

경옥고를 이용한 식초의 개발

박성민¹, 이원욱², 조미정², 이종록², 정대화¹, 박은영¹, 변성희² 김상찬^{1,2}
¹대구한의대학교 한방생명자원연구센터, ²대구한의대학교 한의학과 방제학교실

ABSTRACT

Processing of Vinegar Using Gyoungok-go

Sung-Min Park¹, Won-Wook Lee², Mi-Jeong Jo², Jong-Rok Lee¹, Dae-Hwa Jung¹,
Eun-Young Park¹, Sung-Hui Byun², Sang-Chan Kim^{1,2}

¹The Research Center for Biomedical Resources of Oriental Medicine, Daegu Haany University

²College of Oriental Medicine, Daegu Haany University

Gyoungok-go (GOG; Qiongyu-gao in Chinese) has been used in traditional oriental medicine for the improvement of various physiological vitality functions. The aim of present work is to investigate a processing possibility of vinegar using GOG. GOG vinegar was prepared by two stage fermentations of alcohol and vinegar. The method of GOG fermentation with polished rice as a fermentation substrate is not yet established. The result of alcohol fermentation rate of GOG with some strains, strain No. 1 produced the highest alcohol contents among 7 strains. The strain No. 1 identified *Saccharomyces paradoxus* by 18S rDNA classification. *S. paradoxus* was produced over 20% alcohol in the 1~11% GOG with polished rice. *A. aceti* was produced 8.52% acetic acid from 6.5% alcohol containing 11% GOG, after incubation for 11 days.

•교신저자 : 김상찬

•대구광역시 수성구 상동 165번지 대구한의대학교

•Tel : 82-53-770-2247 Fax : 82-53-770-2335 E-mail : sckim@dhu.ac.kr

•접수 : 2009/ 06/ 01 1차 수정 : 2009/ 06/ 13 채택 : 2009/ 06/ 22

Key word : Gyoungok-go, Fermentation, Vinegar

1. 서 론

경제 성장과 생활수준이 향상됨에 따라 웰빙(well-being)을 지향하는 추세에 영향을 받아 기능성 청주, 약주에 대한 소비자 수요가 증가하고 있다¹⁾. 우리나라에서 일반적으로 제조되고 있는 발효주의 양조방법은 백미, 찹쌀, 누룩 등이 주원료로 사용되어 왔고, 부 원료로는 식물 약재류 등을 첨가하는 방법으로 술을 만들어 왔다. 근래에는 건강에 대한 관심이 높아지면서 각종 기능성을 가진 건강식품 개발이나, 약재의 잎이나 뿌리 등을 부 원료로 각종 생리기능성 물질이 발효과정에서 생성되거나 용출되는 건강기능성 주류의 개발이 활발히 진행되고 있다. 특히, 알코올 해독과 건강 보조 및 질병 예방 등의 기능성을 가진 약주 등이 개발되어 시판중에 있으며^{2,3)} 인삼, 구기자, 두충, 감초, 오미자, 산수유, 숙지황, 매실, 당귀, 동충하초, 상황버섯 등의 침출주 및 발효주가 개발되어 이에 대한 효능이 부분적으로 보고되고 있다⁴⁻⁶⁾. 이러한 생리활성을 나타내는 성분은 발효과정에서 생산되어지거나, 또는 발효 전 부원료에 포함된 물질이 용출되거나 다른 발효 물질과 더불어 전통주의 생리활성에 상승작용을 일으키는 것으로 예측되고 있으나⁷⁾, 어떠한 조성이 구체적으로 어떻게 생리활성에 관여하고 있는지에 관한 연구는 아직 초보적 단계이다⁸⁾.

식초는 동서양을 막론하고 오랫동안 이용되어져 온 발효식품으로 식초에 함유되어 있는 초산은 알코올보다 더 강한 보존 활성을 나타냄으로 피클

등 많은 채소류의 보존에 사용되었다⁹⁾. 식초는 알코올, 곡류 및 과일을 이용하여 만들 수 있는 발효식품으로 발효에 의해 생성된 유기산 등 이차부산물들이 맛, 향 및 식초의 품질을 변화시키는 것으로 알려져 있다¹⁰⁾. 식초는 당이 혐기적 상태에서 알코올로 변환되고 다시 알코올이 호기적 상태에서 산으로 변형되는 과정을 거쳐 생산되며, 다양한 농산물을 이용하여 식초를 개발하고자 많은 연구가 진행되고 있다¹¹⁾. 또한, 식초는 대표적인 알칼리성 식품¹²⁾으로 동맥경화증이나 혈전증을 일으키는 과산화지질을 분해하여 동맥경화의 예방과 부신피질 호르몬의 분비, 소화 및 식욕촉진에 효과가 있으며, 당뇨병과 비만의 개선, 혈압 강하, 노화방지과 항종양 효과 등이 있는 것으로 알려져 있다. 국내에서는 곡물식초를 총산 4.29% (감식초는 2.6%이상)로 규정하고 있으며, 식초를 발효식초, 합성식초, 기타식초로 유형을 분류하고 있으며 다양한 원료와 제조방법에 따라 다량의 제품이 생산되고 있다¹³⁾.

瓊玉膏는宋代洪遵의《洪氏經驗方》에新羅人蔘, 生地黃, 雪白茯苓, 白沙蜜로 구성되는 것으로 되어 있으며, 효능 및 주치로는“養陰潤肺治虛勞乾咳咽燥咯血”이라고 언급된 이래 養性延年하는 방제로 다용되고 있다¹⁴⁾.《東醫寶鑑》에는瓊玉膏의 효능에 대하여“填精補髓, 調眞養性, 返老還童, 補百損, 除百病, 萬神具足, 五臟盈溢, 髮白復黑, 落齒更生, 行如奔馬”라고 기재되어있다¹⁵⁾.

이러한 문헌적 자료에 근거하여 瓊玉膏의 약리활성에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 현재까지 瓊玉膏에 대한 실험적 연구로 瓊玉膏와 瓊

玉膏加味方の 면역 활성화에 관한 연구^{16,17)}와 瓊玉膏 및 瓊玉膏加味方이 폐암에 미치는 영향에 관한 연구 그리고 산화적 손상으로 유발된 심근세포고사에 대한 瓊玉膏의 방어효과 연구 등이 보고되어 있다¹⁸⁾. 瓊玉膏의 성분 분석 및 추출물별 항산화 효능을 연구한 박 등¹⁹⁾의 결과를 보면 경옥고의 일반성분은 수분 함량 50.64%, 탄수화물 45.95%, 조지방과 조단백질은 0.51%, 2.38%, 조회분 함량은 0.52%이고 환원당은 2.86 g/100 g, 수용성 단백질은 170.10 mg/100 g로 조사되었다고 보고하였다. 또한 경옥고의 구성 아미노산 함량은 valine이 가장 높으며, 유리 아미노산은 arginine이 가장 높았으며 다양한 무기질을 함유하고 있다고 보고하였다. 또한, 瓊玉膏 추출물 중 polyphenol 함량, DPPH에 대한 전자공여능, 아질산염 소거능, xanthine oxidase, tyrosinase 저해 활성 등은 클로로포름, 에탄올, 물 추출물 순으로 효능을 나타내는 것으로 보고하였다.

이에 본 연구에서는 瓊玉膏를 이용하여 알코올 및 초산 발효의 진행가능 여부를 조사하고, 최근 많은 소비량을 나타내고 있는 식초 음료로 적용함으로써 본초 및 방제를 이용한 다양한 식초음료의 응용 가능성을 조사하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 재료 및 배지

실험재료인 경옥고는 2008년 9월 경기도 안성시 경옥당한의원에서 제조한 제품을 구입하여 사용하였다. 경옥고만으로 알코올 발효를 유도할 수 없으므로 발효를 위한 기질로 경상북도 김천시에서 생산된 물레방아미를 구입하여 사용하였다. 알코올 발효를 위한 효모의 분리를 위하여 Difco사의 YM broth (0.3% Yeast extract, 0.3% Malt extract, 0.5% Peptone, 1.0% Dextrose, pH 6.2 ± 0.2)배지를 이용하였으며 초산균 배양을 위하여 Mannitol

broth (0.5% Yeast extract, 0.3% Peptone, 2.5% Mannitol, pH 4.0 ± 0.2)를 사용하였다.

2. 균주의 분리

대구, 경상북도지역 민가 7곳에서 직접 담근 전통주 및 과실주 중 인위적으로 알코올을 첨가하지 않은 시료 중 알코올 함량이 10%가 넘는 시료로부터 균주를 분리하였다. 각각의 샘플을 30℃ 진탕배양기에서 24시간 배양한 후 단계회석법으로 회석하고 잡균의 생육을 억제하면서 알코올에 내성을 가지는 균주를 분리하기 위하여 3% prethanol (98%주정)이 첨가된 YM agar (YM broth + 1.5% agar)에 도말한 후 30℃에서 48시간 배양하여 효모로 추정되는 균들을 1차로 순수 분리하였다. 분리균 중 알코올 생산성이 가장 우수한 종을 선발하고 동정한 후 본 연구의 공시균주로 사용하였다.

3. 분리균주의 동정

1차 순수 분리한 균주의 동정은 당이용성 평가방법인 API 20C AUX Kit (bioMerieux, France)를 이용하였으며, 최종 공시균주는 한국미생물보존센터 (KCCM, Korean Culture Center of Microorganisms)에 의뢰하여 18S rDNA분석을 통해 동정하였다.

4. 경옥주의 제조 및 알코올 함량 측정

일반적으로 백미를 이용하여 알코올 발효를 유도할 경우 곰팡이가 생산하는 amylase에 의하여 백미의 전분이 발효성 당 (fermentable sugar)으로 분해되는 당화 (Saccharification)과정을 거친 다음 효모에 의한 알코올 발효가 진행된다. 곰팡이를 사용할 경우 생성된 알코올의 관능성은 좋으나 곰팡이가 생육하여 효소를 생성할 때 까지 장시간의 발효기간이 요구된다. 본 연구에서는 최종 산물인 초산을 보다 빠르게 생산하기 위하여 백미에 Glucoamylase (Shin Nihon Chemical Co., LTD, Japan)를 첨가하여 분리한 효모로부터 보다 신속한 알코올 생산

을 유도하였으며 반응온도, 첨가비율은 제조사의 사용법에 준하여 사용하였다. 국제정주류분석법 중 약주류분석법에 따라 표준 주정계 (Dong Myung, Korea)로 알코올 함량을 측정하였다. 실험방법은 15°C에서 검증한 메스실린더에 100 ml 취하고 이것을 약 300~500 ml 삼각플라스크에 옮긴 다음 이 메스실린더를 약 15 ml의 물로 2회 씻은 액을 삼각플라스크에 합치고 냉각기에 연결한 다음 메스플라스크를 받는 용기로 하여 증류한다. 유액이 70 ml이 되면 증류를 중지하고 물을 가하여 100 ml로 조정한 후 15°C에서 한 눈금인 0.2도인 수은 주정계를 사용하여 측정하였다²⁰⁾.

5. 경옥식초의 제조

경옥주의 알코올 함량을 조정한 후 초산생성균인 *Acetobacter aceti* (KCCM 32409)를 이용하였다. 초산발효 전 Mannitol agar에 3% CaCO₃를 첨가한 고체배지에 균을 접종하여 초산의 생성에 따른 clear zone 형성을 확인하였으며 Mannitol broth에 전배양한 후 균주를 회수하여 초산발효를 진행하였다(Fig. 1).

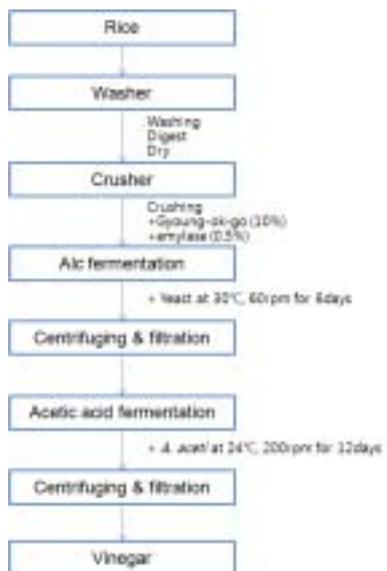


Fig. 1. Preparation of Gyoungok-go vinegar

6. 총산도 측정

산도의 측정은 초산발효중인 시료 10 ml를 취하고 증류수를 이용하여 100 ml로 정용한 후 그 중 20 ml을 이용하여 0.1% phenolphthalein을 지시약으로 하여 0.1N NaOH 용액으로 중화 적정하고 acetic acid로 환원하여 나타내었다²¹⁾.

III. 결과 및 고찰

1. 균주의 분리

대구, 경북지역 민가 7곳의 전통주 및 과실주 시료 10 ml를 멸균수 90 ml과 혼합하고 30°C 진탕 배양기에서 (Vision Science, Korea) 24시간 배양하여 시료 중 균의 증식을 유도하였다. 각각의 시료를 멸균수를 이용하여 단계희석하고 YM agar에 접종하고 30°C에서 2일간 배양하여 균주를 분리하였다. 그 결과 시료로부터 7종의 효모를 분리하였으며 API kit를 이용하여 당 이용성을 조사한 결과는 Table 1과 같다. 분리균주의 당 이용특이성의 결과를 바탕으로 동정용 소프트웨어 (APILAB Plus, <https://apiweb.biomerieux.com>)로 동정한 결과 *Saccharomyces* sp. 4종, *Candida* sp. 2종, *Kloeckera* spp 1종으로 확인되었다. 이 중 glucose를 이용하지 못하는 것으로 조사된 *Kloeckera* spp와 *Candida* sp. 중 1종을 제외한 5종을 대상으로 알코올 발효를 조사하였다.

2. 공시균주의 선발

백미를 1차 증류수에 4시간 침지한 후, 물기를 제거하고 분쇄하여 60°C에서 24시간 건조하였다. 효소제인 glucoamylase의 활성을 조사하기 위하여 분쇄한 백미 600 g을 삼각플라스크에 넣고 1차 증류수 1,200 ml를 첨가한 후 제조사의 사용법에 준하여 0.5% (v/v) 첨가한 후 30°C, 60rpm으로 6일간 배양하면서 샘플을 채취하였다(Fig. 2). 그 결과 배양 5일까지 꾸준히 당화가 진행되는 것으

로 조사되었으나 6일째 큰 변화를 나타내지 않는 것으로 조사되었으며 이는 효소가 최종산물에 의하여 활성이 저해되는 feedback Inhibition이 야기된 것으로 판단되었다.

Table 1. Sugar fermentation test of the isolated strains.

Sugar	Strains					
	1	2	3	4	5	6
Glucose	+	-	-	+	+	+
Glycerol	-	-	-	-	-	+
2-keto-D-Gluconate	-	+	+	-	-	-
L-arabinose	-	-	-	-	-	-
Adonitol	-	-	-	-	-	-
Xylitol	-	-	-	-	-	-
Galactose	+	-	-	-	-	+
Inositol	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-	-
Methyl-D-Glucoside	-	-	-	-	-	-
N-acetyl-D-Glucosamine	-	-	-	-	-	-
Cellobiose	-	-	-	-	-	-
Lactose	-	-	-	-	-	-
Maltose	+	+	-	-	+	+
Sucrose	+	+	-	-	+	+
Trehalose	-	-	-	-	-	+
Melezitose	-	-	-	-	-	-
Raffinose	+	-	-	-	-	+

효소제에 의한 당화를 확인하고 공시균주를 선별하기 위하여 분쇄한 백미 600 g 을 삼각플라스크에 넣고 1차 증류수 1,200 ml를 첨가한 후 glucoamylase 0.5% (v/v)를 첨가한 후 전배양한 1차 분리균주를 원심분리 (4,000rpm)하여 회수하고 10% (v/v) 부피로 접종하여 30°C, 60rpm으로 배양하였다. 분리균주를 이용하여 알코올 발효를 진행한 결과 경상북도 경산지역의 시료에서 분리한 No. 1균주가 가장 양호한 알코올 발효를 하는 것으로 조사되었다(Fig. 3). No. 1균주의 경우 발효 1일부터 3일까지 매우 높은 알코올 생성율을 나타내었으며 발효 4일째에서 6일까지는 거의 유사한

수준으로 알코올을 생성하는 것으로 조사되었다.

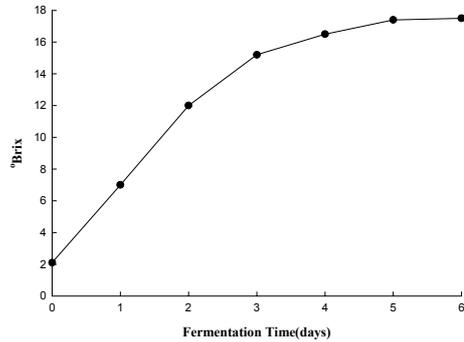


Fig. 2. Saccharification effect by 0.5% glucoamylase.

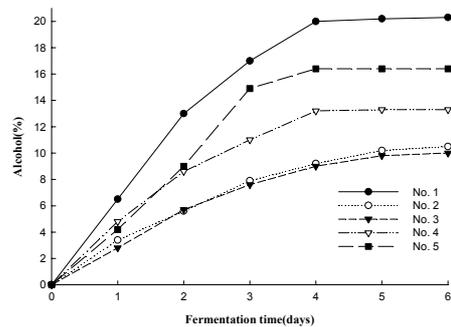


Fig. 3. Alcohol fermentation ability of selected strains

3. 선발균주의 동정

가장 높은 알코올 생성을 나타낸 No. 1 균주의 DNA를 추출하여 PCR로 18S rDNA를 부분적으로 증폭하여 염기서열을 분석하였다. 분석된 염기서열과 GENE BANK의 데이터를 비교하여 molecular phylogenetic tree를 작성하였으며 그 결과 *Saccharomyces paradoxus*와 99%의 상동성을 나타내어 최종 *S. paradoxus* (KFCC 11440P)로 명명하고 한국미생물센터에 균주 기탁하였다.

4. 경옥주의 제조

경옥고를 휴대용 당도계 (Atago, Japan)로 측정한 결과 54 °Brix를 나타내었고 수분함량은 24.4%로 조사되었다. 백미 600 g을 2배량의 1차

증류수에 넣고 발효시 경옥고의 취를 풍부하게 할 수 있는 함량을 조사하기 위하여 경옥고 첨가량을 1차 증류수의 1~11% (v/v)되게 첨가한 후 전배양한 *S. paradoxus* 10% (v/v)를 접종하여 30℃, 60rpm으로 발효하였다. 그 결과 1~11% 경옥고를 첨가한 경우 알코올 발효의 변화는 거의 나타나지 않았으며 이는 경옥고가 높은 당 함량을 나타내지만 직접적으로 알코올 발효에 영향을 주지 않는 것을 확인할 수 있었으며(Fig. 4) 또한 경옥고의 성분에 의하여 선발균주인 *S. paradoxus*의 생육이 저해되지 않는다는 것을 확인할 수 있었다. 경옥고를 1~11% 첨가하여 발효한 경우, 경옥고 11%에서 경옥고 고유의 취가 강하게 나타나는 것으로 볼 때 백미와 경옥고를 혼합하여 알코올 발효를 진행할 때 11%이상의 경옥고를 첨가하는 것이 보다 양호한 결과를 나타내는 것으로 조사되었다.

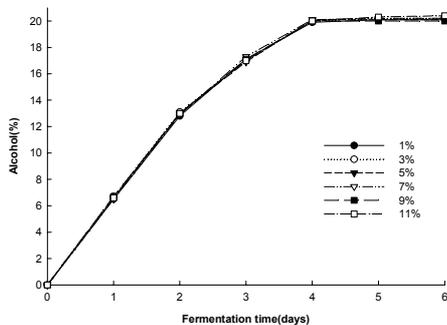


Fig. 4. Alcohol fermentation effects by different concentrations of Gyoungok-go.

5. 경옥식초의 제조

경옥식초의 생산을 위하여 경옥주의 알코올 함량을 *A. aceti*의 생육을 억제하지 않는 농도인 6.5%로 조정된 후 전배양한 *A. aceti*를 회수하여 원심분리하고 전체량의 10% (v/v)비율로 접종하여 24℃, 200rpm으로 12일간 배양하였다. 과실을 이용한 식초 생산의 경우 초기 일정 산도를 첨가하여 균의 생육에 적합한 산도로 조정된 후 초산 생성을 유도하거나 중초를 생산하여 초산발효를

유도하는 경우가 많으나 본 연구에서는 경옥주로부터 순수한 초산을 생성하기 위하여 미 첨가하여 조사하였다. 그 결과 배양 1일째부터 증가하여 배양 11일째 8.52%의 산을 생성하는 것으로 조사되었으며 12일째 산 생성은 증가하였으나 유사한 증가율을 나타내는 것으로 조사되었다. 따라서 경옥주와 공시균을 이용하여 식초를 생산할 경우 11일간 배양하는 것이 보다 양호한 결과를 얻을 수 있는 것으로 판단되었다. 공시균인 *A. aceti*에 의한 초산생성은 초기 산도를 조정된 결과와 달리 완만한 곡선을 나타내지 않는 것으로 조사되었다(Fig. 5) 알코올이 초산으로 전환되는 비율인 발효율은 이론적으로는 에탄올 중량의 1.64배의 식초산이 생성되는 것으로 알려져 있으며 실제로는 이론값의 88~90%의 효율을 나타내는 것으로 알려져 있다. 이러한 이유는 발효과정 중 에탄올의 증발과 식초산 이외의 다른 물질로 전환되기 때문인 것으로 알려져 있다²²⁾. 본 연구의 경우 첨가한 경옥주의 알코올 함량과 비교할 때 79.7%의 효율을 나타내는 것으로 조사되었다.

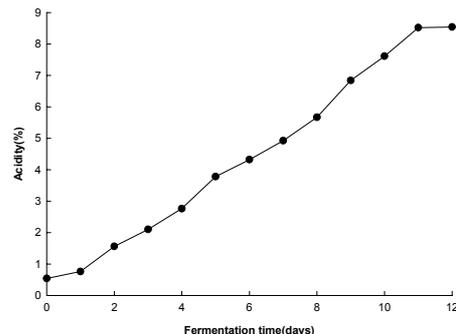


Fig. 5. Acetic acid production from *A. aceti* KCCM 32409.

IV. 결 론

다양한 생리활성을 갖는 경옥고를 이용한 새로운 형태의 식초를 개발하기 위해 최적의 제조 방

법을 조사하였다. 경옥고 알코올 발효시 부족한 당의 보당은 백미를 사용하였으며 당화는 *Rhizopus* sp.가 생성하는 amylase를 이용하였다. 이때 발효 기질의 최적 비율은 백미 : 경옥고 : 증류수 = 33.3 : 59.3 : 7.4 (w/v/v)였다. 발효시 최적균주는 전통주와 과일주에서 순수 분리한 *Saccharomyces paradoxus*였으며 생성된 알코올 함량은 약 20%였다. 제조된 경옥고 알코올 발효물의 알코올 농도를 6.5%로 조정한 후 *Acetobacter aceti* KCCM 32409로 초산발효한 결과 배양 11일째 8.52%의 초산이 생성되었으며 이때 발효 효율은 79.7%였다.

감사의 글

본 연구는 대구한의대학교 기린연구비에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. 유대식, 김정, 김현수, 현지숙, 하현팔, 박문근. 한국 전통 누룩 미생물의 문헌적 고찰(1945년 이후를 중심으로). 한국식품영양과학회지. 1998; 27:789-99.
2. 유대식, 김현수, 홍진, 하현팔, 김태영, 윤인화. 누룩 미생물의 문헌적 고찰(1945년 이전을 중심으로). 한국영양식량학회지. 1996;25:170-9.
3. 차재영, 김현정, 김성규, 이용재, 조영수. 감귤류 플라보노이드가 지질 과산화물 함량에 미치는 영향. 한국식품저장유통학회지. 2000;7:211-7.
4. 차재영, 조영수. 감귤류 플라보노이드의 생리기능 활성. 한국응용생명화학회. 2001;44:122-8.
5. 김현복, 이용우, 이완주, 문재유. 청일뽕 오디를 이용하여 제조된 침출주의 관능평가 및 생리활성연구. 한국잡사학회지. 2001;43:16-20.
6. 황인식, 김선재, 박인배, 박운미, 박정욱, 송현우, 조광호, 정순택. 생약초 침출주의 생리활성 효

- 과. 한국식품저장유통학회. 2005;12:282-6.
7. 정건섭, 오원택, 남삼민, 손병수, 박용석. 한국 전통 약주의 B16BL6 mouse melanoma 및 HRT18 human colon adenocarcinoma 세포 성장 억제 효과. 한국식품과학회. 1998;30:1470-5.
8. 김승진, 백지영, 박찬구, 김계원. 한국 전통약주의 위보호 효과. 한국식품과학회지. 2004;36:818-22.
9. Keith HS. Classification of fermented foods: worldwide review of household fermentation techniques. Food Control. 1997;8:311-7.
10. Lipp M, Radovic BS, Anklam E. Characterisation of vinegar by pyrolysis-mass spectrometry. Food Control. 1998;9:349-55.
11. 주경호, 조명휘, 박기재, 정승원, 임정호. 발효 현미식초의 발효방법 및 원료함량에 따른 품질 변화. 한국식품저장유통학회지. 2009;16:33-9.
12. 한행수. 웰빙건강법 천연식초. 서울:의뜸사, 2007: 17.
13. 황용철, 신광순. 감식초에서 분리한 면역활성다당의 특성. 한국식품과학회지. 2008;40:220-7.
14. 이경위. 중의대사전. 북경:인민위생출판사. 2004: 1669.
15. 허준. 동의보감. 서울:남산당. 1981:78.
16. 이은숙, 서부일, 이준우, 배진승. 瓊玉膏와 瓊玉膏가미방의 면역활성에 관한 연구. 대한본초학회지. 2002;17:95-100.
17. 이은숙, 서부일, 이준우, 배진승. 瓊玉膏 및 瓊玉膏가미방이 폐암에 미치는 영향. 대한본초학회지. 2002;17:101-9.
18. 신선호, 양경석. 산화적 손상으로 유발된 심근 세포 고사에 대한 瓊玉膏의 방어효과. 대한한의학회지. 2004;25:149-59.
19. 이소연, 신유정, 박종혁, 김승모, 박치상. 경옥고의 성분 분석 및 추출물별 항산화 효능 비교. 대한본초학회지. 2008;23:123-36.
20. 이상훈, 정혁준, 여수환, 김현수, 유대식. 신종 누룩사상균, *Aspergillus coreanus* NR 15-1의 α

- Amylase의 효소학적 특성. 한국생물공학회지. 2004;19:301-7.
21. 우승미, 김옥미, 최인욱, 김운숙, 최희돈, 정용진. 참다래 식초 초산발효조건 및 올리고당 첨가의 영향. 한국식품저장유통학회. 2007;14:100-4.
22. 김경은, 최옥수, 이영재, 김해섭, 배태진. 다시마 추출액을 이용한 식초제조. 한국생명과학회지. 2001;11:211-7.