



Research Article

# Potential production strategy for distilled *soju* by fermenting nonsteamed rice using commercial enzyme products

## 상업용 효소제를 이용한 무증자 쌀 발효 증류식 소주의 제조 가능성

Ye Seul Kwon<sup>1</sup>, Jisu Lee<sup>2</sup>, Mi Seong Kim<sup>1,3</sup>, Sochon Han<sup>4</sup>, Han-Seok Choi<sup>1\*</sup>  
 권예슬<sup>1</sup> · 이지수<sup>2</sup> · 김미성<sup>1,3</sup> · 한소천<sup>4</sup> · 최한석<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Major of Agriculture & Fisheries Processing, Korea National College of Agriculture and Fisheries, Jeonju 54874, Korea

<sup>2</sup>Imsil Cheese & Food Research Institute, Imsil 55918, Korea

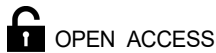
<sup>3</sup>Department of Food Science and Technology, Jeonbuk National University, Jeonju 54896, Korea

<sup>4</sup>Division of Bio Research, Jeonbuk Institute for Food-Bioindustry, Jeonju 54810, Korea

<sup>1</sup>한국농수산대학교 농수산물가공전공, <sup>2</sup>(재)임실치즈앤식품연구소,

<sup>3</sup>전북대학교 식품공학과, <sup>4</sup>(재)전북바이오융합산업진흥원 바이오연구본부

**Abstract** The production of distilled *soju* by fermenting nonsteamed rice was evaluated using commercial enzyme products. White *koji* and modified *nuruk* had alpha-amylase activities of 31.90 U/g and 3,532.71 U/g, respectively, and gluco-amylase activities of 698.32 U/g and 4,899.58 U/g, respectively. The enzyme products had activities of 5,604.15-225,182.00 U/g and 13,517.41-120,822.41 U/g, respectively. At enzyme concentrations of >800 mg/L, the Chung-moo-purified enzyme had an alcohol productivity of ≥19%. Nurukzyme R400, Sanferm Yied, and Diazyme X4 exhibited alcohol productivities of >19% at concentrations of >600 mg/L. The alcohol content of the vacuum distillates was 41.31%-44.86%. The volatile component with the alcohol content adjusted to 25% was analyzed and principal component analysis was performed. The volatile components in white *koji*, Diazyme X4, and Sanferm Yield were similar. The modified *nuruk* treatment group had a relatively high ethyl lactate content compared to the white *koji* treatment group. The Nurukzyme R400 treatment group had high contents of butyric acid and ethyl butyrate. The Chung-moo-purified enzyme was characterized by a low component content. Thus, when enzyme products were used in nonsteamed rice fermentation, no effect on the alcohol productivity and quality of vacuum distilled *soju* was observed, suggesting that it can replace white *koji* and modified *nuruk*.



**Citation:** Kwon YS, Lee J, Kim MS, Han S, Choi HS. Potential production strategy for distilled *soju* by fermenting nonsteamed rice using commercial enzyme products. Korean J Food Preserv, 30(4), 669-682 (2023)

**Received:** July 26, 2023  
**Revised:** August 02, 2023  
**Accepted:** August 08, 2023

**\*Corresponding author**  
 Han-Seok Choi  
 Tel: +82-63-238-9321  
 E-mail: coldstone@korea.kr

Copyright © 2023 The Korean Society of Food Preservation. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

**Keywords** enzyme products, nonsteamed rice, distilled *soju*, alcohol, fermentation

## 1. 서론

최근 증류식 소주 시장은 새로운 전환점을 맞고 있다. 우리나라 주류 전체 소비량은 감소하고 있는데 2021년을 기준으로 본다면 10년 전인 2012년에 비하여 10.8% 감소하였다. 주종별

로는 약주 31.6, 탁주 18.9, 맥주 14.7, 희석식 소주 13.2, 청주 10.6% 순으로 소비량이 줄었다(KOSIS, 2021). 그러나 동일 기간 증류식 소주의 소비량은 693 kL에서 2,567 kL로 270.4%나 성장하였다. 음주문화가 마시고 취하는 문화에서 가치 있는 것을 찾는 문화로 변화된 원인이 큰 것으로 생각된다. 이외에 대중적으로 영향력을 가진 사람들이 색다른 소재를 찾거나 본인의 제품을 판매하기 위해 다양한 채널에 소개하면서 노출량이 증대된 원인도 있다(Korea Agro-Fisheries & Food Trade Corporation, 2021).

증류식 소주는 주원료로 국내 농산물을 사용하기 때문에 쌀 소비 및 농가소득 증가와 관련이 깊다. 증류식 소주의 저변을 확대하기 위해서는 품질뿐 아니라 가격 경쟁력을 높이는 노력이 필요하며 몇몇 시도가 있었다. 증류식 소주의 제조공정은 크게 술덧 제조, 증류, 숙성 단계로 나눌 수 있다. 술덧 제조 단계에서는 발효제, 증자미, 물 효모가 사용된다. 발효제는 주로 산 함량이 높은 백국을 사용하여 술덧을 제조하고 있으며 이 때문에 술덧의 초발 pH가 낮게 된다(Choi 등, 2014). 첫 번째 시도로 pH가 낮은 환경에서 알코올 생산성이 높은 효모를 재래누룩에서 분리하여(Choi 등, 2017) 생산성을 확보하고자 하였다. 증자미는 증자하는 공정에서 쌀에 묻어 있는 이물질들을 제거하고 미생물을 살균하며 특유의 향을 부여하는 장점이 있다(Kim 등, 2012). 그러나 보일러, 증자기, 냉각기 등 각종 설비투자과 더불어 인건비, 처리시간, 에너지 비용 등으로 인력 2-3명이 운영하는 비교적 규모가 작은 양조업체에서는 어려움이 있다. 두 번째 시도는 쌀을 증자하지 않고 분쇄공정만을 거쳐 발효시키는 무증자법을 이용하여 원가를 절감하고 산업화하였다(Choi 등, 2021). 그러나 양조장에서는 여전히 생산비의 부담을 느끼고 있어 해결책이 필요하다.

증류식 소주에 사용하는 입국은 제국기 등 고비용의 설비와 전문인력이 있어야 생산할 수 있기 때문에 대부분의 양조장에서는 위탁생산하고 있다. 지역특산주는 지역의 농산물을 이용해야 하는 법적인 요건이 있어 지역의 쌀을 입국 생산 공장에 보내야 하기 때문에 운반비와 가공비용이 발생하게 된다. 이에 대한 대안으로 법적인 요건에 영향이 없는 재래누룩 또는 개량누룩을 생각해 볼 수 있으나 누룩취의 문제가 있다. 서양에서는 누룩취를 yeasty aroma/flavor로 인식하며 이는 국내 증류주 소주에 부정적인 요소로 작

용하게 된다(Kwak 등, 2015).

전분분해효소는 식품공업에서 폭넓게 이용되며 값이 비교적 저렴한 효소이다. 양조산업에서는 발효를 돕거나 알코올 생산성을 높이기 위해 사용되어 왔다(Oh, 2004). 그러나 입국과 누룩 등 발효제를 사용하지 않는 조건에서 무증자 쌀 발효에 대해서는 과학적으로 접근된 바가 없다. 따라서 상업용 효소제를 이용하여 무증자 쌀을 발효하고 증류식 소주의 특성을 평가하여 산업 적용 가능성을 검토하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 재료

쌀은 강원도지역에서 재배된 신동진 쌀을 구입하여 사용하였고, 백국은 조은곡식(주)(Choeun-Goksik Co., Ltd)에서, 개량누룩은 주식회사 한국효소(Hwaseong, Korea)에서 구매하여 사용하였다. 쌀과 누룩은 롤밀(SKS, Roll Type, Kyungchang, Seoul, Korea)로 1.5 mm 이하로 거칠게 분쇄하여 사용하였다. 술덧 제조에 사용한 효소제 충무정제효소(Chung-moo purified enzyme)는 (주)충무발효(Ulsan, Korea)에서 누룩자임 R400(Nurukzyme R400), Sanferm Yield와 Diazyme®X4는 (주)비전바이오캡(Songpa-gu, Seoul, Korea)에서 구입하였다. 효모는 실험실에서 분리하여 보관 중인 *Saccharomyces cerevisiae* N9(Ahn 등, 2014; Choi 등, 2017)을 YPD배지(BD Difco, Franklin Lakes, NJ, USA)에 접종하고 30°C에서 48시간 전배양한 후 사용하였다.

### 2.2. 술덧 제조

알코올 발효에 일반적으로 사용되는 입국(백국)과 개량누룩(조효소제)을 대조구로 하였다. 입국은 쌀 양의 50%, 개량누룩은 10%, 효소제는 전체 양의 200 mg/L가 되도록 첨가하였다. 전분량을 맞추기 위해서 입국과 개량누룩이 첨가된 양만큼 쌀 양을 적게 넣었다. 즉, 백국 처리구는 백국 200 g에 쌀 400 g을 첨가하였고 개량누룩 처리구는 개량누룩 55 g에 쌀 545 g을 넣었으며, 효소제 처리구는 효소제 0.34 g에 쌀 600 g 첨가하였다. 여기에 물을 전분질 원료의 180%인 1,080 mL를 넣은 후 전배양 효모를 전체 양의 1%인 16.80 mL를 첨가하였다. 단담금으로 25°C에서 13일간

발효하였으며, 1일 1회 교반하면서 무게를 측정하여 무게감 소량을 산출하였다.

### 2.3. 효소활성 측정

누룩의 효소활성 측정을 위한 조효소액은 시료 10 g에 0.5% NaCl(Junsei Chemical Co., Ltd., Tokyo, Japan) 함유 10 mM acetate buffer(pH 5.0) 100 mL를 가하고 실온에서 3시간 동안 3-4회 정도 교반하여 추출한 후 원심분리기(CR22N, Eppendorf Himac Technologies Co., Ltd., Tokyo, Japan)로 원심분리(1,390 ×g, 15 min, 4℃)한 후, 상등액을 회수한 다음 여과(PVDF, 0.45 μm)하여 사용하였다.

### 2.4. α-Amylase 활성 측정

Kikkoman α-amylase 정량키트(Model No. 60213, Kikkoman Co., Tokyo, Japan)를 사용하여 측정하였다. 합성기질로 2-chloro-4-nitrophenyl 6<sup>5</sup>-azido-6<sup>5</sup>-deoxy-β-maltopentaoside(N3-G5-β-CNP)를 사용하며 α-amylase의 작용으로 발색단인 2-chloro-4-nitrophenol(CNP)이 유리되면서 활성을 측정하는 방식이다(Shirokane 등, 1996). 조효소용액의 작용으로 기질용액과 효소용액을 각 0.5 mL씩 혼합한 반응액을 1 mL씩 시험관에 분주하여 37℃에서 5분간 예열하였다. 혼합액에 0.1 mL의 조효소액을 넣고 교반한 후 37℃에서 10분간 반응시킨 다음 반응정지액 2 mL를 첨가하여 반응을 중지시켰다. 분광광도계(UV Spectrophotometer U-2900, HITACHI Co., Tokyo, Japan)를 사용하여 400 nm에서 유리된 CNP의 흡광도값을 측정하였다. Blank는 기질용액과 효소용액을 각 0.5 mL씩 넣은 반응액 1 mL를 15분간 가온한 후 반응정지액 2 mL와 조효소액 0.1 mL를 넣어 동일하게 흡광도를 측정하였다. 효소활성은 제조사가 제공하는 아래의 방식에 따라 계산하여 나타내었으며 효소 1 g이 40℃에서 30분 동안 분해시킬 수 있는 1% 전분용액의 mL 수를 의미한다(NRIB, 2017; Shirokane 등, 1996).

α-Amylase activity (unit/g)

$$= (E_s - E_b) \times 0.179 \times 22.2 \times D_f$$

Es: 시료의 흡광도

Eb: Blank 흡광도

Df: 희석배수

### 2.5. Gluco-amylase 활성 측정

Kikkoman 당화력 분별 정량키트(Model No. 60212, Kikkoman Co., Tokyo, Japan)를 사용하여 측정하였다. 기질인 4-nitrophenyl O-α-D glucopyranosyl-(1→4)-β-D-glucopyranoside(G2-PNP)에 gluco-amylase의 작용으로 발색단인 4-nitrophenol(PNP)이 유리되어 효소활성을 측정하는 방식이다(Imai 등, 1996). 기질용액과 효소용액을 각 0.5 mL씩 혼합한 반응액을 1 mL씩 시험관에 분주하여 37℃에서 5분간 예열하였다. 여기에 0.1 mL의 조효소액을 첨가한 다음 교반하여 37℃에서 10분간 반응시켰다. 반응정지액 2 mL를 넣어 반응을 중지시킨 후 400 nm에서 유리된 PNP의 흡광도값을 측정하였다. Blank는 반응액 1 mL를 15분간 가온한 후 반응정지액 2 mL와 조효소액 0.1 mL를 넣은 후 400 nm에서 흡광도값을 측정하였다. 효소활성은 제조사에서 제공하는 아래 계산식을 사용하였으며, 효소활성은 효소 1 g이 40℃에서 60분 동안 가용성 전분에 작용하여 생성되는 포도당의 mg 수를 의미한다(Imai 등, 1996; NRIB, 2017).

Gluco-amylase activity (unit/g)

$$= (E_s - E_b) \times 0.171 \times 144.6 \times D_f$$

Es: 시료의 흡광도

Eb: Blank 흡광도

Df: 희석배수

### 2.6. 효소제의 농도별 술덧 제조

쌀 600 g에 물 1,080 mL를 첨가한 후 효소제를 쌀과 물을 더한 총량의 200부터 1,000 mg/L까지 200 mg/L씩 증가시키면서 각각의 농도별로 제조하였다. 여기에 전배양 효모를 16.80 mL를 첨가하여 발효를 개시하였으며 1일 1회 교반해 주면서 25℃에서 13일간 발효하였다.

### 2.7. 이화학 성분 분석

술덧의 이화학 성분 분석은 국제청 주류분석규정(National Tax Service Liquors License Support Center, 2014)에

따라 분석하였다. 알코올 함량을 측정하기 위해 각 시료 100 mL에 증류수 70 mL를 혼합하여 증류한 뒤 증류액을 약 80 mL 받고 증류수로 100 mL까지 정용한 후, 알코올 측정계(DMA 101, Anton Paar Co., Graz, Austria)로 측정하였다.

휘발산 함량은 알코올 농도 측정에 사용한 증류액 10 mL를 취해, phenolphthalein(Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 용액 약 2-3방울 떨어뜨린 다음 0.01 N NaOH(Samchun, Seoul, Korea)로 자홍빛으로 변할 때 pH 8.2-8.3까지 적정하고 acetic acid 함량으로 환산하여 나타내었다.

pH는 시료 10 mL를 취하여 pH meter(Orion Star A214, Thermo Scientific Co., Waltham, MA, USA)를 이용하여 3회 반복하였다.

총산은 시료 10 mL를 취하여 혼합 지시약(0.2 g Bromothymol Blue(Sigma Chemical Co.), 0.1 g Neutral Red(Sigma Chemical Co.)를 95% ethyl alcohol(Samchun, Seoul, Korea) 300 mL에 용해한 약 2-3방울 떨어뜨린 다음 0.1 N NaOH(Samchun, Seoul, Korea)로 중화 적정하고 acetic acid로 환산하여 표시하였다.

아미노산도는 시료 10 mL에 혼합 지시약(Bromothymol Blue와 Neutral Red)을 2-3방울 넣고 0.1 N NaOH 용액으로 시료가 담록색이 될 때까지 중화시킨 후 중성 formalin 용액(Biosesang, Gyeonggi-do, Korea) 5 mL를 첨가하였다. 여기에 0.1 N NaOH 용액으로 시료가 담홍색이 될 때까지 적정한 후 그 수치를 glycine 함량으로 환산하여 나타내었다.

환원당 함량과 총당 함량은 시료 10 mL를 Somogyi변법(Hatanaka와 Kobara, 1980)에 준하여 정량한 후 glucose 함량으로 표시하였다.

FAN(free amino nitrogen) 함량은 ninhydrin method에 준하여 glycine(Sigma Aldrich Co.)을 사용하여 측정하였다(Horwitz와 Latimer, 2011).

## 2.8. 증류

술덧을 110 mmHg의 압력하에서 감압증류 하였으며 회전증발농축기(R-114, BÜCHI Labortechnik AG,

Switzerland)를 개조하여 사용하였다. Receiving flask쪽에 관을 연결하여 용량이 측정 가능한 dropping funnel을 부착하였다. 수욕의 온도는 80°C로 하였고, 회전은 50 rpm으로 조정하여 증류하였다. 술덧 1 L를 증발용 수기에 넣고 진공이 걸리면 증발용 수기를 수욕에 넣어 증류를 시작하였다. Dropping funnel에 모인 증류액이 술덧의 40%인 400 mL가 받아지면 증류를 종료하고 원주로 사용하였다. 이후 특성을 평가하기 위하여 알코올, pH, 휘발산을 측정하였다. 증류수율은 술덧에 함유된 순 알코올함량 대비 회수된 원주의 순 알코올 함량을 백분율로 환산하여 나타내었다.

## 2.9. 향기성분 분석

향기성분 분석을 위해 증류된 원주에 물로 알코올 함량을 25%로 조절한 증류식 소주를 사용하였다. 소주용 시료 30 mL에 dichloromethane(Sigma Aldrich Co.) 6 mL를 첨가하여 분배시킨 후 하층액을 회수하여, 0.45 µm syringe filter(Nylon, Sartorius AG)로 여과하였다(Kishimoto 등, 2006).

휘발성 향기성분은 gas chromatography(Nexis GC-2030, Shimadzu Co., Kyoto, Japan)를 사용하여 분석하였다. 분석용 column은 fused silica capillary 30 m×0.32 mm×0.25 µm film thickness(Nukol™, Supelco Co., Bellefonte, PA, USA)를 사용하였다. Column oven의 온도는 50°C(5분), 분당 3°C씩 승온하여 200°C(5분)로 프로그램을 설정하였다. Carrier gas(N<sub>2</sub>)의 유속은 24.2 cm/sec(linear velocity), split ratio 20:1로 설정하였다. Injector의 온도는 250°C, detector는 FID를 사용하였으며 온도는 280°C로 하였다. 분석에 사용한 표준시약은 Sigma aldrich 사의 제품을 사용하였으며, 정량은 외표준 방법으로 하였다.

## 2.10. 통계처리

통계는 SPSS 프로그램(Version 12.0, SPSS, Chicago, IL, USA)을 이용하여 분산분석(ANOVA) 후 유의차가 있는 항목에 대하여는 Duncan's multiple range test로 p<0.05 수준에서 시료 간의 유의차를 검정하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1. 효소제의 무증자 쌀에 대한 알코올 생산성

무증자 쌀에 효소제를 첨가한 다음 발효 기간별 누적 무게 감소량과 pH 변화를 Fig. 1에 나타내었다. 개량누룩 처리구가 발효 4일까지 216.90 g이 감소하면서 가장 높은 감소량을 나타내었고 백국 처리구 107.10 g, 누룩자임 R400 처리구 54.20 g으로 그 뒤를 이었다. 그 이외의 효소제 처리구의 무게감소량은 23.90-40.70 g으로 개량누룩을 사용한 것보다 최대 9.1배의 차이를 보였다. 발효를 종료한 발효 13일까지의 누적 무게감소량은 개량누룩 처리구 261.90 g, 백국 처리구 240.06 g, 누룩자임 R400 처리구 186.82 g 순이었고 나머지 효소 처리구는 95.71-103.70 g으로 개량누룩이나 백국 처리구에 비하여 최대 2.7배의 상당한 차이를 나타내었다.

효소제 처리구의 초기 술덧의 pH는 6.59-6.85 범위로 나타났고, 발효가 진행됨에 따라 낮아지다가 발효 4일 차에 3.28-3.84까지 낮아졌으며 이후 발효종료 시까지 큰 변화를 나타내지 않았다.

효소제의 무증자쌀에 대한 알코올 생산성을 평가하기 위하여 발효가 종료된 술덧의 일반특성을 분석하여 Table 1에 나타내었다. 알코올 함량은 개량누룩 20.28, 백국 19.69, 누룩자임 R400 16.40, Diazyme X4 11.80, Sanferm

Yield 9.50, 충무정제효소 7.82% 순으로 Fig. 1의 무게감소량과 유사하였다. 효소제 처리구 술덧의 총산은 0.09-0.12 acetic acid%, 아미노산은 0.02-0.03 glycine%, 환원당은 0.06-0.09% 대조구인 개량누룩과 백국 사용 술덧과 유사하였다. 반면, free amino nitrogen(FAN)값은 636.48-1,329.85 mg/L로 개량누룩 2,707.98, 백국 1,634.64 mg/L보다 낮았으나 발효에 필요한 200 mg/L 이상은(Hill과 Stewart, 2019) 확보하고 있었다. 효소제 처리구가 개량누룩이나 백국 처리구에 비하여 무증자 쌀에 대한 알코올 생산성이 낮은 것은 효소제의 전분 분해 속도가 느린데 있는 것으로 추정된다.

#### 3.2. 효소제의 전분분해 활성

효소활성이 알코올 생산성에 미치는 영향을 평가하기 위해 효소활성을 측정하고 그 결과를 Table 2에 나타내었다. 산업에서 일반적으로 사용되는 백국과 개량누룩의 액화력은 각각 31.90과 3,532.71 U/g이었고 당화력은 각각 698.32와 4,899.58 U/g이었다. 한편, 효소제의 액화력은 5,604.15-225,182.00 U/g 범위이었고, 당화력은 13,517.41-120,822.41 U/g 범위로 매우 큰 차이를 보였다. 여기에서 충무정제효소와 Sanferm Yield는 액화력이 당화력보다 각각 10.3, 15.7배 강한 액화형 효소이었고 누룩자임 R400과 Diazyme X4는 당화력이 액화력보다 각각

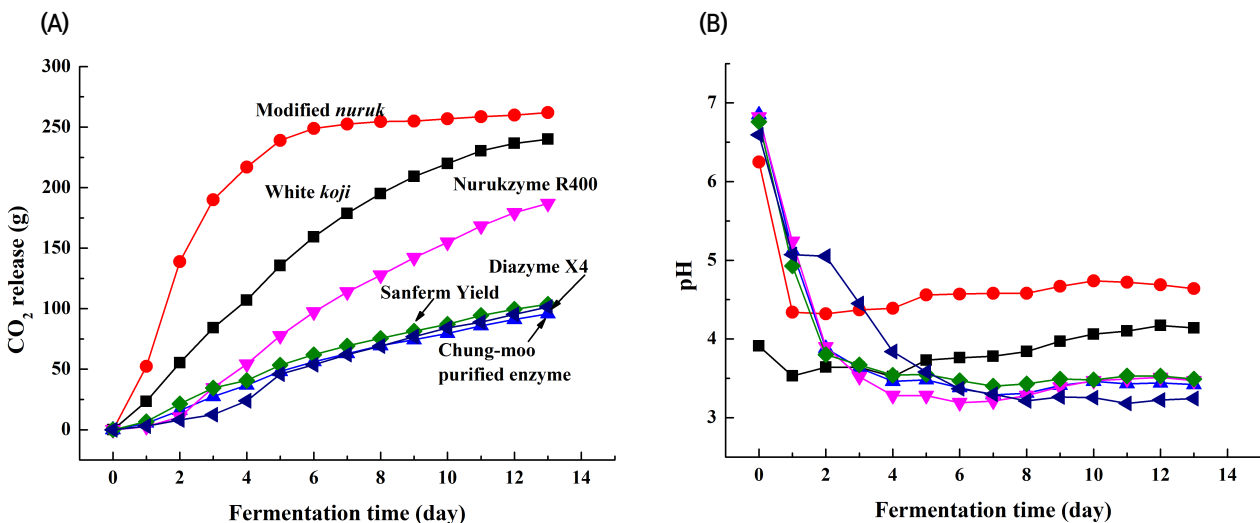


Fig. 1. Comparison of the mass of: (A) CO<sub>2</sub> released and (B) pH during the fermentation time of nonsteamed rice mash prepared with various amylases.

**Table 1.** Chemical properties of nonsteamed rice mash prepared with various amylase products

Enzyme products	Alcohol (%)	Acidity (acetic acid, %)	Amino acidity (glycine, %)	Reducing sugar (%)	Free amino nitrogen (mg/L)
White <i>koji</i>	19.69±0.02 <sup>b1)2)</sup>	0.06±0.00 <sup>d</sup>	0.04±0.00 <sup>a</sup>	0.42±0.01 <sup>a</sup>	1,634.64±5.83 <sup>b</sup>
Modified <i>nuruk</i>	20.28±0.01 <sup>a</sup>	0.05±0.00 <sup>d</sup>	0.04±0.00 <sup>a</sup>	0.11±0.01 <sup>b</sup>	2,707.98±17.35 <sup>a</sup>
Chung-moo PE <sup>3)</sup>	7.82±0.02 <sup>f</sup>	0.12±0.00 <sup>a</sup>	0.03±0.00 <sup>b</sup>	0.09±0.01 <sup>d</sup>	1,329.85±26.79 <sup>c</sup>
Nurukzyme R400	16.40±0.04 <sup>c</sup>	0.09±0.00 <sup>c</sup>	0.02±0.00 <sup>c</sup>	0.10±0.00 <sup>cd</sup>	936.26±11.36 <sup>e</sup>
Sanferm yield	9.50±0.03 <sup>e</sup>	0.12±0.00 <sup>a</sup>	0.03±0.00 <sup>b</sup>	0.11±0.01 <sup>bc</sup>	1,234.59±28.78 <sup>d</sup>
Diazyme X4	11.80±0.02 <sup>d</sup>	0.10±0.00 <sup>b</sup>	0.02±0.00 <sup>c</sup>	0.06±0.01 <sup>e</sup>	636.48±4.05 <sup>f</sup>

<sup>1)</sup>All values are mean±SD (n=3).

<sup>2)a-f</sup>Means with different superscripts in the same column are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

<sup>3)</sup>Chung-moo PE means Chung-moo purified enzyme.

**Table 2.** Enzyme activities of commercial enzyme products and initial enzyme activities in nonsteamed rice mash

Enzyme products	Commercial enzyme products (U/g)		Initial nonsteamed rice mash (U/mL)	
	$\alpha$ -Amylase	Glucosyl- $\alpha$ -amylase	$\alpha$ -Amylase	Glucosyl- $\alpha$ -amylase
White <i>koji</i>	31.90±1.09 <sup>f1)2)</sup>	698.32±14.70 <sup>f</sup>	3.81±0.13 <sup>d</sup>	83.10±1.75 <sup>b</sup>
Modified <i>nuruk</i>	3,532.71±189.29 <sup>e</sup>	4,899.58±103.15 <sup>e</sup>	126.18±6.76 <sup>a</sup>	175.00±3.68 <sup>a</sup>
Chung-moo PE <sup>3)</sup>	139,453.89±1,361.76 <sup>b</sup>	13,517.41±514.08 <sup>d</sup>	27.89±0.27 <sup>c</sup>	2.70±0.10 <sup>e</sup>
Nurukzyme R400	18,729.84±1,772.37 <sup>b</sup>	94,999.60±4,026.95 <sup>b</sup>	3.75±0.35 <sup>d</sup>	19.00±0.81 <sup>d</sup>
Sanferm yield	225,182.00±99,132.84 <sup>a</sup>	14,382.64±8,175.06 <sup>c</sup>	45.04±0.00 <sup>b</sup>	2.88±0.64 <sup>e</sup>
Diazyme X4	5,604.15±207.45 <sup>d</sup>	120,822.41±3,150.71 <sup>a</sup>	1.12±0.04 <sup>d</sup>	24.16±0.63 <sup>c</sup>
CE <sup>4)</sup> against alcohol production			r=0.309 (p=0.551)	r=0.815 (p=0.048)

<sup>1)</sup>All values are mean±SD (n=3).

<sup>2)a-f</sup>Means with different superscripts in the same column are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

<sup>3)</sup>Chung-moo PE means Chung-moo purified enzyme.

<sup>4)</sup>CE means the correlation coefficient between alcohol concentration as shown in Table 1 and two amylase activities ( $\alpha$ -, glucosyl-). The initial enzyme activities in nonsteamed rice mash were calculated based on the amount of added enzyme products.

5.1, 21.6배 높은 당화형 효소로 나타났다. 시험에 사용된 발효제와 효소제의 양을 바탕으로 술덧의 초기 액화력과 당화력을 환산하고 알코올 생산성과의 관계를 평가하였다 (Table 2). 액화력은 개량누룩 처리구 126.18, Sanferm Yield 45.04, 충무정제효소 27.89, 백국 3.81, Diazyme X4 1.12 U/mL 순이었다. 액화력과 발효종료 후 술덧의 알코올 함량과의 상관계수는 0.309(p=0.551)로 알코올 생산성에 대한 설명력이 낮은 것으로 나타났다. 반면 당화력은 개량누룩 처리구 175.00, 백국 83.10, Diazyme X4 24.16, 누룩자임 19.00, Sanferm Yield 2.88, 충무정제효소 2.70 U/mL 순이었다. 당화력이 알코올 생산에 미치는 상관계수는 0.815(p=0.048)로 95% 이상의 신뢰도에서 높

은 설명력을 가지면서 술덧의 당화력이 높은 처리구의 알코올 생산성도 높은 것으로 나타났다.

### 3.3. 효소제의 농도 설정

효소제의 농도별 술덧의 일반성분 분석 결과를 Table 3에 나타내었다. 쌀의 전분가와 발효효율 등으로 증자미와 입국을 사용하는 상업양조에서 알코올 함량은 18-19% 부근이다(Bae, 2012). 모든 효소제는 처리농도에 의존적으로 알코올 생산성이 상승하였다. 충무정제효소를 첨가한 술덧의 알코올 농도는 효소제의 첨가농도에 따라 9.17-19.48% 범위로 800 mg/L 이상 처리구에서 19% 이상의 알코올 함량을 나타내었다. 누룩자임 R400은 16.60-20.00% 범위로

**Table 3.** Initial enzyme activities and chemical properties of nonsteamed rice mash prepared by varying the amount of enzyme products added

Enzyme products	Initial conditions				After fermentation					
	Added conc. (mg/L)	Amylase activity <sup>3)</sup> (U/mL)			Alcohol (%)	pH	Acidity (acetic acid, %)	Amino acidity (glycine, %)	Reducing sugar (%)	Total sugar (%)
		Gluco- (A)	Alpha- (B)	Modified- (A+0.56B)						
Chung-moo purified enzyme	200	2.70	27.89	18.32	9.17±0.06 <sup>1)2)</sup>	3.87±0.02 <sup>e</sup>	0.10±0.00 <sup>a</sup>	0.02±0.00 <sup>b</sup>	0.10±0.01 <sup>b</sup>	2.03±0.20 <sup>a</sup>
	400	5.41	55.78	36.64	15.79±0.05 <sup>d</sup>	4.24±0.01 <sup>f</sup>	0.05±0.00 <sup>d</sup>	0.02±0.00 <sup>b</sup>	0.08±0.01 <sup>bc</sup>	1.51±0.10 <sup>b</sup>
	500	6.76	69.73	45.81	15.29±0.03 <sup>e</sup>	3.73±0.01 <sup>d</sup>	0.09±0.00 <sup>b</sup>	0.03±0.00 <sup>a</sup>	0.09±0.02 <sup>b</sup>	0.41±0.04 <sup>c</sup>
	600	8.11	83.67	54.97	17.81±0.03 <sup>c</sup>	4.06±0.01 <sup>a</sup>	0.06±0.00 <sup>c</sup>	0.02±0.00 <sup>b</sup>	0.11±0.01 <sup>b</sup>	0.29±0.15 <sup>cd</sup>
	800	10.81	111.56	73.29	19.29±0.02 <sup>b</sup>	4.44±0.01 <sup>b</sup>	0.04±0.00 <sup>e</sup>	0.02±0.00 <sup>c</sup>	0.05±0.01 <sup>c</sup>	0.21±0.16 <sup>cd</sup>
	1,000	13.52	139.45	91.61	19.48±0.01 <sup>a</sup>	4.34±0.01 <sup>c</sup>	0.05±0.00 <sup>d</sup>	0.02±0.00 <sup>b</sup>	0.22±0.04 <sup>a</sup>	0.10±0.07 <sup>d</sup>
Nurukzyme R400	200	19.00	3.75	21.10	16.60±0.02 <sup>f</sup>	3.81±0.03 <sup>e</sup>	0.07±0.00 <sup>c</sup>	0.02±0.00 <sup>b</sup>	2.61±1.47 <sup>b</sup>	3.80±0.17 <sup>a</sup>
	400	38.00	7.49	42.20	16.94±0.02 <sup>e</sup>	3.66±0.02 <sup>f</sup>	0.09±0.00 <sup>a</sup>	0.02±0.00 <sup>a</sup>	0.53±0.08 <sup>c</sup>	2.23±0.24 <sup>b</sup>
	500	47.50	9.36	52.74	16.94±0.02 <sup>c</sup>	3.66±0.02 <sup>d</sup>	0.09±0.00 <sup>b</sup>	0.02±0.00 <sup>b</sup>	0.53±0.08 <sup>c</sup>	1.80±0.22 <sup>bc</sup>
	600	57.00	11.24	63.29	19.21±0.02 <sup>b</sup>	4.17±0.01 <sup>a</sup>	0.05±0.00 <sup>e</sup>	0.03±0.00 <sup>a</sup>	1.11±0.52 <sup>c</sup>	1.65±0.44 <sup>bc</sup>
	800	76.00	14.98	84.39	20.00±0.06 <sup>a</sup>	4.04±0.01 <sup>b</sup>	0.06±0.00 <sup>d</sup>	0.02±0.00 <sup>c</sup>	0.28±0.09 <sup>c</sup>	0.86±0.13 <sup>c</sup>
	1,000	95.00	18.73	105.49	18.14±0.02 <sup>d</sup>	3.97±0.03 <sup>c</sup>	0.07±0.00 <sup>b</sup>	0.02±0.00 <sup>a</sup>	4.40±0.67 <sup>a</sup>	0.48±0.23 <sup>d</sup>
Sanferm yield	200	2.88	45.04	28.10	9.13±0.03 <sup>f</sup>	3.69±0.03 <sup>d</sup>	0.10±0.00 <sup>a</sup>	0.02±0.01 <sup>a</sup>	0.08±0.01 <sup>a</sup>	2.75±0.18 <sup>a</sup>
	400	5.75	90.07	56.19	14.41±0.01 <sup>e</sup>	4.04±0.04 <sup>c</sup>	0.05±0.00 <sup>b</sup>	0.02±0.01 <sup>bc</sup>	0.06±0.01 <sup>b</sup>	0.42±0.10 <sup>b</sup>
	500	7.19	112.59	70.24	15.76±0.06 <sup>d</sup>	4.29±0.03 <sup>b</sup>	0.03±0.00 <sup>d</sup>	0.01±0.00 <sup>c</sup>	0.08±0.01 <sup>a</sup>	0.33±0.10 <sup>bc</sup>
	600	8.63	135.11	84.29	19.01±0.03 <sup>c</sup>	4.34±0.06 <sup>b</sup>	0.04±0.00 <sup>c</sup>	0.02±0.00 <sup>d</sup>	0.05±0.01 <sup>bc</sup>	0.18±0.11 <sup>bc</sup>
	800	11.51	180.15	112.39	19.12±0.09 <sup>b</sup>	4.33±0.04 <sup>b</sup>	0.03±0.00 <sup>d</sup>	0.01±0.00 <sup>bc</sup>	0.04±0.01 <sup>c</sup>	0.18±0.10 <sup>bc</sup>
	1,000	14.38	225.18	140.48	19.38±0.02 <sup>a</sup>	4.50±0.05 <sup>a</sup>	0.03±0.00 <sup>d</sup>	0.01±0.00 <sup>b</sup>	0.04±0.01 <sup>bc</sup>	0.16±0.14 <sup>c</sup>
Diazyme X4	200	24.16	0.14	24.24	11.80±0.02 <sup>f</sup>	3.74±0.01 <sup>e</sup>	0.10±0.00 <sup>a</sup>	0.02±0.00 <sup>a</sup>	0.06±0.01 <sup>bc</sup>	1.57±0.31 <sup>a</sup>
	400	48.33	0.27	48.48	17.55±0.05 <sup>e</sup>	4.30±0.01 <sup>d</sup>	0.03±0.00 <sup>bc</sup>	0.02±0.00 <sup>bc</sup>	0.06±0.01 <sup>c</sup>	0.41±0.13 <sup>b</sup>
	500	60.41	0.34	60.60	18.63±0.01 <sup>d</sup>	4.43±0.01 <sup>c</sup>	0.03±0.00 <sup>d</sup>	0.02±0.00 <sup>c</sup>	0.04±0.00 <sup>c</sup>	0.30±0.21 <sup>b</sup>
	600	72.49	0.41	72.72	19.53±0.02 <sup>b</sup>	4.54±0.01 <sup>b</sup>	0.03±0.00 <sup>d</sup>	0.01±0.00 <sup>c</sup>	0.05±0.00 <sup>c</sup>	0.29±0.06 <sup>b</sup>
	800	96.66	0.54	96.96	19.53±0.02 <sup>c</sup>	4.54±0.01 <sup>a</sup>	0.03±0.00 <sup>cd</sup>	0.01±0.00 <sup>bc</sup>	0.05±0.00 <sup>a</sup>	0.29±0.06 <sup>b</sup>
	1,000	120.82	0.68	121.20	20.05±0.01 <sup>a</sup>	4.55±0.04 <sup>b</sup>	0.03±0.00 <sup>b</sup>	0.02±0.00 <sup>b</sup>	0.08±0.02 <sup>b</sup>	0.24±0.10 <sup>b</sup>
CE <sup>4)</sup> against alcohol production	r	0.514	0.151	0.720						
	p	0.010	0.482	0.000						

<sup>1)</sup>All values are mean±SD (n=3).

<sup>2)a-f</sup>Means with different superscripts in the same column are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

<sup>3)</sup>Amylase activities in initial nonsteamed rice mash are calculated based on Table 2.

<sup>4)</sup>CE means the correlation coefficient between alcohol concentration and three amylase activities (gluco-, α-, and modified-).

600 mg/L 이상에서 19% 이상의 알코올 함량을 보여주었다. Diazyme X4는 11.80-20.05% 범위로 600 mg/L 이상 처리구에서 19% 이상 농도로 알코올을 생산하였다. 각

효소제의 농도별 알코올 생산성에 대한 액화력의 상관계수는 0.167(p=0.437)이었고 당화력의 상관계수는 0.501(p=0.013)로 Table 4와 같이 당화력에 큰 영향을 받고 있었다.

다만, 두 효소의 활성은 상호 작용이 있는 것으로 나타났다. 충무정제효소 처리구의 경우 술덧의 액화력이 111.56 U/mL의 높은 활성을 가지고 있으면 당화력이 10.81 U/mL로 낮더라도 19% 이상의 알코올을 생산하였다. 반면, 누룩자임 R400 600 mg/L와 Diazyme X4 600 mg/L 처리구에서는 액화력이 각각 11.24와 0.41 U/mL로 낮았으나 당화력이 각각 57.00과 72.49 U/mL로 높은 경우 19% 이상의 알코올을 생산하였다. 즉, 무증자 쌀의 알코올 생산성을 확보하기 위해서는 액화력이 112 U/mL 정도에서는 당화력이 약 11 U/mL가 필요하고(충무정제효소) 액화력이 0.41 U/mL인 경우 73 U/mL 이상의 당화력이 필요한(누룩자임 R400) 것으로 요약된다. 전분분해에 두 효소가 복합적으로 작용하는 것은 일반적인 사실이고 당화효율이나 반응시간을 줄이기 위해 혼합해서 사용하나 그 비율은 상황에 따라 차이가 있다(Kunamneni와 Singh, 2005; Liu 등, 2014). 충무정제효소와 누룩자임 R400의 결과로부터 당화력이 알코올 생산성에 미치는 영향력을 상수로 두고 액화력이 미치는 영향력을 변수로 두어 계산하면( $112x + 11 = 0.41x + 73$ ) 액화력의 영향력은 0.56 정도이다. 이를 반영한 효소의 활성을 (가칭)복합효소력으로 하고(복합효소력 = 액화력  $\times$  0.56 + 당화력) 그 결과를 Table 3에 나타내었다. 술덧의 알코올 함량 19% 이상이 도달하는 (가칭)복합효소력은 충무정제효소(800 mg/L) 73.29, 누룩자임 R400(600 mg/L) 63.29, Sanferm Yield(600 mg/L) 84.29, Diazyme X4(600 mg/L) 72.72 U/mL로 계산되었다. (가칭)복합효

소력과 알코올 생산성에 대한 상관계수는 0.723( $p=0.000$ )으로 당화력 단독 설명력 0.501보다 설명력이 69% 증가하였다. 이는 효소제의 조합이나 본 연구에 이용되지 않은 다른 효소제를 이용하고자 할 때 참고할 수 있는 결과로 생각된다.

### 3.4. 증류특성

Table 1의 백국과 개량누룩 처리구 술덧과 Table 3의 각 1,000 mg/L 농도로 효소제를 처리한 술덧을 감압 증류하고 그 증류액의 특성을 Table 4에 나타내었다. 각 증류액의 알코올은 41.31-44.86%의 분포를 나타내었다. 이에 대한 증류 효율 즉, 술덧에 함유된 순 알코올의 회수율은 83.5-91.6%의 범위를 보였다. 증류액의 pH는 대조구인 백국 4.17에 비해 Diazyme X4와 누룩자임 R400이 각각 3.76과 3.67로 낮게 나타났다. 이는 Diazyme X4와 누룩자임 R400의 휘발산도 각각 508.00과 862.00 mg/L로 백국 198.00 mg/L보다 높았기 때문으로 해석된다. 술덧에 존재하는 유기산 중 가장 많이 존재하는 것은 citric, succinic, lactic acid지만(Choi 등, 1992) 이들은 증류되지 않으며, acetic acid가 휘발산의 주요성분이다(Choi 등, 2013). 휘발산은 당이 많을 때 과다 생성되며, 일반적으로 액체 발효 증류주의 경우 0.1% 미만으로 생성되나 증류주의 자극취를 주기 때문에 품질에 많은 영향을 미친다(Lee 등, 2015). 휘발산은 저분자량 지방산의 척도이며 일반적으로 식초 냄새로 인식되어, 휘발산이 과다하게 생성될 경우

**Table 4.** Physicochemical properties of vacuum-distilled sprits of nonsteamed rice mash prepared with various amylase products

Enzyme products	Vacuum-distilled sprits			
	Alcohol (%)	pH	Volatile acidity (acetic acid, mg/L)	Alcohol yield (%)
White <i>koji</i>	44.32 $\pm$ 0.00 <sup>c1)2)</sup>	4.17 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	198.00 $\pm$ 0.01 <sup>e</sup>	90.0
Modified <i>nuruk</i>	44.86 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	3.92 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>	404.00 $\pm$ 6.93 <sup>c</sup>	88.5
Chung-moo PE <sup>3)</sup>	44.28 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>	3.92 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>	330.00 $\pm$ 0.01 <sup>d</sup>	90.9
Nurukzyme R400	41.31 $\pm$ 0.02 <sup>e</sup>	3.67 $\pm$ 0.01 <sup>e</sup>	862.00 $\pm$ 3.46 <sup>a</sup>	91.1
Sanferm yield	44.40 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>	4.39 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	78.00 $\pm$ 0.01 <sup>f</sup>	91.6
Diazyme X4	41.83 $\pm$ 0.04 <sup>d</sup>	3.76 $\pm$ 0.01 <sup>d</sup>	508.00 $\pm$ 3.46 <sup>b</sup>	83.4

<sup>1)</sup>All values are mean $\pm$ SD (n=3).

<sup>2)a-f</sup>Means with different superscripts in the same column are significantly different at  $p<0.05$  by Duncan's multiple range test.

<sup>3)</sup>Chung-moo PE means Chung-moo purified enzyme.

White *koji* and modified *nuruk* in Table 1, and enzyme treated samples at 1,000 mg/L from Table 3, were used in the distillation.



향기성분 생성에 부정적으로 작용할 수 있다.

**3.5. 효소제를 이용하여 제조한 증류식 소주의 향기성분**

효소제를 사용하여 제조한 증류식 소주의 향기성분을 Table 5에 나타내었다. 먼저, 각 처리구의 고급알코올류의 합계는 백국 709.85, 개량누룩 347.84, 충무정제효소 459.97, 누룩자임 R400 504.73, Diazyme X4 460.62, Sanferm Yield 790.05 mg/L로 백국과 Sanferm Yield 처리구에서 높게 나타났다. 고급알코올류 중 함량이 높은 것은 isoamyl alcohol로 각각 485.94, 224.10, 352.76, 198.92, 317.39, 569.00 mg/L 농도로 존재하였다. 증류식 소주에 있어 고급알코올류는 기본적인 향미에 영향을 미치는 데 1-propanol(P), isobutanol(B) 및 isoamyl alcohol(A) 비율이 원료 및 제조 방법에 따라 차이가 있는 것으로 알려

져 있다(Lee 등, 2015). 각 처리구의 P, B, A의 합은 642.22, 288.41, 432.41, 270.97, 416.24, 751 mg/L로 Sanferm Yield 처리구가 가장 높았고 처리 방법에 따라 최대 2.6배 차이를 보였다. 그러나 A/P, A/B, B/P의 비율에 있어서는 누룩자임 R400을 제외하면 각각 27.85-50.35, 3.25-3.92, 7.71-15.48 mg/L 범위로 유사하였던 반면, 누룩자임 R400은 각각 3.23, 2.76, 1.17 mg/L로 다른 처리구에 비해 많은 차이를 나타내었다.

지방산 함량의 합은 각각 9.10, 29.30, 7.24, 66.24, 15.59, 10.21 mg/L로 누룩자임 R400 처리구의 함량이 가장 높았고 개량누룩이 뒤를 따랐다. 밀을 원료로 한 개량누룩을 제외하고 쌀을 원료로 하는 백국과 효소제 처리구의 함량을 비교해 보면, 누룩자임 R400 처리구가 대조구인 백국에 비하여 7.3배가량 높았고 그 외의 효소는 0.8-1.8배로

**Table 5.** Volatile components (mg/L) in the vacuum-distilled *soju* (abv. 25%) prepared with non steamed rice and various enzyme products

Compounds	White koji	Modified nuruk	Chung-moo PE <sup>3)</sup>	Nurukzyme R400	Sanferm yield	Diazyme X4
Alcohol						
1-Propanol (P)	17.45±0.13 <sup>b1)2)</sup>	7.14±0.12 <sup>d</sup>	6.47±0.54 <sup>d</sup>	61.59±0.54 <sup>a</sup>	16.49±0.18 <sup>b</sup>	11.35±3.18 <sup>c</sup>
Isobutanol (B)	138.83±0.81 <sup>b</sup>	57.17±0.81 <sup>f</sup>	100.17±0.43 <sup>c</sup>	72.05±0.26 <sup>e</sup>	166.09±0.59 <sup>a</sup>	87.49±6.06 <sup>d</sup>
1-Butanol	0.43±0.01 <sup>bcd</sup>	0.89±0.04 <sup>b</sup>	ND <sup>4)</sup>	111.38±0.58 <sup>a</sup>	0.24±0.01 <sup>c</sup>	0.64±0.14 <sup>bcd</sup>
Isoamyl alcohol (A)	485.94±2.71 <sup>b</sup>	224.10±3.34 <sup>d</sup>	325.76±1.74 <sup>c</sup>	198.92±0.61 <sup>d</sup>	569.00±2.69 <sup>a</sup>	317.39±41.89 <sup>c</sup>
Furfuryl alcohol	15.55±0.13 <sup>d</sup>	39.08±0.85 <sup>b</sup>	0.74±0.03 <sup>e</sup>	46.87±0.20 <sup>a</sup>	0.46±0.08 <sup>e</sup>	23.58±0.92 <sup>c</sup>
Phenethyl alcohol	51.60±0.31 <sup>a</sup>	19.47±0.33 <sup>d</sup>	26.83±0.18 <sup>c</sup>	13.91±0.04 <sup>e</sup>	37.76±0.35 <sup>b</sup>	20.16±4.35 <sup>d</sup>
Subtotal	709.85±4.11 <sup>b</sup>	347.84±5.49 <sup>e</sup>	459.97±2.41 <sup>d</sup>	504.73±2.22 <sup>c</sup>	790.05±3.90 <sup>a</sup>	460.62±56.53 <sup>d</sup>
P+B+A	642.22±1.77 <sup>b</sup>	288.41±4.03 <sup>e</sup>	432.41±1.63 <sup>c</sup>	270.97±3.30 <sup>d</sup>	751.58±2.28 <sup>a</sup>	416.23±39.01 <sup>c</sup>
A/P	27.85±0.36 <sup>c</sup>	31.39±1.00 <sup>bc</sup>	50.35±4.56 <sup>a</sup>	3.23±0.09 <sup>d</sup>	34.51±0.21 <sup>b</sup>	27.96±4.56 <sup>c</sup>
A/B	3.50±0.04 <sup>ab</sup>	3.92±0.01 <sup>a</sup>	3.25±0.01 <sup>bc</sup>	2.76±0.03 <sup>c</sup>	3.43±0.03 <sup>ab</sup>	3.63±0.73 <sup>ab</sup>
B/P	7.96±0.01 <sup>b</sup>	8.01±0.25 <sup>b</sup>	15.48±1.38 <sup>a</sup>	1.17±0.01	10.07±0.15 <sup>b</sup>	7.71±2.96 <sup>b</sup>
Fatty acid						
Butyric acid	6.74±0.04 <sup>d</sup>	21.77±0.67 <sup>b</sup>	3.03±0.05 <sup>e</sup>	61.66±0.25 <sup>a</sup>	2.45±0.13 <sup>e</sup>	11.11±0.98 <sup>c</sup>
Valeric acid	ND	2.22±0.02 <sup>a</sup>	1.58±0.01 <sup>c</sup>	1.63±0.01 <sup>bc</sup>	1.66±0.01 <sup>b</sup>	1.66±0.07 <sup>b</sup>
Isovaleric acid	1.73±0.01 <sup>e</sup>	1.62±0.01 <sup>f</sup>	16.2±0.01 <sup>a</sup>	2.02±0.01 <sup>c</sup>	1.85±0.01 <sup>d</sup>	2.09±0.03 <sup>b</sup>
Hexanoic acid	1.32±0.00 <sup>b</sup>	1.44±0.02 <sup>a</sup>	ND	ND	1.33±0.02 <sup>b</sup>	ND
Heptanoic acid	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Octanoic acid	1.04±0.01 <sup>d</sup>	0.97±0.01 <sup>d</sup>	2.63±0.02 <sup>bc</sup>	2.26±0.02 <sup>c</sup>	4.77±0.00 <sup>a</sup>	2.82±0.57 <sup>b</sup>
Nonanoic acid	ND	2.90±0.03 <sup>a</sup>	ND	0.68±0.00 <sup>b</sup>	ND	ND
Subtotal	10.84±0.06 <sup>d</sup>	30.92±0.76 <sup>b</sup>	9.20±0.10 <sup>e</sup>	68.26±0.28 <sup>a</sup>	12.06±0.16 <sup>d</sup>	17.68±1.65 <sup>c</sup>

(continued)

Compounds	White <i>koji</i>	Modified <i>nuruk</i>	Chung-moo PE <sup>3)</sup>	Nurukzyme R400	Sanferm Yield	Diazyme X4
Ester						
Ethyl acetate	123.61±1.55 <sup>b</sup>	352.09±4.43 <sup>a</sup>	75.10±2.45 <sup>c</sup>	61.01±1.56 <sup>d</sup>	78.74±0.10 <sup>c</sup>	57.53±10.74 <sup>d</sup>
Ethyl butyrate	14.46±0.11 <sup>b</sup>	6.44±0.10 <sup>d</sup>	6.27±0.02 <sup>d</sup>	48.96±0.43 <sup>a</sup>	14.26±0.14 <sup>b</sup>	10.08±2.32 <sup>c</sup>
Isoamyl acetate	8.18±0.05 <sup>a</sup>	1.93±0.01 <sup>cd</sup>	2.03±0.02 <sup>c</sup>	1.28±0.00 <sup>e</sup>	2.68±0.02 <sup>b</sup>	1.83±0.23 <sup>d</sup>
Ethyl succinate	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ethyl hexanoate	0.91±0.01 <sup>a</sup>	0.91±0.01 <sup>a</sup>	0.71±0.01 <sup>b</sup>	0.62±0.02 <sup>c</sup>	0.72±0.05 <sup>b</sup>	0.70±0.05 <sup>b</sup>
Ethyl heptanoate	ND	ND	ND	ND	0.46±0.00 <sup>b</sup>	0.47±0.01 <sup>a</sup>
Ethyl lactate	3.30±0.03 <sup>d</sup>	45.81±0.63 <sup>a</sup>	2.94±0.06 <sup>d</sup>	13.37±0.05 <sup>b</sup>	2.02±0.02 <sup>e</sup>	11.16±0.31 <sup>c</sup>
Ethyl octanoate	2.95±0.01 <sup>d</sup>	2.62±0.03 <sup>d</sup>	4.55±0.07 <sup>b</sup>	3.74±0.04 <sup>c</sup>	8.06±0.07 <sup>a</sup>	4.55±0.51 <sup>b</sup>
Ethyl nonanoate	ND	1.68±0.01 <sup>a</sup>	ND	0.84±0.01 <sup>b</sup>	ND	0.83±0.01 <sup>b</sup>
Subtotal	153.40±1.76 <sup>b</sup>	411.47±5.21 <sup>a</sup>	91.62±2.64 <sup>e</sup>	128.98±2.09 <sup>c</sup>	106.94±0.40 <sup>d</sup>	87.14±14.18 <sup>e</sup>
Sulfur						
Dimethyl sulfide	0.66±0.01 <sup>c</sup>	0.61±0.01 <sup>c</sup>	1.15±0.01 <sup>a</sup>	1.01±0.02 <sup>bc</sup>	1.13±0.03 <sup>ab</sup>	1.01±0.13 <sup>abc</sup>
Dimethyl disulfide	ND	ND	ND	1.19±0.00	ND	ND
Dimethyl trisulfide	ND	ND	ND	1.01±0.04 <sup>b</sup>	1.31±0.02 <sup>a</sup>	1.02±0.01 <sup>b</sup>
Subtotal	0.66±0.01 <sup>e</sup>	0.61±0.01 <sup>e</sup>	1.15±0.01 <sup>d</sup>	3.21±0.06 <sup>a</sup>	2.44±0.05 <sup>b</sup>	2.03±0.13 <sup>c</sup>
Aldehyde						
Furfural	1.43±0.01 <sup>b</sup>	1.52±0.01 <sup>ab</sup>	1.56±0.11 <sup>ab</sup>	1.71±0.11 <sup>a</sup>	1.70±0.01 <sup>a</sup>	1.72±0.21 <sup>a</sup>

<sup>1)</sup>All values are mean±SD (n=3).

<sup>2)a-f</sup>Means with different superscripts in the same row are significantly different at  $p<0.05$  by Duncan's multiple range test.

<sup>3)</sup>Chung-moo PE means Chung-moo purified enzyme.

<sup>4)</sup>ND, not detected.

The vacuum-distilled *soju* (abv. 25%) was prepared by adding water to the distillates, as listed in Table 4.

큰 차이를 나타내지 않았다. 누룩자임 R400의 경우 butyric acid의 함량이 61.66 mg/L로 대조구인 백국에 비하여 9.1 배 높게 나타났고 휘발산의 함량도 높아(Table 4) 산취를 동반하였다. 지방산 중에 저급 및 중급 지방산은 효모의 종류와 발효 온도 경과에 의해 생성될 수 있으나, 일반적으로는 그 함량이 낮아 관능에 영향을 미치지 않는다(Lee 등, 2015). 한편, 부조(산패)에 의해서도 생성될 수 있는데 효모의 종류와 발효 온도가 동일하므로 효모의 대사에 의한 생성보다는 발효과정 중 오염 등 이상발효에 의한 생성으로 생각된다. 따라서, 효소제를 사용할 경우 전분 분해 속도 차이에 따른 알코올 생성 및 초기 pH에 따른(Fig. 1) 오염의 위험성도 있는 것으로 생각된다.

에스테르 화합물의 합은 각각 153.40, 411.47, 91.62, 129.82, 87.14, 106.94 mg/L로, 대조구인 백국과 개량누

룩 처리구에서 높았고 효소제 처리구는 비교적 낮게 나타났다. 에스테르 화합물은 사과, 바나나 및 파인애플 등 과일향과 장미향 등을 가지고 있어(Hadi 등, 2013) 소주의 품질에 많은 영향을 미치는 성분이다. 효소제 처리구가 대조구(백국) 대비 함량이 낮은 것은 ethyl acetate, isoamyl acetate이었으며, 함량이 높은 성분은 ethyl octanoate로 나타났다. Ethyl acetate는 과일향을 가지고 있으나 분별 역치가 25 mg/L로 높아(Lee 등, 2015) 함량이 높아도 그 영향은 비교적 적을 수 있다. Ethyl acetate의 odour activity value (OAV)를 계산하면(Guth, 1997) 각각 4.9, 14.1, 3.0, 2.4, 3.1로 개량누룩을 제외하면 서로 간의 차이가 크게 줄어든다. Isoamyl acetate는 바나나향을 가지고 있으며(Torres 등, 2010) 각각의 농도는 8.18, 1.93, 2.03, 1.28, 1.83, 2.69 mg/L로 효소 처리구가 대조구인 백국에 비하여 최대

6.4배 낮았다. Isoamyl acetate의 분별 역치는 1.6 mg/L로(Lee 등, 2015) OAV는 각각 5.1, 1.2, 1.3, 0.8, 1.7로서 효소 처리구가 바나나향에 있어서 강도가 낮을 수 있다. Ethyl octanoate는 과일향을 가지고 있으며 분별 역치값은 0.2 mg/L이다. Ethyl octanoate의 OAV는 각각 14.7, 13.1, 22.8, 18.7, 40.3으로서 ethyl acetate나 isoamyl acetate에 비하여 높은 영향력을 가지고 있었으며 효소 처리구에서 대조구인 백국 처리구보다 높게 최대 2.7배 높게 나타났다. 에스테르 화합물은 alcohol acetyl transferase (AATFase) 또는 esterase의 작용으로 생성되는데 isoamyl acetate는 isoamyl alcohol을 기질로 AATFase의 작용으로 생성되고(Lee 등, 2015), ethyl octanoate는 AATFase와 esterase의 작용으로 합성된다(Saerens 등, 2010). 따라서 isoamyl acetate는 isoamyl alcohol의 농도와(Lee 등, 2015) AATFase 활성에(Fukuda 등, 1998) 의존적이다. 효소 처리구에 있어 Sanferm Yield 처리구의 isoamyl alcohol의 농도는 대조구(백국) 대비 1.17배 높았음에도 불구하고 isoamyl acetate의 함량은 3.04배 낮았는데 이것은 효소 처리구의 AATFase 활성이 낮을 수 있다고 생각된다. 반면, 효소 처리구의 ethyl octanoate의 함량이 높은 것은 octanoic acid의 함량이 각각 1.04, 0.97, 2.63, 2.26, 2.82, 4.77 mg/L로 효소 처리구에서 높은 것으로 보아 esterase의 활성은 대조구와 유사하여 이의 에스테르 함량도 높은 것으로 추정된다.

황화합물의 총량은 각각 0.66, 0.61, 1.15, 3.21, 2.03, 2.44 mg/L로 효소 처리구의 함량이 높게 나타났다. 황화합물은 methionine과 cysteine 등의 함황아미노산의 효모 대사나 증류 과정 중 열처리에 의해서 생성된다. Table 1에서 백국과 개량누룩을 이용한 술덧의 유리아미노산의 함량은 0.04 glycine%이었고 FAN값은 각각 1,634.64와 2,707.98 mg/L이었다. 반면 Table 3에서 효소제 처리구의 아미노산 함량은 0.01-0.02 glycine%이었으며 FAN값은(Table 1) 636.68-1,329.85 mg/L로 대조구보다 낮았다. 술덧의 아미노산은 쌀이 분해되어 생성되는 것으로 효소제처리구는 단백질 분해효소가 없기 때문에 유리아미노산 함량과 FAN 값이 낮은 것은 당연한 결과로 볼 수 있다. 증류액에서 검출된 dimethyl sulfide, dimethyl trisulfide는 소수성 화합물로 휘발성이 강하다(Lee, 1999; Lee 등, 2015). 따라서 대사

과정에서 생성된 물질은 발효 기간에 상당량 휘산되었고, 대조구보다 효소제 처리구에서 대사되지 못한 결합함황아미노산이 상대적으로 높기 때문에 증류 과정 중 열처리에 의해서 증류액에서도 높은 함량으로 나타난 것으로 추정된다.

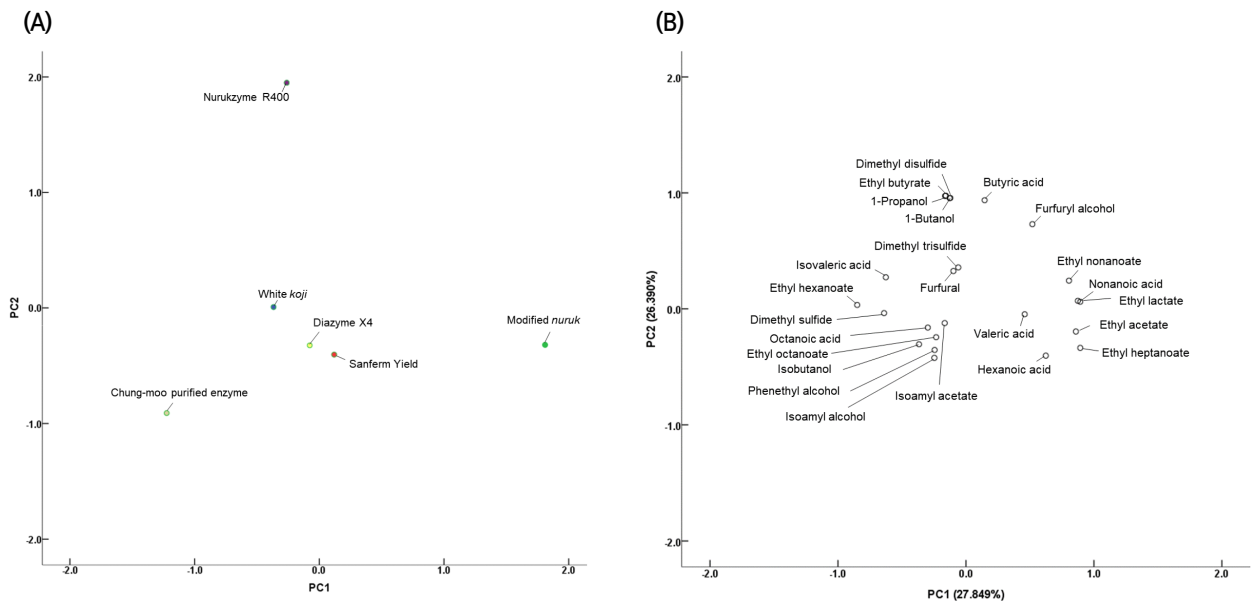
증류취 또는 탄내로 표현되는 성분인 furfural(Shin 등, 2022)의 함량은 대조구가 1.43-1.52, 효소 처리구가 1.56-1.72 mg/L로 큰 차이를 보이지 않았다. Table 2에서 대조구의 환원당 함량은 0.11-0.42% 범위이었고 Table 5에서 효소제의 환원당 함량은 각각 0.22, 4.40, 0.08, 0.04%로 누룩자임 R400 처리구를 제외하면 0.04-0.22% 범위로 유사하였다. Furfural은 pentose와 hexose가 열에 의해 분해된 산물로서 증류 후반에 생성되며, 감압증류주에서는 상압증류주에 비하여 그 함량이 매우 낮은 특징이 있다(Lee 등, 2015). 결국, 본 시험처리의 조건에서는 환원당이 일부 존재하더라도 탄내의 생성은 적은 것으로 확인되었다.

효소제에 대한 각각의 향기성분 생성에 대한 변동을 이해하기 위해서 주성분 분석을 실시하여 Fig. 2에 나타내었다. 제1주성분(PC1)의 설명력은 27.8%, 제2주성분(PC2)의 설명력 26.4%로 전체변동의 54.2%의 설명력을 보여주었다. 증양에 백국, Diazyme X4, Sanferm Yield가 분포되어 이들은 서로 유사한 특성이 있음을 나타내었다. 반면, 개량누룩과 누룩자임 처리구는 이들 그룹과는 거리가 컸으며, 충무정제효소 처리구는 중간 정도의 거리를 가지고 있었다. 즉, 백국이 포함된 그룹을 기준으로 개량누룩 처리구는 상대적으로 ethyl lactate의 함량이 높은 특징이 있고 누룩자임 처리구는 butyric acid와 ethyl butyrate의 함량이 높은 특징이 있는 반면, 충무정제효소 처리구는 대부분의 성분이 낮은 것이 특징으로 나타났다.

결과적으로 효소제를 무증자 쌀 발효에 적용하여도 알코올 생산성에 영향이 없었으며(Table 3), 감압증류한 증류액의 품질에서도 많은 차이를 보이지 않았기(Table 5) 때문에 입국 및 개량누룩의 대체제로서 대안이 될 수 있다고 생각된다.

#### 4. 요약

상업용 효소제를 이용하여 무증자 쌀 발효 증류식 소주의 생산 가능성에 대하여 평가하였다. 백국과 개량누룩의



**Fig. 2.** Principal component analysis (PCA) of the composition distribution of: (A) distillates (abv. 25%) and (B) their volatile compounds from Table 5.

액화력은 각각 31.90과 3,532.71 U/g이었고 당화력은 각각 698.32와 4,899.58 U/g이었다. 효소제의 액화력은 5,604.15–225,182.00 U/g 범위이었고 당화력은 13,517.41–120,822.41 U/g 범위로 나타났다. 효소제 처리 농도에 따른 알코올 생산량에 있어 총무정제효소는 800 mg/L 이상 처리구에서 19% 이상의 알코올 생산성을 나타내었다. 누룩 자임 R400, Sanferm Yied, Diazyme X4는 600 mg/L 이상에서 19% 이상의 알코올 생산성을 보여주었다. 각 효소제의 농도와 알코올 생산성에 대한 상관계수는 액화력이 0.151( $p=0.482$ )이었고 당화력이 0.514( $p=0.010$ )이었다. 술덧을 감압증류한 증류액의 알코올 함량은 41.31–44.86%의 분포를 나타내었다. Diazyme X4와 누룩자임 R400 처리구의 휘발산도 각각 508.00과 862.00 mg/L로 백국 처리구 198.00 mg/L보다 높았다. 알코올 함량을 25%로 조절된 증류식 소주의 향기성분을 분석하고 주성분 분석을 하였다. 백국, Diazyme X4, Sanferm Yield 처리구는 향기성분의 변동이 유사하였다. 개량누룩 처리구는 백국 처리구가 속한 그룹에 비하여 상대적으로 ethyl lactate의 함량이 높은 특징이 있고 누룩자임 R400 처리구는 butyric acid와 ethyl butyrate의 함량이 높은 특징이 있었다. 총무정제효소는 대부분의 성분이 낮은 것이 특징으로 나타났다. 결

과적으로 효소제를 무증자 쌀 발효에 적용하여도 알코올 생산성에 영향이 없었으며, 감압증류한 증류액의 품질에서도 많은 차이를 보이지 않았기 때문에 입국 및 개량누룩의 대체제로서 사용이 가능할 것으로 생각된다.

### Acknowledgements

본 논문은 농림축산식품부의 재원으로 농림식품기술기획평가원의 고부가가치식품기술개발사업의 지원을 받아 연구되었음(122028-3).

### Conflict of interests

The authors declare no potential conflicts of interest.

### Author contributions

Conceptualization: Choi HS. Formal analysis: Kwon YS, Lee J, Kim MS, Choi HS. Writing - original draft: Kwon YS, Lee J, Kim MS, Choi HS. Writing - review & editing: Kwon YS, Lee J, Kim MS, Han S, Choi HS.

### Ethics approval

This article does not require IRB/IACUC approval because there are no human and animal participants.

**ORCID**

Ye Seul Kwon (First author)

<https://orcid.org/0000-0002-2608-5108>

Jisu Lee

<https://orcid.org/0009-0001-6286-5048>

Mi Seong Kim

<https://orcid.org/0000-0002-4460-4397>

Sochon Han

<https://orcid.org/0009-0005-1793-1295>

Han-Seok Choi (Corresponding author)

<https://orcid.org/0000-0001-6792-5620>

**References**

- Ahn BH, Im HR, Kim JH, Kan HR. Brewing yeast *Saccharomyces cerevisiae* 54-3 and brewed alcohol made there with. Korea Patent No. 20130016006 (2014)
- Bea SM. Distilled Soju Manufacturing Technology. Bae Sang-Myeon Liquor Research Institute Co., Seoul, Korea, p 114-122 (2012)
- Choi HS, Kang JE, Jeong ST, Kim CW, Baek SY, Yeo SH. *Soju* brewing characteristics of yeast strains N4 and N9 isolated from Korean traditional *Nuruk*. Korean J Food Preserv, 24, 714-721 (2017)
- Choi HS, Kim EG, Kang JE, Choi JH, Yeo SH, Jeong ST. Effect of varying the amount of water added on the characteristics of mash fermented using modified *Nuruk* for distilled-*Soju* production. Korean J Food Preserv, 21, 908-916 (2014)
- Choi HS, Lim BJ, Lee GS, Park EB, Jeong JM. Development of Technology for Commercialization of Raw Rice Fermented Distillation Type Soju Using Domestic Raw Materials and Native Microorganisms. Report of MAFRA, MAFRA 11-1543000-003418-01, Sejong, Korea (2021)
- Choi SH, Kim OK, Lee MW. A study on the gas chromatographic analysis of alcohols and organic acids during *Takju* fermentation. Korean J Food Sci Technol, 24, 272-278 (1992)
- Choi SI, Kang SA, Cheong C. Yeast selection for quality optimization of distilled spirits. J Korea Academia-Industrial Cooperation Soc, 14, 3887-3896 (2013)
- Fukuda K, Yamamoto N, Kiyokwa Y, Yanagiuchi T, Wakai Y, Kitamoto K, Inoue Y, Kimura A. Balance of activities of alcohol acetyltransferase and esterase in *Saccharomyces cerevisiae* is important for production of isoamyl acetate. Appl Environ Microbiol, 64, 4076-4078 (1988)
- Guth H. Quantitation and sensory studies of character impact odorants of different white wine varieties. J Agric Food chem, 45, 3027-3032 (1997)
- Hadi EL, Zhang FJ, Wu FF, Zhou CH, Tao J. Advances in fruit aroma volatile research. Molecules, 18, 8200-8229 (2013)
- Hatanaka C, Kobara Y. Determination of glucose by a modification of Somogyi-Nelson method. Agric Biol Chem, 44, 2943-2949 (1980)
- Hill AE, Stewart GG. Free amino nitrogen in brewing. Fermentation, 5, 22 (2019)
- Horwitz W, Latimer GW. Official Methods of Analysis of AOAC International. AOAC International, Gaithersburg, MD, USA, p 39-40 (2011)
- Imai Y, Tokutake S, Yamaji N, Suzuki M. A new method of measuring glucose-forming activity in rice *Koji*. J Brew Soc Japan, 91, 51-57 (1996)
- Kim GW, Kim JH, Nho BS, Ahn BH, Yeo SH, Jo HC. Makgeolli and Yakju: Science and Application. Suhaksa, Paju, Korea, p 125-177 (2012)
- Kishimoto T, Wanikawa A, Kono K, Shibata K. Comparison of the odor-active compounds in unhopped beer and beers hopped with different hop varieties. J Agric Food Chem, 54, 8885-8861 (2006)
- Korea Agro-Fisheries & Food Trade Corporation. Food Information Statistics System Alcoholic Beverages Market Trend Report. Korea (2021) Available from: <https://www.atfis.or.kr>. Accessed Jul. 24, 2023.
- Korean Statistical Information Service (KOSIS). Liquor

- tax return. Available from: <https://kosis.kr>. Accessed Jul. 25, 2023.
- Kunamneni A, Singh S. Response surface optimization of enzymatic hydrolysis of maize starch for higher glucose production. *Biochem Eng J*, 27, 179-190 (2005)
- Kwak HS, Ahn BH, Kim HR, Lee SY. Identification of sensory attributes that drive the likeability of Korean rice wines by American panelists. *J Food Sci*, 80, 161-170 (2015)
- Lee DY. Odor components that may occur during alcohol production. *Food Sci Ind*, 32, 62-69 (1999)
- Lee JG, Moon SH, Bae KH, Kim JH, Choi HS, Kim TW, Jeong C. *Distilled Spirits*. Gwangmunkag Co., Seoul, Korea, p 380-408 (2015)
- Liu D, Zhang H, Xu B, Tan J. Development of kinetic model structures for glutinous rice saccharification by different enzymes. *J Food Process Eng*, 37, 317-328 (2014)
- National Research Institute of Brewing (NRIB). Commentary on standard analytical method of National Research Institute of Brewing. Tokyo, Japan (2017) Available from: <https://www.nrrib.go.jp/bun/pdf/bun/nb111.pdf>. Accessed Jul. 25, 2023.
- National Tax Service Liquors License Support Center. *Analysis Regulations of Alcoholic Beverage*. Seoul, Korea, p 53-54 (2014)
- Oh SH. Trends in the utilization of enzyme in food industry. *Food Ind Nurtr*, 9, 1-9 (2004)
- Saerens SM, Delvaux FR, Verstrepen KJ, Thevelein JM. Production and biological function of volatile esters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb Biotechnol*, 3, 165-177 (2010)
- Shin JY, Kang HY, Lim BR, Choi HS. Characteristics of solid-state fermentation mash and distilled liquor prepared using sorghum variety 'Chengpung'. *J East Asian Soc Diet Life*, 32, 46-52 (2022)
- Shirokane Y, Tokutake S, Tobe K, Suzuki M. Simple measurement of  $\alpha$ -amylase activity in rice *koji*. *J Brew Soc Japan*, 91, 889-894 (1996)
- Torres S, Pandey A, Castro GR. Banana flavor: Insights into isoamyl acetate production. *Cell*, 549, 776 (2010)