

Acetobacter sp. 와 그 변이주를 이용한
식초산 발효에 관한 연구
—사과식초의 유기산 조성에 대하여—

김찬조, 박윤중, 이석건, 오만진
충남대학교 농과대학
(1981년 7월 2일 수리)

Studies on the Induction of Available Mutant of Acetic Acid
Bacteria by UV light Irradiation and NTG Treatment.
—On the Organic Acids Composition of Apple Wine Vinegar—

Chan Jo Kim, Yoon Joong Park, Seuk Keun Lee and Man Jin Oh
Dept. of Food Science and Technology, Coll. of Agriculture,
Chungnam Natl. Univ., Daejeon, Korea
(Received July 2, 1981)

Abstract

In order to investigate the changes of organic acid contents during the process of apple vinegar, this experiment was conducted by inoculating apple juice with *Saccharmyces cerevisae*, and then the apple vinegar were prepared with *Acetobacter aceti* and its mutants obtained by the treatment of ultraviolet light and N-methyl-N-nitro-N'-nitrosoguanidine. The organic acids were analyzed by gas chromatography.

The contents of malic acid, citric acid and acetic acid in apple juice were 0.73%, 0.038% and 0.067%, malic acid, lactic acid and acetic acid in the apple wine 0.114%, 0.10%, and 0.03%, while acetic acid and malic acid in apple vinegar, 4.3%, and about 0.05%, respectively.

서 론

필자 등은 前報⁽¹⁾에서 발효력이 강한 균주를 분리, 동정하고 선정균주에 대하여 NTG와 자외선을 처리하여 초기 산생성능이 빠른 변이주를 얻어 모균주와 변이주를 이용한 산 생산 기본조건을 검토하여 보고한 바 있다.

식초 중에 존재하는 각종의 유기산은 원료로 부

더 기인되는 것과 미생물에 의하여 생성되는 것으로 식초의 맛을 조화시켜 주는 성분들이다.

식초중의 유기산 조성에 대하여 古川등은^(2,3,4,5) 식초 중의 불휘발성 유기산을 silica gel 분배 chromatography법에 의하여 분석한 결과 fumaric, 2-ketoglutaric, lactic, succinic, malic, citric, tartaric acid 등의 존재를 확인하였으며 살균과즙을 알콜 발효시켰을 때 succinic, malic acid는 상당량 증가

하지만 lactic acid는 극히 적은량 증가하였다고 보고한 바 있다. 또한 竹内 등은^(6,7) 사과식초 제조과정에 있어서 유기산의 변화에 대하여 검토한 결과 액집배양을 하였을 경우 불취발성 유기산의 감소가 현저하였지만 정치배양에서는 그 변화가 완만하였다고 보고하였다. 식초의 유기산 조성에 관한 국내의 연구로서는 南의⁽⁸⁾ 보고가 있으나 사과식초 발효과정중의 유기산 변화에 관한 보문은 거의 찾아볼 수 없었으므로 *Acetobacter aceti*의 모균주와 변이주를 이용하여 사과식초 제조과정에 있어서 그 발효과정별로 생성된 유기산의 조성을 분석하여 결과를 얻었으므로 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재 료

경북 대구에서 생산된 1980년산 사과(국광)를 원료로 하여 껍과 핵을 제거하고 waring blender에 넣어 적당한량의 물을 가지고 마쇄한 다음 여과하여 식초제조에 위한 사과즙으로 하였다.

2. 공시균주

알콜발효에 사용된 효모는 우수 사과주 효모로 분리하여 본 대학에 보존중인 *Saccharomyces cerevisiae*를 사용하였으며 초산 발효는 前報에서 발표한 *Acetobacter aceti*(T-50)와 그 변이주(U-48, N-67)를 공시균주로 하였다.

3. 양조방법

(1) 주모 및 증초의 제조

사과즙을 상법으로 살균한 다음 공시균주를 접종하여 30°C에서 36시간 배양시켜 알콜발효와 초산발효의 주모와 증초로 하였다.

(2) 알콜발효 및 초산발효

사과즙에 SO₂가 100ppm이 되도록 아황산칼륨을 가한 후 원료에 대하여 3%의 주모를 첨가하고 30°C에서 10일간 발효시켜 사과주를 제조하였다. 제조된 사과주를 60°C에서 1시간 살균한 후 건열 살균한 진탕 플라스크에 넣고 원료에 대하여 5%의 증초를 접종하여 30°C에서 3일간 진탕배양시켜 사과초를 제조하였다.

4. 성분분석

(1) 산 도

시료액을 취하여 증류수로 적당히 희석한 후 0.1 N-NaOH로 P.P를 지시약으로 적정하여 사과즙과 사과주는 malic acid, 식초는 acetic acid의 % (W/V)로 표시하였다.

(2) 유기산의 분석

㉔ 시료의 전처리

상기의 방법으로 제조된 사과즙, 사과주, 사과초를 山下의^(10,11) 방법에 준하여 전처리하였다. 즉 시료 10ml를 amberlite CG-4B의 column (2×15 cm)에 흡착시킨 후 증류수로서 헹잡물을 제거하고 2N-NH₄ OH로서 흡착된 유기산을 암모늄염으로 용離한 후 vacuum evaporator에서 감압하여 55°C에서 암모니아를 비산시켜 농축하였다. 농축된 시료액을 Amberlite CG 120 column (2×15 cm)을 통하여 遊離酸으로 한다음 세척수를 합하여 0.1N-NaOH로 중화하여 유기산의 Na염으로 하였다. 이를 vacuum evaporator로 55°C에서 감압 乾固하여 ester화 시료로 하였다.

㉕ ester화 조건

乾固된 유기산의 Na염에 n-butanol 2ml, 농 H₂SO₄ 0.3ml, 무수 Na₂SO₄ 0.5g를 가하여 heating mantle에서 1시간동안 냉각기가 부착된 응축기를 이용하여 비등시켜 냉각한 후 glass filter(I G 3)에 여과하여 G.C에 주입하였다.

㉖ 유기산의 측정

유기산의 검출은 Table 1의 분석조건으로 하였으며 기지농도의 표준유기산 peak와 시료의 각 peak를 대조하여 반복치법으로 계산하여 표시하였다.

Table 1. Operating Condition of Gas Chromatography.

Instrument	: Shimadzu GC-4BM
Detector	: Flame ionization detector
Column	: 2m x 3mm glass column (dual) : 20% Silicon DC-550 Diasolid
Injection temp	: 230 C
Detector temp	: 240°C
Column temp	: initial 50 C, final 220 C
Program rate	: 5 C/min
Carrier gas	: N ₂ gas 30ml/min
Chart speed	: 10mm/min
Sample size	: 1-2 ul

결과 및 고찰

1. 유기산의 조성

(1) 시료사과

Gas chromatography로서 표준유기산과 사과즙의 유기산을 승온법으로 분석한 결과는 Fig. 1.2와 같았다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 시료사과즙의 유기산은 malic, citric, acetic, glycolic, formic acid

등 7종의 산이 확인되었으며 분리확인된 유기산의 정량치를 生果 100g 당 mg로 표시한 결과는 table 2와 같다. table 2의 결과에서와 같이 malic acid가 78%로서 가장 많았고 다음이 acetic acid, citric acid, formic acid 순이었고 총산에 대한 유기산의 비율은 malic acid 81%, acetic acid 7.6%, citric acid 4%, formic acid 2.5%, glycolic acid 2.5%로 나타내었다. 李⁽³³⁾ 등의 보고를 보면 유기산 중 malic acid의 함량은 홍옥이 0.94%, 국광이 0.52%, 스타킹이 0.11%이었으며 Fernandez⁽¹²⁾ 등

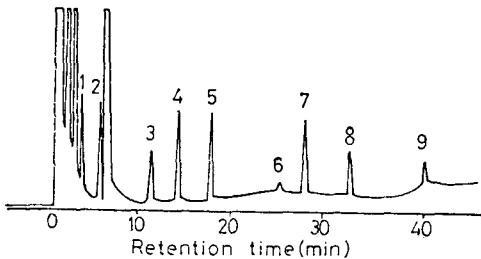


Fig. 1 Gas Chromatography for Standard Organic Acids.

1. formic acid 2. acetic acid 3. lactic acid
4. glycolic acid 5. fumaric acid 6. gluconic acid
7. malic acid 8. tartaric acid 9. citric acid

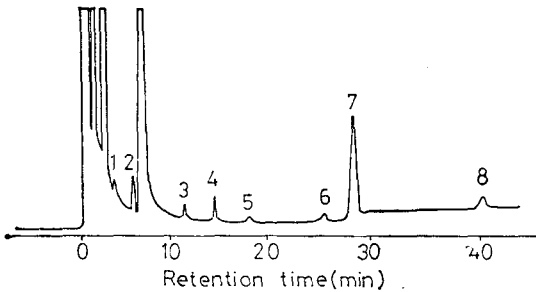


Fig. 2. Gas Chromatography for Organic Acid in Apple.

1. formic acid 2. acetic acid 3. lactic acid
4. glycolic acid 5. oxalic acid 6. gluconic acid
7. malic acid 8. citric acid

은 rambo apple 중 유기산의 조성은 malic acid 0.78%, citric acid 0.19%, syringic acid 0.15%, succinic acid 0.05%, quinic acid 0.09%로서 본 실험의 결과와 상이한 결과를 나타낸 것은 사과 품종, 개체차이, 저장방법, 수확시기, 시료의 분석방법 등에 기인되는 것이며 특히 휘발성산의 함량이 높았던 것은 수확후 저장기간이 길으므로 생성된 것으로 생각되었다.

(2) 사과주의 유기산

SO₂로 살균한 사과즙에 주모를 접종하여 30°C에서 10일간 발효시킨 발효액의 알콜농도는 4.3%, 산도는 0.37%이었으며 유기산의 조성과 함량은 Fig. 3과 같다. table 2에서와 같이 발효액의 유기산 조성은 malic acid 0.12%, lactic acid 0.10%, acetic acid 0.08%, formic acid 0.03%로서 사과즙에 비교할 때 malic acid는 심하게 감소되었으며 lactic, acetic acid는 증가 현상을 나타내었다. 이러한 결과는 알콜발효를 할 때 효모에 의한 malic acid의 자화와 혐기적 상태에서의 당류가 lactic acid로 변화되는 것에 기인된 것으로 생각되었다. 古川⁽³³⁾ 등은 사과주 중의 총산은 0.44%이었으며 각 유기산의 함량은 lactic acid 0.19%, malic acid 0.12%, acetic acid 0.06%, succinic acid 0.04%로서 본 실험의 결과와 비교하기에는 담금원료, 사용한

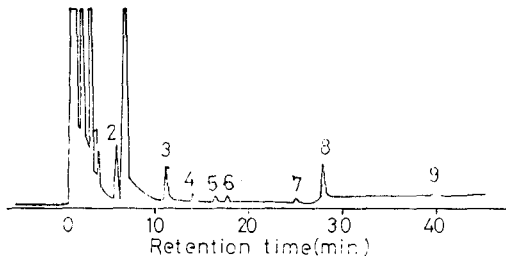


Fig. 3. Gas Chromatography for Organic Acid in Apple wine.

1. formic acid 2. acetic acid 3. lactic acid
4. glycolic acid 5. oxalic acid 6. fumaric acid
7. gluconic acid 8. malic acid 9. citric acid

Table 2. Organic Acid Contents in Apple and Apple Wine.

Unit : mg/100g fresh

organic acid sample	acetic acid	formic acid	glycolic acid	lactic acid	fumaric acid	gluconic acid	malic acid	citric acid
Apple	67.2	19.2	24.0	trace	5.8	17.3	772.8	38.4
Apple wine	78.0	30.7	8.7	103.6	12.2	14.0	114.3	30.4

효모 및 발효조건 등이 다르므로 어려움이 많았다. 後藤⁽¹⁴⁾ 등의 실험에 의하면 *Schizosaccharomyces sp* 이외의 *Saccharaomyces sp*에도 사과산 분해능이 강한 균주가 있다고 보고한 것으로 보아 시료 중에 부착되어 사멸되지 않았던 야생효모에 의하여 malo-lactic 발효에 의한 lactic acid의 증가도 생각할 수 있는 문제라 하겠다.

(3) 사과초의 유기산

초산발효를 시키기 위해서 얻어진 사과주를 60°C에서 1시간동안 환류냉각기를 부쳐 살균한 후 공시균주를 접종시켜 30°C에서 72시간 진탕배양하여 식초 유기산의 조성을 검토한 결과는 Fig. 4~6와 같다. Table 3에서와 같이 모균주와 변이주에 의하여 얻어진 식초의 유기산 조성은 모균주에서 acetic acid 4.3%, lactic acid 0.2%, malic acid 0.03%로서 lactic acid와 malic acid는 사과주에서보다 상당한 감소현상을 나타내었다. 자외선 변이주인 U-48 균주에 있어서는 모균주에 비하여 초산의 비율은 비슷하였으나 lactic acid와 gluconic acid의 함량은 적은 편이었으며 malic acid는 높은 편이었다. 또한 NTG 처리에 의하여 얻어진 N-50 균주에서는 초산의 비율은 비슷하였고 lactic acid와 gluconic acid는 낮은편이었지만 malic acid와 citric acid는 높은 경향을 보였다. 사과주 중에 존재하였던 formic acid는 초산발효를 할 때 산화되어 CO₂와 물로 분해되어지는 것으로 생각되었다. Nakayama⁽¹⁵⁾는 쌀을 원료로한 초에서 succinic acid를 비롯한 7종류의 유기산을 검출하고 불휘발성산이 0.64%이었다고 보고하였으며 竹内等⁽⁶⁾은 액침배양으로 얻어진 사과초의 불휘발성산은 0.1%이었고 표면배양으로 양조한 사과초에서는 불휘발성산이 0.25%이었으며 또한 이 초에서 9종류의 유기산을 검출하여 보고하였다. 이와같이 원료를 달리하여 식초를 제조할 경우 米

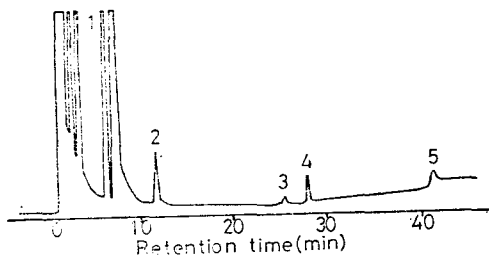


Fig. 4. Gas Chromatography for Organic Acid in Apple Vinegar Aceticated with Mother Strain.

酢는 사과초에 비하여 높은 불휘발성산의 함량을 나타내었으며 본 실험에서도 식초중의 불휘발성산의 함량은 米酢에 비하여 낮은 결과를 나타내어 타 연구와 같은 경향이였다.

2. 초산의 발효과정

모균주와 변이주간의 초산발효의 경과를 보면 Fig. 7와 같다. Fig. 7에서와 같이 배양 24시간이

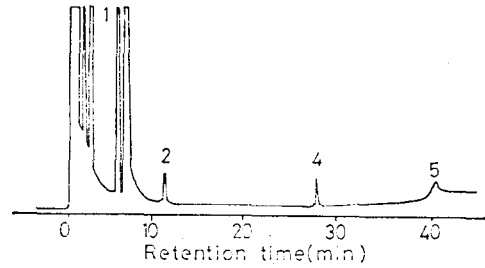


Fig. 5. Gas Chromatography for Organic Acid in Apple Vinegar Brewed with Mutant by the Treatment of N. T. G.

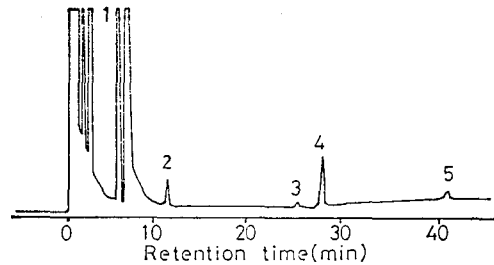


Fig. 6. Gas Chromatography for Organic Acid in Apple Vinegar Brewed with Mutant by the Irradiation of U. V. light.

1. acetic acid 2. lactic acid 3. gluconic acid
4. malic acid 5. citric acid

Table 3. Organic Acid Content in Apple Vinegar. (unit : %)

organic acid sample	acetic acid	latic acid	gluconic acid	citric acid	malic acid
A vinegar	4.30	0.21	0.02	0.05	0.03
B vinegar	4.31	0.09	trace	0.01	0.08
C vinegar	4.34	0.12	0.01	0.10	0.14

A: Vinegar brewed with mother strain (*Acetobacto aceti*)

B: Vinegar brewed with mutant by the irradiation of U. V light (U-48 strain)

C: Vinegar brewed with mutant by the treatment of N.T.G (N-67 strain)

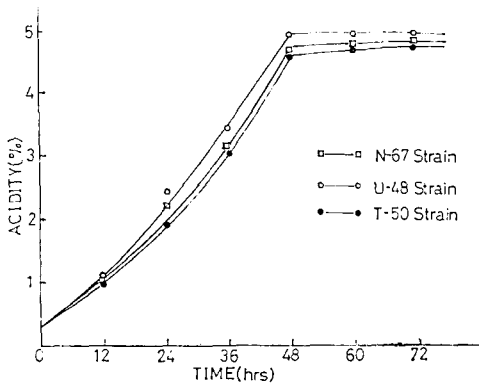


Fig. 7. Time course of Acidity in the Acetic Acid Fermentation of Apple Vinegar by *Acetobacter aceti* and its Mutants.

The strains were cultivated in apple wine contained 4.3% alcohol at 30 C by shaking culture. (oscills 120/min. storke 4cm)

경과하였을 때의 산도는 모균주가 1.92%, 자외선 변이주가 2.42%, NTG 처리 변이주가 2.20%로서 모균주보다 변이주가 초기 산생성능이 합성배지에 서와 같이 다소 빠른 경향을 나타내었다.

요 약

사과 식초 제조 과정 중 유기산의 변화를 검토하기 위하여 사과즙을 알콜발효시킨후 *Acetobacter aceti* 와 이 균에 NTG 와 UV 의 처리로 하여 얻은 변이주를 접종하여 식초산 발효를 시켰을 때 제조과정별로 유기산의 조성 과 함량을 gas chromatography 로 분석하여 다음의 결과를 얻었다.

1. 사과 원료 중 유기산의 함량은 malic acid 0.73%, citric acid 0.038%, acetic acid 0.067% 이었다.

2. 사과즙을 알콜발효시켰을 때 유기산의 함량은 malic acid 0.114%, lactic acid 0.1%, acetic acid

0.08%이었다.

3. 모균주와 변이주를 이용하여 얻어진 발효식초의 유기산 조성에 있어서는 차이가 없었고 함량에서는 차이가 있었다.

4. 변이주의 초기산생성능은 모균주에 비하여 약간 빨랐다.

참 고 문 헌

- 1) 김찬조, 박윤중, 이석진, 오단진; 충남대 농업기술연구보고 7, 169 (1980)
- 2) 古川昌二, 上田隆藏; 日本 醸工 41, 14 (1963)
- 3) 古川昌二, 竹内敏雄, 上田隆藏; 日本 醸工 45, 204 (1967)
- 4) 古川昌二, 竹内信彦, 上田隆藏; 日本 醸工 51, 321 (1973)
- 5) 古川昌二, 竹内信彦, 上田隆藏; 日本 醸工 51, 327 (1973)
- 6) 竹内敏雄, 古川昌二, 上田隆藏; 日本 醸工 46, 288 (1968)
- 7) 竹内敏雄, 古川昌二, 上田隆藏; 日本 醸工 46, 293 (1968)
- 8) 南成熙; 고려대 석사학위논문(1980)
- 9) E. F. Flores, D. A. Kiine and A. R. Johnson; Journal of the AOAC 53, 17 (1970)
- 10) 山下市二, 田村太都, 吉川誠次, 島本富明, 松本明芳; 日本 農化 48, 151 (1974)
- 11) 山下市二, 田村太都; 日本 食品工業學會誌 19, 62 (1972)
- 12) J. P. Thenot and E. C. Hornig; Analytical letters 5, 519 (1972)
- 13) 李東碩, 禹相圭, 梁且範; 한국식품과학회지 4, 134 (1972)
- 14) 後藤昭二, 山崎眞司, 山川祥秀, 横塚勇; 日本 醸工 56, 133 (1978)
- 15) S. Nakayama; Nippon Shokukin Kogyo Gakkaishi 27, 627 (1980)