

사과酒에서 分離한 産膜酵母에 關한 研究

(1) 菌株의 分離 및 同定

鄭 基 澤 · 宋 亨 翼

慶北大學校 農科大學 食品加工學科

Studies on the Film-Forming Yeast Isolated from Apple Wine

(I) Isolation and Identification of Yeast Strain

Chung, Ki Taek · Song, Hyung Ik

Dept. of Food Science and Technology, Coll. of Agric., Kyungpook Natl. Univ.

Summary

Film-formation, which often occurs during storage of apple wine, owing to contamination by film-forming yeasts, results in inferior products. Therefore, for the purpose of preventing this occurrence, we isolated and identified yeast strain.

Among the total number of 45 yeast strains which were isolated from contaminated apple wine in winery, the strains FY-4 and FY-5 were found to be useful. The strain FY-5, which greatly formed film on apple wine, was identified as *Hansenula beijerinckii* or similar strain according to taxonomic characteristics.

緒 論

果實酒의 貯藏中 産膜酵母가 繁殖하면 表面에 皮膜을 形成하게 되고 이는 香味에 影響을 주는 등 製品의 品質을 低下시키는 原因이 된다. 포도주에 産膜을 形成하는 酵母로서는 지금까지 *Pichia*, *Candida*, *Hansenula* 등이 알려지고 있으며 또한 sherry酒 酵母로서 *Saccharomyces*, *Toluropsis* 등이 報告되어 있다.^{3,4,10,14)}

이들 酵母의 産膜形成 要因에 관해서는 비타민類 및 아미노산 등의 効果,^{1,2,6)} 培養條件의 影響^{5,13,15)} 등이 檢討되고 있으며 産膜形成時의 포도주의 成分 및 香味의 變化^{16,17,18)} 등도

다수 報告되어 있다. 近來에는 産膜形成의 原因에 대한 研究가 활발히 이루어지고 있는데 그 原因이 酵母細胞表面의 疎水性 때문인 것으로 알려지고 있다.^{7,8,9)}

그러나 이들 研究는 포도주에서의 産膜性의 檢討가 대부분이고 사과주의 産膜酵母 및 그 要因에 관한 연구는 거의 없는 實情이다.

著者들은 사과주 釀造過程 특히 貯藏中 보편적으로 發生하는 有害한 産膜을 防止하여 사과주의 品質을 保存할 目的으로 실제 사과주 工場의 貯藏사과주에서 産膜酵母를 分離하고 그 分類學的 性質을 檢討하였다.

材料 및 方法

1. 菌分離用 試料

경북 경산읍 所在 太陽酒造에 市販用으로 貯藏中인 사과주중 産膜을 形成한 6個의 저장탱크내의 사과주를 菌分離用 試料로 使用하였다.

2. 菌株의 分離

産膜을 形成하고 있는 사과주의 皮膜을 無菌水에 懸濁하고 이 희석액 1 ml 를 취하여 맥아즙寒天培地 (pH 4.0, 10° Bx)에서 28°C, 3日間 平板培養을 반복하여 순수産膜酵母를 分離하였다. 分離된 菌株는 맥아즙 斜面培地에 移植·培養하여 4°C에서 保存하면서 使用하였다.

3. 産膜形成能

에탄올 10%를 各各 添加한 맥아배지 (pH 4.0, 10° Bx)와 YM培地 (peptone 0.5%, 酵母抽出物 0.3%, 麥芽抽出物 0.3%, 포도당 1%, pH 6.0)를 시험관 (1.5×15cm)에 5 ml 씩 分注하고 菌을 $5\sim7 \times 10^2/ml$ 되게 接種, 28°C, 7日間 培養하는 方法으로 3回 반복 실험하여 皮膜의 形成狀態를 觀察함으로써 菌株別 産膜生成能을 조사하였다.

4. 菌의 同定

形態學的 및 培養學的 性質의 檢討는 飯塚·後藤¹¹⁾의 方法에 準했다. 糖類의 醱酵性 實

驗은 Durham氏 管法을 써서 25°C에서 培養하면서 經時的으로 醱酵管内의 gas集積 및 變色有無로 判定하였다. 당류의 資化性은 auxanography法 및 液体培養法을 併用實驗하였다.

分離菌株의 同定은 分類學的 諸性質을 근거로 Lodder¹²⁾의 方法에 準하여 실시하였다.

5. 試 藥

麥芽抽出物 및 酵母抽出物은 Difco 製品이었고 기타 一般試藥은 日本 和光製品을 주로 하는 市販 一級品을 使用하였다.

結果 및 考察

1. 菌株의 分離

6個 저장탱크내의 사과주의 皮膜에서 分離된 産膜酵母는 총 45株였다. 그중 性質이 다른 것으로 여겨지는 6株에 대하여 單菌學的 性質을 검토하였다.

2. 分離酵母의 選別

6株가 同一한 菌種인지 여부를 확인하고 우량한 産膜形成菌을 選別할 目的으로 몇가지 生理實驗과 함께 産膜形成能을 조사하여 表 1에 나타내었다.

Table 1. Characteristics of film-forming yeasts.

Isolated strain	Assimilation ^z							Flim formation in a medium of ^y	
	Glu	Gal	Suc	Mal	Lac	Alc	KNO ₃	Malt	YM
FY-1	+	-	+	+	-	+	+	++	++
FY-2	+	+	+	+	-	+	+	+	+
FY-3	+	-	+	+	-	+	+	+	++
FY-4	+	-	+	+	-	+	+	++	+++
FY-5	+	-	+	+	-	+	+	+++	+++
FY-6	+	-	-	+	-	+	+	++	++

z) Symbols: Glu, Gal, Suc, Mal, Lac, and Alc show glucose, galactose, sucrose, maltose, lactose, and ethanol, respectively.
+ utilized, - not utilized.

y) Ten percentage of ethanol was added to malt and YM medium, respectively.
Symbols: +, ++, and +++ indicate degree of film formation.
+ scanty, ++ moderate, +++ abundant.

Table 2. Morphological and cultural properties.

Shape and size of vegetative cells	
spheroidal to oval, $(2.8-4.0) \times (4.5-9.8) \mu\text{m}$	
Pseudomycelium formation	
negative	
Ascospore formation	
positive	
Pellicle formation	
positive	
Budding	
multilateral	
Macromorphological characteristics	
Size	: 10mm diameter (30 days)
Shape	: irregularly round
Colour	: white
Surface	: wrinkled
Elevation	: raised

Table 3. Physiological properties.

Fermentation			
D-Glucose	+	Maltose	-
D-Galactose	-	Lactose	-
Sucrose	+	Raffinose	+ (1/3)
Assimilation of carbon compounds			
D-Glucose	+	D-Xylose	+
D-Galactose	-	D-Arabinose	-
L-Sorbose	-	D-Ribose	-
Sucrose	+	L-Rhamnose	+
Maltose	+	Ethanol	+
Cellobiose	+	Glycerol	+
Trehalose	-	Ribitol	-
Lactose	-	D-Mannitol	+
Melibiose	-	Salicin	+
Raffinose	+	DL-Lactic acid	+
Melezitose	+	Succinic acid	+
Inulin	+	Citric acid	-
Soluble starch	-	Inositol	-
Assimilation of potassium nitrate		positive	
Growth in vitamin-free medium		positive	
Production of esters		positive	

6種의 酵母세포가 모두 球形 또는 卵形이었고 多極出芽에 의해 증식하며 KNO_3 資化性은 양성이었다. 糖類의 資化性에 있어서도 거의 비슷한 性質을 나타내므로 모두 同一한 菌種인 것으로 推定되었다.

그러나 에타놀 10%를 添加한 麥芽培地 및 YM培地에서 28°C, 7日間 배양하여 皮膜形成能을 調査한 바 FY-4 및 FY-5가 가장 우수하였다. 本實驗에서는 그중 FY-5를 同定하였다.

3. 選別菌株의 同定

FY-5菌의 分類學的 性質을 以下에 檢討하였다.

(1) 形態學的 特性

麥芽汁배지에서 28°C, 2日間 培養한 後의 세포형태는 구형 또는 난형이었고 그 크기는 $(2.8-4.0) \times (4.5-9.8) \mu m$ 였다. (그림 1)

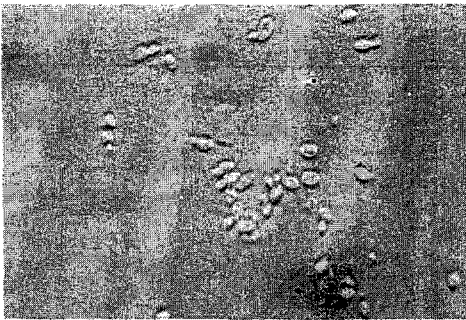


Fig. 1. Photomicrograph(phase contrast) of film-forming yeast, FY-5 strain (x 400).

감자寒天배지에서 25°C, 7日間 slide培養을 한 바 偽菌絲 形成은 관찰되지 않았으며, 맥아즙배지에서 25°C, 24시간 培養한 菌體를 석고배지에 移殖하여 25°C, 1個月間 배양하고 carbol fuchsin용액으로 孢子染色을 행한 바 土星形의 자낭포자의 形成이 관찰되었다.

또한 供試菌은 多極出芽에 의해 증식하는 酵母였다.

(2) 培養學的 特性

맥아즙배지 및 YM배지에 各各 25°C, 3日間 培養한 결과 培養液 表面에 완전히 主름

잡힌 흰색의 皮膜形成을 볼 수 있었고 그중 一部는 沈澱되었다. 이처럼 皮膜形成이 배지의 種類에 관계없이 왕성하므로 本菌은 眞性產膜酵母인 것으로 推定되었다.¹⁰⁾

麥芽寒天平板培地에서 20°C, 30日間 배양한 결과, 集落은 건조하고 주름이 잡힌 흰색으로 응기상태이며 불규칙하게 둥근 모양이었다.

以上的 結果를 要約하여 表2에 나타내었다.

(3) 生理學的 特性

供試菌 FY-5의 醱酵性 및 資化性에 대하여 檢討한 結果를 表3에 나타내었다.

醱酵性에 있어서 glucose, sucrose는 양성이었으나 galactose, maltose의 醱酵性은 없었다.

資化性에 있어서는 glucose, sucrose, maltose, inulin, ethanol등은 잘 利用 하였으나 galactose, lactose, melibiose등은 資化하지 못했다. 질산염 資化性은 양성되었고 비타민 要求性은 없었으며 ester生成이 확인되었다.

(4) 同 定

以上的 分類學的 性質에서, 供試菌FY-5는 多極出芽에 의해 증식하고 질산염을 資化할 수 있으며 세포의 形態가 구형 또는 난형이며 土星形의 자낭포자 형성, ester의 生成, 皮膜의 形成 등으로 미루어 *Hansenula* 屬으로 分類되었다. 또한 glucose, sucrose를 醱酵하며 maltose를 資化하는 點 등으로 보아 Lodder¹²⁾의 分類法에 의하면 *Hansenula beijerinckii* 또는 그 類緣菌으로 同定되었다.

摘 要

貯藏사과주의 產膜을 防止할 目的으로 사과주 釀造場內의 產膜이 形成된 貯藏 사과주에서 產膜酵母 45種을 分離하고 그중 가장 두렷한 產膜生成能을 나타내는 菌株 FY-4, FY-5를 選別하였다.

2 菌株 中 FY-5는 分類學的 諸性質로 보

아 *Hansenula beijerinckii* 또는 그 近緣菌으로 同定되었다.

引用 文 献

1. Castor, J. G. B., and T. E. Archer. 1957. Nutrient requirements for growth of the sherry flor yeast, *Saccharomyces beticus*. Appl. Microbiol. 5: 56-60.
2. Freiberg, K. J., and W. V. Cruess. 1955. A study of certain factors affecting the growth of flor yeast. Appl. Microbiol. 3: 208-212.
3. 後藤昭二. 1959. 産膜性のブドウ酒酵母 について (第1報) ブドウ酒酵母の産膜性とこれらの分布. 醸工. 37: 384-390.
4. 後藤昭二. 1959. 産膜性のブドウ酒酵母について (第2報) 分離酵母の分類及び仮性産膜酵母の分類學的特徴. 醸工. 37: 390-396.
5. 後藤昭二. 1959. 産膜性のブドウ酒酵母について (第3報) 産膜性と二, 三の培養條件. 醸工. 37: 412-416.
6. 後藤昭二. 1961. 仮性産膜性に對するビタミン, アミノ酸の影響. 醸工. 39: 709-713.
7. Iimura, Y., S. Hara, and K. Otsuka. 1980. Cell surface hydrophobicity as a pellicle formation factor in film strain of *Saccharomyces*. Agric. Biol. Chem. 44: 1215-1222.
8. Iimura, Y., S. Hara, and K. Otsuka. 1980. Fatty acids as hydrophobic substance on cell surface of film strain of *Saccharomyces*. Agric. Biol. Chem. 44: 1223-1229.
9. Iimura, Y., S. Hara, and K. Otsuka. 1981. Fatty acids associated with the cell wall in film strains of *Saccharomyces*. Agric. Biol. Chem. 45: 1113-1119.
10. 飯村稔・大塚謙一・原昌道. 1980. ぶどう酒から分離した産膜性酵母. 醸工. 58: 449-452.
11. 飯塚廣・後藤昭二. 1977. 酵母の分類同定法. 第2版. 東京大學出版會. 東京.
12. Lodder, J. 1971. The yeasts, a taxonomic study. 2nd ed. pp. 226-257. North-Holland Publishing Company. Amsterdam.
13. 大塚謙一・飯村稔・戸塚昭・木崎康造・袖山政一. 1978. 赤ぶどう酒から分離した1産膜性酵母の諸性質. 醸工. 56: 265-271.
14. 嶋谷幸雄・野中 滿. 1967. ブドウ酒醸造に關係する microflora に関する研究(第2報) わが國の各ブドウ生産地におけるブドウ畑から, ブドウ酒醸造, 貯酒工程にいたる産膜酵母菌の分布について. 醸工. 45: 185-190.
15. 嶋谷幸雄. 1968. ブドウ酒醸造に關係する microflora に関する研究(第3報) Flor sherry yeast (*Saccharomyces oviformis*) の産膜に影響する諸因子の検討. 醸工. 46: 885-892.
16. 横塚勇. 1963. 日本産ぶどう酒酵母に関する研究(第11報) Flor yeasts を利用した flor sherry の醸造並びに dry table wine の品質改善(その2) 皮膜形成下のぶどう酒の成分並びに香味の變化. 醸造. 58: 82-86.
17. 横塚 勇・後藤昭二. 1963. 日本産ぶどう酒酵母に関する研究(第12報) Flor yeasts を利用した flor sherry の醸造並びに dry table wine の品質改善(その3) Flor yeasts の皮膜形成に及ぼす外圍の培養條件とブドウ酒組成の影響; 培養温度, ブドウ酒の酒精含量と pH 値の影響について. 醸造. 58: 169-174.
18. 横塚 勇・後藤昭二・山川祥秀. 1963. 日本産ぶどう酒酵母に関する研究(第13報) Flor yeasts を利用した flor sherry の醸造並びに dry table wine の品質改善(その4) Flor yeasts の皮膜形成に及ぼす外圍の培養條件とぶどう酒組成の影響; 亞硫酸の添加量及びぶどう酒中の殘糖量の影響について. 醸造. 58: 1221-1224.