

밀감양조주 생산용 효모의 선별, 동정 및 Citric Acid 분해

고영환 · 김재하 · 고정삼* · 김창진**

제주대학교 공과대학 식품공학과, *농과대학 농화학과, **생명공학연구소

Screening and Identification of the Yeasts for Orange Wine and Their Citric Acid Decomposition

Young Hwan Ko, Jae-Ha Kim, Jeong-Sam Koh* and Chang-Jin Kim**

Department of Food Engineering, Cheju National University

*Department of Agricultural Chemistry, Cheju National University

**Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology

Abstract

Yeast strains useful for the production of wine using mandarin orange, *Citrus unshiu*, as a main substrate were screened, and their primary ability to decompose citric acid that affects directly wine quality was investigated. Total eleven strains were selected for brewing orange wine. Five wild strains were from soil-based collections and identified: four of them were *Saccharomyces cerevisiae* and one of them was *S. ellipsoideus*. The rest of six strains were from among eighteen laboratory strains: three of them were *S. cerevisiae*, and the other three were *S. coreanus*, *S. uvarum*, and *S. sake*. Two strains of *S. cerevisiae* out of these selections were chosen and their decomposition of citric acid was investigated. Citric acid was not utilized as sole carbon source for cellular growth. However, when both citric acid and glucose were added together as carbon sources, decrease of citric acid concentration was observed after incubation. Shaking incubation was more effective for the reduction of citric acid than standing incubation. Utilization of citric acid did not contribute to the increase of ethanol concentration during fermentation. On the other hand, it appeared that citric acid caused partial inhibition of cellular growth of the yeasts.

Key words: yeast, orange wine, citric acid, decomposition

서 론

과일주의 양조에대한 연구로는, 경남일원에서 밤을 이용한 청주와 위스키 제조⁽¹⁾와 모과즙을 보당하여 발효시킨 모과주 제조⁽²⁾가 있다. 유와남⁽³⁾은 곡류에 잔류 중인 농약이 ethanol 발효용 효모 *Saccharomyces coreanus*에 미치는 영향을 조사하였고, 류 등⁽⁴⁾은 당밀에서 분리된 *Saccharomyces cerevisiae*의 발효최적조건은 30°C, pH 5.0이었고, 18%의 glucose 함유배지에서 평균 75 g/L의 ethanol을 얻었다고 보고하였다. 이 경우 *S. cerevisiae*에 의한 ethanol 발효능은 매우 낮은 편으로 알려져 있다.

과일주에서 품질의 우열은 원료의 화학적 조성, 양

조에 관여하는 효모의 생리적 특성, 그리고 양조조건 등에 좌우되는 것으로 알려져 있다⁽⁵⁾. 고 등⁽⁶⁾은 감귤을 이용한 과일주 생산에 관한 기초적인 연구를 수행하여 산업화의 가능성을 제시한 바 있다. 그에 따르면, 제주산 온주밀감(*Citrus unshiu*)착즙액을 기존의 효모 균주로 ethanol 발효시켜 양조주를 제조한 결과, 양조주의 유기산 함량은 0.78~1.11%로 주질에 악영향을 미친다고 하였다. 또한, 이 등⁽⁷⁾의 제주산 감귤주스의 성분분석 결과에 의하면, 유기산이 0.76~1.26%로 그 중 대부분이 citric acid이었다. 따라서, 감귤주스 중에 함유된 citric acid의 처리문제가 대두되었으나, 이에 대한 연구검토가 이루어지지 않은 실정이다. Citric acid가 효모의 생육을 위해서 소모될 수 있다면, 양조주의 품질향상에 기여하게 될 것이다.

본 연구에서는 고 등⁽⁶⁾의 밀감 양조주에 대한 연구를 기반으로 하여, 양조주에 적합한 균주를 탐색하고,

Corresponding author: Young Hwan Ko, Department of Food Engineering, Cheju National University, Cheju, Cheju-do 690-756, Korea

이들 효모균주의 citric acid 분해에 대한 기초자료를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

양조주용 온주밀감

양조주의 주원료로 사용된 제주산 온주밀감(*Citrus unshiu*)의 과육성분은 Table 1과 같다. pH는 pH meter (model 220, Corning, USA)로, 수분은 상압가열건조법, 회분은 직접회화법, 그리고 조지방은 Soxhlet 추출기를 사용한 ether추출법으로 각각 분석하였다⁶⁾. Biuret 반응⁹⁾을 이용하여 가용성 단백질을 정량하였고, 환원당은 3,5-dinitrosalicylic acid를 이용한 DNS법¹⁰⁾, 총당은 phenol-H₂SO₄법¹¹⁾, 그리고 당도는 refractometer (Atago, Japan)로 각각 분석하였다.

밀감 양조주 시제품의 제조 및 향미검사

감귤양조주의 제조는 다음과 같이 실시하였다. 과피를 제거한 과육을 착즙하여 얻은 쥬스에 sucrose를 가하여 최종 당농도가 약 20% 되도록 하였으며, KH₂PO₄ 농도가 10 mM이 되도록 가한 후, pH를 5.4로 조절하고 살균 목적으로 sodium metabisulfite (Na₂S₂O₅)를 300 ppm 수준으로 첨가하거나, 또는 70°C에서 30분간 가열처리하였다. 발효기질 1,000 mL당 YM broth (Difco, USA)에 배양시킨 각각의 효모 배양액을 2% 수준으로 접종한 다음, 밀봉하여 28°C 항온배양기에서 일주일 이상 기포생성이 중단될 때까지 발효시켰다. 시제품의 향미검사는 후각만을 이용한 향미검사를 10명의 패널요원이 5점 기호척도법¹²⁾(대단히 싫다, 약간 싫다, 좋지도 싫지도 않다, 약간 좋다, 대단히 좋다)으로 실시하였다.

감귤양조주 생산용 효모의 수집 및 선별

제주지역의 감귤원 토양, 감귤과 토양을 혼합하여 15~20°C에서 일주일내지 한달동안 부숙시킨 것 및 부패감귤로부터 야생효모를 순수분리하였다. 시료 중에

Table 1. General composition of a peeled mandarin orange, *Citrus unshiu*

| Component | Content | Component | Content |
|-------------|----------------|--------------------------|----------------|
| pH | 3.97 | Reducing sugar | 2.0% |
| Moisture | 89.4% | Brix sugar ¹⁾ | 10.8% |
| Ash | 0.3% | Total sugar | 10.1% |
| Crude lipid | less than 0.1% | Protein ²⁾ | less than 1.2% |

¹⁾Determined by a refractometer (Atago, Japan).

²⁾Determined by the biuret reaction.

들어있는 여러 미생물군으로부터 효모만을 선택적으로 우선 분리하기 위하여 YM agar (Difco, USA) 배지를 사용하였다. 각각의 시료를 멸균된 10 mM phosphate buffer (pH 6.8)로 적절히 희석하여 페트리디쉬당 약 100~1000여개의 군락이 형성되도록 평판도말 배양하여 순수분리를 시도하였다. 25~28°C (이하, 설명이 없으면, 배양온도는 동일함)에서 동일 종류의 배지에 계대배양함으로써 순수분리를 유도하였다. 1차적으로 순수분리된 균주 중에서, yeast nitrogen base (Difco, USA)에 탄소원으로 glucose를 첨가한 배지를 이용한 Durahm tube 법을 사용하여 가스 생성의 정도, 이취발생의 여부, cycloheximide (50 µg/mL) 감수성, kanamycin (20 µg/mL) 및 sodium metabisulfite (300 ppm)에 대한 내성 여부를 기준으로 2차 선별하였다. 전술한 과정을 통하여 선별된 야생균주와 기존의 효모 균주(Table 2)를 대상으로, 감귤쥬스를 주원료로 사용하여 간이 ethanol 발효실험을 실시하였다. 감귤쥬스에 최종 당농도가 약 20% 되도록 sucrose를 섞었으며, KH₂PO₄ 농도가 10 mM이 되도록 첨가한 후, pH를 5.4로 조절하고 121°C에서 15분간 고압멸균시킨 발효기질 100 mL에 각각의 효모를 직접 백금니로 접종하여 일주일간 정치배양한 후, ethanol 발효능이 비교적 양호한 균주를 선별하였다. 최종적으로는 감귤양조주 시제품의 제조시 ethanol 농도 및 향미를 기준으로 적합한 균주를 선별하였다. Ethanol 농도는 기본적으로 발효액을 상압증류법으로 증류하여, 증류액중의

Table 2. Yeast strains tested for ethanol fermentation using mandarin orange, *Citrus unshiu*, as a main substrate

| Strains | Strains |
|---|--|
| <i>Saccharomyces sake</i> CFV | <i>Debaryomyces cantarellii</i> IAM12208 |
| <i>Saccharomyces sake</i> | <i>Saccharomyces uvarum</i> IFO1167 |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> IFO0243 | <i>Saccharomyces rocei</i> IAM4991 |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> IFO7056 | <i>Kluyveromyces fragilis</i> IAM12237 |
| <i>Saccharomyces coreanus</i> | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> IAM4274 |
| <i>Kloeckera fragilis</i> IFO0288 | <i>Kluyveromyces marxianus</i> IAM4985 |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> IAM42940 | <i>Torulopsis colliculosa</i> IAM4426 |
| <i>Saccharomyces uvarum</i> IFO0565 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> IAM4512 |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC26603 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC4098 |

ethanol 농도를 비중계(효성계량기제작소, 서울)로 측정하였으나, 필요에 따라서는 효소를 이용한 정량 kit 인 TC Ethanol (Boehringer Mannheim, Germany)를 사용하였다.

효모의 동정

효모의 형태학적 관찰은 yeast morphology agar (Difco, USA)에 배양하여 육안관찰하고, Loeffler's methylene blue⁽¹³⁾로 염색후 400배로 현미경 관찰을 실시하였다. Ascospore의 관찰을 위해서 Kleyn's acetate agar에 배양하여 포자형성을 유도하였다⁽¹⁴⁾. 수집된 효모의 분류 동정을 위해서, carbohydrate fermentation broth⁽¹⁵⁾를 기본 배양액으로 이용하여, 각종 당에 대한 발효성의 유무, 유기산의 생성유무를 검사하였다. 해당 효모를 YM broth에 배양 후 원심분리하여 균체를 회수하고, 멸균 증류수로 3회 세척하여 접종원으로 이용하였고, Durham tube를 시험관에 뒤집어 집어넣고, 배양시 가스발생여부로 발효성 유무, phenol red의 변색여부로 유기산의 생성유무를 판정하였다. 대조구로는 당이 함유되지 않은 것을 사용하였다. 시료로 사용한 당은 0.2 µm filter (Micro Filtration Systems, USA)로 여과 제균하였다. 한편, carbohydrate fermentation broth 대신에 yeast nitrogen base를 사용하여 반복 실험함으로써 발효성을 재확인하였다. 각종 당류, mannitol과 같은 알코올류, citric acid와 같은 유기산, 그리고 질산염과 같은 질소원에 대한 자화실험은 기본적으로 van der Walt and Yarrow의 방법⁽¹⁶⁾에 준해서 실시하였다. 다만, ethanol 자화실험은 0.5% yeast extract, 0.1% (NH₄)₂SO₄, 0.1% KH₂PO₄, 0.05% MgSO₄가 함유된 기본 배지에 ethanol을 3% 수준으로 첨가하고, 효모균주를 접종하여 생육여부를 관찰하였다. 배지중에 들어 있는 yeast extract의 영향에 의한 균체의 생육이 가능하므로 대조구에는 ethanol을 가하지 않고 실험 결과를 상호 비교 판정하였다⁽¹⁵⁾.

Citric acid의 분해능

Yeast nitrogen base를 기본배지로 사용하여, Table 3과 같이 조성이 서로 다른 액체배지(pH 6.8)를 만들어 시험관에 넣고, 28°C 항온배양기에서 일주일간 효모의 정지 또는 진탕 배양 전후의 배양액중 균체농도, glucose, ethanol, 그리고 citric acid의 농도 변화를 측정하였다. 진탕배양은 rotary shaking incubator (Vision Scientific Co., LTD.)를 사용하여 200 rpm으로 실시하였다. 균체농도는 660 nm에서의 흡광도를 측정하여 표시하였다. 10 × yeast nitrogen base, 10% glucose, 그

Table 3. Composition of media for the test of citric acid metabolism by yeasts
(unit : mL)

| Media | Negative control | +Glucose | +Citrate | +Glucose & citrate |
|-------------------------|------------------|----------|----------|--------------------|
| 10× Yeast nitrogen base | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 |
| 10% Glucose | | 0.5 | | 0.5 |
| 10% Citric acid | | | 0.5 | 0.5 |
| Distilled water | 4.5 | 4.0 | 4.0 | 3.5 |

리고 10% citric acid는 각각 여과 제균하여 사용하였다. Ethanol 농도, citric acid 농도, 그리고 glucose 농도는 각각, TC Ethanol, TC Citric Acid, 그리고 TC D-Glucose kit (Boehringer Mannheim, Germany)를 이용하여 제조회사의 사용법에 따라 효소학적 방법으로 측정하였다. 시료는 0.2 µm filter로 제균후 사용하였으며, 흡광도의 측정에는 spectrophotometer (Smart plus, Youngwoo Instruments Co., Korea)를 사용하였다.

결과 및 고찰

효모의 분리 및 선별

밀감양조주에 적합한 야생효모를 획득하기 위하여, 제주도의 감귤원 토양을 주요 분리원으로 사용하여 순수분리된 28개 분리주에 대해서 glucose 발효능, 이취 발생여부, 항생제와 아황산에 대한 내성여부를 조사하여, 그 중에서 glucose를 발효시킬 수 있고, 발효시 역겨운 냄새를 생성하지 않으며, kanamycin (20 µg/mL)과 sodium metabisulfite (300 ppm)에 내성이면서 cycloheximide (50 µg/mL)에 대해서는 감수성인 10개의 분리주를 일차로 선별하였다. kanamycin과 cycloheximide는 효모인지 아닌지를 재확인하기 위해서, 아황산은 양조주 제조시 원료 감귤즙의 살균용으로 사용될 가능성이 있기 때문에, 아황산내성 균주를 우선적으로 선발한다는 의미에서 검토되었다. 감귤성분이 효모의 생육이나 물질대사에 영향을 미칠 가능성을 고려하여, 위와 같이 선별된 10개의 야생주와 *Saccharomyces cerevisiae* 등 ethanol 발효능이 있다고 알려진 18개의 분양주(Table 2)를 대상으로, 121°C에서 15분간 고압멸균시킨 제주산 감귤즙을 원료로 사용하여 간이 ethanol 발효실험을 실시하였다. 그 중에서 ethanol 함량 5% 이상인 균주 11주만을 선택하여 다음 단계인 감귤양조주 제조실험에 적용하였다.

최종적으로 선발된 11개 균주를 ethanol 발효용 효모로 사용해서 감귤 양조주 시제품 제조 실험을 실시한 결과를 Table 4에 요약하였다. 야생의 CA5, CA6, CB1, CB5, CB9 등 5개 균주와 기존의 *S. cerevisiae*

3개 균주, *S. coreanus*, *S. uvarum*, *S. sake* 각각 1개 균주 등 6개 균주, 도합 11개 균주를 사용해서 만든 감귤양조주의 향미는 좋지도 싫지도 않다(3.0)는 수준 이상이었고, 최종 ethanol 농도는 8.5%에서 12.0%로 나타났는데, 이는 과일주로서 통상 ethanol 농도(6~12%)에 비해서 낮지 않다. 뿐만아니라, 최적조건에서 ethanol 발효를 시킬 경우, 최종 ethanol 농도가 증가할 수 있다고 생각된다. 그리고 sodium metabisulfite를 300 ppm 수준으로 첨가한 발효기질과, 70°C에서 30분간 저온살균시킨 발효기질 사이에는 발효후 ethanol 농도에 별다른 차이가 없었다(자료제시 생략). 밀감양조주 시제품의 pH는 4.20~4.65로 발효 중의 유기산의 생성 또는 이산화탄소의 용해에 기인한 것으로 판단된다. 이는 고 등⁶⁾이 밀감양조주의 pH는 3.0~3.7이었다는 보고보다 비교적 높다. Table 4에 제시된 11개 균주는 밀감 양조주용 효모로서 활용가치가 있다고 판단된다.

Table 4. Ethanol concentration and flavor preference of each orange wine

| Strains used for orange wine | Flavor preference ¹⁾ (mean ± standard deviation) | Ethanol (%) | pH |
|-------------------------------|--|-------------|------|
| CA5 | 4.0 ± 0.63 | 11.0 | 4.60 |
| CA6 | 3.0 ± 0.45 | 9.5 | 4.50 |
| CB1 | 3.5 ± 0.50 | 11.5 | 4.50 |
| CB5 | 3.5 ± 0.50 | 9.0 | 4.65 |
| CB9 | 4.0 ± 0.63 | 10.0 | 4.20 |
| <i>S. cerevisiae</i> IFO7056 | 4.0 ± 0.45 | 11.5 | 4.30 |
| <i>S. cerevisiae</i> IFO0243 | 4.0 ± 0.63 | 11.5 | 4.40 |
| <i>S. coreanus</i> | 3.5 ± 0.81 | 12.0 | 4.50 |
| <i>S. cerevisiae</i> IAM42940 | 4.0 ± 0.45 | 11.5 | 4.50 |
| <i>S. uvarum</i> IFO0565 | 3.5 ± 0.81 | 9.0 | 4.25 |
| <i>S. sake</i> CFV | 3.0 ± 0.63 | 8.5 | 4.50 |

¹⁾Higher scores indicate more preference: 1=extremely unpleasant, 2=somewhat unpleasant, 3=neither unpleasant nor pleasant, 4=somewhat pleasant, 5=extremely pleasant.

야생효모의 동정

CA5, CA6, CB1, CB5, CB9 등 최종적으로 선발된 5개의 야생효모 분리주를 동정하고자 하였다. 현미경 하에서의 관찰과 배양특성, 당발효능, 다양한 탄소원과 질소원을 이용한 생육여부 등을 검색한 결과를 Table 5, 6, 7에 요약하였다. Table 5, 6, 7에 나와있는 결과를 토대로하여 Barnett 등¹⁶⁾의 분류동정 기준에 따라 상기 효모들을 잠정적으로 동정한 결과는 Table 8과 같다. 그 중 CA5, CA6, CB1, CB5 등 4개 분리주는 *Saccharomyces cerevisiae*로 동정되었는데, CA5와 CA6, 그리고 CB1과 CB5는 각각 동일한 분리주일 가능성을 배제하지 못하였다. 나머지 1개 분리주 CB9는 *Saccharomyces ellipsoideus*로 추정된다. 이하 본 논문에서의 분리주에 대한 표기는 동정결과에 준해서 나타내었다.

효모의 citric acid 분해

본 연구에서 분리, 동정된 5개 균주와 분양받은 *S. cerevisiae* IFO7056 1개 균주를 대상으로 citric acid의 이용여부를 조사하였다. Table 9와 Table 10의 실험결과에 의하면, 전 균주가 비슷한 양상을 나타내었다. Yeast nitrogen base를 기본배지로 사용하여 glucose를 탄소원으로 첨가하였을 경우에는 양성한 균체생육이 관찰되었으나, 그와 반면에 citric acid만을 탄소원으로 첨가하여 정치 또는 진탕배양을 하였을 경우에는, 균체의 생육이 이루어지지 않았다. 뿐만아니라, glucose와 citric acid를 동시에 탄소원으로 첨가하였을 경우에도 glucose만을 첨가한 경우에 비해서 균체생육 정도가 낮았다. 배지 중의 glucose 농도와 citric acid 농도가 각각 1%인 점을 고려한다면, citric acid 첨가에 의해서 균체의 생육이 억제되었다고 할 수 있다. 그 기작은 분명치 않으나, 고농도의 citric acid에 의한 물질 대사 저해 또는 citric acid와 2가의 양이온이 결합함으

Table 5. Morphological characteristics of yeast isolates

| | | Yeast isolates | | | | |
|-------------------------------------|------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | | CA5 | CA6 | CB1 | CB5 | CB9 |
| When grown on yeast morphology agar | Color | creamy | creamy | creamy | creamy | creamy |
| | Surface | smooth | smooth | smooth | smooth | smooth |
| | Elevation | slightly raised | slightly raised | slightly raised | slightly raised | slightly raised |
| When grown in YM broth | Surface membrane | Absent | Absent | Absent | Absent | Absent |
| | Sediment | Present | Present | Present | Present | Present |
| Cell shape | | globose | globose | globose | globose | ellipsoidal |
| Ascospore shape | | globose to ellipsoidal | globose to ellipsoidal | globose to ellipsoidal | globose to ellipsoidal | globose to ellipsoidal |

Table 6. Fermentation of carbon compounds by yeast isolates

| Carbon compounds | Characteristics | Yeast isolates | | | | |
|------------------|-----------------|----------------|-----|-----|-----|-----|
| | | CA5 | CA6 | CB1 | CB5 | CB9 |
| Cellobiose | Gas formation | - | - | - | - | - |
| | Acid production | - | - | - | - | - |
| Raffinose | Gas formation | + | + | + | + | + |
| | Acid production | + | + | + | + | + |
| Melibiose | Gas formation | - | - | - | - | - |
| | Acid production | - | - | - | - | - |
| Xylose | Gas formation | - | - | - | - | - |
| | Acid production | - | - | - | - | - |
| Mannose | Gas formation | + | + | + | + | + |
| | Acid production | + | + | + | + | + |
| Galactose | Gas formation | + | + | + | + | + |
| | Acid production | + | + | + | + | + |
| Glucose | Gas formation | + | + | + | + | + |
| | Acid production | + | + | + | + | + |
| Lactose | Gas formation | - | - | - | - | - |
| | Acid production | - | - | - | - | - |
| Sucrose | Gas formation | + | + | + | + | + |
| | Acid production | + | + | + | + | + |
| Fructose | Gas formation | + | + | + | + | + |
| | Acid production | + | + | + | + | + |
| Ribose | Gas formation | - | - | - | - | - |
| | Acid production | - | - | - | - | - |
| Maltose | Gas formation | + | + | + | + | + |
| | Acid production | + | + | + | + | + |

Table 7. Assimilation of carbon or nitrogen compounds by yeast isolates

| Carbon or nitrogen compounds | Yeast isolates | | | | |
|---------------------------------|----------------|-----|-----|-----|-----|
| | CA5 | CA6 | CB1 | CB5 | CB9 |
| Ethanol as sole carbon source | - | - | + | + | + |
| Nitrate as sole nitrogen source | - | - | - | - | - |
| Ethylamine | - | - | - | - | - |
| Cellobiose | - | - | - | - | - |
| Raffinose | + | + | + | + | + |
| Melibiose | - | - | - | - | - |
| Mannose | + | + | + | + | + |
| Citric acid | - | - | - | - | - |
| Galactose | + | + | + | + | + |
| Glucose | + | + | + | + | + |
| Lactose | - | - | - | - | - |
| Sucrose | + | + | + | + | + |
| Fructose | + | + | + | + | + |
| Ribose | - | - | - | - | - |
| Mannitol | - | - | - | - | - |
| Sorbitol | - | - | - | - | - |
| Inositol | - | - | - | - | - |
| Maltose | + | + | + | + | + |

Table 8. Preliminary identification of yeast isolates

| Yeast isolates | Identity | Strain designation |
|----------------|-----------------------------------|---------------------------------------|
| CA5 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CA5 |
| CA6 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CA6 |
| CB1 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CB1 |
| CB5 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CB5 |
| CB9 | <i>Saccharomyces ellipsoideus</i> | <i>Saccharomyces ellipsoideus</i> CB9 |

Table 9. Citric acid effect on the growth¹⁾ of yeast isolates by standing incubation for a week

| Strains | Media ²⁾ | Negative control | +Glucose | +Citrate | +Glucose & citrate |
|------------------------------|--------------------------|------------------|----------|----------|--------------------|
| | <i>S. cerevisiae</i> CA5 | | 0.014 | 1.410 | 0.001 |
| <i>S. cerevisiae</i> CA6 | | 0.013 | 1.392 | 0.002 | 1.173 |
| <i>S. cerevisiae</i> CB1 | | 0.014 | 1.395 | 0.001 | 1.142 |
| <i>S. cerevisiae</i> CB5 | | 0.013 | 1.400 | 0.005 | 1.150 |
| <i>S. ellipsoideus</i> CB9 | | 0.013 | 1.402 | 0.004 | 1.185 |
| <i>S. cerevisiae</i> IFO7056 | | 0.014 | 1.405 | 0.003 | 1.190 |

¹⁾The growth was determined by measuring absorbance at 660 nm.

²⁾Negative control had only yeast nitrogen base as nutrients. Refer to Table 3 for detailed medium composition.

Table 10. Citric acid effect on the growth¹⁾ of yeast isolates by shaking incubation for a week

| Strains | Media ²⁾ | Negative control | +Glucose | +Citrate | +Glucose & citrate |
|------------------------------|--------------------------|------------------|----------|----------|--------------------|
| | <i>S. cerevisiae</i> CA5 | | 0.015 | 1.890 | 0.005 |
| <i>S. cerevisiae</i> CA6 | | 0.014 | 1.900 | 0.004 | 1.513 |
| <i>S. cerevisiae</i> CB1 | | 0.014 | 1.920 | 0.004 | 1.538 |
| <i>S. cerevisiae</i> CB5 | | 0.014 | 1.897 | 0.003 | 1.494 |
| <i>S. ellipsoideus</i> CB9 | | 0.014 | 1.895 | 0.004 | 1.520 |
| <i>S. cerevisiae</i> IFO7056 | | 0.013 | 1.940 | 0.004 | 1.498 |

¹⁾The growth was determined by measuring absorbance at 660 nm.

²⁾Negative control had only yeast nitrogen base as nutrients. Refer to Table 3 for detailed medium composition.

로써 Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ 등 미량으로 함유된 원소의 이용저해 일 가능성이 있다. 한편, 동일한 배치조성이란 정치 배양보다 진탕배양이 균체의 생육에 효과적이었는데, 이러한 결과는 진탕배양이 정치배양보다 산소공급에 효과적이라는 점과 효모의 호기적 물질대사 특성에 기인한다고 판단된다.

Citric acid가 균체의 생육에 미치는 연구결과를 토대로, 야생균주 *S. cerevisiae* CA5와 기준균주 *S. cerevisiae* IFO7056을 대상으로 전술한 균체 생육 여

Table 11. Changes in carbon source and ethanol concentrations by standing incubation for a week

| Strains | Media ¹⁾ | Concentration (g/L) | | | | | |
|---------------------------------|---------------------|---------------------|-------|---------|-------|---------|-------|
| | | Citric acid | | Glucose | | Ethanol | |
| | | Initial | Final | Initial | Final | Initial | Final |
| <i>S. cerevisiae</i> CA5 | Negative control | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| | +Glucose | 0.00 | 0.00 | 9.98 | 0.00 | 0.00 | 7.02 |
| | +Citrate | 10.04 | 10.05 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| | +Glucose & citrate | 10.02 | 8.92 | 10.01 | 0.00 | 0.00 | 7.05 |
| <i>S. cerevisiae</i> IFO7056 | Negative control | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| | +Glucose | 0.00 | 0.00 | 10.00 | 0.00 | 0.00 | 7.00 |
| | +Citrate | 10.05 | 10.06 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| | +Glucose & citrate | 9.95 | 8.98 | 9.99 | 0.00 | 0.00 | 6.98 |

¹⁾Negative control had only yeast nitrogen base as nutrients. Refer to Table 3 for detailed medium composition.

Table 12. Changes in carbon source and ethanol concentrations by shaking incubation for a week

| Strains | Media ¹⁾ | Concentration (g/L) | | | | | |
|---------------------------------|---------------------|---------------------|-------|---------|-------|---------|-------|
| | | Citric acid | | Glucose | | Ethanol | |
| | | Initial | Final | Initial | Final | Initial | Final |
| <i>S. cerevisiae</i> CA5 | Negative control | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| | +Glucose | 0.00 | 0.00 | 9.99 | 0.00 | 0.00 | 2.10 |
| | +Citrate | 10.01 | 10.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| | +Glucose & citrate | 10.00 | 7.50 | 10.00 | 0.00 | 0.00 | 1.12 |
| <i>S. cerevisiae</i> IFO7056 | Negative control | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| | +Glucose | 0.00 | 0.00 | 9.98 | 0.00 | 0.00 | 1.15 |
| | +Citrate | 9.99 | 10.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| | +Glucose & citrate | 10.01 | 7.64 | 10.00 | 0.00 | 0.00 | 1.08 |

¹⁾Negative control had only yeast nitrogen base as nutrients. Refer to Table 3 for detailed medium composition.

부의 검정 실험과 동일한 조성의 배지를 사용하여, 정 치 또는 진탕 배양 전후의 citric acid, glucose, 그리고 ethanol 농도의 변화를 측정하여 얻어진 결과를 Table 11과 Table 12에 제시하였다. 이는 효모의 발효 또는 호흡 과정 중에 citric acid의 이용여부를 결정하고, ethanol 발효시 citric acid가 ethanol 농도 변화에 미치는 영향을 파악하고자 함이었다. 그 결과, 균주간에는 뚜렷한 차이점이 없었으며, 약 1% 수준으로 첨가된 glucose는 배양방법이나, citric acid와의 혼용여부에 관계없이 일주일 이내에 모두 소모되었다. Citric acid 만을 탄소원으로 첨가했을 경우에는, 배양전후에 citric acid의 농도 변화가 없었는데, 이는 Table 9와 Table 10에 제시된 자료에서 처럼, 효모가 citric acid를 유일한 탄소원으로 이용하여 생육할 수 없다는 것을 나타낸다. 또한 citric acid와 glucose를 각각 1% 수준으로 혼용했을 경우에는, citric acid의 농도가 감소하였으며, 감소 정도는 정치배양시(약 10%)보다 진탕배양시(약 25%)에 더 크게 나타났다. 이는 citric acid가 효모에 의해서 대사되었음을 나타낸다. Ethanol은 배양방법에 관계없이 glucose가 탄소원으로 첨가되면

생성되었으나, 진탕배양보다 정치배양시에 최종농도가 높았다. 진탕배양시에 균체농도가 상대적으로 높은 것(Table 9와 Table 10 참조)을 고려한다면, 이는 탄소원의 일부가 진탕배양시에 더 많이 균체 생육에 이용되었음을 암시한다. 그러나, citric acid의 혼용이 ethanol 농도의 변화에는 거의 영향이 없었다.

Table 9, 10, 11, 12의 자료를 종합적으로 판단해보면, citric acid는 효모의 유일한 탄소원으로 이용될 수는 없으나, 균체의 생육이 이루어지는 조건하에서는 효모에 의해서 소모되며, 정치배양보다 진탕배양시에 보다 많이 소모된다. 그러나, citric acid는 발효시 ethanol 농도를 높여주는 효과는 없는 것으로 판단된다. 따라서, 감귤 양조주의 품질향상을 위해서, 효모를 이용하여 생물학적 방법으로 citric acid의 농도를 감소시킬 수 있음을 알 수 있었다.

요 약

제주산 온주밀감(*Citrus unshiu*)을 이용한 양조주를 제조하는데 적합한 효모를 선별하고, 밀감양조주의

품질에 직접적으로 연관된 효모의 citric acid 분해능에 대해서 기초조사를 실시하였다. 밀감양조주용으로 활용가능하다고 판단된 균주는 모두 11주이었다. 제주 지역의 토양을 중심으로 5개의 효모균주를 분리, 선별하였는데, 그중 4개 주는 *Saccharomyces cerevisiae*, 나머지 1개 주는 *S. ellipsoideus*로 동정되었다. 한편 분양 균주 18주 중에서 선별된 균주는 6개 주로, *S. cerevisiae* 계통의 3개 주와 *S. coreanus*, *S. uvarum*, *S. sake* 각각 1개 주였다. 이 중에서 *S. cerevisiae* 2개 균주의 citric acid 분해능을 조사하였다. Citric acid는 효모의 유일한 탄소원으로는 이용될 수 없었으나, citric acid가 glucose와 함께 탄소원으로 사용되었을 때, 배양액 중의 citric acid 농도는 감소하였으며, 정치배양보다 진탕배양하였을 때 더 많이 감소하였다. 효모에 의한 citric acid의 이용은 ethanol 농도를 증가시키지 못하였으며, 오히려 citric acid는 효모의 생육을 부분적으로 저해하였다.

감사의 글

본 연구의 수행을 위해서 여러모로 협력해 준 제주대학교의 김성학, 송은영, 정완석, 허윤희, 이정호, 박명준, 그리고 박태근씨에게 감사드립니다.

문 헌

- 성낙계, 심기환, 기우경, 허종화, 조성환, 정덕화 : 밤을 이용한 청주 및 위스키 제조. 경상대 농어촌 개발연구, **8**, 25 (1990)
- 유태중, 한복려 : 모과주 제조에 관한 연구. 고려대학교 농림논집, **28**, 211 (1988)
- 유태중, 남성희 : 탁주효모 *Saccharomyces coreanus*의 알코올발효에 미치는 농약의 영향. 고려대학교 농림논집, **29**, 217 (1989)
- 류병호, 남기두, 김혜성, 김동석, 지영애, 정수자 : Ethanol 발효를 위한 내열성 효모균주의 Screening. 한국산업미생물학회지, **16**, 265 (1988)
- 이계호 : 증류주 숙성에 관한 연구 [제1보] 사과 증류주 숙성에 있어서 숙성통제로서 한국산 참나무 품종별 이용적성에 관하여. 한국농화학회지, **20**, 66 (1977)
- 고정삼, 고남권, 강순선 : 제주도산 감귤발효주의 양조 특성. 한국농화학회지, **32**, 416 (1989)
- 이현유, 석호문, 남영중, 정동효 : 한국산 감귤주스의 이화학적 성상. 한국식품과학회지, **19**, 338 (1987)
- 주현규, 조현기, 박종관, 조규성, 채수규, 마상조 : 식품 분석법. 유통문화사, 서울, (1992)
- Henry, R.J., Sobel, C. and Berkman, S.: Protein determination by the biuret reaction. *Anal. Chem.*, **29**, 1491 (1957)
- Miller, G.L.: Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal. Chem.*, **31**, 426 (1959)
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F.: Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal. Chem.* **28**, 350 (1956)
- 김광옥, 이영춘 : 식품의 관능검사. 학연사, 서울, p.160 (1991)
- Harrigan, W.F. and McCance, M.E.: Laboratory methods in food and dairy Microbiology. Academic Press Inc., London, Great Britain, p.314, p.327 (1976)
- van der Walt, J.P. and Yarrow, D.: Chapter II. Methods for the isolation, maintenance, classification and identification of yeasts. In *The Yeasts, A Taxonomic Study*, Kreger-van Rij, N.J.W. (Ed.), Elsevier, Amsterdam, Netherland, p.45 (1984)
- 京都大學農學部農藝化學教室(編) : 農藝化學實驗書. 産業圖書, 日本, 第2卷, p.835 (1995)
- Barnett, J.A., Payne, R.W. and Yarrow, D.: *The keys. In Yeasts: Characteristics and Identification*, Cambridge University Press, Cambridge, p.539 (1983)

(1997년 4월 1일 접수)