



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)



碩士學位論文

제주조릿대와 감귤을 이용한
알코올발효 및 초산발효의 특성

濟州大學校 大學院

食品工學科

金京珉

2012年 2月



제주조릿대와 감귤을 이용한
알코올발효 및 초산발효의 특성

指導教授 高 榮 煥

金 京 珉

이 論文을 工學 碩士學位 論文으로 提出함

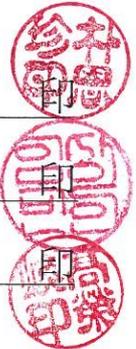
2012年 2月

金京珉의 工學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 _____ 朴 恩 珍

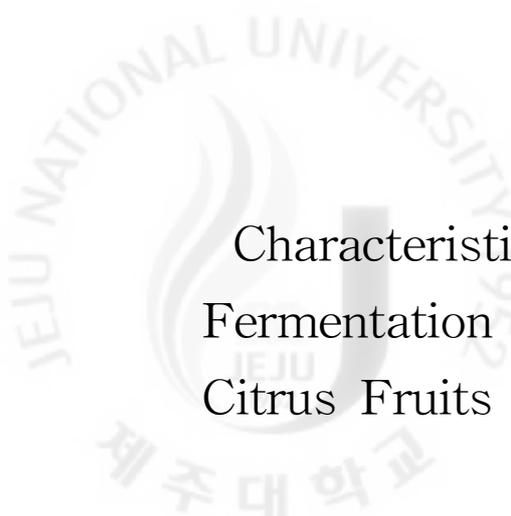
委 員 _____ 任 尙 彬

委 員 _____ 高 榮 煥



濟州大學校 大學院

2012 年 2月



Characteristics of Alcohol- and Acetic acid
Fermentation using *Sasa quepaertensis* and
Citrus Fruits

Kyung-Min Kim

(Supervised by professor Young-Hwan Ko)

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirement for the
degree of Master of Engineering

2012. 02.

This thesis has been examined and approved.

Eun-Jin Park, Thesis director, Prof of Food Science and Engineering

Sang-Bin Lim, Prof of Food Science and Engineering

Young-Hwan Ko, Prof of Food Science and Engineering

February 2012

Department of Food Science and Engineering
GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

목 차

Abstract	1
1. 서 론	2
2. 재료 및 방법	4
2.1. 실험재료	4
2.2. 야생균주 분리 및 동정	4
2.2.1. 효모의 분리	4
2.2.2. 초산균의 분리	4
2.2.3. 분리균의 동정	4
2.3. 표준균주 분양	7
2.4. 알코올 발효	7
2.4.1. 제주조릿대 열수추출물 제조	7
2.4.2. 효모의 생균수 측정	7
2.4.3. 추출물의 알코올 발효	7
2.4.4. 에탄올 함량, 당도 및 PH 측정	8
2.5. 초산 발효	8
2.5.1. 초산균의 생균수 측정	8
2.5.2. Paper disc법을 이용한 알코올 내성 시험	8
2.5.3. 에탄올 농도에 따른 초산 발효	8
2.5.4. 제주감귤을 2차 발효기질로 활용한 초산 발효	9
3. 결과 및 고찰	9
3.1. 분리균주의 동정결과	9
3.1.1. 효모의 동정	9
3.1.2. 초산균의 동정	10

3.2. 에탄올 생성력 비교	10
3.2.1. 효모의 생균수 측정	10
3.2.2. 효모 3종을 이용한 알코올 발효	11
3.2.2.1. 10° Brix 제주조릿대 열수추출물의 알코올 발효	11
3.2.2.2. 15° Brix 제주조릿대 열수추출물의 알코올 발효	12
3.2.2.3. 20° Brix 제주조릿대 열수추출물의 알코올 발효	15
3.3. 초산 생성력 비교	20
3.3.1. 초산균의 생균수 측정	20
3.3.2. Paper disc 법을 이용한 산 생성력 비교	20
3.2.3. 에탄올 농도에 따른 초산생성력 비교	23
3.2.3.1. 3% 에탄올 농도에서의 초산 발효	23
3.2.3.2. 5% 에탄올 농도에서의 초산 발효	23
3.2.3.3. 7% 에탄올 농도에서의 초산 발효	26
3.2.4. 감귤의 첨가비율에 따른 초산 생성력 비교	31
3.2.4.1. 감귤을 10% 첨가한 초산 발효	31
3.2.4.2. 감귤을 20% 첨가한 초산 발효	31
3.2.4.3. 감귤을 30% 첨가한 초산 발효	32
4. 요약	39
5. 참고문헌	41

Abstract

The objective of this study was to develop a vinegar beverage using *Sasa quelpaertensis* Nakai(SQN) leaf and citrus juice extract. Alcohol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* YG-03, *Saccharomyces ellipsoideus* KCTC 7243 and *Saccharomyces cerevisiae* KCTC 7296 was investigated to optimize the fermentative production of alcohol. The effects of the initial sugar contents(10, 15, 20 ° Brix) on alcohol productivity was also conducted to 28°C for 14 days. After 14 days of alcohol fermentation by using three strains, *Saccharomyces cerevisiae* YG-03 showed highest alcohol productivity at 10 and 15 ° Brix sugar contents. Acetic acid fermentation by 5%(v/v) inoculation of *Gluconobacter albidus* AD-08, *Acetobacter aceti* KCTC 1010 and *Acetobacter pasteurianus* KCTC 12289 culture was conducted in shaking incubator at 30 °C for 7 days. Acetic acid fermentation experiment using paper disc method showed widest clear zone at NYC agar plate containing 3% alcohol by *Gluconobacter albidus* AD-08. After 7 days of acetic acid fermentation by using three strains, *Gluconobacter albidus* AD-08 produced total acid of 1.80% in SQN hot water extract including 3%(v/v) alcohol. SQN hot water extract added respectively 10, 20 and 30%(v/v) citrus juice were also fermented by acetic acid bacteria of three strains. After 7 days of acetic acid fermentation, SQN hot water extract added 30% citrus juice extract produced total acid of 3.27% by *Acetobacter pasteurianus* KCTC 12289.

1. 서론

식초는 동서양을 막론하고 유구한 역사성을 갖는 발효식품으로서 음식에 산미를 부여하는 조미료뿐만 아니라 민간요법 등에서 다양한 용도로 널리 사용되어 왔으며 최근에는 건강음료로서 또다시 주목 받고 있다. 이러한 식초는 대표적인 알칼리성 식품으로 동맥경화증이나 혈전증을 일으키는 과산화지질을 분해시켜 동맥경화 예방과 부신피질 호르몬의 분비, 소화 및 식욕촉진, 항종양효과, 체지방 감소, 피로회복 효과 및 면역기능 향상 등의 다양한 생리활성을 나타낸다.(9) 또한 식초는 대표적 휘발성 유기산인 acetic acid 뿐만 아니라 citric acid, succinic acid, tartaric acid 및 lactic acid 등 당 분해 과정의 TCA cycle에서 볼 수 있는 유기산들도 함유하고 있어 생리적 상태에 따라 필요한 물질로 쉽게 전환되어 체내 대사를 원활하게 하고 칼슘 등 미량 성분들의 체내 흡수를 향상시키는 등의 기능을 가지고 있다.(1,8)

과거에는 미생물과 천연자원을 이용한 양조식초가 생산기간이 길고 일정한 품질의 생산이 어려우며 원가가 비싸다는 이유로 합성식초로 대체되었던 적이 있었다. 그러나 최근 식생활의 다양화와 건강에 대한 인식의 확대, 그리고 소득수준의 증가에 따라 천연자원을 원료로 한 고급 양조 식초의 개발 필요성이 증대되고 있다. 이에 따라 참다래, 복숭아, 무화과, 매실, 양파, 유자, 야콘 등을 이용한 다양한 식초 제조에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있다.(4,14,17) 또한 식초 발효액에 다양한 원료를 첨가함으로써 초산 이외의 생리적 기능이 부가된 식초의 생산에 관해서도 연구될 필요가 있다.

초산의 생산과정은 효모에 의한 탄수화물의 알코올 발효와 초산균에 의한 알코올의 산화적 초산 발효의 두 단계로 이루어진다.(5) 알코올을 산화시켜 초산을 생성하는 초산균은 호기적 발효를 하는 균주로서 *Acetobacter aceti*, *Acetobacter pasteurianus*, *Acetobacter schuetzenbachii*, *Gluconobacter oxydans* 등이 있으며, Gram 음성, 호기성 단간균 또는 장간균으로 포자는 형성하지 않는다. 또한 *Gluconobacter* sp.는 알코올보다 당을 더 선호하며 초산을 재산화시킬 수 있는 능력이 없는 반면에 *Acetobacter* sp.는 초산을 재산화시킬 수 있는 TCA 회로를 가지고 있다.(3)

최근 제주지역 중산간 및 한라산 산림지대를 중심으로 제주조릿대(*Sasa quelpaertensis* Nakai)의 개체수가 급속히 증가되고 있으며 제주조릿대는 한라산 산림지역 주요 하층 식생으로 자리 잡고 있어 다른 식물종의 발달을 억제하여 종 다양성을 저하시키고 있다. 현재 제주조릿대를 경제적으로 활용함과 동시에 군락지 내의 종 다양성을 증가시키기 위한 다양한 연구가 진행되고 있으며 경제적으로 활용할 수 있는 다양한 가공제품이 필요한 시점이다.(10) 이러한 조릿대 잎 추출물은 체내의 소화과정 중 탄수화물을 단당으로 분해하는 α -glucosidase의 활성을 저해하고 식후 혈당강화 작용을 한다는 연구결과들이 있으며 앞서서 언급한 식초의 다양한 생리활성과 이를 섭취함으로써 체중감소효과가 나타났다는 연구결과를 바탕으로 제주조릿대 식초가 혈당과 체중감소 조절 기능적 역할을 수행 할 수 있을 것으로 기대한다.(11-13)

또한 제주도의 지역 특산물인 감귤은 비타민, 미네랄, 식이섬유, 유기산 및 유리당과 아올리, flavonoid, limonoid, carotenoid 등의 기능성물질이 다량 함유되어 있는 과실이지만 감귤과즙은 citric acid 함량이 약 2%에 달할 뿐만 아니라 limonene을 대표로한 정유성분과 hesperidin, naringin 등의 flavonoid류와 아올리 다양한 종류의 향균성 alkaloid를 함유하고 있어서 감귤과즙을 이용한 초산발효는 다른 과실에 비하여 어려운 것으로 알려져 있다.(2,18) 그러나 본 연구에서는 감귤을 식초제조의 주원료로 사용하기보다는 초산발효를 돕는 2차 발효기질로서 이용하고 제주조릿대를 주원료로 한 식초에 부족할 수 있는 기호성을 충족시키기 위해 일부 활용됨으로서 이러한 문제에 접근법을 달리하였다. 본 연구에서는 한라산 일대에 널리 있는 제주조릿대를 활용한 식초를 개발하여 제주조릿대의 수요확대 및 국민 건강 증진을 도모하고 제주지역 특산물인 감귤을 활용하여 초산발효의 효율을 증가시킬 수 있다는 결과를 바탕으로 2단계 발효를 통해 제주조릿대 감귤 식초를 제조하고 산업화를 위한 발판을 마련하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 실험재료

본 실험에 발효기질로 사용한 제주조릿대(*Sasa quelpaertensis* Nakai)는 2010년 10월 한라산 중산간 일대에서 채취하여 3일간 자연 건조시키고(19,20) 분쇄하여 사용하였으며, 감귤은 서귀포 효돈에서 생산된 감귤을 구매하여 과피를 벗기고 거즈를 이용하여 착즙하여(18,23) 2차 발효기질로서 이용하였다.

2.2. 야생균주 분리 및 동정

2.2.1. 효모의 분리

본 실험에 사용된 야생균주 중 효모는 감귤과 감귤미숙과를 착즙하여 밀폐용기에서 5일간 상온에서 보관 후 가스생성이 확인되었을 때 YM agar(Difco Co., France)배지에(21) 시료 1백금을 streaking하여 형성된 colony 중 10균주를 단독분리하였고 알코올 발효에 의한 에탄올 함량 측정을 통해 발효력이 가장 뛰어난 균주(YG-03)를 선별하였다(22).

2.2.2. 초산균의 분리

초산발효에 이용된 초산균은 당밀로 보당 된 조릿대열수추출물(10° brix)을 야생효모(YG-03)로 1차 알코올 발효시키고 이를 30℃에서 7일간 정치배양한 2차 발효액에서 분리하였으며 분리배지는 YGC agar(Yeast extract 0.5%, Glucose 3%, Calcium carbonate 1%, Agar 1.5%, ethanol 3%)를 이용하여(3) 투명한 생성이 가장 큰 산 생성균을 선별하였고(2) AD-08로 명명하였다.

2.2.3. 분리균의 동정

DNA 염기서열 결정은 바이오애그진액텍(Jeju, Korea)의 sequencing service를 의뢰하여 분석하였으며 효모의 primer로는 ITS4를 사용하였고 초산균은 27F와 1522R을 사용하였다. 염기서열 결과에 대한 서열간의 유사성을 알아보는 상동성 검색은 National Center for Biotechnology Information (NCBI)에서 운영하는 BLAST를 이용하였다(2,22).

(A)



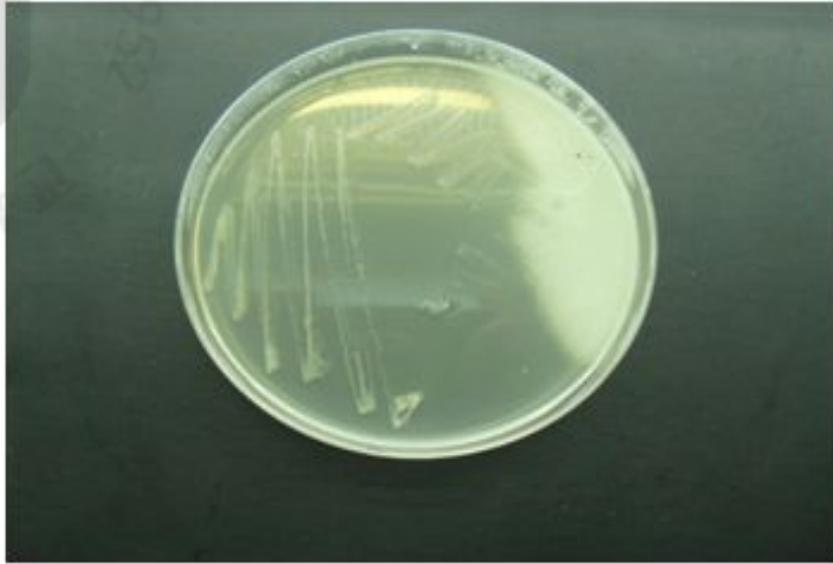
(B)



Fig.1. Morphologies of alcohol producing yeast isolated from immature citrus.

(A) Morphology of yeast isolated form YM agar plate (B) Morphology of yeast using a light microscope (Magnification: $\times 400$)

(A)



(B)



Fig.2. Morphologies of acetic acid bacteria(AAB) isolated from *Sasa quelpaertensis* (A) Morphology of AAB isolated form YPM agar plate (B) Morphology of AAB using a light microscope (Magnification: $\times 400$)

2.3. 표준균주 분양

야생에서 분리한 균주들과의 발효특성을 표준균주와 비교하기 위하여 효모 두 균주, 초산균 두 균주를(Table 1) 한국생명공학연구원 미생물자원센터(KCTC/BRC)에서 분양받았다. 효모는 YM broth에서 28℃ 1일 정치배양 하였고, 초산균은 YPM broth(yeast extract 0.5%, peptone 0.3%, mannitol 2.5%)에서 30℃ 200rpm 진탕배양 하여 실험에 이용하였다 (1,6,9,15).

Table 1. Type strains used in this study

Classification	Strain
Yeast	<i>Saccharomyces ellipsoideus</i> KCTC 7243
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> KCTC 7296
Acetic acid bacteria	<i>Acetobacter aceti</i> KCTC 1010
	<i>Acetobacter pasteurianus</i> KCTC 12289

2.4. 알코올 발효

2.4.1. 제주조릿대 열수추출물 제조

분쇄한 제주조릿대 잎 50g에 증류수 1000 mL를 혼합하였고 hot plate(Corning co., USA)를 이용하여 3시간 환류추출 하였으며(20) 각 효모의 당농도에 따른 알코올 발효력 측정을 위해 10, 15 및 20° Brix 기준으로 정백당(Beksul, Korea)을 이용하여 보당하였다.

2.4.2. 효모의 생균수 측정

각 균주 배양액의 생균수 차이에 따른 실험오차를 줄이기 위해서 십진 희석법에 따른 실험방법을 통해 YM agar 배지를 이용하여 생균수를 측정하였다.

2.4.3. 추출물의 알코올발효

보당된 각 제주조릿대 열수추출물에 감귤미숙과에서 분리한 YG-03, 한국생명공학연구원 미생물자원센터에서 분양받은 *S.ellipsoideus* KCTC 7243과 *S. cerevisiae* KCTC 7296 배양액을 3.0×10^7 cfu/mL 수준으로 희석하였고 열수추출물 기준으로 1%(v/v) 접종하여 28℃에서 혐기적으로 정치발효를 2주간 진행하면서(1,23) 에탄올 함량, 당농도, pH의 변화를 2일 간격으로 측정하였다.

2.4.4. 에탄올 함량, 당도 및 PH 측정

에탄올 함량은 비중법을 이용하여 측정하였다. 채취한 시료액 100mL를 증류하여 약 70mL의 증류액이 모아지면 증류를 멈추고, 증류수를 더하여 100mL을 채웠으며 냉장고에 보관 후 증류액 온도가 15℃까지 떨어지면 주정계(동명계기제작소, Korea)로 에탄올 함량을 측정하였다.(1,7,9) 측정값은 Gay Lussac 주정환산표를 이용하여 보정하였다. 당농도는 당도계(ATAGO, PR-32, Japan)를 이용하여 측정하였고 pH는 pH meter (METTLER TOLEDO 320, USA)를 이용하여 측정하였다.

2.5. 초산 발효

2.5.1. 초산균의 생균수 측정

Shaking incubator(Han baek ST, HB-101M, Korea)에서 30℃, 48시간 배양시킨 AD-10, *Acetobacter aceti* KCTC 1010, *Acetobacter pasteurianus* KCTC 12289의 생균수를 측정하기 위해 YPM agar 배지에 도말하고 2~3일간 30℃에서 배양한 후 형성된 colony 수를 확인하였다(1). 초산균수는 colony수에 희석배수를 곱하고 cfu/mL 단위로 표시하였다.

2.5.2. Paper disc법을 이용한 에탄올 내성 시험

YPM broth에서 배양된 초산균 3종을 이용하여 칼슘이 첨가된 DYC agar(dextrose 1.5%, yeast extract 0.5%, calcium carbonate 1%, agar 1.5%)에 알코올을 각각 3, 5 및 7% 첨가하였고 발효액 0.1mL를 직경 8.0 mm의 멸균한 paper disc(ADVENTEC 8mm, Japan)에 접종하였다. 그리고 30℃에서 5일간 배양한 후 disc 주변에 형성된 clear zone의 폭을 1일 간격으로 측정하였다(2).

2.5.3. 에탄올 농도에 따른 초산발효

3시간 동안 환류추출하여 얻은 제주조릿대 열수추출물에 에탄올을 3, 5 및 7% 첨가하였다. 그다음 shaking incubator에서 30℃, 48시간 배양시킨 AD-10, *A. aceti* KCTC 1010, *A. pasteurianus* KCTC 12289 배양액을 생리식염수를 이용하여 1.5×10^8 cfu/mL 수준으로 희석하였다. 접종량은 추출액 대비 5%(v/v)를 접종하여 200rpm, 30℃에서 7일간 진탕배양하면서 1일 간격으로 시료를 채취하여 변화된 pH 및 총산도를 측정하였다(4,5).

2.5.4. 제주감귤을 2차 발효기질로 활용한 초산발효

제주조릿대 열수추출물에 착즙하고 멸균한(121℃, 15분) 제주감귤 착즙액을 10, 20, 30% (v/v) 비율로 첨가하여 첨가량에 따른 초산 생성력을 알아보고자 하였으며, 5% 에탄올을 첨가한 제주조릿대 열수추출액에 3종의 초산균을 5%(v/v) 비율로 접종하여 실험을 진행하였다. 초산발효는 shaking incubator에서 200rpm, 30℃, 7일간 진행하였고 1일 간격으로 시료를 채취하여 pH 및 총산도를 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 분리균주의 동정 결과

3.1.1. 효모의 동정

분리효모의 28s rRNA의 염기서열을 분석한 결과 감귤미숙과 발효액에서 분리한 YG-03은 Table 2와 같이 partial sequence를 통해 749개의 염기쌍을 확인하였고, *Saccharomyces cerevisiae*와 99.86%의 유사성을 보여 *S. cerevisiae* YG-03으로 명명하였다(6).

Table 2. 28S rRNA partial sequence of isolated yeast YG-03

```
GATTTGAGGTCAACTTTAAGAACATTGTTGCGCTAGACGCTCTCTTCTTATCGATAACG
TTCCAATACGCTCAGTATAAAAAAGATTAGCCGCAGTTGGTAAAACCTAAAACGACCGT
ACTTGCATTATACCTCAAGCACGCAGAGAAACCTCTCTTTGGAAAAAAAACATCCAAT
GAAAAGGCCAGCAATTTCAAGTTAACTCCAAAGAGTATCACTCACTACCAAACAGAATG
TTTGAGAAGGAAATGACGCTCAAACAGGCATGCCCCCTGGAATACCAAGGGGCGCAA
TGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACGGAATTCTGCAATTCACATTACGTATCGCATT
TCGCTGCGTTCTTCATCGATGCGAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTTAATAT
TTTAAAATTTCCAGTTACGAAAATTCTTGTTTTTGACAAAATTTAATGAATAAATAAAATT
GTTTGTGTTTGTACCTCTGGGCCCGATTGCTCGAATGCCCAAAGAAAAAGTTGCAA
AGATATGAAAACCTCCACAGTGTGTTGTATTGAAACGGTTTTAATTGTCTATAACAAAAG
CACAGAAATCTCTCACCGTTTGAATAGCAAGAAAGAACTTACAAGCCTAGCAAGAC
CGCGCACTTAAGCGCAGGCCCGGCTGGACTCTCCATCTCTTGTCTTCTTGCCAGTA
AAAGCTCTCATGCTCTTGCCAAAACAAAAAATCCATTTTC
```

3.1.2. 초산균의 동정

당밀로 보당된 제주조릿대 알코올 발효액에서 분리한 AD-08의 16S rRNA의 염기 서열을 분석한 결과 **Table 3**과 같이 partial sequence을 통해 643개의 염기쌍을 확인하였고, *Gluconobacter albidus*와 98.75% 일치하는 결과를 나타냄으로서 *G. albidus* AD-08로 명명하였다.(16)

Table 3. 16S rRNA partial sequence of isolated bacteria AD-08

```
ATGCAAGTCGCACGAAGGTTTTCGGCCTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTAGG
GATCTATCCACGGGTGGGGGACAACCTTCGGGAACTGGAGCTAATACCGCATGATAC
CTGAGGGTCAAAGGCGCAAGTTCGCCTGTGGAGGAACCTGCGTTCGATTAGCTAGTTG
GTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGATGATCGATAGCTGGTTTGAGAGGATGATCAGC
CACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATAT
TGGACAATGGGGGAAACCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGG
ATTGTAAAGCACTTTCGACGGGGACGATGATGACGGTACCCGTAGAAGAAGCCCCGG
CTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGCTCGGAATGA
CTGGGCGTAAAGGGCGCGTAGGCGGTTTGGACAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCT
TAACCTGGGAACTGCATTTGATACGTCCAGACTAGAGTTCGAGAGAGGGTTGTGGAAT
TCCCA
```

3.2. 에탄올 생성력 비교

3.2.1. 효모의 생균수 측정

분리 효모와 표준균주간의 에탄올 발효력을 비교하기에 앞서 각 효모 배양액의 생균수를 YM agar을 이용하여 십진희석법을 통해 측정하였고, 그 결과는 **Table 4**와 같다. 이 결과를 토대로 3종 효모를 각각 3.0×10^7 cfu/mL 수준으로 조정하기 위해 생리식염수를 이용하여 희석하고 보당된 제주조릿대 열수추출물에 1% (v/v) 비율로 접종하였다.

Table 4. Viable cell count of three yeast cultures

Strain	Viable cell count (cfu/mL)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> YG-03	4.2×10^7
<i>Saccharomyces ellipsoideus</i> KCTC 7243	4.7×10^7
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> KCTC 7296	6.0×10^7

3.2.2. 효모 3종을 이용한 알코올 발효

감귤 미숙과에서 분리한 *S.cerevisiae* YG-03과 표준균주인 *S.ellipsoideus* KCTC 7243 및 *S.serevisiae* KCTC 7296 배양액을 1%(v/v) 비율로 접종하고 14일 동안 2일 간격으로 당도(° Brix), 에탄올함량(%), pH의 변화를 측정하였으며 각 효모간의 당 농도에 따른 에탄올 생성력을 비교하기 위해서 10, 15, 20° Brix로 보당 농도를 달리하여 실험을 진행하였다.

3.2.2.1. 10° Brix 제주조릿대 열수추출물의 알코올 발효

3종의 효모를 이용하여 제주조릿대 열수추출물(10° Brix)을 산소가 통하지 않는 28°C 혐기조건에 14일간 정지 배양하였고, 2일 간격으로 당농도(° Brix), 에탄올함량(%) 및 pH 변화를 측정한 결과는 Table 5 및 Fig 3과 같다.

감귤 미숙과에서 분리한 *S.cerevisiae* YG-03은 초기 당도 10° Brix에서 발효 8일 후 3.3° Brix로 감소하였고 알코올 함량은 0%에서 5.4%로 증가하였다. 이와 비슷하게 분양받은 *S.cerevisiae* KCTC 7296은 8일째 에탄올 함량이 5.2%까지 증가하였으나 *S.ellipsoideus* KCTC 7243는 발효 6일째부터 에탄올 함량이 4.2%로 변화가 없으면서 3종의 효모중 가장 낮은 발효 효율을 나타내었다. 또한 낮은 발효 효율을 나타낸 만큼 당을 이용하는 이용률도 낮은 결과를 나타내었다. pH는 *S.cerevisiae* YG-03이 발효초기 5.22에서 발효 14일 후 3.43까지 감소하였는데 이는 효모가 에탄올 외에도 유기산을 소량 생산하기 때문인 것으로 생각된다. *S.ellipsoideus* KCTC 7243와 *S.serevisiae* KCTC 7296은 각각 발효 14일째 pH가 3.35와 3.05로 감소하면서 *S.cerevisiae* YG-03 보다 낮은 pH를 나타내었다. 이러한 낮은 pH는 2차 초산발효에 있어서 발효초기 초산균의 생육을 억제하는 요인이 될 수 있기 때문에 2차 초산 발효를 위한 알코올 발효액 제조를 위해

서 알코올 발효액의 pH 감소효과가 낮은 균주를 선택하는 것이 바람직하다고 생각된다.

3.2.2.2. 15 ° Brix 제주조릿대 열수추출물의 알코올 발효

15 ° Brix로 보당된 제주조릿대 열수추출물에 3종의 효모를 1%(v/v)접종하여 14일간 알코올 발효시킨 발효액의 당농도(° Brix), 에탄올 함량(%) 및 pH의 변화를 Table 6 와 Fig.4에 나타내었다. 효모 3종의 당의 이용률은 발효 10일 쯤부터 큰 변화를 보이지 않았으며 당을 이용하지 못함에 따라 에탄올 생성률 또한 발효 10일 쯤부터 큰 변화를 나타내지 못하였다. 감귤 미숙과에서 분리한 *S.cerevisiae* YG-03의 에탄올 함량은 발효 10일째 8.2%로 최대치를 보였으며 초기 당농도가 10 ° Brix였던 알코올 발효액과 비교하여 발효초기 당농도가 높음에 따라 에탄올 생성량 또한 커지는 경향을 보였다. 그리고 첨가된 당의 함유량이 높아짐에 따라 효모가 이용하지 못하고 남아있는 당의 함량 또한 많아지는 결과를 보였다. 분양받은 *S.ellipsoideus* KCTC 7243의 에탄올 함량은 발효 12일째 최대치를 나타냈고 7.2%의 함량을 나타내었으며 6.3° Brix의 잔당을 함유함으로써 *S.cerevisiae* YG-03보다 발효 효율이 떨어지는 것으로 나타났다. *S.cerevisiae* KCTC 7296을 접종하여 발효시킨 알코올 발효액에서는 발효 12일째 에탄올 함량이 최대가 되었으며 6.2%의 함량을 나타내었는데 이는 3종의 효모 중에서 가장 낮은 수치이다. 이 결과는 앞서 보여준 초기 당농도가 10 ° Brix였을 때와는 상반된 결과를 보여주고 있는데 이는 *S.ellipsoideus* KCTC 7243이 고농도의 당에서는 높은 발효 효율을 보이고 있으며 *S.cerevisiae* KCTC 7296은 고농도의 당에서 낮은 발효 효율을 나타낸다는 것을 보여주고 있다. pH는 발효 초기와 비교하여 효모가 대수 증식하는 시기인 2일째 급격히 낮아지고 그 이후부터 조금씩 낮아지는 경향을 보였으며 초기 당농도가 10 ° Brix였을 때와 마찬가지로 *S.cerevisiae* YG-03의 pH 저하 정도가 가장 낮았으며 *S.elipsoideus* KCTC 7243과 *S.cerevisiae* KCTC 7296은 각각 3.18 및 3.17로 비슷한 pH를 보였다. 초기 당농도가 10° Brix였을 때와 마찬가지로 15° Brix 일때도 알코올 발효 효율은 *S.cerevisiae* YG-03이 가장 높은 것으로 나타났고 pH 저하율 또한 가장 낮음

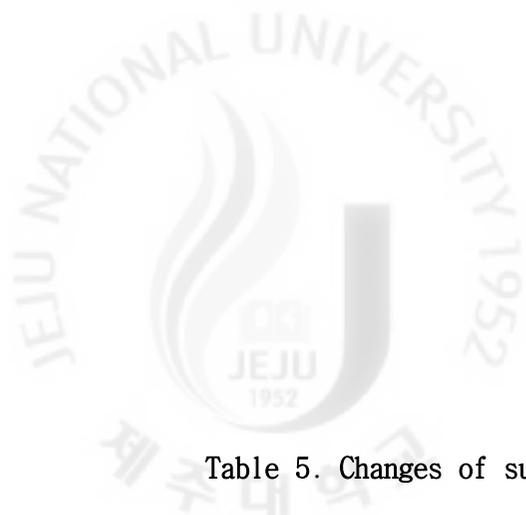
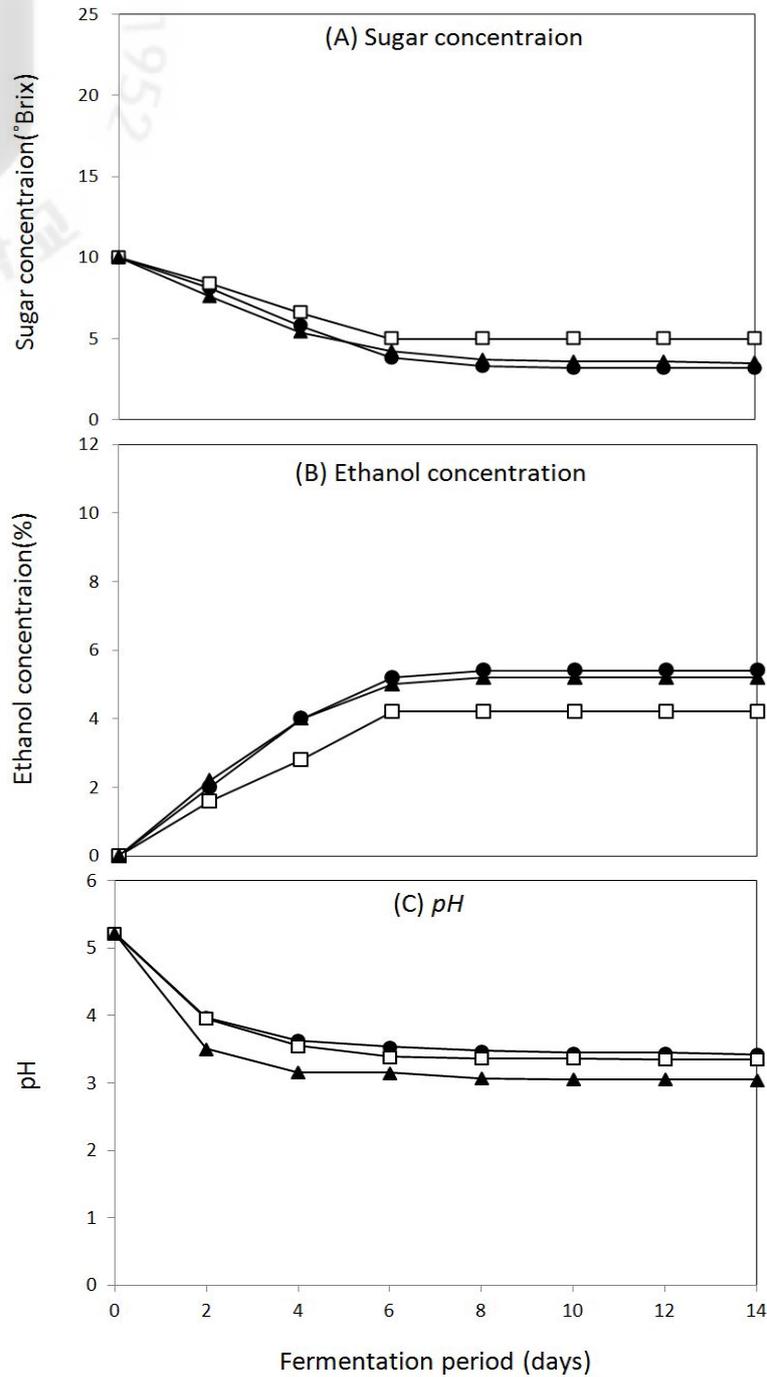


Table 5. Changes of sugar concentration, ethanol concentration and pH during alcohol fermentation in hot water extract of *Sasa quepaertensis* (10 ° Brix)

Strain		Fermentation period (days)							
		0	2	4	6	8	10	12	14
<i>S.cerevisiae</i> YG-03	Sugar(°Brix)	10.00	8.10	5.80	3.80	3.30	3.20	3.20	3.20
	Ethanol(%)	0.00	2.00	4.00	5.20	5.40	5.40	5.40	5.40
	pH	5.22	3.97	3.63	3.54	3.48	3.45	3.45	3.43
<i>S.ellipsoideus</i> 7243	Sugar(°Brix)	10.00	8.40	6.60	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
	Ethanol(%)	0.00	1.60	2.80	4.20	4.20	4.20	4.20	4.20
	pH	5.22	3.96	3.55	3.39	3.37	3.37	3.35	3.35
<i>S.cerevisiae</i> 7296	Sugar(°Brix)	10.00	7.60	5.40	4.20	3.70	3.60	3.60	3.50
	Ethanol(%)	0.00	2.20	4.00	5.00	5.20	5.20	5.20	5.20
	pH	5.22	3.51	3.16	3.15	3.07	3.06	3.06	3.05



-●- *S. cerevisiae* YG-03 , -□- *S. ellipsoideus* 7243, -▲- *S. cerevisiae* 7296

Fig.3. Changes of sugar concentration, ethanol content and pH during alcohol fermentation in hot water extract of *Sasa queipaertensis* (10 ° Brix).

(A) Sugar concentration, (B) ethanol concentration, (c) pH

로서 2차 초산발효를 위한 알코올 발효액 제조를 위해 적합하다고 판단하였다.

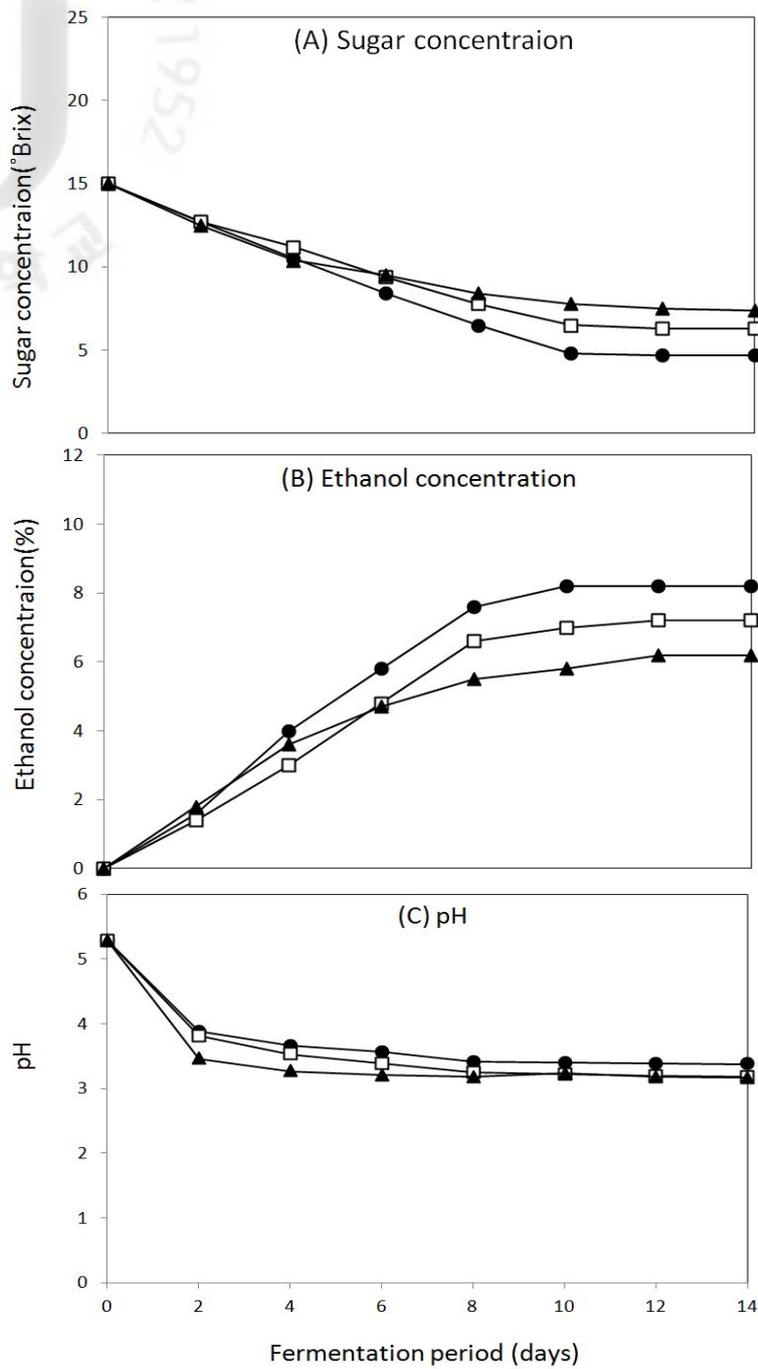
3.2.2.3. 20 ° Brix 제주조릿대 열수추출물의 알코올 발효

20 ° Brix의 당도에서 제주조릿대 열수추출물에 3종의 효모를 접종하여 발효가 진행되는 동안에 당농도(° Brix), 에탄올 함량(%) 및 pH를 측정된 결과를 Table 7과 Fig.5에 나타내었다. 20 ° Brix 당농도에서는 *S.ellipsoideus* KCTC 7243이 발효 14일째 10%의 알코올을 함유함으로써 가장 높은 에탄올 생성력을 보였으며, 그 다음으로 *S.cerevisiae* YG-03이 발효 14일째 9.6%의 에탄올을 생성하였고, *S.cerevisiae* KCTC 7296은 가장 낮은 7.2%의 에탄올을 생성하였다. 이는 초기 당농도가 15 ° Brix 였을 때와 마찬가지로 고농도의 당도일수록 *S.ellipsoideus* KCTC 7243의 알코올 발효 효율이 뛰어났으며 *S.cerevisiae* KCTC 7296의 발효 효율이 떨어지는 결과를 보였다. 반면에 *S.cerevisiae* YG-03은 *S.ellipsoideus* KCTC 7243과 비교하여 조금 낮은 에탄올 생성력을 보였으나 큰 차이를 나타내지 않았고 pH 변화율이 가장 낮았기 때문에 2차 초산발효를 위한 발효액의 제조에 있어서의 활용가능성이 크다고 생각한다. 또한 발효 초기 고농도의 당을 함유할수록 발효가 종료되는 시간이 길어지는 경향을 보였고 효모가 이용하지 못하고 남아있는 당의 함량이 많아지는 결과를 보였다. 결과적으로 남아있는 당의 함량이 적을수록 에탄올 함량이 높았으며, 당의 농도에 따라 효모의 알코올 발효 효율이 달라지는 것을 확인할 수 있었다. *S.cerevisiae* YG-03의 경우는 10~20 ° Brix 당농도 사이에서 큰 영향을 받지 않아 일정한 발효 효율을 나타냈으며 분양받은 *S.ellipsoideus* KCTC 7243은 낮은 당농도에서는 낮은 발효 효율을 나타냈으나 당의 농도가 높아짐에 따라 발효효율이 높아지는 경향을 보였다. 반면에 *S.cerevisiae* KCTC 7296은 낮은 당농도에서는 높은 발효 효율을 보였지만 높은 당농도에서는 알코올 발효 효율이 가장 떨어지는 결과를 보임으로서 각 균주마다 최적의 알코올 발효 효율을 나타내는 당농도가 존재함을 제주조릿대 열수추출물의 2주간의 알코올 발효를 통해 확인할 수 있었다.



Table 6. Changes of sugar concentration, ethanol concentration and pH during alcohol fermentation in hot water extract of *Sasa quelpaertensis* (15° brix)

Strain		Fermentation period (days)							
		0	2	4	6	8	10	12	14
<i>S.cerevisiae</i> YG-03	Sugar(°Brix)	15.00	12.70	10.50	8.40	6.50	4.80	4.70	4.70
	Ethanol(%)	0.00	1.60	4.00	5.80	7.60	8.20	8.20	8.20
	pH	5.28	3.88	3.66	3.57	3.41	3.40	3.39	3.38
<i>S.ellipsoideus</i> 7243	Sugar(°Brix)	15.00	12.70	11.20	9.40	7.80	6.50	6.30	6.30
	Ethanol(%)	0.00	1.40	3.00	4.80	6.60	7.00	7.20	7.20
	pH	5.28	3.81	3.53	3.39	3.25	3.22	3.19	3.18
<i>S.cerevisiae</i> 7296	Sugar(°Brix)	15.00	12.50	10.40	9.50	8.40	7.80	7.50	7.40
	Ethanol(%)	0.00	1.80	3.60	4.70	5.50	5.80	6.20	6.20
	pH	5.28	3.46	3.27	3.21	3.18	3.23	3.18	3.17



●- *S. cerevisiae* YG-03 , □- *S. ellipsoideus* 7243, ▲- *S. cerevisiae* 7296

Fig.4. Changes of sugar concentration, ethanol content and pH during alcohol fermentation in hot water extract of *Sasa quelpaertensis* (15 ° Brix).

(A) Sugar concentration, (B) ethanol concentration, (c) pH

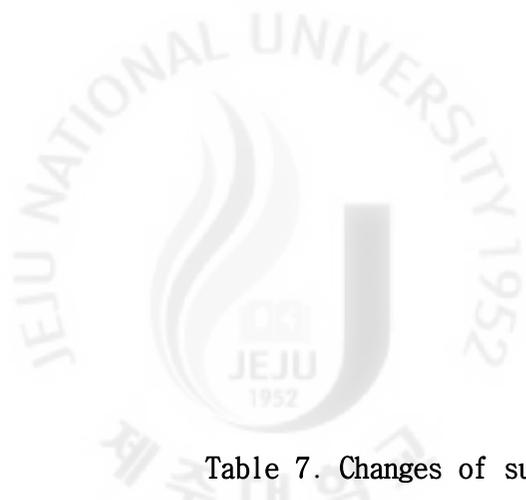
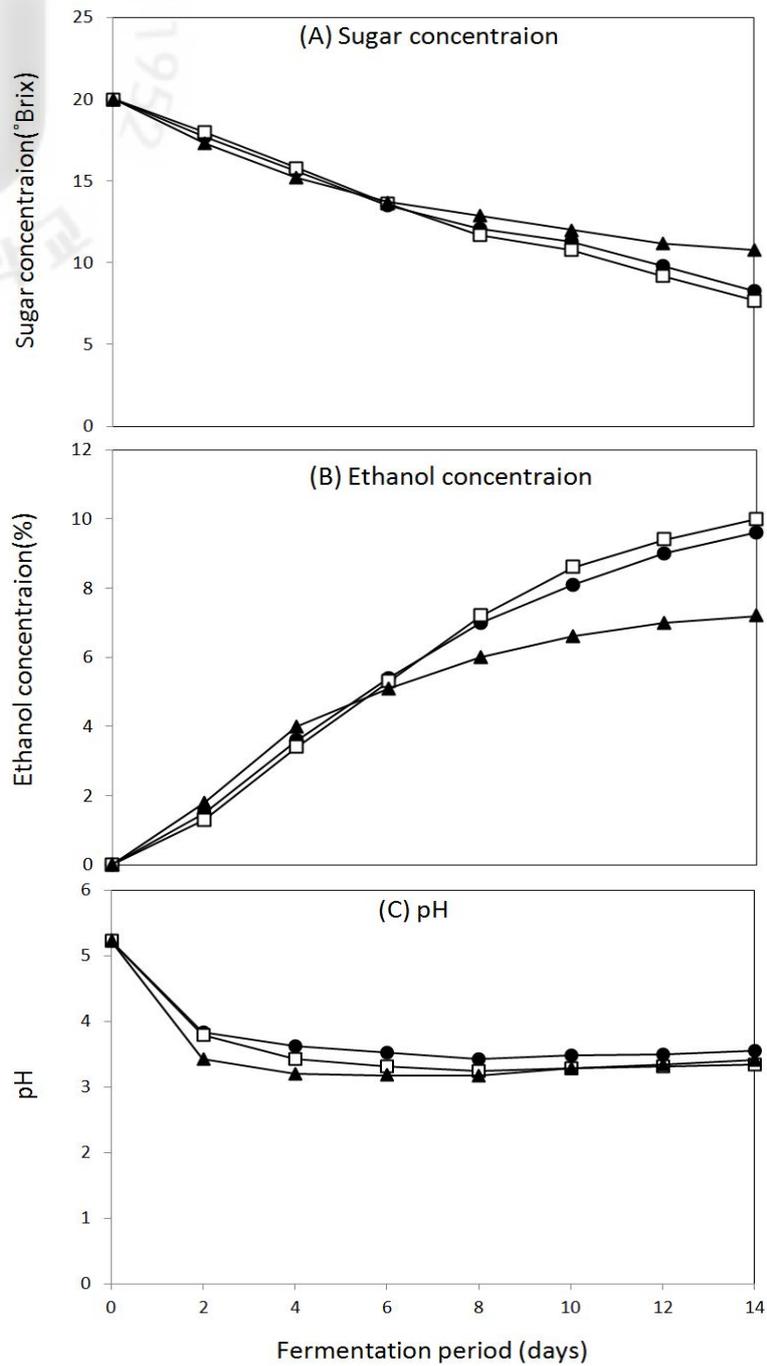


Table 7. Changes of sugar concentration, ethanol concentration and pH during alcohol fermentation in hot water extract of *Sasa quelpaertensis* (20 ° Brix)

Strain		Fermentation period (days)							
		0	2	4	6	8	10	12	14
<i>S.cerevisiae</i> YG-03	Sugar(°Brix)	20.00	17.70	15.60	13.50	12.10	11.30	9.80	8.30
	Ethanol(%)	0.00	1.50	3.60	5.40	7.00	8.10	9.00	9.60
	pH	5.23	3.84	3.62	3.53	3.43	3.48	3.55	3.55
<i>S.ellipsoideus</i> 7243	Sugar(°Brix)	20.00	18.00	15.80	13.60	11.70	10.80	9.20	7.70
	Ethanol(%)	0.00	1.30	3.40	5.30	7.20	8.60	9.40	10.00
	pH	5.23	3.79	3.43	3.32	3.24	3.28	3.32	3.34
<i>S.cerevisiae</i> 7296	Sugar(°Brix)	20.00	17.30	15.20	13.70	12.90	12.00	11.20	10.80
	Ethanol(%)	0.00	1.80	4.00	5.10	6.00	6.60	7.00	7.20
	pH	5.23	3.43	3.20	3.18	3.17	3.29	3.34	3.41



-●- *S. cerevisiae* YG-03 , -□- *S. ellipsoideus* 7243, -▲- *S. cerevisiae* 7296

Fig.5. Changes of sugar concentration, ethanol content and pH during alcohol fermentation in hot water extract of *Sasa queipaertensis* (20 ° Brix).

(A) Sugar concentration, (B) ethanol concentration, (c) pH

3.3. 초산 생성력 비교

3.3.1. 초산균의 생균수 측정

효모의 생균수를 측정하는 방법과 마찬가지로 야생균주와 표준균주 사이의 초산 발효력을 비교하기에 앞서 각 초산균 배양액의 생균수를 YPM agar을 이용하여 10진 희석법을 통해 측정하였고, 그 결과는 **Table 8**과 같다. 이 결과를 토대로 3종의 초산균을 각각 1.5×10^8 cfu/mL 수준으로 조정하기 위하여 생리식염수를 이용하여 희석하고 초산 생성력의 비교 실험을 진행하였다.

Table 8. Vible cell count of three acetic acid bacteria cultures

Strain	Vible cell count (cfu/mL)
<i>Gluconobacter albidus</i> AD-08	3.5×10^8
<i>Actetobacter aceti</i> KCTC 1010	1.5×10^8
<i>Acetobacter pasteurianus</i> KCTC 12289	3.0×10^8

3.3.2. paper disc 법을 이용한 산 생성력 비교

칼슘이 첨가된 DYC agar 배지에 에탄올을 3, 5 및 7% 첨가하여 발효액 0.1mL를 paper disc에 주가하고 30℃에서 5일간 배양한 후 disc 주변에 형성된 clear zone의 폭을 측정하였다. 먼저 야생에서 분리한 *G.albidus* AD-08은 3%의 알코올 농도에서는 다른 두 균주보다 가장 넓은 clear zone을 형성하였으며 배양 첫째 날부터 clear zone이 형성되었고 발효 5일째 45mm 로 최대를 이루었다. 알코올 농도 5%에서는 2일째부터 clear zone이 형성되기 시작하였고 7%에서는 3일째 clear zone이 형성되는 것으로 미루어보아, 알코올농도가 높아짐에 따라 초산균의 생육이 억제되는 것으로 생각된다. 나머지 두 균주 모두 알코올 농도가 높아질수록 clear zone 생성 넓이가 좁아지는 결과를 보였지만 그 중에서 분양받은 *A.pasteurianus* KCTC 12289 는 알코올 농도 3%에서 배양 5일째 35 mm, 5%에서는 31 mm, 7%에서는 28mm로 생성된 clear zone의 차이가 크지 않음으로서 다른 두 균주와 비교하여 알코올 농도에 따른 clear zone 형성에 비교적 영향을 적게 받

Table 9. Clear zone diameter by ethanol concentration during fermentation period

Strain	Ethanol concentration (%)	Fermentation period (days)					Clear zone diameter ¹⁾²⁾
		1	2	3	4	5	
<i>G. albidus</i> AD-08	3	5	19	30	38	45	++++
	5	0	8	16	25	32	+++
	7	0	0	1	8	15	+
<i>A. aceti</i> KCTC 1010	3	0	5	13	18	24	++
	5	0	4	12	18	27	++
	7	0	0	0	5	12	+
<i>A. pasteurianus</i> KCTC 12289	3	4	16	24	29	35	+++
	5	4	14	22	27	31	+++
	7	0	9	17	24	28	++

1) Diameter of clear zone from paper disc method by dissolving calcium with produced acetic acid.

2) ++++ > 40 mm, +++ > 30~39 mm, ++ > 20~29 mm and + < 19 mm

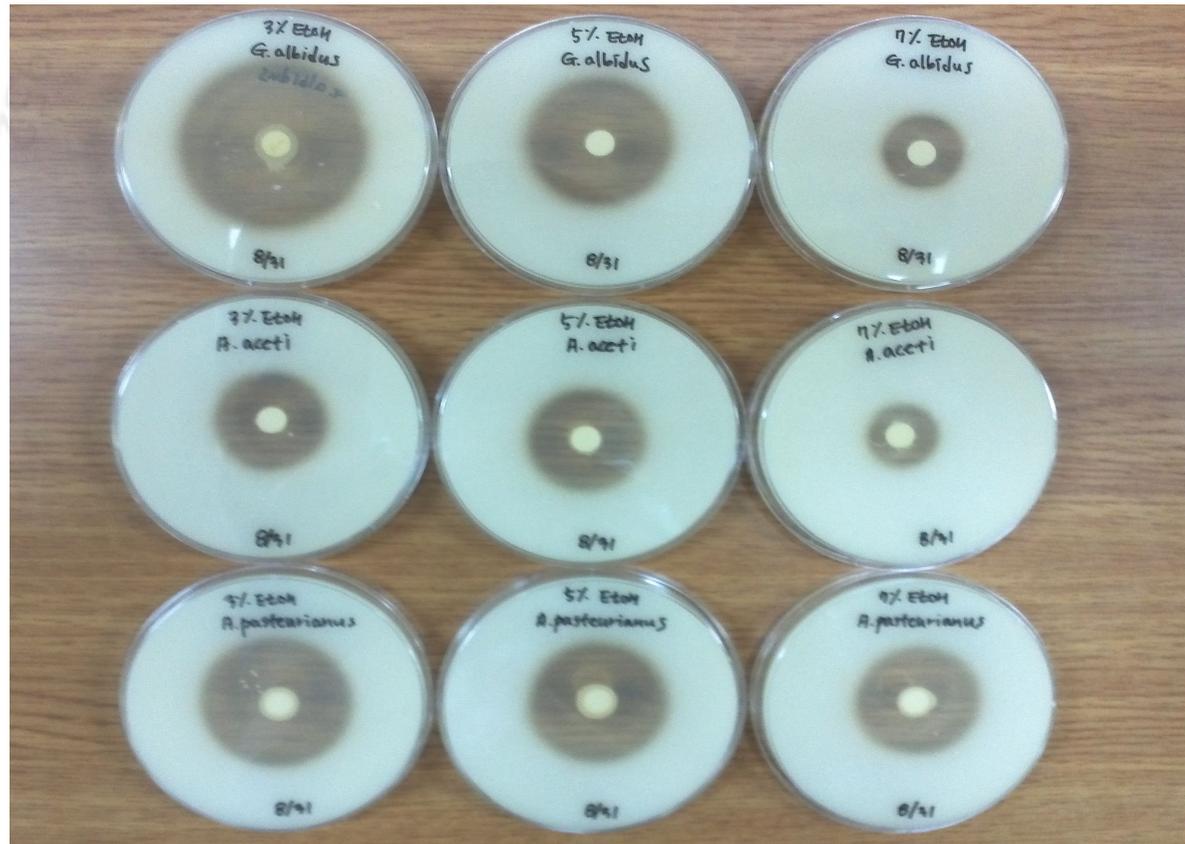


Fig.6. Clear zone formed by an isolated acetic acid bacteria and *Acetobacter* sp. Bacterial cells formed clear zone around paper disc by dissolving calcium with acetic acid produced.

는 것으로 나타났다. 3종의 초산균 중 *A.aceti* KCTC 1010 가장 낮은 초산 생성력을 보였으며, 특히 7% 에탄올 농도에서는 배양 4일째부터 clear zone이 조금씩 형성되었고 배양 5일째 12mm에 머물렀다. 이러한 paper disc 법을 통하여 간접적인 초산균의 에탄올 내성을 확인하였고 이후 3종의 초산균이 에탄올을 첨가한 제주조릿대 열수추출물에서 어떠한 초산발효 양상을 나타내는지 다음 실험을 통해 확인 하였다.

3.2.3. 에탄올 농도에 따른 초산 생성력 비교

3.2.3.1. 3% 에탄올 농도에서의 초산 발효

G.albidus AD-08, *A.aceti* KCTC 1010 및 *A.pasteurianus* KCTC 12289 초산균을 이용하여 3% 에탄올 농도에서 제주조릿대 열수추출물을 초산 발효시킨 결과는 **Table 10** 및 **Fig.7**와 같다. *G.albidus* AD-08은 발효 1일째부터 산을 생성하면서 pH가 급격히 떨어지기 시작하였으며, 발효 7일째 1.80%의 초산을 생성하였고 최종 pH는 2.91이었다. *A.ceti* KCTC 1010은 발효 2일째까지는 가장 많은 초산을 생성하였으나 3일째부터 초산의 생성력이 둔화되면서 발효 7일째 1.52%의 초산을 생성하는데 그쳤다. *A.pasteurianus* KCTC 12289는 3종의 초산균 중에 가장 낮은 초산생성력을 보였고, 발효 7일째 pH 3.41과 0.95%의 초산을 생성하였다. Paper disc 법에서 나타난 결과와 마찬가지로 3%의 알코올 농도에서는 *G.albidus* AD-08의 초산 생성력이 가장 뛰어났으나 *A.pasteurianus* KCTC 12289는 *A.aceti* KCTC 1010보다 초산 생성력이 떨어지는 결과를 보여주었다. 이는 알코올 함유량은 같으나 paper disc 법의 배지조성에서는 유리당을 함유하고 있고 제주조릿대 열수추출물은 영양성분이 부족한 환경이기 때문에 각 초산균이 생육하는데 필요한 영양 요구성이 다르다는 점에서 생기는 차이인 것으로 판단된다.

3.2.3.2. 5% 에탄올 농도에서의 초산발효

제주조릿대 열수추출물에 5%의 에탄올을 첨가하여 3종의 초산균을 통해 발효시킨 결과는 **Table 11** 및 **Fig.8** 와 같다. *G.albidus* AD-08의 경우는 발효 7일째 pH가 5.30에서 4.29로 감소하는 경향을 보였고 초산의 생성 또한 0.12%에 머물렀다.

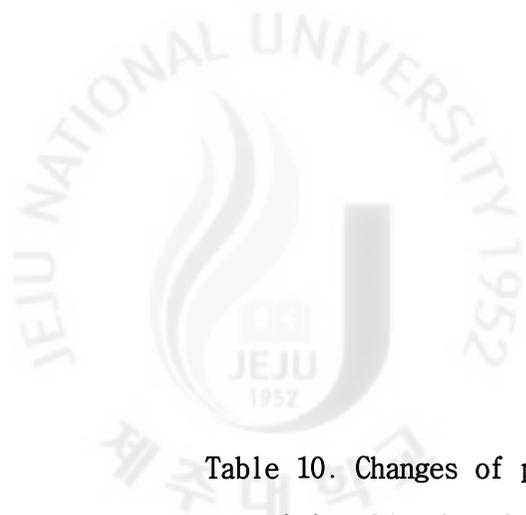
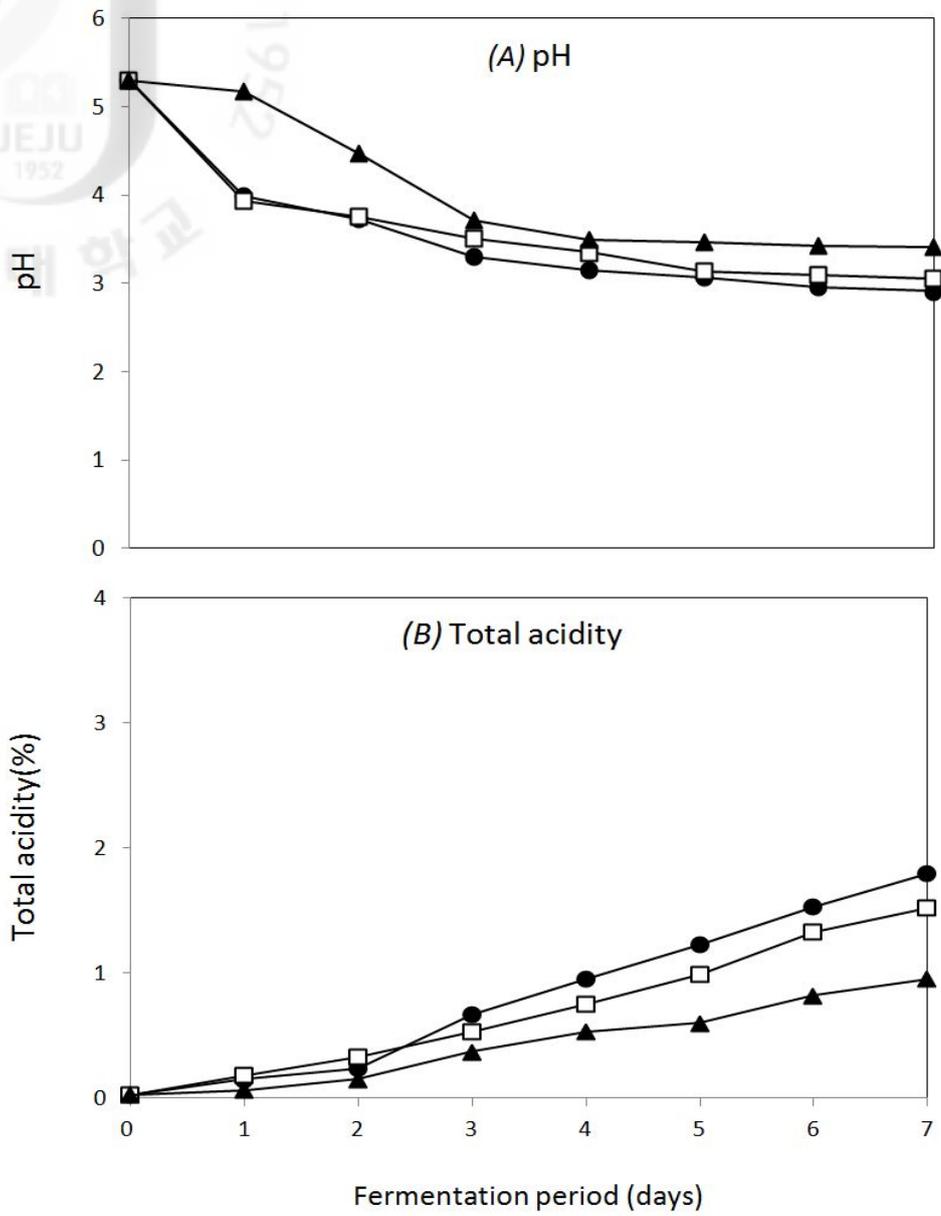


Table 10. Changes of pH and total acidity during acetic acid fermentation in hot water extract of *Sasa quelpaertensis* containing 3% ethanol

Strain		Fermentation period (days)							
		0	1	2	3	4	5	6	7
<i>G.albidus</i> AD-08	pH	5.30	3.99	3.73	3.30	3.15	3.07	2.96	2.91
	Total acidity(%)	0.03	0.15	0.24	0.67	0.95	1.23	1.53	1.80
<i>A.aceti</i> KCTC 1010	pH	5.30	3.94	3.76	3.51	3.35	3.14	3.09	3.05
	Total acidity(%)	0.03	0.18	0.33	0.53	0.75	0.99	1.33	1.52
<i>A.pasteurianus</i> KCTC 12289	pH	5.30	5.17	4.47	3.71	3.50	3.47	3.43	3.41
	Total acidity(%)	0.03	0.06	0.15	0.37	0.53	0.60	0.82	0.95



●- *G. albidus* AD-08 , □- *A. aceti* 1010, ▲- *A. pasteurianus* 12289

Fig.7. Changes of pH and total acidity during acetic acid fermentation in hot water extract of *Sasa quepaertensis* containing 3% ethanol. (A)pH, (B)Total acidity

A. aceti KCTC 1010은 발효 7일째 pH가 3.55까지 떨어졌으며 0.53%의 초산을 생성하며 *G. albidus* AD-08보다 좀더 효율적인 초산 생성력을 보여주었다.

A. pasteurianus KCTC 12289의 경우는 pH가 3.36 까지 떨어졌으며 초산 함량이 0.75%를 나타내어 5%의 에탄올 농도에서는 가장 효율적인 초산생성력을 보여주었다. 이렇듯 3%의 에탄올 농도에서 발효시킨 발효액보다 저조한 초산 생성력을 보인 이유는 부족한 영양성분과 더불어 에탄올 농도가 높아짐에 따라 초산균의 생육이 억제됨으로서 일어난 결과로 판단된다. 하지만 적은 초산을 생성하기는 하였으나 에탄올 농도가 높아짐에 따라 *A. pasteurianus* KCTC 12289의 초산 생성력이 뛰어나다는 paper disc 법의 실험결과와 마찬가지로 제주조릿대 열수추출물에서도 같은 결과를 얻을 수 있었다.

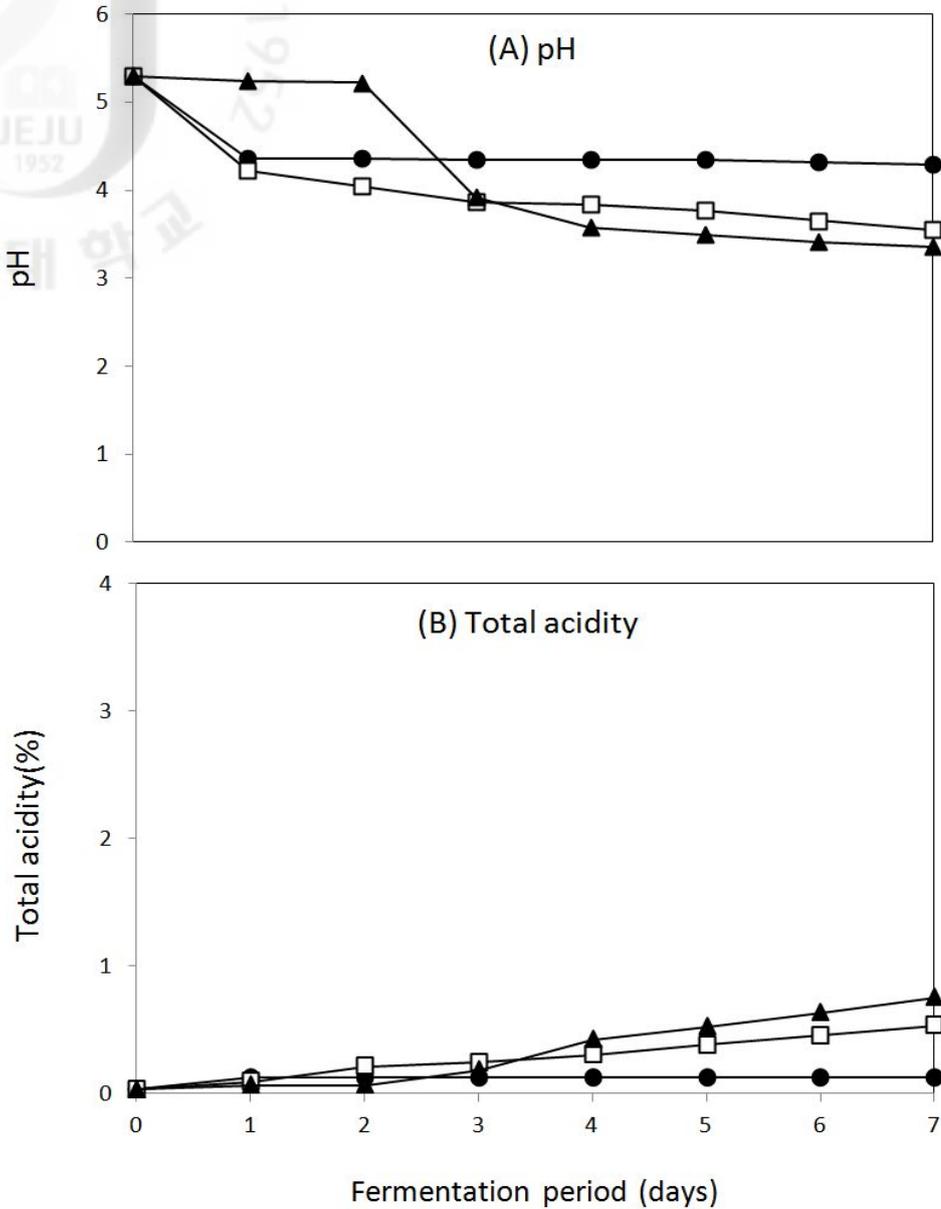
3.2.3.3. 7% 에탄올 농도에서의 초산 발효

가장 고농도의 알코올을 함유한 제주조릿대 열수추출물의 초산발효 실험결과는 Table 12 및 Fig.9과 같다. 결과적으로 3% 와 5%의 에탄올 농도에서 보다 적은 초산을 생성하였는데 *G. albidus* AD-08은 발효 7일째 pH가 4.31로 떨어지는데 그쳤고 이때의 초산 함량은 0.12%이었다. *A. aceti* KCTC 1010도 마찬가지로 pH가 4.59로 떨어지는데 그쳤으며 이때의 초산 함량은 미약했다. 하지만 *A. pasteurianus* KCTC 12289는 다른 두 초산균보다 나은 초산 생성력을 보여주었는데 발효 4일 까지는 다른 균주들과 마찬가지로 비슷한 발효양상을 보이다가 발효 5일째 들어서면서 pH가 3.95로 떨어지기 시작하고, 발효7일 째에는 pH가 3.44 까지 떨어졌으며, 이때의 초산함량은 0.59%였다. 이는 5%의 에탄올을 함유한 제주조릿대 열수추출액의 초산발효 실험과 비슷한 양상을 보여주며 5% 이상의 고농도 알코올에서는 *A. pasteurianus* KCTC 12289 가 좀 더 나은 초산 생성력을 보여주는 것으로 나타났다. 하지만 7일의 짧은 발효 기간을 통해 그 이상의 발효 시간에 있어서 같은 실험결과를 나타낸다고 확신할 수 없으며 이를 확인하기 위해서 이후 장기간에 걸친 초산발효 실험을 통해 재확인해볼 필요가 있다고 판단된다.



Table 11. Changes of pH and total acidity during acetic acid fermentation in hot water extract of *Sasa quepaertensis* containing 5% ethanol

Strain		Fermentation period (days)							
		0	1	2	3	4	5	6	7
<i>G.albidus</i> AD-08	pH	5.30	4.36	4.36	4.35	4.35	4.35	4.32	4.29
	Total acidity(%)	0.03	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12
<i>A.aceti</i> KCTC 1010	pH	5.30	4.22	4.04	3.86	3.84	3.77	3.65	3.55
	Total acidity(%)	0.03	0.09	0.21	0.24	0.30	0.38	0.45	0.53
<i>A.pasteurianus</i> KCTC 12289	pH	5.30	5.24	5.22	3.92	3.58	3.49	3.41	3.36
	Total acidity(%)	0.03	0.06	0.06	0.18	0.42	0.52	0.63	0.75



-●- *G. albidus* AD-08 , -□- *A. aceti* 1010, -▲- *A. pasteurianus* 12289

Fig.8. Changes of pH and total acidity during acetic acid fermentation in hot water extract of *Sasa queipaertensis* containing 5% ethanol. (A)pH, (B)Total acidity

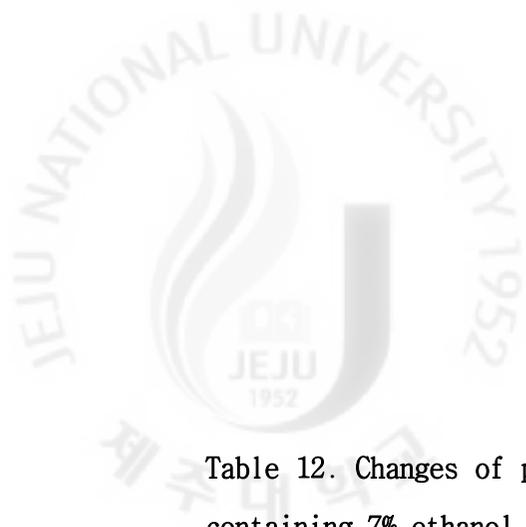
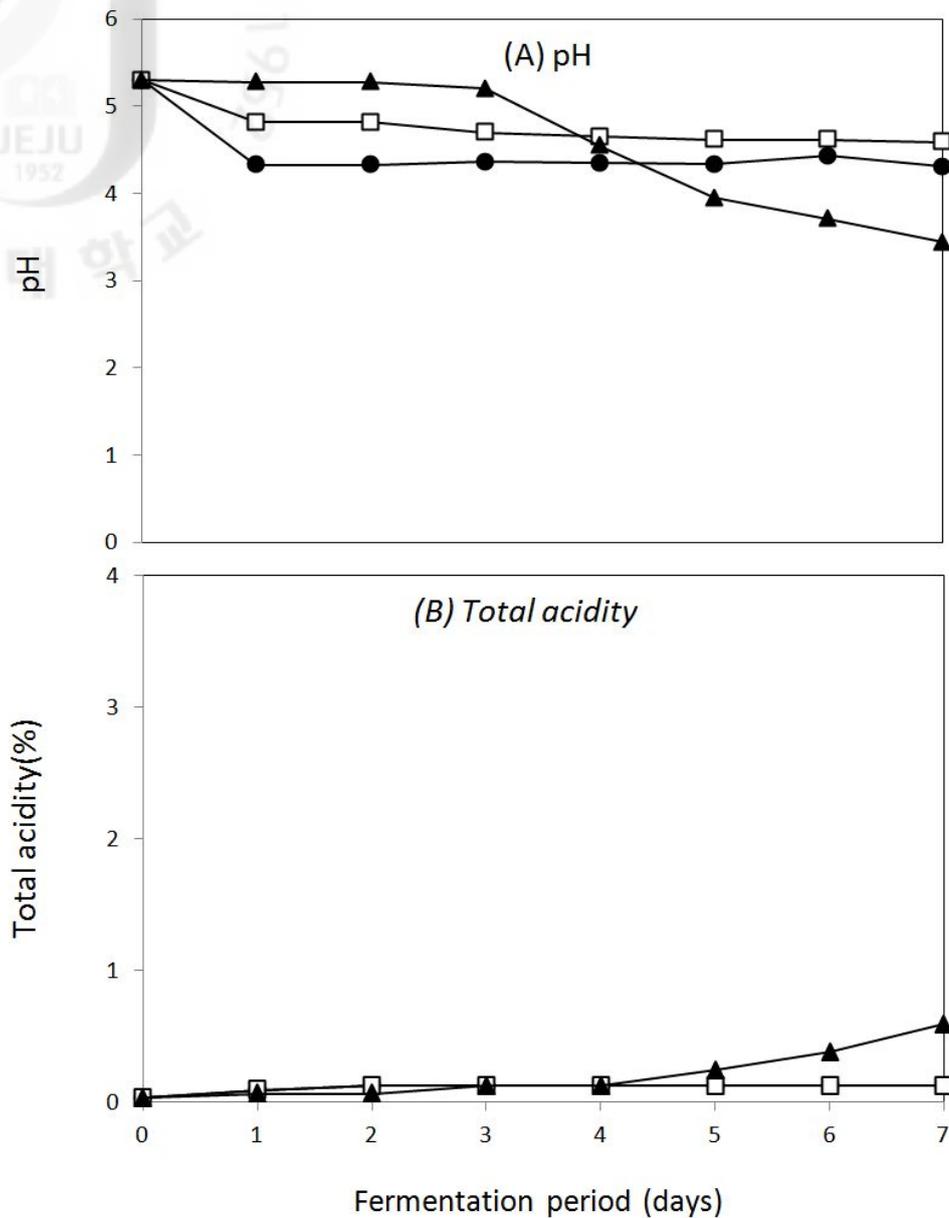


Table 12. Changes of pH and total acidity during acetic acid fermentation in hot water extract of *Sasa quelpaertensis* containing 7% ethanol

Strain		Fermentation period (days)							
		0	1	2	3	4	5	6	7
<i>G.albidus</i> AD-08	pH	5.30	4.33	4.33	4.36	4.35	4.34	4.43	4.31
	Total acidity(%)	0.03	0.09	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12
<i>A.aceti</i> KCTC 1010	pH	5.30	4.82	4.82	4.70	4.65	4.62	4.62	4.59
	Total acidity(%)	0.03	0.09	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12
<i>A.pasteurianus</i> KCTC 12289	pH	5.30	5.28	5.28	5.20	4.55	3.95	3.71	3.44
	Total acidity(%)	0.03	0.06	0.06	0.12	0.12	0.24	0.38	0.59



-●- *G.albidus* AD-08 , -□- *A.aceti* 1010, -▲- *A.pasteurianus* 12289

Fig.9. Changes of pH and total acidity during acetic acid fermentation in hot water extract of *Sasa quepaertensis* containing 7% ethanol. (A)pH, (B)Total acidity

3.2.4. 감귤의 첨가 비율에 따른 초산 생성력 비교

앞서 실험한 알코올 농도에 따른 초산 생성력의 비교 자료를 통해 고농도의 에탄올을 함유할수록 초산생성력이 떨어지는 것을 확인할 수 있었고 그 원인 중 하나는 제주조릿대 열수추출물의 부족한 영양성분 때문인 것으로 판단하였다.

그리하여 제주조릿대의 부족한 영양성분과 기호적인 측면을 보강하기 위해서 제주의 대표적 특산과실인 감귤을 이용하여 초산발효 실험을 진행하였다. 이번 실험에서는 5%의 에탄올을 함유한 제주조릿대 열수추출물에 제주산 감귤착즙액을 10, 20 및 30%(v/v) 비율로 첨가하여 3종의 초산균 배양액을 각각 5%(v/v) 비율로 접종하였으며, 30℃에서 200rpm으로 호기 진탕배양을 하며 1일 간격으로 pH와 총 산도(%)를 측정하였다.

3.2.4.1. 감귤 착즙액을 10% 첨가한 초산 발효

제주조릿대 열수추출물에 감귤 착즙액을 10% 첨가하여 초산 발효를 진행한 실험결과는 Table 13 및 Fig.10과 같으며 *G.albidus* AD-08은 초기 산도와 pH가 발효 7일째의 산도 및 pH와 크게 차이 나지 않음에 따라 10% 감귤 착즙액의 첨가 영향을 받지 않은 것으로 판단된다. 하지만 *A.aceti* KCTC 1010의 경우 초기 pH가 4.26에서 발효 3일째 조금씩 변화가 있기 시작하여 발효 7일째에는 pH가 3.11로 떨어졌고 이때의 초산함량은 1.34%로 감귤 착즙액을 첨가하지 않았을 때와 비교하여 큰 차이를 보였다. *A.pasteurianus* KCTC 12289의 경우는 더욱 뛰어난 초산생성력을 보였는데 pH는 4.26에서 발효 7일째 3.02로 떨어졌으며 초산함량은 발효 7일째 2.08%를 나타내었다.

3.2.4.2. 감귤 착즙액을 20% 첨가한 초산 발효

Table 14와 Fig 11은 20% 감귤 착즙액을 첨가했을 때 7일의 발효기간 동안에 pH와 총산도가 어떻게 변화하는지를 보여주고 있으며 10%의 감귤 착즙액을 첨가했을 때 *G.albidus* AD-08 초산균은 별다른 초산 생성력을 보이지 못하였으나 20%의 감귤 착즙액을 첨가하였을 때에는 발효 4일째부터 초산을 조금씩 생성하기 시작하였고 발효 7일째 1.72%의 초산 함량을 나타내었다. 이는 발효 7일째 1.64%의 초산함량을 나타낸 *A.aceti* KCTC 1010보다도 높은 초산 생성력을 보인

결과이다. 반면에 *A.pasteurianus* KCTC 12289의 경우는 발효 3일 쯤부터 산을 생성하기 시작하여 발효 7일째 2.32%의 산을 생성하며 3종의 초산균 가운데 가장 뛰어난 초산생성 효율을 나타내었다.

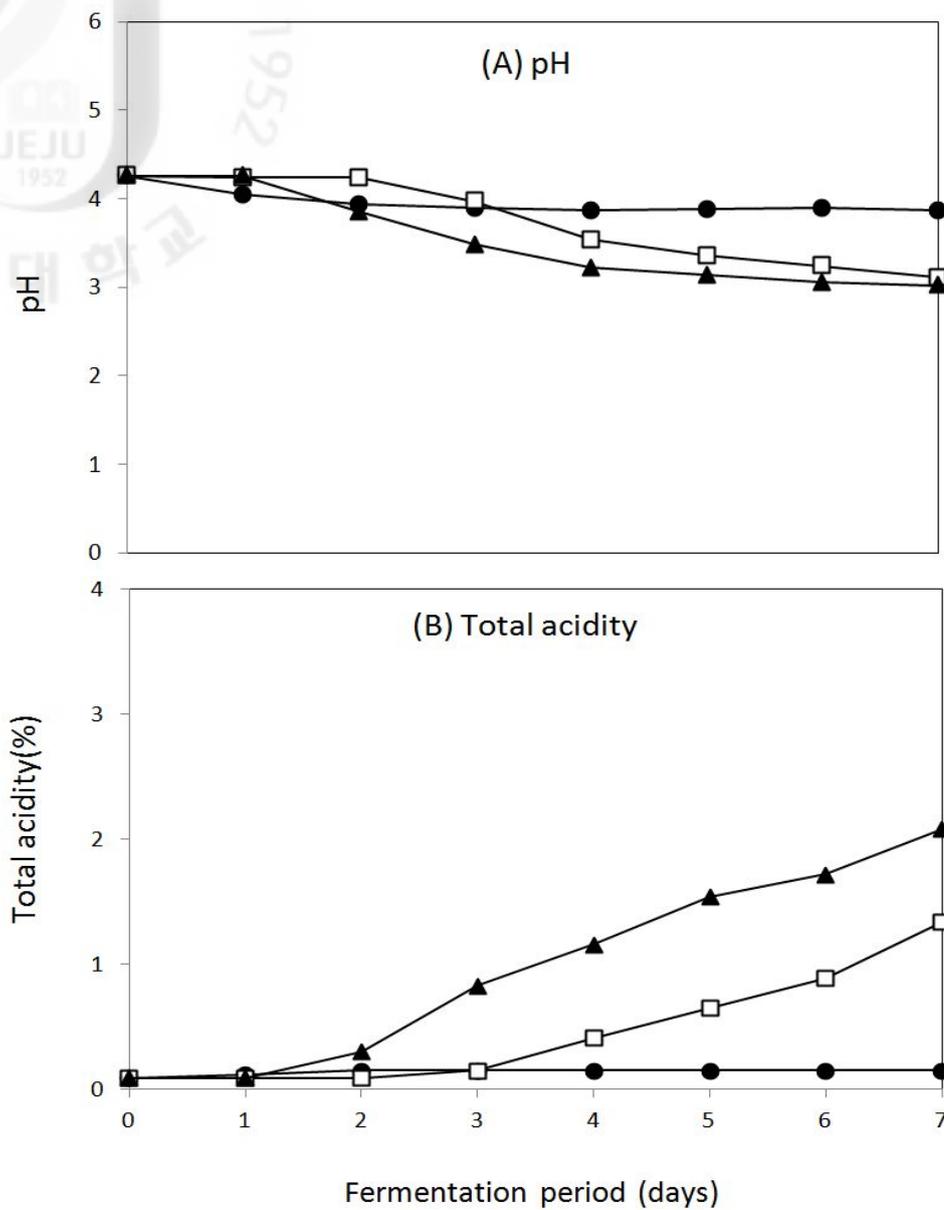
3.2.4.3. 감귤 착즙액을 30% 첨가한 초산 발효

5%의 에탄올을 함유한 제주조릿대 열수추출물에 감귤 착즙액을 30%(v/v) 첨가하여 7일간 초산 발효를 진행한 결과는 Table 15 및 Fig 12과 같다. 감귤의 첨가 비율이 높아짐에 따라 발효 초기 pH가 낮아졌으며 산도 또한 0.21%로 비교적 높은 함량을 보였다. *G.albidus* AD-08의 경우 3.84의 초기 pH에서 발효 7일째 2.68로 낮아졌고 총 산도 또한 2.43으로 앞선 실험들과 비교하여 높은 산도를 나타내었다. *A.aceti* KCTC 1010의 경우 20% 감귤 착즙액의 첨가 때와 마찬가지로 *G.albidus* AD-08 보다는 낮은 초산 생성력을 보였으나 발효 7일째 pH는 3.07로 낮아졌고 총산함량은 1.70%를 나타내었다. 마지막으로 *A.pasteurianus* KCTC 12289의 경우 가장 높은 초산 생성력을 보였는데 발효 2일째 0.72%의 총산 함량을 보이기 시작하여 발효마지막 날인 7일째 pH는 2.94로 떨어졌고 총 산도는 3.27로 가장 높은 함유량을 보였다. 이렇듯 감귤 착즙액의 첨가량이 높아짐에 따라 초산 생성력이 높아지는 결과를 이번실험을 통해 알 수 있었으며 초산균은 알코올을 산화하여 초산을 만들어내지만 충분한 영양성분이 바탕이 되었을 때 생성효율이 커질 수 있다는 것을 또한 이번 실험을 통해 알 수 있었다. 3종의 초산균을 이용한 제주조릿대 열수추출물에 감귤 착즙액의 비율을 달리하여 첨가한 실험은 초산발효의 효율적인 접근을 위해서 필요하다고 판단했으며 앞으로 다양한 제주의 천연자원을 활용한 식초 제조에 있어서 조그마한 보탬이 되었으면 한다.



Table 13. Changes of pH and total acidity during acetic acid fermentation in hot water extract of *Sasa quelpaertensis* containing 5% ethanol and 10% citrus juice

Strain		Fermentation period (days)							
		0	1	2	3	4	5	6	7
<i>G.albidus</i> AD-08	pH	4.26	4.05	3.94	3.90	3.87	3.88	3.90	3.87
	Total acidity(%)	0.09	0.12	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
<i>A.aceti</i> KCTC 1010	pH	4.26	4.24	4.24	3.97	3.54	3.36	3.24	3.11
	Total acidity(%)	0.09	0.09	0.09	0.15	0.41	0.65	0.89	1.34
<i>A.pasteurianus</i> KCTC 12289	pH	4.26	4.26	3.85	3.48	3.22	3.14	3.06	3.02
	Total acidity(%)	0.09	0.09	0.30	0.83	1.16	1.54	1.72	2.08



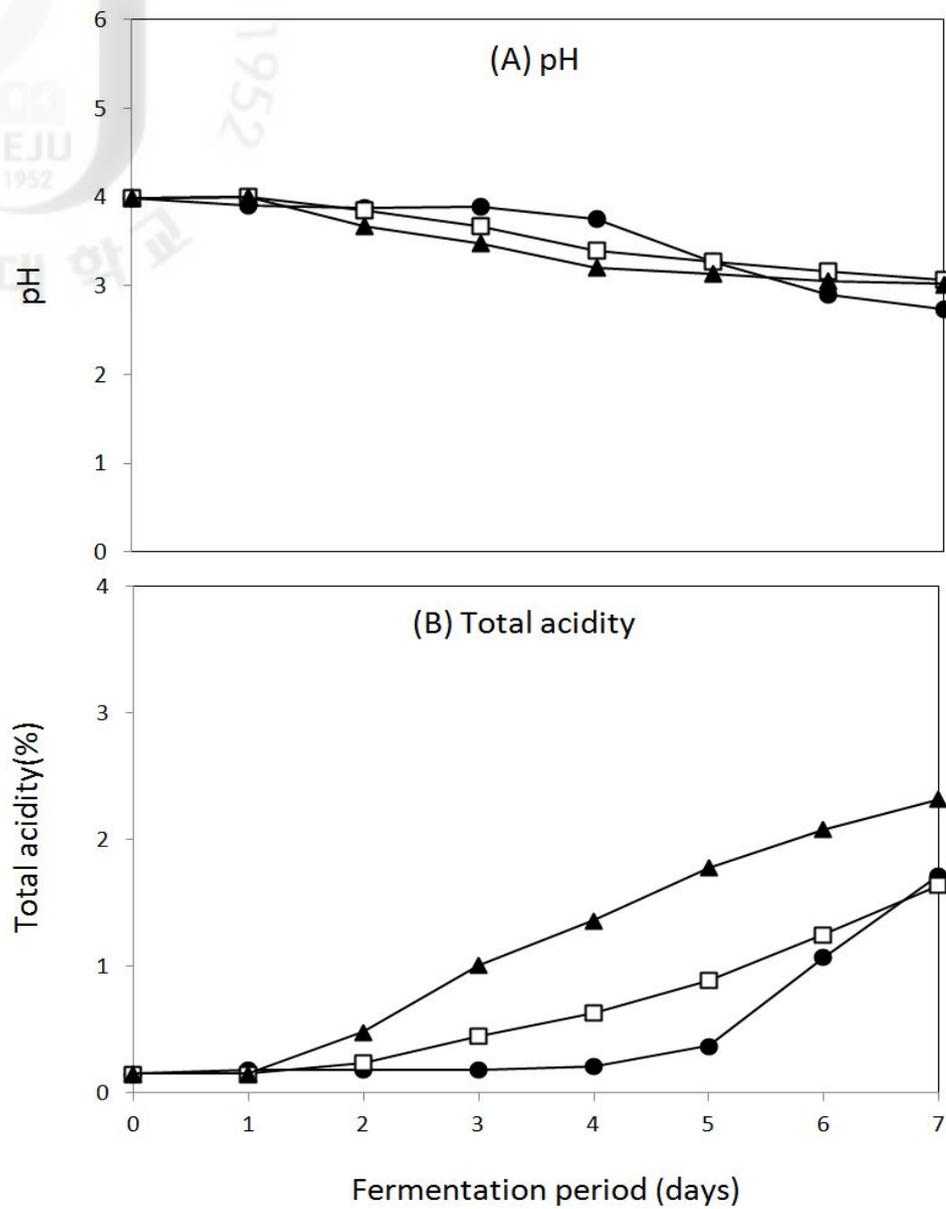
-●- *G. albidus* AD-08 , -□- *A. aceti* 1010, -▲- *A. pasteurianus* 12289

Fig.10. Changes of pH and total acidity during acetic acid fermentation in hot water extract of *Sasa queipaertensis* containing 5% ethanol and 10% citrus juice. (A)pH, (B)Total acidity



Table 14. Changes of pH and total acidity during acetic acid fermentation in hot water extract of *Sasa quelpaertensis* containing 5% ethanol and 20% citrus juice

Strain		Fermentation period (days)							
		0	1	2	3	4	5	6	7
<i>G.albidus</i> AD-08	pH	3.99	3.91	3.88	3.90	3.76	3.27	2.90	2.74
	Total acidity(%)	0.15	0.18	0.18	0.18	0.21	0.37	1.07	1.72
<i>A.aceti</i> KCTC 1010	pH	3.99	4.00	3.85	3.67	3.40	3.27	3.16	3.07
	Total acidity(%)	0.15	0.15	0.24	0.45	0.63	0.89	1.25	1.64
<i>A.pasteurianus</i> KCTC 12289	pH	3.99	4.01	3.67	3.48	3.21	3.14	3.05	3.02
	Total acidity(%)	0.15	0.15	0.48	1.01	1.36	1.78	2.08	2.32



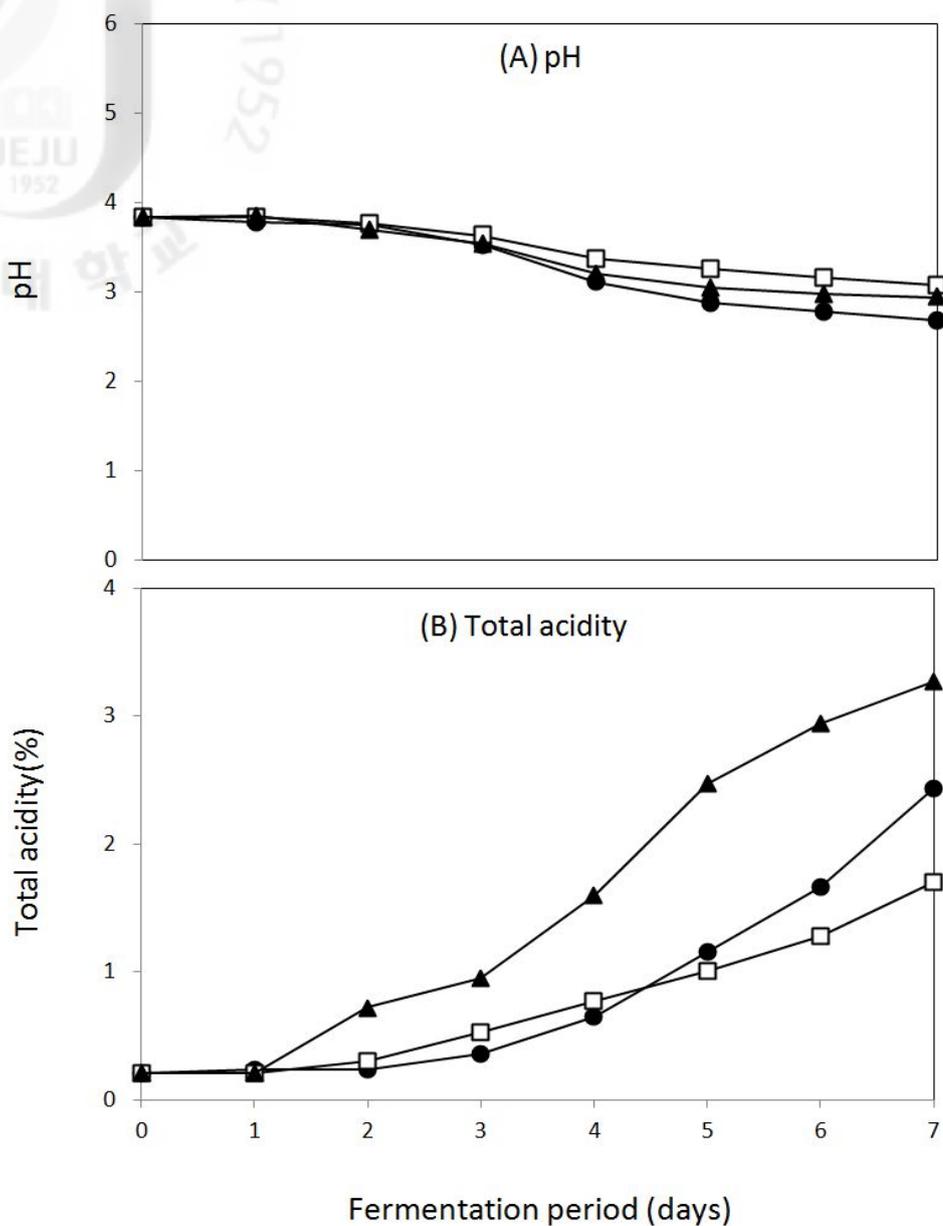
-●- *G. albidus* AD-08 , -□- *A. aceti* 1010, -▲- *A. pasteurianus* 12289

Fig.11. Changes of pH and total acidity during acetic acid fermentation in hot water extract of *Sasa quepaertensis* containing 5% ethanol and 20% citrus juice .
 (A)pH, (B)Total acidity



Table 15. Changes of pH and total acidity during acetic acid fermentation in hot water extract of *Sasa quepaertensis* containing 5% ethanol and 30% citrus juice

Strain		Fermentation period (days)							
		0	1	2	3	4	5	6	7
<i>G.albidus</i> AD-08	pH	3.84	3.78	3.75	3.52	3.11	2.88	2.78	2.68
	Total acidity(%)	0.21	0.24	0.24	0.36	0.65	1.16	1.66	2.43
<i>A.aceti</i> KCTC 1010	pH	3.84	3.84	3.77	3.63	3.37	3.26	3.16	3.07
	Total acidity(%)	0.21	0.21	0.30	0.53	0.77	1.01	1.28	1.70
<i>A.pasteurianus</i> KCTC 12289	pH	3.84	3.85	3.69	3.54	3.20	3.05	2.98	2.94
	Total acidity(%)	0.21	0.21	0.72	0.95	1.60	2.47	2.94	3.27



-●- *G. albidus* AD-08 , -□- *A. aceti* 1010, -▲- *A. pasteurianus* 12289

Fig.12. Changes of pH and total acidity during acetic acid fermentation in hot water extract of *Sasa quelpaertensis* containing 5% ethanol and 30% citrus juice .
 (A)pH, (B)Total acidity

4. 요약

제주조릿대와 제주감귤을 원료로 식초를 제조하기 위해서 한 종의 효모와 한 종의 초산균을 야생에서 분리하였고 한국생명공학연구원 미생물자원센터에서 효모 두 균주와 초산균 두 균주를 분양받아 각 균주간의 알코올 발효 및 초산 발효의 효율을 비교하였다. 3종의 효모를 이용한 알코올발효 실험에서는 제주조릿대 열수추출물에 당 농도를 10, 15, 20 °Brix로 조정하여 각 효모간의 알코올 생성력을 비교하였는데 10 °Brix 와 15 °Brix의 당 농도에서는 야생에서 분리한 *S.cerevisiae* YG-03의 에탄올 생성력이 가장 높게 나타났으며 20 °Brix의 당 농도에서는 분양받은 *S.ellipsoideus* KCTC 7243이 높은 에탄올 생성력을 보였다.

또한 에탄올 생성력이 클수록 효모의 당 이용률이 커지기 때문에 남아있는 당의 농도도 마찬가지로 줄어드는 경향을 보였다. 이어 초산균 3종의 초산 생성력을 알아보기 위해서 먼저 paper disc법을 이용하여 칼슘을 용해한 clear zone의 크기를 측정하였는데 3% 에탄올 농도에서는 *G.albidus* AD-08이 가장 넓은 clear zone을 형성하였으며, 5% 에탄올 농도에서는 *G.albidus* AD-08과 *A.pasteurianus* KCTC 12289가 높은 활성을 보였고, 7% 에탄올 농도에서는 *A.pasteurianus* KCTC 12289가 가장 넓은 clear zone을 형성하여 초기 에탄올 농도에 따라 각 균주의 초산 생성력 또한 달라진다는 것을 확인 할 수 있었다. 그 다음으로 제주조릿대 열수추출물에 3종의 초산균을 5%(v/v) 비율로 접종하여 초산의 생성력을 확인하였는데 3% 에탄올 농도에서는 *G.albidus* AD-08가 발효 7일째 1.80%의 초산을 생성하면서 가장 높은 효율을 보였고 5%와 7% 에탄올 농도에서는 초산균의 생육이 억제되어 초산 생성력이 떨어지는 양상을 보였다. 이러한 이유로 제주조릿대 열수추출물에 2차 발효기질로서 작용할 수 있는 제주감귤 착즙액을 10, 20, 30%(v/v) 비율로 첨가하여 각 균주의 초산생성력을 5% 에탄올 농도에서 다시 한번 측정하였다. 10%(v/v) 첨가구에서 *G.albidus* AD-08은 앞선 실험과 마찬가지로 초산생성이 거의 없었으나 *A.aceti* KCTC 1010과 *A.pasteurianus* KCTC 12289는 각각 1.34%와 2.08%의 초산을 생성하면서 발효 효율이 높아졌고 20%(v/v) 첨가구에서는 3종의 초산균 모두 초산 생성력이 10%(v/v) 첨가구 보다 높은 결과를 나타내었다. 마지막 30%(v/v)첨가구에서는 *G.albidus* AD-08이 발효 7일째

2.43%의 초산을 생성하였고 *A.aceti* KCTC 1010은 1.70%의 산을 생성하여 가장 낮은 효율을 보였으며 *A.pasteurianus* KCTC 12289는 발효 7일째 3.27%의 산을 생성하면서 3종의 초산균 중 가장 뛰어난 초산 생성력을 보였다. 이렇듯 제주감귤의 첨가가 초산발효에 있어서 초산생성 효율을 증진시키는데 역할을 할 수 있으며 제주조릿대만을 원료로 한 초산발효 음료를 개발하는데 취약한 부분인 기호적인 측면을 강화 할 수 있는 하나의 방안으로서 의미가 있다고 판단된다.

5. 참고문헌

1. Lee SY, Yoo KM, Moon BK, Hwang IK. A Study on the Development of Vinegar Beverage Using Yacon Roots(*Smallanthus sonchifolius*) and Analysis of Components Changes During the Fermentation. Korean J. Food Cookery Sci. 26: 95~103(2010)
2. Kim ML, Choi KH. Sensory Characteristics of Citrus Vinegar fermented by *Gluconoacetobacter hansenii* CV1. Korean J. Food Cookery Sci. 21: 243~249(2005)
3. Kim SW, Park JH, Jun HK. Analysis of Optimum Condition for Production of an Onionic Vinegar by Two-Step Fermentations. Journal of Life Science. 18: 1410~1414 (2008)
4. Kang SK, Jang MJ, Kim YD. Isolation and Culture Conditions of *Acetobacter* sp. for the Production of Citron (*Citrus junos*) Vinegar. Korean J. Food Preserv.13: 357~362 (2006)
5. Shin JA, Oh NS. Optimization of Fermentation Process for Acetic Acid Production. Food Engineering Progress. 14: 217~221(2010)
6. Kim YS, Jeong DY, Shin DH.. Optimum Fermentation Conditions and Fermentation Characteristics of Mulberry (*Morus alba*) Wine. Korean J. Food Sci. Technol. 40: 63~69(2008)
7. Jang SY, Sin KA, Jeong YJ. Quality Characteristics of Apple Vinegar by Agitated and Static Cultures. J Korean Soc Food Sci Nutr. 39: 308~312(2010)
8. Tomoo K, Mikiya K, Takashi F, Shinobu U, Takayuki K. Vinegar Intake Reduces Body Weight, Body Fat Mass and Serum Triglyceride Levels in Obese Japanese Subjects. Biosci. Biotechnol. BioChem. 73: 1837~1843(2009)
9. Lee SW, Kwon JH, Yoon SR, Jeong YJ. Quality Characteristics of Brown Rice Vinegar by Different Yeasts and Fermentation Condition. J Korean Soc Food Sci Nutr. 39: 1366~1372(2010)

10. Lee CE, Kim HC, Whang KJ, Park NG, Kim NY, Oh WY. The Evaluation of Feed Value and Growth Characteristics of *Sasa quelpaertensis* Nakai by Horse Grazing in the Woodland of jeju. J. Kor. Grassl. Forage Sci. 30: 151~158(2010)
11. Yang JH, Lim HS, Heo YR. Sasa borealis leaves extract improves insulin resistance by modulating inflammatory cytokine secretion in high fat diet-induced obese C57/BL6J mice. Nutr Res Pract. 4: 99~105(2010)
12. Yun EK, Heo YR, Lim HS. Effects of *Sasa Borealis* leaf Extract on the Glucose Tolerance of Major Foods for Carbohydrate. Korean J Nutr. 43: 215~223(2010)
13. Hwang JY, Han JS. Inhibitory Effects of *Sasa borealis* Leaves Extracts on Carbohydrate Digestive Enzymes and Postprandial Hyperglycemia. J Korean Soc Food Sci Nutr. 36:989~994(2007)
14. Jeoung YJ, Lee MH. A View and Prospect of Vinegar Industry. Food Industry and Nutrition. 5: 7~12(2000)
15. Watchara K, Gunjana T, Taketo I, Toshiharu Y, Osao A, Kazunobu M, Acetic Acid Fermentation of *Acetobacter pasteurianus* : Relationship between Acetic acid Resistance and Pellicle Polysaccharide Formation. Biosci. Biotechnol. Biochem. 74: 1591~1597(2010)
16. Pattaraporn Y, Mai T, Wanchern P, Yuzo Y. *Gluconobacter albidus*(ex Kondo and Ameyama 1958) sp.nov.,nom.rev.,an acetic acid bacterium in the α -proteobacteria. J.Gen.Appl.Microbiol. 50:235~242(2004)
17. Ko YJ, Jeong DY, Lee JO, Park MH, Kim EJ, Kim JW, Kim YS, Ryu CH. The Establishment of Optimun Fermentation Conditons for *Prunus mune* Vinegar and Its Quality Evaluation. J Korean Soc Food Sic Nutr. 36: 361~365(2007)
18. Kim ML, Choi KH. Sensory Characterisitics of Citrus Vinegar fermented by *Gluconacetobacter hansenii* CV1. Korean J. Food Cookery Sci. 21: 263~269(2005)
19. Jeong CH, Choi SG, Heo HJ. Analysis of Nutritional Components and Evaluation of Functional Activities of *Sasa borealis* Leaf Tea. Korean J. Food Sci. Technol. 40: 586~592(2008)

20. Ko MS. Chemical Components in Stalks and Leaves of *Sasa borealis* Makino and Antioxidative and Antimicrobial Activities of Extracts. Korean J. Food Preserv. 15: 125~132(2008)
21. Kim DH, Lee JS. Vinegar Production from Subtropical Fruits. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 29: 68~75(2000)
22. Kang OJ. Isolation and Identification of Yeast Strain from Fermented Tea. Korean J. Food Cookery Sci. 24: 11~15(2008)
23. Jang SY, Woo SM, Park CW, Choi IW, Jeong YJ. Characteristics of Alcohol Fermentation of Citrus Fruit Hydrolysates. J Korean Soc Food Sci Nutr. 39: 1236~1241(2010)

감사의 글

석사학위과정 동안 감사했던 사람들의 이름을 깊이 새기고자 합니다. 먼저 여러모로 부족했던 저를 이 자리에 설 수 있도록 사랑과 배려로 지도해 주셨던 고영환 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 아울러 학업 중에 열의를 갖게 하셨던 강영주 교수님, 늘 진심어린 조언으로 마음에 위로를 주셨던 하진환 교수님, 열성적인 모습으로 늘 귀감이 되신 임상빈 교수님, 그리고 바쁘신 가운데도 논문심사를 맡아 세심하게 검토, 지도하여 주신 박은진 교수님께 감사를 드립니다.

대학원 동기로서 처음부터 학업을 함께하며 많은 힘이 되어준 충우형, 지현이, 강진아 선생님 너무 감사드리며, 많은 격려를 통해 용기를 북돋아 주신 최영진 교수님, 강윤구 선생님 덕분에 많은 힘을 얻었습니다. 조금은 늦게 대학원에서 만났지만 경진이형, 현정이, 수경이 모두 식품공학과 대학원 덕분에 얻은 소중한 인연들이며 대학원 생활 내내 많은 도움을 받았습니다. 고맙습니다.

그리고 직장생활과 학업의 병행으로 인해 많은 시간 같이 있어주지 못했지만 넓고 따듯한 마음으로 이해해주고 할 수 있다는 용기를 불어넣어준 사랑하는 자영이와 지금까지 언제나 변함없는 사랑으로 지켜봐 주시고 부족한 아들을 항상 자랑스럽게 생각하시는 어머니께 너무 감사하다는 말을 전하고 싶습니다.

마지막으로 미흡하지만 이 자리에까지 올 수 있게끔 도와주신 모든 이들에게 작은 결실인 이 논문을 바칩니다.

2011년 12월