

고정화 효모를 이용한 발포성 포도주의 휘발성 성분

이용수* · 이건표* · 최진상†

진주산업대학교 식품가공학과

*대선주조(주)

Volatile Compounds of Sparkling Wine Using Immobilized Yeast

Yong-Soo Lee*, Keun-Pyo Lee* and Jine-Shang Choi†

Dept. of Food Science and Technology, Chinju National University, Chinju 660-758, Korea

*Daesun Distilling Co. Ltd., Pusan 607-080, Korea

Abstract

In order to investigate the possibility of using immobilizing yeast cells with the eliminating purpose of the riddling process in sparkling wine production by the traditional method, the changes in chemical components during and after bottle fermentation by immobilizing yeast cells with alginate were tested. The most volatile compounds, excepting some compounds, were not appreciably different in sparkling wines which obtained from various samples compared. After bottle fermentation, sparkling wine fermented with using free cells were disgorged, with undergoing riddling process, and sparkling wine fermented with undergoing riddling process, and tested. The results showed that the taste and aroma of the sparkling wine produced with using immobilized cells were very similar to that produced with using free cells.

Key words: sparkling wine, volatile compounds, immobilized yeast

서 론

유전기술의 발달로 발효기술은 더욱 현대화되었고, 대량의 물질을 연속 발효시켜 발효산물을 생산하기에 이르렀다. 발효기술을 산업화하기 위해서는 발효산물의 생산성을 높이고 생산비용을 줄이는 방법을 개발하여야 하는데, 이러한 목적을 위하여 최근 미생물을 고정화시켜 발효시키는 bioreactor의 활용이 대두되고 있고, 이에 관한 많은 연구가 진행되고 있다(1-7). 미생물의 고정화기술은 attachment와 entrapment 방식이 있으며, attachment 방법에는 다시 aggregation 방법과 표면고착방법이 있고, 후자의 방식에는 다시 alginate, carageenan 및 porous material을 이용하는 방법이 있다(8,9). 전통적인 발포성 포도주의 생산방법의 특징은 1차 발효된 포도주와 당, 효모, 기타 발효보조제를 병내에 첨가한 다음 병발효시키는 것이다. 그러나 전통적인 발포성 포도주를 생산하기 위한 병발효는 발효가 완료된 후 1~2년 저장하여 병발효 중 증식된 효모와 첨가된 발효보조제를 제거하는 riddling 공정과 disgorging

공정 등(10)을 거치게 되어 많은 시간과 인력이 소요되게 된다.

따라서 이를 중간공정을 줄이기 위한 목적으로 고정화 효모를 이용하여 병발효시킨 것과 전통적인 발포성 포도주의 병발효방법과의 발효 중 발효액의 성분변화와 발효 후 발포성 포도주의 관능적인 분석을 통하여 발포성 포도주의 생산에 고정화 효모의 응용 가능성을 조사하였다.

재료 및 방법

재료

발포성 포도주 제조에 사용한 재료는 chardonnay 40%, cheninblanc 20%, 9110 40%를 혼합하여 제조한 포도주를 $0.45\mu\text{m}$ membrane filter로 써 여과 후 사용하였으며, 사용한 포도주는 알코올 10.7%, 총 산 6.40g/L, pH 3.25, 총 phenolics 278mg/L, 휘발산 0.23g/L의 화학적 조성을 가진 포도주였다. 병발효를 위하여 사용한 균주는 *Saccharomyces cerevisiae* Stamm Wet 136과 Sa-

* To whom all correspondence should be addressed

*ccharomyces bayanus epernay*를 사용하였으며, 효모를 고정화하기 위한 담체는 Sigma사의 sodium alginate를 사용하였다.

효모의 고정화

효모의 고정화는 sodium alginate를 각각 2%, 3% 및 4%되게 첨가하고, 원심분리 후 얻은 효모는 살균수와 1:4로 혼합한 후 3×10^8 cells/g되게 첨가하였다. 효모농도에 따른 발효실험을 위하여 3% sodium alginate용액에 각각 효모 수가 3×10^8 cells/g, 6×10^8 cells/g 및 9×10^8 cells/g되게 첨가하여 균질하게 혼합하였다. 혼합된 alginate-yeast용액은 기포를 제거한 후 사출시켜 0.5M CaCl₂용액에 떨어뜨린 다음 1일간 유지한 후 고정화시켰으며, 고정화된 bead의 크기는 평균 3mm 정도였다. 고정화된 효모는 다시 살균수로 5~6회 세척 후 발효에 사용하였다.

시료의 제조

병발효 시료는 2.5%의 당을 첨가한 기본 포도주 750ml을 열 살균(90°C, 30분)된 750ml용 내압 병에 넣고 고정화 효모 bead를 각각 15g씩 첨가하여 capping 후 15°C에서 발효시켰다. 또한 대조구로서 같은 포도주와 용기에 free cells를 고정화 효모의 효모 수와 같이 첨가하여 발효시켜 각각 5~10일 간격으로 시료를 채취하여 고정화 효모와 비교, 분석하였다.

Higher alcohol의 분석

시료의 higher alcohol은 Hewlett Packard gas chromatography(5890 series II, HP3394A Integrator)를 이용하여 분석하였으며, 분석에 사용한 column은 5% Carbowax 20M 80/120 mesh Carbopack B-AW(for alcoholic beverages), detector는 FID, injector 온도는 190°C, detector 온도는 190°C, column 오븐 온도는 70°C에서 1분간 유지 후 분당 4°C씩 승온시켜 170°C에서 3분간 머무르게 하고, 질소를 carrier gas로 하였다. 정량은 100mg/L의 표준물질(alcohol류와 carbonyl 화합물)을 첨가하여 분석한 chromatogram의 면적과 비교하여 산출하였다.

휘발성 성분의 분석

Shimizu와 Watanabe(11)의 분석방법에 준하여 시료 200ml를 중류한 다음 중류액에 내부 표준물질로서 ethyl peragomate를 3mg/L을 첨가한 후 dichloromethane 200ml로 3회 추출한 다음 분액깔때기로써 dichloromethane

층을 분리하였다. 분리한 dichloromethane 층은 다시 Na₂SO₄으로 탈수시킨 다음 실온 진공 하에서 2ml까지 농축시켜 GC(HP 5890 series II)로 분석하였다. Column은 0.28mm(i.d.)×50m capillary를 사용하였고, FID detector로서 injector 온도는 200°C, detector 온도는 200°C, column 오븐 온도는 70°C에서 1분간 유지시킨 후 4°C/min.으로 승온시켜 190°C에서 4분간 머무르게 하였으며, carrier gas는 질소를 사용하였다. 각 성분의 정량은 표준물질의 면적 값으로 산출하고 내부 표준물질로 보정하여 나타내었다.

효모수의 측정

발효액 중의 효모 수는 hemasitometer와 현미경을 이용하여 10회 측정한 결과 중 최고와 최저값을 제외한 나머지를 평균하여 나타내었다.

관능검사

병발효 후 포도주의 관능검사는 free cells를 이용한 시료는 riddling을 거쳐 양금을 제거하고, 고정화 효모를 이용한 시료는 riddling을 거치지 않고 bead를 제거하여 관능검사의 시료로 사용하였으며, 관능검사는 Marcus의 포도주 관능방법(12)으로 전문 관능요원을 훈련시켜 포도주 관능력을 가진 20명으로 scoring test를 실시하여 그 점수를 평균하여 나타내었다.

결과 및 고찰

Acetaldehyde의 변화

병발효 중 acetaldehyde의 변화는 발효 초기에 급격한 증가를 보였으나, 그 후 점점 감소하였다(Fig. 1). 발효 중 이러한 acetaldehyde의 변화의 양상은 Veselov와 Gracheva(13)의 보고와 같이 포도주의 1차 발효 중 acetaldehyde의 변화양상과 유사하였다. 이러한 발효양상은 효모의 균주와 고정화 효모 및 free cells에서 비슷하였으나, 고정화 효모보다 free cells이 당의 소비가 많은 시점에서 acetaldehyde의 생성량이 높은 결과를 보여 발효속도가 free cells이 빠르다는 것을 알 수 있었다.

Alcohol류와 carbonyl 화합물

발포성 포도주의 제조를 위한 고정화 효모와 free cells를 이용한 병발효 중 higher alcohol의 함량은 초기에 급격한 증가를 보이다가 발효 10일 후에는 완만하게 증가하였다(Fig. 2). 이러한 higher alcohol의 생성양상은 고정화 효모와 free cells에서 비슷하였으며, higher

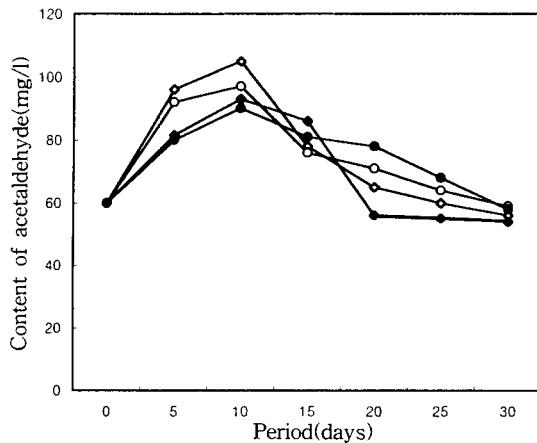


Fig. 1. The changes in content of acetaldehyde during sparkling wine fermentation by immobilized and free yeast cells.
 —◇—: Free cell of *Saccharomyces cerevisiae*
 —◆—: Immobilized cell of *Saccharomyces cerevisiae*
 —○—: Free cell of *Saccharomyces bayanus*
 —●—: Immobilized cell of *Saccharomyces bayanus*

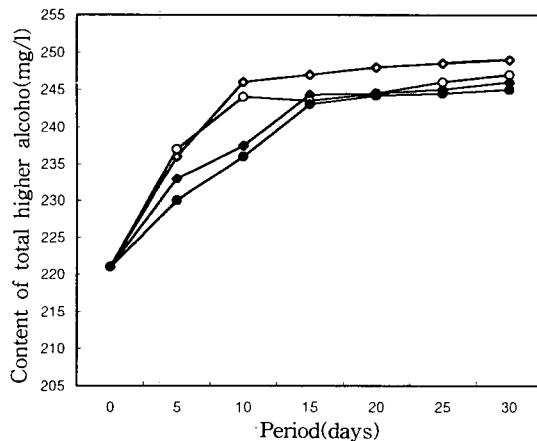


Fig. 2. The changes in content of total higher alcohol during sparkling wine fermentation by immobilized and free yeast cells.
 —◇—: Free cell of *Saccharomyces cerevisiae*
 —◆—: Immobilized cell of *Saccharomyces cerevisiae*
 —○—: Free cell of *Saccharomyces bayanus*
 —●—: Immobilized cell of *Saccharomyces bayanus*

alcohol의 생성량도 큰 차이가 없었다. Higher alcohol의 생성은 주로 발효 중 아미노산의 합성과정에 부생성물로서 생성되며, 포도주의 aroma에 기여하는 것으로 알려져 있다(11,14). 한편, 발효가 완료된 후 각각의 실험구별로 higher alcohol의 조성을 비교해 본 결과(Table 1), 고정화를 위해 사용한 alginate의 각 농도와 효모농도에 큰 차이를 나타내지 않았고, 고정화 효모와 free cells의 경우도 큰 차이를 보이지 않았으나, 모든 시험구에서 발효완료 후 초기 농도보다 propyl alcohol 8mg/L, isobutyl alcohol 4~5mg/L 및 isoamyl alcohol 13~14mg/L 증가하였다.

Esters

병발효 후 휘발성 성분을 분석한 결과, esters 함량은 Table 2와 같다. 고정화 효모와 free cells로 발효시킨 후의 esters가 고정화 효모보다 free cells로 발효시킨 시료에서 다량 함유하는 것으로 나타났다. 즉 ethyl lactate 23~58%, diethyl succinate 23~39%, isoamyl acetate 11~25% 및 ethyl hexanoate 12~18%가 고정화 효모보다 다량 생성되었다. Ethyl butyrate와 ethyl propionate는 비슷하였으며, monoethyl succinate는 고정화 효모가 많이 생성하였다. 균종에 따라서 esters의 생성량이 약간의 차이를 보였는데, *S. bayanus* 사용구가 *S. cerevisiae*보다 조금 많이 함유하였으나, diethyl succinate는 *S. cerevisiae*가 많은 양을 함유하였고, monoethyl succinate는 거의 비슷한 결과를 보였다. Alginate용액에 효모농도별로 고정화시켜 발효시킨 결과 효모의 농도가 높을수록 ethyl propionate, ethyl butyrate, isoamyl acetate, ethyl hexanoate 및 ethyl lactate는 증가하는 것으로 나타났고, alginate 농도가 낮을수록 다양 함유한 결과를 보였으나, 그 차이는 아주 적었다.

Volatile 화합물

각 실험구별로 병발효 후 휘발산의 조성과 함량을 분석한 결과는 Table 3과 같다. 고정화 효모를 이용하여

Table 1. Alcohols and carbonyl compounds of sparkling wine after bottle-fermentation

(unit : mg/L)

Components	Immobilized cell		Free cell		Yeast cell number($\times 10^8/g$)			Alginate conc. (%)		
	<i>S. b.</i> ¹⁾	<i>S. c.</i> ²⁾	<i>S. b.</i>	<i>S. c.</i>	3.0	6.0	9.0	2.0	3.0	4.0
Acetaldehyde	63	44	58	54	63	52	56	58	63	63
Methyl alcohol	42	45	40	38	42	43	45	42	42	45
Propyl alcohol	78	78	81	80	78	78	78	78	78	81
Isobutyl alcohol	24	25	24	25	24	24	25	23	24	25
Isoamyl alcohol	143	144	143	145	143	145	145	149	143	145
Ethyl acetate	48	45	35	44	48	43	44	43	48	46

¹⁾*Saccharomyces bayanus epernay*

²⁾*Saccharomyces cerevisiae*

Table 2. Volatile esters of sparkling wine after bottle-fermentation (unit: mg/L)

Components	Immobilized cell		Free cell		Yeast cell number($\times 10^8/g$)			Alginate conc. (%)		
	S. b. ¹⁾	S. c. ²⁾	S. b.	S. c.	3.0	6.0	9.0	2.0	3.0	4.0
Ethyl propionate	1.15	1.18	1.32	1.16	1.15	1.19	1.28	1.25	1.15	1.10
Ethyl butyrate	3.97	3.85	4.08	3.90	3.97	3.99	4.05	4.00	4.08	3.78
Isoamyl acetate	2.30	2.53	2.88	2.82	2.30	2.37	2.48	2.45	2.30	2.32
Ethyl hexanoate	0.83	0.61	0.93	0.72	0.83	0.82	0.86	0.87	0.83	0.79
Ethyl lactate	2.96	1.56	3.65	2.47	2.96	3.02	3.15	3.03	2.96	2.90
Diethyl succinate	0.83	1.00	1.15	1.23	0.83	0.53	0.80	0.94	0.83	0.85
Monoethyl succinate	2.93	2.56	2.51	2.50	2.93	3.80	2.62	2.89	2.93	3.80

¹⁾*Saccharomyces bayanus* epernay²⁾*Saccharomyces cerevisiae*

Table 3. Some volatile compounds of sparkling wine after bottle-fermentation (unit: mg/L)

Components	Immobilized cell		Free cell		Yeast cell number($\times 10^8/g$)			Alginate conc. (%)		
	S. b. ¹⁾	S. c. ²⁾	S. b.	S. c.	3.0	6.0	9.0	2.0	3.0	4.0
Propionic acid	0.31	0.33	0.42	0.42	0.34	0.38	0.36	0.36	0.34	0.38
Butyrolactone	0.46	0.32	0.48	0.39	0.46	0.42	0.39	0.35	0.46	0.56
Butyric acid	0.36	0.35	0.42	0.38	0.36	0.42	0.39	0.33	0.42	0.56
Hexanoic acid	6.43	7.71	6.48	7.77	6.43	6.42	6.47	6.33	6.43	6.42
Caprylic acid	12.67	12.86	11.19	11.16	12.67	13.62	11.32	12.46	12.67	12.29
Hexanol	1.37	1.29	2.37	2.00	1.37	1.48	1.72	1.52	1.37	1.36
Phenyl ethanol	8.73	11.48	9.40	11.50	8.73	9.88	10.38	10.88	8.73	11.38

¹⁾*Saccharomyces bayanus* epernay²⁾*Saccharomyces cerevisiae*

Table 4. Sensory evaluation of sparkling wine after bottle-fermentation

Items	Immobilized cell		Free cell		Full point
	S. bayanus	S. cerevisiae	S. bayanus	S. cerevisiae	
Appearance	1.67	1.60	1.87	1.80	2.00
Color	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Aroma	2.40	2.40	2.40	2.40	4.00
Acescence	1.93	1.93	1.80	1.80	5.00
Total acid	2.00	2.00	2.00	2.00	5.00
Sugar	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Body	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Flavor	1.53	1.46	1.53	1.46	2.00
Astringency	1.73	1.73	1.73	1.73	2.00
General quality	1.60	1.60	1.60	1.60	2.00
Total score	16.86	16.72	16.93	16.79	20.00

발효시킨 결과 free cells보다 propionic acid, butyric acid 및 hexanoic acid는 낮은 함량을 보였으나, caprylic acid는 많았다. 균주에 따라서도 약간의 차이를 보였는데, *S. cerevisiae* 사용구는 *S. bayanus* 구보다 butyrolactone과 butyric acid를 적게 함유하였고, propionic acid와 caprylic acid는 비슷하였으며, hexanoic acid는 많이 함유하였다. Alginate 농도에 따라 고정화하여 발효시킨 시료의 butyrolactone은 alginate 농도가 높을 수록 증가하였고, hexanoic acid는 감소하였으며, 그 외의 성분은 비슷하였다. 고정화된 bead 중의 효모 농도에 따라서도 차이를 보였는데, butyrolactone은 효모 농도

가 높을수록 감소하였고, 그 외의 성분은 변화가 없거나 불규칙한 변화를 보였다. 이 밖에 알콜류인 hexanol은 free cells가 고정화 효모보다 많이 함유하였으며, 균주간에도 함량의 차이를 보였다. 또한 hexanol은 효모의 농도가 높을수록 증가하였고, alginate의 농도가 높을수록 많은 양을 함유하였다. 그리고 phenyl ethanol은 효모의 농도가 높을수록 다량 함유하였으나, alginate 농도에 따라서는 불규칙한 결과를 보였다. Fumi 등(15)은 고정화 효모가 free cells보다 phenyl ethanol은 다소 많은 양을 함유하며, hexanol은 적게 함유한다고 보고하였다.

관능검사

발효완료 1개월 후 고정화 효모를 사용하여 발효된 포도주는 riddling 공정없이 고정화 효모 bead를 제거하고, free cells를 이용하여 발효된 포도주는 riddling 공정 후 효모 앙금을 제거하여 관능검사를 실시한 결과 대부분의 항목에서는 같은 평가를 얻었으나, 외관의 경우 free cells를 이용하여 발효한 후 riddling 공정을 거친 시료가 고정화 효모를 이용하여 발효한 시료보다 높은 점수를 보였는데, 이는 고정화 효모로부터 이탈된 효모가 원인이 된 것으로 생각된다. 그러나 관능검사 결과 주어진 외관의 점수가 1.60~1.67로서 관능검사 요원의 대부분이 clear와 brilliant의 중간정도로 평가하여 양호한 것으로 평가하였다. Acescence의 경우 free cells보다 고정화 효모를 이용하여 발효시킨 시료가 높은 점수를 얻었다. 이러한 관능검사 결과의 양상은 효모종류에 따라서는 비슷하였고, 그 밖의 실험구의 시료는 고정화 효모의 평가와 비슷하였다. 그러나 Vichon(16), Loyaux 등(17)과 Marais와 Pool(18)에 따르면 포도주의 숙성조건과 저장조건에 따라 향기성분의 조성이 함량 차이가 나타나는 것을 보고한 바 있어 이들의 주질은 일정기간 동안 저장 후 점검해야 정확한 주질 평가가 이루어질 것으로 생각되며, 이에 관한 연구가 더 진행되어야 할 것으로 생각된다.

요약

전통적 발포성 포도주 생산에 필요한 riddling 공정을 제거할 목적으로 yeast cells 농도별로 고정화한 효모와 alginatc 농도별로 고정화한 효모를 이용하여 병 발효 중 및 후의 휘발성 성분을 조사하고 관능검사를 하였다. 휘발성 물질의 경우에도 몇몇 성분을 제외한 대부분의 물질은 뚜렷한 차이를 보이지 않았다. 또한 발효가 완료된 실험구 중 free cells를 이용한 실험구는 riddling 공정을 거치고, 고정화 효모를 이용한 실험구는 riddling 공정없이 disgorging하여 관능분석한 결과 생산된 발포성 포도주의 맛과 향기는 아주 유사하였다.

문현

1. Tyagi, R. D. and Ghose, T. K. : Studies on immobilized *Saccharomyces cerevisiae*. I. Analysis of continuous rapid ethanol fermentation in immobilized cell reactor. *Biotech and Bioeng.*, **24**, 781(1982)

2. Park, S. R. and Wayman, M. : Performance of a novel continuous dynamic immobilized cell bioreactor in ethanolic fermentation. *Enzyme Microb. Technol.*, **9**, 406 (1987)
3. Doran, P. M. and Bailey, J. E. : Effects of immobilization on growth fermentation properties and macromolecular composition of *Saccharomyces cerevisiae* attached to gelatin. *Bioeng.*, **23**, 73(1986)
4. Ray, D. K. and Labuza, T. P. : Characterization of the effect of solutes on the water-binding and gel strength properties of carrageenan. *J. Food Sci.*, **46**, 786(1981)
5. Black, G. M., Webb, C., Matthew, J. M. and Atkinson, B. : Practical reactor systems for yeast cell immobilization using biomass support particles. *Biotech and Bioeng.*, **24**, 134(1984)
6. Navaro, J. M. and Durond, G. : Modification of yeast metabolism by immobilization into porous glass. *European J. Appl. Microbiol.*, **4**, 243(1977)
7. Netto, C. B. and Goma, G. : Communications to the editor. Ethanol fermentation by flocculent yeast on the kinetics of biomass accumulation. *Biotech and Bioeng.*, **30**, 328(1987)
8. Scott, C. D. : Immobilized cells; a review of recent literature. *Enzyme Microb. Technol.*, **9**, 66(1987)
9. Nunez, M. J. and Lema, J. W. : Cell immobilization : Application to alcohol production. *Enzyme Microb. Technol.*, **9**, 642(1987)
10. Zoecklein, B. : *Riddling*. Eastern Grape Grower and Winery News. Aug/Sep. 22(1984)
11. Shimizu, J. and Watanabe, M. : Neutral volatile components in wines of Koshu and Zenkoji grapes. *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 279(1981)
12. Marcus, I. H. : *How to test and improve your wine judging ability*. Davis, California(1974)
13. Veselov, K. T. and Gracheva, I. M. : Intensity of metabolism in brewers yeast in various conditions of fermentation. *Proc. Intern. Congr. Biochem. 5th Moscow.*, **8**, 257(1963)
14. Casoli, A and Colegrande, O. : Use of high performance liquid chromatography for the determination of amino acids in sparkling wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, **33**, 135 (1982)
15. Fumi, M. D., Thioli, G., Colombi, M. G. and Colagrande, O. : Immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* in calcium alginate gel and its application to bottle-fermented sparkling wine production. *Am. J. Enol. Vitic.*, **39**, 267(1988)
16. Vichom, J. M. : Autolysis-key Step at Vicon. *Practical winery*, **4**, 62(1983)
17. Loyaux, D., Roger, S. and Adde, J. : The evolution of champagne volatiles during aging. *J. Sci. Food Agric.*, **32**, 1254(1981)
18. Marais, J. and Pool, H. J. : Effect of storage time and temperature on the volatile composition and quality of dry white table wines. *Vitis*, **19**, 151(1980)