

酵母에 의한 果實酒中の 減酸效果에 關한 研究

(第2報) *Schizosaccharomyces japonicus* var. *japonicus*의 釀造學的 性質

俞 大 植

啓明大學校 理工大學

(1978년 3월 4일 수리)

Studies on the Malic Acid Degradation in Wine by Yeast

(Part 2) Zymologic Characteristics of *Schizosaccharomyces japonicus* var. *japonicus*

Tae Shick Yu

College of Science and Engineering, Keimyung University, Taegu, Korea

(Received March 4, 1978)

Abstract

The malo-alcoholic fermentation characteristics of *Schizosaccharomyces japonicus* var. *japonicus* which was freshly isolated from strawberry were studied. A good assimilation of malic acid by the strain was observed under the following conditions: pH 4.2~4.8, alcohol content less than 12%, sulfur dioxide concentration less than 150 ppm, and less than 0.01% of Mn^{2+} as $MnSO_4$.

The strain could remove 0.3% of malic acid completely in 6 days under stationary culture at 30°C. Shaking the culture could promote growth of the strain but did not affect on the malo-alcoholic fermentation.

序 論

*Schizosaccharomyces pombe*가 사과酸을 알코올과 CO_2 로 分解한다는 사실은 1914年 Kluver⁽¹⁾에 의하여 보고된 바 있다. 그러나 이 菌이 직접적으로 포도주⁽²⁾와 사과주⁽³⁾에 작용하여 減酸效果를 나타낸다는 것을 研究, 報告한 것은 最近의 일이다. 이 菌은 포도주 酵母와 비교하여 生育速度가 느리고 生育 最適 溫度가 높기 때문에 釀造學的으로 이

러운 문제를 內包한다. 즉 果實酒의 醱酵中 野生 酵母가 쉽게 生育이 壓倒되어 生育이 停止되든지 死滅해 버리는 경향이 있다. 그러므로 이 菌을 사용하여 果實酒中の 減酸效果를 誘導한다는 것은 釀造 技術的인 문제가 있었어 강력한 減酸效果를 가지며 酒質에 惡影響을 미치지 않는 우량한 酵母의 檢索이 요망된다.

우리 나라에서도 果實酒의 生産이 高潮되고 있는 이때 이러한 研究가 요망된다고 하겠으나 malo-alcohol 醱酵에 關한 研究는 全無한 狀態였다.

前報⁽⁴⁾에서와 같이 이미 發表된 *Schizosaccharomyces pombe* 0-77⁽⁵⁾보다 강력한 減酸 效果를 가지는 *Schizosaccharomyces japonicus* var. *japonicus*를 말

本研究는 1977年度 文教部 學術研究助成費에 의하여 이루어진 論文의 一部分임.

기의果皮로부터分離, 同定하여 報告한바 있다.
本報에서는 釀造學的 性質을 檢討하여 그의 結
果에 대하여 報告하고자 한다.

材料 및 方法

1. 菌株

딸기의果皮로부터分離, 同定한 *Schizosaccharomyces japonicus* var. *japonicus* 를 사용하였다.

2. 培養基

前報⁽⁴⁾에서 설명한 分離用 培養基를 기본 배양
기로 사용하였다.

Table 1. Medium for the Test of Zymologic Characteristics of *Schizosaccharomyces japonicus* var. *japonicus*.

Malic acid	0.3%
KH ₂ PO ₄	0.1%
MnSO ₄ · H ₂ O	0.005%
Yeast extract	2.0%
pH	4.2%

3. 사과酸的 定量法

前報⁽⁴⁾에 의한 paper chromatography 에 의하여
發色시킨 사과酸的 spot 를 오려서 증류수 10 ml 에
溶出시켰다. 이 溶出液中的 사과酸을 Goodban⁽⁶⁾의
방법에 의하여 비색 定量하였다. 즉 溶出液 1 ml
를 냉각시키면서 진한 황산 6 ml 와 2,7-dihydroxyn-
aphthalene (1g/100 ml 진한 H₂SO₄) 0.1 ml 를 첨가
하여 20 分間 沸騰시켜 반응시켰다. 반응액을 냉
각하여 390 nm 에서의 吸光度 (O. D.) 측정하여
표준곡선 (Fig. 1) 에서 사과酸的 含量을 계산하였다.

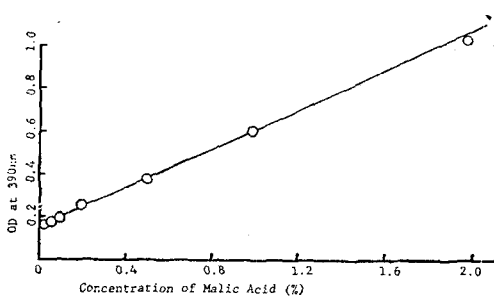


Fig. 1. Standard Curve for Assaying Malic Acid by Goodban Method.

4. 알코올의 定量

培養基中에 생성되는 알코올의 定量은 일반 증
류법에 準하였다.

그 이외의 방법은 常法에 準하였다.

5. 試藥

사용 시약은 和光純藥工業株式會社(日本) 製品
의 시약 특급품을 사용하였다.

結 果

1. pH의 影響

기본 배양기를 각 pH 로 조절한 후 供試菌을 접
종하고 30°C에서 7일간 靜置培養하여 malo-alcohol
발효의 효과를 측정된 결과를 Table 2 에 표시하
였다.

Table 2. Effect of pH on Malo-Alcoholic Fermentation.

Initial pH	Growth*	Malic acid (%)
2.0	—	0.285
2.4	—	0.200
2.8	+	0.142
3.2	++	0.074
3.8	+++	trace
4.2	++	0.0
4.8	++	0.0
5.4	+	Trace
5.8	+	Trace
6.2	+	0.260

*Growth: —, nogrowth; +, grown; ++, good grown; +++, best grown.

供試菌의 生育 限界 pH는 2.8에서 5.8사이
고 특히 pH 3.2에서 4.8 사이가 良好하나 pH 3.8
에서 가장 良好하였다. 그러나 malo-alcohol 발효
에 대한 pH의 효과는 菌의 生育이 良好한 pH의
범위보다 약간 알칼리성인 pH 4.2에서 4.8 사이
가 良好하였다.

2. 알코올의 影響

기본 배양기에 無水 알코올을 各 濃度로 添
후 供試菌을 접종하여 30°C에서 7일간 靜置培養
하여 malo-alcohol 발효에 대한 알코올의 影響을 檢
討하였다.

알코올 濃度 12%까지는 供試菌의 生育과 malo-
alcohol 발효에 아무런 影響을 미치지 못하나 그 이
상의 濃度에 있어서는 濃度가 上昇함에 비례하여
阻害作用도 培大되며 20% 이상의 알코올 濃度에서
는 菌의 生育과 malo-alcohol 발효는 완전히 阻害되
었다.

3. SO₂의 影響

Malo-alcohol 발효가 SO₂ 존재로 받는 影響을 檢討하기 위하여 K₂S₂O₅를 各 濃度가 되도록 조제하여 供試菌을 30°C에서 7일간 培養하였다.

Table 3. Effect of SO₂ Gas on Malo-alcoholic Fermentation.

SO ₂ Conc. (ppm)	Growth(OD at 610 nm)	Malic acid(%)
0.0	5.90	0.0
25	6.20	0.0
50	5.80	0.0
100	2.10	trace
150	1.78	trace
200	2.20	0.100
300	1.55	0.234
500	0.86	0.290

Table 3에서 보는 바와 같이 供試菌의 生育은 50 ppm에서는 아무런 影響을 받지 않으며 그 이상의 濃度에서는 生育 阻害 作用이 認定되었다. 그러나 사과酸의 消失은 150 ppm까지 阻害作用이 認定되지 않으나 그 이상에서는 SO₂ 濃度에 비례하여 阻害作用이 增大되었다. 300 ppm의 SO₂에서는 사과酸의 消失은 완전히 阻害되었다.

4. Mn²⁺의 影響

MnSO₄를 제거한 기본 배양기에서는 malo-alcohol 발효는 완전히 阻害되므로 Malo-alcohol 발효를 誘導하는데 Mn²⁺이 必須因子로서 作用한다고 認定되므로 Mn²⁺의 濃度에 대한 影響을 檢討하였다.

供試菌에 대한 malo-alcohol 발효는 0.01%의 Mn²⁺이 요구되고 있다. 즉 0.01%의 濃度까지는 濃度의 上昇에 비례하여 malo-alcohol 발효가 촉진되나 그 이상의 濃度에서는 오히려 阻害作用을 한다(Table 4).

Table 4. Effect of Mn Ion on Malo-alcoholic Fermentation.

Mn ion(% as MnSO ₄)	Growth(OD at 610 nm)	Malic acid(%)
0.0	5.80	0.287
0.01	5.50	trace
0.05	5.60	0.110
0.10	5.60	0.206
1.00	0.12	0.290
2.00	0.14	0.289
5.00	0.05	0.292

5. 糖의 影響

기본 배양기에 탄수화물로 蔗糖을 첨가한 배양기에서 malo-alcohol 발효를 誘導한 結果, 탄수화물이 존재하면 供試菌에 의한 malo-alcohol 발효를 誘導하지 않으며 탄수화물이 존재하지 않든지 혹은 極微量(0.1%이하) 존재하면 malo-alcohol 발효를 誘導하였다. 그러나 菌의 生育은 탄수화물이 존재하지 않는 환경에서는 거의 增殖하지 않았다.

6. 酸素의 影響

遊離의 산소의 공급 형태에 따라 사과酸의 變化와 菌의 生育을 檢討하여 Table 5에 표시하였다.

Table 5. Effect of Aeration on Growth and Malo-alcoholic Fermentation.

Cultured conditions	Growth (OD at 610 nm)	Malic acid (%)
Static	5.1	Trace
Shaking	21.7	0.0

Growth were tested a broth which were cultured for 3 days at 30°C after inoculation.

菌의 生育은 혐기적 조건인 靜置培養보다 산소의 공급이 충분한 振盪培養이 양호한 菌의 增殖을 나타내었다.

malo-alcohol 발효의 誘導에 있어서는 靜置培養보다 振盪培養하는 것이 사과酸의 分解能이 양호한 것 같다. 그러나 현저한 차이점은 없었다.

7. 酵母 抽出物의 影響

효모 추출물이 malo-alcohol 발효에 미치는 影響을 檢討하기 위하여 효모 추출물을 제거한 기본 배양기에 0.1%, 0.2%, 0.5%, 1%, 1.5%, 2%, 3%, 5% 되도록 효모 추출물을 첨가하여 供試菌을 培養하였다.

효모 추출물을 첨가하지 않은 實驗區에서는 malo-alcohol 발효가 일어나지 않았으며 2%의 濃度까지는, 液의 上昇과 비례하여 malo-alcohol 발효의 效果가 增大되었다. 효모 추출물을 1% 첨가되었을 때 가장 높은 malo-alcohol 발효의 效果를 나타냈다. 그러나 그 이상의 濃度에서는 오히려 阻害作用을 하였다.

8. 사과酸의 消滅 日數

사과酸을 0.3% 含有한 기본 배양기에 供試菌을 接種하여 30°C에서 靜置培養하면서 經時的으로 사과酸의 變化를 측정하여 Table 6에 표시하였다.

菌의 接種 후 3일까지는 아무런 變化가 없었으며 3일 이후부터 사과酸의 消滅이 시작되어 6일

Table 6. Degradation of Malic Acid in Basic Medium.

Cultured time (days)	Malic acid (%)
1	0.285
2	0.287
3	0.285
4	0.250
5	0.170
6	trace
7	0.0
8	0.0
9	0.0
10	0.0

로서 완전히 消滅되었다.

9. 알코올의 生成能

供試菌의 알코올 生成能을 측정하기 위하여 麥芽培養基에 各 濃度의 糖分으로 調整하여 발효시킨후 발효액중의 알코올의 濃度를 測定하여 알코올의 生成能이라 표시하였다.

그 結果를 Fig. 2에 표시하였다.

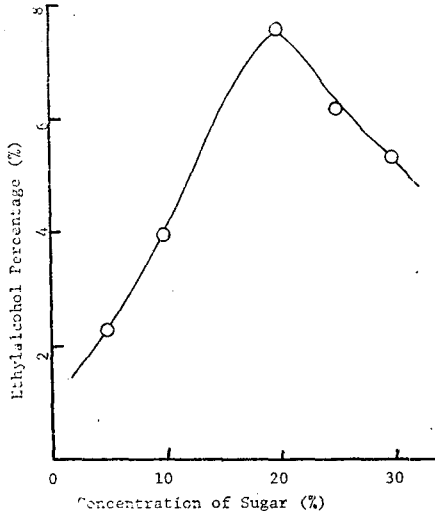


Fig. 2. Production of Ethyl Alcohol by *Schizosaccharomyces japonicus* var. *japonicus*.

Schizosaccharomyces japonicus var. *japonicus* 는 20%의 糖 含有 培養基에서 7.5%의 알코올을 生成시켰다. 20%이상의 糖의 존재는 菌의 生育과 함께 알코올의 生成을 阻害하였다.

考 察

Schizosaccharomyces pombe 0-77⁽⁵⁾보다 강력한

malo-alcohol 발효를 誘導하는 *Schizosaccharomyces japonicus* var. *japonicus*에 대하여 釀造學的 諸 因子를 調査하였다.

Schizosaccharomyces pombe⁽⁷⁾는 pH 2.8~4.0에 서 가장 양호한 malo-alcohol 발효를 하며 乳酸細菌인 *Lactobacillus arabinosus*⁽⁸⁾는 pH 3.2~3.3 이하에서는 malo-lactic fermentation는 阻害를 받는다. 그러나 *Schizosaccharomyces japonicus* var. *japonicus*는 上記 二菌보다 pH 4.2~4.8에서 양호한 발효를 誘導하였다.

일반적으로 酵母菌이 細菌보다 耐알코올性인 것 은 周知의 사실이다.

乳酸菌인 *Lactobacillus arabinosus*⁽⁸⁾는 6% 알코올에서 malo-lactic fermentation阻害를 받으며 17% 알코올에서는 완전히 阻害를 받으나 酵母菌인 *Schizosaccharomyces pombe* 0-77⁽⁵⁾은 11% 알코올에서 아무런 影響을 받지 않으며 12%에서 약간의 阻害가 일어나며 13% 알코올에서 阻害作用이 認定된다고 하였다. *Schizosaccharomyces japonicus* var. *japonicus*는 10% 알코올의 존재로 菌의 生育과 malo-alcohol 발효에는 아무런 阻害를 미치지 못했다. 그 이상의 濃度에서는 알코올 濃度의 上昇에 비례하여 生育과 醱酵作用에 阻害를 받으며 20%에서는 완전히 阻害를 받는 전형적인 酵母의 生理의 特性을 나타내고 있다. 반면 *Schizosaccharomyces versatilis*⁽⁵⁾는 알코올 生成力이 약해서 약 10%를 生成하며 *Schizosaccharomyces pombe* 0-77⁽⁵⁾은 14%이상의 알코올을 生成한다. 그러나 供試菌은 7.5%의 알코올을 生成하여 *Schizosaccharomyces versatilis*⁽⁵⁾보다 낮은 알코올 生成力을 가지고 있다. 그러나 供試菌의 사용은 알코올 生成이 主目的이 아니고 果實酒中の 사과酸의 分解를 主目的으로 하므로 釀造學的으로 문제시 되지 않는다고 하겠다.

果實酒를 釀造하는데 있어서는 선택적 殺菌作用을 가지는 SO₂ 가스를 100~150 ppm 첨가하여 釀造 하므로 耐 SO₂ 性인 菌株가 要求된다. *Lactobacillus arabinosus*⁽⁸⁾는 SO₂ 耐性이 약하여 80 ppm에서 완전한 阻害를 받으나 SO₂ 耐性이 강한 *Schizosaccharomyces pombe*⁽⁷⁾는 200 ppm의 SO₂에 대하여 阻害作用은 認定되지 않는다고 보고하였다. 그러나 供試菌은 50 ppm 이상의 SO₂에서는 生育 阻害作用이 認定되나 malo-alcohol 발효는 아무런 影響을 미치지 못하며 150 ppm 이상의 濃度에서 阻害作用이 認定되었다.

배양액에 炭素源으로서 蔗糖을 첨가하면 malo-alcohol 발효가 거의 일어나지 않고 있었다. 이러한 結果로 부터 供試菌은 糖類가 존재하지 않는 조건에서는 炭液源으로는 사과酸을 同化하여 營養源으로 이용하는 혐기적 발효를 한다. 그러나 炭液源으로서 양호한 蔗糖을 배양기에 첨가하면 사과酸의 同化作用은 약화되고 蔗糖을 同化하여 營養源으로 이용하기 때문이라 추측된다. 그러나 *Schizosaccharomyces liquefaciens*⁽⁹⁾는 糖을 제거한 완전한 배양기에서는 호기적 혹은 혐기적 조건에서 사과酸을 발효하지 못한다는 相反된 보고도 있다.

Schizosaccharomyces pombe⁽⁷⁾의 生育은 振盪培養과 靜置培養의 차이는 없으나, 사과酸의 消失日數는 靜置培養보다 振盪培養의 방법이 有効하여 培養日數가 길면 길수록 사과酸의 分解能은 振盪培養法이 강하게 나타나서 그의 差는 현저하다. 그러나 供試菌의 生育은 靜置培養보다 振盪培養이 현저한 增殖을 나타내고 있으며 사과酸의 分解能은 별다른 차이점을 발견하지 못하였다. 이러한 結果에서 菌의 增殖과 사과酸의 分解能의 비교는 大塚⁽⁷⁾등의 結果와 전혀 相反되는 結果를 얻었다. 더우기 供試菌은 혐기적 조건에서 6일로서 0.3%의 사과酸을 완전히 分解하여 *Schizosaccharomyces pombe* 0-77⁽⁵⁾보다 강력한 사과酸의 分解能을 가지고 있었다.

Malo-alcohol 발효에 있어서 아미노산인 alanine, aspartic acid는 촉진작용이 있으며 몇 종류의 金屬이온 역시 약간의 촉진효과가 있다고 한다⁽⁷⁾.

供試菌은 Mn^{2+} 에 의하여 malo-alcohol 발효가 誘導되고 그의 最適 濃度는 0.01%이며 이 이상의 濃度에서는 오히려 金屬 阻害 効果를 나타낸다.

효모 추출물을 제시한 기본 배양기에서는 malo-alcohol 발효가 전혀 일어나지 않으며 효모 추출물을 첨가하므로 발효는 일어나며 最適 濃度는 2%였다.

이상의 結果는 효모 추출물에 Mn^{2+} 혹은 本 醱酵을 誘導하는 誘導物質 또는 촉진물질인 必須 代謝 産物을 含有할 可能性이 강하게 지배하고 있다. 그러므로 앞으로 이러한 物質을 分離, 同定하는 것도 有益하다고 보며, 供試菌이 *Schizosaccharomyces pombe*⁽⁷⁾보다 SO_2 耐性이 약한 것은 SO_2 에 순양培養하므로 SO_2 耐性 菌株을 쉽게 얻어지리라 믿는다.

이러한 여러 問題點에 대해서는 다음으로 미루겠다.

要 約

果實酒中 酸味が 강한 사과酸을 酵母에 의하여 分解하는 微生物學的 減酸 現象을 규명하기 위하여 供試菌으로서 딸기의 果皮로부터 分離, 同定한 *Schizosaccharomyces japonicus* var. *japonicus*에 대하여 釀造學的 性質을 檢討하였다.

供試菌은 pH 4.2~4.8, 알코올은 12%이하, SO_2 는 150 ppm 이하, Mn^{2+} 은 $MnSO_4$ 로서 0.01% 이하의 濃度에서 양호한 malo-alcohol 발효를 誘導했다.

供試菌은 糖으로 부터 7.5%의 알코올을 生成시켰다. 糖의 첨가는 malo-alcohol 발효를 阻害하였으며 靜置培養과 振盪培養과의 差異點은 認定할 수 없으나 供試菌의 生育은 振盪培養하므로 촉진되었다.

供試菌은 사과酸 0.3%를 30°C에서 靜置培養하므로 6일로서 완전히 分解하였다.

參 考 文 獻

- 1) A. J. Kluyver, *Biochemische Suikerbepalingen*, Delft (1914), Ref. E. Peynaud, *Weinb: Keller*, **12**, 229 (1965).
- 2) J. Jakubowska: *Przemysl Spozywczy*, **8**, 487 (1967), Ref. *Zbl. Bakt.*, **II**, **117**, 330 (1963).
- 3) W. Balloni, R. Materassi, and C. Paoletti: *Ind. Agr.*, **11**, 253 (1973).
- 4) 兪 大植: 韓産微誌, **6**(1), 23 (1978).
- 5) 野々村 英夫, 信田 正, 小原 岩, 加々美 久, 渡邊 正平, 風間 敬一: 日釀協誌, **63**(7), 765 (1968).
- 6) A. E. Goodban, and J. B. Stark: *Anal. Chem.*, **29**, 284 (1957).
- 7) 大塚 謙一, 原 昌道, 齊藤 寛: 日釀協誌, **63**(7), 771 (1968).
- 8) 大塚 謙一, 原 昌道: 日釀協誌, **58**(8), 61 (1963).
- 9) E. Peynaud: *Wine and Vine*, **46**(3), 28 (1965).