

## Two Stage 발효에 의한 고산도 식초 생산

이영철\* · 이금용 · 김형찬 · 박기범 · 유의제 · 안평욱 · 최춘언 · 손세형  
오뚜기식품 중앙연구소

## Production of High Acetic Acid Vinegar Using Two Stage Fermentation

Lee, Young-Chul\*, Geum-Yong Lee, Hyung-Chan Kim, Kee-Buem Park  
Yik-Je Yoo, Peong-Ug Ahn, Chun-Un Choi and Se-Hyung Son  
*Ottogi Research Center, Anyang, Kyonggi-Do 430-070, Korea*

**Abstract** — The production of vinegar containing 16.0~18.0% of acetic acid was examined in two stage fermentation consisting of semi-continuous and fed-batch type. The optimum conditions were obtained when the fermentation was carried out at agitation of 600 rpm, aeration of 0.1 vvm and temperature of 30°C. The initial and residual ethanol concentration in 1st stage were 50.0 g/l and 5.0 g/l, respectively, and the ethanol concentration in 2nd stage was maintained from 5.0 to 10.0 g/l. The maximum productivity was 3.3 g/l-hr and the acidity was 17.6% after the two days of acetic acid fermentation.

산업적인 식초 생산방법에는 크게 surface culture와 submerged culture가 있는데(1), 주로 submerged culture를 이용한 반연속식 혹은 연속식 발효 방법으로 식초를 생산하고 있다. 최근에 식초의 연속적인 생산을 위한 연구가 활발히 이루어지고 있으며, 여기에는 초산균을 calcium alginate gel(2, 3), κ-carrageenan gel(4), cotton fabrics(5), hollow fiber(6, 7) 및 세라믹(8) 등의 담체로 고정화하는 방법, twin bioreactor에 의해 알코올과 초산을 동시에 연속적으로 발효하는 방법(9, 10) 등이 있는데, 특히 유(2) 등은 초산균 고정화법이 free cell culture에 비하여 초산 생산성이 높았다고 보고했다.

그러나 이러한 방법으로 생산한 식초의 최종 산도는 대부분 5.0~7.0% 정도이며, 그 이상의 산도를 갖는 식초를 생산하고자 할 경우에는 발효에 의해 생성되는 초산에 의해 초산균의 생육이 억제되고 따라서 초산 생성속도도 감소하게 되므로(11), 고정화 초산균에 의한 고산도식초의 산업적인 생산은 불가능한 것으로

알려져 왔다.

한편 Maselli(12) 등은 반연속식과 회분식이 조합된 pilot 규모의 초산발효를 수행하되, 여과한 초산균체를 그 중간 단계에 첨가하여 cell density를 증가시킴으로써 결과적으로 산도가 18.0% 이상의 고산도 식초를 생산할 수 있었다고 보고하였으나, 여기에는 막대한 경비가 소요되고 공정도 복잡하므로 산업적으로는 이용이 불가능하다.

따라서 본 연구에서는 산도가 17.0% 이상인 고산도 식초의 산업적 생산을 위한 공정 개발을 목적으로 1st stage에서는 일반적인 반연속식 초산 발효를 진행시키고 2nd stage에서는 1st stage로부터 이송된 초산 발효액에 에탄올을 유가식으로 첨가하여 초산균에 대한 기질 저해작용을 해소하고 초산생산성의 저하를 막는 일련의 two stage 초산 발효를 실시하였던 바, 그 결과를 보고하고자 한다.

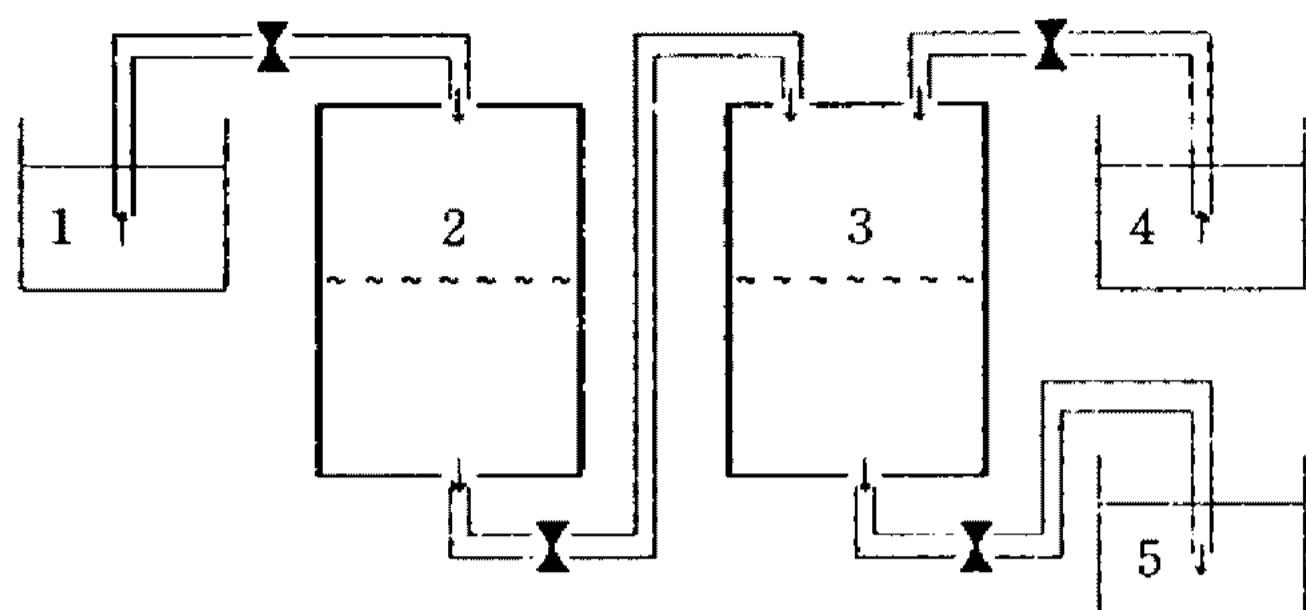
### 재료 및 방법

#### 사용균주 및 배지

당 연구소에 보관 중인 *Acetobacter aceti* OLS-001을

Key words: Vinegar production, two stage fermentation, high acetic acid vinegar

\*Corresponding author



**Fig. 1. Schematic diagram for two stage acetic acid fermentation.**

1: Culture medium, 2: 1st fermentor, 3: 2nd fermentor,  
4: Ethanol reservoir, 5: Acetic acid output

사용하였고 0.22% glucose, 0.02% yeast extract, 0.14%  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , 0.002%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 를 함유한 배지를  $121^\circ\text{C}$ 에서 20분간 살균하여 사용하였는데, 배지 성분 중에 포함되는 초산(산도 10.0%)과 에탄올은 살균된 배지를  $60^\circ\text{C}$ 로 냉각한 후에 각각 20.0%와 4.0%씩 첨가하여 제조하였다.

### Two stage 초산 발효 설계

Two stage에 의한 초산 발효는 Fig. 1에서 보는 바와 같이 working volume 8l의 발효조(Korea fermentor Co. LTD) 2대를 연결하여 구성하였다.

즉 이러한 발효조들에 의해 1st stage에서는 초산 발효가 반연속적으로 수행되며, 2nd stage에서는 전 단계로부터 이송받은 초산 발효액에 기질인 에탄올을 유가식으로 공급함으로써 초산 발효가 완료되도록 설계하였다.

### 발효액의 성분 분석

발효액 중의 산도는 시료 5.0 ml를 중류수로 희석하고 1.0% phenolphthalein 지시약을 가한 후 0.1 N NaOH 용액으로 적정하고 초산으로 환산하여 계산하였으며, 에탄올 농도는 gas chromatography(Shimadzu GC-8A)를 이용하였는데, 내부 표준물질로는 2.0% butanol을 사용하였고 이때의 분석조건은 Table 1과 같다.

### 배양조건

접종용 균주의 배양은 300 ml baffle flask에 50 ml의 배지 용액을 만들어 살균 후 백금이로 균을 접종하여 회전식 진탕배양기(Lab-line Instruments Inc., 미국)로 200 rpm,  $30^\circ\text{C}$ 에서 48시간 배양 하였다.

본 배양은 working volume 8l의 발효조에 배지용

**Table 1. Conditions of gas chromatography**

Packing material: FAL-M 10%
Support: Shimalite TPA
Column: Stainless steel ( $3.0\text{ mm} \times 2.0\text{ m}$ )
Injection temp.: $150^\circ\text{C}$
Column temp.: $90^\circ\text{C}$
Detector: FID

액을 만들어 살균 후 균주 배양액 5.0%를 접종하고, 600 rpm, 0.1 vvm,  $30^\circ\text{C}$ 에서 반연속적으로 48시간 배양하되 이러한 조작을 4~5회 반복한 후 two stage 중 1st stage에서의 초산발효 배양액으로 사용하였다.

### 결과 및 고찰

#### 1st stage에서 초산 발효에 미치는 기질농도의 영향

초산발효시 기질인 에탄올은 대사산물인 초산과 함께 초산 생산성에 큰 영향을 미치는데, 주로 초산 균의 생육을 억제하는 것으로 알려져 있다.

Fig. 2는 1st stage에서 초산생산성에 미치는 초기 에탄올의 농도를 나타낸 것인데, 에탄올농도가 30.0 g/l에서 50.0 g/l로 증가함에 따라 초산 생산성은 2.7 g/l·hr로 거의 일정하였으나 에탄올 농도가 50.0 g/l 이상이 되었을 때에는 초산 생산성이 급격히 감소하였다. 이는 초산균에 대한 에탄올의 저해작용에 기인하며, 박(11) 등의 결과와 일치한다.

Fig. 3은 반연속 발효시 전단계 발효에서의 잔류 에탄올 농도에 따른 다음 단계에서의 초산 생산성을 나타낸 것으로, 에탄올 농도가 8.0 g/l에서부터 5.0 g/l로 감소함에 따라 초산생산성은 3.2 g/l·hr로 거의 일정하였으나, 5.0 g/l 이하로 되었을 때에는 초산생산성이 급격히 감소하였다. 이는 반연속 발효시 초산균에 의해 소비되는 에탄올 농도가 5.0 g/l 이하로 낮아짐에 따라 초산균의 생육에 지장을 초래하여 생산성도 감소하게 되는 것이다(13).

따라서 two stage에 의한 초산 발효시 초산 생산성을 최대로 하기 위해 먼저 1st stage에서의 초기 에탄올 농도를 50.0 g/l 이하로 유지하고 발효 완료시 발효액 중의 잔류 에탄올 농도를 5.0 g/l 이상으로 유지하였다.

#### 1st stage에서의 반연속식 초산 발효

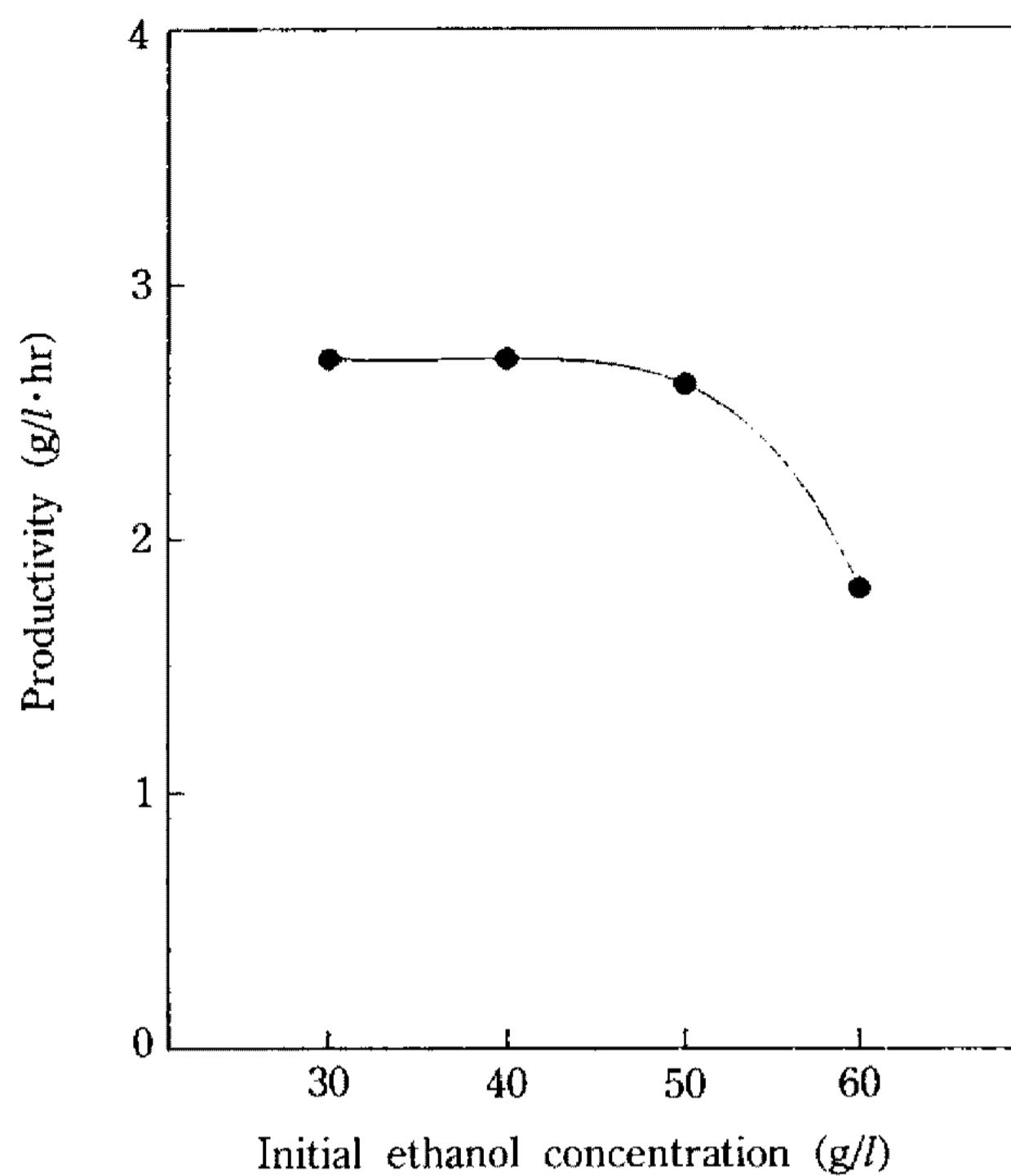


Fig. 2. Effect of initial ethanol concentration on the productivity of acetic acid in 1st stage fermentation.

Fig. 4는 앞에서 결정한 1st stage에서의 기질 농도 조건인 초기 에탄올 농도 50.0 g/l, 잔류 에탄올 농도 5.0 g/l로 반연속식 초산 발효를 실시했을 때의 산도 및 에탄올 농도의 변화와 및 초산 생산성의 변화를 나타낸 것이다.

에탄올 농도가 50.0 g/l에서 5.0 g/l로 감소함에 따라 산도와 초산생산성은 증가하였고 이때의 최대 초산 생산성은 약 2.7 g/l·hr였다. 따라서 이러한 조건으로 초산 발효를 수행할 경우 초산 생산성의 감소없이 연속적인 식초의 생산이 가능하였다.

#### 2nd stage에서 초산 발효에 미치는 기질농도의 영향

Fig. 5는 2nd stage에서 유가식으로 에탄올을 공급하면서 초산발효를 실시하였을 때 에탄올 농도에 따른 산도의 증가를 나타낸 것인데, 초기 산도가 14.0%에서 발효조내의 에탄올 농도를 5.0에서 10.0 g/l로 유지했을 때 초산 생성이 가장 높았다.

따라서 two stage에 의한 초산 발효시 2nd stage에서의 에탄올 농도를 5.0에서 10.0 g/l로 계속 유지하는 것이 고산도 식초의 생산에 적당하였다.

#### Two stage 초산 발효

고산도 식초 생산을 위한 two stage 발효시 시간의

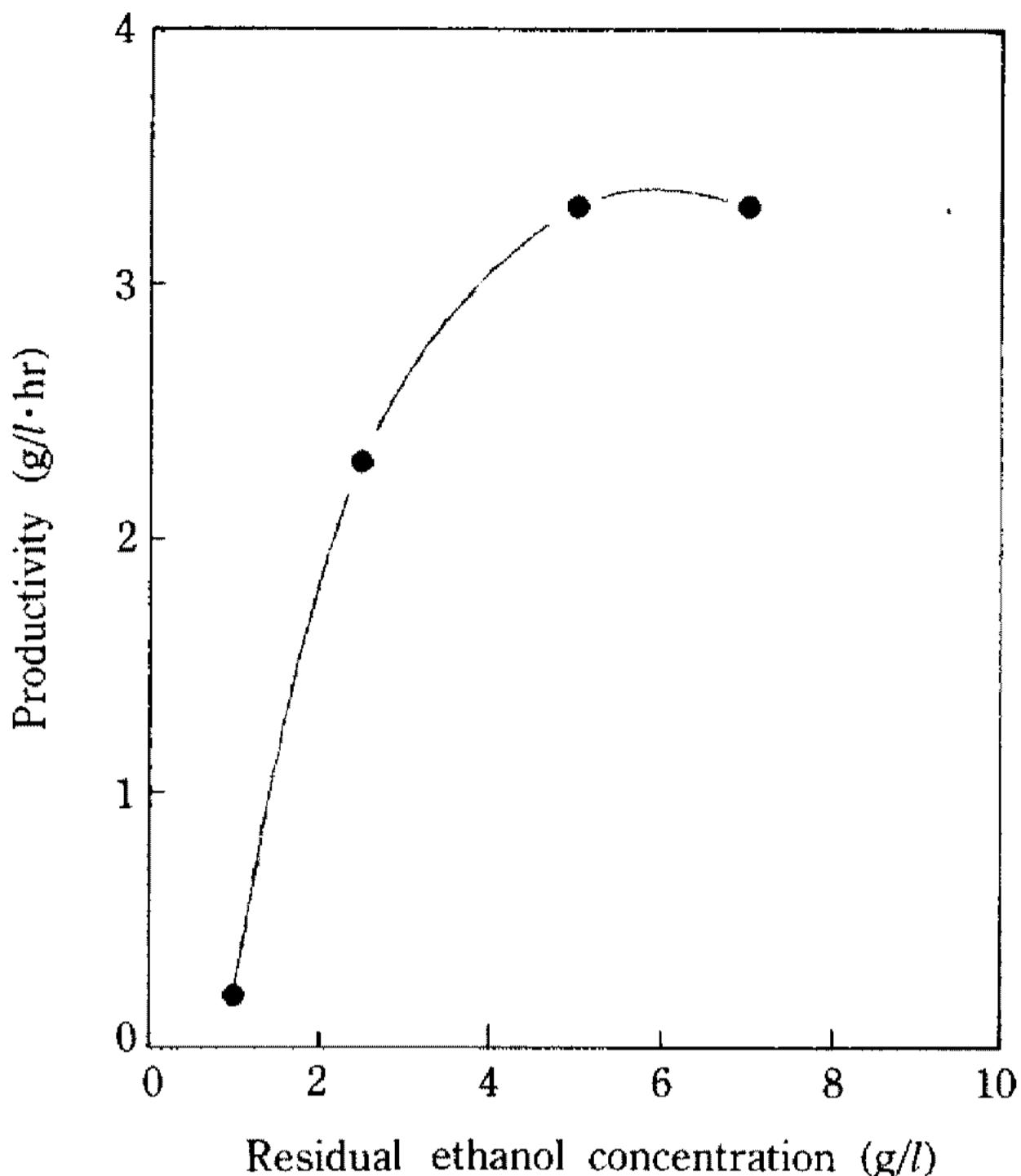


Fig. 3. Effect of residual ethanol concentration on the productivity of acetic acid in semicontinuous fermentation.

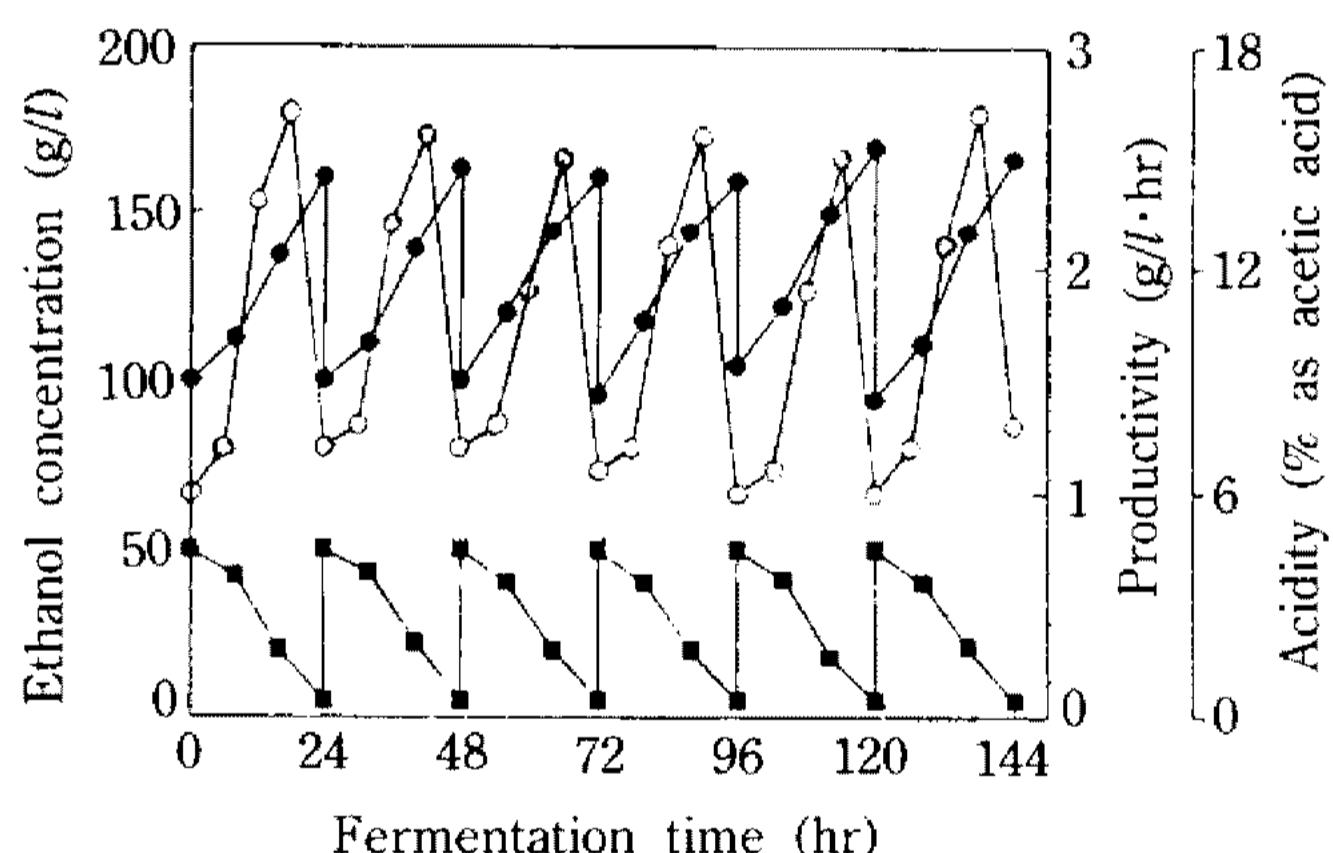
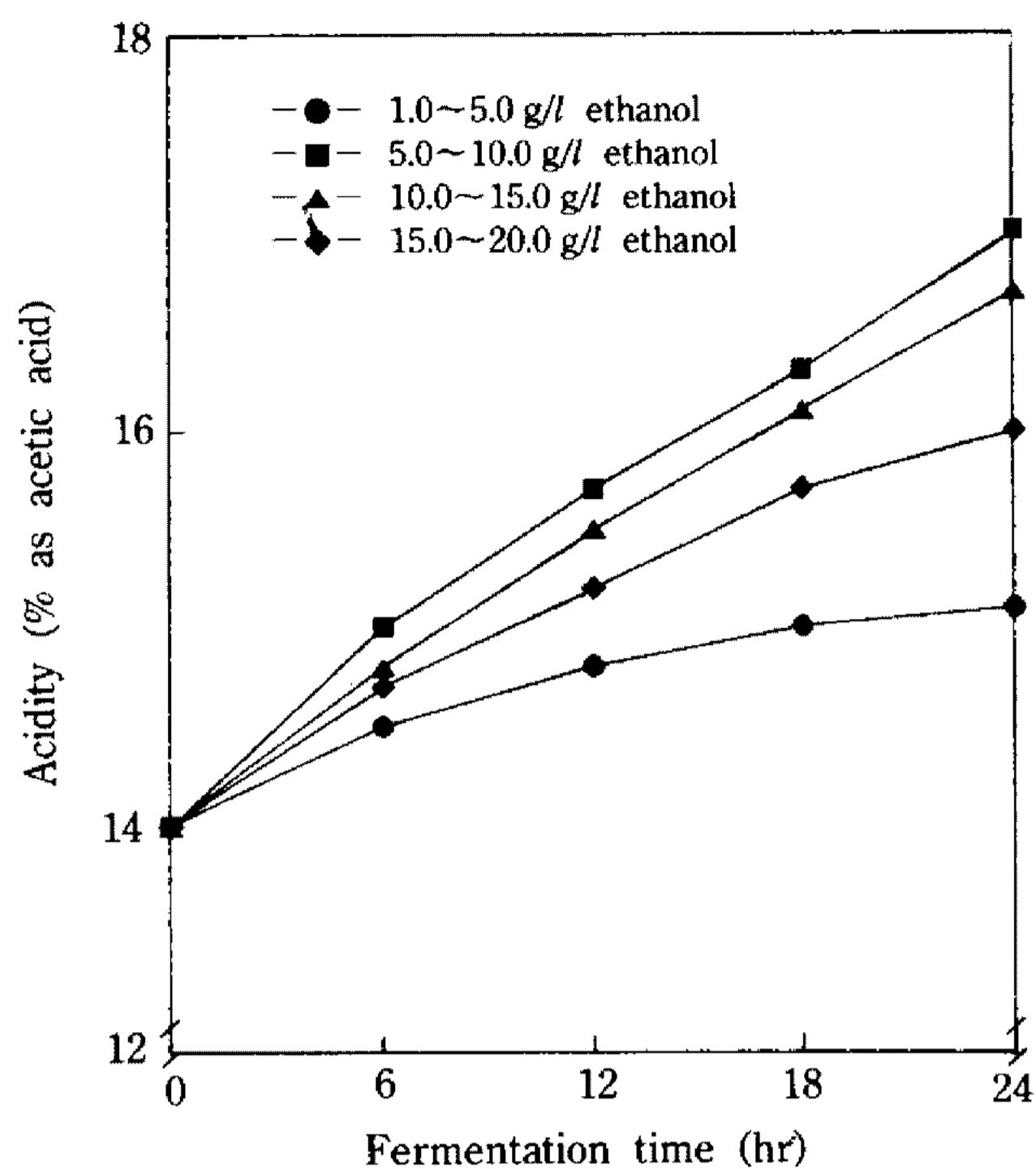


Fig. 4. Profiles of ethanol concentration, acidity and productivity during semi-continuous acetic acid fermentation.

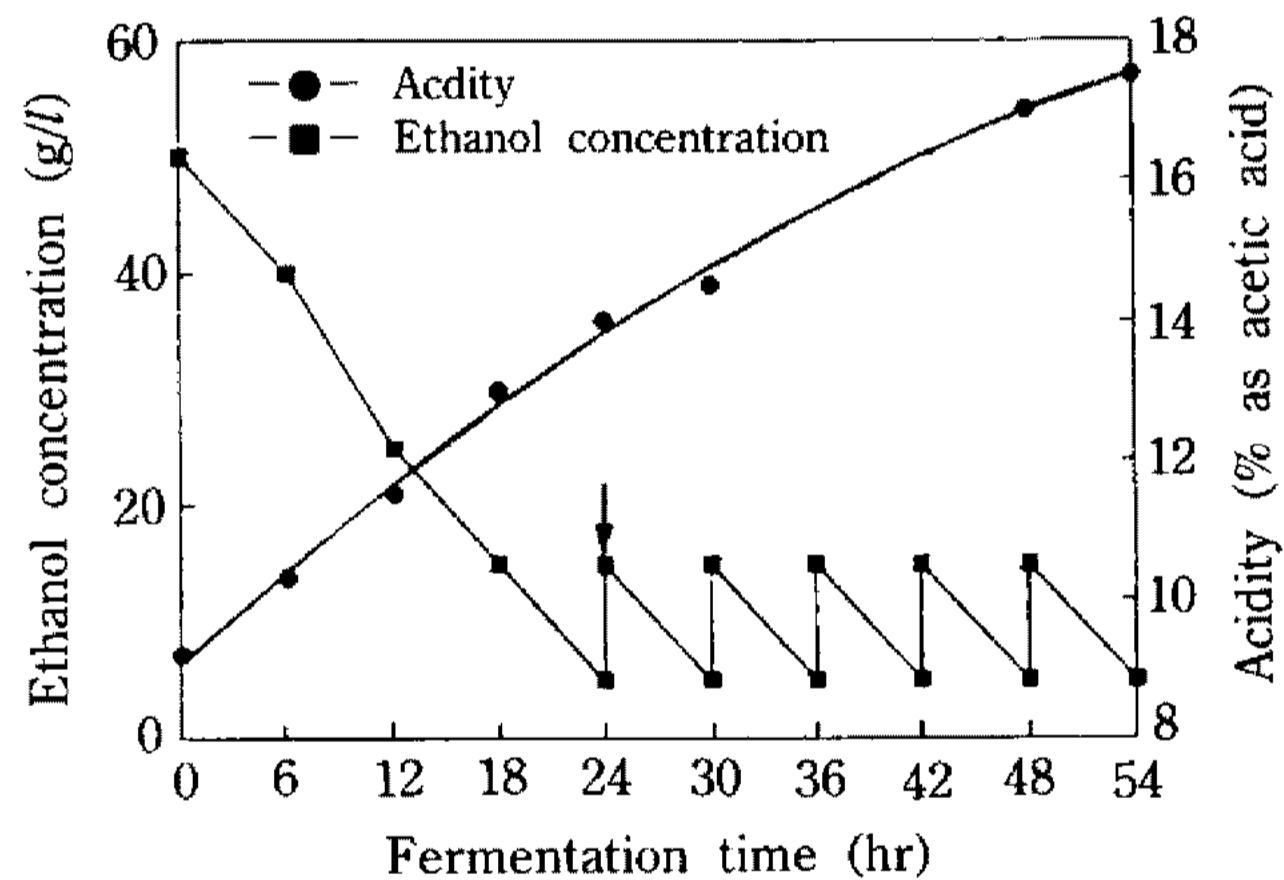
Symbols; —■—, ethanol concentration, —○—, productivity; —●—, acidity

경과에 따른 에탄올 농도 및 산도의 변화를 살펴본 결과 Fig. 6과 같았다.

Two stage에 의한 초산발효 중 1st stage의 최종 산도는 14.0%였고 이때의 잔류 에탄올 농도는 5.0 g/l였으며 2nd stage의 에탄올 농도가 5.0 g/l에서 10.0 g/l로 유지되도록 에탄올을 유가식으로 첨가함에 따라 초산균에 대한 기질의 저해작용이 해소되고 또한 높은 초산 농도에 대한 초산균의 저항성도 증가하게 되어



**Fig. 5. Effect of ethanol concentration on the acidity in 2nd stage fermentation.**



**Fig. 6. Profiles of ethanol concentration and acidity during two stage acetic acid fermentation.**  
Arrow indicates the start of 2nd stage.

(14, 15), 이러한 2단계의 초산 발효가 48시간을 경과한 후에는 산도가 17.6%인 고산도 식초를 생산할 수 있었다.

한편 이때의 최대 초산생산성은  $3.3 \text{ g/l} \cdot \text{hr}$ 였는데, 초산균 고정화법을 이용한 Sun(3) 등의 결과보다 2.5배 높은 수치였다.

## 요약

산업적으로 산도 17.0% 이상의 고산도 식초를 생

산하기 위하여 반연속식인 1st stage와 유가식인 2nd stage로 구성된 two stage 초산 발효를 온도  $30^\circ\text{C}$ , 교반속도 600 rpm, 통기량 0.1 vvm에서 실시하였다.

1st stage에서 초기 에탄올 농도를  $50.0 \text{ g/l}$ , 잔류 에탄올 농도를  $5.0 \text{ g/l}$ 로 정하여 반연속적으로 초산발효를 하고, 2nd stage에서 발효시간의 경과에 따라 에탄올을 유가식으로 첨가하여 초산발효액내의 에탄올 농도를  $5.0 \text{ g/l}$ 에서  $10.0 \text{ g/l}$ 로 유지했을 때 산도가 17.6%인 고산도 식초를 생산할 수 있었으며, 또한 이때의 최대 초산 생산성은  $3.3 \text{ g/l} \cdot \text{hr}$ 였다.

## 참고문헌

- Crueger, W. and A. Crueger. 1984. *Biotechnology*. Pp. 122-124. Science Tech., Madison.
- Yoo, Y.J., K.M. Park, Y.W. Ryu and C.U. Choi. 1990. Vinegar production by *Acetobacter aceti* cell immobilized in calcium alginate. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **5**: 167-173.
- Sun, Y. and S. Furusaki. 1990. Continuous production of acetic acid using immobilized *Acetobacter aceti* in a three-phase fluidized bed bioreactor. *J. Ferment. Bioeng.* **69**: 102-110.
- Osuga, J., A. Mori and J. Kato. 1984. Acetic acid production by immobilized *Acetobacter aceti* cell entrapped in a  $\kappa$ -carrageenan gel. *J. Ferment. Technol.* **62**: 139-149.
- Yamashita, S., S. Ohta and H. Suenaga. 1991. Production of kiwi fruit and persimmon vinegar using *Acetobacter aceti* cells fixed on woven cotton fabrics. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* **38**: 608-613.
- Nanba, A., K. Kimura and S. Nagai. 1985. Vinegar production by *Acetobacter rancens* cells fixed on a hollow filter module. *J. Ferment. Technol.* **63**: 175-179.
- Park, Y.S., H. Otake, M. Fukaya, H. Okumura, Y. Kawamura and K. Toda. 1989. Enhancement of acetic acid production in a high cell-density culture of *Acetobacter aceti*. *J. Ferment. Bioeng.* **68**: 315-319.
- Takada, M. and T. Hiramitsu. 1991. Continuous production of vinegar using bioreactor with supports of porous ceramics. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* **38**: 967-971.
- Saeki, A. 1991. Production of rice vinegar from uncooked rice bran by a parallel combined process consisting of saccharification, ethanol fermentation and acetic acid fermentation. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* **38**: 418-421.

10. Saeki, A. 1991. Continuous vinegar production using twin bioreactors made from ethanol fermentor and acetic acid fermentor. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* **38**: 891-896.
11. Park, Y.S., H. Otake, M. Fukaya, H. Okumura, Y. Kawamura and K. Toda. 1989. Effect of dissolved oxygen and acetic acid concentrations on acetic acid production in continuous culture of *Acetobacter aceti*. *J. Ferment. Bioeng.* **68**: 96-101.
12. Maselli. 1984. Combination semicontinuous and batch process for preparation of vinegar. *U.S. Patent*. No. 4,456,622.
13. Yano, T., M. Kurokawa and Y. Nishizawa. 1991. Optimum substrate feed rate in fed-batch culture with the DO-stat method. *J. Ferment. Bioeng.* **71**: 345-349.
14. Brock, T.D., and M.T. Madigan. 1988. *Biology of Microorganisms*, Pp. 738-739. Prentice Hall.
15. Kittelmann, M., W.W. Stamm, H. Follmann and H.G. Trüper. 1989. Isolation and classification of acetic acid bacteria from high percentage vinegar fermentations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **30**: 47-52.

(Received September 19, 1992)