포도주의 효모가 말로락틱 박테리아에 미치는 영향

박 연 희
<아주대학교 생물공학과 교수>

■目 次■

1. 서 언
2. 실험 재료 및 방법
1) 사용균주
2) 배지 및 스타터조제
3. 실험 방법
4. 결 과
5. 고 찰

1. 서 언

포도주 양조에서 효모에 의한 알콜발효 후에 이차적으로 유산균에 의해서 일어나는 말로락틱 발효(Malolactic Fermentation)는 포도주의 사과산(Malic Acid)을 젖산과 탄산가스로 분해시켜 산도를 낮추고 향기를 증가시키는 작용을 하는 것으로 이 현상이 관찰된 역사는 오래 되었으나 이에 대한 본격적인 연구는 1960년 경 부터 시작 되었다.

$$\begin{array}{l} CH_2COOH \\ | \\ CHOHCOOH \\ \text{사과산} \end{array} \xrightarrow{\text{젖산균}} \begin{array}{l} CH_3 \\ | \\ CHOHCOOH \\ \text{젖산} \end{array} + CO_2$$

이와 같은 말로락틱 발효는 자연적으로 산도를 감소시키므로 유럽과 같이 기온이 낮아 원료포도의 산도가 높은 경우 그 역할이 매우 중요하다. 포도주의 산도를 낮춰 신맛을 줄이고 부드러운 맛을 주는 것 뿐 아니라, 말로락틱 발효가 포도주의 품질을 향상시키는 것은 이 발효과정에서 박테리아가 생산하는 소량의 알데하이드, 에스테르, 디 아세틸 등의 대사산물에 의해 향기가 변화되어 보다 복합적인 향기를 가지게 되며 색깔도 변화된다.

또한 말로락틱 발효는 이와같이 풍미를 향상시키는 작용뿐만 아니라 미생물에 대한 안정성을 가지게 한다. 사과산이 그대로 포도주에 남아있을 경우, 병에 넣은 후 저장중에 말로락틱 발효를 일으켜 혼탁이 생길 수 있기 때문이다.

원래 말로락틱 발효는 적포도주의 경우에 보다 보편적이며 흔히 자연적으로 일어날 수 있다. 그러나 백포도주에서는 자연적인 말로락틱 발효가 일어

나기 힘들며 오래 저장하지않고 소비하며 포도의 신선한 향기를 중요시 여기는 경우에는 오히려 바람직 하지 못한 것으로 여겼다. 그러나 말로락틱 발효를 위한 말로락틱의 스타터가 나오게 된 후에는 Chardonnay등 품종을 사용한 백포도주에서도 산도가 높은 경우에 말로락틱 발효를 시키는 경우가 증가하였으며 특히, 지난 10여년 사이에 포도주 양조에 효모와 말로락틱 스타터의 사용이 증가하면서 더욱 보편화 되었다.

이렇게 효모와 말로락틱의 스타터를 사용할 때에는 일반적으로 알콜발효가 거의 끝날때에 말로락틱 스타터를 첨가하게 되나 포도즙에 처음부터 효모와 말로락틱 두종류의 스타터를 사용하는 방법도 시도하고 있다.

빈번하게 일어나지는 않으나 말로락틱 스타터에 의한 말로락틱 발효가 순조롭게 진행되지 못하고 실패하는 경우가 발생하는데 그 원인으로는 스타터를 사용하는 방법이 잘못된 경우도 있으나 사용하는 효모균주와 말로락틱 균주의 특성에 따라 상호 저해작용 특히 효모균주에 의하여 말로락틱 균주의 생육이 억제되는 경우도 보고 되었다. 효모는 에탄올, SO_2, 기타 억제물질을 생산하며 영양물질을 경쟁적으로 사용하여 말로락틱균의 생육과 대사를 억제할 수도 있으며 반대로 효모는 농약 등 포도즙에 존재하는 억제물질을 흡착하거나 죽은 효모세포가 분해되어 영양물질을 공급함으로써 생육을 촉진시킬 가능성도 있다. 그러므로, 각 효모균주와 말로락틱발효의 스타터로 사용하는 말로락틱 균주들의 특성에 따라 이 두 종류를 적절하게 선택하여 사용하는 것이 말로락틱 발효의 좋은 결과를 얻을 수 있을 것이다. 그러나 이러한 효모균주가 말로락틱 균주의 생육에 미치는 작용에 대하여 연구된 바가 극히 적으므로 본실험에서는 상품화된 효모가 말로락틱 균주 스타터의 생육과 말로락틱 발효에 미치는 영향을 조사하였다.

2. 실험 재료 및 방법

1) 사용균주

실험에 사용한 효모와 말로락틱 균주는 "랄망드"사(카나다. 몬트레올 소재)에서 공급 받았다. 4종의 효모는 상업적으로 중요한 널리 사용되는 균주를 택하였다. 효모 주 "EC1118"과 "K1"은 미국과 유럽에서 널리 사용되며 알콜발효 능력이 높은 것으로 알려져 있고 "71B"주는 사과산을 분해시키는 특성을 가지고 있으며 "Wadenswil"은 말로락틱 발효를 촉진시키는 작용을 가진 효모로 알려졌다. 말로락틱 스타터는 세계 각 포도주 제조지역에서 분리한 Leuconostoc. Oenos로서 프랑스 샹빠뉴 지방에서 분리한 "Inobacter" 미국 오레곤에서 분리한 두 균주를 혼합한 "OSU"와 프랑스, 독일, 미국에서 분리한 4균주를 혼합한 "X-3"를 사용하였다.

2) 배지 및 스타터 조제

포도쥬스 배지는 신선한 포도즙을 물로 1 : 1로 희석하고 1N-KOH를 사용하여 PH를 4.5로 조절한 후 멸균시켰다. 포도는 1991년도 Chardonnay 품종으로 코넬대학소속 뉴욕주 농업 시험소 농장에서 수확한 것을 사용하였다.

이 포도즙의 조성은 당도 23° Brix, PH 3.12 총산도 6.5g/l 사과산 1.63g/l이었다. 착즙 후 50mg/l 의 SO_2를 가하고 24시간 후 냉동보관하면서 사용하였다. 실험에 사용할 때 포도즙은 17/37mg의 SO_2(유리/총)를 함유하고 있으며 사과산은 3.3g/l가 되도록 첨가하여 사용하였다.

1992년 Chardonnay포도는 수확시 당도 21° Boix, PH3.05chd tkseh 12g/l였고 사과산의 6.0g/l였다. SO_2는 가하지 않았고 냉동보관하여 사용하였다.

냉동 건조시킨 말로락틱스타터는 멸균 Sucrose 용액 (5g/l)에서 약 15-30분간 Rehydration시킨

후 포도쥬스배지에서 25°C로 약 3-4일간 배양해서 활성화 시켰다. 이를 실험 포도주나 포도즙에 접종할 때는 약 5×10^7Cell/ml이 되도록 조절하였다.

건조효모는 제조사의 사용지침에 따라 사용하였고, 가스트랩을 단 1L flask에서 20°C에서 발효시켰다. 발효 후 말로락틱 스타터를 가한 경우에는 150ml의 병을 스크류 캡으로 닫고 발효시켰다. 효모의 SO_2 생산측정 실험에는 2.5L의 포도즙을 3L 병에 넣고 개스트랩을 달고 발효시켰다.

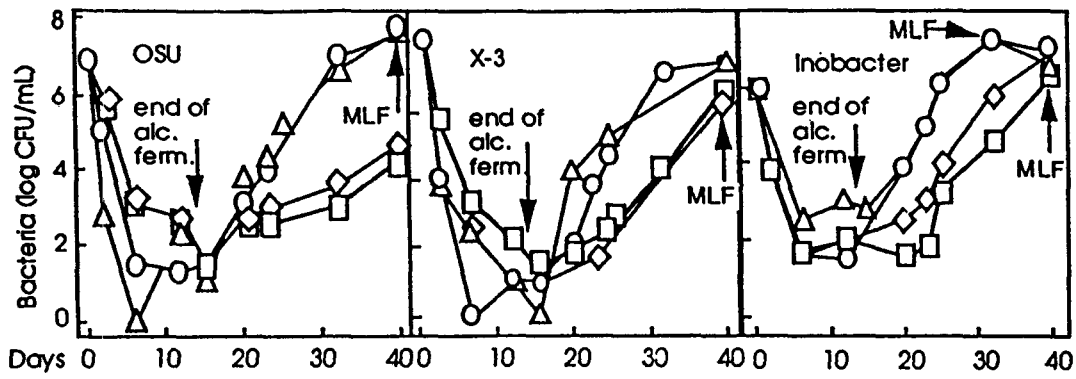
3. 실험방법

현미경으로 균주를 측정할 때에는 Petroff-Hausser측정장치를 사용하여 위상차 현미경으로 측정하였고 박테리아의 생균주는 MLB agar(PH 5.5)에 100ml/l Cycloheximide를 첨가하여 사용하였다. 효모는 YM agar를 사용하여 측정하였다. 적정산도는 0.1N NaOH로 자동 적정장치(Automatic Multitration System, MTS 800, Radiometer, Copenhagen)를 사용하였다. 총 SO_2와 유리 SO_2는 Modified Ripper법으로 Radiometer(Copenhagen, Analytical Application in Beverages DTS 800 918-322-8511D)로 측정하였다. 에탄올 사과산과 젖산은 HPLC(Hewlett-Packard 1090 M)분석하였다. 말로락틱 발효는 포도주의 사과산 함량이 0.1g/l이하가 되면 완결된 것으로 판정하였다.

4. 결 과

*** 효모와 말로락틱 박테리아의 동시접종**

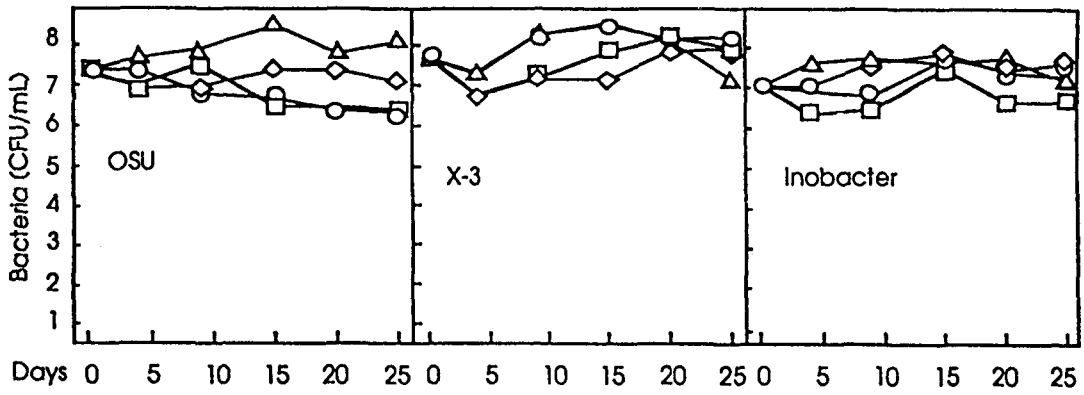
SO_2를 함유한 포도즙과 SO_2를 함유한 포도즙에 효모와 말로락틱 스타터를 동시에 접종했을 때 박테리아의 생육과 말로락틱 발효결과를 <도표1, 2>에 나타내었다. <도표3>과 <도표4>에는 4종 효모주의 각각의 알콜발효 경과와 발효중 유리 SO_2와 총 SO_2의 변화를 나타내고 있다. 이 결과를 보면 SO_2를 가한 포도즙에서는 (PH 3.3, 유리/총 SO_2는 17/37mg/l)박테리아의 생존은 급격히 떨어져서 10^2cfu/ml 내지 10^3cfu/ml정도로 감소 했다가 알콜발효가 끝나면서 다시 회복되기 시작하였다. 말로락틱 발효는 거의 32일부터 55일 사이에 완결되었다. <표1> 그러나 효모 K1과 EC1118를 각각 말로락틱 스타터 OSU와 사용한 경우에는 50일 후에도 약 50%의 사과산만 분해되었다. 효모의 알콜발효는 말로락틱 박테리아의 존재여부에 영향이 없었으며 알콜 발효는 모든 효모가 15일 전에 완결되었다. 효모는 알콜발효중 3%내지 30%까지의 사과산을 분해시킨 것으로 나타났다. <표2>



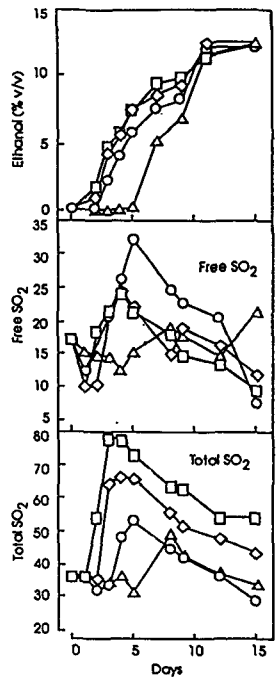
[도표1]SO_2첨가 Chardonnay(1991년) 포도즙에 효모와 박테리아를 동시에 접종 했을 때 박테리아 OSU, X-3와 Inobacter의 생육 EC1118(◇), K1(□), 71B(○), Wadenswil(△)

SO_2를 가하지 않은 포도즙의 경우에는 <표2>에서 보는 바와 같이 말로락틱 박테리아는 그 생존률이 감소하지 않고 그대로 유지되거나 증가하는 것으로 나타났다. 이 때에 말로락틱 발효는 9일 내지 20일 사이에 완결 되었다. <표1>

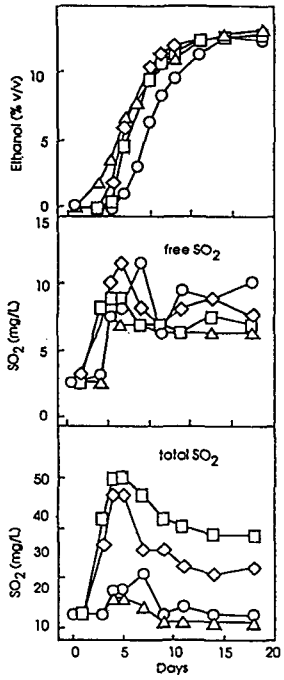
이 경우에는 효모균주가 박테리아의 생육을 억제 또는 촉진 시키는 결과는 볼 수 없었으나 OSU와 X-3의 경우에는 효모 71B와 Wadenswil을 사용했을 때 말로락틱 발효가 더욱 빨리 진행되었다. SO_2를 첨가한 경우와 마찬가지로 박테리아는 효모의 알콜 발효에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났으며 효모는 13% 내지 33%의 사과산을 분해시켰다.



[도표2]SO_2무 첨가 Chardonnay(1992년) 포도즙에 각각 4종의 효모와 박테리아를 동시에 접종했을 경우.(효모종류는 <도표1>과 동일)



[도표3]SO_2첨가 Chardonnay(1991년) 포도즙에 각각의 4종의 효모로 발효시켰을 때 Ethanol, 유리 SO_2, 총 SO_2의 변화. 효모 EC1118(◇), K1(□), 71B(○), Wadenswil(△)



[도표4]SO_2무첨가 Chardonnay(1992년) 포도즙을 각각 4종 효모로 발효시켰을 때 Ethanol, 유리 SO_2, 총 SO_2의 변화(효모 종류는 <도표3>과 동일 표시)

*** 알콜 발효중 효모에 의한 SO_2생성**

4종의 효모는 알콜 발효중 생산하는 SO_2의 양은 그 차이가 매우 큰 것으로 나타났으며 <도표 3, 4>SO_2를 가한 포도즙과 무첨가의 경우에도 각 균주에 따라 거의 일정한 양을 생산하였다. 효모 K1이 가장 많은 SO_2를 생산하였고 EC1118이 그 다음으로 많은 SO_2를 생산하였고 71B와 Wadenswil이 가장 적었다.

<표1> 말로락틱 스타터를 OSU, X-3. Inobacter를 각각 효모 EC1118, K1, 71B Wadenswil로 발효시킨 포도주에 접종하여 말로락틱 발효가 완결될 때까지의 기간(일)

A : 효모와 박테리아 스타터를 Chardonnay포도즙에 동시에 접종한 경우. 포도즙은 당도 23°Brix. 산도 6.5g/L, PH3.3 17/37mg/L SO_2(유리/총 SO_2)

Bacteria	Yeast			
	EC1118	K1	71B	Wädenswil
OSU	>50	>50	40	40
X-3	55	55	40	40
Inobacter	40	55	32	32

B : A와 동일 포도즙으로 알콜발효 후에 말로락틱 박테리아를 가한 경우

Bacteria	Yeast			
	EC1118	K1	71B	Wädenswil
SO_2(mg/L free/total)	11/54	11/54	15/34	14/47
OSU	>28	>28	14	24
X-3	>28	>28	28	>28
Inobacter	24	>28	14	24

*at inoculation of bacteria

C : 효모와 박테리아를 SO_2무첨가 포도즙에 동시에 접종한 경우
(포도즙은 당도 21°brix, PH3.3)

Bacteria	Yeast			
	EC1118	K1	71B	Wädenswil
OSU	18	13	9	9
X-3	20	18	13	13
Inobacter	18	13	18	9

<표2> 알콜 발효중 각 효모균주에 의해 감소된 사과산, 알콜 발효 후 남은 사과산의 양과 소비된 사과산(%)

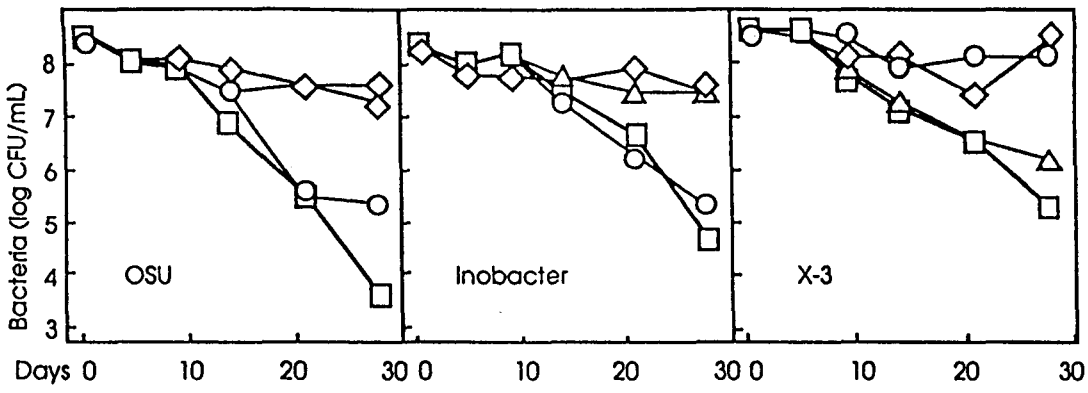
Juice
1991 Chardonnay, sulfited(17/37mg/L)
(23° Brix, pH3.3, TA 6.5g/L, L-malate 3.3g/L)
1992Chardonnay, non-sulfited
(21° Brix, pH3.3, TA 12g/L, L-malate 6.2g/L)

Yeast			
EC1118	K1	71B	Wädenswil
3.2(3%)	2.5(24%)	2.3(30%)	2.7(15%)
5.42(13%)	5.06(18%)	4.14(33%)	5.3(15%)

그러므로 <도표2>와 <도표5>에서 보는바와 같이 효모 K1이 가장 많은 SO_2를 생산하여 박테리아의 생육을 억제하였으며 71B와 Wadenswil은 적은 양의 SO_2를 생산하여 말로락틱 발효가 보다 잘 진행되었다.

*** 알콜발효 말로락틱 박테리아 접종**

말로락틱 박테리아를 알콜발효가 끝난 후 접종했을 때는 <도표5>에서 보는 바와같이 생성된 SO_2에 의해 생육이 억제 되었다. 말로락틱 스타터 중 OSU와 Inobacter가 가장 효과가 좋았으며 효모 Wadenswil, EC1118과 71B를 사용한 경우에는 14일 내지 24일 후에 말로락틱 발효가 완결되었다. 그러나 X-3는 효모 71B로 알콜 발효 시킨 경우에만 28일 후에 말로락틱 발효가 완결 되었다.



[도표5]알콜발효 후 말로락틱 박테리아 접종 했을 때 박테리아의 생존(포도주의 PH3.3, 에타놀, 12.5%, 유리 SO_2, 함량, 11-15mg/l, 총SO_2, 34-54mg/l)

5. 고 찰

*** 말로락틱 박테리아의 생존에 미치는 효모의 영향**

알콜 발효 전에 포도즙에 SO_2를 첨가하여 발효시킨 경우 효모에 의해 생성된 SO_2와 합쳐져 말로락틱 박테리아의 생육을 억제하는 효과가 뚜렷이 나타났다. 이미 포도즙의 PH가 3.3이고 유리 SO_2/총 SO_2 dml di ddl 17/37mg/l일 때 박테리아는 크게 저해를 받는데 알콜 발효중 생산되는 SO_2가 추가 되므로 생존률이 크게 떨어지며 알콜발효가 끝나고 생산된 SO_2가 기체로 제거되어 감소된 후에야 다시 증가 되는 것으로 볼 수 있다.

박테리아는 유리 SO_2/총 SO_2의 양이 20/60mg/l이하로 감소 되었을 때 다시 회복되어 수가 증가하고 말로락틱 발효를 완결시켰다. <표1>에서 보는 바와같이 효모 71B와 Wadenswil로 발효시켜 SO_2의 양의 적은 경우에 말로락틱 발효가 효과적으로 진행됨을 알 수 있다.

*** 말로락틱 박테리아의 생육이 알콜발효에 미치는 영향**

효모와 말로락틱 스타터를 동시에 접종했을 때 박테리아에 의해 알콜 발효가 저해 되는 경우는 없었다. 이 결과는 남 아프리카와 미국의 워싱턴주에서 분리한 Lactobacilli가 효모를 죽이는 박테리오신을 생산한다는 보고에 비추어 포도주의 Leuconostoc에서는 이러한 작용을 찾아볼 수 없었으므로 중요한 의미가 있다.

*** 접종시기**

발효된 포도즙에 많은 양의 SO_2를 첨가한 경우나 SO_2를 많이 생산하는 효모를 사용한 경우에는 말로락틱 발효는 알콜 발효가 완전히 끝난 후에 말로락틱 발효를 시키는 것이 유리하다. 만일 알콜 발효와 말로락틱 발효를 동시에 시키고저 할 때에는 포도즙에 SO_2를 넣지 않거나 가능한 소량의 SO_2를 생성하는 효모를 선택 사용하는 것이 효과적이다. 이미 Beelman가 Kunkee(1985)도 효모와 박테리아의 동시 발효는 SO_2를 가하지 않거나 매우 낮은 조건과 비교적 높은 PH(3.6-3.8) : 그리고 말로락틱 박테리아의 다량 접종(10^7cfu/ml이상) 했을때 성공적이라고 보고 하였다. 이와같이 효모의 알콜 발효와 말로락틱 발효를 동시에 시키는 것은 포도 수확 후 포도주를 완성시켜 병에 넣는 시기를 줄일 수 있어서 매우 편리하며 여러 포도주 제조사에서 성공적으로 하고 있다. 그러나 아직도 이 방법은 원하지 않은 효모나 박테리아가 발효 초기에 급격히 생육하여 알콜 발효를 중지시키

거나 포도주에 이취를 발생시킬 수 있는 위험성이 있다. 이런 경우가 생겼을 때 다시 알콜 발효를 정상화 시키는 것은 매우 어려우므로 막대한 손실을 가져올 수 있다.

*** 효모와 박테리아의 상호작용**

알콜발효와 말로락틱 발효를 동시에 시킬 경우 박테리아의 생육이 특정효모에 의해 뚜렷이 촉진되는 효과는 찾아볼 수 없었으나 효모 Wadenswil과 71B를 사용했을 경우에 전반적으로 양호하였으며 그 다음으로 EC1118이었고 K1의 경우 가장 불량하였다. 이렇게 효모가 생성하는 SO_2의 양의 차이가 매우 적었으나 그 차이가 말로락틱 발효에 영향을 미치는 것으로 나타났다. 알콜발효후에 접종 했을 때 효모 EC1118으로 사용했을 때는 OSU와 X-3는 28일 후에도 생존률은 좋은데도 불구하고 28일 후에도 말로락틱 발효가 완결되지 않았다. 이 결과를 보아서 SO_2의 영향외에도 다른 요인이 있는 것으로 추측할 수 있다.

또한 <도표1>에서는 각기 다른 효모로 발효시킨 경우에 말로락틱 박테리아의 회복되는 양상이 다른 것으로 나타났다.

이상의 결과로 포도즙에 첨가한 SO_2와 알콜발효 중 생산된 SO_2가 말로락틱 발효의 성과에 가장 큰 영향을 미치는 요인으로 볼 수 있다. 이와 같이 몇 종류의 상품화된 효모와 말로락틱 스타터를 적절히 조합했을 때는 알콜 발효와 말로락틱 발효를 동시에 잘 시킬 수 있다. 발효조건을 잘 관리하는 요인으로서는 적절한 SO_2사용, 온도와, PH조절, 말로락틱 스타터의 생존률을 높이고 그 효율 즉, 사과산의 분해작용을 잘 되도록 하는 것이다 (Krieger와 al. 1989, Henick-kling 1993)

또한 이 연구 결과는 현재 포도주 제조시에 사용되는 효모와 박테리아를 종류별로 더 조사하여 적합한 배합과 부적절한 경우를 밝혀야 할 필요성을 보여주고 있다.

참 고 문 헌

1. BEELMAN RB. KUNKEE RE. Inducing simultaneous malolactic-alcoholic fermentation in red table wines. in : Malolactic Fermentation. TH Lee(ed.) pp.97-112. The Australian wine research institute, Glen osemond, South australia, 1985.
2. BISSON LF, KUNKEE RE. Microbial interactions during wine production. In : Mixed cultures in biotechnology, JG Zeikus and EA Johnson(eds). pp.37-68, McGraw-Hill, 1991.
3. FUGELSANG KC, ZOECKLEIN BW. MLF survey. Practical Winery & Vineyard, pp12-18, May/June 1993.
4. HENICK-KLING T. Malolactic fermentation. In : Wine microbiology and Biotechnology. GH Fleet(ed.) pp.289-326, Harwood academic publishers, Chur, 1993.
5. HENICK-KLING T. SANDINE WE, HEATHERBELL DA. Evaluation of malolactic bacteria isolated from Oregon wines. Appl. Environ. Microbiol. 55 : 2010-2016;1989.
6. IZUAGBE YS. DOHMAN TP, SANDINE WE, HEATHERBELL DA, Characterization of *Leuconostoc oenos* sisolated from Oregon wines. Appl. Environ. Microbiol. 50 : 680-684;1985.
7. KRIEGER SA. HAMMES WP, HENICK-KLING T. Effect of medium composition on growth rate, growth yield, and malioactic activity of *Leuconostoc oenos* LoZHl-t7-l. Food Microbiol. 9 : 1, 1992.
8. LONVAUD-FUNEL A. MASCLEF JP. JOYEUX A. PARASKEVOPOULOS Y. Etude

des interactions entre les levures et bacteries dans le moût de raisin. Conn. Vigne Vin. 22 : 11-24;1988a.

9. LONVAUD-FUNEL A, JOYEUX A. DESENS C. Inhibition of malolactic fermentation of wines by products of yeast metabolism. J.Sci. Food Agric. 44 : 183-191;1988b.

10 TEGMO-LARSSON IM, SPITTLER TD. RODRIGUEZ SB. Effect of malolactic fermentation in ethyl carbamate formation in Chardonnay wine. Am. J.Enol. Vitic. 40 : 106-108;1989.

11. VALADE M. MOULIN JP. LAURENT M. NAIL T. Utilization de bactéries lyophylisées ou congelées pour lénsemencement de la fermentation malolactique en Champagne Revue Francaise Oenoloque 99(3) : 21-28;1985.

事事, 留個有餘不盡的意思, 便造物不能忌我, 鬼神不能損我. 若業必求滿, 功必求盈者, 不生內變, 必召外憂.

일마다 얼마만큼의 여유를 두어 다하지 않는 마음을 지니면, 조물주도 나를 꺼려하지 못하고 귀신도 나를 해치지 못한다. 그러나 일이 꼭 가득차기를 바라고 공이 밤드시 가득차기를 바란다면, 안에서 변이 일어나지 않으면 반드시 밖에서 우환이 생기게 마련이다.

－菜根譚중에서－