

## 오미자 식초 제조를 위한 식초산균 분리 및 동정

임 용 숙<sup>†</sup> · 설 일 환

대구외국어대학교 생명과학과

### Isolation of A Bacterial Strain for Fermentation of Omija Vinegar

Yong-Suk Lim<sup>†</sup> and Ill-Whan Sul

Dept. of Biotechnology, Daegu University of Foreign Studies, Gyeongsan 712-881, Korea

#### Abstract

In other to produce vinegar using *Schizandra chinensis* Ballon(omija), acetic acid bacteria(AAB) were selected from several conventional vinegars, and total 30 acetic acid bacterial strains were isolated. Among the isolated strains, a strain was selected from medium containing omija juice which showed the highest productivity of acetic acid. The strain was identified as *Acetobacter* sp. C5-1b. Optimum conditions for acetic acid production of *Acetobacter* sp. C5-1b were involved with 30°C of fermentation temperature and shaking culture. The acidity of culture medium was reached to 5.3% after 8 days shaking cultivation at 30°C.

**Key words:** *Schizandra chinensis* Ballon(omija) juice, acetic acid bacteria(AAB), vinegar.

#### 서 론

식초는 동·서양을 막론하고 오랜 역사를 지닌 발효식품으로, 우리 일상생활과 밀접한 관련을 맺고 있으며 최근 새로운 과일이나 채소를 이용하여 식초를 제조하고자 하는 연구들이 시도되고 있다(Oh YJ 1992, Kim et al 1996, Park et al 1999, Lee et al 1999, Lee et al 2003). 식초는(식품공전 1997) 총산(w/v%)이 초산으로서 4.0~15.0%인 것을 말하며 그 제조 방법에 따라 전분질과 알코올에서 초산발효를 시켜 얻는 양조식초와 발효과정을 거치지 않고 빙초산, 물, 향신료 및 착색료 등을 사용하여 제조하는 합성식초로 나누어지는데 합성 식초는 ethylene이나 acetylene로 부터 유기 합성에 의해 만들어진 빙초산을 원료로 사용하여 발효 기간을 거치지 않으므로 원가 절감 및 대량생산에는 성공적이었지만 식초 고유의 풍미가 없을 뿐만 아니라 빙초산의 합성 및 정제 시 사용되는 유해물질로 인하여 나쁜 영향을 미칠 수 있다(Jeong YJ 1996).

오미자는 목련과에 속하는 자생목 식물의 과실로 향과 맛이 독특하여 오미자차, 오미자주, 오미자화채 등으로 많

이 이용되어 왔다(Lee & Lee 1989, Kim et al 1991). 특히 여름철에는 빨간색과 달고 신 상큼한 맛으로 인하여 식용을 돌우는데 사용이 되고 있으며, 과육의 신맛은 주로 사과산, 주석산 등의 유기산에 기인하는 것으로 알려지고 있다. 한 방에서 오미자의 약리적 효능으로는 피로회복 촉진, 신체 저항력 증가, 콜레스테롤 저하, 신경장애로 오는 자각증상 개선과 정신적 작업능률 개선, 간의 해독력 강화 및 간장 보호 작용 등으로 사용하는 한편, 예전부터 노화를 방지하고 건강증을 예방하는 약재로 사용되어 왔다(Lee et al 1989).

따라서 본 연구에서는 한의학 서적 및 과학문헌에서 그 약효가 인정되어 약용식물로 이용되는 오미자를 이용하여 식초를 생산할 목적으로 오미자즙 배지에서 초산 생성력이 우수한 초산균을 분리 한 후 오미자 열매를 이용한 건강용 식초를 제조하고 발효특성과 관능검사를 통하여 약용식물 식초로서의 개발 가능성을 연구하였다.

#### 재료 및 방법

##### 1. 초산 생성균의 분리

초산발효에 이용된 초산균은 대구, 경북 지역의 가정에서 재래식 발효 방법으로 제조한 종초 30 점을 수집하여 초산균 분리 시료로 사용하였으며, 30°C에서 24시간 동안 활성화 시킨 후 30°C에서 3~4일 동안 배양하여 colony 주변에 투명한 환이 형성된 균을 순수 분리하였다.

본 연구는 2003년도 산학협동재단 연구비 지원에 의하여 수행된 것의 일부임.

<sup>†</sup>Corresponding author : Yong-Suk Lim, Tel: 011-540-7337, E-mail: miso@dufs.ac.kr

## 2. 오미자즙 배지에서의 우수 초산균 선정

분리용 평판 배지에서 초산 생성균주로 선정된 균주들을 초산 생성용 오미자즙 배지에 접종하고 이들 분리균의 초산 생성능을 shaking incubator(SI-600R, Korea)을 사용하여 30℃에서 180 rpm으로 8일간 배양한 후 초산 생성량이 가장 우수한 균주를 실험 균주로 사용하였다. 발효 초산균 공시균주는 한국 종균 협회로부터 *Acetobacter aceti* ATCC 40229, *Acetobacter liquefaciens* ATCC 14835, *Acetobacter pasteurianus* ATCC 33445를 분양받아 사용하였다.

## 3. 사용배지

오미자 식초 제조를 위한 초산 생산균 분리용 평판 배지는 glucose, 3%; peptone, 1%; beef extract, 1%; ethanol, 4%; CaCO<sub>3</sub>, 1%; agar, 1.5%를 사용하여 에탄올을 제외한 나머지를 고압멸균기에서 121℃, 15분간 살균하여 45℃로 냉각한 다음 에탄올은 사용 직전에 무균적으로 첨가하여 잘 흔든 후 petri dish에서 평판배지를 만들어 사용하였으며, 오미자 식초 생산을 위한 우수균주 분리용 액체 배지는 yeast extract, 0.2%; glucose, 0.5%; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.06%; ethanol, 4%가 함유된 배지에 오미자즙 30%를 첨가하여 사용하였다.

## 4. 오미자 추출물의 조제

본 실험에 사용한 오미자는 서울 호원당에서 경기도 이천산을 구입, 정선, 세척한 후 건조 오미자 열매로 발효 실험하였으며, -70℃의 냉동실에 보관하면서 시료로 사용하였다.

오미자 열매에 증류수를 열매 중량에 10배 가해서 설탕은 각각 10g, 15g, 20g을 넣고 12시간, 24시간 추출하였다. 이때 추출 온도는 냉장고(4℃)에서 1회, 2회, 3회 추출하였다. 실온에서는 같은 방법으로 8시간, 16시간, 24시간 추출하였다. 추출액은 Whatman No. 2 여지로 여과한 다음 그 여액을 다시 membrane filter로 여과 살균한 후 다음 실험에 사용하였다.

## 5. 분리균의 동정

분리균주는 Krieg & Holt(1984)의 Bergy's manual of systematic bacteriology와 Gerhardt et al (1981)의 Manual of method for general bacteriology에 준하여 동정하였다.

## 6. 산도 측정

산도 측정은 초산 발효액을 원심분리한 상등액 10 mL를 취하여 0.1% phenolphthalein을 지시약으로 하여 0.1N NaOH 용액으로 적정한 후 산도(%)를 나타내었으며, 이때 초산의 농도는 0.1N NaOH 1 mL를 0.006g으로 계산하였고, 다음의

계산식에 의하여 acetic acid를 백분율(%)로 환산하여 나타내었다.

$$\text{Acidity}(\%) = \frac{0.1 \text{ N-NaOH 소비량} \times 0.006 \text{ g} \times F}{\text{시료의 양 (mL)}} \times 10$$

F: 0.1 N-NaOH factor

## 7. 균 생육도 측정

균 생육도는 spectrophotometer(UV-9100, Korea)를 사용하여 균 현탁액의 흡광도(660 nm)를 나타내었다.

## 결과 및 고찰

### 1. 초산 생산 균주의 분리

초산 생산 균주는 각 가정에서 채취한 30점의 종초를 30℃에서 24시간 동안 배양하고 활성화시킨 후, 초산균 분리용 평판 배지에 희석 배양하였다. 30℃에서 3~4일 동안 배양하여 colony 주변에 투명한 환을 형성하는 균주가 에탄올을 이용하여 초산을 생성할 수 있는 균주로 판단되는 총 30여종의 초산균을 순수 분리하였다. 순수 분리한 균은 보존용 배지에 이식하여 보관하면서 초산 생성 실험에 사용하였다.

### 2. 초산생성 우수균주 선발

분리용 평판배지에서 초산생성 균주로 선정된 균주를 48시간 전배양한 배양액 10 mL를 기본 배지에 오미자 과즙을 30%를 첨가한 초산생성용 오미자즙 배지에서 초산 생성 균주로 판정된 균주들을 접종하고 shaking incubator(rotatory type, 150rpm)를 사용하여 30℃에서 8일간 배양한 후 초산 발효능이 가장 우수한 균주를 최종적으로 선정하고 이후의 실험에 공시균주로 사용하였다(Fig. 1).

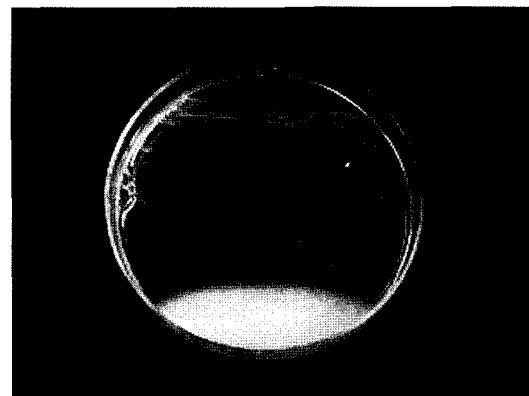


Fig. 1. Isolation of acetic acid bacteria.

### 3. 초산 생성균의 분리 및 동정

분리된 균주 중 초산 생성능이 우수하다고 판정된 균주를 형태적 특징, 배양상의 특징 및 생리적 특징에 따라 Bergey's manual of systematic bacteriology와 Manual of method for general bacteriology에 의하여 동정하였다. 분리균은 그람 음색 간균으로 ethanol을 산화하여 acetic acid를 생성하며, catalase 생성능, acetate와 lactate 산화성은 양성 반응을 나타내었으나 질산염 환원능은 없었다. 탄소원으로 mannitol, inulin, sucrose 및 methanol을 이용하지 못했으며 indole 생성능과 gelatin 액화능이 없는 것으로 나타났다(Table 1). 또한 1.0% 이상의 NaCl 용액에서 증식하지 않아 내염성이 약한 것으로 나타났다. 이와 같은 결과에 따라 Bergey's manual 분류표에 의해 분리균주를 Acetobacter 속으로 동정하였다(Table 1).

### 4. 오미자 추출물의 조제

오미자 식초의 제조를 위하여 오미자 열매량, 추출온도, 추출시간 등에 따른 용해도를 이용하여 최적 추출조건을 알아내기 위하여 오미자 음료를 만드는 여러 가지 방법을 근거로 예비실험을 실시하여 가장 평균적인 값 즉 오미자 열매 10g에 증류수를 열매 중량에 10배 가해서 설탕을 각각 10g, 15g, 20g을 첨가하고 12시간, 24시간 추출하였으며 이때 추출 온도는 냉장고에서 1회, 2회, 3회 추출하였다. 실온에서는 같은 방법으로 8시간, 16시간, 24시간 추출한 후 채점법에 의하여 오미자 음료 추출 조건에서 맛에 미치는 영향을 관능 검사를 통해 실시하였다. 본 연구에서는 경제적인 초산 발효를 위하여 모든 추출물을 합한 결과로 추출 횟수에 상관없이 전체적으로 오미자 고유의 아름다운 색상을 나타낼 뿐만 아니라 오미자의 독특한 향기를 내는 신맛이나 특징적인 풍미 성분에 있어서도 큰 차이를 나타내지 않은 것으로 나타났다. 그러나 색차계로 측정한 결과를 관능적인 색상과 비교한 결과에서는 Table 2(총 3회추출한 평균값)에서 보는 바와 같이 약간의 차이를 나타내었다. L값은 4℃에서 12시간 추출한 경우가 추출횟수에 상관없이 다소 높은 값을 나타내었으며, 붉은 값인 a값은 20℃, 8시간 추출구가 4℃ 추출한 경우에 비해 높은 값을 나타내었다. b값도 a값과 유사한 경향을 나타내었는데 20℃ 24시간 추출한 경우가 가장 높은 값을 나타내었다. Kim et al(1991)은 오미자 용출 시간에 따른 풍미 변화에 관한 연구에서 시간별로 오미자를 우려낸 음료로 관능검사를 실시한 결과 오미자를 물에 9~12시간 우려내면 오미자 음료 풍미성분 함량의 변화치가 크지 않으며, 가장 기호에 맞는 오미자 음료가 될 것이라 보고하고, 오미자 음료의 기호도는 향기에 크게 영향을 주는 산에 의해 결정되었다고 보고하였는데, 이는 본 연구결과와

Table 1. Morphology and physiological properties of the isolated strain

Test	C5-1b
Shape	rod
Gram reduction	-
Catalase	+
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	-
Insulin	+
Sucrose	+
Growth on GYC Medium	+

Table 2. Changes in "L", "a", "b" values of the extraction of omija from water at 4℃ and 20℃

	Lightness(L)	Redness(a)	Yellowness(b)
A <sup>1)</sup>	42.69 <sup>2)</sup>	14.18	3.76
B	42.46	14.50	4.10
C	40.27	17.28	5.87
D	40.12	13.13	5.53
E	39.43	17.30	6.05

<sup>1)</sup> A: water extract of Omija for 12hr at 4℃

B: water extract of Omija for 24hr at 4℃

C: water extract of Omija for 8hr at 20℃

D: water extract of Omija for 16hr at 20℃

E: water extract of Omija for 24hr at 20℃,

<sup>2)</sup> means value of 3 times of extraction of omija.

유사한 경향으로 온도에 상관없이 시간은 8시간, 추출횟수는 총 3회 추출하는 것이 경제적이라 판단되었다.

5. 증식 최적 온도

오미자즙 배지에서의 실험 균주의 증식 최적 온도를 검토하기 위해 배양온도를 5°C 간격으로 20~35°C의 범위에서 8일간 진탕 배양한 후 균 증식량을 살펴본 결과는 Fig. 2와 같다. 증식 최적온도는 30°C로 나타났으며, 25°C와 35°C에서 증식은 비슷하게 나타났다. 본 실험에서 분리한 균주는 생육적온이 30°C로 초산 발효에 유용한 균주로 생각되었다. 초산발효와 관련된 많은 사람들의 연구로부터 배양액의 온도가 낮으면 균주 성장이 억제되고 높으면 균주가 활발하게 성장하나 초산 생성능은 저하됨과 아울러 오염 현상이 일어난다는 보고가 있다(Kim et al 1996, Lee et al 1999, Son et al 2003).

6. 정치 배양과 진탕 배양 시 초산 생성능 비교

같은 배양액 조건에서 진탕 배양, 정치배양의 방법으로 초산발효를 시키면서 초산 생성능을 비교하기 위하여 오미자 추출물이 첨가된 기본 배지를 사용하여 30°C에서 배양하면서 초산 생성량을 측정된 결과 정치 배양보다 진탕배양의 경우 초산 생성능이 우수함을 확인하였다. 정동호(1990)의 보고에 의하면 정치 배양은 액의 표면 가까운 부분에서 발효가 일어나기 때문에 표면 부분이 발열되어 액의 상부와 하부가 5~10°C 정도의 온도차가 나기 때문에 액 전체가 대류하여 긴 발효 시간이 필요하다고 하였다. 中山(1973)은 초산발효는 많은 산소가 소비되나 그 반면 기초 호흡능이 낮기 때문에 많은 공기의 혼입은 필요하지 않다고 하였다. 초산발효는 산화발효이기 때문에 액중의 용존 산소가 문제되며 진탕효과로써 공기의 접촉면을 높여 용존산소의 양을 많게 함으로써 초산발효 속도가 빨라졌다(Fig. 3).

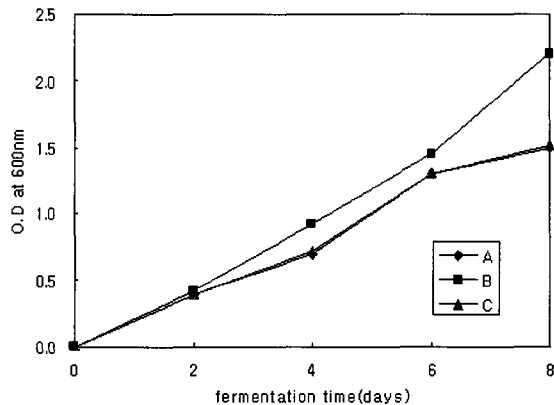


Fig. 2. Effect of temperature on the growth and acidity by *Acetobacter* sp. C5-1b for 8 day.  
A : 25°C, B : 30°C, C : 35°C

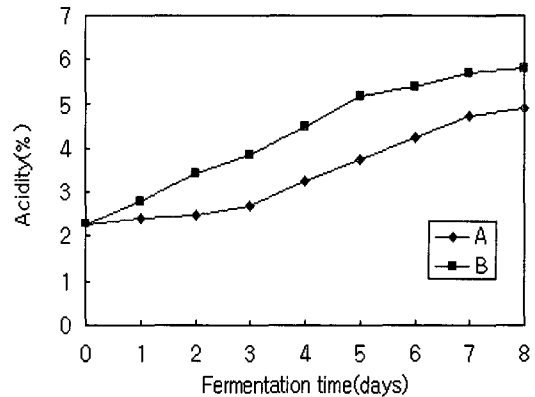


Fig. 3. Comparison of static culture and shaking culture on the acetic acid by production *Acetobacter* sp. C5-1b at 30°C for 8 day.

A: Static culture, B : Shaking culture

요약 및 결론

초산발효에 이용된 초산균은 대구, 경북 지역의 가정에서 재래식 발효 방법으로 제조한 종초 30 점을 수집하여 수집된 식초로부터 초산균을 순수 분리하였으며, 이들 분리균의 초산 생성능을 조사하여 가장 우수한 균주를 선발하고, 오미자 식초 발효 특성을 조사한 후 다음 실험 균주로 사용하였다. 재래초로부터 분리한 30여 균주 중 오미자즙 배지에서 가장 초산 생성능이 우수한 균주로 선정된 균주는 *Acetobacter* sp. C5-1b로 동정되었다. 이 균주의 증식 최적 조건을 살펴본 결과, 최적온도는 30°C였으며 정치배양보다는 진탕배양이 초산발효에 효과적으로 나타났다.

문헌

식품공전 : 한국식품공업협회 p. 485.  
 이도상, 류일환, 이갑상, 신용서, 전승호 (1997) *Acetobacter* sp.를 이용한 알로에 식초의 발효조건 및 lipase 활성 저해효과. *J Korean Soc Agric Chem Biotechnol* 42:105, 1999.  
 정동호 (1990) 식초발효에 관한 연구. 중앙대학교 논문집 24 : 1.  
 정용진 (1996) 반응표면분석에 의한 감식초 제조방법의 최적화. 영남대학교 박사학위논문. 대구 p. 1.  
 中山重德 (1973): *日本醱酵協會誌* 31(3):108.  
 Gerhardt P, Murry GE, Costilow RN, Nester EW, Wood WA, Krieg NR, Phillips GB (1981) *Manual of methods for general bacteriologist*. American Society for Microbiology, Washington, D.C. p. 85.  
 Han SH, Shin MK, Chung YH (1992) Effects of the omija (*Schizandra chinensis* Ballon) extract on the metabolism and

- renal cadmium contents in cadmium administered rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 31: 1102.
- Kim YD, Kang SH, Kang SK (1996) Studies on the acetic acid fermentation using maesil juice. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 25(4): 695.
- Kim YM, Kim DH, Yum CA (1991) Changes in flavor component of omija, *Schizandra chinensis* Baillon, with various extraction times. *Korean J Soc Food Sci* 7: 27.
- Krieg NR, Holt JG (1984) *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Williams and Wikins, Baltimore/london 1: p. 267.
- Lee GD, Kim SK, Lee JM (2003) Optimization of acetic acid fermentation condotion for preparation of strawberry vinegar. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32:812.
- Lee JS, Lee MG, Lee SW (1989) A study on the general components and minerals in parts of omija(*Schizandra chinensis* Ballon). *Korean J Dietary Culture* 4: 173.
- Lee JS, Lee SW (1989) A study on the compositions of free sugars, lipids, and nonvolatile organic acids in parts of omija(*Schizandra chinensis* Ballon). *Korean J Dietary Culture* 4:177.
- Oh YJ (1992) A study on cultural conditions for acetic acid production employing pear juice. *J Korean Soc Food Nutr* 21: 377.
- Park YK, Jung ST, Kang SG, Park IB, Cheun KS, Kang SK (1999) Production of a vinegar from onion. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol* 27(1): 75.
- 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(4): 539.  
(2004년 6월 30일 접수, 2004년 10월 4일 채택)