



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 등록특허공보(B1)**

(45) 공고일자 2017년02월23일  
 (11) 등록번호 10-1703249  
 (24) 등록일자 2017년01월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
 C12N 1/14 (2006.01) C12G 1/022 (2006.01)  
 C12G 3/02 (2006.01) C12G 3/08 (2006.01)  
 C12R 1/865 (2006.01)  
 (52) CPC특허분류  
 C12N 1/14 (2013.01)  
 C12G 1/0203 (2013.01)  
 (21) 출원번호 10-2015-0077294  
 (22) 출원일자 2015년06월01일  
 심사청구일자 2015년06월01일  
 (65) 공개번호 10-2016-0141905  
 (43) 공개일자 2016년12월12일  
 (56) 선행기술조사문헌  
 KR101498955 B1\*  
 J. Microbiol. Biotechnol. (2013), Vol.23,  
 No.9, 1253-1259.\*  
 \*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
 경남과학기술대학교 산학협력단  
 경상남도 진주시 동진로 33 (칠암동)  
 영농조합법인 오름주가  
 경상남도 사천시 미룡길 31-20 (노룡동)  
 (72) 발명자  
 서원택  
 경상남도 산청군 신안면 수월로491번길 36  
 조계만  
 경상남도 진주시 진주대로829번길 21 103동 2501  
 호  
 (뒷면에 계속)  
 (74) 대리인  
 조영신

전체 청구항 수 : 총 6 항

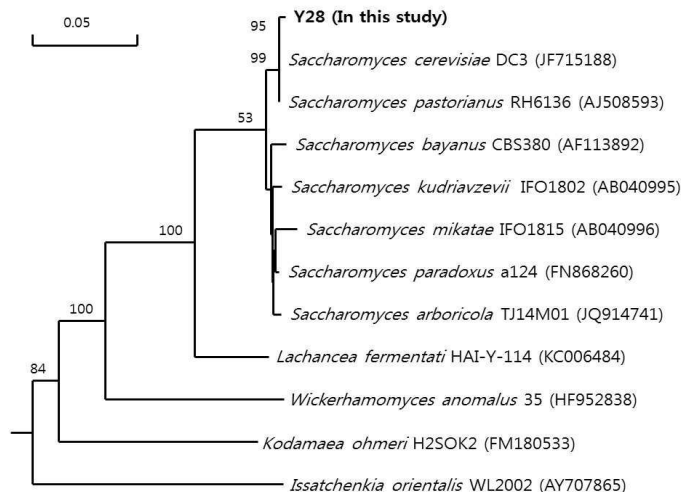
심사관 : 이현석

**(54) 발명의 명칭 신규 사카로마이세스 세레비지에 Y28 균주 및 이를 이용한 참다래-감 혼합 와인의 제조방법**

**(57) 요약**

본 발명에서는 신규한 사카로마이세스 세레비지에 Y28 (*Saccharomyces cerevisiae* Y28) 균주 및 이를 이용한 참다래-감 혼합 와인(혼합과실주)의 제조방법에 관한 것으로, 내산성, 내당성 및 내알코올성이 우수하여 산도가 강한 과실을 이용하여 기호성이 증진된 발효주의 생산능이 탁월한 사카로마이세스 세레비지에 Y28 균주 및 이 균주를 이용하여 신맛은 감소하고 탄닌 함량은 증대되어 기호성이 향상된 참다래-감 혼합 와인의 제조방법이 제공된다.

**대표도 - 도2**



(52) CPC특허분류

- C12G 3/02 (2013.01)
- C12G 3/08 (2013.01)
- C12G 2200/05 (2013.01)
- C12R 1/865 (2013.01)

(72) 발명자

**조현국**

경상남도 사천시 곤명면 완사3길 80

**신지현**

경상남도 사천시 사천읍 서인리 대경아파트 101동  
208호

**정성훈**

경상남도 남해군 남해읍 아산리 망운로10번가길 27

**이희율**

경상남도 진주시 금산면 중천리 금산로 130 금호맨  
션 410호

**이주영**

경상남도 진주시 순환로553번길 7, 1003호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 113028-3

부처명 농림축산식품부

연구관리전문기관 농림수산식품기술기획평가원

연구사업명 고부가가치식품기술개발사업

연구과제명 탄닌 함량이 높은 과일과 참다래를 이용한 기호성과 기능성이 개선된 과실주 제품화

기여율 1/1

주관기관 영농조합법인 오름주가

연구기간 2013.07.16 ~ 2016.07.15

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

참다래 및 감 혼합 와인의 제조를 위한 효모 균주로 유용한, 수탁번호 KACC93227P로 기탁된 사카로마이세스 세레비지에 (*Saccharomyces cerevisiae*) Y28 균주로,

상기 균주는 pH 3에서 OD<sub>600nm</sub> 6 이상의 생육성, 당농도 40%에서 OD<sub>600nm</sub> 5 이상의 생육성, 알코올 농도 10%에서 OD<sub>600nm</sub> 5 이상의 생육성 및 아황산 농도 200 ppm에서 OD<sub>600nm</sub> 7 이상의 생육성을 나타내고, 참다래 및 감 혼합 와인을 제조시 10.0%(v/v) 이상의 알코올 발효능을 갖는 것을 특징으로 하는 균주.

#### 청구항 2

삭제

#### 청구항 3

참다래 및 감 혼합 와인의 제조 방법으로,

- i) 참다래 과즙 60 ~ 70 중량%와 감 과즙 30 ~ 40 중량%을 혼합한 참다래 및 감 혼합 과즙을 제공하는 단계;
- ii) 참다래 및 감 혼합 과즙에 22 ~ 26 브릭스로 보당하는 단계; 및
- iii) 제1항에 따른 사카로마이세스 세레비지에 Y28 균주를 접종하여 발효 및 숙성시키는 단계를 포함하고,

상기 단계 i)에서, 참다래 과즙 및 감 혼합 과즙은, 혼합 과즙의 전체 중량을 기준으로 펙틴아제와 아라반아제의 복합효소 0.2 ~ 0.4 중량%를 첨가하여 40 ~ 45℃의 항온수조에서 2 ~ 4시간 반응시킨 것임을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 4

삭제

#### 청구항 5

제 3항에 있어서, 단계 iii)에서 사카로마이세스 세레비지에 Y28 균주는 2.5% ~ 5.0%(v/v)로 접종하고, 15 ~ 20℃에서 10 ~ 120일간 발효 및 숙성하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 6

제 3항에 있어서, 단계 iii)으로부터의 와인을 60 ~ 100℃에서 살균하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 7

삭제

#### 청구항 8

제 3항, 제 5항 및 제 6항중 어느 한 항에 따라서 제조되고, 기호성이 증진된 참다래 및 감 혼합 와인.

**청구항 9**

제 8항에 있어서, 상기 기호성의 증진은 신맛의 감소와 탄닌 함량의 강화에 의한 것임을 특징으로 하는 기호성이 증진된 참다래 및 감 혼합 와인.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 신규한 사카로마이세스 세레비지에 Y28 (*Saccharomyces cerevisiae* Y28) 균주 및 이를 이용한 참다래-감 혼합 와인(혼합과실주)의 제조방법에 관한 것으로, 더 상세하게는 내산성, 내당성 및 내알코올성이 우수하여, 산도가 강한 과실을 발효하여 기호성이 증진된 발효주의 생산능이 탁월한 사카로마이세스 세레비지에 Y28 균주 및 이 균주를 이용하여 신맛은 감소하고 탄닌 함량은 증대되어 기호성이 향상된 참다래-감 혼합 와인의 제조방법에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0002] 국내 와인 시장은 2000년부터 20, 30대의 젊은 소비층의 관심이 높아지면서 지속적으로 증가하고 있으며 2012년 와인의 소비는 2000년보다 2.5배 증가한  $3.8 \times 10^7$  L를 소비하였다. 최근에는 알코올 함량이 낮은 주류 선호도가 증가함에 따라 편의점 등에서 손쉽게 구할 수 있는 대중적인 술로써 와인 소비량이 더욱 증가하고 있는 추세이다.

[0003] 와인의 품질과 기호도를 결정하는 중요한 요소로는 향기성분, 유기산 및 탄닌의 함량을 들 수 있으며, 따라서 과실을 이용한 와인의 제조방법은 이들 요소가 최적화되도록 개발이 요구되어 왔다. 또한 펙틴질(식이섬유)이 풍부한 과실을 이용하여 와인을 제조할 때, 과실 중의 펙틴질에 의해 수율이 좋지 않거나 혼탁해지는 문제가 발생해 왔던바, 과실의 펙틴질의 함량을 조절하여 과즙의 수율을 높이고 혼탁의 문제를 예방할 수 있는 방법들에 대한 연구도 요구되어 왔다.

[0004] 참다래는 온대성 낙엽과수로 우리나라에서는 주로 남해안 일대와 제주도에서 재배되고 있으며 품종은 헤이워드(Hayward) 품종이 주를 이루고 있으며, 수확 후 후숙하여 먹는 과실이다. 참다래는 헥산알(hexanal)로 대표되는 향을 지니며 자체 당도와 구연산, 사과산 등의 유기산이 풍부해 산도가 높아 신맛이 강하며, 또한 식이섬유(펙틴질)가 풍부하며, 비타민 C, 비타민 E 함량이 높고, 칼슘, 마그네슘, 인 등의 무기질 함량도 풍부하며 그 외에 클로로필, 카로티노이드, 폴리페놀, 플라보노이드와 같은 생리활성 물질을 포함하고 있다. 그러나 호흡상승형 과실이므로 저장 및 유통과정 중에 참다래 조직이 급격히 연화되므로 쉽게 상품성을 잃어버리는 단점이 있어 가공품 개발이 지속적으로 요구되어 오고 있다.

[0005] 감(*Diospyros kari*)은 우리나라에서 재배되고 있는 온대성 과실 중 하나로 포도당과 과당을 주로 포함한 당분이 약 14%로 함유되어 있으며 무기질, 비타민 C, 비타민 A 및 비타민 B와 펙틴질 풍부한 영양학적 가치가 높은 알칼리 식품이며, 에피카테킨(epicatechin) 등의 탄닌(tannin) 성분의 기능성 페놀릭스(phenolics)가 다량 함유되어 있다. 또한 감에는 식이섬유도 풍부하다.

[0006] 참다래를 이용하여 와인을 제조한 종래 기술 (특허등록 353479호, 특허등록 873717호, 특허공개 2012-0049965호)은 몇몇 존재한다. 이들 종래 제조방법은 숙성시킨 참다래 과즙에 통상의 알코올 발효 효모균주인 사카로마이세스 속 균주들을 사용하였는데 이들 통상의 균주들은 내산성, 내당성 및 내알코올성이 부족하여 신맛이 강한 참다래를 주재료로 한 발효주의 제조에 적합하지 않았으며 기호성이 우수한 발효주의 제조가 어려웠다. 대안으로서 특허등록 1486222호는 내당성, 내알코올성 및 알코올 생성능이 우수한 피치아 구일리엘몬디아 이 SY46 균주의 이용가능성을 제시하고 있으나, 이 균주를 이용한 와인 제조는 아직 식용 여부가 담보되지 않은 문제점이 존재한다. 따라서 사카로마이세스 속에 속하면서 내산성, 내당성 및 내알코올성이 우수하여 참다래를 주재료로 한 와인 발효에 최적화될 수 있는 신규한 발효 효모균주의 발굴이 꾸준히 요구되어 왔다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

- [0007] 종래 기술에서의 요구에 부응하기 위해 지속적으로 연구한 결과, 본 발명자들은 천연 과실발효액으로부터 내산성, 내당성 및 내알코올성이 우수한 신규 사카로마이세스 세레비지에 균주를 분리동정하여 이 효모균주가 참다래를 주재료로 한 발효주의 제조에 매우 유용함을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다. 또한 본 발명자들은 참다래를 주재료로 한 발효주의 제조시 감을 적절히 첨가하고 라피타제로 전처리할 경우, 수율과 기호성이 우수한 참다래-감 혼합 과실주(와인)를 제조할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0008] 따라서 본 발명의 목적은 참다래를 주재료로 한 와인 제조에 유용한 내산성, 내당성 및 내알코올성이 우수한 신규 사카로마이세스 세레비지에 Y28 균주를 제공하는 것이다.
- [0009] 또한 본 발명의 목적은 사카로마이세스 세레비지에 Y28 균주를 이용하여 신맛은 감소되고 탄닌이 증가되어 기호성이 증진된 고품질의 참다래-감 혼합 와인의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [0010] 또한 본 발명의 목적은 사카로마이세스 세레비지에 Y28 균주와 라피타제를 이용하여 신맛은 감소되고 탄닌이 증가되어 기호성이 증진되며 수율도 향상되는 고품질의 참다래-감 혼합 와인의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [0011] 또한 본 발명의 목적은 상기 제조방법에 의해 제조되고, 기호성이 증진된 참다래-감 혼합 와인을 제공하는 것이다.

**과제의 해결 수단**

- [0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 참다래를 주재료로 하는 와인 제조를 위한 효모 균주로 사용될 수 있는 사카로마이세스 세레비지에 Y28 균주를 제공한다.
- [0013] 본 발명자들은 과일발효액으로부터 내당성, 내알코올성, 내산성 및 알코올 발효능이 우수한 사카로마이세스 속 신규한 균주를 확인동정하고, 이 균주를 사카로마이세스 세레비지에 Y28로 명명한 후, 국립농업과학원 농업유전 자원센터에 기탁하여 2015년 5월 7일에 수탁번호 KACC93227P를 부여받았다 (실시에 1).
- [0014] 사카로마이세스 세레비지에 Y28 균주의 26S rDNA 염기서열 (도 1)을 결정하였고 이를 기초로 하여 BLAST 네트워크 서비스와 DNA 서열 데이터베이스를 제공하는 미국국립생물정보센터(NCBI)에서 얻은 다른 균종의 26S rDNA 염기서열과 정렬하여 사카로마이세스 속에 속함을 알 수 있었다 (도 2).
- [0015] 사카로마이세스 세레비지에 Y28 균주는 pH 3에서 OD<sub>600nm</sub> 6 이상의 생육성, 당농도 30%에서 OD<sub>600nm</sub> 6 이상의 생육성, 알코올 농도 10%에서 OD<sub>600nm</sub> 5 이상의 생육성 및 아황산 농도 200 ppm에서 OD<sub>600nm</sub> 7 이상의 생육성을 나타냈고, 참다래-감(7 : 3 중량비) 과즙에서 10.2%(v/v)의 알코올 발효능을 가졌다 (도 3a ~ 도 3d 및 표 1).
- [0016] 본 발명의 또 다른 목적에 따라서, 사카로마이세스 세레비지에 Y28 균주를 알코올 발효균주로 사용하는 것을 특징으로 하는 신맛 감소와 탄닌이 증가된 참다래-감 혼합 와인의 제조방법이 제공된다.
- [0017] 본 발명에 따른 참다래-감 혼합 와인의 제조방법은
- [0018] i) 참다래와 감의 혼합 과즙을 제공하는 단계;
- [0019] ii) 참다래 및 감 혼합 과즙에 22 ~ 26 브릭스로 보당하는 단계; 및
- [0020] iii) 사카로마이세스 세레비지에 Y28 균주를 접종하여 발효 및 숙성시키는 단계를 포함한다.
- [0021] 본 발명의 참다래-감 혼합 와인의 제조방법은, 필요에 따라서, 단계 ii) 전에, 참다래 및 감 혼합 과즙에 라피타제 효소를 처리한 후, 치즈 클로스(Cheese cloth)로 여과하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0022] 또한 본 발명의 제조방법은, 필요에 따라서, 단계 iii)으로부터의 와인을 60 ~ 100℃에서 살균하는 단계 및/또는 여과하여 와인병에 충전하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0023] 단계 i): 참다래 및 감 혼합 과즙의 제공

- [0024] 참다래 및 감을 각각 원심분리형 믹서기로 과쇄한 후, 참다래 과즙 60 ~ 70% 중량%와 감 과즙 30 ~ 40 중량%를 혼합하여 참다래와 감 혼합 과즙을 얻는다.
- [0025] 참다래는 후숙에 의해 당도가 높아진 것을 사용한다. 구체적으로는 참다래를 흐르는 물에 세척한 후 물기를 제거하고 6 ~ 10℃에서 15 ~ 20일 후숙시켜 사용하는 것이 바람직하나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0026] 혼합 과즙에서 참다래의 함량은 60 ~ 70 중량%가 바람직한데, 60 중량% 미만일 경우 참다래 특유의 향 등이 감소하며, 70 중량% 초과일 경우 와인의 신맛이 강해진다.
- [0027] 감은 수확 초기의 짙은 맛을 내는 감을 사용한다. 짙은 감은 탄닌(Tannin)을 상대적으로 많이 함유하고 있어서 와인에 탄닌 함량을 증진시키고 기호성도 증진시키는 역할을 한다.
- [0028] 혼합 과즙에서 감의 함량은 30 ~ 40 중량%가 바람직한데, 30 중량% 미만일 경우 와인의 탄닌 함량 증진의 효과가 미흡하고, 40 중량% 초과일 경우는 짙은맛이 강해져서 와인의 기호성이 떨어지게 된다.
- [0029] 단계 ii): 보당
- [0030] 참다래 및 감 혼합 과즙을 보당한다.
- [0031] 보당은 당류를 첨가하여 22 ~ 26 브릭스(brix)가 되도록 조정한다. 보당은 통상적으로 사용되는 당류를 사용하며, 당류는 특별히 제한되지 않는다.
- [0032] 22 브릭스 미만이면 알코올 생성량이 적으며, 26 브릭스 초과시에는 삼투압의 증가로 알코올 생성량이 감소한다.
- [0033] 단계 ii)': 라피타제 효소처리
- [0034] 단계 ii) 전에, 필요에 따라서, 단계 i)의 참다래 과즙 및 감 혼합 과즙에 라피타제 효소를 처리하여 치즈 클로스로 여과하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0035] 라피타제 (rapidase)는 펙틴아제(pectinases)와 아라반아제(arabanases)의 복합효소로 이들의 작용에 의해서 식물세포벽인 펙틴을 가수분해 작용을 하며, 상업적으로 과일 혹은 채소의 가공에 사용되고 있는 것을 이용할 수 있다.
- [0036] 참다래 및 감 혼합 과즙 100 중량부에, 필요에 따라서, 매실 엑기스 5 ~ 10 중량부를 첨가한다. 본 발명의 제조 방법에서 매실 엑기스는 라피타제 효소의 최적 pH로 조정하여 효소 반응 작용을 원활하게 한다.
- [0037] 라피타제 효소 처리는 혼합과즙 총량을 기준으로 라피타제를 0.2 ~ 0.4 중량%로 첨가하여 항온수조에서 2 ~ 4시간 반응시키는 것으로 수행한다. 반응을 완료 후 치즈클로스를 사용하여 고형분을 여과한다. 상기 항온수조는 40 ~ 45℃ 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0038] 라피타제의 처리는 참다래 및 감 혼합과즙의 수득율을 크게 증대시킨다 (표 3 및 4).
- [0039] 단계 iii): 발효
- [0040] 혼합과즙에 사카로마이세스 세레비지에 Y28 균주를 접종하여 발효 및 숙성시킨다.
- [0041] 사카로마이세스 세레비지에 Y28 균주는 2.5% ~ 5.0%(v/v)로 접종한다. 균 접종량이 2.5% 이하이면 발효 속도가 지연되며, 5.0% 이상일 때는 발효 속도와 상관없이 경제성이 없다.
- [0042] 발효 및 숙성 조건은 15 ~ 20℃의 온도에서 10 ~ 120일간 발효, 숙성시킨다. 15℃ 미만에서는 발효 속도가 지연되며, 20℃ 초과에서는 발효 속도는 증가하나, 산패 등이 일어날 수 있다. 10일 미만의 기간이면 알코올 생성력과 풍미가 충분하지 않으며, 120일 초과인 기간이면 산패 등이 일어날 수 있다.
- [0043] 단계 iv): 살균

- [0044] 필요에 따라서, 단계 iii)으로부터의 와인을 살균한다.
- [0045] 살균은 60 ~ 100℃에서 15 ~ 30분간 열처리 하는 것으로 행할 수 있으며, 60℃, 15분 미만으로 살균 시에는 잡균들의 살균이 미흡할 수 있고, 100℃, 30분 초과인 살균 시에는 당, 단백질 등의 영양성분들이 파괴될 수 있다.
- [0046] 단계 v): 여과 및 충전
- [0047] 필요에 따라서, 생산된 와인을 여과하여 와인병에 충전하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0048] 여과는 마이크로 필터를 이용하여, 와인병에 충전은 통상의 방법에 의한다.
- [0049] 본 발명의 제조방법은 사카로마이세스 세레비지에 Y28 균주를 이용하여 신맛은 감소되고 탄닌이 증가되어 기호성이 증진된 고품질의 참다래-감 혼합 와인을 제조케 하며, 또한 라피타제를 사용함에 의해 수율도 향상시킨다.
- [0050] 본 발명의 제조방법에 따라 제조된 참다래-감 혼합 와인은 신맛은 감소되고 탄닌이 증가되어 기호성이 증진된 고품질 와인의 특성을 갖는다 (표 10).

**발명의 효과**

- [0051] 본 발명의 사카로마이세스 세레비지에 Y28 균주는 내산성, 내당성 및 내알코올성을 가져서 신맛이 강한 참다래를 주재료로 한 와인 제조에 매우 유용하며, 고품질의 참다래-감 혼합 와인을 제조케 할 수 있다.
- [0052] 본 발명의 제조방법은 사카로마이세스 세레비지에 Y28 균주를 이용하여 신맛은 감소되며 감 과즙의 첨가에 따른 탄닌의 증가로 기호성이 증진된 고품질의 참다래-감 혼합 와인을 제조케 한다.
- [0053] 본 발명의 제조방법은 또한 라피타제 효소처리 단계를 포함함에 따라 참다래와 감의 펙틴질을 감소시켜 과즙 수득율을 증가시켜서 최종적으로 참다래-감 혼합 와인의 수율을 증가시킨다.

**도면의 간단한 설명**

- [0054] 도 1은 사카로마이세스 세레비지에 Y28 균주의 26S 라이보솜 DNA 염기서열이다.  
 도 2는 사카로마이세스 세레비지에 Y28 균주의 계통발생학적 유연관계도다.  
 도 3은 사카로마이세스 세레비지에 Y28 균주와 대조 균주(사카로마이세스 세레비지에 KCCM 12651)의 내산성, 내당성, 내알코올성 및 내아황산성을 나타낸다. 도 3a는 내산성을 나타내고, 도 3b는 내당성을 나타내고, 도 3c는 내알코올성을 나타내고, 도 3d는 내아황산성을 나타낸다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0055] 다음의 실시예들에 의해 본 발명이 더 상세히 설명된다. 이들 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것이며, 본 발명의 범위가 이들에 의해 제한되어서는 안된다.

**[0056] 실시예 1: 균주 분리 및 특성 확인**

- [0057] <균주 분리>
- [0058] 참다래, 대봉감, 포도, 살구, 자두 등의 과일발효액으로부터 효모 균주를 다음과 같이 분리하였다: 과일을 껍질 채 으깨서 발효병에 넣은 후 약 14일간 발효시킨 후 약 10 mL 취하여 90 mL의 멸균증류수로  $10^6 \sim 10^9$ 으로 희석하고 이를 클로람페니콜(1.5 mg/mL)이 함유된 YPD (Yeast extract 5 g, peptone 5 g, dextrose 20 g) 한천배지에 도말하여 30℃ 에서 48 ~ 72시간 동안 배양하여 전형적인 효모 클로니를 새 YPD 한천배지 순수 분리하여 30℃ 에서 48시간 배양하였다.

- [0059] 1차 순수분리된 95 균주에 대해 pH 4, 당 농도 30%와 알코올 농도 10%에서 일차적으로 선별하여 최종적으로 산 내성, 당 내성, 알코올 내성, 아황산 내성, pH, 산도, 알코올 생성능 및 기호성 평가를 시험한 후 이들 모든 특성을 고려하여 분리된 균주들 중에서 Y28로 칭한 균주를 선별하게 되었다.
- [0060] <균주 특성 확인>
- [0061] 본 발명의 Y28 균주와 대조균주로서 통상의 와인 제조에 사용되어 오던 사카로마이세스 세레비지에 KCCM 12615를 사용하여 산, 당, 알코올 및 아황산에 대한 내성들을 시험하였다.
- [0062] 산 내성 측정은 본 발명의 Y28 균주 및 대조균주(사카로마이세스 세레비지에 KCCM 12615)를 각각 PDB (potato dextrose broth, Becton & Dicknson사, USA) 액체배지에서 30℃에서 48시간 배양한 후, 참조(pH. 6.64), pH 5, pH 4, pH 3의 YPD 액체배지에 각각의 균주를 5%(v/v)로 접종한 후 30℃에서 48시간 배양 후 흡광도 (600nm)를 측정하여 균 생육정도를 결정하고 그 결과를 도 3a에 나타냈다.
- [0063] 당 내성 측정은 PDB 액체배지에 0, 10, 20 및 30% 설탕을 첨가하고 각각의 균주를 5.0%(v/v)로 첨가한 후 37℃에서 48시간 액체배양한 후 흡광도(600nm)를 측정하여 균 생육정도를 결정하였고 그 결과를 도 3b에 나타냈다.
- [0064] 알코올 내성 측정은 PDB 액체배지에 0, 5, 10 및 15% 알코올을 첨가하고 각각의 균주를 5.0%(v/v)로 첨가한 후 37℃에서 48시간 액체배양한 후 흡광도(600nm)를 측정하여 균 생육정도를 결정하였고 그 결과를 도 3c에 나타냈다.
- [0065] 아황산 내성 측정은 각각의 균주를 PDB 액체배지에서 30℃에서 48시간 배양한 후, Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 0, 100, 200, 400 ppm의 YPD 액체배지에 각각 5%(v/v)로 접종한 후 30℃에서 48시간 배양 후 흡광도 (600nm)를 측정하여 균 생육정도를 결정하였고 그 결과를 도 3d에 나타냈다.
- [0066] 도 3a ~ 도 3d로부터 본 발명의 Y28 균주는 대조균주에 비하여 내산성, 내당성, 내알코올성, 내아황산성이 우수함을 확인할 수 있다. 구체적으로 본 발명의 균주는 pH 3에서 OD<sub>600nm</sub> 6 이상의 생육성, 당농도 30%에서 OD<sub>600nm</sub> 6 이상의 생육성, 알코올 농도 10%에서 OD<sub>600nm</sub> 5 이상의 생육성 및 아황산 농도 200 ppm에서 OD<sub>600nm</sub> 7 이상의 생육성을 나타냈다.
- [0067] 이화학적 특성, 알코올 생성능 및 기호성 평가는 24 브릭스로 보당한 참다래-감(7 : 3 중량비) 혼합 과즙에 각각의 균주를 5.0%(v/v)로 접종한 후 20℃에서 14일간 발효시킨 와인을 대상으로 평가하였다. 이화학적 특성과 알코올 생성능의 평가 결과는 표 1에 나타내었다.

**표 1**

분석항목	균주	
	대조균주(KCCM 12651)	본 발명 균주(Y28)
pH	3.68	3.76
산도(% , 젓산)	1.96	1.87
브릭스(°)	9	9.2
환원당(g/L)	5.79	6.27
알코올(%)	10.2	10.2

[0069] 표 1에 보는 바와 같이, 본 발명의 균주의 알코올 생성능은 대조균주와 동일하였으며, 대조균주보다 pH는 높고 산도는 낮았다.

[0070] 기호성 평가는 영농조합법인 으뜸주가 직원(연구원)과 경남과학기술대학교 학부생(3,4학년) 및 대학원생 20명 대상으로 5점 척도법으로 평가하여 평균값으로 표기하여 표 2에 나타냈다.

**표 2**

균주	관능평가 항목				비고
	맛	향	색	전체적인 기호도	
대조균주 (KCCM 12651)	4.02	3.99	3.42	3.67	신맛, 단맛 및 떫은맛이 어려워 있으나, 신맛이 약간 강함
본 발명의 균주(Y28)	4.37	4.12	3.62	4.15	신맛, 단맛 및 떫은맛이 고루 어려워 있음



[0072] 표 2로부터, 관능평가 결과 신맛이 대조균주보다 약해져서 맛, 향 및 전체기호도가 향상되어 본 발명의 균주를 사용하여 제조된 와인이 기호성에서 더 우수한 것을 확인할 수 있다.

[0073] **실시예 2: 균주 동정 및 기탁**

[0074] 선별된 Y28 균주를 PDB 5 ml의 액체배지에 2.5%(v/v)로 접종하고 48시간 배양한 후 1.5 ml 원심분리 튜브에 약 1.25 ml 정도 취한 후 원심분리하여 균체를 모집하고 DNAzol kit(Invitrogen사, USA)를 이용하여 균주의 게놈 DNA를 분리했다.

[0075] 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하여 94℃ 에서 1분간 변성, 52℃ 에서 30초간 풀림, 72℃ 에서 30초 신장으로 30 회 수행하여 26S rDNA (0.6 kb 단편)을 증폭했다. 증폭된 26S rDNA PCR 산물을 1% 아가로스에서 전기영동하고 0.6 kb 단편을 회수 및 정제한 후 pGEM-T Easy (Promega, Madison, USA)를 사용하여 클로닝하고 대장균 (*Escherichia coli*) DH5에 형질전환 후, 형질전환체를 무작위로 선정하여 순수 분리하고 순수 분리된 형질전환체를 50 g의 엡필린 함유된 LB (Luria-Bertani broth, Becton & Dickinson사, USA) 액체배지에 접종하여 37℃ 에서 16시간 배양한 후 균체를 모집하고 플라스미드 정제 Kit (Intron, Suwon, Korea)에 기술된 대로 플라스미드를 분리 정제했다. 분리된 플라스미드를 서열 결정 주형가닥으로 사용하였다. 핵산 염기서열은 PRISM Ready Reaction Dye terminator/primer cycle sequencing kit를 사용한 디데옥시 사슬 종결법을 이용하여 분석하여 그 염기서열 639 bp를 결정하였다 (도 1). 이 26S rDNA 염기서열은 BLAST network service와 DNA sequence database를 제공하는 미국 국립생물정보센터(NCBI)에서 얻은 다른 균들의 것과 상동성을 분석하여 최종 동정했다 (도 2).

[0076] 이와 같이 동정된 균주를 사카로마이세스 세레비지에 (*Saccharomyces cerevisiae*) Y28로 명명하고, 국립농업과학원 농업유전자원센터에 기탁하여 2015년 5월 7일자로 기탁번호 KACC93227P를 부여받았다.

[0077] **실시예 3: 참다래 및 감 혼합 과즙의 라피타제 효소처리 최적화**

[0078] 참다래(품종명: 헤이워드)를 흐르는 물에 3회 세척한 후 물기를 제거하고 6 ~ 10℃에서 15 ~ 20일 후숙시킨 후 원심분리형 믹서기로 파쇄하여 참다래 과즙을 10 kg 준비하였다.

[0079] 대봉감(뽕은맛) 역시 흐르는 물에 3회 세척한 후 물기를 제거하고 원심분리형 믹서기로 파쇄하여 감 과즙을 10 kg 준비하였다.

[0080] 참다래 과즙 1 kg, 감 과즙 1 kg의 각각의 총 중량을 기준으로 매실 엑기스 5 중량%, 라피타제 (Vintessential 사, 호주) 0, 0.1, 0.2 및 0.4 중량% 첨가하여 40 ~ 50℃ 항온수조에서 0.5, 1, 2 및 4시간 반응시킨 후, 치즈 클로스를 사용하여 고형분을 걸러 혼합과즙을 얻었다.

[0081] <라피타제 최적 첨가량>

[0082] 라피타제 첨가량에 따른 참다래 과즙 및 감 과즙의 수율 및 브릭스 분석을 행하였고, 그 결과를 표 3에 나타냈다.

[0083] 수율은 감과즙 착즙 전 kg에 처리 후 착즙 후 kg에 대해서 아래와 같은 계산으로 측정하였다.

[0084] 수율(%) = [1-(착즙 전 kg ÷ 착즙 후 kg)] × 100

**표 3**

[0085]

분석항목	라피타제 처리량 (중량%)			
	0	0.1	0.2	0.4
참다래 과즙				
수율 (%)	76.40	82.00	83.60	89.80
대봉감 과즙				
수율 (%)	44.61	70.90	78.55	81.64

[0086] 표 3에서 확인되는 바와 같이, 라피타제 효소 첨가량이 참다래 및 대봉감 과즙의 수득율은 0.2 ~ 0.4 중량%의 라피타제 처리시 크게 향상되었다.

[0087] <라피타제 최적 처리 시간>

[0088] 라피타제 (0.3 중량%) 처리 시간에 따른 참다래 과즙 및 감 과즙의 수율 분석을 행하였고, 그 결과를 표 4에 나타냈다.

표 4

분석항목	라피타아제 처리시간			
	0.5	1	2	4
참다래 과즙				
수율 (%)	73.00	80.60	81.00	81.60
대봉감 과즙				
수율 (%)	61.25	69.01	74.00	77.71

[0090] 표 4에서 확인되는 바와 같이, 참다래 과즙의 수율은 라피타제 1 ~ 4시간 처리시 수율이 크게 향상되었고, 대봉감 과즙의 수율은 라피타제 1 ~ 4시간 처리 시 많이 증가하였다.

[0091] **실시예 4: 사카로마이세스 세레비지에 Y28를 이용한 참다래-감 혼합 와인의 제조**

[0092] 실시예 3에서와 같이 준비된 참다래 과즙과 대봉감 과즙에 각각 라피타제 0.4중량%, 4시간 처리 후 치즈클로스로 여과한 후, 다음과 표와 같은 비율로 참다래 과즙과 대봉감 과즙을 혼합하여 혼합과즙을 만든 후, 백설탕을 첨가하여 24 브릭스로 보당하였다:

표 5

	비교예 1	비교예 2	비교예 3	시험예 1	시험예 2	비교예 4
참다래 과즙	2,000	1,800	1,600	1,400	1,200	1,000
대봉감 과즙	0	200	400	600	800	1,000
합계	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000

[0094] (단위 ml)

[0095] 실시예 2에서 선별된 사카로마이세스 세레비지에 Y28 균주를 YPD 액체배지 100 mL에 2.5%(2.5 mL) 접종하여 30 °C에서 48시간 배양했다.

[0096] 이 배양액을 상기와 같이 보당된 참다래-대봉감 혼합과즙 각각에 5.0%(100 mL)을 접종한 후, 15 ~ 20°C에서 14일간 발효시켜 참다래-감 혼합 와인을 제조하였다.

[0097] <분석 시료 준비>

[0098] 하기 분석들을 위한 시료는 상기에서 제조된 6가지 참다래-감 혼합 와인을 0.45 μm 필터 여과하여 준비하였다.

[0099] <참다래-감 혼합 와인의 이화학적 특성>

[0100] 상기에서 제조된 6가지 참다래-감 혼합 와인 각각 (시험예 1, 2 및 비교예 1~4)에 대해서 pH, 산도, 브릭스, 환원당 및 알코올의 함량 분석을 행하였다.

[0101] pH는 시료 50 mL을 pH 미터기 (model 3510, Jenway, UK)를 사용하여 측정하였고, 산도는 시료 10 mL를 0.1N-NaOH 용액으로 pH 8.3±0.1 까지 중화시키는데 소요된 0.1N-NaOH의 소비 mL 수를 구한 후 젯산으로 환산하여 구하였고, 브릭스는 시료를 굴절당도계(N-1a, Atago Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 측정하였고, 환원당은 DNS법으로 측정하였고, 알코올 함량은 시료 100 mL에 동량의 증류수를 가한 후 증류한 다음 주정계를 이용하여 측정하였으며 Gay Luccac Table을 이용하여 15°C로 보정하였고, 측정된 모든 결과를 표 6에 나타냈다.

표 6

	참다래-감 혼합 와인					
	비교예 1	비교예 2	비교예 3	시험예 1	시험예 2	비교예 4
pH	3.69	3.70	3.70	3.73	3.72	3.77
산도(% , 젓산)	2.07	2.03	1.96	1.84	1.64	1.51
브릭스(° )	9.6	9.4	9.2	9.0	9.0	8.8
환원당(g/L)	6.07	6.52	6.56	6.68	6.85	6.90
알코올(%)	12	12	11	11	11	11

[0102]

상기 표 6에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 참다래-혼합 와인 (실시예 1~2)은 알코올 함량 등 다른 우수한 이화학적 특성은 그대로 유지하면서도 종래의 참다래 와인 (비교예 1)에 비하여 산도가 낮아져서 와인의 신맛은 감소됨을 확인할 수 있다.

[0104]

<참다래-감 혼합 와인의 유기산 함량>

[0105]

상기에서 제조된 6가지 참다래-감 혼합 와인 각각 (시험예 1, 2 및 비교예 1~4)에 대해서 유기산 함량 분석을 행하였다.

[0106]

유기산 분석은 원심분리 후 시료를 초순수(deionized water; D.W)와 1:1로 희석하여 0.45 μm-막 필터 (Toyoroshikaisha, Ltd.)를 통과시켜 입자를 제거하였다. 유기산 분석 컬럼(TSKgel ODS-100V, 4.6×250 mm, 5 m, Tosoh Corp., Tokyo, Japan)에 전처리한 시료 20 μL을 주입하고 30℃에서 이동상 용매(0.1% phosphoric acid)를 1.0 mL/min 속도로 이동시키면서 UV 검출기(Agilent 1200 series, Agilent Co.)의 210 nm에서 측정하여, 결과를 표 7에 나타내었다.

표 7

유기산 함량 (g/L)	참다래-감 혼합 와인					
	비교예 1	비교예 2	비교예 3	시험예 1	시험예 2	비교예 4
옥살(Oxalic)산	0.16	0.16	0.17	0.22	0.21	0.21
타르타르(Tartaric)산	3.37	2.96	2.57	2.17	1.93	1.73
말(Malic)산	1.83	1.86	1.90	1.91	1.87	1.49
아스코르브(Ascorbic)산	0.14	0.14	0.13	0.11	0.12	0.02
젓산	ND	ND	ND	ND	ND	ND
스트르(Citric)산	7.69	6.93	6.31	5.41	4.69	3.82
숙신산	0.39	0.29	0.21	0.19	0.16	0.17
푸마르(Fumaric)산	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
글루타르(Glutaric)산	ND	ND	ND	ND	ND	ND
총계	13.63	12.37	11.33	10.04	9.01	7.48

ND : 검출되지 않음.

[0107]

[0108]

표 7에서 확인할 수 있듯이, 대봉감의 비율이 증가할수록 유기산 함량이 낮아졌다. 이 결과로부터 대봉감 첨가 시 참다래의 신맛을 감소시킬 수 있는 효과가 있으며, 또한 실시예 1 및 2에서는 신맛이 적절히 감소되어 맛의 조화가 잘 이루어진다는 것을 알 수 있다.

[0109]

<참다래-감 혼합 와인의 탄닌 함량>

[0110]

상기에서 제조된 6가지 참다래-감 혼합 와인 각각 (시험예 1, 2 및 비교예 1~4)에 대해서 탄닌 함량을 측정하였다.

[0111]

탄닌 함량은 Folin-Denis법으로 측정하였다. 원심분리한 후 시료를 0.45 μm-막 필터(Dismic®-25CS, Toyoroshikaisha, Ltd., Tokyo, Japan)로 여과하여 희석한 후 시험관에 시료 0.5 mL과 25% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 용액 0.5 mL을 첨가하여 3분간 정치시킨다. 다시 2N Folin-Ciocalteu 페놀 시약 0.25 mL 첨가하여 혼합한 다음 상온에서 1시간 동안 정치시켜 발색시켰다. 발색된 청색을 분광광도계(Spectronic 2D)를 이용하여 750nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 탄닌 함량은 타닌산(tannic acid)을 사용하여 작성한 표준곡선으로부터 함량을 구하였고, 그 결과를 표 8에 나타냈다.

표 8

분석항목	참다래-감 혼합 와인					
	비교예 1	비교예 2	비교예 3	시험예 1	시험예 2	비교예 4
탄닌 (g/L)	1.00	1.00	1.06	1.07	1.13	1.25

[0112]

[0113]

[0114]

[0115]

표 8에서 확인되는 바와 같이, 대봉감의 비율이 증가할수록 탄닌 함량이 높아졌다. 이 결과로부터 대봉감 첨가 시 와인의 탄닌 함량을 증가시킬 수 있으며, 또한 실시예 1 및 2에서는 탄닌의 함량이 적절히 증가되어 맛이 조화가 잘 이루어진다는 것을 알 수 있다.

<참다래-감 혼합 와인의 향기성분 분포>

상기에서 제조된 6가지 참다래-감 혼합 와인 각각 (시험예 1, 2 및 비교예 1~4)에 대해서 향기성분 분석을 위한 추출 및 포집 방법은 고체상-마이크로 추출 (solid phase-micro extraction; SPME)을 이용한 헤드스페이스 (Autosampler, HS-7697A, Agilent technologies, Santa Clara, CA, USA) 분석 방법을 사용하였다. 시료의 향기 성분 분석은 Jo 등(2012)의 방법을 변형하여 분리 및 동정하여, 그 결과를 표 9에 나타냈다.

표 9

휘발성 풍미 화합물 (Area%)	참다래 : 대봉감 혼합비율					
	10 : 0	9 : 1	8 : 2	7 : 3	6 : 4	5 : 5
Methyl isovalerate			0.34		0.58	
Propene sulfide	0.14	0.12		0.74		0.39
2-Fluoropropene	0.67	0.85	0.80	0.77	0.81	1.41
Ethyl Acetate	20.19	15.13	7.35	6.11	5.17	4.44
Isobutanol		4.36	4.50	4.30		
Dimazin	16.90	8.26	4.48	3.72	3.30	5.38
Ethyl propanoate	0.46	0.37	0.12	0.27	0.16	0.20
1-Pentanol	56.55		78.59	73.77	81.23	77.99
Isoamyl alcohol		64.49				
Ethyl butyrate	1.75	1.72	0.93	1.99	0.72	1.26
D-Valine		0.22				
1-Butene-3-ethoxy				0.29		
2-Buten-1-ol			0.20		0.18	
Isoamyl acetate	1.92	2.08	0.95	3.40	1.74	2.44
Ethyl hexanoate	0.23	0.44	0.23	0.35	0.29	0.46
Phenylethyl Alcohol	0.31	0.60	0.58	0.58	0.73	0.47
Ethyl caprylate		0.16	0.11	0.20	0.13	0.14
Ethyl caprate		0.06		0.09		

[0117]

[0118]

[0119]

[0120]

표 9에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 참다래-감 혼합 와인은 주요 향기성분이 변화되고, 신맛의 주요 성분인 에틸아세테이트(ethyl Acetate) 함량은 감소함을 알 수 있었고, 와인에 장미향을 부여하는 페닐에틸 알코올(phenylethyl alcohol)이 검출되었고, 비교예에 존재하지 않던 향기 성분들도 추가로 존재하게 되어 와인의 전체적 향이 풍부해졌다.

<참다래-감 혼합 와인의 관능평가>

상기에서 제조된 6가지 참다래-감 혼합 와인에 대해서 관능평가를 실시하였다.

관능검사를 실시하기 위하여 영농조합법인 으뜸주가 직원, 경남과학기술대학교 학부생 및 대학원생에게 관능평가전 전시료, 목적, 평가 시 유의사항 등을 설명하고 1차적으로 맛, 향, 색 및 전체적인 분별력이 뛰어난 지원자중 최종 20명을 패널로 선발하였다. 패널이 맛, 향, 색 및 전체적인 기호도를 1(very bad)에서 5(very good)까지의 점수로 평가하여 평균값으로 계산하여 표 10에 나타냈다.

표 10

[0121]

참다래-감 혼합 와인	관능평가 항목				비교
	맛	향	색	전체적인 기호도	
비교예 1	3.24	3.87	3.45	3.54	상대적으로 신맛이 강하게 나타남
비교예 2	3.23	3.90	3.54	3.58	비교예 1과 거의 비슷함
비교예 3	3.89	3.92	3.55	3.87	신맛은 약간 상쇄되나 여전히 남아 있음
시험예 1	4.33	4.02	3.64	4.20	신맛, 단맛 및 떫은맛이 고루 어려워 있음
시험예 2	4.28	4.12	3.63	4.13	
비교예 4	3.12	3.78	3.44	3.44	상대적으로 신맛보다는 떫은맛이 강함

[0122]

표 10에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 참다래-감 혼합 와인 (실시예 1, 2)은 모두 비교예 1~4에 비하여 색, 맛 및 향의 모든 항목에서 높은 점수를 받아서 기호성이 증진되었음을 알 수 있다. 특히 맛의 경우는 신맛, 단맛 및 떫은맛이 고루 어우러져 전체적인 기호도가 매우 향상되었음을 확인할 수 있다.

수탁번호

[0123]

기탁기관명 : 국립농업과학원 농업유전자원센터

수탁번호 : KACC93227P

수탁일자 : 20150507

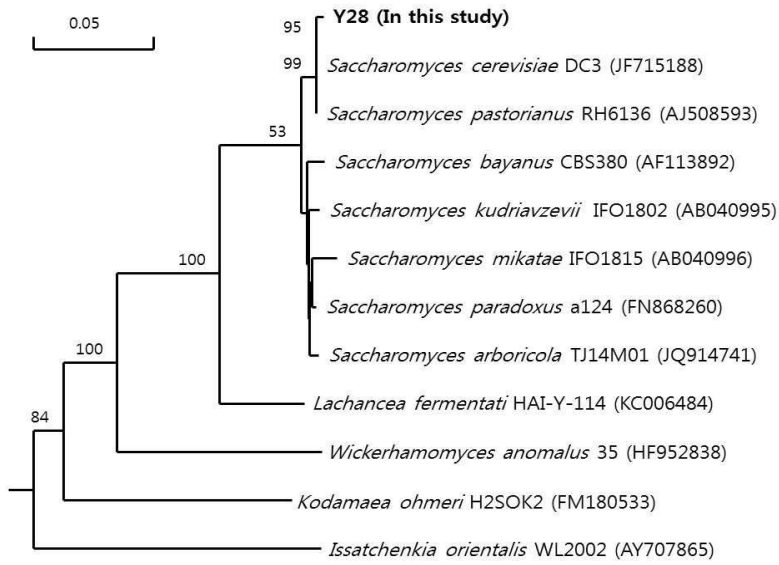
도면

도면1

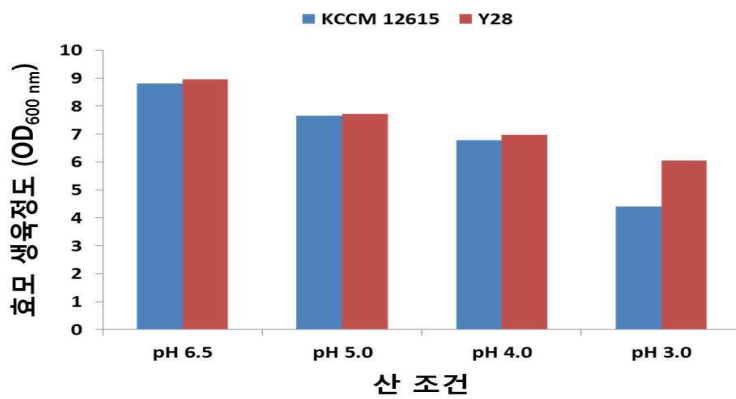
```

1  ACCCGCTGAA TTTAAGCATA TCAATAAGCG GAGGAAAAGA AACCAACCGG GATTGCCTTA
61  GTAACGGCGA GTGAAGCGGC AAAAGCTCAA ATTTGAAATC TGGTACCTTC GGTGCCCGAG
121 TTGTAATTTG GAGAGGGCAA CTTTGGGGCC GTTCCTTGTC TATGTTCCCTT GGAACAGGAC
181 GTCATAGGGG GTGAGAATCC CGTGTGGCGA GGAGTGCGGT TCTTTGTAAA GTGCCTTCGA
241 AGAGTCGAGT TGTTTGGGAA TGCAGCTCTA AGTGGGTGGT AAATCCATC TAAAGCTAAA
301 TATTGGCGAG AGACCGATAG CGAACAAGTA CAGTGATGGA AAGATGATAA GAACTTTGAA
361 AAGAGAGTGA AAAAGTACGT GAAATTGTTG AAAGGGAAGG GCATTTGATC AGACATGGTG
421 TTTTGTGCC TCTGCTCCTT GTGGGTAGGG GAATCTCGCA TTCACTGGG CCAGCATCAG
481 TTTTGGTGGC AGGATAAATC CATAGGAATG TAGCTTGCCT CGGTAAGTAT TATAGCCTGT
541 GGGAAACTG CCAGCTGGGA CTGAGGACTG CGACGTAAGT CAAGGATGCT GGCATAATGG
601 TTATATGCCG CCCGTCTTGA AACACGACCA AGGAGA
    
```

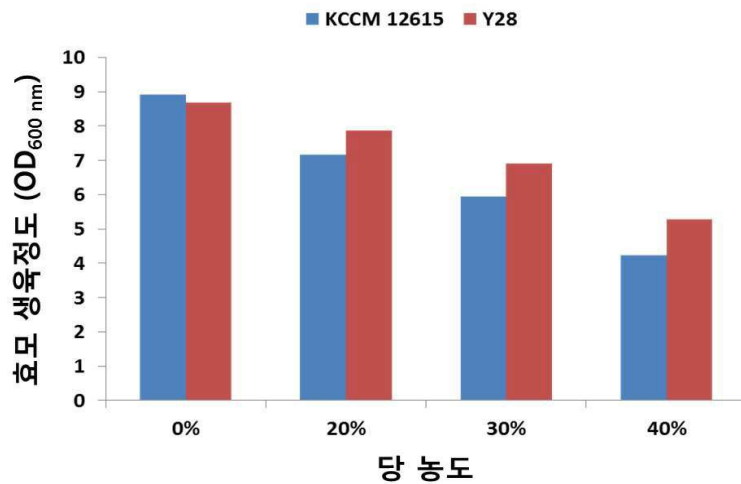
도면2



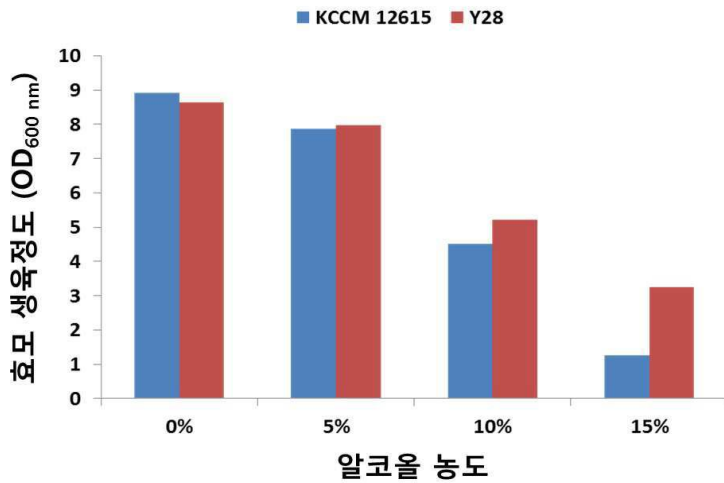
도면3a



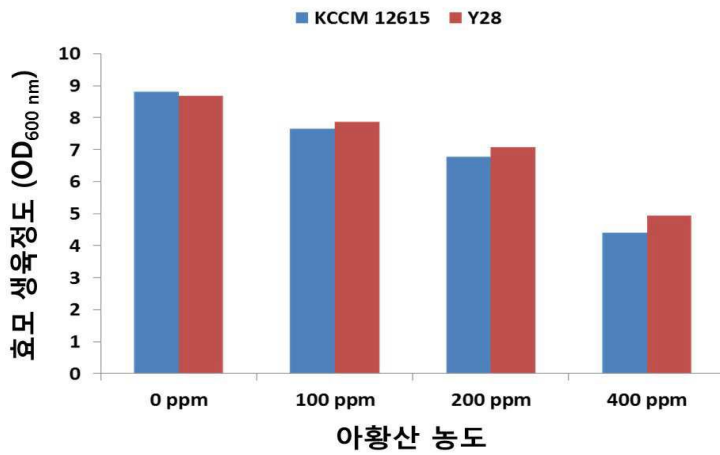
도면3b



도면3c



도면3d



【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 3

【변경전】

참다래 과즙 및 감 혼합 과즙은 펙틴아제와 아라반아제의 복합효소 0.2 ~ 0.4 중량%를

【변경후】

참다래 과즙 및 감 혼합 과즙은, 혼합 과즙의 전체 중량을 기준으로 펙틴아제와 아라반아제의 복합효소 0.2 ~ 0.4 중량%를