

아세트산발효에 관한 연구

노완섭

동국대학교 공과대학 식품공학과
(1978년 9월 18일)

Studies on the Acetic Acid Fermentation

Wan Sup Noh

Department of Food Technology, College of Engineering, Dongguk University, Seoul
(Received September 18, 1978)

Abstract

The manufacture of vinegar provides a means of utilizing the juices of many fruits and various kinds of cereals as well as of starchy vegetables.

However, no successful attempt has been made to utilize the glutinous rice powder, which is discussed from the Mi Gwa (made of glutinous rice) making, for the manufacture of vinegar.

After alcoholic fermentation of the glutinous rice powder, it was decided to ferment the liquor to vinegar and to examine factors affecting this fermentation.

A laboratory typed vinegar generator was used to convert the alcohol in fermented liquor to acetic acid. Recycling of the fermented liquor through the generator was found essential in this process.

Among many strains of *Acetobacter* cultures used, which was selected from ordinary home made vinegar from all over the Korea, *Acetobacter* No. Aa-97 proved more efficient for this fermentation.

Addition of 1% phosphate (K_2HPO_4) and 20% apple cider vinegar to the fermented liquor increased both the rate and efficiency of acetic acid fermentation.

서론

식초는 예로부터 조미료로 애용되어 왔으며 기호식품으로서 불가결한 것이다. 지금까지도 식초는 acethylene으로부터 합성한 빙초산을 물론 회석하여 식용하였던 바 유해성분의 함유로 인체에 독성을 가져왔음이 밝혀졌다⁽¹⁾. 고로 정부에서는 이를 식용 금지케하고 발효법에 의해 제조한 식초만을

사용토록 식품위생법으로 정하려고 한 바있다.⁽²⁾ 그러나 종래에 사용하여 오던 빙초산과 비교하여 불 때 산의 농도가 낮으므로 지금까지 빙초산에 의해 습관화되어 버린 미각에 발효식초는 진한 맛과 감각을 주지못함이 사실이다.

이러한 문제는 단 시일 내에 해결할 수 없는 것으로 소비자들에 대한 계몽과 인식을 점차적으로 고쳐나가도록 하여야할 것이다.

식초산발효에 관한 국내의 연구⁽³⁾는 주정발효나 장류발효에 비하여 그 연구가 많지 않았으므로 앞으로 더 많은 연구와 개발이 요구된다.

본 실험에서는 수출용 미과(米菓)⁽⁴⁾ 제조시 폐기되는 찹쌀가루를 원료로 하여, 전국에 걸쳐 수집한 누룩과 재래식 방법에 의해 양조한 식초로부터 발효력이 강하고 풍미가 좋은 우수한 균주를 순수 분리 선발하여 주정발효와 식초산발효를 실시하여 식초의 질을 향상시켜 보려고 시도한 바 이에 따른 몇 가지 결과를 얻었기에 보고한다.

실험재료 및 방법

1. 사용 균주

(1) 주정발효용 균주 전국 30개 지역에서 수집한 35종의 누룩에서 순수 분리 선발한 균주를 사용하였다.

(2) 초산발효용 균주 전국 33개 지역에서 수집한 37종의 재래식 식초에서 순수 분리 선발한 균주를 사용하였다.

2. 원료

미과(米菓, 아라래) 제조시 폐기되는 찹쌀가루를 사용하였다.

실험방법

1. 균주의 분리

(1) 곰팡이 균주의 분리 누룩 가루 0.1g을 생리식염수로 1 : 1,000으로 희석하고 1 ml를 취하여^(5,6) Table 1의 교체배지로 상법⁽⁷⁾에 따라 순수 분리하고 *Aspergillus*로 인정되는 것만을 선발하여 Table 2의 배지에 사면배양하였다.

(2) 효모균주의 분리 누룩분말 0.1g을 Table 3의 액체배지에서 48시간 배양하여 1 : 100으로 희석하고 그 중 0.1 ml를 취하여 Table 3의 교체배지로 상법에 따라 순수분리하였다.^(8,9)

(3) 초산균의 분리 시료식초 1 ml를 생리식염수로 1 : 100으로 희석하고 그 중 0.2 ml를 취하여 Table 4의 배지로 상법에 따라 순수분리하여 Table 5에 사면배양하였다.^(6,10)

2. 균주의 발효능 검사

(1) 곰팡이 균주의 발효능 검사 분리한 132 균주의 곰팡이 균주를 환원당 생성능에 따라 검색하였다. 즉 10 g의 밀기울배지에 각 균주를 접종 30°C에서 72시간 배양하고 그 중 2g을 취하여 1% soluble starch 30 ml에 가하고 pH 5.0으로 조

Table 1. Medium for Isolation of Mold Strains.

Yeast ext.	3 g
Peptone	3 g
Glucose	30 g
K ₂ HPO ₄	0.1 g
Dist. water	1,000 ml
pH	6.8~7.0

* To prepare solid media added 2% Bacto agar.

Table 2. Czapeck's Agar Medium for Isolation of *Aspergillus*.

Sucrose	30 g
NaNO ₃	2 g
K ₂ HPO ₄	1 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 g
KCl	0.5 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01 g
Bacto agar	15 g
Distilled water	1,000 ml
pH	6.8~7.0

Table 3. Medium for Isolation of Yeast Strains.

Yeast extract	3 g
Peptone	3 g
Glucose	15 g
Maltose	15 g
Hayduck's soln	20 ml
Chloramphenicol	0.1 g
Sodium propionate	0.1 g
Distilled water	1,000 ml
pH	5.7

Table 4. Medium for Isolation of Acetic Acid Bacteria.

Liven extract	100 ml
Tryptone	5 g
Glucose	20 g
CaCO ₃	10 g
Bacto agar	20 g
Distilled water	900 ml
pH	6.8~7.0

정하여 50°C water bath상에서 한 시간 당화시킨 후 여과하여 여액 10 ml를 iodometric method⁽¹²⁾로

Table 5. Medium for Stock Culture of Acetic Acid Bacteria.

Liver extract	100 ml
Tryptophan	0.5 g
Sorbitol	0.02 g
Bacto agar	20 g
Distilled water	1,000 ml
pH	6.8~7.0

환원당을 정량하였다.

정량 결과 6%이상의 환원당을 생성하는 균주에 대하여 반복 시험하고 그 중 가장 우수한 세 균주를 선발하였다.

(2) 효모균주의 발효능 검사 분리한 165균주의 효모균주를 주정발효능에 따라 검색하였다.⁽¹³⁾ 즉 Table 3의 액체배지가 든 Durham 발효관에 접종하여 25°C에서 24시간 배양한 후 가스의 발생이 우수한 것만 선발하고 500 ml 삼각플라스크에 Table 6의 배지 200 ml를 넣고 균을 접종 25°C에서 72시간 배양한 후의 주정 농도를 일반증류법에 따라 측정하여 Gay-Lussac표⁽¹⁴⁾에 의해 보정한 값으로 환산하여 가장 우수한 세 균주만을 선발하였다.⁽¹⁵⁾

Table 6. Medium for Alcoholic Fermentation.

Koji extract	100 ml
Glucose	10 g
Maltose	5 g
Rice powder	5 g
Glutinous rice powder	15 g
Chloramphenicol	0.5 g
Tap water	1,000 ml
pH	5.0

(3) 초산균의 발효능 검사 분리한 125균주의 초산균을 초산발효능에 따라 검색하였다.⁽¹⁶⁾ 즉 500 ml 삼각플라스크에 Table 7의 배지 50 ml를 취하여 균을 접종하고 35°C에서 48시간 진탕배양하여 여과한 여액 10 ml를 0.1N NaOH로 적정하여 계속 좋은 성적을 나타내는 세 균주만을 선발하였다.

3. 주정발효

(1) Koji의 제조 이상의 실험에서 선발한 곰팡이와 효모균주 중 가장 발효능이 우수한 M-21,

Table 7. Medium for Acetic Acid Fermentation.

Liver ext.	100 ml
Tryptophane	0.5 g
Sorbitol	0.02 g
10% ethanol soln	1,000 ml
pH	6.8~7.0

66, 106과 Y-07, 26, 82의 6 균주를 종균으로 koji를 제조하였다. 즉 시판 찹쌀과 맵쌀을 2:1(w/w)로 혼합하여 8시간 침치시켜 300 g을 500 ml 삼각플라스크에 취하여 증자하고 여기에 각 균을 접종 30°C에서 48시간 배양하여 koji를 제조하였다.

(2) 담금 원료인 미과제조시 폐기되는 찹쌀가루를 증자하여 koji와 혼합 30°C에서 48시간 배양한 후 다음과 같은 배합비율로 단사입하였다.

원료의 배합

증자한 찹쌀가루	3 kg
Koji	1 kg
우물물	6 l (후수 3 l포함)

4일간 실온에서 발효시켜 주정농도 유기산 농도 및 pH를 일정한 간격으로 측정하여 주정농도 13.5%로 되었을 때 여과하고 여액을 HTST법⁽¹⁶⁾으로 살균하여 식초산 발효액으로 사용하였다.

4. 초산발효

(1) 실험실형 초산발효장치 본 실험에서 사용한 발효장치는 속성 초산발효방식⁽¹⁷⁾의 원리에 따라 고안한 실험실형 초산발효장치로서 Fig. 1과 같다.

공기는 A의 흡입구로 들어가 B의 0.1% Hg-Cl₂를 통하여 살균하고 C의 멸균수를 통하여 B, C 플라스크의 연결관에 조절기를 부착하여 통기량을 조절하였고 흡입된 공기가 D의 glass wool을 채운 여과 tube를 통과하는 동안 건조되게 하였으며 E의 90°로 구부러진 끝 부분을 공처럼 만들어 직경 1 mm의 미세한 구멍을 뚫어 공기를 고르게 공급해 주도록 하였다. 주발효관 F의 내부에는 밤 나무 대패밥을 채워 G, K로 고정하였으며 이 관에도 미세한 구멍을 뚫어 발효액이 고르게 통과하도록 하였다. 발효액은 병 H에 넣어 서서히 흘러 나오도

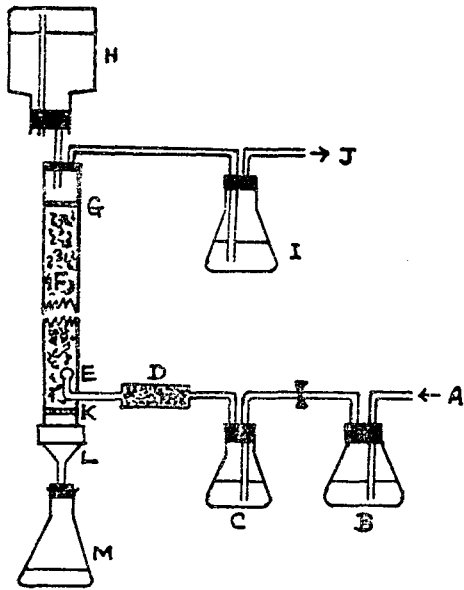


Fig. 1. Schematic Diagram of the Laboratory-Type Generator Column Set Up.

를 조절하였다.

공기는 발효관을 통하여 수액플라스크 I를 거쳐 J의 진공장치로 연결하였고 L의 Buchner funnel과 연결된 부분은 완전히 밀폐하였으며 플라스크 M과 H는 시료의 채취와 재주입을 위하여 개폐할 수 있도록 하였다.

본 실험에 사용한 모든 기구들은 autoclave에서 120°C로 25분간 살균하였으며 주발효관의 대패법에 우수 균주로 선발한 초산균주 Aa-19, Aa-57, Aa-93를 *Acetobacter* broth에 각각 배양하여 충분히 활성화 된 것을 대패법에 골고루 접종되도록 수차에 걸쳐 통과시켜 주었다.

사용한 발효기는 동일한 구조의 것을 3개씩 장치하여 동일한 공기 공급원과 진공장치에 연결하

여 동일한 효과를 갖도록 하였다.

주발효관에는 선발된 초산균주 Aa-19, Aa-57, Aa-93을 각각 접종하여 그 역가를 비교하도록 하였으며 시료액은 700 ml가 15시간에 걸쳐 통과하도록 조절하였다.

실험결과 및 고찰

주정발효에서 얻어진 시료를 Table 8에서와 같이 주정함량 당도 및 pH를 달리하여 비교 실험하였다.

시료 A는 본실험에서 발효시킨 주정을 증류수로 희석한 것이고 시료 B는 ethanol (E. Merck

Table 8. Contents of Sample A and B.

Contents	Sample A	Sample B
Alcohol %	6.5	6.0
Sugar level	8.4	0.8
pH	3.2	3.5

제)을 희석하여 기성 식초로 pH를 조정하였다.

그 결과 초산함량이 시료 A는 5.5%, sample B는 4.4%일 때 최고치를 기록하였다.

1. 재회전의 효과

시료 A와 B를 수차에 걸쳐 발효기를 통과시켜 산도를 측정된 결과는 Table 9와 같다.

총산은 회전수에 따라 증가하였으며 4회째 최고치를 기록하였다.

4회전 후의 초산함량은 시료 A의 Aa-93이 4.7%로 가장 우수하였으며 Aa-19, Aa-57의 순서로 낮았다.

Table 9. Effect of Recycling on the Rate and Efficiency of Acetic Acid Fermentation.

Cycle No.	Sample A			Sample B		
	Aa-19	Aa-57	Aa-93	Aa-19	Aa-57	Aa-93
1	1.8	2.0	2.0	1.2	1.6	1.6
2	2.2	2.5	2.4	1.9	2.4	2.1
3	3.0	3.3	3.6	2.5	2.8	2.4
4	4.5	4.4	4.7	3.5	3.4	3.6
5	4.1	3.7	3.6	2.8	3.0	3.1
Efficiency (%)*	69.8	67.7	72.3	68.3	66.4	70.7

* % efficiency for maximum levels of acidity (4th cycle).

5 회전부터는 감소를 나타냈는데 이러한 산도의 감소는 증발현상과 초산의 산화때문인 것으로 사료된다.

2. 인산염의 효과

Khattak등⁽¹⁸⁾은 초산발효시 인산염으로 K₂HPO₄를 0.5~1.0% 첨가하므로써 산의 생성능과 수율

을 높였다고 보고하고 있다. 이에 본 실험에서도 1%의 K₂HPO₄를 첨가해 주었을 때의 효과를 시험한 결과 Table 10에서와 같이 초산균의 활성도와 수율이 현저하게 증가하였으며 3회전 때 최고치를 기록하였다.

이 경우도 Aa-93이 시료 A에서 5.3으로 가장 우수하였다.

Table 10. Effect of Adding 1% K₂HPO₄ to the Sample A and B on the Rate and Efficiency of Acetic Acid Fermentation.

Cycle No.	Sample A			Sample B		
	Aa-19	Aa-57	Aa-93	Aa-19	Aa-57	Aa-93
1	2.3	1.8	2.3	1.8	1.8	2.4
2	3.0	2.8	3.8	2.0	1.9	2.8
3	5.0	4.8	5.3	4.0	3.6	4.2
4	4.7	4.5	4.8	3.6	3.3	3.5
5	4.5	4.1	4.5	3.2	3.2	3.1
Efficiency (%)*	78.0	76.0	82.0	78.5	73.3	79.5

* % efficiency for maximum levels of acidity (3rd cycle).

3. 기성 식초 첨가의 효과

초산균은 발효액 중의 초산농도가 8~10% 이상이 되면 생육이 저지된다.⁽¹⁹⁾ 그러므로 초산발효에 있어서 발효에 앞서 기성 식초를 첨가하여 pH를 감소시켜 주는 것이 가장 중요하다. 고로 본 실험에서도 시료 A와 B에 기성사과 식초를 시료

액 500 ml당 100 ml씩 첨가하여 주었다. 이 때의 pH를 측정하였더니 3.1이었다. 이렇게 처리한 시료로 초산발효를 실시한 결과 Table 11에서와 같이 발효의 효과와 수율이 모두 향상되었으며 3회전째 최고치에 도달하였고 Aa-93이 시료 A에서 5.5로 최고의 수율을 나타내었다.

Table 11. Effect of Adding 20% Vinegar and 1% K₂HPO₄ to the Sample A and B on the Rate and Efficiency of Acetic Acid Fermentation.

Cycle No.	Sample A			Sample B		
	Aa-19	Aa-57	Aa-93	Aa-19	Aa-57	Aa-93
1	2.3	2.6	2.4	2.6	2.3	1.8
2	3.1	3.4	3.4	2.7	2.7	2.6
3	5.1	5.0	5.5	4.3	4.0	4.4
4	4.9	4.8	5.1	3.6	3.5	3.7
5	3.6	4.2	4.3	3.1	3.0	3.3
Efficiency (%)*	79.5	78.2	84.1	83.5	80.4	85.8

* % efficiency for maximum levels of acidity (3rd cycle).

요 약

미과 제조시 폐기되는 찹쌀가루를 이용하여 주

정발효를 거쳐 식초산발효를 실시한 결과는 다음과 같다.

1) 전국 30개 지역에서 수집한 35종의 누룩으로부터 132균주의 곰팡이와 165주의 효모를 분리하

고 그 발효능을 검사하여 최우수 균주로 M-21, M-66, M-106의 곰팡이 3 균주와 Y-07, Y-26, Y-82의 효모 3 균주를 선발하였다.

2) 전국 33개 지역에서 수집한 37종의 재래식 식초로부터 125균주의 초산균을 분리하고 그 발효능을 검사하여 최우수 균주로 Aa-19, Aa-57, Aa-93의 3 균주를 선발하였다.

3) 속성 초산발효방식의 원리에 따라 실험실형 초산발효기를 고안하여 사용하였다.

4) 초산발효액을 수차에 걸쳐 발효기를 통과시킴으로써 초산 생성량이 증가하였으며 4 회 회전시 최고치를 나타내었다.

5) 초산발효액에 1%의 K_2HPO_4 를 첨가하므로써 초산생성량이 증가하였으며 3 회 회전시 최고치를 나타내었다.

6) 초산발효액에 1%의 K_2HPO_4 와 20%의 기성 식초를 첨가하므로써 발효가 촉진되었으며 초산생성량도 증가하여 3 회 회전시 최고치를 나타내었다.

謝辭 이 논문을 완성함에 있어서 지도와 편달을 하여주신 하 덕모 교수님과 김 창식 교수(학장)님에게 심심한 감사를 표하는 바입니다.

참고문헌

- 1) 이배함, 정성구: 기술연구소보, 2, 14 (1969).
- 2) 이주식: 과학기술처보고, 1, 17 (1970).
- 3) 김찬조: 한국농화학회지, 4, 33 (1963).
- 4) 櫻井芳人, 齊藤道雄, 東秀雄, 鈴木明治: 總合食料工業, 恒性社厚生閣 (東京), pp 510~513

(1969).

- 5) 조덕현: 기술연구소보, 2, 3 (1969).
- 6) Prescott, S. C. and Dunn, C. G.: *Industrial Microbiology* (3rd ed), McGraw-Hill Book Co., New York, (1959).
- 7) Booth, C.: *Methods in Microbiology*, Academic press, New York, 4, 49~111 (1971).
- 8) 장재선: 농촌진흥청보고, 8, 164 (1963).
- 9) Shchelkunova, S. A.: *Microbiologiya*, 30, 568 (1961).
- 10) Underkofler, L. A. and Hickey, R. J.: *Industrial Fermentation*, Chemical publishing Co., New York, 1, 498~535 (1954).
- 11) 장건형, 이계호, 박성오: 기술연구소보 1, 40, (1962).
- 12) 赤掘四郎: 酵素研究法, 上卷, 108 (1956).
- 13) Reed, G. and Pepler, H. J.: *Yeast Technology*, AVI Co., Westport, 47~52 (1973).
- 14) Horwitz, W.: *AOAC* (12th ed), Washington D. C., 968 (1975).
- 15) 하덕모, 박계인: 응용미생물학, 개문사, 274~275 (1977).
- 16) 이재영: 우유가공학, 선진문화사, 89 (1974).
- 17) Khattak, J. N., Hamdy, M. K. and Powers, J. J.: *Food Technol*, 19(6), 108 (1965).
- 18) Khattak, J. N., Hamdy, M. K. and Powers, J. J.: *Food Technol.*, 19(7), 207 (1965).
- 19) Cruess, W. U.: *Commercial Fruit and Vegetable Products*, McGraw-Hill Book Co., New York (1958).