

혼합배양에 의한 산머루주의 감산발효 최적조건

김 성 호*

경북과학대학 바이오 식품과

Optimal Condition for Deacidification Fermentation of Wild Grape Wine by Mixed Culture

Seong-Ho Kim*

Department of Bio-Food Science, Kyongbuk College of Science, Chilgok 718-851, Korea

Received February 28, 2008; Accepted March 20, 2008

In order to prevent wine quality deterioration caused by strong sour taste from raw and other materials during fermentation of wild grape wine, the various mixed cultures conditions of the deacidification fermentation and the alcohol fermentation process by inoculation of mixed strains were investigated. As a result of mixed cultures process after the inoculation of *Schizosaccharomyces pombe* and *Schizosaccharomyces japonicus* with each deacidification fermentation strain in a culture of *Saccharomyces* sp. SMR-3 which was used in the alcohol fermentation strain of wild grape, cultures for 12 days at 22°C with *Saccharomyces* sp. SMR-3 and *Schizosaccharomyces pombe* resulted in the maximum alcohol content at 15.8±0.2% and the minimum with the acidity of 0.44±0.02%, the total organic acid of 648.96±7.14 mg% and malic acid of 99.30±1.24 mg%. Mixed cultures with *Saccharomyces* sp. SMR-3 and *Schizosaccharomyces pombe* under the optimal condition for the deacidification fermentation of wild grape wine showed 2% higher alcohol content, 51.65% lower acidity, 48.02% lower total organic acid, and 81.12% lower malic acid than a single culture of *Saccharomyces* sp. SMR-3.

Key words: deacidification fermentation, mixed culture, *Schizosaccharomyces pombe*, *Schizosaccharomyces japonicus*, wild grape, wine

서 론

산머루(wild grape, *Vitis cignetia*) 열매는 공모양으로 지름 약 8 mm, 가을에 익어 흑자색이 되면 신맛이 난다.¹⁾ 보통 열매는 술을 담그기 위하여 오래전부터 와인처럼 머루주를 만드는데 쓰였으며, 민간처방으로 잎 추출물을 구토와 설사, 동상, 빈혈을 위하여 사용하였으며,²⁾ 최근의 연구에서 뿌리내 물질로 resveratrol을 기본구조로 viniferin, amurensin, heyneanol 등의 물질을 함유하고 있어 뛰어난 염증 치료제로 알려져 있고^{3,4)} 최근 국내 연구에서 왕머루(*Vitis amurensis*) 뿌리로부터 heyneanol A를 분리하여 뇌신경 보호효과에 대한 일부 메커니즘이 보고되었다.^{5,6)}

머루 이용성에 관한 국내 연구로는 개량머루의 이화학적 성분과 개량머루를 이용한 발효제품의 제조,⁷⁾ 개량머루주의 감산에 관한 연구,⁸⁾ 포도주의 일부 원료로서의 이용⁹⁻¹²⁾ 등과 기능성에 관한 보고가 있다.^{13,14)}

포도주와 같은 과실주의 주질 특히 산미를 감소시키기 위한 방법으로는 화학적 방법과 미생물학적 방법이 이용된다. 화학적 방법으로는 물 또는 당을 혼합하거나 당도가 높은 포도주를 혼합하는 희석법,¹⁵⁾ 탄산칼슘,¹⁶⁾ 복합염에 의한 침전처리법,¹⁷⁾ 탄산가스를 불어 넣거나 생성시켜 발효시키는 carbonic maceration,¹⁸⁾ 이온교환수지법¹⁹⁾을 이용한 방법 등이 있다. 또한 미생물학적 방법에는 젖산균에 의해 malic acid를 lactic acid로 전환시키는 malo-lactic fermentation(MLF)²⁰⁾와 효모에 의하여 malic acid를 alcohol로 전환시키는 malo-alcoholic fermentation(MAF)²¹⁾이 있다. MAF는 *Schizosaccharomyces pombe*와 같은 분열 효모가 혐기적 조건하에서 사과산이 효모중의 NAD-dependent L-malate dehydrogenase의 작용으로 oxaloacetate로 산화되어 phosphoenolpyruvate로 탈탄산되고 pyruvate kinase에 의해 pyruvate를 경유하여 alcohol로 분해되는 경로, 사과산이 oxaloacetate, pyruvate를 거쳐 알코올로 분해되는 경로, 사과산이 malic dehydrogenase에 의해 직접 pyruvate가 되어 대사되는 경로, 사과산이 탈탄산되어 직접 알코올과 CO₂로 분해하는 경로 등 4가지 경로가 보고되었다.²²⁾ 국내의 감산발효 연구로는 딸기 과피로부터 사과산 분해효모 *Schizosaccharomyces*

*Corresponding author
Phone: +82-54-972-9586; Fax: +82-54-979-9220
E-mail: shkim@kbscs.ac.kr

japonicus var. *japonicus* St-3를 분리하고,²³⁾ 사과주의 감산에 미치는 여러 인자의 영향을 조사하여 이를 *Sch. pombe* O-77과 비교 검사한 결과와^{24,25)} 포도주의 감산 연구^{15, 26)}등이 있으며 산머루에 관한 유사 연구로 개량머루주의 감산에 관한 연구⁸⁾만이 있을 뿐 산머루주와 과실주의 감산에 관한 국내 연구가 대체로 부족한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 대량 재배되는 산머루의 상품가치의 증대와 우리나라 고유의 과실주로서의 개발을 위하여 산머루 고유의 맛과 향을 살리면서 발효 후 남아있는 강한 산미를 순화시켜 우수한 품질의 발효주를 제조하기 위하여 산머루에서 분리한 알코올발효균주와 감산발효를 일으키는 감산 발효균주를 혼합 배양의 최적발효조건을 설정하고 이 발효과정중의 이화학적 성분 변화와 관능검사를 실시하여 산머루주의 감산효과에 대하여 조사하였다.

재료 및 방법

재료. 본 실험에 사용된 산머루(*Vitis amurensis* Ruprecht)는 2006년 10월에 지리산 근처의 산야에서 재배된 산머루를 수확하여 착즙 후 냉동보관된 것을 지리산 산머루원으로부터 2006년 6월에 공급받아 냉동보관하면서 재료로 사용하였다.

발효균주. 산머루로부터 분리하여 보관중인 알코올 발효 효모 *Saccharomyces* sp. SMR-3과 감산발효 효모인 *Schizosaccharomyces pombe* KCTC 7167와 *Schizosaccharomyces japonicus* KCTC 7710을 각각 산머루 알코올 발효효모와 혼합 발효하여 그 최적 조건을 실험하였다.

알코올 및 감산 발효 균주의 starter배양. 보관중인 알코올 발효 효모인 *Saccharomyces* sp. SMR-3, 감산발효 효모인 *Schizosaccharomyces pombe* KCTC 7167 및 *Schizosaccharomyces japonicus* KCTC 7710 균주를 YM agar(Difco, Co., USA) slant 배지에 접종 후, 30°C, 24시간 활성화 시켜 산머루 착즙액(15°brix)에 각각 1백금이를 접종 후, 30°C, 36시간 배양하여 각각의 starter로 사용하였다.

감산 발효를 위한 균주 선정 및 발효조건 설정. 감산 균주의 선정과 발효조건 설정을 위한 발효방법은 알코올 발효 대조구로서 산머루 착즙액(15°brix)에 sucrose를 첨가하여 20°brix로 보당 후, 전배양된 알코올 발효균주를 5% 접종 후 22°C에서 12일간 배양하였으며, 감산 발효는 보당된 산머루즙에 알코올 발효균주와 감산 발효균주를 각각 5% (v/v)로 접종하여 알코올 발효 중 0, 3, 6, 9 및 12일 동안 혼합 배양하였다. 이때 각각의 발효시간 후 시료를 채취하여 원심분리기로 원심분리(4°C, 3,600×g, 20 min)하여 상등액을 취한 다음 냉동보관하면서 분석용 시료로 사용하였다.

알코올 함량 측정. 알코올 함량은 배양액을 여과한 후 여과액을 증류하여 alcohol hydrometer로 측정된 값을 Gay Lussac 표에 대비하여 산출하였다.²⁷⁾

pH와 총산도 측정. 산머루와 발효액의 pH는 pH meter 619 (Metrohm Co., Swiss)로 측정하였고, 총산도는 시료 20 ml를 취하여 0.1N NaOH로 pH 8.4가 될 때까지 중화시키는데 소비되는 ml 수를 구하여 acetic acid값으로 환산하여 나타내었다.²⁸⁾

유리당 및 유기산 분석. 각 발효액을 원심분리(4°C, 3,600×g, 20 min)한 후 상등액을 취하여 Sep-pak C₁₈ cartridge (Waters Co., USA)를 통과시켜 그 여액을 HPLC를 이용하여 분석하였고,²⁹⁾ 모든 시료는 분석 전에 0.45 μm membrane filter로 여과하여 사용하였다. HPLC는 Shimadzu(LC-10AT, Japan)사의 pump, 20 μl의 loop를 가진 auto injector를 사용하였다. 유리당은 Spherisorb S10 NH₂ column과 이동상으로는 Acetonitrile : deionized water(80 : 20 v/v)를 이용 30°C에서 1.0 ml/min의 유속으로 분리시킨 후 RI detector를 사용하여 분석하였다. 유기산의 HPLC 조건은 μ-Bondapak C₁₈ (4.6×250 mm, Waters Co., USA) 컬럼과 0.1% H₂PO₄(pH 2.1)를 이동상으로 하여 30°C에서 0.5 ml/min의 유속으로 분리 후 UV detector 210 nm에서 검출하였다.

색도. 발효액의 색도는 색차계(Chromameter, model CR-300, CT-310, Minolta Camera Co. Ltd., Japan)를 사용하여 각 시료의 L(lightness), a(redness), b(yellowness) 값으로 나타내었다. 이때 사용된 표준백판의 L, a, b 값은 각각 100.00, -0.02 및 +0.02이었다.

관능검사. 산머루 알코올 발효 대조구와 감산균주 혼합배양 산머루주에 대한 관능검사는 음주 경험이 있고 차이식별능력이 있는 10명의 패널을 선정하여 실시하였다. 즉, 각각의 처리구 별로 색, 맛, 향 및 전반적인 기호도에 대하여 1(대단히 나쁘다)에서 9(대단히 좋다)까지의 점수를 사용하여 평가하였으며,³⁰⁾ 그 결과는 Statistical Analysis System (SAS) program으로 분석한 후 유의차가 있는 항목에 대하여는 Duncan's multiple range test로 $p < 0.05$ 수준에서 유의차를 검정하였다.³¹⁾

결과 및 고찰

감산 발효 산머루주의 알코올 함량, pH 및 산도. 알코올 발효 균주와 감산 발효균주를 접종 후 혼합 발효 시켜 발효기간 별 산머루주의 알코올 함량, pH값 및 산도값을 조사한 결과는 Table 1과 같다.

알코올 함량은 *Saccharomyces* sp. SMR-3과 *Schizosaccharomyces japonicus*의 혼합 배양으로 발효시킨 경우 혼합배양 발효 시간에 비례하여 알코올 함량이 증가하였으나 *Saccharomyces* sp. SMR-3 균주만으로 발효한 대조구와 비교하면, 9일째까지는 유의적인 차이가 없었으며 12일째 첨가구에서는 유의적 차이를 보이며 대조구보다 높은 13.8±0.2%의 알코올 함량을 나타내었다. *Schizosaccharomyces pombe*와 혼합 배양한 경우에는 발효구간의 유의적인 차이를 보였으며, 대조구에서 12.8±0.1%의 알코올 함량이었으며, *Schizosaccharomyces pombe*의 혼합배양 발효구는 대조구보다 높은 함량을 보였고, 감산발효 균주와의 혼합배양 시간이 길어질수록 알코올 함량이 높아져 12일째 발효구에서는 15.8±0.2%이었다. 위의 결과를 종합해 보면, 발효 12일에서 알코올 함량은 *Saccharomyces* sp. SMR-3가 12.8±0.1%, *Schizosaccharomyces japonicus* 혼합배양구가 13.8±0.1%이었으며, *Schizosaccharomyces pombe*와의 혼합배양구가 15.8±0.2%로 가장 높은 알코올 함량을 나타내었다. 이와 같은 결과는 김⁸⁾의 감산 발효후 알코올 함량이 11.33±11.88%이라는

Table 1. Alcohol contents, pH and acidity after alcohol and deacidification simultaneous fermentation of wild grape by *Saccharomyces* sp. SMR-3 and mixed *Schizosaccharomyces japonicus* KCTC 7710 (top) or *Schizosaccharomyces pombe* KCTC 7167 (bottom)

Fermentation type & time	Alcohol contents (%)	pH	Acidity (%)
Wild grape juice	0.0±0.0	3.31±0.03	1.26±0.12
Control (SMR-3)*	12.8±0.1 ^{bc4)}	3.49±0.03 ^{dc}	0.91±0.06 ^b
Mixed (S+J) ¹⁾ 0 days ²⁾	0.0±0.0 ^d	3.35±0.03 ^e	1.23±0.15 ^a
Mixed (S+J) 3 days	12.8±0.2 ^{bc}	3.52±0.02 ^{cb}	0.86±0.01 ^b
Mixed (S+J) 6 days	13.0±0.1 ^{bc}	3.53±0.02 ^b	0.86±0.03 ^b
Mixed (S+J) 9 days	13.5±0.1 ^{ba}	3.55±0.03 ^a	0.86±0.03 ^b
Mixed (S+J) 12 days	13.8±0.2 ^a	3.51±0.02 ^c	0.86±0.01 ^b
Wild grape juice	0.0±0.0	3.31±0.03	1.26±0.12
Control (SMR-3)*	12.8±0.1 ^e	3.49±0.03 ^c	0.91±0.06 ^b
Mixed (S+P) ³⁾ 0 days	0.0±0.0 ^f	3.34±0.03 ^d	1.24±0.14 ^a
Mixed (S+P) 3 days	14.0±0.1 ^d	3.52±0.04 ^c	0.86±0.03 ^b
Mixed (S+P) 6 days	14.8±0.2 ^c	3.53±0.03 ^c	0.86±0.03 ^b
Mixed (S+P) 9 days	15.2±0.3 ^b	3.78±0.03 ^b	0.72±0.04 ^c
Mixed (S+P) 12 days	15.8±0.2 ^a	3.88±0.04 ^a	0.44±0.02 ^d

*Control is inoculated *Saccharomyces* sp. SMR-3 to 22°brix of wild grape juice and then cultured for 12 days at 22°C.

¹⁾Mixed (S+J): *Saccharomyces* sp. SMR-3 and *Schizosaccharomyces japonicus* KCTC 7710

²⁾Simultaneous fermentation time at 22°C

³⁾Mixed (S+P): *Saccharomyces* sp. SMR-3 and *Schizosaccharomyces pombe* KCTC 7167

⁴⁾Means with different superscripts in the same column are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test. Values are mean S.D. (n=3)

보고 보다 더 높은 알코올함량의 결과를 보였다.

산머루 특유의 산미를 적절히 감소시켜 고급 와인으로서의 품질을 갖추기 위하여 알코올 발효 균주와 감산 발효균주를 접종 후 혼합발효 시킨 산머루주의 pH 값은 Table 1과 같다. 산머루즙의 pH는 3.31±0.03으로, 최 등¹³⁾이 보고한 머루즙의 pH 3.5와 비교하면 다소 낮게 나타났다. *Saccharomyces* sp. SMY-3을 단독배양한 대조구의 pH는 3.49±0.03이었고, *Schizosaccharomyces japonicus*와의 혼합배양구는 3.35±0.03~3.55±0.03으로 유의적인 차이가 있었으며, 대조구보다 유의적으로 다소 높은 pH 값을 나타내었다. *Schizosaccharomyces pombe*와의 혼합배양구의 pH는 대조구와 비교하여 9일째 발효까지는 거의 차이가 없었으나 9일째부터 상승하여 12일째 발효에서 유의적으로 높아져 pH 3.88±0.04이었다. pH는 알코올 발효균주 단독배양구보다 감산발효균주 혼합 배양구에서 대체로 유의적으로 높은 값을 나타내었고 혼합배양구의 pH값은 김 등⁸⁾이 개량머루주의 pH가 3.35±3.65로 보고한 결과와 비슷하였다.

알코올 발효균주와 감산 발효균주를 혼합발효 시킨 산머루주의 산도값은 Table 1과 같다. 산머루 원료의 총산도는 1.26±0.12%로 나타나, 포도주용 포도의 최적 총산도는 0.7±0.9%³²⁾ 이었다는 보고와 비교하면, 본 실험에 사용된 산머루의 총산도가 와인용으로는 상당히 높은 편이었다. 또한 이는 한국산 야생머루의 총산도가 0.81%이었다는 결과³³⁾와도 상당한 차이가 있음을 보였다. *Schizosaccharomyces japonicus*의 혼합 배양시간별 배양구간의 유의적인 차이는 없었으나, 알코올 발효 균주 단독배양인 대조구의 경우 0.91±0.06%이었으나 감산발효 혼합 배양에서는 0.86%로 나타나 대조구에 비하여 감소하였다. *Schizosaccharomyces pombe* 혼합배양구의 총산도는 혼합배양 시간이 길어질수록 총산도가 유의적으로 감소하여 12일째 발효 구에서는 0.44±0.02%로 대조구에 비하여 약 51.65%가 감소하였으며 *Schizosaccharomyces japonicus*와의 혼합배양구와의 비

교에서도 상대적으로 월등히 낮은 총산도를 나타내었다.

김⁸⁾은 감산 발효한 개량머루주의 총산도가 0.76%로 대조구에 비해 15% 감소하였다고 한 보고와 비교하여도, 본 연구 결과의 총산도 감소율이 상당히 높게 나타났다. 이는 원료의 초기산도가 높은 원인도 있었지만 본 실험에 이용된 알코올 발효 균주와 각각의 감산발효 균주를 사용한 동시 혼합배양이 감산의 효과가 큰 것으로 판단된다.

감산 발효 산머루주의 유리당 함량. 알코올 발효 균주와 감산발효 균주의 혼합배양에 의한 산머루주의 유리당 변화는 Table 2와 같다. 원료인 산머루즙의 유리당으로는 fructose 와 glucose가 함유되어 있는 것으로 나타났다. 산머루주의 fructose 는 발효 과정 중 대부분이 이용되어 대조구에서는 255.14±8.62 mg%이었으며, 두 혼합 배양구에서는 감산 발효 배양시간이 길어질수록 fructose 함량이 낮게 나타났으며, *Schizosaccharomyces japonicus*를 첨가한 구에서는 알코올 발효 12일째 211.76±3.56 mg%, *Schizosaccharomyces pombe* 첨가구는 알코올 발효 12일째 196.58±4.81 mg%로 나타났다. Glucose와 sucrose 경우도 fructose와 유사한 경향으로 대조구에서 glucose 함량은 133.11±2.37 mg%이었고 sucrose가 35.74±1.23 mg%이었다. Glucose 의 경우 혼합 배양한 구는 발효 3일째까지 함량값이 증가하다가 감산발효 배양 시간이 길어질수록 점차 감소하여 알코올 발효 12일째 *Schizosaccharomyces japonicus* 처리구는 97.56±2.98 mg%, *Schizosaccharomyces pombe* 처리구는 90.17±1.65 mg%의 함량을 나타내었다. 또한 대조구의 발효 12일 후의 glucose 함량이 133.11±2.37 mg%인것과 비교하면 *Saccharomyces* sp. SMR-3 단독배양 보다는 *Schizosaccharomyces pombe* 등의 감산균주와의 혼합배양이 남은 잔당과 발효성 당의 발효에 효율적일 것이라 판단된다. 산머루 발효를 위해 sucrose를 첨가하여 보당하면 효모의 영양원이나 발효기질로 이용되고, 발효가 진행됨에 따라 sucrose 함량이 감소하게 되고 또한 sucrose가

Table 2. Residual sugar contents after alcohol and deacidification simultaneous fermentation of wild grape by *Saccharomyces* sp. SMR-3 and mixed ether *Schizosaccharomyces japonicus* KCTC 7710 (top) or *Schizosaccharomyces pombe* KCTC 7167 (bottom)

Fermentation type & time	Residual sugar content (mg%)			
	Fructose	Glucose	Sucrose	Total
Wild grape juice	12405.43±166.43	57.25±2.11	0.00±0.00	12462.68±168.54
Control (SMR-3)*	255.14±8.62	133.11±2.37	35.74±1.23	423.99±12.22
Mixed (S+J) ¹⁾ 0 days ²⁾	12324.43±125.12	55.16±2.22	6025.14±138.11	18404.73±265.45
Mixed (S+J) 3 days	238.56±9.43	117.98±5.98	30.17±1.64	386.71±17.05
Mixed (S+J) 6 days	213.35±8.01	117.22±4.09	28.59±3.00	359.16±15.10c
Mixed (S+J) 9 days	221.76±5.87	105.44±6.74	22.58±1.69	349.78±14.30
Mixed (S+J) 12 days	211.76±3.56	97.56±2.98	17.56±0.98	326.88±7.52
Wild grape juice	12405.43±166.43	57.25±2.11	0.00±0.00	12462.43±168.54
Control (SMR-3)*	255.14±8.62	133.11±2.37	35.74±1.23	423.99±12.22
Mixed (S+P) ³⁾ 0 days	12228.17±156.23	54.15±1.89	6109.25±156.21	18391.57±314.33
Mixed (S+P) 3 days	215.94±3.65	95.10±2.08	27.59±0.57	338.63±6.30
Mixed (S+P) 6 days	216.55±8.40	91.41±0.76	25.65±2.46	333.61±11.62
Mixed (S+P) 9 days	198.59±1.39	91.68±2.65	23.95±1.75	314.22±5.79
Mixed (S+P) 12 days	196.58±4.81	90.17±1.65	20.78±0.53	307.53±6.99

*Control is inoculated *Saccharomyces* sp. SMR-3 to 22°brix of wild grape juice and then cultured for 12 days at 22°C.

¹⁾Mixed (S+J): *Saccharomyces* sp. SMR-3 and *Schizosaccharomyces japonicus* KCTC 7710

²⁾Simultaneous fermentation time at 22°C

³⁾Mixed (S+P): *Saccharomyces* sp. SMR-3 and *Schizosaccharomyces pombe* KCTC 7167

Table 3. Organic acid contents after alcohol and deacidification simultaneous fermentation of wild grape by *Saccharomyces* sp. SMR-3 and mixed ether *Schizosaccharomyces japonicus* KCTC 7710 (top) or *Schizosaccharomyces pombe* KCTC 7167 (bottom)

Fermentation type & time	Organic acid content (mg%)				
	Malic acid	Acetic acid	Citric acid	Succinic acid	Total
Wild grape juice	1348.20±67.35	0.00±0.00	376.50±32.84	0.00±0.00	1724.70±100.19
Control (SMR-3)*	525.97±7.56 ^{ba)}	523.33±5.98 ^a	133.60±1.54 ^b	65.61±0.74 ^c	1248.51±15.82 ^b
Mixed (S+J) ¹⁾ 0 days ²⁾	1359.12±57.22 ^a	0.25±0.08 ^d	389.34±28.65 ^a	0.12±0.01 ^d	1748.83±85.96 ^a
Mixed (S+J) 3 days	219.53±8.28 ^c	327.90±9.28 ^b	203.80±7.38 ^c	81.13±1.54 ^{ba}	832.36±26.48 ^c
Mixed (S+J) 6 days	218.30±5.29 ^c	332.80±4.75 ^b	202.23±2.74 ^c	83.36±2.12 ^a	836.69±14.90 ^c
Mixed (S+J) 9 days	214.90±5.27 ^c	319.23±17.45 ^{bc}	204.76±2.61 ^c	76.84±0.53 ^b	815.73±25.86 ^c
Mixed (S+J) 12 days	219.00±3.95 ^c	301.60±9.43 ^c	196.40±3.82 ^c	65.46±0.74 ^c	782.46±17.94 ^c
Wild grape juice	1348.20±67.35	0.00±0.00	376.50±32.84	0.00±0.00	1724.70±100.19
Control (SMR-3)*	525.97±7.56 ^b	523.33±5.98 ^a	133.60±1.54 ^d	65.61±0.74 ^b	1248.51±15.82 ^b
Mixed (S+P) ³⁾ 0 days	1299.64±66.57 ^a	0.18±0.08 ^b	341.15±30.28 ^a	0.08±0.01 ^d	1641.05±96.94 ^a
Mixed (S+P) 3 days	194.20±4.21 ^{cd}	366.40±9.21 ^c	190.13±3.32 ^b	77.04±2.09 ^a	827.77±18.83 ^c
Mixed (S+P) 6 days	173.37±6.42 ^d	311.61±3.14 ^c	185.36±3.06 ^{cb}	74.71±0.26 ^a	745.05±12.88 ^d
Mixed (S+P) 9 days	128.27±2.03 ^e	334.96±2.60 ^d	181.46±1.34 ^{cb}	77.43±1.02 ^a	722.12±6.99 ^d
Mixed (S+P) 12 days	99.30±1.24 ^f	365.96±4.61 ^c	183.70±1.29 ^{cb}	00.0±0.00 ^c	648.96±7.14 ^e

*Control is inoculated *Saccharomyces* sp. SMR-3 to 22°brix of wild grape juice and then cultured for 12 days at 22°C.

¹⁾Mixed (S+J): *Saccharomyces* sp. SMR-3 and *Schizosaccharomyces japonicus* KCTC 7710

²⁾Simultaneous fermentation time at 22°C

³⁾Mixed (S+P): *Saccharomyces* sp. SMR-3 and *Schizosaccharomyces pombe* KCTC 7167

⁴⁾Means with different superscripts in the same column are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test. Values are mean S.D. (n=3)

발효과정 중 분해되면서 초기에 glucose가 생성되어 함량이 증가하다가 발효에 이용되면서 점차 감소되는 것이라 판단된다.

감산 발효 산머루주의 유기산 함량. 대조구인 산머루주와 혼합배양한 감산발효주의 각종 유기산 성분의 함량은 Table 3과 같다. 원료인 산머루주의 유기산 함량은 malic acid가 1,348.20±67.35 mg%, citric acid가 376.50±32.84 mg%가 함유되어 있었다.

Malic acid의 경우 *Saccharomyces* sp. SMR-3만으로 12일간 발효시킨 대조구는 525.97±7.56 mg%의 함량으로, 김 등⁷⁾의 개

량머루주의 malic acid 함량 509 mg%였다는 보고와 비슷한 함량의 결과였다. *Schizosaccharomyces japonicus*와 혼합 배양한 시험구의 malic acid 함량은 214.90±5.27~219.53±8.28 mg%를 함유하였고 발효시간이 경과되어도 유의적인 감소는 없었으므로 나타났다. 반면 *Shizosaccharomyces pombe*를 혼합 배양한 발효주는 감산발효균주 처리 시간이 길어질수록 malic acid가 유의적으로 감소하였으며, 혼합배양 12일째 malic acid 함량은 99.30±1.24 mg%로 *Saccharomyces* sp. SMR-3 단독 배양구한 대조구에 비하여 81.12% 감소 효과를 보였다.

Amerine³⁴⁾은 과실 및 과실주의 산미는 유기산 중 malic acid에 가장 큰 영향을 받는다고 보고하였다. 이에 따르면 본 시험에 사용된 산머루는 malic acid의 함량이 상당히 높기 때문에 발효주중의 강한 산미를 나타내는 원인 물질이라 생각된다. Malic acid 함량이 높을 경우에는 malo-lactic fermentation과 malo-alcohol fermentation 등을 통해서 malic acid 함량을 저하시키는 방법이 주로 이용된다.

Gallander³⁵⁾는 포도주 효모와 *Schizosaccharomyces pombe*를 동시에 첨가하여 발효한 결과 *Schizosaccharomyces*속 균이 포도주 효모보다 발효속도가 떨어져 큰 효과를 기대할 수 없었으며, 포도주 효모를 접종하고 6일째 경과 후에 *Schizosaccharomyces*속 균을 접종하면 가장 효과적으로 malic acid를 분해하였다는 보고한 결과와 비교하면 본 실험의 결과와는 차이가 있었다.

Acetic acid의 경우 대조구가 523.33±5.98 mg%의 함량을 보였으며, 감산발효 균주를 혼합 배양한 경우 acetic acid 함량이 301.60±9.43~366.40±9.21 mg%로 대조구에 비해 함량이 낮았다. 산머루주의 citric acid 함량은 대조구에서 133.60±1.54 mg%였으나 *Schizosaccharomyces japonicus*의 혼합 배양 처리구는 196.40±3.82~203.80±7.38 mg%의 함량을 나타내어 대조구에 비해 47.01±52.54% 정도 높은 함량을 나타내었다. *Schizosaccharomyces pombe*를 혼합 배양한 처리구는 181.46±1.34~190.13±3.32 mg%로 대조구에 비해 35.82±42.31% 높았으나 *Schizosaccharomyces japonicus* 혼합배양구보다는 낮은 함량을 보였다.

알코올발효와 감산발효 균주를 혼합 배양하여 발효 경과동안의 산머루주의 총유기산 함량을 살펴본 결과 알코올발효 균주만으로 배양한 대조구에 비해 감산발효균과 혼합처리한 배양구가 발효시간이 경과할수록 유의적으로 유기산 함량이 감소하여 균주별로 각각 37.33%와 48.02%의 감소효과를 보였다.

이상의 결과를 종합해 보면, *Saccharomyces* sp. SMR-3와 *Schizosaccharomyces pombe*를 혼합 접종하여 발효시키면 malic acid 및 총 유기산 함량을 낮출수 있어 가장 효과적으로 유기산을 분해하여 산머루주의 강한 산미를 줄여 줄 것이라 판단된다.

감산 발효 산머루주의 색도변화. 산머루주 제조에 사용한 산머루즙과 혼합균주별로 발효시킨 산머루주의 색도는 Table 4와 같다. 원료 산머루즙의 L값(명도)은 33.77±0.12, a값(적색도)이 49.62±0.10이었고 b값(황색도)은 49.29±0.87로 나타나 색이 검고 짙은 편으로 나타났다. *Saccharomyces* sp. SMR-3과 *Schizosaccharomyces japonicus*를 혼합 배양하여 발효시킨 산머루주의 경우 L값은 대조구에 비해 혼합배양 처리구가 L값이 증가하여 색이 열어짐을 확인하였다. 적색도는 대조구와 혼합배양 처리구 사이에 유의적인 차이가 없었고, 48.76±0.42~50.44±0.13 정도로 나타나, 외국산 포도주의 a값 수치인 40~50과¹²⁾ 유사한 값을 나타내었다. 한편, b값의 경우 대조구에 비해 유의적인 차이를 보이며 혼합배양 시간이 길어질수록 b값이 증가하였으나, 발효 12일 시험구에서는 다시 감소하였다.

알코올발효균을 단독배양한 대조구보다 *Saccharomyces* sp. SMR-3와 *Schizosaccharomyces pombe*를 혼합 배양하여 산머루주를 제조한 경우 L값은 발효시간이 경과함에 따라 유의적으로 높아져 혼합발효 발효 9일째 가장 높은 54.05±0.11를 나타내 색이 열어짐을 확인하였다. 적색도인 a값은 대조구가 49.87±0.12로 나타났고, *Schizosaccharomyces pombe* 혼합 발효시 발효시간별로 유의적인 차이를 보이며 대조구보다 낮은 값을 나타내었다. *Schizosaccharomyces pombe* 와의 혼합배양시 발효가 진행되면서 b값은 점차 증가하였고 발효 6일째에서 71.23±0.25로 가장 높게 나타났다. 육동¹²⁾은 캠벨 포도주의 L값은 34.1, a값이 54.2로 나타났고, 관능검사 결과 열은 적색의 캠벨 포도주를 좋아하는 소비자가 많다는 보고와 본 연구 결과와 유

Table 4. Hunter's color value after alcohol and deacidification simultaneous fermentation of wild grape by *Saccharomyces* sp. SMR-3 and mixed either *Schizosaccharomyces japonicus* KCTC 7710 (top) or *Schizosaccharomyces pombe* KCTC 7167 (bottom)

Fermentation type & time	Hunter's color			
	ΔE	L	a	b
Wild grape juice	95.62±0.98	33.77±0.12	49.62±0.10	49.29±0.87
Control (SMR-3)*	100.99±0.56 ^{a4)}	36.85±0.83 ^{bc}	49.87±0.12 ^a	61.40±0.12 ^d
Mixed (S+J) ¹⁾ 0 days ²⁾	94.83±0.77 ^c	34.56±0.18 ^c	48.51±0.11 ^a	50.18±0.92 ^c
Mixed (S+J) 3 days	100.45±0.24 ^d	40.26±0.91 ^{ba}	48.76±0.42 ^a	63.47±0.18 ^c
Mixed (S+J) 6 days	101.54±0.81 ^b	40.57±0.40 ^{ba}	49.56±0.32 ^a	65.58±0.15 ^b
Mixed (S+J) 9 days	102.17±0.49 ^a	42.57±0.96 ^a	49.52±0.37 ^a	66.28±0.22 ^a
Mixed (S+J) 12 days	101.45±0.21 ^{cb}	38.86±0.77 ^{ba}	50.44±0.13 ^a	63.39±0.16 ^c
Wild grape juice	95.62±0.98	33.77±0.12	49.62±0.10	49.29±0.87
Control (SMR-3)*	100.99±0.56 ^b	36.85±0.83 ^c	49.87±0.12 ^{ba}	61.40±0.12 ^d
Mixed (S+P) ³⁾ 0 days	94.18±0.52 ^d	34.71±0.15 ^f	48.97±0.41 ^{ba}	48.76±0.52 ^c
Mixed (S+P) 3 days	100.45±0.72 ^b	40.62±0.42 ^d	49.09±0.56 ^b	63.37±0.19 ^c
Mixed (S+P) 6 days	98.82±0.29 ^c	47.07±0.27 ^b	43.20±0.40 ^d	71.23±0.25 ^a
Mixed (S+P) 9 days	92.17±0.33 ^e	54.05±0.11 ^a	41.36±0.16 ^e	68.65±0.20 ^b
Mixed (S+P) 12 days	100.08±0.26 ^b	45.41±0.25 ^c	45.46±0.36 ^c	70.21±0.13 ^a

*Control are inoculated *Saccharomyces* sp. SMR-3 to 22°brix of wild grape juice and then cultured for 12 days at 22°C.

¹⁾Mixed (S+J): *Saccharomyces* sp. SMR-3 and *Schizosaccharomyces japonicus* KCTC 7710

²⁾Simultaneous fermentation time at 22°C

³⁾Mixed (S+P): *Saccharomyces* sp. SMR-3 and *Schizosaccharomyces pombe* KCTC 7167

⁴⁾Means with different superscripts in the same column are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test. Values are mean S.D. (n=3)

Table 5. Sensory properties after alcohol and deacidification simultaneous fermentation of wild grape by *Saccharomyces* sp. SMR-3 and mixed either *Schizosaccharomyces japonicus* KCTC 7710 (top) or *Schizosaccharomyces pombe* KCTC 7167 (bottom)

Fermentation type & time	Sensory properties			
	¹⁾ Color	Flavor	Taste	Overall acceptability
Control (SMR-3)*	5.92±1.03 ^c	5.02±0.69 ^c	5.35±1.35 ^d	5.83±0.82 ^d
Mixed (S+J) ²⁾ 0 days ³⁾	6.33±1.15 ^{bc5)}	5.62±0.79 ^b	6.03±0.95 ^c	6.01±0.79 ^{dc}
Mixed (S+J) 3 days	6.15±0.77 ^c	5.71±0.81 ^b	6.43±1.08 ^{bac}	6.12±0.88 ^{dc}
Mixed (S+J) 6 days	6.65±0.79 ^{ba}	6.49±1.16 ^a	6.71±1.03 ^{ba}	6.57±0.60 ^{ba}
Mixed (S+J) 9 days	6.24±0.81 ^{bc}	6.71±1.03 ^a	6.33±1.73 ^{bc}	6.40±1.35 ^{bc}
Mixed (S+J) 12 days	6.94±1.10 ^a	6.77±1.00 ^a	6.87±1.23 ^a	6.85±1.10 ^a
Control (SMR-3)*	5.89±0.74 ^{cb}	5.03±1.06 ^d	5.34±0.61 ^e	5.81±1.17 ^e
Mixed (S+P) ⁴⁾ 0 days	6.12±1.06 ^b	6.01±0.92 ^c	6.05±0.80 ^d	6.07±1.51 ^d
Mixed (S+P) 3 days	6.88±1.05 ^a	6.13±1.00 ^c	6.23±0.84 ^c	6.52±1.20 ^{cb}
Mixed (S+P) 6 days	6.03±0.74 ^b	6.36±1.05 ^b	6.73±1.17 ^b	6.34±0.84 ^c
Mixed (S+P) 9 days	5.75±1.32 ^c	6.88±0.83 ^a	7.04±1.51 ^a	6.55±0.79 ^b
Mixed (S+P) 12 days	6.74±1.17 ^a	6.72±0.79 ^a	7.12±1.20 ^a	6.89±1.29 ^a

*Control are inoculated *Saccharomyces* sp. SMR-3 to 22°brix of wild grape juice and then cultured for 12 days at 22°C.

¹⁾Sensory score

²⁾Mixed (S+J): *Saccharomyces* sp. SMR-3 and *Schizosaccharomyces japonicus* KCTC 7710

³⁾Simultaneous fermentation time at 22°C

⁴⁾Mixed (S+P): *Saccharomyces* sp. SMR-3 and *Schizosaccharomyces pombe* KCTC 7167

⁵⁾Means with different superscripts in the same column are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test. Values are mean S.D. (n=3)

사하게 나타나 감산발효한 산머루주 또한 관능적으로 소비자에게 좋은 반응을 받을 것이라 생각된다.

감산 발효 산머루주의 관능검사. 알코올 발효균주와 감산 발효균주를 혼합 접종하여 발효시킨 산머루주의 색, 향, 맛 및 전체적인 기호도를 조사한 결과는 Table 5와 같으며, 다중비교법에 의해 각 항목의 유의성을 검증한 결과, 시료간에 유의적인 차이를 나타내었다. *Saccharomyces* sp. SMR-3와 *Schizosaccharomyces japonicus*로 발효시킨 경우 *Saccharomyces* sp. SMR-3 단독 배양구인 대조구와의 각 항목에서 유의적인 차이를 보였고 대조구에 비해 혼합 배양구에서 높은 점수를 받았으며, 혼합배양 시간에 비례하여 높은 점수를 나타내었다. *Schizosaccharomyces japonicus* 균주를 혼합 배양한 구에서 혼합 발효 12일째에 색, 향, 맛 및 전체적인 기호도에서 각각 6.94±1.10, 6.77±1.00, 6.87±1.23 및 6.85±1.10으로 나타나 대조군과 발효기간이 짧은 시험구보다 높은 평가를 받았다.

Saccharomyces sp. SMR-3와 *Schizosaccharomyces pombe*를 혼합배양하여 발효시킨 산머루주의 경우 색에 있어서는 3일째 배양구에서 관능점수가 가장 높았으나, 9일째 배양구는 대조구보다 낮게 평가를 받았다. 향의 경우 대체로 발효 시간에 경과함에 따라 높은 점수를 받았고 9일째 배양구에서 가장 향이 좋은 것으로 평가받았다. 맛에 있어서는 대조구에 비해 발효 12일째 배양구에서 월등히 높은 점수를 받았고 전체적인 기호도에서도 12일째 배양구가 유의적으로 가장 높게 평가 되었다. 혼합 배양 균주인 *Schizosaccharomyces japonicus*와 *Schizosaccharomyces pombe* 첨가구간의 관능점수를 비교하였을 경우는 맛과 전반적인 기호도에서 *Schizosaccharomyces pombe*를 혼합배양한 발효주가 7.12±1.20, 6.89±1.29의 평가를 받아 *Schizosaccharomyces japonicus*에 비해 관능적으로 좋은 평가를 받았다.

이상의 결과로 미루어보아 *Saccharomyces* sp. SMR-3 단독배양 산

머루주보다 *Schizosaccharomyces japonicus* 또는 *Schizosaccharomyces pombe* 균주를 알코올 발효균주와 혼합 배양하여 발효시킨 산머루주가 관능적 특성이 유의적으로 높은 것으로 나타났다. 이는 *Schizosaccharomyces japonicus*와 *Schizosaccharomyces pombe*가 산머루주의 산미를 줄임으로서 기호성을 향상시켰을 것이라 판단된다.

초 록

본 연구는 산머루를 이용한 과실주의 발효시 원료 등에서 기인한 강한 산미에 의한 과실주의 품질을 저하시키는 것을 개선시키기 위하여 혼합균주의 접종에 의한 알코올 발효 과정에서 다양한 혼합배양 조건으로 감산발효를 시도하였다. 산머루 알코올 발효균주로 사용된 *Saccharomyces* sp. SMR-3 배양구에 *Schizosaccharomyces pombe*와 *Schizosaccharomyces japonicus*를 각각의 감산발효균주로 접종 후 혼합배양 한 결과, 산머루 알코올 발효균주 *Saccharomyces* sp. SMR-3에 *Schizosaccharomyces pombe*를 22°C, 12일간 혼합 배양한 처리구가 알코올 함량 15.8±0.2%로 최대였고, 산도 0.44±0.02%, 총 유기산 함량 648.96±7.14 mg%, malic acid 99.30±1.24 mg%로 가장 낮게 나타나, 알코올 발효균주 단독으로 배양한 처리구 보다 알코올 함량은 2% 이상 높았고, 산도는 51.65%, 총 유기산은 48.02% 및 malic acid는 81.12%의 감소 효과를 나타내어 최적의 감산발효 조건으로 나타났다.

Key words: deacidification fermentation, mixed culture, *Schizosaccharomyces pombe*, *Schizosaccharomyces japonicus*, wild grape, wine

참고문헌

1. Hwang, J. K. and Ahn, S. Y. (1975) Studies on of the anthocyanins in wild vines. *J. Korean Agricultural Chemical Society*. **18**, 183-193.
2. Cheon, K. B. (1999) Screening of antioxidant from *Vitis coigenetae*, *Vitis vinifera* L. and comparition of its antioxidant activity. Master Thesis, The Konkuk Univ., Korea.
3. Kai, S. H., Mao, L., Lin, N. Y. and Man, K. (2000) Four novel oligostilbenes from the root of *Vitis amurensis*. *Tetrahedron*. **56**, 1321-1329.
4. Huang, K. S., Lin, M. and Cheng, G. F. (2001) Anti-inflammatory tetramers of resveratrol from the roots of *Vitis amurensis* and the conformations of the seven-membered ring in some oligostilbenes. *Phytochemistry*. **58**, 357-362.
5. Lee, E. O., Kwon, B. M., Song, G. Y., Chae, C. H. and Kim, H. S. (2004) Heyneanol a induces apoptosis via cytochrome c release and caspase activation in human leukemic U937 cells. *Life Sci*. **74**, 2313-2326.
6. Hwang, H. S., Lee, H. J., Nangung, M. A., Kim, D. K., Baek, N. I. and Kim, S. H. (2006) Neuroprotective effect of heyneanol A, derived from the roots of *Vitis amurensis* Rup. *Korean J. Medicinal Crop Sci*. **14**, 452-453.
7. Kim, S. Y. and Kim, S. K. (2000) Wine making from new wild grape. *Korean J. Food Nutr*. **10**, 254-262.
8. Kim, S. K. (1996) Deacidification of new wild grape wine. *Korean J. Food Nutr*. **9**, 265-270.
9. Lee, J. E., Won, Y. D., Kim, S. S., Koh, K. H. (2002) The chemical characteristics of Korean red wine with different grape varieties. *Korean J. Food Sci. Technol*. **34**, 151-156.
10. Lee, J. E., Shin, Y. S., Shim, J. K., Kim, S. S., Koh, K. H. (2002) Study on the color characteristics of Korean red. *Korean J. Food Sci. Technol*. **34**, 164-169.
11. Lee, J. E., Hong, H. D., Choe, H. D., Shin, Y. S., Won, Y. D., Kim, S. S., Koh, K. H. (2002) A Study on the sensory characteristics of Korean red wine. *Korean J. Food Sci. Technol*. **35**, 841-848.
12. Yook, C., Seo, M. H., Kim, D. H. and Kim, J. S. (2007) Quality improvement of Campbell Early wine by mixing with different fruits. *Korean J. Food Sci. Technol*. **39**, 390-399.
13. Choi, S. Y., Cho, H. S., Kim, H. J., Ryn, C. H., Lee, J. O. and Sung, N. J. (2006) Physicochemical analysis and antioxidative effects of wild grape (*Vitis coignetia*) juice and its wine. *Korean J. Food & Nutr*. **19**, 311-317.
14. Kim, N. Y., Choi, J. H., Kim, Y. G., Jang, M. Y., Moon, J. H., Park, G. H. and Oh, D. H. (2006) Isolation and identification of an antioxidant substance from ethanol extract of wild grape (*Vitis coignetia*) seed. *Korean J. Food Sci. Technol*. **38**, 109-113.
15. Koh, K. H. and Chang, W. Y. (1998) Changes of chemical components during *Seibel* white grape must fermentation by different yeast strains. *Korean J. Food Sci. Technol*. **30**, 487-493.
16. Mattic, L. R., Plane, R. A. and Weir, L. D. (1980) Lowering wine acidity with carbonate. *Am. J. Enol. Vitic*. **31**, 350-357.
17. Steele, J. T. and Kunkee, R. E. (1978) Deacidification of musts from the Western United States by the calcium double salt precipitation process. *Am. J. Enol. Vitic*. **29**, 153-160.
18. Park, W. M., Park, H. G., Rhee, S. J., Kang, K. I., Lee, C. H., Yoon, K. E. (2004) Properties of wine from domestic grape, *Vitis labrusca* cultivar. Campbell's Early, fermented by carbonic maceration vinification process. *Korean J. Food Sci. Technol*. **36**, 773-778.
19. Castino, M. (1974) Deacidification of wine with strong anion exchange resins in carbonate form. *Vini. Ital*. **16**, 305-401.
20. Webb, A. D. (1974) In Chemistry of Winemaking, American Chemical Society, Washington D.C., p107.
21. Hariantono, J., Yokota, A., Takao, S. and Tomita, F. (1991) Ethanol production from raw starch by simultaneous fermentation using *Schizosaccharomyces pombe* and a raw starch saccharifying enzyme from *Corticium rolfsii*. *J. Ferment Bioeng*. **71**, 367-371.
22. Amerine, M. A., Kunkee, R. E., Ough, C. S., Singleton, V. L. and Webb, A. D. (1980) The technology of wine making, AVI publishing Westport, Conneticut, pp. 565-570.
23. Yu, T. S. (1978) Studies on the malic acid degradation in wine by yeast, I. Isolation and identification of yeast strain(in korean). *Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng*. **6**, 23-26.
24. Chung, K. T., Yu, T. S., Kim, J. K. and Kim, C. S. (1982) Studies on malo-alcohol fermentation in brewing of apple wine, I. Zymological properties of the malo-alcoholic yeast (in Korean). *Korean J. Food Sci. Technol*. **14**, 236-243
25. Chung, K. T. and Kim, C. J. (1982) Studies on malo-alcoholic fermentation in brewing of apple wine, II. Application of the malo-alcoholic fermentation to brewing of the low-alcohol content apple wine using the fallen apples (in Korean). *Korean J. Food Sci. Technol*. **14**, 244-249.
26. Lee, S. O. and Pack, M. Y. (1980) Malo-lactic bacteria in Korean winery environment and their potential use in wine making. *Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng*. **8**, 193-198.
27. National Tax Service Technical Service Institute. (1999) *Alcoholic beverage analysis rule*. Sejung Pub. Co., Seoul, Korea, pp. 196-197.
28. Park, C. S. and Lee, T. S. (2002) Quality characteristics of *Takju* prepared by wheat flour *Nuruk*. *Korean J. Food Sci., Technol*. **34**, 298-302.
29. Shin, J. S., Lee, O. S. and Jeong, Y. J. (2002) Changes in the components of onion vinegars by two stages fermentation. *Korean J. Food Sci. Technol*. **34**, 1079-1084.
30. Kim, U. J. and Ku, K. H. (2001) Sensory evaluation techniques of food, Hyoil Moonwhasa Co., Seoul, Korea. pp. 68-72.
31. SAS (1998) *SAS User's Guide Statistics*, Statistical Analysis System Institute, Cary, NC, (3th ed.), USA.
32. Beelman, R. B. and Gallander, J. F. (1979) Advance in food research. 25, *Academic Press Inc.*, pp. 1-2
33. 이증성, 서홍수, 김용구 (1985) 브랜디용 과수품종 선발시험, 원예 시험장 연구보고서, 과수원시과, 2-25, p. 300.
34. Amerine, M. A., Roessler, E. B. and Ough, C. S. (1965) Acids and the acid taste, I. The effect of pH and titratable acidity. *Am. J. Enol. Victic*. **16**, 29-37.
35. Gallander, J. F. (1974) Wine deacidification with *Schizosaccharomyces pombe*. *Ohio Agri. Res. Dev. Cent. Horti. Ser*. **425**, 43-50.