한국농화학회지 Vol.18, No.1, March 1975
J. Korean Agricultural Chemical Society

紫外線 照射에 依한 濁酒酵母의 變異株 育成에 關한 硏究 (第三報)

——變異株의 生酸能 및 變異株를 利用한 濁酒釀造에 對하여——

金燦祚・吳萬鎭・金聖烈
忠南大學校 農科大學

(1975.2.20 受理)

Studies on the Induction of Available Mutant of Takju Yeast by UV light Irradiation Part III

——On the Acid Productivity of the Mutant and Takju Brewing Utilized the Mutant——

C.J. Kim, M.J. Oh, & S.Y. Kim.
College of Agriculture, Chung nam National University

(Received, February 20, 1975)

SUMMARY

This experiment was conducted to study the effects of temperature and pH upon the acid productivity of the acid producing mutant induced by the treatment of ultraviolet light, and to identify the producing acid by PPC and p-oxydiphenyl method.

Chemical composition of Takju mash brewed with selected yeast and producing acid were observed and the results were as follows.

1) There was no apprecible difference in acid producing activity of mutant at 25°C to 30°C.
2) The acid producing activity of mutant was little below pH 4 and was gradually increased according to approach nenutral, and the accumulation of acid was amounted to 0.5—0.7% as a lactic acid at pH 5 to 7 within 48 hrs of fermentation.
3) The acid produced by mutant was detected to the lactic acid.
4) In the cases of the Takju was brewed with the starter from the acid producing mutant, the requirement of Ipkuk was 5% for all the raw materials, on the contrary, using orginal strain the requirement of Ipkuk was 20%.
5) In the case of both starters from the acid producing mutant and orginal strain were added at different brewing times, and only Bunkuk was used as a saccharifying agent (without Ipkuk), Takju was able to brewed more repidly and successfully than the case of general process.

緖　論

濁酒釀造에 效果的인 酵母菌株를 인위적으로 育成하고저 分離 選定한 2株의 濁酒酵母를 母菌으로 하여 이들 酵母菌에 紫外線을 照射시켜 醱酵力이 강한 2變異株와 또한, 母菌에서 없던 강한 生酸能이 있는 1變異株를 얻어 이를 菌株들의 紫外線에 對한 耐性, 발효력, vitamin 要求性 및 菌學的 諸性質을 調査하고 同定한 結果를 前報[1,2]에서 발표하였다.

酵母의 有機酸 生成에 關한 연구는 *Hansenula anomola var. anomola*의 구연산 生成에 關한 "朴" 等[3]의 報告와 各種酵母의 구연산 生產性 및 液體 Paraffin을 탄소원으로 하여 *Candida lipolytica*의 紫外線 變異株의 구연산 生產能을 검토한 "田淵" 等[4,5,6]의 報告가 있다.

著者 等은 *Saccharomyces*屬 濁酒酵母에서 얻은 紫外線 變異株中 젖酸 生成能이 강한 興味있는 1株에 對하여 그 生酸性에 미치는 온도와 pH의 영향을 검토하고 生成한 酸을 PPC法으로 검정 하였으며 아울러 이 生酸 變異株를 濁酒釀造에 有效하게 利用하므로서 現行 濁酒釀造에서 粒麴을 쓰지 않고 貯藏性이 좋은 良質의 濁酒를 製造하는 同時에 釀造 期間을 단축하여 生產費를 절감하는 效果를 얻을 수 있다는 생각으로 이 生酸變異株를 利用한 濁酒釀造試驗을 하여 그 結果를 얻었으므로 여기에 報告하는 바이다.

實驗材料 및 方法

1. 實驗材料

가. 供試酵母 : 前報[1,2]에서 分離同定한 *Saccharomyces cerevisiae*(5-Y-5) 및 그 生酸性 變異株(30~81)

나. 種麴 : 太白 種麴社 製品

다. 粉麴 : 韓國 麴子會社 製品

라. 濁酒製造原料

밀가루 : 市販 中力粉 二等品

옥수수粉 및 보리쌀 : 市販品

마. 담금用水 : 水道水

2. 實驗方法

가. 變異株의 生酸性과 pH 및 온도

pH 3,4,5,6 및 7로 조정한 Bllg. 12°의 麥芽汁을 500ml 삼각 flask에 200ml씩 分注하고 麥汁 寒天 斜面上에 48時間 前培養한 母菌株와 酸生成變異株를 接種하여 25°C, 30°C 및 35°C에서 배양하면서 12時間마다 10ml씩을 取하여 pH를 측정하고 中和에 要하는 0.1—NaOH의 滴定値를 젖酸으로 환산하여 판정하였다.

나. 生成酸의 檢定

1) Paper chromatography 法[7]

맥아즙(Bllg. 12°, pH 5.0)에 酸生成變異株를 30°C에서 4日間 배양한 液과 原麥芽汁에 標準酸을 各各 0.5%씩 첨가한 液을 Whatman No. 1 여지에 各各 點滴하여 n-butanol : formic acid : H_2O =4 : 15 : 1의 混合 上層液을 溶媒로 20°C에서 약 15時間 展開시켜 0.1% BPB alcohol液을 發色劑로 하는 PPC法에 의하여 검정 하였다.

2) *p*-oxydihpenyl에 의한 檢定法[1]

試料 1ml을 試驗管에 取하여 氷冷하면서 H_2SO_4, 6ml을 서서히 가한 후 沸騰水浴中에 넣고 5分間 加溫하여 20°C 以下로 急 냉각한다. 여기에 4% $CuSO_4$液과 1.5% *p*-oxydiphenyl 溶液 1滴을 가한 후 30°C에서 30分間 靜置하여 沸騰水浴中에서 90秒間 처리하고 室溫에서 냉각시켜 Multipurpose spectrophotometer 5,000(MPS 5,000)으로서 最大吸收 波長을 測定하여 檢定 하였다.

다. 選定 酵母를 利用한 釀造試驗.

밀가루를 蒸煮한 후 種麴을 접종하여 28°C에서 48시간 배양한 粒麴과 粉麴 그리고 麥芽汁(Bllg. 12° pH 5.0)에 供試酵母 2菌株를 各各 接種하여 30°C에서 24시간 배양시킨 酵母로서 담금온도 20~22°C로 表1과 같은 配合比率의 2段法으로 5*l*의 병에 담금하여 25°C에서 4일간 醱酵시키면서 pH 滴定酸度 alcohol 및 :ormol 窒素를 測定比較 하였다.

表1에서와 같은 담금 比率을 基本으로 하고 粒麴 및 粉麴의 使用量을 달리하는 담금, 밀가루의 30%를 옥수수粉으로 또한 50%를 보리쌀로 대체하는 담금, 母菌의 酒母와 그 變異株의 酒母를 혼용하는 담금에서 30~81酵母의 酒母를 時差的으로 使用하는 담금법등도 試驗하였다.

밀가루에는 27%, 옥수수粉에는 60%의 添水를 하고 보리쌀은 12時間 浸水시켜 물을 뺀후 平壓에서 1時間 증자하여 담금 원료로 하였으며 2段담금은 1段담금 24시간 後에 하였다.

라. 술덧 成分 分析

濁酒 술 덧의 分析은 釀造分析法[8]에 따라 다음과 같이 하였다.

1) ethanol; 水蒸氣蒸溜法에 의하여 정량 하였다.

2) pH; TOA HM-5A pH meter로 측정하였다.

3) 酸度 : 술 덧 濾液 10ml로 中和하는데 소요

Table 1. Material ratio of Takju mashing.

Brewing plot	1st stage						2nd stage			Remarks
	ipkuk (g)	wheat flour (g)	seed mash of 5-Y-5 strain (ml)	seed mash of 30-31 strain (ml)	bunkuk (g)	tap water (ml)	wheat flour (g)	bunkuk (g)	tap water (ml)	
No. 1	250		35		9	450	1,000	9	1,800	
2	250			35	9	450	1,000	9	1,800	
3		250	35		18	450	1,000	18	1,800	
4		250		35	18	450	1,000	18	1,800	
5		250	28	7	18	450	1,000	18	1,800	
6	62	188	35		9	450	1,000	9	1,800	
7	62	188		35	9	450	1,000	9	1,800	

ipkuk; moldy wheat flour.
bunkuk; saccharifing agent.

되는 0,1-NaOH의 滴定値로 표시 하였다.

4) formol 窒素 : Sörensen formol 滴定法[9]에 따라 술덧 역액 10ml에 對한 0.1N-NaOH의 滴定値로 포시하였다.

結果 및 考察

가. 酸生成에 對한 pH 및 온도의 영향

酸生成變異株와 그 母菌을 各 pH의 培地에 접종하고 여러 온도에서 배양하여 生成한 酸을 定量함으로써 酸生成에 대한 pH 및 온도의 영향을 檢討한 결과는 圖, 1,2,3 및 表 2와 같다.

圖 1,2,3 및 表2에서 生成酸은 各 pH의 배지에 菌을 배양한 液의 滴定値에서 各 原培地의 滴定値를 감한 값을 젖산量으로 환산하여 표시한 것이다.

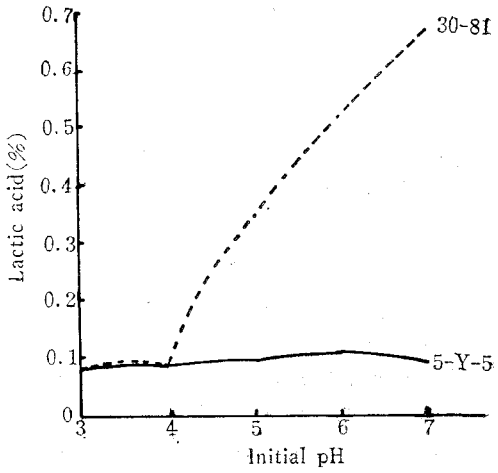

Fig.2. Effect of pH on the acid production of the original yeast and mutant. (at 30°C after 4 days)

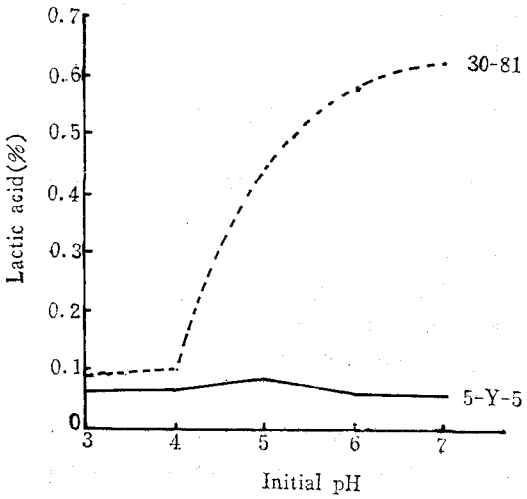

Fig.1. Effect of pH on the acid production on the original yeast and mutant. (at 21°C, after 4days)

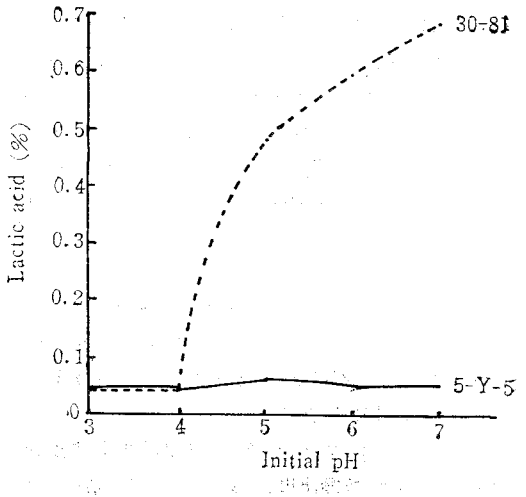

Fig.3. Effect of pH on the acid production of the original yeast and mutant (at 35°C, after 4 days)

Table 2. Effect of temperature and pH on the acid production of the original yeast and mutant during cultural period.

ccultural condition		amount of lactic acid production according to cultural period					
		24hrs.		48hrs.		72hrs.	
		5-Y-5 strain	30-81 strain	5-Y-5 strain	30-81 strain	5-Y-5 strain	30-81 strain
25°C	pH 3	0.063%	0.054%	0.063%	0.081%	0.063%	0.081%
	4	0.063	0.080	0.063	0.090	0.063	0.098
	5	0.065	0.081	0.081	0.180	0.081	0.315
	6	0.070	0.148	0.090	0.445	0.095	0.625
	7	0.075	0.293	0.095	0.428	0.095	0.581
30°C	pH 3	0.080	0.063	0.085	0.081	0.090	0.081
	4	0.080	0.085	0.085	0.090	0.090	0.090
	5	0.085	0.151	0.085	0.279	0.090	0.342
	6	0.085	0.292	0.095	0.504	0.102	0.518
	7	0.080	0.323	0.090	0.562	0.108	0.675
35°C	pH 3	0.054	0.065	0.054	0.065	0.054	0.070
	4	0.070	0.070	0.072	0.075	0.072	0.075
	5	0.075	0.139	0.075	0.203	0.080	0.207
	6	0.070	0.315	0.082	0.427	0.085	0.572
	7	0.083	0.311	0.090	0.549	0.090	0.693

pH 3~4에서는 變異株의 生酸量은 母菌과 비슷하나 pH 5~7에서는 母菌에 비하여 4~10倍의 생산량을 보이며 또한 初發 pH가 중성쪽 일수록 많은 酸을 生成함을 알 수 있었다.

이 pH의 生酸性에 대한 영향은 系狀菌을 利用한 구연산 生成에 있어서는 pH 2~3.5의 低 pH에서 良好하다는 金[10] 尾崎[11] 및 Prescott[12]等의 기술과는 대조적인 것 이었으나 젖산균은 pH 5.5~6.5下에서 젖산을 잘 생성한다는 보고[10,11,12]와 같은 傾向이라고 하겠다.

한편, 田淵[4]等은 $CaCO_3$를 미리 가해준 배지에서 각종 효모의 구연산 생성능을 調査하여 *Saccharomyces acidifaciens*가 0.18%, *Saccharomyces willianus*가 0.48%였다고 발표한 바 있는데 이들에 비하면 이 酸生成變異株는 0.6~0.7%의 젖산을 생성함으로 같은 *Saccharomyces* 屬 효모로서는 강한 生酸能이 있음을 알 수 있었다.

그리고 온도에 따르는 變異株의 酸生成能은 別로 差異를 認定할 수 없었으나 酸 生成은 30~35°C에서 배양 후 24시간 이내에 이미 全 生酸量의 반 이상이 생성되어 졌다.

이들 결과로 보다 이 酸 生成變異株를 濁酒釀造에 이용하면 粒麴使用을 줄일 수 있는 效果 等을 期待할 수 있다고 생각된다.

나. 生酸性의 檢定

顯著한 生酸能과 구연산 및 젖산에 대한 耐性이 강한 變異株가 생성한 酸을 검정하고저 PPC法으로서 그 배양액을 전개發色시킨 結果는 圖4와 같다.

圖4는 먼저 표준산으로서 젖산, 구연산, 사과산 호박산, 푸마르산 等을 原培地에 0.5%씩 첨가하여 酸 生成菌의 배양액과 동시에 전개시키고 發色시킨 결과 젖산과 호박산을 전개시킨 spot와 生酸菌의 培養液을 전개시켜 나타나는 spot와 비슷한 Rf 値를 보였음으로 다시 젖산과 호박산을 같이 混合한 液을 동시에 전개시켜 얻은 pattern인 것이다.

圖4에서 보는 바와 같이 變異株培養液과 젖산의 Rf 値는 0.58이고 호박산의 Rf 値는 0.62이며 젖산과 호박산을 혼합하여 전개시킨 Rf 値는 各各 0.57 및 0.62의 두개가 나온 것으로 미루어 變異株가 生成한 酸은 젖산인 것으로 추정되었다.

한편 젖산과 호박산의 Rf 値로서 各各 0.67 및 0.74로 보고[7]된 것을 볼 수 있다.

그리고 PPC法에 의해서 Rf 値가 거의 비슷한젖산, 호박산 및 시료를 *p*-oxydiph로서 發色시킨결과 젖산과 시료는 발색이 되나 호박산은 발색되지 않았다.

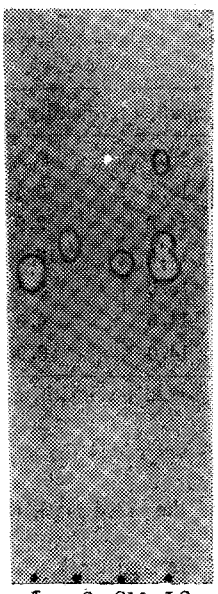

Fig. 4. Paper chromatogram of the identification of produced by the mutant.
L: lactic acid added to malt extract.
S: succinic acid added to malt extract.
CM: medium which was cultured with acid producing mutant.
LS: lactic acid and succinic and added to malt extract.

발색된 液을 MPS 5,000으로서 最大吸收波長을 測定한 결과 젖산과 시료는 570nm로서 同一하였으며 호박산은 발색되지 않아 흡수파장이 측정되지 않았다. 따라서 자외선 變異株에 依한 생성酸은 젖산으로 인정되었다.

이 결과로 30—81菌株는 그 母菌에서는 없든 젖산 生成能이 자외선 조사에 依하여 나타난 變異株라고 하겠으며 또한 이와같이 比較的 많은 量의 젖산을 生成하는 酵母에 대한 報告가 別로 없는것으로 보아 特히 이 變異株의 젖산 生成能은 興味있는 것이라 하겠다.

다. 選定酵母를 利用한 釀造試驗

粒麴을 20% 및 5% 使用한 濁酒담금區와 사용하지 않은 담금區에 母菌株와 酸 生成變異株로 育成한 酒母를 酵母를 各各 첨가하고 또한 粒麴을 使用하지 않은 區에 母菌株의 酒母를 첨가한 12시간후에 變異株의 酵母를 所定量 첨가하여 담금한 各 양조區들의 alcohol, 酸度 및 forma 窒素等의 分析結果는 表3과 같다.

이 試驗에서 담금 직후의 pH는 1段에서 제1 및 2區는 pH 3.8, 제 3, 4 및 5區는 pH 5.8, 제6 및 7區는 pH 4.4이며 2段에서 제1 및 2區는 pH 4.0, 제3區는 pH 4.8, 제4區는 pH 4.6, 제5區는 pH 4.4, 제6 및 7區는 pH 4.2이었다.

表3에서와 같이 20%의 粒麴을 사용한 담금區에서는 變異株와 母菌株의 酒母를 첨가한 區들의 各 成分上에는 큰 差異를 볼 수 없어 酸 生成變異株 이용의 效果를 인정할 수 없었다.

이것은 20%의 粒麴을 사용하면 그 粒麴에서 나오는 酸으로 말미암아 담금 pH가 3.8로 低下되어 酸生成變異株의 生酸能이 活性化되지 않은 까닭이라고 생각된다.

이 結果는 前述한 酸 生成變異株의 特性과 부합되는 것이라 하겠다. 그러나 사용 粒麴量을 5%程度로 하면 母菌의 酒母를 사용한 제6區에서는 酸度가 多少 떨어지나 變異株의 酒母를 사용한 제7區에서는 酒度, 酸度 및 formol 窒素等에서 對照區와 별 차가 없고 風味에 있어서도 粒麴을 사용하지 않고 양조한 濁酒의 결점인 單純味가 補完되어 別途 補酸의 必要性이 없어 결과적으로 생산비의 切減을 가져올 수 있는 것이라 하겠다.

한편, 糖化劑로서 粉麴만을 사용한 담금에서 母菌의 酒母를 사용한 제3區에서는 酸味가 아주 격은 濁酒가 되었으며 變異株의 酒母를 사용한 제4區에서는 酒度가 낮고 과다한 酸 生成으로 飮用에 不適當한 濁酒가 되었다. 그리고 이들 제3 및 4區에서는 粒麴에서 오는 蛋白質 分解酵素가 없으므로해서 formol 窒素도 현저히 적어지고 따라서 風味가 淡白한 것이었다.

그리하여 酸 生成變異株의 生酸能을 조절할 目的으로 母菌의 酒母로서 一段 담금한 12시간 후에 變異株의 酒母를 첨가하여 釀送한 제5區에서는 5%의 粒麴을 사용한 제6 및 7區와 비슷한 良質의 濁酒가 製送되었다.

이와같은 濁酒釀造試驗의 결과로 5% 程度의 粒麴을 사용하거나 母菌의 酒母를 일단 담금한 12시간 경도 후에 一定 比率의 變異株 酒母를 사용하는 것이 이 酸 生成變異株의 生酸能을 效果的으로 탁주양조에 이용할 수 있음을 알 수 있었다.

또한 이 生酸變異株와 母菌株의 酒母의 사용량을 各各 9.5 : 0.5, 9 : 1, 및 5 : 5등으로 變更하고 變異株의 酒母 使用時期를 6시간 및 24시간 後 등으로 변경하여 양조한 결과 별 효과를 인정할 수 없었으며 兩酒母를 동시에 사용하면 어느 경우에도 과다의 生酸이 인정되었다. 그리고 사용 원료로서 밀가루량의 50%를 보리쌀로 대체하는 양조

Table 3. Contents of Takju mashes brewed by the original yeast and mutant.

Formantation period / Components / brewing plot	2 days			4 days		
	alcohol	acidity	formol nitrogen	alcohol	acidity	formol nitrogen
1	13.5%	5.8ml	2.0ml	15.3%	5.9ml	4.0ml
2	13.2	6.5	2.2	15.1	6.4	4.1
3	13.1	2.6	0.6	14.9	2.9	1.0
4	11.4	12.3	2.2	12.5	16.2	2.5
5	12.4	4.9	1.2	15.0	6.5	1.4
6	12.9	3.7	1.2	14.6	4.8	2.8
7	12.4	5.9	1.4	14.0	6.9	3.0

No. 1 Plot was brewed with flour in 1st stage and was added the seed mashwith original strain. (4-Y-5)

No. 2 Plot was brewed with mouldy wheat flour in 1st stage and was added the seed mash with acid proeucing mutant. (30-81)

No. 3 Plot was brewed with steamed wheat flour and was added the seed mash with orginal strain. (5-Y-5)

No. 4 Plot was brewed with steamed wheat flour and was added the seed mash with acid producing mutant. (0-81)

Ne. 5 Plot was brewed with steamed whe at flour and was added the seed mash with acid producing mutant after 12hrs fermentation adding the seed mash with original strain in 1st stage.

No. 6 Plot was brewed with 5% mouldy wheat flour and was added the seed mash with original strain. (5-Y-5)

No. 7 Plot was brewed with 5% mouldy wheat flour and was added the seed mash with acid producing mutant. (30-81)

시험에서는 산도는 비슷하나 酒度, formol 窒素 및 製成酒의 저장성등이 다소 떨어지는 경향이 있었으며 30%를 옥수수분으로 대체하는 시험에서는 발효가 지연되고 주도도 다소 저하되었는데 이것은 옥수수粉을 蒸煮할때 添水量을 많이 한것도 원인이라고 생각된다.

한편 粉麴의 사용량을 증가시키면 산도에 있어서는 별 차이를 보이지 않았으나 주도 및 formol 질소는 약간 증가를 보였다.

摘 要

탁주효모에 자외선을 照射시켜 얻은 變異株의生酸性에 미치는 pH 및 온도의 영향과 생성한 산을 PPC법 및 *p*-oxidiphenyl法으로 검정하고 또한 이 菌을 이용한 탁주양조시험을 하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 酸 생산변이주의 生酸能은 25~35°C 下에서는 별 차이가 인정되지 않았다.

2. 生酸변이주는 pH 4以不에서는 거의 산을 생성하지 않았으나 pH 4 이상에서는 中性으로 감에 따라 급격히 산을 생성하여 pH 5~7하에서는 48시간의 배양으로 0.5~0.7%의 生酸量을 보였다.

3. 변이주가 생성한 산을 검정한 결과 젖산으로 인정되었다.

4. 酸 생성변이주의 酒母를 사용하면 담금원료의 5% 粒麴으로도 20% 粒麴을 사용할 때와 같은 양질의 탁주를 제조할 수 있었다.

5. 糖化劑로서 粉麴만을 사용하여 母菌株의 酒母와 산 생성변이주의 酒母를 시차적으로 첨가함으로서 양조기간의 단축과 양질의 탁주를 제조할 수 있었다.

參 考 文 獻

(1) 金燦祚, 吳萬鎭, 金聖烈‥農化誌 18, 10(1975)

(2) 金燦祚, 吳萬鎭, 金聖烈 : 農化誌 18, 16(1975)

(3) 朴允仲, 吳萬鎭, 李錫健 : 食品科誌 5, 215(1973).

(4) 田中優行, 田原康者, 田淵武士, 阿部又三 : 日本 農化誌 44, 499 (1970).

(5) 田淵武士, 田中優行, 阿部又三 : 日本 農化誌 42, 440 (1968).

(6) 田淵武士, 田中優行, 阿部又三 : 日本. 農化誌 43, 154 (1969)

(7) 小原哲二郎, 鈴木隆雄, 岩尼裕之 : 食品分析ハンドブツク, 建帛社, p. 328, 329 (1969)

(8) 山田正一 : 양조분석법, 産業圖書, 99 (1969).

(9) 東京 農工大學：食品學 實驗法，朝倉書店，p. 55 (1960).
(10) 金浩植：醱酵工學，鄕文社，p. 234 (1965).
(11) 尾崎淺一郎：朝井勇宣編，微生物工業，朝倉書店，p. 376 (1956).
(12) S.C. Prescott & C.G. Dunn: Industrial Microbiology. McGraw-Hill. p. 304 (1959).