

수박즙스의 알콜발효에 관한 연구

김성림* · 김우정* · 이상열 · 변시명

한국과학기술원 생물공학과

*세종대학교 식품공학과

(1984년 6월 12일 수리)

Alcohol Fermentation of Korean Watermelon Juice

Seong-Lim Kim*, Woo-Jung Kim*, Sang-Yeol Lee and Si Myung Byun

Department of Biological Science and Engineering
Korea Advanced Institute of Science and Technology, Seoul

*Department of Food Science and Technology, King Se-Jong University, Seoul

Abstract

For the ultimate manufacture of vinegar with watermelon juice, we examined the preliminarily alcoholic fermentation of watermelon juice using *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* and *Kluyveromyces fragilis*. The juice contained 3.2% total reducing sugar by the Somogyi-Nelson method. Strains of yeast culture, pH, temperature and concentration of sugar in the juice were important factors affecting alcoholic fermentation.

Saccharomyces cerevisiae var. *ellipsoideus* produced 5.3% alcohol from from the juice fortified with 12% glucose under the conditions of pH 5.73 and 27°C for 8 days. Generally, small quantities of various salts and N-sources affected little the alcoholic fermentation of the juice. The sterilization of the juice by autoclaving improved efficiency of fermentation than that by SO₂ sterilization. Determination of alcohol was carried out by the gas chromatographic method using Chromosorb W: Carbowax as packing material.

서 론

수박은 95% 가량의 수분이 함유된 신선한 맛을 주는 과일로서 많은 나라에서 애용되고 있으며, 우리나라에서도 그 재배 면적과 생산량이 증가하고 있으나, 이의 생산과 소비가 여름 한 계절에 국한되고 있고 저장성이 극히 낮아 손실량이 많고 운반에도 불편하여 이의 가공식품 개발이 요구되

고 있다.

수박은 현재 이노제로서의 연구가 일부되고 있으며, 식품분야에서도 수박을 이용한 가공방법으로서, 신등¹⁾이 발효를 이용한 수박즙스로서의 가능성에 관하여 보고한 바가 있고, Khattak 등²⁾은 수박즙스를 이용한 알콜 발효를 *Saccharomyces* 균주를 사용하여 2.1~2.6%의 알콜을 얻었으며, 당의 함량을 15%까지 올렸을때 알콜 농도를 6.5%까지 증가시킬 수 있었다고 하

였다. 그러나 발효에 관여되는 여러 조건과 질소 화합물 및 무기염류의 함량이 수박즙의 알콜 발효에 미치는 영향에 관한 보고는 거의 발표된 바가 없으므로, 본 연구에서도 *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces fragilis*, *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*의 균주를 사용하여 pH 및 온도, 그리고 당의 함량 변화에 따른 각 균주의 알콜 생성량과 여러가지 무기염류 및 질소 화합물의 영향을 비교 실험한 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

시료제조

본 실험에 사용한 원료 수박은 완숙된 것을 시장에서 구입하여 사용하였으며, 5kg 정도되는 수박의 껍질 부분을 제거한 후 적색의 과육 부분만을 waring blender를 사용하여 마쇄한 후 cheese clothes를 이용하여 여과시켰으며, 이렇게 하여 약 2.5l의 수박즙을 얻었다. 얻어진 수박즙은 실험에 사용될때까지 -70°C되는 냉동실에 보관하였다.

성분분석

가. 일반성분 : 환원당의 정량은 Somogyi-Nelson 방법, protein 정량은 micro-kjeldahl 방법, 그리고 지방, 회분, 수분, 정량은 AOAC 방법³⁾에 의하여 정량하였다.

나. 당분리⁴⁾ : TLC를 사용하여 수박즙의 당을 분리하였으며, 이때 사용된 전개용매는 1-butanol: pyridine: H₂O(60:40:30, v/v) 혼합액이었다. 전개후 TLC 판은 20% AgNO₃와 acetone 용액(20% AgNO₃ 1ml+acetone 100ml)에 담근 후 꺼내어 말린 후 ethanolic NaOH용액(1g NaOH+95% ethaol 20ml)에 살짝 담근후 말리고, 1% sodium thiosulfate 용액에 담갔다가 말려 분리된 당을 발색시켰다. 이때 분리된 당은 standard로 함께 apply한, 여러 standard sugar의 R_f치와 비교하여 동정한 결과 glucose, fructose, sucrose가 존재하는 것을 확인할 수 있었다.

다. 알콜의 정량⁵⁾ : 발효 중 생성된 알콜은 gas chromatograph (Hewlett Packard, U.S.A)를 사용하여 정량하였다. Column의 충전제는 solid phase가 chromosorb W, liquid phase는 carbowax 20M을 사용하였고, TCD를 사용하였다. GC 조건은 다음과 같다.

Column temperature: 120°C
 Injection temperature: 200°C
 Detection temperature: 200°C
 ATTN 2↑: 13
 Carrier gas: He
 Carrier gas flow rate: 8ml/min
 TCD signal: A-B

발효시킨 수박즙을 7000rpm에서 15분간 원심분리시켜 균이나 기타 발효후 생기는 침전물을 제거한 상등액을 5μl 취하여 gas chromatography로 정량하였다. 알콜함량은 다음 식으로 계산하였다.

$$\text{Alcohol}(\%) = \left\{ \frac{\text{Experimented area}}{1\mu\text{l standard area}} \right\} \div 5 \times 100$$

사용균주 및 전배양

알콜 효모로는 한국 중균협회 소장의 *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*를 사용하였고, *Saccharomyces cerevisiae*와 *Kluyveromyces fragilis*는 한국과학기술원 생물공학과 소장의 균을 사용하였다.

효모의 전배양은 YM broth medium을 사용하였으며, YM broth media는 121°C에서 15분간 살균시켰다. 무균실에서 완전 살균된 YM broth media에 사용할 균주를 1백금이 접종한 후 28°C에서 24시간 지낸후, 다시 무균실에서 완전 살균된 YM broth media 200ml에 활성화 시킨 media 중 20ml를 취하여 접종 시킨후 28°C에서 24시간 활성화 시킨다. 이렇게 활성화 시킨 media는 4°C되는 냉장고에 보관하였다.

살균 처리

수박즙의 살균방법으로는 가압살균과 SO₂ 처리 두가지 방법을 사용하였는데, 가압살균은 121°C에서 15분 동안 가열하였고, SO₂ 처리는 K₂S₂O₈를 110ppm 첨가하였다.

균 접종 발효조건

살균 처리된 40ml 수박즙에 활성화된 yeast culture 1ml를 접종시켜, 온도 27°C의 항온기에서 면전 위에 Al-foil을 덮어 혐기적 조건을 유지하였다. 하루에 2회 흔들여 yeast와 원액이 서로 잘 혼합되도록 하면서, 9일간 발효를 시켰다. 알콜 생성을 높이기 위하여 glucose를 9%, 12% 첨가한

실험도 행하였고, 발효 종료후에는 4°C 냉장고에 보관 하였다가 알콜 정량을 하였다.

결과 및 고찰

pH의 영향

알콜 발효를 위한 수박 원액의 일반성분은 수분이 95%, 환원당이 3.2%, 단백질이 0.36%, 지방질이 0.19%이었으며, pH는 5.73이었다. (Table 1). 수박주스의 발효를 위한 최적 pH를 찾아내기

Table 1. The chemical composition of watermelon juice.

Total reducing sugar (%)	Protein (%)	Fat (%)	Ash (%)	Water content (%)	Bix°
3.2	0.36	0.19	0.28	95	8~9

위하여 주스에 glucose를 9% 첨가하여 pH를 3~8 되도록 조절한후 살균시킨 다음, 활성화 시킨 *Saccharomyces cerevisiae var. ellipsoideus*를 2% 접종시켜 27°C에서 혐기적 조건하에 6일간 발효시킨 결과는 Fig. 1과 같다.

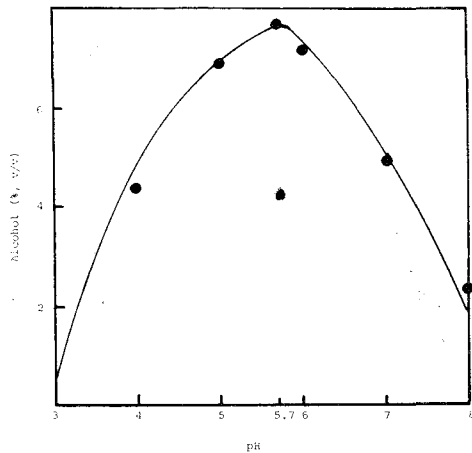


Fig. 1. Effect of pH on the alcohol fermentation of watermelon juice with *S. cerevisiae var. ellipsoideus*.

Fig. 1에서 보듯이 알콜 생성량은 pH 5.7에서 최대치인 3.8%에 도달하였으며, 그 후에는 서서히 감소되는 경향을 보여 수박주스의 발효를 위한 최적 pH는 5.7임을 알 수 있었다.

온도의 영향

수박 원액에 glucose를 9% 첨가하고 pH는 5.7 되도록 조절한 뒤 살균하여 활성화 시킨 *Saccharomyces cerevisiae var. ellipsoideus*를 2% 접종시켜 발효 온도를 22°C부터 37°C까지 변화시키면서 온도가 알콜 발효에 미치는 영향을 조사한 결과 (Fig. 2) 27°C와 29°C 사이에서 가장 많이 알콜을 생성하여 사용된 균주의 pH와 온도의 최적 조건은 5.7과 27~30°C였다.

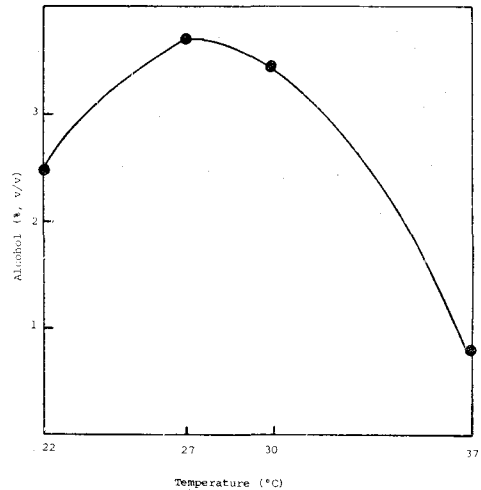


Fig. 2. Effect of temperature on the alcohol fermentation of watermelon juice with *S. cerevisiae var. ellipsoideus*.

Glucose 첨가가 알콜 농도에 미치는 영향

*Saccharomyces cerevisiae*를 이용한 수박주스의 알콜 발효에서 glucose의 농도와 살균방법이 발효 기간에 따른 알콜 생산량에 어떻게 영향을 주는지 알기 위하여 pH 5.7과 27°C에서 7일간 발효시켰다

Fig. 3은 알콜 발효를 위하여 *Saccharomyces cerevisiae*를 사용했을때의 결과로 121°C에서 15분간 고온살균시킨 주스가 SO₂ 처리 주스보다 높은 알콜 생산을 보였다. 고온살균의 경우 glucose 첨가량이 높아지면서 생성된 알콜 농도에 현저한 증가가 있었으나 SO₂ 처리 주스에서는 glucose를 9% 첨가 하였을때 가장 높았다. 발효기간에 따른 알콜 농도는 일반적으로 5~6일에서 최고치에 도달하여 5.2%(v/v)의 alcohol을 생성 하였으며, 그 이후에는 거의 증가되지 않았으므로 발효 5일에 발효가 끝난 것으로 생각된다.

*Kluyveromyces fragilis*와 *Saccharomyces cerevisiae var. ellipsoideus*를 접종시켜 같은 방법

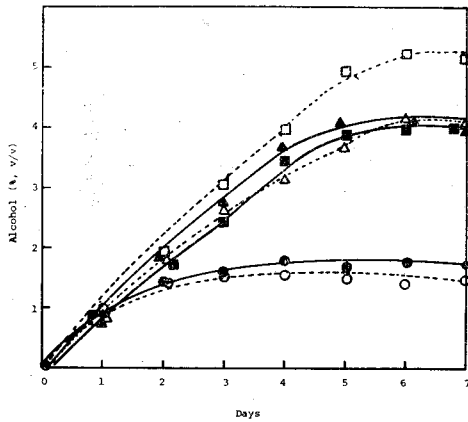


Fig. 3. Effect of glucose addition on the alcohol fermentation of watermelon juice by *S. cerevisiae*.

Control: ●—●, SO₂ treated, ○---○ autoclaved,
 9% glucose: ▲—▲, SO₂ treated, △---△ autoclaved,
 12% glucose: ■—■, SO₂ treated, □---□ autoclaved.

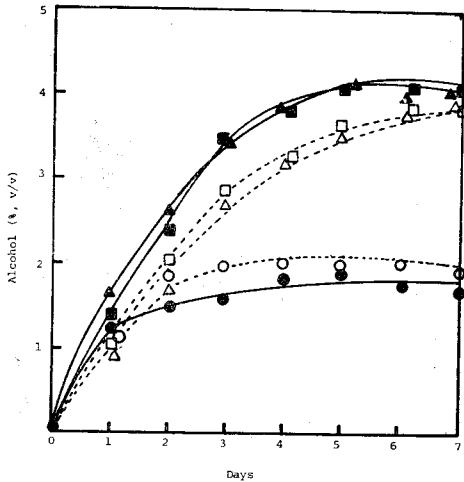


Fig. 4. Effect of glucose addition on the alcohol fermentation of watermelon juice by *K. fragilis*.

Control: ●—● SO₂ treated, ○---○ autoclaved,
 9% glucose: ▲—▲ SO₂ treated, △---△ autoclaved,
 12% glucose: ■—■ SO₂ treated, □---□ autoclaved.

으로 알콜 발효를 시켰을 때의 결과는 Fig. 4 및 Fig. 5와 같다. *Kluyveromyces fragilis*에 의한

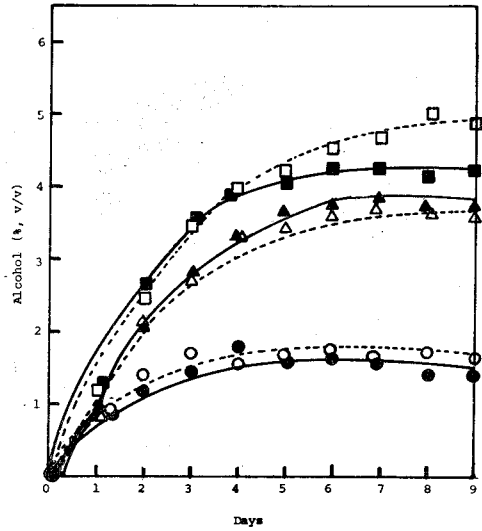


Fig. 5. Effect of glucose addition on the alcohol fermentation of watermelon juice by *S. cerevisiae var. ellipsoideus*.

Control: ●—● SO₂ treated, ○---○ autoclaved,
 9% glucose: ▲—▲ SO₂ treated, △---△ autoclaved,
 12% glucose: ■—■ SO₂ treated, □---□ autoclaved.

알콜 발효의 경우 *Sacharomyces cerevisiae*와 같이 발효 5~6일에 알콜 최대 생성량을 보였으나 glucose 첨가량이 12% 일때와 9% 일때의 수박주스의 알콜 농도는 거의 같은 것으로 나타났으며, 또한 9%와 12%의 glucose인 경우 고온살균 보다 SO₂ 살균 주스에서 더 많은 알콜 발효가 일어났다. 환원당 함량이 3.2%인 대조구에서는 저극히 완만한 증가를 보였다. 한편 *Saccharomyces cerevisiae var. ellipsoideus*은 *Saccharomyces cerevisiae*와 유사한 결과를 보여 고온살균된 시료중, glucose 첨가량이 12%인 주스가, 발효 8일 후 최대치인 5.2%의 알콜 생성량을 보였으며, SO₂에 의해 살균된 12%와 9%, 그리고 고온 살균된 9% 주스가 발효 6~7일에 3.7~4.1%의 알콜을 생성한 유사한 값을 보였다. 이상의 결과에서 균주간에 최대 알콜 생성을 위한 발효일수에 약간의 차이가 있었으나 대조구 보다는 glucose를 첨가하였을 때 알콜 생성량이 높아짐을 알 수 있었으며, *Kluyveromyces fragilis*는 다른 두균주와는 달리 SO₂ 처리 주스가 고온 살균주스들 보다 알콜 생성량이 약간 높았음을 볼 수 있었다.

또한 *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*가 알콜 생성에서 사용된 균주중 가장 완만한 최대치 범위를 보여주어 수박주스 알콜발효를 위해 적절한 균주로 밝혀졌다.

Glucose 용액의 발효 및 최대효율

위에서 사용된 세가지 균주들에 의한 수박주스의 발효가 순수한 glucose 용액을 발효시켰을 때와 알콜 생성량에 어떤 차이가 있는지 조사하기 위하여 pH 5.7로 조정한 glucose 첨가량이 9%, 12% 용액을 27°C에서 혐기적 조건으로 발효시킨 결과는 Fig. 6과 같다.

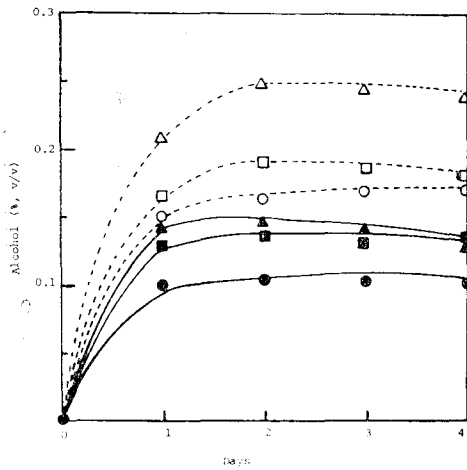


Fig. 6. Changes in alcohol production during glucose fermentation at 27°C and pH 5.7.
S. cerevisiae : ●—● 9% glucose solution, ○---○ 12% glucose solution,
K. fragilis : ▲—▲ 9% glucose solution, △---△ 12% glucose solution,
S. cer. var. ellipsoideus : ■—■ 9% glucose solution, □---□ 12% glucose solution.

최대 알콜발효 일수에서 6~8일인 수박 주스의 경우와는 달리 발효 2일에서 최대 알콜 생성량을 보였으며, 그 생성량도 수박주스 경우의 5% 이하인 0.16~0.25% 정도이었다. 사용 균주 중에서도 *Kluyveromyces fragilis*가 가장 많은 알콜발효를 보인 반면 *Saccharomyces cerevisiae*와 *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*는 비교적 낮은 생성량을 보여 수박주스에는 알콜 발효를 돕는 효소들이 함유되어 있음을 알 수 있었다.

수박주스에 함유되어 있는 당이 알콜로 변하는 정도를 알아보기 위하여 다음 식을 이용하여 최대

효율 값을 계산하였다.

최대효율(%) =

$$\frac{100\text{ml중 함유된 알콜(ml)} \times 180 \times 0.789}{100\text{ml중 함유된 glucose(g)} \times 92} \times 100$$

Table 2는 수박주스 발효에 사용된 균주들의 최대효율을 비교한 것으로 *Saccharomyces cerevisiae*와 *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*는 *Kluyveromyces fragilis* 보다 높은 효율을 나타내었으며, 발효 당시, 후자가 더 안정된 발효상태를 보여 주었으므로 수박의 알콜 발효에 있어서는 *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*를 사용하는 것이 더 양호한 알콜을 생성해 낼 수 있으리라고 사료된다.

Table 2. Fermentation efficiency at maximum alcohol produced at pH 5.72 and 27°C.

Yeast	Reducing sugar* %,	Alcohol-produced, %	Maximum alcohol, %
<i>S. cerevisiae</i>	3.2	2.1	
	12.2	4.3	53.1
	15.2	5.2	52.8
<i>K. fragilis</i>	3.2	2.1	
	12.2	4.0	50.8
	15.2	4.0	40.6
<i>S. cerevisiae</i> var. <i>ellipsoideus</i>	3.2	2.5	
	12.2	4.0	50.8
	15.2	5.3	53.6

* Total reducing sugar content in watermelon juice after addition of glucose.

무기염과 질소 화합물의 첨가

수박주스에 무기염들을 첨가하였을 경우 알콜 발효에 미치는 영향을 조사하기 위하여 Table 3에 표시되어 있는 여러가지 무기물을 glucose 12.2%로 첨가한 수박주스에 넣어 *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*로 6일 동안 발효시킨 것과 각각의 무기물을 하나씩 종합 무기물 혼합액에서 제거하면서 생성된 알콜량을 측정하여 각 무기물의 영향을 비교하였다. 그 결과 salt mixture를 첨가하였을 경우 알콜생성에는 큰 변화를 주지 않는다는 점과 염소 이온은 알콜생성에 큰 저해요소로 작용하며, K, Mg, Cu, Zn, Ca, P 등은 알콜 생성에 필수 불가결한 인자라는 점이 밝혀졌다.

Table 3. Effect of salts on the alcohol fermentation of watermelon juice with *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus* at pH 5.73 and 27°C for 6 days.

Salts Substracted from medium	Salt concentration*	
	30ppm	50ppm
Control	3.7	3.7
KCl	1.4	0.5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.9	1.4
NaCl	4.0	3.8
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.9	1.0
MnCl ₂ ·2H ₂ O	2.2	1.9
ZnCl ₂	1.4	1.3
SnCl ₂ ·2H ₂ O	3.9	3.9
FeSO ₄ ·7H ₂ O	3.4	3.9
CaCO ₃	1.2	0.6
KH ₂ PO ₄	2.1	2.0

* Medium: Total reducing sugar: 12.2%, KCl, MgSO₄·7H₂O, NaCl, CuSO₄·5H₂O, MnCl₂·2H₂O, ZnCl₂, SnCl₂·2H₂O, FeSO₄·7H₂O, CaCO₃, KH₂PO₄ in the concentration of 30ppm or 50ppm.

Table 4. Effects of nitrogen sources on the alcohol fermentation of watermelon juice with *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus* pH 5.73 and 27°C for 6 days.

	N-source	Alcohol %
Organic*	Control	3.7
	Yeast extract	0.7
	Bactopeptone	2.6
	Isoelectric casein	2.4
	Malt extract	2.1
	Bactotryptone	0.6
	Neopeptone	1.2
Inorganic**	Control	3.7
	(NH ₄) ₂ SO ₄	3.8
	NH ₄ Cl	0.2
	NH ₄ NO ₃	3.3
	NaNO ₃	3.2
	(NH ₄) ₆ MO ₇ O ₂₄ ·4HO	1.0

* 1% added. ** 0.5% added.
Total reducing sugar in watermelon juice: 12.2%

Table 4 는 유기 및 무기질소 화합물이 알콜발

효에 미치는 영향을 실험한 결과로 유기질소원을 첨가했을때 알콜 생성에 현저한 감소현상을 보였다. 이유는 접종한 균체가 첨가되는 N-source를 섭취함으로써 알콜발효 보다는 당을 균체의 증식에 이용하였기 때문에 낮은 알콜 생산량을 초래하였다고 본다.

또한 무기질소 화합물의 첨가에서 염소이온이 알콜 생성에 저해요소로 작용한다는 사실을 알 수 있었고, 그 외에는 별로 큰 영향을 미치지 않으나 (NH₄)₆MO₇O₂₄·4H₂O의 첨가시에는 수박액의 색이 검게 변하여 대단히 좋지 않았다.

이상의 결과에서 수박주스에 무기염이나 질소화합물의 첨가가 알콜 발효에 큰 도움이 되지 않는다는 사실이 밝혀졌다.

요 약

수박은 소비자가 즐겨 먹는 신선한 과일로서 저장성이 낮아 손실량이 많을 뿐만 아니라 여름 한철만 소비자에게 공급할 수 있는 단점이 있어 이의 저장성 및 이용성을 높이고자 수박주스의 알콜 발효를 연구하였다.

수박주스속에는 3.2%의 환원당이 함유되어 있었으며, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces fragilis*와 *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* 세균주를 사용하여 pH, 온도, 당 농도가 알콜 발효에 미치는 영향을 조사한 결과, 수박주스에 glucose를 12% 첨가하고 pH 5.73 및 온도 27°C에서 *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*를 2% 접종 시켰을 때, 발효 8일째 최대치인 5.3%의 알콜을 생성함을 알 수 있었다. 또한, 알콜 발효에 있어서 nitrogen sources와 여러 무기염류가 발효에 약간의 영향을 미친다는 사실을 알게 되었으며, 살균방법에 있어서는 SO₂ 처리 (K₂S₂O₈ 110ppm) 보다 고온 살균(121°C, 15분) 하였을때 살균효과가 높을 뿐만 아니라 알콜 생성량도 높았다.

참 고 문 헌

1. 신동화 · 구영조 · 김정옥 · 민병용 · 서기봉 : Korean J. Food Sci. Technol., 10, 215 (1978).
2. Khattak, J.N. Hamdy, M.K. and Powers J.J.: Food Technol. 19(8), 102(1965).

3. Official method of analysis of the A.O.A.C. 8th Ed, 1965.
4. 한국생화학회 교재편찬위원회 편저, 실험생화학, 탐구당, 1981.
5. 최원상 : 패지갑자 배지를 이용한 이눌라아제 생산에 영향을 미치는 조건에 관한 연구, KAIST, M.S. Thesis (1982).
6. Rose, H. A. and Horrison, J.S.: The Yeast, Vol. 2, pp. 4~60, A.P., New York.
7. Skinner, C. and Shapton, G.: Identification methods for microbiologists, Part B. pp.15 2~175, Academic Press, London, New York.
8. Khattak, J.N., Hamdy, M.K. and Powers, J.J.: Food Technol., **19**(6) 108(1965).