

2단계 발효로 제조된 고산도 사과식초의 품질지표성분 설정

조윤희 · 박윤지 · 이현규 · 이혜진 · 정용진¹ · 여수환² · 권중호*
경북대학교 식품공학부, ¹계명대학교 식품가공학과, ²농촌진흥청 발효이용과

Determination of Quality Index Components in High-Acidity Cider Vinegar Produced by Two-Stage Fermentation

Yunhee Jo, Yunji Park, Hyun-Gyu Lee, Hye-Jin Lee, Yong-Jin Jeong¹, Soo-Hwan Yeo², and Joong-Ho Kwon*

School of Food Science and Technology, Kyungpook National University

¹Department and Food Science and Technology, Keimyung University

²Fermentation and Food Processing Division, Department of Agrofood Resources, NASS, RDA

Abstract In this study, high-acidity cider vinegar (HACV) was produced by alcoholic and acetic acid fermentation of apple concentrate without any nutrients and then the optimum alcohol concentration was determined through a qualitative study. HACV was fermented with different initial alcohol concentrations (6-9%) during the process of acetic acid fermentation. The highest content of reducing sugar, organic acids, and free amino acids was observed at 6% of initial alcohol concentration. Approximately 20 types of volatile compounds were identified by solid-phase microextraction (SPME) and GC-MS. The total volatile content was the highest at 6% of initial alcohol concentration, and the acid content was the lowest at 9% of the initial alcohol concentration. The HACV produced by a two-stage fermentation process was qualitatively better than commercial HACV presenting the highest value at 6% of initial alcohol concentration. Malic acid, aspartic acid, and hexyl acetate were selected as quality index components of HACV production by two-stage fermentation on the basis of correlation between their physicochemical properties and the sensory attributes of HACV.

Keywords: high-acidity cider vinegar, two-stage fermentation, quality index component, organic acid, SPME/GC-MS

서 론

사과는 장미목 장미과에 속하는 사과나무의 열매로써, 세계적으로 가장 널리 재배되고 많이 소비되는 과일 중 하나이다(1,2). 최근 시장개방의 확대로 과일의 수입이 증가하는 반면 소비는 감소하고 있어 과잉공급 문제가 발생하고 있다. 미국의 경우 사과를 이용한 가공품 생산비율이 50%를 넘는 반면 우리나라는 생과로 소비하는 비율이 90% 이상을 차지하고 있어, 사과산업의 활성화를 위해 소비자의 요구를 만족시킬 수 있는 다양한 가공품의 개발이 필요하다(3).

식초는 특유의 자극적인 향과 신맛을 지닌 발효식품 중 하나로, 휘발성 및 비 휘발성 유기산, 당, 아미노산, 에스테르 등을 함유하고 있다(4,5). 초산을 주성분으로 하는 식초는 체지방 감소, 피로회복, 성인병 예방 등의 다양한 효과가 알려져 있고, 식초음료 열풍과 함께 기능성식초 시장 또한 성장하고 있다(6). 우리나라의 경우 1970년대까지는 빙초산을 원료로 한 합성식초가, 1980년대부터 주정을 사용하는 양조식초가 주를 이루었으며, 1970년대부터 대량으로 시판되고 있는 사과식초는 주로 주정을 희석하

여 30% 내외의 사과과즙과 무기염을 첨가한 형태로 생산되고 있다. 최근에는 곡물 및 과일 100%를 사용한 천연발효식초를 중심으로 식초시장의 고급화, 다양화가 이루어지고 있고, 이에 따라 천연원료로 알코올 발효한 술덧을 다시 초산 발효하는 2단계 발효제품이 생산되고 있으며, 소비 또한 크게 성장할 것으로 기대된다(7). 한편, 식초는 산도에 따라 4-5%의 저산도, 6-7%의 일반산도, 12-14%의 2배 산도, 18-19% 3배 식초로 구분되며, 산도 10% 이상의 고산도 식초는 운송비용의 절감과 저장 공간의 감소라는 이점이 있어 많이 소비되고 있다(8). 현재 고산도 식초에 대한 국내 연구로는 고농도 에탄올 내성 초산균의 분리(9), 고산도 초산균의 생육특성(10), 1단계 및 2단계 발효에 의한 고산도 식초 생산(11,12) 등이 있으나, 원료 100%를 이용한 고산도 식초의 개발 및 그 품질특성에 관한 연구는 미흡한 상황이다.

본 연구에서는 사과농축액의 2단계 발효를 통한 고산도 사과식초 제조 시 초기 알코올농도에 따른 초산발효 결과를 통해 최적의 초기 알코올농도를 설정하였다. 또한 사과농축액의 2단계 발효로 제조된 고산도 사과식초와 시판 주정발효 고산도 사과식초의 품질차별화를 위해 성분분석 및 관능적 품질평가를 실시하고, 이를 바탕으로 2단계 발효 고산도 사과식초의 품질지표성분을 설정하고자 하였다.

재료 및 방법

재료 및 고산도 사과식초 제조

고산도 사과식초(high-acidity cider vinegar, HACV) 제조에는 사

*Corresponding author: Joong-Ho Kwon, Department of Food Science and Technology, Kyungpook National University, Daegu 41566, Korea
Tel: 82-53-950-5775
Fax: 82-53-950-6772
E-mail: jhkwn@knu.ac.kr
Received May 21, 2015; revised July 2, 2015;
accepted July 2, 2015

과농축액(72°Bx, Daegu Kyoungbuk Apple Nonghyup, Daegu, Korea), 효모(*Saccharomyces cerevisiae* Fermivin, DSM Food Specialties, Seclin, France), 초산균(*Acetobacter pomorum* KJY 8, KCTC 10173BP)을 사용하였고, 식초 제조는 선행연구(13)와 동일하였다. 즉, 사과농축액으로 알코올 발효한 사과주(알코올농도 11%)의 초기 알코올농도를 물을 이용하여 6-8%로 조정 후 1 단계 초산발효를 실시하였다. HACV 제조를 위한 2단계 초산발효 시 최종산도 12%까지 사과주(알코올농도 20%)를 유기식으로 첨가하였다. 이와 같이 사과농축액을 이용하여 초기 알코올농도에 따라 제조된 HACV의 품질 차별화를 목적으로 시판 고산도 사과식초(commercial HACV, CHACV)의 품질을 함께 분석하였다. 라벨에 표기된 초산함량을 기준으로 10% 이상의 제품 3종을 마트에서 구매하였으며, 2배 사과식초(CHACV1, CHACV2) 및 3배 사과식초(CHACV3)로 구분하였다. CHACV1의 경우 농축사과과즙(5.03%), 정제수, 주정, 발효영양원, 사과에센스 등이 함유되어 총 산도 13-14% 범위였고, CHACV2의 경우 사과농축액(5.14%), 정제수, 주요(액상포도당, 주요발효영양원), 주정, 올리고당, 구연산, 합성착향료, 효모추출물 등이 함유되어 총 산도 12-14% 범위였다. CHACV3는 농축사과과즙(5.03%), 주정, 발효영양원, 결정구연산, 사과에센스 등이 함유되어 총 산도 18-19% 범위를 나타내었다. 이상의 시판 식초 3종은 모두 주정이 사용되었고, CHACV3의 경우 구연산도 사용되었다.

환원당, 유기산 및 유리아미노산 함량 분석

환원당 함량은 시료 1 mL에 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 시약 1 mL를 가하여 가열한 후 증류수 3 mL를 가하여 분광광도계(Optizen 2120UV, Mecasys Co., Daejeon, Korea)를 이용하여 546 nm에서 측정하였고, 표준곡선 작성에는 glucose를 사용하였다(14). 시료의 유기산 분석을 위해 sep-pack C₁₈ cartridge로 색소 및 단백질 성분을 제거하고 0.45 µm membrane filter로 여과하여 HPLC (Agilent 1260, Agilent Technol., Palo Alto, CA, USA)로 분석하였다. Aminex HPX-87H column (7.5×300 mm, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)을 사용하여 5 mM sulfuric acid 및 0.6 mL/min 조건으로 분석하였고, UV detector (214 nm)로 검출하였으며, 모든 표준물질은 Sigma 제품을 사용하였다. 유리아미노산 분석을 위해 시료 10 mL와 ethanol 30 mL를 혼합하고 실온에서 24시간 방치한 후 원심분리(8,000 rpm, 15분)하여 단백질을 제거하였다. 상등액을 농축하고 lithium citrate loading buffer (pH 2.2) 10 mL로 용해한 후 0.45 µm membrane filter로 여과하여 amino acid analyzer (L-8800, Hitachi Co. Tokyo, Japan)로 분석하였다(15).

총 페놀, 총 플라보노이드 함량 및 항산화 활성 측정

시료의 총 페놀 함량은 Folin-Ciocalteu 방법(16)에 의해 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준곡선은 gallic acid 용액으로 작성하였고, 시료의 총 페놀 함량은 100 mL 중의 mg gallic acid equivalents (GAE)로 나타내었다. 총 플라보노이드 함량은 Zhishen 등(17)과 Zou 등(18)의 방법에 따라 510 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준곡선 작성에는 catechin을 사용하였고, 시료의 총 플라보노이드 함량은 mg catechin equivalents (CE)/100 mL로 나타내었다. 시료의 항산화 활성은 α,α'-diphenyl-β-picrylhydrazyl (DPPH) (19) 및 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) radical 소거활성(20)으로 각각 517 및 734 nm에서 흡광도를 측정하였고, 시료 첨가구와 비첨가구의 흡광도 차이를 백분율로 나타내었다.

SPME/GC-MS (Solid-phase microextraction/gas chromatography-mass spectroscopy)를 이용한 휘발성분 분석

시료의 휘발성분 포집을 위해 50/30 µm divinylbenzene/carboxen/polydimethyl-siloxane (DVB/CAR/PDMS)으로 코팅된 SPME fiber (Supelco, Bellefonte, PA, USA)를 사용하였고, internal standard로 7% 초산에 용해한 4-pentyl-2-methanol (Fluka, Madrid, Spain)을 사용하였다. Headspace vial (22.5×75 mm, PTFE/silicon septum, aluminum cap)에 시료 2 mL를 넣고 internal standard 20 µL를 넣은 후 250°C에서 5분간 예열 처리된 SPME fiber를 주입하였다. 시료는 70°C heating block에서 20분간 예열되었고, 휘발성분은 SPME fiber를 통해 60분 동안 포집되었으며, GC (Agilent GC 6890, Palo Alto, CA, USA)로 주입 후 탈착을 위해 2분 동안 유지되었다. 휘발성분 분석을 위하여 MSD (mass selective detector)가 부착된 GC를 사용하였고, fused silica capillary column (DB WAX; 60 m×0.25 mm×0.25 µm) 및 헬륨 가스(1 mL/min)를 이용하였다. Oven 온도는 35°C에서 10분간 유지되었고 100°C까지 분당 5°C로 210°C까지 분당 3°C로 상승시켜 1분간 유지되었다. MS system은 MS interface 250°C, ion source 230°C 및 MS quadrupole 150°C 조건이었고, Wiley 7/NIST 05 Library (mass spectral search program, version 5.0, Agilent technologies, Santa Clara, CA, USA)를 사용하였다(21).

관능평가

초기 알코올농도에 따른 HACV 중 이화학적 품질이 우수한 식초 1종과 CHACV 3종에 대한 관능평가를 실시하였다. 시료는 관능검사의 경험이 풍부한 50명의 검사원을 대상으로 식초에 대한 강도와 기호도로 나누어 7점 채점법(1점: 매우 약하다, 매우 나쁘다; 4점: 보통이다; 7점: 매우 강하다, 매우 좋다)으로 평가하였다. 맛의 경우 높은 산도로 인한 음용의 어려움을 고려하여 10배 희석한 시료를 사용하였고, 나머지 항목에는 원액을 사용하였다.

통계처리

결과는 3회 반복하여 평균과 표준편차로 나타내었고, Statistical Analysis System (SAS, v8.1, SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA)를 이용하여 분산분석(ANOVA)을 실시하고, Duncan's multiple range test로 유의성을 검정하였다. 또한 실험결과 사이의 상관관계를 알아보기 위하여 Pearson 상관분석을 실시하였다.

결과 및 고찰

환원당, 유기산 및 유리아미노산 함량

사과주의 초기 알코올농도에 따른 초산발효 시 HACV의 환원당, 유기산 및 유리아미노산 함량 변화를 관찰하였다(Table 1). HACV의 환원당 함량은 초기 알코올농도 8% 이상의 조건에서, 유기산 및 유리아미노산 함량은 7% 이상의 조건에서 유의적인 감소를 나타내었다($p < 0.05$). 이는 6% 및 7%의 알코올농도에서는 초산발효가 빠른 시간 내에 진행되어 발효 5일차에 고산도 식초가 제조되었으나, 알코올농도가 8% 및 9% 범위로 높을 경우 1 단계 초산발효부터 정상적으로 진행되지 않는다는 선행연구(13)의 결과와 관련 있는 것으로 판단되었다. 즉, 초기 알코올농도 6 및 7%의 경우 2단계 초산발효에서 고농도 사과주의 첨가에 따라 발효가 계속 진행되어 발효 종료시점까지 사과주가 일정한 속도로 계속 주입된 반면, 8% 이상의 초기 알코올농도에서는 사과주의 첨가에 따른 초산발효가 진행되지 않아 고농도 사과주의 첨가가 지속적으로 이루어지지 못하였으므로, HACV의 당, 유기산,

Table 1. Comparison of reducing sugar, organic acids, and free amino acids contents (mg/100 mL) between lab fermented and commercial cider vinegars

Properties	High-acidity cider vinegar (HACV) with different initial alcohol content				Commercial high-acidity cider vinegar (CHACV)		
	6%	7%	8%	9%	CHACV1	CHACV2	CHACV3
Reducing sugar	1975±20 ^{1b}	2016±24 ^b	1871±17 ^c	614±7 ^d	21±0 ^e	4183±42 ^a	11±0 ^e
Organic acids							
Citric acids	137±17 ^b	133±24 ^b	124±27 ^b	114±83 ^b	ND ^{2c}	15±7 ^c	607±2 ^a
Malic acids	583±32 ^a	546±80 ^{ab}	500±56 ^{bc}	473±63 ^c	179±2 ^d	194±15 ^d	74±7 ^e
Oxlaic acids	38±0	32±1	37±2	31±1	ND	ND	ND
Acetic acids	9027±130 ^c	8834±95 ^d	8864±61 ^d	6617±72 ^e	9675±12 ^b	9082±68 ^c	13324±90 ^a
Total	9785 ^b	9545 ^c	9525 ^c	7235 ^c	9854 ^b	9291 ^d	14005 ^a
Free amino acids							
Essential							
Threonine	2.27±0.27	1.25±0.13	1.28±0.17	0.59±0.03	0.27±0.05	0.54±0.04	0.41±0.04
Valine	0.50±0.04	0.10±0.02	0.03±0.01	ND	0.26±0.03	0.54±0.04	0.38±0.04
Methionine	0.22±0.03	0.21±0.03	0.15±0.01	0.11±0.01	ND	ND	ND
Isoleucine	0.27±0.03	0.29±0.03	0.10±0.02	0.10±0.02	0.19±0.04	0.40±0.02	0.26±0.04
Phenylalanine	0.12±0.02	0.13±0.03	0.18±0.02	0.10±0.00	0.31±0.03	0.45±0.02	0.45±0.05
Tryptophan	0.14±0.02	0.08±0.01	0.03±0.01	0.03±0.00	0.17±0.02	0.51±0.02	0.27±0.02
Lysine	0.24±0.02	0.29±0.02	0.05±0.01	0.30±0.04	0.16±0.01	0.29±0.02	0.22±0.01
Non-essential							
Aspartic acid	82.79±0.45 ^a	78.57±1.84 ^b	33.31±1.03 ^c	5.89±0.42 ^f	82.79±0.72 ^a	16.14±0.07 ^d	14.30±0.97 ^e
Asparagine	1.54±0.02	0.28±0.01	0.12±0.02	0.14±0.01	1.54±0.06	0.08±0.01	0.28±0.04
Glutamic acid	9.70±0.13	4.01±0.13	1.06±0.02	0.24±0.04	9.70±0.34	3.43±0.02	4.01±0.28
Proline	0.52±0.02	0.51±0.01	0.15±0.02	0.12±0.02	0.52±0.02	0.46±0.04	0.85±0.07
Tyrosine	0.36±0.04	0.24±0.02	0.09±0.02	0.06±0.02	0.36±0.02	0.34±0.04	0.47±0.03
Histidine	0.85±0.05	0.52±0.12	0.45±0.02	0.49±0.01	0.85±0.03	0.05±0.01	0.08±0.01
Arginine	7.61±0.07	4.08±0.06	2.02±0.19	2.07±0.01	7.61±0.19	0.28±0.06	1.26±0.03
Total	107.13 ^a	90.56 ^c	39.02 ^d	10.24 ^f	104.73 ^b	23.51 ^e	23.24 ^e

¹⁾Mean±SD (*n*=3).²⁾Not detected.^{a-c}Values with different small letters within the same column are significantly different at *p*<0.05 based on Duncan's multiple range test.

유리아미노산 함량은 유기식으로 첨가되는 사과주의 차이에 의한 것으로 사료되었다. 이는 높은 알코올 농도에서는 초산균 내성의 약화로 인하여 증식 및 발효가 유도되지 않는다는 Kang 등 (22)의 보고와 유사하였다.

사과주의 초기 알코올농도에 따른 초산발효 결과 환원당, 유기산 및 유리아미노산 함량이 비교적 높게 확인된 초기 알코올농도 6%의 고산도 사과식초(6% HACV)를 시판 고산도 사과식초(CHACV) 3종과 비교하였다(Table 1). CHACV의 환원당 함량은 11-4183 mg/100 mL 범위로, 6% HACV는 1975 mg/100 mL로 확인되었다. CHACV의 유기산 함량은 9293-14007 mg/100 mL 범위로, 6% HACV는 9787 mg/100 mL로 확인되었다. 한편, 3종의 CHACV의 경우 citric acid와 malic acid의 함량이 각각 0-607 및 74-197 mg/100 mL 범위인데 반해, 6% HACV의 경우 각각 137 및 583 mg/100 mL로 확인되었고, 특히 malic acid의 경우 6% HACV에서 유의적으로 높은 함량을 나타내었다(*p*<0.05). 유리아미노산 함량은 CHACV의 경우 23-104 mg/100 mL 범위로, 6% HACV의 경우 107.13 mg/100 mL로 확인되어, 역시 6% HACV에서 유의적으로 높은 함량을 나타내었다(*p*<0.05). 식초의 유기산과 유리아미노산은 원료에서 유래하는 성분으로, 사과식초의 경우 원료로 사용되는 사과의 함량이 높을수록 사과의 주요성분인 malic acid와 aspartic acid와 같은 성분의 함량도 증가될 수 있다

(23-25). Malic acid 함량의 경우 6% HACV가 3종의 CHACV에 비해 3-7배가량 높게 확인되었고, aspartic acid의 경우 6% HACV가 CHACV2 및 CHACV3에 비해 5배가량 높게 확인되었다(*p*<0.05). 6% HACV의 경우 사과농축액을 원료로 한 사과주의 알코올 및 초산발효에 의해 만들어진데 비해, 3종의 CHACV는 주정을 원료로 초산발효를 거친 제품으로 원료의 함량이 5% 범위였다. 이상의 결과, 사과농축액을 원료로 한 사과주의 2단계 발효로 HACV 제조 시 초기 알코올농도 6% 조건에서 유기산 및 유리아미노산 함량이 높은 것으로 확인되었고, 6% HACV는 CHACV에 비해 malic acid 및 aspartic acid 함량이 유의적으로 높았다.

총 페놀 및 총 플라보노이드 함량 및 항산화 활성

페놀 및 플라보노이드 화합물은 체내 생리활성에 기여하며 산화적 스트레스에 대한 항산화 활성을 가진다(26,27). 사과주의 초기 알코올농도에 따른 HACV의 총 페놀 및 총 플라보노이드 함량과 항산화 활성은 Table 2와 같다. 총 페놀은 초기 알코올농도 7% 및 8% 조건에서 가장 높은 함량을 나타내었고, 총 플라보노이드는 6%에서 가장 높은 함량을 보였으며 초기 알코올농도 증가와 함께 감소하였다. 항산화 활성 측정을 위해 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거활성을 측정된 결과, 이들은 모두 초기 알코올농도

Table 2. Comparison of total phenolics content, total flavonoid content, and radical scavenging activity between lab fermented and commercial cider vinegars

Properties ¹⁾	High-acidity cider vinegar (HACV) with different initial alcohol content				Commercial high-acidity cider vinegar (CHACV)		
	6%	7%	8%	9%	CHACV1	CHACV2	CHACV3
TPC (mg GAE/100 mL)	22.93±0.35 ^{1b}	25.93±1.20 ^a	26.87±0.56 ^a	20.48±0.39 ^c	7.89±0.08 ^e	10.63±0.19 ^d	3.69±0.07 ^f
TFC (mg CE/100 mL)	13.73±5.07 ^a	10.71±3.88 ^b	9.20±3.33 ^c	0.74±0.04 ^e	1.36±0.07 ^e	3.63±0.48 ^d	0.19±0.01 ^e
DPPH RSA (%)	53.53±0.49 ^b	56.31±0.18 ^a	57.23±1.15 ^a	50.40±0.18 ^c	25.74±1.09 ^e	33.05±0.37 ^d	11.81±0.67 ^f
ABTS RSA (%)	69.08±1.17 ^b	82.32±0.45 ^a	81.92±0.47 ^a	60.77±0.98 ^c	37.66±0.88 ^e	47.63±1.71 ^d	11.87±0.88 ^f

¹⁾TPC: Total phenolics content; TFC: Total flavonoid content; RSA: radical scavenging activity.

²⁾Mean±SD (*n*=3).

^{a-f}Values with different small letters within the same column are significantly different at *p*<0.05 based on Duncan's multiple range test.

Table 3. Comparison of volatile components (mg/L) between lab fermented and commercial cider vinegars

Properties	High-acidity cider vinegar (HACV) with different initial alcohol content				Commercial high-acidity cider vinegar (CHACV)		
	6%	7%	8%	9%	CHACV1	CHACV2	CHACV3
Acetic esters							
Ethyl acetate	7±1 ^b	7±0 ^b	8±1 ^b	54±1 ^b	261±0 ^a	261±104 ^a	214±8 ^a
Isobutyl acetate	56±1	49±13	51±12	25±2	2±0	2±0	4±0
Isoamyl acetate	6±0	8±1	10±2	13±0	5±0	36±16	6±0
Hexyl acetate	120±21 ^{ab}	103±11 ^b	133±32 ^{ab}	144±17 ^a	64±0 ^c	43±20 ^c	65±2 ^c
Phenethyl acetate	9±1	7±0	9±2	13±3	ND	11±3	ND
Acids							
Acetic acid	2671±207 ^a	2759±95 ^a	2714±646 ^a	1976±88 ^b	2699±93 ^a	1551±88 ^c	2654±164 ^a
Isobutyric acid	8±1	9±0	10±0	9±0	ND	ND	ND
Isovaleric acid	22±11	9±0	9±1	6±1	ND	4±1	ND
Octanoic acid	24±16	19±2	20±2	37±5	ND	ND	ND
Alcohols							
Ethyl alcohol	47±28	15±0	18±5	51±24	95±5	64±24	42±2
Isopentyl alcohol	13±5	18±0	21±0	18±0	ND	6±2	ND
Phenethyl alcohol	11±8	21±0	23±0	16±1	ND	4±1	ND
Aldehydes							
Acetaldehyde	10±1	12±0	ND	ND	10±1	14±1	13±4
Benzaldehyde	18±3	19±2	20±5	18±3	ND	ND	ND
Ethyl esters							
Ethyl palmitate	26±18	26±18	47±19	56±5	69±17	ND	ND
Others							
Acetoin	5.65±0.63	13±2	15±2	17±7	ND	ND	ND
Hexyl isobutyrate	ND	27±2	ND	ND	ND	5±1	ND
Diethyl phthalate	24±3	29±17	37±9	18±15	ND	ND	ND
Total	3077	3150	3145	2471	3205	1801	2998

¹⁾Mean±SD (*n*=3).

²⁾Not detected.

^{a-c}Values with different small letters within the same column are significantly different at *p*<0.05 based on Duncan's multiple range test.

7% 및 8% 조건에서 유의적으로 높은 활성을 나타내었다(*p*<0.05). 초기 알코올농도가 가장 높은 9% 조건에서는 총 페놀 및 총 플라보노이드 함량과 항산화 활성이 모두 유의적으로 감소하였는데, 이는 Kang 등(22)의 결과와 같이 초기 알코올농도가 높을 때 초산발효가 더 이상 진행되지 않아 발효수율이 감소된 결과로 판단되었다.

사과주의 초기 알코올농도에 따른 2단계 초산발효 결과 페놀 및 플라보노이드 함량과 항산화 활성이 비교적 높게 확인된 7% HACV를 3종의 CHACV와 비교하였다(Table 2). 총 페놀함량은 7% HACV의 경우 3종의 CHACV에 비해 약 2-7배가량 높게 확

인되었고, DPPH 및 ABTS 라디칼 소거활성 또한 7% HACV에서 유의적으로 높은 값을 보여주었다(*p*<0.05). 이는 2단계 발효에 의한 고산도 식초의 경우 초산발효 동안 고농도 알코올이 지속적으로 첨가되지만 시판식초는 주정과 영양원으로부터 발효되므로(8), 첨가된 알코올 내의 여러 화학성분이 HACV의 페놀 함량과 라디칼 소거활성에 영향을 주는 것으로 사료되었다. 이상의 결과, 사과농축액을 원료로 한 사과주의 2단계 발효로 HACV 제조 시 총 페놀 함량 및 항산화 활성은 초기 알코올농도 7%에서 높은 것으로 확인되었고, 이는 주정발효 방법의 CHACV에 비해 유의적으로 높은 값을 나타내었다.

SPME/GC-MS를 이용한 휘발성분

사과주의 초기 알코올농도에 따른 HACV의 휘발성분 결과는 Table 3과 같다. HACV의 휘발성분은 acetic ester류 5종, acid류 4종, alcohol류 3종, aldehyde류 1-2종, ethyl ester류 1종 등으로 구성되어 전체 함량은 2471-3150 mg/100 mL로 확인되었다. Acid류는 끓는 점이 높아 휘발성이 낮은 물질이다. 강한 자극성의 acetic acid (sharp, pungent, sour odor)는 HACV의 주요 휘발성분으로 확인되었고, 초기 알코올농도 9% 조건에서 유의적으로 감소하였다($p < 0.05$). Ester류는 유기산과 알코올의 반응으로 생성되는 화합물로 대부분 방향성을 갖는다. Ethyl acetate (etherial, fruity, sweet odor)의 경우 초기 알코올 농도에 따른 변화가 없었고, hexyl acetate (fruity, green, fresh odor)는 일정한 경향을 보이지 않았다($p < 0.05$). Alcohol류의 경우 비교적 다양한 성분이 검출되었는데, 이는 Yoon 등(28)의 결과와 같이 사과농축액의 알코올 발효 과정을 거치면서 ethyl alcohol 외의 여러 성분이 생성된 것으로 예측되었다. 초기 알코올농도에 따른 초산발효 결과, HACV의 총 휘발성분 함량은 초기 알코올농도 6% 조건에서 가장 높게 확인되었다. 또한, 초기 알코올농도 6-7% 조건에서는 acetic acid 함량이 전체 휘발성분의 86-87%를 차지하였으나, 9% 조건에서는 80% 함량에 그쳐 낮은 비율을 나타내었고, 이 역시 높은 초기 알코올농도에서 초산발효가 제대로 진행되지 못한 결과로 추측되었다.

CHACV 3종의 경우 acetic ester류 4-5종, acid류 1-2종, alcohol류 1-3종, aldehyde류 1종, ethyl ester류 0-1종 등으로 총 함량은 1801-3205 mg/100 mL로 확인되었다. 주요 휘발성분으로 acetic acid를 포함한 acid류가 75-88% 비율로 확인되었고, 그 외 과일 향을 특징으로 하는 ethyl acetate, hexyl acetate 등이 확인되었다. Acetic ester류 중 ethyl acetate의 함량은 CHACV에서 높은 반면, hexyl acetate의 경우 HACV에서 높게 확인되어 대조된 경향을 보였다. 이상의 결과, 초기 알코올농도 6-8% 조건에서는 HACV의 acetic acid 함량이 전체 휘발성분의 86-87% 범위를 차지하였고, 이는 CHACV의 84-88% 범위와 유사한 수준이었다.

관능평가

사과주의 초기 알코올농도에 따른 HACV의 품질분석 결과 6% 조건에서 유기산, 유리아미노산, 휘발성분 등이 높은 함량을 나타내어, 6% HACV의 관능특성을 주정발효의 CHACV 3종과 비교하였다(Fig. 1). 식초는 초산으로 인한 자극적인 향과 맛이 주요 특징이다. 식초 고유의 냄새(자극취)와 맛(신맛)에 대한 특징을 강도(1-7점)로 평가하였다. 자극취의 경우 5.6-6.3점 범위로 3배 식초인 CHACV3에서 가장 높게 확인되었고, 6% HACV는 CHACV1와 유의적인 차이를 보이지 않았다($p < 0.05$). 여러 가지 맛 중 가장 즉각적으로 반응하는 신맛은 그 자체의 맛보다는 음식에 섞었을 때 재료의 맛을 극대화 시켜주는 역할을 한다. 유기산의 종류와 함량은 Table 1에서와 같이 식초에 따른 차이를 나타내었으나, 신맛에 대한 강도는 6.0-6.4점 범위로 시료에 따른 차이를 보이지 않았다. 고산도 식초의 색, 향, 맛의 경우 기호도(1-7점)로 평가하여 시료 사이의 특징을 비교하였다. 색의 경우 주정발효의 CHACV 3종은 6% HACV에 비해 비교적 높은 평점을 나타내었는데, 이는 최종적인 막 여과를 통한 맑고 투명한 색에 의한 결과로 사료되었다. 일반적으로 사과식초는 투명한 연노란색을 나타내는데, 이 때 식초의 투명도가 높아질수록 기호도가 증가하는 것으로 알려져 있다(29). 향에 대한 평점은 4.7-5.5점 범위로 6% HACV에서 가장 높았으나, 이는 CHACV1 및 CHACV3와 유의적인 차이를 보이지 않았다($p < 0.5$). 맛 및 전반

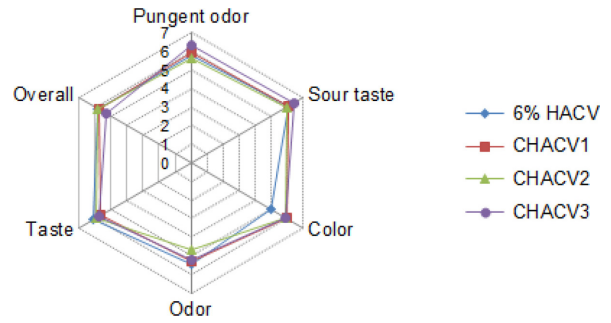


Fig. 1. Comparison of sensory properties between high-acidity cider vinegars with 6% initial alcohol content (6% HACV) and 3 kinds of commercial high-acidity cider vinegars (CHACV).

Table 4. Correlation coefficients between sensory properties and quality characteristics in cider vinegars with high-strength acidity

Quality characteristics	Correlation coefficients (r)		
	Sensory odor	Sensory taste	
Reducing sugar	-0.6622	0.6444	
Organic acids	Citric acid	0.1805	-0.1952
	Malic acid	0.5328	0.8432
	Acetic acid	0.0773	-0.4972
	Total	0.1513	-0.4000
Free amino acids	Aspartic acid	0.6633	0.8092
	Glutamic acid	0.5927	0.8603
	Arginine	0.5436	0.8870
	Total	0.6322	0.8331
Volatile compounds	Acetic esters	-0.7611	-0.6851
	Ethyl acetate	-0.6761	-0.7940
	Hexyl acetate	0.8391	0.6247
	Acids	0.9446	-0.1997
	Acetic acid	0.9319	-0.2347
	Alcohols	-0.0827	-0.2789
	Aldehydes	-0.8109	-0.6261
	Ethyl esters	0.6366	0.8268
Total	0.9252	-0.2753	

적인 기호도의 경우 5.6-6.1점 및 5.3-5.8점 범위로 확인되었고, 6% HACV에서 가장 높은 평점을 나타내었으나 역시 시판 식초와의 유의적인 차이는 인정되지 않았다. 이상의 결과, 2단계 발효에 의한 고산도 사과식초는 시판 식초와 달리 최종적인 막 여과 및 향미 첨가가 이루어지지 않은 상태라 색과 향의 깔끔함은 다소 부족하였으나, 과일 고유의 자연적인 향과 맛이 우수한 장점을 가지는 것으로 판단되었다. 식품의 색과 향은 제품의 품질 향상에 매우 중요한 역할을 하므로(30), 2단계 발효에 의한 고산도 사과식초의 산업적 이용을 위해 품질향상에 대한 더 많은 연구가 필요한 것으로 사료되었다.

고산도 식초의 품질차별화를 위한 지표성분 선정

사과농축액의 2단계 발효를 통한 고산도 사과식초의 품질을 시판 주정발효 고산도 사과식초와 차별화하기 위해 지표성분을 선정하고자 하였다. 초기 알코올농도 6%의 HACV와 주정발효의 CHACV 3종에 대해 이화학적 품질과 관능적 품질의 상관성을 분석하였다(Table 4). 유기산 중 malic acid ($r=0.8432$)와 유리아미

노산 중 aspartic acid ($r=0.8092$), glutamic acid ($r=0.8603$), arginine ($r=0.8870$) 함량은 식초의 맛과 비교적 높은 상관성을 나타내어, 이들의 함량이 식초의 관능적 맛을 결정짓는 중요한 요소로 작용함을 확인할 수 있었다(4,31). 휘발성분 중 acid류의 함량 역시 식초의 향과 높은 상관성($r=0.9446$)을 나타내었고, 이러한 성분 역시 식초의 관능적 향을 결정짓는 중요한 품질요소로 평가되고 있다(32,33). 한편 사과와 감의 경우 유기산 중 malic acid, 아미노산 중 aspartic acid, 휘발성분 중 hexyl acetate 성분이 특이적으로 높음을 감안할 때(34,35), 이들은 사과농축액의 2단계 발효를 통한 고산도 사과식초의 품질평가지표 성분으로 제시할 수 있었다.

결론

사과농축액을 알코올발효하고 초기 알코올농도에 따른 초산발효를 통해 산도 12% 이상의 고산도 사과식초를 제조하였다. 초기 알코올농도를 6-9%로 달리하여 제조한 고산도 사과식초의 환원당, 유기산, 유리아미노산 함량은 6%의 농도에서 우수한 함량을 나타내었고, 8% 이상의 농도에서는 정상적인 초산발효가 유도되지 않아 전반적인 품질이 낮게 확인되었다. 총 페놀 함량 및 라디칼 소거활성은 7%과 8%에서 동일하게 높은 활성을 나타내었다. SPME/GC-MS 분석을 통해 확인된 20여 종의 휘발성분 총 함량은 초기 알코올함량의 증가에 따라 감소하여 6% 농도에서 가장 높게 확인되었고, acid류는 9% 농도에서 가장 낮게 확인되었다. 한편 사과농축액의 2단계 발효에 의한 고산도 식초는 6% 농도에서 최적의 품질특성을 나타내어 이를 주정발효로 제조된 시판 고산도 식초 3종과 비교하였다. 유기산 중 malic acid, 아미노산 중 aspartic acid 및 과일 향을 내는 hexyl acetate 등은 사과의 주요 성분으로 식초 제조 시 사용된 사과의 함량을 간접적으로 확인할 수 있는데, 이들의 함량이 시판 식초에 비해 우수한 것으로 확인되었다. 이화학적 품질과 관능적 품질의 상관성 분석 결과, malic acid, aspartic acid, hexyl acetate는 사과농축액의 2단계 발효에 의한 고산도 사과식초의 품질지표성분으로 제시될 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 공동연구사업(과제번호: PJ008488032012) 지원에 의한 연구결과와 일부로 이에 감사드립니다.

References

- Lee SJ, Jang HL, Shin SR, Yoon KY. Quality characteristics of apple juice according to the sterilization methods. *Korean J. Food Preserv.* 19: 178-184 (2012)
- Jung HY, Kim SS. Identification of ideal size and drivers for consumer acceptability of apple. *Korean J. Food Preserv.* 21: 618-626 (2014)
- Huh MY. Recognition and importance-satisfaction of apple processed products. *J. Korean Soc. Food Cult.* 25: 1-8 (2010)
- Jeoung YJ, Lee MH. A view and prospect of vinegar industry. *Food Ind. Nutr.* 5: 7-12 (2000)
- Lim EJ, Cha GH. Study on manufacturing of vinegar through literatures of the Joseon Dynasty. *J. Korean Soc. Food Cult.* 25: 680-707 (2010)
- Kim KO, Kim SM, Kim SM, Kim DY, Jo DJ, Yeo SH, Jeong YJ, Kwon JH. Physicochemical properties of commercial fruit vinegars with different fermentation methods. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 42: 736-742 (2013)
- Jeong YJ. Current trends and future prospects in the Korean vinegar industry. *Food Sci. Ind.* 42: 52-59 (2009)
- Lee YC, Lee JH. A manufacturing process of high-strength vinegar. *Food Ind. Nutr.* 5: 13-17 (2000)
- Park KS, Chang DS, Cho HR, Park UY. Investigation of the cultural characteristics of high concentration ethanol resistant *Acetobacter* sp. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 23: 666-670 (1994)
- Park MH, Lyu DK, Ryu CH. Characteristics of high acidity producing acetic acid bacteria isolated from industrial vinegar fermentation. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 31: 394-398 (2002)
- Lee YC, Park MS, Kim HC, Park KB, Yoo YJ, Ahn IK, Son SH. Production of high acetic vinegar by single stage fed-batch culture. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* 21: 511-512 (1993)
- Lee YC, Lee GY, Kim HC, Park KB, Yoo YJ, Ahn PU, Choi CU, Son SH. Production of high acetic acid vinegar using two stage fermentation. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* 20: 663-667 (1992)
- Sung NH, Woo SM, Kwon JH, Yeo SH, Jeong YJ. Quality characteristics of high acidity apple vinegar manufactured using two stage fermentation. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 43: 877-883 (2014)
- Luchsinger WW, Cornesky RA. Reducing power by the dinitrosalicylic acid method. *Anal. Biochem.* 4: 346-347 (1962)
- Jeong YJ, Seo KI, Kim KS. Physicochemical Properties of marketing and intensive persimmon vinegars. *J. East Asian Soc. Diet. Life* 6: 355-363 (1996)
- Singleton VL, Rossi Jr. JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Viticult.* 16: 144-158 (1965)
- Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem.* 64: 555-559 (1999)
- Zou Y, Lu Y, Wei D. Antioxidant activity of a flavonoid-rich extract of *Hypericum perforatum* L. in vitro. *J. Agr. Food Chem.* 52: 5032-5039 (2004)
- Blios MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200 (1958)
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Bio. Med.* 26: 1231-1237 (1999)
- Jo YH, Baek JY, Jeong IY, Jeong YJ, Yeo SH, Noh BS, Kwon JH. Physicochemical properties and volatile components of wine vinegars with high acidity based on fermentation stage and initial alcohol concentration. *Food Sci. Biotechnol.* 24: 445-452 (2015)
- Kang BH, Shin EJ, Lee SH, Lee DS, Hur SS, Shin KS, Kim SH, Son SM, Lee JM. Optimization of the acetic acid fermentation condition of apple juice. *Korean J. Food Preserv.* 18: 980-985 (2011)
- Lee DS, Woo SK, Yang CB. Studies on the chemical composition of major fruits in Korea. *Korean J. Food Sci. Technol.* 4: 134-139 (1972)
- Kim CJ, Park YJ, Lee SK, Oh MJ. Studies on the induction of available mutant of acetic acid bacteria by UV light irradiation and NTG treatment-on the organic acids composition of apple wine vinegar. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* 9: 139-143 (1981)
- Seo JH, Kim YJ, Lee KS. Comparison of physicochemical characteristics of fruit vinegars produced from two-stage fermentation. *Food Ind. Nutr.* 8: 40-44 (2003)
- Rice-Evans, CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical. Bio. Med.* 20: 933-956 (1996)
- Alonso AM, Castro R, Rodr 1 guez MC, Guilln DA, Barroso CG. Study of the antioxidant power of brandies and vinegars derived from Sherry wines and correlation with their content in polyphenols. *Food Res. Int.* 37: 715-721 (2004)
- Yoon HN, Moon SY, Song SH. Volatile compounds and sensory odor properties of commercial vinegars. *Korean J. Food Sci. Technol.* 30: 299-305 (1998)
- Kim DH. Studies on the production of vinegar from fig. *J. Korean Soc. Food Sci Nutr.* 28: 53-60 (1999)
- Kim SD, Jang KS, Kim MK. Fermentation of apple vinegar in

- the farmhouse. *J. East Asian Soc. Diet. Life* 4: 75-86 (1994)
31. Na HS, Choi GC, Yang SI, Lee JH, Cho JY, Ma SJ, Kim JY. Comparison of characteristics in commercial fermented vinegars made with different ingredients. *Korean J. Food Preserv.* 20: 482-487 (2013)
32. Yoon HN. Chemical characterization of commercial vinegars. *Korean J. Food Sci Technol.* 31: 1440-1446 (1999)
33. Kim GR, Yoon SR, Lee JH, Yeo SH, Jeong YJ, Yoon KY, Kwon JH. Physicochemical properties of and volatile components in commercial fruit vinegars. *Korean J. Food Preserv.* 17: 616-624 (2010)
34. Choi OJ, Park HR, Chough SH. Variation of free sugar and free amino acid contents of apples during the ripening period. *J. Korean Soc. Food Cult.* 12: 149-153 (1997)
35. Lee SJ, Jang HL, Shin SR, Yoon KY. Quality characteristics of apple juice according to the sterilization methods. *Korean J Food Preserv.* 19: 178-184 (2012)