

## 산머루주 제조를 위한 발효조건 최적화

김 성 호\*

경북과학대학 바이오식품과

# Optimization of Fermentation Conditions for the Manufacture of Wild Grape Wine

Seong-Ho Kim\*

Department of Bio-Food Science, Kyongbuk College of Science, Chilgok 718-851, Korea

Received February 28, 2008; Accepted March 20, 2008

Yeast with excellent ferment ability was isolated and selected from wild grape to manufacture wild grape wine. Wild grape wine by SMR-3 isolated from wild grape was better than other strains in quality, such as high alcohol content and low acidity, residual sugar, organic acid and fusel oil content. Fermentation condition was optimized to manufacture wild grape wine with response surface methodology using isolated SMR-3 as an alcohol fermentation strain. As a result of culture conditions, 10.61% of alcohol content was expected under the conditions of 21.91°C fermenting temperature, 21.48°brix of initial sugar content, and 14.65 day of fermentation time. Residual sugar content showed the lowest value at 24.48°C fermentation temperature, 12.78°brix of initial sugar content, and 9.02 day fermentation time. The highest level of sensory evaluation was found at 20.23°C fermentation temperature, 25.30°brix of initial sugar content, and 5.94 day fermentation time. Ethyl alcohol was the main alcohol component in wild grape wine and fusel oil in wild grape wine was hardly detected; thus, the quality of wild grape wine was considered excellent. The optimal fermentation conditions of wild grape wine was superimposed by deriving a regression equation for alcohol content, fusel oil, ethyl alcohol content, and overall palatability for each variable of wild grape wine. Hence, the optimal fermentation conditions are estimated to be: fermentation temperature 24~28°C, initial sugar content 20~24°brix, and fermenting time 12~14 days.

**Key words:** central composite design, fruit wine, fermentation condition, response surface methodology (RSM), wild grape

### 서 론

산머루는 왕머루(*Vitis amurensis* Ruprecht), 청까마귀머루(*Vitis ficifolia*), 까마귀머루(*Vitis thunbergii* var. *Simuata*), 새머루(*Vitis flexuosa*), 머위(*Vitis coignetiae* Pulliat ex Planch) 및 섬머루(*Vitis coignetiae* var. *glabrescens* Hara) 등이 알려져 있으며 이 중 왕머루(*Vitis amurensis* Ruprecht)가 대표적으로 산머루라 불리며 갈매나무목 포도과(*Vitaceae*)의 대형 낙엽덩굴식물로 산야에 자생하는 산과일이며 그 열매는 공모양으로 지름 약 8mm로, 가을에 익어 흑자색이 되면 신맛과 향이 독특하고, 그 성분이 우수하여 예로부터 민간의 식용 및 약용으로 애용되어 왔으며 분포지역은 중국, 일본, 우리나라 전역에 분포되어 자생하는 식물이다.<sup>1)</sup> 향약대사전, 생약도감 등의 고전에 따르면 머루

는 중창, 중호, 동상, 식욕촉진, 해독, 폐질환, 보혈, 지갈, 이노, 두통, 요통, 두풍, 대하증, 양혈, 폐결핵 및 허약증 등의 효능이 있어 예부터 약용으로 널리 사용되어 왔다.<sup>2)</sup> 산머루에는 칼슘, 인, 회분 등의 성분이 포도보다 10배 이상 높고 특히 항산화작용을 하는 안토시아닌 성분이 다량 함유되어 있는 알칼리 식품으로 체질을 약 알칼리성으로 개선시켜 인체의 자연 치유력을 높여주며, 호르몬 분비를 억제하여 신경을 차분하게 하고 신경성 두통에 효과가 있으며, 두뇌 활동을 촉진하여 기억력을 증진시켜 정신을 맑게 한다.<sup>3)</sup> 또한 비타민, 유기산, 미네랄 등의 성분은 심장을 강하게 하여 심장병을 예방하고 혈액순환을 원활하게 하므로 동맥경화, 고혈압에도 좋은 자연식품이다. 산머루는 생혈, 조혈작용을 하여 피를 깨끗하게 하고 인체의 정화를 도와주며 불순물을 배출시켜 주는 역할을 한다. 산머루의 안토시아닌은 항산화작용이 있어 혈관을 확장하고 인슐린 기능을 높여주는 역할을 하므로 당뇨에 좋으며 관절을 부드럽게 만들어 관절염에도 도움이 된다고 알려져 있다.<sup>4)</sup>

국내의 과실 발효주에 관한 연구로는 모과주,<sup>5)</sup> 포도주,<sup>6)</sup> 참

\*Corresponding author  
Phone: +82-54-972-9586; Fax: +82-54-979-9220  
E-mail: shkim@kbc.ac.kr

다래주,<sup>7)</sup> 수박주,<sup>8)</sup> 및 복숭아주<sup>9)</sup> 등이 있으며, 약재를 이용한 발효주에는 알로에주,<sup>10)</sup> 지골피주,<sup>11)</sup> 대추술,<sup>12)</sup> 벌꿀주<sup>13)</sup> 및 수종의 한약재를 첨가한 전통주<sup>14)</sup> 등 많은 연구를 통하여 전통주의 품질 향상에 크게 기여하였다. 그러나 지금까지 과일을 이용한 상용화된 발효주로는 주로 포도에 관한 것이며 이 포도주 제조 기술은 주로 외국에서 기술을 개발한 것으로, 포도와 품종이 유사한 국내 산머루를 이용한 새로운 발효주의 기술개발을 확립할 필요가 있으며 다양한 머루주의 제품을 개발시켜 농가소득과 국가소득 증대에도 일익을 담당할 수 있을 것이다. 머루에 관한 국내 연구로는 머루의 *antocyanin* 연구,<sup>15,16)</sup> 개량머루를 이용한 발효제품의 제조,<sup>17)</sup> 개량머루주의 감산에 관한 연구,<sup>18)</sup> 머루즙과 머루주의 성분분석과 항산화 효과,<sup>19)</sup> 및 머루종자의 항산화 물질분리와 동정<sup>20)</sup> 등의 보고가 있으며 최근 국내에서 본 연구와 유사한 산머루 와인의 최적 발효조건과 품질 특성<sup>21)</sup>에 대한 연구가 발표되었다. 외국의 경우 머루 *antocyanin*에 관한 연구<sup>22)</sup>와 중국산 머루의 내한성에 관한 연구<sup>23)</sup> 등으로 머루의 이용성에 관한 연구는 부족한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 최근 인공재배에 의해 대량생산되고 있는 산머루의 상품가치 증대와 우리나라 고유의 과실주의 개발을 위하여 산머루 발효주 제조의 최적 발효조건설정으로 산머루 고유의 맛과 향을 살리는 우수한 품질의 발효주를 제조하기 위하여 반응표면분석법에 따라 발효조건을 모니터링 하였다.

### 재료 및 방법

**재료.** 본 실험에 사용된 산머루(*Vitis amurensis* Ruprecht)는 지리산 근처의 산야에서 재배하는 산머루를 2005년 10월경에 수확하여 착즙 후 냉동 보관한 것을 지리산 산머루원에서 2006년 6월에 공급받아 냉동보관하면서 실험에 사용하였다.

**알코올 발효균주의 선발.** 산머루주 발효에 적합한 효모의 선별을 위해 실험실에 보관 중인 *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomces kluyveri*, *Zygosaccharomyces fermentati* 및 산머루 과실에서 순수 분리한 효모(SMR-1-4) 등 14종의 효모를 (Table 1)를 YM broth (Difco Co. USA)를 사용하여 30°C, 36시간 동안 전배양하여, 산머루 착즙액(15°brix)을 sucrose로서 20°brix로 조정된 산머루액에 전배양액 5%(v/v)를 주모로 접종하고 25°C에서 5일간 배양한 후 발효액의 알코올 함량이 높으며 이화학적 특성이 우수한 균주를 선별하였다.

**발효조건 최적화를 위한 실험계획.** 산머루 착즙액을 희석하거나 sucrose를 첨가하여 당도를 발효조건별 °brix로 조정하고, 균주 선별에서 최적균주로 선정된 *Saccharomyces* sp. SMR-3 배양액 주모를 5%(v/v)로 접종하여 Table 2와 같이 설정된 각각의 조건에 따라 발효하였다.

발효특성의 모니터링과 발효조건의 최적화를 위해 반응표면 분석법(response surface methodology, RSM)을 이용하였으며,<sup>24)</sup> 발효조건에 대한 실험계획은 중심합성계획(central composite design)<sup>25)</sup>을 실시하여 알코올발효조건에 중요한 독립변수( $X_i$ )로 고려되는 인자인 발효온도(15~31°C,  $X_1$ ), 초기당도(11~27°brix,  $X_2$ ) 및 발효시간(3~15 days,  $X_3$ )을 5단계 부호화하고(Table 2), 중심합성계획에 따라 16구간으로 설정하여 알코올발효실험을

Table 1. Microbial strains used for wild grape wine fermentation

Strain abbreviation	Organism	Sources
No. 10	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Grape
No. 11	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Grape
No. 12	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Grape
No. 901	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Grape
RCY-14	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Grape
R12	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Apple
DJ-97	<i>Saccharomyces kluyveri</i>	Persimmons
JK-99	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Persimmons
YJK	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Potato
OMK	<i>Zygosaccharomyces fermentati</i>	Potato
SMR-1		
SMR-2	<i>Saccharomyces</i> sp.	Wild grape
SMR-3		
SMR-4		

Table 2. Experimental design of fermentation conditions for wild grape wine

Fermentation conditions	-2	-1	0	1	2
$X_1$ Temperature (°C)	15	19	23	27	31
$X_2$ Intial sugar content (°brix)	11	15	19	23	27
$X_3$ Time (days)	3	6	9	12	15

실시하였다. 또한 이들 독립변수에 영향을 받는 종속변수( $Y_n$ )로는 알코올 함량( $Y_1$ ), 잔당 함량( $Y_2$ ), pH( $Y_3$ ), 산도( $Y_4$ ), 색도( $Y_5$ ), 유기산 함량( $Y_6$ ), fusel oil 및 ethanol 함량( $Y_7$ ) 및 관능적 특성( $Y_8$ ) 등을 측정하여 그 값을 회귀분석에 사용하였다. 또한 산머루주 제조에 있어서 알코올 발효조건이 산머루주의 이화학적 특성에 미치는 영향을 예측된 모델식을 바탕으로 Mathematica program<sup>26)</sup>을 이용하여 4차원 반응표면분석으로 해석하였다.

**알코올 함량 측정.** 알코올 함량은 발효액을 여과한 후 여과액을 증류하여 alcohol hydrometer로 측정된 값을 Gay Lussac 표에 대비하여 산출하였다.<sup>27)</sup>

**pH와 산도 측정.** 산머루주의 pH는 pH meter(pH meter 619, Metrohm Co., Swiss)로 측정하였고, 적정산도는 시료 20 ml를 취하여 0.1 N NaOH로 pH 8.4가 될 때까지 중화시키는데 소비되는 ml수를 구하여 tartaric acid값으로 환산하여 나타내었다.<sup>28)</sup>

**색도.** 발효액의 색도는 색차계(Chromometer, model CR-300, CT-310, Minolta Camera Co. Ltd., Japan)를 사용하여 각 시료의 L(lightness), a(redness), b(yellowness) 값을 3회 반복 측정하여 평균값으로 나타내었다. 이때 사용된 표준백판(standard plate)의 L, a, b 값은 각각 97.59, -0.05 및 1.27이었다.

**잔당 함량 측정.** 채취 시료를 Sep-pak C<sub>18</sub> cartridge와 0.45 µm membrane filter로 여과하여 HPLC로 분석하였다.<sup>29)</sup> 잔당의 동정은 표준품(Sigma Co., USA)의 retention time과 비교하여 확인하였고, 함량은 자동분석기에 의해서 계산된 함량으로 나타내었다. 이때 HPLC system은 LC-10AT(Shimadzu Co. Japan)이었고 컬럼은 Zorbax NH<sub>2</sub> column(4.6 mm×250 mm, Aglient Co.)을 이동상 용매로서 acetonitrile : water(80 : 20, v/v

v%)로 용매속도 1.0 ml/min, Refractive index detector로 표준당의 retention time과 비교하여 동정하였고, 자동분석기에 의해서 계산된 함량으로 나타내었다.

**유기산 함량.** 각 시료를 0.45 µm membrane filter로 여과하고, Sep-pak C<sub>18</sub> cartridge로 지질, 단백질, 색소물질 등을 제거하여 20 µl씩 HPLC에 주입하였다. 유기산 분석<sup>30)</sup>을 위한 HPLC system은 LC-10AT(Shimadzu Co. Japan)이었고 사용한 컬럼은 µ-Bondapak C<sub>18</sub>(4.6 mm×250 mm, Waters Co.)으로, 이동상 용매로서 0.1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>로 용매속도 0.5 ml/min, UV detector 210 nm를 사용하였고, 유기산의 표준품은 Sigma Co.(USA)의 malic acid, acetic acid, citric acid, succinic acid 및 fumaric acid를 사용하였고 표준품의 retention time과 비교하여 동정하였고, 함량은 자동분석기에 의해서 계산된 함량으로 나타내었다.

**Ethyl alcohol 및 fusel oil 분석.** 알코올과 fusel oil 분석시료는 알코올 함량 측정과 같이 증류한 후 0.45 µm membrane filter로 여과하여 GC로 분석하였으며,<sup>31)</sup> GC-17A(Shimadzu Co. Japan) system으로 column은 Supelcowax<sup>TM</sup>-10 fused silica capillary column(30 m×0.25 mm×0.25 µm, Supelco Co. USA)을 사용하였고 column 온도로서 초기온도 30~40°C(rate 1.5°C/min)에서 8°C/min의 속도로 최종온도 200°C로 실시하였으며 carrier gas는 N<sub>2</sub>/Air를 flame ion detector로서 detector 온도 220°C, injector 온도 220°C, split ratio는 50:1로 분석하였다. 각 fusel oil의 동정은 표준품(Sigma Co., USA)의 retention time과 비교하여 동정하였고, 함량은 자동분석기에 의해서 계산된 함량으로 나타내었다.

**관능검사.** 각 발효조건별로 제조된 산머루주에 대하여 관능검사는 음주경험이 있고 차이식별 능력이 있는 관능검사 요원 25명을 선정하여 색, 향, 맛, 전반적인 기호도에 대한 관능검사를 9점 채점법<sup>32)</sup>(1; 매우 좋지 않다/very poor, 3; 좋지 않다/poor, 5; 보통이다/fair, 7; 좋다/good, 9; 매우 좋다/very good)으로 실시하였다.

**통계처리.** 발효균주선정을 위한 발효액의 이화학적 검사에서는 각 시료에 대하여 3회 반복 측정하여 평균값 표준편차로 나타내었다.

**최적 알코올 발효조건 예측값 분석.** 발효조건 최적화에 의한 예측은 SAS program을 이용하였으며, 최적 알코올 발효조건 예측은 발효조건에 대한 contour map을 superimposing 하였을 때 중복되는 부분의 범위에서 예측하였다.<sup>33)</sup>

## 결과 및 고찰

**알코올 및 잔당함량.** 산머루주 알코올 발효에 적합한 균주를 선별하기 위해 균주를 접종한 산머루 발효액의 알코올 생성능을 조사한 결과는 Table 3과 같다. 알코올 함량은 14종의 효모 중 No. 11, DJ-97, OMK 및 SMR-3가 각각 9.8, 10.0, 9.6, 10.0 및 10.8로 나타나 상대적으로 발효력이 우수하였으며, 또한 이들 균주 발효액의 잔당함량은 다른 균주의 잔당함량 보다 낮게 검출되어 대부분의 발효성 당이 알코올로 전환된 것으로 사료된다.

**유기산 함량.** 포도주의 유기산의 함량 및 조성은 포도주의 맛을 크게 좌우한다. HPLC법으로 발효액 중 유기산 조성을 측정할 결과는 Table 4와 같다. 모든 균주 발효액의 유기산 함량은 3.3~4.7%로 나타났고 malic acid의 함량이 가장 높게 나타났다.

**Fusel oil 및 ethyl alcohol 함량.** 각 균주 발효액의 fusel oil 및 ethyl alcohol 함량을 검토한 결과는 Table 5와 같다. Acetaldehyde, methyl alcohol, *n*-propyl alcohol, *iso*-butyl alcohol 및 *iso*-amyl alcohol 등은 fusel oil의 성분으로 이들은 원료 중 함유되어 있는 아미노산으로부터 알코올 발효시에 효모에 의한 탈아미노 반응과 탈카르복시 반응에 의해 생성된다.<sup>34)</sup> 균주별 산머루의 발효액에서 ethyl alcohol 외 *n*-propyl alcohol, isobutyl alcohol 및 isoamyl alcohol 등이 미량 검출되었다.

Table 3. Alcohol and residual sugar contents after fermentation using the wild grape by different strains

Strain abbreviation	Alcohol contents (%)	Residual sugar content (%)			
		Fructose	Glucose	Sucrose	Total sugar
No. 10	5.5±0.5 <sup>1)</sup>	0.71±0.05	- <sup>2)</sup>	0.56±0.02	1.27±0.07
No. 11	9.8±0.3	0.27±0.06	0.13±0.03	0.45±0.03	0.85±0.12
No. 12	9.0±0.6	0.09±0.01	0.31±0.05	0.67±0.02	1.07±0.08
No. 901	6.9±0.4	1.19±0.09	0.57±0.01	0.57±0.01	2.33±0.11
RCY-14	9.5±0.3	0.65±0.01	0.22±0.04	0.52±0.05	1.39±0.10
R12	6.0±0.6	2.25±0.05	3.20±0.23	0.99±0.05	6.44±0.33
DJ-97	10.0±0.3	0.49±0.01	-	0.41±0.01	0.90±0.02
JK-99	9.6±0.5	0.66±0.01	-	0.39±0.04	1.05±0.05
YJK	8.4±0.6	0.48±0.03	3.11±0.04	0.46±0.03	4.05±0.10
OMK	10.0±0.4	0.45±0.01	-	0.52±0.04	0.97±0.05
SMR-1	4.8±0.6	6.59±0.25	3.19±0.06	1.35±0.02	11.13±0.33
SMR-2	6.2±0.6	0.19±0.02	2.59±0.05	3.13±0.05	5.91±0.12
SMR-3	10.8±0.3	0.06±0.01	0.09±0.01	0.40±0.01	0.55±0.03
SMR-4	4.0±0.5	6.84±0.13	3.31±0.31	6.59±0.36	16.74±0.80
Blank (Raw material)	-	6.25±0.41	4.12±0.35	8.26±0.21	18.63±0.97

<sup>1)</sup>Values are mean±SD (n = 3)

<sup>2)</sup>Not detected

**Table 4. Organic acid contents after fermentation using the wild grape by different strains**

Strain abbrev.	Organic acid content (%)					
	Malic acid	Acetic acid	Citric acid	Succinic acid	Tartaric acid	Total
No. 10	2.80±0.05 <sup>1)</sup>	- <sup>2)</sup>	0.23±0.05	0.07±0.001	0.53±0.08	3.63±0.181
No. 11	2.15±0.01	1.58±0.05	-	0.08±0.003	0.44±0.02	4.25±0.083
No. 12	2.19±0.03	1.04±0.03	0.16±0.02	0.02±0.004	0.53±0.02	3.94±0.104
No. 901	2.32±0.04	0.95±0.02	0.19±0.04	0.08±0.005	0.54±0.03	4.08±0.135
RCY-14	2.33±0.06	1.82±0.01	-	0.04±0.004	0.56±0.01	4.75±0.084
R12	2.34±0.03	1.71±0.02	-	0.07±0.004	0.55±0.09	4.67±0.144
DJ-97	2.25±0.02	0.79±0.02	0.18±0.03	0.09±0.005	0.57±0.02	3.88±0.095
JK-99	2.23±0.08	1.17±0.05	0.21±0.01	0.06±0.002	0.56±0.03	4.23±0.172
YJK	2.30±0.03	1.01±0.02	0.20±0.06	0.05±0.004	0.54±0.04	4.1±0.154
OMK	2.09±0.07	1.65±0.03	-	0.08±0.004	0.52±0.01	4.34±0.114
SMR-1	2.81±0.04	-	0.02±0.01	0.07±0.005	0.48±0.08	3.38±0.135
SMR-2	2.53±0.09	1.13±0.03	0.19±0.05	0.03±0.006	0.56±0.09	4.44±0.266
SMR-3	2.18±0.05	0.81±0.09	0.17±0.08	0.07±0.001	0.52±0.02	3.75±0.241
SMR-4	2.79±0.05	-	0.23±0.09	0.07±0.003	0.53±0.03	3.62±0.173
Blank (Raw material)	3.86±0.11	-	0.31±0.05	0.15±0.017	0.87±0.06	5.19±0.237

<sup>1)</sup>Values are mean±SD (n = 3)

<sup>2)</sup>Not detected

**Table 5. Fusel oil contents after fermentation using the wild grape by different strains**

Strain abbrev.	Fusel oil content (%)						
	Ethyl alcohol	Acet aldehyde	Methyl alcohol	n-Propyl alcohol	Isobutyl alcohol	Isoamyl alcohol	Total
No. 10	6.59±0.05 <sup>1)</sup>	- <sup>2)</sup>	-	0.01±0.001	-	0.05±0.007	0.06±0.008
No. 11	10.04±0.06	-	-	-	-	0.05±0.006	0.05±0.006
No. 12	8.62±0.06	-	-	-	-	0.06±0.001	0.06±0.001
No. 901	6.49±0.01	-	-	-	0.01±0.004	0.01±0.002	0.02±0.006
RCY-14	9.51±0.03	-	-	-	-	0.02±0.005	0.02±0.005
R12	6.31±0.04	-	-	0.02±0.005	-	0.01±0.007	0.03±0.012
DJ-97	9.94±0.06	-	-	-	-	0.01±0.004	0.01±0.004
JK-99	8.84±0.07	-	-	-	-	0.07±0.001	0.07±0.001
YJK	9.77±0.05	-	-	-	-	0.08±0.002	0.08±0.002
OMK	9.95±0.07	-	-	-	-	0.06±0.001	0.06±0.001
SMR-1	4.26±0.08	-	-	0.01±0.001	0.02±0.005	0.02±0.005	0.05±0.006
SMR-2	6.90±0.05	-	-	-	0.02±0.002	0.01±0.001	0.03±0.001
SMR-3	10.94±0.11	-	-	-	-	0.01±0.006	0.01±0.006
SMR-4	4.15±0.04	-	-	0.02±0.002	0.05±0.004	0.06±0.004	0.13±0.010
Blank (Raw material)	-	-	-	-	-	-	-

<sup>1)</sup>Values are mean±SD (n = 3)

<sup>2)</sup>Not detected

Ethyl alcohol 함량은 산머루에서 분리된 SMR-3 효모가 10.94%로 가장 높게 나타났다.

**이화학적 성질.** 각 효모에 따른 발효액의 이화학적 성질을 측정 한 결과는 Table 6과 같다. 산도 1.26%의 산머루 원료로서 산머루주를 제조한 결과 모든 처리구에서 산도가 저하하여 0.84~1.08%로 나타났으며, No. 901의 경우 0.84%로 원료에 비하여 33%, No. 11, 12 및 SMR-3의 경우 0.96%로 24%로 낮아졌다. 각 균주별 산머루주에 대한 pH 및 색도는 모든 구에서 유사한 결과를 나타내었다. 위의 모든 실험 결과에 따라 산머루주 알코올 발효에 가장 적합한 균주로 발효액의 잔당과 fusel 함량이 가장 적어 발효성 당이 알코올로 전환되어 알코올 함량이 높고 유기산 함량이 대체로 낮은 SMR-3를 최종 균주로 선발하였다.

김 등<sup>2)</sup>은 산머루와인의 제조를 위하여 거봉, 머스켓 베리에 이 및 산머루 등에서 20여종을 분리하고 이들 중 알코올 내성, 기포 생성능 및 향과 맛이 우수한 균주 4종을 최종 분리하여 산머루 와인 발효에 이용하였다.

**발효조건에 따른 발효주 특성의 모니터링.** 최적 알코올 발효 조건을 설정하기 위해, 앞서 선발된 알코올 생성능과 이화학적 성질이 우수한 SMR-3을 전배양하여 산머루즙에 첨가한 다음 증심합성계획에 의한 16구간의 조건에 따라 발효시험을 실시하고, 이때 얻어진 각각의 발효액에 대하여 알코올 함량, 잔당 함량, 유기산 함량 및 fusel oil 함량을 측정 한 결과는 Table 7~9에 나타내었다. 또한 이화학적 특성과 관능검사 결과는 Table 10에 나타내었다.

각각의 결과를 이용하여 반응표면 회귀분석을 실시하고 각

Table 6. pH, acidity and colors values after fermentation using the wild grape by different strains

Strain abbreviation	pH	Acidity (%)	Color values		
			L	a	b
No. 10	3.87±0.01 <sup>1)</sup>	1.08±0.05	39.15±0.07	48.16±0.12	55.31±0.08
No. 11	3.98±0.01	0.96±0.06	40.55±0.06	44.15±0.02	55.51±0.01
No. 12	3.96±0.03	0.96±0.03	37.32±0.12	48.31±0.08	55.42±0.02
No. 901	3.85±0.02	0.84±0.02	37.38±0.06	49.39±0.11	54.09±0.06
RCY-14	3.91±0.02	1.08±0.08	38.79±0.05	47.11±0.21	56.68±0.07
R12	3.93±0.01	1.02±0.05	42.60±0.06	44.36±0.15	57.51±0.05
DJ-97	3.95±0.03	1.02±0.11	40.17±0.01	48.55±0.16	58.47±0.01
JK-99	3.98±0.02	1.02±0.05	41.82±0.05	45.91±0.08	57.45±0.02
YJK	3.91±0.04	1.02±0.06	45.20±0.08	44.08±0.05	56.87±0.04
OMK	3.93±0.02	1.04±0.01	38.27±0.06	49.16±0.01	56.43±0.01
SMR-1	3.83±0.03	1.08±0.06	39.20±0.21	18.96±0.12	54.98±0.02
SMR-2	3.93±0.01	1.02±0.02	40.67±0.14	47.02±0.15	56.35±0.19
SMR-3	3.97±0.01	0.96±0.02	38.19±0.06	46.12±0.06	56.61±0.04
SMR-4	3.84±0.03	1.08±0.05	39.21±0.07	49.46±0.08	54.17±0.01
Blank (Raw material)	3.15±0.02	1.26±0.15	35.18±0.12	41.56±0.18	50.19±0.22

<sup>1)</sup>Values are mean±SD (n = 3)

Table 7. Experimental data on alcohol and residual sugar content of wild grape wine under different conditions based on central composite design by RSM

Exp. No. <sup>1)</sup>	Fermentation conditions			Alcohol content (%)	Residual sugar content(%)			
	Temperature (°C)	Initial sugar content (°brix)	Time (days)		Fructose	Glucose	Sucrose	Total sugar
1	27(1)	23(1)	12(1)	10.2	3.076	- <sup>2)</sup>	1.085	4.161
2	27(1)	23(1)	6(-1)	6.9	5.024	2.835	2.523	10.382
3	27(1)	15(-1)	12(1)	7.7	-	-	5.023	5.023
4	27(1)	15(-1)	6(-1)	6.6	0.478	-	0.253	0.731
5	19(-1)	23(1)	12(1)	8.0	1.417	0.488	3.654	5.559
6	19(-1)	23(1)	6(-1)	2.3	4.919	8.310	5.984	19.213
7	19(-1)	15(-1)	12(1)	7.8	-	-	6.112	6.112
8	19(-1)	15(-1)	6(-1)	1.8	1.068	0.844	2.186	4.098
9	23(0)	19(0)	9(0)	8.0	1.425	-	1.711	3.136
10	23(0)	19(0)	9(0)	6.8	1.719	-	2.184	3.903
11	31(2)	19(0)	9(0)	8.4	1.383	-	0.561	1.944
12	15(-2)	19(0)	9(0)	2.4	3.589	6.485	4.628	14.703
13	23(0)	27(2)	9(0)	6.2	5.838	6.321	7.856	17.016
14	23(0)	11(-2)	9(0)	5.0	-	-	1.245	1.245
15	23(0)	19(0)	15(2)	9.6	0.830	-	0.123	0.953
16	23(0)	19(0)	3(-2)	1.4	5.627	7.896	3.456	16.935

<sup>1)</sup>The number of experimental condition by central composite design.

<sup>2)</sup>Not detected

중속(반응)변수 즉, 알코올 함량, 잔당 함량, 유기산 함량, fusel oil 함량, pH, 산도, 색도 및 관능검사에 대한 회귀식을 얻었다. 또한 변수별 최적 발효조건과 품질 특성 값을 예측하여 Table 11와 12에 나타내었으며, 이들의 4차원 반응표면은 발효온도와 초기당도 및 발효시간을 독립변수로 하여 Fig 1~13에 각각 나타내었다. 뿐만 아니라 각 중속변수의 발효조건에 대한 영향을 Table 13과 14에 나타내었다.

**알코올 및 잔당함량 변화.** 중심합성계획에 의한 알코올 발효 조건에 따른 알코올 및 잔당의 함량은 Table 7에 나타내었고, 결과에 대한 반응표면 회귀식은 아래와 같다.

$$Y_{AC} = -44.817969 + 2.177344X_1 + 0.605469X_2 + 3.000000X_3 - 0.031250X_1^2 + 0.016406X_1X_2 - 0.028125X_2^2 - 0.076042X_1X_3 + 0.019792X_2X_3 - 0.052778X_3^2$$

$$Y_{RSA} = 60.068148 - 4.057953X_1 + 0.725250X_2 - 3.502479X_3 + 0.075063X_1^2 - 0.053609X_1X_2 + 0.077945X_2^2 + 0.112500X_1X_3 - 0.156729X_2X_3 + 0.150681X_3^2$$

알코올 함량에 대한 회귀식의 R<sup>2</sup>는 0.9800이고, 유의성은 1% 이내의 수준에서 인정되었다. 예측된 정상점(stational point)은 최대점이고, 이때 최대 알코올 함량은 10.11로 예측되었으며,

**Table 8. Experimental data on organic acid of wild grape wine under different conditions based on central composite design by RSM**

Experiment No. <sup>1)</sup>	Organic acid (%)					
	Malic acid	Acetic acid	Citric acid	Succinic acid	Fumaric acid	Total
1	0.802	0.381	0.199	<sup>2)</sup>	0.001	1.383
2	1.041	0.601	-	0.062	0.001	1.705
3	0.546	0.299	0.149	-	0.001	0.995
4	1.251	-	0.188	0.066	0.002	1.507
5	0.830	0.351	0.162	-	0.002	1.345
6	1.172	0.460	0.276	0.064	0.001	1.973
7	0.841	0.217	0.139	-	0.002	1.199
8	1.643	-	0.027	0.069	0.001	1.740
9	0.844	0.323	0.145	-	0.002	1.314
10	0.996	0.335	0.154	-	0.002	1.487
11	0.774	0.441	0.151	-	0.002	1.368
12	0.990	0.333	0.196	-	0.003	1.522
13	0.879	0.406	0.169	-	0.002	1.456
14	0.920	0.104	0.124	-	0.002	1.150
15	0.747	0.322	0.144	-	0.002	1.215
16	1.471	0.131	0.185	0.012	0.002	1.801

<sup>1)</sup>The number of experimental condition by central composite design.

<sup>2)</sup>Not detected

**Table 9. Experimental data on ethyl alcohol and fusel oil of wild grape wine under different conditions based on central composite design by RSM**

Experiment No. <sup>1)</sup>	Ethyl alcohol & Fusel oil (mg%)						
	Ethyl alcohol	Acet aldehyde	Methyl alcohol	n-Propyl alcohol	Isobutyl alcohol	Isoamyl alcohol	Total
1	10.802	<sup>2)</sup>	-	0.01	0.01	0.02	10.806
2	6.632	-	-	-	-	-	6.632
3	7.047	-	-	-	-	-	7.047
4	6.079	-	-	-	0.01	0.01	6.081
5	8.088	-	-	-	0.01	0.01	8.090
6	1.854	-	-	-	-	0.02	1.856
7	7.526	-	-	0.01	-	-	7.527
8	1.885	-	-	-	-	-	1.885
9	8.700	-	-	0.01	0.01	0.01	8.703
10	8.738	-	-	0.01	0.01	-	8.740
11	8.398	-	-	-	-	0.01	8.399
12	2.074	-	-	0.01	-	0.02	2.077
13	6.384	-	-	-	-	-	6.384
14	4.457	-	-	-	-	-	4.457
15	9.362	-	-	0.01	0.01	0.02	9.366
16	0.831	-	-	-	-	-	0.831

<sup>1)</sup>The number of experimental condition by central composite design.

<sup>2)</sup>Not detected

이때 발효조건들은 발효온도 22.82°C, 초기당도 21.80°brix 및 발효시간 14.62일이었다(Table 11). Fig. 1에서 보는 바와 같이 알코올 함량의 4차원 반응표면을 분석한 결과, 발효온도가 높고 발효시간이 길수록 알코올 함량이 증가하는 것으로 나타났다. 알코올 함량에 대한 발효조건 영향은 Table 13과 같이 발효온도 및 발효시간에 영향을 크게 받고 있었으며, 초기당도도 다소 영향을 받고 있는 것으로 나타났다.

김 등<sup>21)</sup>은 산머루액을 초기당도 24°brix로 조절하여 24°C에서 15일간 발효하였을 때, 알코올 함량이 12%로 나타났다고 보고 하여, 본 연구결과의 알코올 함량이 다소 낮은 것으로 나타났

다. 그러나 포도주의 알코올 함량이 대개 10~13%로 다양한 제품이 출시 판매되고 있고 포도주 선택성도 기호도에 따른 점 등으로 산머루의 제품도 다양한 품질의 제품이 필요할 것으로 사료된다.

각 조건별로 제조된 산머루주의 잔당함량은 0~19%의 값을 나타내어 각 발효액에 따라 큰 차이를 보였다. 이는 발효조건의 차이에 의한 것으로 알코올 함량과도 상관성이 있는 것으로 나타났다. 잔당함량에 대한 회귀식의 R<sup>2</sup>는 0.9609이고, 1% 이내에서 유의성이 인정되었다. 예측된 정상점은 최저점이고, 최저값은 -1.28%로 예측되었고, 이때 조건은 발효온도 24.83°C,

**Table 10. Experimental data on pH, acidity, hunter's color value and organoleptic properties of wild grape wine under different conditions based on central composite design by RSM**

Exp. No. <sup>1)</sup>	pH	Acidity (%)	Hunter's Color value			Organoleptic properties			
			L	a	b	Color	Flavor	Taste	Overall palatability
1	3.49	1.22	40.17	38.82	54.64	6.27	6.00	5.00	5.53
2	3.84	1.26	34.34	43.33	51.50	6.27	6.20	6.60	6.13
3	3.54	0.94	42.13	38.49	51.99	5.87	5.53	3.07	4.67
4	3.88	1.20	38.03	46.42	53.11	5.83	6.07	3.73	4.93
5	3.38	1.28	36.58	44.50	54.48	6.73	5.87	6.27	6.07
6	3.83	1.36	31.89	46.57	48.54	5.80	5.93	7.27	6.60
7	3.40	1.22	36.28	46.00	51.23	6.27	5.75	3.33	4.53
8	3.83	1.40	34.15	47.62	49.15	5.93	5.80	5.27	5.27
9	3.88	0.36	36.34	44.86	53.78	6.40	6.80	4.33	5.60
10	3.87	0.18	36.64	47.06	53.59	6.33	6.90	5.890	5.73
11	3.97	0.23	39.12	39.21	53.83	5.53	5.80	3.40	4.60
12	3.85	0.36	29.00	45.98	45.12	5.00	5.20	6.00	5.70
13	3.89	0.26	37.21	46.25	54.73	6.33	5.87	7.07	6.67
14	3.93	0.30	35.38	47.35	50.56	5.87	5.73	3.00	4.27
15	3.40	1.32	44.28	43.91	58.40	4.87	6.13	3.20	4.33
16	3.81	1.26	33.44	49.61	49.29	5.67	6.80	6.67	6.47

<sup>1)</sup>The number of experimental condition by central composite design.

**Table 11. Predicted levels of extraction conditions of wild grape wine for the maximum responses of variables by the ridge analysis**

Responses	R <sup>2</sup>	Pro > F	X <sub>1</sub> <sup>1)</sup> (°C)	X <sub>2</sub> <sup>2)</sup> (°brix)	X <sub>3</sub> <sup>3)</sup> (days)	Stational point	Morphology
Alcohol content	0.9800	0.0002	22.82	21.80	14.62	10.11	Maximum
Residual sugar content	0.9609	0.0014	24.83	12.87	9.04	-1.28	Minimum
Organic acid content	0.8000	0.1226	23.48	20.66	3.14	1.33	Saddle point
Fusel oil & ethyl alcohol content	0.9942	<.0001	24.53	21.77	12.46	10.30	Maximum
pH	0.7628	0.1827	29.01	14.37	7.09	3.94	Saddle point
Acidity	0.4431	0.8116	22.60	18.49	3.02	1.70	Saddle point

<sup>1)</sup>Fermentation temperature, <sup>2)</sup>Initial sugar content, <sup>3)</sup>Fermentation time

**Table 12. Predicted levels of extraction conditions of wild grape wine for the maximum responses of variables by the ridge analysis**

Responses	R <sup>2</sup>	Pro>F	X <sub>1</sub> <sup>1)</sup> (°C)	X <sub>2</sub> <sup>2)</sup> (°brix)	X <sub>3</sub> <sup>3)</sup> (days)	Stational point	Morphology
L	0.9479	0.0033	25.98	19.58	14.55	45.03	Saddle point
a	0.8955	0.0230	22.99	15.15	3.74	50.08	Saddle point
b	0.9151	0.0130	23.10	23.30	14.06	58.83	Saddle point
Color	0.6594	0.3908	23.74	23.73	9.19	6.62	Maximum
Flavor	0.8891	0.0270	23.98	19.38	6.73	6.79	Maximum
Taste	0.9431	0.0042	20.02	25.14	5.87	8.04	Maximum
Overall palatability	0.9594	0.0016	20.16	25.37	6.06	7.12	Maximum

<sup>1)</sup>Fermentation temperature, <sup>2)</sup>Initial sugar content, <sup>3)</sup>Fermentation time

초기당도 12.86°brix 및 발효시간 9.04일이었다. Fig. 2의 잔당 함량에 대한 반응표면에서 발효온도는 23°C 이상, 초기당도는 17°brix 이하, 발효시간은 8~12일의 범위에서 가장 낮은 함량인 것을 알 수 있었다. 잔당함량에 대한 발효조건 영향은 Table 13 과 같이 초기당도와 발효시간에 가장 큰 영향을 받고 있었으며, 발효온도에도 다소 영향을 받는 것으로 나타났다.

이러한 결과는 Kang 등<sup>35)</sup>의 마를 이용한 약소주 제조에서 담금 시에 잔당함량이 가장 높고, 발효가 진행되면서 잔당함량이 점점 감소한다고 보고한 결과와 유사한 경향이였다. 김 등<sup>21)</sup>은 산머루액을 초기당도 24°brix로 조절하여 24°C에서 15일간 발

효하였을 때 산머루 와인의 총당이 50 mg/m로 시판와인보다 높은 함량 이었다고 보고하였다. 그러나 이러한 고농도의 총당 함량이 산머루 자체의 신맛이 강하기 때문에 남아있는 총당으로 신맛을 감화시키고 신맛과 단맛의 어우러짐이 산머루 와인의 맛과 향을 증대 시킨다고 고찰하였다.

**유기산의 함량 변화.** 포도주의 유기산 함량 및 조성은 포도 주류의 맛을 크게 좌우하는 것으로 알려져 있다.<sup>36)</sup> 발효 조건 별 유기산 함량 변화는 Table 8에 나타내었으며, 유기산 조성에 있어서 malic acid가 비교적 높은 함량을 나타내었다. 또한 결과에 대한 반응표면 회귀식은 아래와 같다.

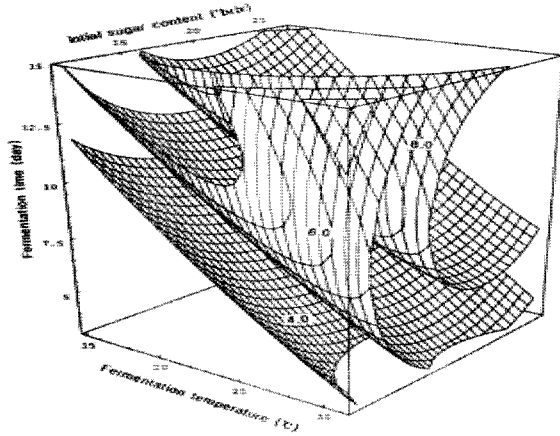


Fig. 1. Four-dimensional response surface for alcohol content of wild grape wine at constant values (4.0, 6.0, 8.0%) as functions of fermentation temperature, initial sugar content and fermentation time.

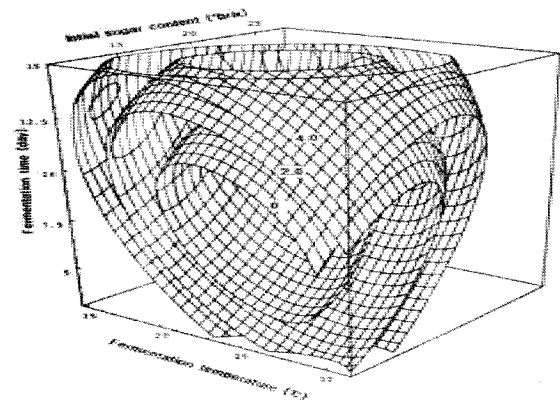


Fig. 2. Four-dimensional response surface for residual sugar content of wild grape wine at constant values (0, 2.0, 4.0%) as functions of fermentation temperature, initial sugar content and fermentation time.

$$Y_{OA} = 6.823062 - 0.187742X_1 + 0.010992X_2 - 0.433479X_3 + 0.000695X_1^2 + 0.008695X_1X_2 - 0.003078X_2^2 - 0.001240X_1X_3 - 0.005260X_2X_3 + 0.019417X_3^2$$

산머루주의 유기산 함량에 대한 회귀식의 R<sup>2</sup>는 0.8000이고, 10% 이내에서 유의성은 인정되지 않았다. Table 11과 같이 예측된 정상점은 안장점(saddle point)으로 능선분석을 실시하여 본 결과 최대값은 1.33%로 예측되었다. 이 예측값을 얻을 수 있는 조건은 발효온도 23.48°C, 초기당도 20.66°brix 및 발효시간 3.14일로 나타났다. 발효조건별 유기산 함량 변화의 반응표면은 Fig. 3과 같이 발효시간이 짧아질수록 유기산 함량은 증가하는 것으로 나타났으며, 발효시간이 7일 이하의 범위에서 높은 값을 나타내는 것을 알 수 있었으며, Table 13에서도 알 수 있듯이 발효시간에 영향을 받고 있었으며, 발효온도 및 초기당도에는 거의 영향을 받지 않는 것을 알 수 있었다. 산머루주는 전반적으로 유기산 함량이 높게 나타났고 특히 malic acid의 함량이 높게 나타나, 산머루주의 강한 산미의 원인으로 작용될 것이라 생각된다. Amerine 등<sup>37)</sup>은 유기산의 종류가 과실 및 과실주의 산미에 미치는 영향을 검토한 결과 총산도가 동일하였을

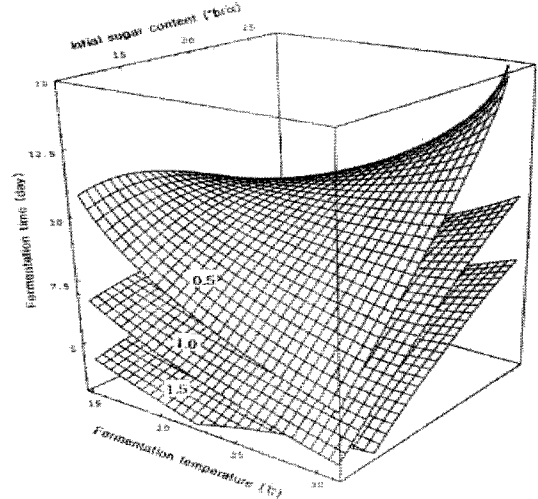


Fig. 3. Four-dimensional response surface for organic acid content of wild grape wine at constant values (0.5, 1.0, 1.5%) as a function of fermentation temperature, initial sugar content and fermentation time.

때 사과산 > 주석산 > 구연산 > 젖산의 순으로 산미가 강하였고 동일 pH에서는 사과산 > 젖산 > 구연산 > 주석산의 순으로 산미가 강하였다고 보고하였다.

**Fusel oil 및 ethyl alcohol 함량 변화.** 발효조건에 따른 fusel oil 및 ethyl alcohol 함량은 Table 9와 같으며, 결과에 대한 반응표면 회귀식은 아래와 같다.

$$Y_{F\&EC} = -63.911047 + 3.110211X_1 + 1.245477X_2 + 3.684125X_3 - 0.054422X_1^2 + 0.023883X_1X_2 - 0.051539X_2^2 - 0.077677X_1X_3 + 0.032031X_2X_3 - 0.100625X_3^2$$

Ethyl alcohol은 당으로부터 효모발효에 의해 생성되는 주요 성분으로서 과실주뿐만 아니라 약주와 탁주 및 증류주에서도 주요 향미성분으로 관여하는 것으로 알려져 있다.<sup>38)</sup>

Ethyl alcohol 함량에 대한 회귀식의 R<sup>2</sup>는 0.8197이고, 5% 유의수준에서 유의성이 인정되었다. Table 11과 같이 예측된 정상점은 최대점이고, 최적 예측조건은 발효온도 24.21, 초기당도 19.70°brix 및 발효시간 9.59일로 나타났으며, 최대값은 10.30%로 예측되었다. 발효조건에 따른 ethyl alcohol 함량 변화의 반응표면은 Fig. 4와 같이 나타났으며, ethyl alcohol 함량이 가장 높은 범위는 발효온도는 21~25°C, 초기당도 19~23°brix, 발효시간 8~11일 이었다. 또한 Table 13에서와 같이 발효온도에 영향을 가장 크게 받으며 다음으로 발효시간에 영향을 받으나, 설정된 범위 내에서는 초기당도에 대해서는 영향을 거의 받지 않았다. 각 조건별 산머루주에서 acetaldehyde, n-propyl alcohol, isobutyl alcohol 및 isoamylalcohol 등의 fusel oil은 미량 검출되었다. 주류 중의 fusel류는 소량으로 존재할 경우 맛과 향을 높이는 역할을 하지만 그 함량이 많으면 향미가 나빠지고 숙취의 원인이 되는 것으로 알려져 있다.<sup>39)</sup> 우리나라 식품공전상<sup>40)</sup>의 fusel류의 규격은 0.1%이하로 규정되어 있어 본 실험의 산머루주는 에탄올 함량을 제외한 퓨젤유만을 대상으로 하였을 때 규격에 적합한 것으로 나타났다.

**pH 변화.** 발효조건에 따른 pH 변화는 Table 10과 같고, 결



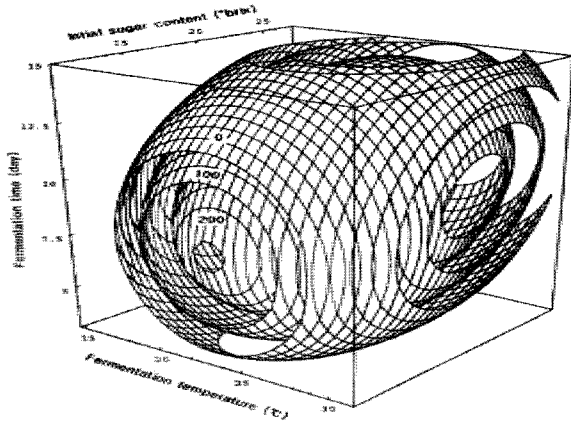


Fig. 4. Four-dimensional response surface for fusel oil & ethanol content of wild grape wine at constant values (0, 100, 200 mg%) as functions of fermentation temperature, initial sugar content and fermentation time.

과에 대한 반응표면 회귀식은 아래와 같다.

$$Y_{\text{pH}} = 4.090234 - 0.023984X_1 - 0.008359X_2 + 0.046525X_3 + 0.000547X_1^2 - 0.000547X_1X_2 + 0.000547X_2^2 + 0.001979X_1X_3 - 0.000312X_2X_3 - 0.007500X_3^2$$

회귀식의  $R^2$ 는 0.7628이었고, 유의성은 10% 이내의 유의수준에서 인정되지 않았다. 예측된 정상점은 안장점이므로 능선 분석을 한 결과, 최대값은 pH 3.94이었고 이때의 발효조건은 발효온도 29.01°C, 초기당도 14.37°brix 및 발효시간 7.09일이었다.

Fig. 5와 같이 발효시간이 짧아질수록 pH는 점차 증가하였다. pH에 대한 발효조건을 살펴보면 Table 13과 같이 발효시간의 영향이 가장 크게 나타났으며, 다음으로 발효온도에 영향을 받았으나 설정된 범위내의 초기당도에 대해서는 거의 영향을 받지 않았다.

Wine류의 pH는 table wine이 pH 3.6, dessert wine은 pH 3.8 이하 일 때 안정하다고 하였다.<sup>41)</sup> 따라서 본 실험의 산머루 발효액 모두는 pH 상으로 보아서는 dessert wine의 상태와 비슷한 형태라 판단된다. 또한 김 등<sup>21)</sup>은 산머루와인의 최종 pH가 3.59로 시판와인의 pH인 3.61~3.86 보다 낮게 나타났다고 보고하여 본 연구와는 다소 다른 결과였다.

**총산도 변화.** 발효조건에 따른 총산도의 변화는 Table 10과 같으며, 결과에 대한 반응표면 회귀식은 아래와 같다.

$$Y_A = 5.077734 - 0.075781X_1 - 0.089062X_2 - 0.572917X_3 + 0.000391X_1^2 + 0.002500X_1X_2 + 0.000156X_2^2 - 0.000417X_1X_3 + 0.003333X_2X_3 + 0.028333X_3^2$$

회귀식의  $R^2$ 는 0.4431로 유의성은 인정되지 않았다. 예측된 정상점은 안장점으로 능선분석 결과, 최소값은 0.20%과 최대값은 1.70%이었고, 이때의 최소값은 발효온도 27.55°C, 초기당도 19.15°brix 및 발효시간 9.02일 이었고 최대값은 발효온도 22.60°C, 초기당도 18.49°brix 및 발효시간 3.02일이었다. Fig. 6과 같이 발효시간이 짧을수록 총산도가 높았으며, Table 13의 총산도에 대한 발효조건을의 영향은 모든 변수에 대해서 영향이 없었

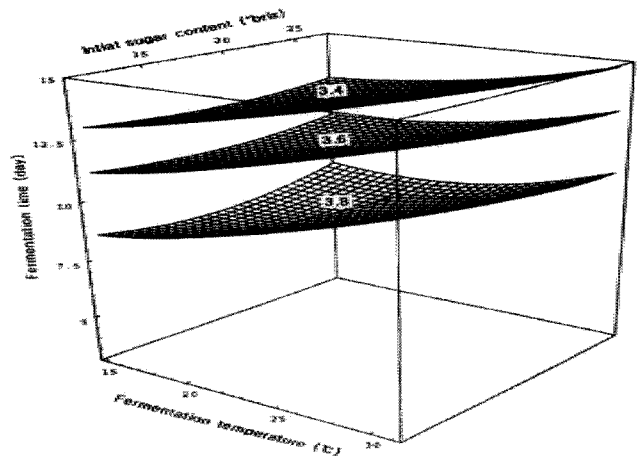


Fig. 5. Four-dimensional response surface for pH of wild grape wine at constant values (3.4, 3.6, 3.8) as functions of fermentation temperature, initial sugar content and fermentation time.

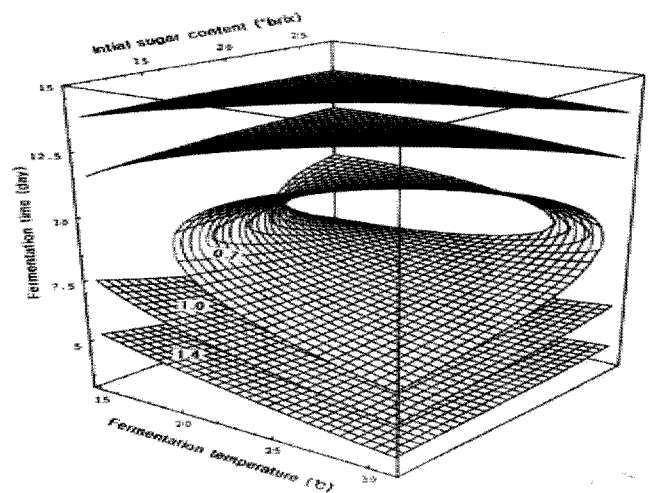


Fig. 6. Four-dimensional response surface for acidity of wild grape wine at constant values (0.7, 1.0, 1.4%) as a function of fermentation temperature, initial sugar content and fermentation time.

다. 이는 본 실험의 3가지 발효조건과 산머루와인의 산도와는 상관관계가 없는 결과라 판단된다.

김 등<sup>21)</sup>이 제조한 산머루와인은 초기당도 24°brix로 조절하여 24°C에서 발효하였을 때 총산도는 0.95%으로 시판용 와인의 산도 0.57~0.71% 보다 높은 산도의 결과가 나타났고, 이는 포도보다 신맛이 강한 산머루 원료가 그 원인이라고 고찰하였다.

**색도 변화.** 중심합성계획에 의해 제조된 산머루주의 색차계의 색도를 측정 한 결과 L값은 29.00~44.28이었으며, a값은 38.49~49.61의 범위이었고, b값은 45.12~58.40의 범위를 나타내었다(Table 10). 또한 그 결과에 대한 반응표면 회귀식은 다음과 같다.

$$Y_L = 3.547656 + 2.565391X_1 + 0.314922X_2 - 1.978542X_3 - 0.037969X_1^2 - 0.028828X_1X_2 - 0.003047X_2^2 + 0.032396X_1X_3 + 0.044687X_2X_3 + 0.065833X_3^2$$

$$Y_a = 27.974375 + 2.793828X_1 - 0.847891X_2 + 0.542500X_3 -$$

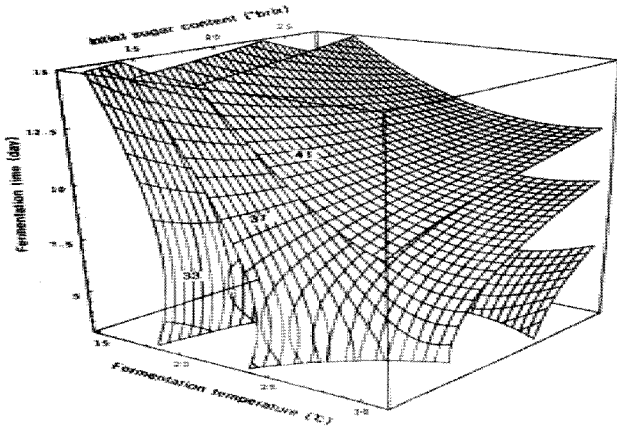


Fig. 7. Four-dimensional response surface for lightness of wild grape wine at constant values (33, 37, 41) as functions of fermentation temperature, initial sugar content and fermentation time.

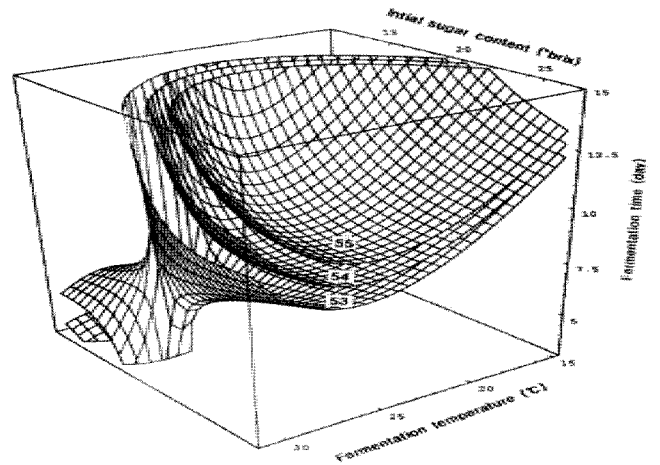


Fig. 9. Four-dimensional response surface for yellowness of wild grape wine at constant values (53, 54, 55) as functions of fermentation temperature, initial sugar content and fermentation time.

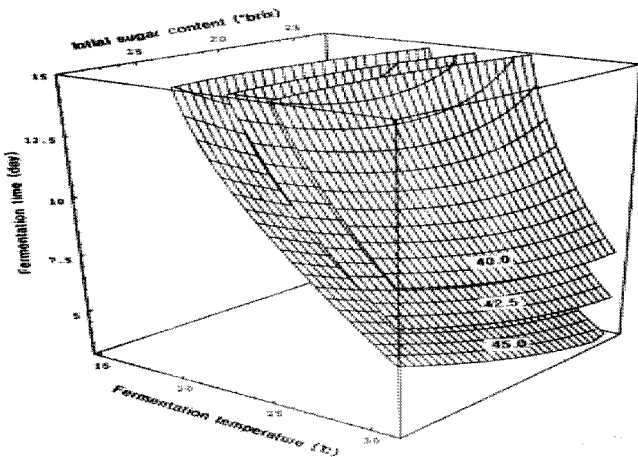


Fig. 8. Four-dimensional response surface for redness of wild grape wine at constant values (40.0, 42.5, 45.0) as functions of fermentation temperature, initial sugar content and fermentation time.

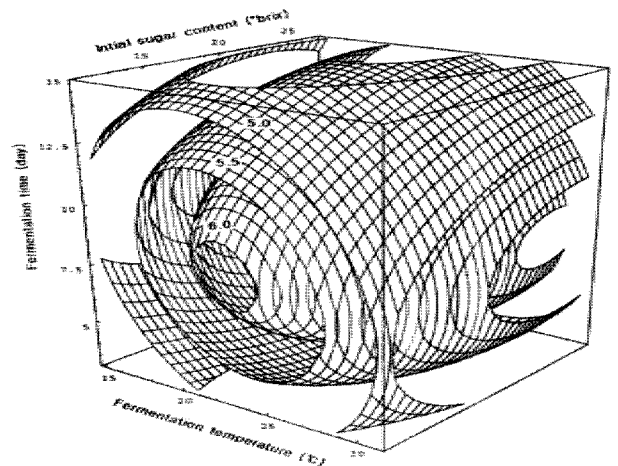


Fig. 10. Four-dimensional response surface for organoleptic color of wild grape wine at constant values (5.0, 5.5, 6.0) as functions of fermentation temperature, initial sugar content and fermentation time.

$$0.052813X_1^2 - 0.001641X_1X_2 + 0.012891X_2^2 - 0.091146X_1X_3 + 0.030937X_2X_3 + 0.021806X_3^2$$

$$Y_b = -8.792031 + 4.220625X_1 + 0.331563X_2 + 0.339167X_3 - 0.065781X_1^2 - 0.012500X_1X_2 - 0.016250X_2^2 - 0.062500X_1X_3 + 0.084583X_2X_3 + 0.004444X_3^2$$

L값의 R<sup>2</sup>가 0.9479, a값의 R<sup>2</sup>가 0.8955 및 b값의 R<sup>2</sup>가 0.9151로 나타났으며, L값은 1% 이내에서, a값 및 b값은 5% 이내에서 유의성이 인정되었다(Table 12). 최적 예측조건에서 예측된 정상점이 안장점(saddle point)으로 나타나 능선분석(ridge analysis)을 실시하였다. L값은 발효온도 25.98°C, 초기당도 19.58°brix 및 발효시간 14.55일 일때 가장 높은 45.03을 나타내었으며, a값은 발효온도 22.99°C, 초기당도 15.15°brix 및 발효시간이 3.74일 일때 가장 높은 50.08을 나타내었다. b값은 발효온도가 23.10°C, 초기당도 23.30°brix 및 발효시간이 14.06일 일때 가장 높은 58.83을 나타내었다.

발효조건에 따른 색도에 대한 반응표면을 보면 L값(Fig. 7)

에서는 발효온도가 높을수록, 발효시간이 길어질수록 높은 값을 나타내었으며, a값(Fig. 8)은 발효시간이 짧을수록 값이 증가하였다. 또한 b값(Fig. 9)에서는 발효시간이 길어질수록 증가하였다. Table 14에서 보는 바와 같이 색도에 대한 발효조건에 따른 영향은 L값, a값 및 b값 모두 초기당도보다는 발효온도와 발효시간에 더 많은 영향을 받는 것으로 나타났다.

**산머루주의 관능적 특성.** 중심합성계획에 의해 16구간으로 발효조건에 따라 산머루주를 제조하고, 관능검사를 실시하여 색, 향, 맛 및 전반적인 기호도를 Table 10에 나타내었다. 발효온도, 초기당도 및 발효시간을 실험계획을 바탕으로 제조된 16구간의 산머루주에 대해서 9점 채점법에 따라 관능적 품질을 평가해 본 결과 색은 4.87~6.73, 향은 5.20~6.90, 맛은 3.00~7.27 및 전반적인 기호도는 4.27~6.67로 발효조건에 따라 많은 차이를 나타내었다(Table 10). 또한 산머루주의 색, 향, 맛 전반적인 기호도의 관능검사 결과를 SAS program을 이용하여 회귀 분석한 결과 반응표면 회귀식은 아래와 같다.

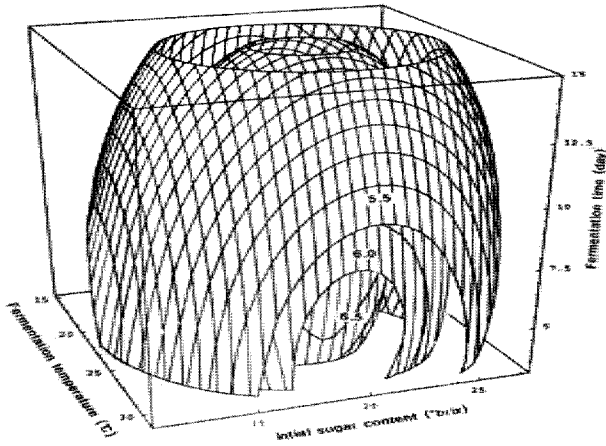


Fig. 11. Four-dimensional response surface for organoleptic flavor of wild grape wine at constant values (5.5, 6.0, 6.5) as functions of fermentation temperature, initial sugar content and fermentation time.

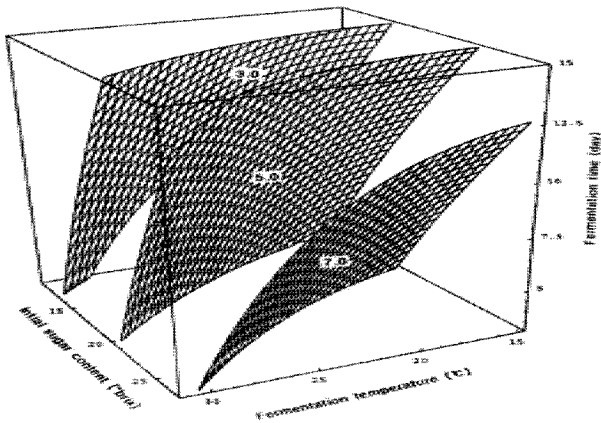


Fig. 12. Four-dimensional response surface for organoleptic taste of wild grape wine at constant values (3.0, 5.0, 7.0) as functions of fermentation temperature, initial sugar content and fermentation time.

$$Y_C = -7.202344 + 0.839141X_1 + 0.046797X_2 + 0.727292X_3 - 0.017188X_1^2 + 0.003984X_1X_2 - 0.004141X_2^2 - 0.012813X_1X_3 + 0.005729X_2X_3 - 0.030417X_3^2$$

$$Y_F = -11.321016 + 1.003203X_1 + 0.547266X_2 + 0.232500X_3 - 0.021094X_1^2 + 0.002734X_1X_2 - 0.016406X_2^2 - 0.006563X_1X_3 + 0.003438X_2X_3 - 0.010694X_3^2$$

$$Y_T = 2.822422 + 0.079688X_1 + 0.322344X_2 - 0.350833X_3 - 0.005703X_1^2 - 0.001094X_1X_2 - 0.000469X_2^2 + 0.007083X_1X_3 - 0X_2X_3 - 0.003611X_3^2$$

$$Y_{Op} = -2.839609 + 0.398672X_1 + 0.425547X_2 - 0.073542X_3 - 0.008047X_1^2 - 0.006328X_1X_2 - 0.003047X_2^2 + 0.004271X_1X_3 - 0.001354X_2X_3 - 0.007361X_3^2$$

이때 발효조건 변화에 따라 산머루주의 색, 향, 맛 및 전반적인 기호도에 대한 반응표면 회귀분석 결과에서 회귀식의  $R^2$ 는 0.6594, 0.8891, 0.9431 및 0.9594로 나타났으며, 색을 제외하고 각각 5%, 1% 및 1%의 유의수준에서 유의성이 인정되었

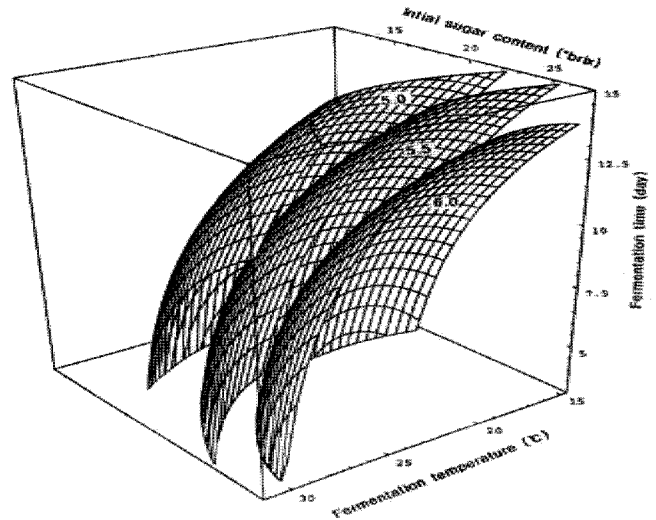


Fig. 13. Four-dimensional response surface for overall palatability of wild grape wine at constant values (5.0, 5.5, 6.0) as functions of fermentation temperature, initial sugar content and fermentation time.

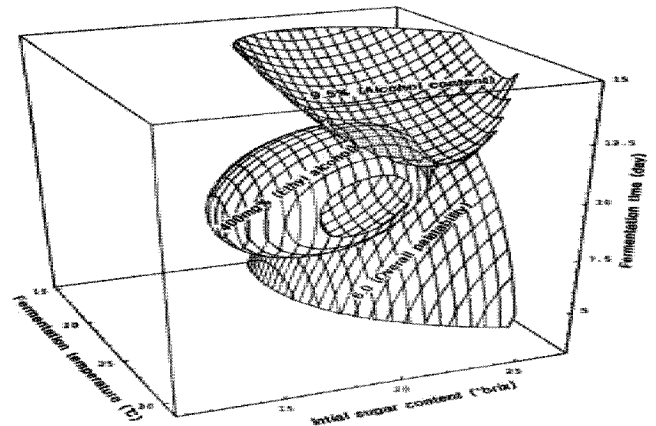


Fig. 14. Superimposed response surface for optimization of alcohol content, ethyl alcohol content and overall palatability as functions of fermentation temperature, initial sugar content and fermentation time of wild grape wine.

다(Table 12).

예측된 정상점은 모두 최대점이고, 최대의 관능점수를 나타내는 발효조건은 색에 있어서 발효온도 23.74°C, 초기당도 23.73°brix 및 발효시간 9.19일로 나타났으며, 향은 발효온도 23.98°C, 초기당도 19.38°brix 및 발효시간 6.73일 일때 가장 좋은 점수를 나타내었다. 또한 맛의 경우 발효온도 20.02°C, 초기당도 25.14°brix 및 발효시간 5.87일 일때 최대값을 나타내었으며, 전반적인 기호도에 있어서 발효온도 20.16°C, 초기당도 25.37°brix 및 발효시간 6.06일에서 최대의 관능점수를 나타내었다(Table 12).

Table 14에서 보는 바와 같이 색에 대한 발효조건에 대한 영향은 설정된 범위내에서 모든 발효조건에 대한 영향은 거의 없는 것으로 나타났으며, 향과 맛 및 전반적인 기호도에 있어서는 초기당도에 영향을 가장 많이 받으며 다음으로 발효온도와 발효시간이 영향을 미치는 것으로 나타났다.

**Table 13. Regression analysis for regression model of alcohol, residual sugar, organic acid, fusel oil & ethyl alcohol content, pH and acidity in fermentation condition for wild grape wine**

Fermentation condition	F-Ratio					
	Alcohol content	Residual sugar content	Organic acid content	Fusel oil & ethyl alcohol content	pH	Acidity
Temperature (°C)	29.02***	7.56**	0.12	102.77***	0.24	0.05
Initial sugar content (°brix)	4.07*	19.16***	0.58	32.92***	0.04	0.02
Time (days)	48.70***	14.84***	5.17**	173.74***	4.08*	0.79

\*Significant at 10% level; \*\* significant at 5% level; \*\*\*significant at 1% level.

**Table 14. Regression analysis for regression model of hunter's color value and organoleptic properties in fermentation condition for wild grape wine**

Fermentation condition	F-Ratio						
	L	a	b	Color	Flavor	Taste	Overall palatability
Temperature (°C)	12.11***	7.19**	7.39**	1.69	8.55**	3.75*	4.05*
Initial sugar content (°brix)	0.68	0.47	2.21	0.48	5.03**	14.44***	22.34***
Time (days)	13.67***	5.16**	7.42**	1.67	2.12	6.71**	9.84***

\*Significant at 10% level; \*\* significant at 5% level; \*\*\*significant at 1% level.

**Table 15. The range of optimum fermentation condition for maximum response variables by superimposing response surface of alcohol content, ethyl alcohol and overall palatability of wild grape wine**

Fermentation condition	Range of predicted condition (optional point)
Temperature (°C)	24~28 (25)
Initial sugar content (°brix)	20~24 (22)
Time (days)	12~14 (13)

Mathematica program을 이용하여 발효온도, 초기당도 및 발효시간에 따른 관능특성을 Fig. 10~13에 나타내었다. 색에 관한 관능적 특성(Fig. 10)은 발효시간 5~11일에서 최대의 관능점수를 나타내고 그 전후로 하여 감소하였으며, 산머루주의 향에 대한 발효조건의 영향(Fig. 11)은 초기당도가 18~20°brix 범위에서 최대의 관능점수를 나타내고 그 전후로 하여 감소하였다. 맛에 대한 관능적 특성(Fig. 12)은 초기당도가 높을수록 관능점수가 증가하는 경향을 나타내었다. 또한 전반적인 기호도에 대한 관능적 특성(Fig. 13)은 맛과 유사한 경향을 나타내어 초기당도에 영향을 많이 받으며 초기당도가 높을수록 관능점수가 증가하는 경향을 나타내었다. 이러한 결과로 적절한 발효조건으로 인하여 선호도가 우수한 산머루주를 제조할 수 있을 것이라 사료된다.

**최적 발효조건의 예측.** 고품질의 산머루주 제조를 위해 산머루의 최적 알코올 발효조건을 설정하고자 각 조건에 따라 발효된 산머루주의 알코올함량 9.5% 이상, fusel oil 및 ethyl alcohol 10.3% 이상, 관능적 특성 중 전반적인 기호도 6.0 이상에 대한 4차원 반응표면을 superimposing 하였다(Fig. 14). 이 반응표면으로부터 설정될 수 있는 최적조건 범위는 Fig. 14의 점침 부분으로써 Table 15와 같이 산머루주 발효 최적조건 범위는 발효온도 24~28°C, 초기당도 20~24°brix 및 발효시간 12~14일이었다. 따라서 이로부터 최적점이라고 예상되는 발효

온도 25°C, 초기당도 22°brix, 발효시간 13일을 임의의 최적발효조건으로 예측하였다.

### 초 록

산머루 발효주 제조를 위하여 산머루에 자생하고 있는 발효력이 우수한 효모를 분리 선별하였다. 최종 선별된 균주는 산머루에서 분리한 SMR-3이 알코올 발효력이 우수하고 산도, 잔당, 유기산 함량 및 fusel oil 등의 함량이 낮아 품질면에서 다른 균주로 발효한 산머루주보다 우수하였다. SMR-3을 이용하여 산머루주 제조 최적화를 위한 반응표면 분석결과 알코올 함량이 가장 높은 배양조건으로 온도 21.91°C, 당함량 21.48°brix, 발효시간 14.65일의 조건에서 알코올 함량 10.61%가 예상되었고, 잔당함량은 24.48°C, 12.78°brix, 발효시간 9.02일의 조건에서 최소값을 나타내었다. 관능평가의 결과 발효온도 20.23°C, 초기당도 25.30°brix, 발효시간 5.94일에서 최대값을 나타내었다. 알코올 중 ethyl alcohol이 대부분이었고, fusel oil은 거의 검출되지 않아서 산머루주의 품질이 우수한 것으로 판단된다. 각 변수에 대한 회귀식을 도출하여 인자별 산머루주의 알코올 함량, fusel oil, ethyl alcohol 함량 및 전반적인 기호도에 대한 최적 발효조건을 superimposing한 결과 발효온도 24~28°C, 초기당도 20~24°brix 및 발효시간 12~14일의 범위로 각각 예측되었다.

**Key words:** central composite design, fermentation condition, fruit wine, response surface methodology(RSM), wild grape

### 참고문헌

1. Kim, C. M., Shin, M. K., Ahn D. G. and Lee, K. S. (1998) In *Joongyakdaesajun*. Jung dam, Seoul.

2. Jung, B. S. and Shin, M. K. (1998) In *Hyangyakdaesajun*. Younglimsa, Seoul.
3. Hwang, I. K. and Ahn, S. Y. (1975) Studies on the anthocyanins in wild vines. *J. Korean Agric. Chem. Soc.* **18**, 183-193.
4. Yook, C. S. (1997) In *Saengyakdogam*. Kyungwonchulpansa, Seoul.
5. Lee, D. H., Kim, J. H., Kim, N. M., Choi, J. S. and Lee, J. S. (2002) Physiological functionality of Chinese quince wine and liquors. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **17**, 266-270.
6. Yoo, J. Y., Seog, H. M., Shin, D. H. and Min, B. Y. (1984) Enological characteristics of Korean grape and quality evaluation of their wine. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **12**, 185-190.
7. Woo, S. M., Choi, I. W. and Jeong, Y. J. (2006) Effect of kiwi wine and kiwi liqueur on sensory characteristics as cooking alcohol. *Korean J. Food Preserv.* **13**, 519-523.
8. Hwang, Y., Lee, K. K., Jung G. T., Ko, B. R., Choi, D. C., Choi, Y. G. and Eun, J. B. (2004) Manufacturing of wine with watermelon. *Korean J. Food Sci. Technol.* **36**, 50-57.
9. Yi, S. H., Ann, Y. G., Choi, J. S. and Lee, J. S. (1996) Development of peach fermented wine. *Korean J. Food & Nutr.* **9**, 409-412.
10. Park, J. S., Sung, C. G. and Chang, K. W. (1996) Change of barbaloin contents in Aloe wine. *Agric. Chem. & Biotechnol.* **39**, 183-188.
11. Park, J. S., Seo, G. S., No, J. G., Cho, I. S. and Park, J. H. (1995) Characteristics of the Gigolphy (*Lycii cortex Radicis*) wine. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* **3**, 128-134.
12. Kang, H. A., Chang, K. S., Min, Y. K. and Choi, Y. H. (1998) Value addition of jujube wine using microfiltration and ultrafiltration. *Korean J. Food Sci. Technol.* **30**, 1146-1151.
13. Rhim, J. W., Kim, D. H. and Jung, S. T. (1997) Production of fermented honey wine. *Korean J. Food Sci. Technol.* **29**, 337-342.
14. Kim, Y. S. and Park, Y. S. (2007) The production of traditional alcoholic beverage in containing medicinal herb. *Food Sci. & Indus.* **40**, 83-89.
15. Hwang, I. K. and Ahn, S. Y. (1975) Studies on the anthocyanins in wild vines (*Vitis amurensis* Ruprecht) (I); Separation and determination of anthocyanins in wild vines. *J. Korean Agric. Chem. Soc.* **18**, 183-187.
16. Hwang, I. K. and Ahn, S. Y. (1975) Studies on the anthocyanins in wild vines (*Vitis amurensis* Ruprecht) (II); Identification of anthocyanins in wild vines. *J. Korean Agric. Chem. Soc.* **18**, 188-193.
17. Kim, S. Y. and Kim, S. K. (1997) Wine making from new wild grape. *Korean J. Food & Nutr.* **10**, 254-262.
18. Kim, S. G. (1996) Deacidification of new wild grape wine. *Korean J. Food & Nutr.* **9**, 265-270.
19. Choi, S. Y., Cho, H. S., Kim, H. J., Ryu, C. H., Lee, J. O. and Sung, N. J. (2006) Physicochemical analysis and antioxidative effects of wild grape (*Vitis coignetiea*) juice and its wine. *Korean J. Food & Nutr.* **189**, 311-317.
20. Kim, N. Y., Choi, J. H., Kim, Y. G., Jang, M. Y., Moon, J. H., Park, G. H. and Oh, D. H. (2006) Isolation and identification of an antioxidant substance from ethanol extract of wild grape (*Vitis coignetiea*) seed. *Korean J. Food Sci. Technol.* **38**, 109-113.
21. Kim, E. J., Kim, Y. H., Kim, J. W., Lee, H. H., Ko, Y. J., Park, M. H., Lee, J. O., Kim, Y. S., Ha, Y. L. and Ryu, C. H. (2007) Optimization of fermentation process and quality properties of wild grape wine. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **36**, 366-370.
22. Igarashi, K., Takanashi, K., Makino, M. and Yasui, T. (1989) Antioxidative activity of major anthocyanin isolated from wild grape. *Nippon Shokuin Kogyo Gakkaishi.* **36**, 852-860.
23. He, P. and Luo, S. (2004) The inheritances of fruit skin and must colors in a series of interspecific and intraspecific crosses between *V. vinifera* and wild species native to China. *Scientia Horticulturae.* **99**, 29-40.
24. Myers, R. H. (1971) Response surface methodology. Allyn and Bacon, Inc. Boston, USA.
25. Wanasundara, P. K. J. D. P. D. and Shahidi, F. (1996) Optimization of hexameta phosphate-assisted extraction of flaxseed proteins using response surface methodology. *J. Food Sci.* **61**, 604-607.
26. Martha, L. A. and James, P. B. (1992) The mathematica handbook, compatible with mathematica, Version 2.0, An imprint of academic press. Inc. Harcourt Brace & Co., Massachusetts, pp. 15-511.
27. National Tax Service Technical Service Institute. (1999) Alcoholic beverage analysis rule. Sejung Pub. Co., Seoul, Korea, p 196.
28. 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.
29. Oh, S. L., Kim, S. S., Min, B. Y. and Chung, D. Y. (1990) Composition of free sugars, free amino acids, non-volatile organic and tannin in the extracts of *L. chinensis* M., *A. acutiloba* K., *S. chinensis* B. and *A. sessiliflorum* S. *Korean J. Food Sci. Technol.* **22**, 76-81.
30. Palmer, J. and List, D. M. (1973) Determination of organic acids in foods by liquid chromatography. *J. Agric. Chem.* **21**, 903-906.
31. Choi, S. H., Kim, O. K. and Lee, M. W. (1992) A study on the gas chromatographic analysis of alcohol and organic acid during *Takju* fermentation. *Korean J. Food Sci. Technol.* **24**, 272-278.
32. Lee, S. J., Lee, J. E. and Kim, S. S. (2004) Development of Korean red wines using various grape varieties and preference measurement. *Korean J. Food Sci. Technol.* **36**, 911-918.
33. Flors, J. D. and Chinnan, M. S. (1987) Optimization of pimento pepper lyepeeling process using response surface methodology. *Trans. of ASAE.* **30**, 560-566.
34. Lee, T. S., Lee, D. S., Noh, B. S., Kim, K. and Pack, H. S. (1994) Determination and multivariate analysis of flavor components in the Korean folk *Sojues* using GC-MS. *Korean J. Food Sci. Technol.* **26**, 50-758.
35. Kang, D. K., Kim, S. K., Min, G. G., Chung, S. H., Lee, S. P. and Choi, B. S. (1998) Studies on development of "Sanyakju" traditional folk wine made of Chinese yam (*Dioscorea batatas* Decne). *RDA J. of Industrial Crop Sci.* **40**, 41-45.
36. Jeong, S. T., Choi, J. U. and Goto, N. (2001) Fermentation characteristics of wine yeast strains. *Korean J. Postharvest Sci.*

- Technol.* **8**, 320-325.
37. Amerine, M. A., Roessler, E. B. and Ough, C. S. (1965) Acid and the acid taste, I. The effect of pH and titratable acidity. *Am. J. Enol. Victic.* **16**, 29-37.
38. Kang, M. Y., Yoo, S. S., Park, T. S., Mok, C. K. and Chang, H. G. (1999) Analysis of flavors in heat-sterilized *Yakju*. *Food Engineering Process.* **3**, 170-175.
39. In, H. Y., Lee, T. S., Lee, D. S. and Noh, B. S. (1995) Volatile components and fusel oils of sojues and mashes brewed by Korean traditional method. *Korean J. Food Sci. Technol.* **27**, 235-240.
40. KFDA. (2005) Code of Korea Food Regulation. Korea food and drug administration, Seoul, Korea.
41. Amerine, M. A. and Ough, C. S. (1980) Methods for analysis of musts and wines. Willey-Interscience, John Willey & Son, New York, p. 11.