

## Environmental resistance of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* with tolerance to potassium metabisulfite at the microbial succession stage of fermenting Campbell Early grape

Mi-Sun Kim<sup>1</sup>, Young-Ah Hong<sup>1</sup>, Soo-Hwan Yeo<sup>2</sup>, Seong-Yeol Baek<sup>2</sup>, Hye-Ju Yun<sup>2</sup>,  
Chang-Ho Rhee<sup>3</sup>, Kwan-Pil Kim<sup>4</sup>, Heui-Dong Park<sup>1,5\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Food Science and Technology, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

<sup>2</sup>Department of Agro-food Resource, National Academy of Agricultural Science, RDA, Suwon 441-853, Korea

<sup>3</sup>Gyeongbuk Institute for BioIndustry, Andong 760-380, Korea

<sup>4</sup>Lotte Confectionery Company, LTD, Seoul 150-100, Korea

<sup>5</sup>Institute of Fermentation Biotechnology, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

### 캠벨얼리 와인발효 중 효모 천이단계에서 분리된 아황산 내성 토착형 효모의 환경내성

김미선<sup>1</sup> · 홍영아<sup>1</sup> · 여수환<sup>2</sup> · 백성열<sup>2</sup> · 윤혜주<sup>2</sup> · 이창호<sup>3</sup> · 김관필<sup>4</sup> · 박희동<sup>1,5\*</sup>

<sup>1</sup>경북대학교 식품공학부, <sup>2</sup>농촌진흥청 국립농업과학원 농식품자원부, <sup>3</sup>(재)경북바이오산업연구원, <sup>4</sup>롯데제과, <sup>5</sup>경북대학교 발효생물공학연구소

#### Abstract

Several indigenous sulfite-resistant yeasts were isolated at the microbial succession stage of yeast flora during spontaneous fermentation of Campbell Early grapes using a YPD plate that contained 200 mg/L or 500 mg/L potassium metabisulfite. When they were applied to the wine fermentation using the Campbell Early grape and apple juices, strains S13 and D8 showed strong alcohol fermentation and good flavor production. They were identified as *Saccharomyces cerevisiae* in the phylogenetic analysis based on their ITS 1-5.8S-ITS II DNA sequences. The two yeast strains grew to a high cell density in the YPD media supplemented with 40%(w/v) glucose. They also grew rapidly in the YPD media at 40°C. While strain S13 showed some differences in cell density at the two temperatures, no marked difference was observed during the culture of strain D8. The strains grew relatively well at pH 5.0 and 9.0 compared with pH 7.0, which was the optimum pH for their growth. Especially, strain S13 cultivated in the YPD media at pH 9.0 grew to 93% of the growth of strain D8, which was obtained at pH 7.0.

**Key words** : indigenous yeast, environmental tolerance, phylogenetic tree, grape wine

#### 서 론

우리나라의 포도 재배 지역은 최저 온도가 섭씨 15도 이상인 지역으로 김천, 경산, 영동, 영천, 천안, 안성 등에 분포되어 있다. 품종별 재배면적은 2010년 현재 조생종인 캠벨얼리가 전체 노지포도 재배면적의 69.5%인 12,219 ha에서 재배되고 있으며 중생종인 거봉이 15.4%인 2,702 ha,

만생종인 Muscat Bailey A가 7.5%인 1,312 ha에서 재배되고 있다(1,2). 포도의 과실, 주스, 포도주 등에는 포도당, 과당과 같은 탄수화물을 비롯하여 기능성의 페놀물질, 여러 가지 비타민과 유기산, 칼륨, 마그네슘, 칼슘, 철 등의 인체에 유용한 무기물들이 함유되어 있어 천연건강식품이라 할 수 있다(3). 특히 포도주는 전 세계적으로 소비되고 있는 대중적인 알코올음료로서 포도주의 폴리페놀 성분은 심장 질환, 암, 노화, 동맥경화 등 만성적인 질병을 지연, 예방하는 효과가 있다고 알려져 있다(4). 현재 포도주는 2011년 현재 세계적으로 연간 약 2,600만 톤이 생산되고 있으며

\*Corresponding author. E-mail : hpark@knu.ac.kr  
Phone : 82-53-950-5774, Fax : 82-53-950-6772

이 중 프랑스가 약 660만 톤을 생산하여 세계 제1위를 차지하고 있고 다음으로 이탈리아가 약 470만 톤, 스페인이 약 330만 톤을 생산하고 있으며 미국, 중국, 아르헨티나, 호주, 칠레 등이 그 뒤를 잇고 있다(5). 최근 우리나라의 경우 포도주 소비량이 급증하였으나 대부분이 외국수입 포도주에 의존하고 있으며 복분자를 포함한 국내 과실주 시장은 약 870억원으로서 전체 주류시장의 약 1.2%를 점유하고 있을 뿐이다(6). 포도주에 관한 연구는 유럽을 중심으로 포도의 재배에서부터 포도주의 전 생산과정에 관한 연구가 광범위하고 깊게 수행되어 있으나 우리나라의 경우에는 체계적인 연구가 진행되지 못하였다.

유럽을 중심으로 발달한 포도주는 주로 유럽종 포도인 *Vitis vinifera*계에 속하는 적포도주용의 카베르네 소비뇽, 메를로, 피노 누아르 등과 백포도주용의 샤르도네 등의 양조용 포도를 원료로 제조되고 있다(7). 또한 포도주의 향과 맛을 개선하기 위하여 다양한 효모가 개량되어 *S. cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus* 등의 포도주 효모균주가 산업화되어 시판되고 있다(8). 하지만 이들 대부분의 효모 역시 높은 당 농도에서의 발효는 삼투압 스트레스를 증가시키고 대사의 변화, 균주성장과 발효에 어려움을 나타낸다(9,10). 일부 연구자에 의하여 높은 당 농도의 환경에서 효모 스트레스 유전자들이 발현되면서 스트레스 반응이 유도되는 것이 조사되었다(11,12). 또한 *S. cerevisiae*는 당을 분해하여 알코올과 CO<sub>2</sub>를 생산하게 되는데 발효과정 중에 생성된 알코올 역시 효모에게 스트레스를 주게 되며(13) 어떤 *S. cerevisiae* 균주의 경우에는 높은 당 농도와 알코올 등의 여러 스트레스 환경에서 효모의 발효력이 변하거나 영향을 받는다고 하였다(14). 따라서 특별한 발효조건에서는 여러 가지 많은 스트레스 요인이 작용할 수 있으므로 적절한 실험을 통하여 각각의 목적에 부합하는 최적의 균주를 선발하여 사용함이 유리하다(15).

현재 산업적으로 시판되고 있는 *S. cerevisiae*, *S. bayanus* 등의 균주들은 *V. vinifera*계에 속하는 유럽종의 포도를 발효하는데 적합한 균주들로 개발되었으며 현재까지 우리나라의 주 포도품종인 *Vitis labruscana*에 속하는 캠벨얼리 포도에 적합한 와인효모 균주에 관하여는 체계적인 연구가 진행되지 못하였다(16). 따라서 본 연구에서는 캠벨얼리 와인 발효 중 야생효모의 생육억제 및 색소 안정화를 위해 첨가하는 potassium metabisulfite에 대해 내성을 가지고 있는 우리나라 토착형 포도주 효모를 분리하고자 하였다. 또한 우리나라 고유의 토착형 포도주 효모 개발을 위한 기초 자료를 얻기 위하여 이 효모들의 포도주 제조와 관련성이 있는 내당성, 내산성, 내열성 등의 특성을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 시료 및 균의 배양조건

본 실험에 균원 시료로 사용한 포도 원료는 2012년 경북

상주와 영주 일원에서 수확한 캠벨얼리 포도를 사용하였다. 토착형 효모의 분리 및 배양을 위하여 사용한 배지는 YPD 배지(1% Bacto-yeast extract, 2% Bacto-peptone, 2% Dextrose) 배지로서 필요에 따라 0.1 N HCl 또는 0.1 N NaOH를 사용하여 pH를 조정하여 사용하였다(17). 효모의 일반적인 배양은 YPD 배지를 사용하여 30°C에서 48시간 진탕 배양하여 얻은 전배양액을 5%(v/v)되게 집중한 후 동일한 조건에서 배양하였다. 효모 균주는 YPD 배지에서 48시간 배양하여 얻은 배양액과 30%(w/v) 글리세롤 용액을 1:1로 혼합하여 -70°C에 보관하면서 사용하였다.

### 효모 균주의 분리

토착형 포도주 효모의 분리를 위하여 경북 상주와 영주 일원에서 수확한 포도에 설탕을 가하여 24 °Brix로 조절한 후 20°C에서 자연발효를 행하였다. 시료는 Hong과 Park(18)의 결과에 따라 알코올의 생성이 시작되면서 효모 균주의 천이가 일어나는 발효 6일에 채취하였다. 시료를 적당하게 희석한 후 plate 당 50-200개의 콜로니가 형성될 수 있도록 200 mg/L의 potassium metabisulfite를 함유하는 YPD 고체 배지에 도달한 다음 30°C에서 배양한 다음 세포의 모양을 현미경으로 검경하면서 효모형을 가진 균주들만을 분리하였다. 이들을 다시 500 mg/L의 potassium metabisulfite를 함유한 YPD 고체배지에 희석도말배양하여 생육이 우수한 효모들만을 순수분리하였다. 분리한 효모들을 500 mg/L의 potassium metabisulfite를 첨가한 것과 첨가하지 않은 YPD 액체배지에 다시 배양하면서 균의 생육도를 660 nm에서 측정하여 상기의 두 조건에서 생육도에 큰 차이가 없는 균주들만을 선별하였다. 또한 이 균주들을 200 mg/L의 potassium metabisulfite를 첨가한 포도주스와 사과주스에 각각 접종하여 와인발효 시험을 행한 후 알코올 발효에 의한 가스의 발생이 강하면서 sniffing test에 의한 발효 후 향기가 우수한 균주들을 선별하여 공시균주로 하였다.

### PCR-RFLP

효모 ITS I-5.8S-ITS II영역의 PCR 반응을 위한 primer는 ITS1(5' -TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3')과 ITS4(5' -TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3')를 사용하여 (19) 95°C에서 15분간 1회 반응 후 95°C, 20초 - 50°C, 40초 - 72°C, 1분 30초간 반응을 1 cycle로 30회 반복하고 최종적으로 72°C에서 5분간 1회 반응 후 종결하였다. 기계는 ABI 9700 Thermal Cycler(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 사용하였으며 PCR 산물은 PCR Purification Kit(SolGent, Daejeon, Korea)를 사용하여 정제하였다. PCR 산물의 제한효소 절편 길이 다형현상을 확인하기 위하여 정제한 PCR 산물을 HaeIII 제한효소로 처리한 후 생성된 DNA 단편을 상법에 따라 1.5% agarose gel을 사용하여 확인하였다(20). DNA 단편 크기의 측정용 marker로는 100 bp

DNA Ladder(SolGent, Daejeon, Korea)를 사용하였다.

### 효모의 동정

효모 DNA 염기서열 결정은 SolGent사(Daejeon, Korea)의 sequencing service를 의뢰하여 분석하였으며 sequencing primer로는 ITS1 또는 ITS4를 사용하였다(19). 염기서열 결과에 대한 서열간의 유사성을 알아보는 상동성 검색은 National Center for Biotechnology Information(NCBI, Bethesda, MD, USA)에서 운영하는 BLAST를 이용하였고 계통학적 분석을 위한 다중서열정렬은 European Molecular Biology Laboratory-European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI, Hinxton, UK)에서 제공하는 ClustalW2를 이용하였다. 그리고 계통 유연관계 분석에서 염기서열의 편집은 BioEdit version 7.0.9.0, 1997-2007 프로그램(Bioedit, Stockport, UK)을 이용하였으며(21) 근린결합분석(neighbor-joining analysis)에 의한 phylogenetic tree 작성 및 분석에는 MEGA4 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) version 4.0.2, 1993-2008 프로그램(Center for Evolutionary Medicine and Informatics, Tempe, AZ, USA)을 이용하였다(22).

### 아황산 내성 분석

분리 효모들의 아황산에 대한 내성 분석을 위하여 아황산에 의한 효모의 생육 저해정도를 조사하였다. 아황산의 첨가를 위하여 500 mg/L의 potassium metabisulfite를 함유하는 YPD 액체배지에 전배양액을 5%(v/v) 접종한 후 30°C에서 24시간 동안 150 rpm의 속도로 진탕하면서 배양하였다. 배양 중 경시적으로 시료를 검체한 후 660 nm에서 흡광도를 측정하여 potassium metabisulfite를 첨가한 YPD 배지에서의 균의 생육도를 potassium metabisulfite를 첨가하지 않은 YPD 배지에서의 생육도와 비교하여 조사하였다.

### 효모의 환경내성 분석

효모의 내당성 분석을 위하여 고농도의 포도당에 대한 효모의 생육 저해정도를 조사하였다. 포도당을 첨가하여 최종농도가 40, 60%가 되게 인위적으로 조정된 YPD 액체 배지에 종배양액 5%(v/v)씩 접종한 후 30°C에서 각각 진탕 배양하면서 660 nm에서의 흡광도를 측정하여 2%의 포도당을 함유하는 YPD 배지에서의 생육도와 비교하였다. 효모의 내열성 측정을 위하여 YPD 액체배지에 균을 접종한 후 20, 30, 40, 50°C에서 배양하면서 균의 생육도를 비교하였으며 내산성 및 내알칼리성 분석은 YPD 배지의 pH를 2, 5, 7, 9로 조정된 배지에 균을 접종한 후 30°C에서 배양하면서 균의 생육도를 비교하였다.

## 결과 및 고찰

### 발효 중 효모 천이 현상

일반적으로 포도 원료로부터 *S. cerevisiae*를 분리하는

것은 거의 불가능한 것으로 알려져 있는데 이러한 현상은 포도에 존재하는 야생의 효모가 대부분이 *Hanseniaspora* sp.에 속하는 균주이기 때문이다. 그 외 일부 *Candida* sp., *Zygoascus* sp. 등에 속하는 균주가 검출되기도 하지만 *S. cerevisiae*가 검출된 보고는 거의 없는 실정이다(23). 경북 상주 및 영주 일원 두 지역에서 수확한 캠벨얼리에 보당하여 24 °Brix로 조절한 후 자연발효를 행하면서 발효 특성을 조사한 결과 발효 6~8일 후 알코올 생성이 시작되면서 *S. cerevisiae*들이 처음 나타나기 시작하며 발효 초기 우점균인 *H. uvarum*으로부터의 천이 현상이 일어나는 것으로 최근 보고되었다(18).

따라서 이 시기가 토착형 *S. cerevisiae* 균주의 분리에 가장 적합한 시기로 생각되어진다. 본 연구에서 자연발효 6일 후 임의로 분리한 효모들의 ITS I-5.8S-ITS II 영역을 증폭한 DNA를 제한효소 *HaeIII*로 절단한 후 전기영동한 결과는 Fig. 1과 같다. 두 지역에서 수확한 캠벨얼리 모두 자연발효 6일 후 새로운 전기영동 양상을 나타내는 균주들이 8개 균주 중 1개 균주의 빈도로 확인되었다. 또한 그 전기영동 양상은 기 보고된(18) *S. cerevisiae*의 것들과 동일하게 나타나 이 시점의 시료를 토착형 포도주 효모의 분리에 적합한 시료로 사용하였다.

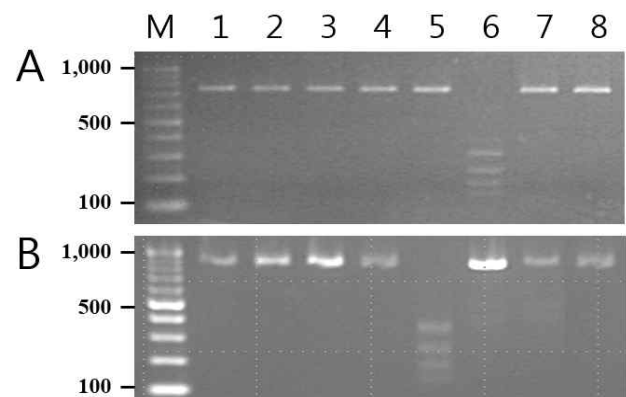
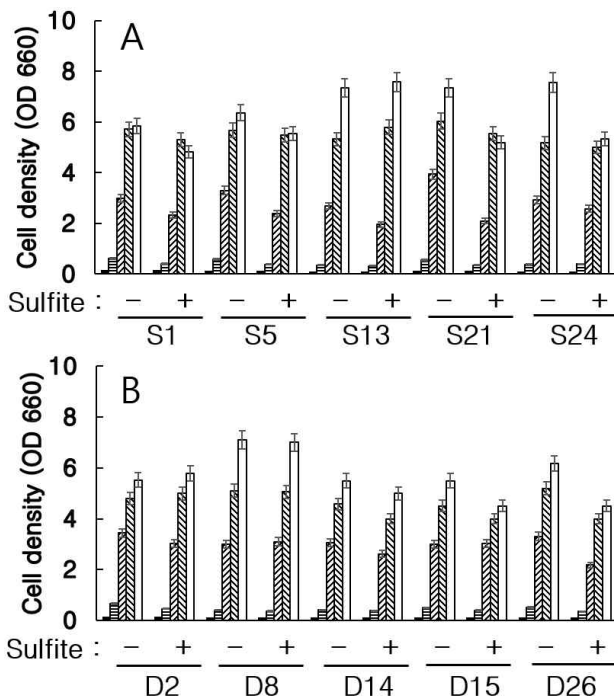


Fig. 1. PCR-RFLP patterns of *HaeIII* digested ITS 1-5.8S-ITS II DNA fragments amplified from yeasts randomly isolated after 6 days of spontaneous fermentation of Campbell Early grapes grown in two different regions (A and B).

### 토착형 우량 효모 균주의 분리

캠벨얼리 발효 6일 후의 시료로부터 200 mg/L의 potassium metabisulfite를 함유하고 있는 YPD 배지에서 생육이 우수한 효모 균주를 각각 30여주씩을 분리하였다. 이들을 다시 500 mg/L의 potassium metabisulfite를 함유하는 YPD 고체배지에 희선도말배양하여 각각 5주씩의 효모균주들을 분리한 다음 500 mg/L의 액체배지에서 생육도를 조사한 결과는 Fig. 2와 같다. 상주 캠벨얼리 포도로부터 분리하여 얻은 S1, S5, S13 균주가 아황산의 존재 유무에 관계없이 유사한 생육도를 나타내었으며 S13 균주가 가장



**Fig. 2. Changes in the cell density of the yeast isolates during culture in YPD liquid media in the presence of 500 mg/L potassium metabisulfite.**

Yeast cell density was measured at 660 nm before (■) and after cultivation for 4 (▨), 8 (▧), 12 (▩) and 24 h (□). A and B represent two Campbell Early grapes grown in two different regions.

**Table 1. Alcohol and flavor production in grape must and apple juice by of selected yeast strains**

Strain	Grape juice		Apple juice		Selection
	Alcohol	Flavor	Alcohol	Flavor	
S1	++	++	++	++	×
S5	+++	++	++	++	×
S13	+++	+++	+++	+++	0
D2	+++	++	+++	++	×
D8	+++	+++	+++	+++	0
D24	++	++	+++	+	×

우수한 생육도를 나타내었다. 영주 단산 포도로부터 분리한 효모 중에는 D2, D8, D14가 유사한 생육도를 나타내었으며 특히 D8 균주가 우수한 특성을 나타내었다. 아황산은 식품첨가물로서 산화방지, 살균작용 그리고 갈변방지 등의 작용 때문에 일반식품, 음료 그리고 약품 등의 보존제로 사용되고 있다. 포도주 제조에 있어서는 색소의 안정화를 위한 항산화제 역할과 선택적 살균제의 특성을 가지고 있어 유해한 미생물을 제어함으로써 아황산에 대한 내성을 가지고 있는 와인효모에 의한 정상적인 와인의 발효를 위하여 사용되므로 특히 포도주 발효에 있어서 중요한 특성이다 (24). 따라서 아황산 내성이 우수한 6개의 균주들을 소량의

포도주스와 사과주스에 접종하여 발효를 행하면서 알코올 발효능과 향기 생성능을 조사한 결과 분리 균주 S13과 D8 이 매우 우수한 결과를 나타내었다(Table 1). 따라서 균주 S13과 D8을 최종적으로 선정하여 공시균주로 하였다.

**분리 효모의 동정**

분리 균주의 동정을 위하여 효모 ITS I-5.8S - ITS II 영역의 DNA 염기서열을 바탕으로 분자계통 유연관계를 밝히기 위한 근린결합분석을 이용하여 계통학적 분석을 행한 결과는 Fig. 3과 같다. 두 분리 균주의 모두 대조균주인 *S. cerevisiae* S288c 표준균주와 유전적으로 매우 가까운 위치에 있음을 알 수 있었으며 염기서열은 99% 이상의 상동성을 나타내었다. 따라서 본 연구에서 분리한 potassium metabisulfite 내성을 가진 두 균주 S13 및 D8을 *S. cerevisiae* 또는 그 유연균으로 동정하였다. 두 균주 모두 계란형의 형태를 가지고 출아에 의해 번식하였으며 자낭포자를 잘 형성하였다. 당 발효성 및 당자화성을 조사한 결과 두 균주 모두 glucose, fructose, galactose, maltose, sucrose, raffinose, xylitol 등의 발효능 및 자화능이 우수하였으나 sorbose, arabinose, lactose, mannitol 등의 발효능 및 자화능은 거의 없거나 매우 미약하여 *S. cerevisiae*의 일반적인 특성과 잘 일치하였다(자료 미제시).

**분리 효모의 환경내성**

분리 균주의 내당성을 알아보기 위하여 포도당의 농도를 40, 50 및 60%로 조정된 YPD 배지에서 660 nm에서의 생육도를 조사한 결과 40% 포도당의 존재 하 S13 균주는 최대 37.6, D8 균주는 39.4의 흡광도를 나타내었다. 이는 S13의 경우 2%의 포도당을 함유하고 있는 YPD 배지에서의 생육도 14.6에 비하여 약 2.6배, D8의 경우 10.1에 비하여 약 3.9배의 생육도를 나타내어 이 두 균주 모두가 고농도의 포도당 존재 하에서도 생육이 왕성한 것으로 생각되었다. YPD 배지에 포도당을 60%가 되게 첨가한 배지에서의 생육은 다소 지연되는 현상을 나타내었으나 48시간 배양 후 S13의 660 nm에서의 흡광도가 약 29, D8은 약 26.7의 생육도를 나타내었다(Fig. 4).

두 분리균주의 내열성을 알아보기 위하여 20, 30, 40, 50℃의 온도에서 균을 배양하면서 생육도를 조사한 결과 20~40℃의 온도에서 모두 비교적 양호한 생육도를 나타내었다. 균주 S13의 경우에는 20℃에서는 30℃에서보다 초기 생육도의 증가 다소 지연되었다. 그러나 배양 36시간 이후 부터는 거의 유사하게 증가하여 48시간 후에는 흡광도가 모두 약 15로서 거의 동일한 수준의 생육도를 나타내었다. 하지만 균주 D8의 경우에는 48시간 배양 후 30℃에서 약 9.5의 흡광도를 나타내어 20℃에서의 흡광도 15.4보다 매우 낮게 나타났다. 두 균주 모두 50℃의 온도에서는 생육이 거의 불가능하였다(Fig. 5).

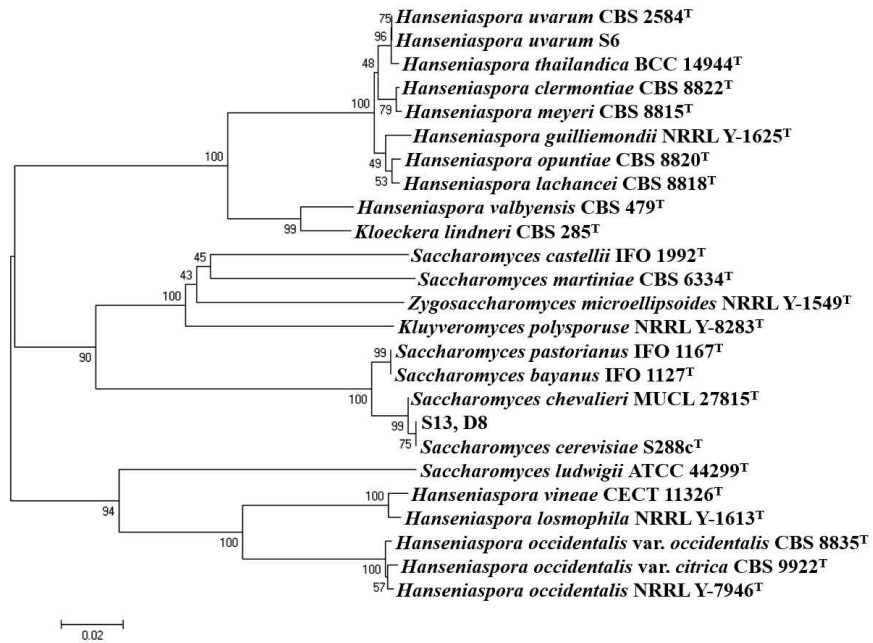


Fig. 3. Phylogenetic tree of the yeast isolates S13 and D8.

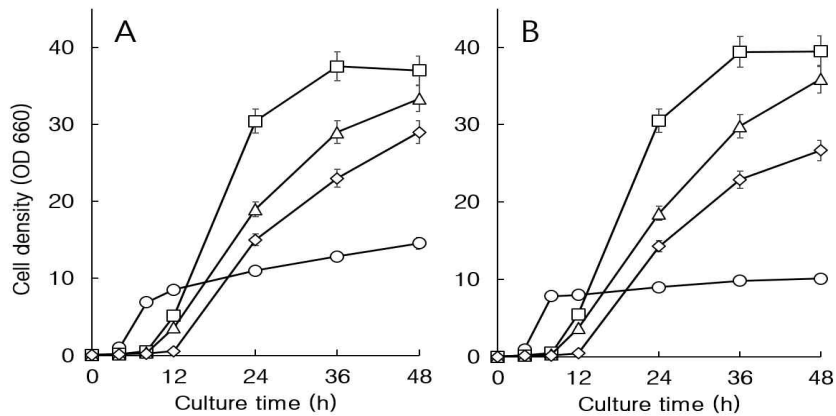


Fig. 4. Changes in the cell density of the yeast isolates S13 (A) and D8 (B) during culture in YPD liquid media supplemented with 2 (○), 40 (□), 50 (△) and 60% glucose (◇).

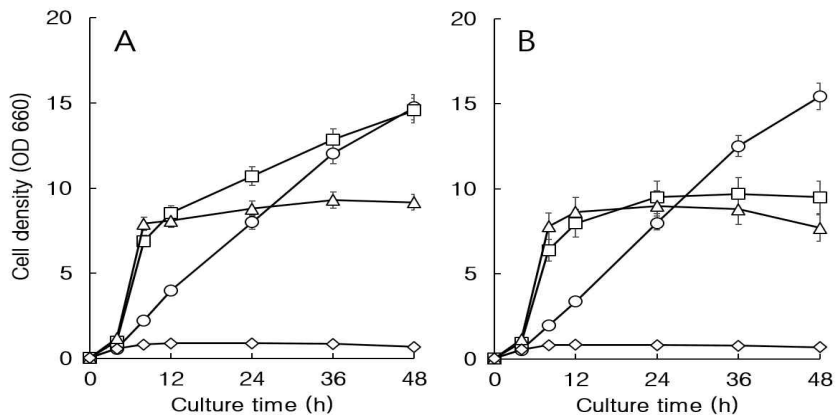


Fig. 5. Changes in the cell density of the yeast isolates S13 (A) and D8 (B) during culture in YPD liquid media at 20 (○), 30 (□), 40 (△) and 50°C (◇).

두 분리균주의 내산성 및 내알칼리성을 알아보기 위하여 YPD 배지의 pH를 2.0, 5.0, 7.0, 9.0으로 조정된 배지에 배양 하면서 균의 생육도를 조사한 결과 S13의 경우 pH 5.0 및 pH 7.0에서 균의 생육도가 거의 유사하게 나타났으며 pH 9.0에서도 약 93% 수준의 생육도를 나타내어 이 균주는 넓은 범위의 pH에서도 생육이 양호함을 알 수 있었다. 그러나 균주 D8의 경우에는 pH 7.0에서 생육이 가장 양호하였으며 pH 5.0에서는 생육이 다소 낮게 나타났고 pH 9.0에서는 더욱 낮은 생육도를 나타내어 pH에 민감한 반응을 나타내었다(Fig. 6).

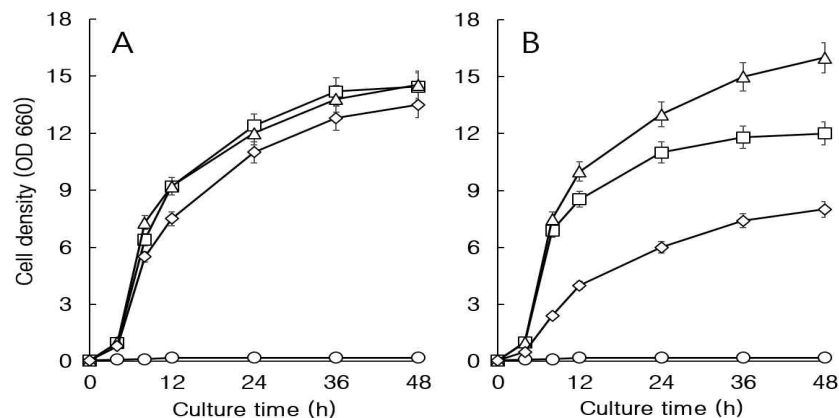


Fig. 6. Changes in the cell density of the yeast isolates S13 (A) and D8 (B) during culture in YPD liquid media adjusted to pH 2.0 (○), 5.0 (□), 7.0 (△) and 9.0 (◇).

일반적으로 포도주의 제조를 위하여는 순수한 형태의 효모를 배양하여 스타터로 첨가하여 발효를 유도하는 것이 포도주의 품질을 균일화하고 개선하는데 도움이 되는 것으로 알려져 있다(25,26). 그러나 이 경우에도 토착형 효모가 발효에 관여하여 원료 포도의 품종이나 재배지역 등에 따라 독특한 특성을 가진 포도주가 제조된다(27-30). 이러한 이유로 인하여 포도 자체에 존재하거나 발효 중에 발효에 관여하는 것으로 추정되는 토착형의 *S. cerevisiae* 균주는 물론 non-*Saccharomyces* 효모에 관한 연구가 활발하게 진행 중에 있다(31-35). 또한 포도주의 독특한 특성을 강화하기 위하여 두 종류의 토착형 효모를 이용한 혼합발효에 관한 연구들이 보고되고 있다(33,36-38). 본 연구에서 발효 중의 Campbell Early 포도에서 분리한 우리나라 토착형 *S. cerevisiae* S13과 D8 균주의 포도주 발효시험이 진행 중에 있으며 이들의 첨가가 국산 캠벨얼리 포도주의 품질에 미치는 영향에 관하여는 좀 더 연구해야 할 과제이다.

## 요 약

경북 상주와 영주 일원에서 수확한 캠벨얼리 포도의 자연발효 중 *S. cerevisiae*가 처음으로 나타나면서 효모의 천이

현상이 일어나는 시점의 발효액으로부터 아황산 내성을 지닌 토착형 효모를 분리하였다. 분리 효모들 중 캠벨얼리 주스 및 사과주스의 발효 중 알코올의 생성능과 우수한 향기를 생성할 수 있는 두 효모 균주 S13과 D8 균주를 선별하였다. ITS 1-5.8S-ITS II 염기서열을 토대로 계통분석을 통하여 두 분리 효모는 *S. cerevisiae*로 동정하였다. 분리 효모의 환경내성을 조사한 결과, 두 균주 모두 40%의 포도당을 함유하는 YPD 배지에서도 잘 생육하였으며 60%의 포도당 존재 하에서도 다소 지연되기는 하였으나 생육이 양호하여 내당성이 높게 나타났다. 온도를 달리하여 배양

한 결과, 40°C의 온도에서도 비교적 양호한 생육도를 나타내어 S13 균주는 30°C에 비하여 약 63%, D8 균주는 약 81%의 생육도를 나타내었다. 두 균주 모두 pH 7.0에서 생육도가 가장 높았으며 pH 5.0과 9.0에서도 비교적 양호한 생육도를 나타내었다. 특히 균주 S13은 pH 9.0에서도 생육이 양호하였으며 pH 7.0에서의 생육도와 비교하여 약 93%의 생육도를 나타내었다.

## 감사의 글

본 연구는 2013년 농촌진흥청 어젠다 과제(PJ00943902)의 연구비 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## References

1. Korean Statistical Information Service (2010) Census of agriculture, forestry and fisheries. Seoul, Korea
2. Korea Rural Economic Institute Agricultural Outlook Center (2011) Grape 201101. <http://aglook.krei.re.kr/jsp/agreport/fruit/list.js>. Retrieved 2013-07-22

3. Lee SK, Mbawambo ZH, Chung H, Luyengi L, Gamez EJC, Metha RG, Kinghorn AD, Pezzuto JM (1998) Evaluation of the antioxidant potential of natural products. *Comb Chem High Throughput Screening*, 1, 35-46
4. Koh KH (1999) Healthy characteristics of wine. *Food Ind*, 4, 20-25
5. FAO (2012) FAOSTAT. <http://faostat3.fao.org/home/index.html#DOWNLOAD>. Retrieved 2013-07-22
6. Cho YM (2013) A market trend of Korean alcoholic beverages in 2012. *Alcohol Liquor Ind*, 115, 72-81
7. Jackson R (2008) *Wine science: principles and applications*. Academic Press, San Diego, CA, USA, p 15-49
8. Hwang SW, Park HD (2009) Characteristics of red wine fermentation of freeze-concentrated Campbell Early grape juice using various wine yeasts. *Korean J Food Preserv*, 16, 977-984
9. Attfield PV (1997) Stress tolerance. The key to effective strains of industrial baker's yeast. *Nat Biotechnol*, 15, 1351-1357
10. Pigeau G, Inglis D (2005) Upregulation of ALD3 and GPD1 in *Saccharomyces cerevisiae* during icewine fermentation. *J Appl Microbiol*, 99, 112-125
11. Erasmus DJ, Merwe GK, Vuuren HJJ (2003) Genome-wide expression analyses: metabolic adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to high sugar stress. *FEMS Yeast Res*, 2, 375-399
12. Jiménez-Martí E, Zuzuarregui A, Gomar-Alba M, Gutiérrez D, Gil C, del Olmo M (2011) Molecular response of *Saccharomyces cerevisiae* wine and laboratory strains to high sugar stress conditions. *Int J Food Microbiol*, 145, 211-220
13. Caridi A, Crucitti P, Ramondino D (1999) Winemaking of must at high osmotic strength by thermotolerant yeast. *Biotechnol Lett*, 21, 617-620
14. Aguilera F, Peinado RA, Millán C, Ortega JM, Mauricio JC (2006) Relationship between ethanol tolerance, H<sup>+</sup>-ATPase activity and the lipid composition of the plasma membrane in different wine yeast strains. *Int J Food Microbiol*, 110, 34-42
15. Zuzuarregui A, Del Olmo M (2004) Expression of stress genes in wine strains with different fermentative behavior. *FEMS Yeast Res*, 4, 699-710
16. Yook C, Seo MH, Kim DH, Kim JS (2007) Quality improvement of Campbell Early wine by mixing with different fruits. *Korean J Food Sci Technol*, 39, 390 - 399
17. Guthrie C, Fink RG (1991) *Methods in Enzymology: Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology*. Academic Press, San Diego, CA, USA, 194, p 13
18. Hong YA, Park HD (2013) Role of non-*Saccharomyces* yeasts in Korean wines produced from Campbell Early grapes: potential use of *Hanseniaspora uvarum* as starter culture. *Food Microbiol*, 34, 207-214
19. White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungi ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (Eds.) *PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, San Diego, CA, USA, p 315-322
20. Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular cloning: A laboratory manual* (3rd edition). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, p 5.2-5.17, p 5.55-5.60, p 5.65-5.67, p 5.79-5.82
21. Hall TA (1999) BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser*, 41, 95-98
22. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol*, 24, 1596-1599
23. Torija MJ, Rozès N, Poblet M, Guillamón JM, Mas A (2001) Yeast population dynamics in spontaneous fermentations: comparison between two different wine-producing areas over a period of three years. *Antonie van Leeuwenhoek*, 79, 345-352
24. Ough CS, Crowell EA (1987) Use of sulphur dioxide in winemaking. *J Food Sci*, 52, 386-389
25. Pretorius IS (2000) Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast*, 16, 675-729
26. Rankine BC (1977) Modern developments in selection and use of pure yeast cultures for winemaking. *Aus Wine Brew Spirit Rev*, 96, 31-33
27. Heard GM, Fleet GH (1985) Growth of natural yeast flora during the fermentation of inoculated wine. *Appl Environ Microbiol*, 50, 727-728
28. Mercado L, Dalcero A, Masuelli R, Combina M (2007) Diversity of *Saccharomyces* strains on grapes and winery surfaces: analysis of their contribution to fermentative flora of Malbec wine from Mendoza (Argentina) during two consecutive years. *Food Microbiol*, 24, 403-412
29. Querol A, Barrio E, Huerta T, Ramon D (1992) Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeast strains. *Appl Environ Microbiol*, 58, 2948-2953

30. Schütz M, Gafner J (1993) Analysis of yeast diversity during spontaneous and induced alcoholic fermentations. *J Appl Bacteriol*, 75, 551 - 558
31. Nisiotou AA, Spiropoulos AE, Nychas GJE (2007) Yeast community structures and dynamics in healthy and Botrytis-affected grape must fermentations. *Appl Environ Microbiol*, 73, 6705-6713
32. Zott K, Miot-Sertier C, Claisse O, Lonvaud-Funel A, Masneuf-Pomarede I (2008) Dynamics and diversity of non-Saccharomyces yeasts during the early stages in winemaking. *Int J Food Microbiol*, 125, 197-203
33. Ciani M, Comitini F, Mannazzu I, Domizio P (2010) Controlled mixed culture fermentation: a new perspective on the use of non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking. *FEMS Yeast Res*, 10, 123-133
34. Fleet GH, Heard GM (1993) Yeasts: growth during fermentation. In: Fleet GH (Ed), *Wine microbiology and biotechnology*. Harwood Academic Publishers, Newark, NY, USA, p 27-54
35. Jolly NP, Augustyn OPH, Pretorius IS (2006) The role and use of non-*Saccharomyces* yeasts in wine production. *South African J Enol Vitic*, 27, 15-39
36. Bely M, Stoeckle P, Masneuf-Pomarede I, Dubourdieu D (2008) Impact of mixed *Torulaspota delbrueckii* - *Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation. *Inter J Food Microbiol*, 122, 312 - 320

---

(접수 2013년 7월 24일 수정 2013년 9월 30일 채택 2013년 10월 2일)