

어젠다코드	2-6-2		구분	완결	
기술분야코드	V3	기술유형코드	H03	작목구분코드	RR-02-RR08
과제종류	농업공동연구		세부사업(약어)	지역주력	
과제명	중균활용 음료형 발효식초 개발				
과제책임자	성명		직급	소속기관 및 부서	
	홍진호		대표	농업법인 부일농산	
연구기간	2015 ~ 2018		참여연구기관	-	
세부과제명			부서	세부책임자	연구기간
1) 음료형 발효식초 개발			농업법인 부일농산	홍진호	'15~'18
2) 식초 발효용 중균 개발			농식품연구소	이하연	'15~'18
색인용어	중균, 초산균, 발효식초, 음료형 식초				

ABSTRACT

Recently, an interest in vinegar has increased because of its various healthy effects such as serum cholesterol reduction, immune modulation, appetite suppression, and resistance to cardiovascular diseases. Vinegar is industrially produced by fermentation of Acetic acid bacteria(AAB), gram negative and obligatory aerobic bacteria. In this study, we developed technology of making fermented vinegar with regional produce and vinegar starter. We isolated *Acetobacter pasteurianus* AFY-4 producing high producing acetic acid from Korean fermented vinegar and confirmed by 16S rRNA gene sequences. In this study, we monitored growth at various condition such as temperature, pH, initial ethanol and acetic acid concentration in order to optimize growth condition of *A. pasteurianus* AFY-4. The high growth rates and acetic acid production of AFY-4 strain occurred at 30°C, pH 3, initial ethanol concentration of 5% and initial acetic acid concentration of 0.2%. The results will be used to make the scale-up production of vinegar using *A. pasteurianus* AFY-4. We conducted the optimization of acetic acid fermentation of hardy kiwi (*Actinidia arguta*), Korean wild grapes (*Vitis coignetiae Pullia*) and brown rice (*Oryza sativa*) using *A. pasteurianus* AFY-4 strain based on the response surface methodology (RSM). The optimization of acetic acid fermentation for producing hardy kiwi vinegar were determined by five levels of initial ethanol (X_1), initial acetic acid (X_2) and acetic acid bacteria inoculum volume (X_3), using the central composite design. The acetic acid yield (Y_1) and residual ethanol (Y_2) for acetic acid fermentation of optimized by RSM were very significantly different. Based on aging time, metabolite of vinegar was analyzed by GC-TOF/MS. Also, we evaluated various physiological effect (anti-oxidant, anti-microbial, and inhibition on conjugation of malodialdehyde with protein) of the final fermented vinegar. Quality control factor and shelf life of drink type vinegar with starter were established.

1. 연구목표

식초는 동서양의 대표적인 발효식품 중 하나로 오랫동안 이용되어 왔으며, 특유의 강한 산성으로 인하여 식품 내 유해 미생물 생육 저해효과를 가지며, 유기산, 에스테르, 아미노산, 당류 등을 포함한 독특한 방향과 신맛을 가진 식품이다(Jeong YJ & Lee MH 2000). 식초는 여러 원료를 효모에 의해 알코올 발효한 후, 초산균으로 초산 발효하여 제조한 것으로 조미료 이외에 식품 보존효과와 의약품으로도 이용되어 왔다(Ha YD & Kim KS 2000; Jeong YJ & Lee MH, 2000). 또한, 식초는 알칼리성 식품으로서 피로회복, 항당뇨, 항비만, 항노화, 항종양 및 소화 및 식용 촉진 효능, 동맥경화 예방, 혈압상승 및 당뇨병, 비만에 관한 효과 등의 기능성이 보고되어(Kim DH 1999; Lee WJ & Kim SS 1998) 최근 건강식품으로서의 인식이 확산되고 있으며, 단순 조미용뿐만 아니라 음용으로도 소비량이 꾸준히 증가하고 있는 추세이다(Park HJ 등 2014). 식품공전에서 식초의 식품 규격은 초산으로서의 총산이 4.0~20.0%이고, 초산균이 초산 발효 시, 기질로 이용하는 에탄올과 초산 농도에 대한 내성 정도에 따라 최종 산도가 결정된다고 알려져 있다(Yoon HN 1998). 식초는 곡물 식초와 과일식초로 나눌 수 있으며, 과일주를 원료로 하는 과일식초의 경우 과일식초 제조를 위한 초산균(Acetic acid bacteria)의 에탄올 저항성, 아황산 저항성, 고산도 생성 균주에 관한 연구가 주를 이루고 있고(Park KS 등 1994; Park MH 등 2002; Yim EJ 등 2015), 과일 원료인 유자, 감귤 미숙과, 매실, 아로니아 등을 이용한 건강 기능성 식초에 대한 연구가 보고되었다(Kang SK 등 2006; Kim YD 등 1996; Park HJ 등 2014; Yi MR 등 2014). 하지만 토종 과수인 다래, 머루를 이용한 과일식초에 대한 연구는 미비한 실정이다. 도내 농특산물의 이용가능성과 부가가치 향상을 위하여 종균을 활용한 고품질의 발효식초 제조기술을 개발하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

〈제2세부과제: 식초 발효용 종균 개발〉

(시험 1) 유용 균주(효모, 초산균) 분리 및 특성평가

본 연구는 국내 발효식초 40점을 수집하여 YPD 배지와 YCM 배지에 시료를 분주하여 각각 효모 302주와 초산균 126주를 분리하여 에탄올 생성능과 초산 생성능을 측정하여 비교하였다.

(시험 2) 선발 균주 동정

본 연구는 시험 1에서 분리한 균주 중 저알코올 생성 효모 *Saccharomyces cerevisiae* MA8-3와 초산 생성능이 우수한 균주 *Acetobacter pasteurianus* AFY-4, *Gluconobacter oxydans* GV30-1를 최종적으로 선발하였고, 각각 18S rRNA, 16S rRNA의 염기서열을 분석하여 균주를 동정하였다. 동정된 균주는 blastn 분석을 기반으로 계통수를 작성하였고, API kit를 이용하여 생화학적 특성 평가와 주사전자현미경을 통한 형태학적 분석을 수행하였다.

(시험 3) 종균 생육조건 확립

본 연구는 최종 선발된 효모와 초산균을 온도(15~35℃), pH(2~7), 초기 에탄올(5~10%), 초기 초산농도(0.2~4.0%) 조건을 달리하여 생균수와 산도, 알코올 함량을 측정하여 최적 생육조건을 확립하고자 하였다.

(시험 4) 종균 보관조건 확립

본 연구는 시험 3에서 확립된 최적 생육조건에서 배양된 초산균을 액상형과 분말형으로 제조하여 저장온도는 4°C, -20°C, -70°C에서 1개월 마다 생균수를 측정하였다.

(시험 5) 종균활용 발효식초 대량생산공정 개발

본 연구는 머루, 다래, 현미를 이용하여 발효식초를 100 L 제조한 후, 0~6개월 동안 잔류알코올, 산도, 환원당, 색도를 측정하였다.

(시험 6) 발효·숙성기간별 대사체 분석

본 연구는 머루식초, 다래식초, 현미식초를 1~6개월 동안 숙성하여 GC-TOFMS를 이용하여 대사체(당류, 아미노산류, 유기산류, 지방산류 등)를 분석하였다.

(시험 7) 발효식초 생리활성 평가

본 연구는 머루식초, 다래식초, 현미식초의 항산화활성, 항균활성, 총페놀함량 및 총플라보노이드 함량, 지질과산화물 억제활성을 평가하였다.

(시험 8) 음료형 발효식초 개발

본 연구는 머루식초, 다래식초, 현미식초의 부재료(과실즙, 과실농축액, 곡물당화액 등)의 배합비를 달리하여 제조한 후, 전문패널 대상으로 관능평가를 실시하였다.

(시험 9) 음료형 발효식초 품질지표 설정

본 연구는 원료(머루, 다래, 현미), 부재료(청, 착즙액, 농축액), 중간제품(식초용 술, 식초), 완제품(음료 3종, 음료베이스 3종)의 산도, 색도, 갈변도, 일반세균수, 대장균군을 저장기간별로 측정하여 제품관리를 위한 품질지표의 규격을 설정하였다.

(시험 10) 음료형 발효식초 유통기한 설정

본 연구는 음료(3종)과 음료베이스(3종)를 가속실험을 통하여 남용온도 15°C, 35°C, 유통온도 25°C에 저장하여 산도, 색도, 일반세균수, 대장균군, 이취, 성장 등을 조사하여 식품의약품안전처 유통기한 설정프로그램을 이용하여 유통기한을 설정하였다.

3. 결과 및 고찰

〈제2세부과제: 식초 발효용 종균 개발〉

(시험 1) 유용 균주(효모, 초산균) 분리 및 특성평가

다양한 발효식품(김치, 누룩, 발효액)으로부터 분리한 효모(302점)의 에탄올 생성능을 비교를 통하여 초산균 초기 생육에 영향을 미치는 적정 에탄올(5~10%)을 생성하는 저알콜 생성 효모 균주를 1차 선별하였다.

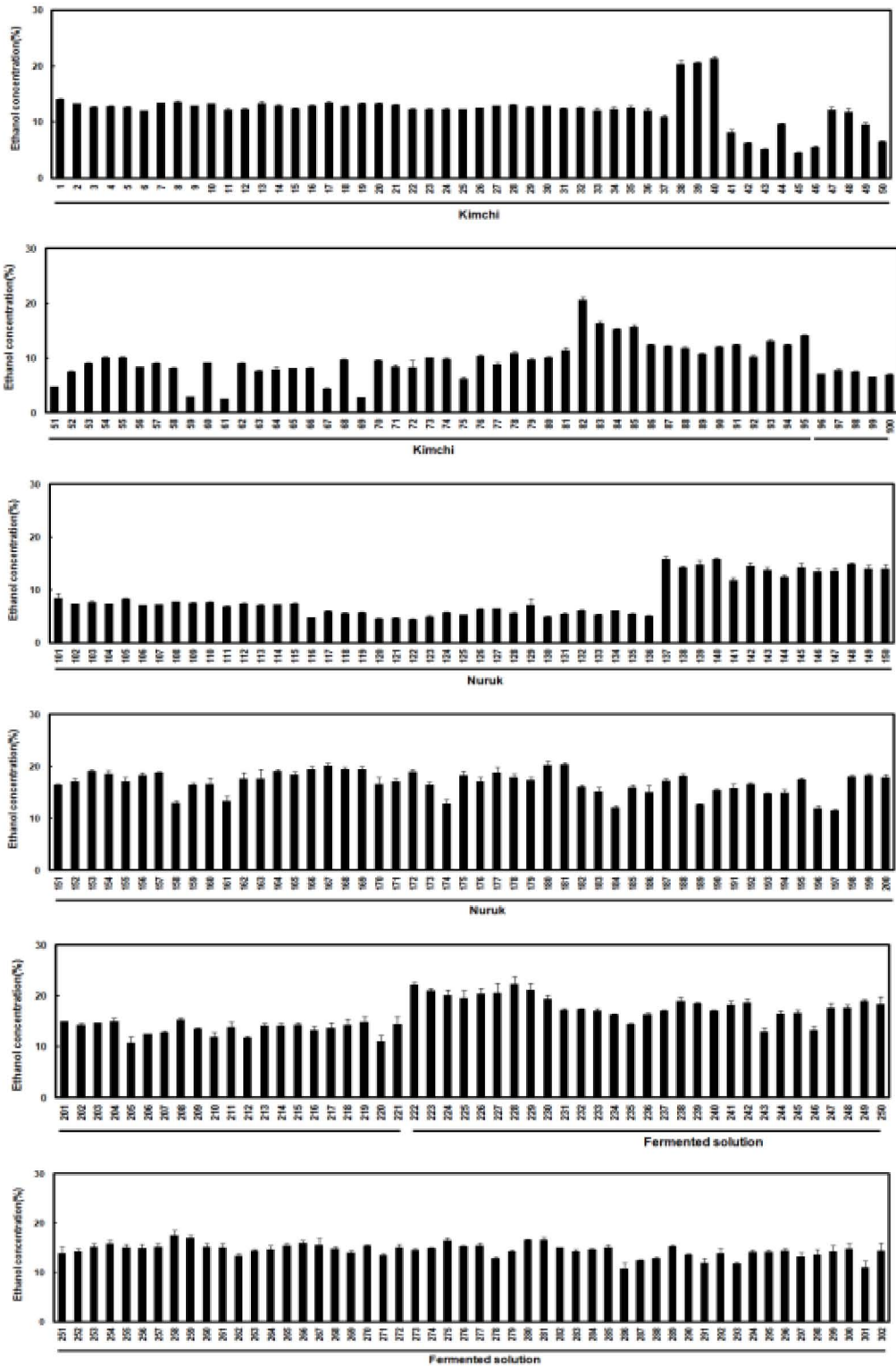


그림 1. 호모 에탄올 생성능 비교

1차 선발된 저알콜 생성 효모의 알코올 발효 시 주류 품질에 영향을 미치는 아황산 내성, 에탄올 내성, 황화수소 생성, 바이오제닉 아민(Histidine, tyrosine, phenylalanine, tryptophane, lysine, leucine) 생성, Cellulenin·TFT(5, 5', 5'-trifluoro-D,L-leucine)저항성 및 효소 활성(β -glucosidase, protease, urease)을 비교평가하였다.

표 1. 아황산 · 에탄올 내성 및 효소활성

번호	균주명	SO ₂	Ethanol(%)				β -glucosidase	Protease	Urease
			5	10	15	20			
1	KC31-5	+	+	+	+	-	+	-	-
2	KC31-11	+	+	+	+	-	+	-	-
3	KC31-27	+	+	+	+	-	+	-	-
4	MA8-3	+	+	+	+	+	+	-	-
5	MA8-4	+	+	+	+	+	+	-	-
6	MA8-13	+	+	+	+	+	+	-	-
7	MA8-14	+	+	+	+	+	+	-	-
8	MA8-15	+	+	+	+	+	+	-	-
9	MA8-16	+	+	+	+	+	+	-	-
10	MA8-17	+	+	+	+	+	+	-	-
11	MA8-18	+	+	+	+	+	+	-	-
12	NR2-2	+	+	+	+	-	+	-	-
13	NR2-12	+	+	+	+	-	+	-	-

표 2. 황화수소 · 바이오제닉 아민 생성 및 Cerulenin, TFT 저항성

번호	균주명	H ₂ S	Biogenic amine						Cerulenin	TFT
			His	Tyr	Phe	Try	Lys	Leu		
1	KC31-5	+	-	-	-	-	-	-	+	-
2	KC31-11	+	-	-	-	-	-	-	+	-
3	KC31-27	+	-	-	-	-	-	-	+	-
4	MA8-3	++	-	-	-	-	-	-	-	+
5	MA8-4	++	-	-	-	-	-	-	-	+
6	MA8-13	++	-	-	-	-	-	-	-	+
7	MA8-14	++	-	-	-	-	-	-	-	+
8	MA8-15	++	-	-	-	-	-	-	-	+
9	MA8-16	++	-	-	-	-	-	-	-	+
10	MA8-17	++	-	-	-	-	-	-	-	+
11	MA8-18	++	-	-	-	-	-	-	-	+
12	NR2-2	++	-	-	-	-	-	-	+	+
13	NR2-12	++	-	-	-	-	-	-	+	+

배지에 함유된 CaCO₃을 분해하여 초산균이 생성한 초산에 의하여 투명환을 생성하는 초산균 및 그 초산균이 생성하는 투명환의 길이를 측정하여 고유기산 생성의 초산균을 선발하였다.

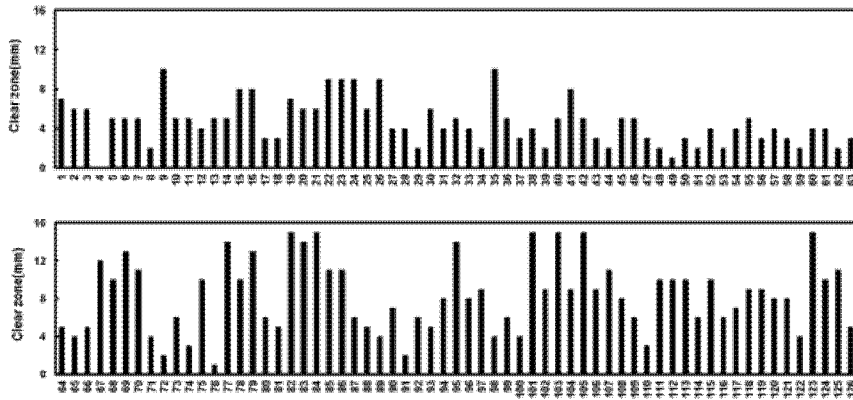


그림 2. 초산균 초산 생성능 비교

(시험 2) 선발 균주 동정

18S rRNA 염기서열을 이용한 균주 동정 후, *Saccharomyces* 계열 1종, non-*Saccharomyces* 계열 1종 총 2종의 효모(MA8-3, NR2-2)를 선발하였으며, 선발 균주의 추후 술 제조에서 다양한 곡류 및 과실류 등의 원료 이용가능성을 확인하기 위해 탄소원 이용능을 조사하였다.

표 3. 18S rRNA 염기서열을 이용한 균주 동정

번호	균주번호	에탄올 농도(%)	균주명	상동성(%)	Accession 번호
1	MA8-3	7.5±0.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	CP011558.1
2	NR2-2	4.8±0.1	<i>Pichia kudriavzevii</i>	99	KP674595.1

표 4. 선발 효모의 탄소원 이용능

구 분	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> MA8-3	<i>Pichia kudriavzevii</i> NR2-2
Glucose	+	+
Glycerol	-	+
2-Keto-D-Gluconate	-	-
L-Arabinose	-	-
D-Xylose	-	-
Adonitol	-	-
Xylitol	-	-
D-Galactose	+	-
Inositol	-	-
D-Sorbitol	-	-
α-Methyl-D-Glucoside	+	-
N-Acetyl-D-Glucosamine	-	+
D-Cellobiose	-	-
D-Lactose	-	-
D-Maltose	+	-
D-Saccharose(Sucrose)	+	-
D-Trehalose	+	-
D-Melezitose	+	-
D-Raffinose	+	-

※ API 20C AUX it(효모용)결과

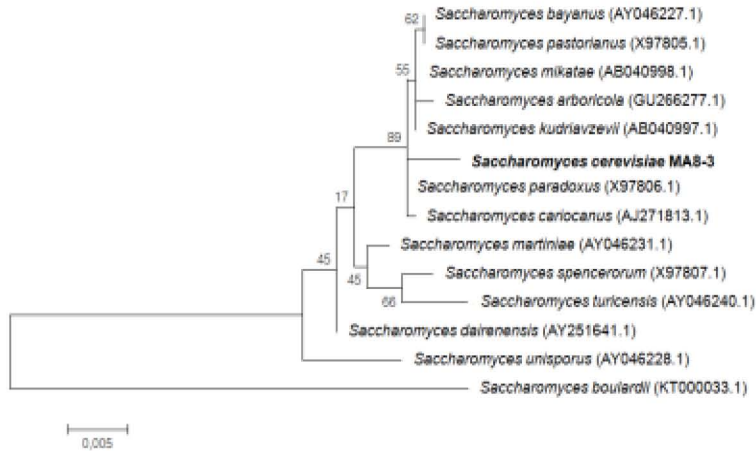


그림 3. *Saccharomyces cerevisiae* MA8-3 계통수

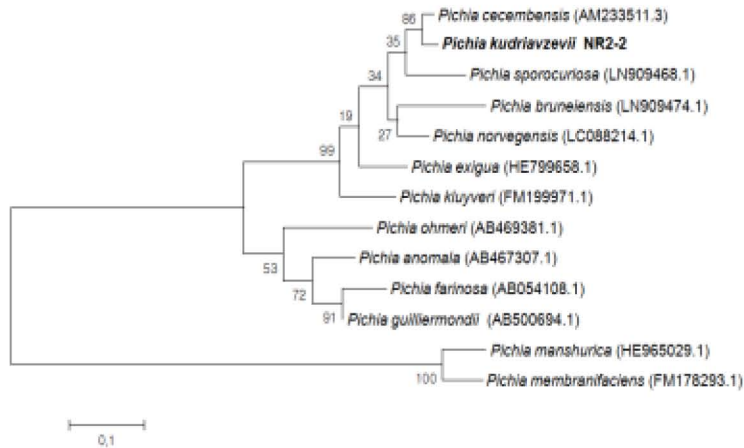


그림 4. *Pichia kudriavzevii* NR2-2 계통수

16S rRNA 염기서열 분석하여 식용 미생물로 가능한 *Acetobacter pasteurianus* 1종과 국내 식초에서 잘 발견되지 않는 것으로 보고된 *Gluconobacter* 속 균주 1종 총 초산균 2종을 최종 선별하였다.

표 5. 16S rRNA 염기서열을 이용한 균주 동정

번호	균주번호	초산생성환(mm)	균주명	상동성(%)	Accession 번호
1	AFY-4	15	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	99%	AB906396.1
2	GV30-1	10	<i>Gluconobacter oxydans</i>	99%	KU686773.1

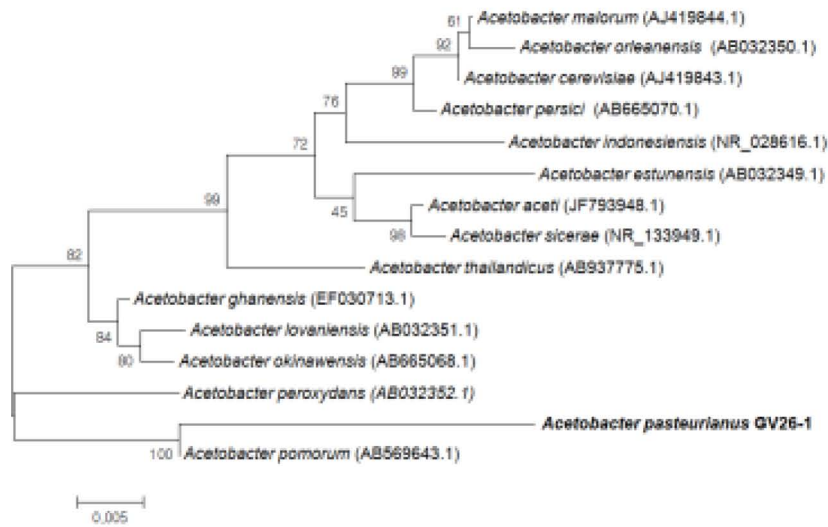


그림 5. *Acetobacter pasteurianus* AFY-4 계통수

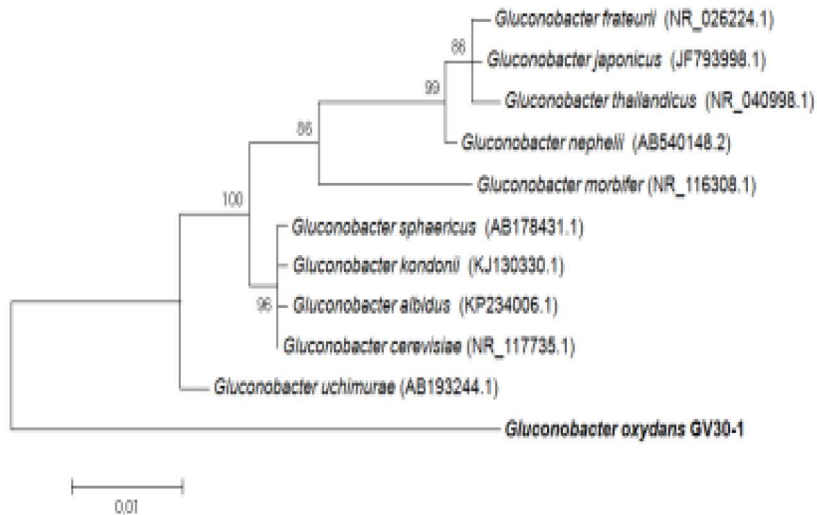


그림 6. *Gluconobacter oxydans* GV30-1 계통수

표 6. 생화학적 특성

구 분	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	<i>Gluconobacter oxydans</i>
	AFY-4	GV30-1
2-Nitrophenyl-β-D-galactopyranoside	-	-
L-Arginine	-	-
L-Lysine	-	-
L-Ornithine	-	-
Thisodium citrate	-	-
Sodium thiosulfate	-	-
Urea	+	-
L-Tryptophane	-	-
Indole production	+	-
Sodium pyruvate	+	+
Gelatin	-	-
D-Glucose	+	+
D-Mannitol	-	+
Inositol	-	-
D-Sorbitol	-	+
L-Rhamnose	-	+
D-Sucrose	-	-
D-Melibiose	+	+
Amygdalin	-	-
L-Arabinose	+	+
Oxidase	-	-
Potassium nitrate	-	-

주사전자현미경으로 40K 및 80K배 확대하여 형태학적 구조를 관찰한 결과, 두 균주 모두 간균으로 균주길이는 AFY-4의 경우 2.024 um, GV30-1은 2.262 um으로 측정되었고, 균 표면과 균체 사이에 작고 가는 물질을 형성하는 것을 확인하여 식초 발효시 식초 표면에 생성되는 초산균막의 구성성분으로 추정된다.

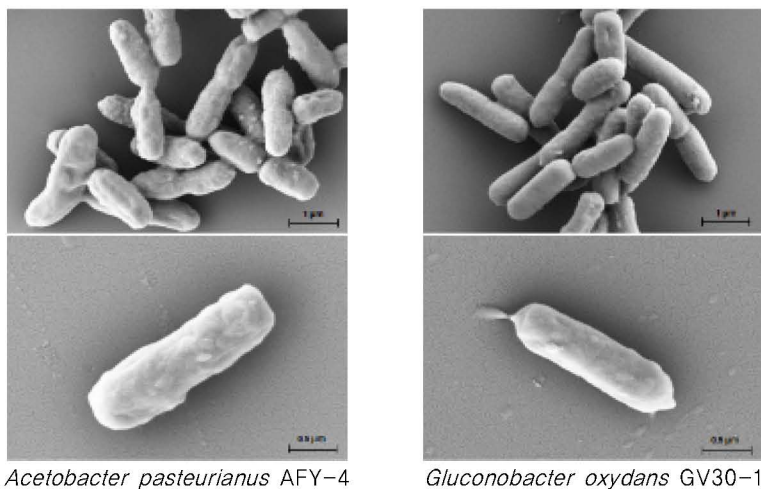


그림 7. 초산균 SEM 분석

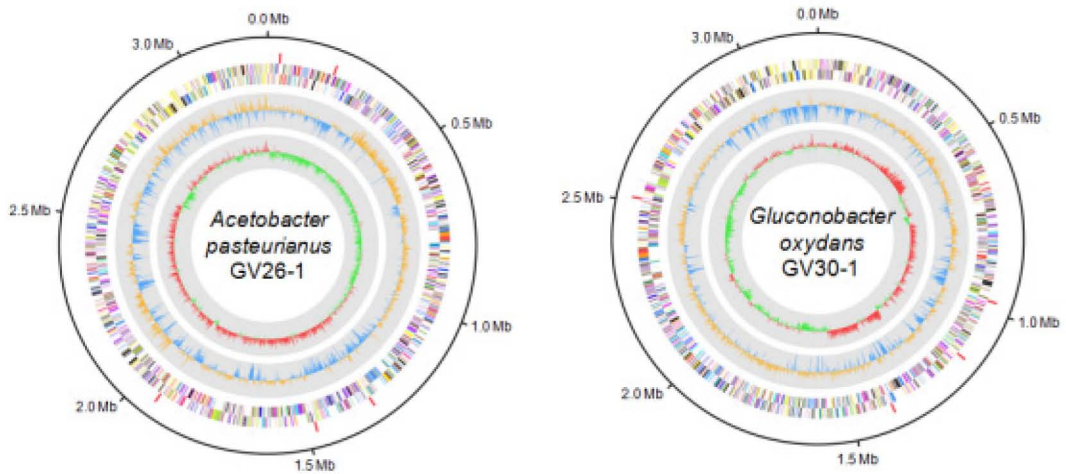


그림 8. 초산균 전체 유전체 지도

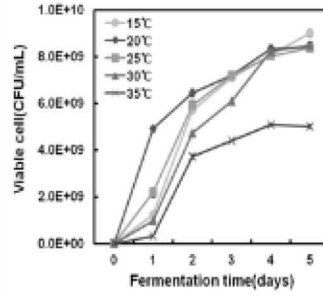
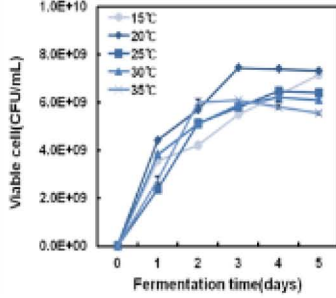
표 7. 초산균(2종)의 유전체 염기서열 특성

구 분	<i>Acetobacter pasteurianus</i> AFY-4	<i>Gluconobacter oxydans</i> GV30-1
염색체 크기(bp)	3,222,280	3,198,950
G+C 함량(%)	52.53	60.54
단백질 코딩 염기서열(CDS)	3,026	3,069
rRNA 오페론	15	12
tRNA 수	56	57

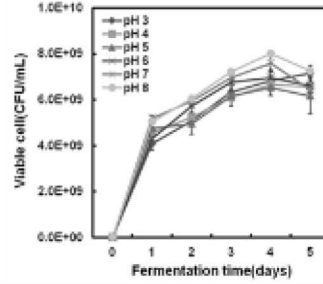
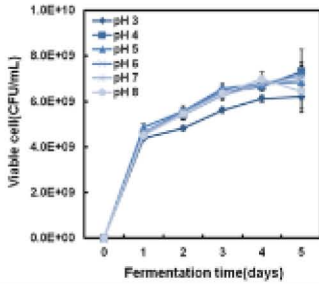
(시험 3) 종균 생육조건 확립

Saccharomyces cerevisiae MA8-3은 15~20℃, NR2-2는 15~30℃에서 생육하였고, 두 균주 모두 넓은 범위의 pH(3~8)에서 생육이 가능한 것이 관찰됨에 따라 위 균주를 이용한 알코올 발효 시 다양한 원료들의 적용가능성을 확인할 수 있었다.

○ 온도(15~35℃)



○ pH(3~8)



Saccharomyces cerevisiae MA8-3

Pichia kudrivzevii NR2-2

○ 탄소원

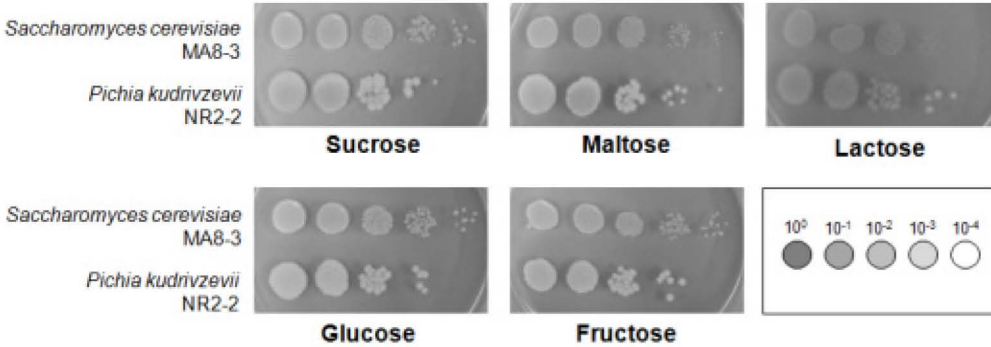


그림 9. 생육조건별 효모의 생육비교

초산균은 다른 세균들에 비하여 생육조건이 까다롭기 때문에 선발된 초산균의 온도, pH 및 알코올 농도 등 초기 생육에 관여하는 주요 변수들의 영향을 확인하여 생육조건을 설정하였다.

(시험 4) 종균 보관조건 확립

동결보호제 및 액상 및 고체 상태에 따라 저장기간 중 생균수 감소를 확인하였고, 액상 보관시 일반적으로 알려진 균주 보관(Glycerol 15% 첨가)조건에서 감소율이 19.2%로 가장 낮았음. 동결 건조한 균주 분말의 경우, 냉장보관 시 포도당 10% 처리구와 -20℃ 냉동보관시 과당 10% 처리구의 감소율이 각각 3.9%와 9.8%로 가장 낮은 감소율을 나타냄. 액상과 분말을 비교 시, 분말상태로 보관 시 감소율이 더 낮았으며, 동결보호제를 처리하지 않은 대조구는 균이 사멸하거나 처리구에 비하여 유의적으로 낮은 생존율을 나타내었다.

표 8. 보관조건에 따른 감소율

구 분	보관온도	동결보호제	생존율(%)	감소율(%)
액상	-20℃ (냉동)	무처리	1.4	98.6
		Glycerol 15%	7.4	92.6
		DMSO 10%	2.4	97.6
	-70℃ (초저온)	무처리	21.6	78.4
		Glycerol 15%	80.8	19.2
		DMSO 10%	43.0	57.0
분말	4℃ (냉장)	무처리	0.0	100.0
		포도당 10%	96.1	3.9
		과당 10%	54.8	45.2
		탈지분유 10%	22.4	77.6
	-20℃ (냉동)	무처리	0.0	100.0
		포도당 10%	68.4	31.6
		과당 10%	90.2	9.8
		탈지분유 10%	71.0	29.0

(시험 5) 종균활용 발효식초 대량생산공정 개발

반응표면분석법을 이용하여 초산발효 조건을 최적화하였다. 중심합성계획법을 이용하여 실험계획을 설계하여 초산발효 최적화를 위한 독립변수로 초기알코올, 초기산도, 접종농도 3가지 변수를 선정하였고, 종속변수로는 잔류알코올과, 산도로 선정하여 분산분석을 통하여 높은 만족도를 갖는 최적점을 선택하고 지점 예측을 통해 최적 값을 예측하였다. 다레식초의 최적조건은 초기 알코올도수 9.00%, 초기산도 1.29%, 접종농도 15.34%로 예측되었다.

표 9. 다레식초 실험설계 및 결과

번호	변수 부호화			독립변수(%)			반응변수(%)		
	X1	X2	X3	X1	X2	X3	Y1	Y2	Y3
	초기 알코올	초기 산도	접종 농도	알코올	초기 산도	접종 농도	잔류 알코올	산도	당도
1	-1	-1	-1	6	1.0	15	0.0048	4.20	3.50
2	-1	-1	1	6	1.0	25	0.0326	3.57	3.60
3	-1	1	-1	6	2.0	15	0.0217	4.49	3.70
4	-1	1	1	6	2.0	25	0.0374	4.10	3.80
5	1	-1	-1	8	1.0	15	0.0060	4.26	3.93
6	1	-1	1	8	1.0	25	0.0194	3.86	4.00
7	1	1	-1	8	2.0	15	0.0244	4.53	4.00
8	1	1	1	8	2.0	25	0.0495	4.41	4.20
9	0	0	0	7	1.5	20	0.0264	4.33	3.80
10	0	0	0	7	1.5	20	0.0085	4.69	4.00
11	2	0	0	9	1.5	20	0.0142	5.14	4.50
12	-2	0	0	5	1.5	20	0.0245	4.29	3.50
13	0	2	0	7	2.5	20	0.0523	4.67	4.10
14	0	-2	0	7	0.5	20	0.0056	3.88	3.60
15	0	0	2	7	1.5	30	0.0388	4.35	4.10
16	0	0	-2	7	1.5	10	0.0087	4.64	3.60

표 10. 다래식초 초산발효최적화 실험결과 분산분석

구 분	제공합	자유도	평균제공합	F값	p값
모델	0.1062	9	0.0118	6.3164	0.0281
A-초기알코올	0.0123	1	0.0123	6.5990	0.0501
B-초기산도	0.0526	1	0.0526	28.1395	0.0032
C-접종농도	0.0175	1	0.0175	9.3463	0.0282
AB	0.0000	1	0.0000	0.0071	0.9363
AC	0.0021	1	0.0021	1.1091	0.3405
BC	0.0026	1	0.0026	1.3731	0.2941
A2	0.0017	1	0.0017	0.8870	0.3895
B2	0.0208	1	0.0208	11.1098	0.0207
C2	0.0112	1	0.0112	6.0016	0.0579
잔차	0.0093	5	0.0019		
적합성결여	0.0062	4	0.0016	0.5019	0.7691
순 오차	0.0031	1	0.0031		
합계	0.1163	15			
표준편차	0.0432		예측 오차제공합		0.0943
평균	1.4641		결정계수(R ²)		0.9192
변동계수	2.9526		조정결정계수		0.7736

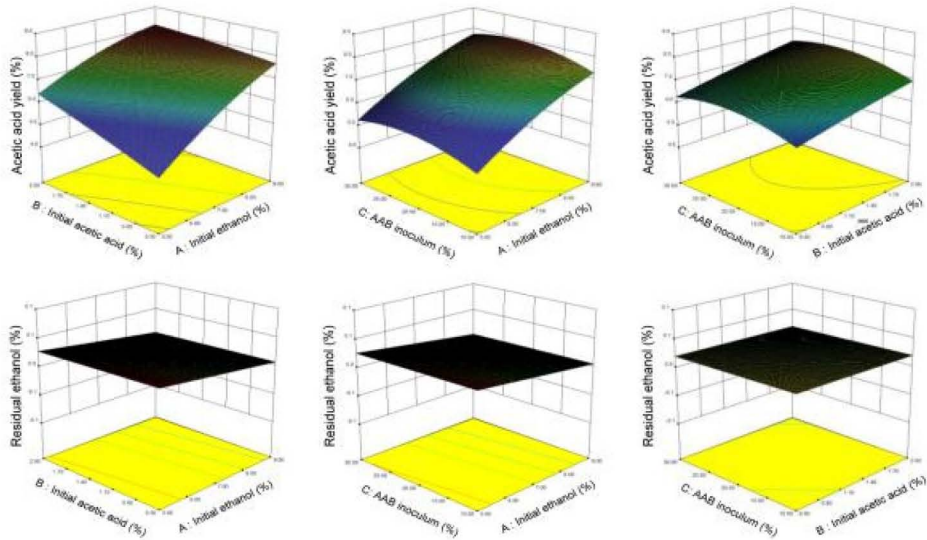


그림 10 다래식초의 반응표면분석 결과(위: 산도, 아래: 잔류알코올)

표 11. 다래식초의 초산발효 최적화 반응표면 모델식

구 분	2차 회귀모형식
산 도	$+7.04+1.19A+0.55B+0.21C-0.31AB+0.015AC+0.026BC-0.26A^2-0.049B^2-0.42C^2$

표 12. 다래식초의 최적 초산발효 조건 예측

구분	목표값	최소 한계	최대 한계	최적화 수치
A: 초기알코올	in range	5	9	8.95
B: 초기 산도	in range	0.5	2	1.86
C: 접종 농도	in range	10	30	25.02
산도	Maximize	5.85	8.01	8.15
잔류알코올	Minimize	0.0042	0.0290	0.004

표 13. 중심합성계획법으로 실시한 머루식초 초산발효 실험 처리구 및 결과

실험번호	변수 부호화			독립변수			반응변수		
	X1	X2	X3	X1	X2	X3	Y1	Y2	Y3
	초기 알코올	초기 산도	접종 농도	초기 알코올 (%)	초기산도 (%)	접종농도 (%)	잔류 알코올	산도	당도
1	-1	-1	-1	6	1.0	15	0.3052	6.50	5.30
2	-1	-1	1	6	1.0	25	0.5123	6.47	5.60
3	-1	1	-1	6	2.0	15	0.0359	7.83	5.90
4	-1	1	1	6	2.0	25	0.0341	7.64	6.00
5	1	-1	-1	8	1.0	15	1.6878	6.46	6.20
6	1	-1	1	8	1.0	25	0.8980	6.58	6.40
7	1	1	-1	8	2.0	15	0.9563	7.53	6.53
8	1	1	1	8	2.0	25	1.5692	6.15	5.00
9	0	0	0	7	1.5	20	1.9077	6.38	6.20
10	0	0	0	7	1.5	20	1.8771	6.42	6.00
11	2	0	0	9	1.5	20	1.4793	3.99	5.50
12	-2	0	0	5	1.5	20	0.0347	6.88	5.10
13	0	2	0	7	2.5	20	1.2045	7.09	6.40
14	0	-2	0	7	0.5	20	0.9854	4.45	4.30
15	0	0	2	7	1.5	30	0.9828	7.26	6.50
16	0	0	-2	7	1.5	10	1.0751	6.74	5.70

머루식초의 최적조건은 초기 알코올도수 5.17%, 초기산도 1.98%, 접종농도 10.15%로 예측되었다

표 14. 중심합성계획법으로 실시한 머루식초 초산발효 실험결과 분산분석

구 분	제공합	자유도	평균제공합	F값	p값
모델	7.9628	3	2.6543	4.0129	0.0343
A: 초기알코올	3.5066	1	3.5066	5.3015	0.0400
B: 초기산도	4.4448	1	4.4448	6.7198	0.0236
C: 접종농도	0.0114	1	0.0114	0.0173	0.8976
잔차	7.9372	12	0.6614		
적합성결여	7.9366	11	0.7215	1146.9141	0.0230
순 오차	0.0006	1	0.0006		
합계	15.9000	15			
표준편차		0.8133	예측 오차제공합		15.7147
평균		6.5235	결정계수(R ²)		0.5008
변동계수		12.4670	조정결정계수		0.3760

표 15. 머루식초의 초산발효 최적화 반응표면 모델식

예 측	2차 회귀모형식
산 도	Acidity = 6.26 - 0.94A + 0.79B - 0.053C

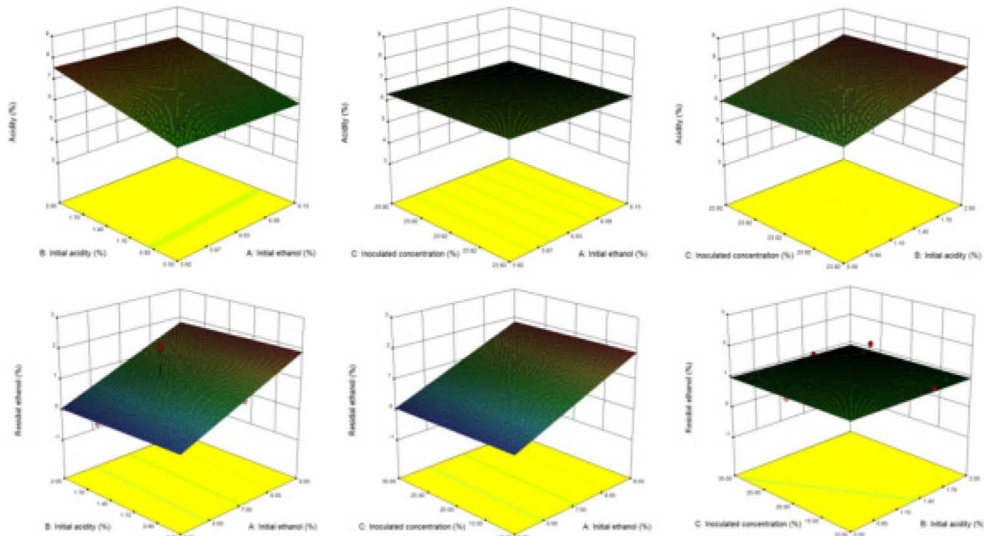


그림 11. 머루식초의 반응표면분석 결과(위: 산도, 아래: 잔류알코올)

표 16. 머루식초의 최적 초산발효 조건 예측

구 분	목표값	최소한계	최대한계	최적화 수치
A: 초기알코올	in range	5	9	5.17%
B: 초기 산도	in range	0.5	2	1.98%
C: 접종 농도	in range	10	30	10.15%
산도	Maximize	3.99	7.83	7.93692%
잔류알코올	Minimize	0.0340	1.9077	0.153234%

현미식초의 최적조건은 초기 알코올도수 7.79%, 초기산도 2.00%, 접종농도 30.00%로 예측되었다.

표 17. 중심합성계획법으로 실시한 현미식초 초산발효 실험 처리구 및 결과

번호	변수 부호화			독립변수			반응변수		
	X1	X2	X3	X1	X2	X3	Y1	Y2	Y3
	초기 알코올	초기 산도	접종 농도	알코올 (%)	초기산도 (%)	접종농도 (%)	잔류 알코올	산도	당도
1	-1	-1	-1	6	1.0	15	0.0051	5.85	4.40
2	-1	-1	1	6	1.0	25	0.0129	6.13	4.80
3	-1	1	-1	6	2.0	15	0.0118	6.83	5.00
4	-1	1	1	6	2.0	25	0.0121	6.92	5.30
5	1	-1	-1	8	1.0	15	0.0220	7.31	5.47
6	1	-1	1	8	1.0	25	0.0198	7.39	5.70
7	1	1	-1	8	2.0	15	0.0050	7.65	5.73
8	1	1	1	8	2.0	25	0.0187	8.01	6.10
9	0	0	0	7	1.5	20	0.0182	7.24	5.50
10	0	0	0	7	1.5	20	0.0158	7.25	5.60
11	2	0	0	9	1.5	20	0.5819	7.69	6.23
12	-2	0	0	5	1.5	20	0.0090	5.96	4.53
13	0	2	0	7	2.5	20	0.1649	7.85	5.70
14	0	-2	0	7	0.5	20	0.0295	5.96	5.00
15	0	0	2	7	1.5	30	0.0224	7.07	6.10
16	0	0	-2	7	1.5	10	0.0125	6.58	4.90

표 18. 중심합성계획법으로 실시한 현미식초 초산발효 실험결과 분산분석

구 분	제곱합	자유도	평균제곱합	F값	p값
모델	6.965544	3	2.321848	53.427870	0.000000
A-초기알코올	4.102906	1	4.102906	94.411657	0.000000
B-초기산도	2.663776	1	2.663776	61.295941	0.000005
C-접종농도	0.198863	1	0.198863	4.576012	0.053671
잔차	0.521491	12	0.043458		
적합성결여	0.521339	11	0.047394	311.834336	0.044144
순 오차	0.000152	1	0.000152		
합계	7.487035	15			
표준편차		0.1923	예측 오차제곱합		2.3451
평균		6.9808	결정계수(R ²)		0.9751
변동계수		2.7547	조정결정계수		0.9302

표 19. 현미식초의 초산발효 최적화 반응표면 모델식

구 분	2차 회귀모형식
산 도	Acidity = 6,78 + 1,01A + 0,61B + 0,22C

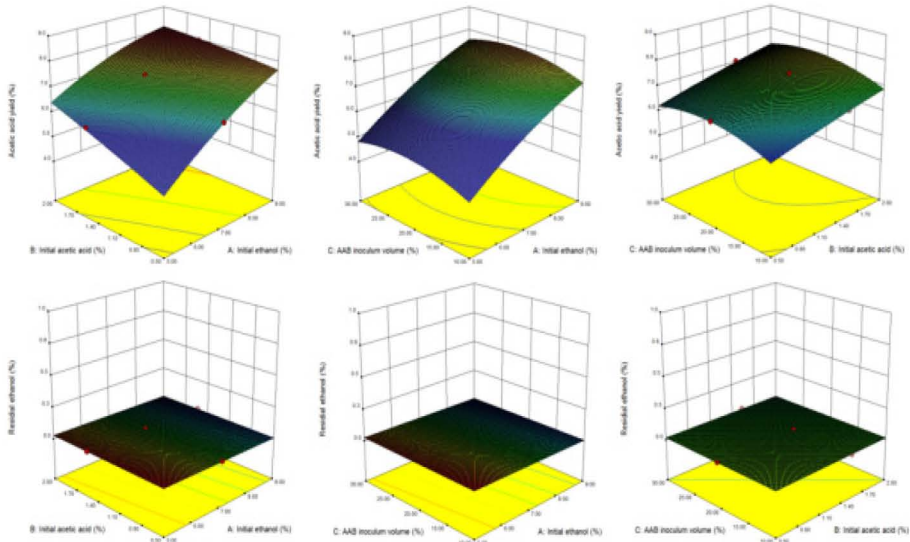


그림 12. 현미식초의 반응표면분석 결과(위: 산도, 아래: 잔류알코올)

표 20. 현미식초의 최적 초산발효 조건 예측

구 분	목표값	최소한계	최대한계	최적화 수치
A: 초기알코올	in range	5	9	7,79%
B: 초기 산도	in range	0,5	2	2,00%
C: 접종 농도	in range	10	30	30,00%
산도	Maximize	5,85	8,01	8,01008%
잔류알코올	Minimize	0,0050	0,5819	0,138701%

(시험 6) 발효 · 숙성기간별 대사체 분석

숙성기간에 따른 다래식초의 주요 대사체를 GC-TOF/MS로 분석하여 주요 대사물질을 선정하기 위하여 Fisher ratio 값이 200이상인, 총 507종의 대사체 중 7종의 대사물질이 선정되었다.

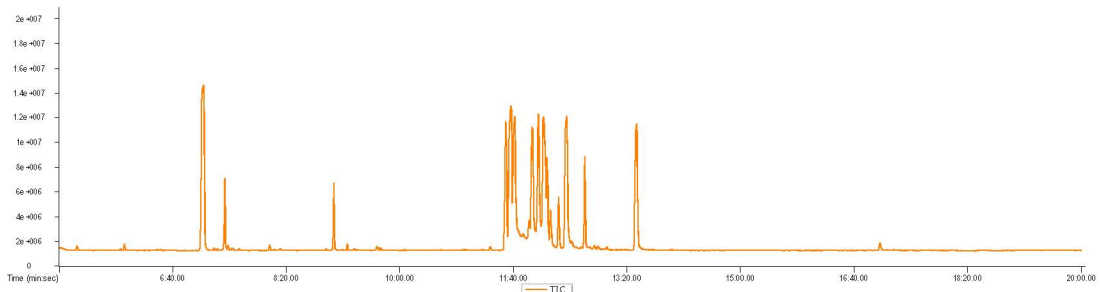


그림 13. 다래식초의 GC-TOF/MS 총이온크로마토그램

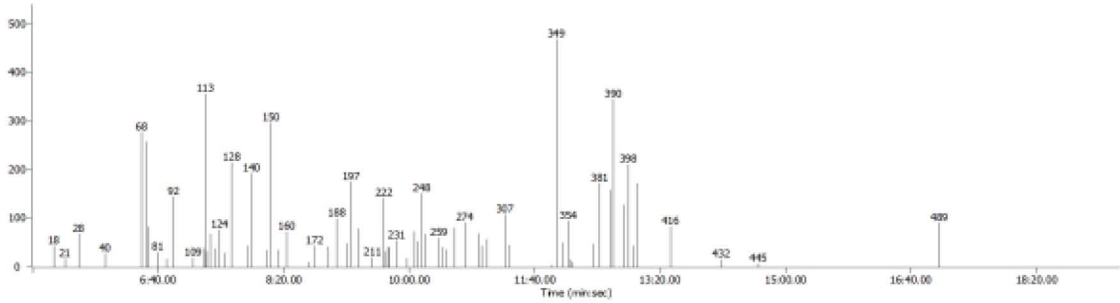


그림 14. 숙성기간별 다래식초의 Fisher ratio plot(숫자: 대사물질의 피크번호)

* Fisher ratio: $(m_1 - m_2)^2 / (v_1 + v_2)$, m은 평균, v는 변화량으로 변수의 판별능을 나타내는 값

표 21. 숙성기간에 따른 다래식초의 주요 대사물질

No.	Name	Peak No.	Mass	Fisher ratio ¹⁾
<i>Organic acids</i>				
1	Quinic acid	349	345	467.31
2	Propanoic acid	128	189	213.99
<i>Amino acids</i>				
3	L-Isoleucine	113	158	355.49
4	L-Theronine	150	73	295.34
5	L-Norvaline	74	144	256.65
<i>Sugar and sugar derivatives</i>				
6	α-D-(+)-Mannopyranose	390	204	344.11
7	α-Hydroxypyruvic acid	398	73	209.81

균주의 종류와 숙성기간에 따라 발효식초의 대사물질의 함량이 변화하는 것을 확인하였고, 특히 Shikimate pathway의 대사산물로서 다래에 풍부하다고 알려진 퀴닌산(quinic acid)의 Fisher ratio 값이 467.31로 가장 높게 나타났다.

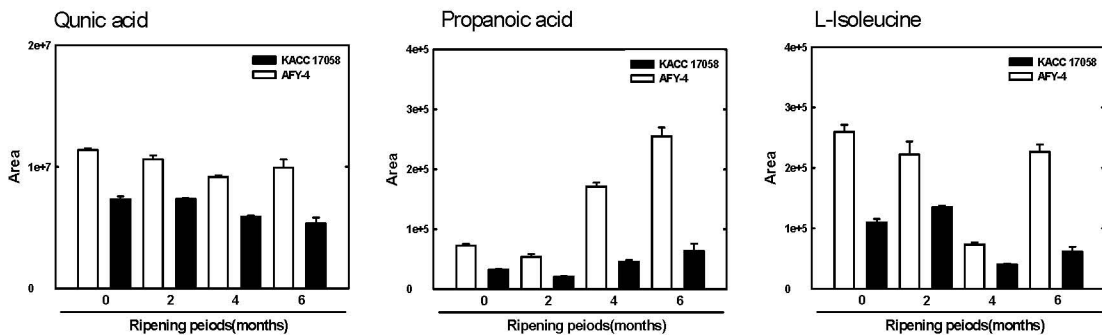


그림 15. 숙성기간별 다래식초의 주요 대사물질 비교

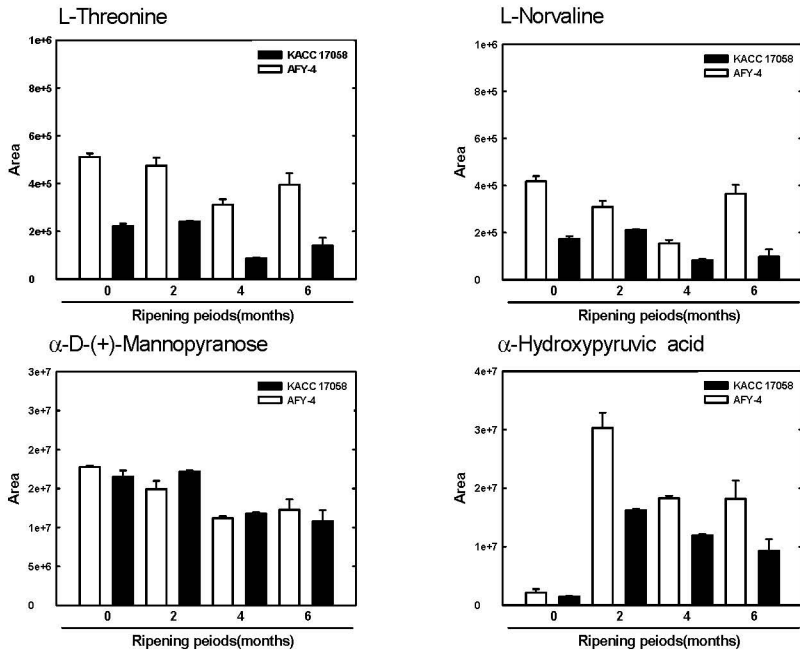
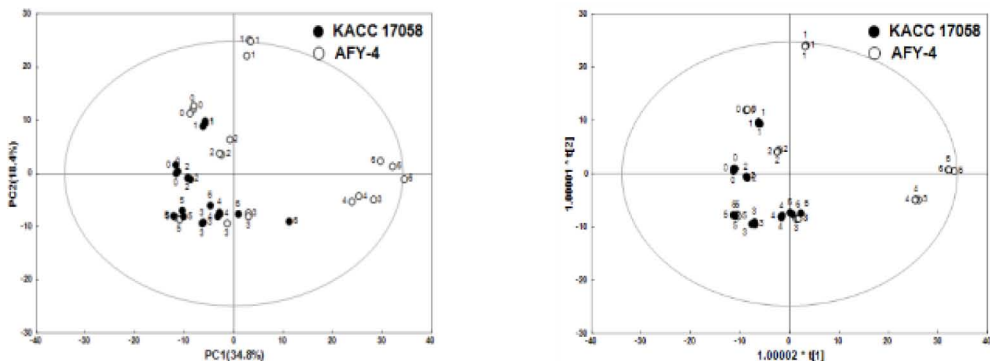


그림 15. 숙성기간별 다래식초의 주요 대사물질 비교(계속)

총 7종의 대사물질은 유기산 2종, 아미노산 3종, 당류 및 유도체 2종으로 분류되었고, 6종(Qunic acid, L-isoleucine, L-threonine, L-norvaline, α-D-(+)-Mannopyranose)의 대사물질은 숙성기간이 경과됨에 따라 감소하는 경향을 보인 반면, propanoic acid만 증가하는 경향을 나타내었다.

다변량 통계분석을 통하여 숙성시간에 따른 대사체의 profiling을 분석한 결과 주성분분석(PCA) 보다 직교부분최소자승법판별분석(OPLS-DA) 결과가 R^2 가 각각 0.639, 0.881로 OPLS-DA 판별모델이 더 적합한 것으로 확인되었고, AFY-4 균주로 발효시킨 다래식초가 4개월, 6개월 숙성되었을 때, 다른 숙성기간에 비하여 현저하게 구별됨을 확인하였다.



(좌: PCA, 우: OPLS-DA)

그림 16. 숙성기간별 다래식초의 대사체 다변량 통계분석

숙성기간에 따른 머루식초의 대사체는 총 189종으로 나타났으며 실험구인 AFY-4 균주로 발효한 머루식초와 대조구 KACC 17058 균주로 발효시킨 머루식초와의 대사체 변화가 유사하게 나타났다. 주성분 분석 결과를 보면 식초 제조 직후인 0개월 차에 비하여 숙성이 시작되면서 3, 6, 9, 12개월 숙성 샘플과 확연하게 구별되는 것을 확인하여 숙성이 시작되면서 대사체들의 함량 변화가 이루어지는 것을 확인할 수 있었다. 또한 6개월 이상이 지나면서 대사체의 변화가 크게 이루어지는 것으로 나타났다.

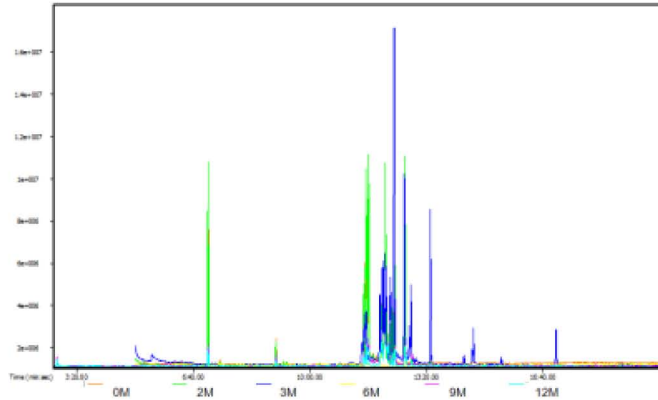


그림 17. 숙성기간별 머루식초의 총 이온크로마토그램

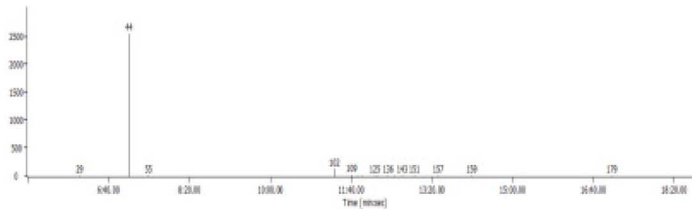


그림 18. 숙성기간별 머루식초의 Fisher ratio plot

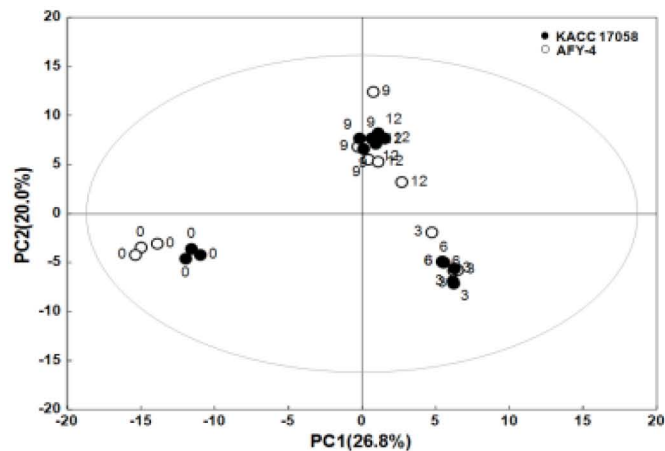


그림 19. 숙성기간에 따른 머루식초 대사체 PCA 분석

표 22. 숙성기간에 따른 머루식초의 주요 대사물질

No.	Name	Rt(min:sec)	mass	Fisher ratio ¹⁾
1	Trisiloxane	6:03.60	73	4.7961
2	Glycerol	7:05.60	73	2560.9
3	Butanoic acid	7:28.70	175	3.7652
4	D-Allofuranose	11:48.00	191	2.1362
5	D-Psicopyranose	11:40.45	204	23.393
6	D-Psicopyranose	11:53.35	204	5.2941
7	α-D-(+)-Mannopyranose	12:09.70	191	9.7132
8	Glucopyranose	12:43.10	73	11.693
9	D-Ribose	12:34.35	217	2.5743

숙성기간에 따른 현미식초 대사체의 변화를 비교하였다. 총 872종의 대사체가 동정되었다. 다레나 머루식초와 같은 과실식초에 비하여 대사체의 종류가 2~4배 많이 검출되었다. 숙성기간에 따른 변동이 큰 물질 9개를 표 00에 나타내었다. 현미식초도 마찬가지로 숙성 전후에 따라 데이터가 확연하게 구별되었고, 6개월 이상이 지나면 대사체의 함량이 전반적으로 감소하는 경향을 나타내었다.

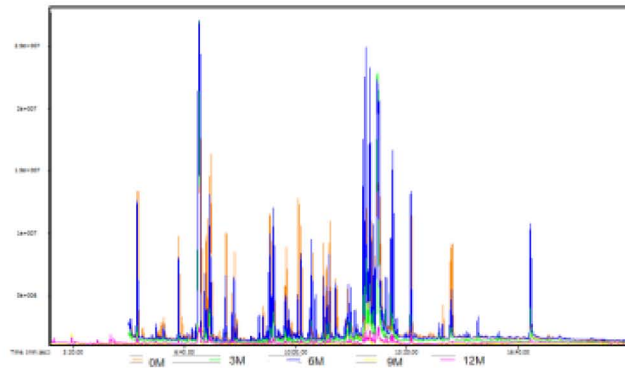


그림 20. 숙성기간별 현미식초의 총 이온크로마토그램

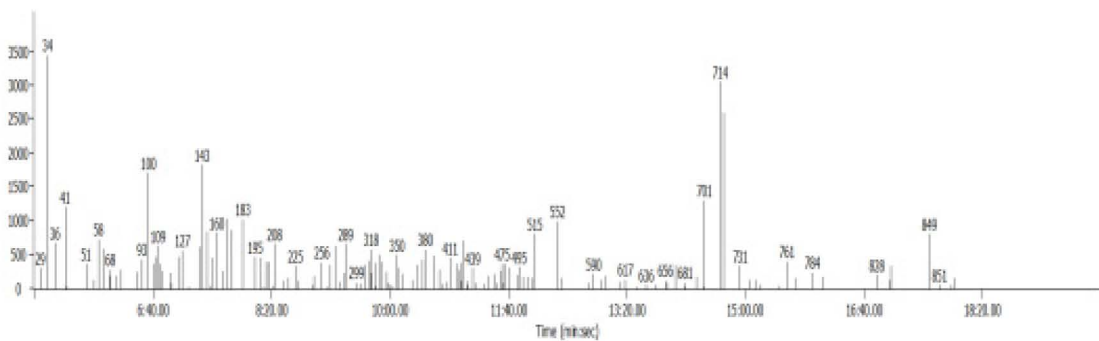


그림 21. 숙성기간별 현미식초의 Fisher ratio plot

표 23. 숙성기간에 따른 현미식초의 주요 대사물질

No.	Name	Rt(min:sec)	mass	Fisher ratio ¹⁾
1	Trimethylsilyloxy-cyclobutane	5:10,10	88	3453,1
2	Trimethyl(1-propoxypropan-2-yloxy)silane	14:38,41	204	3054,9
3	1-(trimethylsilyl)-2-hexanol	14:41,02	204	2585,9
4	(1-Methoxypropan-2-yl)oxy]trimethylsilane	7:20,06	142	1813,6
5	Trisiloxane	6:35,40	179	1704,5
6	Silanamine	14:24,82	204	1289,9
7	1,2-Bis(trimethylsiloxy)ethane	5:24,81	131	1194,7
8	Silanamine	7:42,07	99	1027,7
9	L-Alanine	7:54,47	204	1006,4

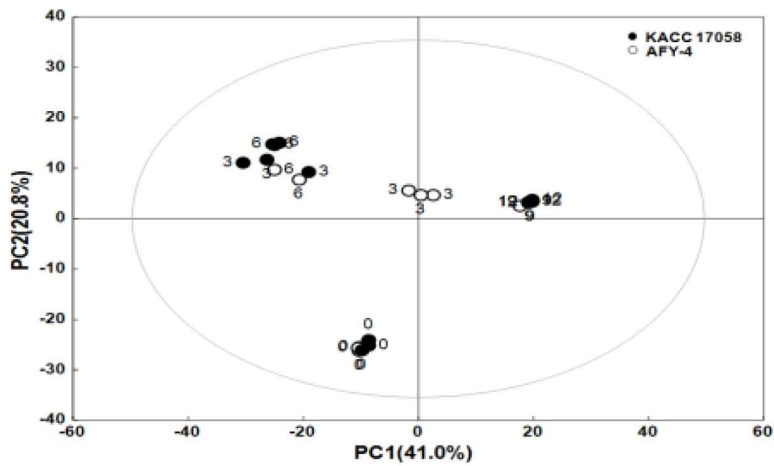


그림 22 숙성기간에 따른 현미식초 대사체 PCA 분석

(시험 7) 발효식초 생리활성 평가

항산화 활성을 측정하여 IC₅₀ 값을 비교한 결과 <머루 < 현미식초 순으로 낮아 다래식초가 가장 높은 항산화 활성을 나타내었고, 총페놀 및 총플라보노이드 함량은 머루 > 다래 > 현미식초 순으로 머루식초가 가장 높았다.

표 24. 발효식초 항산화 활성, 총페놀 및 총플라보노이드 함량

구분	머루식초	다래식초	현미식초
DPPH assay(IC ₅₀) ¹⁾	0.12%	0.06%	0.34%
ABTS assay(IC ₅₀)	0.60%	0.62%	1.03%
Total phenol(μg GAE/mL) ²⁾	117.43 ± 2.37 ^b	87.00 ± 1.96 ^c	25.41 ± 0.18 ^a
Total flavonoid(μg NE/mL) ³⁾	82.01 ± 6.61 ^b	49.11 ± 6.61 ^c	11.83 ± 1.68 ^a

¹⁾ IC₅₀(Inhibitory concentration 50%) : 활성을 50% 억제하는데 필요한 농도(대조구 Vit.C- 0.29 mg/mL)

²⁾ GAE(Gallic acid equivalent) : 갈산 당량

³⁾ NE(Naringin equivalent) : 나린진 당량

디스크 확산법으로 식중독미생물 5종에 대한 항균활성을 측정한 결과 *Salmonella enterica*와 *Bacillus cereus*에 대한 항균활성을 나타내었고, 현미식초의 경우 머루식초와 다래식초에 비하여 유의적으로 높은 항균활성을 나타내었다.

표 25. 식중독미생물에 대한 발효식초 항균활성 비교 (단위: mm)

구 분	머루식초	다래식초	현미식초
<i>Salmonella enterica</i>	9.75±0.35 ^a	14.75±0.35 ^b	15.75±0.35 ^b
<i>Bacillus cereus</i>	18.50±0.71 ^a	18.75±0.35 ^a	20.25±0.35 ^b
<i>Staphylococcus aureus</i>	N,D ¹⁾	N,D	N,D
<i>Eshcerichia coli</i>	N,D	N,D	N,D
<i>Yersinia enterocolitica</i>	N,D	N,D	N,D

¹⁾ Not detected

첨가농도별 발효식초 처리에 따른 지질과산화물 중간생성물인 MDA(Malonodialdehyde)와 단백질 BSA(bovine serum albumin)의 결합억제 효과를 SDS-PAGE를 통하여 확인한 결과, 발효식초 첨가농도의 의존적으로 MDA-BSA 결합물의 농도가 감소하는 것을 확인하였다.

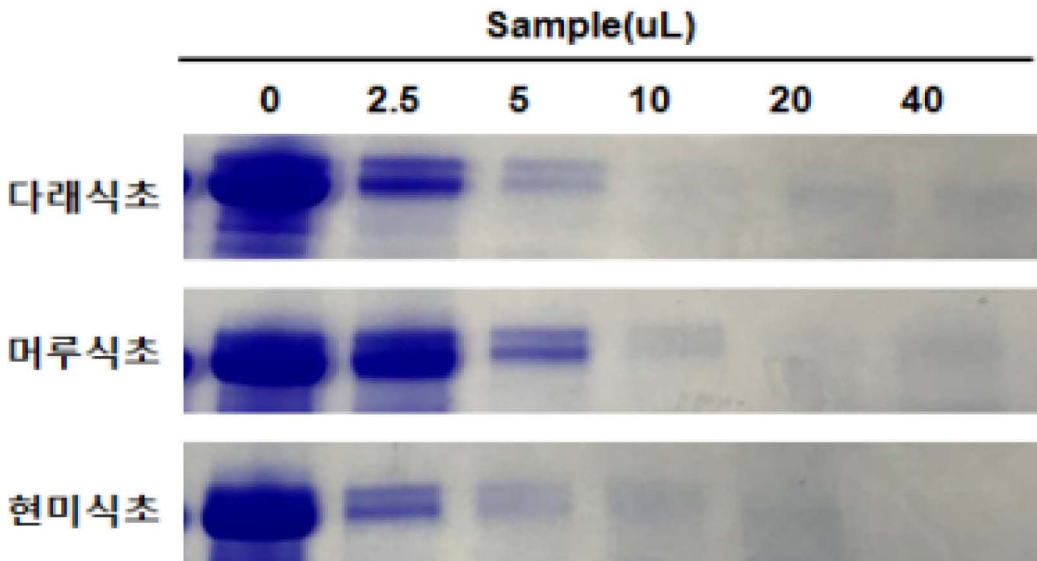


그림 23. MDA-BSA 결합단백질 SDS-PAGE

또한 현미 > 다래 > 머루식초 순으로 지질과산화물과 단백질의 결합 억제 효과가 높은 것으로 확인 되어 발효식초의 콜레스테롤 생합성 대사의 억제 효과 가능성을 확인하였다.

(시험 8) 음료형 발효식초 개발

AFY-4 균주를 이용한 발효식초와 음료베이스 및 음료 제조공정에 대하여 특허출원 완료하였다 (출원번호10-2017-0039860).

표 26. 다래식초 음료베이스 배합비

재 료	중 량 (g)
다래식초(산도 7.42%, 당도 7.8°Brix)	20
다래청(57.8°Brix)	30
다래착즙액(12.6°Brix)	10
올리고당(77.5°Brix)	5
정제수	35
합 계	100

표 27. 다래식초 음료 배합비

재 료	중 량 (g)
다래식초	12
다래청(57.8°Brix)	20
다래착즙액(12.6°Brix)	8
올리고당(77.5°Brix)	2
정제수	58
합 계	100



그림 18. 발효식초를 이용한 음료베이스 및 음료

표 28. 발효식초 이화학적 특성

구 분		머루식초	다래식초	현미식초
pH		2.88	2.97	2.95
산도(%)		8.61	7.82	8.57
당도(°Brix)		15.1	7.8	5.46
총 유기산(mg%)		4,624	5,900.78	5,666
유기산 (mg%)	Formic acid	-	125.90	-
	Oxalic acid	5.63	5.29	18.98
	Acetic acid	4222.10	5090.22	5339.56
	Lactic acid	38.12	206.18	53.29
	Succinic acid	17.50	23.38	46.50
	Tartaric acid	19.52	-	73.88
	Citric acid	321.28	449.80	134.44
총 유리아미노산(mg%)		37.42	105.79	258.14
유리 아미 노 산 (mg%)	Aspartic acid	0.29	0.10	0.18
	Threonine	2.01	4.89	9.52
	Serine	0.92	4.91	9.61
	Glutamic acid	4.18	13.71	24.76
	Glycine	0.80	2.56	11.02
	Alanine	2.90	26.33	39.10
	Valine	3.07	3.30	15.29
	Methionine	0.51	0.70	5.12
	Cystine	0.07	0.09	0.38
	Iso-leucine	2.29	2.38	10.54
	Leucine	4.13	3.74	23.78
	Tyrosine	1.66	1.70	14.66
	Phenylalanine	3.29	3.03	16.90
	Trptophan	0.00	0.00	0.00
	Ornithine	0.43	1.05	4.37
Lysine	4.20	3.75	22.95	
Histidine	0.66	1.27	6.08	
Arginine	2.95	21.64	27.65	
무기질 (mg%)	Na	-	-	-
	Ca	0.021	0.076	0.037
	K	1,438	0.822	2,608
	Mg	0.594	0.020	0.810
	P	0.003	0.002	0.012
	Fe	0.003	0.003	0.002
	Mn	0.001	-	0.001

음료형 다래식초의 경우 음료베이스와 음료의 유의적 차이는 없었고, 6.22~6.25점으로 중상에 해당하는 평가를 받았으며, 다래음료의 경우, 신맛과 단맛의 희망 강도가 기존보다 감소하는 방향으로 관능개선요구가 있었다.

표 27. 음료형 다래식초의 관능평가(9점 척도법)

구 분	종합 기호 ¹⁾	외관 기호	맛 기호	질감 기호	뒷맛 기호
다래음료베이스	6.22 ^{a2)}	5.56 ^b	6.25 ^a	6.08 ^a	6.00 ^a
다래음료	6.25 ^a	6.25 ^a	6.16 ^a	6.00 ^a	5.91 ^a

1) 종합기호: 각 시료의 종합기호 평균에 대해 LSD 검증

2) 동일한 문자는 시료 간 유의차가 없다는 것을 의미(p<0.05), 다중비교는 세부 속성 별로 시료 평균에 대해 LSD 검증



그림 19. 다래음료 및 음료베이스의 종합기호도 및 주요특성 인지강도

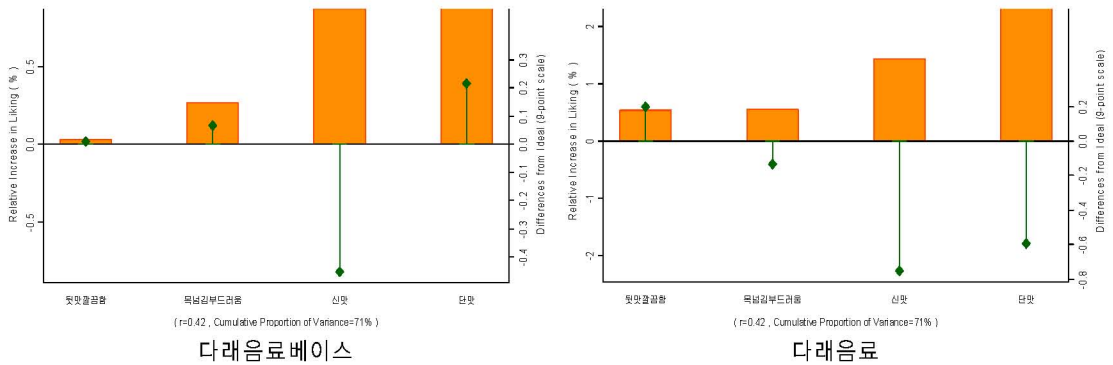


그림 20. 음료형 다래식초의 인지 및 희망강도

표 27. 음료형 머루식초의 관능평가(9점 척도법)

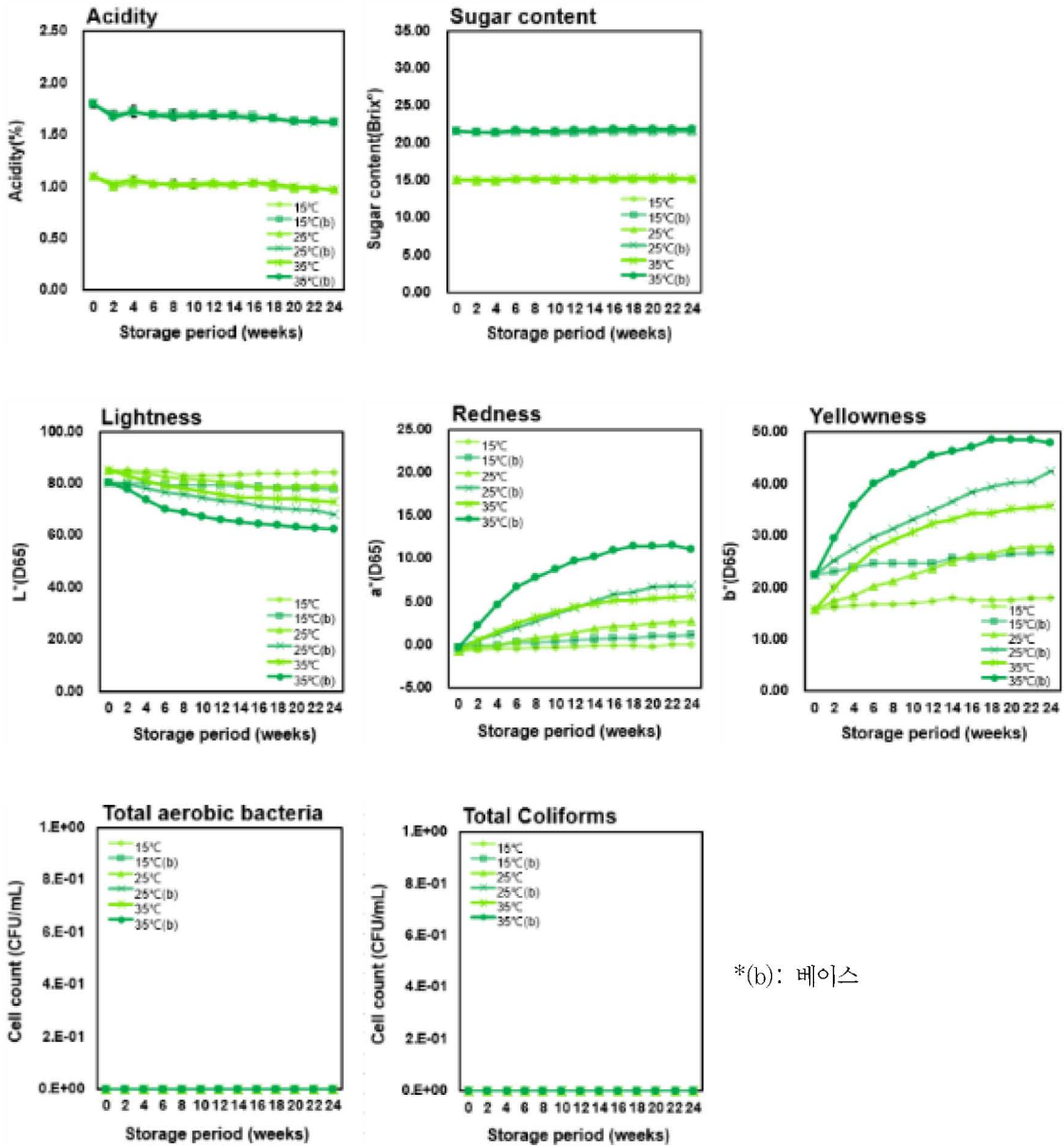
구 분	종합 기호 ¹⁾	외관 기호	맛 기호	질감 기호	뒷맛 기호
머루음료베이스	7.27 ^{aA}	7.42 ^a	7.16 ^a	6.91 ^a	6.70 ^a
머루음료	5.95 ^{bA}	7.25 ^a	5.86 ^b	5.88 ^b	5.58 ^b

1) 종합기호: 각 시료의 종합기호 평균에 대해 LSD 검증

2) 동일한 문자는 시료 간 유의차가 없다는 것을 의미(p<0.05), 다중비교는 세부 속성 별로 시료 평균에 대해 LSD 검증

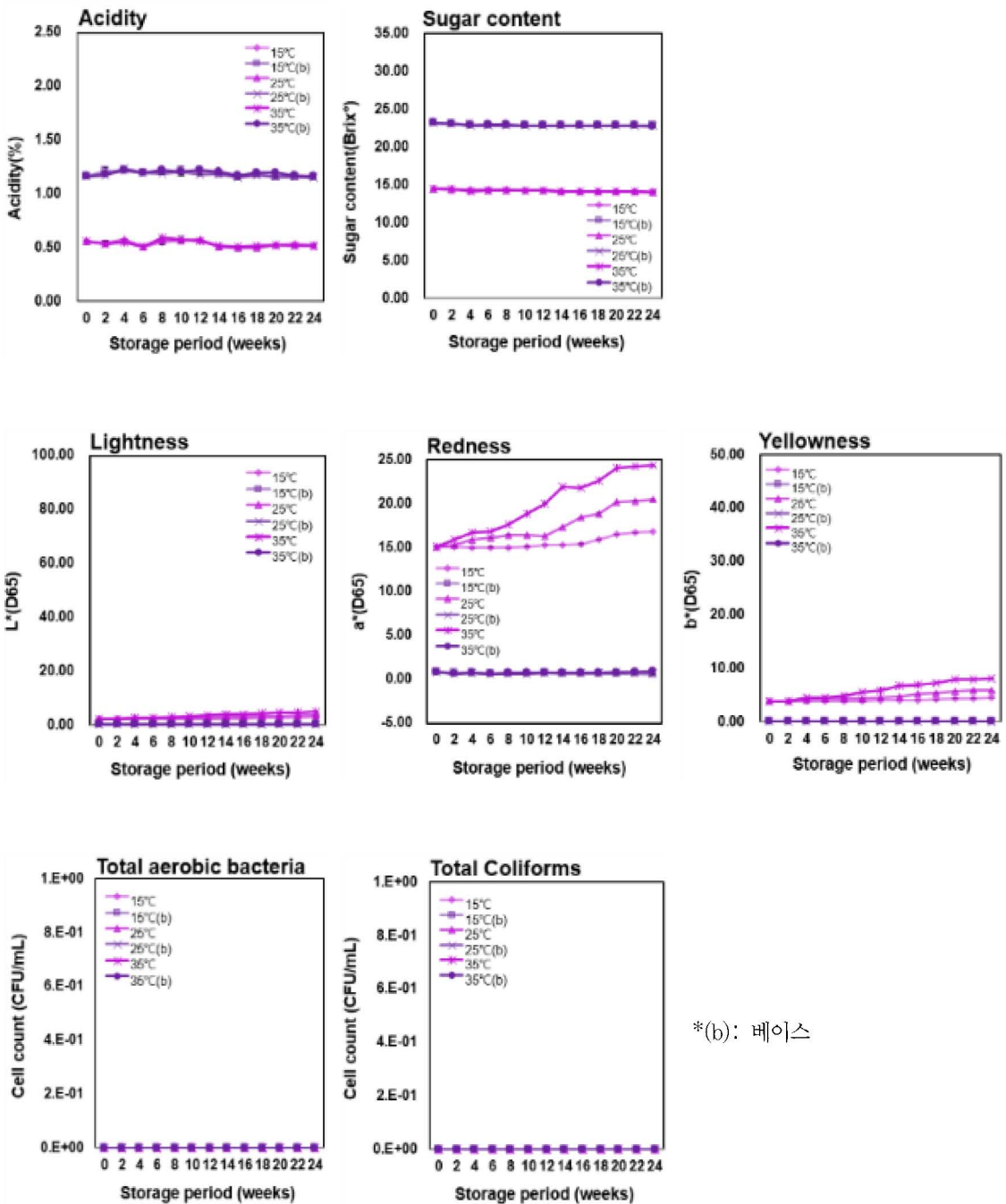
(시험 9) 음료형 발효식초 품질지표 설정

산도와 당도는 6개월간 품질변화가 거의 없는 것으로 판단되었으며 미생물학적 특성은 변화가 전혀 나타나지 않았다. 가속실험 중 저장온도별로 품질변화가 가장 뚜렷하게 나타난 특성은 색도로 유통기한을 설정할 때 가장 큰 지표가 될 것으로 사료되었다.



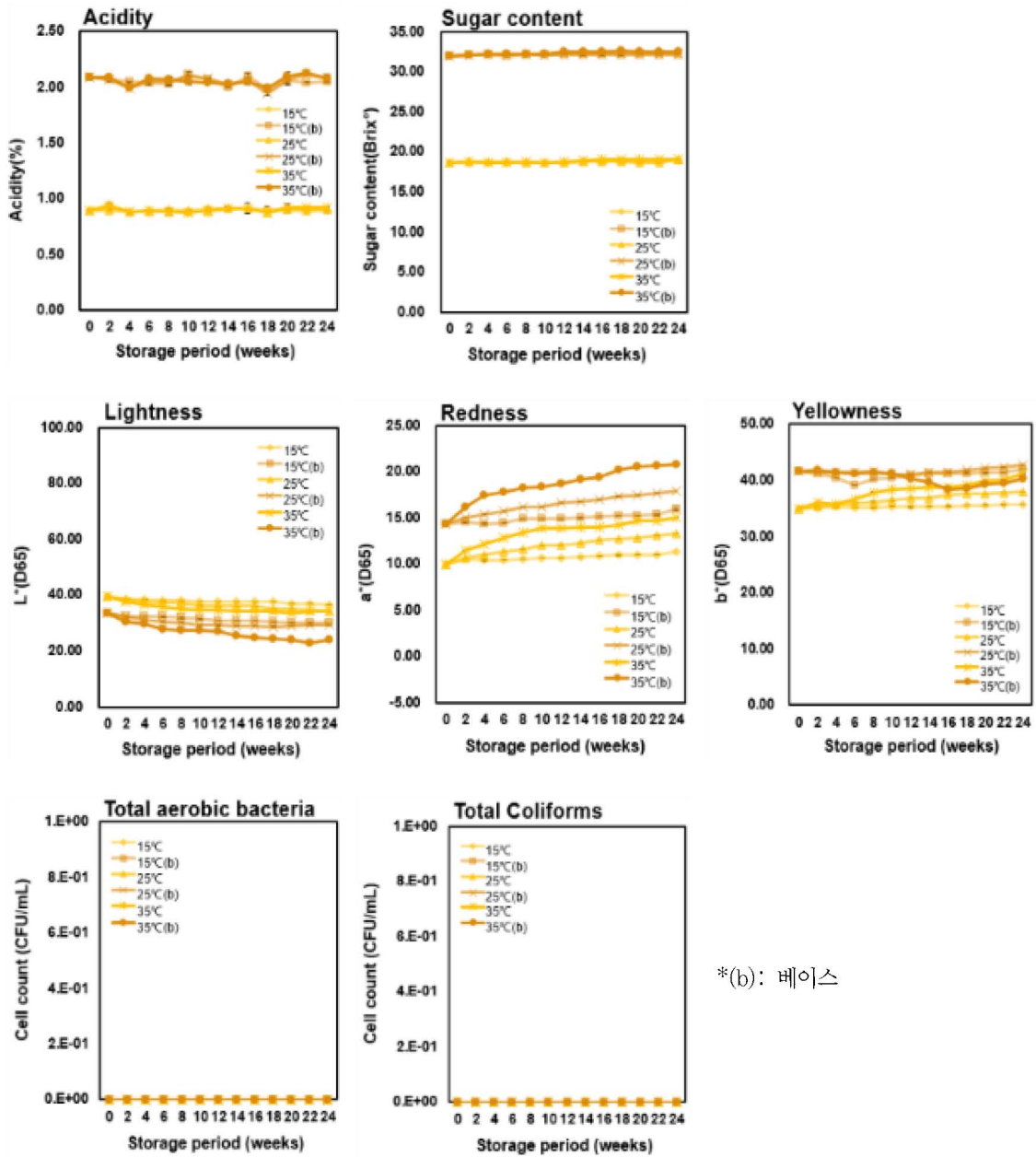
*(b): 베이스

그림 25. 저장조건별 다래음료 및 다래음료베이스의 품질변화 비교



*(b): 베이스

그림 26. 저장조건별 머루음료 및 머루음료베이스의 품질변화 비교



*(b): 베이스

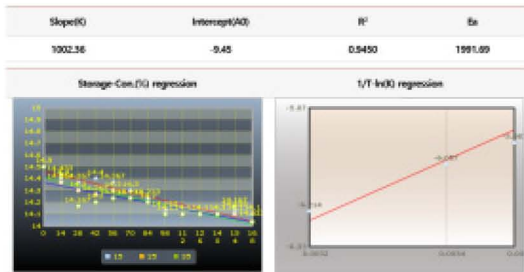
그림 27. 저장조건별 현미음료 및 현미음료베이스의 품질변화 비교

(시험 10) 음료형 발효식초 유통기한 설정

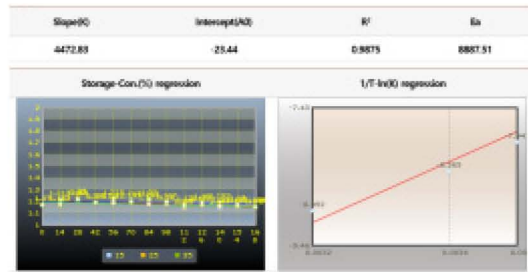
가속실험을 통하여 상온 유통제품인 발효음료와 음료베이스의 유통기한을 산출하였다. 안전계수는 0.8을 적용하였으며, 음료보다는 음료베이스가 유통기한이 더 길었으며, 현미 > 다래 > 머루 제품 순으로 유통기한이 설정되었다.

표 28 음료형 발효식초 유통기한 예측실험 결과

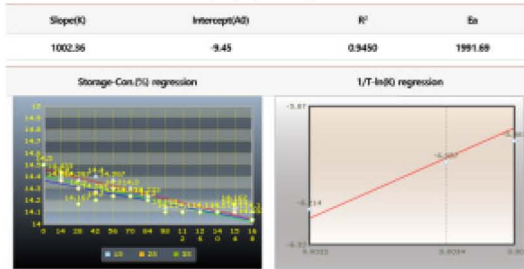
구분	품질지표	0차 유통기한 (개월)	결정계수(R ²)	1차 유통기한 (개월)	결정계수(R ²)	
다래	음료	산도	21.23	0.9142	23.10	0.9864
	가용성고형분	37.93	0.8728	37.32	0.8711	
베이스	음료	산도	13.21	0.3196	13.69	0.2753
	가용성고형분	58.32	0.8103	59.29	0.8092	
머루	음료	산도	14.58	0.0975	15.41	0.0743
	가용성고형분	12.53	0.9450	12.77	0.9408	
베이스	음료	산도	26.65	0.9875	32.13	0.9873
	가용성고형분	23.37	0.1368	26.65	0.1468	
현미	음료	산도	57.87	0.9853	64.22	0.9954
	가용성고형분	32.69	0.7946	31.98	0.7921	
베이스	음료	산도	51.18	0.0000	53.19	0.0009
	가용성고형분	83.18	0.9754	84.83	0.9752	



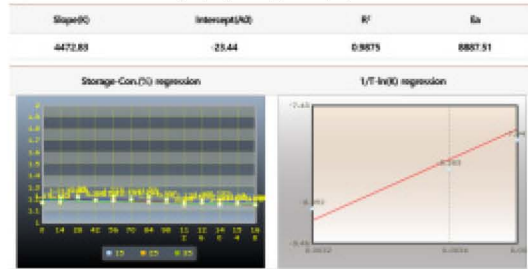
다래식초 음료



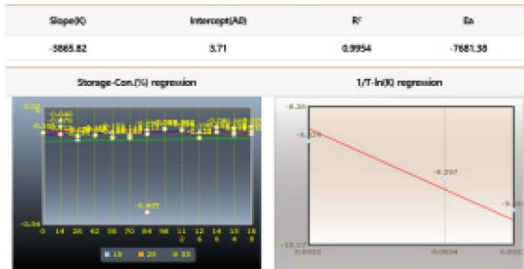
다래식초 음료베이스



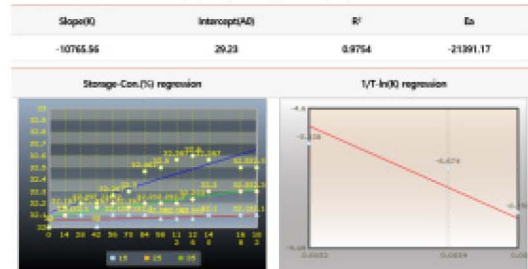
머루식초 음료



머루식초 음료베이스



현미식초 음료



현미식초 음료베이스

그림 28. 유통기한 산출을 위한 0·1차 반응식

표 29. 음료형 발효식초 유통기한 예측실험 결과

구 분	예측 유통기한(개월)	안전계수	최종 유통기한(개월)
다래 음료	23.10	0.7	16.17
다래 음료베이스	58.32	0.7	40.82
머루음료	26.65	0.7	18.66
머루 음료베이스	26.65	0.7	18.66
현미 음료	64.22	0.7	44.95
현미 음료베이스	83.18	0.7	58.23

4. 적 요

〈제2세부과제: 식초 발효용 종균 개발〉

(시험 1) 유용 균주(효모, 초산균) 분리 및 특성평가

가. 국내 발효식초 40점을 수집하여 YPD 배지와 YCM 배지에 시료를 분주하여 각각 효모 302주와 초산균 126주를 분리하여 에탄올 생성능과 초산 생성능을 측정하여 비교하였음

(시험 2) 선발 균주 동정

가. 시험 1에서 분리한 균주 중 저알코올 생성 효모 *Saccharomyces cerevisiae* MA8-3와 초산 생성능이 우수한 균주 *Acetobacter pasteurianus* AFY-4, *Gluconobacter oxydans* GV30-1를 최종적으로 선발하였고, 각각 18S rRNA, 16S rRNA의 염기서열을 분석하여 균주를 동정하였다. 동정된 균주는 blastn 분석을 기반으로 계통수를 작성하였음
 나. 생화학적 특성 평가와 주사전자현미경을 통한 형태학적 분석을 수행하였음

(시험 3) 종균 생육조건 확립

가. 최종 선발된 효모와 초산균을 온도(15~35℃), pH(2~7), 초기 에탄올(5~10%), 초기 초산농도(0.2~4.0%) 조건을 달리하여 생균수와 산도, 알코올 함량을 측정하여 최적 생육조건을 확립하였음

(시험 4) 종균 보관조건 확립

가. 시험 3에서 확립된 최적 생육조건에서 배양된 초산균을 액상형과 분말형으로 제조하여 저장 온도는 4℃, -20℃, -70℃에서 1개월 마다 생균수를 측정하였음

(시험 5) 종균활용 발효식초 대량생산공정 개발

가. 머루, 다래, 현미를 이용하여 발효식초를 100 L 제조한 후, 0~6개월 동안 잔류알코올, 산도, 환원당, 색도를 분석하여 대량생산공정을 개발하였음

(시험 6) 발효·숙성기간별 대사체 분석

가. 머루식초, 다래식초, 현미식초를 1~6개월 동안 숙성하여 GC-TOFMS를 이용하여 대사체(당류, 아미노산류, 유기산류, 지방산류 등)를 분석하였음

(시험 7) 발효식초 생리활성 평가

가. 머루식초, 다래식초, 현미식초의 항산화활성, 항균활성, 총페놀함량 및 총플라보노이드함량, 지질과산화물 억제활성을 평가하였음

(시험 8) 음료형 발효식초 개발

가. 머루식초, 다래식초, 현미식초의 부재료(과실즙, 과실농축액, 곡물당화액 등)의 배합비를 달리하여 제조한 후, 전문패널 대상으로 관능평가를 실시하였음

(시험 9) 음료형 발효식초 품질지표 설정

가. 원료(머루, 다래, 현미), 부재료(청, 착즙액, 농축액), 중간제품(식초용 술, 식초), 완제품(음료 3종, 음료베이스 3종)의 산도, 색도, 갈변도, 일반세균수, 대장균군을 저장기간별로 측정하여 제품관리를 위한 품질지표의 규격을 설정하였음

(시험 10) 음료형 발효식초 유통기한 설정

가. 음료(3종)과 음료베이스(3종)를 가속실험을 통하여 남용온도 15°C, 35°C, 유통온도 25°C에 저장하여 산도, 색도, 일반세균수, 대장균군, 이취, 성상 등을 조사하여 식품의약품안전처 유통기한설정프로그램을 이용하여 유통기한을 설정하였음

5. 인용문헌

- Ha YD, Kim, KS (2000) Civilization history of vinegar. *Food Ind Nutr* 5(1): 1-6.
- Jeong YJ, Lee MH (2000) A view and prospect of vinegar industry. *Food Ind Nutr* 5: 7-12.
- Kang SK, Jang MJ, Kim YD (2006) Isolation and culture conditions of *Acetobacter* sp. for the production of citron (*Citrus junos*) vinegar. *Korean J Food Preserv* 13(3): 357-362.
- Kim DH (1999) Studies on the production of vinegar from fig. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 28(1):53-60.
- Kim YD, Kang SK, Kang SH (1996) Studies on the acetic acid fermentation using maesil juice. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 25(4): 695-700.
- Lee WJ, Kim SS (1998) Preparation of Sikhe with brown rice. *Korean J Food Sci Technol* 30(1): 146-150.
- Park HJ, Jeong SH, Yoon HH, Jung JH, Song JY (2014) Optimization of the acetic acid fermentation for aronia vinegar using response surface methodology. *Korean J Food Cook Sci* 30(6): 792-799.
- 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 Sci Nutr* 23(4): 666-670.
- Yoon HN (1998) Simultaneous gas chromatographic analysis of ethanol and acetic acid in vinegar. *Korean J Food Sci Technol* 30(6): 1247-1251.

Yim EJ, Jo SW, Lee ES, Park HS, Ryu MS, Uhm TB, 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(1): 108–118.

Yi MR, Hwang JH, Oh YS, Oh HJ, Lim SB (2014) Quality characteristics and antioxidant activity of immature *Citrus unshiu* vinegar. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 43(2): 250–257.

6. 연구결과 활용

연도(연차)	활용방안	제 목
2015(1년)	학술발표	고유기산 생성 신규 초산균 분리 및 동정
2016(2년)	학술발표	<i>Acetobacter pasteurianus</i> AFY-4 균주 특성
	학술발표	<i>Gluconobacter oxydans</i> GV30-1 균주 특성
	균주기탁	초산균 균주 기탁 5건
2017(3년)	학술발표	<i>Acetobacter pasteurianus</i> AFY-4 전장유전체 특성
	특허출원	종균을 이용한 발효식초 제조방법
	균주기탁	<i>Acetobacter pasteurianus</i> AFY-4 균주기탁
	홍 보	종균을 이용한 음료형 발효식초
2018(4년)	논문게재	종균을 이용한 ○○발효식초의 초산발효 최적화
	홍 보	지역특산작목 및 종균을 이용한 발효식초

성과지표명		연도		1년차(2015)		2년차(2016)		3년차(2017)		4년차(2018)		계	
		목표	실적	목표	실적	목표	실적	목표	실적	목표	실적	목표	실적
논문 게재	SCI	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	비SCI	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1
특허	출원	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	1	1
	등록	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
학술 발표	국제	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	1	1
	국내	1	1	1	1	1	1	-	-	-	-	3	3
홍보		-	-	-	-	1	1	1	1	1	1	2	2
생물자원기탁		-	-	5	5	-	1	-	-	-	-	5	6
계		1	1	7	7	3	4	2	2	2	2	13	14

7. 연구원

구분	소속	직급	성명	수행업무	참여년도			
					'15	'16	'17	'18
과제책임자	농업법인 부일농산	대표	홍진호	과제 총괄	○	○	○	○
2세부책임자	농식품연구소	농업연구사	이하연	세부주관 수행	○	○	○	○
공동연구자	농식품연구소	농업연구관	안문섭	시험수행 및 평가	○	○	-	○
	"	농업연구사	권혜정	품질조사 지원	○	○	○	○
	"	"	박지선	"	○	○	○	○
	"	공업서기	최병철	"	○	○	○	○
	"	공무직	고윤지	시험수행	○	○	○	○