

국내 전통누룩에서 분리한 증류식 소주용 효모의 특성

최한석^{1*} · 강지은¹ · 정석태¹ · 김찬우¹ · Kazunori Takamine²

¹국립농업과학원 발효식품과, ²가고시마대학교 농학부

Characterization of Yeast for Soju (Distilled Spirits) from Korean Traditional Nuruk

Han-Seok Choi^{1*}, Ji-Eun Kang¹, Seok-Tae Jeong¹, Chan-Woo Kim¹ and Kazunori Takamine²

¹Fermented Food Science Division, National Academy of Agricultural Science, Wanju 55365, Korea

²Faculty of Agriculture, Kagoshima University, Kagoshima 890-0065, Japan

ABSTRACT : The occurrence and characterization of yeast isolated from Korean traditional *nuruk* were investigated. Sequences of the D1/D2 domain of the 26S rDNA were identical for a strain examined and had a similarity value of 100% compared to sequences of the type strain of *Saccharomyces cerevisiae* (NRRL Y-12632). The isolate able to assimilate with trehalose, raffinose, and methyl-glucoside assimilate was also capable of glucose, galactose, maltose, and sucrose fermentation. It did not proliferate at 40°C or above, but was able to grow in concentration of 50% glucose and 10% NaCl. By combining nucleotide sequence, morphological observation, and physiological characteristics, the isolate was identified as *S. cerevisiae*.

KEYWORDS : Distilled spirits, Nuruk, *Saccharomyces cerevisiae*, Soju

술의 풍미는 시각, 청각, 후각, 촉각, 미각의 오감에 의해 정해지나 증류식 소주에 있어서는 후각을 자극하는 향기 성분이 소주의 품질을 결정짓는 중요한 요소이다. 술의 향기 성분은 본질적으로는 효모가 가장 큰 영향을 미치며 효모가 생성하는 주된 향기 성분은 알코올, 카르보닐 화합물, 유기산, 에스테르, 합황화합물, 아민 등이다[1]. 이들 화합물들은 효모의 대사과정이나 증류과정 중 생성되는데 술덧의 산(acid) 함량과 관련이 있는 것으로 알려져[2] 일본 증류식 소주에는 citric acid 생성량이 많은 백국균(*Aspergillus luchuensis*)과 흑국균(*A. awamori*)을 사용해 왔고[3], 브랜디 제조에는 총 산함량이 0.8~1.0% 이상인 Ugni blanc

포도 품종을 원료로 사용해오고 있다[4].

이에 따라 각 나라는 산 농도가 높은 환경에서 발효 가능한 효모를 증류주 제조에 사용함으로써 품질을 향상시키고 제품의 경쟁력을 확보해 왔다. 이에 반해 우리나라는 1965년 양곡관리법 시행에 의해 증류식 소주제조가 어려워지면서 주정을 이용한 희석식 소주가 자리매김하게 되었고[5], 주정공장에서는 효소제를 이용하여 원료를 당화하다 보니 비교적 안정적인 pH 환경에서 알코올 생산량이 높은 효모에 관심이 쏠리게 되었다. 최근 경제성장과 더불어 향미가 좋은 고품질 증류주 수요가 증가하게 되면서 수입 효모를 이용하여 증류식 소주를 제조하려는 시도가 있었다[6]. 그러나 우리나라는 외국과 증류주 제조에 사용하는 원료 및 방법이 다르고 일부 효모는 자국의 산업을 보호하기 위해 해외로 수출하지 않기 때문에 우리 환경에 알맞은 효모의 개발이 필요하다. 우리 연구팀은 국내 10개 지역 전통누룩을 수집, 증류식 소주제조 적합성을 조사한 결과 강원도 원주에서 구입한 누룩이 안정적인 발효특성을 가지고 있고 일본 증류식 소주에 비하여 aldehyde류의 생산이 높은 특징이 있으며 일본인을 대상으로 한 관능평가에서도 일본 소주보다 화려한 향을 갖는 것을 발견하였다[7]. 이에 술덧으로부터 효모를 분리하여 특성을 조사한 바 pH 3.0에서 일본 소주제조용 효모 C4보다 증식이 우수하였고 0.23~0.26%(citric acid) 정도의 산이 포함된 술덧

Kor. J. Mycol. 2015 September, 43(3): 196-199
<http://dx.doi.org/10.4489/KJM.2015.43.3.196>
 pISSN 0253-651X • eISSN 2383-5249
 © The Korean Society of Mycology

*Corresponding author
 E-mail: coldstone@korea.kr

Received June 23, 2015
 Revised June 26, 2015
 Accepted June 28, 2015

© This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

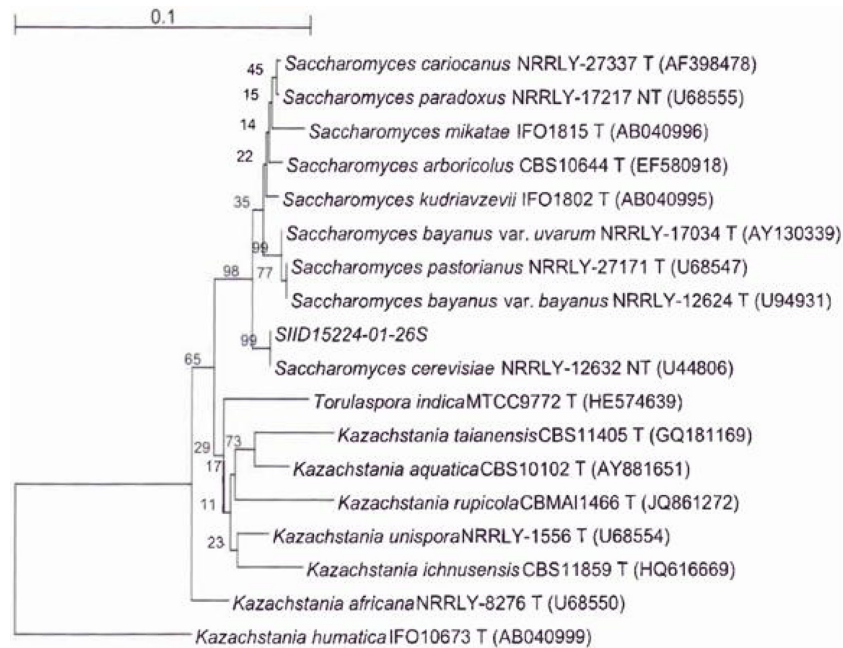


Fig. 1. Phylogenetic tree of isolate strain (SIID15224-01-26S) with related species. Neighbor-joining tree was based on 26S rDNA domain D1-D2.

에서도 정상적인 발효가 가능한 것으로 나타났다[8]. 따라서 분리된 효모를 국내 증류식 소주제조용으로 사용하고 자 동정하고 생리적 특성을 조사하였다.

분리효모의 동정 및 형태적 특징

분리균(N4)을 yeast-mold (YM) 액체배지에서 증식시킨 후 DNA를 추출하고[9] NL1과 NL4 primer[10]와 Prime STAR HS DNA Polymerase(Takara Bio, Kusatsu, Japan)를 이용하여 polymerase chain reaction(PCR) 증폭하였다. 이어 ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)로 정제한 다음 ChromaPro 1.5(Technelysium Pty, South Brisbane, Australia) 프로그램으로 염기서열을 결정하였다. 분리균의 26S rDNA-D1/D2 염기서열을 Apollon DB-FU BLAST[11]를 이용하여 상동성을 검색한 결과 자낭균류계 효모의 일종인 *Saccharomyces cerevisiae*의 표준균주 NRRL Y-12632(accession no. U44806)와 100% 상동성을 나타내었다. Apollon DB-FU 외에 GenBank/DDBJ/EMBL에 수록되어 있는 database에 대한 상동성 검색 결과에서도 분리균의 염기서열은 *S. cerevisiae*로 등록되어 있는 다수의 database에 대하여 100%의 상동성을 나타내었다. 염기서열을 바탕으로 작성한 계통수에서 분리균은 *Saccharomyces*속에 구성된 클러스터에 포함되었고 *S. cerevisiae* NRRL Y-12632와 동일한 분자계통학적 위치를 나타내었다(Fig. 1).

분리균의 형태는 돌기가 없는 매끄러운 모양의 용기형태이며 광택성을 가지고 있고 표면은 평활하고 색은 백색에서 크림색을 띠었다(Fig. 2). YM 평판배지에서 배양시작 1

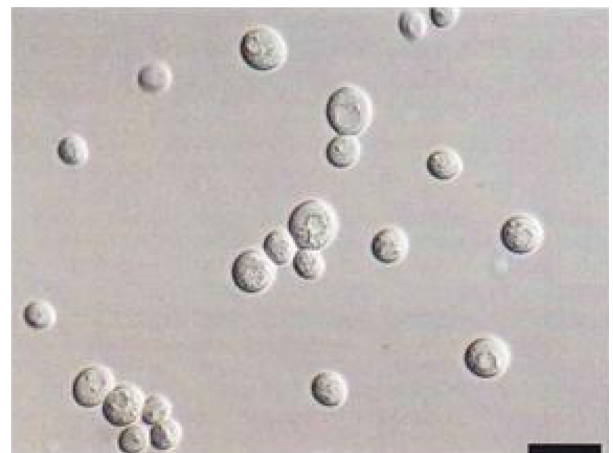


Fig. 2. Morphological feature of colony on above culture media of isolate (scale bar = 10 μ m).

주일 후 영양세포는 이구형에서 계란모양의 긴타원형으로 변화하였고 다극출아에 의해 증식되는 것으로 확인되면서 전형적인 *S. cerevisiae*의 형태학적 특징[12]을 보였다. 그러나 배양시작 1~2개월 경과한 평판에서 유성 생식기관의 형성은 나타나지 않았다.

생리적 특성

분리균의 생리적 특징을 Table 1에 나타내었다. 당류 중 glucose, galactose, maltose, sucrose를 이용하여 발효할 수 있었으나 이당류인 trehalose와 melibiose를 발효할 수 없는 것은 표준균주와 동일하였으나 비교균주와 달리 삼당

Table 1. Assimilation and fermentation of the isolated yeast, SIID 15224-01-26S

	Isolate N4	Kurtzman <i>et al.</i> [12]	Barnett <i>et al.</i> [13]	CBS 1171
Fermentation				
Glucose	+	+	+	+
Galactose	+	V	+/-	+
Maltose	+	+	+/-	+
Sucrose	+	+	+/-	+
Trehalose	-	-	L/-	ND
Melibiose	-	-	+/-	-
Raffinose	-	+	+/-	+
C assimilation				
Glucose	+	+	+	+
Galactose	+	V	+/-	+
D-Glucosamine	-	-	-	-
D-Ribose	-	-	-	-
D-Xylose	-	-	-	-
D-Arabinose	-	-	-	-
Sucrose	+	+	+/-	+
Maltose	+	+	+/-	+
Trehalose	+	+	+/-	+
α -Methyl-D-glucoside	+	V	+/-	D
Salicin	-	-	-	-
Melibiose	-	-	+/-	-
Lactose	-	-	-	-
Raffinose	+	+	+/-	+
Glycerol	-	-	+/-	-
Ribitol	-	-	-	-
D-Mannitol	-	-	L/-	-
Galactitol	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-
D-Gluconate	-	V	-	-
DL-Lactate	L	V	+/-	D
Succinate	-	-	L/-	-
Ethanol	-	+	+/-	+
N assimilation				
Nitrate	-	-	-	-
Ethylamine	-	-	-	-
L-Lysine	-	-	-	-
Cadaverine	-	-	-	-
Tolerance				
Growth at 37°C	+	V	+/-	ND
Growth at 40°C	-	V	+/-	ND
Growth at 45°C	-	ND	-	ND
0.1% Cycloheximide	-	-	-	-
50% Glucose	+	+	+/-	+
10% NaCl/5% glucose	+	+	+/-	-
Vitamin				
Vitamin-free	+	-	+/-	-

CBS, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Urecht, Netherlands.

+, positive; -, negative; W, weak; D, delay (positive results after 1 week); L, latent (positive results after 2 weeks); V, variable; ND, no data.

류인 raffinose를 발효할 수 없는 것으로 나타났다. 탄소원 자화성에서는 발효성당 이외에 trehalose, raffinose를 포함한 methyl-glucoside를 자화할 수 있었던 반면 inositol, galactitol 등의 당알코올 등은 당화할 수 없었다. 특히 비교 균주와 달리 ethanol을 자화할 수 없는 특성을 가지고 있었다. 질소원은 표준균주와 동일하게 nitrate에서 cadaverine 까지 모든 질소원을 자화하지 못했다. 분리균은 40°C 이상에서는 증식하지 못했으며 단백질 합성저해제인 cycloheximide에 대한 내성은 관찰되지 않았지만 50% glucose와 10% NaCl 농도에서 성장할 수 있었다. 이외에 비타민 요구성이 없는 것으로 조사되었다. 이러한 생리·생화학 특성은 Kurtzman 등[12], Barnett 등[13]의 기술내용 이외에 CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures)의 표준균주 CBS 1171(NRRL Y-12632와 동일균주)와도 매우 유사한 것으로 나타났다. 이상의 26S rDNA-D1/D2 염기배열, 형태관찰 및 생리적 특성을 종합하여 분리균을 *S. cerevisiae*로 동정하고 *S. cerevisiae* N4의 이름으로 농업유전정보자원센터에 기탁(KACC 93224P) 하였다.

적 요

본 연구에서는 국내 전통누룩에서 분리한 증류식 소주용 효모의 생리적 특성을 조사하고 동정하였다. 분리균(N4)의 26S rDNA-D1/D2 염기배열은 *Saccharomyces cerevisiae* 표준균주(NRRL Y-12632)와 100% 상동성을 나타내었고 다극출이에 의해서 증식하였다. Glucose, galactose, maltose, sucrose를 발효할 수 있으며 trehalose, raffinose, methyl-glucoside를 자화할 수 있었다. 40°C 이상에서는 증식하지 못했으며 50% glucose와 10% NaCl 농도에서 성장할 수 있었다. 염기배열, 형태관찰 및 생리적 특성을 종합하여 분리균을 *S. cerevisiae*로 동정하였다.

Acknowledgements

This work was carried out with the support of “Cooperative Research Program for Agriculture Science & Technology Development (Project No. PJ008600)” Rural

Development Administration, Republic of Korea.

REFERENCES

1. Ishikawa T. Component. In: Yoshizawa Y, Ishikawa TA, Tadenuma M, Nagasawa M, Nagami K, editors. Encyclopedia of brewing and fermentation food. Tokyo: Asakura Publishing; 2004. p. 70-82.
2. Brewing Society of Japan. Component of the alcoholic beverages. Tokyo: Brewing Society of Japan; 1999.
3. Hong SB, Lee M, Kim DH, Varga J, Frisvad JC, Perrone G, Gomi K, Yamada O, Machida M, Houbraken J, et al. *Aspergillus luchuensis*, an industrially important black *Aspergillus* in East Asia. PLoS One 2013;8:e63769.
4. Tomioka S. Brandy. In: Yoshizawa Y, Ishikawa TA, Tadenuma M, Nagasawa M, Nagami K, editors. Encyclopedia of brewing and fermentation food. Tokyo: Asakura Publishing; 2004. p. 288-301.
5. Jo HC. *Uli Sul Bijgi* (Korean traditional liquor-making). Seoul: Nexus Press; 2005.
6. Choi SI, Kang SA, Cheong C. Yeast selection for quality optimization of distilled spirits. J Kor Acad Industr Coop Soc 2013;14:3887-96.
7. Yoshizki Y, Kim HM, Okutsu K, Ikenaga M, Tamaki H, Takamine K. “Nuruk”, Korean traditional *koji*, as a possible material for producing Japanese *Shochu*. J Brew Soc Jpn 2015;110: 170-8.
8. Choi HS, Jeong ST, Yeo SH, Kang JE. Brewing yeast *Saccharomyces cerevisiae* N4 and distilled liquor made there with. Korea Patent 2015; No. 10-2015-0070353.
9. Marmur J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. J Mol Biol 1961;3:208-18.
10. O'Donnell K. Fusarium and its near relatives. In: Reynolds DR, Taylor JW, editors. The fungal holomorph: mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematics. Wallingford: CAB International; 1993. p. 225-33.
11. Altschul SE, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res 1997;25:3389-402.
12. Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T. The Yeasts: a taxonomic study. 5th ed. Amsterdam: Elsevier; 2011.
13. Barnett JA, Payne RW, Yarrow D. Yeasts: characteristics and identification. 3rd ed. Cambridge: Cambridge University Press; 2000.