

## 전분분해효소와 유산균에 의한 보리의 유산발효

이 형춘 · 구 영조\* · 신 동화\*\*

서울보건전문대학

\* 한국식품개발연구원

\*\* 전북대학교

(1988. 11. 22 수리)

Lactic Fermentation of Steamed Barley with an Enzyme and a Lactobacillus

Hyeong-Choon Lee · Chung-Oh Park \* · Dong-Hwa Shin \*

Seoul Health Junior College

\* Korea Food Research Institute

\*\* Cheonbuk National University

(Received November, 22, 1988)

### ABSTRACT

Fermented barley food was produced by the combining action of an enzyme and a lactobacillus. When *Lactobacillus sp.* L-5 and commercial liquefying amylase from Tae Pyeong Yang Chemical Co. were selected, inoculated on steamed barley and cultivated at 37°C for 48hrs, the fermented product of good quality was obtained. In batch cultivation using rotary drum fermentor, viable cell count reached  $1.1 \times 10^9$  CFU/g after 12hrs' cultivation, and specific growth rate in logarithmic phase was  $0.6 \text{ hr}^{-1}$ . Viable cell count, acidity, pH, concentration of reducing sugar and viscosity of the 48hrs' fermentation product from rotary drum fermentor was  $4.3 \times 10^8$  CFU/g, 1.17%, 3.1, 10.7% and 1430cp.

### 서 론

저자들은 이미 곰팡이·효모 및 유산균에 의한 보리의 혼합발효<sup>1)</sup>에 대한 연구를 수행하였으나, 보리의 이용도증대를 위해서는 보리발효식품을 포함한 보리가공식품이 다양하게 연구되어야 한다.

따라서, 본 연구에서는 효소와 유산균을 이용한 보리발효식품에 대하여 실험하였으며, 다음과 같은 점에 착안하였다. 즉, 첫째, 보리전분의 분해력이

강하며, 발효산물에 우수한 관능성을 부여하는 효소로써 보리기질을 분해하여 환원당을 생성시키고, 둘째, 이 환원당을 유산균이 이용하여 증식함으로써 발효산물에 요구르트적 풍미를 부여하며, 셋째, 찐 보리에 효소와 유산균을 동시에 접종하여 발효함으로써 공정의 단순화를 꾀하고, 넷째, 회전드럼형발효조를 이용하여 기질과 효소와 유산균이 잘 혼합되도록 하는 동시에 회전에 의해 찐보리의 분해효과를 증진시킴으로써 우수한 조직감을 형성한다는 것이다.

전보리를 기질로 하여 유산발효를 행한 연구는 아직 없으나, 쌀기질을 효소를 이용하여 당화한 후 유산발효를 한 연구<sup>2)</sup>와, 쌀기질에 아밀라아제 또는 Koji와 유산균을 동시에 접종하여 발효한 연구<sup>3)</sup>가 보고되어 있다.

또한 본 연구에서 사용한 회전드럼형 발효조는 종래 Ochratoxin A<sup>4)</sup>의 생산, 호밀짚의 사료화<sup>5)</sup>, 옥수수과 사료폐액혼합물의 발효<sup>6)</sup>와 같은 반고체 기질의 발효에 사용되었다.

## 재료 및 방법

### 1. 보 리

세도하다가품종을 구입하여 사용하였다.

### 2. 효 소

태평양화학주식회사제 액화효소와  $\beta$ -아밀라아제, Sigma Chemical Co.제 porcine pancreas  $\alpha$ -아밀라아제 및 San Ko Chemical Co.제 Aspergillus 源 Taka-아밀라아제를 구입하여 사용하였다.

### 3. 균 주

*Lactobacillus sp.* L-5, *L. acidophilus* HL 36, *L. casei* YIT 9018, *L. plantarum* ATCC 8014 및 *L. helveticus* HL 18을 사용하였다.

### 4. 발효기질의 제조

페트리접시를 사용하는 실험에서는 전보<sup>1)</sup>와 동일하게 제조하였다. 또한 기질의 수분함량별 실험에서는 보리와 물의 중량비를 각각 1:1, 1:1.5, 1:2, 1:2.5 및 1:3으로 맞추어 기질을 제조하였다.

회전드럼형발효조를 사용하는 실험에서는 페트리접시를 사용하는 경우와 동일하게 처리한 보리 배지를 용적이 약 7ℓ인 발효조드럼당 1.5kg씩 채운 후 발효조 전체를 소형레토르트에 넣고 121°C로 15분간 멸균하였다.

### 5. 효소액의 제조

효소분말 10g에 멸균식염수(NaCl 0.5%) 50 ml를 가하여 30°C에서, 2000rpm으로 30분간 진탕후 Toyo No. 1 여지로 여과한 다음 Oxoid No.100 membrane filter로 제균하였다.

### 6. 접종 및 배양방법

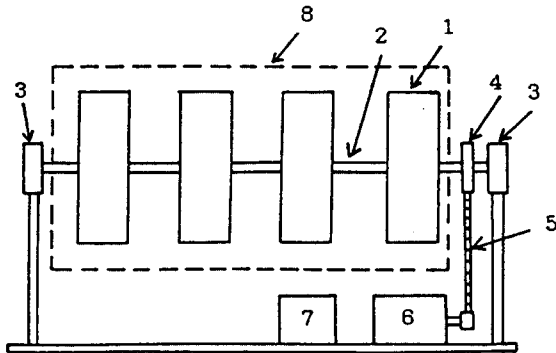
페트리접시를 사용하는 실험에서는, 유산균의 경우 MRS agar 배지에 37°C로 24시간 사면배양한 시험관에 멸균생리식염수를 10ml 넣어서 현탁시킨 유산균액을 페트리접시당 1ml, 효소액은 페트리접시당 5ml 첨가후, 멸균스푼으로 보리배지와 잘 혼합하여 37°C로 배양하였다.

회전드럼형발효조를 사용하는 실험에서는, 유산균의 경우 MRS broth 배지에 1백금이 접종하여 37°C로 24시간 배양후 배양액을 0.1% 멸균펩톤수로 2회 세척한 다음 균농도를  $2.0 \times 10^8$  개/ml로 조정된 현탁액을 보리배지 1.5kg당 10ml, 효소액의 경우는 보리배지 1.5kg당 25ml 가한후, 37°C, 15rpm의 조건하에서 회전배양하였다. 배양중 시간경과에 따라 시료를 30g씩 채취하여 유산균생균수, 산도 및 pH에 대하여 분석을 행하였고, 48시간 배양후의 시료에 대해서는 환원당과 점도를 부가하여 측정하였다.

### 7. 회전드럼형발효조

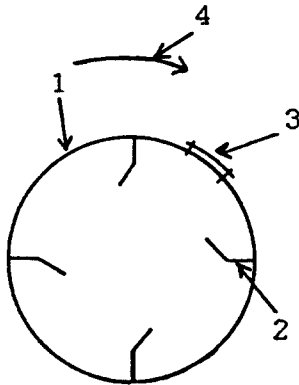
본 실험에 사용한 발효조는 회전드럼형으로써 Lindenfelser와 Ciegler<sup>4)</sup>에 의거하여 自作하였고, 전체적인 구조는 Fig.1과 같다. 드럼 및 축은 stainless steel로 만들었으며, 지름이 30cm이고 길이가 10cm인 원통형 드럼을 축에 일정한간격으로 4개 부착하였다. 축과 받침대가 닿는 부분에는 베어링을 설치하고, 한쪽 끝에는 스프로킷을 달아서 모터에 의한 회전이 가능하도록 하였으며, 회전속도는 변속장치로 조정하였다. 축과 드럼은 받침대로부터 분리하여 따로 멸균할 수 있도록 하였다. 또한, 히터와 온도조절기를 장치한 온도조절장치로 드럼부의 온도를 조절하였다.

드럼의 내부에는 Fig.2와 같이 90°간격으로 4개의



- 1. Fermentor drum
- 2. Shaft
- 3. Bearing
- 4. Sprocket
- 5. Chain
- 6. Motor
- 7. Variable speed gear
- 8. Temperatur control box

Fig.1. Diagram of rotary drum fermentor



- 1. Fermentor drum
- 2. Baffle
- 3. Sampling port
- 4. Direction of rotation

Fig.2. Diagram of fermentor drum

baffle을 설치하여 반고체기질이 잘 섞이도록 하였는데, baffle의 길이는 7cm로 하였고, 드럼과의

부착점으로부터 3.5cm되는 위치에서 회전방향으로 30°구부러지게 하였다. 또한 각 드럼의 표면에 시료채취구를 만들어 배양중의 시료채취가 가능토록 하였다.

8. 시료의 처리

전보"와 동일하게 하였다.

9. 분석방법

1) pH 및 산도

전보"와 동일하게 하였다.

2) 환원당

Somogyi의 변법<sup>7)</sup>을 사용하였다. 발색시료로는 회전드럼형발효조의 발효산물 10g을 멸균증류수 90ml와 잘 혼합한 후, 7000rpm으로 30분간 원심분리한 상등액을 사용하였다.

3) 점도

Brookfield점도계(LVI형)로 20°C에서 측정 한 후, centipoise로써 나타내었다.

10. 관능검사방법

전보"와 동일하게 하였다.

11. 유산균생균수 측정방법

MRS agar배지를 사용하여 평판분주법<sup>8)</sup>으로 측정하였다. 단, 배양조건은 37°C로 48시간 배양하였다.

결과 및 고찰

1. 효소의 선발

발효산물에 우수한 관능성을 부여하는 효소를 선발하기 위하여, *Lactobacillus* sp. L-5와 4가지 효소를 각각 조합하여 페트리접시의 보리기질에 접종한 다음 37°C로 48시간 배양후 발효산물의 색, 향미, 물성 및 전체적 기호도에 대하여 관능검사를 한 결과를 Table 1에 나타내었다.

즉, 색에 있어서는 분산분석결과, 효소간에 유

Table 1. Sensory evaluation of barley fermented\* with *Lactobacillus sp.* L-5 in combination with various amylases.

Amylases	A	B	C	D	Signifi- cant at:	LSD* * at p=0.05
Color	5.6± 0.9	4.6± 1.5	2.9± 1.3	3.3± 1.0	p=0.01	1.0
Flavor and taste	4.2± 0.6	3.8± 1.2	3.3± 1.2	2.3± 1.5	p=0.05	1.2
Texture	4.5± 1.0	3.5± 1.2	4.1± 1.5	3.1± 0.9	Not sig. at p=0.05	
Overall acceptibility	4.7± 1.1	3.9± 0.9	3.3± 1.4	2.8± 1.0	p=0.01	1.3

\* Fermented at 37°C for 48hrs

\* \* Least significant differenece

A: Liquefying amylase from Tae Pyeong Yang Co.

B: Liquefying amylase of porcine pancreas from Sigma Chemical Co.

C: Taka amylase of Aspergillus source from San Ko Chemical Co.

D: β-Amylase from Tae Pyeong Yang Co.

Table 2. Sensory scores and acidity of barley fermented with an enzyme in combination with various lactobacilli.

Enzyme* plus:	Sensory scores* * at 48hrs' cult- ivation	Acidity(%)* * * at 24hrs' cultivation
<i>Lactobacillus sp.</i> L-5	3.8± 0.5	0.78
<i>L. helveticus</i> HL 18	3.6± 1.2	0.59
<i>L. casei</i> YIT 9018	3.9± 0.9	0.71
<i>L. plantarum</i> ATCC 8014	4.2± 1.2	0.74
<i>L. acidophilus</i> HL 36	3.6± 0.8	0.48

\* Liquefying amylase from Tae Pyeong Yang Chem. Co.

\* \* Not significant at p=0.05

\* \* \* As lactic acid

의수준 1%에서 차이가 있는 것으로 나타났으며, LSD값에 의하면 태평양화학 액화아밀라아제가 나머지 3가지효소보다 유의수준 5%에서 우수하였다. 향미의 경우 전체적으로 유의수준 5%에서 차이가 인정되었으며, 태평양화학액화아밀라아제가 가장 우수하였다. 물성은 효소간의 차이가 인정되지 않았으며, 전체적인 기호도에 있어서는

역시 태평양화학액화아밀라아제가 가장 우수하였다. 색, 향미, 전체적기호도에서 태평양화학액화아밀라아제가 가장 우수하였으므로 향후실험에서는 이 효소를 사용하였다.

## 2. 유산균의 선발

기호성과 산생성력이 우수한 유산균을 선발하기

위하여, 태평양화학액화아밀라아제와 5종의 유산균을 각각 조합하여 페트리접시의 보리기질에 접종한 다음 37°C로 48시간 배양후 발효산물의 기호도와 산도를 조사한 결과를 Table 2에 나타내었다. 즉, 기호도에 있어서는 유의수준 5%에서 유산균간의 차이가 인정되지 않았으며, 산도에서는 *Lactobacillus sp.* L-5, *L. casei* YIT 9018 및 *L. plantarum* ATCC 8014의 경우 0.7%이상으로써 이것은 보리기질에 잘 적응하여 증식한 결과라고 생각되었다. *L. helveticus* HL 18과 *L. acidophilus* HL 36의 경우에는 각각의 산도가 0.59% 및 0.48%로써 산생성력이 약하였다. *Lactobacillus sp.* L-5의 산생성력이 가장 우수하였으므로 향후실험에서는 이 균주를 사용하였다.

3. 발효산물의 물성에 미치는 기질수분함량의 영향

수분함량을 각각 63.9%, 68.8%, 73.0%, 80.1% 및 83.3%로 맞춘 보리배지를 페트리접시에 넣고, 여기에 태평양화학액화아밀라아제와 *Lactobacillus sp.* L-5를 접종하여 37°C로 48시간 배양후, 발효산물의 물성에 대하여 관능검사를 실시한 결과를 Table 3에 나타내었다.

Table 3. Effect of initial water content of substrate on the texture of barley fermented with an emzyme\* plus *Lactobacillus sp.* L-5

Water content(%)	Sensory Scores as texture* *
63.9	3.5±1/4
68.8	4.4+1.0
73.0	4.4+0.9
80.1	3.5+1.3
83.3	2.5+0.9

\* Liquefying amylase from Tae Pyeong Yang Chem. Co.

\*\* Significant at p=0.01, LSD(at p=0.05)=1.0

즉, 약65%에서 80%까지의 범위에서는 유의수준 5%에서 보리기질의 수분함량이 기호성에 큰 영

향을 주지 않는 것으로 나타났으나, 약 63%~73%의 범위에서 관능검사점수가 높게 얻어졌으므로 향후 실험에서는 기질의 수분함량을 70%내외로 조절하여 실험하였다.

4. 회전드럼형발효조에 의한 발효실험

공장규모의 대량생산을 위한 예비실험으로써 회전드럼형발효조를 사용하여 발효실험을 하였다. 이 경우, 효소와 유산균을 보리기질에 동시에 접종하여 배양12시간까지는 3시간간격으로, 24시간까지는 4시간간격으로, 36시간까지는 6시간간격으로 시료를 채취하여 분석한 결과는 Fig.3와 같다.

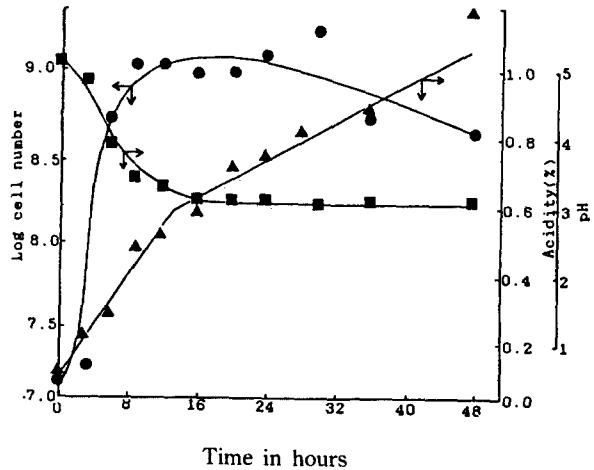


Fig.3. Changes in cell number(●—●), acidity(▲—▲) and pH(■—■) occurring in barley fermented with *Lactobacillus sp.* L-5 in combination with an liquefying amylase by rotary drum fermentor at 37°C and 15rpm

즉, 생균수는 초기  $1.5 \times 10^7$ 개/g에서 급격히 증가하여 배양12시간만에  $1.1 \times 10^9$ 개/g에 달하였으며, 이후 30시간까지 일정하게 유지되다가 서서히 감소하여 48시간후에는  $4.3 \times 10^8$ 개/g이었다. 이 때, 대수증식기에서의 비증식율은 약0.6hr<sup>-1</sup>였으며, 균수배가시간은 약1.2hr였다. 鳥越等<sup>2)</sup>은 아밀라아제와 유산균을 쌀기질에 접종하여 발효한 결과, 배양 19시간후에 유산균생균수가  $2 \times 10^8$ 개/g임을 보고하였는데, 본 실험의 결과보다 10배 낮은 것으로써

이는 유산균이 쌀보다는 오히려 보리기질에 대하여 우수한 적응성을 가지고 증식한 결과라고 생각되었다. 이러한 고찰은 島越等<sup>2)</sup>의 생균수자료에 근거하여 대수증식기에서의 비증식율을 계산할 경우, 약0.5hr<sup>-1</sup>로써 본 실험의 결과보다 낮다는 사실로써도 뒷받침된다.

산도는 그림에서 보는 바와 같이, 배양14시간까지 급격히 증가하여 약 0.6%에 달했다가 이후 48시간까지는 산생성속도가 약간 저하하여 배양48시간후에는 1.17%에 달하였다. 산생성속도가 배양14시간정도를 변곡점으로하여 2가지로 분리되어 나타난 것은 생균수결과와 잘 일치된다. 즉, 대수증식기에서의 산생성속도가 정체기 및 사멸기에서의 산생성속도보다 더 큰 것으로 나타났다. 발효산물을 산함량의 관점에서 요구르트와 비교할 경우, 배양42시간이전의 산물은 mild yoghurt(산함량;0.85~0.95%)에 필적하며 42시간이후의 산물은 more acid yoghurt(산함량;0.95~1.20%)에 필적한다고 하겠다.<sup>9)</sup>

pH는 배양개시와 함께 급격히 감소하여 16시간만에 3.2를 기록하였으며, 이후 48시간까지 거의 일정하게 유지되었다. pH를 생균수변화와 관련하여 고찰하면 그림과 같이 pH의 저하와 함께 균증식이 정체기로 돌입하였다. 따라서 균증식에 대한 결정적인 limiting factor는 pH라고 생각되었으며, 이는 배양48시간후의 발효산물에 환원당이 10.7% 잔류하므로 유산균이 이용할 수 있는 기질이 충분히 존재한다는 것으로도 뒷받침된다. 그러나 유산균은 pH나 탄소원외에도 아미노산, 비타민등의 growth factor를 필요로 하기 때문에 <sup>10)</sup>이들 성분이 limiting factor로 작용할 가능성도 배제할 수 없는 것으로 사료되었다.

48시간배양후의 시료의 점도는 1430centipoise였고, 발효경과에 따른 산물의 향미를 추적한 결과, 배양12시간까지는 보리의 향미가 그대로 남아 있었으며, 그 이후부터 보리맛은 감소하고 유산균에 의한 풍미가 형성되기 시작하여 배양48시간후에는 향미와 물성이 우수한 호상(糊狀)의 보리발효산물이 얻어졌다.

## 요 약

효소로써는 태평양화학주식회사제 액화아밀라아제를, 유산균으로써는 *Lactobacillus sp.* L-5를 선발하여, 이들을 고체상태의 전 보리기질에 동시에 접종한 후 37℃로 48시간 배양한 결과 풍미가 우수한 보리의 유산발효산물이 얻어졌다. 또한, 보리기질의 수분함량을 70%내외로 할 경우 발효산물의 물성이 우수하였다.

회전드럼형발효조를 사용하여 37℃, 15rpm의 조건하에서 발효할 경우, 유산균은 대수증식기에서 0.6hr<sup>-1</sup>의 비증식속도로 증식하여 배양 12시간만에 정체기로 들어갔으며, 산도는 계속 증가하여 배양48시간후에 1.17%였다. 발효경과에 따라 보리맛은 계속 감소하여 48시간 배양후에는 요구르트적 풍미를 갖는 호상(糊狀)의 발효산물로 되었다.

## 참 고 문 헌

- (1) 이형춘, 구영조, 신동화:곰팡이, 효모 및 유산균에 의한 보리의 혼합발효, 한국식품영양학회지 투고중
- (2) 協和醱酵工業(株), 敷島製パン株式會社:米を原料とする乳酸飲料およびその製造法, 日本特許昭 55-9756 (1980)
- (3) 小正醸造有限會社:米を原料とした乳酸飲料の製造法, 日本特許昭 56-11783 (1981)
- (4) Lindenfelser, L. A. and Ciegler, A.:Solid-substrate fermentor for ochratoxin A production, Applied Microbiology, 29(3), 323 (1975)
- (5) Han, Y. W. and Anderson, A. W.:Semisolid fermentation of ryegrass straw, Applied Microbiology, 30(6), 930 (1975)
- (6) Hesseltine C. W.:Solid state fermentation-part2, Process Biochemistry, 12, 29 (1977)
- (7) 小原哲二郎, 鈴木隆雄, 岩尾裕之:食品分析ハンドブック, 建帛社, 第2版, pp.217-219 (1977)
- (8) Thatcher, F. S. and Clark, D. S.:Microorganisms

- in foods:1, University of Toronto Press, pp.66-67 (1975)
- (9) Rasic, J. L. and Kurmann, J. A.:Yoghurt, published by the authors, 103 (1978)
- (10) Skinner, F. A. and Lovelock, D. W.:Identification methods for microbiologists, Academic Press, 250 (1979)