

쌀엿 저장시 주요 오염원인 *Zygosaccharomyces bailii*의 성장에 당도가 미치는 영향

이희석 · 최진원 · 송혁환 · 하상도 · 박성용¹ · 이용갑¹ · 이 찬*
중앙대학교 식품공학과, ¹(주)오투기 중앙연구소

The Effects of Sugar Content on Growth of *Zygosaccharomyces bailii* in Rice-syrup

Hee-Seok Lee, Jin-Won Choi, Hyuk-Hwan Song, Sang-Do Ha, Sung-Yong Park¹,
Yong-Gab Lee¹, and Chan Lee*

Department of Food Science and Technology, Chung-Ang University
¹OTTOGI Research Center

Spoilage yeast was isolated from spoiled rice-syrup and identified by Microbial Identification system (MIDI) as *Zygosaccharomyces bailii* based on composition of fatty acids exhibiting carbon skeleton of 16:0, 16:1 (Δ cis 7), 18:2 (Δ cis 9), 18:1 (Δ cis 9), and 18:1. Increase in sugar content (1°brix) resulted in decreased moisture concentration (1%), and water activity decreased from 0.72 to 0.63 when sugar concentration increased from 77 to 83°brix. Yeast showed very slow growth during three weeks post-inoculation in rice-syrup at 77 and 79°brix, and maximal level of *Z. bailii* was found at 6 and 10 weeks storage at 15 and 25°C, respectively. At over 81°brix its growth slowly decreased at beginning of storage, indicating rice-syrup could be preserved safely at above 81°brix sugar content without *Z. bailii* contamination.

Key words: rice-syrup, *Zygosaccharomyces bailii*, sugar content, water activity

서 론

엿은 각종 전분을 산이나 맥아와 같은 효소를 이용하여 액화 및 당화를 시킨 후, 농축 시켜 만든 단맛과 끈기를 가진 우리나라 고유의 전통 식품이다(1). 엿은 독특한 맛과 성상을 지니고 있어 그 수요가 계속 증가하고 있으며(1), 유밀과, 강정류의 제조과정에서 중요한 재료 중의 하나이다. 엿은 제조되는 지역과 그 곳의 특산물에 따라 여러 가지 종류로 나누어진다. 옥수수 가루에 엿기름을 섞어서 만든 황해도와 강원도 지방의 황골엿, 수수와 엿기름을 혼합한 수수엿, 고구마를 삶아서 메주처럼 찌어서 만든 무안의 고구마엿 등이 있다. 전라도 지방의 백당엿, 수수엿에 에호박을 넣어 만든 경상도 지방의 호박엿, 그리고 제주도 지방에서 생산되는 차조나 맵쌀, 찹쌀 등의 전분을 원료로 하여 만든 맥아엿에 꿩이나 닭, 돼지고기 등과 익보초, 마늘 등과 섞어 만든 보신용 약초엿 등도 중요한 엿의 종류로 보고되고 있다(2). 이 외에도 엿기름 가루를 삭혀서 만든 쌀엿, 무를 채 썰어 조려서 만든 무엿, 통옥수수를 싹 틔어

만든 통옥수수 엿 등이 또한 알려져 있다. 쌀엿은 쌀을 주식으로 하고 있는 우리나라에서는 가장 많이 생산되며, 자연감미료로서의 역할로 인하여 활용분야가 확대되고 있다.

지금까지의 엿에 대한 연구는 주로 성분 및 저장 중 품질변화 및 공정과정의 개선에 대하여 이루어 졌으며(1,3,4), 쌀엿 자체의 저장성이 높다고 인식되어 쌀엿을 변패시키는 미생물의 성장과 억제하는 방법에 대해서는 연구가 미흡한 실정이다. 그러나 실제로는 액상상태의 쌀엿에도 당도조절이 적합하지 않은 경우 미생물에 의한 오염이 발생되며, 또한 개봉 후 소비자의 보관 부주의로 인하여 제품이 변패하는 경우도 빈번하게 일어난다. 현재까지 알려진 쌀엿의 주요 변패균은 효모이다. 효모는 식품과 음료에서 흔히 발견되는 변패균으로서 높은 당 농도에서도 성장할 수 있으며, 당을 발효시켜서 CO₂ gas를 생성시켜(5) 제품의 품질을 저하시킨다. 효모는 쌀엿 이외에도 우유, 와인, 버터, 유산균 제품, 빵, 잼, 고추장, 그리고 복숭아 통조림 등의 주된 변패균이며, 효모의 오염으로 인한 식품의 변패가 여러 가지 형태로 보고 되고 있다(6-10).

효모 중 쌀엿을 오염시키는 주된 균은 *Zygosaccharomyces bailii*이다. *Z. bailii*가 쌀엿에 오염될 경우 다른 전분가공제품에서처럼 알콜 발효와 함께 다량의 CO₂ gas를 생성시키고(11), 생성된 CO₂ gas는 쌀엿용기를 부풀게 하거나 파손시켜 유통과정에서 문제가 되고 있으며, 쌀엿을 제조하여 유통하는 업체들이 쌀엿제품을 회수하는 경우도 발생되고 있다. *Z. bailii*에 의한

*Corresponding author: Lee Chan, Department of Food Science and Technology, College of Industrial Science, Chung-Ang University, Ansong, Gyunggi, 456-756, Korea
Tel: 82-31-670-3035
Fax: 82-31-676-8865
E-mail: chanlee@cau.ac.kr

CO₂ gas 발생 및 품질 저하는 당 농도에 의해 영향을 받기 때문에(5,12) 변패성 효모인 *Z. bailii*의 성장을 저해시키기 위하여 고농도의 당이 함유된 쌀엿을 제조 유통시키는 것이 품질 관리 측면에서 중요하다. 또한 쌀엿의 변패가능성을 쉽게 예측할 수 있는 평가의 기준을 마련하는 것이 쌀엿 제조 및 유통 시에 좋은 품질을 유지시킬 수 있는 방법이 된다. 따라서 쌀엿의 주된 변패균인 *Z. bailii*가 쌀엿에서 생육할 수 있는 조건을 규명하고자 한다. 이를 위하여 제조공정에 맞는 쌀엿을 제조하고 쌀엿의 당도와 수분함량, 수분활성도(a_w)간의 상관관계를 조사하며, *Z. bailii*의 생육에 미치는 영향을 살펴보고자 한다. 또한 현장에서 쉽게 적용될 수 있는 변패가능성을 예측할 수 있는 평가법을 마련하여 쌀엿의 유통 및 저장 중 미생물에 의한 오염 위험성을 줄이는 방안을 모색하고자 한다.

재료 및 방법

시료의 제조

수분 함량이 14% 이하인 쌀에 45°C의 조건으로 가열된 정제수를 배합한 후 교반 및 에어를 이용하여 세척한다. 세척 후 100°C의 조건으로 증자를 시킨 뒤 6,000 BAU/g에 해당하는 α -amylase를 첨가하여 98°C에서 pH가 5.5가 되도록 액화를 시킨 뒤 60°C의 온도에서 10시간 동안 100%의 백아효소를 이용하여 당화를 시킨다. 당화된 시료를 95°C에서 1시간 동안 가열하여 효소를 실활시킨다. 이 과정을 거친 뒤 프레스 여과를 거쳐 103°C의 조건으로 개방 농축을 하며, 다시 한번 여과를 한 후 70°C에서 진공 농축을 거쳐 당도가 조절된 쌀엿을 본 연구에 사용하였다.

균주의 분리, 동정 및 배양

본 실험에서 사용한 *Z. bailii*는 시판되어지고 있는 쌀엿 중 용기가 팽창한 제품으로부터 분리한 뒤 지방산 조성분석을 통해 동정한 것이다. 지방산 조성분석 과정은 다음과 같다. Cellular fatty acid methyl ester는 Microbial Identification system(MIDI, Microbial ID, Inc. Newark, Delaware, USA)의 표준 방법에 따라 추출되어 준비되었다. 이 추출물을 Hewlett-Packard 사의 HP 5890A gas chromatography 시스템으로 분석하였다.

분리된 효모를 potato dextrose agar(PDA, Difco, USA; potato infusion form 200 g, dextrose 20 g per 1 liter water)에서 25°C, 암소의 조건으로 5일 배양 후 4°C에서, 냉장 보관하면서 실험에 사용하였다. *Z. bailii*의 보존 배지로 PDA를 사용하였으며, 분리 및 배양 시 PDA 배지를 10% tartaric acid로 pH 3.5가 되도록 acidified 시킨 Acidified PDA(APDA)를 사용하였다.

당도별 쌀엿의 수분 함량 및 수분활성도(a_w) 조사

Brown 등(13)에 의해 *Z. bailii*가 당 안에서 성장할 경우 수분활성도(a_w)가 0.75에서 0.8일 경우 성장에 저해를 준다고 보고 되어졌다. 시판되어지는 쌀엿의 당도가 80°brix 내외인 것을 감안하여 당도를 77, 79, 81, 83°brix로 정하여 당도에 따른 쌀엿의 수분 함량(%)과 수분활성도(a_w)의 변화를 조사하였다. 시료인 쌀엿에는 휘발성분이나, 열에 의해 산화되는 성분이 적기 때문에 식품의 수분 측정 방법으로 사용되는 상압가열건조법과 감압가열건조법 중 상압가열건조법을 이용하였다. 당도가 조절된 시료에서 10g의 양을 채취하여 항량을 구한 후, 105°C의 온도에서 건조 시키며 쌀엿의 당도별 수분 함량을 조사하였다. 당도를 77, 79, 81, 83°brix로 조절된 쌀엿을 3g 취한 후

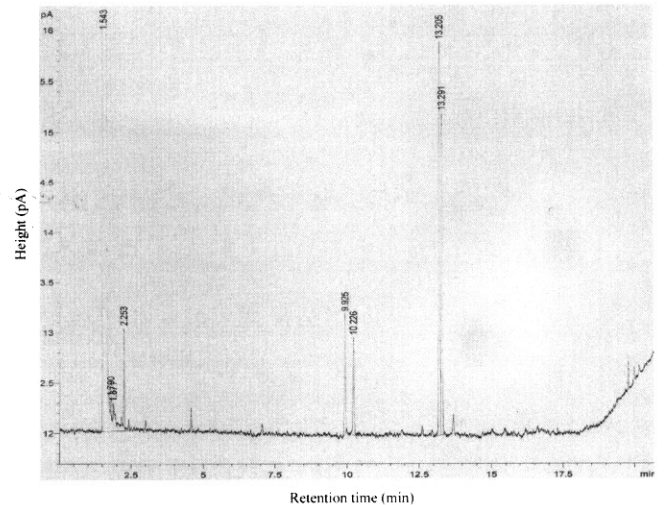


Fig. 1. Cellular fatty acid composition of *Zygosaccharomyces bailii*.

25°C의 조건에서 평형상대습도 측정기기(Novasinu TH-200, Switzerland)를 이용해 쌀엿의 당도별 평형상대습도(ERH = $a_w \times 100$)를 측정하여 수분활성도(a_w)의 변화를 조사하였다.

저장조건에 따른 *Z. bailii*의 성장 조사

PDA에서 냉장보관 되어있는 균주를 APD(APDA without agar) broth에 접종 시킨 뒤 25°C의 암소에서 125 rpm의 조건으로 전 배양을 거친 후 같은 조건에서 48시간 동안 본 배양을 하였다. 본 배양 후 APDA에 pour plate method로 접종하여 25°C의 암소에서 5일 동안 정지배양한 뒤 균수를 측정하였다. 균수 측정 후 77, 79, 81, 83°brix로 조절된 쌀엿 20g에 10 cfu/g이 되도록 균을 접종하고 15와 25°C에서 배양하면서 균의 생육을 관찰하였다. 1주일의 간격으로 각 sample에 생리식염수 20 mL을 섞어 2배 희석한 후 *Z. bailii*의 균수 변화를 조사하였다.

결과 및 고찰

쌀엿 변패균의 분리 및 지방산 조성분석을 통한 균주 동정

쌀엿 변패균을 유통과정 중 변패된 쌀엿제품으로부터 분리한 후 지방산 조성 분석을 실시하였다. 지방산 조성 분석을 위하여 cellular fatty acid methyl ester를 MIDI 사(Newark, Delaware, USA)의 표준 방법에 따라 추출하였다. 분리된 균주의 지방산은 MIDI분석에서 2.253 9.925 10.226 13.205 13.291의 체류시간(retention time)을 나타내었으며(Fig. 1), 이 성분들은 16:0, 16:1(Δ cis ω 7), 18:2(Δ cis ω 9), 18:1(Δ cis ω 9) 그리고 18:1의 탄소골격을 지닌 지방산들로 분석되었다(Fig. 1, Table 1). 이와 같은 지방산 조성을 나타내는 균주를 MIDI의 데이터베이스에서 검색하였으며, 분리된 균주를 *Z. bailii*로 동정하였다(Table 1). 이와 같은 지방산 분석을 통한 균주의 동정은 젖산균을 포함한 여러 가지 미생물에서 이루어지며(14-16), 신뢰도가 높은 방법으로 알려져 있다.

당도별 수분함량 및 수분활성도(a_w)

당도가 조절된 각 시료에서 10g의 양을 채취하여 상압가열건조법을 이용하여 수분함량 조사 시 샘플은 77, 79, 81, 그리

Table 1. Major cellular fatty acid composition of *Zygosaccharomyces bailii* isolated from spoiled rice-syrup

RT ¹⁾	Area	Ar/Ht ²⁾	Response	ECL ³⁾	Carbon structure	%
1.543	481210281	0.028	-	7.022	SOLVENT PEAK	-
1.790	717	0.036	-	7.525	-	-
1.871	310	0.015	-	7.690	-	-
2.253	3294	0.027	-	8.468	-	-
9.9256	121	0.040	0.967	15.816	16:1 cis ω9	11.87
10.226	5384	0.043	0.966	15.999	16:0	10.43
13.205	22109	0.044	0.959	17.720	18:2 cis ω9	42.54
13.291	18277	0.045	0.959	17.769	18:1 cis ω9 18:1	35.16

¹⁾RT: retention time.

²⁾Ar/Ht: area/height.

³⁾ECL: equivalent chain length.

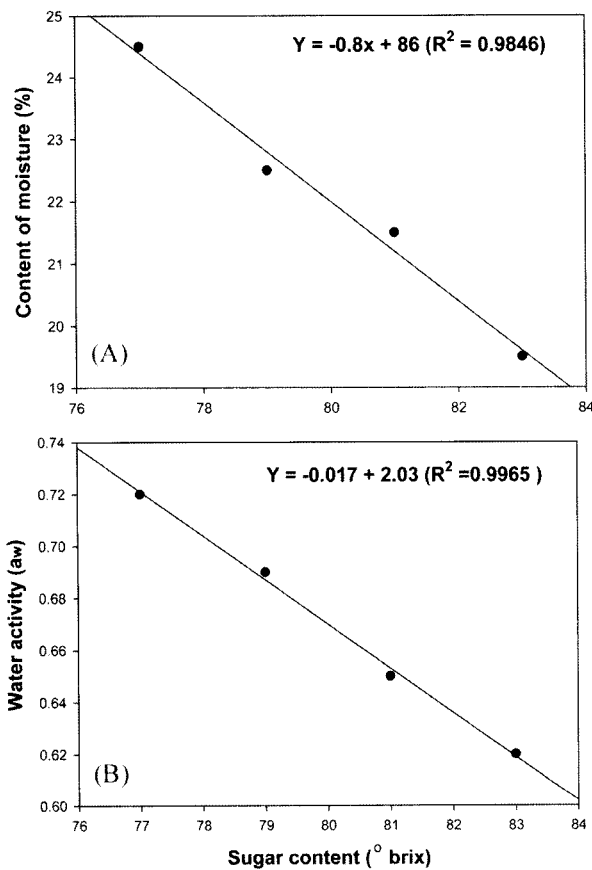


Fig. 2. Moisture content (%) and water activity (a_w) at different sugar contents.

(A) Moisture content (%) vs sugar content, (B) Water activity (a_w) vs sugar content.

고 83°brix에서 각각 24.5, 22.5, 21.5, 19.5%의 수분함량을 나타냈다. 이는 쌀엿의 당도를 약 1°brix 증가 시켰을 경우 약 1%의 수분함량이 감소하게 되는 반비례의 상관관계로 분석되었다(Fig. 2A). 쌀엿의 당도에 따른 수분활성도(a_w)의 변화를 측정시 77, 79, 81 그리고 83°brix에서 수분활성도가 각각 0.72, 0.70, 0.65, 0.63으로 나타났으며, 77°brix에서 83°brix까지 당도가 증가하는데 수분활성도(a_w)가 0.09 감소하였다(Fig. 2B). Kim 등(17)은 내삼투압성 효모가 수분활성도(a_w) 0.65 정도의 매우 낮은 조건에서 성장할 수 있으며, 높은 삼투압에서는 효모의 성장이 저해된다고 보고 하였다. 본 실험에서 쌀엿의 수분활성

도(a_w)가 0.65에서 쌀엿의 당도는 81°brix로 나타났다. 시판되는 쌀엿의 당도가 약 80°brix 내외이므로 이 조건에서 변패균의 생육이 어렵다는 것을 추측할 수 있었다. 수분활성도를 현장에서 측정하는 것은 쉽지 않다. 그러므로 쌀엿의 수분함량 및 수분활성도(a_w)와 당도와 상관관계를 조사하면 비교적 측정하기 쉬운 당도만으로 쌀엿의 수분함량 및 수분활성도(a_w)를 추정할 수 있게 된다. 이 같은 결과는 산업체에서 당도만을 측정하여 쉽게 미생물의 생육가능성을 예측할 수 있는 중요한 자료가 된다.

저장 조건에 따른 *Z. bailii*의 성장 조사

당도가 77, 79, 81, 83°brix로 조정된 쌀엿에 10 cfu/g으로 조정된 *Z. bailii*를 접종한 후 15°C와 25°C에 저장하며 시험균의 생육을 관찰하였다. 이 실험에서 당도가 높을수록 그리고 온도가 낮을수록 시험균의 생육이 저해됨을 관찰할 수 있었다. 77°brix에서는 15°C에서 3주 경과한 시점까지 균수가 초기 접종균수에 비해 감소하였다. 그러나 강한 내삼투압성을 가지고 있는 살아남은 소수의 *Z. bailii*가 4주 경과한 시점부터 서서히 성장하기 시작하였으며, 6주부터 급격히 균수의 증가를 나타내었다. 이 조건에서 변패균은 10주에 최대 균수를 나타내었으며 그 이후 서서히 사멸하기 시작하였다. 25°C의 조건에서도 마찬가지로 3주까지 균수가 감소하는 경향을 보이다가 그 이후 *Z. bailii*가 다시 급격히 성장하기 시작하였다. 그리고 5주가 경과한 시점에서는 최대의 균수를 나타내었으며 그 이후 사멸하는 것으로 관찰되었다(Fig 3A). 쌀엿의 당도를 79°brix로 조정했을 경우에도 77°brix에서와 유사한 결과가 나타났다. 15°C에서는 감소하던 시험균이 5주 이후에 다시 성장하기 시작하였으며 8주까지 급격한 성장률을 나타내었다. 이 후 10주에서 최대 균수를 보였으며 점차로 사멸하였다. 25°C의 경우 감소하는 정도에서 차이는 있었지만 역시 3주간 감소의 경향을 보이다가 8주까지 완만한 증가량을 보이다 8주에서 10주 사이 최대 균수로 급격한 성장이 보였다(Fig 3B). 한편, 81°brix 이상의 조건에서는 15°C와 25°C에 관계없이 접종 후 3-4주까지 급격한 균수의 감소를 보였으며 이후에도 완만한 감소하다 14주 이후부터 *Z. bailii*는 관찰되지 않았다(Fig 3C, D). Praphailong 등(18)은 *Z. bailii*의 경우 당도를 70° brix까지 높인다 해도 내성을 지니기 때문에 성장을 할 수 있다고 발표하였으며, Jeanne-Marie 등(19)은 30에서 80°brix까지 당도가 증가할수록 *Z. bailii*의 성장이 저해되며 80°brix에서 이상의 당도에서는 매우 적은 성장률을 보인다고 보고하였다. 한편, Merico 등(20)은 당의 농도가 적을 때 변패균의 오염으로 ethanol과 glycerol이 생성된다고 발표하였으며, 이는 당 농도를 높임으로서 방지될 수 있다고 보

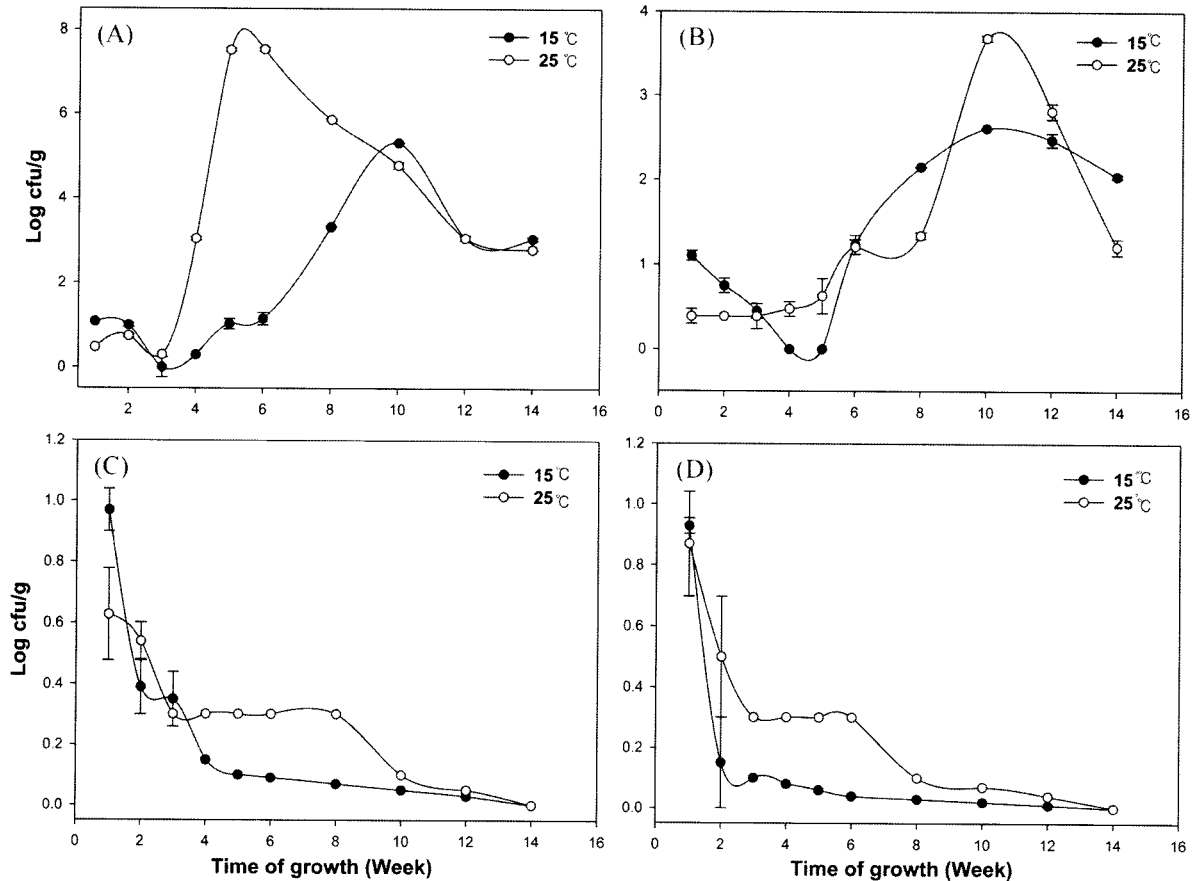


Fig. 3. Effect of temperature on growth of *Zygosaccharomyces bailii* at different sugar content.
(A) 77°brix, (B) 79°brix, (C) 81°brix, (D) 83°brix.

고하였다. 쌀엿의 경우 *Z. bailii*는 79°brix 이하에서 일정시간 동안 균수의 감소 후 급격한 균수의 증가 후 감소하는 생육특징을 보였다. 이 실험의 결과와 여러 기존의 연구결과를 종합해 볼 때 쌀엿이 당도가 81°brix 이상 그리고 25°C 이하의 조건에서 유통, 저장되어 진다면 변패균인 *Z. bailii*에 노출되어도 품질의 저하를 줄일 수 있음을 알 수 있었다. 또한, 추후 초기 균 수, 당도만을 측정하여도 *Z. bailii*의 온도별 성장률 및 유통 가능기간을 추정할 수 있었다.

요 약

쌀엿 유통과정 중 변패를 일으키는 효모를 분리하여, 지방산 분석을 통하여 동정하였다. 분리된 균주의 지방산을 Microbial Identification system(MIDI)으로 분석하여 16:0, 16:1(*Acis* 7), 18:2(*Acis* 9), 18:1(*Acis* 9) 그리고 18:1의 탄소골격을 지닌 5가지 지방산을 확인하였다. 이 결과를 MIDI 데이터베이스와 비교하였으며 쌀엿 유통과정 중 변패를 일으킨 변패균을 *Zygosaccharomyces bailii*로 동정하였다. 쌀엿 변패균의 오염에 의한 쌀엿의 품질 저하를 방지하기 위하여 당도의 변화에 따른 쌀엿의 %수분함량과 수분활성도(a_w)의 관계를 연구하였다. 쌀엿의 당도를 약 1°brix 증가 시켰을 경우 약 1%의 수분함량이 감소하게 되는 반비례의 상관관계를 가짐을 알 수 있었다. 그리고 77°brix에서 83°brix까지 당도가 증가하는데 수분활성도(a_w)가 0.09 감소하였다. 15°C 및 25°C에서 당도가 조정된 쌀엿에 변패균을 접종한 후 저장 시 변패균의 생육을 관찰하였다. 79°brix

이하의 쌀엿에 변패균이 접종되었을 경우 모두 일정시간 동안 균체 증가량을 나타내다가 급격한 균수의 증가 후 감소하는 생육 특징을 보였다. 그러나 81°brix 이상의 조건에서는 15, 25°C에 관계없이 접종 후 3-4주까지 급격한 균수의 감소를 보였으며, 이후에도 완전한 감소를 보이다 14주차부터 변패균의 생육이 더 이상 관찰되지 않았다. 결론적으로 쌀엿이 81°brix, 25°C 이하로 생산, 저장된다면 *Z. bailii*와 같은 변패균의 노출에 따른 피해를 방지할 수 있음을 알 수 있었다.

감사의 글

이 논문은 2004년도 중앙대학교 일반연구비 지원에 의한 것임.

문 헌

1. Chung JH, Rhee CO. Simulation for improving the process of Korean traditional. *Food Eng. Prog.* 1: 29-34 (1997)
2. Kim HS, Knag YJ. Optimal conditions of saccharification for a traditional malt syrup in *Cheju*. *Korean J. Food Sci. Technol.* 26: 659-664 (1994)
3. Kim HY, Shin HH. Quality characteristics of the traditional Korean snack, *Yut-gang-jung* with perilla and changes during storage. *Korean J. Soc. Food Cookery Sci.* 19: 753-757 (2003)
4. Rhee CO, Park KH, Soeg HM. Change in quality attributes of *Chang-pyung Yeot* (taffy-like foods) with storage temperature. *Korean J. Food Sci. Technol.* 24: 515-518 (1992)
5. Leyva JS, Manrique M, Prats L, Loureiro-Dias MC, Peinado JM. Regulation of fermentative CO₂ production by the food spoilage

- yeast *Zygosaccharomyces bailii*. *Enz. Microbiol. Technol.* 24: 270-275 (1999)
6. Betts GD, Linton P, Betteridge RJ. Food spoilage yeast: effect of pH, NaCl and temperature on growth. *Food Control* 10: 27-33 (1999)
 7. Loureiro V, Ferreira MM. Spoilage yeasts in the wine industry. *Food Microbiol.* 86: 23-50 (2003)
 8. Hong CH. A study on yeast and mold contamination of fermented milk products in Korea. *Korean J. Env. Hlth. Soc.* 7: 51-57 (1981)
 9. Choi JY, Park SK, Kyung KH. Heat resistance studies of selected yeasts isolation from swollen commercially canned peaches. *Korean J. Food Sci. Technol.* 19: 38-41 (1987)
 10. Jin HS, Lee KJ. Isolation and characterization of a volume-expanding yeast from *Sunchang Gochujang*. *Korean J. Food Nutr.* 12: 339-343 (1999)
 11. Kwak YS, Choo JJ, Shin HJ, Park KH. Effects of changes in composition of herb extract product on growth of spoilage yeast, *Zygosaccharomyces* sp. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 28: 997-1002 (1999)
 12. Loureiro V. Spoilage yeasts in foods and beverages: characterization and ecology for improved diagnosis and control. *Food Res. Int.* 33: 247-256 (2000)
 13. Brown AD. Microbial water stress. *Am. Soc. Microbiol.* 40:803-846 (1976)
 14. Lee JS, Chun CO, Kim HJ, Joo YJ, Lee HJ, Park CS, Ahn JS, Park YH, Mheen TJ. Analysis of cellular fatty acid methyl esters (FAMES) for the identification of *Leuconostoc* strains isolated from Kimchi. *J. Microbiol.* 34: 225-228 (1996)
 15. Lee JS, Jung MC, Kim WS, Lee KC, Kim HJ, Park CS, Lee HJ, Joo YJ, Lee KJ, Ahn JS, Park W, Park YH, Mheen TI. Identification of lactic acid bacteria from Kimchi by cellular FAMES analysis. *Korean. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 24: 234-241 (1996)
 16. Vauterin YPL, Vancaneyt M, Swings J, Kersters K. Application of fatty acid methyl esters for the taxonomic analysis of the genus *Xanthomonas*. *Sys. Appl. Microbiol.* 16: 47-71 (1993)
 17. Kim DH. *Food chemistry*. Tamgudang Press, Seoul, Korea. pp. 12-19 (1998)
 18. Praphailong W, Fleet GH. The effect of pH, sodium chloride, sucrose, sorbate and benzoate on the growth of food spoilage yeasts. *Food Microbiol.* 14: 459-468 (1997)
 19. Membre JM, Kubaczka M, Chene C. Combined effects of pH and sugar on growth rate of *Zygosaccharomyces rouxii*, a bakery product spoilage yeast. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 4921-4925 (1999)
 20. Merico A, Capitanio D, Vigentini I, Ranzi BM, Compagno C. Aerobic sugar metabolism in the spoilage yeast *Zygosaccharomyces bailii*. *FEMS Yeast Research* 4: 277-283 (2003)

(2005년 10월 12일 접수; 2005년 11월 28일 채택)