효소 처리 수박을 이용한 에탄올 생산 최적화

김비성 · 김지후 · 이희섭

부산대학교 식품영양학과

Optimization of Ethanol Production from Watermelon by Enzyme Treatment

Beesung Kim, Jihoo Kim, and Heeseob Lee

Department of Food Science and Nutrition, Pusan National University

ABSTRACT This study was undertaken to evaluate the efficiency of ethanol produced by the response surface methodology using enzyme-treated low-grade watermelons (*Citrullus vulgaris* Schrad.). Before ethanol production, entire watermelons were treated with different sets of enzymes. The extraction yield with the Celluclast[®] 1.5L and Viscozyme[®] L (1:1) combination was significantly higher than other treatments. Compared to other conditions, the total sugar and reducing sugar contents were significantly higher with two conditions, viz., Celluclast[®] 1.5L and Viscozyme[®] L (1:1), and Celluclast[®] 1.5L, Pectinex[®] Ultra Pulp and Viscozyme L (1:1:1). To optimize the ethanol production from enzyme treated *Citrullus vulgaris* Schrad., a central composite design (CCD) was introduced, based on the following four variables: amount of *Saccharomyces cerevisiae* AFY (X_1 : 0~6%), amount of *Kluyveromyces marxianus* KCCM 12015 (X_2 : 0~6%), amount of *Candida kefyr* KCCM 50614 (X_3 : 0~6%), and fermentation time (X_4 : 0~10 days). The experimental data were fitted with quadratic regression equations, and the accuracy of the equations was analyzed by ANOVA. The statistical model predicted highest ethanol production of 6.18% under the optimal conditions X_1 =3.61%, X_2 =1.5%, X_3 =1.5%, and X_4 =7.5 days. The optimized conditions were validated by observation of an actual ethanol production, which yielded 5.9% ethanol. These results agree well with the predicted model value.

Key words: watermelon, ethanol production, optimization, enzyme treatment, response surface methodology

서 론

우리나라 대표적인 여름 과채류이며 덩굴식물인 수박 (*Citrullus vulgaris* Schrad.)은 박과에 속하는 일년생 호온성 식물로 한의학에서는 성질이 차고 맛은 달며 방광, 위, 심장에서 열을 내려 더위를 식혀주는 과일로 여겨지고 있다. 또한 과육 및 과피에 포함된 α -아미노산인 citrullin은 요소 대사 과정의 중간대사물질로 이뇨작용, 발기부전, 혈관질환, 부종 등에 효과가 있으며, 과육의 붉은색에 포함된 lycopene은 지용성 carotenoid 색소로써 항암효과가 있다고 알려져 있다(Park과 Kim, 2010; Kim 등, 1999; Lee, 1983; Lee, 1994).

수박은 대부분 생과로 생산 및 소비가 여름철에 집중되어 있으며 저장성이 낮고 부패를 많이 차지해서 보관 및 운반이 불편한 단점이 있다. 작황 부진과 홍수로 인해 상품성 없는

수박들이 밭에 방치되어 판매되지 못하고 있다. 또한 선별장과 창고에 보관하는 동안에 높은 수분율과 온도로 쉽게 부패되어 폐기되는 경우가 많다. 따라서 상품성 없는 수박들을 이용한 가공식품에 대한 개발이 필요하다. 그중 본 실험에 사용된 수박의 원산지인 함안군은 수박 재배면적이 968 ha로 경남 최대 수박 산지이며 환경 오염방지과 농가 일자리 창출을 위해 비상품성 수박으로 다양한 수박 가공식품 상품화를 시도하고 있다. 하지만 수박의 높은 수분율로 인해 가공식품에 고유의 색과 향을 입히기 어렵고 수익성이 낮아 아직 성과를 보지 못하고 있는 실정이다.

수박은 주로 과육을 이용하며 수박과 관련된 국내연구로는 수박의 5가지 품종에 대한 이화학적 성분의 분석(Hong 등, 2008)과 수박의 휘발성 향기 성분(Kim 등, 1999) 등에 대한 것이 있으며, 수박 가공에 관한 연구로는 역삼투에 의한 수박 주스의 농축(Suh 등, 2001), 수박 음료의 제조(Hwang 등, 2004a), 수박 주스의 알코올 발효에 대한 연구(Kim 등, 1984), 수박을 이용한 발효주 제조(Hwang 등, 2004b) 등이 보고되고 있지만, 이들 제품은 수박의 과육만을 이용해 제조되는 방식으로 이 경우 수박의 껍질부분이 부산물로 남는 문제점이 발생한다. 수박의 과피는 일반적인 소화효소에 의해서 분해되지 않는 pectic substances, hemi-

Received 19 Jun 2020; Revised 30 Dec 2020; Accepted 31 Dec 2020
Corresponding author: Heeseob Lee, Department of Food Science and Nutrition, Pusan National University, 2, Busandaehak-ro 63beon-gil, Geumjeong-gu, Busan 46241, Korea,
E-mail: heeseoble@pusan.ac.kr

Author information: Beesung Kim (Graduate student), Jihoo Kim (Other), Heeseob Lee (Professor)

cellulose, cellulose, lignin 등의 다당류로 구성되어 있어서 기능성 식이섬유나 산 및 효소분해를 이용한 바이오에탄올 생산에 대한 연구가 일부 진행되었지만 전반적으로 수박의 파피를 활용한 연구는 미비한 실정이다(Jeon 등, 2018; Lee와 Kim, 2014). 따라서 다양한 원인으로 상품성이 떨어져 폐기되는 수박을 이용한 가공제품 개발이 필요하다. 본 연구에서는 상품성이 떨어지는 수박의 전체 부분에 효소 처리를 실시한 후 반응표면분석법을 활용한 에탄올 생산 최적화를 통해 폐기되는 수박의 활용성을 높여 환경적인 문제를 해결할 뿐 아니라 수박 농가의 부가가치를 높이고자 하였다.

재료 및 방법

재료 및 사용균주

본 실험에 사용된 수박은 경상남도 함안군에서 재배된 것 중 상품 가치가 떨어져 판매할 수 없는 수박을 구하여 실험에 사용하였다. 수박 표면을 수돗물로 세척 후 물기를 제거하고 일정한 크기로 자른 다음, 분쇄기(RB-853SB, Ronic, Seoul, Korea)로 분쇄하였다. 분쇄된 수박은 일정량으로 나누어 냉동실에 보관하며 실험재료로 사용하였다. 에탄올 발효에 사용된 효모 중 *Saccharomyces cerevisiae* AFY는 발효주에서 분리된 효모이며, 다른 2종의 효모는 한국미생물보존센터(KCCM, Korea Culture Center of Microorganisms, Seoul, Korea)에서 *Kluyveromyces marxianus* KCCM 12015와 *Candida kefyr* KCCM 50614를 분양받아 사용하였다. 이들은 YM broth(Difco Co., Franklin Lakes, NJ, USA)를 사용하여 28°C, 24시간 동안 배양한 후 0.85% NaCl로 치환하여 효소 처리된 시료에 접종하였다.

시료 효소 처리

수박 에탄올 생산 최적화를 위해 분쇄된 수박에 효소 처리를 실시하여 수율 및 당 함량을 증가시키고자 하였으며, 실험에 사용된 효소는 Celluclast[®] 1.5L, Pectinex[®] Ultra Pulp, Viscozyme[®] L(Novozymes, Bagsværd, Denmark)이다. Celluclast[®] 1.5L은 cellulase이며, Pectinex[®] Ultra Pulp는 polygalacturonase, Viscozyme[®] L은 복합효소로 cellulase, hemicellulase, arabanase, xylanase, β -glucanase를 함유하고 있다. 각 효소 처리에 따른 최적조건을 찾기 위하여 시료에 Celluclast[®] 1.5L, Pectinex[®] Ultra Pulp 및 Viscozyme[®] L을 시료 중량 대비 각 0.15% 첨가한 군, Celluclast[®] 1.5L, Pectinex[®] Ultra Pulp, Celluclast[®] 1.5L과 Viscozyme[®] L, Pectinex[®] Ultra Pulp와 Viscozyme[®] L을 함께 0.15% 첨가한 군, Celluclast[®] 1.5L, Pectinex[®] Ultra Pulp 및 Viscozyme[®] L을 모두 함께 0.15% 첨가한 군으로 시료 및 효소를 삼각플라스크에 넣은 후 50°C, 110 rpm으로 맞춰진 항온수조(JSSB-30T, JSR, Gongju, Korea)에서 효소반응을 6, 12, 24시간 실시하였다.

시료 추출 수율 측정

효소 처리에 따른 시료의 추출 수율을 확인하기 위해 각 조건에 따른 효소 반응 후 반응물 20 g을 용기에 담아 4,000 rpm에서 30분 동안 원심분리기(Combi-514R, Hanil Co., Ltd., Seoul, Korea)를 이용하여 원심분리 후 상등액을 제거하고 남은 반응물의 무게를 측정하였으며, 총 시료량에서 원심분리 후 남은 시료량을 뺀 값을 총 시료량으로 나눈 다음 100을 곱하여 추출 수율을 구하였다.

총당 함량

시료의 총당(total sugar) 함량은 DuBois 등(1956)의 phenol-sulfuric acid법을 이용하여 분석하였다. 시험관에 시료 0.5 mL와 5% 페놀 용액 0.5 mL를 혼합한 후 진한 황산 2.5 mL를 첨가하고 교반하여 실온에서 20분간 반응시킨 다음 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. Fructose를 표준물질로 하여 표준검량선을 작성한 후 정량하였다.

환원당 함량

시료의 환원당은 DNS(dinitrosalicylic acid)법을 이용하여 측정하였으며, 표준물질은 fructose를 이용하여 0.1~0.7 mg/mL 농도 범위에서 검량곡선을 그린 후 정량에 이용하였다(Miller, 1959).

실험디자인

수박을 이용한 알코올 제조 방법 최적화 분석은 Design Expert 8(State-Easy Co., Minneapolis, MN, USA) 프로그램 사용하였으며, 제품의 최적화는 반응표면분석(response surface methodology, RSM)에서 중심합성계획법(central composite design, CCD)을 이용하여 설계하였다. 독립변수는 *Saccharomyces cerevisiae* AFY와 *Kluyveromyces marxianus*(KCCM 12015), *Candida kefyr*(KCCM 50614)의 효소 처리된 시료에 대한 접종량, 발효 시간으로 4가지 요인을 설정하였으며 종속변수에는 에탄올 함량을 측정하였다. 각 독립변수의 첨가량은 예비실험을 통해 *Saccharomyces cerevisiae* AFY와 *Kluyveromyces marxianus*(KCCM 12015), *Candida kefyr*(KCCM 50614) 0~6%(v/v), 발효 시간은 0~10일로 설정하였으며, -2, -1, 0, 1, 2의 5단계로 부호화하여 나타내었다. Central composite의 실험점은 정중앙점(0.0, center point), $\pm\alpha$ 점(axial point), ± 1 level점(factorial point)과 모델설정 및 적합결여 검증을 위한 반복점을 3개 선택하여 모두 27개의 실험점이 확정되었다(Table 1).

에탄올 발효

에탄올 발효는 효소 처리를 통해 추출 수율, 총당 및 환원당 함량이 높았던 조건으로 효소 처리를 실시한 후 Whatman No. 2 filter paper(Whatman, Brentford, UK)를 이용하여 여과하였다. 여과된 시료는 감압농축기(EYELA, Tokyo,

Table 1. Experimental design for optimization of ethanol fermentation conditions from watermelon

Sample No.	Factor			Fermentation time (day)
	AFY ¹⁾ (%, v/v)	KCCM 12015 ²⁾ (%, v/v)	KCCM 50614 ³⁾ (%, v/v)	
1	1.5	1.5	1.5	2.5
2	4.5	1.5	1.5	2.5
3	1.5	4.5	1.5	2.5
4	4.5	4.5	1.5	2.5
5	1.5	1.5	4.5	2.5
6	4.5	1.5	4.5	2.5
7	1.5	4.5	4.5	2.5
8	4.5	4.5	4.5	2.5
9	1.5	1.5	1.5	7.5
10	4.5	1.5	1.5	7.5
11	1.5	4.5	1.5	7.5
12	4.5	4.5	1.5	7.5
13	1.5	1.5	4.5	7.5
14	4.5	1.5	4.5	7.5
15	1.5	4.5	4.5	7.5
16	4.5	4.5	4.5	7.5
17	0	3	3	5
18	6	3	3	5
19	3	0	3	5
20	3	6	3	5
21	3	3	0	5
22	3	3	6	5
23	3	3	3	0
24	3	3	3	10
25	3	3	3	5
26	3	3	3	5
27	3	3	3	5

¹⁾*Saccharomyces cerevisiae* AFY.²⁾*Kluyveromyces marxianus* (KCCM 12015).³⁾*Candida kefyr* (KCCM 50614).

Japan)를 이용하여 16°Brix로 농축한 후 각 시료를 삼각플라스크에 실험디자인에 따라 정해진 조건으로 넣은 다음 air lock을 설치하여 공기의 유입을 차단하면서 혐기조건으로

28°C, 100 rpm으로 맞춰진 항온수조(JSSB-30T, JSR)에서 발효를 실시하였다.

에탄올 함량 측정

에탄올 함량은 증류법으로 시료를 전처리한 후 분석하였다. 각 조건에 따라 발효된 발효액을 4,000 rpm에서 30분 동안 원심분리기(Combi-514R, Hanil Co., Ltd.)를 이용하여 원심분리하였다. 이때 얻어진 상등액 중 100 mL를 취한 후 증류하여 메스실린더에 증류액 70 mL를 취한 다음 나머지 증류수 30 mL를 넣어 전량을 100 mL로 맞추어 0.1도 단위의 주정계(DongMyeong Inc., Seoul, Korea)로 에탄올 함량을 측정하였다.

통계분석

실험에서의 모든 통계분석은 SPSS Ver 25.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 사용하여 각 측정 군의 결과값에 대한 평균과 표준편차를 산출하고 각 측정 군의 차이 유무를 one-way analysis of variance(ANOVA)로 분석한 뒤 실험의 유의성을 Duncan's multiple range test를 이용하여 유의수준 $P < 0.05$ 범위에서 검정하였다.

결과 및 고찰

추출 수율

분쇄된 수박에 Celluclast[®] 1.5L, Pectinex[®] Ultra Pulp 및 Viscozyme[®] L을 각 조건에 따라 처리하여 수박의 가수분해에 따른 추출 수율, 당도, 환원당 및 총당을 확인하고자 하였다. 먼저 추출 수율 결과는 Table 2와 같다. 단일 효소 처리 시 Viscozyme[®] L이 다른 효소에 비해 추출 수율이 높은 것을 확인할 수 있었다. 또한 같은 효소 처리시간에서 6, 12, 24시간 모두 Celluclast[®] 1.5L과 Viscozyme[®] L을 1:1 처리한 군의 추출 수율이 다른 군에 비해 유의적으로

Table 2. Changes in extraction efficiency rate, reducing sugar contents, and total sugar contents of watermelon juice by different enzyme treatment conditions

Sample treatment	Extraction efficiency rate (%)			Reducing sugar (mg/g)			Total sugar (mg/g)		
	6 h	12 h	24 h	6 h	12 h	24 h	6 h	12 h	24 h
0	61.9±0.4 ^{h1)}	61.9±0.4 ^h	61.9±0.4 ^g	68.6±0.1 ^c	68.6±0.1 ^f	68.6±0.1 ^f	92.2±0.7 ^c	92.2±0.7 ^g	92.2±0.7 ^g
1	63.7±0.0 ^g	63.9±0.0 ^g	64.0±0.0 ^f	69.4±0.3 ^d	69.6±0.2 ^e	70.4±0.2 ^c	99.8±0.3 ^d	101.4±0.6 ^f	104.2±0.2 ^f
2	84.8±0.0 ^d	84.9±0.0 ^d	84.9±0.0 ^d	70.3±0.1 ^c	73.7±0.5 ^c	75.4±0.2 ^b	101.1±0.7 ^c	107.3±0.4 ^c	109.2±0.6 ^d
3	82.8±0.1 ^f	83.1±0.0 ^f	83.7±0.1 ^c	71.5±0.1 ^b	73.8±0.2 ^{bc}	73.9±0.1 ^d	102.9±0.8 ^b	105.4±0.5 ^d	106.5±0.8 ^e
4	89.7±0.1 ^a	90.4±0.1 ^a	91.3±0.1 ^a	71.6±0.3 ^b	75.5±0.2 ^a	77.3±0.2 ^a	102.8±0.8 ^b	112.5±0.7 ^a	115.5±0.1 ^a
5	88.1±0.1 ^c	88.5±0.1 ^c	89.5±0.1 ^c	73.1±0.2 ^a	74.2±0.4 ^b	74.7±0.7 ^c	105.8±0.4 ^a	108.7±0.8 ^b	111.6±0.5 ^c
6	83.8±0.2 ^e	84.6±0.1 ^e	84.9±0.0 ^d	71.2±0.3 ^b	72.0±0.2 ^d	74.4±0.1 ^c	102.5±0.5 ^b	104.3±0.1 ^e	111.0±0.3 ^c
7	88.7±0.1 ^b	89.0±0.1 ^b	89.9±0.1 ^b	73.3±0.2 ^a	75.3±0.1 ^a	76.9±0.4 ^a	105.8±0.6 ^a	113.3±0.8 ^a	114.7±0.2 ^b

0, Non-treatment; 1, 0.15% celluclast treatment; 2, 0.15% viscozyme treatment; 3, 0.15% pectinex ultra pulp treatment; 4, 0.15% celluclast:viscozyme (1:1) treatment; 5, 0.15% celluclast:pectinex ultra pulp (1:1) treatment; 6, 0.15% viscozyme:pectinex ultra pulp (1:1) treatment; 7, 0.15% celluclast : viscozyme : pectinex ultra pulp (1:1:1) treatment.

^{h)}Values are mean±SD.

Means with different letters (a-h) are significantly different by one-way ANOVA followed Duncan's multiple range test at the 0.05 level of significance.

높았으며, 처리시간이 증가함에 따라 추출 수율 역시 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 이는 본 실험에 사용된 효소인 Celluclast® 1.5L은 cellulose 가수분해효소, Viscozyme® L은 cellulose, hemicellulose, xylose 가수분해효소로 구성되어 있어 이들이 수박을 구성하고 있는 cellulose, hemicellulose 및 pectin 등을 저분자 당당류 등으로 분해된 것으로 판단된다.

환원당 함량 측정

분쇄된 수박의 효소 처리에 따른 환원당 함량은 Table 2와 같다. 단일효소 및 복합효소 처리군 모두 반응 시간이 증가함에 따라 환원당 함량이 증가하는 것을 확인할 수 있었고, 단일효소 처리군에서 24시간 반응했을 때 Viscozyme® L이 다른 효소에 비해 환원당 함량이 높은 것을 확인할 수 있었다. 이는 채종박에 Celluclast® 1.5L, Pectinex® Ultra Pulp 및 Viscozyme® L을 각각 단독으로 처리한 후 24시간 반응하였을 때 Viscozyme® L의 환원당 함량이 다른 효소 처리군과 비교하여 높았던 결과와 동일한 경향을 나타내었다(Rodrigues 등, 2014). 6시간 처리 시 Celluclast® 1.5L, Pectinex® Ultra Pulp를 1:1 처리한 군과 Celluclast® 1.5L, Pectinex® Ultra Pulp, Viscozyme® L을 1:1:1로 처리한 군의 함량이 높았다. 처리시간이 증가함에 따라 12, 24시간 처리 시 Celluclast® 1.5L, Viscozyme® L을 1:1 처리한 군과 Celluclast® 1.5L, Pectinex® Ultra Pulp 및 Viscozyme® L을 1:1:1 처리한 군에서 환원당 함량이 다른 군에 비해 유의적으로 높음을 확인할 수 있었는데, 이는 실험에 사용된 효소가 cellulose, hemicellulose, xylose, pectin 가수분해 효소로 구성되어 있어 이들이 수박을 구성하고 있는 cellulose, hemicellulose 및 pectin 등을 저분자 당당류 등으로 분해된 것으로 판단된다. Celluclast® 1.5L, Pectinex® Ultra Pulp 및 Viscozyme® L 처리 시 환원당 함량이 높았던 결과는 채종박에 Celluclast® 1.5L, Pectinex® Ultra Pulp 및 Viscozyme® L을 동시에 처리하여 24시간 반응하였을 때와 동일한 결과를 보였다(Rodrigues 등, 2014).

총당 함량 측정

분쇄된 수박의 효소 처리에 따른 총당 함량은 Table 2와 같으며 앞선 환원당 함량과 마찬가지로 6시간 처리 시 Celluclast® 1.5L, Pectinex® Ultra Pulp를 1:1 처리한 군과 Celluclast® 1.5L, Pectinex® Ultra Pulp, Viscozyme® L을 1:1:1로 처리한 군의 함량이 높았다. 그리고 처리시간이 증가함에 따라 12, 24시간 처리 시 Celluclast® 1.5L, Viscozyme® L을 1:1 처리한 군과 Celluclast® 1.5L, Pectinex® Ultra Pulp, Viscozyme® L을 1:1:1 처리한 군에서 총당 함량이 다른 군에 비해 유의적으로 높음을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 생강에 Celluclast® 1.5L, Viscozyme® L을 1:1 처리했을 때 Celluclast® 1.5L과 Viscozyme® L을 독립적으로 처리한 군에 비해 총당의 함량이

높은 것과 유사한 경향을 나타내었으며, 과피에 존재하는 세로박 다당류를 분해하기 위해서는 복합효소 처리가 유리하게 작용하는 것으로 판단된다(Nam 등, 2018). 추출 수율, 환원당, 총당 결과를 바탕으로 수박에 Celluclast® 1.5L, Viscozyme® L을 1:1 처리한 후 에탄올 생산 최적화를 실시하였다.

효소 처리된 수박의 에탄올 생산

효소 처리된 수박의 에탄올 제조율의 최적화를 위해 반응 표면분석법 중 중심합성법(CCD)을 이용하여 실시하였으며, 독립변수는 *Saccharomyces cerevisiae* AFY, *Kluyveromyces marxianus*(KCCM 12015), *Candida kefyr*(KCCM 50614)의 효소 처리된 시료에 대한 접종량 그리고 발효 시간으로 하였다. *Saccharomyces cerevisiae* AFY는 사전실험을 통해 에탄올 생산 능력이 높은 균주를 선택했으며, *Kluyveromyces marxianus*(KCCM 12015), *Candida kefyr*(KCCM 50614)는 식약처에서 허가한 식품에 사용 가능한 효모이다. 여러 논문의 연구결과(Yoshida 등, 2010; Hong 등, 2007; Rajoka 등, 2004)에서 β -glucosidase 활성을 가진다고 보고되었고 이들을 cellulase 계통의 효소로 처리된 수박 시료에 사용함으로써 에탄올 생산율을 높이고자 선택하였다.

4가지 독립변수에 따른 에탄올 제조율의 반응표면분석 결과는 Table 3과 같다. Table 3에는 실제값과 예측값을 같이 나타내어 각 조건에 대한 실험값과 실험결과에 따라 성립된 모델의 예측값을 비교함으로써 실험값과 예측값 간의 차이를 확인하였으며 독립변수에 따른 에탄올 제조율에 대한 영향을 나타내는 회귀방정식은 다음과 같다. 이를 통해 각 독립변수에 대한 종속변수의 예측값을 도출할 수 있다.

$$Y = 4.73 + 0.46X_1 - 0.017X_2 - 0.008333X_3 + 1.36X_4 + 0.037X_1X_2 - 0.10X_1X_3 - 0.21X_1X_4 + 0.11X_2X_3 - 0.15X_2X_4 - 0.038X_3X_4 - 0.39X_1^2 + 0.056X_2^2 + 0.16X_3^2 - 0.51X_4^2 \quad (1)$$

여기서 Y는 각 독립변수에 따른 에탄올 제조율을 나타내며, X_1 은 *Saccharomyces cerevisiae* AFY의 효소 처리된 시료에 대한 접종량, X_2 는 *Kluyveromyces marxianus*(KCCM 12015)의 효소 처리된 시료에 대한 접종량, X_3 는 *Candida kefyr*(KCCM 50614)의 효소 처리된 시료에 대한 접종량, X_4 는 발효 시간을 나타내었다.

실제 실험값을 기준으로 보았을 때 에탄올 제조율은 0.0~5.8% 범위였으며, 가장 높았던 값의 독립변수 조건은 *Saccharomyces cerevisiae* AFY 3%(v/v), *Kluyveromyces marxianus*(KCCM 12015) 3%(v/v), *Candida kefyr*(KCCM 50614) 0%(v/v), 발효 시간은 5일이었을 때였고 Table 3에서 21번째 값이었다.

(1)의 회귀방정식은 Table 4에서 독립변수에 대한 에탄올 제조율의 quadratic regression model ANOVA 결과로

Table 3. Central composite design arrangement, and the observed and predicted values for response surface methodology

Run	Coded variable levels				Ethanol concentration (%)	
	$X_1^{1)}$	$X_2^{2)}$	$X_3^{3)}$	$X_4^{4)}$	Observed values	Predicted values
1	-1	-1	-1	-1	2.0	1.9
2	+1	-1	-1	-1	3.1	3.4
3	-1	+1	-1	-1	2.0	1.9
4	+1	+1	-1	-1	3.1	3.5
5	-1	-1	+1	-1	2.1	1.9
6	+1	-1	+1	-1	3.2	3.0
7	-1	+1	+1	-1	2.4	2.4
8	+1	+1	+1	-1	3.3	3.6
9	-1	-1	-1	+1	5.7	5.4
10	+1	-1	-1	+1	5.7	6.0
11	-1	+1	-1	+1	4.3	4.8
12	+1	+1	-1	+1	5.4	5.6
13	-1	-1	+1	+1	5.4	5.3
14	+1	-1	+1	+1	5.4	5.5
15	-1	+1	+1	+1	5.4	5.1
16	+1	+1	+1	+1	5.1	5.5
17	-2	0	0	0	1.8	2.3
18	+2	0	0	0	4.8	4.1
19	0	-2	0	0	4.8	5.0
20	0	+2	0	0	5.4	4.9
21	0	0	-2	0	5.8	5.4
22	0	0	+2	0	5.2	5.4
23	0	0	0	-2	0.0	0.0
24	0	0	0	+2	5.7	5.4
25	0	0	0	0	5.0	4.7
26	0	0	0	0	4.7	4.7
27	0	0	0	0	4.5	4.7

¹⁾*Saccharomyces cerevisiae* AFY (% , v/v).²⁾*Kluyveromyces marxianus* (KCCM 12015) (% , v/v).³⁾*Candida kefyr* (KCCM 50614) (% , v/v).⁴⁾Fermentation time (day).**Table 4.** Analysis of variance of the experimental results for the quadratic model¹⁾

Source	Sum of squares	Degrees of freedom	Mean square	F-value	Prob> F
Model	62.35	14	4.45	21.54	<0.0001
Residual	2.48	12	0.21		
Lack of fit	2.35	10	0.24	3.72	0.2305
Pure error	0.13	2	0.063		
Cor total	64.83	26			

¹⁾Coefficient of determination (R^2)=0.9617; Adjusted R^2 =0.9171; Coefficient of variation (CV)=11.03%; Adeq. precision=17.840.

표현되며, 이를 통해 모델의 적합성을 판단할 수 있다. 그 결과를 살펴보면 F-value는 21.54이며, P -value는 0.0001 보다 작으므로 이 모델이 높은 유의성을 가짐을 확인할 수 있다. 또한 Coefficient of determination(R^2)=0.9617 값 역시 이 모델의 적합성이 높다는 것을 나타내며(Zhang 등, 2015), Lack of fit(적합성 결여)의 F-value는 3.72고 P -

value가 0.2305로 유의적이지 않은데 이 역시 예측된 모델이 적절하다는 것을 나타낸다. Adequate precision은 signal에서 noise까지의 ratio를 측정할 수 있으며, 일반적으로 4 이상의 높은 값을 나타내는 것이 필요한데 본 모델은 17.840이므로 이 모델은 디자인 공간을 탐색하는 데 유용할 것으로 판단된다(Ghosh와 Hallenbeck, 2010; Zhu 등, 2010).

Fig. 1은 회귀방정식으로부터 분석된 결과를 바탕으로 나타낸 3차원 반응표면 곡선으로 각각의 그래프들은 네 가지의 독립변수 중에서 두 개의 독립변수를 중앙값에 고정했을 때 나머지 두 독립변수들이 종속변수에 어떤 영향을 미치는지 나타낸다. Fig. 1A는 X_3 (KCCM 50614 접종량)와 X_4 (fermentation time)가 중앙값일 때 X_1 (AFY 접종량), X_2 (KCCM 12015 접종량)의 상관관계를 나타내며, X_1 이 중간값일 때 종속변수인 에탄올 생성량이 높은 것을 확인할 수 있고 에탄올 생성량에 대해 X_2 는 크게 영향을 미치지 않는 것을 확인할 수 있었다. Fig. 1B는 X_2 와 X_4 가 중앙값일 때 X_1 , X_3 의 상관관계를 나타내며, X_1 이 중간값일 때 종속변수인 에탄올 생성량이 높은 것을 확인할 수 있고 에탄올 생성량에 대해 X_3 는 크게 영향을 미치지 않는 것을 확인할 수 있었다. Fig. 1C는 X_1 과 X_4 가 중앙값일 때 X_2 , X_3 의 상관관계를 나타내며, X_1 이 중간값일 때 X_4 가 증가할수록 종속변수인 에탄올 생성량이 높은 것을 확인할 수 있었다. Fig. 1E는 X_1 과 X_3 가 중앙값일 때 X_2 , X_4 의 상관관계를 나타내며, X_4 가 증가할수록 종속변수인 에탄올 생성량이 높은 것을 확인할 수 있었고 에탄올 생성량에 대해 X_2 는 크게 영향을 미치지 않는 것을 확인할 수 있었다. Fig. 1F는 X_1 과 X_2 가 중앙값일 때 X_3 , X_4 의 상관관계를 나타내며, X_4 가 증가할수록 종속변수인 에탄올 생성량이 높은 것을 확인할 수 있었고 에탄올 생성량에 대해 X_3 는 크게 영향을 미치지 않는 것을 확인할 수 있었다. Fig. 2는 실제값과 예측값 간의 상관관계를 나타낸 결과로 선형의 관계를 따르고 있어 모델에 대한 적합성이 높음을 확인할 수 있었다.

Table 5는 모델에서 종속변수인 에탄올 제조율과 회귀계수 간의 유의성을 나타낸 결과이며 P -value 값이 작을수록 종속변수에 대해 유의적인 영향을 나타낸다. 본 모델에서 일차항은 AFY 접종량(X_1)과 발효 시간(X_4), 이차항(X^2)은 AFY 접종량(X_1)과 발효 시간(X_4)에서 에탄올 생성(종속변수)에 유의하였다.

본 모델을 바탕으로 에탄올 생산 최적조건을 검색하였으며, 최적조건은 AFY 접종량(X_1)=3.61%, KCCM 12015 접종량(X_2)=1.5%, KCCM 50614 접종량(X_3)=1.5%, 발효 시간(X_4)=7.5 day일 때 에탄올 생성량의 예측값은 6.18%, 실제값은 5.9%가 나왔고, 예측값과 비교해 실제값이 낮았지만 오차범위 5% 안에 들어가므로 이 조건은 에탄올 생산을 최적화하는 데 적합한 값을 확인할 수 있었다.

Fig. 1. Response surface curve of the effect of different factors on the production of alcohol from enzyme treated watermelon (A) response surface as function of amount of AFY (X_1) and amount (% v/v) of KCCM 12015 (X_2); (B) response surface as function of amount (% v/v) of AFY (X_1) and amount (% v/v) of KCCM 50614 (X_3); (C) response surface as function of amount (% v/v) of AFY (X_1) and fermentation time (X_4); (D) response surface as function of amount (% v/v) of KCCM 12015 (X_2) and amount (% v/v) of KCCM 50614 (X_3); (E) response surface as function of amount (% v/v) of KCCM 12015 (X_2) and fermentation time (X_4); (F) response surface as function of amount (% v/v) of KCCM 50614 (X_3) and fermentation time (X_4).

Fig. 2. Predicted-actual values plot of alcohol concentration.

요 약

본 연구에서는 상품성이 떨어지는 수박 전체 부분에 효소 처리를 실시한 후 반응표면분석법을 통해 에탄올 제조 효율을 확인하고자 하였다. 효소 처리 결과 추출 수율은 Celluclast® 1.5L과 Viscozyme® L을 1:1 처리한 군의 추출 수율이 다른 군에 비해 유의적으로 높았으며, 총당, 환원당 함량

Table 5. Regression coefficient model and P -values for each model terms

Model term	Coefficient estimated	Standard error	F-value	P -value
Model	4.73	0.26		
$X_1^{1)}$	0.46	0.093	24.39	0.0003***
$X_2^{2)}$	-0.017	0.093	0.032	0.8605
$X_3^{3)}$	-0.008333	0.093	0.008062	0.9299
$X_4^{4)}$	1.36	0.093	214.19	<0.0001***
$X_1 X_2$	0.037	0.11	0.11	0.7472
$X_1 X_3$	-0.10	0.11	0.77	0.3963
$X_1 X_4$	-0.21	0.11	3.49	0.0862
$X_2 X_3$	0.11	0.11	0.98	0.3419
$X_2 X_4$	-0.15	0.11	1.74	0.2116
$X_3 X_4$	-0.038	0.11	0.11	0.7472
X_1^2	-0.39	0.098	16.00	0.0018**
X_2^2	0.056	0.098	0.33	0.5783
X_3^2	0.16	0.098	2.52	0.1384
X_4^2	-0.51	0.098	26.45	0.0002***

¹⁾*Saccharomyces cerevisiae* AFY (% v/v).

²⁾*Kluyveromyces marxianus* (KCCM 12015) (% v/v).

³⁾*Candida kefyr* (KCCM 50614) (% v/v).

⁴⁾Fermentation time (day).

** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

은 Celluclast® 1.5L, Viscozyme® L을 1:1 처리한 군과 Celluclast® 1.5L, Pectinex® Ultra Pulp, Viscozyme® L

을 1:1:1 처리한 군에서 환원당 함량이 다른 군에 비해 유의적으로 높음을 확인할 수 있었다. 이 결과를 바탕으로 수박으로부터 에탄올 제조 최적화를 위해 AFY 접종량(X_1 : 0~6%), KCCM 12015 접종량(X_2 : 0~6%), KCCM 50614 접종량(X_3 : 0~6%), 발효 시간(X_4 : 0~10 days)을 독립변수로 두어 중심합성계획법(central composite design; CCD)을 실시하였다. 실험 결과는 이차회귀방정식에 적용되었으며, 회귀방정식에 대한 신뢰도는 ANOVA에 의해 분석되었다. 에탄올 생성율의 가장 높은 조건은 AFY 접종량=3.61%, KCCM 12015 접종량=1.5%, KCCM 50614 접종량=1.5%, 발효 시간=7.5 day일 때 예측값은 6.18%, 실제값은 5.9%가 나왔으며, 이 조건은 에탄올 생산을 최적화하는 데 적합한 값을 확인할 수 있었다.

REFERENCES

- DuBois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem.* 1956. 28:350-356.
- Ghosh D, Hallenbeck PC. Response surface methodology for process parameter optimization of hydrogen yield by the metabolically engineered strain *Escherichia coli* DJT135. *Biore-sour Technol.* 2010. 101:1820-1825.
- Hong J, Wang Y, Kumagai H, Tamaki H. Construction of ther-motolerant yeast expressing thermostable cellulase genes. *J Biotechnol.* 2007. 130:114-123.
- Hong SP, Lim JY, Jeong EJ, Shin DH. Physicochemical proper-ties of watermelon according to cultivars. *Korean J Food Preserv.* 2008. 15:706-710.
- Hwang Y, Lee KK, Jung GT, Ko BR, Choi DC, Choi JS, et al. Manufacturing of watermelon beverage added with natural color extracts. *Korean J Food Sci Technol.* 2004a. 36:226-232.
- Hwang Y, Lee KK, Jung GT, Ko BR, Choi DC, Choi YG, et al. Manufacturing of wine with watermelon. *Korean J Food Sci Technol.* 2004b. 36:50-57.
- Jeon HI, Song GS, Kim YS. Physicochemical properties of alco-hol insoluble polysaccharides fractions from watermelon and oriental melon peels and their effects on growth of intestinal bacteria. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2018. 47:981-987.
- Kim KS, Lee HJ, Kim SM. Volatile flavor components in water-melon (*Citrullus vulgaris* S.) and oriental melon (*Cucumis melo* L.). *Korean J Food Sci Technol.* 1999. 31:322-328.
- Kim SL, Kim WJ, Lee SY, Byun SM. Alcohol fermentation of Korean watermelon juice. *J Korean Agric Chem Soc.* 1984. 27:139-145.
- Lee BH. Cultivation of vegetable in a greenhouse. Sunjinmun-hwasa, Seoul, Korea. 1983. p 223-239.
- Lee SB, Kim H. The effect of acid hydrolysis and enzymatic saccharification in bioethanol production process using fruit peels. *Appl Chem Eng.* 2014. 25:619-623.
- Lee WS. Vegetable of Korea. Kyungpook National University Press, Daegu, Korea. 1994. p 189-202.
- Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem.* 1959. 31:426-428.
- Nam DG, Kim M, Im P, Kim SB, Choe JS, Cho AJ. Solubiliza-tion of polysaccharide and functional components by high-pressure enzyme treatment from ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). *Food Eng Prog.* 2018. 22:173-185.
- Park CS, Kim ML. Preparation and characterization of water-melon wine. *Korean J Food Preserv.* 2010. 17:547-554.
- Rajoka MI, Khan S, Latif F, Shahid R. Influence of carbon and nitrogen sources and temperature on hyperproduction of a thermotolerant β -glucosidase from synthetic medium by *Kluy-veromyces marxianus*. *Appl Biochem Biotechnol.* 2004. 117: 75-92.
- Rodrigues IM, Carvalho MGVS, Rocha JMS. Increasing the pro-tein content of rapeseed meal by enzymatic hydrolysis of carbohydrates. *BioRes.* 2014. 9:2010-2025.
- Suh JY, Kang HA, Chang KS. Concentration of watermelon juice by reverse osmosis. *Food Eng Prog.* 2001. 5:160-164.
- Yoshida E, Hidaka M, Fushinobu S, Koyanagi T, Minami H, Tamaki H, et al. Role of a PA14 domain in determining sub-strate specificity of a glycoside hydrolase family 3 β -glucosi-dase from *Kluyveromyces marxianus*. *Biochem J.* 2010. 431: 39-49.
- Zhang Y, Gao X, Liu J, Ge Y. Pilot production of *Clonostachys rosea* conidia in a solid-state fermentor optimized using re-sponse surface methodology. *Eng Life Sci.* 2015. 15:772-778.
- Zhu T, Heo HJ, Row KH. Optimization of crude polysaccharides extraction from *Hizikia fusiformis* using response surface methodology. *Carbohydr Polym.* 2010. 82:106-110.