

참다래(*Actinidia chinensis*) 유래 *Saccharomyces cerevisiae* HKFR18의 양조특성

백상원 · 김계원¹ · 박천석² · 손종연 · 심재용*

국립한경대학교 식품생명화학공학부(식품생명공학전공) 및 글로벌 K푸드 연구센터,
¹국립한경대학교 양조연구센터, ²경희대학교 식품생명공학과

Brewing Characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* HKFR18 Isolated from Kiwi Fruits (*Actinidia chinensis*)

Sang Won Baek, Gye Won Kim¹, Cheon-Seok Park², Jong-Youn Son, and Jae-Yong Shim*

School of Food Biotechnology & Chemical Engineering (Department of Food Science & Biotechnology) and
Global K-Food Research Center, Hankyong National University

¹Brewing Research Center, Hankyong National University

²Department of Food Science and Biotechnology, Kyung Hee University

Abstract

The purpose of this study is to separate and identify a new yeast strain and to evaluate its brewing characteristics in three different types of alcohol fermentation as compared with a commercial yeast strain, *S. cerevisiae*. The yeast isolated from kiwi fruits (*Actinidia chinensis*) was identified as *Saccharomyces cerevisiae* and named *S. cerevisiae* HKFR18. The brewing characteristics were not significantly different between *S. cerevisiae* HKFR18 and commercial *S. cerevisiae* for all types of fermentation. The lactic acid and citric acid content in *S. cerevisiae* HKFR18 was significantly higher than commercial *S. cerevisiae* for simultaneous two-step fermentation with *Nuruk* and independent two-step fermentation, respectively. The acetic acid content in *S. cerevisiae* HKFR18 was 1.3 times lower than that in commercial *S. cerevisiae* for single-step fermentation. In *S. cerevisiae* HKFR18 and commercial *S. cerevisiae*, benzene ethanol, and 3-methyl-1-butanol were the major aromatic compounds for two-step fermentation, while benzene ethanol and isobutyl alcohol were the major aromatic compounds for single-step fermentation. These results suggest that the domestic *S. cerevisiae* HKFR18 from kiwi fruits can be a good alternative for commercial *S. cerevisiae* strains for various types of alcohol fermentation.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*, brewing characteristics, alcohol fermentation

서 론

알코올 발효에 관여하는 대표적인 효모인 *Saccharomyces cerevisiae*는 오래전부터 빵, 와인, 맥주 등 다양한 발효식품의 제조에 사용된 단세포 출아 효모로 혐기 조건에서는 당을 이용하여 에탄올과 이산화탄소를 생산하는 발효를 진행하고 호기 조건에서는 해당과정을 통해 에너지를 획득하고 증식하는데 이 두 가지 특성 모두 산업적으로 활용되기 때문에 맥주, 와인, 막걸리 등 각각의 주류에 적합한 균주를 선택하는 것이 매우 중요하다(Eeom et al., 2018). *S.*

*cerevisiae*의 양조특성에 대하여는 효모 종류를 달리한 탁주 술덧의 품질특성에 대한 연구(Lee et al., 2010), 누룩에서 분리한 효모를 이용한 찹쌀발효주의 이화학적 특성 및 휘발성 향기성분에 대한 연구(Kim et al., 2009), 전통 누룩으로부터 분리된 *S. cerevisiae* HA3을 이용한 하향주의 제조 및 특성(Jung et al., 2006), 전통 누룩에서 분리한 증류식 소주용 효모의 특성(Choi, 2017), 효모에 따른 약주의 품질특성(Shin et al., 1999), 국산 포도로부터 분리된 *S. cerevisiae*에 의한 동결농축 사과주스의 알코올 발효특성(Choi et al., 2011) 등이 보고되었다. Eeom et al. (2018)은 국내 생물자원에서부터 분리한 다양한 *S. cerevisiae* 균주들과 상업용 균주의 하우스키퍼(house keeping) 유전자에 대한 multilocus sequence typing (MLST) 분석 시 차이가 있고, 나타나는 차이를 3개의 계통군으로 분류하였으며, 생쌀 발효 방식의 병행발효 적용 시 동일한 계통군에서는 동등 수준의 알코올 발효능을 나타내고 계통군에 따라 알코

*Corresponding author: Jae-Yong Shim, School of Food Biotechnology & Chemical Engineering (Department of Food Science & Biotechnology) and Global K-Food Research Center, Hankyong National University, 327 Jungang-ro, Anseong-si, Gyeonggi-do, 17579, Korea
Tel: +82-31-670-5158; Fax: +82-31-670-5159
E-mail: jyshim@hknu.ac.kr

Received 8 July 2021; revised 27 July 2021; accepted 29 July 2021

을 발효능의 차이가 있는 것으로 보고하였는데 이와 같은 연구 결과는 국내 자생 *S. cerevisiae* 균주가 주류 양조 산업 현장에서 사용하고 있는 상업용 *S. cerevisiae* 균주와는 차별화된 양조산물 제조에 적용 가능성을 제시하는 것으로 생각되었다. 최근에는 전통 누룩에서 분리한 *S. cerevisiae* 균주를 적용하여 제빵 산업에서 성공적인 성과를 구현하였고(Noh et al., 2017), 다양한 분야에서 국내 자생 *S. cerevisiae* 균주의 산업현장 적용 가능성 제고가 기대되고 있지만 주류 양조 산업에의 적용은 매우 미흡한 상황이다. 본 연구에서는 주류 양조에 적합한 국내 자생 *S. cerevisiae* 균주 분리 가능성이 큰 과실소재 및 잔류농약 안정성과 지역 차별성 등을 고려하여 제주산 참다래 열매를 선정하여 *S. cerevisiae* 균주를 탐색하였고 주류 양조 시 대표적인 발효방식인 병행복발효, 단행복발효, 단발효에 적용 시 알코올 생성능, 환원당, 당도, 산도, 유기산 조성 및 향기성분을 조사하고 이를 각각의 발효방식에서 사용되고 있는 상업용 *S. cerevisiae* 균주와의 비교를 통해 국내 자생 *S. cerevisiae* 균주의 주류 양조 산업에서의 이용 가능성에 대하여 검토하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 연구에 사용된 참다래 열매(*Actinidia chinensis*)는 제주특별자치도 제주시 한림읍 귀덕리에서 재배한 것으로 한살림에서 제공받아 사용하였다. 발효제로 사용된 개량누룩(*Bio-Nuruk*, Hangukhyoso, Hwaseong, Korea)과 입국(*Ipguk*, Joeun Cereal, Hwaseong, Korea)은 구매하여 사용하였으며, 상업용 *Saccharomyces cerevisiae*는 La parisienne (S. I. Lesaffre, Marcq-en-Baroeul, France), US-05 (Fermentis, Marcq-en-Baroeul, France), Fermivin (Oenobrand, Montferrier-sur-Lez, France)으로 비전바이오캡(Bision, Seoul, Korea)에서 구매하여 사용하였다.

효모의 분리

참다래 열매의 껍질을 과육이 포함되도록 깎아 10 g을 칭량한 후 100 mL의 증류수에 현탁 한 후 단계적으로 10^{-2} - 10^{-7} 배 희석하여 엠포실린(Sigma Aldrich, St. Paul, MN, USA) 10 µg/mL이 들어 있는 potato-dextrose 한천배지(Becton Dickinson Difco™, Franklin Lakes, NJ, USA)에 100 µL씩 도말하고 25°C에서 48시간 배양하였다. 배양이 끝난 후 형성된 효모 집락을 순수 분리하였다.

DNA 추출

분리된 균주를 10 mL의 PD 액체배지(Becton Dickinson)에서 2일간 배양한 뒤 원심 분리를 통해 상층액을 제거하여 배양액으로부터 균체를 분리하였다. 분리된 효모 균체

를 액체질소에 10초간 얼린 후 100°C 끓는 물에서 30초간 끓이는 것을 5회 반복하여 효모의 세포벽을 파괴하였다. 효모 분쇄액 200 µL을 취해 lysis buffer (200 mM Tris-HCl pH 8.5, 25 mM EDTA 및 0.5% SDS) 500 µL와 500 µL의 phenol: chloroform: isoamyl alcohol (25:24:1 (v/v), Bioneer Corp., Daejeon, Korea)을 첨가한 후, 10,000×g에서 30분 동안 원심 분리하여 상층액을 얻었다. 이 후 상층액 600 µL에 3 M sodium acetate 60 µL와 isopropyl alcohol 360 µL를 첨가한 뒤, 10,000×g에서 5분간 원심분리하여 침전된 DNA를 얻었다. 침전된 DNA에 500 µL의 70% 에탄올을 첨가해 세척하고 10,000×g에서 1분동안 원심분리하여 상층액을 제거한 후 50°C에서 15분간 두어 남아있는 에탄올을 제거하였다. 이 후 30 µL의 TE-RNase (100 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA, 20 µL RNase)를 첨가한 뒤 37°C에서 15분 동안 반응시켜 RNA를 제거하였다. 이렇게 확보된 genomic DNA는 -20°C에서 냉동 보관하였다.

균주 동정

균주의 동정을 위하여 rTaq DNA polymerase (TaKaRa, JAPAN)를 사용하여 ITS1-5.8S rRNA-ITS4 영역을 증폭하였다. DNA 증폭을 위해 yeast universal primer인 ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3')과 ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') primer를 이용하여 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 수행하였다. PCR은 Thermal cycler (ASTEC PC-320, ASTEC Inc, Fukuoka, Japan)을 이용하여 95°C에서 10분간 pre-denaturation 시킨 후 95°C에서 30초간 denaturation, 55°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 30초간 extension의 과정을 30회 반복한 뒤, 마지막으로 72°C에서 post-extension을 10분간 수행하였다. 증폭 산물은 0.8% 아가로스겔(agarose gel) 상에서 전기 영동하고 정제하여, 마크로젠(Macrogen, Seoul, Korea)에 염기서열 분석을 의뢰하였다. 분석된 염기서열은 National Center Biotechnology Information (NCBI)의 Basic Local Alignment Search Tool (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)을 이용하여 동정하였다.

병행복발효 술덧 담금

병행복발효 술덧 담금은 발효제로 개량누룩(*Bio-Nuruk*, Hangukhyoso, Hwaseong, Korea)과 입국(*Ipguk*, Joeun Cereal, Hwaseong, Korea)을 사용하여 실시하였다. 개량누룩을 사용한 담금은 백미 0.6 kg을 침지, 증자 후 개량누룩 9.4 g, 물 0.9 L을 첨가한 다음 참다래에서 분리한 *S. cerevisiae* HKFR18와 병행복발효주 양조 제조에 사용되는 *S. cerevisiae* (La parisienne, S. I. Lesaffre, Marcq-en-Baroeul, France)를 PD 액체배지에 접종하여 550 nm에서의 흡광도

가 1.5가 되도록 배양한 배양액을 각각 50 mL씩 접종하여 1단 담금을 실시하고, 25°C에서 24시간 경과 후 백미 1.2 kg을 세미, 침지, 증자 한 백미 1.2 kg, 개량누룩 18.7 g 및 물 1.8 L를 가하여 2단 담금을 실시하였으며, 술덧 온도는 25°C를 유지하면서 8일간 발효를 실시하였다. 입국을 사용한 담금은 입국 156.2 g에 물 206 mL를 첨가한 다음 *S. cerevisiae* HKFR18와 상업용 *S. cerevisiae* La parisienne를 PD 배지에 접종하여 550 nm에서의 흡광도가 1.5가 되도록 배양한 배양액을 각각 10 mL씩 접종하여 25°C에서 48시간 배양한 다음 백미 0.3 kg을 세미, 침지, 증자 후 물 0.9 L를 첨가해 1단 담금을 실시하고 25°C에서 24시간 배양한 다음 백미 1.2 kg을 세미, 침지, 증자 후 물 1.8 L를 첨가하여 2단 담금을 실시한 후 술덧 온도 25°C를 유지하면서 9일간 발효를 실시하였다.

단행복발효 술덧 담금

맥아(Pilsner Malt, Weyermann, Germany) 3 kg을 분쇄 후 물 16 L를 첨가하여 64°C에서 1시간 동안 추출한 다음 78°C에서 10분간 추출 후 여과한 여액과 여과 잔사에 78°C의 물 7 L를 첨가하여 여과한 여액을 혼합하여 맥즙을 제조하였다. 맥즙을 15분간 끓여 자비한 다음 SAAZ홉(TOP HOP spol. s. r. o., Czech Republic) 20 g을 갈아서 첨가 후 45분간 끓여 자비하고, 냉침시켜 상층액을 분리한 맥즙 3.5 L에 참다래에서 분리한 *S. cerevisiae* HKFR18와 단행복발효 양조에 사용되는 상업용 *S. cerevisiae* (US-05, Fermentis, Marcq-en-Baroeul, France)를 PD 배지에 접종하여 550 nm에서의 흡광도가 1.5가 되도록 배양한 배양액을 각각 44 mL씩 접종한 다음 술덧 온도 20°C를 유지하면서 5일간 발효를 실시하였다.

단발효 술덧 담금

참다래 열매를 파쇄한 후 여과한 과즙 10 L에 설탕 866 g을 첨가하여 15 brix로 조정 후 yeast extract (Difco, New Jersey, USA) 5 g 첨가 후 참다래에서 분리한 *S. cerevisiae* HKFR18와 상업용 *S. cerevisiae* (Fermivin, Oenobrand, Montferrier-sur-Lez, France)를 PD 배지에 접종하여 550 nm에서의 흡광도가 1.5가 되도록 배양한 배양액을 각각 90 mL씩 접종한 다음 술덧 온도 25°C를 유지하면서 발효를 실시하였다.

발효생성물의 발효 특성 분석

술덧의 알코올 함량은 주류분석규정(NTS, 2010)에 따라 측정하였다. 술덧을 원심분리하여 얻은 여과액 100 mL를 메스실린더에 채운 다음 500 mL 삼각플라스크에 옮기고 30 mL 증류수로 메스실린더에 남은 여과액을 1회 씻은 후 그 액을 여과액이 들어있는 500 mL 삼각플라스크에 추가로 더 넣어주었다. 그 후 플라스크를 알코올 증류기에 연

결시키고 증류액이 냉각되어 나오는 관에 메스실린더를 연결하여 증류액 80 mL를 받은 다음 100 mL가 될 때까지 증류수로 채운 다음 증류된 용액을 density meter (DMA 35, Anton paar, North Ryde, Austria)를 사용하여 알코올 함량을 측정하였다. 환원당은 dinitrosalicylic acid (DNS)법 (Chae et al., 2002)을 이용하여 측정하였다. 술덧을 여과하여 1 mL를 취한 후 DNS 용액 3 mL를 첨가하고 100°C에 10-15분간 반응시킨 다음 증류수 21 mL를 첨가 후 분광광도계(Genesys 10-S, Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, USA)를 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였고 포도당을 표준당으로 하여 환원당을 계산하였으며, 당도는 당도계(HI96811, Hanna Instruments, Woonsocket, USA)를 사용하여 측정하였다. 적정 산도는 국제청 주류분석규정(NTS, 2010)에 따라 여과된 시료를 정확히 10 mL를 채취하여 100 mL 삼각플라스크에 넣은 후 BTB (bromothymol blue, Samchun Pure Chemical Co., Pyeongtaek, Korea)와 NR (neutral red, Dae Jung Chemicals & Metals Co., Siheung, Korea) 혼합지시약을 2-3방울 떨어뜨린 다음 0.1 N NaOH로 중화 적정하며 시료의 pH가 6.85-7.0가 될 때까지 적정하면서 0.1 N 수산화나트륨 용액의 소비 mL 수치를 측정하여 산도로 하였다.

유기산 분석

유기산은 HPLC (Shiseido Nanosapce SI-2, Japan)를 이용하여 포스트 컬럼(post column)법을 적용하여 분석하였다. 시료는 0.45 µm 필터(Advantec, Tokyo, Japan)를 이용하여 여과한 후 사용하였고 Shodex RSpak KC-811 (8.0 mm ID×300 mm, Showa Denko KK CO., Tokyo, Japan) 컬럼을 2개 연결하여 사용하였으며 오븐 온도는 63°C, 유량(flow rate)은 0.8 mL/min로 하였고, 이동상은 3 mM perchloric acid을 사용하였으며 시료주입량(injection volume)은 10 µL로 하였다. 분리된 유기산은 reaction coil에서 0.2 mM BTB, 15 mM Na₂HPO₄, 2 mM NaOH를 사용하여 발색시켰으며, 온도는 25°C, 발색용액의 유량(flow rate)은 1.0 mL/min로 하였고, 440 nm에서의 흡광도를 측정하여 검출하였다.

향기성분 분석

향기성분은 GC/MS Agilent 6890N GC/Agilent 5973 mass selective detector (MSD, Agilent Co., Pal Alto, CA, USA)를 사용하여 분석하였다. 휘발성 성분의 추출에는 SPME (Solid Phase Micro Extraction) fiber (50/30 µm divinylbenzene, carboxen on polydimethylsiloxane, Supelco Co., Bellefonte, PA, USA)를 사용하였고, 술덧 시료 10 mL를 20 mL head space vial에 넣고 teflon cap으로 밀봉한 다음 50°C에서 30분 간 평형상태에 도달시킨 후, SPME fiber를 1 cm 노출시켜 30분 동안 휘발성 성분을 흡

착시킨 다음 GC의 시료주입구에 SPME fiber를 노출시키고 200°C 1분간 탈착시켰다. 컬럼은 DB-wax (60 m length × 0.25 mm i.d. × 0.25 µm film thickness: J & W Scientific, Folsom, CA, USA)를 사용하였고, 오븐 온도는 40°C에서 5분 간 유지한 후 200°C까지 5°C/min의 속도로 승온시켜 20분 간 유지하였다. 시료 주입구의 온도는 200°C, 검출기 온도는 250°C로 하였으며, 이동상으로는 헬륨가스를 사용하였고 유속은 1.1 mL/min으로 하고, 이온화전압(ionization voltage)은 70 eV, 분자량의 범위(m/z)는 33-500으로 하여 분석하였다.

통계 처리

실험결과는 SAS package (release 8.01, SAS Institute, Cary, NC, USA)를 이용하여 측정하였다. 측정결과는 평균 ± 표준편차로 나타내었으며, 평균값의 통계적 유의성은 Duncan's multiple range test에 의해 $p < 0.05$ 수준에서 검정하였다.

결과 및 고찰

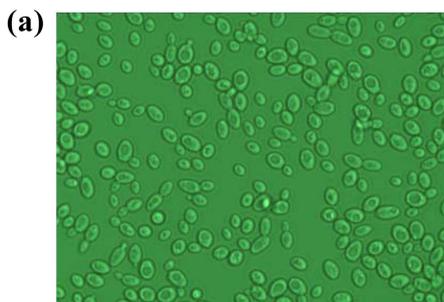
효모의 동정

참다래 열매로부터 분리한 균은 PD 배지에서 흰색 집락을 형성하였으며 한 개의 집락에서 얻은 균주를 위상차 현미경(Olympus, IS2-XLP, Tokyo, Japan)으로 검경한 결과 계란형의 형태를 보여주었고 출아를 하는 균주가 확인되었다(Fig. 1a). 참다래 열매에서 분리한 균주의 DNA를 분리하여 효모의 동정에 사용되는 특이적 프라이머로 PCR

증폭을 한 후 생성된 PCR 산물을 마크로젠(Seoul, Korea)에 시퀀싱(sequencing) 분석, 의뢰한 결과 *S. cerevisiae*의 ITS1-5.8S rRNA-ITS2와 일치도가 가장 높게 나타났다(Fig. 1b). 이상의 결과로부터 참다래 열매로부터 분리한 균은 *S. cerevisiae*로 최종 동정하였고 이를 *S. cerevisiae* HKFR18로 명명하였고 이 후 양조실험에 사용하였다.

병행복발효 술덧의 양조 특성

개량누룩을 발효제로 사용한 병행복발효 술덧의 발효 9일 경과 후 HKFR18 시험구와 상업용 효모 La parisienne 시험구의 발효 생성물 분석 결과, 알코올 함량은 HKFR18 시험구에서 19.4%, La parisienne 시험구에서 19.8%로 동등 수준의 알코올 생성능이 확인되었으며, 환원당 함량은 HKFR18 시험구에서 1.2 mg/mL, La parisienne 시험구에서 1.2 mg/mL로 동등 수준이었으며, 산도는 HKFR18 시험구에서 3.2 mL, La parisienne 시험구에서 2.9 mL로 HKFR18 시험구에서 더 높은 결과를 나타내었다(Table 1). 총 유기산 함량은 HKFR18 시험구에서 2,918.4 µg/mL, La parisienne 시험구에서 2,372.9 µg/mL로 나타나 HKFR18 시험구의 총 유기산 함량이 La parisienne 시험구 대비 높은 결과를 나타내었으며(Table 1), 이와 같은 결과는 HKFR18 시험구의 산도가 La parisienne 시험구 대비 높은 결과의 원인인 것으로 생각되었다. 특히 HKFR18 시험구에서는 lactic acid 함량이 1,540.6 µg/mL로 가장 많이 함유되었고, La parisienne 시험구 대비 약 2.4배 높은 결과를 나타내었으며, La parisienne 시험구에서는 succinic acid가 802.0 µg/mL로 가장 많이 함유되었고, HKFR18 시험구 대비 약



(b)	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Identities
	Saccharomyces cf. cerevisiae/paradoxus culture CBS:7336 internal transcribed spacer 1, partial sequence	1325	1325	100%	0.0	99%
	Saccharomyces cerevisiae culture CBS:7764 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	1325	1325	100%	0.0	99%
	Saccharomyces cerevisiae culture CBS:5818 internal transcribed spacer 1, partial sequence	1325	1325	100%	0.0	99%

Fig. 1. Morphological feature (a) and ITS-5.8S-rRNA concordance (b) of colony on culture of isolate.

Table 1. Composition of ethyl alcohol, reducing sugar, acidity and organic acids in simultaneous saccharification and alcohol fermentation mash using *S. cerevisiae* HKFR18 and *S. cerevisiae* (La parisienne) with Nuruk and Ipguk

Koji	Yeast strain	Ethyl alcohol (% v/v)	Reducing sugar (mg/mL)	Acidity (mL)	Organic acids (µg/mL)					
					Citric acid	Malic acid	Succinic acid	Lactic acid	Acetic acid	Total
Nuruk	La parisienne	19.8±0.1	1.2±0.0	2.9±0.0	406.7±25.3 ^a	347.5±22.7 ^b	802.0±27.4 ^b	642.2±62.5 ^b	174.5±6.8 ^a	2,372.9±23.5 ^b
	HKFR18	19.4±0.1	1.2±0.0	3.2±0.1	396.0±19.9 ^a	276.4±17.4 ^a	578.5±26.8 ^a	1,540.6±29.3 ^a	126.8±54.1 ^a	2,918.3±101.0 ^a
Ipguk	La parisienne	18.4±0.0	0.6±0.1	5.5±0.0	2,200.1±43.5 ^b	299.5±16.4 ^a	580.2±40.5 ^a	515.0±78.5 ^a	22.6±20.2 ^a	3,616.4±89.8 ^b
	HKFR18	18.3±0.0	0.7±0.0	5.8±0.0	2,326.5±47.5 ^a	334.0±16.8 ^a	597.7±16.9 ^a	571.4±31.0 ^a	45.0±39.4 ^a	3,874.6±74.2 ^a

^{a-b}Values with different superscript within a same column are significantly different (<0.05) by Duncan's multiple test.

1.4배 높은 결과를 나타내었다. HKFR18 시험구와 La parisienne 시험구의 향기성분 조성에서 좋지 않은 신맛에 관여하는 것으로 알려진 acetic acid (Kim et al., 2009)와 furan계열인 ethyl pentofuranoside와 ethyl hexopyranoside는 La parisienne 시험구에서만 검출되었고 1,2,3-propanetriol은 La parisienne 시험구에서 HKFR18 시험구보다 유의적으로 많은 양이 검출되었다. 하지만 다른 향기성분에서는 특이적인 차이는 관찰되지 않았다(Table 2).

입국을 발효제로 사용한 병행복발효 술덧의 발효 9일 경과 후 HKFR18 시험구와 La parisienne 시험구의 발효 생성물 분석 결과, 알코올 함량은 HKFR18 시험구에서 18.3%, La parisienne 시험구에서 18.4%로 동등 수준의 알코올 생성능이 확인되었으며, 환원당 함량은 HKFR18 시험구에서 0.7 mg/mL, La parisienne 시험구에서 0.6 mg/mL로 동등 수준이었으며, 산도는 HKFR18 시험구에서 5.8 mL, La parisienne 시험구에서 5.5 mL로 HKFR18 시험구에서 다소 높은 결과를 나타내었다(Table 1). 총 유기산 함량은 HKFR18 시험구에서 3,874.6 µg/mL, La parisienne 시험구에서 3,616.4 µg/mL로 나타나 HKFR18 시험구의 총 유기산 함량이 La parisienne 시험구 대비 높은 결과를 나타내었으며(Table 1), 이와 같은 결과는 HKFR18 시험구의 산도가 La parisienne 시험구 대비 높은 결과의 원인인 것으로 생각되었으나 유기산 종류에 따른 차이는 개량누룩을 발효제로 사용한 시험구 대비 크지 않은 것으로 확인되었으며, HKFR18 시험구와 La parisienne 시험구에서 각각 citric acid 함량이 2,326.5 µg/mL, 2,200.1 µg/mL로 총 유기산의 50% 이상인 결과를 나타내었는데 이는 입국에 접종하는 *Aspergillus luchuensis*가 생산하는 citric acid의 영향 (So et al., 1999) 때문인 것으로 생각되었다. 입국을 사용한 HKFR18 시험구와 La parisienne 시험구의 향기성분 조성에서도 특이적인 차이는 관찰되지 않았으나 사과, 바나나, 코코아 향을 내는 것으로 알려진 isobutyl alcohol (Choi, 2017)이 HKFR18 시험구에서만 검출되었다(Table 3).

본 연구에서 사용한 La parisienne은 병행복발효 산업 현장에서 사용되고 있는 대표적인 *S. cerevisiae* 균주이고, 발효제로는 대부분 개량누룩과 입국을 발효제로 사용하

Table 2. Aromatic compounds of simultaneous saccharification and alcohol fermentation mash using *S. cerevisiae* HKFR18 and *S. cerevisiae* (La parisienne) with Nuruk

Compound	Peak Area (x10 ⁵)	
	La parisienne	HKFR18
1-propanol	12.5±1.1 ^b	17.0±1.4 ^a
Acetic acid, ethyl ester	53.9±2.3 ^a	60.2±11.8 ^a
Acetic acid	20.1±0.9	-
2-methyl 1-propanol	96.3±3.8 ^b	129.0±31.2 ^a
3-methyl-Butanal	13.6±1.8 ^a	14.2±2.7 ^a
Ethane, 1,1-diethoxy-	-	13.6±0.7
3-methyl-1-butanol	283.5±6.0 ^a	303.3±31.8 ^a
2-methyl-1-butanol	106.5±1.9 ^a	101.6±9.2 ^a
2,3-butanediol	54.4±6.4 ^a	51.8±14.9 ^a
Benzenaldehyde	14.4±1.2 ^a	21.8±6.8 ^a
1,2,3-propanetriol	106.3±13.4 ^b	46.3±24.1 ^a
Benzeneacetaldehyde	22.1±3.0 ^a	20.0±5.0 ^a
ethyl 4-hydroxybutanoate	27.7±1.9 ^a	25.1±5.1 ^a
Benzeneethanol	512.2±28.3 ^a	565.3±106.4 ^a
2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one	9.2±0.7 ^b	20.2±5.3 ^a
Ethyl hydrogen succinate	25.1±5.4 ^a	15.1±7.2 ^a
Butanedioic acid, diethyl ester	36.6±2.7 ^a	30.7±8.3 ^a
Octanoic acid, ethyl ester	13.0±2.9 ^a	10.0±2.8 ^a
Ethyl pentofuranoside	52.1±5.1	-
Benzeneethanol	54.4±3.9 ^a	50.9±16.1 ^a
Ethyl hexopyranoside	47.8±30.7	-
Tryptophol	8.1±0.9 ^a	9.8±4.3 ^a

^{a-b}Values with different superscript within a same row are significantly different (<0.05) by Duncan's multiple test.

고 있음을 고려하였을 때 이와 같은 결과는 국내 자생 *S. cerevisiae* 균주인 HKFR18이 병행복발효 산업 현장에서 적용 가능한 양조 특성을 나타내고 있음을 의미하는 것으로 생각되었으며, 발효제로 개량누룩을 사용한 시험구에서 신맛의 특성과 강도에 차이를 나타낼 수 있는 유기산 조성의 차이가 확인되었으므로 개량누룩을 발효제로 사용하는 경우 HKFR18 시험구와 La parisienne 시험구의 관능품질 차별화도 기대할 수 있을 것으로 생각되었다.

Table 3. Aromatic compounds of simultaneous saccharification and alcohol fermentation mash using *S. cerevisiae* HKFR18 and *S. cerevisiae* (La parisienne) with *Ipguk*

Compound	Peak Area ($\times 10^5$)	
	La parisienne	HKFR18
1-propanol	22.8 \pm 2.7 ^a	25.6 \pm 2.0 ^a
Acetic acid, ethyl ester	65.5 \pm 45.6 ^a	98.4 \pm 1.4 ^a
2-methyl 1-propanol	71.6 \pm 17.8 ^a	66.6 \pm 4.4 ^a
3-methyl-Butanal	8.6 \pm 0.8 ^a	9.6 \pm 1.4 ^a
Isobutylalcohol	-	265.6 \pm 8.8
3-methyl-1-butanol	234.3 \pm 17.3	-
2-methyl-1-butanol	72.6 \pm 4.7 ^b	82.0 \pm 2.1 ^a
2,3-butanediol	54.7 \pm 25.6 ^a	54.3 \pm 3.7 ^a
1-butanol, 3-methyl-, acetate	76.2 \pm 4.6 ^a	74.8 \pm 5.8 ^a
Oxime, methoxy-phenyl-	6.7 \pm 0.8 ^a	6.4 \pm 0.2 ^a
1,2,3-propanetriol	52.6 \pm 21.9 ^a	58.3 \pm 35.7 ^a
Hexanoic acid, ethyl ester	94.8 \pm 64.5	-
Benzeneacetaldehyde	19.3 \pm 0.4 ^a	20.9 \pm 1.1 ^a
Ethyl 4-hydroxybutanoate	12.3 \pm 3.7 ^a	17.1 \pm 1.1 ^a
Benzeneethanol	541.7 \pm 21.6 ^a	536.2 \pm 20.5 ^a
Octanoic acid	12.9 \pm 4.7 ^a	12.0 \pm 3.5 ^a
Butanedioic acid, diethyl ester	7.9 \pm 0.3	-
Octanoic acid, ethyl ester	20.4 \pm 1.9 ^a	17.8 \pm 2.2 ^a
4-vinylphenol	8.3 \pm 1.1	-
Acetic acid, 2-phenylethyl ester	83.8 \pm 13.4 ^a	62.6 \pm 7.0 ^a
2-methoxy-4-vinylphenol	11.1 \pm 4.3 ^a	10.9 \pm 2.2 ^a
Benzeneethanol	42.9 \pm 15.2 ^a	48.0 \pm 4.2 ^a
Tryptophol	18.9 \pm 3.6 ^a	21.2 \pm 1.69 ^a

^{a-b}Values with different superscript within a same row are significantly different (<0.05) by Duncan's multiple test.

단행복발효 술덧의 양조 특성

단행복발효 술덧의 발효 5일 경과 후 HKFR18 시험구와 상업용 효모 US-05 시험구의 발효 생성물 분석 결과, 알코올 함량은 HKFR18 시험구에서 4.8%, US-05 시험구에서 4.7%로 동등 수준의 알코올 생성능이 확인되었으며, 환원당 함량은 HKFR18 시험구에서 8.4 mg/mL, US-05 시험구에서 9.0 mg/mL로 유의적인 차이가 나타나지 않았고, 산도는 HKFR18 시험구와 US-05 시험구에서 모두 1.2 mL로 동등한 수준의 결과를 나타내었다(Table 4). 유기산 함량은 HKFR18 시험구에서 1,814.7 μ g/mL, US-05 시험구에서 1,855.4 μ g/mL로 유의적인 차이가 나타나지 않았으나 HKFR18 시험구에서 US-05 시험구 대비 citric acid와 malic

Table 5. Aromatic compounds of independent saccharification and alcohol fermentation mash using *S. cerevisiae* HKFR18 and *S. cerevisiae* (US-05)

Compound	Peak Area ($\times 10^3$)	
	US-05	HKFR18
Acetic acid, ethyl ester	71.4 \pm 17.4 ^b	21.12 \pm 0.6 ^a
2-methyl 1-propanol	11.5 \pm 0.6 ^b	21.5 \pm 2.4 ^a
3-methyl-1-butanol	106.0 \pm 3.7 ^b	127.5 \pm 8.0 ^a
2-methyl-1-butanol	35.6 \pm 1.5 ^b	71.3 \pm 4.4 ^a
1,3-Butanediol	23.3 \pm 3.3	-
2-Furanmethanol	12.9 \pm 6.6	-
1-Butanol, 3-methyl-, acetate	15.1 \pm 1.8 ^a	14.1 \pm 2.8 ^a
1,2,3-propanetriol	34.1 \pm 26.2 ^b	23.4 \pm 12.3 ^a
4H-Pyran-4-one, 3-hydroxy-2-methyl-	11.1 \pm 2.3 ^b	6.5 \pm 0.7 ^a
Benzeneethanol	208.7 \pm 12.6 ^b	371.7 \pm 33.6 ^a
Octanoic acid	30.8 \pm 3.3 ^a	33.0 \pm 5.4 ^a
Octanoic acid, ethyl ester	9.3 \pm 1.5 ^a	9.6 \pm 1.6 ^a
4-vinylphenol	11.1 \pm 1.8 ^a	14.6 \pm 1.7 ^a
5-Hydroxymethylfurfural	15.3 \pm 5.1 ^a	17.4 \pm 5.7 ^a
Acetic acid, 2-phenylethyl ester	12.0 \pm 1.0 ^a	16.1 \pm 3.0 ^a
2-methoxy-4-vinylphenol	17.0 \pm 0.7 ^b	28.3 \pm 4.3 ^a
Decanoic acid	-	16.0 \pm 3.0
Decanoic acid, ethyl ester	-	6.8 \pm 0.9
Benzeneethanol	11.1 \pm 1.1 ^b	24.4 \pm 4.5 ^a
Ethyl hexopyranoside	20.6 \pm 10.0	-
Tryptophol	26.3 \pm 6.4 ^b	42.0 \pm 8.0 ^a

^{a-b}Values with different superscript within a same row are significantly different (<0.05) by Duncan's multiple test.

acid 함량이 약 1.3배 높은 결과를 나타내었고, succinic acid와 acetic acid 함량은 US-05 시험구에서 HKFR18 시험구 대비 각각 1.5배, 4.8배 높은 결과를 나타내었다(Table 4). 향기성분 조성은 HKFR18 시험구와 US-05 시험구에서 유의적인 차이를 보이는 성분들이 검출되었는데 2-methyl-1-propanol, 2-methyl-1-butanol, 달콤한 향으로 알려져 있는 benzeneethanol (Jun & Kim, 2002) 및 맥주에서 쓴맛과 폐놀취에 영향을 끼치는 tryptophol (Jeong et al., 2015) 등이 HKFR18 시험구에서 US-05 시험구 대비 1.6-2.1배 높은 함량을 나타내는 것으로 확인되었다(Table 5).

이와 같이 단행복발효 산업현장에서 사용되고 있는 상업용 균주인 US-05 시험구 대비 HKFR18 시험구에서 동등 수준의 알코올 생성능이 확인되었고, 총 유기산 함량은 동등 수준이지만 조성에서 차이를 나타내었으며, 향기성분

Table 4. Composition of ethyl alcohol, reducing sugar, acidity and organic acids in independent saccharification and alcohol fermentation mash using *S. cerevisiae* HKFR18 and *S. cerevisiae* (US-05)

Yeast strain	Ethyl alcohol (% v/v)	Reducing sugar (mg/mL)	Acidity (mL)	Organic acids (μ g/mL)					
				Citric acid	Malic acid	Succinic acid	Lactic acid	Acetic acid	Total
US-05	4.7 \pm 0.0	9.0 \pm 0.3	1.2 \pm 0.0	841.3 \pm 59.8 ^b	81.7 \pm 27.6 ^a	453.2 \pm 29.5 ^b	223.2 \pm 39.5 ^a	256.0 \pm 49.5 ^b	1,855.4 \pm 144.1 ^a
HKFR18	4.8 \pm 0.0	8.4 \pm 0.2	1.2 \pm 0.0	1,102.7 \pm 25.2 ^a	105.0 \pm 31.6 ^a	307.8 \pm 11.5 ^a	245.8 \pm 64.3 ^a	53.4 \pm 48.5 ^a	1,814.7 \pm 67.3 ^a

^{a-b}Values with different superscript within a same column are significantly different (<0.05) by Duncan's multiple test.

Table 6. Composition of ethyl alcohol, Brix, acidity and organic acids in single-step alcohol fermentation mash using *S. cerevisiae* HKFR18 and *S. cerevisiae* (Fermivin)

Yeast strain	Ethyl alcohol (% v/v)	Brix (%)	Acidity (mL)	Organic acids(μg/mL)					
				Citric acid	Malic acid	Succinic acid	Lactic acid	Acetic acid	Total
Fermivin	7.2±0.0	6.0	15.4±0.1	7,860.0±52.6 ^a	899.8±19.8 ^a	754.1±58.3 ^a	198.5±9.4 ^a	78.3±5.2 ^b	9,790.8±133.8 ^a
HKFR18	7.2±0.0	6.4	15.1±0.1	7,881.0±39.9 ^a	905.7±1.5 ^a	709.1±12.5 ^a	207.5±14.5 ^a	52.6±6.6 ^a	9,755.9±73.9 ^a

^{a-b}Values with different superscript within a same column are significantly different (<0.05) by Duncan's multiple test.

Table 7. Aromatic compounds of single-step alcohol fermentation mash using *S. cerevisiae* HKFR18 and *S. cerevisiae* (Fermivin)

Compound	Peak Area (×10 ⁵)	
	Fermivin	HKFR18
Hexane	-	20.0±12.0
Acetic acid ethyl ester	32.4±9.0 ^a	40.0±5.1 ^a
Acetic acid	7.5±1.8	-
2-methyl-1-propanol	30.7±3.4 ^b	45.1±5.5 ^a
isobutyl alcohol	273.7±6.9 ^b	338.9±29.4 ^a
2-methyl-1-butanol	104.1±3.0 ^b	157.6±13.1 ^a
1-Hexanol	61.2±4.6 ^a	67.0±6.2 ^a
3-methyl-1-butanol, acetate	61.4±6.1 ^b	139.4±20.8 ^a
2-methyl-1-butanol, acetate	8.3±1.0 ^b	21.2±3.2 ^a
3-methyl-2,5-Furandione	26.0±21.4 ^b	36.1±13.4 ^a
propanedioic acid, proyl-1,2,3-propanetriol	-	17.6±2.6
Hexanoic acid, ethyl ester	47.2±43.0 ^a	16.8±12.3 ^a
Acetic acid, Hexyl ester	19.3±5.2 ^a	20.6±4.3 ^a
Benzeneethanol	14.1±3.0 ^a	34.8±7.2 ^a
Octanoic acid	182.2±16.0 ^b	383.2±39.3 ^a
Octanoic acid, ethyl ester	76.3±12.0 ^a	90.7±12.8 ^a
4-vinylphenol	20.4±6.5 ^a	22.8±5.1 ^a
Acetic acid, 2-phenylethyl ester	13.5±2.7 ^a	13.3±2.64 ^a
2-methoxy-4-vinylphenol	14.2±1.8 ^b	41.4±7.9 ^a
Decanoic acid	17.9±6.1 ^a	14.2±3.3 ^a
Bezeneethanol 1,3,4,5-	22.7±8.3 ^a	27.6±4.9 ^a
Tetrahydroxycyclohexanecarboxylic acid	-	14.8±3.9
Tryptophol	132.7±44.2 ^a	122.1±36.6 ^a
	24.0±8.0 ^a	38.5±10.3 ^a

^{a-b}Values with different superscript within a same row are significantly different (<0.05) by Duncan's multiple test.

조성도 유의적인 차이를 나타내는 성분들이 검출되었으므로 차별화된 관능품질을 나타낼 수 있는 단행복발효 술덧의 양조에 HKFR18이 적용 가능할 것으로 생각되었다.

단발효 술덧의 양조 특성

단발효 술덧의 발효 5일 경과 후 HKFR18 시험구와 상업용 효모(Fermivin) 시험구의 발효 생성물 분석 결과, 알코올 함량은 HKFR18 시험구와 Fermivin 시험구에서 각각 7.2%로 동등 수준의 알코올 생성능이 확인되었으며, 당도는 HKFR18 시험구에서 6.4%, Fermivin 시험구에서 6.0%로 동등한 수준으로 나타났고, 산도는 HKFR18 시험구에서 15.1 mL, Fermivin 시험구에서 15.4 mL로 유의적인 차이를 나타내지 않는 것으로 확인되었고, 유기산 함량은

HKFR18 시험구에서 9,755.9 μg/mL, Fermivin 시험구에서 9,790.8 μg/mL로 유의적인 차이가 나타나지 않았으며, citric acid, malic acid, succinic acid 및 lactic acid 함량도 유의적인 차이가 나타나지 않았으나 자극적인 신맛과 부정적인 향기에 관여하는 것으로 알려진 acetic acid (Kim et al., 2009) 함량은 Fermivin 시험구에서 HKFR18 시험구 대비 약 1.5배 높은 결과를 나타내었다(Table 6). 향기성분 조성은 HKFR18 시험구와 Fermivin 시험구에서 유의적인 차이를 보이는 성분들이 검출되었는데 검출된 성분 중 acetic acid와 1,2,3-propanetriol만 Fermivin 시험구에서 HKFR18 시험구 대비 함량이 높은 결과를 나타내었고, 다른 성분들은 전부 HKFR18 시험구에서 Fermivin 시험구 대비 동등 수준 이상의 함량을 나타내는 것으로 확인되었다(Table 7).

본 연구에서 사용한 Fermivin은 단발효 산업 현장에서 사용되고 있는 대표적인 상업용 *S. cerevisiae* 균주로 HKFR18 시험구에서 Fermivin 시험구 대비 동등 수준의 알코올 생성능과 총 유기산 함량은 동등 수준이지만 조성에서는 상대적으로 acetic acid 함량이 낮은 특성, 풍부한 향기성분 조성이 확인되었으므로 Fermivin 대비 차별화된 관능품질을 기대할 수 있을 것으로 판단되었다.

요 약

참다래 열매로부터 분리한 균주의 형태학적 특성과 DNA를 분리하여 효모의 동정에 사용되는 특이적 프라이머로 PCR 증폭을 한 후 생성된 PCR 산물의 염기서열 분석 결과, *S. cerevisiae*로 동정하였고, 동정된 균주는 *S. cerevisiae* HKFR18로 명명하였다. HKFR18을 적용하여 병행복발효, 단행복발효 및 단발효를 실시한 결과, 병행복발효 산업에서 사용되는 상업용 효모 *S. cerevisiae* La parisienne 대비 발효제로 개량누룩 사용 시험구의 경우, 동등 수준의 알코올 생성능을 나타내었고, 신맛의 특성과 강도에 차이를 나타낼 수 있는 유기산 조성의 차이가 확인되었으며, 입국 사용 시험구의 경우에는 알코올 생성능, 유기산 조성 및 향기성분 조성에서도 특이적인 차이는 관찰되지 않았다. 단행복발효 산업현장에서 사용되고 있는 상업용 균주인 *S. cerevisiae* US-05 시험구 대비 HKFR18 시험구에서 동등 수준의 알코올 생성능이 확인되었고, 총

유기산 함량은 동등 수준이지만 조성에서는 차이가 확인 되었으며, 향기성분 조성도 유의적인 차이를 나타내는 성분들이 검출되었다. 단발효 산업현장에서 사용되고 있는 상업용 균주인 *S. cerevisiae* Fermivin 시험구 대비 HKFR18 시험구에서 동등 수준의 알코올 생성능과 총 유기산 함량은 동등 수준이지만 조성에서는 상대적으로 acetic acid 함량이 낮은 특성, 검출된 향기성분 대부분 높은 함량을 나타내었다. 이와 같이 국내 자생 *S. cerevisiae* 균주인 *S. cerevisiae* HKFR18이 주류 산업 현장에서 적용되고 있는 상업용 *S. cerevisiae* 균주의 대체 가능한 주류 양조 가능성이 확인되었으므로 HKFR18과 상업적으로 이용되고 있는 *S. cerevisiae* 균주와의 관능품질 차별화 및 계통군 분류에 대한 심화 연구를 통하여 국내 자생 생물자원의 활용 가능성을 제고할 수 있는 단서를 제공할 수 있을 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 국립환경대학교 연구역량 장학생 지원사업에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

References

- Chae SK, Gang GS, Rue ID, Ma SJ, Bang GY, Oh MH, Oh SH. 2002. Standard food analysis. Ji-Gu Publishing, Paju, Korea, p. 403.
- Choi JH. 2017. Characteristics of simultaneous saccharification and alcohol fermentation with *Wickerhamomyces anomalus* SC-1, wild type yeast strain isolated Korean traditional *nuruk*. M.S. thesis. Hankyong National Univ. Anseong, Korea.
- Choi SH, Choi YJ, Lee AR, Park SA, Kim DH, Baek SY, Yeo SH, Lee CH, Park HD. 2011. Fermentation characteristics of freeze-concentrated apple juice by *Saccharomyces cerevisiae* isolated from Korean domestic grapes. Korean J. Food Preserv. 18: 559-566.
- Eeom YJ, Son SY, Jung DH, Hur MS, Kim CM, Park SY, Shin WC, Lee SJ, Auh JH, Kim GW, Park CS. 2018. Diversity analysis of *Saccharomyces cerevisiae* isolated from natural sources by multilocus sequence typing (MLST). Food Sci. Biotechnol. 27: 1119-1127.
- Jeong C, Park CS, Yeo SH, Jo HC, Noh BS. 2015. Brewing Science. Kwangmoonkag, Paju, Korea, p. 238.
- Jung HK, Park CD, Park HH, Lee GD, Lee IS, Hong JH. 2006. Manufacturing and characteristics of Korean traditional liquor, Hahyangju prepared by *Saccharomyces cerevisiae* HA3 isolated from traditional *Nuruk*. Korean J. Food Sci. Technol. 38: 659-667.
- Jun HR, Kim JY. 2002. Comparison of volatile compounds in red pepper (*Capsicum annum* L.) powders from different origins. Food Sci. Biotechnol. 11: 293-302.
- Kim HR, Kwon YH, Jo SJ, Kim JH, Ahn BH. 2009. Characterization and volatile flavor components in glutinous rice wines prepared with different yeasts of *Nuruks*. Korean J. Food Sci. Technol. 41: 296-301.
- Lee HS, Park CS, Choi JY. 2010. Quality characteristics of the mashes of *Takju* prepared using different yeasts. Korean J. Food Sci. Technol. 42: 56-62.
- Noh BS, Kim GW, Song SH, Go SH, Oh, JW. 2017. New product development of food. Soohaksa, Seoul, Korea, pp.157-160.
- NTS. 2010. Alcohol analysis regulation. Technical Service Institute of National Tax Service. National Tax Service. Korea.
- Shin KR, Kim BC, Yang JY, Kim YD. 1999. Characterization of *Yakju* prepared with yeasts from fruits. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 28: 794-800.
- So MH, Lee YS, Noh WS. 1999. Change in microorganisms and main components during *Takju* brewing by a modified *Nuruk*. Korean J. Food & Nutr. 12: 226-232.

Author Information

백상원: 국립환경대학교 대학원생
 김계원: 국립환경대학교 교수
 박천석: 경희대학교 교수
 손종연: 국립환경대학교 교수
 심재용: 국립환경대학교 교수