



토종효모 *Saccharomyces cerevisiae* GBY5를 이용한 오디발효주의 발효 특성 및 항산화 활성

류은혜 · 채규서 · 권지웅[†]

(재)베리&바이오식품연구소

Fermentation Characteristics and Antioxidant Activity of Mulberry Wine Fermented with *Saccharomyces cerevisiae* GBY5

Eun-Hye Ryu, Kyu-Seo Chae and Ji-Wung Kwon[†]

Berry & Biofood Research Institute, Jeonbuk 56417, Republic of Korea

ABSTRACT

Mulberry wine was manufactured using four strains isolated from mulberry and aronia to select the strain most suitable for mulberry wine production. Among the yeast strains tested, *Saccharomyces cerevisiae* GBY5 (*S. cerevisiae* GBY5), named for its high ethanol production and strong red hue, was selected as the final fermentation strain to manufacture the wine. Traditional yeast (*S. cerevisiae* GBY5) and *Saccharomyces cerevisiae* Fermivin (*S. cerevisiae* Fermivin), a product that is used widely for commercial wine production, was added to the mulberries at a concentration of approximately 1×10^9 CFU/kg, followed by incubation at 25°C for 6 days. The final products of the mulberries fermented with *S. cerevisiae* GBY5 contained 13.33% alcohol, 8.93 °Brix, and 0.78% total acidity. In the mulberries fermented with *S. cerevisiae* Fermivin, the final product contained 13.24% alcohol, 9.23 °Brix, and 0.81% total acidity. The lightness of the wine made with *S. cerevisiae* Fermivin was higher than that made with *S. cerevisiae* GBY5, but the redness and yellowness of *S. cerevisiae* GBY5 were higher than those made with *S. cerevisiae* Fermivin. The concentrations of malic and citric acid were higher in the wine fermented with *S. cerevisiae* GBY5, whereas the concentration of acetic acid was higher in the wine fermented with *S. cerevisiae* Fermivin. Finally, the total polyphenol content of *S. cerevisiae* GBY5 was higher than made with *S. cerevisiae* Fermivin. The DPPH radical scavenging activity of *S. cerevisiae* Fermivin was as high as that of *S. cerevisiae* GBY5, but the ABTS radical scavenging activity of *S. cerevisiae* GBY5 was higher than that of *S. cerevisiae* Fermivin. In conclusion, the traditional yeast *S. cerevisiae* GBY5 produced mulberry wine with a higher alcohol concentration than *S. cerevisiae* Fermivin and exhibited excellent redness and antioxidant activity. Thus, *S. cerevisiae* GBY5 can replace *S. cerevisiae* Fermivin in industrial wine production.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*, mulberry, fermentation, antioxidant activity

서 론

경제성장에 따른 생활수준의 향상 및 여성의 사회진출로 인하여 와인 시장의 저변이 확대됨에 따라 와인이 대중화 되고 있으며, 소비량이 더욱 증가하는 추세이다. 또한 가볍게 술을 즐기는 사회 분위기 확산과 건강을 중요시하는 소비자 들이 증가함에 따라 알코올 도수가 높은 주류보다 저 알코올 주류의 선호도가 증가하고 있다(Kim KI & Kim ML 2010).

와인은 발효주로서 포도뿐만 아니라, 다양한 과실이나 열매의 과즙을 알코올 발효시킨 것으로서 발효과정을 통하여 풍미가 증진되고, 과실이 지니고 있는 기능성 고분자 물질들

이 저분자 물질로 전환됨에 따라 생리활성이 증가하게 된다 (Son WR & Choi SW 2013). 이와 같은 과실 발효주에서는 원료의 특성이 품질에 가장 큰 영향을 미치기 때문에 복분자, 블루베리 및 자두와 같은 기능성 과실을 이용한 와인의 시장성이 주목받고 있으며, 제품개발 또한 활발하게 이루어져 왔다 (Son WR & Choi SW 2013). 와인은 발효를 통해 고유의 풍미 및 기호성이 향상되며, 발효에 사용되는 효모는 발효주의 맛을 결정하는 중요한 요소이다. 이처럼 발효에 이용되는 효모가 와인 생산에서 중요한 위치를 차지하고 있으나, 포도(Roh HI 등 2008), 복분자(Moon YJ 등 2005; Kong TI & Cheong C 2015), 오디(Kim HR 등 2006; Son WR & Choi SW 2013), 아로니아(Yoon HS 등 2017) 등의 과실 발효주 제조에 사용된 효모는 대부분 수입산 효모로서 국내 과실주가 향후 세계시

[†] Corresponding author : Ji-Wung Kwon, Tel: +82-63-560-5190, Fax: +82-63-563-6680, E-mail: kjwung@hanmail.net

장에서 경쟁력을 가지기 위해서는 원재료의 다양화뿐만 아니라, 국내산 토종 효모 개발을 통한 발효주의 풍미 및 품질 개선에 대한 연구가 필요하다. 다행히도 최근 포도 및 복분자로 부터 토종효모가 분리되어 와인 제조를 위한 다양한 연구가 진행되고 있으나(Kim YS 등 2008), 국내 재배 및 생산량이 급증하고 있는 아로니아에서 분리된 효모에 대한 연구는 찾아 보기 힘든 실정이다. 그뿐만 아니라 농림축산식품부의 통계자료에 따르면, 아로니아의 항산화기능의 우수성이 알려지면서 국내 아로니아 총생산량은 2013년 117톤에 그치던 것이 4년 사이에 70배 이상 증가하여 2017년에는 8,779톤이 생산되었다. 하지만 이러한 생산량의 급증이 과잉생산에 따른 가격 폭락으로 이어지면서 생산 농가에 경제적 부담을 가중시키게 됨에 따라 아로니아 소비확충을 위한 다양한 이용방안에 대한 연구가 절실하게 필요한 상황이다.

오디는 뽕나무과(Moraceae) 뽕나무속(Morus)에 속하는 교목성 낙엽수인 뽕나무의 열매로서 검은색 또는 자홍색을 띠고 온대와 열대 지방에 주로 분포하며(Park SW 등 1997), 복분자와 더불어 국내에서 재배역사가 가장 오래된 베리류로 분류된다(Ju MJ 등 2009). 오디는 노화 및 콜레스테롤 억제(Du Q 등 2008), 항산화, 항염증 및 시력개선 효과(Choi SW 2005), 당뇨병(Kim TW 등 1996) 등에 효과를 나타내는 안토시아닌 계통의 색소 및 플라보노이드를 다량 함유한 기능성 신소재로서 최근 주목 받고 있다(Kim TK 등 2003). 하지만 오디는 과육이 약하여 상처 입거나 무르기 쉬울 뿐만 아니라, 수분함량이 높아 저장성이 낮으므로 일부만이 생과로 유통되고, 나머지는 냉동 유통되거나 음료나 잼, 젤리, 술 등으로 가공되어 유통되고 있다. 오디의 당도는 발효주 생산을 위해서는 부족하나, 오디가 갖고 있는 고유의 강한 색상과 향은 당의 첨가에 의해 희석되지 않기 때문에 발효주 생산을 위한 과실로 적절하며, 특성 있는 술로써 개발이 가능하다(Park SW 등 1997).

따라서 본 연구에서는 오디(*Morus alba* L.) 및 아로니아(*Aronia melanocarpa*)의 소비증대 및 부가가치 향상을 위하여, 각각의 베리류로부터 분리된 토종효모 중에서 우선적으로 오디 발효주 제조에 적합한 효모를 선발하고, 상용균주인 *Saccharomyces cerevisiae* Fermivin (*S. cerevisiae* Fermivin)와 발효특성 및 항산화 활성 비교를 통해 새로운 토종효모를 이용한 오디 발효주의 개발 가능성에 대해 조사하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

본 실험에 사용된 오디 및 아로니아는 전라북도 고창군에서 2018년에 수확한 것을 구입하여 -40°C 에서 냉동 보관하여 사용하였다.

2. 발효균주의 분리 및 배양

전라북도 고창군 농가에서 구입한 오디와 아로니아를 25°C 에서 7일간 발효한 후 멸균거즈로 여과한 액을 균주 분리를 위한 시료로 사용하였다. 시료를 10배 희석법으로 희석한 후 YPD(bacto yeast extract 1%(w/v), bacto peptone 2%(w/v), dextrose 2%(w/v) 고체배지(Difco, Spark, MD, USA)에 도말하고, 25°C 에서 48시간 배양하여 단일집락을 분리하였다. 오디로부터 분리된 3종의 토종효모(DDY4, BB8, OD3)와 아로니아로부터 분리된 GBY5 효모는 YPD(Difco) 액체배지를 이용하여 25°C 에서 48시간 동안 진탕 배양기(VS-8480, Vision Scientific Co., Ltd., Daejeon, Korea)에서 배양한 후 $10,000\times\text{g}$ 에서 10분간 원심분리하여 얻은 균체를 멸균수로 2회 세척한 후 사용하였다. 또한, 실험의 대조군으로 수입 시판건조효모 *S. cerevisiae* Fermivin(DSM Food Specialties, B.V., Delft, netherlands)을 구입하여 15% 설탕용액에 20°C 에서 10분간 배양한 후 활성화시켜 발효에 사용하였다.

3. 오디 발효주의 제조

오디 10 kg을 으갠 뒤 시판 백설탕을 이용하여 25°Brix 가 되도록 보당한 후 토종효모 및 시판효모를 1×10^9 CFU/kg이 되도록 접종하여 교반하고, 25°C 에서 6~7일 동안 발효시켰다. 발효가 완료된 오디 발효주는 유압착즙기(Stainless 70 L, tomotech Ltd., Seoul, Korea)를 사용하여 착즙하고, -4°C 에서 2일 동안 냉동 보관하여 pore size 1.2 μm membrane filter(RAWP14250, Merck Millipore, Darmstadt, Germany)를 사용하여 여과하였다.

4. 균주 동정

4종의 토종효모 중 오디 발효주 제조에 우수한 것으로 선발된 토종효모 GBY5의 동정은 균주를 YPD 고체배지에 계대 배양하여 순수 분리한 후 sequencing 전문 기관인 ㈜마크로젠(Seoul, Korea)에 의뢰하여 18S rRNA의 염기서열을 분석한 후 National Center for Biotechnology information(NCBI, RP, Bethesda, MD, USA)의 BLAST(Basic Local Alignment Search Tool) 프로그램을 사용하여 균주를 동정하였다.

5. 발효특성

알코올 함량은 알코올 분석기 세트(Alcoholizer wine, Anton Paar, Graz, Austria)를 이용하여 측정하였으며, 당도는 상온에서 당도계(PAL-1 Pocket Refractometer, ATAGO, Tokyo, Japan)를 이용하여 측정하였다. pH는 pH meter(S20, Mettler Toledo, Schwerzenbach, Switzerland)로 측정하였고, 총산도는 AOAC(1990) 방법에 의해 오디 발효주 10 mL를 pH 8.3까지 도달하는데 필요한 0.1 N NaOH 용액의 소비량(mL)으

로 정의하고 citric acid(% w/w) 함량으로 환산하여 나타내었다. 또한, 색도는 분광색차계(CM-5, Minolta, Osaka, Japan)를 사용하여 Hunter L값(명도, lightness), a값(적색도, redness) 및 b값(황색도, yellowness)을 측정하였으며, 사용된 백색 판(Calibration plate)의 값은 $L=92.73$, $a=-0.03$, $b=-0.06$ 이며, L값, a값 및 b값을 각 3회 반복 측정하여 평균값으로 나누어 색도를 측정하였다.

6. 유기산 함량 분석

오디 발효주의 유기산 측정을 위해 발효주를 0.45 μm membrane filter(Millipore, Bedford, MA, USA)로 여과한 후 회석하여 HPLC(Ultimate 3000, Dionex, Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 분석하였다. 이때 표준물질은 lactic acid, citric acid, malic acid, acetic acid, succinic acid, oxalic acid, fumaric acid(Sigma-Aldrich)을 사용하였으며, 컬럼은 Aminex HPX-87H(300 \times 10 mm; Bio-Rad, Hercules, CA, USA), solvent는 0.01N H_2SO_4 (Sigma-Aldrich)를 사용하였다. 분석조건으로 flow rate는 0.5 mL/min, UV detector 210 nm, injection volume은 10 μL 였다(Sung JM 등 2008).

7. 총 폴리페놀, 총 플라보노이드 및 총 안토시아닌 함량

총 폴리페놀 함량은 건강기능식품공전 방법(KFDA 2012)을 응용하여 측정하였다. 즉, 시료 1 mL에 증류수 7.5 mL와 Folin-Ciocalteu's phenol reagent(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 0.5 mL, 35% Na_2CO_3 (Sigma-Aldrich) 1 mL를 첨가하고, 실온 암조건에서 1시간 동안 정치한 후, UV/VIS spectrophotometer(UV-2450, Shimadzu Co., Kyoto, Japan)를 사용하여 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 표준검량곡선은 tannin acid(Sigma-Aldrich)를 사용하여 작성하고, 이로부터 총 폴리페놀 함량을 구하였다. 총 플라보노이드 함량은 Chang CC 등(2002)의 방법을 응용하여 측정하였다. 시료 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 제조한 용액에 diethylene glycol 2 mL, 1 N-NaOH 20 μL 를 순서대로 첨가하고, 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 UV/VIS spectrophotometer를 사용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 총 플라보노이드 함량은 rutin(Sigma-Aldrich)을 표준물질로 사용하여 검량곡선을 작성하고, 이로부터 총 플라보노이드 함량을 구하였다.

총 안토시아닌 함량은 Kim YD 등(1998)의 방법을 응용하여, 각각의 시료 10 mL에 0.1% HCl을 함유하는 80% 메탄올 용액 40 mL로 24시간 동안 진탕배양기(Vision Scientific)에서 추출한 후 UV/VIS spectrophotometer를 사용하여 528 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 표준물질은 cyanidin을 사용하여 검량곡선을 작성하고, 이로부터 총 안토시아닌 함량을 구하였다.

8. DPPH 라디칼 소거활성

DPPH(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) 라디칼 소거능은 Choi JS 등 (1993)의 방법을 응용하여, 5 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 15 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 25 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 35 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 50 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 농도로 조제한 각각의 추출물 100 μL 에 에탄올 200 μL 를 가하고, 0.2 mM DPPH 용액(Sigma-Aldrich) 300 μL 를 가한 후 볼텍스 믹서(VM-10, Daihan Scientific Co., Ltd., Gangwon, Korea)로 교반하여 실온에서 30분간 반응시키고 ELISA reader(Synergy HT, Biotec, Washington DC, USA)를 사용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 대조구는 에탄올만을 첨가하여 분석하였다.

$$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} = \left(1 - \frac{A}{B}\right) \times 100$$

A: absorbance of sample

B: absorbance of blank

9. ABTS 라디칼 소거활성

ABTS(2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt) 라디칼 소거능은 Art MJTJ 등(2004)의 방법을 응용하여 농도별로 조제한 각각의 시료 5 μL 에 ABTS radical 용액 195 μL 를 첨가하여 7분간 반응시킨 후 ELISA reader(Biotec)를 사용하여 734 nm에서 흡광도를 측정하였고, 대조구는 시료 대신에 에탄올을 첨가하였다.

$$\text{ABTS radical scavenging activity (\%)} = \left(1 - \frac{A}{B}\right) \times 100$$

A: absorbance of sample

B: absorbance of blank

10. 통계처리

본 연구에서 오디 발효주는 2회 제조하여 각 시험항목별 3회 반복하여 분석하였으며, SPSS program 23.0(Statistical Package for Social Sciences, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 통계처리 후 평균과 표준편차로 나타내었다. 각 시험군간의 통계적 유의성 검증은 $p < 0.05$ 수준에서 Student's *t*-test 및 one-way ANOVA로 분석하였으며, Duncan's multiple range test를 이용하여 사후검정을 실시하였다.

결과 및 고찰

1. 우수 발효 효모의 선발 및 동정

오디 발효주를 제조하기 위한 알코올 생성력과 색상이 우수한 효모를 선발하기 위해 오디와 아로니아로부터 분리된 4종의 토종효모(DDY4, GBY5, BB8, OD3)를 25 °Brix로 보

당한 오디에 각각 접종한 후 25°C에서 7일간 배양하면서 발효 특성을 Table 1에 나타내었다.

알코올 함량의 경우, GBY5가 13.40±0.35%로 가장 높게 나타났으며, 다음으로 DDY4 (12.76±0.64%), OD3(12.20±0.09%), BB8(11.46±0.06%) 순이었다. 당도는 OD3이 9.27±0.06 °Brix로 가장 높게 나타났으며, DDY4, GBY5 및 BB8은 유의적($p<0.05$)인 차이가 없는 것으로 나타났다. pH의 경우 BB8이 4.45±0.03으로 가장 높게 나타났으며, 총산도의 경우 DDY4와 GBY5가 각각 0.73±0.02, 0.73±0.06%로 가장 높게 나타났으며, OD3이 0.64±0.04%로 가장 낮게 나타났다. 색도는 명도(L)의 경우 DDY4가 32.17±0.03으로 가장 높게 나타났으나, 적색도(a) 및 황색도(b)의 경우 GBY5가 각각 50.40±0.77, 31.10±0.91로 가장 높게 나타났다. 오디와 아로니아로부터 분리된 4종의 토종효모 모두 오디 발효가 정상적으로 일어난 것으로 생각되나, 본 실험에서는 에탄올 생성량이 가장 높고, 적색도가 우수한 GBY5 균주를 최종 발효 균주로 선발하여 오디 발효주 제조 시험에 사용하였다.

아로니아로부터 분리된 GBY5의 동정은 18S rRNA의 염기서열을 분석한 후 NCBI의 BLAST 분석프로그램을 이용한 상동성 분석 결과, *Saccharomyces cerevisiae*와 98% 이상의 상동성을 나타내었으며, 따라서 이 균주를 *S. cerevisiae* GBY5(KCCM12271P)로 명명하였다.

2. 발효특성

토종효모 *S. cerevisiae* GBY5와 수입 시판건조효모 Fermivin을 이용하여 초기 당도가 25 °Brix가 되도록 보당한 후 오디 발효주를 제조하였고, 0일부터 6일까지의 발효 기간에 따른 발효특성을 Table 2에 나타내었다. *S. cerevisiae* GBY5의 경우, 발효 1일째부터 알코올 생성량이 급격하게 증가한 후 4일째부터는 큰 변화가 없어 발효가 정지된 것으로 보이며, 최종 알코올 함량은 13.33±0.02%로 나타났다. 대조군으로 사용된

Fermivin 또한 *S. cerevisiae* GBY5와 유사한 발효 양상을 나타내어 발효 완료 후 최종 알코올 함량이 13.24±0.02%까지 증가하였으나 *S. cerevisiae* GBY5보다는 유의적($p<0.05$)으로 낮은 알코올 함량을 나타내었다. 효모에 의한 발효 유무를 판단하기 위한 지표로 당도 변화를 살펴본 결과, 발효가 진행됨에 따라 *S. cerevisiae* GBY5와 Fermivin 모두 당도가 감소하여 최종 당도는 각각 8.93±0.06 °Brix 및 9.23±0.05 °Brix를 나타내었다. 이는 Chae KS 등(2014)이 오디를 30 °Brix로 보당한 후 *S. cerevisiae* B-8을 이용하여 25°C에서 10일간 발효 하였을 때 최종 알코올 함량과 당도는 각각 16.47%, 10.5 °Brix로 최종 알코올 함량과 당도가 본 실험보다 높게 나타났으나, Kim YS 등(2008)의 오디 마쇄액을 24 °Brix로 보당한 후 *S. cerevisiae* KCCM 12224를 이용하여 26°C에서 8일 동안 발효한 결과, 최종 알코올 함량과 당도는 각각 11.0%, 8.5~8.7 °Brix로 본 실험 결과와 비교 시 *S. cerevisiae* GBY5가 발효기간이 2일이 더 짧음에도 불구하고 약 2% 높은 알코올 생성량을 나타내었으며, 발효 종료 후 당도는 낮은 것으로 나타났다. 이러한 결과는 오디 발효 시 오디의 품종, 초기 보당 농도 및 발효 온도, 발효 기간 및 발효균주 등 다양한 요소에 의한 복합적인 영향에 의한 차이로 생각되며, *S. cerevisiae* GBY5를 이용한 발효 시 오디 발효액에 포함된 당은 효모의 영양원이나 발효 기질로 이용되면서 알코올로 전환됨에 따라 당도는 감소하고 알코올 함량은 증가하여 발효가 정상적으로 진행된 것으로 판단된다.

오디 발효주의 pH와 총산도는 발효진행 상황을 판단할 수 있는 중요한 지표이며, 발효주의 품질에 중요한 영향을 미치는 요소이다. *S. cerevisiae* GBY5를 이용한 오디 발효주의 pH 및 총산도의 변화를 측정된 결과, *S. cerevisiae* GBY5로 발효한 오디 발효주의 경우 발효기간이 경과함에 따라 pH는 초기 4.41±0.07에서 서서히 감소하여 발효 종료 후 4.00±0.01로 감소하였으며, 총산도의 경우 발효초기 0.41±0.01%에서

Table 1. Physicochemical characteristics of mulberry wine fermented with different yeast for 7 days at 25°C

Yeast ¹⁾	Alcohol content (%)	Sugar concentration (°Brix)	pH	Total acidity (%)	Hunter color		
					L value	a value	b value
DDY4	12.76±0.64 ^{2)ab}	8.33±0.06 ^b	4.14±0.02 ^b	0.73±0.02 ^a	32.17±0.03 ^a	47.36±2.52 ^b	29.43±0.21 ^b
GBY5	13.40±0.35 ^a	8.47±0.06 ^b	4.13±0.15 ^b	0.73±0.06 ^a	29.26±0.42 ^c	50.40±0.77 ^a	31.10±0.91 ^a
BB8	11.46±0.06 ^c	8.30±0.36 ^b	4.45±0.03 ^a	0.70±0.02 ^{ab}	28.79±0.17 ^c	46.25±0.02 ^b	30.11±0.20 ^{ab}
OD3	12.20±0.09 ^b	9.27±0.06 ^a	4.11±0.01 ^b	0.64±0.04 ^b	30.38±0.43 ^b	47.46±0.19 ^b	30.45±0.72 ^{ab}

¹⁾ DDY4, BB8, OD3: strain isolated from mulberry, GBY5: strain isolated from aronia.

²⁾ Values are mean±S.D.

^{a-c} Means in column by different superscripts are significantly different at $p<0.05$ by Duncan's multiple range test.

Table 2. Changes in fermentation characteristics of mulberry wines fermented using *S. cerevisiae* GBY5 and *S. cerevisiae* Fermivin

Fermentation time (days)	Alcohol content (%)		Sugar concentration (°Brix)		pH		Total acidity (%)	
	<i>S. cerevisiae</i> Fermivin	<i>S. cerevisiae</i> GBY5	<i>S. cerevisiae</i> Fermivin	<i>S. cerevisiae</i> GBY5	<i>S. cerevisiae</i> Fermivin	<i>S. cerevisiae</i> GBY5	<i>S. cerevisiae</i> Fermivin	<i>S. cerevisiae</i> GBY5
0	0.47±0.15 ^{1)c}	0.79±0.14 ^c	24.30±0.04 ^a	23.80±0.03 ^{a****}	4.44±0.01 ^a	4.41±0.07 ^a	0.39±0.01 ^c	0.41±0.01 ^{d*}
1	1.88±0.05 ^d	4.99±0.11 ^{d****}	21.90±0.02 ^b	18.00±0.03 ^{b****}	4.19±0.01 ^b	4.14±0.01 ^{b**}	0.76±0.01 ^b	0.63±0.01 ^{c***}
2	9.81±0.22 ^c	10.67±0.13 ^{c*}	13.20±0.03 ^c	11.70±0.02 ^{c****}	4.17±0.01 ^c	4.14±0.01 ^{b*}	0.79±0.02 ^a	0.73±0.02 ^{b*}
3	12.67±0.12 ^b	12.61±0.12 ^b	10.20±0.04 ^d	9.80±0.01 ^{d**}	4.12±0.01 ^d	4.14±0.01 ^b	0.80±0.01 ^a	0.76±0.01 ^{a**}
4	13.03±0.11 ^a	13.21±0.08 ^a	9.70±0.01 ^e	9.00±0.04 ^{e**}	4.07±0.01 ^e	4.11±0.01 ^{b**}	0.80±0.02 ^a	0.77±0.02 ^a
5	13.16±0.07 ^a	13.29±0.09 ^a	9.50±0.02 ^f	8.96±0.03 ^{ef***}	4.06±0.01 ^e	4.09±0.01 ^{b*}	0.81±0.02 ^a	0.77±0.01 ^{a*}
6	13.24±0.02 ^a	13.33±0.02 ^{a**}	9.23±0.05 ^g	8.93±0.06 ^{fg**}	4.03±0.01 ^f	4.00±0.01 ^{c*}	0.81±0.01 ^a	0.78±0.01 ^{a*}

¹⁾ Value are mean±S.D.

^{a~g} Means in column by different superscripts are significantly different at $p<0.05$ by Duncan's multiple range test.

Means are different significantly between *S. cerevisiae* Fermivin and *S. cerevisiae* GBY5 at * $p<0.05$, ** $p<0.01$ and *** $p<0.001$.

발효가 진행됨에 따라 점차 증가하여 발효 종료 후 0.78±0.01%로 나타났다. Fermivin을 이용한 발효의 경우 pH는 *S. cerevisiae* GBY5와 유사한 경향을 나타내어 발효 종료 후 4.03±0.01로 나타났으나, 총산도의 경우 발효 종료 후 0.81±0.01%로 *S. cerevisiae* GBY5에 비해 유의적($p<0.05$)으로 높게 나타났다. 이러한 결과는 Kim YS 등(2008)의 오디 마쇄액을 24 °Brix로 보당한 후 *S. cerevisiae* KCCM 12224로 26°C에서 8일 동안 발효한 후 pH 및 총산도는 각각 4.07±0.01, 0.83±0.02%으로 나타났다는 연구결과와 유사한 것으로 나타났다.

색도는 발효주 품질평가의 중요 항목 중 하나로 폴리페놀 함량, 미생물 활성 및 SO₂ 등 여러 요인에 의해 영향을 받는 것으로 알려져 있다(Lee JE 등 2002). 본 연구에서 *S. cerevisiae* GBY5로 발효한 오디 발효주의 색도를 측정된 결과를 Table 3에 나타내었다. 명도(L)의 경우, Fermivin이 30.68±0.01로 *S. cerevisiae* GBY5에 비해 유의적($p<0.05$)으로 높게 나타났으나, 황색도(b)는 *S. cerevisiae* GBY5가 32.53±0.01로 Fermivin에 비해 유의적($p<0.05$)으로 높게 나타났다. 오디 발효주에 있어 중요한 색소 인자인 적색도(a)는 *S. cerevisiae* GBY5가 49.73±0.00으로 Fermivin에 비해 유의적($p<0.05$)으로 높은 값을 나타내어 더 붉은 색을 나타내었다.

3. 유기산 함량

토종효모 *S. cerevisiae* GBY5와 수입 시판건조효모 Fermivin을 이용하여 25°C에서 6일간 발효한 오디 발효주의 유기산 함량 측정결과를 Table 4에 나타내었다. 2종의 효모를

Table 3. Color values of the mulberry wines with fermented using *S. cerevisiae* GBY5 and *S. cerevisiae* Fermivin

Strain	Hunter color		
	L value	a value	b value
<i>S. cerevisiae</i> Fermivin	30.68±0.01 ¹⁾	49.47±0.01	32.11±0.01
<i>S. cerevisiae</i> GBY5	28.59±0.00 ^{***}	49.73±0.00 ^{***}	32.53±0.01 ^{***}

¹⁾ Value are mean±S.D.

Means are different significantly between *S. cerevisiae* Fermivin and *S. cerevisiae* GBY5 at *** $p<0.001$.

이용하여 제조한 오디 발효주의 유기산 중에서 malic acid의 경우 *S. cerevisiae* GBY5와 Fermivin이 각각 3.92±0.04, 3.81±0.01 mg/mL로 *S. cerevisiae* GBY5가 유의적($p<0.05$)으로 높게 나타났으며, citric acid 함량도 *S. cerevisiae* GBY5가 3.63±0.05 mg/mL로 fermivin보다 유의적($p<0.05$)으로 높게 나타났다. Acetic acid의 경우, fermivin이 3.26±0.04 mg/mL로 *S. cerevisiae* GBY5보다 유의적($p<0.05$)으로 높은 함량을 나타내었으며, fumaric acid의 경우 *S. cerevisiae* GBY5에서는 검출되지 않았으나, fermivin에서는 미량 검출되었다. Kim KI & Kim ML(2010)은 오디 과즙으로부터 분리된 야생효모를 이용한 오디와인에서 malic acid, citric acid, oxalic acid가 주요 산으로 검출되었으나, 본 결과에서는 oxalic acid는 전혀 검출되지 않고 오히려 acetic acid가 소량 검출되었으며, fermivin을 이용한 오디 발효주에서는 fumaric acid도 소량

Table 4. Changes in organic acid content of mulberry wines with fermented using *S. cerevisiae* GBY5 and *S. cerevisiae* Fermivin

Strain	Organic acid content (mg/mL)			
	Malic acid	Citric acid	Acetic acid	Fumaric acid
<i>S. cerevisiae</i> Fermivin	3.81±0.01 ¹⁾	2.99±0.01	3.26±0.04	0.13±0.00
<i>S. cerevisiae</i> GBY5	3.92±0.04*	3.63±0.05**	1.99±0.01***	ND ²⁾

¹⁾ Value are mean±S.D.

²⁾ Not detected.

Means are different significantly between *S. cerevisiae* Fermivin and *S. cerevisiae* GBY5 at * $p<0.05$, ** $p<0.01$ and *** $p<0.001$.

검출되어 차이를 보였다.

발효주에서 유기산 함량은 원료의 숙성 정도에 따라 달라 지기도 하고, 발효주 제조에 사용한 효모의 종류 및 발효 조건에 따라 달라진다(Jackson RS 2008). 본 연구에서 토종효 모 *S. cerevisiae* GBY5와 수입 시판건조효모 Fermivin을 이 용한 오디 발효주 중에서 *S. cerevisiae* GBY5는 발효주 제조 시 자극적이고 신미를 가지는 acetic acid 함량이 적고, 와인의 신맛을 부드럽게 해주는 malic acid와 와인의 향에 신선함을 증가시키는 citric acid 함량이 Fermivin에 비해 높기 때문 에 오디발효주 제조에 더 적합한 것으로 판단되었다.

4. 총 폴리페놀, 총 플라보노이드 및 총 안토시아닌 함량

토종효모 *S. cerevisiae* GBY5와 수입 시판건조효모 Fermivin을 이용하여 제조한 오디 발효주의 총 폴리페놀, 총 플라보노이드 및 총 안토시아닌 함량변화를 Table 5에 나타내 었다. 항산화 활성의 간접적인 지표가 되는 것으로 알려진 (Lee SY 등 2008; Kwak JH 등 2010) 총 폴리페놀 함량의 경 우 *S. cerevisiae* GBY5가 2.92±0.01 TAE mg/mL로 Fermivin 의 2.78±0.03 TAE mg/mL에 비해 유의적($p<0.05$)으로 높게 나타났다. 활성산소종을 효과적으로 제거하는 항산화능이 높다고 알려진(Tsao R 2010) 총 플라보노이드 함량의 경우

S. cerevisiae GBY5가 1.11±0.08 RUE mg/mL, Fermivin은 1.05±0.02 RUE mg/mL로 나타났으나 유의적 차이($p<0.05$)는 없는 것으로 나타났다. 또한, 근래 노화억제와 시력 개선 효 과 및 망막장애의 치료, 항산화 작용 등 다양한 생리 활성을 갖는 것으로 보고됨에 따라 인체에 무해한 천연 색소 및 기 능성 소재로써 각광받고 있는(Park SW 등 1997; Kang CS 등 2003; Kim HB 등 2003) 총 안토시아닌 함량을 측정된 결과 역시 *S. cerevisiae* GBY5와 Fermivin이 0.57±0.01 CYE mg/mL로 두 종의 발효주간의 유의적 차이($p<0.05$)는 발견되 지 않았다. 이러한 결과는 Chae KS 등(2014)의 연구에서 *S. cerevisiae* B-8과 Fermivin으로 발효한 오디 발효주에서 총 폴리페놀 함량은 *S. cerevisiae* B-8이 1.97±0.01 GAE mg/mL 로 Fermivin의 1.90±0.02 GAE mg/mL에 비해 유의적($p<0.05$) 으로 높았으나, 총 플라보노이드 함량의 경우 두 종의 발효 주간의 유의적 차이는 없었다는 보고와 유사한 결과를 나타 내었다. Kim YS 등(2008)은 *S. cerevisiae* KCCM 12224 효모 를 이용한 오디 와인의 발효 중 총 안토시아닌 함량이 감소하 였는데, 이는 주로 cyanidin-3-glucoside(C-3-G)의 감소에 의 한 영향이라고 보고하였다. 플라보노이드, 카테킨, 안토시아 닌 등의 기능성 물질을 종합적으로 부르는 폴리페놀 성분은 체내에서 항산화 작용을 통하여 항암효과, 심혈관계 질환 예

Table 5. Antioxidant activities of the mulberry wines with fermented using *S. cerevisiae* GBY5 and *S. cerevisiae* Fermivin

Strain	Polyphenol contents (TAE ¹⁾ mg/mL)	Flavonoid contents (RUE ²⁾ mg/mL)	Anthocyanin contents (CYE ³⁾ mg/mL)	DPPH (IC ₅₀ μL/mL) ⁴⁾	ABTS (IC ₅₀ μL/mL)
<i>S. cerevisiae</i> Fermivin	2.78±0.03 ⁵⁾	1.05±0.02	0.57±0.01	15.68±0.05	22.83±0.20
<i>S. cerevisiae</i> GBY5	2.92±0.01*	1.11±0.08	0.57±0.01	16.80±0.03***	22.45±0.15*

¹⁾ Total polyphenol contents was expressed as mg tannin acid (TAE) per 100 gram.

²⁾ Total flavonoid contents was expressed as mg rutin (RUE) per 100 gram.

³⁾ Total anthocyanin contents was expressed as mg cyanidin (CYE) per 100 gram.

⁴⁾ DPPH and ABTS radical scavenging activity were expressed as the mean of 50% inhibitory concentration of triplicate determines, obtained by interpolation of concentration inhibition curve.

⁵⁾ Value are mean±S.D.

Means are different significantly between *S. cerevisiae* Fermivin and *S. cerevisiae* GBY5 at * $p<0.05$, and *** $p<0.001$.

방, 노화방지 등(Kim HJ 등 2000)을 나타내므로 총 폴리페놀 함량이 높은 *S. cerevisiae* GBY5는 현재 양조 산업에 주로 이용되고 있는 시판효모인 Fermivin을 대체할 수 있는 효모로 오디 발효주 제조에 산업적으로 이용 가능할 것으로 판단된다.

5. DPPH 및 ABTS 라디칼 소거활성 변화

토종효모 *S. cerevisiae* GBY5와 수입 시판건조효모 Fermivin을 이용하여 제조한 오디 발효주의 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거활성의 IC₅₀ 값을 측정된 결과를 Table 5에 나타내었다. *S. cerevisiae* GBY5와 Fermivin의 DPPH 라디칼 소거활성의 IC₅₀ 값은 각각 16.80±0.03 µL/mL, 15.68±0.05 µL/mL로 Fermivin의 DPPH 라디칼 소거활성이 *S. cerevisiae* GBY5보다 유의적($p<0.05$)으로 높은 활성을 나타냈다. 반면에 *S. cerevisiae* GBY5와 Fermivin의 ABTS 라디칼 소거활성의 IC₅₀ 값을 측정된 결과, *S. cerevisiae* GBY5가 22.45±0.15 µL/mL로 Fermivin의 22.83±0.20 µL/mL보다 유의적($p<0.05$)으로 높게 나타났다. 이는 *S. cerevisiae* GBY5가 양이온 라디칼인 ABTS에 잘 반응하는 항산화 물질이 많을 것으로 예상되며(Wang M 등 1999), Chae KS 등(2014)의 연구에서 *S. cerevisiae* B-8과 Fermivin으로 발효한 오디 발효주에서 토종효모인 *S. cerevisiae* B-8의 DPPH 라디칼 소거활성이 Fermivin보다 낮은 활성을 나타내었으나, ABTS 라디칼 소거활성의 경우 *S. cerevisiae* B-8이 Fermivin보다 ABTS 라디칼 소거활성이 높게 나타나 본 연구결과와 유사한 것으로 나타났다.

요약 및 결론

본 연구에서는 오디 발효주 제조에 적합한 토종효모를 선별하고자 오디 및 아로니아로부터 4종의 토종효모를 분리하였다. 이들을 이용한 오디 발효 시 4종의 효모 모두 정상적인 발효가 진행된 것으로 나타났으며, 이 중 GBY5 균주가 오디 발효주의 에탄올 생성량과 적색도가 각각 13.40%, 50.40%로 가장 높게 나타나 오디 발효주 제조를 위한 최종 발효 균주로 선별하였다. 최종 선별된 GBY5 균주의 18S rRNA 염기서열을 분석한 결과, *S. cerevisiae*로 동정되었으며, *S. cerevisiae* GBY5로 명명하였다.

아로니아로부터 분리된 토종효모 *S. cerevisiae* GBY5와 상업적으로 주류 제조에 많이 사용되고 있는 *S. cerevisiae* Fermivin을 이용한 발효주를 제조하여 알코올함량, 당도, pH, 총산도 및 색도 등의 발효 특성을 분석한 결과, 최종 알코올 함량은 *S. cerevisiae* GBY5가 13.33%로 Fermivin의 13.24%보다 유의적으로 높게 나타났다. 당도는 발효가 진행됨에 따라 *S. cerevisiae* GBY5와 Fermivin 모두 당도가 감소하여 최종 당도는 각각 8.93 및 9.23 °Brix를 나타내었다. 또한 두 균

주 모두 발효에 의해 pH는 감소하고 총산도는 증가하는 경향을 나타내었으며, 발효주의 색도를 측정된 결과 Fermivin을 이용한 발효주의 명도(L)는 *S. cerevisiae* GBY5에 비해 유의적($p<0.05$)으로 높게 나타난 반면, 황색도(b) 및 적색도(a)의 경우 *S. cerevisiae* GBY5가 유의적($p<0.05$)으로 높게 나타났다. 오디 발효주의 유기산 함량을 측정된 결과, 발효주 제조 시 자극적이고 신미를 가지는 acetic acid 함량이 fermivin에 의한 3.26 mg/mL보다 *S. cerevisiae* GBY5가 1.99 mg/mL로 유의적($p<0.05$)으로 낮게 나타났으며, 와인의 신맛을 부드럽게 해주는 malic acid의 경우 *S. cerevisiae* GBY5가 fermivin보다 유의적($p<0.05$)으로 높게 나타났다. 와인의 신선함을 증가시키는 citric acid 함량도 마찬가지로 *S. cerevisiae* GBY5가 3.63 mg/mL로 fermivin의 2.99 mg/mL보다 유의적($p<0.05$)으로 높게 나타났다.

발효주의 기능성 변화를 비교하기 위하여 총 폴리페놀, 총 플라보노이드 및 총 안토시아닌 함량을 비교한 결과, 총 폴리페놀 함량에서 차이가 확인되었으며 *S. cerevisiae* GBY5를 이용한 발효주의 총 폴리페놀 함량이 2.92 TAE mg/mL로 Fermivin에 의한 발효주 2.78 TAE mg/mL보다 유의적($p<0.05$)으로 높게 나타났다. 또한 오디 발효주의 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거활성의 IC₅₀ 값을 측정된 결과, DPPH 라디칼 소거활성의 경우 *S. cerevisiae* Fermivin이 GBY5보다 유의적($p<0.05$)으로 높게 나타난 반면, ABTS 라디칼 소거활성의 경우 *S. cerevisiae* GBY5에서 유의적($p<0.05$)으로 높게 나타났다.

이러한 결과를 종합해볼 때 토종효모 *S. cerevisiae* GBY5 균주는 수입 시판효모인 Fermivin에 비해 최종 알코올 생성량이 높고 우수한 적색도를 나타내며, citric acid와 malic acid 함량이 높아 와인의 향과 맛에 있어 신선하고 부드러운 풍미를 나타내었다. 또한, 폴리페놀 함량과 ABTS 라디칼 소거활성이 Fermivin에 비해 우수하여 심미적뿐만 아니라, 기능적인 측면에서도 경쟁력 있는 토종효모로서 Fermivin을 대체할 수 있는 효모로 기대되며, 발효주 생산 등의 산업적 활용이 가능하며 이용가치가 높을 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 농림축산식품부가 지원하는 2015년 농촌자원 복합산업화지원사업 향토건강식품품목품화사업에 의해 수행된 연구결과이며, 연구비 지원에 감사드립니다.

REFERENCES

AOAC (1990) Official Methods of Analysis. 15th ed. Associ-

- ation of Official Analytical Chemists, Washington, DC.
- Arts MJTJ, Haenen GRMM, Voss HP, Bast A (2004) Antioxidant capacity of reaction products limits the applicability of the trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay. *Food Chem Toxicol* 42(1): 45-49.
- Chae KS, Jung JH, Yoon HH, Son RH (2014) Antioxidant activity and main volatile flavor components of mulberry wine fermented with *Saccharomyces cerevisiae* B-8. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 43(7): 1017-1024.
- Chang CC, Yang MH, Wen HM, Chen JC (2002) Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J Food Drug Anal* 10(3): 178-182.
- Choi JS, Lee JH, Park HJ, Kim HG, Young HS, Mun SI (1993) Screening for antioxidant activity of plants and marine algae and its active principles from *Prunus davidiana*. *Korean J Pharmacogn* 24(4): 299-303.
- Choi SW (2005) Development of High Quality Functional Foods Using Mulberry (*Morus* spp.) fruit. Ministry of Agriculture Food and Rural Affairs Report.
- Du Q, Zheng J, Xu Y (2008) Composition of anthocyanins in mulberry and their antioxidant activity. *J Food Compost Anal* 21(5): 390-395.
- Jackson RS (2008) Chemical constituents of grapes and wine. pp 270-331. In: *Wine Science. Principles and Applications*. Jackson RS (ed). Academic Press, Burlington, MA, USA.
- Ju MJ, Kwon JH, Kim HK (2009) Physiological activities of mulberry leaf and fruit extracts with different extraction conditions. *Korean J Food Preserv* 16(3): 442-448.
- Kang CS, Ma SJ, Cho WD, Kim JM (2003) Stability of anthocyanin pigment extracted from mulberry fruit. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32: 960-964.
- KFDA (2012) Korea Health Supplements Food Standard Codex. Korea Health Supplements Association, Seoul, Korea. p 463, p 529.
- Kim HB, Kim AJ, Kim SY (2003) The analysis of functional materials in mulberry fruit and food product development trends. *Food Sci Ind* 36: 49-60.
- Kim HJ, Jun BS, Kim SK, Cha JY, Cho SY (2000) Polyphenolic compound content and antioxidative activities by extracts from seed, sprout and flower of safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *J Korean Soc Food Sci Nutr* 29: 1127-1132.
- Kim HR, Kwon YH, Kim HB, Ahn BH (2006) Characteristics of mulberry fruit and wine with varieties. *J Korean Soc Appl Bio Chem* 49(3): 209-214.
- Kim KI, Kim ML (2010) Characteristics of wine fermented from mulberry juice. *Korean J Food Preserv* 17(4): 563-570.
- Kim TK, Shin HD, Lee YH (2003) Stabilization of polyphenolic antioxidants using inclusion complexation with cyclodextrin and their utilization as the fresh-food preservative. *Korean J Food Sci Technol* 35(2): 266-271.
- Kim TW, Kwon YB, Lee JH, Yang IS, Youm JK, Lee HS, Moon JY (1996) A study on the antidiabetic effect of mulberry fruits. *Korean J Seric Sci* 38: 100-107.
- Kim YD, Ha KY, Lee KB, Shin HT, Cho SY (1998) Varietal variation of anthocyanin content and physicochemical properties in colored rice. *Korean J Breed* 30(3): 305-308.
- Kim YS, Jeong DY, Shin DH (2008) Optimum fermentation conditions and fermentation characteristics of mulberry (*Morus alba*) wine. *Korean J Food Sci Technol* 40(1): 63-69.
- Kong TI, Cheong C (2015) Quality characteristics of black raspberry wine added with wild grape by yeast strains and fermentation conditions. *JKAIS* 16(5): 3361-3369.
- Kwak JH, Choi GN, Park JH, Kim JH, Jeong HR, Jeong CH, Heo HJ (2010) Antioxidant and neuronal cell protective effect of purple sweet potato extract. *J Agric Life Sci* 44(2): 57-66.
- Lee JE, Shin YS, Sim JK, Kim SS, Koh KH (2002) Study on the color characteristics of Korean red wine. *Korean J Food Sci Technol* 34: 164-169.
- Lee SY, Shin YJ, Park JH, Kim SM, Park CS (2008) An analysis of the Gyungokgo's ingredients and a comparison study on anti-oxidation effects according to the kinds of extract. *Korean J Herbol* 23(2): 123-136.
- Moon YJ, Lee MS, SUNG CK (2005) Physicochemical properties of raspberry wine using active dry yeast strains. *Korean J Food & Nutr* 18(4): 302-308.
- Park SW, Jung YS, Ko KC (1997) Quantitative analysis of anthocyanins among mulberry cultivars and their pharmacological screening. *J Korean Soc Hort Sci* 38(6): 722-724.
- Roh HI, Chang EH, Joeng ST, Jahng KY (2008) Characteristics of fermentation and wine quality. *Korean J Food Preserv* 15(2): 317-324.
- Son WR, Choi SW (2013) Biological activity and analysis of α -glucosidase inhibitor from mulberry (*Morus alba* L.)

- wine. Korean J Food Preserv 20(6): 877-885.
- Sung JM, Lim JH, Park KJ, Jeong JW (2008) Effects of semi-dried red pepper with a different seed ratio on the quality of kimchi. Korean J Food Preserv 15(3): 427-436.
- Tsao R (2010) Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. Nutrients 2(12): 1231-1246.
- Wang M, Shao Y, Li J, Zhu N, Rangarajan M, LaVoie EJ, Ho CT (1999) Antioxidative phenolic glycosides from sage (*Salvia officinalis*). J Nat Prod 62: 454-456.
- Yoon HS, Park HJ, Park JH, Jeon JO, Jeong CW, Choi WI, Kim SD, Park JM (2017) Quality characteristics and volatile flavor components of aronia wine. Korean J Food Nutr 30(3): 599-608.
-
- | | |
|---------------|---------------|
| Date Received | Apr. 29, 2019 |
| Date Revised | Jun. 13, 2019 |
| Date Accepted | Jun. 13, 2019 |