

누룩 스타터의 유당발효 효모에 관한 연구

박상교 · 강미영* · 김동신

경북대학교 낙농학과, *경북대학교 가정교육과

Studies on the Lactose Fermenting Yeast from Nuruk Starter

Sang-Kyo Park, Mi-Young Kang* and Dong-Shin Kim

Department of Dairy Science, Kyungpook National University

*Department of Home Economics, Kyungpook National University

Abstract

The strain of Nuruk yeast No. 15 (NY-15) which ferments lactose in milk was isolated from Nuruk and identified as *Saccharomyces marxianus* according to the API 20C profile index. The lactose hydrolysing ability of NY-15 was similar to that *Saccharomyces fragilis* ATCC 8583 which has β -galactosidase activity. Its optimum growth temperature, pH and time for the production of maximum enzyme activity showed 28°C, 4.5 and 28hr, respectively. Galactose as well as sucrose as carbon sources, and urea as nitrogen source increased the production of enzyme. In order to test the production of alcohol, NY-15 was inoculated in whey medium and whey medium added with sugar. In the former, NY-15 produced 2% alcohol and in the latter, it showed 12% alcohol production. The optimal medium pH for lactose hydrolysis of NY-15 is 4.5, whereas that of *Saccharomyces fragilis* ATCC 8583 is 3.5

Key words: Nuruk starter, whey, β -galactosidase

서 론

발효유의 형태는 원료, 고형분함량, 미생물, 지역 등에 따라 대단히 많으나, 최종 발효산물의 종류에 따라 유산발효유(lactic acid fermented milk)와 유산-알코올 발효유(lactic acid-alcohol fermented milk)로 구분할 수 있다. 유산-알코올 발효유로서 현재 유럽 각국에서 시판되고 있는 kefir, koumiss 등은 우유에 함유되어 있는 유당을 가수분해시키는 β -galactosidase와 가수분해산물의 알코올 발효를 행하게 하는 효소군이 함유된 미생물군(kefir grains)을 이용한 음료이다⁽¹⁾. 우리나라에서 예로부터 알코올 발효의 스타터로 사용되던 누룩에 β -galactosidase의 활성이 있는 효모군이 존재하면, 마치 kefir starter culture와 같은 이용이 가능하리라 여겨진다. 이렇게 누룩을 이용하여 산-알코올 발효유를 제조하면 유제품의 기호성면 뿐만 아니라 유당 분해효소 결핍자에게 좋은 유음료가 될 수 있으리라고 기대되는 등 새로운 유음료생산에 활용될 수 있으리라 생각된다. 본 연구는 산-알코올 발

효유 제조를 위한 일련의 연구의 일환으로서 누룩으로부터 lactose 분해효소를 가지는 균주를 분리하여 분리한 균주의 β -galactosidase 생산에 관한 검토와 아울러 알코올 생산능에 관해서 검토하였다.

재료 및 방법

유당발효능을 가지는 균주의 분리

누룩은 대구시 소재 칠성시장에서 구입하였으며, 유당을 분해하는 효모를 분리하기 위하여 먼저 누룩을 분쇄하여 살균된 증류수에 혼합하고 30분간 유리봉으로 교반한 후 cheese cloth로 여과하였다. 이 여과액을 121°C에서 15분간 가압 살균된 malt extract broth (Difco Co., 성분: malt-extract)에 3% 접종하여 28°C에서 48시간 배양하였다. 누룩 배양물에 백금니를 적시어 malt extract agar(malt extract 3%, bacto-peptone 0.5%, agar 1.5%) 위에 streaking하여 28°C에서 2-3일간 배양하여 생성된 하나의 colony마다 현미경 검사를 하면서 단일균주의 colony가 나타날 때까지 streaking을 반복하여 800개의 단일균주로 형성된 colony를 얻었다.

Corresponding author: Mi-Young Kang, Dept. of Home Economics, Kyungpook National University

사용배지 및 배양방법

효모세포의 배양을 위한 기본배지로는 whey permeate (pH 4.6)에 0.25% yeast extract, 0.25% bacto-peptone 을 첨가하여 사용하였다. 살균처리된 배지 100 ml 에 한 백금니의 culture 를 접종하고 28°C 에서 28시간 진탕배양(120 strokes/min)하였다. 배양된 균체를 모으기 위하여 상기의 기본배지 2 l 를 발효조 (fermentor, Bioengineering Co. Switzland)에 넣고 121°C에서 15분간 가압살균한 후 2%의 culture 를 접종하여 28°C에서 교반(150 rpm/min, aeration)하면서 28시간 동안 배양하였다.

유당 소비능 측정 (유당 이용성 검사)

살균된 whey permeate 에 분리한 누룩효모 No.15 (NY-15)를 한 백금니 접종하여 28°C에서 28시간 진탕 배양(120 strokes/min)하여 계대배양물을 얻었다. 이를 다시 살균된 whey permeate 에 2% 접종하여 Tales'의 방법⁽²⁾에 의하여 배양시간의 경과에 따른 유당 소비능을 조사하였다. 즉, 시료 2.5 ml 에 5% ZnSO₄ 0.2 ml, 4.5% Ba(OH)₂ 0.2 ml 를 첨가하여 혼합한 후 1,500×g 에서 원심분리한다. 상등액 1 ml 에 Tales' reagent 2.5 ml 를 혼합하여 100°C에서 6분간 가열한 후 급냉하여 520 nm 에서 흡광도의 변화를 측정한다. 다음 유당의 표준곡선에 따라 유당의 변화를 측정하였다. 대조구로는 *Saccharomyces fragilis*(ATCC 8583)을 이용하였다.

CO₂ gas 생성조사

Whey permeate 를 넣은 Durham tube⁽³⁾에 상기의 800개의 순수 yeast colony 를 각각 한 백금니 접종하고, 28°C에서 진탕배양(120 strokes/min)하면서 gas 생성을 조사하였다.

조효소의 추출 (β -galactosidase 의 추출)

효모세포체를 모으기 위하여 배양액을 5,000×g 에서 10분간 원심분리한 후 그 침전물을 0.02 M phosphate buffer (pH 7.0)로 3회 세척하여 세포밀도가 100 mg/ml 이 되도록 같은 buffer 로 현탁하였다. 이 현탁액에 8% (v/v)의 toluene 을 첨가하여 37°C에서 5시간 교반한 후 15,000×g 에서 15분간 원심분리하여 cell debris 를 제거하고 상등액을 취하여 β -galactosidase 의 조효소액으로 하였다. 비교군으로는 *Saccharomyces fragilis* ATCC 8583 으로서 누룩 yeast 와 동일한 방법으로 배양하여 조효소액을 추출하였다.

β -galactosidase 의 활성측정

β -galactosidase 의 활성은 Craven⁽⁴⁾ 등의 방법에 의하여 측정하였다. 2.5 mM O-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG)를 0.1 M NaCl, 0.01 M MgCl₂, 0.1 M 2-mercaptoethanol, 50 mM Tris HCl 을 포함하는 완충액 (pH 7.5)에 녹여 효소의 기질로 사용하였다. 기질용액에 효소용액을 넣어 반응시킨 후 420 nm 에서의 흡광도의 변화로부터 효소활성 단위를 구하였다. 효소활성 단위는 1분 동안에 ONPG 로부터 ONP 1 μ mol 을 생산했을 때의 효소량을 1 unit 로 하였다.

Alcohol 함량측정

AOAC (Association of official analytical chemists)의 dichromateoxidation 방법⁽⁵⁾에 따라 microkjeldahl 장치에 의해서 alcohol 함량을 측정하였다. 그리고 단백질 정량은 Lowry⁽⁶⁾법에 의해서 정량하였고, 당 함량은 환원당 측정법⁽⁷⁾에 의해서 측정하였다.

결과 및 고찰

누룩으로부터 분리한 균주의 유당 발효능

누룩으로부터 분리한 균체 중 Fig. 1에서 제시하는 바와 같이 No.4 와 No.15 의 균체가 유당 분해능을 보였다. No.15 의 균체는 비교군인 *Saccharomyces*

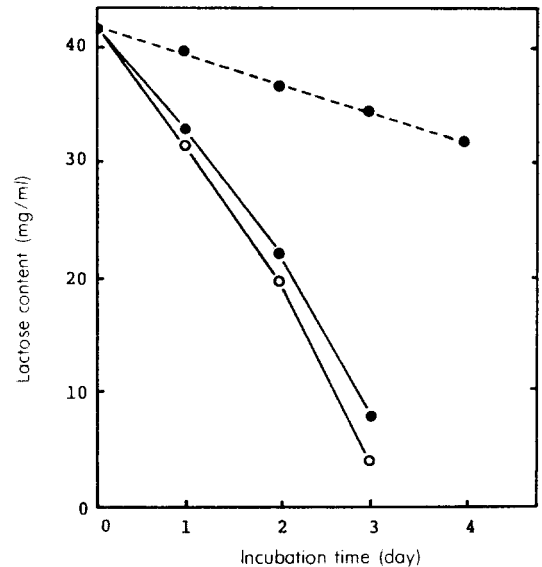


Fig. 1. Lactose-consuming test during the growth of 3 different yeasts at 28°C in whey medium NY-4, (●-●); NY-15, (●-●); *S. fragilis* (○-○).

fragilis 와 같은 정도의 유당 분해능을 보인 것을 알 수 있다. 그리고 CO₂ 생성의 여부를 조사한 결과 No.4 와 No.15 균체 둘다 CO₂ 생성이 확인되었다. 이렇게 유당 분해능과 CO₂ 생성이 보이므로 이들 두 균체는 유당발효능이 있는 균주로써 산-알코올 발효유 제조에 이용될 수 있는 가능성이 있는 균주라 할 수 있겠다. 이에 누룩을 이용한 산-알코올 발효유 제조를 위한 일련의 연구에는 유당 분해능이 보다 큰 No.15의 균주를 순수배양하여 이용하기로 하였다.

분리한 균주의 β-galactosidase 활성

순수배양한 No.15 균주 조효소액의 β-galactosidase 활성을 Table 1에 제시하였다. 누룩 yeast 조효소액의 활성과 *Saccharomyces fragilis* ATCC 8583의 조효소액의 활성이 거의 비슷한 것으로써 그 활성이 매우 높게 나타났다.

균주의 β-galactosidase 생산에 관하여

배양시간에 따른 누룩 yeast의 성장과 β-galactosidase의 활성

Fig.2에 제시하는 바와 같이 No.15 균주를 whey medium에 배양시킨 결과 28시간까지는 세포의 계속적인 성장이 보이며, 또한 세포의 성장과 더불어 세포의 파쇄액인 β-galactosidase 조효소 추출액의 활성도 증가한다. β-galactosidase 활성은 배양 후 28시간대에 최대치를 나타내었고, 그 이후부터는 감소의 경향을 보였다.

배지의 pH 변화에 따른 β-galactosidase 생산

누룩 yeast No.15 균주를 배양액의 pH를 달리하고 앞의 결과에 준하여 28°C에서 28시간 배양시켜 원심집균한 세포체에 toluene을 처리하여 얻은 상등액의 β-galactosidase 활성을 측정하였다. Fig.3에 제시한 바와 같이 pH 4.5-5.0에서 β-galactosidase의 생산에 최대값을 나타내었다.

탄소원 종류의 영향

기본배지의 탄소원 대신에 여러 종류의 당을 5% (w/v)가 되도록 첨가하여 pH 4.6, 28°C에서 28시간 배양하여 생산되는 β-galactosidase의 활성을 측정된 결과 Table 2와 같다. 비교균인 lactose 첨가에 비해서 galactose와 sucrose가 효소의 생산을 증가시키고 있으며, glucose, fructose, mannose의 첨가시에는 현저한 감소의 경향을 나타내었다.

질소원 종류의 영향

기본배지의 탄소원인 lactose의 농도를 5% (w/v)

Table 1. β-galactosidase activity of Nuruk yeast (No. 15) and *S. fragilis* ATCC 8583

Strain	Protein (mg/ml)	Activity (units/ml)	Specific activity (units/mg protein)
Nuruk yeast (No. 15)	10.5	7.56	0.72
<i>S. fragilis</i> (ATCC 8583)	9.80	9.51	0.97

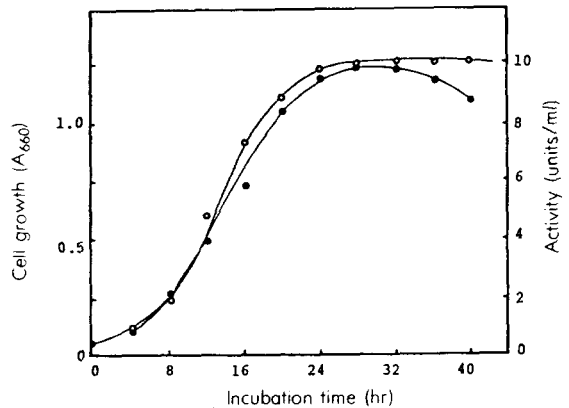


Fig. 2. Cell growth curve and time course of β-galactosidase production of NY-15 in whey permeate. Cell growth rate was measured by A₆₆₀ (○—○) and the β-galactosidase activity (●—●) was assayed by the standard method using ONPG as the substrate

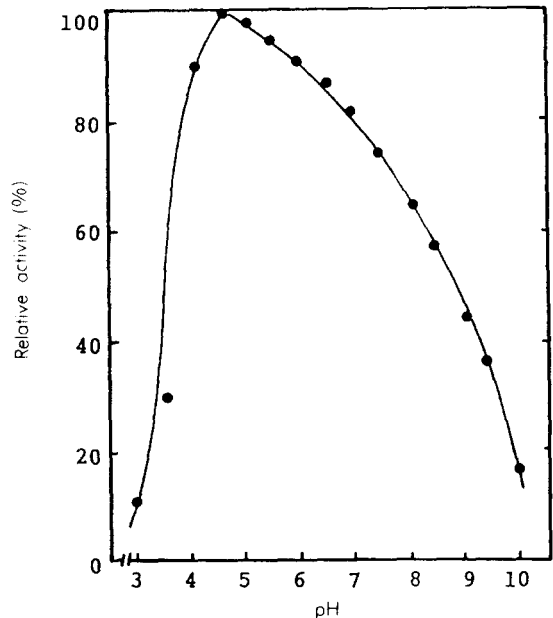


Fig. 3. Effect of pH on β-galactosidase production from NY-15

Table 2. Effect of carbon source on the β -galactosidase production from NY-15

Carbon source	Relative activity (%)
Control	100
Glucose	26
Galactose	174
Fructose	34
Sucrose	120
Mannose	14

Table 3. Effect of nitrogen source on the β -galactosidase production from NY-15

Nitrogen source	Relative activity (%)
Control	100
NH ₄ Cl	121
(NH ₄) ₂ SO ₄	92
(NH ₄) ₂ PO ₄	107
(NH ₂) ₂ CO ₃	207

으로 고정시키고 각종 질소원을 질소량으로 0.25%씩 각각 첨가하여 pH 4.6으로 조정한 후 28°C에서 28시간 배양하여 β -galactosidase의 활성을 측정된 결과 Table 3과 같다. 질소원으로써 urea 첨가시에 약 2배의 증가효과를 보였다.

누룩으로부터 분리한 균주의 알코올 생성능

본 실험에서 분리한 균주의 활용방안을 검토하는 목적으로 치즈 제조 후의 폐기물인 유청에 접종하여 알코올 발효를 수행하였다. Fig. 4에 제시하는 바와 같이 8일째에 알코올 함량이 2.2%로써 유청에 함유된 유당(lactose 함량 4.9%⁽⁸⁾)만을 이용하는 경우에 최대의 알코올 함량은 2%라 할 수 있겠다. 이러한 결과는 *S. fragilis*를 이용하여 whey의 알코올 발효를 실시하였던 Mehaia⁽⁹⁾ 등의 결과와 유사하였다.

또한 20% (w/v)의 당 첨가에 의한 알코올 생성은 2%에서 약 12%로 증가되었다. 이것도 Koshikowski⁽¹⁰⁾, Wang⁽¹¹⁾, O'leary⁽¹²⁾ 등의 연구에서와 같이 *S. fragilis*를 이용한 알코올 발효의 경우 당을 첨가함으로써 알코올 생성함량을 14%까지 증진시킬 수 있었다는 것과 비슷한 결과를 보였다. 이러한 결과들로부터는 누룩으로부터 분리한 β -galactosidase 활성을 가지는 균주 NY-15는 유청의 알코올 발효능에 있어서 *S. fragilis*와 상당히 유사한 것을 알 수 있다. 그러나 알코올 생성에 대한 최적 pH는 Fig. 5에서 보는 바와 같이 누룩 yeast NY-15는 pH 4.5에서 최대의 알코올

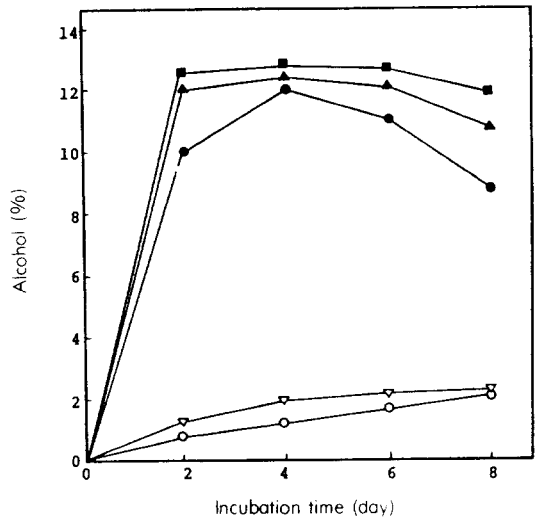


Fig. 4. Alcohol yields obtained through fermentation of whey permeate by *S. fragilis* and NY-15. (▽-▽) *S. fragilis*, whey permeate; (○-○) NY-15, whey permeate; (●-●) NY-15, contained 20% (w/v) glucose; (▲-▲) NY-15, contained 20% (w/v) lactose; (■-■) NY-15, contained 20% (w/v) sucrose

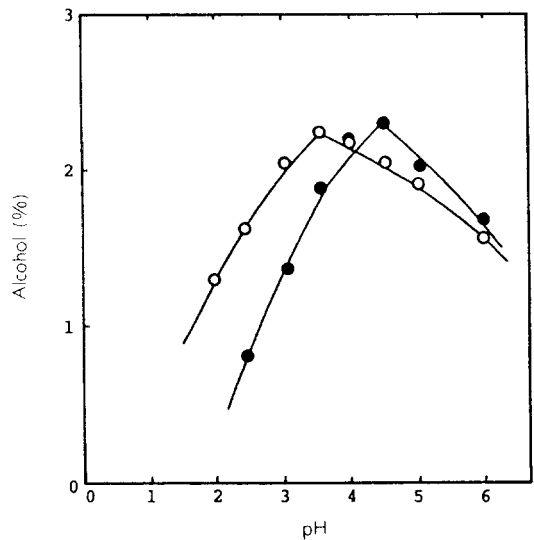


Fig. 5. Alcohol production by NY-15 (●-●) and *S. fragilis* (○-○) from pH controlled whey

생성을 보였고, *S. fragilis*는 pH 3.5에서 최대의 생성을 보였다.

요 약

누룩으로부터 유당 분해능과 CO₂ 생성능이 있는 균주를 분리하였다. 분리한 균주의 세포파쇄액을 β-galactosidase 조효소액으로 하여 효소생산을 위한 최적 배양조건에 대해 조사한 결과 28°C에서 배양하는 경우 균체량과 효소생산량은 pH 4.5-5.0, 28시간에서 최대치를 나타내었다. 탄소원으로는 galactose와 sucrose를, 질소원으로는 urea를 사용했을 때 효소생산량이 증가하였다. 분리한 균주의 유당 발효능을 조사하기 위해서 유청에 접종하여 알코올 생산량을 검토한 결과 유청에 있는 유당만을 이용한 경우에 최대 알코올 생산함량이 2% 정도인데, 유청에 20% (w/v)의 당 첨가에 의해서 알코올 생산함량이 12%로 증가하였다. 누룩으로부터 분리한 균주와 본 실험에서 비교군으로 사용한 *S. fragilis* ATCC 8583의 유당 분해능과 알코올 생성능은 매우 유사하나 유당발효의 최적 pH가 누룩 yeast는 4.5인데 비해서 *S. fragilis*는 3.5이었다.

감사의 말

본 연구는 한국과학재단연구비 지원(1986-1988)으로 수행되었으며 이를 깊이 감사드립니다.

문 헌

1. Iwasawa, S., Ueda, M., Miyata, N., Hirota, t. and Ahiko, K. : Identification and fermentation character of kefir yeast., *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 2631 (1982)
2. Tales, F.F.F., Young, C.K. and Stull, J.W. : A method for rapid determination of lactose., *J. Dairy*

- Sci.*, **61**, 506 (1978)
3. Benson, H.J. : Microbiological applications : A laboratory manual in general microbiology, 4th ed., Wm. C. Brown publishers dubuque, Iowa, p.135 (1985)
4. Craven, G.R., Steers, E. and Anfinsen, C.B. : Purification composition, and molecular weight of the β-galactosidase of *E. coli* K-12., *J. Biol. Chem.*, **280**, 2468 (1964)
5. Sidney, W. : Official method of analysis., 14th ed., A.O.A.C., Washington, D.C., p.220 (1984)
6. Lowry, O.H., Resovroygh, N.Z., Farr, A.L. and Randall, R.J. : Protein measurement with the folin phenol reagent., *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951)
7. 福井作藏 : 還元糖の定量法, 東京大學出版會, 45 (1973)
8. Kennedy, J.P. : Utilization of whey., *Cultured Dairy Product J.*, **5**, 13 (1985)
9. Mehaia, M.A., Cheryan, M. and Argondelis, C.J. : Conversion of whey permeate to ethanol., *Cultured Dairy Product J.*, **2**, 9 (1985)
10. Kosikowski, F.V. and Wzorek, W. : Whey wine from concentrates of reconstituted acid whey powder., *J. Dairy Sci.*, **60**, 1982 (1979)
11. Wang, C.J., Jayanata, Y. and Bajpai, R.K. : Effect of multiple substrates in ethanol fermentation from cheese whey., *J. Ferment. Technol.*, **65**, 249 (1987)
12. O'leary, V.S., Sutton, C., Bencivengo, M., Sullivan, B. and Holsinger, V.H. : Influence of lactose hydrolysis and solids concentration on alcohol production by yeast in acid whey ultrafiltrate., *Biotechnology and Bioengineering*, **XIX**, 1689 (1977)

(1989년 11월 7일 접수)