

생전분 분해효소를 이용한 옥수수 알콜발효조건의 모니터링

정용진 · 김경은 · 신진숙 · 조혜심 · 이오석*

계명대학교 식품가공학과, *계명대학교 전통미생물자원 개발 및 산업화센터

Monitoring of Alcohol Fermentation Condition of Corn Using Raw Starch Enzyme

Yong-Jin Jeong, Kyungeun Kim, Jin-Suk Shin, Hye-Sim Jo and *Oh-Seuk Lee

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

*Traditional Microorganism Resources Center, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

Abstract

This study was carried out to set up alcohol fermentation condition for uncooked corn. Response surface methodology(RSM) was applied to optimize and monitor the alcohol fermentation condition with uncooked corn. The optimal yeast strain for fermentation of uncooked corn was *Saccharomyces cerevisiae* GRJ. The polynomial equation for alcohol contents, brix, pH and total acidity showed 0.8852, 0.9202, 0.8806 and 0.9940 of R², respectively. The optimal condition for maximum alcohol contents were 0.18% (w/w) of enzyme concentration and 180% (v/w) of added water content. Predicted values at optimum alcohol fermentation condition agreed with experimental value.

Key words : corn, uncooked fermentation, alcohol fermentation, response surface

서 론

옥수수는 세계적으로 중요한 식량작물 중의 하나이며 국내에서는 전분함량이 높아서 대부분 전분 생산 원료로 사용되고 있으며 국내에서는 식용 옥수수 일부 제외하고 전량 수입되어 사료용, 가공용 및 공업용 등의 다양한 용도로 이용되고 있으며 국내 수입곡물 중 1위를 차지하고 있다(1). 옥수수는 70% 이상의 전분을 함유하고 있어 전분을 생산할 수 있는 중요한 자원이고 가격도 저렴할 뿐만 아니라(2), 안정적으로 공급이 가능하여 전분의 주요 소재로 널리 이용되고 있다. 옥수수 전분은 물엿, 포도당 등 전분당의 제조원료, 각종 식품의 점조제, 제지공업에서의 sizing제 및 coating제 등에 널리 사용되고 있을 뿐만 아니라(3) 알콜발효 후 식초제조에 원료로 사용되고 있다.

최근 식초는 단순 조미료 기능과 더불어 항균작용, 콜레스테롤 저하작용 및 체내 대사 조절기능을 비롯한 건강증진 효과가 보고되어 다양화 및 고급화되는 추세에 있다(4,5). 현재 식초는 전분질 원료의 분쇄, 증자, 당화 및 발효과정을 통해서 제조되고 있으며, 이때 많은 에너지를 사용하게 된다(6,7). 특히 전체 공정에 필요한 에너지의 30~40%가 증자

과정에 소요되고, 증자과정에서 많은 열을 받음으로써 생리활성을 나타내는 많은 성분들이 손실될 가능성이 크다. 최근 증자과정을 거치지 않고 생전분 분해효소를 이용하여 현미 알콜발효조건(7), 정 등(8)은 타피오카의 알콜발효특성에 관하여 보고 하였으며 koji를 이용하여 무증자 알콜발효에 관한 연구가 보고 되고 있다. 무증자 알콜발효는 방법은 제조공정을 단순화하고, 증자에 따른 에너지의 절감 효과를 얻을 수 있을 뿐만 아니라 옥수수에 존재하는 열에 불안정한 효소, 단백질 및 비타민류 등의 변성 및 파괴를 최소화할 수 있는 생전분 분해효소법이 많은 주목을 받고 있다(7-9). 우리나라의 농가에서는 식용으로 옥수수를 재배하여 간식용 등으로 이용하고 있으며 산업적으로 이용되고 있는 옥수수는 전량 수입하고 있는 실정으로 껍질이 얇고 찰기가 있는 농가에서 재배된 옥수수의 활용 방안이 요구된다.

따라서 본 실험에서는 비열처리 무증자 옥수수 생식초를 생산하기 위한 전단계로서 생전분 분해효소를 이용한 알콜 발효조건을 모니터링하여 알콜발효 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용한 옥수수는 2000년 경북 영천에서 생산된

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

옥수수를 구입하여 수세 후 물기를 제거하고 blander mixer 를 사용하여 40mesh로 분쇄한 후 시료로 사용하였다.

효소제 및 주모

무증자 효소제는 starch saccharifying enzyme(Daiwa kasei Co., Japan, Lot P8AB665)를 이용하였으며, 주모는 분쇄한 옥수수 100g에 수돗물 200ml와 효소제 0.15%(w/w)를 첨가하여 50℃ 항온수조에서 4시간 동안 100rpm으로 속도로 진탕하면서 당화시킨 후 여과한 여액에 *Saccharomyces cerevisiae* GRJ를 접종하고, 30℃에서 100rpm의 속도로 진탕하면서 24시간 배양하였다. 배양액 10%(v/v)를 본 발효의 주모로 사용하였다.

균주의 선발

옥수수 생전분 알콜발효에 적합한 효모를 선발하기 위하여 옥수수 분말 100g에 생전분 분해효소제 0.15%(w/w)와 수돗물 200ml를 첨가한 후 실험실에 보관중인 *Saccharomyces cerevisiae* H9, *S. cerevisiae* GRJ, *S. cerevisiae* W, *S. cerevisiae* SP, *S. Kluyveri* DJ97의 배양액 10%(v/v)를 주모로 접종하여 30℃에서 100rpm의 속도로 진탕하면서 48시간 발효를 시킨 다음 알콜함량이 가장 높은 균주를 선발하였다.

담금방법 및 실험계획

옥수수분말 100g을 500ml 삼각플라스크에 넣고 설정된 각각의 조건에 따라 *S. cerevisiae* GRJ 배양액 주모를 10%(v/v)으로 접종하여 30℃에서 100rpm의 속도로 진탕하면서 48시간 동안 발효하였다. 정 등(4,5)의 방법에 준하여 반응표면분석법(respose surface methodology, RSM)을 사용하였으며 중심합성계획(central composite design)에 의한 요인(독립)변수(Xi)의 실험계획은 옥수수 무증자 알콜발효조건에 중요한 요인변수로 고려되는 인자, 즉 효소첨가량(0.05~0.25%, X1), 가수량(100~300%, X2)을 5단계로 부호화하고 중심합성계획에 따라 10구간으로 설정하여 옥수수 무증자 알콜발효실험을 실시하였다(10,11). 그리고 반응변수(Yn)는 알콜함량(Y1), 당도(Y2), pH(Y3), 총산(Y4)으로 회귀분석을 실시하였다. SAS(statistical analysis system) program을 이용하여 회귀분석에 의한 예측을 하였고(12), 회귀분석 결과 임계점(critical point)이 최대점(maximum)이거나 최소점(minimum)이 아니고 안장점일 경우에는 능선분석을 하여 최대점을 구하였다. 분석에 사용한 시료는 발효가 종료된 후 가수하여 300ml로 동일하게 fill up하여 whatman No. 4여과지로 여과한 후 그 여액을 사용하였다.

일반성분 분석

발효액의 알콜함량은 발효액을 여과한 후 증류하여 alcohol hydrometer로 측정된 값을 Gay Luccac Table로 환산하여 계산하였으며(4,5), 당도는 굴절당도계(N1 Atago Ca., Japan)를

이용하여 측정하였다. pH는 pH meter(Metrohm 691, Swiss)를 사용하여 측정하였으며 총산은 0.1N NaOH용액으로 중화적정하여 초산함량으로 환산하였다(13).

알콜발효조건 예측값 분석

옥수수 무증자 최적 알콜발효조건 예측은 일반성분에 대한 contour map을 superimposing하였을 때 중복되는 부분의 범위를 이용하여 예측하였으며, 예측된 범위중에서 임의의 조건을 설정하여 회귀식에 대입한 후 그 예측된 최적값에 이용하여 실증실험을 실시하였다.

결과 및 고찰

균주의 선발

무증자 옥수수 알콜발효에 적합한 균주를 선발하기 위하여 분쇄한 옥수수분말에 5종의 효모를 접종하여 발효한 다음 생성된 알콜을 함량을 비교한 결과는 Table 1과 같다. 무증자 효소를 이용한 알콜발효 후 생성된 알콜함량은 *Saccharomyces cerevisiae* GRJ가 13.3%로 가장 높았으며, *S. Kluyveri* DJ97는 12.4%, *S. cerevisiae* W는 11.8%, *S. cerevisiae* SP가 11.3%이었으며, *S. cerevisiae* H9가 11.1%로 가장 낮았다. 이러한 결과는 이 등(7)이 보고한 현미 무증자의 발효에 *S. cerevisiae* GRJ가 가장 많은 알콜을 생산한다는 사실과 같은 경향이었으나 알콜생산 함량에서는 상당한 차이가 있었다. 이러한 결과는 옥수수 전분과 현미전분의 아밀로스 함량 및 전분의 구조적인 차이에서 비롯된 것으로 생각된다.

Table 1. Comparison of brix, pH, total acidity and alcohol content by different strains

Strains	Brix	pH	Total acidity	Alcohol content(%)
<i>S. cerevisiae</i> H9	7.2	4.27	0.36	11.1
<i>S. cerevisiae</i> GRJ	8.4	4.36	0.57	13.3
<i>S. cerevisiae</i> W	8.4	4.35	0.54	11.8
<i>S. cerevisiae</i> SP	7.8	4.26	0.48	11.3
<i>S. Kluyveri</i> DJ97	8.2	4.21	0.66	12.4

일반성분 변화 모니터링

중심합성계획에 따른 알콜발효 조건별 생성된 알콜함량(Y1)은 Table 2에 나타내었고, 그 결과를 이용한 반응표면 회귀식은 아래와 같다.

$$\begin{aligned}
 Y_{\text{Alcohol content}} = & - 16.088988 + 99.392857X1 + 0.155190X2 \\
 & - 234.642857X12 - 0.080000X1X2 \\
 & - 0.000320X22 - 1.571429 + 9.428571X1 + \\
 & 0.039262X2
 \end{aligned}$$

Table 2. Experimental data on brix, pH, total acidity and alcohol content of alcohol fermentation of raw corn powder under different conditions based on central composite design for response surface analysis

Experimental number ¹⁾	Alcohol content (%)	Brix	pH	Total acidity
1	7.1	5.6	4.47	0.42
2	7.7	6.0	4.11	0.48
3	9.1	6.2	4.46	0.36
4	8.9	6.1	4.14	0.48
5	9.3	6.4	4.25	0.42
6	9.1	6.2	4.30	0.42
7	8.1	6.0	4.30	0.42
8	5.8	5.3	4.19	0.54
9	8.3	5.6	3.97	0.54
10	3.9	5.9	4.34	0.42

1) The number of experimental conditions by central composite design.

알콜함량에 대한 회귀식의 R2는 0.8852이고 유의성은 10% 이내의 수준에서 인정되었다(Table 3). 예측된 정상점(station point)은 최대점이고 이때 최대 알콜함량은 9.71%로 예측되었으며, 이 예측된 알콜함량을 얻을 수 있는 발효조건(요인변수)들은 효소제 함량 0.17%, 가수량 221%(w/v)이었다(Table 3). Fig. 1에서 보는 바와 같이 알콜함량의 contour map을 분석한 결과, 효소제 첨가량은 0.15%이상에서 가수량은 150~230% (w/v) 범위에서 알콜함량이 증가하는 경향을 볼 수 있었다. 이러한 결과는 glucoamylase 농도가 높을수록 당화력이 증가한다는 측면에서는 이 등(7)과 이 등(14)의 연구결과와 유사하였으나 무증자 알콜발효에 최적효소농도가 각각 1%, 0.44%인 결과보다는 훨씬 낮은 0.17%인 것으로 조사되었다. 이러한 차이는 효소제와 발효조건에 따른 차이 및 사용원료 전분의 구조적인 차이에서 발생하는 것으로 생각된다.

발효조건에 따른 당도에 대한 contour map은 Fig. 1과 같고 이때 회귀식은 다음과 같다.

$$Y_{Brix} = 0.742857 + 32.785714X_1 + 0.028714X_2 - 64.285714X_{12} - 0.050000X_1X_2 - 0.000054286X_2^2$$

Table 3. Predicted levels of alcohol fermentation conditions for the maximum responses of brix, pH, total acidity and alcohol content by the ridge analysis

Responses	R ²	Prob>F	X ₁	X ₂	Maximum	Mol-pology
Alcohol content	0.8852	0.0512	0.17	221	9.71	max.
Brix	0.9202	0.0256	0.19	179	6.35	max.
pH	0.8806	0.0551	0.16	114	4.41	max.
Total acidity	0.9440	0.0130	0.23	107	0.36	min.

X₁ : Enzyme content(%), X₂ : Added water content(v/w)

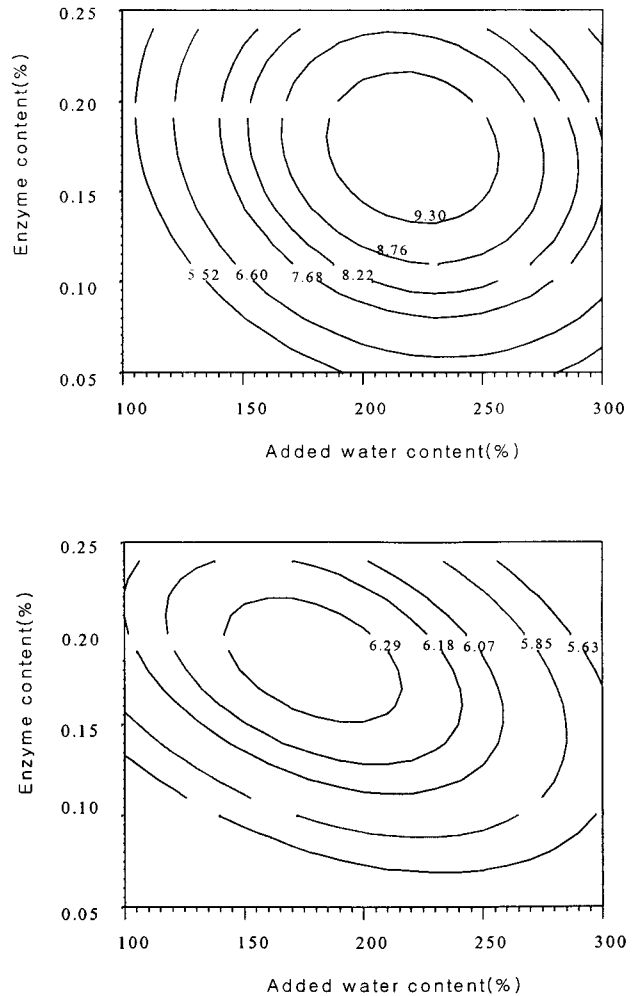


Fig. 1. Contour map for the effects of alcohol fermentation conditions of brown rice on brix(top) and alcohol content(bottom).

Table 3에서와 같이 당도의 회귀식의 R2는 0.9202이었고 5%이내 수준에서 유의성이 인정되었다. 최적 알콜발효를 위한 예측조건은 효소제 함량 0.19%, 가수량 179%(w/v)이었고 이때 예측된 정상점(station point)은 최대점이었다.

각 조건의 알콜발효에서 pH(Y3)와 총산(Y4)의 결과는 Table 2에 나타내었다. 그리고 최적 알콜발효조건과 contour map은 Table 3과 Fig. 2에 각각 나타내었으며, 이들의 회귀식은 다음과 같다.

$$Y_{pH} = 4.191012 + 0.992857X_1 + 0.002490X_2 - 4.642857X_{12} + 0.004000X_1X_2 - 0.000013643X_2^2$$

$$Y_{Total\ acidity} = 0.928214 - 3.628571X_1 - 0.002771X_2 + 6.428571X_{12} + 0.006000X_1X_2 + 0.000006429X_2^2$$

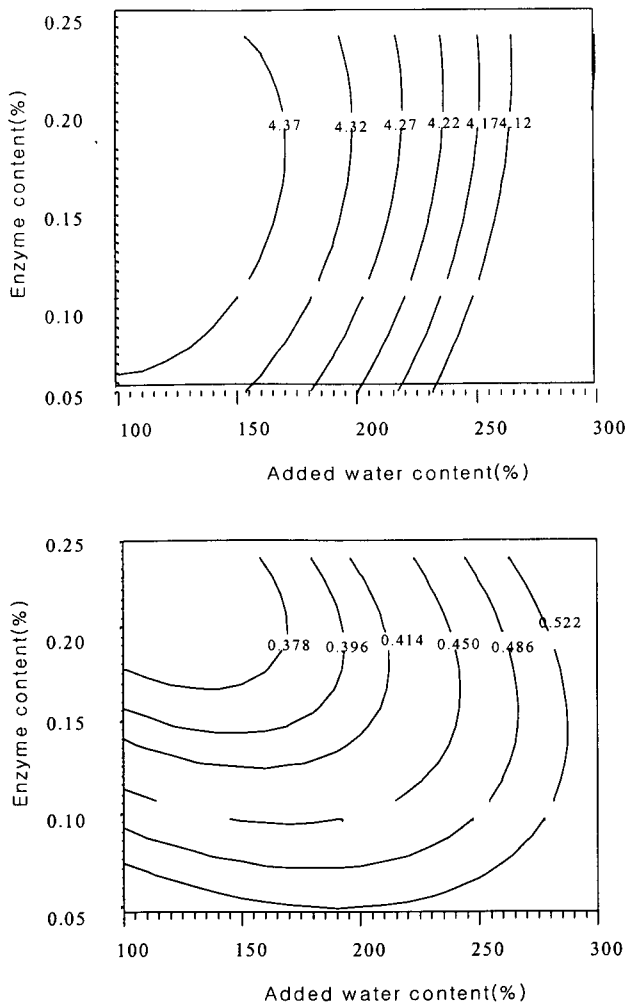


Fig. 2. Contour map for the effects of alcohol fermentation conditions of brown rice on pH(top) and total acidity(bottom)

pH와 총산에 대한 회귀식의 R²는 0.8806, 0.9440이었고 유의성은 각각 10%와 5%이내 수준에서 인정되었다. pH와 총산의 예측된 정상점은 각각 최대점과 최소점이었고 이때 예측된 알콜발효조건은 Table 3에 나타내었다.

Glucoamylase의 당화력과 알콜발효에 영향을 미치는 pH와 알콜 발효과정에서 산패 정도를 알 수 있는 총산의 변화를 조사한 결과, pH는 3.97~4.47의 범위였으며, 총산은 0.36~0.54 범위였다. 이 범위내에서 알콜발효과정중의 산패 현상은 나타나지 않았다. 이상의 결과는 이 등(14)의 최적 pH 3.5와는 조금 차이가 있었으며, 김 등(15)의 흑미를 이용한 무증자 실험의 2-3일차 결과와 오 등(16)의 쌀보리의 무증자 알콜 발효에서 효모의 이용율이 pH 4.3 그리고 이 등(7)의 생진분 분해효소를 이용한 현미의 알콜 발효에서 pH 4.14가 양호하다는 것과 유사한 결과를 얻을 수 있었다.

알콜발효조건 설정

옥수수를 이용한 발효조건별 알콜함량(Y1), 당도(Y2), pH

(Y3) 그리고 총산(Y4)에 대한 contour maps를 superimposing 하여 무증자 알콜발효조건 최적화를 위한 발효조건 범위를 예측하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 당도, 알콜함량, 총산 그리고 pH를 모두 만족시킬 수 있는 독립변수의 범위는 효소제 함량 0.165~0.205%. 가수량 185~195%(w/v)이었다 (Table 4).

알콜발효 일반성분들의 contour map를 superimposing하여 얻은 최적예측조건 범위중 임의의 알콜발효 조건 즉, 효소제 함량 0.18%, 가수량 180%(w/v)로 설정하여 실제 알콜발효한 결과는 알콜함량 9.34%, 당도 6.37로 나타나 RSM기법에 의해 예측된 값과 유사한 값을 나타내어 도출된 회귀식의 신뢰성을 검증할 수 있었다(Table 5). 이상의 결과로 무증자 효소를 이용한 식초생산 전단계의 알콜발효조건을 설정할 수 있었으나 scale-up에 따른 담금조건별 성분변화 등에 관한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

Table 4. Predicted values of response variables at the range of optimum conditions

Fermentation condition	Range of optimum conditions
Enzyme content (%)	0.165 ~ 0.205
Added water content (v/w)	185 ~ 195

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

Optimum conditions		Alcohol content(%)		Brix(o)	
Enzyme content (%)	Added water content (v/w)	predicted	observed	predicted	observed
0.180	180	9.17	9.34	6.35	6.37

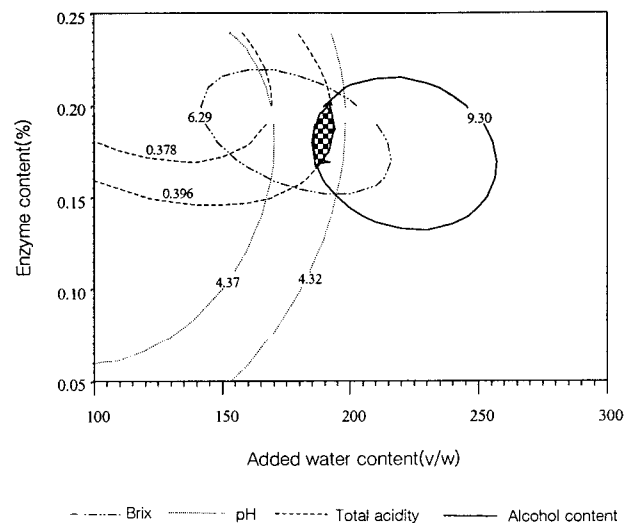


Fig. 3. Superimposed contour map of optimized conditions for alcohol content, brix, pH and total acidity for alcohol fermentation of brown rice.

감사의 글

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

요 약

본 연구에서는 옥수수의 무증자 알콜발효조건을 설정하고 자 반응표면분석으로 알콜발효조건을 모니터링하였다. 그 결과 무증자 발효에 가장 적합한 효모는 *S. cerevisiae* GRJ이었으며, alcohol content, brix, pH 및 총산에 대하여 회귀분석한 결과, R2는 각각 0.8852, 0.9202, 0.8806 및 0.9940이었다. 최적 알콜발효 조건은 효소제 함량 0.18%, 가수량 180%(v/w)로 예측되었으며 최적 알콜발효조건에서의 예측값은 실제값과 유사한 경향으로 나타나 실증이 검증되었다.

참고문헌

- Jung, T.W., Moon, G.Q., Cha, S.W., Kim, S.L., Kim, S.K. and Son, B.Y. (2001) Comparison of grain quality characteristics in waxy corn hybrids with a white and a black colored pericarp. *Korean J. Breed*, 33, 40-44
- Lee, S.K., Mun, S.H. and Shin, M.S. (1997) Enzyme-resistant starch formation from mild acid-treated maize starches. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 29, 1309-1315
- Kim, J.B., Lee, S.Y. and Kim, S.K. (1992) Rheological characteristics of thermal gelatinized corn starch solution. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 24, 54-56
- 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
- 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
- Park, K.H., OH, B.H. and Lee, K.H. (1984) Production of alcohol from starch without cooking: A chemical gelatinization method. *J. Korean Agricultural Chemical Society*, 27, 52-54
- Lee, O.S., Jeong, Y.J., Ha, Y.D., Kim K., Shin .S. and Kwon, H. (2001) Monitoring of alcohol fermentation condition with brown rice using raw starch-digesting enzyme. *Korean J. Postharvest Sci. Technol.*, 8, 412-418
- Jeong, Y.J., Baek, C.H., Woo, K.J., Woo, S.M., Lee, O.S. and Ha, Y.D. (2002) Alcohol fermentation characteristics of tapioca using raw starch enzyme. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 31, 405-410
- 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
- Lee, G.D., Kim, J.S. and Kwon, J.H. (1996) Monitoring of dynamic changes in mailard reaction substrate by response surface methology. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 28, 212-219
- Floros, J.S. and Chinnan, M.S. (1987) Optimization of pimento pepper lyepeeling process using response surface methology. *Trans of ASAE.*, 30, 560-566
- SAS (1990) SAS/STAT User's guide version 6. 4th ed., SAS institute Inc., Cary, NC, U.S.A.
- 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
- 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, Techol.*, 16, 463-471
- 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
- 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 2002년 4월 12일)