

## 발포성 포도주의 생산에 고정화 효모의 이용

이용수 · 이건표 · 최진상\*

대선주조(주), \*진주산업대학교 식품가공학과

### Using of Immobilized Yeast Cells for the Production of Sparkling Wine

Yong-Soo Lee, Kyun-Pyo Lee and Jine-Shang Choi\*

Daesun Distilling Co. Ltd.

\*Department of Food Science and Technology, Chinju National University

#### Abstract

In order to investigate the possible application of immobilized yeast cells in sparkling wine production instead of riddling process by the traditional method, fermentation characteristics were tested during the sparkling wine fermentation in the bottle using immobilized yeast cells with alginate. The rates of sugar consumption and alcohol production were faster with free cells than those with immobilized cells during the fermentation. The higher concentration of yeast cells and the lower concentration of alginate in the cell immobilization resulted in the faster sugar consumption and alcohol production. It also resulted in the increase of yeast cell concentration released from immobilized beads during the fermentation. However, no differences were shown in the contents of alcohol, residual sugar and CO<sub>2</sub> pressure after fermentation. In case concentration of yeast cells released from immobilized beads during bottle fermentation, the higher concentration of alginate had and the lower had.

**Key words :** sparkling wine, bottle fermentation, immobilized yeast

#### 서 론

고정화기술은 생화학분야를 비롯하여 알코올의 생산, 폐수처리, 고분자 물질의 생산과 식품 및 음료산업에 응용 개발되고 있다(1,2). 미생물의 활력이나 특성에 positive 역할을 하거나 그 특성을 잃지 않게 하면서 미생물의 이동성을 제한하고 어느 한계를 벗어나지 않도록 하는 이러한 목적을 위하여 최근 미생물을 고정화시켜 발효시키는 bioreactor의 활용이 대두되고 있고, 이에 관한 많은 연구가 진행되고 있다(3~11). 특히 많은 연구성과를 나타낸 분야는 에탄올의 생산으로서, 에탄올 생산 효모인 *Saccharomyces cerevisiae* 세포를 고정화하여 연속적인 에탄올발효를

유도한 결과들(3), 효모세포를 고정화하여 에탄올을 생산하는 결과를 보고하였다(12). 고정화 효모를 이용한 bioreactor를 응용하여 백포도주를 생산하는 연구(5)와 고정화 효모를 이용하여 미당화액을 연속발효시켜 에탄올을 생산하는 결과를 보고하였다(13). 한편 포도주 생산시 malolactic 발효를 조절하는 연구와 malolactic 발효균과 효모를 동시에 고정화하여 발효를 조절하는 연구보문도 있다(14). 국내에서도 고정화에 관한 연구가 진행되어 왔는데, 고정화 효모를 충전한 관형발효기에서 기질을 연속발효시켜 에탄올을 생산하는 결과를 발표하였고(15,16), 미생물의 세포와 효소를 동시에 고정화하여 전분으로부터 에탄올을 생산하는 연구를 하였으며(17), *Leuconostoc oenos* 세포를 고정화하여 포도주의 산을 조절하는 연구결과를 보고하였다(18).

본 연구에서는 전통적인 발포성 포도주 생산에 반

Corresponding author : Jine-Shang Choi, Department of Food Science and Technology, Chinju National University, 150 Chilam-dong, Chinju-si, Gyeongnam 660-758, Korea

드시 필요한 riddling 공정을 제외할 목적으로 고정화 기술을 이용하여 alginate 농도별, 효모농도별, 균주별 발효속도 및 발효액중의 효모세포 농도 등을 측정하여 병발효에의 이용 가능성을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 재료

발포성 포도주의 제조에 사용한 기본 포도주는 chardonnay 40%, cheninblanc 20%, 9110 40%를 혼합하여 제조한 포도주를 0.45  $\mu\text{m}$  membrane filter로써 여과 후 사용하였으며, 사용한 포도주는 에탄올 10.7%, 총 산 6.40 g/L, pH 3.25, 총 페놀물질 278 mg/L, 휘발산 0.23 g/L의 화학적 조성을 가진 포도주였다. 병발효를 위해 사용한 균주는 *Saccharomyces cerevisiae* Stamm Wet 136과 *Saccharomyces bayanus* epemay를 사용하였으며, 효모를 고정화하기 위한 담체는 Sigma사의 sodium alginate를 사용하였다.

### 주모용 효모배양

주모의 제조는 사면배지에 배양하여 저장한 효모를 yeast extract 10 g/L, peptone 10 g/L, glucose 40 g/L를 함유한 배지(pH 4.5)에 접종시킨 다음 27°C에서 2일간 진탕배양하였다. 배양된 효모는 원심분리하여 상정액은 버리고 다시 멸균수로 2~3회 씻어 원심분리하여 free cells 발효와 고정화 발효를 위하여 사용하였다.

### 효모의 고정화

효모의 고정화는 원심분리 후 얻은 효모를 살균수와 1:4로 혼합하여 세포수가  $3 \times 10^8$  cells/g되게 하고, sodium alginate를 각각 2%, 3% 및 4%되게 첨가하였다. 효모농도에 따른 발효실험을 위하여 3% sodium alginate 용액에 각각 효모 수가  $3 \times 10^8$  cells/g,  $6 \times 10^8$  cells/g 및  $9 \times 10^8$  cells/g되게 첨가하여 균질하게 혼합하였다. 혼합된 alginate-yeast 용액은 기포를 제거한 후 0.5 M CaCl<sub>2</sub> 용액에 떨어뜨린 다음 1일간 유지한 후 고정화시켰으며, 고정화된 bead의 크기는 평균 3 mm 정도였다. 고정화된 효모는 다시 살균수로 5~6회 세척 후 발효에 사용하였다.

### 시료의 조제 및 분석

병발효 시료는 2.5%의 당을 첨가한 기본 포도주 750 mL를 가열살균(90°C, 30 min)된 750 mL용 내압 병에 넣고, 고정화 효모 bead를 각각 15 g씩 첨가하여 capping 후 15°C에서 발효시켰다. 또한 대조구로서

같은 포도주와 용기에 free cells을 고정화 효모의 효모 수와 같이 첨가하여 발효시켜 각각 5~10일 간격으로 시료를 채취하여 고정화 효모와 비교, 분석하였다.

발효중과 발효후의 환원당, 에탄올 및 CO<sub>2</sub> 압력 등은 Amerine과 Ough의 포도주 분석방법(19)에 준하였다.

### 효모수의 측정

발효액중의 효모 수는 haemocytometer와 현미경을 이용하여 10회 측정된 결과 중 최고와 최저값을 제외한 나머지를 평균하여 나타내었다.

## 결과 및 고찰

### Alginate 농도에 따른 발효속도

Alginate 농도별로 고정화시킨 효모를 첨가하여 발포성 포도주의 병발효를 수행한 결과 Fig. 1에서 보는 바와 같이 alginate 농도에 따라 발효속도에 영향을 주는 것으로 나타나 alginate 농도가 높을수록 초기 발효속도는 늦었으나 최종 에탄올의 생성량에는 거의 변화를 보이지 않았다. 초기 발효속도의 지연은 alginate beads의 막이 기질인 당과 산물의 투과속도에 영향을 미치기 때문으로 생각된다.

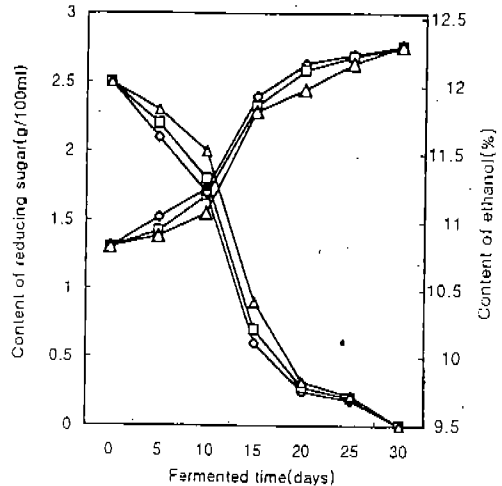


Fig. 1. The changes in contents of reducing sugar(A) and ethanol(B) produced during sparkling wine fermentation using immobilized cells with various alginate concentrations.

—◇—; 2% Alginate, —□—; 3% Alginate  
—△—; 4% Alginate.

효모농도에 따른 변화

Alginate에 효모 농도를 각각  $3 \times 10^8$  cells/g,  $6 \times 10^8$  cells/g 및  $9 \times 10^8$  cells/g을 첨가하여 고정화시킨 효모를 이용하여 병발효시킨 결과(Fig. 2), 첨가한 효모의 농도에 따라 발효속도에 약간의 차이를 보였다.  $9 \times 10^8$  cells/g을 첨가한 초기에 당의 소비가 급격하게 이루어져 발효 15일 경과 후 82%의 당을 소비하였고,  $3 \times 10^8$  cells/g과  $6 \times 10^8$  cells/g을 첨가하여 병발효시킨 시료에서 70~72%의 당을 소비하였으나 발효가 완료된 후 에탄올 생성량과 잔류당의 함량은 거의 차이를 보이지 않았다.

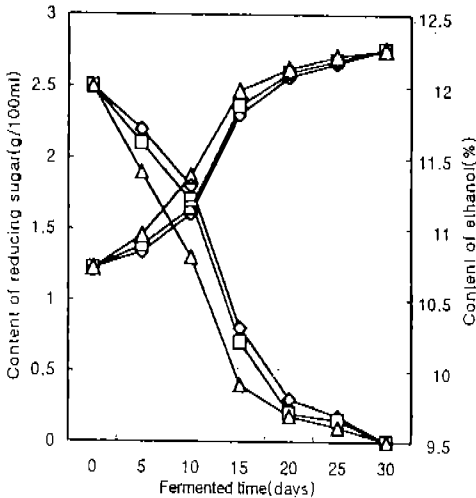


Fig. 2. The changes in reducing sugar(A) and ethanol(B) produced during sparkling wine fermentation using immobilized cells with various yeast concentrations in alginate bead.

—◇— ;  $3 \times 10^8$  cell/g, —□— ;  $6 \times 10^8$  cell/g  
—△— ;  $9 \times 10^8$  cell/g.

균주별 고정화 효모와 free yeast cells의 발효 속도

*Saccharomyces cerevisiae*와 *Saccharomyces bayanus* 균주의 고정화 효모와 free cells을 이용하여 각각의 발효속도를 비교한 결과 2가지 종류 모두 고정화 효모보다 free cells의 발효속도가 빠른 것으로 나타났다(Fig. 3). Free cells의 경우 고정화 효모와 비교하면 발효 10일 후 free cells을 이용하여 발효시켰을 때 *S. cerevisiae*의 경우 56%, *S. bayanus*의 경우 52%의 당을 소비한 반면, 고정화 효모를 사용한 경우 각각 30%와 26%의 당을 소비하여 free cells의 초기 발효

속도는 빠른 것으로 나타났지만, 발효가 완료된 후 에탄올 생성량과 잔류당의 함량은 큰 차이를 보이지 않았다.

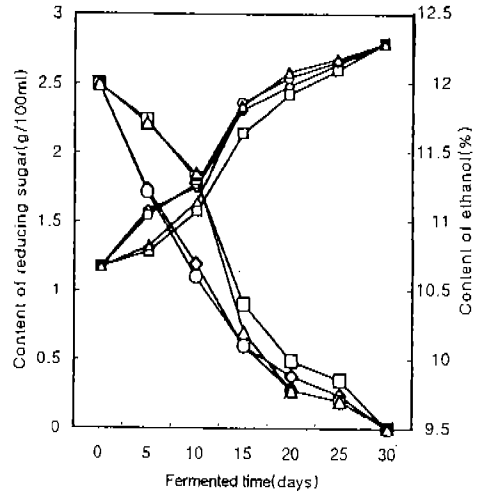


Fig. 3. The changes in contents of reducing sugar(A) and ethanol(B) produced during sparkling wine fermentation with immobilized yeast cells and free yeast cells.

—◇— ; Free cell of *Saccharomyces cerevisiae*  
—□— ; Immobilized cell of *Saccharomyces cerevisiae*  
—○— ; Free cell of *Saccharomyces bayanus*  
—△— ; Immobilized cell of *Saccharomyces bayanus*

한편, alginate 농도별로 고정화시킨 효모, 효모 농도별로 고정화시킨 효모 및 고정화 효모와 free cells을 이용하여 병발효를 완료시킨 후의 당함량, 에탄올 함량 및 CO<sub>2</sub> 생성 압력을 측정된 결과(Table 1)는 모든 시료에서 차이를 보이지 않았고, 발효율도 94.3~95.0% 범위로서 많은 차이는 보이지 않았으며, CO<sub>2</sub> 생성압력도 비슷한 결과였다. Williams와 Munnecke에 따르면 alginate 용액에 효모의 농도를 증가시키므로써 시간당 에탄올 생성량과 효모 cells당 시간당 에탄올의 생성량은 증가하는 반면, free cells의 경우는 감소하는 것으로 보고하였고, 초기 에탄올의 농도가 4~8% 함유한 경우는 에탄올에 의해 효모 cells의 성장과 시간당 에탄올의 생성율이 낮아지는 것으로 보고하였다(12). 또한, alginate gel에 고정화하여 연속적인 발효를 수행한 결과 glucose 1 g당 에탄올 0.446~0.485 g을 생산하여 이론적으로 에탄올의 수율이 92~95% 정도로 보고되었으나(15), 본 실험에서는 약간 높은 수율을 나타내었다.

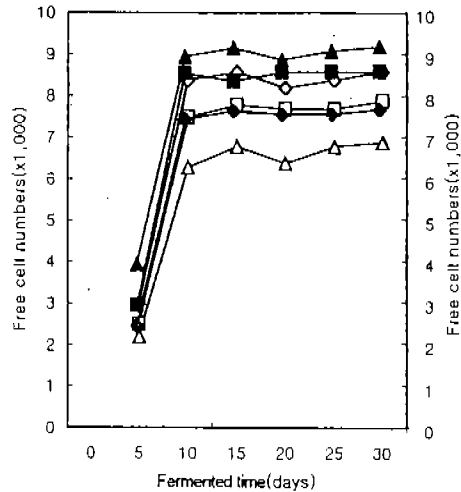
**Table 1. Reducing sugar, ethanol and CO<sub>2</sub> pressure of sparkling wine after bottle-fermentation**

Samples	Items	Reducing sugar (%)	Ethanol (%)	CO <sub>2</sub> pressure (kg/cm <sup>2</sup> at 10°C)
Immobilized cell	<i>Saccharomyces bayanus</i>	0.02	12.24	6.04
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0.02	12.24	6.04
Free cell	<i>Saccharomyces bayanus</i>	0.02	12.23	6.04
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0.02	12.23	6.05
Yeast cell number (×10 <sup>8</sup> cells/g)	3.0	0.02	12.24	6.04
	6.0	0.02	12.24	6.03
	9.0	0.02	12.24	6.05
Alginate concentration (%)	2.0	0.02	12.24	6.04
	3.0	0.02	12.24	6.04
	4.0	0.02	12.20	6.00

#### 발효중 free yeast cells의 변화

Alginate 농도별로 효모를 고정화하여 병발효시킴 발효기간별로 발효액중의 free cells의 농도를 측정 한 결과 Fig. 4에서 보는 바와 같이 발효가 시작된 후 10일이 경과한 후 최대의 농도를 보이고 10일 이후는 거의 변화가 없었다. 그러나 alginate 농도에 따라 고정화 bead에서 이탈된 free cells은 차이를 보여, alginate 농도가 4%에서는  $6.4 \times 10^3$  cells/mL, 3%에서는  $7.5 \times 10^3$  cells/mL, 그리고 2%에서는  $8.3 \times 10^3$  cells/mL의 cells 농도를 나타내었다. 효모 농도별로 각각 고정화한 bead를 사용하여 발효시킨 결과 병발효 중의 변화는 전자의 실험구와 비슷한 양상의 결과를 보였으나, 발효가 끝난 후 발효액중의 free cells 농도는  $3 \times 10^8$  cells/g의 경우  $7.5 \times 10^3$  cells/mL,  $6 \times 10^8$  cells/g의 경우  $8.5 \times 10^3$  cells/mL 및  $9 \times 10^8$  cells/g의 경우  $9.1 \times 10^3$  cells/mL의 농도를 보여(Fig. 4), alginate 농도와 효모농도에 따라 alginate 농도가 높을수록, 효모농도가 낮을수록 발효액중의 free cells의 농도가 낮아졌다. Ough와 Amerine은 정상적인 포도주스를 이용하여 발효시킬 경우 발효 중 효모의 증식은 발효 시작 후 1~2일 사이에 대부분 일어나며, 그 후 효모의 농도는 거의 일정하다고 하였다(20). 본 실험의 결과 효모농도는 발효 후 10일에 최대농도를 나타내었고, 그 후 거의 일정하게 유지되어 증식속도가 지연이 되었는데, 이는 발효액의 초기 에탄올의 농도가 10.7%로서 효모의 증식을 어느 정도 저해하였기 때문으로 생각된다. 고정화 효모 bead 중의 alginate 농도와 효모농도에 따라 발효 후 발효액중의 free cells

의 농도차이는 효모의 증식에 따른 alginate gel의 안정성에 관련되는 것으로 생각된다. Alginate의 농도가 높을수록 효모의 증식에 따른 bead 내부압력의 팽창력에 견디는 힘이 강하며, 고정화 bead 내에 효모의 농도가 높을수록 낮은 농도에 비하여 증식된 효모의 농도가 증가되어 bead의 alginate gel 막의 파괴가 쉬워지는 것으로 생각된다.



**Fig. 4. The changes in release yeast cells of alginate concentrations(A) and yeast cells concentrations(B) during sparkling wine fermentation.**

—◇—; 2% Alginate, —□—; 3% Alginate,  
—△—; 4% Alginate, —◆—;  $3 \times 10^8$  cells/g,  
—■—;  $6 \times 10^8$  cells/g, —▲—;  $9 \times 10^8$  cells/g.

#### 요 약

전통적인 생산방법을 이용하여 발포성 포도주생산에 필요한 riddling 공정을 제외할 목적으로 고정화 효모의 이용 가능성을 조사하기 위하여 yeast cells 농도별로 고정화한 효모와 alginate 농도별로 고정화한 효모를 이용하여 병발효중의 발효속도를 조사하였다. 병발효 중 당소비율과 에탄올 생성율은 free cells 실험구가 고정화 효모구보다 빨랐고, 고정화 효모중의 alginate 농도가 낮을수록 고정화 효모 중 yeast cells 농도가 높을수록 빨랐다. 그러나 발효가 완료된 후 에탄올의 함량, 잔류당 및 CO<sub>2</sub> 압력 등은 거의 차이가 없었다. 병발효 중 고정화 효모로부터 이탈된 yeast cells 농도는 고정화 효모중의 alginate 농도가 높을수록 yeast cells 농도가 낮을수록 적게 함유하였다.

## 참고문헌

1. Scott, C.D. (1987) Immobilized cells ; A review of recent literature. *Enzyme Microb. Technol.*, **9**, 66
2. Nunez, M.J. and Lema, J.W. (1987) Cells immobilization ; Application to alcohol production. *Enzyme Microb. Technol.*, **9**, 642
3. Tyagi, R.D. and Ghose, T.K. (1982). Studies on immobilized *Saccharomyces cerevisiae*. I. Analysis of continuous rapid ethanol fermentation in immobilized cells reactor. *Biotech. and Bioeng.*, **24**, 781
4. Parekh, S.R. and Wayman, M. (1987) Performance of a novel continuous dynamic immobilized cells bioreactor in ethanolic fermentation. *Enzyme Microb. Technol.*, **9**, 406
5. Shimobayashi, Y. and Tomanaga, K. (1986) Application of biotechnology on food industry(part I). Brewing of white wine by bioreactor. 北海道立工業試験場報告, No. 285
6. Fumi, M.D., Thioli, G., Colombi, M.G. and Colagrande, O. (1988) Immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* in calcium alginate gel and its application to bottle-fermented sparkling wine production. *Am. J. Enol. Vitic.*, **39**, 267
7. Doran, P.M. and Bailey, J.E. (1986) Effects of immobilization on growth fermentation properties and macromolecular composition of *Saccharomyces cerevisiae* attached to gelatin. *Biotech. and Bioeng.*, **23**, 73
8. Ray, D.K. and Labuza, T.P. (1981) Characterization of the effect of solutes on the water-binding and gel strength properties of carrageenan. *J. Food Science.*, **46**, 786
9. Black, G.M., Webb, C., Matthew, J.M. and Atkinson, B. (1984) Practical reactor systems for yeast cells immobilization using biomass support particles. *Biotech. and Bioeng.*, **24**, 134
10. Navaro, J.M. and Durond, G.D. (1977) Modification of yeast metabolism by immobilization into porous glass. *Eur. J. Appl. Microbiol.*, **4**, 243
11. Netto, C.B. and Goma, G. (1987) Communications to the editor. Ethanol fermentation by flocculent yeast : on the kinetics of biomass accumulation. *Biotech. and Bioeng.*, **30**, 328
12. Williams, D. and Munnecke, D.M. (1981) The production of ethanol by immobilized yeast cells. *Biotech. and Bioeng.*, **23**, 1813
13. Hirotsune, M., Nakada, F., Kamachi, M. and Honma, T. (1987) Continuous fermentation of saccharified rice solution using immobilized yeasts. *J. Brew. Soc. Japan*, **82**, 582
14. Mccord, J.D. and Ryu, D.Y. (1985) Development of malolactic fermentation process using immobilized whole cells and enzymes. *Am. J. Enol. Vitic.*, **36**, 214
15. 서근학, 최승호, 송승구 (1988) 고정화된 효모로 증진된 관형발효기에서의 에탄올 연속발효. 한국산업미생물학회지, **16**, 205
16. 류병호, 남기두 (1987) Continuous alcohol fermentation using immobilized growing yeast cells. 한국산업미생물학회지, **15**, 248
17. 김청호, 이균민, 한문희, 이상기 (1985) 동시 고정화된 amylogucosidase와 *Zymomonas mobilis*를 이용한 전분으로부터의 에탄올 생산. 한국산업미생물학회지, **15**, 430
18. 이수오, 박무영 (1980) 포도주 신맛 조절을 위한 *Leuconostoc oenos* 세포의 고정화. 한국식품과학회지, **12**, 299
19. Amerine, M.A. and Ough, C.S. (1980) Methods for analysis of musts and wine. *Wiley Inter. Science*
20. Ough, C.S. and Amerine, M.A. (1968) Continuous fermentation of grape juice. *Mitt. Rebe. Wein, Ser. A. (Kterneburg)*, **18**, 428

---

(1998년 3월 7일 접수)