

Acetobacter sp.를 이용한 알로에 식초의 발효조건 및 Lipase활성 저해효과

이도상* · 류일환 · 이갑상¹ · 신용서¹ · 전승호¹

주/김정문 알로에, ¹원광대학교 농화학과

초 록 : *Acetobacter* sp. DS-118을 분리 동정하고 이 균주를 이용하여 알로에 식초의 발효 조건을 검토하였으며 알로에 식초의 lipase 활성 저해 효과를 측정하여 새로운 기능성 식품개발에 이용하고자 하였다. 감식초로부터 초산생산능이 우수한 균을 분리하여 형태학적, 생화학적 특성을 검토한 결과, *Acetobacter*속으로 판단되어 *Acetobacter* sp. DS-118로 명명하였다. 알로에 식초의 발효 조건을 검토한 결과, 알코올 농도 10%, 초기 산도 3~4%, 최적 발효 온도는 25°C였으며, 유기질소원이 무기 질소원보다 초산 생성정도가 높았다. 알로에 식초의 유기산은 초산이 12%, malic acid, Δ -galactronic acid가 소량 검출되었다. Lipase에 대한 알로에 식초의 저해효과를 살펴본 결과 산도 12%의 알로에 식초 첨가시 92% lipase 저해 효과를 보였으며 IC₅₀값이 43%를 나타내어 새로운 개념의 비만 방지 식품 개발이 가능할 것으로 판단된다.

서 론

식초는 초산이외의 각종 휘발성 및 불휘발성 유기산류, 당류, 아미노산류, 에스테르류를 함유하여 식욕을 자극하는 방향과 맛을 가지고 있으며¹⁾ 생체 조직내에서 호기적으로 쉽게 분해될 수 있고 생리적 상태에 따라서 필요한 물질로 쉽게 전환될 수 있어 생체의 균형을 유지하고 필요한 미량금속이 염으로 흡수될 수 있어 다양한 기능식품²⁾으로 인정되어 최근에는 영양학적으로 다량섭취가 권장되고 있는 바이다. 식초에 대한 연구는 식초의 생산 방법이나 이화학적 분석, 관능적 특성을 연구하는 것으로 구분할 수 있으며 식초의 생산성 증대나 다양한 원료를 선택하여 발효시킬 때 최적의 생산 조건을 설정하는 것으로 요약할 수 있다.³⁾

원료로써의 배,⁴⁾ 사과⁵⁾ 등의 과일에 대한 식초의 발효 가능성에 대한 연구는 보고되었으나 민간요법에 자주 쓰여졌던 알로에를 이용한 알로에식초에 대한 연구는 없는 실정이다. 알로에는 백합과의 다년생 식물로서 맛이 쓰고 빛나는 물질을 의미하는 아랍어 알로에(Alloeh)에서 기원하였으며 열대지방 및 아열대 지방을 중심으로 500여종이 서식하고 있고 우리나라에서도 동의보감에 어린이의 오감(五疳)을 다스리고 삼충(三蟲)을 죽이며 치루와 개선(疥癬; 옴)과 어린이의 열경(熱驚)을 다스리는 노회라고 소개되었다.⁶⁾ 알로에는 건위효과, 완화효과, 항균 및 항진균작용, 항종양작용⁷⁾ 외에도, 페놀계인 안트라퀴논 유도체들은 모발 유연작용, 자외선차단작용, 비듬, 가려움 제거작용 등을 나타내며 다당체성분(분자량, 10⁴~10⁶ Da)은 보습효과, 피부세포 활성화 작용을 나타내는⁸⁾ 등의 유용성이 알려지면서 그 사용범위가 점차 일반화되고 있다. 그러나 아직까지도 알로에의

효과에 관하여 그 어떤 gel 성분의 생리 작용이 규명되어 임상실험에서 증명된 것이 없기 때문에 제약과 식품공업에서 겔중에 포함된 어떤 단일 성분을 이용한 약제나 식품이 개발되지 못하고,⁹⁾ 이¹⁰⁾의 Aloe vera gel 추출물에 대한 장내 유해세균의 항균 활성과 같은 가능성에 대한 연구가 이루어지고 있을 뿐으로 알로에를 이용한 발효 식품의 개발은 전무한 실정이다. 이에 본 연구는 *Acetobacter* sp.를 분리, 동정하고 이 균주를 이용하여 알로에 식초의 발효 조건을 살펴보았으며 알로에 식초의 lipase 활성 저해 효과를 측정하였다. 이는 lipase가 체내에서 plasma TG를 지방산의 형태로 체내에 에너지원으로 공급하는 작용을 갖고 있는 효소이므로 이를 효과적으로 저해함으로써 새로운 용도의 식품 개발에 이용하고자 한다.

실험 재료 및 방법

재료

본 실험에 사용한 재료는 주/김정문 알로에 김제 농장에서 재배한 1 kg이상의 알로에 베라(*Aloe vera* Linne)를 사용하였으며, 전북 고산에 위치한 호종 식품과 감골 식품에서 발효 숙성시킨 감식초를 초산균을 분리하기 위한 시료로 사용하였다.

사용 배지

초산 생성균 분리용 평판배지는 2% yeast extract, 0.5% peptone, 1.5% agar에 3.0% ethanol, 0.0022% bromocresol-purple이 함유된 배지를 사용하였으며, 액체배지는 한천 및 지시약을 제외한 배지를 사용하였으며 이때 배지의 pH는 6.8이었다.

균주의 분리

감식초를 액체 배지에 1% 접종하고 30°C에서 4일간 진

찾는 말 : *Acetobacter* sp. DS-118, Aloe 식초, lipase 저해효과
*연락처자

탕 배양한 후, 이 배양액을 지시약으로서 bromocresol-purple이 첨가된 분리용 평판 배지에 streaking하여 30°C에서 4일간 배양하였다. 배지의 색깔이 자색에서 노란색으로 그리고 다시 자색으로 환원되는지를 관찰한 후 여기에 나타난 colony를 1차 분리하였다. 분리된 균들은 분리용 액체 배지에 백금이로 1회 접종하여 30°C에서 4일간 진탕 배양한 후, 각 균주의 초산 생성능을 측정하여 초산 생성능이 가장 좋은 균주를 선별하였다.

초산 생성 균주의 동정

분리된 균의 동정은 Laboratory manual of experimental microbiology,¹¹⁾ 식품공학 실험 II,¹²⁾ Microbiological application,¹³⁾ Bergey's manual of systematic bacteriology 1,¹⁴⁾ 2¹⁵⁾ 등에 수록되어 있는 일반적인 초산균 동정법에 따라 행하였다.

증식도 측정

진탕 배양시 균 증식도는 spectrometer(Secommen S1000)를 사용하여 660 nm에서 배양액의 흡광도를 측정하여 나타내었다.

산도 측정

산도의 측정은 phenolphthalein 용액을 지시약으로 하여 0.1 N NaOH 표준 용액으로 중화 적정하고 초산으로 환산하여 나타내었다.

유기산 분석

분리된 균주가 생성하는 acetic acid의 유기산 함량 분석은 HP(Hewlett Parkard)-6890을 사용하였고, column은 HP-carbowac 20 M(30 m×0.32 mm×0.25 μm)을 사용하였다. column oven의 온도는 70°C에서 1분간 유지한 뒤 150°C까지 분당 4°C씩 승온하여 8분간 유지하였다. 이때 주입부 온도는 250°C, 검출기 온도는 250°C로 고정하였고, 운반기체는 N₂ gas를 사용하였으며 inject pressure를 12 psi로, split ratio는 1:3으로 하고 검출기의 make-up gas는 N₂를 45 ml/min로 공급하였다. 칼럼에서 분리된 물질은 불꽃이온화검출기(FID)로 검출하였고 각 peak의 면적계산 및 정량분석의 계산은 HP-chamstation Data System에 의해 분석하였다.

알로에 식초의 발효조건 검토

껍질을 제거한 알로에 과육은 homomixer로 150 rpm에서 30분간 마쇄한 후, 당농도를 25 brix로 조절하여 121°C에서 15분간 멸균하고 2%의 효모를 첨가하여 4일간 알코올 발효시켰다. 그 다음 여과하여 알로에 푸레를 제거한 후 60°C에서 30분간 살균한 종초를 접종하고 알코올 농도, 초기 산도, 발효 온도 및 질소원 첨가등 제조조건을 변화시키면서 알로에 식초의 발효조건을 검토하였다.

Lipase 활성 저해 측정

Lipase 활성 저해 측정은 Yamada¹⁶⁾ 등의 방법을 이용하여

Intralipos(glycerin 2.5 g, soybean oil 10 g, lecitin 1.2 g, 증류수 10 ml를 10,000 rpm에서 15분간 유화) 90 ml에 LAS 0.1 g을 넣고 0.5 M glycerine buffer 용액 10 ml를 가한 후, 2 N NaOH로 pH 10.0으로 조절한 기질 2 ml를 시험관에 넣어 37°C에서 5분간 방치한 후 조효소액 0.1 ml를 넣고 37°C에서 1시간동안 반응시켰다. Acetone-ethanol(v/v 1:1) 혼합액 4 ml를 첨가하여 반응을 정지시킨 후, 60% ethanolic 0.1 N KOH를 2 ml 첨가하였다. 지시약으로서 phenolphthalein을 2~3 방울을 떨어뜨린 후, 0.05 N HCl로 적정하였고, 대조구는 기질 2 ml에 증류수 0.1 ml를 넣어 위의 방법과 동일하게 행하였다. 효소의 1 unit는 1분간 1 μmol의 지방산을 유리하는 양으로 하였다.

효소의 저해 활성은 저해제 농도에 따른 잔존 효소 활성을 대조구와 비교하여 상대 저해 활성으로 나타내었다.

$$\text{저해율 (\%)} = \left(1 - \frac{\text{알로에 식초 시료의 유리지방산}}{\text{Blank의 유리지방산}} \right) \times 100$$

결과 및 고찰

분리 균주의 동정

분리한 균주(DS-118)의 colony의 형태는 circular이고 밝은 크림색으로 표면은 mucoid 상태였으며, 그램 음성의 단간균 형태로 포자와 편모는 존재하지 않았으나, 운동성이 있었다(Fig. 1). 생리학적 특성은 Table 1과 같이 GYC 한천 배지에서 생육 온도 범위는 5~40°C이었고 생육 pH는 2~6이었다. Catalase 양성으로 알코올을 산화하여 acetic acid를 생성하였다. Acetate와 lactate 산화성은 양성이며 nitrate 환원성은 음성이었다. 탄소원으로서 methanol, dextrin, cellobiose 등을 이용하지 못했고 1.0% 이상의 NaCl 용액에서 증식하지 않아 내염성이 약한 것으로 나타났다. Oxidase 음성 및 절대호기성이었으며 urease를 생산하지 않았다. 이에 DS-118 균주의 형태학적, 배양학적 특성 및 생리학적 특성을 비교 검토하여 본 결과 *Acetobacter*속으로 판단되었기 때문에 *Acetobacter* sp. DS-118로 명명하였다.

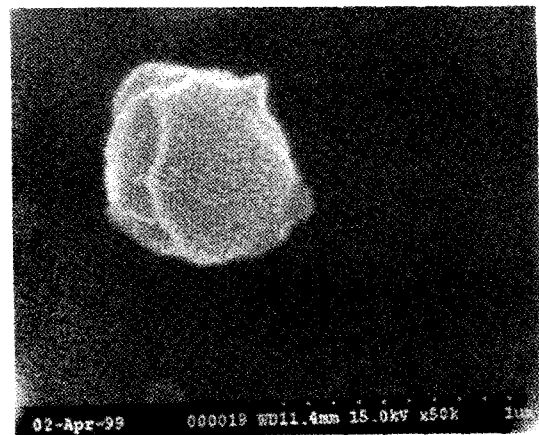


Fig. 1. Scanning electron micrograph of *Acetobacter* sp. DS-118.

Table 1. Physiological characteristics of strain DS-118

Temperature range for growth	5~40°C
pH range for growth	2~6
NaCl tolerance for growth	≤ 1%
Catalase	Positive
Oxidase	Negative
Urease	Negative
Growth	Negative
Growth on carbon source	
Ethanol	Positive
Na acetate	Positive
n-propanol	Positive
D-mannitol	Positive
Sorbitol	Positive
n-butanol	Negative
Glucose	Negative
Mannose	Negative
Maltose	Negative
Dextrin	Negative
Cellobiose	Negative
Nitrate reduction	Negative
Growth on SM medium	
+1.0% ethanol	Positive
+2.0% ethanol	Positive
+5.0% ethanol	Positive
+10.0% ethanol	Positive
Nutrient broth	Negative
Growth on GVC medium	
	Positive

종초의 제조

초산을 경제적으로 생산하기 위해서는 고농도의 균체 배양이 필요하므로 DS-118균주를 알코올 농도 8%로 조절된 알로에 술 여액에 접종하고 30°C, 14일간 배양하면서 균체 농도와 산도의 변화를 경시적으로 살펴본 결과를 Fig. 2와 Fig. 3에 나타내었다. 배양 3일째부터 서서히 증가하여 배양 10일째 산도 8.64%에 도달하였으며 균체 농도 또한 배양 10일째 최대 흡광도를 나타내었다. 따라서 종초의 사용적기는 균 성장도가 최대인 시기라 생각되어 접종후 10일 배양한 배양액을 종초로 사용하는 것이 적합하다고 판단되었다.

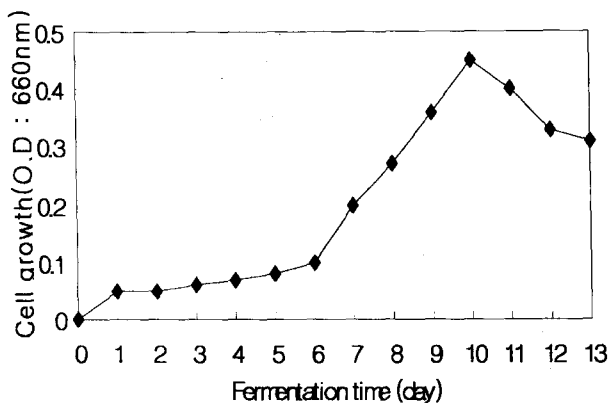


Fig. 2. The periodical changes in the growth of Acetobacter sp. DS-118.

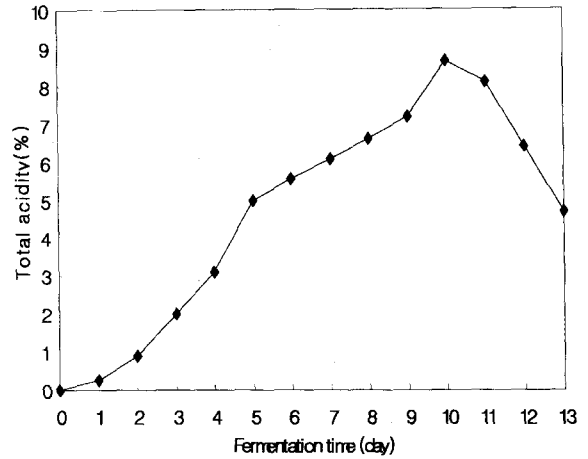


Fig. 3. The periodical changes in the acetic acid production of Acetobacter sp. DS-118.

알코올 농도의 영향

알로에 술 여액의 알코올 농도 4, 6, 8, 10%로 조정하고 0.5% 종초를 첨가하여 30°C, 14일간 진탕 배양하면서 경시적으로 생성되는 초산양을 측정한 결과는 Fig. 4에 나타내었다. 알코올 농도 4% 조정구에서는 배양 4일째 산도 3.5%에 도달하였으며 알코올 농도 6% 조정구에서는 배양 6일째 5.4%의 산도를 보였으나 이후 급격히 산도의 감소를 보였다. 또한 알코올 농도 10% 조정구에서는 배양 14일째 10.35%의 산도를 보여 가장 높게 나타내었다. Nakayama¹⁷⁾는 초산균에 의한 알코올 산화로 고농도 초산을 축적하기 위해서는 세포내의 particle-bound enzymes, co-enzymes, cytochrome system의 조절이 필요하며 이로써 알코올의 산화, 과산화의 조절이 가능하다고 보고하였는데 위의 결과를 통해 알코올 6%에서 가장 높은 초산 생성량을 보였다는 김¹⁸⁾ 등과 10%에서는 균의 발육이 인정되지 않았다는 정¹⁹⁾의 보고와는 달리 고농도의 알코올에서도 매우 높은 초산 생성량을 보여 매우 유용한 결과로 판단하였다.

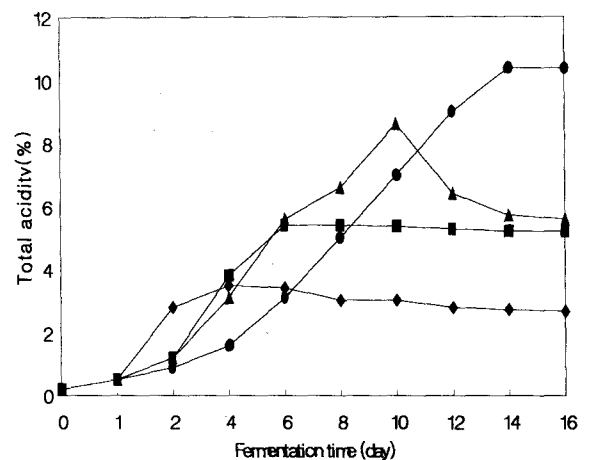


Fig. 4. Effect of initial ethanol concentration on the acetic acid production from Acetobacter sp. DS-118. ■—■: 4%, ◆—◆: 6%, ▲—▲: 8%, ●—●: 10%.

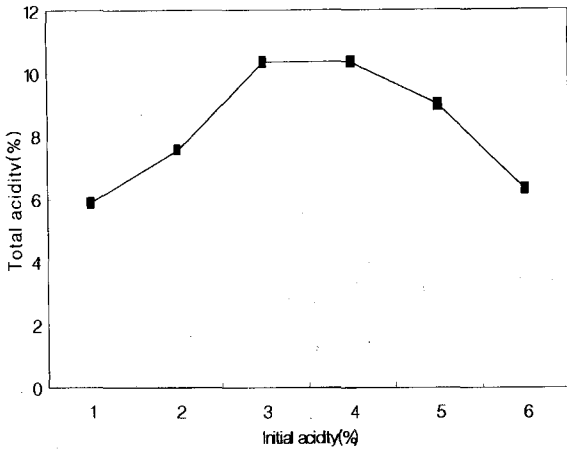


Fig. 5. Effect of initial acetic acid concentration on the acetic acid production from *Acetobacter* sp. DS-118.

초기 산도의 영향

알코올 농도 10%로 조절된 알로에 술 여액에 초기 산도를 1~6%범위에서 1%간격으로 조절한 후 0.5% 종초를 첨가하고 30°C에서 14일 진탕 배양한 후 생성되는 초산량을 측정하여 Fig. 5에 나타내었다. 초기 3~4% 첨가구에서 산도 10.35%로 가장 높게 나타났으며 5%이상의 범위에서는 초산 생성량이 감소하였다. 이와 같은 결과로 볼 때 분리 균주는 초기 산도가 3~4%의 범위가 가장 적합한 발효조건이라 판단된다.

발효 온도의 영향

알코올 농도를 10%로 조절된 알로에 술 여액에 초기 산도를 3%로 조절하고, 0.5% 종초를 첨가한 후 발효온도를 15~35°C 범위에서 5°C 간격으로 각각 조절한 후 14일간 진탕 배양하여 이때 생성되는 초산량을 측정하여 Fig. 6에 나타내었다. 25°C 배양구에서 산도 11.2%로 가장 높은 산생성량을 보였으며 30°C 배양구에서는 급격히 감소하는 경향을 나타내었다.

이와 같은 결과로 볼 때 초산 발효시 배양온도가 너무 낮

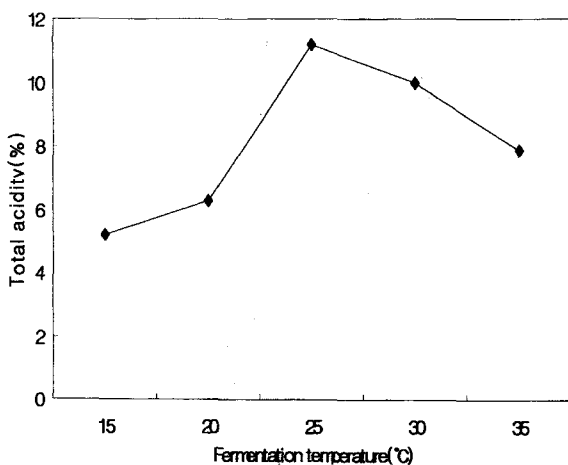


Fig. 6. Effect of fermentation temperature on acetic acid production by *Acetobacter* sp. DS-118.

으면 발효속도가 늦어지고 너무 높으면 에탄올 및 초산 손실이 일어나 풍미를 잃게 되는데^{20,21)} 본 실험에서는 25°C가 최적 발효 온도로 판단되었다.

질소원 첨가의 영향

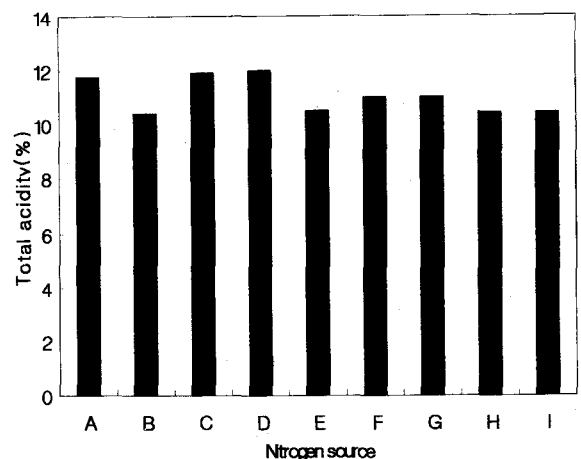
초산 생성에 미치는 유기 및 무기 질소원 첨가의 영향을 보기 위하여 유기 질소원으로서 malt extract, soybean meal, beef extract, yeast extract, corn steep liquor, polypeptone, tryptone을 첨가하였으며 무기 질소원으로서 (NH₄)₂SO₄, NH₄NO₃를 각각 1%농도로 첨가하여 30°C에서 14일간 진탕 배양한 후 생성되는 초산량을 측정하여 Fig. 7에 나타내었다. 유기질소원이 무기 질소원보다 초산 생성정도가 높았으며 유기질소원은 거의 유사하였으나 yeast extract 첨가구에서 산도 12%로 가장 높은 초산 생성량을 나타내었다. 또한 yeast extract는 비타민류, 유기염류 특히 아미노산을 많이 함유하고 있으므로 소량의 첨가로서 영양이 충분히 공급되는 것으로 생각되며 이는 C/N율과 관련성이 있는 것으로 생각된다.

유기산 분석

김²²⁾ 등이 보고한 매실 식초의 유기산은 acetic acid를 포함하여 citric acid, malic acid, tartaric acid, lactic acid등 5종류가 확인되었으며 총유기산은 6.5%였고, 밀감과피즙은 소량의 oxalate, malate, pyruvate가 검출되었으며 총산도가 5.84%라는 김²³⁾의 보고 등이 있었으나 알로에 식초의 유기산은 Fig. 8에서와 같이 초산이 12%, malic acid, Δ-galactronic acid가 소량 검출되었다.

Lipase 활성 저해의 측정

Fig. 9에서와 같이 알로에 식초 40% 첨가시에는 46%의 lipase 저해 효과를 보였으며 80% 첨가는 87%의 저해 효과,



A : Malt extract B : Soybean meal C : Beef extract
 D : Yeast extract E : Corn steep liquor F : Poly peptone
 G : Tryptone H : (NH₄)₂SO₄ I : NH₄NO₃

Fig. 7. Effect of nitrogen source on acetic acid production by *Acetobacter* sp. DS-118.

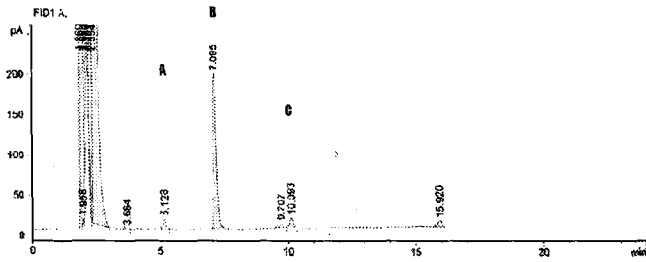


Fig. 8. Analysis of organic acid in fermented Aloe vinegar using a GC-FID. A: malic acid, B: acetic acid, C: Δ-galactronic acid.

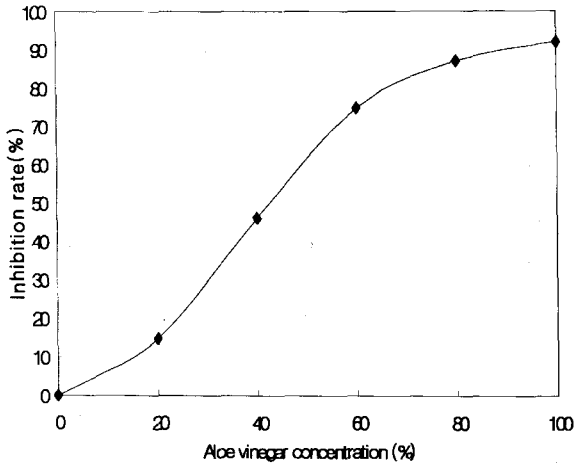


Fig 9. Inhibitory effect of Aloe vinegar on the activity of lipase.

그리고 희석하지 않은 산도 12%의 알로에 식초는 92%의 lipase 저해 효과를 보였으며 IC₅₀값이 43%였다.

이 결과는 plasma TG를 지방산의 형태로 체내에 에너지 원으로서 공급하는 작용을 하는^{24,26)} lipase를 효과적으로 저해함으로써 새로운 개념의 비만 방지 식품의 개발이 가능할 것으로 생각된다.

감사의 글

이 연구는 1998년도 원광대학교 대학 연구비에 의해 수행되었으므로 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Hong, J. S., Lee, K. S. and Chei, D. S. (1989) Fermentation science and engineering. Hagnmunsa, 98-99.
2. Son, S. M. (1992) Study on the alcohol fermentation and subsequent vinegar production by immobilized cells from saccharified potato starch. M. S. Thesis, KonKuk University, Seoul.
3. Yoon, H. N., Moon, S. O. and Song, S. H. (1998) Volatile compounds and sensory odor properties of commercial vinegars. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **30**(2), 299-305.
4. Oh, Y. J. (1966) A study on cultural conditions for acetic acid production employing pear juice. *J. Kor. Soc. Food Nutr.* **21**(4), 377-380.
5. Kim, C. J., Park, Y. J., Lee, S. K. and Oh, M. J. (1981) On

- the organic acids composition of apple wine vinegar. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **9**(4), 139-143.
6. Kim, J. M. and Jang, S. H. (1993) Aloe of mysterious medical plant, Garine(Seoul). 31-37.
7. 井端榮夫 (1983) アロエエキストラクトの化粧品への利用, *フレク ラソスーナル*, **11**(3), 118.
8. 鈴木義麟 (1983) 프로어의藥理作用と 醫藥品への應用, *フレク ラソ스샤ール*, **11**(3), 115-117.
9. Lee, H. J. (1995) The physiological efficacy of *aloe gel*. *J. Kor. Soc. Food Nutr.* **24**(6), 1026-1038.
10. Lee, J. S. (1995) Antimicrobial activity of *Aloe vera* against intestinal pathogens. M. S. Thesis, Korea University, Seoul.
11. Ronald, M. A., Lawrence, C. P. and Alfred, E. B. (1995) Laboratory manual of experimental microbiology, Mosby, 65-76.
12. Yoo, J. H. (1990) Experiments in food science and engineering. volume II. Tamgudang 36-220.
13. Benson, H. J. (1990) Microbiological application, WCB, 48-66.
14. Noel, R. K. and John, G. H. (1984) Bergey's manual of systematic bacteriology, Williams & Wilkins, 1st(ed.), 270-274.
15. Peter, H. A. S., Nicholas, S. M. and John, G. H. (1984) Bergey's manual of systematic bacteriology, Williams & Wilkins. 2st (ed.), 1373-1375.
16. Yamada, K., Ota, Y. and Machida, H. (1962) Studies on the production of lipase by microorganism. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*. **36**, 860-864.
17. Yang, P. C. and Choi, D. S. (1979) Physiological characteristics of acetic acid bacteria isolated from clover flower vinegar. *J. Kor. Agric. Chem. Soc.* **22**(3), 150-159.
18. Kim, H. J., Park, S. H. and Park, C. H. (1992) Studies on the production of vinegar from barley. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **7**(5), 350-354.
19. Jong, D. H. (1980) A study on acetic acid fermentation. M. S. Thesis, ChungAng University. 24.
20. Higikata, K. S., Takano, H. O and Tei, A. T. (1972) Fermentation science and engineering, *Journal (Japan)* **50**(1), 7-12.
21. Rao, M. R. R. and Stokes, J. L. (1953) Nutrition of the acetic acid bacteria. *J. Bacteriol.* **65**, 405-412.
22. Kim, O. D., Kang, S. H. and Kang, S. G. (1996) Studies on the acetic acid fermentation using maesil juice. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **25**(4), 695-700.
23. Kim, T. S. and Jong, D. H. (1986) Studies on the acetic acid fermentation using mandarin orange juices. M. S. Thesis, KyungPook University.
24. Evans, R. D. and Williamson, D. H. (1989) Lipid metabolism during the initiation of lactation in the rat. The effects of starvation and tumor growth. *Biochem. J.* **262**, 887.
25. Eckel, R. H. (1987) Adipose tissue lipoprotein lipase. In "lipoprotein lipase" Borensztajn, J.(ed.), Evener, Chicago, IL, 79.
26. Eckel, R. H., Kern, P. A., Sadur, C. N. and Yost, T. J. (1986) Methods for studying lipoprotein lipase in human adipose tissue. In "Methods in diabetes research" volume II, Clinical methods clarke, W. L., Larner, J. and Pohl, S. L.(ed), John Wiley and Sons, New York, N Y., 259.

Optimization in the Preparation of Aloe Vinegar by *Acetobacter* sp. and Inhibitory Effect against Lipase Activity

Do-Sang Lee*, Il-Hwan Ryu, Kap-Sang Lee¹, Yong-Seo Shin¹ and Seung-ho Chun (*Kim Jeong Moon Aloe Co., Ltd. 427-4, Nakseong-ri, Keum Ku-myeoun, Kimjea-City, Chonbuk, Korea; ¹Wonkwang University, Dept. of Agricultural Chemistry, College of Agriculture 344-2, Shinyong-Dong, Iksan-City, Chonbuk, Republic of Korea*)

Abstract : *Acetobacter* sp. were isolated from persimmon vinegar. We studied about conditions of Aloe vinegar fermentation by an isolated strain and inhibitory effect against lipase activity. Strains DS-118 was strictly aerobic, motile, gram negative, non-spore-forming and short rod shaped. It reacted positively in catalase test, was oxidase test negative, was ureas negative, was produced acetic acid from alcohol. On the basis of these results, it was identified as a strain of *Acetobacter* sp. In the preparation of Aloe vinegar, optimum initial alcohol concentration, acidity, and fermentation temperature were 10%, 3~4% and 25°C, respectively. The major organic acid in Aloe vinegar was acetic acid (12%), but malic acid and Δ -galactronic acid were also present in trace. The Aloe vinegar (acidity : 12%) inhibited lipase activity and it's IC₅₀ was 43%.

Key words : *Acetobacter* sp., Aloe vinegar, lipase inhibition

*Corresponding author