清酒酵母의 Alcohol 耐性

宋 亨 翼
〈大邱工業專門大 敎授〉

1. 緖 論

청주양조법의 특징은 開放醱酵方式에 의하면서다 효모의 自然순수 배양환경을 造成하여 併行複醱酵에 의하여 20~22%의 고농도 alcohol을 生成하는 것이다.

清酒釀造에서 酵母에 의한 고농도 alcohol 生成과 관련하여 우리는 두가지 점에 대하여 관심을 가지게 된다. 그 하나는 어떻게 해서 清酒釀造에서는 다른 양조에서 볼 수 없는 고농도 alcohol이 酵母에 의해 生成될 수 있느냐 하는 점이고 다른 하나는 親株의 여러가지 단점을 보완하여 清酒의 품질을 향상시키고 alcohol농도를 높이기 위하여 요즈음 한창 연구되고 있는 고농도 alcohol耐性 變異株에 관한 것이다.

먼저 清酒양조에서 볼 수 있는 酵母의 고농도 alcohol 生成에 대하여 알아 보고자 한다.

이와같은 현상은 다른 釀造에서는 볼 수 없는 것으로서 일반적으로 糖化가 필요없는 單醱酵나 糖化와 醱酵가 분리되어 있는 單行複醱酵에서는 清酒에서보다 훨씬 낮은 alcohol을 生成하고도 醱酵末期에 효모가 약화되어 발효가 지연되거나 심하면 중지되는 경우마저 있다.

清酒양조에서는 어떻게 해서 발효말기에 alcohol이 18~20% 生成되어도 효모가 사멸되지 않고 20%이상의 고농도 alcohol을 생산할 수 있을까 하는 점은 퍽 흥미로운 일이 아닐 수 없다.

다음으로 耐alcohol性 청주효모의 선택에 대하여 알아보면, 발효말기에 alcohol이 18~20% 生成되면 대부분의 효모는 거의 사멸되고 발효가 현저히 완만해 진다. 이와 같은 酒醪를 그대로 방치하면 효모菌 體內의 carboxypeptidase의 活性化로 인한 아미노산의 溶出을 가져와 아미노산이 증가하고 着色이 되기 쉬우며 품질이 나빠지고 保存性이 결여되어 저장酒는 火落菌의 침입을 받기 쉽다. 이런 현상을 방지하기 위해서는 발효末期에 高濃度 alcohol이 生成되거나 alcohol添加 後에도 사멸되기 어려운 소위 alcohol耐性이 강한 變異株를 分離·이용하는 것이 바람직하다.

이렇게 함으로써 製成酒의 品質低下나 保存性에 영향을 주지 않고 清酒醪의 장기간 발효를 도모하여 고농도 alcohol을 생산하며 酒粕

비율을 감소시켜 原料米를 절약할 수 있는 등 여러가지 잇점이 따르게 된다.

淸酒釀造에서 고농도 alcohol生成 현상을 효모쪽에서 보면 酵母의 alcohol耐性이라고 말할 수 있다. 즉 酵母는 自信이 生成한 alcohol에 耐性을 가지고 있어서 高濃度의 alcohol을 생산할 수 있는 능력이 있음을 의미하는 것이다. 청주양조에서 고농도 alcohol이 만들어진다는 것은 다시 말해서 淸酒酵母가 비교적 고농도의 alcohol에 耐性이 있어서 酵母生育이 阻害되지 않음을 말하는 것으로 淸酒제조 자체가 이처럼 효모生育이 저해되지 않도록 하는 因子를 지니고 있다고 봐야 할 것이다.

한편, alcohol耐性 變異株란 通常의 淸酒醪의 alcohol 농도보다도 높은 alcohol 농도에서도 生育할 수 있는 酵母로서 이 酵母는 같은 여건하에서도 親株의 難點을 보완할 수 있어 청주양조의 관리와 품질면에서 여러가지 장점을 나타낼 수 있는 가능성이 있다.

이 두가지 문제에 관하여 지금까지 검토되어온 硏究內容을 중심으로 살펴 보고자 한다.

2. 高濃度 alcohol 耐性 變異株의 分離 및 利用

(1) 變異株의 分離方法

酵母의 alcohol耐性이란 ①증식 가능한 alcohol 濃度 ②醱酵力에 미치는 alcohol濃度 ③alcohol용액 중에서의 生存率등 세가지로 나누어 생각해 볼 수 있으나 여기서는 ③의 뜻으로 淸酒醪 末期의 고농도 alcohol(20%)에서도 사멸되기 어려운 酵母를 말한다.

淸酒의 耐alcohol性 酵母를 分離하는 방법에는 두가지가 있다[1]. 그 하나는 淸酒酵母의 自然 變異株 가운데서 alcohol耐性이 강한 효모를 선택하는 方法이다. 자외선 조사 등의 여러가지 變異처리에 의해 人工돌연변이를 유발시켜 分離할 수도 있으나 공교롭게도 가장 널리 이용되는 淸酒효모(Saccharomyces Sake Kyokai No. 7)에서는 現在까지 人工돌연변이에 의해서 有用 耐alcohol性 효모가 分離되지 않고 있다.

이 方法을 대략 소개하면, koji extract 중에서 親株(Sac. Sake Kyokai No. 7)를 20°C에 5일간 배양하여 그 培養菌體를 水洗後 20% alcohol, 0.1M-acetate buffer(pH 4.2), glucose 1%, 효모수 10^8/m*l*의 條件에서에 15°C. 7日間 放置한다. 生存효모를 대상으로 平板培養을 되풀이하여 生存率 2%이상의 菌株를 얻고 다시 같은 조작을 반복하여 生存率 10% 이상의 菌株를 分離하고 이 가운데 가장 生存率이 높은 효모를 alcohol耐性 變異株로 선택하는 것이다.

또 한가지 방법은 alcohol耐性株의 菌學的 性質을 이용한 것으로서 alcohol耐性株는 酵母 세포벽 분해요소에 의해 溶解되기 어렵다는 점을 이용하여 變異株를 濃縮하는 방법이다. 즉 청주효모 또는 자외선 조사처리 효모를 koji extract에서 20°C에 48시간 배양하여 대수증식기에 이르면 원심분리하여 無菌水로 세척하고 0.1M-phosphate buffer(pH 7.5)에 菌數 10^8/m*l*가 되도록 효모를 현탁시킨 후 효모세포벽 용해효소를 30°C에서 3~5시간 處理하여 효소反應을 유도한다. 反應 終了液을 다시 koji

extract에 일정시간 배양하여 溶解되지 않는 酵母를 얻고 다시 上記의 培養, 溶菌反應 操作을 되풀이하여 酵母生菌溶解酵素에 溶解되기 어려운 효모 즉 alcohol耐性효모를 濃縮하는 것이다.

이 방법은 앞의 방법보다 容易하게 耐性株를 分離할 수 있어 현재 多數의 變異株가 分離되어 있지만 實用性에 관해서는 검토중이다

(2) 耐alcohol性 變異株의 菌學的 性質

淸酒酵母(Sac. sake Kyokai No. 7)의 自然變異株에서 分離된 두개의 變異株(6-4-C, 26-3-C)의 菌學的 性質을 親株와 비교하면 다음과 같다[1].

①糖資化性과 醱酵性 : 변이주는 親株에 비해 α-methyl-D-glucoside의 발효성과 자화성이 약하다.

②酵母 현탁액에서의 生存性 : 배양 효모를 水洗후 증류수에 현탁하여 20°C, 30日間 放置하거나 pantothenic acid결핍배지에서 30°C에서 5일간 진탕배양하면 生存率이 親株보다도 현저히 크다.

③효소活性 : 효모 세포벽에 存在하는 것으로 알려진 酸性 phosphatase 및 invertase 活性이 親株보다 약하다.

④Killer抵抗性 : 變異株는 어느것이나 killer factor에 대하여 저항성이 있어서 killer효모에 의해 사멸되지 않는다.

⑤酵母生菌溶解酵素에 대한 溶解性 : 대수증식기의 변이주는 Oerskovia sp. 또는 Arthrobacter luteus의 生菌溶解효소에 의해 溶解되기 어렵다.

이밖에 TTC染色性, β-alanine培地에서의 生育, cellulose와의 응집성, 기타 菌學的 성질은 親株와 거의 동일하다.

(3) 淸酒양조시 耐alcohol性 효모의 利用性

앞서의 變異株를 利用하여 소규모 양조시험을 한 결과 親株와 비교하여 몇가지 특징이 나타났다. 그 중요한 것을 요약하면 다음과 같다[2].

①酒母생략의 培養효모를 사용한 바 배양효모의 색이 親株보다 희다.

②酒醪의 香氣는 親株보다 약간 떨어지거나 거의 같다.

③醪前半의 당감소율이 떨어져서 alcohol生成이 지연되며 따라서 여과까지의 발효일수가 길어진다.

④醪後半의 당감소율은 떨어지지 않는다.

⑤Alcohol添加 後도 효모가 사멸되기 어려우므로 곧 여과할 필요가 없다.

⑥醪末期에 효모가 사멸되지 않으므로 장기간의 발효가 가능하고 酒質을 저하시키지 않고 20~21%의 alcohol生成이 가능하다.

⑦醪, 製成酒의 酸度가 높은데, 그 이유는 親株에 비해 malic acid가 많기 때문이다. 일반淸酒의 酸組成의 비율은 succinate : lactate : malate=5 : 5 : 2~3이지만 耐性株로 만든 淸酒의 酸組成은 5 : 3 : 5로써 malate가 많다.

⑧製成酒의 아미노산이 적고 색이 옅으며 貯藏中 갈변도 적다. 또한 hetero火落菌의 生育도 억제된다.

⑨ 親株에 비해 酒粕비율이 낮고 원료미當 純alcohol 生産量이 많다.

이상에서 기술한 바와 같이 alcohol耐性효모는 종래의 효모와 醱酵과정, 酒質 등에 있어

서 큰 차이가 있어서 자원을 절약하고 酒質의 均様化 등의 당면 문제를 해결하는데 유효한 수단의 하나가 될 것이다.

3. 淸酒醸造에 있어서 高濃度 alcohol生成 因子

청주양조에서 고농도 alcohol生成기구의 해명은 원료의 하나인 *rice-koji*에서 비롯되었다.

山崎[3]는 酒醪 중의 koji固形部가 고농도 alcohol生成의 필수조건이라 하였고 井上 등[4]은 Aspergillus oryzae나 Aspergillus oryzae의 alcohol抽出液에 의해 효모의 증육이 촉진되고 耐alcohol性이 켜짐을 밝혀 Aspergillus oryzae에 特殊因子가 存在함을 推察하였다. 또한 福井[5], 中西[6] 등은 각각 koji extract중의 미지物質에 의해 효모의 耐糖性 및 耐alcohol性이 增强됨을 보고하였다. 山城 등은[7] koji extract 添加만으로서는 고농도 alcohol이 生成되지 않고 koji의 고형부가 꼭 필요하다고 보고함으로써 山崎의 결과를 지지했다.

林田은[8] 이 결과를 토대로 다시 검토한 바 淸酒醪 자체가 高濃度 alcohol生成因子를 지니고 있어서 자체의 醱酵力을 增强하고 더우기 保護하는 독자의 기능을 구비하고 있음을 확인하였다.

일반적으로 발효력 增强기능으로서는 Aspergillus oryzae-proteolipid(이하 PL이라 略함)에 의한 효모증식 촉진효과를 들고 있으며[9] 발효력보호 기능으로서는 ①低温발효에 의한 生成alcohol의 害作用완화, ②併行複醱酵에 따른 효모의 고농도 糖壓迫 防止 ③白米 단백질 oryzenin에 의한 tryptophol 등의 발효副生 有害物質의 吸着[10] ④PL, 기타 성분에 의한 醪의 산화환원전위의 유지와 조절을[11] 들고 있다.

이와 같은 복합적인 결과로써 淸酒醪에서 고농도 alcohol生成이 가능하다고 볼 수 있다.

4. 高濃度 alcohol 生成因子로서의 麴菌PL

PL은 1951年 Folch등에[12] 의해 최초로 分離된 lipid-protein複合體로서 물에 不溶이라는 점이 lipoprotein과 다르다. 그 중에 가장 상세히 연구된 것은 소뇌의 PL이지만 그 구조나 기능에 대해서는 不明한 점이 많다.

한편, Aspergillus oryzae-PL에 대해서는 이보다 훨씬 늦게 연구되어 청주양조에 있어서 고농도 alcohol生成因子로서 주목을 받고 있다.

Kawaharada 등은[13] Aspergillus oryzae의 *mycelia*로부터 PL을 分離하였으며 林田[14] 등은 PL의 구조가 不飽和지방산을 含有하는 인지질과 巨大分子의 複合體임을 확인하였다. 이어 林田 등은[15] PL을 合成배지에 添加한 결과, 20% 이상의 고농도 alcohol을 단기간에 生成하는 사실로 미루어 麴菌PL은 효모증식촉진작용과 고농도 alcohol生成作用을 동시에 나타내는 고농도 alcohol生成因子임을 확인하였다. 또한 일반 微生物의 生育이 阻害되는 환경인 低温, 높은 糖含量, alcohol 및 젖산의 存在, 혐기적 조건하에서도 PL이 존재하면 효모의 증식이 촉진되어 醱酵力이 증대됨을 알았다.

林田 등은[16] 合成배지에 PL을 첨가하여 여러가지 조건하에서 효모의 生理的 性質을 조사한 바, PL이 배양조건에 따라 효모의 生理에 큰 영향을 미치며 주발효 醪와 같은 혐기적 조건하에서만이 PL에 의해 높은 醱酵力과 높은 alcohol耐性이 얻어짐을 알았다.

Aspergillus oryzae-PL의 組成과 양조에서의 역할에 대해 지금까지 밝혀진 것을 보면 다음과 같다[17]. 麴菌PL의 조성은 phospholipid 58.5%, protein 26.7%, ash 5.4%로 밝혀졌다. 인지질의 구성成分은 phosphatidylcholine 78.3%, sphingolipid 18.5%, lysophosphatidylcholine 3.2%이며 지방산의 77.5%가 不飽和지방산이고 그 중에서 linoleic acid가 대부분을 점하고 있다.

단백질 부분은 지방족 및 산성 아미노산이 풍부한 것으로 알려지고 있다.

PL의 역할은 혐기적 배양조건에서 자신이 지니고 있는 不飽和지방산 含有 phosphatidylcholine을 효모細胞에 공급하여 효모生育을 촉진하고 효모活性을 높이는 것으로 되어 있다.

즉 PL은 효모의 lipid-supplier로서의 역할을 담당하는 셈이 되는 것이다.

끝으로 alcohol耐性효모의 細胞구조에 대해 알아보면 Hayashida 등은[18] PL을 添加하여 혐기적으로 배양한 청주효모(Sac. sake Kyokai No. 7)의 alcohol耐性 變異株를 전자현미경으로 관찰한 바, 세포질에 腔胞가 전혀 없고 많은 lipid가 축적되어 있으며 耐性株의 sphaeroplast도 alcohol에 대하여 親株보다 安定함을 최초로 확인하였다.

5. 高濃度 alcohol 生成과정에 있어서 酵母의 生理的 性質

淸酒효모의 生理에 대해서는 다수의 연구가 있지만 麴菌 由來의 PL에 의한 고농도 alcohol 生成과정에서 효모의 生理的 性質 변화에 대해서는 不明한 점이 많다. 大內 등은[19] 淸酒醪를 그대로 사용하면 효모를 回收하기 어려운 점을 감안하여 액체合成배지에 18% 이상의 alcohol을 生成하도록 한 培養系를 써서 대사産物의 消長, 효모의 醱酵力 등을 조사하여 실제의 淸酒醪와 비교하였다.

培地에 따라서 8~20일로써 18%의 alcohol이 生成되었으며 효모의 증식能, 발효力, methylene blue染色率 등은 일반 청주醪에서의 生理와 거의 같았다. 또한 Sac. sake Kyokai No. 7을 15°C, 25일간 발효시켜 alcohol 18%를 生成하는 과정에서의 菌體구성 成分의 변화를 보면[20], glycogen, DNA, RNA, 인지질 등은 발효기간중 거의 변동이 없었으며 全脂質과 stearic acid는 초기에 증가하여 이후는 일정濃度로 유지되었다. 세포벽 구성成分인 glucan과 mannan은 中期 이후 서서히 증가했다. 효모의 貯藏糖인 trehalose는 초기에 증가하다가 이후 減少하였으며 全糖은 초기에 증가하다가 일단 감소한 후 서서히 증가했다. 단백질은 감소하는 경향이었고 palmitoleic acid와 oleic acid는 초기에 감소하고 그 후는 일정수준으로 유지되었다. 지방산 ethyl ester는 alcohol의 生成에 따라 증가하는 것으로 推定되었다. 이처럼 균체 구성成分은 발효초기에

뚜렷한 변화가 일어났으며 고농도 alcohol축적 시기인 발효후기에는 변화가 의외로 적은 경향이었다.

그러나 이것만으로는 불충분하므로 이 과정에서의 菌體內 효소의 動態, energy level, 단백질 및 核酸의 대사 등을 조사하여 종합적으로 검토해 볼 필요가 있으리라 사료되어 이 분야의 연구가 기대된다.

6. 結 論

이상에서 淸酒양조와 관련하여 高濃度 alcohol이 生成되는 원인과 인자에 대하여 알아보고 이와 아울러 고농도 alcohol生成과정에서의 효모의 生理的 성질에 대하여 살펴 보았다. 또한 청주의 고농도 alcohol生成과 품질향상을 위해 연구되고 있는 alcohol耐性 變異株에 관하여 그 分離法, 균학적 性質 및 利用性을 개괄적으로 검토하였다.

淸酒에서의 고농도 alcohol生成因子에 대해서는 술이 만들어지는 바로 그 환경에서 검토되어 여러가지가 밝혀지고 있지만 그 중에서 가장 중요한 因子는 麴菌 由來의 PL로 알려지고 있다. 그러나 現在로서는 PL의 대략적인 組成과 役割이 推定되고 있을 뿐 자세한 고농도 alcohol生成기구에 관해서는 연구단계에 있다.

耐alcohol性 變異株에 관해서는 分離方法과 菌學的 性質이 밝혀지고 있으며 이를 이용한 淸酒시험양조가 이루어지고 있는 단계에 있어 실용화되기 위해서는 앞으로 많은 문제가 연구·검토되어야 할 것이다.

參 考 文 獻

1. 原 昌道, 野白喜久雄 : 釀造, 73, 14(1978)
2. 原 昌道, 野白喜久雄 : 釀造, 73, 76(1978)
3. 山崎何惠 : 醱酵協會誌, 16, 335(1958)
4. 井上貞三, 高岡祥夫, 秦 昌造 : 醱工, 40, 511(1962)
5. 福井三郎, 谷 喜雄, 岸部忠信 : 醱工, 33, 59(1955)
6. 中西透, 灘井幸明, 照井堯造 : 醱工, 38, 564(1960)
7. 山城敬一, 下出光男, 谷 喜雄, 福井三郎 : 醱工, 44, 602(1966)
8. 林田晋策 : 化學と生物, 9, 648(1971)
9. 川原田肇, 林田晋策, 本江元吉 : 醱工, 48, 29(1970)
10. 本江元吉, 林田晋策, 井上 繁, 小泉隆司, 川原田肇 : 農化, 41, 630(1967)
11. 川原田肇, 古賀 肇, 林田晋策, 本江元吉 : 農化, 41, 640(1967)
12. J. Folch and M. Lees : J. Biol. Chem., 191, 807(1951)
13. H. Kawaharada, S. Hayashida and M. Hongo : J. Ferment. Technol., 48, 29(1970)
14. S. Hayashida, D.D. Feng and M. Hongo : Agr. Biol. Chem., 38, 2001(1974)
15. 林田晋策, 南里信也, 鄧 德豊, 本江元吉 : 農化, 48, 529(1974)
16. S. Hayashida, D.D. Feng and M. Hongo : Agr. Biol. Chem., 39, 1026(1975)
17. S. Hayashida, D.D. Feng, K. Ohta, S. Chaitiumvong and Hongo : Agr. Biol. Chem., 40, 73(1976)
18. S. Hayashida and K. Ohta : Agr. Biol. Chem., 42, 1139(1978)
19. 大內弘造, 佐藤智博, 高岸正邦, 植田浩行, 秋山裕一 : 釀造, 72, 667(1977)
20. 大內弘造, 植田浩行, 川瀨直樹, 佐藤智博, 高岸正邦, 秋山裕一 : 釀造, 72, 735(1977)