J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.
32(4), 544~548(2003)

매실을 이용한 초산 발효의 최적 조건

손상수 · 지원대† · 정현채
영남대학교 식품가공학과

Optimum Condition for Acetic Acid Fermentation Using Mume (*Prunus mume* Sieb. et Zucc) Fruits

Sang-Su Son, Won-Dae Ji† and Hyun-Chae Chung
Dept of Food Science and Technology, Yeungnam University, Kyongsan 712-749, Korea

Abstract

To produce acetic acid from Mume (*Prunus mume* Sieb. et Zucc) fruits, fermentation conditions were optimized by a response surface methodology (RSM) using the fractional factorial design with 3 variables and 5 levels. The coefficient of determination (R^2) of response surface regression equation for acetic acid production was 0.9462. Optimum conditions for acetic acid production were involved with 8.76% of alcohol content, 26.27℃ of fermentation temperature and 8.42% of sugar content. Finally, predicted level of acetic acid production at these conditions was 3.23%.

Key words: acetic acid production, mume fruits, *Prunus mume* Sieb. et Zucc, response surface methodology

서 론

우리의 식생활과 밀접한 관계를 갖고 오랜 옛날부터 이용되어 온 양조식초는 합성식초와는 달리 초산균의 초산발효에 의하여 생성되는 초산을 주성분으로 하여 소량의 유기산류, 유리당류, 아미노산류 및 에스테르류 등을 함유하여 특유한 방향과 맛을 가지는 발효식품이다. 양조식초는 이용가능한 원료의 다양화로 많은 종류가 만들어져 왔는데, 최근에는 식생활의 다양화와 더불어 품질이 우수하고 안전성이 확보된 고급의 양조식초에 대한 소비자의 관심이 크게 높아지고 있어 새로운 과일이나 야채 등을 이용하여 독특한 풍미를 가진 양조식초를 개발하고자 하는 시도가 활발히 행하여지고 있다(1-5).

한편, 매실은 우리 나라의 전국각지에서 식용, 약용 및 관상수로 널리 애용되고 있는 다년생의 낙엽교목인 매화나무(*Prunus mume* Sie. et Zucc.)의 과실로서 유기산뿐만 아니라 당분 및 무기성분을 함유하고 있는 알칼리성 식품으로(6), 우리나라에서는 최근에 와서 매실의 효용이 재인식되어 새로운 자연식품으로 여러 분야에서 각광을 받고 있으나 매실을 이용한 가공식품의 개발에 관한 연구는 아직 미약한 실정이며(7-9), 특히 매실을 이용한 식초에 관한 연구는 더욱 미진하다(10).

본 연구는 매실의 약리적 기능성이 함유된 우수한 기호성의 매실 양조식초를 산업적으로 대량생산할 목적으로 매실을 사용한 초산생성의 발효조건을 반응표면분석법으로 조사하였기에 보고하고자 한다.

†Corresponding author. E-mail: jiwd@yumail.ac.kr
Phone: 82-53-810-2951, Fax: 82-52-815-1891

재료 및 방법

재료 및 사용균주

본 실험에 사용한 매실은 경남 창녕 지역에서 생산된 1999년 산 청매를 원료로 하였다. 초산발효에 사용된 균은 *Acetobacter aceti* KCTC 1010이며, 유전자은행에서 분양받아 사용하였다.

초산발효

씨를 제거한 매실 과육은 homomixer로 150 rpm에서 30분간 마쇄하고 100°C에서 30분간 멸균한 후, 원료양에 대해 2%의 초산균 배양액을 접종하여 각 조건별로 초산발효를 시켰다.

초산함량 및 균 생육도 측정

초산함량은 초산발효액을 원심분리한 상등액 10 mL를 취하여 0.1% phenolphtalein을 지시약으로 하여 0.1 N NaOH로 적정한 후 초산으로 환산하여 나타내었다. 균 생육도는 spectrophotometer(U-2000, Hitachi, Japan)를 사용하여 균 배양액의 흡광도(660nm)로 나타내었다.

초산생성의 최적화

최적 발효조건을 구하기 위한 실험계획으로서 중심합성

실험계획을 사용하였으며, 반응표면분석을 위해 SAS(Statistical Analsis System) program을 사용하였다.

초산발효조건 즉, 독립변수(Xn)는 알콜함량(X_1), 발효온도(X_2), 당농도(X_3)이었으며, 각 조건들은 -2, -1, 0, 1, 2로서 다섯 단계로 부호화하였고, 실험값은 Table 1에 나타내었다. 혼합조건의 품질 특성에 관련된 종속변수(Yn)로서는 초산함량(Y)이었으며, 각각의 실험은 3반복으로 행하여 그 평균값을 회귀분석에 사용하였다. Table 1에 나타난 독립변수는 중심합성실험계획에 따라 Table 2와 같이 16구로 설정하여 실시하였다. 이때, 세 가지 독립변수와 종속변수에 대한 2차 회귀모형은 다음과 같다.

$$Yn = \beta_0+\beta_1X_1+\beta_2X_2+\beta_3X_3+\beta_{12}X_1X_2+\beta_{13}X_1X_3+\beta_{23}X_2X_3 +\beta_{11}X_1^2+\beta_{22}X_2^2+\beta_{33}X_3^2$$

여기서 Y는 종속변수, X_1, X_2, X_3은 독립변수, β_0는 절편, β_n은 회귀계수이다. 회귀분석 결과 임계점이 최대점과 최소점이 아니고 안장점일 경우에는 능선분석을 하여 최적점을 구하였으며, contour map과 3차원 반응표면분석으로 최적 발효조건을 찾았다.

결과 및 고찰

초산 생성에 미치는 알콜농도, 발효온도 및 당농도의 영향

식초의 최종 산도는 사용 균주의 초산 생산 능력 및 발효 방법에 기인된다고 말할 수 있다. 특히, 발효 방법보다는 초산생성균의 균주특성에 절대적으로 영향을 받는데 이는 기질로 이용되는 에탄올에 대한 저해작용 및 생성물인 초산 농도에 대한 내성 정도가 최종 산도를 결정하는 것으로 초산의 농도가 내성 정도를 벗어나면 초산균의 생육이 억제되고 초산 생성속도가 감소되어 더 이상의 산도 증가는 불가능하기 때문이다. 회분식 식초 발효시 발효 초기에 에탄올과 초산농도를 균주 특성에 맞도록 조절해주어야 함은 물론 발효가 진행되면서 에탄올과 초산의 농도가 변화하게 되고 이들 농도가 균주의 내성 정도를 벗어나게 될 경우 생성된 초산농도를 감소시키고 에탄올 농도를 증가시켜 균주의 활성이 유지되도록 해야 한다고 Yoon(11)은 보고하였다. 본 연구에서는 알콜함량이 초산생성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 2% 간격으로 0~8% 알콜범위에서 알콜을 첨가한 후 초산생성능을 조사하였다. 그 결과는 Fig. 1에서 보는 바와 같다. 4%의 알콜농도에서 최고의 초산생성량을 나타내었고, 초산균의 성장은 2%에서 최고를 나타내었다. Kim 등(10)은 재래식 방법으로 제조한 식초에서 분리한 *Acetobacter* sp. VC-2의 경우 매실초 제조를 위한 초산생성용 매실즙 배지에서 에탄올 농도가 초산발효 시 초산 생성량에 미치는 영향을 조사한 연구에서 알코올의 초기농도가 6%일 때 가장 효과적인 것으로 보고하여 본 연구와 상이하였다. 그러나 Hong 등(2)은 단감을 이용한 식초제조 시 초산 발효의 기질인 알코올을 일정량 첨가하면 초기에 빠른 산의 증가에 따른 pH의 감소로 인한 잡균의 증식억제와 함께 산생성이 급격히 증가하는데, 알코올 4%첨가구의 최종 산도는 4.86%로서 관능적인 향미가 우수하지만, 알코올 6% 첨가구는 산생성이 저해되어 대조구보다 산도가 낮고 강한 자극취와 관능적인 향미가 부적합하므로 알코올을 4% 첨가시키는 방법이 효과가 좋다고 보고하여 본 실험의 결과를 뒷받침하였다.

전통적으로 생산되고 있는 발효식초는 실온에서 발효시키므로 외부 기온의 변화에 따라 품질의 차이가 나타날 수 있다. 따라서 발효온도별 초산생성을 조사하기 위하여 5°C 간

Table 1. Levels of acetate fermentation conditions in experimental design

X_i	Fermentation condition	Level				
		-2	-1	0	1	2
X_1	Alcohol content (%)	2	4	6	8	10
X_2	Temperature (°C)	20	25	30	35	40
X_3	Sugar content (%)	2	4	6	8	10

Table 2. Central composite design by RSM computer program for optimization of acetate fermentation conditions

Treatment number	Alcohol content (%)	Temperature (°C)	Sugar content (%)
1	4 (-1)	25 (-1)	4 (-1)
2	4 (-1)	25 (-1)	8 (1)
3	4 (-1)	35 (1)	4 (-1)
4	4 (-1)	35 (1)	8 (1)
5	8 (1)	25 (-1)	4 (-1)
6	8 (1)	25 (-1)	8 (1)
7	8 (1)	35 (1)	4 (-1)
8	8 (1)	35 (1)	8 (1)
9	6 (0)	30 (0)	6 (0)
10	6 (0)	30 (0)	6 (0)
11	10 (2)	30 (0)	6 (0)
12	2 (-2)	30 (0)	6 (0)
13	6 (0)	40 (2)	6 (0)
14	6 (0)	20 (-2)	6 (0)
15	6 (0)	30 (0)	10 (2)
16	6 (0)	30 (0)	2 (-2)

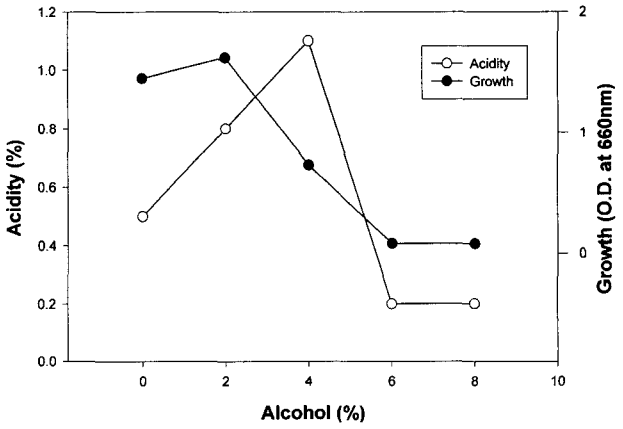

Fig. 1. Effects of alcohol content on the acetic acid production by *Acetobacter aceti* KCTC 1010.

격으로 20~40°C의 온도범위에서 72시간동안 각각 배양한 결과는 Fig. 2에서 보는 바와 같다. 일반적으로 초산발효 시 배양 온도가 너무 낮으면 발효속도가 늦어지고 너무 높으면 에탄올 및 초산 손실이 일어나 풍미를 잃게되는데, 본 연구에서도 40°C에서 배양된 시험구가 가장 낮은 초산함량을 나타내었으며, 30°C와 35°C에서 배양한 시험구는 비슷한 양상이었으나, 35°C에 배양한 시험구에서 조금 더 높은 함량을 나타내었다. 한편, 초산균의 성장은 30°C에서 최고치를 나타내었으나 이 이상의 온도에서는 급격히 감소하는 것으로 나타났다. Kim 등(10)은 재래식 방법으로 제조한 식초에서 분리한 *Acetobacter* sp. VC-2의 경우 매실초 제조를 위한 초산생성용 매실즙배지에서 증식 최적 온도가 30°C이며, 초산생성량도 증식 최적 온도에서 가장 높게 나타났다고 보고하여 본 실험의 결과와 유사하였으나, Lee 등(12)이 분리균 *Acetobacter* sp. DS-118을 이용하여 알로에 식초의 발효조건을 검토한 결과에서 25°C가 최적 발효 온도라고 보고한 것과는 조금 차이가 있었다. Hong 등(2)은 식초 생산을 위한 감 배지를 제조하여 25°C, 30°C 및 35°C의 발효온도로 산생성능을 조사한 결과 온도가 높을수록 발효 후기의 산 생성량이 높게 나타나며 특히, 35°C의 경우는 발효 초기부터 급격히 증가하는 것으로 나타났으나 실제 공정에서 온도의 증감폭이 ±5°C인 점을 고려하면 온도 조절에 실패하여 40°C에 달할 경우 제품이 부패하기 쉬우므로 최적 발효는 30°C가 적합할 것이라고 보고하였다.

발효기간별 초산 함량과 초산균의 생육도 변화를 조사한 결과는 Fig. 3에서 보는 바와 같이 120시간 동안 계속적으로 산 생성이 증가하여 약 2.1%의 초산함량을 나타내었으며, 초산균의 성장도 발효시간에 따라 비례적으로 증가하는 것으로 나타났다.

반응표면분석법에 의한 초산발효의 최적화

초산생성의 최적화를 위해 중심합성계획법에 따라 각 독립변수를 알콜함량, 발효온도 및 당함량으로 요인변수들을 -2, -1, 0, 1, 2로서 5개로 부호화하여 초산 생성능을 조사한

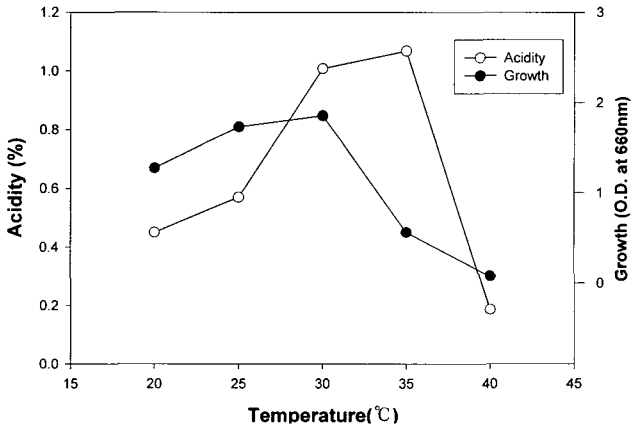

Fig. 2. Effects of fermentation temperatures on the acetic acid production by *Acetobacter aceti* KCTC 1010.

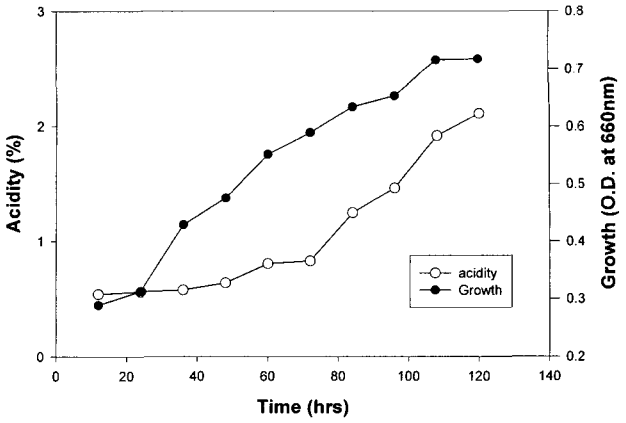

Fig. 3. Acetic acid production from mume by *Acetobacter aceti* KCTC 1010 during the fermentation time.

결과는 Table 3과 같고, 반응변수인 초산생성능에 미치는 독립변수의 영향을 나타낸 결과는 Table 4에서 보는 바와 같이 독립변수 중 알콜함량이 가장 큰 영향을 끼치며, 알콜함량은 1%수준($p<0.01$)에서 유의성이 인정되었다.

수립된 회귀식에 대해 분산분석한 결과는 Table 5에서 보는 바와 같다. F검정결과, 반응변수는 수립된 회귀식에 1% 수준($p<0.01$)에서 유의성을 나타내었으며, 다중회귀분석결과 일차항은 1%수준($p<0.01$)에서, 이차항은 5%수준($p<0.05$)에서 유의성이 인정되었고, 변수상호간에는 유의성이 없는 것으로 나타났다. 이차회귀식에 의하여 형성된 반응표면결

Table 3. Experimental design for acetic acid production under different conditions of alcohol content, temperature and sugar content

Treatment number	Alcohol content (%)	Temperature (°C)	Sugar content (%)	Acetic acid content (%)
1	4 (-1)	25 (-1)	4 (-1)	2.42
2	4 (-1)	25 (-1)	8 (1)	2.29
3	4 (-1)	35 (1)	4 (-1)	3.43
4	4 (-1)	35 (1)	8 (1)	4.44
5	8 (1)	25 (-1)	4 (-1)	1.83
6	8 (1)	25 (-1)	8 (1)	1.28
7	8 (1)	35 (1)	4 (-1)	0.97
8	8 (1)	35 (1)	8 (1)	0.97
9	6 (0)	30 (0)	6 (0)	2.22
10	6 (0)	30 (0)	6 (0)	2.22
11	10 (2)	30 (0)	6 (0)	1.01
12	2 (-2)	30 (0)	6 (0)	6.09
13	6 (0)	40 (2)	6 (0)	0.81
14	6 (0)	20 (-2)	6 (0)	1.32
15	6 (0)	30 (0)	10 (2)	2.55
16	6 (0)	30 (0)	2 (-2)	3.59

Table 4. Analysis of variance showing significant effects of fermentation variables on acetic acid production

Fermentation variables	Degrees of freedom	Sum of squares	Prob>F
Alcohol content (%)	4	23.98	0.0011
Temperature (°C)	4	4.10	0.0787
Sugar content (%)	4	1.52	0.3559

Table 5. Analysis of variance showing effects of treatment variables as linear or quadratic terms and interaction (cross product) effect on response variables

Source	Degrees of freedom	Sum of squares	Prob>F
Model	9	29.93	0.0036
Linear	3	19.85	0.0010
Quadratic	3	7.12	0.0145
Cross product	3	2.96	0.0905
Variability explained (R^2)		0.9462	

$Yn=-7.383500+0.341687X_1+0.903375X_2-1.056688X_3-0.054175X_1X_2-0.044687X_1X_3+0.021175X_2X_3+0.083188X_1^2-0.011550X_2^2+0.052938X_3^2$.

과 R^2는 0.9462로 높게 나타났다. Jeong 등(13)은 감을 이용한 식초제조를 위하여 *Acetobacter* sp. PA 97를 공시균으로 알콜발효생성물을 이용한 최적의 초산발효조건에 대한 실험계획으로써 독립변수로 배양시간과 진탕속도를 설정하여 발효조건에 따른 총산을 측정한 결과, 각 조건의 회귀식에서 총산의 R^2는 0.9747이었다고 보고하였다.

초산생성에 대한 독립변수를 알콜농도, 발효온도 및 당농도로 하였을 때 그 변화 정도를 반응표면과 contour map으로 살펴보았다. 각각 알콜농도와 발효온도, 알콜농도와 당농도, 발효온도와 당농도를 함수로 하여 등고선을 그려본 결과, 반응변수에 따른 조건이 일치하지 않아 세가지의 실험변수 중 가장 영향이 적은 것으로 나타난 당농도를 고정시키고 알콜농도와 발효온도간의 최적 조건을 찾고자 하였다. 당농도의 중간값을 6%로 정한 후 알콜농도와 발효온도만을 변수로 하여 분석을 행한 결과 그 변화정도를 알아보기 위해 반응표면과 contour map을 나타낸 결과는 각각 Fig. 4와 Fig. 5와 같다. 이러한 결과에 대한 각 반응변수의 정상점과 정상점에서의 독립변수조건은 정상점이 안장점으로 나타나므로 능선분석을 하여 초산생성능이 가장 높은 조건을 구한 결과는 Table 6에서 보는 바와 같이 알콜함량 8.76%, 발효온도 26.27°C, 당농도 8.42%로 나타났다.

기존의 연구보고에서 초산발효를 위한 발효온도의 경우,

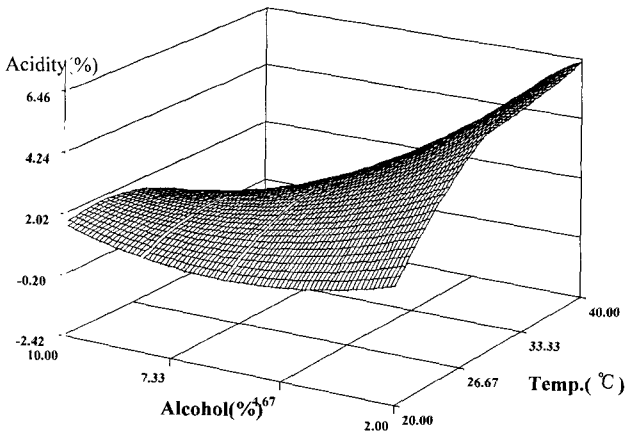

Fig. 4. Response surface for acetic acid production.

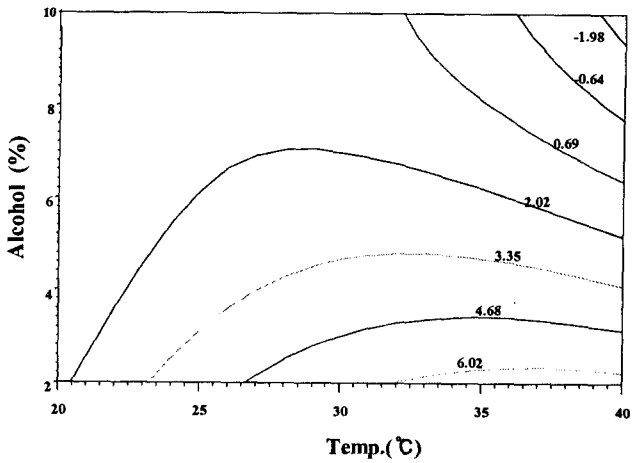

Fig. 5. Contour map for acetic acid production.

Table 6. Predicted levels of fermentation conditions for optimum responses of acetic acid production

Fermentation variables	Levels for optimum responses of acetic acid production
Alcohol content (%)	8.76
Temperature (°C)	26.27
Sugar content (%)	8.42
Morphology	saddle point
Predicted value at stationary point (%)	3.23

Lee 등(12)은 분리균 *Acetobacter* sp. DS-118을 이용한 알로에 식초의 최적 발효 온도가 25°C라고 보고하였다. 당 함량의 경우는 Kim 등(10)은 재래식 방법으로 제조한 식초에서 분리한 *Acetobacter* sp. VC-2의 경우 매실초 제조를 위한 초산생성용 매실즙 배지에서 포도당 0.2% 첨가구에서는 산도 값이 6.5%로 최대치를 보였으나, 0.3% 이상의 첨가구에서는 산도가 오히려 감소하는 것으로 나타나 포도당의 첨가농도가 과량일 경우 초산발효가 저해된다고 보고하였다. Hong 등(2)은 단감을 이용한 식초제조 시 알코올 발효의 기질인 포도당을 첨가할 경우 첨가된 당의 일부만 알코올로 전환되고 나머지는 유해균의 증식과 이취 발생 및 착색에 관여하여 상품성을 저하시키므로 포도당 첨가효과는 부적합하다고 보고하여 본 연구의 결과와는 차이를 나타내었다.

본 연구에서 최적조건 즉, 알콜함량 8.76%, 발효온도 26.27°C, 당농도 8.42%에서의 초산생성 예상치는 3.23%로 나타났다. Park 등(4)은 양파를 이용한 식초제조 시 양파착즙액을 알콜발효하여 얻은 알콜함량 5.8%인 양파주를 양파착즙액으로 희석하여 알콜 함량 4%, 초기산도 2%, 발효온도 30°C에서 20일 동안 발효시켰을 때 총산도는 6.7%였다고 보고하였고 Kim(5)은 무화과를 이용한 *Acetobacter* sp. E에 의한 초산발효는 알코올 8~9%에서 종초를 5% 첨가하여 27~30°C에서 12~14일 발효시키면 산도 7.08~7.56%의 초산 발효액을 얻을 수 있었다고 보고하였다.

요 약

매실을 사용하여 초산을 생산하기 위하여 알콜 농도, 발효 온도, 당 농도의 3변수와 5수준의 fractional factorial design에 의하여 RSM computer program을 사용하여 최적 발효조건을 조사하였다. 초산함량에 대한 회귀분석결과, R^2는 0.9462로 높게 나타났다. 알콜 농도 8.76%, 발효 온도 26.27°C, 당 농도 8.42%에서 발효하는 것이 초산 생성을 위하여 가장 양호하였으며, 이 조건에서의 초산 생성 예상치는 3.23%이었다.

문 헌

1. Oh YJ. 1992. A study on cultural conditions for acetic acid production employing pear juice. *J Korean Soc Food Nutr* 21: 377-380.
2. Hong JH, Lee GM, Hur SH. 1996. Production of vinegar using deteriorated deastringent persimmons during low temperature storage. *J Korean Soc Food Nutr* 25: 123-128.
3. Ko EJ, Hur SS, Choi YH. 1998. The establishment of optimum cultural conditions for manufacturing garlic vinegar. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 27: 102-108.
4. 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: 75-79.
5. Kim DH. 1999. Studies on the production of vinegar from fig. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 28: 53-60.
6. Shim KH, Sung NK, Choi JS, Kang KS. 1989. Changes in major components of Japanese apricot during ripening. *J Korean Soc Food Nutr* 18: 101-108.
7. Bae JH, Kim KJ, Kim SM, Lee WJ, Lee SJ. 2000. Development of the functional beverage containing the *prunus mume* extracts. *Korean J Food Sci Technol* 32: 713-719.
8. Jung GT, Ju IO, Choi JS, Hong JS. 2000. Preparation and shelf-life of soybean curd coagulated by fruit juice of *Schizandra chinensis* RUPRECHT (omija) and *Prunus mume* (maesil). *Korean J Food Sci Technol* 32: 1087-1092.
9. Lee EH, Nam ES, Park SI. 2002. Characteristics of curd yogurt from milk added with maesil (*Prunus mume*). *Korean J Food Sci Technol* 34: 419-424.
10. Kim YD, Kang SH, Kang SK. 1996. Studies on the acetic acid fermentation using maesil juice. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 25: 695-700.
11. Yoon HN. 1998. Simultaneous gas chromatographic analysis of ethanol and acetic acid in vinegar. *Korean J Food Sci Technol* 30: 1247-1251.
12. Lee DS, Ryu IH, Lee KS, Shin YS, Chun SH. 1999. Optimization in the preparation of aloe vinegar by *Acetobacter* sp. and inhibitory effect against lipase activity. *J Korean Soc Agric Chem Biotechnol* 42: 105-110.
13. Jeong YJ, Lee GB, Kim KS. 1998. Optimization for the fermentation condition of persimmon vinegar using response surface methodology. *Korean J Food Sci Technol* 30: 1203-1208.

(2003년 2월 14일 접수; 2003년 6월 2일 채택)