

## 유자식초 제조를 위한 초산균의 분리 및 배양조건

강성구 · 장미정 · 김용두<sup>†</sup>  
순천대학교 식품공학과

### Isolation and Culture Conditions of *Acetobacter* sp. for the Production of Citron (*Citrus junos*) Vinegar

Seong-Koo Kang, Mi-Jeong Jang and Yong-Doo Kim<sup>†</sup>

Department of Food Science and Technology, Sunchon National University, Suncheon 540-742, Korea

#### Abstract

In order to produce vinegar using citron (*Citrus junos*), acetic acid bacteria were selected from several conventional vinegars, and total 25 acetic acid producing bacterial strains were isolated. Among the isolated strains, a strain was selected from the medium which showed the highest productivity of acetic acid. The strain was identified as *Acetobacter* sp. V-16 and its cultural characteristics were also investigated in the medium with citron juice. Optimum temperature for the growth of *Acetobacter* sp. V-16 was 30 °C. The medium containing 2% acetic acid, 5% ethanol, and 30% citron juice was suitable for acetic acid production with *Acetobacter* sp. V-16. The acidity of culture medium was reached to 6.8% after 10 days shaking cultivation at 30 °C.

**Key words** : citron (*Citrus junos*) vinegar, *Acetobacter* sp. V-16, acetic acid

#### 서 론

최근에 우리의 식문화가 인스턴트화된 가공식품이 주류를 이루고 있는 실정이나 생활수준의 향상으로 건강에 대한 관심이 고조되면서 자연식과 천연 가공식품의 방향으로 진행되어 지고 있다(1,2).

향과 맛이 독특한 유자도 근래에 많은 관심을 갖게 된 것 중의 하나인데, 유자차, 유자쥬스, 유자식초 등의 천연가공식품으로 많은 연구의 대상이 되고 있다. 유자는 비타민 C, 무기질, 유기산, pectin 및 생리활성물질 뿐만 아니라 좋은 향기도 많이 함유되어 있으나 다량의 쓴맛을 함께 함유하고 있고, 생과일은 생식으로는 거의 불가능하여 간단한 가공이라도 거쳐야만 식용이 가능하다(3,4). 최근 우리나라는 생산량이 급증하여 유자의 소비촉진 및 부가가치의 향상을 위해 유자생산자 단체나 생산지역 농협을 중심으로 유자가공공장을 설립하여 운영되고 있으나, 기호성과 상품성을 높일 수 있는 제품의 개발, 저장성 향상 및 제조설

비에 관한 체계적이고 합리적인 공장설계 등에 관한 연구가 미흡한 실정이다.

한편, 식초는 동·서양을 막론하고 오랜 역사를 지닌 발효식품으로, 우리 일상생활과 밀접한 관련을 맺고 있으며 특유의 강한 산성 때문에 식품 내 유해 미생물의 생육을 억제하는 효과가 있다. 식초는 소량의 휘발산 및 비휘발성의 유기산, 당류, 아미노산, ester 등을 함유한 독특한 방향과 신맛을 가진 대표적인 발효식품이다(5). 또한 식초는 수세기를 통해 여러 가지 원료를 사용하여 많은 종류의 식초가 제조되어 왔다. 국내에서는 양조식초는 알코올을 주원료로 사용하고 곡물이 4% 이상 함유된 곡물식초, 과즙이 30% 이상 함유된 과일식초의 형태로 시판하고 있다. 과일이나 채소를 이용하여 식초를 제조하고자 하는 연구로는 Kim 등(6)의 매실식초, Kim 등(7)과 Jeong 등(8)의 감식초, Lee 등(9)의 감자식초, Oh 등(10)의 배식초, Ko 등(11)의 마늘식초, Park 등(12)과 Shin 등(13)의 양파식초, Kim 등(14)의 무화과 식초, Seo 등(15)의 과일식초, 등 다양한 식품부채료를 첨가하여 식초제조 조건에 대한 연구들이 이루어지고 있는 실정이다. 그러나 유자를 원료로 하는 식초 제조에

<sup>†</sup>Corresponding author. E-mail : kyd4218@sunchon.ac.kr,  
Phone : 82-61-750-3256, Fax : 82-61-750-3256

관한 연구로는 Shim 등(16)이 발효온도, 알코올농도 및 초기산도 등의 최적조건에 대한 보고가 있을 뿐 이에 대한 연구가 미흡한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 유자의 소비책의 일환으로 전보(17)에 이어 유자즙액을 이용한 발효식초를 개발하기 위하여 재래식 식초 20종의 종초로부터 초산 생성능이 우수한 초산균을 순수 분리하였고, 이 균을 사용한 유자식초 배양 조건에 대하여 조사한 결과를 보고 하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 시 료

본 실험에 사용한 유자는 2001년 11월에 전남 순천시 해룡면에서 수확한 중량 120 g내외의 생과를 구입하여 0℃에 보관하면서 착즙하여 즙액(°Brix; 11, 총산; 3.8)은 4℃에서 냉장 보관하면서 발효와 분석 시료로 사용하였다.

### 사용배지

초산 생산균 분리용 평판 배지는 yeast extract 1%, glucose 5%, CaCO<sub>3</sub> 3%, agar 2.5%에 에탄올이 3% 함유된 배지를 사용하였으며, 초산 생산균 분리용 액체배지는 yeast extract 1%; glucose 5%가 함유된 배지에 알코올이 3% 함유된 배지를 사용하였다. 그리고 유자식초 생산용 액체배지는 yeast extract 1%, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.06%, glucose 0.5%의 함유된 기본 배지에 유자즙액(v/v)과 알코올을 각각의 농도별로 첨가하여 사용하였다.

### 공시균주의 분리

초산발효에 이용된 초산균은 재래식 발효방법으로 제조된 전남 순천시 인근 가정으로부터 수집된 20점의 종초에서 분리된 초산생성균 중 가장 산생성능이 우수한 균주를 이용하였다. 즉, 수집된 종초를 30℃에서 24시간 동안 활성화시킨 후, 생리식염수로 적절하게 희석하여 각각의 분리 시료에서 0.2 mL를 분리용 평판배지에 도말접종하고 30℃에서 3일 동안 배양하여 colony 주위에 투명환을 형성하는 균을 순수분리하였다. 고체배지에서 분리된 균을 다시 초산 생산균 액체배지 200 mL에 1백금이 접종하고 30℃에서 3일간 진탕배양(150 rpm) 한 후, 초산 생성능이 가장 우수한 균주를 최종적으로 선정하였다.

### 공시균주의 동정

분리된 균주 중 초산생성능이 우수하다고 판정된 공시균주의 형태 및 생화학적 특성은 Mac Faddin(18)의 방법에 준하였으며, 균의 동정은 Krieg과 Holt(19)의 방법에 따라 실시하였다.

### 초산 생성 배양 방법

삼각 플라스크에 유자식초 생산용 액체배지를 200 mL씩 넣고 공시균주 배양액을 0.1%가 되게 접종한 후, 진탕배양기(Vision Co., MFC 8480, Korea)에서 30℃, 150 rpm으로 12일간배양하면서 산도변화를 측정하였다.

### 증식온도

유자식초 생산용 액체배지에서 공시균주의 증식 최적 온도를 조사하기 위하여 3% 에탄올과 유자식초 생산용 액체배지에 분리균주를 접종하여 5℃ 간격으로 20-40℃의 온도범위에서 48시간 진탕배양 한 다음 균의 증식을 측정하였다.

### 초기산도 및 초기 알코올 농도

초기산도가 미치는 영향을 보기 위하여 3% 알코올이 함유된 유자식초 생산용 액체배지의 초기산도를 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0%로 각각 조절하여 시험 배양액으로 사용하였으며, 알코올 농도가 미치는 영향을 보기 위하여 유자식초 생산용 액체배지에 알코올 함량을 3, 5, 7 및 9%로 되게 각각 첨가된 배지에 공시균주를 접종하여 배양 경과에 따른 초산 생산량을 조사하였다.

### 유자즙액 농도

유자즙액의 첨가농도가 공시균주를 이용한 초산발효에 미치는 영향을 검토하기 위하여 알코올 3%와 기본배지에 유자즙액이 10~40%까지 10% 간격으로 첨가된 배지에 공시균주를 접종하여 배양 경과에 따른 초산 생산량을 조사하였다.

### 증식도 측정

진탕배양시의 균 증식도는 spectrophotometer(Jasco Co., V-570, Japan)를 사용하여 배양액의 흡광도(660 nm)로 나타내었다.

### 산도 측정

산도측정은 0.1% phenolphthalein을 지시약으로 하여 0.1N NaOH 용액으로 중화 적정하고 acetic acid 로 환산하여 나타내었다.

### 발효효율

발효 초기산도에 따른 이론적인 초산생성량에 대한 순수 초산생성량을 백분율로 나타내었다.

$$\text{발효효율} = \frac{\text{최종산도}(\%, \text{w/v}) - \text{초기산도}(\%, \text{w/v})}{\text{초기 알코올 농도}(\%, \text{v/v}) \times 1.304} \times 100$$

## 결과 및 고찰

### 초산생산 균주의 분리

초산 생성력이 우수한 균주를 선정하기 위해 가정에서 수집된 종초로부터 초산균 분리용 평판배지에서 colony의 주위에 투명환을 형성하는 25개의 초산 균주를 순수 분리하였으며, 이들 균주를 3%의 알코올을 함유한 초산 생산균 분리용 액체배지에 각각 다시 접종하여 30°C에서 3일간 진탕배양한 후 초산 생성능을 비교한 결과는 Table 1과 같다. 25개 균주 중 V-16균주가 2.58%로 초산 생성능이 가장 높은 균주로 나타났으며, 다음으로는 V-22, V-17, 및 V-24 균주 등이 2.52%, 2.49%, 2.46%로 각각 나타났다. 따라서 다른 균주에 비하여 초산 생성능이 가장 우수하다고 인정된 V-16균주를 공시균주로 최종 선정하였다.

Table 1. The acetic acid producing ability of strains isolated from the seed culture using conventional vinegar

Strains No.	Acidity (%)
V - 1	1.32
V - 2	1.23
V - 3	1.38
V - 4	1.41
V - 5	1.35
V - 6	1.38
V - 7	1.32
V - 8	1.08
V - 9	1.41
V -10	1.17
V -11	2.43
V -12	2.19
V -13	2.16
V- 14	2.10
V -15	2.28
V -16	2.58
V -17	2.49
V -18	2.13
V -19	2.22
V -20	2.43
V -21	2.34
V -22	2.52
V -23	2.16
V -24	2.46
V -25	2.19

### 분리균주의 동정

공시균주의 형태 및 생리학적 특성을 조사한 결과는 Table 2와 같다. 알코올을 산화하여 초산을 생산하는 Gram 음성간균으로서 catalase 생성능 및 운동성을 나타내었다. 그리고 당 발효성은 dextrin, glucose, maltose를 발효하여 gas를 생성하였으며, arabinose, fructose, inulin, raffinose, rhamnose, sucrose 등은 발효하지 못하였다. 또한 알코올 발효성에 있어서 ethanol과 propanol을 발효하였으며 methanol, amyl alcohol 및 butanol은 발효하지 않았고, 질산염 및 nutrient broth와 GYC medium을 자화하였다. 이상과 같은 당발효성, 알코올발효성, 질소원 등의 이용을 검토한 결과, *Acetobacter aceti* 속으로 동정되었으나 정확한 species는 알 수 없었다. 따라서 이 균주를 *Acetobacter* sp. V-16으로 명명하였다.

Table 2. Morphological and physiological properties of strain V-16

Test	V-16
Shape	rod
Gram reaction	-
Catalase	+
Motility	+
Oxidation of Carbohydrate	
Arabinose	-
Dextrin	+
Fructose	-
Glucose	+
Inulin	-
Lactose	-
Maltose	+
Raffinose	-
Rhamnose	-
Sucrose	-
Nitrate reduction	+
Oxidation of Alcohol	
Ethanol	+
Methanol	-
Propanol	+
Amyl alcohol	-
Butanol	-
Nutrient broth	+
Growth on GYC Medium	+

+: Positive, -: Negative.

**증식 최적온도**

3% 알코올과 유자식초 생산용 액체배지에서 발효온도를 25℃, 30℃, 35℃ 및 40℃로 하여 2일 동안 진탕배양하여 공시균주의 증식도를 살펴본 결과는 Fig. 1과 같다. 즉, 발효 온도 30℃에서 최대의 균증식을 보였으며, 초산생성량도 증식 최적온도에서 가장 높게 나타났다. 또한 25℃와 35℃에서 증식은 비슷하게 나타나고 있으나 25℃보다 온도가 낮아지거나 35℃보다도 높아지면 증식이 급격히 낮아지는 경향을 나타냈다. 이와 같은 결과로 볼 때, 초산발효 시 배양 온도가 너무 낮으면 발효속도가 늦어지고, 너무 높으면 알코올 및 초산 손실이 일어나 풍미를 잃게 되는데, 본 실험에서 분리한 공시균주는 생육적온이 30℃로 초산발효에 유용한 균주로 생각되었다.

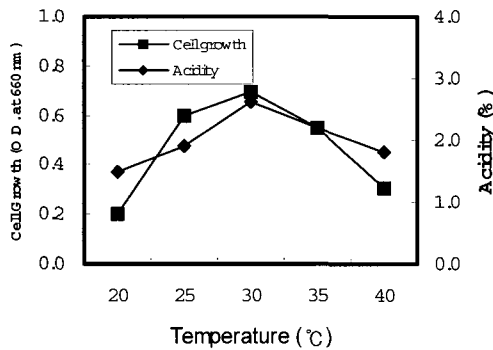


Fig. 1. Effects of temperature on the growth of *Acetobacter* sp. V-16 for 48 hr.

**초산발효 효율에 미치는 초기산도의 영향**

*Acetobacter* sp. V-16 균주를 이용한 유자식초의 발효 최적조건을 찾기 위하여 3% 알코올이 함유된 유자식초 생산용 액체배지의 초기산도를 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 및 3.0%로 각각 조절하여 30℃에서 12 일간 발효하여 총산을 조사한 결과, 각 처리별 발효효율은 Fig. 2와 같다. 일반적으로 초산발효 시 잡균오염방지를 위하여 초기산도를 조절하여 주게 되는데, *Acetobacter* sp. V-16 균주는 초기산도가 2% 처리구에서 발효효율이 86.9%로 가장 높게 나타났다. 초기산도 1.0와 1.5%에서는 발효효율 56.2%로 초산발효가 잘 진행되지 않은 것으로 나타났으며, 2.5%와 3.0%에서는 발효효율이 각각 69.0%와 40.9%로 나타나 처리 농도가 높아질수록 감소하는 경향을 보였다. 따라서 유자식초 발효 시 초기산도는 2%로 조절하는 것이 적당한 것으로 판단되었다. Kim 등(20)의 보고에 의하면 식초제조 시 초기산도가 증가 할수록 초산발효의 유도기가 길어지므로 초기산도를 2%로 조절하는 것이 적당하다고 하였으며, Oh의 보고(10)에 따르면 초기산도 0.5 및 1.0%에서는 산막유해균의 오염으로 초산발효가 잘 진행되지 않았으며 2%이상에서는 별 차이

기 없었다고 보고하였는데, 본 실험결과와 비슷한 결과를 보였다.

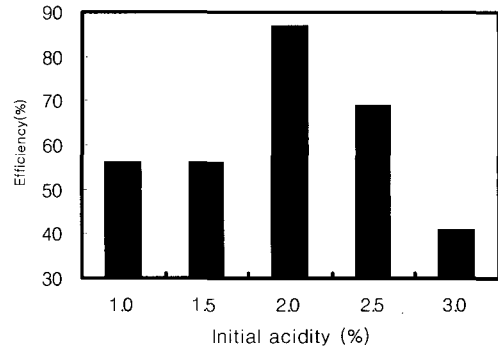


Fig. 2. Effect of initial acidity on the acetic acid production by *Acetobacter* sp. V-16 at 30℃ for 12 days.

**유자즙액 첨가농도의 영향**

유자즙액의 첨가농도가 *Acetobacter* sp. V-16 균주를 이용한 초산발효에 미치는 영향을 검토하기 위하여 알코올 3%와 기본배지에 유자즙액이 10~40%까지 10%간격으로 첨가된 배지(초기산도 2)에 공시균주를 접종하여 30℃에서 12 일간 진탕배양하면서 경시적으로 유자즙액 첨가농도별로 초산 생성능을 조사한 결과는 Fig. 3과 같다. 유자즙액 농도가 30%와 20%첨가구에서 발효정지기인 10일경에 각각 4.9%와 4.2%로 비교적 높게 나타났으나 10%와 40%첨가구에서는 상대적으로 낮게 나타났다. 또한 유자즙액 농도가 증가함에 따라 황갈색이 증가함을 보이고 있는데, 특히 농도가 높은 40% 첨가구의 색상은 유자즙액과 비슷할 정도로 불투명한 황색을 나타냈다. 이와 같은 결과로 보아 유자식초의 색상, 생산 원가 등을 고려할 때 유자즙액의 함유 농도가 10%이하와 40%이상의 첨가 농도는 적당하지 않은 첨가농도로 생각되며, 식품규격과 관능성 등을 종합적으로 고려할 때 유자즙액 첨가농도는 30%가 가장 좋을 것으로 판단되었다.

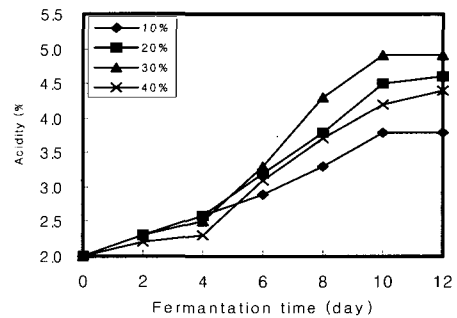


Fig. 3. Effect of citron juice concentration on the acetic acid production by *Acetobacter* sp. V-16 at 30℃ for 12 days.

**초기 알코올 농도의 영향**

초기 알코올 첨가농도가 *Acetobacter* sp. V-16 균주를 이용한 초산발효에 미치는 영향을 검토하기 위하여 유지즙액 30%와 알코올 함량을 3, 5, 7 및 9%로 되게 각각 첨가한 유자식초 생산용 액체배지(초기산도 2)를 30℃에서 12일간 진탕배양 하면서 배양 경과에 따른 초산 생산량을 조사한 결과는 Fig 4와 같다. 알코올 3% 첨가구는 배양 6일 만에 산도 값이 4.9%에 도달하였으나 이후에는 증가하지 않았으며, 에탄올 5% 첨가구는 배양 10일째에 4개 처리구 중에서 가장 높은 산도 값 6.8%를 보였으나 이후 생성된 초산이 산화 분해되어 산도는 감소하는 경향을 보였다. 반면 알코올 농도 7%에서는 발효 10일째에 4.3%로 오히려 낮은 산도 생성을 보였으며, 특히 9% 첨가구는 배양 10일째에도 산도 증가가 보이지 않았는데 이는 알코올 농도가 높을수록 유도가 길어지고 균의 생육이 억제되기 때문인 것으로 생각된다. 이상의 결과로 미루어 보아 본 실험에서 분리 동정된 *Acetobacter* sp. V-16 균주를 이용한 유자식초생산에는 알코올의 초기농도는 5%일 때 가장 효율적인 것으로 나타났다.

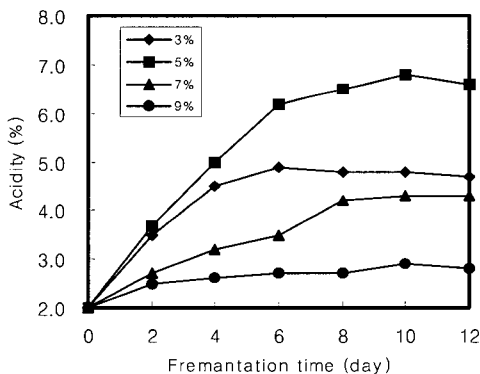


Fig. 4. Acetic acid production from *Acetobacter* sp. V-16 by initial ethanol concentration during the incubation period at 30℃ for 12 days.

**요 약**

유자즙액을 이용한 식초생산을 위하여 초산생성능이 우수한 초산균을 재래초로부터 분리, 동정하고 유자식초 제조를 위한 최적 발효조건을 검토하였다. 재래초로부터 분리한 25균주 중 초산 생산균 분리용 배지에서 초산 생성능이 가장 우수한 균주로 최종 선정된 균주는 *Acetobacter* sp. V-16 으로 동정되었다. 이 균주의 유자식초 생산용 액체 배지에서 배양조건을 살펴본 결과, 최적온도는 30℃이었으며, 초산생성에 적합한 배지의 조성은 초기산도 2%, 알코올 농도 5% 및 유지즙액 30%가 함유된 배지였다. 유자식초

생산 최적조건은 5% 알코올과 유지즙액 30%가 첨가된 배지를 이용하여 30℃에서 진탕배양 시 10일 만에 최고 산도인 6.8%에 도달하였다.

**감사의 글**

본 연구는 농림부 농림기술개발사업의 연구비에 의하여 수행된 결과의 일부이며, 이에 깊이 감사드립니다.

**참고문헌**

1. Lee, G.D. and Jeong, Y.J. (1998) Optimization on organoleptic properties of *Kochujang* with addition of persimmon fruits. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 27, 1132-1136
2. Jeong, Y.J. Seo, J.H. Park, N.Y. Shin, S.R. and Kim, K.S. (1999) Changes in the components of persimmon vinegars by two stages fermentation(II). *Korean J. Post-harvest Sci. Technol. Agri. Products.* 6, 233-238
3. Kim, O.B. (1944) Cultural technology of citron. Ouseong publ. Co. Korea. p.31
4. Jeong J.W., Lee Y.C., Kim I.H., Kim J.H. and Lee K.M. (1977) Technological development of processing utilization and storage of domestic citrons. *Korean Res. Ins.* G1229-0822
5. Jeong, Y.J. and Lee, M.H. A view and propect of vinegar industry. (2000) *Food Indust. Nutr.*, 5, 7-12
6. Kim, Y.D., Kang, S.H. and Kang, S.K. (1996) Studies on the acetic acid fermentation using *Maesil* juice. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 25, 695-700
7. Kim, S.K., Lee, G.D. and Chung, S.K. (2003) Monitoring on fermentation of persimmon vinegar from persimmon peel. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 35, 642-647
8. Jeong, Y.J., Lee, G.D. and Kim, K.S. (1998) Optimization for the fermentation conditions of persimmon vinegar using response surface methodology. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 30, 1203-1208
9. Lee, G.D., Jeong, Y.J., Seo J.H. and Lee, J.M. (2000) Monitoring on alcohol and acetic acid fermentation of potatoes using response surface methodology. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 29, 1062-1067
10. Oh, Y.J. (1992) A study on cultural conditions for acetic acid production employing pear juice. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 21, 377-380
11. Ko, E.J., Hur, S.S. and Choi, Y.H. (1998) The

- establishment of optimum cultural conditions for manufactory of garlic vinegar. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr., 27, 102-108
12. Park, Y.K., Jung, S.T., Kang, S.G., Park, I.B., Cheun, K.S. and Kang, S.K. (1999) Production of a vinegar from onion. Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 27, 75-79
  13. Shin, J.S., Lee, O.S. and Jeong, Y.J. (2002) Changes in the components of onion vinegars by two stages fermentation. Korean J. Food Sci. Technol., 34, 1079-1084
  14. Kim, D.H. Studies on the production of vinegar from fig. (1999) J. Korean Soc. Food Sci. Nutr., 28, 53-60
  15. Seo, J.H., Kim, Y.J. and Lee, K.S. (2003) Comparison of physicochemical characteristic of fruit vinegars produced from two-stage fermentation. Food Indust. Nutr., 8, 40-44
  16. 심기환, 남기봉 (1995) 유자 부산물 이용 천연식초 가공 상품화 기술개발, 농촌진흥청 내고장 새기술 개발 산업 보고서. p.28-29.
  17. Kang, S.K. Jang, M.J. and Kim, Y.D. (2006) A study on the flavor constituents of the citron (*Citrus junos*). Korean J. Food Preser., 13, 204-210
  18. Mac Faddin, J.F. (1980) Biochemical tests for identification of medical bacteria. Williams Baltimore/London, p.162
  19. Krieg, N.R. and Holt, J.G. (1984) Bergey's manual of systematic bacteriology. Williams and Wikins, Baltimore/London. p.267
  20. Jeong, S.T., Kim, J.G., Chang, H.S., Kim, Y.B. and Choi, J.U. (1996) Optimum condition of acetic acid fermentation for persimmon vinegar preparation and quality evaluation of persimmon vinegar. Korean J. Post-harvest Sci. Technol. Agri. Products, 3, 171-178

---

(접수 2006년 2월 21일, 채택 2006년 5월 30일)