

## 효모와 고오지 곰팡이의 혼합배양에 의한 주정생산

최병권 · 김영배  
고려대학교 식품공학과

### Ethanol Production by the Mixed Culture of Some *Aspergilli* and *Saccharomyces cerevisiae*

Byung-Kwon Choi and Young Bae Kim  
Department of Food Technology, Korea University

#### Abstract

Some mixed culture systems consisting of koji molds and yeast were tested for the ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation using polished rice as the substrate. *Aspergillus shirousamii* showed the highest ethanol production in the mixed culture with *Saccharomyces cerevisiae* on steamed rice added with 150 ml water in 250 ml Erlenmeyer flask. The optimum initial pH, temperature and specific surface for the ethanol production in this system were 6.5, 30°C, and 0.1, respectively. Under this condition, 12.9% ethanol was produced with inoculation with  $5 \times 10^2$  conidia/ml of *A. shirousamii* and  $5 \times 10^6$  cells/ml of *S. cerevisiae* in 10 days.

Key words : simultaneous saccharification and fermentation, ethanol fermentation, mixed culture of mold and yeast

## 서 론

주정은 가장 오래된 역사를 지닌 발효산물의 하나로서 문화권마다 고유한 발효법이 발달하여 전래되고있다. 우리나라에서는 쌀을 비롯한 곡류를 주원료로 이용하였으며, 따라서 필요한 전분 가수분해의 효소원으로는 분쇄한 곡류에 곰팡이를 키워 만든 누룩을 사용하였다. 누룩은 또한 효모의 접종원이기도 하여 전분을 기질로 하여 아밀라제를 생산하는 곰팡이와 이를 이용하는 효모의 혼합배양물이며, 이 때 효모는 전분 기질에서 이용함에 있어 자신이 아밀라제를 생산하지 못하므로 곰팡이 존재에 의존하여야 하는 특성의 생태학적 관계를 가진다. 그러나 근래에는 누룩대신 선정된 균주만을 순수 배양한 고오지를 효소원으로 따로 만들어 사용하는 것이 곡류를 이용한 주정발효의 보통 방법이다. 곰팡이는 거의 전부 편성 호기성이므로 이때 첨가된 고오지의 곰팡이는 주정 발효 중에는 산소의 차단으로 곧 활력을 잃을 것이나 표면에서는 상당기간 동안 살아있어 주정발효에 영향을 줄 수 있을 것으로 생각된다.

본 연구는 주정 발효에서 별도의 고오지 제조 과정없이 곡류에서 주정을 생산할 목적으로, 쌀을 원료로 하여

곰팡이와 효모를 동시에 접종하여 혼합배양을 하고, 그 과정 중 효모의 주정 발효가 가능한 고오지 곰팡이 종류와 발효 조건을 찾아낼 목적으로 시도하였다.

## 재료 및 방법

### 균주

고오지 곰팡이로는 *Aspergillus awamori*, *A. kawachii*, *A. niger*, *A. oryzae*, *A. shirousamii*를, 효모는 *Saccharomyces cerevisiae*를 사용하였다. 이들은 본 연구실에서 보관 중인 것으로 potato dextrose agar에 곰팡이는 7일, 효모는 3일간 30°C에서 배양하여 사용하였다. 곰팡이 접종원은 0.05% Tween 80용액으로 포자 현탁액을 제조하였으며, 효모는 생리적 식염수에 균체 현탁액을 만들어 각각 네겟의 가제로 걸러서 균사 및 균체덩어리를 제거한 후 counting chamber로 균수를 조절하였다.

### 발효조건

원료는 정부미(전분 78%)를 시중에서 구입하여 사용하였다. 발효조건은 달리 언급이 없는 한 다음과 같다. 즉, 250 ml의 삼각플라스크에 50g의 쌀을 넣고 1시간 동안 침지 후 여분의 물을 빼 다음 121°C에서 15분간 가압살균하였다. 여기에 살균된 수돗물을 100 ml 가하고 효모와 곰팡이의 포자를 각각  $5 \times 10^6$ 씩 접종하여 30°C

Corresponding author : Young Bae Kim, Department of Food Technology, Korea University, 1 Anam-dong, Sungbuk-ku, Seoul, 136-701, Korea

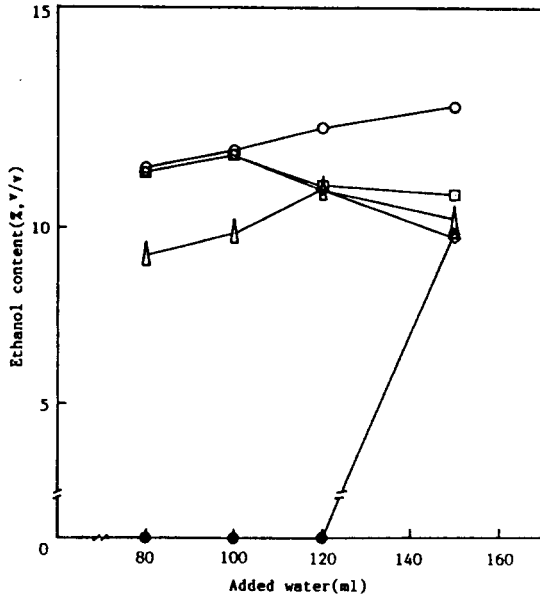


Fig. 1. Effect of amount of added water on the ethanol production in the mixed culture of *S. cerevisiae* and different aspergilli on cooked rice

○-○; *A. shirousamii*, □-□; *A. awamori*  
 △-△; *A. oryzae*, ◇-◇; *A. kawachii*  
 ●-●; *A. niger*

The amount of uncooked rice was 50g.

에서 10일간 정치배양 시키었다.

분석방법

효모 생균수는 malt extract agar에 drop count 방법<sup>(1)</sup>으로 처리한 후 30°C에서 3일간 배양하여 발생하는 콜로니의 수를 세었다. 주정함량은 산화법<sup>(2)</sup>으로 측정하였다.

결과 및 고찰

곰팡이 종류와 가수량이 주정발효에 미치는 영향

효모를 고오지 곰팡이 5종과 각각 동시 접종하고 가수량을 달리한 10일간의 혼합 배양에서의 주정 생산량은 Fig. 1과 같다. *Aspergillus awamori* 및 *A. oryzae*, 그리고 *A. kawachii*를 사용한 경우에는 가수량 100 ml 혹은 120 ml에서 각각 최대 주정생산량을 보이고 더 이상의 가수에서는 오히려 주정생산이 감소하였다. *A. shirousamii*의 경우에는 가수량 150 ml 까지에서도 주정 생산량이 증가하여, 사용한 곰팡이 중 가장 높은 12.8%의 생산을 보였다. 한편, *A. niger*의 경우에는 가수량 120 ml까지도 전혀 주정이 생산되지 않았으나 150 ml에서는 급히 증가하였다.

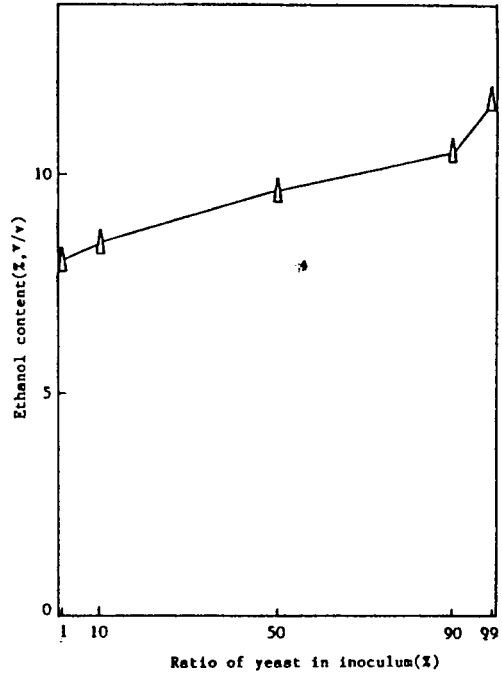


Fig. 2. Effect of mold and yeast ratio in inoculum on the ethanol production in the mixed culture of *A. shirousamii* and *S. cerevisiae* on cooked rice

곰팡이의 성장 중에 아밀라제가 생성되어 전분이 가수분해 되어야만 효모는 주정을 생산할 수 있다. 가수량을 증가시키면 산소차단 효과가 증가되어 곰팡이의 성장은 억제되는 것이 보통이다. 따라서 지나친 곰팡이의 성장의 억제는 전분 가수분해효소의 생산을 감소시키고 이로 인하여 주정발효도 또한 억제되는 것으로 보인다. 그러나 *A. niger*의 경우에는 120 ml의 가수량까지도 곰팡이 균사가 배양용기 바닥까지 빠르게 퍼져나간 것으로 보아 오히려 곰팡이의 지나치게 우세한 성장으로 효모의 성장이 약화되고 따라서 주정이 생산되지 못하였던 것으로 생각된다. 곰팡이의 성장에 미치는 산소분압의 영향은 종류에 따라 크게 다르며<sup>(3)</sup>, 사용했던 곰팡이 중 *A. niger*는 낮은 산소의 분압에서 비교적 잘 자라는 것으로 믿어진다. 이상의 결과 사용한 곰팡이 중에서 가장 주정생산에 좋은 결과를 낸 *A. shirousamii*를 선택하여 다음 실험에서 사용하였다. 이 때 가수량에 따라 증가할수록 주정의 생산이 증가 추세이나 사용한 용기에 더 이상의 가수에서는 곰팡이의 표면 성장과 발효시의 가스발생으로 마개를 적시어 무균상태의 유지와 균일한 실험 성적을 얻기가 어려워 150 ml의 가수량을 선택하였다.

주정생산에 미치는 몇 가지 발효조건에 미치는 영향

곰팡이와 효모의 접종 비율, 비표면적, 초기 pH 및

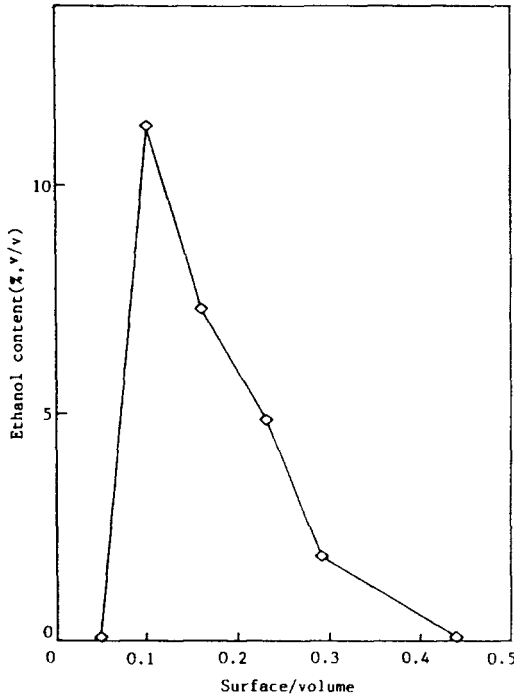


Fig. 3. Effect of specific surface(surface area in cm<sup>2</sup>/volume cm<sup>3</sup>) in fermentation aliquot on the ethanol production in the mixed culture of *A. shirousamii* and *S. cerevisiae* on cooked rice

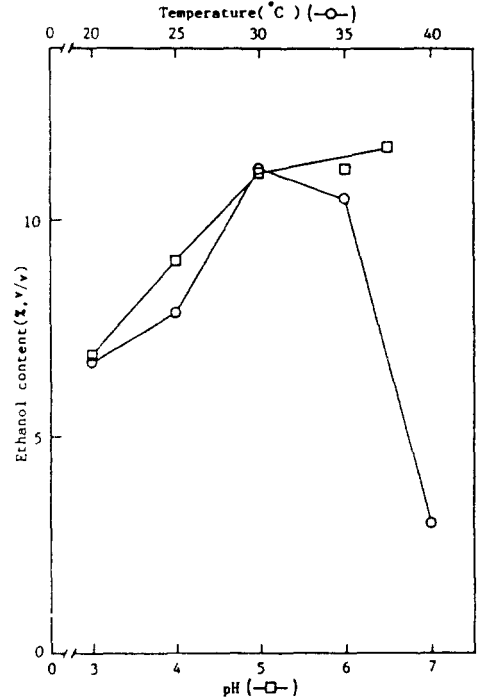


Fig. 4. Effect of initial pH and temperature on the ethanol production in the mixed culture of *A. shirousamii* and *S. cerevisiae* on cooked rice

발효 온도가 10일 동안의 발효에서 주정 생산에 미치는 영향은 각각 Fig. 2, 3 및 4와 같다. 접종 총균수를 flask당  $1 \times 10^7$ 으로하여 곰팡이에 대한 효모의 비율을 1%에서 99%까지 변화시키어 접종한 후의 발효 결과 효모의 비율이 증가할수록 주정의 생산은 증가하였다. 따라서 접종시 효모의 수가 주정 생산에 더욱 영향이 큰 것으로 생각된다.

99% 효모의 비율로 접종한 동일한 재료를 지름이 다른 용기에서 발효시키어 용적(cm<sup>3</sup>)에 대한 표면적(cm<sup>2</sup>)의 비를 0.05에서 0.44까지 변화시킨 결과 비표면적 0.05에서 1% 이하이던 주정생산량은 비표면적 0.1에서 주정 함량이 11.4%로 제일 높았으며 그 이상에서는 다시 낮아졌다. 비표면적이 0.1보다 크면 곰팡이 성장이 지나치게 우세해져서 기질이 곰팡이 균체생산에 주로 이용되고, 반면에 그보다 작으면 곰팡이의 성장이 지나치게 억제되어 아밀라제의 생산이 불충분하여 발효당 생성이 감소되어 따라서 주정 생산도 감소하는 것으로 볼 수 있다.

초기 pH는 pH를 조절하지 않은 경우인 6.5에서, 그리고 30°C의 온도에서 주정생산량이 가장 높게 나타났다.

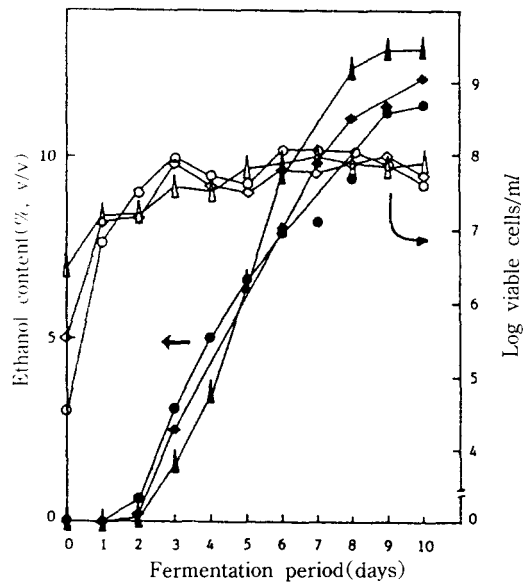


Fig. 5. Yeast growth and ethanol production in the mixed culture on cooked rice when inoculated with  $5 \times 10^2$  conidia/ml of *A. shirousamii* and  $5 \times 10^4$  (○),  $5 \times 10^5$  (◇) and  $5 \times 10^6$  cells/ml (△) of *S. cerevisiae*, respectively

### 효모 접종량이 발효과정에 미치는 영향

이상에서 보인 최적조건에서 곰팡이의 접종량을  $5 \times 10^2$  conidia/ml로 고정하고 효모의 접종량을  $5 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^5$  및  $5 \times 10^6$  cells/ml로 변화시킨 결과 발효과정에 미치는 영향은 Fig. 5와 같다. 최대성장 후 효모의 수는 접종량에 크게 영향을 받지 않는 것으로 나타났다. 그러나 주정의 생성시점은 효모의 접종량이 적을수록 다소 빨랐다. 반면에 주정의 생성속도 및 10일 후의 생산량은 접종량이 증가할수록 증가하여 최고 12.9%를 보였다. 이는 기질의 첨가없이 10일 동안의 발효기간을 감안한다면 별도로 제조한 고오지를 사용하는 기존의 일반적인 주정발효의 경우<sup>(4)</sup>와 비교하여 뒤지지 않는 수율이라고 생각된다.

### 요 약

쌀을 기질로 하여 고오지 곰팡이와 *Saccharomyces cerevisiae*를 함께 동시 접종하여 혼합 배양에 의한 동시 당화발효를 시도하였다. *Aspergillus awamori*, *A. kawachii*, *A. niger*, *A. oryzae* 및 *A. shirousamii*를 각각 *S. cerevisiae*와 혼합배양하였을 때 *A. shirousamii*와의 혼합

배양에서 가장 높은 주정생산량을 보였다. 이 때의 가수량은 쌀 50g에 대하여 150 ml 이었다. 곰팡이와 효모는 각각  $5 \times 10^2$  conidia/ml 및  $5 \times 10^6$  cells/ml로 접종한 경우에, 용적에 대한 표면적의 비는 0.1에서 그리고 초기 pH 6.5 및 30°C의 배양조건에서 10일 동안 발효시 최고 12.9%의 주정이 생산되었다.

### 문 헌

1. Collins, C.H. and Lyne, P.M. : *Microbiological Methods*, 5th ed., Butterworths, p.133 (1984)
2. Amerine, M.A. and Ough, C.S. : *Methods for Analysis of Musts and Wines*, John Wiley & Sons, p.93 (1979)
3. Berry, D.R. : The environmental control of the physiology of filamentous fungi. In *The Filamentous Fungi*, Smith, J.E. and Berry, D.R.(ed.), Edward Arnold, vol.1, p.28(1975)
4. Kodama, K and Yoshizawa, K. : Sake. In *Alcoholic Beverage, Economic Microbiology*, Rose, A.H.(ed.), Academic Press, vol. 1, p.450 (1977)

(1990년 7월 9일 접수)