

매실을 이용한 알콜 발효의 최적 조건

손상수 · 지원대^{*} · 정현재
영남대학교 식품가공학과

Optimum Condition for Alcohol Fermentation Using Mume (*Prunus mume* Sieb. et Zucc) Fruits

Sang-Su Son, Won-Dae Ji^{*} and Hyun-Chae Chung

Dept of Food Science and Technology, Yeungnam University, Kyongsan 712-749, Korea

Abstract

To produce alcohol from Mume (*Prunus mume* Sieb. et Zucc) fruits, fermentation conditions were optimized by a response surface methodology (RSM) using the fractional factorial design with 3 variables and 5 levels. The coefficient of determination (R^2) of response surface regression equation for alcohol production were 0.9276. Optimum conditions for alcohol production were involved with 8.39% of sugar content, 28.86°C of fermentation temperature and 3.84 days of fermentation time. Finally, predicted level of alcohol production at these conditions was 5.24%.

Key words: alcohol production, mume fruits, *Prunus mume* Sieb. et Zucc, response surface methodology

서 론

매화나무(*Prunus mume* Sie. et Zucc.)는 우리나라의 전 국각지에서 식용, 약용 및 관상수로 널리 애용되고 있는 다년 생 식물의 낙엽교목이다. 매화나무의 과실인 매실에는 당분 과 칼슘, 철분 등 미네랄이 풍부할 뿐만 아니라 구연산 등 각종 유기산이 다량 함유하고 있어 신맛이 강하지만, 산성식품이 이닌 알칼리성 식품으로 우리 인체에 매우 이롭게 작용한다(1).

매실은 주로 생식되지 않는 가공전용 과실로서 국내에서 생산되는 전체량이 대부분 매실즙이나 매실 액기스 등 가공 용으로 사용되고 있다. 최근 매실의 효용이 재인식되어 여러 가지 건강 증진 효과를 가진 매실 식품을 개발하기 위한 연구가 많이 진행되고 있는데, Bae 등(2)은 매실을 새로운 기능성 음료로 개발하여 각종 암세포주에 미치는 영향과 실제 운동 선수에게 섭취시 혈액내 전해질의 농도와 삼투압의 변화를 조사한 바 있고, Lee 등(3)은 매실 착즙액 3%를 첨가하여 발효시킨 호상요구르트에 당에 절인 매실과육을 첨가하여 매 실 호상요구르트를 제조하여 품질 특성을 보고한 바 있으며, Kim 등(4)은 매실을 이용하여 식초를 생산하고자 하는 연구를 보고하였다. 그러나, 매실을 이용한 알콜생성에 관한 연구는 미진한 편이다.

이에 본 연구는 매실이 가진 여러 가지 우수한 효능으로 인하여 건강 지향적인 소비자들의 관심이 고조되고 있고 삶

의 질을 높여주는 식문화에 대한 국민들의 인식이 새로워지고 있는 현실에 따라, 매실의 약리적 기능성이 함유되고 기 호성이 우수한 매실 발효식품을 개발하여 산업적으로 대량 생산하는 기반을 구축할 목적으로 반응표면분석법으로 매 실을 사용한 알콜생성의 발효조건을 조사하였기에 보고하 고자 한다.

재료 및 방법

재료 및 사용균주

본 실험에 사용한 매실은 경남 창녕 지역에서 생산된 1999 년 산 청매를 원료로 하였다. 알콜발효에 사용된 효모는 *Saccharomyces cerevisiae* KCTC 1213이며, 이들은 유전자은행에서 분양받아 사용하였다.

알콜발효 및 분석

씨를 제거한 매실 과육은 homomixer로 150 rpm에서 30 분간 마쇄하고 100°C에서 30분간 멸균한 후, 원료양에 대해 각각 2%의 효모 배양액을 접종하여 각 조건별로 알콜발효를 시켰다. 알콜 분석은 시료를 초순수로 3배 희석하고 교반기로 진탕한 다음 10,000×g에서 30분간 원심분리한 후, membrane filter(0.45 μm, Millipore)로 여과한 다음, 여과액을 GC를 이용하여 분석하였다. 사용된 칼럼은 Porapak QS stainless column(2 m×3 mm)이었다. 오븐온도는 150°C, 주입기의 온도는 200°C, 검출기(FID)의 온도는 220°C이며, Carrier gas

^{*}Corresponding author. E-mail: jiwid@yumail.ac.kr
Phone: 82-53-810-2951. Fax: 82-52-815-1891

는 N₂(20 mL/min.)를 이용하였다.

결과 및 고찰

알콜생성의 최적화

최적의 알콜생성 조건을 구하기 위한 실험계획으로서 Jeong 등(5)의 방법에 준하여 중심합성실험계획을 세웠으며, 반응표면분석을 위해 SAS(Statistical Analysis System) program을 사용하였다(6).

알콜생성 조건 즉, 독립변수(Xn)는 당농도(X₁), 발효온도(X₂), 발효시간(X₃)이었으며, 각 조건들은 -2, -1, 0, 1, 2로서 다섯 단계로 부호화하였고, 실험값은 Table 1에 나타내었다. 혼합조건외 품질 특성에 관련된 종속변수(Yn)로서는 알콜함량(Y₁)이었으며, 각각의 실험은 3반복으로 행하여 그 평균값을 회귀분석에 사용하였다. Table 1에 나타난 독립변수는 중심합성실험계획에 따라 Table 2와 같이 16구로 설정하여 실시하였다. 이때, 세 가지 독립변수와 종속변수에 대한 2차 회귀모형은 다음과 같다.

$$Y_n = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2$$

여기서 Y는 종속변수, X₁, X₂, X₃는 독립변수, β₀는 절편, β_n은 회귀계수이다. 회귀분석 결과 임계점이 최대점과 최소점이 아니고 안장점일 경우에는 능선분석을 하여 최적점을 구하였으며, contour map과 3차원 반응표면분석으로 알콜생성 조건을 찾았다.

Table 1. Levels of alcohol fermentation conditions in experimental design

X _i	Fermentation condition	Level				
		-2	-1	0	1	2
X ₁	Sugar content (%)	0	3	6	9	12
X ₂	Temperature (°C)	20	25	30	35	40
X ₃	Time (days)	2	3	4	5	6

Table 2. Central composite design by RSM computer program for optimization of alcohol fermentation conditions

Treatment number	Sugar content (%)	Temperature (°C)	Time (days)
1	3 (-1)	25 (-1)	3 (-1)
2	3 (-1)	25 (-1)	5 (1)
3	3 (-1)	35 (1)	3 (-1)
4	3 (-1)	35 (1)	5 (1)
5	9 (1)	35 (1)	3 (-1)
6	9 (1)	25 (-1)	5 (1)
7	9 (1)	25 (-1)	3 (-1)
8	9 (1)	35 (1)	5 (1)
9	6 (0)	30 (0)	4 (0)
10	6 (0)	30 (0)	4 (0)
11	12 (2)	30 (0)	4 (0)
12	0 (-2)	30 (0)	4 (0)
13	6 (0)	40 (2)	4 (0)
14	6 (0)	20 (-2)	4 (0)
15	6 (0)	30 (0)	6 (2)
16	6 (0)	30 (0)	2 (-2)

알콜 생성에 미치는 발효온도, 당농도 및 발효시간의 영향 매질중에서 최적의 알콜 생성능을 알아보기 위하여 발효온도를 5°C 간격으로 하여 20~40°C의 온도범위에서 48시간 동안 진탕배양한 후 알콜 생성을 조사한 결과는 Fig. 1과 같다.

전반적으로 발효온도 20~35°C까지는 알콜생성이 비슷하였으나, 25°C에서 조금 더 알콜생성량이 높은 것으로 나타났고, 이후 온도증가에 따라 조금씩 감소하다가 35°C 이상에서 급격히 감소하는 것으로 나타났다. Kim과 Ryu(7)는 두 종류의 효모를 이용하여 알콜발효시 발효온도와 기질종류에 대한 연구에서 두 개의 효모 서로간 차이는 있었지만 대체적으로 25°C에서 균체중식량이 최대로 나타났으며, 25~30°C 범위에서 알콜생성량이 가장 우수하였으며, 40°C에서는 알콜생성이 급격히 감소한다고 보고하였는데, 본 연구와 같은 결과였다. 또한 Kim과 Ryu(7)의 연구에서 같은 조건으로 알콜발효를 하더라도 발효에 관여하는 효모에 크게 영향을 받는다는 것을 알 수 있었다.

당농도별 알콜생성을 조사하기 위하여 매질중 2% 간격으로 glucose를 첨가하여 0~12%의 당농도 범위에서 48시간 배양하여 알콜생성량을 조사한 결과 Fig. 2와 같다. 첨가한 당농도가 증가할수록 알콜생성량이 비례해서 증가함을 알 수 있었다. Hur 등(8)은 *S. cerevisiae*를 이용하여 초기 당농도를 다르게 하여 돼지감자의 알콜발효특성을 조사한 바, 초기 당농도가 5~11%인 경우는 당의 대부분이 알콜로 전환된다고 했으며, 19% 이상에서는 당의 알콜 전환률이 감소하여 70% 이하로 떨어진다고 보고하였는데, 12% 당첨가에 비례하여 알콜생성된 본 연구 결과와 일치하였다. 또, Yang 등(9)은 *S. cerevisiae*를 분리하여 당 내성을 조사한 결과, 15%까지 효모가 계속 생육하였으며 이후 감소하는 것으로 보고된 바와 같이, 본 연구에서도 12% glucose를 첨가한 실험군에서

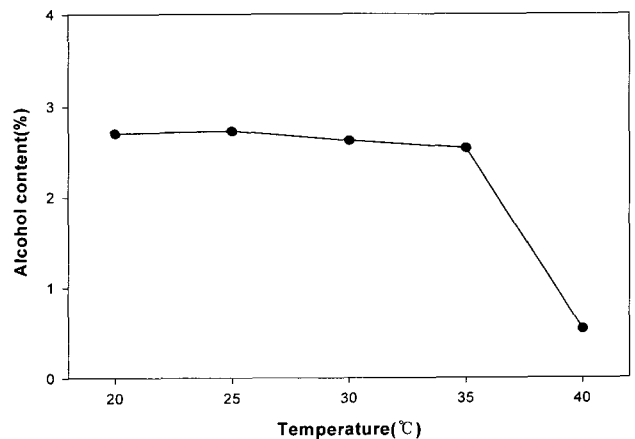


Fig. 1. Effects of fermentation temperature on the alcohol production by *Saccharomyces cerevisiae* KCTC 1213 for 48 hours.

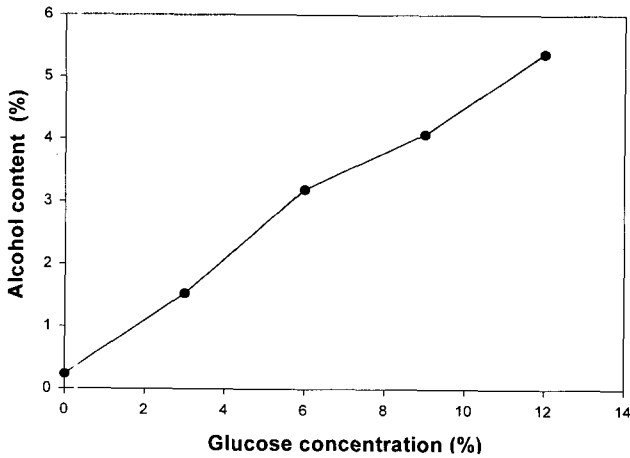


Fig. 2. Effects of sugar content on the alcohol production by *Saccharomyces cerevisiae* KCTC 1213 for 48 hours.

효모의 계속적인 생육으로 알콜의 생산이 가능했으리라 생각된다. 한편, Kim과 Lee(10)는 난지과실을 이용하여 식초제조를 연구하는 과정에서 당을 추가로 첨가(보당)하지 않고 알콜발효를 시키는 경우에는 살균 처리하는 경우를 제외하고는 발효 중 잡균 오염의 가능성이 많고 더구나 과실초가 손상과나 미숙과 등 생식용으로 적당하지 않은 과실을 사용하는 경우가 많기 때문에 잡균 오염 이외에도 야생 초산균에 의하여 생성된 초산이 재산화될 염려가 있어 알콜 발효시 보당하여 이들의 오염을 최소화하는 것이 균일한 품질의 과실 초 생산에 유리할 것이라 보고하기도 하였다.

발효기간별 알콜 함량의 변화를 조사하기 위하여 8%의 glucose를 첨가한 후 30°C에서 배양하는 동안 알콜생성량을 조사한 결과는 Fig. 3과 같다. 배양 60시간까지는 발효시간에 비례해서 알콜함량이 증가하였으나 이 시간 이후는 거의 일정한 수준으로 유지되었으며, 그 함량은 4%정도로 나타났다. Jecng 등(11)은 감자전분을 효소로 분해하여 알콜발효하는 과정중 시간이 경과함에 따라 24시간 동안 알콜생산이 점차 증가하였으며 이후 알콜 함량이 감소하는 경향으로 보고

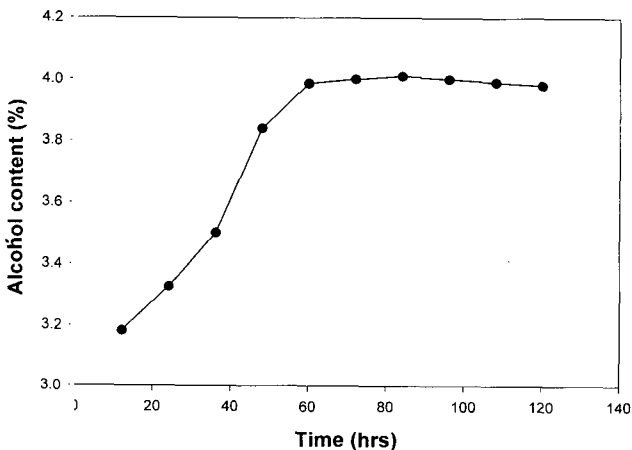


Fig. 3 Alcohol production from mume by *Saccharomyces cerevisiae* KCTC 1213 during the fermentation time at 30°C.

하여 본 연구 결과와는 약간의 상이함을 보였으나, 사용한 재료나 알콜발효시 이용한 효모의 종류나 특성에 따라 약간의 차이가 나는 것으로 생각된다.

반응표면분석법에 의한 알콜발효의 최적화

알콜발효의 최적화를 위해 중심합성계획법에 따라 각 독립변수를 당농도, 발효온도 및 발효시간으로 요인변수들을 -2, -1, 0, 1, 2로써 5개로 부호화하여 알콜 생성능을 조사한 결과는 Table 3과 같으며, 반응변수에 미치는 독립변수의 영향은 Table 4에서 보는 바와 같다. 알콜생성능에 미치는 영향은 당농도가 가장 큰 영향을 끼치며, 당농도는 1%수준(p<0.01)에서 유의성이 인정되고, 발효온도는 5%수준(p<0.05)에서 유의성이 있었다.

수령된 회귀식에 대해 분산분석한 결과는 Table 5에서 보는 바와 같다. F검정결과, 반응변수는 수정된 회귀식에 유의성을 나타내었으며, 다중회귀분석결과 일차항은 1%수준(p<0.01)에서, 이차항은 5%수준(p<0.05)에서 유의성이 인정되었고, 변수상호간에는 유의성이 없는 것으로 나타났다. 이차 회귀식에 의하여 형성된 반응표면결과 R²는 0.9276으로 높게 나타났다.

독립변수를 당농도, 발효온도 및 발효시간으로 하고, 반응변수를 알콜생성량으로 하였을 때 그 변화정도를 반응표면으로 살펴보았다. 각각 당농도와 발효온도, 당농도와 발효시간, 발효온도와 발효시간을 함수로 하여 등고선을 그려본 결과, 반응변수에 따른 조건이 일치하지 않아 세가지의 실험변

Table 3. Experimental design for alcohol production under different conditions of sugar content, temperature and time

Treatment number	Sugar content (%)	Temperature (°C)	Time (days)	Alcohol content (%)
1	3(-1)	25(-1)	3(-1)	0.72
2	3(-1)	25(-1)	5(1)	0.97
3	3(-1)	35(1)	3(-1)	1.34
4	3(-1)	35(1)	5(1)	1.11
5	9(1)	35(1)	3(-1)	3.47
6	9(1)	25(-1)	5(1)	3.38
7	9(1)	25(-1)	3(-1)	3.94
8	9(1)	35(1)	5(1)	3.48
9	6(0)	30(0)	4(0)	4.96
10	6(0)	30(0)	4(0)	4.96
11	12(2)	30(0)	4(0)	3.99
12	0(-2)	30(0)	4(0)	0.08
13	6(0)	40(2)	4(0)	0.67
14	6(0)	20(-2)	4(0)	2.85
15	6(0)	30(0)	6(2)	1.59
16	6(0)	30(0)	2(-2)	2.67

Table 4. Analysis of variance showing significant effects of fermentation variables on alcohol production

Fermentation variables	Degrees of freedom	Sum of squares	Prob>F
Sugar content (%)	4	28.89	0.0025
Temperature (°C)	4	11.38	0.0252
Time (days)	4	8.50	0.0478

Table 5. Analysis of variance showing effects of treatment variables as linear or quadratic terms and interaction (cross product) effect on response variables

Source	Degrees of freedom	Sum of squares	Prob>F
Model	9	35.29	0.0084
Linear	3	21.57	0.0030
Quadratic	3	13.51	0.0099
Cross product	3	0.20	0.9284
Variability explained (R ²)		0.9276	

$$Y_n = -40.372500 + 1.726458X_1 + 1.917875X_2 + 5.566875X_3 - 0.009417X_1X_2 - 0.023750X_1X_3 + 0.002250X_2X_3 - 0.081250X_1^2 - 0.032000X_2^2 - 0.707500X_3^2$$

수 중 가장 영향이 적은 것으로 나타난 발효시간을 고정시키고 당농도와 발효온도간의 최적 조건을 찾고자 하였다. 발효시간의 중간값을 4일로 정한 후 당농도와 발효온도만을 변수로 하여 분석을 행한 결과 그 변화정도를 알아보기 위해 반응표면과 contour map을 나타낸 결과는 각각 Fig. 4와 Fig. 5와 같다. 당농도가 증가함에 따라 알콜 생성량은 급격히 증가하였으며, 당의 농도가 8%이상 증가함에 따라 서서히 감

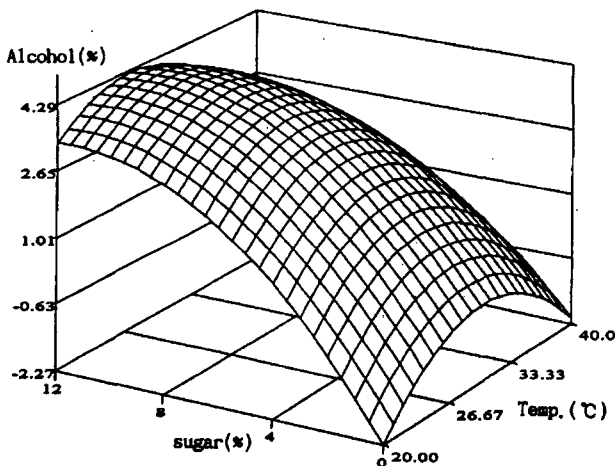


Fig. 4. Response surface for alcohol production.

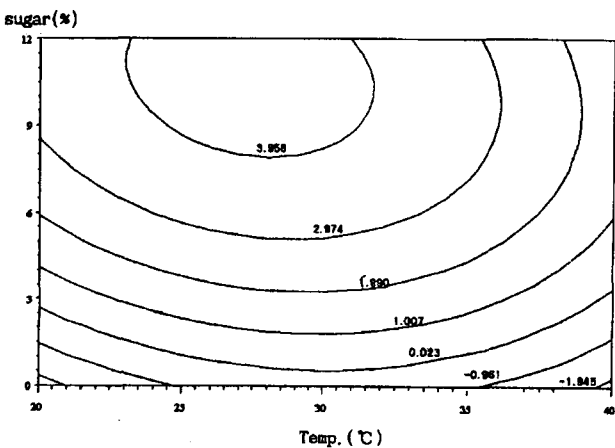


Fig. 5. Contour map for alcohol production.

Table 6. Predicted levels of fermentation conditions for optimum responses of alcohol production

Fermentation variables	Levels for optimum responses of alcohol production
Sugar content (%)	8.39
Temperature (°C)	28.86
Time (days)	3.84
Morphology	MAX
Predicted value at stationary point (%)	5.24

소하는 것으로 나타났다. Hur 등(8)의 초기 당농도에 따른 비증식속도를 조사한 결과, 7.5%까지는 당농도 증가에 따라 비증식속도가 증가하나 그 이상에서는 농도가 증가함에 따라 비증식속도가 감소한다고 하였는데, 본 연구와 같은 결과였다. 그리고, 발효온도가 증가함에 따라 알콜생성량이 증가하였으나, 29°C 이상에서는 점차 감소하는 경향을 나타내었다. Kim 등(12)이 *S. cerevisiae*를 이용하여 수박쥬스의 알콜 발효를 실험한 결과, 27°C와 29°C 사이에서 가장 많은 알콜을 생성하였다고 보고한 결과와 일치하였다.

이러한 결과에 의한 각 반응변수의 정상점과 정상점에서의 독립변수조건은 Table 6에서 보는 바와 같이 당농도 8.39%, 발효온도 28.86°C, 발효시간 3.84일로 나타났다.

본 연구에서 최적조건 즉, 당농도 8.39%, 발효온도 28.86°C, 발효시간 3.84일 발효 시 알콜생성 예상치는 5.24%로 나타났는데, 이러한 예상 결과를 *S. cerevisiae*로 알콜발효를 시행한 다른 연구 결과들과 비교해 보았을 때, Kim 등(12)이 수박쥬스에 9%의 당을 첨가하여 6~7일 동안 발효하여 3.7~4.1%의 알콜을 생성하는 결과보다 발효시간의 감소 및 알콜생성량이 증가하는 결과이며, Park 등(13)이 양파착즙액에 당도를 14°Brix로 조정하여 30°C에서 5일 동안 발효시켰을 때 알콜함량 5.8%인 양파주를 얻는 결과보다도 당이나 발효시간의 절약효과를 얻을 수 있는 결과이다.

요 약

매실을 사용하여 알콜을 생산하기 위하여 당농도, 발효온도, 발효시간의 3변수와 5수준의 fractional factorial design으로 RSM computer program을 사용하여 최적 발효조건을 조사하였다. 알콜함량에 대한 회귀분석결과, R²는 0.9276으로 높게 나타났다. 당농도 8.39%, 발효온도 28.86°C에서 3.84일간 발효하는 것이 알콜을 생성을 위하여 가장 양호하였으며, 이 조건에서의 알콜 생성 예상치는 5.24%이었다.

문 헌

1. Shim KH, Sung NK, Choi JS, Kang KS. 1989. Changes in major components of japanese apricot during ripening. *J Korean Soc Food Nutr* 18: 101-108.
2. Bae JH, Kim KJ, Kim SM, Lee WJ, Lee SJ. 2000. Development of the functional beverage containing the *Prunus*

- mume* extracts. *Korean J Food Sci Technol* 32: 713-719.
3. Lee EH, Nam ES, Park SI. 2002. Characteristics of curd yogurt from milk added with maesil (*Prunus mume*). *Korean J Food Sci Technol* 34: 419-424.
 4. Kim YD, Kang SH, Kang SK. 1996. Studies on the acetic acid fermentation using maesil juice. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 25: 695-700.
 5. Jeong YJ, Kim KE, Shin JS, Jo HS, Lee OS. 2002. Monitoring of alcohol fermentation condition of corn using raw starch enzyme. *Korean J Food Preservation* 9: 179-183.
 6. SAS. 1999. SAS/STAT User's guide version 8.1. SAS Institute Inc. Cary, NC, USA.
 7. Kim HJ, Ryu YW. 1989. The conditions affecting ethanol tolerance of yeast strains in alcohol fermentation—study on the fermentation temperature and substrate type. *Korean J Biotechnol Bioeng* 4: 167-171.
 8. Hur Bk, Kim HS, Mok YI. 1989. Functional relationship between the fermentation characteristics of *S. cerevisiae* and fermentation time. *Korean J Biotechnol Bioeng* 4: 191-196.
 9. Yang JY, Park KH, Park UH, Yu JH. 1990. Screening and characterization of the high-alcohol producing *Saccharomyces cerevisiae* D1. *Kor J Appl Microbiol Biotech* 18: 511-516.
 10. Kim DH, Lee JS. 2000. Vinegar production from subtropical fruits. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 29: 68-75.
 11. Jeong YJ, Seo JH, Lee JB, Jang SM, Shin SR, Kim KS. 2000. Changes in the components during alcohol fermentation of potatoes using pilot system. *Korean J Postharvest Sci Technol* 7: 233-239.
 12. Kim SL, Kim WJ, Lee SY, Byun SM. 1984. Alcohol fermentation of Korean watermelon juice. *J Agric Food Chem* 27: 139-145.
 13. Park YK, Jung ST, Kang SG, Park IB, Cheun KS, Kang SK. 1999. Production of a vinegar from onion. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol* 27: 75-79.

(2003년 2월 14일 접수; 2003년 6월 2일 채택)