

매실을 이용한 식초산 발효에 관한 연구

김용두[†] · 강성훈* · 강성구

순천대학교 식품공학과

*전남대학교 식품공학과

Studies on the Acetic Acid Fermentation Using Maesil Juice

Yong-Doo Kim[†], Sung-Hoon Kang* and Seong-Koo Kang

Dept. of Food Science and Technology, Sunchon National University, Sunchon 540-742, Korea

*Dept. of Food Science and Technology, Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea

Abstract

In other to produce vinegar using maesil, acetic acid bacteria were selected from several conventional vinegars, and total 16 acetic acid producing bacterial strains were isolated. Among the isolated strains, a strain was selected from the medium with maesil juice which showed the highest productivity of acetic acid. The strain was identified as *Acetobacter* sp. VC-2 and it's cultural characteristics were also investigated in the batch shake flasks. The medium containing 2% acetic acid, 6% ethanol, 0.2% glucose, 0.3% yeast extract and 30% maesil juice was suitable for acetic acid production with *Acetobacter* sp. VC-2 at 30°C. The acidity of culture medium was reached to 6.5% after 8 days shaking cultivation at 30°C. The main components of organic acids were acetic, citric, malic and tartaric acid, and they were 4.28, 1.38, 0.48 and 0.30%, respectively.

Key words: maesil, *Acetobacter* sp., vinegar, acetic acid

서 론

식초는 전분질과 알코올에서 초산발효를 시켜 얻는 양조식초와 발효과정을 거치지 않고 빙초산, 물, 향신료 및 착색료 등을 사용하여 제조하는 합성식초로 구별된다. 양조식초에는 사용되는 원료에 따라 쌀, 주박, 맥아, 레몬, 사과, 포도 및 감식초 등이 있는데, 초산발효에 의하여 생성되는 초산을 주 성분으로 해서 소량의 휘발성 또는 비휘발성의 유기산, 당류, 아미노산 및 ester 등을 함유하여 특유한 방향과 신맛을 가진 발효식품이다(1). 우리나라 식초제조 기원은 삼국시대에 중국으로부터 전래된 것으로 추측되며(2), 약탁주를 이용한 양조식초가 상류층 가정에서 자가제조되어 이용되다가 1950년대 후반에 비로소 양조식초가 공업적으로 생산되기 시작하였다(3). 식초에 관한 국내 연구로 전 등(4)이 우수초산균을 분리하여 자외선과 NTG를 처리하여 초기 산생성능이 우수한 균주를, 김 등(5)은 밀감과피식초에서 *Acetobacter pasteurianus*를, 박

등(6,7)은 고농도 에탄올 내성 초산균을 분리, 동정한 바 있다. 또한 오(8)는 배식초 제조를 위한 기본 발효조건을 보고하였고, 김과 조(9)의 곶감주 발효에 관한 연구, 신과 배(10)의 감을 이용한 과일초 제조 가능성 검토, 김 등(11)의 *Acetobacter aceti*의 모균주와 변이주를 이용한 사과초 제조과정에서 생성된 유기산의 조성을 분석 보고한 바 있다.

한편, 매실은 succinic acid, citric acid, malic acid 및 tartaric acid 등의 유기산 뿐만 아니라 sitosterol과 무기질 함량이 많은 알칼리식품으로 알려져 있는데, 옛부터 엑기스를 추출하여 차로 음용하고 미숙과실을 건위, 주독, 해독 및 구충제 등 한약제로 일부 이용되어 왔으며, 매실식품으로는 술, 엑기스, 잼, 차, 장아찌 및 김치 등으로 개발되어 있다(12). 그러나 매실을 이용한 식초에 관한 연구는 미비한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 매실을 이용하여 식초를 생산할 목적으로 매실즙배지에서 초산생성력이 우수한 초산균을 분리, 동정하였고, 이 균의 배양특성과 매실

[†]To whom all correspondence should be addressed

식초의 유기산 조성을 조사한 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용한 매실은 전남 순천시 월등면 지역에서 생산된 1994년산 매실(품종 : 백가하)을 원료로 사용하였으며, 채취한 매실을 수돗물에 충분히 수세하여 씨를 제거한 과육을 waring blender로 마쇄한 것을 매실즙으로 이용하였다.

배지

초산 생산균 분리용 평판배지는 표준배지(yeast extract, 1% ; glucose, 5% ; CaCO₃, 3% ; agar, 2.5%)(13)에 ethanol이 4% 함유된 배지를 사용하였으며, 매실초 제조를 위한 초산생산용 매실즙배지는 yeast extract, 0.2% ; glucose, 0.5% ; (NH₄)₂PO₄, 0.06% ; ethanol 4% 함유된 배지에 매실즙액을 30%로 첨가하여 사용하였다. 이때 사용된 매실즙액은 매실 1kg에서 얻은 추출액을 1L로 정용한 것을 사용하였다.

초산 생성균의 분리

순천시 근교지역의 가정에서 제조한 재래초 10여점을 초산균 분리 시료로 하였으며, 30°C에서 24시간 동안 활성화시킨 후 생리식염수로 적절하게 희석하여 각각의 분리시료에서 0.2ml씩 분리용 평판배지에 도말 배양하고 30°C에서 3일간 배양하여 colony 주위에 투명한이 형성된 균을 순수분리하였다.

매실즙 배지에서의 우수 초산균 선정

분리용 평판배지에서 초산 생성균주로 선정된 균주들을 초산 생성용 매실즙배지에 접종하고 shaking incubator(Kiya Seisakusho Co., Japan)를 사용하여 30°C에서 100rpm으로 8일간 배양한 후 초산 생성량이 가장 좋은 균주를 최종 선정하였다.

분리균의 동정

분리균주는 Bergy's manual of systematic bacteriology(14)와 Manual of method for bacteriology(15)에 준하여 동정하였다.

산도 측정

산도 측정은 초산 발효액을 원심분리한 상등액 10ml

를 취하여 0.1% phenolphthalein을 지시약으로 하여 0.1 N NaOH로 적정한 후 초산으로 환산하여 나타내었다.

균생육도 측정

균생육도는 spectrophotometer(Cecil 292, U.K)를 사용하여 균현탁액의 흡광도(660nm)로 나타내었다.

유기산 분석

유기산 분석은 시료 1ml를 먼저 활성화된 amberlite IRA-118H(Sigma, USA)과 amberlite IRA-45(Sigma, USA)를 사용하여 유기산을 흡착, 분리시킨 다음 55°C에서 감압 건조한 후, n-butanol 2ml, benzene 2ml, H₂SO₄ 1ml 및 무수 Na₂SO₄ 2g을 가하여 환류 냉각장치에서 2시간 동안 비등시킨 다음, 증류수로 수회 세척하고 ether로 추출한 후 10ml로 정용하여 GC로 분석하였다. 분석조건은 Table 1과 같고, 유기산 함량은 외부표준법으로 계산하였다.

결과 및 고찰

초산 생성균의 분리 및 동정

순천시 근교지역 가정에서 재래식 방법으로 제조한 10여점의 식초로부터 초산균 분리용 배지에 접종하여 colony의 주위에 clear zone을 형성하는 16개 균주를 순수분리하였다. 이들 균주 중 매실즙을 첨가한 배지에서 초산생성이 우수한 균을 선정하기 위해 매실즙액이 30%가 함유되어 있는 초산생산용 매실즙 배지에 분리 균주들을 각각 접종하여 초산 생성량이 가장 높은 균를 공시균주로 최종적으로 선정하였다. 분리균의 형태 및 생리학적 특성을 조사한 결과(Table 2), 그람 음성 간균으로 ethanol을 산화하여 acetic acid를 생성하며, 운동성, catalase 생성능, acetate와 lactate 산화성은 양성 반응을 나타내었으나 질산염 환원능은 없었다. 탄소원으로 mannitol, inulin, sucrose 및 methanol을 이용하지 못했으며 indole 생성능과 gelatin 액화능이 없는 것

Table 1. The conditions of gas chromatography for analysis of organic acids

Instrument	Hewlett Packard 5890A GC
Detector	Flame ionization detector
Column	Ultra 2
Detector temp.	250°C
Injector temp.	250°C
Oven temp.	70~220°C(5°C/min)
Carrier gas	N ₂ (split rate 30 : 1)
Injection	2μl

Table 2. Morphology and physiological properties of the isolated strain

Test	VC-2
Shape	rod
Gram reaction	-
Catalase	+
Mobility	+
Growth on carbon source :	
Ethanol	+
Methanol	-
Na-Acetate	+
n-Propanol	+
Amyl alcohol	-
n-Butanol	-
Nitrate reduction	-
Growth on SM medium	
+0.5% NaCl	+
+1.0% NaCl	+
+2.0% NaCl	-
+1.0% Ethanol	+
+2.0% Ethanol	+
+5.0% Ethanol	+
+10.0% Ethanol	-
Nutrient broth	-
Oxidation of carbohydrate	
D-Glucose	+
D-Fructose	+
D-Mannitol	+
Dextrun	-
Inulin	+
Sucrose	+
Growth on GYC Medium	+

으로 나타났다. 또한 1.0% 이상의 NaCl 용액에서 증식하지 않아 내염성이 약한 것으로 나타났다. 이와 같은 결과에 따라 Bergy's manual 분류표에 의해 분리균주를 *Acetobacter* 속으로 동정되었으나 정확한 species는 알 수 없었다. 따라서 이 균주를 *Acetobacter* sp. VC-2로 명명하였다.

증식 최적온도

매실즙배지에서의 공시균주의 증식 최적 온도를 검토하기 위하여 배양온도를 5°C 간격으로 20~40°C의 온도범위에서 48시간 동안 진탕배양한 후 균의 증식과 산도의 생성량을 살펴본 결과는 Fig. 1과 같다. 증식 최적 온도는 30°C로 나타났으며, 초산 생성량도 증식 최적 온도에서 가장 높게 나타났다. 또한 25°C와 35°C에서 증식은 비슷하게 나타나고 있으나 25°C 보다 온도가 낮아지거나 35°C 보다도 높아지면 증식율이 급격히 낮아지는 경향을 나타냈다. 이와 같은 결과로 볼 때 초산 발효시 배양 온도가 너무 낮으면 발효속도가 늦어지

고, 너무 높으면 에탄올 및 초산 손실이 일어나 풍미를 잃게 되는데, 본 실험에서 분리한 공시균주는 생육적 온이 30°C로 초산 발효에 유용한 균주로 생각되었다.

정치배양과 진탕배양시 총산도 증가량의 비교

정치배양과 진탕배양이 초산생성에 미치는 영향을 조사하기 위해 매실즙배지에 분리균주를 접종하고 8일 동안 배양하면서 총 산도를 경시적으로 측정된 결과는 Fig. 2와 같다. 진탕배양에서는 정치배양에 비해 분리균의 유도기가 짧았으며 산도 증가량도 발효 1일째부터 증가하기 시작하여 7일째에는 5.8%까지 도달하였다. 정치배양의 경우는 발효 3일째 부터 산도가 서서히 증가하기 시작하여 발효 8일째에 5.0%에 도달하여 진탕배양 보다 초산 생성량도 낮을 뿐만 아니라 발효진행속도가 늦게 나타났는데, 이는 정치배양의 경우 발

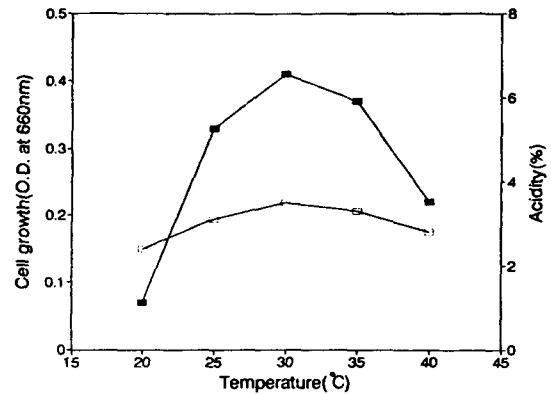


Fig. 1. Effects of temperature on the growth and acidity by *Acetobacter* sp. VC-2 for 48hr. ■-■: Cell growth, □-□: Acidity

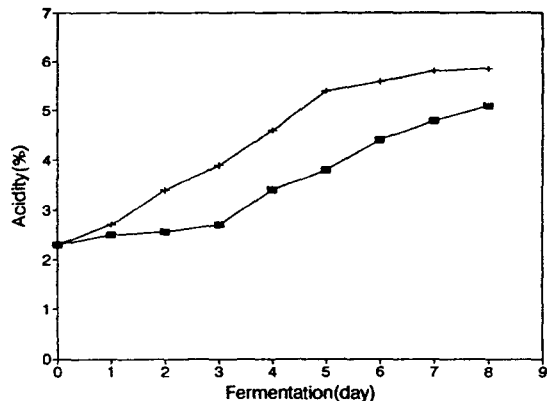


Fig. 2. Effects of shaking culture and static culture on the total acidity by *Acetobacter* sp. VC-2 at 30°C. ■-■: Static culture, +-+: Shaking culture

효는 액면에서 주로 이루어지므로 통기량에 의한 차이로 생각되었다. 따라서 본 실험에 사용된 공시균주는 진탕배양이 초산발효에 효과적임을 알 수 있었다.

초기 산도의 영향

초기 산도가 초산 생성량에 미치는 영향을 살펴 보기 위하여 매실즙배지의 초기 산도를 1~4%의 범위에서 1% 간격으로 각각 조절하여 30°C에서 진탕배양하면서 8일 동안 경시적으로 생성된 초산량을 측정된 결과는 Fig. 3과 같다. 모든 시료구에서 7일째에 발효가 거의 완료되었는데, 초기 초산 농도가 가장 낮은 1% 첨가구에서는 초산 생성량이 가장 낮게 나타났으며, 2%와

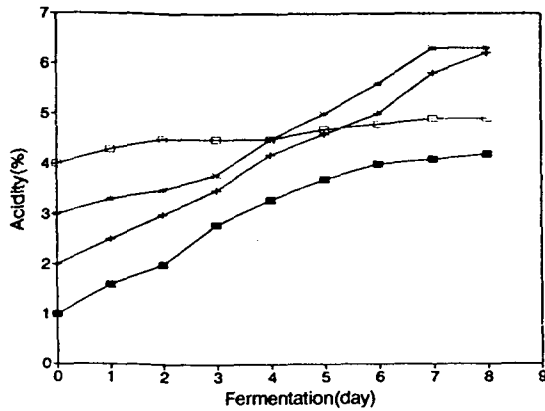


Fig. 3. Acetic acid production from *Acetobacter* sp. VC-2 by the initial acidity concentration during the incubation period at 30°C.
 ■-■: Acetic acid 1%, +-+: Acetic acid 2%, *-*: Acetic acid 3%, □-□: Acetic acid 4%

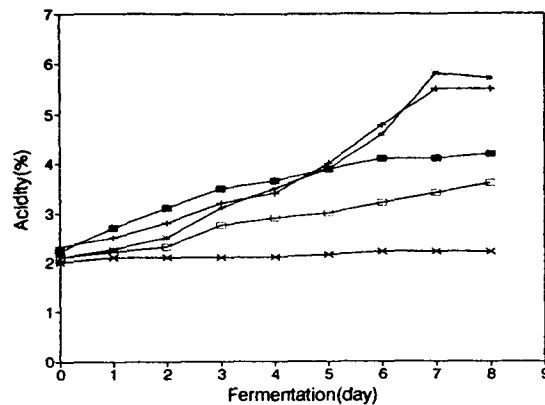


Fig. 4. Acetic acid production from *Acetobacter* sp. VC-2 by the initial ethanol concentration during the incubation period at 30°C.
 ■-■: Ethanol 2%, +-+: Ethanol 4%, *-*: Ethanol 6%, □-□: Ethanol 8%, ×-×: Ethanol 10%

3% 첨가구에서 발효 7일째에 5.8%, 6.3%로 가장 높게 나타났다. 그러나 4% 첨가구에서는 초산 생성이 약간 증가는 하였으나 발효가 진행되지 않았다. 이와 같은 결과로 볼 때 분리균주는 초기 산도가 2~3%의 범위가 가장 적합한 발효조건이라 판단되었다. 한편 초산 발효시 2% 이상의 산도에서는 *Mycoderma* 산막효모의 증식이 억제된다고 김 등(5)이 보고한 바 있다.

알코올 농도의 영향

에탄올 농도가 초산발효시 초산 생성량에 미치는 영향을 보기 위하여 매실즙배지에 에탄올 초기 농도를 2, 4, 6, 8 및 10%로 각각 첨가하여 30°C에서 진탕배양하면서 경시적으로 산도를 측정된 결과는 Fig. 4와 같다. 에탄올 2% 첨가구에서는 배양 6일째에 산도가 4.1%에 도달하였으나 그 이후에는 증가하지 않았다. 에탄올을 4% 첨가구에서는 배양 7일째에 6.2%에 도달한 다음 감소하였고, 에탄올 6% 첨가구에서는 배양 7일째 6.5%의 산도를 보여 가장 높게 나타났다. 그러나 에탄올 8%와 10%의 첨가구에서는 산도가 오히려 낮게 나타났다. 특히 10% 첨가구에서는 배양 8일째에도 산도의 증가가 보이지 않았다. 이상의 결과로 보면 알코올의 초기농도는 6%일 때 가장 효과적인 것으로 나타났다.

포도당 농도의 영향

매실즙액 30%와 에탄올 4%를 첨가한 액체배지에 포도당 농도를 0~0.5%까지 0.1% 간격으로 각각 달리 첨가하여 30°C에서 8일간 진탕배양하여 산도를 측정해 본 결과는 Table 3과 같다. 포도당 무첨가구에서의 산도 값은 4.2%였으나 포도당의 농도를 증가할 경우 산도는 증가하다가 다시 감소하는 경향을 보였다. 즉 0.2% 첨가구에서는 6.5%로 최대치를 보였으나, 0.3% 이상의 첨가구에서는 산도가 오히려 감소하였다. 이와 같은 결과는 배지 중의 sucrose 함량이 과량일 경우 초산발효가 저해된다는 남과 유(13)의 보고와 일치하

Table 3. Effect of glucose concentration on the production of acetic acid by *Acetobacter* sp. VC-2

Concentration of glucose(%)	Acidity(%)
0.0	4.2
0.1	5.0
0.2	6.5
0.3	5.8
0.4	5.0
0.5	5.0

고 있는데, 정확한 원인은 앞으로 보다 구체적인 실험을 해야할 것으로 생각된다.

질소원 농도의 영향

초산생산 매실즙배지에 질소원으로 사용된 yeast extract의 농도를 0~0.5% 까지 0.1% 간격으로 각각 달리하여 증식 최적 농도를 조사하기 위하여 공시균을 접종하고 30°C에서 8일 동안 진탕배양한 후 산도를 조사해 본 결과는 Table 4와 같다. Yeast extract 무첨가 구에서 4.0%의 산도를 보였으나, yeast extract 첨가 농도가 증가함에 따라 산도는 증가하는 경향을 나타내었다. 즉 yeast extract 첨가 농도 0.3%와 0.4%에서 산도 6.5%로 가장 높게 나타났으며, 그 이상 농도에서는 큰 차이를 보이지 않았으나 오히려 약간 감소하는 경향을 보였다.

유기산의 함량

분리 초산균, *Acetobacter* sp. VC-2 균주를 사용하여 상기 배양조건에서 얻어진 최적 발효조건에서 8일간 진탕배양한 후 유기산을 분석한 결과는 Table 5와 같다. 매실식초의 유기산은 acetic acid를 포함하여 5종류가 확인되었으며, 총 유기산은 6.50%로 나타났다. Acetic acid의 함량이 4.28%로 가장 많았으며, 그 다음으로는 citric acid(1.38%), malic acid(0.48%), tartaric acid(0.30%), lactic acid(0.07%) 순으로 나타났다. 매실식초에 함유된 acetic acid와 다른 유기산들의 함량이

Table 4. Effect of yeast extract concentration on the production of acetic acid by *Acetobacter* sp. VC-2

Concentration of yeast extract(%)	Acidity(%)
0.0	4.0
0.1	5.5
0.2	6.0
0.3	6.5
0.4	6.5
0.5	6.3

Table 5. Contents of organic acids in maesil vinegar by *Acetobacter* sp. VC-2

Components	Content(%)
Acetic acid	4.28
Lactic acid	0.07
Malic acid	0.48
Tartaric acid	0.30
Citric acid	1.38
Total	6.50

많은 차이를 보이고 있는데, 이와 같은 이유는 acetic acid는 발효가 진행되면서 초산생산균에 의해 생산량이 증가하는 반면 다른 유기산들은 발효가 일어나기 전에 이미 원료 매실에 존재하고 있는 유기산으로 생각된다. 심 등(16)은 매실의 유기산 조성은 citric acid와 malic acid가 주요 성분이라고 보고한 바 있다.

이상의 결과로 미루어 보아 *Acetobacter* sp. VC-2을 이용한 매실 식초생산에는 매실즙 30%, 초기 산도 2%, 에탄올 농도 6%, 포도당 0.2%, yeast extract 0.3%가 함유된 배지를 이용하여 30°C에서 8일간 진탕배양할 때가 가장 효과적이었다.

요 약

매실즙을 이용한 식초생산을 위하여 초산생성능이 우수한 초산균을 재래초로부터 분리, 동정하고 매실초 제조를 위한 최적 발효조건을 검토하였다. 재래초로부터 분리한 16균주 중 매실즙배지에서 가장 초산 생성능이 우수한 균주로 선정된 균주는 *Acetobacter* sp. VC-2로 동정되었다. 이 균주의 증식 최적 조건을 살펴본 결과, 최적 온도는 30°C였으며 정치배양 보다는 진탕배양이 효과적으로 나타났다. 초산생성에 적합한 배지의 조성은 매실즙 30%, 초기 산도 2%, 에탄올 농도 6%, 포도당 0.2%, yeast extract 0.3%가 함유된 배지였다. 이와 같은 배양조건에서 매실식초는 8일째에 발효가 거의 완료되었으며, 이때 얻은 매실초의 총 산도는 6.5%였다. 주요 유기산으로는 acetic acid, citric acid, malic acid 및 tartaric acid였는데, 이들 함량은 4.28, 1.38, 0.48 및 0.30%로 각각 나타났다.

문 헌

1. 김관조, 김교창, 김도영, 오만진, 이석진, 이수오, 정순택, 정지훈 : 발효공학. 선진문화사, p.285(1990)
2. 조병희 : 시판 식초의 품질 특성에 관한 연구. 서울여자대학 대학원 석사학위논문(1988)
3. 朝井勇宣 : 醋酸菌 研究 歴史. 醱酵協會誌(日本), 26, 25 (1968)
4. 전홍성, 박종필, 이양수, 김연순, 김중승, 김성준 : 식초로부터 분리한 초산발효균들의 특성에 관한 연구. 조선대학교 유전생물공학연구지, 2, 117(1992)
5. 김용호, 박운중, 손천배 : 식초제조에 있어 밀감과피즙 이용에 관한 연구. 충남대학교 농업기술 연구보고, 8, 110(1981)
6. 박권삼, 장동석, 조학래, 박옥연 : 고농도 에탄올 내성 초산균의 개발 및 배양특성. 한국영양식량학회지, 23, 666(1994)
7. 박권삼, 이명숙, 무종수, 장동석 : 고농도 에탄올 내성균 *Acetobacter* FM-10을 이용한 초산 발효조건 검토. 한

- 국영양식량학회지, **23**, 845(1994)
8. 오영준 : 배를 이용한 식초의 발효조건에 관한 연구. 한국영양식량학회지, **21**, 337(1992)
 9. 김해중, 조재선 : 고량주 박초 제조에 관한 연구. 산업미생물학회지, **9**, 191(1981)
 10. 신두호, 배정 : 감을 이용한 식초제조. 대전실전중경공전논문집, **16**, 857(1987)
 11. 김찬조, 박윤중, 이석진, 오만진 : *Acetobacter* sp.와 그 변이주를 이용한 식초산 발효에 관한 연구(사과식초의 유기산조성에 대하여). 산업미생물학회지, **9**, 139(1981)
 12. 서화중, 이명렬, 정두래 : 매실추출물이 흰쥐의 위액분비 및 사염화탄소로 유발시킨 가토의 간장장애에 미치는 영향. 한국영양식량학회지, **19**, 1(1990)
 13. 남성희, 유태중 : 인삼성분이 천연 발효에 미치는 영향. 고려인삼학회지, **4**, 121(1980)
 14. Krieg, N. R. and Holt, J. G. : Bergey's manual of systematic bacteriology. Williams and Wikins, Baltimore/London, Vol. 1, p.267(1984)
 15. Gerhardt, P., Murry, G. E., Costilow, R. N., Nester, E. W., Wood, W. A., Krieg, N. R. and Phillips, G. B. : Manual of methods for general bacteriology. American Society for Microbiology, Washington, D. C., p.85(1981)
 16. 심기환, 성낙계, 최진상, 강갑석 : 매실의 숙성중 성분변화. 한국영양식량학회지, **18**, 101(1989)

(1996년 4월 19일 접수)