

탁주 발효에 대한 Nisin의 이용

유진영* · 이 성

한국식품개발연구원 생물공학연구부

Use of Nisin for Improved Ethanol Production during Takju Fermentation. Jin-Young Yoo* and Sung Lee. Food Biotechnology Division, Korea Food Research Institute, Seongnam, Bundang P.O.Box 2, Kyonggido, 463-420, Korea - Takju is a traditional alcoholic beverage that has been prepared by fermenting the cooked rice and Nuruk (Korean-style bran koji). During fermentation, bacterial contamination is a problem which inhibits the growth of yeast and thus lowers the ethanol production from starch of rice, and causes souring. Major contaminants were known to be gram-positive acid producers at the early stage of fermentation. This problem would be solved if the contaminated bacteria could be controlled. Nisin, a GRAS-grade preservative, was added at the level of 500 iu/g as it retards the growth of the gram-positive bacteria. It was possible to control acid and ethanol production during fermentation. This process increased the ethanol production by 2 % comparing with control.

탁주는 오랫동안 즐겨 음용되어 왔던 전통 주류로서 자연 발효 시킨 밀기울과 증자된 쌀을 물과 적당히 혼합하여 발효시켜 제조한다. 탁주를 제조하는데에는 누룩으로부터 유래된 당화효소류와 효모류가 작용하며 우선 전분을 분해 당화하면서 효모류가 발효성 당을 이용하여 에탄올을 생성하는 것이 주된 공정이다. 양조장에서는 발효공정시 주모를 사용하여 숙성으로 발효를 하고자하는 경향이나 누룩에서 유래되는 일부 세균들에 의하여 에탄올 발효가 지연되는 경우가 있으며 아울러 탁주에 다량의 산이 생성되는 이른바 산패의 원인이되기도 한다. 이와같은 주된 원인균으로는 젖산균과 *Bacillus*속 균 등 그람 양성균(1)으로서 이들의 증식을 억제하면 이와같은 문제점이 해결될 수 있으리라 판단되지만 탁주 발효가 완전한 무균관리로 진행되지 않으므로 여러 가지 어려운 점이 있다.

발효가공 및 저장에 있어서 잡균의 관리에는 열처리를 이용한 살균공정(2) 및 첨가제를 이용하는 방법이 있으나(3-5) 탁주 발효 공정에는 이들 방법을 응용첨가하는데에는 다소 어려움이 있다. 그러나 첨가물을 이용하여 발효원료로부터 유입되는 잡균의 증식을 억제하고 또 이들 물질이 독성이 없다면 이는 바람직한 방법이 될 수 있다. 발효 및 저장에서 미생물의 증식을 억제하는 항균물질은 알려져 있지만 대부분이 독성을 가지고 있어 그 사용에 제약이 있다. 그러나 젖산균이 생성하는 항균 물질인 bacteriocin은 저분자량의 펩타이드 물질로서 주로 그

람 양성균으로부터 생산되며 생산균과 분류학적으로 유연관계인 세균에 대하여 생육을 저해하며 특히 그람 양성균에 작용을 한다. 이와같은 bacteriocin중 상품화된 것으로 영국의 Aplin & Barrett사의 nisaplin이 있는데 이 상품의 주성분은 nisin이다. Nisin은 34개의 아미노산으로 구성된 열안정성이 있는 것으로 GRAS물질로 되어 있을 뿐 아니라 현재 육류, 낙농제품, 포도주 및 통조림류에 전세계적으로 사용되고 있다(6-9). 이 물질은 그람 양성 세균에 효력이 있어 탁주 발효시 첨가하면 잡균의 증식을 억제하고 따라서 에탄올 발효를 촉진할 뿐 아니라 산패를 억제할 수 있다고 판단하여 nisin 첨가에 의한 탁주 제조 시험을 실시하여 그 결과를 보고한다.

재료 및 방법

탁주제조

탁주의 제조는 우선 멥쌀을 14-15 °C의 물에서 10-20시간 침지한 후 마쇄후 증미하여 제조한 코오지 10g에 물 85 ml을 넣고 0.5%의 효모(P 사)를 넣어 25°C에서 16시간 증식시켜 주모를 만들었다. 별도로 증자된 쌀로 제조한 분국에 1:1.72의 비율로 가수한 후 미리 제조한 주모를 섞어 1 단 사임을 하였고 24시간 발효를 하였다. 1 단 사임이 지난후 1 단 사임량의 2.5배에 해당하는 증미와 물 3.57 l을 넣어 2 단 사임에 들어 갔으며 이때 아밀라제와 누룩을 넣어 9일간 발효하였다(Table 1).

Nisin(Aplin & Barrett사, 10⁶ iu/g)은 사임시기별로 최종 농도가 500 iu/g가 되도록 조절하여 첨가하였고 발효는 유리용기(직경 21 cm, 높이 30 cm의 유리용기)에서 진행되었으며 하단에서 탁주를 채취할수 있도록 유리

*Corresponding author

Tel. 82-342-780-9106, Fax. 82-342-709-9877

E-mail: microbug@chollian.dacom.co.kr

Key words: Takju, Nisin, Ethanol.

Table 1. Composition of ingredients for Takju preparation.

Materials	Seed mash	1 st Mashing	2nd Mashing	Total
Rice	10 g*	840 g	2.1 kg	2.95 kg
Mold		2.5 g		2.5 g
Yeast	0.5 g			0.5 g
Nuruk			50 g	50 g
Amylase			0.5 g	0.5 g
Water	85 ml	1.445 l	3.67 l	5.1 l

*is a moldy rice powder (rice koji).

관(길이 3 cm, 직경 1 cm)를 설치하였으며 상부는 발효 관으로 외부의 공기를 차단하였다.

pH 및 산도의 측정

탁주발효 중의 pH는 탁주를 여과하여 직접 pH meter(Orion SA 520 meter)로 측정하였다. 산도측정은 여과액에 상기 pH meter의 전극을 담그고 0.1 N NaOH 용액으로 pH 7.0이 되도록 적정하여 소비된 0.1 N NaOH 용액으로부터 젖산량으로 환산하였다.

환원당의 측정

시료 5 g에 증류수를 넣어 90 ml로 정용한 다음 30 분간 교반시킨 후 10% lead acetate 5 ml와 3.2% sodium oxalate 5 ml를 넣어 단백질을 제거,여과한 다음 100 ml로 정용하였다. 그 중 1 ml를 취한 후 Dinitrosalicylic acid 시약으로 발색시켜 550 nm에서 측정된 흡광도를 glucose로 환산하였다(10).

생균수와 효모수의 계수

탁주중의 생균수는 plate count agar(Difco)를 이용하여 측정하였고 효모수는 potato dextrose agar(Difco)를 이용하여 측정하였다(11).

에탄올 분석

탁주중의 에탄올 분석은 권등(12, 13)의 방법에 준하여 시료를 전처리하여 15% FFAP column (I.D. 2 mm × 2 m)이 부착된 Gas chromatograph(model 3300, Varian associates, U.S.A.)로 분석하였다.

결과 및 고찰

pH 및 산도의 변화

탁주를 25℃에서 발효시키면서 정기적으로 pH 변화를 본 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 탁주의 발효중 pH는 대조구에 비하여 nisin 첨가구는 천천히 떨어져 초기에 6.0-6.5이던 것이 발효 5일에 pH 4.06, 7일에 pH 4.05를 나타냈으나 대조구는 5일만에 pH 3.85에 도달하여 7일에

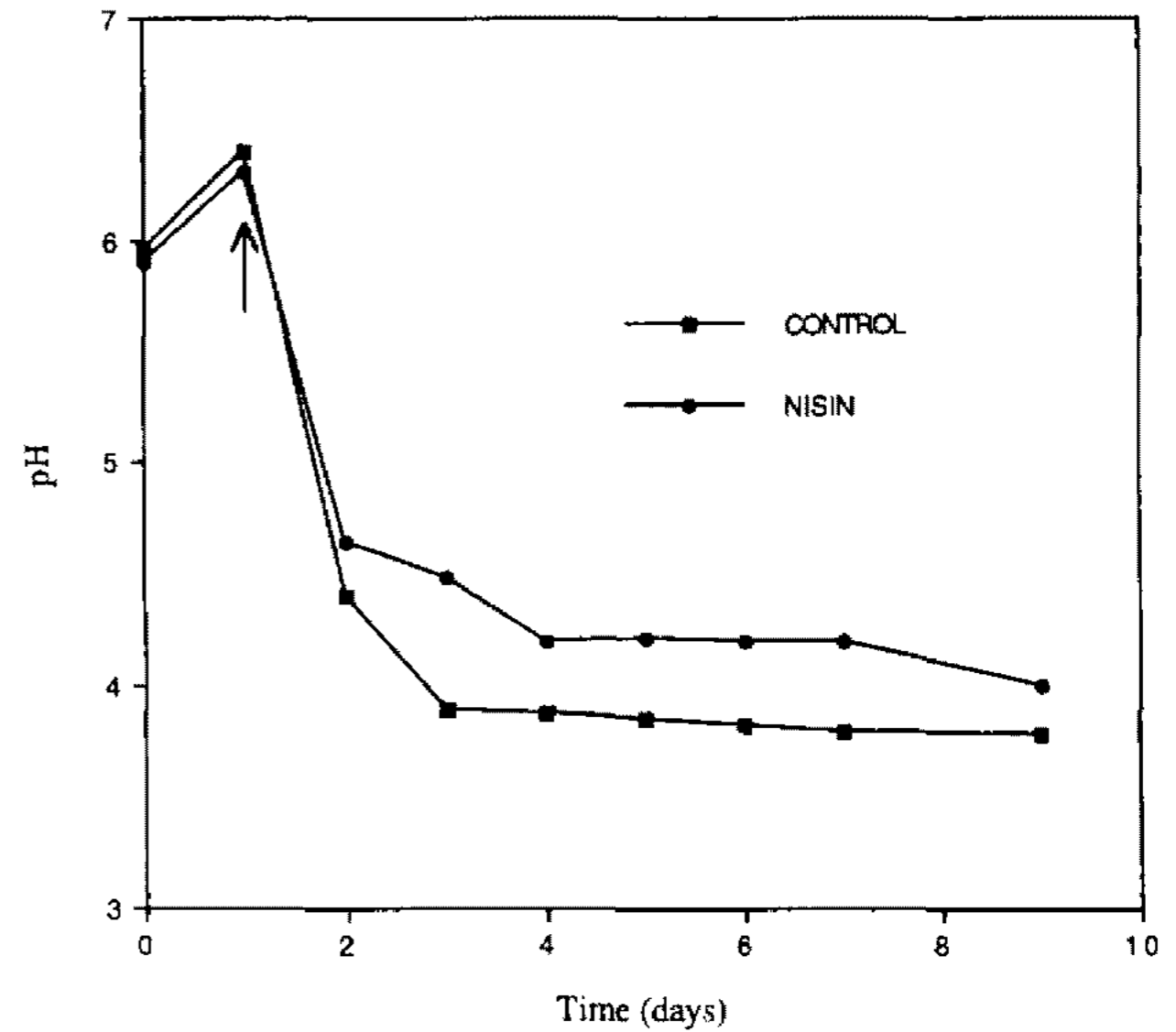


Fig. 1. Changes of pH during Takju fermentation(Arrow means 1st mashing).

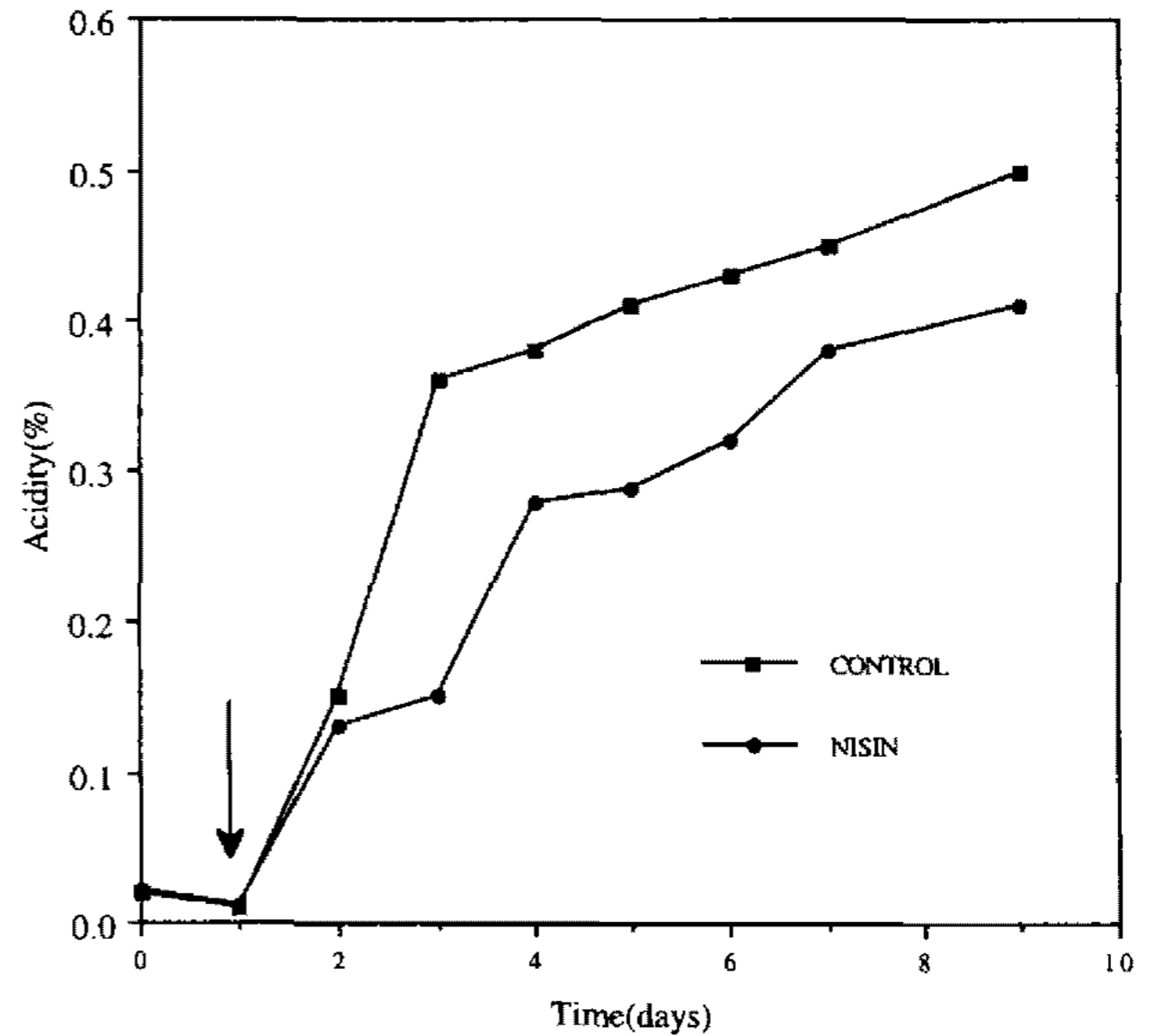


Fig. 2. Changes of acidity during Takju fermentation.

는 pH 3.79로서 nisin에의한 산생성 억제효과를 보였다. 산도를 보면 Fig.2와 같이 초기에 0.01-0.02%이던 것이 1단 사입 후 급격히 증가하여 대조구에서 발효 5일째에 0.37%, 7일째에 0.43%, 9일째에 0.50%의 산생성량을 보였고 nisin 첨가구는 각각 0.28, 0.32, 0.41%의 산을 생성하여 pH변화의 경우 보다 큰 차이를 나타내었다. 최 등(14)은 김치 저장 중 에 nisin 첨가효과를 실험한 결과 대조구는 15℃에서 5일에 0.57, 9일에 0.93, 14일째에 1.13의 산생성량을 보였으나 nisin 첨가구는 각각 0.47, 0.69, 0.88%의 산을 생성하였다고 하였고 Grewal 등(15)도 Khoa에 nisin 첨가효과를 실험한 결과 대조구는 실온에서 7일에 0.42%, 14일에 0.68%, 4주 후 1.65%의 산 생성을 보인 반면 0.02%의 nisin 첨가구는 각각 0.38

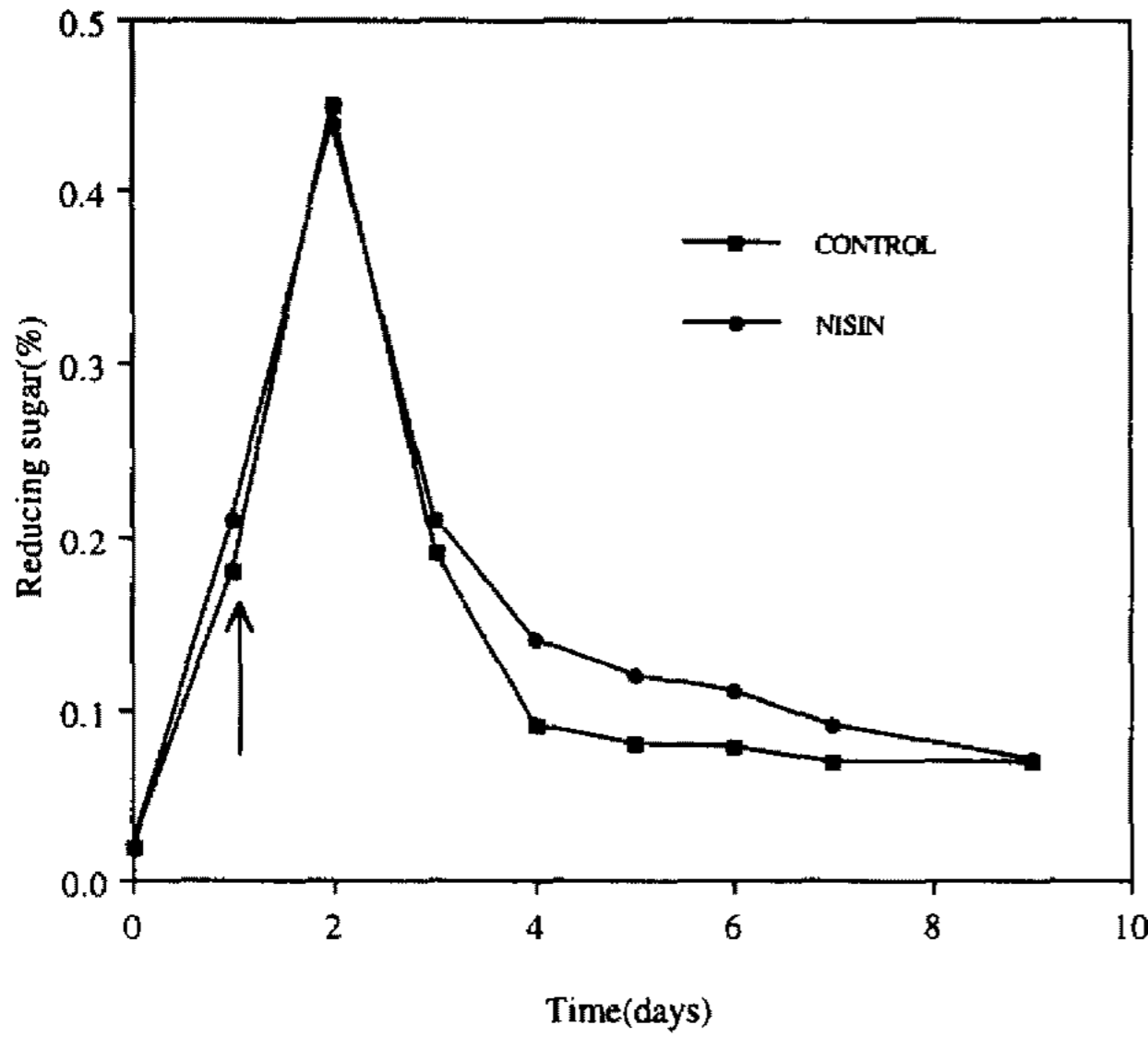


Fig. 3. Changes of reducing sugar during Takju fermentation.

%, 0.50%, 1.27%의 산생성을 보였다고 보고하고 있어 nisin을 첨가하여 탁주 발효시 이용하면 산패를 효과적으로 억제 할 수 있으리라 판단된다.

환원당의 변화

탁주를 25℃에서 발효시키면서 경시적으로 본 환원당의 변화를 추적한 결과 Fig. 3과 같다. 대조구 및 nisin 처리구 모두 0.4% 부근으로 증가되었다가 서서히 감소하는 경향으로 큰 차이를 보이지 않았다. 이는 1단 사입과 2단사입 초반에 첨가된 쌀코오지와 누룩에 의하여 발효성당이 비슷하게 생성된 것이며 nisin 첨가에 의한 영향을 받지 않는 것으로 나타났다. 두 처리구 간에 소비경향이 유사한 것은 발효중 첨가된 효모와 혼입된 세균들의 균형에 의하여 발효 종료점까지 생성된 대사 산물은 상이 할지 모르지만 대조구와 처리구 모두 비슷하게 당을 이용되었음을 보여 주는 것이다.

생균수와 효모수의 변화

탁주를 25℃에서 발효시키면서 경시적으로 본 생균수와 효모수의 동적변화는 Fig. 4, Fig. 5와 같다. 생균수는 대조구가 1단 입시 7.90×10^6 cfu/ml, 2단 사입시에 1.05×10^9 cfu/ml로 최대균증식을 보였으며 5 일째 8.50×10^7 cfu/ml, 7 일째에 6.85×10^7 cfu/ml을 보였다. nisin첨가구는 각각 1일에 7.90×10^6 cfu/ml, 2단 사입시 1.50×10^8 cfu/ml, 5일에 1.40×10^8 cfu/ml, 7일에 1.70×10^7 cfu/ml을 나타내어 1단 사입시에는 nisin첨가구 및 대조구 공히 비슷하였으나 2 단사입시 nisin 첨가구에서 세균이 90% 감소된 것이며 이는 1단 사입시 첨가된 nisin에 의하여 세균수가 감소된 것으로 판단할 수 있다. 한편 효모수를 보면 2단 사입 시기인 2일째까지 대조구 및 처리구 공히 큰 차이가 없으나 발효과정중 대조구의 효모수

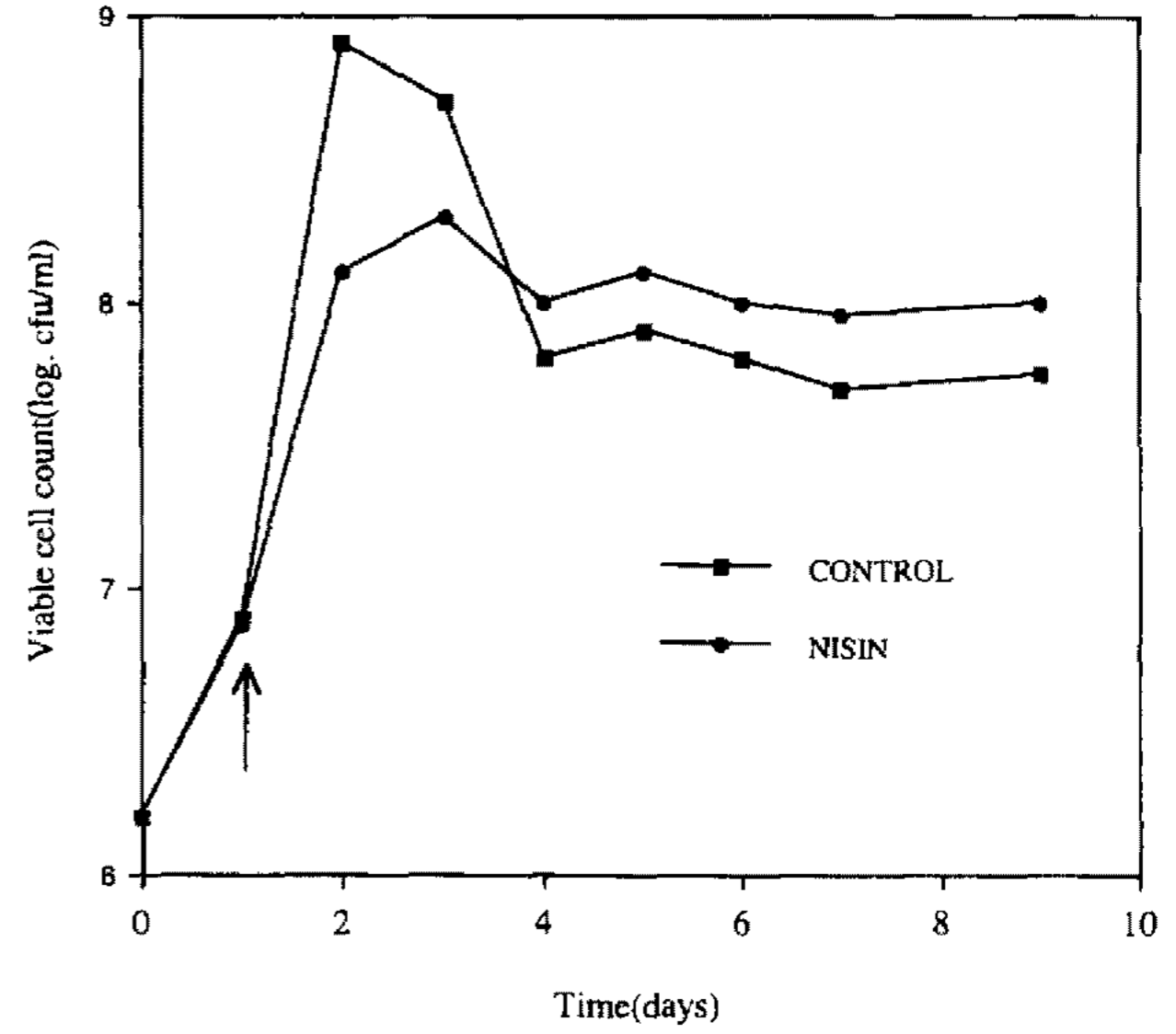


Fig. 4. Changes of viable cell count during Takju fermentation.

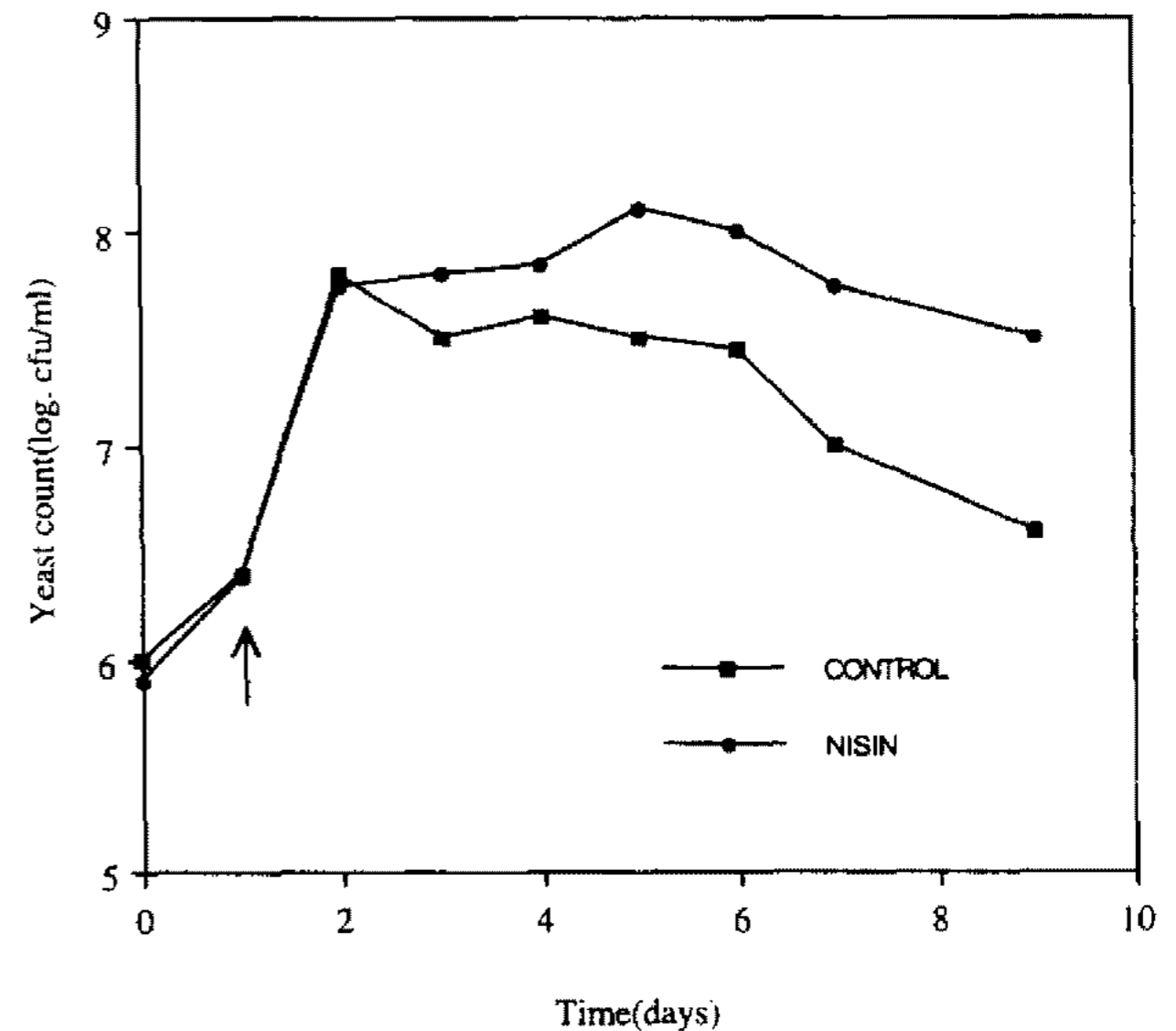


Fig. 5. Changes of yeast count during Takju fermentation.

는 감소하고 nisin 처리구는 높은 수준을 계속 유지하는 경향으로 대조구는 5일째 5.10×10^7 cfu/ml, 7일째 1.70×10^7 cfu/ml, 9일째 6.50×10^6 cfu/ml을 나타내었으나 nisin첨가구는 각각 1.11×10^8 cfu/ml, 6.90×10^7 cfu/ml, 4.45×10^7 cfu/ml을 나타내었다. 이와같은 균수와 효모수의 균수변화를 볼때 nisin 첨가에 의한 세균의 생육억제 효과를 보임과 동시에 효모는 억제를 받지 않고 계속 증식되면서 발효에 관여함을 알 수 있다. 한편 본 연구에의 대조구가 매우 청결하게 처리된 실험실적 규모라고 판단할 때 공업적인 규모의 공정에서는 더욱 큰 효과를 거둘 것으로 판단된다.

에탄올 함량의 변화

탁주를 25℃에서 발효시키면서 경시적으로 본 에탄올

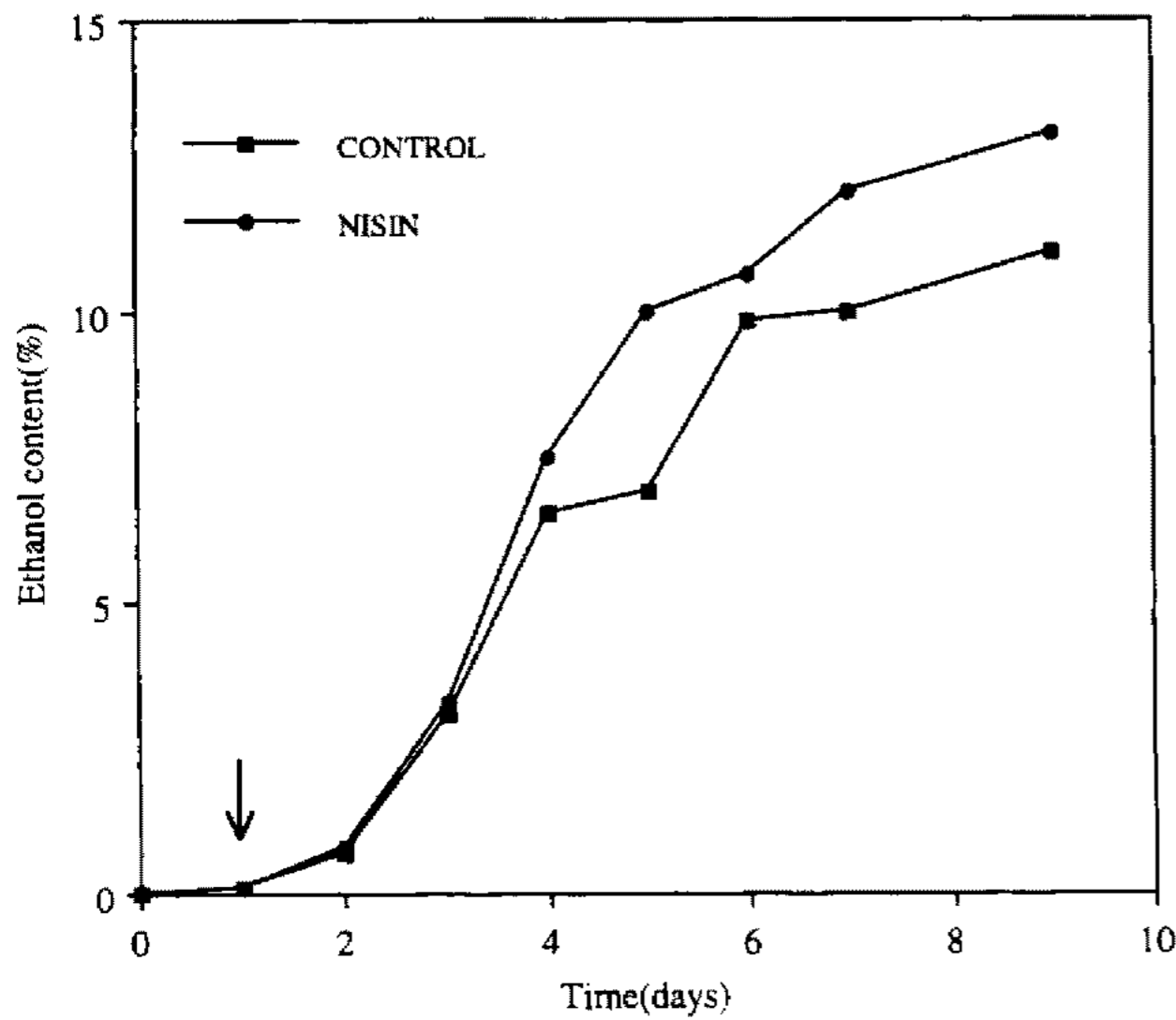


Fig. 6. Changes of ethanol content during Takju fermentation.

함량의 변화를 조사한 결과 Fig. 6과 같다. 즉 2단사입 1일 후부터 급격히 생성량이 증가하는 경향으로 대조구는 5일째 6.9%, 7일째 10.0%, 9일째 11.0%를 나타내었고 nisin 첨가구는 각각 7.5%, 10.6%, 13.0%을 나타내어 2% 정도의 증가를 보여 주었다. 이는 에탄올 발효과정중 nisin에 의한 세균증식이 억제되어 상대적으로 효모의 증식을 도와 에탄올 함량을 높이고 대조구에서는 젖산과 같은 에탄올이외의 대사물들이 생성됨을 의미하는 것이다.

요 약

전통 알콜 발효주인 탁주의 발효시 세균의 오염 및 이들의 증식에 의한 에탄올 생성능 저하는 탁주 발효에 있어서 관능적 및 경제적 손실을 준다. 이와같은 문제점은 젖산균을 포함한 그람 양성균에 의하여 이루어 지는데 GRAS물질인 nisin을 첨가하여 이를 해결하고자하였다. Nisin을 500 iu/g 수준으로 사입시 첨가하였을 때 초기 세균수의 감소에 도움을 주며 효모의 증식을 도와 발효기간중 효모의 활력유지에 영향을 주었으며 최종 에탄올 함량으로 2%정도 증가효과를 보았다. 이는 탁·약주 발효시 야기될 수 있는 세균 오염에 의한 변패방지 또는 품질 향상에 도움을 준 것이라고 판단된다.

감사의 말

이 연구논문은 고려대학교 식품 가공 핵심 기술 연구

센터의 지원(CAFST Research paper No. 97001)으로 작성되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. 한국식품과학회. 1971. 주류. 한국식품문헌총람 1: 525-644.
2. 이철호, 태원택, 김기명, 이현덕. 1991. 탁주의 저온살균 조건에 관한연구. 한국식품과학회지 23:44-51.
3. 식품공업협회. 1994. 15. 조미식품, 식품공전, p. 473-475.
4. 송미라. 1985. 난백 Lysozyme 첨가에 의한 탁주 보전성에 관한 연구. 고려대학교 대학원 석사학위논문.
5. 이성기, 김인호, 민병용. 1990. Lysozyme 및 glycine의 첨가가 막걸리의 품질에 미치는 영향. 한국농화학회지 33: 252-256.
6. Goel, M. C., H. E. Calbert, and E. H. Marth. 1967. Manufacture and keeping quality of low fat dairy spread. *J. Milk Food Technol.* 32: 312-318.
7. Mahmoud, S. A. Z., G. M. El-sadek, and A. H. M. Dawood. 1976. Effect of nisin on prolonging the keeping quality of pasteurized milk. *Zbl. Bakt. Abt. II, Bd.* 131: 277-284.
8. Heinemann, B., Voris, L., and C. R. Stumbo. 1965. Use of nisin in processing food products. *Food Technol.* 19: 592-596.
9. Radler, F. 1990. Possible use of nisin in winemaking. I. Action of nisin against lactic acid bacteria and wine yeasts in solid and liquid media. *Am. J. Enol. Vitic.* 4: 1-6.
10. Michael, D., Gilles, J. K., Hamilton, P. A., Rebers, and S. Fred. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28: 350-356.
11. DIFCO. 1985. Difco Manual. p. 679, 689.
12. Kwon, D. J., J. H. Cho., H. K. Kim, and M. H. Park. 1990. Long-term storage of fresh red pepper paste. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 22: 415-420.
13. Dickes, G. J. and P. V. Nicholas. 1978. 4. Sampling and sample derivatization. p. 61-77. in *Gas Chromatography in Food Analysis*, Butterworths.
14. 최신양, 이인선, 유진영, 정건섭, 구영조. 1990. 김치발효에 대한 nisin의 저해효과, 산업미생물학회 18: 620-623.
15. Grewal, K. S. and S. C. Jain. 1977. A study on the effect of nisin treatment on the organoleptic properties, acidity. *J. Res. Punjab Agric. Univ.* 14: 460-467.

(Received 2 December 1996)