

## 고농도 에탄올내성 초산균의 개발 및 배양특성

박권삼 · 장동석<sup>†</sup> · 조학래\* · 박옥연

부산수산대학교 식품공학과

\*동의공업전문대학 식품공학과

### Investigation of the Cultural Characteristics of High Concentration Ethanol Resistant *Acetobacter* sp.

Kwon-Sam Park, Dong-Suck Chang<sup>†</sup>, Hak-Rae Cho\* and Uk-Yeon Park

Dept. of Food Science and Technology, National Fisheries University of Pusan, Pusan 608-737, Korea

\*Dept. of Food Technology, Donggeui Technical Junior College, Pusan 614-053, Korea

#### Abstract

To increase the yield of acetic acid production, the author developed the bacterial strain which could grow well in high concentration of ethanol from the seed culture using in conventional vinegar production factory. By attenuation of the isolated strain in the broth media containing 5~10% ethanol, we could get the strain which could grow in the broth medium containing 10% ethanol. This strain was identified and named as *Acetobacter* sp. FM-10, and it's cultural characteristics were also investigated. The medium containing 10% ethanol, 5% glucose and 1% yeast extract was suitable for the acetic acid production with *Acetobacter* sp. FM-10. Optimum temperature and pH for the growth of *Acetobacter* sp. FM-10 were 30°C and 5.0, respectively. The acidity of culture medium was reached to 9.0% after 20 days static cultivation at 30°C.

Key words : *Acetobacter* sp., acetic acid, vinegar

#### 서 론

식초는 에탄올 및 당을 초산발효시켜 얻은 발효액으로써 총산이 초산으로써 4.0~15.0 w/v%인 것<sup>1)</sup>을 말한다. 에탄올은 초산균의 발효기질로 이용되나 초산균은 에탄올 농도가 높을수록 사멸현상이 일어날 뿐 아니라 대사 중간 생성물에 의한 발효억제현상<sup>2,3)</sup>도 나타난다. 또한 초산균은 절대 호기성이기 때문에 균이 증식함에 따라 균막을 형성함으로써 미생물의 호흡활성을 저해하게 된다. 이러한 저해 요인을 방지하고 호소활성을 증진시키려는 연구로서 Hanssan과 Robinson<sup>4)</sup>의 기계적인 교반과 Ho 등<sup>5)</sup>의 air lift fermentation방법 등이 있으며, 유기약품 첨가에 의한 발효효율 증진에 관한 연구로는 acetic acid와 에탄올 첨가에 의한 초산균 증식의 상승효과에 관한 Akira 등<sup>6)</sup>의 보고가 있으나 고농도 에탄올 내성균의 개발과 개발균주에 의한 초산발효에

관한 연구는 그다지 많지 않다. 그러므로 고농도의 에탄올에서 증식이 가능하고 발효속도가 빠른 균주를 개발한다면 경제적이고 효율적인 양조 식초생산을 기대할 수 있을 것이다.

한편 재래식 식초의 생산방식은 발효 종료액을 1/3~1/4 가량 남겨 이를 다음 발효시에 종초로 이용하기를 반복하고 있다. 이렇게 장기간 동안 반복 사용된 종초에는 초산균 뿐 아니라 각종 불필요한 세균도 증식하게 되지만 고농도에서 증식 가능한 초산균을 활용하면 잡균의 발육을 쉽게 억제할 수 있다.

따라서 본 연구에서는 고농도의 초산을 생산하기 위하여 재래식 식초 생산공장의 종초로부터 에탄올이 10% 첨가된 배양액에서 증식 가능한 초산균을 에탄올 순양법으로 개발·분리하였고 이 균의 배양특성에 대하여 조사한 결과를 보고하고자 한다.

<sup>†</sup>To whom all correspondence should be addressed

재료 및 방법

시료

재래식 발효방식을 이용하여 식초를 생산하는 경남 소재 S사의 종초를 사용하였다.

사용배지

초산 생산균 분리용 평판배지는 표준배지 (yeast extract, 1% ; glucose, 5% ; CaCO<sub>3</sub>, 3% ; agar, 2.5%)<sup>7)</sup>에 ethanol이 2% 함유된 배지를 사용하였으며, 초산 생산용 액체배지는 yeast extract 1%, glucose 5%가 함유된 배지에 ethanol을 농도별로 첨가하여 사용하였으며, 이때 배지의 최초 pH는 6.0이었다.

고농도 에탄올 내성 초산균의 개발

에탄올 농도가 0.5% 간격으로 5~10%가 되도록 각각 첨가된 초산 생산용 배지 50ml당 종초를 1 drop씩 접종하여 30°C에서 정치배양하였다. 증식이 일어난 flask 중에서 가장 에탄올 농도가 높은 곳에서 자란 배양액을 다시 그 보다 에탄올 농도가 높은 배지에 접종하기를 계속 반복해 나갔다. 최종적으로 증식이 일어난 flask 중에서 에탄올 농도가 가장 높은 flask의 배양액을 초산균 분리용 평판배지에 희석배양하여 colony주위에 투명한이 형성된 균을 분리해 내었다. 위의 방법으로 순양하여 분리한 균을 다시 10% 에탄올이 함유된 초산 생산용배지에 접종하여 균의 증식유무를 확인하였다.

분리균의 동정

분리균의 형태 및 생화학적 특성은 Mac Faddin<sup>8)</sup>의 방법에 준하였으며, 균의 동정은 Krieg와 Holt의 방법<sup>7)</sup>에 따라 실시하였다.

증식도 측정

진탕배양시의 균 증식도는 spectrophotometer (Shimadzu : UV-160)를 사용하여 배양액의 흡광도 (540nm)로 나타내었으며, 정치배양의 경우에는 건조 균체량으로 나타내었다.

산도 측정

산도측정은 phenolphthalein용액을 지시약으로 하여 0.1N NaOH 표준용액으로 중화적정하고 초산으로 환산하여 나타내었다.

결과 및 고찰

균주의 순양 및 분리

에탄올 농도를 0.5% 간격으로 5~10%가 되게 각각 만든 초산 생산용 배지에 종초를 접종하여 배양하였다. 배양 4일만에 에탄올 5.0%와 5.5%까지 함유한 배지에서 균의 증식에 의한 혼탁이 나타났으며, 이 때 배양액의 pH는 3.0 부근으로 저하되어 있었으므로 flask 내에 산생성균의 증식이 일어났음을 알 수 있었다. 그러나 그 이상의 에탄올 농도의 배지에서는 증식이 일어나지 않았다. 그래서 6% 이상의 에탄올 함유 초산 생산용배지를 새로 만들어 에탄올 5.5% 함유 배지의 배양액을 이들 배지에 새로이 접종하여 배양하였다. 이런 방식으로 순양을 거듭해 나간 결과, 에탄올 6%의 배지에서 증식이 일어나기까지는 5일, 7.5%는 15일, 8.5%는 21일, 10% 배양액에서는 42일 만에 균의 증식이 일어났다 (Table 1). 따라서 10% 에탄올을 함유하는 배지의 배양액을 초산균 분리용 평판에 희석배양하여 독립 colony를 분리해 내었으며, 분리한 균 중에서 초산 생성속도가 빠르고, 배양액의 향미가 우수한 균을 공시균으로 최종적으로 선정하였다.

Table 1. Required time (days) for attenuating the cultural seed in the broth medium<sup>1)</sup> containing various concentrations of ethanol

Code of attenuation	Concentration of ethanol (%)										
	5.0	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0	9.5	10.0
1st	4 <sup>2)</sup>	4	NG <sup>3)</sup>	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG
2nd	.	.	1	4	8	NG	NG	NG	NG	NG	NG
3rd	.	.	.	.	.	3	5	NG	NG	NG	NG
4th	.	.	.	.	.	.	.	4	9	13	NG
5th	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	12

<sup>1)</sup>Broth medium composition : 5% glucose, 1% yeast extract and ethanol

<sup>2)</sup>Required time (days) for attenuating

<sup>3)</sup>No growth

### 분리균주의 동정

분리균의 형태 및 각종 생화학적 특성을 조사한 결과, ethanol을 산화하여 acetic acid를 생산하는 Gram 음성 간균으로서 catalase 생성능, 운동성, lactate 및 acetate 산화능에 있어서는 양성반응을 나타내었으나, oxidase 생성능, 유화수소 생성능, indole 생성능, gelatin 액화능은 없었으며, 탄소원으로 ethanol과 mannitol을 이용할 수 있고, 5% ethanol을 포함한 배지에서 증식이 잘 되었다. 그리고 식염내성과 탄소원, 질소원 이용능 등을 검토한 결과(Table 2), *Acetobacter*속으로 동정되었으나 정확한 species는 알 수 없었다. 따라서 이 균주를 *Acetobacter* sp. FM-10으로 명명하였다.

Table 2. Characteristics of the isolated high concentration ethanol resistant *Acetobacter* sp. FM-10

Test	FM-10
Gram reaction	-
Cell morphology	rod
Catalase	+
Oxidase	-
Motility	+
Oxidation of	
Ethanol into acetic acid	+
Lactate into CO <sub>2</sub> and H <sub>2</sub> O	+
Acetate into CO <sub>2</sub> and H <sub>2</sub> O	+
H <sub>2</sub> S production	-
Indole production	-
Hydrolysis of gelatin	-
Growth on carbon sources :	
Ethanol	+
Methanol	-
Mannitol	+
Dulcitol	-
Dextrin	-
Raffinose	-
Na-Acetate	+
D-Galactose	±
L-Arabinose	±
Growth on	
SM medium	
+0.5% NaCl	+
+1.0% NaCl	+
+2.0% NaCl	-
+5.0% Ethanol	+
+10.0% Ethanol	+(After attenuated)
Nutrient broth	-
Growth on single L-amino acids	
as sole source of nitrogen :	
L-Glycine	-
L-Lysine	-
Growth in the presence of dyes :	
0.001% Malachite green	+
0.0001% Crystal violet	+

### 증식 최적온도 및 pH

*Acetobacter* sp. FM-10의 증식 최적 온도를 조사하기 위하여 에탄올이 2% 첨가된 Glucose-Yeast extract basal medium (pH 6.0)에 분리균주를 접종하여 5°C 간격으로 20~40°C의 온도범위에서 24시간 진탕배양(100 rpm)한 다음 균의 증식도를 흡광도로 살펴본 결과, Fig. 1에서와 같이 30°C에서 최대의 증식도를 나타내었다. 또한 균의 증식정도는 20°C에서와 40°C에서 비슷한 경향을 나타내고 있으나, 25°C에서는 35°C에서 보다 균의 증식이 훨씬 양호하였으며 30°C 보다 온도가 높아지면 증식율은 급격히 감소하는 경향을 나타내고 있었다. 분리균주의 증식 최적 pH를 조사하기 위

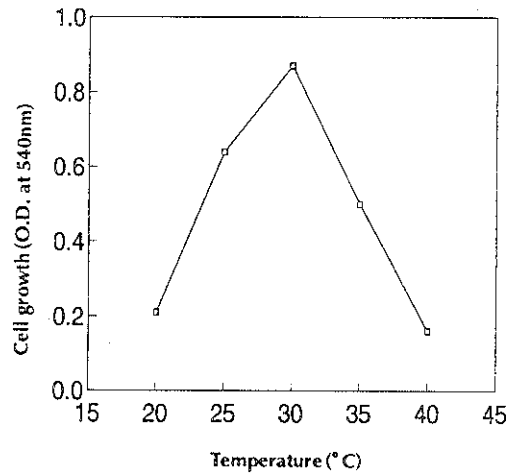


Fig. 1. Effects of temperature on the growth of *Acetobacter* sp. FM-10 for 24hr.

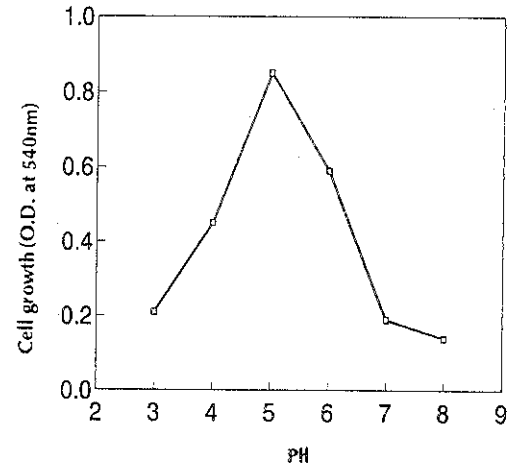


Fig. 2. Effects of pH on the growth of *Acetobacter* sp. FM-10 at 30°C for 24hr.

하여 30°C에서 24시간 진탕배양(100rpm)한 다음 균의 증식도를 흡광도로 살펴본 결과, Fig. 2와 같이 증식 최적 pH는 5.0 부근이었으며, pH 3.0 이하에서와 7.0 이상에서는 증식속도가 현저하게 저하되었고, pH 4.0에서 6.0 사이에서는 균의 발육이 양호하였다.

질소원의 영향

배지에 첨가한 질소원의 종류별로 균 증식도 및 산 생성능을 비교한 결과는 Table 3과 같다. 포도당과 에탄올을 각각 5% 첨가한 배지에 yeast extract, malt extract, peptone, casamino acid, soybean meal, urea, ammonium sulfate를 각각 1%씩 첨가하여 조제한 배지에 공시균을 접종하여 30°C에서 4일간 정치배양한 다음 균체량 및 산도값을 비교해 본 결과, 1% yeast extract

Table 3. Effect of nitrogen sources on the productions of cell mass and acetic acid by *Acetobacter* sp. FM-10

Nitrogen source	Conc.(%)	Cell mass (mg/100ml)	Acidity (%)
Yeast extract	1	89.3	3.42
Malt extract	1	10.2	0.11
Peptone	1	15.5	0.28
Casamino acid	1	9.8	0.09
Urea	1	7.5	0.03
Soybean meal	1	10.2	0.09
Ammonium sulfate	1	10.8	0.09

\*The strain was cultured at 30°C for 4 days in 5% ethanol and 5% glucose basal medium

Table 4. Effect of yeast extract concentration on the productions of cell mass and acetic acid by *Acetobacter* sp. FM-10

Conc. of yeast extract (%)	Cell mass (mg/100ml)	Acidity (%)
0.5	76.1	2.84
1.0	89.3	3.42
1.5	90.4	3.36
2.0	91.5	3.29
2.5	89.4	3.27
3.0	89.8	3.31

\*The strain was cultured same as in Table 3

Table 5. Effect of glucose concentration on the productions of cell mass and acetic acid by *Acetobacter* sp. FM-10

Conc. of Glucose (%)	Cell mass(mg/100ml)	Acidity(%)
0	76.7	2.35
1	88.5	3.53
2	89.9	3.32
3	98.6	3.39
4	89.2	3.49
5	93.3	3.57

\*The strain was cultured same as in Table 3

를 첨가한 경우 *Acetobacter* sp. FM-10은 균체량 및 산도가 각각 89.3mg/100ml, 3.42%였으며, 나머지 질소원들은 거의 이용하지 못하는 것으로 나타났다. 따라서 최적 질소원으로 선정된 yeast extract의 농도를 0.5% 간격으로 0.5~3.0% 까지 각각 달리하여 증식 최적농도를 조사해 본 결과, 0.5% 첨가구에서는 1% 첨가구 보다 균체량 및 산도가 낮은 것으로 나타났다. 1% 이상 첨가 반응구에서는 1% 첨가구 보다 균체량은 89.4~91.5mg/100ml로 다소 높은 경향을 나타내었으나, 산도는 오히려 1% 첨가구가 3.42%로 약간 높은 것으로 나타났다 (Table 4).

포도당 농도의 영향

Yeast extract 1%와 에탄올 5%를 첨가한 배지에 포도당 농도를 0%~5% 까지 1% 간격으로 각각 달리 첨가하여 30°C에서 4일간 정치배양하여 균체량 및 산도를 조사해 본 결과는 Table 5와 같다.

포도당 무첨가구에서의 균체량 및 산도는 각각 76.7mg/100ml, 2.35%였으나, 포도당의 농도가 증가함에 따라 균체량은 100ml당 88.5~98.6mg, 산도는 3.32~3.57% 까지 증가하는 경향을 나타내었다. 그러나 포도당 1% 이상의 첨가구에서부터는 균체량 및 산도가 일정하지는 않았으나, 5% 첨가구에서는 3.57%로 최고의 산도치를 나타내었다.

에탄올 농도의 영향

Yeast extract 1%와 포도당 5%가 함유된 배지에 에탄

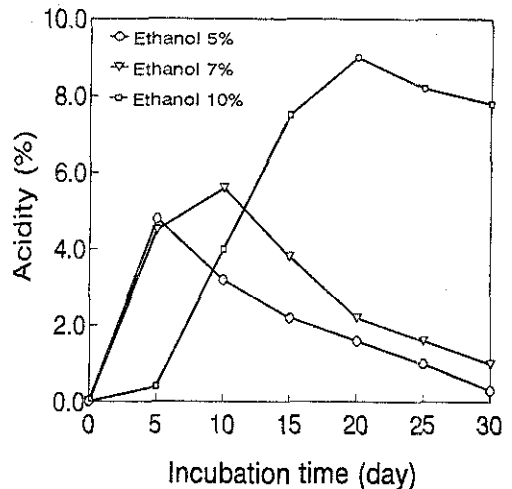


Fig. 3. Acetic acid production from *Acetobacter* sp. FM-10 by ethanol concentration during the incubation period at 30°C.

을 농도가 5%, 7%, 10% 되게 각각 첨가한 다음, 30°C에서 정치 배양하면서 배양경과에 따른 산도를 조사한 결과는 Fig. 3과 같다. 에탄올 5% 첨가구에서는 배양 5일만에 산도값이 4.8%에 도달하였으나, 이 후 생성된 초산이 산화분해되어 산도는 서서히 감소하였다. 에탄올 7% 첨가구에서는 배양 7일만에 최고 산도치인 6.8%에 도달한 다음 감소하였고, 10% 첨가구에서는 배양 10일 까지 초산의 생성은 ethanol 농도가 5% 및 7% 때 보다 나뉘었다. 배양 15일째에는 산도가 7.5%로 ethanol 농도가 낮을 때 보다 산 생성이 양호하였으며, 배양 20일째에는 최고 산도값인 9.0%에 도달하였다.

이상의 결과로 미루어 보아 *Acetobacter* sp. FM-10을 이용한 식초생산에는 에탄올 10%, 포도당 5%, yeast extract 1%가 함유된 배지를 이용하여 30°C에서 20일간 정치배양할 때가 가장 효과적이었다.

## 요 약

식초 생산의 수율을 높이기 위해 재래식 식초생산에 사용되고 있는 종초로부터 고농도의 에탄올에 내성을 나타내는 균주를 에탄올 순양법으로 개발해 내었다. 에탄올이 5~10% 첨가된 액체배지에 종초를 각각 가하여 에탄올 10%에서 증식이 가능한 균주를 순양 개시 42일 만에 분리해 내었고, 이를 동정하여 *Acetobacter* sp. FM-10이라고 명명하였으며, 이 균주의 배양 특성을 살펴본 결과는 다음과 같다. *Acetobacter* sp. FM-10의 증식 최적조건을 살펴본 결과, 최적온도는 30°C였으며, 최적 pH는 5.0이었다. 초산생산에 적합한 배지의

조성은 에탄올 10%, 포도당 5%, yeast extract 1%가 함유된 배지였다. 식초생산 최적조건은 에탄올이 10% 첨가된 배지를 이용하여 30°C에서 정치배양시 배양 20일만에 최고 산도인 9.0%에 도달하였다.

## 문 헌

1. 주병오 : 식품위생관계법규. 지구문화사, 서울, p. 531 (1992)
2. Romeo, J., Scherage, M. and Umbreit, W. W. : Stimulation of the growth and respiration of a methylotrophic bacterium by morphine. *Appl. Environ. Microbiol.*, **34**, 611 (1977)
3. Park, Y. S., Ohtake, H., Fukaya, M., Okumura, H., Kawamura, Y. and Toda, K. : Effect of dissolved oxygen and acetic acid concentrations on acetic acid production in continuous culture of *Acetobacter aceti*. *J. Ferment. Bioeng.*, **68**, 96 (1989)
4. Hanssan, I. T. M. and Robinson, C. W. : Oxygen transfer in mechanically agitated aqueous system containing dispersed hydrocarbon. *Biotech. Bioeng.*, **19**, 661 (1977)
5. Ho, C. S., Erickson, L. E. and Fan, L. T. : Modeling and stimulation of oxygen transfer in air lift fermentor. *Biotech. Bioeng.*, **19**, 1503 (1977)
6. Akira, N., Akihiro, T. and Shiro, N. : Synergistic effects of acetic acid and ethanol on the growth of *Acetobacter* sp. *J. Ferment. Technol.*, **62**, 501 (1984)
7. Krieg, N. R. and Holt, J. G. : *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Williams and Wikins, Baltimore / London, Vol.1, p. 267 (1984)
8. Mac Faddin, J. F. : *Biochemical tests for identification of medical bacteria*. Williams and Wikins, Baltimore / London, p.162 (1980)

(1994년 2월 17일 접수)