

동양배 (*Pyrus serotina*)를 원료로 한 *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4124에 의한 에탄올 발효시 배양온도와 영양분의 영향

오 영 준

동신대학교 식품영양학과

Effect of Culture Temperature and Nutritional Components on the Production of Ethanol Using *Pyrus serotina* by *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4124

Young-Jun Oh

Dept. of Food and Nutrition, Dongshin University, Naju 520-714, Korea

Abstract

The effects of cultural temperature and nutritional components on the production of ethanol using juice of *Pyrus serotina* as the substrate for *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4124 were studied. After anaerobic cultivation in 5L flask of a defined pear juice at 20° C, ethanol concentration of 11.5% (v/v) could be obtained. The addition of a small amount of $K_2S_2O_5$ was essential for the successful production of ethanol. Ethanol concentration could be further enhanced by supplementing a small amount of various complex nitrogen sources. When 0.05% of yeast extract and 0.05% of $(NH_4)_2HPO_4$ were added to a defined medium, ethanol concentration obtained after 7 day cultivation at 20° C was 12.3%.

Key words : *Pyrus serotina*, ethanol

서 론

우리나라에서 생산되는 배는 연간 17만톤(t) 정도에 달하고 있으나 대부분 생과로 소비되고 있어 배의 안정적 수급조절이 어려워져 생과로 판매하기 어려운 과일의 발생률은 전체 생산량의 15% 정도에 이른다. 이런 상품성이 낮은 배를 이용하여 무살균가공법을 확립하여 저렴한 가격으로 기호에 알맞고 저장력이 강한 고농도의 배술을 제조하고 공업화 생산할 수 있는 기초를 마련하기 위하여 본 연구를 수행하였다.

전라도 전주를 중심으로 형성되었던 생강 재배단지인 이강주의 명산지다. 증보산림경제에 의하면 이강주의 재법은 배를 거피하여 와석위에 갈아 즙을 내어 고운 형질으로 바치고 찌꺼기를 버리고 생강도 즙을 내어 바치고 이 두가지와 꿀을 잘섞어 소주병에 넣어서 증탕하여 쓴다라고 하였다(1-3). 여기에서 배는 가향성분으로만 첨가되고 있으며 본 실험 연구에서와 같은 배즙에 효모를 넣어 발효시키는 방법과는 근본적으로 차이가 있다. 특히 서양배 (*Pyrus communis*)를 원료로한

배술은 배특유의 향기성분과 알콜과의 조화에 의한 적합한 기호는 어느 다른 주류도 이를 추종하지 못하는 것이다(4). 따라서 동양배 (*Pyrus serotina*)를 원료로한 배술도 그 기호도가 우수할 것으로 기대되어 본 연구에서는 동양배 (*Pyrus serotina*)를 발효기질로 하여 여기에 효모를 배양하여 알콜발효를 행할 때 온도와 여러가지 영양원 첨가의 영향에 대하여 실험하였기에 그 결과를 보고 하고자한다.

재료 및 방법

배즙의 제조 및 아황산의 처리

나주지역 농가에서 수집한 상품성이 낮은 배를 깨끗이 세척한 후 물기를 제거하여 4~8 등분한 다음 파쇄기로 마쇄시킨 후 아황산 처리를 하여 원료배즙으로 사용하였으며 아황산의 첨가방법은 $K_2S_2O_5$ (메타칼리, potassium pyrosulfite)를 배즙에 100~400ppm을 첨가하였다. 메타칼리는 무수물로 산성용액에서 57%의 유효성 SO_2 를 발생시킨다.

사용균주 및 배지

본 연구에서 사용한 균주는 한국중균협회에서 분양 받은 효모 *Saccharomyces cerevisiae*의 5균주를 사용하여 전통적으로 사용해 온 누룩 중에서 알콜 발효력을 비교 검토하여 그 중에서 알콜 발효력과 SO₂내성이 강한 균주 *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4124를 공식균주로 하였다. 균주의 보존용 배지로는 yeast-malt agar (Difco)를 사용하였다.

에탄올 함량의 측정

증류법에 의하여 얻은 유출액을 주정계의 눈금과 액운을 측정하여 Windisch 참고표 (5)에 의하여 에탄올 용량 %를 산출하였다.

총당 정량

발효 전의 배즙 및 발효액의 일부를 취하여 3000rpm에서 15분간 원심분리한 후 상등액을 취하여 다음과 같은 방법 (6)에 의하여 총당량을 구하였다. 상등액 1ml에 5% phenol 1ml을 첨가하고 여기에 다시 98% H₂SO₄ 5ml을 첨가한 후 전체 반응액을 실온 상태의 온도로 맞춘 다음 40분 이내에 spectrophotometer (Shimadzu)로 490nm에서 흡광도를 측정하였으며 표준용액으로는 포도당 용액을 사용하였다.

산도 측정법

시료용액 10ml에 phenolphthalein을 지시약으로 하여 중화하는데 요하는 0.1N NaOH 적정량을 citric acid 로 계산하였다.

보당 (배즙조정)

원료배즙에 당을 첨가할 때는 saccharose를 사용하여 다음 식에 의하여 계산하였다.

$$S = \frac{W(a - b)}{100 - b}$$

S(kg) : 첨가하여야 할 당의 양, W(kg) : 배즙의 무게
a(%) : 배즙의 당도, b(%) : 요구하는 배즙의 당도

주모제조

100ml 삼각 플라스크에 10ml 배즙을 넣고 80°C에서 30분간 살균한 후 배양효모한 백곰이를 접종하여 28°C에서 2일간 배양하여 종균을 준비한다. 별도로 250ml 삼각플라스크를 준비하여 여기에 100ml 배즙을 넣고 메타칼리롤 100~200ppm 되게 가하여 하룻동안 방치한 다음 미리 준비한 종균액 10ml를 가한 후 28°C에서 2~5일간 효모를 왕성하게 증식시켜 주모(8-10)로 사용하였다.

발효

살균된 5L 삼각플라스크에 2.5~3L의 16~28%로 보당한 배즙을 넣고 5% 정도의 주모와 100~400ppm 정도의 메타칼리롤을 첨가한 다음 온도를 15~30°C로 유지하면서 호기적 상태에서 2일간 발효 후 발효관으로 밀폐하여 혐기적 상태로 유지시키면서 발효를 진행시켰다. 알콜발효는 CO₂가스의 발생을 필수로 하고 공기의 공급은 필요없으므로 발효관을 통하여 CO₂ 가스발생이 일어나지 않았을 때를 발효의 종료점으로 하였다.

결과 및 고찰

원료배의 성분분석 및 착즙

비율 원료배를 깨끗한 물로 2회 씻고 불량 부분을 제거한 후 고추가루 마쇄용 착즙기로 착즙한 배즙을 분석한 결과를 Table 1에 나타내었다.

Table 1에서 보는 바와 같이 품종에 따른 당도나 산도에 상당한 차이가 있는 것은 수확기나 미숙과의 비율에 따른 것으로 추측되며 착즙률은 약 71% 정도를 나타내었다.

배즙의 K₂S₂O₅ 처리농도의 영향

배의 과피에는 야생효모, 곰팡이, 유해세균(초산균, 젖산균)이 부착되어 있으므로 배즙을 그대로 방치하여도 발효가 진행되나 주질이 나빠진다. 그러므로 마쇄와 동시에 아황산을 가하여 유해균을 살균시키거나 그의 증식을 저지시킨다. 그 효력을 발휘하여 최후에 그 농도가 낮아지면 원래 이들 균 보다 아황산 내성이 강한 우량한 효모의 주모를 가하여 발효시킨다. 따라서

Table 1. The composition of various pear juice

Species of <i>Pyrus serotina</i>	Concentration of sugar (%)	Total acidity (mg%)	Yield of juice (%)
Changsiprang	10~13	230~260	72.5
Shingo	10~13	220~240	70.5
Gumchonchu	9~12	230~250	70.0

발효기질로 사용할 배주는 아황산 처리를 할 필요가 있으며 그 농도는 효모의 생육에도 영향을 줄 것으로 추정되어 본 실험에서는 $K_2S_2O_5$ 의 농도를 달리하여 24%로 보당한 배주에 첨가한 후 2일간 배양한 효모 *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4124를 배주량에 대하여 5% 접종하여 20°C에서 7일간 발효 중의 에탄올 생성량을 비교하였다. Fig. 1에서 나타내는 바와 같이 $K_2S_2O_5$ 농도가 100~200ppm 경우는 비슷한 경향을 나타내고 있으나 300ppm 이상에서는 알콜발효능이 감소하는 현상을 관찰할 수 있었다. 따라서 다음 부터는 배주 중의 $K_2S_2O_5$ 농도를 200ppm으로 조정하여 실험을 진행시켰다.

당농도의 영향

Saccharomyces cerevisiae ATCC 4124의 최적 에탄올 생성조건을 설정하기 위하여 배주의 당농도를 측정된 후 설탕으로 보당하여 그 영향을 조사하였다. 즉, 배주의 당도를 6, 20, 24, 28%로 각각 달리하여 $K_2S_2O_5$ 농도는 200ppm으로 조정하여 20°C에서 7일간 혐기적 조건으로 정지발효시키면서 에탄올 함량을 측정하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 당 농도가 16%일 때는 저농도의 에탄올이 생성되었으며 28%일 때에도 당의 농도에 의한 효모증식의 억제로 인하여 에탄올 생산이 저조한 결과를 나타내었으나 24%일 때가 대체적으로 양호함을 알 수 있었다.

발효온도의 영향

일반적으로 발효온도가 높으면 무산균 처리한 배주

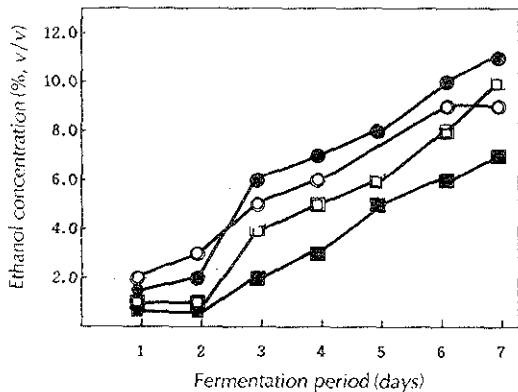


Fig. 1. Effect of $K_2S_2O_5$ concentration in pear juice on the production of ethanol by *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4124 at 20°C.

중의 유산균 등이 생육이 촉진되어 이상발효가 일어나고 지나치게 발효온도가 낮으면 효모의 생육이 저해를 받아 생성에탄올 수율이 낮아진다고(7) 알려져 있다. 따라서 효모증식시 발효온도가 최종 배출의 향미성분과 에탄올 수율에 영향을 미칠 것이라고 판단되어 발효온도에 대한 영향을 검토한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 15°C에서는 효모의 생육이 저해를 받아 알콜생성이 장애를 일으킨 것으로 추정되었으며 25와 30°C에서는 혐기적 발효개시 4~5일 사이에 알콜생성치가 최고에 달한 그 상태를 유지하였으며 20°C에서는 알콜생성 속도가 발효기간에 따라 꾸준히 증가하여 발효 7일째에는 알콜농도가 12.5%에 달하였다. 따라서 발

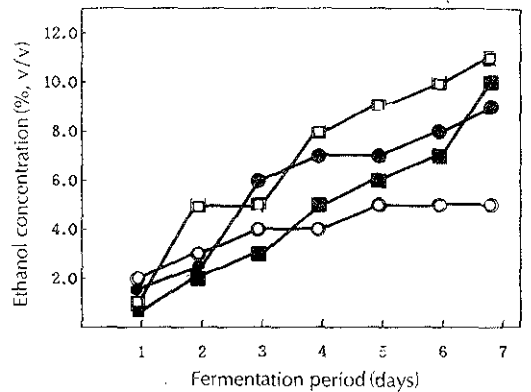


Fig. 2. Effect of sugar concentration on the production of ethanol by *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4124 in pear juice containing 200ppm $K_2S_2O_5$ at 20°C.

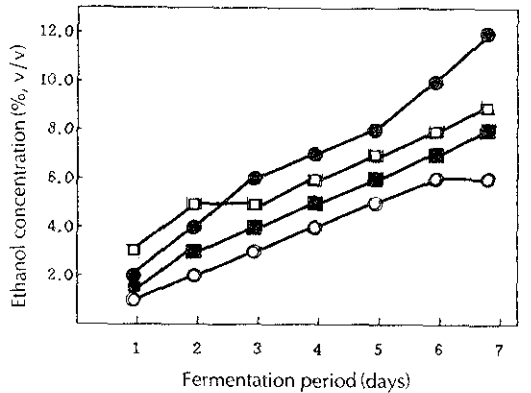


Fig. 3. Effect of fermentation temperature on the production of ethanol by *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4124 in pear juice containing 24% sugar and 200ppm $K_2S_2O_5$ at 20°C.

효온도는 20°C가 가장 좋은 것으로 나타났다. Piper와 Bruchmann(4) 그리고 Kreipe(11)은 향미가 풍부하고 기호도가 뛰어난 과일주를 얻기 위해서는 저온에서 발효시키는 것이 좋다고 보고하고 있다.

발효기간의 영향

파쇄한 배즙을 24%로 보당하여 20°C에서 200ppm의 K₂S₂O₅를 처리한 후 주발효 배즙량의 5% 주모를 접종하여 CO₂ 가스가 전혀 발생치 않을 때 까지 발효를 시키고 발효과정 중 일정량을 취하여 당농도와 알콜농도를 측정하였다. 그 결과를 Fig. 4에 나타냈다. Fig.에서 나타난 바와 같이 7~10일 사이에 최대의 알콜농도를 보였다. 그러나 그 후에도 CO₂ 가스 발생 현상은 계속되어 관찰할 수 있었다. 이것은 잔당이 계속적인 발효가 일어나는 것과 아울러 최종 발효산물의 풍미에서 상당히 영향을 미칠 것으로 추정된다. 고농도의 기질을 이용할 수 있는 균주는 에탄올 생산시 삼투압에 민감한 잡균의 억제와 생성된 에탄올의 회수시 증류 경비를 감소시키는 장점이 있다(12).

주모 배양기간의 영향

파쇄된 배즙은 별도로 효모를 첨가하지 않은 상태에서 발효되어 배술이 만들어지나 이와 같은 발효법은 위험성이 있으므로 우량 효모를 인위적으로 배양하여 주모를 만들어서 발효하는 것이 필수적이라 하겠다. 본 실험에서는 주모용 균주로서 *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4124를 사용하여 배즙을 기질로 하고 기간을 달리 해서 주모의 증식 상태를 관찰하면서 당농도 24%와 200ppm 메타칼리가 처리된 본 발효용 배즙에 배양된

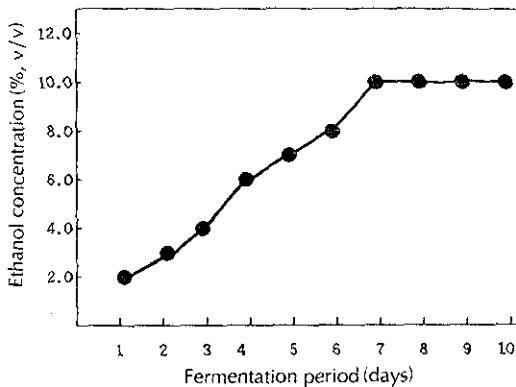


Fig. 4. Effect of fermentation period on the production of ethanol by *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4124 in pear juice containing 24% sugar and 200ppm K₂S₂O₅ at 20°C.

주모를 첨가하여 20°C에서 7일간 정치배양 하였다. Fig. 5에서 나타난 바와 같이 3일간 배양한 주모를 본 발효용 배즙량의 5%가 되게 첨가하여 발효시킨 발효산물이 5일 까지의 초기에는 2일 배양주모 보다 약간 낮은 듯하다가 6일 이후에는 가장 높은 알콜 생산량을 가져왔다.

1일에서 2일간 배양한 주모는 균체증식이 충분치 않은 것으로 판단되었으며 4일간 배양한 주모를 첨가했을 때는 에탄올 생성에 약간의 유의적인 차이를 관찰할 수 있었다. 이러한 실험결과에 의하여 지금까지의 실험에서는 2일간 배양한 효모를 주모로 사용하였으나 이후의 실험에서는 3일간 배양한 효모를 사용하였다.

질소원 첨가의 영향

배즙에는 효모가 영양원으로 이용할 수 있는 질소량이 충분치 않다고 알려져 있으므로 24%로 보당한 배즙에 0.05%의 유기태 및 무기태 질소원을 첨가하여 각 질소원이 에탄올 생산에 미치는 영향(13,14)을 검토하였다. 여기에서 NH₄H₂PO₄를 첨가한 것은 배즙 중에 결핍될 수 있는 인을 보충해 주는 부수적인 효과를 기대하기 위한 것이다. 사용된 질소원을 소량의 배즙에 녹인 후 발효용 배즙에 첨가하여 20°C에서 7일간 혐기적 발효를 수행하였다. Fig. 6에서 표시한 것과 같이 Yeast extract, (NH₄)₂SO₄, NH₄HPO₄를 단독으로 첨가할 시에는 에탄올 생성능에 별효과가 없었으나 Yeast extract와 (NH₄)₂HPO₄를 조합했을 경우에는 에탄올 생산성이 양호하였다.

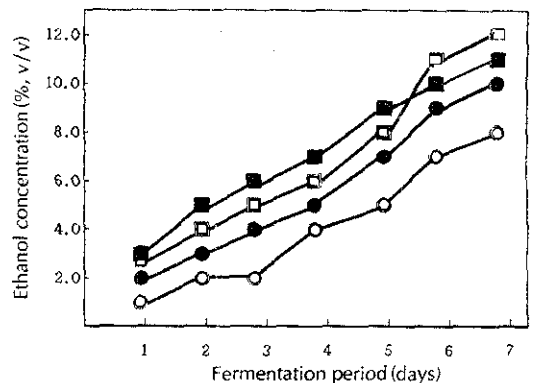


Fig. 5. Effect of cultivation time of seed mash on the production of ethanol by *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4124 in pear juice containing 24% sugar and 200ppm K₂S₂O₅ at 20°C.

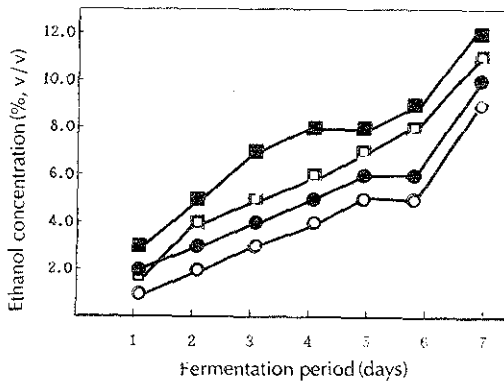


Fig. 6. Effect of nitrogen source on the production of ethanol by *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4124 in pear juice containing 24% sugar and 200ppm $K_2S_2O_5$ at 20°C.

- : 0.05% Yeast extract
- : 0.05% $(NH_4)_2SO_4$
- : 0.05% Yeast extract + 0.05% $(NH_4)_2SO_4$
- : 0.05% Yeast extract + 0.05% $(NH_4)_2HPO_4$

요 약

비교적 연구가 미미한 우리나라에서 생산되는 동양 배 (*Pyrus serotina*)를 원료로 하여 기호성이 우수하고 저장력도 강한 발효배술을 생산하기 위한 기초연구를 수행하였다. 배즙을 발효기질로하여 여기에 *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4124를 접종배양시 최적 에탄올 생성조건을 비교, 검토한 결과를 요약하면 다음과 같다. 배즙은 착즙 즉시 $K_2S_2O_5$ 를 200ppm 농도로 처리하는 것이 polyphenol oxidase의 작용을 억제하여 갈변방지에 효과적임과 동시에 잡균이 증식을 억제하여 배즙발효에 필수적임을 알 수 있었으며 최적 발효온도는 20°C, 최적 발효기간 7일, 최적 당 농도는 24%였으며 질소 원료로 Yeast extract와 $(NH_4)_2HPO_4$ 를 조합하여 첨가시

향상된 에탄올 수율을 얻을 수 있었다.

문 헌

- 이철호, 김기명 : 옛문헌에 의한 한국술의 종류와 제조기술. 생물산업 (한국산업미생물학회), 6, 8(1993)
- 정현배 : 우리나라 주류산업의 현황과 국제적 위치. 생물산업(한국산업미생물학회), 7, 5(1994)
- 이성우 : 쌀을 이용한 명주개발연구. 한국식품개발연구원, p.415 (1992)
- Piper, H. J., Bruchmann, E. E. and Kool, E. : Technologie der Obstbrennerei. Verlag Eugen Ulmer Stuttgart, p.110(1977)
- 허신행 : 발효공학실험. 지구문화사, p.86(1989)
- Dubois, M. : Colorimetric method for determination of sugars. *Analyt. Chem.*, 28, 350(1956)
- Jones, R. P., Pamment, N. and Greenfield, D. F. : Alcohol fermentation by yeasts-the effect of enviromental and others variables. *Process Biochemistry*, 12, 42(1981)
- Beuda, I. : Wine and brandy. In "Industrial Microbiology" 4th ed., Reed, G.(ed.), Avi Publishing Company, Inc., p.293(1982)
- Kosaric, N., Wiczorek, A., Cosentino, G. P., Magee, R. J. and Prenosil, J. E. : Ethanol fermentation. In "Biotechnology" Rehm, H. J. and Reed, G.(ed.), Verlag Chemie, Vol. 3, p.257(1983)
- 정호원 : 전통주와 쌀을 이용한 주류개발. 식품과학과 산업, 4, 127(1989)
- Kreipe, H. : Getreide und kartoffelbrennerei. Verlag Eugen Ulmer Stuttgart, p.150(1981)
- 김정옥, 김중근 : 전통 이화주 양조 중의 주요성분(유기산, 알콜, fusel oil) 및 관능적 품질 특성. 한국식품과학회지, 10, 1(1994)
- 최병권, 김영배 : 효모와 고지곰팡이의 혼합배양에 의한 주정생산. 한국식품과학회지, 22, 696(1990)
- Otsuka, K., Iki, i. and Yamashita, T. : Relationship between type and component of alcoholic beverages. *Hakkokogaku*, 57, 20(1979)

(1995년 3월 22일 접수)