

반응표면분석을 이용한 농축 포도즙의 알코올발효 조건 최적화

김윤숙[†] · 김로사 · 최희돈 · 최인욱
한국식품연구원

Optimization for The Alcoholic Fermentation of Concentrated Grape Juice Using Response Surface Methodology

Yoonsook Kim[†], Rosa Kim, Hee-Don Choi, and In-Wook Choi

Korea Food Research Institute, Gyeonggi 463-746, Korea

Abstract

Response surface methodology (RSM) was applied to optimize alcohol fermentation of concentrated grape juice. Sugar concentration (X_1), agitation rate (X_2) and fermentation time (X_3) were chosen as the independent variables of the central composite design (CCD). Dependent variables were alcohol content (Y_1) and total acidity (Y_2). To optimize two dependent variables, desirability function was defined as $Y_1=10.0\%$ and $Y_2=\text{minimum}$. The optimum conditions for alcohol fermentation were 19.98°Bx (sugar concentration), 104.1 rpm (agitation rate) and 89.67 hr (fermentation time). The predicted responses were 10.0% in alcohol content and 0.86% in total acidity. The coefficients of determination (R^2) were 0.948 and 0.958, which indicate that the model fit was highly significant ($p<0.001$). The experimental values were 10.1% for alcohol content and 0.88% for total acidity. These values were similar to the predicted values from RSM.

Key words: concentrated grape juice, alcoholic fermentation, response surface methodology (RSM)

서 론

포도는 2006년을 기준으로 우리나라 총 과실 재배면적 155,000 ha의 14%인 22,000 ha에서 재배되고 있다(1). 전체 생산량의 45.8%를 차지하는 경상북도를 비롯하여 충청북도와 경기도, 충청남도 등 우리나라 전역에 걸쳐서 재배가 가능한 과실이며, 그 중 Campbell early종은 1983년 전체 재배면적의 81.5%에서 1997년 66.3%로 감소하는 추세를 보였으나 여전히 주품종의 위치를 지키고 있다(1,2). *Vitis labrusca* 종에 속하는 Campbell early종은 우리나라 기후조건에 매우 적합하고 향이 좋아서 주로 생과로 소비되고 있으며, 가공품으로 처리되는 포도는 전체 생산량의 7%정도이다(3,4). 우리나라의 포도는 대개 8월이나 9월에 일시적으로 출하되며 이때 수입되는 생과와 더불어 과일 공급이 일어나는 경우에는 농가에서 피해를 입게 되고 포도 산업이 심각한 위기를 맞이하게 된다(5,6). 이러한 어려움을 극복하기 위해 포도를 이용한 다양한 가공품의 연구개발이 요구되고 있다. 포도 가공품 중 가장 활발한 보고를 보이는 포도주와 포도주스에 대한 연구로는 Kim 등(6)의 국산 포도를 이용한 적포도주의 개발에 대한 연구와 Lee 등(7)의 포도 품종을 달리한 적포도주의 이화학적 성분변화에 대한 보고가 있다. Kim 등(8)은

가당 및 효모첨가가 Campbell early 포도주 발효에 미치는 영향에 대한 연구를 보고하였으며 Kim 등(9)은 열처리 조건이 포도즙의 착즙 수율 및 품질에 미치는 영향을 보고하였다. 포도주 이외에 포도의 가공품으로 제시되는 것이 포도 식초이다. 식초는 알코올발효와 초산발효 2단계에 의해 제조되며 동맥경화, 고혈압 등의 성인병 예방효과와 콜레스테롤 저하효과 등이 밝혀지면서 다양한 과실을 원료로 한 제품이 제조되고 있다. 국내 과실 식초에 대한 연구로는 Jeong 등(10)의 2단계 발효에 의한 사과식초와 시판 사과식초의 품질비교에 대한 연구, Lee 등(11)의 참외의 알코올 및 초산발효 특성 모니터링에 대한 보고와 Jeong 등(12)의 반응표면분석에 의한 감식초 제조조건의 최적화에 대한 보고가 있다. 그러나 포도 식초에 대한 연구는 미흡한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 반응표면분석을 이용하여 포도 식초 제조 시 알코올 발효의 최적 조건을 찾아서 초산발효가 일어나기에 적합한 알코올 함량과 총산도를 제시하여 고품질 포도 식초를 생산하는데 기초자료로 활용하고자 하였다.

재료 및 방법

재료

김천지방의 Campbell early종 포도를 농가로부터 구입하

[†]Corresponding author. E-mail: kimyus@kfri.re.kr
Phone: 82-31-780-9281, Fax: 82-31-780-9281

Table 1. Experimental range and values of the independent variables in the central composite design for alcohol fermentation conditions

Independent variables	Symbol	Levels				
		-1.682	-1	0	1	1.682
Sugar conc. (°Bx)	X ₁	8.2	13	20	27	31.8
Agitation rate (rpm)	X ₂	15.9	50	100	150	184.1
Fermentation time (hr)	X ₃	55.6	72	96	120	136.4

여 원료로 하여 제경, 수세 및 마쇄하여 껍질과 씨 등을 제거하고 착즙하였으며 착즙액을 실험재료로 사용하였다. 효모는 적포도주 발효용인 *Saccharomyces cerevisiae* fermivin 7013(DSM Food Specialties B.V., The Netherlands)을 사용하였다.

실험설계

포도즙의 알코올발효에 대한 당도, 교반속도 및 발효시간이 미치는 영향을 알아보고 최적 발효조건을 설정하기 위하여 중심합성설계(Central composite design, CCD)를 이용하여 실험을 실시하였다. 포도즙의 발효에 영향을 미치는 당도(°Bx, X₁), 교반속도(rpm, X₂) 및 발효시간(hr, X₃)은 독립변수(independent variables)로 설정하였으며(Table 1), 알코올함량(%), Y₁과 총산도(%), Y₂는 각각 종속변수(dependent variables)로 설정하였다(Table 1).

알코올 발효

포도착즙액을 당도별(8.2, 13, 20, 27, 31.8°Bx)로 준비하여 건조효모를 포도즙에 0.03%(w/v) 첨가하여 12시간 동안 전배양한 배양액을 총 담금량의 5%(v/v)씩 접종하여 항온배양기(25°C)에서 실험설계에서 설정된 발효시간 동안 알코올 발효를 진행하였다.

당도 및 알코올 함량

발효가 끝난 시료의 당도는 상온에서 당도계(model PAL-1, Atago Co., Ltd., Tokyo, Japan)를 이용하여 측정하였다. 알코올 함량은 포도발효액을 100 mL 취하여 냉각관이 연결된 증류기에서 가열하고 수기에 80 mL 이상의 알코올을 받아 증류수로 100 mL로 정용한 후 온도계와 주정계를 이용하여 측정한 후 Gay Lussac Table을 이용하여 15°C 값으로 보정하였다.

총산도

발효가 끝난 시료의 총산도(total acidity)는 발효 포도즙에 0.1 N NaOH용액으로 중화 적정하여 pH 8.3에 도달하는 데 소요되는 양을 측정하여 acetic acid로 환산하였다.

통계분석

반응표면회귀분석은 SAS program(SAS Institute Inc., USA, ver. 9.0)을 이용하였다(13). 이때 독립변수 X_i와 X_j에 대한 종속변수 Y(알코올 함량, 산도)는 다음과 같은 2차 회귀식으로 나타내었으며, β₀는 상수이고, β_i, β_{ii}, β_{ij}는 회귀계

수이다.

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 \beta_{ij} X_i X_j$$

발효 조건의 최적화는 MINITAB statistical software (Version 13, Minitab Inc., USA)의 Minitab program을 이용하여 각각의 반응변수에 대한 목표 값을 설정하여 그 범위를 만족시키면서 합성된 만족도(D)를 최대화하는 인자의 최적조합으로 결정하였다.

결과 및 고찰

알코올 함량의 변화

포도즙의 알코올발효에 대한 당도, 교반속도 및 발효시간이 미치는 영향을 알아보고 최적 발효조건을 설정하기 위하여 포도즙의 발효에 영향을 미치는 당도(°Bx, X₁), 교반속도(rpm, X₂) 및 발효시간(hr, X₃)을 독립변수(independent variables)로, 알코올함량(%), Y₁과 총산도(%), Y₂를 각각 종속변수(dependent variables)로 설정하였다. 포도즙을 당도별(8.2, 13, 20, 27, 31.8°Bx)로 준비하여 주모를 5%씩 접종하고 Table 1과 같은 조건으로 알코올 발효를 진행한 결과 독립변수에 의해 영향을 받는 종속변수 알코올함량(%), Y₁)

Table 2. Central composite design and responses of dependent variables for alcohol fermentation conditions to independent variables

Exp. No.	Coded levels of variable			Responses	
	X ₁	X ₂	X ₃	Y ₁	Y ₂
1	-1	-1	-1	5.3	0.70
2	1	-1	-1	10.1	1.21
3	-1	1	-1	6.3	0.66
4	1	1	-1	13.1	1.08
5	-1	-1	1	6.3	0.72
6	1	-1	1	14.4	1.24
7	-1	1	1	6.7	0.60
8	1	1	1	14.4	1.15
9	-1.682	0	0	2.3	0.39
10	1.682	0	0	11.9	1.53
11	0	-1.682	0	10.4	0.80
12	0	1.682	0	9.9	0.88
13	0	0	-1.682	6.3	0.83
14	0	0	1.682	9.3	0.85
15	0	0	0	10.3	0.86
16	0	0	0	10.3	0.88
17	0	0	0	10.4	0.86

X₁ (sugar conc., °Bx), X₂ (agitation rate, rpm), X₃ (fermentation time, hr). Y₁ (alcohol content, %), Y₂ (total acidity, %).

과 총산도(%, Y_2)의 값은 Table 2에 나타내었다. t -statistic에 근거하여 종속변수 Y_1 의 일차항(X_1, X_2, X_3), 이차항(X_1^2, X_2^2, X_3^2), 상호항(X_1X_2, X_1X_3, X_2X_3)의 계수와 유의성을 나타낸 결과(Table 3), X_1, X_3 및 X_1^2 항은 유의성이 인정되었으나 ($p < 0.05$), 상호항은 모두 유의하지 않는 것으로 나타났다. Table 4는 종속변수 Y_1 에 대한 반응표면모델식(response surface model equation)을 나타낸 것으로 결정계수(R^2)는 0.948이고 유의성은 1%이내에서 인정되었다. 또한 종속변수 Y_1 의 ANOVA(analysis of variance)의 결과에 의하면 이차항과 상호항은 유의하지 않으며, 특히 상호항의 경우 독립

변수 간의 상호작용은 거의 없는 것으로 나타났다($p > 0.1$). 그러나 일차항에서는 유의수준이 0.001로 매우 유의성이 있는 것으로 인정되었다(Table 5).

각 독립변수가 Y_1 (알코올함량, %)에 미치는 영향을 그래프로 나타낸 결과(Fig. 1), 당도가 증가할수록 알코올함량은 급격히 증가하는 경향을 나타내었다. 이는 Lee 등(11)의 참외의 알코올 및 초산발효 특성 모니터링 과정과 Son 등(14)의 매실을 이용한 알코올발효의 최적화 연구, 그리고 Lee 등(15)의 감자의 알코올발효 및 초산발효의 모니터링 연구에서 알코올함량의 변화는 당 함량이 높아짐에 따라 비례한다는 경향과 유사하였다. 이에 더해 Kim 등(8)은 원활한 포도주 발효를 위해서는 가당과 효모 첨가가 필요하다고 하였다. 또한 교반속도에 대한 알코올함량의 그래프는 완만한 곡선을 보임으로써 이 조건은 알코올함량에 큰 영향을 주지 않는 것으로 사료된다. 발효시간은 증가할수록 알코올함량을 증가시키는 경향을 나타내었고 이때의 증가 속도는 시간이 지날수록 점차 둔화되었다. 이를 통해 알코올함량은 교반 속도에는 큰 영향을 받지 않고, 초기 당도가 높을수록 그리고 발효시간이 길수록 알코올함량이 높아지며 그 중에서도 초기당도가 더 큰 영향을 주는 요인으로 나타났다. 이는 Lee 등(16)이 딸기의 알코올 발효 시 딸기의 초기농도가 발효시간과 발효온도보다 더 큰 영향을 준다는 보고와 Jeong 등(12)의 감식초 제조조건 중 알코올 발효 시 교반속도와 발효

Table 3. Estimated coefficients of the fitted quadratic polynomial equation for different response based on t -statistic

	Y_1		Y_2	
	Coefficient	p-value	Coefficient	p-value
Intercept	10.2466	0.001	0.8641	0.001
X_1	3.1885	0.001	0.2868	0.001
X_2	0.2606	0.428	-0.0180	0.458
X_3	0.8820	0.025	0.0069	0.773
X_1X_1	-0.8445	0.043	0.0417	0.142
X_2X_2	0.2338	0.515	-0.0007	0.978
X_3X_3	-0.5970	0.124	-0.0007	0.978
X_1X_2	0.2000	0.637	-0.0075	0.809
X_1X_3	0.5250	0.236	0.0175	0.577
X_2X_3	-0.4500	0.303	-0.0050	0.872

X_1 (sugar conc., °Bx), X_2 (agitation rate, rpm), X_3 (fermentation time, hr). Y_1 (alcohol content, %), Y_2 (total acidity, %).

Table 4. Response surface model for alcohol fermentation conditions

Responses	Quadratic polynomial model	R^2	p-value
Y_1	$Y_1 = 10.2466 + 3.1885X_1 + 0.2606X_2 + 0.8820X_3 - 0.8445X_1^2 + 0.2338X_2^2 - 0.5970X_3^2 + 0.2000X_1X_2 + 0.5250X_1X_3 - 0.4500X_2X_3$	0.948	0.001
Y_2	$Y_2 = 0.8641 + 0.2868X_1 - 0.0180X_2 + 0.0069X_3 + 0.0417X_1^2 - 0.0007X_2^2 - 0.0007X_3^2 - 0.0075X_1X_2 + 0.0175X_1X_3 - 0.0050X_2X_3$	0.958	0.001

X_1 (sugar conc., °Bx), X_2 (agitation rate, rpm), X_3 (fermentation time, hr). Y_1 (alcohol content, %), Y_2 (total acidity, %).

Table 5. Analysis of variance (ANOVA) for response of dependent variables (Y_1 and Y_2)

Responses	Sources	DF	SS	MS	F-value	p-value
Y_1	Model	9	168.197	18.6885	14.23	0.001
	Linear	3	150.397	50.1322	38.17	0.001
	Quadratic	3	13.655	4.5517	3.47	0.080
	Cross-product	3	4.145	1.3817	1.05	0.428
	Residual	7	9.194	1.3134	-	-
	Lack of fit	5	9.187	1.8375	551.24	0.002
	Pure error	2	0.007	0.0033	-	-
	Total	16	177.391	-	-	-
Y_2	Model	9	1.155	0.1283	17.96	0.001
	Linear	3	1.129	0.3762	52.66	0.001
	Quadratic	3	0.023	0.0077	1.07	0.420
	Cross-product	3	0.003	0.0010	0.14	0.930
	Residual	7	0.050	0.0071	-	-
	Lack of fit	5	0.050	0.0099	74.62	0.013
	Pure error	2	0.000	0.0001	-	-
	Total	16	1.205	-	-	-

Y_1 (alcohol content, %), Y_2 (total acidity, %).

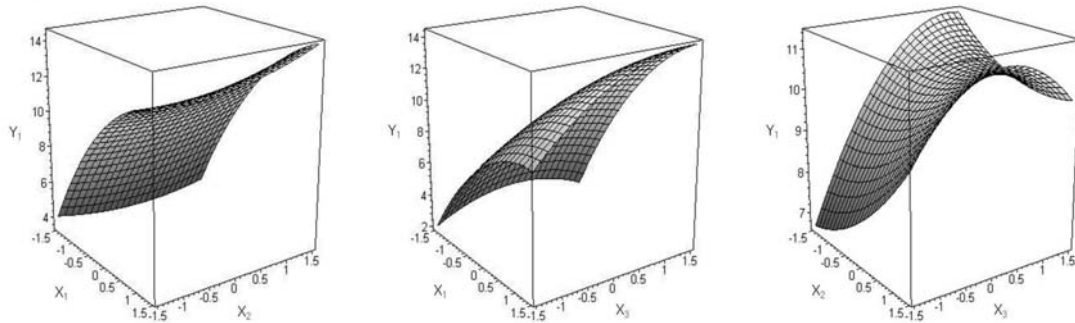


Fig. 1. Response surface plots for alcohol content in alcohol fermentation. X_1 (sugar conc., °Bx), X_2 (agitation rate, rpm), X_3 (fermentation time, hr), Y_1 (alcohol content, %).

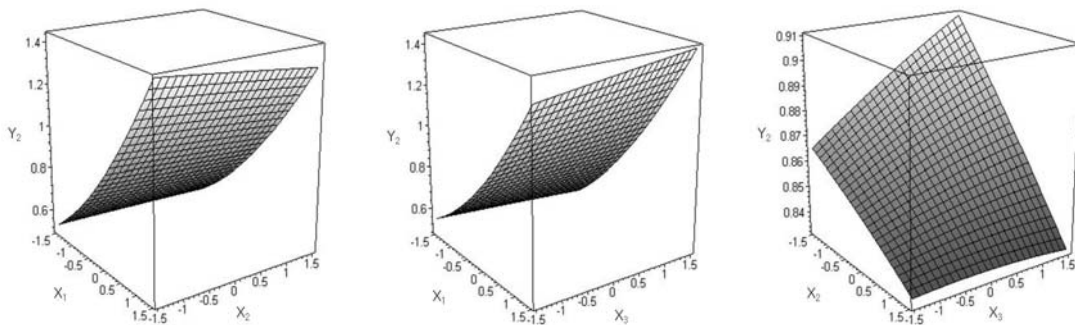


Fig. 2. Response surface plots for acidity in alcohol fermentation. X_1 (sugar conc., °Bx), X_2 (agitation rate, rpm), X_3 (fermentation time, hr), Y_2 (total acidity, %).

시간보다는 원료 감 당도에 주로 영향을 받는다는 결과와 비슷한 경향이였다.

총산도의 변화

포도즙의 알코올 발효 시 얻어진 Y_2 (총산도, %)의 값은 Table 2와 같이 나타내었다. t -statistic에 근거한 종속변수 Y_2 의 일차항(X_1, X_2, X_3), 이차항(X_1^2, X_2^2, X_3^2), 상호항(X_1X_2, X_1X_3, X_2X_3)의 계수와 유의성을 나타낸 결과(Table 3), 일차항 중에서도 오직 X_1 항만이 유의성이 있는 것으로 나타났다 ($p < 0.05$). Table 4는 종속변수 Y_2 에 대한 반응표면모델식을 나타낸 것으로 Y_2 의 결정계수(R^2)는 0.958이었고 본 실험계획의 반응표면모델식이 통계적으로 1%이내에서 유의성이 인정되었다. 종속변수 Y_2 의 ANOVA의 결과를 살펴보면 (Table 5), 일차항은 매우 유의성이 있는 것으로 나타나지만 ($p < 0.01$) Y_2 의 이차항과 상호항은 유의성이 없으며 독립변수 간의 상호작용은 거의 없는 것으로 사료된다($p > 0.1$).

Fig. 2는 포도즙의 알코올 발효 시 각 독립변수가 총산도에 미치는 영향에 대한 것으로 당도가 증가할수록 총산도도 급격히 증가하는 경향을 나타내었다. 이는 Lee 등(7)이 발효 과정 중 총산도는 점차 감소한다는 보고와 다소 다른 경향이 었으나 Lee 등(11)의 참외의 알코올발효에서 발효시간이 증가함에 따라 총산도가 증가한다는 보고와는 유사한 결과를 보였다. 교반속도가 높아질수록 총산도는 감소하였고, 발효

시간이 증가할수록 총산도가 증가하였으나 당도에 의한 영향에 비하여 적은 것으로 나타났다. 이러한 결과는 총산도에서도 비슷한 양상을 보여 발효 시의 교반속도나 발효시간보다는 초기 당도에 큰 영향을 받는 것으로 나타났다. 이는 Lee 등(16)이 딸기의 알코올 발효 특성 모니터링 연구에서 알코올 발효 시 산도는 발효시간보다 초기 당 함량에 더 많은 영향을 받는 요인으로 나타났다는 결과와 일치하였다.

최적의 알코올발효 조건 예측

본 연구에서는 포도즙의 최적 알코올발효조건을 구하기 위하여 Minitab software의 Multiple Response Optimizer를 사용하였다. 종속변수 알코올함량(Y_1)의 경우는 목적 값을 10%로 설정하였으며, 총산도(Y_2)는 그 값이 최소화되는 것을 목적으로 하였다. 통계적으로 산출된 독립변수의 부호화된 최적값(coded value)은 당도(X_1)가 -0.0017, 교반속도

Table 6. Optimal conditions of alcohol fermentation

Independent variables	Critical value	
	Coded	Uncoded
X_1	-0.0017	19.98
X_2	0.0820	104.1
X_3	-0.2636	89.67

X_1 (sugar conc., °Bx), X_2 (agitation rate, rpm), X_3 (fermentation time, hr).

Table 7. Predicted values of response variables

Response variables	Predicted values
Y ₁	10.0
Y ₂	0.86

Y₁ (alcohol content, %), Y₂ (total acidity, %).

(X₂)가 0.0820, 발효시간(X₃)이 -0.2636으로 나타났으며, uncoded value(실제값)로는 당도(X₁)가 19.98°Bx, 교반속도(X₂)가 104.1 rpm, 발효시간(X₃)이 89.67 hr이었다(Table 6). 상기의 최적조건에서 통계적으로 산출된 종속변수의 값은 알코올함량(Y₁) 10.0%와 총산도(Y₂) 0.86이다(Table 7). 이상의 모델조건을 검증하기 위하여 설정된 최적 조건을 이용해 실제 포도즙의 알코올발효 실증실험을 실시한 결과 발효액의 알코올함량이 10.1%, 총산도가 0.88%로 통계적으로 예측된 결과와 거의 유사하였다. 따라서 본 실험에서 반응표면분석을 이용하여 설정한 알코올발효 최적조건 설정이 유효함을 증명하였다. 이는 Yook 등(17)이 초기 당도를 20°Bx로 하여 포도주를 발효한 결과, 발효 2주 후 11.6%의 알코올함량을 얻었다는 보고와 유사하였다.

요 약

포도즙의 알코올 발효 시 당 농도와 교반속도, 발효시간이 알코올함량과 총산도에 미치는 영향을 알아보기 위해 반응표면분석을 이용하여 알코올발효 조건을 최적화하였다. 알코올함량은 10%, 총산도는 최소화되는 것을 목적으로 하여 알코올 발효조건을 최적화한 결과 19.98°Bx로 농축한 국내산 Campbell early 포도즙에 효모를 접종시킨 후 교반속도 104.1 rpm으로 89.67시간 동안 발효시켰을 때 목적값에 가장 근접한 결과를 나타내었다. 알코올 발효 시 포도즙의 당도가 증가할수록 알코올함량과 총산도는 증가하는 경향을 나타내었고, 교반속도는 알코올함량과 총산도에 큰 영향을 주지 않는 것으로 나타났다. 또한 발효시간이 길어질수록 알코올함량과 총산도가 증가하는 경향을 나타내었다.

감사의 글

이 논문은 농림수산식품부·농림기술관리센터 지정 포도 연구사업단의 연구비 지원에 의하여 연구되었음.

문 헌

1. Ministry of Agriculture & Forestry Republic of Korea. 2006. Agricultural & Forestry Statistical Yearbook. p 116-117.
2. Lee JC. 2001. *New Technology of Grape Cultivation*. Sun-jinMunwha Co., Seoul, Korea. p 23-27.
3. Park WM, Park HG, Rhee SJ, Lee CH, Yoon KE. 2002. Suitability of domestic grape, cultivar campbell's early, for production of red wine. *Korean J Food Sci Technol* 34: 590-596.
4. The annual report of food industry. 2005. The AF News Press, Seoul, Korea. p 200-205.
5. Lee SJ, Lee JE, Kim SS. 2004. Development of Korean red wines using various grape varieties and preference measurement. *Korean J Food Sci Technol* 36: 911-918.
6. Kim JS, Sim JY, Yook C. 2001. Development of red wine using domestic grapes, campbell early. part (I)-characteristics of red wine fermentation using campbell early and different sugars. *Korean J Food Sci Technol* 33: 319-326.
7. Lee JE, Won YD, Kim SS, Koh KH. 2002. The chemical characteristics of Korean red wine with different grape varieties. *Korean J Food Sci Technol* 34: 151-156.
8. Kim JS, Kim SH, Han JS. 1999. Effects of sugar and yeast addition on red wine fermentation using campbell early. *Korean J Food Sci Technol* 31: 516-521.
9. Kim JS, Kim SH, Lee WK, Pyun JY, Yook C. 1999. Effects of heat treatment on yield and quality of grape juice. *Korean J Food Sci Technol* 31: 1397-1400.
10. Jeong YJ, Seo JH, Lee GD, Park NY, Choi TH. 1999. The quality comparison of apple vinegar by two stages fermentation with commercial apple vinegar. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 28: 353-358.
11. Lee GD, Kwon SH, Lee MH, Kim SK, Kwon JH. 2002. Monitoring on alcohol and acetic acid fermentation properties of muskmelon. *Korean J Food Sci Technol* 34: 30-36.
12. Jeong YJ, Lee GD, Kim KS. 1998. Optimization for the fermentation condition of persimmon vinegar using response surface methodology. *Korean J Food Sci Technol* 30: 1203-1208.
13. SAS. 2000. *User's Guide*. SAS Institute, Gary, NC, USA.
14. Son SS, Ji WD, Chung HC. 2003. Optimum condition for alcohol fermentation using mume (*Prunus mume* Sieb. et Zucc) fruits. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32: 539-543.
15. Lee GD, Jeong YJ, Seo JH, Lee JM. 2000. Monitoring on alcohol and acetic acid fermentation of potatoes using response surface methodology. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 29: 1062-1067.
16. Lee JM, Kim SK, Lee GD. 2003. Monitoring on alcohol fermentation characteristics of strawberry. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32: 679-683.
17. Yook C, Seo MH, Kim DH, Kim JS. 2007. Quality improvement of campbell early wine by mixing with different fruits. *Korean J Food Sci Technol* 39: 390-399.

(2008년 10월 20일 접수; 2008년 11월 20일 채택)