

Effects of different drying methods on fermentation characteristics and viability of cold-adaptive yeast

Seong Yeol Baek, Ji-Young Mun, Soo-Hwan Yeo*

Department of Agro-food Resource, National Institute of Agricultural Science, RDA, Wanju 55365, Korea

저온 적응성 효모의 보존방법에 따른 균체의 생존율 및 발효특성

백성열 · 문지영 · 여수환*

농촌진흥청 국립농업과학원 농식품자원부

Abstract

The quality characteristics of *Yakju* and survival rate of yeast were investigated by modifying the drying method for the cold adapted yeast strain *Saccharomyces cerevisiae* Y297 (SCY297). Viability and fermentation characteristics of the freeze-dried, air blast-dried, and liquid SCY297 cultures were compared after storing them at 25°C. In addition, 5% skimmed milk, α -lactose, or trehalose was added as a protective agent for examining the effects of drying methods. During the 15-week storage period, the liquid and freeze-dried SCY297 cultures containing a protective agent showed a survival rate of 80%. However, the air blast-dried SCY297 culture showed 80% survival rate only in the skimmed milk supplemented group. Compared to the untreated cells, the acidity and amino acidity of *Yakju* prepared using freeze-dried or air blast-dried cultures of SCY297 increased by 2 fold and 5.7 fold respectively, while the alcohol content decreased by 5.07%. Compared to the untreated cells, the pH and amino acidity of *Yakju* prepared using the liquid culture of SCY297 increased by 1.5 fold and 2.5 fold respectively. Although the alcohol content decreased by 2.9%, decrease rate was lower than that observed for the freeze-dried and air blast-dried yeast cultures. Therefore, the results of this study showed that using a liquid starter culture was more advantageous than using the conventional solid culture.

Key words : *Saccharomyces cerevisiae*, fermentation, viability, drying, starter

서 론

우리나라 전통주의 하나인 약주는 찹쌀, 멥쌀 등의 곡류에 누룩을 첨가하여 당화와 발효가 동시에 진행되는 병행복발효주이다. 약주는 발효 중 미생물이 생산한 효소에 의해 유기산, 휘발성 향기성분, 생리활성물질과 당분이 생겨나 독특한 맛과 향을 가진다. 최근, 탁·약주 제조에서 알코올뿐만 아니라 맛과 향에 대한 관심이 높아지고 있으며, 이를 매개하는 효모의 중요성이 대두되고 있다(1).

국내 대부분의 주류 제조사는 수입산 효모 종균인 *Saccharomyces cerevisiae* Fermivin(프랑스), *S. cerevisiae* W-3(일본), *S. cerevisiae* EC1118(캐나다) 등 와인용 또는 제빵용 효모를 사용하고 있다. 수입 종균은 사용하기가 편리하고 주질이 안정적으로 유지되는 장점이 있어 주류업체에서 선호하는 실정이다. 최근 보고된 연구에 따르면 국내에서 분리된 토착 효모가 우리 술을 만드는데 기여할 수 있음을 보고하였다(2,3). 우리나라를 대표하는 탁·약주가 수입산 주류보다 경쟁력과 차별성의 우위를 점하기 위해서는 수입 효모 대신 한국산 유용 효모를 분리하여 사용할 필요가 있다(4,5). 따라서 탁·약주 생산을 위한 첫걸음은 가장 한국적인 효모 종균(스타터)을 개발하여 현장적용을 거친 후, 농산업체에 기술이전을 통한 국산 종균의 보급을 높이는데 있다.

발효미생물은 나름대로 균주별 고유의 특성을 가지고

*Corresponding author. E-mail : yeobio@korea.kr
Phone : 82-63-238-3610, Fax : 82-63-238-3843
Received 27 September 2017; Revised 8 November 2017;
Accepted 9 November 2017.
Copyright © The Korean Society of Food Preservation. All rights reserved.

있지만 내외부 환경변화로 인해 본래의 특성을 잃어버리기 쉽다. 따라서 산업적으로 이용하기 위해서는 무엇보다도 변이가 없는 종균의 안정성이 요구된다. 이러한 종균을 개발하기 위한 가장 중요한 요소로써 세포 생존을 유지, 장기 저장 용량 및 건조 방법 등이 있다. 미생물 고유의 특성 유지와 종균의 산업적 활용 빈도를 높이기 위해, 미생물의 동결 건조법(6), 유동층 건조(7) 및 분무 건조법(8) 등 다수의 연구 결과들이 보고되었다. 현재 시판되는 다수의 산업용 효모 제품은 발효액을 동결 감압시킨 후 얼음의 승화에 의해 수분을 제거하는 동결 건조법을 이용한다. 이와 같은 방법은 다른 건조 방법에 비해 물리적 구조의 복원성과 화학적 안정성의 특징을 가지고 있지만(9) 건조 시간이 길고 종균의 재생을 저하뿐만 아니라 에너지와 비용이 많이 투입되기 때문에 제품화를 위한 기술로는 문제점을 가지고 있다(10). 유동층 건조 및 분무 건조의 경우는 건조 중 고온으로 인한 스타터 배양균의 생존력이 낮기 때문에 적합하지 않다. 하지만, 송풍 건조는 비용을 낮추어 세포 손상을 적게 유도하고 다른 건조 방법(11)과 비교하여도 초기 수분 조절이 용이하고 복원 결과, 재생률이 높아 국내외 종균업체에서 널리 사용하고 있는 대표적인 방법 중 하나이다. 또한 액상 종균은 저장 능력에 대한 한계, 특정 포장과 취급에 대한 단점을 가지지만, 건조과정을 거치지 않아 비용을 낮추는 점과 발효기간 단축으로 다양한 미생물에 적용 가능한 것이 장점으로 알려져 있다(12).

본 연구에서는 저온 적응성 효모의 액체 종균제조 가능성을 높이기 위하여 기존에 알려진 동결건조와 송풍건조 방법으로 제형화하여 액체 종균과 비교하였으며 이들 효모의 장기 저장에 따른 생존율과 발효 특성 등을 조사하였다.

재료 및 방법

효모 균주 및 재료

본 실험에서 사용한 균주는 선행 연구에서 선발된 효모로 한국농업미생물유전자원센터(KACC)에 등록한 것으로 15°C에서 생육정도가 높은 *Saccharomyces cerevisiae* Y297 (KACC93244P, SCY297)를 사용하였다(13). 실험에 사용된 효모는 yeast extract 1%, peptone 2%, dextrose 2%(YPD, BD, Franklin Lakes, NJ, USA) 액체배지에 배양 후, 20%

glycerol을 첨가하여 -80°C에서 보관하여 사용하였다. 약주 제조에 사용한 백국은 (주)조은곡식(경기도 화성시)에서 구입하였고, 멥쌀은 2014년 9월 경기도 철원에서 채배된 오대미를 사용하였다. 정제효소는 (주)충무발효에서 구입하여 약주제조에 사용하였다.

쌀 당화액 제조

쌀 당화액은 멥쌀을 세척하고 약 2시간 동안 물에 침지한 후, 1시간 물 빼기를 하였다. 멥쌀을 1시간 동안 증자한 후에 냉각하였다. 멥쌀 6 kg을 기준으로 5 L의 플라스틱 통에 각각 고두밥 3 kg과 입국(Koji, Joengoksik Co., Ltd, Hwaseong, Korea) 540 g 넣은 후, 물 4.5 L 첨가하여 잘 혼합하여, 40°C에서 3일간 발효한 후, 쌀 당화액으로 사용하였다(Fig. 1). 쌀 당화액은 고압증기멸균기를 이용하여 121°C에서 15분간 멸균하였다.

합성배지 및 쌀 당화액에서 효모의 생육도 조사

시험균으로써 합성배지인 YPD(Con), 합성배지에 2% 효모 추출물(YPD+YE), 합성배지에 2% 펩톤(YPD+P), 합성배지에 2% 텍스트로오스(YPD+D), 쌀 당화액(SM), 쌀 당화액에 2% 효모 추출물과 2% 펩톤을 각각 첨가한 액(SM+YE+P) 10 mL에 전배양액 SCY297 효모를 0.1% 접종하여 30°C에서 24시간 진탕배양한 후, 생균수를 측정하였다.

효모 제형화 방법

쌀 당화액 배지(750 mL)에 SCY 297의 접종량은 전배양액 30 mL으로 접종하였으며, 진탕배양기(Wisdom®WIS-20R, Daihan Scientific Co., Ltd., Wonju, Korea)로 25°C에서 48시간 동안 120 rpm으로 배양하였다. 배양 후, 12,000 rpm, 7 min 조건에서 원심분리(VS-24SMTi, VISION SCIENTIFIC Co., Ltd., Hwaseong, Korea)를 하였다. 액체 제형은 효모 배양 농축액량을 300 mL로 하였으며, 각각의 부형제(α -lactose, trehalose, skim milk) 5%를 혼합한 후, falcon tube에 40 mL씩 담아 25°C에 저장하였다.

동결건조 제형은 각각의 액체 제형(무처리, 5% 알파 락토오스, 5% 트레할로오스, 5% 스킴 밀크)을 specimen cup(SPL life Science Co., Ltd., Pocheon, Korea) 용기에 90 mL씩 넣은 후, 초저온냉동고(ilShin® DF8517, IlShinBioBase Co., Ltd., Yangju, Korea)에 24시간 보관하였다. 특히,

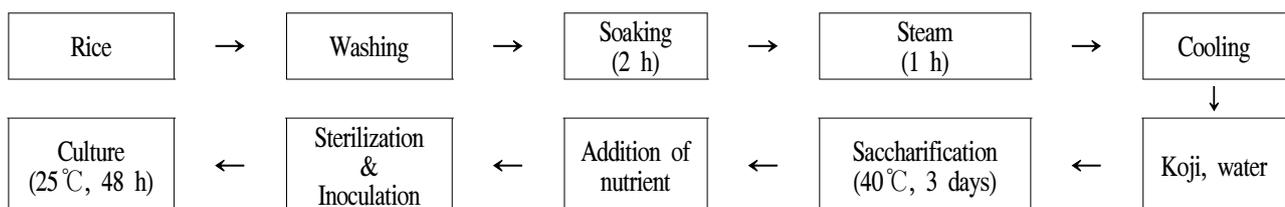


Fig. 1. Schematic processing of rice saccharified medium.

specimen cup의 위 표면을 호일로 포장하여 공기가 통과할 수 있도록 하고 시료를 넣어 8일 동안 동결건조(-75°C)를 하였다. 동결건조 후, 시료는 25°C에 저장하였다.

송풍건조 제형은 각각의 액체 제형(무처리, 5% 알파 락토오스, 5% 트레할로오스, 5% 스킵 밀크)을 specimen cup 용기에 40 mL씩 넣은 후, 용기의 위 표면을 랩핑 한 다음, 공기가 통할 수 있도록 구멍을 만들었다. 중력대류식 방법으로 온도를 40°C에서 2일간 건조한 후에 25°C에 저장하였다.

생존율 측정

효모 균체의 생존율을 측정하기 위해, 건조 전 배양액 1.0 mL를 적절한 배수로 희석하여 YPD 고체배지에 100 µL를 분주하여 도말한 후, 30°C에서 48시간 배양하여, 형성된 콜로니를 계수하여 colony forming unit을 대수함수(log CFU/mL)로 나타내어 초기 균수로 정하였다. 액체 및 건조 균체 또한 위와 같은 방법으로 균수를 측정하여 다음과 같은 방정식으로 각각의 생존율을 측정하였다(14).

$$\text{생존율(\%)} = \frac{\text{액체 및 건조된 균수}(N_t)}{\text{초기 균수}(N_0)} \times 100$$

약주 담금 및 발효

멤쌀 1 kg을 씻어 2시간 동안 물에 담근 다음, 물 빼기와 증자를 각각 1시간 한 후, 냉각하였다. 2 L 용기에 고두밥과 입국 180 g, 정제효소(Choongmoo Fermentation Co., Ltd., Ulju, Korea) 1 g, 담금수 1.5 L를 넣은 후, 각각의 건조 효모(동결, 송풍 및 액체)를 쌀 당화액에 전배양하여 중량의 1%를 접종하여 20°C에서 14일간 발효하였다. 제조된 밑술은 원심분리 후, 분석용 시료로 사용하였다.

이화학 분석

pH는 시료 10 mL를 취하여 pH meter(FE20, Mettler Toledo, Switzerland)로 측정하였으며, 적정산도는 시료 5 mL에 1% 페놀프탈레인 지시약을 2-3방울 떨어뜨린 후, pH가 8.3이 될 때까지 0.1 N NaOH 용액으로 적정하여 acetic acid(%)로 환산하였다. 고형분 함량은 당도계

(ATAGO Pocket PAL-1, ATAGO Co., Tokyo, Japan)를 사용하여 측정하였다. 아미노산도는 시료 10 mL에 1% 페놀프탈레인 지시약 2-3방울을 가하고 0.1 N NaOH 용액으로 중화한 후 중성포르말린 용액 5 mL를 넣고 0.1 N NaOH 용액으로 담홍색이 될 때까지 적정하여 측정하였다(15). 알코올 함량은 시료 100 mL를 취하여 증류수 100 mL를 가한 후, 가열 증류를 통하여 80 mL의 증류액을 얻었다. 이를 증류수로 100 mL 정용한 다음, 비중계로 알코올 도수(%)와 온도를 측정하고 국세청 보정표를 이용하여 환산하였다(16).

통계처리

실험 결과의 통계처리는 평균(mean)과 표준편차(SD)로 표시하였고 SPSS 12.0(SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 통계 프로그램을 이용하여 일원배치 분산분석을 사용하여 p<0.05 수준에서 Duncan's multiple range test(DMRT)로 평균 간 다중비교를 하였다.

결과 및 고찰

합성배지와 쌀 당화액 배지의 효모 생육도

본 연구에 사용한 저온 적응성 효모 SCY 297을 상업용 종균으로 만들기 위해서는 짧은 시간에 균수를 높이는 것이 중요하다. 미생물 배양에 널리 사용되는 합성배지(YPD)를 기준으로 쌀을 당화한 당화액, 그리고 일부 영양원을 첨가하였을 때 효모 개체수가 증가하는 정도를 Table 1에 나타내었다. 합성배지의 경우 5.59 log CFU/mL, 쌀 당화액은 5.86 log CFU/mL로 쌀 당화액에서 효모 개체수가 높게 나타난 것을 알 수 있었다. 합성배지에 미생물 생육 영양원인 효모 추출물, 펩톤, 덱스트린을 각각 2% 첨가하였을 때, 효모의 생육은 5.89, 5.97 및 6.04 log CFU/mL로 증가하였다. 쌀 당화액에 효모 추출물, 펩톤을 첨가하여 배양한 결과, 6.14 log CFU/mL로 대조구인 합성배지보다 10%, 쌀 당화액보다 2% 높게 나타났다. 쌀 당화액이 합성배지보다 효모의 생육에 필요한 다양한 영양분을 함유한 것으로 보인다. 특히, 쌀 당화액에 질소원을 첨가하면 효모의 생육이 더욱 촉진하는 것을 알 수 있었다. 현재, 국내에서는 쌀

Table 1. Viable yeast cell counts of cold adaptive SCY297 cultured in synthetic medium (YPD) and saccharified medium

Con (YPD)	Viable yeast cell counts (log CFU/mL)				
	YPD + Yeast extract ³⁾	YPD + Peptone ⁴⁾	YPD + Dextrose ⁵⁾	Saccharified medium	Saccharified medium +YE ³⁾ +P ⁴⁾
5.59±0.040 ^{1a2)}	5.89±0.066 ^b	5.97±0.080 ^{bc}	6.04±0.056 ^c	5.86±0.114 ^b	6.14±0.040 ^d

¹⁾Data are means±SD (n=3).

^{2)a-d}Means in a row by different superscripts are significantly different at 5% significance level by Duncan's multiple range test.

³⁾⁻⁵⁾Yeast extract (YE), peptone (P), dextrose were added at 2%, respectively.

당화액을 이용하여 효모를 상업적으로 배양하고 있진 않다. 하지만 최근, 제빵에 사용되는 효모를 쌀을 이용한 발효액 제조에 사용하는 시도가 이루어지고 있다(17). 실험실 조건에서는 쌀을 이용한 발효액종이나 효모 발효액 제조가 가능하나, 산업적으로 대규모 생산하기 위해서는 원료의 경제성, 공정의 효율성 등에 대한 검토가 필요한 것으로 판단된다.

제형화 및 저장기간에 따른 효모 생존율 변화

저온 적응성이 뛰어난 효모 SCY 297의 산업용 증균제로 제조하기 위하여 동결건조, 송풍건조, 액체 형태 등 다양한 제형 조건으로 25°C에서 15주간 저장에 따른 효모 생존율을 생균수로 측정하여 조사하였다. 또한 부형제 종류별(스킴밀크, 알파 락토오스, 트레할로오스)로 각각 5%씩 첨가하여 SCY 297 효모의 생존율을 측정하였다. 동결건조 방법으로 효모를 제형화한 후, 저장 기간과 부형제 종류에 따른 생존율 측정 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 부형제 무첨가 상태로 동결 건조한 경우, 4주 차 생균수는 5.99 log CFU/mL, 상대적 생존율은 95.6%로 높게 나타났다. 하지만 15주 차 생균수는 1.43 log CFU/mL, 상대적 생존율은 22.9%로 저장 기간이 오래될수록 효모의 생존율이 저하되었다. 부형제인 스킴밀크를 사용하였을 때, 15주 차 생균수는 5.17 log CFU/mL, 상대적 생존율은 82.3%로 부형제 무첨가보다 약 4배의 높은 생존율을 나타내었다. 또한 알파 락토오스 및 트레할로오스 부형제 첨가시 상대적 생존율이 각각 73.9%, 79.9%로 나타난 것으로 보아 부형제의 사용이 효모의 생존

율에 큰 영향을 미치는 것으로 확인하였다. 균주를 동결건조 할 때, 세포벽 파괴 방지를 위해 부형제인 스킴밀크를 대부분 사용하며 이들의 농도는 5-10% 내외로 첨가한 것이 미생물 생존율 향상에 도움이 된다고 보고하였다(18). 또한 Abadias 등(9)은 부형제로 당 종류 중 갈락토오스, 락토오스, 트레할로오스 및 라피노오스의 5-10% 농도에서 *Candida sake*의 동결건조시 생존율을 높은 것으로 보고하였다. 건조에 대한 생존율을 높이기 위해서는 균주마다 적합한 당의 선정이 중요한 것으로 보여진다.

송풍건조 방법으로 효모를 제형화한 후, 저장 기간과 부형제에 따른 효모 생존율 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 부형제 무첨가의 경우, 4주 차 생균수는 5.97 log CFU/mL, 상대적 생존율은 96.8%로 동결건조한 생균수와 차이가 없었다. 하지만 15주 차 생균수가 측정되지 않아 장기저장에 부적합한 것으로 판단된다. 또한 알파 락토오스, 트레할로오스 부형제 첨가군에서도 효모가 생육되지 않아 송풍건조시 장기저장에 적합하지 않은 부형제로 판단된다. 부형제 중 스킴 밀크만이 15주 차에 생균수가 측정되어 5.11 log CFU/mL, 상대적 생존율은 82.3%로 나타났으며, 동결건조에 의한 생존율과 유사하였다. Lee 등(18)은 *S. cerevisiae* D8 균주는 송풍 건조시 가장 높은 생존율에 영향 주는 부형제로 트레할로오스(생존율 97.5%)이며, *Hanseniaspora uvarum* S6은 슈크로오스(생존율 92.6%)라고 보고하였다. 이는 효모 균주마다 가지는 특성의 차이와 제조조건에 따라 맞춤형 부형제가 필요한 것을 알 수 있다.

액체 방법으로 효모를 제형화한 후, 저장 기간과 부형제

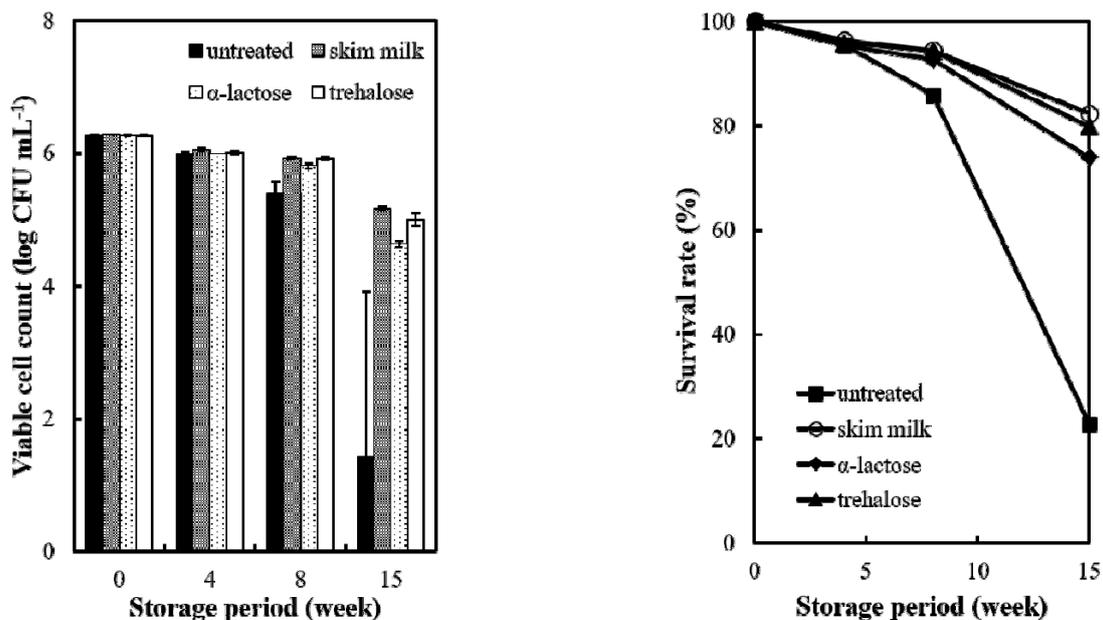


Fig. 2. Changes in the viable cell count (left panel) and survival rate (right panel) of freeze-dried formulation yeast cells stored at 25°C for 15-week. 5% skimmed milk, α-lactose or trehalose was used as a protective agents for cold adaptive *S. cerevisiae* Y297, respectively.

All data are expressed as the mean±SD (n=3).

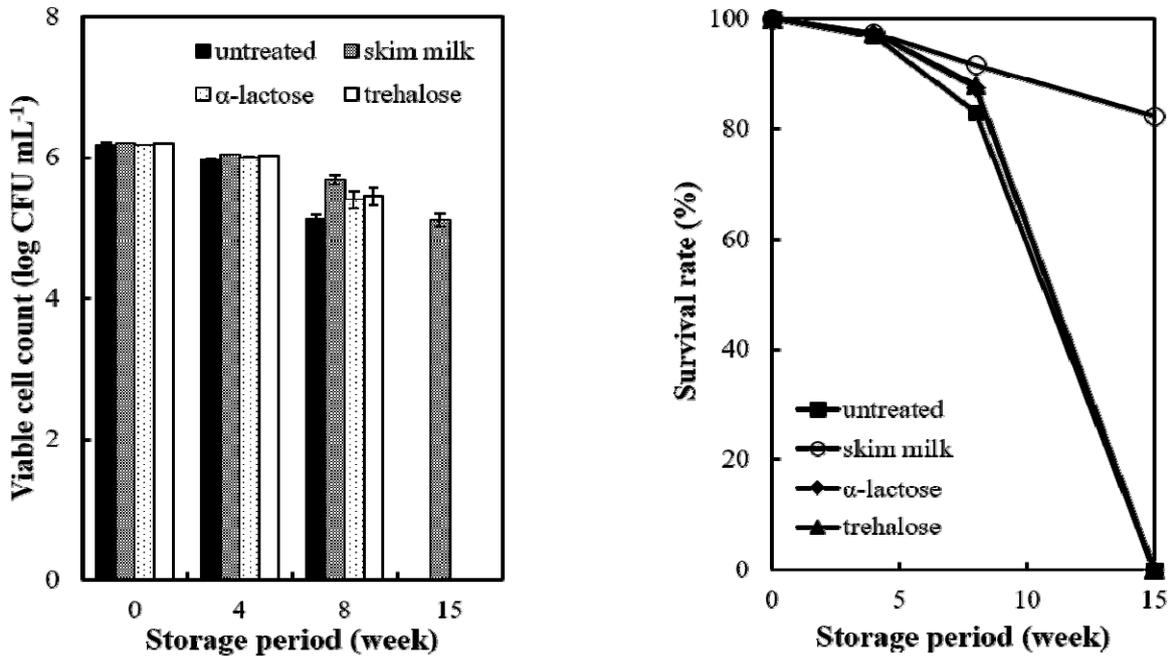


Fig. 3. Changes in the viable count (left panel) and survival rate (right panel) of air blast-dried formulation yeast cells stored at 25°C for 15-week. 5% skimmed milk, α-lactose or trehalose was used as a protective agents for cold adaptive *S. cerevisiae* Y297, respectively. All data are expressed as the mean±SD (n=3).

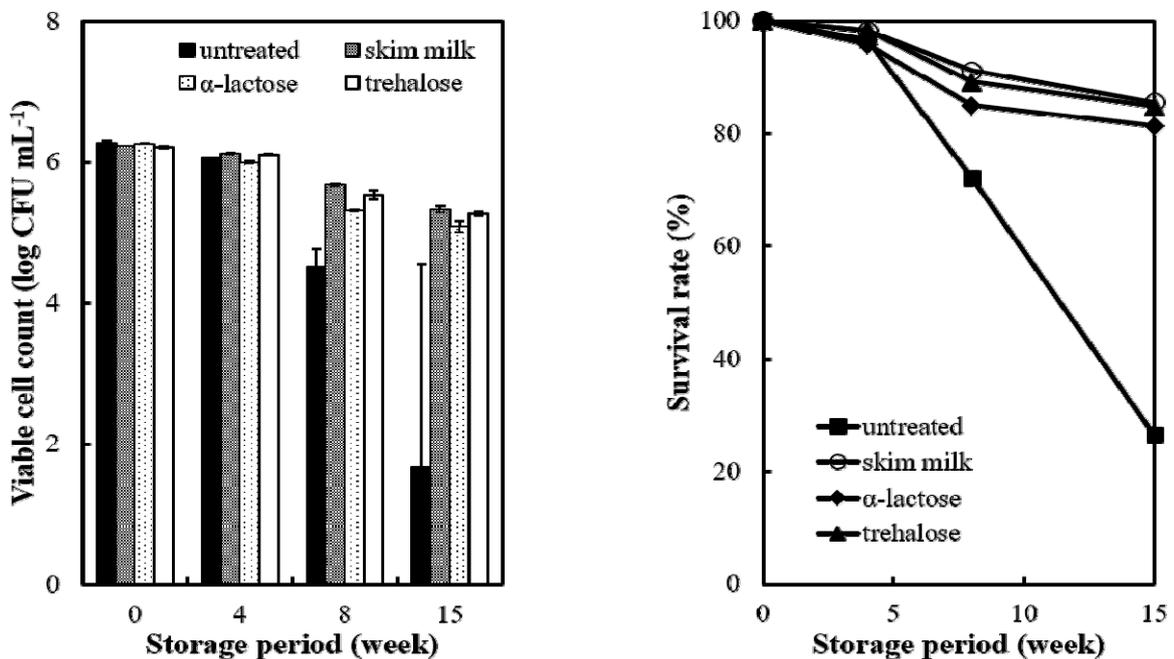


Fig. 4. Changes in the viable count (left panel) and survival rate (right panel) of liquid formulation yeast cells stored at 25°C for 15-week. 5% skimmed milk, α-lactose or trehalose was used as a protective agents for low temperature-adaptive *S. cerevisiae* Y297, respectively. All data are expressed as the mean±SD (n=3).

에 따른 생존율 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 대조구로서 부형제 무첨가 액체 종균의 경우, 4주 차 생균수는 6.06 log CFU/mL, 상대적 생존율은 96.6%로 동결건조법 및 송풍건

조법에 의한 생균수와 차이가 없었다. 15주 차 생균수는 1.67 log CFU/mL, 상대적 생존율은 26.6%로 부형제 첨가 없이 효모의 장기저장은 어려운 것으로 나타났다. 하지만 부형제

를 첨가한 액체 제형의 경우, 사용한 3종류 부형제 모두 효모의 생존율에 긍정적인 영향을 주는 것으로 나타났다. 15주 차 스kim 밀크의 상대적 생존율은 85.5%, 알파 락토오스의 상대적 생존율은 81.3%, 트레할로오스의 상대적 생존율은 84.8%로 나타나 동결건조 및 송풍건조 방법보다 저온 적응성 효모 SCY297의 제형은 액체 제형이 장기저장에 유용한 것으로 판단된다.

효모 제형 형태와 저장기간에 따른 약주의 양조적성 평가

저온 적응성 효모 SCY 297의 제형화 및 저장 기간별로 약주를 제조하여 이들의 양조적성을 평가하였다. 제형화 전의 효모 SCY 297, 저장기간 4주, 10주, 15주 차의 동결건조 방법으로 제형화된 효모로 각각의 약주를 제조하여 품질 분석을 한 결과를 Table 2에 나타내었다. 제형화 전의 효모와 동결건조 되어 저장기간에 따라 차이는 pH, 적정

Table 2. Physicochemical properties of *Yakju* made from cold adaptive yeast of freeze-dried formulation cells using SCY297 and not freeze-dried formulation cells using SCY297

Storage period (week)	Protective agent (5%)	pH	Soluble solid (^o Brix)	Titrateable acidity (% v/v)	Amino acidity (mL)	Alcohol (% v/v)
	Control (SCY297)	3.49±0.01 ^{1)(dk2)}	12.30±0.10 ^c	0.53±0.01 ^e	3.03±0.06 ^e	19.30±0.10 ^a
4	Untreated	3.04±0.00 ^f	12.20±0.10 ^{cd}	0.45±0.01 ^h	3.48±0.16 ^e	15.03±0.15 ^c
	Skim milk	3.00±0.01 ^f	11.00±0.00 ^e	0.45±0.02 ^h	3.06±0.00 ^e	15.03±0.06 ^c
	α-Lactose	3.30±0.00 ^e	12.20±0.20 ^{cd}	0.46±0.00 ^h	2.22±0.01 ^e	14.17±0.06 ^g
	Trehalose	3.02±0.02 ^f	11.47±0.11 ^f	0.47±0.03 ^h	3.00±0.01 ^e	14.07±0.06 ^g
10	Untreated	3.67±0.04 ^d	13.67±0.12 ^a	0.91±0.05 ^d	10.67±0.55 ^{cd}	15.57±0.06 ^b
	Skim milk	4.53±0.34 ^a	12.07±0.12 ^d	0.80±0.07 ^e	10.00±0.21 ^d	15.37±0.15 ^{cd}
	α-Lactose	3.65±0.04 ^d	11.87±0.12 ^e	0.78±0.06 ^e	11.66±0.96 ^c	15.03±0.06 ^c
	Trehalose	4.26±0.27 ^b	12.53±0.06 ^b	0.72±0.04 ^f	10.96±0.51 ^{cd}	14.83±0.06 ^f
15	Untreated	4.19±0.02 ^{bc}	12.53±0.06 ^b	1.04±0.03 ^{bc}	15.25±1.06 ^b	15.43±0.06 ^{bc}
	Skim milk	4.07±0.04 ^{bc}	12.37±0.06 ^{bc}	1.14±0.05 ^a	17.26±2.49 ^c	15.23±0.36 ^d
	α-Lactose	4.02±0.01 ^c	11.57±0.06 ^f	1.09±0.03 ^{ab}	14.83±0.81 ^b	14.83±0.06 ^f
	Trehalose	4.14±0.04 ^{bc}	12.07±0.06 ^d	1.02±0.02 ^c	14.29±0.22 ^b	15.03±0.03 ^e

¹⁾Data are means±SD (n=3).

^{2)a-h}Means in a row by different superscripts are significantly different at 5% significance level by Duncan's multiple range test.

Table 3. Physicochemical properties of *Yakju* made from cold adaptive yeast of air blast-dried formulation cells using SCY297 and not air blast-dried formulation cells using SCY297

Storage period (week)	Protective agent (5%)	pH	Soluble solid (^o Brix)	Titrateable acidity (% v/v)	Amino acidity (mL)	Alcohol (% v/v)
	Control (SCY297)	3.49±0.01 ^{1)(dk2)}	12.30±0.10 ^d	0.53±0.01 ^b	3.03±0.06 ^a	19.30±0.10 ^a
4	Untreated	3.73±0.10 ^c	11.80±0.20 ^c	0.68±0.06 ^b	7.97±0.67 ^b	16.03±0.15 ^d
	Skim milk	3.98±0.12 ^d	11.60±0.00 ^b	0.64±0.05 ^b	7.81±0.76 ^b	15.63±0.06 ^e
	α-Lactose	3.28±0.16 ^a	11.33±0.12 ^a	0.69±0.07 ^b	11.65±0.70 ^{cd}	14.83±0.06 ^g
	Trehalose	3.18±0.06 ^a	11.67±0.12 ^{bc}	0.68±0.06 ^b	10.79±0.30 ^c	16.77±0.10 ^c
10	Untreated	4.16±0.01 ^e	12.90±0.00 ^f	1.02±0.04 ^c	12.95±2.16 ^{de}	16.80±0.00 ^c
	Skim milk	4.16±0.04 ^e	12.17±0.06 ^d	1.06±0.03 ^c	14.04±0.84 ^e	16.03±0.06 ^d
	α-Lactose	3.92±0.03 ^d	12.43±0.06 ^c	1.34±0.01 ^e	16.70±0.80 ^f	15.37±0.06 ^f
	Trehalose	3.95±0.07 ^d	12.20±0.00 ^d	1.22±0.02 ^d	16.12±0.76 ^f	17.17±0.10 ^b
15	Untreated	-	-	-	-	-
	Skim milk	-	-	-	-	-
	α-Lactose	-	-	-	-	-
	Trehalose	-	-	-	-	-

¹⁾Data are means±SD (n=3).

^{2)a-f}Means in a row by different superscripts are significantly different at 5% significance level by Duncan's multiple range test.

산도, 아미노산도, 알코올 함량으로 나타났다. 대조구로써 비제형화된 효모의 pH, 적정산도, 아미노산도, 알코올 함량은 각각 3.49, 0.53, 3.03, 19.9%인데 반해, 제형화시킨 4주차 동결건조 효모로 빚은 약주는 각각 3.0-3.3, 0.45-0.47, 2.22-3.48, 14.07-15.03%이며, 15주 차는 각각 4.02-4.19, 1.02-1.14, 14.29-17.26, 14.83-15.43%로 나타났다. 고품분 함량을 살펴보면 제형화 전 약주와 제형화후 저장기간에 따라 제조된 약주의 고품분 함량 차이가 작은 것으로 나타났다. 제형화 전의 효모에 비해 동결건조 후, 저장기간이 오래될수록 알코올 발효 특성에 영향을 미치는 것으로 보인다. 특히, 아미노산도의 급격한 증가와 알코올 함량 감소 부분이 효모의 동결건조와 부형제에 의한 영향인지는 추가적인 연구가 필요하다.

비제형화 SCY 297, 저장기간 4주, 10주 차의 송풍건조 방법으로 제형화된 효모로 약주를 제조한 결과는 Table 3과 같다. 4주 차 송풍건조 효모의 약주 pH, 적정산도, 아미노산도, 알코올 함량은 각각 3.18-3.98, 0.64-0.69, 7.81-11.65, 14.83-16.77%이며, 10주 차는 3.95-4.16, 1.02-1.34, 14.04-16.70, 15.37-17.17%로 나타났다. 송풍건조로 제형화된 효모는 비제형화 효모로 제조된 약주의 고품분 함량에 비해 차이가 작게 나타나 동결건조된 효모와 유사하게 특성을 보였다.

제형화 전의 효모 SCY 297, 저장기간 4주, 15주 차의 액체 방법으로 제형화된 효모로 약주를 제조하여 품질을 분석한 결과는 Table 4에 나타내었다. 4주 차 액체 형태 효모의 약주 pH, 적정산도, 아미노산도, 알코올 함량은 각각 3.44-3.47, 0.53-0.56, 3.10-3.42, 18.5-19.6%이며, 15주 차는 4.44-5.35,

0.56-0.65, 6.07-8.13, 17.0-18.2%로 나타났다. 액체 효모의 경우, 제형화 전에 비해 알코올 함량의 변화는 동결건조 및 송풍건조 방법에 비해 낮게 나타났으나, pH와 고품분 함량이 증가한 것으로 나타났다. 동결건조, 송풍건조 및 액체 제형화 효모의 저장기간에 따라 약주를 발효하였을 때, 이들의 품질변화를 살펴본 결과, 액체 효모가 비제형화 효모에 비해 품질변화가 가장 적은 것으로 나타났다. 특히, 알코올 생산성은 동결건조 효모가 15% 내외, 송풍건조 효모는 17% 내외, 액체 효모는 19% 정도로 비제형화 효모와 유사하였다. 이는 동결건조 및 송풍건조에 비해 액체 저장법이 효모에 스트레스 자극이 적은 것으로 판단되며, 효모 고유의 특성을 유지하는 것으로 본 실험에서 확인하였다.

효모 제형화 방법인 동결건조, 송풍건조 및 액체 형태와 효모 부형제에 따른 평균 제형의 저장기간과 생존율 및 발효 특성 등을 분석하였다. 동결건조, 액체의 경우, 부형제를 첨가하면 실온에서 15주까지 약 80% 이상의 생존율을 나타냈었고 송풍건조는 skim milk만이 약 80% 이상의 생존율을 보였다. 제형화된 효모의 발효 특성은 약주를 발효하여 그 술덧을 분석한 결과, 동결건조 및 송풍건조 효모는 대조구에 비해 적정산도, 아미노산도가 증가하였고, 알코올 함량은 감소하였다. 반면 액체 효모는 제형화 전에 비해 pH, 고품분 함량, 아미노산도가 증가 폭이 낮았고, 알코올 함량의 감소 또한 낮게 나타났다. 이런 결과를 종합해보면, 저온 적응성 효모 SCY297의 제형화는 액상형 중균화가 하나의 대안이 될 수 있는 가능성을 제시하였다.

Table 4. Physicochemical properties of Yakju made from cold adaptive yeast of liquid formulation cells using SCY297 and not liquid formulation cells using SCY297

Storage period (week)	Protective agent (5%)	pH	Soluble solid (°Brix)	Titrateable acidity (% v/v)	Amino acidity (mL)	Alcohol (% v/v)
	Control (SCY297)	3.49±0.01 ^{1bc2}	12.30±0.10 ^e	0.53±0.01 ^d	3.03±0.06 ^f	19.30±0.10 ^b
4	Untreated	3.44±0.00 ^c	14.43±0.01 ^d	0.55±0.14 ^{cd}	3.01±0.01 ^f	19.63±0.06 ^a
	Skim milk	3.45±0.01 ^c	14.30±0.10 ^d	0.53±0.01 ^d	3.16±0.01 ^f	19.27±0.06 ^b
	α-Lactose	3.47±0.01 ^c	14.30±0.10 ^d	0.56±0.01 ^{bcd}	3.42±0.02 ^f	19.37±0.06 ^b
	Trehalose	3.45±0.01 ^c	14.47±0.12 ^d	0.57±0.02 ^{bcd}	3.20±0.01 ^f	18.53±0.06 ^c
10	Untreated	4.38±0.04 ^b	15.67±0.12 ^{bc}	0.61±0.07 ^{ab}	5.39±0.54 ^c	18.36±0.15 ^d
	Skim milk	4.46±0.01 ^b	15.93±0.12 ^{ab}	0.60±0.05 ^{abc}	6.52±0.49 ^{cd}	17.43±0.15 ^g
	α-Lactose	4.75±0.56 ^b	15.90±0.10 ^{abc}	0.61±0.04 ^{ab}	6.79±0.63 ^{bcd}	18.56±0.06 ^c
	Trehalose	4.82±0.52 ^b	15.73±0.15 ^{abc}	0.53±0.04 ^d	6.91±0.52 ^{bc}	18.03±0.15 ^c
15	Untreated	4.86±0.35 ^{ab}	15.73±0.31 ^{abc}	0.65±0.02 ^a	6.07±0.23 ^{bc}	17.78±0.06 ^f
	Skim milk	4.44±0.20 ^b	15.67±0.23 ^{bc}	0.58±0.01 ^{bcd}	7.05±0.78 ^{bc}	16.97±0.06 ^h
	α-Lactose	5.35±0.61 ^a	15.60±0.20 ^c	0.60±0.02 ^{abc}	7.60±0.56 ^{ab}	18.23±0.03 ^d
	Trehalose	4.68±0.03 ^b	16.00±0.20 ^a	0.56±0.01 ^{bcd}	8.13±0.63 ^a	17.43±0.06 ^g

¹Data are means±SD (n=3).

^{2a-h}Means in a row by different superscripts are significantly different at 5% significance level by Duncan's multiple range test.

요 약

저온 적응성 효모 SCY297의 증균 방법에 따른 생존율과 약주 제조시 양조 특성을 조사하였다. 동결건조, 송풍건조 및 액체 제형 방법으로 제조한 다음, 실온에서 장기 저장에 따른 효모의 생존율과 양조 특성을 비교하였다. 또한, 부형제로 skim milk, α -lactose, trehalose를 5%씩 첨가하여 생존율과 양조특성에 미치는 영향을 조사하였다. 부형제가 첨가된 동결건조 및 액체 제형 SCY297 효모는 실온에서 15주까지 약 80% 이상의 생존율을 나타내었고, 송풍건조는 skim milk 첨가한 경우만 약 80% 이상 생존율을 나타내었다. 저장기간 및 제형화된 효모 SCY297로 약주를 발효하여 그 술덧을 분석한 결과, 동결건조 및 송풍건조된 SCY297는 무처리 SCY297보다 적정산도는 0.61, 아미노산도는 14.23 증가하였고, 알코올 함량은 5.07% 감소하였다. 액체 SCY297는 무처리 SCY297보다 pH 1.86, 아미노산도는 5.1 증가하였고, 알코올 함량은 2.9%로 감소량이 낮았다. 따라서 본 연구 결과, 종래의 고상형 방법보다 액상형 방법을 통한 증균화 가능성을 제시하였다.

감사의 글

This work was carried out with the support of “Cooperative Research Program for Agriculture Science & Technology Development (Project No. PJ01198401)” Rural Development Administration, Republic of Korea.

References

- Lee DH, Kang HY, Lee YS, Cho CH, Kim SJ, Lee JS (2011) Quality of Korean *Yakju*. Korean J Microbiol Biotechnol, 39, 274-280
- Kim HR, Kim JH, Bai DH, Ahn BH (2012) Feasibility of Brewing *Makgeolli* using *Pichia anomala* Y197-13, a Non-*Saccharomyces cerevisiae*. J Microbiol Biotechnol, 22, 1749-1757
- Baek SY, Lee YJ, Kim MD, Yi JH, Mun JY, Yeo SH (2015) Characterization of ethanol fermentation with wild type yeast strains. Microbiol Biotechnol, 43, 227-235
- Hong YA, Park HD (2013) Role of non-*Saccharomyces* yeasts in Korean wines produced from Campbell Early grapes: potential use of *Hanseniaspora uvarum* as a starter culture. Food Microbiol, 34, 207-214
- Baek SY, Lee YJ, Kim JH, Yeo SH (2015) Isolation and characterization of wild yeasts for improving liquor flavor and quality. Microbiol Biotechnol, 43, 56-64
- Ale CE, Otero MC, Pasteris SE (2015) Freeze-drying of wine yeasts and *Oenococcus oeni* and selection of the inoculation conditions after storage. J Bioprocess Biotech, 5, 248-253
- Bayrock D, Ingledew WM (1997) Mechanism of viability loss during fluidized bed drying of baker's yeast. Food Res Int, 30, 417-425
- Luna-Solano G, Salgado-Cervantes MA, Rodriguez-Jimenes GC, Garcia-Alvarado MA (2005) Optimization of brewer's yeast spray drying process. J Food Eng, 68, 9-18
- Abadias M, Benabarre A, Teixido N, Usaii J, Vinas I (2001) Effect of freeze drying and protectants on viability of the biocontrol yeast *Candida sake*. Int J Food Microbiol, 65, 173-182
- George JP, Datta AK (2002) Development and validation of heat and mass transfer models for freeze-drying of vegetable slices. J Food Eng, 25, 89-93
- Santivarangkna C, Kulozik U, Foerst P (2007) Alternative drying processes for the industrial preservation of lactic acid starter cultures. Biotechnol Prog, 23, 302 - 315
- Melin P, Hakansson S, Schnurer J (2007) Optimization and comparison of liquid and dry formulations of the biocontrol yeast *Pichia anomala* J121. Appl Microbiol Biotechnol, 73, 1008-1016
- Seo DJ, Yeo SH, Mun JY, Baek SY (2016) Effects of low temperature-adapted *Saccharomyces cerevisiae* Y297 strain and fermentation temperature on the quality characteristics of *Yakju*. Korean J Food Preserv, 23, 666-672
- Chandralekha A, Hrishikesh Tavanandi A, Amrutha N, umesh Hebbar H, Raghavarao KSMS, Ramachandra G (2016) Encapsulation of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) by spray drying for extension of shelf life. Drying Technology, 34, 1307-1318
- Im SY, Baek CH, Baek SY, Park HY, Choi HS, Choi JH, Jeong ST, Shin WC, Park HD, Yeo SH (2014) Quality characteristics of *Takju* according to different rice varieties and mixing ratio of *Nuruk*. Korean J Food Preserv, 21, 892-902
- Kim JY, Yi YH (2010) pH, acidity, color, amino acids, reducing sugars, total sugars and alcohol in puffed millet powder containing millet *Takju* during fermentation. Korean J Food Sci Technol, 42, 727-732
- Choi SH, Lee SJ (2014) Quality characteristics of Korean wheat bread prepared with substitutions of naturally

- fermented rice starters. Korean J Culinary research, 20, 100-119
18. Lee SB, Choi WS, Jo HJ, Yeo SH, Park HD (2016) Optimization of air blast drying process for manufacturing *Saccharomyces cerevisiae* and non *Saccharomyces* yeast as industrial wine starters. AMB Expr, 6, 105-115