

야생 효모의 분리 · 동정 및 이를 이용한 포도주 제조

김정인 · 이남근 · 함영태*

중앙대학교 생명공학과

거봉포도로부터 분리하여 동정한 야생효모 *Saccharomyces cerevisiae* IJ850을 이용, 국내산 캠벨얼리와 거봉포도를 발효시켜 적포도주를 제조하고, 이의 발효 특성을 분석함으로써 포도주 제조용 발효균주로서의 가능성을 알아보고자 하였다. 야생발효균주의 분리를 위하여 안성지역 거봉포도와 캠벨얼리 포도즙을 실온에서 6일 동안 스타터의 첨가없이 자연발효시켜 우세균주를 분리하였다. 거봉에서 분리된 효모의 발효능이 캠벨얼리에서 분리된 효모보다 1.8배정도 높았다. 거봉에서 분리한 발효균주를 분자 생물학적인 방법인 26S rDNA 염기서열에 근거하여 동정한 결과, *Saccharomyces cerevisiae*와 99.7%의 유사성을 나타내어 *Saccharomyces cerevisiae* IJ850으로 동정되었다. 분리균주를 이용한 포도주의 제조에서는 캠벨얼리와 거봉포도즙의 최종 당도를 25°Brix로 포도당을 이용하여 보당하고, 이산화탄소를 발효조에 채우고, 실온에서 10일간 발효시켰다. 포도주의 수율은 캠벨얼리가 75%, 거봉이 85%였고, 최종 알코올 도수는 캠벨얼리가 11.0%, 거봉이 13.0%이었다. 산업용 발효균주인 *S. cerevisiae* EC-1118과 비교한 결과 총산도는 캠벨얼리와 거봉 포도주 모두에서 산업용 발효균주인 EC-1118에 비하여 분리한 *S. cerevisiae* IJ850에서 낮은 수치를 보였다. 포도주의 pH와 색도 분석에서는 *S. cerevisiae* IJ850과 *S. cerevisiae* EC-1118로 제조한 포도주 모두에서 비슷한 수치를 보여주었으나, 페놀 성분분석에서는 *S. cerevisiae* EC-1118로 제조한 캠벨얼리 포도주에서 125 mg/L의 함량을, *S. cerevisiae* IJ850으로 제조한 거봉 포도주에서 75 mg/L의 함량을 나타내었다. 따라서 국내 거봉포도로부터 분리한 *S. cerevisiae* IJ850은 포도주 생산에 사용될 수 있는 균주로써 그 가능성을 보여주었다.

Key words □ campbell's early, geubong, red wine, *Saccharomyces cerevisiae*

서 론

최근 우리나라는 소득의 증가와 웰빙생활에 대한 관심이 높아지면서, 포도주의 소비량이 매년 20-30%씩 매우 빠르게 성장하고 있다. 그러나 아직까지 포도주는 대부분 수입에 의존하고 있으며, 그 수입량도 지속적으로 늘어나고 있다. 이에 국내에서도 포도주 제조에 대한 많은 연구들이 활발히 이루어지고 있으며(6, 10), 우리나라 사람들에게 식용으로 친숙한 캠벨얼리와 거봉포도 품종으로 만든 포도주의 생산이 시도되고 있고 있다. 하지만 국내에서 생산되는 포도주의 수요는 수입 포도주에 비해 매우 미비할 뿐만 아니라 질적으로도 개선되어야 할 필요성이 많은 것이 현 실정이다. 포도주의 품질은 많은 부분 포도품종에 영향을 받으나, 발효 균주, 제조과정 및 숙성과정에 따른 영향 또한 크다.

국내 재배 포도품종을 이용한 포도주의 질적 개선을 위해서는 선행적으로 발효균주 및 제조공정에 대한 많은 연구가 요구된다. 특히 포도주 제조에 있어서 발효능과 발효에 따른 향미성분은 포도주의 품질에 영향을 주는 요소로써 발효 균주에 의해서 많은 부분이 결정된다(5, 7, 8). 국내 포도주 제조에 쓰이는 발효

균주가 대부분 외국에서 개발한 균주를 사용하고 있다는 점에서 국내재배 포도품종에 적합한 발효 균주의 개발은 매우 중요하다. 제조과정 면에 있어서도 국내에서 생산되는 포도를 이용한 포도주 제조시 산도가 높고, 말릭산의 함유량이 높아 자극적이고 신맛이 강한 단점이 있으나, 박 등(11)은 carbonic maceration (CM) 발효 방법으로 포도주를 제조하여 품질을 향상시키는 방안을 제시하였다. 따라서 본 연구에서는 안성지역 거봉포도로부터 분리한 야생효모 IJ850을 분자생물학적 방법을 통해 동정하고 이를 이용하여 국내산 캠벨얼리와 거봉포도를 발효하여 적포도주를 제조하고 그 특성을 분석하여, 분리 동정한 야생효모의 발효 특성과 포도주 제조용 발효균주로서의 가능성을 분석하고자 하였다.

재료 및 방법

야생 발효효모의 분리

2006년 8월에 수확한 영동지역의 캠벨얼리와 안성지역의 거봉포도를 이용하여 자연발효를 유도한 후, 6일째에 자연 발효되고 있는 포도즙으로부터 균주들을 YPD plate (yeast extract 1%, peptone 2%, dextrose 2%, agar 1.5%; pH 4.5)에 접종하여 우점종 효모균주를 분리하였다.

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 82-31-670-3064, Fax: 82-31-675-0406
E-mail: ythahm@cau.ac.kr

26S rDNA 염기서열 해석

분리된 효모균주를 YPD broth (yeast extract 1%, peptone 2%, dextrose 2%; pH 4.5)에 접종하여 30°C에서 48시간동안 배양한 후, 원심분리하여 Genomic DNA Purification Kit (Promega Co., Madison, USA)를 이용하여 DNA를 추출하였다.

26S rDNA 단편을 증폭하기 위하여 Cletus 등이 제안한 primer-NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3'), NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGAC GG-3')를 이용하였다(3). PCR 반응조건은 PCR PreMix (Bioneer Corp., Seoul, Korea)에 Template DNA 2 µl, each primer 0.75 µM를 넣어 총량을 50 µl로 맞추어 PCR (Applied Biosystems, GeneAmp PCR System 2700, Singapore) 증폭을 수행하였다. PCR 증폭 조건은 pre-denature 94°C 3분, denature 94°C 1분, annealing 58°C 1분, extension 72°C 1.5분, final extension 72°C 5분의 조건으로 36 cycles를 실시하여 26S rDNA 단편을 증폭하였다. 서열 분석은 솔젠트사 (SolGent Co., Seoul, Korea)에 의뢰하였으며, 사용한 primer는 forward NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3')이었다. 또한 National Center for Biotechnology Information (NCBI, USA)의 BLAST를 사용하여 26S rDNA 단편의 유전자염기 서열 상동성을 근거로 동정하였다(2).

포도주 제조

포도주 제조에 사용한 포도는 2006년 8월에 수확된 영동지역의 캠벨엘리와 안성지역의 거봉포도를 사용하였다. 캠벨엘리와 거봉포도의 줄기를 제거한 다음, 껍질과 포도 속을 분리하여 0.6 kg씩 4개의 발효통에 나누어 담고, 포도즙의 당도가 25°Brix가 되도록 포도당(Samyang Co., Korea)을 첨가하였다. 발효는 변형된 CM 발효방법으로 미리 2시간 동안 배양한 starter인 야생 분리균주 *S. cerevisiae* IJ850와 산업 균주 *S. cerevisiae* EC-1118을 캠벨엘리와 거봉포도즙에 각각 접종하고, K₂S₂O₅ 첨가 없이 발효조에 이산화탄소를 충전하여 실온에서 발효시켰다. 포도주 제조 과정은 Fig. 1에 나타내었다.

이화학 분석

총산도, 당도(°Brix), 비중, 알코올 함량(%), pH 측정, 색도 및 페놀성분 분석을 실시하였다. 총산도 측정은 tartaric acid의 비교양으로 측정하였다. 10 ml의 시료에 phenolphthalein 용액(1% in methanol)을 5방울을 첨가한 후, 교반기 위에서 burette를 이용하여 0.1 N NaOH로 적정하였다. 시료가 분홍색으로 15초 동안 변색을 유지시키는 NaOH양을 측정하였다(9). 발효 중 포도주의 당도는 당도계(ATAGO, N-1α, Japan)를 이용하여 측정하였고, 비중은 15°C에서 비중계로 측정 하였다. 알코올 함량은 1차 증류 후 15°C에서 100 ml로 양을 조정한 후, 주정계를 이용하여 측정하였다(4). pH는 pH meter (ORION, 420A, USA)을 이용하여 측정하였다. 발효 완료 후 포도주의 색도는 색차계 (Color Techno System Co., JC801, Japan)를 이용하여 5회 측정한 다음, 평균값을 L*(lightness), a*(redness), b*(yellowness) 값으로 나타내었다. 페놀성분의 분석은 Swain과 Hillis (12)의 방법을 사용하

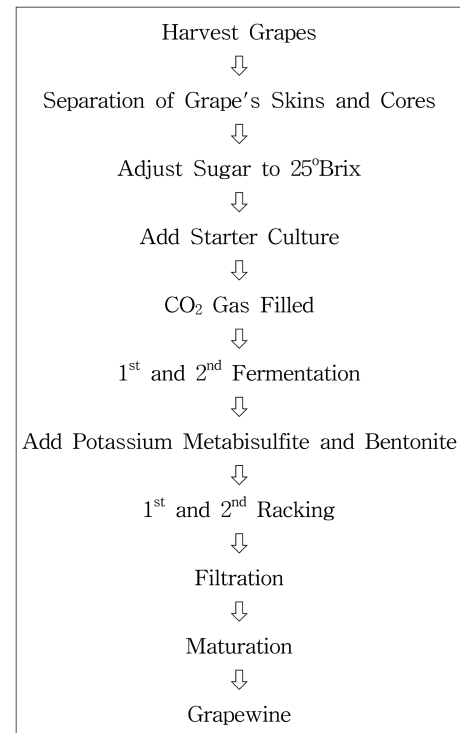


Fig. 1. The flow chart of wine production.

였다. 분석 방법은 Folin-Ciocalteu reagent (Sigma-Aldrich, USA)로 반응시킨 후, Spectrophotometer (Mecasys, OPTIZEN 2120 UV, Korea)를 이용하여 750 nm에서 측정하였다.

결과 및 고찰

야생 발효효모의 분리

영동지방의 캠벨엘리와 안성지역의 거봉포도즙의 당도를 25°Brix로 보정한 후, 실온에서 자연 발효시켰다. 발효 1일째는 거의 변화가 없었으나, 2일째부터 거봉의 경우 9°Brix정도 낮아져 캠벨엘리의 자연발효균보다 발효 능력에 있어서 1.8배 높았다 (Fig. 2). 발효 6일째 거봉 포도주의 당도는 9.0°Brix로 캠벨엘리 포도주보다 1.8°Brix 낮은 수치를 보였으며, 이에 거봉 자연발효 포도주로부터 주 발효 균주를 분리하였다.

분리 균주의 동정

분리 균주의 동정은 26S rDNA 유전자 염기서열의 해석을 통하여 동정하였다(Table 1). 분리된 균주는 포도주 발효에 주로 이용되고 있는 *Saccharomyces cerevisiae*와 99.7%의 염기서열 유사성을 나타내었다. 따라서 이 균주를 *S. cerevisiae* IJ850으로 동정하였다.

발효 과정 중의 총산도 변화

일반적으로 포도주 발효에서의 산도는 포도주의 상쾌한 맛을 결정하는 중요한 요인으로 발효과정 중 총산도의 변화를 Fig. 3

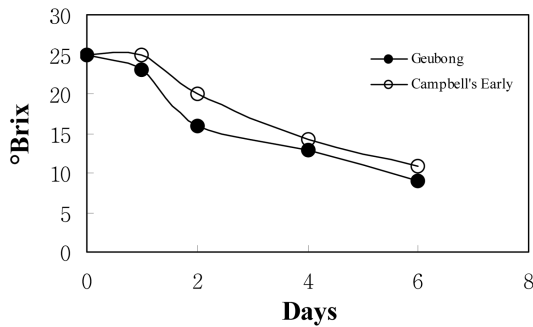


Fig. 2. Changes of sugar content (°Brix) during fermentation. '—○—' Campbell's Early, '—●—' Geubong

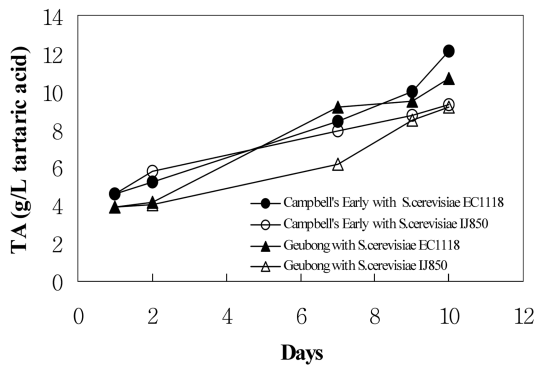


Fig. 3. Changes of total acidity in Campbell's Early and Geubong wines fermented with *Saccharomyces cerevisiae* IJ850 and EC1118. '—○—' Campbell's Early with *S. cerevisiae* IJ850, '—●—' Campbell's Early with *S. cerevisiae* EC1118, '—△—' Geubong with *S. cerevisiae* IJ850, '—▲—' Geubong with *S. cerevisiae* EC1118.

에 나타내었다. 발효 초기의 총산도는 캠벨얼리가 4.56으로 거봉의 3.88보다 높게 나왔다. 발효과정 중에는 발효 5일째까지 캠벨얼리 포도주에서는 야생 분리균주 *S. cerevisiae* IJ850를 접종한 포도주에서 산업균주 *S. cerevisiae* EC1118 발효 포도주보다 총산도가 높았으나, 그 이후에는 더 낮은 값을 보였으며, 1차 발효 완료시점인 10일째에는 총산도의 값이 9.3으로 나타났다. 거봉포

Table 2. Physicochemical properties of Campbell's Early and Geubong wines fermented with *Saccharomyces cerevisiae* IJ850 and EC1118

| | Campbell's early | | Geubong | |
|-----------------------------------|------------------|---------|---------|---------|
| | IJ850 | EC-1118 | IJ850 | EC-1118 |
| Fermentation temperature (°C) | 27-29 | 27-29 | 27-29 | 27-29 |
| Alcohol content (% v/v) | 11.0 | 10.6 | 13.0 | 12.5 |
| pH | 3.24 | 3.17 | 3.28 | 3.25 |
| Total acidity (g/L tartaric acid) | 9.3 | 12.1 | 9.2 | 10.7 |
| Gravity | 0.99 | 0.99 | 0.99 | 0.99 |
| °Brix | 5.6 | 5.6 | 6.2 | 6.0 |
| Initial weight (kg) | 0.65 | 0.65 | 0.60 | 0.60 |
| Production of wine (ml) | 525 | 497 | 527 | 507 |
| Yield (%) | 80.8 | 76.5 | 87.8 | 84.5 |

도주에서는 발효 초기부터 야생균주와 산업 균주 간에 차이를 보여 야생 균주로 제조되는 포도주에서 총산도 값이 낮게 증가되었고, 발효 완료시점에서는 총산도 값이 9.16을 보였다. 적절한 총산도 값이 6-8 g/L tartaric acid인 점을 감안하여 볼 때(1), 다소 높은 값을 보였는데 이는 이른 수확기의 완숙되지 않은 포도를 사용하여 제조에 사용했기 때문이라고 사료된다. 포도의 수확 시기를 감안하여 완숙된 포도를 사용한다면, 일반적으로 쓰이는 산업 균주보다는 분리한 야생 균주가 캠벨얼리나 거봉포도를 이용한 포도주 제조시, 신맛이 보다 적은 포도주를 제조할 수 있음으로서, 국내 포도 품종으로 제조된 포도주의 단점인 신맛을 개선시킬 수 있을 것으로 사료된다.

포도주 생산 수율

포도주 생산 수율(%)을 살펴보면(Table 2), 캠벨얼리 포도보다 과육이 풍부한 거봉포도에서 높게 나타났으며, 야생 분리균주로 발효시킨 포도주가 산업 균주로 발효시킨 포도주에 비하여 캠벨얼리에서에서 4.3%, 거봉에서는 3.3% 높게 나타났다. 이는 야생 분리균주가 과육과 포도 껍질에 대한 분해능이 더 높기 때문인 것으로 사료된다.

Table 1. The results of BLAST search of the 26S rDNA region sequence obtained from strain IJ850

| Fragment sequenced (bp) | Species and strain designation | GenBank accession no. | Similarity (%) ^a |
|-------------------------|--|-----------------------|-----------------------------|
| 561 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> isolated TZSc5 | EF489415 | 99.7 |
| 592 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> clone N235 | EF192590 | 99.7 |
| 602 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> strain PR1 | EF063139 | 99.7 |
| 583 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> isolate G89 | DQ466538 | 99.7 |
| 572 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> NRRL Y-12649 | AY130346 | 99.7 |
| 561 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> strain TepR27 | AF533068 | 99.7 |
| 3911 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | J01355 | 99.7 |

^aRelation of similarity of number of nucleotides in 26S rDNA fragment between isolate and GenBank accession strain

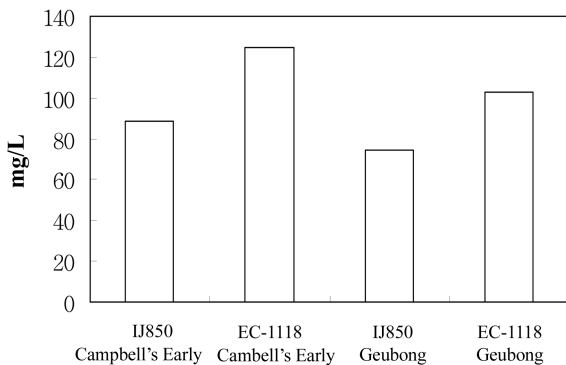


Fig. 4. The concentrations of total phenolic compounds in Campbell's Early and Geubong wines fermented with *Saccharomyces cerevisiae* IJ850 and EC1118.

Table 3. Color density properties of Campbell's Early and Geubong wines fermented with *Saccharomyces cerevisiae* IJ850 and EC1118

| | Campbell's early | | Geubong | |
|----|------------------|---------|---------|---------|
| | IJ850 | EC-1118 | IJ850 | EC-1118 |
| L* | 3.5 | 4.1 | 3.4 | 3.4 |
| a* | 54.0 | 54.3 | 55.3 | 55.1 |
| b* | -42.5 | -42.7 | -42.3 | -42.2 |

L*: lightness, a*: redness, b*: yellowness

발효 후 이화학 성분 분석

포도주 발효 완료 후 이화학 성분 분석 값은 Table 2에 나타내었다. 캠벨얼리의 포도주에서 최종 알코올 함량이 야생 분리균주인 *S. cerevisiae* IJ850과 산업 균주인 *S. cerevisiae* EC1118에서 각각 11.0%와 10.6%로 분석되었으며, 거봉포도주에서도 각각 13.0%와 12.5%의 알코올 함량을 보임으로서, 야생 분리균주인 *S. cerevisiae* IJ850에서 약간 높은 알코올 함량을 보였다. pH는 캠벨얼리를 산업균주로 발효한 포도주에서 3.17 값을 보인 것을 제외하고는 pH 3.2에서 3.3 사이의 값을 보임으로서, 바람직하다는 포도주의 pH 범위 내에(4) 있는 것을 확인하였다.

포도주의 기능성을 부여하는 폴리페놀 성분의 함량 측정에서는 캠벨얼리와 거봉포도주에서 양 균주 모두 75-125 mg/L 사이의 수치를 보였다(Fig. 4). 캠벨얼리 포도주에서 거봉포도주보다 페놀 함량이 높게 나타났는데, 이는 캠벨얼리 포도가 거봉포도보다 동일 질량 대비 과피의 차이가 많이 나기 때문인 것으로 사료된다.

포도주의 색깔은 맛, 향기와 더불어 포도주의 품질을 좌우하는 요소로, 적포도주의 경우 맑은 붉은색에서부터 진한 붉은색의 다양한 제품이 출시되고 있다. 야생 분리균주와 산업 균주사이의 포도주 색도를 측정하여 본 결과, a*(redness)의 값이 캠벨얼리포도주에서는 야생 분리균주와 산업 균주의 포도주에서 54.0과 54.3의 값이 측정되었으며, 거봉 포도주에서는 각각 55.3 과 55.1의 수치를 보임으로서 야생 분리균주로 포도주 제조시 색도에는

큰 차이가 없음을 확인할 수가 있었다(Table 3).

따라서 이화학적 성분분석 결과, 국내 거봉포도로부터 분리한 *S. cerevisiae* IJ850 균주가 산업균주와 비교하여 총산도 뿐만 아니라 알코올, pH, 수율 등에서 보다 나은 분석결과를 보임으로서 국내 포도 품종을 이용한 포도주 생산에 적합한 균주로써 그 가능성을 보여주고 있다.

감사의 말

이 논문은 2005년도 중앙대학교 학술연구비 지원에 의해 수행된 결과로 이에 감사를 드립니다.

참고문헌

1. American wine society. 1999. The complete handbook of wine-making, p. 87-93. Kent Inc., MI., USA.
2. Baleiras Couto, M.M., R.G. Reizinho, and F.L. Duarte. 2005. Partial 26S rDNA restriction analysis as a tool to characterise non-*Saccharomyces* yeast present during red wine fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* 102, 49-56.
3. Cletus, P.K. and J.R. Christie. 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie Leeuwenhoke* 73, 331-371.
4. Iverson, J. 2000. Home wine making step by step. A guide to fermenting wine grapes, 3rd ed., p. 106-107. Stonemark Publishing Co., Medford., MA., USA.
5. Jeong, S.T., N. Goto, and J.U. Choi. 2001. Fermentation characteristics of wine yeast strains for white wine making. *Korean J. Post-harvest Sci. Technol.* 8, 326-330.
6. Kim, J.S., J.Y. Sim, and C. Yuk. 2001. Characteristics of red wine fermentation using campbell early and different sugars. *J. Food Sci. Technol.* 33, 319-326.
7. Kishimoto, M., E. Soma, T. Shinohara, and S. Goto. 1998. Comparison of wine making properties between *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Brew. Soc. Japan* 93, 231-237.
8. Moon, Y.J., M.S. Lee, and C.K. Sung. 2004. The fermentation properties of red wine using active dry yeast strains. *Korean J. Food Nutr.* 17, 450-457.
9. Ough, C.S. and M.A. Amerine. 1987. Methods for analysis of musts and wines, p. 29-36. In C.S. Ough and M.A. Amerine, 2nd ed. John Wiley & Sons Inc., New York., USA.
10. Park, K.L., S.S. Nah, Y.J. You, and S.C. Hong. 1969. Studies on the red wine production (in Korean). Technical Bulletin of National Institute of Technology and Quality. 19, 107.
11. Park, W.M., H.G. Park, S.J. Rhee, K.I. Kang, C.H. Lee, and K.E. Yoon. 2004. Properties of wine from Domestic Grape, *Vitis labrusca* cultivar. Campbell's Early, fermented by carbonic maceration vinification process. *Korea J. Food Sci. Technol.* 36, 773-778.
12. Swaun, T. and W.E. Hillis. 1959. The phenolic constituents of *Prunus domestica* L.-The quantitative analysis of phenolic constituents. *J. Sci. Food Agric.* 10, 63-68.

(Received July 19, 2007/Accepted August 9, 2007)

ABSTRACT : Isolation and Identification of Wild Yeast and Its Use for the Production of Grapewine
Jung In Kim, Nam Keun Lee, and Young Tae Hahn* (Department of Biotechnology, Chung Ang University, Anseong 456-756, Korea)

The domestic cultured Campbell's Early and Geubong grapes were fermented for the production of red wines with the isolated wild yeast *Saccharomyces cerevisiae* IJ850. For the isolation of wild yeast, Geubong and Campbell's Early grapejuices were naturally fermented at room temperature for 6 days without adding stater culture. The strain isolated from Geubong which has 1.8 times higher fermentative ability than the strains isolated Campbell Early was selected. The selected strain was identified by using 26S rDNA sequencing. The strain showed 99.7% of similarity with *Saccharomyces cerevisiae* and thus identified as *Saccharomyces cerevisiae* IJ850. It was investigated the fermentative ability as the start culture. For the production of grapewine, the final sugar concentrations of grapejuices were adjusted to the 25°Brix with anhydrous glucose. The grapejuices were fermented at room temperature for 10 days in the air-locked bottles filled with CO₂ gas. The final yield and alcohol concentration of Campbell's Early and Geubong grapewines fermented with the isolated wild yeast were 80.8%, 11.0% and 87.8%, 13.0%, respectively. Between the isolated wild yeast *S. cerevisiae* IJ850 and the commercial yeast *S. cerevisiae* EC1118, total acidities of grapewines produced with wild yeast were lower than those produced with the commercial yeast. The pH values and the values of color analysis of grapewines produced with both strains were similar. The total phenol contents of Campbell's Early and Geubong wines produced with the isolated yeast and the commercial yeast were obtained in the range of 75 to 125 mg/L. In conclusion, *S. cerevisiae* IJ850 isolated from the domestic cultured Geubong grape is able to use to produce grapewines as stater culture.