



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

공 학 석 사 학 위 논 문

수제맥주와 람빅맥주로부터 분리된
효모의 특성과 알코올 발효



2020년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

식 품 공 학 과

황 진 우

공 학 석 사 학 위 논 문

수제맥주와 람빅맥주로부터 분리된 효모의 특성과 알코올 발효

지도 교수 양 지 영

이 논문을 공학석사 학위논문으로 제출함.

2020년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

식 품 공 학 과

황 진 우

황진우의 공학석사 학위논문을 인준함

2020년 2월



위 원 장 농학박사 이 양 봉



위 원 약학박사 김 영 목



위 원 농학박사 양 지 영



목 차

Abstract	iii
I. 서론	1
II. 실험방법 및 방법	4
1. 실험 재료 및 시약	4
2. 수제맥주와 람빅맥주에서의 효모 분리 및 동정	4
3. 수제맥주와 람빅맥주에서 분리한 효모의 당, 알코올 내성	5
4. 당화액 제조 및 분리된 효모의 발효액 제조	6
5. 분리된 효모로 제조한 발효액의 이화학 분석	6
6. HPLC를 이용한 알코올 발효액의 유기산 분석	7
7. 알코올 발효액의 휘발성 화합물 분석	7
8. 통계처리	10
III. 결과 및 고찰	11
1. 수제맥주와 람빅맥주에서 분리한 효모 동정 결과	11
2. 수제맥주와 람빅맥주에서 분리한 효모의 당, 알코올 내성	11
3. 분리된 효모로 제조한 발효액의 이화학 분석	28
4. 알코올 발효액의 유기산 분석 결과	30
5. 알코올 발효액의 휘발성 화합물 분석 결과	32

IV. 요약	39
V. 참고문헌	41



Characteristics and Alcohol Fermentation of Yeast from Craft Beer and Lambic Beer

Jin woo Hwang

Department of Food Science and Technology, The Graduate School
Pukyong National University

Abstract

This study was aimed to investigate the alcoholic fermentation characteristics of yeasts from craft beer and lambic beer. Isolated yeasts were identified as *Brettanomyces bruxellensis*, *Pichia manshurica*, *Pichia membranifaciens* and *Saccharomyces cerevisiae*. As results of sugar and alcohol tolerance tests, *S. cerevisiae* showed the greatest growth at glucose concentration of 40%, and ethanol tolerance ranged from 8 to 12%. *B. bruxellensis* was found to have a sugar tolerance of from 30 to 40% and an alcohol tolerance of from 8 to 12%, of which the LA-3 strain had the best tolerance. After fermentation during 5 days, pH, acidity, sugar and alcohol contents of the fermentation broth were measured. As results of the physicochemical characteristics, alcohol fermentation using sugars was actively performed in *S. cerevisiae* with a solid content of 7.2 ~ 8.5 °brix, pH of 4.45 ~ 4.64, and alcohol content of 3.0 ~ 4.8%. Among them, CB-10 showed the lowest sugar content as 7.2 °brix and the highest alcohol content as 4.8%, which means it consumed most sugar in the malt extract by alcohol fermentation. As shown by the sugar and alcohol tolerance results, *B. bruxellensis* showed less sugar consumption because its growth was slower than *S. cerevisiae*. In addition, it was confirmed that the alcohol concentration also showed a relatively low value, from 0.8 to 1.6%. *Pichia*

spp. had no alcohol fermentation, so there was no change in pH, acidity and alcohol content except for decreasing small amounts of sugar for use of growth. Organic acids and volatile compounds were analyzed among alcoholic fermentation strains. Acetic acid, lactic acid and succinic acid were increased after fermentation. Among them, CB-7 showed a low acetic acid content and a high succinic acid content. In general, the volatile compounds showed higher area of *S. cerevisiae*, and among them, CB-8 showed the highest area value. Some of the yeasts isolated from craft beer and lambic beer were found to be the same species, but their characteristics were different.



I. 서론

국내에서 2018년 가장 많이 소비되는 주류의 점유율은 맥주가 36.88%이고 다음으로 소주가 34.76%를 차지하고 있다. 맥주는 홉을 첨가한 몰트를 알코올 발효를 통해 만들어진 음료(Caballero, Blanco, and Porras, 2012)이고, 그 재료는 몰트, 홉, 물, 효모로 4가지이다. 몰트는 맥주의 갈색, 황금색 등 색깔을 구성하며 펄스너 몰트, 비엔나 몰트, 초콜렛 몰트 등 다양한 종류가 있으며 저마다 맛도 다르다. 홉은 품종에 따른 향의 특성(Kaltner, D., and Mitter, W., 2003)이 달라지며 양조 과정 중 쓴맛과 향기를 부여하기 위해 자비 공정 중 또는 후에 홉을 첨가한다(Kishimoto, T. et al., 2006). 또한 홉으로부터 유래된 isohumulone은 그람양성균에 작용하여 미생물적 부패에 대한 내성(Simpson, W. J., 1993)을 가지는 이점이 있다. 물은 맥주 성분의 90% 이상을 차지하는 중요한 요소로 칼슘, 마그네슘 이온 함유량이 적은 연수는 맥주의 색이 옅으며 홉의 신맛과 쓴맛, 향을 북돋아주며 경수의 경우 홉의 맛과 향을 감추어 맥아의 풍미가 잘 드러나는 특징이 있다. 효모는 원하는 맥주의 스타일에 따라 달라진다. 발효 방식에 따라 상면, 하면, 자연발효 맥주로 나눌 수 있는데 향, 풍미, 기포성에서 다른 특징을 가지고 있다. 에일은 *Saccharomyces cerevisiae*와 같은 상면발효 효모로 만든 것으로 발효온도가 15 ~ 25℃ 사이로 효모가 발효 도중에 생기는 거품과 함께 상면으로 떠오르며 향을 내기는 좋지만 청량감이 떨어지는 단점이 있다. 반면 라거는 *Saccharomyces pastorianus*와 같이 하면발효 효모로 만든 것으로 발효온도가 에일보다 낮은 6 ~ 8℃이며 효모가 분산되어 있지만 하부 쪽으로 분포하며 차가운 온도에서 천천히 발효하기 때문에 향보다는 청량감을 느끼기가 좋다. 그리고 랍빅맥주는 벨기에의 브리셀 인근 지역에서 중심으로 만들어지는

자연발효 맥주로 맥즙을 자연의 미생물들에게 노출시킨 뒤 나무통에 6개월에서 3년까지 오랜 기간 동안 숙성을 진행하여 제조한다. 이 때 젖산균, 초산균 등에 의해 강한 신맛을 내는 특징이 있으며 *Brettanomyces* spp.에 의해 발효가 진행된다. *Brettanomyces* 효모는 와인과 맥주 산업에 부패 효모로 잘 알려져 있지만 랍빅맥주와 같은 특정 맥주에서는 특유의 향을 제공한다 (Lentz et al., 2015). 자연발효 맥주는 효모가 위쪽에 존재하여 상면발효와 비슷하지만, 야생 효모를 사용하는 것과 발효온도가 16℃ 정도인 차이가 있다 (Gonzalez Viejo et al., 2016). 휘발성 화합물은 맥주와 와인과 같은 발효음료에서 미량의 화합물이지만 향미 프로파일에 매우 중요한 물질이다 (Nykanen, L., and Suomalainen, H. 1983; Xue-qin Guan et al. 2019; Pallottino, F et al. 2019). 휘발성 화합물 중 가장 중요한 것은 단쇄지방산, 중쇄지방산, 고급알코올 그리고 에스터이다 (Pires, E. J. et al., 2015). 그 중 에스터는 발효 중에 생성된 에스터 농도에서만 결정되는 것이 아니라 효모의 종류, 온도, pH, 알코올 농도 (Suomalainen, H 1981), 효모 접종량 (Verbelen, P. J et al., 2009), 맥아 조성에 따라서도 달라진다 (He, Y., Dong et al., 2014; Ferreira, I., and Guido, L., 2018). 또 다른 휘발성 화합물인 고급 알코올 또한 맥아 조성, 효모 종류, 발효 조건에 의하여 영향을 받는다 (Procopio, S. et al., 2013; Kucharczyk, K. and Tuszynski, T., 2015). 그리고 고급 알코올은 에탄올을 제외하고 맥주의 일차 발효 동안 생성된 주요 휘발성 화합물으로 (Carlos A. Blanco et al., 2016), 이는 향기활성 에스터의 직접적인 전구체이므로 에스터의 최적 생산을 위해서는 고급알코올 형성을 제어해야 한다 (Goncalves, J. L. et al., 2014). 맥주 중 수제맥주는 2018년 2월 주세법 개정에 따라 마트와 슈퍼마켓, 편의점 등에서도 수제맥주의 유통이 가능하도록 정부의 규제가 완화되었고, 개성과 만족을 중시하는 가치소비를 중시하는 트렌드가 확산되어 수제맥주를 찾는 사람들이 늘어나게 되어 수제맥주 제조업

체가 2014년 54곳에서 2019년 119곳까지 증가하였다.

수제맥주와 람빅맥주에 대한 연구는 펄스너 스타일의 라거 크래프트 맥주를 특성화하기 위한 휘발성 성분 분석(Vanessa Giannetti et al., 2019), VIS/NIR 분광기를 이용한 발효 중인 수제맥주의 신속 품질 평가(Giovenzana, V. et al., 2014), 수제맥주 재발효의 분석적 측면에 선택된 *Saccharomyces cerevisiae* 균주의 지배력과 영향(Canonico, L. et al., 2014), 전통적인 자연발효 람빅맥주의 미생물 다양성(Spitaels, F. et al., 2014)에 대한 연구들이 보고되고 있다.

본 연구에서는 시중에 판매되고 있는 수제맥주와 람빅맥주에 존재하는 효모를 분리하여 그들의 당, 알코올 내성을 확인하였고, 유기산 분석, 휘발성 화합물 분석을 통해 특성을 연구해보았다.



II. 실험 재료 및 방법

1. 실험 재료 및 시약

맥주는 시중 판매되고 있는 부산지역의 수제맥주와 수입되고 있는 람빅맥주를 사용하여 실험을 진행하였다. 구입한 맥주들은 실험에 사용하기 전 냉장 보관하였다. HPLC 분석을 위하여 사용된 용매 acetonitrile과 water (Honeywell Burdick and Jackson, Muskegon, MI, USA)를 사용하였다. 표준 물질로 사용한 유기산은 analytical grade로 acetic acid (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), citric acid (Sigma-Aldrich), lactic acid (SUPELCO, Bellefonte, PA, USA)와 succinic acid (SUPELCO)를 사용하여 분석하였다. 배지는 YPD broth (Difco, Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA)와 YPD agar (Difco, Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA)를 사용하였다.

2. 수제맥주와 람빅맥주에서의 효모 분리 및 동정

효모의 분리 및 동정을 위해 수제맥주 및 람빅맥주를 YPD agar (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose, 1.5% agar, Difco) 배지에 3분 도말을 하여 25℃에서 2 ~ 5일 동안 배양하였다. 전형적인 집락이 발생하였을 때 콜로니를 크기, 모양, 색깔 등 형태학적 특징에 따라 분리한 뒤 순수한 단일균주를 확보하기 위해 YPD agar (Difco)에 다시 도말하는 과정을 3번에 걸쳐 진행하여 순수한 단일 균주를 분리하였다. 분리된 단일균주들은 crystal

violet (Liofilchem, Roseto degli Abruzzi, TE, Italia)을 이용하여 단 염색을 진행한 뒤 슬라이드 글라스에 고정시켜 현미경(Olympus CX23, Tokyo, Japan)을 이용하여 균주의 크기, 모양을 관찰하여 효모로 추정되는 균주들을 선별하였다. 분리된 균주는 YPD broth (Difco)에 배양한 뒤, glycerol 함유량을 70%로 하여 cryogenic vial (Treuline, Portlandm OR, USA)에 넣은 뒤 -80℃에서 보관하여 실험에 사용하였다.

선별된 효모들의 동정을 위해 (주)바이오닉스(Seoul, Korea)에 의뢰를 하여 25s ~ 28s rRNA의 D1/D2 영역의 염기서열을 분석하였다. 프라이머로는 NL1 (5'-GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG-3')과 NL4 (5'-GGT CCG TGT TTC AAG ACG G-3')를 사용하였으며 Sanger method 방식의 high throughput DNA analyzer를 사용하여 염기서열을 분석하였다. 그 후 분석된 염기서열을 NCBI의 BLAST를 사용하여 상동성을 비교하였다.

3. 수제맥주와 람빅맥주에서 분리한 효모의 당, 알코올 내성

당 내성은 YPD broth (Difco)에 포도당 농도가 10, 20, 30, 40% 되도록 당을 첨가한 뒤 배양한 효모들을 각 배지들의 1%에 해당되는 양을 접종하여 인큐베이터에서 25℃로 배양하면서 12시간 주기로 Epoch 2 microplate reader (BioTek, Winooski, VT, USA)를 이용하여 660 nm에서 흡광도를 측정하여 당 내성을 확인하였다. 이 때 대조구로 2%의 포도당 농도를 가지는 YPD broth (Difco)를 사용하였다.

알코올 내성의 경우 대조군은 에탄올을 첨가하지 않은 것을 사용하였으며 YPD broth (Difco)에 에탄올을 첨가하여 4, 8, 12, 16%의 농도로 만들어 효모를 접종한 뒤 마찬가지로 660 nm 흡광도를 측정하여 알코올 내성을 확인

하였다.

4. 당화액 제조 및 분리된 효모의 발효액 제조

효모에 의한 알코올 발효 특성을 알아보기 위하여 당화액은 비어스쿨 (Seoul, Korea)에서 dry malt extract (Kingbee biotechnology, Shanghai, China)를 구매하여 제조하였다. 먼저 dry malt 13 g당 증류수 100 mL를 첨가한 뒤 autoclave로 121℃에서 15분간 멸균시킨 뒤 여과지를 사용하여 거르고 상온까지 식혀서 배양에 사용되었다. 분리하여 냉동 보관된 효모 1 mL를 YPD borth (Difco) 50 mL에 접종하고, 30℃에서 3일간 배양한 뒤 660 nm에서 흡광도를 0.8 ± 0.05 로 맞추었다. 제조한 당화액 100 mL의 1%에 해당되는 효모 배양액 1 mL를 접종하여 25℃에서 5일간 정치배양 하여 알코올 발효액을 제조한 뒤 상층액을 분석시료로 사용하였다.

5. 분리된 효모로 제조한 발효액의 이화학 분석

고형분 함량은 당도계(ATAGO Master 53a, ATAGO Co. LTD., Tokyo, Japan)을 사용하여 측정하였으며 pH는 ORION 3 STAR (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 이용하여 측정하였다. 적정산도는 시료 3 mL에 1% phenolphthalein 2 ~ 3방울을 떨어뜨린 뒤 증류수를 약 50 mL 첨가한 뒤에 0.1 N NaOH로 중화 적정 하였으며 소비된 NaOH의 양을 acetic acid(%)로 환산하였다. 알코올 함량은 시료 100 mL를 가열한 뒤 증류액은 70 mL 정도까지 받은 후에 증류수를 사용하여 100 mL로 정용하였다. 온도계를 사용하여 온도를 측정한 뒤 주정계 AL-21a (ATAGO Co. LTD., Tokyo, Japan)를 사용하여 값을 읽은 후 온도 보정표를 사용하여 보정하였

다. 이화학적 특성 분석 후 알코올 발효균주를 선정하여 유기산과 휘발성 화합물 분석을 진행하였다.

6. HPLC를 이용한 알코올 발효액의 유기산 분석

유기산 분석을 위해 당화액에 효모를 접종한 뒤 25℃에서 5일간 발효를 시킨 뒤 분석하였다. 먼저 시료 1.5 mL를 10,000 rpm에서 10분간 원심분리 후, 상등액을 취하여 당을 제거하기 위해서 Hypersep Amino Spe column (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 acetonitrile (Honeywell)과 water (Honeywell)를 사용하여 컨디셔닝 후 사용하였다. 그 다음 0.20 μ m membrane filter (Toyo Roshi Kaisha, Ltd., Tokyo, Japan)로 여과 후, HPLC (U-3000, Thermo Fisher Scientific Inc., MA., USA)로 분석하였다. 유기산 분석을 위한 HPLC 조건은 Table 1과 같았다. 이동상은 acetonitrile : 0.5% metaphosphoric acid를 6 : 4 비율로 하여 isocratic elution으로 분석하였다.

7. 알코올 발효액의 휘발성 화합물 분석

휘발성 화합물 분석은 GC-MS를 사용하여 분석하였다. 시료 3 mL를 Amber Screw Cap Bottles (Supelco)에 담아 dry oven 50℃에서 30분 방치 후 시료채취용 진공펌프 VPC-10 (Shimadzu Co., Kyoto, Japan)을 사용하여 흡착튜브(APK Sorbent Tube, KNR Co., Ltd., Korea)에 5분 동안 흡착시켰다. 분석은 자동열탈착기인 TurboMatrix 650 ATD (Perkin Elmer, Santa Clara, CA, USA)와 GC-MS-TQ8050 (Shimadzu, Co., Kyoto, Japan)을 사용하여 분석하였다. 분석을 위한 GC 조건은 다음의 Table 2에 나타내었다. 사

Table 1. HPLC Condition for the analysis of organic acid content

Condition		
Column	Model	Acclaim™ 120
	Size	4.6 × 250 mm
	Particle size	5 μm
	Flow rate	0.7 mL/min
Analysis Condition	Oven temp.	25°C
	UV detector	210 nm
	Injection Quantity	7 μL

Table 2. GC-MS Condition for the analysis of volatile compounds

Condition	
Column	Model AT-1 capillary column
	Size 60 m × 0.32 mm
	Particle size 1.0 μm
Analysis Condition	Interface temp. 250°C
	Oven program. 35°C (10 min) → 8°C/min → 120°C (10 min) → 12°C/min → 180°C (7 min) → 15°C/min → 230°C (10 min)
	Carrier gas He (1.0 mL/min)
	Sampler temp. 25°C
	Flow rate 1.0 mL/min
	Split ratio Split mode

용된 column은 AT-1 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)이고, carrier gas로 헬륨을 사용하였다.

8. 통계처리

통계처리는 Minitab (R17)을 이용하였으며, one way ANOVA 분석을 통해 95% 신뢰 구간에서 Fisher 쌍별 비교를 이용하여 유의적인 차이를 확인하였다.



Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 수제맥주와 람빅맥주에서 분리한 효모 동정 결과

선정한 맥주에서 YPD agar (Dfico)를 이용하여 콜로니의 형태학적 특성에 따라 균을 순수분리하고 현미경을 사용하여 관찰한 뒤 효모로 추정되는 것들을 Fig. 1 ~ 2에 나타내었다. 분리한 균들의 크기는 5 ~ 15 μm 정도이고 효모의 대표적인 번식방법인 출아법을 관찰할 수 있었다. 동정한 결과는 다음의 Table 3에 나타내었다. CB-2, CB-4, CB-5, CB-7, CB-8, CB-10은 *S. cerevisiae*로 동정되었으며 구형 또는 단난형의 형태를 가지며 세포의 여러 곳에서 출아가 일어나는 무성생식 중 출아법의 한 방법인 다극출아의 형태를 볼 수 있었다. CB-3과 CB-9는 *Pichia manshurica*, CB-1은 *Pichia membranifaciens*로 동정되었고 난형 또는 타원구형의 형태를 볼 수 있었으며 다극출아의 특징이 있었다. 또한 이들을 액체 배양하였을 때 산막효모인 *Pichia* spp.의 대표적인 특징인 액면에 피막상의 균체를 형성하였다. LA-1, LA-2와 LA-3는 *Brettanomyces bruxellensis*로 동정되었으며 다른 효모에 비해 크기가 작으며 침두타원형의 형태를 지니며 다극출아가 관찰되었다.

2. 수제맥주와 람빅맥주에서 분리한 효모의 당, 알코올 내성

분리한 *S. cerevisiae* 6종, *P. manshurica* 2종, *P. membranifaciens* 1종, *B. bruxellensis* 3종을 당, 알코올을 첨가하여 원하는 농도로 맞춘 YPD broth

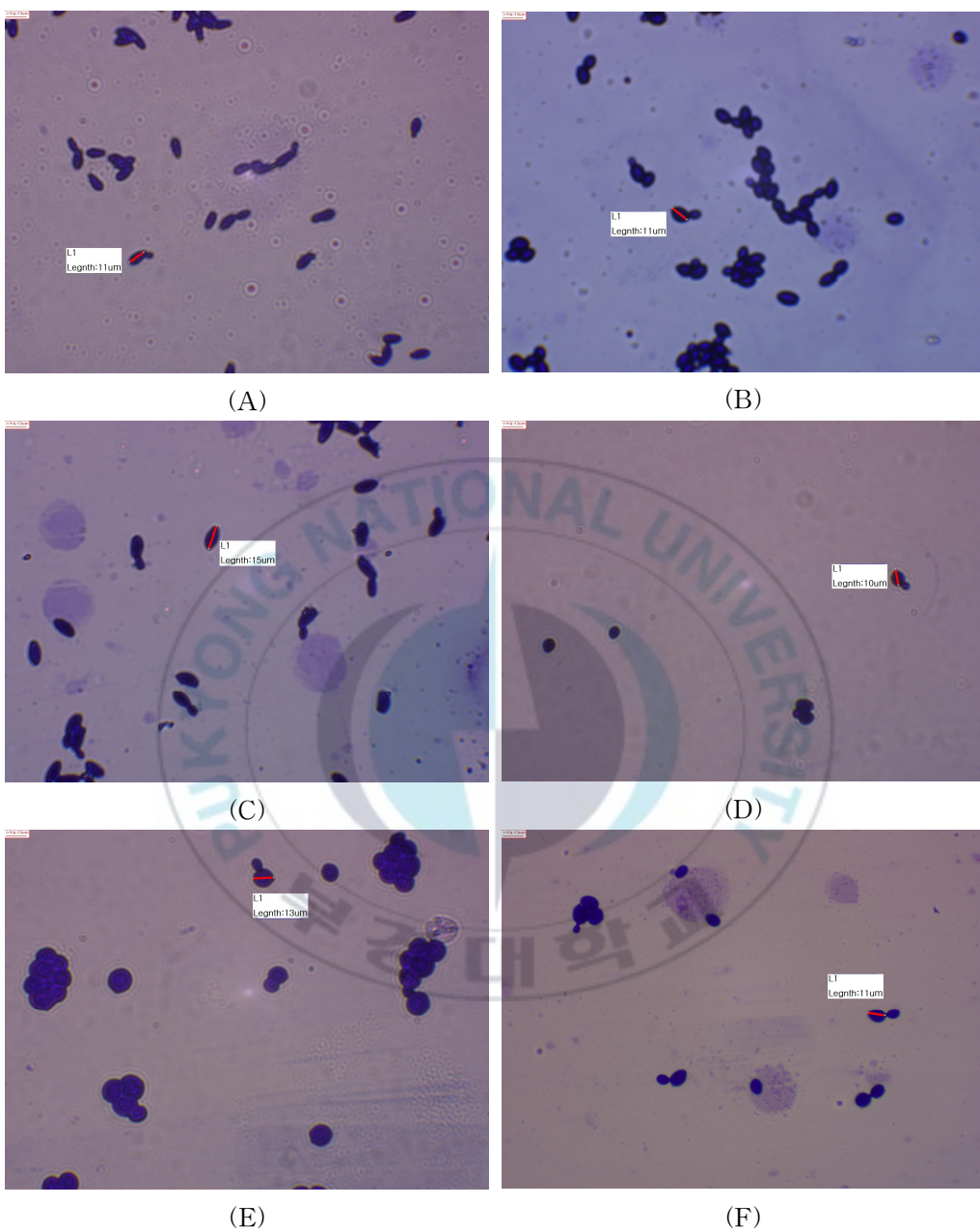


Fig. 1. Micrograph of CB-1 (A), CB-2 (B), CB-3 (C), CB-4 (D), CB-5 (E), CB-7 (F) isolated form craft beer.

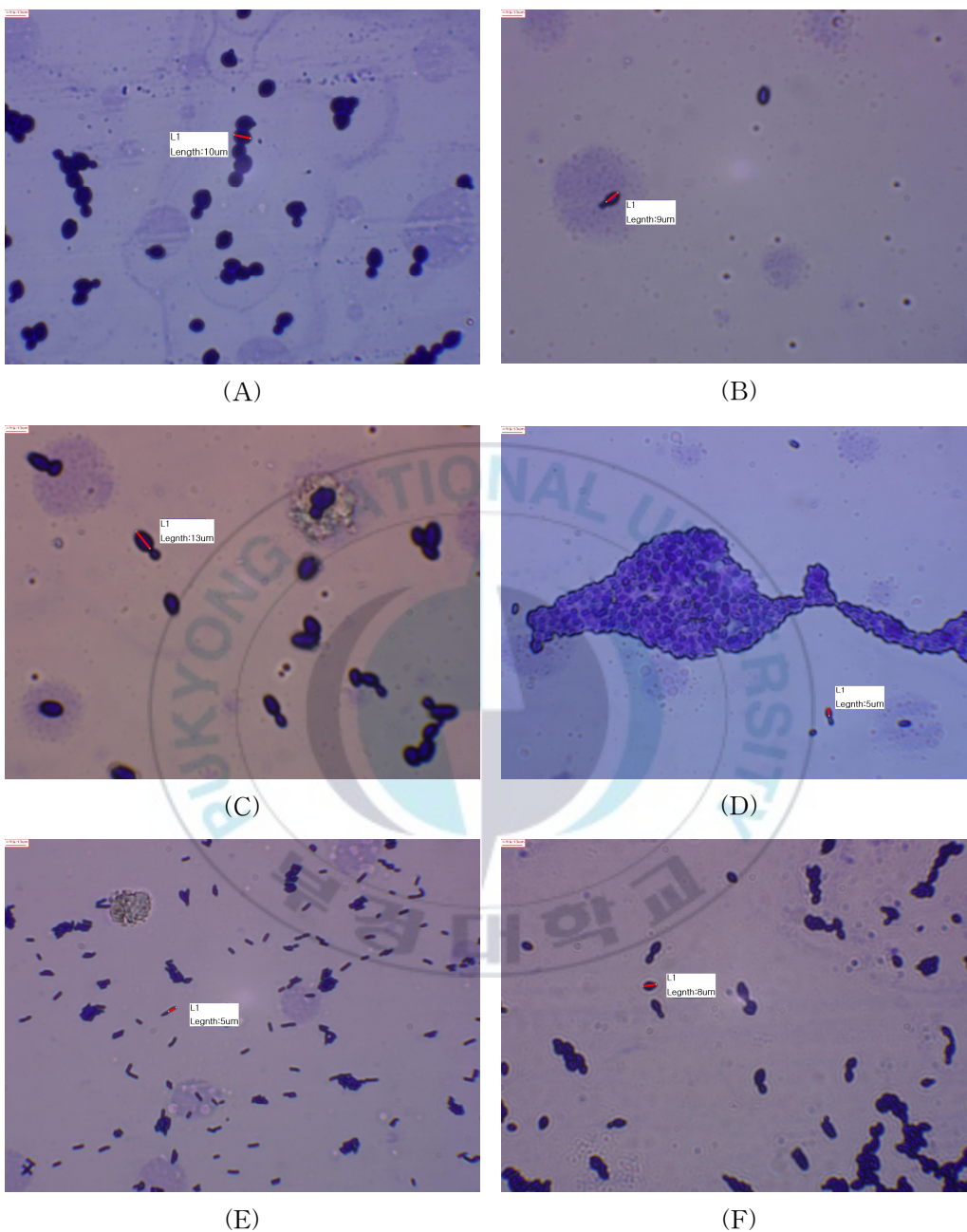


Fig. 2. Micrograph of CB-8 (A), CB-9 (B), CB-10 (C), LA-1 (D), LA-2 (E) and LA-3 (F) isolated from craft beer and lambic beer.

Table 3. Identification results of yeast isolated from craft beer and lambic beer

Code	Strains
CB-1	<i>Pichia membranifaciens</i>
CB-2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
CB-3	<i>Pichia manshurica</i>
CB-4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
CB-5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
CB-7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
CB-8	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
CB-9	<i>Pichia manshurica</i>
CB-10	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
LA-1	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>
LA-2	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>
LA-3	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>

(Difco)에 접종하여 192시간까지 12시간 단위로 흡광도를 측정해본 결과는 다음의 Fig. 3 ~ 14에 나타내었다. 먼저 Fig. 3은 CB-1의 당, 알코올 내성을 나타낸 것으로 당 내성의 경우, glucose 2%에서 가장 높은 생육을 보였으며 농도가 높아질수록 생육이 떨어졌으며 glucose 40%에서는 생육정도가 다른 농도에 비해 낮았지만 조금씩 상승하는 경향을 보였다. 알코올에 대한 내성은 8%로 확인하였으며 12%에서는 생육을 하지만 그 수치가 저조하였고 16%에서는 생육을 하지 못하였다. Fig. 4는 CB-2에 대한 것으로 glucose 40%까지 생육이 원활하였으며 glucose 2%에서는 초기 생육속도가 가장 빠르지만 36시간 이후로는 생육이 정지하였다. 알코올 내성은 8%까지는 원활하게 생육하였으며 12%에서는 비교적 느리긴 하지만 내성이 있음을 확인할 수 있었다. Fig. 5는 CB-3의 당, 알코올 내성을 나타낸 것으로 glucose 농도가 높아질수록 생육이 떨어지는 것을 확인할 수 있었으며 가장 생육이 활발한 것은 2%이고 40%에서는 생육을 하지 못하였다. 알코올 내성의 경우 156시간까지 알코올이 4% 첨가되었을 때 첨가하지 않은 것보다 오히려 생육이 좋은 것을 확인할 수 있었으며 알코올 8%까지 내성을 가지며 그보다 높은 농도에서는 생육을 하지 못하였다. Fig. 6은 CB-4에 대한 그래프로 glucose 40%에서도 생육이 원활했으며 36시간 이후에는 glucose 2%보다 높은 생육을 보였다. 알코올 내성은 12%까지 있으며 4%, 8%는 급격하게 성장하는 반면 12%에서는 상대적으로 완만한 성장을 보였다. Fig. 7과 Fig. 8은 CB-5, CB-7에 대한 결과로 두 균주 모두 40%까지 당 내성을 가지며 glucose 2%에서는 36시간 이후 생장이 변하지 않는 반면 다른 농도에서는 72시간 까지도 생육하는 것으로 나타났다. 알코올 내성은 8%까지 가지며 alcohol 4%의 경우 CB-5, CB-7이 36시간에 생육이 포화가 되었으며 alcohol 8%의 경우 CB-5는 84시간에, CB-7은 72시간에 포화가 되었다. Fig. 9와 Fig. 11은 각각 CB-8, CB-10의 당, 알코올 내성을 나타낸 그래프로 CB-4와 당, 알코올 내

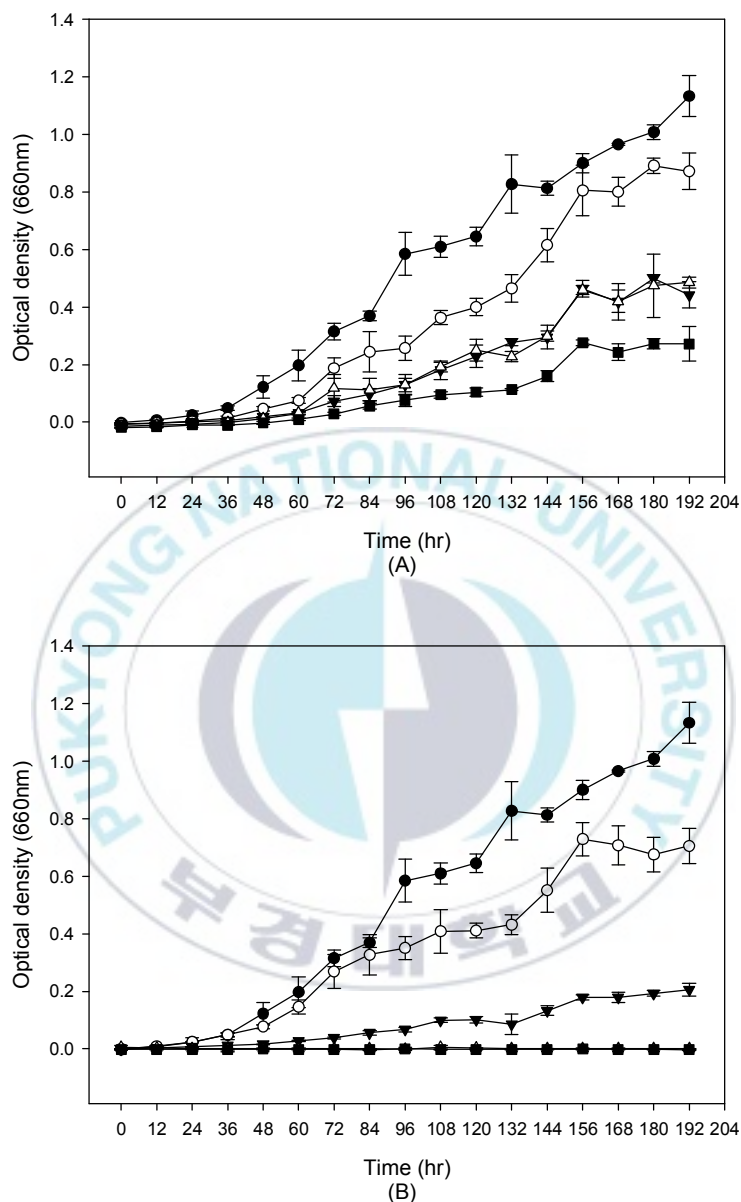


Fig. 3. Glucose tolerance(A) and ethanol tolerance(B) of CB-1. The data were averaged after three experiments. (A) ●, glucose 2% ; ○, glucose 10% ; ▼, glucose 20% ; △, glucose 30% ; ■, glucose 40%. (B) ●, alcohol 0% ; ○, alcohol 4% ; ▼, alcohol 8% ; △, alcohol 12% ; ■, alcohol 16%.

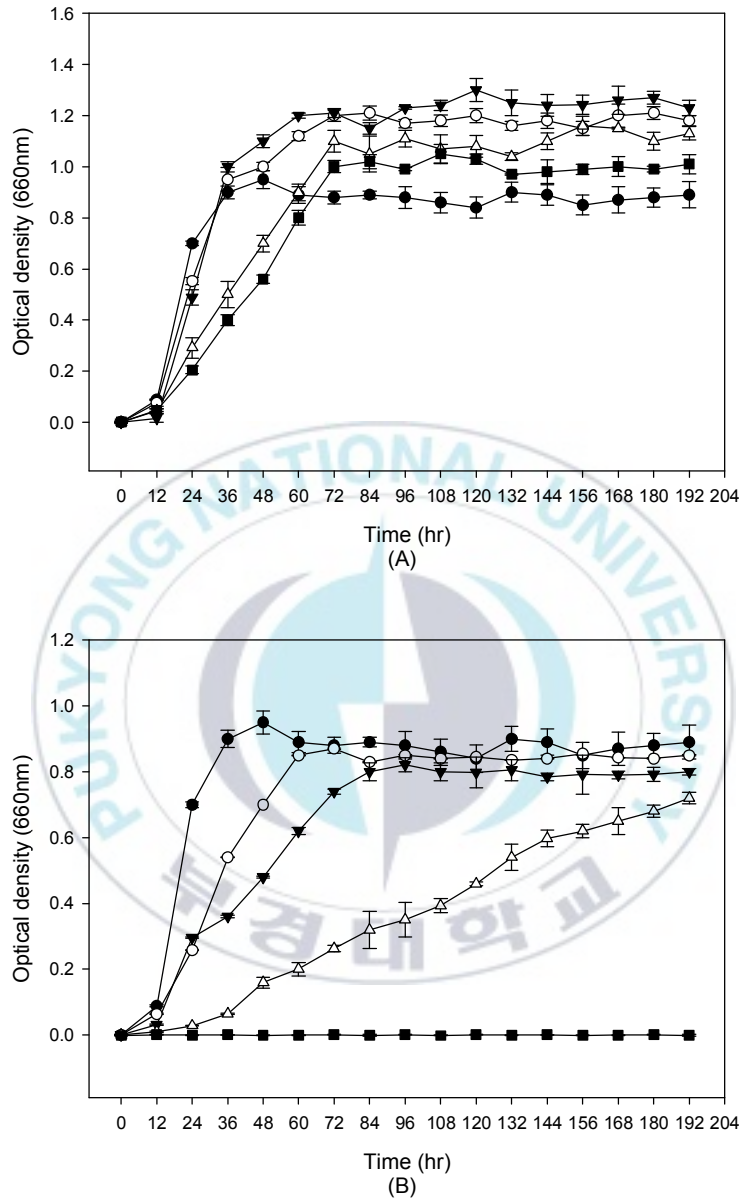


Fig. 4. Glucose tolerance(A) and ethanol tolerance(B) of CB-2. The data were averaged after three experiments. (A) $\bullet$, glucose 2% ; $\circ$, glucose 10% ; $\blacktriangledown$, glucose 20% ; $\triangle$, glucose 30% ; $\blacksquare$, glucose 40%. (B) $\bullet$, alcohol 0% ; $\circ$, alcohol 4% ; $\blacktriangledown$, alcohol 8% ; $\triangle$, alcohol 12% ; $\blacksquare$, alcohol 16%.

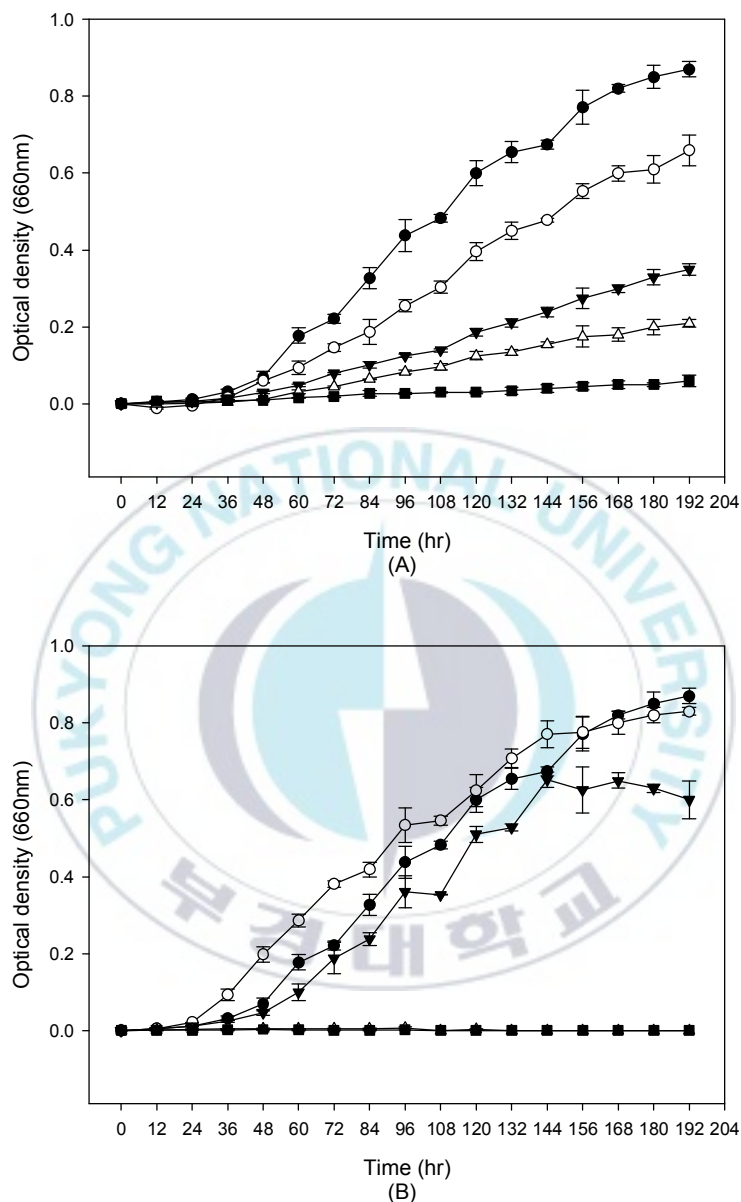


Fig. 5. Glucose tolerance(A) and ethanol tolerance(B) of CB-3. The data were averaged after three experiments. (A) —●—, glucose 2% ; —○—, glucose 10% ; —▼—, glucose 20% ; —△—, glucose 30% ; —■—, glucose 40%. (B) —●—, alcohol 0% ; —○—, alcohol 4% ; —▼—, alcohol 8% ; —△—, alcohol 12% ; —■—, alcohol 16%.

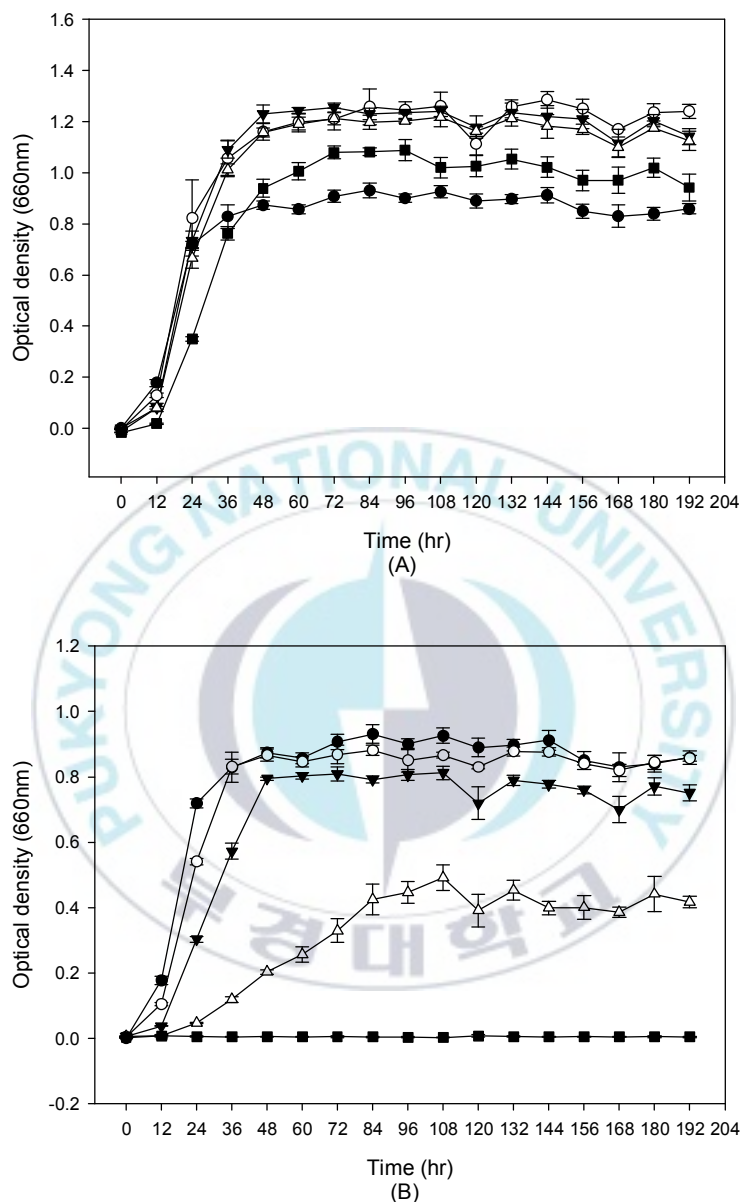


Fig. 6. Glucose tolerance(A) and ethanol tolerance(B) of CB-4. The data were averaged after three experiments. (A) ●, glucose 2% ; ○, glucose 10% ; ▼, glucose 20% ; △, glucose 30% ; ■, glucose 40%. (B) ●, alcohol 0% ; ○, alcohol 4% ; ▼, alcohol 8% ; △, alcohol 12% ; ■, alcohol 16%.

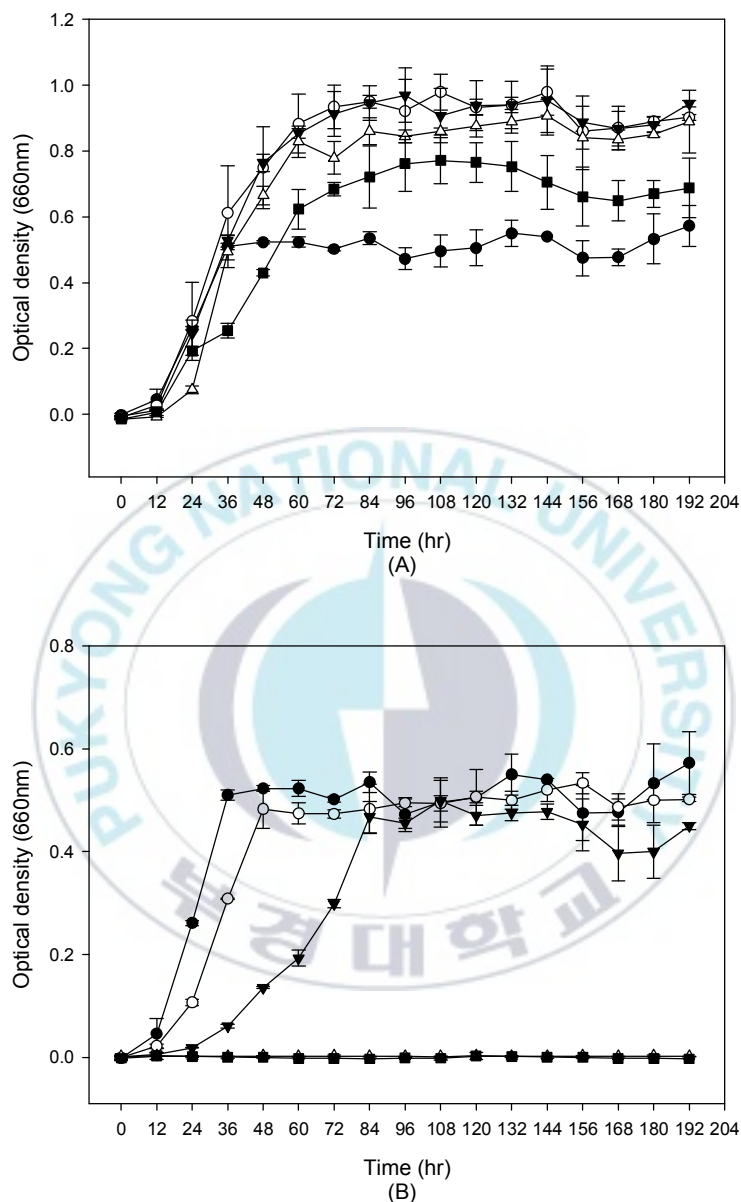


Fig. 7. Glucose tolerance(A) and ethanol tolerance(B) of CB-5. The data were averaged after three experiments. (A) ●, glucose 2% ; ○, glucose 10% ; ▼, glucose 20% ; △, glucose 30% ; ■, glucose 40%. (B) ●, alcohol 0% ; ○, alcohol 4% ; ▼, alcohol 8% ; △, alcohol 12% ; ■, alcohol 16%.

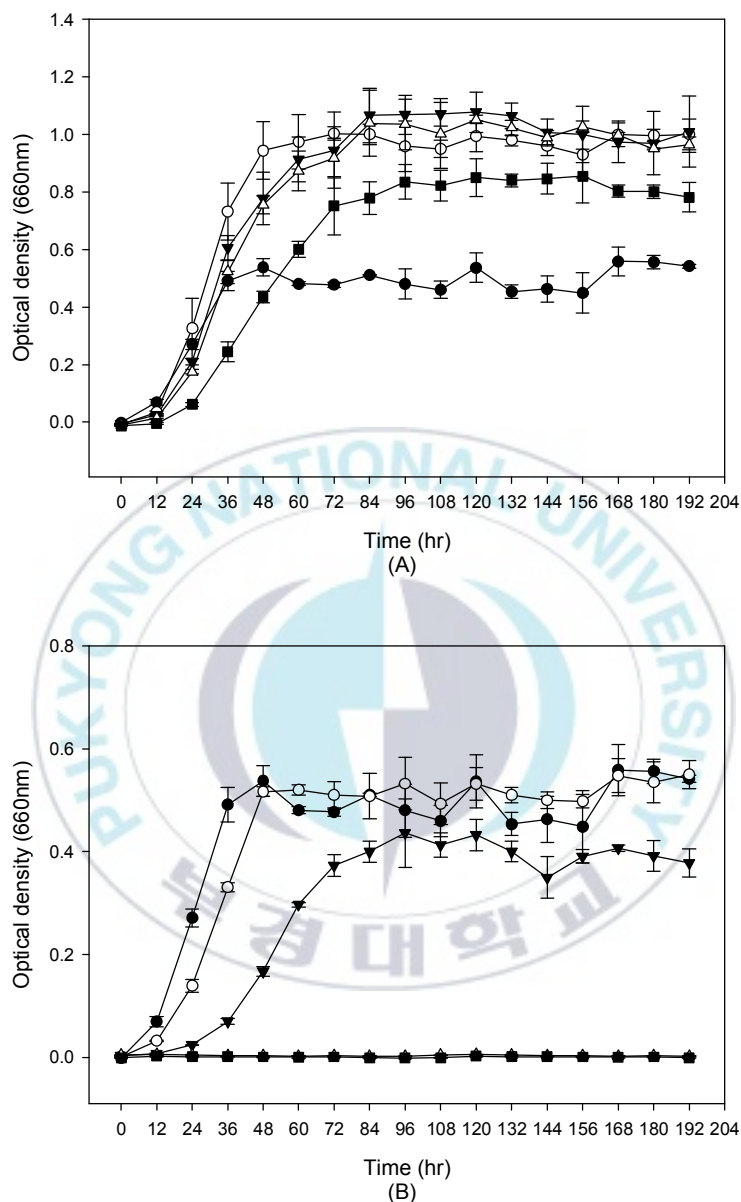


Fig. 8. Glucose tolerance(A) and ethanol tolerance(B) of CB-7. The data were averaged after three experiments. (A) ●, glucose 2% ; ○, glucose 10% ; ▼, glucose 20% ; △, glucose 30% ; ■, glucose 40%. (B) ●, alcohol 0% ; ○, alcohol 4% ; ▼, alcohol 8% ; △, alcohol 12% ; ■, alcohol 16%.

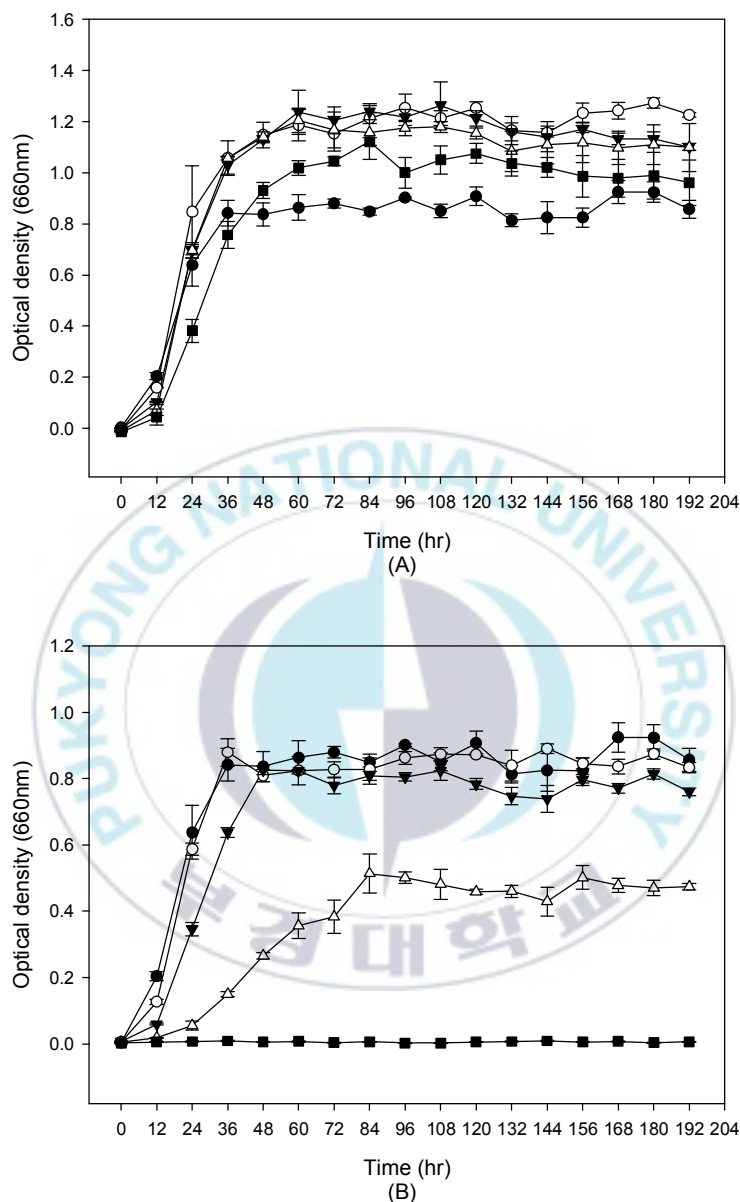


Fig. 9. Glucose tolerance(A) and ethanol tolerance(B) of CB-8. The data were averaged after three experiments. (A) ●, glucose 2% ; ○, glucose 10% ; ▼, glucose 20% ; △, glucose 30% ; ■, glucose 40%. (B) ●, alcohol 0% ; ○, alcohol 4% ; ▼, alcohol 8% ; △, alcohol 12% ; ■, alcohol 16%.

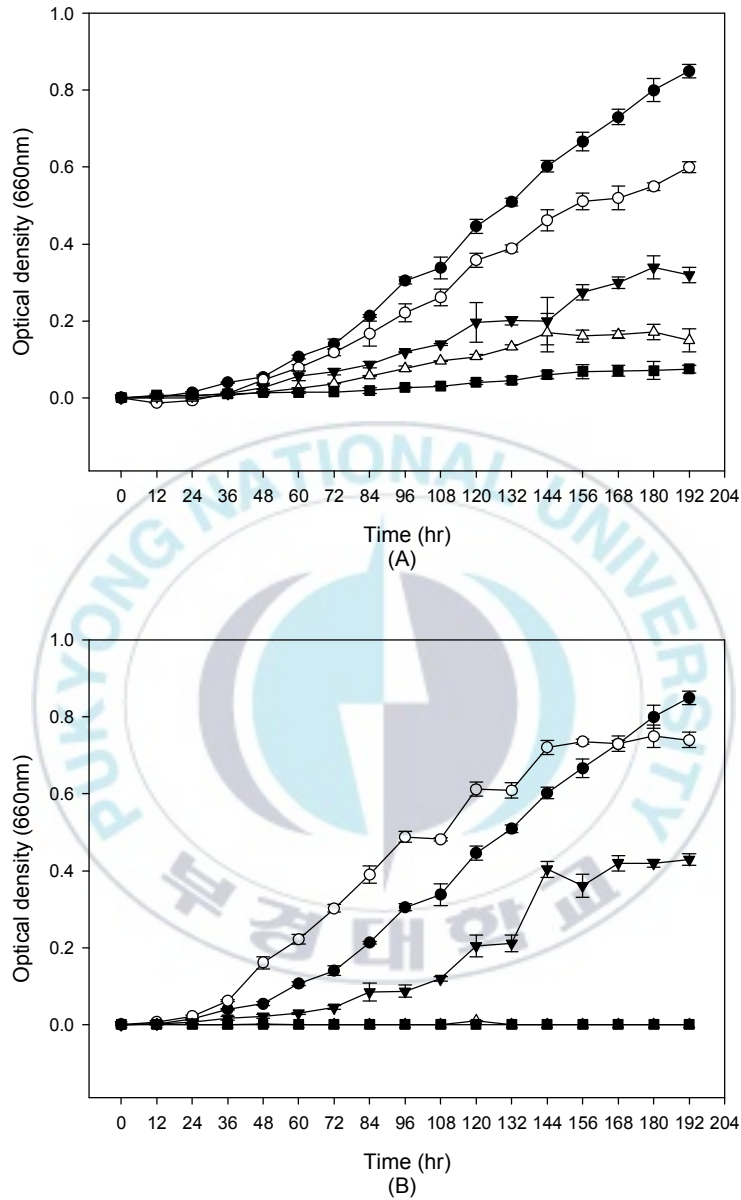


Fig. 10. Glucose tolerance(A) and ethanol tolerance(B) of CB-9. The data were averaged after three experiments. (A) —●—, glucose 2% ; —○—, glucose 10% ; —▼—, glucose 20% ; —△—, glucose 30% ; —■—, glucose 40%. (B) —●—, alcohol 0% ; —○—, alcohol 4% ; —▼—, alcohol 8% ; —△—, alcohol 12% ; —■—, alcohol 16%.

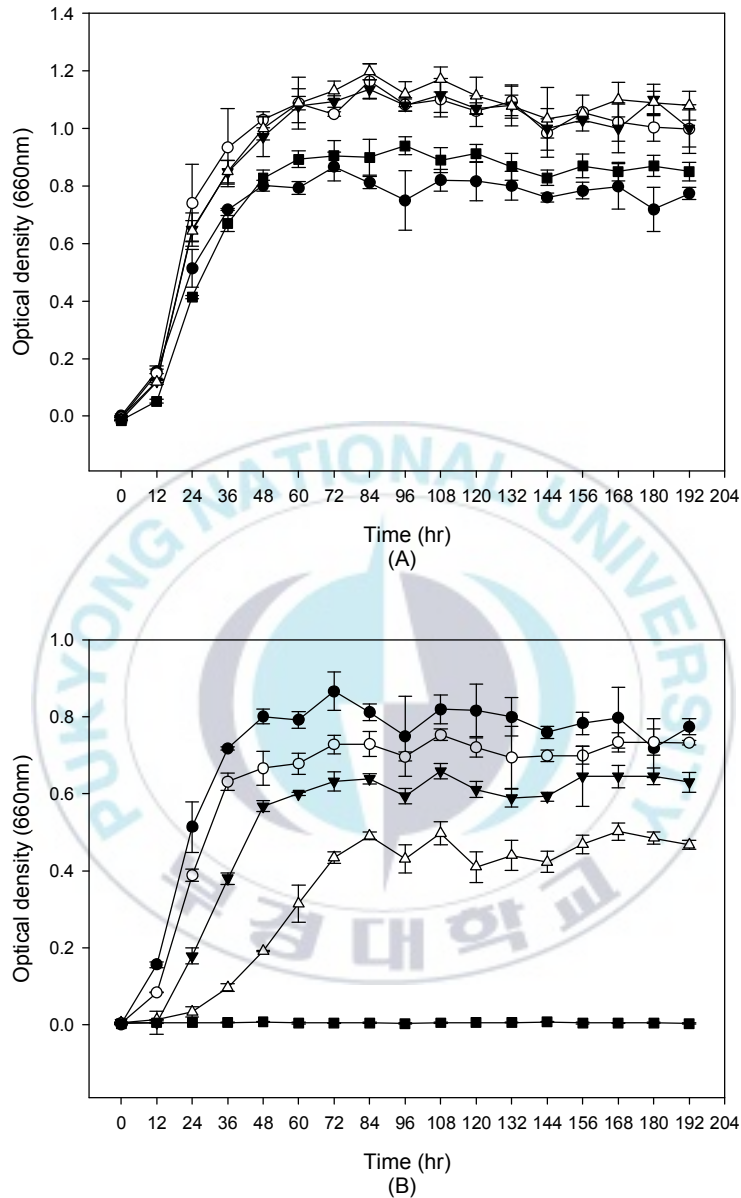


Fig. 11. Glucose tolerance(A) and ethanol tolerance(B) of CB-10. The data were averaged after three experiments. (A) ●, glucose 2% ; ○, glucose 10% ; ▼, glucose 20% ; △, glucose 30% ; ■, glucose 40%. (B) ●, alcohol 0% ; ○, alcohol 4% ; ▼, alcohol 8% ; △, alcohol 12% ; ■, alcohol 16%.

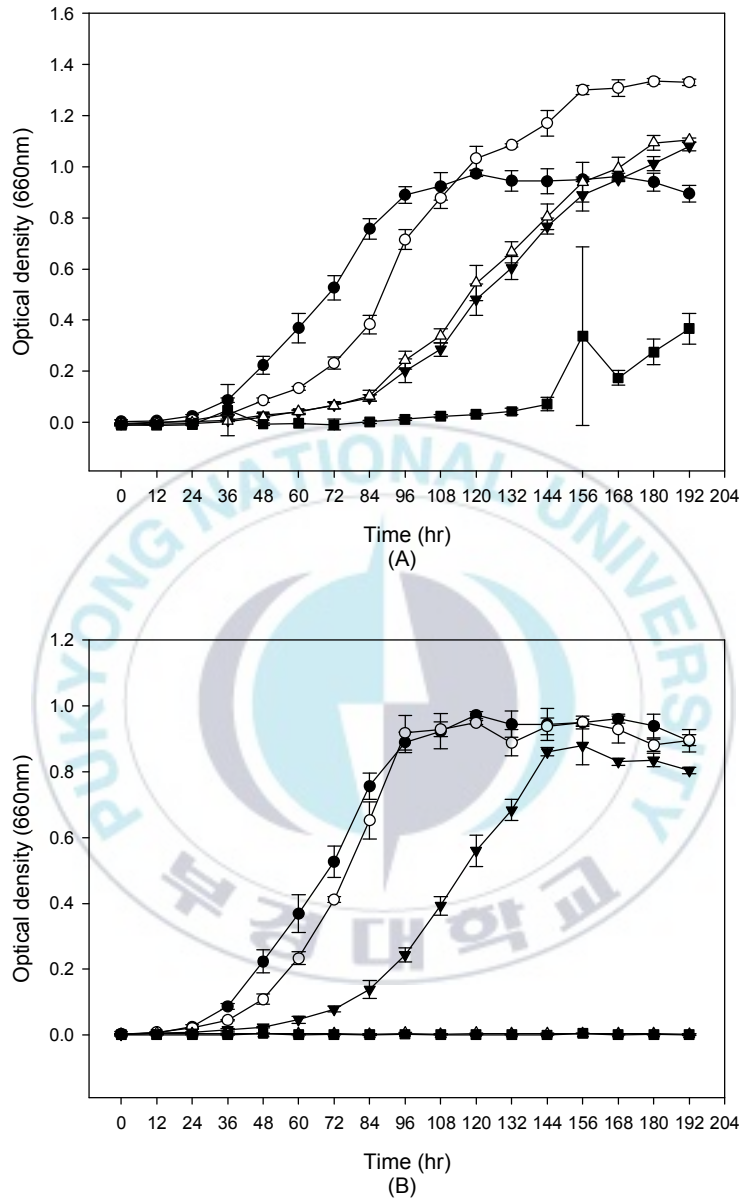


Fig. 12. Glucose tolerance(A) and ethanol tolerance(B) of LA-1. The data were averaged after three experiments. (A) ●, glucose 2% ; ○, glucose 10% ; ▼, glucose 20% ; △, glucose 30% ; ■, glucose 40%. (B) ●, alcohol 0% ; ○, alcohol 4% ; ▼, alcohol 8% ; △, alcohol 12% ; ■, alcohol 16%.

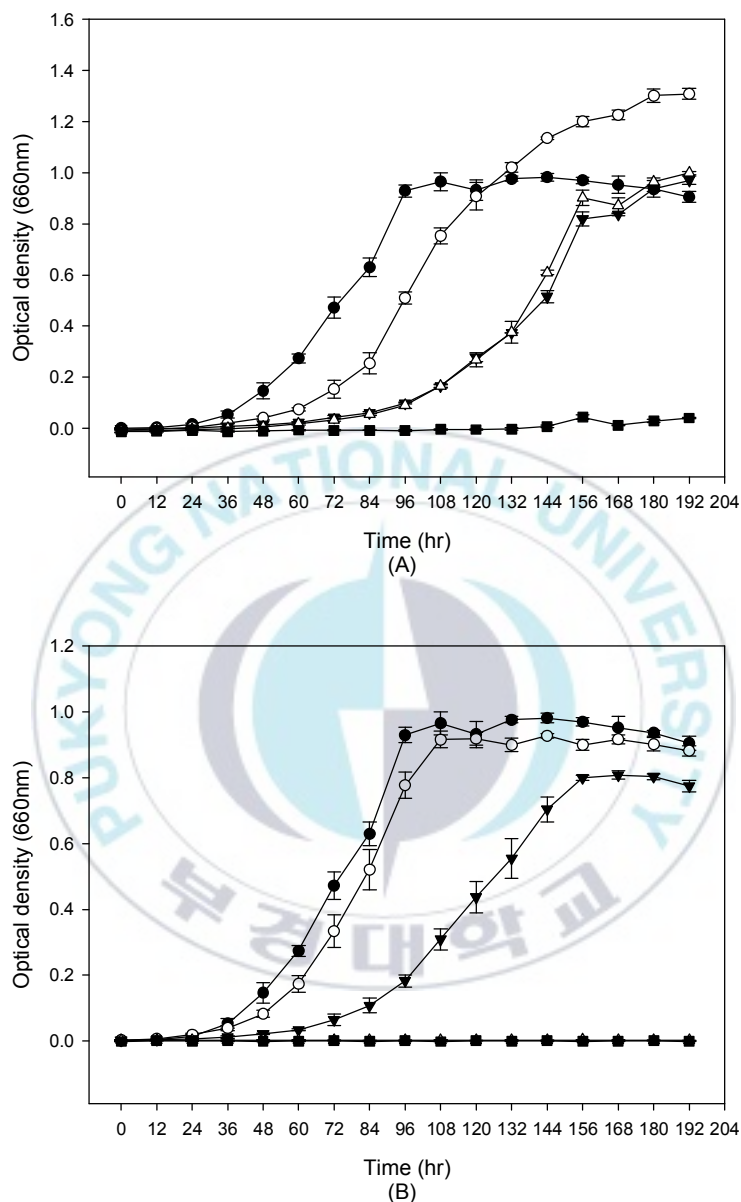


Fig. 13. Glucose tolerance(A) and ethanol tolerance(B) of LA-2. The data were averaged after three experiments. (A) ●, glucose 2% ; ○, glucose 10% ; ▼, glucose 20% ; △, glucose 30% ; ■, glucose 40%. (B) ●, alcohol 0% ; ○, alcohol 4% ; ▼, alcohol 8% ; △, alcohol 12% ; ■, alcohol 16%.

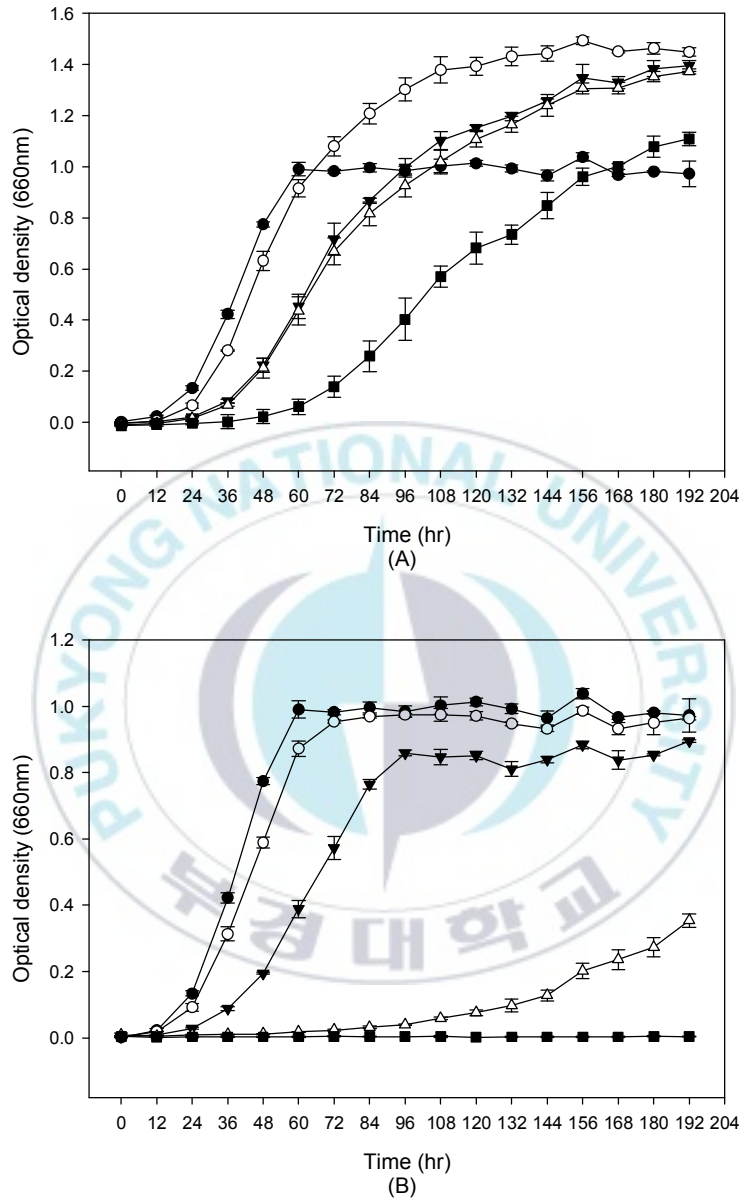


Fig. 14. Glucose tolerance(A) and ethanol tolerance(B) of LA-3. The data were averaged after three experiments. (A) ●, glucose 2% ; ○, glucose 10% ; ▼, glucose 20% ; △, glucose 30% ; ■, glucose 40%. (B) ●, alcohol 0% ; ○, alcohol 4% ; ▼, alcohol 8% ; △, alcohol 12% ; ■, alcohol 16%.

성이 비슷한 경향을 보이며 마찬가지로 당 40%, 알코올 12%까지 내성을 가진다. Fig. 10은 CB-9를 나타낸 것으로 CB-3의 당, 알코올 내성과 유사하게 나왔으며 glucose 20%부터 생육이 현저하게 낮아졌으며 알코올 내성은 8%까지 가지는 것을 확인되었다. Fig. 12와 13은 LA-1, LA-2의 당, 알코올 내성을 나타낸 그래프로 LA-1의 경우 glucose 10%일 때 가장 높은 성장을 보였고, glucose 30%까지 원활한 성장을 보였으며 glucose 40%에서는 144시간 이후 조금씩 성장하는 모습을 보였다. LA-2는 glucose 10, 20, 30%는 LA-1과 비슷한 경향을 보였지만 glucose 40%에서는 생육을 하지 못하였다. 알코올 내성의 경우 LA-1과 LA-2는 모두 alcohol 8%까지 내성을 가지는 것으로 나타났다. Fig. 14는 LA-3의 당, 알코올 내성으로 glucose 40%까지 생육이 원활하였으며 glucose 2%의 경우 60시간 이후부터는 생육이 정지하는 것을 확인할 수 있었다. 알코올 내성은 alcohol 8%까지 원활한 생육을 보이며 alcohol 12%에서는 96시간 이후부터 조금씩 생육하였다.

3. 분리된 효모로 제조한 발효액의 이화학 분석

만들어진 당화액과 당화액에 효모를 1%를 접종시킨 뒤 25℃에서 5일간 발효 시킨 뒤의 당도, pH, 산도, 알코올 도수는 다음 Table 4에 나타내었다. 제조된 당화액의 당도는 13 °brix, pH는 5.26, 산도는 0.116%로 측정되었다. *Saccharomyces* 속은 당도가 7.2 ~ 8.5 °brix로 나타났으며, CB-10 효모가 가장 낮았으며 CB-7 효모가 가장 높게 나타났다. *Brettanomyces* 속은 10 ~ 11.2 °brix로 LA-3 효모가 가장 낮았으며 LA-1이 가장 높았지만 LA-2와 유의적인 차이를 보이지 않았으며, *Pichia* 속은 당도가 12 °brix로 나타났다. *Saccharomyces* 속이 다른 효모보다 낮은 당도를 나타내었고, 이는 *S. cerevisiae* 효모가 당을 이용하여 알코올 발효를 활발히 진행하여 감소한

Table 4. Chemical properties of alcohol fermentation with different yeasts

Yeast strains		Sugar contents (°Brix)	pH	Titrateable acidity (%)	Alcohol (%)
Medium	⁻¹⁾	13.0±0.2 ^{2)a}	5.26±0.06 ^b	0.116±0.006 ^c	–
CB-1	<i>P. membranifaciens</i>	12.0±0.5 ^b	5.39±0.03 ^a	0.115±0.010 ^c	–
CB-2	<i>S. cerevisiae</i>	8.0±0.3 ^e	4.52±0.12 ^{f,g}	0.164±0.015 ^a	3.4±0.2 ^c
CB-3	<i>P. manshurica</i>	12.0±0.5 ^b	5.20±0.06 ^b	0.113±0.008 ^c	–
CB-4	<i>S. cerevisiae</i>	8.2±0.2 ^e	4.55±0.04 ^{e,f}	0.140±0.012 ^b	3.6±0.2 ^c
CB-5	<i>S. cerevisiae</i>	8.0±0.4 ^e	4.45±0.02 ^g	0.151±0.010 ^{a,b}	3.0±0.3 ^d
CB-7	<i>S. cerevisiae</i>	8.5±0.2 ^e	4.63±0.05 ^{d,e}	0.134±0.008 ^b	3.0±0.4 ^d
CB-8	<i>S. cerevisiae</i>	8.0±0.3 ^e	4.49±0.04 ^{f,g}	0.147±0.014 ^{a,b}	4.0±0.2 ^b
CB-9	<i>P. manshurica</i>	12.0±0.4 ^b	5.26±0.06 ^b	0.115±0.009 ^c	–
CB-10	<i>S. cerevisiae</i>	7.2±0.2 ^f	4.64±0.04 ^{d,e}	0.149±0.010 ^{a,b}	4.8±0.3 ^a
LA-1	<i>B. bruxellensis</i>	11.3±0.2 ^c	4.75±0.02 ^c	0.138±0.011 ^b	0.8±0.3 ^f
LA-2	<i>B. bruxellensis</i>	11.2±0.2 ^c	4.72±0.05 ^{c,d}	0.140±0.008 ^b	1.0±0.2 ^f
LA-3	<i>B. bruxellensis</i>	10.0±0.4 ^d	4.64±0.04 ^{d,e}	0.147±0.013 ^{a,b}	1.6±0.2 ^e

¹⁾ – means “not detected”.

²⁾ Results are mean ± standard deviations of three independent experiments. Same letter in the column are not significantly different at the 5% level. (p<0.05).

것으로 보인다. pH는 *Saccharomyces* 속의 경우 4.45 ~ 4.64로 나타났고, CB-5가 가장 낮았으며 CB-10이 가장 높았다. *B. bruxellensis* 속은 4.64 ~ 4.75로 LA-3이 가장 낮았고 LA-1과 LA-2는 유의적인 차이를 보이지 않았다. *Pichia* 속의 pH는 5.20 ~ 5.39로, *P. membranifaciens*는 증가하였으며, *P. manshurica*는 맥아즙과 유의적인 차이를 나타내지 않았다. *S. cerevisiae* 효모의 적정 산도는 0.134 ~ 0.164%로 나타났으며 CB-7이 가장 낮았으며 CB-2가 가장 높았다. *B. bruxellensis* 속은 0.138 ~ 0.147%로, LA-1이 가장 낮았으며 LA-3이 가장 높지만, 유의적인 차이를 나타내지 않았다. *Pichia* 속은 0.113 ~ 0.115%로 맥아즙과 유의적인 차이는 없었다. 알코올 생성능 비교 결과 *Saccharomyces* 속이 3.0 ~ 4.8%로 CB-5와 CB-7이 가장 낮았으며, CB-10이 가장 높은 함량을 나타내었고, 다른 연구에서의 알코올 함량과 유사하였다(Guido et al., 2004). *B. bruxellensis* 속의 경우에는 0.8 ~ 1.6% 함량을 나타내었으며 LA-1이 가장 낮고 LA-3이 가장 높은 함량을 나타내었고, *Pichia* 속은 알코올 함량이 0%였다.

4. 알코올 발효액의 유기산 분석 결과

유기산 분석 결과는 다음의 Table 5에 나타내었다. Acetic acid의 경우 *Saccharomyces* 속의 경우 0.29 ~ 0.35 g/L로 나타났으며, CB-8이 가장 낮았으며 CB-2의 경우가 가장 높은 함량을 나타내었다. Acetic acid는 알코올 발효 중 당 농도가 높으면 효모가 삼투압에 의해 acetaldehyde가 에탄올로의 환원이 느려져 더 많은 acetic acid가 합성(Erasmus et al., 2003)되고, 맥아즙의 pH가 낮으면 acetic acid가 많이 합성된다(Shimazu et al., 1981; Monk et al., 1984). Sroka 등의 연구결과보다 acetic acid 함량이 낮게 나왔는데 이는 맥아즙의 당 농도와 pH의 차이에 의한 것으로 판단된다. *Brettanomyces* 속

Table 5. Concentration of organic acid of alcohol fermentation with different yeasts

(Unit : g/L)

Yeast strains		Acetic acid	Citric acid	Lactic acid	Succinic acid
Medium	– ¹⁾	0.10±0.007 ^{2)d}	0.07±0.01 ^a	0.90±0.08 ^d	–
CB-2	<i>S. cerevisiae</i>	0.37±0.023 ^a	0.09±0.006 ^a	1.68±0.18 ^a	0.18±0.02 ^b
CB-4	<i>S. cerevisiae</i>	0.31±0.02 ^{b,c}	0.08±0.004 ^a	0.99±0.08 ^d	0.16±0.01 ^{b,c}
CB-5	<i>S. cerevisiae</i>	0.34±0.015 ^{a,b}	0.07±0.009 ^a	1.19±0.13 ^{b,c}	0.12±0.03 ^d
CB-7	<i>S. cerevisiae</i>	0.31±0.02 ^{b,c}	0.07±0.015 ^a	1.29±0.15 ^b	0.22±0.02 ^a
CB-8	<i>S. cerevisiae</i>	0.29±0.015 ^c	0.09±0.011 ^a	0.94±0.1 ^d	0.10±0.03 ^{d,e}
CB-10	<i>S. cerevisiae</i>	0.35±0.03 ^a	0.07±0.006 ^a	1.29±0.11 ^b	0.13±0.01 ^{c,d}
LA-1	<i>B. bruxellensis</i>	0.30±0.024 ^c	0.09±0.007 ^a	0.91±0.08 ^d	0.02±0.006 ^f
LA-2	<i>B. bruxellensis</i>	0.29±0.015 ^c	0.08±0.025 ^a	1.04±0.07 ^{c,d}	0.04±0.009 ^f
LA-3	<i>B. bruxellensis</i>	0.35±0.02 ^a	0.09±0.013 ^a	1.03±0.05 ^{c,d}	0.08±0.01 ^e

¹⁾ – means “not detected”.

²⁾ Results are mean ± standard deviations of three independent experiments. Same letter in the column are not significantly different at the 5% level. (p<0.05).

은 0.29 ~ 0.35 g/L로 나타났으며 LA-1과 LA-2는 유의적인 차이를 보이지 않았고 LA-3이 가장 높았다. Citric acid는 모든 발효액에 대하여 유의적인 차이가 없었으며, lactic acid는 *Saccharomyces* 속은 0.94 ~ 1.68 g/L로 CB-8이 가장 낮았으며 가장 높은 CB-2는 CB-8보다 약 1.8배 높은 함량을 나타내었다. *Brettanomyces* 속은 0.91 ~ 1.04 g/L로 나타났으며 LA-1이 가장 낮고 LA-2가 가장 높게 나타났다. Succinic acid의 함량은 *Saccharomyces* 속은 0.10 ~ 0.22 g/L로 나타났으며 CB-7이 가장 높았으며, CB-8이 가장 낮게 나타났다. *Brettanomyces* 속은 0.02 ~ 0.06 g/L로 *Saccharomyces* 속보다 낮게 나왔으며 LA-1과 LA-2는 유의적인 차이는 없었으며, LA-3이 가장 높게 나타났다. 알코올 발효 결과 초기 당화액보다 acetic acid, lactic acid, succinic acid가 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 그 중 CB-7 균주가 신맛을 가지는 acetic acid 함량이 낮고, 감칠맛을 가지는 succinic acid 함량이 높아 유기산 특성이 뛰어난 것을 알 수 있었다.

5. 알코올 발효액의 휘발성 화합물 분석 결과

알코올 발효액을 GC-MS-TQ8050로 휘발성 화합물을 분석한 결과는 다음의 Table 6에 나타내었다. 분석된 휘발성 화합물은 알코올 7종, 에스터 14종, 알데히드 9종, 기타 1종으로 분류되었다. *Saccharomyces* 속에서 *Brettanomyces* 속에 비해 큰 면적 값을 나타냈으며 1차 알코올인 1-propanol, isobutyl alcohol, isoamyl alcohol, 2-methyl-1-butanol이 주요 성분으로 분석되었고 *Brettanomyces* 속에서만 2차 알코올인 isopropyl alcohol과 furfuryl alcohol이 분석되었다. 이 중 isoamyl alcohol은 고급알코올 그룹에서 풍미에 가장 정량적으로 중요한 영향을 미치는 화합물 (Kobayashi et al., 2006)이고 2-methyl-1-butanol은 퓨젤유에서 유래되는 성

Table 6. Volatile compounds of after alcoholic fermentation

RT	Compounds	Area (/10 ⁴)									
		Wort	CB-2	CB-4	CB-5	CB-7	CB-8	CB-10	LA-1	LA-2	LA-3
Alcohols											
5.996	Isopropyl Alcohol	– ¹⁾	–	–	–	–	–	–	77	71	52
7.919	1-Propanol	–	868	973	658	574	813	880	86	84	265
11.635	isobutyl alcohol	–	2424	1897	938	472	2246	1902	110	334	718
16.751	Isoamyl alcohol	–	7998	7605	4150	2373	5772	5438	449	664	1021
16.902	2-Methyl-1-butanol	–	4593	3555	1659	1173	3450	3101	240	562	833
20.687	Furfuryl alcohol	–	–	–	–	–	–	–	10	21	19
32.305	2-Phenylethanol	–	–	39	–	–	28	51	–	–	–
	Total	0	20484	19369	9505	6692	16009	15372	972	1738	2907

(continued)

RT	Compounds	Area (/10 ⁴)									
		Wort	CB-2	CB-4	CB-5	CB-7	CB-8	CB-10	LA-1	LA-2	LA-3
Esters											
6.451	Ethyl formate	–	165	–	141	169	165	170	–	59	63
10.741	Ethyl Acetate	–	14940	12373	7005	6301	10502	14015	952	1230	6887
15.689	Ethyl propionate	–	190	242	111	87	110	238	–	–	20
15.78	Propyl acetate	–	69	55	–	–	33	–	–	–	–
17.788	Ethyl isobutyrate	–	–	–	–	–	–	–	14	19	48
18.223	Isobutyl acetate	–	251	126	29	13	88	108	–	–	–
19.161	Ethyl butyrate	–	545	272	57	59	184	228	–	–	17
20.9	Ethyl-2-methylbutyrate	–	–	–	–	–	–	–	–	–	63
21.61	Isoamyl acetate	–	3654	2084	1534	804	1211	1959	–	–	–
21.702	Methyl-butyl acetate	–	977	439	409	444	636	754	92	87	283
26.253	Ethyl caproate	–	2264	1190	162	136	622	841	–	–	23
35.442	Ethyl octanoate	–	1583	858	239	277	605.	739	243	324	619
36.959	Phenylethyl acetate	–	32	20	–	–	–	19	–	–	–
41.728	Ethyl decanoate	–	121	90	29	–	94	136	–	–	258
	Total	0	24790	17750	9716	8289	14251	19207	1302	1718	8281

(continued)

RT	Compounds	Area (/10 ⁴)									
		Wort	CB-2	CB-4	CB-5	CB-7	CB-8	CB-10	LA-1	LA-2	LA-3
Aldehydes											
4.335	Acetaldehyde	627	2841	–	3689	2538	10165	5252	932	2517	1456
7.663	Isobutyraldehyde	1106	270	194	142	–	–	–	149	–	–
12.661	Isovaleraldehyde	4194	275	214	698	98	799	489	86	70	136
13.21	2-Methylbutanal	1135	499	100	214	46	486	291	70	51	39
18.935	Hexanal	80	–	12	–	10	–	–	–	–	–
24.415	Benzaldehyde	–	–	–	–	19	37	–	–	–	–
26.406	Octanal	56	–	–	–	–	50	–	–	–	–
32.081	Nonanal	86	–	20	–	–	80	57	28	41	–
35.699	Decanal	79	57	44	37	22	143	101	48	95	51
	Total	7364	3942	584	4780	2732	11761	6190	1313	2773	1681
Others											
37.863	4-Ethylguaiacol	–	–	–	–	–	–	–	117	152	110
	Total	0	0	0	0	0	0	0	117	152	110

¹⁾ – means “not detected”.

분으로 포도와 같은 과일에서 자연적으로 발생하는 향기성분으로(Howard, 1993) 맥주의 향과 맛에 직접적으로 영향을 주는 향기성분으로 알려져 있다. 2-Phenylethanol는 효모 내에서 phenylalanine으로부터 Ehrlich 경로에 의해 생성되는 것으로 장미와 같은 향이 나는 풍미 및 향기 화합물로서 맥주에 중요한 향기성분 중 하나이다(Etschmann, M., 2002). 하지만 본 실험에서는 발효액 중 일부만 관측됐을 뿐만 아니라 면적이 극히 낮았는데 그 이유는 phenylethanol은 낮은 휘발성을 가지는 특징이 있는데 앞서 분석을 위해 시료를 드라이오븐 50℃에서 30분간 방치 후 진공펌프를 이용한 흡착 방법을 사용하였기 때문에 phenylethanol이 휘발되지 않아 분석되지 않은 것으로 생각된다.

맥주 중 발견되는 에스터류는 대표적으로 ethyl acetate, isoamyl acetate, ethyl caproate, ethyl caprylate와 phenyl ethyl acetate 등이 있는데 (Verstrepen et al., 2003), 이러한 에스터는 주류의 풍미에 있어 알코올보다 중요하지만 이들의 농도가 너무 높으면 맥주에 지나치게 많은 과일 맛이 부여되는 특징이 있다. 본 실험에서 검출된 ester류의 결과, 예서는 9 ~ 12가지의 ester류가 검출되었으며 *B. bruxellensis*에서는 5 ~ 9가지의 ester류가 검출되었다. 그 중에서도 ethyl acetate, ethyl-2-methylbutyrate, ethyl caproate, ethyl octanoate가 ester 중 높은 면적을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. Ethyl acetate는 에탄올과 아세트산의 에스터로, 농도는 일반적으로 맥주에서 가장 높으며 과일과 같은 향(Kobayashi et al., 2006)을 가지는 특징이 있다. 본 연구에서도 ester류 중 가장 높은 면적 값을 나타내었으며 다른 연구에서도 ethyl acetate가 가장 큰 값을 나타내 본 연구의 결과와 비슷한 경향을 나타내었다(Nespro et al., 2019). Isoamyl acetate은 맥주에서 가장 중요한 ester 중의 하나(Kobayashi et al., 2006)이며 ester 중 두 번째로 면적 값이 크게 나타났다. 그 외에도 럼과 파인애플 향의 ethyl propionate

(Burdock, 1975), 배 향의 propyl acetate, 파인애플과 바나나 향의 ethyl isobutyrate (Gillies et al., 1987) 등의 향기성분이 생성되었다. 파인애플 향의 ethyl caproate (Zheng et al., 2012)은 ethyl hexanoate, 합성과일향 생성에 사용되는 ethyl octanoate (Fahlbusch et al., 2003), 브랜디 향이 나는 ethyl decanoate는 ethyl ester로 효모 발효에 의해 세포 내에서 생성되는 향기활성 ester인데, 이들은 소수성으로 세포 밖으로 세포막을 통해 확산될 수 있다. 또한 acetate ester와는 다르게 ethyl ester는 지방산 사슬의 길이가 길어질수록 매질로의 확산이 줄어드는 특징이 있어 C8인 ethyl caproate는 100%, C10인 ethyl octanoate는 54 ~ 68%, C12인 ethyl decanoate는 8 ~ 17% 정도가 확산이 된다(Verstrepen et al., 2003; Saerens et al., 2008). 실험 결과에서도 ethyl caproate, ethyl octanoate, ethyl decanoate로 갈수록 면적 값이 줄어드는 경향이 나타남을 확인할 수 있었다.

Aldehyde류 결과는 맥아즙에서 alcohol과 ester류는 검출되지 않았지만 여러 종류의 aldehyde가 검출되었고 맥아가 함유하는 자유 aldehyde는 isovaleraldehyde가 가장 많았으며 그 다음으로 isobutyraldehyde가 검출되었다. Acetaldehyde는 acetate, ethanol, acetic acid의 전구체(De Roos et al., 2019)로 9종의 aldehyde 중에서 acetaldehyde가 가장 높은 면적 값을 나타내었다. CB-8에서 가장 높은 면적 값이 나타났는데, 이는 추가적으로 더 많은 향기 성분 및 에탄올을 만들어낼 가능성이 있다고 판단된다. 아미노산의 한 종류인 leucine과 맥아 내의 reductone의 반응에 의하여 생기는 isovaleraldehyde (Bamforth, 2003)과 바나나, 오렌지 향을 조합하는데 사용되는 decyl aldehyde, 2-methylbutanal이 모든 발효액에서 공통적으로 검출되었다.

마지막으로 4-ethylguaiacol은 와인이나 맥주에서 *Brettanomyces* 속이 생성하는 페놀 화합물(Caboni et al., 2007)로 농도가 620 $\mu\text{g/L}$ 보다 커지면 짙은 'Brett' 특성 또는 페놀성 특성이 뚜렷해져 와인에 안좋은 향미를 미치게

되고, 400 $\mu\text{g/L}$ 미만에서는 향료, 연기 및 가죽의 향으로 인해 와인 향기에 복합적으로 좋게 작용하는(Loureiro et al., 2003) 특성이 있는데 본 연구 결과, *B. bruxellensis* 발효액에서 4-ethylguaiacol이 선택적으로 검출되었다.



IV. 요약

수제맥주와 람빅맥주 효모의 알코올 발효 특성을 알아보기 위해 효모를 분리한 뒤 동정한 결과 분리한 균들은 *B. bruxellensis*, *P. manshurica*, *P. membranifaciens*, *S. cerevisiae*의 4가지로 동정되었다. 당 및 알코올 내성을 실험한 후, 제조한 당화액에 효모를 접종하여 발효하여 발효액의 당, pH, 산도, 알코올 함량을 조사한 뒤 알코올 발효 균주에 대해서 유기산과 휘발성 화합물 분석을 하였다. 당 및 알코올 내성 실험결과 *S. cerevisiae* 속이 glucose 40% 농도에서도 생육이 뛰어나 가장 당 내성이 뛰어났으며 에탄올 내성은 8 ~ 12% 가짐을 확인할 수 있었다. *Brettanomyces* 속은 당 내성 30 ~ 40%, 알코올 내성 8 ~ 12%를 가짐을 확인할 수 있었으며, 그 중 LA-3 균주의 내성이 가장 뛰어나 생육정도가 더 높은 것을 확인할 수 있었다. *Pichia* 속이 다른 균주보다 전반적으로 생육속도가 느린 것을 확인할 수 있었으며, 당 및 알코올 농도 증가에 대해 민감한 결과를 나타내 가장 낮은 당, 알코올 내성을 가짐을 확인할 수 있었다. 제조된 당화액에 효모를 접종하여 배양한 뒤 이화학적 특성을 확인해본 결과 *S. cerevisiae* 속이 고형분 함량이 7.2 ~ 8.5 °brix, pH는 4.45 ~ 4.64, 알코올 함량 3.0 ~ 4.8%로 당을 이용한 알코올 발효가 활발하게 진행되었다. 그 중 CB-10이 당 함량 7.2 °brix, 알코올 함량 4.8%로 당을 가장 많이 소모하여 알코올 발효를 하여 알코올 농도가 가장 높은 것을 확인할 수 있었다. *B. bruxellensis* 속은 당, 알코올 내성 결과에서 확인했듯이 생육이 *S. cerevisiae* 속보다 느리기 때문에 당 소모가 적었으며, 그에 따른 알코올 농도도 0.8 ~ 1.6%로 상대적으로 낮은 수치를 나타내는 것을 확인할 수 있었다. *Pichia* 속은 알코올 발효가 일어나지 않아 생육에 적은 양의 당을 사용한 것을 제외하면 pH, 산도, 알코올 함량의 변화

가 일어나지 않았다. 알코올 발효액의 유기산 분석 결과 acetic acid, lactic acid, succinic acid가 증가하였으며, 그 중 CB-7은 낮은 acetic acid 함량과 높은 succinic acid 함량을 나타내었다. 휘발성 화합물은 전반적으로 *S. cerevisiae* 속이 높은 면적의 향기성분을 나타내었으며, 그 중 CB-8이 전체적으로 높은 면적 값을 나타내는 것을 확인하였다. 그리고 *Brettanomyces* 속 발효액에서 *Brettanomyces* 효모가 생성하는 페놀화합물인 4-ethylguaiacol이 검출되었다. 시중 판매되는 수제맥주와 람빅맥주에서 분리한 효모들은 같은 종으로 판명된 것들도 있었지만, 각각의 특성이 다른 것을 확인하였다.



V. 참고문헌

- Bamforth, C. W. (2003) Encyclopedia of food sciences and nutrition (Second Edition) | Chemistry of Brewing, 440-447
- Blanco, C. A., Andres-Iglesias, C. and Montero, O. (2016). Low-alcohol beers: Flavor compounds, defects, and improvement strategies. Critical reviews in Food Science and Nutrition, 56(8), 1379-1388.
- Burdock, G. A. (1975). Fenaroli's handbook of flavor ingredients: Volume 2. Edited, translated and revised by T.E. Furia and N. Bellanca. 2nd ed. Cleveland: the chemical rubber Co., 190.
- Caballero, I., Blanco, C. A. and Porras, M. (2012). Iso- α -acids, bitterness and loss of beer quality during storage. Trends in Food Science and Technology, 26(1), 21-30.
- Caboni, P., Sarais, G., Cabras, M. and Angioni, A. (2007). Determination of 4-ethylphenol and 4-ethylguaiaicol in wines by LC-MS-MS and HPLC-DAD-fluorescence. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55(18), 7288-7293.
- Canonico, L., Comitini, F. and Ciani, M. (2014). Dominance and influence of selected *Saccharomyces cerevisiae* strains on the analytical profile of

craft beer refermentation. Journal of the Institute of Brewing, 120(3), 262-267.

De Roos, J. and De Vuyst, L. (2019). Microbial acidification, alcoholization, and aroma production during spontaneous lambic beer production. Journal of the Science of Food and Agriculture, 99(1), 25-38.

Erasmus, D. J., van der Merwe, G. K. and van Vuuren, H. J. (2003). Genome-wide expression analyses: metabolic adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to high sugar stress. FEMS Yeast Research, 3(4), 375-399.

Etschmann, M., Bluemke, W., Sell, D. and Schrader, J. (2002). Biotechnological production of 2-phenylethanol. Applied Microbiology and Biotechnology, 59(1), 1-8.

Fahlbusch, K. G., Hammerschmidt, F. J., Panten, J., Pickenhagen, W., Schatkowski, D., Bauer, K. and Surburg, H. (2003). Flavors and fragrances. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 83.

Ferreira, I. and Guido, L. (2018). Impact of wort amino acids on beer flavour: A review. Fermentation, 4(2), 23.

Giannetti, V., Mariani, M. B., Torrelli, P. and Marini, F. (2019). Flavour component analysis by HS-SPME/GC - MS and chemometric modeling

to characterize Pilsner-style Lager craft beers. *Microchemical Journal*, 103991, 1-6.

Gillies, B., Yamazaki, H. and Armstrong, D. W. (1987). Production of flavor esters by immobilized lipase. *Biotechnology Letters*, 9(10), 709-714.

Giovenzana, V., Beghi, R. and Guidetti, R. (2014). Rapid evaluation of craft beer quality during fermentation process by vis/NIR spectroscopy. *Journal of Food Engineering*, 142, 80-86.

Goncalves, J. L., Figueira, J. A., Rodrigues, F. P., Ornelas, L. P., Branco, R. N., Silva, C. L. and Camara, J. S. (2014). A powerful methodological approach combining headspace solid phase microextraction, mass spectrometry and multivariate analysis for profiling the volatile metabolomic pattern of beer starting raw materials. *Food chemistry*, 160, 266-280.

Guan, X. Q., Nie, C., Guo, Y. W. and Zhang, J. (2019). Changes of Hop-Derived Aroma Compounds in India Pale Ale during Brewing and Storage. *International Journal of Food Engineering*, 5(1), 50-57.

Guido, L. F., Rodrigues, P. G., Rodrigues, J. A., Goncalves, C. R. and Barros, A. A. (2004). The impact of the physiological condition of the pitching yeast on beer flavour stability: an industrial approach. *Food*

Chemistry, 87(2), 187-193.

He, Y., Dong, J., Yin, H., Zhao, Y., Chen, R., Wan, X. and Chen, L. (2014). Wort composition and its impact on the flavour active higher alcohol and ester formation of beer - a review. *Journal of the Institute of Brewing*, 120(3), 157-163.

Howard, Philip H. (1993), *Handbook of environmental fate and exposure data for organic chemicals*, 4, Boca Raton, Florida: CRC Press, 392-396.

Kaltner, D. and Mitter, W. (2003). The influence of hops upon the aroma and taste of beer. *Scandinavian Brewers' Review*, 60, 8-16.

Kishimoto, T., Wanikawa, A., Kono, K. and Shibata, K. (2006). Comparison of the odor-active compounds in unhopped beer and beers hopped with different hop varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(23), 8855-8861.

Kobayashi, M., Nagahisa, K., Shimizu, H. and Shioya, S. (2006). Simultaneous control of apparent extract and volatile compounds concentrations in low-malt beer fermentation. *Applied microbiology and biotechnology*, 73(3), 549-558.

Kucharczyk, K. and Tuszyński, T. (2015). The effect of pitching rate on fermentation, maturation and flavour compounds of beer produced on an

- industrial scale. *Journal of the Institute of Brewing*, 121(3), 349–355.
- Lentz, M. and Harris, C. (2015). Analysis of growth inhibition and metabolism of hydroxycinnamic acids by brewing and spoilage strains of *Brettanomyces* yeast. *Foods*, 4(4), 581–593.
- Loureiro, V. and Malfeito-Ferreira, M. (2003). Spoilage yeasts in the wine industry. *International journal of food microbiology*, 86(1-2), 23–50.
- MONK, P. R. and COWLEY, P. J. (1984). Effect of nicotinic acid and sugar concentration of grape juice and temperature on accumulation of acetic acid during yeast fermentation. *Journal of Fermentation Technology*, 62(6), 515–521.
- Nespor, J., Andres-Iglesias, C., Karabín, M., Montero, O., Blanco, C. A. and Dostálek, P. (2019). Volatile compound profiling in czech and spanish lager beers in relation to used production technology. *Food Analytical Methods*, 12(10), 2293–2305.
- Nykanen, L. and Suomalainen, H. (1983). Aroma of beer, wine and distilled alcoholic beverages (Vol. 3). Springer Science and Business Media, 1–3.
- Pallottino, F., Taiti, C., Violino, S., Costa, C., Masi, E. and Mancuso, S. (2019). Relationship among volatile organic compounds and sensory

properties in craft beer. Food Science and Engineering, 1(1), 1-11.

Pires, E. J., Teixeira, J. A., Branyik, T., Brandao, T. and Vicente, A. A. (2015). Continuous beer fermentation - diacetyl as a villain. Journal of the Institute of Brewing, 121(1), 55-61.

Procopio, S., Krause, D., Hofmann, T. and Becker, T. (2013). Significant amino acids in aroma compound profiling during yeast fermentation analyzed by PLS regression. Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie - Food Science and Technology, 51(2), 423-432.

Saerens, S. M. G., Delvaux, F., Verstrepen, K. J., Van Dijck, P., Thevelein, J. M. and Delvaux, F. R. (2008). Parameters affecting ethyl ester production by *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation. Applied and Environmental Microbiology, 74(2), 454-461.

Shimazu, Y. and Watanabe, M. (1981). Effects of yeast strains and environmental conditions on formation of organic acids in must during fermentation. Journal of Bioscience and Bioengineering, 59(1), 27-32.

Simpson, W. J. (1993). Cambridge Prize Lecture. Studies on the sensitivity of lactic acid bacteria to hop bitter acids. Journal of the Institute of Brewing, 99(5), 405-411.

Spitaels, F., Wieme, A. D., Janssens, M., Aerts, M., Daniel, H. M., Van

- Landschoot, A. and Vandamme, P. (2014). The microbial diversity of traditional spontaneously fermented lambic beer. *PLOS ONE*, 9(4). e95384, 1-11.
- Sroka, P. and Tuszynski, T. (2007). Changes in organic acid contents during mead wort fermentation. *Food Chemistry*, 104(3), 1250-1257.
- Suomalainen, H. (1981). Yeast esterases and aroma esters in alcoholic beverages. *Journal of the Institute of Brewing*, 87(5), 296-300.
- Verbelen, P. J., Dekoninck, T. M. L., Saerens, S. M. G., Van Mulders, S. E., Thevelein, J. M. and Delvaux, F. R. (2009). Impact of pitching rate on yeast fermentation performance and beer flavour. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82(1), 155-167.
- Verstrepen, K. J., Derdelinckx, G., Dufour, J. P., Winderickx, J., Thevelein, J. M., Pretorius, I. S. and Delvaux, F. R. (2003). Flavor-active esters: adding fruitiness to beer. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 96(2), 110-118.
- Viejo, C. G., Fuentes, S., Li, G., Collmann, R., Conde, B. and Torrico, D. (2016). Development of a robotic pourer constructed with ubiquitous materials, open hardware and sensors to assess beer foam quality using computer vision and pattern recognition algorithms: RoboBEER. *Food Research International*, 89, 504-513.

Zheng, L. Y., Sun, G. M., Liu, Y. G., Lv, L. L., Yang, W. X., Zhao, W. F. and Wei, C. B. (2012). Aroma volatile compounds from two fresh pineapple varieties in China. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(6), 7383–7392.

