum</i> NCDO 955	MRS	37
<i>Pediococcus cidilactici</i> HW 01	MRS	30
<i>Leuconostoc citrium</i> HW 02	MRS	30
<i>Pediococcus damnosus</i> KCTC 3370	MRS	25
<i>Pediococcus pentosaseus</i> KFRI 834	MRS	37

② 홉 내성 균주의 Hop-resistant genes (horA, horB, horC)의 확인

m-HGA+E에 의하여 hop 내성을 지니는 균주(표현형)로 확인된 경우 hop 내성 유전자의 탐색을 통해 맥주유해균의 재확인과 m-HGA+E의 검증을 한다. 실험에 사용된 균주의 genomic DNA와 plasmid DNA 각각 추출한다. 추출방법은 제조사의 방법을 따라 진행한다. 단, 그람양성균을 사용하므로 lysis 과정 전에 반드시 Lysozyme처리를 하여 추출한 각 균의 genomic DNA와 plasmid DNA를 primer와 함께 Bio-RAD T100 Thermal Cycler (Bio-Rad,

Hercules, CA, USA)에서 PCR을 실행한다. Primer와 annealing temperature는 Table 1-16에서 표기되어 있다. PCR 결과(10 μ l)는 2% agarose gel에 전기영동을 하여 결과를 확인한다.

Table 1-16. hor A, horB, horC detection primer

Gene	Specific primer	Nucleotide sequence	Annealing temperature
<i>horA</i>	LbHC-1	5'-ATCCGGCGGTGGCAAATCA-3'	60°C
	LbHC-2	5'-AATCGCCAATCGTTGGCG-3'	60°C
<i>horB</i>	AORF1F	5'-ATGTTGTATTTGACTTGTATCAGG-3'	55°C
	AORF1R	5'-AACAGGGATTTAATAATGTATCGG-3'	55°C
<i>horC</i>	AORF2F	5'-GTCAACGAAGACAAAGGAGCTCTC-3'	60°C
	AORF2R	5'-GGGCGAACCGTGAACAAATAG-3'	60°C

③ Wort에서 *P. acidilactici* HW 01의 배양을 통한 bacteriocin 생성 확인방법

P. acidilactici HW 01을 wort에 접종하여 30°C에서 배양하면서 균주의 성장에 따른 pH변화와 생균수, pH의 변화 및 bacteriocin (arbitrary unit, AU)을 측정한다. AU는 생육억제를 보인 최고 희석배수의 역수/mL로 나타낸다. 이것은 starter wort의 배양조건 확립을 위하여 진행되는 과정이다.

④ Bacteriocin beer 제조방법

P. acidilactici HW 01을 10 mL MRS broth에서 16시간 배양한다. 배양이 완료된 broth를 centrifugation (19,461 g, 10 min, 4 °C,) 후 상등액을 버리고 3차증류수 10 mL을 넣고 vortexing하여 pellet을 현탁시킨다. 이와 같은 방법으로 3차 증류수로 세척하는 과정을 총 2회 반복한다. 현탁액을 원심분리 (19,461 g, 10min, 4 °C) 후 상등액을 제거한 후 10mL의 wort를 넣고 vortexing한다. 1)의 과정을 통해 만들어진 un-hopped wort에 현탁액을 주입한다 (1%, v/v). 잘 혼합 후 30°C에서 16시간 배양한다. 배양이 완료된 wort는 starter wort라 명명한다. Starter wort를 가지고 발효과정을 동일하게 거쳐 만들어진 맥주를 bacteriocin beer라 한다.

⑤ Bacteriocin beer의 발효 분석

Bacteriocin beer의 주 발효 분석은 2일 간격으로 9일간 총 6회 실시하였으며, 후 발효 분석은 3일 간격으로 15일간 총 7회 측정하였다. 측정항목은 위의 발효 과정에서 주발효/후발효 분석항목과 같고(Specific gravity, Yeast viability, Reducing sugar, Free amino nitrogen, color, pH, alcohol content, foam stability, turbidity, 관능평가), bacteriocin 활성 측정항목이 추가되었다.

- Bacteriocin activity 측정

Agar-well diffusion assay로 bacteriocin 활성을 확인한다. 활성을 보기위하여 사용된 Indicator균은 *Lactobacillus plantarum* NCDO 955를 사용하였다. 이 균은 MRS agar와 broth (De Man, Rogosa and Sharpe)에서 37°C, 1일간 배양 후 사용한다. AU는 생육억제를 보인 최고 희석배수의 역수/mL로 나타낸다.

⑥ Bacteriocin beer의 유해균 저해능 확인 실험방법

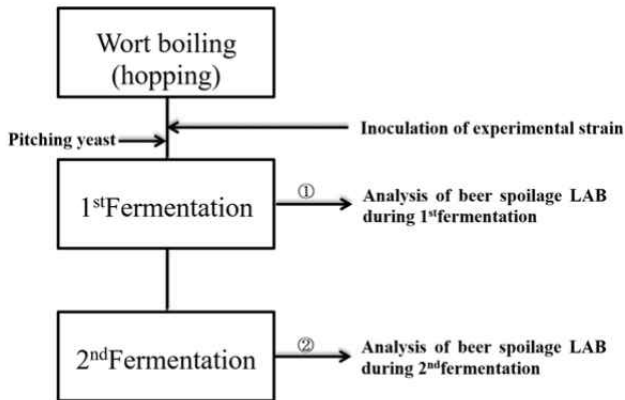


Fig. 1-14. 맥주 유해균 분석을 위한 sampling point.

Primary fermentation 시작단계에서 유해균 (*P. damnosus* KCTC 3370)을 low inoculum (10 cfu/mL)과 high inoculum (1×10^5 cfu/mL) 주입하여 발효 중 유해균 변화를 m-HGA+E 방법과 MRS agar를 이용한 생균수 확인을 통하여 확인한다. 이때 pH가 3.7로 조정된 hopped wort로 primary fermentation을 진행한다. 같은 방법으로 유해균을 주입하여 유해균 변화를 m-HGA+E 방법과 MRS agar를 이용한 생균수 확인을 한다. 주 발효 에서 2 일 간격으로 9일간 총 6회 실시하였으며, 후 발효에서 3일 간격으로 15일간 총 7회 측정하였다.

(3) 결과 및 고찰

(가) 맥주 제조과정 중 미생물 분석 및 보완

① HGA+E과 m-HGA+E의 유효성 확인

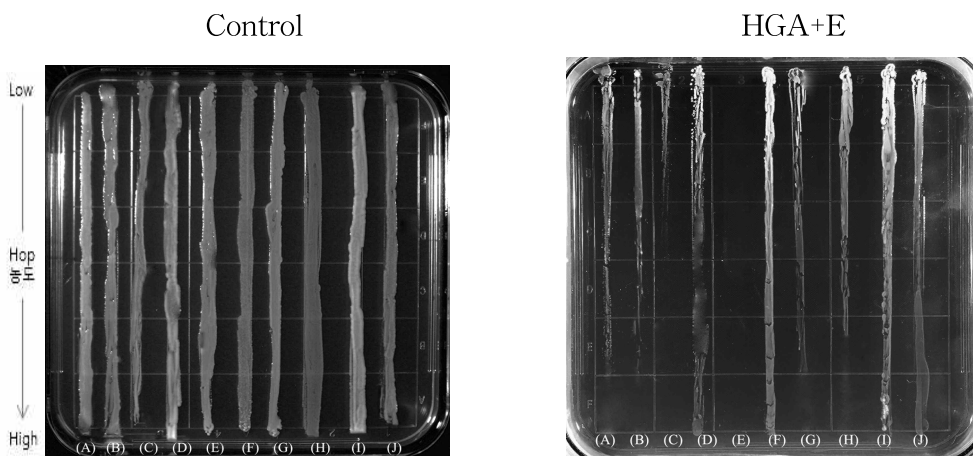


Fig. 1-15. 사각 petridish HGA+E에서의 적용 결과. HGA+E은 30 °C에서 36h 배양 (A) *Lactobacillus plantarum* NCDO 955, (B) *Lactobacillus plantarum* KFRI 814, (C) *Lactobacillus curvatus* KCTC 3767, (D) *Pediococcus damnosus* KCTC 3370, (E) *Pediococcus pentosaceus* KFRI 834, (F) *Lactobacillus lindneri* KCTC 5088, (G) *P. acidilactici* HW 01, (H) *Leuconostoc citrium* HW 02, (I) *Lactobacillus brevis* KCTC 3498, (J) *Lactobacillus brevis* DF 01

Fig. 1-15은 기존의 논문 (Haakensen et al., 2009)에서 보여준 HGA+E의 방법에 의거하여 10가지 균 (A)~(J)의 hop에 대한 내성유무를 확인하였다. 결과를 보면 control 대비 (A), (B), (E), (G), (H)는 m-HGA+E에서 자라지 못한 것을 볼 수 있다. 반면 (D), (F), (I), (J)는 HGA+E에서 hop의 농도가 높은 부분까지 자랐다. 따라서 이 4개의 균을 hop에 내성을 지니는 균주라 볼 수 있다. 이전에 Ahn의 연구된 논문에 따르면 이번 실험에서 hop 내성 균주로 볼 수 있는 *P. damnosus* KCTC 3370, *Lb. lindneri* KCTC 5088, *Lb. brevis* KCTC 3498는 hop에 내성을 지니는 균이라 밝혀졌다 (Ahn et al., 2017). HGA+E을 사용하여 hop에 내성이 있는지 없는지를 판단할 수 있다. 하지만 HGA+E은 Fig.2에서 보듯이 단일 균주의 hop에 저항성이 있는지 여부를 판단할 수 있다.

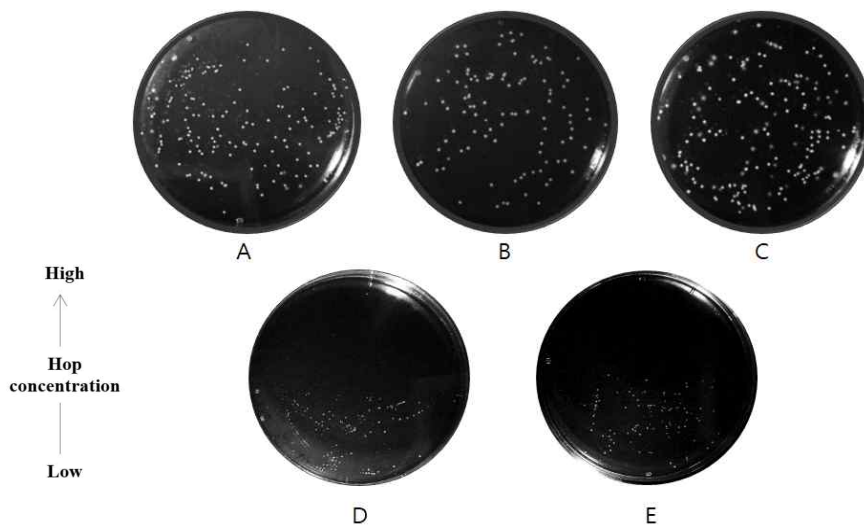


Fig. 1-16. m-HGA+E의 적용

HGA+E은 균의 단일 colony 얻은 후 맥주 유해균임을 판정하므로 보다 많은 시간이 소요된다. 하지만 맥주의 제조과정 중 sampling을 통하여 m-HGA+E에 spreading을 통하여 맥주 유해균 여부 확인 시 첫째로는 맥주 유해균의 존재 유무를 Fig. 3와 같은 양성, 음성으로 판단이 가능하다. 두 번째로는 single colony를 얻을 수 있다. 이것을 통한 PCR analysis의 용이성, 균의 동정 등을 진행하는데 편리한 점이 있다. 마지막으로 HGA+E보다 m-HGA+E이 더 경제적이며 간편하다는 것이다. HGA+E를 제조함에 많은 배지가 소요되며 사각형의 petri dish이므로 균일하게 spreading을 진행하기에 알맞지 않다. 이런 단점을 보완하여 맥주 유해균을 제조 공정상에서 빠르고 간편하게 확인할 수 있도록 디자인한 것이 m-HGA+E이다.

HGA+E에서 사용한 균주중 hop 내성균주와 hop에 내성이 없는 균주를 선별하여 실험을 진행하였다. Fig. Fig. 1-16에서 보듯이 hop에 내성을 지니는 맥주 유해균 (A: *Lb. brevis* KCTC 3498, *Lb. damnosus* KCTC 3370, *Lb. lindneri* KCTC 5088)은 plate 전 범위에서 자라 양성 (+) 으로 판정할 수 있고 hop에 내성이 없는 일반적인 젓산균 (*P. acidilactici* HW 01, *Lb. plantarum* NCDO 955)들은 plate의 절반 이하로 자라므로 음성 (-)으로 판정할 수 있다.

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 M

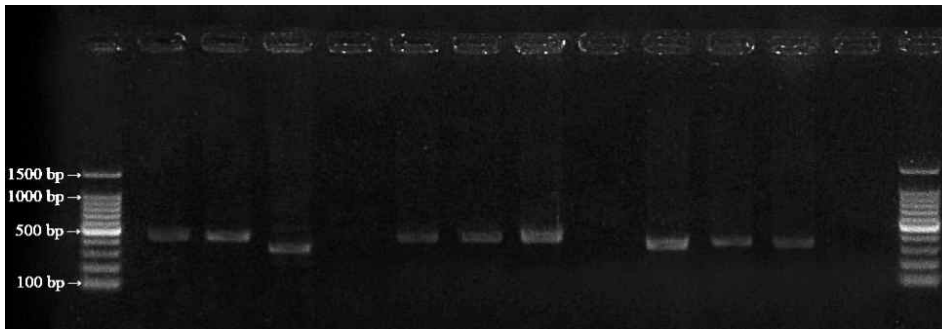


Fig. 1-17 Identification of *horA*, *horB* and *horC* genes in the plasmid DNA of hop resistant strains (*Lb. brevis* KCTC 3498, *P. damnosus* KCTC 3370, *Lb. lindneri* KCTC 5088). Plasmid DNA isolates extracted by plasmid DNA extraction kit was subjected to polymerase chain reaction (PCR) using primers. The PCR result (10 μ l) was electrophoresed on 2% agarose gel. Lane M: SiZerTM-100 DNA Marker (iNtRON Biotechnology). Results of detection for *horA* gene are lanes 1 - 4; 1, *Lb. brevis* KCTC 3498; 2, *P. damnosus* KCTC 3370; 3, *Lb. lindneri* KCTC 5088; 4, Non template control (NTC). Results of detection for *horB* gene are lanes 5 - 8; 5, *Lb. brevis* KCTC 3498; 6, *P. damnosus* KCTC 3370; 7, *Lb. lindneri* KCTC 5088; 8, Non template control (NTC). Results of detection for *horC* gene are lanes 9 - 12; 9, *Lb. brevis* KCTC 3498; 10, *P. damnosus* KCTC 3370; 11, *Lb. lindneri* KCTC 5088; 12, Non template control (NTC).

5가지 균주 (*Lb. brevis* KCTC 3498, *Lb. damnosus* KCTC3370, *Lb. lindneri* KCTC 5088, *P. acidilactici* HW 01, *Lb. plantarum* NCDO 955)에서 *horA*, *horB*, *horC*의 존재여부를 확인하였다. Fig. 1-16 결과는 Fig. 1-15에 나타난 것과 같았다. *Lb. brevis* KCTC 3498, *Lb. damnosus* KCTC 3370, *Lb. lindneri* KCTC 5088의 plasmid DNA에서 3종류의 유전자가 전부 확인되었다. 나머지 *P. acidilactici* HW 01, *Lb. plantarum* NCDO 955에서는 3가지 유전자 중 어느 것도 확인되지 않았다 (데이터는 표기하지 않음). Hop 내성유전자 확인을 통해 m-HGA+E의 결과와 동일함을 확인하여 m-HGA+E의 검증을 하였다.

② Starter wort의 특성 및 wort boiling 후 박테리옌 잔존활성

Starter wort의 제조 목적은 bacteriocin 생성 균주인 *P. acidilactici* HW 01을 사용하여 un-hopped wort에서 직접적으로 bacteriocin을 생성하여 발효단계까지 잔존시키는 것이 목적이다. Bacteriocin HW 01의 경우 2차 년도에서 맥주 유해균에 대한 항균효과가 확인 되었으므로 un-hopped wort에서 균이 bacteriocin을 생성이 되는지 확인하고 맥주의 발효기간에

bacteriocin 활성이 잔존한다면 맥주에 유해균을 저해할 것이다. 그러면 맥주 유해균이 발생시키는 turbidity, off-flavor 등의 문제를 해결 할 수 있다. 동시에 유럽의 Flanders Red Ale (Belgium), Berliner Weisse (Germany)과 같이 신맛이 있는 한국 발효 맥주로의 개발도 가능 할 것이다. 다음에 starter wort에서 HW 01의 변화와 bacteriocin 변화를 확인한 결과가 나타나 있다.

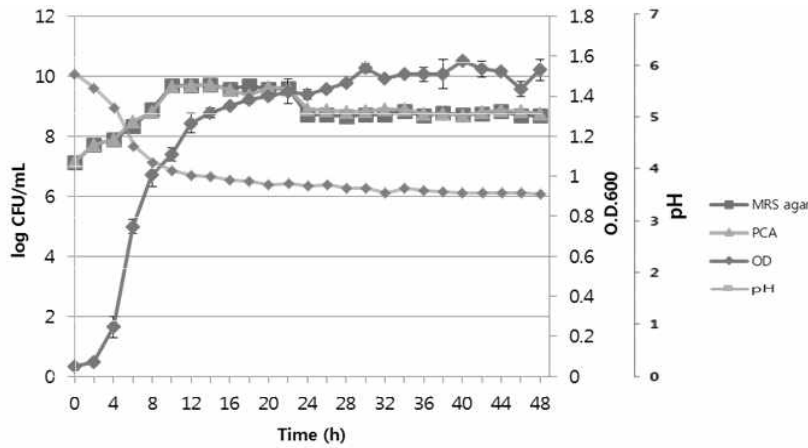


Fig. 1-18 Starter wort의 생균수, OD, pH 변화. Error bars represent standard deviation (n=3).

Fig. 1-18는 un-hopped wort에서 *P. acidilactici* HW 01을 주입하여 48시간 동안 균이 성장하면서 변화되는 특성을 확인한 것이다. Starter wort의 경우 제조 시 HW 01을 주입하고 균의 배양온도인 30°C에서 배양을 진행하였다. Un-hopped wort의 경우 효모가 자라고 알코올과 탄산을 생성하기 위한 영양성분이 가득한 상태이다. 그럴 경우 starter HW 01이 un-hopped wort에서 발효 중 다른 균이 자랄 수 있기 때문에 이에 대한 여부를 확인하기 위하여 MRS agar와 PCA 배지를 사용하여 발효 중 un-hopped wort 내의 균의 성장 변화를 확인하였다. MRS agar는 젖산균을 선택적으로 확인하는 배지이며 PCA는 시료의 모든 균을 확인하는 배지이다. 그래프 상에서 두 가지 배지의 생균수가 시간이 지남에 따라 비슷하게 진행되었으므로 HW 01만이 자랐다는 것을 확인할 수 있다. 또 최종 pH는 pH 3.7 정도 까지 낮아지는 것을 확인할 수 있었다.

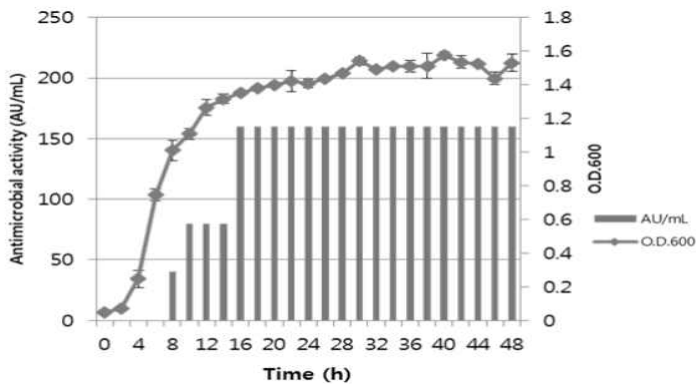


Fig. 1-19 Starter wort의 발효 중 bacteriocin 활성 변화. Error bars represent standard deviation (n=3).

Fig. 1-19에서 보이는 것과 같이 HW 01을 un-hopped wort에 주입한 이후 bacteriocin 활성은 8시간부터 생겨 16시간에서 최대 활성을 보인다. Bacteriocin beer의 생산을 위해 starter wort의 배양 조건을 확립이 요구되어진다. 중요하게 검토되어야하는 부분은 bacteriocin 활성과 pH값과의 적정선을 맞추는 것이 필요하다. pH는 8시간부터 이미 pH3.7 정도까지 낮아진다. 추가적인 배양을 하여도 pH는 크게 변하지 않는다. 그러므로 bacteriocin 활성이 최대 활성이 되는 16시간을 배양 조건으로 하며 온도는 HW 01의 배양온도인 30°C로 한다.



Fig. 1-20 Wort boiling 후 균의 잔존 여부와 bacteriocin의 잔존활성 확인 : 항균활성 확인(좌), PCA (중), MRS agar (우)

Fig. 1-20에서 는 starter wort를 hop과 함께 boiling 과정을 거친 후 bacteriocin과 HW01의 잔존 여부를 확인한 실험이다. Anne Vaughan의 연구에서는 bacteriocin이 boiling 단계이후 활성을 보이지 못했다. 하지만 bacteriocin HW 01은 boiling 후에도 잔존활성을 보이는 것을 알 수 있다. 또한 균은 boiling 과정에서 모두 사멸하여 발효단계에서 사멸해야 한다. 실험결과 PCA와 MRS agar상에서 모두 균이 자라지 않는 것을 확인 할 수 있다. 결과적으로 다음에 진행되는 발효단계에 bacteriocin 활성이 유지된다는 것을 알 수 있다.

③ Bacteriocin beer의 발효 특성 확인

㉞ Bacteriocin 활성변화

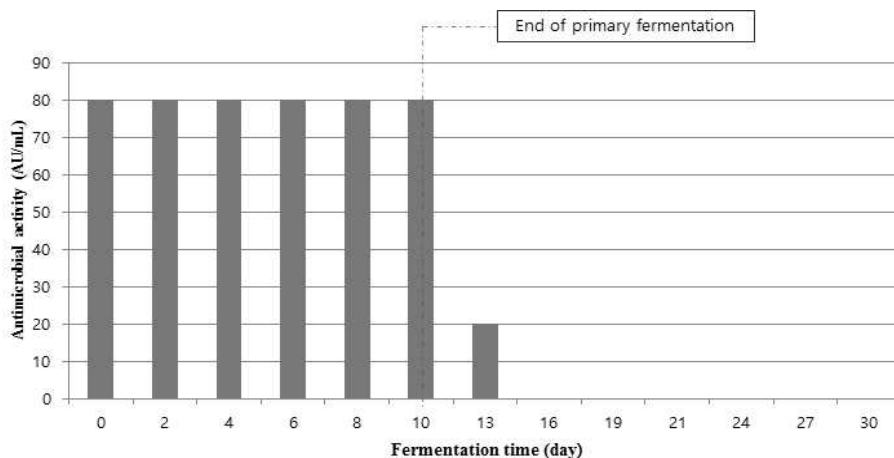


Fig. 1-21 Bacteriocin beer의 발효기간 중 bacteriocin 활성 변화. Error bars represent standard deviation (n=3).

발효 기간 중 bacteriocin의 활성은 최대 80 AU/mL이며 주 발효가 끝나는 시점에 활성이 급격하게 떨어져서 16일부터 활성을 나타내지 않았다. 이는 Anne Vaughan에 의해 연구된 것과 같이 bacteriocin이 lager 효모의 hydrophobic한 부분과 결합하여 flocculation되면서 같이 침강하는 것으로 추측되며 주 발효가 종료되는 시점에 하면에 침강한 yeast가 제거되면서 bacteriocin과 yeast가 함께 제거되어 활성이 급격히 감소하는 것으로 추측이 되어 진다. 발효 중 영양성분이 비교적 많은 주 발효 단계에 bacteriocin 활성이 유지됨으로 유해균에 의한 오염을 줄일 수 있다. 또한 소비자의 인식에서 bacteriocin이 최종 맥주 단계까지 잔존할 경우 거부감이 발생 할 수 있다. 결론적으로 주 발효 종료와 동시에 bacteriocin이 제거되는 것이 긍정적 결과로 간주되어진다.

Boiling 이후부터 주발효 단계까지 bacteriocin이 유해균에 의한 오염을 막아주는 역할을 할 것이며 후 발효 단계는 이미 효모가 주 발효 단계에서 발효액의 많은 영양분을 소비하여 스스로의 성장, 알코올의 생성, 탄산의 생성 등을 통해 거의 영양분이 존재하지 않는 상태가 된다. 이런 환경은 미생물의 성장을 할 수 없으므로 유해균의 조절능력이 확인되었다고 볼 수 있다.

㉠ pH 변화

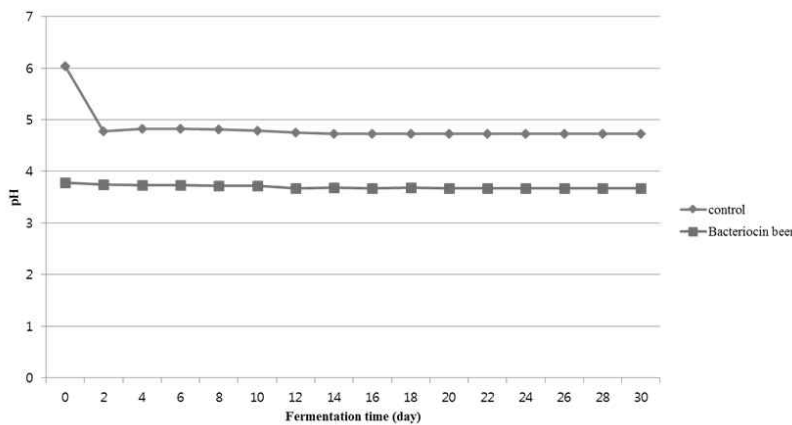


Fig. 1-22 Bacteriocin beer의 발효기간 중 pH 변화. Control의 경우 광맥으로만 제조한 beer Error bars represent standard deviation (n=3).

발효 기간 중 pH의 변화는 기존의 starter wort와 같은 약 pH 3.7정도로 유지되었다. 이는 결과적으로 유기산에 의한 항균효과를 더해줌으로 유해균을 저해하는데 효과가 있다고 볼 수 있다. 또 boiling 이후부터 주 발효 단계까지 bacteriocin이 유해균에 의한 오염을 막아주는 역할을 할 것이며 후 발효 단계는 이미 효모가 주 발효 단계에서 발효액의 많은 영양분을 소비하여 스스로의 성장, 알코올의 생성, 탄산의 생성 등을 통해 거의 영양분이 존재하지 않는 상태가 된다. 이러한 환경에서는 bacteriocin이 존재 하지 않더라도 낮은 pH가 하나의 hurdle로 작용할 것이다.

㊦ Yeast viability, Free amino acid,(FAN), 환원당, 비중 변화 확인
 Bacteriocin beer의 5가지 발효 특성을 보면 다음과 같다.

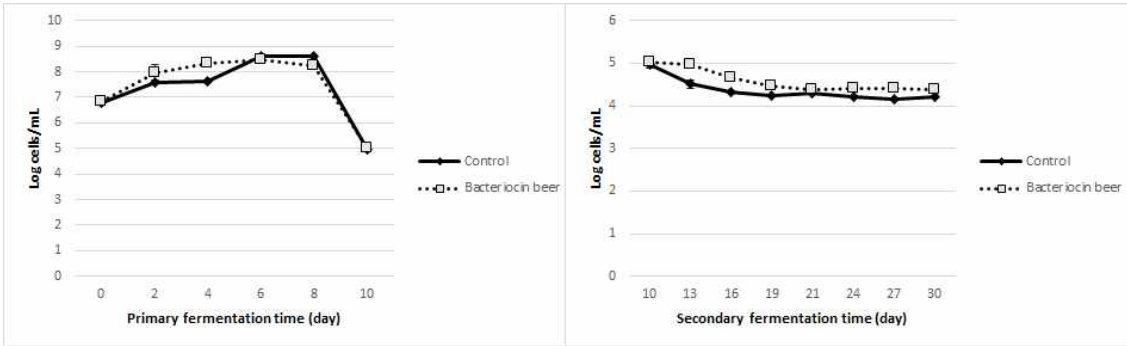


Fig. 1-23 Bacteriocin beer의 발효기간 중 yeast viability 변화, Error bars represent standard deviation (n=3).

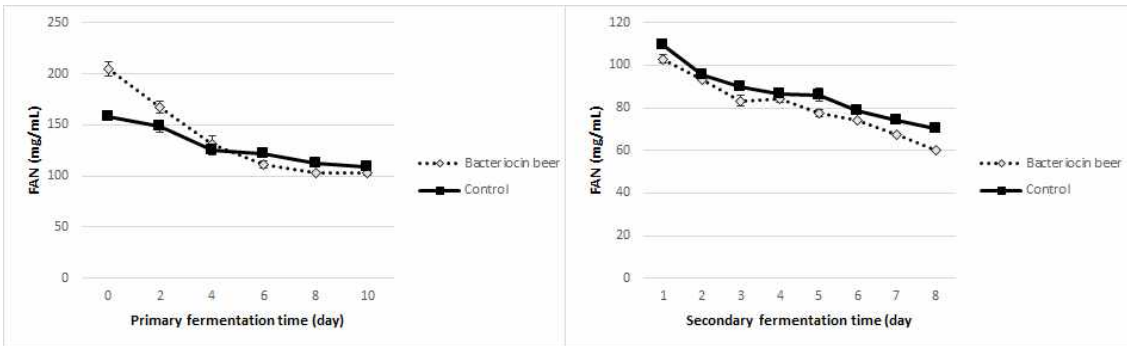


Fig. 1-24 Bacteriocin beer의 발효기간 중 FAN 변화. Error bars represent standard deviation (n=3).

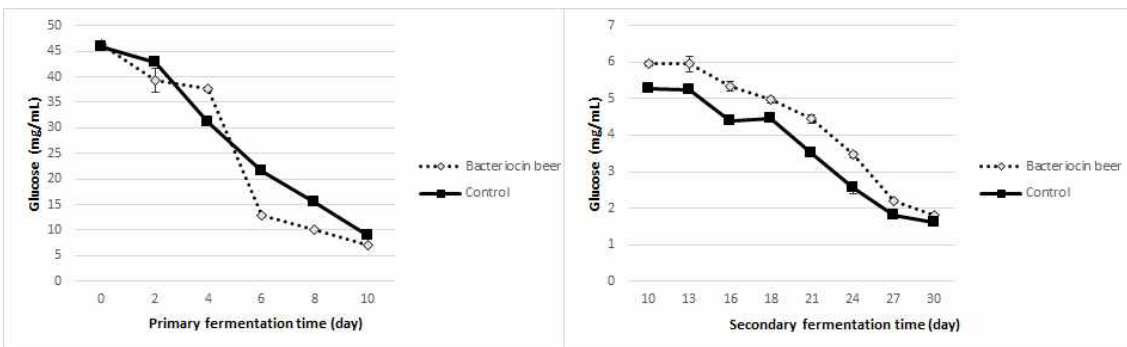


Fig. 1-25 Bacteriocin beer의 발효기간 중 환원당 변화. Error bars represent standard deviation (n=3).

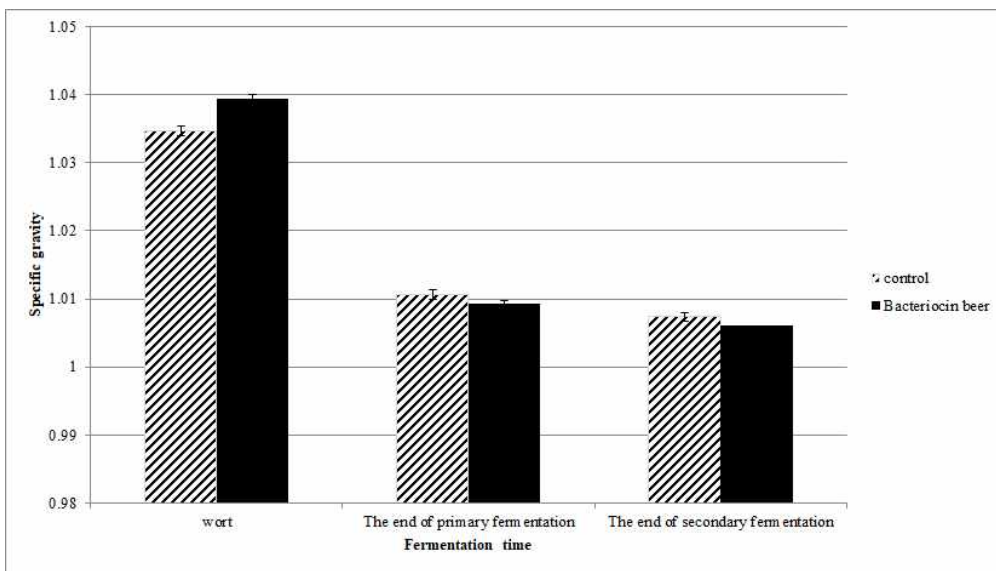


Fig. 1-26 Bacteriocin beer의 발효기간 중 비중의 변화. Error bars represent standard deviation (n=3).

Fig. 1-23 - Fig. 1-26 까지 bacteriocin beer의 특성과 control beer의 비교해 볼 때 차이가 없다는 것을 볼 수 있다. 발효 초기에는 약간의 차이가 있지만 최종 발효가 끝난 후 결과들은 bacteriocin beer와 control beer의 특징이 같다. 이것은 HW 01에 의해 생성된 bacteriocin과 산에 의하여 효모가 피해를 받지 않아다는 것을 의미한다. 그러므로 결과적으로 HW 01을 starter로 사용하여 맥주 제조 시 맥주의 특성에 큰 문제가 없다는 것을 확인할 수 있었다.

㉔ 최종 bacteriocin beer의 특성

Table 1-17. Bacteriocin beer와 control beer의 최종 맥주 특성

Factor	Control	Bacteriocin beer
pH	4.72 ± 0.00	3.67 ± 0.00***
Alcohol contents (%)	4.23 ± 0.17	4.26 ± 0.12
Bitterness (BU)	21.19 ± 0.25	20.98 ± 0.11
Foam stability	380.06 ± 35.87	404.39 ± 31.97
Turbidity	Exist	Free of turbidity

Mean ± standard deviation (n=3)

Significance level in the unpaired t-test : *p<0.05, **p<0.01, ***P<0.001

Table 1-17.에서 보는 것과 같이 control 대비 bacteriocin beer는 알코올 함량, 쓴맛, 거품 안정성에는 큰 차이가 존재하지 않는다. 차이는 젖산균을 발효한 wort를 사용했기 때문에 control보다 낮은 pH를 지닌다. 혼탁도의 경우 control 맥주에서는 존재하는 것으로 실험결과 나타났다. 하지만 bacteriocin beer의 경우에는 혼탁도가 없는 것으로 나타났다. 이것은 산에 의한 맥주의 단백질이 응고하여 yeast와 함께 flocculation되어 주 발효가 끝나고 yeast와 함

게 제거된다고 추측되어진다. 이로 인하여 탁도가 낮아 응집제등의 추가적인 처리를 하지 않아도 맑은 맥주를 얻을 수 있다.

㉔ Color

L value는 lightness를 뜻하며 100에 가까울수록 흰색에 가까움을 의미한다. a value는 green-red를 뜻하며 양수의 값이 red를 뜻하며 그 절대 값이 높아질수록 그 색이 진해진다. b value는 yellow-blue를 뜻하며 양수의 값이 yellow를 뜻하며 그 절대 값이 높아질수록 그 색이 진해진다. 색도의 실험 결과는 다음과 같다.

Table 1-18. Bacteriocin beer와 control beer의 color

Sample	L value	a value	b value
Control	39.11	0.32	8.53
Bacteriocin beer	39.68	0.42	10.15

결과적으로 맥주의 color를 분석해보았을 때 L value에서는 큰 차이를 보이지 않았다. a value와 b value에서 bacteriocin beer가 조금 높은 값이 나왔다. 하지만 실제 Table 1-18의 관능평가에서 보이는 것처럼 육안으로는 구분이 어렵다. 따라서 두 시료간의 차이는 없다고 볼 수 있다.

㉕ 관능평가

Table 1-19. Bacteriocin beer와 control beer의 관능평가

Sensory attribute	Sample	
	Control	Bacteriocin beer
Mouthcoating mouthfeel	2.87 ± 0.45	2.95 ± 0.58
Carbonation mouthfeel	3.55 ± 0.48	4.13 ± 0.55
Body mouthfeel	3.78 ± 0.34	3.57 ± 0.70
Thick mouthfeel	2.55 ± 0.37	2.55 ± 0.53
Alcoholic odor	5.08 ± 0.25	4.63 ± 0.42
Bitter taste	5.13 ± 0.15	2.98 ± 0.19 ***
Astringent mouthfeel	4.85 ± 0.20	3.17 ± 0.38 *
Duration of aftertaste	5.88 ± 0.23	4.91 ± 0.34
Fruity odor	2.75 ± 0.25	6.23 ± 0.25 ***
Sour taste	2.82 ± 0.22	7.17 ± 0.46 **
Sweet taste	2.08 ± 0.03	3.65 ± 0.19 **
Color	4.90 ± 0.46	4.95 ± 0.18
Total preference	4.50 ± 0.49	6.05 ± 0.25 *

Mean ± standard deviation (n=3)

Significance level in the unpaired t-test : *p<0.05, **p<0.01, ***P<0.001

Table 1-19를 보면 control 대비 bacteriocin beer에서 쓴맛이 덜하다는 결과가 나왔다. 하지만 Table 1-4에서 결과로 보면 control과 bacteriocin의 BU (bitterness unit)는 거의 같았다. Astringent mouthfeel의 경우 bacteriocin beer가 control보다 상대적으로 적게 나왔다. Total preference (전체기호도)의 경우 bacteriocin beer를 더 선호한다는 결과가 나타났다. Fruity odor의 경우 매우 유의적 차이가 크게 나왔으며, 과일추출물이 들어가지 않았음에도 과일향이 강도가 세다는 의견이 다수 존재하였다. 추가적인 관능 의견으로 bacteriocin beer의 맛이 샴페인과 유사하다는 의견과 신맛이 다소 강하다는 의견이 포함되어있다. 사람들이 전체기호도가 bacteriocin beer가 더 높다는 결과를 얻었으므로 bacteriocin beer가 실제 한국형 sour beer로의 발전 가능성을 확인하였다.

④ Bacteriocin beer의 유해균 저해능력 및 m-HGA+E 적용

Primary fermentation 시작단계에서 pH를 3.7로 조정된 hopped wort (chemical adjust) 와 hopped starter wort에 유해균을 주입하여 발효 중 유해균의 변화를 확인하였다. 유해균은 *P. damnosus* KCTC 3370을 사용하였고 균의 주입량은 low (10 cells/mL)와 high (1x10⁵cfu/mL)로 하였다. 10 cells/mL의 경우 자연적으로 오염될 경우이며 1x10⁵cfu/mL은 인위적으로 오염시킨 경우이다. 총 4개의 시료를 가지고 실험을 한 결과 Fig.11과 같은 결과가 나왔다. 여기서 생균수는 단일 균주만을 주입하였으므로 MRS agar를 사용하여 확인하였다.

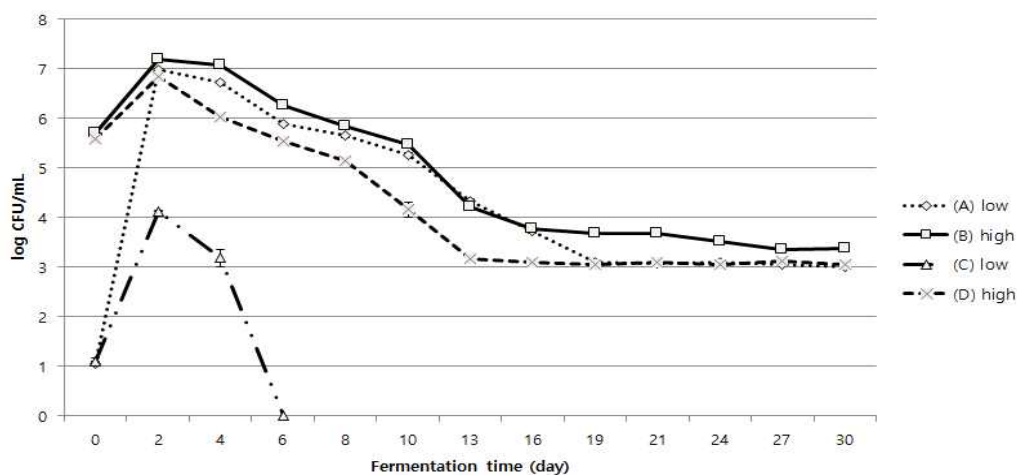


Fig. 1-27 pH 조정(3.7) wort 와 fermented wort에서 유해균 접종량 차이에 따른 발효단계에서 유해균의 변화. 유해균은 *P. damnosus* KCTC 3370을 사용하였고 균의 주입량은 low (10 cells/mL)와 high (1x10⁵cfu/mL)로 하였음. (A) 와 (B) 는 wort의 pH를 3.7로 조정, (C) 와 (D) 는 fermented wort 사용. Error bars represent standard deviation (n=3).

Fig. 1-27의 결과를 보면 (C)의 경우가 균이 적게 주입되고 starter wort를 사용하여 발효를 진행한 경우이다. 나머지 3가지 경우 모두 유해균이 사멸 되지 않았다. 여기서 주목할 부분은 (A)와 (C) 이다. 이 실험에서 pH를 화학적으로 조절하여 첨가한 이유는 유해균 사멸에

영향을 미치는 요인이 pH인지 bacteriocin인지 확인. 두 가지 경우 모두 유해균의 주입량이 적은 경우이나 (A)의 경우는 화학적으로 pH를 조절한 경우이며 (C)는 HW 01에 의해 낮은 pH와 bacteriocin을 지닌다. 허나 (A)의 경우 시간이 지남에 따라 많은 균이 주입된 시료와 같은 그래프 양상을 보인다. 하지만 (A)의 경우 6시간째 균이 모두 사멸하는 것을 볼 수 있다. 다시 말해 발효기간 중 유해균에 대한 bacteriocin의 저해작용이 유지되고 있음을 알 수 있는 대목이다. 그렇지만 균이 많이 주입된 경우는 그 활성이 지속 되지 못하였다. 그러한 이유를 고찰하면 bacteriocin의 활성이 발효단계까지 잔존하나 wort boiling 이후 160 AU/mL에서 80 AU/ml로 활성이 감소하면서 유해균의 양이 많은 경우 큰 효과를 보지 못한다고 볼 수 있다. 또 효모와 bacteriocin이 flocculation하여 가라앉기 때문에 균의 양이 많은 경우 충분한 저해 효과를 볼 수 없다고 추측된다.

Table 1-20. 발효단계에서 modified HGA+E를 이용한 유해균 관별 방법 적용. Wort는 fermented wort를 사용함. 유해균은 *P. damnosus* KCTC 3370을 사용하였고 균의 주입량은 low (10 cells/mL)와 high (1×10^5 cfu/mL)로 하였음 (n=3).

Fermentation time (day)	Low inoculum of beer spoiler	High inoculum of beer spoiler
0	+	+
2	+	+
4	+	+
6	-	+
8	-	+
10	-	+
13	-	+
16	-	+
19	-	+
21	-	+
24	-	+
27	-	+
30	-	+

Modified HGA+E을 이용한 유해균 존재확인 +, 유해균 있음 -, 유해균 없음

Table 1-20에서 보면 m-HGA+E을 사용하여 양성과 음성을 구분한 것이다. Low inoculum의 경우 6시간부터 음성으로 나와 유해균이 사멸되는 것을 확인 가능하다. 이 실험으로 m-HGA+E를 실제 맥주 공정상에서 적용 가능하다는 점을 확인 할 수 있었다. bacteriocin beer가 starter wort부터 주 발효 단계까지 유해균에 대한 저해능력이 지속되어져 오염을 방지하는 것을 결과로 확인 할 수 있다. 이 결과는 Fig.11의 결과와 일치한다.

나. 홍삼/복분자 맥주의 발효 최적 첨가시기 규명

(1) 요약

맥주 발효 기간 동안 홍삼extract와 복분자 과즙의 첨가시기를 다르게 하여 최적 첨가시기를 확립하였다.

(가) 맥주 제조를 위한 실험재료

먼저 국산 보리 광맥 맥아는 농촌진흥청 벼맥류부의 협조에 의하여 전라북도 익산에서 수확된 것을 사용하였다. 광맥은 2010년 개발된 맥류 품종으로, 대립, 다수성이며 도복, 습해, 한해 등에 강하고 보리호위축병에 저항성이 있으며 기후변화에 따른 불시출수에 안정적인 특성이 있다. 효소는 (주)Bision Biochem에서 세가지 액화 효소를 구입하여 사용하였다. 당화효소 α -amylase (from *Bacillus licheniformis*)와 amyloglucosidase (or glucoamylase, from *Aspergillus niger*)는 각각 Almylex BT2, GA-L New 제품을 사용하였고 여과증진효소 β -glucanase (from *Trichoderma reesei*, pentosanase 활성 포함)는 Laminex BG2 제품을 사용하였다. 홉(hop)은 Czech Saaz(AA 2.2%) pellet을 이용하였고, 효모는 비전바이오켄 맥주발효용 효모 Saflager W-34/70을 이용하였다.

(나) 맥주 제조 방법

① 당화(Mashing)과정

㉠ 효소 처리

당화 전 당화효소 α -amylase와 amyloglucosidase, 여과증진효소 β -glucanase를 각각 맥아 사용량의 0.1 % 로 첨가하였다.

㉡ Mashing procedure

광맥 맥아 각 50g을 400mL 의 증류수에 넣고 당화조로 옮긴 뒤 52℃에서 20분간 세이킹 하면서 당화시킨다. 다음으로 분당 1℃씩 상승시켜 10분 동안 62℃까지 올린 다음 1시간 더 당화시킨다. 그 다음 마찬가지로 1℃/min 속도로 10분간 온도를 10℃ 증가시켜 맥즙의 온도를 72℃까지 올린 다음 15분간 당화시킨다. 그 다음 4분간 온도를 4℃ 증가시켜 76℃에서 10분간 당화를 하여 당화를 완료한다.

㉢ Cooling and filtration

1시간 이후, 맥아즙은 10~15분 이내에 상온으로 냉각하고 젖는 것을 멈추고, 온도계를 제거한 후, 비이커에 증류수를 부어 450.0±0.05g으로 맞춘다.

저울에 무게를 재기 전에 유리막대를 이용하여 한번 저어주고, 여과 전에 한 번 더 저어준 후(5분 이상 15분 이하) 전체 내용물을 지름 20cm의 깔때기로 주름진 여과지(아래)를 이용하여 여과하고 지름 20cm 관찰용 유리커버를 여과 동안에 덮는다. 첫 번째 맥아즙 100ml을 다시 부어서 여과하며 여과지 위의 잔유물이 갈라지기 시작하면 여과를 종료한다. 여과가 느리게 진행될 때는 2시간 이후에 여과를 종료한다. 거친 맥아의 경우 200±2ml 맥아즙을 정확히 추출한다. 여과시간은 100ml 맥아즙을 다시 여과하였을 때 1시간 이내에 여과가 종료되는 것이고, 더 오래 걸리면 느린 것이다. 투명도를 15분 이내로 관찰하여 맑음, 약간 탁함, 탁함으로 표현한다.

② 발효(Fermentation)과정

당화과정을 거쳐 나온 맥즙에 hop을 1/2, 1/4, 1/4로 3회 나누어 넣으며, 각각 10분, 5분, 5분씩 끓여주었다(Wort boiling). 이후 맥즙의 온도를 20℃까지 급속 냉각시켰다. 그 후 알코올 도수 예측 및 당화의 정도를 파악하기 위한 초기 비중을 측정하였다. 홉이 들어간 맥즙(hopped wort)에 효모를 5.0×10^6 cells/mL이 되도록 주입한 뒤, 공기 차단기(air lock)를 설치하여 전 발효는 14℃에서 7일간, 후 발효는 4℃에서 21일간 실시하였다. 또한, 홍삼 extract는 발효홍삼 G21(명장홍삼, ㈜바산고려홍삼)을 사용하였고, 복분자 과즙은 복분자 순액 700mL(선운산 농협, 베리웰)을 사용하였다.

- 홍삼extract(1)/복분자 과즙(2) 첨가시기별 발효 방법

홍삼 extract는 맥즙의 0.01%(w/v), 복분자 과즙은 맥즙의 3.0%(v/v)를 넣어 발효하였다. 홍삼 extract와 복분자 과즙은 각각 주발효 전, 후발효 전에 넣어 발효를 진행하였고, 마지막으로 후발효 후에 홍삼ex와 복분자 과즙을 넣어 전발효 전과 후발효 전에 첨가한 맥주와 pH, 알코올 함량, 색도, 관능평가 등의 비교를 하였다.

③ 주발효, 후발효 분석

주발효 전, 주발효 후, 후발효 후, 세 지점에서 비중(specific gravity), pH, 색도를 비교하였고, 주발효와 후발효 기간 동안 환원당, free amino nitrogen(FAN), 효모 변화를 각 샘플별로 분석하였다. 주발효 분석은 2일 간격으로 7일간 4회 실시하였으며, 후발효 분석은 3일 간격으로 21일간 8회 실시하였다. 주발효 동안에는 아무것도 첨가하지 않은 발효액(Control)과 주발효 전에 홍삼 ex를 넣은 발효액(S1), 주발효 전에 복분자 과즙을 넣은 발효액(S2)의 분석을 실시하였다. 후발효 분석은 control, S1, S2와 후발효 전에 홍삼 ex를 넣은 발효액(P1), 후발효 전에 복분자 과즙을 넣은 발효액(P2) 총 5가지 샘플을 가지고 분석을 실시하였다.

㉞ Specific gravity

발효액 sample의 100mL를 메스실린더에 거품이 생기지 않도록 넣고, 비중계(200-DK-6, Daekwang, Seoul, Korea)를 이용하여 비중의 변화를 측정하였다. 비중의 변화는 당화 후의 맥즙의 original gravity(O.G.), 주 발효 종료 후 specific gravity(S.P.1), 후 발효 종료 후 final gravity(S.P.2)를 측정하였다.

㉞ Yeast viability

효모의 생육 변화는 ASBC 방법을 기준으로 하였다. 효모 생육수를 측정하기 위해 methylene blue 염색법을 기준으로 하였고 haemocytometer를 사용하여 측정하였다.

㉞ Reducing sugar

환원당의 양은 DNS법을 기준으로 하여 측정하였다. DNS시약은 10.0g의 3,5-dinitrosalicylic acid, 2.0g phenol과 200.0g rochelle salt를 1000mL의 sodium hydroxide(10g/L)와 Sodium carbonate(0.5g/L)에 용해시켜 준비하였다. 환원당을 함유하고

있는 시료는 100배 희석하여 사용했으며, 희석된 시료 1mL과 DNS시약 3mL을 끓는 물에서 5분간 반응시킨 후 상온에서 5분간 식혀 spectrophotometer(UVmini-1240, Shimadzu, Kyoto, Japan)를 이용하여 550nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도 값은 standard curve를 이용하여 환원당량으로 산출한 뒤 희석배수를 곱하였다.

㉔ Free amino nitrogen

i) Ninhydrin color reagent 제조법

증류수 100mL 기준으로 10.0g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 6.0g KH_2PO_4 , 0.5g 1,2,3-indantrione· H_2O , 0.3g fructose를 100mL의 증류수와 섞어 제조한다.

ii) Dilution solution 제조법

KIO_3 2.0g과 증류수 600mL을 400mL의 ethyl alcohol에 섞어서 제조한다. 제조된 dilution solution은 냉장보관해서 사용한다.

iii) Glycine standard solution 제조법

Stock solution으로 제조한 뒤 사용 시, working solution을 만들어서 사용한다. Stock solution은 107.2 mg glycine· H_2O 을 100mL 증류수로 희석해서 냉장보관한다. Working solution은 stock solution을 증류수에 100배 희석해서 사용한다.

iv) 실험방법

100배 희석된 sample 2.0mL, 증류수(blank) 2.0mL, stadard solution 2.0mL을 각 test tube에 넣는다. 1.0mL ninhydrin color reagent를 첨가하고, 증발을 막기 위해서 마개를 씌운다. 16분 동안 끓는 물에서 가열하고, 24분 동안 cooling한 다음 dilution solution을 각각 5.0mL씩 넣고 vortexing 하여 완벽하게 섞는다. 증류수로 auto-zero를 잡고, spectrophotometer를 이용하여 570nm에서 흡광도를 측정한다. 3반복하여 측정된 흡광도의 평균에서 평균 blank 흡광도 값을 뺀다. 그 식은 다음과 같다.

$$\text{Free amino nitrogen}(mg/L) = \frac{(\text{측정된 흡광도} - \text{blank 흡광도}) \times 2 \times 100}{(\text{Standard 흡광도} - \text{blank 흡광도})}$$

④ 후발효 추가 분석 항목

첨가물을 넣지 않은 대조군(Control)과 주발효 전 홍삼 ex를 첨가한 맥주(S1), 복분자 과즙을 첨가한 맥주(S2), 후발효 전 홍삼 ex를 첨가한 맥주(P1), 복분자 과즙을 첨가한 맥주(P2), 마지막으로 후발효 후 홍삼 ex를 첨가한 맥주(SF1), 복분자 과즙을 첨가한 맥주(SF2) 총 7가지 맥주의 후발효 추가 분석을 실시하였다.

㉕ Color

색도계(CR-300, Minolta Co., Ltd., Osaka, Japan)을 이용하여 맥주의 색도를 L, a, b 값으로 측정하여 부원료 종류 및 함량별 영향을 분석하였다. L 값은 lightness(명도)를 나타내며 1부터 100까지 표시되며, 100에 가까울수록 흰색에 가까움을 의미한다. a 값의 경우 green-red 값을 나타내며, 양수의 값을 가지면 빨간색, 음수의 값을 가지면 초록색에 가까

움을 의미하며, 절대값이 증가할수록 그 색의 강도는 높아진다. b 값의 경우 yellow-blue 값을 나타내며, 양수의 값을 가지면 노란색, 음수의 값을 가지면 초록색에 가까움을 의미하며, 절대값이 증가할수록 그 색의 강도는 높아진다.

㉞ pH

pH meter(ORION 3 STAR, Thermo, Singapore)를 사용하여 3반복 측정하였다. 첨가물을 넣지 않은 대조군(Control)과 주발효 전 홍삼 ex를 첨가한 맥주(S1), 복분자 과즙을 첨가한 맥주(S2), 후발효 전 홍삼 ex를 첨가한 맥주(P1), 복분자 과즙을 첨가한 맥주(P2), 마지막으로 후발효 후 홍삼 ex를 첨가한 맥주(SF1), 복분자 과즙을 첨가한 맥주(SF2) 총 7가지 샘플 맥주의 pH를 비교하였다.

㉟ Alcohol content

알코올 함량은 알코올 증류장치를 이용하여 측정하였다. 알코올을 증류시킨 후 주정계(211-DK-12, Daekwang, Seoul, Korea)를 이용하여 측정하였으며, 이를 주정분 온도 환산표를 통해 알코올 함량을 환산하였다.

㊱ Foam stability

맥주의 거품 안정성의 경우 ASBC에 제시된 방법을 이용하여, 만든 맥주의 거품안정성을 비교하였다. 하부에 cock이 있는 유리 칼럼 높이 직경을 사용하여 시료 50 mL를 붓고 30 초 후에 거품이 외의 하층액을 제거하였다. 그 후 230초간 거품이 꺼지는 시간으로 깨진 거품의 양(b)과 남은 거품 양(c)을 측정하여 거품안정성(sigma)을 측정하였다. 거품안정성을 산출하는 식은 아래와 같다.

$$\Sigma = \frac{230}{2.303 \log \left[\frac{b+c}{c} \right]}$$

㊲ Turbidity

맥주의 탁도(turbidity)는 spectrophotometer(UVmini-1240, Shimadzu, Kyoto, Japan)를 이용하여 측정하였다. 700 nm에서의 흡광도가 430 nm에서 측정한 흡광도 보다 ≤ 0.039 배라면 탁도가 “없음(none)”으로, 아니라면 “있음(exist)”으로 결정하였다. 젖산균 배양액을 넣어 제조한 bio-acidified 맥아를 이용하여 만든 맥주와 젖산균 배양액을 넣지 않고 제조한 맥아를 이용하여 만든 맥주의 turbidity를 비교하여 분석하였다.

㊳ 관능평가

관능검사는 attribute difference test를 수행하였다. 동국대학교 식품공학과 대학생 30명 중에서 10명을 선발하였다. 패널 선택을 위하여 각 패널의 관능검사 결과의 ANOVA가 수행되었으며, 맥주의 주된 taste인 bitterness를 고려하였다. 5개의 Reference로(20, 40, 60, 80, and 100 mg/L-water of isohumulone solution)이 사용되었다. 묘사적 언어는 ASBC[5]

를 기준으로 선택된 패널들에 의해 채택되었다. 관능적 특성은 Odor(O), Taste(T), Mouthfeel(M)과 afterflavor(Af)로 구성되었으며, 다음과 같이 세분화되었다. Oily(OTM), Carbonation(M), Body(OTM), Mouthcoating(MAf), Alcoholic(OTW), Malty(OT), Fruity(OT), Bitter(TAf), Astringent(MAf)에 더하여 Overall preference로 구성하였다. 선택된 패널들은 기술어를 사용하기 위하여 reference material를 사용하여 훈련되었다.

각 시료마다 평가해야 할 특성이 많기 때문에 실험은 랜덤화 블럭법을 이용하여 설계되었다. 각 특성 당 강도는 0-10점 척도로 평가되었다(0: 없음, 1-2: 약함, 3-4: 보통, 5-6: 강함, 7-8: 더 강함, 9-10: 매우 강함) (Kim et al., 1996). 맥주 샘플은 test전에 4℃에서 하루 보관 후 사용하였다. 검사는 20℃의 tasting booth에서 실행되었다. 10 mL의 시료는 random three digit code로 labeling 된 유리컵에 담겼으며, 9개의 시료가 패널에게 주어졌다. 처음에는 odor에 대한 것을 평가하고, 그 후 마셨을 때 taste, mouthfeel, aftertaste를 평가하였다. 한 시료 당 모든 질문을 평가한 후 다른 설문지에 다른 시료를 평가하게 했다. 패널요원들은 시료 당 30초의 휴식시간을 가졌으며, 물과 unsalted cracker로 입을 헹군 후 검사를 시행했다.

(3) 결과 및 고찰

(가) 홍삼/복분자 첨가시기별 맥주의 발효특성

① 담금 과정(mashing)후 및 hop 첨가 후 맥즙 분석

담금 과정을 통해 수득된 용액을 맥즙(wort)이라 하며, 맥아의 고분자 성분들이 당분이나 단백질과 같은 저분자 성분으로 분해되어 수용성으로 변한다. 아래의 table 1-8은 광맥 맥아를 이용하여 당화 후 un-hopped wort와 hop을 첨가하여 자비(boiling) 후의 hopped wort의 품질 특성을 나타낸 것이다. 맥즙 자비 시 맥즙의 멜라노이딘이 생성되어 맥즙 색소가 어두워지게 되며 이 멜라노이딘에 의해 맥즙이 산산화 되며, hop성분도 맥즙의 pH 감소에 영향을 끼친다. 맥즙 자비 시 맥즙의 pH가 낮을 때, 단백질-폴리페놀 성분이 빠르게 침전되며 맥즙의 색이 덜 어두워지게 된다.

Table 1-21. un-hopped wort와 hopped wort 분석 결과

분석 항목		un-hopped wort	Hopped wort
pH		5.95	5.86
비중(Specific gravity)		1.031	1.040
Free amino nitrogen(mg/L)		113.50	144.84
환원당 (mg/mL)		47.53	56.38
Filtration time(min)		56.18	-
Color	L value	40.61	35.64
	a value	0.19	0.27
	b value	7.61	11.74

② 홍삼 extract와 복분자 과즙 첨가 시기별 맥주의 발효 분석

아래의 결과표와 차트에서 1은 홍삼ex 첨가를 나타내며, 2는 복분자 과즙 첨가를 의미한다. S1은 주발효 전 홍삼ex 첨가, P1은 후발효 전(주발효 후) 홍삼ex 첨가, SF1은 후발효 후(최종 맥주) 홍삼ex 첨가한 샘플을 나타낸 것이고, S2는 주발효 전 복분자 과즙 첨가, P2은 후발효 전(주발효 후) 복분자 과즙 첨가, SF2는 후발효 후(최종 맥주) 복분자 과즙을 첨가한 샘플을 말한다.

㉞ pH

발효가 진행되면서, 즉 효모가 맥즙의 당을 이용하면서 맥주의 pH는 감소하게 된다. 일반적으로 mash의 pH는 5.6 ± 0.2 , boiled wort의 pH는 5.4 ± 0.2 , 최종 후발효 후 pH는 4.2-4.8으로 알려져 있다. 맥주 제조과정에서 pH는 효모의 발효과정에 뿐만 아니라 최종적으로 맥주의 맛에 영향을 주기도 하며, 최종맥주의 pH가 4.0보다 낮을 때 시거나 쓴맛, 건조한 맛이 날 수 있다. 맥주 pH의 변화는 table 9와 table 10에 나타내었다. 홍삼/복분자 맥주의 최종 pH는 lager type맥주의 pH범위를 충족했다.

Table 1-22. 발효 기간 동안 홍삼 extract첨가 맥주의 pH 변화

	Control	S1	P1	SF1
주발효 전 측정	5.86	5.83	5.86	5.85
후발효 전 측정	4.69	4.65	4.75	4.69
후발효 후 측정	4.65	4.62	4.59	4.65

Table 1-23. 발효 기간 동안 복분자 과즙 첨가 맥주의 pH변화

	Control	S2	P2	SF2
주발효 전 측정	5.86	5.04	5.86	5.85
후발효 전 측정	4.69	4.55	4.55	4.69
후발효 후 측정	4.65	4.55	4.46	4.48

Table 1-22 에서 주발효 전 홍삼 ex를 첨가한 맥주(S1)의 pH가 다른 샘플보다 0.03 낮게 나타났지만 홍삼ex가 맥즙의 pH에 미치는 영향과 발효에 의한 영향을 정확히 구분할 수 없으며, 홍삼ex로 인한 pH의 감소라고 할 수는 없다. 전체 샘플의 최종 맥주의 pH를 보면 홍삼ex를 첨가했을 때 control과 비교하여 큰 차이를 보이지 않았다.

Table 1-23에서 주발효 전 복분자 과즙을 첨가한 맥주(S2)의 pH는 5.04로 control과 다른 샘플의 pH보다 낮게 나타났으며, 복분자 과즙을 첨가했기 때문인 것으로 보인다. (복분자 과즙 pH 3.39) 하지만 S2의 후발효 후의 pH (pH 4.55)는 control (pH 4.65)보다는 낮지만 P2 (pH 4.46)와 SF2 (pH 4.48)보다는 높은 pH를 보였다. S2의 pH는 후발효 전과 후에 pH 4.55로 일정했으나, control과 P2, SF2의 pH는 후발효 후 낮게 측정되었다.

복분자 과즙을 첨가한 맥주의 pH가 홍삼ex를 첨가한 맥주보다 전체적으로 낮게 나타났다.

㉟ 비중 (Specific gravity; SG)

2차년도 보고서에서도 나타났듯이, 맥주 발효 시 비중(Specific gravity)은 순수 물의 밀도에 대한 용액의 밀도를 의미한다. 담금 과정(mashing)에서 맥아가 가지고 있는 성분들이 물에 녹게 되어 비중이 상승한다. 발효가 진행됨에 따라 효모가 맥즙의 영양분을 이용하여 알코올이나 탄산가스 등을 생성하게 되며 따라서 비중은 감소하게 된다. 일반적으로 최종 맥주 제품의 비중은 1.010정도이며, 순수한 물의 경우 1.000이다.

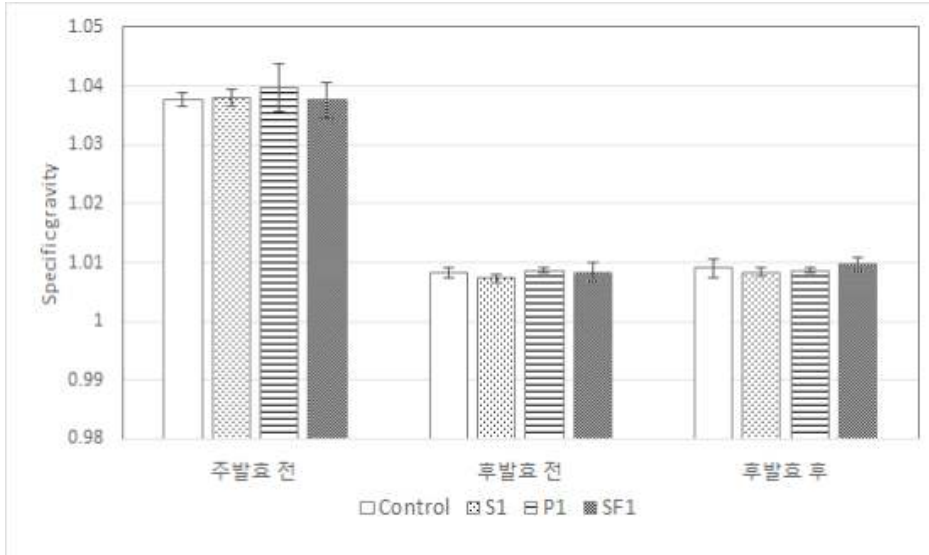


Fig. 1-28 발효 기간 동안 홍삼 extract 첨가 맥주의 비중

S1 : 주발효 전 홍삼ex 첨가 맥주, P1 : 후발효 전 홍삼ex 첨가 맥주, SF1 : 후발효 후 홍삼 ex 첨가 맥주

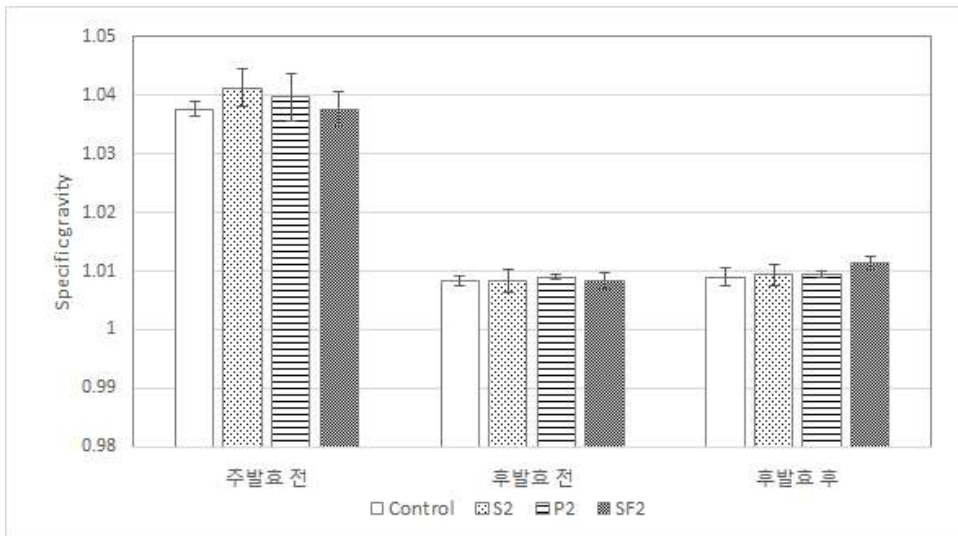


Fig. 1-29 발효 기간 동안 복분자 과즙 첨가 맥주의 비중

S2 : 주발효 전 복분자 과즙 첨가 맥주, P2 : 후발효 전 복분자 과즙 첨가 맥주, SF2 : 후발효 후 복분자 과즙 첨가 맥주

주발효 전 모든 맥주 샘플의 비중은 약 1.040에 가깝게 나타나며, 홍삼ex를 주발효 전에 첨가했을 때에도 control과 크게 차이가 나지 않았다. 주발효가 끝난 후 모든 샘플의 비중이 약 1.010이하로 감소하였으며, 이는 효모에 의한 알코올 발효에 의한 것이다. 후발효 동안에는 비중의 변화가 거의 일어나지 않았으며, 후발효 후 홍삼ex를 첨가한 맥주의 비중이 후발효 전보다 증가하였지만 유의적 차이는 없었다.

Fig. 10을 보면, control에 비해 주발효 전 복분자 과즙을 첨가한 샘플(S2)의 비중이 높게 나타났으며, 최종 맥주(후발효 후 측정)에서 후발효 후 복분자 과즙을 첨가한 샘플(SF2)의 비중이 약 1.011로 나머지 샘플의 비중보다 높게 나타났다. 따라서 복분자 과즙의 첨가는 비중의 증가에 영향을 주는 것으로 보인다.

㊤ 환원당(Reducing sugar; RS)

담금 과정에서 맥아로부터 나온 당류를 효모가 이용하여 알코올 발효를 하는데 발효가 진행됨에 따라 환원당의 양이 감소하게 된다. 이 실험에서는 glucose를 standard로 하여 맥주의 환원당량을 간접적으로 알 수 있다. 발효 기간 동안의 환원당 변화는 다음과 같다.

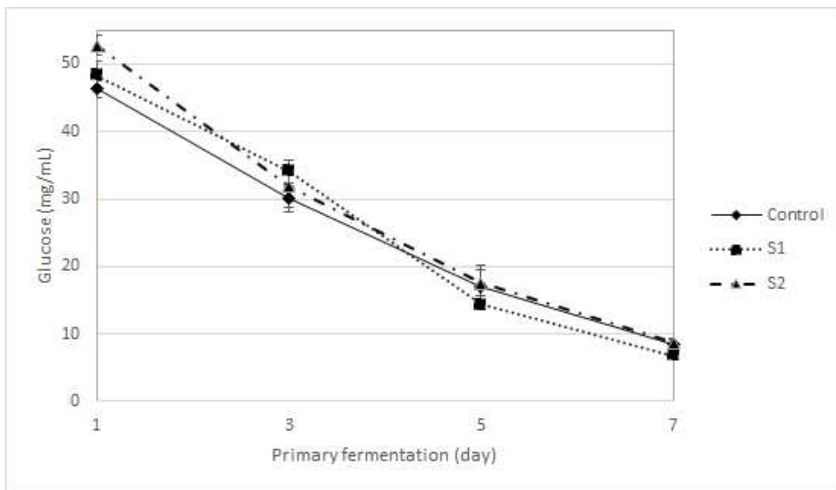


Fig. 1-30 주발효 동안 환원당 변화

S1 : 주발효 전 홍삼ex 첨가 맥주, S2 : 주발효 전 복분자 과즙 첨가 맥주

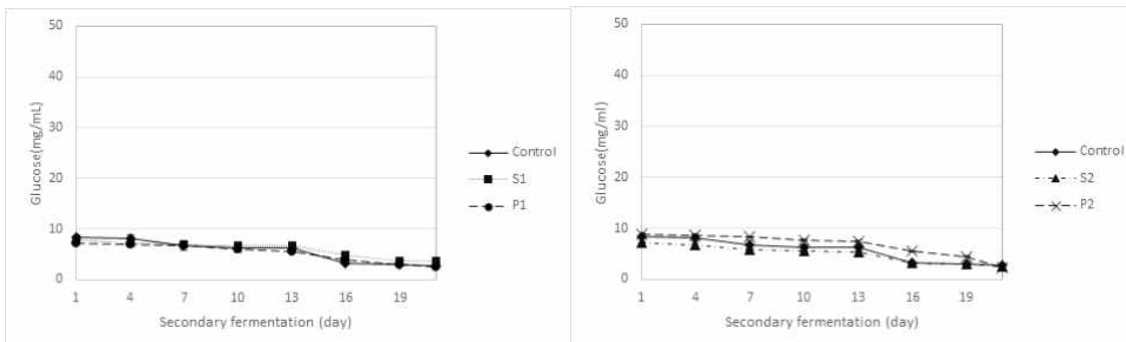


Fig. 1-31 후발효 동안 환원당 변화

S1 : 주발효 전 홍삼ex 첨가 맥주, P1 : 후발효 전 홍삼ex 첨가 맥주 (좌)

S2 : 주발효 전 복분자 과즙 첨가 맥주, P2 : 후발효 전 복분자 과즙 첨가 맥주 (우)

홍삼ex에 비해 복분자 과즙에는 당류가 높은 함량으로 존재하기 때문에 주발효 전 복분자를 첨가한 맥주(S2)의 환원당의 양이 가장 높게 나타난다. 주발효가 진행되면서 control과 S1, S2의 환원당 함량은 급격하게 줄어들며, 후발효 시작할 때의 함량은 거의 차이를 보이지 않았다. Fig. 21의 좌측 그래프에서 후발효 전 홍삼ex를 첨가한 맥주(P1)의 초기 환원당량은 control맥주, S1맥주와 차이를 보이지 않았고, 후발효 동안 환원당 감소는 비슷하게 나타났다. Fig. 1-31의 우측 그래프는 후발효 동안 복분자 첨가 맥주의 환원당 변화를 나타내는데, 후발효 전 복분자 과즙을 첨가했을 때 control과 S2 맥주보다 초기 환원당 함량이 약간 높게 나타났다. 주발효 이후 효모를 회수하는 과정을 거치기 때문에 후발효 시작 전, 효모의 수가 급격히 줄어들며 후발효 동안 모든 맥주 샘플에서 환원당 함량의 변화는 크게 나타나지 않았다.

㉔ Free amino nitrogen (FAN)

Free amino nitrogen (FAN) 함량을 측정하는 것은 담금 과정 이후 맥즙이나 발효 기간 동안 또는 발효 후의 맥주에 녹아있는 small peptide, amino acid, ammonium ions 등의 함량을 나타낸다. FAN은 효모의 성장에 이용되며, 효모는 FAN을 이용하여 증식하며 이를 통해 알코올 발효가 진행된다. FAN의 함량이 지나치게 많으면 맥주를 탁하게 하는 haze를 형성하며 따라서 FAN은 맥주의 품질에 영향을 미친다. FAN 함량이 지나치게 적으면 효모의 성장이 잘 일어나지 않게 되며, 알코올 발효가 제대로 일어나지 못한다.

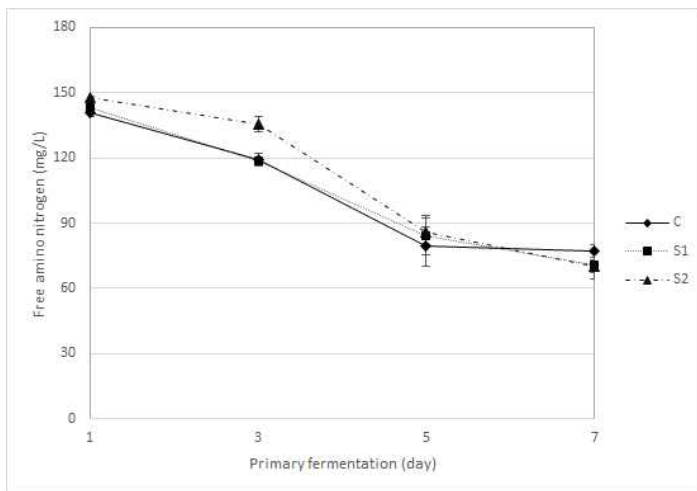


Fig. 1-32 주발효 동안 FAN 변화

S1 : 주발효 전 홍삼ex 첨가 맥주, S2 : 주발효 전 복분자 과즙 첨가 맥주

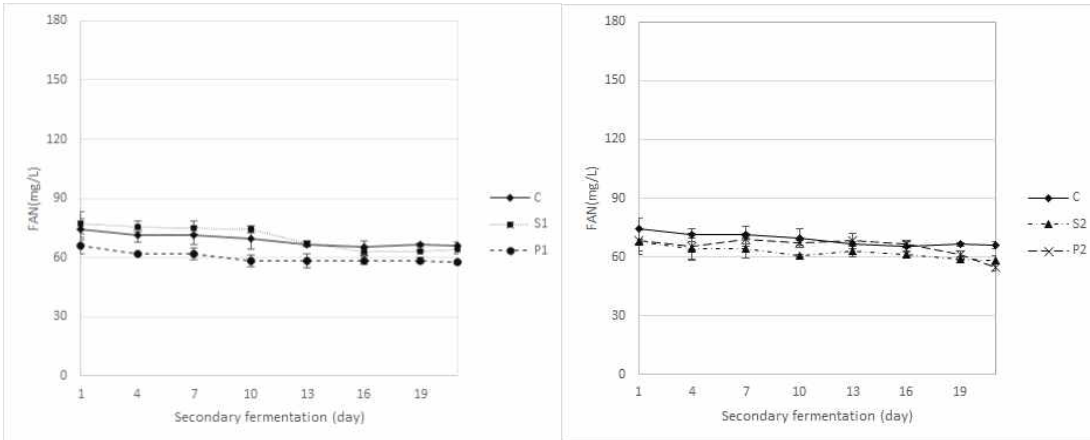


Fig. 1-33 후발효 동안 FAN 변화

S1 : 주발효 전 홍삼ex 첨가 맥주, P1 : 후발효 전 홍삼ex 첨가 맥주 (좌)

S2 : 주발효 전 복분자 과즙 첨가 맥주, P2 : 후발효 전 복분자 과즙 첨가 맥주 (우)

주발효 기간 동안 control과 홍삼ex를 넣은 맥주(S1), 복분자 과즙을 넣은 맥주(S2)의 FAN 함량은 급격히 감소하며, 이는 환원당 함량 변화와 유사하게 나타난다. Fig. 22를 보면, 주발효 동안 FAN 함량은 S2맥주에서 control과 S1맥주보다 높게 나타나는 경향을 보였다. Table 8에서 hopped-wort의 specific gravity는 1.040으로 °P(degree plato)으로 계산하면 약 10.0°P 이다. 참고문헌에 따르면 12°P의 맥즙일 때 효모가 최적의 알코올 발효를 하기 위해 필요한 FAN의 함량은 약 140-150mg/L이므로 모든 맥주 샘플의 초기 FAN함량은 적절하다고 할 수 있다.

㉓ Yeast viability

효모는 발효 기간 동안 맥즙에 있는 FAN과 당을 이용하여 알코올 발효를 한다. 주발효 동안 그 수가 증가하다가 효모 회수과정 이후 급격히 감소하며, 후발효 동안 다시 증가한다. 발효 기간 중 yeast viability 변화는 다음과 같다.

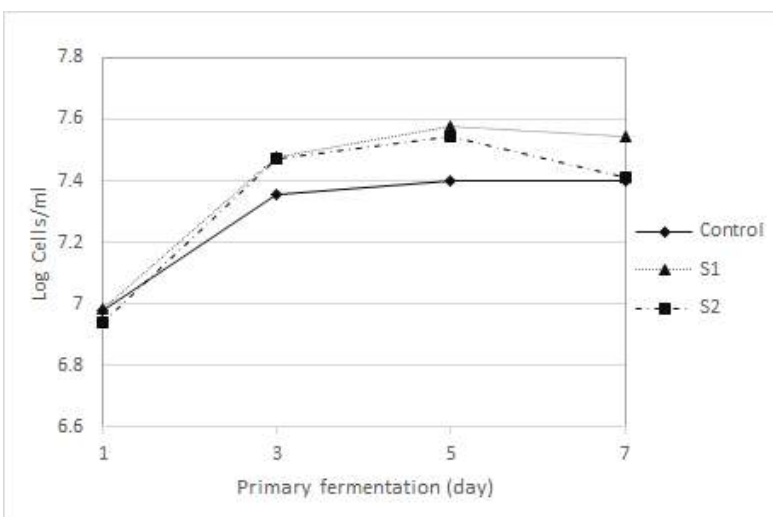


Fig. 1-34 주발효 동안 효모 변화

S1 : 주발효 전 홍삼ex 첨가 맥주, S2 : 주발효 전 복분자 과즙 첨가 맥주

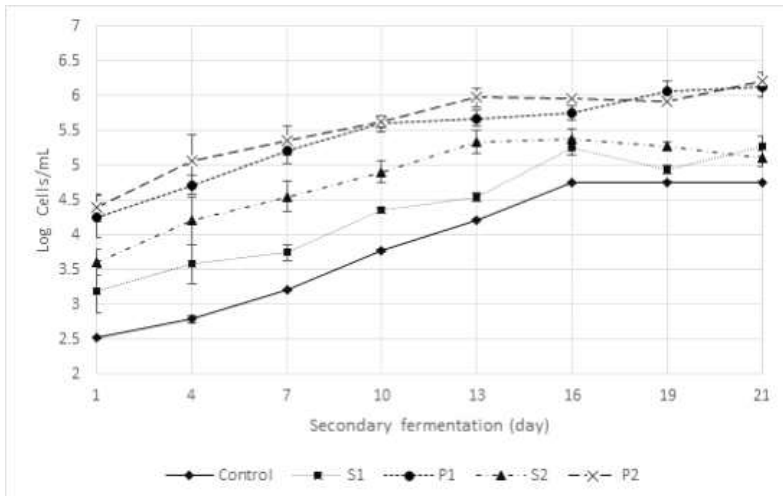


Fig. 1-35 후발효 동안 효모 변화

S1 : 주발효 전 홍삼ex 첨가 맥주, S2 : 주발효 전 복분자 과즙 첨가 맥주, P1 : 후발효 전 홍삼ex 첨가 맥주, P2 : 후발효 전 복분자 과즙 첨가 맥주

효모는 초기 5.0×10^6 cells/mL에 맞게 접종하였으며, 그 이후 약 7.6log까지 증가하였다. Fig. 1-34는 주발효 동안 효모가 증가하는 것을 나타내는 그래프인데, 홍삼ex와 복분자 과즙을 첨가한 맥주(S1, S2)의 효모가 control에 비해 0.2 log 정도 증가하였다. Fig. 1-35는 후발효 동안 효모 변화를 나타내는데, 초기 효모 수는 주발효 전 첨가한 맥주(S1, S2)보다 후발효 전에 홍삼ex와 복분자 과즙을 첨가한 맥주(P1, P2)에서 높게 나타났다. 주발효 전에 첨가한 홍삼ex와 복분자 과즙의 영양분은 주발효 동안 효모에 의해 소모가 된 것으로 보이며, 후발효 전에 첨가한 홍삼ex와 복분자 과즙은 후발효 동안 효모가 증식하는 데 사용되어 그 수가 가장 높게 나타난 것으로 생각된다.

㉞ Color

색도 측정은 L, a, b value로 나타낼 수 있는데, L value는 lightness를 뜻하며 100에 가까울수록 흰색에 가까워짐을 의미한다. a value는 green-red계열의 색을 의미하는데, 양수 값이 red를 뜻하며, 그 절대값이 높아질수록 색이 짙어진다. b value는 yellow-blue계열을 의미하고, 양수일 때 yellow를 뜻하는데 이 수치 또한 절대값이 높아질수록 그 색이 짙어짐을 말한다. 색도 측정은 발효 기간 동안 측정되었으며, 주발효 전, 후발효 전, 후발효 후의 3가지 시점에서 측정되었다.

Table 1-24. 발효 기간 동안 홍삼ex 첨가 맥주의 색도 변화

		L	a	b
Control	주발효 전 측정	35.32 ± 0.18	0.34 ± 0.04	11.26 ± 0.24
	후발효 전 측정	37.43 ± 1.16	0.32 ± 0.08	11.23 ± 0.03
	후발효 후 측정	39.07 ± 0.98	0.64 ± 0.24	10.47 ± 0.47
S1	주발효 전 측정	33.00 ± 0.38	1.18 ± 0.21	12.89 ± 0.27
	후발효 전 측정	36.82 ± 0.39	0.67 ± 0.10	13.24 ± 0.26
	후발효 후 측정	37.38 ± 0.07	0.79 ± 0.17	12.54 ± 0.94
P1	주발효 전 측정	35.32 ± 0.18	0.34 ± 0.04	11.26 ± 0.24
	후발효 전 측정	37.75 ± 0.44	0.79 ± 0.17	14.62 ± 0.31
	후발효 후 측정	37.16 ± 0.10	1.05 ± 0.39	13.08 ± 1.04
SF1	주발효 전 측정	35.32 ± 0.18	0.34 ± 0.04	11.26 ± 0.24
	후발효 전 측정	37.75 ± 0.44	0.79 ± 0.17	14.62 ± 0.31
	후발효 후 측정	38.24 ± 0.20	0.51 ± 0.26	12.76 ± 0.77

Table 1-25. 발효 기간 동안 복분자 과즙 첨가 맥주의 색도 변화

		L	a	b
Control	주발효 전 측정	35.32 ± 0.18	0.34 ± 0.04	11.26 ± 0.24
	후발효 전 측정	37.43 ± 1.16	0.32 ± 0.08	11.23 ± 0.03
	후발효 후 측정	39.07 ± 0.98	0.64 ± 0.24	10.47 ± 0.47
S2	주발효 전 측정	26.72 ± 0.83	8.10 ± 0.92	7.04 ± 0.07
	후발효 전 측정	29.50 ± 0.67	8.47 ± 1.15	8.58 ± 0.35
	후발효 후 측정	30.40 ± 1.45	7.90 ± 1.10	9.06 ± 0.57
P2	주발효 전 측정	35.32 ± 0.18	0.34 ± 0.04	11.26 ± 0.24
	후발효 전 측정	24.01 ± 0.37	11.00 ± 0.07	6.74 ± 0.40
	후발효 후 측정	26.68 ± 0.64	9.47 ± 0.60	7.92 ± 0.29
SF2	주발효 전 측정	35.32 ± 0.18	0.34 ± 0.04	11.26 ± 0.24
	후발효 전 측정	37.75 ± 0.44	0.79 ± 0.17	14.62 ± 0.31
	후발효 후 측정	25.45 ± 1.01	10.15 ± 0.66	6.32 ± 0.42

Table 1-24에서 control맥주와 각 첨가시기별 홍삼 맥주의 L value는 발효가 진행됨에 따라 증가하는 경향을 보이는데, 이것은 maillard 반응에 의해 FAN과 같은 질소 화합물의 양이 감소되는 것과 관련이 있다. 각 발효 시기별로 홍삼ex를 첨가하더라도 a와 b value는 큰 변화가 없었다. Table 1-25에서 복분자 과즙을 넣은 직후, 발기를 의미하는 L value와 blue-yellow계열을 의미하는 b value는 감소하며, a value는 증가한다. 또한, 주발효 전 시점에 복분자 과즙을 첨가한 맥주(S2)의 L value는 후발효 전과 후에 과즙을 첨가한 맥주(P2, SF2)보다 더 높은 값을 나타냈다. 시각적으로도 P2와 SF2보다 S2 샘플이 더 투명한 색을 나타내었다.

㊦ Alcohol content, foam stability, turbidity

Table 1-26는 맥주의 알코올 함량, 거품 안정성, 탁도 측정결과를 나타낸 표이다. 홍삼ex 이나 복분자 과즙을 첨가한 맥주와 control 간에 큰 차이를 보이지 않았으며, 당 함량이 높은 복분자 과즙을 주발효 전에 첨가하여 발효시킨 맥주는 control보다 높은 알코올 함량이 나왔다. 또한, 모든 샘플은 응집 및 여과 살균을 하지 않은 상태에서 실험에 사용되었으므로 탁도는 있음으로 측정되었다. 거품안정성은 control보다 홍삼/복분자 맥주에서 높게 측정되었으

며, 주발효 전에 홍삼ex와 복분자 과즙을 넣어 발효시킨 맥주(S1, S2)가 그 중에서도 높게 측정되었다. 홍삼맥주에서는 saponin과 같은 성분으로 인해 거품안정성이 향상된 것으로 보이며, 복분자 과즙을 첨가한 맥주에서는 복분자에 함유된 여러 성분 때문인 것으로 생각된다. 맥주의 거품안정성은 FAN value와 음의 상관관계를 갖는다고 알려져 있다.

Table 1-26. 최종 맥주의 알코올 함량, 거품 안정성, 탁도 측정 결과

	Alcohol content(%)	Foam stability	Turbidity
Control	4.0 ± 0.26	165.88 ± 5.71	Existed
S1	3.7 ± 0.25	281.76 ± 3.25	Existed
P1	3.7 ± 0.11	173.98 ± 5.68	Existed
SF1	3.8 ± 0.25	209.32 ± 7.11	Existed
S2	4.2 ± 0.19	267.16 ± 2.29	Existed
P2	3.6 ± 0.22	250.97 ± 4.14	Existed
SF2	3.8 ± 0.15	183.56 ± 5.21	Existed

㉠ 관능평가

관능평가는 동국대학교 식품공학과 대학원생 및 대학생 20명을 상대로 하여 진행되었다. 그 결과는 table 1-27과 table 1-28에 나타내었다.

Table 1-27. 홍삼ex 첨가 맥주의 관능평가 결과

	홍삼 extract 첨가 맥주			
	Control	S1	P1	SF1
Oily mouth (미끄럼거림)	4.20 ± 0.13	3.73 ± 0.03	3.57 ± 0.22	3.42 ± 0.17
Alcoholic (알코올 향)	4.77 ± 0.12	5.03 ± 0.27	4.61 ± 0.04	5.00 ± 0.43
Bitterness (쓴 맛)	4.40 ± 0.06	5.32 ± 0.12	5.30 ± 0.13	5.13 ± 0.26
Astringency (뽀은 맛)	3.82 ± 0.11	4.50 ± 0.33	4.55 ± 0.38	4.58 ± 0.38
Duration aftertaste (뒷맛 지속도)	4.25 ± 0.10	4.83 ± 0.31	4.92 ± 0.27	4.83 ± 0.19
Aromatic (과일 향)	4.42 ± 0.20	4.43 ± 0.10	4.48 ± 0.04	4.68 ± 0.41
Sourness (신 맛)	3.47 ± 0.26	3.35 ± 0.28	3.40 ± 0.18	3.77 ± 0.02
Colour (색도)	3.65 ± 0.09	3.83 ± 0.35	4.58 ± 0.20	4.25 ± 0.19
Overall acceptance (전체기호도)	4.07 ± 0.12	4.05 ± 0.36	4.45 ± 0.28	4.48 ± 0.09

Table 1-28. 복분자 과즙 첨가 맥주의 관능평가

	복분자 과즙 첨가 맥주			
	Control	S2	P2	SF2
Oily mouth (미끄럼거림)	4.2 ± 0.13	3.37 ± 0.35	3.05 ± 0.13	3.42 ± 0.36
Alcoholic (알코올 향)	4.77 ± 0.12	4.52 ± 0.09	4.73 ± 0.13	4.85 ± 0.18
Bitterness (쓴 맛)	4.40 ± 0.06	4.52 ± 0.20	4.50 ± 0.22	4.30 ± 0.15
Astringency (뽀은 맛)	3.82 ± 0.11	4.37 ± 0.15	4.53 ± 0.24	4.30 ± 0.21
Duration aftertaste (뒷맛 지속도)	4.25 ± 0.10	4.57 ± 0.19	4.95 ± 0.23	5.02 ± 0.09
Aromatic (과일 향)	4.42 ± 0.20	5.78 ± 0.39	6.08 ± 0.04	6.28 ± 0.03
Sourness (신 맛)	3.47 ± 0.26	4.63 ± 0.22	4.48 ± 0.51	4.60 ± 0.12
Colour (색도)	3.65 ± 0.09	5.63 ± 0.16	6.43 ± 0.16	6.88 ± 0.29
Overall acceptance (전체기호도)	4.07 ± 0.12	5.00 ± 0.38	5.38 ± 0.10	5.68 ± 0.12

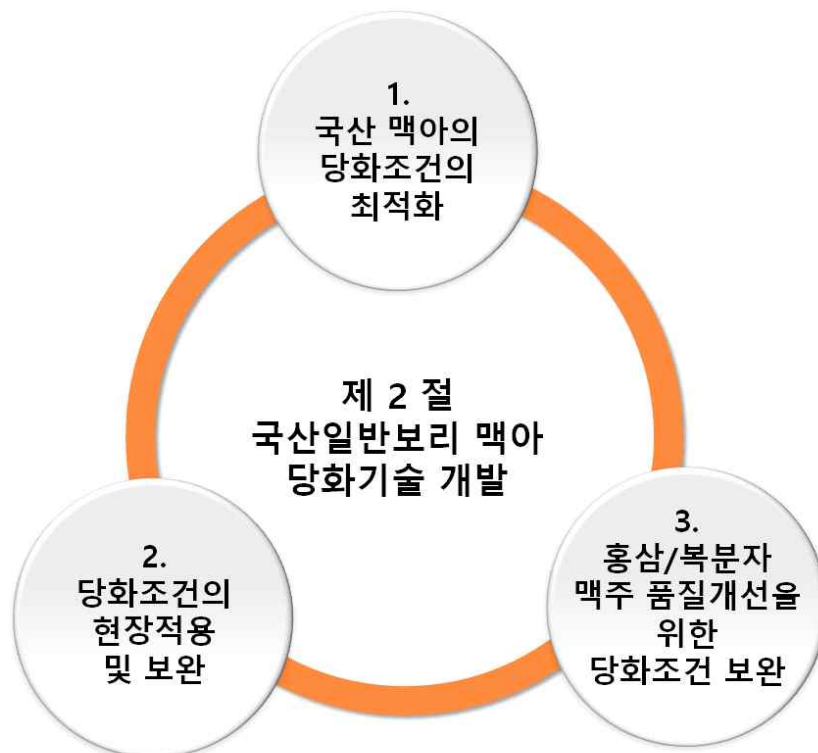
홍삼ex 첨가맥주는 홍삼 자체의 쓴맛과 뽀은맛으로 인해 관능평가 시 쓴맛 항목에서 control(4.40 ± 0.06)에 비해 높은 S1(5.32 ± 0.12), P1(5.30 ± 0.13), SF1(5.13 ± 0.26) 수치를 나타냈다. 또한, 뽀은맛 항목에서도 control(3.82 ± 0.11)보다 S1(4.50 ± 0.33), P1(4.55 ± 0.38), SF1(4.58 ± 0.38)으로 높게 나타났다. 전체기호도에서는 후발효 전과 후에 홍삼ex를 첨가한 샘플의 관능이 나머지도 높았다.

복분자 과즙 첨가맥주에서 뽀은맛, 과일향, 신맛, 색도 등에서 control에 비해 높은 수치를 나타내었고, 특히 후발효 후에 첨가한 샘플(SF2)의 관능평가가 과일향, 신맛, 색도 항목에서 다른 시기에 복분자 과즙을 첨가한 맥주(S2, P2)보다 더 높게 나타났다. 또한, 전체 기호도에서 SF2의 관능이 가장 좋게 평가 되었는데, 그 이유로는 후발효 후에 복분자 과즙을 첨가했기 때문에 향과 맛이 변하지 않은 상태로 남아있기 때문인 것으로 생각된다. Figure 24와 figure 25에서 보면, 첨가물(홍삼 또는 복분자, 여기서는 복분자)을 넣어 발효시킨 샘플에서 각 첨가물을 이용하여 효모가 더 많은 수로 자란 것을 볼 수 있다. 주발효 전과 후발효 전에 복분자 과즙을 넣으면 효모가 이를 이용하여 발효를 하게 되고 따라서 복분자 과즙의 본래 향과 맛 등이 변질된 것으로 보인다.

전체기호도에서 후발효 전과 후에 홍삼ex를 첨가한 샘플의 관능이 나머지도 높게 나타났으나, 홍삼 맥주를 복분자 과즙을 첨가한 맥주와 비교하면 낮은 수치를 나타낸다. Table 28의 복분자 맥주의 관능평가 결과를 볼 때, 본래의 맥아를 이용하여 만든 맥즙으로 최종 발효까지 시킨 후 복분자 과즙을 첨가하는 것이 관능적인 면에서 가장 적절하다고 생각된다. 발효 시작 전에 첨가하면, 발효기간 동안 맥주의 맛과 향 또한 변질될 수 있으므로 맥주의 품질 면에서도 발효가 끝난 후에 첨가물을 넣는 것이 적절한 것으로 보인다.

제 2 절 국산일반보리 맥아 당화기술 개발

- 국산 일반보리(광맥)를 사용하여 맥아 당화 공정에 효소를 처리하는 기술을 개발하였다. 먼저 광맥을 이용하여 맥즙을 제조한 뒤 맥즙 제조 적성을 평가하였다. 평가 결과 부족한 환원당을 보충하기 위해 당화효소를 사용하여 수입 맥아인 Pilsner와 비슷한 수준의 맥즙을 만들 수 있었다. 또한 여과 증진 효소를 사용한 결과 여과시간을 단축시킨다는 것을 확인하여 맥아량의 0.1 %를 효소 사용 최적 조건으로 설정하였다.
- 효소를 이용한 당화 기술을 현장 적용시키기 위해 참여기업의 실제 당화온도 조건을 적용하여 맥즙을 제조하고 제조적성을 분석하였다. 그 결과 당화효소 및 여과 증진 효소의 사용으로 맥아사용량을 감소시킬 수 있다는 것을 확인하였다. 또한 홍삼/복분자 맥주 제조를 위해 haze생성을 최소화하기 위하여 protease를 처리하였다. 그 결과 FAN이 증가하여 haze 감소에 긍정적인 영향을 미치는 것을 확인 하여 당화공정 중의 효소처리가 맥즙의 제조 적성을 개선 할 수 있음을 확인하였다.



1. 국산 맥아의 당화조건의 최적화

가. 광맥 맥즙의 제조 적성 분석

(1) 요약

맥즙 제조 적성을 분석하기 위해 당화과정 중 온도별, 당화시간별 맥즙 성분변화를 측정하였다. 광맥과 Pilsner 맥즙의 환원당량을 비교하였을 때 당화 시간과 온도가 증가할수록 환원당량이 증가하였으며 최종 맥즙의 환원당량은 광맥이 Pilsner에 비하여 약 15% 정도 낮은 수치를 보였다. Free amino nitrogen(FAN)은 시간과 온도가 증가할수록 FAN 측정치도 증가하는 추세를 보였으며 광맥 맥즙은 Pilsner맥즙 보다 높은 수치를 보였다. 광맥의 filtration time은 Pilsner에 비하여 약 2.5배 정도 더 오래 걸리는 것을 확인하였다. Viscosity도 이와 상응하는 결과를 얻었는데 당화 시간과 온도의 증가에 따라 맥즙의 점도가 증가하는 추세를 보였으며, 최종 광맥 맥즙의 점도가 Pilsner 맥즙의 점도 보다 높아 filtration time에도 부정적인 영향을 미치는 것을 확인할 수 있었다. 모든 분석 항목을 종합하였을 때, 광맥의 맥즙 제조 적성이 수입 맥아인 Pilsner와 비교하였을 때 상대적으로 좋지 않은 것으로 나타났다.

(2) 재료 및 방법

(가) 재료

① 보리

국산 보리 광맥은 농촌진흥청 벼맥류부의 협조에 의하여 전라북도 익산에서 수확된 것을 사용하였으며, 외국산 보리 Pilsner는 독일 Weyermann사에서 수입 구매하여 사용하였다. 광맥은 2010년 개발된 맥류 품종으로, 대립, 다수성이며 도복, 습해, 한해 등에 강하고 보리호위축병에 저항성이 있으며 기후변화에 따른 불시출수에 안정적인 특성이 있다. 광맥은 호품 보리에 비하여 원맥 및 맥아 품질 특성이 우수한 특성이 있어 맥주 제조용으로 특화된 작물이다. 제맥 과정은 Automatic Micromalting Systems (Phoenix Biosystems Co., Australia)을 이용하여 침맥과 발아, 배조의 3단계로 진행하였으며(Kim et al., 2013), 제조된 맥아는 Drum mill(Malt Drum Mill, Jeil Industry Co., Seoul, Korea)을 이용하여 1mm 간극으로 분쇄된 것을 사용하였다.

(나) 실험 방법

① 당화 방법

㉠ Grinding

EBC와 ASBC에서는 이러한 목적에 맞도록 특별히 고안된 DLFU (Buhler) 디스크형 분쇄기(disk mill)을 이용하고 있다.

㉡ Mashing procedure

거친 분쇄맥아와 고운 분쇄맥아 각 50g을 200ml의 45°C 증류수(46-48°C)에 넣고 유리막대로 빠르게 저어준 후 액체의 냄새와 향기를 노트한다.(향기로움, 곰팡이냄새, 덜익음, 퀴퀴함

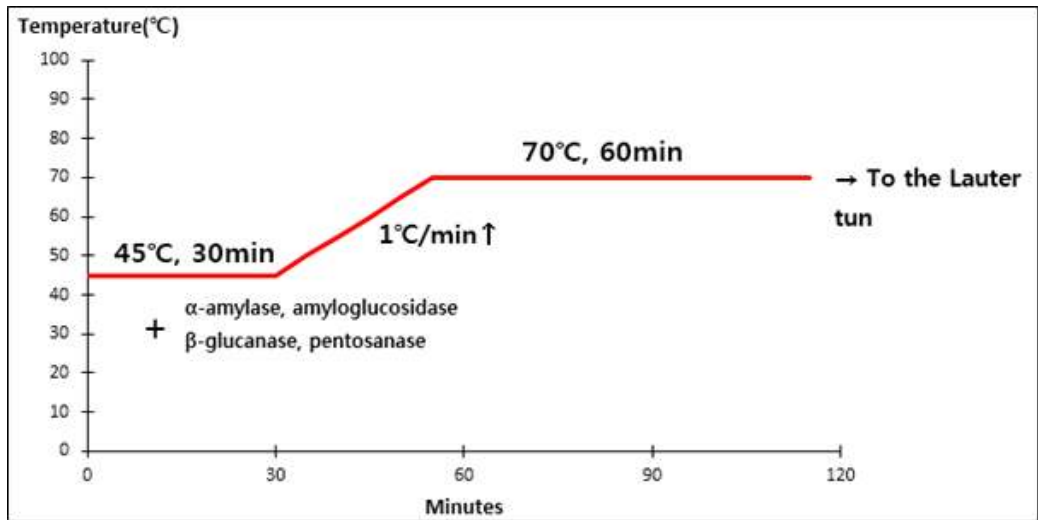
등) 이를 당화기에 옮겨 46°C에서(당화 비커에 온도계를 위치시킨다.) 30분간 저어주면서 당화시킨다. 다음으로 분당 1°C씩 상승시켜 70°C 까지 (24분) 올린 다음 70-71°C의 물을 100ml 추가하고 1시간 동안 더 당화시킨다.

㉔ Conversion

1시간 동안 더 당화시키는 동안에 5분마다 측정하여 0.02N 요오드용액을 자기관에 검사하여 당화시간을 조사한다[1.27g I₂ + 2.50g KI in H₂O 500ml 당화가 완료되면 yellow로 염색된다]. 측정 간격은 5분 미만이나 5-7분사이로 한다. 전환시간과 맥아 거칠기와는 관계가 없다.

㉕ Cooling and filtration

맥즙을 얻기 위한 당화 방법은 EBC Congress mash법을 따랐으며, 그 방법은 다음과 같다. 곱게 분쇄한 맥아 5 g을 250 mL Duran laboratory bottle (SCHOTT DURAN, Germany)에 넣고 45°C 증류수 20 mL와 잘 섞은 다음 효소를 첨가하고 Shaking water bath (BF-46SB, Biofree, Korea)를 이용하여 45°C, 100 rpm으로 30분간 1차 당화를 시킨다. 1°C/min 속도로 25분간 온도를 25°C 증가시켜 맥즙의 온도를 70°C까지 올린 다음 70°C의 증류수 10 mL를 더 첨가한 후 1시간 더 당화시킨다. 당화가 완료되면 맥즙을 20°C로 식히고 증류수로 최종 무게를 45 g으로 맞춘 다음 주름진 여과지 No.597 1/2 (Whatman, Germany)를 4등분하여 접은 다음 유리갈대기(지름 85mm)를 사용하여 여과하며, 초기 10 mL 맥즙을 재 여과한 것을 시료로 사용하였다.



② 맥즙 제조 적성 평가

㉑ Reducing sugar

DNS법(Miller GL., 1959)에 따라 DNS시약 3 ml에 sample 1ml 와 섞는다. 끓는 물에서 5분 간 반응을 시킨 후 상온에서 5분간 식힌다. 반응이 종료된 sample을 spectrophotometer를 이용하여 550 nm의 파장에서 흡광도를 측정한다. 측정된 흡광도를 standard curve에 대입하여 환원당을 정량한다.

㉒ Free Amino Nitrogen (ASBC 방법)

1.0ml ninhydrine color reagent 각각의 test tube에 첨가한다. 받침대에 두고 증발을 막기 위해 15-20mm glass marble의 마개를 씌운다. 16min 동안 water bath에서 가열하고, 20min 동안 20°C±1°C bath에서 식힌 다음 5ml dilution solution 을 넣는다. 완벽하게 섞고 증류수와 비교하여 570nm에서 30분 이내에 흡광도를 측정한다.

㉓ pH (ASBC 방법)

맥즙 원액을 pH/reference 전극 시스템을 이용하여 pH를 측정한다. 여과를 거친 당화액의 온도를 25°C로 일정하게 유지시킨 후에 pH meter(mettler Toledo Seveneasy pH)을 이용하여 pH를 측정하여 0.05pH 수준까지 나타낸다.

㉔ Filtration time (ASBC 방법)

당화액 45 mL를 시료로 하여 여과지(No. 2, Whatman)를 사용하여 맥아즙이 여과되는데 걸리는 시간을 측정하였다. 초기 10 mL의 맥즙을 재 여과하고 더 이상 filter cake에 액체가 보이지 않으며, 갈라지기 시작할 때를 측정 종료 시점으로 하였다.

㉕ Viscosity (ASBC 방법)

여과를 거친 당화액의 점도를 항온 수조에 설치된 진동식 점도계(A&D, SV-10 Sine-wave Vibro viscometer)를 사용해서 25°C 에서 측정하였다.

③ Real scale에서의 공정별 과정

(1) 당화



<당화조에 맥아를 투입>



<5t 당화조 안의 맥아>



<당화조 전체 모습>

실제 공장의 5t 당화조에서의 당화 과정

(2) 발효



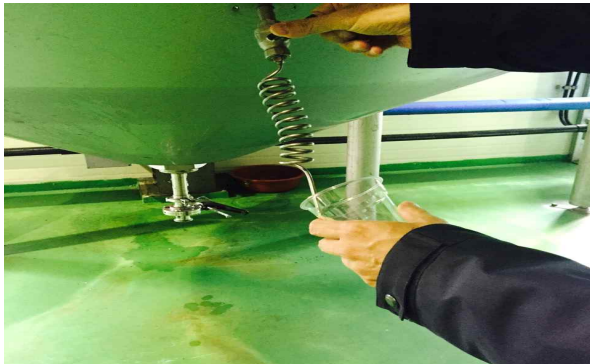
<발효조 온도 control panel>



<발효조 전체 모습>

실제 공장의 10kL 발효조에서의 발효 과정

(3) 완성



<발효가 끝난 맥주>



<Canning 설비 모습>

(3) 결과 및 고찰

(가) 맥즙의 성분변화 및 품질평가

국산 보리를 이용한 맥주 제조는 이전 연구들로부터 많이 보고되어왔듯이 그 품종으로 인하여 제조에 한계가 있다고 밝혀져 왔다(Lee WJ., 1989; Kim JH et al., 2014). Figure 1은 당화 과정 중 온도별, 시간별에 따른 맥즙 성분 변화를 나타낸 것이고, Table 1-1은 광맥과 Pilsner 맥아를 당화시켜 얻은 최종 맥즙의 제조적성을 비교한 것이다. Pilsner는 lager 맥주를 만드는 대표적인 맥아로 그 품질이 좋아 대중적으로 사용되고 있으므로 광맥의 비교 대상으로 하였다.

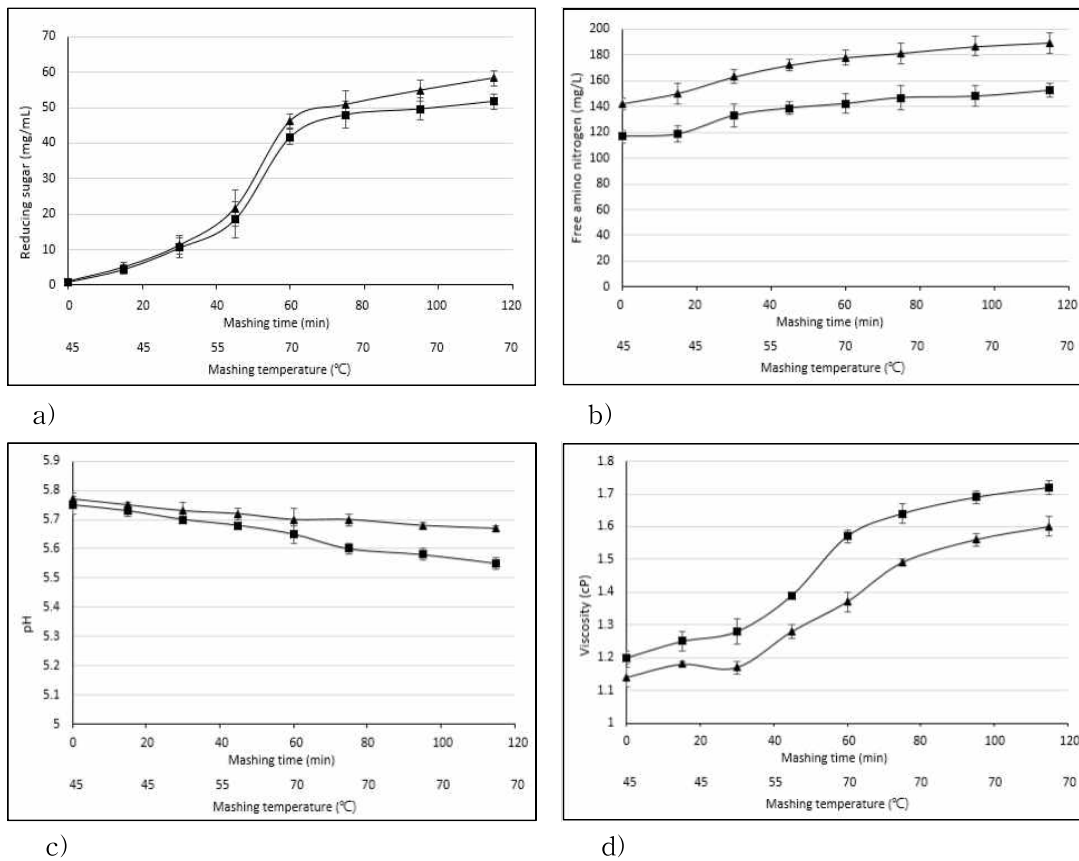


Fig. 2-1. 광맥과 Pilsner의 당화 과정 중 당화 온도별, 시간별에 따른 a) Reducing sugar, b) Free amino nitrogen, c) pH, d) Viscosity 변화

Table 2-1. 광맥과 Pilsner 맥즙의 reducing sugar, free amino nitrogen, pH, viscosity, filtration time 비교

	광맥	Pilsner
Reducing sugar (mg/mL)	52.13 ± 2.78	60.12 ± 1.22
Free amino nitrogen (mg/L)	186.57 ± 2.9	151.79 ± 2.07
pH	5.54 ± 0.01	5.68 ± 0.02
Viscosity (cP)	1.71 ± 0.03	1.59 ± 0.01
Filtration time (min)	53.33 ± 3.54	21.60 ± 2.35

맥즙의 환원당은 맥아에 내재된 당화효소에 의해 전분이 가수분해 되어 생기는 것으로, 발효 과정에서 효모의 주 영양공급원이 되고, 효모는 분해된 당을 이용하여 부산물로 에탄올을 생성한다. 따라서 맥즙에 존재하는 환원당량은 효모의 생육에 결정적인 영향을 주며, 최종 맥주에서 에탄올 함량에 영향을 주므로 맥즙에서 높은 수치를 보이는 것이 좋지만(Kim JH et al., 2014) 지나치게 많은 양은 맥주에 잔여당을 발생시켜 칼로리를 높이고 발효시간을 길게 만들게 된다(Johan and Esther and Sergio., 2014). 광맥과 Pilsner 맥즙의 환원당량을 비교하였을 때 당화 시간과 온도가 증가할수록 최초 0 mg/mL이었던 맥즙의 당량이 점차 증가하였으며, 1차 당화가 끝난 후 온도 증가 구간에서 큰 폭으로 증가하였다. 최종 맥즙의 환원당량은 광맥이 52.13 mg/mL로 Pilsner에 비하여 약 15% 정도 낮은 수치를 보였다. 그리고 Free amino nitrogen(FAN)은 맥즙에 존재하는 수용성 단백질의 양의 지표로 유리 아미노산 양을 말하며, 적당한 양은 발효에서 효모의 영양소가 되어 효모의 활성화에 도움을 주지만 너무 높은 함량은 차후 맥주에서 혼탁 등 haze를 발생시켜 품질의 안정성을 떨어뜨리는 것으로 알려져 있다(Briggs DE et al., 1981). 본 연구에서 광맥 맥즙은 186.57 mg/L로 Pilsner맥즙 보다 높은 수치를 보였으며, 시간과 온도가 증가할수록 FAN 측정치도 증가하는 추세를 보였다. 또한 pH는 당화 시 효소들의 활성화와 단백질의 가용화나 응고에 관여할 뿐만 아니라 tannin의 추출률을 결정하는 요소로, 증류수를 이용한 당화 시 5.8정도가 최적으로 알려져 있는데(Banasik OJ et al., 1979), 적정 pH에 가까운 것은 Pilsner로, 광맥은 조금 더 낮게 나타났다. 한편, filtration time은 맥주를 생산하는데 있어서 경제적 측면에 영향을 주는 요인으로 filtration time이 짧을 수록 맥주 제조에 있어 좋다. 이번 분석에서 광맥의 filtration time은 53.33 min으로 Pilsner에 비하여 약 2.5배 정도 더 오래 걸리는 것을 확인하였다. Viscosity도 이와 상응하는 결과를 얻었다. 맥즙의 점도는 세포벽 성분인 polysaccharide 중 β -glucan과 의 영향을 많이 받으며(J Wang et al., 2004) 기본적으로 맥즙의 점도는 1.33 cP로 알려져 있다(Banasik OJ et al., 1979). 당화 시간과 온도의 증가에 따른 결과 당화가 진행되면서 용출되는 가용성 성분들의 증가로 맥즙의 점도가 증가하는 추세를 보였으며, 최종 광맥 맥즙은 1.71 cP로 1.59 cP인 Pilsner 맥즙 보다 높아 filtration time에도 부정적인 영향을 미치는 것을 확인할 수 있었다. 모든 분석 항목을 종합하였을 때, 광맥의 맥즙 제조 적성이 수입 맥아인 Pilsner와 비교하였을 때 상대적으로 좋지 않은 것으로

나타났고, 특히 환원당량이 낮고 filtration time이 긴 점은 품질이 좋은 맥주를 만들기 위하여 개선될 필요가 있으므로, 본 연구에서는 당화 시 효소를 첨가하여 맥즙의 제조 적성을 높이기로 한다.

나. 당화효소 처리가 광맥의 맥즙 제조적성에 미치는 영향

(1) 요약

당화과정을 촉진시켜 국산맥아로부터 발효성 당을 고효율로 생성하기 위해 amylase 또는 amyloglucosidase 등 효소처리를 하였으며 당화효소 첨가에 따른 맥즙의 성분변화를 분석하였다. 맥즙의 환원당량을 비교 분석한 결과 당화효소인 amylase와 amyloglucosidase를 각각 처리하였을 때보다 같이 처리하였을 때 더 많은 환원당을 얻을 수 있었으며 맥아의 0.1 %를 처리하였을 때 환원당량이 효소를 처리하지 않은 광맥의 맥즙 보다 약 15 % 증가하여 Pilsner 맥즙의 환원당량과 비슷한 수치를 얻었다. 하지만 가용성 성분의 증가로 filtration time 및 점도가 증가하여 개선이 필요하다고 여겨진다.

(2) 재료 및 방법

(가) 재료

① 보리

국산 보리 광맥은 농촌진흥청 벼맥류부의 협조에 의하여 전라북도 익산에서 수확된 것을 사용하였으며, 외국산 보리 Pilsner는 독일 Weyermann 사에서 수입 구매하여 사용하였다. 광맥은 2010년 개발된 맥류 품종으로, 대립, 다수성이며 도복, 습해, 한해 등에 강하고 보리호위축병에 저항성이 있으며 기후변화에 따른 불시출수에 안정적인 특성이 있다. 광맥은 호품 보리에 비하여 원맥 및 맥아 품질 특성이 우수한 특성이 있어 맥주 제조용으로 특화된 작물이다. 제맥 과정은 Automatic Micromalting Systems (Phoenix Biosystems Co., Australia)을 이용하여 침맥과 발아, 배조의 3단계로 진행하였으며(Kim et al., 2013), 제조된 맥아는 Drum mill(Malt Drum Mill, Jeil Industry Co., Seoul, Korea)을 이용하여 1mm 간극으로 분쇄된 것을 사용하였다.

② 효소

효소는 (주) Bision Biochem에서 세가지 액화 효소를 구입하여 사용하였다. 당화효소 α -amylase (from *Bacillus licheniformis*)와 amyloglucosidase (or glucoamylase, from *Aspergillus niger*)는 각각 Spezyme FRED, BioWin AG 제품을 사용하였고 여과증진효소 β -glucanase (from *Trichoderma reesei*, pentosanase 활성 포함)는 BrewMax L 제품을 사용하였다.

(나) 실험 방법

① 당화 방법

㉑ Grinding

EBC와 ASBC에서는 이러한 목적에 맞도록 특별히 고안된 DLFU (Buhler) 디스크형 분쇄기(disk mill)을 이용하고 있다.

㉒ Mashing procedure

거친 분쇄맥아와 고운 분쇄맥아 각 50g을 200ml 의 45℃ 증류수(46-48℃)에 넣고 유리막대로 빠르게 저어준 후 액체의 냄새와 향기를 노트한다.(향기로움, 곰팡이냄새, 덜익음, 퀴퀴함 등) 이를 당화기에 옮겨 46℃에서(당화 비커에 온도계를 위치시킨다.) 30분간 저어주면서 당화시킨다. 다음으로 분당 1℃씩 상승시켜 70℃ 까지 (24분) 올린 다음 70-71℃의 물을 100ml 추가하고 1시간 동안 더 당화시킨다.

② 맥즙 제조 적성 평가

㉑ Reducing sugar

DNS법(Miller GL., 1959)에 따라 DNS시약 3 ml에 sample 1ml 와 섞는다. 끓는 물에서 5분간 반응을 시킨 후 상온에서 5분간 식힌다. 반응이 종료된 sample을 spectrophotometer를 이용하여 550 nm의 파장에서 흡광도를 측정한다. 측정된 흡광도를 standard curve에 대입하여 환원당을 정량한다.

㉒ Free Amino Nitrogen (ASBC 방법)

1.0ml ninhydrine color reagent 각각의 test tube에 첨가한다. 받침대에 두고 증발을 막기 위해 15-20mm glass marble의 마개를 씌운다. 16min 동안 water bath에서 가열하고, 20min 동안 20℃±1℃ bath에서 식힌 다음 5ml dilution solution 을 넣는다. 완벽하게 섞고 증류수와 비교하여 570nm에서 30분 이내에 흡광도를 측정한다.

㉓ pH (ASBC 방법)

맥즙 원액을 pH/reference 전극 시스템을 이용하여 pH를 측정한다. 여과를 거친 당화액의 온도를 25℃로 일정하게 유지시킨 후에 pH meter(mettler Toledo Seveneasy pH)을 이용하여 pH를 측정하여 0.05pH 수준까지 나타낸다.

㉔ Filtration time (ASBC 방법)

당화액 45 mL를 시료로 하여 여과지(No. 2, Whatman)를 사용하여 맥아즙이 여과되는데 걸리는 시간을 측정하였다. 초기 10 mL의 맥즙을 재 여과하고 더 이상 filter cake에 액체가 보이지 않으며, 갈라지기 시작할 때를 측정 종료 시점으로 하였다.

㉕ Viscosity (ASBC 방법)

여과를 거친 당화액의 점도를 항온 수조에 설치된 진동식 점도계(A&D, SV-10 Sine-wave Vibro viscometer)를 사용해서 25℃ 에서 측정하였다.

(3) 결과 및 고찰

광맥을 당화시킨 맥즙에서 부족한 발효성 당을 더 추출하여 환원당량을 증가시키기 위하여 당화효소 α -amylase와 amyloglucosidase를 첨가하였다. Figure 1은 두 효소를 각각 첨가한 광맥 맥즙의 환원당량 결과를 나타내어 Pilsner와 비교한 것이다. 두 가지 효소의 당화력을 비교하고, 당화 시 효소의 첨가 양을 결정하기 위하여 효소의 양을 5 μ L 부터 최대 200 μ L 까지 첨가하여 맥즙에 추출되는 당량을 비교하였다. 여러 연구에서 amyloglucosidase를 맥주 제조에 첨가할 때 발효성 당이 매우 증가하는 것이 확인되었으며(Johan et al., 2014; Bamforth, 2009), 본 연구에서도 amyloglucosidase를 최대 200 μ L 첨가하였을 때 첨가하지 않은 맥즙에 비하여 환원당량이 57.5%가 증가하는 것이 확인 되었다. 반면 α -amylase를 첨가한 경우 효소 양의 증가에 따른 환원당량의 증가 폭이 크지 않으며, 최대 200 μ L 효소를 첨가하였을 때 17.5%의 증가를 나타내었다. 이는 효소의 가수분해능 차이에 의한 현상으로, amyloglucosidase는 α -1,4 결합뿐 아니라 α -1,6 결합을 끊어 glucose 소단위로 전분을 가수분해하는 glucogenic 효소인 반면, α -amylase는 전분을 가수분해하여 glucose 또는 maltose 단위로 분해시키며 α -1,6 결합을 가수분해하지 못하여 amylopectin 구조와 같은 가지 구조를 갖는 전분을 분해시키지 못하고 남기게 된다(Serna-Saldivar., 2010). 따라서 amyloglucosidase를 첨가한 맥즙은 glucose가 대부분으로 이루어져 있는 반면, α -amylase 첨가 맥즙은 glucose 외에도 maltose, maltotriose, 분해되지 못한 다당류 등으로 이루어져 있어(Johan et al., 2014) 맥즙의 환원당량을 측정하였을 때 그 수치가 낮게 나오는 것이라 추측 된다.

효소의 최적 첨가 양은 광맥 맥즙의 환원당량이 Pilsner와 비슷한 추출 양을 보일 때로 하며, α -amylase를 첨가할 경우 200 μ L의 양을 써야 하나 amyloglucosidase를 사용하면 10 μ L를 첨가할 때 Pilsner의 환원당량인 60.12 mg/mL에 도달 할 수 있었다.

또한 당화효소 α -amylase와 amyloglucosidase를 혼합하여 첨가한 맥즙의 환원당량도 figure 1에 나타내었다. 본 연구 결과 혼합하여 첨가했을 때의 환원당량이 각각 처리하였을 때 보다 더 증가하였음을 확인 할 수 있었다. 이는 α -amylase의 낮은 가수분해력이 amyloglucosidase에 의해 보완되는 상호작용에 의한 효과가 나타난 것으로, α -amylase 작용으로 생성된 작은 다당류들을 amyloglucosidase가 glucose 단위로 잘게 분해시켜 그 효율을 높인 것으로 여겨진다(N Richards et al., 2004). 효소를 혼합하였을 때 사용하는 최적 양은 두 효소를 5 μ L씩 첨가하는 것으로, 이 때 Pilsner 맥즙의 환원당량과 비슷한 수치를 보인다.

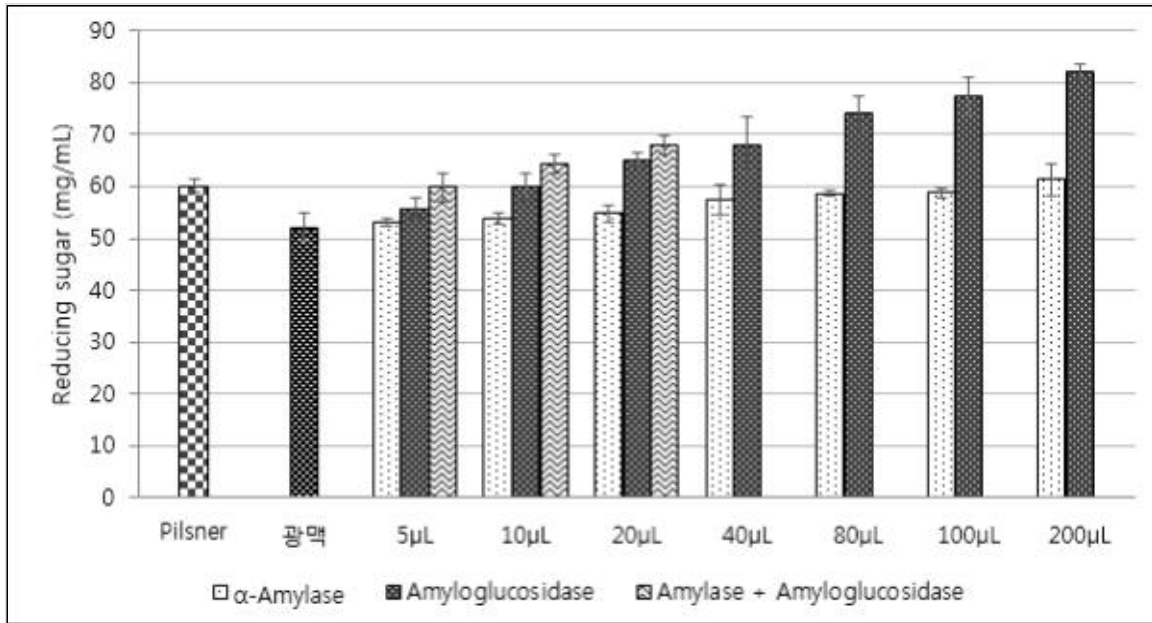


Fig. 2-2. 당화효소 첨가에 따른 광맥 맥즙의 환원당량 변화

Table 2-2. 당화효소 첨가에 따른 광맥 맥즙의 FAN, pH, Viscosity, Filtration time (A: α-amylase, AG: amyloglucosidase)

	광맥 A5μL+AG5μL
Free amino nitrogen (mg/L)	195.55 ± 3.9
pH	5.55 ± 0.02
Viscosity (cP)	1.78 ± 0.01
Filtration time (min)	87.67 ± 4.16

당화효소를 첨가하였을 때 광맥의 맥즙 제조 적성에 일어나는 변화를 분석한 결과를 Table 30에 나타냈다. Table 29에 나타나 있는 광맥과 비교하였을 때, 환원당량 이외에도 당화효소 첨가로 인한 성분 변화가 일어났는데, FAN도 환원당과 마찬가지로 효소를 첨가하지 않은 맥즙에 비하여 추출된 양이 늘어 그 수치가 증가하였음이 확인되었고 pH도 약간 증가하였지만 유의적 차이는 보이지 않았다($P < 0.05$). 또한 점도 역시 증가하였는데, 이는 당화효소에 의해 가수분해된 가용성 성분들의 추출 증가에 상응하는 결과로 나타나며, 이에 따라 filtration time도 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 특히 filtration time은 87.67 min으로 당화효소를 처리하지 않은 맥즙에 비하여 약 35 min, 65%정도가 증가함을 확인하였다. 이는 Pilsner 맥즙과 비교하였을 때 4배 정도 더 큰 수치로, 맥주를 생산함에 있어서 큰 문제점이 되므로 개선이 필요한 항목이다. 따라서 당화효소를 첨가할 때, 여과를 증진시키는 효소(β -glucanase, pentosanase)를 사용함으로써 점도를 낮추고 filtration time을 줄이는 연구가 진행되었다.

다. 여과 증진 효소 처리가 광맥의 맥즙 제조 적성에 미치는 영향

(1) 요약

당화효소의 처리로 맥즙의 환원당량을 증가시켰으나 당화효소의 처리로 인한 가용성 성분들의 증가와 β -glucan 함량의 증가로 Filtration time과 점도가 증가하여 여과성능이 낮아졌다. 이에 광맥 맥즙의 점도와 filtration time을 낮추기 위하여 β -glucanase를 처리 하였으며 효소 첨가에 따른 맥즙의 성분변화를 분석하였다. 효소 처리한 맥즙의 점도와 filtration time을 비교한 결과 점도의 경우 약 21 % 가량 감소하였으며 마찬가지로 filtration time도 50 % 감소하여 맥즙의 여과 성능을 높일 수 있었다.

(2) 재료 및 방법

(가) 재료

① 보리

국산 보리 광맥은 농촌진흥청 벼맥류부의 협조에 의하여 전라북도 익산에서 수확된 것을 사용하였으며, 외국산 보리 Pilsner는 독일 Weyermann 사에서 수입 구매하여 사용하였다. 광맥은 2010년 개발된 맥류 품종으로, 대립, 다수성이며 도복, 습해, 한해 등에 강하고 보리호위축병에 저항성이 있으며 기후변화에 따른 불시출수에 안정적인 특성이 있다. 광맥은 호품 보리에 비하여 원맥 및 맥아 품질 특성이 우수한 특성이 있어 맥주 제조용으로 특화된 작물이다. 제맥 과정은 Automatic Micromalting Systems (Phoenix Biosystems Co., Australia)을 이용하여 침맥과 발아, 배조의 3단계로 진행하였으며(Kim et al., 2013), 제조된 맥아는 Drum mill(Malt Drum Mill, Jeil Industry Co., Seoul, Korea)을 이용하여 1mm 간극으로 분쇄된 것을 사용하였다.

② 효소

효소는 (주) Bision Biochem에서 세가지 액화 효소를 구입하여 사용하였다. 당화효소 α -amylase (from *Bacillus licheniformis*)와 amyloglucosidase (or glucoamylase, from *Aspergillus niger*)는 각각 Spezyme FRED, BioWin AG 제품을 사용하였고 여과증진효소 β -glucanase (from *Trichoderma reesei*, pentosanase 활성 포함)는 BrewMax L 제품을 사용하였다.

(나) 실험 방법

① 당화 방법

㉠ Grinding

EBC와 ASBC에서는 이러한 목적에 맞도록 특별히 고안된 DLFU (Buhler) 디스크형 분쇄기(disk mill)을 이용하고 있다.

㉡ Mashing procedure

거친 분쇄맥아와 고운 분쇄맥아 각 50g을 200ml 의 45°C 증류수(46-48°C)에 넣고 유리막대로 빠르게 저어준 후 액체의 냄새와 향기를 노트한다.(향기로움, 곰팡이냄새, 덜익음, 쿼퀴함 등) 이를 당화기에 옮겨 46°C에서(당화 비커에 온도계를 위치시킨다.) 30분간 저어주면서 당화시킨다. 다음으로 분당 1°C씩 상승시켜 70°C 까지 (24분) 올린 다음 70-71°C의 물을 100ml 추가하고 1시간 동안 더 당화시킨다.

② 맥즙 제조 적성 평가

㉓ Reducing sugar

DNS법(Miller GL., 1959)에 따라 DNS시약 3 ml에 sample 1ml 와 섞는다. 끓는 물에서 5분간 반응을 시킨 후 상온에서 5분간 식힌다. 반응이 종료된 sample을 spectrophotometer를 이용하여 550 nm의 파장에서 흡광도를 측정한다. 측정된 흡광도를 standard curve에 대입하여 환원당을 정량한다.

㉔ Free Amino Nitrogen (ASBC 방법)

1.0ml ninhydrine color reagent 각각의 test tube에 첨가한다. 받침대에 두고 증발을 막기 위해 15-20mm glass marble의 마개를 씌운다. 16min 동안 water bath에서 가열하고, 20min 동안 20°C±1°C bath에서 식힌 다음 5ml dilution solution 을 넣는다. 완벽하게 섞고 증류수와 비교하여 570nm에서 30분 이내에 흡광도를 측정한다.

㉕ pH (ASBC 방법)

맥즙 원액을 pH/reference 전극 시스템을 이용하여 pH를 측정한다. 여과를 거친 당화액의 온도를 25°C로 일정하게 유지시킨 후에 pH meter(mettler Toledo SevenEasy pH)을 이용하여 pH를 측정하여 0.05pH 수준까지 나타낸다.

㉖ Filtration time (ASBC 방법)

당화액 45 mL를 시료로 하여 여과지(No. 2, Whatman)를 사용하여 맥아즙이 여과되는데 걸리는 시간을 측정하였다. 초기 10 mL의 맥즙을 재 여과하고 더 이상 filter cake에 액체가 보이지 않으며, 갈라지기 시작할 때를 측정 종료 시점으로 하였다.

㉗ Viscosity (ASBC 방법)

여과를 거친 당화액의 점도를 항온 수조에 설치된 진동식 점도계(A&D, SV-10 Sine-wave Vibro viscometer)를 사용해서 25°C 에서 측정하였다.

③ β -glucan 측정

맥즙에 존재하는 β -glucan 함량 분석은 Megazyme β -glucan assay kit (K-BGLU, Megazyme International Ireland, Co. Wicklow, IRELAND)를 이용하여 측정하였다. 먼저 5 mL의 맥즙을 2.5 g의 곱게 갈린 ammonium sulphate와 잘 혼합 하여 용해한 후 4°C에서 20

시간 세워서 방치한 것을 centrifuge를 이용하여 1000 g에서 10분간 원심분리하였다. 분리된 상층액은 제거하고, 남겨진 pellet은 50% 에탄올 1 mL로 완전히 용해한 다음 10 mL의 50% 에탄올을 추가로 첨가하여 washing하고 1000 g에서 5분간 원심분리 하는 과정을 두 번 반복하였다. Washing 후 상층액을 제거하고 남은 pellet은 sodium phosphate buffer (20mM, pH 6.5)를 넣어 4.8 mL로 볼륨을 조정하고 잘 혼합한 다음 lichenase (E-LICHN, Megazyme International) 0.2mL (10 U)를 첨가하여 40°C에서 5분간 반응시켰다. 이후 1000 g에서 10분간 원심분리하여 상층액 0.1 mL를 3개의 시험관에 각각 취하고 2개의 시험관에는 β -glucosidase (E-BGLUC, Megazyme International) 0.1 mL (0.2 U)를 첨가하고 나머지 1개의 시험관에는 sodium acetate buffer (50mM, pH 4.0) 0.1 mL를 넣어 40°C에서 15분간 반응시켰다. GOPOD Reagent (K-GLUC, Megazyme International) 3 mL를 각 시험관에 넣고 40°C에서 20분간 반응 시킨 후 Spectrophotometer (OPTIZEN 2120UV, Mecasys Co. Ltd., Korea)를 이용하여 510nm에서 흡광도를 측정하여 β -glucan 함량을 구하였다.

(3) 결과 및 고찰

당화효소 첨가 시 맥즙의 점도 증가는 가용성 성분들의 추출양 증가로 설명할 수 있지만, 맥즙의 점도 자체에 가장 큰 영향을 미치는 요인은 맥아에 함유된 β -glucan 양으로 알려져 있다(L Johansson, 2006). 많은 연구에서 보리의 β -glucan 함량과 맥즙의 점도에 대한 상관 관계를 나타냈고, β -glucan의 함량이 낮은 보리일수록 생성된 맥즙의 점도가 낮은 경향을 보였다(Lee YT and Lee CK., 1994). 이와 같이 Table1의 결과에서도 광맥 맥즙의 점도와 filtration time의 수치가 Pilsner 맥즙에 비하여 높은 것으로 보아 광맥 자체에 β -glucan 함량이 많은 것으로 추측할 수 있고, 같은 광맥에서도 당화효소를 첨가한 광맥이 β -glucan 함량이 많아 일반 광맥 맥즙 보다 점도와 filtration time 수치가 높은 것으로 예상하였다. 본 연구에서 β -glucan assay kit로 세가지 맥즙에 함유된 β -glucan의 양을 측정한 결과 실제로 광맥 맥즙이 Pilsner에 비하여 두 배 이상 많은 양을 함유하고 있으며, 당화효소를 첨가한 광맥 맥즙이 일반 광맥보다 약 30% 더 많다고 나타났다(Table 2-3). 보리가 가지는 β -glucan은 맥아를 제조하는 과정에서 보리가 발아하면서 합성된 β -glucanase에 의해 분해되어 상당량이 감소되지만 제맥 후 맥아에 남아있는 β -glucan 양은 제맥 조건이나 보리의 품종에 따라 달라질 수 있다(Etokakapan, 1993; J Wang et al., 2003; Lee YT et al., 1994). 이는 광맥과 Pilsner의 β -glucan 함량 차이를 설명 할 수 있으며 품종 차이에 의한 발아 중 β -glucanase의 활성 차이로 분해되지 않은 β -glucan이 당화 과정 중에 맥즙으로 추출 된 것으로 여겨진다. 또한 β -glucan은 배유의 겉부분과 호분층에서 복합 다당류와 펩타이드 등과 결합되어 존재하는데(Bhatty, 1993; Zheng et al., 2000; Storsley et al., 2003), 첨가한 당화효소에 의해 전분이 가수분해 되면서 결합되어 있던 β -glucan의 추출에도 영향을 미쳐 당화효소를 첨가한 맥즙에 β -glucan이 더 많이 추출되어 그 함량이 높은 것이라 사료된다.

Table 2-3. Pilsner와 광맥, 당화효소 첨가한 광맥 맥즙의 β -glucan 함량 비교 (A: α -amylase, AG: amyloglucosidase)

	Pilsner	광맥	광맥 A5 μ L+ AG5 μ L
β -glucan (mg/L)	82.82 \pm 6.96	190.31 \pm 8.55	232.23 \pm 7.97

광맥 맥즙의 점도와 filtration time을 낮추기 위하여 첨가하는 효소로서 β -glucan을 분해시켜 여과를 증진시키는 효소인 β -glucanase를 처리하였다. 효소 양에 따른 변화를 보기 위하여 당화효소가 첨가된 맥즙에 β -glucanase 양을 5, 10, 20 μ L 첨가하여 맥즙의 점도와 filtration time의 변화를 보았다(Fig. 2-3). 본 연구 결과 β -glucanase의 양을 늘려 첨가할수록 filtration time과 점도가 줄어드는 것을 확인할 수 있었다. 특히 β -glucanase를 20 μ L 첨가할 경우 filtration time은 29 min으로, 당화효소만 첨가한 맥즙에 비하여 약 70% 감소하였으며 점도는 1.42cP로 약 20% 감소하였다. 또한 각 맥즙의 β -glucan 함량을 측정한 결과 세 맥즙 모두 10mg/L 미만으로 줄어든 것으로 나타나 β -glucanase에 의해 모두 분해된 것으로 보인다. 이는 β -glucanase 활성 뿐만 아니라 pentosanase 활성을 포함하고 있어 큰 폭으로 감소된 것으로 사료된다.

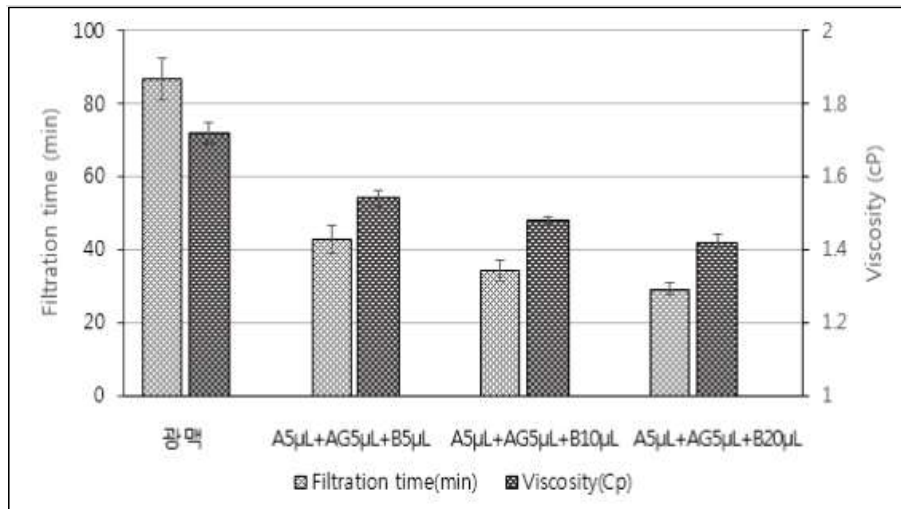


Fig. 2-3. 당화효소와 β -glucanase를 첨가한 맥즙의 filtration time과 viscosity 변화 (A: α -amylase, AG: amyloglucosidase, B: β -glucanase)

Table 2-4. 여과증진효소 첨가에 따른 당화효소 처리 광맥 맥즙의 Reducing sugar, FAN, pH 변화 (B: β -glucanase)

	B5 μ L	B10 μ L	B20 μ L
Reducing sugar (mg/mL)	60.25 \pm 2.03	61.62 \pm 1.01	62.85 \pm 1.00
Free amino nitrogen (mg/L)	196.97 \pm 4.64	199.93 \pm 3.44	209.29 \pm 3.4
pH	5.54 \pm 0.02	5.54 \pm 0.01	5.53 \pm 0.01

점도와 filtration time 외에 여과 효소 첨가에 따른 맥즙 제조 적성의 변화를 측정된 결과를 Table 32에 나타내었다. 환원당량은 여과효소의 양이 증가함에 따라 약간 증가하는 추세를 보이나 유의적 차이는 나타나지 않았다($P < 0.05$). β -glucan은 다량의 glucose가 $\beta(1 \rightarrow 4)$ 와 $\beta(1 \rightarrow 3)$ 결합으로 이루어져 있으며, β -glucanase는 이를 가수분해하여 glucose 등의 작은 단편들로 분해(Bourne & John, 1970)하는데, β -glucan 분해에 의해 생성되는 환원당은 전분에서 나오는 환원당에 비하여 그 양이 매우 적기 때문에 전체적인 맥즙의 환원당량의 차이가 크게 증가하지 않는 것으로 보인다. 그리고 Free amino nitrogen(FAN)은 여과 효소 양의 증가에 따라 맥즙에 추출된 FAN 함량도 증가함이 나타났는데, 이는 β -glucan과 강하게 결합되어있던 펩타이드 성분들이(Bhatty, 1993; Zheng et al., 2000; Storsley et al., 2003) β -glucanase에 의해 β -glucan이 분해되면서 유리되어 증가한 것으로 사료된다. 한편, pH는 세 맥즙의 유의차가 없는 것으로 보아($P < 0.05$) β -glucan의 분해는 맥즙의 pH에 영향을 주지 않는 것으로 나타났다.

따라서 여과 효소 첨가로 인한 β -glucan의 분해는 점도와 filtration time을 줄여 제조 적성을 증가시키고, 맥주 생산에 있어서 여과 과정을 단축시키고 맥즙의 추출율을 높일 수 있을 것으로 기대하며, 높은 β -glucan 함량으로 발생할 수 있는 맥주의 haze 현상과 침전, gel 형성 등의 문제점을 해결할 수 있어 광맥을 이용한 맥주 생산에 있어서 경제적인 측면과 생산성, 품질 안정화 등에 긍정적인 영향을 미칠 것으로 기대된다.

2. 당화조건의 현장적용 및 보완

가. 현장적용을 위한 맥즙의 제조 적성 분석

(1) 요약

참여기업의 맥주 제조시설 중 5t 당화조의 당화온도 프로파일을 데이터 로거를 이용해 측정하여 당화 중 온도 profile을 확립하였다. 온도조건을 실험실에서 적용하여 당화공정 중 맥즙의 제조적성을 분석하였다. 제조적성을 분석한 뒤 당화공정 중 맥즙 품질을 모니터링하여 여과성능 분석에 따른 분해조건 및 당화공정을 개선하였다.

(2) 재료 및 방법

(가) 재료

① 데이터 로거

참여기업의 맥주 제조시설 중 5t 당화조의 당화온도 프로파일을 얻기위해 데이터 로거는 (주)대한FCS에서 Signatrol / SL53T Temperature data logger 제품을 구매하여 사용하였다.

(나) 실험 방법

① 데이터 로거의 측정

실험실에서 사용하는 당화조와 실제 한국홍삼맥주 공장에서 사용하는 5t 당화조의 크기가 다르기 때문에 그에 따라 입력한 온도와 실제 당화조 안의 온도가 다를 수 있다고 예상하였다. 이에 한국홍삼맥주의 공장의 5t 당화조 안에 세 개(D1-CH1, D2-CH1, D3-CH1)의 데이터 로거를 각각 다른 위치에서 실제 당화 중 당화조 안의 온도를 측정하였다. D1-CH1은 당화조 중심기둥에, D2-CH1은 당화조 2번째 계단에, D3-CH1은 당화조 3번째 계단에 각각 설치하여 다른 위치에서의 온도 프로파일을 얻었다.



Fig. 2-5. 홍삼맥주 제조 시설 중 5t 당화조에 데이터 로거를 설치한 모습

(3) 결과 및 고찰

(가) 참여기업의 맥주 제조시설 중 5t 당화조의 당화온도 프로파일 확립

실험실에서 사용하는 당화조와 실제 한국홍삼맥주 공장에서 사용하는 5t 당화조의 크기가 다르기 때문에 그에 따라 입력한 온도와 실제 당화조 안의 온도가 다를 수 있다고 예상하였다. 이에 한국홍삼맥주의 공장의 5t 당화조 안에 세 개(D1-CH1, D2-CH1, D3-CH1)의 데이터 로거를 각각 다른 위치에서 실제 당화 중 당화조 안의 온도를 측정하였다(Figure 3). Figure 4에 세 개의 데이터 로거로 측정한 온도그래프를 중첩하여 나타내었다.

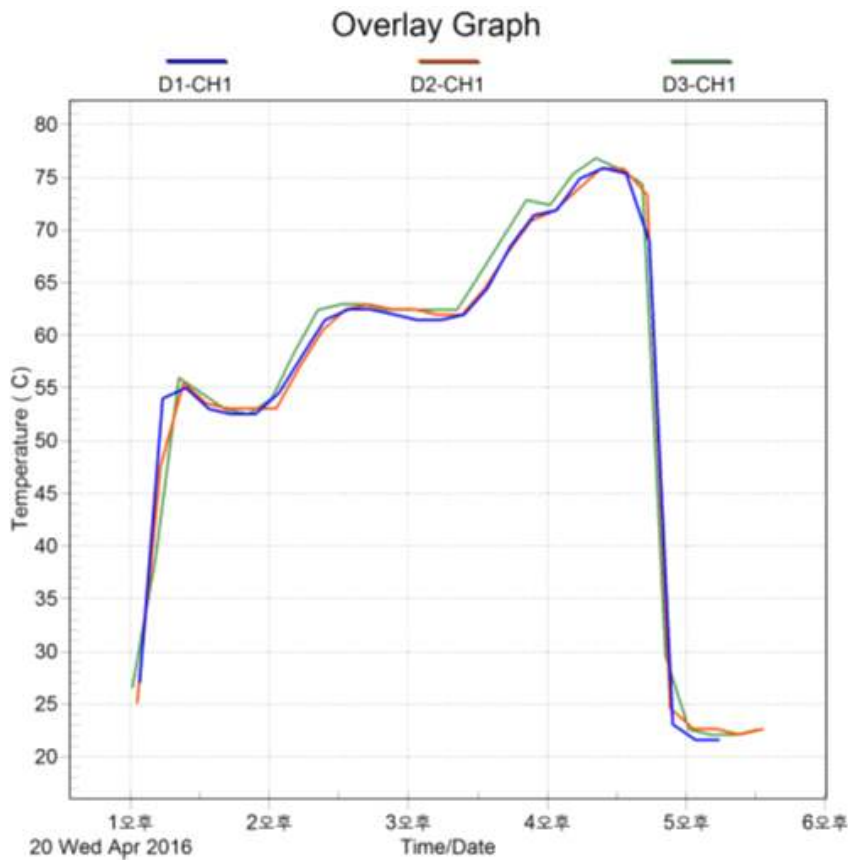


Fig. 2-6. 데이터로거로 측정한 (주)홍삼맥주 당화조 안의 실제 온도

홍삼맥주 당화조 안의 실제 온도 측정 실험 결과 세 개의 각각 다른 위치에서 측정한 데이터로거의 값이 비슷한 것으로 보아 당화조 안의 온도가 균일함을 알 수 있었다. 실험실에서는 당화시에 52°C에서 20분간 1차 당화를 시킨 다음 1°C/min 속도로 10분간 온도를 10°C 증가시켜 맥즙의 온도를 62°C까지 올린 다음 1시간 더 당화시킨다. 그 다음 마찬가지로 1°C/min 속도로 10분간 온도를 10°C 증가시켜 맥즙의 온도를 72°C까지 올린 다음 15분간 당화시킨다. 그 다음 4분간 온도를 4°C 증가시켜 76°C에서 10분간 당화를 하여 당화를 완료하여 약 129분 간 당화를 진행한다. 하지만 실제 공장의 5t 당화조 온도를 측정해보니 부피가 커짐에 따라 온도를 올리는 데에 더 많은 시간이 걸렸다. 실제 당화조 안에서는 52°C에서 20분간 당화를 시킨 다음 25분간 온도를 10°C 증가시켜 맥즙의 온도를 62°C까지 올린 다음 1시간 더 당화시킨다. 그 다음 35분간 온도를 10°C 증가시켜 맥즙의 온도를 72°C까지 올린 다음 12분간 당화시킨다. 그 다음 20분간 온도를 4°C 증가시켜 76°C에서 10분간 당화를 하여 당화를 완료하였다. 실제 공정에서는 약 192분 간 당화를 진행하여 당화시간이 약 2시간 에서 약 3시간으로 증가하였다. 실험실 당화조 안의 온도와 참여기업의 실제 5t 당화조 안의 온도를 Table 2-5에 비교하였다.

Table 2-5. 실험실 온도 조건과 한국홍삼맥주(주) 당화조 실제 온도 비교

실험실 온도 조건	당화 중 실제 홍삼맥주 5t 당화조 온도
52 °C (20min)	52 °C (30min)
↓ (10min)	↓ (25min)
62 °C (60min)	62 °C (60min)
↓ (10min)	↓ (35min)
72 °C (15min)	72 °C (12min)
↓ (4min)	↓ (20min)
76 °C (10min)	76 °C (10min)
129 min	192 min

이에 고창 공장의 실제 당화조의 온도를 설정하여 실험실에서 그대로 재현하였다. Figure 5는 실험실에서 재현한 홍삼맥주 공장의 당화조 온도 프로파일을 나타내고 있다. 당화온도 조건의 변경으로 인한 맥즙 제조적성의 변화를 알아보기 위하여 위의 방법과 동일하게 맥즙 사용량에 따른 맥즙 제조 적성을 분석하였다(Figure 7).

나. 당화과정 촉진을 위한 당화효소 사용 및 조건 확립

(1) 요약

당화효소 α -amylase, amyloglucosidase 사용에 따른 맥즙의 물리화학적 분석을 수행하였다. 당화과정 촉진을 위한 당화효소를 사용한 결과 당화효소를 첨가하였을 때 환원당량이 효소 사용량이 증가할 때 효소를 처리하지 않은 맥즙과 비교해 증가하는 것을 확인 할 수 있었다. 또한 광맥에 효소를 맥아의 0.1 % 씩 만 사용하여도 환원당량이 약 15 % 증가하여 61.2 mg/mL로 Pilsner 맥아로 제조한 맥즙의 환원당량(60.12 mg/mL)보다 높은 수치를 보이는 것을 확인하였다. 하지만 당화효소를 첨가할수록 당화효소의 영향으로 환원당이 증가하면서 viscosity가 점점 증가하여 filtration time에도 부정적인 영향을 미치는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 환원당량을 적정수준으로 증가시키면서 filtration time을 최소로 증가시키는 맥아의 0.1 %를 당화효소 최적조건으로 결정하였다.

(2) 재료 및 방법

(가) 재료

① 보리

국산 보리 광맥은 농촌진흥청 벼맥류부의 협조에 의하여 전라북도 익산에서 수확된 것을 사용하였으며, 외국산 보리 Pilsner는 독일 Weyermann 사에서 수입 구매하여 사용하였다. 광맥은 2010년 개발된 맥류 품종으로, 대립, 다수성이며 도복, 습해, 한해 등에 강하고 보리호위축병에 저항성이 있으며 기후변화에 따른 불시출수에 안정적인 특성이 있다. 광맥은 호품 보리에 비하여 원맥 및 맥아 품질 특성이 우수한 특성이 있어 맥주 제조용으로 특화된 작물

이다. 제맥 과정은 Automatic Micromalting Systems (Phoenix Biosystems Co., Australia)을 이용하여 침맥과 발아, 배조의 3단계로 진행하였으며(Kim et al., 2013), 제조된 맥아는 Drum mill(Malt Drum Mill, Jeil Industry Co., Seoul, Korea)을 이용하여 1mm 간극으로 분쇄된 것을 사용하였다.

(나) 실험 방법

① 당화 방법

㉠ Grinding

EBC와 ASBC에서는 이러한 목적에 맞도록 특별히 고안된 DLFU (Buhler) 디스크형 분쇄기(disk mill)을 이용하고 있다.

㉡ Mashing procedure

거친 분쇄맥아와 고운 분쇄맥아 각 50g을 200ml 의 45℃ 증류수(46-48℃)에 넣고 유리막대로 빠르게 저어준 후 액체의 냄새와 향기를 노트한다.(향기로운, 곰팡이냄새, 덜익음, 키키편 등) 이를 당화기에 옮겨 46℃에서(당화 비커에 온도계를 위치시킨다.) 30분간 저어주면서 당화시킨다. 다음으로 분당 1℃씩 상승시켜 70℃ 까지 (24분) 올린 다음 70-71℃의 물을 100ml 추가하고 1시간 동안 더 당화시킨다.

㉢ Conversion

1시간 동안 더 당화시키는 동안에 5분마다 측정하여 0.02N 요오드용액을 자기관에 검사하여 당화시간을 조사한다[1.27g I₂ + 2.50g KI in H₂O 500ml 당화가 완료되면 yellow로 염색된다]. 측정 간격은 5분 미만이나 5-7분사이로 한다. 전환시간과 맥아 거칠기와는 관계가 없다.

㉣ Cooling and filtration

1시간 이후, 맥아즙은 10~15분 이내에 상온으로 냉각하고 젖는 것을 멈추고, 온도계를 제거한 후, 비이커에 증류수를 부어 450.0±0.05g으로 맞춘다.

저울에 무게를 재기 전에 유리막대를 이용하여 한번 저어주고, 여과 전에 한 번 더 저어준 후(5분 이상 15분 이하) 전체 내용물을 지름 20cm의 깔대기로 주름진 여과지(아래)를 이용하여 여과하고 지름 20cm 관찰용 유리커버를 여과 동안에 덮는다. 첫 번째 맥아즙 100ml을 다시 부어서 여과하며 여과지 위의 잔유물이 갈라지기 시작하면 여과를 종료한다. 여과가 느리게 진행될 때는 2시간 이후에 여과를 종료한다. 거친 맥아의 경우 200±2ml 맥아즙을 정확히 추출한다. 여과시간은 100ml 맥아즙을 다시 여과하였을 때 1시간 이내에 여과가 종료되는 것이고, 더 오래 걸리면 느린 것이다. 투명도를 15분 이내로 관찰하여 맑음, 약간 탁함, 탁함으로 표현한다.

참여기업의 실제 당화조의 온도프로파일을 얻어 실험실에서 재현하였다. 52℃에서 20분간

당화를 시킨 다음 25분간 온도를 10℃ 증가시켜 맥즙의 온도를 62℃까지 올린 다음 1시간 더 당화시킨다. 그 다음 35분간 온도를 10℃ 증가시켜 맥즙의 온도를 72℃까지 올린 다음 12분간 당화시킨다. 그 다음 20분간 온도를 4℃ 증가시켜 76℃에서 10분간 당화를 하여 당화를 완료하였다. 당화가 완료되면 맥즙을 20℃로 식히고 증류수로 최종 무게를 45 g으로 맞추고 다음 주름진 여과지 No.597 1/2 (Whatman, Germany)를 4등분하여 접은 다음 유리깔대기 (지름 85mm)를 사용하여 여과하며, 초기 10 mL 맥즙을 재 여과한 것을 시료로 사용하였다.

(주)홍삼맥주 당화조 온도 적용

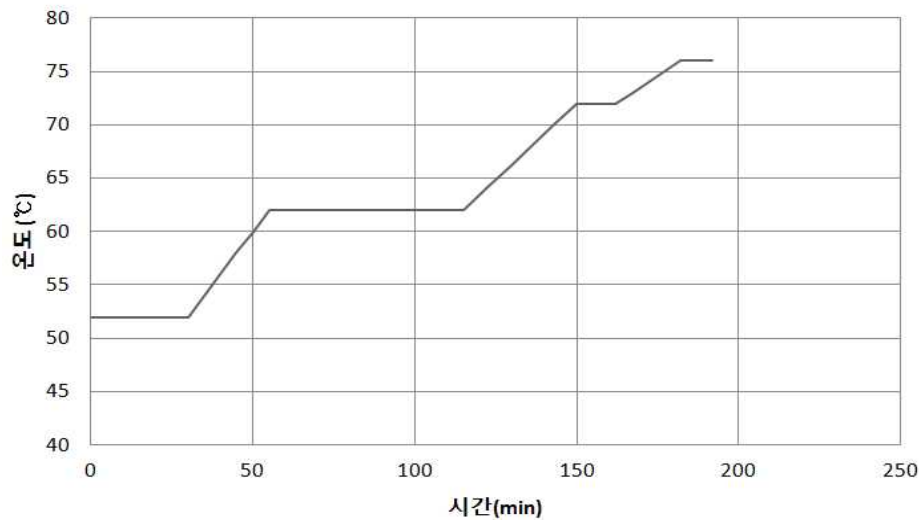


Fig. 2-7 데이터로거로 측정된 (주)홍삼맥주 당화조 안의 실제 당화 온도 조건

② 맥즙 제조 적성 평가

㉠ Reducing sugar

DNS법(Miller GL., 1959)에 따라 DNS시약 3 ml에 sample 1ml 와 섞는다. 끓는 물에서 5분간 반응을 시킨 후 상온에서 5분간 식힌다. 반응이 종료된 sample을 spectrophotometer를 이용하여 550 nm의 파장에서 흡광도를 측정한다. 측정된 흡광도를 standard curve에 대입하여 환원당을 정량한다.

㉡ Free Amino Nitrogen (ASBC 방법)

1.0ml ninhydrine color reagent 각각의 test tube에 첨가한다. 받침대에 두고 증발을 막기 위해 15-20mm glass marble의 마개를 씌운다. 16min 동안 water bath에서 가열하고, 20min 동안 20℃±1℃ bath에서 식힌 다음 5ml dilution solution 을 넣는다. 완벽하게 섞고 증류수와 비교하여 570nm에서 30분 이내에 흡광도를 측정한다.

㉢ pH (ASBC 방법)

맥즙 원액을 pH/reference 전극 시스템을 이용하여 pH를 측정한다.

여과를 거친 당화액의 온도를 25℃로 일정하게 유지시킨 후에 pH meter(mettler Toledo Seveneasy pH)을 이용하여 pH를 측정하여 0.05pH 수준까지 나타낸다.

㉔ Filtration time (ASBC 방법)

당화액 45 mL를 시료로 하여 여과지(No. 2, Whatman)를 사용하여 맥아즙이 여과되는데 걸리는 시간을 측정하였다. 초기 10 mL의 맥즙을 재 여과하고 더 이상 filter cake에 액체가 보이지 않으며, 갈라지기 시작할 때를 측정 종료 시점으로 하였다.

㉕ Viscosity (ASBC 방법)

여과를 거친 당화액의 점도를 항온 수조에 설치된 진동식 점도계(A&D, SV-10 Sine-wave Vibro viscometer)를 사용해서 25°C 에서 측정하였다.

(3) 결과 및 고찰

국산 보리를 이용한 맥주 제조는 이전 연구들로부터 많이 보고되어왔듯이 그 품종으로 인하여 제조에 한계가 있다고 밝혀져 왔다(Lee WJ., 1989; Kim JH et al., 2014). 광맥을 당화시킨 맥즙에 부족한 발효성 당을 더 추출하여 환원당량을 증가시키기 위하여 당화효소 α -amylase와 amyloglucosidase를 첨가하였다. 1차년도 실험의 결과에서 당화효소 α -amylase와 amyloglucosidase를 혼합하여 첨가했을 때의 환원당량이 효소들을 각각 처리하였을 때보다 더 증가하였음을 확인 할 수 있었다. 이는 α -amylase의 낮은 가수분해력이 amyloglucosidase에 의해 보완되는 상호작용에 의한 효과가 나타난 것으로, α -amylase 작용으로 생성된 작은 다당류들을 amyloglucosidase가 glucose 단위로 잘게 분해시켜 그 효율을 높인 것으로 여겨진다(N Richards et al., 2004). 따라서 2차년도 맥아에 당화효소 α -amylase와 amyloglucosidase를 혼합하여 맥아의 0.1, 0.2, 0.3 %로 효소 사용량에 차등을 두어 효소를 처리하여 실험을 하였다. Table 34은 광맥에 당화효소(alpha-amylase, amyloglucosidase)를 맥아의 0.1 %(5 μ L), 0.2 %(10 μ L), 0.3 %(15 μ L)로 효소 사용량에 차등을 두어 처리하여 당화한 맥즙의 제조적성을 비교한 것이다. 효소처리를 하지 않은 맥아를 당화하여 제조한 맥즙을 비교 대상으로 하였다.

Table 2-6. 당화효소(α -amylase, amyloglucosidase) 사용량에 따른 광맥 맥즙의 Reducing sugar, FAN, filtration time, viscosity, pH 변화 (A: α -amylase, AG: amyloglucosidase)

	Control	A5 μ L+AG5 μ L	A10 μ L+AG10 μ L	A15 μ L+AG15 μ L
Reducing sugar (mg/mL)	53.0 \pm 2.48	61.20 \pm 3.88	62.3 \pm 5.32	63.0 \pm 1.25
FAN (mg/L)	178 \pm 10.37	167.05 \pm 4.94	171 \pm 7.34	175 \pm 5.23
Filtration time (min)	13.50 \pm 8.38	22.09 \pm 7.84	19.85 \pm 10.23	19.95 \pm 5.38
Viscosity (cP)	1.60 \pm 0.23	1.70 \pm 0.02	1.70 \pm 0.03	1.72 \pm 0.15
pH	5.83 \pm 0.08	5.88 \pm 0.64	5.86 \pm 0.35	5.85 \pm 1.26

맥즙의 환원당은 맥아에 내재된 당화효소에 의해 전분이 가수분해 되어 생기는 것으로, 발효 과정에서 효모의 주 영양공급원이 되고, 효모는 분해된 당을 이용하여 부산물로 에탄올을 생

성한다. 따라서 맥즙에 존재하는 환원당량은 효모의 생육에 결정적인 영향을 주며, 최종 맥주에서 에탄올 함량에 영향을 주므로 맥즙에서 높은 수치를 보이는 것이 좋지만(Kim JH et al., 2014) 지나치게 많은 양은 맥주에 잔여당을 발생시켜 칼로리를 높이고 발효시간을 길게 만들게 된다(Johan and Esther and Sergio., 2014). 당화효소를 첨가하지 않은 맥즙의 경우 환원당량이 53.0 mg/mL로 기준인 Pilsner 맥아의 환원당량인 60.12 mg/mL(1차년도 측정 결과)보다 약 13.4 % 낮은 수치를 보였다. 당화효소를 첨가하였을 때 환원당량이 효소 사용량이 5 μ L , 10 μ L, 15 μ L로 증가할 때 효소를 처리하지 않은 맥즙과 비교해 15.47 %(8.2 mg/mL), 17.54 %(9.3 mg/mL), 18.86 %(10.0 mg/mL)로 증가하는 것을 확인 할 수 있었다. 또한 광맥에 효소를 5 μ L씩 만 사용하여도 환원당량이 61.2 mg/mL로 Pilsner 맥아로 제조한 맥즙의 환원당량(60.12 mg/mL)보다 높은 수치를 보였다. Free amino nitrogen(FAN)은 맥즙에 존재하는 수용성 단백질의 양의 지표로 유리 아미노산 양을 말하며, 적당한 양은 발효에서 효모의 영양소가 되어 효모의 활성에 도움을 주지만 너무 높은 함량은 차후 맥주에서 혼탁 등 haze를 발생시켜 품질의 안정성을 떨어뜨리는 것으로 알려져 있다(Briggs DE et al., 1981). 당화효소를 첨가하지 않은 광맥의 경우 FAN 값이 178.0 mg/L로 기준인 Pilsner 맥즙의 FAN 값인 151.8 mg/L보다 약 17 % 높은 수치를 보였지만 당화효소를 첨가하자 줄어들었다가 효소의 사용량이 많아질수록 증가하는 추세를 보였다. 또한 pH는 당화 시 효소들의 활성화와 단백질의 가용화나 응고에 관여할 뿐만아니라 tannin의 추출률을 결정하는 요소로, 증류수를 이용한 당화 시 5.8 정도가 최적으로 알려져 있다(Banasik OJ et al., 1979). 본 연구에서는 효소를 처리하지 않은 광맥의 맥즙이 5.83으로 적정 수준이었고 효소를 첨가하여 pH가 약간 증가하였지만 유의적인 차이는 보이지 않았다. 한편, filtration time은 맥주를 생산하는데 있어서 경제적 측면에 영향을 주는 요인으로 filtration time이 짧을 수록 맥주 제조에 있어 좋다. 이번 분석에서 효소를 첨가하지 않은 광맥의 filtration time은 13.50 min이었으며 당화효소를 많이 첨가 할수록 시간이 늘어나는 것을 확인 할 수 있었다.. Viscosity도와 상응하는 결과를 얻었다. 맥즙의 점도는 세포벽 성분인 polysaccharide 중 β -glucan과의 영향을 많이 받으며(J Wang et al., 2004) 기본적으로 맥즙의 점도는 1.33 cP로 알려져 있다(Banasik OJ et al., 1979). 당화효소를 첨가할수록 당화효소의 영향으로 효소를 첨가함에 따라 환원당이 증가하면서 viscosity가 점점 증가하여 filtration time에도 부정적인 영향을 미치는 것을 확인할 수 있었다. 모든 분석 항목을 종합하였을 때, 당화효소(α -amylase, amyloglucosidase)를 5 μ L 씩 첨가하였을 때 환원당량이 61.2mg/L로 적정수준으로 증가시키면서 filtration time을 최소로 증가시키는 A5 μ L+AG5 μ L(효소사용량이 맥아의 0.1 %)를 당화효소 최적조건으로 결정하였다.

다. 여과 성능 향상을 위한 여과증진효소 사용 및 조건 확립

(1) 요약

당화효소의 처리로 인한 가용성 성분들의 증가와 β -glucan 함량의 증가로 Filtration time과 점도가 증가하여 여과성능이 낮아져 이를 개선하기 위하여 β -glucanase를 처리 하였으며 여과증진효소 β -glucanase(pentosanase) 사용에 따른 맥즙의 물리화학적 분석을 수행하였다. 여과증진효소를 사용한 결과 효소를 첨가하였을 때 filtration time이 효소 사용량이 증가할 때 효소를 처리하지 않은 맥즙과 비교해 맥아량의 0.1 % 만 사용하더라도 약 19 % 가량 감소하는 것을 확인 할 수 있었다. 또한 나머지 환원당량, FAN, Brix, pH 등의 주요 맥즙 제조 적성 요소들의 수준을 유지하여 당화효소 사용의 효과를 저해하지 않는다는 것을 확인하여 맥아의 0.1 %를 여과증진효소의 최적조건으로 결정하였다.

(2) 재료 및 방법

(가) 재료

① 보리

국산 보리 광맥은 농촌진흥청 벼맥류부의 협조에 의하여 전라북도 익산에서 수확된 것을 사용하였으며, 외국산 보리 Pilsner는 독일 Weyermann 사에서 수입 구매하여 사용하였다. 광맥은 2010년 개발된 맥류 품종으로, 대립, 다수성이며 도복, 습해, 한해 등에 강하고 보리호위축병에 저항성이 있으며 기후변화에 따른 불시출수에 안정적인 특성이 있다. 광맥은 호품 보리에 비하여 원맥 및 맥아 품질 특성이 우수한 특성이 있어 맥주 제조용으로 특화된 작물이다. 제맥 과정은 Automatic Micromalting Systems (Phoenix Biosystems Co., Australia)을 이용하여 침맥과 발아, 배조의 3단계로 진행하였으며(Kim et al., 2013), 제조된 맥아는 Drum mill(Malt Drum Mill, Jeil Industry Co., Seoul, Korea)을 이용하여 1mm 간극으로 분쇄된 것을 사용하였다.

② 효소

효소는 (주) Bision Biochem에서 세가지 액화 효소를 구입하여 사용하였다. 당화효소 α -amylase (from *Bacillus licheniformis*)와 amyloglucosidase (or glucoamylase, from *Aspergillus niger*)는 각각 Spezyme FRED, BioWin AG 제품을 사용하였고 여과증진효소 β -glucanase (from *Trichoderma reesei*, pentosanase 활성 포함)는 BrewMax L 제품을 사용하였다.

(나) 실험 방법

① 당화 방법

㉠ Grinding

EBC와 ASBC에서는 이러한 목적에 맞도록 특별히 고안된 DLFU (Buhler) 디스크형 분쇄기(disk mill)을 이용하고 있다.

㉡ Mashing procedure

거친 분쇄맥아와 고운 분쇄맥아 각 50g을 200ml 의 45°C 증류수(46-48°C)에 넣고 유리막대로 빠르게 저어준 후 액체의 냄새와 향기를 노트한다.(향기로움, 곰팡이냄새, 덜익음, 퀴퀴함 등) 이를 당화기에 옮겨 46°C에서(당화 비커에 온도계를 위치시킨다.) 30분간 저어주면서 당화시킨다. 다음으로 분당 1°C씩 상승시켜 70°C 까지 (24분) 올린 다음 70-71°C의 물을 100ml 추가하고 1시간 동안 더 당화시킨다.

② 맥즙 제조 적성 평가

㉠ Reducing sugar

DNS법(Miller GL., 1959)에 따라 DNS시약 3 ml에 sample 1ml 와 섞는다. 끓는 물에서 5분간 반응을 시킨 후 상온에서 5분간 식힌다. 반응이 종료된 sample을 spectrophotometer를 이용하여 550 nm의 파장에서 흡광도를 측정한다. 측정된 흡광도를 standard curve에 대입하여 환원당을 정량한다.

㉡ Free Amino Nitrogen (ASBC 방법)

1.0ml ninhydrine color reagent 각각의 test tube에 첨가한다. 받침대에 두고 증발을 막기 위해 15-20mm glass marble의 마개를 씌운다. 16min 동안 water bath에서 가열하고, 20min 동안 20°C±1°C bath에서 식힌 다음 5ml dilution solution 을 넣는다. 완벽하게 섞고 증류수와 비교하여 570nm에서 30분 이내에 흡광도를 측정한다.

㉢ pH (ASBC 방법)

맥즙 원액을 pH/reference 전극 시스템을 이용하여 pH를 측정한다. 여과를 거친 당화액의 온도를 25°C로 일정하게 유지시킨 후에 pH meter(mettler Toledo Seveneasy pH)을 이용하여 pH를 측정하여 0.05pH 수준까지 나타낸다.

㉣ Filtration time (ASBC 방법)

당화액 45 mL를 시료로 하여 여과지(No. 2, Whatman)를 사용하여 맥아즙이 여과되는데 걸리는 시간을 측정하였다. 초기 10 mL의 맥즙을 재 여과하고 더 이상 filter cake에 액체가 보이지 않으며, 갈라지기 시작할 때를 측정 종료 시점으로 하였다.

㉓ Viscosity (ASBC 방법)

여과를 거친 당화액의 점도를 향한 수조에 설치된 진동식 점도계(A&D, SV-10 Sine-wave Vibro viscometer)를 사용해서 25°C 에서 측정하였다.

③ β -glucan 측정

맥즙에 존재하는 β -glucan 함량 분석은 Megazyme β -glucan assay kit (K-BGLU, Megazyme International Ireland, Co. Wicklow, IRELAND)를 이용하여 측정하였다. 먼저 5 mL의 맥즙을 2.5 g의 곱게 갈린 ammonium sulphate와 잘 혼합 하여 용해한 후 4°C에서 20 시간 세워서 방치한 것을 centrifuge를 이용하여 1000 g에서 10분간 원심분리하였다. 분리된 상층액은 제거하고, 남겨진 pellet은 50% 에탄올 1 mL로 완전히 용해한 다음 10 mL의 50% 에탄올을 추가로 첨가하여 washing하고 1000 g에서 5분간 원심분리 하는 과정을 두 번 반복하였다. Washing 후 상층액을 제거하고 남은 pellet은 sodium phosphate buffer (20mM, pH 6.5)를 넣어 4.8 mL로 볼륨을 조정하고 잘 혼합한 다음 lichenase (E-LICHN, Megazyme International) 0.2mL (10 U)를 첨가하여 40°C에서 5분간 반응시켰다. 이후 1000 g에서 10분간 원심분리하여 상층액 0.1 mL를 3개의 시험관에 각각 취하고 2개의 시험관에는 β -glucosidase (E-BGLUC, Megazyme International) 0.1 mL (0.2 U)를 첨가하고 나머지 1개의 시험관에는 sodium acetate buffer (50mM, pH 4.0) 0.1 mL를 넣어 40°C에서 15분간 반응시켰다. GOPOD Reagent (K-GLUC, Megazyme International) 3 mL를 각 시험관에 넣고 40°C에서 20분간 반응 시킨 후 Spectrophotometer (OPTIZEN 2120UV, Mecasys Co. Ltd., Korea)를 이용하여 510nm에서 흡광도를 측정하여 β -glucan 함량을 구하였다.

(3) 결과 및 고찰

광맥을 당화효소를 사용하여 환원당량을 적정 수준으로 증가시켰지만 환원당량을 증가시키는 반면에 viscosity가 증가하면서 filtration time도 증가하여 맥주제조 효율을 떨어트렸다. 당화효소 첨가 시 맥즙의 점도 증가는 가용성 성분들의 추출량 증가로 설명할 수 있지만, 맥즙의 점도 자체에 가장 큰 영향을 미치는 요인은 맥아에 함유된 β -glucan 양으로 알려져 있다(L Johansson, 2006). 많은 연구에서 보리의 β -glucan 함량과 맥즙의 점도에 대한 상관 관계를 나타냈고, β -glucan의 함량이 낮은 보리일수록 생성된 맥즙의 점도가 낮은 경향을 보였다(Lee YT and Lee CK., 1994). Table 1의 결과를 보면 같은 광맥에서도 당화효소를 첨가한 광맥이 β -glucan 함량이 많아 일반 광맥 맥즙 보다 점도와 filtration time 수치가 높은 것으로 예상하였다. 따라서 본 연구에서 당화효소를 처리한 맥아(A5 μ L+AG5 μ L)에 여과증진 효소(β -glucanase)를 맥아의 0.1 %(5 μ L), 0.2 %(10 μ L), 0.4 %(20 μ L)로 효소 사용량에 차등을 두어 처리하여 당화한 맥즙의 filtration time과 β -glucan 함량을 측정하였다. 이에 따라 여과증진 효소(β -glucanase)에 의한 β -glucan의 분해가 맥즙의 filtration time에 미치는 영향을 알아보고 최적 효소 양을 결정하였다. 효소처리를 하지 않은 맥아를 당화하여 제조한 맥즙과 당화효소 처리한 맥즙(A5 μ L+AG5 μ L)을 비교 대상으로 하였다(Fig. 2-8.). 또한 여과증진 효소 첨가에 따른 맥즙의 Reducing sugar, FAN, filtration time, viscosity, brix, pH 변화를 Table 2에서 비교하였다.

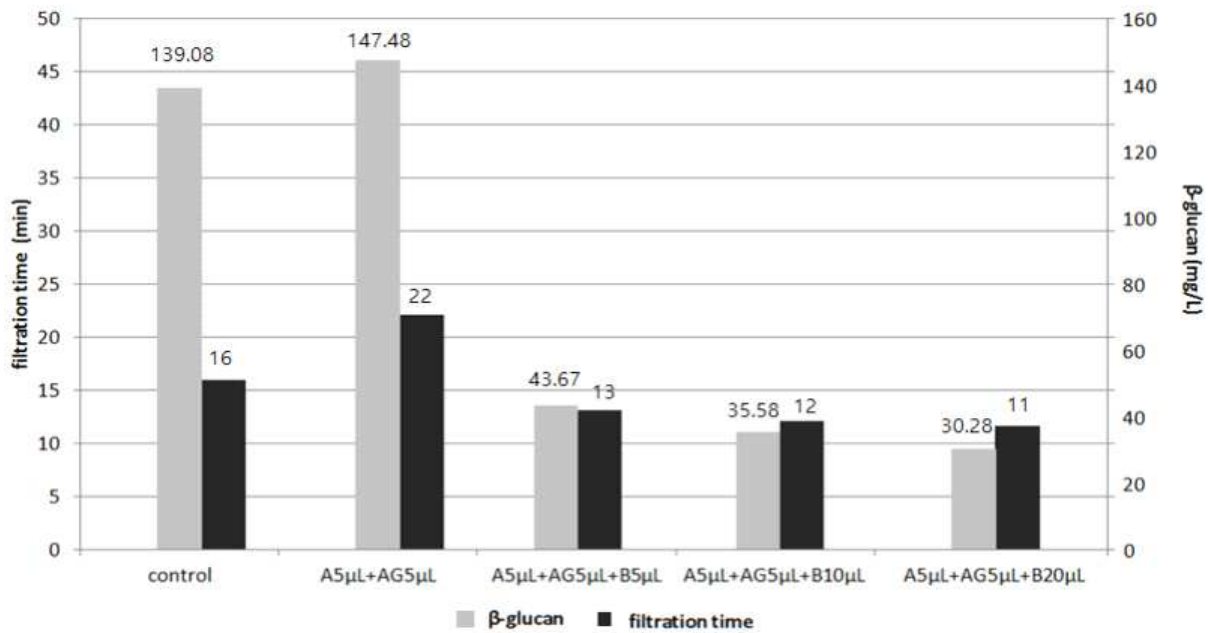


Fig. 2-8. 여과증진효소 첨가에 따른 당화효소 처리 맥즙의 Filtration time 및 β -glucan 함량 변화 (A: α -amylase, AG: amyloglucosidase, B: β -glucanase)

당화효소를 첨가한 광맥 맥즙의 β -glucan 함량(147.48 mg/L)이 효소를 첨가하지 않은 광맥 (139.08 mg/L)보다 약 6 % 더 많다고 나타났다(Figure 1). 또한 β -glucan 함량의 증가로 filtration time도 증가하는 것을 확인 할 수 있었다. 보리가 가지는 β -glucan은 맥아를 제조하는 과정에서 보리가 발아하면서 합성된 β -glucanase에 의해 분해되어 상당량이 감소되지만 제맥 후 맥아에 남아있는 β -glucan 양은 제맥 조건이나 보리의 품종에 따라 달라질 수 있다(Etokakapan, 1993; J Wang et al., 2003; Lee YT et al., 1994). 이는 품종 차이에 의한 발아 중 β -glucanase의 활성 차이로 분해되지 않은 β -glucan이 당화 과정 중에 맥즙으로 추출된 것으로 여겨진다. 또한 β -glucan은 배유의 겉부분과 호분층에서 복합 다당류와 펩타이드 등과 결합되어 존재하는데(Bhatty, 1993; Zheng et al., 2000; Storsley et al., 2003), 첨가한 당화효소에 의해 전분이 가수분해 되면서 결합되어 있던 β -glucan의 추출에도 영향을 미쳐 당화 효소를 첨가한 맥즙에 β -glucan이 더 많이 추출되어 그 함량이 높은 것이라 사료된다. 본 연구 결과에서 당화효소를 처리하지 않은 맥아에 β -glucanas를 5 μ L (맥아량의 0.1 %) 첨가하였을 때의 β -glucan 함량(43.67 mg/mL)이 효소를 첨가하지 않은 맥즙의 β -glucan 함량(139.08 mg/mL)보다 약 68 % 감소한 것을 확인 할 수 있었다. viscosity의 영향으로 filtration time 또한 22 min에서 13 min으로 감소하여 여과증진효소(β -glucanase)가 β -glucan을 분해하여 filtration time을 감소시킨다는 것을 확인 하였다. 첨가하는 여과증진효소(β -glucanase)양을 늘릴수록 β -glucan의 양이 감소하여 filtration time이 줄어들지만 β -glucanas를 맥아의 0.1 % 이상 사용하였을 때 효소사용량에 비해 그 효과가 미미해 여과증진효소(β -glucanase)의 최적 조건을 맥아의 0.1 %로 설정하였다.

Table 2-7. 여과증진효소 첨가에 따른 당화효소 처리 맥즙의 Reducing sugar, FAN, viscosity, brix, pH 변화 (A: α -amylase, AG: amyloglucosidase, B: β -glucanase)

	Control	A5 μ L+AG5 μ L	A5 μ L+AG5 μ L +B5 μ L	A5 μ L+AG5 μ L +B10 μ L	A5 μ L+AG5 μ L +B20 μ L
Reducing sugar (mg/mL)	53.0 \pm 2.48	61.20 \pm 3.88	61.33 \pm 2.40	62.78 \pm 0.90	60.47 \pm 4.12
FAN (mg/L)	178 \pm 10.37	167.05 \pm 4.94	181.31 \pm 6.71	178.13 \pm 10.31	181.11 \pm 6.00
Viscosity (cP)	1.60 \pm 0.23	1.70 \pm 0.02	1.54 \pm 0.04	1.61 \pm 0.05	1.54 \pm 0.09
Brix (%)	7.40 \pm 0.26	7.85 \pm 0.64	8.20 \pm 0.06	8.30 \pm 0.71	8.20 \pm 0.85
pH	5.83 \pm 0.08	6.10 \pm 0.53	6.05 \pm 0.38	6.05 \pm 0.08	6.05 \pm 0.73

당화효소를 5 μ L 씩 첨가한 맥즙에 여과증진효소(β -glucanase)를 첨가한 결과 환원당량은 61.33 mg/mL, 62.78 mg/mL, 60.47 mg/mL로 차이가 크지 않았다. 당화효소를 처리한 광맥의 FAN(167 mg/L)값이 당화효소를 첨가하지 않은 광맥의 FAN(178 mg/L)값보다 낮은 값을 가졌는데 여과증진 효소를 5 μ L 처리함에 따라 약 8 % 증가(181.31 mg/L) 하는 것을 확인 할 수 있었다. 하지만 여과증진효소를 각 5 μ L, 10 μ L, 20 μ L 처리 하였을 때 FAN 값이 181.31 mg/L, 178.13 mg/L, 181.11 mg/L로 효소의 양이 증가함에 따라서는 큰 차이를 보이지 않았다. Figure 1에서 당화효소를 첨가한 광맥 맥즙이 당화효소의 영향으로 β -glucan이 더 추출되어 β -glucan의 함량이 증가하였다고 설명하였는데 당화효소의 첨가로 β -glucan함량이 증가함에 따라 이에 상응하여 viscosity도 증가하였다. 여과증진효소를 함께 처리하였을 때(1.54cP) 당화효소만 처리하였을 때(1.70cP)보다 약 9 % 감소하여 맥즙의 점도에 긍정적인 영향을 미치는 것을 확인 할 수 있었다. 점도에서도 마찬가지로 여과증진효소의 사용량이 늘어남에 따라 큰 차이는 보이지 않았다. Brix와 pH의 경우에서도 여과증진효소의 사용량이 늘어남에 따라 큰 차이는 보이지 않았다. 결과적으로 여과증진효소를 맥아량의 0.1 %인 5 μ L만 첨가하여도 당화효소 사용으로 증가한 β -glucan을 분해해 맥즙의 점도를 감소시켜 filtration time을 감소시키는 역할을 하는 것을 확인 할 수 있었다. 또한 나머지 환원당량, FAN, Brix, pH 등의 주요 맥즙 제조 적성 요소들의 수준을 유지하여 당화효소 사용의 효과를 저해하지 않는다는 것을 확인 하였다.

라. 확립된 효소조건에 의한 현장 적용 및 맥즙 제조 적성 분석

(1) 요약

확립된 효소조건에 의한 현장 적용을 위해 참여기업 당화조의 온도 프로파일과 더불어 광맥 맥아에 최적 효소(α -amylase, amyloglucosidase, β -glucanase)조건인 맥아의 0.1 %를 처리하여 당화하여 맥아 사용량에 따른 맥즙의 제조 적성을 분석하였다. 당화효소인 α -amylase, amyloglucosidase로 인해 적은 맥아량으로도 기준 환원당량에 도달해 맥아를 약 25 % 절약할 수 있다는 것을 확인 하였다. filtration time 또한 여과증진효소인 β -glucanase를 처리하지 않은 맥아로 제조한 맥즙보다 약 32 % 정도 감소하여 긍정적인 역할을 하는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 맥즙 제조 적성의 평가로 최적 당화조건을 한국홍삼맥주 당화 온도 (192 min), 맥아 사용량 15 %, 효소 사용량 맥아의 0.1 %로 확립하였다.

(2) 재료 및 방법

(가) 재료

① 보리

국산 보리 광맥은 농촌진흥청 벼맥류부의 협조에 의하여 전라북도 익산에서 수확된 것을 사용하였으며, 외국산 보리 Pilsner는 독일 Weyermann 사에서 수입 구매하여 사용하였다. 광맥은 2010년 개발된 맥류 품종으로, 대립, 다수성이며 도복, 습해, 한해 등에 강하고 보리호위충병에 저항성이 있으며 기후변화에 따른 불시출수에 안정적인 특성이 있다. 광맥은 호품 보리에 비하여 원맥 및 맥아 품질 특성이 우수한 특성이 있어 맥주 제조용으로 특화된 작물이다. 제맥 과정은 Automatic Micromalting Systems (Phoenix Biosystems Co., Australia)을 이용하여 침맥과 발아, 배조의 3단계로 진행하였으며(Kim et al., 2013), 제조된 맥아는 Drum mill(Malt Drum Mill, Jeil Industry Co., Seoul, Korea)을 이용하여 1mm 간극으로 분쇄된 것을 사용하였다.

② 효소

효소는 (주) Bision Biochem에서 세가지 액화 효소를 구입하여 사용하였다. 당화효소 α -amylase (from *Bacillus licheniformis*)와 amyloglucosidase (or glucoamylase, from *Aspergillus niger*)는 각각 Spezyme FRED, BioWin AG 제품을 사용하였고 여과증진효소 β -glucanase (from *Trichoderma reesei*, pentosanase 활성 포함)는 BrewMax L 제품을 사용하였다.

(나) 실험 방법

① 당화 방법

㉠ Grinding

EBC와 ASBC에서는 이러한 목적에 맞도록 특별히 고안된 DLFU (Buhler) 디스크형 분쇄기(disk mill)을 이용하고 있다.

㉡ Mashing procedure

거친 분쇄맥아와 고운 분쇄맥아 각 50g을 200ml 의 45°C 증류수(46-48°C)에 넣고 유리막대로 빠르게 저어준 후 액체의 냄새와 향기를 노트한다.(향기로움, 곰팡이냄새, 덜익음, 퀴퀴함 등) 이를 당화기에 옮겨 46°C에서(당화 비커에 온도계를 위치시킨다.) 30분간 저어주면서 당화시킨다. 다음으로 분당 1°C씩 상승시켜 70°C 까지 (24분) 올린 다음 70-71°C의 물을 100ml 추가하고 1시간 동안 더 당화시킨다.

② 맥즙 제조 적성 평가

㉢ Reducing sugar

DNS법(Miller GL., 1959)에 따라 DNS시약 3 ml에 sample 1ml 와 섞는다. 끓는 물에서 5분간 반응을 시킨 후 상온에서 5분간 식힌다. 반응이 종료된 sample을 spectrophotometer를 이용하여 550 nm의 파장에서 흡광도를 측정한다. 측정된 흡광도를 standard curve에 대입하여 환원당을 정량한다.

㉣ Free Amino Nitrogen (ASBC 방법)

1.0ml ninhydrine color reagent 각각의 test tube에 첨가한다. 받침대에 두고 증발을 막기 위해 15-20mm glass marble의 마개를 씌운다. 16min 동안 water bath에서 가열하고, 20min 동안 20°C±1°C bath에서 식힌 다음 5ml dilution solution 을 넣는다. 완벽하게 섞고 증류수와 비교하여 570nm에서 30분 이내에 흡광도를 측정한다.

㉤ pH (ASBC 방법)

맥즙 원액을 pH/reference 전극 시스템을 이용하여 pH를 측정한다.

여과를 거친 당화액의 온도를 25°C로 일정하게 유지시킨 후에 pH meter(mettler Toledo SevenEasy pH)을 이용하여 pH를 측정하여 0.05pH 수준까지 나타낸다.

㉥ Filtration time (ASBC 방법)

당화액 45 mL를 시료로 하여 여과지(No. 2, Whatman)를 사용하여 맥아즙이 여과되는데 걸리는 시간을 측정하였다. 초기 10 mL의 맥즙을 재 여과하고 더 이상 filter cake에 액체가 보이지 않으며, 갈라지기 시작할 때를 측정 종료 시점으로 하였다.

㉦ Viscosity (ASBC 방법)

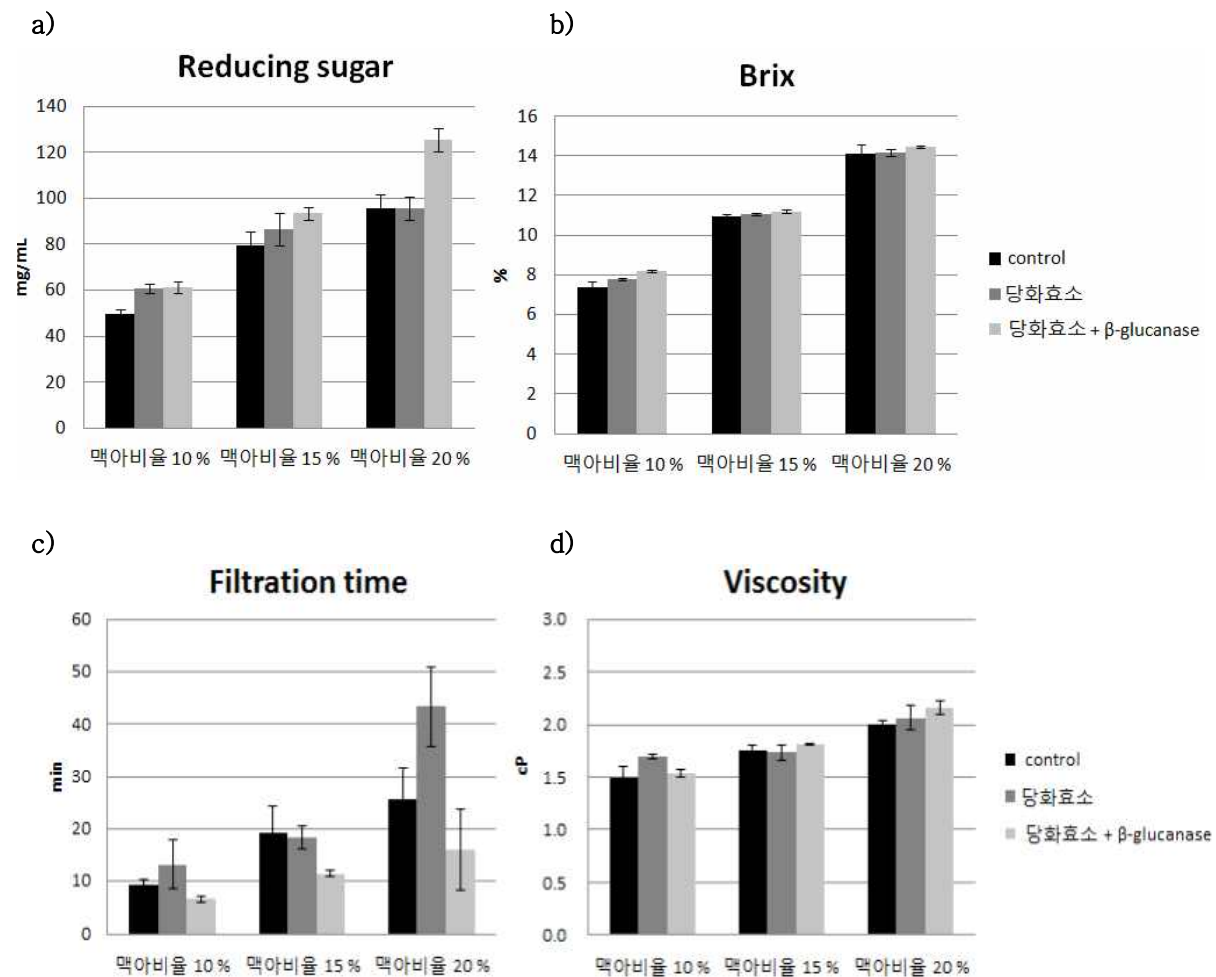
여과를 거친 당화액의 점도를 항온 수조에 설치된 진동식 점도계(A&D, SV-10 Sine-wave Vibro viscometer)를 사용해서 25°C 에서 측정하였다.

(3) 결과 및 고찰

(가) (주)홍삼맥주 맥아 사용량에 따른 맥즙 분석

기존의 맥아 사용량은 ASBC법에 의하여 10 %의 맥아를 사용하여 당화를 진행하였다. 하지만 실제 한국홍삼맥주 공장에서 사용하는 맥아 사용량은 20 %로 맥아 사용량이 달라짐에 따라 주요 맥즙 평가 항목들의 수치가 달라질 수 있다. 따라서 광맥 맥아에 앞서 확립한 최적 효소조건인 맥아의 0.1 %를 처리하여 맥아 사용량에 따라 10 % (A5 μ L+AG5 μ L+B5 μ L), 15 % (A7.5 μ L+AG7.5 μ L+B7.5 μ L), 20 % (A10 μ L+AG10 μ L+B10 μ L) 당화하여 맥즙을 분석하였다. 추가로 당화효소만 처리하였을 때의 맥아사용량에 따른 맥즙분석을 위해 당화효소의 최적 조건인 맥아의 0.1 %를 처리하여 10 % (A5 μ L+AG5 μ L), 15 % (A7.5 μ L+AG7.5 μ L), 20 % (A10 μ L+AG10 μ L)를 당화하여 맥즙을 분석하였다. 또한 효소처리를 하지 않은 맥아를 맥아 사용량에 따라 10 %, 15 %, 20 %로 당화하여 제조한 맥즙을 비교대상으로 하였다.

이처럼 효소무처리 맥아, 당화효소처리 맥아, 당화효소+ β -glucanase처리 맥아를 맥아 사용량을 10 %, 15 %, 20 %로 하여 제조한 맥즙으로 Reducing sugar, Brix, filtration time, viscosity, FAN을 측정하여 Figure 2-9에 나타내었다. (A: α -amylase, AG: amyloglucosidase, B: β -glucanase)



e)

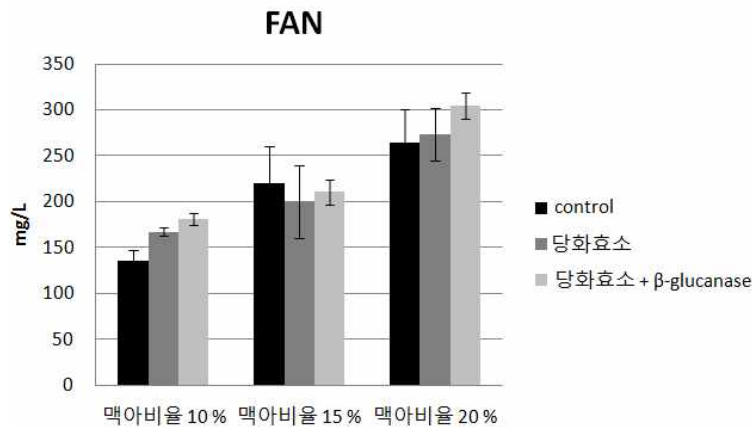


Fig. 2-9. 맥아 사용량에 따른 a) Reducing sugar, b) Brix, c) filtration time, d) viscosity, e) FAN 변화

먼저 Reducing sugar의 경우 맥아 사용량이 증가함에 따라 증가하는 추세를 보였다. 또한 당화효소를 처리한 맥아의 경우 당화효소에 의해 전분이 가수분해 되어 환원당이 당화효소를 처리함에 따라 증가하였으며 또한 당화효소에 여과증진효소(β -glucanase)를 처리한 경우에 β -glucan이 다량의 glucose가 $\beta(1\rightarrow4)$ 와 $\beta(1\rightarrow3)$ 결합으로 이루어져 있으며, β -glucanase는 이를 가수분해하여 glucose 등의 작은 단편들로 분해(Bourne & John, 1970)하는데, β -glucan 분해에 의해 생성되는 환원당 β -glucan의 분해로 glucose 등의 환원당으로 분해되기 때문에 환원당 양이 증가한 것으로 추측된다. Brix도 마찬가지로 환원당량이 증가함에 따라 증가하는 추세를 보였으며 맥아 사용량에 따라, 효소의 사용에 따라 증가하였다. 한국홍삼맥주에서는 20%의 맥아로 사용하는데 맥아 사용량 20%의 결과에서 효소를 첨가하지 않은 맥아(95.69mg/mL)와 최적 효소조건인 0.1%를 처리한 맥아(125.46mg/mL)의 환원당량을 비교해보면 약 31% 정도 증가한 것을 확인 할 수 있다. Filtration time의 경우도 맥아의 사용량이 증가하면 증가하는 추세를 보였다. 맥아 사용량 10%, 20%의 경우를 살펴보면 당화효소를 처리하면 가용성 추출물의 증가로 filtration time이 증가하지만 여과증진효소(β -glucanase)를 처리하면 β -glucan의 분해로 filtration time이 감소하는 것을 확인 할 수 있었다. viscosity의 경우 맥아 사용량이 10%일 때 filtration time 과 같이 당화효소를 사용하였을 때 증가했다가 여과증진효소를 사용하였을 때 감소하는 양상을 보였다. 맥아 사용량이 15%, 20%의 경우에는 여과증진효소를 처리하였을 때 오히려 점도가 약간 증가하였지만 유의적인 수치는 아니었다. 맥아 사용량 20%의 경우에 filtration time이 효소를 처리하지 않은 맥아(25.67 min)보다 당화효소에 여과증진효소를 처리한 맥아(16.00 min)가 약 37% 감소하여 여과증진효소가 맥즙의 filtration time에 긍정적인 역할을 하는 것을 확인 할 수 있었다. FAN의 경우도 맥아사용량이 증가함에 따라 증가하는 것을 확인 할 수 있었다. 또한 효소 무처리에서 보다 당화효소를 처리할 때, 여과증진효소를 같이 처리할 때 증가하는 경향을 보였다. 이는 β -glucan과 강하게 결합되어있던 펩타이드 성분들이(Bhatty, 1993; Zheng et al., 2000; Storsley et al., 2003) β -glucanase에 의해 β -glucan이 분해되면서 유리되어 증가한 것으로 사료된다.

(나) (주)홍삼맥주 실제 당화 온도 적용

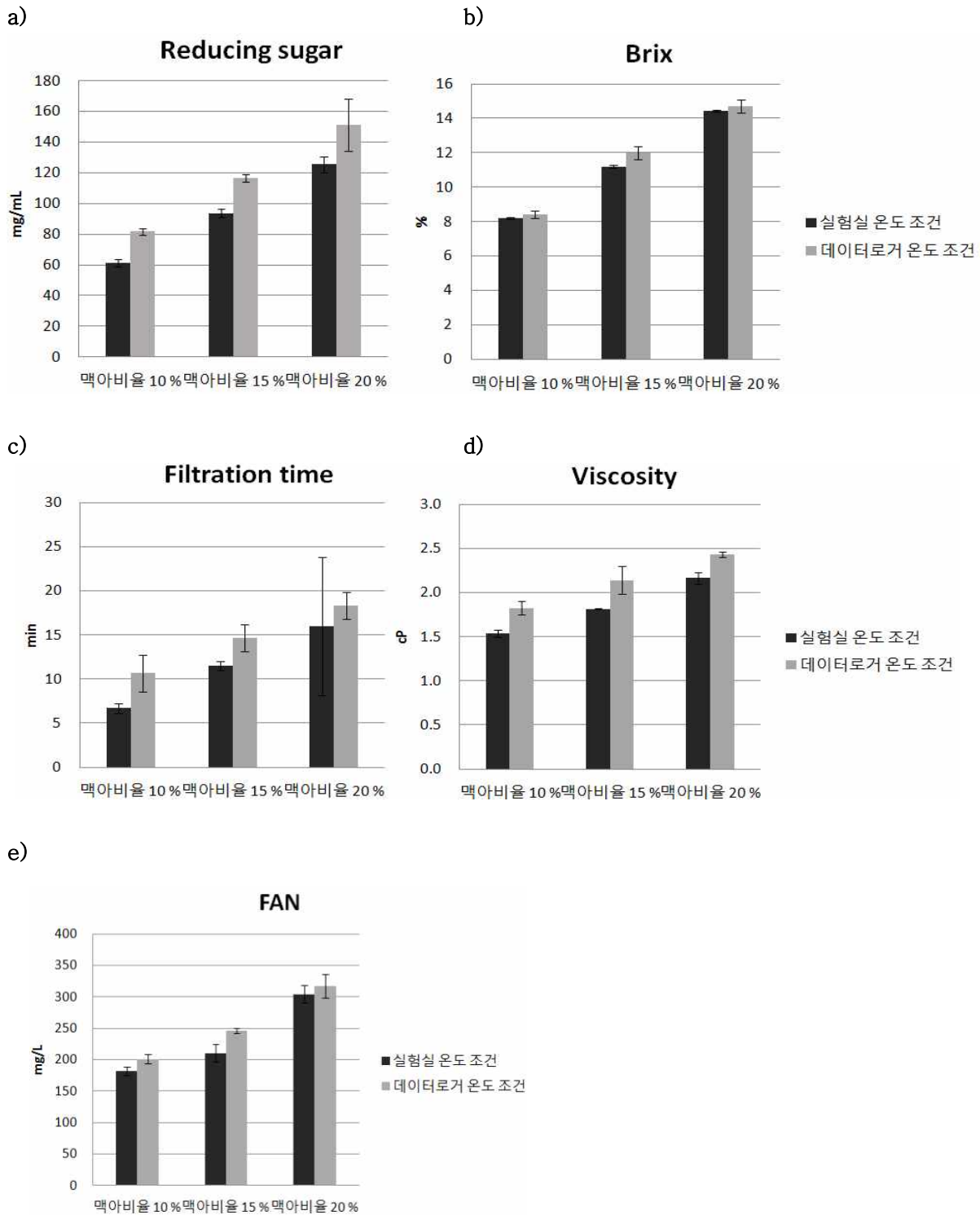


Fig. 2-10. 당화 온도 조건 변화에 따른 맥아비율별 a) Reducing sugar, b) Brix, c) filtration time, d) viscosity, e) FAN 변화

당화시간이 약 두 시간에서 세 시간으로(약 38 %) 증가한 결과 당화시간이 증가함에 따라 Reducing sugar, brix, filtration time, viscosity, FAN이 모두 증가하였다. 환원당량의 경우 당화시간의 증가로 인하여 맥아를 15 % 사용하지 않더라도 맥아 10 %사용만으로도 환원당량이 81.81mg/mL로 기준점인 80mg./mL을 넘어서 맥아를 절약 할 수 있다는 것을 확인하였다. 또한 Brix 값에서도 맥아를 20 % 사용하지 않고도 15 %사용만으로도 Brix 값이 기준당도인 12 %에 도달해 맥아를 절약할 수 있다는 것을 확인 하였다. 따라서 최적 당화 조건을 홍삼맥주 당화 온도(192 min), 맥아 사용량 15 %, 효소 사용량 맥아의 0.1 %로 정하여 맥즙의 Reducing sugar, FAN, filtration time, viscosity, brix를 측정하여 Table 2-8에 나타내었다.

Table 2-8. 최적조건 (맥아 사용량 15 %, 효소량 맥아의 0.1 % 사용, 홍삼맥주 당화 온도)으로 제조한 광맥 맥즙의 Reducing sugar, FAN, filtration time, viscosity, brix 변화 (A: α -amylase, AG: amyloglucosidase, B: β -glucanase)

A 5 μ L + AG 5 μ L + B 5 μ L	
Reducing sugar (mg/mL)	116.40 \pm 2.35
FAN (mg/L)	245.69 \pm 4.15
Filtration time (min)	14.67 \pm 1.53
Viscosity (cP)	2.14 \pm 0.16
Brix (%)	12.00 \pm 0.38

그 결과 최적 조건으로 제조한 맥즙의 환원당량이 116.40 mg/mL로 기준인 80 mg/mL를 넘어서는 수치를 보였다. 또한 Brix값도 12 %로 기준인 12 %에 도달하여 적합한 맥즙이라는 결론을 내렸다. 또한 FAN의 경우에도 245.69 mg/L로 적절한 FAN수치(150-250 mg/L)를 가지는 것으로 나타났다. 맥즙의 점도가 기본적인 맥즙의 점도(1.33cP)보다 높은 수치를 보였는데 이 부분은 다른 방법을 통해 보완하여야 할 것이다. filtration time 또한 14.67min으로 효소를 처리하지 않은 맥아로 제조한 맥즙(19.33min)보다 약 32 % 정도 감소하여 긍정적인 역할을 하는 것을 확인 할 수 있었다. 이러한 맥즙 제조 적성의 평가로 최적 당화조건을 한국홍삼맥주 당화 온도(192 min), 맥아 사용량 15 %, 효소 사용량 맥아의 0.1 %로 확립하였다.

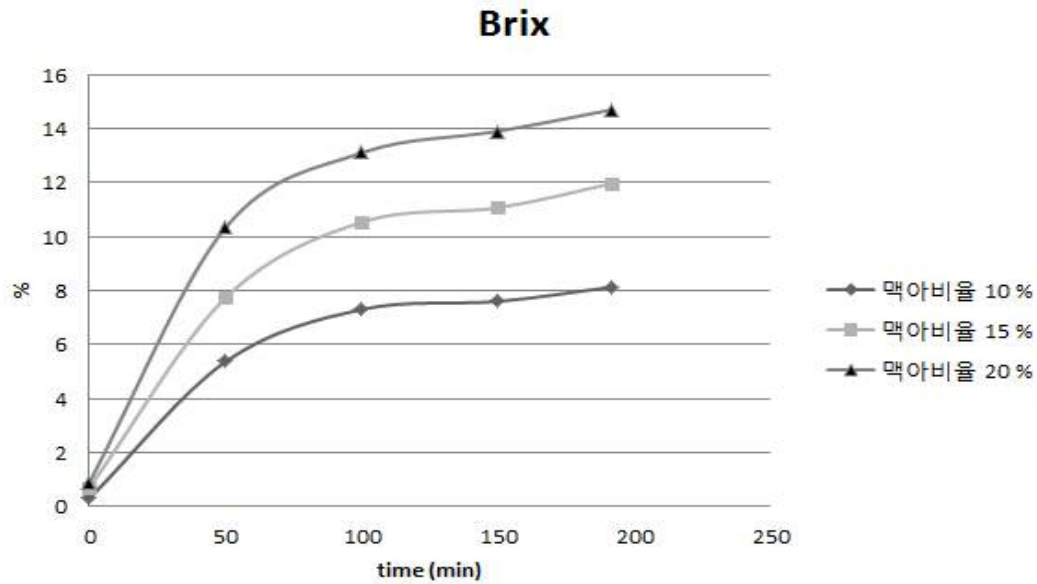


Fig. 2-11. 광맥의 당화 과정 중 맥아사용량, 당화 시간별에 따른 Brix 변화

위의 방법과 동일하게 최적당화조건인 한국홍삼맥주 당화온도(192 min)로 효소 맥아의 0.1 % 사용하여 맥아 사용량을 10 %, 15 %, 20 %로 차등을 두어 제조한 맥즙의 당화 중 당화 시간별, 온도별 Brix의 변화를 Figure 2-11에 나타내었다. 광맥 맥즙의 Brix를 맥아사용량 별로 시간별로 비교해보면 처음 52 °C에서 당화를 시작하고 62 °C로 온도를 증가시킬 때 처음 50분 동안 가장 큰 폭으로 증가하였다. 최초 약 0 % 이었던 맥즙의 당도가 맥아 사용량 별(10 %, 15 %, 20 %)로 5.37 %, 7.73 %, 10.33 %로 가장 큰 폭으로 증가하였으며 또한 50분 이후에는 서서히 증가하는 양상을 보였다.

3. 홍삼/복분자 맥주 품질개선을 위한 당화조건 보완

가. 홍삼/복분자 맥주제조를 위한 당화 조건 보완

(1) 요약

홍삼/복분자 맥주 제조를 위해 확립된 효소 처리 조건에 기능성 소재 (홍삼농축액, 복분자즙)를 첨가하여 맥즙 제조를 하였고, 당화단계에서 기능성 소재 첨가가 맥즙의 품질에 어떤 영향을 미치는지 평가하였다. 홍삼을 첨가한 맥주의 경우 FAN값이 7% 증가하였고 복분자를 첨가한 맥주의 경우에는 환원당량이 6 % 증가하였으며 FAN또한 증가하였다. 다른 pH, 점도, filtration time 등에는 영향을 끼치지 않았다. 이렇게 제조한 맥즙을 발효하여 발효적성을 평가하였는데 홍삼맥주의 경우에는 홍삼의 첨가가 발효에 영향을 끼치지 않았으나 복분자 맥주의 경우에는 환원당량의 증가로 알코올 함량이 증가하는 것을 확인하였다. 하지만 당화시 홍삼과 복분자를 첨가 할 경우 색도나 향, 맛이 저하되어 발효 후나 살균 전에 첨가하여야 될 것으로 사료된다.

(2) 재료 및 방법

(가) 재료

① 보리

국산 보리 광맥은 농촌진흥청 벼맥류부의 협조에 의하여 전라북도 익산에서 수확된 것을 사용하였으며, 외국산 보리 Pilsner는 독일 Weyermann 사에서 수입 구매하여 사용하였다. 광맥은 2010년 개발된 맥류 품종으로, 대립, 다수성이며 도복, 습해, 한해 등에 강하고 보리호위충병에 저항성이 있으며 기후변화에 따른 불시출수에 안정적인 특성이 있다. 광맥은 호품 보리에 비하여 원맥 및 맥아 품질 특성이 우수한 특성이 있어 맥주 제조용으로 특화된 작물이다. 제맥 과정은 Automatic Micromalting Systems (Phoenix Biosystems Co., Australia)을 이용하여 침맥과 발아, 배조의 3단계로 진행하였으며(Kim et al., 2013), 제조된 맥아는 Drum mill(Malt Drum Mill, Jeil Industry Co., Seoul, Korea)을 이용하여 1mm 간극으로 분쇄된 것을 사용하였다.

② 효소

효소는 (주) Bision Biochem에서 세가지 액화 효소를 구입하여 사용하였다. 당화효소 α -amylase (from *Bacillus licheniformis*)와 amyloglucosidase (or glucoamylase, from *Aspergillus niger*)는 각각 Spezyme FRED, BioWin AG 제품을 사용하였고 여과증진효소 β -glucanase (from *Trichoderma reesei*, pentosanase 활성 포함)는 BrewMax L 제품을 사용하였다. Pectinase (from *Aspergillus niger*)는 Planpase PR 제품을 사용하였다.

③ 홍삼 농축액/복분자과즙

홍삼농축액은 부산고려홍삼에서 홍삼G21 제품을 사용하였고, 복분자과즙은 고창 선운산농협에서 베리웰복분자순액 제품을 사용하였다.

(나) 실험 방법

① 당화 방법

㉠ Grinding

EBC와 ASBC에서는 이러한 목적에 맞도록 특별히 고안된 DLFU (Buhler) 디스크형 분쇄기(disk mill)을 이용하고 있다.

㉡ Mashing procedure

거친 분쇄맥아와 고운 분쇄맥아 각 50g을 200ml 의 45℃ 증류수(46-48℃)에 넣고 유리막대로 빠르게 저어준 후 액체의 냄새와 향기를 노트한다.(향기로움, 곰팡이냄새, 덜익음, 퀴퀴함 등) 이를 당화기에 옮겨 46℃에서(당화 비커에 온도계를 위치시킨다.) 30분간 저어주면서 당화시킨다. 다음으로 분당 1℃씩 상승시켜 70℃ 까지 (24분) 올린 다음 70-71℃의 물을 100ml 추가하고 1시간 동안 더 당화시킨다.

② 맥즙 제조 적성 평가

㉢ Reducing sugar

DNS법(Miller GL., 1959)에 따라 DNS시약 3 ml에 sample 1ml 와 섞는다. 끓는 물에서 5분간 반응을 시킨 후 상온에서 5분간 식힌다. 반응이 종료된 sample을 spectrophotometer를 이용하여 550 nm의 파장에서 흡광도를 측정한다. 측정된 흡광도를 standard curve에 대입하여 환원당을 정량한다.

㉣ Free Amino Nitrogen (ASBC 방법)

1.0ml ninhydrine color reagent 각각의 test tube에 첨가한다. 받침대에 두고 증발을 막기 위해 15-20mm glass marble의 마개를 씌운다. 16min 동안 water bath에서 가열하고, 20min 동안 20℃±1℃ bath에서 식힌 다음 5ml dilution solution 을 넣는다. 완벽하게 섞고 증류수와 비교하여 570nm에서 30분 이내에 흡광도를 측정한다.

㉤ pH (ASBC 방법)

맥즙 원액을 pH/reference 전극 시스템을 이용하여 pH를 측정한다. 여과를 거친 당화액의 온도를 25℃로 일정하게 유지시킨 후에 pH meter(mettler Toledo SevenEasy pH)을 이용하여 pH를 측정하여 0.05pH 수준까지 나타낸다.

㉥ Filtration time (ASBC 방법)

당화액 45 mL를 시료로 하여 여과지(No. 2, Whatman)를 사용하여 맥아즙이 여과되는데 걸리는 시간을 측정하였다. 초기 10 mL의 맥즙을 재 여과하고 더 이상 filter cake에 액체가 보이지 않으며, 갈라지기 시작할 때를 측정 종료 시점으로 하였다.

㉦ Viscosity (ASBC 방법)

여과를 거친 당화액의 점도를 항온 수조에 설치된 진동식 점도계(A&D, SV-10 Sine-wave Vibro viscometer)를 사용해서 25℃ 에서 측정하였다.

㉞ 색도

색도계(CR-300, Minolta Co., Ltd., Osaka, Japan)을 이용하여 맥즙의 색도를 L, a, b 값으로 측정하여 부원료 종류 및 함량별 영향을 분석하였다. L 값은 lightness(명도)를 나타내며 1부터 100까지 표시되며, 100에 가까울수록 흰색에 가까움을 의미한다. a 값의 경우 green-red 값을 나타내며, 양수의 값을 가지면 빨간색, 음수의 값을 가지면 초록색에 가까움을 의미하며, 절대값이 증가할수록 그 색의 강도는 높아진다. b 값의 경우 yellow-blue 값을 나타내며, 양수의 값을 가지면 노란색, 음수의 값을 가지면 초록색에 가까움을 의미하며, 절대값이 증가할수록 그 색의 강도는 높아진다.

(3) 결과 및 고찰

(가) 홍삼농축액 첨가 따른 홍삼 맥주의 맥즙 제조 적성 평가

1, 2차년도 실험의 결과에서 당화효소 α -amylase, amloglucosidase와 여과증진효소 beta-glucanase를 이용하여 광맥을 당화시킨 맥즙의 환원당량을 증가시켰다. 따라서 3차년도 실험에서는 확립된 효소 처리 조건에 기능성 소재 (홍삼농축액, 복분자즙)를 첨가하여 맥즙 제조를 하였고, 당화단계에서 기능성 소재 첨가가 맥즙의 품질에 어떤 영향을 미치는지 평가하였다. 2차년도 맥아에 α -amylase, amloglucosidase와 beta-glucanase를 혼합하여 각각 맥아의 0.1%를 처리하였고, 홍삼농축액을 전체 부피의 0.01%, 0.05%, 0.1%씩 첨가하여 실험을 진행하였다. Table 2-9은 농도별 홍삼농축액을 첨가한 맥즙의 제조적성을 비교한 것이다. 홍삼농축액을 첨가하지 않고 효소 처리만 하여 맥아를 당화시킨 맥즙을 비교 대상으로 하였다.

Table 2-9. 홍삼농축액 사용량에 따른 광맥 맥즙의 FAN, filtration time(F/T), viscosity, pH, Reducing sugar, Color. The data are expressed as the mean \pm standard deviation (n=3). Means sharing the same superscript are not significantly different from each other (p<0.05) using IBM SPSS Statistics (ANOVA test).

	Control (맥아의 0.1% 효소만)	0.01% 홍삼 맥주 (전체 부피의 0.01% 첨가)	0.05% 홍삼 맥주 (전체 부피의 0.05% 첨가)	0.1% 홍삼 맥주 (전체 부피의 0.1% 첨가)
FAN (mg/L)	145.4 \pm 6.5 a	145.42 \pm 3.19 ab	145.82 \pm 6.09 ab	156.5 \pm 7.34 b
F/T (min)	100 \pm 5.3 a	100 \pm 8.3 a	100 \pm 5.8 a	110 \pm 7.3 a
점도 (Cp)	1.5 \pm 0.1 a	1.5 \pm 0.1 a	1.6 \pm 0.1 a	1.6 \pm 0.1 a
pH	6.0 \pm 0.0 a	5.9 \pm 0.0 a	6.0 \pm 0.1 a	5.9 \pm 0.1 a
환원당 (mg/mL)	72.49 \pm 5.93 a	72.85 \pm 7.05 a	72.94 \pm 6.12 a	73.79 \pm 5.06 a
L (lightness)	38.7 \pm 1.8 a	41.2 \pm 1.4 a	40.1 \pm 0.7 a	40.5 \pm 1.9 a
a (redness)	-0.1 \pm 0.4 a	-0.1 \pm 0.5 a	0.0 \pm 0.6 a	0.1 \pm 0.7 a
b (yellowness)	10.0 \pm 3.1 a	10.8 \pm 2.4 a	11.4 \pm 1.9 a	12.1 \pm 2.4 a

Free amino nitrogen(FAN)은 맥즙에 존재하는 수용성 단백질의 양의 지표로 유리 아미노산 양을 말하며, 적당한 양은 발효에서 효모의 영양소가 되어 효모의 활성화에 도움을 주지만 너무 높은 함량은 차후 맥주에서 혼탁 등 haze를 발생시켜 품질의 안정성을 떨어뜨리는 것으로 알려져 있다(Briggs DE et al., 1981). 전체 부피의 홍삼농축액 농도를 증가할수록 FAN 값이 유의적으로 증가하였으며 첨가하지 않은 맥즙의 FAN 값 145.4±6.5 mg/L 보다 0.1% 홍삼 맥주의 FAN값이 7% 증가하였다. 홍삼에는 polyacetylene 성분, 펩티드, 항산화성 페놀성 물질 등 기능성 물질이 존재하기 때문에 당화과정 중 FAN 값 증가에 영향을 주었다고 생각된다. 그 외 filtration time, viscosity, pH, reducing sugar, color 모두 대조군과 유의적인 차이가 없었다.

(나) 복분자과즙 첨가 따른 복분자 맥주의 맥즙 제조 적성 평가

1, 2차년도 실험의 결과에서 당화효소 α-amylase, amloglucosidase와 여과증진효소 beta-glucanase를 이용하여 광맥을 당화시킨 맥즙의 환원당량을 증가시켰다. 따라서 3차년도 실험에서는 확립된 효소 처리 조건에 기능성 소재 (홍삼농축액, 복분자즙)를 첨가하여 맥즙 제조를 하였고, 당화단계에서 기능성 소재 첨가가 맥즙의 품질에 어떤 영향을 미치는지 평가하였다. 2차년도 맥아에 α-amylase, amloglucosidase와 beta-glucanase를 혼합하여 맥아의 0.1%를 처리하였고, 복분자과즙을 전체 부피의 1%, 3%, 5%로 농도에 차등을 두어 실험을 진행하였다. Table 2-10는 복분자과즙을 농도별 첨가한 맥즙의 제조적성을 비교한 것이다. 복분자과즙을 첨가하지 않고 효소 처리만 하여 맥아를 당화시킨 맥즙을 비교 대상으로 하였다.

Table 2-10. 복분자과즙 사용량에 따른 광맥 맥즙의 FAN, filtration time(F/T), viscosity, pH, Reducing sugar, Color. The data are expressed as the mean ± standard deviation (n=3). Means sharing the same superscript are not significantly different from each other (p<0.05) using IBM SPSS Statistics (ANOVA test).

	Control (맥아의 0.1% 효소만)	1% 복분자 맥주 (전체 부피의 1% 첨가)	3% 복분자 맥주 (전체 부피의 3% 첨가)	5% 복분자 맥주 (전체 부피의 5% 첨가)
FAN (mg/L)	145.4±6.50 a	162±5.10 b	179.65±7.44 bc	192.97±9.19 c
F/T (min)	100±5.3 a	95±6.1 a	95±5.1 a	90±7.3 a
점도 (Cp)	1.5±0.1 a	1.5±0.1 a	1.5±0.1 a	1.5±0.1 a
pH	6.0±0.0 d	5.8±0.0 c	5.4±0.0 b	5.0±0.0 a
환원당 (mg/mL)	72.49±5.93 a	74.81±5.33 ab	75.42±5.22 ab	76.82±3.01 b
L (lightness)	38.7±1.8 c	37.7±0.4 bc	34.2±1.7 b	29.9±3.5 a
Color a (redness)	-0.1±0.4 a	1.5±0.4 a	5.1±1.4 b	8.3±2.0 c
b (yellowness)	10.0±3.1 a	10.6±3.1 a	10.5±2.4 a	9.1±1.8 a

맥즙의 환원당은 맥아에 내재된 당화효소에 의해 전분이 가수분해 되어 생기는 것으로, 발효 과정에서 효모의 주 영양공급원이 되고, 효모는 분해된 당을 이용하여 부산물로 에탄올을 생성한다. 따라서 맥즙에 존재하는 환원당량은 효모의 생육에 결정적인 영향을 주며, 최종 맥주에서 에탄올 함량에 영향을 주므로 맥즙에서 높은 수치를 보이는 것이 좋지만(Kim JH et al., 2014) 지나치게 많은 양은 맥주에 잔여당을 발생시켜 칼로리를 높이고 발효시간을 길게 만들게 된다(Johanan and Esther and Sergio., 2014). 복분자과즙 5%를 첨가하였을 때 환원당량이 76.82 mg/mL로 복분자과즙을 첨가하지 않은 맥즙의 환원당량 72.49mg/mL 과 비교해 약 6%가 증가하였다. 이것은 복분자 자체의 당이 존재하므로 당화효소에 의해 복분자의 환원당이 맥즙 특성에 영향을 준 것이다. Free amino nitrogen(FAN)의 경우 복분자과즙 첨가량이 많아질수록 FAN값도 증가하는 추세를 보였다. 복분자과즙 첨가량이 전체 부피의 1%, 3%, 5%로 증가할 때 복분자과즙을 첨가하지 않은 맥즙과 비교해 11.42%(16.6 mg/mL), 23.56%(34.25 mg/mL), 32.72%(47.57 mg/mL) 로 증가하는 것을 확인 할 수 있었다. 또한 복분자과즙 첨가량이 증가할수록 pH는 5.8에서 5.0까지 감소하는 추세를 보였으며 복분자과즙 첨가하지 않은 맥즙의 pH(6.0)와 비교할 때 5% 복분자 맥주의 pH(5.0)는 0.17%정도 감소하였다. 반면 색도는 복분자과즙 첨가량이 증가할수록 적색도는 증가하였고, 밝기는 감소하였다. 그 외 맥즙 평가항목인 filtration time, viscosity, color의 황색도는 대조군과 유의적인 차이가 없었다.

(다) 홍삼농축액과 복분자과즙 첨가 따른 홍삼 및 복분자 맥주의 발효 특성 평가

홍삼농축액과 복분자과즙을 농도별로 각각 첨가 후 당화한 맥즙을 Lager Dry Yeast (Saflager W-34/70, 1×10^7 cells/ml)를 첨가하여 하면 발효를 진행하였다. 발효 후 완성된 맥주로 발효 특성을 분석하였고 그 결과는 Table 2-11에서 확인 할 수 있다.

Table 2-11. 홍삼 맥주와 복분자 맥주의 발효특성 분석. 알코올 함량, 거품안정성, 발효능, 탁도, 색도 (L, a, b).

	Alcohol content (%)	Foam stability	Fermentability (%)	Cloudiness	Color		
					L	a	b
Control	4.8±0.72a	281.77±25.6a	79.50±3.07a	Existed	37.02±0.46c	0.41±0.16a	11.06±0.09b
0.01 %	4.7± 0.49a	281.19±35.9a	78.35±4.0a	Existed	38.00±1.60c	1.01±0.64a	13.83±0.09cd
홍삼 맥주 0.05 %	4.6±0.40a	284.52±24.88a	78.10±3.7a	Existed	37.06±1.50c	0.83±0.20a	13.42±0.39cd
0.1%	5.1±0.35a	306.99±31.37a	79.10±4.8a	Existed	36.24±1.24c	1.40±0.40a	14.50±1.83d
복분자 맥주 1%	5.0±0.74a	289.60±28.9a	80.13±3.0a	Existed	34.79±1.15bc	2.19±0.66a	12.29±0.68bc
3%	5.5±0.92ab	240.74±30.1a	80.03±3.0a	Existed	31.08±2.56b	5.58±1.39b	11.20±0.93b
5%	6.3±0.32b	218.66±29.4a	82.60±3.8a	Existed	26.67±4.90a	8.15±1.90c	8.56±2.09a

The data are expressed as the mean ± standard deviation (n=3). Means sharing the same superscript are not significantly different from each other (p<0.05) using IBM SPSS Statistics (ANOVA test).

일반적으로 맥주는 5%정도의 알코올함량을 갖는다. 이번 실험에서는 Control 맥주는 4.8%, 홍삼 맥주의 알코올함량은 4.7%-5.1%로 측정이 되었는데 Control과 유의적인 차이는 발생하지 않았다. 반면 복분자 맥주의 알코올함량은 5.0%-6.3%를 나타내어 Control 맥주와 비교 시 유의적으로 증가하였다. 복분자과즙을 첨가한 맥주의 당화 적성 평가 결과 환원당량이 증가하였고 그 결과 발효 과정 중 효모의 생육에 영향을 주어 알코올 함량 증가에 영향을 주었음을 확인하였다.

(라) 복분자과즙 첨가 시기에 따른 복분자 맥주 색도 비교

당화단계에서 복분자과즙을 첨가한 맥주와 발효 후 복분자과즙을 첨가한 맥주의 색도 측정 결과 적색도 항목에서 큰 차이를 보였다. Figure 2-12과 2-13는 복분자과즙 첨가 시기에 따른 색도 비교를 나타낸 것으로 당화단계에서 복분자과즙 첨가 시 맥주의 적색도가 크게 감소한 것을 확인하였다. 열에 불안정한 복분자의 안토시아닌이 당화 과정 중 색소가 분해되어 발생한 결과로 5% 복분자 맥주를 기준으로 비교하면 발효 후 첨가한 경우보다 28.88% 감소하였다. 따라서 당화과정 중 복분자 과즙을 첨가하여 당화 진행 시 복분자 고유의 맛과 향, 색도 감소에 영향을 주므로 당화단계 첨가 시기는 부적합하다고 결정하였다.

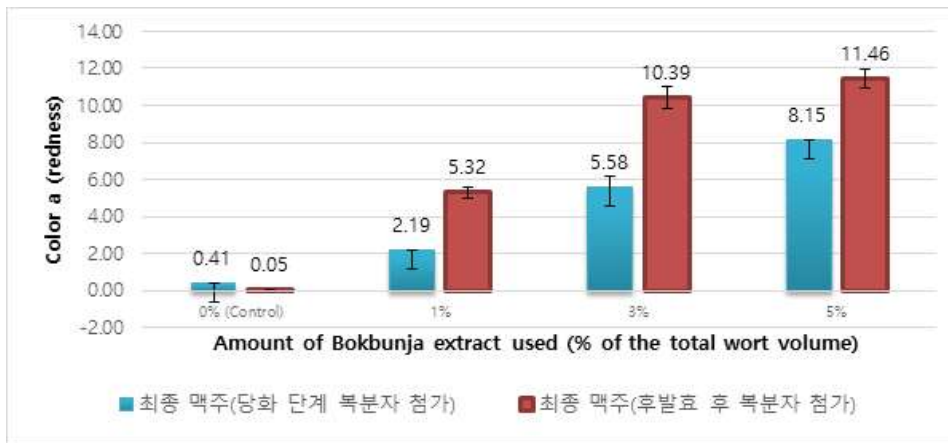


Fig. 2-12. 복분자 맥주의 적색도 비교

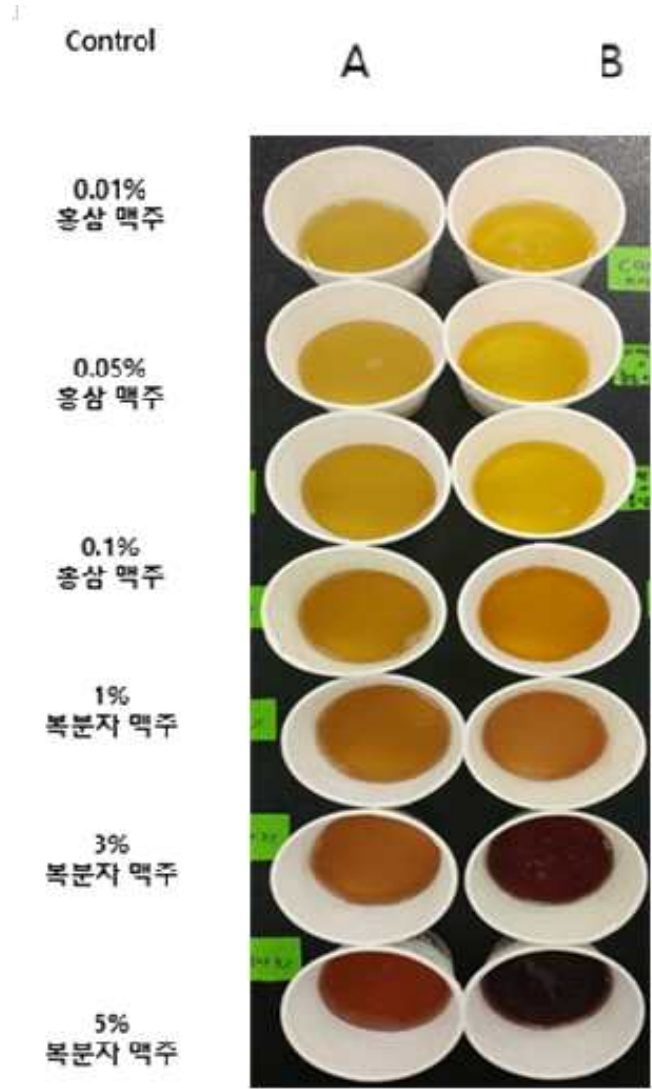


Fig. 2-13. 홍삼 및 복분자과즙 첨가 시기에 따른 맥주 색도 비교 (A : 당화 단계에서 홍삼, 복분자과즙 첨가; B : 후발효 후 홍삼, 복분자과즙 첨가)

(마) 홍삼농축액과 복분자과즙 첨가 따른 홍삼 및 복분자 맥주의 관능평가 결과

식품생명공학과 대학원생들을 상대로 한 관능평가 결과는 다음과 같다.

Table 2-12. 홍삼 맥주와 복분자 맥주의 관능평가 결과. The data are shown as the mean \pm standard deviation (n=3). Means sharing the same superscript are not significantly different from each other (p<0.05) using IBM SPSS Statistics (ANOVA test). 9점 척도, 1(매우 약함) \leftrightarrow 9(매우 강함) / panelist : n= 10

	Control	홍삼 맥주				복분자 맥주	
		0.01%	0.05%	0.1%	1%	3%	5%
Oily mouth	5.1 \pm 0.36b	5.0 \pm 0.35 b	4.5 \pm 0.64ab	3.7 \pm 0.72a	4.4 \pm 0.25ab	4.2 \pm 0.40ab	4.0 \pm 0.46a
Alcoholic	5.8 \pm 0.35cd	4.3 \pm 0.55 a	4.6 \pm 0.51ab	5.0 \pm 0.20ab c	5.2 \pm 0.15ab cd	5.4 \pm 0.81bc d	6.2 \pm 0.75d
Bitterness	5.0 \pm 0.51ab	4.0 \pm 0.15 a	4.2 \pm 0.20ab	4.9 \pm 1.07ab	5.0 \pm 0.35ab	4.7 \pm 0.80ab	5.5 \pm 1.40b
Astringency	4.5 \pm 0.22ab	3.8 \pm 0.15 a	4.3 \pm 0.68ab	4.7 \pm 0.85ab	5.4 \pm 0.40b	4.9 \pm 0.91ab	5.1 \pm 0.90b
Aromatic	4.8 \pm 0.84ab	4.9 \pm 0.76 ab	4.6 \pm 0.83a	4.3 \pm 0.60a	5.2 \pm 0.42c	6.0 \pm 0.85bc	6.5 \pm 0.38c
Sourness	3.6 \pm 0.21a	3.7 \pm 0.15 a	4.1 \pm 0.44a	3.7 \pm 0.46a	5.0 \pm 0.96b	4.9 \pm 0.46b	5.1 \pm 0.26b
Color	4.4 \pm 0.40a	4.2 \pm 0.38 a	4.4 \pm 0.47a	5.0 \pm 0.12ab	5.2 \pm 0.31b	5.4 \pm 0.47b	6.4 \pm 0.83c
Overall acceptance	4.9 \pm 0.44ab	4.4 \pm 0.20 ab	4.4 \pm 0.35a	4.5 \pm 0.32a	5.4 \pm 0.70b	5.5 \pm 0.42b	5.2 \pm 0.17ab

관능평가 결과는 복분자과즙을 첨가한 맥주가 과일향이 나며 새콤한 맛이 난다는 평을 받았다. 새콤한 맛은 복분자 특유의 과일향에 의한 것으로 색도와 복분자 향에 의해 전체 기호도 점수에서 대조군에 비해 높은 점수를 받았다. 하지만 후발효 후 첨가한 복분자 맥주와 관능평가를 비교했을 때 당화과정 중 열에 의한 안토시아닌 색소 분해와 발효 과정 중 복분자 특유의 맛과 향, 색도를 감소시켜 당화 시기에 복분자 과즙을 첨가하는 것은 부적합하다는 평가를 받았다. 홍삼농축액을 첨가한 홍삼 맥주 경우도 당화, 발효, 숙성 과정 중 홍삼 맥주의 이취 발생으로 전체 맥주 평가 대상 중 홍삼 맥주의 전체 기호도는 최하 점수를 받았다.

결과적으로 홍삼 농축액과 복분자 과즙을 첨가하여 맥주 제조 시 당화 과정 첨가보다 발효 후 첨가하는 것이 맥주 제조에 적합하다고 생각된다.

나. 홍삼/복분자 맥주제조를 위한 haze 생성 최소화

(1) 요약

효소 처리를 통하여 맥주의 haze 생성 최소화를 위한 방법을 실험해보고자 하였다. 홍삼/복분자 맥주 관능평가 결과 홍삼 맥주는 이취 발생으로 haze 생성 최소화 실험에서 제외시켰다. protease와 pectinase를 사용한 복분자 맥주의 맥즙의 제조 적성을 평가한 결과 효소를 첨가할수록 FAN값은 증가하는 추세를 보였으나 pectinase 처리가 복분자 적색도를 감소시킨다는 것을 확인하여 protease 효소만 처리하여 맥주 당화 및 발효를 진행하였다. protease 효소 사용에 따른 복분자 맥주의 맥즙 제조 적성 및 발효 적성을 평가한 결과 효소 첨가량이 증가할수록 유리아미노산(FAN) 값 증가하였다. 이는 펩타이드 결합 분해로 인해 haze 감소에 영향을 줄 것으로 기대된다.

(2) 재료 및 방법

(가) 재료

① 효소

효소는 (주) Bision Biochem에서 세가지 액화 효소를 구입하여 사용하였다. 당화효소 α -amylase (from *Bacillus licheniformis*)와 amyloglucosidase (or glucoamylase, from *Aspergillus niger*)는 각각 Spezyme FRED, BioWin AG 제품을 사용하였고 여과증진효소 β -glucanase (from *Trichoderma reesei*, pentosanase 활성 포함)는 BrewMax L 제품을 사용하였다. Pectinase (from *Aspergillus niger*)는 Planpase PR 제품을 사용하였다.

② 홍삼 농축액/복분자과즙

홍삼농축액은 바산고려홍삼에서 홍삼G21 제품을 사용하였고, 복분자과즙은 고창 선운산농협에서 베리웰복분자순액 제품을 사용하였다.

(나) 실험 방법

① 당화 방법

㉠ Grinding

EBC와 ASBC에서는 이러한 목적에 맞도록 특별히 고안된 DLFU (Buhler) 디스크형 분쇄기(disk mill)을 이용하고 있다.

㉡ Mashing procedure

거친 분쇄맥아와 고운 분쇄맥아 각 50g을 200ml 의 45°C 증류수(46-48°C)에 넣고 유리막대로 빠르게 저어준 후 액체의 냄새와 향기를 노트한다.(향기로움, 곰팡이냄새, 덜익음, 퀴퀴함 등) 이를 당화기에 옮겨 46°C에서(당화 비커에 온도계를 위치시킨다.) 30분간 저어주면서 당화시킨다. 다음으로 분당 1°C씩 상승시켜 70°C 까지 (24분) 올린 다음 70-71°C의 물을 100ml

추가하고 1시간 동안 더 당화시킨다.

② 맥즙 제조 적성 평가

㉠ Reducing sugar

DNS법(Miller GL., 1959)에 따라 DNS시약 3 ml에 sample 1ml 와 섞는다. 끓는 물에서 5분 간 반응을 시킨 후 상온에서 5분간 식힌다. 반응이 종료된 sample을 spectrophotometer를 이용하여 550 nm의 파장에서 흡광도를 측정한다. 측정된 흡광도를 standard curve에 대입하여 환원당을 정량한다.

㉡ Free Amino Nitrogen (ASBC 방법)

1.0ml ninhydrine color reagent 각각의 test tube에 첨가한다. 받침대에 두고 증발을 막기 위해 15-20mm glass marble의 마개를 씌운다. 16min 동안 water bath에서 가열하고, 20min 동안 20°C±1°C bath에서 식힌 다음 5ml dilution solution 을 넣는다. 완벽하게 섞고 증류수와 비교하여 570nm에서 30분 이내에 흡광도를 측정한다.

㉢ pH (ASBC 방법)

맥즙 원액을 pH/reference 전극 시스템을 이용하여 pH를 측정한다. 여과를 거친 당화액의 온도를 25°C로 일정하게 유지시킨 후에 pH meter(mettler Toledo Seveneasy pH)을 이용하여 pH를 측정하여 0.05pH 수준까지 나타낸다.

㉣ Filtration time (ASBC 방법)

당화액 45 mL를 시료로 하여 여과지(No. 2, Whatman)를 사용하여 맥아즙이 여과되는데 걸리는 시간을 측정하였다. 초기 10 mL의 맥즙을 재 여과하고 더 이상 filter cake에 액체가 보이지 않으며, 갈라지기 시작할 때를 측정 종료 시점으로 하였다.

㉤ Viscosity (ASBC 방법)

여과를 거친 당화액의 점도를 항온 수조에 설치된 진동식 점도계(A&D, SV-10 Sine-wave Vibro viscometer)를 사용해서 25°C 에서 측정하였다.

㉥ 색도

색도계(CR-300, Minolta Co., Ltd., Osaka, Japan)을 이용하여 맥즙의 색도를 L, a, b 값으로 측정하여 부원료 종류 및 함량별 영향을 분석하였다. L 값은 lightness(명도)를 나타내며 1부터 100까지 표시되며, 100에 가까울수록 흰색에 가까움을 의미한다. a 값의 경우 green-red 값을 나타내며, 양수의 값을 가지면 빨간색, 음수의 값을 가지면 초록색에 가까움을 의미하며, 절대값이 증가할수록 그 색의 강도는 높아진다. b 값의 경우 yellow-blue 값을 나타내며, 양수의 값을 가지면 노란색, 음수의 값을 가지면 초록색에 가까움을 의미하며, 절대값이 증가할수록 그 색의 강도는 높아진다.

(3) 결과 및 고찰

본 연구는 효소 처리를 통하여 맥주의 haze 생성 최소화를 위한 방법을 실험해보고자 하였다. 홍삼/복분자 맥주 관능평가 결과 홍삼 맥주는 이취 발생으로 haze 생성 최소화 실험에서 제외시켰고, 복분자 맥주는 전체 기호도 평가에서 최고점을 받은 전체 부피의 복분자과즙 3% 첨가한 맥즙으로 실험을 진행하였다. 사용한 효소는 단백질 분해효소 protease와 펙틴 분해효소 pectinase이며 각각 사용한 광맥의 0.1%, 0.2%, 0.3% 씩 첨가하여 당화를 진행하였다.

(가) 효소 protease와 pectinase를 사용한 복분자 맥주의 맥즙 제조 적성 평가

기본 효소(α -amylase, amloglucosidase, beta-glucanase)와 전체 부피의 복분자 과즙 3%을 첨가 후 맥주의 haze 생성 최소화를 위하여 protease와 pectinase 효소를 추가로 첨가하여 당화를 진행하였다. protease와 pectinase 효소 처리한 복분자 맥주의 맥즙 제조 적성 평가 결과는 Table 2-13 와 같다. 전체 부피의 3% 복분자과즙을 첨가한 후 protease와 pectinase 를 각각 맥아의 0%, 0.1%, 0.2%, 0.3% 씩 첨가하여 기본 3가지 효소(α -amylase, amloglucosidase, beta-glucanase)만 처리한 맥즙(Control)과 비교 분석하였다

Table 2-13. Protease와 pectinase 효소 처리한 3% 복분자 맥주의 맥즙 적성 평가.

	Control	3% 복분자 맥주				
		0%	맥아의 0.1% (A)	맥아의 0.2% (B)	맥아의 0.3% (C)	
FAN (mg/L)	142.51±5.21a	170.41±10.15b	182.90±9.64bc	189.13±9.59bc	201.71±8.50c	
F/T (min)	98±1.41b	96±1.41ab	95±2.60a	95±2.10a	95±1.50a	
점도 (Cp)	1.40±0.05a	1.40±0.04a	1.38±0.06a	1.39±0.06a	1.39±0.07a	
pH	6.03±0.06d	5.45±0.05c	5.07±0.07b	4.95±0.01b	4.91±0.09b	
환원당 (mg/mL)	66.25±1.02a	72.15±2.46ab	75.68±6.02b	75.18±2.17b	79.32±6.76b	
L	39.39±0.44d	35.46±0.41a	36.42±0.20b	37.42±0.30c	37.31±0.52c	
Color	a	0.19±0.03a	3.74±0.66c	2.61±0.47b	1.99±0.58b	2.50±0.52b
	b	8.71±0.91a	8.79±1.32a	14.51±1.36b	14.39±1.47b	16.50±1.19b

(A: protease 5 μ l+pectinase 110unit, B: protease 10 μ l+pectinase 220unit, C: protease 15 μ l+pectinase 330unit) The data are expressed as the mean \pm standard deviation (n=3). Means sharing the same superscript are not significantly different from each other (p<0.05) using IBM SPSS Statistics (ANOVA test).

효소를 첨가할수록 FAN값은 증가하는 추세를 보였다. 또한 효소 사용량이 증가할수록 pH가 점차 감소하였고 그 결과 분자 고유 적색도가 감소하는 경향을 확인하였다. 안토시아닌 색소는 자색을 가진 수용성 색소로 매우 불안정하기 때문에 pH, 가열, 당류, 산소 등에 의해 안정성에 영향을 받는다. pectinase 효소 처리는 맥즙의 pH를 감소시켜 안토시아닌 색소를 불안정하게 하여 복분자 적색도를 감소시킨다는 것을 각 효소처리를 진행하면서 확인할 수 있었다.(Fig. 2-14.). 그리하여 protease 효소만 처리하여 맥주 당화 및 발효를 진행하기로 결정하였다.

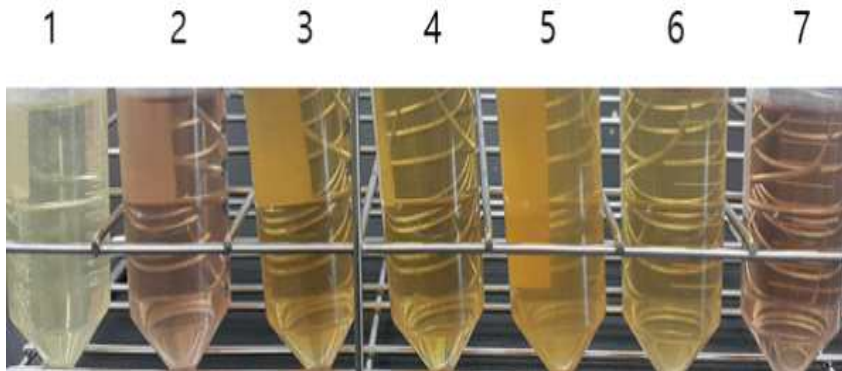


Fig. 2-14. protease와 pectinase 효소 처리에 따른 맥즙 색도 비교 (P1 : protease, P2 : pectinase ; ①: protaese 5 μ l+pectinase 110unint, ② : protaese 10 μ l+pectinase 220unint, ③ : protaese 15 μ l+pectinase 330unint)

- 1 : 무첨가군
- 2 : 3% 복분자
- 3 : 3% 복분자 + p1/p2 ①
- 4 : 3% 복분자 + p1/p2 ②
- 5 : 3% 복분자 + p1/p2 ③
- 6 : 3% 복분자 + p2(110unit)
- 7 : 3% 복분자 + p1 (5 μ l)

(나) protease 효소 사용에 따른 복분자 맥주의 맥즙 제조 적성 평가

기본 효소(α -amylase, amloglucosidase, beta-glucanase)와 전체 부피의 복분자 과즙 3%를 첨가 후 맥주의 haze 생성 최소화를 위하여 protease 효소를 사용한 맥아의 0.1%, 0.2%, 0.3% 씩 추가 첨가하여 당화를 진행하였다. protease 효소 처리한 복분자 맥주의 맥즙 제조 적성 평가 결과는 Table 2-14과 같다.

Table 2-14 Protease 효소 처리한 3% 복분자 맥주의 맥즙 적성 평가. The data are expressed as the mean \pm standard deviation (n=3). Means sharing the same superscript are not significantly different from each other (p<0.05) using IBM SPSS Statistics (ANOVA test).

		3% 복분자 맥주			
		0%	0.1%	0.2%	0.3%
FAN (mg/L)		168.44 \pm 9.05 a	185.40 \pm 10.19 ab	200.51 \pm 12.11 b	209.52 \pm 9.72 b
F/T (min)		91 \pm 2.89 a	100.67 \pm 4.04 b	111.67 \pm 2.9 c	118.33 \pm 5.77 c
점도 (Cp)		1.31 \pm 0.13 a	1.32 \pm 0.13 a	1.32 \pm 0.14 a	1.35 \pm 0.15 a
pH		5.47 \pm 0.08 a	5.39 \pm 0.05 a	5.47 \pm 0.07 a	5.45 \pm 0.07 a
환원당 (mg/mL)		71.93 \pm 2.33 a	72.53 \pm 1.82 a	71.77 \pm 0.69 a	72.45 \pm 1.50 a
	L	34.60 \pm 0.16 a	34.18 \pm 0.23 a	34.57 \pm 0.42 a	34.12 \pm 0.46 a
Color	a	4.34 \pm 0.54 a	4.93 \pm 0.45 a	4.56 \pm 0.08 a	4.67 \pm 0.63 a
	b	8.66 \pm 0.39 a	9.22 \pm 0.61 a	9.19 \pm 0.45 a	9.45 \pm 0.27 a

Protease 효소 첨가량 증가할 수록 FAN 값과 F/T(Filtration time)이 증가하였다. Protease 효소를 사용된 맥아의 0.3% 첨가 시 Control에 비해 FAN 24.39%, F/T 30%가 각각 증가하였다. F/T 증가는 효소에 의해 가수분해 된 가용성 성분들이나 여러 polymer들의 추출 증가에 의한 결과로 보인다.

(다) protease 효소 사용에 따른 복분자 맥주의 발효 특성 평가

복분자과즙을 농도별로 각각 첨가 후 당화한 맥즙을 Lager Dry Yeast (Saflager W-34/70, 1×10^7 cells/ml)를 첨가하여 하면 발효를 진행하였다. 발효 후 완성된 맥주로 발효 특성을 분석하였고 그 결과는 Table 2-15에서 확인 할 수 있다.

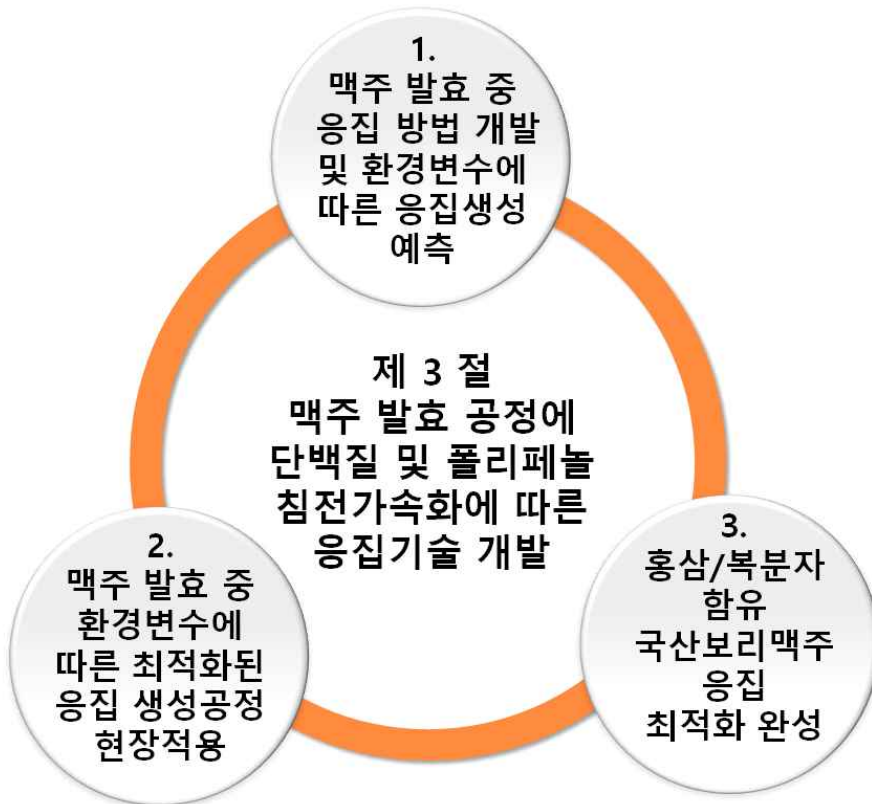
Table 2-15. Protease 효소 처리한 3% 복분자 맥주의 발효특성 분석. 알코올 함량, 거품안정성, 발효능, 탁도, 색도 (L, a, b). The data are expressed as the mean \pm standard deviation (n=3). Means sharing the same superscript are not significantly different from each other ($p < 0.05$) using IBM SPSS Statistics (ANOVA test).

		3% 복분자 맥주			
		0%	0.1%	0.2%	0.3%
Alcohol content (%)		5.13 \pm 0.76 a	4.67 \pm 0.38 a	4.63 \pm 0.61 a	5.23 \pm 0.31 a
Foam stability		254.91 \pm 6.83 c	201.77 \pm 6.93 bc	157.49 \pm 5.30 ab	118.85 \pm 6.44 a
Fermentability (%)		80.12 \pm 7.46 a	78.88 \pm 9.48 a	77.47 \pm 2.35 a	80.66 \pm 4.95 a
Cloudiness		Existed	Existed	Existed	Existed
	L	33.91 \pm 2.75 a	33.88 \pm 0.97 a	33.90 \pm 0.99 a	33.97 \pm 0.65 a
Color	a	5.48 \pm 2.20 a	4.79 \pm 0.11 a	5.29 \pm 0.27 a	5.24 \pm 0.78 a
	b	11.75 \pm 1.12 a	11.34 \pm 0.79 a	12.57 \pm 0.42 a	12.63 \pm 0.25 a

농도별 protease 효소 처리한 복분자 맥주의 맥즙 적성 평가 결과 FAN값 증가하였다. 그 결과 protease 효소 첨가량이 증가할수록 광맥과 복분자 내에 존재하는 단백질, 폴리펩타이드가 분해되어 감소됨에 따라 거품안정성이 감소하는 경향을 나타냈었고, 0.3% 효소 처리 시 무처리군에 비해 53.38% 정도 감소하였다. 그 외 평가항목에서는 효소 처리하지 않은 맥즙과 유의적인 차이는 없었다. 단백질은 폴리페놀과 결합하여 haze 형성하기 때문에 단백질 함량이 높으면 맥주의 haze 형성 및 탁도를 높인다. 따라서 Protease 효소 첨가량이 증가할수록 유리아미노산(FAN) 값 증가하여 펩타이드 결합 분해를 확인하였으므로 haze 감소에 영향을 줄 것으로 기대된다. Protease 효소 첨가한 맥주 관능평가 결과 신맛을 제외한 맛과 향, 전반적인 기호도 평가에서 효소 처리하지 않은 맥주와 유의적인 차이가 없었다(not showed).

제 3 절 맥주 발효 공정에 단백질 및 폴리페놀 침전가속화에 따른 응집기술 개발

- Shelf-life 증진을 위한 침전 및 여과기술을 개발한다. 발효 공정에 단백질 및 폴리페놀 침전가속화에 따른 응집기술을 개발한다.
- 맥주에서 발생하는 혼탁이나 침전물 문제는 여러 가지 원인이 있으나 대부분은 단백질과 폴리페놀 등으로 인해 발생한다. 단백질과 폴리페놀류, 또는 그 단백질-폴리페놀 복합체로부터 발생하는 혼탁을 없애기 위해서는 맥주 중 단백질이나 폴리페놀을 제거하는 공정이 필요하며 맥주 거품형성에 영향을 미치는 단백질을 제거하는 것보다 폴리페놀을 제거하여 혼탁을 개선시키는 것이 효과적이다.



1. 맥주 발효 중 응집 방법 개발 및 환경변수에 따른 응집생성 예측

가. 응집 방법 개발

(1) 요약

맥주 발효 중 응집 방법 개발 및 환경변수에 따른 응집 생성을 예측한다. 광맥 맥주 발효 중 응집 검사를 진행하며 PVPP, Silica xerogel 응집제로 측정한다. 후발효 중 단백질 및 폴리페놀 침전 응집 방법을 개발한다. 환경변수에 따른 응집 방법 개발은 수입 맥아인 pilsner와 국산 맥아인 광맥을 이용하여 0℃, 4℃, 7℃ 온도차로 실험을 진행하며, 5분, 10분, 20분, 30분 시간별로 나눠 응집생성량을 확인한다.

(2) 재료 및 방법

(가) 실험재료

실험에 사용된 맥아는 국내산 2조맥인 광맥(국립식량과학원)을 이용하였고, 응집제로는 PVPP, Silica xerogel(Lucilite TR), Silica xerogel(L10)을 사용하여 3반복 실험을 하였다.

(나) 당화방법

맥즙을 얻기 위한 당화방법은 EBC Congress mash법(ASBC, 1992 and European Brewery Convention, 1998)을 따랐으며, 그 방법은 다음과 같다. 곱게 분쇄한(1mm) 맥아 50g을 Amber bottle (SCHOTT DURAN, Germany)에 넣고 45℃의 증류수 200mL와 잘 섞은 다음 Shaking water bath (BF-46SB, Biofree, Korea)을 이용하여 45℃에서 100rpm으로 30분간 당화시킨 후 1℃/min의 속도로 25분 동안 온도를 증가시켜 맥즙의 온도를 70℃까지 올린다. 그 후 70℃의 증류수 100mL를 첨가하여 70℃를 유지하면서 1시간 더 당화시킨다. 당화가 완료되면 20℃로 맥즙을 식히고 증류수를 첨가하여 무게를 450g로 맞추고 주름진 여과지 No.597 1/2 (Whatman, Germany)를 이용하여 여과하며, 초기 20mL 맥즙을 재여과한 후 당화적성 실험을 위해 사용하였다.

(다) 발효방법

맥주의 발효공정은 당화과정을 거친 맥즙에 α -acid 함량이 10%인 Hallertauer tradition Hop(Hopsteiner, Germany)을 3회 나누어 주입 후 끓인(전체의 1/2 추가 후 10분, 전체의 1/4 추가 후 5분, 전체의 1/4 추가 후 5분)다음 이 맥즙을 얼음위에 급속냉각 시킨다(Cho HC., 2004). 냉각 후 알코올도수 예측 및 당화의 정도를 파악하기 위한 초기비중을 측정하도록 한다. 이후 맥즙에 미리 propagation시킨 효모(Hefeweizen Ale Yeast WLP300, USA)를 주입(Cheong C et al., 2007)한 뒤, 공기차단기를 설치하여 1차 발효를 실시한다. 1차 전발효의 조건은 20℃에서 8일간 발효 시킨다. 이후 2차 발효를 위해 맥즙을 병입한 후 15℃의 온도에서 7일간 발효시켜 탄산가스를 만들도록 한다. 이 과정을 거쳐 만들어진 맥주를 이용하여 맥주적성실험을 위해 사용하였다.

④ 응집생성량 측정

Dry oven(105℃)에 Whatman 1을 8시간 말린다. Desiccator에 필터페이퍼를 넣고 30분 동안 식힌다. 필터페이퍼 무게 측정(A)한다. PVPP, Silica xerogel A, Silica xerogel B를

맥주에 첨가하여 응집을 확인한다. Whatman 1 필터페이퍼로 여과한다. Dry oven(105℃)에 여과한 필터페이퍼를 8시간 말린다. Desiccator에 필터페이퍼를 넣고 30분 동안 식힌다. 필터페이퍼 무게 측정(B)한다. (A) - (B) = (C) 값으로 응집 생성량을 측정한다.

(3) 결과 및 고찰

(가) 응집 결과

Table 3-1. Effect of different concentration of PVPP, Silica xerogel A, B on beer hazes from beer Brewing process

treatment	PVPP (0℃)			
	5mg	10mg	15mg	20mg
control	56.77±1.61	56.77±1.61	56.77±1.61	56.77±1.61
5min	93.22±0.57	94.65±1.19	96.51±1.12	97.26±2.24
10min	93.44±2.35	94.99±1.23	97.13±1.47	100.78±1.22
20min	96.38±2.20	99.34±1.30	99.87±1.30	103.28±2.87
30min	91.89±1.54	92.64±1.31	98.66±1.04	118.85±2.43

treatment	Silica A (0℃)			
	5mg	10mg	15mg	20mg
control	56.77±1.61	56.77±1.61	56.77±1.61	56.77±1.61
5min	80.65±2.43	91.21±0.96	93.08±1.56	95.62±1.33
10min	86.45±1.80	92.54±1.20	96.36±0.80	98.01±1.41
20min	91.17±0.99	95.07±1.65	94.97±1.20	97.15±0.94
30min	94.30±1.86	97.93±1.43	99.80±1.99	103.20±2.62

treatment	Silica B (0℃)			
	5mg	10mg	15mg	20mg
control	56.77±1.61	56.77±1.61	56.77±1.61	56.77±1.61
5min	77.41±0.88	79.87±1.3	82.15±1.14	83.65±2.99
10min	81.86±1.19	82.57±1.93	84.50±2.14	86.65±2.18
20min	83.21±1.72	87.32±3.40	87.07±2.69	88.61±1.70
30min	84.28±1.06	85.95±1.44	87.62±1.53	90.60±0.75

Table 3-1는 광맥맥주의 저장온도 0℃에서 시간별(5, 10, 20, 30 분) 및 응집제 용량별(5, 10, 15, 20mg) 을 측정한 결과 값이다. PVPP 와 Silica xerogel A, B는 응집시간과 응집제함량에 비례하여 응집생성량의 차이는 없었다. 응집시간 30분일 때 응집생성량이 최대로 증가함을 확인했다. 0℃에서는 PVPP 30분일 때 응집생성량이 제일 좋은 결과를 보였다. 반면 Silica B는 PVPP와 Silica xerogel A의 비해 응집생성량이 적은 것을 확인했다.

Table 3-2. Effect of different concentration of PVPP, Silica xerogel A, B on beer hazes from beer Brewing process

treatment	PVPP (4°C)			
	5mg	10mg	15mg	20mg
control	46.77±1.49	46.77±1.49	46.77±1.49	46.77±1.49
5min	77.52±1.74	77.89±1.78	82.11±3.72	84.73±1.17
10min	80.78±1.32	82.48±1.11	85.15±1.32	85.63±1.49
20min	82.34±1.27	87.28±2.02	91.69±1.03	1. 97.45±2.39
30min	86.45±1.67	89.86±1.77	93.99±1.77	104.26±1.56

treatment	Silica A (4°C)			
	5mg	10mg	15mg	20mg
control	46.77±1.49	46.77±1.49	46.77±1.49	46.77±1.49
5min	75.73±1.66	81.83±2.37	84.24±1.77	86.33±1.13
10min	80.59±1.69	84.17±1.03	80.73±2.99	90.78±2.18
20min	76.1±1.29	74.99±1.07	83.71±2.37	94.17±1.98
30min	77.49±2.1	82.39±1.54	97.93±1.44	100.97±1.91

treatment	Silica B (4°C)			
	5mg	10mg	15mg	20mg
control	46.77±1.49	46.77±1.49	46.77±1.49	46.77±1.49
5min	77.41±0.88	79.87±1.3	82.15±1.14	83.65±2.99
10min	81.86±1.19	82.57±1.93	84.50±2.14	86.65±2.18
20min	83.21±1.72	87.32±3.40	87.07±2.69	88.61±1.70
30min	84.28±1.06	85.95±1.44	87.62±1.53	90.60±0.75

Table 3-2는 광맥맥주의 저장온도 4°C에서 시간별(5, 10, 20, 30 분) 및 응집제 용량별 (5, 10, 15, 20 mg)을 측정하였다. PVPP 와 Silica xerogel A, B는 응집시간과 응집제 함량에 비례하여 응집생성량의 차이는 없었다. 응집시간 30min일 때 응집생성량의 최대로 증가함을 확인하였다. 시간이 더 지날수록 응집생성량이 증가하는 것을 확인하였다. 0°C와 비슷하게 PVPP, 30min일 때 응집함량이 제일 높은 것으로 확인되었다.

Table 3-3. Effect of different concentration of PVPP, Silica xerogel A,B on beer hazes from beer Brewing process

treatment	PVPP (7°C)			
	5mg	10mg	15mg	20mg
control	46.77±1.49	46.77±1.49	46.77±1.49	46.77±1.49
5min	65.78±1.76	66.19±1.39	69.46±2.02	70.41±0.99
10min	65.2±1.57	68.34±1.36	71.67±1.57	75.5±1.07
20min	72.14±1.27	75.39±1.09	77.94±1.59	80.96±1.27
30min	74.64±1.43	78.38±1.21	79.34±1.54	83.22±1.03

treatment	Silica A (7°C)			
	5mg/ml	10mg/ml	15mg/ml	20mg/ml
control	46.77±1.49	46.77±1.49	46.77±1.49	46.77±1.49
5min	64.78±1.76	65.38±1.32	68.43±1.73	69.25±1.99
10min	68.2±1.08	70.34±1.36	72.69±1.24	75.18±1.09
20min	70.14±1.27	73.39±1.09	75.94±1.59	76.96±1.27
30min	71.34±1.43	70.38±1.21	72.34±1.54	77.22±1.03

treatment	Silica B (7°C)			
	5mg/ml	10mg/ml	15mg/ml	20mg/ml
control	46.77±1.49	46.77±1.49	46.77±1.49	46.77±1.49
5min	54.50±4.18	56.39±1.17	59.20±1.28	62.10±1.57
10min	58.49±1.08	60.96±0.77	64.76±1.03	66.27±1.21
20min	61.42±1.65	64.37±0.83	67.36±1.90	70.54±0.87
30min	61.28±2.73	72.08±2.88	71.94±1.35	73.40±0.98

Table 3-3는 앞서 보인 Table 1,2 과 같이 광맥맥주의 저장온도 7°C에서 시간별(5, 10, 20, 30 분) 및 응집제 용량별(5, 10, 15, 20mg) 을 측정 한 것이다. PVPP 와 Silica xerogel A, B는 응집시간과 응집제함량에 비례하여 응집생성량의 차이는 없었다. 응집시간 30min일 때 응집생성량이 최대로 증가함을 확인했다. 시간이 더 지날수록 응집이 증가하는 것을 확인 하였다. 응집생성량이 많았던 30분과 4°C 변화량은 다음 Table 3-4에 나타내었다.

Table 3-4. Effect of different concentration of PVPP, Silica xerogel A, B on beer hazes from beer Brewing process

treatment	Beer haze formation(mg)		
	PVPP	silica A	silica B
	30min		
control	46.77±1.49 ^f	46.77±1.49 ^f	46.77±1.49 ^f
5mg	74.64±1.43 ^c	67.96±1.44 ^d	61.28±2.72 ^e
10mg	78.37±1.21 ^b	73.75±3.83 ^c	72.07±2.88 ^c
15mg	79.34±1.53 ^b	78.89±1.97 ^b	71.94±1.34 ^c
20mg	83.21±1.03 ^a	79.37±1.39 ^b	73.42±0.97 ^c

Means within each row with different superscript are significantly different at $p < 0.05$ lower case letter indicate the effect of different beer coagulant.

나. 응집 여과 후 폴리페놀 및 단백질 함량 확인

(1) 요약

응집 여과 후 폴리페놀 및 단백질 함량을 확인한다. 폴리페놀의 함량을 흡광도로 측정하며, 단백질의 함량을 켈달법으로 측정한다.

(2) 재료 및 방법

(가) 총 폴리페놀 함량 측정

폴리페놀 분석법으로 가장 널리 사용되고 있는 Folin-Ciocalteu법을 기본분석 방법으로 측정한다. 몰리브데늄 염의 색변화를 이용한 방법으로 용액 중 다른 성분들에 의한 방해가 가장 작은 것으로 알려져 있으며 색의 발현은 2시간 경과한 점에서 가장 강하다. 표준으로 받아들여질 정도로 일반화된 Folin-Ciocalteu 분석 과정은 100mL volumetric flask에 60mL 증류수를 넣고 시료 1mL을 가한다. FCR(Folin-Ciocalteu Reagent) 용액 5.0mL를 가하고 섞은 후 20% Na_2CO_3 15mL를 가한다. 증류수를 채워 100mL 용액을 만든 후 23°C에서 2시간 방치하여 색이 형성되도록 기다린 후 표준 흡광도 760nm에서 측정한다.

(나) 단백질 함량 측정

단백질 함량의 대표적인 Kjeldhal법을 이용한다. 맥주 시료 1mL과 분해촉진제 (K_2SO_4 : CuSO_4 = 4 : 1)를 넣어준다. 켈달 플라스크에 황산원액 20mL를 넣고 Sonicator로 시료가 고루 섞이게 해준다. 켈달 랙에 400°C 3시간 동안 분해시킨다. 가열이 완료되면 에메랄드색으로 변하며 이를 삼각플라스크에 옮기고 4% boric acid를 넣고 혼합지시약(Methyl Red : 2~3drop, Methylene Blue : 2~3 drop)을 떨어뜨린다. 삼각 플라스크를 증류장치에 연결하여 4분간 증류, 포집한다. 0.02N-HCL로 적정한다.

(3) 결과 및 고찰

(가) 폴리페놀 함량

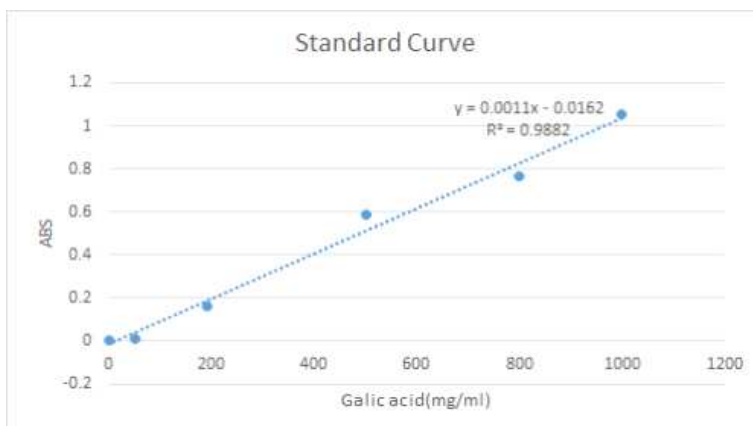
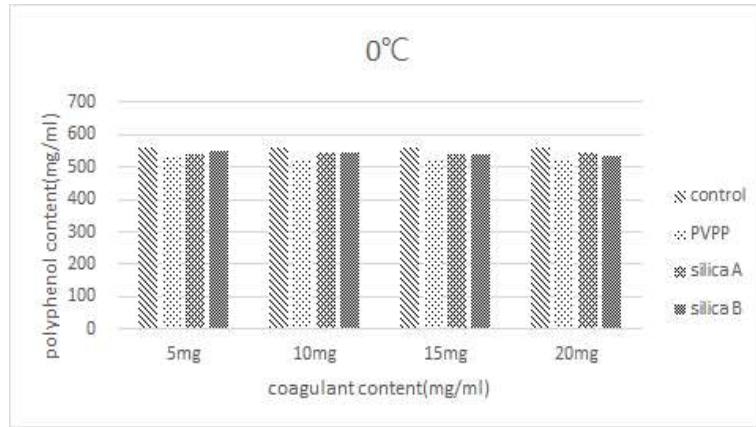
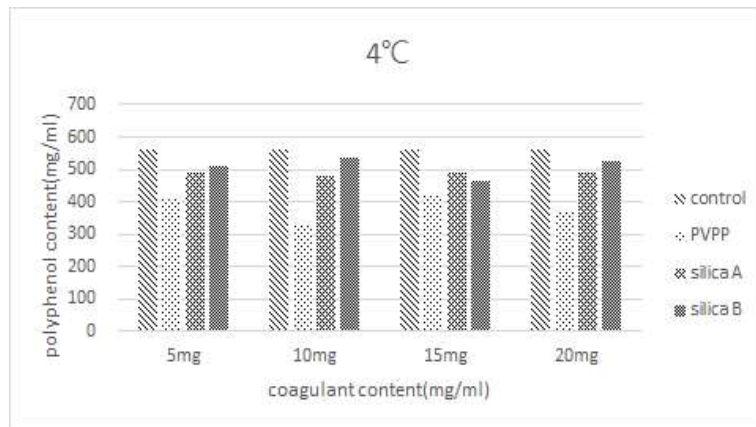


Fig. 3-1. Calibration curve for standard gallic acid

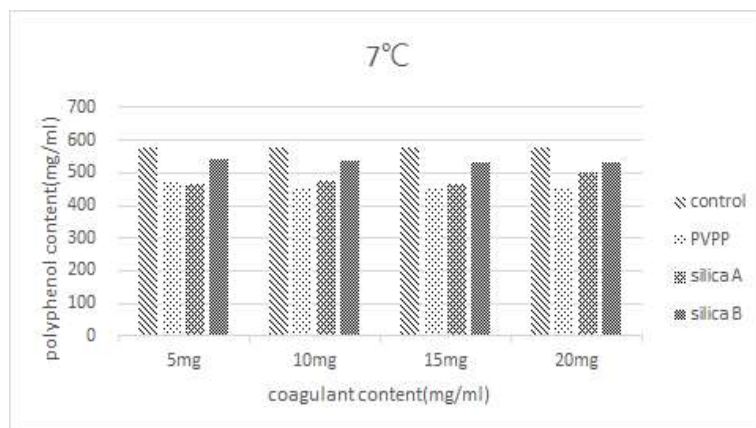
Fig. 3-1은 Gallic acid의 polyphenol standard curve이다. gallic acid는 -OH 작용기 세 개가 한 개의 벤조산에 붙어 있는 형태로 비교적 단순한 구조, 높은 수용성, 효과적인 발색을 보이는 이상적인 표준물질로 간주된다. 벤조산에 수산기(-OH)가 세 개가 치환된 형태로 분자 당 수산기의 비율이 높다. $R^2=0.9882$ 로 1값과 유사하게 나온 것을 확인하였다.



(a)



(b)



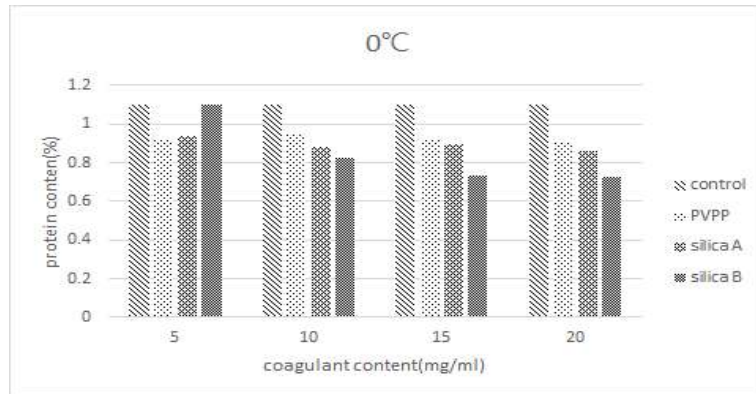
(c)

Fig. 3-2. 온도별 저장한 폴리페놀 함량 확인, a : 0°C, b : 4°C, c : 7°C

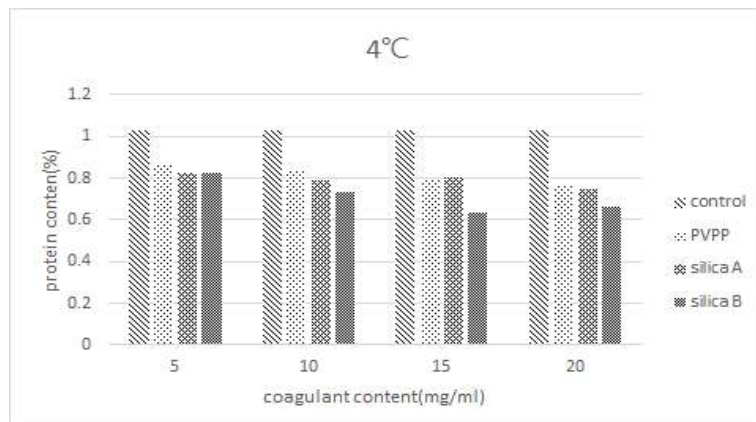
Fig. 3-2는 흡광도로 분석한 광맥 맥주의 polyphenol의 함량이다. 가장 효과가 좋았던 응

집시간 30분에 응집생성량을 5, 10, 15, 20mg을 넣어 온도별로 비교 한 결과이다. 0°C에서는 컨트롤에 비해 폴리페놀양이 줄어들지 않는 반면 4°C에서는 control에 비해 PVPP와 Silica xerogel A는 폴리페놀이 감소하였다. 또한 7°C에도 폴리페놀이 PVPP와 Silica xerogel A의 폴리페놀이 감소하였지만 4°C와 비교하였을 때 많이 감소하지 않은 것을 확인하였다. 최적조건은 PVPP 응집제를 10mg, 4°C, 30분 동안 투여한 것으로 판단하였다.

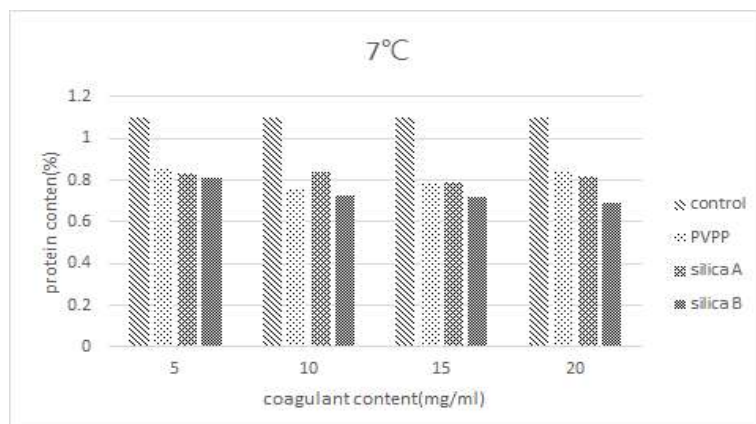
(나) 단백질 함량



(a)



(b)



(c)

Fig. 3-3. 온도별, 응집생성량 단백질 함량 비교, a : 0℃, b : 4℃, c : 7℃

Fig. 3-3은 켈달로 본 광맥맥주의 단백질 함량이다. 0℃에서는 PVPP와 Silica xerogel A에 비해 Silica xerogel B가 단백질 함량이 감소했다. 4℃에서는 응집제 3가지 종류 다 골고루 감소하였으며 7℃ 또한 Silica B가 단백질 함량이 제일 많이 감소하였다. PVPP와 Silica xerogel A의 주된 응집은 폴리페놀이며 Silica B의 주된 응집은 단백질로 추정된다. 단백질 함량은 혼탁도, 쓴맛, 거품의 안정성 등에 영향을 제공하여 맥주품질의 안정성에 영향을 미친다.

다. 공정된 맥주 켈리티 확인

(1) 요약

공정된 맥주 켈리티 확인은 거품의 안전성, 탁도, 쓴맛, 알코올함량을 통해 기존 맥주와 비슷한지 비교 분석한다. 관능검사를 통해 기호도 조사를 진행한다.

(2) 재료 및 방법

(가) 알코올 함량

알코올농도는 증류법을 이용한 Vinometer(211-DK-12, Daekwang, Korea)를 이용하여 측정하여 식품공전상에 제시되어있는 주류분석 규정에 나온 술의 알코올함량 측정방법에 의해 분석하였다(Korea Food & Drug Administration, 2012).

(나) 쓴맛

맥주를 거품의 손실이 없도록 가스를 제거하여 20℃로 조절하고 10 mL 를 원심관에 취한 후 6 N 염산 0.5mL, 이소옥탄 20mL를 가하여 밀봉한 다음 진탕기를 250rpm에서 15분간 흔들었다. 3000 rpm 에서 3분간 원심분리 후 이소옥탄 층을 10mm 셀에 취해 순수한 이소옥탄을 대조로 275 nm에서 흡광도 A 를 측정하였다.

$$\text{Bitterness} = 50 \times A \text{ (BU)}$$

(다) 거품 안정성 측정

하부에 cock 이 있는 유리 칼럼(높이 250 mm, 직경 50mm)을 사용하였다. 시료 50mL를 붓고 30초 후에 거품 이외의 하층액을 cock을 열어 제거한 후 cock을 다시 막는다. 그 후 230초간 거품이 깨지는 시간을 허용하여 깨진 거품 양(b)과 남은 거품 양(c)을 측정하여 다음과 같은 식으로 거품 안정성(sigma, Σ)을 산출하였다(Ratnavathi et al., 2000).

$$\Sigma = \frac{230}{2.303 \log \left[\frac{b+c}{c} \right]}$$

(라) 탁도 측정

Spectrophotometer(UVmini-1240, Shimadzu, Kyoto, Japan)를 이용하여 700nm에서의

흡광도가 430nm에서 측정한 흡광도 보다 ≤ 0.039 배라면 탁도가 “없음”으로, 아니라면 “있음”으로 결정한다. 각 품종별 맥주의 차이를 분석한다.

(마) 관능평가

차이식별검사 방법을 이용하였으며, 패널 요원으로 동국대 식품공학과 대학원생 30명 중에서 패널요원의 차이식별능력, 참여의식, 편견 유무 등을 고려하여 10명을 선발 하였다. 관능검사는 일회 검사 당 시료수가 많아 다시료차이식별검사 방법인 불완전 블록법을 이용하여 실험을 설계하였다(Kim KW and Lee YC, 1996). 검사 항목은 ASBC 규격에 정의된 묘사 용어 중 맥주의 맛을 내포할 수 있는 관능적 특성 중 향 특성 5개, 맛 특성 6개, 입안 촉감 특성 1개, 뒷맛 특성 1개 항목을 선택하여 사용하였다(Crumplen and Lewis, 1997 e). 향 특성 5가지는 Aromatic (O1), Cereal(O2), Sweet(O3), Carbonation(O4),의 강도로 정의하였다. 맛 특성 6가지는 Aromatic(T1), Cereal(T2), Sweet(T3), Bitter(T4), Carbonation(T5),의 강도로 정의 하였다. 뒷맛 특성은 Carbonation(A1)의 강도로 정의하였다(Table 5). 각 용어에 대한 평점은 1-10 범위의 숫자 항목 척도로 표시하여 속성에 대한 차이의 기호도로 평가하였다.

Table 3-5. The sensory attributes in classification of beer flavor.

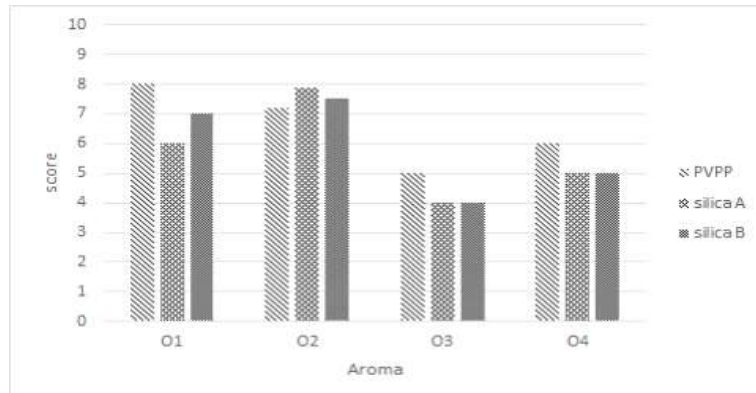
Flaver class	Attribut e	Description	Abbreviations of flavor		
			odor	Taste	After taste
class 1	Aromati c	Alcoholic	O1	T1	
class 3	Cereal	Raw grain flavor, husk-likie,	O2	T2	
class 10	Sweet	Honey, syrupy	O3	T3	
class 12	Bitter	Bitter		T4	
class 13	Mouth-coating	Carbonation, astringent, warming, metallic	O4	T5	A1

(바) 통계처리

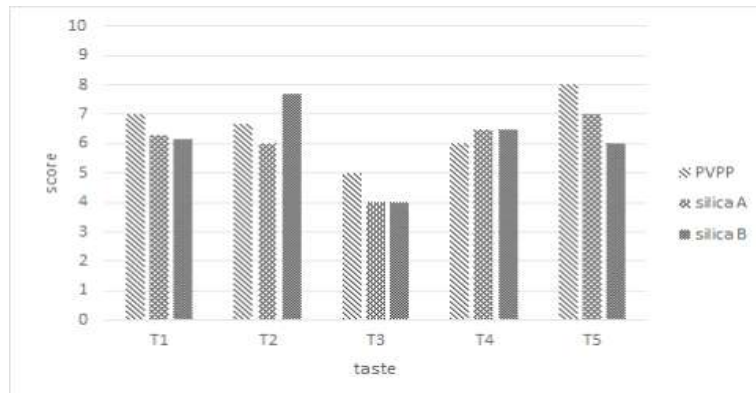
평균값의 차이 분석은 $p=0.05$ 의 유의적 수준에서 분산분석(Analysis of variance, ANOVA) 하였으며, 통계분석 프로그램인 SPSS(Statistical Package for the Social Science Version 21.0)을 이용하였다.

(3) 결과 및 고찰

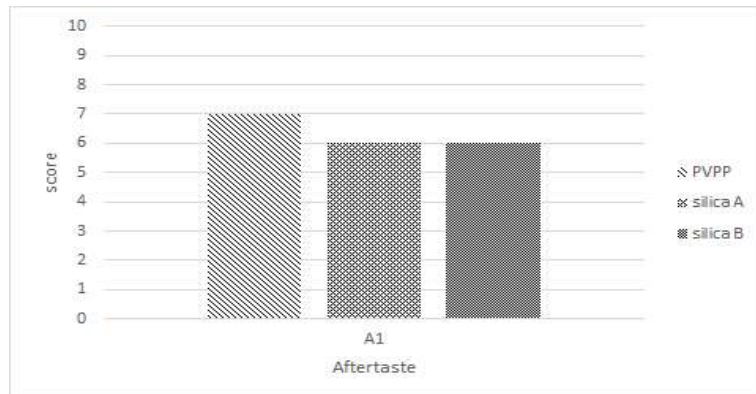
(가) 관능검사



(a)



(b)



(c)

Fig. 3-4. 응집 후 맥주의 향, 맛, 뒷맛 관능평가, a : 향 , b : 맛, c : 뒷맛

Fig. 3-4는 광맥맥주의 관능검사 결과이다. Aromatic의 O1과 T1는 PVPP 응집제를 넣었던 기호도 점수가 제일 높게 나타났고, 탄산의 향, 맛을 나타내는 O4, T5, A1 또한 PVPP가 다른 응집제 보다 기호도가 높은 것으로 나타났다. 전체적으로 보았을 때 기호도가 제일 높았던 것은 PVPP 응집제를 넣은 것으로 판단하였다.

(나) 알코올 함량, 쓴맛, 탁도, 거품의 안정성 측정

Table. 3-6. Quality factors of beer made of 4 different barleys.

Factor	0°C			4°C			7°C		
	PVPP	silica A	silica B	PVPP	silica A	silica B	PVPP	silica A	silica B
Alcohol(%)	4.25 ±0.07	4.32 ±0.13	4.12±0 .16	4.52 ±0.15	4.39 ±0.38	4.21 ±0.35	4.3 ±0.37	4.2 ±0.56	4.44 ±0.39
Bitter taste	15 ±1.29	16 ±2.64	15.5 ±3.65	16.28 ±2.64	15.38 ±1.35	15.18 ±2.08	14.03 ±2.82	15.26 ±1.68	14.17 ±2.39
Turbidity	Exist	Exist	Exist	Exist	Exist	Exist	Exist	Exist	Exist
Foam stability	209.06 ±46.12	203.39 ±50.38	190.34 ±60.29	210.23 ±49.12	236.31 ±39.25	187.05 ±43.28	237.12 ±20.67	207.54 ±60.87	190.36 ±40.33

Table 3-6는 알코올 함량, 쓴맛, 탁도, 거품의 안정성 측정 결과 값이다. 본 실험에서 제조한 표준 알코올 농도는 4.3~5.6%로 알려져 있다. 모든 측정치는 표준 알코올 농도 범위에 근접하였다. 또한 쓴맛 정도는 주로 hop에서 나오는 유도체인 iso-α acid 함량에 따라 나타나며, 측정 표준범위는 10-40BU로 모든 보리의 측정치가 범위에 속하였다. 탁도는 맥주의 발효과정 중 효모모의 성장 및 단백질, 폴리페놀의 존재 등을 통해 발생하는데 맥주의 발효 유무를 진단 할 수 있는 척도가 되는데 탁도가 발생하였기에 맥주의 발효 진행이 잘 되었다고 볼 수 있다. 거품의 안정성은 맥주 품질 특성에 있어 가장 기초적이고 중요한 항목으로 hop에서 유리되는 iso-α acid와 malt로부터 기인한 많은 protein 및 polypeptide에 의해 생성된다. 거품의 안정성의 수치가 높을수록 보다 안정하다는 것을 뜻하는데 PVPP 응집제를 넣은 맥주가 제일 높았고 그중 4°C에서 가장 안정한 값이 나왔다. Silica B는 단백질을 제거하는 응집제이기 때문에 단백질 함량이 낮아 안정성이 낮은 것으로 판단하였다.

2. 맥주 발효 중 환경변수에 따른 최적화된 응집 생성공정 현장적용

가. 후발효 중 다양한 응집제의 현장조건 및 환경변수 개발

(1) 요약

후발효 중 다양한 응집제의 현장 조건 및 환경변수를 개발한다. 응집처리 및 제거에 따른 맥주의 유통기한을 감소시키는 Haze 유발성분인 폴리페놀 및 단백질의 함량을 분석한다. 쓴맛, 알코올 함량, 색도, 거품의 안정성, 관능평가 등 맥주의 품질 평가를 실시하여, 응집처리 시 맥주의 품질 저하를 일으키지 않음을 확인한다. 응집제를 처리한 맥즙에서 응집제 PVPP A와 Silica xerogel A를 사용하였을 때 단백질과 폴리페놀의 제거 효율이 좋았으며, 응집제 선정에 따른 최적 응집 조건을 확립하여 응집 능력을 개선한다. 1차년도 응집제 투여 최적 조건인 PVPP, Silica xerogel(A,B) 사용에 따른 분석을 수행한다. 모든 응집제가 응집효과를 보였으나 특히 PVPP A와 Silica xerogel A에서 응집 효율이 좋았으며, 응집조건은 응집 시간 60min, 응집제첨가량 80mg이 적합하였다. 맥주의 퀄리티 분석은 쓴맛, 알코올 함량, 거품의 안정성, 관능평가가 진행되었으며, 분석결과 응집제 처리가 맥주의 퀄리티에 영향을 주지 않아 맥주제조에 적합하다고 판단하였다.

(2) 재료 및 방법

(가) 실험재료

실험에 사용된 맥아는 국내산 2조맥인 광맥(국립식량과학원)을 이용하였고, 응집제로는 PVPP A(polyclar brewbrite), PVPP B(polyclar plus 730), PVPP C(polyclar 10), Silica xerogel A(Lucilite TR), Silica xerogel B(Lucilite 10)을 사용하여 3반복 실험을 하였다.

(나) 당화방법

맥즙을 얻기 위한 당화방법은 (주)홍삼맥주의 맥주제조방법을 따랐으며, 그 방법은 다음과 같다. 광맥 750g을 당화조에 넣고 52℃의 증류수 6L와 잘 섞은 다음 Shaking water bath (BF-46SB, Biofree, Korea)을 이용하여 52℃에서 20rpm으로 20분간 당화시킨 후 1℃/min 속도로 10분 동안 온도를 증가시켜 맥즙의 온도를 62℃까지 올린다. 그 후 62℃에서 20rpm으로 60분간 당화시키고 1℃/min 속도로 10분 동안 온도를 증가시켜 맥즙의 온도를 72℃까지 올린다. 다시 72℃에서 20rpm으로 15분간 당화시킨 후 1℃/min 속도로 4분 동안 온도를 증가시켜 맥즙의 온도를 76℃까지 올리고 76℃에서 20rpm으로 10분간 당화시켜 당화를 완료한다. 맥즙의 온도가 20℃가 될 때까지 식히고 증류수 1.5L를 가하여 7.5L가 되도록 한다. 주름진 여과지 No.597 1/2 (Whatman, Germany)를 이용하여 여과하며, 초기 20mL 맥즙을 재여과 시킨 후 당화적성 실험을 위해 사용하였다.

(다) 발효방법

맥주의 발효공정은 당화과정을 거친 맥즙에 α -acid 함량이 10%인 Hallertauer tradition Hop(Hopsteiner, Germany)을 3회 나누어 주입 후 끓인(전체의 1/2 추가 후 10분, 전체의 1/4 추가 후 5분, 전체의 1/4 추가 후 5분)다음 이 맥즙을 얼음위에 급속냉각 시킨다(Cho HC., 2004). 냉각 후 알코올도수 예측 및 당화의 정도를 파악하기 위한 초기비중을 측정하도록 한다. 이후 맥즙에 미리 propagation시킨 효모(Hefeweizen Ale Yeast WLP300, USA)를 주입(Cheong C et al., 2007)한 뒤, 공기차단기를 설치하여 1차 발효를 실시한다. 1차 전발효의 조건은 20℃에서 8일간 발효 시킨다. 이후 2차 발효를 위해 맥즙을 병입한 후 15℃의 온도에서 7일간 발효시켜 탄산가스를 만들도록 한다. 이 과정을 거쳐 만들어진 맥주를 이용하여 맥주적성실험을 위해 사용하였다.

(라) 응집생성량 측정

Dry oven(105℃)에 Whatman 1을 8시간 말린다. Desiccator에 필터페이퍼를 넣고 30분 동안 식힌다. 필터페이퍼 무게 측정(A)한다. PVPP, Silica xerogel A, Silica xerogel B를 맥주에 첨가하여 응집을 확인한다. Whatman 1 필터페이퍼로 여과한다. Dry oven(105℃)에 여과한 필터페이퍼를 8시간 말린다. Desiccator에 필터페이퍼를 넣고 30분 동안 식힌다. 필터페이퍼 무게 측정(B)한다. $(A) - (B) = (C)$ 값으로 응집 생성량을 측정한다.

(마) 총 폴리페놀 함량 측정

폴리페놀 분석법으로 가장 널리 사용되고 있는 Folin-Ciocalteu법을 기본분석 방법으로

측정한다. 폴리브데늄 염의 색변화를 이용한 방법으로 용액 중 다른 성분들에 의한 방해가 가장 작은 것으로 알려져 있으며 색의 발현은 2시간 경과한 점에서 가장 강하다. 표준으로 받아들여질 정도로 일반화된 Folin-Ciocalteu 분석 과정은 100mL volumetric flask에 60mL 증류수를 넣고 시료 1mL을 가한다. FCR(Folin-Ciocalteu Reagent) 용액 5.0mL를 가하고 섞은 후 20% Na₂CO₃ 15mL를 가한다. 증류수를 채워 100mL 용액을 만든 후 23°C에서 2시간 방치하여 색이 형성되도록 기다린 후 표준 흡광도 760nm에서 측정한다.

(바) 단백질 함량 측정

단백질 함량의 대표적인 Kjeldhal법을 이용한다. 맥주 시료 1mL과 분해촉진제 (K₂SO₄ : CuSO₄ = 4 : 1)를 넣어준다. 켈달 플라스크에 황산원액 20mL를 넣고 Sonicator로 시료가 고루 섞이게 해준다. 켈달 랙에 400°C 3시간 동안 분해시킨다. 가열이 완료되면 에메랄드색으로 변하며 이를 삼각플라스크에 옮기고 4% boric acid를 넣고 혼합지시약(Methyl Red : 2~3drop, Methylen Blue : 2~3 drop)을 떨어뜨린다. 삼각 플라스크를 증류장치에 연결하여 4분간 증류, 포집한다. 0.02N-HCL로 적정한다.

(사) 알코올 함량

알코올농도는 증류법을 이용한 Vinometer(211-DK-12, Daekwang, Korea)를 이용하여 측정하여 식품공전상에 제시되어있는 주류분석 규정에 나온 술의 알코올함량 측정방법에 의해 분석하였다(Korea Food & Drug Administration, 2012).

(아) 쓴맛

맥주를 거품의 손실이 없도록 가스를 제거하여 20°C로 조절하고 10 mL 를 원심관에 취한 후 6 N 염산 0.5mL, 이소옥탄 20mL를 가하여 밀봉한 다음 진탕기를 250rpm에서 15분간 흔들었다. 3000 rpm 에서 3분간 원심분리 후 이소옥탄 층을 10mm 셀에 취해 순수한 이소옥탄을 대조로 275 nm에서 흡광도 A 를 측정하였다.

$$\text{Bitterness} = 50 \times A \text{ (BU)}$$

(자) 거품 안정성 측정

하부에 cock 이 있는 유리 깔럼(높이 250 mm, 직경 50mm)을 사용하였다. 시료 50mL를 붓고 30초 후에 거품 이외의 하층액을 cock을 열어 제거한 후 cock을 다시 막는다. 그 후 230초간 거품이 깨지는 시간을 허용하여 깨진 거품 양(b)과 남은 거품 양(c)을 측정하여 다음과 같은 식으로 거품 안정성(sigma, Σ)을 산출하였다(Ratnavathi et al., 2000).

$$\Sigma = \frac{230}{2.303 \log \left[\frac{b+c}{c} \right]}$$

(차) 탁도 측정

Spectrophotometer(UVmini-1240, Shimadzu, Kyoto, Japan)를 이용하여 700nm에서의

흡광도가 430nm에서 측정한 흡광도 보다 ≤ 0.039 배라면 탁도가 “없음”으로, 아니라면 “있음”으로 결정한다. 각 품종별 맥주의 차이를 분석한다.

(카) 관능평가

차이식별검사 방법을 이용하였으며, 패널 요원으로 동국대 식품공학과 대학원생 30명 중에서 패널요원의 차이식별능력, 참여의식, 편견 유무 등을 고려하여 10명을 선발 하였다. 관능검사는 일회 검사 당 시료수가 많아 다시료차이식별검사 방법인 불완전 블록법을 이용하여 실험을 설계하였다(Kim KW and Lee YC, 1996). 검사 항목은 ASBC 규격에 정의된 묘사 용어 중 맥주의 맛을 내포할 수 있는 관능적 특성 중 향 특성 5개, 맛 특성 6개, 입안 촉감 특성 1개, 뒷맛 특성 1개 항목을 선택하여 사용하였다(Crumplen and Lewis, 1997 e). 향 특성 5가지는 Aromatic (O1), Cereal(O2), Sweet(O3), Carbonation(O4),의 강도로 정의하였다. 맛 특성 6가지는 Aromatic(T1), Cereal(T2), Sweet(T3), Bitter(T4), Carbonation(T5),의 강도로 정의 하였다. 뒷맛 특성은 Carbonation(A1)의 강도로 정의하였다(Table 3-7). 각 용어에 대한 평점은 1-10 범위의 숫자 항목 척도로 표시하여 속성에 대한 차이의 기호도로 평가하였다.

Table 3-7. The sensory attributes in classification of beer flavor.

Flaver class	Attribute	Description	Abbreviations of flavor		
			odor	Taste	After taste
class 1	Aromatic	Alcoholic	O1	T1	
class 3	Cereal	Raw grain flavor, husk-like,	O2	T2	
class 10	Sweet	Honey, syrupy	O3	T3	
class 12	Bitter	Bitter		T4	
class 13	Mouth-coating	Carbonation, astringent, warming, metallic	O4	T5	A1

(타) 통계처리

평균값의 차이 분석은 $p=0.05$ 의 유의적 수준에서 분산분석(Analysis of variance, ANOVA) 하였으며, 통계분석 프로그램인 SPSS(Statistical Package for the Social Science Version 21.0)을 이용하였다.

(3) 결과 및 고찰

(가) 응집 결과

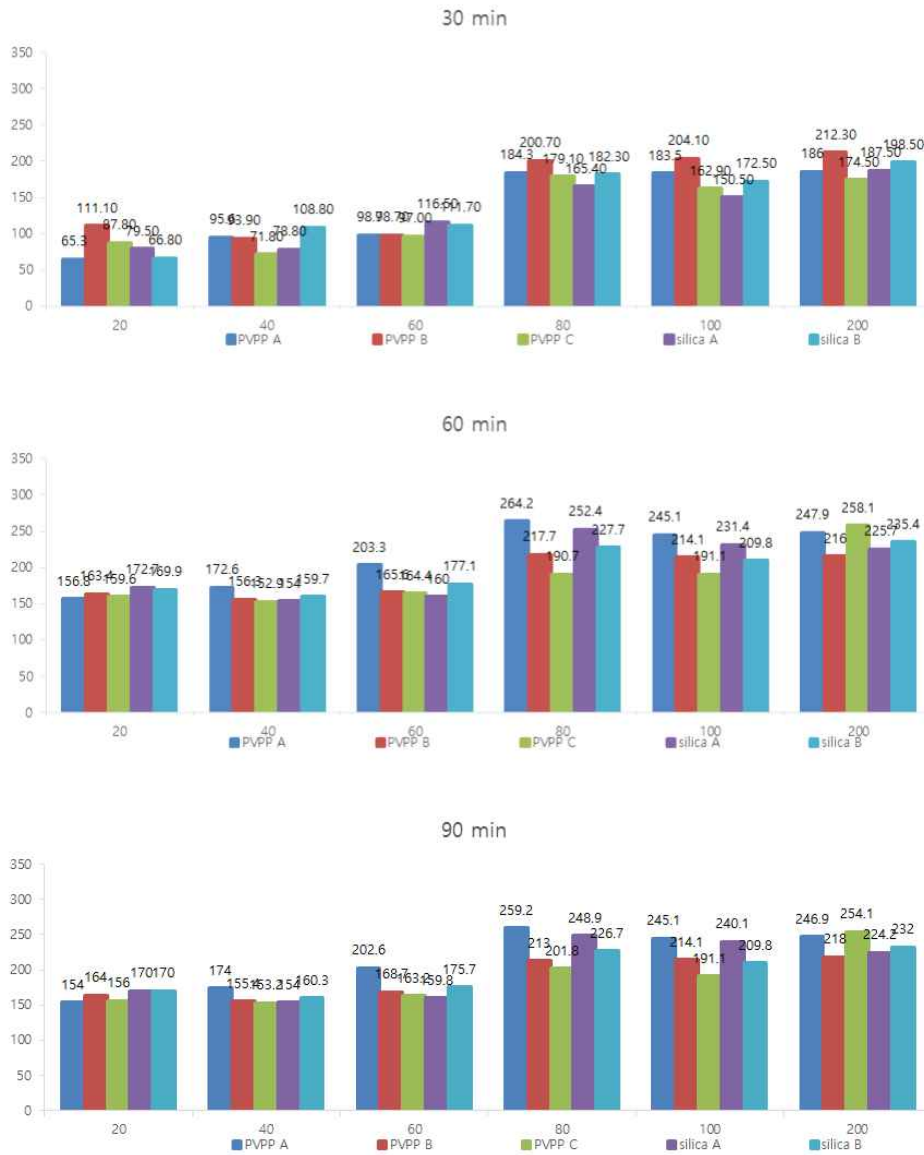


Fig. 3-5. Effect of different concentration of PVPP A, B, C, Silica xerogel A, B on beer hazes from beer Brewing process

Fig. 3-5.은 맥주의 응집 시간별(30, 60, 90 분) 및 응집제 용량별(20, 40, 60, 80, 100mg) 응집량을 측정된 결과 값이다. PVPP A, B, C 와 Silica xerogel A, B는 대체적으로 응집제 첨가량이 80mg일 때 가장 응집효과가 좋은 것으로 나타났으며, 응집시간 60분일 때 응집생성량이 최대로 증가함을 확인 할 수 있었다. 특히 PVPP A를 사용하였을 때 응집생성량이 제일 좋은 것으로 나타났다. 반면 PVPP C는 다른 응집제에 비해 응집생성량이 적은 것을 확인하였다.

(나) 폴리페놀 함량

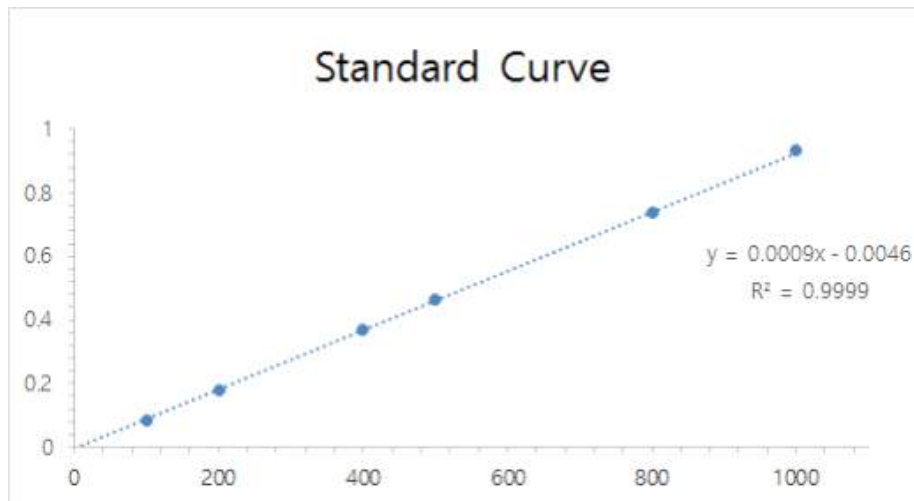


Fig. 3-6. Calibration curve for standard gallic acid

Fig. 3-6.는 Gallic acid의 polyphenol standard curve이다. gallic acid는 -OH 작용기 세 개가 한 개의 벤조산에 붙어 있는 형태로 비교적 단순한 구조, 높은 수용성, 효과적인 발색을 보이는 이상적인 표준물질로 간주되고 있다. 벤조산에 수산기(-OH)가 세 개가 치환된 형태로 분자 당 수산기의 비율이 높다. $R^2=0.9999$ 로 1값과 유사하게 나온 것을 확인할 수 있다.

Fig. 3-7. 응집 조건에 따른 폴리페놀 함량 확인

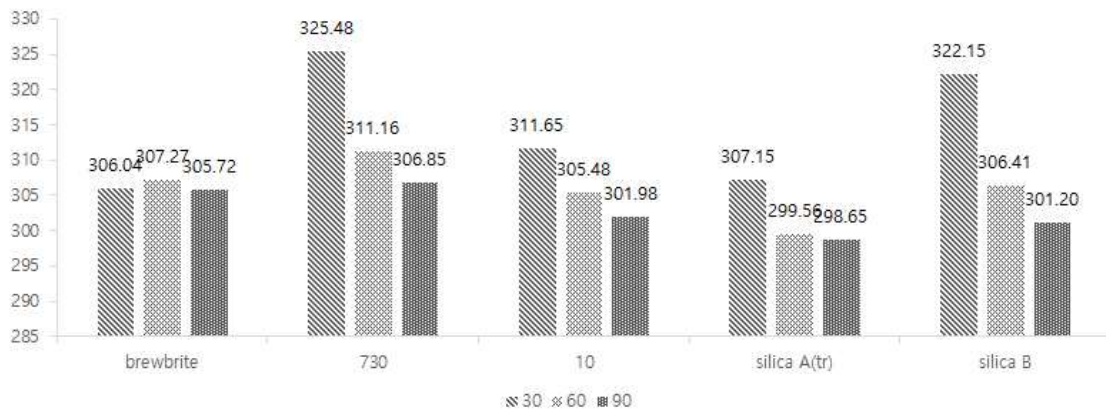


Fig. 3-7-1. 응집제 종류에 따른 폴리페놀 함량 확인

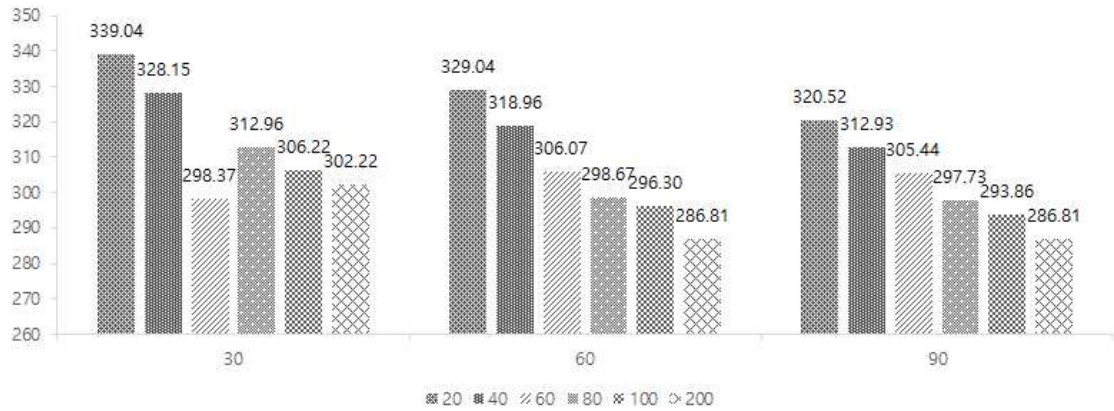


Fig. 3-7-2. 응집 시간에 따른 폴리페놀 함량 확인

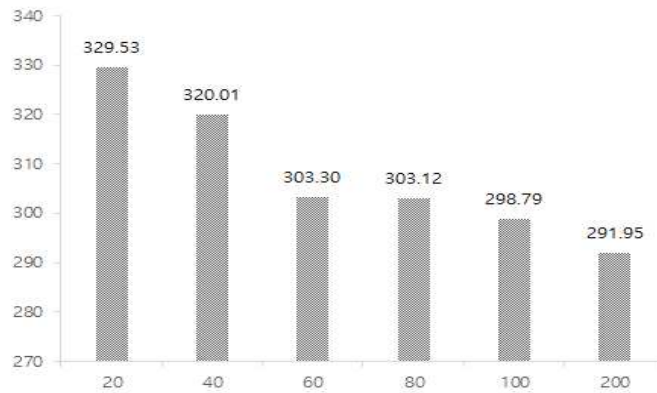


Fig. 3-7-3. 응집제 첨가량에 따른 폴리페놀 함량 확인

Fig. 3-7.은 응집제의 종류 및 응집시간, 응집제 첨가량에 따른 응집조건별 폴리페놀 함량을 나타낸 것이다. Fig. 3-7-1에서 응집제 종류별 폴리페놀 함량을 비교하였을 때, PVPP A, Silica xerogel A에서 효과가 잘 나타났으며, 대체적으로 60분에서 가장 효과가 크게 나타났다. Fig. 3-7-2는 응집 시간별 폴리페놀 함량을 나타낸 것이다. 60분과 90분동안 응집하였을 때 가장 효과가 잘 나타났으며, 응집제 첨가량이 60mg 이상일 때 적합한 것으로 나타났다. Fig. 3-7-3에서도 응집제 첨가량이 60mg과 80mg일 때 가장 폴리페놀 응집에 적합한 것으로 나타났으며, 응집 조건별 폴리페놀 함량은 응집제를 PVPP A, Silica xerogel A를 60mg, 60분 동안 응집하였을 때 가장 적합한 것을 확인 할 수 있었다.

(다) 단백질 함량

Fig. 3-8. 응집 조건에 따른 단백질 함량 확인

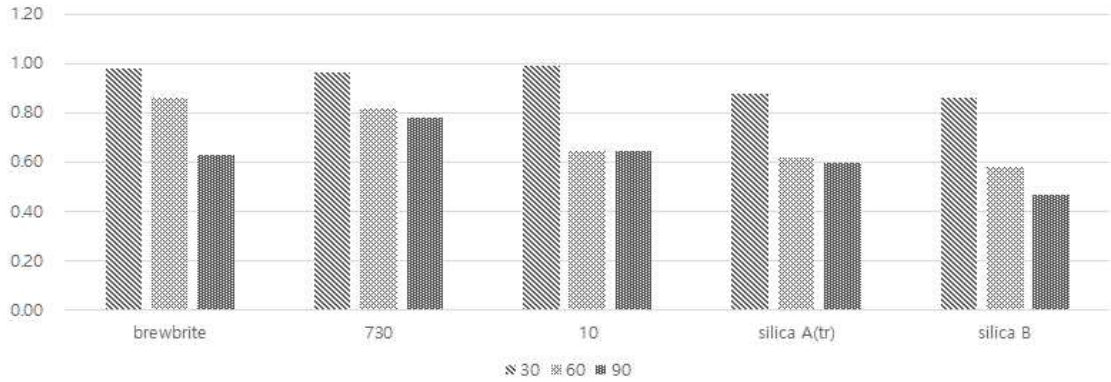


Fig. 3-8-1. 응집제 종류에 따른 단백질 함량 확인

Fig. 3-8-1에서 응집제 종류별 단백질 함량을 비교하였을 때, 모든 응집제에서 효과가 잘 나타났으나 특히 Silica xerogel B에서 가장 효과가 좋았으며, 대체적으로 60분에서 가장 효과가 크게 나타났다.

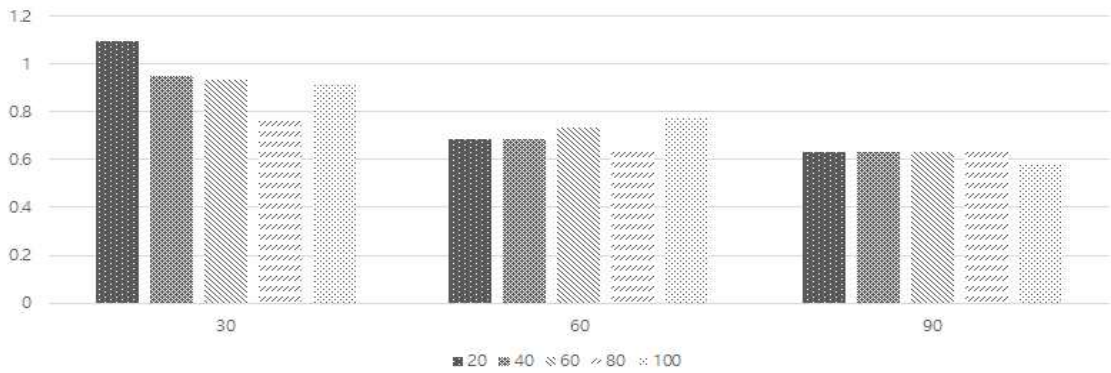


Fig. 3-8-2. 응집 시간에 따른 단백질 함량 확인

Fig. 3-8-2는 응집 시간별 단백질 함량을 나타낸 것이다. 60분과 90분 동안 응집 하였을 때 가장 효과가 잘 나타났다.

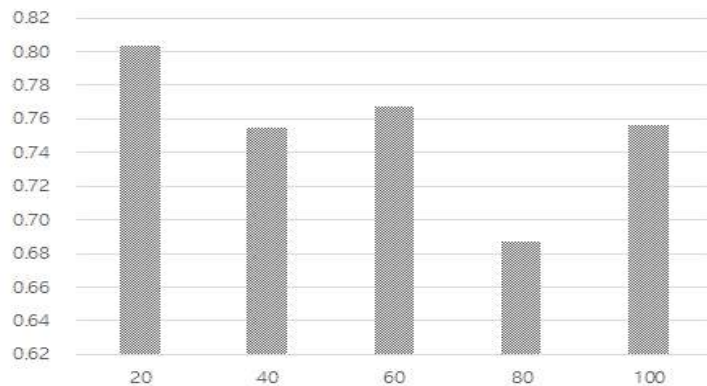


Fig. 3-8-3. 응집제 첨가량에 따른 단백질 함량 확인

Fig. 3-8.는 응집제의 종류 및 응집시간, 응집제 첨가량에 따른 응집조건별 단백질 함량을 나타낸 것이다. Fig. 3-8-1에서 응집제 종류별 단백질 함량을 비교하였을 때, 모든 응집제에서 효과가 잘 나타났으나 특히 Silica xerogel B에서 가장 효과가 좋았으며, 대체적으로 60분에서 가장 효과가 크게 나타났으며, Fig. 3-8-2는 응집 시간별 단백질 함량을 나타낸 것이다. 60분과 90분 동안 응집 하였을 때 가장 효과가 잘 나타났다. Fig. 3-8-3에서 응집제 첨가량별 단백질 함량을 비교하였을 때 80mg일 때 가장 효과가 크게 나타났다. 종합적으로 응집 조건별 단백질 함량은 80mg, 60분 동안 응집하였을 때 가장 적합한 것으로 보이며, 응집제 종류별 단백질 함량은 큰 차이가 없고, 모두 비슷하게 나타난 것을 확인 할 수 있었다. 단백질 함량은 맥주의 혼탁도, 쓴맛, 거품의 안정성 등에 영향을 미친다.

(라) 알코올 함량 측정

Table 3-8. Quality factors of beer alcohol content(%)

Table 3-8-1. 응집 시간에 따른 알코올 함량 확인

	PVPP A	PVPP B	PVPP C	silica A	silica B
30 min	4.22±0.17	4.39±0.14	4.27±0.11	4.30±0.17	4.29±0.13
60 min	4.23±0.13	4.26±0.17	4.29±0.14	4.30±0.09	4.24±0.18
90 min	4.12±0.16	4.36±0.20	4.20±0.12	4.19±0.19	4.13±0.12

Table 3-8-2. 응집제 종류 및 응집제 첨가량에 따른 알코올 함량 확인

	PVPP A	PVPP B	PVPP C	silica A	silica B
20mg	4.31±0.18	4.24±0.13	4.25±0.14	4.29±0.14	4.21±0.11
40mg	4.11±0.17	4.24±0.15	4.29±0.19	4.12±0.14	4.25±0.19
60mg	4.25±0.15	4.31±0.11	4.23±0.18	4.13±0.13	4.21±0.10
80mg	4.12±0.17	4.14±0.12	4.22±0.19	4.34±0.16	4.28±0.15
100mg	4.23±0.16	4.20±0.17	4.17±0.14	4.38±0.19	4.13±0.16

본 실험에서 제조한 맥주의 응집제 첨가에 따른 종도 함량은 다음과 같다. 알코올 농도 측정결과 control의 알코올 함량은 4.5% 로 모든 측정치는 control보다 적은 함량을 나타냈으나 그 차이가 미세하였고 응집처리량에 따른 유의적 감소로 보이지 않아 맥주의 응집제 처리는 알코올 농도에 영향을 미치지 않는 것으로 보인다. 또한 맥주의 표준 알코올 종도는 4.3~5.6%로 모든 측정값이 표준 알코올 농도 범위에 해당하였다. 맥주의 응집제 처리는 알코올 농도에 영향을 미치지 않는 것으로 보인다.

(마) 쓴맛 측정

Table 3-9. Quality factors of beer bitter taste

		PVPP A	PVPP B	PVPP C	silica A	silica B
30min	Control	17.10 ± 0.89	17.10 ± 0.89	17.10 ± 0.89	17.10 ± 0.89	17.10 ± 0.89
	20mg	15.50 ± 3.98	15.20 ± 3.02	15.76 ± 2.31	16.00 ± 1.09	16.31 ± 2.97
	40mg	15.04 ± 2.49	14.82 ± 2.04	15.06 ± 1.25	15.50 ± 0.30	16.00 ± 1.09
	60mg	13.98 ± 1.23	14.92 ± 1.28	14.28 ± 1.08	15.13 ± 1.14	16.13 ± 2.54
	80mg	13.81 ± 2.49	13.68 ± 1.84	14.12 ± 2.15	14.81 ± 1.36	15.39 ± 1.94
	100mg	13.50 ± 0.94	13.90 ± 2.29	14.01 ± 3.22	14.20 ± 1.58	15.29 ± 0.84
60min	Control	17.10 ± 0.89	17.10 ± 0.89	17.10 ± 0.89	17.10 ± 0.89	17.10 ± 0.89
	20mg	15.13 ± 2.15	15.20 ± 1.87	15.85 ± 2.14	15.41 ± 2.49	15.82 ± 2.97
	40mg	14.87 ± 0.64	14.32 ± 1.24	15.06 ± 3.24	14.62 ± 2.11	15.29 ± 2.12
	60mg	13.23 ± 1.54	14.17 ± 2.22	14.28 ± 2.28	13.29 ± 1.25	14.13 ± 2.87
	80mg	13.03 ± 2.08	13.47 ± 1.21	13.29 ± 2.16	13.05 ± 2.51	13.40 ± 2.89
	100mg	12.50 ± 1.98	13.18 ± 1.35	12.87 ± 2.22	12.94 ± 1.52	13.28 ± 1.58
90min	Control	17.10 ± 0.89	17.10 ± 0.89	17.10 ± 0.89	17.10 ± 0.89	17.10 ± 0.89
	20mg	15.40 ± 2.74	14.97 ± 1.87	15.74 ± 2.15	15.04 ± 2.21	15.31 ± 2.66
	40mg	15.04 ± 2.58	14.23 ± 2.52	15.14 ± 2.59	15.50 ± 2.69	15.02 ± 1.82
	60mg	12.90 ± 0.65	14.14 ± 1.26	14.22 ± 2.04	13.23 ± 2.15	14.25 ± 2.15
	80mg	12.81 ± 1.23	13.24 ± 0.97	13.82 ± 2.50	12.82 ± 2.47	13.24 ± 3.52
	100mg	12.54 ± 1.52	12.60 ± 1.08	13.30 ± 1.28	12.25 ± 1.52	13.21 ± 2.48

쓴맛 정도는 주로 hop에서 나오는 유도체인 iso- α acid 함량에 따라 나타나며, 쓴맛 측정 결과 모든 측정 표준범위가 10-40BU로 모든 보리의 측정치가범위에 속하였다.

(바) 거품안정성 측정

거품의 안정성은 맥주 품질 특성에 있어 가장 기초적이고 중요한 항목으로 hop에서 유리되는 iso- α acid와 malt로부터 기인한 많은 protein 및 polypeptide에 의해 생성된다. 거품의 안정성의 수치가 높을수록 보다 안정하다는 것을 뜻하는데 PVPP A 응집제를 넣은 맥주가 제일 안정한 값을 가졌다. Silica xerogel A, B는 단백질을 제거하는 응집제이기 때문에 단백질 함량이 낮아 안정성이 낮은 것으로 예상해 볼 수 있다.

(사) 탁도 측정

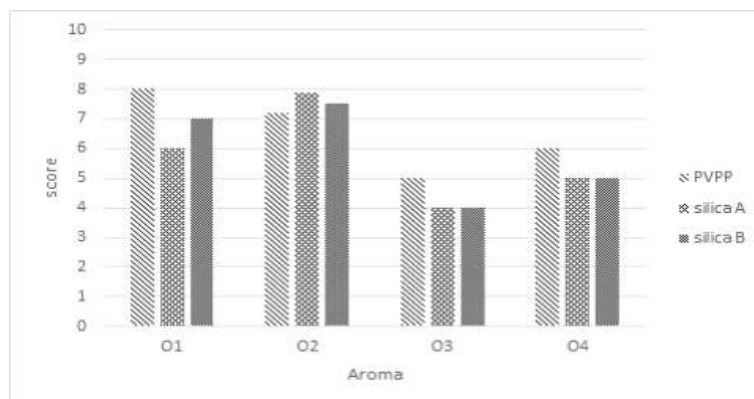
Table 3-10. Quality factors of beer Turbidity

		PVPP A	PVPP B	PVPP C	silica A	silica B
30min	Control	not turbid	not turbid	not turbid	not turbid	not turbid
	20mg	not turbid	not turbid	not turbid	not turbid	not turbid
	40mg	not turbid	not turbid	not turbid	not turbid	not turbid
	60mg	not turbid	not turbid	not turbid	not turbid	not turbid
	80mg	not turbid	not turbid	not turbid	not turbid	not turbid
	100mg	not turbid	not turbid	not turbid	not turbid	not turbid
60min	Control	not turbid	not turbid	not turbid	not turbid	not turbid
	20mg	not turbid	not turbid	not turbid	not turbid	not turbid
	40mg	not turbid	not turbid	not turbid	not turbid	not turbid
	60mg	not turbid	not turbid	not turbid	not turbid	not turbid
	80mg	not turbid	not turbid	not turbid	not turbid	not turbid
	100mg	not turbid	not turbid	not turbid	not turbid	not turbid
90min	Control	not turbid	not turbid	not turbid	not turbid	not turbid
	20mg	not turbid	not turbid	not turbid	not turbid	not turbid
	40mg	not turbid	not turbid	not turbid	not turbid	not turbid
	60mg	not turbid	not turbid	not turbid	not turbid	not turbid
	80mg	not turbid	not turbid	not turbid	not turbid	not turbid
	100mg	not turbid	not turbid	not turbid	not turbid	not turbid

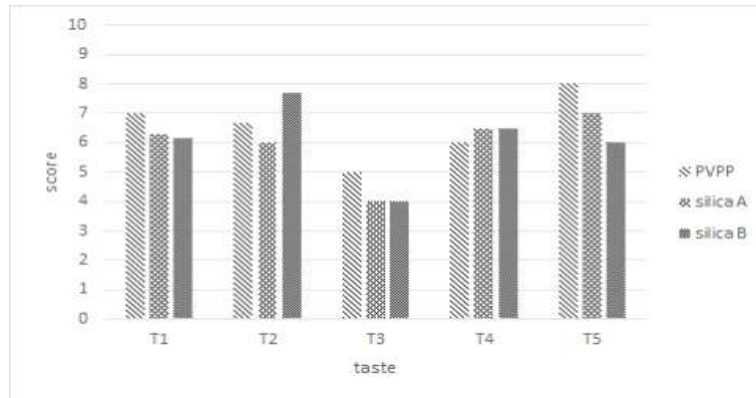
The absorbance value at 700 nm was 0.039 times higher than that at 430 nm, the beer was regarded as "turbid", if not, the beer was regarded as "not turbid"

탁도는 맥주의 발효과정 중 효모모의 성장 및 단백질, 폴리페놀의 존재 등을 통해 발생하는데 맥주의 발효 진행이 잘 되었다고 볼 수 있다. Spectrophotometer(UVmini-1240, Shimadzu, Kyoto, Japan)를 이용하여 700nm에서의 흡광도가 430nm에서 측정한 흡광도를 비교하였을 때 0.039배 이하인 값을 나타내었으므로 모두 탁도가 나타나지 않은 것을 확인하였다.

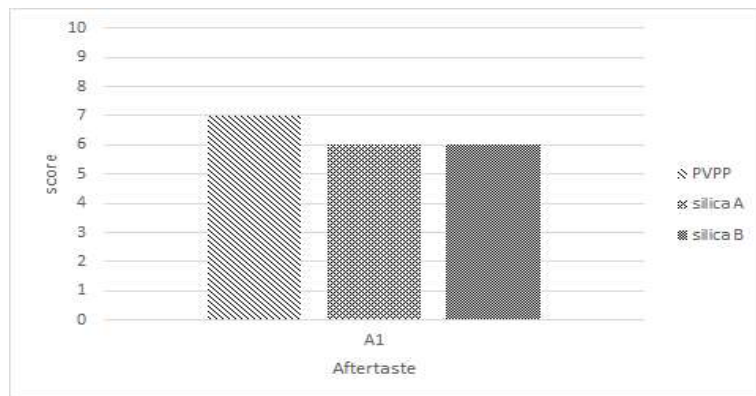
(아) 관능검사



(a)



(b)



(c)

Fig. 3-9. 응집제 종류에 따른 단백질 함량 확인. 응집 후 맥주의 향, 맛, 뒷맛 관능평가, a : 향, b : 맛, c : 뒷맛

Fig. 3-9.는 광맥맥주의 관능검사 결과이다. Aromatic의 O1과 T1는 PVPP 응집제를 넣었던 기호도 점수가 제일 높게 나온 걸 확인할 수 있었고, 탄산의 향, 맛을 나타내는 O4, T5, A1 또한 PVPP가 다른 응집제 보다 기호도가 높은 것으로 나타났다. 전체적으로 보았을 때 기호도가 제일 높았던 것은 PVPP 응집제를 넣었을 때인 것으로 확인할 수 있었다.

3. 홍삼/복분자 함유 국산보리맥주 응집 최적화 완성

가. 홍삼/복분자 맥주용액의 최적 응집조건 개발

(1) 요약

홍삼/복분자 함유 국산보리 맥주에 대한 응집 생성 가속화 조건 및 응집 최적화를 완성하며 보완한다. 홍삼/복분자 함유 맥주의 제조 중 사용 가능한 응집 소재 및 응집방법에 대한 개발을 진행한다. 폴리페놀 및 단백질 응집제를 수출용 홍삼/복분자 함유 맥주에 적용하고 보완한다. 홍삼/복분자 맥주 용액의 최적 응집조건을 개발한다. 홍삼 중 사포닌 및 진세노사이드에 따른 응집도와 홍삼 중 사포닌 및 진세노사이드에 따른 응집도를 평가한다. 홍삼/복분자 함유 맥주의 최적 응집제 및 응집조건을 선정한다.

(2) 재료 및 방법

(가) 실험재료

실험에 사용된 맥아는 국내산 2조맥인 광맥(국립식량과학원)을 이용하였고, 응집제로는 PVPP A(polyclar brewbrite), PVPP B(polyclar plus 730), PVPP C(polyclar 10), Silica xerogel A(Lucilite TR), Silica xerogel B(Lucilite 10)을 사용하여 3반복 실험을 하였다.

(나) 당화방법

맥즙을 얻기 위한 당화방법은 (주)홍삼맥주의 맥주제조방법을 따랐으며, 그 방법은 다음과 같다. 광맥 750g을 당화조에 넣고 52℃의 증류수 6L와 잘 섞은 다음 Shaking water bath (BF-46SB, Biofree, Korea)을 이용하여 52℃에서 20rpm으로 20분간 당화시킨 후 1℃/min 속도로 10분 동안 온도를 증가시켜 맥즙의 온도를 62℃까지 올린다. 그 후 62℃에서 20rpm으로 60분간 당화시키고 1℃/min 속도로 10분 동안 온도를 증가시켜 맥즙의 온도를 72℃까지 올린다. 다시 72℃에서 20rpm으로 15분간 당화시킨 후 1℃/min 속도로 4분 동안 온도를 증가시켜 맥즙의 온도를 76℃까지 올리고 76℃에서 20rpm으로 10분간 당화시켜 당화를 완료한다. 맥즙의 온도가 20℃가 될 때까지 식히고 증류수 1.5L를 가하여 7.5L가 되도록 한다. 주름진 여과지 No.597 1/2 (Whatman, Germany)를 이용하여 여과하며, 초기 20mL 맥즙을 재여과 시킨 후 당화적성 실험을 위해 사용하였다.

(다) 발효방법

맥주의 발효공정은 당화과정을 거친 맥즙에 α -acid 함량이 10%인 Hallertauer tradition Hop (Hopsteiner, Germany)을 3회 나누어 주입 후 끓인(전체의 1/2 추가 후 10분, 전체의 1/4 추가 후 5분, 전체의 1/4 추가 후 5분) 다음 이 맥즙을 얼음위에 급속냉각 시킨다(Cho HC., 2004). 냉각 후 알코올도수 예측 및 당화의 정도를 파악하기 위한 초기비중을 측정하도록 한다. 이때 혼탁물질 제거를 위한 응집처리를 실시하고 이후 맥즙에 propagation시킨 효모(Hefeweizen Ale Yeast WLP300, USA)를 주입(Cheong C et al., 2007)한 뒤, 공기차단기를 설치하여 1차 발효를 실시한다. 1차 전발효의 조건을 따라 20℃에서 8일간 발효시킨다. 이후 2차 발효를 위해 맥즙을 병입한 후 15℃의 온도에서 7일간 발효시켜 탄산가스를 만들도록 한다. 이 과정을 거쳐 만들어진 맥주를 이용하여 맥주적성실험을 위해 사용하였다.

(라) 응집생성량 측정

Dry oven(105℃)에 Filter paper Whatman 1을 8시간 동안 말린다. Desiccator에 Filter paper를 넣고 30분 동안 식힌다. Filter paper의 무게(A)를 측정한다. 응집제 PVPP A(polyclar brewbrite), PVPP B(polyclar plus 730), PVPP C(polyclar 10), Silica xerogel A(Lucilite TR), Silica xerogel B(Lucilite 10)의 일정량을 맥주에 첨가하여 일정시간 동안 응집을 확인한다. Filter paper Whatman 1로 응집생성물을 여과시킨다. Dry oven(105℃)에 여과가 완료된 Filter paper를 8시간 동안 말린다. Desiccator에 Filter paper를 넣고 30분 동안 식힌다. Filter paper 무게(B) 측정한다. $(A) - (B) = (C)$ 값으로 응집 생성량을 측정한다.

(마) 총 폴리페놀 함량 측정

폴리페놀 분석법으로 가장 널리 사용되고 있는 Folin-Ciocalteu법을 기본분석 방법으로 측정한다. 몰리브데늄 염의 색변화를 이용한 방법으로 용액 중 다른 성분들에 의한 방해가 가장 작은 것으로 알려져 있으며 색의 발현은 2시간 경과한 점에서 가장 강하다. 표준으로 받아들여질 정도로 일반화된 Folin-Ciocalteu 분석 과정은 100mL volumetric flask에 60mL 증류수를 넣고 시료 1mL을 가한다. FCR(Folin-Ciocalteu Reagent) 용액 5.0mL를 가하고 섞은 후 20% Na₂CO₃ 15mL를 가한다. 증류수를 채워 100mL 용액을 만든 후 23℃에서 2시간 방치하여 색이 형성되도록 기다린 후 표준 흡광도 760nm에서 측정한다.

(3) 결과 및 고찰

(가) 응집제 종류 및 응집 시간에 따른 응집생성량 확인

Table 3-11. Effect of different concentration of PVPP A, B, C, Silica xerogel A, B on beer hazes from beer brewing process

(mg)	30min				
	PVPP A	PVPP B	PVPP C	silica A	silica B
20	65.3	111.1	87.8	79.5	66.8
40	95.6	93.9	71.8	78.8	108.8
60	98.7	98.7	97.0	116.5	111.7
80	184.3	200.7	179.1	165.4	182.3
100	183.5	204.1	162.9	150.5	172.5
200	186.0	212.3	174.5	187.5	198.5
(mg)	60min				
	PVPP A	PVPP B	PVPP C	silica A	silica B
20	156.8	136.4	159.6	172.7	169.9
40	172.6	156.3	152.9	154.0	159.7
60	203.3	165.6	164.4	160.0	177.1
80	264.2	217.7	190.7	252.4	227.7
100	245.1	214.1	191.1	231.4	209.8
200	247.9	216.0	258.1	225.7	235.4
(mg)	90min				
	PVPP A	PVPP B	PVPP C	silica A	silica B
20	154.0	164.0	156.0	170.0	170.0
40	174.0	155.4	153.2	154.0	160.3
60	202.6	168.7	163.2	159.8	175.7
80	259.2	213.0	201.8	248.9	226.7
100	245.1	214.1	191.1	240.1	209.8
200	246.9	218.0	254.1	224.2	232.0

Table 3-11은 맥주의 응집 시간별(30, 60, 90분) 및 응집제 용량별(20, 40, 60, 80, 100mg) 응집량을 측정한 결과 값이다. PVPP A, B, C 와 Silica xerogel A, B는 대체적으

로 응집제 첨가량이 80mg일 때 가장 응집효과가 좋은 것으로 나타났으며, 응집시간 60분일 때 응집생성량이 최대로 증가함을 확인 할 수 있었다. 특히 PVPP A를 사용하였을 때 응집량이 제일 좋은 것으로 나타났다. 반면 PVPP C는 다른 응집제에 비해 응집생성량이 적은 것을 확인할 수 있었다. 응집물 생성결과 PVPP A(polycar brewbrite)를 60분 동안 0.16%(w/v) 첨가하는 것을 최적 조건으로 선정하였다.

(나) 복분자/홍삼 맥주에 응집최적조건 적용

Table 3-12. 복분자/홍삼 추출액 함유 맥주의 응집물 생성결과

Table 3-12-1. 복분자(*Rubus coreanus* Miq.) 추출액 함유 맥주의 응집물 생성결과

	<i>Rubus coreanus</i> Miq. (v/v)				
	0%	1%	3%	5%	7%
Coagulant formation (mg)	229.83±10.2 5 ^a	294.03±76.7 2 ^{ab}	348.77±57.2 8 ^{ab}	377.03±66.6 8 ^{ab}	403.27±45.1 9 ^b

1) a-b Means with the different letters are significantly different (p<0.05).

Table 3-12-2. 홍삼(*Panax ginseng* C. A. Meyer(Red Ginseng)) 추출액 함유 맥주의 응집물 생성결과

	<i>Panax ginseng</i> C. A. Meyer(Red Ginseng) (v/v)				
	0%	0.2%	0.4%	0.6%	0.8%
Coagulant formation (mg)	229.83±10.2 5 ^a	252.63±34.3 6 ^a	267.07±46.1 2 ^a	251.53±13.2 8 ^a	272.87±56.5 8 ^{ab}

1) a-b Means with the different letters are significantly different (p<0.05).

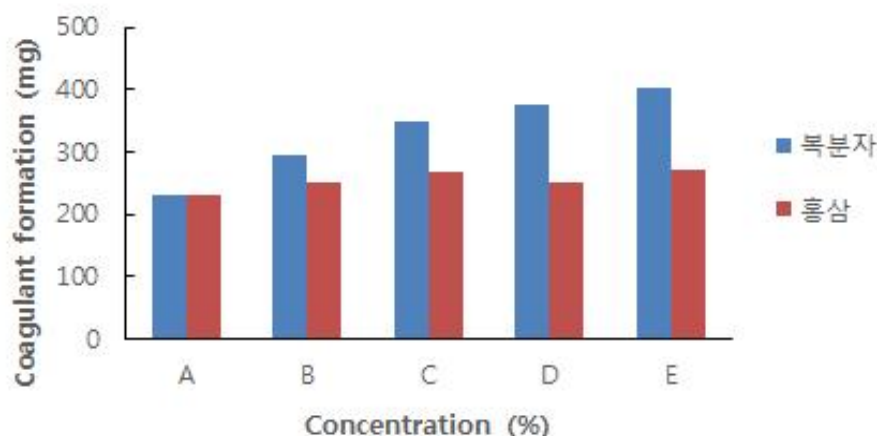


Fig. 3-10. 복분자/홍삼 추출액 함유 맥주의 응집물 생성결과

Table 3-12, Fig. 3-10.는 복분자/홍삼 추출액 함유 맥주의 응집물 생성결과이다. 복분자/홍삼 추출액을 함유한 맥주에 일반맥주의 최적응집조건인 PVPP A(polycar brewbrite)

0.16%(w/v)를 60분 동안 적용하였다. 응집생성물 결과를 살펴보면, 복분자/홍삼 추출액의 첨가량이 증가할수록 응집생성량은 증가하였다. 복분자맥주의 경우 추출액(0-7%) 첨가 시 5%(v/v)까지는 응집생성량이 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 홍삼맥주의 경우 추출액(0-0.8%) 첨가 시 모든 농도에서 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 따라서 홍삼/복분자 추출물을 맥주제조에 사용 시 일반맥주의 최적응집조건을 적용하였을 때 응집생성량은 큰 차이가 없을 것으로 판단하였다.

(다) 복분자/홍삼 추출액 함유 맥주 중 기능성물질 평가 결과

Table 3-13. 홍삼/복분자 추출액 중 폴리페놀 함량 평가 결과

Ingredient analysis	<i>Panax ginseng C. A.</i>	<i>Rubus coreanus Miq.</i>
	<i>Meyer</i> (Red Ginseng)	
	Content (mg/g)	Content (mg/g)
Anthocyanin	–	1.05
Ginsenoside Rb1	–	–
Ginsenoside Rg1	–	–
Ginsenoside Rg3	0.23	–

Table 3-13는 홍삼/복분자 추출액의 폴리페놀 함량을 나타낸 것이며, 분석법은 건강기능식품공전을 따랐다. 복분자 추출액은 Anthocyanin을 1.05mg/g을 함유하고 있으며, 홍삼 추출액은 Ginsenoside Rg3를 0.23mg/g 함유하고 있는 것을 확인하였다. 홍삼 추출액의 경우 건강기능식품으로 분류되는 기준은 Rg1, Rg2, Rg3가 0.8mg 이상 함유해야 하므로 건강기능식품 외 홍삼 추출액 음료로 분류하였다.

Table 3-14. 홍삼/복분자 추출액 함유 맥주 중 일반성분 함량 평가 결과

Ingredient analysis	<i>Panax ginseng C. A.</i>		<i>Rubus coreanus Miq.</i> (v/v)	
	<i>Meyer</i> (Red Ginseng) (v/v)			
	Content per 50mL	Nutrient Standard value (%)	Content per 50mL	Nutrient Standard value (%)
Calorie	25kcal	–	26kcal	–
Carbohydrate	6g	2	7g	2
Sugar	5g	–	6g	–
Protein	0g	0	0g	0
Fat	0g	0	0g	0
Saturated fat	0g	0	0g	0
Unsaturated fat	0g	–	0g	–
Cholesterol	0mg	0	0mg	0
Salt	0mg	0	0mg	0

Table 3-14는 홍삼/복분자 추출액 함유 맥주 중 일반성분 함량을 나타낸 것이다. 일반성분 분석결과 홍삼과 복분자 추출액 모두 기능성물질 외 탄수화물을 함유하는 것을 확인하였다.

나. 응집제 처리 홍삼/복분자 맥주의 품질평가 및 보완

(1) 요약

맥주제조 과정 중 응집제 첨가에 따른 품질 변화를 평가하고 보완한다. 응집제 처리 홍삼/복분자 함유 맥주의 품질평가 및 보완을 진행한다. 응집조건에 따른 홍삼/복분자 함유 맥주의 품질평가를 실시한다. 최적 응집 처리 홍삼/복분자 함유 맥주의 관능평가를 실시한다. 홍삼/복분자/ 함유 국산보리맥주 응집 최적화를 완성한다.

(2) 재료 및 방법

(가) 알코올 함량

알코올농도는 증류법을 이용한 Vinometer(211-DK-12, Daekwang, Korea)를 이용하여 측정하여 식품공전 상에 제시되어있는 주류분석 규정에 나온 술의 알코올함량 측정방법에 의해 분석하였다(Korea Food & Drug Administration, 2012).

(나) 쓴맛

맥주를 거품의 손실이 없도록 가스를 제거하여 20℃로 조절하고 10mL 를 원심관에 취한 후 6N 염산 0.5 mL, 이소옥탄 20mL 를 가하여 밀봉한 다음 진탕기를 이용해 250 rpm에서 15분간 흔들었다. 3000rpm 에서 3분간 원심분리 후 이소옥탄 층을 10mm 셀에 취해 순수한 이소옥탄을 대조로 275nm에서 흡광도 (A)를 측정하였다.

$$\text{Bitterness} = 50 \times A \text{ (BU)}$$

(다) 거품 안정성 측정

하부에 cock이 있는 유리 칼럼(높이 250 mm, 직경 50mm)을 사용하였다. 시료 50mL를 붓고 30초 후에 거품 이외의 하층액을 cock을 열어 제거한 후 cock을 다시 막았다. 그 후 230초간 거품이 깨지는 시간을 허용하여 깨진 거품 양(b)과 남은 거품 양(c)을 측정하여 다음과 같은 식으로 거품안정성(sigma, Σ)을 산출하였다(Ratnavathi et al., 2000).

$$\Sigma = \frac{230}{2.303 \log \left[\frac{b+c}{c} \right]}$$

(라) 탁도 측정

Spectrophotometer(UV mini-1240, Shimadzu, Kyoto, Japan)를 이용하여 700nm에서의 흡광도가 430nm에서 측정한 흡광도 보다 ≤ 0.039 배라면 탁도가 “없음”으로, 아니라면 “있음”으로 판단한다. 각 품종별 맥주의 탁도 차이를 분석한다.

(마) 관능평가

차이식별검사 방법을 이용하였으며, 패널 요원으로 동국대 식품공학과 대학원생 30명 중에서 패널 요원의 차이식별능력, 참여의식, 편견 유무 등을 고려하여 10명을 선발 하였다. 관능검사는 일회 검사 당 시료수가 많아 다시료차이식별검사 방법인 불완전 블록법을 이용하여 실험을 설계하였다(Kim KW and Lee YC, 1996). 검사 항목은 ASBC 규격에 정의된 묘사 용어 중 맥주의 맛을 내포할 수 있는 관능적 특성 중 향 특성 5개, 맛 특성 6개, 입안 촉감 특성 1 개, 뒷맛 특성 1개 항목을 선택하여 사용하였다(Crumplen and Lewis, 1997 e). 향 특성 5가지는 Aromatic (O1), Cereal(O2), Sweet(O3), Carbonation(O4)의 강도로 정의하였다. 맛 특성 6가지는 Aromatic(T1), Cereal(T2), Sweet(T3), Bitter(T4), Carbonation(T5)의 강도로 정의하였다. 뒷맛 특성은 Carbonation(A1)의 강도로 정의하였다 (Table 3-15). 각 용어에 대한 평점은 1-10 범위의 숫자 항목 척도로 표시하여 속성에 대한 차이의 기호도로 평가하였다.

Table 3-15. The sensory attributes in classification of beer flavor.

Flaver class	Attribute	Description	Abbreviations of flavor		
			Odor	Taste	After taste
class 1	Aromatic	Alcoholic	O1	T1	
class 3	Cereal	Raw grain flavor, husk-lkie,	O2	T2	
class 10	Sweet	Honey, syrupy	O3	T3	
class 12	Bitter	Bitter		T4	
class 13	Mouth-coating	Carbonation, astringent, warming, metallic	O4	T5	A1

(바) 통계처리

평균값의 차이 분석은 p=0.05의 유의적 수준에서 분산분석(Analysis of variance, ANOVA) 하였으며 통계분석 프로그램인 SAS(Statistical Analysis Software)을 이용하였다.

(3) 결과 및 고찰

(가) 홍삼/복분자 추출액 함유 맥주의 알코올함량 품질평가

Table 3-16. Quality factors of beer alcohol content(%)

Table 3-16-1. 복분자액 첨가에 따른 복분자 함유 맥주의 알코올함량 평가

	<i>Rubus coreanus</i> Miq. (v/v)				
	0%	1%	3%	5%	7%
Alcohol(%)	5.2±0.100 ^a	5.4±0.100 ^b	5.6±0.115 ^c	5.9±0.100 ^d	6.1±0.100 ^e

- 1) All values mean \pm standard deviation of triplicate determinations.
 2) a-g Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$).

Table 3-16-2. 홍삼액 첨가에 따른 홍삼 함유 맥주의 알코올함량 평가

	<i>Panax ginseng</i> C. A. Meyer(Red Ginseng) (v/v)				
	0%	0.2%	0.4%	0.6%	0.8%
Alcohol(%)	5.2 \pm 0.100 ^a	5.6 \pm 0.058 ^c	6.2 \pm 0.100 ^e	6.7 \pm 0.115 ^f	7.1 \pm 0.058 ^g

- 1) All values mean \pm standard deviation of triplicate determinations.
 2) a-g Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$).

본 실험에서 제조한 맥주의 복분자/홍삼 추출액 첨가에 따른 알코올 함량은 Table 3-16 와 같다. 알코올 농도 측정결과 Control의 알코올 함량은 5.2%로 맥주의 표준 알코올 농도 범위인 4.3~5.6%에 속했다. 모든 맥주의 알코올 함량 측정치는 추출액 첨가량이 증가함에 따라 Control보다 높은 함량을 나타내었으며 유의적인 차이를 보였다. 이는 복분자와 홍삼 추출액에 함유된 탄수화물 당이 발효에 기인하여 알코올 도수가 증가한 것으로 판단된다. 복분자 추출액 함유 맥주의 경우 첨가량이 3%까지는 맥주의 표준 알코올 농도 범위 안에 속하였으며, 홍삼 추출액 함유 맥주의 경우 0.2%까지는 맥주의 표준 알코올 농도 범위 안에 속하는 것을 확인하였다.

(나) 홍삼/복분자 추출액 함유 맥주의 탁도 품질평가

Table 3-17. Quality factors of beer Turbidity

Table 3-17-1. 홍삼/복분자 추출액의 탁도 평가

	<i>Rubus coreanus</i> Miq. (v/v)	<i>Panax ginseng</i> C. A. Meyer(Red Ginseng) (v/v)
Turbidity	Turbid	Turbid

- 1) The absorbance value at 700nm was 0.039 times higher than that at 430nm, the beer was regarded as "turbid", if not, the beer was regarded as "not turbid".

Table 3-17-2. 복분자액 첨가에 따른 복분자 함유 맥주의 탁도 평가

	<i>Rubus coreanus</i> Miq. (v/v)				
	0%	1%	3%	5%	7%
Turbidity	Not turbid	Not turbid	Not turbid	Not turbid	Not turbid

- 1) The absorbance value at 700nm was 0.039 times higher than that at 430nm, the beer was regarded as "turbid", if not, the beer was regarded as "not turbid".

Table 3-17-3. 홍삼액 첨가에 따른 홍삼 함유 맥주의 탁도 평가

	<i>Panax ginseng C. A. Meyer</i> (Red Ginseng) (v/v)				
	0%	0.2%	0.4%	0.6%	0.8%
Turbidity	Not turbid	Not turbid	Not turbid	Not turbid	Not turbid

1) The absorbance value at 700nm was 0.039 times higher than that at 430nm, the beer was regarded as "turbid", if not, the beer was regarded as "not turbid".

탁도는 맥주의 발효과정 중 효모의 성장 및 단백질, 폴리페놀의 존재 등을 통해 발생하는 데 이는 맥주의 발효 유무를 확인할 수 있는 척도다. Spectrophotometer(UV mini-1240, Shimadzu, Kyoto, Japan)를 이용하여 700nm에서의 흡광도와 430nm에서 측정된 흡광도를 비교하였다. Table 3-17-1는 복분자/홍삼 추출액의 탁도 평가 결과이다. 두 가지 추출액 모두 700nm에서의 흡광도 값이 430nm에서의 흡광도 값보다 0.039배 이하를 나타내어 추출액 자체만으로는 ‘Turbid’로 평가되었다. Table 3-17-2와 Table 3-17-3은 각각 복분자/홍삼 추출액 첨가에 따른 맥주의 탁도 평가 결과이다. 모든 맥주의 흡광도 값을 비교하였을 때 700nm에서의 흡광도 값이 430nm에서의 흡광도 값보다 0.039배 이하인 값을 나타내어 모두 탁도가 나타나지 않은 것을 확인하였다. 따라서 홍삼/복분자 추출액의 다음과 같은 농도로 첨가 하였을 때 첨가량이 맥주의 품질저하를 일으키지 않는 것으로 판단되었다.

(다) 홍삼/복분자 추출액 함유 맥주의 거품안정성 품질평가

Table 3-18. Quality factors of beer Foam Stability

Table 3-18-1. 복분자액 첨가에 따른 복분자 함유 맥주의 거품안정성 평가

	<i>Rubus coreanus</i> Miq. (v/v)				
	0%	1%	3%	5%	7%
Foam stability	203.22±34.69 0 ^a	250.91±17.74 2 ^{bc}	250.89±20.40 9 ^{bc}	281.97±21.45 9 ^c	281.94±26.81 8 ^c

- 1) All values mean ± standard deviation of triplicate determinations.
- 2) a-c Means with different letters are significantly different (p<0.05).

Table 3-18-2. 홍삼액 첨가에 따른 홍삼 함유 맥주의 거품안정성 평가

	<i>Panax ginseng C. A. Meyer</i> (Red Ginseng) (v/v)				
	0%	0.2%	0.4%	0.6%	0.8%
Foam stability	203.22±34.69 0 ^a	236.22±17.70 8 ^{ab}	240.98±34.62 4 ^{bc}	245.46±19.53 8 ^{bc}	260.55±32.22 2 ^{bc}

- 1) All values mean ± standard deviation of triplicate determinations.
- 2) a-c Means with different letters are significantly different (p<0.05).

거품의 안정성은 맥주 품질 특성에 있어 가장 기초적이고 중요한 항목으로 hop에서 유리되는 iso- α acid와 malt로부터 기인한 많은 protein 및 polypeptide에 의해 생성된다. Table 4는 복분자/홍삼 추출액 첨가에 따른 맥주의 거품안정성 평가 결과이다. 거품의 안정성의 수치가 높을수록 보다 안정하다는 것을 뜻하는데 추출액 첨가량이 증가할수록 맥주의 거품이 안정한 값을 가지는 것을 확인하였다.

(라) 홍삼/복분자 추출액 함유 맥주의 쓴맛 품질평가

Table 3-19. Quality factors of beer bitter taste

Table 3-19-1. 복분자액 첨가에 따른 복분자 함유 맥주의 쓴맛 품질평가

	<i>Rubus coreanus</i> Miq. (v/v)				
	0%	1%	3%	5%	7%
Bitter Taste (BU)	11.15±0.02 ^a	11.43±0.06 ^a	11.59±0.12 ^{ab}	12.27±0.69 ^{bc}	11.82±0.26 ^{ab}

1) The measurement standard range is 10–40BU (bittering units) and all the concentrations are within the range.

2) a–c Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$).

Table 3-19-2. 홍삼액 첨가에 따른 홍삼 함유 맥주의 쓴맛 품질평가

	<i>Panax ginseng</i> C. A. Meyer (Red Ginseng) (v/v)				
	0%	0.2%	0.4%	0.6%	0.8%
Bitter Taste (BU)	11.15±0.02 ^a	12.93±0.33 ^c	12.67±0.96 ^c	12.71±1.00 ^c	12.87±0.55 ^c

1) The measurement standard range is 10–40BU (bittering units) and all the concentrations are within the range.

2) a–c Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$).

쓴맛 정도는 주로 hop에서 나오는 유도체인 iso- α acid 함량에 따라 나타나며, 맥주의 iso-octane으로 산성화되어 추출된 bitter substances를 측정하여 결정된다. Table 3-19는 복분자/홍삼 추출액 첨가에 따른 맥주의 쓴맛 품질평가 결과이다. 쓴맛 측정 결과 모든 맥주의 측정값이 표준범위인 10–40BU에 속하였다. 따라서 복분자/홍삼 추출액 첨가량이 맥주의 품질저하를 일으키지 않는 것으로 판단하였다.

(마) 관능검사

Table 3-20. 복분자/홍삼 맥주의 향(Odor) 관능평가

Table 3-20-1. 복분자액 첨가에 따른 복분자 함유 맥주의 향(Odor) 관능평가

Odor	<i>Rubus coreanus</i> Miq. (v/v)				
	0%	1%	3%	5%	7%
O1	6.26±0.23 ^a	6.25±0.22 ^a	5.59±0.29 ^b	5.25±0.25 ^b	5.26±0.26 ^b
O2	6.08±0.10 ^a	4.65±0.29 ^b	4.65±0.27 ^b	4.47±0.43 ^{bc}	4.24±0.26 ^c
O3	5.22±0.19 ^a	5.24±0.25 ^a	6.88±0.22 ^b	6.57±0.34 ^b	6.66±0.26 ^b
O4	5.55±0.26 ^a	5.42±0.30 ^a	5.14±0.19 ^a	5.27±0.30 ^a	5.14±0.19 ^a

1) a-c Means with the different letters are significantly different (p<0.05).

Table 3-20-2. 홍삼액 첨가에 따른 홍삼 함유 맥주의 향(Odor) 관능평가

Odor	<i>Panax ginseng</i> C. A. Meyer(Red Ginseng) (v/v)				
	0%	0.2%	0.4%	0.6%	0.8%
O1	6.26±0.23 ^a	5.92±0.17 ^a	6.00±0.12 ^a	4.69±0.42 ^b	4.31±0.35 ^b
O2	6.08±0.10 ^a	4.90±0.23 ^b	4.75±0.19 ^b	4.13±0.17 ^c	4.06±0.15 ^c
O3	5.22±0.19 ^a	4.26±0.10 ^b	4.88±0.12 ^a	5.21±0.22 ^a	5.20±0.23 ^a
O4	5.55±0.26 ^a	5.16±0.17 ^b	5.49±0.09 ^{ab}	5.43±0.09 ^{ab}	5.20±0.21 ^b

1) a-c Means with the different letters are significantly different (p<0.05).

Odor는 Alcoholic(O1), Cereal(O2), Sweet(O3), Carbonation(O4)이다. 각 특성 당 강도는 0-10점 척도로 평가되었다(0: 없음, 1-2: 약함, 3-4: 보통, 5-6: 강함, 7-8: 더 강함, 9-10: 매우 강함). 각 농도별 시료가 10mL 씩 패널 요원들에게 주어졌다. 한 시료 당 모든 질문을 평가한 후 다른 설문지에 다른 시료를 평가하게 했다. 패널 요원들은 시료 당 30초의 휴식시간을 가졌으며, 물로 입을 헹군 후 검사를 시행했다.

Table 3-20-1는 복분자 추출액 함유 맥주의 향 관능평가 결과이다. 관능검사 결과 Alcoholic 항목을 나타내는 O1은 추출액의 첨가량이 증가할수록 점차 감소하는 양상을 보였으며, 3%부터 유의적인 차이를 나타내었다. Cereal 항목을 나타내는 O2는 1%부터 유의적인 차이를 나타내었으며 추출액의 첨가량이 증가할수록 점차 감소하는 양상을 보였다. 따라서 3% 이상 첨가 시 Alcoholic과 Cereal향을 감소시키는 것으로 판단하였다.

Table 3-20-2는 홍삼 추출액 함유 맥주의 향 관능평가 결과이다. 관능검사 결과 Cereal 항목을 나타내는 O2는 추출액의 첨가량이 증가할수록 점차 감소하는 양상을 보였으며, 0.4% 이상 첨가 시 일반맥주의 Cereal 향을 감소시키는 것으로 판단하였다.

Table 3-21 복분자/홍삼 맥주의 맛(Taste) 관능평가

Table 3-21-1. 복분자액 첨가에 따른 복분자 함유 맥주의 맛(Taste) 관능평가

Taste	<i>Rubus coreanus</i> Miq. (v/v)				
	0%	1%	3%	5%	7%
T1	5.51±0.52 ^a	6.55±0.31 ^b	6.71±0.26 ^b	6.66±0.26 ^b	6.47±0.16 ^b
T2	6.83±0.33 ^a	5.16±0.14 ^b	5.12±0.11 ^b	3.85±0.13 ^c	3.46±0.11 ^d
T3	2.65±0.47 ^a	4.97±0.13 ^b	5.63±0.11 ^c	6.77±0.11 ^d	6.87±0.10 ^d
T4	4.44±0.30 ^a	6.16±0.17 ^b	6.19±0.18 ^b	6.15±0.17 ^b	6.81±0.11 ^c
T5	4.07±0.18 ^a	4.76±0.11 ^b	5.69±0.20 ^c	5.72±0.24 ^c	6.16±0.17 ^d

1) a-d Means with the different letters are significantly different (p<0.05).

Table 3-21-2. 홍삼액 첨가에 따른 홍삼 함유 맥주의 맛(Taste) 관능평가

Taste	<i>Panax ginseng</i> C. A. Meyer(Red Ginseng) (v/v)				
	0%	0.2%	0.4%	0.6%	0.8%
T1	5.51±0.52 ^a	6.65±0.21 ^b	6.76±0.21 ^b	6.76±0.11 ^b	7.14±0.17 ^b
T2	6.83±0.33 ^a	6.21±0.19 ^b	4.48±0.26 ^c	4.02±0.03 ^d	3.99±0.11 ^d
T3	2.65±0.47 ^a	5.63±0.43 ^b	5.80±0.20 ^{bc}	5.81±0.22 ^{bc}	6.44±0.43 ^c
T4	4.44±0.30 ^a	5.77±0.10 ^b	6.82±0.09 ^c	6.66±0.21 ^c	6.78±0.27 ^c
T5	4.07±0.18 ^a	5.84±0.14 ^b	6.08±0.07 ^c	5.67±0.15 ^b	6.55±0.12 ^d

1) a-d Means with the different letters are significantly different (p<0.05).

Taste는 Alcoholic(T1), Cereal(T2), Sweet(T3), Bitter(T4), Carbonation(T5)이다. 각 특성 당 강도는 0-10점 척도로 평가되었다(0: 없음, 1-2: 약함, 3-4: 보통, 5-6: 강함, 7-8: 더 강함, 9-10: 매우 강함).

Table 3-21-1는 복분자 추출액 함유 맥주의 맛 관능평가 결과이다. 관능검사 결과 Cereal 항목을 나타내는 T2는 복분자 추출액의 첨가량이 증가할수록 점차 감소하는 양상을 보였다. T3, T4, T5는 복분자 추출액의 첨가량이 증가함에 따라 점차 증가하는 양상을 보였다. 결과적으로 복분자액 첨가는 맥주의 Cereal 맛 저하와 단맛, 쓴맛 향상에 영향을 미치는 것을 확인하였고, 적절한 농도 범위는 1-3%로 판단하였다.

Table 3-21-2는 홍삼 추출액 함유 맥주의 맛 관능평가 결과이다. 관능검사 결과 Cereal 항목을 나타내는 T2는 홍삼 추출액의 첨가량이 증가할수록 점차 감소하는 양상을 보였다. T3, T4, T5는 홍삼 추출액의 첨가량이 증가함에 따라 점차 증가하는 양상을 보였다. 결과적으로 홍삼액 첨가는 맥주의 Cereal 맛 저하와 단맛, 쓴맛 증가에 영향을 미치는 것을 확인하

였고, 적절한 농도 범위는 0.2%로 판단하였다.

Table 3-22. 복분자/홍삼 맥주의 뒷맛(After Taste) 관능평가

Table 3-22-1. 복분자액 첨가에 따른 복분자 함유 맥주의 뒷맛(After Taste) 관능평가

After Taste	<i>Rubus coreanus</i> Miq. (v/v)				
	0%	1%	3%	5%	7%
A1	5.20±0.22 ^a	6.37±0.23 ^b	7.64±0.27 ^c	7.52±0.26 ^c	7.81±0.14 ^c

1) a-c Means with the different letters are significantly different (p<0.05).

Table 3-22-2. 홍삼액 첨가에 따른 홍삼 함유 맥주의 뒷맛(After Taste) 관능평가

After Taste	<i>Panax ginseng</i> C. A. Meyer (Red Ginseng) (v/v)				
	0%	0.2%	0.4%	0.6%	0.8%
A1	5.20±0.22 ^a	6.37±0.10 ^b	6.60±0.25 ^b	6.53±0.13 ^b	6.55±0.10 ^b

a-b Means with the different letters are significantly different (p<0.05).

After Taste는 Carbonation(A1)이다. 각 특성 당 강도는 0-10점 척도로 평가되었다(0: 없음, 1-2: 약함, 3-4: 보통, 5-6: 강함, 7-8: 더 강함, 9-10: 매우 강함).

Table 3-22-1는 복분자 추출액 함유 맥주의 뒷맛 관능평가 결과이다. 관능검사 결과 Carbonation 항목을 나타내는 A1는 추출액 첨가량이 증가할수록 증가하는 양상을 보였다.

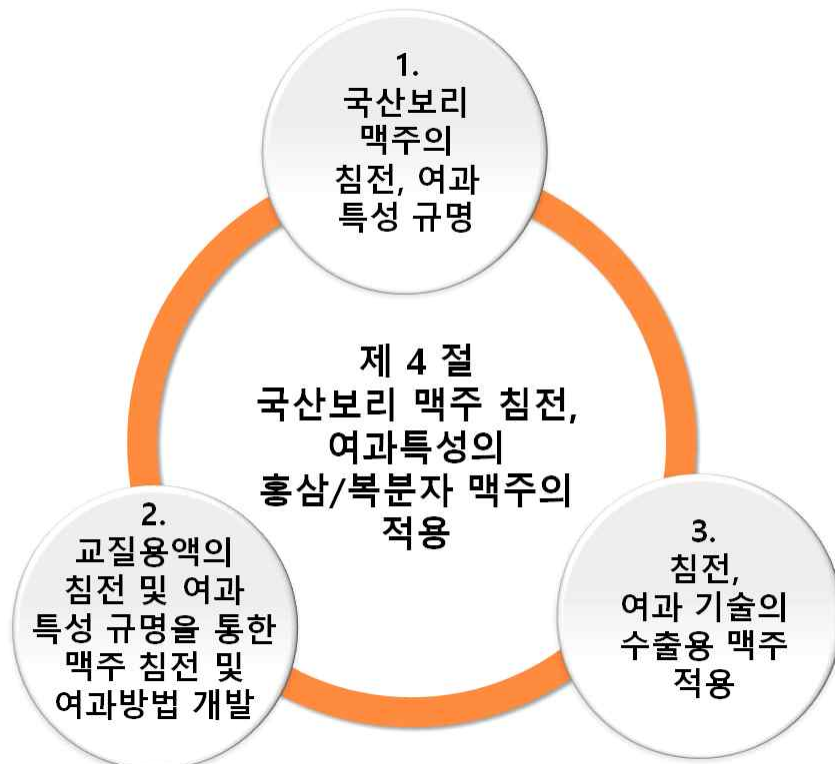
Table 3-22-2는 홍삼 추출액 함유 맥주의 뒷맛 관능평가 결과이다. 관능검사 결과 Carbonation 항목을 나타내는 A1는 Control과 비교하여 유의적 차이를 나타내었지만, 전체적인 농도 범위에서 크게 증가하지 않는 것을 확인하였다. 따라서 복분자/홍삼 추출액의 첨가가 맥주의 뒷맛을 일으키는 Carbonation의 맛에 영향을 미치는 것으로 판단하였다.

홍삼/복분자 추출액 함유 맥주의 기호도조사 결과 복분자 맥주는 첨가량이 3%일 때 가장 높았으며, 홍삼 맥주는 첨가량이 0.2%-0.4%일 때 가장 높은 것을 확인하였다. 관능평가와 기호도조사를 조합하여 분석한 결과 복분자 추출액 함유 맥주의 최적 첨가량 조건은 3%, 홍삼 추출액 함유 맥주의 최적 첨가량 조건은 0.2%로 판단하였다.

제 4 절 국산보리 맥주 침전, 여과특성의 홍삼/복분자 맥주의 적용

-국산보리 맥주의 침전, 여과 특성은 국산보리 맥아로부터 제조된 교질용액의 침전, 여과시간을 줄이는데 있으며, 침전, 여과시간의 감소는 맥아 교질용액의 점도와 가장 큰 상관관계를 가진다. 맥주 교질용액의 점도를 감소시킨다면, 큰 폭의 침전, 여과시간의 감소를 이끌어낼 수 있겠지만 맥아의 분해를 통한, 다음 단계인 발효에서 필요한, 당류의 증가는 필연적으로 점도의 증가로 연결되어 침전, 여과시간의 증가로 이어지게 된다. 따라서 서로 상반된 두 요소의 최적화가 맥주 제조현장에서 적용되어야만 한다. 국산보리 광맥 맥아와 더불어 수입 맥아인 펄스너 맥아에 대하여 맥주 교질용액의 점도를 중심으로 맥주 교질용액의 침전, 여과 특성을 규명하였다.

-이 특성들의 홍삼/복분자의 제조 기술에 최종 적용을 위하여 일반적인 맥주 제조방법에 더하여, 실험구로 맥아의 분해를 증진시킬 효소 처리했을 때의 침전, 여과 특성들과 보조여과제로 glass bead를 선택하여 맥주 교질용액의 점도에 미치는 영향들을 규명하였다. 또한 홍삼/복분자 맥주, 특히 홍삼맥주의 제조에 따른 생리적 활성연구를 통하여 홍삼맥주의 특성을 보여주었으며, 홍삼/복분자 맥주 제조 시 홍삼/복분자의 첨가시기를 가능한 바, 홍삼을 mashing과정에 첨가 시 발효 후 제성과정이 필요하며 복분자는 즙 형태로 발효가 완료된 후로 첨가하는 것이 안정적이었다.



1. 국산보리 맥주의 침전, 여과 특성 규명

가. 맥주 교질용액 중 공정에서 형성된 입자의 물성에 따른 침강특성 규명

(1) 요약

맥주 교질용액에서 용질의 크기는 여과에서도 보았듯이 무척 작다. 따라서 효율적으로 침강을 시키기 위해서는 침강시간을 획기적으로 줄일 수밖에 없고, 이를 위해서는 원심침강에 의한 분리방법을 쓸 수밖에 없으며 실제로 공장 단위의 맥주제조 현장에서도 원심침강 방법을 사용하고 있다.

(2) 재료 및 방법

(가) 재료

맥주 교질용액을 제조하기 위하여 2 종류의 맥아를 사용하였다. 하나는 수입된 필스너 타입의 맥아를 사용하였으며, 또 하나는 국립식량과학원 벼맥류부의 지원으로 2014년도에 전라북도 익산지역에서 수확된 맥주보리인 광맥을 맥아로 제조하여 사용하였다.

(나) 방법

① 제맥 방법

제맥은 Automatic Micromalting Systems (Phoenix Biosystems Co., Australia)을 이용하여 침맥(Steeping)과 발아(Germination), 배조(Kilning)의 3단계로 진행이 되었다. 침맥은 15℃에서 wet steeping과 dry steeping을 3회 반복하여 실시하였으며, germination은 16℃에서 총 5일간 보리를 발아시킨 후 제근하여 사용하였다. 배조는 처음 30분간 45℃를 유지한 후, 65℃까지 각 5℃의 온도 구간별 온도 증가속도를 점차 감소시킨 다음, 85℃까지는 온도 증가속도를 점차 크게 하여 제맥하였다. 제조된 맥아는 Drum mill (Malt Drum Mill, Jeil Industry Co.,Korea)을 이용하여 1 mm의 간극으로 분쇄하였다.

② 맥주의 점도

제조된 맥주의 점도는 Brookfield 점도계를 이용하여 각기 다른 rpm에서 겔보기 점도를 다음과 같이 계산하였다.

$$\eta = \frac{F'}{S} \quad (4-1)$$

$$F' = \frac{M}{2\pi R_b^2 L} \quad (4-2)$$

여기에서 M은 토크로써 673.7 dyne-cm이고, R_b 는 점도계에 사용된 spindle의 반지름으로써 1.884 cm, L은 spindle의 effective length로써 6.51 cm이다. 또한,

$$S = \frac{2\omega R_c^2 R_b^2}{x^2(R_c^2 - R_b^2)} \quad (4-3)$$

여기에서 ω 는 spindle의 각속도로써 radians/second로 나타내고 이는 $(2\pi/60)N$ 과 같고 N은 rpm을 나타낸다. Rb는 spindle의 반지름(cm)이고, Rc는 점도계 용기의 반지름으로써 4.35 cm, x는 실제 실험용 용기의 반지름으로써 3.8 cm이었다.

③ 맥주의 색도와 밀도

맥주의 색도는 Minolta 색차계로 측정하였으며, 맥주의 밀도는 맥주의 알코올 도수를 측정하여 계산하였다. 맥주의 알코올 함량은 약 4%로 측정되었으므로, 제조된 맥주의 물과 알코올을 제외한 다른 성분을 무시하고 다음 식으로 맥주의 밀도를 계산하였다.

$$\rho_{beer} = 0.96\rho_{water} + 0.04\rho_{alcohol} \quad (4-4)$$

④ 맥주의 침강 특성

입자들의 물성에 따른 침강 특성을 Stock의 법칙에 따라서 규명하고자 한다.

Stock의 법칙 :
$$v_t = \frac{D_p^2(\rho_p - \rho_f)}{18\mu} g \quad (4-5)$$

여기에서 D_p 는 입자의 직경(m), ρ_p 는 입자의 밀도(= 2500 kg/m³), ρ_f 는 맥주의 밀도(= 988.8 kg/m³), g 는 중력가속도(= 9.8 m/s²), μ 는 맥주의 점도이다.

(3) 결과

(가) 침강에서 맥주의 점도

제조된 맥주의 점도를 구하기 위하여 150, 200, 250 rpm에서의 겉보기 점도를 주어진 식 (4-1)로부터 (4-3)에 따라 계산하였으며 그 결과는 다음 표 4-1과 같다.

Table 4-1 Apparent viscosity of beer at different rpm of spindle of Viscometer

rpm	η (dyne/cm ²)
150	0.4887
200	0.3665
250	0.2932

표에서 보는 바와 같이 제조된 맥주의 겉보기 점도는 사용된 rpm의 크기가 증가함에 따라 감소하는 경향을 보였다. 따라서 외삽법으로 0 rpm에서의 점도로 제조된 맥주의 점도로 정하였으며, 그 값은 약 1.14 dyne/cm²이었다.

(나) 침강에서 맥주의 색도와 밀도

Minolta 색차계를 통하여 나타난 제조된 필스너 타입 맥주의 색도는 표 4-2와 같다.

Table 4-2 Chroma of beer made from pilsner type

L	a	b
101.72 ± 4.74	-1.56 ± 0.08	7.33 ± 0.25

제조된 맥주의 밀도는 25°C에서 물의 밀도가 997.08 kg/m³이고, 에탄올의 밀도가 790 kg/m³이므로 식 (4-4)에 따라 988.80 kg/m³이었다.

(다) 맥주의 침강 특성

여과박의 조쇄 입자들의 맥주 교질용액에서의 침강 특성을 규명하기 위하여 식 (4-5)의 Stock의 법칙을 적용하여 침강속도를 구하였으며, 이 침강속도에 따라 40 cm 길이의 mass cylinder에서의 침강 시간을 구한 결과는 표 4-3과 같다. 여기에서 ρ_p 는 입자의 밀도(= 2500 kg/m³), ρ_f 는 맥주의 밀도(= 988.8 kg/m³), g는 중력가속도(= 9.8 m/s²), μ 는 맥주의 점도(= 1.14 kg/ms)이다.

Table 4-3 Precipitation velocity of different particle size by Stock's law and their precipitation time

	Range 1	Range 2	Range 3	Range 4	Range 5
Average D_p (mm)	2.8065	1.4095	1.040	0.5995	0.1435
v_t (m/s)	0.0566	0.0141	0.0078	0.0026	0.0002
Precipitation time (sec)	7.0	28.4	51.3	153.8	2666.7

표 4-3에서 보듯이 맥주 용질의 크기별 침강속도는 용질의 크기가 작아질수록 기하급수적으로 낮아지고, 이에 비례해서 침강시간은 크게 증가할 수밖에 없다. 그럼에도 불구하고 맥주 교질용액에서 용질의 크기는 앞 절의 여과에서도 보았듯이 무척 작다. 따라서 효율적으로 침강을 시키기 위해서는 침강시간을 획기적으로 줄일 수밖에 없고, 이를 위해서는 원심침강에 의한 분리방법을 쓸 수밖에 없다. 실제로 공장 단위의 맥주제조 현장에서도 원심침강 방법을 사용하고 있다. 이를 위하여 2차 년도에는 현장에서의 원심침강 분리방법의 연구와 효소를 이용한 용질의 함량감소 방식을 병행하도록 하는 연구가 진행되도록 하겠다.

나. 입자의 물성에 따른 여과특성 규명

(1) 요약

맥주의 여과특성은 당화 후 발효에서 대부분의 불용성 고형물들은 제거되거나, 제거되지 않은 불용성 고형물의 양이 극히 적으므로 여과에서의 압력강하가 1/10 기압(1기압 = 1.013 x 10⁵ kPa) 정도에 불과하였다. 따라서, 발효와 숙성 단계에서 침강 후 여과에서 불용성 고형분에 의한 문제는 전혀 없다고 할 수 있다. 다만, 여과지로도 걸러지지 않은 미세 입자들과 수용성 고형분들이 살균 단계에서 불용화되면서 침전되는 문제점들은 예상할 수 있다. 이 문제점을 해결하기 위해서는 화학적 침전제의 사용(3세부 과제)이나 효소의 사용을 검토해야 완전히 해결될 것으로 보인다. 맥주 용질의 크기별 침강속도는 용질의 크기가 작아질수록 기하급수적으로 낮아지고, 이에 비례해서 침강시간은 크게 증가할 수밖에 없다.

(2) 재료 및 방법

(가) 재료

맥주 교질용액을 제조하기 위하여 2 종류의 맥아를 사용하였다. 하나는 수입된 필스너 타입의 맥아를 사용하였으며, 또 하나는 국립식량과학원 벼맥류부의 지원으로 2014년도에 전라북도 익산지역에서 수확된 맥주보리인 광맥을 맥아로 제조하여 사용하였다.

(나) 방법

① 제맥 방법

제맥은 Automatic Micromalting Systems (Phoenix Biosystems Co., Australia)을 이용하여 침맥(Steeping)과 발아(Germination), 배조(Kilning)의 3단계로 진행이 되었다. 침맥은 15℃에서 wet steeping과 dry steeping을 3회 반복하여 실시하였으며, germination은 16℃에서 총 5일간 보리를 발아시킨 후 제근하여 사용하였다. 배조는 처음 30분간 45℃를 유지한 후, 65℃까지 각 5℃의 온도 구간별 온도 증가속도를 점차 감소시킨 다음, 85℃까지는 온도 증가속도를 점차 크게 하여 제맥하였다. 제조된 맥아는 Drum mill (Malt Drum Mill, Jeil Industry Co.,Korea)을 이용하여 1 mm의 간극으로 분쇄하였다.

② 맥주의 여과특성과 여과막의 건조

여과에서 고체-액체 혼합물인 여료(slurry)는 여체(filter medium)와 여과막(filter cake)의 좁고 불규칙한 공극을 통과하여 흐르기 때문에 많은 저항을 받으며 그 결과 압력이 크게 강해진다. 따라서 여과는 이와 같은 압력 강하를 이겨내고 액이 흐를 수 있도록 하는 힘, 구동력(driving force)을 외부로부터 받아야 한다.

$$\text{압력강하 : } \Delta P = \frac{\mu}{A} \cdot \frac{dV}{dt} \left(\alpha \cdot \omega \cdot \frac{V}{A} + R_m \right) \quad (4-6)$$

$$\text{여과속도 : } \frac{dV}{dt} = A \cdot \frac{\Delta P}{\mu \left(\alpha \cdot \omega \cdot \frac{V}{A} + R_m \right)} \quad (4-7)$$

여기에서 ΔP 는 정용여과에서 압력강하, μ 는 맥주의 점도, A 는 여액이 통과하는 면적, V 는 여액량, t 는 여과시간, R_m 은 여체의 저항을 나타낸다. 또한 a 는 여과박의 저항계수, ω 는 단위 여액량을 얻을 때 형성된 여과박의 양(무게)이다.

제조된 맥주의 여과는 여료의 농도가 높지 않아서 압력의 강하가 크게 일어나지 않았다. 따라서 여과는 다른 구동력을 사용하지 않고 단순히 중력에 의지해서 진행되었다. 여과에는 Whatman filter paper No. 1을 사용하였으며, 여과의 종료 후 여과지 위에 쌓인 여과박은 건조기에서 105°C 건조법에 의해 건조되었다.

건조된 여과박은 조쇄한 뒤 진동체(JISICO, model RO-TAP)로 입자별로 분류하여 정확한 침강특성을 연구하기 위해 사용되었다.

(3) 결과

① 맥주의 여과특성과 여과박의 건조

제조된 맥주의 여과는 여료의 농도가 높지 않아 여과보조제의 도움 없이 Whatman 여과지 No.1에서 단순한 중력의 힘으로만 진행되었다. 식 (4-6)과 (4-7)을 통하여 압력강하와 여과 속도를 구하면, 식 (4-6)에서 여체에 의한 저항을 무시할 수 있으므로 여과기의 여과면적은 0.0095 m², 5 m³의 맥주를 여과하는데 30분이 소요되었으며, 이때의 압력강하가 약 2 kPa로 측정되었다. 따라서

$$\mu\alpha\omega = \frac{A^2 \cdot \Delta P \cdot t}{V^2} = \frac{(0.0095)^2 \cdot (2000) \cdot (30 \times 60)}{(5)^2} \approx 13.0 \text{ kg/m}^3 \cdot \text{s}$$

따라서 전체 맥주 80 m³을 여과하는데 6 시간 정도가 소요되므로, 전체적인 맥주 여과에서 압력강하는

$$\Delta P = \frac{(\mu\alpha\omega) \cdot V^2}{A^2 \cdot t} = \frac{(13.0) \cdot (80)^2}{(0.0095)^2 \cdot (6 \times 60 \times 60)} = 4.27 \times 10^4 \text{ kPa}$$

결론적으로 맥주의 여과특성은 당화 후 발효에서 대부분의 불용성 고형물들은 제거되거나, 제거되지 않은 불용성 고형물의 양이 극히 적으므로 여과에서의 압력강하가 1/10 기압(1기압 = 1.013 x 10⁵ kPa) 정도에 불과하였다. 따라서, 발효와 숙성 단계에서 침강 후 여과에서 불용성 고형분에 의한 문제는 전혀 없다고 할 수 있다. 다만, 여과지로도 걸러지지 않은 미세 입자들과 수용성 고형분들이 살균 단계에서 불용화되면서 침전되는 문제점들은 예상할 수 있다. 이 문제점을 해결하기 위해서는 화학적 침전제의 사용(3세부 과제)이나 효소의 사용을 검토해야 완전히 해결될 것으로 보인다.

여과를 통하여 얻어진 여과박은 입자의 크기에 따른 침강 속도를 구하기 위하여 건조기에서 105°C 건조법으로 건조한 다음 조쇄하여 Sieve Shaker로 분류하였다. 이 때 사용된 체의 종류는 No. 5, 10, 14, 18, 50이었다. 침강에 사용될 체별 입자의 크기는 두 체의 체 눈 크기의 평균으로 하였다. 따라서, 5번체는 통과하고 10번체를 통과하지 못한 입자의 크기는 5번체의 체 눈 크기인 3.962 mm와 10번체의 체 눈 크기인 1.651 mm의 평균인 2.801 mm로 정하였다

2. 교질용액의 침전 및 여과특성 규명을 통한 맥주 침전 및 여과방법 개발

가. 맥주 교질용액의 침강기 가동조건 개발

(1) 요약

측정된 맥주 교질용액들의 점도는 계산된 값에 비하여 더 낮은 수치를 보였으며, 특히 국산 광맥 맥아로 제조된 교질용액의 점도가 수입 펄스너 타입의 맥아로 제조한 교질용액의 점도보다 더 낮은 값을 보였다. 이는 광맥의 탄수화물 등의 함량이 수입맥아에 비하여 낮기 때문에 제조된 교질용액의 점도가 낮아지고 더욱 Newtonian 용액에 가까운 용액이 만들어지는 것으로 보인다.

공장에서 사용하는 탱크의 용량이 50 L이며, 직경은 2 m, 원심침강 배출구의 높이는 바닥으로부터 약 30 cm 위에 위치한 Whirlpool type의 원심침강 장치를 이용하여 침강시간을 측정한 결과 광맥 교질용액의 침강시간이 약 2시간 30분으로 펄스너 타입 수입맥아의 침강시간 약 2시간 45분에 비하여 조금 더 빠른 양상을 보였다.

(2) 재료 및 방법

(가) 재료

맥주 교질용액을 제조하기 위하여 2 종류의 맥아를 사용하였다. 하나는 수입된 펄스너 타입의 맥아를 사용하였으며, 또 하나는 국립식량과학원 벼맥류부의 지원으로 2014년도에 전라북도 익산지역에서 수확된 맥주보리인 광맥을 맥아로 제조하여 사용하였다.

(나) 방법

① 제맥 방법

제맥은 Automatic Micromalting Systems (Phoenix Biosystems Co., Australia)을 이용하여 침맥(Steeping)과 발아(Germination), 배조(Kilning)의 3단계로 진행이 되었다. 침맥은 15°C에서 wet steeping과 dry steeping을 3회 반복하여 실시하였으며, germination은 16°C에서 총 5일간 보리를 발아시킨 후 제근하여 사용하였다. 배조는 처음 30분간 45°C를 유지한 후, 65°C까지 각 5°C의 온도 구간별 온도 증가속도를 점차 감소시킨 다음, 85°C까지는 온도 증가속도를 점차 크게 하여 제맥하였다. 제조된 맥아는 Drum mill (Malt Drum Mill, Jeil Industry Co.,Korea)을 이용하여 1 mm의 간극으로 분쇄하였다.

② 맥주의 점도

제조된 맥주의 점도는 Brookfield 점도계를 이용하여 각기 다른 rpm에서 겔보기 점도를 다음과 같이 계산하였다.

$$\eta = \frac{F'}{S} \quad (4-1)$$

$$F' = \frac{M}{2\pi R_b^2 L} \quad (4-2)$$

여기에서 M은 토크로써 673.7 dyne-cm이고, R_b 는 점도계에 사용된 spindle의 반지름으로써 1.884 cm, L은 spindle의 effective length로써 6.51 cm이다. 또한,

$$S = \frac{2\omega R_c^2 R_b^2}{x^2 (R_c^2 - R_b^2)} \quad (4-3)$$

여기에서 ω 는 spindle의 각속도로써 radians/second로 나타내고 이는 $(2\pi/60)N$ 과 같고 N은 rpm을 나타낸다. R_b 는 spindle의 반지름(cm)이고, R_c 는 점도계 용기의 반지름으로써 4.35 cm, x는 실제 실험용 용기의 반지름으로써 3.8 cm이었다.

③ 맥주의 색도와 밀도

맥주의 색도는 Minolta 색차계로 측정하였으며, 맥주의 밀도는 맥주의 알코올 도수를 측정하여 계산하였다. 맥주의 알코올 함량은 약 4%로 측정되었으므로, 제조된 맥주의 물과 알코올을 제외한 다른 성분을 무시하고 다음 식으로 맥주의 밀도를 계산하였다.

$$\rho_{beer} = 0.96 \rho_{water} + 0.04 \rho_{alcohol} \quad (4-4)$$

④ 맥주의 침강 특성

입자들의 물성에 따른 침강 특성을 Stock의 법칙에 따라서 규명하고자 한다.

$$\text{Stock의 법칙 : } v_t = \frac{D_p^2 (\rho_p - \rho_f)}{18\mu} g \quad (4-5)$$

여기에서 D_p 는 입자의 직경(m), ρ_p 는 입자의 밀도(= 2500 kg/m³), ρ_f 는 맥주의 밀도(= 988.8 kg/m³), g는 중력가속도(= 9.8 m/s²), μ 는 맥주의 점도이다.

(3) 결과

(가) 교질 용액의 물성변화 모니터링

① 교질용액의 점도 변화

제조된 맥주 교질용액의 점도를 구하기 위하여 150, 200, 250 rpm에서의 겉보기 점도를 주어진 식 (4-1)로부터 (4-3)에 따라 계산하였으며 그 결과는 다음 표 4-4와 같다. 또한 필스너 타입의 수입 맥아와 국산보리인 광맥으로 만든 맥아로 맥주 교질용액을 제조하여 Brookfield 점도계로 측정한 150, 200, 250 rpm에서 측정한 점도를 함께 표시하였다.

Table 4-4 Apparent viscosity of beer at different rpm of spindle of Viscometer

rpm	Calculated η (dyne/cm ²)	Imported malt - Pilsner type	Korean barley malt - GwangMac
150	0.4887	0.432 ± 0.017	0.418 ± 0.018
200	0.3665	0.346 ± 0.011	0.344 ± 0.013
250	0.2932	0.281 ± 0.037	0.285 ± 0.015

표에서 보는 바와 같이 제조된 맥주의 겉보기 점도는 사용된 rpm의 크기가 증가함에 따라 감소하는 경향을 보였다. 따라서 외삽법으로 0 rpm에서의 점도로 제조된 맥주의 점도로 정하였으며, 그 값은 약 1.14 dyne/cm²이었다. 또한 측정된 맥주 교질용액들의 점도는 계산된 값에 비하여 더 낮은 수치를 보였으며, 특히 국산 광맥 맥아로 제조된 교질용액의 점도가 수입 필스너 타입의 맥아로 제조한 교질용액의 점도보다 더 낮은 값을 보였다. 이는 광맥의 탄수화물 등의 함량이 수입맥아에 비하여 낮기 때문에 제조된 교질용액의 점도가 낮아지고 더욱 Newtonian 용액에 가까운 용액이 만들어지는 것으로 보인다. 하지만 표 4-4에서 보여지는 각 rpm에서의 점도들이 유의적 차이를 보이지는 않았다.

② 교질용액의 색도와 밀도

Minolta 색차계를 통하여 나타난 제조된 필스너 타입과 국산보리 광맥으로 제조된 맥주 교질용액의 색도는 표 4-5와 같다.

Table 4-5 Chroma of beer made from imported pilsner type and Korean GwangMac malts

Malt type	L	a	b
Imported pilsner	101.72 ± 4.74	-1.56 ± 0.08	7.33 ± 0.25
Korean GwangMac	94.71 ± 1.87	-1.71 ± 0.10	9.99 ± 0.04

표에서 보듯이 서로 다른 맥아로 제조된 맥주 교질용액의 색도는, 전체적인 색이 겉으로 보기에는 황금색에 가까운 맥주 색임에도 불구하고, 약간의 차이를 보였다. L 값은 필스너 타입 교질용액이 101.72이고 광맥 교질용액이 94.71로 필스너 타입 교질용액이 좀 더 밝은 색을 보이고 있으며, a 값은 필스너 타입은 -1.56인 반면에 광맥이 -1.71로 광맥 교질용액에서 초록색이 더 크게 나타난 반면에 b 값은 필스너 타입이 7.33이고 광맥이 9.99로써 광맥 교질용액의 노란색이 더 진한 것을 알 수 있었다.

제조된 맥주의 밀도는 25°C에서 물의 밀도가 997.08 kg/m³이고, 에탄올의 밀도가 790 kg/m³이므로 식 (4-4)에 따라 988.80 kg/m³이었다.

(나) 중규모 탱크에서의 가동조건 개발

① 교질용액의 침강 특성

교질용액에서의 침강 특성을 규명하기 위하여 식 (4-5)의 Stock의 법칙을 적용하여 침강속도를 구하였으며, 이 침강속도에 따라 40 cm 길이의 mass cylinder에서의 침강 시간을 구한 결과는 표 4-6과 같다. 여기에서 ρ_p 는 입자의 밀도(= 2500 kg/m³), ρ_f 는 맥주의 밀도(= 988.8 kg/m³), g는 중력가속도(= 9.8 m/s²), μ 는 맥주의 점도(= 1.14 kg/ms)이다.

Table 4-6 Precipitation velocity of different particle size by Stock's law and their precipitation time

	Range 1	Range 2	Range 3	Range 4	Range 5
Average D _p (mm)	2.8065	1.4095	1.040	0.5995	0.1435
v _t (m/s)	0.0566	0.0141	0.0078	0.0026	0.0002
Precipitation time (sec)	7.0	28.4	51.3	153.8	2666.7

표 4-6에서 보듯이 맥주 용질의 크기별 침강속도는 용질의 크기가 작아질수록 기하급수적으로 낮아지고, 이에 비례해서 침강시간은 크게 증가할 수밖에 없다. 그럼에도 불구하고 맥주 교질용액에서 용질의 크기는 무척 작기 때문에 효율적으로 침강을 시키기 위해서는 침강시간을 획기적으로 줄일 수밖에 없고, 이를 위해서는 원심침강에 의한 분리방법을 쓸 수밖에 없다. 실제로 공장 단위의 맥주제조 현장에서도 원심침강 방법을 사용하고 있다.

따라서 공장에서 사용하는 Whirlpool type의 원심침강 장치를 이용하여 침강시간을 측정된 결과 광맥 교질용액의 침강시간이 약 2시간 30분으로 펄스너 타입 수입맥아의 침강시간 약 2시간 45분에 비하여 조금 더 빠른 양상을 보였다. 이 때 원심침강장치를 사용한 탱크의 용량은 50 L이며, 직경은 2 m, 원심침강 배출구의 높이는 바닥으로부터 약 30 cm 위에 위치하였다.

나. 교질용액에 대한 여과기 가동조건 개발

(1) 요약

광맥으로 제조된 교질용액은 수입 맥아로 만든 교질용액에 비하여 당도는 낮고, 가용성 단백질 함량은 높다. 즉 국산보리로 만든 맥아의 교질용액의 물성은 수입 맥아 교질용액에 비하여 제맥적성이 더 낮음을 보여 주었다. 따라서 여과시간을 단축하기 위하여 3 가지 서로 다른 효소로 처리하여 실험한 결과 광맥으로 제조한 교질용액의 경우 효소 C의 사용이 가장 유리한 것으로 보인다. 그러나 펄스너 타입의 수입 맥아로 제조하는 교질용액의 제맥적성은 효소 B가 가장 적합하였다.

일반적으로 광맥 맥아로 제조된 맥주 교질용액에 효소를 처리할 경우 효소 A나 C로 처리할 때 효소 B를 처리한 교질용액의 겔보기 점도에 비하여 비교적 낮은 수치를 보이므로 효소 A나 효소 C를 사용하는 것이 바람직하다고 생각된다.

효소 B를 처리한 맥즙의 여과속도는 효소를 처리하지 않은 무처리구에 비해 크게 증가하지 않았으며, 오히려 사용된 효소 농도가 증가할수록 여과속도도 정체 내지는 증가하는 경향을 보였다. 이는 맥아즙의 많은 분해가 이루어지면서 콜로이드 상의 미세구조가 파괴되면서 죽(paste)처럼 물리적 변화가 이루어지고, 이러한 물리적 변화가 원활한 여과를 가로막는 작용을 했다고 볼 수 있다. 이를 해결하기 위해서는 glass beads와 같은 보조여체를 사용하는 것이 효과적으로 보인다.

(2) 재료 및 방법

(가) 재료

맥주 교질용액을 제조하기 위하여 2 종류의 맥아를 사용하였다. 하나는 수입된 필스너 타입의 맥아를 사용하였으며, 또 하나는 국립식량과학원 벼맥류부의 지원으로 2014년도에 전라북도 익산지역에서 수확된 맥주보리인 광맥을 맥아로 제조하여 사용하였다.

(나) 방법

① 제맥 방법

제맥은 Automatic Micromalting Systems (Phoenix Biosystems Co., Australia)을 이용하여 침맥(Steeping)과 발아(Germination), 배조(Kilning)의 3단계로 진행이 되었다. 침맥은 15℃에서 wet steeping과 dry steeping을 3회 반복하여 실시하였으며, germination은 16℃에서 총 5일간 보리를 발아시킨 후 체근하여 사용하였다. 배조는 처음 30분간 45℃를 유지한 후, 65℃까지 각 5℃의 온도 구간별 온도 증가속도를 점차 감소시킨 다음, 85℃까지는 온도 증가속도를 점차 크게 하여 제맥하였다. 제조된 맥아는 Drum mill (Malt Drum Mill, Jeil Industry Co.,Korea)을 이용하여 1 mm의 간극으로 분쇄하였다.

② 맥주의 여과특성과 여과막의 건조

여과에서 고체-액체 혼합물인 여료(slurry)는 여체(filter medium)와 여과막(filter cake)의 좁고 불규칙한 공극을 통과하여 흐르기 때문에 많은 저항을 받으며 그 결과 압력이 크게 강해진다. 따라서 여과는 이와 같은 압력 강하를 이겨내고 액이 흐를 수 있도록 하는 힘, 구동력(driving force)을 외부로부터 받아야 한다.

$$\text{압력강하 : } \Delta P = \frac{\mu}{A} \cdot \frac{dV}{dt} \left(\alpha \cdot \omega \cdot \frac{V}{A} + R_m \right) \quad (4-6)$$

$$\text{여과속도 : } \frac{dV}{dt} = A \cdot \frac{\Delta P}{\mu \left(\alpha \cdot \omega \cdot \frac{V}{A} + R_m \right)} \quad (4-7)$$

여기에서 ΔP 는 정용여과에서 압력강하, μ 는 맥주의 점도, A 는 여액이 통과하는 면적, V 는 여액량, t 는 여과시간, R_m 은 여체의 저항을 나타낸다. 또한 α 는 여과막의 저항계수, ω 는 단위 여액량을 얻을 때 형성된 여과막의 양(무게)이다.

③ 맥주 교질용액 분석방법

맥주 교질용액의 평가를 위한 실험을 위해 색도, 추출률, 가용성 단백질 함량, 효소력 측정 방법은 ASBC법을 따랐고, 당도, 밀도 실험 방법은 AOAC법에 의하여 분석하였다.

㉠ 교질용액의 색도

맥주 교질용액의 색도는 Minolta Color & Color Difference Meter(Tokyo, Japan)를 이용하여 L, a, b 값을 측정하였다.

㉡ 추출률

비중계를 이용하여 측정한 맥주 교질용액의 비중으로부터 추출률을 다음 식으로 계산하였다.

$$\text{추출률, as-is (\%)} = \{P (M + 800)\} / (100 - P) \quad (4-8)$$

식에서 P = 맥즙의 추출률 (% , Plato)

M = 맥아의 수분 함량 (%)

800 = 당화 시 맥아 100 g에 사용된 증류수 량

㉢ 가용성 단백질

Kjeldahl 방법에 의해 얻어진 회귀값을 이용하여 215 nm와 225 nm에서 측정된 흡광도 값으로 가용성 단백질 함량을 구하는 분광광도계법을 사용하였다. 즉, 가용성 단백질 함량(%)은

$$\text{가용성 단백질(\%)} = a + b(A_{215} - A_{225}) \quad (4-9)$$

식에서 a = 회귀식의 y 절편

b = 회귀식의 기울기 값

㉣ 효소력가

맥아 추출액을 일정량의 전분용액에 가한 후 일정시간 반응시켰을 때 β-amylase가 전분을 maltose로 분해시킨 후 남아있는 전분량을 요오드 용액으로 발색시켜 0.1N thiosulphate 용액으로 무색이 될 때까지 적정함으로써 당화력을 측정한다.

$$\text{효소력가, as-is (W.K)} = (B - S) \times \text{factor} \quad (4-10)$$

$$\text{효소력가, dry basis (W.K)} = (D \times 100)/(100 - M) \quad (4-11)$$

식에서 B = blank에 소비된 0.1N thiosulphate 용액량(mL),

S = sample에 소비된 0.1N thiosulphate 용액량(mL),

D = 효소력가, as-is (W.K), M = 맥아의 수분함량 (%)

(3) 결과

(가) 여과기 가동조건

앞에서도 언급했듯이 맥주 교질용액의 여과는 교질용질의 크기에 따라 여과시간이 좌우되며 용질의 크기가 작을수록 시간이 오래 걸리게 된다. 이를 극복하기 위하여 교질용액을 구성하는 전분질의 크기를 작게 잘라서 여과시간을 줄일 수 있으므로 효소를 이용하기로 하였다. 효소 이용의 효과를 검증하기 위하여 우선 국산보리인 광맥 맥아로 제조한 맥주 교질용액과 수입맥아로 만든 맥주 교질용액의 성질을 분석하여 비교하였으며, 그 결과는 다음 표 4-7과 같다.

Table 4-7 Properties of mashed malts made from Korean GwangMac and imported Pilsner

	Colorness	S u g a r contents (%)	Density	Extraction yield (dry, %)	Soluble protein content (%)	Enzyme activity (W.K.)
GwangMac	6.2	7.9	1.0317	63.4	3.06	4.6
Pilsner	4.0	8.3	1.0331	66.2	2.96	5.5

표에서 보듯이 광맥으로 제조된 교질용액은 수입 맥아로 만든 교질용액에 비하여 당도는 낮고, 가용성 단백질 함량은 높다. 이는 국산 보리가 가지는 태생적 한계로 외국산 보리에 비해 전분 함량이 낮으며, 조직이 더 단단한 데 비하여 맥주 제조에는 불리한 단백질 함량이 낮은 보리의 특성이 교질용액에서도 똑같이 보여주고 있다. 또한 국산보리가 훨씬 더 단단하기 때문에 교질용액으로의 추출률도 63.4%로 수입 맥아 교질용액의 66.2%에 비해 낮았으며, 효소력이 역시 광맥이 4.6인데 비하여 수입맥아 교질용액은 5.5로 훨씬 낮았다. 결국 국산보리로 만든 맥아의 교질용액의 물성은 수입 맥아 교질용액에 비하여 제맥적성이 더 낮음을 보여 주었다.

(나) 효소를 이용한 가동조건 확립

① 효소 처리에 따른 교질용액의 특성 변화

여과시간을 단축하기 위하여 3 가지 서로 다른 효소로 처리하여 실험하였다. 이들은 β -glucanase를 중심으로 서로 다른 효소를 섞은 후, 각각 효소 A(α -amylase + β -glucanase), 효소 B(amyloglucosidase + β -glucanase), 효소 C(β -glucanase)로 명명하여 사용하였다. 각각의 효소 A, B, C에 대하여 서로 다른 농도로 효소를 조제하고 국산 광맥 맥아 및 수입 맥아로 제조한 맥주 교질용액에 섞은 후 교질용액의 물성을 분석하여 비교하였다.

Table 4-8 Property changes of GwangMac malt after using 3 different enzyme mixtures

	Colorne ss	S u g a r c o n t e n t s (%)	Density	Extraction yield (dry, %)	S o l u b l e p r o t e i n c o n t e n t (%)	E n z y m e a c t i v i t y (W.K.)
GwangMac	6.2	7.9	1.0317	63.4	3.06	4.6
+ A 0.1%	7.7	8.4	1.0336	69.2	4.57	2.4
+ A 0.5%	7.1	8.6	1.0346	67.2	5.87	3.4
+ A 1.0%	6.3	7.4	1.0295	59.0	5.09	3.9
+ B 0.1%	5.5	5.6	1.0226	45.2	2.42	6.8
+ B 0.5%	7.3	7.5	1.0299	59.8	2.92	3.9
+ B 1.0%	6.5	9.4	1.0377	75.4	3.54	1.5
+ C 0.1%	6.2	7.4	1.0295	59.0	3.08	9.4
+ C 0.5%	4.2	6.9	1.0275	55.0	2.75	6.5
+ C 1.0%	3.2	6.4	1.0258	51.6	2.43	6.2

위 표에서 보듯이 당도는 효소 A와 C는 사용되는 효소 농도가 증가함에 따라 감소하는 경향을 보인 반면에 효소 B만이 효소 농도가 증가함에 따라 당도도 증가하였다. 추출률 또한 이와 유사한 경향을 보임을 알 수 있다. 즉, 발효에 사용될 포도당의 농도가 증가했다고 할 수 있으므로 발효가 원활하게 이루어져서 알코올 농도를 조절하는데 유리할 것이다. 수용성 단백질의 농도는 효소 A와 B는 사용되는 효소 농도가 증가함에 따라 증가하는 반면에 효소 C의 경우에만 효소 농도 증가에 따라 수용성 단백질 농도가 감소하였다. 단백질 농도의 증가는 일반적으로 맥주 발효에 좋은 영향을 미치지 않으므로 가능하면 단백질 농도는 낮은 것이 유리하다. 효소력가의 경우 효소 B와 C는 사용되는 효소 농도가 증가함에 따라 0.1% 농도에서 최고치를 보이고 점차 감소하는 경향을 보였으며, 효소 C의 경우에는 효소 농도가 1.0%까지 증가하여도 감소된 효소력가의 값은 효소를 사용하지 않았을 때보다 훨씬 높았다. 반면에 효소 A는 효소 농도가 증가함에 따라 효소력가도 증가하였으나 1.0%의 효소력가의 값이 효소를 사용하지 않았을 때의 효소력가를 넘어서지는 못했다. 전체적으로 판단하면, 광맥으로 제조한 교질용액의 경우 효소 C의 사용이 가장 유리한 것으로 보인다.

Table 4-9 Property changes of imported Pilsner malt after using 3 different enzyme mixtures

	Colornes s	S u g a r c o n t e n t s (%)	Density	Extraction yield (dry, %)	S o l u b l e p r o t e i n c o n t e n t (%)	E n z y m e a c t i v i t y (W.K.)
Pilsner	4.0	8.3	1.0331	66.2	2.96	5.5
+ A 0.1%	5.2	8.4	1.0334	66.8	4.04	0.3
+ A 0.5%	5.0	8.6	1.0342	68.4	4.47	3.2
+ A 1.0%	7.3	10.8	1.0430	86.0	5.12	2.4
+ B 0.1%	6.4	9.1	1.0363	72.6	3.30	2.2
+ B 0.5%	4.7	9.0	1.0360	72.0	3.40	10.6
+ B 1.0%	4.4	7.9	1.0315	63.0	2.83	25.3
+ C 0.1%	2.9	7.2	1.0287	57.4	2.68	19.3
+ C 0.5%	3.2	7.3	1.0293	58.6	2.90	16.9
+ C 1.0%	4.1	6.9	1.0277	60.4	3.05	13.0

필스너 타입의 수입 맥아로 제조한 맥주 교질용액에 있어서, 당도는 효소 B와 C는 효소농도가 증가함에 따라 감소하는 경향을 보인 반면에 효소 A는 효소 농도 증가에 따라 당도도 증가하는 경향을 보였다. 추출률 또한 이와 유사한 경향을 보여주었다. 수용성 단백질의 농도는 효소 A와 C에서 사용되는 효소의 농도가 증가함에 따라 증가하는 경향을 보인 반면에 효소 B는 효소 농도의 증가에 따라 수용성 단백질의 농도가 감소하는 경향을 보였다. 효소력가의 경우, 효소 A와 B는 효소 농도가 증가함에 따라 효소력가가 증가하였으며, 특히 효소 B의 효소력가 증가가 크게 이루어졌다. 이에 반해 효소 C는 효소 농도 증가에 따라 효소력가가 감소하는 경향을 보여주었다. 전체적으로는 필스너 타입의 수입 맥아로 제조하는 교질용액의 제맥적성은 효소 B가 가장 적합하였다.

② 효소 처리에 따른 교질용액의 점도 변화

각각의 효소 A, B, C에 대하여 서로 다른 농도로 효소를 조제하고 국산 광맥 맥아 및 수입 맥아로 제조한 맥주 교질용액에 섞은 후 교질용액의 점도를 측정하였다. 표 4-10은 광맥 맥아로 제조된 맥주 교질용액에 효소를 처리했을 때 겉보기 점도의 변화를 보여주고 있으며 표 4-11은 수입 맥아로 제조된 맥주 교질용액에 효소를 처리했을 때 겉보기 점도의 변화를 나타낸다. 사용된 효소의 양은 맥주 교질용액의 제조에 사용된 맥아의 무게에 대한 백분율(w/w)로 적용하였다.

Table 4-10 Apparent viscosity of Korean barley GwangMac malt in accordance with different enzyme concentrations

Enzyme \ RPM		150	200	250
Control (0%)		0.418 ± 0.018	0.344 ± 0.013	0.285 ± 0.015
A	0.1%	0.189 ± 0.077	0.318 ± 0.054	0.113 ± 0.006
	0.5%	0.184 ± 0.032	0.343 ± 0.037	0.107 ± 0.012
	1.0%	0.127 ± 0.017	0.282 ± 0.052	0.171 ± 0.038
B	0.1%	0.237 ± 0.034	0.422 ± 0.034	0.181 ± 0.009
	0.5%	0.190 ± 0.044	0.458 ± 0.037	0.152 ± 0.011
	1.0%	0.226 ± 0.031	0.389 ± 0.015	0.150 ± 0.030
C	0.1%	0.183 ± 0.045	0.380 ± 0.036	0.152 ± 0.042
	0.5%	0.161 ± 0.017	0.378 ± 0.035	0.143 ± 0.030
	1.0%	0.144 ± 0.028	0.379 ± 0.040	0.118 ± 0.036

일반적으로 광맥 맥아로 제조된 맥주 교질용액에 효소를 처리할 경우 겔보기 점도는 200 rpm에서 최대값을 보이는 역 V자 형을 보여주었다. 또한 대체적으로 효소 처리 교질용액의 겔보기 점도가 효소 무처리 교질용액의 겔보기 점도에 비해서 낮아짐을 알 수 있었다. 다만 200 rpm에서는 오히려 무처리 교질용액의 겔보기 점도보다 높아지는 경향을 보였는데 이는 효소 처리에 의해서 콜로이드 상의 용액이 분해되면서 낮은 겔보기 점도를 보일 것이란 예측을 벗어나는 수치이다. 이에 대해서는 추가적인 실험을 통해서 밝혀내야 할 것으로 보인다. 종합적으로는 효소 A나 C로 처리할 때 효소 B를 처리한 교질용액의 겔보기 점도에 비하여 비교적 낮은 수치를 보이므로 효소 A나 효소 C를 사용하는 것이 바람직하다고 생각된다.

Table 4-11 Apparent viscosity of imported Pilsner malt in accordance with different enzyme concentrations

Enzyme \ RPM		150	200	250
Control (0%)		0.432 ± 0.017	0.346 ± 0.011	0.281 ± 0.037
A	0.1%	0.228 ± 0.022	0.295 ± 0.029	0.122 ± 0.055
	0.5%	0.238 ± 0.038	0.315 ± 0.004	0.113 ± 0.012
	1.0%	0.211 ± 0.004	0.306 ± 0.010	0.168 ± 0.043
B	0.1%	0.244 ± 0.017	0.293 ± 0.016	0.107 ± 0.022
	0.5%	0.225 ± 0.042	0.277 ± 0.053	0.151 ± 0.016
	1.0%	0.193 ± 0.025	0.305 ± 0.009	0.155 ± 0.049
C	0.1%	0.174 ± 0.039	0.361 ± 0.096	0.139 ± 0.039
	0.5%	0.203 ± 0.057	0.395 ± 0.082	0.155 ± 0.030
	1.0%	0.162 ± 0.021	0.295 ± 0.005	0.144 ± 0.031

수입 맥아를 이용하여 제조된 맥주 교질용액에 효소를 처리하였을 경우, 무처리 교질용액의 겔보기 점도에 비하여 겔보기 점도가 낮아짐을 확인할 수 있었으며 이는 광맥 맥아 제조 교질용액에서와 비슷한 역 V자 형의 값을 나타내었다. 다만 모든 처리구에서의 겔보기 점도가 무처리 교질용액의 겔보기 점도보다 크지 않은 점이 광맥에서와의 차이점이었다. 효소 처리 시, 수입 맥아 교질용액의 겔보기 점도도 200 rpm에서 가장 높은 값을 보였기 때문에 이에 대한 검증 작업이 필요할 것으로 보인다. 종합적으로는 효소 C가 효소 A나 B에 비하여 훨씬 낮은 겔보기 점도값을 보이므로 효소 C의 사용이 바람직할 것으로 보인다.

③ 효소 처리에 따른 교질용액의 색도 변화

국산 광맥으로 만든 맥아를 이용한 교질용액에 효소를 처리하였을 때의 색도 변화를 표 4-12에 나타내었으며, 수입 펄스너 타입 맥아로 제조된 교질용액에 효소를 처리하였을 때의 색도 변화를 표 4-13에 나타냈다.

Table 4-12 Chroma of Korean barley GwangMac malt in accordance with different enzyme concentrations

Enzyme		L	a	b
Control (0%)		94.71 ± 1.87	-1.71 ± 0.10	9.99 ± 0.04
A	0.1%	88.43 ± 0.03	-0.19 ± 0.05	5.12 ± 0.01
	0.5%	85.06 ± 0.03	-0.19 ± 0.05	6.48 ± 0.02
	1.0%	81.74 ± 0.01	-0.04 ± 0.03	6.20 ± 0.01
B	0.1%	83.69 ± 0.05	0.11 ± 0.02	6.90 ± 0.03
	0.5%	82.99 ± 0.04	0.06 ± 0.03	7.56 ± 0.01
	1.0%	82.71 ± 0.13	0.06 ± 0.01	7.84 ± 0.00
C	0.1%	90.76 ± 0.11	-0.32 ± 0.06	6.58 ± 0.02
	0.5%	90.55 ± 0.05	-0.34 ± 0.06	7.16 ± 0.06
	1.0%	87.59 ± 0.22	-0.25 ± 0.02	7.94 ± 0.05

광맥으로 제조한 교질용액에 효소를 처리할 경우 일반적으로 L 값(lightness)은 감소하여 더 짙은 색을 내는 반면에, a 값(redness)은 증가하여 더 붉은 색을 내고 b 값(yellowness)은 감소하여 노란 색은 감소하는 경향을 보였으며, 같은 효소에서는 효소 농도가 증가할수록 이 경향은 좀 더 뚜렷하게 나타났다. 이는 효소 농도의 증가는 콜로이드 상의 거대 분자의 분해가 이루어짐을 의미하며, 분해 후 작은 분자들의 입자가 적층되면서 빛의 투과를 방해하여 밝은 색은 감소한 것으로 보인다. 아울러 적색과 황색의 변화 역시 효소에 의한 거대 분자의 분해와 포도당이나 맥아당 함량의 증가로 나타나는 변화로 이해된다.

Table 4-13 Chroma of imported Pilsner malt in accordance with different enzyme concentrations

Enzyme		L	a	b
Control (0%)		101.72 ± 4.74	-1.56 ± 0.08	7.33 ± 0.25
A	0.1%	84.36 ± 0.03	0.18 ± 0.03	5.70 ± 0.03
	0.5%	79.70 ± 0.14	0.11 ± 0.01	6.89 ± 0.18
	1.0%	84.61 ± 0.25	0.15 ± 0.02	6.08 ± 0.01
B	0.1%	64.87 ± 0.03	-0.24 ± 0.03	4.11 ± 0.01
	0.5%	62.17 ± 0.12	-0.29 ± 0.03	4.28 ± 0.03
	1.0%	53.18 ± 0.10	-0.41 ± 0.05	4.37 ± 0.00
C	0.1%	78.44 ± 0.01	-0.16 ± 0.04	6.62 ± 0.01
	0.5%	91.14 ± 0.02	-0.18 ± 0.02	4.91 ± 0.11
	1.0%	87.92 ± 0.07	-0.10 ± 0.02	5.89 ± 0.02

수입 맥아로 제조된 교질용액에 효소를 처리할 경우, 광맥 맥아의 교질용액에서 보였던 색의 변화가 같은 양상으로 보여주고 있다. 다만 국산 맥아의 교질용액에서보다 L 값의 감소와 b 값의 증가가 더 크게 나타난 반면에 a 값의 증가는 광맥 맥아의 교질용액에 비해 증가폭이 더 작았다. 또한 효소별 차이가 국산 맥아의 교질용액에서 보다 더욱 크게 나타남을 알 수 있었는데, 변화량이 가장 큰 것은 효소 B의 처리에서 보여주고 있다.

(다) 효소 이용에 따른 가동조건 최적화 적용

① 효소 처리에 따른 교질용액의 여과 시간

맥주공장에서 여과는 침강과 발효에 있어 지대한 영향을 미치는 공정이다. 또한 여과시간의 축소는 전체 공정에 드는 비용을 크게 줄일 수 있는 요소 중의 하나이다. 일반적으로 맥아를 분쇄하고 맥즙을 만드는 여과공정은 비용을 줄이기 위해서 단순히 중력에 의한 여과 방식을 선택하고 있으므로, 이를 보조하면서 여과시간을 단축하기 위하여 효소처리를 선택하였다. (2)번 항목에서와 같이 서로 다른 효소제재 3 가지를 선택하여 이들이 여과시간에 미치는 영향을 알아보았다. 국산 광맥으로 제조된 맥아의 여과시간은 표 4-14에 표시하였으며, 이와 비교하기 위하여 수입맥아 필스너 타입 맥아의 여과시간은 표 4-16에 나타내었다.

Table 4-14 Filtration time of Korean barley GwangMac malt in accordance with different enzyme concentrations

Enzyme		Filtration time	Cake weight (g)
Control (0%)		2 hr 30 min	22.2
A	0.1%	2 hr 10 min	23.3
	0.5%	2 hr	21.9
	1.0%	2 hr	20.6
B	0.1%	2 hr 35 min	19.4
	0.5%	2 hr 20 min	18.6
	1.0%	2 hr 25 min	18.7
C	0.1%	2 hr 10 min	20.9
	0.5%	2 hr	20.6
	1.0%	1 hr 55 min	19.8

광맥 맥아로부터 제조된 맥즙에 각기 다른 효소를 첨가하고 여과했을 때, 효소의 종류에 따라 서로 다른 결과를 보여주었다. 일반적으로는 같은 효소에서 첨가량이 증가함에 따라 여과 시간은 감소하는 경향을 보였다. 여과 후에 남은 여과박의 무게는 맥즙이 효소에 의해 얼마나 많이 분해되었는지를 나타낸다고 할 수 있는데, 여과박의 무게가 가장 크게 감소한 것은 효소 B이다. 그럼에도 불구하고 효소 B를 처리한 맥즙의 여과속도는 효소를 처리하지 않은 무처리구에 비해 크게 증가하지 않았으며, 오히려 사용된 효소 농도가 증가할수록 여과속도도 정체 내지는 증가하는 경향을 보였다. 이는 맥아즙의 많은 분해가 이루어지면서 콜로이드상의 미세구조가 파괴되면서 죽(paste)처럼 물리적 변화가 이루어지고, 이러한 물리적 변화가 원활한 여과를 가로막는 작용을 했다고 볼 수 있다. 효소 A나 C도 고농도의 효소 처리에서 많은 분해가 이루어졌음에도 불구하고 효율적인 여과가 이루어지지 않았음을 짐작할 수 있는 결과이다. 따라서 효소를 사용하여 여과시간을 감소시키는 것은 물리적 변화에 의해 크게 영향을 받을 수 있었을 것으로 보이며 이를 해결하기 위해서는 glass beads와 같은 보조여제를 사용하는 것이 효과적으로 보인다. 주어진 조건에서 효소의 사용은 효소 C가 가장 안정적으로 여과시간을 줄일 수 있을 것으로 보인다.

Table 4-15 Filtration time of imported Pilsner malt in accordance with different enzyme concentrations

Enzyme		Filtration time	Cake weight (g)
Control (0%)		2 hr 45 min	26.3
A	0.1%	2 hr 30 min	22.5
	0.5%	2 hr 25 min	22.3
	1.0%	2 hr 15 min	21.9
B	0.1%	2 hr 25 min	18.9
	0.5%	2 hr 30 min	16.7
	1.0%	2 hr 20 min	18.6
C	0.1%	2 hr 30 min	20.5
	0.5%	2 hr 35 min	22.3
	1.0%	2 hr 30 min	21.6

수입 맥아를 이용하여 제조된 맥즙의 경우에도 광맥으로 제조된 맥즙의 여과와 유사한 패턴을 보이고 있다. 사용된 각각의 효소는 효소 농도가 증가함에 따라 분해 정도와 여과시간의 감소가 이루어짐을 알 수 있었다. 역시 분해되는 정도는 효소 B가 가장 크게 분해를 시키는 것으로 나타났으며, 그럼에도 불구하고 여과시간의 감소는 다른 효소와 비교해서 큰 차이가 나지 않았다. 효소 A와 C는 분해 정도나 여과시간에서 유사한 결과를 보여주었으며, 여과시간은 오히려 효소 A의 사용이 가장 단축효과가 높았다.

3. 침전, 여과 기술의 수출용 맥주 적용

가. 홍삼맥주 교질용액의 유효성분 분석

(1) 요약

일반적으로 홍삼맥주의 생리활성은 홍삼맥주 10%군에 비해 2.5% 및 5%군의 저농도 첨가군에서 알코올분해효소 등의 알코올과 관련된 효소활성을 정상군으로 거의 회복시키는 기능과 더불어 간기능지표 효소활성에 있어서 특히 5%투여군에서 간장보호 활성이 있을 것으로 추정되며 항비만효과도 함께 관찰되었다.

(2) 재료 및 방법

(가) 재료

① 맥주 교질용액 실험 재료

맥주 교질용액을 제조하기 위하여 2 종류의 맥아를 사용하였다. 하나는 수입된 펄스너 타입의 맥아를 사용하였으며, 또 하나는 국립식량과학원 벼맥류부의 지원으로 2014년도에 전라북

도 익산지역에서 수확된 맥주보리인 광맥을 맥아로 제조하여 사용하였다.

② 생리활성 실험 재료

시약으로서는 GOT, GPT, γ -GTP assay kit는 아산제약, ethanol, ADH(alcohol dehydrogenase), ALDH(aldehyde dehydrogenase) assay kit 시약은 abcam 社를 사용하였으며, Oil red O는 Sigma 제품을 사용하였다. 기기는 microplate reader(Molecular Device, VERSAmax)를 사용하였다.

③ 실험동물 및 처치

실험에 사용한 동물은 생후 4주령된 ICR 생쥐 (18±2g, ♂)를 (주)샘타코에서 구입하여 사용하였으며, 온도 22±2℃, 습도 55±10%, light/dark 12시간의 사육조건에서 일주일동안 적응시킨 후 사용하였고 고형사료를 자유로이 섭취시켰다. 실험군은 대조군과 실험군으로 크게 나누고, 표 1과 같이 맥주 시료를 4주간 음용시켰으며, 실험동물은 처치 전 절식시켰다. 생쥐를 희생시켜 심장채혈 하여 혈청을 분리한 다음, 혈청 중 6가지 (GOT, GPT, γ -GTP, Ethanol, ADH, ALDH) 성분을 분석하였다. 양성대조군으로는 시판맥주를 사용하였다.

Table 4-16 Identification of Samples

구분	시료	개체수
Control-	증류수	n=6
Control+	시판 맥주	n=6
0%	홍삼맥주 0%	n=6
2.5%	홍삼맥주 2.5%	n=6
5.0%	홍삼맥주 5%	n=6
10.0%	홍삼맥주 10%	n=6

(나) 방법

① 제맥 방법

제맥은 Automatic Micromalting Systems (Phoenix Biosystems Co., Australia)을 이용하여 침맥(Steeping)과 발아(Germination), 배조(Kilning)의 3단계로 진행이 되었다. 침맥은 15℃에서 wet steeping과 dry steeping을 3회 반복하여 실시하였으며, germination은 16℃에서 총 5일간 보리를 발아시킨 후 제근하여 사용하였다. 배조는 처음 30분간 45℃를 유지한 후, 65℃까지 각 5℃의 온도 구간별 온도 증가속도를 점차 감소시킨 다음, 85℃까지는 온도 증가속도를 점차 크게 하여 제맥하였다. 제조된 맥아는 Drum mill (Malt Drum Mill, Jeil Industry Co.,Korea)을 이용하여 1 mm의 간극으로 분쇄하였다.

② 생리활성 실험 방법

㉠ 혈중 GOT, GPT 측정

혈청 내 GOT, GPT 측정은 Reitman-Frankel법을 이용하여 측정하였으며, GOT는 L-아스

파라긴산, α-케토글루탈산을, GPT,는 DL-알라닌, α-케토글루탈산을 기질로 사용하였다. 각각의 기질 1mL을 37°C에서 5분간 반응시킨 후 혈청 0.2mL을 잘 혼합하여 37°C에서 GOT는 60분, GPT는 30분간 반응시키고 2,4-디니트로 페닐 히드라진을 1mL 혼합하여 실온에서 20분간 방치 후 0.4N NaOH를 10mL넣어 10분간 실온에서 방치 후 505nm에서 측정하였다. 표준물질로는 피루빈산 리튬을 사용하였다.

㉔ 혈중 γ-GTP 측정

혈청 내 γ-GTP는 5-아미노 살리실산법을 이용하여 측정하였으며, γ-글루타밀-3-카르복실-4-하이드록시 아니리드와 트리스 아미노메탄을 혼합한 용액 1mL를 37°C에 5분간 방치 후 각 혈청 20μL를 잘 혼합하여 37°C에서 20분간 반응하고 p-카시레놀과 메타과요드산 나트륨 혼합액을 3mL넣어 실온에서 10분간 방치 후 635nm에서 측정한다. 표준물질로는 5-아미노 살리실산을 사용하였다.

㉕ 혈중 Ethanol 농도 측정

혈청 내 Ethanol는 96well plate에 10배 희석한 혈청 30μL를 assay buffer 20μL와 reaction mix 50μL(ethanol assay buffer 48μL, ethanol enzyme mix 2μL)를 잘 혼합하여 37°C에서 차광하에 30분간 반응하여 microplate reader를 사용하여 570nm에서 측정하였다. 표준물질은 순수한 에탄올 표준품을 사용하였다.

에탄올의 농도는 다음과 같은 식을 이용해서 구하였다.

$$\text{concentration of EtOH} = Sa/Sv(\text{nmol}/\mu\text{L or mM}) \quad (4-12)$$

Sa : sample amount frome the standard curve (nmol)

Sv : sample volume added into the sample well (μL)

㉖ 혈중 ADH 활성 측정

ADH활성은 혈청 20μL와 assay buffer 30μL, reaction mix 100μL(ADH assay buffer 82μL, developer 8μL, isopropanol 10uL)와 잘 혼합하여, 37°C에서 3분간 반응시킨 후 450nm에서 측정(A0)하고, 그 이후에 37°C에서 추가 30분에서 2시간동안 5분마다 450nm에서 측정한다 (A1).

표준물질로는 NADH를 사용하였다.

ADH 활성은 다음과 같은 공식을 이용해서 구하였다.

$$\text{ADH activity} = \frac{B}{\Delta T \times V} \times \text{Sample Dilution Factor} = \text{nmol}/\text{min}/\text{mL} = \text{mU}/\text{mL}$$

(4-13)

B : The HADH amount generated by ADH(nmol)

T : The time of reaction(min)

V : The sample volume added into the reaction well(mL)

㉓ 혈중 ALDH 활성 측정

ALDH활성은 혈청 20μL에 assay buffer 30μL, reaction mix 50μL(ALDH assay buffer 43μL, ALDH substrate mix 2μL, acetaldehyde 5μL)를 잘 혼합하여 실온에서 5분간 방치한 후 450nm에서 측정한다(A1). 그 후 20분에서 60분 동안 매 3분마다 450nm에서 측정한다(A2), 표준물질로는 NADH를 사용하였다.

ALDH 활성은 다음과 같은 공식을 이용해서 구하였다.

$$\text{ADH activity} = \frac{B}{(\Delta T \times V)} \times \text{Dilution Factor} = \text{nmol/min/mL} = \text{mU/mL}$$

(4-14)

B : The amount of NADH generated by sample (nmol)

T : The reaction time (min)

V : The sample volume used into the reaction well (mL)

㉔ Oil red O 염색에 의한 간조직 내 지질입자의 조직학적 변화 관찰

실험이 종료된 후 각 군의 간장 조직을 절취하여 Bouin's solution과 20% sucrose 용액에 하룻밤 담구어 고정된 후 냉동절편기로 20μm의 두께로 절단한 후 free floating method를 이용하여 Oil red O 염색을 시행하여 간조직 내 지질입자의 조직학적 변화를 관찰하여 항비만효과를 관찰하였다.

(3) 결과

(가) 홍삼 추출 조건에 따른 홍삼맥주에서 ginsenoside 함량

맥아에 첨가되는 홍삼의 양과 조건에 따른 진세노사이드의 함량 변화는 다음 표 4-17과 같다. 첨가되는 홍삼의 양은 맥아의 중량 대비 첨가되는 중량의 백분율을 의미하며, 끓이는 시간도 1 내지 3시간으로 하여 맥즙을 만들고 발효시켜 제조한 홍삼맥주에 함유된 진세노사이드의 양을 진안의 홍삼연구소에 의뢰하여 분석하였다.

Table 4-17 Ginsenoside concentration in the different ratio to malt and boiling time

Added amount of red ginseng (% , w/w)	Boiling time (hr)	Rg1 (mg/g)
5	1	0.50
	2	0.89
	3	1.13
10	1	0.50
	2	1.08
	3	1.22
15	1	1.06
	2	1.41
	3	1.71

상기 표에서 보여주듯이 홍삼맥주에 함유된 진세노사이드의 함량은 첨가되는 홍삼의 양이 많을수록 증가하였으며, 같은 홍삼의 양에서는 끓이는 시간이 길수록 증가하는 것을 보여주

었다. 정확한 진세노사이드 함량은 같은 조건에서도 큰 차이를 보여주었다. 이는 홍삼의 단단한 조직이 끓일 때 물러지는 정도와 원래 지니고 있던 홍삼의 진세노사이드 함량 차이 그리고 발효까지 손실되는 양의 차이가 매번 달라지기 때문에 어느 값으로 특정할 수는 없었다. 따라서 제품의 품질 일관성을 위해서는 홍삼맥주 숙성 후 제성 과정을 두고 홍삼 열수 추출물을 혼합하여 일정 값으로 유지시킬 수밖에 없다.

(나) 홍삼맥주의 생리활성

① 혈중 ethanol 농도에 미치는 효과

4주간 각각의 시료를 음용한 생쥐의 혈청 내 ethanol농도를 측정된 결과, 투여한 각 군간에 유의적인 변화는 관찰되지 않았으나 홍삼맥주 2.5%를 투여한 군에서 타 군에 비해 ethanol 농도가 약간 저하되는 경향을 나타내었다(그림 4-1).

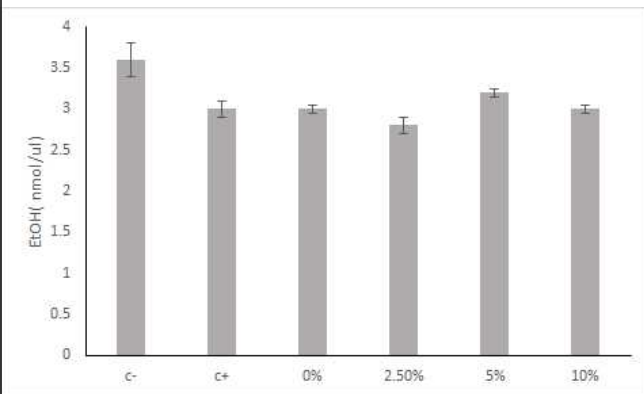


Fig. 4-1. Ethanol concentration in the rat serum

② 혈중 ALDH 활성에 미치는 효과

생쥐 혈청 내 aldehyde dehydrogenase(ALDH) 활성을 측정된 결과, 양성대조군인 시판맥주(Control+)투여군에 비하여 홍삼맥주 2.5, 5.0 및 10.0% 투여군에서 농도의존적으로 혈중 ALDH 활성이 감소되는 경향이 있었다(그림 4-2). 이러한 결과는 상기의 ADH 활성 결과와는 상반되는 결과를 나타내었으며, 추후 재확인이 필요한 것으로 사료된다.

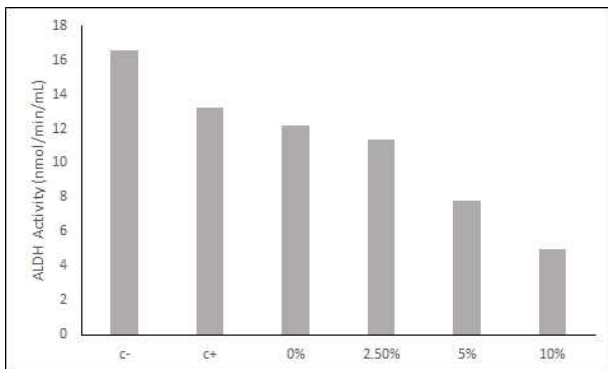


Fig. 4-2. ALDH activity in the rat serum

③ 혈중 GOT 활성에 미치는 효과

혈청 내 GOT 활성을 측정한 결과, 특히 2.5%, 5% 홍삼맥주 투여군에서 다른 맥주 투여군에 비해 유의적으로 감소되었다(그림 4-3).

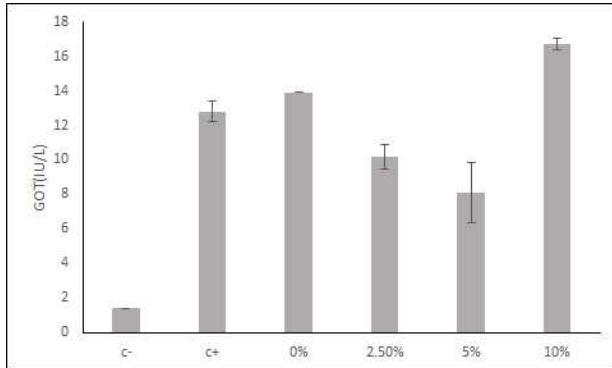


Fig. 4-3. GOT activity in the rat serum

④ 혈중 GPT 활성에 미치는 효과

혈청 내 GPT 활성에 있어서는 시판맥주 (Control+) 및 0%, 10%군에서 현저하게 증가하였으나, 홍삼맥주 2.5 및 5% 투여군에서 유의적으로 감소되는 효과를 나타내었다(그림 4-4).

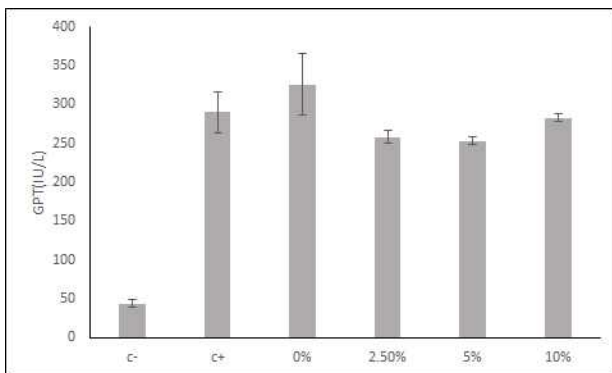


Fig. 4-4. GPT activity in the rat serum

⑤ 혈중 γ -GTP 활성에 미치는 효과

혈청 중 γ -GTP 활성은 0% 홍삼맥주 음용군에서 타군에 비해 증가하였으나 2.5%, 5% 및 10.0%의 홍삼맥주 음용군에서 정상군(Control-)과 유사하게 감소되었다(그림 4-5.)

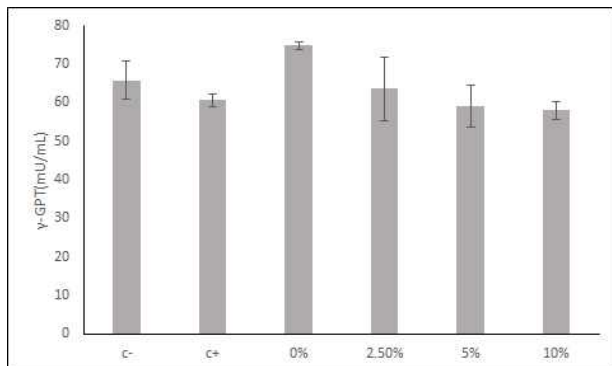


Fig. 4-5 γ -GTP activity in the rat serum

⑥ 간 소엽의 지질입자에 미치는 효과

생쥐 간소엽 세포내 Oil red O에 염색된 지질입자의 분포는 정상군(Control-)에 비해 전반적으로 모든 군에서 증가하였고 지질입자의 크기로 증가하였다. 그 중에서 5% 홍삼맥주 투여군이 다른 군에 비해 지질입자의 크기가 감소하였고, 분포도 미약하게 나타났다. 이러한 결과는 홍삼맥주 특히 5%투여군에서 지방과립을 억제하는 효과가 있음을 확인하는 결과라 해석할 수 있다(그림 4-6.)

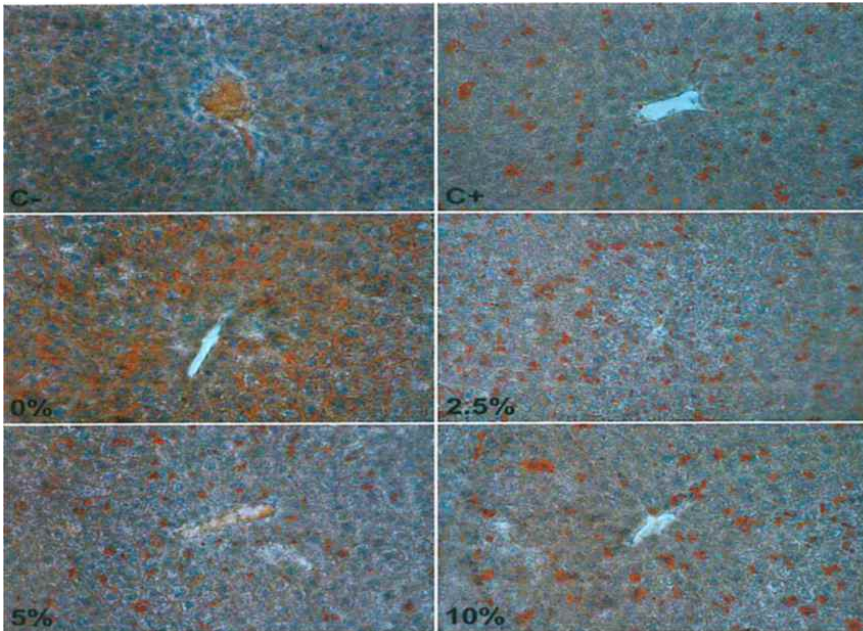


Fig. 4-6. Effect to lipid particles in the rat liver cell (x200)

Control-: Normal group

Control+: Commercial beer

0%: red ginseng 0% beer

2.5%: red ginseng 2.5% beer

5%: red ginseng 5% beer

10%: red ginseng 10% beer

이상의 연구결과, 전반적으로 홍삼맥주 10%군에 비해 2.5% 및 5%군의 저농도 첨가군에서 알코올분해효소 등의 알코올과 관련된 효소활성을 정상군으로 거의 회복시키는 기능과 더불어 간기능지표 효소활성에 있어서 특히 5%투여군에서 간장보호 활성이 있을 것으로 추정되며 항비만효과도 함께 관찰되었다.

나. 맥주 교질용액의 원심분리 및 여과

(1) 요약

같은 크기의 glass bead 지름에서 glass bead 사용량에 따른 점도의 변화를 살펴보면 일반적으로 glass bead의 사용량이 0 g에서 15 g으로 증가함에 따라 효소 A나 B에서와 마찬가지로 점도의 크기 또한 증가함을 알 수 있다. 이는 증가한 glass bead 사용량이 더 큰 glass bead 사이의 공극 부피를 제공함에 따라 paste(죽) 상태의 압축으로 여과를 방해하는 현상을 줄여주는 것으로 보인다.

(2) 재료 및 방법

(가) 재료

① 맥주 교질용액 실험 재료

맥주 교질용액을 제조하기 위하여 2 종류의 맥아를 사용하였다. 하나는 수입된 필스너 타입의 맥아를 사용하였으며, 또 하나는 국립식량과학원 벼맥류부의 지원으로 2014년도에 전라북도 익산지역에서 수확된 맥주보리인 광맥을 맥아로 제조하여 사용하였다.

(나) 방법

① 제맥 방법

제맥은 Automatic Micromalting Systems (Phoenix Biosystems Co., Australia)을 이용하여 침맥(Steeping)과 발아(Germination), 배조(Kilning)의 3단계로 진행이 되었다. 침맥은 15°C에서 wet steeping과 dry steeping을 3회 반복하여 실시하였으며, germination은 16°C에서 총 5일간 보리를 발아시킨 후 체근하여 사용하였다. 배조는 처음 30분간 45°C를 유지한 후, 65°C까지 각 5°C의 온도 구간별 온도 증가속도를 점차 감소시킨 다음, 85°C까지는 온도 증가속도를 점차 크게 하여 제맥하였다. 제조된 맥아는 Drum mill (Malt Drum Mill, Jeil Industry Co.,Korea)을 이용하여 1 mm의 간극으로 분쇄하였다.

② 맥주의 점도

제조된 맥주의 점도는 Brookfield 점도계를 이용하여 각기 다른 rpm에서 겉보기 점도를 다음과 같이 계산하였다.

$$\eta = \frac{F'}{S} \quad (4-1)$$

$$F' = \frac{M}{2\pi R_b^2 L} \quad (4-2)$$

여기에서 M은 토크로써 673.7 dyne-cm이고, R_b 는 점도계에 사용된 spindle의 반지름으로써 1.884 cm, L은 spindle의 effective length로써 6.51 cm이다. 또한,

$$S = \frac{2\omega R_c^2 R_b^2}{x^2(R_c^2 - R_b^2)} \quad (4-3)$$

여기에서 ω 는 spindle의 각속도로써 radians/second로 나타내고 이는 $(2\pi/60)N$ 과 같고 N은 rpm을 나타낸다. R_b 는 spindle의 반지름(cm)이고, R_c 는 점도계 용기의 반지름으로써 4.35

cm, x는 실제 실험용 용기의 반지름으로써 3.8 cm이었다.

구해진 각 rpm에서 겉보기 점도는 rpm 대 겉보기 점도의 기울기를 구하고 단위 환산을 통하여 각 교질용액의 점도를 계산하였다.

(3) 결과

(가) 맥주 교질용액의 여과조건 완성

① 효소 처리 및 보조여과제 사용에 따른 교질용액의 점도 변화 - 광맥

맥주 교질용액의 여과는 교질용질의 크기에 따라 여과시간이 좌우되며 용질의 크기가 작을수록 시간이 오래 걸리게 된다. 이를 극복하기 위하여 교질용액을 구성하는 전분질의 크기를 작게 잘라서 여과시간을 줄일 수 있으므로 효소를 이용한 바가 있다. 그러나 일반적으로 점도의 경우는 효소 처리에 의해서 콜로이드 상의 용액이 분해되면서 낮은 점도를 보이는 반면에 여과에서는 낮은 점도로 인한 호상 형태(죽과 같은 형태)로 여과 시간을 느리게 하는 단점을 보였다. 따라서 앞선 연구에서 밝혔듯이 효소 처리에 의해 교질용액의 조성에서 높은 당도를 유지하면서 여과시간을 감소시키기 위하여 보조여과제로써 glass bead를 사용하였다.

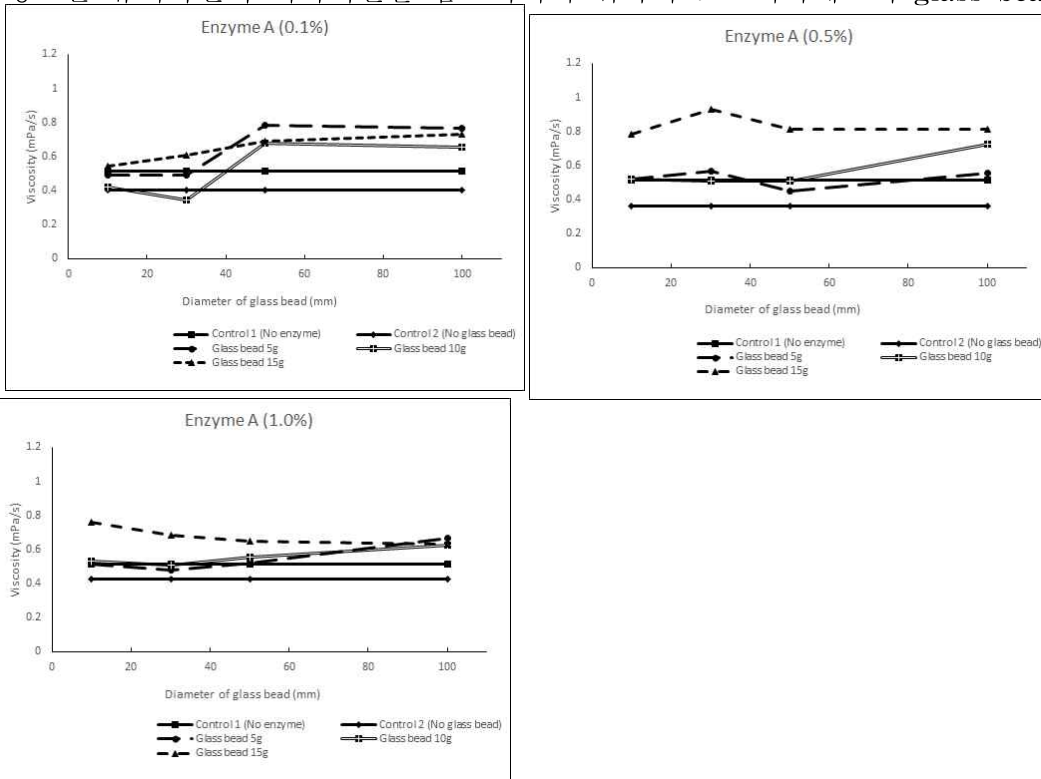


Fig. 4-8. Effect of amount and size of glass beads on the viscosity in the mash (GwangMac) filtration with the treatment of enzyme A.

여과 후 효소 무처리 대조구1의 점도가 0.517 mPa/s였으며, 효소 처리 후 glass bead를 사용하지 않은 대조구2의 점도가 0.36 내지 0.42 mPa/s이었던 것에 비하면 여과보조제로 galss bead를 사용한 대부분의 실험구들의 점도는 대조구2의 점도에 비하여 증가함을 알 수 있었다. 이는 여과보조제로 사용한 glass bead의 공극 사이로 효소에 의해 충분히 분해된 광맥 보리의 포도당, 맥아당 등의 저분자 당류들이 통과함으로써 점도가 증가하는 것으로 보인다. 다만 효소 A의 경우 사용된 각 효소의 농도에서 0.1%는 glass bead의 지름이 커질수록 점도가 증가하는 경향을 보인 반면에 15 g의 glass bead를 사용했을 때 0.5%와 1.0%의 농도

에서는 glass bead의 지름이 증가함에 따라 점도가 감소하는 경향을 보인다. 이는 여과보조제의 공극의 부피가 커짐에 따라 오히려 공극 사이에 들어가는 분해물질의 성상이 죽처럼 달라붙어서 여과를 방해하는 것으로 보인다.

또한 같은 크기의 glass bead 지름에서 glass bead 사용량에 따른 점도의 변화를 살펴보면 일반적으로 glass bead의 사용량이 0 g에서 15 g으로 증가함에 따라 점도의 크기 또한 증가함을 알 수 있다. 이는 증가한 glass bead 사용량이 더 큰 glass bead 사이의 공극 부피를 제공함에 따라 paste(죽) 상태의 압축으로 여과를 방해하는 현상을 줄여주는 것으로 보인다.

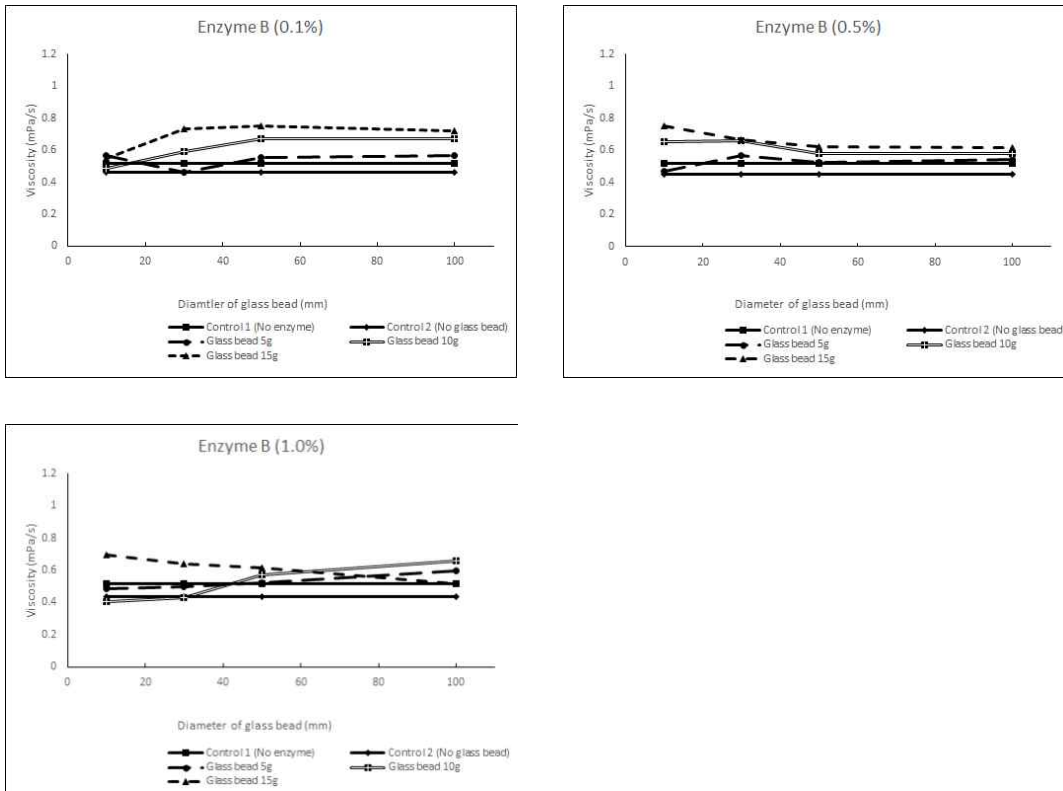


Fig. 4-9. Effect of amount and size of glass beads on the viscosity in the mash (GwangMac) filtration with the treatment of enzyme B.

효소 B의 경우에도 여과보조제로 glass bead를 사용한 대부분의 실험구들의 점도는 대조구 2의 점도에 비하여 증가하였으나 효소 A에 비해 증가 폭은 크지 않았다. 이는 효소 A와 마찬가지로 여과보조제로 사용한 glass bead의 공극 사이로 효소에 의해 충분히 분해된 광맥 보리의 포도당, 맥아당 등의 저분자 당류들이 통과함으로써 점도가 증가함을 알 수 있었다. 다만 효소 B의 경우 사용된 각 효소의 농도에서 5 g 또는 10 g의 glass bead를 사용했을 때는 glass bead의 지름이 커질수록 점도가 증가하는 경향을 보인 반면에 15 g의 glass bead를 사용했을 때는 특히 0.5%와 1.0%의 농도에서는 glass bead의 지름이 증가함에 따라 점도가 감소하는 경향을 보인다. 이는 여과보조제의 공극의 부피가 커짐에 따라 오히려 공극 사이에 들어가는 분해물질의 성상이 죽처럼 달라붙어서 여과를 방해하는 것으로 보인다.

또한 같은 크기의 glass bead 지름에서 glass bead 사용량에 따른 점도의 변화를 살펴보면

일반적으로 glass bead의 사용량이 0 g에서 15 g으로 증가함에 따라 효소 A에서와 마찬가지로 점도의 크기 또한 증가함을 알 수 있다. 이는 증가한 glass bead 사용량이 더 큰 glass bead 사이의 공극 부피를 제공함에 따라 paste(죽) 상태의 압축으로 여과를 방해하는 현상을 줄여주는 것으로 보인다.

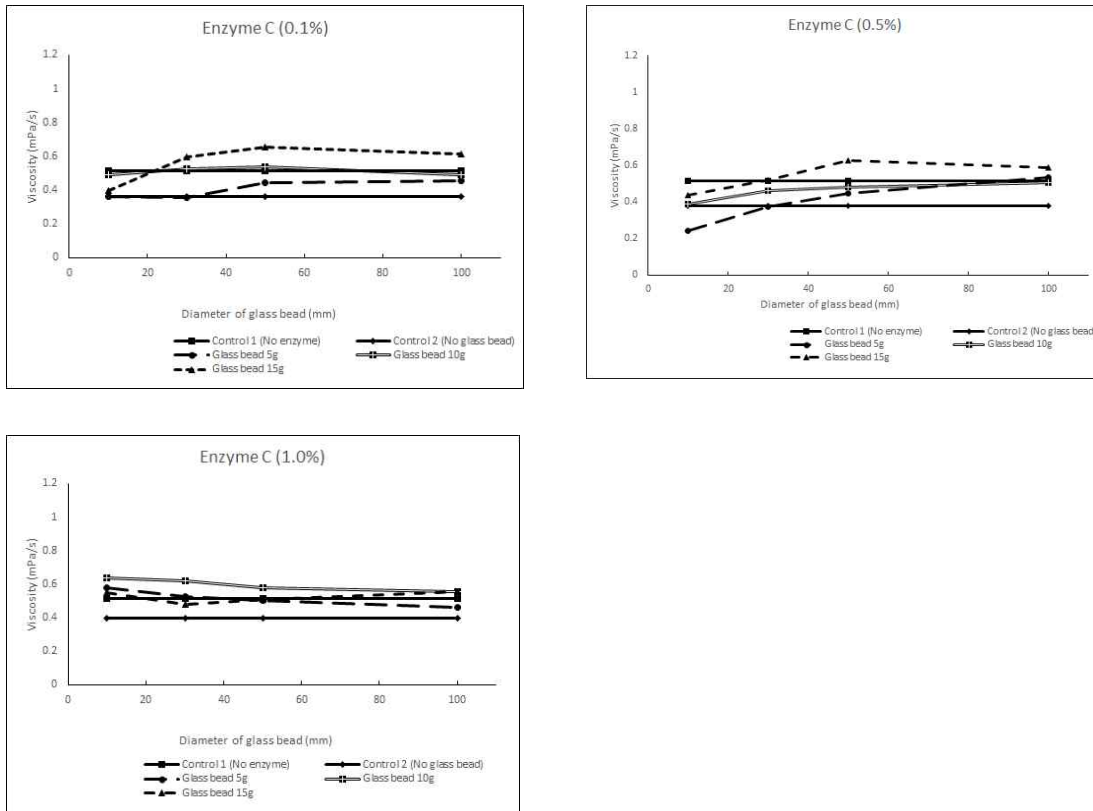


Fig. 4-10. Effect of amount and size of glass beads on the viscosity in the mash (GwangMac) filtration with the treatment of enzyme C.

효소 C의 경우에도 여과보조제로 glass bead를 사용한 대부분의 실험구들의 점도는 대조구 2의 점도에 비하여 증가하였으나 효소 A나 효소 B의 경우와는 다르게 glass bead 지름 10과 30 mm에서는 오히려 대조구2의 점도보다 감소하는 경우도 있었다. 이는 효소 A나 B와 마찬가지로 여과보조제로 사용한 glass bead의 공극 사이로 효소에 의해 충분히 분해된 광맥 보리의 포도당, 맥아당 등의 저분자 당류들이 통과함으로써 점도가 증가함을 알 수 있었다. 다만 효소 C의 경우 사용된 각 효소의 농도에서 5 g 또는 10 g의 glass bead를 사용했을 때는 glass bead의 지름이 커질수록 점도가 증가하는 경향을 보인 반면에 15 g의 glass bead를 사용했을 때는 특히 0.5%와 1.0%의 농도에서는 glass bead의 지름이 증가함에 따라 점도가 크게 증가했다가 감소하는 경향을 보인다. 이는 여과보조제의 공극의 부피가 커짐에 따라 오히려 공극 사이에 들어가는 분해물질의 성상이 죽처럼 달라붙어서 여과를 방해하는 것으로 보인다.

또한 같은 크기의 glass bead 지름에서 glass bead 사용량에 따른 점도의 변화를 살펴보면 일반적으로 glass bead의 사용량이 0 g에서 15 g으로 증가함에 따라 효소 A나 B에서와 마

찬가지로 점도의 크기 또한 증가함을 알 수 있다. 이는 증가한 glass bead 사용량이 더 큰 glass bead 사이의 공극 부피를 제공함에 따라 paste(죽) 상태의 압축으로 여과를 방해하는 현상을 줄여주는 것으로 보인다.

② 효소 처리 및 보조여과제 사용에 따른 교질용액의 점도 변화 - 수입맥 필스너

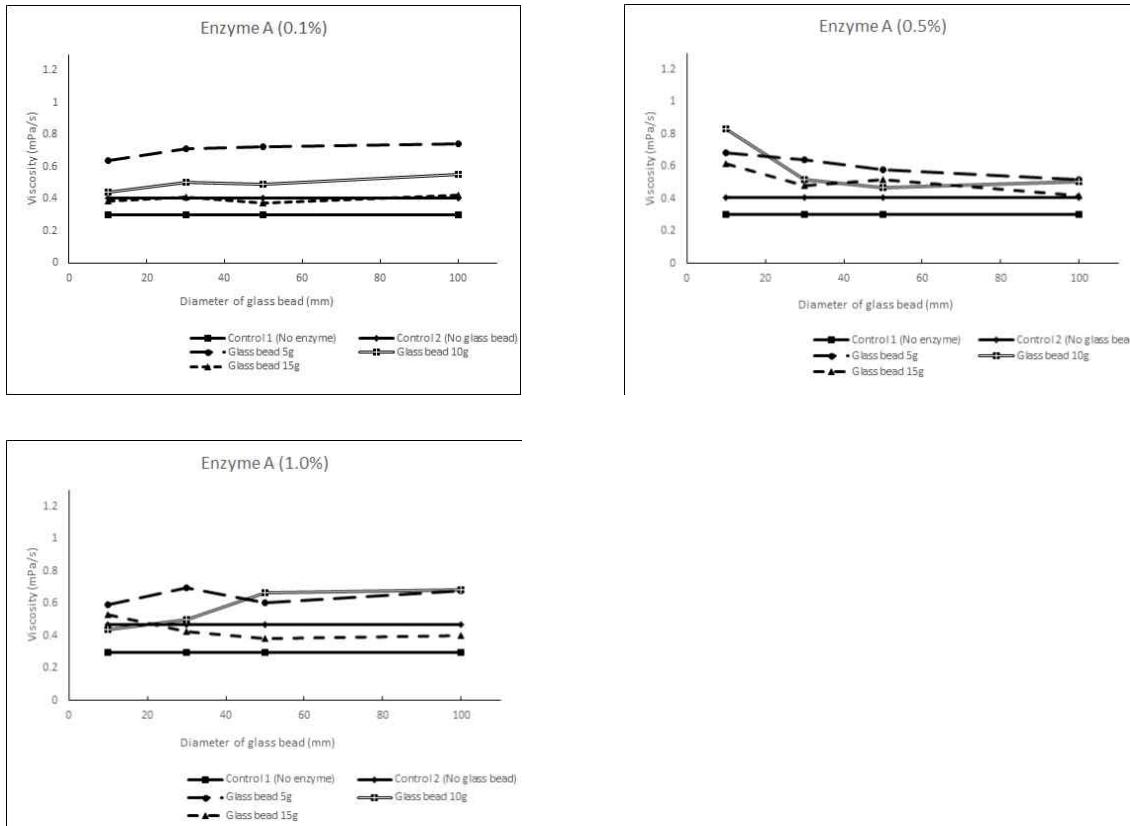


Fig. 4-11. Effect of amount and size of glass beads on the viscosity in the mash (Pilsner) filtration with the treatment of enzyme A.

필스너 수입맥아의 여과 후 효소 무처리 대조구1의 점도는 0.298 mPa/s로 광맥의 점도보다 낮았으나, 효소 처리 후 glass bead를 사용하지 않은 대조구2의 점도는 0.40 내지 0.46 mPa/s으로 광맥의 대조구2의 점도보다 높았다. 그럼에도 불구하고 여과보조제로 glass bead를 사용한 대부분의 실험구들의 점도는 대조구2의 점도에 비하여 증가하였으나 광맥에서의 점도 증가에는 미치지 못함을 알 수 있었다. 이는 여과보조제로 사용한 glass bead의 공극 사이로 효소에 의해 충분히 분해된 필스너 맥아의 포도당, 맥아당 등의 저분자 당류들이 통과함으로써 점도가 증가하는 것으로 보이나 광맥에서 처리한 효소 A의 효과에는 미치지 못하는 것으로 보인다. 또한 광맥에서는 사용된 각 효소의 농도에서 대체적으로 glass bead의 지름이 커질수록 점도가 증가하는 경향을 보인 반면에 수입 필스너 맥아에서는 glass bead의 지름이 증가함에 따라 점도가 오히려 감소하는 경향을 보인다. 이는 여과보조제의 공극의 부피가 커짐에 따라 오히려 공극 사이에 들어가는 분해물질의 성상이 죽처럼 달라붙어서 여

과를 방해하는 것으로 보인다.

또한 같은 크기의 glass bead 지름에서 glass bead 사용량에 따른 점도의 변화를 살펴보면 광맥 맥아와는 다르게 일반적으로 glass bead의 사용량이 0 g에서 15 g으로 증가함에 따라 점도의 크기 또한 감소함을 알 수 있다. 이는 앞서 설명한 바와 마찬가지로 의미로 증가한 glass bead 사용량이 더 큰 glass bead 사이의 공극 부피를 제공함에 따라 paste(죽) 상태의 압축으로 여과를 방해하는 현상을 줄여주는 것으로 보인다.

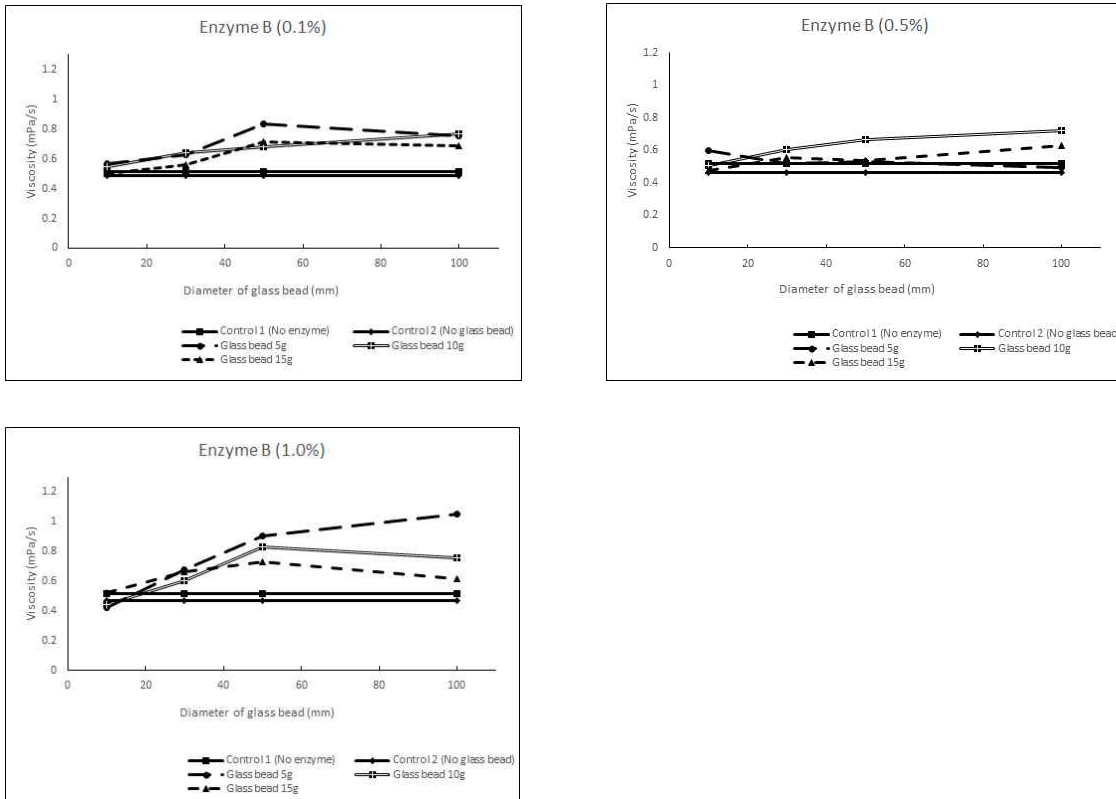


Fig. 4-12. Effect of amount and size of glass beads on the viscosity in the mash (Pilsner) filtration with the treatment of enzyme B.

여과보조제로 galss bead를 사용한 대부분의 실험구들의 점도는 효소 A에서와 마찬가지로 대조구2의 점도에 비하여 증가하였으며, 효소 A를 필스너 맥아에 처리했을 때의 점도 증가량보다는 낮았으나, 광맥에서 효소 B를 처리함에 따른 점도 증가보다는 같거나 약간 높은 것을 알 수 있었다. 이는 여과보조제로 사용한 glass bead의 공극 사이로 효소에 의해 충분히 분해된 필스너 맥아의 포도당, 맥아당 등의 저분자 당류들이 통과함으로써 점도가 증가하는 것으로 보이나 앞서 처리한 효소 A의 효과에는 미치지 못하는 것으로 보인다. 또한 필스너에 처리한 효소 A에서와 마찬가지로, 광맥에서는 사용된 각 효소의 농도에서 대체적으로 glass bead의 지름이 커질수록 점도가 증가하는 경향을 보인 반면에 수입 필스너 맥아에 대한 효소 B처리하는 glass bead의 지름이 증가함에 따라 점도가 오히려 감소하는 경향을 보인다. 이는 여과보조제의 공극의 부피가 커짐에 따라 오히려 공극 사이에 들어가는 분해물질의 성상이 죽처럼 달라붙어서 여과를 방해하는 것으로 보인다.

또한 같은 크기의 glass bead 지름에서 glass bead 사용량에 따른 점도의 변화를 살펴보면 앞선 효소 A 처리에서와 마찬가지로, 일반적으로 glass bead의 사용량이 0 g에서 15 g으로 증가함에 따라 점도의 크기 또한 감소함을 알 수 있다. 이는 앞서 설명한 바와 마찬가지로 의미로 증가한 glass bead 사용량이 더 큰 glass bead 사이의 공극 부피를 제공함에 따라 paste(죽) 상태의 압축으로 여과를 방해하는 현상을 줄여주는 것으로 보인다.

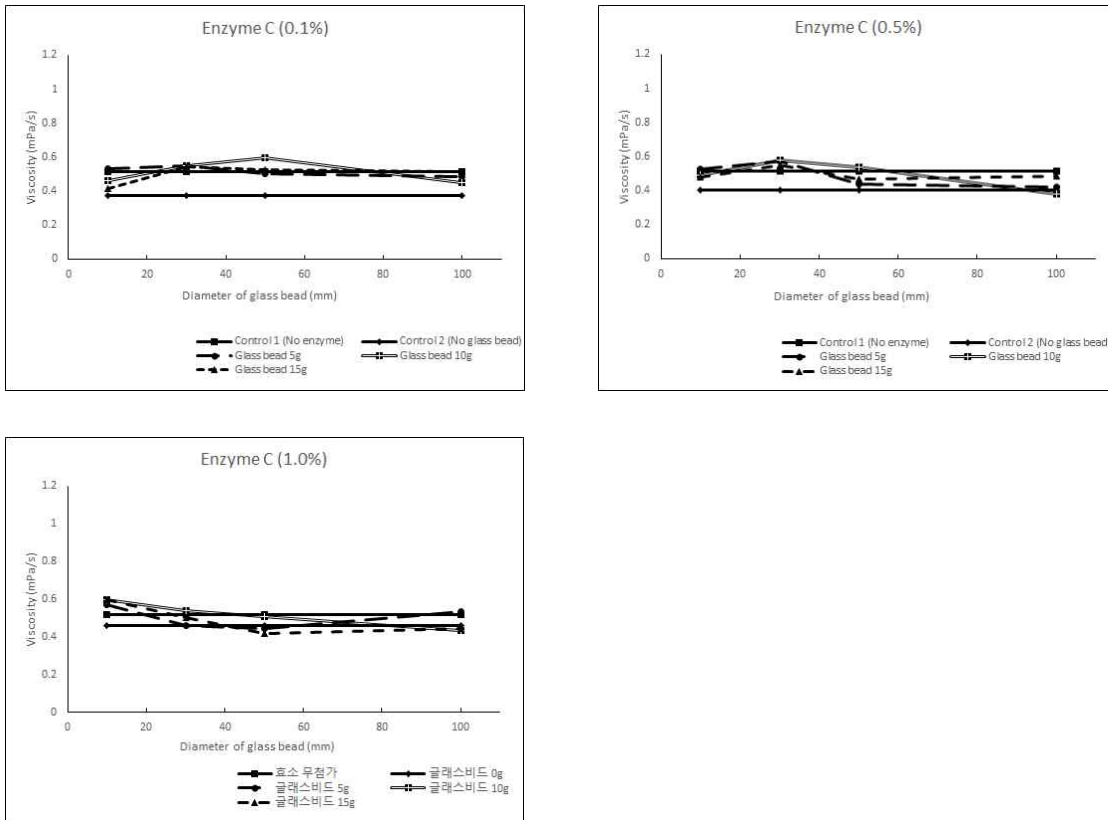


Fig. 4-13. Effect of amount and size of glass beads on the viscosity in the mash (Pilsner) filtration with the treatment of enzyme C.

효소 C의 경우에는 여과보조제로 glass bead를 사용한다 할지라도 대부분의 실험구들의 점도는 대조구2의 점도에 비하여 소폭 증가하거나 거의 같은 것을 알 수 있었다. 이는 효소 C가 β -glucanase이기 때문에 수입 펄스너 맥아를 충분히 분해하지 못한 것으로 보이며 다른 효소들을 사용했을 때 생기는 죽과 같은 상태에는 이르지 못하기 때문에 여과보조제의 효과는 나타나지 않는 것으로 보인다. 또한 사용된 각 효소의 농도에서 대체적으로 glass bead의 지름이 커질수록 점도가 증가하는 경향을 보이거나 특히 10 g의 glass bead를 사용했을 때 점도가 더 증가하는 경향을 보였다.

또한 같은 크기의 glass bead 지름에서 glass bead 사용량에 따른 점도의 변화를 살펴보면 앞서 펄스너에 처리한 효소 A나 B와는 다르게, 10 g의 glass bead를 사용했을 때가 5 g과 15 g의 glass bead를 사용했을 때에 비해 점도가 더 증가하는 경향을 보였다. 이는 앞서 설명한 바와 마찬가지로 의미로 충분한 분해가 이루어지지 않아서 glass bead 사이의 공극과 여과와는 상관관계가 없는 것으로 보인다.

다. 맥주 교질용액의 원심분리 조건 완성

(1) 요약

동일한 glass bead를 사용했을 때 맥즙의 점도는 사용 효소의 종류와 농도에 따른 점도 변화의 패턴이 일정함이 없이 혼재되는 양상을 보여 주었다. 다만 효소 C를 사용하였을 때의 점도가 효소 A나 B를 사용했을 때의 점도보다는 낮았다. 대조구와 비교해 보아도 몇몇 조건에서만 점도의 감소를 보여줄 뿐, 실험구 대부분의 점도가 대조구의 점도에 비해 거의 같거나 증가함을 알 수 있었다. 이는 대부분의 실험구에서 효소의 처리와 여과보조제인 glass bead의 사용은 침강에 큰 영향을 미치지 못하거나 침강속도를 크게 증가시키는 것으로 보인다.

(2) 재료 및 방법

(가) 재료

① 맥주 교질용액 실험 재료

맥주 교질용액을 제조하기 위하여 2 종류의 맥아를 사용하였다. 하나는 수입된 필스너 타입의 맥아를 사용하였으며, 또 하나는 국립식량과학원 벼맥류부의 지원으로 2014년도에 전라북도 익산지역에서 수확된 맥주보리인 광맥을 맥아로 제조하여 사용하였다.

(나) 방법

① 제맥 방법

제맥은 Automatic Micromalting Systems (Phoenix Biosystems Co., Australia)을 이용하여 침맥(Steeping)과 발아(Germination), 배조(Kilning)의 3단계로 진행이 되었다. 침맥은 15℃에서 wet steeping과 dry steeping을 3회 반복하여 실시하였으며, germination은 16℃에서 총 5일간 보리를 발아시킨 후 제근하여 사용하였다. 배조는 처음 30분간 45℃를 유지한 후, 65℃까지 각 5℃의 온도 구간별 온도 증가속도를 점차 감소시킨 다음, 85℃까지는 온도 증가속도를 점차 크게 하여 제맥하였다. 제조된 맥아는 Drum mill (Malt Drum Mill, Jeil Industry Co.,Korea)을 이용하여 1 mm의 간극으로 분쇄하였다.

② 맥주의 점도

제조된 맥주의 점도는 Brookfield 점도계를 이용하여 각기 다른 rpm에서 겔보기 점도를 다음과 같이 계산하였다.

$$\eta = \frac{F'}{S} \quad (4-1)$$

$$F' = \frac{M}{2\pi R_b^2 L} \quad (4-2)$$

여기에서 M은 토크로써 673.7 dyne-cm이고, R_b 는 점도계에 사용된 spindle의 반지름으로써 1.884 cm, L은 spindle의 effective length로써 6.51 cm이다. 또한,

$$S = \frac{2\omega R_c^2 R_b^2}{x^2(R_c^2 - R_b^2)} \quad (4-3)$$

여기에서 ω 는 spindle의 각속도로써 radians/second로 나타내고 이는 $(2\pi/60)N$ 과 같고 N은 rpm을 나타낸다. R_b 는 spindle의 반지름(cm)이고, R_c 는 점도계 용기의 반지름으로써 4.35 cm, x는 실제 실험용 용기의 반지름으로써 3.8 cm이었다.

구해진 각 rpm에서 겉보기 점도는 rpm 대 겉보기 점도의 기울기를 구하고 단위 환산을 통하여 각 교질용액의 점도를 계산하였다.

(3) 결과

① Glass bead 처리에 따른 침강 및 점도 변화 - 광맥

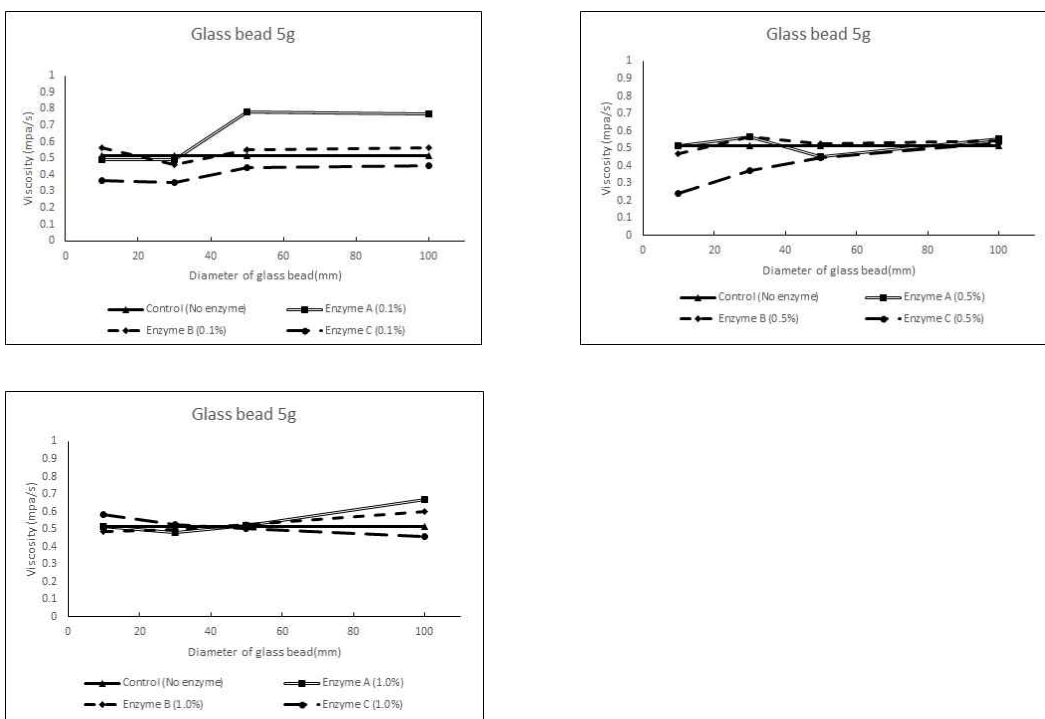


Fig. 4-14. Viscosity changes of GwangMac mash in accordance with the size of 5 g glass bead with the different enzyme treatment.

광맥 맥아를 효소 처리하고 보조여과제인 glass bead를 사용하여 여과한 여과물의 침강 속도는 점도에 비례해서 다르게 된다. 일반적으로 점도가 높으면 침강속도가 떨어지게 될 것이고 점도가 낮으면 침강속도는 증가하게 될 것이다. 따라서 여과보조제인 glass bead의 양이 동일한 상황에서 효소의 종류와 농도를 다르게 처리하고 사용된 glass bead의 지름이 다른 조건에서 점도를 측정하여 상대적인 침강속도를 추정해 보았다.

위 그림에서 보듯이 동일한 5 g의 glass bead를 사용했을 때 맥즙의 점도는 효소 A나 B에 비하여 효소 C를 사용하는 것이 점도의 감소 정도가 가장 낮았다. 즉 그만큼 침강속도가 증가함을 나타내지만 대조구와 비교해 보았을 때, 효소 C의 처리에서만 효과를 보는 것으로

보인다. 더욱이 0.1%와 0.5% 효소농도에서 이 효과가 나타나지만 효소 농도가 1.0%로 증가하면 실험구 사이에 효과를 보기 어려우며, 실험구 대부분의 점도가 대조구의 점도에 비해 거의 같거나 증가함을 알 수 있었다. 이는 일부 구간의 효소 C 처리를 제외한다면 효소의 처리와 여과보조제인 5 g의 glass bead의 사용은 침강에 큰 영향을 미치지 못하거나 침강속도를 오히려 증가시키는 것으로 보인다.

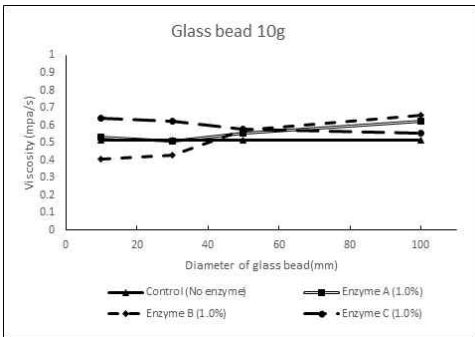
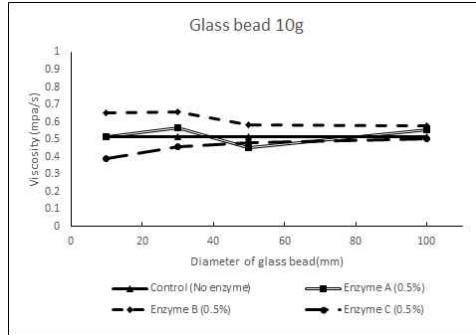
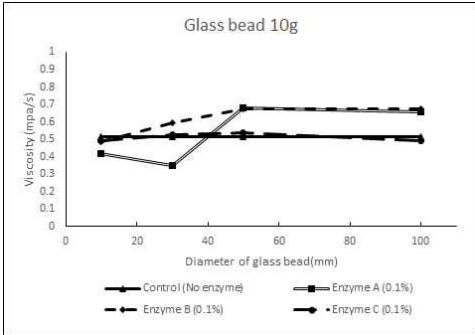


Fig. 4-15. Viscosity changes of GwangMac mash in accordance with the size of 10 g glass bead with the different enzyme treatment.

위 그림에서 보듯이 동일한 10 g의 glass bead를 사용했을 때 맥즙의 점도는 5 g의 galss bead를 사용했을 때와 비교하여 사용 효소의 종류와 농도에 따른 점도 변화의 패턴이 일정함이 없이 혼재되는 양상을 보여 주었다. 대조구와 비교해 보아도 몇몇 조건에서만 점도의 감소를 보여줄 뿐, 실험구 대부분의 점도가 대조구의 점도에 비해 거의 같거나 증가함을 알 수 있었다. 이는 대부분의 실험구에서 효소의 처리와 여과보조제인 10 g의 glass bead의 사용은 침강에 큰 영향을 미치지 못하거나 침강속도를 오히려 증가시키는 것으로 보인다.

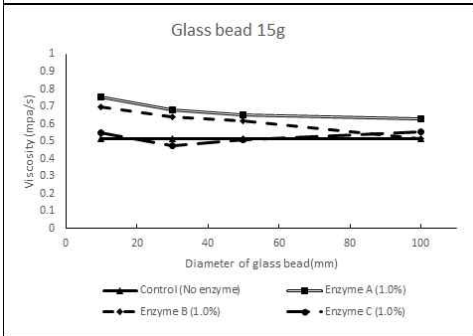
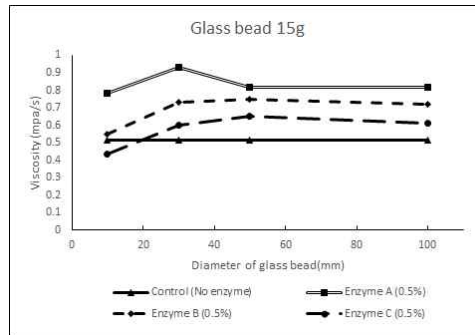
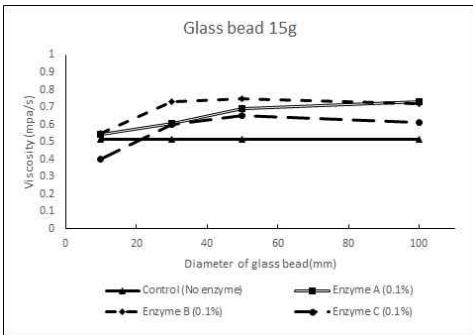


Fig. 4-16. Viscosity changes of GwangMac mash in accordance with the size of 15 g glass bead with the different enzyme treatment.

위 그림에서 보듯이 동일한 15 g의 glass bead를 사용했을 때 맥즙의 점도는 5 g 또는 10 g의 glass bead를 사용했을 때와 비교하여 사용 효소의 종류와 농도에 따른 점도 변화의 패턴이 일정함이 없이 혼재되는 양상을 보여 주었다. 다만 효소 C를 사용하였을 때의 점도가 효소 A나 B를 사용했을 때의 점도보다는 낮았다. 대조구와 비교해 보아도 몇몇 조건에서만 점도의 감소를 보여줄 뿐, 실험구 대부분의 점도가 대조구의 점도에 비해 거의 같거나 증가함을 알 수 있었다. 이는 대부분의 실험구에서 효소의 처리와 여과보조제인 15 g의 glass bead의 사용은 침강에 큰 영향을 미치지 못하거나 침강속도를 크게 증가시키는 것으로 보인다.

② Glass bead 처리에 따른 침강 및 점도 변화 - 수입맥 필스너

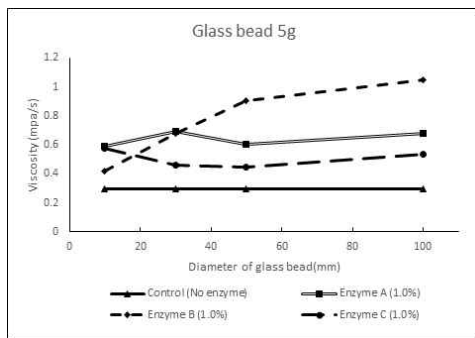
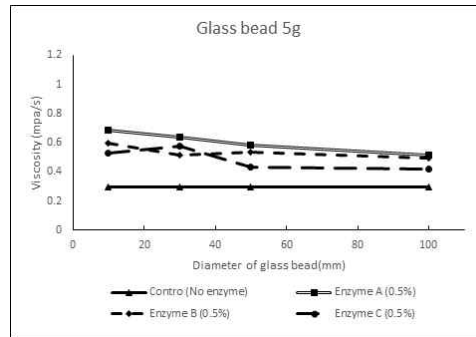
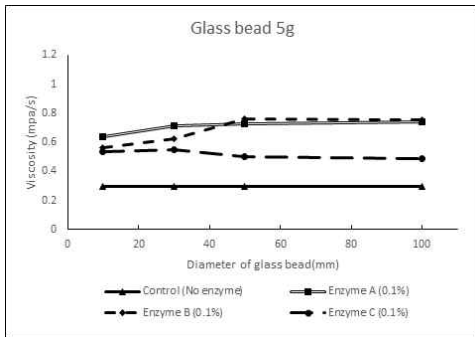


Fig. 4-17. Viscosity changes of Pilsner mash in accordance with the size of 5 g glass bead with the different enzyme treatment.

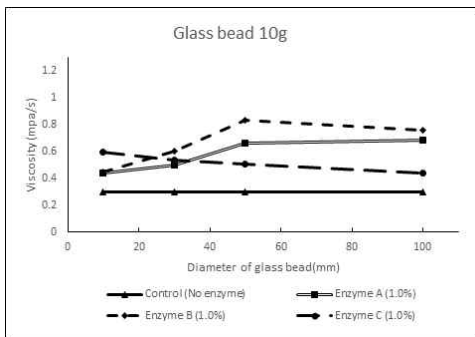
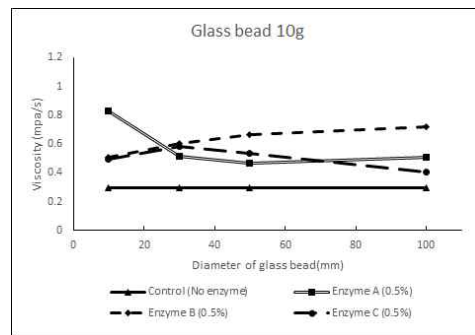
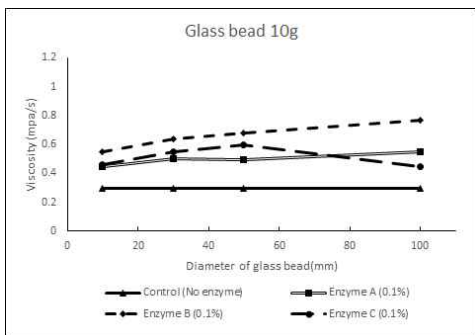


Fig. 4-18. Viscosity changes of Pilsner mash in accordance with the size of 10 g glass bead with the different enzyme treatment.

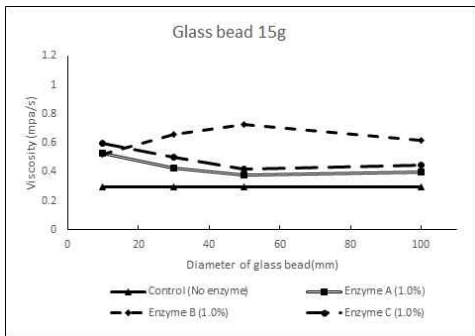
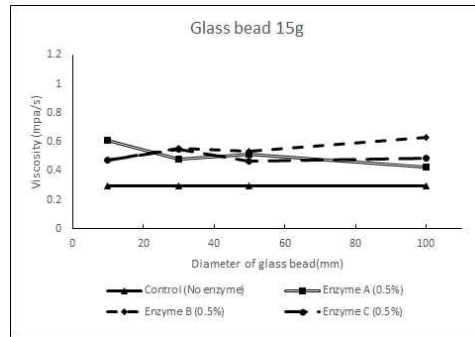
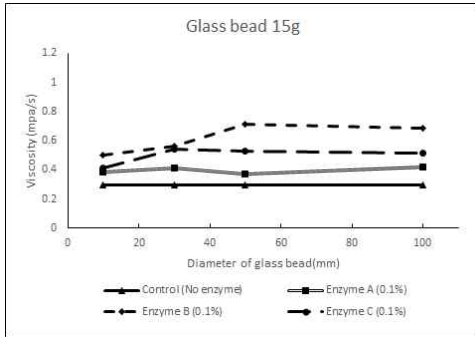
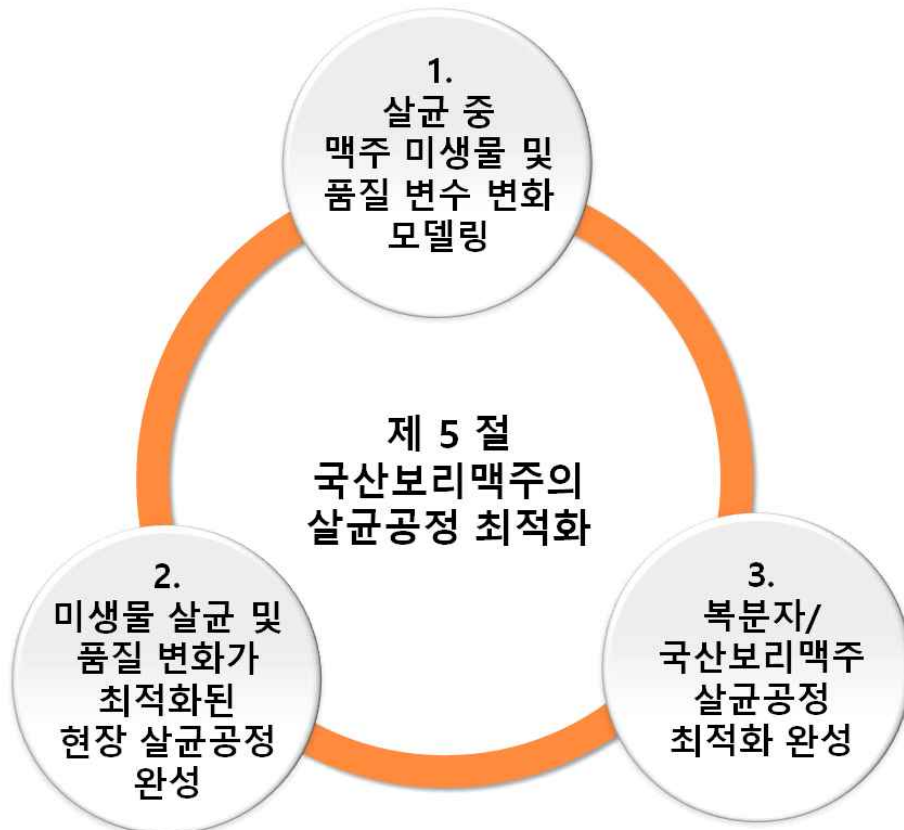


Fig. 4-16. Viscosity changes of Pilsner mash in accordance with the size of 15 g glass bead with the different enzyme treatment.

수입맥 펄스너에 대하여 서로 다른 3 가지 효소 A, B, C를 처리하고 보조여과제로 glass bead를 사용하여 여과한 후에 여액에서의 점도 변화를 살펴보면 위 그림들 Figure 4-14부터 4-16에서 보듯이, 사용 효소의 종류와 농도에 따른 점도 변화의 패턴이 일정함이 없이 혼재되는 양상을 보여 주었다. 모든 조건의 실험구에서 보이는 점도는 대조구의 점도보다 높았는데 이는 수입맥 펄스너의 점도가 광맥의 점도에 비해 크게 낮았던 이유가 가장 크지만 같은 실험 조건에서의 광맥에 대한 점도와 비교했을 때에도 펄스너에 대한 점도가 대체적으로 높게 나타난 이유도 있다. 수입맥 펄스너에 대한 전체적인 실험조건들에서는 점도가 높음에 따라 침강속도가 증가하고 효소적 처리에 의한 분해량은 광맥 맥아에 비해 월등히 크다할 수 있다. 효소별로 비교해 보면, 효소 B를 사용하였을 때의 점도가 효소 A나 C를 사용했을 때의 점도보다는 높았다. 이는 대부분의 실험구에서 효소의 처리와 여과보조제인 15 g의 glass bead의 사용은 침강속도를 크게 증가시켜 침강에는 부정적인 효과를 줄 것으로 보인다.

제 5 절 국산보리맥주의 살균공정 최적화

- 국산보리 광맥을 이용하여 맥주 살균 공정 최적화를 완성하였다. 첫째로 국산보리 맥주의 부패 미생물 및 품질 변화 변수 kinetics을 연구하였다. 미생물의 경우 고전적인 방법인 D, z값, 품질변화 변수의 경우 이취발생시간(Off-flavor development time) 및 아레니우스 식을 이용한 온도의존성을 실험적으로 산출했다.
- 미생물 살균 및 품질변화가 최적화된 참여기업의 현장 살균공정을 완성하였다. 현장 살균기 가동 조건에 따른 여러 공정변수를 실험적으로 모니터링 한 후 퍼지추론(Fuzzy reasoning)을 통해 다양한 공정변수를 산출했다. 변온 조건에 따른 미생물 농도를 예측할 수 있는 modeling 및 이취 발생 시간(품질 변화 변수)을 예측할 수 있는 modeling을 적용하여 최적 조건을 완성하였다.
- 복분자를 첨가한 복분자맥주의 살균 공정 최적화를 완성하였다. 복분자 첨가 시점을 고려한 여러 살균 시나리오를 연구하여 복분자 첨가시점을 결정하였으며 최적의 복분자맥주 살균 공정을 최적화하였다.



1. 살균 중 맥주 미생물 및 품질 변수 변화 모델링

가. 살균 kinetics 모델링

(1) 요약

총 3년간의 연구 내용 중 1차 년도에 수행된 기반 연구로서 맥주 품질 저하의 원인 균의 가열 살균 특성에 관하여 연구하였다. 구체적으로 가열 온도, 시간에 따른 예측 미생물학 기반 kinetics 함수 및 온도의존 함수를 개발하였다. 맥주 품질 저하의 주요 원인 균으로는 *Lactobacillus brevis*와 *Pediococcus damnosus*를 실험 대상으로 선정하였다. *L. brevis*는 맥주 오염에서 가장 대표적인 맥주 spoilage 균으로 알려져 있다. 그람 양성의 obligate heterofermentative 젖산균으로, hop에 저항성이 있으며 맥주 내 텍스트린이나 전분질을 발효시켜 맥주를 변질시킨다. *P. damnosus* 또한 *Pediococci*속에 속하는 균 중 가장 많이 발견되는 맥주 spoilage균으로서, homofermentative 젖산균의 한 종류이며 hop에 내성이 있고, 대사산물로서 산과 diacetyl을 생성하여 맥주의 이취(buttery flavor)를 발생시킨다. 이 두 균을 가지고 살균 실험을 진행하여 얻은 살균 실험데이터를 모델링 하는 방법으로 전통적인 D, z 값을 포함하는 kinetics 해석과 비선형 등은 불활성화를 나타낼 수 있는 Weibullian 모델을 사용하여 kinetics를 정량적으로 규명하였다. 그 결과 50, 55, 60도에서 *Lb. brevis*의 D값은 각각 21.73분, 9.98분, 1.63분이었고, *P. damnosus*는 33.74분, 14.16분, 1.88분이었다. 또한 z값은 *Lb. brevis*이 8.9°C, *P. damnosus*이 7.95°C였다.

(2) 재료 및 방법

2.1. 살균 실험

2.1.1. 맥주 제조(당화 및 발효)

맥주 제조에 사용된 맥아는 국내산 2조맥인 광맥(국립식량과학원)을 이용했으며, EBC Congress mash법에 따라 당화하여 맥즙을 제조하였다. 맥아 50g을 45°C의 증류수에 잘 섞은 다음 45°C에서 30분간 당화 시킨 후 온도를 증가시켜 맥즙의 온도를 70°C까지 가열하였다. 그 후 70°C의 증류수 100 mL를 첨가하여 70°C를 유지하면서 1시간 더 당화시켰다. 당화가 완료되면 17-18°C로 맥즙을 식히고 증류수를 첨가하여 무게를 450 g로 맞춘 후 주름진 여과지를 이용하여 여과하였다. 발효과정은 맥즙에 hop을 3회에 걸쳐 1/2, 1/4, 1/4로 나누어 넣으며, 각각 10분, 5분, 5분씩 끓여 주었다. 이후 맥즙의 온도를 20°C가 될 때까지 급속 냉각시켰다. 여기에 미리 증식한 효모를 주입한 뒤, 공기차단기를 설치하여 20°C에서 4일간 1차 발효를 실시하였다. 1차 발효 후 맥주를 병입한 후 15°C의 온도에서 7일간 2차 발효를 하였다.

2.1.2. 균주 배양

살균 실험 중 균의 열 저항성에의 영향을 피하기 위해 제조한 맥주를 비가열적 방법으로 살균하여 사용하였으며 살균된 맥주 샘플은 사용되기 전 까지 갈색 플라스크에 담아 4°C에

서 보관하였다. 실험에 이용된 *Lactobacillus brevis*와 *Pediococcus damnosus*는 모두 KCTC (Korean Collection for Type Cultures)로부터 분양받아 실험에 사용하였다. *Lb. brevis*와 *P. damnosus* 균을 몇 loop취하여 미리 살균시킨 튜브에 담긴 MRS broth 10ml에 접종한 다음 30°C에서 48시간동안 배양하였다. cell은 원심분리(6000g에서 10분)하여 peptone water로 3번 세척한 다음 맥주에 균질화하여 살균 실험에 사용될 균 현탁액을 준비하였다. 균 농도는 1.0×10^6 c.f.u/mL로 맞췄다.

2.1.3. 살균 실험

flask법에 따라 실험 장치를 설치하였다. 500 mL 용량의 3구 Woufff 플라스크의 첫 번째 입구에 플라스크 중심부의 온도를 쟈 수 있도록 온도계를 설치하고, medium에 균이 균 일하게 섞이도록 긴 mechanical stirrer를 가운데 입구에 설치하였다. 세 번째 입구는 실험 시작할 때 살균된 맥주를 접종하고, 실험동안 샘플을 빼내는 용도로 사용하였다. 실험동안 무균적인 조건을 유지하기 위해 각 입구는 기구 설치와 동시에 고무마개와 네오프렌 격막으로 막아 실험하였으며 사용되는 모든 초자기류, 플라스크, stirrer는 실험 전 60°C에서 2시간 동안 미리 멸균해놓았다. 미리 살균한 맥주 495ml을 flask 안에 무균적으로 부어넣은 다음 플라스크를 클램프에 고정하여 순환되는 항온조에 넣은 다음 실험 온도로 가열한다. 온도가 원하는 온도로 유지되면, 5mL의 균 현탁액을 플라스크의 세 번째 입구를 통해 무균적으로 접종하여 최종 농도가 1×10^4 c.f.u/mL가 되도록 한다. 목표 경과시간이 지난 후 세 번째 입구를 통해 시료 1000 μ l을 무균적으로 취하여 1.5mL Ep tube에 넣고 바로 얼음에 넣어 5분간 냉각하였다. 실험온도는 50, 55, 60°C에서 실험하였고 시간 기준은 접종원을 넣자 마자 0점으로 잡았다. 경과 시간은 50, 55°C에서는 0에서 30초 까지는 30초 간격으로, 30초 이후로는 30초 간격으로 120초까지를 실험했으며, 60°C에서는 10초 간격으로 0에서 60초까지 실험하였다. 각 샘플마다 살아남은 세포 수는 MRS agar에서 배양하여 plate counting으로 2반복 실험했다. *Lb. brevis*는 37°C에서 2일 동안 배양하였으며, *P. damnosus*는 30°C에서 5일 동안 배양했다.

2.2. 미생물 살균 kinetics

본 연구에서는 first-order mortality kinetics의 전통적인 가정의 유효성과 관계없는 미생물 불활성화 kinetics에 대한 선형 혹은 비선형 모델링을 수행하였다.

2.2.1 D, z 값 모델

$$\frac{dN(t)}{dt} = -kN(t) = -\frac{2.303}{D(t)}N(t) \quad (1)$$

$$\log N(t) = \log N_0 - \frac{1}{D(t)}t \quad (2)$$

여기서 $N(t)$ 는 미생물농도(c.f.u/mL), t 는 시간(min), T 는 온도($^{\circ}\text{C}$), $D(T)$ 는 log 주기로 1 만큼 감소시키는데 소요되는 시간(decimal reduction time, min), N_0 는 초기미생물농도이다.

$$\log D_1 = \log D_2 - \frac{1}{z}(T_1 - T_2) \quad (3)$$

여기서 T_1, T_2 는 특정온도, D_1, D_2 는 해당 온도에서의 D값, z 는 D값을 1/10로 단축시키는데 소요되는 온도 상승 값($^{\circ}\text{C}$)을 의미한다.

2.2.2. 비선형 등온 불활성화 모델 (Weibullian model)

$$\log \frac{N(t)}{N_0} = \log S(t) = -b(T) t^{n(T)} \quad (4)$$

여기서 $S(t)$ 는 survival 비율(N/N_0), $b(T)$ 는 온도의존속도상호변수를 의미하고, $n(T)$ 는 shape factor에 해당하는 실험적으로 구해진 지수를 의미한다. 그런데 여러 실험을 통해 $n(T)$ 는 온도와 무관하게 일정한 것으로 나타나 아래의 식이 유도된다.

$$\log S(t) = -b(T) t^n \quad (5)$$

$$\ln(\log S(t)) = \ln b(T) - n \ln t \quad (6)$$

여기서 식 (6)은 식 (5)를 선형 회귀분석하기 위하여 양변에 log를 취하여 변환된 함수식이다.

한편 $b(T)$ 의 온도의존성은 아래 식과 같이 나타낼 수 있다.

$$b(T) = 10^{aT-c} \quad (7)$$

$$\log b(T) = aT - c \quad (8)$$

여기서 식 (8)은 식 (7)를 선형 회귀분석하기 위하여 양변에 log를 취하여 변환된 함수식이다. a 와 c 는 온도의존 상호변수를 의미한다.

(3) 결과 및 고찰

3.1. 살균

맥주의 품질 저하의 원인 균으로 알려진 *Lactobacillus brevis*와 *Pediococcus damnosus*에 대한 살균 실험결과를 Fig. 5-1, 5-2, 5-3에 나타내었다. 살균 시간에 따른 살아남은 생균수를 각 온도별로 나타내었다.

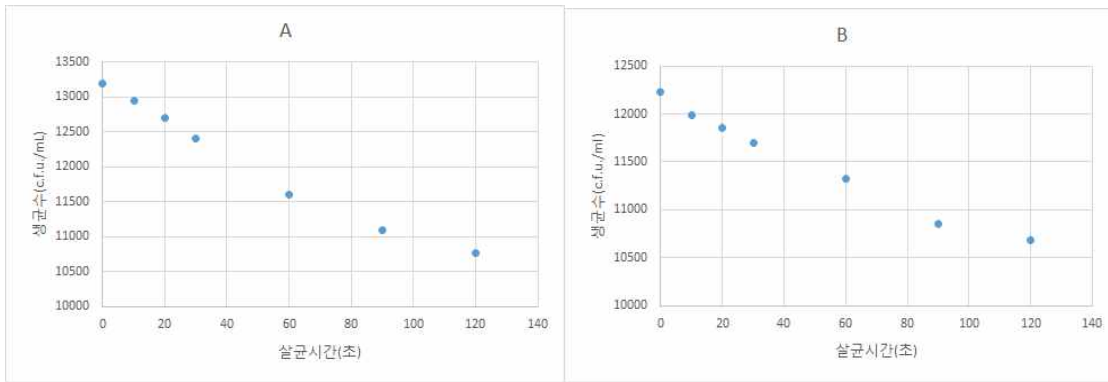


Fig. 5-1. 50°C 살균조건에서 시간에 따른 균 농도 $N(t)$ 변화. A: *Lb. brevis*, B: *P. damnosus*.

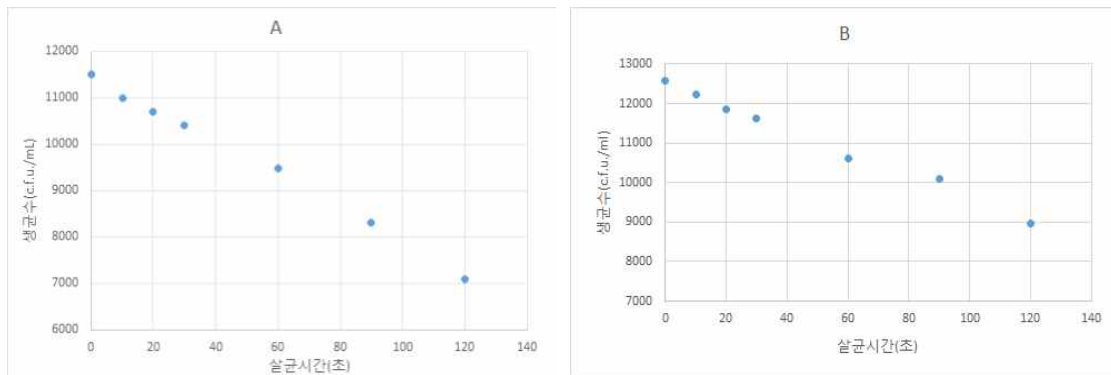


Fig. 2. 55°C 살균조건에서 시간에 따른 균 농도 $N(t)$ 변화. A: *Lb. brevis*, B: *P. damnosus*.

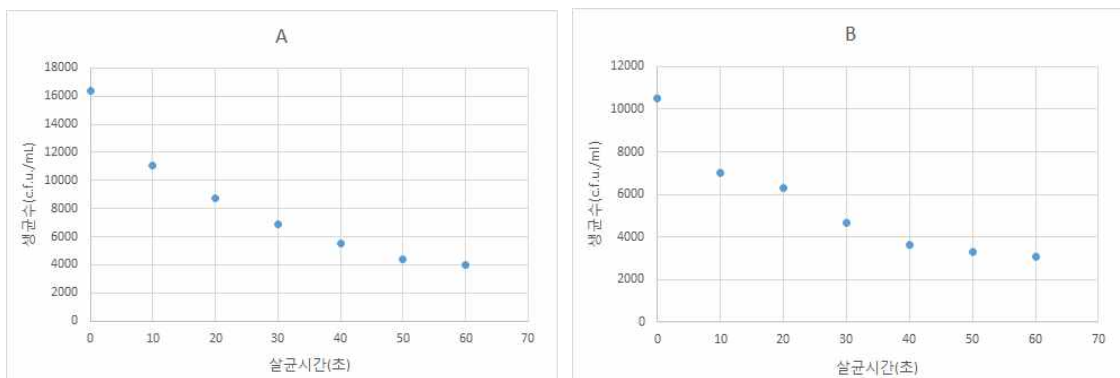


Fig. 3. 60°C 살균조건에서 시간에 따른 균 농도 $N(t)$ 변화. A: *Lb. brevis*, B: *P. damnosus*.

Fig. 5-1, 5-2, 5-3을 보면 살균 시간이 경과할수록 지수적인 균 농도의 감소가 나타남을 알 수 있으며 이러한 경향은 온도가 높아질수록 더 뚜렷하게 나타났다. 이는 온도가 증가할수록 살균 정도가 역시 지수적으로 증가함을 의미한다. 하지만 위의 그래프로는 두 균 간의 차이에 대해 해석하기에 한계가 있어 이 데이터에 모델식을 적용하여 비교해보았다.

3.2. 살균 kinetics

3.2.1. D, z 값 모델

Fig. 1-3의 결과를 가지고 전통적인 kinetics 모델링인 D값과 z값을 포함하는 함수식을 적용하여 얻은 결과를 Fig. 5-4~5-6에 나타내었다.

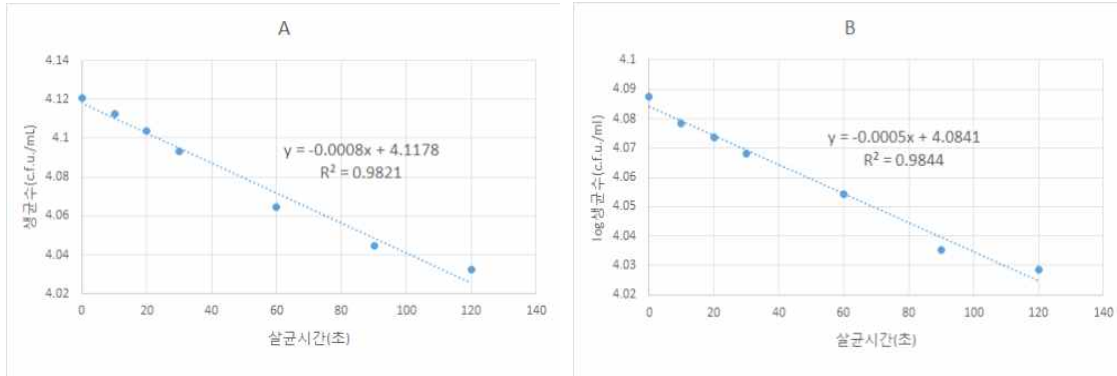


Fig. 5-4. 50°C 살균조건에서 시간에 따른 균 농도 변화에 D 값 모델의 적용. A: *Lb. brevis*, B: *P. damnosus*.

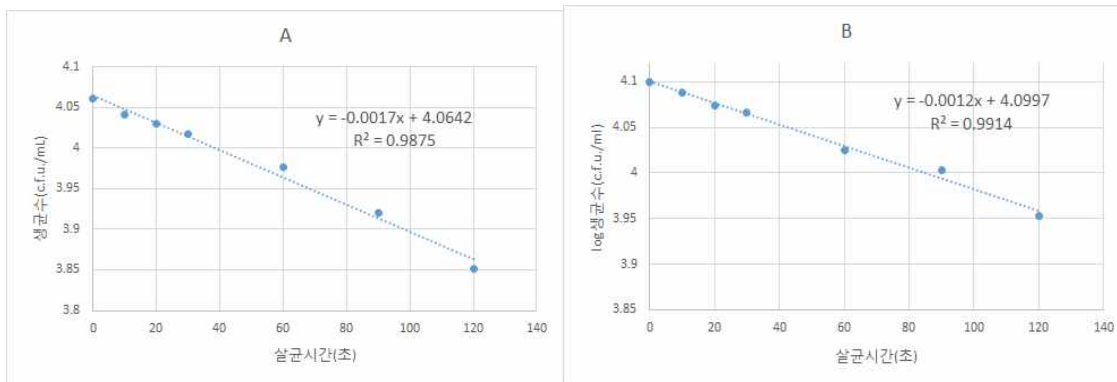


Fig. 5-5. 55°C 살균조건에서 시간에 따른 균 농도 변화에 D 값 모델의 적용. A: *Lb. brevis*, B: *P. damnosus*.

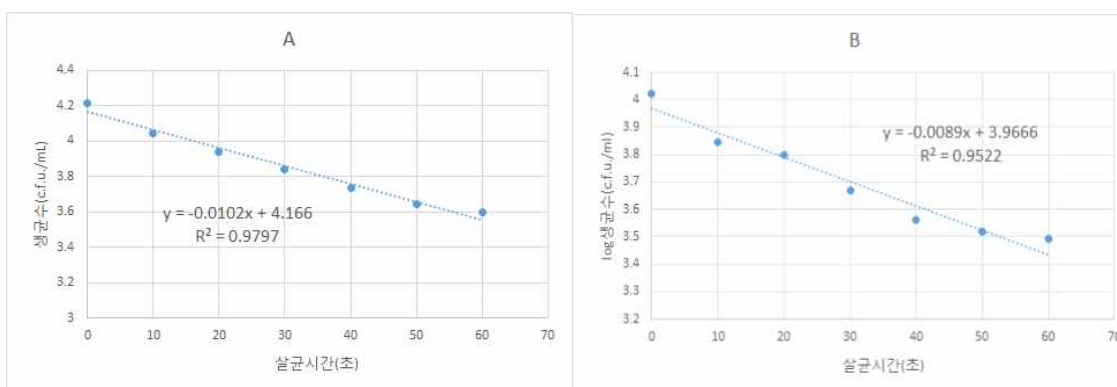


Fig. 5-6. 60°C 살균조건에서 시간에 따른 균 농도 변화에 D 값 모델의 적용. A: *Lb. brevis*, B: *P. damnosus*.

이는 전통적인 살균 kinetics 모델의 변수인 D값과 z값의 의미를 잘 설명해주고 있다. 즉, D값이란 균의 농도가 1/10로 감소하는데 소요되는 시간을 의미하는데 이에 따르면 시간

의 증가에 대한 살균도는 선형적으로 증가하는 것이 아니고 지수적으로 급격히 증가해야 한다. 본 실험에서 살균시간에 따른 균 농도의 데이터를 이를 잘 반영하였다. *Lb. brevis*의 그래프가 더 가파른 기울기를 나타내고 있다. 기울기가 가파르다는 것은 그만큼 온도 변화에 대해 살균도가 급격히 증가한다고 해석할 수 있다. 즉, *Lb. brevis*보다 *P. damnosus*의 열 저항성이 더 높다고 할 수 있는데 이러한 특성은 z 값을 통해 쉽게 파악할 수 있다. z 값을 구하기 위해 50, 55, 60°C에서 각각의 D값을 식(2)에 선형회귀 분석하여 산출된 결과는 Table 5-1에 나타냈으며, 그 D값을 온도에 따라 plot한 그래프는 Fig. 7과 같다.

Table 5-1. 맥주의 품질 저하 원인균의 D, z 값

	Temperature (°C)	D value (min)	R ²	z value(°C)	R ²
<i>Lactobacillus brevis</i>	50	21.73	0.98	8.90	0.95
	55	9.95	0.99		
	60	1.63	0.98		
<i>Pediococcus damnosus</i>	50	33.74	0.98	7.98	0.95
	55	14.16	0.99		
	60	1.88	0.95		

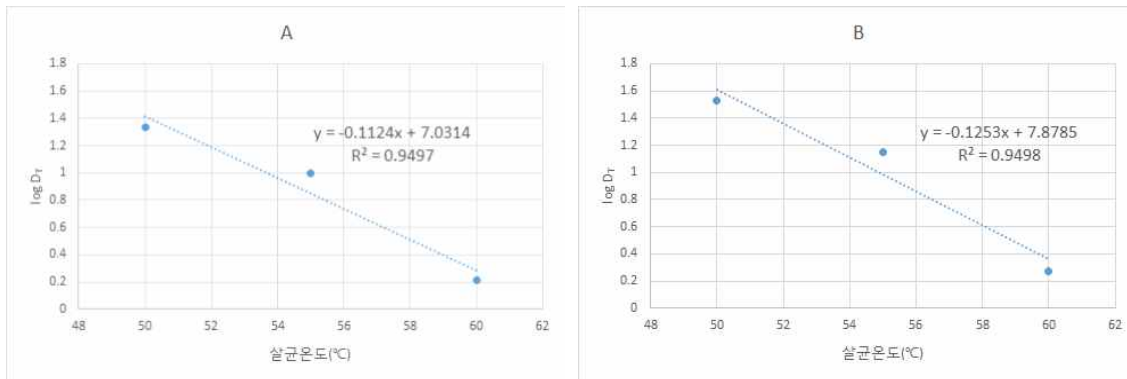


Fig. 5-7. 살균 온도에 따른 D값에 z 값 모델의 적용. A: *Lb. brevis*, B: *P. damnosus*.

또한 온도의존성을 나타내는 z값의 의미는 온도가 증가할 때 살균시간이 비례적으로 단축되는 것이 아니라 지수적으로 급격히 감소함을 나타낸다. 식 (2)을 적용하여 산출한 z 값은 *Lb. brevis*가 8.9°C, *P. damnosus*가 7.98°C로 산출되었다. *Lb. brevis*의 z 값이 크다는 것은 즉, 온도 증가에 따른 미생물 사멸의 온도 의존성이 크다는 것이고, 위의 Fig 5-4, 5-5, 5-6을 통해 예측했던 바와 같이 *Lb. brevis*보다 *P. damnosus*의 열 저항성이 조금 더 크다고 할 수 있다.

최종적으로 완성된 kinetic 모델 함수식은 다음과 같았다.

$$N(t) = 10^{\log N_0 - (t/10^{(61.8884 - T)/8.9})} \quad (9)$$

$$N(t) = 10^{\log N_0 - t/10^{(62.1546 - T)/7.98}} \quad (10)$$

최종적으로 완성된 *Lb. brevis*와 *P. damnosus*의 kinetic 모델 함수식은 각각 식(9)과 식(10)과 같았다.

3.2.2. Weibullian 모델

Fig. 5-8, 5-9, 5-10은 Fig. 5-1, 5-2, 5-3의 미생물 살균실험 데이터를 가지고 $\log S(t)$ 로 변환하여 나타낸 그래프이다.

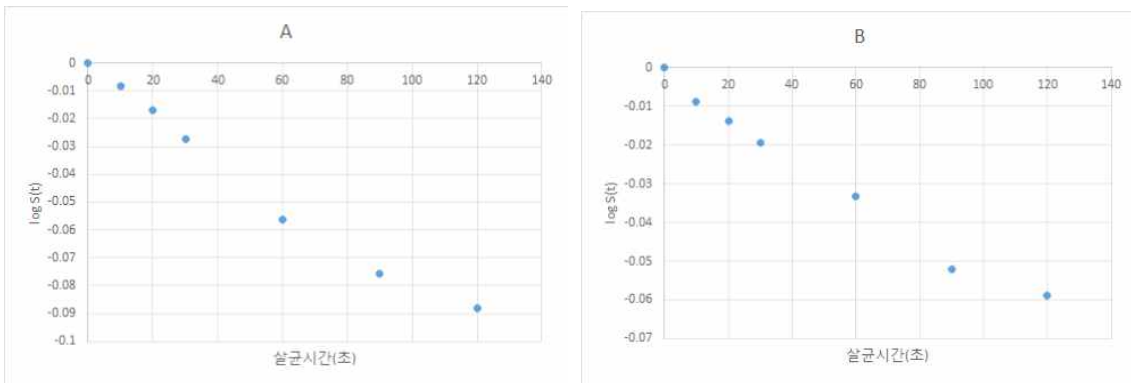


Fig. 5-8. 50°C 살균조건에서 시간에 따른 균 농도 $N(t)$ 변화. A: *Lb. brevis*, B: *P. damnosus*.

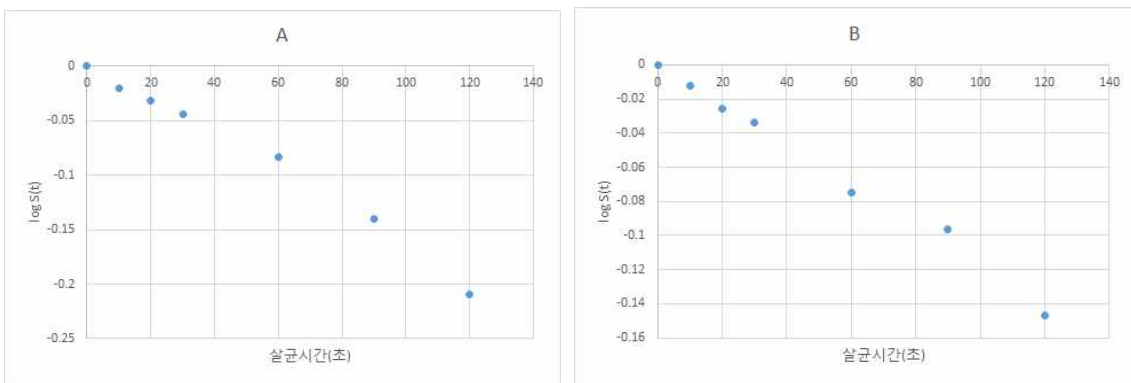


Fig. 5-9. 55°C 살균조건에서 시간에 따른 균 농도 $N(t)$ 변화. A: *Lb. brevis*, B: *P. damnosus*.

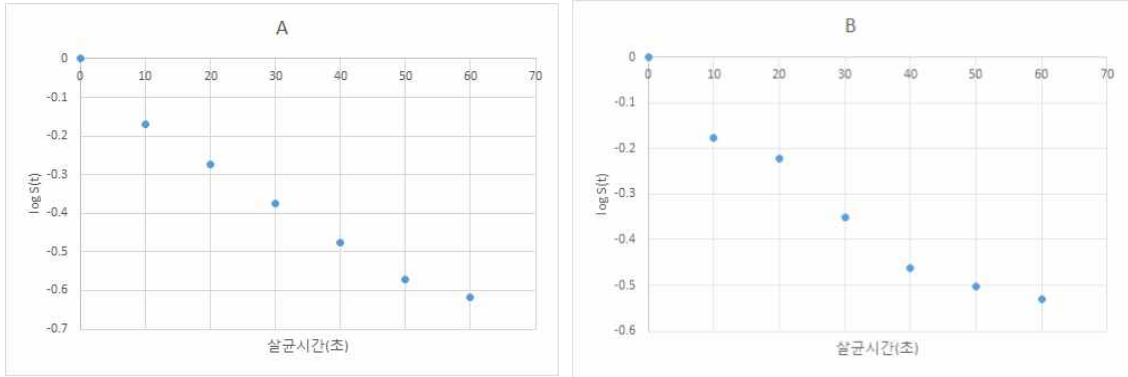


Fig. 5-10. 60°C 살균조건에서 시간에 따른 균 농도 $N(t)$ 변화. A: *Lb. brevis*, B: *P. damnosus*.

위의 결과 또한 Fig 5-1, 5-2, 5-3과 같이 미생물 사멸의 지수적 변화를 잘 나타내고 있다. 살균 시간에 따른 $\log S(t)$ 값이 선형으로 감소한다는 것은, 살균도의 의미를 갖고 있는 초기 균수에 대한 살균 후 미생물수인 $S(t)$ 값 자체는 지수적으로 감소한다는 것을 나타낸다. 두 균 사이의 차이를 보면 살균 시간에 따른 *Lb. brevis*의 $S(t)$ 값의 변화 폭이 *P. damnosus*보다 큰 것을 알 수 있다. 식 (6)에 따라 회귀 분석하여 얻은 결과를 Fig. 11-13에 나타내었다.

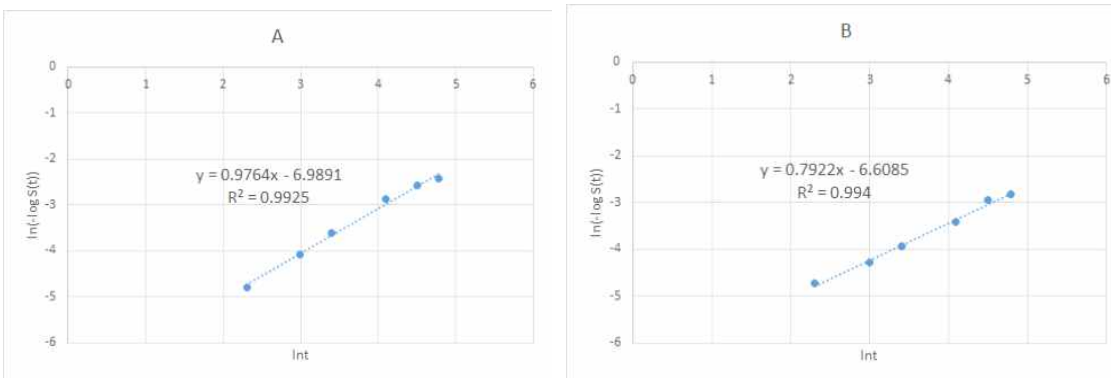


Fig. 5-11. 50°C 살균조건에서 시간에 따른 균 농도 변화에 Weibullian 모델의 적용. A: *Lb. brevis*, B: *P. damnosus*.

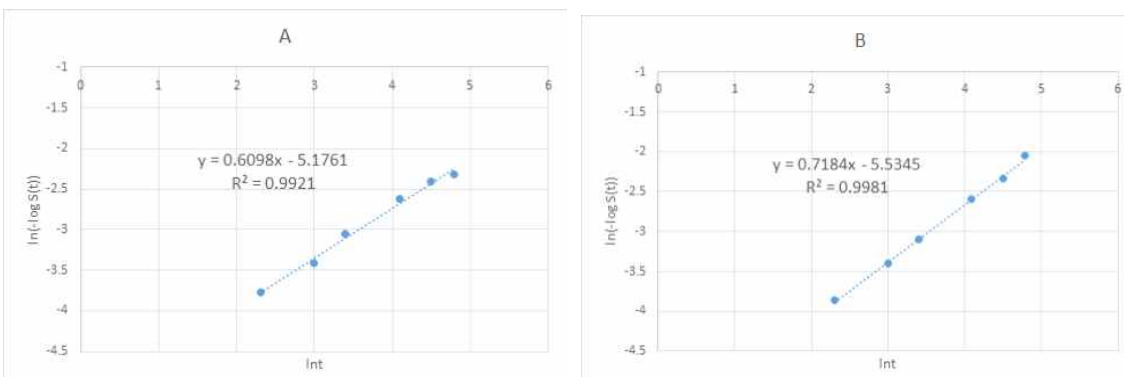


Fig. 5-12. 55°C 살균조건에서 시간에 따른 균 농도 변화에 Weibullian 모델의 적용. A: *Lb. brevis*, B: *P. damnosus*.

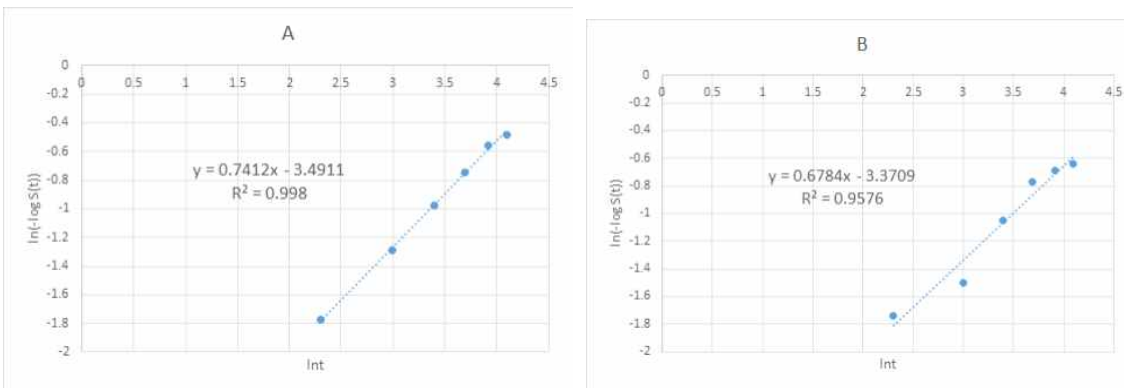


Fig. 5-13. 60°C 살균조건에서 시간에 따른 균 농도 변화에 Weibullian 모델의 적용. A: *Lb. brevis*, B: *P. damnosus*.

Fig 5-8, 5-9, 5-10에서 알 수 있듯이 $\log S(t)$ 의 변화가 음수이기 때문에 식(5)의 양변에 음수를 취한 다음 회귀분석하여 나타내었다. 그 결과는 Table 5-2와 같았으며, 온도의존성 파악을 위해 $b(T)$ 값을 온도에 따라 plot한 결과는 Fig. 14와 같았다.

Table 5-2. 맥주의 품질 저하 원인균의 Weibullian 모델의 b , n , a , c 값

	Temperature(°C)	b	n	R^2	a	c	R^2
<i>Lactobacillus brevis</i>	50	0.00	0.98	0.99			
	55	0.01	0.61	0.99	0.15	10.62	0.99
	60	0.03	0.74	0.99			
<i>Pediococcus damnosus</i>	50	0.00	0.79	0.99			
	55	0.00	0.72	0.99	0.14	9.98	0.96
	60	0.03	0.68	0.96			

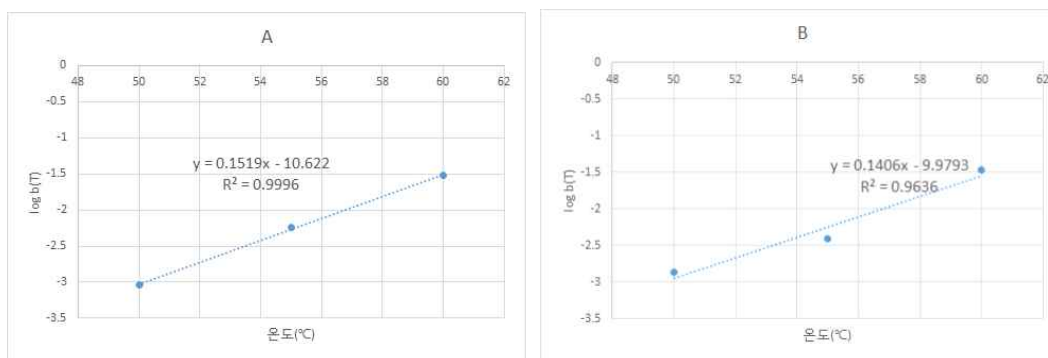


Fig. 5-14. 살균 온도에 따른 Weibullian 모델의 b 값에 온도의존성 모델(식 (6))의 적용. A: *Lb. brevis*, B: *P. damnosus*.

온도의존성을 나타내는 a값을 보면 *Lb. brevis*가 0.15, *P. damnosus*가 0.14로 산출되었다. D, z값 모델과 마찬가지로 *Lb. brevis*의 사멸 경향이 온도 의존성이 조금 더 높고, *P. damnosus*가 열 저항성이 더 크다는 것을 알 수 있다. 한편, n의 값에 따라 n>1인 경우와 n<1인 경우로 나뉘지는데, n=1인 경우가 일반적으로 알려진 1차 반응의 불활성화 모델에 해당된다.

최종적으로 완성된 *Lb. brevis*와 *P. damnosus*의 kinetic 모델 함수식은 각각 식(11)과 식 (12)과 같았으며 함수식에 적용된 n의 평균값은 *Lb. brevis*가 0.78, *P. damnosus*가 0.73 이었다.

$$S(t) = 10^{(-10^{(0.15T-10.62)}t^{0.78})} \quad (11)$$

$$S(t) = 10^{(-10^{(0.14T-9.98)}t^{0.73})} \quad (12)$$

나. 품질 변화 kinetics 모델링

(1) 요약

맥주 살균의 주안점을 크게 두 가지에 주어진다. 먼저 충분한 살균 정도가 필수적이다. 이와 함께 간과되지 말아야 요인으로 가열에 따른 풍미의 변화를 들 수 있다. 본 연구에서는 맥주 가열에 따른 풍미의 변화를 실험하였다. 풍미 변화는 이취 발생 확률로 나타내었으며 logistic 함수를 사용하여 모델링하였다. 그 결과 50, 55, 60℃에서 이취 발생 확률 P와 가열(살균)시간 X의 함수로 나타내어지는 품질 변화 함수는 각각 $P=1/(\exp(-0.10197X+3.8653))$, $P=1/(\exp(-0.18607X+4.4672))$, $P=1/(\exp(-0.41492X+5.3404))$ 로 나타났다. 온도의존성은 logistic 함수의 상호변수인 g와 h의 다항식으로 나타내었으며 그 결과 $g = -0.0029T^2+0.287155T-7.22222$, $h = 0.005426T^2-0.44935T+12.7678$ 로 규명되었다.

[비고] 당초 연구방법에는 온도, 시간에 더하여 용존산소를 계획하였으나 용존산소의 영향은 이취발생에 미미한 것으로 조사되어 배제하였다.

(2) 재료 및 방법

2.1. 맥주 가열 실험

관능평가에 사용된 맥주는 국내산 2조 맥인 광맥(국립식량과학원)을 이용하여 제조한 맥주를 가지고 실험하였다. 살균 용기로는 330 mL 갈색 유리병을 사용했으며, come up time 을 최소화하기 위하여 유리병에 맥주를 300 mL 씩 넣고 microwave를 이용하여 온도가 (T*-2)~T* °C에 도달하면(T*:목표 온도) capper를 이용하여 입구를 봉 하고 목표 온도로 세팅된 shaking water bath에서 rpm 170 속도로 교반하면서 가열하였다. 목표 시간만큼 가열 살균한 맥주는 바로 얼음으로 옮겨 30분 이상 냉각한 다음 관능평가에 사용되기 전까지

4~5도에서 보관하였다. 온도는 50, 55, 60℃도 세 가지 조건으로 살균했으며, 살균 시간은 각 온도에서 산출한 두 가지 spoliage 균의 D값의 평균값을 기반으로 산출하였다. 50℃에서는 살균도 0-3 범위에서 살균 시간 interval은 살균도 0.25로 실험하였으며, 55℃에서는 살균도 0-4범위에서 살균 시간 interval은 살균도 0.5로 실험하였고, 60℃에서는 살균도 0-16 범위에서 살균 시간 interval은 살균도 0.25씩 실험하였다.

2.2. 관능검사

먼저 관능평가를 위한 패널의 선발 및 훈련 과정을 실시하였다. 동국대학교 식품공학과 대학원생 40여명을 대상으로 실제 검사할 시료와 다른 맥주 시료를 제공하고 여러 시료의 변별 능력 및 반복성을 통계적으로 분석하여 그 중 30명을 패널 요원으로 선발하였다. 패널을 계속 교육하고 훈련하며 그 능력을 향상시키는 과정을 실시하여 최종적으로 가능성이 없는 패널을 배제하여 본 실험에 활용한 20명의 패널을 확정하였다. 각 온도별 샘플 수가 많아 관능평가는 3일에 걸쳐 실시하였으며, 차이 식별 검사를 통해 해당 샘플의 이취 유무를 평가하도록 했다. 평가 사이사이에 입을 헹글 수 있는 생수와 무염 크래커를 제공하였다.

2.3. 품질변화 kinetics

풍미의 변화를 가열 시간 경과에 따라 이취가 발생하는 확률을 kinetics의 변수로 정하고 logistic 모델로 모델링하였다.

$$P = 1 / (1 + \exp(gX + h)) \quad (13)$$

여기서 P는 관능검사의 이취 발생/비발생 빈도수의 비율로 이취 발생의 확률을 의미하며, X는 가열 또는 살균 시간, g와 h는 상수이다. 식 (13)을 회귀분석하기 위하여 식 (14)과 같이 변환하였다.

$$\ln((1 - P) / P) = gX + h \quad (14)$$

온도의존성을 규명하기 위하여 logistic 모델의 매개변수인 g와 h의 온도의존성 식을 다항식으로 제시하였다.

$$g = a_1 + a_2 T + a_3 T^2 \quad (15)$$

$$h = b_1 + b_2 T + b_3 T^2 \quad (16)$$

(3) 결과 및 고찰

3.1. 가열 중 이취 발생

Fig. 5-15는 50, 55, 60°C에서 가열할 때 이취가 발생하는 확률을 나타낸다.

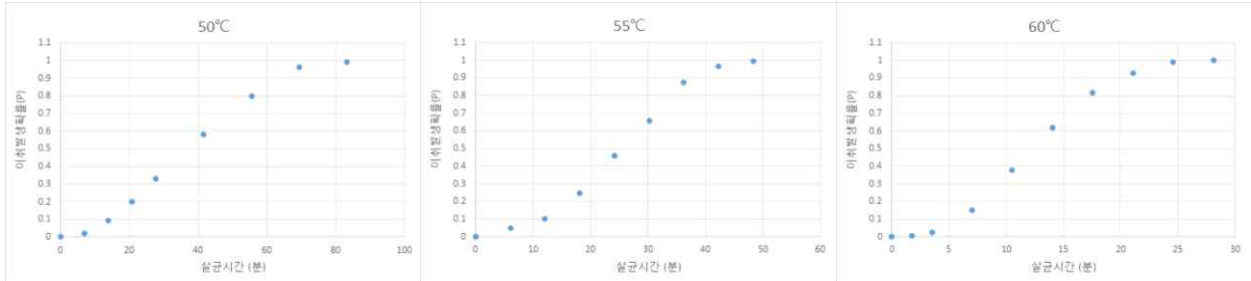


Fig. 5-15. 살균 시간에 따른 맥주의 이취 발생 확률(P=0 : 이취 발생 불감지, P=1 : 모든 패널이 이취의 발생을 감지)

그래프의 모양을 보면 logistic 함수의 형태를 나타내고 있다. 살균 시간이 길어짐에 따라 초기에는 이취 발생 확률이 작다가 어느 순간 급격히 증가하면서 1에 가까운 값으로 수렴하는 형태를 보이고 있다. 가열(살균)시간에 따른 확률의 관계 함수를 구하기 위해서는 logistic 함수를 적용하여 산출할 수 있다.

3.2. 품질변화 kinetics

Fig. 5-16는 logistic 함수의 변형 식 (14)을 선형 회귀분석하여 함수의 상호변수를 산출하는 과정을 보여준다. 이로부터 산출된 상호변수는 Table 5-3과 같다. 또한 온도의존성 모델을 회귀 분석한 결과는 Fig. 5-17과 같다.

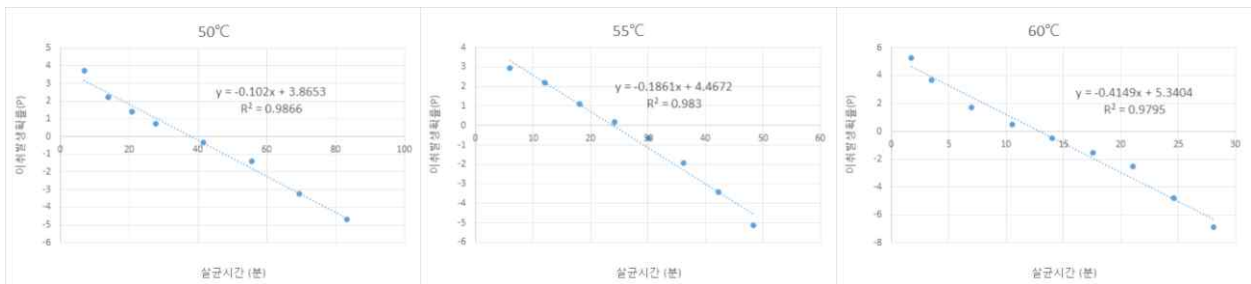


Fig. 5-16. 살균 시간에 따른 맥주의 이취 발생 확률에 logistic 모델 적용.

Table 5-3. 맥주의 이취 발생에 대한 logistic 모델의 g, h 값 및 온도의존성 모델

temperature (°C)	g	h	R ²	g, h의 온도의존성 모델	R ²
50	-0.10197	3.8653	0.99	$g = -0.0029T^2 + 0.287155T - 7.22222$ $h = 0.005426T^2 - 0.44935T + 12.7678$	R ² =1
55	-0.18607	4.4672	0.98		R ² =1
60	-0.41492	5.3404	0.98		

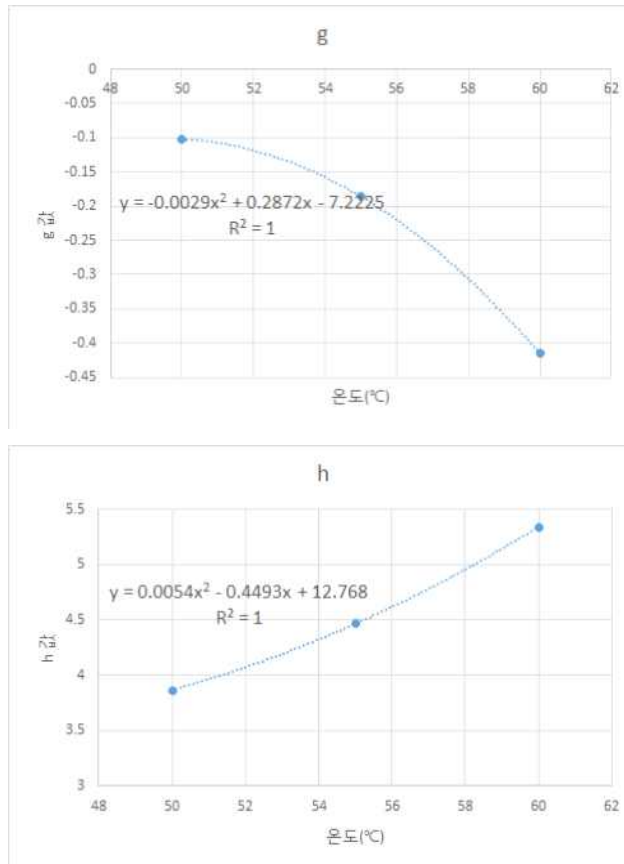


Fig. 5-17. logistic 모델의 매개변수인 g, h의 온도의존성 함수.

Fig. 5-17과 Table 5-3을 통해 각 온도에서 g, h값을 산출하였다. 이 값을 식 13의 logistic 함수에 대입하면 해당 온도에서의 이취 발생 확률 함수를 구할 수 있다.

다. 최적의 살균 온도/시간 결정

(1) 요약

맥주 살균과 품질변화 kinetic 모델을 접목하여 최적의 살균 조건을 산출하였다. 품질변화 kinetic에서 이취 발생 확률이 0.5인 시점을 이취 발생 시간(ODT, off-flavor detection time)으로 정의하고, 온도 범위 50-65°C 구간에서 이취 발생 시간(ODT)을 계산하였다. 또한 미생물 사멸 kinetic에서 확인된 각 미생물의 D값을 이용하여 해당 ODT의 살균도를 계산하였다. 각 살균 조건을 도식화하여 이취발생도 방지하고 살균도 충분한 조건을 최적 조건으로 결정하였다. 이로부터 59.6°C에서 12.8분이 최적 살균 조건으로 결정되었다.

[비고] 당초 연구방법에는 최적화 방법으로 반응표면분석(중심합성법 실험설계 포함)을 계획하였으나 살균 및 맛 변화를 동시에 충족하는 조건은 독립변수인 온도, 시간 간 함수관계를 결정해서 반응표면분석에서 필요로 하는 독립변수의 성격을 만족시키지 못하여 도식화 방법을 최적화하는데 적용하였다.

(2). 재료 및 방법

2.1. 이취발생시간 계산

식 (14)에서 이취 발생 확률(P)가 0.5가 될 때의 살균 시간을 이취 발생 시간으로 계산한다.

$$\ln((1-0.5)/0.5) = gX + h$$

$$\therefore X = -\frac{h}{g}$$

2.2. D 값 계산 *b. brevis*의

식 (3) 또는 fig. 7의 관계식을 사용하여 온도에 따른 D 값을 계산한다.

2.3. 살균도 계산

적으로 식품에 존재하는 균을 완전히 살균하기는 불가능하므로 살균 공정의 목적을 달성키 위한 살균 목표 값을 균 농도 비를 대수 값($\log N_0/N$)으로 나타낸 살균치(또는 살균도, n)으로 나타낸다. 다시 말해 살균공정의 가열 살균 시간(thermal death time, TDT)은 살균 목표 값(n)에 따라서 결정된다.

$$TDT = n \cdot D \quad (17)$$

각 온도에서의 이취발생시간을 D값으로 나누어 해당 시간에 상응하는 살균도를 계산한다. 맥주의 충분한 살균 조건인 살균도 = 5 이상인 살균 시간 조건이취발생시간으로부터 식 (16)로부터 산출하여 기준되는 살균도를 만족시키는 조건을 최적으로 결정하되 단, 두 가지 균을 모두 만족시키는 조건으로 제한한다.

(3) 결과 및 고찰

Table 5-4에 각 온도에서의 이취 발생 시간과 두 균을 기준으로 하는 D값을 산출하였다. 또한 각 D값의 살균도를 산출하였다.

Table 5-4. 50 - 65°C에서 미생물 사멸 kinetics와 품질 변화 kinetics를 적용한 살균 시간 산출 (아래첨자 A는 *Lb. brevis*를, 아래첨자 B는 *P. damnosus*를 의미한다)

Temperature (°C)	이취 발생시간 (분)	D _A (min)	살균도 _A (n,n·D)	D _B (min)	살균도 _B (n,n·D)
50	33.51	25.79	1.30	41.07	0.82
51	32.73	19.91	1.64	30.78	1.06
52	30.69	15.37	2.00	23.06	1.33
53	27.92	11.86	2.35	17.28	1.62
54	24.93	9.16	2.72	12.95	1.92
55	22.04	7.07	3.12	9.71	2.27
56	19.44	5.46	3.56	7.27	2.67
57	17.18	4.21	4.08	5.45	3.15
58	15.25	3.25	4.69	4.08	3.74
59	13.63	2.51	5.43	3.06	4.45
60	12.25	1.94	6.32	2.29	5.34
61	11.10	1.50	7.42	1.72	6.46
62	10.12	1.16	8.76	1.29	7.86
63	9.29	0.89	10.41	0.97	9.62
64	8.57	0.69	12.46	0.72	11.86
65	7.96	0.53	14.98	0.54	14.69

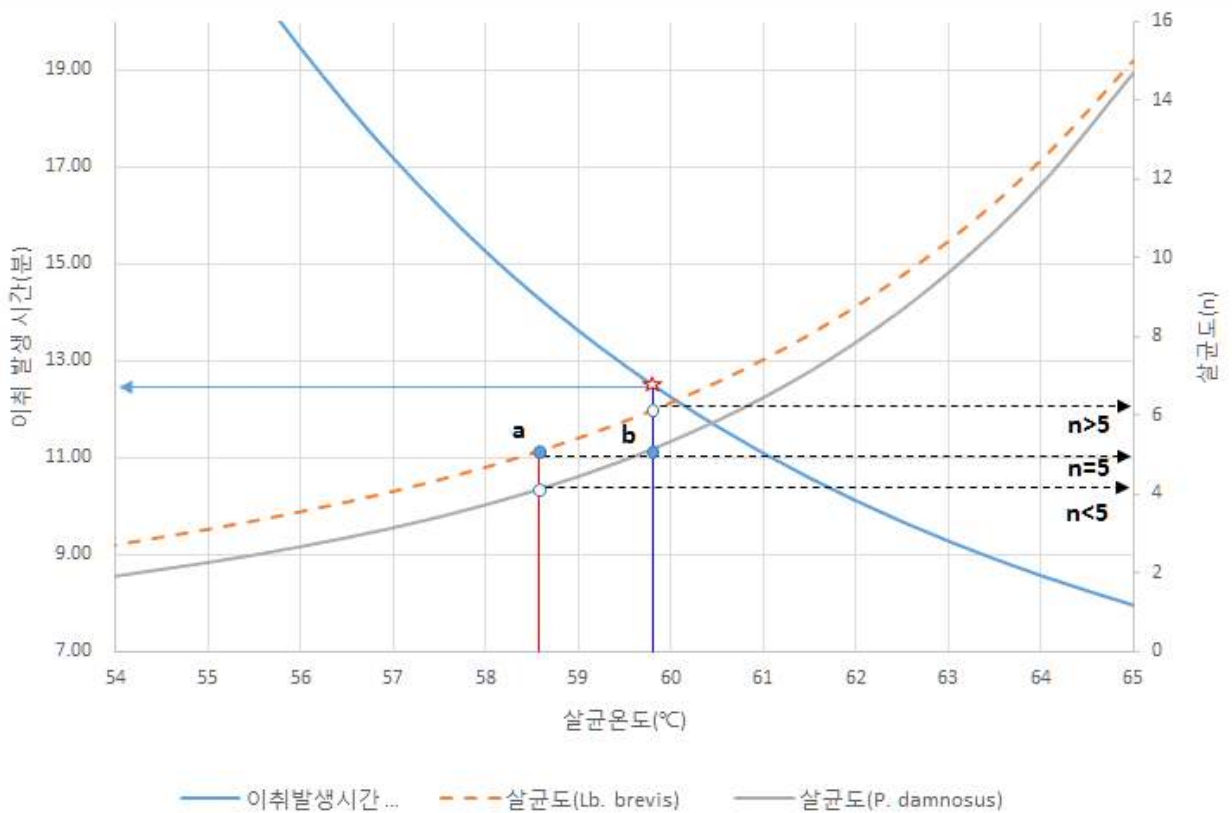
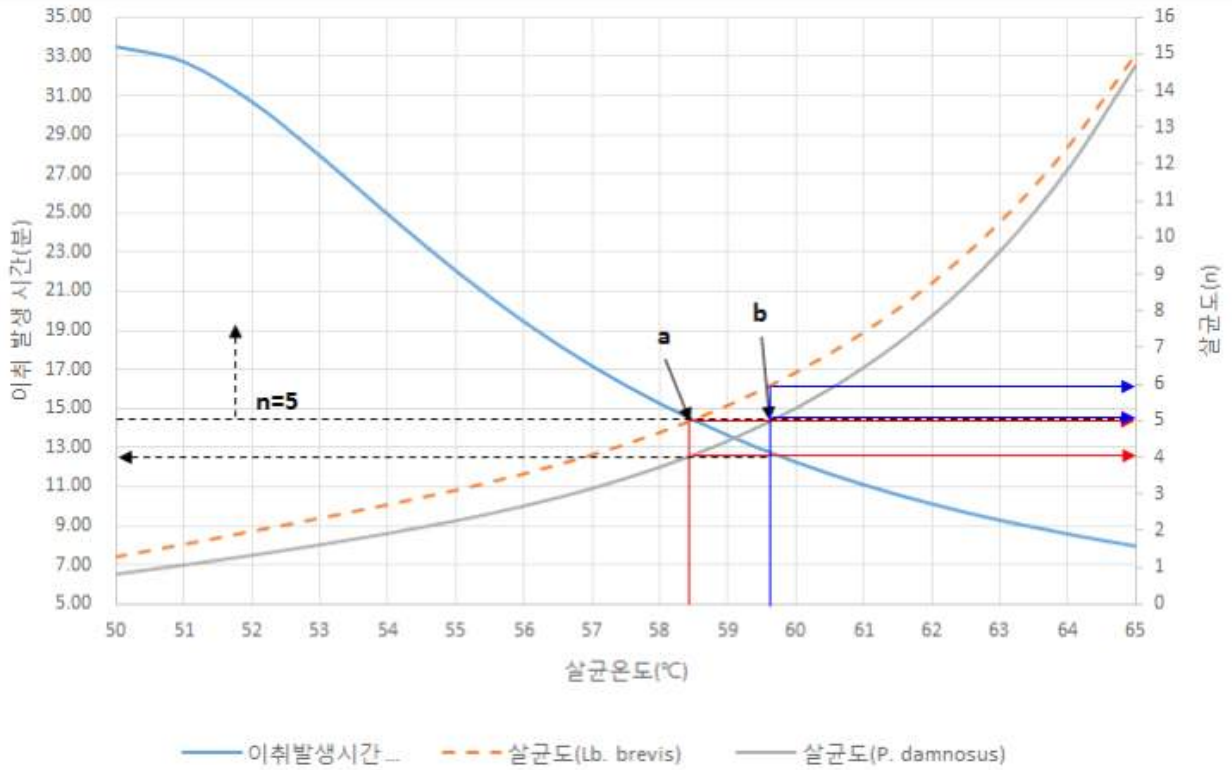


Fig. 5-14. 최적 살균조건의 도표 분석(graphical analysis). ☆가 최적 조건: 온도= 59.6℃, 시간 = 12.8분.

점선으로 나타난 *b. brevis*의 그래프를 A곡선, *P. damnosus*의 그래프를 B곡선이라 하자. 기준이 되는 살균도 ($n=5$)를 기준으로 그 위의 범위의 곡선이 목표 살균도를 만족하는 범위가 된다. $n=5$ 직선과 A, B 곡선이 만나는 지점을 a, b라 하면, 각 점에서의 살균 온도와 시간 쌍을 구할 수가 있다. 두 지점에서의 살균 조건쌍을 읽으면 a점이 58.5°C에서 14.5분, b점이 59.6°C에서 12.8분이다. 첫 번째 a점의 살균 조건은 *b. brevis*의 살균도 조건은 만족하지만 *P. damnosus*를 기준으로 했을 때에는 살균도 n 이 약 4정도로, n 이 5 이하가 되므로 두 균의 살균도 조건을 만족하지 못한다. 반면 b점의 살균 조건은 *P. damnosus*를 기준으로 했을 때 $n=5$ 을 만족하는 동시에 *b. brevis*를 기준으로 했을 때에는 n 이 6정도로, 살균도 n 이 5 이상이므로 두 균의 살균도가 모두 $n \geq 5$ 가 된다. 결과적으로, 최적 살균조건은 b점의 조건이며, 이 점에 가장 가까운 살균 온도쌍을 Table 4에서 찾으면 60°C에서 12.25분이라고 할 수 있다.

2. 미생물 살균 및 품질 변화가 최적화된 현장 살균공정을 완성

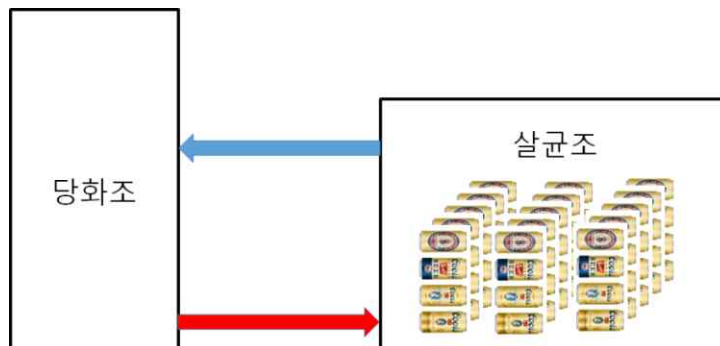
가. 현장 살균기 가동조건에 따른 공정변수 모니터링

(1) 실험 재료 및 방법

1.1.1. 맥주 제조(당화 및 발효)

맥주 제조에 사용된 맥아는 국내산 2조맥인 광맥(국립식량과학원)을 이용했으며, EBC Congress mash법에 따라 당화하여 맥즙을 제조하였다. 맥아 50g을 45°C의 증류수에 잘 섞은 다음 45°C에서 30분간 당화 시킨 후 온도를 증가시켜 맥즙의 온도를 70°C까지 가열하였다. 그 후 70°C의 증류수 100 mL를 첨가하여 70°C를 유지하면서 1시간 더 당화시켰다. 당화가 완료되면 17-18°C로 맥즙을 식히고 증류수를 첨가하여 무게를 450 g로 맞춘 후 주름진 여과지를 이용하여 여과하였다. 발효과정은 맥즙에 hop을 3회에 걸쳐 1/2, 1/4, 1/4로 나누어 넣으며, 각각 10분, 5분, 5분씩 끓여 주었다. 이후 맥즙의 온도를 20°C가 될 때까지 급속 냉각시켰다. 여기에 미리 증식한 효모를 주입한 뒤, 공기차단기를 설치하여 20°C에서 4일간 1차 발효를 실시하였다. 1차 발효 후 맥주를 병입한 후 15°C의 온도에서 7일간 2차 발효를 하였다. 제조된 맥주를 500ml 캔에 담는다.

1.1.2. 살균조 가동 중 온도/시간 모니터링을 통한 온도 profile 도출



현장의 맥주 살균기는 위 그림과 같이 기존 시설을 활용하기 위하여 당화조에서 물을 가열

한 후 살균수조에 가열된 물을 순환시키는 구조로 되어있다.

먼저 제조된 맥주를 캔닝하기 전에 온도 데이터 로거를 함께 넣어 밀봉한다. 당화조의 온도를 여러 가지로 설정하였을 때 맥주 캔이 경험하는 시간에 따른 온도를 수집하여 데이터 베이스를 구축한다. 본 실험에서는 50℃, 60℃, 70℃ 세 가지 대표 셋팅 온도의 온도 profile 을 얻는다.

1.1.3. 살균조 운전 조건과 온도/시간 관계 함수를 퍼지 추론 적용하여 완성

퍼지 추론에 이용되는 소속도 함수의 대표적인 함수는 Fig. 1-3에 나타내었다. 다음과 같이 Triangular 함수, Gaussian 함수, Sigmoid 함수를 포함한다. 각 소속도 함수에서 예측하고자 하는 온도의 소속도를 읽어내고 퍼지 합성을 통하여 시간에 따른 온도의 예측 값을 산출한다.

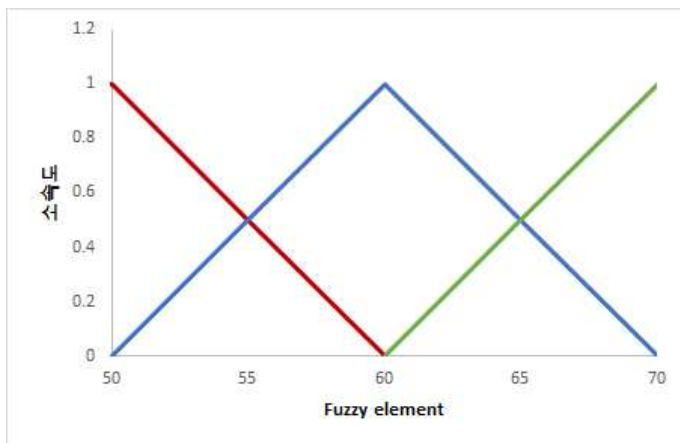


Fig. 5-15. 퍼지 추론에 이용되는 소속도 함수인 Triangular 함수

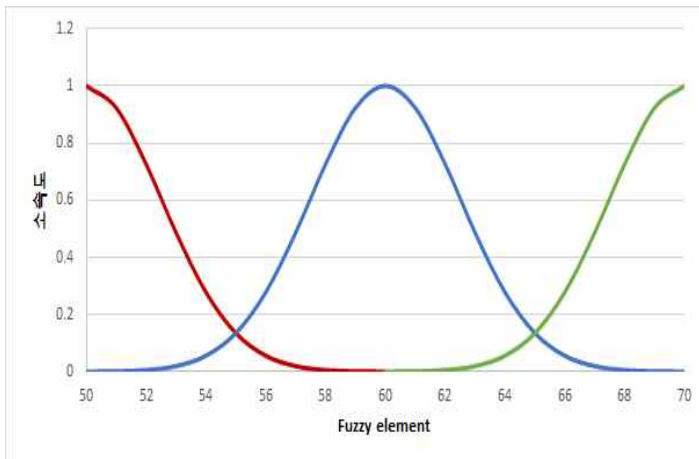


Fig. 5-16. 퍼지 추론에 이용되는 소속도 함수인 Gaussian 함수

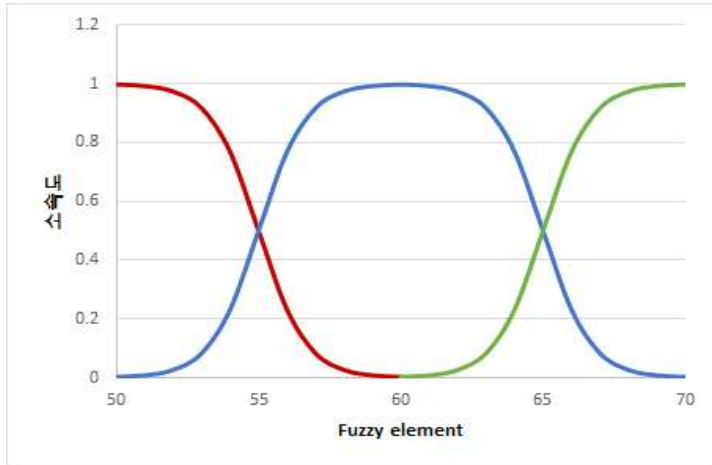


Fig. 5-17. 퍼지 추론에 이용되는 소속도 함수인 Sigmoid 함수

예측하고자 하는 임의의 온도 62°C의 소속도를 각 함수에서 읽어낸다. 62°C의 각 소속도 함수별 소속도와 소속도 합을 구한 뒤 살균조 가동 중 온도/시간 모니터링을 통해 도출한 60°C, 70°C의 온도 profile을 이용하여 62°C에서의 시간에 따른 예측 값을 퍼지 합성을 통해 산출한다. 퍼지 합성은 다음 식을 이용한다.

$$Y = f_{T_1}(t) \times w_1 + f_{T_2}(t) \times w_2 / (w_1 + w_2) \quad (1)$$

여기서 $f_{T_1}(t)$, $f_{T_2}(t)$ 은 각각 살균조 가동 중 온도/시간 모니터링을 통해 도출한 셋팅 온도인 T_1 , T_2 의 시간에 따른 온도, w_1 , w_2 는 각 소속도 함수별 온도 60°C, 70°C에서의 소속도이다. 예를 들어, 위에서 설명한 임의의 온도 62°C의 경우 소속도 함수별 소속도를 구한다.

이를 위의 식 (1)에 적용하여 각각 세 가지 소속도 함수별 62°C의 시간에 따른 온도를 예측한다. 이후 실제 셋팅 온도 62°C의 실측실험을 진행하고 예측 함수와 비교한다. 실측 실험 결과와 세 가지 소속도 함수의 R^2 를 비교한 결과 가장 정확도가 높은 소속도 함수를 결정한다. 최종 결정된 소속도 함수로 온도 구간 50-70°C는 1°C 단위로 퍼지합성을 진행하여 시간에 따른 온도 예측함수를 얻어낸다.

1.2 현장 살균기 가동 조건에 따른 살균/품질 예측에 의한 최적 조건 완성

살균조 가동 조건과 퍼지 추론을 적용하여 얻은 온도/시간 관계 함수를 이용하여 미생물 농도와 관능적 품질을 고려한 맥주 살균 최적 조건을 완성한다.

1.2.1 살균조 운전 조건에 따른 미생물 농도 및 관능적 품질을 예측

등온 조건에서 미생물 농도를 예측할 수 있는 modeling 식은 다음과 같다.

$$N = 10^{\log N_0 - (t/10^{(62.1546 - T)/7.98})} \quad (2)$$

여기서 t 는 살균 시간(분), T 는 온도($^{\circ}\text{C}$), N_0 는 초기 균 농도(c.f.u./ml)이다. 식 (2)는 1차년도에 완성한 식으로 열 저항성이 큰 *Padiococcus damnosus*의 kinetics model 함수식이다. 그러나 실제 살균조 가동 조건을 고려하면, 맥주가 경험하는 온도 profile은 등온 조건이 아닌 변온 조건이다. 변온 조건에서의 미생물 농도 변화 계산은 아래 식을 이용한다.

$$\begin{aligned}
 N_1 &= N_0 + \Delta N(at T_1) \\
 N_2 &= N_1 + \Delta N(at T_2) \\
 N_3 &= N_2 + \Delta N(at T_3) \\
 &\vdots \\
 &\vdots \\
 &\vdots \\
 N_{(t)} &= N_{(t-1)} + \Delta N(at T_t) \qquad (3)
 \end{aligned}$$

퍼지 합성을 통해 얻어낸 시간에 따른 온도 profile을 이용하여 변온 조건에서 미생물 농도 변화를 계산한다. 식 (3)에서 $N_{(t)}$ 는 시간 t 에서 미생물 농도를 의미한다. 변온 조건에서 1초 단위로 기록된 온도에 따른 미생물 농도는 이전 미생물 농도에 미생물 농도 변화량 $\Delta N(at T_t)$ 을 더하여 구한다. 미생물 농도 변화량 $\Delta N(at T_t)$ 은 식 (2)에서 t 살균 시간(분) 대신 t 의 변화량(Δt)을 대입하고 온도 $T(^{\circ}\text{C})$ 는 시간 t 에서의 $T(^{\circ}\text{C})$ 를 이용하여 구한다.

식품의 살균 중 음료의 일반적인 살균도는 5D로 알려져 있다. 일반적으로 식품에 존재하는 균을 완전히 살균하기는 불가능하므로 살균 공정의 목적을 달성키 위한 살균 목표 값인 균 농도 비를 대수 값($\log N_0/N$)으로 나타낸 살균치(또는 살균도, n)으로 나타낸다. 다시 말해 살균공정의 가열 살균 시간(thermal death time, TDT)은 살균 목표 값(n)에 따라서 결정된다. 따라서 살균도 5D를 만족하는 시간 t_a 를 산출한다. 퍼지 추론을 통해 얻은 모든 작동 조건(셋팅 온도)에 대한 t_a 를 구한다.

등온 조건에서 이취가 발생하는 시간을 산출한 modeling 식은 다음과 같다.

$$\text{이취 발생 시간, } t_{OF} = f(\text{온도}) \qquad (4)$$

식 (4)는 1차년도에 완성한 식으로 풍미의 변화를 가열 시간 경과에 따라 이취가 발생하는 확률(P)을 kinetics 변수로 정하고 logistic model로 모델링하였다. 여기서 $P=0.5$ 일 때 이취 발생 시간을 구하고 이취 발생 시간의 역수를 취하여 이취 발생 속도($1/t_{OF}$)를 구한다. 이취 발생 속도의 온도 의존성을 규명하기 위하여 아레니우스식을 이용한다. 이취 발생 속도($1/t_{OF}$)의 아레니우스식은 다음과 같다.

$$\frac{1}{t_{OF}} = A \cdot \exp\left(\frac{E_a}{R \cdot T}\right) \quad (5)$$

식 (5)에 로그를 취한 선형 관계식은 다음과 같다.

$$\ln \frac{1}{t_{OF}} = \frac{E_a}{R} \cdot \frac{1}{T} + \ln A \quad (6)$$

그러나 실제 살균조에서 살균을 진행할 때 맥주의 관능적 품질 또한 미생물의 농도와 같이 등은 조건의 영향을 받는 것이 아닌 변온 조건의 영향을 받게 된다. 실제 살균조의 가동 조건 온도 profile을 보면 셋팅 온도까지 come up time이 존재하므로 변온 조건을 고려해야 한다. 따라서 퍼지 합성을 통해 얻어낸 시간에 따른 온도 profile에 아레니우스식을 적용하여 순간온도의 이취 발생 시간을 구한다. 그리고 시간 변화를 각 시점의 이취 발생 시간으로 나눠준 다음 그 누적치를 이취 생성률로 산출했다. 이취 생성률 식은 아래와 같다.

$$\begin{aligned} \text{이취 생성률} &= f(\text{온도 profile}, t_{OF}) \\ &= \frac{\Delta t}{t_{OF_1}} + \frac{\Delta t}{t_{OF_2}} + \frac{\Delta t}{t_{OF_3}} + \frac{\Delta t}{t_{OF_4}} + \dots = \sum \frac{\Delta t}{t_{OF_n}} \quad (7) \end{aligned}$$

이취 생성률이 1에 도달(100%)하는 시점을 이취 발생 시점 t_b 으로 정의하여 모든 작동 조건(셋팅 온도)에 대한 t_b 를 읽어낸다.

1.2.2 예측치의 비교로부터 살균기 운전 최적 조건을 결정

위 방법들로부터 나온 살균도 만족 시간(t_a)과 이취 발생 시점(t_b)을 이용하여 살균기 운전 최적 조건을 결정한다. 50°C-70°C 사이 모든 작동 조건(셋팅 온도)에 대한 살균도 만족 시간(t_a)과 이취 발생 시점(t_b)을 구하고 이를 온도에 따른 시간 그래프로 나타낸다. 그래프에서 t_a 가 t_b 보다 작아지는 온도 구간에서 시간 t_a 이상 t_b 이하로 살균기 운전 조건을 결정한다.

(2) 결과 및 고찰

2.1. 살균조 가동 중 온도/시간 모니터링을 통한 온도 profile 도출

살균조 운전 조건인 셋팅 온도 50℃, 60℃, 70℃에서 맥주 500ml 캔이 경험한 온도 profile을 Fig. 5-18.에 나타내었다.

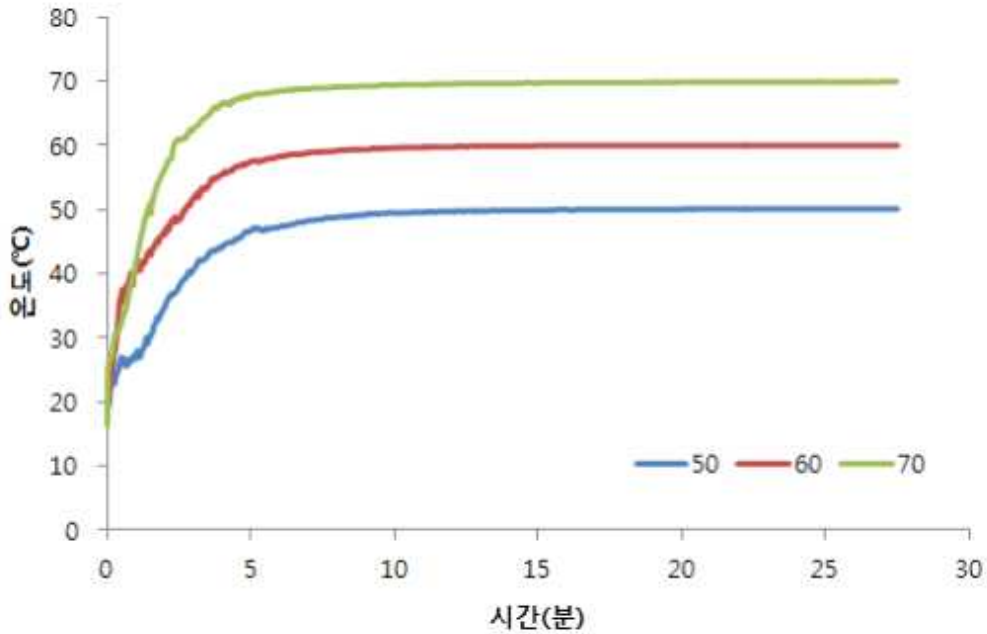


Fig. 5-18. 50℃, 60℃, 70℃에서 맥주 500ml 캔이 경험한 실측 온도 profile

2.2. 살균조 운전 조건과 온도/시간 관계 함수를 퍼지 추론 적용하여 완성

살균조 운전 조건 임의의 셋팅 온도 62℃를 이용하여 퍼지 추론을 진행하였다.

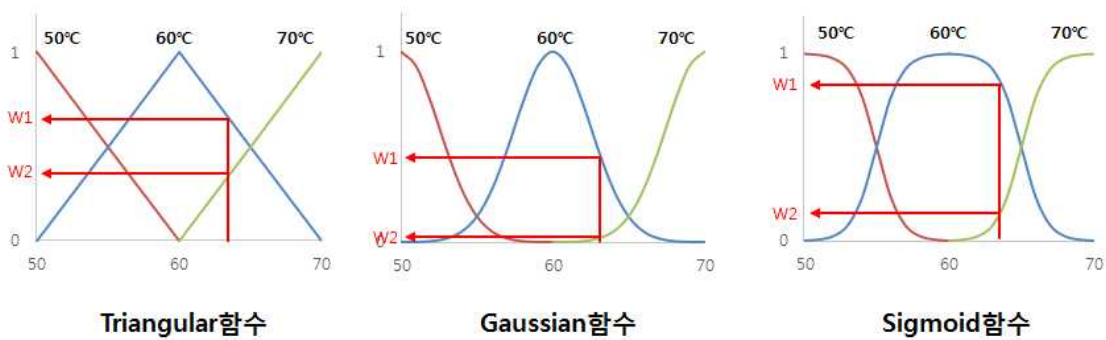


Fig. 5-19. 세 가지 Triangular, Gaussian, Sigmoid 소속도 함수에서 62℃의 소속도 도출 simulation.

Table. 5-5. 세 가지 Triangular, Gaussian, Sigmoid 소속도 함수에서 읽어낸 62°C의 소속도

	triangular	gaussian	sigmoid
50°C	0	0	0
60°C	0.8	0.726149	0.973403
70°C	0.2	0.005976	0.026597
소속도 합(w_1+w_2)	1	0.732125	1

세 가지 Triangular, Gaussian, Sigmoid 소속도 함수에서 해당 셋팅 온도 62°C의 소속도를 읽어낸 후(Fig. 5-19.) Table. 5-5에 나타냈다. Fig. 5-18와 Table. 5-5. 그리고 식 (1)을 이용하여 퍼지합성을 진행하여 1초 단위 시간에 따른 온도 profile을 도출한다. 해당 셋팅 온도 62°C에서 실측 실험을 진행하고 예측 값과 R^2 을 비교해보니 Triangular 함수의 R^2 가 0.9668, Gaussian 함수의 R^2 가 0.8479, Sigmoid 함수의 R^2 가 0.8659로 Triangular 함수의 정확도가 가장 높았다.(Fig. 5-20.)

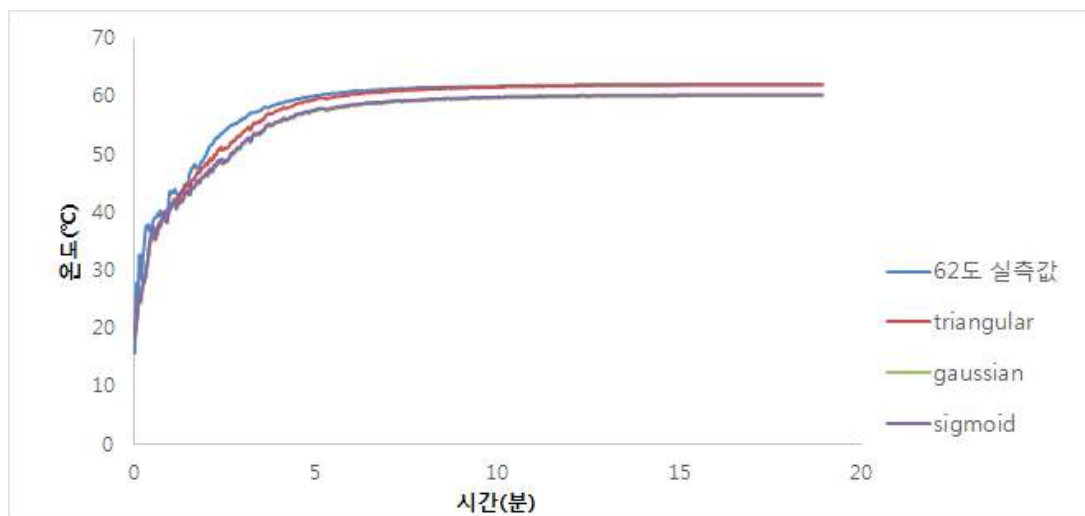


Fig. 5-20. 62°C의 온도 profile 실측값과 소속도 함수를 통한 예측값의 비교.

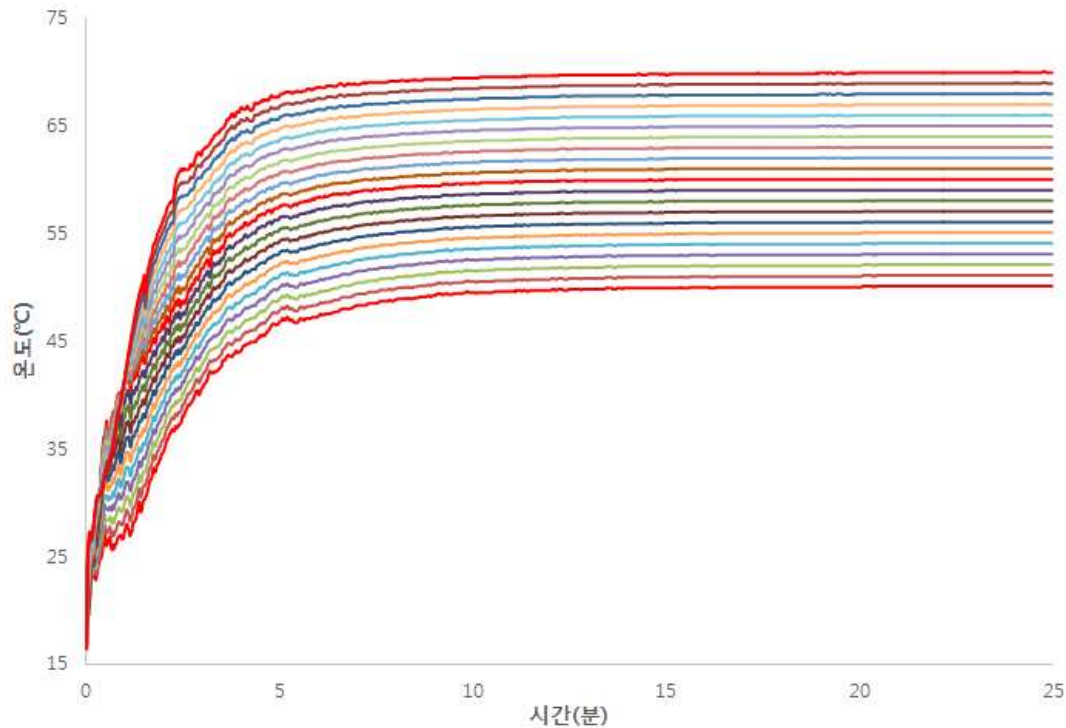


Fig. 5-21. 퍼지 추론에 의한 50°C-70°C 전 작동 조건(셋팅 온도) 온도 profile

따라서 각 온도별로 Triangular 소속도 함수에서 읽어낸 소속도를 구하고 위에서 소개한 식 (1)을 이용하여 퍼지 추론으로 50°C-70°C 전 작동 조건(셋팅 온도)에 대한 온도 profile 을 도출한다. 이는 Fig. 5-21에 나타내었다.

3.2 살균조 운전 조건에 따른 미생물 농도 및 관능적 품질을 예측

실질적으로 살균조 운전 조건에 따라 살균 시 미생물 농도와 관능적 품질이 어떻게 변화하는지 알아보기 위하여 퍼지추론을 통해 도출한 전 작동 조건(셋팅 온도) 구간의 온도 profile과 식 (2)-(7)을 이용하여 예측했다. 가열 살균 시 미생물의 사멸 정도와 관능적 품질에 관한 예측은 등온 조건에서 진행된다면 간단하다. 하지만 실제 산업 현장에서 사용되는 살균조는 come up time이 존재하므로 본 연구는 산업 현장 적용 최적화를 위해 변온 조건을 고려하였다. 따라서 미생물 사멸 및 관능적 품질 변화 각각의 속도와 온도 의존성을 고려했다.

미생물 농도 변화의 경우, 'worse senario'에 의해서 미생물이 가장 많은 경우를 가정하고 살균 실험을 진행하므로 초기 미생물 농도(N_0)는 10000(CFU/ml)으로 정하였다. 가열 살균 시 온도에 따른 미생물 농도변화를 알아보기 위하여 1차년도에 진행한 미생물 사멸 kinetics을 이용하였다. 앞서 소개한 식 (2)는 등온조건에서 온도별 미생물 농도를 예측할 수 있는 model이다. 그러나 본 연구에서는 변온조건을 고려하여, 온도별 미생물 농도 누적치를 나타낸 식 (3)으로 예측했다. 온도에 따른 미생물 농도 변화량이 산출되면 살균도 5D를 만족하는 시점을 살균도 만족 시간(t_a)로 정의한다. Fig. 5-22.와 Fig. 5-23는 이와 같은

과정을 설명한다. Fig. 5-23.의 빨간색 표시는 살균도 5D를 만족한 시간을 나타낸다.

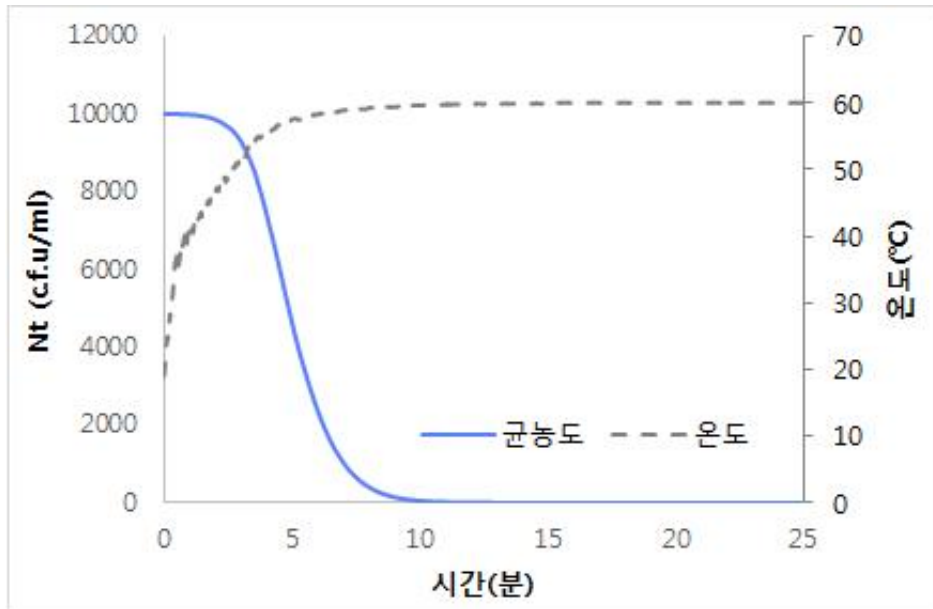


Fig. 5-22. 미생물 농도 변화 graph

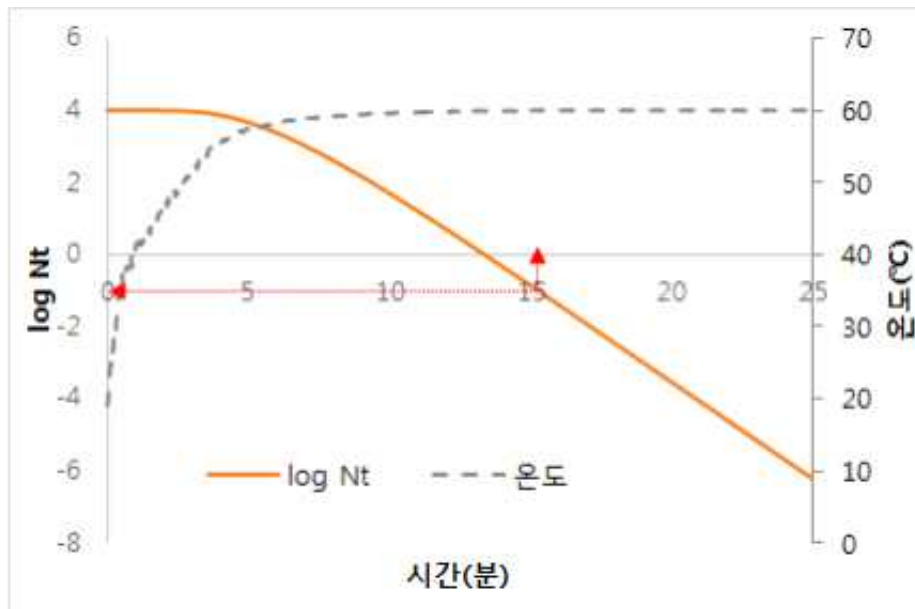


Fig. 5-23. log(미생물 농도) 변화 graph

이와 같은 방법으로 50℃-70℃ 전 작동 조건(셋팅 온도)에 대한 살균도 만족 시간(t_a)을 도출하여 살균조 운전 조건에 따른 살균도 예측 modeling을 완성했다.(Table. 5-6.)

Table. 5-6. 50℃-70℃ 작동 조건(셋팅 온도)에 대한 살균도 만족 시간(t_a)

온도(℃)	살균도 만족 시간(t_a)
50	169.1
51	128.75
52	98.38
53	75.53
54	58.33
55	45.38
56	35.61
57	28.25
58	22.68333333
59	18.46666667
60	15.26666667
61	12.88333333
62	11.03333333
63	9.55
64	8.35
65	7.383333333
66	6.583333333
67	5.933333333
68	5.383333333
69	4.916666667
70	4.533333333

이취 발생의 경우, 관능검사를 통해 얻은 binomial data를 통하여 풍미의 변화를 가열 시간 경과에 따라 이취가 발생하는 확률로 나타내고 그 확률을 kinetics의 변수로 정하여 logistic model로 모델링하였다. 아래의 표(Table. 5-7)는 관능평가를 통해 얻어진 data를 modeling 하여 얻어진 결과를 온도 50℃, 60℃, 70℃ 각각의 이취발생시간(t_{OF}), 이취발생속도($1/t_{OF}$)로 나타낸 값을 보여준다.

Table. 5-7. 50℃, 60℃, 70℃의 이취발생시간(t_{OF}), 이취발생속도($1/t_{OF}$)

온도(℃)	이취발생시간(t_{OF})	이취발생속도($1/t_{OF}$)
50	33.51	0.029841838
55	22.04	0.045372051
60	12.25	0.081632653

Table. 5-8의 data로부터 이취발생속도($1/t_{OF}$)의 온도의존성을 규명하기 위하여 아레니우스식을 이용한다. 식 (6)은 변수 $1/T$, $\ln(1/t_{OF})$ 에 관한 일차식이다.

Table. 5-8. 50℃, 60℃, 70℃ 각각의 $1/\text{절대온도}(T)$ 와 각 온도에서의 $\ln(1/t_{OF})$ 값.

온도(℃)	$1/T(K)$	$\ln(1/t_{OF})$
50	0.003096	-3.511843902
55	0.003049	-3.092858984
60	0.003003	-2.505525937

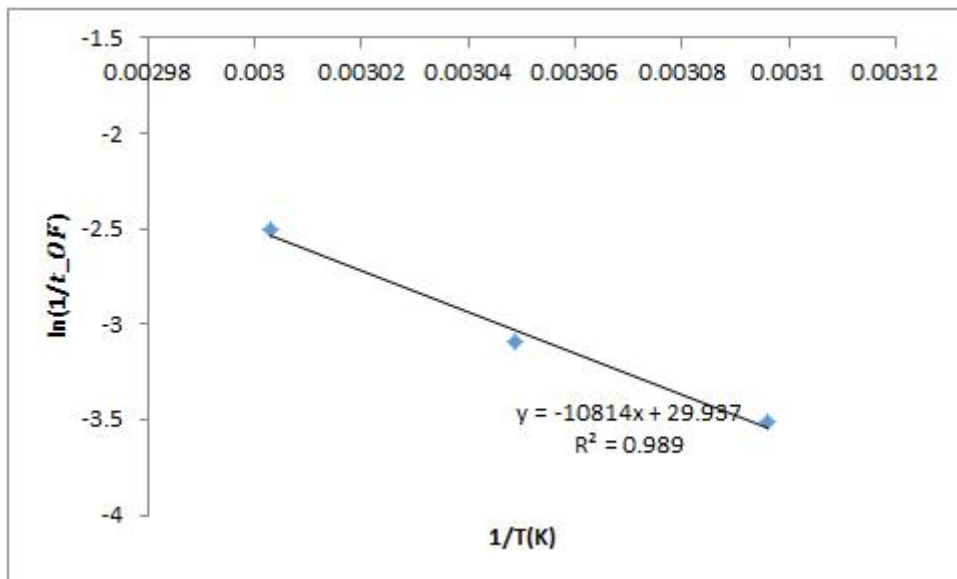


Fig. 5-24. 이취발생속도($1/t_{OF}$)의 온도의존성을 보여주는 아레니우스식

Table. 5-7로부터 Table. 5-8를 구하고 Table. 5-8를 이용하여 이취발생속도($1/t_{OF}$)의 온도의존성을 보여주는 아레니우스식을 완성하였다. 이취발생속도($1/t_{OF}$)의 온도의존성을 규명하였으므로 실제 살균조가 경험하는 온도 profile의 각 온도별 순간온도 이취발생시간을 도출하는 것이 가능하다. 임의의 온도에서 살균조가 실제 경험한 온도 profile에 따른 순간온도 이취발생시간을 구하고 1초 단위로 측정된 온도 profile의 시간 변화를 각 시점의 이취발생 시간으로 나뉜 다음 그 누적치를 이취 생성률로 산출했다. 이취생성률이 1이 되는 시점을 이취 발생 시점으로 정하였다. 따라서 퍼지 추론으로 얻어진 50℃-70℃ 전 작동 조건(셋팅 온도)에 대한 온도 profile에 아레니우스식을 적용하여 각 온도별 순간온도 이취발생시간을 도출하고 이취생성률을 산출하여 이취생성률이 1이 되는 시간(t_b)을 온도별로 구했다.

Table. 5-9. 50℃-70℃ 작동 조건(셋팅 온도)에 대한 이취발생률=1 시간(t_b)

온도(℃)	이취발생률=1 시간 (t_b)
50	41.05
51	38.13333333
52	35.31666667
53	32.63333333
54	30.05
55	27.56666667
56	25.21666667
57	22.98333333
58	20.85
59	18.85
60	16.95
61	15.26666667
62	13.68333333
63	12.23333333
64	10.88333333
65	9.65
66	8.51666667
67	7.5
68	6.58333333
69	5.78333333
70	5.1

3.3. 예측치의 비교로부터 살균기 운전 최적 조건을 결정

Table. 5-10. 50℃-70℃ 작동 조건(셋팅 온도)에 대한 살균도 만족 시간(t_a)과 이취발생률=1 시간(t_b)

온도	살균도 만족 시간, t_a	이취 발생 시점 t_b
50	169.17	50.10
51	128.83	51.09
52	98.50	32.25
53	75.67	29.50
54	58.33	27.02
55	45.50	24.77
56	35.67	22.75
57	28.33	20.92
58	22.68	19.25
59	18.47	17.75
60	15.27	16.38
61	12.88	15.22
62	11.03	14.15
63	9.55	13.17
64	8.35	12.28
65	7.38	11.47
66	6.58	10.72
67	5.93	10.05
68	5.38	9.42
69	4.92	8.83
70	4.53	8.32

위의 방법으로 도출된 50℃-70℃ 작동 조건(셋팅 온도)에 대한 살균도 만족 시간(t_a)과 이취발생률=1 시간(t_b)을(Table. 6.) 바탕으로 맥주 살균 최적 조건을 찾아내기 위하여 온도 별 살균도 만족 시간(t_a), 이취발생률=1 시간(t_b) graph를 완성하였다.

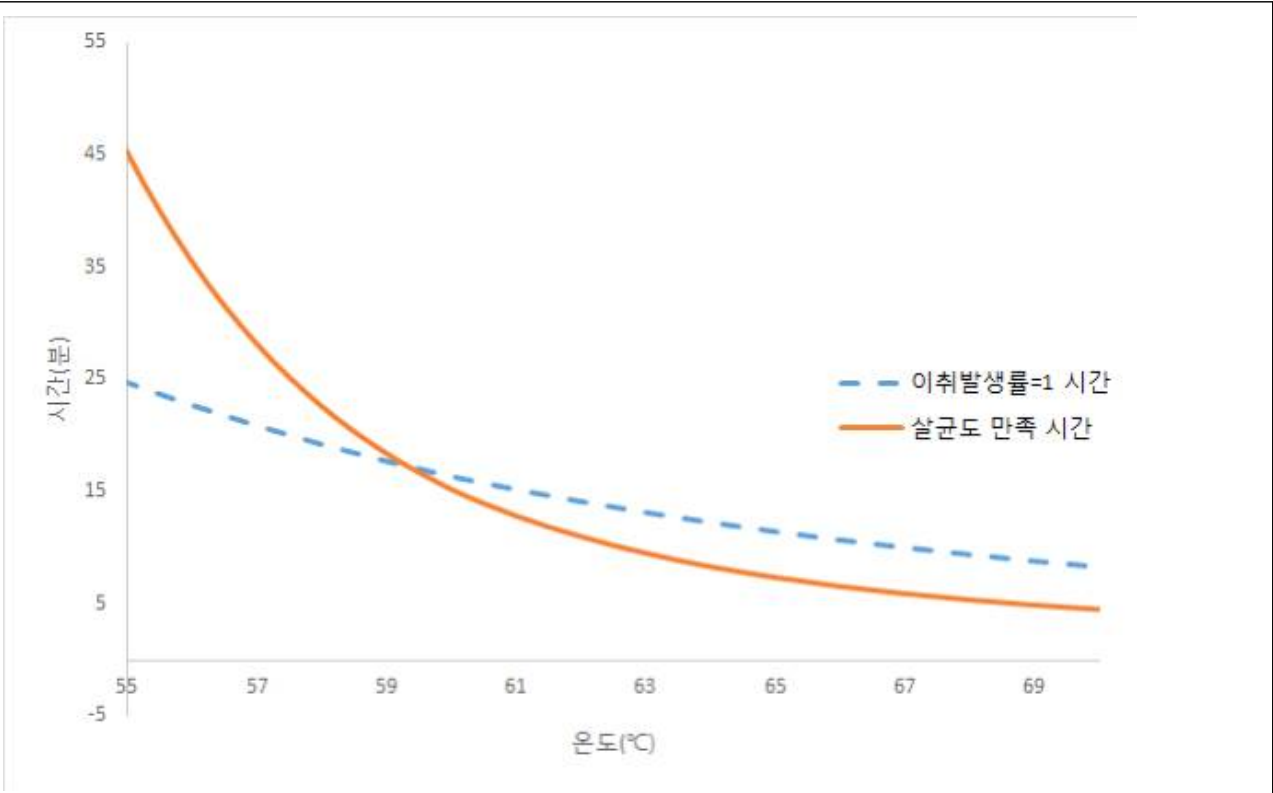


Fig. 5-25. 살균기 운전 최적 조건 결정을 위한 온도별 살균도 만족 시간(t_a), 이취발생률=1 시간(t_b) graph

최적의 살균 조건 영역은 살균도 만족 시간보다 이취발생률이 1에 도달한 시간이 더 큰 온도 구간이다. 맥주 살균 시 목표한 미생물 농도 감소를 이룬 시간이 이취가 발생하는 시간보다 더 적으면 살균 효과를 볼과 동시에 이취가 발생하지 않으므로 최적의 조건이라 할 수 있다. 위의 graph에서 이취 발생률이 1에 도달한 시간과 살균도 만족 시간이 같아지는 조건은 59.35°C에서 17.265분이다. 이 시점 이후의 온도 구간에서 살균도 만족 시간(t_a)은 이취 발생률=1 시간(t_b)보다 항상 적은 값을 나타낸다. 따라서 최적의 살균 조건은 59.35°C 이후 온도 조건이 된다.

3. 홍삼/복분자/국산보리맥주 살균 공정 최적화 완성

가. 복분자맥주의 살균 공정 최적화 완성

(1) 실험 재료 및 방법

1.1. 맥주 제조(당화 및 발효)

맥주 제조에 사용된 국산 보리 광맥은 농촌진흥청 벼맥류부의 협조에 의하여 전라북도 익산에서 수확된 것을 사용하였으며 제맥 과정은 Automatic Micromalting Systems (Phoenix Biosystems Co., Australia)을 이용하여 침맥과 발아, 배조의 3단계로 진행하였다(Kim et al., 2013). 당화전 당화효소 α -amylase와 amyloglucosidase, 여과증진효소 β -glucanase를 각각 맥아 사용량의 0.1 % 로 첨가하였다. 맥즙을 얻기 위한 당화 방법은 다음과 같다. 맥아 5 g을 250 mL Duran laboratory bottle (SCHOTT DURAN, Germany)에 넣고 증류수 40 mL와 잘 섞은 다음 효소를 첨가하고 Shaking water bath (HST-205SW, Hanbaekst, Korea)를 이용하여 52°C, 100 rpm으로 20분간 1차 당화를 시켰다. 1°C/min 속도로 10분간 온도를 10°C 증가시켜 맥즙의 온도를 62°C까지 올린 다음 1시간 더 당화시켰다. 그 다음 마찬가지로 1°C/min 속도로 10분간 온도를 10°C 증가시켜 맥즙의 온도를 72°C까지 올린 다음 15분간 당화시켰다. 그 다음 4분간 온도를 4°C 증가시켜 76°C에서 10분간 당화를 하여 당화를 완료했다. 당화가 완료되면 맥즙을 20°C로 식히고 증류수로 최종 무게를 45 g으로 맞춘 다음 주름진 여과지 No.597 1/2 (Whatman, Germany)를 4등분하여 접은 다음 유리깔대기(지름 85mm)를 사용하여 여과하며, 초기 10 mL 맥즙을 재 여과한 것을 시료로 사용하였다. 사용된 홉은 Saaz(AA 2.6%)이며, 효모는 비전바이오켄 맥주발효용 효모 Saflager W-34/70을 사용하였다. 홉과 효모 모두 참여기업에서 실제 이용하는 것을 이용하였다. 맥즙에 hop을 1/2, 1/4, 1/4로 3회 나누어 넣으며, 각각 10분, 5분, 5분씩 끓여주었다. 이후 맥즙의 온도를 20°C까지 급속 냉각시켰다. 그 후 알코올 도수 예측 및 당화의 정도를 파악하기 위한 초기 비중을 측정하였다. 여기에 효모를 6.0×10^6 cells/mL이 되도록 주입한 뒤, 공기 차단기(air lock)를 설치하여 전 발효는 14°C에서 7일간, 후 발효는 4°C에서 15일간 실시하였다. 발효를 마친 맥주는 갈색병에 병입하여 4-5°C에 보관하였다.

1.2. 복분자맥주 제조를 위한 복분자 첨가 및 살균 방법

복분자는 냉동복분자를 구입하여 사용하였다. 과육을 그대로 착즙한 형태인 착즙액으로 실험에 이용하였다. 이는 수동 착즙기를 이용하여 직접 착즙하였다.

복분자맥주의 복분자 첨가 시점 및 살균 특성을 알아보고 가장 효과적인 살균 방법을 도출해내기 위하여 세 가지 다른 살균 방법으로 실험을 수행했다. 고안된 세 가지 다른 살균 방법은 다음과 같다. 첫 번째, 맥주 및 복분자 착즙액을 각각의 살균조건에 맞도록 따로 살균한다. 그리고 각각 살균된 맥주와 복분자 착즙액을 혼합한다. 복분자 맥주의 복분자 착즙

액 함량이 3%가 되도록 제조한다(case 1). 복분자 농도 3%(v/v)의 기준은 1세부의 복분자 농도별 관능평가 실험 결과를 기반으로 모든 세부가 동일하게 적용하였다. 두 번째, 맥주를 먼저 살균한다. 그리고 살균되지 않은 복분자를 혼합하여 복분자 맥주를 제조한다. 이 또한 복분자 맥주의 복분자증 함량이 3%가 되도록 제조한다. 이 후 복분자 맥주를 살균한다(case 2). 마지막으로 세 번째, 복분자 착즙액을 먼저 살균한다. 그리고 살균되지 않은 맥주에 미리 살균된 복분자 착즙액을 3% 혼합하여 복분자 맥주를 제조한다. 이 후 복분자 맥주를 살균한다(case 3). 위의 세 가지 살균 방법 각각의 미생물 살균 정도 및 품질 저하를 알아보기 위한 이화학적 측정 및 관능평가를 진행하여 비교 분석한다. 이를 통하여 목표한 미생물 살균도를 충분히 만족하여 미생물의 안정성을 확보하면서 맥주의 품질 저하는 최소화하는 살균 조건을 나타내는 최적의 살균 방법 한 가지를 도출한다.

1.3. 복분자맥주의 미생물 살균

복분자맥주의 살균 대상 미생물은 젖산균과 효모로 정하였다. 복분자 착즙액에서 가장 많이 발견되는 미생물은 효모로 알려져 있기 때문에 대상 미생물로 선택하였다. (Shearer, A. E. 2002. et al.) 국산 보리 맥주의 경우, 기 1, 2차년도에서 연구대상으로 삼았던 맥주 부패균을 대상 미생물로 선택하였다. 예비 실험을 통하여 직접 냉동복분자를 착즙한 복분자 착즙액에 많은 수의 효모와 곰팡이가 존재함을 확인하였다. 하지만 곰팡이는 효모보다 열적 사멸이 빠르게 이루어지므로 효모를 대상 미생물로 선택하였다.

살균 실험은 세 가지 방법으로 진행되었다.

첫 번째, 복분자증과 국산보리맥주를 각각 살균조건에 맞도록 살균하는 방법이다. (Case1) 복분자증의 경우, 미리 살균된 test tube에 10ml의 복분자 착즙액을 담는다. 살균조건은 60℃에서 적절한 살균 시간 interval을 정하였다. 미리 60℃로 설정된 shaking water bath (HST-205SW, Hanbaekst, Korea)로 살균했다. 살균조의 온도를 균일하게 유지하기 위해 rpm 100으로 설정하였다. 60℃로 설정된 water bath에 준비된 test tube sample을 전부 담았다. 시간 interval별로 sample을 취했다. 취한 sample은 잔존열에 의한 미생물의 추가 사멸을 막기 위해 바로 얼음물에 담아 냉각시켰다. 냉각시킨 sample은 적절하게 희석하여 yeast and mold용 3M petri film에 도말했다. 30℃ 인큐베이터에서 2-3일간 배양한 후 생균수를 계수한다. 국산보리맥주의 경우, 미리 살균된 test tube에 9ml의 맥주를 담았다. 1ml의 맥주 부패균 *Lb. brevis* 를 주사했다. Worst-case scenario에 의해 가장 심각한 맥주 부패환경을 조성해 주기 위하여 위와 같은 방법으로 부패균의 농도를 표준화하였다.(Zufall, C., & Wackerbauer K. 2000.) 살균조건은 50℃에서 적절한 살균 interval을 정하였다. shaking water bath (HST-205SW, Hanbaekst, Korea)의 조건 및 살균 실험 방법은 상기 복분자증 살균 조건과 동일하다. 단, 맥주 부패균(*Lb. brevis*)은 젖산균이므로 균 배양에 MRS agar를 이용한다. Spiral (Easyspiral®, Interscience, France)을 이용하여 MRS agar 위에 부패균을 spiral plating 한다. 30℃ 인큐베이터에서 2-3일 배양한 후 생균수를 계수한다. 살균 후 각각의 살균 기준(minimum level)에 따라 살균 온도 및 살균 시간을 도출하였다. 맥주의 부패균(젖산균)은 기 연구에서 제시했던 5 log reduction을 기준으로 하였다. 효모의 경우, (Park, H. J. et al. 2013.)에서 제시한 살균 조건인 65℃, 20분을 본 연구에 적

용하여 기준을 마련하였다. 본 연구에 사용된 효모를 65℃, 20분 살균하여 초기 효모 cells 수와 살균 후 살아남은 효모 cells 수의 차를 그 기준으로 마련하였다.

두 번째, 미리 살균된 test tube에 10ml의 맥주를 담고 50℃에서 16.24분간 shaking water bath를 이용하여 살균했다. Case 1의 국산보리맥주 실험결과를 토대로 맥주의 살균 온도 및 시간을 결정하였다. 이 후 복분자 맥주의 복분자즙 함량이 3%가 되도록 살균되지 않은 복분자 착즙액을 혼합하여 복분자 맥주를 제조한다. 제조된 복분자 맥주의 초기 효모와 부패균(젖산균) 수를 계수하기 위해 다음과 같은 방법으로 실험을 진행한다. 제조된 복분자 맥주를 적절히 희석하여 효모를 계수하기 위해 yesat and mold용 3M petri film에 도말하고 부패균(젖산균)을 계수하기 위하여 MRS agar에 spiral을 이용하여 도말하여 초기 균수를 확인한다. 30℃ 인큐베이터에서 2-3일 배양한 후 살아있는 효모 및 부패균(젖산균)을 계수한다. 제조된 복분자 맥주는 10ml씩 미리 살균된 test tube에 담고 60℃에서 적절한 살균 interval로 살균한다. 살균된 sample은 시간별로 취하여 바로 냉각시킨다. 냉각된 sample은 적절한 희석배수로 희석한다. 이 후 효모를 계수하기 위해 yesat and mold용 3M petri film에 도말하고 부패균(젖산균)을 계수하기 위하여 MRS agar에 spiral (Easyspiral®, Interscience, France)을 이용하여 도말하여 30℃ 인큐베이션에서 2-3일 배양한다. 생균수를 계수한다. 복분자의 효모 살균효과를 보다 확실하게 파악하기 위하여 대조군으로 3% 복분자착즙액을 제조한다. Peptonated water와 복분자 착즙액을 혼합하여 3% 복분자 착즙액을 제조한다. 10ml씩 미리 살균된 test tube에 담고 60℃에서 적절한 살균 간격으로 살균한다. 살균 방법 및 생균수 계수 방법은 상기 내용과 같다.

세 번째, 미리 살균된 test tube에 10ml의 복분자즙을 담고 60℃에서 32.54분간 shaking water bath를 이용하여 살균한다. Case 1의 복분자착즙액 실험결과를 토대로 복분자착즙액의 살균 온도 및 시간을 결정하였다. 이 후 복분자 맥주의 복분자즙 함량이 3%가 되도록 살균되지 않은 맥주와 혼합하여 복분자 맥주를 제조한다. 제조된 복분자 맥주의 초기 효모와 부패균(젖산균) 수를 계수하기 위해 상기 두 번째 방법과 동일하게 실험을 진행한다. 제조된 복분자 맥주는 10ml씩 미리 살균된 test tube에 담고 50℃에서 적절한 살균 간격으로 살균한다. 살균된 sample은 시간별로 취하여 바로 냉각시킨다. 냉각된 sample은 적절한 희석배수로 희석한다. 이 후 효모를 계수하기 위해 yesat and mold용 3M petri film에 도말하고 부패균(젖산균)을 계수하기 위하여 MRS agar에 spiral (Easyspiral®, Interscience, France)을 이용하여 도말하여 30℃ 인큐베이션에서 2-3일 배양한다. 생균수를 계수한다. 맥주의 부패균(젖산균) 살균효과를 보다 확실하게 파악하기 위하여 대조군으로 97% 맥주를 제조한다. peptonated water와 맥주를 혼합하여 97% 맥주를 제조한다. 10ml씩 미리 살균된 test tube에 담고 50℃에서 적절한 살균 간격으로 살균한다. 살균 방법 및 생균수 계수 방법은 상기 내용과 같다.

1.4. 복분자맥주의 관능평가

1.4.1. 이화학적 품질 검사

(1) pH 측정

pH는 pH meter (S20 SevenEasy™ pH, Mettler-Toledo International Inc., Seoul, Korea) 를 이용하여 20℃에서 측정하였다.

(2) 알코올 함량 측정

알코올 함량은 알코올 증류장치를 이용하여 측정하였다. 알코올을 증류시킨 후 주정계 (211-DK-12, Daekwang, Seoul, Korea)를 이용하여 측정하였으며, 이를 주정분 온도 환산표를 통해 알코올 함량을 환산하였다.

(3) 색도 측정

색도계(CR-300, Minolta Co., Ltd., Osaka, Japan)을 이용하여 살균 후 맥주의 색도를 L(Lightness), a(redness), b(yellowness) 값으로 측정하였다.

1.4.2. 관능적 품질 검사

관능검사는 차이 식별 검사(attribute difference test)를 수행하였다. 동국대학교 식품공학과 대학원생 30명 중에서 패널 요원의 차이식별능력, 참여의식 등을 고려하여 10명을 선발하였다. 패널 선택을 위하여 각 패널의 관능검사 결과의 ANOVA가 수행되었다. 맥주의 주된 taste bitterness를 고려하였다. Reference로는 5개의 20, 40, 60, 80, 그리고 100mg/L-water of isohumulone solution이 사용되었다. 묘사적 언어는 ASBC (St. Paul, 1992.)를 기준으로 선택된 패널들에 의해 채택되었다. 관능적 특성은 odor, taste, mouthfeel, aftertaste, color로 구성되었으며, 다음과 같이 세분화하였다. odor alcoholic odor, taste는 bitter taste, fruity taste, astringent taste, sour taste, sweet taste, mouthfeel로 mouthcoating mouthfeel, carbonation mouthfeel, body mouthfeel, thick mouthfeel, aftertaste로 duration of aftertaste, 마지막으로 color에 더하여 Overall preference로 구성하였다. 선택된 패널들은 기술어를 사용하기 위하여 reference material 를 사용하여 훈련되었다.

각 시료마다 평가해야 할 특성이 많기 때문에 실험은 랜덤화 블럭법을 이용하여 설계되었다. 각 특성 당 강도는 0-9점 척도로 평가되었다(0: 없음, 1-2: 약함, 3-4: 보통, 5-6: 강함, 7-8: 더 강함, 9: 매우 강함) (Kim et al., 1996). 맥주 샘플은 test전에 4℃에서 하루 보관 후 사용하였다. 검사는 20℃의 tasting booth에서 실행되었다. 10 mL의 시료는 random three digit code로 labeling 된 유리컵에 담겼으며, 3개의 시료가 패널에게 주어졌다. 처음에는 odor에 대한 것을 평가하고, 그 후 마셨을 때 taste, mouthfeel, aftertaste, color를 평가하였다. 한 시료 당 모든 질문을 평가한 후 다른 설문지에 다른 시료를 평가하게 했다. 패널요원들은 시료 당 30초의 휴식시간을 가졌으며, 물과 unsalted cracker로 입을 헹군 후 검사를 시행했다.

Table 5-11. 관능평가지.

(강도)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
미끄럼 거림	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
CO2양, 쏘는감	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
무게감	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
끈적거 림	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
알코올 향	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
쓴맛	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
떫은맛	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
뒷맛 지속도	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
과일맛	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
신맛	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
단맛	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
색도	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	매우싫 음		싫음		보통		좋음		매우좋 음
전체기 호도	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

1.5. 통계분석

총 실험은 3반복으로 진행하였고, 실험의 평균값은 SPSS(Statistical Package for the Social Science, Ver. 23) 통계프로그램을 사용하여 유의차 ($\alpha=0.05$) 수준에서 일원배치 분산분석(ANOVA)를 통하여 분석하였다. 또한 샘플들 간의 유의차를 분석하기 위해 Duncan의 다중 비교법(multiple comparison test)을 실시하였다.

(2) 실험 결과 및 고찰

2.1. 복분자 첨가 시나리오 (case 1) 살균 실험

Case 1은 복분자 착즙액과 맥주를 각각 살균한 경우로 가장 표준에 가까운 살균 방법이다. 각각 살균한 경우를 혼합하여 3% 복분자 맥주를 완성할 수 있다. 따라서 맥주와 복분자 착즙액 각각의 열적 사멸 경향을 고려하여 살균 조건을 설정해야 한다. 본 실험에서는 복분자 착즙액의 경우 60°C에서 2, 4, 7, 10, 14, 20, 35분 동안 가열한 뒤 효모의 생균수를 측정하였다. 그 결과는 Fig. 5-26과 같다. 복분자 착즙액의 초기 효모 cells 수는 2.1×10^8 cells/ml 였다. 살균 시간이 증가할수록 살아남은 효모의 cells 수는 감소했다. 효모의 목표 살균치는 참고논문을 바탕으로 결정하였다. (Park, H. J. et al. 2013.)는 효모를 65°C에서 20분간 살균했다. 본 실험에서는 예비실험을 통해 복분자 착즙액의 효모를 대상으로 동일 온도 및 시간(65°C, 20분)을 가열하였다. 효모의 초기 cells 수와 가열 후 cells 수의 차이로 나타난 7 log reduction을 그 기준으로 삼았다. 따라서 효모가 2.1×10^1 cells/ml이 되는 시간 및 온도를 최종 살균 조건으로 정하였다. 그 결과 효모가 충분히 살균되었다고 여겨지는 조건은 60°C, 32.54분으로 도출되었다.

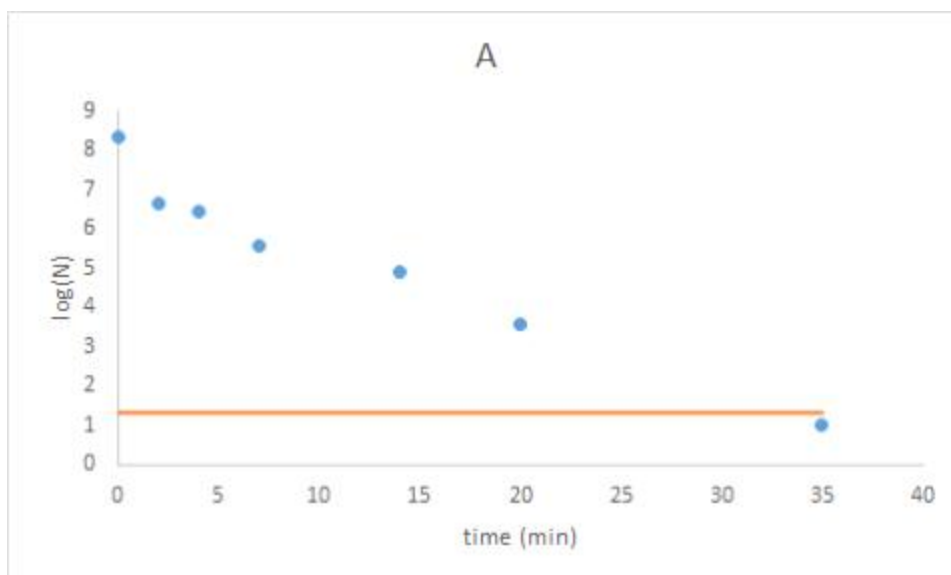


Fig. 5-26. 100% 복분자 착즙액의 살균의 경우, 60°C 살균조건에서 시간에 따른 효모 농도 변화. 실선은 7 log reduction 기준치.

100% 맥주의 경우, 맥주의 부패균인 *Lb. brevis*를 target microorganisms으로 정하였다. 본 실험에서는 맥주의 경우 50°C에서 1.5분 간격으로 7.5분까지 그리고 2.5분 간격으로 15분까지 가열한 후 *Lb. brevis*의 생균수를 측정하였다. 그 결과는 Fig. 5-27와 같다. 맥주의 초기 *Lb. brevis* 균수는 2.8×10^7 CFU/ml 였다. 살균 시간이 증가할수록 살아남은 균수는 감소했다. 1/2 차년도 연구 내용을 바탕으로 *Lb. brevis*의 목표 살균치는 5 log reduction 이다. 따라서 이를 만족하는 살균 온도 및 시간은 50°C, 16.24 분으로 도출되었

다.

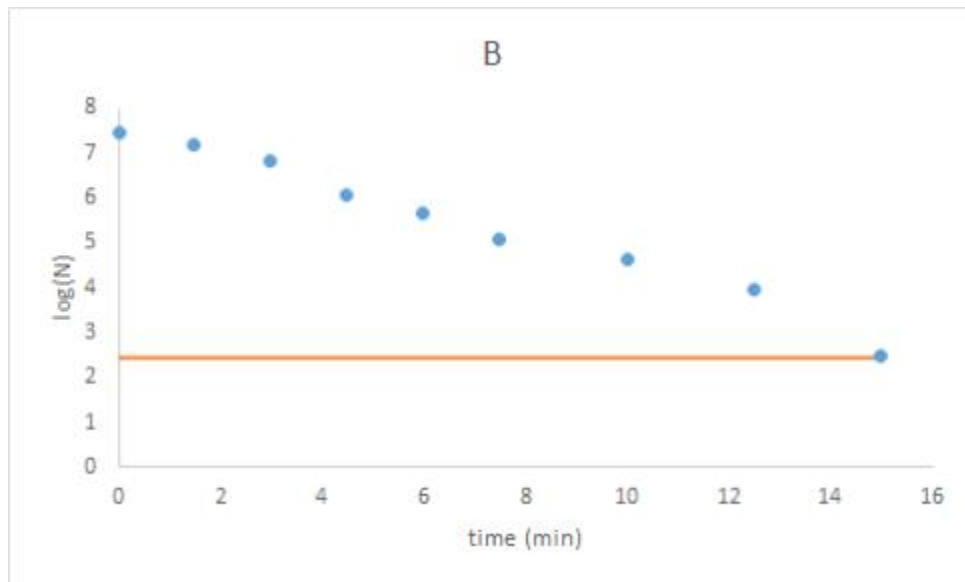


Fig. 5-27. 100% 맥주의 살균의 경우, 50°C 살균조건에서 시간에 따른 균 농도 변화. 실선은 5 log reduction 기준치.

따라서 맥주 및 복분자 착즙액의 목표 살균치를 만족하는 살균 조건인 온도와 시간을 Table 5-12에 나타내었다. Case 1의 총 살균 시간은 맥주 50°C에서 16.24분과 복분자 60°C에서 32.54분의 합인 48.78분이다. Case 1의 방법으로 복분자를 첨가, 살균하는 것은 가장 표준적인 방법이지만 복분자 착즙액과 맥주를 혼합하는 공정 중 오염 가능성이 농후하다.

Table 5-12. 복분자착즙액 및 맥주 각각의 살균 실험 결과

	온도	시간	목표 살균도
맥주	50°C	16.24분	5 log reduction
복분자	60°C	32.54분	7 log reduction

2.2 복분자 첨가 시나리오 (case 2, 3) 살균 실험

Case 2는 맥주를 먼저 50°C에서 16.24분간 살균한 뒤, 살균되지 않은 복분자 착즙액을 3%로 혼합하여 복분자 맥주를 제조한 뒤 살균하는 방법이다. 먼저 살균된 맥주의 살균 조건은 case 1으로부터 도출되었다. Case 2 방법은 기본적으로 복분자 맥주에서 살균되지 않은 복분자즙으로부터 기인된 효모의 살균 경향을 파악하고자 함이다. 따라서 control로 3% 복분자 착즙액의 효모 살균 경향 또한 파악하여 3% 복분자 맥주의 경우와 비교 분석하였다. 먼저, 제조된 3% 복분자 맥주의 효모 및 젖산균(부패균)의 초기 농도는 각각 1.6×10^6 cells/mL, 8.6×10 CFU/mL 으로 나타났다. 맥주는 미리 50°C에서 16.24분 살균되었으므로 살아남은 균수가 매우 적은 것으로 나타났다. 3% 복분자 착즙액의 효모 초기 농도는

6.2x10⁶ cells/mL이다. 가열 시간이 증가함에 따라 3% 복분자 착즙액 및 3% 복분자 맥주의 효모 농도는 감소하였다. 또한 3% 복분자 맥주의 효모가 3% 복분자 착즙액의 효모보다 더 빠르게 사멸하는 것을 확인하였다. 이는 복분자의 유기산과 더불어 맥주의 alcohol, 낮은 pH, 낮은 O₂함량, 높은 CO₂ 그리고 낮은 영양성분 등 맥주의 hurdle effect으로 인한 어려운 환경으로 인해 효모가 더 빠르게 사멸한 것으로 생각된다. 따라서 3% 복분자 맥주에서 효모의 살균 기준치 7 log reduction을 만족한 온도 및 시간을 산출하면 60℃에서 28.53분이다. case 1에서 도출되었던 100% 복분자즙의 효모 살균 조건인 60℃에서 34.54분 보다 살균 시간이 단축되었다. 따라서 복분자 맥주에서 효모의 살균 효과가 더 높은 것으로 나타났다. 맥주로부터 기인된 부패균인 *Lb. brevis*의 경우, 60℃에서 가열 시간에 따라 생균수가 발견되지 않았다. 이는 60℃에서 *Lb. brevis*가 D-value가 매우 작아 빠르게 사멸하기 때문인 것으로 보인다.

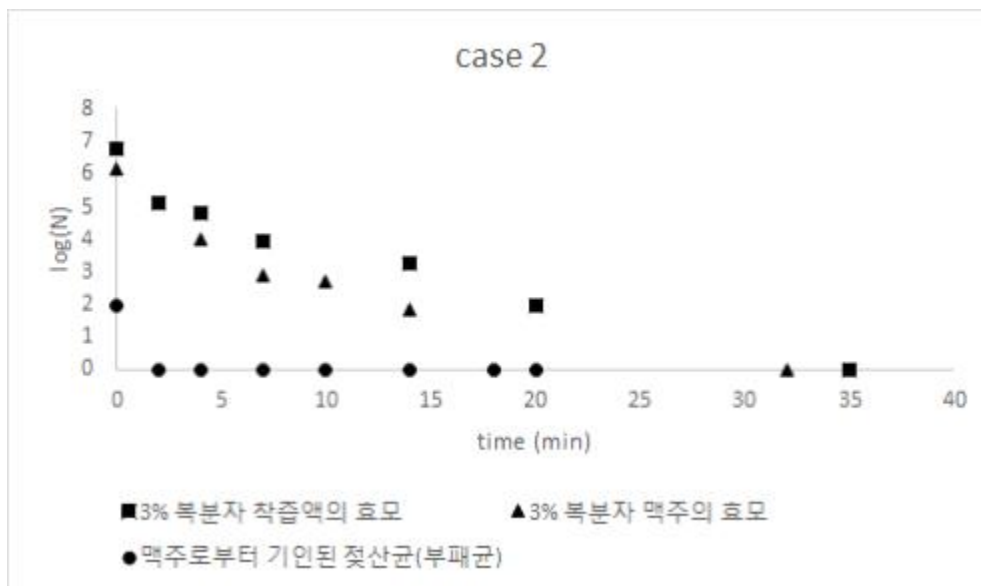


Fig. 5-28. 복분자 첨가 시나리오 case 2에 따른 효모의 생균수 변화 및 잔존하는 젖산균의 생균수 변화

Case 3는 복분자 착즙액을 먼저 60℃에서 32.54분 살균한 뒤, 살균되지 않은 맥주와 혼합하여 3% 복분자 맥주를 완성한다. Case 3 방법은 기본적으로 3% 복분자 맥주에서 살균되지 않은 맥주로부터 기인된 부패균(젖산균)의 살균 경향을 보고자 함이다. Fig. 5-29.는 case 3 실험 방법에 따른 효모 및 부패균(젖산균)의 생균수 변화를 나타내었다. 3% 복분자 맥주에서 부패균의 살균 효과를 알아보기 위해 control로 97% 맥주에서의 부패균의 사멸 경향 또한 관찰하였다. 3%의 복분자 맥주에는 97%의 맥주가 함유되어 있으므로 control로 97% 맥주를 사용하였다. Fig. 5-29.에서 97% 맥주 및 3% 복분자 맥주의 초기 부패균(*Lb. brevis*)의 농도는 각각 3.4x10⁷ CFU/mL, 1.3x10⁸ CFU/mL이다. 살균 시간이 증가함에 따라 부패균(*Lb. brevis*)의 생균수는 감소한다. 특히, 3%의 복분자 맥주의 경우 대조군(control)보다 부패균이 더 빠르게 사멸하였다. 이 또한 본래 맥주의 alcohol, hop 성분, 낮은 pH, 낮은 O₂함량, 높은 CO₂ 그리고 낮은 영양성분 등 맥주의 hurdle effect으로 인한 어

려운 환경으로 인해 부패균이 쉽게 사멸하지만 복분자의 유기산 및 다른 성분들의 영향이 더해져 더욱 빠르게 사멸하는 것으로 판단한다. 따라서 3% 복분자 맥주에서 부패균(*Lb. brevis*)의 살균 기준치 5 log reduction을 만족한 온도 및 시간을 산출하면 50°C에서 11.79분이다. Case 1에서 맥주의 살균 기준치 5 log reduction을 만족한 살균 조건인 50°C, 16.24분보다 시간이 단축되었다. 따라서 3% 복분자 맥주에서 맥주 부패균의 살균 효과가 더 크다. 한편, 복분자즙으로부터 기인된 효모의 경우 초기 농도는 7.4×10^0 cells/mL 이다. 그리고 살균시간이 증가함에 따라 6분 후로는 발견되지 않았다. 먼저 복분자 착즙액을 살균했지만 7 log reduction 기준 만큼 살균했기 때문에 남아있는 효모가 있었다. 그리고 50°C에서 살균을 진행하니 효모가 발견되지 않은 것으로 보아 모두 사멸한 것으로 판단된다.

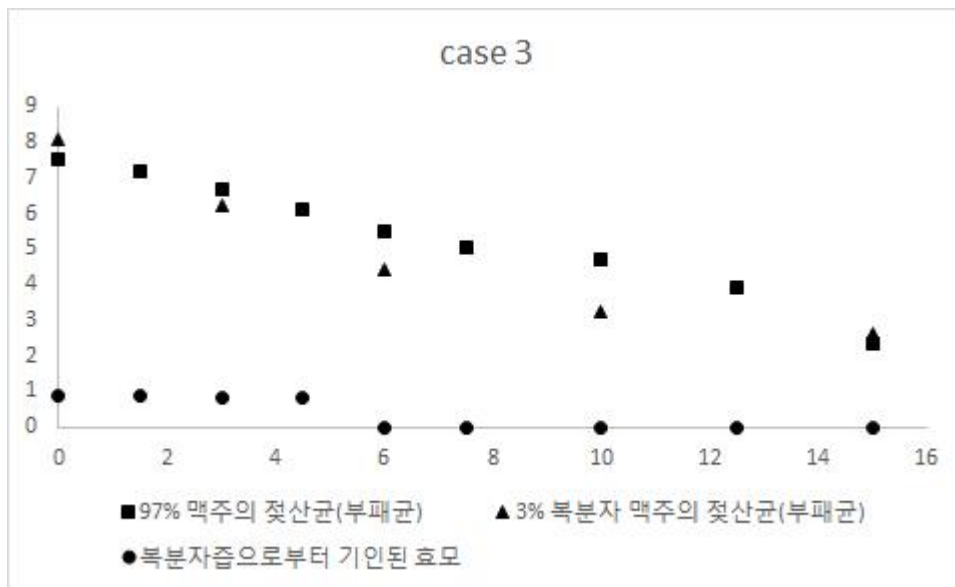


Fig. 5-29. 복분자 첨가 시나리오 case 3에 따른 젖산균의 생균수 변화 및 잔존하는 효모의 생균수 변화

2.3 복분자 맥주의 이화학적 품질 평가

(1) pH, alcohol, 색도 측정

세 가지 살균 방법인 Case 1, 2, 3에 따라 도출된 살균 조건(온도, 시간)에 따라 살균한 복분자 맥주의 pH, alcohol content(%), 색도 L 값, a 값, b 값은 표 5-13과 같다. pH 측정 결과 살균방법 case 1은 4.57, case 2가 4.57, case 3는 4.57 이다. 세 가지 살균 방법에 따른 복분자 맥주의 pH는 모두 동일했다. pH는 품질 측면에서 복분자 맥주의 맛(신맛)에 영향을 미치는 요소로 세 가지 방법으로 살균한 복분자 맥주에 대한 pH의 영향은 같았다. Alcohol 함량(%) 측정 결과, 각각의 살균 방법에 따라 case 1은 4.6%의 alcohol 함량이, case 2는 3.1%, case 3는 4.4% 이다. Case 1과 case 3는 비슷한 값을 보였지만 case 2는 case 1, 3과 비교하여 큰 차이를 보였다. 이는 제조된 복분자 맥주를 500ml 알루미늄 캔에 넣고 가열을 하더라도 캔 윗부분에 head space가 존재하므로 가열 중 alcohol의 증발이 그

원인이다. 특히, 살균 방법 case 2는 먼저 맥주를 50℃ 16.24분 가열 살균 한 뒤, 복분자 착즙액을 혼합하여 복분자 맥주를 만든 후 다시 한 번 더 60℃, 28.53분 살균하였다. 결과적으로 맥주는 두 번 가열 살균을 경험하였으므로 alcohol이 더 많이 증발되었다. 색도는 밝기를 나타내는 L 값은 크게 세 가지 살균 방법(case 1, 2, 3)에 따라 큰 차이가 없었다. 하지만 적색도를 나타내는 a 값은 다른 sample에 비해 case 3의 복분자 맥주에서 가장 낮게 나타났다. Case 1, 2의 살균 방법 보다 case 3의 살균 방법으로 인한 적색의 손실이 큰 것으로 나타났다. 이는 case 3의 살균 방법 특성 상, 복분자 착즙액을 먼저 60℃에서 32.54분간 가열살균하고 맥주와 혼합하여 복분자 맥주를 제조한 뒤 다시 한 번 50℃에서 11.79분 가열 살균한다. 따라서 복분자 착즙액은 두 번 살균이 되므로 다른 실험군에 비해 색의 저하가 일어났다. 그러나 육안으로는 큰 차이가 없다. 황색을 나타내는 b 값의 경우 세 가지 실험방법 간 큰 차이를 보이지 않았다.

Table 5-13. Case 1, 2, 3로부터 도출된 살균 조건에 따른 복분자 맥주의 pH, alcohol content(%), 색도 측정값

		case 1	case 2	case 3
pH		4.57	4.57	4.57
alcohol		4.6	3.1	4.4
색도	L	24.19	22.19	25.35
	a	12.64	15.00	10.33
	b	6.25	7.17	5.71

2.4. 복분자 맥주의 관능학적 품질 평가

Case 1, 2, 3 살균 조건에 따라 살균한 복분자 맥주의 관능 검사 결과는 표 4와 같다. 관능검사 결과 각각의 복분자 맥주의 외관, 향, 맛, 전반적인 기호도를 측정한 결과, duration after taste, fruity taste, sour taste, sweet taste 그리고 overall preference 항목에서만 유의적인 차이(p<0.05)를 보이고 나머지 항목에서 유의적인 차이는 없었다. 뒷맛지속도(duration after taste)는 Case 2의 살균 방법을 이용한 복분자맥주가 5.30으로 가장 높았다. 맛에 해당하는 fruity taste의 강도는 Case 3의 경우가 8.33으로 가장 높았다. 이는 case 2의 2.43 강도와 큰 차이를 보였다. sour taste의 강도는 case 2의 경우가 8.07로 가장 높았다. sweet taste의 강도는 Case 3 실험군이 7.97로 가장 높았다.

전체적인 기호도는 Case 3의 경우 가장 높고 case 1, case 2 순으로 기호도가 낮아짐을 알 수 있다. fruity taste와 sweet taste의 강도가 높고 sour taste의 강도가 상대적으로 낮았던 case 3 실험군이 overall preference가 가장 높았다.

Table 5-14. Case 1, 2, 3로부터 도출된 살균 조건에 따른 복분자 맥주의 관능적 성질

	case1	case2	case3
mouthcoating mouthfeel	2.6±0.26	2.73±0.32	2.93±0.21
carbonation mouthfeel	2.43±0.15	2.33±0.15	2.50±0.17
body mouthfeel	1.36±0.21	1.26±0.29	1.60±0.17
thick mouthfeel	1.63±0.46	1.36±0.21	1.70±0.36
alcoholic	5.10±0.89	5.26±0.72	5.47±0.42
bitter taste	5.03±0.67	4.60±1.00	4.13±0.76
astringency	1.73±0.38	1.4±0.26	1.67±0.23
duration after taste	4.50±0.10 ^b	5.53±0.25 ^a	5.30±0.46 ^b
fruity taste	6.8±0.70 ^b	2.43±0.55 ^c	8.33±0.06 ^a
sour taste	7.57±0.23 ^{ab}	8.07±0.38 ^a	7.20±0.20 ^b
sweet taste	5.46±0.38 ^b	3.37±0.61 ^c	7.97±0.12 ^a
color	6.93±0.49	7.50±0.20	7.40±0.35
overall preference	6.70±0.20 ^b	3.20±0.10 ^c	7.43±0.23 ^a

1)All value is shown as mean ± S. D. (n=3)

2)Different leeters(a, b, c) indicate significant mean difference (p<0.05) according to Turkey's multiple comparison test between each samples.

복분자 맥주의 품질 특성 항목으로 이화학적 검사의 경우, pH, alcohol, 색도 측정 결과, pH는 case 1, 2, 3 실험군간 동일하였다. alcohol은 case 2 살균 방법을 이용한 경우 손실이 가장 컸다. 색도의 경우, a 값을 보면 case 3이 가장 낮았다. case 3을 적용한 복분자 맥주의 적색 저하가 가장 많이 일어났지만 관능평가 결과 color 항목의 유의적인 차이가 없었으므로 육안으로는 case1, 2, 3의 색 차이가 없다.

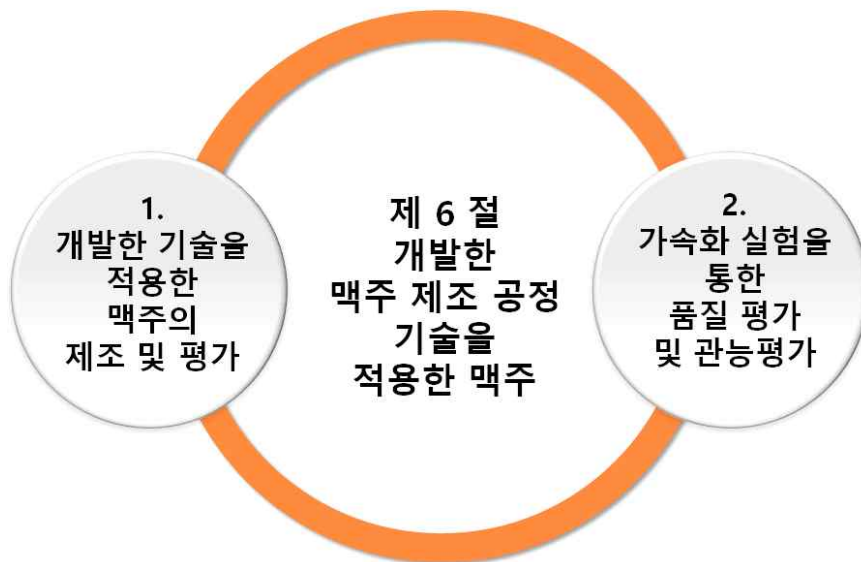
또한 관능검사의 경우 mouthcoating mouthfell, carbonation mouthfeel, body mouthfeel, thick mouthfeel, alcoholic, bitter taste, astringency, duration after taste, fruity taste, sour taste, sweet taste, color, overall preference를 측정한 결과, case 3 살균 조건을 적용하여 살균한 복분자 맥주의 관능속성 결과 값이 가장 우수함을 확인하였다. 또한 case 1은 복분자를 60℃ 32.54분 살균하고, 맥주는 50℃ 16.24분 살균하므로 총 살균 시간은 32.54 + 16.24 = 48.78 분이다. case2는 맥주를 50℃ 16.24분 미리 살균한다. 그리고 복분자 맥주는 60℃에서 28.53분 살균한다. 총 살균 시간은 16.24 + 28.53 = 44.77분이다. case 3은 복분자를 60℃ 32.54분 미리 살균한다. 그리고 복분자 맥주는 50℃에서 11.79분 살균한다. 총 살균 시간은 44.33분이다. 따라서 총 살균 시간은 case 1이 가장 길고 case 2와 case 3이 44.77분, 44.33분으로 비슷한 결과를 보였다.

결과적으로, 품질 특성의 이화학적 측정 및 관능평가 결과를 토대로 case 3 살균 방법 및 조건에 의해 살균된 복분자 맥주가 가장 우수하다는 것, 또한 전체적인 살균 시간이 가장 적으므로 맥주 제조 현장에서 살균조를 작동할 때의 비용 및 에너지 측면에서 경제적이라는 점 등을 포함하여 여러 가지 측면을 생각해 보았을 때, case 3 살균 방법 및 조건을 이용하는 것이 맥주 살균을 효율적으로 진행할 수 있으므로 가장 적합하다.

제 6 절 개발한 맥주 제조 공정 기술을 적용한 맥주

- 본 연구를 통해 개발한 효소를 이용한 당화공정, 최적 응집 조건, 최적 살균 조건을 모두 적용하여 모든 기술이 적용된 홍삼/복분자 맥주를 제조하여 각 과정에 대한 평가를 진행하였다. 효소를 처리하여 당화를 하여 맥즙 제 적성을 평가한 결과 환원당량을 발효에 적합한 양 만큼 끌어올릴 수 있었으며 발효적성 평가에서도 우수한 발효능을 확인 할 수 있었다. 또한 응집도 평가를 통해 응집제를 투여하여 맥주 거품형성에 영향을 미치지 않는 폴리페놀을 제거하여 혼탁함을 개선시킬 수 있음을 확인하였다. 최적의 살균 조건을 적용하여 실험한 결과 효소 및 젖산균을 제어할 수 있음을 확인하였으며 관능평가에서도 우수한 평가를 받았다.

- 맥주에 응집제를 처리한 것이 맥주의 살균, 관능적 요인에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해 응집제를 처리한 맥주의 살균실험, 관능평가를 실시하였다. 또한 응집제가 맥주의 유통과정 중에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위해 응집제 처리 후 가속화 실험을 진행하여 살균 실험, 관능평가를 실시하였다. 이미 확립되어 있는 살균방법을 통해 살균한 결과 응집제 처리가 미생물의 생육을 유발하지 않는다는 것을 확인하였으며, 관능평가에서도 큰 영향을 미치지 않았다. 또한 유통 과정 중에 응집제가 미생물의 생육을 유발하지 않는 것을 확인할 수 있었다. 관능평가 결과, 응집제가 시간이 지난 후에도 관능적 품질에 큰 영향을 미치지 않는 것을 확인할 수 있었다.



1. 개발한 맥주 제조 공정 기술을 적용한 맥주의 제조 및 평가

(1) 요약

본 연구를 통해 개발한 효소를 이용한 당화공정, 최적 응집 조건, 최적 살균 조건을 모두 적용하여 모든 기술이 적용된 홍삼/복분자 맥주를 제조하여 각 과정에 대한 평가를 진행하였다. 효소를 처리하여 당화를 하여 맥즙 제 적성을 평가한 결과 환원당량을 발효에 적합한 양만큼 끌어올릴 수 있었으며 발효적성 평가에서도 우수한 발효능을 확인 할 수 있었다. 또한 응집도 평가를 통해 응집제를 투여하여 맥주 거품형성에 영향을 미치지 않는 폴리페놀을 제거하여 혼탁함을 개선시킬 수 있음을 확인하였다. 최적의 살균 조건을 적용하여 실험한 결과 효소 및 젖산균을 제어할 수 있음을 확인하였으며 관능평가에서도 우수한 평가를 받았다.

(2) 재료 및 방법

(가) 재료

① 보리

국산 보리 광맥은 농촌진흥청 벼맥류부의 협조에 의하여 전라북도 익산에서 수확된 것을 사용하였으며, 외국산 보리 Pilsner는 독일 Weyermann 사에서 수입 구매하여 사용하였다. 광맥은 2010년 개발된 맥류 품종으로, 대립, 다수성이며 도복, 습해, 한해 등에 강하고 보리호위축병에 저항성이 있으며 기후변화에 따른 불시출수에 안정적인 특성이 있다. 광맥은 호품 보리에 비하여 원맥 및 맥아 품질 특성이 우수한 특성이 있어 맥주 제조용으로 특화된 작물이다. 제맥 과정은 Automatic Micromalting Systems (Phoenix Biosystems Co., Australia)을 이용하여 침맥과 발아, 배조의 3단계로 진행하였으며(Kim et al., 2013), 제조된 맥아는 Drum mill(Malt Drum Mill, Jeil Industry Co., Seoul, Korea)을 이용하여 1mm 간극으로 분쇄된 것을 사용하였다.

② 효소

효소는 (주) Bision Biochem에서 세가지 액화 효소를 구입하여 사용하였다. 당화효소 α -amylase (from *Bacillus licheniformis*)와 amyloglucosidase (or glucoamylase, from *Aspergillus niger*)는 각각 Spezyme FRED, BioWin AG 제품을 사용하였고 여과증진효소 β -glucanase (from *Trichoderma reesei*, pentosanase 활성 포함)는 BrewMax L 제품을 사용하였다. 본 연구에서 평가한 맥즙의 제조적성에 따라 효소량을 맥아의 0.1 %로 정하여 당화 전에 처리하였다.

③ 홍삼 농축액/복분자과즙

홍삼농축액은 바산고려홍삼에서 홍삼G21 제품을 사용하였고, 복분자과즙은 고창 선운산농협에서 베리웰복분자순액 제품을 사용하였다.

④ 응집제

최적응집조건인 PVPP A(polycar brewbrite) 0.16%(w/v)를 60분 동안 적용하였다.

(나) 실험방법

① 당화 방법

㉠ Grinding

EBC와 ASBC에서는 이러한 목적에 맞도록 특별히 고안된 DLFU (Buhler) 디스크형 분쇄기(disk mill)을 이용하고 있다.

㉡ Mashing procedure

거친 분쇄맥아와 고운 분쇄맥아 각 50g을 200ml 의 45℃ 증류수(46-48℃)에 넣고 유리막대로 빠르게 저어준 후 액체의 냄새와 향기를 노트한다.(향기로움, 곰팡이냄새, 덜익음, 퀴퀴함 등) 이를 당화기에 옮겨 46℃에서(당화 비커에 온도계를 위치시킨다.) 30분간 저어주면서 당화시킨다. 다음으로 분당 1℃씩 상승시켜 70℃ 까지 (24분) 올린 다음 70-71℃의 물을 100ml 추가하고 1시간 동안 더 당화시킨다.

㉢ Conversion

1시간 동안 더 당화시키는 동안에 5분마다 측정하여 0.02N 요오드용액을 자기판에 검사하여 당화시간을 조사한다[1.27g I₂ + 2.50g KI in H₂O 500ml 당화가 완료되면 yellow로 염색된다]. 측정 간격은 5분 미만이나 5-7분사이로 한다. 전환시간과 맥아 거칠기와의 관계가 없다.

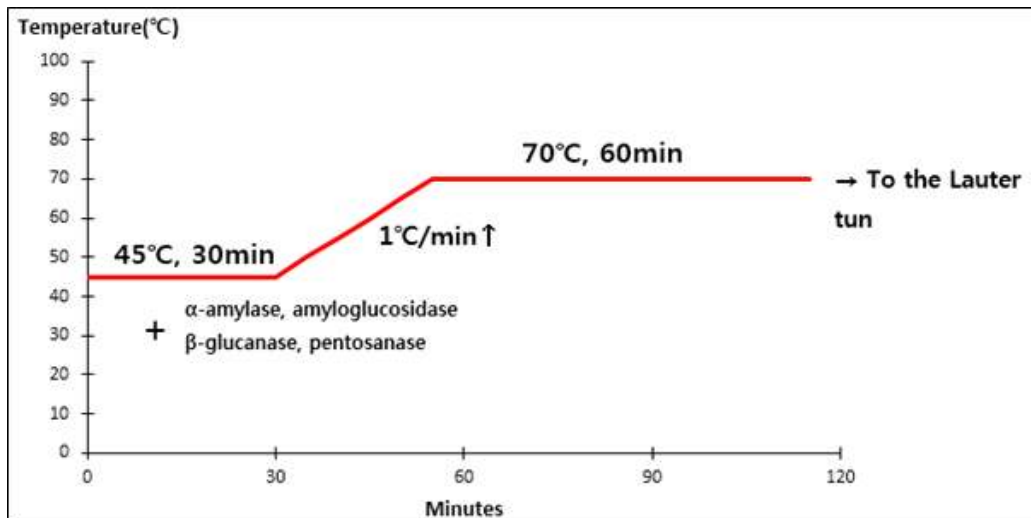
㉣ Cooling and filtration

맥즙을 얻기 위한 당화 방법은 EBC Congress mash법을 따랐으며, 그 방법은 다음과 같다. 곱게 분쇄한 맥아 5 g을 250 mL Duran laboratory bottle (SCHOTT DURAN, Germany)에 넣고 45℃ 증류수 20 mL와 잘 섞은 다음 효소를 첨가하고 Shaking water bath (BF-46SB, Biofree, Korea)를 이용하여 45℃, 100 rpm으로 30분간 1차 당화를 시킨다. 1℃/min 속도로 25분간 온도를 25℃ 증가시켜 맥즙의 온도를 70℃까지 올린 다음 70℃의 증류수 10 mL를 더 첨가한 후 1시간 더 당화시킨다. 당화가 완료되면 맥즙을 20℃로 식히고 증류수로 최종 무게를 45 g으로 맞춘 다음 주름진 여과지 No.597 1/2 (Whatman, Germany)를 4등분하여 접은 다음 유리깔대기(지름 85mm)를 사용하여 여과하며, 초기 10 mL 맥즙을 재 여과한 것을 시료로 사용하였다.

② 맥즙 제조 적성 평가

㉠ Reducing sugar

DNS법(Miller GL., 1959)에 따라 DNS시약 3 ml에 sample 1ml 와 섞는다. 끓는 물에서 5분간 반응을 시킨 후 상온에서 5분간 식힌다. 반응이 종료된 sample을 spectrophotometer를 이용하여 550 nm의 파장에서 흡광도를 측정한다. 측정된 흡광도를 standard curve에 대입하여 환원당을 정량한다.



㉞ Free Amino Nitrogen (ASBC 방법)

1.0ml ninhydrine color reagent 각각의 test tube에 첨가한다. 받침대에 두고 증발을 막기 위해 15-20mm glass marble의 마개를 씌운다. 16min 동안 water bath에서 가열하고, 20min 동안 20°C±1°C bath에서 식힌 다음 5ml dilution solution 을 넣는다. 완벽하게 섞고 증류수와 비교하여 570nm에서 30분 이내에 흡광도를 측정한다.

㉞ pH (ASBC 방법)

맥즙 원액을 pH/reference 전극 시스템을 이용하여 pH를 측정한다. 여과를 거친 당화액의 온도를 25°C로 일정하게 유지시킨 후에 pH meter(mettler Toledo SevenEasy pH)을 이용하여 pH를 측정하여 0.05pH 수준까지 나타낸다.

㉞ Filtration time (ASBC 방법)

당화액 45 mL를 시료로 하여 여과지(No. 2, Whatman)를 사용하여 맥아즙이 여과되는데 걸리는 시간을 측정하였다. 초기 10 mL의 맥즙을 재 여과하고 더 이상 filter cake에 액체가 보이지 않으며, 갈라지기 시작할 때를 측정 종료 시점으로 하였다.

㉞ Viscosity (ASBC 방법)

여과를 거친 당화액의 점도를 항온 수조에 설치된 진동식 점도계(A&D, SV-10 Sine-wave Vibro viscometer)를 사용해서 25°C 에서 측정하였다.

③ 발효 방법

사용된 홉은 Saaz(AA 2.6%)이며, 효모는 비전바이오캠 맥주발효용 효모 Saflager W-34/70을 사용하였다. 홉과 효모 모두 참여기업에서 실제 이용하는 것이다. 맥즙에 hop을 1/2, 1/4, 1/4로 3회 나누어 넣으며, 각각 10분, 5분, 5분씩 끓여주었다. 이후 맥즙의 온도를 20°C까지 급속 냉각시켰다. 그 후 알코올 도수 예측 및 당화의 정도를 파악하기 위한 초기 비중을 측정하였다. 여기에 효모를 1.0×10⁷ cells/mL이 되도록 주입한 뒤, 공기 차단기(air lock)를 설치하여 전 발효는 14°C에서 7일간, 후 발효는 4°C에서 15일간 실시하였다.

젖산균 배양액을 넣어 제조한 bio-acidified 맥아를 이용하여 만든 맥주와 젖산균 배양액을

넣지 않고 제조한 맥아를 이용하여 만든 맥주는 같은 방법으로 제조하였으며, 주발효 분석은 2일 간격으로 7일간 총 4회 실시하였으며, 후 발효 분석은 2일 간격으로 15일간 총 7회 측정하였다.

㉑ Bacteriocin beer 제조방법

P. acidilactici HW 01을 10 mL MRS broth에서 16시간 배양한다. 배양이 완료된 broth를 centrifugation (19,461 g, 10 min, 4 °C,) 후 상등액을 버리고 3차증류수 10 mL을 넣고 vortexing하여 pellet을 현탁시킨다. 이와 같은 방법으로 3차 증류수로 세척하는 과정을 총 2회 반복한다. 현탁액을 원심분리 (19,461 g, 10min, 4 °C) 후 상등액을 제거한 후 10mL의 wort를 넣고 vortexing한다. 1)의 과정을 통해 만들어진 un-hopped wort에 현탁액을 주입한다 (1%, v/v). 잘 혼합 후 30°C에서 16시간 배양한다. 배양이 완료된 wort는 starter wort라 명명한다. Starter wort를 가지고 발효과정을 동일하게 거쳐 만들어진 맥주를 bacteriocin beer라 한다.

㉒ Bacteriocin beer의 발효 분석

Bacteriocin beer의 주 발효 분석은 2일 간격으로 9일간 총 6회 실시하였으며, 후 발효 분석은 3일 간격으로 15일간 총 7회 측정하였다. 측정항목은 위의 발효 과정에서 주발효/후발효 분석항목과 같고(Specific gravity, Yeast viability, Reducing sugar, Free amino nitrogen, color, pH, alcohol content, foam stability, turbidity, 관능평가), bacteriocin 활성 측정항목이 추가되었다.

④ 주 발효 및 후 발효 분석항목 및 분석법

주발효 분석은 2일 간격으로 7일간 총 4회 실시하였으며, 후 발효 분석은 2일 간격으로 15일간 총 7회 측정하였다. 분석항목 및 분석방법은 다음과 같다.

㉑ Specific gravity

발효액 100mL를 메스실린더에 넣고, 비중계(200-DK-6, Daekwang, Seoul, Korea)를 이용하여 비중의 변화를 측정하였다. 비중의 변화는 당화 후의 맥즙의 original gravity(O.G.), 전 발효 종료 후 specific gravity(S.P.1), 후 발효 종료 후 final gravity(S.P.2)를 측정하였다.

㉒ Yeast viability

효모의 생육 변화는ASBC 방법을 기준으로 하였다. 효모 생육수를 측정하기 위해 methylene blue 염색법을 기준으로 하였고 haemocytometer를 사용하여 측정하였다. 1차 발효 4일 및 2차 발효 7일, 총 11일 동안의 생육 변화 양상을 확인하여 부원료 종류 및 첨가량별 영향을 비교하였다.

㉑ Reducing sugar

환원당의 양은 DNS법을 기준으로 하여 측정하였다. DNS시약은 10.0g의 3,5-dinitrosalicylic acid, 2.0g phenol과 200.0g rochelle salt를 1000mL의 sodium

hydroxide(10g/L)와 Sodium carbonate(0.5g/L)에 용해시켜 준비하였다. 환원당을 함유하고 있는 시료는 100배 희석하여 사용했으며, 희석된 시료 1mL과 DNS시약 3mL을 끓는 물에서 5분간 반응시킨 후 상온에서 5분간 식혀 spectrophotometer(UVmini-1240, Shimadzu, Kyoto, Japan)를 이용하여 550nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도 값은 standard curve를 이용하여 환원당량으로 산출한 뒤 희석배수를 곱하였다.

㉞ Free amino nitrogen

Wort 분석과 같은 방법으로 발효가 끝난 맥주의 free amino nitrogen 함량을 분석하여, 젖산균 배양액을 넣어 제조한 bio-acidified 맥아를 이용하여 만든 맥주와 젖산균 배양액을 넣지 않고 제조한 맥아를 이용하여 만든 맥주의 free amino nitrogen을 비교하였다.

⑤ 최종 맥주의 분석 항목 및 분석법

후 발효 단계가 완료된 젖산균 배양액을 넣지 않은 control 맥주와 젖산균 배양액을 넣어 제조한 bio-acidified 맥아를 이용하여 만든 맥주의 color, pH, alcohol content 등의 측정을 통하여 최종 맥주의 quality 측정을 하였다. 분석항목과 분석법은 다음과 같다.

㉠ 색도 측정

Wort 분석과 같은 방법으로 발효가 끝난 맥주의 color를 분석하여, 젖산균 배양액을 넣어 제조한 bio-acidified 맥아를 이용하여 만든 맥주와 젖산균 배양액을 넣지 않고 제조한 맥아를 이용하여 만든 맥주의 색도를 비교하였다.

㉡ pH 측정

발효가 끝난 맥주를 pH meter(ORION 3 STAR, Thermo, Singapore)를 사용하여 3반복 측정하여, 젖산균 배양액을 넣어 제조한 bio-acidified 맥아를 이용하여 만든 맥주와 젖산균 배양액을 넣지 않고 제조한 맥아를 이용하여 만든 맥주의 pH를 비교하였다.

㉢ 알코올 함량 측정

알코올 함량은 알코올 증류장치를 이용하여 측정하였다. 알코올을 증류시킨 후 주정계(211-DK-12, Daekwang, Seoul, Korea)를 이용하여 측정하였으며, 이를 주정분 온도 환산표를 통해 알코올 함량을 환산하였다. 젖산균 배양액을 넣어 제조한 bio-acidified 맥아를 이용하여 만든 맥주와 젖산균 배양액을 넣지 않고 제조한 맥아를 이용하여 만든 맥주의 알코올 함량을 비교하였다.

㉣ 거품 안정성 측정

맥주의 거품 안정성의 경우 ASBC에 제시된 방법을 이용하여, 젖산균 배양액을 넣어 제조한 bio-acidified 맥아를 이용하여 만든 맥주와 젖산균 배양액을 넣지 않고 제조한 맥아를 이용하여 만든 맥주의 거품안정성을 비교하였다. 하부에 cock이 있는 유리 깔럼 높이 직경을 사용하여 시료 50 mL를 붓고 30초 후에 거품이 위의 하층액을 제거하였다. 그 후 230초간 거품이 꺼지는 시간으로 꺼진 거품의 양(b)과 남은 거품 양(c)을 측정하여 거품안정성(sigma)을 측정하였다. 거품안정성을 산출하는 식은 아래와 같다.

$$\Sigma = \frac{230}{2.303 \log \left[\frac{b+c}{c} \right]}$$

㉓ 탁도 측정

맥주의 탁도(turbidity)는 spectrophotometer(UVmini-1240, Shimadzu, Kyoto, Japan)를 이용하여 측정하였다. 700 nm에서의 흡광도가 430 nm에서 측정한 흡광도 보다 ≤ 0.039 배라면 탁도가 “없음(none)”으로, 아니라면 “있음(exist)”으로 결정하였다. 젖산균 배양액을 넣어 제조한 bio-acidified 맥아를 이용하여 만든 맥주와 젖산균 배양액을 넣지 않고 제조한 맥아를 이용하여 만든 맥주의 turbidity를 비교하여 분석하였다.

㉔ Diacetyl 함량 측정

Diacetyl 함량 측정은 spectrophotometer(UVmini-1240, Shimadzu, Kyoto, Japan)를 이용한 비색법으로 측정하였다. 0.175 M iso-niazide 용액 10 mL에 acetic acid 몇 방울을 넣어 산성화시킨다. 여기에 2.9×10^{-4} M diacetyl solution 5mL과 0.15M ZR(IV)염 1 mL를 더해 주었다. 3 M HCl과 4 M NaOH로 pH를 1.7 ± 0.1 로 조정시킨 후 제조한 용액을 50 mL 부피 플라스크에 옮겨서 물로 희석하였다. 약 30분 뒤, diacetyl의 농도를 20-200 ppb 사이로 나타내어 calibration curve를 작성하였다(Rafael et al., 1993). 시료 25mL을 NaCl 포화용액 70 mL과 섞어준 뒤, 이 혼합물을 iso-niazide 용액 20 mL에 30 mL이 포집될 때까지 증류시킨다. 이 값을 calibration curve와 대조하여 diacetyl의 양을 측정하였다. 젖산균 배양액을 넣어 제조한 bio-acidified 맥아를 이용하여 만든 맥주와 젖산균 배양액을 넣지 않고 제조한 맥아를 이용하여 만든 맥주의 diacetyl 함량을 비교하여 분석하였다.

㉕ 관능평가

관능검사는 차이 식별 검사(attribute difference test)를 수행하였다. 동국대학교 식품공학과 대학원생 30명 중에서 패널 요원의 차이식별능력, 참여의식 등을 고려하여 10명을 선발하였다. 패널 선택을 위하여 각 패널의 관능검사 결과의 ANOVA가 수행되었다. 맥주의 주된 taste bitterness를 고려하였다. Reference로는 5개의 20, 40, 60, 80, 그리고 100 mg/L-water of isohumulone solution이 사용되었다. 묘사적 언어는 ASBC (St. Paul, 1992)를 기준으로 선택된 패널들에 의해 채택되었다. 관능적 특성은 odor, taste, mouthfeel, aftertaste, color로 구성되었으며, 다음과 같이 세분화하였다. odor는 fruity odor, alcoholic odor, taste는 bitter taste, astringent taste, sour taste, sweet taste, mouthfeel로 mouthcoating mouthfeel, carbonation mouthfeel, body mouthfeel, thick mouthfeel, aftertaste로 duration of aftertaste, Overall preference로 구성하였다. 선택된 패널들은 기술어를 사용하기 위하여 reference material를 사용하여 훈련되었다.

각 시료마다 평가해야 할 특성이 많기 때문에 실험은 랜덤화 블럭법을 이용하여 설계되었다. 각 특성 당 강도는 0-9점 척도로 평가되었다(0: 없음, 1-2: 약함, 3-4: 보통, 5-6: 강함, 7-8: 더 강함, 9: 매우 강함) (Kim et al., 1996). 맥주 샘플은 test전에 4°C에서 하루 보관 후 사용하였다. 검사는 20°C의 tasting booth에서 실행되었다. 10 mL의 시료는 random three digit code로 labeling 된 유리컵에 담겼으며, 4개의 시료가 패널에게 주어졌다. 처음에는 odor에 대한 것을 평가하고, 그 후 마셨을 때 taste, mouthfeel, aftertaste를

평가하였다. 한 시료 당 모든 질문을 평가한 후 다른 설문지에 다른 시료를 평가하게 했다. 패널 요원들은 시료 당 30초의 휴식시간을 가졌으며, 물과 unsalted cracker로 입을 헹군 후 검사를 시행했다.

⑥ 응집제 처리 및 응집생성량 측정

Dry oven(105°C)에 Filter paper Whatman 1을 8시간 동안 말린다. Desiccator에 Filter paper를 넣고 30분 동안 식힌다. Filter paper의 무게(A)를 측정한다. 응집제 PVPP A, PVPP B, PVPP C, Silica xerogel A, Silica xerogel B의 일정량을 맥주에 첨가하여 일정 시간 동안 응집을 확인한다. Filter paper Whatman 1로 응집생성물을 여과시킨다. Dry oven(105°C)에 여과가 완료된 Filter paper를 8시간 동안 말린다. Desiccator에 Filter paper를 넣고 30분 동안 식힌다. Filter paper 무게(B) 측정한다. $(A) - (B) = (C)$ 값으로 응집 생성량을 측정한다.

⑦ 살균

발효가 끝난 맥주는 Control 맥주, Bacteriocin 맥주, 복분자 맥주, 홍삼 맥주 이렇게 4 가지 맥주로 제조한다. 제조된 맥주는 Shaking water bath를 이용하여 가열살균 한다. 4가지 맥주 중 Control 맥주, Bacteriocin 맥주, 홍삼 맥주는 1/2차년도 살균 연구 결과로부터 도출된 살균조건인 60°C, 15.37분에 따라 살균한다. 살균할 맥주는 500ml 알루미늄 캔에 500ml 용량으로 담아 살균한다. 복분자 맥주의 경우, 제조 방법은 3차년도 복분자맥주 살균 연구로부터 도출된 결과를 따른다. 먼저 복분자 착즙액을 10ml test tube에 담고 60°C 32.54분 살균한다. 32.54분은 10ml 복분자 착즙액의 come-up-time을 포함한다. 살균을 마친 복분자 착즙액은 최종 복분자 맥주의 3% (v/v)가 되도록 첨가한다. 제조된 복분자 맥주는 50°C에서 11.79분간 살균한다.

⑧ 통계분석

총 실험은 3반복으로 진행하였고, 실험의 평균값은 GraphPad Prism 5 (GraphPad Prism 5.03) 통계프로그램을 사용하여 유의차($\alpha=0.05$) 수준에서 일원배치 분산분석(ANOVA)를 통하여 분석하였다. 또한 Control 샘플과 다른 샘플들 간의 유의차를 분석하기 위해 독립표본 t 검정(t-test)을 실시하였다.

(3) 결과 및 고찰

(가) 홍삼/복분자 맥주의 당화과정 후 맥즙제조적성 평가

3차년도 간의 연구를 통해 당화 과정에서 국산보리인 광맥에 부족한 환원당과 유리아미노산(FAN)을 얻기 위한 노력으로 당화효소인 α -amylase와 amyloglucosidase, 여과 효소인 β -glucanase를 처리하여 맥즙을 제조하였고 효소인 최적 조건을 맥아의 0.1 %로 결정하였다. 이에 홍삼/복분자 맥주를 제조하기 위한 맥즙을 효소의 최적 조건을 처리하여 제조하여 맥즙 제조적성을 평가하여 Table 1에 나타내었다.

Table 6-1. 제조된 맥즙의 특성 분석

	FAN (mg/L)	Filtration time (min)	점도 (Cp)	pH	환원당(mg/mL)
Control	152.5±3.24	121±8.28	1.54±0.03	5.9±0.01	74.62±2.93
Pilsner	151.79±2.07	116±9.29	1.59±0.01	5.58±0.02	60.12±1.22

수입 맥아인 Plisner와 비교해보면 환원당의 경우 효소 처리한 광맥의 맥즙의 환원당량이 74.62mg/ml로 Pilsner의 맥즙(60.12mg/ml)보다 24 % 높아 발효에 필요한 당을 충분히 가지고 있는 것으로 확인 하였다. FAN을 비교하여 본 결과 광맥의 맥즙의 FAN이 152.5mg/L로 Pilsner 맥즙의 FAN인 151.79mg/L와 유사한 값을 가지며 적절한 FAN 수치(150-170mg/L)안에 들어 발효하기에 적절한 환원당과 FAN을 가지는 것을 확인 할수 있었다.

(나) 홍삼/복분자 맥주의 발효 중 발효적성 평가

홍삼/복분자 맥주의 제조를 위해 최적의 효소 조건을 처리하여 제조한 맥즙을 발효시켰다. 발효과정 중의 pH와 비중의 변화를 측정하여 Table 1에 나타내었으며 발효 적성 평가를 통해 분석한 최종 맥주의 발효특성을 Table 2에 나타내었다.

Table 6-2. 발효기간 동안 pH와 비중(specific gravity)변화

	pH	비중
맥즙(Wort)	5.99±0.04	1.025
Hopped wort	5.85±0.01	1.036
주발효 후	4.69±0.04	1.007
후발효 후	4.67±0.02	1.008

발효가 진행되면서, 즉 효모가 맥즙의 당을 이용하면서 맥주의 pH는 감소하게 된다. 또한, 발효시 pH가 5.6-4.6으로 낮아지면서 홉의 고미 성분(α -acids, β -acid, iso- α -acid)의 용해도가 감소하게 된다. 발효 중에 베타산은 거의 완전 제거되고, 알파산의 경우 90%가량 제거 된다. 용해도가 상대적으로 좋은 이소알파산은 감소되는 비율이 현저하게 적지만 효모에 의해 흡착되어 그 농도는 지속적으로 감소하게 된다. 일반적으로 mash의 pH는 5.6 ± 0.2, boiled wort의 pH는 5.4 ± 0.2, 최종 후발효 후 pH는 4.2-4.8으로 알려져 있다. 맥주 제조 과정에서 pH는 효모의 발효과정에 뿐만 아니라 최종적으로 맥주의 맛에 영향을 주기도 하며, 최종맥주의 pH가 4.0보다 낮을 때 시거나 쓴맛, 건조한 맛이 날 수 있다. 최종 맥주 발효실험에서는 table 1에서 나타냈듯이, 최종발효 후 pH는 약 4.67로 맥주의 일반적 pH를 충족시켰다.

맥주 발효 시 비중(Specific gravity)은 순수 물의 밀도에 대한 용액의 밀도를 의미한다. 담금 과정(mashing)에서 맥아가 가지고 있는 성분들이 물에 녹게 되어 비중이 상승한다. 발효가 진행됨에 따라 효모가 맥즙의 영양분을 이용하여 알코올이나 탄산가스 등을 생성하게 되며 따라서 비중은 감소하게 된다. 맥즙의 비중은 맥주의 알코올 함량에 영향을 미치고 또한 맥아 맛과 쓴맛 사이의 균형을 인식하는 데 영향을 미친다. 일반적으로 최종 맥주 제품의 비중은 1.010정도이며, 순수한 물의 경우 1.000이다. Table 6-2에서 맥즙의 초기 비중은 1.025, 최종 발효 후 비중은 1.008로 낮아진 것을 볼 수 있다.

Table 6-3. 최종 맥주의 발효 특성

	Alcohol content(%)	Cloudiness	Foam stability	Color		
				L	a	b
Control	4.2±0.26	exist	165.88±5.67	40.37±0.98	0.51±0.24	10.66±0.47

Table 6-3는 맥주의 알코올 함량, 거품 안정성, 탁도 측정결과를 나타낸 표이다. 일반적으로 맥주는 약 5%의 알코올 함량을 갖는데, 최종 발효 실험에서는 약 4.2%로 측정되었다. 샘플은 응집 및 여과 살균을 하지 않은 상태에서 실험에 사용되었으므로 탁도는 있음으로 측정되었다. 또한, 거품안정성은 FAN value와 단백질, 베타 글루칸과 같은 non-polysaccharide에 의해 영향을 받으며, 최종 발효 실험에서는 약 165.88로 측정되었다. 색도 측정은 L, a, b value로 나타낼 수 있는데, L value는 lightness를 뜻하며 100에 가까울수록 흰색에 가까워짐을 의미한다. a value는 green-red계열의 색을 의미하는데, 양수 값이 red를 뜻하며, 그 절대값이 높아질수록 색이 짙어진다. b value는 yellow-blue계열을 의미하고, 양수일 때 yellow를 뜻하는데 이 수치 또한 절대값이 높아질수록 그 색이 짙어짐을 말한다. 최종 발효 후 맥주의 색도에서 b value는 약 10.66, 밝기를 나타내는 L value는 약 40.37을 나타내었다. 2세부 발효 실험에서 복분자 맥주 색도는 붉은색이 강하게 나타나므로 a value가 높게 나타나는 것을 확인했는데, 최종 발효 실험 때에는 응집 후 첨가물을 추가했으므로 control 맥주의 색도 실험만 진행하였다.

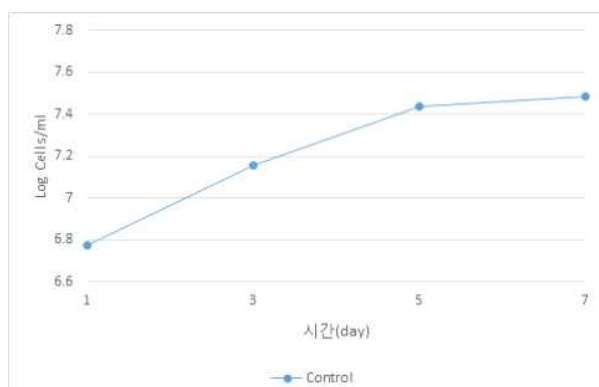


Fig 1. 주 발효 기간 동안 효모 변화

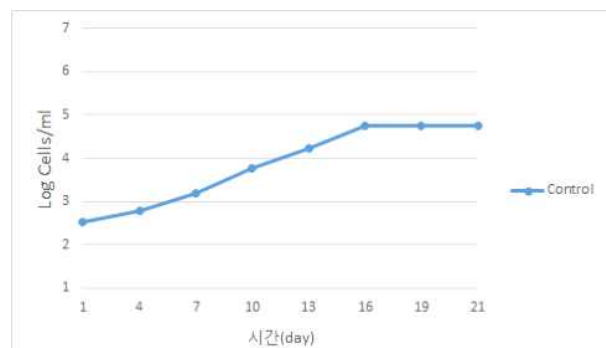


Fig 2. 후 발효 기간 동안 효모 변화

2세부의 홍삼/복분자 맥주 발효 실험과 동일하게 효모는 초기 5.0×10^6 cells/mL에 맞게 접종하였으며, 주발효가 진행되면서 그 양이 약 log 7.45까지 증가하였다. 발효기간 중의 효모 변화는 위의 fig. 1과 fig. 2와 같다. Fig. 1은 주발효 기간 중의 효모 변화를, fig. 2은 후발효 기간 중의 효모 변화를 나타낸다. 발효 중에는 맥즙에 있는 maltose와 maltotriose 등의 당류와 peptides들에 의해서 효모의 cell mass가 증가하고, 그 결과 효모에 의한 알코올 발효가 진행된다. 효모의 양이 증가할수록 발효는 수월하게 진행된다. 후발효를 시키기 위해 가라앉은 효모는 남겨두고 상층액만 갈색 페트병에 병입을 진행하는데, 이 때 위의 그래프에서 보듯이 효모의 수는 약 log 2.5까지 급격히 감소하게 된다. 하지만 후발효 기간에도 단당류나 peptide가 남아 있기 때문에 효모의 양은 소량이지만 증가하였다.

(다) 최적화된 응집 조건을 적용한 홍삼/복분자 맥주의 응집도 평가

맥주의 응집생성량 확인을 위해 최적의 응집제 조건을 적용하여 제조한 맥주를 처리시켰다. 응집물 생성량의 무게를 측정하여 Table 6-4에 나타내었다.

Table 6-4. 제조된 맥주의 응집생성물 결과

응집물 생성량 (mg)	
Control	3143±38

Table 6-4은 맥주의 응집물 생성량 결과이다. 700ml 맥주용량을 기준으로 맥주의 최적응집조건인 PVPP A(polycar brewbrite) 0.16%(w/v)를 60분 동안 적용하였다. Table 1은 맥주 700ml 당 응집생성량으로 다음과 같은 값을 나타내었다. 일반적으로 최적응집조건을 적용하였을 때 맥주 50ml 당 응집생성량은 약 230mg이며, 맥주 700ml 당 응집생성량은 다음과 같이 일정함을 나타냈다. 또한, 응집제를 투여하여 맥주 거품형성에 영향을 미치지 않는 폴리페놀을 제거하여 혼탁함을 개선시킬 수 있음을 확인하였다.

(라) 최적화된 살균 조건을 홍삼/복분자 맥주 제조에 적용

Control 맥주, Bacteriocin 맥주, 홍삼 맥주, 복분자 맥주의 살균 후 효모 및 젖산균의 생균수는 표 Table 6-5과 같다. Control 맥주, Bacteriocin 맥주, 홍삼 맥주는 60°C, 15.37분간 살균한하였고 복분자 맥주의 경우, 복분자를 60°C 먼저 32.54분 살균하고 복분자 맥주 제조 후 50°C, 11.79분간 살균하였다. 효모의 경우 살균 후 control 맥주에서 1.0×10^0 CFU/mL, 존재한다. 홍삼맥주와 복분자 맥주, bacetriocin 맥주에서는 발견되지 않았다. 젖산균은 네 가지 모든 맥주에서 발견되지 않았다. 이는 맥주가 낮은 pH, 알코올 함유, hop compounds, 높은 CO₂ 농도, 낮은 O₂ 농도 등 미생물들이 자라나기 힘든 환경을 갖추고 있으며, 대부분의 맥주 부패균의 알려진 D₆₀이 매우 적으므로 본 연구에서 살균 조건으로 삼은 60°C, 15.37(Control 맥주, Bacteriocin 맥주, 홍삼 맥주) 및 50°C, 11.79분(복분자 맥주)에서 충분히 살균되었음을 알 수 있다.

Table 6-5. 살균 후 네 가지 맥주의 효모 및 젖산균의 생균수

	Control beer	Red ginseng beer	Black raspberry beer	Bacteriocin beer
효모 (CFU/mL)	1.0*10 ⁰	0	0	0
젖산균 (CFU/mL)	0	0	0	0

Table 6-6. 살균 후 네 가지 맥주의 관능평가

	Control beer	Red ginseng beer	Black raspberry beer	Bacteriocin beer
mouthcoating mouthfeel	4.06±0.09	4.37±0.07	3.93±0.12	4.23±0.15
carbonation mouthfeel	4.57 ±0.03	4.77±0.03*	5.23±0.07***	5.37±0.03***
body mouthfeel	3.37±0.13	4.23±0.17*	4.8±0.20**	4.03±0.07*
thick mouthfeel	3.13±0.03	3.6±0.10*	4.4±0.15**	2.93±0.09
alcoholic odor	4.4±0.06	5.3±0.06***	5.73±0.09***	5.67±0.03***
bitter taste	3.87±0.17	5.13±0.15**	4.57±0.15*	3.87±0.15
astringent taste	4.17±0.19	4.77±0.18	4.53±0.03	4.4±0.06
duration after taste	4.3±0.06	5.3±0.31*	5.73±0.07***	5.4±0.10***
fruity taste	2.6±0.06	3.67±0.17*	6.63±0.22***	7.1±0.06***
sour taste	2.17 ±0.03	3.13±0.03***	4.13±0.15***	6.7±0.06***
sweet taste	2.73±0.07	3.13±0.07*	5.4±0.10***	5.07±0.18***
overall preference	3.63±0.15	3.93±0.03	5.9±0.17***	5.8±0.06***

1) All value is shown as mean ± standard deviation (n = 3).

2) Significance levels in the independent t-test:

* p < 0.05;

** p < 0.01;

*** p < 0.001.

관능검사의 결과는 Table 6-6와 같다. Control 맥주와 홍삼 맥주, Control 맥주와 복분자 맥주, Control 맥주와 bacteriocin 맥주 각각의 유의적 차이를 비교하였다. Control 맥주와 비교하여 alcoholic odor, sour taste, carbonation mouthfeel, fruity taste, sweet taste는 홍삼, 복분자 맥주 모두 큰 차이를 보였다. 이와 같은 항목을 바탕으로 홍삼 맥주와 복분자 맥주를 비교해보면, duration after taste, fruity taste, sweet taste는 복분자 맥주가 높았다. 과일향과 단맛의 경우 복분자의 특성으로부터 비롯된 것이라고 볼 수 있다. 전체 기호도에서도 홍삼 맥주와 복분자 맥주를 비교하면 복분자 맥주가 더 높은 값을 보인다. 따라서 홍삼맥주보다는 복분자맥주가 제품의 완성도나 품질 측면에서 더 우수하다. 또한 박테리옌 맥주도 control 맥주와 비교하면 carbonation mouthfeel, fruity taste, sour taste에서 큰 유의적 차이를 보인다. 과일맛과 신맛이 control보다 더 높은 값을 보이는 이유는 젖산균의 작용으로 인해 생성된 여러 물질 및 젖산에 의한 것으로 생각된다. 박테리옌 맥주는 mashing 후에 젖산균을 주입한다. 배양하는 동안 젖산균은 박테리옌과 젖산을 생성한다.

전체적인 기호도 측면에서도 컨트롤과 비교했을 때 bacteriocin 맥주가 높은 값을 보인다. bacteriocin 맥주도 생성된 박테리오신에 의해 미생물 안정성이 높아졌고 관능평가 결과도 좋았다는 점에서 우수한 맥주라고 생각된다.

2. 가속화 실험을 통한 품질 평가 및 관능평가

(1) 요약

맥주에 응집제를 처리한 것이 맥주의 살균, 관능적 요인에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해 응집제를 처리한 맥주의 살균실험, 관능평가를 실시하였다. 또한 응집제가 맥주의 유통과정 중에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위해 응집제 처리 후 가속화 실험을 진행하여 살균 실험, 관능평가를 실시하였다. 이미 확립되어 있는 살균방법을 통해 살균한 결과 응집제 처리가 미생물의 생육을 유발하지 않는다는 것을 확인하였으며, 관능평가에서도 큰 영향을 미치지 않았다. 또한 유통 과정 중에 응집제가 미생물의 생육을 유발하지 않는 것을 확인할 수 있었다. 관능평가 결과, 응집제가 시간이 지난 후에도 관능적 품질에 큰 영향을 미치지 않는 것을 확인할 수 있었다.

(2) 재료 및 방법

(가) 가속화 실험 조건

6개월과 12개월에서 맥주의 품질을 평가하기 위하여 다음과 같은 방법으로 가속실험 조건을 설정하였다. 맥주의 Q_{10} Value는 3으로 가정하였으며 맥주의 초기 온도는 14°C 로 설정하였다. 가속실험은 10일간 진행하였다.

$$Q_{10} = 3 \rightarrow \frac{k_{T_0+10}}{k_{T_0}} = 3 \rightarrow k_{T_0+10} = 3 \times k_{T_0}$$

즉, 온도가 10도 증가할 때 맥주 내 품질의 반응속도는 3배 증가한다.

이를 바탕으로 6개월의 가속실험 조건을 구하면 다음과 같다.

$$6\text{month} \approx 180\text{day}, \frac{180\text{day}}{10\text{day}} = 18$$

$$18 = 3^n, \log_3 18 = n, n = 2.6$$

$$T = 2.6 \times 10 = 26$$

반응기간은 18배 감소하였으므로 때문에 반응속도는 18배 증가하여야 한다. 반응속도가 18배 증가하기 위해 증가해야할 온도는 26°C 이다. 따라서 6개월 후 맥주의 품질을 10일간의 실험으로 진행하기 위한 가속실험 온도는 40°C 로 설정하였다. 위와 같은 방법으로 12개월 후 맥주의 품질을 나타내기 위한 가속 실험 온도는 47°C 로 설정하였다.

(나) 알코올 함량

알코올농도는 증류법을 이용한 Vinometer(211-DK-12, Daekwang, Korea)를 이용하여 측

정하여 식품공전 상에 제시되어있는 주류분석 규정에 나온 술의 알코올함량 측정방법에 의해 분석하였다. (Korea Food & Drug Administration, 2012).

(다) 쓴맛

맥주를 거품의 손실이 없도록 가스를 제거하여 20℃로 조절하고 10mL 를 원심관에 취한 후 6N 염산 0.5 mL, 이소옥탄 20mL 를 가하여 밀봉한 다음 진탕기를 이용해 250 rpm에서 15분 간 흔들었다. 3000rpm 에서 3분간 원심분리 후 이소옥탄 층을 10mm 셀에 취해 순수한 이소 옥탄을 대조로 275nm에서 흡광도 (A)를 측정하였다.

$$\text{Bitterness} = 50 \times A \text{ (BU)}$$

(라) 거품 안정성 측정

하부에 cock이 있는 유리 칼럼(높이 250 mm, 직경 50mm)을 사용하였다. 시료 50mL를 분 고 30초 후에 거품 이외의 하층액을 cock을 열어 제거한 후 cock을 다시 막았다. 그 후 230초 간 거품이 깨지는 시간을 허용하여 깨진 거품 양(b)과 남은 거품 양(c)을 측정하여 다음과 같 은 식으로 거품안정성(sigma, Σ)을 산출하였다(Ratnavathi et al., 2000).

$$\Sigma = \frac{230}{2.303 \log \left[\frac{b+c}{c} \right]}$$

(마) 탁도 측정

Spectrophotometer(UV mini-1240, Shimadzu, Kyoto, Japan)를 이용하여 700nm에서의 흡광도가 430nm에서 측정한 흡광도 보다 ≤ 0.039 배라면 탁도가 “없음”으로, 아니라면 “있음”으로 판단한다. 각 품종별 맥주의 탁도 차이를 분석한다.

(바) 살균 실험

일반 맥주, 복분자 맥주, 홍삼 맥주 3 가지 맥주의 살균 실험을 진행한다. 맥주는 Shaking water bath를 이용하여 가열살균을 실시한다. 일반 맥주와 홍삼 맥주는 1/2차년도 살균 연구 결과로부터 도출된 살균조건인 60℃, 15.37분에 따라 살균을 진행한다. 살균할 맥주는 500ml 플라스틱 용기에 200ml 용량으로 담아 살균을 진행한다. 복분자 맥주의 경우, 3차년도 복분자 맥주 살균 연구로부터 도출된 결과를 따른다. 복분자 맥주는 50℃에서 11.79분간 살균을 진행한다.

(사) 관능 평가

관능검사는 차이 식별 검사(attribute difference test)를 수행하였다. 동국대학교 식품공학과 대학원생 30명 중에서 패널 요원의 차이식별능력, 참여의식 등을 고려하여 10명을 선발하였다. 패널 선택을 위하여 각 패널의 관능검사 결과의 ANOVA가 수행되었다. 맥주의 주된 taste bitterness를 고려하였다. Reference로는 5개의 20, 40, 60, 80, 그리고 100 mg/L-water of isohumulone solution이 사용되었다. 묘사적 언어는 ASBC (St. Paul, 1992)

를 기준으로 선택된 패널들에 의해 채택되었다. 관능적 특성은 odor, taste, mouthfeel, aftertaste, color로 구성되었으며, 다음과 같이 세분화하였다. odor는 fruity odor, alcoholic odor, taste는 bitter taste, astringent taste, sour taste, sweet taste, mouthfeel로 mouthcoating mouthfeel, carbonation mouthfeel, body mouthfeel, thick mouthfeel, aftertaste로 duration of aftertaste, Overall preference로 구성하였다. 선택된 패널들은 기술을 사용하기 위하여 reference material를 사용하여 훈련되었다. 각 시료마다 평가해야 할 특성이 많기 때문에 실험은 랜덤화 블럭법을 이용하여 설계되었다. 각 특성 당 강도는 0-9 점 척도로 평가되었다(0: 없음, 1-2: 약함, 3-4: 보통, 5-6: 강함, 7-8: 더 강함, 9: 매우 강함) (Kim et al., 1996). 맥주 샘플은 test전에 4℃에서 하루 보관 후 사용하였다. 검사는 20℃의 tasting booth에서 실행되었다. 10 mL의 시료는 random three digit code로 labeling 된 유리컵에 담겼으며, 4개의 시료가 패널에게 주어졌다. 처음에는 odor에 대한 것을 평가하고, 그 후 마셨을 때 taste, mouthfeel, aftertaste를 평가하였다. 한 시료 당 모든 질문을 평가한 후 다른 설문지에 다른 시료를 평가하게 했다. 패널 요원들은 시료 당 30초의 휴식시간을 가졌으며, 물과 unsalted cracker로 입을 헹군 후 검사를 시행했다.

(아) 통계 분석

총 실험은 3반복으로 진행하였고, 실험의 평균값은 GraphPad Prism 5 (GraphPad Prism 5.03) 통계프로그램을 사용하여 유의차($\alpha=0.05$) 수준에서 일원배치 분산분석(ANOVA)를 통하여 분석하였다. 또한 Control 샘플과 다른 샘플들 간의 유의차를 분석하기 위해 독립표본 t 검정(t-test)을 실시하였다.

(3) 결과 및 고찰

맥주제조 과정 중 응집제 첨가 및 가속화 실험에 따른 품질 변화를 평가하고 보완한다. 응집제를 처리하지 않은 일반/복분자/홍삼 맥주의 품질평가를 실시한다. 최적응집조건에 따른 일반/복분자/홍삼 맥주의 품질평가 및 보완을 진행한다. 동시에 가속실험을 진행하여 비교 및 보완한다.

Table 6-7. 일반/복분자/홍삼 맥주의 품질평가 결과

	일반 맥주	복분자 맥주	홍삼 맥주
Alcohol (%)	3.7±0.1	4.1±0.1	5.2±0.1
Bitter taste	12.3±0.2	11.6±0.3	16.6±0.1
Turbidity	Turbid	Turbid	Turbid
Foam stability	224.4±15.7	210.3±26.3	215.0±23.3

본 실험에서 제조한 맥주의 일반/복분자/홍삼 맥주의 품질평가 결과는 Table 6-7와 같다. 알코올 농도 측정결과 일반 맥주의 알코올 함량은 3.7%, 복분자 맥주의 알코올 함량은 4.1%, 홍삼 맥주의 알코올 함량은 5.2%로 일반맥주에 비해 복분자/홍삼 첨가는 알코올함량을

증가시켰다. 이는 복분자와 홍삼에 함유된 탄수화물 당이 발효에 기인하여 알코올 도수가 증가한 것으로 판단된다.

쓴맛 정도는 주로 hop에서 나오는 유도체인 iso- α acid 함량에 따라 나타나며, 맥주의 iso-octane으로 산성화되어 추출된 bitter substances를 측정하여 결정된다. 쓴맛 측정 결과 모든 맥주의 측정값이 표준범위인 10-40BU에 속하였다.

탁도는 맥주의 발효과정 중 효모의 성장 및 단백질, 폴리페놀의 존재 등을 통해 발생하는데 이는 맥주의 발효 유무를 확인할 수 있는 척도다. 모든 맥주의 흡광도 값을 비교하였을 때 700nm에서의 흡광도 값이 430nm에서의 흡광도 값보다 0.039배 이하인 값을 나타내어 모두 탁도가 나타나지 않은 것을 확인하였다.

거품의 안정성은 맥주 품질 특성에 있어 가장 기초적이고 중요한 항목으로 hop에서 유리되는 iso- α acid와 malt로부터 기인한 많은 protein 및 polypeptide에 의해 생성된다. 거품의 안정성의 수치가 높을수록 보다 안정하다는 것을 뜻하는데 복분자/홍삼 첨가가 일반 맥주의 거품 안정성에 크게 영향을 미치지 않는 것을 확인하였다.

모든 품질평가를 분석한 결과, 복분자/홍삼의 첨가는 일반 맥주의 품질저하를 일으키지 않는 것으로 판단하였다.

Table 6-8. 응집제를 적용한 일반/복분자/홍삼 맥주의 품질평가 결과

Table 6-8-1. 가속실험을 진행하지 않은 일반/복분자/홍삼 맥주의 품질평가 결과

	일반 맥주	복분자 맥주	홍삼 맥주
Alcohol (%)	3.7 \pm 0.1	4.1 \pm 0.1	5.3 \pm 0.1
Bitter taste	11.9 \pm 0.2	11.2 \pm 0.5	15.5 \pm 0.6
Turbidity	Not turbid	Not turbid	Not turbid
Foam stability	229.1 \pm 10.0	255.3 \pm 12.7	243.1 \pm 13.7

본 실험에서 제조한 맥주의 응집제를 적용하였고, 가속실험을 진행하지 않은 일반/복분자/홍삼 맥주의 품질평가 결과는 Table 6-8-1와 같다.

알코올 농도 측정결과 일반 맥주의 알코올 함량은 3.7%, 복분자 맥주의 알코올 함량은 4.1%, 홍삼 맥주의 알코올 함량은 5.3%로 응집제 처리는 맥주의 알코올함량에 영향을 미치지 않는 것으로 판단하였다.

쓴맛 측정 결과 모든 맥주의 측정값이 표준범위인 10-40BU에 속하였으며, 응집제 처리는 맥주의 쓴맛변화에 영향을 미치지 않는 것으로 판단하였다.

모든 맥주의 흡광도 값을 비교하였을 때 700nm에서의 흡광도 값이 430nm에서의 흡광도 값보다 0.039배 이하인 값을 나타내어 모두 탁도가 나타나지 않은 것을 확인하였다.

거품 안정성의 수치는 응집제처리 하지 않은 맥주와 비교하여 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 따라서 응집제 처리가 거품안정성에 크게 영향을 미치지 않는 것을 확인하였다.

모든 품질평가를 분석한 결과, 응집제 처리는 일반 맥주의 품질저하를 일으키지 않는 것으로

로 판단하였다.

Table 6-8-2. 가속실험(6개월)을 진행한 일반/복분자/홍삼 맥주의 품질평가 결과

	일반 맥주	복분자 맥주	홍삼 맥주
Alcohol (%)	3.8±0.1	4.2±0.1	5.3±0.1
Bitter taste	12.9±0.3	12.0±0.2	16.0±0.2
Turbidity	Not turbid	Not turbid	Not turbid
Foam stability	229.1±11.4	248.0±12.7	241.8±16.0

본 실험에서 제조한 맥주의 응집제를 적용하고 가속실험(6개월)을 진행한 일반/복분자/홍삼 맥주의 품질평가 결과는 Table 6-8-2와 같다.

알코올 농도 측정결과 일반 맥주의 알코올 함량은 3.8%, 복분자 맥주의 알코올 함량은 4.2%, 홍삼 맥주의 알코올 함량은 5.3%로 가속실험을 진행한 맥주의 알코올함량에 영향을 미치지 않는 것으로 판단하였다.

쓴맛 측정 결과 모든 맥주의 측정값이 표준범위인 10-40BU에 속하였으며, 가속화 처리는 맥주의 쓴맛변화에 영향을 미치지 않는 것으로 판단하였다.

모든 맥주의 흡광도 값을 비교하였을 때 700nm에서의 흡광도 값이 430nm에서의 흡광도 값보다 0.039배 이하인 값을 나타내어 모두 탁도가 나타나지 않은 것을 확인하였다.

거품 안정성의 수치는 가속화처리 하지 않은 맥주와 비교하여 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 따라서 거품안정성에 크게 영향을 미치지 않는 것을 확인하였다.

모든 품질평가를 분석한 결과, 가속화 처리는 일반 맥주의 품질저하를 일으키지 않는 것으로 판단하였다.

Table 6-8-3. 가속실험(12개월)을 진행한 일반/복분자/홍삼 맥주의 품질평가 결과

	일반 맥주	복분자 맥주	홍삼 맥주
Alcohol (%)	3.7±0.1	4.0±0.1	5.0±0.1
Bitter taste	11.2±0.5	11.1±0.2	13.9±0.9
Turbidity	Not turbid	Not turbid	Not turbid
Foam stability	205.2±14.5	229.5±10.1	231.2±12.4

본 실험에서 제조한 맥주의 응집제를 적용하고 가속실험(12개월)을 진행한 일반/복분자/홍삼 맥주의 품질평가 결과는 Table 6-8-3와 같다.

알코올 농도 측정결과 일반 맥주의 알코올 함량은 3.7%, 복분자 맥주의 알코올 함량은 4.0%, 홍삼 맥주의 알코올 함량은 5.0%로 약간 감소하였으나 가속실험을 진행한 맥주의 알코올함량에 영향을 미치지 않는 것으로 판단하였다.

쓴맛 측정 결과 모든 맥주의 측정값이 표준범위인 10-40BU에 속하였으며, 가속화 처리는 맥주의 쓴맛변화에 영향을 미치지 않는 것으로 판단하였다.

모든 맥주의 흡광도 값을 비교하였을 때 700nm에서의 흡광도 값이 430nm에서의 흡광도

값보다 0.039배 이하인 값을 나타내어 모두 탁도가 나타나지 않은 것을 확인하였다.

거품 안정성의 수치는 가속화처리 하지 않은 맥주와 비교하여 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 따라서 거품안정성에 크게 영향을 미치지 않는 것을 확인하였다.

모든 품질평가를 분석한 결과, 6개월, 12개월의 가속화 처리에서 일반 맥주의 품질저하를 일으키지 않는 것으로 판단하였다.

Table. 6-9. 살균 후 일반/ 홍삼/ 복분자 맥주의 효모 및 젖산균(LAB)의 생균수. (A: 응집제를 처리하지 않은 맥주, B: 응집제 처리를 한 맥주, C: 응집제를 처리하고 가속화 처리한 맥주)

	Control beer			Black raspberry beer			Red ginseng beer		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
Yeast (CFU/mL)	1.0*10 ⁰	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
LAB (CFU/mL)	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D

*N.D: Not Detect

3가지 처리방법(응집제 처리를 하지 않은 맥주, 응집제 처리를 한 맥주, 응집제 처리 후 가속화 실험을 한 맥주)에 따른 살균 실험 결과는 Table. 3. 과 같다. 실험 결과에 따르면, 일반 맥주에서 응집제를 처리하지 않았을 때, 효모가 1.0*100 CFU/mL 관찰 되었다. 이를 제외하고 나머지 모든 조건에서는 효모와 젖산균이 발견되지 않았다. 이를 통해 맥주에 응집제를 첨가하는 것이 미생물 살균에 영향을 끼치지 않는다고 판단하였다. 또한, 응집제를 넣은 후, 가속화 처리를 한 맥주에서도 미생물의 생육이 발견되지 않았기 때문에 응집제가 맥주가 유통되는 기간 동안에도 미생물의 생육을 유발하지 않는다고 판단하였다.

Table. 6-10-1. 응집제를 처리하지 않은 맥주의 관능평가

	Control beer	Red ginseng beer	Black raspberry beer
mouthcoating mouthfeel	4.06±0.09	4.37±0.07	3.93±0.12
carbonation mouthfeel	4.57±0.03	4.77±0.03*	5.23±0.07***
body mouthfeel	3.37±0.13	4.23±0.17*	4.8±0.20**
thick mouthfeel	3.13±0.03	3.6±0.10*	4.4±0.15**
alcoholic odor	4.4±0.06	5.3±0.06***	5.73±0.09***
bitter taste	3.87±0.17	5.13±0.15**	4.57±0.15*
astringent taste	4.17±0.19	4.77±0.18	4.53±0.03
duration after taste	4.3±0.06	5.3±0.31*	5.73±0.07***
fruity taste	2.6±0.06	3.67±0.17*	6.63±0.22***
sour taste	2.17±0.03	3.13±0.03***	4.13±0.15***
sweet taste	2.73±0.07	3.13±0.07*	5.4±0.10***
overall preference	3.63±0.15	3.93±0.03	5.9±0.17***

Table. 6-10-2. 응집체를 처리한 맥주의 관능평가

	Control beer	Red ginseng beer	Black raspberry beer
mouthcoating mouthfeel	4.21±0.06	4.35±0.11	3.18±0.15
carbonation mouthfeel	4.88±0.12	4.56±0.01**	5.31±0.06***
body mouthfeel	3.57±0.12	4.65±0.11*	4.75±0.16**
thick mouthfeel	4.55±0.16	5.15±0.16*	4.95±0.05**
alcoholic odor	4.10±0.11	5.55±0.10***	5.95±0.10***
bitter taste	3.52±0.14	5.22±0.13**	4.55±0.14*
astringent taste	5.25±0.13	5.87±0.08*	6.12±0.07**
duration after taste	5.21±0.05	5.21±0.15*	5.79±0.14***
fruity taste	1.12±0.11	3.51±0.32*	7.97±0.14***
sour taste	1.21±0.08	4.21±0.14***	6.11±0.25***
sweet taste	1.45±0.21	4.54±0.16*	6.63±0.07***
overall preference	2.16±0.14	4.12±0.04**	6.21±0.11***

Table. 6-10-3. 응집체를 처리한 후 가속 실험(6개월)한 맥주의 관능평가

	Control beer	Red ginseng beer	Black raspberry beer
mouthcoating mouthfeel	4.09±0.04	4.35±0.08	3.89±0.05
carbonation mouthfeel	4.69±0.06	4.85±0.02*	5.11±0.04***
body mouthfeel	3.21±0.11	4.32±0.11*	4.85±0.16**
thick mouthfeel	4.11±0.06	5.25±0.13***	4.97±0.12**
alcoholic odor	4.35±0.05	5.46±0.09***	5.88±0.12***
bitter taste	3.74±0.15	5.12±0.12**	4.68±0.11*
astringent taste	5.16±0.15	5.54±0.15*	5.31±0.12
duration after taste	4.25±0.11	5.54±0.32**	5.66±0.15***
fruity taste	1.55±0.04	4.02±0.16***	6.88±0.11***
sour taste	2.02±0.03	3.25±0.11***	5.23±0.16***
sweet taste	2.25±0.16	3.85±0.11**	5.79±0.11***
overall preference	3.85±0.11	4.88±0.04*	5.96±0.16***

Table. 6-10-4. 응집체를 처리한 후 가속 실험(12개월)한 맥주의 관능평가

	Control beer	Red ginseng beer	Black raspberry beer
mouthcoating mouthfeel	3.82±0.15	3.82±0.27	3.62±0.15
carbonation mouthfeel	4.26±0.02	4.52±0.12*	4.78±0.02***
body mouthfeel	3.52±0.18	3.82±0.07*	4.25±0.12***
thick mouthfeel	4.03±0.17	5.28±0.27***	4.52±0.06**
alcoholic odor	3.94±0.03	5.16±0.07***	5.62±0.19***
bitter taste	3.28±0.19	4.82±0.15**	4.32±0.08*
astringent taste	4.83±0.02	5.41±0.18*	5.14±0.19
duration after taste	4.83±0.14	5.35±0.04**	5.29±0.05***
fruity taste	1.05±0.09	3.83±0.12***	6.67±0.28***
sour taste	1.73±0.18	3.45±0.18***	5.14±0.12***
sweet taste	2.17±0.07	3.52±0.07**	5.74±0.01***
overall preference	3.42±0.04	4.52±0.02*	5.89±0.06***

3가지 처리방법에 따른 관능평가 결과는 Table 10-1,2,3,4에 나타내었다. 먼저, 일반 맥주와 홍삼/ 복분자 맥주를 비교해보면, alcoholic odor, sour taste, carbonation mouthfeel, fruity taste, sweet taste에서 홍삼, 복분자 맥주 모두 큰 차이를 보였다. 이외에 duration after taste, fruity taste, sweet taste는 복분자 맥주가 높았으며, 전체 기호도에서도 홍삼 맥주와 일반맥주에 비해 더 높은 값을 가지는 것을 확인 할 수 있다.

응집체를 처리하였을 때, 관능적 품질에 변화가 있는지 확인하기 위해, 응집체를 처리한 맥주와 응집체를 처리하지 않은 맥주를 비교해보면, 3가지 맥주 모두에서 body/thick mouthfeel과 astringent taste 이외에는 큰 차이가 나타나지 않았다. body/thick mouthfeel과 astringent taste의 경우도 응집체 처리가 3가지 맥주의 맛에 큰 영향을 미친다고 판단하기 어려운 정도로 증가한 것을 확인 할 수 있었다. 또한 전체 기호도의 값은 일반맥주에서는 소폭 감소하였고, 홍삼과 복분자 맥주에서는 소폭 증가하는 것을 확인 할 수 있었다. 하지만 3가지 맥주의 전체 순위에는 영향을 미치지 않는 것을 확인 할 수 있다.

응집체를 처리한 맥주와 응집체 처리 후 가속화 처리(6개월, 12개월)한 맥주의 관능평가 결과를 살펴보는 것으로 맥주의 응집체 처리가 일정 기간이 지난 후에 관능적 품질에 영향을 미치는지 확인 할 수 있었다. 앞에서 나타난 양상과 같이 alcoholic odor, sour taste, carbonation mouthfeel, fruity taste, sweet taste에서 홍삼, 복분자 맥주 모두 큰 차이를 보이는 양상이 2가지 처리방법 모두에서 나타나고 있다. 또한 body mouthfeel의 경우 홍삼 맥주에서는 소폭 감소, 복분자 맥주에서는 소폭 증가하는 경향을 나타내고 있으며, thick mouthfeel의 경우 거의 차이가 없는 것을 확인 할 수 있었다. 이를 바탕으로 맥주에 첨가한 응집체가 시간이 지난 후에도 맥주의 관능적 품질에 영향을 주지 않는다는 것을 확인 할 수 있다.

○ 사업화성과 및 매출실적

- 사업화 성과

항목	세부항목			성 과
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	0.4억원
			향후 3년간 매출	5억원
		관련제품	개발후 현재까지	억원
			향후 3년간 매출	억원
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : % 국외 : %
			향후 3년간 매출	국내 : % 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)	3			
	소요예산(백만원)	300			
	예상 매출규모 (억원)	현재까지	3년후	5년후	
		0.4	5	7	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내			
국외					
	향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획				
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)	현재	3년후	5년후	
	수입대체(내수)				
	수 출				

제 4 장 목표달성도 및 관련분야 기여도

				코드번호	D-06
제1절 목표달성도					
구분 (연도)	세부과제명	세부연구내용	달성도 (%)	연구개발 수행내용	
1차 년도 (2014~ 2015)	국산맥아 의 당화조건 최적화 (1세부)	(1) 맥즙의 제조 적성 분석	100%	a. 맥즙 품질평가를 위해 당화과정 중 온도별, 당화시간별 맥즙 성분변화 측정 b. 추출된 맥즙을 이용하여 맥즙 품질평가 실시. Reducing sugar, free amino acid(FAN), pH, viscosity, filtrationtime의 5가지 항목 측정	
		(2) 당화과정 촉진을 위한 α -glucan 분해효소 사용 - 국산맥아로부터 발효성 당을 고효율로 생성하기 위해 amylase 또는 amyloglucosidase 등 효소처리	100%	a. 효소를 이용한 당화기술 개발을 위한 기존 효소 반응에 대한 자료조사 b. 2차년도 대비하여 대용량 액화 효소 α -amylase, amyloglucosidase 사용. c. 당화 촉진을 확인할 수 있는 실험 설계 및 당화효소 첨가에 따른 맥즙 성분변화 분석	
		(3) 맥즙의 여과성능 분석 - 여과에 적합한 물성을 갖는 맥즙을 제조하기 위해 β -glucanase, pentosanase 처리 후 여과성능 분석	100%	a. 여과증진효소 첨가를 위한 맥주의 점도와 β -glucan에 대한 자료 조사 b. 2차년도 대비하여 대용량 액화 효소 β -glucanase(pentosanase 활성 포함, BrewMax L) 사용 c. 여과 증진력을 확인할 수 있는 실험 설계 및 여과증진효소 첨가에 따른 맥즙 성분변화 분석	

맥아접종용 젖산균 starter 분리 (2세부)	(1) 맥아로부터 BLIS 젖산균 분리	100%	<ul style="list-style-type: none"> a. 국산 맥아인 광맥과 수입 맥아인 Pilsner를 이용, bacteriocin like inhibitory substance(BLIS) 생산 젖산균 분리 b. 분리균주가 Broth에서 BLIS 생산 여부 확인 c. 분리균주를 API 50CHL kit과 16s rRNA sequencing을 통해 동정
	(2) 분리된 젖산균의 hop 내성 및 맥주 오염균 여부 확인	100%	<ul style="list-style-type: none"> a. 15 IBU로 조정된 mMRS broth 이용, 분리 균주의 hop 내성 실험 b. 맥주 오염균 분별 배지를 이용하여 분리균의 맥주 오염 가능성 확인
	(3) 분리된 젖산균의 BLIS 생산 조사	100%	<ul style="list-style-type: none"> a. 5, 30, 60℃의 온도에서 배양하면서 BLIS 생산 조사 b. 배양 시간대 별로 생균수, pH 변화, BLIS 생산량 조사 (arbitrary unit) c. 생성된 BLIS에 의한 향균 spectrum 조사
후발효중 단백질 및 폴리페놀 침전 응집 방법을 개발 (3세부)	(1) 응집 방법 개발	100%	<ul style="list-style-type: none"> a. 맥주에 쓰이는 응집제에 대한 자료 문헌 조사 b. 국산 맥주 공정에 필요한 조건 문헌 조사 및 조건 수립 c. 응집제 선정 및 실험 온도, 시간에 대한 방법 선정 및 응집량 확인 d. 응집량 확인 방법 문헌 조사

		(2) 응집 여과 후 폴리페놀 및 단백질 함량 확인	100%	<p>a. polyphenol 함량을 확인할 수 있는 기계 및 실험 방법 관련 문헌 조사</p> <p>b. 단백질 함량을 확인할 수 있는 기계 및 실험 방법 관련 문헌 조사</p> <p>c. 폴리페놀과 단백질 함량을 각각 흡광도, 켈달법으로 측정</p>
		(3) 공정된 맥주 켈리티 확인	100%	<p>a. 쓴맛, 거품의 안전성, 알코올 함량, 거품의 안정을 측정할 수 있는 자료 문헌 조사 및 비교 분석</p> <p>b. 관능검사를 통해 기호도 조사</p>
	국산보리 맥주의 침전, 여과특성 규명 (1협동)	(1) 맥주 교질용액 물성에 따른 침강 특성 규명	100%	<p>a. 맥주 교질용액의 점도, 색도, 밀도 측정</p> <p>b. 이들 물성을 Stock의 법칙에 따른 여과속도 계산으로 침강특성 규명</p>
		(2) 맥주 교질용액 물성에 따른 여과 특성 규명	100%	<p>a. 교질용액의 여과를 통한 압력 강하와 여과시간 측정</p> <p>b. 이를 통한 여과 특성 규명과 여과막 제조</p>
	살균 중 맥주 미생물 및 품질 변수 변화 모델링 (4세부)	(1) 살균 kinetics 모델링	100%	<p>a. 맥주 품질 저하 원인 균의 가열 살균 특성에 관하여 연구</p> <p>b. D, z 값 모델 및 비선형 등온 불활성화 모델 (Weibullian model)을 사용한 가열 온도, 시간에 따른 예측 미생물학 기반 kinetics 함수 및 온도의존함수 개발</p>
		(2) 품질 변화 kinetics 모델링	100%	<p>a. 맥주에서 가열과 동시에 발생하는 풍미의 변화에 대한 실험을 진행</p>

				<p>b. 풍미 변화를 이취 발생 확률로 나타내어, logistic 모델을 적용한 가열온도, 시간에 따른 kinetics 함수 및 온도의존 함수 개발</p> <p>c. 용존산소의 영향은 이취 발생에 미치는 것으로 조사</p>
		(3) 최적의 살균 온도/시간 결정	100%	<p>a. 맥주 살균과 품질변화 kinetic 모델을 사용하여 최적의 살균 조건을 확립</p> <p>b. 이취 발생 시간(off-flavor detection time, ODT)을 확립하고 50-65℃ 범위에서 이취 발생 시간을 계산한 다음, 미생물의 D 값을 이용하여 해당 ODT의 살균도를 계산</p> <p>c. 각 살균 조건을 도식화하여 이취발생이 적으면서 살균이 충분한 조건을 최적 조건으로 결정</p>
2차 년도 (2015~ 2016)	당화조건 의 현장적용 및 보완 (1세부)	(1) 현장 적용을 위한 맥즙 제조 적성 분석	100%	<p>a. 참여기업의 맥주 제조시설 중 5t 당화조의 당화온도 프로파일을 데이터 로거를 이용해 측정, 당화 중 온도 profile 확립</p> <p>b. 온도조건을 실험실에서 적용하여 당화공정 중 맥즙의 제조적성을 분석</p> <p>c. 당화공정 중 맥즙 품질 모니터링하여 여과성능 분석에 따른 분해조건 및 당화공정을 개선함</p>

		(2) 당화과정 촉진을 위한 당화효소 사용 및 조건 확립	100%	<p>a. 당화효소 α-amylase, amyloglucosidase 사용에 따른 맥즙의 물리화학적 분석을 수행함</p> <p>b. 당화과정 촉진을 위한 당화효소를 사용한 결과 맥즙의 reducing sugar를 15 % 증가시키면서 당화적성을 향상시킴 여과시간을 19 % 감소시켜 당화 적성을 향상시킴</p>
		(3) 여과 성능 향상을 위한 여과증진 효소 사용 및 조건 확립	100%	<p>a. 여과증진 효소 β-glucanase(pentosanase) 사용에 따른 맥즙의 물리화학적 분석을 수행함</p> <p>b. 여과 성능 향상을 위한 여과증진 효소를 사용한 결과 여과시간을 19 % 감소시켜 당화 적성을 향상시킴</p>
		(4) 확립된 효소조건의 현장적용	100%	<p>a. 데이터 로거를 통해 얻은 온도 profile을 적용하여 맥즙 제조 적성을 분석한 결과 효소사용으로 맥아사용량 25 %를 절약 할 수 있다는 것을 확인</p> <p>b. 효소 처리한 맥즙을 발효하여 맥주를 제조하여 분석한 결과 발효능이 28 %, 알코올 함량이 27 % 증가하여 발효 적성을 향상시킴</p>
	pilot scale 에서 분리균의 적용 및 보완 (2세부)	(1) 분리된 맥아를 이용한 제맥	100%	<p>a. 분리된 BLIS 생성균주 (starter)와 국산 광맥 보리를 이용한 제맥</p> <p>b. Bio-acidified 맥아의 제맥 적성 분석</p>

				<p>c. 원료보리, 침맥직후, 침맥완료, 맥아의 pH, 미생물 분석 실시</p> <p>d. 맥아의 효소 분석 - α, β-amylase, β-glucanase activity 측정</p>
		(2) Bio-acidified 맥아의 맥즙 및 당화 적성 분석	100%	<p>a. Infusion 방식을 이용한 당화</p> <p>b. un-hopped wort, hopped wort 제조 후, pH, extract content, color, free amino nitrogen, β-glucan, viscosity, filtration rate 등을 조사</p>
		(3) Bio-acidified 맥아를 이용한 맥즙의 발효 적성 분석	100%	<p>a. 주 발효 분석 - Specific gravity, pH, yeast 성장, alcohol 함량 분석</p> <p>b. turbidity, diacetyl 분석</p>
맥주 후발효 중 폴리페놀 및 단백질 응집 현장적용 및 보완 (3세부)		(1) 국산 보리 맥주 제조 모니터링	100%	<p>a. 참여 기업의 맥주제조 시설 중 50L 및 0.5t 규모의 맥주품질 및 응집도 모니터링 (색도, 맛, 거품안전성 등)</p> <p>b. 대용량 맥주에 적용한 응집 조건에 따라 최적 응집 조건 확인 및 선정</p>
		(2) 후발효 중 다양한 응집제의 현장 조건 및 환경 변수 개발	100%	<p>a. 1차년도 응집제 투여 최적조건인 PVPP, Silica xerogel A,B 사용에 따른 분석 수행</p> <p>b. 응집처리 및 제거에 따른 맥주의 유통기한을 감소시키는 Haze 유발성분인 폴리페놀 및 단백질의 함량 분석</p> <p>c. 쓴맛, 알코올 함량, 색도, 거품의 안전성, 관능평가 등 맥주의 품질 평가 실시</p>
	침전, 여과기술의 국산보리	(1) 맥주 교질용액의 물성변화 모니터링	100%	<p>a. 맥주 교질용액의 점도, 색도, 밀도 변화 모니터링</p>

	맥주 생산현장 적용 및 보완 (1협동)	(2) 맥주 교질용액 에 대한 원심침강 기의 가동 최적조 건 확립과 적용	100%	a. 실제 가동조건에서의 맥주 교질용 액의 점도, 색도, 밀도를 측정하고 침 강시간을 측정함 b. 이들 물성과 침강시간을 기반으로 Stock의 법칙에 따라 침강속도를 계 산하여 최적조건 확립함
		(3) 맥주 교질용액 에 대한 여과기의 구성 및 가동 최적 조건 확립과 적용	100%	a. 맥주 교질용액의 여과에 따른 당도, 단백질함량, 추출율, 효소력 가 등을 측정함 b. 여과시간 단축을 위해 3가지 서로 다른 효소를 교질용액에 처 리하고 위의 성질들을 측정함 c. 아울러 교질용액의 점도, 색도 측정으로 최적의 여과조건을 확립 함
	미생물 살 균 및 품 질 변화가 최적화된 현장 살균 공정 완성 (4세부)	(1) 현장 살균기 가 동조건에 따른 공 정변수 모니터링	100%	a. 실험적으로 살균조 가동 중 온 도/시간 모니터링을 통한 온도 profile 도출 b. 살균조 운전 조건과 온도/시간 관계 함수를 퍼지 추론 적용하 여 완성
		(2) 현장 살균기 가 동 조건에 따른 살 균/품질 예측에 의 한 최적 조건 완성	100%	a. 살균조 운전 조건에 따른 미생 물 농도 및 관능적 품질을 예측 b. 예측치의 비교로부터 살균기 운전 최적 조건을 결정
3차 년도 (2016~ 2017)	홍삼/복분 자 맥주 품질개선 을 위한 당화조건 보완 (1세부)	(1) 홍삼/복분자 맥주제조를 위한 당화 조건 보완	100%	a. 지역특산 부원료 및 기능성소 재 첨가에 따른 맥주품질을 모 니터링 b. 당화능 향상을 위한 전분 분해 효소 처리조건 확립

				c. 여과능 향상을 위한 polysaccharides 분해효소 조건 확립
		(2) 홍삼/복분자 맥주 제조를 위한 haze 생성 최소화	100%	a. haze 생성을 최소화시키기 위한 protease 사용에 따른 맥주 특성 분석 및 최적 효소조건 확립 b. protease 처리로 FAN이 증가하여 haze 감소에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 사료됨
저온살균과 acidified malt의 hurdle 을 이용한 홍삼/복분자 맥주 품질개선 (2세부)	(1) 1차년도에서 분리한 젖산균의 당화 및 발효 중 미생물 분석 및 보완에 적용	100%	a. 맥주 유해균의 빠른 확인을 위한 modified hop-gradient agar with ethanol의 개발 b. un-hopped wort에 HW01을 발효시켜 얻은 starter wort를 이용한 bacteriocin 맥주 제조 c. bacteriocin 맥주의 유해균 저해능 확인	
	(2) 홍삼/복분자 맥주의 발효 최적 첨가시기 규명	100%	a. 맥주의 특성 확인은 pH, yeast viability, specific gravity, free amino nitrogen, turbidity, alcohol, reducing sugar, color 항목을 측정. b. 주 발효 전에 홍삼/복분자를 첨가하여 제조된 맥주 특성 확인 c. 주 발효 후에 홍삼/복분자를 첨가하여 제조된 맥주 특성 확인 d. 후 발효 종료 후 홍삼/복분자를 첨가하여 제조된 맥주 특성 확인	
수출용 홍삼/복분자 맥주의 응집제 적용 및 보완	(1) 홍삼/복분자 맥주 용액의 최적 응집조건 개발	100%	a. 홍삼 중 사포닌 및 진세노사이드에 따른 응집도 평가 b. 복분자 중 폴리페놀 함량에 따른 응집도 평가	

				c. 홍삼/복분자 맥주의 최적 응집제 및 응집조건 선정
	(3세부)	(2) 응집제 처리 홍삼/복분자 맥주의 품질평가 및 보완	100%	a. 응집조건에 따른 홍삼/복분자 맥주의 품질평가 실시 b. 최적 응집 처리 홍삼/복분자 맥주의 관능평가 실시
	침전, 여과기술의 수출용 홍삼/복분자맥주 적용 및 보완 (1협동)	(1) 홍삼/복분자 맥주 교질용액의 특성 분석	100%	a. 홍삼 추출조건에 따른 홍삼맥주에서 ginsenoside 함량 분석 b. 쥐 실험을 통한 홍삼맥주 생리활성 시험을 통한 생리활성 효과 검증
		(2) 홍삼/복분자 맥주 교질용액의 원심분리 및 여과조건 완성	100%	a. 여과보조제로 glass bead를 사용하여 맥주 교질용액의 점도 측정으로 여과특성 규명 b. 다양한 효소 및 glass bead 사용조건들에 따른 여과조건 시 점도 측정을 통한 여과조건 완성
	수출용 프리미엄 국산보리 맥주의 살균공정 최적화 완성 (4세부)	(1) 복분자 맥주의 여러 가지 살균 방법에 따른 미생물 및 품질 변화 규명	100%	a. 복분자 맥주의 살균 대상 미생물인 젖산균과 효모의 열적 사멸을 복분자 맥주의 살균 방법에 따라 어떠한 차이가 있는지 규명 b. 복분자 맥주의 살균 방법(case 1, 2,3)에 따른 이화학적 품질 검사 및 관능적 품질 검사를 실시
		(2) 복분자 맥주의 살균 공정 최적화 완성	100%	a. 복분자 첨가 시점을 고려한 여러 가지 살균 시나리오를 연구하여 복분자 첨가 시점을 결정 b. 복분자 맥주의 살균 방법에 따른 미생물 및 품질 변화 결과를 바탕으로 하여 복분자 맥주 살균 공정을 최적화

제 2 절 관련분야 기여도

1. 기술적측면

- 가. 제맥공정에 젖산균 starter를 사용하여 bio-acidified malt를 제조하고 맥주오염균을 제어하는 기술을 개발
- 나. 광맥의 맥즙 품질 개선을 위해 당화공정에 효소를 이용하는 기술을 개발
- 다. 발효공정에 단백질 및 폴리페놀 침전가속화에 따른 응집기술을 개발
- 라. shelf life 증진을 위한 침전 및 여과기술 개발
- 마. 맥주 살균공정을 최적화

2. 경제적. 산업적 측면

가. 국산보리를 이용한 수출용 프리미엄 맥주의 상품화 및 사업성 확보

- 참여기업인 (주)한국홍삼맥주에 기술이전을 하고 상품화할 예정이며, 프리미엄 하우스맥주/지역맥주 프랜차이즈용 제품 및 수출용 제품을 생산하는데 활용이 가능할 것으로 보인다.
- 지역 특화된 하우스맥주 생산을 기반으로 주변관광지, 지역축제, 지역행사 등을 연계하여 점차 수도권 franchise 사업화로 거점이 확대될 것으로 기대한다.
- 고품격 국산보리맥주의 생산으로 다양하고 특색 있는 고급 맥주를 선호하는 소비자의 기대에 부응하고 수입맥주의 대체효과 및 외국산 맥주보리 원맥의 수입이 감소될 것으로 기대된다.
- 다양하고 차별화된 지역맥주를 생산하는 기반기술의 보급 및 확대를 통해 향후 고품질 국산맥주의 해외수출에 따른 외화획득이 가능할 것으로 기대된다.

나. 국내 보리농업·농가의 수익 증대

- 국내 식량소비구조의 변화로 인한 지속적인 보리소비 감소에 대비하여 국내 농업보호 측면에서 안정적인 국산보리원맥 수급과 국내산 보리의 생산기반 유지 대책 마련에 활용될 것으로 기대된다.
- 국내보리를 이용한 맥주개발에 생산 지역과 관련한 기능성 원료의 사용은 국내산 보리의 소비뿐만 아니라 국내작물의 소비증대와 농한기 농가수입 증대에 기여 할 것으로 보여진다.
- 국내 보리농업의 자생력 강화와 제조업 활성화를 통한 일자리 창출 및 지역 경제 활성화에 기여할것으로 기대된다.
- EU, 미국 등과 체결한 FTA의 발효 및 보리 수매제도의 폐지 등에 따라 예상되는 국내 보리재배 농가의 경제적 손실이 보전 될 것으로 기대된다.

다. 국내 맥주산업에 적용하였을 때의 원가절감 효과

- 국내 소규모 맥주 시장 규모는 2017년 기준 약 200억 원
- 국산 맥아 2,000t(20억 원)으로 맥주 10,000t(200억 원)을 제조
- 효소의 사용으로 맥아 사용량이 25% 가량 감소되는 것을 이에 적용하면 약 5억 원의 원가 절감 효과를 얻을 것으로 기대됨

표 1. 맥주 1batch 제조에 사용되는 원료와 맥주제조 가격

제조방법	제맥	<ul style="list-style-type: none"> • 제맥기 제원 : 폭 2.2 m, 높이 3 m / 스테인리스 스틸 / 침맥, 발아, 건조 • 제맥시간 : 10일
	당화	<ul style="list-style-type: none"> • 당화기 제원 : 폭 1.2 m, 높이 1.8 m / 스테인리스 스틸 / 당화, 자비, 침전 • 당화시간 : 2~3일
	발효	<ul style="list-style-type: none"> • 발효기 제원 : 폭 1.2 m, 높이 1.8 m / 스테인리스 스틸 / 발효 • 발효시간 : 1주일이상
예상생산량	1 톤 / 회	
원료	광맥(200 kg), 홉(1 kg), 효모(500 g), 응집제(1.6 kg), 복분자 순액 (3kg) or 홍삼 추출액 (0.2kg)	
	맥아 20 %, 효소사용 X	맥아 15 %, 효소사용 O
소비자 원료가격 (출처: 비어스쿨)	<ul style="list-style-type: none"> • 광맥보리가격: 400,000원 → 200원/500cc • Hop 가격: 178,571원 → 89원/500cc • 효모 가격: 217,391원 → 109원/500cc • 응집제 가격: 363,201 → 181원/500cc • 홍삼 추출액 가격: 180,000원 → 90원/500cc • 복분자 순액 가격: 68400원 → 34.2원/500cc <p style="text-align: right;"> 합계: 579원/500cc 맥주 합계: 669원/500cc 홍삼맥주 합계: 613원/500cc 복분자맥주 </p>	<ul style="list-style-type: none"> • 광맥보리가격: 300,000원 → 150원/500cc • Hop 가격: 178,571원 → 89원/500cc • 효모 가격: 217,391원 → 109원/500cc • 응집제 가격: 363,201 → 181원/500cc • 효소 가격: 6,300원 → 3.15원/500cc • 홍삼 추출액 가격: 180,000원 → 90원/500cc • 복분자 순액 가격: 68400원 → 34.2원/500cc <p style="text-align: right;"> 합계: 532원/500cc 맥주 합계: 613원/500cc 홍삼맥주 합계: 557원/500cc 복분자맥주 </p>

제 5 장 연구결과의 활용계획

코드번호	D-07
<p>제1절 연구개발 성과</p> <p>1. 기술이전<첨부> 국산보리를 이용한 맥즙의 침전 및 여과 기술</p> <p>2. 학회지등재 가. SCI 등재 논문</p> <p>(1) Increasing fermentable sugar yields by high-pressure treatment during beer mashing J. Inst. Brew. Vol. 122, pp. 143~146 (2015.12.30)</p> <p>(2) Effect of bacteriocin-producing <i>Pediococcus acidilactici</i> K10 on beer fermentation. J. Inst. Brew. Vol. 123, pp. 422~429 (2016.03.21)</p> <p>(3) Adding enzymes to improve the propertise of the Korean barley Gwangmaek wort during mashing. Food Sci. Biotechnol. Vol. 25, pp. 124~128 (2016.10.31)</p> <p>(4) Isolation and characterization of bacteriocin-producing <i>Pediococcus acidilactici</i> HW01 from malt and its potential to control beer spoilage lactic acid bacteria. Food Cotrol. Vol. 80, pp. 59~66 (2017.04.21.)</p> <p>(5) In vitro anti-obesity effects of sesamol mediated by adenosine monophosphate-activated protein kinase and mitogenactivated protein kinase signaling in 3T3-L1 cells Food sci. Biotechnol, Vol 26(1), pp. 195~200 (2017.02.28)</p> <p>(6) Investigation of sensory attributes contributing to beer preference among Koreans by using fuzzy reasoning J. Inst. Brew. Vol. 123, pp. 49~57 (2017.03.15.)</p> <p>3. 사업재산권(특허) 가. 기능성이 향상된 홍삼맥주 제조방법<첨부> 나. 과일맥주의 제조 방법 및 이로부터 제조된 과일 맥주 <첨부></p> <p>4. 학술발표 가. Influence of coagulant on haze formation from beer fermentation process (2015, 부산 BEXCO, 한국식품과학회)</p>	

- 나. 박테리오신을 생성하는 젓산균 첨가 맥주의 발효 Kinetics 특성 (2015, 부산 BEXCO, 한국식품과학회)
- 다. 국산보리맥주의 살균 공정의 최적화 (2015 제주 해비치호텔 한국산업식품공학회)
- 라. Adding enzymes to improve the propertise of the Korean barley Gwangmaek wort during mashing (2016 대구 EXCO 한국식품과학회)
- 마. Isolation and characterization of bacteriocin producing *Pediococcus acidilactici* HW01 from malt and its potential for controlling beer spoilage lactic acid bacteria (2016 대구 EXCO 한국식품과학회)
- 바. 젓산균을 첨가한 맥주의 bio-acidification 효과 및 발효 특성 (2016 대구 EXCO 한국식품과학회)
- 사. Influence of Coagulant on Haze Formation for Beer Fermentation Process (2016 대구 EXCO 한국식품과학회)
- 아. Optimization of Pasteurization process of beer for avoiding off-flavor (2016 강릉 라카이 샌드파인 리조트 한국산업식품공학회)
- 자. Evaluation of fermentation charateristics of redv ginseng beerand bokbunja beer (2017 제주 ICC 한국식품과학회)
- 차. Characterization of bacteriocinogenic *Pediococcus acidilactici* HW01 from malt and its application (2017 광주 김대중컨벤션센터 Asian conference on Lactic Acid Bacteria)
5. 인력양성(석사논문)
- 가. 김혜진 Effect of Enzymatic and Ultrasonic Treatment on Reducing Sugar Production from Korean 6-row Barley During Mashing
- 나. 백은진 Adding enzymes to improve the properties of the Korean barley Gwangmaek wort
- 다. 김보나 Influence of Coagulant on Haze Formation from Beer fermentation Process
- 라. 안현우 Isolation and characterization of bacteriocin-producing *Pediococcus acidilactici* HW01 from malt and its potential to control beer spoilage lactic acid bacteria
- 마, 김진선 Assessment of the application of bacteriocin producing *Pediococcus acidilactici* HW01 as a starter on malting process
- 바. 최정화 Impact of High-Pressure Treatment on Increasing Fermentable Sugar Yields during Mashing

제2절 연구개발 결과의 활용계획

1. 실용화 산업화 계획

본 연구 결과 개발된 국산보리맥주 제조 기술은 참여기업의 제품 상품화에 크고 활용될 수 있으리라 여겨진다. 또한 맥주 원료인 맥아의 제조에 국산 보리, 그리고 맥주의 기능성 지역특화 소재인 홍삼, 복분자를 사용하여 지역 농산물 소비에 크게 기여할 것으로 기대된다. 또한 지역 특화된 지역맥주 또는 하우스맥주 생산을 기반으로 주변관광지, 지역축제, 지역행사 등을 연계하여 점차 수도권 franchise 사업화로 거점을 확대할 수 있다.

2. 교육 지도 홍보 기술확산 계획

참여기업을 중심으로 실무 종사자를 임시 세미나를 통하여 교육 지도한다. 본 기술의 적용업체가 확대될 경우 정기적인 모임을 갖고 관련 기술을 교육 지도한다. 또한 국산보리 맥주 상품화의 활성화를 위하여 그 우수성을 학계, 산업계에 홍보한다. 즉, 국내 저명 학술대회, 지역 신문 기사를 통하여 홍보한다. 또한 참여기업인 (주)한국홍삼맥주에 기술이전을 하였으며, (주)한국홍삼맥주는 단계별 실용화 계획을 가지고 있으며 최종적으로 하우스맥주/지역맥주 프랜차이즈용 제품을 출시할 계획이다.

3. 추가연구, 타연구에 활용 계획

국산보리맥주 기술의 상업화를 추진한다. 본 연구를 통해 개발한 맥아제조, 당화, 응집, 침전 및 여과 기술은 타 주류의 개발에도 매우 효과적으로 적용될 수 있을 것을 기대된다.

제 6 장 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

	코드번호	D-08
○ 참고문헌으로 대체		

제 7 장 연구개발결과의 보안등급

	코드번호	D-09
보안등급 분류	보안	일반
		√
결정 사유	국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제24조의4에 해당하지 않음	

제 8 장 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

(해당사항 없음)

제 9 장 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

	코드번호	D-11
1. 일반안전		
1. 실험실 청결 및 정리정돈상태 -양호 -미흡 2. 음식물 반입 및 흡연 여부 - 양호 - 미흡 3. 개인보호구, 구급약품, 실험실장비 (흡 후드 등) 관리상태 -양호 -미흡 4. 비상 연락망 및 비상시 행동요령 비치상태 -양호 -미흡		

2. 전기안전

1. 전기코드 손상 및 배선 정리상태

- 양호
- 미흡

2. 접지형 콘센트를 사용하고 문어발식 콘센트 사용 금지 여부

- 양호
- 미흡

3. 소방안전

1. 비상구 및 피난통로에 장애물 적재 여부

- 양호
- 미흡

2. 소화기 비치 및 충전 상태

- 양호
- 미흡

3. 불꽃 내는 난방기구/ 실험기기 관리 상태

- 양호
- 미흡

4. 가스안전

1. 가스 용기의 옥외 보관, 전도방지 및 환기 상태

- 양호
- 미흡

2. 충전기한 초과 여부

- 양호
- 미흡

3. 배관, 조정기 및 밸브 등의 작동 상태 및 가스 누출 확인

- 양호
- 미흡

4. 배관 표시사항 부착 및 가스 사용 시설 경계/경고 표시 부착 여부

- 양호
- 미흡

5. 화공안전

1. 물질안전보건자료(MSDS) 교육 및 자료 비치 상태

-양호

-미흡

2. 화학물질 성상별 분류 및 시약장 등 안전한 장소에 보관 상태

-양호

-미흡

3. 화학물질의 보관 용기에 경고 표시 여부

-양호

-미흡

4. 실험실 폐액 및 폐기물 관리 상태 (폐기물 스티커, 적정용기 사용)

-양호

-미흡

6. 생물안전

1. 미생물을 취급 및 보관하는 장소에 생물 재해 표시 부착 여부

-양호

-미흡

2. 실험실 구역 구분 및 손 세척시설 설치 여부

-양호

-미흡

7. 기계기구

1. 기계 및 공구의 조임부 또는 연결부 이상 여부

-양호

-미흡

2. 위험설비(레이저, 고온/고압 실험장비) 안전장치 설치상태

-양호

-미흡

제 10장 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문 /특허 /기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역 할	코드번호			D-12	
					논문게재지/ 특허등록국가	Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/ 인용횟수 등)
1	논문	Increasing fermentable sugar yields by high-pressure treatment during beer mashing	동국대학교 산학협력단	최정화	Journal of the Institute of Brewing	1.82	2015.12.30	단독	SCI
2	논문	Effect of bacteriocin-producing <i>Pediococcus acidilactici</i> K10 on beer fermentation	동국대학교 산학협력단	김민지	Journal of the Institute of Brewing	1.82	2016.03.21	단독	SCI
3	논문	Adding enzymes to improve the propertise of the Korean barley Gwangmaek wort during mashing	동국대학교 산학협력단	백은진	Food Science and Biotechnology	0.699	2016.10.31	단독	SCI
4	논문	Isolation and characterization of bacteriocin-producing <i>Pediococcus acidilactici</i> HW01 from malt and its potential to control beer spoilage lactic acid bacteria	동국대학교 산학협력단	안현우	FOOD CONTROL	3.496	2017.04.21	단독	SCI
5	논문	In vitro anti-obesity effects of sesamol mediated by adenosine monophosphate-activated protein kinase and mitogenactivated protein kinase signaling in 3T3-L1 cells	동국대학교 산학협력단	고건	Food Science and Biotechnology	0.699	2017.02.28	중복	SCI
6	논문	Investigation of sensory attributes contributing	동국대학교 산학협력단	홍주희	Journal of the Institute of	1.82	2017.03.15	단독	SCI

		to beer preference among Koreans by using fuzzy reasoning			Brewing				
7	특허	기능성이 향상된 홍삼맥주 제조방법	우석대학교 산학협력단	-	대한민국	-	2016.07.22	-	-
8	특허	과일 맥주의 제조 방법 및 이로부터 제조된 과 일 맥주	동국대학교 산학협력단	-	대한민국	-	2017.12.08	-	-
9	학술 발표	influence of coagulant on haze formation from beer fermentation process	동국대학교 산학협력단	김 보 나	대한민국	-	2015.06.03	-	-
10	학술 발표	박테리오신을 생성하는 젖산균 첨가 맥주의 발 효 Kinetics 특성	동국대학교 산학협력단	김 민 지	대한민국	-	2015.06.03	-	-
11	학술 발표	국산보리맥주의 살균 공 정의 최적화	동국대학교 산학협력단	신 혜 원	대한민국	-	2015.11.11	-	-
12	학술 발표	Adding enzymes to improve the propertise of the Korean barley Gwangmaek wort during mashing	동국대학교 산학협력단	백 은 진	대한민국	-	2016.08.18	-	-
13	학술 발표	Isolation and characterization of bacteriocin producing Pediococcus acidilactici HW01 from malt and its potentialfor controlling beer spoilage lactic	동국대학교 산학협력단	김 진 선	대한민국	-	2016.08.18	-	-
14	학술 발표	젖산균을 첨가한 맥주의 bio-acidification 효과 및 발효 특성	동국대학교 산학협력단	최 은 지	대한민국	-	2016.08.18	-	-
15	학술 발표	Influence of Coagulant on Haze Formation for Beer Fermentation Process	동국대학교 산학협력단	임 애 희	대한민국	-	2016.08.18	-	-
16	학술 발표	Optimization of Pasteurization process	동국대학교 산학협력단	김 지 혜	대한민국	-	2016.10.06	-	-

		of beer for avoiding off-flavor							
17	학술 발표	Evaluation of fermentation characteristics of red ginseng beer and bokbunja beer	동국대학교 산학협력단	유희경	대한민국	-	2017.06.21	-	-
18	학술 발표	Characterization of bacteriocinogenic <i>Pediococcus acidilactici</i> HW01 from malt and its application	동국대학교 산학협력단	김왕준	대한민국	-	2017.07.05	-	-

제 11 장 기타사항

코드번호	D-13
○ 기타사항 없음	

제 12 장 참고문헌

코드번호	D-14
<ol style="list-style-type: none">1. Ahn, H., Kim, J., Kim, W. J. (2017) Isolation and characterization of bacteriocin-producing <i>Pediococcus acidilactici</i> HW01 from malt and its potential to control beer spoilage lactic acid bacteria. <i>Food Control</i>. 80. 59-66.2. Back, W. (1994) Secondary contaminations in the filling area. <i>Brauwelt International</i>. 4. 326-333.3. Back, W. (2005) <i>Colour atlas and handbook of beverage biology</i>. Nurnberg: Fachverlag Hans Carl.4. Bergsveinson, J., Pittet, V., Ziola, B. (2012) RT-qPCR analysis of putative beer-spoilage gene expression during growth of <i>Lactobacillus brevis</i> BSO 464 and <i>Pediococcus clausenii</i> ATCC BAA-344(T) in beer. <i>Applied Microbiology and Biotechnology</i>. 96(2). 461-470.5. Bunker, H. (1955) The survival of pathogenic bacteria in beer. <i>Proc. Euro. Brew. Conv.</i> 5. 330-341.6. Deng, Y., Liu, J. Y., Li, H. P., Li, L., Tu, J. X., Fang, H. J., Chen, J., Qian, F. (2014) An improved plate culture procedure for the rapid detection of beer-spoilage lactic acid bacteria. <i>Journal of the Institute of Brewing</i>. 120(2). 127-132.7. Fujii, T., Nakashima, K., Hayashi, N. (2005) Random amplified polymorphic DNA-PCR based cloning of markers to identify the beer-spoilage strains of <i>Lactobacillus brevis</i>, <i>Pediococcus damnosus</i>, <i>Lactobacillus collinoides</i> and <i>Lactobacillus coryniformis</i>. <i>Journal of Applied Microbiology</i>. 98(5). 1209-1220.8. Garofalo, C., Osimani, A., Milanovic, V., Taccari, M., Aquilanti, L., Clementi, F. (2015) The Occurrence of Beer Spoilage Lactic Acid Bacteria in Craft Beer Production. <i>Journal of Food Science</i>. 80(12). M2845-M2852.9. Haakensen, M., Schubert, A., Ziola, B. (2009) Broth and agar hop-gradient plates used to evaluate the beer-spoilage potential of <i>Lactobacillus</i> and <i>Pediococcus</i> isolates. <i>Int J Food Microbiol</i>. 130(1). 56-60.	

10. Haakensen, M. C., Butt, L., Chaban, B., Deneer, H., Ziola, B., Dowgiert, T. (2007) horA-Specific real-time PCR for detection of beer-spoilage lactic acid bacteria. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. 65(3). 157-165.
11. Hollerova, I., Kubizniakova, P. (2001) Monitoring Gram positive bacterial contamination in Czech breweries. *Journal of the Institute of Brewing*. 107(6). 355-358.
12. Kim, M., Choi, E., Kim, J., Ahn, H., Han, H., Kim, W. J. (2016) Effect of bacteriocin-producing *Pediococcus acidilactici* K10 on beer fermentation. *Journal of the Institute of Brewing*. 122(3). 422-429.
13. Menz, G., Andrighetto, C., Lombardi, A., Corich, V., Aldred, P., Vriesekoop, F. (2010) Isolation, Identification, and Characterisation of Beer-Spoilage Lactic Acid Bacteria from Microbrewed Beer from Victoria, Australia. *Journal of the Institute of Brewing*. 116(1). 14-22.
14. Pattison, T. L., Geornaras, I., von Holy, A. (1998) Microbial populations associated with commercially produced South African sorghum beer as determined by conventional and Petrifilm (TM) plating. *International Journal of Food Microbiology*. 43(1-2). 115-122.
- Rouse, S., van Sinderen, D. (2008) Bioprotective potential of lactic acid bacteria in malting and brewing. *Journal of Food Protection*. 71(8). 1724-1733.
15. Sakamoto, K., Konings, W. N. (2003) Beer spoilage bacteria and hop resistance. *International Journal of Food Microbiology*. 89(2-3). 105-124.
16. Schonberger, C., Kostecky, T. (2011) 125th Anniversary Review: The Role of Hops in Brewing. *Journal of the Institute of Brewing*. 117(3). 259-267.
17. Suzuki, K., Asano, S., Iijima, K., Kuriyama, H., Kitagawa, Y. (2008) Development of detection medium for hard-to-culture beer-spoilage lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*. 104(5). 1458-1470.
18. Suzuki, K., Iijima, K., Ozaki, K., Yamashita, H. (2005) Isolation of a hop-sensitive variant of *Lactobacillus lindneri* and identification of genetic markers for beer spoilage ability of lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 71(9). 5089-5097.
19. Suzuki, K., Iijima, K., Sakamoto, K., Sami, M., Yamashita, H. (2006) A review of hop resistance in beer spoilage lactic acid bacteria. *Journal of the Institute of Brewing*. 112(2). 173-191.
20. Suzuki, K., Koyanagi, M., Yamashita, H. (2004) Genetic characterization of non-spoilage variant isolated from beer-spoilage *Lactobacillus brevis* ABBC45(C). *Journal of Applied*

Microbiology. 96(5). 946-953.

21. Taskila, S., Neubauer, P., Tuomola, M., Breitenstein, A., Kronlof, J., Hillukkala, T. (2009) Improved Enrichment Cultivation of Beer Spoiling Lactic Acid Bacteria by Continuous Glucose Addition to the Culture. *Journal of the Institute of Brewing*. 115(3). 177-182.
22. Thelen, K., Beimfohr, C., Snaidr, J. (2006) Evaluation study of the frequency of different beer-spoiling bacteria using the VIT analysis. *Technical quarterly-Master Brewers Association of the Americas*. 43(1). 31-35.
23. Wieme, A. D., Spitaels, F., Aerts, M., De Bruyne, K., Van Landschoot, A., Vandamme, P. (2014) Identification of beer-spoilage bacteria using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *International Journal of Food Microbiology*. 185. 41-50.
24. Lei, H., Zhao, H., Yu, Z., & Zhao, M. (2012) Effects of wort gravity and nitrogen level on fermentation performance of brewer's yeast and the formation of flavor volatiles. *Applied biochemistry and biotechnology*. 166(6). 1562-1574.
25. He, Y., Dong, J., Yin, H., Zhao, Y., Chen, R., Wan, X., Chen, P., Hou, X., Liu, J. & Chen, L. (2014) Wort composition and its impact on the flavour-active higher alcohol and ester formation of beer—a review. *J. Inst. Brew.* 120(3). 157-163.
26. Chang, Y. H., Kwak, H. S., Yoo, B., & Lee, Y. (2015) Rheological properties, ginsenosides contents, sensory evaluations of Korean red ginseng extracts. *International journal of food science & technology*. 50(12). 2664-2671.
27. Lim, J. W., Jeong, J. T., & Shin, C. S. (2012) Component analysis and sensory evaluation of Korean black raspberry (*Rubus coreanus* Mique) wines. *International journal of food science & technology*. 47(5). 918-926.
28. Crumplen, R. M. (1997) *Laboratory methods for craft brewers*, pp. 9, 35-83, American Society of Brewing Chemists, USA.
29. Gupta, M., Abu-Ghannam, N., & Gallagher, E. (2010) Barley for brewing: Characteristic changes during malting, brewing and applications of its by-products. *Comprehensive reviews in food science and food safety*. 9(3). 318-328.
30. Yang, J. W., & Choi, I. S. (2017) Comparison of the phenolic composition and antioxidant activity of Korean black raspberry, Bokbunja, (*Rubus coreanus* Miquel) with those of six other berries. *CyTA-Journal of Food*. 15(1). 110-117.
31. Steiner, E., Auer, A., Becker, T., & Gastl, M. (2012) Comparison of beer quality

attributes between beers brewed with 100% barley malt and 100% barley raw material. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 92(4). 803-813.

32. Guyot-Declerck, C., François, N., Ritter, C., Govaerts, B., & Collin, S. (2005) Influence of pH and ageing on beer organoleptic properties. A sensory analysis based on AEDA data. *Food quality and preference*. 16(2). 157-162.
33. MacWilliam, I. C. (1975) pH in malting and brewing—A review. *J. Inst. Brew.* 81(1). 65-70.
34. Jacobi, W. M., Woodcock, K. E., & Grove, C. S. (1956) Theoretical investigation of foam drainage. *Industrial & Engineering Chemistry*. 48(11). 2046-2051.
35. Christopher, M. B., and David, Q. (2006) *Brewing Yeast and Fermentation*. pp. 406, Wiley Blackwell, New Jersey.
36. Kunze, W. (2007) *Technologie Brauer und Mälzer*. pp. 44-53, VLB, Berlin.
37. Nadzeyka, A., Altenhofen, U., and Zahn, H. (1979) The significance of beer proteins in relationship to cold break and age-related haze formation, *Brauwissenschaft*. 32(6), 167-172.
38. Siebert, K. J., Carrasco, A., and Lynn, P.Y. (1996) Formation of protein-polyphenol haze in beverages, *Food Chemistry*. 44(8), 1997-2005.
39. European Brewery Convention. (1998) *Analytica-EBC*, 5th ed., Section 9 Beer Method 9.28.2 Carbon Dioxide in Beer: Instrumental Method, Fachverlag Hans, Nürnberg, Germany.
40. Briggs, D. E., Boulton, C.A., Brookes, P. A., and Stevens, R. (2004) *Brewing science and practice*. pp.34, 38, 98-102, 270, 510-512, 539-540, CRC Press, New York.
41. Cho, H. C. (2004) *How to brew your own beer*. pp. 82-94, NEXUS Books, Seoul.
- Boulton, C. A. (1991) Yeast management and the control of brewery fermentations, *Brewers' Guardian*. 120, 25-29.
42. Association of Official Analytical Chemists. (2005) *Official Methods of Analysis*, 18th ed., Arlington, VA.
43. Reeb, J., and Milota, M. (1999) Moisture content by the oven-dry method for industrial testing, *Western Dry Kiln Association Proceedings*, 66-71.
44. Kim BG., Kong C., Kil DY., and Ahn JY. (2014) Comparison of Oven-drying Methods for Determination of Moisture content in feed Ingredients, *Asian-Australas J Anim Sci*,

27(11):1615-22.

45. Boulton, C. A. (1991) Yeast management and the control of brewery fermentations, *Brewers' Guardian*, 120, 25-29.
46. Lewis, M. J., Krumland, S.C., and Muhleman, D.J. (1980). Dye-binding method for measurement of protein in wort and beer, *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 37-41
47. Horwitz, W., Latimer, G. W. (2011) Official methods of analysis of AOAC International. Chapter 27, pp. 39-40.
48. Crumplen, R. M. (1997) Laboratory methods for craft brewers, pp. 9, 35-83, American Society of Brewing Chemists, USA.
49. Kim, G. O., Kim, S. S., Sung, N. G., and Lee, Y. C. (1993) Sensory Science Theory and applications, pp. 79-106, Shin Gwang, Seoul.
50. Ellena, S. K., and Hildegard, H. (2014) The effect of reduced alcohol on the sensory profiles and consumer preferences of white wine, *Journal of Sensory Studies*, 29, 33-42.
51. Siebert, K. J. (1999) Effects of protein-polyphenol interactions on beverage haze, stabilization, and analysis, *J. Agr. Food Chem*, 47(2), 353-362.
52. Mitchell, A. E., Hong, Y.-J., May, J. C., Wright C. A., and Bamforth, C. W. (2005) A Comparison of Polyvinylpyrrolidone (PVPP), Silica Xerogel and a Polyvinylpyrrolidone (PVP)-Silica Co-Product for Their Ability to Remove Polyphenols from Beer, *Institute Of Brewing*, 111(1)
53. Shewry, P. R., and Miflin, B. J. (1982) Genes for the storage proteins of barley, *Qual. Plant Plant Foods Hum. Nutr.* 31(3), 251-267.
54. N. SADOUGHI et al. (2012) EFFECT OF γ -IRRADIATION ON THE PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES, AND MICROBIAL AND SENSORY QUALITIES OF COLD-STORED ONION PUREE. *Journal of Food Processing and Preservation*. 1745-4549.
55. I.M.L.B. Avila et al. (2006) VARIABILITY IN QUALITY OF WHITE AND GREEN BEANS DURING IN-PACK STERILIZATION. *Journal of Food Engineering*.149-156.
56. P. Baucour et al. (2003) PROCESS OPTIMIZATION STRATEGIES TO DIMINISH VARIABILITY IN THE QUALITY OF DISCRETE PACKAGED FOODS DURING THERMAL PROCESSING. *Journal of Food Engineering*. 147-155.

57. S.D. Holdsworth. (1985) Optimisation of Thermal Processing—A Review. *Journal of Food Engineering*. 89–116.
58. A.E.H. SHEARER et al. (2002) Heat Resistance of Juice Spoilage Microorganisms. *Journal of Food Protection*. 1271–1275.
59. K.N.Jordan and T.M. Cogan. (1999) Heat resistance of *Lactobacillus* spp. Isolated from Cheddar cheese. *Letters in Applied Microbiology*. 136–140.
60. Han-Seok Choi et al. (2006) Alcoholic Fermentation of Bokbunja (*Rubus coreanus* Miq.) wine. *KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL.* 543–547.
61. Hiroshi Ogawa et al. (1990) Pressure Inactivation of Yeasts, Molds, and Pectinesterase in Satsuma Mandarin Juice: Effects of Juice Concentration, pH, and Organic Acids, and Comparison with Heat Sanitation. *Agric. Biol. Chem.* 1219–1225.
62. V.H. Tournas and Eugenia Katsoudas. (2005) Mould and yeast flora in fresh berries, grapes and citrus fruits. *Journal of Food Microbiology*. 11–17.
63. M. H. TANIWAKI et al. (2001) Comparison of Culture Media, Simplate, and Petrifilm for Enumeration of Yeasts and Molds in Food. *Journal of Food Protection*. 1592–1596.
64. Bok-Hee Kang et al. (2012) Isolation and Identification of Contaminated Organisms on Dried Persimmon. *Korean J. Food preserv.* 939–945.
65. S.Z Salleh-Mack and J.S. Roberts. (2007) Ultrasound pasteurization: The effects of temperature, soluble solids, organic acids and pH, on the inactivation of *Escherichia coli* ATCC 25922. *Ultrasonics Sonochemistry*. 323–329.
66. A. Adekunle et al. (2010) Modelling of yeast inactivation in sonicated tomato juice. *Journal of Food Microbiology*. 116–120.
67. Kamal Rai Aneja. et al. (2014) Microbes Associated with Freshly Prepared Juices of Citrus and Carrots. *Journal of Food Science*. 7.
68. Jin Seop Bak. (2015) Effective inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* in minimally processed Makgeolli using low-pressure homogenization-based pasteurization. *SpringerPlus*. 4:160.
69. Hye-Jung Park. et al. (2013) Characterization of Volatile Components in Makgeolli, a Traditional Korean Rice Wine, with or without Pasteurization, During Storage. *J. Molecules*. 5317–5325.

70. Na-Mi Kim. et al. (1996) Changes in Chemical Components of Red Ginseng Extract Solution and Physicochemical Properties of Precipitates Formed During Sterilization and Storage. *Korea J. Ginseng Sci.* 54-59.
71. Ann YG. 1998. Sugars in korean and japanese beer-sugar contents. *Korean J. Food & Nutr.* 11 (2): 143-149.
72. ASBC. 1992. *Methods of Analysis of the American Society of Brewing Chemists*, 8th ed. American Society of Brewing Chemists, St. Paul, MN, USA. pp. 101-223.
73. Bamforth CW. 1982. Barley b-glucans: their role in malting and brewing. *Brewers Digest.* 3: 22-35.
74. Bamforth CW. 2009. Current perspectives on the role of enzymes in brewing. *J. Cereal Sci.* 50 (3), 353-357.
75. Banasik OJ, Pyler RE. 1979. Barley crop survey: A report on the 1977 and 1978 six-row malting barley crops. Vol.36, pp. 3-6.
76. Bhatti RS. 1993. Extraction and enrichment of (1→3), (1→4)-β-D-glucans from barley and oat brans. *Cereal Chem.* 70: 73-77. 32
77. Bonnie MK. Duineveld CAA. 1999. Changes in bitterness as beer ages naturally. *Food Qual Prefer.* 10: 315-324.
78. Bourn DT, Pierce JS. 1970. β-glucan and β-glucanase in brewing. *J. Inst. Brew.* 76 (4): 328-335.
79. Briggs DE. *Barley*. 1978. Chapman and Hall, London, England. pp. 102-304.
80. Briggs et al., 2004. *Brewing: Science and practice* 510-511, Elsevier, New York.
81. Etokakpan OU. 1993. Enzymatic degradation and nature of the endosperm cell-walls of germinating sorghums and barley. *J. Sci. Food. Agri.*, 61: 389-393.
82. European Brewery Convention. 1998. *ANALYTICA-EBC*. Fachverlag Hans Carl, Nuremberg, Germany. pp. 1-217.
83. Evans DE, Sheehan MC, Stewart DC. 1999. The impact of malt derived proteins on beer foam quality. Part II: The influence of malt foam
84. positive proteins and non-starch polysaccharides on beer foam quality. *J. Inst. Brew.* 105: 171-178.

85. Goode DL, Halbert C, Arendt EK. 2003. Optimization of mashing conditions when mashing with unmalted sorghum and commercial enzymes. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 61 (2): 69-78.
86. Graham GS, Fergus GP. 2006. *Handbook of brewing*, 2nd ed. CRC Press, Boca Raton. pp. 69-504.
87. Johanan ER, Esther PC, Sergio O. SS. 2014. Maltose and glucose utilization during fermentation of barley and sorghum lager beers as affected by β - amylase or amyloglucosidase addition. *J. Cereal Sci.* 60: 602-609.
88. Johansson L. 2006. Structural analyses of (1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 4)- β -D-glucan of oats and barley. Department of Applied Chemistry and Microbiology, Faculty of Agriculture and Forestry of the University of Helsinki, Helsinki, Finland.
89. Kim HJ, Kim HJ. 2015. Physicochemical characteristics of Jeju barley and extracted β -glucan. *Food Eng. Prog.* 19 (2): 132-138.
90. Kim JH, Kim JH, Choi EJ, Lee SJ, Kwon YA, Hong KW, Kim WJ. 2014. Multivariate analysis for feasibility of Korean six-row barleys for beer brewing. *J. Inst. Brew.* 120 (4): 371-378.
91. King BM, Duineveld CAA. 1999. Changes in bitterness as beer ages naturally. *Food Qual Prefer.* 10. 315-324.
92. Korea National Institute of Crop Science, Rural Development Administration. Description variety of Major food crops. Available from:
93. <http://www.nics.go.kr>. Accessed 2011.
94. Korea Food & Drug Administration. *Korean Food Standards Codex*. 2012.
95. Korea Food & Drug Administration, Osong, Korea. pp. 5-27-1.
96. Lee WJ. 1989. Malting quality characteristics of Korean and North American barley varieties. *J. Korean Agric. Chem. Soc.* 32 (3): 203-208.
97. Lee YT, Lee CK. 1994. Effect of varietal variation in barley on β -glucan and malt quality characteristics. *Korean J. Food Sci. Technol.* 26 (2): 172-177.
98. Li Y, Schwarz PB, Barr JM, Horsley RD. 2008. Factors predicting malt extract within a single barley cultivar. *J. Cereal Sci.* 48: 531-538.

99. Miller GL. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31: 426-428.
100. Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs, Korea Agro-Fisheries & Food Trade Corporation. 2015. Current status of processed foods market segment - Alcoholic beverages. Available from: <http://www.aTFIS.or.kr>. Accessed 2015.
101. Nerida R, Mangan C, Geoffrey N. 2004. Examination of the use of exogenous α -amylase and amyloglucosidase to enhance starch digestion in the small intestine of the horse. *J. Anim. Feed. Sci.* 114: 295-305.
102. O'Connor-Cox, E. S. C., and Ingledew, W. M. 1989. Wort nitrogenous sources—Their use by brewing yeasts: A review. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 47:102-108.
103. Odibo F, Nwankwo L, Agu R. 2002. Production of malt extract and beer from Nigerian sorghum varieties. *Process Biochem.* 37: 851-855.
104. Ogu EO, Odibo FJC, Agu RC, Palmer GH. 2006. Quality assessment of different sorghum varieties for their brewing potential. *J. Inst. Brew.* 112 (2), 117-121.
105. Palmer GH. 1975. Influence of endosperm structure on extract development. *Proceedings of the American Society of Brewing Chemists*: 174-180.
106. Sergio O. SS. 2010. Cereal grains: properties, processing, and nutritional attributes. CRC Press, Boca Raton. pp. 405-406.
107. Shin HK, Kim YS, Bae SH, Kim ZU. 1980. Quality characteristic of Korean malt barley varieties. *J. Kor. Soc. Applied Biological Chem.* 23 (3): 150-156.
108. Steiner E, Auer A, Becker T, Gastl M. 2012. Comparison of beer quality attributes between beer brewed with 100% barley malt and 100% barley raw material. *J. Sci. Fod Agric.* 92: 803-813.
109. Steiner E, Auer A, Becker T, Gastl M. 2010. Turbidity and haze formation in beer—insights and overview. *J. Inst. Brew.* 116(4): 360-368.
110. Storsley JM, Izydorczyk MS, You S, Biliaderis CG, Rossangel B. 2003. Structure and physicochemical properties of β -glucans and arabinoxylans isolated from hull-less barley. *Food Hydrocolloid.* 17: 831-844.
111. Taylor, J. R. N., and Boyd, H. K. 1986. Free α -amino nitrogen production in sorghum beer mashing. *J. Sci. Food Agric.* 37:1109-1117.

112. Tim O'Rourke. 2002. The role of pH in brewing. *The brewer international*. 2. Technical Summary 8: 21-23.
113. Tony D'Amore, Inge Russell, Graham G. Stewart. 1989. Sugar utilization by yeast during fermentation. *J. Industrial microbiology*. 4 (4) : 315-323
114. Villettaz JC, Steiner D, Trogus H. 1984. The use of beta glucanase as an enzyme in wine clarification and filtration. *Am. J. Vitic*. 35 (4), 253-256.
115. Wang J, Zhang G, Chen J, Wu F. 2004. The changes of β -glucan content and β -glucanase activity in barley before and after malting and their relationships to malt qualities. *Food Chem*. 86: 223-228.
116. Zheng GH, Rossnagel BG, Tyler RT, Bhatti RS. 2000. Distribution of β -glucan in the again of hull-less barley. *Cereal Chem*. 77: 140-144
117. Haakensen, M. C., Butt, L., Chaban, B., Deneer, H., Ziola, B., Dowgiert, T. (2008) horA-Specific Real-Time PCR for Detection of Beer-Spoilage Lactic Acid Bacteria (vol 66, pg 158, 2007). *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. 66(4). 249-249.

[별첨]

● 기술이전

기술이전(노하우) 계약서



■ 기술이전명칭 : 국산보리를 이용한 맥즙의 침전 및 여과 기술



2017 년 2 월 15일



제1조(계약의 목적) 본 계약은 “우석대학교 산학협력단”(이하 ‘갑’이라 함)이 보유한 우석대학교 식품과학대학(원) 권영안 교수의 기술(노하우)를 “한국홍삼맥주주식회사”(이하 ‘을’이라 함)에게 “통상실시권”을 허여하고, 기술료를 지불하는 당사자간의 권리·의무 관계에 필요한 제반 사항을 규정하는 것을 목적으로 한다.

제2조(기술이전 명칭) 노하우 기술이전(이하 ‘기술이전’이라 함)의 기술명칭은 다음과 같다.

- 국산보리를 이용한 맥주의 침전 및 여과 기술

제3조(계약기간) 본 계약의 기간은 계약 체결일로부터 36개월 까지로 한다. 단, (을)은 위 기간의 연장이 필요한 경우 (갑)과의 사전 서면합의에 의하여 연장할 수 있으며, (갑)과 (을)은 제2조의 기술이전 내용을 서면 합의하여 수정할 수 있다.

제4조(이행사항) ① 노하우 기술이전은 (갑)과 (을)의 협의를 통해 (갑)이 지정한 장소에서 수행하는 것으로 한다.

② (을)은 계약기간 중 (갑)의 사전 동의를 구하고 (갑)에게 방문하여 필요한 기술이전을 요청할 수 있으며, (을)이 연구수행 중 (갑)에게 기술이전을 구하는 경우 (갑)은 이에 성실히 응해야 한다.

③ (갑)은 기술이전을 수행하기 위하여 (을)의 사업장을 출입하는 경우 (을)의 제반 내규 규정을 성실히 준수하여야 한다.

제5조(기술료) ① “을”은 “갑”에게 아래의 지급방법에 따라 기술료 금 오백오십만원정(W5,500,000 /부가세 포함)을 지급한다.

구분	금액	지급기한
기술료	5,500,000원 (VAT포함)	17. 2. 15

※ 지급계좌 : 전북은행 / 예금주 : 우석대학교 산학협력단

제6조(비밀보장) (을)은 본 계약과 관련하여 (갑)이 제공한 일체의 자료, 아이디어 (Idea) 등 기술이전 중에 취득한 (갑)의 노하우(Know-How) 또는 기술정보를 본 계약의 목적에 한하여 사용하여야 하고, (갑)의 사전 서면 승인 없이는 제3자에게 누설해서는 아니되며, 본 항의 의무는 본 계약의 기간만료 또는 해지 후에도 계속하여 유효하다.

제7조(명칭사용) ①(갑)과 (을)은 광고, 판매촉진, 기타 선전의 목적 또는 기술이전의 수행 사실을 인용 목적으로 상대방의 상호 또는 상표 등 명칭을 사용하고자 할 경우에는 상대방의 서면동의를 얻어야 한다.

제8조(계약의 해지) ①(갑)은 다음 사유가 발생하는 경우 (을)에 대한 서면 통지로 본 계약을 해지할 수 있다.

1. (을)이 본 계약을 위반하고 그 시정을 요청하는 (갑)의 통지를 받은 날로부터 3주 내에 이를 시정하지 않는 경우
2. 기술이전 책임자의 사망·사고·소속변경, 기타 사유로 인하여 기술이전의 완수가 어렵다고 판단되는 경우

②(을)의 불가피한 사정으로 인하여 본 계약을 해지하여야 하는 경우 (을)은 3주간의 기간을 정하여 (갑)에게 이를 통보하여 상호 협의한 후 본 계약을 해지할 수 있다.

③(갑)이 본 계약을 위반하여 원활한 기술이전 및 자문의 수행이 극히 곤란하다고 판단될 경우 (을)은 3주간의 기간을 정하여 (갑)에게 그 시점을 최고할 수 있으며, 이 기간내에 시정하지 않을 경우에는 본 계약을 해지할 수 있다.

④기타 계약의 해지에 관한 사항은 (갑)과 (을)의 합의에 의한다.

제9조(계약의 변경) 본 계약의 변경은 (갑)과 (을)의 서면 합의에 의한다.

제10조(신의성실) (갑)과 (을)은 본 계약을 수행함에 있어서 최대한의 신의와 성실로써 임하여야 한다.

제11조(양도의 제한) (갑)과 (을)은 상대방의 사전 서면 동의 없이 본 계약상의 권리 또는 의무를 제3자에게 양도할 수 없다.

제12조(해석) ①본 계약에 명시되지 아니한 사항 및 본 계약의 해석상 이의가 있을 경우 쌍방의 합의로 결정한다.

②기본계약서와 계획서의 내용이 상충하는 경우, 기본계약서의 규정이 우선하는 것으로 한다.

제13조(분쟁해결) ① 본 계약과 관련하여 양 당사자간의 분쟁이 발생한 경우, 원칙적으로 “갑”과 “을” 상호간의 합의에 의해 해결한다.

② 제1항에도 불구하고 분쟁이 해결되지 않을 경우 “갑”의 주소지 관할 지방법원을 그 관할로 하여 재판함으로써 해결한다.

제14조(완전합의) 본 계약 체결 전의 기술이전에 관한 (갑)과 (을)의 구두 또는 서면상의 합의로서 본 계약의 규정에 반하는 사항은 그 효력이 없는 것으로 한다.

위 사항을 증명하기 위하여 이 계약서 2부를 작성하고 각 당사자가 서명 날인한 후 각각 1부씩 보관한다.

- 첨부 : 1. 기술이전 내용 및 방법. 1부.
2. 갑과 을의 법인인감증명서 1부
3. 갑과 을의 사업자등록증 1부

2017년 2월 15일

(갑) 주 소 : 전라북도 완주군 삼례읍 삼례로 443
기 관 : 우석대학교 산학협력단
대 표 : 단 장 이 우 금 (인)
기술책임자 : 권 영 안 (인)

(을) 주 소 : 전라북도 완주군 삼례읍
상 호 : 한국홍삼맥주주식회사
대 표 : 대표이사 이 용 선 (인)
담 당 자 : 박 용 수

Increasing fermentable sugar yields by high-pressure treatment during beer mashing

Jung-Hwa Choi, Jin-Won Kang, A. T. M. Mijanur Rahman and Seung Ju Lee*

High-pressure treatment, which is an effective means of enhancing enzymatic reactions, was implemented during beer mashing to increase the production yield of fermentable sugar (FS). The malt solution was heated (62, 67, and 72°C) under pressure (0.1 (1 atm), 2, 50 and 100 MPa), and the FS was measured. The amount of FS reached an equilibrium level, which was the highest at 67°C and at 2 MPa. The pressures were 2, 50, 100, and 0.1 MPa in decreasing order of FS amount at 67°C. The temperatures were 67, 72 and 62°C in decreasing order of FS amount at 2 MPa. With a mechanistic approach, only the effect of pressure on gelatinization was analysed. The gelatinization degrees were also higher at pressures higher than 0.1 MPa. This observation highlights the positive effect (increasing the FS yield) of high-pressure treatment on beer mashing. Copyright © 2015 The Institute of Brewing & Distilling

Keywords: malt; mashing; saccharification; gelatinization; high-pressure treatment

Introduction

In beer manufacture, the saccharification of starch of malted barley to produce fermentable sugar during mashing is very important in terms of production yield (1). In order to recover a high yield of sugar, high starch content in the malted barley is required. Either the two-row barley with a higher starch content or the six-row barley with a relatively lower starch content along with a fairly high percentage of adjuncts (i.e. corn or rice) is commonly used to make beer. The saccharification of starch is normally carried out by an enzymatic reaction. Two-row barley malt, which has a lower enzymatic activity, does not require the coincident use of adjuncts, while six-row barley has greater enzyme activity and, therefore, is used with significant adjunct content. However, by only depending on raw materials with high fermentable sugar content, it may not be economically feasible to make beer.

Many studies have reported a positive effect of high pressure on enzymatic reactions. In a previous study, the activity of β -glucosidase was found to increase up to a given pressure of 100 MPa (2). The activities of pectinesterase and polygalacturonase, which have an impact on the texture of Dongchimi (a traditional Korean fermented food/vegetable), increased after high hydrostatic pressure treatment (3). However, it has also been reported in several studies that pressures above the optimum can inactivate the enzymes. Recent work on the effect of pressure on lipase from *Rhizomucor miehei* found that, by increasing the pressure up to 10 MPa, the catalytic efficiency of the studied enzyme improved, rising to a maximum and subsequently decreasing at higher pressures (4). The protease enzyme from *Methanococcus jannaschii* was treated with high pressure and it was found that the maximum rate of the enzyme-substrate reaction increased 2-fold while raising the pressure to 50 MPa (5). As described above, pressure could be applied as an effective method to improve enzymatic saccharification during the malting process under appropriate conditions.

Mashing is the process of soaking malt grains in hot water in order to provide the enzymes the right conditions in which the grain starches are converted into fermentable sugar. During mashing, starch is gelatinized and saccharified by malt enzymes. It has been

reported that pressure, if sufficiently high (420 MPa), can also induce the gelatinization of starch (6). In addition, high-pressure-induced starch gelatinization can decrease the temperature of gelatinization (7).

In this study, it was hypothesized that the production yield of fermentable sugar could be increased by applying a high-pressure treatment. The effect of hydrostatic pressure (0.1, 2, 50 and 100 MPa) on the mashing process was investigated. The fermentable sugar yield was analysed, as a general beer malt solution was mashed under pressure. With a mechanistic approach, only the effect of pressure on gelatinization during mashing was analysed.

Materials and methods

Materials

Pale ale malt (American two-row base malt) was purchased from Beer School Co. (Seoul, Korea) for this study. English pale ale beer falls into the broad category of 'ale', in which yeasts generally rise to the surface as the beer ferments.

The pale ale malt was filtered through a sieve with a pore size of 710 μ m. In addition, heat-inactivated malt was prepared by placing 3 g of the malt in a dry oven (SJ-201DL, Sejong Scientific Co. Ltd, Gyeonggi-do, Korea) to inactivate amylase by heating at 100°C for 60 min (8).

Mashing under high pressure

A hydraulic pressure device (TFS-0.5 L, Innoway, Co. Ltd, Gyeonggi-do, Korea) was used. A solution of 1 g malt with 8 mL distilled water was placed in a vinyl plastic bag and vacuum-packed, after which

* Correspondence to: S. J. Lee, Department of Food Science and Biotechnology, Dongguk University-Seoul, Seoul 100-715, Republic of Korea. E-mail: lseungju@dongguk.edu

Department of Food Science and Biotechnology, Dongguk University-Seoul, Seoul 100-715, Republic of Korea

Effect of bacteriocin-producing *Pediococcus acidilactici* K10 on beer fermentation

Minji Kim, Enuji Choi, Jinseon Kim, Hyunwoo Ahn, Hojong Han and Wang June Kim*

Beer is generally considered to be a beverage that has high microbiological stability. However, some undesirable lactic acid bacteria (LAB) can grow in beer and consequently spoil this beverage. In this study, bacteriocin-producing *Pediococcus acidilactici* K10 was used as a means of bio-acidifying the mash and reducing the spoilage LAB content of the beer. The K10 strain had antimicrobial activity against two beer spoilage LAB strains in wort and did not grow in a beer environment. The K10 strain was inoculated before the mashing step. The effect of K10 as a starter culture was investigated and compared with a control. As a result, filtration time was shortened by 17 min, alcohol content was increased by 137%, foam stability was increased by 156%, bitterness was increased by two bitterness units and there was a significant difference ($p < 0.05$) in aromatic and sour odour. The feasibility of using bacteriocin-producing LAB strain in beer brewing is envisaged. Copyright © 2016 The Institute of Brewing & Distilling

Keywords: bacteriocin; BLIS; lactic acid bacteria; beer spoilage; bio-acidification beer

Introduction

Beer is an alcoholic beverage with relatively high microbiological stability owing to the fact that it lacks sufficient amounts of oxygen and nutrients required for the growth of many microorganisms (1). Particularly, bitter hop compounds (~17–55 ppm of *iso- α -acids*) in beer have antibacterial activity against many Gram-positive bacteria. Therefore, only limited species of microorganisms have been reported to survive and spoil beer (1).

Nevertheless, lactic acid bacteria (LAB) can be found at most stages of the brewing process. It has been reported that 60–90% of microbiological spoilage is caused by LAB (2,3). Beer-spoilage LAB cause visible turbidity, acidity and, in some cases, off-flavour when grown in beer. Therefore, LAB are generally considered as undesirable microorganisms serving as spoilage bacteria in beer (4).

However, certain LAB can positively affect the beer brewing process by eliminating undesirable microorganisms, such as beer-spoilage LAB, by bio-acidification of the wort. Some LAB are used to acidify unhopped wort either at the beginning of mashing (mash acidification) or during wort boiling (wort acidification), or both (5). According to Nummer (6), the most commonly used strains for biological acidification include *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus amylovorus* and *Pediococcus acidilactici*.

Mash acidification can be accomplished either by direct addition of an acidulant, such as lactic acid, or by inoculation of LAB (bio-acidification). However, direct addition of lactic acid is considered undesirable in Germany owing to the Purity Law (7,10). On the other hand, bio-acidification of mash has several benefits such as reduction of pH by 0.15–0.25 units, resulting in improved α -amylase, protease, endo- β -glucanase and phosphatase activities, which in turn increases buffer capacity and produces higher levels of soluble nitrogen (5). Some LAB are known to produce bacteriocin or a bacteriocin-like-inhibitory-substance (BLIS), which inhibits the growth of phylogenetically closely related LAB and some food-borne pathogenic microorganisms.

The application of bacteriocin- or BLIS-producing LAB strains in beer, in conjunction with other hurdles, such as pasteurization and filtration, may represent an attractive bio-preservation strategy to obtain safer and more stable beers (8). Ogden et al. (9) suggested that nisin has the ability to control spoilage LAB in beer. However, in some countries, the addition of a bacteriocin, other than nisin or BLIS as a food preservative, is not allowed (10). To overcome this, the inoculation of bacteriocinogenic LAB (*in situ* production), in lieu of purified bacteriocin, would be an alternative solution. However, selection of bacteriocinogenic LAB and the inoculation time should be carefully examined. The criterion is that it must be able to grow in an unhopped mash and at lower pH (bio-acidification), which will improve enzyme activity (11) and produce bacteriocin or BLIS, but it should not survive in the wort boiling process, in which hops are added and wort is boiled. If the LAB survive in hopped wort, the beer becomes cloudy and it is regarded as beer spoilage.

In this study, a thermal resistant bacteriocin-producing *P. acidilactici* K10 strain was chosen. Antimicrobial activity of the K10 strain against beer spoilage LAB was tested. Inability of the strain in hopped-wort was tested and its effects on beer fermentation parameters were analysed.

Materials and methods

Microorganisms and culture conditions

The bacteriocin producer strains *Lactobacillus brevis* DF01, *Enterococcus faecium* SH01, *E. faecium* DB01 and *P. acidilactici* K10 were

* Correspondence to: Wang June Kim, Department of Food Science and Biotechnology, College of Biosystem, Dongguk University 32, Dongguk-ro, Ilsandong-gu, Goyang-si, Gyeonggi-do, 420-810, Republic of Korea. E-mail: wjkim@dongguk.edu

Department of Food Science and Biotechnology, Dongguk University-Biomedi Campus, Dongguk-ro, Ilsandong-gu, Goyang-si, Gyeonggi-do, Republic of Korea

Adding enzymes to improve the properties of the Korean barley Gwangmaek wort during mashing

Eun Jin Baek, Young An Kwon¹, and Kwang Won Hong*

¹Department of Food Science and Biotechnology, Dongsuk University-Seoul, Goyang, Gyeonggi 10326, Korea

²Department of Food Science and Culinary Art, Woosuk University, Wanju, Jeonbuk 55338, Korea

Received March 7, 2016
Revised June 9, 2016
Accepted June 15, 2016
Published online October 31, 2016

*Corresponding Author
Tel/Fax: +82-31-961-5140
E-mail: hkwon@dongsuk.edu

pISSN 1226-7708
oISSN 2092-6456

© KGSF and Springer 2016

Abstract This study investigated the properties of the Korean barley Gwangmaek wort and compared them to those of the imported Pilsner. The reducing sugar content of Gwangmaek (52.13 mg/mL) was 13% lower than that of Pilsner. The filtration time for Gwangmaek (53 min) was 2.5 times longer than that of Pilsner. The α -amylase and amyloglucosidase treatments increased the reducing sugar content of Gwangmaek up to that of Pilsner. However, the filtration time (88 min) significantly increased after the enzyme treatment. In terms of β -glucan contents measured during the mashing process of Pilsner, Gwangmaek, and α -amylase and amyloglucosidase-treated Gwangmaek, the enzyme-treated Gwangmaek had the highest at 232.23 mg/L, followed by Gwangmaek (190.31 mg/L) and Pilsner (82.82 mg/L). When β -glucanase was added during mashing, there was no change in reducing sugar content. However, the filtration time significantly decreased from 88 to 29 min, and viscosity also declined from 1.78 to 1.42 cp.

Keywords: Gwangmaek, wort property, starch-degrading enzyme, β -glucanase

Introduction

South Korea's beer production reached 2 million kL in 2013 and it has recently grown by 8 percent annually (1). In Korea, beer is mostly made using imported malt. Lately, however, there have been a lot of studies on the development of different and diverse beers using local agricultural products (2-3). In particular, numerous varieties using Korean barley have been developed and their quality has been evaluated to brew beer (4). The Korean barley Gwangmaek is a two-row barley developed recently in Korea. It is resistant to pests and cold. In addition, it has been reported that it has great raw barley and malt qualities (5). However, its wort properties after mashing are little known.

The wort properties can have a large influence on the brewing process and the final product. In general, when the wort properties are evaluated after mashing, the following are analyzed: fermentable sugar, protein amount, viscosity, filtration time, and pH (4,6). The fermentable sugar has a significant effect on the growth of yeast cells and also affects the ethanol content in the final fermented product (7). If the fermentable sugar concentration is too high in the wort, residual sugar is generated, which in turn increases the calorie content in the final product and fermentation time (8). An appropriate amount of protein is helpful for the growth of yeast during fermentation, but excessive protein content could lower the quality

of beer by generating haze (9-11). pH is a critical factor that determines the quality of beer, having an effect on enzyme activity, colloidal stability, bitterness, and color during brewing (12-13). In addition, filtration time and wort viscosity can have an effect on beer production from economic aspects.

When the sugar content of wort is low because of low starch contents in barley or poorly modified malt, adjuncts or enzymes can be added (14). There have been attempts to increase the ethanol yield in beer by raising the wort sugar content by adding starch-degrading enzymes (8,15-17). Both α -amylase and amyloglucosidase generate glucose, maltose, or maltotriose by hydrolyzing the α -1,4 bond in starch. In particular, amyloglucosidase can further increase the fermentable sugar content by degrading the α -1,6 bond (15,18-19). In addition, the β -glucan content in barley can also affect beer brewing. Barley β -glucan is a glucose polymer with irregular structure consisting of β -1,4 and β -1,3 bonds and is associated with firmly linked peptide sequences in the barley endosperm cell wall (20). β -Glucan is degraded by intrinsic β -glucanase in barley during malting (21). However, insufficiently degraded β -glucan inhibits the wort separation by increasing its viscosity and thus increases the filtration time. In addition, it can form a chill haze after being precipitated during secondary fermentation, causing a decrease in the quality of the beer (22-23). This study compared Gwangmaek with Pilsner in terms of wort properties and investigated the use of α -amylase,



Isolation and characterization of bacteriocin-producing *Pediococcus acidilactici* HW01 from malt and its potential to control beer spoilage lactic acid bacteria



Hyunwoo Ahn, Jinseon Kim, Wang June Kim*

Department of Food Science and Biotechnology, College of Life Science and Biotechnology, Dongguk University, Gyeonggi-do, 10326, South Korea

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 September 2016

Received in revised form

10 April 2017

Accepted 16 April 2017

Available online 21 April 2017

Keywords:

Bacteriocin

Inhibition of beer spoilage LAB

Pediococcus acidilactici HW01

ABSTRACT

A bacteriocin-producing lactic acid bacterium was isolated from malts. The isolate was identified as *Pediococcus acidilactici* by morphological, API 50 CHL kit and 16S rRNA analysis, and designated as strain HW01. The antimicrobial activity was maintained over a broad pH range (pH 2–11). Proteolytic enzymes and α -amylase treatments inactivated the bacteriocin activity; while catalase, heat, detergents, and solvents did not. The molecular weight of the crude bacteriocin was approximately 6 kDa by SDS-PAGE. The bacteriocin production phenotype (Bac⁺) was linked to a 9.8 kb plasmid and was not increased by co-culture with an indicator microorganism. Bacteriocin HW01 inhibited several Gram-positive bacteria, including health-threatening microorganisms (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus curvatus*, *Listeria monocytogenes*, and *L. innocua*). Particularly, *Pediococcus damnosus* and *P. claussenii*, which were isolated from spoiled beer, were strongly antagonised by the bacteriocin. *P. acidilactici* HW01 has tolerance to hop compounds but is unable to grow in a simulated beer environment. The potential of the HW01 strain, as a starter culture in brewing, to control beer spoilage lactic acid bacteria, is discussed.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Beer is one of the world's most ancient and widely consumed fermented alcoholic beverages. Beer is considered an unfavourable growth medium for microorganisms due to intrinsic and extrinsic hurdles. Intrinsic hurdles, include low pH (3.8–4.7), ethanol (3.5–10% v/v), negligible fermentable sugars, low oxygen (<0.1 ppm), antimicrobial hop compounds (17–55 ppm of iso- α -acid), and elevated carbon dioxide (0.5%, w/w). Extrinsic antimicrobial hurdle processes, include acidification of malt (bio-acidification), mashing, wort boiling, pasteurisation or sterile-filtration and cold temperature storage. However, a few niche microorganisms are able to grow in malt, wort, and beer, when one or more of these antimicrobial hurdles are absent or present at a decreased level. A few, beer-specific lactic acid bacteria (LAB) have evolved or adapted to hops and are able to spoil beer. Particularly, strains of *Pediococcus damnosus*, *P. claussenii*, *Lactobacillus brevis*, *Lb. lindneri*, and *Lb. curvatus*, are the most frequently isolated LAB that adversely affect beer quality (Garofalo et al., 2015; Jespersen & Jakobsen,

1996; Menz et al., 2010; Sakamoto & Konings, 2003; Suzuki, Asano, Iijima, & Kitamoto, 2008).

In contrast, certain LAB play a beneficial role in improving beer quality. Acidification of mash and/or wort by addition of LAB starter, referred to as 'bio-acidification', is a relatively recent process in the beer industry. It was not only effective in decreasing the pH of the mash, which enhances the activity of many malt enzymes but also lowers the mash viscosity, leading to shorter lautering and wort filtration time, and increased malt yield and quality (Haikara & Laitila, 1995). Bio-acidification is required to lower the mash or wort pH and, thereby, meet the German purity law regulation. Berliner Weisse and Lambic are well-known local beers fermented by the action of beneficial LAB (Vriesekoop, Krahl, Hucker, & Menz, 2012). Several studies have used LAB starter culture to safeguard the microbiological quality of beer, particularly, inhibit the proliferation of spoilage LAB in beer (Haikara & Laitila, 1995; Vriesekoop et al., 2012). The antimicrobial effect could be partly attributed to lactic acid, produced by the LAB but also the formation of small, heat-stable inhibitory peptides, referred to as bacteriocins. Addition of purified bacteriocins is regulated by governmental agencies and the Germany purity law. However, the use of bacteriocin-producing LAB (*in situ* production) to acidify mash or wort is allowed. Limited studies have isolated bacteriocin-producing LAB

* Corresponding author.

E-mail address: wjkim@dongguk.edu (W.J. Kim).

***In vitro* anti-obesity effects of sesamol mediated by adenosine monophosphate-activated protein kinase and mitogen-activated protein kinase signaling in 3T3-L1 cells**

Geon Go, Jung-Suk Sung, Seung-Cheol Jee, Min Kim, Won-Hee Jang, Kyu-Young Kang¹, Dae-Young Kim¹, Sihyoung Lee², and Han-Seung Shin^{2,*}

Department of Life Science, Dongguk University-Seoul, Goyang, Gyeonggi 10326, Korea

¹Department of Biological and Environmental Science, Dongguk University-Seoul, Goyang, Gyeonggi 10326, Korea

²Department of Food Science and Biotechnology, Dongguk University-Seoul, Goyang, Gyeonggi 10326, Korea

Received December 31, 2015
Revised September 25, 2016
Accepted December 15, 2016
Published online February 26, 2017

*Corresponding Author
Tel: +82-31-963-3143
Fax: +82-31-963-3108
E-mail: spartan@dongguk.edu

pISSN 1226-7708
eISSN 2092-6456

© KofOST and Springer 2017

Abstract Sesamol is a phenol derivative of sesame oil and a potent anti-oxidant, anti-inflammatory, anti-hepatotoxic, and anti-aging compound. We investigated the effects of sesamol on the molecular mechanisms of adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. The intracellular lipid accumulation accompanied by increased extracellular release of free glycerol was decreased during differentiation on treating 3T3-L1 with sesamol. Sesamol treatment on 3T3-L1 inhibited adipogenic differentiation by down-regulating adipogenesis-related factors (C/EBP α , PPAR γ , and SREBP-1). Lipid accumulation was repressed by decreasing fatty acid synthase and by up-regulating lipolysis-response genes (HSL and LPL). The molecular mechanisms of sesamol-induced inhibition in adipogenesis were mediated by increased levels of phosphorylated adenosine monophosphate-activated protein kinase and its substrate acetyl-CoA carboxylase. Sesamol treatment, in turn, modulated the different members of the mitogen-activated protein kinase family by suppressing phosphorylation of ERK 1/2 and JNK and by increasing the phosphorylation of p38. In summary, sesamol inhibits adipogenic differentiation by reducing phosphorylation levels of ERK 1/2 and JNK while inducing lipolysis by activating p38 and AMPK. Our results demonstrate that the molecular mechanisms of *in vitro* anti-obesity effects of sesamol are due to the combined effects of preventing both lipid accumulation and adipogenesis.

Keywords: sesamol, adipogenesis, anti-obesity, AMPK, lipolysis, MAPK

Introduction

Adipocytes play an important role in the maintenance of metabolic balance by secreting lipid hormones, adipokines, and various transcription factors; [1] however, the over-expansion of adipocytes leads to obesity, thereby causing a variety of pathological disorders including hypertension, type II diabetes mellitus, heart disease, cancer, and osteoarthritis [2–6]. Due to the harmful effects of obesity, therapeutic approaches using natural products have been studied for preventing obesity and the diseases caused by obesity [7]. Natural compounds for the treatment of obesity have been discovered with a focus on the mechanisms involved in restoring the balance between energy intake and expenditure, stimulating adipocyte apoptosis, inhibiting preadipocyte differentiation and lipogenesis, and increasing lipolysis [8]. Therefore, considerable effort has been made to discover natural products and bioactive compounds that can prevent obesity, with a specific focus on the mechanisms of adipocyte proliferation and differentiation [9]. Recent studies showed that several natural

bioactive compounds found in ginseng, coptidis, and melon may play roles in the prevention of obesity [10].

Adipocyte differentiation is strongly related to obesity. The 3T3-L1 preadipocytes, which can differentiate into mature adipocytes, are a well-characterized *in vitro* model for studying adipocyte differentiation [11,12]. The peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) and CCAAT/enhancer-binding proteins (C/EBPs) are the major regulators during lipid-laden adipocyte differentiation from preadipocytes [13]. In order to induce adipogenesis, 3T3-L1 preadipocytes are treated with a hormonal cocktail MDI containing 3-isobutyl-1-methylxanthine, dexamethasone, and insulin to activate C/EBP β and C/EBP δ , which, in turn, up-regulate gene expressions of C/EBP α and PPAR γ [14]. Adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) is an $\alpha\beta\gamma$ -heterotrimeric enzyme complex, which acts as a sensor of cellular energy status by monitoring the AMP to ATP ratio [15]. The mitogen-activated protein kinase (MAPK) family, including extracellular signal-regulated kinases (ERKs), jun aminoterminal kinase (JNK), and p38 mitogen-activated protein kinases (p38), play different

Investigation of sensory attributes contributing to beer preference among Koreans by using fuzzy reasoning

Ju Hee Hong, Jung-Hwa Choi and Seung Ju Lee*

The sensory attributes which contribute to preferences for different beers amongst Koreans were investigated and ranked in terms of their priority. The priority sensory attributes were those with high contribution weights to overall preference. Three sets of contribution weights of the attributes were determined by fuzzy reasoning from the votes through a survey from the groups of all consumers (group I), lager-preferring consumers (group II) and ale-preferring consumers (group III). In order to investigate the most reliable contribution weights, the overall preferences of 20 beers were sensory-evaluated and compared with those estimated by fuzzy reasoning with the contribution weights. When the contribution weights of the attributes were most reliable, the estimates were equal to the total preferences of the samples. It was found that the estimates from groups II and III agreed with the experimental data better than those from group I. This indicates that the contribution weights from group I were less reliable, most likely because there are several groups of Korean consumers with a wide variety of preferences. Therefore, Korean priority sensory attributes for groups II and III were as follows. For group II, the attributes with the contribution weights in decreasing order were found to be 'total CO₂' > 'bitterness' > 'duration aftertaste' > 'aromatic' > 'foam volume' > 'density'; for group III, the contribution weights were in the order of 'aromatic' > 'total CO₂' > 'bitterness' > 'duration aftertaste' > 'density' > 'foam volume'. These findings will help develop beers appropriate for Korean tastes. Copyright © 2017 The Institute of Brewing & Distilling

Keywords: beer; Korean consumers; sensory priority attributes; fuzzy reasoning; sensory evaluation

Introduction

The market for beverages with a low alcohol content, i.e. beer and wine, accounts for 89% of the total market for alcoholic beverages in the world. In Korea, the market for beer has increased over the last decade. Beers sold in Korea include a variety of products, ranging from three major Korean domestic beers (Cass, Hite and Kloud) to world-famous foreign beers from Japan, the Netherlands, Germany and China (1,2). Imported beers have increased in number and popularity in recent years, now accounting for up to 30% of the total number of beers sold in the country (3). It has been suggested that Korean beers do not meet a variety of Korean tastes. Thus, it is useful to determine which attributes of beer the Korean palate prefers in order to establish future directions for the development of new beers appropriate for Korean tastes.

The preference for beers is determined by several factors, such as brand, price, distribution, design and sensory attributes (4). Sensory attributes include aroma, appearance, taste and mouthfeel, and can be described in as many as 122 words, e.g. floral, hoppy, nutty, worty, burnt, phenolic, oily, stale, sour, sweet, bitter, astringent, thick (5). The importance of certain sensory attributes differs greatly across individuals, cultures, nationalities etc. For instance, the Chinese do not prefer beers with strong bitter or acidic tastes (6). American, Brazilian, Iranian and Canadian consumers prefer different beers: Bud Light, Skol, non-alcoholic beers and Budweiser, respectively (7). This indicates that consumers in different countries take different sensory attributes into consideration. No previous report has considered Korean preferences for beer.

The priority of each of the sensory attributes can be determined by a survey. A survey can provide an enormous amount of data

easily and quickly. However, it has the disadvantage of low accuracy because surveys are usually conducted using questionnaires without providing any samples of a product. Therefore, it is necessary to assure the reliability of the results of a survey. Such reliability can be tested by fuzzy reasoning. The more accurately the surveys estimate the priorities of sensory attributes, the fewer errors there are between the fuzzy-reasoned and experimentally determined preferences (8).

Fuzzy reasoning is a mathematical method dealing with fuzzy sets rather than deterministic values or crisp sets. A fuzzy set is a dataset that includes uncertainty or ambiguity, which includes panel responses in sensory evaluation studies (9–11). If, for example, sweetness is given ten scores (3, 4, 3, 4, 3, 2, 4, 2, 5, 4) in a sensory evaluation, they can be averaged $(3 + 4 + 3 + 4 + 3 + 2 + 4 + 2 + 5 + 4)/10 = 3.4$. However, if they are presented as a fuzzy set, $\{(2, 0.2), (3, 0.3), (4, 0.4), (5, 0.1)\}$ in which 0.2, 0.3, 0.4 and 0.1 are the membership degrees of the elements, the original data remain intact. In other words, a fuzzy set can be a good method to avoid false interpretations of the available data as it reflects all of the original data rather than average data. The routine procedure used for fuzzy reasoning for sensory evaluation is: (a) define the fuzzy set; (b) develop fuzzy rules with the fuzzy sets (priorities and preference of sensory attributes); (c) compose the two

* Correspondence to: Seung Ju Lee, Department of Food Science and Biotechnology, Dongguk University-Seoul, Goyang-si, Gyeonggi-do, Republic of Korea. E-mail: lsjungju@dongguk.edu

Department of Food Science and Biotechnology, Dongguk University-Seoul, Goyang-si, Gyeonggi-do, Republic of Korea

- 중국 수출을 위한 MOU 체결
<한국어>

한국홍삼맥주주식회사·(유)봉호식품첨가제

업 무 협 약 서

한국홍삼맥주주식회사와 (유)봉호식품첨가제는 한국홍삼맥주주식회사가 생산하는 맥주의 중국 내 유통을 수행하기 위하여 다음과 같이 업무 협약을 체결하고 성실히 이행할 것을 약정한다.

제1조(목적) 본 협약은 한국홍삼맥주주식회사와 (유)봉호식품첨가제 간 중국 내 맥주 수출입과 인적 교류를 통한 이행 증진과 이윤 창출을 위한 상호 협력을 목적으로 한다.

제2조(협약의 내용) 양 기관은 신의성실에 따라 다음 각 호를 협력한다.

1. 애로기술해결, 기술개발, 경영지도, 공동연구, 장비지원 등 기술 교류에 관한 사항
2. 한국홍삼맥주주식회사가 생산 또는 유통하는 맥주의 중국 내 맥주 수출입과 유통에 관한 사항
3. 한국홍삼맥주주식회사 생산 맥주의 중국 내 유통 우선순위 부여
4. 한국홍삼맥주주식회사가 수행하는 각종 기술연구 과제 등에 우선 참여
5. 기타 유기적인 협력관계를 유지하기 위해 협력이 필요한 제반 사항

제3조(협약의 이행) 양 기관은 신의 성실의 원칙에 따라 협약을 이행하고 세부사항이나 명시되지 않은 사항은 상호 협의하여 결정한다.

제4조(효력) 본 협약은 양 기관의 대표자가 서명한 날로부터 효력이 발생하며, 양 기관 중 일방의 서면통보가 있는 날까지 유효하다.

2017 년 10 월 27 일

한국홍삼맥주주식회사	(유)봉호식품첨가제
대 표 이 용 선	대 표 이 중 민

韩国红参啤酒株式会社·丰浩食品添加剂有限公司

业务协议书

韩国红参啤酒(株式会社)和丰浩食品添加剂(有限公司)双方为使韩国红参啤酒(株式会社)生产的啤酒在中国营销,缔结以下业务协议并忠实履行条款。

第1项(目的)本协议的签订目的是韩国红参啤酒(株式会社)和丰浩食品添加剂(有限)双方通过在中国进出口啤酒和人力交流,来促进协议执行和利润创造的相互协助。

第2项(协议内容)双方单位要诚实地互相协助履行以下各条内容。

1. 解决障碍技术,技术开发,经营指导,共同研究,装备支援等技术交流的相关事项
2. 韩国红参啤酒(株式会社)所生产和营销的啤酒在中国国内进出口和营销的相关事项
3. 赋予韩国红参啤酒(株式会社)所生产的啤酒在中国国内可优先营销的特权
4. 积极参与韩国红参啤酒(株式会社)所实行的各类技术研究课题等
5. 其他可帮助维持双方的有机合作关系所需的诸项事项

第3项(协议履行)双方单位以诚实守信为原则履行本协议,如有细部事项或不明确的事项将由双方协议后决定。

第4项(效力)本协议自双方单位代表签字之日起产生效力,到有其中一方的书面通知日为止有效。

2017年 10月 27日

韩国红参啤酒(株式会社)

丰浩食品添加剂(有限)

代表 李容善



代表 李中民



서울시 강남구 역삼동 677-18 조이타워 3층
 H.P www.dsip.kr / E-mail dsip@dsip.kr

대신국제특허법률사무소
 Dae-Sin International Patent & Law Office

Tel. 02.555.1205
 Fax. 02.555.0240

2016. 07. 22.

수신: 우석대학교 권영안 교수님
 발신: 대신국제특허법률사무소(발송 담당자: 김도희)
 제목: 출원보고서 송부

귀사의 무궁한 발전을 기원합니다.

당소에 의뢰하신 특허출원에 대하여 다음과 같이 출원이 이루어졌음을 알려 드립니다.

1	Our Ref. / Your Ref.	PA-D16321
2	출원인	우석대학교 산학협력단
3	발명자	권영안/홍광원
4	출원번호/출원일자	10-2016-0093128 / 2016.07.22
5	발명의 명칭	기능성이 향상된 홍삼맥주 제조방법
6	심사청구	무
7	해외출원기일 (우선권주장출원기일)	2017.07.22
8	첨부	출원번호통지서☑, 출원서☑ 각 1 부

귀사의 주소 또는 전화번호가 변경되는 경우, 관련 서류의 송부 등에 차질이 생겨 당사자에게 불이익이 발생될 수 있으니, 당소에 변경된 내용을 알려주시기 바랍니다.

그 외 의문사항이 있으시면 연락주시기 바랍니다.

대신국제특허법률사무소 大進士
 변리사 이종우 李鍾宇

관인생략

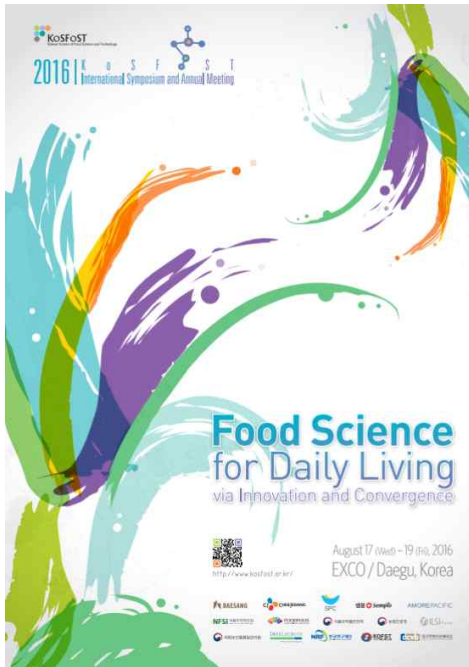
출원번호통지서

출원일자 2017.12.08
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무) 창조번호(11035)
출원번호 10-2017-0167902 (접수번호 1-1-2017-1223028-11)
출원인명칭 동국대학교 산학협력단(2-2006-008178-3)
대리인성명 두호특허법인(9-2014-100041-1)
발명자성명 이승주
발명의명칭 과일 맥주의 제조 방법 및 이로부터 제조된 과일 맥주

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
※ 납부자번호 : 0131(기관코드)+접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객번호 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
※ 특허로(patent.go.kr) 접속 > 민원서비스다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허-실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.
※ 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr>-특허마당-PCT/마드리드
※ 우선권 인정기간 : 특허-실용신안은 12개월, 상표-디자인은 6개월 이내
※ 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적교환가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.
※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 종업원이 직무수행과정에서 개발한 발명을 사용자(기업)가 명확하게 승계하지 않은 경우, 특허법 제62조에 따라 심사단계에서 특허거절결정되거나 특허법 제133조에 따라 등록이후에 특허무효사유가 될 수 있습니다.
8. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.



P12 -069

Adding Enzymes to Improve the Properties of the Korean Barley Gwangmaek Wort during Mashing

Eunjin Baek*, Hyejin Kim, Kwangwon Hong
 Department of Food Science and Biotechnology, Dongguk University, Korea

This study investigated the properties of the Korean barley Gwangmaek wort and compared them to those of the imported Pilsner. The reducing sugar content of Gwangmaek (52.13 mg/mL) was 13% lower than that of Pilsner. The filtration time for Gwangmaek (53 min) was 2.5 times longer than that of Pilsner. The α -amylase and amyloglucosidase treatments increased the reducing sugar content of Gwangmaek up to that of Pilsner. However, the filtration time (88 min) significantly increased after the enzyme treatment. In terms of β -glucan contents measured during the mashing process of Pilsner, Gwangmaek, and α -amylase and amyloglucosidase-treated Gwangmaek, the enzyme-treated Gwangmaek had the highest at 232.23 mg/L, followed by Gwangmaek (190.31 mg/L) and Pilsner (82.82 mg/L). When β -glucanase was added during mashing, there was no change in reducing sugar content. However, the filtration time significantly decreased from 88 min to 29 min, and viscosity also declined from 1.78 to 1.42 cp.

P12 -006

Isolation and Characterization of Bacteriocin Producing *Pediococcus acidilactici* HW01 from Malt and Its Potential for Controlling Beer Spoilage Lactic Acid Bacteria

Jinseon Kim*, Hyunwoo Ahn, Jiwon Park, Seoung Hyuk Kim, Ahrang Choi, Wang June Kim
 Department of Food Science and Biotechnology, Dongguk University, Korea

A bacteriocin-producing lactic acid bacterium was isolated from malt. From morphological, API 50 CHL kit and 16S rRNA analysis, the isolate was identified as *Pediococcus acidilactici* and designated as *Ped. acidilactici* HW01. The physico-chemical properties of crude bacteriocin was partially characterized by treatment of various enzymes, pH, heat, detergents and organic solvents. The molecular weight of the crude bacteriocin of *Ped. acidilactici* HW01 was estimated to be approximately 6 kDa by SDS-PAGE. The bacteriocin production phenotype (Bac+) was linked to a 9.8 kb plasmid. The antimicrobial spectrum of *P. acidilactici* HW01 includes some gram-positive bacteria along with beer spoilage bacteria. Through growth test under hop compounds and ABD medium which mimics a real beer environment, of *Ped. acidilactici* HW01 has tolerance to hop compounds but has no ability to grow in beer environment. The feasibility of HW01 strain in the prevention of beer spoilage LAB during brewing is envisaged.

Effect of Biological Acidification on Mash and Beer Fermentation by the Addition of Lactic Acid Bacteria

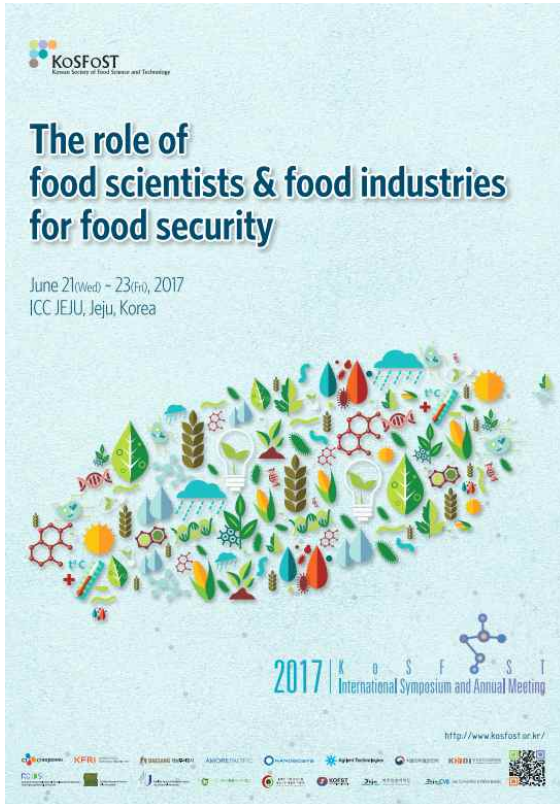
Eunji Choi*, Lim Seok Hong, Jeongmok Cho, Jeehee Kang, Wang June Kim
Department of Food Science and Biotechnology, Dongguk University, Korea

The acidification of mash or wort is an unusual technique including bio-acidification by lactic acid bacteria (LAB) in brewing. However, the LAB produce several metabolites that positively influence quality of wort and beer. The LAB improve flavor and accelerate fermentation process. In this study, isolated bacteriocin producing LAB, *Pediococcus acidilactici* (PA) and *Leuconostoc citreum* (LC) from pilsner type malt were added in mash for acidification. In addition, bio-acidified wort and beer were measured by extract analysis. Several properties (free amino nitrogen, reducing sugar, viable yeast cell, specific gravity, alcohol content, foam stability, and sensory evaluation) in beer were measured during fermentation (primary, secondary) and at the end of fermentation. Through this study, bio-acidification was verified as positive on beer quality. PA showed overall higher quality, and LA also showed higher quality except for filtration time than control beer. By modifying pH and temperature of mash and wort, enzyme activity was enhanced and the filtration time was shortened by synergy effect.

Influence of Coagulant on Haze Formation for Beer Fermentation Process

Ae-Hee Lim*, Han-Seung Shin, Bo-Na Kim
Department of Food Science and Biotechnology and Food and Bio Safety Research Center, Dongguk University, Korea

Beer haze is generally formed through complexation of protein and polyphenolic ingredients in beer fermentation process. Reduction of Beer haze could be solved by lowering protein and polyphenol levels, or by minimizing the molecular size of protein and polyphenols. Coagulant including PVPP (Polyvinylpolypyrrolidone) and silica xerogel were evaluated during beer fermentation process. The method of saccharification for obtaining the wort is followed the process of beer brewing. The fraction containing identification and relative quantification of procyanidins is eluted, then quantitatively analyzed by combined high performance liquid chromatography and fluorescence detector. Protein quantitative measurement was evaluated by Kjeldahl. Quality of beer including alcohol content, bitterness, foam, haze, and color were also evaluated.



P12 -081

Evaluation of fermentation characteristics of red ginseng beer and *bokbunja* beer

Heekyung Ryu*, Chan Song Jang, Kwang Won Hong
Department of Food Science and Biotechnology, Dongguk University, Korea

The effect of addition of red ginseng and *bokbunja* extracts on the characteristics of beer was investigated for the purpose of developing functional beer using the Korean barley 'Gwang-maek'. After adding red ginseng extract and *bokbunja* extract to the mashing step, the properties of wort and the final beer product were evaluated. No significant differences were observed in the wort properties of 0.1% red ginseng beer (RGB), except regarding the free amino nitrogen (FAN), which showed 7% increase compared with the control group without red ginseng extract. However, RGB had a low score in the flavor and aroma evaluation owing to the off-flavor. In the case of *bokbunja* beer (BB), the pH of the wort decreased from 5.8 to 5.0 as the amount of extract added was increased. The amounts of reducing sugar and FAN in the 5% BB were increased by 6% and 30%, respectively, and the amount of alcohol was increased by 31%. The red color, flavor, and aroma of BB decreased, whereas the bitter taste increased. When the red ginseng and *bokbunja* extracts were added to the beer after the fermentation period, however, the best scores of 0.01% RGB and 3% BB were obtained in the preference test.