

국산 포도주 주박으로부터 주석산 분해 세균의 분리 및 특성

김종현 · 최상훈 · 홍영아 · 김동환 · 이원희¹ · 이창호² · 박희동[†]
경북대학교 식품공학과, ¹경북대학교 임산공학과, ²경북바이오산업연구원

Isolation and Characterization of Tartaric Acid-Degrading Bacteria from Korean Grape Wine Pomace

Jong-Hyun Kim, Sang-Hoon Choi, Young-A Hong, Dong-Hwan Kim, Won-Hee Lee¹,
Chang-Ho Rhee² and Heui-Dong Park[†]

Department of Food Science and Technology, Kyungpook National University, Deagu 702-701, Korea

¹Department of Wood Science and Technology, Kyungpook National University, Deagu 702-701, Korea

²Gyeongbuk Institute of Bio Industry, Andong 760-380, Korea

Abstract

Several tartaric acid-degrading bacteria were isolated from Korean grape wine pomace after enrichment culture at 30°C for 10 days in liquid media containing tartaric acid. Among them, strains KMBL 5777 and KMBL 5778 exhibited the highest level in the growth and tartaric acid degradability in a medium containing 0.2%(w/v) tartaric acid as a sole carbon source. They were identified as *Acetobacter tropicalis* based on their morphological and physiological characteristics as well as their 16S rDNA sequences. Blast search of the 16S rDNA sequences revealed that the isolated strains are closest to *Acetobacter tropicalis*. Homologies of the sequences of KMBL 5777 and KMBL 5778 were 96.0 and 98.9%, respectively with those of *A. tropicalis* LMG 1663. Both the two bacteria showed higher tartaric acid degradation at 25°C than those at 20 and 30°C. They could degrade tartaric acid at a wide range of pH between 4.0 and 7.0 with the most rapid degradability at pH 7.0. However, when the bacteria were grown for 8 days, the same level of tartaric acid degradation was observed at pH 4.0, 5.0, 6.0 and 7.0, which was 90.0% of degradation of the acid.

Key words : *Acetobacter tropicalis*, grape wine, tartaric acid degradation, wine pomace

서 론

우리나라는 재배포도 품종의 비율은 2004년을 기준으로 캠벨얼리 74.3%, 거봉 13.1%, MBA (Muscat Bailey A) 5.9%, 세리단 3.4%, 기타 3.3%로서 캠벨얼리가 거의 대부분을 점유하고 있다(1-3). 캠벨얼리 포도는 다른 품종에 비하여 생과로서의 품질이 우수하고 우리나라 소비자의 기호에 적합할 뿐 아니라 한국의 재배환경에 적합한 특성을 가지고 있어 오랜 동안 우리나라의 대표적인 포도 품종으로 널리 재배되어 왔다(2). 그러나 캠벨얼리 포도는 생과로서의 적성은 우수하나 당도가 약 15%로서 그 함량이 낮으며 신맛

이 강하고 향이 약한 반면 foxy flavor의 함유로 인하여 포도주의 제조에는 부적합한 특성을 가지고 있다(3,4-6).

포도의 신맛 성분은 약 90%가 주석산과 사과산으로 이루어져 있다(7-9). 포도의 유기산 함량은 품종, 재배지역의 기후 등에 의해 달라진다(8,10). 일반적으로 와인용 포도의 재배가 적합한 지역에서 재배된 포도의 주석산 함량은 3-7 mg/mL, 사과산 함량은 1-10 mg/mL의 수준을 나타내지만(8) 우리나라 캠벨얼리 포도와 같이 추운 지방에서 재배된 포도의 경우에는 포도주의 주질을 나쁘게 할 정도로 많은 양의 유기산을 함유하는 경우도 있다(4,5,11). 포도주의 주질을 개선하기 위하여 포도주 제조 시에는 과량의 유기산을 제거하는 것이 중요한 과정으로 제안된 바 있다(13). 실제 포도주의 산미 감소를 위하여 주로 젖산균의 일종인

[†]Corresponding author. E-mail : hpark@knu.ac.kr,
Phone : 82-53-950-5774, Fax : 82-53-950-6772

Oenococcus oeni 균주를 이용한 말로-락틱 발효 및 알코올 효모를 이용한 말로-에탄올릭 발효 등 사과산의 분해에 관한 매우 다양한 연구가 진행되어 왔으며 말로-락틱 발효는 전 세계적으로 와인 양조장에서 신맛의 조절을 위하여 현장에 적용하고 있다(7,9,11,13,14).

미생물에 의한 주석산의 분해에 관한 연구는 아직 매우 초보단계에 있다. 현재까지 주석산 분해 미생물의 분리에 관하여는 *Candida tartarivorans* sp. nov., *Candida bertaie*, *Candida paludigena*, *Stephanoascus smithiae* 등 몇몇 균주에 대한 보고가 있으며(15-16) 포도주 변패에 관여하는 *Lactobacillus plantarum*과 *Lactobacillus brevis* 등의 젖산균의 일부 균주가 주석산을 분해할 수 있음이 밝혀져 있을 뿐 체계적인 연구가 진행되지 못하였다(17). Ascorbic acid로부터 식물체에 의해 합성되어지는(18) 주석산은 포도에 존재하는 비발효성 유기산으로서 포도주의 발효에 관여하는 포도주 효모는 주석산을 대사할 수 없기 때문에 포도주의 발효 시에도 효모에 의해 분해되지 않는다(17,19-20). 발효가 끝난 후 포도주에 잔존하는 주석산은 포도주의 향미, 입에서 느끼는 촉감, 숙성에 큰 영향을 미치게 된다(18). 또한 저장 및 유통 중 주석산염의 침전은 가장 중요한 물리적 불안정성의 가장 큰 요인으로 작용한다(21).

포도주의 제조에 있어서 과량으로 존재하는 주석산을 제거하기 위하여는 전통적인 침전법 즉 앙금질 (racking) 또는 저온 결정화 방법에 의존하고 있으며(21) 비교적 최근 포도주 주석산의 안정화를 위한 electro dialysis 방법이 보고된 바 있다(22). 생물학적 또는 효소학적인 방법에 의한 주석산의 분해를 위하여 주석산을 분해할 수 있는 다양한 미생물의 분리 및 이들에 의한 주석산의 분해 특성, 주석산 분해효소에 대한 연구 등이 활성화되어야 할 것으로 생각되나 현재까지 이에 대한 연구는 미진한 실정에 있다. 최근까지 우리나라 포도주의 신맛 조절을 위한 연구로는 타 과실과 혼합에 의한 포도주 주질 개선 연구(3), 사과산의 제거를 위한 말로-락틱 발효의 이용(23), 역삼투압 여과의 이용(24) 및 포도주스의 청징화를 위한 한외여과의 이용(25) 등에 관한 보고가 있을 뿐이다.

본 연구에서는 주석산의 함량이 높은 것으로 알려진 캠벨얼리 포도의 포도주 주박으로부터 주석산 분해능이 강한 세균 균주를 분리하고 그 특성을 규명하는 한편 이 균주에 의한 주석산의 분해 특성을 조사하고자 하였다.

재료 및 방법

사용 배지 및 균의 배양

본 실험에 사용한 배지는 MYP 배지(26)를 변형한 AE-TA 배지(27)로서 그 조성은 Table 1과 같다. 균의 배양은 AE-TA 액체 배지에 균을 한 백금이 접종하여 25°C에서

150 rpm으로 진탕 배양하였다. 균주는 AE-TA 한천 배지에 균을 한 백금이 접종한 후 25°C에서 24시간 배양하여 균의 증식 정도를 확인한 후 4°C에 보관하면서 실험에 사용하였다. 또한 균주의 변이를 방지하기 위한 장기보존은 분리 균주를 15% glycerol 용액에 현탁하여 -70°C에 냉동 보관하였다. 본 실험에 사용한 L(+)-주석산과 ammonium metavanadate는 Junsei사 (Japan)의 특급시약을 구입하여 사용하였다.

주석산 분해 세균의 분리

주석산 분해 미생물을 집식배양하기 위하여 먼저 캠벨얼리 포도주 주박을 0.2%(w/v) 주석산을 함유하고 있는 AE-TA 배지에 첨가하여 30°C에서 10일간 배양하였다. 배양액 1 mL를 생리식염수 (0.85% NaCl) 9 mL에 현탁한 후 10⁴-10⁶ 배 희석하여 AE-TA 고체배지에 100 µL를 도말하고 30°C에서 24시간 배양하여 생성되는 독립 colony를 분리하였다. 분리한 균주들은 같은 평판배지에서 재차 접종하여 30°C에서 24시간 배양하여 순수 분리하였다. 분리된 균주를 AE-TA 액체배지에 접종하여 균을 배양한 후 잔존 주석산 함량을 조사하고 분해력이 강한 균주들을 주석산 분해 균주로 최종 선별하였다.

세균의 동정

분리 세균의 동정은 균의 형태학적 특성, API 20E kit, 16S rDNA의 염기서열 결정 및 상동성 검색을 통하여 행하였다. API kit (bioMerieux, France)를 이용한 동정은 배양된 분리균을 API kit에 100 µL를 접종하고 30°C에서 24시간 반응시킨 후 biochemical test, assimilation test 그리고 fermentation test를 하였다. Biochemical test는 saline 용액에 시험균을 현탁하여 건조된 기질이 들어있는 kit의 cupule에 접종하여 배양 후 발색시약을 첨가하여 물질의 대사유무를 색의 변화로써 판정하였다. Assimilation test는 최소배지에 현탁한 시험균을 탄수화물이 유일한 탄소원으로 들어있는 kit의 cupule에 접종 배양한 후 시험균이 이들 당을 이용할 수 있는지 여부를 탁도 변화로 알아보았다. Fermentation test는 당으로부터 산의 생산에 따른 pH의 변화로 판정하였다. 세균의 동정은 이상의 결과들을 토대로 하여 Bergey's manual of systematic bacteriology의 기준에 따라 동정하였다(27).

전자현미경 관찰

분리균의 배양액을 AE-TA 배지에 1%가 되게 접종하여 3일간 30°C에서 배양한 균체를 사용하였다. 세포의 고정은 Sheehan과 Hrapchak의 방법(28)에 따라 배양액에 Karnovsky 시약을 균체와 1:1(v/v)로 혼합해 약한 vacuum 상태에서 2시간 동안 균을 고정시키고 0.05 M cacodylate buffer (pH 7.2)로 세척한 후 hood에서 20분간 방치하였다. 여기에 0.5% uranyl acetate 용액을 혼합하여 4°C에서 16시간 동안

prestaining하고 30, 50, 70, 80 및 90% ethanol로 각각 20분씩 탈수한 후 다시 100% ethanol로 20분씩 3회 탈수 하였다. 다음으로 hood에서 propylene oxide 용액으로 20분간 2회 탈수한 후, propylene oxide와 isoamylacetate를 1:1 (v/v)로 섞은 용액을 넣어 2시간 방치한 다음, 100% isoamylacetate 용액을 넣어 진공 desicator에서 16시간 동안 방치하였다. 임계점 건조기로 건조시킨 다음 건조된 시료를 Knutton의 방법(29)에 따라 gold coating한 후 주사전자현미경(scanning electron microscope, Hitachi Co. S-4300, Japan)으로 관찰하였다.

PCR을 이용한 16S rDNA의 증폭 및 염기서열의 분석

PCR을 위한 세균의 염색체 DNA는 Dneasy Tissue Kit (Quigen, U.S.A.)를 사용하여 분리하였다. 분리 균주의 16S rDNA 단편을 증폭한 PCR primer로는 정방향 (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3') 및 역방향 (5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3')의 올리고뉴클레오타이드를 20 mer 내외로 합성하여 사용하였다(30). PCR 반응은 10 µl의 Taq DNA polymerase 완충용액 (× 10), 8 µL의 2.5 mM dNTP 혼합용액, 2 µL의 주형 DNA (<1 µg), 2 µL의 100 pmol 정방향 primer 및 역방향 primer, 0.5 µL의 Taq DNA polymerase (5 units/µL; Takara Co., Japan) 및 75.5 µL의 멸균증류수를 혼합하여 사용하였다. 반응은 94°C에서 5분간 denaturation하고 다시 94°C에서 1분, 55°C에서 1분, 72°C에서 1분의 cycle을 30회 반복하였다(31). DNA 염기서열 결정을 위하여 PCR 산물은 Dynabeads PCR Clean Up Kit (DynaL Biotech ASA, Norway)를 사용하여 정제하였다. 염기서열의 결정은 (주)마크로젠 (www.macrogen.co.kr)에 의뢰하여 양방향 염기서열을 분석하였으며 염기서열의 상동성 검색은 NCIB (www.ncbi.nlm.nih.gov)의 Blast search를 통하여 행하였다.

주석산 함량 측정 및 기타 분석 방법

배양액 중의 주석산 함량을 측정하기 위하여 Mantha의 방법(32)에 따라 배양액을 8,000 × g에서 10분간 원심 분리하여 얻은 상정액 일정량을 취하여 pH를 3.2로 조절한 시료 0.5 mL와 1% ammonium metavanadate를 1:1(v/v)로 섞은 후 5분 동안 상온에서 반응시켰다. 이 반응액의 흡광도를 540 nm에서 측정한 후 주석산의 표준곡선을 이용하여 환산하였다. 그람염색은 Cappuccino 등의 방법(33)에 따라 미국 Difco사의 시약을 구입하여 실시하였다. 균의 생육도는 UV spectrophotometer로 600 nm에서의 흡광도를 측정하여 cell density로 나타내었다.

결과 및 고찰

주석산 분해세균의 분리 및 동정

주석산을 분해 할 수 있는 균주를 분리하기 위하여 포도

주 주박으로부터 0.2%(w/v) 주석산을 함유하는 배지를 사용하여 주석산을 이용할 수 있는 세균 15 균주를 분리 하였다. 분리 균주의 주석산 분해력을 조사한 결과 KMBL 5777 과 KMBL 5778 두 균주의 주석산 분해력이 가장 우수하여 이 두 균주를 주석산 분해 세균으로 최종 선발하였다. 이 두 균주를 다시 AE-TA배지에서 진탕 배양하면서 이들의 생육곡선과 주석산 분해력을 조사한 결과 구 균주 모두 주석산 분해능이 강하였다(자료 미제시). 균주 KMBL 5777 과 KMBL 5778을 30°C에서 3일간 배양한 후 주사전자현미경으로 관찰하였다(Fig. 1). 두 균주는 전형적인 간균으로서 그 모양과 크기가 유사하였으나 KMBL 5778 균주가 KMBL 5777보다 표면이 다소 거친 모습을 관찰할 수 있었다. 따라서 이 두 균주 모두를 공시균주로 사용하였다.

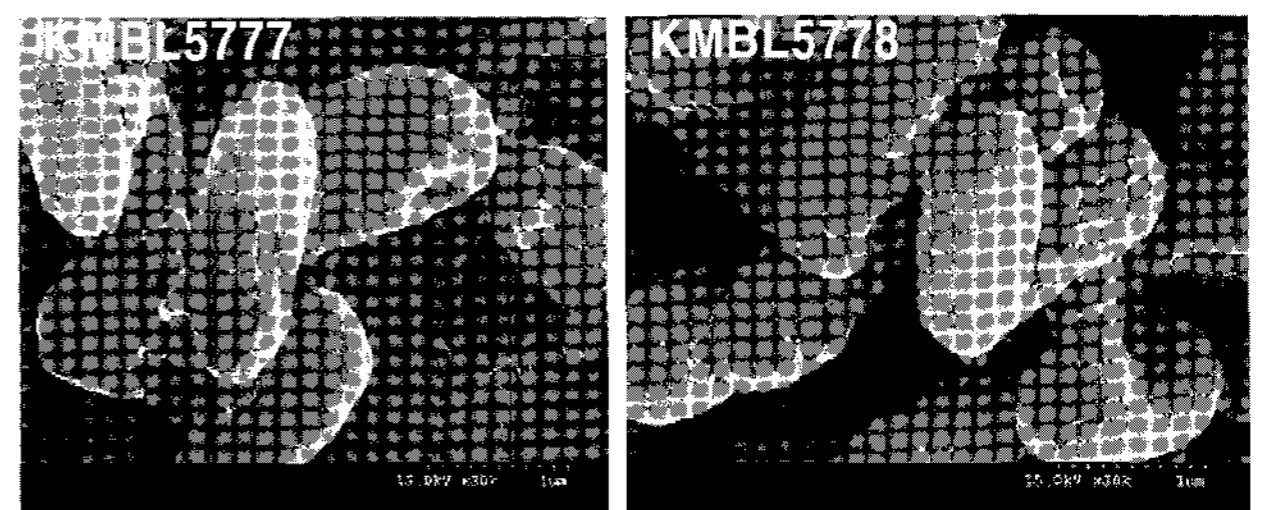


Fig. 1. Scanning electron microphotograph of the isolates KMBL 5777 and KMBL 5778 degrading malic acid.

분리 균주의 동정

분리 균주의 동정을 위하여 형태학적 및 생리학적 특성을 조사하였다(Table 1, 2). 두 균주 모두 그람염색 결과 그람 음성균으로 확인되었으며 세포의 크기를 조사한 결과 KMBL 5777은 0.75-0.95 × 1.8-2.4 µm, KMBL 5778은 0.8-1.08 × 1.6-2.1 µm으로 두 균주 모두 크기가 비슷하였다. Mobility test 결과 운동성이 없는 것으로 나타났고 색상은 연한 흰색이었다. 전체적으로 KMBL 5777과 KMBL 5778 두 균주의 형태학적인 특성은 매우 유사하였다.

Table 1. Composition of media used in this study

Medium	Ingredient	Concentration(%)
AE-TA medium	L(+)-Tartaric acid	0.2
	Bactopeptone	0.3
	Yeast extract	0.2
	Ethanol	1.0

생리학적 특성은 Table 2와 같이 catalase test와 VP test에서 모두 양성반응을 나타냈으며 urease, cytochrome oxidase, methyl red, ONPG, MR, gelatin liquefaction, arginine dehydrolase, lysine 및 ornithine decarboxylase, tryptone deaminase, H₂S 및 indole production test 결과 두 균주 모두 음성으로 나타났다. 두 균주 모두 100 ppm의 cycloheximide

의 존재 하에 생육이 불가능하여 cycloheximide에 대해 저항성을 가지고 있지 않았다. 다양한 당 및 당 알코올로부터의 산 생성 유무를 조사한 결과 두 균주 모두 glucose, melibiose 및 rhamnose에서는 산을 생성하였으나 saccharose와 arabinose의 당과 mannitol과 sorbitol 및 inositol에서는 산을 생성하지 못하였다. 이상의 각종 특성들은 *Acetobacter tropicalis*의 특성과 유사한 것으로 나타났다(26). 따라서 이상의 결과를 토대로 하여 두 분리 균주를 *A. tropicalis*로 동정하였다.

Table 2. Morphological characteristics of the isolates KMBL 5777 and KMBL 5778

Characteristics	KMBL 5777	KMBL 5778
Gram staining	-	-
Cell size(μm)	0.75-0.95 × 1.8-2.4	0.8-1.08 × 1.6-2.1
Cell shape	rod	rod
Mobility	-	-
Shape	entire, circular, convex	entire, circular, convex
Color	pale white	pale white

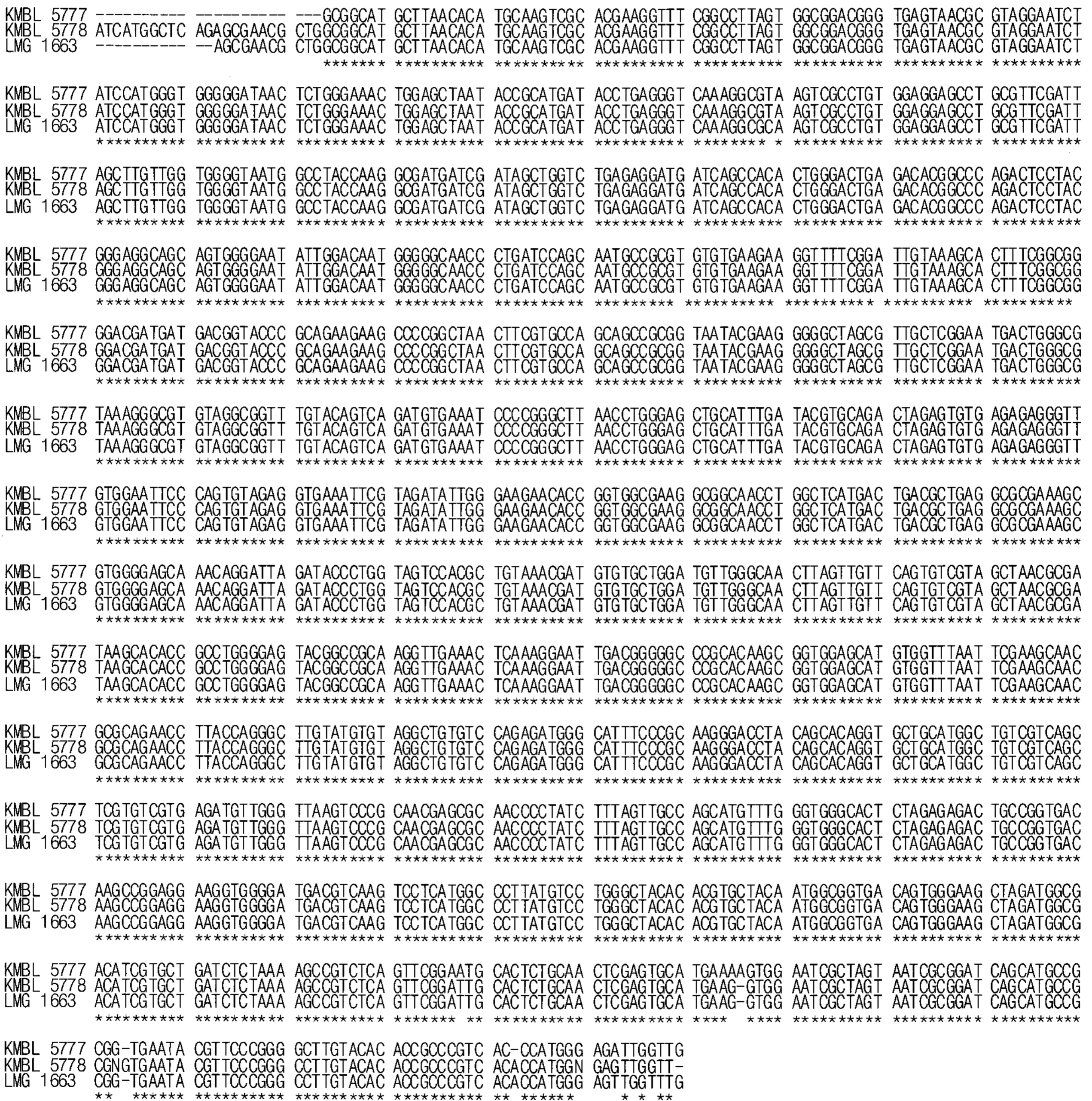


Fig. 2. Analysis of 16S rDNA sequences of the isolats KMBL 5777 and KMBL 5778 degrading malic acid.

DNA fragments containing 16S rDNA were amplified by PCR from the chromosomal DNAs of the isolates KMBL 5777 and KMBL 5778. The 16S rDNA DNA sequences were determined and aligned with those of *A. tropicalis* LMG 1663 obtained from the NCIB web site (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

16S rDNA 염기서열 결정 및 상동성 분석

분리 균주 KMBL 5777 및 KMBL 5778의 16S rDNA 단편을 증폭하기 위하여 primer를 Bioneer사 (Bioneer Co., Korea)에 의뢰하여 합성하고 이를 primer로 사용하여 두 균주의 염색체 DNA를 주형으로 PCR을 행하였다. PCR 산물의 전기영동 결과 약 1.4 kb를 함유하고 있는 것이 확인되었다(자료 미제시). 이 증폭된 DNA 단편의 염기서열을 결정한 후 KMBL 5777와 KMBL 5778의 염기서열과 상동성을 가진 균주들을 알아보기 위하여 NCIB (www.ncbi.nlm.nih.gov)의 Blast search로 검색한 결과 KMBL 5777은 *Acetobacter tropicalis* LMG 1663과 가장 높은 상동성을 나타내었으며 KMBL 5778 균주는 *A. tropicalis* A77과 가장 높은 상동성을 나타내었다. 두 분리 균주의 염기서열과 Blast search에서 얻은 *A. tropicalis* LMG 1663 균주의 염기서열을 ClustalW (www.ch.embnet.org)로 정리한 결과는 Fig. 2와 같다. 이 세 균주 사이에 극히 적은 수의 염기서열 차이를 확인할 수 있었으며 KMBL 5777 균주와 *A. tropicalis* LMG 1663와의 상동성은 99.3%, KMBL 5778 균주와 *A. tropicalis* A77 균주와의 상동성은 99.8%로 나타났다.

A. tropicalis sp. nov. 균주는 2000년 인도네시아의 꽃, 과일 및 발효식품에서 *A. indonesiensis* sp. nov.와 함께 처음으로 분리되었다(34). 여기에 *A. syzygii* sp. nov., *A. cibinongensis* sp. nov., *A. orientalis* sp. nov. 등 3 종의 새로운 *Acetobacter* sp. 종이 추가되었다(35). 새로운 종으로 보고된 이들 균주는 16S rDNA의 phylogenetic 분석에 의해 식초의 생산에 산업적으로 이용되고 있는 *Acetobacter aceti*와 함께 *Acetobacter* sp.의 일종으로 분류되었으나 그 특성에는 상당한 차이가 있다(34,35). 이러한 이유로 Cleenwerk 등(36)은 *A. tropicalis*를 포함하는 *Acetobacter* sp.의 새로운 종들을 다시 조사하였으며 그 과정에서 두 종의 새로운 *A. cerevisiae* sp. nov., *A. malorum* sp. nov.를 추가하게 되었다. 이와 같이 최근 보고된 7 종의 *Acetobacter* sp.에 대한 연구는 그 역사가 얼마 되지 않아 생리학적 특성에 관한 정보가 잘 알려져 있지 않은 실정이다. 본 연구에서 분리된 *A. tropicalis* KMBL 5777과 KMBL 5778 두 균주의 주석산 분해능은 처음으로 알려지게 된 흥미로운 특성이라 하겠다.

***A. tropicalis* KMBL 5777과 KMBL 5778에 의한 주석산의 분해**

두 분리 균주의 온도에 따른 생육도와 주석산의 분해력을 조사하기 위해 pH를 3으로 조절한 AE-TA 배지에 균을 접종한 후 진탕속도 150 rpm으로 배양온도 20, 25, 30 및 37°C에서 배양하면서 균의 생육도와 주석산의 분해정도를 조사한 결과는 Fig. 3과 같다. 두 균주 모두 25°C에서 생육도와 주석산의 분해력이 가장 우수하였다. 12일 배양의 경우 600 nm에서의 생육도가 각각 2.4, 2.3에 달하였으며 잔존

주석산의 농도는 약 0.02%로서 초기 첨가 주석산의 약 90%가 분해되는 현상을 나타내었다. 20°C에서는 25°C에 비하여 다소 생육도와 주석산 분해력이 감소하였으며 30°C에서는 생육도와 주석산 분해력이 더욱 감소하였다. 37°C에서는 12일 동안 균의 생육이 불가능하였고 주석산의 분해는 전혀 관찰되지 않았다. 일반적으로 *Acetobacter* sp.는 생육최적온도가 30°C 부근이며 내열성인 경우 37°C에서 생육이 가능하며 초산을 생성하는 것으로 알려져 있다(37-40). 본 연구에서 분리한 두 균주는 모두 37°C에서는 생육이 불가능하였고 30°C에서도 20°C와 25°C에 비하여 생육이 감소하여 전형적인 저온균의 특성을 나타내어 이에 관하여는 좀 더 연구해야 할 과제이다.

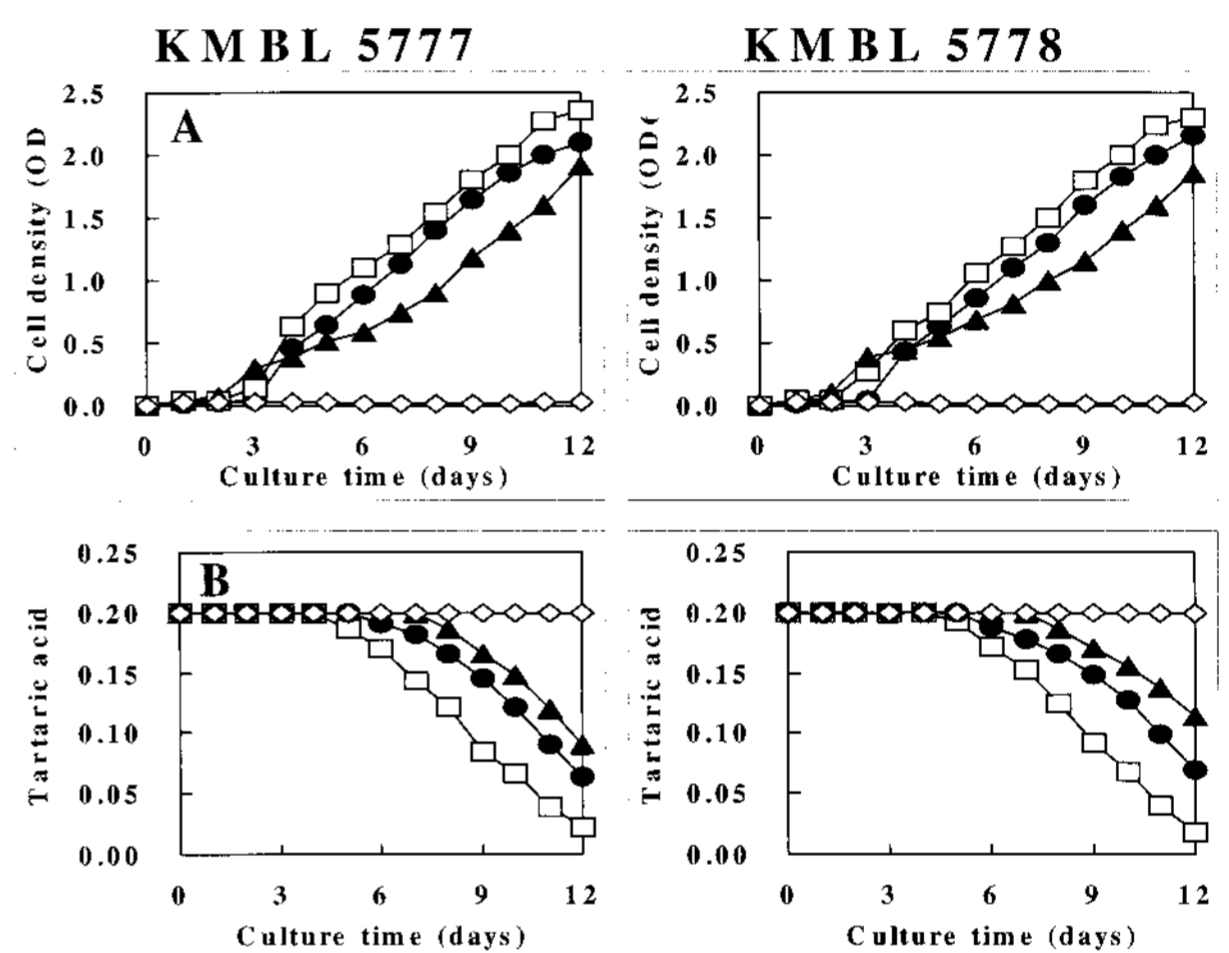


Fig. 3. Effects of culture temperature on the cell growth and tartaric acid degradation by *A. tropicalis* KMBL 5777 and KMBL 5778.

The bacteria were grown at various temperature for 12 days in AE-TA media whose pH was adjusted to 3.0. During the culture at 20 (●), 25 (□), 30 (▲) and 37°C (◇), changes in the cell density at 600 nm (A) and residual tartaric acid content (B) were monitored.

배지의 pH에 따른 두 분리 균주의 생육도와 주석산의 분해력을 조사하기 위해 AE-TA 배지의 초기 pH를 2, 3, 4, 5, 6 및 7로 조절한 AE-TA 배지에 균을 접종한 후 진탕속도 150 rpm으로 배양온도 25°C에서 배양하면서 균의 생육도와 주석산의 분해정도를 조사한 결과는 Fig. 4와 같다. 배지의 pH에 따라 생육에는 확연한 차이가 있었으며 pH 2에서는 두 균주 모두 생육하지 못하였고 주석산의 분해 또한 불가능하였다. 균주 KMBL 5777은 pH 6과 7에서 우수한 생육도를 나타내었으며 pH 5에서는 다소 생육이 감소하였다. 그러나 KMBL 5778은 pH 5, 6 및 7에서 모두 생육이 우수하였으며 거의 유사한 수준의 생육도를 나타내었다. 두 균주 모두 pH 4에서는 생육도가 감소하였고 pH 3에서는 매우 느린 생육을 나타내었다. 주석산 분해력은 두 균주 모두 pH 6에서 가장 우수하여 배양 6일 후에는 약 90%의 주석산이 분해되었으며 그 이후에는 더 이상 주석산의 분해

Table 3. Physiological characteristics the isolates KMBL 5777 and KMBL 5778

Characteristics	KMBL 5777	KMBL 5778
Catalase	+	+
Urease	-	-
Cytochrome oxidase	-	-
Methyl red test	-	-
ONPG(β -galactosidase)	-	-
VP test	+	+
MR test	-	-
Gelatin liquefaction	-	-
Arginine dehydrolase	-	-
Lysine decarboxylase	-	-
Ornithine decarboxylase	-	-
Tryptophane deaminase	-	-
H ₂ S production	-	-
Indole production	-	-
Cycloheximide resistance		
100 ppm	-	-
1000 ppm	-	-
Acid produced from		
Glucose	+	+
Saccharose	-	-
Melibiose	+	+
Rhamnose	+	+
Arabinose	-	-
Inositol	-	-
Mannitol	-	-
Sorbitol	-	-

가 거의 진행되지 않았다. 다른 pH에서는 주석산의 분해속도는 pH 7, 5, 4, 3의 순으로 지연되는 현상을 나타내었으나 배양 8일 후에는 pH 4에서 7까지 모두 잔존 주석산의 농도가 0.02%(w/v)로서 주석산 분해력이 pH 6에서와 같이 유사한 값을 나타내었다.

주석산의 분해 미생물에 관한 보고로는 현재까지 *C. tartarivorans* sp. nov., *C. bertae*, *C. paludigena*, *S. smithiae* 등 몇몇 균주(15-16)와 포도주 변패에 관여하는 *L. plantarum*과 *L. brevis* 등이 있다(17). 하지만 이 균주들은 와인의 품질에 나쁜 영향을 미치기 때문에 와인의 제조에는 사용이 불가능한 것으로 보고된 바 있다(16,17,40). 현재까지 *A. tropicalis* 균주들의 와인 제조에 미치는 특성들에 대하여는 보고된 바 없으며 현재 본 연구실에서 연구 중에 있다.

요 약

주석산은 포도에 상당량 함유되어 있어 포도 주스 또는 포도주의 저장 및 유통 기간 중에 침전물을 형성하여 품질을 저하시킨다. 본 연구에서는 주석산의 분해에 사용될 수 있는 효소 자원의 개발을 목적으로 주석산 분해 세균을 분리하고 그 특성을 조사하였다. 주석산의 함량이 높은 것으로 알려진 국산 캠벨얼리 포도주의 주박으로부터 주석산 분해세균을 집식배양한 후 주석산을 탄소원으로 함유하는 배지를 사용하여 주석산을 분해할 수 있는 세균을 분리하였다. 분리 균주 중에서 KMBL 5777과 KMBL 5778 두 균주가 주석산 함유 배지에서 생육도와 주석산 분해능이 가장 우수하였다. 이 두 균주의 형태학적, 생리학적 특성 및 16S rDNA를 분석하여 *Acetobacter tropicalis*로 동정하였다. 16S rDNA 염기서열의 상동성은 KMBL 5777 균주와 *A. tropicalis* LMG 1663 균주 사이에는 99.3%, KMBL 5778 균주와 *A. tropicalis* A77 균주 사이에는 99.8%로 나타났다. 두 균주에 의한 주석산 분해 조건을 조사한 결과 두 균주 모두 25°C, 배지의 초기 pH 6.0에서 가장 우수한 생육도와 주석산 분해능을 나타내었다. 주석산 0.2%를 함유하는 배지에서 8일간의 배양 후에는 600 nm에서의 생육도가 약 2.3에 도달하였으며 주석산 분해율은 약 90%를 나타내었다. 온도에 의한 영향은 25°C에 비하여 20, 30°C의 순으로 활성이 감소하였으며 37°C에서는 생육과 주석산 분해가 전혀 불가능하였다. pH 6에 비하여 pH 7, 5, 4, 3의 순으로 주석산의 분해속도가 감소하였으나 pH 7, 5, 4의 경우에는 배양 8일 후 pH 6의 경우와 유사한 주석산 분해능을 나타내었다.

감사의 글

본 연구는 농림기술개발사업의 연구비 (No. 2030099-3)

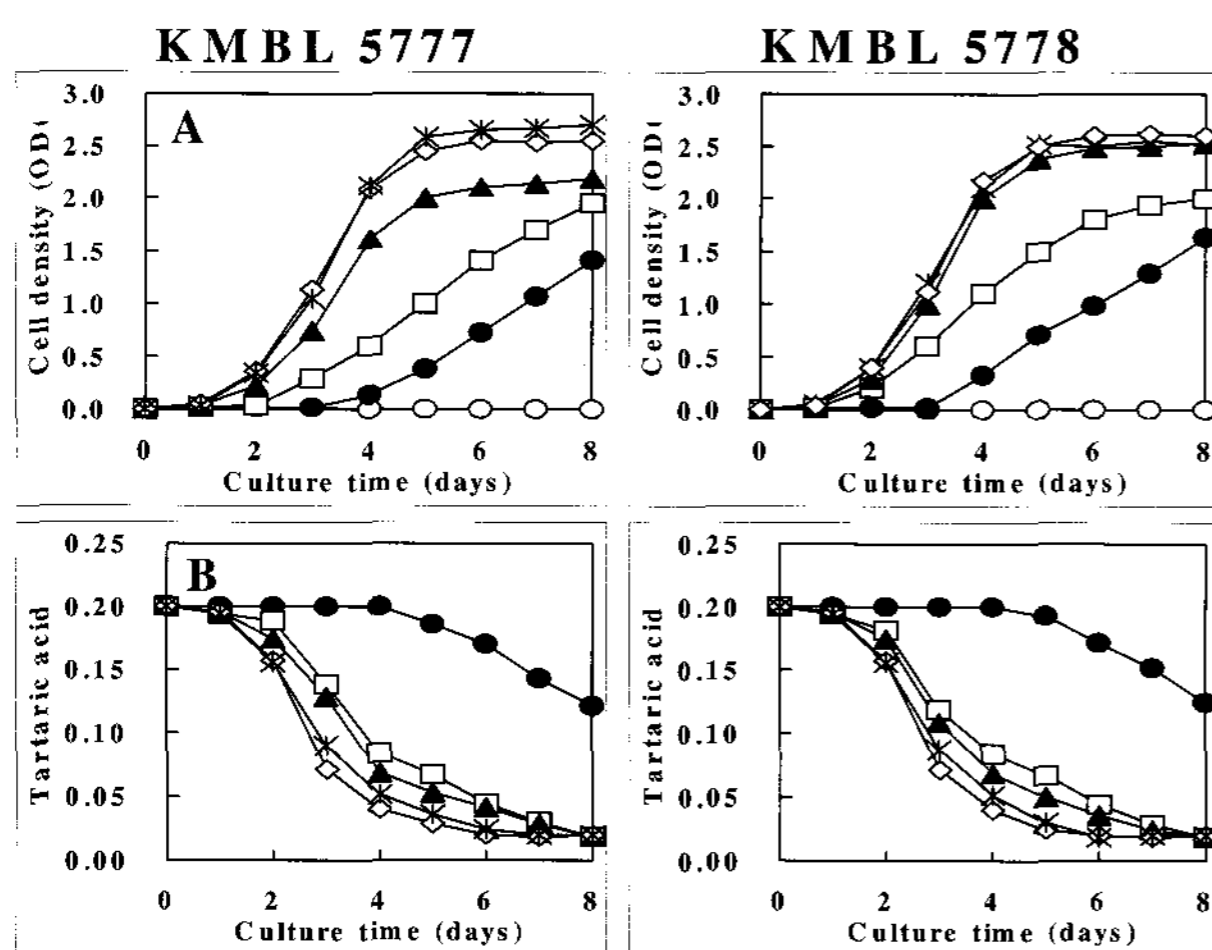


Fig. 4. Effects of initial pH of the media on the cell growth and tartaric acid degradation by *A. tropicalis* KMBL 5777 and KMBL 5778.

The bacteria were grown at 25°C for 8 days in AE-TA media. During the culture in the AE-TA media whose pH was adjusted to 2.0 (○), 3.0 (●), 4.0 (□), 5.0 (▲), 6.0 (◇) and 7.0 (*), changes in the cell density at 600 nm (A) and residual tartaric acid content (B) were monitored.

지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Ministry of Agriculture & Forestry (2006) Agricultural & forestry statistical yearbook, Ministry of Agriculture & Forestry, Seoul, Korea. p. 117
2. Kim, S.K. (2005) The present state of grape cultivation in Korea. In: Symposium on development of Yeongdong grape cluster regional innovation. Yeongdong Grape Cluster Organization, Yeongdong, Korea. p. 4-10
3. Yook, C., Seo, M.H., Kim, D.H and Kim, J.S. (2007). Quality improvement of Campbell Early wine by mixing with different fruits. Korean J. Food Sci. Technol., 39, 390-399
4. Park, W.M., Park, H.G., Rhee, S.J., Lee, C.H., and Yoon K.E. (2002) Suitability of domestic grape, cultivar Campbell's Early, for production of red wine. Korean J. Food Sci. Technol., 34, 590-596
5. Park, W.M., Park, H.G., Rhee, S.J., Kang, K.I., Lee, C.H. and Yoon, K.E. (2004) Properties of wine from domestic grape, *Vitis labrusca* cultivar. Campbell's Early, fermented by carbonic maceration vinification process Korean J. Food Sci. Technol., 36, 773-778
6. Seo, S.H., Rhee, C.H. and Park, H.D. (2007) Degradation of malic acid by *Issatchenkia orientalis* KMBL 5774, an acidophilic yeast strain isolated from Korean grape wine pomace. J. Microbiol., 45, 521-527
7. Beelman, R.B. and Gallander, J.F. (1979) Wine deacidification. Adv. Food. Res. 25, 1-53.
8. Ruffner, H.P. (1982) Metabolism of tartaric and malic acids in *Vitis*: a review, Part A. *Vitis*, 21, 247-259
9. Thornton, R.J. and S.B. Rodriguez (1996) Deacidification of red and white wines by a mutant of *Schizosaccharomyces malidevorans* under commercial winemaking conditions. Food Microbiol., 13, 475-482
10. Volschenk, H., Viljoen-Bloom, M., Subden, R.E. and van Vuuren, H.J.J. (2001) Malo-ethanolic fermentation in grape must by recombinant strains of *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast, 18, 963-970
11. Gallander, J.F. (1977) Deacidification of eastern table wines with *Schizosaccharomyces pombe*. Am. J. Enol. Vitic., 28, 65-68
12. Pretorius, I.S. (2000) Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. Yeast, 16, 675-729
13. Munyon, J.R. and Nagel, C.W. (1977) Comparison of methods of deacidification of musts and wines. Am. J. Enol. Vitic. 28, 79-87
14. Ramon-Portugal, F., Seiller, I., Taillandier, P., Favarel, J.L., Nepveu, F. and Strehaiano, P. (1999) Kinetics of production and consumption of organic acids during alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. Food Technol. Biotechnol., 37, 235-240
15. Fonseca, A, Fell, J.W., Kurtzman, C.P. and 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
16. Kurtzman, C.P. and Robnett, C.J. (1998) Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. Antonie an Leeuwenhoek, 73, 331-371
17. Graham, H.F. (1993) Wine: microbiology and biotechnology, Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland
18. DeBolt, S., Cook, D.R. and Ford, C.M. (2006) L-Tartaric acid synthesis from vitamin C in higher plants. Proc. Natl. Acad Sci., USA 103, 5608-5613
19. Gao, C. and G.H. Fleet. 1995. Degradation of malic and tartaric acids by high density cell suspensions of wine yeasts. Food Microbiol., 12, 65-71
20. Fonseca, A. (1992) Utilization of tartaric acid and related compounds by yeasts: taxonomic implications. Canadian J. Microbiol., 38, 1242-1251
21. Boulton, R.B., Singleton, V.L., Bisson, L.F. and Kunkel, R.E. (1996) Principles and practices of winemaking. Chapman & Hall, New York, U.S.A. p.320-351
22. Goncalves, F., Fernandes, C., dos Santos, P.C. and de Pinho, M.N. (2003) Wine tartaric stabilization by electro dialysis and its assessment by the saturation temperature. J. Food Engin., 59, 229-235
23. Lee, S.O. and Park, M.Y. (1980) Immobilization of *Leuconostoc oenos* cells for wine deacidification. Korean J. Food Sci. Technol., 12, 299-304
24. Lee, S.R., Kang, H.A., Chang, Y.I. and Chang, K.S. (1999) The changes of physicochemical composition of wine by reverse osmosis system. Food Eng. Prog., 3, 1-7
25. Ko, E.J. and Choi, Y.H. (1999) Clarification of grape juice by ultrafiltration and membrane fouling characteristics. Food Eng. Prog., 3, 57-63
26. Sievers, M. and Swings, J. (2005) Genus I. *Acetobacter* Beijerinck 1898, 215AL, In: Bergey's manual of

- systematic bacteriology (2nd Ed.) Vol. II, Brenner, D.J., Krieg, N.R. and Staley, J.T.(Editor), Springer, New York, U.S.A., p.51-54
27. Park, M.H., Lyu, D.K. and Ryu, C.H. (2002) Characteristics of high acidity producing acetic acid bacteria isolated from industrial vinegar fermentation. J. Korean Soc. Food. Sci. Nutr., 31, 394-398
 28. Sheehan, D. and Hrapchak, B. (1980) Theory and practice of histotechnology. Battelle Press, Columbus, USA., p.330-331
 29. Knutton, S. (1995) Electron microscopical methods in adhesion. Methods Enzymol. 253, 145-158
 30. Hayashi, H., Sakamoto, M. and Benno, Y. (2004) Evaluation of three different forward primers by terminal restriction fragment length polymorphism analysis for determination of fecal *Bifidobacterium* spp. in health subjects. Microbiol. Immunol., 48, 1-6
 31. Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K. (1992) Short protocol in molecular biology, 2nd ed. John Wiley & Sons, Inc., New York., U.S.A.
 32. Mantha, D., Aslam-Basha, Z. and Panda, T. (1998) Optimization of medium composition by response surface methodology for the production of tartaric acid by *Gluconobacter suboxydans*. Biopress Engin., 19, 285-288
 33. Cappuccion, J.G. and Sherman, N. (1983) Microbiology: a laboratory manual. Abbison-Wesley Publishing Co. Inc., U.S.A.
 34. Lisdiyanti, P., Kawasaki, H., Seki, T., Yamada, Y., Uchimura, T. and Komagata, K. (2000) Systematic study of the genus *Acetobacter* with descriptions of *Acetobacter indonesiensis* sp. nov., *Acetobacter tropicalis* sp. nov., *Acetobacter orleanensis* (Henneberg 1906) comb. nov., *Acetobacter lovaniensis* (Frateur 1950) comb. nov., and *Acetobacter estunensis* (Carr 1958) comb. nov. J. Gen. Appl. Microbiol., 46, 147 - 65
 35. Lisdiyanti, P., Kawasaki, H., Seki, T., Yamada, Y., Uchimura, T. and Komagata, K. (2001) Identification of *Acetobacter* strains isolated from Indonesian sources, and proposals of *Acetobacter syzygii* sp. nov., *Acetobacter cibinongensis* sp. nov. and *Acetobacter orientalis* sp. nov. J. Gen. Appl. Microbiol., 47, 119-131
 36. Cleenwerck, I., Vandemeulebroecke, K., Janssens, D. and Swings, J. (2002) Re-examination of the genus *Acetobacter*, with descriptions of *Acetobacter cerevisiae* sp. nov. and *Acetobacter malorum* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 52, 1551-1558
 37. Ohmori, S., Masai, H., Arima, K. and Beppu, T. (1980) Isolation and identification of acetic acid bacteria for submerged acetic acid fermentation at high temperature. Agric. Biol. Chem., 44, 2901-2906
 38. Saeki, A., Theeragool, G., Matsushita, K., Toyama, H., Lotong, N. and Adachi, O. (1997) Development of thermotolerant acetic acid bacteria useful for vinegar fermentation at higher temperatures. Biosci. Biotechnol. Biochem., 61, 138-145
 39. Lu, S.F., Lee, F.L. and Chen, H.K. (1999) A thermotolerant and high acetic acid-producing bacterium *Acetobacter* sp. I14-2. J. Appl. Microbiol., 86, 55-62
 40. Lafon-Lafourcade, S., Carre, E. and Ribéreau-Gayon, P. (1983) Occurrence of lactic acid bacteria during the different stages of vinification and conservation of wines. Appl. Environ. Microbiol., 46, 874-880

(접수 2008년 2월 28일, 채택 2008년 5월 23일)