

## Deacidification Effect of Campbell Early Must through Carbonic-Maceration Treatment: Isolation and Properties of the Bacteria Associated with Deacidification

Eun Ha Chang<sup>1</sup>, Seok Tae Jeong<sup>2\*</sup>, Sung Min Jeong<sup>1</sup>, Byung Sun Lim<sup>1</sup>, Jung Ho Noh<sup>1</sup>,  
Kyo Sun Park<sup>1</sup>, Seo Jun Park<sup>1</sup> and Jong Uck Choi<sup>3</sup>

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

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

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

### Carbonic Maceration 처리에 의한 Campbell Early 발효액의 감산 효과: 감산 관련 미생물의 분리 및 특성

장은하<sup>1</sup> · 정석태<sup>2\*</sup> · 정성민<sup>1</sup> · 임병선<sup>1</sup> · 노정호<sup>1</sup> · 박교선<sup>1</sup> · 박서준<sup>1</sup> · 최종욱<sup>3</sup>  
<sup>1</sup>원예특작과학원 과수과, <sup>2</sup>국립농업과학원 발효이용과, <sup>3</sup>경북대학교 식품공학과

#### Abstract

The grape cultivar Campbell Early has high levels of malic acid as well as tartaric acid. The high concentration of total acid in the Campbell Early wine is a critical aspect of the wine's sensory characteristics. To prevent the deterioration of the wine's quality, which is caused by the strong sour taste derived from the raw material in wine making, the deacidification factor was investigated via carbonic maceration under different temperature conditions, especially in the presence or absence of malolactic bacteria. Based on the results of the presence test of the malolactic bacteria during carbonic-maceration treatment, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum*, and *Streptococcus thermophilus* were characterized morphologically and were identified via biochemical tests and 16S-rRNA-gene-sequencing analysis. The isolated strains were found not to consume malic acid and to produce lactic acid. Moreover, these strains were consumed as soluble solids. The isolated strains are popularly known as lactic-acid bacteria and should have produced lactic acid from glucose. The *Oenococcus oeni* of the malolactic bacteria was not isolated. These results showed that the isolated strains are not deacidified during carbonic-maceration treatment.

Key words : malic acid, carbonic maceration, deacidification, malolactic bacteria

#### 서 론

포도주에 있어 산미에 관여하는 주요 유기산은 주석산과 사과산으로 알려져 있다(1). 이런 유기산 함량은 포도재배 지역이나 계절에 따라 다르므로 사용된 포도의 품질에 따라 포도주의 산도도 달라진다. 일반적으로 와인용 포도의 재배가 적합한 지역에서 재배된 포도의 주석산 함량은 3-7 mg/mL, 사과산 함량은 1-10 mg/mL의 수준을 나타내지만 (2), 우리나라와 같이 추운지방에서 재배된 포도의 경우 다량의 유기산을 함유하는 경우가 많다(3). 포도주의 유기산 중 주석산은 ascorbic acid로부터 식물체에 의해 합성되

어지며(4), 포도에 존재하는 비발효성 유기산으로서 포도주의 발효에 관여하는 포도주 효모는 주석산을 대사할 수 없기 때문에 포도주의 발효 시에도 효모에 의해 분해되지 않는다(5-7). 따라서 주석산 함량을 감소시키기 위한 방법에는 화학적방법이나 침전법(양금법)이 사용되고 있으며 (8), 초보단계이긴 하지만 미생물학적 방법으로 *Candida tartarivorans sp nov*, *Candida bertaie*, *Candida paludigena*, *Stephanoascus smithiae* 등 몇몇 주석산 분해 미생물에 의한 감산 방법들이 보고되고 있다(9-10). 사과산 함량을 감소시키기 위한 방법으로는 malo-lactic fermentation (MLF)이나 malo-alcoholic fermentation (MAF) 또는 carbonic maceration (CM) 방법이 이용되고 있다. 특히 포도의 유기산 중 사과산은 마실 때 목을 자극하는 신맛을 느끼게 하는 문제점을

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

가지고 있어 많은 양이 존재할 때 포도주의 품질에 큰 영향을 미친다고 알려져 있는데, CM방법은 사과산 함량이 높은 포도로 포도주를 제조할 경우 인위적인 미생물의 접종 없이 사과산을 감소시킬 수 있는 방법으로 유용할 것이라 생각된다. 전 실험에서 CM처리 방법으로 제조된 포도주에서 사과산 함량이 크게 감소된 것을 밝혔으며, CM처리 시 사과산 감소는 온도의 영향을 받는다는 것을 밝혔다(11). 그러나 CM처리 시 사과산 함량을 감소시키는 원인에 대해 구체적으로 구명한 실험이 많지 않으며, 대부분 미생물에 의한 자연적인 malo-lactic 발효와 유사한 방법에 의해 사과산이 감소할 거라고 추측하고 있다(12). Malo-lactic 발효는 미생물이 사과산을 이용해 젖산을 생성하는 발효방법으로 포도주에 있어 젖산 함량의 증가는 포도주에 부드러운 맛을 부여한다고 알려져 있으며 대표적인 균으로 *Oenococcus oeni*가 알려져 있다. Lee 등(13)과 Chang 등(11)의 CM처리 포도주의 경우도 일반적으로 제조되는 포도주보다 사과산은 감소하고 젖산 함량은 높게 나타나는 경향을 보였다.

많은 미생물이 발효로 성장할 때, 발효 산물로 젖산을 생산한다. 특히 일부 세균들이 많은 양의 젖산을 생산하기도 하는데, 이들을 젖산 생성균이라 한다. 젖산 생성균은 혐기성 세균이며, 산소가 존재하여도 발육할 수 있는 내산소성 혐기성균들이다. 대표적인 젖산 생성균은 *Lactobacillaceae* 균에 속하고, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Lactobacillus*와 *Leuconostoc sp.*의 5개 속으로 분류된다. 젖산 생성균은 형태적으로 2련구균, 4련구균 등의 구균과 간균에 주로 속하고 발효형식과 젖산의 구조에 따라 정상젖산균과 이상젖산균으로 나뉘어진다. 젖산균의 정상적인 생육을 위해서는 탄소원 외에 아미노산 형태의 질소원, 비타민류, 무기염 및 생육인자들이 요구된다. 정상젖산균은 당을 기질로 하여 오직 젖산만을 생산하는 것으로 젖산을 상업적으로 대량 생산하는 데 유용하며 일부의 *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* 속이 여기에 속한다. 이상젖산균은 젖산 외에 부산물로 이산화탄소와 더불어 에탄올 또는 초산을 생성하는 균으로서 일부의 *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Bifidobacterium* 속이 여기에 분류된다.

본 연구에서는 산 함량을 감소시키는 방법 중 CM처리를 이용했을 때 사과산 함량을 감소시키고 젖산 함량은 증가시키는 주요 원인이 자연적으로 포도 표면에 생육하는 미생물 중 사과산을 대사에 이용하는 미생물에 의한 영향인지 밝히 고자 실험을 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 포도주 제조방법

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. 적포도주 제조에 있어 대조구와 carbonic maceration (CM) 방법은 장 등(14)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 9일에 온도별 포도알맹이를 취해 사과산의 분해나 젖산의 생성에 관여하는 미생물의 분리, 동정을 중심으로 실험을 수행하였다.

## 미생물 분리 및 동정

### 총균수 및 젖산균수 측정

CM처리 포도의 총균수 및 젖산균수의 측정은 온도별 CM처리 포도를 취해 0.85% 생리식염수에 적당한 배수로 희석하여 총균수는 3M 건조필름배지(3M사, USA)를 이용해 일반세균, 곰팡이 및 효모수를 계수하여 나타내었고, 젖산균수는 *Lactobacilli* MRS agar (Difco Co, USA) 평판배지에 희석된 시료를 도말해 형성된 colony를 계수하여 시료 1 g 중의 젖산균수(cfu/g)로 나타내었다.

### 젖산균 분리

CM처리 포도의 사과산 감소에 영향을 미치는 젖산균을 분리하기 위해 포도 알맹이를 채취해 0.85% NaCl 생리 식염수에 단계적으로 희석하여 bromocresol purple (BCP) 0.02%를 함유한 *Lactobacilli* MRS 평판배지에 도말한 후 이산화탄소 가스를 치환하여 산소가 5% 미만인 밀폐용기에 담아 35°C에서 3-5일간 배양(15)하여 나타난 집락 중 산의 생성으로 인해 황색으로 변하는 집락을 젖산균으로 판단하고 1차적으로 분리하였다. 또한 젖산균 중 malo-lactic 발효를 일으키는 대표적인 균인 *Oenococcus oeni* 균을 분리하기 위해 기본적인 *Lactobacilli* MRS 배지에 0.3% L-malic acid를 첨가하고 pH 4.5로 조정된 산성배지를 만들었다. 이러한 선택배지에 희석된 시료를 도말하여 산소가 5% 미만인 밀폐용기에 담아 35°C에서 3-5일간 배양하여 나타난 집락을 분리하였다. 분리한 젖산균은 2회 이상 계대 배양을 통해 순수 분리하였으며 분리 균주들은 *Lactobacilli* MRS 액체 배지에서 증식시킨 다음 원심분리하여 균체를 모은 후 25% glycerol 용액에 현탁하여 -80°C에서 보관하면서 젖산균의 동정과 형태 및 생리학적 특성 실험을 실시하였다.

### 균의 동정

균주의 동정은 Gram 염색, catalase 반응시험, oxidase 반응시험, glucose에서 CO<sub>2</sub> 생성유무 등을 분석하여 Bergey의 Determinative Bacteriology Manual 제 8판(1974)과 Bergey의 Systematic Bacteriology Manual Vol.2 (1986)에 따라 분류하였다. 배양액을 Gram 염색한 후 광학현미경 관찰을 통해 형태학적 특성을 관찰하였고, catalase 반응 시험은 슬라이드 위에 균을 도말한 후 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 용액을 배양액과

반응시킨 후 기포의 발생 유무에 따라 양성(positive)과 음성(negative)으로 판정하였다. Oxidase 시험은 페트리 접시에 여과지를 올려놓은 후 Kovacs 시약을 여과지에 떨어뜨리고 백금침으로 시험할 집락을 묻힌 다음 여과지에 도달하여 10-15초 내에 색깔이 변하면 양성균주로, 변하지 않으면 음성균주로 판정하였다. Glucose에서 CO<sub>2</sub> 생성 유무는 균주의 액체 배양 중 Durham tube (Φ 8L×L/35 mm)를 이용하여 가스 생성여부를 판별하였다. 또한 API 50 CHL kit (BioMerieux Co, France)을 이용하여 당으로부터 산생성 시험을 수행하였으며 보다 정확한 동정을 위해 분리 균주의 chromosomal DNA를 분리한 후 16S rRNA 유전자의 염기서열을 분석하였다. Universal primer인 27F primer (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3')와 1492R primer (5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3')를 이용하여 PCR 증폭 후 증폭된 PCR 산물의 염기서열을 분석하였고, 분석된 염기서열을 이용하여 NCBI에서 blast search를 통해 상동성이 높은 젖산균을 동정하였다.

#### 분리균의 사과산 분해특성 분석

분리된 3개 균주의 배양 중 사과산 분해특성을 알아보기 위해 포도의 사과산 함량과 비슷한 양의 0.3% L-malic acid를 *Lactobacilli* MRS 액체 배지에 첨가한 후(pH 5.98) 분리균을 배양액의 1% 농도로 접종하여 35°C에서 배양하면서 시기별로 잔여 사과산 함량을 L-malic acid kit (Megazyme, Ireland)를 이용해 측정하였다. 먼저 균의 배양 중 시기별로 배양액을 원심분리 한 후 상등액을 취해 시료로 사용하였다. L-malic acid kit를 이용한 잔여 사과산 함량 측정은 cuvettes에 증류수 2 mL, sample 0.1 mL (blank는 증류수 0.1 mL), 1M glycylglycine buffer (pH 10.0) 0.1 mL, NAD<sup>+</sup>/PVP 0.1 mL 및 glutamate-oxaloacetate transaminase (GOT) 0.02 mL를 첨가하였다. 이들 혼합액을 섞고 3분 후 340 nm에서 흡광도를 측정하고(As<sub>1</sub>), 측정 후 15,000 U/mL L-Malate dehydrogenase 0.02 mL를 첨가하고 섞은 후 대략 3분 후에 흡광도(As<sub>2</sub>)를 측정한다. Blank는 시료 대신 증류수를 넣어 A<sub>B1</sub>과 A<sub>B2</sub>를 측정한 후 다음의 식에 대입해 잔여 사과산 함량으로 나타내었다.

$$c = \frac{V \times MW}{\xi \times d \times v} \times \Delta A \text{ L-malic acid} \times F \text{ [mg/L]}$$

$$c = \frac{2.34 \times 134.09}{6300 \times 1.0 \times 0.1} \times \Delta A \text{ L-malic acid} \times F \text{ [mg/L]}$$

c = concentration

V = final volume [mL]

MW = molecular weight of L-malic acid [g/mol]

ξ = extinction coefficient of NADH at 340 nm  
= 6300 [l × mol<sup>-1</sup> × cm<sup>-1</sup>]

d = light path [cm]

v = sample volume [mL]

F = dilution factor of the sample

ΔA<sub>S</sub> = A<sub>S2</sub>-A<sub>S1</sub>

ΔA<sub>B</sub> = A<sub>B2</sub>-A<sub>B1</sub>

ΔA = ΔA<sub>S</sub> - ΔA<sub>B</sub>

#### 분리균의 젖산생성량 측정

분리된 3개 균주의 배양 중 젖산 생성량을 알아보기 위해 잔여 사과산 함량을 측정된 시료를 이용해 젖산 함량을 L-lactic acid kit (megazyme, Ireland)를 이용해 동일하게 효소적 방법으로 측정하였다. 측정은 light pass 10 mm cuvettes에 증류수 1.6 mL, sample 0.1 mL (blank는 증류수 0.1 mL), 0.5M glycylglycine buffer(pH 10.0) 0.1 mL, NAD<sup>+</sup>/PVP 0.1 mL 및 glutamate-pyruvate transaminase (GPT) 0.02 mL를 첨가하고 섞은 후 3분 후 흡광도 340 nm에서 측정하고(AS<sub>1</sub>), 측정 후 2,000 U/mL L-Lactate dehydrogenase 0.02 mL를 첨가하고 섞은 후 대략 3분 후에 흡광도(AS<sub>2</sub>)를 측정한다. Blank는 시료 대신 증류수를 넣어 A<sub>B1</sub>과 A<sub>B2</sub>를 측정한 후 다음의 식에 대입해 젖산 생성량으로 나타내었다.

$$c = \frac{2.24 \times 90.1}{6300 \times 1.0 \times 0.1} \times \Delta A \text{ L-lactic acid} \times F \text{ [mg/L]}$$

#### 결과 및 고찰

##### Carbonic maceration처리 포도의 젖산균수 및 총균수

포도의 CM처리 중 사과산의 감소와 젖산의 생성에 영향을 미치는 요인 중 자연적인 malo-lactic 발효 미생물의 관여

**Table 1. Occurrence of lactic acid bacteria, bacteria, yeast and mold after carbonic maceration treatments of Campbell Early grape in different temperature for 9 days**

Treatments	Bacteria (cfu/g)	Yeast (cfu/g)	Mold (cfu/g)	Total Lactic acid bacteria (cfu/g)	Yellow colony of lactic acid bacteria (cfu/g)
CM25	2.0×10 <sup>5b1)</sup>	1.5×10 <sup>4b</sup>	7.4×10 <sup>3b</sup>	1.55×10 <sup>5b</sup>	21 <sup>ab</sup>
CM35	8.3×10 <sup>3a</sup>	3.0×10 <sup>4a</sup>	6.7×10 <sup>3a</sup>	1.75×10 <sup>4a</sup>	45 <sup>a</sup>
CM45	7.3×10 <sup>2a</sup>	1.8×10 <sup>4b</sup>	0 <sup>a</sup>	1.90×10 <sup>4a</sup>	0 <sup>b</sup>

<sup>1)</sup>Means with the different letters in same column are significantly different(p<0.05) by Duncan's multiple range test. 먼저 CM처리

9일에 시료 중의 총균수와 MRS 평판배지상에 형성된 젖산균수를 살펴본 결과를 Table 1에 나타내었다. 일반 세균수의 경우 CM처리 온도가 증가할수록 감소하였고 효모 수는 모든 처리에서  $10^4$  cfu/g colony 수를 나타내었으며, 곰팡이 수는 온도가 증가할수록 감소하여 45°C에서는 곰팡이가 나타나지 않았다. MRS 평판배지상에 형성된 젖산균수의 경우 25°C에서는  $10^5$  cfu/g colony 수를, 35°C와 45°C는  $10^4$  cfu/g colony 수를 나타내었으며, 배지상에 자란 균의 형태는 25°C에서는 다양한 형태의 균종들이 분포하였으나 35°C와 45°C는 비슷한 형태의 균종들이 많이 나타났다. MRS 평판배지에서 자란 colony 중 좀 더 명확하게 젖산균을 분리하기 위해 배지에 bromocresol purple (BCP) 발색시약을 첨가하여 MRS 배지에 자란 colony 중 산생성에 의해 황색으로 변한 colony만을 계수하였을 경우 25°C에서는 21 cfu/g colony의 집락 주변이 황색으로 변하였고, 35°C에서는 45 cfu/g colony가 황색으로 변하여 보라색의 배지가 완전히 황색으로 바뀌었지만 45°C에서는 황색으로 변하는 colony가 없었다. 일반 MRS 배지에서와 BCP가 첨가된 MRS 배지에서 젖산균수의 차이가 나는 것은 젖산균뿐만 아니라 다른 일반 통성혐기성세균도 MRS 배지에 형성되었기 때문인 것으로 보이며, 45°C에서는 높은 온도에서 생육이 강한 균들이 생장했을 가능성이 높은 것으로 판단되었다. 이와 같은 결과로 보았을 때 젖산균을 분리하기 위해선 일반 MRS 배지만 사용하는 것보다 BCP와 같은 발색시약을 첨가하는 것이 젖산균을 분리하는데 더 유용한 것으로 판단되었다. 그러나 malo-lactic 발효를 일으키는 대표적인 균인 *Oenococcus oeni* 균을 분리하기 위해 기본적인 MRS 배지에 0.3% L-malic acid를 첨가하고 pH 4.5로 조정된 산성배지에 BCP를 첨가하면 배지가 노란색으로 변하기 때문에 발색의 변화로 균을 분리할 수가 없었다. 따라서 이런 선택배지에서는 형태가 다른 colony 집락 전부를 분리해 형태 및 생리학적 특성 실험을 실시한 후 젖산균을 동정해야 할 것으로 판단되었다.

**분리 젖산균의 특성 및 탄소원 이용능**

CM처리 포도에서 사과산을 감소시키고 젖산을 생성시키는 미생물을 동정하기 위해 각각의 온도별 CM처리에서 시료를 취해 멸균수로 희석한 후 BCP-MRS 고체 배지에 도말하여 3일간 배양한 후 평판배양 상의 colony의 형태로 보아 서로 다른 황색 균체 집락의 균을 25°C와 35°C CM처리에서 분리하였으며 이들을 다시 동일 배지에 계대배양한 후 황색으로 변하는 13개의 colony를 분리하였다. 분리한 13개의 colony와 선택배지에서 분리한 colony를 동정하기 위하여 형태학적, 생리학적 특성을 조사해 Gram 양성의 통성 혐기성의 구균 또는 간균 3균주를 최종 분리하였다. 분리된 3균주의 형태학적, 생리학적 특성을 조사한 결과는 Table 2에서와 같이 3균주 모두 catalase와 oxidase가 음성이

**Table 2. Morphological and biochemical characteristics of lactic acid bacteria isolated from carbonic maceration treatment of Campbell Early grape in different temperature**

Characteristics	Strains		
	L-1	L-2	L-3
Cell morphology	rod	coccus	rod
Gram stain	+	+	+
Catalase	-	-	-
Oxidase	-	-	-
CO2 from glucose	+	-	-
Growth at 25°C	+	+	+
35°C	+	+	+
45°C	+	+	-
Acid from			
Amygdalin	-	-	+
Arabinose	+	-	+
Cellobiose	-	+	+
Esculin	+	+	+
Fructose	+	+	+
Galactose	+	+	+
Glucose	+	+	+
Gluconate	+	-	+ <sup>w</sup>
Lactose	+	+	+
Maltose	+	+	+
Mannitol	-	+	+
Mannose	-	+	+
Melezitose	-	-	+
Melibiose	+	-	+
Raffinose	+	+ <sup>w</sup>	+
Rhamnose	-	-	-
Ribose	+	-	+
Salicin	-	+	+
Sorbitol	-	-	+
Sucrose	+	+	+
Trehalose	-	-	+
Xylose	+	-	+ <sup>w</sup>

+, positive; +<sup>w</sup>, weak positive; -, negative

였고, glucose로부터 gas 생성 여부에 있어 L-1균주는 gas를 생성하였지만 L-2균주와 L-3균주는 gas를 생성하지 않았다. 또한 3균주의 배양온도를 조사한 결과 L-3 균주는 25°C와 35°C에서는 생육하였지만 45°C에서는 생육하지 못하였으며, L-1과 L-2균주는 45°C에서도 생육하는 것으로 나타났다.

API 50 CHL kit를 이용하여 분리균주의 당으로부터 산생성능을 검토한 결과는 Table 2에서와 같다. 먼저

*Lactobacillus*속 균주의 종 동정에서는 분리균주의 세포형태가 간균이고 sucrose에서 dextran을 생성하지 않으면 *Lactobacillus*속으로 동정되었다. Glucose로부터 gas를 생성하지 못하고 arginine으로부터 암모니아를 생성하지 못하며 당 발효능 중 rhamnose에서 산을 생성하지 않는 균주는 *Lactobacillus plantarum*의 특성으로 알려져 있으며, glucose로부터 gas를 생성하고 arginine으로부터 암모니아를 생성하며 amygdalin, cellobiose, mannitol, mannose, melezitose, rhamnose, salicin, sorbitol, trehalose에서 산을 생성하지 않으면 *Lactobacillus brevis*로 알려져 있다(16). 이를 바탕으로 확인한 결과 L-1균주는 *Lactobacillus brevis*와 비슷한 결과를 나타내었고, L-3균주는 *Lactobacillus plantarum*과 비슷한 결과를 나타내었다. 반면 L-2균주는 *Lactobacillus*속 균이 아닌 다른 균인 것으로 판단되었다.

특히 25°C에서는 *Lactobacillus sp.* 균들의 특성이 나타나지 않았으며 대부분 산을 생성하는 다른 균종들이므로 판단되었다. 분리한 황색 colony 13개 중 절반의 colony가 gram 음성의 단간균으로 catalase 양성이었으며 glucose로부터 gas를 생성하지 않았으며 탄소원 이용능에서 glycerol을 이용하는 것으로 보아 *Gluconobacter* 속이나 *Acetobacter* 속의 균주들이므로 생각되었다(17).

### 분리 젖산균의 동정

분리 젖산균의 동정을 위해 각 균주의 partial 16S rRNA gene sequencing 결과를 NCBI의 blast search를 통해 상동성을 조사하였다. 그 결과 Table 3에서와 같이 L-1균주는 *Lactobacillus brevis*와 98%의 상동성을 나타내었고, L-2균주는 *Streptococcus thermophilus*와 97%의 상동성을 나타내었으며 L-3균주는 *Lactobacillus plantarum*과 97%의 상동성을 나타내었다. 특히 CM처리에서 동정된 균들 중 *Lactobacillus brevis*가 colony 수에 있어 우위를 차지하는 균으로 나타났다.

MRS broth에 사과산을 포도에 존재하는 사과산 함유량과 비슷하게 첨가한 다음 동정된 균주를 1% 농도로 접종하여 배양하면서 사과산의 소비정도를 검토한 결과 Fig. 1에서와 같이 3균주 모두 사과산을 거의 소비하지 않는 것으로 나타났다. 젖산균들 중 정상젖산균에 속하는 균들은 glucose에서 젖산을 85% 이상 생성하고 여기에 속하는 균들은 *Lactobacillus plantarum*, *L. casei*, *L. acidophilus*,

*Streptococcus* 속 등이 알려져 있다. 이상젖산균에 속하는 균들은 glucose에서 젖산을 50% 이하 생성하고 그 외에 CO<sub>2</sub>와 더불어 에탄올이나 초산을 생성하는 것으로 알려져 있고 여기에 속하는 균들은 *Lactobacillus brevis*, *L. fermentum*, *Leuconostoc mesenteroides* 등이 알려져 있다. 특히 최근 연구에서 젖산균들 중 *L. plantarum*균주에 malolactic enzyme이 존재한다는 보고(18)와 이 균이 사과산을 이용해 젖산을 생성하는 malo-lactic 발효를 한다(19,20)는 연구들이 보고되었다. 그러나 본 실험에서는 분리된 *L. plantarum*이 사과산을 소모하지 않는 것으로 나타나 사과산이 함유된 MRS broth에서 균을 배양할 때 배양액의 낮은 pH와 같은 배양환경이 균의 생육 속도에 영향을 미쳐 이와 같은 결과를 나타내었을 것으로 판단된다. Hernandez 등(19)의 실험에서도 *L. plantarum*균은 *O. oeni*균보다 포도주의 환경에 내성이 약하고 상업적으로 malo-lactic 발효 starter로서 비효율적이라는 보고가 있었다.

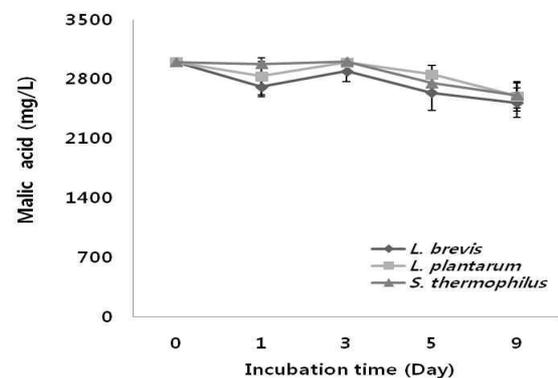


Fig. 1. Ability of malic acid degradation of isolated strains in MRS broth.

균의 동정 결과 포도의 CM처리 시 당으로부터 젖산을 생성시키는 젖산균이 존재함을 확인하였다. 그러나 CM처리로 포도의 사과산을 감소시키기 위해선 malo-lactic bacteria가 존재해야 하는데 대표적인 균인 *Oenococcus oeni*균은 CM처리 포도에서 동정되지 않았다. 또한 동정된 대부분의 균이 당에서 젖산을 생성하는 균으로 알려져 있으며, 사과산 함유량을 측정된 MRS 배지에서 분리 균의 젖산 생성량을 살펴본 결과 Fig. 2에서와 같이 모든 균에서 젖산이 생성되는 것으로 보아 분리된 균들이 일반적으로 포도의 당을 이용해 젖산을 생성할 것으로 판단되었다. 분리균들이 당을 이용해 젖산을 생성하는지 확인하기 위해 MRS 액체배지에 분리된 3균을 배양하면서 Brix 당도를 측정된 결과 Fig. 3에서와 같이 모든 배지에서 초기보다 Brix 당도가 떨어짐을 알 수 있었다. 특히 분리된 3 균들 중 *L. plantarum*과 *S. thermophilus*균은 정상젖산균이기 때문에 젖산 생성량이 이상젖산균인 *L. brevis*균보다 2배 가까이 더 많아야 하지만 본 실험결과는 2배 이상의 차이를 보이지

Table 3. Identification of lactic acid bacteria isolated from carbonic maceration treatment

Sample	Homology (%)	Identification
L1	98%	<i>Lactobacillus brevis</i>
L2	97%	<i>Streptococcus thermophilus</i>
L3	97%	<i>Lactobacillus plantarum</i>

않았는데 이는 사과산이 함유된 MRS broth에서 분리균을 배양했을 때 *L. brevis*균의 생육이 가장 왕성하였고, *S. thermophilus*균이 가장 약한 것으로 나타났으며, Fig. 3의 당도가 감소하는 것을 보았을 때도 *L. brevis*균의 배양액에서 가장 많이 감소하는 것으로 보아 생육정도가 젖산 생성 함량에 영향을 미쳤을 것으로 판단된다.

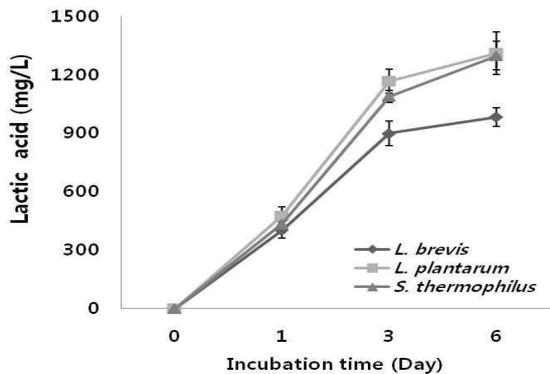


Fig. 2. Ability of lactic acid accumulation of isolated strains in MRS broth.

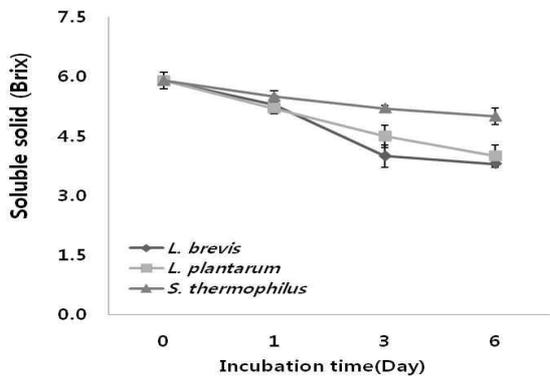


Fig. 3. Utilization of soluble solids of isolated strains in MRS broth.

그러나 본 실험에서 분리된 균들이 사과산을 이용해 젖산을 생성하거나 또는 당을 이용해 젖산을 생성한다 하더라도 이와 같은 탄소원들을 젖산으로 변환시키기 위해선 충분한 균체 수가 존재해야 하며, 대부분 포도주 발효에 있어 접종원으로 사용되는 효모의 수가 보통  $1 \times 10^6 \sim 10^8$ /mL의 수준으로 접종(21,22)을 해서 알코올 발효를 하는 것과 비교해 보았을 때 Table 1의 실험 결과에 비추어 황색 집락을 나타내는 lactic acid bacteria colony 수가 CM처리 9일에 최대 40여 개 밖에 되지 않는 것으로 보아 젖산 생성균의 개체 수가 malo-lactic 발효를 일으키기에는 너무 적은 수임을 알 수 있었다. 따라서 CM처리 초기에는 젖산생성이 미미하다가, CM처리가 진행될수록 colony 개체 수 증가에 따라 젖산 생성이 증가되었으며, 25°C나 45°C보다 생육에 적합한 35°C에서 젖산 함량이 높게 나타났을 것으로 판단된다.

따라서 본 실험결과 포도의 CM처리 시 젖산의 증가는 당에서 젖산을 생성시키는 젖산균에 의한 것으로 판단되며, 사과산의 감소는 동정된 젖산균의 결과나 개체수로 보아 malo-lactic 미생물에 의한 영향은 크게 작용하지 않는 것으로 나타났다.

## 요 약

Carbonic maceration 처리는 포도주 제조 시 사과산을 감소시키는 방법으로 사과산 감소의 원인 중 미생물의 영향을 알아보려고 사과산을 감소시키고 젖산을 생성시키는 미생물을 분리, 동정한 결과 *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum* 및 *Streptococcus thermophilus*의 젖산균이 존재하는 것으로 나타났다. 분리된 균들은 대부분 당에서 젖산을 생성하는 균으로 알려져 있으며 사과산을 함유한 배지에서 균의 배양 중 사과산을 이용하지 않고 젖산을 생성하는 것으로 보아 주로 당을 이용하여 젖산을 생성하는 것으로 보인다. 사과산을 이용해 젖산을 생성시키는 대표적인 malo-lactic bacteria인 *Oenococcus oeni* 균은 본 실험에서는 동정되지 않았다. 따라서 carbonic maceration 처리 시 사과산의 감소는 포도에 자연적으로 생육한다는 malo-lactic bacteria나 감산 관련 미생물의 영향은 크게 받지 않는 것으로 판단되며, 젖산 함량의 증가는 당을 이용하는 다양한 젖산균에 의해 생성되는 것으로 판단된다.

## 참고문헌

1. Beelman RB, Gallander JF (1979) Wine deacidification. *Adv Food Res*, 25, 1-53
2. Ruffner HP (1982) Metabolism of tartaric and malic acids in *Vitis*: a review, Part A. *Vitis*, 21, 247-259
3. Park WM, Park HG, Rhee SJ, Lee CH, Yoon KE (2002) Suitability of domestic grape, cultivar Campbell Early, for production of red wine. *Korean J Food Sci Technol*, 34, 590-596
4. DeBolt S, Cook DR, Ford CM (2006) L-tartaric acid synthesis from vitamin C in higher plants. *Proc Natl Acad Sci, USA* 103, 5608-5613
5. Graham HF (1993) *Wine microbiology and biotechnology*. Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland
6. Gao C, Fleet GH (1995) Degradation of malic and tartaric acids by high density cell suspensions of wine yeasts. *Food Microbiol*, 12, 65-71
7. Fonseca A (1992) Utilization of tartaric acid and related compounds by yeasts: taxonomic implications. *Canadian*

- J Microbiol, 38, 1242-1251
8. Boulton RB, Singleton VL, Bisson LF, Kunkel RE (1996) Principles and practices of winemaking. Aspen Publishers, Gaithersburg, Maryland, USA p.320-351
  9. Fonseca A, Fell JW, Kurtzman CP, Spencer-Martins I (2000) *Candida tartarivorans* sp. nov., an anamorphic ascomycetous yeast with the capacity to degrade L- and meso-tartaric acid. Int J Syst Evol Microbiol, 50, 389-394
  10. Kurtzman CP, Robnett CJ (1998) Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. Antonie van Leeuwenhoek, 73, 331-371
  11. 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
  12. 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
  13. Lee JK, Kim JS (2006) Study on the deacidification of wine made from Campbell Early. Korean J Food Sci Technol, 38, 408-413
  14. 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
  15. Lee SO, Pack MY (1980) Malo-lactic bacteria in Korean winery environment and their potential use in wine making. Korean J Appl Microbiol Bioeng, 8, 193-198
  16. Kim JH, Kim JI (1999) Identification and fermentation characteristics of lactic acid bacteria isolated from dongchimi as starter for radish juice. Korean J Microbiol, 35, 307-314
  17. Park MH, Lyu DK, Ryu CH (2002) Characteristics of high acidity producing acetic acid bacteria isolated from industrial vinegar fermentation. J Korean Soc Food Sci Nutr, 31, 394-398
  18. Caspritz G, Radler F (1983) Malolactic enzyme of *Lactobacillus plantarum*. J Biologi Chemi, 258, 4907-4910
  19. Hernandez H, Estrella I, Perez-Gordo M, Alegria EG, Tenorio C, Ruiz-Larrea F, Moreno-Arribas MV (2007) Contribution of malolactic fermentation by *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus plantarum* to the changes in the nonanthocyanin polyphenolic composition of red wine. J Agric Food Chem, 55, 5260-5266
  20. Pozo-Bayon MA, Alegria EC, Polo MC, Tenorio C, Martin-Alvarez PJ, Calvo de la Banda MT, Ruiz-Larrea F, Moreno-Arribas MV (2005) Wine volatile and amino acid composition after malolactic fermentation: Effect of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus plantarum* starter cultures. J Agric Food Chem, 53, 8729-8735
  21. Yoo JY, Seon HM, Shin DH, Min BY (1984) Enological characteristics of Korean grape and quality evaluation of their wine. Korean J Appl Microbiol Bioeng, 12, 185-190
  22. Kim JS, Kim SH, Han JS (1999) Effects of sugar and yeast addition on red wine fermentation using Campbell Early. Korean J Food Sci Technol, 31, 516-521

---

(접수 2011년 5월 17일 수정 2011년 11월 11일 채택 2011년 11월 18일)