

감과실 알코올 발효를 위한 효모의 분리

정용진 · 서권일 · 신승렬* · 서지형** · 강미정** · 김광수**

동국전문대학 전통, *경산대학교 식품, **영남대학교 식품영양학과

Yeast Isolate for Alcohol Fermentation of Persimmon Fruits

Yong-Jin Jeong, Kwon-Il Seo, Seung-Ryeul Shin*, Chi-Hyeong Seo**,
Mi-Jung Kang** and Kwang-Soo Kim**

Department of Traditional Fermented Food, Tongkuk College, Chilkok, 718-850

*Department of Food Science, Gyungsan University, Kyungsan, 712-240

**Department of Food and Nutrition, Yeungnam University, Kyungsan, 712-749

ABSTRACT

To utilize abundant poor persimmon fruits effectively, it was studied on alcohol fermentation strains which were isolated and indentified from poor persimmon fruits. The strains which had exellent alcohol production ability were analyzised morphogical, cultural characteristics and identified *Saccharomyces cerevisiae* YJK 20, *Sacachromyces kluveri* DJ 97. Alcohol production ability between the isolated strains and industrial alcohol yeasts was compared in the YPD medium, persimmon extract medium. Isolated strains had high alcohol production ability in both of two medium, respectively. So it was expected that the strains, YKJ 20 and DJ 97 had good alcohol fermentation ability of persimmon fruits.

Key words: yeast, identification, persimmon, alcohol Fermentation.

I. 서 론

감(*Diospyros kaki*)은 당질과 비타민 A, C가 풍부한 알칼리성 식품으로 대장의 수축과 분비액의 분비 촉진 및 기침 등에 효과가 있다고 알려져 있다^{1~4)}. 이러한 영양적인 특성에도 불구하고 다른 과실에 비하여 그 이용성이 제한되어 왔으나 최근 감식초 제조에 많이 이용되고 있다^{5~7)}. 재래식 감식초는 11월

중순에 수확된 감을 병행복발효의 자연발효를 통해 제조하여 이듬해 7월경 제품으로 출하된다^{8,9)}. 재래식 감식초의 경우 감에 많이 함유된 탄닌성분이 많은 맛과 polyphenol oxidase의 기질이 되어 갈변현상과 알코올발효를 저해하고 효소단백질과 복합체를 형성하여 유색 침전물이 생성되기도 한다^{10,11)}. 한편 잡균의 오염으로 비위생적이고 제조때마다 제품의 색상이 변색되어 상품성이 낮을 뿐만 아니라 5~

6 개월간의 장기간 발효로 대량생산 및 보존이 어려워 경제성이 낮은 실정이다¹²⁻¹⁴⁾. 감식초의 품질규격은 초산함량 2.6 % 이상으로 기타 식초의 4.0~20.0 % 보다 낮게 규정되어 있는데¹⁵⁾ 이는 재래적인 방법으로는 알코올발효가 저해되어 식초의 기질이 되는 알코올생성량이 낮아져 식초의 수율 또한 낮을 수 밖에 없기 때문이다¹⁶⁾. 따라서 일반식초와 같은 산미료의 기능을 하지 못하여 대량생산에 많은 문제점이 있다. 최 등¹³⁾도 감 품종별 자연발효와 인위적인 발효에 의한 품질 비교에서 알코올발효균주간의 알코올생성력을 비교하여 고품질의 식초생산의 문제점을 보고하였고, 정¹²⁾은 알코올발효와 초산발효의 2단계 발효로써 감필름을 이용하여 20 °C에서 5일째에 7~8 % 알코올발효하였으며, 정 등¹⁴⁾은 저온저장중 발생되는 불량한 단감을 파쇄하여 알코올발효 및 초산발효를 2단계로 약 12일만에 산도 6% 정도의 감식초를 제조하여 시판되는 사과, 현미, 재래식 감식초와 품질을 비교한 결과 속성으로 감식초를 제조 할 수 있는 조건에 관하여 보고하였다. 알코올발효 균주의 개발과 개량에 관한 연구로는 당화용 glucoamylase를 분비하는 효모의 개발¹⁷⁾, 고농도알코올의 발효가 가능한 효모의 개발¹⁸⁾, 내알코올성 효모의 개발¹⁹⁾, 응집성 효모의 개발²⁰⁾, 균체의 고정화²¹⁾, 연료용 알코올생산 효모에 관한 연구²²⁾, 김치 stater용 효모의 개발²³⁾ 등의 많은 연구가 이루어지고 있다.

그러나 감식초의 전단계인 감알코올발효를 효율적으로 이루기 위한 균주에 관한 연구는 거의 없는 실정으로 감에 많이 함유된 탄닌물질에 내성을 가진 동시에 알코올발효력이 우수한 균주의 선발은 감에 풍부한 발효성 당질을 이용한 알코올수율을 높일 수 있어서 보다 높은 산도의 감식초의 대량생산이 기대된다.

따라서 본 연구에서는 감식초의 전단계인 알코올수율을 높이고 일정한 품질의 감식초 대량생산을 위하여 감에서 우량의 알코올발효 균주를 선발하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험재료

본 실험에 사용된 감은 1996년 11월 경북 청도군 일대에서 생산된 짧은감과 경남 진영군에서 생산된 단감을 각각 사용하였다.

1) 사용균주

본 실험에 사용된 균주는 동국전문대학에 보관중인 *Saccharomyces cerevisiae* Kyokai 7, *Saccharomyces cerevisiae* FWKS 260, *Saccharomyces cerevisiae* S 7001, *Saccharomyces cerevisiae* PDA, *Saccharomyces cerevisiae* S-2, *Saccharomyces cerevisiae* R 12, *Saccharomyces cerevisiae* Balyoun 1과 대구주조협회 탁주발효용균주 *Saccharomyces cerevisiae* No. 105를 비교 균주로 사용하였다.

2) 배 지

효모 분리용 배지로 YPD 및 YM(yeast extract 0.3%, malt extract 0.3%, glucose 0.5%, bacto peptone 0.5%, pH 6.0) 배지를 이용하였으며^{24,25)} 단감 및 짧은감을 파쇄한 slurry(이하 slurry라 칭함)를 착즙 여과하여 여액을 감추출물 배지로 각각 사용하였다.

2. 실험방법

1) 균주의 분리 및 동정

부패된 감의 과육과 꼭지 100 g을 500 ml 삼각플라스크에 넣고 30°C shaking incubator에서 50 rpm으로 2일간 배양한 배양액을 분리원으로 YPD 및 YM 배지를 이용하여 평판도말을 반복하여 약 40여종의 효모를 분리한 후 CO₂~H₂SO₄ 중량 감량법²¹⁾으로 알코올발효균주를 1차 선별하고 발효시험을 행하여 알코올발효력이 우수하고 관능적 향취가 우수한 2 균주를 분리하여 Lodder의 "The Yeast" 및 Kreger-van Rij의 분류 기준에 따라 형태학적 특성 및 생리적 성질 등을 검사한 후 동정하였다²⁵⁻²⁹⁾.

2) 산업용 균주와 분리균주의 알코올생성능 비교

분리균주와 산업적으로 이용되고 있는 균주^{24,25)}와의 알코올생성능은 glucose 15%, pH 6.0으로 조

절된 YPD 변형배지 및 단감 및 뽕은감을 파쇄한 slurry(이하 slurry라 칭함)를 착즙 여과하여 만든 감추출물 배지에서 각각 30℃로 38시간 정치배양하여 생성된 알코올함량을 비교하였다.

3) 알코올함량 측정

알코올함량 측정은 배양액을 원심분리한 후 상등액을 증류하여 alcohol hydrometer로 측정된 값을 Gay Lussac table로 환산하여 계산하였다²²⁾.

4) 발효수율

알코올 수율은 초기당농도에 따른 알코올생성량에 대한 이론적 수득율로 아래와 같이 계산하였다²⁴⁾.

Ethanol yield(%) =

$$\frac{\text{Final ethanol concentration}(g/l)}{\text{Initial glucose concentration}(g/l)} \div 0.51 \times 100$$

결과 및 고찰

1. 균주의 분리 및 동정

감으로 부터 분리된 40여종의 알코올발효 효모를 1차적으로 선별하여, 이중 알코올발효력이 우수한 YJK 20과 DJ 97을 선별하였다. 이들의 형태학적 특성과 생리학적 성질은 Table 1과 같다. 균주의 외

Table 1. Morphological and cultural characteristics of the isolated strains from persimmon fruit

Classification	Strains	
	YJK 20	DJ 97
Cell shape	oval	round
Cell size	3.7~4.5×5.5~7.0	4.0~6.0×6.5~8.0
Vegetative reproduction	budding	budding
Ascospore	present(1~4)	present(1~4)
Pseudomycelium	absent	absent
Truemycelium	absent	absent
Culture in YM media		
Pellicle	absent	absent
Ring	absent	absent
Growth on YM agar		
Edge	entire	entire
Elevation	raised	raised
Surface	smooth	smooth
Color	white creamy	white creamy
Growth at 37 °C	+	+
Gelatin liquefaction	-	-
Acid production	-	-
Urea hydrolysis	-	-
Ester production	+	+
Splitting of glucoside	-	-
Cycloheximide resistance		
0.01 %(100 ppm)	-	-
0.1 %(1000 ppm)	-	-

+ : positive, - : negative

Table 2. Fermentation and assimilation of carbon and nitrogen compound by the isolated strains from persimmon fruit

Source	Strains		Source	Strains	
	YJK 20	DJ 97		YJK 20	DJ 97
(Carbon)			(Carbon)		
Fermentation			Fermentation		
Glucose	+	+	Lactose	-	-
Galactose	+	+	Cellobiose	-	-
Sucrose	+	+	Trehalose	-	-
Maltose	+	-	Melibiose	+	-
Raffinose	+	+	Starch	-	-
Melezitose	-	-	Inulin	-	-
Assimilation			Assimilation		
Glucose	+	+	Xylose	w	-
Galactose	+	+	Arabinose	-	-
Melezitose	+	-	Rhamnose	-	-
Sucrose	+	+	Citric acid	-	-
Lactose	-	-	Ribose	-	-
Maltose	+	+	Arbutin	-	-
Celliobiose	-	-	Inositol	-	-
Trehalose	+	+	Glycerol	+	-
Melibiose	+	+	Mannitol	-	-
Raffinose	+	+	Salicin	-	-
Starch	w	-	Xylitol	w	-
Inulin	-	-	Ethanol	+	+
Sorbose	-	-	Methanol	-	-
(Nitrogen)			(Nitrogen)		
Potassium nitrate	-	-	Ethylamine · HCl	-	+
Sodium nitrite	-	-	Cadaverine · 2HCl	-	+
L-Lysine	-	-			

+ : Fermentation or assimilation, w : Weak, - : Not fermentation or assimilation

형은 YJK 20은 난형, DJ 97은 타원형으로 비교적 큰 효모였으며, 두 균주 모두 출아의 흔적이 있어 출아법으로 증식함을 알 수 있었다. 또한 두 균주 모두 위균사와 진균사는 형성하지 않고 1~4개의 자낭포자를 형성하였다. 배양학적 특성으로는 YM 액체배지에서 두 균주 모두 피막을 형성하지 않았으며, YM 한천배지상에서 집락의 색상은 white-cream색을 나타내었다. 한편 37℃에서 두 균주 모두 생육이 가능하였으며 gelatin 액화력, 산 생성력, urea hydrolysis, glycoside 생성은 없었고, ester 생성만 있었다. 또한 cycloheximide 내성은 0.01 및 0.1%에

서 나타나지 않았다.

탄소원의 발효성을 조사한 결과 Table 2에 나타난 것처럼 YJK 20은 glucose, galactose, sucrose, maltose, raffinose, melibiose를 잘 발효하였고, melezitose, lactose, cellobiose, trehalose, starch, inulin에서는 잘 발효되지 못한 반면에, DJ 97은 glucose, galactose, sucrose, raffinose에서 발효되었다. 그리고 자화성 시험에서 YJK 20은 glucose, galactose, melezitose, sucrose, maltose, trehalose, melibiose, raffinose, glycerol, ethanol을 잘 자화하였고, starch, xylose, xylitol을 약하게 자화

하였다. 한편 DJ 97은 glucose, galactose, sucrose, maltose, trehalose, melibiose, raffinose, ethanol을 잘 자화하였다. 한편 YJK 20은 nitrogen 자화성이 없었으나, DJ 97은 ethylamine · HCl, cadaverine · 2HCl의 자화성이 있었다.

이상의 결과로 미루어 Lodder 등과 Rij 등²⁶⁻²⁹⁾의 분류에 따라 YJK 20은 *Saccharomyces cerevisiae*, DJ 97은 *Saccharomyces kluyveri* 또는 유연균인 것으로 동정할 수 있었다.

2. 산업용 균주와 분리균주의 알코올 생성능 비교

분리균주와 산업적으로 이용되고 있는 균주^{24,25)}의 알코올수율을 비교하기 위하여 초기 pH 6.0, 배양온도 30°C, glucose 농도 15%의 변형 YPD 배지와 감을 착즙 여과하여 만든 배지에서의 알코올 생성력을 비교하였다. 그 결과 Table 3에서와 같이 변형 YPD 배지에서는 YJK 20, DJ 97 및 주정 생산균인 *S. cerevisiae* Balyoun 1은 각각 94.66, 95.78 및 98.51%로 높게 나타났으며, 청주효모인 S 7001 및 S-2 도 비교적 높은 수율을 나타내었다. 그러나 감 추출물 배지에서 수율을 비교한 결과 Table 4에서와 같이 YJK 20은 단감 추출물에서 97.43%, DJ 97은 뽕감 추출물에서 95.68%의 수율로 YPD 배지보다 높은 수율을 나타내었으나, YPD 배지에서 알코올수율이 가장 높았던 Balyoun 1 및 다른 비교 균

Table 3. Comparison of alcohol production between the isolated strains and industrial alcohol yeasts in the modified YPD medium

Strains	EtOH (%)	Yield (%)
<i>S. cerevisiae</i> YJK 20	7.24	94.66
<i>S. kluyveri</i> DJ 97	7.33	95.78
<i>S. cerevisiae</i> Kyokai 7	6.63	86.63
<i>S. cerevisiae</i> Balyoun 1	7.48	98.51
<i>S. cerevisiae</i> FWKS 260	6.48	84.67
<i>S. cerevisiae</i> S 7001	7.42	96.95
<i>S. cerevisiae</i> PDA	7.05	92.12
<i>S. cerevisiae</i> S-2	7.27	94.98
<i>S. cerevisiae</i> R 12	5.93	77.56
<i>S. cerevisiae</i> No. 105	7.05	92.16

주들의 수율은 크게 떨어지는 경향을 나타냈으며, 이는 우와 이⁶⁾의 감 탄닌 성분이 효모의 알코올발효를 저해한다는 보고와도 일치하였다. 이상의 결과로 보아 감에서 분리된 YJK 20 및 DJ 97은 YPD 배지 및 감추출물 배지에서 비교적 높은 알코올수율은 나타내어 탄닌에 내성이 있는 균주로 추정되었다.

IV. 요약

과일생산 및 저온저장 중에 발생하는 다량의 불량감을 효율적으로 활용하기 위하여 부패된 감에서 알

Table 4. Comparison of alcohol production between the isolated strains and industrial alcohol yeasts in the persimmon extract medium

Strains	SPE ¹⁾		APE ²⁾	
	EtOH (%)	Yield (%)	EtOH (%)	Yield (%)
<i>S. cerevisiae</i> YJK 20	7.55	97.43	7.03	91.85
<i>S. kluyveri</i> DJ 97	7.12	93.08	7.32	95.68
<i>S. cerevisiae</i> Kyokai 7	6.62	86.47	5.86	76.60
<i>S. cerevisiae</i> Balyoun 1	7.27	94.97	7.08	92.60
<i>S. cerevisiae</i> FWKS 260	5.84	76.33	5.36	70.07
<i>S. cerevisiae</i> S 7001	6.27	81.93	5.46	71.45
<i>S. cerevisiae</i> PDA	6.93	90.58	4.96	64.84
<i>S. cerevisiae</i> S-2	6.84	89.41	6.81	89.03
<i>S. cerevisiae</i> R 12	5.87	76.68	5.93	77.52
<i>S. cerevisiae</i> No. 105	6.90	90.24	6.48	84.81

¹⁾ SPE is sweet persimmon extract medium.

²⁾ APE is astringent persimmon extract medium.

코울발효력이 우수한 균주를 선별하였다. 분리된 균주의 형태학적, 배양학적 특성을 조사한 결과 YJK 20, DJ 97은 각각 *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces kluyveri*로 동정할 수 있었다. 산업적으로 이용되고 있는 알코올 발효균주와 YPD 변형 배지 및 감추출물 배지를 사용하여 각각의 알코올발효력을 비교한 결과 분리되는 산업적으로 이용되고 있는 균주들에 비하여 YPD 변형 배지뿐만 아니라, 감추출물 배지에서도 알코올생성력이 우수하였다. 따라서 감을 이용한 알코올발효력이 우수한 균주로 선별할 수 있었다.

참고문헌

1. 강춘기 : 우리나라 과실류의 역사적 고찰. 한국 식물화학회지, 5(3), 301, 1990.
2. 식품성분분석표, 농진청 농촌영양개선연수원, 1991.
3. 문광덕, 김종국, 김준한, 오상룡 : 감과육 및 껍질의 유용성분 및 가공 이용에 관한 연구. 한국식생활문화학회지, 10(4), 321, 1995.
4. 문광덕, 손태화 : 건시제조중 감과실의 당조성의 변화 및 물성. 한국식문화학회지, 3(4), 385, 1988.
5. 원충연 : 감식초 제조와 품질에 관한 연구. 영남대학교 석사학위논문, 1994.
6. 우강용 : 꽃감주 개발에 관한 연구, 한국음식문화연구원 논문집, 287, 1993.
7. 우강용, 이수학 : 꽃감주 개발에 관한 연구, 한국식품과학회지, 26(3), 204, 1994.
8. 차원섭, 박준희, 김진구 : 감식초 생산에 관한 연구, 상주농잠전문대학논문집, 20, 29, 1986.
9. 김명찬, 조기택, 심기환 : 落果柿를 이용한 식초 제조, Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng., 8(2), 103, 1980.
10. 손태화, 성종환 : 감과실의 탄닌물질의 생성 및 탈삼기작에 관한 연구, Korean J. Food Sci. Technol., 13(4), 1981.
11. 채수규, 유태종 : 미생물 Tannase를 이용한 도토리酒의 실험적 제조. Korean J. Food Sci. Technol., 15(4), 1983.
12. 정석태 : 2 단계발효에 의한 감식초의 품질향상. 경북대학교 석사학위논문, 1995.
13. 최신양, 구영조, 이명기 : 감식초음료 개발에 관한 연구. 한국식품개발연구원 결과보고서, 1995.
14. 정용진, 신승렬, 강미정, 서지형, 원충연, 김광수 : 불량 단감을 이용한 숙성 감식초의 제조와 품질 평가. 동아시아식생활학회지, 6(2), 221, 1996.
15. 식품공전 : 한국식품공업협회, p471, 1995.
16. Sugiura, A. and Tomana, T. : Relationships of ethanol production by seeds of different types of Japanese persimmons and their tannin content. HortSci., 18(3), 319, 1983.
17. Kim, Y. H. and Seu, J. H. : Culture condition for glucoamylase production and ethanol productivity of heterologous transformant of *Saccharomyces cerevisiae* by glucoamylase gene of *Saccharomyces diastaticus*, Kor. J. Microbiol. Bioteng., 16, 494, 1988.
18. Jones, M. A. and Ingledew, W. M. : Fuel alcohol production optimization of temperature for efficient very-high-gravity fermentation. Appl. Environ. Microbiol., 60, 1048, 1994.
19. Park, Y. M., Kim, C. H. and Rhee, S. K. : Selection of an ethanol tolerant *Clostridium thermohydrosulfuricum* strain. J. Microbiol. Biotechnol., 2, 226, 1992.
20. Son, S. M., Kim, I. G. and Pyun, Y. R. : High productivity of ethanol fermentation using flocculant yeast. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 20, 607, 1992.
21. Luong, J. H. T. and Tseng, M. C. : Process and thchnoeconomics of ethanol production by immobilized cells. Appl. Microbiol. Biotechnol., 19, 207, 1984.
22. 김재환, 진익렬, 서정훈 : 연료용 알코올의 고온 생산을 위한 고온선 효모 *Saccharomyces cerevisiae* F38-1의 분리. 한국산업미생물학회지,

- 23(5), 617, 1995.
23. 김혜자, 이철수, 김영찬, 양차범, 강상모 : 김치 starter 용으로 분리한 효모의 동정. 한국산업 미생물학회지, 24(4), 430, 1996.
24. 이창호 : *Saccharomyces cerevisiae* B 15-1의 에탄올 발효 특성. 경북대학교 석사학위논문, 1993.
25. Chung, K. T., Bang, K. W., Song, H. I., Kim, J. K. and Jeong, Y. J. : Conditions for protoplast formation and fusion of the killer yeast. Kor. J. Microbiol., 27, 4, 1989.
26. Kreig, N. R. and Holf, J. G. : Bergey's manual of systematic bacteriology, Williams and Wilkins, Baltimore /London, 1, 267, 1984.
27. Barnett, J. A., Payne, R.W. and Yarrow, D. : Yeasts characteristics and identification. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 1983.
28. Lodder, J. : The Yeasts a taxonomic study. North Holland Publishing Co., Amsterdam, Netherlands, 1970.
29. Rij, K. : The yeasts a taxonomic study. Elsevier, Amsterdam, Netherlands, 1984.

(1997년 11월 20일 접수)