

*Saccharomyces bayanus*에 의한 Glucose 용액의 발효중 생성된 휘발성 성분과 저장중 이 성분들의 분석

1. 중성분획

정 속 현

동서공파대학교 식품공학과

Analysis of Volatile Compounds, Produced in a Glucose Solution Fermented by *Saccharomyces bayanus*, during Fermentation and Conservation of Fermented Solution

1. Neutral Fraction

Sook-Hyun Chung

Dept. of Food Engineering, Dongseo University, Pusan 610-010, Korea

Abstract

Twenty esters, 14 alcohols, 5 aldehydes, 5 ketones, 5 lactones, 2 S-containing compounds and 1 hydrocarbon are identified by GC-MS from volatile compounds in a glucose solution containing Yeast-Carbon-Base medium fermented for 64 hrs by *Saccharomyces bayanus* at pH 3.5, 25°C, 400rpm and 35L/h of aeration for 24hrs. Under the different conditions of conservation (1~4), ethyl 2-hydroxy-4-methylpentanoate, ethyl succinate, nonanol and phenylacetaldehyde are produced during conservation of fermented solution. 17 esters increased during conservation at 13°C for 12 weeks and the increase of ethyl 9-hexadecenoate is important among 13 esters increased during conservation at 35°C for 24hrs. During conservation, aldehydes increased at 35°C, but decreased at 13°C and the great increase of isobutanol, benzaldehyde and phenylacetaldehyde is observed at 35°C. Alcohol and lactones increased but ketones decreased during conservation.

Key words : *Saccharomyces bayanus* CBS-7045, alcohol fermentation, volatile compounds

서 론

Alcohol 음료 중에 나타나는 향기는 3단계의 과정을 통하여 형성된 것이라고 할 수 있다. 그 첫째는 alcohol 음료의 원료 그 자체에서 유래되는 향이고, 둘째는 당이 효모의 작용으로 발효라는 과정을 거쳐 alcohol을 생성하는 과정에서 부대 산물로서 나타나는 것이다. 셋째는 alcohol 음료의 숙성 중에 발생하는 여러 화학적, 생화학적 반응에 의해 나타나게 된다. 이 중에서 두번째 즉 발효과정에서 형성되는 향은 사용된 효모의 종류(1,2)나 발효방법(3,4) 등에 의해 크게 좌우될 수 있고, 이러한 이유로 여러 가지 새로운 기술이 응용될 수 있다. 이를 위한 새로운 기술의 도입으로 alcohol 생산력은 낮지만 향기 성분의 생성이 높은 *Saccharomyces cerevi-*

siae MF12와 alcohol에 대한 내성이 높아 고농도의 alcohol 생산은 가능하지만 향기 성분의 생산이 뒤떨어지는 *Saccharomyces cerevisiae* V11으로 유전자 재조합 기술에 의한 새로운 균종을 개발하려는 시도가 프랑스와 호주의 포도주 연구소에서 공동으로 진행중이다. 또한 "CO₂ maceration을 이용한 포도주 발효법" (5)이 개발되어 적용단계에 있다. 이 발효법은 포도주의 발효에서 효모를 이용한 alcohol 발효가 진행되기 전에 포도를 CO₂에 침지시켜 포도 중의 여러 성분 특히 아미노산의 용출을 강화하며, CO₂로 조성된 혐기적 상태에서 포도 자체의 효소에 의한 반응이 진행되어 소량의 alcohol 생성과 아미노산에서 유래되는 많은 방향성 성분을 생성할 수 있는 방법이다(6). 발효과정에서 형성된 성분은 주로 ester류와 alcohol류로 alcohol 음료에서는 그 함량

이나 종류에 있어서 다른 어느 과정의 향기 보다도 중요한 위치를 차지한다. 포도주의 경우를 살펴보면 포도즙에서는 대략 0.1mg/kg의 수준에 지나지 않던 고급 alcohol의 함량이 발효중 크게 증대되어 1L당 몇 백mg 정도로 증가된다고 보고되고 있다(7). 모든 alcohol 음료에서 고급 alcohol은 유리된 형태 혹은 지방산의 ester화 형태로서 향기를 형성하는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(8,9). 그리고 발효에 사용된 효모의 종류가 이러한 ester의 함량에 큰 영향을 미친다는 보고(10-12)가 많이되어 있다. Alcohol 음료는 이와 같이 기본적인 원료의 품질이나 발효과정에 따라 형성된 향기 성분들이 숙성 중에 서로 조화를 이루어 그 품질을 개선하는데 크게 기여한다. 이때 숙성과정의 조건 즉 온도, 기간, 효모의 첨가 여부 등이 향기 성분의 생성에 중요한 요인이 되고, 동시에 발효 직후 용액 중에 존재하는 휘발성 성분의 함량도 저장 중 향기 성분의 변화에 대단히 크게 영향을 끼친다고 여러 보고(13-15)에서 발표되었다. 본 연구는 효모에 의한 glucose용액의 alcohol 발효에 의하여 생성된 휘발성 성분의 확인과 이와 같은 model alcohol 발효액에 효모를 첨가하여 서로 다른 온도의 조건에서 저장하는 중에 발생하는 휘발성 성분의 변화를 실험하여 alcohol 음료의 숙성 조건을 개선하는데 필요한 기초 자료를 얻기 위하여 glucose용액에 *Saccharomyces bayanus*를 접종하여 발효시킨 alcohol용액과 이를 저장시키면서 휘발성 성분의 변화를 실험한 결과이다.

재료 및 방법

시료제조

Glucose용액(170g/L)에 Yeast-Carbon-Base(Difco, 11.7 g/L)배지를 첨가하여 nitrogen-free glucose용액으로 준비하였다. 20L의 BIOLAFITE 발효조에 미리 준비된 15L의 glucose용액에 30°C에서 30분간 활성화시킨 *Saccharomyces bayanus* CBS-7045(1NRA)를 300mg/L의 농도로 접종하여 발효시켰다. *Saccharomyces bayanus*는 dry active 타입으로 약 2.5×10^7 cell/g의 분말 상태다. 발효의 조건은 pH 3.5, 온도 25°C, 진탕속도 400rpm, 그리고 발효 초기 24시간 동안만 36L/hr으로 통기시켰다. 발효과정은 glucose 감소량(비중계, Mettler/Paar DMA 46, USA)과 biomass 증가량(O.D. at 620nm)의 측정으로 확인하여 64시간으로 발효를 완료시켰다. 완료된 발효액은 4개의 삼각플라스크에 분할하고, 그 중 하나는 시료 1로 하여 즉시 휘발성 성분 추출에 사용하고, 나머지 3

개의 삼각플라스크는 서로 다른 조건에서 저장하였다. 시료 2는 25°C에서 6주간, 시료 3은 13°C에서 12주간, 그리고 시료 4는 35°C에서 24시간 저장하였다. 이렇게 저장된 시료를 휘발성 성분 분석용의 시료(duplicate)로 사용하였다.

휘발성성분 추출

시료 1~4를 매회 3L씩 취하여 0.94mg의 methyl decanoate를 내부 표준물질로 첨가하고, 함황성분 분석을 위한 내부 표준물질로 4-methylthio-2-pentanone을 0.273 mg 첨가하였다. 이렇게 준비된 용액은 실험실에서 재증류한 Freon 11(ATOCHEM) 300ml로서 continuous liquid/liquid extractor를 이용하여 저온실($13 \pm 1^\circ\text{C}$)에서 24시간 동안 추출하였고, 추출된 유기용매 분획을 acidic fraction과 neutral fraction으로 분리하여 약 390ml의 neutral fraction 유기용매 분획을 얻었다(Fig. 1). 이 유기용매 분획을 농축 과정 중 volume의 변화에 따라 크기가 서로 다른 4단계 DUFTON type의 농축관을 이용하여 최종 volume 100 μl 까지 농축하였다. 사용된 농축관의 크기는 Table 1에 설명하였다.

GC/MS 분석과 휘발성성분의 동정

추출 농축액 1 μl 를 DB-5 capillary column(60m \times 0.25 mm, 0.25mm film thickness : J & W scientific, Inc. CA. USA)에 장착된 GC-MS(GIRDEL 310, NERMAG 10-10, Fr.)에 주입하여 분석하였다. 오븐 온도는 30°C에서 3분간 머문 후 220°C까지 2°C/min으로 승온시켜 20분간 머물었다. MS 조건은 ion source 온도, 250°C; ionization energy, 70eV; mass range, 25~300a.m.u; scan rate, 0.8/sec로 하였다. 각 성분들은 E.P.A.-N.I.H. library data를 NERMAG SIDAR 111B System을 이용하여 자동 검색하였고, 동시에 표준품과의 retention index로서 확인하였다. 사용된 표준품 중 γ -nonalactone, γ -decalactone, δ -decalactone, δ -dodecalactone은 Aldrich(USA), 그리고 methanethiol acetate, 2-methyltetrahydrothiophenone-3은 Pfaltz & Bauer(USA)의 제품이었다. 그 외의 사용된 표준품은 Fluka(Switzerland) 제품이었다. 휘발성 성분의 동정에서 표준품의 사용 여부는 Table 2에 표시하였다. 함황성분의 분석은 GIRDEL 300GC(DELSEI, Fr.)에 FPD(Model 100AT, Melody Lab. Inc., USA)를 이용하였다. 각 성분의 함량은 내부 표준물질에 대한 상대적 면적 비로 계산하였다. 함황물질의 함량은 내부 표준물질에 대한 상대적 높이 비로 계산하였다(16,17).

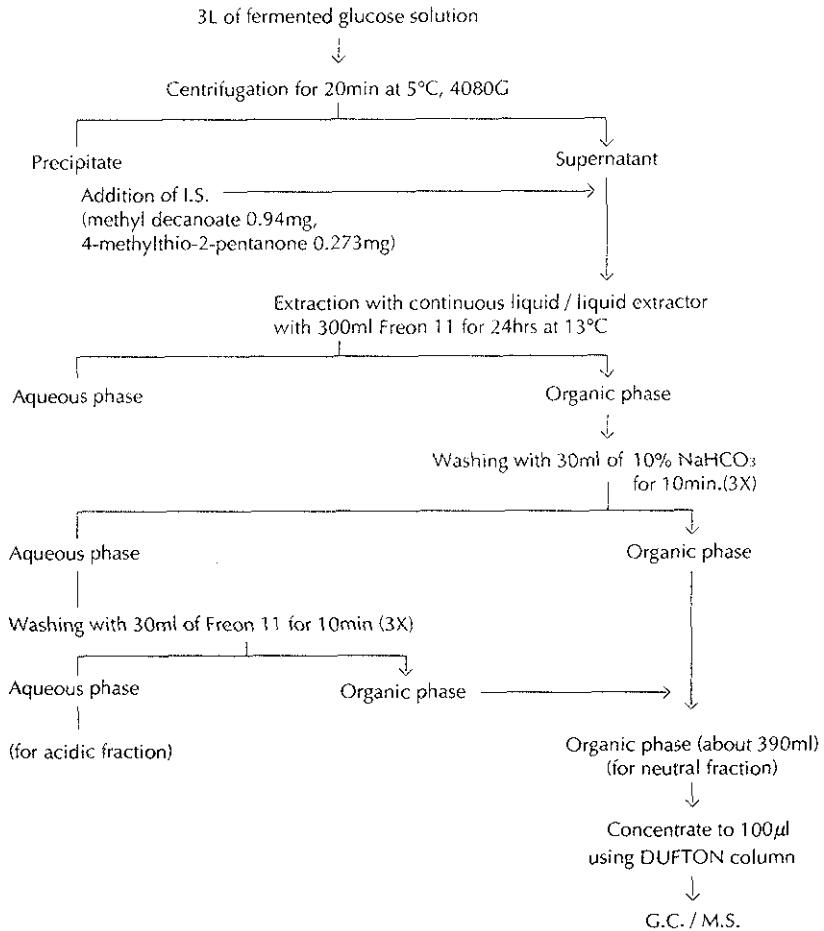


Fig. 1. Isolation procedure of volatile concentrates.

Table 1. Description of used DUFTON columns

	1st step ¹⁾	2nd step ²⁾	3rd step ²⁾	4th step ²⁾
Length of column (cm)	30	30	20	15
Material of spiral	glass	nickel	nickel	nickel
Diameter of spiral (mm)	2.5	0.8	0.6	0.4
Diameter of central glass (mm)	15	8	3	1.9
I.D. of glass tube (mm)	20	10	4.3	2.8
Final vol. to concentrate (ml)	100	10	0.5	0.1
Joint size	19/26	19/26	7/16	5/13

¹⁾This column is commercial products

²⁾This column is fabricated in the laboratory

결과 및 고찰

Alcohol 발효과정

Alcohol 발효 중 glucose 함량의 변화와 biomass 증식 상태를 관찰하였다 (Fig. 2). Biomass의 관찰 결과 대수

기는 약 18시간 후쯤 접어들었고, 48시간 후에는 정지기로 들어갔다. 이것은 glucose 소모량과도 일치되었고, 이것을 토대로 발효는 시작 64시간 후에 멈추었다. 이때 alcohol 농도는 약 11.6%였다.

Table 2. Changes of volatile component identified from the fermented glucose solution during conservation

Volatile components	Retention index ¹⁾	Evidences ²⁾	Amount ($\mu\text{g/L}$)			
			Sample 1 (0)	Sample 2 (25° C, 6wks)	Sample 3 (13° C, 12wks)	Sample 4 (35° C, 24hrs)
Esters (22)						
Ethyl propanoate	384	A	1932.4	2167.3	3117.8	1967.8
Ethyl butanoate	605	A	703.2	711.9	899.4	669.8
Ethyl lactate+acetal	624	A	102.9	691.0	200.4	66.7
Isoamyl acetate	711	A	1173.8	1552.1	1811.6	1204.7
Ethyl 3-hydroxybutanoate	835	A	148.6	119.5	29.9	40.8
Ethyl hexanoate	974	A,B	1096.7	993.9	658.9	762.0
Ethyl 2-hydroxy-4-methyl-pentanoate	1134	A	0	56.4	31.2	23.8
Ethyl heptanoate	1209	A,B	11.5	7.3	6.7	9.0
Ethyl succinate	1381	A	0	55.0	53.7	2.0
Ethyl octanoate	1417	A,B	895.4	839.9	722.6	563.8
Methyl nonanoate	1472	A,B	5.6	4.9	6.1	5.1
Ethyl phenylacetate	1528	A,B	262.8	218.8	201.9	265.8
2-Phenylethyl acetate+geraniol	1547	A,B	262.8	218.8	201.9	265.8
Amyl 2-methylvalerate	1691	A	29.2	48.9	45.3	42.3
Ethyl 9-decenoate	1787	A	9.8	12.1	11.7	10.9
Ethyl decanoate	1798	A,B	238.3	224.7	247.7	158.1
Ethyl 2-hydroxy-3-phenyl-propanoate	1830	A	4.7	91.9	31.4	15.1
Ethyl propyl malate	2019	A	27.8	38.3	27.9	31.8
Ethyl dodecanoate	2142	A,B	39.9	38.3	39.8	37.4
Isopropyl tetradecanoate	2498	A	11.6	2.9	23.2	11.6
Ethyl 9-hexadecenoate	2907	A	2.9	4.7	5.8	9.4
Ethyl hexadecanoate	2932	A	4.5	4.7	7.7	6.9
Alcohols (15)						
4-Methylpentanol	649	A	125.2	99.9	76.8	90.9
3-Methylpentanol	654	A	258.3	159.0	149.4	142.3
2-Methylpentanol	661	A,B	57.4	46.7	26.6	33.0
2,4-Dimethylpentanol	676	A	40.5	0	12.8	26.9
Heptanol	910	A,B	342.3	386.2	82.1	255.1
Linalool	1218	A,B	342.3	386.2	82.1	255.1
2-Phenylethanol	1218	A,B	63.6	25.9	42.7	39.9
Nonanol	1372	A,B	0	0	2.0	15.9
α -Terpineol	1429	A,B	14.1	15.2	12.8	14.4
4-Vinylphenol	1460	A	5.0	0	1.9	6.4
Citronellol	1495	A,B	50.7	50.2	59.8	57.2
1-Phenol-2-pentanol	1736	A	103.2	79.8	29.3	46.4
Nerolidol	2084	A,B	43.1	36.7	25.0	23.2
2,3-Dihydrofarnesol	2370	A	15.2	12.8	17.4	7.7
Farnesol	2438	A	55.4	27.4	24.7	21.9
Aldehydes (6)						
Isobutanal	208	A	36.4	45.2	5.3	105.4
Heptanal	764	A,B	20.0	0	0	28.6
Benzaldehyde	919	A,B	38.5	8.9	7.0	113.1
Phenylacetaldehyde	1093	A	0	13.5	0	23.8
Nonanal	1227	A,B	6.5	33.5	9.6	5.1
Decanal + unknown	1443	A,B	42.5	28.1	2.5	3.2
Ketones (5)						
2-Butanone	172	A	6.6	9.5	45.7	5.5
3-Methyl-2-butanone	346	A,B	275.3	33.5	298.9	299.7
2-Heptanone	742	A,B	31.3	62.7	34.3	32.5
2-Nonanone	1197	A,B	17.3	34.4	30.6	33.3
3-Keto- β -ionone	1912	A	8.0	0	0	18.4

Table 2. Continued

Volatile components	Retention index ¹⁾	Evidences ²⁾	Amount (µg/L)			
			Sample 1 (0)	Sample 2 (25°C, 6wks)	Sample 3 (13°C, 12wks)	Sample 4 (35°C, 24hrs)
Lactones (5)						
γ-Nonalactone	1762	A,B	91.0	53.1	106.6	7.4
γ-Decalactone	1918	A,B	9.0	7.5	7.9	10.0
δ-Decalactone	1956	A	14.7	11.7	5.0	6.2
δ-Dodecalactone	2422	A,B	55.4	27.4	24.7	21.9
δ-Lactone	2891	A	2.8	3.9	2.4	1.7
Others (3)						
Methanthal acetate	363	A,B	35.5	89.6	87.4	78.6
Xylene	687	A	33.2	81.1	8.6	31.1
2-Methyltetrahydrothiophenone-3	957	A,B	243.8	206.8	151.5	157.6

¹⁾Retention index is estimated in accordance with a modified Kovats method (35)

²⁾A : Component is identified tentatively by GC-MS

B : Component is identified by authentic chemical

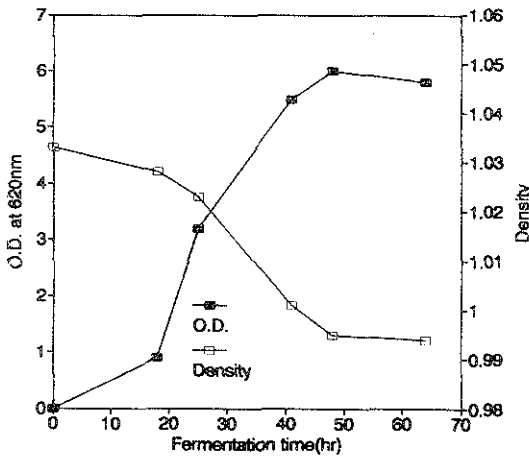


Fig. 2. Consumption of glucose (density) and growth of yeast during fermentation.

Alcohol 발효에 의한 휘발성성분

Alcohol 발효가 완결된 직후의 용액인 시료 1에서 휘발성 성분을 분석한 결과 52개의 peak를 정량적으로 처리하고, 이들을 동정한 결과 20개의 ester, 14개의 alcohol, 5개의 aldehyde, 5개의 ketone, 5개의 lactone, 2개의 함황성분, 1개의 hydrocarbon이 동정되었다 (Table 2). 정량적 처리는 하지 못하였으나, ethyl 9-octadecenoate, ethyl octadecanoate, isoamyl 9-octadecenoate, 2,3-butanedione과 ethyl acetate 등 5개의 성분이 동정되었다. 그 외 7개의 동정하지 못한 peak가 있었다. Table 2에서는 정량적으로 처리하지 못한 5개의 동정된 성분과, 동정하지 못한 7개의 peak는 제외하였다. 본 결과는 *Saccharomyces cerevisiae*를 이용하여 sucrose용액을 alcohol 발효시킨 다른 보고 (12)의 휘발성 성분 분석 결과와 대

체로 유사하지만, 본 실험에서 ethyl propanoate의 함량이 높고, nerolidol이 생성된 점이 다르게 나타났다. 이 차이점은 본 실험에서 사용된 효모가 지닌 특징으로서 추정되며, 이는 *Saccharomyces bayanus*로 발효시킨 프랑스 삼쇄인에서 이 두 성분이 동정되기 때문이다 (18). 또한 본 실험의 발효배지 (Yeast-Carbon-Base)와는 다른 Yeast-Nitrogen-Base배지에서 *Saccharomyces fermenti*를 사용한 glucose용액의 alcohol 발효에서는 이 두 성분이 동정되었고 이 보고 (19)에서 nerolidol 생성에 관한 설명으로 Yeast-Nitrogen-Base에 함유된 다량의 함질소화합물에서 유래된다고 설명하였고, 또다른 보고 (20)에서는 L-leucine의 몇가지 성분들이 terpene류의 생성에 중요한 전구체라고 설명하였다. 이와 같은 설명은 본 실험에서 함질소화합물이 지극히 제한된 Yeast-Carbon-Base배지의 사용으로도 nerolidol이 생성된 점과는 잘 일치되지 않는다.

Terpenol계인 citronellol, linalool 그리고 geraniol (본 실험에서는 2-phenylethyl acetate peak에 묻혀 정량할 수 없었다)은 본 실험에서 사용된 것과 동일한 Yeast-Carbon-Base 배지에서 *Kluyveromyces lactis*로 실험한 결과에서 보고되었다 (21). 현재까지 포도주에서는 보고된 경우가 없었으나 본 실험에서 동정한 3-methyl-2-butanone은 3-methyl-2-butanol이 발효 중 생성된다는 보고 (20)에 근거하여, alcohol과 ketone간의 산화-환원반응에 의하여 생성될 수 있는 것이라 사료된다. Alcohol 발효 음료에서 일반적 성분인 2,3-butanediol이 확인되지 않았다. 이점은 사용된 추출용매인 Freon 11의 특징인 ethanol을 포함한 저분자 alcohol류에 대한 낮은 추출률에 기인한 것이라고 생각된다 (22,23). Methanethiol ace-

tate와 2-methyltetrahydrothiophenone-3이 본 실험에서 동정되었다. 이것은 이미 포도주에서는 확인된 성분이고 (17) 본 실험에서는 배지 중에 함유된 합황성분에 근거하여 형성된 것으로 유추된다 (24,25).

저장중 휘발성성분의 변화

저장 중 이들 휘발성 성분의 변화는 Table 2에 나타나 있다. 4개의 성분 즉 ethyl 2-hydroxy-4-methylpentanoate, ethyl succinate, nonanol, phenylacetaldehyde는 발효 직후의 시료 1에서는 동정되지 않았으나 2~4 조건의 저장 중 형성되었다.

본 실험에서 ester는 전반적으로 저장 중 증가되었고, 분석 동정된 22종의 ester 중 시료 3에서는 17종, 시료 2와 4에서는 13종이 증가되었다. 이것은 alcohol 발효액의 저장 중 ester의 증가에서 저장기간의 연장이 중요하게 작용되었음을 나타낸다. 증가된 ester 중에서 ethyl propanoate, isoamyl acetate, ethyl 2-hydroxy-4-methylpentanoate, ethyl succinate, ethyl phenylacetate, amyl 2-methylvalerate, ethyl 9-decenoate, ethyl 2-hydroxy-3-phenylpropanoate, ethyl propyl malate, ethyl 9-hexadecenoate 그리고 ethyl hexadecanoate 등 11종이 시료 2~4 모두에서 증가되었다. 이 중 ethyl 2-hydroxy-3-phenylpropanoate와 ethyl 9-hexadecenoate는 증가율이 다른 성분에 비하여 아주 높고, 특히 ethyl 9-hexadecenoate는 저장기간은 24시간이지만 35°C에 저장된 시료 4에서 가장 높은 증가율을 보인다. 이것은 고온저장에 의하여 효모의 자가분해가 가속화되고, 그 결과 지방산이 유리되고, 유리된 지방산은 ethanol과 ester화 반응을 하므로 나타난 결과로 추정되며, 효모의 자가분해에 의하여 9번 위치 불포화지방산이 다량 유리되었다는 다른 보고 (26)도 본 결과를 설명하는 근거가 될 수 있다.

유기산 ester인 ethyl lactate, ethyl succinate, ethyl propyl malate 등은 ethyl lactate가 시료 4에서 감소한 것을 제외하고는 저장 중 시료 2~4 모두에서 증가되었다. 이와 같은 alcohol 발효 음료의 저장 중에 나타나는 유기산 ester의 증가 현상은 다른 보고 (27,28)에서도 나타난 결과이다. 특히 ethyl lactate와 ethyl succinate는 그 증가율이 시료 2에서 시료 3을 능가하였고, 이것은 저장온도를 13°C에서 25°C로 상승시키므로서 유기산 ester의 증가에 소요되는 저장기간이 단축된 것을 보여준다. Ethyl succinate가 본 실험에서 발효 직후는 없었지만 저장 중 생성된 것은 앞선 보고 (29,30)에서 설명한 alcohol 발효 중 일부 생성가능하지만, 저장 중 주로 생성된다는 것 과 부합된다. 이와 같이 저장 중 증가되는 유기산 ester

는 포도주에서 관능적인 품질의 개선에 크게 기여한다고 보고되었다 (31). 저장 중 감소되는 ester 중 ethyl 3-hydroxybutanoate, ethyl hexanoate, ethyl heptanoate 그리고 ethyl octanoate 등 4종이 시료 2~4 모두에서 감소되었다. 이들 감소된 ester는 대체로 분자량이 크지 않은 것이 특징으로 보인다. Ester의 저장 중 변화에서 동일 성분일지라도 증가 혹은 감소되어 서로 상반된 결과들이 발표되었고 이런 현상을 저자들은 발효 직후의 함량이 높으면 저장 중 감소되고, 함량이 낮으면 증가됨으로서 휘발성 성분들이 저장 중 화학적 평형을 이루는 방향으로 끊임없이 반응이 일어나고 있기 때문이라고 설명하였다 (32,33).

대다수의 alcohol은 저장 중 크게 감소하였고, 이것은 타보고 (30-32)의 alcohol 음료의 저장 중 나타난 alcohol 성분의 감소와도 일치한다. 이와 같은 저장 중 alcohol의 감소 현상은 ester화 반응이나 산화 반응이 저장 중 일어나므로 alcohol이 소모되어 나타나고, 그 결과 생성된 생성물인 ester나 aldehyde는 증가된다고 설명한다 (32). 본 실험에서는 linalool, α -terpineol, citronellol, nerolidol, 2,3-dihydrofarnesol과 farnesol 등 6종의 terpenoid계 alcohol이 분석되었다. 이들 중 linalool, nerolidol 그리고 farnesol 등은 저장 시료 2~4 모두에서 저장 중 크게 감소되었고, citronellol은 저장 중 초기 농도를 유지하거나 약간 증가되는 것으로 나타났다.

Aldehyde의 저장 중 변화는 고온저장의 시료 4에서 증가가 가장 크고, 상온저장의 시료 2에서도 증가되었다. 이와 같은 결과로 aldehyde의 증가는 저장온도의 상승으로 인하여 산화반응이 촉진되어 나타난 것으로 추정할 수 있다. 특히 고온저장의 시료 4에서 isobutanal과 benzaldehyde의 함량이 초기 농도(시료 1)의 약 3배로 증가되었고, 상온저장의 시료 2에서는 nonanal이 초기 농도의 약 5배에 달하고 있다. 저온저장의 시료 3에서는 대부분의 aldehyde가 오히려 감소되었고 nonanal만이 약간의 증가를 보였다.

Ketone은 저장 중 대다수가 증가되었고 3-keto- β -ionone은 고온저장의 시료 4에서 초기 농도에 비하여 2배 이상 증가하였지만 상온과 저온저장의 시료 2, 3에서는 저장 중 감소되어 흔적도 없어졌다. Lactone은 대다수가 크게 감소하였고 고온저장의 시료 3에서 감소율이 더욱 크게 나타났다. 특히 복숭아 향을 나타내는 γ -nonalactone은 고온저장에서 그 감소율이 아주 높아 초기 농도의 10% 정도로 감소되고 상온저장에서는 초기 농도의 약 60% 정도로 감소되었지만 저온저장의 시료 3에서는 오히려 약간의 증가를 나타내고 있다.

함황성분 중 ester인 methanthiol acetate는 저장 중 시료 2~4 모두에서 2배 이상 증가하였고, 발효 때 대량 생산되어 초기 농도가 높았던 2-methyltetrahydrothiophenone-3은 시료 2~4 모두에서 감소되었다. 2-methyltetrahydrothiophenone-3은 다른 보고(25)에서도 발효 직후의 시료에서 비교적 높은 농도를 나타내었고 저장 중 감소되었다. 이와 같은 현상을 발효 중 효소적으로 대량 생산된 함황성분이 저장 중 화학적 평형반응에 의해 감소된다고 설명한다(25).

저장 중 나타나는 휘발성 성분의 분석결과는 저온저장에서 ester의 증가가 가장 크게 나타났고, 이것은 저장기간이 길어짐으로서 나타난 결과이고, 고온저장에서의 ester의 증가는 저온에 비하여 약하지만 이것은 저장기간이 짧았기 때문인 것으로 생각되며, 고온저장에서는 aldehyde의 증가가 수반되었고 저온저장에서는 감소되었다. 상온저장은 ester와 aldehyde의 변화를 비교할 때 저온과 고온저장의 혼합 형태의 현상이 일어났다. 즉 ester의 증가도 있으면서 aldehyde의 형성은 고온저장에 비하여 약하였다. 이것은 적절한 저장조건이 설정되면 숙성 기간을 단축시키면서 향을 개선하는데 중요한 ester를 증가시키고 산화는 억제되어 aldehyde의 생성을 저지할 수 있는 방법이 가능함을 보여준다. 현실적으로 이들을 실현하기 위해서는 앞으로 좀더 다양한 저장조건에서의 실험 즉 온도와 기간의 세분화, model 용액과 병행한 실제 alcohol 음료를 통한 저장실험의 결과들이 수행되어야 할 것이다.

요 약

Yeast-Carbon-Base배지로 조성된 glucose용액을 *Saccharomyces bayanus*로 pH 3.5, 25°C, 400rpm, 그리고 발효 초기 24시간 동안만 35L/h로 통기시키면서 64시간 만에 alcohol 발효를 완료시켜, 발효 중 생성된 휘발성 성분과 이들 발효액을 여러 조건에서 숙성(25°C에서 6주, 13°C에서 12주, 35°C에서 24시간)시켰을 때 휘발성 성분의 변화를 GC-MS로 분석하였다. 20개의 ester, 14개의 alcohol, 5개의 aldehyde, 5개의 ketone, 5개의 lactone, 2개의 함황성분과 1개의 hydrocarbon이 발효중 생성되었다. Ethyl 2-hydroxy-4-methyl pentanoate, ethyl succinate, nonanol과 phenylacetaldehyde 등이 발효액의 저장 중 새로이 생성되었다. Ester는 일반적으로 저장 중 증가되었고, 13°C에서 12주간 저장된 시료에서 가장 크게 증가되어 본 실험에서 분석된 22개의 ester 중 17개가 증가하였다. 35°C에서 24시간 저장된 시료에서는 13개

의 증가된 ester 중 ethyl 9-hexadecenoate의 증가가 가장 현저하였다. Aldehyde는 35°C 저장에서 크게 증가되었으나 13°C 저장에서는 감소되었다. Isobutanal, benzaldehyde와 phenylacetaldehyde는 35°C 저장에서 현저하게 증가하였다. Alcohol과 lactone은 저장 중 감소되고 ketone은 증가되었다.

문 헌

1. Nykanen, L. and Nykanen, I. : Production of esters by different yeast strains in sugar fermentation. *J. Inst. Brew.*, **83**, 30(1977)
2. Soufleros, E. et Bertrand, A. : Rôle de la "Souche de levure" dans la production des substances volatiles au cours de la fermentation du jus de raisin. *Conn. Vigne Vin*, **13**, 181(1979)
3. Monk, P. R. and Cowley, P. J. : Effect of nicotinic acid and sugar concentration of grape juice and temperature on accumulation of acetic acid during yeast fermentation. *J. Ferment. Technol.*, **62**, 515(1984)
4. Nordstrom, K. : Study on the formation of volatile esters in fermentation with brewer's yeast. *Svensk Kemisk Tidskrift*, **76**, 510(1964)
5. Flanzy, C., Flanzy, M. and Benard, P. : La vinification par macération carbonique. INRA de Paris, p.31(1987)
6. Ducruet, V., Flanzy, C., Bourzeix, M. et Chambroy, Y. : Les constituants volatils des vins de macération carbonique. *Sciences des aliments*, **3**, 413(1983)
7. Amerine, M. A., Berg, H. W., Kunkee, R. E., Ough, C. S., Singleton, V. L. and Webb, A. D. : The technology of wine making. 4th ed., Avi publishing Co. Inc., Connecticut, p.111(1980)
8. Lee, C. Y. and Cooley, H. J. : Higher-alcohol contents in New York wines. *Am. J. Enol. Vitic*, **32**, 244(1981)
9. Kimura, Y., Hasimoto, N., Nagashima, Y. and Yoshioka, K. : Systematic design of flavor quality of light beer "Kirin beer light". *MBAA Technical Quarterly*, **24**, 140(1987)
10. Soumalainen, H. and Nykanen, L. : The aroma components produced by yeast in nitrogen-free sugar solution. *J. Inst. Brew.*, **72**, 469(1966)
11. Nykanen, I. : Distribution of esters produced during sugar fermentation between the yeast and the medium. *J. Inst. Brew.*, **83**, 32(1977)
12. William, A. A., Hollands, T. A. and Tucknott, O. G. : The gas chromatographic-mass spectrometric examination of the volatiles produced by the fermentation of a sucrose solution. *Z. Lebensm. Unters. -Forsch.*, **172**, 377(1981)
13. Shinohara, T. and Watanabe, M. : Effect of fermentation conditions and aging temperature on volatile ester contents in wine. *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 2645(1981)
14. Ramey, D. D. and Ough, C. S. : Volatile ester hydrolysis or formation during storage of model solution and wines. *J. Agric. Food Chem.*, **28**, 928(1980)

15. Kormakova, T. A. and Drovoglav, E. S. : Changes in bouquet components of champagne wine during storage. *Prikl. Biokhimi. Mikrobiol.*, **12**, 113 (1976)
16. Farwell, S. O. and Barinaga, C. J. : Sulfur-selective detection with FPD : Current enigmas, practical usage, and future directions. *J. Chromatogr. Sci.*, **24**, 483 (1986)
17. Leppanen, O. A., Denslow, J. and Ronkainen, P. P. : Determination of thiolacetate and some other volatile sulfur compounds in alcoholic beverage. *J. Agric. Food Chem.*, **28**, 359 (1980)
18. Loyaux, D. : Analyse des composés volatils du champagne : Etude de leur évolution au cours du vieillissement en présence des levures., *Ph. D. thesis* at Univ. of Dijon in France (1981)
19. Fagan, G. L., Kepner, R. E. and Webb, A. D. : Production of linalool, cis- and trans-nerolidol, and trans, trans-farnesol by *Saccharomyces fermenti* growing as a film on simulated wine. *Vitis*, **20**, 36 (1981)
20. Hock, R., Benda, I. and Schreier, P. : Formation of terpenes by yeast during alcoholic fermentation. *Z. Lebensm. Unters. Forsh.*, **179**, 450 (1984)
21. Drawert, F. and Barton, H. : Biosynthesis of flavor compounds by microorganisms. 3. Production of monoterpenes by the yeast *Kluyveromyces lactis*. *J. Agric. Food Chem.*, **26**, 765 (1978)
22. Cobb, C. S. and Maurice, M. B. : Comparison of extracting solvents for typical volatile components of eastern wines in model aqueous-alcoholic systems. *J. Agric. Food Chem.*, **26**, 197 (1978)
23. Marais, J. and Houtman, A. C. : Quantitative gas chromatographic determination of specific esters and higher alcohols in wine using Freon extraction. *Am. J. Enol. Vitic.*, **30**, 250 (1979)
24. Dawivedi, B. K. and Arnold, R. G. : Chemistry of thiamin degradation in food products and model systems : A review. *J. Agri. Food Chem.*, **21**, 54 (1973)
25. Schreier, P., Drawert, F. and Junker, A. : GLC-MS investigation of volatile constituents of wine. *Z. Lebensm. Unters. -Forsh.*, **154**, 279 (1974)
26. Bloomfield, D. and Block, K. : Formation of 9-unsaturated fatty acids. *J. Biol. Chem.*, **235**, 337 (1960)
27. Stern, D. J., Guadagni, D. and Stevens, K. L. : Aging of wine : Quantitative changes in the volatile of Zinfandel wine during two years. *Am. J. Enol. Vitic.*, **26**, 208 (1975)
28. Rodopoulos, A. K., Bezzbov, A. A., Egorov, I. A. and Nechaev, L. N. : Study of aromatic substance in dry table wine. *Prikl. Biokhimi. Mikrobiol.*, **15**, 309 (1979)
29. Webb, A. D., Kepner, R. E. and Maggiora, L. : Some volatile components of wines of *Vitis vinifera* varieties Cabernet sauvignon and Ruby cabernet 1. Neutral compounds. *Am. J. Enol. Vitic.*, **20**, 16 (1969)
30. Simpson, R. F. : Aroma and compositional changes in wine with oxidation, storage and aging. *Vitis*, **17**, 274 (1978)
31. Usseglio-Tomasset, L. : Influence de la température de conservation sur les caractéristique physico-chimiques et organoleptiques des vins (vins aromatique). *Bull. I' O.I.V.*, **623**, 19 (1983)
32. Onishi, M., Guymon, J. F. and Crowell, E. A. : Change in some volatile constituents of brandy during aging. *Am. J. Enol. Vitic.*, **28**, 152 (1977)
33. 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)
34. Van den Dool, H. and Kratz, P. D. : A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *J. Chromatogr.*, **11**, 463 (1963)

(1995년 10월 7일 접수)