



Research Article

High temperature treatments to control sugar consumption by yeasts during *makgeolli* fermentation

막걸리 발효 시 효모의 당분 소비 억제를 위한 고온처리

Chan-Woo Kim^{1†}, Seok-Tae Jeong^{1†}, Yoo-Deok Park², Juong-Bin Kim², Bo-Ra Lim¹, Heui-Yun Kang^{1*}
 김찬우^{1†} · 정석태^{1†} · 박유덕² · 김정빈² · 임보라¹ · 강희윤^{1*}

¹Fermented & Processed Food Science Division, National Institute of Agricultural Sciences, Jeonju 55365, Korea

²New Product Development Team, Juro Corporation, Yeosan 32438, Korea

¹국립농업과학원 발효가공식품과, ²주료주식회사 신제품개발팀

Abstract This study aimed to control sugar consumption during *makgeolli* fermentation using high temperature treatments after 3 days of fermentation at normal temperature. *makgeolli* fermentation was performed at 25°C for the initial 3 days and at 34, 37, 40, and 43°C, respectively, for the next 4 days. When fermented at 25°C (control), the alcohol content increased up to 16.5%; however the alcohol content of *makgeolli* treated at elevated temperatures reduced by 13.8%. In the control group, typical saccharification and fermentation proceeded simultaneously, and the reducing sugar content remained low due to sugar consumption by active yeast. However, at high fermentation temperatures, the *nuruk* enzymes functioned normally and saccharification proceeded well; however the conversion of fermentable sugars to alcohol was inhibited, possibly due to a decrease in yeasts activity. The viable cell count of yeasts was 4–6 log CFU/mL regardless of the fermentation temperature. These results indicate the possibility of producing sweet live-yeast *makgeolli* without the addition of artificial sweeteners through a temperature-controlled *makgeolli* fermentation.

Keywords *makgeolli*, high temperature, yeast, sugar consumption, sweetener



Citation: Kim CW, Jeong ST, Park YD, Kim JB, Lim BR, Kang HY. High temperature treatments to control sugar consumption by yeasts during *makgeolli* fermentation. Korean J Food Preserv, 29(3), 466-471 (2022)

Received: November 12, 2021
Revised: March 11, 2022
Accepted: April 25, 2022

[†]These authors contributed equally to this study.

***Corresponding author**
 Heui-Yun Kang
 Tel: +82-63-238-3621
 E-mail: albert@korea.kr

Copyright © 2022 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.

1. 서론

막걸리는 전분질을 원료로 담금하며, 누룩 미생물 중 곰팡이가 분비한 효소에 의한 전분의 당화 공정에서 분해된 발효성 당이 효모에 의해 알코올로 전환되는 병행발효주이다(Lee 등, 2010a; Lee 등, 2010b). 막걸리에는 식이섬유, 비타민 B군, 단백질 등이 풍부하게 함유되어 있으며, 발효제인 누룩의 단백질분해효소에 의해 다양한 아미노산도 많이 함유되어 있다(So 등, 1999a). 특히 살균을 하지 않은 생막걸리에는 살아 있는 효모가 다량으로 함유되어 있어서 일반 주류와는 다른 영양학적 특성을 지니고 있다(So 등, 1999b). 국내 시판 막걸리의 품질 특성을 분석한 결과, 대부분의 제품에서 막걸리에 사용 가능한 감미료인 아스파탐(aspartame)과 페닐알라닌(phenylalanine)을 사용하는 것으로 확인되었다(Park 등, 2011). 아스파탐은 L-aspartic

acid와 L-phenylalanine이 결합된 dipeptide의 methyl ester로 설탕의 약 200배의 단맛을 지닌 인공감미료로 막걸리 제조 시 폭넓게 사용되어 왔으나(Yeo와 Jeong, 2010), 최근 감미료를 첨가하지 않은 막걸리에 대한 소비자의 관심이 증가함에 따라, 적정 수준의 단맛을 함유한 감미료 무첨가 생막걸리 제조기술에 대한 연구가 요구되고 있다.

미생물의 성장과 대사활동은 생육온도와 밀접하게 연관되어 있다. 발효온도가 높을 경우, 효모는 온도 조절을 위한 세포 내 메커니즘이 없으므로 필수 영양소의 투과성 감소, 원형질막의 유동성 증가 등 세포 손상이 확장되는 결과를 초래한다(Bleoanca와 Bahrimo, 2013).

미생물의 생육온도가 효소 합성에 미치는 영향에 대해서도 보고되었는데, 양조용 효모인 *Saccharomyces cerevisiae*의 alcohol dehydrogenase의 활성은 생육온도에 따라 크게 2-3배 차이가 있는 것으로 알려졌다(Jones와 Hough, 1970). 효모에 의한 알코올 생성 또한 발효온도에 직접적인 영향을 받으며, 일반적으로 *S. cerevisiae*는 40℃까지 알코올 생성 속도가 증가하는 것으로 알려져 있다. 전통적으로 냉각 시스템이 없던 시절의 일본의 사케 양조는 발효온도를 10-15℃로 유지하기 위해서 주로 겨울에 수행되었고(Hashimoto 등, 2006), 맥주 발효 또한 라거와 에일 제조 시 각각 6-14℃, 15-20℃의 온도(Bamforth, 1998)에서 진행된다. 막걸리의 발효 온도는 일반적으로 25℃에서 진행되는데, 현재까지 막걸리 발효온도와 관련된 대부분의 연구에서는 10-25℃와 같이 저온에서 탁주의 향기성분에 관련된 연구(Song 등, 2020)나, 원료 및 발효제 등에 따른 온도별 발효특성(Baek 등, 2013; Kim 등, 2012; Kim 등, 2020; Shin 등, 2017)에 대해서만 살펴보았으며, 발효 후반부의 고온처리가 막걸리의 품질 특성 및 당분의 소비 억제에 미치는 영향 등에 관한 연구는 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 막걸리 제조 시 발효 후기의 고온처리로 효모에 의한 당분의 소비가 억제되는 동시에, 효모가 살아 있는 생막걸리의 제조방법에 대한 연구결과를 소개하고자 한다.

2. 실험재료 및 방법

2.1. 재료 및 막걸리 제조

막걸리 제조에 사용된 효모는 건조분말 형태의 *S.*

cerevisiae(La Parisienne, S. I. Lesaffre Co., Marcq-en-Baroeul, French)를 사용하였다. 발효제는 역가 300 SP 이상의 진주곡자(Jinju-Gokja, Jinju, Korea)와 60 SP 이상의 쌀알누룩(JEGS Co., Ltd., Hwaseong, Korea)을 사용하였다. 막걸리는 팽화미에 쌀알누룩과 재래누룩의 당화력(sp)을 고려하여 전분질 원료 g당 30 sp가 되게 첨가하였고, 건조효모는 전체 술덧량의 0.05%, 급수율은 150%로 조정하였다. 발효는 초기 3일 동안 25℃에서 진행한 이후, 후기 고온처리 온도(25, 34, 37, 40, 43℃)에서 4일을 추가로 발효하였다. 발효 과정에서 경시적인 시료의 채취는 발효액을 균일하게 혼합한 다음 일정 분량을 취해 거름망으로 여과한 뒤 분석 시료로 사용하였다.

2.2. pH 및 총산 함량 측정

pH는 pH meter(Thermo scientific orion 3 star, USA)를 이용하여 측정하였고, 총산은 막걸리 발효액 10 mL를 0.1 N NaOH 용액으로 pH 8.2까지 중화시키는 데 소요되는 0.1 N NaOH의 소비 mL를 젖산(lactic acid) 함량으로 환산하여 total acid(% w/v)로 표시하였다.

2.3. 알코올 및 환원당 함량 측정

알코올 함량은 증류 플라스크에 막걸리 발효액 100 mL와 증류수 50 mL를 혼합 후 증류하여 100 mL 메스실린더에 90 mL까지 증류액을 받은 후, 증류수로 정용하여 알코올 분석기(Digital Alcohol Meter DA-155, Kyoto Electronics Manufacturing Co., Ltd., Japan)를 이용해 측정하였다. 환원당 함량은 DNS(dinitrosalicylic acid)법을 이용하여 분석하였다. 희석한 시료 용액 0.2 mL에 DNS 시약 0.6 mL를 넣고 끓는 수욕 중에서 5분 동안 중탕한 다음, 냉각하여 증류수 4.2 mL를 넣고 혼합한 뒤 분광광도계(UV spectrophotometer JP/UV-2450, Shimadzu Co. Ltd., Kyoto, Japan)를 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 환원당 함량은 포도당 표준 검량선을 이용하여 Reducing sugar(g/100 mL)로 표시하였다.

2.4. 효모 생존수 측정

효모 생존수는 자동 효모세포카운터(Luna-II YF™, Logosbiosystems, Anyang, Korea)를 이용하여 측정하

였다. 막걸리 시료를 버퍼 용액과 적정 비율로 혼합한 다음, 발색시약을 첨가하여 10분 동안 상온에서 반응시킨다. 반응이 완료되면 측정용 셀에 10 μ L를 분주하여 생균수 및 생존율을 측정한다.

2.5. 통계처리

통계분석은 SPSS 12.0.1 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 분석결과의 평균과 표준편차를 구하였고, 세 그룹 이상의 시료 간 유의적 차이는 일원배치분산분석 (ANOVA)으로 $p < 0.05$ 수준에서 검증하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 발효 온도에 따른 알코올 함량 변화

막걸리 발효 후기의 온도 차이에 따른 알코올의 함량 변화는 Fig. 1과 같다. 발효 초기의 3일 동안은 25°C에서 동일하게 발효했기 때문에 정상적으로 알코올이 생성됨을 확인하였고, 이후 발효 온도가 증가할수록 알코올 생성이 현저하게 낮아지는 경향을 보였다. 대조구인 25°C의 경우, 발효 7일 차에 알코올이 16.5%까지 생성된 반면, 발효 온도가 높아질수록 알코올 함량이 13.8% 수준까지 감소하였다. 전통적으로 양조용 효모의 최적 발효 온도는 28-33°C이며, 일반적으로 36°C 이하에서 진행되기 때문에(Babiker 등, 2010), 고온 발효에 의한 효모의 대사생리 활성이 저해되어 알코올 생성이 감소하는 결과로 이어진 것으로 사료된다.

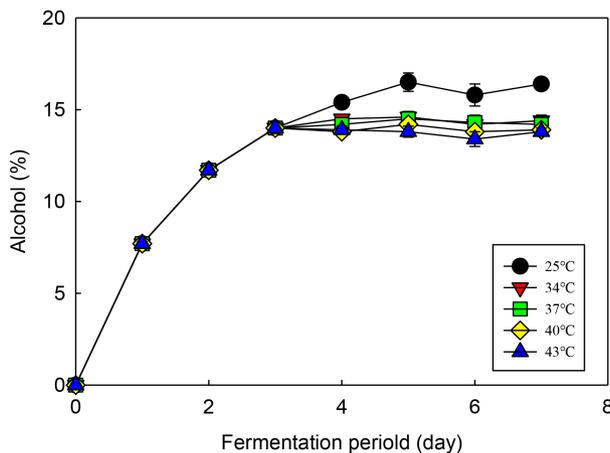


Fig. 1. Changes of alcohol content by high temperature treatments after 3 days of *makgeolli* fermentation at 25°C.

다. 발효 온도가 높아질수록 에탄올 생성량이 감소하는 특성은 Torija 등(2003)의 결과와 유사한 경향을 보였다.

3.2. 발효 온도에 따른 pH 및 총산 함량 변화

막걸리 발효 후기의 고온 발효에 따른 pH 및 총산 함량의 변화는 Fig. 2와 같다. pH는 발효 3일 차까지 소폭 감소하였는데, 이는 효모에 의한 유기산 생성으로 인한 것으로 판단되며, 이후 4.0-4.2 수준을 유지하였다. 막걸리의 pH는 일반적으로 3.5-4.5 수준으로(Kang 등, 2014), 이는 젖산균 등 다른 세균류의 증식을 억제할 수 있는 조건이다. 막걸리 발효 후기에, 고온 처리에 의한 pH의 변화는 비슷한 수준으로 유지되었다. 막걸리 발효가 진행되면서 알코올이 생성됨에 따라 총산 함량도 같이 증가하게 된다. Fig. 3에서 볼 수 있듯이 총산 함량은 발효 초기 3일까지 크게 증가하였는데, 이는 효모의 알코올 발효가 왕성해지면서 유기산의 생성으로 사료되며, 생성된 총산 함량은 막걸리의 풍미와 보존성과 관련된다. 발효 3일 이후 온도가 높아질수록 총산 함량이 빠르게 감소되었는데, 이는 누룩 속에 젖산균을 포함한 다양한 미생물에 의해 유기산의 재흡수가 진행되어 일부 영양원으로 사용된 것으로 사료된다.

3.3. 발효 온도에 따른 환원당 함량 변화

막걸리 발효 후기의 고온 처리에 따른 환원당 함량 변화를 Fig. 4에 나타내었다. 대조구인 25°C에서는 다른 고온

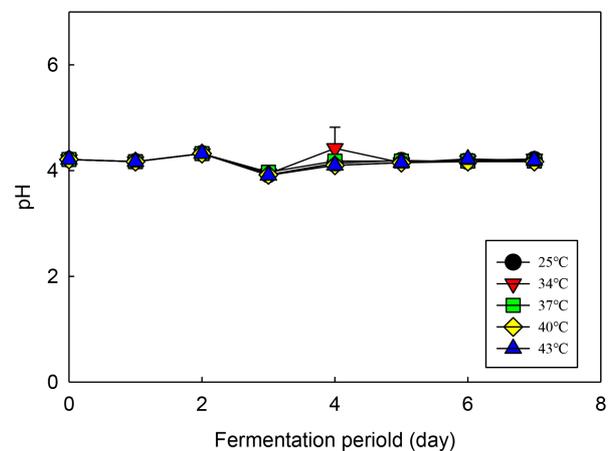


Fig. 2. Changes of pH by high temperature treatments after 3 days of *makgeolli* fermentation at 25°C.

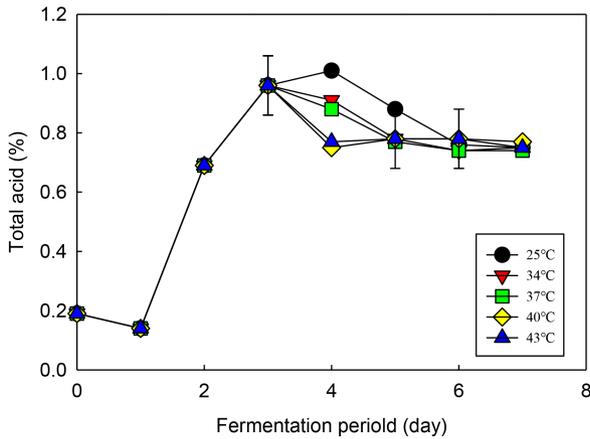


Fig. 3. Changes of total acid content by high temperature treatments after 3 days of *makgeolli* fermentation at 25°C.

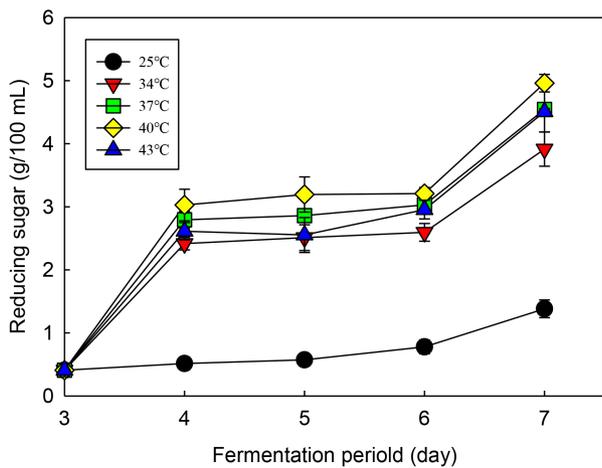


Fig. 4. Changes of reducing sugar content by high temperature treatments after 3 days of *makgeolli* fermentation at 25°C.

발효 처리구에 비해 비교적 낮은 0.52-1.38 g/100 mL 수준의 환원당 함량을 유지하는 것으로 확인되었다. 막걸리 발효는 전분의 당화 과정과 알코올 발효가 동시에 일어나는 병행발효이다(Lee 등, 2010a; Lee 등, 2010b). 이는 누룩에 있는 전분 분해 효소에 의해서 쌀 전분이 발효성 당으로 분해되는 동시에, 효모가 이를 소모해서 에탄올로 전환하는 것으로, 25°C에서는 효모에 의한 알코올 발효가 활발하게 진행되면서 잔여 당분이 적게 남은 것으로 확인되었다. 막걸리 발효 후기의 고온 처리구의 경우, 환원당 함량이 3.91-4.96 g/100 mL 수준으로 대조구에 비해 크게 증가

하였다. 이는 누룩에서 유래한 액화 및 당화효소 작용의 온도 범위는 대부분 30-50°C이기 때문에(Kim 등, 1998), 고온에서 발효할 경우 전분의 분해가 활발하게 진행되어 환원당 함량이 높게 나타난 것으로 판단된다. 또한, 일반적으로 양조용 효모의 발효는 30°C 전후에서 진행되기 때문에 고온 발효를 할 경우, 효모의 에너지 대사가 저해되어 발효성 당분의 소모가 정상적으로 진행되지 않는 것으로 사료된다. 이러한 결과로 알코올 생성은 저해되면서 당분은 크게 증가하는 특징을 나타내었다.

3.4. 발효 온도에 따른 효모 생균수 변화

막걸리 발효 후기의 고온 발효에 의한 효모의 생균수 변화를 Fig. 5에 나타내었다. 대조구인 25°C 발효의 경우, 효모 생균수는 5.5-6.4 log CFU/mL, 생존율은 99.7% 이상으로 높게 나타났다(Table 1). *Saccharomyces cerevisiae*는 알코올 내성이 강한 것으로 알려져 있기 때문에, 발효 후반부에 알코올 함량이 높은 조건에서도 효모 생존율이 높게 나타난 것으로 사료된다. 본 연구에서는 막걸리 후기의 고온 발효를 4일 동안만 진행했기 때문에 효모 생균수의 유의적인 변화를 살펴볼 수 없었지만, 고온에서 발효가 지속될 경우 일반적으로 효모의 자기소화가 더 많이 발생하는 등(Lee 등, 2010a) 죽은 균수가 증가했을 것으로 판단된다. Min 등(2011)은 막걸리를 20°C에서 30일 동안 저장했을 때 초기 효모 생균수의 약 89%가 감소한다고 보고하기도 하였다. 결

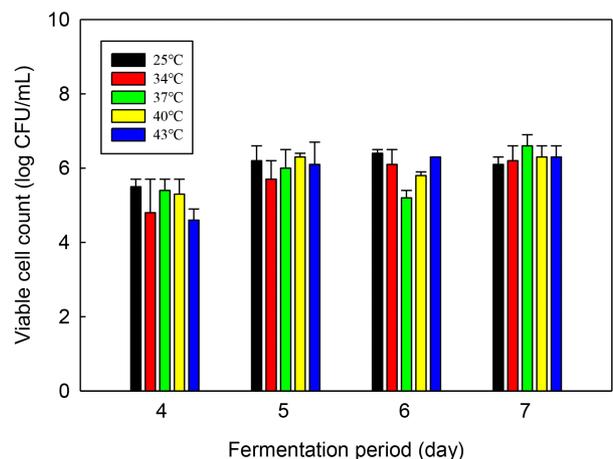


Fig. 5. Changes of viable yeast number by high temperature treatments after 3 days of *makgeolli* fermentation at 25°C.

Table 1. Survival rate of yeasts by high temperature treatments after 3 days of *makgeolli* fermentation at 25°C

| Temperature (°C) | Fermentation period (day) | | | |
|------------------|---------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | 4 | 5 | 6 | 7 |
| 25 | 99.9±0.0 ^{1)a} | 99.7±0.2 ^a | 99.9±0.1 ^a | 99.7±0.2 ^a |
| 34 | 99.1±0.7 ^a | 99.3±0.6 ^a | 99.6±0.2 ^a | 99.7±0.2 ^a |
| 37 | 99.9±0.0 ^a | 99.8±0.1 ^a | 98.8±1.0 ^a | 99.9±0.1 ^a |
| 40 | 99.8±0.2 ^a | 99.8±0.1 ^a | 99.3±0.2 ^a | 99.7±0.2 ^a |
| 43 | 98.6±0.9 ^a | 99.5±0.6 ^a | 99.6±0.4 ^a | 99.7±0.1 ^a |

¹⁾Data are means±SD (n=3).

^aValues followed by the same superscript letter in the same column and row are not significantly different (p>0.05).

과적으로 막걸리 발효 후반부의 높은 알코올 조건과 단기간의 고온 발효가 효모의 사멸에는 직접적으로 영향을 크게 미치지 않는 것으로 사료되며, 이를 통해 효모가 다량으로 함유되어 있는 생막걸리 제조 가능성을 고려해볼 수 있다.

4. 요약

본 연구에서는 막걸리 제조 시 발효 후기의 고온 처리가 막걸리의 품질 특성과 효모 생육에 미치는 영향을 파악하고자 하였다. 일반적인 막걸리의 발효 온도인 25°C에서 초기 3일 동안 발효한 이후 고온(37-43°C)에서 4일간 발효를 진행하였다. 대조구인 25°C에서와 달리 발효 후기의 온도가 높을수록 효모의 당 소모능과 에탄올 생성능이 저하되었고, 이러한 당분 소비 억제는 막걸리의 잔여 당분 함량이 적정 수준으로 유지될 수 있음을 보여주었다. 효모의 생균수와 생존율은 발효 후반부에 4.6-6.6 log CFU/mL, 98.6-99.9% 수준으로 높게 나타났으며, 이는 발효 후기의 단기간 고온 발효가 효모 사멸에 직접적으로 미치는 영향은 낮은 것으로 사료된다. 따라서 본 연구결과, 막걸리 제조 시 발효 후기에 고온 처리를 통해, 당분의 소비를 억제하여 적정 단맛을 유지할 수 있으므로 비발효성 감미료를 첨가하지 않고서도 효모가 살아 있는 생막걸리 제조가 가능한 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 공동연구사업(과제번호: PJ015855)의 지원으로 이루어진 것이며, 연구비 지원에 감사드립니다.

Conflict of interests

The authors declare no potential conflicts of interest.

Author contributions

Conceptualization: Jeong ST. Data curation: Kang HY. Formal analysis: Kim CW, Park YD, Kim JB. Methodology: Kim CW. Lim BR. Validation: Jeong ST. Writing - original draft: Kim CW. Writing - review & editing: Jeong ST, Kang HY.

Ethics approval

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

ORCID

Chan-Woo Kim (First author)
<https://orcid.org/0000-0002-7858-9885>
 Seok-Tae Jeong (First author)
<https://orcid.org/0000-0001-9997-2763>
 Yoo-Deok Park
<https://orcid.org/0000-0003-1591-4203>
 Juong-Bin Kim
<https://orcid.org/0000-0002-6057-0182>
 Bo-Ra Lim
<https://orcid.org/0000-0003-1128-5921>
 Heui-Yun Kang (Corresponding author)
<https://orcid.org/0000-0001-5479-7973>

References

- Babiker MA, Banat A, Hoshida H, Ano A, Nonklang S, Akada R. High-temperature fermentation: How can processes for ethanol production at high temperatures become superior to the traditional process using mesophilic yeast? *Appl Microbial Biotechnol*, 85, 861-867 (2010)
- Baek CH, Choi JH, Choi HS, Jeong ST, Kim JH, Jeong YJ, Yeo SH. Quality characteristics of brown rice *Makgeolli* produced under differing conditions. *Korean J Microbiol Biotechnol*, 41, 168-175 (2013)
- Bamforth HW. Brewing matters to a head: The status of research on beer foam. In *Eur Brewery Convention Monogr*, 27, 1-21 (1998)
- Bleoanca L, Bahrimo G. Overview on brewing yeast stress factors. *Rom Biotechnol Lett*, 18, 8559-8572 (2013)
- Hashimoto S, Aritomi K, Minohara T, Nishizawa Y, Hoshida H, Kashiwagi S, Akada R. Direct mating between diploid sake strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbial Biotechnol*, 69, 689-696 (2006)
- Jones RC, Hough JS. The effect of temperature on the metabolism of baker's yeast growing on continuous culture. *J Gen Microbiol*, 60, 107-116 (1970)
- Kang JE, Choi HS, Choi JH, Yeo SH, Jeong ST. Physicochemical properties of Korean non-sterilized commercial *Makgeolli*. *Korean J Community Living Sci*, 25, 363-372 (2014)
- Kim DR, Seo BM, Noh MH, Kim YW. Comparison of temperature effects on brewing of *makgeolli* using uncooked germinated black rice. *KSBB journal*, 27, 251-256 (2012)
- Kim HS, Hyun JS, Kim J, Ha HP, Yu DS. Enzymological characteristics and identification of useful fungi isolated from traditional Korean nuruk. *Kor J Appl Microbial Biotechnol*, 26, 456-464 (1998)
- Kim JK, Jo SW, Kim EJ, Ham SH, Jeong DY. Characteristics of brown rice *Makgeolli* brewed at different temperatures and mixing ratios of *Nuruk*. *Korean J Food Sci Technol*, 52, 94-102 (2020)
- Lee JW, Park JW. Quality characteristics of makgeolli during separation storage methods. *Food Eng Prog*, 14, 346-353 (2010a)
- Lee MY, Sung SY, Kang HK, Byun HS, Jung SM, Song JH, Lee JS. Quality characteristics and physiological functionality of traditional rice wines in Chungnam province of Korean. *Kor J Microbiol Biotechnol*, 38, 177-182 (2010b)
- Min JH, Baek SY, Lee JS, Kim HK. Changes of yeasts and bacterial flora during the storage of Korean traditional *Makgeolli*. *Kor J Mycol*, 39, 151-153 (2011)
- Park CW, Jang SY, Park EJ, Yeo SH, Kim OM, Jeong YJ. Comparison of the quality characteristics of commercial *Makgeolli* type in South Korea. *Korean J Food Preserv*, 18, 884-890 (2011)
- Shin DS, Jeong ST, Sim EY, Lee SK, Kim HJ, Woo KS, Oh SK, Kim SJ, Park HY. Quality characteristics of mixed *Makgeolli* with barley and wheat by fermentation temperature. *Korean J Food Nutr*, 30, 305-311 (2017)
- So MH, Lee YS, Han SH, Noh BS. Analysis of major flavor compounds in *Takju* mash brewed with a modified *Nuruk*. *Korean J Food Nutr*, 12, 421-426 (1999a)
- So MH, Lee YS, Noh BS. Improvement in the quality of *Takju* by a modified *Nuruk*. *Korean J Food Nutr*, 12, 427-432 (1999b)
- Song CS, Ju HM, Kim JM. Effects of isoamyl acetate production in *Makgeolli* according to fermentation conditions. *J Life Sci*, 30, 162-168 (2020)
- Torija MJ, Beltran G, Novo M, Poblet M, Guillamon JM, Mas A, Rozes N. Effect of fermentation temperature and *Saccharomyces* species on the cell fatty acid composition and presence of volatile compounds in wine. *Int J Food Microbiol*, 85, 127-136 (2003)
- Yeo SH, Jeong YJ. Current trends and development a plan in the Korean *Makgeolli* industry. *Food Sci Ind*, 43, 55-64 (2010)