

微生物을 이용한 果實酒의 減酸效果



鄭 基 澤

<慶北大 教授>

1. 緒 言

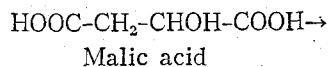
果實酒(Wine)는 다른 술에 비하여 酸이 多量 含有되어 있다는 것이 하나의 특징으로 되어 있다. 果實酒의 總酸(주석산으로 환산)은 대개 0.7~0.8% 정도로서 같은 釀造酒 중에서도 穀類를 원료로 제조한 술인 청주, 약주에 비하여 거의 2~3배에 가까운 높은 酸을 含有하고 있다. 果實酒의 이같은 特有的 酸味 하나만으로도 오래전부터 전통적으로 低酸度의 穀酒를 愛飲해 온 우리나라의 국민성과 기호를 만족시키지 못하고 외면당하고 있다고 해도 과언은 아닐 것이다.

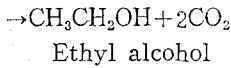
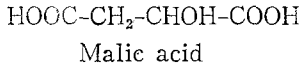
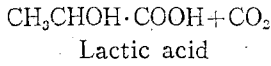
통계¹⁾에 의하면 1974年 世界各國의 1人當 果實酒 소비량은 이태리 111%, 프랑스 103%, 미국 5%, 일본 0.4%로써 주로 西歐에서 多量 소비됨을 알 수 있다. 가까운 日本에서 全酒類中 果實酒가 차지하는 비율이 1975년에 0.5% 정도에 지나지 않는 것으로 보아 우리나라

는 이와 비슷하거나 낮은 것으로 推定되어 果實酒의 大衆化는 아직도 요원한 감이 없지 않다.

이런 點을 고려하여 생각해낸 方法이 바로 果實酒內의 酸을 감소시켜 좀 더 低酸味의 순한 맛이 나는 果實酒를 얻는 方法이다. 그런데 酸度를 감소시켜 酸味를 조절하는 方法은 대개 두가지로 요약할 수 있다. 그 하나는 열기성 물질인 CaCO₃등을 첨가하여 果實酒中의 有機酸을 中和·除去하는 化學的인 方法이다. 이 方法은 비단 果實酒에만 국한된 것이 아니라 淸酒나 다른 酒類의 酸味를 감소시킬 목적으로도 利用되고 있으나 이 方法에 의하면 果實酒中의 有機酸을 구별하지 않고 同一한 條件으로 中和하므로 減酸效果외에 不作用을 일으켜 오히려 酒質을 惡化시키거나 不安定하게 만들 위험성을 내포하고 있어 오늘날은 잘 사용되고 있지 않는 實情이다.

또 하나의 方法은 微生物을 利用하는 微生物學的인 方法이다. 微生物을 利用한 果實酒의 減酸法은 果實酒中에 含有된 有機酸中 酸味가 특히 강한 사과산을 酸味가 약한 젖산이나 Ethyl alcohol로 분해하는 것으로써, 利用하는 微生物의 종류에 따라 다시 區分하여, 젖산균을 利用하여 사과산을 젖산으로 분해하는 Malolactic fermentation(MLF)과 酵母 특히 分열酵母인 Schizosaccharomyces屬에 의하여 사과산을 Ethyl alcohol로 分解하는 Maloalcoholic fermentation(MAF)으로 나눌 수가 있다.



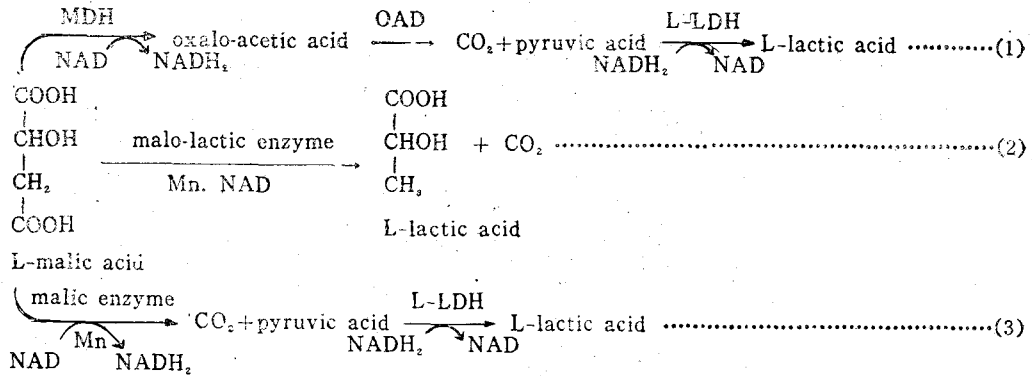


上記의 MLF pathway를 최초로 확립한 사람은 Seifert(1901)²⁾이며 젖산균중에서도 특히 MLF에 관여하는 것을 ML-bacteria라 부르고 있다. 필자는 여러 가지減酸效果中 주로 젖산

균이 관여하는 MLF에 관해서 기술하고자 한다.

2. MLF에 의한 사과산의 分解기구

果實酒中에 含有된 유기산의 젖산에 의한 대사분해에 관한 研究는 오래전부터 있어 왔으며 多數의 연구가 있다. 그 代謝徑路를 소개하면 다음과 같다.



MDH; L-malate dehydrogenase (EC; 1.1.1.37)

OAD; oxaloacetate decarboxylase (EC;4.1.1.3)

L-LDH; L-lactate dehydrogenase

malo-lactic enzyme; L-malate lyase

malic enzyme; L-malate oxidoreductase (decarboxylating) (EC;1.1.1.38 or 39)

Fig.1. Pathways of the conversion of malic acid to lactic acid.

L-Malic acid가 ML-bacteria에 의해서 Lactic acid로 대사되는 徑路는 세가지로 나누어 생각할 수 있다. 그 첫째 徑路를 보면 우선 L-malic acid가 젖산균중의 NAD-dependent L-malate dehydrogenase의 도움으로 oxalo-acetic acid로 산화되고 다시 oxalo-acetic acid decarboxylase에 의해 pyruvic acid를 경유하여 NADP-dependent L-Lactate dehydrogenase에 의해 젖산으로 分解하는 (1)번 徑路이다. 두번째 徑路는 L-Malic acid가 "Malo-Lactic enzyme"이라는 효소, 즉 L-Malate carboxy lase에 의해 NAD와 Mn

의 촉매로 직접 젖산으로 decarboxylation되는 (2)번 徑路이며, 세번째 徑路는 Malic enzyme인 NAD-dependent L-Malate oxidoreductase(decarboxylating)에 의해 바로 pyruvic acid로 脫炭酸되고 이후는 (1)번 徑路和 같은 과정을 거쳐 젖산으로 分解되는 (3)번 徑路이다.

이들 대사경로에 대한 연구를 대략 살펴보면 Korkes et al (1950)³⁾은 Lactobacillus arabinose로부터 Malic acid를 직접 pyruvic acid로 分解하는 Malic enzyme을 최초로 발견했으며 Fleisch et al(1965)⁴⁾은Malic acid를

가역적으로 decarboxylation시켜 pyruvic acid를 생성하는 Malic enzyme과 (1)번 경로의 Malic acid dehydrogenase(MDH)와 oxaloacetic acid decarboxylase(OAD)가 Malate 대사에 관계함을 밝혀냈다. 특히 Malic enzyme과 OAD에 대하여 Michaelis constants, P-chloromercuribenzoate inhibition, avidin의 영향 등을 조사한 결과 분명히 별개의 다른 효소임을 알아냈으며 LDH는 果實酒中の pH가 높아서 그 活性이 active하지 않기 때문에 L-Malic acid는 (1)번 徑路보다는 (3)번 徑路를 거쳐 分解된다고 주장했다. Korkes & Ochoa(1948)⁵⁾는 Malic acid를 직접 젖산균에 의해 Lactic acid로 脫炭酸시키는 효소 L-Malate. carboxyl lyase와 NAD를 최초로 발견함으로써 Malo-lactic반응, 즉 (2)번 徑路를 처음으로 확인했다. 또한 Jerchal et al(1956)⁶⁾은 MLF 徑路는 (2) (3)번의 두가지 반응 경로가 있음을 알아냈으며 Schütz & Radler(1973)⁷⁾도 대부분의 Malic acid의 Lactic acid로의 전환은 Malate carboxy lyase와 補酵素 NAD에 의한 直接的인 decarboxylation인 (2)번 경로이고 나머지 소량의 Malic acid는 pyruvic acid를 거쳐 NADH의 도움으로 Lactic acid로 되는 (3)번 徑路를 거친다고 했다. 이 주장은 Morenzoni(1974)⁸⁾, Kunkee(1975)에 의해 다시 확인되었고 이 반응을 Isotope를 써서 확인한 사람은 Alizade & Simon(1973)⁹⁾ 이었다. Morenzoni(1974)⁸⁾에 따르면 (3)번 경로의 pyruvic acid는 hydrogen acceptor로 作用하며 초기의 미생물 成長을 자극한다고 한다. 한편, (2)번 경로에 의한 Malate 分解는 carbon dioxide Electrode를 사용한 측정법으로 Lonvaud & Ribereau-Gayon(1973)¹⁰⁾에 의해 뚜렷이 밝혀지게 되었다.

이들 諸研究를 종합할 때, L-Malic acid가 Lactic acid로 分解되는 mechanism은 L-malate carboxyl lyase가 발견되기 전에는 (1)번과 (3)번 徑路를 거쳐 젖산균에 의해 Lactic acid가 생성된다고 알려졌으나 이 효소가 발견된 現在에는 Malic acid의 대부분이 (2)번 경로를 거쳐 대사되고, 나머지 일부만이 (3)번 경로를 거치게 되며, (1)번 경로는 극히 일어나기 어려운 것으로 보고 있다. 그러나 이들 대사경로도 現在까지 완전히 確立되어 있는 것은 아니다.

3. MLF에 관여하는 bacteria

MLF에 관여하는 bacteria, 즉 ML-bacteria에 대해서는 오래전부터 다수의 研究者에 의해 검토되어 왔으며 대략 네가지屬으로 나누어 생각할 수 있다.

1. *Leuconostoc* sp...coccus, hetero type.
Leu. mesenteroides, *Leu. dextranicus*,
Leu. citrovorum (*Leu. oenos*) 등
2. *Lactobacillus* sp...rod, homo, hetero type.
Lac. delbrueckii, *Lac. plantarum*,
Lac. casei, *Lac. brevis* 등
3. *Pediococcus* sp...coccus, homo type.
P. cerevisiae, *Micrococcus malolacticus*,
Micrococcus multivorax 등
4. *Streptococcus* sp...coccus, homo type.
St. lactis, *St. malolacticus* 등

以上에서 알 수 있는 바와 같이 대부분의 젖산균이 MLF에 관여하지만 그 중에서도 특히 桿狀젖산균인 *Lactobacillus* (homo, hetero type)와 球狀젖산균인 *Leuconostoc* (hetero type), *Streptococcus* (homo type), *Pedioc-*

occus(homo type)의 4屬이 가장 중요한 ML-bacteria로 알려져 있다. 이들中 Micrococcus는 Pediococcus屬에 넣어 分類하는 學者도 있고 Streptococcus屬에 넣는 學者도 있어서 명료하지 않다. 특히 Leuconostoc citrovorum은 그 후 Ingraham et al(1960)¹¹⁾이 California產 赤포도주에서 분리한 Leu. oenos와 同一한 균주임이 밝혀졌으며 UCD Enology Number Leuc. oenos. ML-34로 命名되어 生理的 性質 및 양조학적 特性이 現在 가장 많이 연구되어 있으며 실제 공업적으로 널리 利用되고 있다.

4. MLF에 영향을 미치는 各種因子

ML-bacteria는 一般的으로 Alcohol 및 SO₂ 耐性이 약하므로 ML-bacteria의 증식 및 Malic enzyme에 의한 malate分解는 alcohol, SO₂, pH 등의 환경因子の 영향을 받기 마련이다. 따라서 MLF에 미치는 영향은 균의 증식과 효소반응에 의한 사과산 分解라는 두 가지 측면에서 검토하지 않으면 안된다.

온도: 일반적으로 ML-bacteria의 증식을 위한 最適溫度는 25°C 정도라고 알려져 있으며 SO₂ 농도 100ppm의 果醪에서는 8~15°C에서 균의 증식이 억제된다는 보고도 있다. 또한 MLF 효소반응의 最適溫度는 15~20°C이며 15°C 이하면 MLF가 지연된다고 한다.

SO₂: 대개 SO₂ 100~150ppm에서 MLF가 일어나지 않는데 SO₂ 저해 정도는 세균의 종류, 원료果實의 품종에 따라 다르고 共存하는 alcohol濃度에 따라서도 달라진다. SO₂ 100ppm의 농도에서 60일까지 MLF의 Start가 지연되었다는 보고도 있다.

Alcohol: alcohol농도 10~13.5%의 범위에서는 거의 영향이 없으나 그 以上에서는 저해

를 일으킨다. 한편, 原(1963)¹²⁾의 MLF효소반응에서는 6%까지는 거의 영향이 없고 以後 alcohol증가와 더불어 강한 저해를 받으며 17%以上에서는 완전히 저해되었다고 한다.

pH: ML-bacteria의 最適증식 pH는 4.1~4.5이고 pH3.0以下에서는 증식이 억제된다. 또한 MLF前後의 pH를 비교할 때 MLF後가 MLF前에 비해 pH가 0.2 unit 정도 증가하며 initial pH가 높을수록 pH증가의 폭이 크다는 Bousbouras & Kunkee(1971)¹³⁾의 보고가 있으며 alcohol濃度와도 관계가 있어서 alcohol 10%일때 pH 2.93에서도 MLF가 일어났다는 보고도 있다.

糖 및 營養素: 糖의 利用性은 strain에 따라 다른데 어떤 균주는 Hexose보다 Pentose를 carbon源으로 더 잘 利用하며 Hexose인 Glucose나 Fructose를 單獨으로는 利用 못하나 Glucose와 Fructose가 共存시는 잘 利用한다는 보고도 있는데 이 현상은 Glucose가 pentose cycle을 거쳐 대사될 때 fructose는 NAD에 의해 Hydrogen acceptor로서 작용한다고 한다. 젖산균이나 ML-bacteria는 營養源으로 주로 Vitamin B complex인 nicotinic acid, folic acid, pantothenic acid, riboflavin, thiamin등을 필요로 하며 growth factor로써 특히 Tomato juice를 요구하는 것도 있다. 배지에 Tomato juice를 2.5% 정도 첨가하면 균체증식의 lag phase를 단축시키고 세포수를 증가시켜 ML-bacteria의 증식에 效果的이라고 한다. 이 Tomato juice에 관해서는 Amachi & Yoshizumi(1969)¹⁴⁾, Amachi et al(1971)¹⁵⁾에 의해 Tomato juice에 포함되어 있는 growth factor의 구조를 밝혀내는데 成功한 바 있다. 이 결과에 따르면 growth factor의 total structure는 glucose가 D-Pantothenic acid의 C-4' 위치에서 β-glucoside결합을 하고

있는 4'-O-(β -D-glucopyranosyl)-D(R)-Pantothenic acid라고 한다.

기타 : 과량의 Tannin은 ML-bacteria를 저해하나 포도주 중의 Tannin量으로서는 거의 영향이 없으며 Tannin이 거의 없는것 보다 적당량 함유하는 편이 오히려 좋다. Red wine이 White wine보다 MLF가 일어나기 쉬운 理由中の 하나가 Red wine중에 多量 含有된 Tannin과 관계가 있지 않을까 생각된다. 무기염인 Mn과 Mg은 대사경로의 보조소로 작용하기 때문에 MLF촉진효과를 나타내며 酵母가 共存時는 ML-bacteria와 酵母 사이에 공생 관계가 成立되어 ML-bacteria의 증식이 오히려 왕성해진다고 한다. 또한 果實酒 제조과정中 Racking(양금뜨기)操作을 하게 되는데 Racking이 빠를수록 MLF발생이 어렵다고 알려져 있어서 酵母의 初期除去가 MLF의 發生을 저해함을 입증해 준다. 유기산中 tartaric acid는 ML-bacteria의 증식을 저해하며 malic acid를 carbon source로 利用 못하는 菌株은 malic acid에 의해서도 저해를 받는다. 한편 fumaric acid는 0.15%정도의 농도에서 MLF를 강하게 저해하므로 실제 工業的으로 人爲的인 MLF 방지제로 널리 쓰인다.

5. MLF와 果實酒의 品質問題

以上에서 MLF에 미치는 몇가지 因子를 살펴봤으나 MLF가 과실주의 酸味를 조절하기 위하여 效果의인 것은 사실이지만 MLF 自體가 모든 과실주에 꼭 바람직하다고는 말할 수 없다. MLF의 利害得失 문제는 wine의 type, 포도 재배지역(기후), 포도 품종, 제조 기술 등에 따라 달라지기 때문이다. 일례로 기후가 서늘한 북유럽 지방에서 生産되는 포도는 malic acid含量이 tartaric acid보다 월등히 높

으므로 MLF가 바람직한 경우이고 California처럼 따뜻한 지방에서는 malic acid가 tartaric acid含量의 $\frac{1}{3}$ 이하로 상당히 酸含量이 낮기 때문에 MLF가 不必要한 경우가 된다. 우리가 MLF에서 생각하지 않으면 안되는 點은 포도중의 酸含量, bacterial fermentation에 의한 제품의 flavour문제, wine의 미생물학적인 安定性 等일 것이다. MLF가 일어난 후에는 주류중의 산도의 감소와 함께 diacetyl, acetone, 揮發酸의 生成이 현저한데 이들 성분은 낮은 농도에서는 flavour가 될 수 있으나 含量이 높으면 좋지 못한 odor를 나타내므로 신중히 고려할 必要가 있다고 본다.

오늘날에는 실제로 必要에 따라 MLF를 人爲的으로 유도하거나 억제할 수 있는 여러가지 方法들이 確立되어 가고 있다. 비록 人爲的으로 MLF를 유도하지 않더라도 Ingraham et al¹⁶⁾ 1966)이 California産 포도주 144點을 조사한 결과 적포도주에서 75%, 백포도주에서 30%가 MLF를 일으킨 것으로 보고되고 있으나 工業的으로 여러가지 條件을 고려하여 人爲的으로 MLF를 誘導하거나 억제할 必要가 생기게 된다. 먼저 MLF誘導에 관하여 알아보면 ML-bacteria를 果醪에 첨가하는 時期에 따라 ML-bacteria의 菌體 또는 培養液을 果汁에 주모와 함께 접종하여 Alcohol발효와 MLF를 共存시키는 方法, MLF를 完結후 酒모를 접종하여 Alcohol발효를 유도하는 방법 및 alcohol발효 후반기 즉 alcohol含量 8~10%, 糖 3~4%정도일 때 ML-bacteria를 첨가하는 방법이 있다. 이 때 ML-bacteria의 접종량은 배양액 상태일 때 1.3%, 菌體일 때는 $10^6 \sim 10^7$ cell/ml이 좋으며 배양액의 SO₂ 농도는 20~50ppm, ML-bacteria의 growth factor로서 Tomato juice 첨가가 效果的이라고 한다. ML-bacteria의 배양 배지로서는 습

成培地가 주로 쓰이며果汁에다 pepton, casein등을 혼합한 천연배지나 Rogosa 배지 등이 널리 쓰인다.

MLF의 防止法으로서는 cold storage(15°C以下), SO₂첨가(100ppm以上), early rack-ing法, Fumaric acid첨가법 등이 있으며 이 方法은 單用하는 것 보다는 병용함으로써 높은 效果를 얻을 수 있다.

6. 結 言

果實酒의 酸味를 조절하기 위하여 微生物을 利用하는 方法을 개발적이고도 단편적으로 기술하였다. 발효, 특히 젖산균이 관여하는 젖산 발효는 효모에 의한 alcohol발효보다 훨씬 복잡하고 미묘한 點이 한 두 가지가 아니다. 특히 ML-bacteria에 의해 유도되는 MLF는 여러가지 因子가 거기에 관여하여 영향을 주며 또한 MLF前後의 wine中の 여러가지 성분 변화, flavour, taste 등에 크게 영향을 주어 제품 自體의 品質에 至大한 영향을 주므로, 모든 條件을 고려하여 신중히 다룰 必要가 있다고 본다. MLF가 바람직하지 않으면 억제하고 바람직한 경우는 人爲的으로 유도할 수는 있지만 아직도 미해결 상태로 남아있는 문제가 무수히 많다. 과실주를 常飲해 온 西歐에서도 이런 실정인데 果實酒가 이제 겨우 本格的으로 개발되고 있는 우리나라에서는 더 말할 나위가 없을 것이다. 우리도 이런 곳에 눈을 돌림으로서 보다 良質의 果實酒를 生産해 낼 수 있지 않을까 생각한다.

參 考 文 獻

- 1) 食品と科學社 編(1977) : 食品と科學. 19, 44.
- 2) Seifert, W. (1901) : Zeits. Landwirts, Versuch. Öst., 4, 980~992

- 3) Korkes, S., del Campillo, A. & Ochoa, S. (1950) : J. biol. Chem, 187, 891~905
- 4) Flesch, P. & Holbah, B. (1965) : Arch. Mikrobiol., 51, 401~413
- 5) Korkes, S. & Ochoa, S. (1948) : J. biol. Chem., 176, 463~464
- 6) Jerchel, D., Flesch, P. & Bauer, E. (1956) : Justus Liebigs Annln Chem., 601, 40~60
- 7) Schütz, M. & Radler, F. (1973) : Arch. Mikrobiol., 91, 183~200
- 8) Morenzoni, R.A. (1974) : Enzymology of the MLF. In "Chemistry of winemaking". Advances in Chemistry Series. American Chemical Society, Washington.
- 9) Alizade, M.A. & Simon, H. (1973) : Z. Physiol. Chem., 354, 163~168
- 10) Lonvaud, M. & Ribéreau-Gayon, P. (1973) : C.r. hebdom. Séanc. Acad. Sci. Paris. 276, 2329~2331.
- 11) Ingraham, J.L., Vaughn, R.H & Cooke, G.M. (1960) : Am. J. Enol. vitic., 11, 1~4
- 12) 大塚原(1963) : 日本釀造協會誌. 58, 727
- 13) Bousbouras, G.E. & Kukee, R.E. (1971) : Am. J. Enol. vitic., 22, 121~126
- 14) Amachi, T. & Yoshizumi, H. (1969) : Agr. Biol. Chem., 33, 139~146
- 15) Amachi, T., Imamoto, S. & Yoshizumi, H. (1971) : Agr. Biol. Chem., 35, 1222~1230
- 16) Ingraham, J.L. & Cooke, G.M. (1960) : Am. J. Enol. vitic., 11, 160

