

米糠배지에서 酵母에 의한 에탄올 발효액의 평가

손경현* · 윤종수 · 성용분 · 이강표 · 김재철 · 이재홍

제일제당(주) 가공식품개발센터

Assessment of Ethanol Fermentation with Rice Bran by Yeasts

Sohn, Kyung-Hyun*, Jong-Soo Yun, Yong-Bun Seong, Kang-Pyo Lee,
Jae-Cherl Kim and Jae-Heung Lee

Foods R & D Center, Cheil Foods & Chemicals Inc.
636 Guro-Dong, Guro-Gu, Seoul 152-050, Korea

Abstract — Rice bran was employed as a main medium component for ethanol fermentation by *Saccharomyces* species. Among the several strains of *Saccharomyces* yeasts, *S. cerevisiae* IFO 2346 was selected as the best strain in view of the interest in the production of ethanol and amino acids. It was found that *S. cerevisiae* IFO 2346 showed 3×10^8 cells/ml and 4.7% (v/v) ethanol production after 72 hr cultivation. Although total amount of free amino acids was decreased from 1,099 mg/l to 829 mg/l during the fermentation, glutamic acid, histidine, and isoleucine were increased considerably. With the supplement of 5% glucose to the fermentation medium, both ethanol and amino acid production were increased up to 134% and 264%, respectively, compared to the control case. Glutamic acid, leucine, alanine, phenylalanine, and valine were the major amino acids in the fermentation broth.

미강은 현미의 도정중 생산되는 농업부산물로서 풍부한 양의 지방, 비타민 B군 및 양질의 단백질, 섬유질 등을 함유하고 있다(1). 이러한 우수한 영양적 가치에 비해 현재 미강유, 사료 등으로 이용이 제한되고 있어 폭넓은 산업적 이용에 대한 연구가 요구되고 있다. 특히 미강 발효액은 양질의 단백질과 풍부한 양의 유리 아미노산을 함유하여 발효조미료, 저알콜 건강음료, 천연피부보습제 등의 다양한 산업적 용도가 기대되어 진다.

Saeki는 미강을 원료로 하여 효모에 의한 에탄올 발효와 초산균에 의한 초산발효를 同一系내에서 행하는 식초제조법을 보고한 바 있다(2). 한편 미강발효액은 피부 보습효과가 현저하여, 화장품 및 입욕제의 피부보습제로 이용되고 있으며, 이러한 보습효과는 천연보습인자(Natural Moisturizing Factor)인

유리 아미노산군이 풍부하게 존재하기 때문인 것으로 알려져 있다(3).

또한 미강 발효액은 풍부한 양의 아미노산 뿐만 아니라 효모에 의한 발효과정에서 생성된 알콜, 퓨젤유 등을 다량으로 함유하고 있어, 매스킹(masking)제 및 조미료의 베이스로 이용 가능성이 예상된다(4). 특히 글루탐산, 알라닌 및 유기산으로 구성된 정미 성분과 에탄올, 퓨젤유 등의 방향성분이 잘 조화되어 있어, 포도당만 적당량 첨가하여 천연 발효조미료로 개발 가능한 것으로 생각된다(5). 또한 미강발효액은 필수 아미노산 및 기타 인체에 유용한 성분들을 다량 함유하고 있어, 새로운 형태의 알콜음료 또는 발효 추출 건강음료로 용도 개발이 가능하다.

이러한 목적의 일환으로 본 연구에서는 미강을 효소적으로 가수분해한 당화액을 제조하여, 미강배지에서의 *Saccharomyces*속 효모의 발효특성 및 유리 아미노산을 포함한 주요 대사산물들의 변화를 살펴 보았으며, 이와 같이 제조한 미강 발효액의 산업적 이용

Key words: Rice bran, *Saccharomyces cerevisiae*, ethanol fermentation, amino acid

*Corresponding author

가능성을 검토하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용한 미강은 김포(경기도)에 위치한 정미소로부터 입수하였으며, 외부공기를 차단한 후 4°C에서 보관하였다. 미강당화액의 제조에 액화효소로 Fungamyl(800 FAU/g)을 Novo Industri A/S로부터 입수하였으며, 당화효소로 Kokulase M(31,400 U/g)를 Sankyo(Tokyo, Japan)로부터 입수하여 사용하였다(6).

균주

본 실험에 사용된 *Saccharomyces cerevisiae* IFO 2346, *S. cerevisiae* IFO 0309는 Institute for Fermentation, Osaka(Japan)로부터, *S. sake* Kyokai No. 7, *S. sake* Kyokai No. 9, *S. cerevisiae* S-2는 일본양조 협회로부터, *S. cerevisiae* Guro는 제일제당 주정공장에서로부터 분양받았다. 이들 효모는 MGYP 사면배지(malt extract 0.5%, yeast extract 1.0%, peptone 1.0%, glucose 3.0%, agar 2.0%)에 접종하여 30°C에서 48시간 배양후 4°C에서 보관하였다.

미강의 당화

미강 800 g, 수돗물 2.8 l, Fungamyl 1.6 ml을 혼합하여 60°C에서 1시간 액화후, 121°C에서 30분간 가압 살균하였다. 살균후 55°C로 냉각하여 Kokulase M을 800 mg 가하여 3시간 당화한 다음 배지로 사용하였다.

배양조건

500 ml 삼각플라스크를 사용하여, 각 효모 균주를 200 ml의 멸균된 MGYP 배지에 1백금이 접종하여 28°C에서 36시간 진탕배양하여 종균으로 사용하였다. 5l 발효조 배양은 미강당화액을 working volume 3l로 하여 접종량 5%, 교반속도 300 rpm, 온도 28°C에서 배양하였고, 이 때 통기는 하지 않았다. 한편 flask 배양은 250 ml 또는 500 ml 삼각플라스크에 working volume을 각각 100 ml 또는 200 ml로 하여 접종량 5%, 온도 28°C로 정치배양하였다. 배양액 중의 산화 환원전위(ORP) 측정은 DKK 전극(Type 6327L, Japan)을 사용하였다.

발효액 분석

발효액을 4000 rpm에서 30분간 원심분리하여 얻은 상등액을 0.45 µm membrane filter로 여과한 후 일반분석을 실시하였다. 가용성 총당은 phenol-sulfuric acid method를 사용하여 분석하였다(7). 발효액의 유리아미노태 질소(free amino N)는 ninhydrin color reagent를 사용한 colorimetric assay로 분석하였다(8). 에탄올 함량은 Sigma kit를 사용한 효소분석법으로 실시하였다(9). 효모의 생균수 측정은 적당히 희석한 배양액을 MGYP agar 배지에 도말하여 나타난 집락수로 계산하였다.

아미노산 분석

유리 아미노산은 HPLC(Waters Amino Acid Conversion Kit 2)를 사용하여 이온교환 칼럼(Waters amino acid analysis column)으로 분리후 post-column 반응으로 유도체화하여 형광검출기를 사용하여 검출하였다. 이때 용매로 2% sodium citrate(H 3.05) 및 2% sodium nitrate(pH 9.75)를 사용하여 48분간 0%에서 100%의 구배로, 이후 26분간 isocratic하게 조정하였으며, 이때 유속은 0.45 ml/min로 하였다. 컬럼 후 반응은 OPA(Ortho-phthaldehyde) 용액을 사용하였고, detector로 Waters 420 Fluorescence detector를 excitation 338 nm, emission 425 nm로 하여 사용하였다.

결과 및 고찰

균주 특성비교

α -amylase 및 glucoamylase를 사용하여 55°C에서 3시간 당화후 가용성 총당 12%, 환원당 7%의 미강당화액을 얻었다. 이때 가용성 총당중 환원당의 비율은 평균 60% 수준을 나타내었다. 미강은 단백질, 지방, 섬유질의 함량이 높기 때문에 당화효소에 의한 전분질의 가수분해가 비교적 효율적으로 진행되지 않았다(10).

이와 같이 제조한 미강배지에서 7가지 *Saccharomyces*속 효모들의 에탄올 생성능을 비교한 결과 *S. sake* Kyokai 7, *S. cerevisiae* IFO 2346, *S. cerevisiae* Guro 등이 비교적 에탄올 생성능이 우수하였다(Table 1). 한편, 발효완료액의 유리 아미노산의 함량을 비교해 본 결과, *S. cerevisiae* IFO 2346 및 *S. cerevisiae*

Table 1. Comparison of fermentation characteristics of various yeasts with rice bran medium^a

Strains	pH	Residual sugar (%)	Ethanol production (%)	Free amino acids (mg/l)
<i>S. cerevisiae</i> FIO 0390	5.37	1.1	4.2	363
<i>S. cerevisiae</i> IFO 2346	5.50	1.1	4.9	1,040
<i>S. sake</i> Kyokai 6	5.50	1.0	4.7	784
<i>S. sake</i> Kyokai 7	5.30	0.9	5.0	446
<i>S. sake</i> Kyokai 9	5.48	0.9	4.2	502
<i>S. cerevisiae</i> S-2	5.47	ND*	4.2	468
<i>S. cerevisiae</i> Guro	5.13	0.6	4.9	961

*ND; not detected

^a2.8 l saccharified rice bran in 5 l flask was inoculated with each strain (5% inoculum) and fermentation was carried out at 28°C for 72 hr.

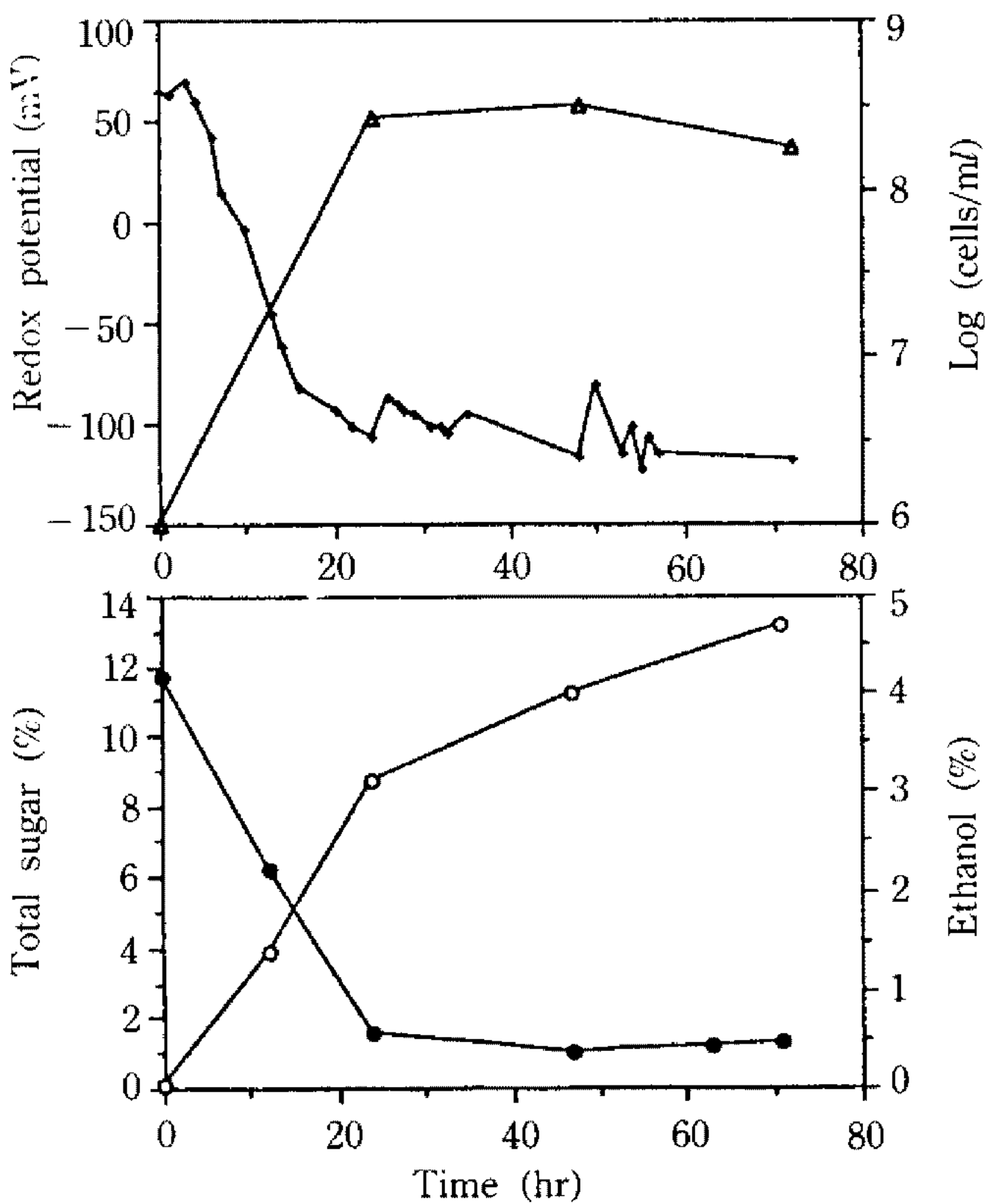


Fig. 1. Typical time course of ethanol fermentation with rice bran medium by *S. cerevisiae* IFO 2346.

(○; Ethanol, ●; total sugar, △; viable cell number, +; redox potential).

Guro가 고농도의 유리 아미노산을 축적하고 있었다. 이상의 결과에서 우수한 에탄올 생성능(4.9%) 및 높은 유리 아미노산 함유량(1040 mg/l)을 동시에 만족시키는 *S. cerevisiae* IFO 2346을 최종적으로 선별하여 아래와 같은 여러 가지 발효특성들을 살펴보았다.

S. cerevisiae IFO 2346은 미강당화액에서 발효 24시간 후 3×10^8 cells/ml로 성장하였고, 발효 72시간 후 약 4.7%(v/v)의 에탄올이 생성되었다(Fig. 1). 균체 성장에 따라 배양액의 산화환원전위차(ORP)가 -100 mV까지 떨어지면서 용존산소가 거의 결핍되었으며, 에탄올 발효가 왕성하게 진행되었다. 발효 24시간이 경과되면서 배지의 당은 거의 고갈되었으나, 완만하게 에탄올 생성은 지속되었다. 이러한 현상은 발효과정 중 발효성 당이 미강으로부터 계속적으로 생성되기 때문인 것으로 추측된다.

유리아미노산 변화

효소로 전처리한 미강당화액의 유리아미노산 조성 과 72시간 배양한 발효액의 유리아미노산 조성을 비교한 결과를 Table 2 나타내었다. 발효과정중 유리아미노산의 총량은 1099 mg/l에서 829 mg/l로 감소하였으며, 유리아미노산 조성도 큰 변화를 나타내었다. 미강당화액에는 alanine, arginine, aspartic acid가 높은 함량을 나타내었으나, 발효완료액에는 glutamic acid, alanine, histidine의 함량이 높았다.

각 유리아미노산의 경시적 변화를 살펴본 결과, 유리아미노산의 총량은 발효전 1099 mg/l에서 발효 12시간 후 100 mg/l로 크게 감소되나 이후에 다시 서서히 증가하였으며, 이들 유리아미노산을 발효에 의하여 감소되는 아미노산群(Group 1), 오히려 증가하는 아미노산群(Group 2) 및 발효전후 큰 변화가 없는 아미노산群(Group 3)으로 크게 대별할 수 있었다. Group 1에 속하는 아미노산들 가운데 aspartic acid, arginine, glycine은 각각 97%, 73%, 74%의 대

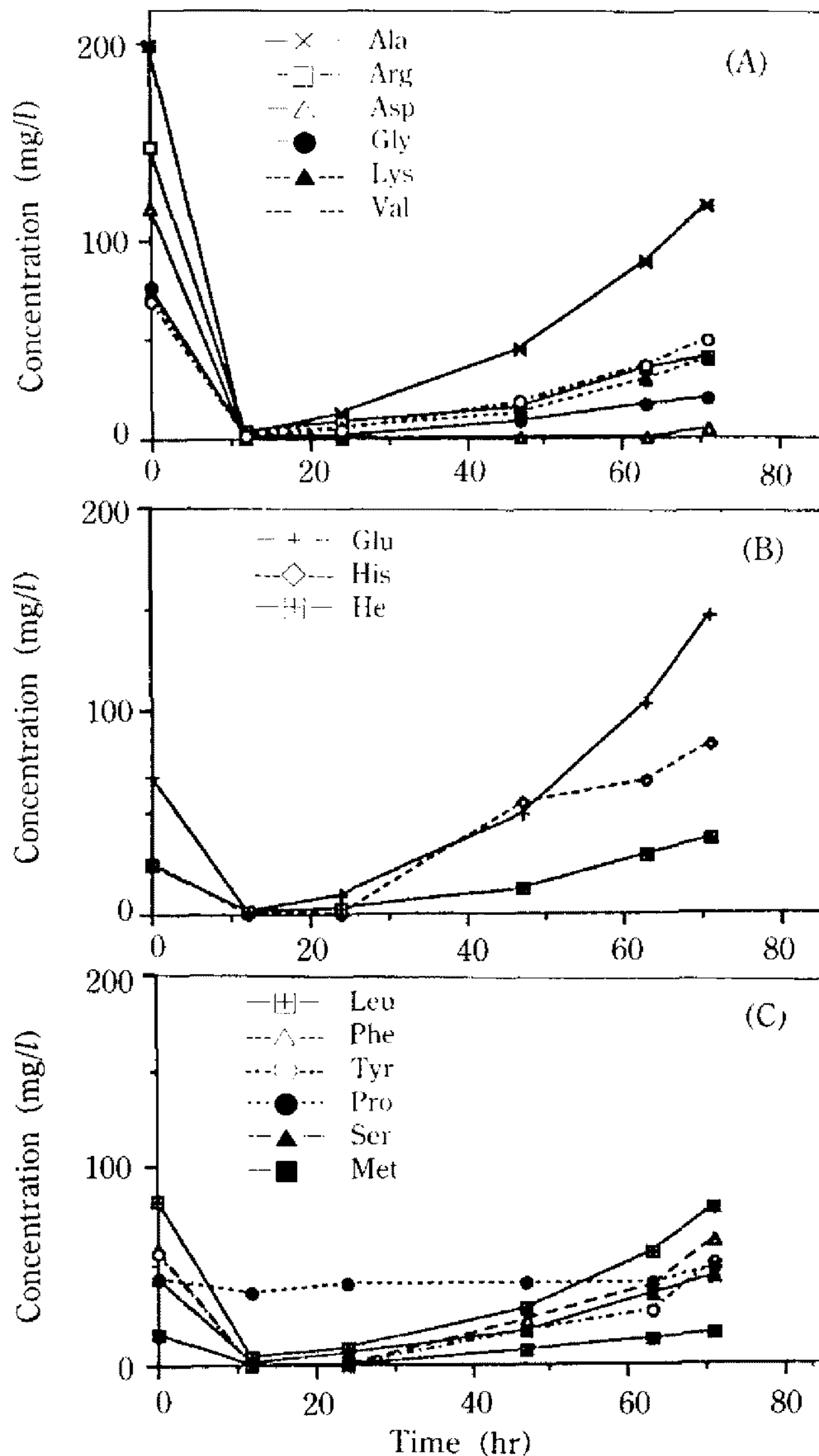


Fig. 2. Time-course study of amino acid production with rice bran medium by *S. cerevisiae* IFO 2346.

A: Amino acids that decreased during the fermentation (Group 1).

B: Amino acids that increased during the fermentation (Group 2).

C: The rest of amino acids not belong to group 1 and group 2 (Group 3).

폭적인 감소율을 나타내었다(Fig. 2(a)). Group 2의 아미노산들 중 glutamic acid, histidine은 각각 218%, 315%로 대폭 증가하였는데(Fig. 2(b)), 특히 glutamic acid는 발효조미료 등에서 정미성 성분으로 중요한 역할을 하므로 관심을 가질 필요가 있다. Group 3에 속하는 아미노산들은 발효초기시 감소되었으나, 발효가 진행됨에 따라 다시 처음량을 회복하는 패턴을 보였으나, proline은 예외적으로 거의 경시적 변화를

Table 2. Changes in free amino acids before and after ethanol fermentation by *S. cerevisiae* IFO 2346^a

Amino acid	Fermentation (A)	Fermented (B)	B/A
Asp	116	4	0.03
Ala	198	116	0.59
Arg	147	40	0.27
Ser	43	44	1.02
Glu	67	146	2.18
His	26	82	3.15
Lys	73	39	0.53
Leu	82	78	0.95
Gly	77	20	0.26
Val	70	48	0.69
Phe	58	62	1.07
Pro	44	47	1.07
Tyr	56	51	0.91
Ile	25	37	1.48
Met	15	15	1.00
Trp	0	0	0.00

^aFermentation was carried out at 30°C in 5 l fermentor for 54 hr.

Table 3. Effect of additional glucose on ethanol production and amino acid content in the fermented broth^a

Additional glucose(%)	Residual sugar(%)	Ethanol (%)	Free amino N(mg/l)	Free amino acid(mg/l)
0	1.29	4.7	197	829
5	1.63	6.3	625	2191
10	1.25	9.6	367	1185

^aFermentation was carried out at 28°C in 5 l fermentor for 91 hr with *S. cerevisiae* IFO 2346

나타내지 않았다(Fig. 2(c)).

이상과 같은 유리아미노산의 경시적 변화로 미루어 볼 때, 미강으로부터 생성된 유리아미노산은 일차적으로 효모에 의해 소비되어지며(proline은 제외), 발효가 더 진행되면서 다시 효모로부터 생성 또는 유출되는 것으로 생각되며, 이 과정에서 유리아미노산 조성의 변화가 발생하는 것으로 추측되어진다(11).

포도당 첨가효과

배양 초기에 미강당화액에 5% 및 10%의 포도당을 첨가하였을 때, 발효완료액의 에탄올 함량은 포도당을

Table 4. Change of individual amino acid content by additional glucose supplemented to the fermentation medium

Amino acid	Amount of glucose addition		
	0%	5%	10%
Glu	146	403	233
Ala	116	236	127
His	82	19	13
Leu	78	245	140
Phe	62	163	98
Tyr	51	114	67
Val	47	163	84
Pro	47	136	42
Ser	44	136	65
Arg	40	136	74
Lys	39	137	80
Ile	37	127	67
Gly	20	84	41
Met	15	56	31
Asp	4	63	23
Total	829 mg/l	2191 mg/l	1185 mg/l

첨가하지 않은 경우보다 134% 및 204%의 증가를 나타내어, 에탄올은 포도당 첨가량에 비례하여 생성됨을 알 수 있었다(Table 3). 한편 유리아미노산 함량은 포도당 첨가량 5%에서 2,191 mg/l로 포도당 무첨가의 경우보다 264%의 대폭적인 증가를 나타내었으나, 포도당 첨가 10%에서는 포도당 무첨가의 경우와 비슷한 수준의 유리아미노산을 함유하고 있어, 포도당 첨가량과 유리아미노산의 함량은 직선적인 비례관계를 보이지 않았다.

한편 포도당 첨가에 의한 각 유리아미노산의 함량 변화를 Table 4에 나타내었다. 포도당 첨가량 5%에서 histidine을 제외한 대부분의 아미노산이 약 2배씩 골고루 증가하여, glutamic acid 403 mg/l, alanine 236 mg/l, leucine 245 mg/l, phenylalanine 163 mg/l, valine 163 mg/l의 높은 함량을 나타내었다. 한편 histidine은 5% 및 10%의 포도당 첨가로 오히려 함유량이 19 mg/l 및 13 mg/l로 대폭적인 감소를 보였다.

포도당의 첨가로 발효액의 유리아미노산 함량이 크게 증가하는 것은 일차적으로 미강당화액의 유리아미노산이 효모에 의하여 탄소원으로 이용되는 것이 줄어들며, 한편으로 효모의 아미노산 생합성 효소에

의해 포도당이 아미노산으로 전환되기 때문인 것으로 추측된다.

이와 같이 제조한 미강발효액의 산업적 이용가능 분야를 고려해 볼 때, 본 미강발효액은 특히 고농도의 glutamic acid를 함유하므로 쌀을 원료로 하여 제조되는 양조조미료보다 발효조미료로서 더욱 유리한 점이 있었다. 한편 인체의 필수 아미노산인 arginine, leucine, isoleucine, lysine, phenylalanine, valine, methionine 등을 골고루 함유하고 있어 건강식품의 첨가물로 용도개발이 가능할 것으로 사료되며 또한 미강발효액은 풍부한 아미노산이 잔존하여 향후 천연피부보습제로의 개발이 기대된다.

요 약

*Saccharomyces*속 효모를 사용하여 미강을 배지로 하여 에탄올 발효특성을 조사하였다. 액화효소와 당화효소로 전처리한 미강에서 여러 *Saccharomyces*속 효모들을 배양한 결과 *Saccharomyces cerevisiae* IFO 2346이 높은 에탄올 생성 및 유리아미노산 함량을 나타내었다.

균체성장은 발효 24시간에 3×10^8 cells/ml로 증가하였으며, 발효 72시간후 4.7%의 에탄올을 생성하였다. 유리아미노산 총량은 발효과정중 1,099 mg/l에서 829 mg/l로 감소하였으나, glutamic acid, histidine 및 isoleucine은 오히려 각각 218%, 315% 및 148%로 증가하였다.

배양 초기에 미강당화액에 5%의 포도당을 첨가하였을 때, 발효완료액은 포도당 무첨가시보다 에탄올 함량은 134%, 유리아미노산 함량은 264%의 대폭적인 증가를 보였으며, 이때 발효완료액에는 glutamic acid, leucine, alanine, phenylalanine, valine 등의 유리아미노산이 높은 함량을 보였다.

참고문헌

1. Juliano, B.O. 1985. Rice bran, pp. 647-687. In B.O. Juliano (ed.), *Rice Chemistry and Technology*. American Association of Cereal Chemists, Inc., St. Paul, Minnesota.
2. Saeki, A. 1991. Production of rice vinegar from uncooked rice bran by a parallel-combined process consisting of saccharification, ethanol ferme-

- ntation and acetic acid fermentation. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* **23**: 418-421.
3. Nakayama, Y. and I. Horii. 1988. Skin moisturization and NMF, pp. 8-12. *In Science of Humectants-Recent Progress and Prospective Problem*, Fragrance-Journal Company, Tokyo.
 4. Akita, T. and Kuwahara. 1987. On proteolysis of rice protein in Sake brewing enzyme preparations. II. Several tests for increasing of amino acid in quantity. *Kochi Joshi Daigaku Kiyo, Shizen Kagakuhen* **35**: 45-58.
 5. 徳山孝. 1981. 醸造調味料の製造法. 일본특허 출원 공고 昭56-37785: 107-111.
 6. Yasunosuke, N. 1983. Enzyme preparations used for sake brewing. *J. Brew. Soc. Japan* **78**: 49-55.
 7. Dubois, M., K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers and F. Smiuh. 1956. The phenol-sulphuric acid method for total sugar assays. *Anal. Chem.* **28**: 350.
 8. Helrich, K. 1990. Chapter 27. Malt beverages and brewing materials, pp 734-735. *In K. Helrich (ed.), Official Methods of Analysis of Official Analytical Chemist*, Vol. 2. Association of Official Analytical Chemist, Inc., Arlington, Virginia.
 9. Sigma Diagnostics. 1989. Alcohol, Procedure No. 332-UV, pp. 1-9. Sigma Chemical Co., St. Louis, MO.
 10. 光島逸朗. 1978. 白糖을 原料로 한 澱粉成分 抽出方法. 일본공개 특허공보 昭53-72837: 237-239.
 11. Iwano, K., N. Iizuka, K. Saito and Y. Nunokawa. 1981. Production of amino acids in Sake moromi-mash, II. Decrease of amino acids by yeast fermentation. *J. Brew. Soc. Japan* **76**: 272-275.

(Received November 26, 1991)