

## 감 과실로부터 알코올 발효 효모의 분리 및 특성

이창호 · 박희동\*  
경북대학교 식품공학과

**Isolation and Characterization of Alcohol Fermentation Yeasts from Persimmon. Chang-Ho Rhee and Heui-Dong Park\***. Department of Food Science and Technology, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea - From persimmon fruits, about 40 yeast strains were isolated and tested for their ability of alcohol fermentation were tested. Among them, two strains, RCY14 and RCY15, showing the highest alcohol fermentability were selected for further investigations. They were identified as *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces kluyveri* based on their morphological, cultural and physiological properties. Their optimum condition for the alcohol fermentation in YPD-15% glucose was pH 6.0, 30°C and 120 rpm of shaking speed. The alcohol yields of *S. cerevisiae* RCY14 and *S. kluyveri* RCY15 in a persimmon juice were 94.54 and 96.81%, respectively. Although the alcohol yields of both strains were not very high in YPD-15% glucose, they were much higher in a persimmon juice as compared to those of *S. cerevisiae* Balyon-1, *S. cerevisiae* 701 and *S. cerevisiae* W3 which are being used in the industrial alcohol fermentation.

일반적으로 감 과실은 아열대로부터 온대에 이르기까지 넓은 지역에 분포하고 있고 우리나라 전역에서 생산되고 있으며 다른 과실에 비하여 시비나 농약의 사용이 적고 기호성이 높아서 매년 생산이 증가 추세에 있다(1). 감은 크게 단감(*Diospyros kaki*, L)과 뽕은감(*Diospyros kaki*, T)으로 대별되는데 단감의 경우는 대부분 생과로 이용되고 있으나 수확기 기후조건에 의한 불량과실의 발생 및 저장 중 갈변 또는 연화현상으로 인하여 효율적으로 이용되지 못하고 있다(2). 뽕은감의 경우도 탈삼 또는 연화과정을 거쳐야 할 뿐만 아니라 기호적으로 단감에 비하여 선도가 낮고 과잉생산으로 인한 가격폭락으로 일부가 수확되지 않은 상태로 버려지는 등 경제적으로 큰 손실이 초래되고 있다(3). 이러한 감 과실은 가용성 당의 함량이 11-14%로서 상대적으로 높을 뿐 아니라 vitamin A와 C의 함량이 높고 장의 수축과 분비액을 촉진하며 설사와 기침을 멈추게 하는 약리작용을 가지고 있는 우수한 과실이다(4). 그러나 이러한 영양적인 특성에도 불구하고 다른 과실에 비해 이용성이 제한되어 왔으며 일부가 옛날부터 일반 농가에서 제조되어온 건시(곶감) 및 발효 제품으로서 감 식초의 제조에 이용되고 있는 실정이다(5). 최근 시판되고 있는 감 식초는 가정에서 전래되고 있는 자연 발효에 의존하고 있기 때문에 유해 미생물의 오염으로 인하여 비위생적이며 제조시 색상, 유효 성분 등이 일정하지 못하여 상품성이 낮을뿐 아니라 3-

4개월 동안 장시간 발효를 행하므로 경제성이 떨어지는 단점이 있다. 그러나 현재까지 감과실의 가공을 효율적으로 수행하기 위한 균주들의 분리와 특성에 관한 연구는 거의 없는 실정이다. 따라서 본 실험에서는 대량 출하 및 저온 저장중에 발생하는 불량 감 과실의 이용성 증대를 위해 감 과실로부터 알코올 효모를 분리하여 그 특성을 조사하였다.

### 재료 및 방법

#### 균주의 분리

감 과실의 과육과 꼭지로부터 YPD 한천배지(1% yeast extract, 2% bacto peptone, 2% glucose, 2% agar, pH 6.0)를 사용하여 약 40여종의 효모를 분리한 후 CO<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 감량법(6, 7)으로 알코올 발효시험을 행하여 알코올 발효력이 우수한 균주 2종을 선정하여 본 실험의 공시 균주로 사용하였다.

#### 배양방법

전배양은 YPD 배지에 공시 균주를 접종한 후 30°C에서 120 rpm의 속도로 24시간 진탕배양하였다. 알코올 생산력을 조사하기 위한 본 배양은 15% glucose를 함유하는 YPD 배지를 elenmeyer flask에 분주하여 살균한 후 전 배양액 5%(v/v)를 접종하여 30°C에서 120 rpm으로 진탕배양하였다.

#### 분리된 균주의 동정

분리된 효모 균주는 형태적 및 생리적 특성을 조사하

\*Corresponding author

Tel. 82-53-950-5774, Fax. 82-53-950-6772

E-mail: hpark@bh.kyungpook.ac.kr

Key words: Persimmon, Alcohol yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces kluyveri*

여 Lodder, Barnett 등 및 Rij의 분류 기준(8-10)에 따라 동정하였다.

**분석 방법**

발효액내의 알코올 함량은 발효액 80 ml을 취한 후 증류수 20 ml을 첨가하여 증류한 다음 이 증류액을 주정계로 측정된 값을 Gay Lussac table로 온도 보정하여 환산하였다(11, 12).

**알코올 생성을 위한 배양조건외 검토**

알코올 생산에 미치는 배양온도의 영향은 초기 pH 6.0, 진탕속도 120 rpm으로 하여 배양온도를 25, 30, 35 및 40℃에서 배양하여 알코올 수율을 비교하였다. 초기 pH의 영향을 검토하기 위하여는 배양온도 30℃, 진탕속도 120 rpm으로하고 배지의 초기 pH를 4.0에서 9.0까지 1.0간격으로 조절하여 알코올 수율을 비교하였다. 진탕속도의 영향을 조사하기 위하여는 회전 진탕속도를 100, 120 및 150 rpm으로 각각 달리하여 초기 pH 6.0, 배양온도 30℃로하여 알코올 수율을 비교 하였다.

**산업용 균주와 분리된 균주와의 알코올 발효능 비교**

분리 균주와 산업적으로 이용되고 있는 알코올 효모의 발효능은 초기 pH 6.0, 배양온도 30℃ 및 진탕속도 120 rpm으로하여 15%의 glucose를 함유하는 YPD 배지 및 뽕은감을 원료로 제조한 주스를 사용하여 조사하였다. 감 주스는 뽕은감을 균질기로 마쇄한 후 20,000×g에서 20분간 원심분리하여 얻은 상정액을 취하여 제조하였으며 여기에 200 ppm의 K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>를 첨가하여 알코올 발효에 사용하였다.

**결과 및 고찰**

**분리 균주의 동정**

감 과육과 꼭지로부터 40여종의 효모를 분리한 후

15%의 glucose를 함유하는 YPD 배지에서의 알코올 발효력이 우수한 두 균주 RCY14와 RCY15를 최종 선별하였다. 두 균주 모두 YM 한천 배지에서 배양한 후 현미경으로 관찰한 결과 대부분의 세포가 구형이었으며 일부의 세포가 난형을 나타내었다(Fig. 1). 균주 RCY14와 RCY15의 형태적 및 배양적 특성을 조사한 결과(Table 1) 자낭포자를 형성하였으며 출아에 의해 영양증식을 하였으며 진균사는 형성하지 않았다. YM 한천 배지상에서 전형적인 효모의 형태로 증식하여 *Saccharomyces* sp.에 속하는 효모인 것으로 추정하였다. 또한 생리적 특성을 조사한 결과(Table 2) RCY14 균주는 glucose, sucrose, maltose 및 melibiose등을 발효하였으나 lactose, trehalose 및 inulin 등은 발효하지 못하였다. 또한 glucose, galactose, sucrose, maltose, trehalose, melibiose, raffinose, glycerol 및 xylitol은 자화 하였으나 그 외의 탄소원은 자화하지 못하였다. RCY14 균주는 질산염 자화성이 없었으며 37℃에서 생육이 가능하였다. 이러한 특성으로 균주 RCY14는 *Saccharomyces cerevisiae* 또는 그 유연균으로 동정하였다. RCY15 균주는 glucose, sucrose, maltose 및 raffinose등을 발효하였고 lactose, trehalose 및 melibiose등은 발효하지 못하였다. 또한 glucose, galactose, sucrose, maltose, trehalose, melibiose, raffinose 및 ethanol은 자화 하였으나 그 외의 탄소원은 자화하지 못하였다. RCY15 균주는 질산염중 ethylamine·HCl과 cadaverine·2HCl을 자화하였고 37℃에서 생육이 가능하였다. 이상의 결과를 토대로하여 RCY15 균주는 *Saccharomyces kluyveri* 또는 그 유연균으로 동정하였으나 L-lysine의 자화성에 대하여는 서로 상반된 결과를 나타내었다.

**알코올 생성을 위한 배양조건외 검토**

배양온도의 영향 알코올 발효균주 *S. cerevisiae* RCY14와 *S. kluyveri* RCY15의 배양온도에 따른 알코올 발효

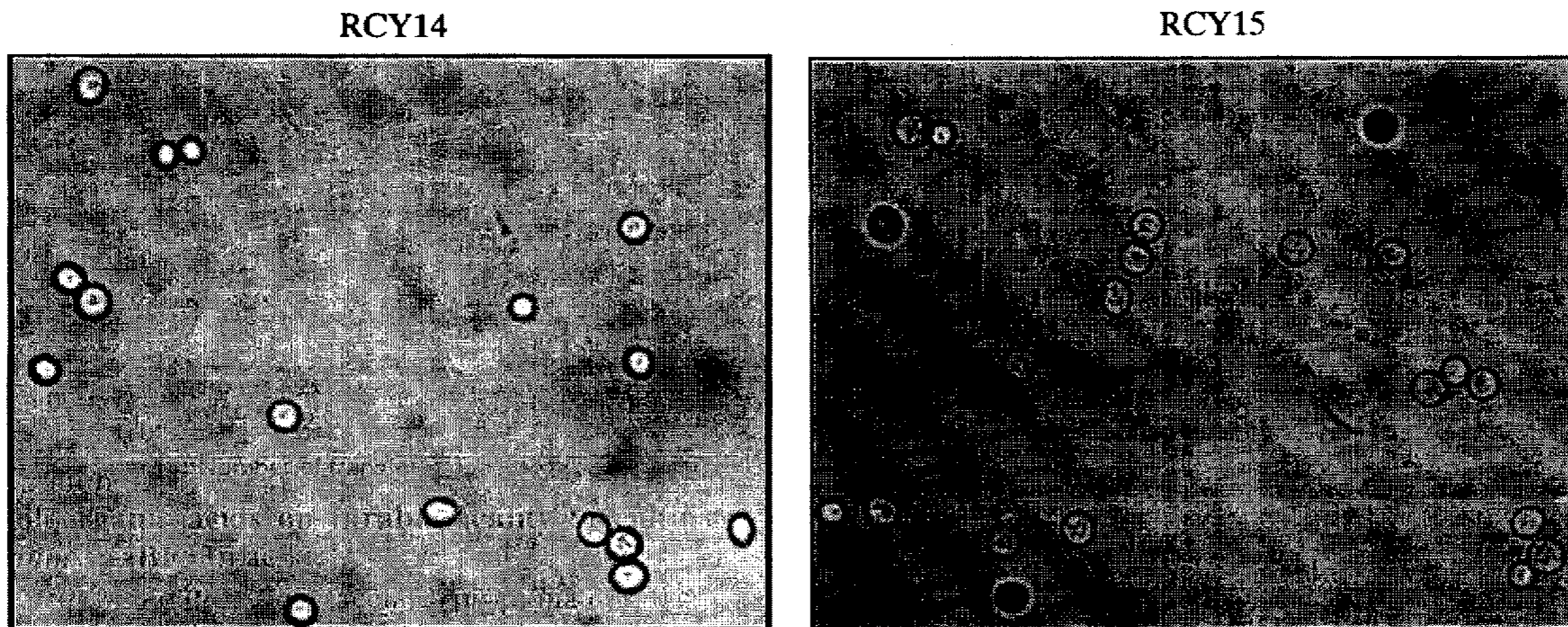


Fig. 1. Microphotographs (×400) of the alcohol fermentation yeasts isolated from persimmon.

**Table 1. Morphological and cultural characteristics of the alcohol fermentation yeasts isolated from persimmon**

Classification	RCY14	RCY15
Cell shape	oval and round	oval and round
Cell size	3.5-4.0×5.0-6.5	4.0-6.0×6.5-8.0
Vegetative reproduction	budding	budding
Ascospore	present (2-4)	present (2-4)
Pseudomycelium	absent	absent
True mycelium	absent	absent
Culture in YM media		
Pellicle	absent	absent
Ring	absent	absent
Growth on YM agar		
Edge	entire	entire
Elevation	raised	raised
Surface	smooth	smooth
Color	white creamy	white creamy
Growth at 37°C	+	+
Gelatin liquefaction	-	-
Acid production	-	-
Urea hydrolysis	-	-
Ester production	+	+
Splitting of glucoside	-	-
Cycloheximide resistance (100 ppm)	-	-

+: positive, -: negative.

의 영향을 조사하기 위해 glucose 농도를 15%로 조절한 YPD 배지에서 배양온도 25, 30, 35 및 40°C에서 알코올 수율을 조사하였다(Table 3). 온도는 효모의 성장 및 알코올 생성에 중요한 요인 중의 하나로서 온도가 낮으면 성장속도 및 알코올 생성속도는 감소하고 온도가 상승함에 따라 대사속도가 빨라져 초기 발효속도는 증가하지만 알코올 생성율은 낮아진다(13-15). *S. cerevisiae* RCY14와 *S. kluyveri* RCY15 모두 배양온도 30°C, 24시간 배양 시 최대의 생육 및 알코올 발효 수율을 나타내었으며 그때의 알코올 수율은 각각 96.95%와 95.78%이었다.

**pH의 영향** 초기 pH의 영향을 검토하기 위하여 15%의 glucose를 함유하는 YPD 배지의 초기 pH를 4.0에서 9.0까지 1.0간격으로 조절하여 알코올 발효율을 조사하였다. 그 결과 배양 24시간 후, *S. cerevisiae* RCY14는 초기 pH 5.0, 6.0 및 7.0에서, *S. kluyveri* RCY15는 초기 pH 5.0에서 최대의 생육도를 나타내었으며 두 균주 모두 pH 6.0에서 가장 높은 알코올 수율을 나타내었다(Table 4). 일반적으로 효모의 생육 최적 pH는 pH 5.0으로 알려져 있으나 본 연구에서 분리한 균주 RCY14는 5.0-7.0의 넓은 범위의 pH에서 생육이 우수하게 나타났는데 현재 그 이유는 명확하지 않다. 두 균주 모두 초기 pH 9의 경우 발효율이 급격히 감소하였을 뿐 넓은 범위의 pH에서 안정된 발효율을 나타내었는데 Ohta(16)의 보고와 같이 알코올 발효가 극한적인 범위가 아닌 넓은

**Table 2. Fermentation and assimilation of carbon and nitrogen compounds by the alcohol fermentation yeasts isolated from persimmon**

Source	RCY14	<i>S. cerevisiae</i>	RCY15	<i>S. kluyveri</i>
(Carbon)				
Fermentation				
Glucose	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+
Sucrose	+	+	+	+
Maltose	+	+	-	-
Raffinose	+	+	+	+
Melezitose	-	-	-	-
Lactose	-	-	-	-
Cellobiose	-	-	-	-
Trehalose	-	-	-	-
Melibiose	+	+	-	-
Starch	-	-	-	-
Inulin	-	-	-	-
Assimilation				
Glucose	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+
Melezitose	-	-	-	-
Sucrose	+	+	+	+
Lactose	-	-	-	-
Maltose	+	+	+	+
Celliobiose	-	-	-	-
Trehalose	+	+	+	+
Melibiose	+	+	+	+
Raffinose	+	+	+	+
Starch	-	-	-	-
Inulin	-	-	-	-
Sorbitose	-	-	-	-
Xylose	-	-	-	-
Arabinose	-	-	-	-
Rhamnose	-	-	-	-
Citrate	-	-	-	-
Ribose	-	-	-	-
Arbutin	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-
Glycerol	+	+	-	-
Mannitol	-	-	-	-
Salicin	-	-	-	-
Xylitol	w	-	-	-
Ethanol	+	+	+	+
Methanol	-	-	-	-
(Nitrogen)				
Potassium nitrate	-	-	-	-
Sodium nitrite	-	-	-	-
L-Lysine	-	-	-	+
Ethylamine HCl	-	-	+	+
Cadaverine 2HCl	-	-	+	+

+: fermentation or assimilation, w: weak, -: not fermentation or assimilation.

pH에서 양호하다는 것과 잘 일치하였다.

**진탕속도의 영향** 진탕속도가 알코올 발효에 미치는

**Table 3. Effect of temperature on the growth and ethanol yield in the YPD-15% glucose media by the alcohol fermentation yeasts isolated from persimmon**

Temperature (°C)	<i>S. cerevisiae</i> RCY14		<i>S. kluyveri</i> RCY15	
	Growth (mg/ml)	Yield (%)*	Growth (mg/ml)	Yield (%)
25	3.679	93.35	3.717	92.48
30	3.735	96.95	4.058	95.78
35	3.657	82.54	3.658	81.61
40	3.631	77.56	3.525	57.83

\*Ethanol yield was calculated from the following equation;

$$\text{Yield (\%)} = \frac{\text{Final ethanol concentration (g/L)}}{\text{Initial glucose concentration (g/L)} \times 0.51} \times 100$$

**Table 4. Effect of pH on the growth and ethanol yield in the YPD-15% glucose media by the alcohol fermentation yeasts isolated from persimmon**

pH	<i>S. cerevisiae</i> RCY14		<i>S. kluyveri</i> RCY15	
	Growth (mg/ml)	Yield (%)	Growth (mg/ml)	Yield (%)
4.0	3.727	92.39	3.705	90.19
5.0	3.735	96.12	4.058	93.92
6.0	3.735	96.95	3.897	95.78
7.0	3.740	93.05	3.862	93.12
8.0	3.681	92.05	3.589	91.12

영향을 검토하기 위하여 초기 pH 6.0인 15%의 glucose를 함유하는 YPD 배지를 사용하여 배양온도 30°C에서 진탕속도를 100, 120 및 150 rpm으로 조절하여 알코올 수율을 비교한 결과, 배양 24시간 후 *S. cerevisiae* RCY14와 *S. kluyveri* RCY15 모두 균의 생육도는 150 rpm에서 가장 양호하였으나 알코올 수율은 120 rpm에서 가장 높았다(Table 5). 이러한 현상으로 보아 약 15%의 당을 함유하는 배지를 사용하여 본 연구에서 분리한 균주에 의해 알코올 발효를 행할 경우 적당한 속도로 통기를 해주는 것이 더욱 유리할 것으로 추정된다.

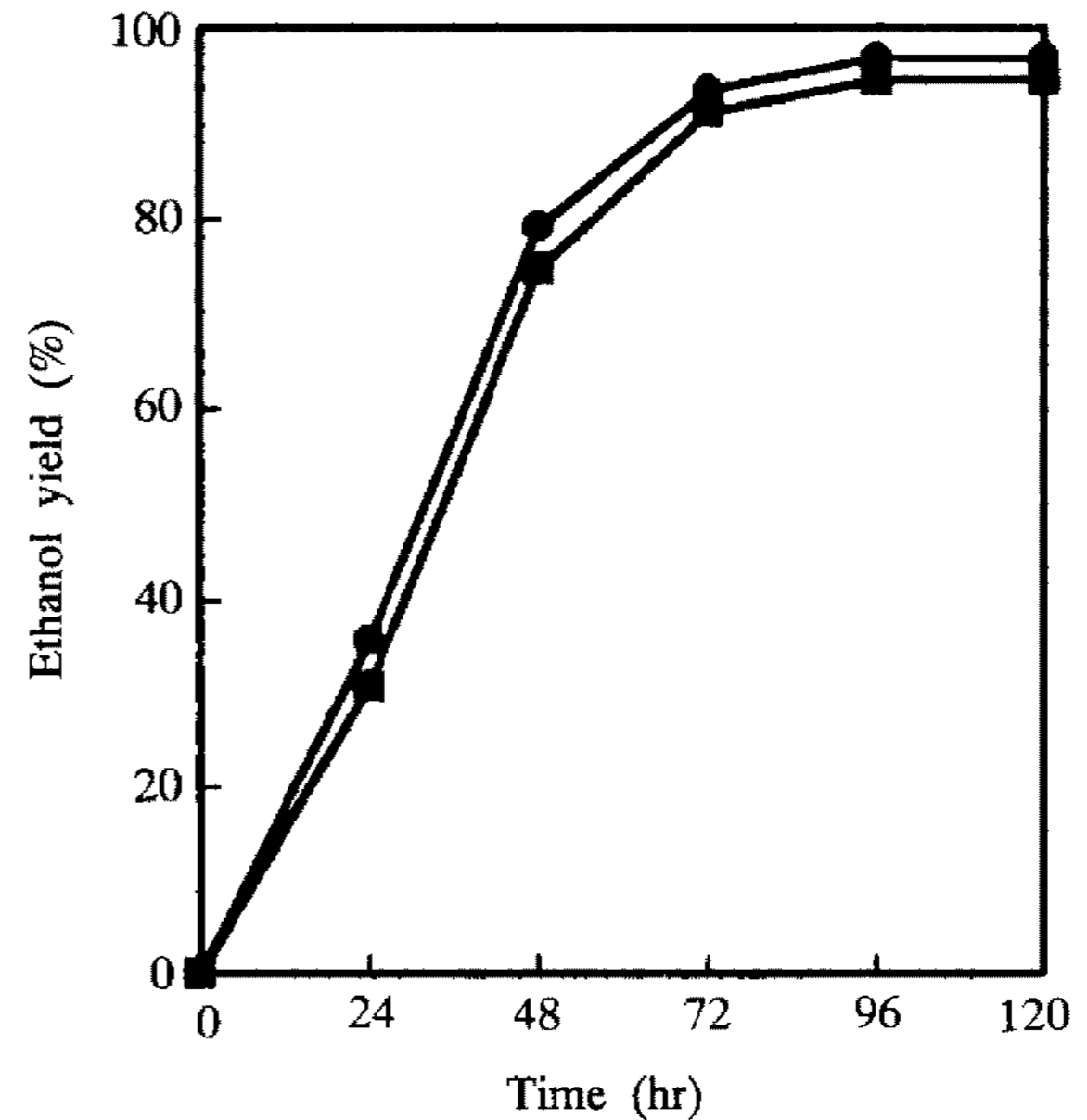
**배양시간에 따른 알코올 수율의 변화**

감 주스에서 두 균주를 120시간 동안 배양하면서 경시적으로 알코올 수율의 변화를 조사한 결과는 Fig. 2와 같다. 두 균주 모두 배양시간에 따라 알코올 수율이 증가하였으나 96시간 배양으로 최대 알코올 수율에 도달한 후 그 이상의 배양시간에서는 일정한 값을 나타내었다. 따라서 본 실험의 조건에서 이 들 균주를 사용하여 알코올 발효를 행할 경우 96시간이 가장 적합할 것으로 생각된다. 두 균주의 알코올 수율을 비교한 결과 전 발효기간을 통하여 균주 RCY15이 RCY14에 비하여 알코올 수율이 다소 높은 경향을 나타내었다.

**산업용 균주와 분리된 균주와의 알코올 발효능 비교**

**Table 5. Effect of shaking speed on the growth and ethanol yield in the YPD-15% glucose media by the alcohol fermentation yeasts isolated from persimmon**

Shaking speed (rpm)	<i>S. cerevisiae</i> RCY14		<i>S. kluyveri</i> RCY15	
	Growth (mg/ml)	Yield (%)	Growth (mg/ml)	Yield (%)
100	3.635	93.31	3.717	91.12
120	3.974	96.95	4.011	95.78
150	4.027	92.39	4.035	90.18



**Fig. 2. Effect of incubation time on the ethanol yields in persimmon juice by *S. cerevisiae* RCY14 and *S. kluyveri* RCY15. ■—■ : *S. cerevisiae* RCY14, ●—● : *S. kluyveri* RCY15.**

감 과실로부터 분리한 알코올 발효 균주와 현재 알코올 및 주류의 제조에 산업적으로 이용되고 있는 균주들의 알코올 발효율을 비교하였다(Table 6). 15% glucose를 함유하는 YPD 배지에서는 현재 주정공장에서 알코올 발효에 널리 이용하고 있는 *S. cerevisiae* 발연 1호와 24시간 배양 후의 알코올 발효율을 비교하였으며, 감 주스를 원료로 한 알코올 발효시는 현재 포도주의 제조에 널리 이용되고 있는 *S. cerevisiae* 701 및 W3 두 균주와 96시간 배양 후의 알코올 발효율을 비교하였다. 분리된 두 균주 모두 15%의 glucose를 함유하는 YPD 배지에서는 발연 1호보다 발효율이 낮았다. 그러나, 감 주스를 원료로 한 경우에는 발연 1호나 포도주의 제조에 사용되고 있는 *S. cerevisiae* 701 및 W3보다 균의 생육도 및 알코올 발효 수율이 더욱 높게 나타났다. 이러한 현상은 주정의 제조 및 포도주의 제조에 사용되고 있는 효모들은 감 과실의 독특한 특성에 의하여 알코올 발효가 저해되기 때문으로 추정되며, 이 들은 감을 원료로 한 알코올 발효에 부적합하다는 결과를 나타내고 있다. 감 과실에서 분리된 두 균주가 감 주스를 원료로 한 알코올 발효시 수율이 높은 것

**Table 6. Comparison of the growth and ethanol yield in YPD-15% glucose media and persimmon juice between the alcohol fermentation yeasts isolated from persimmon and the industrial alcohol yeasts**

Strains	YPD-15% glucose		Persimmon juice*	
	Growth (mg/ml)	Yield (%)	Growth (mg/ml)	Yield (%)
<i>S. cerevisiae</i> RCY14	4.043	96.95	4.017	94.54
<i>S. kluyveri</i> RCY15	4.031	95.78	4.021	96.81
<i>S. cerevisiae</i> Balyon-1	4.033	98.51	4.002	90.80
<i>S. cerevisiae</i> 701	-	-	3.813	93.06
<i>S. cerevisiae</i> W3	-	-	3.955	90.15

Persimmon juice was prepared as follows; after persimmon fruits were homogenized with a homogenizer, the supernatant was collected by centrifugation at 20,000×g for 20 min. The supernatant added with 200 ppm of K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> was used for the ethanol fermentation by the various yeast strains.

은 이 균주들이 오랜 세월동안 감 과실의 특성에 적응하여 순화되었기 때문으로 추정되며 감 알코올 또는 감식초의 제조에는 감 과실로부터 알코올 효모를 분리하여 사용하는 것이 경제적으로 훨씬 유리할 것으로 생각된다.

## 요 약

감 과실의 이용성 증대를 위해 감 과실의 과육과 꼭지로부터 알코올 발효 효모를 분리·동정하고 균의 생육 및 알코올 발효에 대한 최적 조건을 검토하였다. 분리된 40여종의 효모 중 알코올 발효력이 가장 우수한 두 균주를 선별하여 균주의 형태학적, 생리학적 및 배양학적 특성을 조사한 결과 Lodder, Barnet 및 Rij의 분류기준에 따라 *Saccharomyces cerevisiae* 및 *Saccharomyces kluyveri* 또는 그 유연군으로 동정되었다. 이들 균주의 알코올 생성을 위한 최적 조건은 두 균주 모두 배양온도 30℃, 초기 pH 6.0, 진탕속도 120 rpm에서 알코올 발효율이 가장 높았으며 발효율은 *S. cerevisiae* RCY14 및 *S. kluyveri* RCY15가 각각 96.95 및 95.78%이었다. 분리된 두 균주와 현재 산업적으로 알코올 발효에 이용되고 있는 균주들을 사용하여 감 주스에서 알코올 발효율을 비교한 결과 *S. cerevisiae* RCY14와 *S. kluyveri* RCY15가 포도주의 제조에 사용되고 있는 *S. cerevisiae* 701 및 *S. cerevisiae* W3 또는 주정 생산에 사용되고 있는 *S. cerevisiae* Balyon-1보다도 발효율이 더욱 높게 나타났다.

## 참고문헌

1. 정석태. 1995. 2단계 발효에 의한 감식초의 품질향상. 경

북대학교 석사학위 논문.

- 홍정화, 이기민, 허성호. 1996. 저온저장중 품질이 저하된 단감을 이용한 식초의 제조. *J. Korean Soc. Food Nutr.* **25**: 123-128.
- 문광덕, 김종국, 손태화. 1993. 전처리 및 건조방법에 따른 꽃감의 품질변화. *한국식문화학회지.* **8**: 331-336.
- 유태종. 1976. 식품 카르테. 박명사.
- 문광덕, 김종국, 김준한, 오상룡. 1995. 감 과육 및 껍질의 유용성분 및 가공 이용에 관한 연구. *한국식생활문화학회지.* **10**: 321-325.
- Kim, Y. H. and J. H. Seu. 1988. Culture condition for glucoamylase production and ethanol productivity of heterologous transformant of *Saccharomyces cerevisiae* by glucoamylase gene of *Saccharomyces diastaticus*. *Kor. Jour. Appl. Microbiol.* **16**: 494-498.
- Roychoudhury, P. K., T. K. Ghose and G. K. Chotani. 1986. Vapor liquid equilibrium behavior of aqueous ethanol solution during vacuum coupled simultaneous saccharification and fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* **28**: 972-976.
- Lodder, J. 1970. *The Yeasts: a taxonomic study*. North Holland Publishing Co., Amsterdam, Netherlands.
- Barnett, J. A., R. W. Payne and D. Yarrow. 1983. *Yeasts: Characteristics and identification*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Rij, K. 1984. *The Yeasts: a taxonomic study*. Elsevier, Amsterdam, Netherlands.
- Bajpai, P. and A. Margaritis. 1987. The effect of temperature and pH on the ethanol production by free and immobilized cells of *Kluyveromyces marxianus* grown on Jerusalem artichoke extract. *Biotechnol. Bioeng.* **30**: 306-313.
- Strehaiano, P., M. Mota and G. Goma. 1983. Effect of inoculum on kinetics of Alcoholic fermentation. *Biotech. Letters.* **5**: 135-140.
- Alison, M. J. and W. M. Ingedew. 1994. Fuel alcohol production: optimization of temperature for efficient very high gravity fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 1048-1051.
- King, G. and A. Hossain. 1982. The effect of temperature, pH and initial glucose concentration on the kinetics of ethanol production by *Zymomonas mobilis* in bath fermentation. *Biotech. Letters.* **4**: 531-536.
- Park, J. K., S. Y. Park and Y. J. Yoo. 1989. Temperature effects and optimization for ethanol fermentation. *Kor. Jour. Appl. Microbiol. Bioeng.* **17**: 619-623.
- Ohta, K., K. Supanwong and S. Hayashida. 1981. Environmental effects on ethanol tolerance of *Zymomonas mobilis*. *Annual Reports ICME.* **3**: 109-116.

(Received 6 January 1997)