

## 생전분 분해효소를 이용한 현미 알콜발효조건의 모니터링

이오석 · 정용진 · 하영득 · 김경은 · 신진숙 · 권훈 \*  
계명대학교 식품가공학과, \* 삼화식품(주)

### Monitoring of Alcohol Fermentation Condition with Brown Rice Using Raw Starch-Digesting Enzyme

Oh-Seuk Lee, Yong-Jin Jeong, Young-Duck Ha, Kyungeun Kim, Jin-Suk Shin and Hun Kwon\*

Department of Food Science and Technology, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

\* Samhwafoods Co., Ltd, Daegu 704-200, Korea

#### Abstract

This study was carried out to set up alcohol fermentation condition for uncooked brown rice. Response surface methodology(RSM) was applied to optimize and monitor of the alcohol fermentation condition with uncooked brown rice. The optimal yeast strain for fermentation of uncooked brown rice was *S. cerevisiae* GRJ. The polynomial equation for alcohol contents, brix, pH and total acidity showed 0.8828, 0.8409, 0.9431 and 0.9280 of  $R^2$ , respectively. Optimum range of uncooked alcohol fermentation for maximum alcohol contents were 0.34%(w/w) of enzyme concentration and 350%(v/w) of added water content, respectively. Predicted values at optimum alcohol fermentation condition agreed with experimental values.

**Key words** : uncooked fermentation, brown rice, alcohol, response surface

#### 서 론

전분질 원료를 사용한 알콜발효는 원료의 분쇄, 증자, 당화 및 발효과정으로 이루어진다. 이 때 증자과정은 전분을 호화시켜 효소분해 작용이 용이하게 하는 과정으로 알콜 생산에 필요한 에너지의 30~40%가 소비되는 것으로 알려져 있다(1). 당화는 원료전분의 구조, 전분의 종류, 액화-당화조건 및 액화-당화효소의 종류와 역가에 따라서 많은 차이가 있으며, 최근에 원료전분을 증자하지 않고 생전분을 그대로 발효에 이용하기 위한

많은 연구가 진행되어 왔다(2). 이러한 무증자 당화법은 증자에너지가 불필요하고, 증자하지 않음으로써 전분의 구조적 팽윤현상이 일어나지 않아 기질을 고농도로 첨가하여 당화시킬 수 있는 장점이 있을 뿐만 아니라 농축에 필요한 에너지를 절감할 수 있다. 무증자 당화법에는 생전분 분해력이 강한 효소를 이용한 효소분해법, 산·알칼리 처리로 전분 분자에 구조적 변화를 일으켜 당화시키는 화학적 방법과 효소처리법에 분쇄마찰매체를 함유한 bioreactor를 활용하는 방법 등이 있으나 산업적으로 실용화에는 분쇄 마찰계를 이용한 효소분해법이 많은 장점이 있는 것으로 알려져 있다(3).

우리나라의 주식인 쌀은 대부분이 전분질로 구성되어 있어 탁주, 약주, 소주, 증류주 등의 원료로 많이 사용되고 있다. 쌀은 도정정도에 따라 현미와 백미로 나눌

Corresponding author : Yong-Jin Jeong Department of Food Science and Technology, Keimyung University, Daegu 702-701, Korea  
E-mail : yjjeong@knu.ac.kr

수 있는데, 현미는 백미에 비해 영양성분 함량이 매우 높은 것으로 알려져 있다(4). 특히 현미 중에는 식이섬유, 칼슘, 철분 및 thiamin과 riboflavin 등의 비타민이 함유되어 있어서 동맥경화, 당뇨병 등 성인병 예방에 효과가 있는 기능성 식품으로써 그 활용가능성이 기대되고 있다(5). 최근에는 쌀에 항산화 및 간보호 활성(6)과 발암억제 효과(7), angiotensin I-converting enzyme(ACE) 저해(8), *Bifidobacterium* 증식촉진(9) 및 대식세포 자극기능(10) 등이 있다는 연구 결과가 발표되어 새롭게 주목받고 있다.

식생활의 발달과 더불어 식초는 단순 조미료 기능을 넘어서 건강보조 식품으로서 소비가 증가되고 있으며, 항균작용, 콜레스테롤 저하작용 및 체내 대사 조절기능을 비롯한 건강증진 효과가 보고되어 다양화 및 고급화되는 추세에 있다(11, 12). 식초제조방법은 과일 또는 전분을 원료로 사용하여 알콜발효한 후 초산발효과정을 거쳐 생산되거나, 주정을 회석하여 초산발효를 하면서 과즙을 첨가하여 생산하고 있다. 현재 현미식초는 증자한 후 발효제로써 누룩 등을 첨가하여 알콜발효를 한 다음 초산발효를 하는 2단계 과정으로 생산되고 있다(11). 그러므로 증자과정에서 생리활성을 나타내는 많은 성분들이 손실될 것으로 생각된다.

따라서 본 실험에서는 비열처리 무증자 생식초 생산을 위한 전단계로써 생전분 분해효소를 이용한 알콜발효조건을 모니터링하여 생식초 제조에 적합한 알콜발효조건을 확립키 위한 기초자료를 얻고자 한다.

## 재료 및 방법

### 재료

본 실험에 사용한 현미는 2000년 경북 상주에서 생산된 일반계 현미를 구입하여 수세 후 흐르는 물에 2시간 침지 후 부직포에 받쳐서 물기를 제거하고 blander mixer로 40mesh로 분쇄하여 시료로 사용하였다.

### 효소제 및 주모

생전분 분해효소제는 starch saccharifying enzyme(Daiwa kasei Co., Japan, Lot P8AB665)을 사용하였으며, 주모는 분쇄한 현미 100g에 수도물 200ml와 효소제를 0.2%(w/w) 첨가하여 50℃ 항온수조에서 24시간 50 rpm으로 속

로 진탕하면서 당화시킨 후 여과한 여액에 *S. cerevisiae GRJ*를 접종하고, 30℃에서 100 rpm의 속도로 진탕하면서 24시간 배양하였다. 본 발효에는 배양액 10%(v/v)를 각각 주모로 사용하였다.

### 균주의 선별

생전분 발효에 적합한 효모의 선별을 위하여 현미 분말 100g에 생전분 분해효소제 starch saccharifying enzyme 0.15%(w/w)와 수도물 200ml를 첨가한 후, 실험실에 보관중인 *S. cerevisiae* H9, *S. cerevisiae* GRJ, *S. cerevisiae* W, *S. cerevisiae* SP 및 *S. Kluyveri* DJ97 균주 배양액 10%(v/v)를 주모로 접종하여 30℃, 100rpm의 속도로 48시간 진탕배양한 후 알콜함량이 가장 높은 균주를 선별하였다.

### 담금방법 및 실험계획

현미분말 100g을 500ml 삼각플라스크에 넣고 Table 1과 같이 설정된 각각의 조건에 따라 *S. cerevisiae GRJ* 배양액 주모를 10%(v/v)로 접종하여 30℃에서 100rpm의 속도로 진탕하면서 48시간 동안 발효하였다. 정 등(13, 14)의 방법에 준하여 반응표면분석법(respose surface methodology, RSM)을 사용하였으며, 중심합성계획(central composite design)에 의한 요인(독립)변수(Xi)의 실험계획은 무증자 알콜발효조건에 중요한 요인변수로 고려되는 인자인 효소첨가량(0.1~0.5%, X<sub>1</sub>)과 가수량(100~500ml, X<sub>2</sub>)을 5단계로 부호화하고 중심합성계획에 따라 10구간으로 설정하여 무증자 알콜발효실험을 실시하였다. 그리고 반응변수(Yn)로는 알콜함량(Y<sub>1</sub>), 당도(Y<sub>2</sub>), pH(Y<sub>3</sub>), 총산(Y<sub>4</sub>)의 회귀분석을 실시하였다. 회귀분석에 의한 예측은 SAS(statistical analysis system) program을 이용하였고(15), 회귀분석 결과 임계점(critical point)이 최대점(maximum)이거나 최소점(minimum)이 아니고 안장점일 경우에는 능선분석을 하여 최대점을 구하였다. 각각의 시료는 발효 후 가수량을 500ml로 동일하게 fill up하여 whatman No. 4에 여과한 후 여액을 분석하였다.

### 일반성분 분석

알콜함량 측정은 여과액을 증류하여 alcohol hydrometer로 측정된 값을 Gay Luccac Table로 환산하여 계산하였으며(12), 당도는 굴절당도계(N1 Atago Ca., Japan)로 측

정하였다. pH는 pH meter(Metrohm 691, Swiss)를 사용하여 측정하였으며, 총산은 0.1N NaOH용액으로 중화적정하여 초산함량으로 환산하였다(16).

#### 알콜발효조건 예측값 분석

최적 알콜발효조건 예측은 일반성분에 대한 contour map을 superimposing하였을 때 중복되는 부분의 범위에서 예측하였다. 또한 예측된 범위에서 임의의 조건을 설정하여 회귀식에 대입한 후, 그 예측된 최적값에 대하여 실증실험을 실시하였다.

Table 1. Central composite design for the optimization

| Experimental number <sup>1)</sup> | Enzyme content(%) | Added water content(%) |
|-----------------------------------|-------------------|------------------------|
| 1                                 | 0.2 (-1)          | 200 (-1)               |
| 2                                 | 0.4 (+1)          | 200 (-1)               |
| 3                                 | 0.2 (-1)          | 400 (+1)               |
| 4                                 | 0.4 (+1)          | 400 (+1)               |
| 5                                 | 0.3 (0)           | 300 (0)                |
| 6                                 | 0.3 (0)           | 300 (0)                |
| 7                                 | 0.5 (+2)          | 300 (0)                |
| 8                                 | 0.1 (-2)          | 300 (0)                |
| 9                                 | 0.3 (0)           | 500 (+2)               |
| 10                                | 0.3 (0)           | 100 (-2)               |

<sup>1)</sup>The number of experimental conditions by central composite design.

## 결과 및 고찰

#### 균주선발

무증자 현미 알콜발효에 적합한 균주를 선발하기 위하여 분쇄한 현미 생시료에 *S. cerevisiae* H9, *S. cerevisiae* GRJ, *S. cerevisiae* W, *S. cerevisiae* SP 및 *S. Kluyveri* DJ97 5종의 효모를 접종하여 알콜함량을 비교한 결과는 Table 2와 같다. 알콜발효 후 알콜함량은 각각 12.3, 15.8, 14.1, 14.9 및 15.4%로 전반적으로 높게 나타났으나, *S. cerevisiae* GRJ가 15.8%로 가장 높아 최종 선발하였다. 이상의 결과는 김 등(17)의 흑미를 이용한 무증자 유색주 제조 결과의 2일째 알콜함량과 유사한 수준으로 균주에 따른 알콜함량 차이는 크지 않은 것으로 생각된다.

Table 2. Comparison of alcohol content by different strains

| Strains                  | Alcohol content(%) |
|--------------------------|--------------------|
| <i>S. cerevisiae</i> H9  | 12.3               |
| <i>S. cerevisiae</i> GRJ | 15.8               |
| <i>S. cerevisiae</i> W   | 14.1               |
| <i>S. cerevisiae</i> SP  | 14.9               |
| <i>S. Kluyveri</i> DJ97  | 15.4               |

#### 일반성분 변화 모니터링

중심합성계획에 의한 알콜발효 조건에 따른 알콜함량 ( $Y_1$ )은 Table 3에 나타내었고, 결과에 대한 반응표면 회귀식은 아래와 같다.

$$Y_{\text{Alcohol content}} = -1.571429 + 9.428571X_1 + 0.039262X_2 - 5.714286X_1^2 - 0.012500X_1X_2 - 0.000048214X_2^2$$

알콜함량에 대한 회귀식의  $R^2$ 는 0.8828이고 유의성은 10%이내의 수준에서 인정되었다. 예측된 정상점(station point)은 최대점이고 이때 최대 알콜함량은 7.38%로 예측되었으며, 이 예측된 알콜함량을 얻을 수 있는 발효 조건(요인변수)들은 효소제 함량 0.44%, 가수량 349.81ml 이었다(Table 4). Fig. 1에서 보는 바와 같이 알콜함량의 contour map을 분석한 결과, 효소제 첨가량 0.3%이상과 가수량 320~400ml 범위에서 알콜함량이 증가하는 경향을 볼 수 있었다. 이 결과는 이 등(2)의 무증자 전분 당화에 이용한 glucoamylase의 농도가 높을수록 당화력이 증가한다는 보고와 유사하였으나 최적농도가 1%보다는 훨씬 낮은 0.44%에서 가장 당화력이 우수하여 무증자 알콜발효에 필요한 환원당 생성이 가능하였다. 그러나 효소제의 역가 또는 발효조건에 따른 차이는 있을 것으로 생각된다. 발효조건에 따른 당도에 대한 contour map은 Fig. 2와 같고 이때 회귀식은 다음과 같다.

$$Y_{\text{Brix}} = 0.985714 + 8.744048X_1 + 0.010327X_2 - 6.517857X_1^2 - 0.012500X_1X_2 - 0.000010268X_2^2$$

Table 4에서와 같이 당도의 회귀식의  $R^2$ 는 0.8409이었고 10%이내 수준에서 유의성이 인정되었다. 최적 알콜 발효를 위한 예측조건은 효소제 함량 0.45%, 가수량 227.23ml이었고 이때 예측된 정상점(station point)은 최대점이었다.

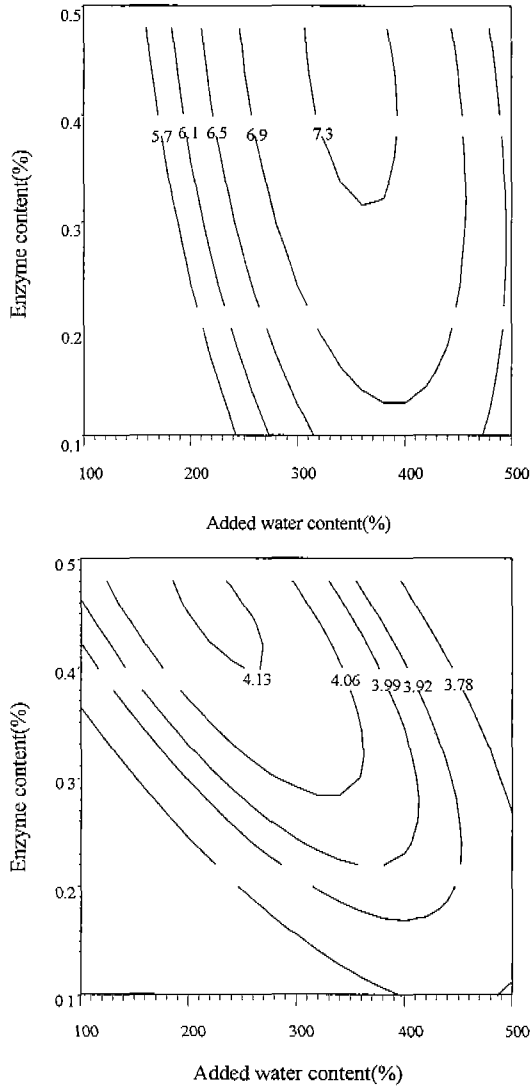


Fig. 1. Contour map for the effects of alcohol fermentation conditions of brown rice on alcohol content(top) and brix(bottom).

각 조건의 알콜발효에서 pH( $Y_3$ )와 총산( $Y_4$ )은 Table 3에 나타내었다. 그리고 최적 알콜발효조건과 contour map은 Table 4와 Fig. 3, 4에 각각 나타내었으며, 이들의 회귀식은 다음과 같다.

$$Y_{pH} = 5.118571 + 0.911905X_1 - 0.006705X_2 + 6.285714X_1^2 - 0.011750X_1X_2 + 0.000014536X_2^2$$

$$Y_{Total\ acidity} = -0.245714 + 2.105952X_1 + 0.002306X_2 - 4.732143X_1^2 + 0.002500X_1X_2 - 0.000004982X_2^2$$

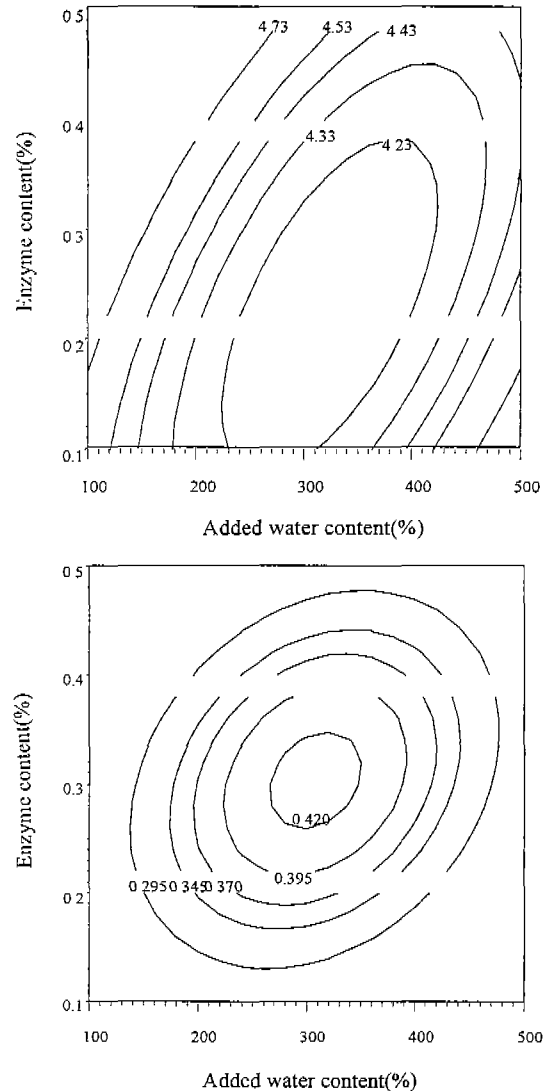


Fig. 2. Contour map for the effects of alcohol fermentation conditions of brown rice on pH(top) and total acidity(bottom).

pH와 총산에 대한 회귀식의  $R^2$ 는 0.9431, 0.9280이었고 유의성은 5%이내 수준에서 인정되었다. pH와 총산의 예측된 정상점은 각각 최소점과 최대점이었고 이때 예측된 알콜발효조건은 Table 4에 나타내었다.

Glucosylase의 당화력과 알콜발효에 미치는 pH의 영향과 알콜 발효과정에서 산패 정도를 알 수 있는 총산의 변화를 조사한 결과, pH는 4.2~4.3의 범위였으며, 총산 0.37~0.42 범위였다. 이때의 알콜생성이 가장 높았으므로 전분 당화력과 *S. cerevisiae*의 환원당 이용률

이 높은 것으로 생각되었으며, 알콜발효과정에서 산패 현상은 나타나지 않았다. 이상의 결과는 이 등(2)의 무증자 전분의 당화에서 glucoamylase의 최적 pH 3.5와는 다소 차이가 있었으며, 김 등(17)의 흑미를 이용한 무증자 실험의 2-3일차 결과 및 오 등(18)의 쌀보리의 무증자 알콜 발효에서 효모의 이용율이 pH 4.3에서 양호하다는 것과 유사한 결과를 얻을 수 있었다.

Table 3. Experimental data on alcohol contents, brix, pH and total acidity of alcohol fermentation of brown rice under different conditions based on central composition design for response surface analysis

| Experimental number <sup>1)</sup> | Alcohol content(%) | °Brix | pH   | Total acidity |
|-----------------------------------|--------------------|-------|------|---------------|
| 1                                 | 6.2                | 3.7   | 4.29 | 0.33          |
| 2                                 | 6.7                | 4.2   | 4.68 | 0.31          |
| 3                                 | 6.9                | 3.9   | 4.28 | 0.30          |
| 4                                 | 6.9                | 3.9   | 4.20 | 0.38          |
| 5                                 | 6.8                | 4.2   | 4.13 | 0.47          |
| 6                                 | 7.0                | 3.9   | 4.35 | 0.39          |
| 7                                 | 7.3                | 4.0   | 4.74 | 0.23          |
| 8                                 | 6.2                | 3.6   | 4.20 | 0.25          |
| 9                                 | 6.8                | 3.8   | 4.47 | 0.24          |
| 10                                | 3.3                | 3.5   | 5.13 | 0.22          |

<sup>1)</sup> The number of experimental conditions by central composite design

Table 4. Predicted levels of alcohol fermentation conditions for the maximum responses of alcohol contents, brix, pH and total acidity by the ridge analysis

| Responses          | R <sup>2</sup> | Prob>F | X <sub>1</sub><br>(enzyme content) | X <sub>2</sub><br>(added water content) | Maximum | Molpogy |
|--------------------|----------------|--------|------------------------------------|---|---------|---------|
| Alcohol content(%) | 0.8828         | 0.0532 | 0.44                               | 349.81                                  | 7.38    | max.    |
| °Brix              | 0.8409         | 0.0937 | 0.45                               | 227.23                                  | 4.14    | max.    |
| pH                 | 0.9431         | 0.0133 | 0.23                               | 323.53                                  | 4.14    | min.    |
| Total acidity      | 0.9280         | 0.0211 | 0.30                               | 307.64                                  | 0.43    | max.    |

알콜발효조건 설정

현미를 이용한 무증자 알콜발효조건을 최적화를 위하여 알콜 발효조건별 알콜함량(Y<sub>1</sub>), 당도(Y<sub>2</sub>), pH(Y<sub>3</sub>) 및 총산(Y<sub>4</sub>)에 대한 contour maps을 superimposing하여 최적

알콜 발효조건 범위를 예측하였다. Fig. 3와 같이 알콜 함량, 당도, pH 그리고 총산을 모두 만족시키는 독립변수의 범위는 효소제 함량 0.315~0.380%. 가수량 330~363ml이었다.

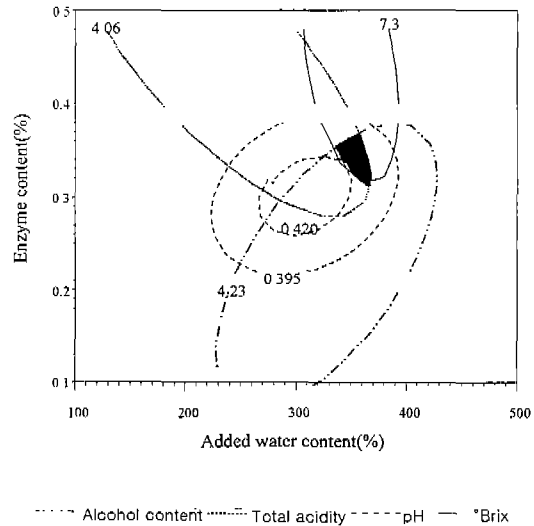


Fig. 3. Superimposed contour map of optimized conditions for alcohol content, brix, pH and total acidity for alcohol fermentation of brown rice.

알콜발효 일반성분들의 contour map를 superimposing 하여 얻은 최적예측조건 범위중 임의의 알콜발효 조건은 효소제 함량 0.34%, 가수량 350(v/w)으로 설정하여 실제 알콜발효한 결과는 Table 5와 같았다. 알콜함량과 당도는 RSM기법에 의해 예측된 값과 유사한 값을 나타내어 도출된 회귀식의 신뢰성을 검증할 수 있었다.

이상의 결과로 생전분 분해효소를 이용한 식초생산 전단계의 알콜발효조건을 설정할 수 있었다. 그러나 scale-up에 따른 담금조건별 성분변화 등에 관한 많은 연구가 필요 할 것으로 생각된다.

Table 5. Comparison between predicted and observed values of alcohol content and brix at the given condition within the range of optimum conditions

| Optimum conditions |                           | Alcohol content(%) |          | °Brix     |          |
|--------------------|---------------------------|--------------------|----------|-----------|----------|
| Enzyme content (%) | Added water content (v/w) | Predicted          | Observed | Predicted | Observed |
| 0.34               | 350                       | 7.32               | 7.25     | 4.07      | 4.15     |

## 요 약

본 연구에서는 현미의 무증자 알콜발효조건을 설정하고자 반응표면분석으로 알콜발효조건을 모니터링하였다. 그 결과 무증자 알콜발효에 적합한 *S. cerevisiae* GRJ를 선발할 수 있었다. 알콜함량, brix, pH 및 총산에 대한 회귀식의  $R^2$ 는 각각 0.8828, 0.8409, 0.9431 및 0.9280이었다. 무증자 알콜발효에서 알콜함량의 최대치는 효소제 함량 0.34%(w/w) 및 가수량 350(v/w)의 범위에서 얻을 수 있었다. 최적조건에서 실제 실험값과 예측값들은 유사한 경향을 나타내었다.

## 감사의 글

본 연구는 계명대학교 전통미생물자원개발 및 산업화 연구센터(RRC)의 연구비 지원에 의하여 수행된 연구결과물의 일부이며, 연구비 지원에 감사드립니다.

## 참고문헌

1. Park K.H., OH, B.H. and Lee, K.H. (1984) Production of alcohol from starch without cooking: A chemical gelatinization method. *J. Korean Agric. Chem. Soc.*, 27, 52-54
2. Lee, S.Y., Shin, Y.C., Lee, S.H., Park, S.S., Kim H.S. and Byun S.M. (1984) Saccharification of uncooked Starch. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 16, 463-471
3. Lee, Y.H. and Park J.S. (1989) Evaluation of operational conditions and power consumption of a bioreactor for enzymatic saccharification of uncooked starch. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, 17, 349-357
4. Lee, C.H. (1998) Functional properties of brown rice. *Bulletin of Food Tech.*, 11, 3-6
5. Lee, W. J. and Kim, S.S. (1998) Preparation of sikhe with brown rice. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 30, 146-150
6. Kwak, T.S., Park, H.J., Jung, W.T. and Choi, J.W. (1999) Antioxidative and hepatoprotective activity of coloured- scented and Korean native rice varieties based on different layers. *J. Korean Soc. Food. Sci. Nutr.*, 28, 191-198
7. Nam, S.H. and Kang, M.Y. (1997) In vitro Inhibitory effect of colored rice bran extracts carcinogenicity. *Agric. Chem. Biotech.*, 40, 307-312
8. 村元學, 河村達雄 (1991) 米タンパク質と米タンパク由來の抗血壓上昇性(アンギオテンシン變換酵素阻害)ペプチド. *日本食品工業*, 18,
9. Hosoyama, H., Oosawa, M., and Hamano, M. (1991) *Bifidobacterium* growth promoting substance in rice bran koji extract. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi.*, 38, 940-942
10. Miwa, M., Kong, Z.L., Shinohara, K. and Watanabe, M. (1990) Macrophage stimulating activity of foods. *Agric. Biol. Chem.*, 54, 1863-1865
11. Jeong, Y.J., Seo, J.H., Jung, S.H., Shin, S.R. and Kim, K.S. (1998) The quality comparison of uncleaned rice vinegar by two stages fermentation with commercial uncleaned rice vinegar. *Korean J. Postharvest Sci. Technol.*, 5, 374-379
12. Jeong, Y.J., Seo, J.H., Lee, G.D., Park, N.Y., and Choi, T.H. (1999) The quality comparison of apple vinegar by two stages fermentation with commercial apple vinegar. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 28, 353-358
13. Lee, G.D., Kim, J.S. and Kwon, J.H. (1996) Monitoring of dynamic changes in mailard reaction substrate by response surface methodology. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 28, 212-219
14. Floros, J.S. and Chimman, M.S. (1987) Optimization of pimento pepper lyepeeling process using response surface methodology. *Trans of ASAE.*, 30, 560-566
15. SAS (1990) SAS/STAT User's guide version 6. 4th ed., SAS institute Inc., 2. 1457
16. Jeong, Y.J., Seo, K.I. and Kim, K.S. (1996) Physicochemical properties of marketing and intensive persimmon vinegar. *J. East Asian Soc. Dietary Life*, 6, 355-363
17. Kim, S.D., Kim, M.H. and Ham, S.S. (2000) Preparation and quality of uncooked-colored wine using black rice. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 29, 224-230

18. Oh, S.H., Kwon, H.J. and O P.S. (1987) Screening of a potent, raw naked barley saccharifying enzyme producer and its application on the uncooked alcohol fermentation. *Kor. J. Appl. Micorbiol. Bioeng.*, 15, 408-413
- 

(접수 2001년 9월 5일)