

Seibel 포도즙 알코올 발효 및 저장 중 휘발성 향기성분의 변화

고경희* · 장우영¹

*가톨릭대학교 식품영양학전공, ¹남양유업(주)중앙연구소

Changes of Volatile Flavor Compounds of Seibel Grape Must during Alcohol Fermentation and Aging. Koh, Kyung-Hee* and Woo-Young Chang¹. Major of Food Science and Nutrition, The Catholic University of Korea, Puchon 422-743, ¹Research and Development Center, Namyang Dairy Products Co., Ltd. - A great variety of the volatile metabolic by-products was formed in yeast cell during alcohol fermentation. The seibel grape (*Vitis labrusca*) which was grown in the Southern Korea used for wines. The objective of this research was to identify the volatile flavor compounds during alcohol fermentation and aging at 12°C. *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe* were inoculated and fermented in seibel grape must. The volatile flavor compounds of logarithmic, stationary and death phases were extracted, concentrated and identified by gas chromatograph/mass spectrometer (GC/MS). The volatile flavor compounds were determined by a Hewlett-Packard 5890 II Plus GC which was equipped with Supelcowax 10 fused silica capillary column (60m × 0.32mm × 0.25 μm film thickness) wall coated with polyethyleneglycerol. The scan detection method allowed the comparison of the spectrum from the chromatogram of volatile flavor compounds to those in data Wiley's base library. Among the volatile compounds collected by ether-hexane extraction method, the evolution of 20 main compounds, such as 9 esters (ethyl butyrate, isoamyl acetate, ethyl caproate, *n*-hexyl acetate, ethyl caprylate, ethyl caprate, diethyl succinate, ethyl hexadecanoate, 2-phenethyl acetate), 4 alcohols (3-methyl-1-butanol, 1-hexanol, 1-heptanol, benzoethanol), 4 ketones and acids (2-octanone, caproic acid, caprylic acid, capric acid), 2 furan and phenol (2,6-bis(1,1-dimethyl ethyl)phenol, 2,3-dihydrobenzofuran) were observed during alcohol fermentation and aging. The production of the esters during alcohol fermentation with *S. cerevisiae* was higher than those of *Sch. pombe*. The sensory scores of the aged wine samples in aroma, taste and overall acceptability were not significantly different ($p < 0.05$).

Key words : seibel grape must, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, volatile flavor compounds

포도주의 휘발성 향기성분은 포도주의 품질을 결정하는 중요한 요소로서 인식되어 왔으며 유럽이나 미국, 일본 등지에서는 이에 대한 연구가 활발하게 수행되어 왔다 [1-20, 24, 27, 30-34]. 포도주의 향을 일반적으로 세 가지 향으로 나눌 수 있는데 첫째는 포도 자체가 지니고 있는 향기와 둘째는 발효과정 중 효모에 의해서 생성되는 향, 셋째는 포도주가 숙성되면서 생성되는 향기로 이 세 가지 향이 복합적으로 작용하여 '부케(bouquet)'라는 용어로 포도주의 향기를 표현하게 된다. 발효과정 중 효모에 의해 합성되는 휘발성 향기성분으로는 volatile organic acid, aldehydes류, alcohol류, ester류가 있는데 이중 많은 부분을 fatty acid ester와 고급 알코올이 차지하고 있으며 포도주의 특유한 'fruity, floral'한 성질을 부여하게 된다[21, 31-33]. 효모에 의해 ester가 합성되는 기작은 Nordstrom[18, 19]이 설명하

였고 Shreier[28]가 정리하였다. 포도주의 휘발성 향기성분에 관한 현재까지의 연구를 살펴보면 ester의 형성에 효모의 종류, 발효온도, 포도즙의 조성, SO₂의 함량이 미치는 영향에 관한 연구[31, 33]와 휘발성 향기물질의 분석, 동정에 관한 연구 등[8, 13, 17, 26-36]이 있다. 최근 향기성분을 포집하고 분석하는 기술에 대한 연구가 두드러지게 발전하고 있는데 포도주의 향기 성분을 포집하기 위해 주로 사용되고 있는 방법으로는 유기용매를 이용한 추출방법 [28, 36]과 headspace에 있는 향기성분을 밀폐된 관을 통하여 질소나 헬륨과 같은 무취의 기체로 purging을 하여 acetone과 얼음, dry ice 등으로 싸여 있는 cold trap에서 향기성분을 포집하는 방법 [8, 17-24]. 그리고 초임계유체를 사용하여 특수한 향기성분을 분리하는 방법 등이 있다.

우리 나라에서는 포도주에 관한 연구로서 품종 선별에 대한 연구[14, 28, 37]와 양조 및 효모에 대한 연구[11, 12, 22, 29]들이 있으나 포도주를 선택하는 요소로 가장 중요한 역할을 하는 flavor에 관한 국내 연구는 거의 없는 실정이다. 백포도주의 flavor는 발효온도, 효모의 종류, 포도품종,

*Corresponding author
Tel. 82-32-340-3313, Fax. 82-32-340-3111
E-mail: verokoh@www.cuk.ac.kr

양조기술 등 매우 미묘하고 섬세한 요소에 의해 영향을 받기 때문에 flavor의 성질과 복합성을 규명하는데 많은 어려움이 있으며 flavor에 대한 기초연구 없는 포도주의 주질 개선은 어렵다고 생각되어 본 연구에서는 국내에서 수확한 양조용 백포도 (*seibel* 품종, *Vitis labrusca*)를 이용하여 *Saccharomyces cerevisiae*와 산도를 감산시키는 *Schizosaccharomyces pombe*로 12°C에서 발효시켰을 때 발효과정 및 저장 중에 생성되는 flavor의 종류와 양을 gas chromatography와 gas chromatography-mass spectrometer로 비교 분석하였다.

재료 및 방법

재료

*Saccharomyces cerevisiae*는 건조효모(Gist-brocades, France)를 사용하였으며, *Schizosaccharomyces pombe* (KCCM 32588, ATCC 16979, IFO 0358)는 한국미생물보존센터(KCCM)에서 분양받아 121°C에서 15분간 가압멸균한 YM 액체배지(Difco, U.S.A)에 접종하여 25°C에서 72시간 배양한 후 3회 계대배양한 것을 사용하였다. 발효효모들의 양조학적 특성을 조사하기 위하여 양조용 *seibel* 포도즙은 1996년 8월 23일 경북 (주)두산 백화 경산공장에서 공급받아 본 실험의 재료로 사용하였다.

Seibel 포도즙 발효

1996년도 여름에 수확한 *seibel*포도는 제경(destemming)과 파쇄(crushing)를 한 후 SO₂를 아황산(H₂SO₃, sulphurous acid 6%)의 형태로 50 ppm 첨가하였다. 착즙한 과즙에서 고형분(pomace, 粕)을 제거하기 위하여 원심분리하여 청징시킨 후 11%의 알코올을 얻기위해 당도가 20.0 Brix가 되도록 saccharose(Junsei chemical Co, Japan)로 보당(sugar addition)하였다. 포도즙의 총산도와 pH를 측정하였고[32], 준비된 포도즙 18 l를 각각 멸균한 750 ml, 350 ml 발효병에 나누어 담고 2.0 × 10⁶ CFU/ml의 효모를 접종하여 12°C의 통성 혐기성 조건하에서 발효를 실시하여 발효기간 동안 효모의 생균수를 측정하였다.

휘발성 향기성분 추출

Seibel 포도즙의 향기성분 분석은 포도원액을 발효기간 별로 나누어 실시하여 향기성분의 변화를 균주별, 기간별(대수기, 정상기, 사멸기)로 보고자 하였다. 발효액은 4°C에서 10,000 rpm으로 원심분리(Sorvall® RC 26 plus, Dupont, USA)하여 효모를 분리한다. 효모를 분리해낸 상층액 50 ml를 100 ml 분별깔대기에 넣고 여기에 internal standard인 2-octanol(100 mg/l, 50% ethanol) 1 ml와 4 ml의 ether과 hexane의 혼합용매(Junsci, Japan, 1:1, v/v)를 기하고 5분간 진탕하여 향기성분을 추출하였다. 이 과정을

3회 반복하여 얻은 추출액에 무수 황산나트륨(Na₂SO₄, Yakuri Pure Chemicals Co., Japan)를 0.5g 가하고 냉동고에서 6시간 방치하였다. 이렇게 탈수한 추출액을 실온에서 질소 기류하에 250 μl까지 농축한 후 300 μl glass cap tube(CROMATO®, USA)에 넣어 냉동고에서 저장하면서 분석에 사용하였으며 향기성분 추출 방법은 Fig. 1과 같다.

GC에 의한 휘발성 향기성분 분석

향기성분 분석에 사용한 GC는 Hewlett-packard 5890 II Plus였으며 column으로는 극성인 Supelcowax 10 fused silica capillary column (0.32 mm i.d., ×60 m in length, wall coated with polyethyleneglycol, film thickness 0.25 μm, Supelco™, Inc., USA)을 사용하였다. 이 때 injector와 detector ports의 온도는 각각 250°C 및 260°C였으며 column의 온도는 40°C에서 3분간 유지한 다음 230°C까지 3°C/min 속도로 올린 후 이 온도를 20분간 유지시켰다.

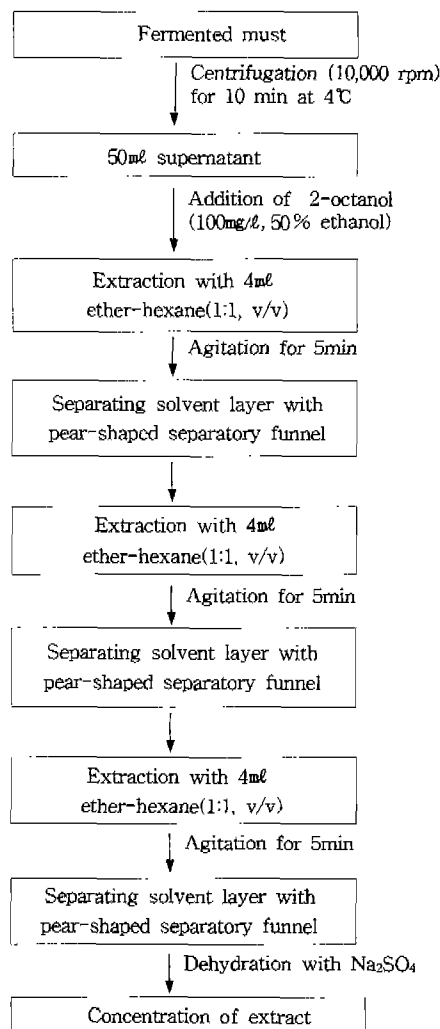


Fig. 1. Flow diagram of the solvent extraction procedure for the volatile flavor compounds.

Carrier gas로는 helium을 유속 1.5 ml/min 으로 사용하였으며 injector port에서의 split ratio은 1:50으로 조절하였다. Detector로서는 FID를 사용하였으며 이때 보충기체로서 질소를 사용하였다. 시료는 1 µl를 주입하였다. GC chromatogram에 나타난 화합물은 basic program이 내장된 integrator로부터 각각의 retention index(RI)를 구하여 화합물의 동정에 필요한 자료로 활용하였다.

GC/MS 에 의한 휘발성 향기성분 동정

Ether와 hexane의 혼합용매로 추출한 향기성분을 확인하기 위하여 GC/MS system을 사용하여 분석을 실시하였다. 사용한 GC의 조작조건은 위에서 설명한 바와 같으며 GC에서 MS로 시료를 도입시키기 위한 interface 온도는 200°C였다. MS는 Concept II(Kratos Analytical, Manchester, UK)였으며 시료의 이온화는 electron impact(EI) 법으로 행하였다. GC/MS 분석을 위한 조건으로 ionization voltage 70eV, mass range는 10-300m/e로 설정하고 온도 program 등 다른분석 조건들은 GC와 동일하게 하였다. 한편, GC의 검출기로 사용한 FID에서 얻어진 chromatogram과 MS에서 얻어진 total ion chromatogram을 상호비교하기 위한 표준물질로는 Sigma제품(Sigma Chemical Co., USA)과 Aldrich제품 (Aldrich Chemical Co., USA)을 사용하였으며, 먼저 표준물질을 GC에 주입하였을때 FID에서 얻어지는 chromatogram으로 부터 각각의 표준물질의 머무름시간(retention time)을 구하였다. FID에서 분리된 각 peak의 동정은 Wiley nbs mass spectral database version 3.60 (National Bureau of Standard, Washington, D.C., USA)을 사용하여 비교하였다. 포도즙 향기성분의 양적인 변화는 GC검출기로 사용된 FID의 response (area count)를 자동적분기(HP3396A, Hewlett-packard, USA)로 측정하고 절대적인 값으로 나타내었다. 이때 자동적분기의 조작 조건으로는 zero = 0, attenuation = 7, chart speed = 5cm/min, area rejection = 50,000, threshold = 5, peak width = 0.04로 하였다.

관능검사 및 통계처리

관능검사 경험이 있는 32명을 대상으로 백포도주의 기호도 조사를 하였다. 관능검사 요원으로 하여금 색, 향, 맛, 뒷맛, 전반적인 기호도를 9단계 기호척도법으로 평가 하였다. 평가시에 「대단히 나쁘다」는 1점, 「대단히 좋다」는 9점으로 하였다. 통계처리는 SAS(Statistical Analysis System)를 이용하여 Duncan의 다중비교법에 의해 각 항목의 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

알코올 발효 중 휘발성 향기성분의 동정

Seibel 포도즙은 당도가 13.0 brix, pH는 3.2, 총산도는 8.7 g/l이었다. 포도즙은 당도 20 brix가 되도록 보당한 후 *S. cerevisiae*, *Sch. pombe*를 2.0×10^6 cfu/ml로 접종하여 24일 동안 12°C에서 발효시켰다. 발효과정 중 효모의 생균수를 측정한 결과, *S. cerevisiae*는 4일째가 대수기로 5.0×10^7 cfu/ml, 정상기는 8일째로 4.7×10^8 cfu/ml, 사멸기는 24일째로 4.5×10^8 cfu/ml로 나타났으며, *Sch. pombe*는 *S. cerevisiae*의 생육 보다 느렸다. *S. cerevisiae*, *Sch. pombe*에 의해 발효된 seibel 포도즙을 대수기, 정상기, 사멸기에 채취하여 유기용매법을 이용하여 향기성분을 포집하였다. 포집된 향기성분을 농축한 다음 여과지에 적신 후 용매를 휘발시키고 냄새를 맡은 결과, 포도원액에서는 향이 매우 약하였으나 대수기, 정상기, 사멸기의 농축액에서는 과일향의 향기로운 냄새를 강하게 띠고 있음을 확인할 수 있었다. 이는 포도주의 발효과정 중 효모에 의해 여러 휘발성분이 생성되기 때문이며 유럽, 미국, 일본 등지의 여러 연구자들에 의해 연구가 되어왔다.

Fig. 2, 3, 4는 포도원액과 *S. cerevisiae*, *Sch. pombe*에 의해 발효된 대수기, 정상기, 사멸기의 seibel 포도즙을 diethyl ether와 hexane을 1:1 혼합한 유기용매로 추출한 다음 이를 GC로 분리한 chromatogram이다. 전체적으로 보아 머무름시간이 5분정도 경과할 때부터 여러 성분이 용출되기 시작하는 것을 알 수 있었고 머무름시간 60분대까지 향기 성분이 용출되어 유기용매 추출법이 비교적 비등점이 낮은 것부터 비등점이 높은 향기 성분을 포집하는데 효율적임을 알 수 있었다. 포도원액에서는 약 30여종의 향기 성분이 분리되었고 정상기, 사멸기에는 약 50여종의 향기 성분이 분리되었다.

한편 seibel 포도즙의 향기를 나타내는 향기 성분을 확인하기 위해 포집한 향기 성분을 GC/MS로 분석하여 mass spectrum을 얻어 이를 Wiley nbs library로 확인한 다음 이들 중 확인된 20종의 주요 향기성분 변화를 Table 1, 2에 나타내었다. Seibel 포도즙 발효과정 중 생성된 향기 성분으로 alcohol류 4종류, ketone 및 acid류 5종류, ester류 9

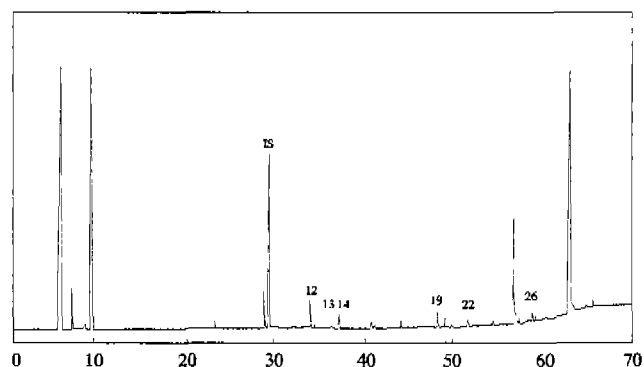


Fig. 2. GC chromatogram of the volatile flavor compounds on seibel grape must.

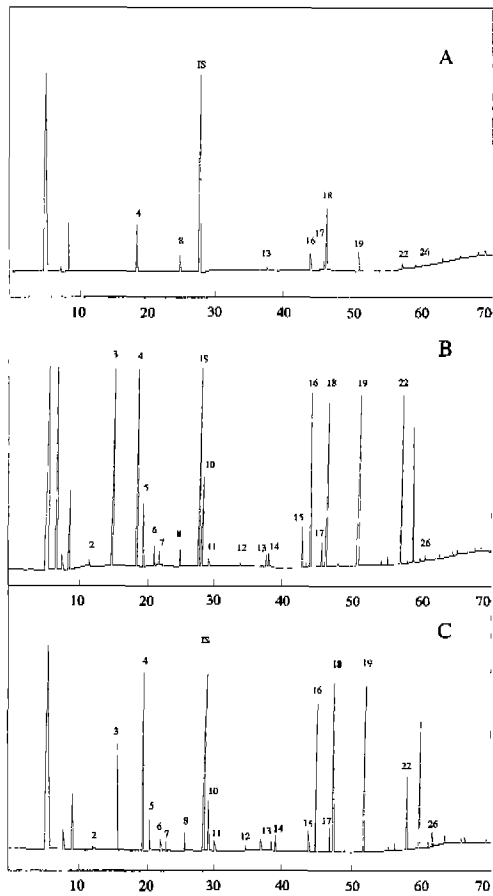


Fig. 3. GC chromatogram of the volatile flavor compounds on *seibel* grape must during alcohol fermentation with *S. cerevisiae*. A, Logarithmic phase; B, Stationary phase; C, Death phase.

종류, furan 및 phenol류 2종류 를 확인하여 관찰할 수 있었다.

Table 1은 *S. cerevisiae*에 의해 발효된 *seibel* 포도즙의 휘발성 향기성분 함량을 나타내었다. *Seibel* 포도즙의 총 휘발성 향기성분중 에스테르가 차지하는 양은 1.7%이며 대수기, 정상기, 사멸기에는 각각 1.3%, 18.7%, 6.1%를 차지하였다. 알코올류의 경우 대수기에는 11.8%, 정상기에는 45.2%, 사멸기에는 43.2%로써 에스테르와 알코올류는 발효 정상기에 가장 많은 함량을 보였다. Ketone 및 acid류는 발효 대수기, 정상기, 사멸기에 각각 7.3%, 33.9%, 28.3%로 역시 발효 정상기에 최대의 생성량을 보이고 있다.

Table 2는 *Sch. pombe*로 발효시킨 휘발성 향기성분 함량을 나타낸 것으로 에스테르가 차지하는 비율은 발효초기에 0.1%, 중기 1.4%, 말기 2.7%로 발효말기에 에스테르의 생성량이 많았다. 알코올류도 대수기, 정상기, 사멸기에 각각 16.7%, 26.1%, 32.7%로써 역시 사멸기에 가장 많이 생성되었다. *S. cerevisiae*는 발효 정상기에 가장 많은 휘발성 향기 성분이 생성되지만 *Sch. pombe*는 발효 사멸기에

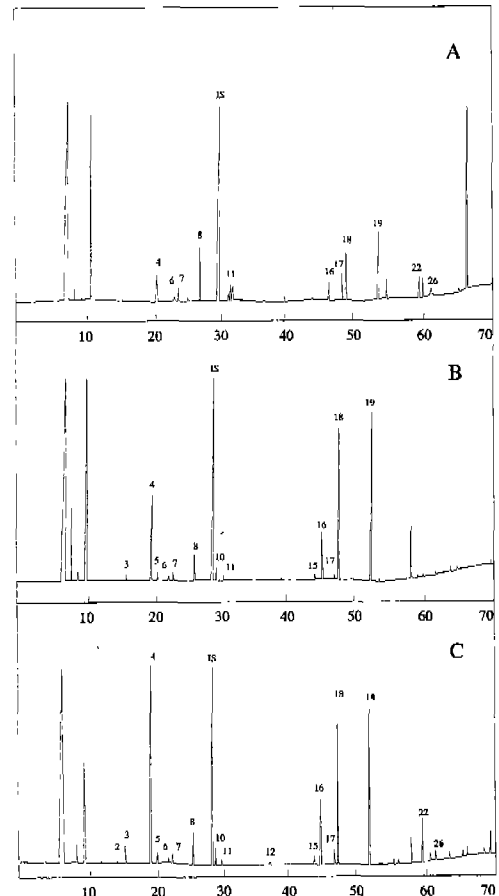


Fig. 4. GC chromatogram of the volatile flavor compounds on *seibel* grape must during alcohol fermentation with *Sch. pombe*. A, Logarithmic phase; B, Stationary phase; C, Death phase.

가장 많이 생성하였다.

Alcohol, aldehyde, ketone, acid류

Seibel 포도즙에 함유되어 있는 알코올 성분으로 1-hexanol, 1-heptanol, benzoethanol, 3-methyl 1-butanol의 변화를 관찰하였다. 이들 알코올성 수산기는 2중, 3중 결합이 있으면 향이 강하고 위치에 따라서도 향의 감지도 다르다고 하며 OH수가 많으면 향이 오히려 감소하고 방향족 알코올이 지방족 알코올보다 약하다고 한다[3]. 또한 *seibel* 포도즙에 존재하는 ketone류로 2-octanone와 acid류로는 caproic acid, caprylic acid, capric acid, lauric acid가 확인되었다. Caproic acid는 pungent 하고 caprylic acid는 butter의 향이 나며 capric acid는 phenolic의 향을 갖는다고 한다[23].

Ester류와 terpenoid류

Seibel 포도즙에 함유되어 있는 ester 성분으로 ethyl

Table 1. Changes of the volatile flavor compounds on *seibel* grape musts during alcohol fermentation with *S. cerevisiae* at 12°C

Peak No.	Compounds	Phase (Peak area %)			Identification	
		<i>Seibel</i> grape must	Logarithmic	Stationary		Death
Esters						
2	Ethyl butyrate	-	-	0.38	0.10	A,B
3	Isoamyl acetate	-	-	16.49	4.08	A,B
5	Ethyl caproate	-	-	0.59	0.58	A,B
6	<i>n</i> -Hexyl acetate	-	-	0.44	0.24	A,B
10	Ethyl caprylate	-	-	0.83	0.43	A,B
12	Ethyl caprate	1.33	-	-	0.24	A,B
13	Diethyl succinate	0.22	1.32	-	-	A,B
14	Ethyl hexadecanoate	1.11	-	-	-	B
15	2-Phenethyl acetate	-	-	0.41	0.41	A,B
Alcohols						
4	3-Methyl-1-butanol	-	7.81	21.21	21.72	B
8	1-Hexanol	-	0.42	6.13	1.74	B
11	1-Heptanol	-	-	0.31	0.24	B
18	Benzoethanol	-	3.52	17.51	19.52	B
Ketones and Acids						
7	2-Octanone	-	-	-	0.20	B
16	Caproic acid	-	2.92	6.52	4.78	B
19	Caprylic acid	1.03	4.23	18.12	20.0	B
22	Capric acid	1.24	0.15	9.31	3.12	B
Furans and Phenols						
17	2,6-bis(1,1-dimethyl ethyl)phenol	-	3.42	1.01	0.44	B
26	2,3-Dihydro benzofuran	0.12	6.22	0.55	0.35	B

A, Retention time; B, Mass spectrometer.

butyrate, isoamyl acetate, ethyl caproate, *n*-hexyl acetate, ethyl caprate, ethyl caprylate, ethyl hexadecanoate, 2-phenethyl acetate, diethyl succinate의 9종류가 확인되었다. Ethyl butyrate는 사과향의 중요한 성분이고 ethyl caproate는 딸기향을 갖고 있다고 한다[23]. Ethyl caprylate와 ethyl caproate는 꽃향을 가지며 2-phenethyl acetate는 포도주향(wine-like)을 갖는 물질로 알려져 있다. 발효하는 동안 효모에 의해 합성되는 휘발성 대사물은 매우 다양한데 이 중 많은 부분을 fatty acid ester가 차지하고 있음을 알 수 있었다. 효모에 의해 생성되는 에스테르는 크게 끓는점을 기준으로 light, middle, heavy의 3부분으로 나눌 수 있는데 light fraction에는 isoamyl alcohol, ethyl, isobutyl, isoamyl acetate가 있으며 middle fraction에는 ethyl caproate, phenethyl acetate, ethyl caprylate, ethyl caprate 등이 있으며, heavy fraction의 ethyl fraction에는 ethyl myristate, ethyl palmitate, ethyl palmitoate가 있다. 그 중 middle fraction은 fruit ester라 불리며 포도주의 향에 매우 중요한 역할을 하는 에스테르로 알려져 있다[33].

발효 대수기에는 *S. cerevisiae* 만이, 정상기에는 모든 균주가 6~7종류의 에스테르를 생성하기 시작하였으며 에스테르 생성량에 있어서 2가지 균주 중 *S. cerevisiae*가 *Sch.*

*pombe*보다 에스테르량이 다소 많았다. 또한 발효 기간별로 에스테르 생성량을 비교해 보면 *S. cerevisiae*는 정상기에 18.7%, *Sch. pombe*는 사멸기에 1.4%의 최대치를 각각 나타내었다. 두 균주 모두 발효 정상기에 에스테르의 생성이 서서히 증가하였는데 Isoamyl acetate가 가장 풍부하게 존재하는 에스테르로 나타났다.

Nordstrom[19]에 의하면 포도주가 발효되는 동안 합성되는 에스테르는 포도주에 함유되어 있는 acetic acid와 ethanol의 esterification을 통해서가 아니라 yeast cell 안에서 esterification이 일어나 합성되기 때문에 효모의 종류에 따라 에스테르 합성능력이 크게 좌우된다고 한다[31]. 즉, ester의 합성은 포도주의 acid와 알코올의 농도보다도 ATP, acetyl coenzyme A 등 ester의 형성 enzyme system 관련 유무에 영향을 더 받는다고 할 수 있다.

Daudt와 Ough[7]는 발효 중 에스테르와 고급 알코올 함량이 효모의 종에 따라 그 생성량과 조성에 큰 차이가 있다고 하였으며, Cottrell과 Mcmellan[6]은 발효온도가 낮을수록 ethyl acetate를 많이 함유하고 품종에 따라 차이가 있으며 특히 Chardonnay 품종이 white riesling 등의 품종과 비교해서 2배정도 높다고 보고하였다. Goat와 Ough[9]은 불용성 고형분 함량이 증가함에 따라 isobutyl alcohol,

Table 2. Changes of the volatile flavor compounds on seibel grape musts during alcohol fermentation with *Sch. pombe* at 12°C

Peak No.	Compounds	Phase (Peak area %)				Identification
		<i>Seibel</i> grape must	Logarithmic	Stationary	Death	
Esters						
2	Ethyl butyrate	-	-	-	0.14	A, B
3	Isoamyl acetate	-	-	0.24	0.71	A, B
5	Ethyl caproate	-	-	0.10	0.63	A, B
6	<i>n</i> -Hexyl acetate	-	0.10	0.12	0.27	A, B
10	Ethyl caprylate	-	-	0.63	0.73	A, B
12	Ethyl caprate	1.33	-	-	0.08	A, B
13	Diethyl succinate	0.22	-	0.15	-	A, B
14	Ethyl hexadecanoate	1.11	-	-	-	B
15	2-Phenethyl acetate	-	-	0.13	0.18	A, B
Alcohols						
4	3-Methyl-1-butanol	-	4.24	13.61	19.74	B
8	1-Hexanol	-	6.12	2.70	2.46	B
11	1-Heptanol	-	0.42	0.28	0.38	B
18	Benzoethanol	-	5.94	9.50	10.12	B
Ketones and Acids						
7	2-Octanone	-	0.39	0.47	0.43	B
16	Caproic acid	-	3.53	3.67	3.88	B
19	Caprylic acid	1.03	6.18	10.0	9.60	B
22	Capric acid	1.24	2.20	-	1.14	B
Furans and Phenols						
17	2,6-bis(1,1-dimethyl ethyl)phenol	-	0.63	1.09	0.77	B
26	2,3-Dihydro benzofuran	0.12	0.22	-	0.67	B

A, Retention time; B, Mass spectrometer.

Table 3. Changes of the ester contents on seibel grape must with different yeast strains during alcohol fermentation at 12°C (mg/l)

Yeast strain	EB	IA	ECO	HA	ECL	ECR	PA	DS
Grape must	-	-	-	-	-	1.0	1.3	-
Logarithmic phase								
<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	-	-	-	4.2
<i>Sch. pombe</i>	-	-	-	1.2	-	-	-	-
Stationary phase								
<i>S. cerevisiae</i>	24.8	38.9	84	33.6	87.0	-	33.4	-
<i>Sch. pombe</i>	-	3.5	3.2	2.3	1.7	-	1.3	-
Death phase								
<i>S. cerevisiae</i>	45.0	56.8	3.0	5.9	11.7	21.8	4.3	-
<i>Sch. pombe</i>	18.4	9.64	48.2	19.8	40.4	7.6	15.6	-

EB, Ethyl butyrate; IA, Isoamyl acetate; ECO, Ethyl caproate; HA, *n*-Hexyl acetate; ECL, Ethyl caprylate; ECR, Ethyl caprate; PA, 2-phenethyl acetate; DS, Diethyl succinate.

active amylalcohol, isoamylalcohol의 함량이 증가하는 반면 *n*-propyl alcohol과 휘발성 ester 함량은 감소한다고 하였다. 효모 종류이외에도 에스테르의 형성은 발효 온도, SO₂ 함량, 포도즙종 등에 의해서도 영향을 받는다고 한다 [7].

Furan, phenol류 및 기타

Seibel 포도즙에서 분리된 furan 유도체로는 2, 3-dihydro

benzofuran과 phenol류로는 2,6-bis(1,1-dimethyl ethyl) phenol이 분리되었는데 furan 유도체는 식품의 향기 성분으로 매우 중요한 화합물로 알려져 있고 그 향기 특성은 달콤한 향기라고 하며 또한 phenol류는 혼연취를 나타내는 성분이라고 밝혀져 있다[23]. 그러나 아직 포도주의 휘발성분의 동정이 완벽하게 이루어지지 않아서 동정된 성분과 조성만으로 균주들이 생성하는 향기성분의 특성을 구별하기는 어

Table 4. Changes of the ester contents on *seibel* grape wine with or without yeast cell during aging at 12°C (mg/l)

Treatment		EB	IA	ECO	HA	ECL	ECR	PA	DS
<i>S. cerevisiae</i>	Without	2.4	38.0	8.1	2.9	9.7	2.5	2.4	2.0
	With	2.2	32.8	7.5	2.4	9.1	2.8	-	2.3
<i>Sch. pombe</i>	Without	1.5	13.2	6.1	1.9	6.5	2.1	1.9	0.6
	With	1.6	14.8	6.1	2.5	8.0	2.0	2.3	1.1

EB, Ethyl butyrate; IA, Isoamyl acetate; ECO, Ethyl caproate; HA, *n*-Hexyl acetate; ECL, Ethyl caprylate; ECR, Ethyl caprate; PA, 2-phenethyl acetate; DS, Diethyl succinate.

Table 5. Mean scores of the sensory evaluation data on aged wines

Treatment	Characteristics					
	Color	Aroma	Taste	After taste	Overall acceptability	
<i>S. cerevisiae</i>	Without yeast	6.29 ^d	6.43 ^a	5.71 ^d	5.57 ^d	5.43 ^{ab}
	With yeast	7.14 ^a	6.29 ^a	5.14 ^a	5.57 ^b	5.71 ^{ab}
<i>Sch. pombe</i>	Without yeast	6.88 ^a	6.13 ^a	5.25 ^a	5.75 ^a	5.25 ^{ab}
	With yeast	6.25 ^d	6.50 ^a	5.75 ^a	5.50 ^a	5.50 ^{ab}

1) Mean score of 32 assessors. Mean within columns followed by same superscripts are not significantly different ($p < 0.05$). 2) Sensory characteristics were rated on 9-point scale : like extremely(9), dislike extremely(1). 3) Significant difference at 5% level by Duncan's multiple rang test.

려우며 미확인된 성분의 동정을 위한 연구가 더욱 진행되어야 할 것이다.

저장 중 Esters 향기성분의 변화

Seibel 포도즙을 두 균주로 발효시켰을 때 에스터의 생성량을 균주별, 발효기 간별로 나타내었다. 총 9종류의 에스터가 생성되었는데 발효 초기에는 *S. cerevisiae*는 발효중기에 6~7종류의 에스터를 생성하기 시작하였으며 에스터 생성량에 있어서 *S. cerevisiae*가 *Sch. pombe* 보다 에스터량이 다소 많았다. 또한 발효 기간별로 에스터 생성량을 비교해 보면 3가지 균주 모두 사멸기에 최대의 생성량을 보였다. *Seibel* 포도즙에는 ethyl caprate와 2-phenethyl acetate가 각각 1.0 mg/l와 1.3 mg/l가 함유되었으나 대수기에서는 오직 *S. cerevisiae*만이 diethyl succinate를 4.2 mg/l 생성할 뿐이었다. 정상기는 에스터의 생성이 서서히 증가하였는데 isoamyl acetate가 가장 풍부하게 존재하는 에스터로 나타났다.

에스터의 생합성 과정을 보면 우선 α -keto acid가 산화적 decarboxylation 과정을 거쳐 acyl coenzyme A를 형성하게 된다. Acyl group의 alcoholysis에 의한 acyl coenzyme A의 절단은 ester의 생성을 가져오게 된다. 이는 에스터의 합성이 포도주에 함유되어 있는 acetic acid와 ethanol의 esterification을 통해서가 아니라 yeast cell 안에서 esterification이 일어나 합성된다는 Nordstrom의 보고와도 일치하였다[19]. Table 3. 4에서 발효과정 중 생성되는 에스터의 양과 저장 중의 에스터의 양을 비교해 볼 때 저

장한 *seibel* 포도즙에 함유되어 있는 에스터의 양이 급격하게 감소되었음을 확인할 수 있었다. 이는 대부분의 에스터가 C5~C8의 탄소수를 가지는 저분자 휘발성 에스터이므로 저장 중에 상당량의 에스터가 휘발되기 때문으로 보인다. Chisholm 등[8]은 백포도주를 오랜기간 저장하게 되면 효모에 의해 생산된 acetate가 서서히 가수분해되어 fruitness가 감소할 뿐만 아니라 acetate가 acetic acid로 변화하여 백포도주의 향에 영향을 준다고 보고하였다.

관능검사

Koh[11]등은 *S. cerevisiae*, *Sch. pombe* 균주로 알코올 발효 후 포도주 관능검사에서 맛의 경우, *Sch. pombe*가 *S. cerevisiae*보다 좋다고 하였으며 향, 뒷맛, 종합적인 평가는 두 균주 사이에 유의한 차이가 없다고 보고하였다. Table 5는 *S. cerevisiae*, *Sch. pombe* 균주로 발효를 마친 포도주를 2주간 12°C에서 균주별, 효모분리 유무를 다르게 저장한 후 관능검사를 실시한 결과이다. *S. cerevisiae*, *Sch. pombe*의 균주, 효모분리 유무를 달리한 포도주 모두 맛과 뒷맛, 향, 종합적인 평가에서 유의한 차이를 보이지 않았다 ($p > 0.05$).

요 약

본 연구는 국내에서 수확한 양조용 백포도(*seibel* 품종)을 이용하여 *S. cerevisiae*, *Sch. pombe*를 *seibel* 포도즙에 접종하여 12°C에서 발효시켰을 때 발효과정과 숙성 중에 생

성되는 휘발성 향기성분의 종류와 에스터의 양을 GC와 GC/MS를 이용하여 동정하였다. *S. cerevisiae*, *Sch. pombe*에 의해 발효된 seibel 포도즙을 대수기, 정상기, 사멸기로 나누어 향기성분을 ether-hexane 으로 추출하여 GC로 분석한 결과 약 50여종의 향기성분이 분리되었고, GC/MS를 이용하여 mass spectrum을 얻어 Wiley library에 의해 확인된 주요 20종의 향기성분으로, alcohol류 4종, ketone류와 acid류 5종, ester류 9종, furan 및 phenol류 2종의 향기성분의 변화를 관찰하였다. *S. cerevisiae*는 *Sch. pombe*보다 알코올 발효 중 에스테르의 향기성분 함량이 높았으며, 정상기에서 isoamyl alcohol, ethylcaproate, *n*-hexyl acetate, ethylcaprylate와 2-phenylacetate는 최대의 함량을 나타내었다. 저장 중에는 효모와 분리시키지 않고 2주간 12°C에서 저장한 것과 효모를 분리 후 저장시킨 것의 에스테르 향기성분을 비교한 결과 큰 변화는 없었으며, 관능검사 결과에서도 효모분리 유무에 따른 저장 중 맛, 향기, 종합적인 평가에서 유의한 차이는 나타나지 않았다 ($p < 0.05$).

REFERENCES

1. Anocibar Beloqui, A., P. Duedes de Pinho, and A. Bertrand. 1995. Bis(2-Hydroxyethyl) disulfide, a new sulfur compound found in wine-Its influence in wine aroma. *Am. J. Enol. Vitic.* **46**: 84-87.
2. Atlas, R. M., L. C. Parks, and A. E. Brown. 1995. *Laboratory Manual of Experimental Microbiology*. Mosby-Year Book, Inc, St. Louis, USA.
3. Baumes, R., R. Cordonnier, S. Nitz, and F. Drawert. 1986. Identification and determination of volatile constituents in wines from different vine cultivars. *J. Sci. Food Agric.* **37**: 927-932.
4. Cabaroglu, T., A. Canbas, R. Baumes, C. Bayonove, J.P. Lcpoutre, and Z. Gunata. 1997. Aroma composition of a white wine of *Vitis vinifera* L. cv. Emir as affected by skin contact. *J. Food Sci.* **62**: 680-683.
5. Chisholm, M. G., L. A. Guiher, and S. M. Zaczkiwicz. 1995. Aroma characteristics of aged vidal blanc wine. *Am. J. Enol. Vitic.* **46**: 56-62.
6. Cottrell, T. H. F. and M. R. McMellan. 1986. The effect of fermentation temperature on chemical and sensory characteristics of wines from seven white grape cultivars growth in New York State. *Am. J. Enol. Vitic.* **37**: 190-195.
7. Daudt, C. E. and C. S. Ough. 1973. Variations in some volatile acetate esters formed during grape juice fermentation-Effects of fermentation temperature, SO₂, yeast strain, and grape variety. *Am. J. Enol. Vitic.* **24**: 130-135.
8. Ferreiro, V., A. Rapp, J. F. Cacho, H. Hastrich, and I. Yavas. 1993. Fast and quantitative determination with Freon 113. *J. Agric. Food Chem.* **41**: 1413-1420.
9. Groat, M. and C. S. Ough. 1978. Effects of insoluble solids added to clarified musts on fermentation red wine composition and wine quality. *Am. J. Enol. Vitic.* **46**: 112-117.
10. Killian, E. and C.S. Ough. 1979. Fermentation esters - Formation and retention as affected by fermentation temperature. *Am. J. Enol. Vitic.* **24**: 301-305.
11. Koh, K. H. and W. Y. Chang. 1998. Changes of chemical components during seibel white grape must fermentation by different yeast strains. *Korean J. Food Sci. Technol.* **30**: 487-493.
12. Koh, K. H., W. Y. Chang, and K. L. Seo. 1998. The effect of deacidification on synthetic grape must with *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Natural Science* **19**: 87-97.
13. Kotormán, M., M. L. Simon, and B. Szajáni. 1991. Application of flow injection system in wine analysis. *J. Agric. Food Chem.* **39**: 909-910.
14. Lee, K. Y., J. C. Kim, J. C. Lee, and K. H. Yun. 1966. Characteristics of seven grape varieties selected as recommendable in Korea. *Nongsa Sihum Yangu Bogo* **9**: 137-143.
15. Lee, Y. S., K. P. Lee, and J. S. Choi. 1998. Volatile compounds of sparkling wine using immobilized yeast. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **27**: 24-28.
16. Lema, C., C. Garcia-Jares, I. Orriols, and L. Angulo. 1996. Contribution of *Sacchromyces* and non-*Saccharomyces* populations to the production of some components of Albariño wine aroma. *Am. J. Enol. Vitic.* **47**: 206-216.
17. Lopez, R. M., L. M. Libbey, B. T. Watson, and M. R. McDaniel. 1992. Odor analysis of Pinot Noir wines from grapes of different maturities by a gas chromatography olfactometry technique (Osme). *J. Food Sci.* **57**: 985-1019.
18. Nordstrom, K. 1964. Formation of esters from acids by brewer's yeast. V. Effect of some vitamins and mineral nutrients. *J. Inst. Brew.* **70**: 209-221.
19. Nordstrom, K. 1964. Formation of esters from acids by brewer's yeast. II. Formation from lower fatty acids. *J. Inst. Brew.* **70**: 42-55.
20. Nykänen, L. and I. Nykönen. 1977. Production of esters by different yeast strains in sugar fermentation. *J. Inst. Brew.* **83**: 30-31.
21. Nykänen, L., I. Nykänen, and H. Suomalainen. 1977. Distribution of esters produced during sugar fermentation between the yeast cell and the medium. *J. Inst. Brew.* **83**: 32-34.
22. Park, Y. H. 1975. Studies on the grape variety and the selection of yeast strain for wine-making in Korea. *J. Korean Agricultural Chemical Society* **18**: 219-227.
23. Peynaud, E. 1980. *Le goût du vin*. Bordas, Paris, France.
24. Presa-Owens, C. and A. C. Noble. 1995. Descriptive analysis of three white wine varieties from Penedès. *Am. J. Enol. Vitic.* **46**: 5-9.
25. Presa-Owens, C., M. Lamuela-Raventos, S. Buxaderas, and M. C. Torre-Boronat. 1995. Characterization of macabeo, xarel.lo, and parellada white wines from the Penedès region. *Am. J. Enol. Vitic.* **46**: 529-541.
26. Salinas, M. R., G. L. Alonso, and F. J. Esteban. 1994. Adsorption-thermal desorption-gas chromatography applied to the determination of wine aromas. *J. Agric. Food Chem.*

- 42: 1328–1331.
27. Salinas, M. R., G. L. Alonso, G. Navarro, F. Pardo, J. Jimeno, and D. Huerta. 1996. Evolution of the aromatic composition of wines undergoing carbonic maceration under different aging conditions. *Am. J. Enol. Vitic.* **47**: 134–144.
28. Schreier, P., F. Drawert, and A. Junker. 1976. Identification of volatile constituents from grapes. *J. Agric. Food Chem.* **24**: 331–336.
29. Shimoda, M., T. Shibamoto, and A. C. Noble. 1993. Evaluation of headspace volatiles of carbernet sauvignon wines samples by an on-column method. *J. Agric. Food Chem.* **41**: 1664–1668.
30. Shindo, S., J. Murakami, and S. Koshino. 1992. Control of acetate ester formation during alcohol fermentation with immobilized yeast. *J. Ferment. Bioeng.* **73**: 370–374.
31. Soles, R. M., C. S. Ough, and R. E. Kunkee. 1982. Ester concentration differences in wine fermentation by various species and strains of yeasts. *Am. J. Enol. Vitic.* **33**: 94–98.
32. Suomalainen, H. 1971. Yeast and its effect on the flavour of alcoholic beverages. *J. Inst. Brew.* **77**: 164–176.
33. Suomalainen, H. and M. Lehtonen. 1978. The production of aroma compound by yeast. *J. Inst. Brew.* **85**: 149–156.
34. Towey, J. P. and A. L. Waterhouse. 1996. The extraction of volatile compounds from French and American oak barrels in chardonnay during three successive vintages. *Am. J. Enol. Vitic.* **47**: 163–172.
35. Villén, J., F. J. Senor ns, G. Reglero, and M. Herraiz. 1995. Analysis of wine aroma by direct injection in gas chromatography without previous extraction. *J. Agric. Food Chem.* **43**: 717–722.
36. Williams, A. A. and O. G. Tuckn tt. 1973. The selective extraction of aroma components from alcoholic distillates. *J. Sci. Food Agric.* **24**: 863–871.
37. Yoo, J. Y., H. M. Seog, D.H. Shin, and B. Y. Min. 1984. Enological characteristics of Korcan grapes and quality evaluation of their wine. *Korean J. Appl. Microiol. Bioeng.* **12**: 185–190.
38. Zoccklein, B. W., K. C. Fugelsang, B. H. Gump, and F. S. Nury. 1995. *Wine Analysis and Production*. Champman and Hall Publisher, USA.

(Received August 28, 1999)