

## Alcohol Fermentation을 위한 배지로서의 Cheese Whey의 이용

김상필 · 박희경 · 김도환 · 허태련\*  
인하대학교 공과대학 생물공학과

### Utilization of Cheese Whey for Alcohol Fermentation Medium

Sang-Pil Kim, Hee-Kyung Park, Do-Hwan Kim and Tae-Ryeon Heo\*

Department of Biotechnology, Inha University, Incheon 402-751, Korea

#### Abstract

In order to use whey lactose in alcohol fermentation, we investigated fermentation conditions of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces fragilis* in lactose-hydrolyzed whey with  $\beta$ -D-galactosidase. and optimum conditions of the above two yeasts through oxygen regulation by Pasteur effect which is the characteristic of the yeasts were determined. In addition, optimum condition for application of fermented whey in Tak-ju process was also examined. With 0.7%  $\beta$ -D-galactosidase, 93% lactose was hydrolyzed at pH 6.5 in 30 minutes. Because *S. cerevisiae* is unable to ferment galactose, the production of ethanol by *S. cerevisiae* was lower than that of *K. fragilis* in lactose-hydrolyzed whey. But ethanol productivity by *S. cerevisiae* was higher than that by *K. fragilis* in glucose added whey. In fermentation with oxygen regulation and addition of 60 g/l glucose, the ethanol productivity of *K. fragilis* and *S. cerevisiae* were 18.9 g/l (11.8% increase) and 43.5 g/l (22.1% increase), respectively. It appeared that the ethanol productivity of *S. cerevisiae* was higher than that of *K. fragilis* under the above conditions. In ethanol fermentation added rice starch, *Aspegillus oryzae* hydrolyzed 80% of starch in 60 hours, and the production of ethanol was 80.2 g/l

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces fragilis*, whey, Takju

#### 서 론

치즈 생산시 원료유 85~90%가 부산물로 생성되는 유청은 단백질, 유당, 수용성 비타민, 무기질 등의 유용한 성분들을 함유하고 있으므로 이들 성분 이용을 위한 다양한 연구가 진행되고 있다. 유청단백질은 알부민, 글로불린 등의 면역성 단백질로 구성되어 있으며, 이러한 단백질을 분리하여 여러 분야에 이용되고 있다. 이와같이 유청에는 미생물 성장에 필요한 비타민, 지방과 미네랄 성분이 포함되어 있으므로 발효산업의 배지로서도 많이 이용되고 있다<sup>(1,2)</sup>. 유청내에 존재하는 유당은 유당불내증인 사람의 경우에 소화에 어려움이 있으므로 이를 분해시켜 이용하는 연구가 여러가지 방법으로 진행되고 있으며 유당을 발효하여 에탄올, 유산(lactic acid) 등을 생산하는 분야도 활발히 연구되고 있다<sup>(3)</sup>. 유당을 분해하여 에탄올을 생산하는 효모는 극히 제한되어 있다. *Kluyveromyces fragilis*는 유당을 분해하여 에탄올을 생산하는 효모중의 하나로 발효 효모인 *Saccharomyces cerevisiae*에 비하여 에탄올에 대한 내성이 약하기 때문에

낮은 에탄올 생산능을 나타낸다. 반면에 *S. cerevisiae*는 유당의 분해효소인  $\beta$ -galactosidase가 없기 때문에 유당을 직접 이용하지 못한다. 따라서 유청배지에서는 생육이 불가능하므로 효소를 이용하여 유당을 glucose와 galactose로 분해시킨후 에탄올을 효율적으로 생산할 수 있다<sup>(4,5)</sup>.

또한 에탄올 생산 수율을 높이기 위하여 효모의 특성을 응용하고 균 성장기와 에탄올 생산 기간동안 용존 산소를 조절하면 더욱 높은 에탄올 수율과 발효시간의 단축을 기대할 수 있다<sup>(6)</sup>. 유청의 효율적 이용을 위하여 일차적으로 알코올로 발효한 유청을 원료로 하여 탁주 제조에 응용하였다. 일반적으로 탁주제조에 이상적인 용수로 풍부한 양의 미네랄을 포함하는 것이 권장되는데<sup>(7)</sup>, 유청내에는 다량의 미네랄이 함유되어 있고, 또한 발효된 유청을 이용할 경우 유청의 산도가 곰팡이에 의한 당화와 효모에 의한 에탄올 발효에 적합하기 때문에 따로 유산균을 접종할 필요가 없으므로 발효시간의 단축효과와 발효 공정을 간단하게 할 수 있을 것으로 기대된다.

유청내에 존재하는 riboflavin(Vitamin B<sub>2</sub>)은 유청의 색소를 제공하는 물질로 빛에 의하여 쉽게 파괴되며, 파괴된 riboflavin은 유청의 불쾌취를 갖게하므로 이 물질의 제거를 위하여 활성탄(activated carbon)을 이용하여 유청내의 riboflavin을 제거하는 것이 바람직하다<sup>(8)</sup>.

Corresponding author: Tae-Ryeon Heo, Department of Biotechnology, College of Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea

따라서 본 연구에서는 에탄올 발효의 배지로서 유청을 이용할 수 있도록 *K. fragilis*와 *S. cerevisiae*를 사용하였으며 또한 발효도중 용존 산소의 공급을 조절하여 에탄올의 생산수를 증대를 유도하였다. 그리고 유청 발효액을 탁주 제조에 응용하기 위하여 탁주 제조에 사용되는 곰팡이와 효모의 처리, 유청내의 색소를 제공하는 riboflavin의 제거, 그리고 유청을 용수에 혼합사용하는 방법으로 탁주 제조의 발효 시간에 대한 효율성의 변화에 대해 연구결과를 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 원료 유청

치즈 생산공정의 부산물인 유청에서 지방을 제거하여 냉동보관한 후 30°C 수조에서 해동하여 실험에 사용하였다. 5 N citric acid와 1 N NaOH를 이용하여 유당분해 실험의 경우에 pH를 6.5로 조절하였고, 효모에 의한 유당의 가수분해 실험의 경우에는 pH를 4.5로 조절하여 90°C에서 15분간 살균후 실험에 이용하였다.

### 사용 균주

유산균인 *Lactobacillus bulgaricus*, *L. helveticus*와 *Streptococcus thermophilus*를 각각 10%의 멸균 탈지분유 배지에서, 효모 *K. fragilis* ATCC 46537와 *S. cerevisiae* IFO 2346를 YMPG 배지에서 2주 마다 계대배양하여 사용하였다<sup>(6,13)</sup>. 효소는 유당분해 효소인 Lactozyme 3000 L-HP-G(NOVO, Denmark)를 사용하였다. 이때 사용된 효소의 활성도는 3000 LAU/ml(1 LAU=1  $\mu$ mole glucose production/min)로서 4°C에서 냉장보관 하였다<sup>(9,10)</sup>.

### 유당의 가수분해

유산균에 의한 유당의 가수분해는 유청의 pH를 6.5로 조절한 후, 6%(v/v) 접종하여, 42°C, 120 rpm으로, 효모에 의한 유당의 가수분해는 pH를 4.5로 조절하여 6%(v/v)의 균을 접종한 후에 30°C, 120 rpm의 진탕배양기에서, 효소에 의한 유당의 가수분해는 pH를 6.5로 조절한 유청에 0.7%의 효소를 첨가하여 40°C, 120 rpm의 진탕배양기에서 반응시켰다.

### pH와 적정 산도의 측정

pH는 Metrohm 654 pH meter(Swiss)를 사용하여 측정하였으며, 적정 산도는 AOAC법에 의하여 Metrohm 665 Dosimat titrator(Swiss)를 사용하여 측정하였다<sup>(11)</sup>.

### 건조 균체량 측정

배양액을 3500 rpm, 15분간 원심분리한 후에 상등액을 제거하고, 80°C의 건조기에서 15 시간동안 건조시킨 후에 균체량을 측정하였다.

### 유당 함량의 측정

유당의 함량은 Nickerson<sup>(12)</sup> 등에 의한 colorimetric method에 의하여 540 nm에서 spectrophotometer(Perkin Elmer Lambda 3B UV/VIS : U.S.A)를 사용하여 측정하였다. 유당 소모량은 초기 유당량에 대한 상대비율로 표시하였다.

### 에탄올 농도의 측정

유청 발효액을 3500 rpm에서 15분간 원심분리한 후에 취한 상등액을 9 ml 취하여 control peak 물질로써 acetone을 1 ml 첨가하여 에탄올 농도를 측정하는데 사용하였다. 에탄올 농도는 gas chromatography(Shimadzu GC 14A)로 분석하였으며, 분석에 사용된 주입량은 2  $\mu$ l로 하였다. GC의 운전조건은 column은 CBP-1 capillary column(무극성, 25 m length)을 사용하였으며, detector는 flameion detector(FID), carrier gas는 N<sub>2</sub>(20 ml/min), column 온도는 90°C, injection 온도는 130°C, chart speed는 0.7 m/s, 그리고 측정시간은 7분이었다.

### 당 농도의 측정

유당이 분해되어 생긴 포도당과 galactose의 농도를 HPLC로 분석하였다<sup>(14,15)</sup>. 분석에 사용된 HPLC는 Dionex 4000i(U.S.A)였으며, detector는 Dionex pulsed amperometric detector, column은 carbohydrate carbo-pac PA1이었다.

### 에탄올 발효

효소로 유당을 가수분해한 유청을 5 N citric acid로 pH를 4.5로 조절한 후 90°C에서 15분간 살균, 냉각한 후, *S. cerevisiae* IFO 2346를 접종하여 30°C, 120 rpm의 진탕배양기에서 배양하였다. 이 균과 비교하기 위하여 유당을 가수 분해시키지 않은 동일 조건의 유청에서 *K. fragilis* ATCC 46537을 배양하면서 결과를 비교하였다<sup>(16,17)</sup>.

### 유청의 발효를 위한 회분식 배양

유청에 *K. fragilis* ATCC 46537을 3%(v/v) 접종하여 30°C, 200 rpm에서 배양하였다. 이때 발효시작 후 15시간 동안은 균체의 생성을 촉진하기 위하여 4 vvm으로 산소를 공급해 주었으며, 그 이후에는 에탄올 생산을 위하여 산소 공급을 중단하였다. 이때 5 N citric acid와 1 N NaOH를 이용하여 배양중에 pH를 4.5로 유지하여 주었다. 동일한 조건에서 유당을 가수 분해시킨 유청에 *S. cerevisiae* IFO 2346을 3%(v/v) 접종하여 실험하였다. 회분식 배양과 동일한 조건에서 *K. fragilis*의 경우에는 60 g/l의 포도당을 첨가하여 배양하였다.

### 미분을 첨가한 유청에서의 에탄올 발효

탁주 제조용 주모로서 *A. oryzae* KFCC 101과 *S. cerevisiae* IFO 2346(1 : 1)을 증자된 미분에 접종한후 23°C에서 48시간 배양하였다. 이때 유청의 1차 발효액의

pH가 4.5이므로 유산균은 접종하지 않았으며 *K. fragilis*로 1차 발효한 유청에 증가된 미분을 15% 첨가한 것을 배지로 이용하였다. 이때 주모를 10%(v/v)접종하여 배양액을 1.5~로 하여 30℃, 120 rpm에서 배양하였으며 이때 산소를 4 vvm으로 계속 공급해 주었다.

**유청의 색소 제거**

발효된 유청을 활성탄을 이용하여 여과 처리하여 색소인 riboflavin을 제거하였다. 여과방법은 유청 발효액 활성탄을 첨가한 후 60분간 200 rpm으로 교반후 여과하여 나온 유청 발효액을 430 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 이때 사용된 활성탄은 Powder type activated carbon(Model No. 2510)이었다.

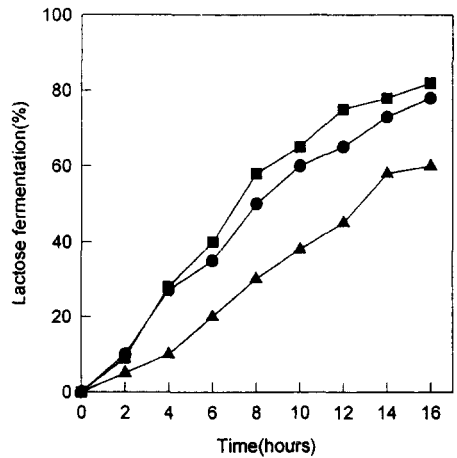
**결과 및 고찰**

**유당의 분해**

각각의 유청에 유산균인 *L. bulgaricus*와 *S. thermophilus*의 1:1 혼합균, *L. helveticus*, 그리고 효모인 *K. fragilis* ATCC 46537을 접종하여 유당의 분해율을 조사하였다 (Fig. 1). 유산균 혼합배양의 경우 유당 발효율이 발효 16 시간만에 76%이었다. *L. helveticus*는 발효 16시간만에 82%, 한편 효모의 경우 *K. fragilis* ATCC 46537은 발효 16시간후 유당 발효율은 60%이었다. 효모의 경우는 유산균보다 생장이 느리기 때문에 배양 16시간까지 유당 분해율이 유산균에 비하여 낮은 결과를 나타냈으나 그 이후에도 계속적으로 증식하였다. 한편 효소에 의한 가수분해의 경우 β-D-galactosidase에 의하여 30분만에 93%의 유당 분해율을 나타냈으므로(Fig. 2) 효소를 이용하여 유당을 glucose와 galactose로 가수분해 시켜준 후에 *S. cerevisiae* IFO 2346을 이용하였다.

**포도당과 유당의 첨가량에 따른 발효**

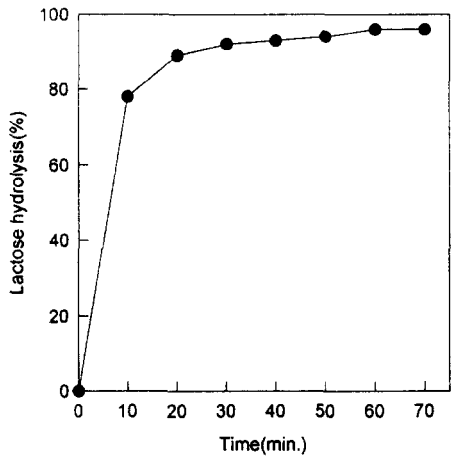
*S. cerevisiae*에 의한 발효의 경우 유당의 가수 분해로 생긴 galactose를 이용하지 못하여, 미생물이 이용할 수 있는 당농도가 낮아서 발효의 효율이 미비하였다(Table 1). 기질의 양과 균의 발효 효과를 조사하기 위하여 먼저 유당을 가수분해한 유청 배지에 포도당을 첨가하여 *S. cerevisiae*를 배양하였다. 최대 건조 균체량의 경우 60 g/l의 포도당 첨가에서 7.3 g/l, 30 g/l의 포도당 첨가시에는 6.3 g/l, 그리고 90 g/l의 포도당 첨가시에는 7.1 g/l로 60 g/l의 기질 첨가시에 우수하였으나, 60 g/l와 90 g/l의 포도당 첨가시에 기질에 의한 저해를 많이 받지 않았다. 에탄올을 생산에서도 비슷한 경향을 나타내었다. 에탄올 생산의 경우 60 g/l의 포도당을 첨가한 경우는 30.9 g/l, 30 g/l의 포도당을 첨가시는 28.4 g/l, 그리고 90 g/l의 포도당 첨가시에는 32.7 g/l로 기질에 의한 저해를 적게 받았다. 한편 *S. cerevisiae*의 당 이용율로 residual sugar를 측정된 결과 각각 30 g/l의 기질 첨가시에는 29%, 60 g/l의 기질 첨가시에는 36%, 그리고 90 g/l의 기질



**Fig. 1. Changes of lactose fermentation by various lactic acid bacteria and *K. fragilis***

L+S=*L. bulgaricus* & *S. thermophilus*, 1:1 ratio

●—●, L+S; ■—■, *L. helveticus*; ▲—▲, *K. fragilis*



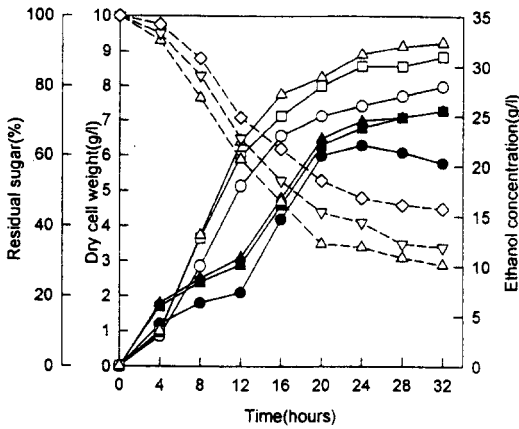
**Fig. 2. Kinetics of lactose hydrolysis with β-D-galactosidase Temperature: 42°C, Enzyme dosage: 0.7%(v/v)**

**Table 1. Comparison of lactose fermentation by *K. fragilis* and *S. cerevisiae***

	<i>K. fragilis</i>	<i>S. cerevisiae</i>
Dry cell weight(g/l)	6.1	4.2
Residual sugar(%)	8.9	4.8
Ethanol concentration(g/l)	11.7	6.2

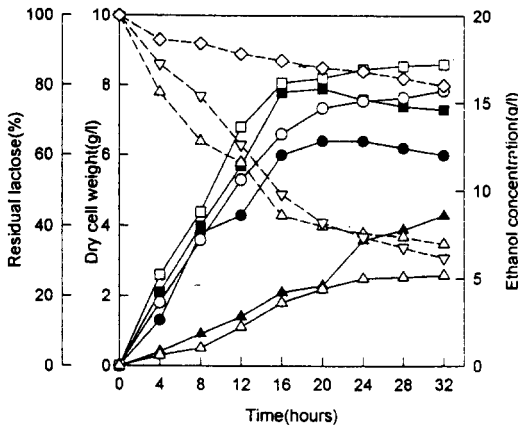
첨가시에는 44%이었다(Fig. 3).

*K. fragilis*의 경우 60 g/l의 유당을 첨가한 경우가 최대 건조 균체량 7.9 g/l로 30 g/l의 6.4 g/l와 90 g/l의 4.3 g/l보다 우수하였으며, 에탄올을 생산에서도 60 g/l의 유당을 첨가한 경우가 17.1 g/l로 30 g/l의 15.7 g/l, 그리고



**Fig. 3.** Effect of glucose addition on sugar consumption, and ethanol production and dry cell weight by *S. cerevisiae*

DCW: dry cell weight, R.S.: residual sugar  
EtOH: ethanol concentration  
●—●, DCW(30 g/l); ■—■, DCW(60 g/l); ▲—▲, DCW(90 g/l); △—△, R.S.(30 g/l); ▽—▽, R.S.(60 g/l); ◇—◇, R.S.(90 g/l); ○—○, EtOH(30 g/l); □—□, EtOH(60 g/l); △—△, EtOH(90 g/l)

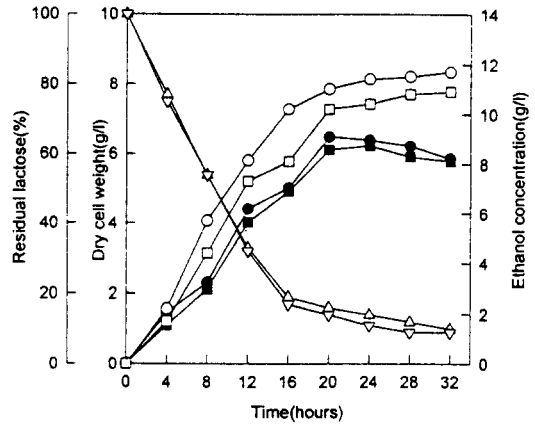


**Fig. 4.** Effect of lactose addition on lactose fermentation, ethanol production and dry cell weight by *K. fragilis*

DCW: dry cell weight, R.L.: residual lactose  
EtOH: ethanol concentration  
●—●, DCW(30 g/l); ■—■, DCW(60 g/l); ▲—▲, DCW(90 g/l); △—△, R.L.(30 g/l); ▽—▽, R.L.(60 g/l); ◇—◇, R.L.(90 g/l); ○—○, EtOH(30 g/l); □—□, EtOH(60 g/l); △—△, EtOH(90 g/l)

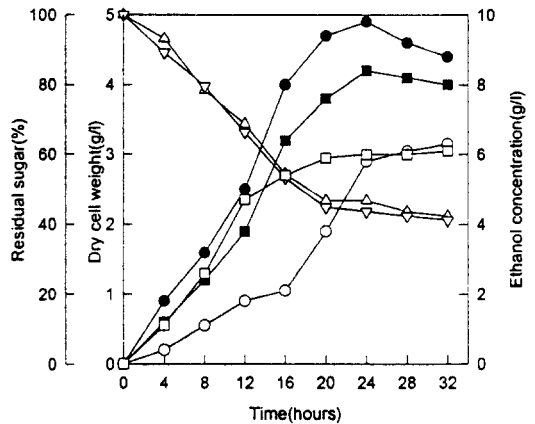
90 g/l의 5.2 g/l보다 우수하였다. 유당 발효에서는 30 g/l의 유당 첨가시 잔존하는 유당은 25%, 60 g/l의 유당 첨가시에는 21%이었다(Fig. 4).

유청의 발효를 위한 회분식 배양



**Fig. 5.** Comparison of oxygen controlled and non-controlled culture by *K. fragilis*

DCW: dry cell weight, R.L.: residual lactose  
EtOH: ethanol concentration  
●—●, DCW(controlled); ■—■, DCW(non-controlled); ▽—▽, R.L.(controlled); △—△, R.L.(non-controlled); ○—○, EtOH(controlled); □—□, EtOH(non-controlled)



**Fig. 6.** Comparison of oxygen controlled and non-controlled culture by *S. cerevisiae*

DCW: dry cell weight, R.S.: residual sugar,  
EtOH: ethanol concentration  
●—●, DCW(controlled); ■—■, DCW(non-controlled); ▽—▽, R.L.(controlled); △—△, R.L.(non-controlled); ○—○, EtOH(controlled); □—□, EtOH(non-controlled)

대부분의 효모는 산소가 충분히 존재하는 경우에는 생장을 하며, 산소가 결핍된 상황에서는 에탄올 발효를 하므로 발효 도중에 산소의 공급을 조절하여 발효조건을 조성하였다. *S. cerevisiae* IFO 2346의 경우에는 유당을 미리 가수분해 시켜서 원료로 사용하였으며, *K. fragilis* ATCC 46537은 유당을 전처리 하지 않은 조건에서 실험하였다. *K. fragilis* ATCC 46537의 경우 산소를 조절할 경우가 최대 건조 균체량이 6.7 g/l로써 조절을 하지 않은

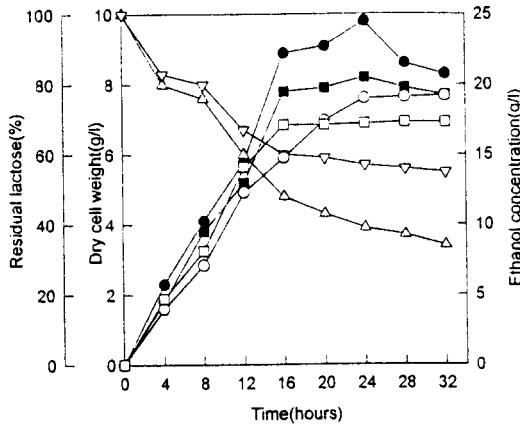


Fig. 7. Effect of oxygen control and 60 g/l glucose addition on dry cell weight, ethanol concentration and lactose fermentation by *K. fragilis*

DCW: dry cell weight, R.L.: residual lactose  
EtOH: ethanol concentration  
●—●, DCW(controlled); ■—■, DCW(non-controlled);  
▽—▽, R.L.(controlled); ▲—▲, R.L.(non-controlled);  
○—○, EtOH(controlled); □—□, EtOH(non-controlled)

경우의 5.8 g/l보다 우수하였으며, 에탄올 생산에서도 산소를 조절한 경우, 최대 에탄올 농도가 11.8 g/l로 조절하지 않은 조건의 10.4 g/l보다 우수하였다(Fig. 5). *S. cerevisiae* IFO 2346은 산소를 조절한 조건에서 최대 건조 균체량이 4.94 g/l로 산소를 조절하지 않은 경우의 4.2 g/l보다 우수하였으며, 에탄올 생산은 산소를 조절하였을 때 6.2 g/l로 산소를 조절하지 않은 경우의 6.6 g/l보다 떨어졌다. 이는 산소를 조절하는 경우에 발효초기에 균체 성장에 기질을 소모하여 에탄올 발효에 필요한 기질의 고갈로 인하여 발생한 결과로 추정된다(Fig. 6). 발효조 내로 포도당을 각각 60 g/l 첨가한 후에 동일한 조건에서 효모에 의한 발효를 실시하였다. *K. fragilis* ATCC 46537의 경우 산소를 조절한 경우에 최대 건조 균체량이 9.7 g/l, 산소를 조절하지 않은 조건에서는 8.1 g/l였으며 에탄올 생산의 경우에는 산소를 조절한 경우는 최대 에탄올 생산량이 18.9 g/l로 산소를 조절하지 않은 경우의 17.1 g/l보다 약 14% 정도 증가하였다(Fig. 7). *K. fragilis*는 산소를 조절하지 않는 경우에는 발효 16시간 이후에는 에탄올의 생산이 거의 중단되었으나, 산소를 조절한 경우에는 발효시작 후 24시간까지 계속하여 에탄올을 생산하는 결과를 나타내었다. *S. cerevisiae*의 경우에는 최대 건조 균체량과 에탄올 생산량이 *K. fragilis*보다 증가하였다. 최대 건조 균체량의 경우 산소를 조절한 경우에는 20시간후에 7.1 g/l로 같은 시간에 산소를 조절하지 않은 경우인 6.05 g/l보다 우수하였으며, 에탄올 생산은 34.5 g/l로 산소를 조절하지 않은 경우의 32.1 g/l보다 증가하였으며, 산소를 조절한 경우에는 에탄올을 생산하는 시간이 계속하여 유지되었다(Fig. 8). 즉, 같은 효모일지

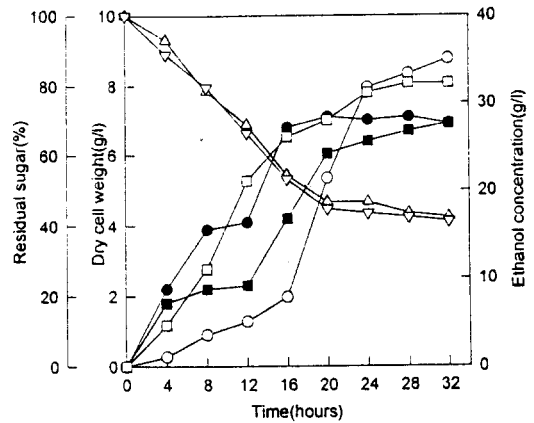


Fig. 8. Effect of oxygen control and 60 g/l glucose addition on dry cell weight, ethanol concentration and lactose fermentation by *S. cerevisiae*

DCW: dry cell weight, R.S.: residual sugar  
EtOH: ethanol concentration  
●—●, DCW(controlled); ■—■, DCW(non-controlled);  
▽—▽, R.S.(controlled); ▲—▲, R.S.(non-controlled);  
○—○, EtOH(controlled); □—□, EtOH(non-controlled)

라도 *S. cerevisiae* IFO 2346은 *K. fragilis* ATCC 46537에 비하여 산소에 의한 영향이 크다는 것을 알 수 있었다.

미분을 첨가한 유청에서의 에탄올 발효

발효된 유청에 15%(w/v)의 증자된 미분을 첨가한 후, *A. oryzae* KFCC 101과 *S. cerevisiae* IFO 2346의 1:1 혼합균으로 배양하면서 곰팡이에 의한 sugar consumption과 효모에 의한 에탄올 생산량을 측정된 결과, 발효후 60시간 후에 sugar consumption는 83.2 g/l, 그리고 최대 에탄올 생산량은 발효 60시간만에 80.2 g/l이었다(Fig. 9). 이때 *A. oryzae*가 전분을 분해한 후 5시간 이후부터(전분 분해도: 7%) *S. cerevisiae*에 의한 에탄올 발효가 시작되는 것으로 보아 *S. cerevisiae*는 사용 기질을 모두 *A. oryzae*에 의해 분해된 포도당에 의존하는 것을 알 수 있었다. *A. oryzae*는 전분 분해능이 발효 초기에(30시간) 왕성하므로 *S. cerevisiae*가 계속하여 에탄올을 생성하는데 적합한 미생물로 판정되므로 *S. cerevisiae*와의 혼합배양에 우수한 균으로 사용될 수 있다. 보통 탁주의 발효에 있어서 80 g/l 이상의 에탄올을 생산하는데까지는 72시간 이상이 소모되는데 발효 시간이 단축된 이유는 1차로 발효된 유청의 pH가 4.5 정도로 곰팡이와 효모가 성장하기 좋은 조건이므로, 전통적인 탁주 발효에서 배지의 pH를 저하시키기 위해 걸리는 유산균의 증식기간을 단축시켜 준 효과가 있기 때문이라고 생각된다. 1차로 발효된 유청내에 존재하는 약 1% 정도의 에탄올이 탁주 발효중의 곰팡이와 효모의 성장에 영향을 미치는가를 알아보기 위한 실험 결과에서(Fig. 10), *A. oryzae* KFCC

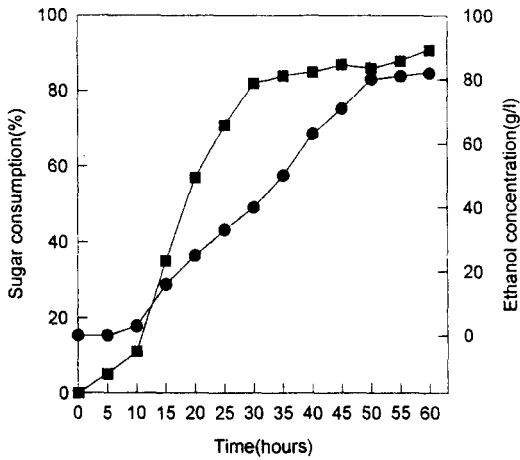


Fig. 9. Changes of sugar consumption and ethanol production by *A. oryzae* and *S. cerevisiae* at whey addition of 15% rice starch  
●—●, ethanol production; ■—■, sugar consumption

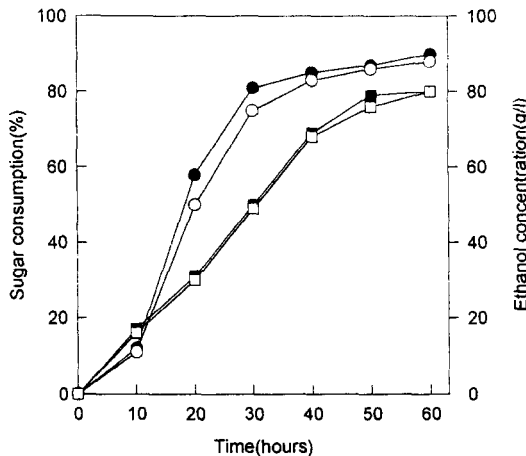


Fig. 10. Effect of ethanol inhibition on sugar consumption and ethanol production in Takju fermentation  
A: no ethanol  
B: ethanol existence  
●—●, sugar consumption(A); ○—○, sugar consumption(B); ■—■, ethanol production(A); □—□, ethanol production(B)

101의 당화도와 *S. cerevisiae*에 의한 에탄올 생산의 초기에 존재하는 1%의 에탄올은 거의 영향을 끼치지 않는 것을 알 수 있었다.

유청의 색소 제거

활성탄에 의한 유청내의 색소 제거시 온도에 따른 영향을 보면, 본 실험에 사용된 활성탄의 경우 상온에서 실시하는 경우보다는 고온에서 실시 하는것이 색소의 제거 효과가 우수한 것으로 나타났으나, 색소가 제거되

Table 2. Effect of color removal on temperature changes of activated carbon

Temperature (°C)	Riboflavin content (µg/g <sup>1</sup> )	Ethanol loss (%) <sup>2</sup>
room temperature	0.061	3.4
40	0.0072	19.6
50	0.0028	21.7
60	0.0023	22.6

<sup>1</sup>)means g of activated carbon

Total ethanol amount - ethanol amount

$$^2) = \frac{\text{lost by activated carbon}}{\text{Total ethanol amount}} \times 100$$

Table 3. Effect of color removal by additional amount of activated carbon

Additional amounts (%) <sup>3</sup>	Riboflavin content (µg/g <sup>1</sup> )	Ethanol loss (%) <sup>2</sup>
2	0.0072	3.4
3	0.0052	13.2
4	0.0016	22.6
5	not detected	23.8

<sup>1</sup>)means g of activated carbon

Total ethanol amount - ethanol amount

$$^2) = \frac{\text{lost by activated carbon}}{\text{Total ethanol amount}} \times 100$$

<sup>3</sup>)means activated carbon

면서 에탄올도 일부분이 동시에 제거되는 것을 알 수 있었다. Table 2에서처럼 50°C와 60°C에서의 실험 결과가 40°C에서의 실험 결과에 비하여 색소 제거에 있어서는 2.5배 이상, 상온에서의 결과보다는 20배 이상 우수하였으나, 활성탄에 색소와 함께 흡착되는 에탄올의 손실 면에서는 50°C와 60°C에서의 실험 결과가 21.7%와 22.6%로 상온에서의 3.4%에 비하여 약 7배 정도의 에탄올이 더 손실됨을 알 수 있었다. 또한 Table 3에서 처럼 첨가량에 의한 색소 제거 실험에서도 첨가량이 많을수록 색소의 제거 효과가 뛰어났으나, 에탄올 손실면에서 4%와 5%의 활성탄을 첨가하는 경우에는 3%의 경우에 비하여 약 2배, 그리고 2%의 첨가에 비하여 약 7배 정도의 에탄올 손실이 따르는 것으로 나타났다.

요 약

본 연구는 유청을 에탄올 발효에 이용하기 위하여 유청에 함유된 유당을 β-D-galactosidase로 가수분해한 후 *Saccharomyces cerevisiae*와 *Kluyveromyces fragilis*의 발효 조건을 비교하였으며, 효모의 특성인 pasteur effect를 이용하여 용존 산소의 조절에 의한 유청에서의 *K. fragilis*와 *S. cerevisiae*의 에탄올 발효 조건을 실험하였다. 또한 탁주의 제조에 에탄올 발효된 유청을 용수에

혼합, 응용하기 위한 최적 조건을 조사하였다.

pH 6.5로 조절된 유청에 0.7%(v/v)의  $\beta$ -D-galactosidase를 첨가하여 30분만에 93%의 유당이 가수분해되었다. 이를 배지로 이용하여 에탄올 발효한 결과 *S. cerevisiae*는 galactose를 이용하지 못하므로 에탄올 생산력이 *K. fragilis*에 비하여 낮았으나 glucose를 첨가한 배지에서는 *S. cerevisiae*의 에탄올 생산량이 *K. fragilis* 보다 증가하였다.

용존 산소를 조절하고 glucose를 첨가하여준 실험에서는 *K. fragilis*와 *S. cerevisiae*의 에탄올 생산량이 각각 18.9 g/l와 34.5 g/l로 에탄올 생산량이 11.8% 22.1% 증가하였다. 즉 용존산소를 조절한 조건에서는 *S. cerevisiae*의 에탄올 생산력이 더 우수하였다. 미분을 첨가한 에탄올 발효에서는 *Aspergillus oryzae*가 발효 60시간만에 80% 이상의 당화력을 보였으며, 이때 생산되는 에탄올의 양은 80.2 g/l였다.

## 문 헌

- Koskowsky, F.V.: Whey utilization and whey products. *J. Food Sci.*, **62**, 1149 (1979)
- Forsum, E. and Hambraeus, L.: Nutritional and biochemical studies of whey products. *J. Dairy Sci.*, **60**, 370 (1976)
- Coton, S.G.: Whey technology. *J. Soc. Dairy Technol.*, **33**, 89 (1980)
- Rogosa, M., Browne, H.H. and Whittier, E.O.: Ethylalcohol from whey. *J. Food Sci.*, **67**, 112 (1982)
- Flicknger, M.C. and Jansen, N.B.: Alcohol production from whey ultrafiltrate. *Biotech. Bioeng.*, **57**, 1277 (1980)
- O'leary, V.S., Green, G. and Holsinger, V.H.: Alcohol production by selected yeast strains in lactose-hydrolyzed acid whey. *Biotech. Bioeng.*, **54**, 1019 (1977)
- Zoo, S.L. and Woo, T.R.: Studies on the microflora of Tak-Ju brewing. *Kor. J. Microbial.*, **8**, 116 (1976)
- Deger, D. and Ashoor, S.H.: Light-induced changes in appearance, odor, and riboflavin content of cheese. *J. Dairy Sci.*, **70**, 1371 (1987)
- Application of Yeast Lactose-A Review. NOVO Enzyme Division Filw No. A 5489b-GB, Nov. (1979)
- Mahoney, R.P. and Whitaker, J.R.: Purification and physicochemical properties of  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. *J. Food Sci.*, **43**, 321 (1978)
- A.O.A.C.: Official Methods of Analysis, 14th, Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C. (1984)
- Nickeerson, T., Vujicic, A., I.F. and Lin, A.Y.: Colorimetric estimation of lactose and its hydrolytic products. *J. Food. Sci.*, **59**, 3 (1975)
- Ronald, M.A.: *Handbook of Microbiological Media*. CRC Press, Inc. p.1007. Boca Raton, Florida (1993)
- Eber, J.R. and Bunner, J.R.: Determination of lactose in milk products by HPLC. *J. Dairy Sci.*, **67**, 884 (1984)
- Jeon, I.J. and Manta, V.R.: High performance during  $\beta$ -D-galactosidase action on lactose. *J. Dairy Sci.*, **68**, 581 (1985)
- Tin, C.S.F. and Mawson, A.J.: Ethanol production from whey in membrane recycle bioreactor. *Process Biochem.*, **28**, 217 (1993)
- Janssens, J.H., Bernerd, A. and Bailey, R.B.: Ethanol from whey: Continuous fermentation with cell recycle. *Biotech. Bioeng.*, **26**, 1 (1984)

(1995년 7월 13일 접수)