

누룩으로부터 분리한 Wild Type 효모의 청주(淸酒)제조 가능성에 관한 연구

김혜련 · 백승희¹ · 서민재² · 안병학*

한국식품연구원 전통식품연구본부, ¹한양대학교 식품영양학과, ²(주)두산 R&D센터 발효연구팀

Feasibility of Cheongju Brewing with Wild Type Yeast Strains from Nuruks. Kim, Hye-Ryun, Seung-Hee Baek¹, Min-Jae Seo², and Byung-Hak Ahn*. *Traditional Food Research Division, Korea Food Research Institute, ¹Department of Food and Nutrition, Hanyang University, ²Research & Development Center, Doosan Corporation* – In order to select the best strains to have the feasibility of Cheongju brewing, 10 wild type yeast strains from 300 different types of Nuruk were investigated on their ethanol resistance, resistance to glucose and flocculation. The amounts of alcohol, organic acids, and volatile compounds, Brix, pH were also examined for the alcoholic beverages made with the 10 selected strains. Almost all strains showed alcohol production activities in the medium containing 18%(v/v) ethanol and 29%(w/v) glucose. The strains 90-2 showed a higher flocculation activity than other strains. Strains 54-3, 90-2 and 91-5 produced more alcohol than control strain (7.42%(w/w)) when fermented with wild type yeast strains. In addition, alcoholic beverages containing low acetic acid also showed low levels of total acidity. GC/MS analysis of the product showed 4 alcohols, 11 esters and 1 acid as volatile compounds. Selected strains were tentatively identified as *Phichia sydowiorum* (91-5), *Zygosaccharomyces cidri* (192-2 and 271-4), and as *Saccharomyces cerevisiae* (18-2, 54-3, 90-2, 91-2, 98-2, 99-5 and 272-7) by BIIOLOG method.

Key words: Wild type yeast strains, ethanol resistance, flocculence, alcoholic beverages

서 론

외국산 주류와 경쟁력이 있는 우리 술을 개발하기 위해서는 주류제조에 있어 원천 자본인 우수한 발효미생물의 확보가 필수적이다. 예로부터 우리는 발효 공학적으로 가장 특징적인 누룩을 이용하는 양조기술을 발전시켜 이어왔으나 양조산업이 현대화되는 과정에서 미생물원인 누룩의 가치가 제대로 평가되지 못하고 사라져 가는 상황에 이르러 되었으며 주류관련 연구의 위축으로 우리전통의 맥을 잇는 주류 제조는 자생력을 거의 상실한 단계에까지 이르렀었다. 그러나 최근 전통약주의 시장성장과 함께 희석식 소주의 저알코올화되는 상반되게 전통약주의 고알코올화에 따라 전통 누룩으로부터 분리한 야생효모의 고알코올 생성능을 비롯한 향 특성 및 양조특성에 관한 연구가 수행되고 있다.

누룩에 의해 제조되는 전통주의 주질 개선 연구와 함께 발효주에 사용되는 미생물에 관한 연구 보고로는 청주의 주질 개선을 위한 국 및 효모의 선정과 그 발효특성[13], 생리활성 물질인 glutathione을 다량 함유하는 효모에 관한 분리 동정 및 최적 생산조건[9], 제주민속 좁쌀 약주 발효를 위한 우수균주 선발과 선발된 균주에 의한 양조특성[6,7], 약탁주

발효과정 중의 미생물 군총(microflora)의 변화[12], 에탄올 생성능과 생존능이 우수한 효모균주의 분리 및 동정[3], 에탄올내성 효모 *Saccharomyces cerevisiae* SE211의 분리 및 특성[11] 등이 있다.

국내 각 대학 및 연구소에서 양조에 관련한 발효미생물, 주류의 발효공정개발 등 각종 연구보고를 하고 있으나 대부분 일본 술에서 분리되어 이용되고 있는 *Aspergillus*속 곰팡이에 관한 연구가 주류를 이루고 있고 전통누룩의 미생물에 대한 연구는 사상균 연구가 대부분이며[4, 5, 10] 전통주에 적합한 효모의 선발이나 육종 및 생산에 관한 연구가 지속적으로 진행되지 못하고 있다. 본 연구는 전국에서 수집한 누룩 300여 점에서 분리한 효모 1,500여 균주를 대상으로 주류의 품질특성에 가장 중요한 효모의 알코올 발효능력, 향기생성 능력, 알코올 내성, 고온발효성, 침강성, 유기산 생성능력 등 실용적인 측면에서 주요한 특성들을 구명하여 현장에서 바로 응용할 수 있도록 DB화하는 과정에서 선발된 우수 효모 10균주의 입국(koji)에서의 발효특성을 보고하여 우리나라 전통 누룩으로부터 분리한 wild type 효모를 사용하여 발효제로 입국(koji)을 사용하고 3단 사입하여 고알코올 발효주이며 맑은 술로 불리는 청주(淸酒)의 제조 가능성을 검토하고자 한다.

*Corresponding author

Tel: 82-31-780-9102, Fax: 82-31-709-9876

E-mail: bhahn@kfri.re.kr

재료 및 방법

재료

실험에 사용된 효모는 본 연구원에서 누룩으로부터 분리하여 보존하고 있는 균주를 사용하였으며 대조균은 일본양조협회 10호(*Saccharomyces cerevisiae*) 효모를 사용하였다 (Table 1). *Koji*는 (주)두산으로부터 냉동된 상태로 공급받아 사용하였다.

Koji 당화액 및 발효액 제조

Koji 당화액은 *koji*와 물을 1 : 3(w/v)으로 혼합하고 62°C에서 5시간 교반하여 당화시킨 후 6000 rpm에서 20분 동안 원심분리하여 16 °Brix로 제조하였고 *koji* 발효액은 당화액에 lactic acid를 첨가하여 pH를 3.7로 맞추는 후 20°C에서 7일간 발효하여 제조하였으며 누룩으로부터 분리한 효모 균체 접종량은 PDA배지(Potato dextrose agar, Difco, Detroit Michigan, USA), 29°C, 24시간으로 2차 계대 배양한 후 멸

균한 0.85% NaCl에 현탁하였고 Turbidimeter(BIOLOG, USA)를 이용하여 590 nm에서의 absorbance를 측정하여 2×10^7 /mL 농도로 조절하여 접종하였다.

이화학적 분석

알코올 함량은 GC(Hewlett Packard 5890A, USA)를 사용하였고 column DB-ALC2(30m length × 0.53 mm I.d × 2 μm film thickness : J & W Scientific, USA), isothermal 50°C, Inlet 120°C, Detector FID 250°C 그리고 carrier gas로 helium을 사용하였으며 표준물질의 농도와 peak area의 log값으로부터 표준곡선을 작성하여 각각의 알코올 함량을 산출하였다. pH는 pH meter(Orion Model EA 940, USA)를 사용하여 측정하였고 °Brix는 Refractometer(ATAGO Pocket PAL-1, Japan)를 이용하여 측정하였으며 흡광도는 UV/VIS spectrophotometer (Diod-Array) HP 8453(Hewlett Packard, USA)으로 660 nm에서 absorbance를 측정하였다. 유기산은 시료를 0.45 μm syringe filter(XPERTEK, USA)로 여과한 후 HPLC(Jasco UV-975 UV/VIS detector, Tokyo, Japan)로 분석하였다. 분석조건은 Aminex HPX-87H(300 mm × 7.8 mm) column(Bio-rad, California, USA)을 사용하였고 이동상은 0.01 N sulfuric acid, flow rate는 0.6 mL/min, column oven 온도는 35°C, injection volume은 20 μl 그리고 UV 210 nm에서 분석하였다[2].

Table 1. List of wild type yeast strains according to collecting area of *Nuruks*.

Yeast No.	Collecting Area of <i>Nuruks</i>
18-2	Gyeongsangbuk-do Andong III
54-3	Chungcheongbuk-do Cheongju
90-2	Gyeongsangnam-do Hapcheon I
91-2	Gyeongsangnam-do Hapcheon II
91-5	
98-2	Chungcheongnam-do Kyeryong-paekilju
99-5	Gyeongsangbuk-do Andong-soju
192-2	Chungcheongbuk-do Jecheon
271-4	Chungcheongnam-do Dangjin
272-7	Chungcheongnam-do Boryeong

알코올 발효성 및 알코올 내성, 내당성

Koji 당화액 10 mL에 효모를 접종한 후 발효온도 5, 15, 25, 35°C로 4분화하여 각각의 온도에서 durham tube에 생기는 CO₂ gas 생성 속도를 관찰하여 알코올 발효성을 측정하였다. 알코올 내성은 YPD(glucose 2%, yeast extract 0.5%, bactopectone 1%: Sigma, USA) 액체 배지에 효모

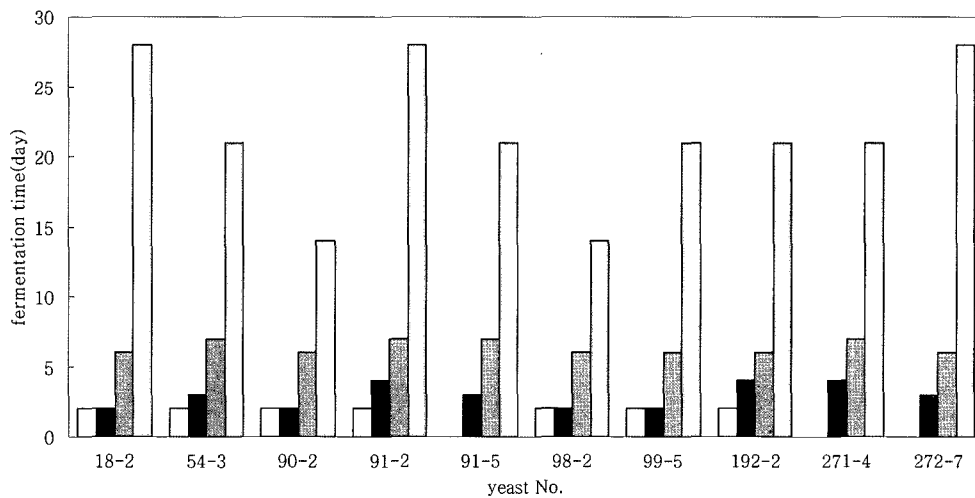


Fig. 1. Alcohol fermentability of wild type yeast strains with fermentation temperature. 10 wild type yeast strains were inoculated in saccharified medium prepared with rice *koji* and water (1:3) with durham tube. Fermentation time was measured at filled CO₂ gas in durham tube. □, 35°C; ■, 25°C; ▤, 15°C; ▨, 5°C.

접종 직후 무수에탄올을 14, 16, 18, 20, 22%(v/v)가 되도록 각각 첨가하여 20°C에서 72시간 배양한 후 660 nm에서의 흡광도를 측정하여 비교하였고 내당성은 20, 23, 26, 29% glucose가 함유된 각각의 YPD 액체배지를 이용하여 20°C에서 48시간 배양한 후 660 nm에서의 흡광도를 측정하여 비교하였다[7].

침강성

침강성은 PDB(Potato dextrose broth, Difco, Detroit Michigan, USA) 액체배지를 이용하여 25°C에서 48시간 진탕 배양한 후 원심 분리하여 각각을 A와 B로 나누어 처리를 달리하였다. A는 pellet에 증류수와 0.5M EDTA solution을 넣고 현탁하였다. B는 pellet에 CaSO₄ solution을 첨가하여 현탁한 후, 다시 원심분리를 하여 pellet에 CaSO₄ buffer solution을 첨가하여 현탁하여 6분 동안 정치하였다. 각각을 10배로 희석하여 600 nm에서의 흡광도를 측정하여 비교하였다[1]. Flocculence, % = (A-B) × 100/A

미생물 신속 간이 동정

미생물 동정은 BIOLOG社(USA)의 서로 다른 종류의 95개 carbon sources로 코팅된 96-well MicroPlate를 이용하여 MicroLog™ System, Release 4.2 database로 동정하였다. 배지 BUY(Biolog Universal Yeast Agar, USA)에서 24시간 동안 배양한 효모 균체를 Inoculating Fluid인 sterile water에 47%T의 농도로 희석하여 YT MicroPlate에 100 µl per well로 접종한 후 26°C에서 48, 72시간 배양하여 동정하였다.

휘발성 화합물 분석

발효액 20 mL를 40°C로 30분 동안 평형시킨 후 30분 동안 100 µm polydimethylsiloxane fiber에 포집하여 SPME (Solid Phase Microextraction)를 이용하여 GC에 1분 동안 주입하였다. 휘발성 화합물 분석은 Hewlett Packard 6890N GC/ Hewlett Packard 5973N mass selective detector (MSD)(Hewlett Packard Co., Palo Alto, CA, USA)를 사용하였다. Column은 DB-Wax(60 m length × 0.25 mm I.d × 0.25 µm film thickness : J & W Scientific, Folsom, CA, USA)를 사용하였고 Oven 온도는 40°C에서 5분간 유지한 후 200°C까지 3°C/min의 속도로 승온시켰으며 Injector 200°C, carrier gas는 helium을 사용하였고 flow rate는 2 mL/min 조건이었다. MSD 조건은 capillary direct interface temperature 250°C, ion source temperature 230°C, ionization voltage 70 eV, mass range 33-350 a.m.u, 그리고 scan rate 2.2 scan/sec였고 휘발성 화합물 동정은 retention indices(RI), mass spectra와 aroma properties를 비교하여 확인하였다.

결과 및 고찰

선별효모의 알코올 발효성

Koji 당화액 10 mL에 효모를 접종한 후 발효온도 5, 15, 25, 35°C 각각에서 durham tube에 생기는 CO₂ gas 생성 속도를 관찰하여 알코올 발효성을 측정된 결과는 Fig. 1에 나타내었다. 35°C에서 효모 91-5, 271-4 그리고 272-7에서는 gas가 생성되지 않아 발효성을 확인할 수 없었으나 나머지 균주는 모두 2일만에 durham관에 gas가 가득 차 올랐고 25°C에서는 효모 18-2, 90-2, 98-2 그리고 99-5가 35°C와 동일하게 2일 만에 gas가 가득 찼으며 나머지는 모두 3, 4일이 경과하여 가득 차 올랐다. 저온인 15°C에서는 모든 균주가 일주일 정도의 시간이 걸렸으며 냉장온도인 5°C에서는 효모 90-2와 98-2가 14일로 가장 짧았고 효모 18-2, 91-2 그리고 272-7이 28일로 가장 오래 걸렸으며 나머지는 21일의 시간이 소요되었다.

선별효모의 알코올 내성, 내당성 및 침강성

누룩에서 분리한 효모의 알코올 내성(ethanol 14, 16, 18, 20, 22%(v/v)), 내당성(glucose 20, 23, 26, 29%(w/w)) 및 침강성을 측정된 결과는 Table 2에 나타내었다. 알코올 내성은 ethanol 16%에서 효모 98-2의 활성이 대조군보다 더 좋게 나타났고 선별된 10개의 효모 모두 활성을 보였으며 ethanol 18%에서는 효모 192-2와 271-4는 활성을 보이지 않았고 나머지 효모는 모두 활성을 보였으나 16%보다 감소하게 나타났으며 효모 272-7이 가장 높았고 ethanol 20%이상에서는 효모 54-3, 90-2 그리고 91-5만이 활성을 보였고 특히 효모 91-5는 대조군의 3배 이상의 활성을 나타냈으며 Kim[7] 등이 보고한 에탄올 20%에서의 내성과 활성이 비슷하게 나타났다. 내당성은 효모 18-2만이 특이적으로 낮은 활성을 보였으며 효모 54-3과 192-2는 glucose 함량이 증가함에 따라 감소하게 나타났고 나머지는 모두 비슷한 활성을 보였으며 Kim[7] 등이 보고한 glucose 20%에서의 내당성과 활성이 비슷하게 나타났다. 침강성은 효모 90-2가 83.3%로 very flocculent yeast(>80%)로 나타났고 효모 54-3, 98-2 그리고 271-4가 nonflocculent yeast(<20%) 범주에 속했으며 나머지는 모두 moderately yeast(20~60%)로 나타났다. 발효물의 향은 효모 18-2와 91-5가 과일 향이 나면서 신선한 느낌으로 대조군과 유사하였으며 과일 향 대신 단 향이 나면서 신선한 느낌을 주는 효모는 54-3과 192-2였고 나머지 6개 효모를 이용한 발효물에서는 각각 단 향, 신선한 느낌, 부드러운 느낌과 함께 공통적으로 신 향이 느껴졌다.

발효액의 이화학적 특성

선별 효모의 알코올 생성능력을 비교하기 위하여 초기 koji 당화액 배지의 당도를 16 °Brix로 하여 발효 후 최대 알코올 함량이 8%(v/v) 정도가 될 것을 예상하였다. 일주일 발

Table 2. Characteristics of wild type yeast strains.

Yeast No.	Ethanol-resistance ^a (OD _{660nm})				Sugar-resistance ^b (OD _{660nm})				Flocculence (%)	Flavor description
	16	18	20	22	20	23	26	29		
J-10 ^c	1.92	0.13	0.29	- ^d	2.84	2.63	2.82	2.34	29.33	refresh, fruity
18-2	0.25	0.04	-	-	0.99	0.87	0.94	0.52	55.34	refresh, fruity
54-3	1.47	0.16	0.12	0.02	2.52	2.47	2.04	1.52	8.38	refresh, sweet
90-2	1.33	0.04	0.19	-	3.09	2.38	2.95	2.47	83.03	savory odor, sweet
91-2	0.14	0.04	-	-	2.60	2.49	2.72	2.11	35.96	sour, sticky, sweet
91-5	1.71	0.61	1.05	-	3.06	2.58	3.08	2.48	35.48	refresh, fruity
98-2	2.46	0.22	-	-	3.25	3.14	3.50	2.87	5.87	savory odor, refresh
99-5	0.49	0.16	-	-	3.07	2.82	3.43	2.86	25.02	savory odor, waxy, sweet
192-2	0.16	-	-	-	2.47	2.01	1.65	0.83	59.01	sweet, refresh
271-4	0.61	-	-	-	2.69	2.75	2.82	2.26	9.87	diffusive, refresh, sour
272-7	1.65	0.21	-	-	2.85	2.27	2.51	2.53	64.83	soda, mild, sour

^a: Yeast strains were cultured at 20°C for 72 hr on YPD broth containing 16, 18, 20, 22% of ethanol

^b: Yeast strains were cultured at 20°C for 48 hr on YPD broth containing 20, 23, 26, 29% of glucose

^c: Japanese sake yeast

^d: No detection.

Table 3. Characteristics of alcoholic beverage with wild type yeast strains^a.

Yeast No.	pH	°Brix.	Alcohol (%)	Organic acids(mg/mL)					
				Citric	Malic	Succinic	Lactic	Acetic	Total
J-10 ^b	4.21	9.3	7.42	0.41	8.53	11.24	0.27	1.32	21.78
18-2	4.32	9.6	7.46	0.63	5.63	9.86	0.22	2.05	18.40
54-3	4.31	9.2	6.00	0.73	2.44	4.40	0.02	0.72	8.31
90-2	4.31	9.5	7.17	0.30	4.88	9.88	0.17	1.76	16.98
91-2	4.24	9.3	7.70	1.21	6.02	9.65	0.03	1.44	18.35
91-5	3.97	18.5	6.60	- ^c	0.10	0.86	0.25	0.47	1.68
98-2	4.41	10	7.55	0.47	0.37	10.50	0.01	1.74	13.09
99-5	4.33	10.7	7.12	0.39	5.26	10.02	0.01	1.30	16.98
192-2	4.21	9.3	6.61	0.07	9.48	7.44	0.03	2.01	19.03
271-4	4.25	9.3	6.70	0.61	7.64	7.11	0.04	2.56	17.96
272-7	4.27	9.8	6.53	0.85	6.31	11.88	0.25	1.87	21.16

^a: 10 wild type yeast strains were inoculated in saccharified medium prepared with rice *koji* and water(1:3)(16°Brix), and cultured at 20°C for 7 days after inoculation

^b: Japanese sake yeast

^c: No detection.

효 후 얻어진 발효액에서 측정된 알코올 함량은 효모 91-2가 7.7%로 가장 높았고 효모 98-2와 18-2가 7.46% 이상으로 대조군의 알코올 함량 7.42%보다 높게 나타나 우수한 알코올 생성능력을 보였으며 다음으로 효모 90-2와 99-5가 7.12% 이상으로 높게 나타났고 나머지 효모 5 균주 모두 6.0% 이상의 알코올 함량으로 우수한 알코올 생성능을 보였다. 발효물의 pH와 당도를 측정된 결과 pH 4.21~4.41, 당도 9.2~10.7 °Brix로 근사하게 나타났으며 특이하게 효모 91-5만이 pH는 3.97로 낮게, 당도는 18.5 °Brix로 높게 나타났다.

발효물의 유기산으로는 citric, malic, succinic, lactic, acetic acid가 검출되었고(Table 3), 효모간의 차이는 있었지

만 그 중 malic과 succinic acid의 함량이 가장 높은 경향을 나타내었다. 전체 유기산 중 가장 많은 함량을 보인 succinic acid는 효모 272-7이 11.88 mg/mL로 대조군보다 0.64 mg/mL 높게 검출되어 가장 많이 나타났고 10 mg/mL 이상인 효모는 98-2와 99-5였으며 다음으로 많은 함량을 보인 malic acid는 효모 192-2가 9.48 mg/mL로 대조군보다 0.95 mg/mL 높게 검출되었다. Lactic acid는 0.01~0.25 mg/mL로 전체 유기산 중 함량이 가장 적었고 그 차이는 미미하였으며 citric acid는 효모 91-2에서 1.21 mg/mL로 가장 높게 나타났고 효모 91-5에서는 검출되지 않았으며 나머지는 0.3~0.85 mg/mL 수준으로 대조군과 비슷한 함량을 보였다. Acetic acid는 효모 271-4가 2.56 mg/mL로 가장 높게 검출

Table 4. Volatile compounds of alcoholic beverage with wild type yeast strains.

(unit : peak area%)

Volatile compounds	RI ^a	18-2	54-3	90-2	91-2	91-5	98-2	99-5	192-2	271-4	272-7	J-10 ^b
Ethyl acetate	800	0.357 ^c	0.363	0.168	0.337	- ^d	0.320	0.618	0.220	0.174	0.369	0.406
Ethanol	922	93.014	91.221	94.536	92.269	96.262	92.408	91.223	95.424	95.095	92.278	88.714
Isobutyl acetate	1007	0.012	0.127	0.153	0.128	-	0.141	0.120	0.043	-	0.097	0.073
Ethyl butanoate	1029	0.557	0.333	0.710	0.481	0.211	0.528	0.823	0.212	0.227	0.487	0.258
Isobutyl alcohol	1099	1.542	1.750	0.643	1	0.952	1.204	2.012	0.773	0.559	1.738	0.823
Isoamyl acetate	1113	-	0.103	-	-	-	-	0.161	-	-	-	-
Isoamyl alcohol	1214	1.716	1.296	1.296	1.371	0.679	1.433	1.818	0.916	0.834	1.762	0.905
Ethyl caproate	1224	0.172	0.280	0.121	0.262	0.070	0.192	0.146	0.162	0.22	0.166	1.194
Ethyl caprylate	1431	0.108	1.632	0.608	1.573	0.344	1.136	0.886	0.848	1.004	0.834	2.735
Acetic acid	1451	0.122	0.041	0.140	0.067	0.164	0.123	0.087	0.068	0.120	0.100	-
Ethyl caprate	1636	1.560	1.987	1.027	1.899	0.645	1.600	1.064	0.904	1.141	1.293	3.948
Ethyl laurate	1842	0.264	0.362	0.218	0.293	0.318	0.281	0.207	0.125	0.184	0.262	0.453
Isoamyl decanoate	1860	0.232	0.174	0.148	0.143	0.172	0.291	0.514	0.120	0.148	0.225	0.191
Phenethyl alcohol	1915	0.201	0.135	0.141	0.015	0.090	0.201	0.216	0.100	0.191	0.219	0.128
Ethyl myristate	2043	0.114	0.097	0.068	0.106	0.066	0.112	0.106	0.059	0.061	0.127	0.086
Ethyl palmitate	>2200	0.030	0.099	0.023	0.057	0.026	0.029	-	0.025	0.041	0.041	0.084
Total		100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

^a : Retention indices were determined using C₈-C₂₂ as external reference^b : Japanese sake yeast^c : Average of relative percentage of total peak area^d : No detection.

되었고 효모 91-5와 54-3이 0.47과 0.72 mg/mL로 가장 낮게 나타났으며 전체 유기산 함량은 효모 272-7이 21.16 mg/mL로 가장 많았으나 대조군 보다는 0.62 mg/mL 적게 나타났고 acetic acid 함량이 가장 적었던 효모 91-5와 54-3이 1.68과 8.31 mg/mL로 가장 적게 나타났다.

발효액의 휘발성 향기성분

발효물의 휘발성 향기 성분을 Solid Phase Microextraction (SPME)을 이용하여 추출하고 gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS)로 확인한 결과 33개의 휘발 성분이 확인되었다(Table 4). 그 중 16개의 휘발 성분이 동정되었는데 작용기별로 보면 alcohol류가 phenethyl alcohol을 포함하여 4종, ester류가 isobutyl acetate를 포함하여 11종 그리고 acid류가 1종이었다. 휘발성 향기성분의 면적비율(peak area%)은 alcohol류 88.71~96.26%, ester류 1.85~9.43% 그리고 acid류 0~0.16%로 alcohol류의 면적비율이 월등히 높았고 다음이 ester류로 나타났다. Isobutyl alcohol과 isoamyl alcohol로 대표되는 higher alcohol은 효모 99-5에서 4.05%로 가장 많은 면적비율로 나타났고 효모 272-7이 1.58%로 가장 적게 나타났다. Ester류는 대조군이 9.43%로 월등히 높았고 효모 54-3과 91-2에서 5.45와 5.28%로 중간 이상을 보였으며 효모 91-5는 1.85%로 가장 적게 나타났고 ester류 중 가벼운 과일 향으로 top note에 성숙감과 둥근 모양을 나타내는 isoamyl acetate는 효모 54-3과 99-5에서만 검출되었고 청주의 향기성분으로 알려진[8] 강하고 보급력이 있는 fruity-

winey odor를 나타내는 ethyl caproate는 대조군에서 월등히 높았으며 효모 54-3과 91-2에서 0.26%이상으로 나타났다. Acetic acid는 ester 면적비율이 가장 적었던 효모 91-5에서 0.16%로 가장 높게 나타났고 효모 54-3에서 0.04%로 가장 적게 나타났으며 대조군에서는 검출되지 않았다.

선별효모 동정

누룩으로부터 분리한 효모를 BIOLOG로 신속 간이 동정한 결과 효모 18-2, 54-3을 비롯한 7 균주가 *Saccharomyces cerevisiae*, 효모 192-2와 271-4는 *Zygosaccharomyces cidri* 그리고 효모 91-5는 *Pichia sydowiorum*으로 동정되었다(Table 5).

Table 5. Identification of 10 wild type yeast strains.

Species	Yeast No.	% Probability	Similarity Index Value
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	18-2	100	0.86
	54-3	100	0.93
	90-2	99	0.86
	91-2	100	0.93
	98-2	100	0.93
	99-5	99	0.86
	272-7	100	0.93
<i>Zygosaccharomyces cidri</i>	192-2	100	0.85
	271-4	100	0.55
<i>Pichia sydowiorum</i>	91-5	75	0.65

요 약

누룩으로부터 분리한 야생효모 10 균주의 청주제조 가능성을 위해 발효에 관여하는 몇 가지 특성을 조사한 후 신속 간이 동정하였다. 전국에서 수집한 300여 점의 누룩으로부터 알코올 발효성이 뛰어난 야생효모 10 균주를 선별하였으며 알코올 내성, 내당성 및 침강성을 조사한 후 발효물을 제조하여 알코올 함량, 당도, pH, 유기산 및 휘발성 향기성분을 조사하였고 선별된 10 균주를 Biolog를 이용하여 신속 간이 동정하였다. 알코올 내성은 ethanol 함량 18%까지는 모두 활성을 보였으나 20%이상에서는 효모 54-3, 90-2 그리고 91-5만이 활성을 나타냈으며 내당성은 모두 우수하였고 침강성은 효모 90-2가 83.03%로 매우 좋게 나타났다. 야생 효모를 이용하여 발효물을 제조한 후의 알코올 함량은 대조군 7.42%보다 높게 나타난 것이 3 균주였으며 유기산은 효모 272-7이 대조군과 거의 같은 함량을 보였고 acetic acid 함량이 적은 균주는 total acid 함량 또한 적게 나타났다. 발효물에서의 휘발성 향기성분은 alcohol류가 4종, ester류가 11종 그리고 acid 류가 1종 확인되었다. Higher alcohol과 휘발성분의 대부분을 차지한 ester류는 대조군이 월등히 높았고 효모 54-3과 91-2에서 대조군 면적비율의 중간 이상으로 나타났다. BIOLOG로 신속 간이 동정한 결과 효모 54-3 외 6 균주가 *S. cerevisiae*, 효모 192-2와 271-4는 *Z. cidri* 그리고 효모 91-5는 *P. sydowiorum*으로 동정되었다

REFERENCES

1. ASBC(American Society of Brewing chemists) *Methods of Analysis, 9th Edition*. 2004. Microbiology Method Yeast-11.
2. Bruce W. Z., C. F. Kenneth, H. G. Barry, and S. N. Fred. 1995. *Wine Analysis and Production*, pp. 447-449. Chapman & Hall, New York, U.S.A.
3. Kang, T. Y., G. H. Oh, and K. Kim. 2000. Isolation and identification of yeast strains producing high concentration of ethanol with high viability. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **28**: 309-315
4. Kim, H. S., J. S. Hyun, J. Kim, H. P. Ha, and T. S. Yu. 1998. Enzymological characteristics and identification of useful fungi isolated from traditional Korean Nuruk. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26**: 456-464.
5. Kim, H. S. and T. S. Yu. 2000. Volatile flavor components of traditional Korean Nuruk produced by Nuruk fungi. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **28**: 303-308.
6. Kim, J. Y. and J. S. Koh. 2004. Fermentation characteristics of Jeju foxtail millet-wine by isolated alcoholic yeast and saccharifying mold. *J. Kor. Soc. Appl. Biol. Chem.* **47**: 85-91.
7. Kim, J. Y. and J. S. Koh. 2004. Screening of brewing yeasts and saccharifying molds for foxtail millet-wine making. *J. Kor. Soc. Appl. Biol. Chem.* **47**: 78-84.
8. Lee, J. H. 1998. Effect of esterases from rice wine yeast on the ethyl caproate production during rice wine brewing. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26**: 50-54.
9. Park, J. C., M. Ok, J. Y. Cha, and Y. S. Cho. 2003. Isolation and identification of the high-glutathione producing *Saccharomyces cerevisiae* FF-8 from Korean traditional rice wine and optimal producing conditions. *J. Kor. Soc. Agric. Chem. Biotech.* **46**: 348-352.
10. Park, J. W., K. H. Lee, and C. Y. Lee. 1995. Identification of filamentous molds isolated from Korean traditional Nuruk and their amyolytic activities. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 737-746.
11. Seo, M. J. and S. R. Ryu. 2002. Screening and characteristics of ethanol tolerant strain *Saccharomyces cerevisiae* SE211. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **30**: 216-222.
12. Seo, M. Y., J. K. Lee, B. H. Ahn, and S. K. Cha. 2005. The Changes of microflora during the fermentation of Takju and Yakju. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **37**: 61-66.
13. Shin, C. S., S. K. Lee, and Y. J. Park. 1996. Characteristics of the yeast strains which isolated for improvement of Choungju quality. *Agric. Chem. Biotechnol.* **39**: 9-15.

(Received Mar. 28, 2006/Accepted June 14, 2006)