

酵母에 의한 果實酒中の 減酸効果에 關한 研究

(第 1 報) 菌株의 分離 및 同定

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 1) Isolation and Identification of Yeast Strain

Tae Shick Yu

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

(Receive March 4, 1978)

Abstract

Yeast strains capable to perform malo-alcoholic fermentation in wine were screened. Out of 54 strains isolated from apples, tomatos, grapes, and strawberries, two strains showed strong assimilation of malic acid. After further screening one strain of strawberry origin was selected and identified as *Schizosaccharomyces japonicus* var. *japonicus* based on the morphological and physiological characteristics examined.

序 論

과실주의 酸味를 조절하는 방법중에 微生物學的 減酸方法이 있다. 즉 과실주중의 酸味가 강한 사과酸을 乳酸菌에 의하여 乳酸으로 轉換시키는 malo-lactic 발효와 酵母菌에 의하여 ethyl alcohol로 轉換시키는 malo-alcohol 발효가 알려져 있다. 이와 같은 減酸現象에 의하여 포도주는 pH 3.3에서 3.5로 酸味가 조절되어, 약 0.6%의 減酸효과를 일으킨다⁽¹⁾. 이들 발효는 과실의 酸含量이 많은 지방에서는 必須不可決하다.

Ingrapam⁽²⁾ 등은 California 産의 생포도주 144 점을 조사한 결과 赤포도주에서는 75%, 白포도주에

서는 약 30%의 試料가 減酸現象을 받고 있다고 보고하였다. 또한 Fornachon⁽³⁾의 보고에 의하면, Australia의 생포도주 217 점을 8개월 동안 저장한 결과, 46%의 減酸現象이 일어났다고 한다.

특히 malo-alcohol 발효를 유도하는 효모균으로서는 *Schizosaccharomyces*^(4,5,6)屬이 알려져 있다.

著者は 酸味가 강한 과실주에 malo-alcohol 발효를 유도시켜 酸味가 약한 良質의 과실주를 醱造하고자 사과酸의 分解力이 강한 酵母菌을 分離하고자 하였다. 이미 잘알려져 있는 *Schizosaccharomyces pombe* 0-77⁽⁷⁾보다 강력한 酵母菌을 自然界로 부터 分離, 固定하여 同定코져 分離菌의 生育, 孢子形成의 有無, 偽菌糸의 形成, 糖類의 醱酵性, 糖類의 資化性, 질산염의 資化性 등을 檢討하여 分離菌을 *Schizosaccharomyces japonicus* var. *japonicus* 로 同定하였기에 報告하고자 한다.

本研究은 1977年度 文教部學術研究助成費에 의한 研究論文임)

材料 및 方法

1. 菌의 分離

사과, 딸기, 토마토, 포도등의 果皮에서 平板塗抹培養法에 의하여 酵母菌을 분리하였다.

Table 1. Medium used for Isolation of Malic acid Assimilating Yeast.

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

分離菌을 Table 1과 같은 組成의 分離用 培養基 5 ml에 각각 접종하여 30°C에서 7일간 정지 배양한 후 배양액을 paper chromatography로 사과酸의 消失을 측정하여 malo-alcohol 발효로 誘導할 수 있는 菌株로 선별하였다. 비교 菌株로서 *Schizosaccharomyces pombe* 0-77⁽⁷⁾과 비교, 검토하였다.

2. 培養學의 特徵

培養基는 麥芽汁培養基와 감자培養基를 常法으로 殺菌後 사용하였다. 麥芽汁培養基에서 供試菌의 生育狀態, 皮膜形狀 등을 검토하였으며, 麥芽寒天培養基에서 colony의 色相과 形態를 관찰하였다.

3. 形態學의 特徵

菌體의 形態 및 크기는 供試菌은 麥芽汁培養基에서 25°C, 3일간 培養시켜 관찰하였다. 僞菌糸의 形態는 28°C에서 7일간 감자培養基에서 培養시켜 관찰하였다.

4. 生理學의 特徵

供試菌에 대한 糖類의 醱酵性은 Durham 醱酵管에 各糖類로 無菌的으로 1%되게 첨가하여 28~30°C에 培養하면서 經時的으로 Durham 試驗管內의 가스集積의 有無와 量을 측정하였다.

糖類의 資化性은 sugar auxanography 법으로 試驗糖類의 분말을 無菌的으로 소량씩 塗抹하고 28°C에서 培養하여 經時的으로 菌의 生育을 관찰하였다. 대조시험으로서 포도당을 사용하였다. 질산염 資化性試驗은 基本培養基(2% glucose, 0.9% KNO₃, 0.1% KH₂PO₄, 0.05% MgSO₄ · 7H₂O, 2% agar)와 대조 培養基로서 KNO₃를 첨가하지 않은 培養基를 사용하여 平板培養으로 生育의 差를 관찰하였다. 또한 基本培養基와 製造培養基에서 寒天을 제

거한 液體培養基에서도 培養하여 生育의 有無와 그 生育度를 관찰하였다.

탄소원으로서의 사과酸의 이용성은 1%효모추출물, 0.1% KH₂PO₄, 0.1% MnSO₄, 0.5% 사과酸을 함유한 液體培養基를 pH 4.5로 조절한 후 殺菌하였다. 이 液體培地基에 供試菌을 점종배양하여 菌의 生育을 측정하였다. 대조시험으로서는 사과酸을 첨가하지 않은 培養基를 사용하였다. 탄소원으로서의 ethanol의 이용성은 0.1% KH₂PO₄, 0.1% (NH₄)₂SO₄, 0.05% MgSO₄ · 7H₂O를 함유한 培養基를 殺菌후 ethanol 含量 3%되게 첨가하여 供試菌을 25°C에서 7일간 培養하면서 生育度를 측정하였다.

5. 供試菌의 同定

供試菌의 同定은 長谷川⁽⁸⁾와 J. Lodder의 *The Yeasts*⁽⁹⁾에 準하여 同定하였다.

6. 菌株의 生育度 淸定

菌株의 生育度는 培養液은 직접 Spectrophotometer(Coleman 44)를 사용하여 610 nm의 흡광도(O. D.)를 측정하여 표시하였다.

7. 有機酸의 定性

培養液中の 有機酸은 大島등의 사용한 paper chromatography에 準하였다. 즉 Whatman여과지(No. 2)에 培養液의 50 μl를 spot하여 n-butanol : acetic acid : H₂O=4 : 1 : 2(v/v%)의 展開劑를 사용하여 상승법으로 전개, 風乾後 80°C의 건조기에서 약 4시간 건조시켰다. 건조한 여과지에 0.1% bromophenol blue-alcohol 용액을 분무하여 有機酸을 發色시켜 사과酸과 그 이외의 有機酸은 Rf치로 확인 定性하였다.

8. 試藥

L-Malic acid는 日本, 和光純藥工業株式會社製品(Cord No. 138-0052)을 효모추출물은 日本大五榮養化學株式會社 製品(Wako Cord No. 393-00021)을 구입 사용하였다. 상기 이외의 사용시약은 日本和光純藥工業株式會社 製品의 試藥 特級品을 구입 사용하였다.

結 果

1. 사과酸 資化性菌의 分離

사과, 토마토, 포도, 딸기로부터 酵母菌을 54種所를 分離, 固定하였다.

Table 2.에 표시된 바와 같이 培養液中的 사과酸의 消失을 paper chromatography에 의하여 malo-alcohol 발효의 효과를 나타내는 St-3, St-6 菌

Table 2. Decomposition of Malic acid by Various Yeasts.

Strains	Spot of malic acid
<i>Saccharomyces ellipsoideus</i>	Large spot
St-3	No detect
St-6	No detect
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> 0-77	Trace

The strains were cultured in the isolating media after 7 days at 30°C.

株를 선별하였다. 이들 菌은 딸기의果皮로부터分離固定된 酵母菌으로서, *Schizosaccharomyces pombe* 0-77 보다 malo-alcohol 발효를 강력히 유도하였다. 供試菌으로서 St-3 菌을 사용하였으며, 0.3% 사과酸은 培養 6 일로 완전히 消失시켰다.

2. 供試菌의 培養學的, 形態學的, 生理學의 特徵
供試菌의 諸性質을 조사한 결과는 Table 3에 표시했다.

麥芽汁培養基에서 25°C, 3 일간 培養하면 아주 얇은 皮膜을 形成하고, 5 일에는 皮膜의 중앙에 균열이 생겨 시험관의 기벽에 두꺼운 環이 形成된다. 그러나 培養 10 일 후에는 모두 침전되었다.

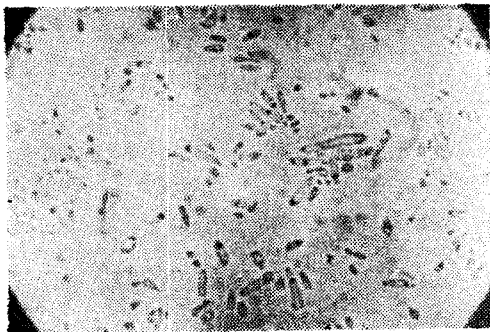


Fig. 1. Micrograph of cell of Malic Acid Assimilating Strains.

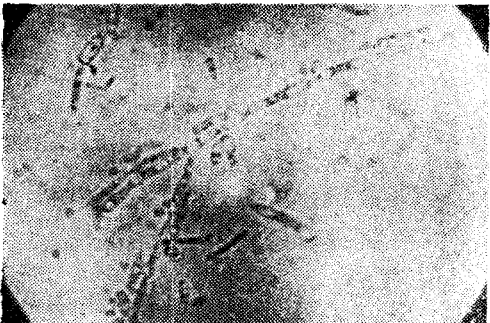


Fig. 2. Micrograph of Pseudomycelium of Malic Acid Assimilating Strain.

Table 3. Morphological Characteristics and Physiological Properties of *Schizosaccharomyces* St-3.

Morphological characteristics:			
Growth in malt extract after 3 days at 25°C, cells are pasteurinus long oval to cylindrical, long oval cells vary from 6.0~8.0 μ in diam; cylindrical cells measure (5. ~. 5~6. 0) × (10~14) μ. This strain are formed firm after 3 days at 25°C, but formed ring after 5 days, and sediment are formed after 10 days. Pseudomycelium is product in potato medium after 7 days at 28°C. Growth on malt-extract agar; After 7 days at 30°C the streak culture is echinulate and undulate, at first white creamy, after about 20 days brownish-cream to brown.			
Sporuration; Formed			
Physiological properties			
Fermentation			
Glucose	+	Raffinose	+
Soluble starch	-	D-Arabinose	-
Inulin	-	Inositol	-
Melibiose	+	Rhamnose	-
Xylose	-	Lactose	-
Galactose	-	Maltose	+
Mannose	+	Sucrose	+
Assimilation of carbon compounds			
Glucose	+	Raffinose	+
Soluble starch	-	D-Arabinose	-
Inulin	-	Inositol	-
Melibiose	-	Rhamnose	-
Xylose	-	Lactose	-
Galactose	-	Maltose	+
Mannose	+	Sucrose	+
Ethanol	+	Malic acid	+
Assimilation of pottasium nitrate; Negative			
Growth on 50% (w/w) glucose-yeast extract agar; Negative			
Growth at 37°C; Positive			

효모추출물과 50%포도당 培養基에서는 生育하지 못했다.

菌의 形態는 Fig. 1에 표시한 것과 같이 麥芽汁培養基에서 25°C, 3 일간 培養하면 菌의 形態는 *Pasteuriamus* 속은 long oval 이었다. 더우기 감자배양기 7 일간 배양하면 偽菌糸를 形成하였다.

偽菌糸는 Fig. 2에 표시하였다.

糖類의 醱酵性을 조사한 결과 glucose, melibiose, mannose, raffinose, maltose, sucrose 를 발효하며, 그중 mannose 가 가장 왕성하며 maltose 가 가장 약하게 발효하였다. Galactose, lactose, D-arabinose, rhamnose, inositol 등은 발효하지 않았다. 糖類에 資化性은 醱酵性과 거의 같은 種類의 糖類가 資化되나 melibiose 는 資化하지 못하였다.

St-3 菌株는 分裂法에 의하여 增殖하며 결산염의 資化性은 陰性이었다.

3. 탄소원으로서 사과酸的 이동성

Table 3 에 나타난바와 같이 供試菌은 탄소원으로서 사과酸은 資化할 수 있다. 사과酸의 濃度와 供試菌의 生育과의 關係를 조사하기 위하여 9.3, 0.5, 1.0, 3.0, 5.0%씩 사과酸을 함유한 培養基에 供試菌을 혐기적으로 培養한 結果를 Fig. 3 에 표시하였다. 供試菌은 1% 사과酸에서 가장 양호하게 生育하며 현저한 사과酸의 減少를 나타낸다.

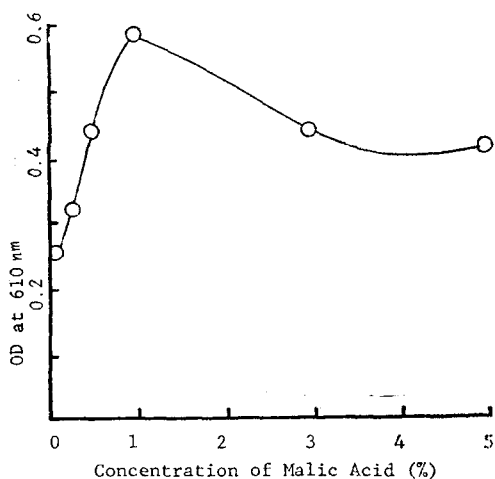


Fig. 3. Effect of Concentration of Malic Acid on Growth of *Schizosaccharomyces* St-3.

考 察

딸기의 果皮로부터 *Schizosaccharomyces Prombe* 0-77⁽⁷⁾ 菌株보다 강력한 malo-alcohol 발효의 效果를 나타내는 St-3, St-6 의 두 菌株를 선별하였다. 供試 St-3, 菌株를 J. Lodder 의 *The Yeast*⁽⁹⁾에

準하여 同定을 한 바 分裂法에 의하여 增殖하며 胞子를 形成하고 galactose 를 발효 못하므로 *Schizosaccharomyces* 屬으로 分類하였다.

偽菌糸를 形成하며 melibiose 로 발효하므로 *Schizosaccharomyces japonicus* 와 일치하였다. 그러나 胞子の 形態에 대한 實驗은 만족하게 수행되지 못하여 變種의 同定은 어려우나 偽菌糸의 形態로 보아 *Schizosaccharomyces japonicus* var. *japonicus* 로 同定하였다.

要 約

사과酸을 단시간에 소비하여 malo-alcohol 발효를 강력히 유도하는 酵母菌을 딸기의 果皮로부터 分離, 同定한 結果 *Schizosaccharomyces japonicus* var. *japonicus* 로 同定하였다.

參 考 文 獻

- 1) M. A. Amerine, and W. V. Cruess: *The Technology of Wine Making*, The Avi Pub. Co., INC, Westport, Connecticut, p. 7 (1960)
- 2) J. L. Ingrapham and G. M. Cooke: *Amer. J. Enol. Viticul.*, **11**, 160 (1960).
- 3) J. C. M. Fornachon: *Aust. J. Appl. Sci.*, **8**, 69 (1957).
- 4) A. J. Kluyver: *Biochemische Suikerbepalingen*, Delft (1914), Ref. E. Peynaud: *Weinb. Keller.*, **12**, 229 (1965)
- 5) J. Jakubowska: *Przemysl Spozywczy*, **8**, 487 (1997), Ref. *Zbl. Bakt.*, **II**, 117, 330 (1963).
- 6) W. Balloni, R. Materassi, and C. Paoletti: *Ind. Agr.*, **11**, 253 (1973).
- 7) 野野村 英夫, 信田 正, 小原 巖, 加加美久 渡邊 正平, 風間 敬一: *日釀協誌*, **63**(7), 7 65 (1968)
- 8) 長谷川 武治: *微生物の分類と同定* (東京 大出版會, 日本, 東京) p. 67~137 (1975).
- 9) J. Lodder: *The Yeasts, A Taxonomic Study*, North-Holland Pub. Co., Amsterdam, p. 733 ~755 (1970).