

Deacidification Effect of Campbell Early Must via Carbonic Maceration : Effect of Enzyme Activity Associated with Malic-Acid Metabolism

Eun Ha Chang¹, Seok Tae Jeong^{2*}, Sung Min Jeong¹, Jeong Ho Roh¹,
Kyo Sun Park¹, Seo Jun Park¹ and Jong Uck Choi³

¹Fruit Research Division, National Institute of Horticultural & Herbal Science, RDA, Suwon 440-310, Korea

²Fermentation & Food Processing Division, National Academy of Agricultural Science RDA, Suwon 441-853, Korea

³Department of Food Science & Technology, Kyungpook National University, Daegu 720-701, Korea

Carbonic Maceration 처리에 의한 Campbell Early 발효액의 감산 효과: 사과산 대사 관련 효소활성의 영향

장은하¹ · 정석태^{2*} · 정성민¹ · 노정호¹ · 박교선¹ · 박서준¹ · 최종욱³
¹원에특작과학원 과수과, ²국립농업과학원 발효이용과, ³경북대학교 식품공학과

Abstract

To determine the deacidification factor during carbonic maceration (CM), different temperature conditions were studied. The pH was higher in CM-35°C and CM-25°C and was lower in CM-45°C. The total acid was inversely related to the pH. The malic-acid level decreased much more in CM-35°C than in CM-45°C while the lactic-acid level increased much more in CM-35°C. The activity of the NADP-malic enzyme, which catalyzes the oxidative decarboxylation of L-malate into pyruvate, CO₂, and NADPH, was higher in CM-25°C and CM-35°C while CM-45°C showed no NADP-malic enzyme activity. The malic-dehydrogenase (MDH) activity was higher in CM-25°C and CM-35°C while CM-45°C showed no MDH activity. The oxalacetate decarboxylase activity was similar to the NADP-malic-enzyme and MDH activities. Pyruvate decarboxylase activity was shown in all the CM treatments. The L-lactic dehydrogenase (LDH) activity was not explored in the fermentation of pyruvate to lactate via LDH in the grapes during CM. In this study, it was confirmed that carbonic maceration reduced the malic acid during fermentation and was affected by the temperature. Moreover, it was assumed that the deacidification during the carbonic maceration of the grapes was probably correlated with the degradation enzyme activity of malic acid.

Key words : malic acid, carbonic maceration, deacidification, enzyme activity

서 론

포도주에 있어 적당한 산미는 포도주의 풍미를 나타내는 데 바람직하다. 포도주에 있어 산미에 관여하는 주요 유기산은 주석산과 사과산으로 알려져 있으며 이런 유기산 함량은 포도재배 지역이나 계절에 따라 다르므로 사용된 포도의 품질에 따라 포도주의 산도도 달라진다. 포도주와 같은 과일주의 산미를 감소시키기 위한 방법 중 화학적 방법으로는 희석법(1), 탄산칼슘(2), 복합염에 의한 침전처리법(3), 이온

교환수지법(4)을 이용한 방법 등이 있고, 미생물학적 방법으로는 젖산균에 의해 malic acid를 lactic acid로 전환시키는 malo-lactic fermentation (MLF)(5)과 효모에 의하여 malic acid를 alcohol로 전환시키는 malo-alcoholic fermentation (MAF)(6)이 있다. 특히, 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

*Corresponding author. E-mail : cleo77@korea.kr.
Phone : 82-31-240-3421, Fax : 82-31-240-3708

pyruvate가 되어 대사되는 경로, 사과산이 탈탄산되어 직접 알코올과 CO₂로 분해하는 경로 등 4가지 경로가 보고되었다(7). Carbonic maceration (CM)은 파쇄 되지 않은 온전한 포도송이를 밀폐용기에 담아 2주 혹은 그 이상 CO₂를 유지하며 혐기적 조건하에서 각각의 포도 알맹이가 자체적으로 발효하는 것을 이용한 방법으로, 이전 연구를 통해 CM처리 포도주가 감산, 특히 사과산 함량의 감소에 효과적이라는 것과 CM처리 온도가 높을수록 사과산 함량이 많이 감소된다는 것을 밝힌바 있다.(8) 그러나 CM처리 시 사과산 감소의 원인에 대해 구체적으로 밝힌 연구가 미비한 실정이다.

본 연구에서는 국산 포도주의 가장 큰 문제점인 높은 산 함량을 감소시키기 위해 산 함량을 감소시키는 방법 중 CM처리를 이용해 감산의 정도와 감산을 시키는 주요 원인을 밝히고자 사과산 대사에 관여하는 효소활성을 중심으로 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

재료 및 사용 효모

포도주 제조에 사용된 포도는 2009년 김천시 구성면 하강리에서 생산된 캠벨얼리(Campbell Early) 품종이었고 효모는 *Saccharomyces cerevisiae*(Fermivin 7013, DSM Food specialties BV, Delft)을 사용하였다.

포도주 제조방법

적포도주 제조에 있어 대조구와 carbonic maceration (CM) 방법은 장 등(9)의 방법에 따라 실시하였다. CM처리는 온도별로 25°C, 35°C, 45°C에서 2주간 행하고 CM처리 중 산 함량의 감소에 있어 사과산 감소의 원인을 구명하기 위해 처리 중 0, 3, 6, 10, 14일에 포도알맹이를 취해 유기산 함량 및 효소활성을 분석하였다.

pH 및 총산

pH 및 총산 분석용 시료는 포도주 원액 속에 녹아있는 이산화탄소를 제거하기 위하여 상온에서 세차게 흔든 후 정지시킨 시료를 사용하였다. pH는 원액 그대로 pH meter (Model 115PD, Istek, Korea)를 이용하여 측정하였다. 총산은 포도주 시료 5 mL에 증류수 20 mL를 넣은 다음 0.1 N NaOH로 pH 8.2까지 적정한 다음 들어간 0.1 N NaOH 용량에 상당하는 샘플 내 총산을 포도주의 주된 산인 주석산(tartaric acid)으로 환산하였다.

유기산 함량

유기산 함량은 포도주를 3배 정도 희석한 후 HPLC용 메탄올과 3차 증류수로 활성화 한 Sep-pak C18 cartridge로 처리하고 0.45 µm membrane filter로 여과한 후 HPLC

(Agilent 1100 HPLC Chemstation, Youngin)로 분석하였다 (10). HPLC의 조건은 다음과 같이 column은 Zorbax SB-Aq (4.6×250 mm, 5 µm, Agilent, USA)이었고, 이동상은 20 mM phosphate buffer (pH 2.0)와 acetonitrile을 97:3의 비율로 0.4 mL/min의 속도로 흘러주었다. Detector는 variable wavelength detector이었고 검출파장은 210 nm로 설정하였으며 injection volume은 10 µL이었다. 유기산 함량은 농도별 표준물질을 이용해 환산하여 나타내었다.

효소 추출액 제조

CM처리 포도의 다양한 효소활성 측정을 위한 효소 추출은 Angleon 등(11)의 방법에 따라 추출하였다. 먼저 시료 100 g에 시료의 1.5배 되는 cold 아세톤과 아세톤에 대하여 5% polyethylene glycol 6000 (Hayashi pure chemical Ind, Japan)을 첨가해 1분간 마쇄시킨 후 여과하였다. 여과지 위의 잔여물에 cold 아세톤을 더 첨가해 다시 한 번 갈아주고 여과한 후 cold 아세톤으로 여러 번 씻어주었다. 여과지 위에 생성된 aceton powder를 수시간 실온에 방치하여 말리고 사용할 때까지 -20°C에 저장하였다. 이렇게 준비된 powder 0.5 g에 5 mM mercaptoethanol과 2 mM EDTA가 함유된 차가운 0.1M sodium phosphate buffer (pH 7.5) 20 mL를 넣고 상온에서 30분간 교반한 후 4°C 15,000 rpm에서 15분간 원심분리를 한 후 상등액을 취해 효소활성 측정에 사용하였다.

Malic enzyme활성 측정

Malic enzyme (EC 1.1.1.40)활성은 Geer 등(12)의 방법에 따라 수행하였다. 즉 L-malate와 β-NADP의 존재하에 malic enzyme이 관여해 pyruvate와 CO₂, β-NADPH를 생성시키는 원리를 이용한다. 효소활성 반응액은 100 mM Tris/HCl buffer (pH 7.4) 2 mL에 100 mM L-malic acid 0.1 mL, 20 mM β-NADP 0.05 mL, 20 mM MnCl₂ 0.75 mL를 넣어 섞은 후 분광광도계를 이용하여 25°C에서 안정화된 기질용액에 enzyme extract 0.1 mL를 넣어 최종 3 mL가 되게 한 후 분광광도계를 이용하여 340 nm에서 5-10분 정도 β-NADPH 증가를 측정하였다. Blank는 enzyme extract 대신 증류수 0.1 mL를 넣어 측정된 뒤 아래의 식으로 계산하여 효소활성을 나타내었다. 효소활성 1 unit는 25°C pH 7.4에서 분당 1.0 µmole L-malate와 β-NADP가 pyruvate와 CO₂, β-NADPH로 전환하는 효소의 양으로 하였다.

$$\text{Units/mL enzyme} =$$

6.22 = Millimolar extinction coefficient of β -NADPH at
340 nm

0.1 = Volume of enzyme used

Malic dehydrogenase활성 측정

Malic dehydrogenase (EC 1.1.1.37)활성은 Bergmeyer 등 (13)의 방법에 따라 수행하였다. 즉, oxaloacetate와 β -NADH의 존재하에 malic dehydrogenase가 관여해 malic acid와 β -NAD를 생성시키는 원리를 이용한다. 효소활성 반응액은 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5)에 녹인 0.14 mM β -NADH (β -nicotinamide adenine dinucleotide, reduced form disodium salt) 2.8 mL를 light path 1cm cuvettes에 넣고 25°C에서 안정시킨 후 동일한 buffer에 녹인 7.6 mM oxaloacetic acid (OAA) 0.1 mL와 효소추출액 0.1 mL를 넣어 즉시 섞은 후 분광광도계 340 nm에서 2분 동안 β -NADH의 감소 정도를 측정하였다. Blank는 enzyme extract 대신 buffer 0.1 mL를 넣어 동일하게 측정된 뒤 malic enzyme에서와 같은 식으로 계산하여 나타내었다. 효소활성 1 unit는 25°C pH 7.5에서 분당 1.0 μ mole oxalacetate와 β -NADH가 L-malate와 β -NAD로 전환하는 효소의 양으로 하였다.

Oxalacetate decarboxylase활성 측정

Oxalacetate decarboxylase (EC 4.1.1.3)활성은 oxalacetic acid가 oxalacetate decarboxylase의 작용으로 pyruvic acid와 CO₂를 생성하고 생성된 pyruvic acid가 β -NADH와 H⁺의 존재하에 lactic dehydrogenase의 작용으로 lactic acid와 β -NAD⁺를 생성시키는 원리를 이용해 측정한다. 효소활성 반응액은 100 mM triethanolamine HCl (pH 8.0) 0.9 mL에 10 mM MnCl₂ 0.1 mL, 6.5 mM β -NADH 0.1 mL, deionized water 0.9 mL, 차가운 10 mM Tris HCl (pH 8.0)에 희석한 550 units/mL lactic dehydrogenase solution 0.02 mL와 효소추출액 0.05 mL를 넣어 분광광도계 340 nm 25°C에서 흡광도를 측정하여 혼합액이 안정될 때까지 둔 후 차가운 200 mM Tris HCl (pH9.0)에 녹인 50 mM oxalacetic acid 0.1 mL를 넣어 바로 섞어준 뒤 10분 동안 흡광도를 측정하였다. Blank는 효소추출액 대신 10 mM Tris HCl (pH 8.0) 용액 0.05 mL를 넣어 동일하게 10분 동안 흡광도를 측정된 뒤 다음의 식으로 계산하여 나타내었다. 효소활성 1 unit는 25°C pH 8.0에서 분당 1.0 μ mole oxalacetate가 pyruvate와 CO₂로 전환하는 효소의 양으로 하였다.

Units/mL enzyme =

결과 및 고찰

Carbonic maceration처리 시 용기 내 가스 조성

CM처리 시 밀폐 용기 내부의 가스 조성을 알아보기 위하여 시간별 산소 농도와 이산화탄소의 농도를 확인한 결과 Fig. 1에서와 같이 처리 24시간이 되기 전에 용기 내부의 산소 농도는 0%를, 이산화탄소 농도는 100% 가까이 변화되어 완전히 혐기 조건이 되는 것을 알 수 있었다.

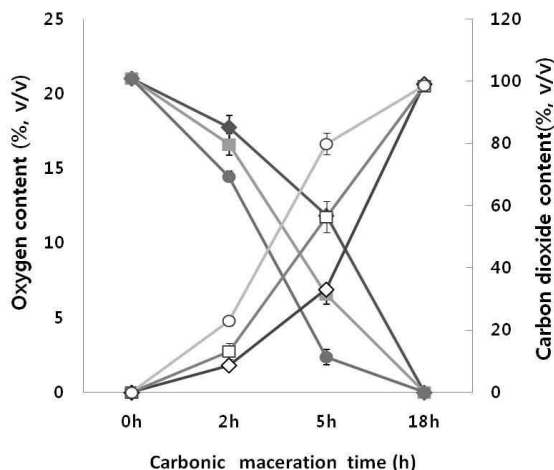


Fig. 1. Changes in the O₂ and CO₂ concentrations based on the temperature during Carbonic Maceration process of Campbell Early grapes.

O₂ concentration at 25°C (◆), 35°C (■), and 45°C (●) as well as CO₂ concentration at 25°C (◇), 35°C (□) and 45°C (○) were determined.

Carbonic maceration처리 포도의 pH 및 총산

CM처리 포도의 사과산 함량 감소에 영향을 미치는 요인을 찾고자 포도를 2주 동안 온도별 CM처리를 한 후 시기별로 포도의 pH를 측정된 결과는 Table 1과 같다. pH는 25°C와 35°C에서 가장 많이 증가하였고 대조구와 45°C는 초기와 비슷하거나 조금 증가하여 25°C와 35°C보다 더 낮은 pH 값을 나타내었다. 총산함량은 25°C와 35°C에서 처리시간이 경과할수록 함량이 많이 감소하는 것으로 나타났으며 35°C는 처리 6일 이후 총산 함량이 조금씩 증가하는 경향을 보였다. 반면 45°C는 초기와 비슷한 총산함량을 나타내었다. 위와 같은 결과로 볼 때 CM처리 시 적정의 온도 증가가 포도의 pH 증가 및 총산 함량 감소에 영향을 주는 것으로 나타났으며 총산 함량을 감소시키는 요인들이 온도에 영향을 받는 것으로 생각된다.

Carbonic maceration처리 포도의 유기산 함량

CM처리 포도의 사과산 함량 감소에 영향을 미치는 요인을 찾고자 포도를 2주 동안 온도별 CM처리 한 후 시기별로 유기산 함량을 측정된 결과를 Table 1에 나타내었다.

사과산은 35°C와 25°C에서 가장 많이 감소되었으며 특히

35°C는 처리 6일까지 급격히 감소되어 초기보다 50% 이상의 감소율을 보였다가 이후 감소율이 서서히 줄어들었지만 25°C는 14일까지 일정하게 감소하는 것으로 나타났다. 반면 45°C에서는 사과산 함량이 초기에 조금 감소한 후 거의 변화 없이 일정한 함량을 나타내었으며, 대조구에서는 발효 중 사과산이 거의 감소하지 않는 것으로 나타났다. 사과산의 감소는 포도의 물질대사 중 사과산이 포도 자체의 효소반응에 의해 분해되어 pyruvate와 같은 물질로 변화된 후 알코올을 생성하는 발효대사로 산함량이 감소하거나 (15,16), 미생물학적으로 *Saccharomyces* 속의 효모나 malo-ethanolic 발효를 일으키는 일부 *Schizosaccharomyces* 와 같은 효모의 효소(17-20)에 의해 분해되거나, 또는 사과산을 이용해 젖산을 생성시키는 젖산균에 의해 사과산이 분해된다고 알려져 있다.

젖산은 초기에 498 mg/L의 함량을 나타내었는데 대조구에서는 3일에 905 mg/L를 나타내었다가 6일에 좀 더 증가한 후 발효 완료일까지 비슷한 함량을 유지하였다. CM처리 중 25°C에서는 함량이 증가하였지만 다른 처리에 비해 낮은 함량을 나타내었다. 45°C에서도 처리 중 함량이 증가하였지만 대조구보다 낮은 함량을 나타내었고, 반면 35°C는 처리 6일까지 함량이 급격히 증가한 후 처리 완료일까지 비슷한 함량을 나타내어 초기의 3배 이상의 함량을 나타내었으며 다른 처리에 비해 가장 높은 젖산 함량을 나타내었다. 일반적으로 발효 중 젖산은 젖산균에 의해 생성하게 되는데 혐기적 상태에서 당이나 사과산을 이용해 젖산을 생성하는 젖산균의 활성이 높은 것이 원인으로 생각되며, 포도 껍질에 존재하는 젖산균의 유무나 성장 속도가 젖산 함량에 영향을 미쳤을 것이라 생각된다. 보통 포도 껍질에 존재하는 미생물은 포도 껍질의 특성상 포도 내부로 침투하기가 힘들지만 껍질이 약해져 찢어지거나 상처를 입으면 내부로 쉽게 침투할 수 있게 된다. 혐기처리나 CM처리의 경우에도 온도가 높으면 포도 껍질이 약해져 쉽게 찢어지고 대기환경이 미생물 특히 통성혐기성 미생물들이 생육하기에 적합하게 되어 자연적인 malo-lactic 발효가 일어나 포도의 사과산을 소비해 젖산 생성에 영향을 미치지 않았을까 생각된다. 특히 CM35°C에서 젖산 함량이 많이 증가되었다는 것은 젖산균의 성장에 온도가 크게 영향을 미쳤을 것으로 생각된다. Spranger 등(21)의 실험에서 사과산 함량의 감소와 젖산 함량의 증가가 malo-lactic 발효와 유사한 반응에 의한 결과라는 보고와 같이 CM처리 포도주가 다른 처리의 포도주에 비해 사과산의 함량은 감소하고 젖산의 함량은 증가하였으며, 장 등(8)과 이 등(22)의 실험에서도 비슷한 경향을 나타내었다.

Carbonic maceration처리 포도의 malic enzyme 활성

Malic enzyme은 L-malic acid를 탈탄산화시켜 pyruvate, CO₂ 및 NADPH를 생성한다. malic enzyme 활성은 Fig. 2에

Table 1. Changes in the pH, total acid, malic acid and lactic acid based on the temperature during carbonic maceration process of Campbell Early grapes.

Treatments		Treatments days				
		0	3	6	10	14
Control	pH	3.89 ^a	3.82 ^c	3.97 ^c	4.04 ^b	
CM25		3.89 ^a	4.06 ^{ab}	4.11 ^b	4.20 ^{ab}	4.28 ^{ab}
CM35		3.89 ^a	4.15 ^a	4.25 ^a	4.22 ^a	4.37 ^a
CM45		3.89 ^a	4.00 ^b	4.01 ^{bc}	4.03 ^b	4.04 ^b
Control	Total acid (%, w/v)	0.63 ^a	0.67 ^c	0.62 ^b	0.61 ^b	
CM25		0.63 ^a	0.55 ^{ab}	0.54 ^c	0.52 ^a	0.49 ^a
CM35		0.63 ^a	0.52 ^a	0.49 ^a	0.51 ^a	0.53 ^a
CM45		0.63 ^a	0.65 ^{bc}	0.65 ^b	0.64 ^b	0.61 ^b
Control	Malic acid (mg/L)	2191 ^a	2193 ^b	2264 ^c	2311 ^c	
CM25		2191 ^a	1812 ^{ab}	1610 ^b	1350 ^b	1042 ^c
CM35		2191 ^a	1496 ^a	867 ^a	695 ^a	655 ^a
CM45		2191 ^a	1823 ^{ab}	1723 ^b	1717 ^b	1722 ^b
Control	Lactic acid (mg/L)	498 ^a	905 ^a	1055 ^b	1056 ^c	
CM25		498 ^a	556 ^a	692 ^b	716 ^b	726 ^b
CM35		498 ^a	879 ^a	1514 ^a	1614 ^a	1599 ^a
CM45		498 ^a	697 ^a	846 ^b	844 ^{bc}	925 ^b

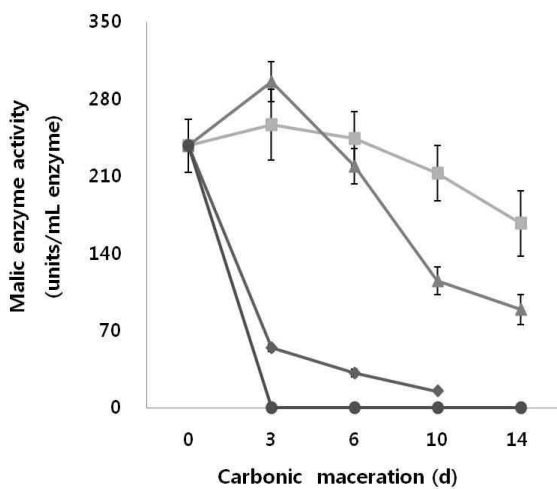


Fig. 2. Changes in the malic enzyme activity based on the temperature during carbonic maceration process of Campbell Early grapes.

Control(◆) and carbonic maceration at 25°C(■), 35°C(▲) and 45°C(●).

서와 같이 25°C에서는 초기부터 처리 완료시까지 활성이 높게 나타났으며 35°C에서는 초기에 활성이 높다가 처리 시간이 경과할수록 활성이 낮아졌으며 대조구에서는 초기부터 CM처리에 비해 활성이 낮게 나타나다가 발효 시 급격히 떨어지는 것으로 나타났다. 반면 45°C에서는 초기부터 효소활성이 나타나지 않았다. 특히 25°C와 35°C의 처리온도에 있어서 초기에는 온도가 높을수록 활성도 크지만 처리 시간이 경과할수록 온도가 높으면 활성이 빨리 감소하는

것으로 나타났다. 이와 같은 malic enzyme 활성의 결과를 Table 1의 포도의 유기산 중 사과산 함량의 감소와 비교해 보면 35°C와 25°C에서 가장 많은 사과산 함량이 감소되었고 대조구와 45°C에서 감소가 적은 것으로 나타났다. Marr(23)는 단세포 생물에서 malic enzyme에 의한 aerobic fermentation 조절에 관한 실험에서 aerobic fermentation 과정 중 malic enzyme은 oxalacetate와 acetyl-coenzyme A에 의해 저해되어 pyruvate로 전환되지 않고, fumarase를 통해 oxalacetate로부터 succinate까지 전환되는 mechanism이 나타난다고 보고하였다. Redzepovic 등(24)의 다양한 Saccharomyces 종에 의한 사과산 감산 실험에서 사과산이 발효 초기에는 fumarase에 의해 succinate로 전환될 수 있지만, 대부분 발효 중 malic enzyme에 의해 pyruvate를 거쳐 에탄올로 전환된다고 보고하였다. 따라서 malic enzyme의 활성을 나타내기 위해서는 호기적 조건보다 혐기적 조건에서 활성이 강하게 나타나며 본 실험에서의 CM은 완전 혐기적인 조건이기 때문에 malic enzyme의 영향으로 사과산이 pyruvate로 거쳐 에탄올로 전환되어 사과산 함량이 감소되었을 것으로 판단된다.

Carbonic maceration처리 포도의 malic acid dehydrogenase 활성

Malic acid dehydrogenase는 malic acid와 β-NAD⁺의 존재 하에 oxaloacetate, β-NADH 및 H⁺를 생성시키거나 반대로 oxaloacetate와 β-NADH의 존재하에 malic acid와 β-NAD⁺

를 생성시키는 효소이다. 효소활성을 측정한 결과 Fig. 3에
서와 같이 25°C에서는 초기부터 처리 완료시까지 활성이
높게 나타났으며 35°C에서는 초기에 활성이 높다가 처리
시간이 경과할수록 활성이 낮아졌으며 대조구에서는 초기
부터 CM처리에 비해 활성이 낮게 나타나다가 발효 시 급격
히 떨어지는 것으로 나타났다. 반면 45°C에서는 초기부터
효소활성이 나타나지 않았다. 특히 대조구의 경우 초기부
터 효소활성이 낮은 것은 포도주 제조 시 첨가하는 메타아
황산칼륨이 효소의 활성에 영향을 미쳤기 때문에 CM처리
보다 초기 활성이 낮게 나타나는 것이라 판단된다. 45°C의
경우 활성이 나타나지 않는 것은 보통 효소활성에 있어
온도와 반응속도 사이에서 온도가 40°C를 넘으면 활성이
저하된다는 사실에 미루어 45°C는 효소의 활성을 저해시키
는 온도라 판단된다.

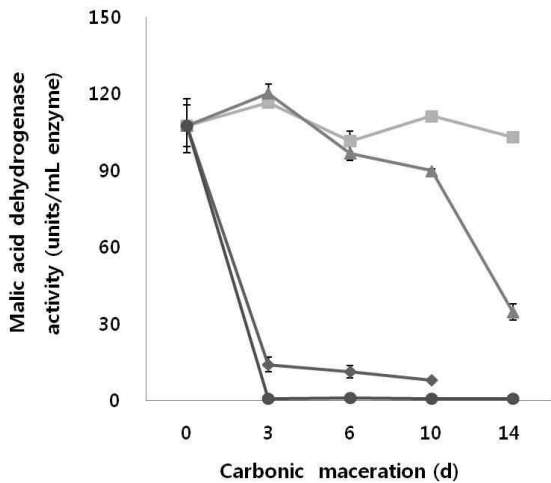


Fig. 3. Changes in the malic acid dehydrogenase activity based on the temperature during carbonic maceration process of Campbell Early grapes.

Control(◆) and carbonic maceration at 25°C(■), 35°C(▲) and 45°C(●).

Carbonic maceration처리 포도의 oxalacetate decarboxylase 활성

Oxalacetate decarboxylase활성 측정은 Fig. 4에 나타낸
것과 같이 전반적으로 모든 CM처리에서 처리 초기에는
활성이 높다가 처리 기간이 지날수록 효소활성이 낮아지는
것으로 나타났다. 처리 중 35°C와 25°C의 활성이 높은 것으
로 나타났고 처리 3일에 최고 활성을 보이다가 서서히 낮아
지는 것으로 나타났다. 반면 45°C에서는 활성이 없는 것으
로 나타나 malic enzyme나 malic acid dehydrogenase와 비슷
한 결과를 보였다. Pablo 등(25)은 malic enzyme family에
속하는 oxalacetate decarboxylase의 특성을 조사하는 실험
에서 malate, oxalacetate, succinate와 같은 C₄ compounds로부
터 phosphoenolpyruvate를 합성시키는 mechanism 중 C₄
compounds를 이용할 수 없는 변종 E. coli strain을 malate와
succinate를 첨가한 minimal medium에서 배양 시 변종 strain

이 C₄ compound를 C₃ compound로 전환시킬 수 없기 때문에
medium에서 성장하지 못하였지만, oxalacetate decarboxylase
gene이 변종 strain에 존재할 때 succinate가 첨가된 medium
에서 성장하여 oxalacetate decarboxylase가 oxalacetic acid
로부터 pyruvate를 합성시킬 수 있음을 밝혔다. 따라서
malic enzyme과 oxalacetate decarboxylase 두 효소 모두
malic acid나 oxalacetic acid로부터 pyruvate를 합성시킬 수
있으며, CM처리 포도에는 두 효소 모두 존재함으로 사과산
감소에 영향을 미쳤을 것으로 판단된다.

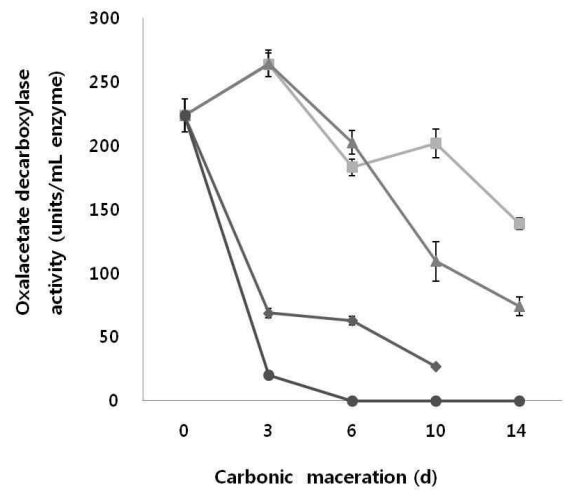


Fig. 4. Changes in the oxalacetate decarboxylase activity based on the temperature during carbonic maceration process of Campbell Early grapes.

Control(◆) and carbonic maceration at 25°C(■), 35°C(▲) and 45°C(●).

Carbonic maceration처리 포도의 pyruvate decarboxylase 활성

Pyruvic acid는 당의 해당경로의 1단계 마지막 대사산물
로 생성되거나 malate가 NADP-malic enzyme의 영향을 받
아 생성되는 물질이다. 포도의 당이나 malate가 pyruvate로
전환된 뒤 혐기적 조건에 의해 pyruvate가 TCA cycle로 넘
어가지 않고 ethanol로 전환될 때 중간산물로 아세트알데하
이드가 생성하게 된다. Pyruvate decarboxylase(PDC)는
pyruvate를 아세트알데하이드로 전환시키는 효소로 이 효
소의 활성은 Fig. 5에서와 같이 대조구를 제외한 모든 CM처
리에서 처리 3일에 활성이 급격히 증가한 후 일정하게 활성
이 유지되다가 처리 10일 이후 급격히 감소하였다. CM처리
는 혐기적 조건이기 때문에 과실에 알코올이 축적하게 되며
대부분 당이나 일부 사과산이 알코올과 CO₂로 전환하게
된다. CM 45°C처리 포도 알맹이 내에도 알코올과 CO₂가
생성되는 사실에 미루어 다른 효소활성과 달리 pyruvate
decarboxylase는 높은 온도에서도 활성을 나타내는 것으로
나타났다. Yang 등(26)은 CM처리 중 포도 알맹이 내의 알코
올 생성량이 보통 0.5-2.2%의 범위라고 보고하였다. 그러나
pyruvate decarboxylase의 활성은 다른 효소에 비해 활성이

크지 않은 것으로 나타났는데, Bruemmer 등(27)의 실험에서도 pyruvate decarboxylase의 활성은 다른 효소활성에 비해 활성이 낮은 것으로 보고되었다.

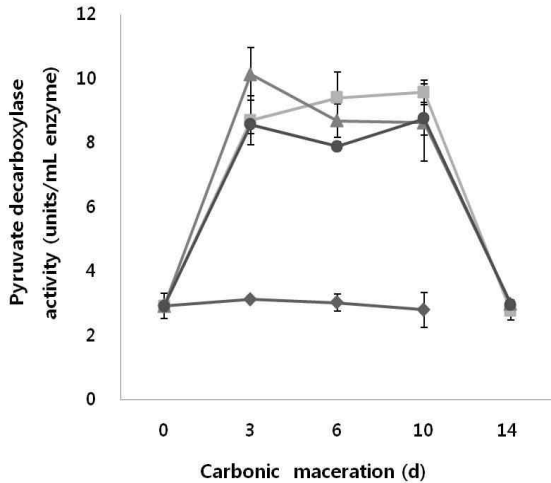


Fig. 5. Changes in the pyruvate decarboxylase activity based on the temperature during carbonic maceration process of Campbell Early grapes.

Control(◆) and carbonic maceration at 25°C(■), 35°C(▲) and 45°C(●).

Carbonic maceration처리 포도의 L-Lactic dehydrogenase 활성

Lactic acid 축적은 pyruvate까지의 급격한 당분해와 동시에 succinate dehydrogenase 활성의 감소에 의한 더딘 호기적 호흡률에 의해 일어난다고 알려져 있다(28). 본 실험에서는 젖산을 생성시킬 때 관여하는 효소 L-lactic dehydrogenase (EC 1.1.1.27)의 활성이 포도 자체에 있는 지 알아보기 위해 CM처리 중 효소활성을 측정된 결과 포도에서는 이 효소의 활성이 나타나지 않았다(자료 미제시). 이와 같은 결과로 보았을 때 CM처리 중 젖산의 증가는 젖산균이 관여했기 때문이라 판단된다. 또한 CM처리 온도별로 젖산 함량에 차이가 나는 것으로 보아 젖산균의 생육에 온도가 큰 영향을 미치는 것으로 보인다. 대부분의 과일에서 pyruvate가 lactate dehydrogenase의 작용으로 lactate까지 발효되는 과정은 거의 없다. 대부분의 과일은 O₂가 제한되어 있거나 O₂ 소비율이 높은 반응에서는 lactate를 축적시키는 대신 발효와 관련된 물질대사를 더 활발하게 일으킨다고 알려져 있는데, Borsani 등(29)의 복숭아 실험에서 수확 후 성숙 중 LDH의 활성은 없었지만 PDC와 alcohol dehydrogenase (ADH)의 활성은 증가되었다고 보고하였고, Germain 등(30)은 토마토에서 LDH genes을 확인하였지만 산소 스트레스에 따른 반응에서 LDH 활성이 기저 수준 정도라고 보고하여 LDH 활성이 거의 없음을 알 수 있었다. 이와 같은 결과로부터 CM처리 시 사과산의 감소는 사과산 대사관련 효소 작용의 영향을 받는 것으로 판단되었으며, 젖산의 증가는 포도 자체의 효소작용에 의하여 생성되는 것이 아

닌 젖산균과 같은 다른 요인에 의해 발생될 것으로 판단되었다.

요 약

Carbonic maceration처리 포도주에 있어 유기산 특히 사과산 함량을 감소시키는 주요 원인을 찾고자 포도를 2주 동안 온도별 carbonic maceration 처리하며 시기별로 산함량 및 사과산대사 관련 효소활성을 측정하였다. 온도별 carbonic maceration 처리 포도의 pH는 CM-25°C와 CM-35°C에서 처리 시간이 경과할수록 가장 높았으며, 총산은 초기에는 CM-35°C에서 가장 낮은 함량을 나타내었지만 처리 6일 이후 서서히 증가하였고, CM-25°C는 처리 완료일 까지 꾸준히 감소하는 것으로 나타났다. CM-45°C는 초기와 비슷한 함량을 나타내어 다른 처리보다 높은 총산 함량을 나타내었다. 유기산 함량에 있어 사과산 함량은 CM-35°C에서 가장 많이 감소하였고, 젖산 함량은 CM-35°C에서 가장 높게 나타났다. 사과산 대사관련 효소활성을 살펴본 결과, malic enzyme과 malic dehydrogenase는 CM-25°C와 CM-35°C에서 가장 높은 효소활성을 나타내었지만 CM-45°C에서는 초기부터 효소활성이 나타나지 않았다. oxalacetate decarboxylase 활성도 malic dehydrogenase 활성과 비슷한 경향을 나타내었다. pyruvate decarboxylase 활성은 다른 효소활성에 비해 활성이 낮았지만, CM-45°C에서도 활성을 나타내었다. 반면 L-lactic dehydrogenase 활성은 어떤 처리 구에서도 나타나지 않았다. 이와 같은 결과로부터 온도와 효소활성과의 관계에 있어 온도가 40°C 이상에서는 사과산 대사관련 효소가 활성을 나타내지 않는 것을 알 수 있었고, carbonic maceration 처리에서 사과산 감소가 효소의 작용에 크게 영향 받는 것을 확인할 수 있었지만, 젖산 생성에 대해서는 효소작용 외에 사과산 대사 미생물과 같은 다른 요인들에 대해 좀 더 깊이 있는 연구가 필요하다.

참고문헌

1. Koh KH, Chang WY (1998) Changes of chemical components during seibel white grape must fermentation by different yeast strains. Korean J Food Sci Technol, 30, 487-493
2. Mattic LR, Plane RA, Weir LD (1980) Lowering wine acidity with carbonate. American J Enol Vitic, 31, 350-357
3. Steele JT, Kunkee RE (1978) Deacidification of musts from the western united states by the calcium double salt precipitation process. American J Enol Vitic, 29, 153-160

4. Castino M (1974) Deacidification of wine with strong anion exchange resins in carbonate form. *Vini Ital*, 16, 305-401
5. Webb AD (1974) Chemistry of winemaking. American Chemical Society, Washington DC, p 107
6. Hariantono J, Yokota A, Takao S, 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
7. Amerine MA, Kunkee RE, Ough CS, Singleton VL, Webb AD (1980) The technology of wine making. AVI publishing Westport, Connecticut, p 565-570
8. Chang EH, Jeong ST, Roh JH, Jeong SM, Park SJ, Lee HC, Choi JU (2010) Enological characteristics of campbell early grape must studied using various carbonic maceration temperatures. *Korean J Food Preserv*, 17, 881-888
9. Chang EH, Jeong ST, Roh JH, Yun HK, Park KS, Choi JU (2008) Effect on wine quality of pre-treatment of grapes prior to alcohol fermentation. *Korean J Food Preserv*, 15, 824-831
10. Agilent technologies (2006) Food solutions with HPLC
11. Angleton EA, Flurkey WH (1984) Activation and alteration of plant and fungal polyphenoloxidase isoenzymes in sodium dodecyl sulfate electrophoresis. *Phytochemistry*, 23, 2723-2725
12. Geer BW, Krochko D, Oliver MJ, Walker VK, Williamson JH (1980) A comparative study of the NADP-malic enzymes from *Drosophila* and chick liver. *Comp Biochem Physiol*, 65B, 25-34
13. Bergmeyer HU (1974) Methods of Enzymatic Analysis (vol 1), 2nd ed, Academic press, New York, p 485-486
14. Gounaris AD, Turkenkopf I, Buckwald S, Young A (1971) Pyruvate decarboxylase. I. Protein dissociation into subunits under conditions in which thiamine pyrophosphate is released. *J Biol Chem*, 246, 1302-1309
15. Flanzy M (1935) Nouvelle methode de vinification. *Comptes rendus de l'academie d'agriculture de France*, 21, 935-938
16. Flanzy C, Flanzy M, Bernard P (1987) La vinification par maceration carbonique. INRA, Paris, p 125
17. Fuck E, Radler F (1972) Apfelsaurestoffwechsel bei *Saccharomyces*. I. Der anaerobe apfelsaureabbau von *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Mikrobiol*, 87, 149-164
18. Fuck E, Stark G, Radler F (1973) Apfelsaurestoffwechsel bei *Saccharomyces*. II. Anreicherung und eigenschaften eines malat enzymes. *Arch Mikrobiol*, 89, 223-231
19. Saura A, Lokki J, Oura E, Soumalainen H (1979) Qualitative yeast enzyme analysis by electrophoresis. *European J Appl Microbiol Biotechnol*, 7, 355-364
20. Silva S, Ramon PF, Andrade P, Abreu S, Texeira FM, Strehaiano P (2003) Malic acid consumption by dry immobilized cells of *Schizosaccharomyces pombe*. *American J Enol Vitic*, 54, 50-55
21. Spranger MI, Climaco MC, Sun B, Eiriz N, Fortunato C, Nunes A, Leandro MC, Avelar ML, Belchior AP (2004) Differentiation of red winemaking technologies by phenolic and volatile composition. *Analytica Chimica Acta*, 513, 151-161
22. Lee JK, Kim JS (2006) Study on the deacidification of wine made from campbell early. *Korean J Food Sci Technol*, 38, 408-413
23. Marr JJ (1972) *Crithidia fasciculata*: Regulation of aerobic fermentation by malic enzyme. *Experimental Parasitology*, 33, 447-457
24. Redzepovic S, Orlic S, Majdak A, Kozina B, Volschenk H, Viljoen-Bloom M (2003) Differential malic acid degradation by selected strains of *Saccharomyces* during alcoholic fermentation. *Int J Food Microbiol*, 83, 49-61
25. Pablo DS, Mauricio GM, Salvador P, Christian M (2004) Characterization of an oxaloacetate decarboxylase that belongs to the malic enzyme family. *FEBS Letters*, 570, 217-222
26. Yang DY, Kakuda Y, Ronald ES (2006) Higher alcohols, diacetyl, acetoin and 2,3-butanediol biosynthesis in grapes undergoing carbonic maceration. *Food Res Int*, 39, 112-116
27. Bruemmer JH, Roe BW (1970) Biochemical changes in grapefruit during anaerobic metabolism. *Florida State Hort Soci*, 83, 290-294
28. Jha AK, Singh AK, Prasad US (1990) Respiratory metabolites in Litchi chinesis Sonn. During fruit ripening and senescence. *Indian J Exper Biol*, 28, 537-541
29. Borsani J, Budde CO, Porrini L, Lauxmann MA, Lombardo VA, Murray R, Andreo CS, Drincovich MF, Lara MV (2009) Carbon metabolism of peach fruit after harvest: changes in enzymes involved in organic acid and sugar level modifications. *J Exp Bot*, 60, 1823-1837
30. Germain V, Ricard B (1997) Two ldh genes from tomato and their expression in different organs, during fruit ripening and in response to stress. *Plant Mol Biol*, 35, 949-954