

막걸리 종초 제조에 적합한 초산균의 분리 및 발효특성

이혜빈¹ · 오현화¹ · 정도연² · 전현일¹ · 송근섭¹ · 김영수¹

¹전북대학교 식품공학과
²(재)발효미생물산업진흥원

Isolation and Characterization of Acetic Acid Bacteria for Producing “Makgeolli Seed-Vinegar”

Hye-Bin Lee¹, Hyeonhwa Oh¹, Do-Youn Jeong², Hyun-II Jun¹,
Geun-Seoup Song¹, and Young-Soo Kim¹

¹Department of Food Science and Technology, Chonbuk National University

²Microbial Institute for Fermentation Industry (MIFI)

ABSTRACT Acetic acid bacteria strains were isolated from commercial natural vinegar. Ten isolated strains were identified using 16S rRNA gene sequencing data after evaluating the ethanol- and sulfur-tolerance. Eight of the strains isolated were identified as *Acetobacter pasteurianus*. *A. pasteurianus* JAC002, JAC005, and JAC008 strains, which showed a high ethanol tolerance, were selected for making “Makgeolli seed-vinegar”. Rice wine vinegars were manufactured with the selected strains through fermentation, and their physicochemical properties and antimicrobial activities were evaluated. *A. pasteurianus* JAC002 strain showed the highest oxidation ability to acetic acid from ethanol on the twentieth day of fermentation, resulting in 4.21% total acidity, 3,791.77 mg% acetic acid content, and 2,931.78 mg% ethanol consumption content. Rice wine vinegar manufactured with the *A. pasteurianus* JAC002 strain showed increased antimicrobial activities against *Staphylococcus aureus* (KACC1927) and *Escherichia coli* (KACC10115). As a result, *A. pasteurianus* JAC002 strain was found to be the most suitable strain for “Makgeolli seed-vinegar”.

Key words: acetic acid bacteria, Makgeolli seed-vinegar, rice wine vinegar, acetic acid fermentation

서 론

우리나라를 비롯한 중국, 일본 등의 아시아권에서는 다양한 곡류를 재료로 하여 술을 빚는 문화가 발달되었고, 이러한 곡류주 중 전통가양주인 막걸리는 상온에서 발효시켜 막걸리 식초로도 이용 가능한 것으로 알려져 왔다. 막걸리는 비타민 B군뿐만 아니라 다양한 아미노산 및 유기산을 함유하고 있어 고유 풍미를 보유하고 있는 것으로 알려져 있고 (1), 기능성으로 항암작용과 지질개선 효과가 보고된 바 있다 (2,3). 이와 같은 특성이 있는 막걸리로 식초를 제조한다면 막걸리의 기능성과 더불어 식초의 기능성(항비만 효과, 염증 억제 효과)이 보강된 시너지 효과를 기대할 수 있다 (4,5). 그러나 막걸리를 이용한 식초 제조에 대한 보고가 많지 않아 이에 대한 연구가 필요한 실정이다.

식초 제조의 주 발효균인 초산균에 대한 연구는 많은 연구자에 의해 진행되어 왔다. 과일주를 원료로 하는 식초의 경

우 초산균의 에탄올 저항성과 아황산 저항성에 대한 연구가 주를 이루고 있으며 (6,7), 옥, 미나리, 복분자 등의 기능성 원료를 첨가한 건강 기능성 식초 제조에 대한 연구도 진행되어 왔다 (4,5,8). 특히 고에탄올에서 acetic acid 생성능이 우수한 *Acetobacter pomorum*, *Acetobacter aceti* 등이 보고되었지만 (9,10) 식품원료로 허가된 균주 (*Acetobacter pasteurianus*)가 아니기 때문에 산업적으로 사용이 어려운 실정이다. 따라서 식품원료로 허가된 균주이면서 산 생성능이 우수하고, 기능성을 향상시킬 수 있는 *A. pasteurianus* 초산균주를 확보하는 연구가 더 필요한 실정이다. 또한, *A. pasteurianus* 균이라 하더라도 acetic acid의 동화작용 (assimilation), acetic acid의 유기산 (citric acid, lactic acid, succinic acid 등)으로의 전환, 세포 안에 축적된 acetic acid의 세포 밖으로의 유출 (efflux) 등에 관여하는 초산균의 능력이 균주마다 다르기 때문에 (11) 배양을 통한 발효 특성 (에탄올 저항성, 초산 저항성, 이화학적 성분 변화 등)을 평가할 필요가 있다.

자연발효식초는 곡류주나 과일주를 공기가 통하는 환경에서 초산발효를 유도시켜 제조한 것으로 양조식초라고도 한다 (9). 이때 생성되는 acetic acid 양은 에탄올을 acetic acid로 전환시키거나 당을 acetic acid로 산화시키는 초산

Received 19 July 2017; Accepted 31 August 2017

Corresponding author: Young-Soo Kim, Department of Food Science and Technology, Chonbuk National University, Jeonju, Jeonbuk 54896, Korea

E-mail: ykim@jbnu.ac.kr, Phone: +82-63-270-2569

균의 특성에 따라 달라지며, 초산발효가 진행됨에 따라 acetic acid 이외에도 유기산류, 아미노산류, 에스테르류 등의 성분 변화가 일어난다(8,11). 한편 Alauzet 등(12)은 초산균 중에서도 인체에 유해한 병원성 균주가 분리될 수 있다고 보고하였고, *Granulibacter bethesdensis*를 비롯하여 병원성 초산균이 보고됨에 따라 균주의 안전성이 확인되어야 할 필요가 있다(13). 또한, 환경에 따라 우점하는 초산균이 다르기 때문에 품질이 균일하지 않을 가능성이 높다(14). 따라서 발효특성이 검증된 균주를 사용하여 종초를 제조할 경우 품질의 안정성을 확보할 수 있고 균주를 제어할 수 있기 때문에 식품 유해요소 생성을 억제할 수 있을 것으로 판단된다.

본 연구에서는 자연발효식초로부터 에탄올 및 아황산 저항성을 보유한 *A. pasteurianus*를 선발하였고, 선발된 균주를 막걸리에 접종하여 발효기간에 따른 이화학적 특성을 분석하고자 하였다. 또한, 분석 결과를 토대로 막걸리 종초 제조에 적합한 초산균을 선발하고 제조조건을 구축하는 자료로 이용하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료 및 시약

초산균 분리를 위한 시료는 자연발효식초로 제조 판매되고 있는 전북 및 전남 지역의 식초를 수집하여 사용하였다. 막걸리 종초 제조를 위한 막걸리는 쌀막걸리(구름, 순창군)를 구입하여 사용하였다. 균주를 배양하기 위한 배지 조성 성분인 yeast extract, agar는 BD사(Becton, Dickinson & Co., Franklin Lakes, NJ, USA), glucose, potassium disulfite는 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA), calcium carbonate는 삼천(Pyeongtaek, Korea), ethanol은 대정화금(Siheung, Korea)으로부터 구입하여 사용하였다. 총산도 실험을 위한 phenolphthalein, 0.1 N NaOH solution은 대정화금, 항균 활성 측정용 배지인 nutrient agar (NA), nutrient broth(NB)는 BD사로부터 구입하여 사용하였다. 유리당 및 유기산 분석 표준물질로 사용한 glucose, fructose, sucrose, oxalic acid, citric acid, malic acid, tartaric acid, lactic acid, acetic acid는 Sigma-Aldrich Co. 제품을 사용하였으며 그 밖의 시약들은 HPLC grade를 사용하였다.

균주 분리

식초 시료를 GYE broth(1% yeast extract, 5% glucose, 6% ethanol)에서 활성화시켜 이를 GYCE agar(1% yeast extract, 5% glucose, 6% ethanol, 1.5% calcium carbonate, 2.5% agar)에 도말(100 μ L)하여 정지배양(30°C, 5 일)한 후 콜로니 주위로 clear zone이 생긴 콜로니를 선발하였다. Clear zone이 생성된 콜로니는 6% 에탄올이 첨가된 GYCE에 수차례 희석도말하여 단일콜로니를 얻었고, 1 백금을 취하여 GYE broth 3 mL에 접종한 후 진탕배양

(30°C, 120 rpm, 2일)하여 50% glycerol과 1:1 혼합하여 -70°C에 냉동보관하면서 실험균주로 사용하였다.

에탄올 저항성과 아황산 저항성

에탄올 저항성은 6%, 10% 에탄올이 첨가된 GYE broth에서, 아황산 저항성은 6% 에탄올과 350 ppm의 potassium disulfite를 함유한 GYE broth에서 총산도 증가를 통해 평가하였다. 냉동보관균주를 GYCE(1% yeast extract, 5% glucose, 6% ethanol, 1.5% calcium carbonate, 2.5% agar)에서 활성화시킨 후에 GYE(1% yeast extract, 5% glucose, 6% ethanol) 3 mL에 초산균 1 백금을 접종하고 진탕배양(30°C, 120 rpm, 5일)하여 전배양액으로 하였다. 전배양액 1 mL를 각 실험구에 접종하여 진탕배양(30°C, 120 rpm, 10일)하면서 2일 간격으로 샘플링한 후 총산도를 측정하였고, 총산도의 증가를 저항성으로 평가하였다. 총산도는 시료 1 mL에 0.1 N NaOH를 첨가하여 pH 8.3에 도달할 때까지 소모된 양을 초산 함량으로 산출하였다.

분리균주의 동정

분리된 균주의 16S rRNA 유전자의 염기서열에 의한 동정을 위해 universal primer 27F(5'-AGAGTTTGTATCC TGGCTCAG-3')와 1492R(5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')을 사용하여 유전자를 증폭한 다음 이 PCR 산물을 정제한 후 염기서열을 해독하였다. 이 염기서열을 이용하여 BLASTN search(15)와 Ribosomal Database Project(RDP, ver.11)의 SeqMatch program에서 서열 일치도가 높은 표준균주의 16S rRNA 유전자 염기서열을 얻었고, 염기서열 간의 상호비교를 위해 CLUSTAL W(16)를 사용하였다. 계통도 분석은 균주들의 16S rRNA 유전자 염기서열들을 정렬하고 chromatogram의 비교와 수작업으로 gap이 최소화되게 보정한 후 Tamura-Nei model에 기초한 Maximum Likelihood 방법(17)을 사용하였고, 각각의 계통수에서 각 분자에 대한 통계적 신뢰의 산출은 bootstrap을 1,000회 설정하여 MEGA program(18)을 사용하여 계통분석 tree를 작성하였다.

막걸리 종초 제조

막걸리는 원심분리 후 상층액을 취해 70°C에서 30분간 살균시켜 실험에 사용하였다. 에탄올 및 아황산 저항성과 동정 결과를 이용하여 최종 선발된 초산균주 3종을 6% 에탄올이 첨가된 GYE 배지 50 mL에 접종하고 진탕배양(30°C, 120 rpm, 5일)하였다. 이들 배양액의 균체량을 측정 후 균주별로 동일한 균체량을 막걸리 시료에 접종하여 진탕배양(30°C, 120 rpm, 20일)하면서 5일 간격으로 샘플링하여 이화학적 특성 변화를 분석하였다.

이화학적 특성 측정

pH는 pH meter(PP-15, Sartorius, Goettingen, Ger-

many)를 사용하여 측정하였고, 당도는 당도계(pal-1, Atago, Tokyo, Japan)를 사용하여 측정하였다. 총산도는 시료 1 mL에 0.1 N NaOH를 첨가하여 pH 8.3에 도달할 때까지 소모된 양을 초산 함량으로 산출하였다.

유리당 분석

유리당은 Oh 등(19)의 방법으로 측정하였다. 분석을 위해 시료를 2배 희석하여 Sep-pak C18 cartridge(Waters, Milford, MA, USA)에 통과시킨 다음, 0.22 µm membrane filter(Futecs Co., Ltd., Daejeon, Korea)로 여과하여 HPLC(Futecs Co., Ltd.)로 분석하였다. 분리된 유리당의 각 peak는 동일조건에서 분석한 표준물질 mixture의 peak 면적비율과 retention time을 비교하여 함량을 산출하였다. Asahipak NH2P-50 4E column(Showa Denko America, Inc., Lexington, NY, USA) 및 ELSD detector(Chrom Tech, Inc., Bad Camberg, Germany)를 사용하여 이동상 75% acetonitrile, 유속 0.8 mL/min, column oven 온도는 30°C의 조건으로 분석하였다.

유기산 및 에탄올 분석

유기산 및 에탄올은 Kim과 Song(20)의 방법으로 측정하였다. 분석을 위해 시료를 10배 희석하여 Sep-pak C18 cartridge(Waters)에 통과시킨 다음, 0.22 µm membrane filter(Futecs Co., Ltd.)로 여과하여 HPLC system(Shimadzu Co., Kyoto, Japan)으로 측정하였다. 분리된 유기산 및 에탄올의 각 peak는 동일조건에서 분석한 표준물질 mixture의 peak 면적비율과 retention time을 비교하여 함량을 산출하였다. HPLC system의 분석조건은 Aminex HPX-87H Ion Exclusion column(300×7.8 mm, 9 µm, Bio-Rad Labs., Richmond, CA, USA), 이동상은 0.008 M H₂SO₄, 유속은 0.6 mL/min, column oven 온도는 35°C, 검출기는 UV-VIS detector(SPD-10A, Shimadzu Co.) 및 검출 파장은 210 nm였다.

항균 활성 분석

식품 유해균에 대한 항균 활성은 paper disc(ø6 mm, Toyo Roshi Kaisha, Ltd., Tokyo, Japan)를 이용한 agar diffusion 방법을 사용하였다. 본 실험에 사용된 유해균주는 *Staphylococcus aureus* KACC1927과 *Escherichia coli* KACC10115로 각각의 균주는 NB에 진탕배양(37°C, 200 rpm, 18시간)하여 활성화시킨 후 멸균된 면봉으로 NA에 도말하였다. 균이 도말된 NA의 표면에 6 mm paper disc를 올려놓고, 그 위에 시료를 20 µL 점적하여 37°C에서 18시간 동안 정치배양 하였다. Paper disc 주위에 형성된 clear zone을 측정하여 항균력을 확인하였고, 항균 활성은 paper disc의 직경에 대한 clear zone의 직경 비율로 나타내었다.

통계분석

각 실험은 3회 반복하여 얻은 결과를 SPSS package program(Ver. 12.0K, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 평균±표준편차로 Table에 나타내었고, 오차막대를 표현하기 위해 각 평균값의 표준오차를 Fig. 1에 표시하였다. 각 시료 간의 유의성은 $P < 0.05$ 수준에서 one-way ANOVA로 분산분석한 후에 Duncan's multiple range test로 비교하였다.

결과 및 고찰

분리 균주의 에탄올 및 아황산 저항성

식품공전에 따르면 식초의 품질규격 중 총산 함량은 4.0~20.0 w/v%(acetic acid)의 범위로 규정되어 있다(21). 이는 에탄올로부터 acetic acid로 전환되는 이론적 전환율이 100%이기 때문에(6), 초기 배양액에 함유된 에탄올의 함량이 4% 미만일 경우 4% 이상의 acetic acid가 생성되기 어렵다. 또한, 막걸리는 6% 이내의 에탄올을 함유하고 있는 곡류주기 때문에 막걸리 종초 제조에 적합한 초산균 선발을 위해서는 6% 에탄올이 첨가된 합성배지(GYCE agar)에서 acetic acid의 생성 유무를 평가해야 한다. 따라서 본 연구에서는 초산균 집락 주위로 생성된 clear zone(투명환)의 유무로 acetic acid 생성 여부를 확인하였고, 각 시료에서 가장 큰 투명환이 생성된 집락을 분리한 후 수차례의 희석도말을 이용하여 최종 분리된 단일 콜로니 10개를 선택하였다.

선택된 10개 균주의 에탄올 저항성과 아황산 저항성을 평가한 결과는 Fig. 1과 같다. 6~10% 에탄올이 첨가된 GYE broth에 10일 동안 배양하면서 총산도 변화를 측정하였을 때 JAC008 균주의 경우 6% 에탄올에서(Fig. 1A) 총산도가 4.78%까지 상승하였고, 10% 에탄올에서는(Fig. 1B) 3.63% (10일 경과)를 나타내어 에탄올 저항성이 가장 우수한 것으로 확인되었다. 그러나 JAC002 균주와 JAC005 균주의 경우 에탄올 저항성은 JAC008 균주보다 낮았지만 배양기간 중 총산도가 빠르게 증가하고, 아황산에 대한 저항성(Fig. 1C)을 보이는 것으로 나타났다. 포도주를 비롯한 과실주에는 효모의 에탄올 생성능을 최대화시키고 저장성을 증가시키기 위하여 아황산을 첨가하기 때문에 적정 농도의 아황산 내성을 보유한 초산균이 종균으로서 더 유용하다고 판단된다(6,22). 따라서 아황산 저항성이 우수한 JAC002와 JAC005 균주는 아황산이 첨가된 과실주의 종균으로서 사용 가능할 것으로 판단된다. 결과적으로 에탄올 저항성은 JAC008 균주가 가장 우수하였으나 넓은 영역의 종균으로서 사용가능성은 JAC002와 JAC005 균주가 더 유용할 것으로 기대된다.

분리 균주의 동정 결과

RDP(Ribosomal Database Project)의 SeqMatch 프로그램을 이용하여 10개 균주의 16S rRNA 유전자 염기서열과 가장 가까운 표준균주들을 선정된 뒤 MEGA program에

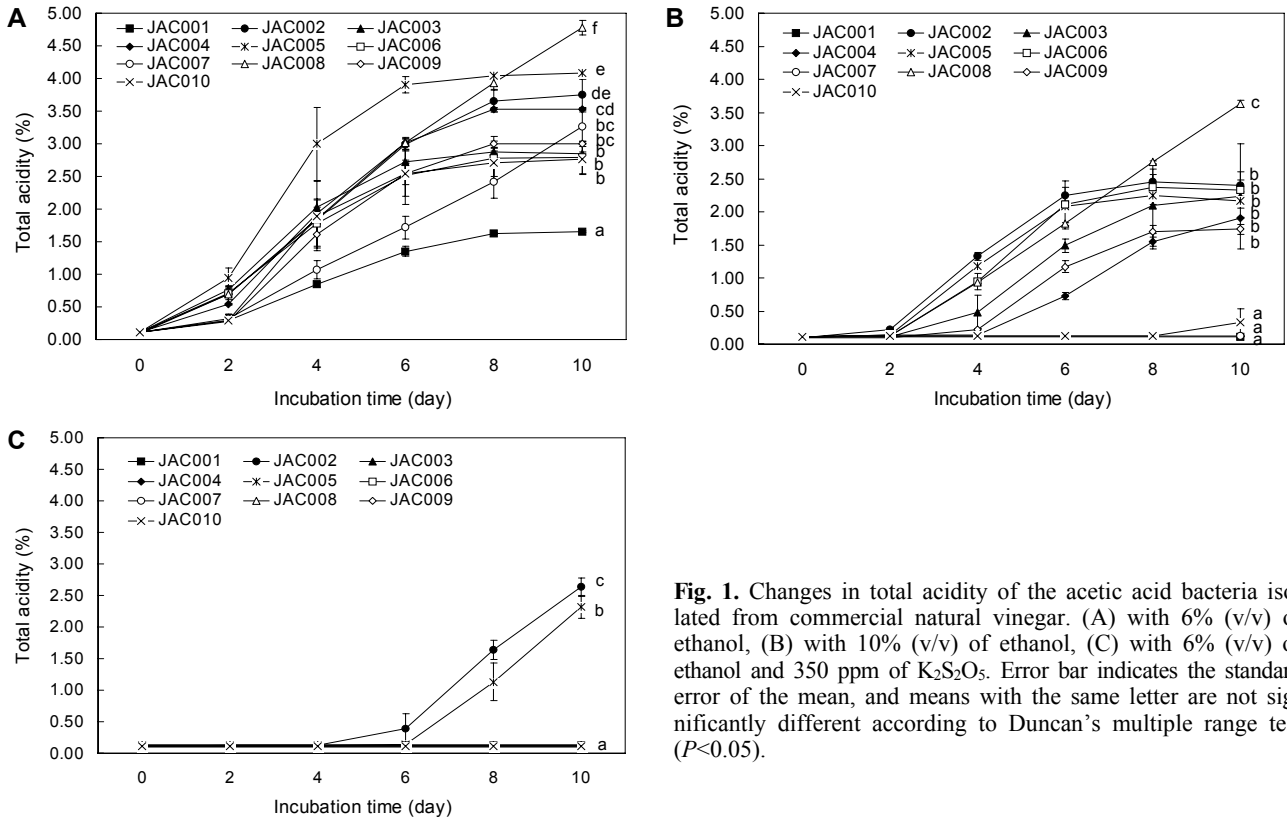


Fig. 1. Changes in total acidity of the acetic acid bacteria isolated from commercial natural vinegar. (A) with 6% (v/v) of ethanol, (B) with 10% (v/v) of ethanol, (C) with 6% (v/v) of ethanol and 350 ppm of K₂S₂O₅. Error bar indicates the standard error of the mean, and means with the same letter are not significantly different according to Duncan's multiple range test ($P < 0.05$).

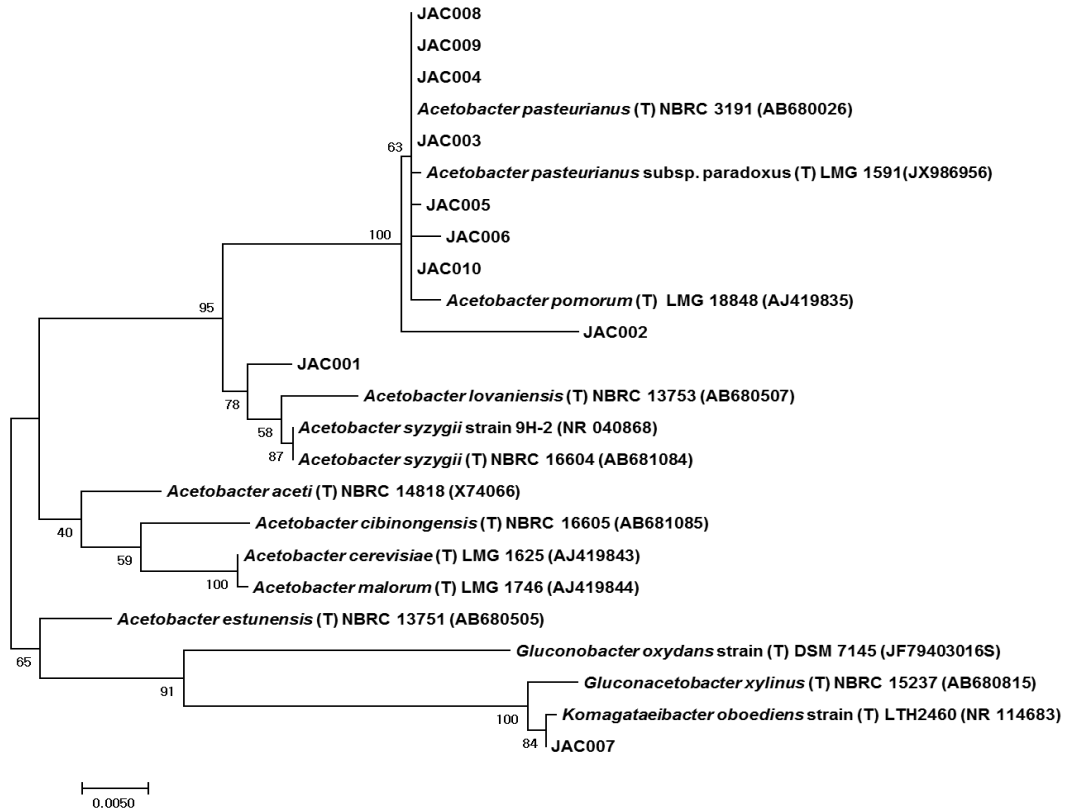


Fig. 2. Phylogenetic tree of the strains isolated from commercial natural vinegar through the maximum likelihood method based on the 16S rRNA gene sequences.

서 계통도를 분석한 결과는 Fig. 2와 같다. 분리균주 중 JAC 001 균주는 표준균주 *Acetobacter syzygii*(99%)와 근연관계가 가장 가까웠으며, JAC002, JAC003, JAC004, JAC005, JAC006, JAC008, JAC009, JAC010 균주들은 서열일치도가 98% 이상으로 *A. pasteurianus*와 근연관계가 가장 가까웠다. 또한, JAC007 균주는 *Komagataeibacter oboediens* strain LTH 2460(99%)과 근연관계가 가장 가까웠다. 결과적으로 선택된 10개의 균주는 *A. pasteurianus* 균주 8종, *A. syzygii* 균주 1종, *K. oboediens* 균주 1종으로 *A. pasteurianus* 균주가 주를 이루었다.

선발 균주로 제조한 막걸리 종초의 이화학적 특성

식품의약품안전처에서는 *A. pasteurianus* 종만을 식초 제조에 제한사용을 허가하고 있다. 특히 본 연구에서 에탄올 저항성이 우수한 3개 균주(JAC002, JAC005, JAC008) 모두 *A. pasteurianus*로 확인되어 종초 제조용 종균으로 유용하리라 판단되었다. 따라서 이들 3개의 균주를 막걸리에 접종하여 발효특성을 평가하였다. 선행연구에서 비살균 막걸리에 초산균주를 접종하여 진탕배양(30°C, 120 rpm)하였을 때 효모와 유산균 모두 증식하는 것이 확인되었으나, 막걸리를 원심분리 하여 얻은 상층액을 열처리(70°C, 30분)한 결과 효모와 유산균의 증식이 억제되었다. 따라서 막걸리를 이와 같은 방법으로 전처리한 후 *A. pasteurianus*인 JAC 002, JAC005, JAC008 균주를 접종하여 20일간 진탕배양(30°C, 120 rpm)하면서 이화학적 특성을 분석하였다(Table 1). 식초의 품질규정(총산 함량 4.0~20.0 w/v%, acetic acid 기준)에 적합한 시료로는 총산도가 4.21%(20일 경과)인 *A. pasteurianus* JAC002 균주 발효물이었으며, 나머지 균주는 총산도가 미미하게 증가하여 1%를 넘지 않는 것으로 확인되었다. *A. pasteurianus* JAC002 균주의 막걸리 발효물 pH는 3.72(0일 경과)에서 2.74(20일 경과)까지 낮아

졌으며, 당도는 3.7°Brix(0일 경과)에서 4.0°Brix(20일 경과)로 높아졌다. 반면에 *A. pasteurianus* JAC005와 *A. pasteurianus* JAC008 균주의 pH와 총산도의 변화는 5일 경과 이후에는 발효물 간 큰 차이를 보이지 않았고, 당도는 일정하게 유지되는 경향을 보였다.

선발 균주로 제조한 막걸리 종초의 유리당 함량

막걸리 종초의 발효기간에 따른 유리당의 함량 변화는 3가지 표준물질(fructose, glucose, sucrose)을 이용하여 정량화한 정량곡선을 이용하여 분석하였으며, 그 결과는 Table 2와 같다. 대조구를 포함하여 *A. pasteurianus* JAC 002, *A. pasteurianus* JAC005, *A. pasteurianus* JAC008 균주의 발효물에서 sucrose peak의 머무름 시간에 검출되는 peak는 확인되지 않았다. Park 등(23)이 보고한 막걸리의 유리당 분석 결과에서는 sucrose뿐만 아니라 fructose도 검출되지 않았는데, 본 연구에 사용된 막걸리에서는 sucrose는 검출되지 않았지만 fructose와 glucose는 각각 18.85 mg%와 25.38 mg%로 검출되었다. 또한, 초산균을 접종한 발효물에서는 발효기간에 따른 유리당의 변화량이 대조구와 큰 차이가 없었다. 이는 초산균이 세포 내에서 당을 산화하여 acetic acid를 생성하였기보다는 함유된 에탄올로부터 acetic acid를 생성하였기 때문에(11) 발효과정 중 막걸리에 함유된 당의 이용률이 거의 없었을 것으로 판단된다.

선발 균주로 제조한 막걸리 종초의 유기산 및 에탄올 함량

막걸리 종초의 유기산 함량 분석 결과는 Table 3과 같다. 막걸리 종초의 유기산은 대조구와 초산균 3종의 접종구에서 oxalic acid, citric acid, tartaric acid, malic acid, lactic acid, acetic acid 등 6종이 검출되었다. 총 유기산 함량은 발효 20일이 경과되었을 때 *A. pasteurianus* JAC002 균주 발효물이 3,951.18 mg%로 가장 높았으며 대조구(153.58

Table 1. Physicochemical properties of *Makgeolli* seed-vinegar manufactured with selected *Acetobacter pasteurianus* strains

Properties	Sample	Incubation time (day)				
		0	5	10	15	20
Total acidity (%)	Con. ¹⁾	0.21±0.00 ^{aA2-4)}	0.20±0.01 ^{aA}	0.21±0.00 ^{aA}	0.21±0.01 ^{aA}	0.21±0.01 ^{aA}
	JAC002	0.21±0.01 ^{aA}	1.05±0.02 ^{dB}	1.79±0.02 ^{dC}	2.89±0.02 ^{dD}	4.21±0.02 ^{dE}
	JAC005	0.21±0.00 ^{aA}	0.62±0.01 ^{bB}	0.61±0.01 ^{bB}	0.60±0.03 ^{bB}	0.60±0.01 ^{bB}
	JAC008	0.20±0.00 ^{aA}	0.87±0.02 ^{cC}	0.86±0.02 ^{cBC}	0.84±0.02 ^{cBC}	0.82±0.02 ^{cB}
pH	Con.	3.72±0.01 ^{bB}	3.72±0.01 ^{dB}	3.71±0.01 ^{dA}	3.70±0.01 ^{dA}	3.70±0.01 ^{dA}
	JAC002	3.72±0.01 ^{bE}	3.23±0.01 ^{aD}	3.06±0.01 ^{aC}	2.88±0.01 ^{aB}	2.74±0.01 ^{aA}
	JAC005	3.72±0.01 ^{bC}	3.34±0.01 ^{cA}	3.35±0.01 ^{cAB}	3.35±0.01 ^{cAB}	3.36±0.00 ^{cB}
	JAC008	3.69±0.01 ^{aD}	3.26±0.01 ^{bA}	3.27±0.01 ^{bB}	3.28±0.01 ^{bBC}	3.29±0.01 ^{bC}
°Brix	Con.	3.7±0.1 ^{aA}	3.7±0.1 ^{aA}	3.8±0.0 ^{aB}	3.8±0.0 ^{bB}	3.7±0.1 ^{aA}
	JAC002	3.7±0.1 ^{aA}	3.8±0.1 ^{aA}	3.9±0.0 ^{bB}	4.0±0.0 ^{cC}	4.0±0.1 ^{bC}
	JAC005	3.7±0.1 ^{aA}	3.7±0.1 ^{aA}	3.8±0.0 ^{aA}	3.7±0.1 ^{aA}	3.7±0.3 ^{aA}
	JAC008	3.7±0.1 ^{aA}	3.8±0.1 ^{aA}	3.8±0.1 ^{aA}	3.7±0.0 ^{aA}	3.7±0.2 ^{abA}

¹⁾Con. is control of non-inoculated rice wine, stored at 4°C.

²⁾Values are mean±SD (n=3).

³⁾Different lower-case letters (a-d) in the same column indicate a significant difference according to Duncan's multiple range test ($P<0.05$).

⁴⁾Different upper-case letters (A-E) in the same row indicate a significant difference according to Duncan's multiple range test ($P<0.05$).

Table 2. Free sugar contents of *Makgeolli* seed-vinegar manufactured with selected *A. pasteurianus* strains (Unit: mg%)

Sugar	Sample	Incubation time (day)		
		10	15	20
Fructose	Con. ¹⁾	18.85±0.29 ^{aA2)-4)}	19.41±0.21 ^{aA}	19.13±0.24 ^{aA}
	JAC002	22.14±0.65 ^{cA}	23.72±0.29 ^{cB}	20.66±0.65 ^{abA}
	JAC005	19.21±0.40 ^{aA}	21.12±1.21 ^{abA}	21.61±1.09 ^{abA}
	JAC008	20.87±0.47 ^{ba}	21.84±0.40 ^{ba}	22.61±1.30 ^{ba}
Glucose	Con.	25.38±0.17 ^{ba}	26.48±0.37 ^{abB}	25.64±0.23 ^{aAB}
	JAC002	28.54±0.73 ^{cA}	33.48±0.52 ^{bbB}	33.42±0.94 ^{cB}
	JAC005	23.15±0.29 ^{aA}	26.37±0.82 ^{abB}	26.42±0.95 ^{abB}
	JAC008	25.78±0.71 ^{ba}	27.46±0.80 ^{aAB}	28.79±0.84 ^{bbB}

¹⁾Con. is control of non-inoculated rice wine, stored at 4°C.

²⁾Values are mean±SD (n=3).

³⁾Different lower-case letters (a-c) in the same column indicate a significant difference according to Duncan's multiple range test ($P<0.05$).

⁴⁾Different upper-case letters (A,B) in the same row indicate a significant difference according to Duncan's multiple range test ($P<0.05$).

Table 3. Organic acid and alcohol contents of *Makgeolli* seed-vinegar manufactured with selected *A. pasteurianus* strains (Unit: mg%)

Organic acid	Sample	Incubation time (day)		
		10	15	20
Oxalic acid	Con. ¹⁾	0.44±0.05 ^{aA2)-4)}	0.44±0.05 ^{aA}	0.53±0.05 ^{aB}
	JAC002	0.49±0.06 ^{aA}	0.40±0.06 ^{aA}	0.42±0.05 ^{aA}
	JAC005	0.44±0.05 ^{aA}	0.45±0.13 ^{aA}	0.45±0.10 ^{aA}
	JAC008	0.48±0.04 ^{aA}	0.62±0.33 ^{aA}	0.42±0.04 ^{aA}
Citric acid	Con.	66.11±3.27 ^{aA}	65.42±6.39 ^{aA}	68.08±1.94 ^{aA}
	JAC002	79.47±12.80 ^{aA}	78.88±19.37 ^{aA}	80.37±16.43 ^{aA}
	JAC005	72.84±1.85 ^{aA}	78.55±4.47 ^{aA}	77.76±4.83 ^{aA}
	JAC008	79.45±2.44 ^{aA}	76.63±3.25 ^{aA}	74.91±2.74 ^{aA}
Tartaric acid	Con.	0.58±0.12 ^{aA}	0.45±0.39 ^{aA}	0.79±0.22 ^{aA}
	JAC002	3.74±1.15 ^{cA}	5.36±0.90 ^{cAB}	6.60±0.41 ^{cB}
	JAC005	0.75±0.66 ^{abA}	2.12±0.86 ^{ba}	1.81±0.55 ^{ba}
	JAC008	2.10±0.71 ^{ba}	1.64±0.61 ^{abA}	1.26±0.21 ^{abA}
Malic acid	Con.	13.81±0.07 ^{aA}	13.94±0.95 ^{aA}	26.42±0.95 ^{aA}
	JAC002	53.57±9.81 ^{ba}	57.48±3.57 ^{ba}	58.12±2.37 ^{ba}
	JAC005	174.85±3.96 ^{da}	187.08±5.01 ^{dB}	189.77±5.32 ^{dB}
	JAC008	133.74±1.77 ^{ca}	134.42±2.99 ^{ca}	134.99±2.50 ^{ca}
Lactic acid	Con.	53.21±3.55 ^{cA}	55.52±8.61 ^{da}	54.06±1.99 ^{da}
	JAC002	15.57±3.78 ^{aA}	16.91±1.48 ^{aA}	13.91±3.43 ^{aA}
	JAC005	34.17±4.58 ^{ba}	40.58±1.10 ^{cb}	40.87±1.59 ^{cb}
	JAC008	28.91±0.48 ^{ba}	27.90±4.92 ^{ba}	29.26±1.18 ^{ba}
Acetic acid	Con.	15.35±1.55 ^{aA}	18.18±6.46 ^{aA}	16.71±0.97 ^{aA}
	JAC002	1,368.52±254.171 ^{da}	2,552.45±134.001 ^{dB}	3,791.77±72.93 ^{dC}
	JAC005	390.07±16.02 ^{ba}	412.35±7.69 ^{ba}	403.70±13.05 ^{ba}
	JAC008	652.64±12.34 ^{ca}	636.62±18.41 ^{ca}	604.29±39.20 ^{ca}
Total organic acids	Con.	149.51±8.39 ^{aA}	153.96±22.66 ^{aA}	153.58±5.34 ^{aA}
	JAC002	1,521.35±281.57 ^{ca}	2,711.49±158.09 ^{dB}	3,951.18±90.50 ^{dC}
	JAC005	673.13±21.95 ^{ba}	721.13±18.94 ^{bb}	714.36±24.53 ^{baB}
	JAC008	897.32±10.40 ^{ba}	877.83±29.93 ^{ca}	845.13±45.50 ^{ca}
Ethanol	Con.	4,381.52±375.90 ^{ca}	4,431.89±986.32 ^{ba}	4,280.23±139.66 ^{ca}
	JAC002	2,975.46±547.60 ^{abB}	2,361.08±125.17 ^{abB}	1,348.45±22.81 ^{aA}
	JAC005	3,655.22±117.23 ^{baB}	3,761.68±57.94 ^{bb}	3,547.48±97.53 ^{ba}
	JAC008	3,771.29±49.15 ^{bcB}	3,639.11±89.80 ^{bb}	3,349.06±201.95 ^{ba}

¹⁾Con. is control of non-inoculated rice wine, stored at 4°C.

²⁾Values are mean±SD (n=3).

³⁾Different lower-case letters (a-d) in the same column indicate a significant difference according to Duncan's multiple range test ($P<0.05$).

⁴⁾Different upper-case letters (A-C) in the same row indicate a significant difference according to Duncan's multiple range test ($P<0.05$).

mg%)에 비해 25배 이상 증가하였다. 검출된 유기산 중에서는 acetic acid가 대부분을 차지하였고, 이어서 citric acid, malic acid, lactic acid, tartaric acid, oxalic acid 순이었다.

초산균에 의해 과잉 생성된 acetic acid는 초산 내성 기작과 관련하여 acetyl-CoA를 거쳐 citric acid, malic acid 등의 유기산으로 전환된다(11). 발효 20일 경과 후 *A. pasteurianus* JAC005와 *A. pasteurianus* JAC008 균주의 acetic acid 함량은 각각 403.70 mg%와 604.29 mg%로 *A. pasteurianus* JAC002 균주의 3,791.77 mg%보다 크게 낮았으나, citric acid 함량은 대조구와 초산균 발효물 간에 유의차가 없었다. 반면에 malic acid 함량은 *A. pasteurianus* JAC005와 *A. pasteurianus* JAC008 균주에서 각각 189.77 mg%와 134.99 mg%로 *A. pasteurianus* JAC002 균주의 58.12 mg%보다 높았다. Lactic acid 함량은 대조구가 54.06 mg%로 가장 높았으며, *A. pasteurianus* JAC002 균주는 13.91 mg%로 가장 낮은 값을 나타내었다. 곡류주는 발효 시 혐기적 조건에서 효모에 의해 에탄올이 생성될 뿐만 아니라 유산균 발효에 의해 lactic acid가 생성되는데, 곡류 식초에서 이는 균덕내의 원인이 된다고 알려져 있다(21,24). 따라서 *A. pasteurianus* JAC002 균주 발효물의 lactic acid 함량이 대조구에 비해 1/3 이상 감소하였기 때문에 막걸리 식초의 균덕내가 감소하였을 것이라 판단된다.

총산도와 유기산의 변화를 비교하여 분석한 결과 4% 이상의 총산도를 보인 *A. pasteurianus* JAC002 균주 20일차 발효물은 총유기산에 대한 acetic acid의 함량비가 대략 96%로 acetic acid에 의해 총산도가 결정되었을 것으로 판단된다. 에탄올 함량은 *A. pasteurianus* JAC002 균주 20일차 발효물이 1,348.45 mg%로 대조구(4,280.23 mg%)에 비해 2,931.78 mg%의 감소를 보였으나 acetic acid 함량은 3,775.06 mg%가 증가하여 에탄올로부터 acetic acid로의 전환율이 가장 우수한 균주로 확인되었다. 이와 같은 결과를 토대로 *A. pasteurianus* JAC002 균주는 생성된 acetic acid를 다른 유기산으로 전환하는 능력보다는 acetic acid

를 축적하는 능력이 높은 균주로 막걸리 종초에 사용될 수 있는 초산균 종균으로 유용할 것이라 판단된다.

선발 균주로 제조한 막걸리 종초의 항균 활성

막걸리 종초의 항균 활성 분석 결과는 Table 4와 같다. 식품유해 지표세균 중 그람양성인 *S. aureus*(KACC1927)와 그람음성인 *E. coli*(KACC10115)에 대한 막걸리 종초의 발효기간별 증식 억제 활성은 *A. pasteurianus* JAC002 균주 발효물이 가장 우수하였다. Budak 등(25)은 식초의 acetic acid가 세포벽 및 세포막 손상을 유발하여 유해균 증식을 억제하는 것으로 보고하였다. 유해균주인 *S. aureus*와 *E. coli*는 일정농도까지 acetic acid 내성을 보유하고 있으나, 본 연구에 사용된 *S. aureus*(KACC1927)의 경우 *A. pasteurianus* JAC002 균주 발효물은 총산도 1.79%(10일 경과)에서 1.63의 활성을, 총산도 4.21%(20일 경과)에서 3.34의 활성을 보였으나 1% 미만의 총산도에서는 항균 활성이 나타나지 않았다. 한편 *E. coli*(KACC10115)의 경우 *A. pasteurianus* JAC008 균주 발효물은 총산도 0.86%(10일 경과)에서 1.72의 활성을 나타냈다. 또한, *A. pasteurianus* JAC002 균주 발효물에서는 총산도 농도 의존적으로 항균 활성이 증가하였고, 특히 총산도 4.21%(20일 경과)의 발효물에 대한 항균 활성이 4.24로 가장 높았다. Woo 등(26)은 식초 처리에 의해 식품유해균인 *S. aureus*와 *E. coli*의 세포가 팽윤되어 세포벽이 파괴되었다고 보고하였고, 따라서 막걸리 종초의 항균 활성은 acetic acid의 생성량 증가에 따른 pH의 저하에 기인하는 것으로 추정된다. 또한, Bearson 등(27)은 pH 2.5에서 생존이 가능한 *E. coli* 같은 장내미생물의 산(acid) 저항성에 대해 강산이 아닌 약산의 존재가 세포의 분자적 조절시스템의 균형을 깨뜨려 생육을 저해하는 것으로 보고하고 있다. 따라서 *A. pasteurianus* JAC008 균주 발효물의 경우 pH가 *A. pasteurianus* JAC005와 유의적 차이를 보이지 않았음에도 *E. coli*(KACC10115)에 항균 활성이 확인된 것으로 보아 acetic acid의 함량 변화에 의한 영향으로 추정된다.

Table 4. Antimicrobial activity of *Makgeolli* seed-vinegar manufactured with selected *A. pasteurianus* strains

Strain	Sample	Incubation time (day)		
		10	15	20
<i>Staphylococcus aureus</i> (KACC1927)	Con. ¹⁾	ND ²⁾	ND	ND
	JAC002	1.63±0.14 ^{a3)4)}	2.78±0.18 ^b	3.34±0.16 ^c
	JAC005	ND	ND	ND
	JAC008	ND	ND	ND
<i>Escherichia coli</i> (KACC10115)	Con.	ND	ND	ND
	JAC002	3.24±0.09 ^a	4.07±0.26 ^b	4.24±0.31 ^b
	JAC005	ND	ND	ND
	JAC008	1.72±0.11 ^b	1.76±0.13 ^b	1.50±0.04 ^a

¹⁾Con. is control of non-inoculated rice wine, stored at 4°C.

²⁾ND is not detected.

³⁾Values are mean±SD (n=3).

⁴⁾Different lower-case letters (a-c) in the same row indicate a significant difference according to Duncan's multiple range test ($P<0.05$).

결과적으로 본 연구에 사용된 *A. pasteurianus* JAC002 균주의 경우 총산도가 발효 20일 경과까지 유의적으로 증가함에 따라 유해균 억제능과 선형상관관계가 성립됨이 확인되었다. 따라서 *A. pasteurianus* JAC002 균주를 막걸리 종초 제조를 위한 종균으로 사용하였을 때 이상발효를 일으키는 잡균의 증식을 제어하여 품질의 안정화를 이룰 수 있을 것으로 판단된다.

요 약

자연발효식초로부터 acetic acid 생성능이 우수한 10종의 균주를 분리한 후 에탄올 저항성과 아황산 저항성을 평가하였고, 16S rRNA 염기서열을 분석하여 균주를 동정한 다음 명명하였다. 분리 동정된 10종의 균주 중 식품원료 사용 가능 균주인 *Acetobacter pasteurianus*는 8종으로 확인되었다. *A. pasteurianus* 8종 중 에탄올 저항성이 우수한 JAC002, JAC005, JAC008의 세 균주를 이용하여 막걸리 종초를 제조하였다. 진탕배양(30°C, 120 rpm) 조건에서 20일 동안 발효시키면서 막걸리 종초의 이화학적 특성, 유리당과 유기산의 변화, 유해균에 대한 항균 활성을 측정하였다. 선발 균주 중 *A. pasteurianus* JAC002 균주는 발효 20일 경과 후 총산도 4.21%, acetic acid 함량 3,791.77 mg%, 에탄올 소모량 2,931.78 mg%로 대조구나 다른 초산균에 비해 에탄올의 acetic acid 전환능이 우수하였다. 식품유해 지표균인 *Staphylococcus aureus*(KACC1927)와 *Escherichia coli*(KACC 10115)에 대한 항균 활성은 *A. pasteurianus* JAC002 균주가 접종된 막걸리 종초의 발효기간이 20일까지 경과했을 때 acetic acid 농도의 증가와 더불어 유의적으로 증가하는 것으로 확인되었다. 특히 *A. pasteurianus* JAC002 균주를 막걸리 종초 제조를 위한 종균으로 사용하였을 때 acetic acid 생성능이 우수하여 우점화가 유리하며 에탄올로부터 acetic acid로의 전환율이 높은 것으로 확인되었다. 따라서 이 막걸리 종초를 사용하여 다양한 원료의 식초를 제조한다면 식초의 풍미를 유지하면서 기능성을 증대시킬 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 2017년 산업통상자원부 산업기술거점기관지원(한국형 유용균주, 과제번호: R0004073) 사업의 지원에 의해 수행되었습니다.

REFERENCES

1. Lee JW, Chung YK, Park JW. 2013. Pasteurization characteristics of *Makgeolli* (Korea rice wine) with various initial concentrations of yeasts. *J Korean Food Nutr* 26: 633-637.
2. Shin EJ, Kim SH, Kim JH, Ha J, Hwang JT. 2015. Dealcoholized Korean rice wine (makgeolli) exerts potent anti-tumor effect in AGS human gastric adenocarcinoma cells and

- tumor xenograft mice. *J Microbiol Biotechnol* 25: 1485-1492.
3. Shin MO, Kim MH, Bae SJ. 2010. The effect of *Makgeolli* on blood flow, serum lipid improvement and inhibition of ACE *in vitro*. *J Life Sci* 20: 710-716.
4. Cheong SR, Kim R, Park YK, Baek SY, Yeo SH, Lee CH. 2015. Anti-obesity effect of fermented detoxified *Rhus verniciflua* vinegar supplementation in diet-induced obese rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 44: 1771-1778.
5. Park YH, Choi JH, Whang K, Lee SO, Yang SA, Yu MH. 2014. Inhibitory effects of lyophilized dropwort vinegar powder on adipocyte differentiation and inflammation. *J Life Sci* 24: 476-484.
6. Yim EJ, Jo SW, Lee ES, Park HS, Ryu MS, Uhm TB, Kim HY, Cho SH. 2015. Fermentation characteristics of mulberry (*Cudrania tricuspidata*) fruit vinegar produced by acetic acid bacteria isolated from traditional fermented foods. *Korean J Food Preserv* 22: 108-118.
7. Park KS, Chang DS, Cho HR, Park UY. 1994. Investigation of the cultural characteristics of high concentration ethanol resistant *Acetobacter* sp.. *J Korean Soc Food Nutr* 23: 666-670.
8. Hong SM, Kang MJ, Lee JH, Jeong JH, Kwon SH, Seo KI. 2012. Production of vinegar using *Rubus coreanus* and its antioxidant activities. *Korean J Food Preserv* 19: 594-603.
9. Jo D, Lee HJ, Jeong YJ, Yeo SH, Kwon JH. 2014. Quality properties of pear vinegars with high-acidity under different fermentation conditions. *Korean J Food Sci Technol* 46: 418-424.
10. Kim DK, Baik MY, Kim HK, Hahm YT, Kim BY. 2012. Manufacture of the red ginseng vinegar fermented with red ginseng concentrate and rice wine, and its quality evaluation. *Korean J Food Sci Technol* 44: 179-184.
11. Wang B, Shao Y, Chen F. 2015. Overview on mechanisms of acetic acid resistance in acetic acid bacteria. *World J Microbiol Biotechnol* 31: 255-263.
12. Alauzet C, Teyssier C, Jumas-Bilak E, Gouby A, Chiron R, Rabaud C, Counil F, Lozniewski A, Marchandin H. 2010. Gluconobacter as well as *Asaia* species, newly emerging opportunistic human pathogens among acetic acid bacteria. *J Clin Microbiol* 48: 3935-3942.
13. Greenberg DE, Porcella SF, Stock F, Wong A, Conville PS, Murray PR, Holland SM, Zelazny AM. 2006. *Granulibacter bethesdensis* gen. nov., sp. nov., a distinctive pathogenic acetic acid bacterium in the family *Acetobacteraceae*. *Int J Syst Evol Microbiol* 56: 2609-2616.
14. Baek C, Baek S, Lee SH, Kang JE, Choi HS, Kim JH, Yeo SH. 2015. Characterization of *Acetobacter* sp. strain CV1 isolated from a fermented vinegar. *Microbiol Biotechnol Lett* 43: 126-133.
15. Zhang Z, Schwartz S, Wagner L, Miller W. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J Comput Biol* 7: 203-214.
16. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22: 4673-4680.
17. Tamura K, Nei M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol* 10: 512-526.
18. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis

- using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28: 2731-2739.
19. Oh HJ, Jeon SB, Kang HY, Yang YJ, Kim SC, Lim SB. 2011. Chemical composition and antioxidative activity of kiwifruit in different cultivars and maturity. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40: 343-349.
 20. Kim YS, Song GS. 2002. Characteristics of kiwifruit-added traditional *kochujang*. *Korean J Food Sci Technol* 34: 1091-1097.
 21. Baek SY, Kim JS, Mun JY, Lee CH, Park YK, Yeo SH. 2016. Quality characteristics of detoxified *Rhus verniciflua* vinegar fermented using different acetic acid bacteria. *Korean J Food Preserv* 23: 347-354.
 22. Yang HJ, Jeong SJ, Jeong SY, Heo JH, Jeong DY. 2015. Screening of biogenic amine non-producing yeast and optimization of culture conditions using statistical method for manufacturing black raspberry wine. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 44: 592-601.
 23. Park CW, Jang SY, Park EJ, Yeo SH, Kim OM, Jeong YJ. 2011. Comparison of the quality characteristics of commercial *Makgeolli* type in South Korea. *Korean J Food Preserv* 18: 884-890.
 24. Lee GE, Kim SM, Huh CK, Cho IK, Kim YD. 2015. Comparison of quality properties and identification of acetic acid bacteria for black waxy rice vinegar. *Korean J Food Preserv* 22: 443-451.
 25. Budak NH, Aykin E, Seydim AC, Greene AK, Guzel-Seydim ZB. 2014. Functional properties of vinegar. *J Food Sci* 79: R757-R764.
 26. Woo SM, Jang SY, Kim OM, Youn KS, Jeong YJ. 2004. Antimicrobial effects of vinegar on the harmful food-borne organisms. *Korean J Food Preserv* 11: 117-121.
 27. Bearson S, Bearson B, Foster JW. 1997. Acid stress responses in enterobacteria. *FEMS Microbiol Lett* 147: 173-180.