



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0060616
(43) 공개일자 2016년05월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) C12G 3/02 (2006.01)
C12R 1/865 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 1/20 (2013.01)
C12G 3/02 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0056191(분할)
(22) 출원일자 2016년05월09일
심사청구일자 2016년05월09일
(62) 원출원 특허 10-2014-0162751
원출원일자 2014년11월20일
심사청구일자 2014년11월20일

(71) 출원인
경기도
경기도 수원시 팔달구 효원로 1 (매산로3가)
(72) 발명자
강희윤
경기도 화성시 효행로 1076-9 206동 1601호(병점
동, 안화마을우남퍼스트빌)
정재운
경기도 수원시 영통구 광고호수로152번길 23,
2301동 303호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인태동

전체 청구항 수 : 총 2 항

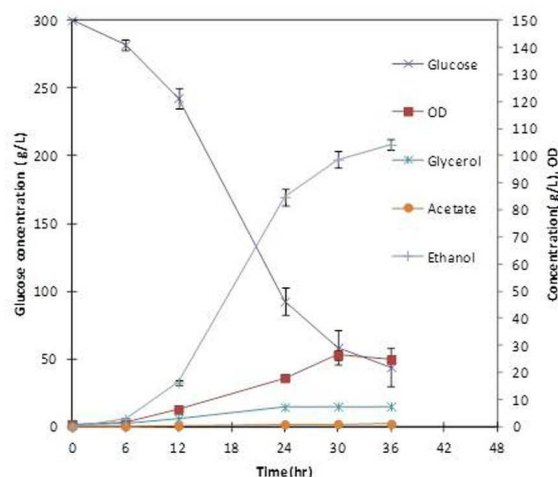
(54) 발명의 명칭 **향미증진 양조용 효모 사카로마이세스 세레비지애 및 이를 이용하여 제조한 발효주**

(57) 요약

본 발명은 향미증진 양조용 효모 사카로마이세스 세레비지애(Saccharomyces cerevisiae) 및 이를 이용하여 제조한 발효주에 관한 것으로, 사카로마이세스 세레비지애 HY2012(RYRR) (기탁번호: KCCM11547P) 및 사카로마이세스 세레비지애(Saccharomyces cerevisiae) HY2013(Y5) (기탁번호: KCCM11548P)를 제공한다.

여기서, 본 발명에 의하면 향미성분을 다량 생성하는 특성을 지는 새로운 양조용 분리 효모 사카로마이세스 세레비지애(Saccharomyces cerevisiae) HY2012(RYRR) (기탁번호: KCCM11547P)를 이용하여 증자발효법으로 제조된 발효주 및 향미성분을 다량 생성하는 특성을 지는 새로운 양조용 분리 효모 사카로마이세스 세레비지애(Saccharomyces cerevisiae) HY2013(Y5) (기탁번호: KCCM11548P) 및 이러한 효모를 이용하여 무증자발효법으로 제조된 발효주를 양조할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12R 1/865 (2013.01)

Y02E 50/17 (2013.01)

(72) 발명자

박인태

경기도 고양시 일산동구 위시티4로 80 107동 2904호 (식사동, 위시티일산자이1단지)

김희동

경기도 화성시 동탄반석로 231 예당마을롯데캐슬아파트

임재욱

경기도 수원시 권선구 권중로 31 303동1002호 (권선동, 신안풍림아파트)

명세서

청구범위

청구항 1

사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*) HY2013(YY5) (기탁번호: KCCM11548P)

청구항 2

사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*) HY2013(YY5) (기탁번호: KCCM11548P)을 이용하여 무증자발효법으로 제조되는 것을 특징으로 하는 발효주.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 향미증진 양조용 효모 사카로마이세스 세레비지애 및 이를 이용하여 제조한 발효주에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 효모는 혐기적 조건에서 에너지를 생산하기 위해 유기화합물들을 분해하는 과정을 수행하게 되고, 이러한 과정의 결과로 알코올, 유기산 및 탄산가스 등이 발생한다. 이러한 효모의 작용 성질을 이용하여 생성되는 알코올은 포도주, 맥주, 막걸리 등의 발효용 주류에 포함되기 때문에 주류제품에 대한 품질 향상에 관련한 연구는 발효에 사용되는 효모에 대한 연구를 통해 이루어질 수 있다.

[0003] 현재 알코올 발효를 통한 주류의 양조에는 사카로마이세스(*Saccharomyces*)속의 효모균들이 다양하게 주류별, 국가별로 구분되어 사용되고 있으며, 이중에서도 알코올 발효능이 높은 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*)는 넓은 이용범위를 가지고 있다.

[0004] 하지만 현재 국내에서 양조되는 다양한 주류에 사용되는 사카로마이세스 세레비지애의 경우, 국내에서 선별된 효모를 사용하지 않고 시판되고 있는 와인생산용 수입 양조효모인 라빠리장(*La Parisienne*) 혹은 퍼미빈(*Fermivin*)을 이용하거나 유래가 불분명한 사카로마이세스 세레비지애를 이용하고 있었다.

[0005] 이러한 시판되고 있는 수입 양조효모를 이용하여 양조하는 종래기술에 대한 선행문헌에는 대한민국 등록특허공보 제10-1392274호의 "레스베라트롤 함량이 증강된 포도주 및 이의 제조방법"(이하, '종래기술'이라고 함)이 있다.

[0006] 주류제품의 발효품질을 결정하는 많은 요소들 중 효모에 의해 생성되는 향미 성분의 종류 및 함량이며, 이러한 주류제품의 발효품을 개선하기 위해서는 종래기술과 같이 수입되어 시판되거나 유래가 불분명한 사카로마이세스 세레비지애보다는 국내 자연계로부터 분리된 효모이면서 향미성분을 다량 생성하는 사카로마이세스 세레비지애를 이용하여 양조하는 것이 요구되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 상기 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로써, 본 발명의 목적은 국내 자연계로부터 분리된 효모이면서 향미성분을 다량 생성하는 양조용 효모를 제공하는데 있다.

[0008] 또한, 본 발명의 다른 목적은 국내 자연계로부터 분리된 효모이면서 향미성분을 다량 생성하는 양조용 효모를 이용하여 제조된 발효주를 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*) HY2012(RYRR)

(기탁번호: KCCM11547P)를 제공한다.

[0010] 상기 다른 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*) HY2013(YY5) (기탁번호: KCCM11548P)를 제공한다.

[0011] 상기 또 다른 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*) HY2012(RYRR) (기탁번호: KCCM11547P)을 이용하여 증자발효법으로 제조된 발효주.

[0012] 상기 또 다른 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*) HY2013(YY5) (기탁번호: KCCM11548P)을 이용하여 무증자발효법으로 제조된 발효주를 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명에 의해, 향미성분을 다량 생성하는 특성을 가지는 새로운 양조용 분리 효모 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*) HY2012(RYRR) (기탁번호: KCCM11547P) 및 이러한 효모를 이용하여 증자발효법으로 제조된 발효주를 제공할 수 있다.

[0014] 또한, 본 발명에 의해, 향미성분을 다량 생성하는 특성을 가지는 새로운 양조용 분리 효모 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*) HY2013(YY5) (기탁번호: KCCM11548P) 및 이러한 효모를 이용하여 무증자발효법으로 제조된 발효주를 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도1은 본 발명에 따른 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*) HY2012(RYRR) (기탁번호: KCCM11547P)의 내당성 실험 결과를 나타낸 그래프이다.

도2는 본 발명에 따른 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*) HY2013(YY5) (기탁번호: KCCM11548P)의 내당성 실험 결과를 나타낸 그래프이다.

도3은 본 발명에 따른 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*) 대조군의 내당성 실험 결과를 나타낸 그래프이다.

도4 및 도5는 본 발명에 따른 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*) HY2012(RYRR) (기탁번호: KCCM11547P)의 분리된 18S rRNA 유전자 서열에 따른 분류학적 계통분류도를 도시하고 있다.

도6 및 도7는 본 발명에 따른 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*) HY2013(YY5) (기탁번호: KCCM11548P)의 분리된 18S rRNA 유전자 서열에 따른 분류학적 계통분류도를 도시하고 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016] 본 발명의 바람직한 실시예에 대하여 첨부된 도면을 참조하여 더 구체적으로 설명하되, 이미 주지된 기술적 부분에 대해서는 설명의 간결함을 위해 생략하거나 압축하기로 한다.

[0017] <사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*) HY2012(RYRR) (기탁번호: KCCM11547P)에 관한 설명>

[0018] 본 발명은 내산성과 당내성이 우수하면서도 발효 시 향미가 풍부한 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*) HY2012(RYRR) (기탁번호: KCCM11547P) 및 이 효모를 이용하여 증자발효법으로 제조되는 발효주에 관한 것으로서, 이에 대해 이하에서 도면을 참조하여 상세하게 설명한다.

[0019] 1. 신규 효모의 선발

[0020] 화성시 소재 논토양의 벚짚으로부터 채취한 시료 10g을 2% 포도당 용액 100ml에 24시간 동안 혼탁배양한 후 1시간 동안 정지시켜 얻은 상층액 10ml를 YPD 배지에 접종시켜 48시간동안 혼탁배양을 수행하였다. 그 후 혼탁 배양한 시료는 YPD고체배지에 도말하여 30℃ 배양기에서 2일간 배양한 뒤 순수 분리하였다.

[0021] 이렇게 분리한 효모 균주들 중에서 내산성과 당내성이 우수하면서도 발효 시 향미가 풍부한 양조용 효모를 선별하기 위해 알코올 첨가 배지를 이용하여 내알코올성 균주 12점을 선별하고, 그 중 형태학적으로 구분이 가능한 효모 5점에 대해 양조발효시험을 수행하였다. 그 결과를 하기 표1에 나타내었다.

표 1

Sample	Alcohol(%)	Sugar(brix)	Acidity(ml)	pH	Scent
3A3YS	17.4	13.05	4.5	4.30	-
RYR1	17.6	11.05	3.8	4.35	-
RYRR	16.1	13.09	4.1	4.31	strong fruit flavour
SY13	16.3	12.39	3.5	4.27	weak flavour
SY72	16.1	12.18	5.9	4.18	weak flavour

표1에 나타나는 바와 같이, 균주 3A3YS 및 균주 RYR1의 경우 본 발명에 따른 균주 RYRR에 비해 알코올 생산능력은 더 높지만 향미에 관한 특성이 전혀 없으며, 결과적으로 높은 알코올 생산능력과 강한 과일향을 내는 향미를 가진 RYRR을 선발하였다.

2. 신규 효모의 동정

분리되어 선발된 균주 RYRR은 18S rRNA 염기서열 분석하였으며, 그 결과 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*)와 99%로 일치함을 확인하였으며, 한국미생물보존센터(Korean culture center of microorganisms)에 국제균주기탁하여 신규의 KCCM11547P로 명명되었다.

여기서, 분석에 사용된 염기서열의 서열목록은 첨부될 서열목록과일에 기재되어 있으며, 이와 같은 염기서열을 이용해 계통분류학적 방법으로 분석한 결과는 도4 및 도5에 도시되어 있다.

여기서, KCCM11547P로 명명된 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*) HY2012(RYRR)의 균주특성은 다음과 같다.

(1) 균의 형태: 흰색~크림색 원형 콜로니, 3x8 μ m의 타원형

(2) 출아: 다면 출아, 30% 이상의 당농도에서도 내당성을 가짐, 제한배지(영양원)에서 군사 발달

(3) 탄소원에 대한 이용성 정도(최대 균체생장조건 내 탄소원 각 20g/L씩)

표 2

Unit : 건조균체량(DCW, Dry Cell Weight) (g/L)

탄소원	0 hour	24 hour	48 hour	72 hour
Fructose	0.05	3.3	4.7	4.6
Glucose	0.05	3.3	5.2	4.5
Sucrose	0.05	3.6	5.1	5.2
Xylose	0.05	1.5	2.4	2.9

3. 신규 효모의 당내성 실험

사카로마이세스 세레비지에 HY2012(RYRR)의 당내성을 확인하기 위해 기본 YPD 액체배지(yeast extract 1%, Bacto peptone 1%, glucose 2%)에서 24시간동안 30℃, 150rpm의 조건하에서 종배양을 한 뒤, 300g/L의 글루코오스(Glucose) 농도의 YPD배지를 당내성 배지로 사용하여 36시간동안 발효하였다.

이렇게 당내성 배지에서 발효된 과정을 거친 뒤, 균체량 측정을 위해 분석용 시료를 5ml을 수집하여 원심분리 후 증류수로 2회 세척하여 스펙트로포토메터 590nm에서 OD(Optical Density)값을 측정하였다.

또한, 에탄올 및 글루코오스 농도측정을 위해 분석용 시료를 원심분리 후 얻은 상층액을 가지고 가스크로마토그래피를 수행하였다.

도1에 도시된 그래프는 사카로마이세스 세레비지에 HY2012(RYRR)의 당내성 실험 결과를 나타낸 것으로, 대조군으로서 수입용 시판 효모인 라빠리장(La Parisienne)의 사카로마이세스 세레비지에를 통해 같은 당내성 실험을 수행한 도3의 그래프와 비교하여 양조용 효모로서의 적합성을 판단할 수 있다.

도1 및 도3을 비교하면, 300g/L의 고농도 배지에서도 사카로마이세스 세레비지에 HY2012(RYRR)는 시판효모보다 당 소비속도, 균체량 및 알코올 생산량이 높게 나타나는 것을 알 수 있다. 특히 배양시간 30시간을 기준으로

로 사카로마이세스 세레비지에 HY2012(RYRR)의 균체량은 두 배 정도 더 높게 측정되었다.

[0038] 이러한 우수한 당내성을 가지는 사카로마이세스 세레비지에 HY2012(RYRR)의 특징은 균체의 안정적 증식이 가능하게 하고, 양조용 효모로서 매우 적합하다는 것을 확인할 수 있다.

[0039] 4. 신규 효모의 내산성 실험

[0040] 사카로마이세스 세레비지에 HY2012(RYRR)의 내산성을 확인하기 위해 기본 YPD 액체배지(yeast extract 1%, Bacto peptone 1%, glucose 2%)에서 24시간동안 30℃, 150rpm의 조건하에서 종배양을 한 뒤, 구연산과 젖산을 통해 pH를 각각 6.3, 4.3, 3.3, 3.0, 2.6, 2.2로 구분하여 형성된 YPD배지들을 내산성 배지들로 사용하여 효모를 접종한 뒤 72시간동안 30℃, 150rpm의 조건하에서 배양하여 균체량의 변화를 측정하였다.

[0041] 균체량 측정은 분석용 시료를 5ml을 수집하여 원심분리 후 증류수로 2회 세척하여 스펙트로포토메터 590nm에서 OD(Optical Density)값을 측정하였다. 그 결과를 하기 표3 및 표4에 나타내었다.

표 3

[0042] Unit : 건조균체량(DCW, Dry Cell Weight) (g/L)

구연산을 통한 배지의 pH	24 hour	48 hour	72 hour
6.37	3.1	4.0	4.0
4.29	4.2	2.5	4.9
3.30	4.1	3.1	4.2
2.90	3.9	2.4	0.7
2.58	3.7	4.1	3.0
2.22	1.4	0.1	0.3

표 4

[0043] Unit : 건조균체량(DCW, Dry Cell Weight) (g/L)

젖산을 통한 배지의 pH	24 hour	48 hour	72 hour
6.25	3.2	4.8	3.1
4.37	2.9	3.3	3.7
3.32	3.0	3.4	2.3
2.98	4.1	3.9	3.3
2.59	2.2	3.3	3.2
2.20	0.2	0.1	0.1

[0044] 표3 및 표4에 나타나는 바와 같이, 사카로마이세스 세레비지에 HY2012(RYRR)는 pH 2 내지 6의 넓은 범위 내에서 생육 가능하며, 시간의 흐름에 따른 생육 정지 정도가 높지 않은 것을 확인할 수 있다. 따라서, 사카로마이세스 세레비지에 HY2012(RYRR)는 우수한 내산성을 가지며, 그 결과 발효과정 초기의 산 조건이 낮더라도 균주의 생육이 가능하여 잡균증식 억제를 통한 발효조건의 안전성을 도모할 수 있다.

[0045] 5. 신규 효모를 통해 제조된 발효주의 양조능력 및 향미 분석

[0046] 균주 사카로마이세스 세레비지에 HY2012(RYRR)의 양조능력 및 향미 분석은 술덧 담금을 통해 확인하였다. 양조 원료로서 쌀을 물로 3회 이상 세미하고, 2시간동안 쌀 부피에 2배가 되는 물에 침지한 후 1시간 동안 탈수한 쌀을 증기에 40분간 쪄 후 냉각시켜 증자한 쌀을 이용하였다.

[0047] 증자한 쌀에 가수량을 쌀의 150%에 해당하는 양으로 설정하고, 추가적으로 당화제(개량누룩 또는 정제효소) 및 YPD배지에서 2일간 혼탁배양한 뒤 원심분리하여 증류수로 1회 세척 한 효모 10^6 CFU/ml를 접종하여 혼합 발효하였다. 그 결과는 하기 표5에 나타난 것과 같다.

표 5

[0048]

증자	acetaldehyde	MeOH	n-propanol	iso-butanol	isoamyl alcohol	Furfural
RYRR	58.70	59.16	38.38	44.61	403.32	0.12
대조군	41.46	68.00	52.84	32.26	299.19	1.21

[0049] 표5에 나타나는 바와 같이, 균주 RYRR는 대조군으로서 사용된 수입용 시판 효모인 라빠리장(La Parisienne)의 사카로마이세스 세레비지애의 실험결과 값과 비교하여 알코올 발효의 과정에서 생성되는 아세트알데히드(Acetaldehyde), 이소부탄올(iso-Butanol), 이소아밀 알코올(isoamyl Alcohol)의 양이 더 증가하여 우수한 양조능력을 가지고 있음을 확인할 수 있다.

[0050] 또한, 미생물에 의한 알코올 발효의 결과 생성되는 향미 성분으로는 부틸 알콜(butyl alcohol), 이소 부탄올(iso-butanol), 2-펜에틸알콜(2-phenethyl alcohol), 에틸아세테이트(ethyl acetate), 이소아밀 알코올(isoamyl alcohol) 등이 알려져 있으나, 그 중에서도 이소 부탄올 및 이소아밀 알코올은 과일향을 내는 향미 성분으로 알려져 있다. 이러한 주요 향미성분의 함량에서 오는 향미의 차이는 발효를 통해 제조된 주류제품의 품질을 규정하는 중요한 지표로서 사용되고 있다.

[0051] 이중에서 특히, 표5에 나타난 이소 부탄올 및 이소아밀 알코올의 함량을 다른 사카로마이세스 세레비지애 균주들을 통해 증자발효법으로 제조된 발효주 내 함량과 비교해본 결과를 하기 표6에 나타내었다. 여기서 대조군으로는 국내 시판효모인 사카로마이세스 세레비지애를 이용하였다.

표 6

[0052]

	Control	RYRR	Fermivin	La Parisienne
iso-butanol	32.26	44.61	35.88	27.03
isoamyl alcohol	299.19	403.32	400.90	250.89

[0053] 표6에 나타나는 바와 같이, 사카로마이세스 세레비지애 HY2012(RYRR)를 이용하여 증자발효법을 통해 제조된 발효주는 향미성분의 함량에서부터 다른 균주들을 이용하여 증자발효법을 통해 제조된 발효주들과 차이를 가진다.

[0054] 즉, 사카로마이세스 세레비지애 HY2012(RYRR)를 이용하여 발효주를 제조할 경우 과일향의 향미가 풍부하여 사용자의 기호도를 증가시킬 수 있으며, 이에 사용되는 균주는 수입되어지는 시판용 효모와 달리 국내에서 쉽게 분리하여 사용할 수 있다.

[0055] <사카로마이세스 세레비지애(Saccharomyces cerevisiae) HY2013(YY5) (기탁번호: KCCM11548P)에 관한 설명>

[0056] 본 발명은 내산성과 당내성이 우수하면서도 발효 시 향미가 풍부한 사카로마이세스 세레비지애(Saccharomyces cerevisiae) HY2013(YY5) (기탁번호: KCCM11548P) 및 이 효모를 이용하여 무증자발효법으로 제조되는 발효주에 관한 것으로서, 이에 대해 이하에서 도면을 참조하여 상세하게 설명한다.

[0057] 1. 신규 효모의 선발

[0058] 화성시 소재 논토양의 벚짚으로부터 채취한 시료 10g을 2% 포도당 용액 100ml에 24시간 동안 혼탁배양한 후 1시간 동안 정치시켜 얻은 상층액 10ml를 YPD 배지에 접종시켜 48시간동안 혼탁배양을 수행하였다. 그 후 혼탁 배양한 시료는 YPD고체배지에 도말하여 30℃ 배양기에서 2일간 배양한 뒤 순수 분리하였다.

[0059] 이렇게 분리한 효모 균주들 중에서 내산성과 당내성이 우수하면서도 발효 시 향미가 풍부한 양조용 효모를 선별하기 위해 알코올 첨가 배지를 이용하여 내알코올성 균주 12점을 선별하고, 그 중 형태학적으로 구분이 가능한 효모 5점에 대해 양조발효시험을 수행하였다. 결과적으로 높은 알코올 생산능력과 강한 과일향을 내는 향미를 가진 YY5를 선발하였다.

[0060] 2. 신규 효모의 동정

[0061] 분리되어 선발된 균주 YY5은 18S rRNA 염기서열 분석하여, 그 결과 사카로마이세스 세레비지애(Saccharomyces cerevisiae)와 99%로 일치함을 확인하였으며, 한국미생물보존센터(Korean culture center of microorganisms)에 국제균주기탁하여 신규의 KCCM11548P로 명명되었다.

[0062] 여기서, 분석에 사용된 염기서열의 서열목록은 첨부될 서열목록파일에 기재되어 있으며, 이와 같은 염기서열을 이용해 계통분류학적 방법으로 분석한 결과는 도6 및 도7에 도시되어 있다.

[0063] 여기서, KCCM11547P로 명명된 사카로마이세스 세레비지애(Saccharomyces cerevisiae) HY2012(RYRR)의 균주특성은 다음과 같다.

- [0064] (1) 균의 형태: 흰색~크림색 원형 콜로니, 3x8 μ m의 타원형
- [0065] (2) 출아: 다면 출아, 30% 이상의 당농도에서도 내당성을 가짐, 제한배지(영양원)에서 군사 발달
- [0066] (3) 탄소원에 대한 이용성 정도(최대 균체생장조건 내 탄소원 각 20g/L씩)

표 7

[0067] Unit : 건조균체량(DCW, Dry Cell Weight) (g/L)

탄소원	0 hour	24 hour	48 hour	72 hour
Fructose	0.05	3.5	5.0	5.1
Glucose	0.05	3.3	5.2	5.0
Sucrose	0.05	3.8	5.1	5.2
Xylose	0.05	1.3	2.2	2.7

[0068] 3. 신규 효모의 당내성 실험

[0069] 사카로마이세스 세레비지에 HY2013(YY5)의 당내성을 확인하기 위해 기본 YPD 액체배지(yeast extract 1%, Bacto peptone 1%, glucose 2%)에서 24시간동안 30℃, 150rpm의 조건하에서 종배양을 한 뒤, 300g/L의 글루코오스(Glucose) 농도의 YPD배지를 당내성 배지로 사용하여 36시간동안 발효하였다.

[0070] 이렇게 당내성 배지에서 발효된 과정을 거친 뒤, 균체량 측정을 위해 분석용 시료를 5ml을 수집하여 원심분리 후 증류수로 2회 세척하여 스펙트로포토미터 590nm에서 OD(Optical Density)값을 측정하였다.

[0071] 또한, 에탄올 및 글루코오스 농도측정을 위해 분석용 시료를 원심분리 후 얻은 상층액을 가지고 가스크로마토그래피를 수행한다.

[0072] 도2에 도시된 그래프는 사카로마이세스 세레비지에 HY2013(YY5)의 당내성 실험 결과를 나타낸 것으로, 대조군으로서 수입용 시판 효모인 라빠리장(La Parisienne)의 사카로마이세스 세리비지애를 통해 같은 당내성 실험을 수행한 도3의 그래프와 비교하여 양조용 효모로서의 적합성을 판단할 수 있다.

[0073] 도2 및 도3을 비교하면, 300g/L의 고농도 배지에서도 사카로마이세스 세레비지에 HY2013(YY5)는 시판효모보다 당 소비속도, 균체량 및 알코올 생산량이 높게 나타나는 것을 알 수 있다. 특히 배양시간 36시간을 기준으로 사카로마이세스 세레비지에 HY2013(YY5)의 균체량은 두 배 정도 더 높게 측정되었다.

[0074] 이러한 우수한 당내성을 가지는 사카로마이세스 세레비지에 HY2013(YY5)의 특징은 균체의 안정적 증식이 가능하게 하고, 양조용 효모로서 매우 적합하다는 것을 확인할 수 있다.

[0075] 4. 신규 효모의 내산성 실험

[0076] 사카로마이세스 세레비지에 HY2013(YY5)의 내산성을 확인하기 위해 기본 YPD 액체배지(yeast extract 1%, Bacto peptone 1%, glucose 2%)에서 24시간동안 30℃, 150rpm의 조건하에서 종배양을 한 뒤, 구연산과 젖산을 통해 pH를 각각 6.3, 4.3, 3.3, 3.0, 2.6, 2.2로 구분하여 형성된 YPD배지들을 내산성 배지들로 사용하여 효모를 접종한 뒤 72시간동안 30℃, 150rpm의 조건하에서 배양하여 균체량의 변화를 측정하였다.

[0077] 균체량 측정은 분석용 시료를 5ml을 수집하여 원심분리 후 증류수로 2회 세척하여 스펙트로포토미터 590nm에서 OD(Optical Density)값을 측정하였다. 그 결과를 하기 표8 및 표9에 나타내었다.

표 8

[0078] Unit : 건조균체량(DCW, Dry Cell Weight) (g/L)

구연산을 통한 배지의 pH	24 hour	48 hour	72 hour
6.37	3.0	4.3	4.4
4.29	3.2	3.9	4.8
3.30	3.2	4.3	4.5
2.90	3.2	3.0	3.8
2.58	2.9	3.3	3.7
2.22	0.5	0.1	0.1

표 9

[0079]

Unit : 건조균체량(DCW, Dry Cell Weight) (g/L)

젖산을 통한 배지의 pH	24 hour	48 hour	72 hour
6.25	3.7	4.0	4.3
4.37	4.5	5.0	4.3
3.32	4.7	5.5	4.1
2.98	3.0	4.1	4.2
2.59	2.1	2.4	3.0
2.20	0.1	0.1	0.1

[0080]

표8 및 표9에 나타나는 바와 같이, 사카로마이세스 세레비지에 HY2013(YY5)는 pH 2 내지 6의 넓은 범위 내에서 생육 가능하며, 시간의 흐름에 따른 생육 정지 정도가 높지 않은 것을 확인할 수 있다. 따라서, 사카로마이세스 세레비지에 HY2013(YY5)는 우수한 내산성을 가지며, 그 결과 발효과정 초기의 산 조건이 낮더라도 균주의 생육이 가능하여 잡균증식 억제를 통한 발효조건의 안전성을 도모할 수 있다.

[0081]

5. 신규 효모를 통해 제조된 발효주의 양조능력 및 향미 분석

[0082]

균주 사카로마이세스 세레비지에 HY2013(YY5)의 양조능력 및 향미 분석은 술덧 담금을 통해 확인하였다. 양조 원료로서 쌀을 물로 3회 이상 세미하고, 2시간동안 쌀 부피에 2배가 되는 물에 침지한 후 1시간 동안 탈수한 무증자 쌀을 이용하였다.

[0083]

무증자 쌀에 가수량을 쌀의 150%에 해당하는 양으로 설정하고, 추가적으로 당화제(개량누룩 또는 정제효소) 및 YPD배지에서 2일간 혼탁배양한 뒤 원심분리하여 증류수로 1회 세척 한 효모 10^6 CFU/ml를 접종하여 혼합 발효하였다. 그 결과는 하기 표10에 나타난 것과 같다.

표 10

[0084]

증자	acetaldehyde	MeOH	n-propanol	iso-butanol	isoamyl alcohol	Furfural
YY5	43.92	115.76	51.07	53.05	522.19	0.10
대조균	40.30	116.01	36.75	36.30	441.59	0.04

[0085]

표10에 나타나는 바와 같이, 균주 YY5는 대조균으로서 사용된 수입용 시판 효모인 라빠리장(La Parisienne)의 사카로마이세스 세레비지에의 실험결과 값과 비교하여 알코올 발효의 과정에서 생성되는 아세트알데히드(Acetaldehyde), n-프로판올(n-propanol), 이소부탄올(iso-Butanol), 이소아밀 알코올(isoamyl Alcohol)의 양이 더 증가하여 우수한 양조능력을 가지고 있음을 확인할 수 있다.

[0086]

또한, 미생물에 의한 알코올 발효의 결과 생성되는 향미 성분으로는 부틸 알콜(butyl alcohol), 이소 부탄올(iso-butanol), 2-펜에틸알콜(2-phenethyl alcohol), 에틸아세테이트(ethyl acetate), 이소아밀 알코올(isoamyl alcohol) 등이 알려져 있으나, 그 중에서도 이소 부탄올 및 이소아밀 알코올은 과일향을 내는 향미 성분으로 알려져 있다. 이러한 주요 향미성분의 함량에서 오는 향미의 차이는 발효를 통해 제조된 주류제품의 품질을 규정하는 중요한 지표로서 사용되고 있다.

[0087]

이중에서 특히, 표10에 나타난 이소 부탄올 및 이소아밀 알코올의 함량을 다른 사카로마이세스 세레비지에 균주들을 통해 무증자발효법으로 제조된 발효주 내 함량과 비교해본 결과를 하기 표11에 나타내었다. 여기서 대조균으로는 국내 시판효모인 사카로마이세스 세레비지에를 이용하였다.

표 11

[0088]

	Control	YY5	Fermivin	La Parisienne
iso-butanol	36.30	53.05	33.05	37.30
isoamyl alcohol	441.59	522.19	446.52	427.46

[0089] 표11에 나타나는 바와 같이, 사카로마이세스 세레비지에 HY2013(YY5)를 이용하여 무증자발효법을 통해 제조된 발효주는 향미성분의 함량에서부터 다른 균주들을 이용하여 무증자발효법을 통해 제조된 발효주들과 차이를 가진다.

[0090] 즉, 사카로마이세스 세레비지에 HY2013(YY5)를 이용하여 발효주를 제조할 경우 과일향의 향미가 풍부하여 사용자의 기호도를 증가시킬 수 있으며, 이에 사용되는 균주는 수입되어지는 시판용 효모와 달리 국내에서 쉽게 분리하여 사용할 수 있다.

[0091] 본 발명에 개시된 실시예는 본 발명의 기술 사상을 한정하기 위한 것이 아니라 설명하기 위한 것이고, 이러한 실시예에 의해서 본 발명의 기술 사상의 범위가 한정되는 것은 아니다. 보호범위는 아래 청구범위에 의하여 해석되어야 하며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 기술 사상은 본 발명의 권리 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 할 것이다.

수탁번호

[0092]

기탁기관명 : 한국미생물보존센터

수탁번호 : KCCM11547P

수탁일자 : 20140618

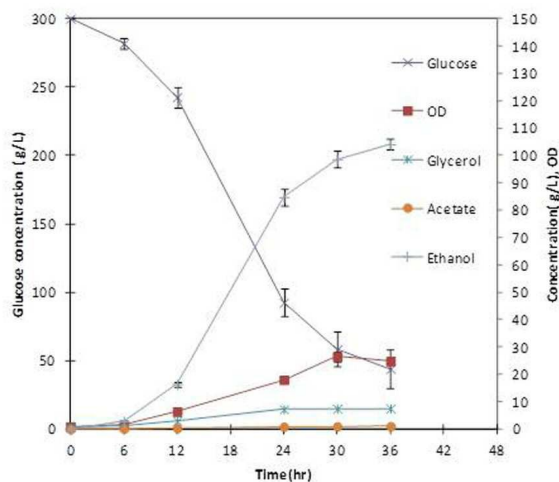
기탁기관명 : 한국미생물보존센터

수탁번호 : KCCM11548P

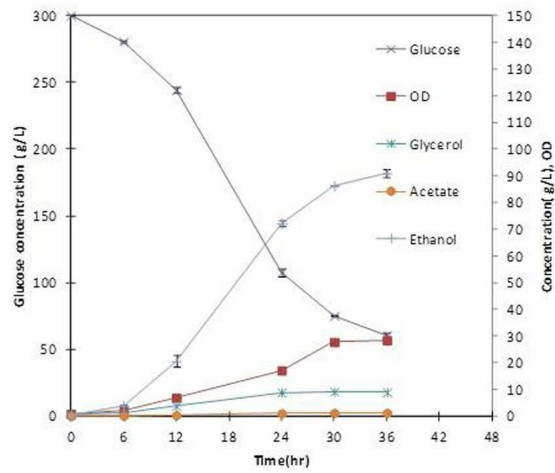
수탁일자 : 20140618

도면

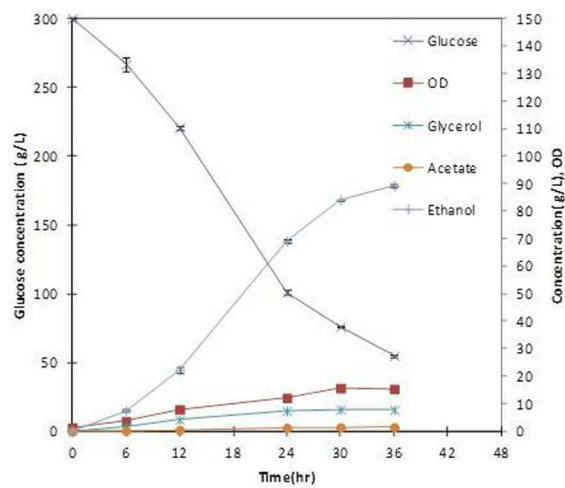
도면1



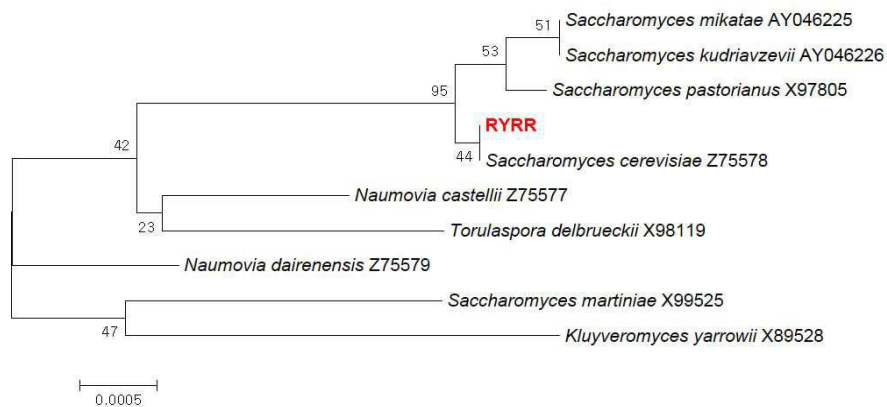
도면2



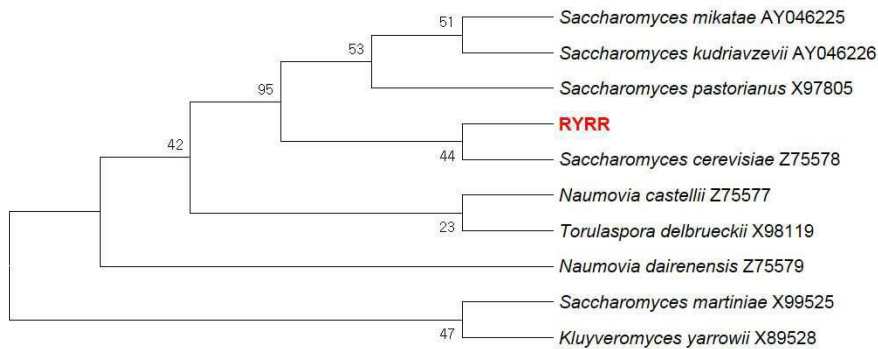
도면3



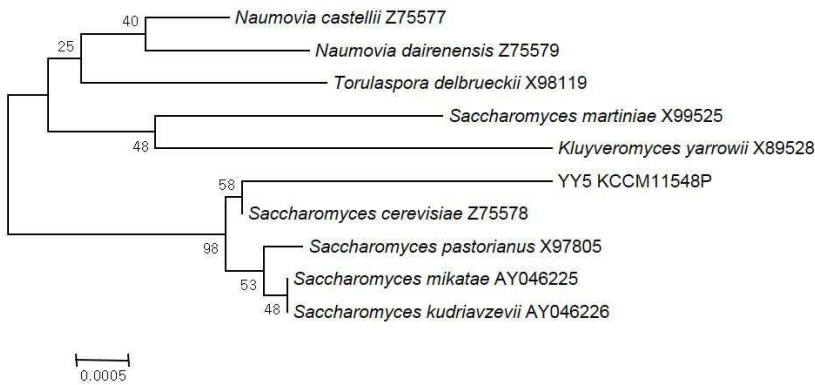
도면4



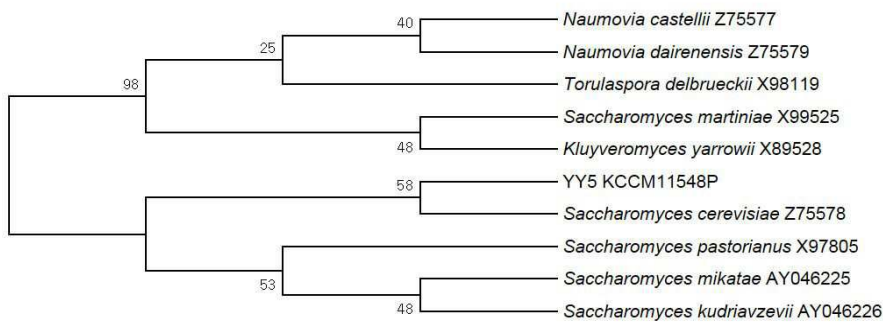
도면5



도면6



도면7



서열 목록

- <110> GyeongGi-Do
- <120> Flavour-enhancing yeast *Saccharomyces cerevisiae* and brewed alcohol made therewith
- <130> P2014-090-1
- <160> 2
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1

<211> 1662

<212> RNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae* HY2012(RYRR) 18S rRNA

<400> 1

```

agtataagca atttatacag tgaactgcg aatggctcat taaatcagtt atcgtttatt      60
tgatagtacc ttactacat ggtataactg tgtaattct agagctaata catgcttaaa      120
atctcgaccc ttggaagag atgtatttat tagataaaaa atcaatgtct tcggactctt      180

tgatgattca taataacttt tcgaatcgca tggccttggt ctggcgatgg ttcattcaaa      240
tttctgccct atcaactttc gatggttagga tagtggccta ccatggtttc aacgggtaac      300
ggggaataag ggttcgattc cggagaggga gcctgagaaa cggctaccac atccaaggaa      360
ggcagcaggc gcgcaaatta cccaatccta attcaggag gtagtgacaa taaataacga      420
tacagggcc attcgggtct tgtaattgga atgagtacaa tgtaataacc ttaacgagga      480
acaattggag ggcaagtctg gtgccagcag ccgcggtaat tccagctcca atagcgtata      540
ttaaagtgtg tgcagttaaa aagctcgtag ttgaactttg ggcccgttg gccggtcgga      600

tttttcgtg tactggattt ccaacggggc ctttccttct ggctaacctt gagtcttgt      660
ggctcttgcc gaaccaggac ttctactttg aaaaatttag agtgttcaaa gcaggcgat      720
tgctcgaata tattagcatg gaataataga ataggacgtt tggttctatt ttgttggttt      780
ctaggacat cgtaatgatt aatagggacg gtccggggca tcagtattca attgtcagag      840
tgaaattct tggattttat gaagactaac tactgcgaaa gcatttgcca aggacgttt      900
cattaatcaa gaacgaaagt taggggatcg aagatgatca gataccgtcg tagtcttaac      960
cataaactat gccgactagg gatcgggtgg tgttttttta atgaccact cggcacctta      1020

cgagaaatca aagtccttgg gttctggggg gattatggtc gcaaggctga aacttaaagg      1080
aattgacgga agggcaccac caggagtga gcctgcggct taatttgact caacacgggg      1140
aaactacca ggtccagaca caataaggat tgacagattg agagctcttt ctgattttg      1200
tgggtggtgg tgcatggcgg ttcttagttg gtggagtgat ttgtctgctt aattgcgata      1260
acgaacgaga ctttaacct ctaaatagt gtgctagcat ttgttggtta tccacttctt      1320
agagggacta tcggtttcaa gccgatgaa gttgaggca ataacaggtc tgtgatgccc      1380
ttagacgttc tgggccgcac gcgcgctaca ctgacggagc cagcgagtct aaccttggcc      1440

gagaggtctt ggtaactctg tgaactccg tcgtgctggg gatagagcat tgtaattatt      1500
gtctttcaac gaggaattcc tagtaagcgc aagtcacag cttgcgttga ttacgtccct      1560
gccctttgta cacaccgccc gtcgctagta ccgattgaat ggcttagtga ggcctcagga      1620

```

tctgcttaga gaagggggca actccatctc agagcggaga at 1662

<210> 2

<211> 1707

<212> RNA

<213> Saccharomyces cerevisiae HY2013 (YY5) 18S rRNA

<400> 2

catgtctagt atagcattta tacagtgaaa ctgcgaatgg gctcatttaa atcagttatc 60

gtttatttga tagttccttt actacatagg tataactcgt ggtaattcta gagctaatac 120

atgcttaaaa tctcgaccct ttggaagaga tgtatttatt agataaaaa tcaatgtctt 180

cggactcttt gatgattcat aataactttt cgaatcgcac gcccttgtgc tggcgtatgt 240

tcattcaaat ttctgccta tcaactttcg atggtaggat agtggcctac catggtttca 300

acgggtaacg gggaataagg gttcgattcc ggagaggag cctgagaaac ggctaccaca 360

tccaaggaag gcagcaggcg cgcaaatc ccaatcctaa ttcaggagg tagtgacaat 420

aaataacgat acagggccca ttccgggtctt gtaattggaa tgagtacaat gtaaatacct 480

taacgaggaa caattggagg gcaagtctgg tgccagcagc cgcggttaatt ccagctccaa 540

tagcgtatat taaagtgtt gcagttaaaa agctcgtagt tgaactttgg gcccggttgg 600

ccggtccgat ttttcgtgt actggatttc caacggggcc tttcttctg gctaacttgg 660

agtccttgtg gctcttggcg aaccaggact ttactttga aaaaattaga gtgttcaaag 720

caggcgtatt gctcgaatat attagcatgg aataatagaa taggacgttt ggttctatct 780

tggttggttc taggaccatc gtaatgatta ataggacgg tcgggggcat cagtattcaa 840

ttgtcagagg tgaaattctt ggatttattg aagactaact actgcgaaag catttgccaa 900

ggacgttttc attaatcaag aacgaaagt aggggatcga agatgatcag ataccgtcgt 960

agtcttaacc ataaactatg ccgactaggg atcgggtggg gtttttttaa tgaccactc 1020

ggcaccttac gagaatcaa agtctttggg ttctgggggg agtatggtcg caaggtgaa 1080

acttaagga attgacgaa gggcaccacc aggagtggag cctgcggctt aatttgactc 1140

aacacgggga aactcaccag gtccagacac aataaggatt gacagattga gagctctttc 1200

ttgattttgt ggggtggtgt gcatggccgt tcttagttgg tggagtatt tgtctgctta 1260

attgcgataa cgaacgagac cttaacctac taaatagtgg tgctagcatt tgctggttat 1320

ccacttctta gagggactat cggtttcaag ccgatggaag tttgaggcaa taacaggtct 1380

gtgatccct tagacgttct gggccgcacg cgcgtacac tgacggagcc agcaggtcta 1440

accttggccg agaggtcttg gtaatcttgi gaaactccgt cgtgctgggg atagagcatt 1500

gtaattattg ctcttcaacg aggaattcct agtaagcgca agtcatcagc ttgcgttgat	1560
tacgtccctg ccctttgtac acaccgcccg tcgctagtag cgattgaatg gcttagtgag	1620
gcctcaggat ctgcttagag aagggggcaa ctccatctca gagcggagaa ttggacaaa	1680
cttggtcatt agagaactaa agtcgta	1707