

초산균을 달리하여 제조한 사과식초의 품질특성

박혜진 · 박재은 · 강혜정* · 김민자** · 김건희*** · †엄현주

충청북도농업기술원 지방농업연구소, *충청북도농업기술원 연구원, **충청북도농업기술원 지방농업연구소, ***충북대학교 축산·원예·식품공학부 식품생명공학과 박사과정

Quality Characteristics of Apple Vinegar using Various Acetic Acid Bacteria

Hye Jin Park, Jae Eun Park, Hye Jeong Kang*, Min-Ja Kim**, Geonhee Kim*** and †Hyun-Ju Eom

Associate Researcher, Chungcheongbukdo Agricultural Research and Extension Services, Cheongju 28130, Korea

*Researcher, Chungcheongbukdo Agricultural Research and Extension Services, Cheongju 28130, Korea

**Senior Researcher, Chungcheongbukdo Agricultural Research and Extension Services, Cheongju 28130, Korea

***Ph.D. Student, Division of Animal, Horticultural and Food Sciences, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Korea

Abstract

To develop farm-made high effective vinegar, this study prepared apple vinegar using four kinds of acetic acid bacteria isolated from a natural fermentation liquid of 'Cheongsoo' grapes and analyzed vinegar samples fermented 93% apple juice and 7% alcohols at 30°C for 20 days. To accomplish this, quality characteristics such as pH, total acidity, reducing sugar, organic acid, color, total polyphenol contents, and antioxidant activity contents were determined. The pH decreased while total acidity of all samples gradually increased during fermentation period. The vinegar with AP 21 strain tended to increase the total acidity quicker than other stains. Reduced sugar content remained high until the last fermentation day. Furthermore, reduced sugar contents of all vinegars increased as fermentation progressed by decomposing sucrose present in apples. When physiological activities were compared, apple vinegars fermented with AP 21 and 30 strains had higher total polyphenol and flavonoid contents than other samples. However, there was no significant difference in antioxidant activity between samples. These results indicate that strain 21 is the most suitable starter as acetic acid bacteria for producing farm-made vinegar.

Key words: farm-made high effective vinegar, acetic acid bacteria, *Acetobacter pasteurianus*

서론

식초는 동서양의 대표적인 발효식품으로, 우리 일상생활과 밀접한 관련을 맺고 있으며, 발효과정에서 생성된 독특한 방향과 신맛으로 인해 전통적으로 식품의 맛을 내는 산미료로 이용되어 왔다(Shin 등 2017). 식초는 초산균의 발효과정 중 생성되는 초산의 함량을 품질판정의 지표로 이용되며, 식품공전에서는 총산 함량을 4-20%(초산, w/v%) 범위로 정하고 있다(Lee 등 2018a). 이러한 식초는 곡류, 과일류, 주류 등을 주원료로 하여 알코올을 발효 및 초산발효를 거쳐 제조하는 발효식초와 발효과정을 거치지 않고 빙초산 또는 초산을 먹

는 물로 희석하여 만든 희석초산으로 구분할 수 있다(MFDS 2024). 또한, 발효식초는 과즙이나 곡물 당화액을 이용한 식초의 제조방법으로 알코올 발효와 초산발효를 연속적으로 실시하는 경우와 단순히 초산발효만 실시하는 경우로 구분할 수 있다. 알코올 발효 실시 여부에 따라 식초의 화학성분에 차이가 다소 있을 수 있으며, 결국 원료의 종류, 사용 초산균주, 제조방법, 발효조건, 숙성정도에 따라 spirit vinegar와 과즙 및 곡물식초는 함유 성분들의 종류 및 함량에 따라 차이를 나타낼 수 있다(Yoon HN 1999).

최근 식초시장은 단순 조미료 기능에서 건강용 식초로 소비패턴이 변화되면서 고품질 식초제조에 관한 연구 및 산

† Corresponding author: Hyun-Ju Eom, Associate Researcher, Chungcheongbukdo Agricultural Research and Extension Services, Cheongju 28130, Korea. Tel: +82-43-220-5691, Fax: +82-43-220-5679, E-mail: hyunjueom@korea.kr

업화가 요구되고 있으며, 산딸기(Han 등 2010), 고추(Park 등 2010), 꾸지뽕 열매(Yim 등 2015), 도라지(Lee 등 2018b), 섬애약쑥(Shin 등 2020) 등과 같은 천연 원료를 소재로 한 식초관련 연구들이 보고되고 있다.

식초를 발효하는데 가장 중요한 요소 중 하나는 초산균이며, 균주에 따라 식초의 품질을 판정하는 지표로 이용되며 이들이 식초의 독특한 향과 맛을 결정한다(Baek 등, 2014; Yim 등 2015). 국내 초산균 연구는 고산도 생성 초산균을 분리하여 발효특성에 관한 연구(Baek 등 2015), 아로니아 발효액에서 분리한 초산균을 활용하여 아로니아 식초를 제조한 연구(Eom 등 2019), 토착 초산균인 *Acetobacter pasteurianus* A11-2를 첨가한 도라지 식초(Gil 등 2020) 등 초산균을 발효종균으로 분리하여 식초연구에 사용한 예는 많지 않은 실정이다. 또한 소량으로 생산되고 있는 농가형 식초의 경우는 사용한 원료, 만드는 방법의 차이 등으로 인해 집집마다 다른 풍미를 가진 식초를 생산하고 있지만, 발효종균의 미사용으로 장기간의 발효시간, 일정하지 않은 식초품질 및 이상발효 등 다양한 문제점이 대두되고 있다(Baek 등 2013). 이에 초산의 생산 수율이 높고 식초 제조에 용이한 균주를 발굴 및 개발해야 할 필요성이 대두되고 있다.

따라서 본 연구는 농가형 식초의 단점을 해결하기 위하여 식초용 종균으로 분리한 초산균을 활용하여 식초에 적용, 초산균 종류에 따라 사과식초의 색도, 유기산, 환원당 및 생리활성 등 조사하여 앞으로 농가형 식초의 발효종균으로의 가능성을 확인해보고자 한다.

재료 및 방법

1. 사용균주, 배지 및 사과식초 제조

본 연구에 사용한 초산균은 충북농업기술원에서 분리하여 보관 중인 것으로, 세척하지 않은 청수포도를 착즙해서 초산을 넣어 초기 총산을 2%로 만든 즙을 자연에서 발효시킨 청수발효액에서 분리하였다. *Acetobacter pasteurianus* 15(AP 15), *A. pasteurianus* 16(AP 16), *A. pasteurianus* 21(AP 21), 및 *A. pasteurianus* 30(AP 30)로 최종 동정되었으며, 본 연구에 식초 종균으로 사용하였고, 대조구(control)로는 *A. pasteurianus* KACC 13994를 사용하였다. 초산 발효를 위한 초산균의 고체배지 조성은 1% yeast extract(BD Difco Laboratories, Detroit, MI, USA), 5% glucose(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), 3% CaCO₃(Sigma Chemical Co.), 3% ethanol(Sigma Chemical Co.), 2.5% agar(BD Difco Laboratories)이며, 액체배양 배지의 조성은 YGE 배지(1% yeast extract, 5% glucose, 3% ethanol)를 사용하였다. 초산발효를 위해 5가지 균주를 YGE 배지에 접종하여 계대배양 하였으며, 진탕 배양기를 사용하

여 30℃, 200 rpm에서 총산 4% 이상일 때 종초로 사용하였다. 사과식초를 제조하기 위하여 알코올 발효는 하지 않고, 초산발효만 유도하였다. 초산균 5종은 YGE배지에 배양한 뒤 원심분리하고 0.85% NaCl 용액에 셀을 씻은 뒤 종균으로 사용하였다. 93% 사과즙(Sigolnaeum, Chungju, Korea)과 7% 발효주정(DEL, Hwaseong, Korea)을 혼합하고 이를 30℃, 200 rpm에서 20일간 발효를 진행하였다. 대조구 *A. pasteurianus* KACC 13994 균주를 첨가한 식초는 control, 나머지는 각각의 첨가한 초산균주 이름으로 명명하였다.

2. pH 및 총산 함량

사과 식초의 pH는 pH meter(Sartorius AG, Gottingen, Germany)를 이용하여 측정하였고, 총산은 시료 10 mL에 1% phenolphthalein 2-3방울을 넣고 0.1 N NaOH로 pH 8.2~8.3이 될 때까지 적정하였다. 적정에 소비된 NaOH 소비량은 acetic acid에 상당하는 유기산 계수를 이용하여 총산으로 환산하여 나타내었다.

3. 환원당 측정

환원당 측정(Eom 등 2022)은 100배 희석한 시료 200 µL에 DNS 시약 400 µL를 넣고 끓는 물에서 5분 중탕 후 1분 이상 냉각시켰다. 분광광도계(Bio Tek Epoch 2 microplate reader, Bio Tek Instruments, Inc, Winooski, VT, USA)를 이용하여 흡광도(550 nm)를 측정하였다. 환원당 정량은 glucose(Sigma-Aldrich Co.)를 표준물질로 사용하여 검량선을 작성 후 환산하였다.

4. 유기산 분석

사과식초의 유기산 분석은 시료를 원심분리한 후 상등액을 취하여 0.45 µm H-PTFE membrane filter(Whatman)로 여과한 다음 HPLC(Agilent 1260 infinity, Agilent, Santa clara, CA, USA)로 분석하였다. 분석용 칼럼은 Aminex HPX-87H(300 mm×7.8 mm, Biorad)을 사용하였고, 이동상 용매는 0.008 N H₂SO₄로 0.6 mL/min으로 주입하였으며, 칼럼온도는 30℃를 유지하였고, 20 µL의 시료를 주입하여 210 nm에서 UV검출기를 이용하여 검출하였다. 분리된 각 피크는 유기산 표준물질인 citric acid, malic acid, succinic acid, fumaric acid, acetic acid, malic acid(Sigma-Aldrich Co.)의 검량곡선으로부터 산출하였다.

5. 색도 측정

색도 측정은 색도색차계(CM-3500d, Tokyo, Japan)를 이용하여 수행하였다. 15 mL 시료는 petri-dish에 담겨 3회 측정된 값의 평균을 취하여 계산되었으며, 이는 명도 L 값(lightness),

적색도 a값(redness) 그리고 황색도 b값(yellowness)으로 나타내었다. 표준백색판의 값은 $L=96.89$, $a=-0.07$, $b=-0.18$ 이었다.

6. 총 폴리페놀 함량 측정

사과식초의 총 폴리페놀 함량은 Amerine & Ough(1980) 방법을 이용하여 측정하였다. 식초 50 μL 에 2% Na_2CO_3 1 mL를 혼합하여 3분 동안 방치한 후, 1 N Folin-Ciocalteu's phenol reagent(Sigma-Aldrich Co.) 50 μL 를 혼합하여 30분 동안 반응시켰다. 반응액의 흡광도 값을 750 nm에서 측정하였고, 검량선은 표준물질은 rutin(Sigma-Aldrich Co.)을 사용하여 작성하였다. 이때, gallic acid를 표준물질로 사용하여 동일하게 실험해 검량선을 작성하였으며 시료의 총 폴리페놀 함량을 나타내었다.

7. 총 플라보노이드 측정

사과식초의 총 플라보노이드 함량은 Chung HJ(2014)의 방법을 변형하여 수행하였다. 식초 시료 200 μL 에 1 N NaOH 600 mL와 diethylene glycol 4 mL를 가하여 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 후, 420 nm에서 반응액의 흡광도 값을 측정하였다. 표준물질은 rutin을 사용하여 검량선을 작성하였고, 총 플라보노이드 함량은 rutin의 검량선에 기초해 환산하여 나타내었다.

8. 항산화 활성 측정

사과식초의 항산화 활성을 평가하기 위해 ABTS 및 DPPH 라디칼 소거능을 측정하였다. ABTS 라디칼 소거능(Re 등 1999)은 7.4 mM ABTS(2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid, Sigma-Aldrich Co.)와 2.6 mM potassium persulfate을 24시간 동안 암소에 방치하여 ABTS 양이온을 형성시킨 후 이 용액을 735 nm에서 1.3~1.5의 흡광도 값이 나오도록 증류수로 희석하였다. 희석된 ABTS 용액 1 mL와 식초 시료 50 μL 를 혼합하여 30분간 반응시킨 후 흡광도를 735 nm에서 측정하였고, ABTS 값은 시료 첨가구와 시료 비첨가구의 흡광도를 백분율로 나타내었다. DPPH 라디칼 소거능(Choi 등 2003)은 0.4 mM DPPH(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, Sigma-Aldrich Co.) 용액을 1.5~1.7의 흡광도 값이 나오도록 희석한 후 희석된 추출물 0.2 mL에 DPPH 용액 0.8 mL를 가하여 실온에서 30분간 방치한 후 525 nm에서 흡광도를 측정하였다. ABTS 측정과 마찬가지로 DPPH 값 또한 시료 첨가구와 비첨가구의 흡광도 차이를 백분율(%)로 나타내었다.

9. 통계처리

모든 시험은 3반복 진행하였으며 결과는 평균±표준편차(standard deviation, SD)로 나타낸 후 통계분석은 SPSS(Statistical

Package for the Social Science, Ver 12.0 SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하였고, 동질성을 비교하기 위해 분산분석(ANOVA)을 실시한 후 측정값 간의 유의성을 Duncan's multiple range test로 $p<0.001$ 수준에서 검증하였다.

결과 및 고찰

1. pH, 총산, 환원당 및 유기산 분석

청수포도 천연발효액에서 분리한 4종의 초산균을 활용하여 사과식초를 제조하였으며, 발효 후 사과식초의 pH와 총산은 Table 1에 나타내었다. 대조구를 포함하는 모든 시료는 초기 pH 4.04~4.14에서 시작하여 발효 20일 경과 후에 접종한 종균에 따라 pH 2.89~3.08로 나타나 발효가 진행될수록 모든 실험구에서 pH 값은 점점 낮아졌고, 특히 AP21을 접종한 식초가 가장 빨리 pH 값이 감소하였다. 첨약약속을 첨가한 식초의 발효 25일째에 pH 범위가 3.0~3.14라고 보고하였고(Shin 등 2020)과 도라지 식초의 경우 발효 15일 때 pH 3.57~3.69였다고 보고(Gil 등 2020)하여, 원료나 종초의 종류에 따라 다양한 pH 값을 나타냈지만, 식초는 pH 변화보다는 총산 값으로 발효의 종료를 확인하는 것이 더 정확하다.

총산 함량은 발효 기간 동안 모든 시료에서 증가하는 형태를 보였고 pH와 총산의 함량이 반비례적으로 나타났다. 초기 산도는 0.30~0.35%로 시작하여 발효 마지막날인 20일째에는 3.44~5.12%로 다양한 값을 나타내었는데, 대조구는 발효 10일부터 꾸준히 증가하여 발효 20일째 4.22%의 산도를 나타냈고, AP21 균주를 첨가한 식초의 경우 발효 5일만에 3.12% 총산을 나타냈고, 발효 10일째는 4.78%로, 발효 10일만에 식초의 식품공전 기준인 4%(v/v, 초산 기준) 이상 도달하였다. 따라서 AP21 균주는 다른 균주에 비하여 초기 발효율이 높아 단기간 발효 시에 가장 적합한 균주라 할 수 있다. 초산균은 알코올을 영양원이나 발효 기질로 사용하여 초산 등 다양한 유기산을 생성시켜 산도가 증가하게 된다(Park 등 2012). 좀 더 정확한 유기산의 함량을 확인하기 위하여 HPLC로 몇 가지 유기산을 정량하였다(Table 2). 발효 20일째 사과식초의 유기산을 분석을 하였을 때, citric acid는 모든 시료에서 검출되지 않았고, acetic acid가 가장 많은 함량을 차지했다. 앞서 총산 함량의 경우와 같이 acetic acid 함량의 경우, AP21 균주를 첨가한 사과식초의 경우 4.12%로 가장 높은 값을 나타내, 빠른 식초생산을 위해서 AP21 균주가 적합하다고 판단된다. 유기산 중 acetic acid를 포함하여 malic acid, succinic acid 등 총 유기산은 4.79%로 나타났고 가장 적은 함량은 AP16을 첨가한 식초로 acetic acid의 경우 3.08% 함량을 보였고, 총 유기산은 3.82%로 나타났다.

식초의 환원당 결과는 Table 1과 같다. 사과에 존재하는 탄

Table 1. Changes in pH, total acidity and reducing sugar of apple vinegar by various acetic acid bacteria

Sample	Fermentation time (days)					
	0	5	10	15	20	
pH	Control	4.04±0.01 ^{Ad}	3.78±0.00 ^{Ba}	3.59±0.00 ^{Ca}	3.31±0.01 ^{Db}	2.96±0.00 ^{Ec}
	AP15	4.08±0.00 ^{Ac}	3.68±0.01 ^{Bb}	3.51±0.00 ^{Cc}	3.40±0.00 ^{Da}	3.01±0.01 ^{Eb}
	AP16	4.08±0.01 ^{Ac}	3.69±0.02 ^{Bb}	3.58±0.01 ^{Cb}	3.24±0.01 ^{Dc}	3.08±0.01 ^{Ea}
	AP21	4.14±0.01 ^{Aa}	3.35±0.01 ^{Bd}	3.23±0.00 ^{Ce}	2.90±0.02 ^{Da}	2.89±0.00 ^{De}
	AP30	4.12±0.00 ^{Ab}	3.62±0.01 ^{Bc}	3.39±0.00 ^{Cd}	2.92±0.01 ^{Dd}	2.91±0.01 ^{Ed}
Total acidity	Control	0.31±0.02 ^{Ea}	0.81±0.02 ^{Dc}	1.98±0.03 ^{Cd}	3.81±0.11 ^{Bc}	4.22±0.15 ^{Ac}
	AP15	0.35±0.05 ^{Ea}	1.31±0.05 ^{Dc}	2.54±0.11 ^{Cc}	3.09±0.09 ^{Bd}	3.85±0.09 ^{Ad}
	AP16	0.33±0.04 ^{Ea}	1.32±0.03 ^{Dc}	2.13±0.04 ^{Cd}	2.33±0.0 ^{Be}	3.44±0.15 ^{Ac}
	AP21	0.30±0.01 ^{Da}	3.12±0.12 ^{Ca}	4.78±0.12 ^{Ba}	5.23±0.20 ^{Aa}	5.12±0.13 ^{Aa}
	AP30	0.34±0.02 ^{Da}	1.60±0.06 ^{Cb}	3.48±0.16 ^{Bb}	4.59±0.21 ^{Ab}	4.78±0.07 ^{Ab}
Reducing sugar	Control	9.40±0.40 ^{Cab}	10.73±0.14 ^{Bb}	11.31±0.07 ^{Aab}	11.47±0.15 ^{Aa}	11.47±0.21 ^{Ab}
	AP15	8.84±0.24 ^{Dc}	11.41±0.27 ^{Ba}	10.81±0.08 ^{Cb}	11.33±0.19 ^{Bab}	12.17±0.17 ^{Aa}
	AP16	9.64±0.34 ^{Cab}	11.18±0.62 ^{Bab}	10.95±0.06 ^{Bb}	11.38±0.23 ^{Bab}	12.13±0.05 ^{Aa}
	AP21	9.82±0.10 ^{Ca}	11.26±0.09 ^{ABab}	11.78±0.58 ^{Aa}	11.08±0.11 ^{Bb}	11.41±0.23 ^{ABbc}
	AP30	9.15±0.04 ^{Cbc}	11.36±0.05 ^{Ba}	11.96±0.57 ^{Aa}	11.20±0.20 ^{Bab}	11.11±0.10 ^{Bc}

Each values mean±S.D.

^{a-c}Values with different small letters within a column are significantly different by Duncan's multiple range test ($p<0.001$).

^{A-E}Values with different capital letters within a row are significantly different by Duncan's multiple range test ($p<0.001$).

Table 2. Changes in organic acid of apple vinegar by various acetic acid bacteria

Sample	Malic acid (%)	Succinic acid (%)	Fumaric acid (%)	Acetic acid (%)	Total (%)
Control	0.46±0.02 ^{Bab}	0.24±0.00 ^C	0.00±0.00 ^D	3.59±0.03 ^{Ac}	4.29±0.06 ^c
AP15	0.46±0.00 ^{Bb}	0.23±0.00 ^C	0.01±0.00 ^D	3.42±0.01 ^{Ad}	4.11±0.01 ^d
AP16	0.49±0.03 ^{Ba}	0.24±0.00 ^C	0.01±0.00 ^D	3.08±0.01 ^{Ac}	3.82±0.04 ^e
AP21	0.45±0.00 ^{Bb}	0.22±0.00 ^C	0.00±0.00 ^D	4.12±0.02 ^{Aa}	4.79±0.02 ^a
AP30	0.45±0.00 ^{Bb}	0.24±0.00 ^C	0.00±0.00 ^D	3.77±0.02 ^{Ab}	4.46±0.02 ^b

Each values mean±S.D.

^{a-c}Values with different small letters within a column are significantly different by Duncan's multiple range test ($p<0.001$).

^{A-D}Values with different capital letters within a row are significantly different by Duncan's multiple range test ($p<0.001$).

수화물은 대부분 과당, 포도당 및 자당(설탕)의 형태로 존재한다(RDA 2016). Table 1에서 보듯이 모든 실험구에서 발효 초기에는 8.84-9.82%의 환원당 값을 나타내었고, 발효가 진행될수록 증가하여 발효 20일째에는 11.11~12.17% 환원당 값을 나타내었다. 이는 사과가 가지고 있는 자당(설탕)이 가수분해 효소로 인해 과당과 포도당으로 바뀌어 비환원당인 자당으로 존재했던 발효 초기에는 검출되지 않았다가 가수분해되면서 점점 증가한 것으로 TLC 분석결과로 예측되었다(Data not shown).

초산균 중 *A. pasteurianus*의 경우는 알코올을 먹이원으로

이용하며 포도당, 과당 등을 대사할 수 있는 형태로 변화시키는 kinase 류가 존재하지 않아 당류를 대사하기 어렵다(Zheng 등 2017). 오히려 이런 특징은 식초 종균의 좋은 특성으로, 식초발효 시 과실류에 존재하는 환원당을 대사하지 않고 발효 내내 환원당이 유지되어 과일의 천연당을 그대로 식초로 섭취할 수 가 있다. 이런 특징은 식초의 기호도에 좋은 영향을 줄 것으로 판단된다. 이렇듯 식초발효는 초산균주에 따라 일부 균주는 초산을 과산화하여 다시 물로 된다고 보고되고 있어(Saeki 등 1997; Baek 등 2014), 어떤 종류의 종균을 사용하는지가 중요하며, 이외에도 초산균에 따라 초기 알코

을 농도, 초기산도, 균 배양온도, 배양속도, 배양기간 및 영양 성분에 따라 산 함량이 크게 달라질 수 있어 우수한 중균 사용이 식초발효에 매우 중요하다(Jeong 등 1996; Eom 등 2019).

2. 색도 측정

서로 다른 초산균을 활용하여 제조한 식초의 색도측정 결과는 Table 3에 나타내었다. 식초 시료의 초기에는 명도(L 값)는 30.74~41.56으로 나타났고, 발효 20일째에는 32.05~53.02의 값을 나타냈다. 초산균의 종류별 및 발효일자별로 다양한 명도를 나타냈고, 발효일이 증가할수록 대조구, AP16을 접종한 식초 및 AP21을 접종한 식초의 경우는 명도가 증가하였고, 나머지 두 시료는 처음보다 감소하였다. 특히, 발효 마지막날에는 대부분 비슷한 명도를 나타냈으나, AP16을 접종한 식초의 경우 다소 높은 명도(53.02)를 나타냈다. 적색도(a 값)의 경우는 발효초기 20.66~26.04로, 발효 20일째에는 9.84~18.55로 모든 실험구에서 발효날짜가 경과할수록 값은 낮아지는 경향성을 보였다. 마지막으로 황색도(b 값)는 50.93~59.65에서 발효 20일째 45.40~51.09로 발효가 진행될수록 다소 낮아지는 경향성을 나타냈다.

일반적으로 시판하는 저산도, 일반산도, 2배 산도 및 3배 산도 사과식초의 색도를 분석한 선행연구에서, 명도는

90.41~99.01, 적색도는 -2.21~-0.78 및 황색도 5.64~28.46으로 다양하게 나타나(Jo 등 2012), 본 연구와 큰 차이를 보였으나, 다양한 제조법으로 인한 색도 변화를 보고한 선행연구에 제조된 식초 색상은 원료 및 발효 방법에 따라 차이가 있다고 보고하여(Lee 등 2019), 식초 색도의 차이는 다양하다 볼 수 있다.

3. 총 폴리페놀, 총 플라보노이드 함량 및 라디칼 소거 활성

서로 다른 초산균을 활용하여 제조한 식초의 총 폴리페놀, 총 플라보노이드 함량 및 항산화 활성 측정결과를 Table 4에 나타내었다. 먼저, 초기 총 폴리페놀 함량은 88.88~111.23 mg%를 나타냈고, 발효가 진행되면서 대조구, AP15 및 AP16을 첨가한 식초의 경우는 총 폴리페놀 함량이 줄어든 반면, 나머지 두 시료의 경우 증가하여 AP21을 첨가한 식초의 경우 발효 초기보다 발효 20일째 38%가 증가한 121.69 mg%로 나타났고, 동일기간 AP30로 발효한 식초는 21% 증가한 134.55 mg% 수치를 나타냈다. 다음으로 총 플라보노이드 함량은 총 폴리페놀 함량보다는 다소 적게 측정되었는데, 초기에는 8.90~11.59 mg% 함량을 나타냈고, 발효가 진행될수록 증가하여 마지막 발효 20일에는 24.27~36.03 mg%으로 모든 실험구에서 발효가 진행할수록 증가하는 경향성을 보였다.

Table 3. Changes in color of apple vinegar by various acetic acid bacteria

	Sample	Fermentation time (days)				
		0	5	10	15	20
L* (lightness)	Control	30.74±0.14 ^{Dc2)}	38.18±0.09 ^{Cc}	21.70±0.03 ^{Ed}	45.75±0.11 ^{Aa}	38.69±0.06 ^{Bb}
	AP15	41.56±0.11 ^{Ba}	45.48±0.20 ^{Aa}	43.68±0.07 ^{ABb}	44.97±2.61 ^{Aa}	37.80±0.11 ^{Cc}
	AP16	33.01±0.03 ^{Dd}	42.49±0.25 ^{Cb}	45.85±0.34 ^{Ba}	45.78±0.06 ^{Ba}	53.02±0.16 ^{Aa}
	AP21	33.80±0.05 ^{Ec}	37.42±0.21 ^{Bd}	41.89±0.11 ^{Ac}	34.46±0.30 ^{Dc}	36.09±0.30 ^{Cd}
	AP30	38.13±0.01 ^{Cb}	34.53±0.04 ^{De}	43.49±0.12 ^{Ab}	39.58±0.14 ^{Bb}	32.05±0.02 ^{Ee}
a* (redness)	Control	26.04±0.04 ^{Aa}	19.23±0.00 ^{Ca}	23.64±0.01 ^{Ba}	14.21±0.04 ^{Ec}	15.77±0.18 ^{Dc}
	AP15	20.66±0.04 ^{Ae}	13.47±0.02 ^{De}	14.17±0.11 ^{Cc}	12.66±0.00 ^{Ec}	15.83±0.05 ^{Bc}
	AP16	25.61±0.04 ^{Ab}	15.91±0.07 ^{Bd}	13.23±0.08 ^{De}	13.96±0.03 ^{Cd}	9.84±0.03 ^{Ed}
	AP21	25.34±0.03 ^{Ac}	18.41±0.02 ^{Cc}	15.89±0.02 ^{Eb}	18.88±0.06 ^{Ba}	17.41±0.15 ^{Db}
	AP30	23.00±0.06 ^{Ad}	18.80±0.06 ^{Bb}	13.69±0.04 ^{Ed}	15.68±0.08 ^{Db}	18.55±0.06 ^{Ca}
b* (yellowness)	Control	50.93±0.23 ^{Cc}	55.92±0.05 ^{Aa}	36.73±0.08 ^{Ec}	52.65±0.06 ^{Ba}	50.29±0.10 ^{Dd}
	AP15	59.65±0.06 ^{Aa}	48.53±0.04 ^{Cc}	48.40±0.25 ^{Cd}	46.15±0.00 ^{Dd}	49.52±0.01 ^{Bc}
	AP16	53.99±0.05 ^{Ad}	54.02±0.07 ^{Ab}	50.02±0.03 ^{Cb}	51.16±0.02 ^{Bb}	45.40±0.03 ^{De}
	AP21	54.88±0.08 ^{Ac}	53.51±0.14 ^{Bc}	52.45±0.08 ^{Ca}	51.22±0.21 ^{Db}	51.09±0.07 ^{Da}
	AP30	58.72±0.05 ^{Ab}	51.50±0.26 ^{Bd}	49.36±0.08 ^{Dc}	49.95±0.02 ^{Cc}	48.28±0.06 ^{Ed}

Each values mean±S.D.

^{a-c}Values with different small letters within a column are significantly different by Duncan's multiple range test ($p<0.001$).

^{A-E}Values with different capital letters within a row are significantly different by Duncan's multiple range test ($p<0.001$).

Table 4. Changes in total polyphenol, total flavonoid content and antioxidant activity (ABTS, DPPH) of apple vinegar by various acetic acid bacteria

	Sample	Fermentation time (days)				
		0	5	10	15	20
Total polyphenol (mg TAE/100 g)	Control	100.90±3.37 ^{Ab}	75.09±1.59 ^{Cc}	71.83±1.89 ^{Cc}	73.11±1.36 ^{Cd}	84.23±3.03 ^{Bd}
	AP15	100.39±3.17 ^{Ab}	83.85±1.90 ^{Bb}	87.18±4.62 ^{Bb}	88.94±1.47 ^{Bc}	98.37±4.38 ^{Ac}
	AP16	96.48±2.13 ^{Ab}	74.80±2.60 ^{Cc}	76.32±3.82 ^{Cc}	73.49±2.12 ^{Cd}	84.99±0.66 ^{Bd}
	AP21	88.88±1.90 ^{CDc}	90.92±1.00 ^{Ca}	87.90±0.93 ^{Db}	96.93±0.99 ^{Bb}	121.69±1.94 ^{Ab}
	AP30	111.23±1.85 ^{Ba}	91.95±0.67 ^{Ea}	97.97±3.03 ^{Da}	105.25±2.93 ^{Ca}	134.55±2.05 ^{Aa}
Total flavonoid (mg TAE/100 g)	Control	11.59±1.46 ^{Ba}	23.33±1.03 ^{Abc}	22.69±2.17 ^{Ad}	22.25±1.70 ^{Ab}	25.26±1.73 ^{Ab}
	AP15	8.90±0.98 ^{Cb}	21.95±1.91 ^{Bcd}	26.17±1.06 ^{Abc}	25.35±0.58 ^{Aa}	26.49±2.07 ^{Ab}
	AP16	10.00±0.68 ^{Cab}	20.56±1.60 ^{Dd}	24.91±1.34 ^{Accd}	23.11±1.38 ^{Ab}	24.27±1.58 ^{Ab}
	AP21	10.47±0.43 ^{Eab}	25.64±1.05 ^{Db}	29.49±0.59 ^{Ba}	26.97±0.69 ^{Ca}	34.23±0.50 ^{Aa}
	AP30	10.09±1.23 ^{Dab}	29.19±0.32 ^{Ba}	28.37±1.43 ^{BCab}	26.77±0.75 ^{Ca}	36.03±1.46 ^{Aa}
DPPH radical scavenging activity (%)	Control	82.87±1.00 ^{Aa}	83.19±0.89 ^{Aa}	66.79±5.78 ^{Bb}	81.37±0.56 ^{Aa}	83.04±0.62 ^{Ab}
	AP15	83.32±2.39 ^{Aa}	83.23±2.44 ^{Aa}	80.23±1.76 ^{Aa}	83.55±0.85 ^{Aa}	80.29±3.82 ^{Ab}
	AP16	81.22±2.81 ^{Aa}	82.57±1.46 ^{Aa}	79.62±0.58 ^{Aa}	80.83±3.78 ^{Aa}	82.60±0.98 ^{Ab}
	AP21	80.20±3.10 ^{Ba}	83.67±1.33 ^{Aa}	81.10±1.67 ^{Aa}	82.46±0.37 ^{ABa}	84.17±0.32 ^{Aa}
	AP30	82.02±1.57 ^{ABa}	84.78±0.79 ^{Aa}	83.02±1.04 ^{Aa}	79.73±2.45 ^{Ba}	84.18±1.19 ^{Aa}
ABTS radical scavenging activity (%)	Control	76.18±1.90 ^{Bb}	81.65±1.60 ^{Ab}	47.09±1.25 ^{Dc}	68.71±1.33 ^{Cb}	69.57±1.06 ^{Cb}
	AP15	78.53±1.17 ^{Ba}	85.54±0.61 ^{Aa}	73.09±1.15 ^{Db}	75.39±0.64 ^{Ca}	77.78±0.56 ^{Ba}
	AP16	76.54±0.11 ^{Cab}	82.88±0.83 ^{Ab}	75.53±0.20 ^{Da}	74.38±0.88 ^{Ea}	77.91±0.17 ^{Ba}
	AP21	78.15±1.13 ^{Ab}	73.31±1.24 ^{Be}	65.34±0.46 ^{Cc}	59.88±2.17 ^{Dd}	71.17±0.40 ^{Bb}
	AP30	78.02±0.77 ^{Ab}	77.13±0.78 ^{Ac}	63.71±0.92 ^{Cd}	62.42±1.22 ^{Cc}	66.36±1.66 ^{Bc}

Each values mean±S.D.

^{a-d}Values with different small letters within a column are significantly different by Duncan's multiple range test ($p<0.001$).

^{A-E}Values with different capital letters within a row are significantly different by Duncan's multiple range test ($p<0.001$).

몇 가지 시판 과일식초의 품질을 분석한 선행연구(Kim 등 2013)에서 사과, 매실, 레몬 및 포도식초를 분석한 결과 알코올 발효와 초산발효를 한 식초보다 초산발효만 한 식초의 총 폴리페놀 함량이 약 10배 이상 차이가 난다고 보고하였고, 특히 사과식초의 경우는 알코올 발효를 하지 않고, 초산발효를 한 경우 55.76 mg% 검출되었다고 하였다. 총 플라보노이드류 함량도 동일 논문(Kim 등 2013)에서 초산발효만 한 사과식초가 13.24 mg%로 가장 높게 검출되었는데 본 연구와 비교하였을 때 절반정도의 수치를 보였다. 시판 사과식초의 산도에 따른 품질특성을 비교평가한 선행논문(Jo 등 2012)에서 산도가 올라갈수록 총 폴리페놀 함량이 감소하여 저산도 사과식초가 54.66 mg%로 가장 높고, 일반산도, 2배 및 3배식초는 낮은 값을 나타내었다. 총 플라보노이드 또한 유사한 연구결과로 저산도 식초에서 10.92 mg% 검출되었고, 나머지 식초에서는 거의 검출되지 않았다. 본 연구의 결과는 알코올

발효를 하지 않고, 초산발효만 일으켜 단시간에 발효한 이유와 식초 원료인 사과의 품질 등 다양한 원인으로 선행연구보다 높은 함량의 총 폴리페놀과 총 플라보노이드 함량을 나타내었다.

서로 다른 초산균을 첨가한 사과식초의 DPPH 라디칼 소거능을 분석하기 위하여 식초시료를 60% 에탄올로 3배 희석하여 측정한 결과, 대조구 10일째 시료를 제외하고 나머지 시료에서 80% 이상의 소거 활성을 나타냈고, 시료 사이에 유의적인 차이가 나타나지 않았다. ABTS 라디칼 소거능의 경우 사과식초 시료원액을 사용하였다. 결과는 초기 76.18~78.53% 라디칼 소거능을 보였으나, 발효가 진행될수록 높아지거나 혹은 낮아지면서 경향성이 보이지 않았으나 발효 마지막날인 20일째에는 발효 첫날 소거능과 유사하게 나타났다. Jo 등(2012)의 연구에 따르면 저산도, 일반산도, 2배 및 3배 식초의 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거능은 저산도에서만

높게 나타나고 나머지 식초에서는 낮은 값을 나타낸다고 보고하여 시판 식초의 산도에 따라서 다양한 항산화 활성을 나타낸다고 보고하였고, Gil 등(2020)의 연구에서는 동일한 초산균을 사용하였을 때 도라지 전처리를 달리하였을 때 발효가 진행될수록 항산화 활성의 차이가 난다고 보고하였다. 농가형 발효식초로부터 분리한 서로 다른 *A. pasteurianus* 초산균 6종의 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거능을 조사할 결과 균주마다 유의적인 차이가 존재한다고 보고(Kim 등 2022)하여 항산화능은 발효방식, 재료 및 초산균의 종류 등에 의해서 차이가 있다고 판단된다.

요약 및 결론

본 연구는 농가형 식초의 발효종균으로의 가능성을 확인해보고자 청수포도 천연발효액에서 분리한 초산균 4종을 활용하여 사과식초를 제조한 뒤, 품질분석을 진행하였다. 식초의 가장 중요한 품질특성인 총산의 경우 *A. pasteurianus* 21 균주를 첨가한 식초가 초기 산도가 급격히 증가하였으며, 최종 산도도 가장 높았고, 유기산 함량 또한 가장 높게 검출되었다. 식초에 존재하는 환원당의 경우 *A. pasteurianus* 균주 특성상 알코올 존재 시 당을 섭취하지 않고, 또한 포도당이나 과당을 대사할 수 있는 효소 또한 존재하지 않아 발효 마지막날까지 환원당 상태로 존재하였고, 더욱이 사과에 존재하는 자당까지 분해하여 모든 식초의 환원당값은 증가하였다. 높은 환원당 함량은 관능에 좋은 영향을 줄 것으로 판단된다. 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량의 경우 대조구, AP15 및 AP16을 첨가한 식초 값보다 AP21이나 AP30을 첨가한 식초가 다소 높게 검출되었고, ABTS 및 DPPH 라디칼 소거능 균주의 종류나 발효시간에 의해 차이가 크지 않았다. 따라서 모든 것을 종합해보면 총산은 동일한 시간동안 빨리 생성되며, 높은 유기산 함량을 보이면서 식초발효 동안 생리활성은 높게 유지되거나 감소시키지 않은 *A. pasteurianus* 21 균주가 농가형 식초 제조에 가장 적합한 초산균이라 판단된다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 연구사업(RS-2022-RD010225)의 지원에 의해 수행된 것으로 이에 감사드립니다.

References

- Amerine MA, Ough CS. 1980. Methods for Analysis of Musts and Wines. pp.176-180. Wiley
- Baek CH, Baek SY, 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
- Baek CH, Jeong DH, Baek SY, Choi JH, Park HY, Choi HS, Jeong ST, Kim JH, Jeong YJ, Kwon JH, Yeo SH. 2013. Quality characteristics of farm-made brown rice vinegar via traditional static fermentation. *Korean J Food Preserv* 20:564-572
- Baek SY, Park HY, Lee CH, Yeo SH. 2014. Comparison of the fermented property and isolation of acetic-acid bacteria from traditional Korean vinegar. *Korean J Food Preserv* 21: 903-907
- Choi Y, Kim M, Shin JJ, Park JM, Lee J. 2003. The antioxidant activities of the some commercial teas. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32:723-727
- Chung HJ. 2014. Comparison of total polyphenols, total flavonoids, and biological activities of black chokeberry and blueberry cultivated in Korea. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 43:1349-1356
- Eom HJ, Kwon NR, Kang HJ, Park HJ, Kim SY, Kim JH. 2022. Quality characteristics of *byeolmijang* prepared by different variety of roasted grain powders. *Korean J Food Nutr* 35:106-115
- Eom HJ, Yoon HS, Kwon NR, Jeong YJ, Kim Y, Hong ST, Han NS. 2019. Comparison of the quality properties and identification of acetic acid bacteria for aronia vinegar. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 48:1397-1404
- Gil NY, Hwang IG, Gwon HM, Yeo SH, Kim SY. 2020. Quality characteristics of vinegar fermented by *Platycodon grandiflorum* root and *Acetobacter pasteurianus* A11-2. *Korean J Food Nutr* 33:737-746
- Han WC, Ji SH, Surh J, Kim MH, Lee JC, Jang KH. 2010. Characterization of vinegar using *Rubus crataegifolius* and *Rosa rugosa* Thunb. *J East Asian Soc Diet Life* 20:582-588
- Jeong YJ, Shin SR, Kang MJ, Seo CH, Won CY, Kim KS. 1996. Preparation and quality evaluation of the quick fermented persimmon vinegar using deteriorated sweet persimmon. *J East Asian Diet Life* 6:221-227
- Jo D, Park EJ, Kim GR, Yeo SH, Jeong YJ, Kwon JH. 2012. Quality comparison of commercial cider vinegars by their acidity levels. *Korean J Food Sci Technol* 44:699-703
- Kim KO, Kim SM, Kim SM, Kim DY, Jo D, Yeo SH, Jeong YJ, Kwon JH. 2013. Physicochemical properties of commercial fruit vinegars with different fermentation

- methods. *J Korean Soc Food Sci Nut* 42:736-742
- Kim SH, Kim JY, Jeong WS, Gwon HM, Kim SY, Yeo SH. 2022. Culture and function-related characteristics of six acetic acid bacterial strains isolated from farm-made fermented vinegars. *Korean J Food Preserv* 29:142-156
- Lee HY, Goh YJ, Park JS, Ahn MS, Kwon HJ. 2018a. Optimization of acetic acid fermentation of hardy kiwi vinegar using low-pH tolerant *Acetobacter pasteurianus* AFY-4. *J East Asian Soc Diet Life* 28:136-144
- Lee SJ, Kim SH, Kim SY, Yeo SH. 2019. Quality characteristics of *kujippong* (*Cudrania tricuspidata*) vinegar fermented by various acetic acid bacteria. *Korean J Food Preserv* 26:766-776
- Lee YJ, Byun GI, Jin SY. 2018b. Quality characteristic and antioxidant activities of vinegar added with *Etteum* bell flower root. *Korean J Food Nutr* 31:549-558
- Ministry of Food and Drug Safety [MFDS]. 2024. Food and food additives code. Available from <https://various.foodsafetykorea.go.kr/fsd/#/> [cited 31 July 2024]
- Park CS, Kim KS, Noh JG, Rho CW, Yoon HS. 2010. Quality characteristics of the germinated brown rice vinegar added with red pepper. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39:567-572
- Park S, Chae KS, Son RH, Jung J, Im YR, Kwon JW. 2012. Quality characteristics and antioxidant activity of *bokbunja* (black raspberry) vinegars. *Food Eng Prog* 16:340-346
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 26:1231-1237
- Rural Development Administration [RDA]. 2016. Korean Food Composition Table II. 9th ed. pp. 1-593. Rural Development Administration
- Saeki A, Theeragool G, Matsushita K, Toyama H, Lotong N, Adachi O. 1997. Development of thermotolerant acetic acid bacteria useful for vinegar fermentation at higher temperatures. *Biosci Biotechnol Biochem* 61:138-145
- Shin JH, Kang MJ, Byun HU, Bea WY, Shin JY, Seo WT, Choi JS, Shin JH. 2017. Quality characteristics of fermented vinegar prepared with *seomaeyaksuk* (*Artemisia argyi* H.) extract. *Korean J Food Preserv* 24:647-657
- Shin JY, Kang MJ, Kang JR, Choi JS, Seo WT, Shin JH. 2020. Quality characteristics of fermented vinegar containing different concentration of an ethanol extract from 'seomaeyaksuk' (*Artemisia argyi* H.). *Korean J Food Preserv* 27:212-223
- Yim EJ, Jo SW, Lee ES, Park HS, Ryu MS, Uhm TB, Kim HY, Cho SH. 2015. Fermentation characteristics of mulberry (*Cudrania tricusoidata*) fruit vinegar produced by acetic acid bacteria isolated from traditional fermented foods. *Korean J Food Preserv* 22:108-118
- Yoon HN. 1999. Chemical characterization of commercial vinegars. *Korean J Food Sci Technol* 31:1440-1446
- Zheng Y, Zhang R, Yin H, Bai X, Chang Y, Xia M, Wang M. 2017. *Acetobacter pasteurianus* metabolic change induced by initial acetic acid to adapt to acetic acid fermentation conditions. *Appl Microbiol Biotechnol* 101:7007-7016

Received 06 August, 2024

Revised 09 August, 2024

Accepted 14 August, 2024