KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL. Vol. 35, No. 1, pp. 103~110 (2003)

KOREAN JOURNAL OF
한국식품과학회지
FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY
©The Korean Society of Food Science and Technology

Semi-pilot plant 규모 bioreactor를 이용한 재래식 간장의 알코올발효

권광일 · 이종구 · 최종동[1] · 정현채 · 유문균[2] · 임무혁[3] · 김기주
최용훈[4] · 김영지[5] · 서정식[5] · 최 청 · 최광수*

영남대학교 식품가공학과, [1]대구지방식품의약품안전청, [2]서울지방식품의약품안전청,
[3]식품의약품안전청, [4]경인지방식품의약품안전청, [5]영남이공대학 식품영양학과

Alcoholic Fermentation of Traditional *Kanjang* by Semi-pilot Scale Bioreactor Systems

Kwang-Il Kwon, Jong-Gu Lee, Jong-Dong Choi[1], Hyun-Chae Chung, Mun-Kyun Ryu[2], Moo-Hyeog Im[3], Ki-Ju Kim, Yong-Hoon Choi[4], Young-Ji Kim[5], Chung-Sik Suh[5], Cheong Choi and Kwang-Soo Choi*

Department of Food Science and Technology, Yeungnam University
[1]Daegu Regional Food and Drug Administration
[2]Seoul Regional Food and Drug Administration
[3]Korea Food and Drug Administration
[4]Kyungin Regional Korea Food and Drug Administration
[5]Department of Food Nutrition, Yeungnam College of Science and Technology

Stable production of fermented *kanjang* containing 1.8% (v/v) ethanol was obtained within four days using traditional *kanjang* containing 4% added glucose in packed-bed bioreactor systems filled with immobilized *Zygosaccharomyces rouxii* and *Candida versatilis* on porous alumina ceramic bead carrier at 28±0.5°C and aeration rate of 0.05 vvm. Specific rates of alcohol production for *Z. rouxii* and *C. versatilis* were 0.0033 and 0.0031/day, respectively, and those of glucose consumption were both -0.0087/day in the batch type of alcoholic fermentation. In semi-continuous alcoholic fermentation at a dilution rate of 0.25/day, specific rates of alcohol production for *Z. rouxii* and *C. versatilis* were 0.0045 and 0.0029/day, and those of glucose consumption were -0.01 and -0.008/day, respectively, using identical bioreactor system. Similar specific rates of alcohol production were observed both in the batch or semi-continuous process and in the continuous one at the dilution rate of 0.25/day. Sensory characteristics of all alcoholic-fermented *kanjang* by *Z. rouxii*, *C. versatilis*, and a mixture of both yeasts (2 : 1, w/w) were shown to be significantly superior to those of home-made *kanjang* as revealed through organoleptic evaluation tests (P<0.05).

Key words: *kanjang*, alcoholic fermentation, alumina ceramic bead, bioreactor system

서 론

전통간장은 콩을 수침, 자숙한 후 성형한 메주를 자연상태에서 1~2개월간 발효시키고, 이 메주를 염수에 담금하고 2~3개월 숙성 발효시킨 후 덧의 건더기와 액을 분리하여 간장덧의 건더기는 된장으로 여액을 간장으로 사용한다. 그런데, 전통간장에서는 숙성온도에 따라서 약간의 젖산은 생성되나 알코올발효는 거의 일어나지 않아 간장의 향미에 영향을 주는 알코올 성분이 거의 함유되어 있지 않다는 단점을 가지고 있다.[1]

이러한 점에서 Kaneko 등[2]은 한국 전통간장은 일본간장에 비하여 향미가 떨어진다고 하였다. 따라서, 알코올발효공정을 통한 향미와 품질이 뛰어난 간장을 제조할 필요성이 제기되고 있다.

간장의 향미와 품질의 개선을 위한 연구로 Choi 등[3]이 아미노산간장의 풍미를 높이기 위하여 알코올발효를 실시하였고, 김[4]은 전통간장의 향기를 개선하기 위하여 세포 융합한 효모를 이용한 발효법을 개발한 바 있다.

지금까지 간장에서의 향미 증진을 위한 연구는 주로 일본에서 연구된 것으로, 산분해간장과 어간장의 향미를 증진하는 연구와 고정화 미생물을 이용하여 젖산발효와 알코올발

*Corresponding author : Kwang-Soo Choi, Department of Food Science and Technology, College of Natural Resources, Yeungnam University, 214-1 Dae-dong, Kyongsan-si, Kyungsangbuk-do 712-749, Korea
Tel: 82-53-810-2954
Fax: 82-53-815-1891
E-mail: kschoi@yumail.ac.kr

효를 실시하여 간장의 발효기간을 단축하는 연구가 주가 되었으며[5-11], 국내의 경우 일본식 양조간장과 어간장을 고정화 미생물에 의해 발효시키는 연구가 전부였다.[12-15]

그러나, bioreactor에 의한 간장의 알코올발효성능에 관한 연구로는 Choi 등[16]이 전통간장의 맛을 향상시키고 생산효율을 증대하여 고품질의 균일한 간장을 생산하는 기술을 확립하기 위하여 bioreactor를 사용한 보고가 있을 뿐, 전통간장 자체의 향미 및 품질개선을 위해 고정화 미생물을 이용한 semi-pilot plant 규모의 bioreactor system을 이용하여 알코올발효와 알코올발효의 성능에 대해 연구한 예는 거의 없었다.

따라서, 본 연구에서는 발효 규모를 확대시켜서 전통간장의 연속발효 성능을 확인하기 위하여 약 15 L와 30 L용량의 Pyrex제 유리로 bioreactor를 제작하고, 각각 *Candida versatilis*와 *Zygosaccharomyces rouxii*를 다공질 알루미나 세라믹 비드에 고정화 시켜서 bioreactor에 충전하여, semi-pilot plant 규모로 전통간장의 회분식, 반연속식 및 연속식 알코올발효 시험을 실시하였다.

재료 및 방법

재료

1999년산 태광콩(경북 농산물원종장 의성분장 생산)을 사용하여 전통식 방법으로 메주를 제조하여 20% 소금물과 1 : 3의 비율로 혼합하여 간장덧을 만들고 2개월간 숙성시킨 후 압착기와 압여기(Plate and Frame Filter, Armfield, England)로 두 번 여과하여 분리한 간장을 다시 2개월간 실온에서 숙성 시켰다. 전통간장(pH 5.08, 호기성세균수 9×10^6 CFU/mL)을 111~113°C에서 8.48분간 고온연속살균하여 bioreactor에 의한 알코올발효용 공시간장으로 사용하였다.

Bioreactor장치

Semi-pilot plant 규모의 전통간장의 알코올발효시험에 사용한 bioreactor의 장치도는 Fig. 1에 나타난 바와 같다. Bioreactor는 내경 18 cm×높이 120 cm(내용량 약 30 L)와 내경 18 cm×높이 60 cm(내용량 약 15 L)의 pyrex제 유리로 제작하였으며, 하부의 공기 주입구를 통하여 필터로 여과된 무균공기가 주입되고, reactor하부에는 다공질 유리판을 장착하여 공기가 미세한 기포로서 장치 내로 공급되어 산소의 용해속도를 높이도록 하였다.

연속발효시 원료간장은 peristaltic pump로 reactor 하부측면 원료 주입구로부터 장치 내로 정량적으로 주입시키도록 제작되었다.

Bioreactor 상부측면에 있는 발효액 출구로 발효된 간장이 연속적으로 익류되어 나가도록 되어있고(연속발효의 경우) reactor 상단부에는 냉각관을 달아서 알코올 등의 휘발성 성분의 휘발을 방지하도록 하였다.

회분식 알코올발효시는 무균공기만을 연속적으로 0.05 vvm으로 공급시키고 하단의 원료 주입 구와 상단의 발효간장출구는 차단하고 일정량의 원료간장을 채우고 알코올발효를 실시하였다.

고정화 담체 및 효모의 고정화

Bioreactor system에 의한 알코올발효시험에 사용한 효모는 *Zygosaccharomyces rouxii*와 *Candida versatilis*를 사용하였고, 이 효모들의 고정화에 사용한 담체는 입자평균직경이 57 μm인 전용 알루미나를 골재입자로 사용하여 만든 다공질 알루미나 세라믹 비드를 사용하였다. 다공질 알루미나 세라믹 비드는 Choi 등[16]의 실험에서 효모 고정화용으로 적당한 것으로 밝혀진 #240의 알루미나(Al_2O_3: Fuji Inc., Japan)를 골재로 하고, 장석 [(NaK)$AlSi_3O_8$]을 결착제로 PVA를 성형제로 하여 제조하였고, 이들을 알루미나 58%, 증류수 35%, 장석 5.8% 및 PVA 1.2%의 질량비로 혼합하고 4~6 mm 직경의 비드로 성형한 후 1,350°C의 전기로에서 소결하였다.

담체에 효모를 고정화시키기 위하여 전통간장과 대두 추출액(콩과 물의 비를 1 : 9로 하여 3시간동안 환류추출하여 여과한 액)을 1 : 1로 혼합한 후 살균한 간장배지에 *Zygosaccharomyces rouxii*와 *Candida versatilis*를 각각 접종하여 30°C에서 5일간 배양하였다. 각각의 효모종모 배양액을 원심분리(6,760×g, 20분)하여 균체를 분리하여 멸균수로 농축균체를 만든 후, 건열멸균한 알루미나 세라믹 비드를 농축균체에 넣고, 진공펌프를 이용하여 장치 내부의 공기를 탈기하면 비드의 기공에 존재하는 공기는 제거되면서 농축균체의 균체가 기공 속에 흡수되어 고정화되도록 하였다.

고정화 효모에 의한 전통간장의 회분식 알코올발효

전통간장의 회분식 알코올발효시험은 고정화 *Candida versatilis*와 *Zygosaccharomyces rouxii*를 10 kg(부피 4.6 L)과 20 kg(부피 9.2 L)씩을 용량 15 L와 30 L의 bioreactor에 각각 충전하고 당을 4% 첨가하여 살균한 전통간장을 각각 10 kg 및 20 kg씩 채워서 하부로부터 0.05 vvm의 무균공기를 연속적으로 통기하면서 28±0.5°C에서 발효시키면서 경시적으로 간장의 당과 알코올의 함량변화를 측정하였다.

고정화 효모에 의한 전통간장의 반연속식 알코올발효

고정화 효모에 의한 전통간장의 반연속 알코올발효시험은, 회분식 알코올발효에서 39일차부터 1일 0.377%(w/v) 정도의 알코올을 안정된 속도로 생성하여 4일 동안 4%의 당을 모두 소비하여 약 1.52%(w/v)의 알코올을 생산한다는 결과를 토대로 실시하였다. 즉, 회분식 알코올발효 중인 bioreactor 내의 기질간장 20 kg(대형 reactor)과 10 kg(소형 reactor)의 1/4인 5 kg과 2.5 kg씩의 발효간장을 매일 회수하고 그만큼의 4% 당을 함유한 새로운 간장을 보충하면서 28±0.5°C에서 0.05 vvm으로 통기시키면서 반연속식 발효를 실시하고 당과 알코올의 함량변화를 조사하였다.

고정화 효모에 의한 전통간장의 연속식 알코올발효

고정화 효모에 의한 전통간장의 연속알코올발효시험은 반연속식 알코올발효에서 1.5%(w/v) 알코올을 함유한 간장을 안정되게 반연속 생산하였으므로 반연속발효시키던 bioreactor에서와 같은 비율(180 mL/h 또는 90 mL/h)로 발효간장을 출구에서 연속적으로 회수하면서 공급구에서 4% 당을 함유한 살균간장을 연속 공급하여 실시하였다.

통기량과 발효온도는 반연속발효시와 동일한 조건에서 실시하였고, 매일 발효간장의 당과 알코올의 함량변화를 조사하였다.

비알코올생산속도와 비기질이용속도, 체류시간, 희석률의 측정

고정화 효모를 충전한 bioreactor system에서 간장의 알코올발효시 최대 속도로 발효 할 때의 비알코올생산속도(specific rate of product formation)와 비기질이용속도(specific rate of substrate utilization)는 발효 중 경시적으로 기질 내에 들어있는 효모를 고정시킨 비드의 농도(X, g/L), 기질 내에서 생성된 산물(alcohol)의 농도(P, g/L), 기질 내에서 이용된 기질(glucose)의 농도(s, g/L) 및 발효시간(t, day)을 측정하여 다음 (1)식과 (2)식을 사용하여 산출하였다.

$$\text{비알코올생산속도} = \frac{1}{X} \cdot \frac{dp}{dt} \quad (1)$$

$$\text{비기질(당)이용속도} = \frac{1}{X} \cdot \frac{-ds}{dt} \quad (2)$$

비알코올생산속도의 단위는 1/day이며, 비기질(당)이용속도의 단위도 1/day가 된다.

회분발효 시의 체류시간(retention time, RT)은 bioreactor 내에서 기질이 체류하면서 발효가 완료될 때까지의 시간(day)이고, 반연속발효와 연속발효에서는 반연속적 또는 연속적으로 용량 V L의 bioreactor에서 기질주입속도(flow rate) F(L/day)로 주입하면서 기질이 평균적으로 발효조 내에 머무는 시간(day)이다. 즉 RT= $\frac{V}{F}$ (day)이고, 희석률(dilution rate, D)과 체류시간(RT)과는 역의 관계이다. 즉 D=$\frac{1}{RT}$ = $\frac{F}{V}$ 이다. 희석률 D의 단위는 1/day이다.

젖산 및 Glucose 측정

Yoda 등[17]의 방법에 따라 간장 시료를 일정한 비율로 희석하고 0.45 μm membrane filter로 여과한 후 효소 막을 이용한 YSI 2700 Select Biochemistry Analyzer(YSI Inc., USA)를 이용하여 분석하였다.

$$\text{D-Glucose}+O_2 \xrightarrow{\text{Glucose Oxidase}} H_2O_2+\text{D-Glucono-}\delta\text{-Lactone}$$

$$\text{L-Lactic acid}+O_2 \xrightarrow{\text{Lactic acid Oxidase}} H_2O_2+\text{Pyruvic acid}$$

총질소

총질소의 함량은 AOAC법에 준하여 측정하였는데, 시료를 분해장치(Digestion system 1007 digester, USA)로 분해시키고 켈텍장치(Kjeltec system 2200 distiling unit, USA)를 이용하여 증류되어 나온 NH_3를 5% boric acid가 든 수기에 받아 생성된 $NH_4H_2BO_3$를 0.1 N HCl로 적정하여 소비된 mL수를 총질소로 환산하여 양을 구하였다[18].

갈색도

간장의 갈색도는 시료를 7,200×g에서 30분간 원심 분리한 후 상징액을 취하여 분광광도계(Spectrophotometer(shimadzu, Japan)를 이용하여 500 nm에서 측정된 값으로 하였다[19].

식염 및 순추출물

간장 1 mL를 취하여 100배 희석하고, 이 액 20 mL를 취하여 100 mL 삼각 플라스크에 넣고 여기에 2% K_2CrO_4 용액 1 mL를 지시약으로 가한 다음 0.1 N $AgNO_3$ 용액으로 엷은 오렌지색이 될 때까지 적정하여 식염의 양을 계산하였다[19].

0.1 N $AgNO_3$ 1 mL ≡ 0.005845 g NaCl

순추출물은 정제해사를 증발접시에 취하여 105±1°C에서 항량을 구한 후 시료 일정량을 취하고 수분을 증발시켜 추출물의 함량을 측정하고, 여기에 식염의 양을 감하여 순추출물로 하였다[19].

알코올 및 유리아미노산

알코올 분석은 간장시료를 membrane filter(0.45 μm)로 여과한 액을 GC(DS 6200, Donam systems Inc. Korea)에 직접 주입하여 분리 정량하였으며, 칼럼 충전제는 porapak QS, 주입부 온도 210°C, 검출기(FID) 온도 220°C, 운반기체는 질소(20 mL/min), 칼럼 온도는 150°C로 분석하였다. 유리아미노산 분석은 간장 시료를 각각 아미노산 분석용 Lithium citrate buffer로 20배 희석한 다음 0.45 μm membrane filter로 여과한 액을 아미노산 자동 분석기(Bio chrom 20 amino acid analyzer)에 주입하여 분리 정량 하였다[20].

식미검사 및 통계처리

간장의 기호도 조사는 간장 맛에 익숙한 검사요원 20~25명을 선발하여 10점법으로 각 시료의 맛을 채점하였다. 평가항목은 색, 향기, 구수한 맛, 짠맛, 단맛, 신맛 및 종합적 기호도로 나누고, 아주 좋으면 10점, 좋으면 8점, 보통이면 6점, 나쁘면 4점, 아주 나쁘면 2점을 주도록 하였으며, 채점 평균을 각 시료의 식미검사 점수로 하였다. 식미검사는 직접 맛을 보는 방법을 선택하였다[21]. 결과의 통계처리는 SPSS 7.5 for windows program을 사용하였으며 분산분석과 Duncan의 다중검증법으로 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

회분식 알코올발효

내용량 30 L와 15 L의 bioreactor (Fig. 1)내에 다공질 알루미나 세라믹 비드 담체에 고정화시킨 고정화 *Zygosaccharomyces rouxii*와 *Candida versatilis*를 각각 20 kg과 10 kg씩 충전하고 고온연속살균장치를 사용하여 살균하여 실온으로 냉각한 4% 당함유 전통간장(발효기질간장)을 각각 20 kg(17.33 L)과 10 kg(8.67 L)씩 주입하여 28±0.5°C의 발효실에서 0.05 vvm으로 무균공기를 연속하여 통기하면서 전통간장의 회분식 알코올발효를 실시하여 경시적 간장의 알코올 함량변화를 측정한 결과는 Fig. 2와 같았다.

Fig. 2에서 보는 바와 같이 발효시작 후 1회 발효에서는 당 농도 4%의 간장으로부터 1.8%(v/v)의 알코올이 생성되기까지 *Z. rouxii*나 *C. versatilis* 모두 16일이 소요되었고, 2회 발효 시는 9일, 3회는 8일, 4회는 5일 소요되다가 6회 발효 시부터는 3회 연속하여 모두 발효개시 4일만에 1.8%(v/v)의 알코올을 함유한 간장을 안정적으로 발효 생산하였다.

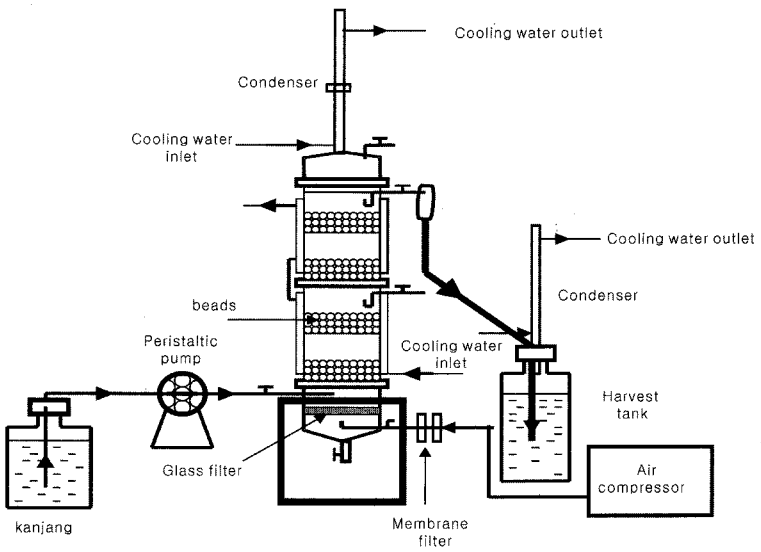

Fig. 1. Schematic flow sheet of bioreactor system for the continuous alcoholic fermentation of *kanjang*.

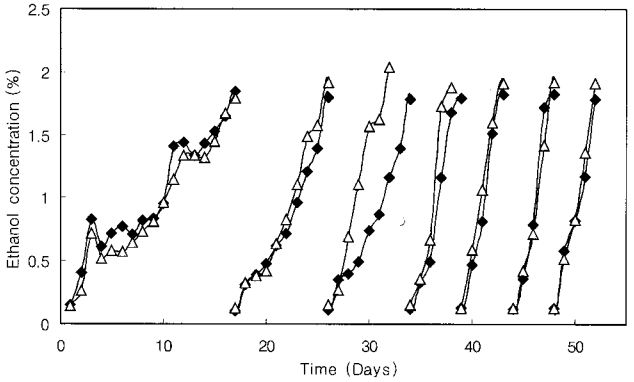

Fig. 2. Changes in alcohol content during alcoholic fermentation of *kanjang* by batch type bioreactor system packed with immobilized *Z. rouxii* and *C. versatilis*.
△: Ethanol content of *kanjang* fermented by *Z. rouxii*.
◆ : Ethanol content of *kanjang* fermented by *C. versatilis*.

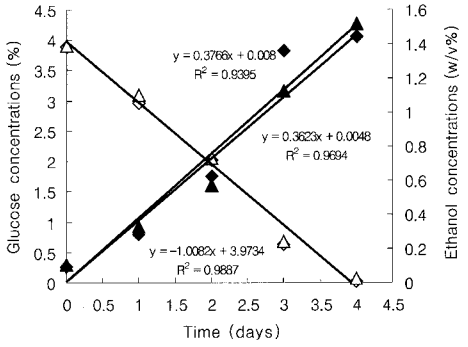

Fig. 3. Correlation curves between days of fermentation and alcohol production consuming sugar during batch alcoholic fermentation of *kanjang* by bioreactor system packed with immobilized yeast cells at constant state.
▲ : Ethanol content of *kanjang* fermented by *Z. rouxii*.
◆ : Ethanol content of *kanjang* fermented by *C. versatilis*.
△: Sugar content of *kanjang* fermented by *Z. rouxii*.
◇: Sugar content of *kanjang* fermented by *C. versatilis*.

그러므로, 이 bioreactor를 이용한 간장의 알코올발효시의 최고 알코올발효속도를 나타낼 때의 체류시간(retention time)은 4일이라는 것을 알 수 있었다.

이 bioreactor system에 의하여 4%의 당을 함유한 간장으로부터 최고 속도로(4일) 안정하게 1.8%(v/v)의 알코올을 함유한 간장을 생산할 때의 당과 알코올 함량의 경시적 변화를 측정한 결과는 Fig. 3과 같았다.

Fig. 3에서 보는 바와 같이 *Z. rouxii*와 *C. versatilis*의 경시적(1/day) 알코올생산방정식은 각각 Y = 0.38X+0.008과 Y= 0.36X+0.0048로써 *Z. rouxii*가 약간 알코올 생산속도가 높았고 이때의 비알코올생산속도 즉, 1 L간장 내에 포함된 담체에 고정된 고정화 효모단위 g(담체포함 무게)으로부터 1 L기질 내에 생성되는 산물(알코올)의 1일 생산속도(1/day)는 각각 0.0033/day와 0.0031/day이었다.

또, 이때의 비기질(당)소비속도는 *Z. rouxii*와 *C. versatilis* 모두 똑같이 –0.0087/day이고, 경시적 당 소비방정식은 Y = –1.0082X+3.9734로써 매일 1%의 당을 소비하여 0.36~0.37% (w/v)의 알코올을 생산함을 알 수 있었다.

그리고, 이 회분식 bioreactor에서 발효기간, 즉, 평균 체류시간이 4일 이기 때문에 매일 한번씩 기질을 회수한다면 희석률(D)은 반연속발효시 0.25/day(D = 1/RT)가 됨을 알 수 있었다.

반연속식 알코올발효

다공질 알루미나 세라믹 비드에 고정시킨 *Z. rouxii*와 *C. versatilis*가 각각 충전된 bioreactor에서 전통간장의 회분식 알코올발효시험을 실시한 결과 발효개시 39일차부터는 각각 20 kg와 10 kg의 간장을 채운 *Z. rouxii*와 *C. versatilis* 고정 bioreactor에서 다같이 발효기간(체류시간) 4일로서 간장 내의 당을 모두 소비하여 각각 0.0033/day과 0.0031/day의 비알코올생산속도로서 1.8%의 알코올을 안정하게 발효 생산하였다. 그래서, 52일차부터는 회분식으로 알코올발효하던 각각의 bioreactor에서 발효방법을 반연속식으로 전환하여 간장의 알

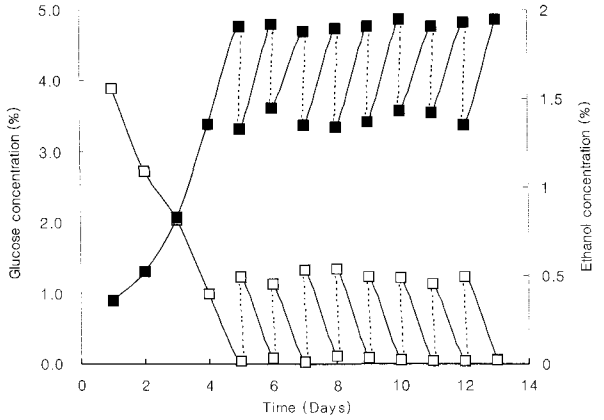

Fig. 4. Changes in sugar and alcohol content during semi-continuous alcoholic fermentation of *kanjang* by bioreactor system packed with immobilized *Z. rouxii*.
■ : Ethanol content, □: Glucose content.

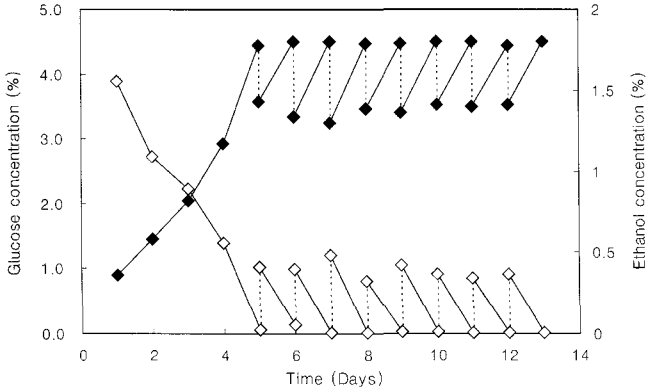

Fig. 5. Changes in sugar and alcohol content during semi-continuous alcoholic fermentation of *kanjang* by bioreactor system packed with immobilized *C. versatilis*.
◆ : Ethanol content, ◇: Glucose content.

코올발효시험을 계속하였다.

고정화 *Z. rouxii*가 충전된 30 L용량의 대형 bioreactor와 고정화 *C. versatilis*가 충전된 15 L용량의 bioreactor에 각각 희석률 0.25/day에 해당하는 5 kg와 2.5 kg의 발효간장을 매일 일정시간에 회수하고 동량의 신선한 살균간장을 보충하면서 반연속적으로 간장의 알코올발효를 실시하면서 경시적으로 간장의 알코올과 당 함량변화를 측정한 결과를 Fig. 4와 Fig. 5에 각각 나타내었다.

Fig. 4에서는 *Z. rouxii*가 고정된 bioreactor에서 간장의 반연속적 알코올발효시 간장의 경시적 알코올과 당 함량변화를 측정한 결과를 보여준다. 이 bioreactor에서 고정화 *Z. rouxii*에 의한 간장의 알코올 비생산속도는 0.0045/day이고, 당의 비소비속도는 −0.01/day로써 이 반응조를 이용한 회분식 발효시보다 약간 당 소비속도와 알코올생산속도가 높았으며, 매일 1.92%(v/v)[1.52%(w/v)]의 알코올을 함유하고, 잔당 함량이 0.06%의 간장을 5 kg씩 일정하게 13일간 반연속적으로 생산할 수 있었다.

Fig. 5에서는 *C. versatilis*가 고정된 bioreactor에서 간장의 알코올과 당 농도의 변화를 경시적으로 측정한 결과를 보여준다. 이 반응조에서 고정화 *C. versatilis*에 의한 간장의 알코올 비생산속도와 당의 비소비속도는 각각 0.0029/day와 −0.0081/day로써 회분식으로 하였을 때와 차이 없는 알코올생산능과 당소비능을 보여주었다. *Z. rouxii* 반응조보다 알코올생산능이 약간 떨어짐을 보여주었다.

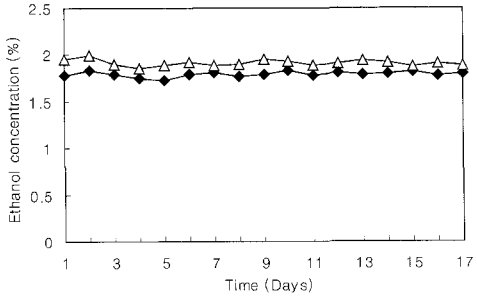

Fig. 6. Changes in alcohol content during continuous alcoholic fermentation of *kanjang* by bioreactor system packed with immobilized *Z. rouxii* and *C. versatilis*.
△: *Z. rouxii*, ◆ : *C. versatilis*.

연속식 알코올발효

전통간장의 반연속발효에서 *Z. rouxii*와 *C. versatilis*가 충전된 bioreactor에서 반연속발효 개시 7일 후부터 7일간 계속하여 안정한 최고의 알코올생성능을 보여주었다. 그래서, 반연속적으로 알코올발효하던 각각의 bioreactor에서 발효방식을 연속식 발효법으로 전환하여 간장의 알코올발효시험을 계속 실시하였다.

연속발효에서는 희석률은 반연속발효와 같이 0.25/day가 되도록 하되 기질간장을 연속적으로 세분하여 일정하게 peristaltic pump로 공급하면서 연속적으로 회수하였는데 간장의 비중이 1.154로 측정되었기 때문에 각각 시간당 용량공급속도로서 180 mL와 90 mL의 간장을 연속적으로 공급하여 5 kg/day 및 2.5 kg/day에 해당하는 간장을 연속적으로 bioreactor 내로 공급하면서 간장의 연속적 알코올발효를 실시하고 연속적으로 회수된 간장의 알코올 함량을 측정하여 Fig. 6에 나타내었다.

Fig. 6에서 보는 바와 같이 bioreactor를 이용한 간장의 연속적인 알코올발효에서도 0.25 day^{-1}의 희석률로 간장을 연속공급 및 회수하였을 때 17일간 발효에서 일정한 알코올을 생성할 수 있음을 보여 주었으며 *Z. rouxii*의 경우 1.91%(v/v)[1.51%(w/v)]의 알코올과 0.047%의 잔당을 함유한 간장을 얻을 수 있었고, *C. versatilis*의 경우 1.79%(v/v)[1.44%(w/v)]의 알코올과 0.06%의 잔당을 함유한 간장을 얻을 수 있었다.

Table 1에서는 고정화 *Z. rouxii*와 *C. versatilis*를 충전한 bioreactor에서 전통간장을 알코올발효 시켰을 때, 회분식, 반연속식 및 연속식 발효법으로 발효시켰을 때의 각각의 비알코올생산속도, 비당소비속도, 알코올발효 속도식, 당 소비속도식 간장의 알코올과 잔당 함량을 비교한 결과를 보여준다.

Bioreactor를 이용한 전통간장의 알코올 발효시 회분식, 반연속식 및 연속식 발효에서 비알코올생산속도나 비당소비속도에서는 크게 차이가 없음을 보여주는 것과 작업의 능률면이나 편리성 등으로 볼 때 연속식 발효법을 이용하는 것이 훨씬 유리할 것으로 판단되었다.

Table 1. Comparisons of specific alcohol production rate and specific sugar consumption rate in the alcoholic fermentation processes of *kanjang* by bioreactor system packed with respective immobilized yeast cells

	Batch fermentation		Semi-continuous fermentation		Continuous fermentation	
	Z. rouxii	*C. versatilis*	*Z. rouxii*	*C. versatilis*	*Z. rouxii*	*C. versatilis*
I	0.0033	0.0031	0.00451	0.00288		
II	-0.00874	-0.00874	-0.01	-0.00811		
III	Y[1)]=0.377X+0.008	Y=0.362X+0.0048	Y=0.421X+1.097	Y=0.332X+1.087		
IV	Y=-1.0082X+3.9734	Y=-1.0082X+3.9734	Y=-1.175X+1.234	Y=-0.936X+0.961		
V	1.91 (1.51)	1.81 (1.43)	1.92 (1.52)	1.79 (1.42)	1.91 (1.51)	1.79 (1.42)
VI	0.057	0.033	0.059	0.02	0.047	0.06

I: Specific rate of alcohol production (1/day).
II: Specific rate of sugar utilization (1/day).
III: Functional equation of alcoholic fermentation.
IV: Functional equation of sugar utilization.
V: Average ethanol content of fermented *kanjang* (%(v/v)) (% w/v in the parentheses).
VI: Average residual sugar content of fermented *kanjang* (%).
[1)]Y: % alcohol; X: day.

Table 2. Chemical compositions of raw-, sterilized- and alcoholic fermented-*kanjang*

	A	B	C	D	E
Moisture	74.90	74.99	74.04	73.73	73.83
NaCl	19.58	19.43	19.29	19.29	19.28
Pure extract (%)	5.52	5.58	6.67	6.98	6.89
TN[1)]	1.06	1.05	1.11	1.12	1.12
Lactic acid	0.681	0.708	0.691	0.685	0.644
pH	5.09	5.08	5.24	5.24	5.29
O.D.[2)]	2.29	2.19	3.02	3.00	3.00

A: Raw *kanjang*.
B: Sterilized *kanjang*; Continuous high temperature short time sterilized *kanjang* at 111~113°C for 8.48 minutes.
C: *Z. rouxii* fermented *kanjang*.
D: *C. versatilis* fermented *kanjang*.
E: *CZ kanjang* (1 : 2); Mixed fermented *kanjang* incorporated by 1 : 2 weight proportions of respective *kanjang* fermented by *C. versatilis* and *Z. rouxii*.
[1)]TN: Total nitrogen, [2)]O.D.: Optical density at 500 nm.

알코올발효 간장의 성분 분석

전통간장을 111~113°C에서 8.48분 살균하여 다공질 알루미나 세라믹 비드 담체에 각각 *Z. rouxii*와 *C. versatilis*를 고정화시켜서 충전형 bioreactor system에 충전하여 알코올발효를 시킨 후 원료간장과 알코올발효간장의 성분을 비교한 결과는 Table 2와 Table 3과 같았다.

Table 2에서 생간장과 살균한 후의 기질(원료) 간장사이에는 아무변화가 없었으나, 알코올발효 후 발효간장은 순고형물이 1.1~1.4%, O.D.값이 약 0.8 증가하였다. 이것은 기질간장에 glucose 4%을 첨가하여 알코올발효시켰기 때문에 순고형물이 증가하고, 알코올발효기간 중 당과 유리아미노산간에 maillard반응으로 O.D.값이 증가한 것으로 보였다.

Table 3에서 생간장, 살균(기질)간장과 알코올발효간장의 아미노산조성을 비교한 결과 전체적으로 알코올발효간장의 총 아미노산 함량이 약간 증가하였는데, 이것은 발효 중 효모의 peptidase류에 의하여 약간 분해된 것으로 보였다.

알코올발효간장의 식미특성

*Z. rouxii*와 *C. versatilis*를 다공질 알루미나 세라믹 비드 담체에 고정화시킨 후 semi-pilot plant scale bioreactor system에 충전하여 살균전통간장을 기질로 하여 알코올발효시킨 간장을 집간장(가정에서 만든 간장)과 비교하여 식미검사한 결과는 Table 4에 나타나 있다.

Table 4의 결과를 보면 색에 있어서는 집간장과 bioreactor system 으로 알코올발효시킨 CV간장(*C. versatilis* 발효간장), ZR간장(*Z. rouxii* 발효간장) 및 CZ간장(CV간장과 ZR간장을 1 : 2의 용량비로 혼합한 간장)들간에는 유의 차가 없었으나 향기, 구수한 맛, 짠맛, 신맛, 단맛 및 종합적 기호도에서는 CV간장, ZR간장 및 CZ간장은 집간장과 비교해서 월등한 식미점수 차로 5% 수준에서 유의 차를 보여주었다.

특히, 향기, 구수한 맛, 단맛, 종합적 기호도에서 고도의 유의 차가 있었는데 이것은 전통간장을 알코올발효시키므로 인하여 생성되는 알코올에 의하여 간장의 향미에 영향을 주어 다른 맛 성분의 기호도에 영향을 미친 것으로 생각되었다.

이러한 식미검사 결과로 보아 전통간장의 기호도 향상을 위하여 bioreactor system에 의하여 전통간장을 알코올발효 시키는 것이 바람직한 것으로 나타났다.

Table 3. Changes in the free amino acid content during sterilization and alcoholic fermentation of *kanjang* (Unit: mg%)

Amino acid	*Kanjang*[1)]				
	A	B	C	D	E
Aspartic acid	75.85	74.01	85.36	85.86	87.58
Threonine	87.64	82.04	90.62	90.03	86.93
Serine	141.34	136.93	147.27	148.85	140.68
Glutamic acid	607.65	580.64	612.76	615.15	592.36
Proline	121.14	116.29	127.47	123.76	119.51
Glycine	77.62	74.67	79.12	77.84	75.44
Alanine	215.83	207.59	206.72	207.47	196.89
Cystine	22.14	21.56	21.36	21.54	20.15
Valine	133.58	132.26	135.32	137.98	126.81
Methionine	33.30	31.73	31.85	32.04	29.86
Isoleucine	130.96	128.21	133.52	136.11	126.53
Leucine	189.90	191.47	199.95	203.51	190.09
Tyrosine	66.64	67.70	68.52	67.79	63.30
Phenylalanine	109.44	107.46	111.66	112.11	107.85
Histidine	9.73	9.10	13.73	11.56	14.74
Lysine	143.72	140.69	149.10	148.53	144.87
Arginine	3.73	3.62	4.97	4.75	5.62
Total	2170.23	2105.98	2219.30	2224.89	2129.21
GA/TA(%)[2)]	28.00	27.57	27.61	27.65	27.82

[1)]Refer to foot note of Table 2.
[2)]Percentage of glutamic acid content/total amino acid content.

Table 4. Organoleptic characteristics of alcoholic fermented *kanjang* samples produced by bioreactor systems packed with different strains of immobilized yeast cells

	CV kanjang[1)]	*ZR kanjang*[2)]	*CZ kanjang*[3)]	Home made *kanjang*	F value
Color	6.90 ± 1.97^{a}	6.79 ± 1.50^{a}	7.03 ± 1.57^{a}	6.59 ± 1.80^{a}	0.35
Flavor	6.48 ± 1.82^{a}	7.24 ± 1.64^{a}	6.38 ± 1.97^{a}	3.93 ± 1.89^{b}	17.79**
Savory	6.55 ± 2.13^{a}	6.41 ± 1.45^{a}	6.31 ± 1.63^{a}	4.48 ± 1.90^{b}	8.56**
Salty	6.62 ± 2.01^{a}	6.86 ± 1.77^{a}	6.38 ± 1.74^{a}	5.28 ± 2.74^{b}	3.22*
Sour	6.24 ± 1.77^{a}	6.45 ± 1.50^{a}	5.69 ± 1.39^{ab}	5.07 ± 2.10^{b}	3.78*
Sweet	7.17 ± 1.65^{a}	6.41 ± 1.80^{ab}	6.10 ± 1.86^{b}	3.90 ± 1.70^{c}	18.66**
Overall	7.03 ± 1.74^{a}	7.17 ± 1.65^{a}	6.10 ± 1.70^{ab}	3.72 ± 1.75^{b}	25.23**

In a row, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by Duncan's multiple range test.
Each value is mean ± SD.
*p<0.05, **p<0.01.
[1)]*Kanjang* fermented by immobilize *Z. rouxii* cells.
[2)]*Kanjang* fermented by immobilize *C. versatilis* cells.
[3)]Refer to foot note of Table 2.

요 약

다공질 알루미나 세라믹 비드 담체에 각각 고정화시킨 고정화 *Zygosaccharomyces rouxii*와 *Candida versatilis*를 충전한 충전형 bioreactor를 이용한 전통간장의 회분식 알코올발효시험에서 4%의 포도당을 첨가한 전통간장으로부터 발효온도 28±0.5°C와 0.05 vvm의 통기발효에서 체류시간 4일에 1.8%의 알코올을 함유한 간장을 안정적으로 생산할 수 있음을 볼 수 있었다.

이때 *Z. rouxii*와 *C. versatilis*의 비알코올생산속도는 각각 0.0033/day와 0.0031/day이었으며, 비기질소비속도는 두 균주 모두 똑같이 −0.0087/day이었다.

동일 조건 하에서 희석률 0.25/day(체류시간 4일)로서 회분식에서 사용한 것과 같은 bioreactor를 이용하여 간장을 반연속적으로 알코올발효 시켰을 때 *Z. rouxii*와 *C. versatilis*의 비알코올생산속도는 각각 0.0045/day와 0.0029/day이었고, 당의 비소비속도는 각각 −0.01/day와 −0.008/day로 나타났다.

이 bioreactor를 이용한 간장의 연속발효시험에서도 희석률 0.25/day(체류시간 4일)에서 회분식이나 반연속식 시험에서와 유사한 비알코올생산속도를 보여주었다.

식미검사 결과 알코올발효 전통간장인 CV간장, ZR간장 및 CZ간장의 식미특성이 모두 집간장의 식미보다 5% 수준에서 우수함을 보여주었다.

감사의 글

본 연구는 2000년도 과학기술처 선도기술개발사업의 연구비에 의하여 수행된 연구결과의 일부로서 이에 깊이 감사 드립니다.

문 헌

1. Lee, S.R. Korean Fermented Foods. Department of Printing & Publishing Ewha Women's University, Seoul (1992)
2. Kaneko, K., Tsuji, K., Kim, C.H., Otcguro, C., Sumino, T., Aida, K., Sahara, K. and Kaneda, T. Contents and compositions of free sugars, organic acids, free amino acids and oligopeptides in soy sauce and soy paste produced in Korea and Japan. Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi 41: 148-156 (1994)
3. Choi, S.B., Kwon, O.S., Nam, H.S., Shin, Z.I. and Yang, H.C. Optimization for the alcohol fermentation of hydrolyzed vegetable protein (HVP) soy sauce by *Saccharomyces rouxii*. Korean J. Food Sci. Technol. 24: 330-334 (1992)
4. Kim, J.K. Process for the development of novel hybrid fusant yeast strain producing characteristic soy sauce aroma from *Zygosaccharomyces rouxii* and *Torulopsis versatilis* and its application to the soy sauce production. Korea Patent 92-104 (1992)
5. Hamada, T., Ishiyama, T. and Motai, H. Continuous fermentation of soy sauce by immobilized cells of *Zygosaccharomyces rouxii* in an airlift reactor. Appl. Microbiol. Biotechnol. 31: 346-350 (1989)
6. Iwasaki, K.I. and Ueno, N. Porous alumina ceramics for immobilization of soy sauce yeast cells. J. Ceramic Soc. Japan 98: 1186-1190 (1990)
7. Horitsu, H., Maseda, Y. and Kawai, K. A new process for soy sauce fermentation by immobilized yeasts. Agri. Biol. Chem. 54: 295-300 (1990)
8. Hamada, T., Sugishita, M., Fukushima, Y., Fukase, T. and Motai, H. Continuous production of soy sauce by a bioreactor system. Press Biochem. 26: 39-45 (1991)
9. Iwasaki, K.I., Nakajima, M., Sasahara, H. and Watanabe, A. Rapid ethanol fermentation for soy sauce production by immobilized yeast cells. Agric. Biol. Chem. 55: 2201-2207 (1991)
10. Iwasaki, K.I., Nakajima, M. and Sasahara, H. Rapid ethanol fermentation for soy sauce production using a microfiltration membrane reactor. J. Ferment. Bioeng. 72: 373-378 (1991)
11. Horitsu, H., Wang, M.Y. and Kawai, K. A modified process for soy sauce fermentation by immobilized yeasts. Agric. Bio. Chem. 55: 269-271 (1991)
12. Ryu, B.H., Kim, S.J. and Shin, D.B. Lactic acid, ethylalcohol and 4-ethylguaiacol contents of rapid fermentation of sardine soy sauce prepared by using immobilized whole cells. Korean J. Food Sci. Technol. 24: 456-462 (1992)
13. Ryu, B.H., Cho, K.J., Chae, Y.J. and Jin, S.H. Continuous rapid fermentation of soy sauce by immobilized *Zygosaccharomyces rouxii* BH-90 and Candida versatilis BH-91 using column type reactor. Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 21: 366-372 (1993)
14. Kim, S.J., Shin, D.B. and Ryu, B.H. Continuous rapid fermentation of sardine soy sauce by using column type reactor packed immobilized yeast cells. Korean J. Food Sci. Technol. 25: 154-159 (1993)
15. Ryu, B.H. Continuous rapid fermentation of fish sauce by using column type reactor packed immobilized cells. The Research Reports of Miwon Research Institute of Korean Food and Dietary Culture 5: 577-597 (1994)
16. Choi, K.S., Choi, C., Kwon, H., Kwon, K.I., IM, M.H., Chung, H.C., Choi, J.D. and Hwang, C.S. Mass Production of Traditional Fermented Soy Products by Biotechnological Technique –Studies on the mass production of *kanjang*–. pp. 35-262. Ministry of Science & Technology, Seoul (2000)
17. Yoda K., Urakabe, R. and Tsuchida, T. Enzyme electrode provided with immobilized enzyme membrane. U.S. Patent 4,240,889 (1980)
18. AOAC. Official Methods of Analysis. 16th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC, USA (1995)
19. Yonsei University. Yonsei University Methods in Laboratory Experiments of Foods. pp. 725-727. Tamgudang publishing Co., Seoul (1975)
20. Japanese Soy Sauce Research Institute. Methods in Shoyu Experiments. pp. 140-150. Mitsuosa printing Co, Tokyo, Japan (1990)
21. Lee, C.H., Chae, K.S., Lee, S.K. and Park, B.S. Quality Managerments in Food Industry, pp. 98-160. Yoorim Munwhasa, Seoul (1982)

(2002년 10월 4일 접수; 2002년 12월 30일 채택)