

미생물 효소에 의한 한국산 감의 발효 식품 제조기술 확립에 관한 연구 -미생물 고정 Bioreactor 제조-

박충웅, 이강민, 김경숙
(전북대학교 자연과학대학 분자생물과)

Development of Korean Persimmon juice Fermentation by Microorganism
Enzyme Immobilized Bioreactor
-Design of Yeast Immobilized Bioreactor-

Park Chung-Ung, Lee Kang-Min, Kim Kyung-Suk

Department of Molecular Biology, Chonbuk National University Chonju, 560-756, Seoul, Korea

Abstract

By using the Korean persimmon juice as raw material, persimmon wine fermentation was carried out with 5 strains of *Saccharomyces*(*S. cerevisiae*, *S. formosensis*, *S. sake*, *S. carlsbergensis*, *S. ellipsoideus*). *S. cerevisiae* and *S. formosensis* are very suitable for conversion of persimmon juice to persimmon alcohol but not *S. sake*, *S. carlsbergensis*, *S. ellipsoideus*. In the process of fermentation, the compositions of aminoacids were changed. Aromatic aminoacids such as phenylalanine, tyrosine were decreased but arginine and methionine were increased. Amounts of sugar(glucose, fructose) and *Saccharomyces* affect on alcohol concentration of persimmon alcohol produced. Alcohol concentration of persimmon alcohol was doubled with adding of 10% glucose in *S. formosensis* fermentation. In *S. cerevisiae* fermentation, glucose could not augment the alcohol concentration. Finally we got 11.5% persimmon alcohol by *S. formosensis*. We designed a alcohol bioreactor by immobilization of *S. formosensis* on porous supportor and packing it in column. We got 8% persimmon alcohol with this system.

I. 서론

1. 연구목적 및 필요성

감은 동양 특유의 과일로서 감나무는 병충해가 적어 농약을 전혀 사용하지 않는 무공해 과수이다. 또한, 감나무는 내한성이 약한 온대성 과수로서 우리나라에서는 주로 중부 이남지방에서 재배되고 있으며, 특히 경상남도과 전

라남·북도에서 감의 생산량이 많고, 농촌 산간 지방에 주로 분포되어 있다.

현재 우리나라 농촌의 당면한 어려움은 우루과이 라운드에 의한 시장의 개방으로 농산물 수입이 급증되어 우리 농산물의 경쟁력이 떨어지고 있는 것이다. 이를 극복하기 위하여 각 지방의 고유한 토산품을 국제 경쟁력이 있는 상품으로 개발하고 또한, 각 지방의 독특한 재료를 이용한 특색있는 가공식품을 개발하여 상품화시키려는 노력이 절실히 요구되고 있다.

미생물을 이용하여 유용한 물질을 합성하려는 경향은 최근에 많이 행하여 지고 있고 생명공학에서 매우 전망있는 분야이며 세포를 이용한 반응(Cell bioconversion)은 효소반응에 비하여 매우 경제적이고 더욱 복잡한 생성물을 만들 수 있으므로, 발효공학이나 세포를 이용한 의약품 합성에 많이 이용되고 있다.

전국적으로 생산되는 감의 양은 해마다 늘고 있으나 최근 인력의 부족과 이농농가의 증가로 그대로 방치되어 허실되는 양이 엄청나게 늘어나고 있다. 본 연구는 이렇게 이용되지 못하는 감으로부터 미생물 고정 Bioreactor를 이용하여 효율적인 발효식품 제조 기술에 의하여 감식초와 감와인을 제조하여 농가소득 증가는 물론 우루과이 라운드(U. R)를 대비한 첨단 영농기술의 일부분으로 개발할 계획이다.

위의 기술 개발은 감자, 고구마의 녹말로부터 ethanol을 발효시키는 Bioreactor System과 매우 비슷하므로, 본 연구과제를 통하여 감즙으로부터 감와인, 감식초 제조는 물론 다른 Bioreactor 개발에 이용하려는 목적이 있다.

II. 본 론

1. 재료 및 방법

가. 재료

균주로는 *Saccharomyces cerevisiae*(*S. cerevisiae*), *S. carlsbergensis*, *S. formosensis*, *S. sake*, *S. ellipsoideus*를 이용하였다. *S. cerevisiae*와 *S. formosensis*는 조해청주로 부터 배양 받았으며 *S. formosensis*, *S. sake*, *S. ellipsoideus*는 전북대학교 농대 식품가공학과로 부터 배양 받아 사용하였다.

기기로는 HPLC(Tosoh 8010 series), UV(Hitachi 3300) GC(Hitachi 3000)를 사용하였다. Alcohol dehydrogenase와 조효소 NAD는 Boehringer manneheim으로부터 구입하였으며, 배지용액이나 그외 화학약품은 특급시약을 사용하였으며, HPLC나 GC를 위하여 고순도 시약을 사용하였다. 균주 고정화를 위한 고정체로는 Kirin 고정화 물체를 사용하여 고정화시켰다.¹⁾

나. 연구방법

1) 발효과정중 각 성분 변화조사

1-1. 발효전 감육과 감즙의 성분분석

시료인 홍시속의 당 성분과 pH 및 아미노산 성분을 조사하여 이들이 발효되는 동안 어떻게 변화되는가를 조사한다. 감즙에 포함된 아미노산을 결정하는데 HPLC를 사용하였다. HPLC는 Carbpac PA1 칼럼(4×250mm)을 사용하였다. 유속은 0.8ml/min으로 150mM sodium Hydroxide용액을 사용하여 분리 분석하였으며, detector로는 pulsed Amperometric detector를 사용하여 검출하였다.

1-2. 감즙을 이용한 발효 실험

20ml의 감즙 시료를 시험관에 넣고 솜으로 막은 후 질소로 포화시켜서 알코올의 산화를 방지 하면서 30°C에서 발효시킨다. 시료를 분취하여 발효기간 동안 pH meter를 사용하여 시간에 따른 pH의 변화를 조사하였다. pH의 변동이 거의 없을 때까지의 시일과 시료의 알코올 생성량을 효소와 가스 크로마토그래피(GC)를 사용하여 조사하였다. GS는 glass porapakQ 3.0mmφ×2m 칼럼을 사용하여, 수소 0.5kg/cm², 산소 0.5kg/cm²에서 질소를 carrier gas로 이용하였다. Detector는 200°C에서 TCD detector를 이용하여 측정하였다.

1-3. 효소를 이용한 알코올 농도의 결정

발효중 알코올생성을 더욱 정확하게 결정하기 위하여 alcohol dehydrogenase를 사용하여 결정하였다. 이 효소는 NAD를 조효소로 사용하며 알코올을 알데히드나 케톤으로 변화 시키면서 생기는 NADH를 340nm에서 측정한다. 우선 알코올농도에 대하여 활성도를 calibration 한다음 7mM NAD, 10 μl alcohol dehydrogenase, 10 μl sample을 사용하여 50mM TES buffer pH7.5 용액에서 측정하였다.

1-4. 감즙에 균주를 첨가한 발효 실험

위의 실험 조건하에서 기술한 양의 감즙에 *S. cerevisiae*, *S. carlsbergensis*, *S. formosensis*, *S. sake*, *S. ellipsoideus*를 각각 20mg, 50mg, 100mg을 첨가하고 발효시켜 발효가 종료될 때 까지의 걸리는 시간과 시간에 따른 산도의 변화를 조사하고, 발효 종료 후 알코올의 생성량을 가스 크로마토그래피를 통해 분석하며, 아미노산 성분은 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)로 성분을 분석

한다.

2) 균주의 성장에 미치는 효과

2-1. 배지 성분의 영향

균주를 배양하기 위하여 일반적으로 많이쓰이는 YEP

배지와, 각종 영양물질이 조합된 Defined media와 Salt media 등에서 균주를 배양하여 사용하고 이들 배지가 균주 성장에 미치는 효과를 조사한다.^{2,3,4)}

	YEP medium(I)	Defined medium(II)	Salt medium(III)
Lactose	60.0 g	60.0 g	60.0 g
Yeast extract	3.0 g		
Peptone	3.5 g		
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.0 g	12.00 g	
KH ₂ PO ₄	2.0 g	1.00 g	1.36 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1.0 g	0.52 g	0.50 g
pH	4.5	4.5	4.5
KCl		0.12 g	
NaCl		0.06 g	
CaCl ₂ · 2H ₂ O		0.09 g	
FeSO ₄ (NH ₄) ₂ SO ₄ · 6H ₂ O		0.035 g	
CuSO ₄ · 5H ₂ O		0.50mg	
ZnSO ₄ · 7H ₂ O		0.30 μ g	
CoSO ₄ · 4H ₂ O		2.30 μ g	
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O		3.30 μ g	
H ₃ BO ₃		7.30 μ g	
KI		1.70 μ g	
NiSO ₄ · 6H ₂ O		2.50 μ g	
Thiamine HCl		5.00mg	
Pyridoxine HCl		6.26mg	
Nicotinic acid		5.00mg	
D-Biotin		0.125mg	
Ca-Dipanthothenate		6.25mg	
Meso-inositol		125.00mg	
Distilled water	1.00L	1.00L	1.00L

2-2. Sugar, pH 온도의 영향

기질물질로 사용되는 Sugar중 Fructose, Glucose, Amino acids가 균주의 성장속도에 미치는 영향을 조사한다.

균주의 발효에 알맞는 최적 pH를 찾기 위하여 pH4.5-7.2에서, 20°C~37°C에서 균주의 성장속도에 영향을 미치는 온도를 측정한다.

3) 미생물 고정화

3-1. 세라믹 표면에 미생물 흡착 고정화^{5,6,7)}

미생물 고정화를 위하여 Porous 세라믹 표면에 제일 발효를 잘 시키는 *S. formosensis*를 흡착 시켜서 사용한다. Kirin사로 부터 구입한 SiO₂ 고정화 물체의 기공 부분에 *S. formosensis*를 충전하였다. 100ml flask에 100mg균주와 20ml 고정화 물체를 넣은후 50rpm정도로 약하게 저어주면 균주가 고정화 물체 안으로 들어가게 된다.

3-2. Bioreactor 제조

기술한 고정화 물질로 반응칼럼을 제조한뒤 감즙을 천천히 흘려 보내면서 10 × 200mm 생성되는 생성물질의 pH와 알콜 농도를 위의 방법으로 측정하였다.

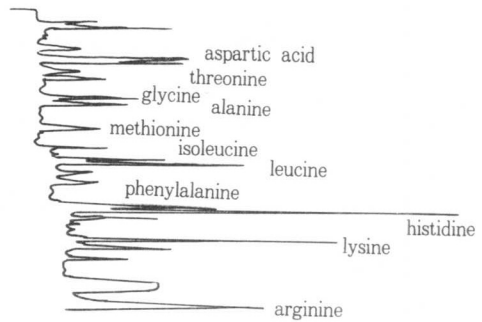


그림 1. 감즙의 아미노산조성의 HPLC

2. 결과 및 고찰

시료인 홍시의 성분분석 결과와 시료의 pH 및 아미노산 조성을 표준 아미노산의 머뮴 시간(retention time)을 고려하여 HPLC로 분석하였다.

감즙은 수분(85%), 지방(0.3%), 당(14%), 섬유(2%) 등으로 구성되어 있으며 당은 대부분 glucose와 fructose로 되어 있다. 감즙은 보통 pH가 5정도이며 여러종류의 아미노산을 포함하고 있다. 아미노산은 arginine, proline, leucine, lysine 순으로 많이 함유하고 있으며 아미노산의 함유량은 발효후 변한다(그림1). 이들 아미노산중 leucine은 필수 아미노산이므로 외부에서 섭취해야 하는데 이러한 아미노산을 함유하고 있는 감즙으로 감주를 만들어 섭취할 수 있을 것이다. 아미노산은 *S. formosensis* 2mg/ml을 넣고 일주일 동안 발효 시킨 후 아미노산을 분석 하였다. 그림2 에서 보는 바와 같이 발효후 arginine, methionine, cysteine의 양은 증가되었다. Cysteine은 감즙에는 거의 없었으나 발효 후에는 많은 양의 cysteine이 생겼다. Tyrosine, phenylalanine과 같은 aromatic 아미노산은 발효 후 거의 없어졌다.

균주 없이 감즙만 이용하여 30°C에서 10일 동안 발효 시킨 후의 알콜농도는 0.5% 이하였다. 균주를 사용하지 않았으므로 알콜농도는 높지 않았다. 이 때 pH는 발효함에 따라서 매우 낮아져 발효후의 pH는 3.3정도이었다. 이것은 감즙을 균주를 사용하지 않고 발효하면, 만들어진 감주가 바로 산화되어 감초로 되며, 감초로 인하여 매우

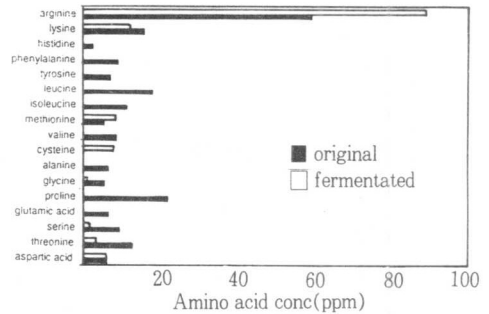


그림 2. 감즙의 아미노산조성과 감즙을 *S. formosensis* 균주로 1주일 동안 발효시킨 후의 아미노산 농도 변화

낮은 산도를 갖기 때문이다.

균주를 배양하기 위하여 일반적으로 많이 쓰고 있는 YEP 배지와 영양물질이 많이 첨가되어 있는 defined 배지와 염배지에서 균주를 배양한 결과 그림 3에서 보는 바와 같이 YEP 배지에서 *S. ellipsoideus*가 제일 잘 자랐다. 이들 모든 균주들은 YEP 배지에서 잘자랐으며 24h 정도 배양하면 10⁶ 세포로 배양되었다.

감즙을 발효시키는 균주들을 더욱 잘 배양하기 위하여 YEP 배지와 defined 배지, 염배지등에서 배양하고, 20°~37°C 온도사이에서, pH 4.5~7.2 사이에서 배양한 결과 배지의 성분은 세포성장예 크게 영향을 주지 않았으며 온도는 30°C 부근에서 pH는 5.5정도에서 가장 잘 자랐

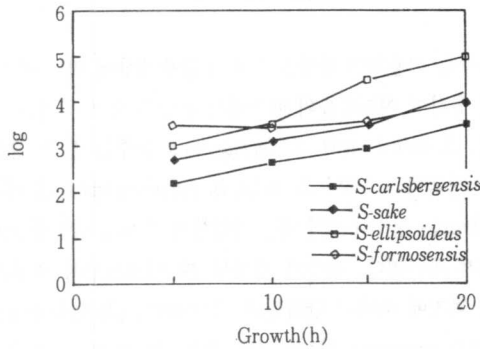


그림 3. YEP 배지에서 여러가지균주의 성장속도

다.^{11,12,13)}

20ml 감즙에 원심분리하여 분리한 100mg의 균주를 넣고 30°C에서 발효시켰다. 발효시키면서 생성되는 알콜의 양을 효소적인 방법과 G.C를 이용한 기기적으로 분석하였다. 분석 결과 (그림 4)에서 보는 바와 같이 *S. cerevisiae*는 매우 감즙을 잘 만들었다. *S. cerevisiae*는 약 8%의 알콜을 생성한 반면 *S. carlsbergensis*는 약 3% 정도 밖에 만들지 못하였다. 또한 일반청주 발효에 사용되는 균인 *S. sake*, 역시 감즙을 생산하는데는 부적합하였다. 알콜이 발효되는 동안에 변하는 pH를 조사해 보니 *S. ellipsoideus*는 pH가 4.3에서 발효후 3.3으로 크게 떨어졌다. 이것은 만들어진 알콜이 균주에 의해서 산화되어 감초를 만들기 때문일 수 있다. 그러므로 그림4에서 보는 바와 같이 발효 처음에 알콜이 많이 생성되지만 시간이 지나면서 알콜이 산화되기 때문에 알콜이 더 이상 증가되지 않음을 알 수 있다.

알콜발효에 미치는 당량의 영향을 알아보기위하여 glucose와 fructose를 첨가하여 알콜의 생성을 보았다. 20mg균주를 함유하고 있는 10ml의 감즙에 1.0g의 glucose를 (10% w/v) 첨가했을 때, 알콜은 11.5%를 생성하였다. fructose의 영향은 glucose에 비하여 크지 않았다. 그러므로 알콜농도를 증가하기 위하여는 glucose와 같은 당을 더 첨가하든지 아니면 감즙에 있는 tannine, pectine과 같은 polysaccharide를 분해하여 당을 만들 수 있는 효소를 첨가하면 알콜의 농도를 증가시킬

수 있을 것이다. 알콜의 생성에 미치는 당의 양은 균주에 따라서 모두다르다. 예를 들어 *S. cerevisiae*는 당의 양에 따라서 별로 변하지 않았으나 (그림 6)처럼 *S. formosensis*는 당이 증가할수록 달라졌다. 또한 알콜생성에 미치는 균주의 양 역시 균주 마다 다르게 나타난다. 20, 50, 100mg 균주를 10ml 감즙에 넣어 발효시키면, *S. sake*, *S. ellipsoideus*는 균주의 양에 따라서 생성되는 알콜농도가 별로 변하지 않으나 *S. formosensis*는 균주의 양에 따라서 생성되는 알콜농도가 크게 변하였다. 20mg을 넣었을때 약 5%의 알콜을 생성했으나 100mg을 넣은 결과 11.5% 정도의 배이상의 알콜을 생성하였다. 위의 결과 가장 발효를 잘 시키는 *S. formosensis* 균을 고정화 물체에 고정화하였다. 고정화 한후 비고정화된 균주를 제거한 후 칼럼에 충전해서 bioreactor를 만들었다. 만든 bioreactor에 감즙을 통과시키면서 시료에 대한 pH와 알콜농도를 측정하였다. 측정된 결과 (그림 7)에서 보는 바와같이 pH는 약간 감소하였으며, 알콜은 증가하여 8일후 약 9%의 알콜을 얻을 수 있었다. 이것은 보통 감즙의 발효로 부터 얻은 결과와 비슷하지만 균주를 쉽게 제거하여 다시 이용할 수 있는 잇점이 있기 때문에 감주 제조 뿐만 아니라 일반 균주를 이용한 유용한 의약품의 bioconversion system의 연구에도 응용할 수 있을 것이다.^{8,9)}

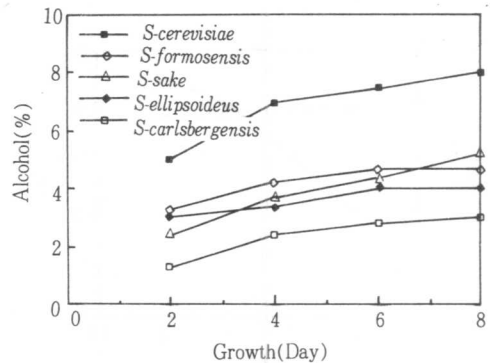


그림 4. 발효시간에 따른 여러가지 균주에 의해 생성되는 알콜농도

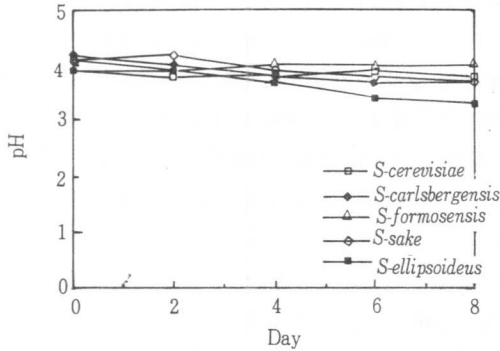


그림 5. 여러가지 균주에 의한 발효동안의 PH 변화

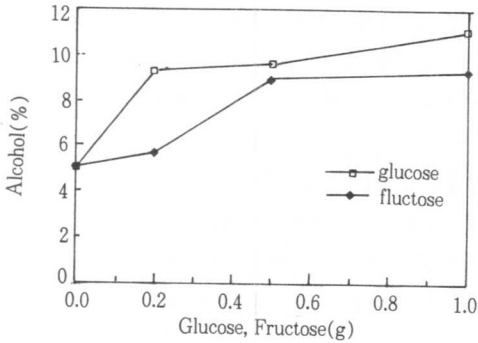


그림 6. 알콜생성에 미치는 당의 영향
20mg *S. form-osenis*로 10ml의 감즙을 발효시킬때 첨가된 당의 양에 따른 알콜 생성

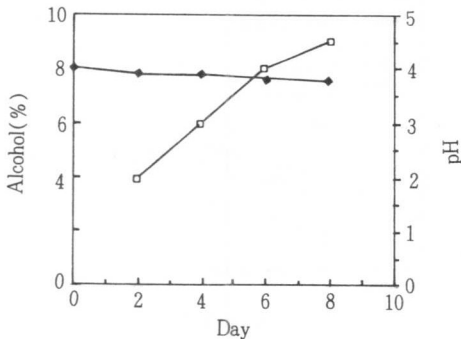


그림 7. 칼럼 bioreactor에 의한 감주의 생산(□)과 PH (◆)변화

III. 결 론

균주를 이용하여 감즙으로 부터 감주생산에 대한 본 연구를 통하여 여러종류의 배지에서 균주의 성장 조건을 얻었다. *S. cerevisiae*와 *S. formosensis* 균주는 감주 생산에 적합하다. 그러나 *S. sake*, *S. carlsbergensis*, *S. ellipsoideus*는 청주나 맥주에는 적합할지 모르나 감주생산을 잘하지 못하였다. 감주가 생산될 때 아미노산의 조성은 발효 과정에 따라서 달라진다. Tyrosine, phenylalanine 과 같은 aromatic 아미노산은 감소하는 반면, arginine methionine은 증가하였다. Cystein은 감즙에는 별로 존재하지 않았으나 발효후 감주에는 많이 존재하였다.

감주의 알콜농도에 당과, 균주의 양이 영향을 미칠수가 있다.¹⁴⁾ *S. formosensis*는 첨가된 당에 의해서 감주의 알콜농도를 증가시킨다. *S. formosensis*에 glucose를 10% 증가시키면 알콜 농도는 거의 배이상으로 증가하였다. 그러나 *S. cerevisiae*는 첨가된 당의 양에 별로 영향을 받지 않았다. 또한 균주의 양에 대한 실험에서는 알콜을 적게 생산하는 *S. sake*, *S. ellipsoideus*는 균주의 양을 증가하여도 알콜 농도는 변하지 않으나, *S. formosensis*는 균주의 양이 증가하면 알콜농도도 증가하였다. 이것을 더 발전시킨다면 시판되는 청주수준인 15%까지 증가시켜서 감주를 상품화 할 수 있으리라 생각한다.¹⁵⁾ 위의 균주를 이용하여 기공 고정화 물체에 균주를 고정화 하여 칼럼 bioreactor를 만들었다. 이 bioreactor를 이용하여 8% 알콜을 함유한 감주를 생산할 수 있으나, 고정화 물체가 비싸기 때문에 실제로 상업화를 위한 반응기 제조로는 더욱 연구해야할 줄로 생각한다.

참고 문헌

1. B. Mattiason, Immobilized cells and organelles vol a. CRC Boca Raton. FL.,(1983).
2. R. I. Muteles and E Buttat. Appl. Microbiol., 28. 901.(1974).
3. A. M. Harbison, A. G. Kenpton and G. G. Stewart, Dev. Ind. Microbiol., 25, 467(1984)
4. E. Oura, Biotechnol. Bioeng., 16, 1197(1974)

5. A. Assa and R. Bar. *Biotechnol. Bioeng.*, 38, 1325 (1991)
6. C. Chen. M. C. Dale, M. R. Okos. *Biotechnol. Bioeng.*, 36, 993(1991)
7. M. C. Dale, C. Chen and M. R. Okos *Biotechnol. Bioeng.*, 36, 983(1990)
8. W. K Kang, R. Schukla and K. K. Sipkar. *Biotechnol. Bioeng.*, 36, 326 (1990)
9. D. S. Inoles, A. S. Michaels, C. R. Robertson and A. Martin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 23, 85 (1985)
10. Y. Shabtai, S. Chaiomovig, A. Freeman, E. Katchalski-Katzir, C. Linder, M. Nemas, M. Perry and O. Kedem. *Biotechnology and Bioengineering*, 38, 864(1991)
11. S. T. Hsu and S. T. Yang. *Biotechnology and Bioengineering*, 38, 571(1991)
12. L. R. Gowda, N. Bachhawat and S. G. Bhat. *Enzyme, Microb. Technol.*, 13, 154(1991)
13. Icaro, L. Perez and D. Cantero. *Biotechnology and Bioengineering*, 38, 742(1991)
14. 정동효, 발효와 미생물공학, 선진문화사 (1991)
15. 김철환, 고려대 논문집 (1984)