KOREAN J. FOOD & NUTR
1(2) 56~63(1988)

곰팡이, 효모 및 유산균에 의한 보리의 혼합발효

이 형춘 · 구 영조* · 신 동화**

서울보건전문대학

*한국식품개발연구원

**전북대학교

(1988. 11. 22 수리)

Mixed Culture Fermentation of Steamed Barley by a Tri-Culture System

Hyeong-Choon Lee · Young-Jo Koo* · 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 mixed culture fermentation with a tri-culture system of a mold, a yeast and a lactobacillus.

When *Rhizopus delemar* IFO 4746, *Hansenular anomala* IFO 0568 and *Lactobacillus sp.* L-5 were selected and cultivated on steamed barley at 30℃ for 2days and 37℃ for 3days, the fermented product of good quality was obtained. During fermentation, changes in acidity, pH, water content and color of fermented barley were examined.

서 론

보리는 색, 취반식미, 외관등이 쌀에 비해 열등하기 때문에 그 소비량이 계속 감소하여 왔다.

그러나, 농가소득증대와 식량자급율향상을 위해서는 장기적인 보리증산의 기반을 조성해야 하므로, 보리소비를 유도하기 위한 보리가공식품에 대한 연구를 통하여 보리의 이용도를 증진시킬 필요가 있다.

보리를 가공할 경우, 발효가공하면 보리의 식미를 개선하는 동시에 소화율과 영양을 증진시킬 수 있는 등 여러 가지 장점이 있음을 감안할 때, 보리발표식품의 연구가 필요하다고 생각되었다.

보리발효식품에 대한 연구는 맥아당화액을 유산발효한 것[1], 보리당화액을 유산발효한 것[2] 정도이며, 보리를 직접 발효기질로 이용한 연구는 아직 없다. 보리와 유사한 쌀을 기질로 한 발효식품에 관한 연구로써는 유산발효음료에 대한 연구[3,4]외에 동양전통발효식품 중 Tape[5]와 Chinese rice pudding[6]에 관한 연구가 있다.

본 연구에서는 공정단순화를 위하여 찐보리에 균을 그대로 접종하여 고체발효를 행하는 것과

균들을 동시에 접종하여 혼합발효를 행함으로써 공정을 단순화시키는 동시에 종간의 상호작용을 적절히 이용하여 발효식품의 관능성을 향상시키는 데에 주안점을 두었다. 또한, 혼합발효시 균의 조합에 있어서는, 보리전분의 분해력이 크고 포자형성능과 알콜생성능이 약하며 식용가능한 곰팡이를 이용함으로써 보리전분을 분해하여 당을 생성시킨 후, 이 당을 기질로 하여 증식하는 효모의 방향성분과 유산균의 산미가 곰팡이의 대산산물과 서로 조화하여 풍미가 우수한 식품을 형성할 수 있다는 데 착안하여 곰팡이, 효모 및 유산균의 혼합시스템을 설정하였다.

재료 및 방법

1.보 리

보리는 세도하다가 품종을 구입하여 사용하였다.

2. 균 주

본 실험의 균주는 곰팡이로써는 *Rhizopus delemar* IFO 4746, *R. japonicus* IFO 4758, *R. javanicus* IFO 4801, *R. arrhizus* NRRL 1469, *R. oligosporus* NRRL 2710, *R. oryzae* YUFE 1406, *Aspergillus niger* M-5, *A. oryzae* IFO 5238, *A. awamori* IFO 4308, *A. kawachii* IFO 4314, *A. nidulans* YUFE 1045, *Amylomyces rouxii* NRRL A-17, 199, 효모로써는 *Endomycopsis fibuligera* NRRL Y-7145, *Pichia burtonii* NRRL Y-7143, *Hansenula anomala* IFO 0568, *H. subpelliculosa* NRRL Y-7176, *H. malanga* NRRL Y-7175, Candida melinii NRRL Y-7171, *C. parapsilosis* NRRL Y-7172, *Saccharomyces cerevisiae* IFO 0304, *Torulopsis sp.* ATCC 46433, 유산균으로써는 *Lactobacillus sp.* L-5, *L. acidophilus* HL 36, *L. casei* YIT 9018, *L. plantarum* ATCC 8014, *L helveticus* HL18을 사용하였다.

이 중에서 *A. niger* M-5와 *L. sp.* L-5는 한국식품개발연구원으로부터 기증받았으며, 나머지는 각각 해당 균주분양기관으로부터 구입 및 기증받은 것이었다.

3. 발효기질의 제조

보리조곡(粗穀)을 Satake grain testing mill(Satake Engineering Co., Japan)로 도정수율 70%로 도정하여 물로 세척 후, 보리쌀과 물의 중량비가 1:2로 되게끔 물을 가하여 하룻밤 방치하였다. 이것을 30분간 증자후 지름이 12㎝인 페트리접시에 150g씩 넣어서 121℃, 15분 멸균하여 기질로써 사용하였다.

4. 접종 및 배양방법

곰팡이는 Difco제 PDA배지에 30℃, 5일간 사면배양 후, 배양시험관에 멸균증류수를 10㎖씩 넣어서 백금구(白金鉤)로 포자를 현탁시킨 다음, 이 현탁액을 페트리 접시당 3㎖씩 접종하였다. 효모는 YM배지에 30℃, 2일간 사면배양후 시험관에 멸균증류수를 5㎖씩 넣어서 균을 현탁시킨 액을 페트리접시당 1㎖씩 접종하였으며, 유산균은 MRS배지로 37℃, 24시간 사면배양후 시험관에 멸균생리식염수 10㎖씩을 넣어 현탁시킨 액을 페트리접시당 1㎖씩 첨가하였다. 현탁액을 접종한 후 멸균스푼으로 보리배지와 완전히 섞어주었다.

접종이 끝난 후, 페트리접시를 항온기에 넣어 5일간 배양하였다.

5. 발효보리의 처리

배양이 끝난 보리를 수거하여 Nissei제 homogenizer를 사용하여 5000rpm으로 5분간 마쇄후 3겹 꺼즈를 통과시켜 종구(縱溝)를 제거한 다음 관능검사 및 분석용시료로써 사용하였다.

6. 분석방법

1)pH

pH미터를 사용하여 측정하였다.

2)산도

0.1N NaOH로 적정후 유산산도(乳酸酸度)로 환

산하여 나타내었다.[7]

3)수분함량

105℃항량법[8]을 사용하였다.

4)색도(色度)

Gardner XL-10 color difference meter로 백색도를 측정하였다. 이때 표준 plate의 백색도는 89.2였다.

7. 관능검사방법

8명으로 구성된 관능검사요원에 의해 발효시료의 기호도를 7점평점법으로 실시하였다.

결과 및 고찰

1. 전분분해성균주의 선발

혼합발효를 위해서는 먼저 보리전분을 잘 분해할 수 있는 균주를 선발하여야 하므로, 지금까지 알려진 균주로써 아밀라아제생산력이 강하고 전분식품에 대하여 발효적성이 좋다고 알려진 곰팡이 11종, 효모2종에 대하여 30℃로 5일간 발효실험을 행한 결과를 Table 1에 나타내었다.

이 결과에서 보면, *Rhizopus*속의 6종은 모두 포자를 형성치 않았으며, 균사도 거의 형성치 않으면서 보리입자를 잘 분해하였고, 향미도 무난하여

Table 1. Characteristics of barley fermented with various fungi at 30℃ for 5 days

Organisms	No. of species tested	Characteristics
Rhizopus	6	No spore formation, good dissolution of barley kernel, acceptable flavor
Aspergillus	5	Formation of spores and mycellial felt
Amylomyces rouxii NRRL A-17, 199	1	Slight dissolution, plain taste
Endomycopsis Fibuligera NRRL Y-7145	1	Slight dissolution, rough growth on kernel surfaces, unpleasant smell
Pichia burtonii NRRL Y-7143	1	Slight dissolution, rough growth on kernel surfaces, unpleasant smell

Table 2. Characteristics of barley fermented with *Rhizopus species* at 30℃ for 5 days

Phizopus species	Taste	Alcoholic flavor	Dissolution of barley kernel	Mycellial formation
R. delemar IFO 4746	Sweet, slightly sour	Mild	Strong	Slight
R. japonicus IFO 4758	Strongly sour, bitter	Strong	Strong	Felt formation
R. javanicus IFO 4801	Strongly sour	Mild	Weak	Slight
R. arrhizus NRRL 1469	Slightly bitter	Strong	Strong	Slight
R. oligosporus NRRL 2710	Bitter	Mild	Weak	Felt formation
R. oryzae YUFE 1406	Plain	None	None	Felt formation

보리기질에 대한 발효적성이 좋았다. *Aspergillus* 5종의 경우에는 전부 과량의 포자를 형성하였고, 균사를 많이 형성하여 보리기질과 felt를 형성하였다. *A. rouxii*는 인도네시아의 전통적인 쌀발효식품인 Tapé Ketan으로부터 분리된 곰팡이로써 Cronk등[5]의 보고에 의하면, 단독으로 쌀기질에 배양할 경우에는 전분분해성이 좋았다고 하였으나, 보리기질에 대해서는 분해정도가 아주 약했으며 향미도 좋지 않았다.

다음으로 전분분해성 효모인 *E. fibuligera*와 *P. burtonii*는 보리기질분해성이 아주 약했으며, 보리입자표면이 거친 외관을 나타내었고, 향미도 좋지 않았다. 따라서, Rhizopus속이 포자 및 균사형성, 보리기질의 분해성 및 향미면에서 보리에 대한 발효적성이 좋은 것으로 나타났으므로 *Rhizopus*속 6종에 대하여 재차 선별실험을 행하였다.

*Rhizopus*속 6종을 보리기질에 접종하여 30℃에서 5일간 발효하여 발효산물의 맛, 알콜향의 강도, 보리분해정도 및 균사형성를 비교한 것을 Table 2에 나타내었다.

즉 *R. oligosporus* 및 *R. oryzae*는 보리기질과 felt를 형성하였으며, *R. javanicus*는 보리입자의 분해력이 약했고 *R. arrhizus*는 약간 쓴맛과 함께 강한 알콜향을 발산하였다.

Table 3. Characteristics of barley fermented with *Rhizopus delemar* in combination with various yeasts at 30℃ for 5days

Organisms	Flavor	Taste	Dissolution of barley kernel	Appearance of barley kernel
Rhizopus delemar IFO 4746+*Hansenular anomala* IFO 0568	Strong ester flavor	Sour	Strong	Smooth
R. delemar+*H. subpelliculosa* NRRL Y-7176	Strong ester flavor	Bitter	Strong	Smooth
R. delemar+*H. malanga* NRRL Y-7175	Alcoholic flavor, slightly upleasant smell	Bitter	Weak	Smooth
R. delemar+*Endomycopsis fibuligera* NRRL Y-7145	Strongly unpleasant odor	Plain	Weak	Rough
R. delemar+*Pichia burtonii* NRRL Y-7143	Alcoholic flavor, unpleasant odor	Sour	Weak	Smooth
R. delemar+*Candida melinii* NRRL Y-7171	Slightly unpleasant odor	Slightly bitter	Weak	Smooth
R. delemar+*C. parapsilosis* NRRL Y-7172	No particular smell	Slightly bitter	Weak	Rough
R. delemar+*Saccharomyces cerevisiae IFO 0304*	Unpleasant odor	Plain	Weak	Rough
R. delemar+*Torulopsis sp.* ATCC 46433	Unpleasant odor	Plain	Weak	Smooth

그러나 *R. delemar*의 경우에는 향미가 무난하고, 보리입자의 분해력이 강한 동시에 균사형성은 거의 없었으므로 향후의 실험에 있어서는 이 균주를 계속 사용하였다.

2. 효모의 선발

다음으로는 발효산물에 향을 부여할 목적으로 *R. delemar*와 9종의 효모를 각각 조합하여 30℃로 5일간 혼합발효를 행한 결과를 Table 3에 나타내었다.

먼저, *H. anomala*와 *H. subpelliculosa*는 ethyl acetate로 추정되는[9] 강한 ester향을 발산하였으며, *C. parapsilosis*는 특정한 향이 없었고, 나머지 6종은 전부 좋지않은 향을 생성하였다. Cronk등[5]은 쌀배지에 *A. rouxii*와 여러종의 효모를 조합하여 각각 혼합발효할 경우 *H.anomala*와 *H. subpelliculosa*가 모두 강한 ester향을 발산함을 보고 하고 있어서 본 실험의 결과와 일치하였으나, *E. fibuligera*는 쌀배지에서는 바람직한 좋은 향을 나타냈음을 보고하고 있어서 본 실험과는 다른 결과였다.

맛에 있어서는 *H. anomala*및 *P. burtonii*는 신맛을 나타내었고 *E. fibuligera, S. cerevisiae*및 *Torulopsis sp.*는 특별한 맛이 없이 덤덤하였으며, 나머지 4종의 효모는 쓴맛을 띄었다.Wei와 Jung[6]은 Chinese rice pudding의 발효실험에서 쌀배지에 *R. arrhizus*와 *H. anomala* 또는 *R. arrhizus*와 *Torulopsis sp.*를 조합하여 혼합배양할 경우, *H. anomala*의 경우에는 달콤한 신맛을 생성한다고하여 본 실험의 결과와 일치하였으나, *Torulopsis sp.*의 경우에는 아주 바람직한 향미를 나타낸다고 한 것과는 달리 본 실험에서는 그다지 바람직하지 못한 결과였다. 이것은 *Torulopsis sp.*의 경우 발효기질의 차이에 기인한 것이라 생각된다.

보리기질의 분해에 있어서는 *H. anomala* 및 *H. subpelliculosa*는 *R. delemar* 단독의 경우보다 더 강한 분해성을 나타낸 반면 나머지 7종은 *R. delemar* 단독의 경우와 큰 차이가 없었다. *H. anomala* 및 *H. subpelliculosa*의 경우 이처럼 분해성이 좋은 것은 두종의 효모가 액화전분을 자화이용하기 때문에[10,11] *R. delemar*의 액화아밀라아제에 의해 생성된 액화전분을 다시 분해하여 소비하는 결과, *R. delemar*의 액화아밀라아제에 대한 최종산물저해(product inhibition)[12]가 없어져서 액화력이 계속 유지되기 때문이라 생각되었다.

한편, *E. fibuligera, C. parapsilosis* 및 *S. cerevisiae*에서는 보리입자표면이 특징적으로 거칠게 되었다.

효모실험의 결과를 종합하면 *H. anomala*가 나머지 8종에 비하여 보리기질에 대한 발효적성이 우수하였으므로 향후의 실험에서는 *H. anomala*를 사용하였다.

3. *R. delemar* 및 *H. anomala*에 의한 혼합배양계와 *R. delemar, H. anomala* 및 *Lactobacillus sp.*에 의한 혼합배양계의 비교

R. delemar 및 *H. anomala*에 의한 혼합배양계에

Table 4. Characteristics of barley fermented with *Rhizopus delemar* in combination with H. anomala and with *H. anomala* plus *Lactobacillus sp.*

Barley fermented with:	Sensory scores*	Acidity(%)	Water content(%)
Rhizopus delemar IFO 4746 +*Hansenular anomala* IFO 0568**	3.1± 1.1	1.8	79.8
R.delemar+*H. anomala* +*Lactobacillus sp.* L-5***	*4.2*± 0.8	1.9	80.5

* Significant at p=0.05

** Fermented at 30℃ for 5days

*** Fermented at 30℃ for 2days followed by 37℃ for 3days

유산균을 더 부가할 겨우 유산균에 의한 풍미부여로 관능성이 향상될 것으로 생각되어 이 세균주에 의한 혼합발효와 *R. delemar* 및 *H. anomala*의 두 균주에 의한 혼합발효를 실시하여 기호도, 산도 및 수분함량에 대하여 조사 결과를 Table 4에 나타내었다. 배양조건은 세균주혼합발효의 경우에는 30℃에서 2일 배양후 37℃로 전이하여 3일 배양하였으며, 두 균주혼합발효의 경우에는 30℃로 5일 배양하였다.

실험결과, 산도 및 보리입자의 분해성을 간접적으로 표시하는 수분함량에 있어서는 거의 차이가 없으나, 기호성은 *Lactobacillus sp.*를 첨가한 경우가 유의수준 5%에서 우수한 것으로 나타났다. 따라서 향후에는 *R. delemar* 및 *H. anomala*에 유산균을 부가하는 혼합발효계로써 실험을 하였다.

4. 유산균의 선발

R. delemar, H. anomala 및 유산균의 혼합발효계에서 관능성이 우수한 유산균을 선발할 목적으로 *R. delemar* 및 *H. anomala*에 5종의 유산균을 각각 접종하여 30℃로 2일, 37℃로 3일 배양후의 발효산물의 기호성을 비교한 결과는 Table 5와 같다. 즉, 유산균 종류별로 5%수준에서 유의차가 없는 것으로 나타났으므로, 향후실험에서는 전실험에 사용했던 *Lactobacillus sp.*를 그대로 사용하였다.

5. 혼합발효시 시간에 따른 발효산물의 성상변화

R. delemar, H. anomala 및 *Lactobacillus sp.*의 세균주로 30℃로 2일, 37℃로 3일간 혼합발효를 실시하면서 24시간 간격으로 시료의 pH, 산도, 수분함량 및 색도를 측정한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. pH는 초기 5.2에서 24시간만에 3.8로 급

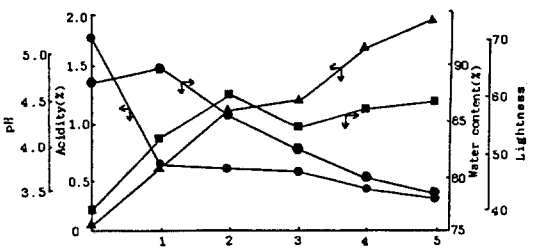

Fig. 1.Changes in pH(●—●), acidity(▲—▲), water content(■—■) and lightness(⬣—⬣) occurring in barley fermented with mixed culture of *Rhizopus delemar* IFO 4746, *Hansenula anomala* IFO 0568 and *Lactobacillus sp.* L-5, at 30℃ for 2days and 37℃ for 3days.

Table 5. Sensory scores of barleys fermented with *R. delemar* and *H. anomala* in combination with various lactobacilli.

Barley fermented* with:	Sensory scores**
Rhizopus delemar IFO 4746+*Hansenula anomala* IFO 0568+*Lactobacillus sp.* L-5	*3.9*± 1.3
R. delemar+*H. anomala*+*L. acidophilus* HL 36	*4.0*± 0.9
R. delemar+*H. anomala*+*L. casei* YIT 9018	*4.0*± 1.1
R. delemar+*H. anomala* + *L. plantarum* ATCC 8014	*4.3*± 1.0
R. delemar+*H. anomala* + *L. helveticus* HL 18	*3.9*± 0.9

* At 30℃ for 2days followed by 37℃ for 3days

** Not significant at p=0.05

격히 떨어졌으며, 그 이후에는 약간씩 떨어져서 5일후에는 3.4였다.

산도는 배양 2일까지 급격히 증가하였다가 2일부터 3일까지는 완만하게 증가하고 이후 5일까지 다시 급격히 증가하여 배양 5일째에는 1.9%였다. 수분함량은 초기 77.4%에서 배양2일까지 급격히 증가하였다가 그 이후에는 85%내외로 비교적 일정하게 유지되는 경향을 보였다. 색도는 초기에는 63.5였는데, 배양24시간 후부터 계속 감소하여 배양 5일째에는 45.9였다.

배양2일째까지 pH가 급격히 떨어지고 산도가 급격히 증가한 것은 30℃의 배양온도조건하에서 잘 증식하는 *R. delemar*와 *H. anomala*의 대사작용으로 생성된 여러가지 유기산[10]에 의한 것으로 생각되었으며, 배양3일째부터 다시 산도의 증가와 pH의 감소를 보인 것은 37℃의 온도조건하에서 최적증식을 보이는 유산균에 의해 생성된 유산때문이라 생각된다. 수분함량이 배양2일째가지 증가한 것은 *R. delemar*의 액화 및 당화아밀라아제의 작용으로 생성된 환원당을 다시 *R. delemar*가 호흡대사한 결과 생성된 H_2O때문이라 생각되었다.

색도의 변화는 효모의 대사과정에서 생성되는 H_2S[13]와 밀접한 관계가 있는 것으로 생각되었다. 먼저 배양1일째까지 색도의 변화가 없는 것은 *R. delemar*의 아밀라아제에 의해서 생성되는 환원당이 *H. anomala*가 이용할 정도로 충분하지 못했기 때문이며, 그 이후에는 충분히 생성된 환원당을 *H. anomala*가 계속 대사하여 H_2S를 생성하고, 이것이 배지중의 무기성분과의 반응으로 거무스름한 화합물을 형성하기 때문에 색도가 계속 감소하였다고 생각된다. 이러한 변색은 발효산물의 관능성을 저하시킬 우려가 있으므로 향후 개선되야 할 것이다.

또한 발효경과에 따라 발생되는 향을 추적한 결과, 배양2일에서 3일사이에 *H. anomala*에 의해 생성되는 강한 ester향을 감지할 수 있었고, 3일 이후에는 관능성이 우수한 단내가 형성되어 배양5일까지에 완전히 조성되어 그 이후에 계속 유지되는 것을 관찰할 수 있었다.

요 약

곰팡이로써는 *Rhizopus delemar* IFO 4746, 효모로써는 *Hansenula anomala* IFO 0568, 유산균으로써는 *Lactobacillus sp.*를 선발하여 이들을 고체상태의 찐 보리기질에 동시에 접종한 후 30℃로 2일, 37℃로 3일 혼합배양하여 풍미가 우수한 보리발효산물을 얻었다.

발효시 시간경과에 따라 pH는 24시간만에 급격히 떨어져 배양 5일후에는 3.4였고, 산도는 계속 증가하여 5일후에는 1.9%였으며, 색도는 계속 감소하였다.

참 고 문 헌

(1) 이주원:맥아당화액을 이용한 유산균 음료의 제조에 관한 연구, 고려대학교 대학원 석사학위논문(1980)

(2) 이성갑, 김기철:*Lactobacillus acidophilus*에 의한 보리당화액의 젖산발효, 한국농화학회지, **31**(3), 255 (1988)

(3) 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菌 飮料およびその製造法, 日本特許昭 55-9756 (1980)

(4) 小正釀造有限會社:米を原料とした乳酸飮料の製造法, 日本特許昭, 56-11783 (1981)

(5) Cronk, T.C., Steinkraus, K.H., Hackler, L.R. and Mattick, L.R.:Indonesian Tapé Ketan fermentation, Applied and Environmental Microbiology, **33**(5), 1067 (1977)

(6) Wei, D.L. and Jong, S.C.:Chinese rice pudding fermentation:fungal flora of starter cultures and biochemical changes during fermentation, J. of Fermentation Technology, **61**(6), 573 (1983)

(7) Association of Official Analitical Chemists:Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 13th ed., 240 (1980)

(8) 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, 21 (1977)

(9) Seppo, L. and Jorma, E:Formation of ethyl acetate in *Hansenula anomala*, Acta. Chem. Scand. **22**(5), 1482 (Eng) (1968)

(10) Lodder, J.:The Yeasts, North-Holland Publishing Company, 249 (1971)

(11) Lodder, J:The Yeasts, North-Holland Publishing Company, 305 (1971)

(12) 藤田榮信, 杉本芳範, 田中伸哉, 吉田敏臣, 田口久治:清酒醪プロセスたおける蒸し米の溶解, 醱酵工学會誌, **61**(5), 331 (1983)

(13) Hernondez, M.R.:Production of H_2S by wine yeasts grown with several sulfur containing compounds, Semana Vitivinicolo, **19**(935), 2, 359-2, 360 (1964)