

고산도 생성 초산균의 분리 및 발효특성

백창호, 백성열, 이세희, 강지은, 최한석, 김재현, 여수환*
농촌진흥청 국립농업과학원 농식품자원부 발효식품과

Received: May 15, 2015 / Revised: May 21, 2015 / Accepted: May 21, 2015

Characterization of *Acetobacter* sp. Strain CV1 Isolated from a Fermented Vinegar

Chang-ho Baek, Seong-yeol Baek, Se Hee Lee, Ji-Eun Kang, Han-Seok Choi, Jae-Hyun Kim, and Soo-Hwan Yeo*
Fermented Food Science Division, Department of Agrofood Resources, NAAS, RDA, Wanju 565-850, Republic of Korea

Ten types of farm-made brewing vinegars were collected and four high acetic acid-producing strains (CV1, CV3, CV5, and CV6) were isolated. Among them strain CV1, exhibiting highly alcohol-resistant and acetic acid-producing properties, was selected and its taxonomic properties were investigated by phenotypic (particularly chemotaxonomic) characterization and phylogenetic inference based on 16S rRNA gene sequence analysis. On SM broth agar, cells of strain CV1 were gram-staining-negative and formed pale white colonies with smooth to rough surfaces. Strain CV1 produced acetate from ethanol and was resistant to up to 8% (v/v) ethanol in LM broth. Strain CV1 had a G+C content of 61.0 mol%, contained *meso*-DAP as the cell wall amino acid, and possessed Q-10 as the major ubiquinone. A comparison of 16S rRNA gene sequences showed that strain CV1 was most closely related to *Gluconacetobacter saccharivorans* ($\geq 99.0\%$ identity). In liquid media, the optimum growth conditions for acetic acid production were 30°C and pH >3.0 and strain CV1 produced 9.3% and 8.4% acetic acids from 10% and 9% alcohol concentrations, respectively.

Keywords: *Gluconacetobacter saccharivorans*, 16S rDNA gene sequence analysis, vinegar, acetic acid

서 론

식초는 술과 함께 가장 오랜 역사를 가진 발효식품 중의 하나로서 음식을 조리할 때 첨가되는 조미성분으로 주로 사용되어 왔으나 최근에는 다이어트 등의 건강을 위한 기능성 음료 생산을 위한 원료 사용되고 있다[6]. 식초는 식품의 맛을 상승시키는 조미료로서 발효과정에서 독특한 방향과 신맛을 주는 대표적인 알칼리성 발효식품이며[23], 당이 알코올 발효를 거쳐 초산발효로 생산된 초산을 주성분으로 발효 기질에 따라 다양한 유기산과 아미노산, 당류 및 에스테르 등을 함유하고 있다[7, 34].

국내에서 생산되는 식초는 주정을 희석하고 무기염류를 첨가한 양조식초, 과즙함량 30% 이상을 함유하는 과실식초, 곡물 함량 4% 이상을 함유하는 곡물식초가 대부분이었으나[8], 최근, 식품의 기능성을 중요하게 여기는 소비자 인식에 따라

단순 조미료에서 기능성이 부여된 건강음료로 소비패턴이 변화되면서 원료로서 과즙이나 곡물의 함량이 높고 유기산 뿐만 아니라 아미노산이 풍부한 흑초와 같은 고품질 곡물 발효식초가 등장하는 등 생산과 소비가 증가되는 추세이다[8, 18]. 일반적인 초산발효의 산도는 약 6–7%인데 이는 사용 균주의 초산 생성능과 발효 방법에 따라 다르게 나타난다[20]. 그러나, 윤 등[37]의 보고에 의하면, 발효 방법보다는 발효에 관여하는 종균의 초산생산 특성이 산도 증감에 상대적으로 더 큰 영향을 미치는 것으로 알려져 있으며, 기질로 이용되는 알코올 및 생성물인 초산농도의 내성에 따라 최종 산도가 결정된다고 보고되고 있다.

초산균은 그 종류에 따라 생산되는 초산과 유기산 함량이 다르며 총산 함량을 좌우하는 품질 지표로 이용되므로 우수한 초산균을 발굴하고 개량하는 것이 무엇보다도 중요하다. 초산균은 초산과 젖산을 과산화시킬 수 있는 *Acetobacter* 속과 알코올보다 당을 더 선호하며 초산을 과산화시킬 수 없는 *Gluconobacter* 속 두 종류로 분류되어 왔으나 Yamada와 Kondo 등에 의해 새로운 아속인 *Gluconacetobacter* 속이 보고된 바 있다[36]. 지금까지 알려진 대표적인 초산균은

*Corresponding author

Tel: +82-63-238-3610, Fax: +82-63-238-3843

E-mail: yeobio@korea.kr

© 2015, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

Acetobacter aceti, *A. pasteurianus*, *A. xylinum* [1], *A. methanolicus* [33], *Gluconacetobacter entanii* [27], *Glu. xylinus* [3], *Glu. oboediens* [35], *Glu. hansenii* [21], *Gluconobacter cerevisiae* [30] 및 *Glu. nephelii* [14] 등이 있다.

국내에서 고산도 식초 제조용 균주로는 *Acetobacter* 속의 초산균을 사용하여 약 6-7% 초산을 생산한 후, 일정량의 식초를 분취한 다음, 알코올을 첨가하여 생산하는 유가배양 (Fed-batch) 방식으로 고산도 식초(12-14%)를 생산하고 있다[19]. 그러나 농가에서는 종균을 사용하지 않고 자연 발효 방식으로 식초를 제조하기에 장시간의 발효기간에 의한 품질 균일성을 유지하기 쉽지 않을 뿐만 아니라[17], 초산 함량이 낮은 저산도 식초(약 2.4-4%)가 대부분이며 살균공정 없이 산성에 의한 저장성만으로 침전물 생성, 갈변 등의 품질 저하가 발생하는 문제점에 노출되어 있다[11]. 이에 농가형 천연 발효식초의 품질 향상을 위해, 고산도 생성 유용 발효종균의 확보와 보급이 필요한 상황이다. 뿐만 아니라 국내 천연 발효식초에 서식하는 초산균의 체계적인 분류 동정, 균주 개량 및 산업화에 대한 연구가 미흡한 상황이며, 초산발효에 대한 연구는 주로 저산도 초산균에 국한되어 있어[9, 22], 8% 이상의 고농도 초산을 생성하는 종균에 대한 연구는 미흡한 실정이다.

본 연구에서는 농가에서 사용하는 정지배양법으로 고산도 초산을 생성할 수 있는 알코올 내성이 우수한 초산균의 발효특성을 구명하고자 하였다.

재료 및 방법

시료 및 배지

본 실험에 사용한 식초는 전국에서 소규모로 제조·시판된 농가형 발효식초 10점을 수집하여 4°C 냉장보관 하면서 시료로 사용하였다. 초산 생성균 분리용 평판배지는 SM 배지 (yeast extract 0.5%, glucose 3.0%, CaCO₃ 1.0%, agar 2.0%, ethanol 5.0%, w/v) [18]를 사용하였으며, 초산균 배양용 액체배지는 LM 배지 (yeast extract 0.5%, glucose 0.5%, glycerol 1.0%, MgSO₄·7H₂O 0.02%, ethanol 5.0%, acetic acid 1.0%, w/v) [12]를 사용하였다.

초산균 분리 및 선정

농가형 발효식초에서 분리한 초산균 중 산 생성능이 가장 우수한 균주를 사용하였다. 적정배수로 희석된 발효식초 100 µl를 SM 배지에 도말하고 30°C에서 3일 동안 배양하여 생성된 초산균의 단일 집락(colony)을 동일한 배지에 계대 배양하여 순수 분리한 뒤, 고체배지에 점적하고 30°C에서 7일간 배양한 후 생성된 투명한 크기를 비교하여 우수 초산균을 선별하여 실험에 사용하였다[21].

균주 동정

분리 초산균의 균학적 동정은 형태학적 및 생화학적 특성 등을 조사하였다. 균주의 형태 관찰을 위해 SM 배지에 48시간 배양한 균체를 60, 70, 80, 90, 95 및 100% 에탄올로 단계적으로 수분을 제거한 후, 위상차 현미경(Axio Imager A2, Carl Zeiss Microimaging GmbH, Gottingen, Germany)으로 관찰하였다. 그람 염색은 Kit (Becton, Dickinson and Co., Maryland, USA)를 사용하였고, 균주 동정을 위하여 분리균을 API 20NE Kit (BioMerieux, France)에 100 µl 접종하고 30°C에서 24시간 반응시켰다. 형태학적 및 생화학적 특성 결과를 토대로 초산균을 동정하였다[4].

세포 지방산 분석

균주의 세포 지방산 분석을 위해, SM 배지에서 72시간 동안 배양된 균체로부터 지방산을 추출한 후[25] fatty acid methyl esters (FAMES)를 분석하였다. FAMES는 capillary column (HP-19091B-102, Ultra 2, 25 m × 0.20 mm, 0.33 µm) 과 MIDI Hewlett-packard microbial identification system (MIDI; Microbial ID, Inc., Newark, Delaware, USA) software가 장착된 gas chromatograph (HP6890, Palo alto, USA)로 분석하였다. 오븐 온도는 170°C에서 260°C까지 5°C/mim의 속도로 승온하였고, 이후 310°C까지 40°C/min의 속도로 승온 후 1분간 유지하였으며, 이동상은 H₂ (0.5 ml/min)를 사용하였다.

염색체 DNA GC 함량 및 퀴논 화합물 분석

초산균의 염색체 DNA는 Saito와 Miura [23] 방법으로 추출 및 정제하여 사용하였다. GC 함량은 Tamaoka와 Komagata [32] 방법을 사용하여 측정하였다. 퀴논 화합물은 Komagata와 Suzuki [12]의 방법으로 분리 및 추출하여 HPLC로 분석하였다. 분석 칼럼은cosmosil-pack 5C₁₈-AR (4.6 × 150 mm, Nacalai tesque Co., Japan)을 사용하였으며 이동상으로 methanol/isopropyl ether (3:1)를 1.0 ml/min의 유속으로 사용하였고, 검출기는 UV detector (Waters Co, Milford, Connecticut, USA)를 사용하여 270 nm에서 분석하였다.

분리 초산균의 계통 분석

분리 초산균의 계통도를 작성하기 위하여 16S rDNA 염기서열을 분석하였다. 염색체 DNA (chromosomal DNA)를 주형(template)으로 universal primer인 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')와 1492R (5'-GGTTACCTT GTTACGACTT-3') [10, 16]를 이용하여 polymerase chain reaction (PCR)을 수행하였으며, 반응 생성물의 염기서열 분석은 (주)제노셀(Genocell Co., Ltd, Yongin, Korea)에 의뢰하였으며, DNASTar Lasergene 7 (DNASTar Inc, Madison,

WI, USA) 프로그램을 이용하여 분석하였다. 결정된 염기서열의 상동성 검사는 National Center for Biotechnology Information (NCBI; www.ncbi.nlm.nih.gov/)에서 제공하는 BLAST search를 통하여 수행하였고, 염기서열 간의 상동성은 Clustal W 프로그램[30]을 사용하여 확보된 염기서열들 간의 다중서열정렬(Multiple sequence alignment) 검색을 수행하였으며[2], 계통도는 Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA 4) 프로그램[15]을 사용하여 neighbor-joining [25]법과 Kimura-nei 방법으로 작성하였고 계통도의 안정성 검사를 위해 1,000번의 bootstrapping [5]을 수행하여 계통도의 견고성을 확인하였다. 동정된 균주의 16S rDNA 염기서열은 GenBank에 등록하였다(AB759966).

분리 균주의 생육 특성

분리균의 탄소원 이용능은 각각 2% ethanol과 acetic acid를 첨가한 LM 배지에 glucose 대신에 다양한 탄소원(fructose, maltose, sucrose, mannitol, sorbitol, glycerol, lactate)을 첨가하여 30°C에서 14일 동안 배양하면서 분리균의 생육 특성을 조사하였고 온도에 따른 생육 특성은 15, 20, 25, 30, 35 및 37°C에서 20일간 배양하였다. 또한, 초기 pH 조건(2.0, 2.4, 2.7, 3.0, 3.4)을 달리하고 30°C에서 20일간 배양한 후, 660 nm에서 흡광도로 생육 정도를 측정하였고, 초산 생성능을 확인하기 위해 ethanol 농도를 5, 6, 7, 8, 9, 10%로 조정한 LM 배지에서 20일 동안 배양하였다.

적정산도

발효에 의하여 생성된 초산의 함량(% v/v)은 중화 적정법을 이용하여 측정하였다[9].

미생물 생육도

초산균의 생육 정도는 배양액을 적정 배수로 희석하여, 분광 광도계(UV Spectrophotometer 1601, Shimadzu Co, Kyoto, Japan)를 이용해 660 nm에서 흡광도를 측정하여 결정하였다.

결과 및 고찰

초산균 선정 및 형태학적 특성

전국에서 수집한 발효식초로부터 초산균을 분리하고자 SM 배지에 도말하여 균주의 생육 유무를 확인하였다. 그 결과, 유기산을 생성하며 생육이 왕성한 초산균 4주를 1차 선별하였고, 선별된 초산균을 같은 배지에 다시 도말하여 생성된 투명환의 크기를 비교한 결과, CV1로 명명된 균주가 18.7 ± 0.6 mm로 가장 크게 나타났다(Table 1). 균주보존센터에 등록된 표준균주(Type strain)를 대조구로 하여 분리된 초산균과 형태학적 특징을 비교한 결과, CV1 균주는 그람 음성균으로 크기는 $0.2-0.3 \times 4-6 \mu\text{m}$ 였으며 운동성이 없는 단일균 형태의 간균으로 판단되었다(Fig. 1, Table 2).

분리된 CV1 균주의 생화학적 특성은 Table 3에 나타내었

Table 1. Comparison of acid production by isolated *Acetobacter* strains.

<i>Acetobacter</i> sp.	CV1	CV3	CV5	CV6
Clear zone size (mm)	$18.7 \pm 0.6^{1)}$	17.2 ± 0.7	16.2 ± 0.4	16.8 ± 0.3

¹⁾Values are mean \pm SD (n = 2).

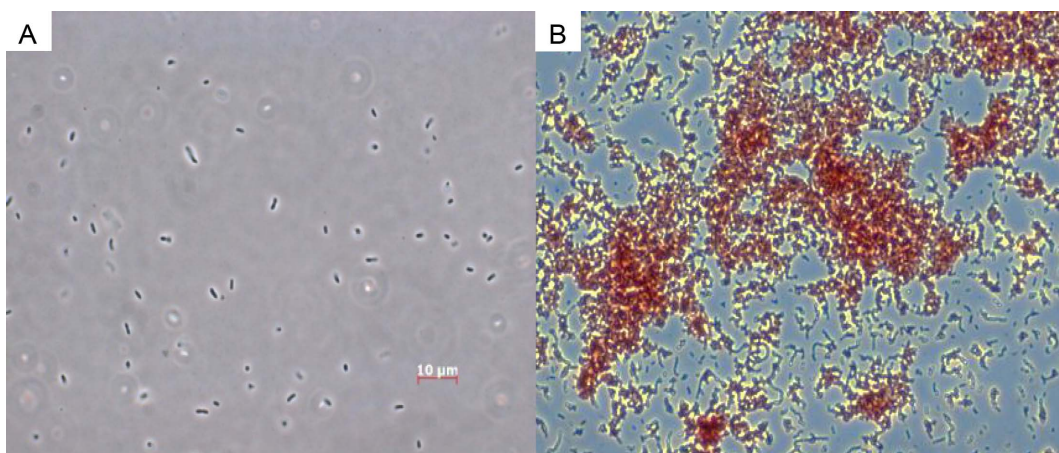


Fig. 1. Phase contrast micrograph ($\times 1,000$) (A) and gram staining (B) of isolated strain CV1 grown on LM agar plate for 2 days and 30°C.

Table 2. Morphological characteristics of strain CV1 and type strain of *Acetobacter* species.

Characterization	<i>Glu. hansenii</i> KCCM 40230	<i>A. pasteurianus</i> KCTC 12289	<i>A. pomorum</i> KCTC 22319	Isolated strain CV1
Gram staining	-	-	-	-
Cell shape	Long rod	Rod	Rod	Long rod
Cell size (μm)	0.6-0.7 × 1.4-1.8	0.3-0.4 × 0.7-0.8	0.2-0.3 × 0.6	0.2-0.3 × 4-6
Motility	-	-	-	-
Colony characteristics (Solid medium)	-	-	-	-
Shape	Entire, circular convex to flat	Entire, circular convex to flat	Entire, circular convex to flat	Entire, circular convex to flat
Color	Pale white	Pale white	Pale white	Pale white
Surface	Smooth to rough	Smooth to rough	Smooth to rough	Smooth to rough
Transparency	Opacity	Opacity	Opacity	Opacity

Table 3. Biochemical characteristics of strain CV1 and type strain of *Acetobacter* species.

Characterization	<i>Glu. hansenii</i> KCCM 40230	<i>A. pasteurianus</i> KCTC 12289	<i>A. pomorum</i> KCTC 22319	Isolated strain CV1
Catalase	(+)	(+)	(+)	(+)
Nitrate reduction	-	-	-	-
Indole production	-	(+)	(+)	(+)
Glucose fermentation	-	-	-	-
Arginine dihydrolase	-	-	-	-
Urease	-	-	-	-
Escullin hydrolysis	(+)	(+)	(+)	-
Gelatin hydrolysis	-	-	-	-
β-glucosidase	-	-	-	-
D-glucose	-	-	-	-
D-arabinose	-	-	-	-
D-mannose	-	-	-	-
D-mannitol	-	-	-	-
N-acetyl-D-glucosamine	-	-	-	-
Assimilation				
D-maltose	-	-	-	-
Potassium gluconate	-	-	-	-
Capric acid	-	-	-	-
Adipic acid	-	-	-	-
Malic acid	-	-	-	-
Trisodium citrate	-	-	-	-
Phenylacetic acid	-	-	-	-

(+) : positive, - : negative

으며, 생화학적 및 탄소원 이용 특성을 근거로 CV1 균주는 *Gluconacetobacter* 속(genus) 보다 *Acetobacter* 속에 유사한 것으로 판단되었다.

분리 균주의 chemotaxonomy 특성

CV1 균주의 diaminopimelic acid (DAP)는 meso-DAP이고 세포벽 아미노산은 alanine, glutamic acid, glycine 및

lysine으로 구성되어 있는 것으로 나타났다. CV1 균주의 세포벽 지방산 조성은 불포화지방산과 관련 지방산(C_{18:1} w7c/18:1 w6c)이 대표적인 지방산으로 약 65%가 존재하고 있고, C_{10:0}, C_{12:0}, C_{18:0} 3OH, C_{16:1} iso I/C_{14:0} 3OH & C_{16:1} w7c/C_{16:1}

w6c가 미량으로 존재하는 것으로 확인되었다. 주된 quinone 은 Q₁₀ (55.8%)과 Q₉ (44.2%)으로 확인되었고, Lisdiyanti 등[21]이 보고한 *Gluconacetobacter* 속이 갖는 대표적인 Q₁₀ 이 90% 이상 검출된 결과와 다소 상이하였지만, G+C 함량

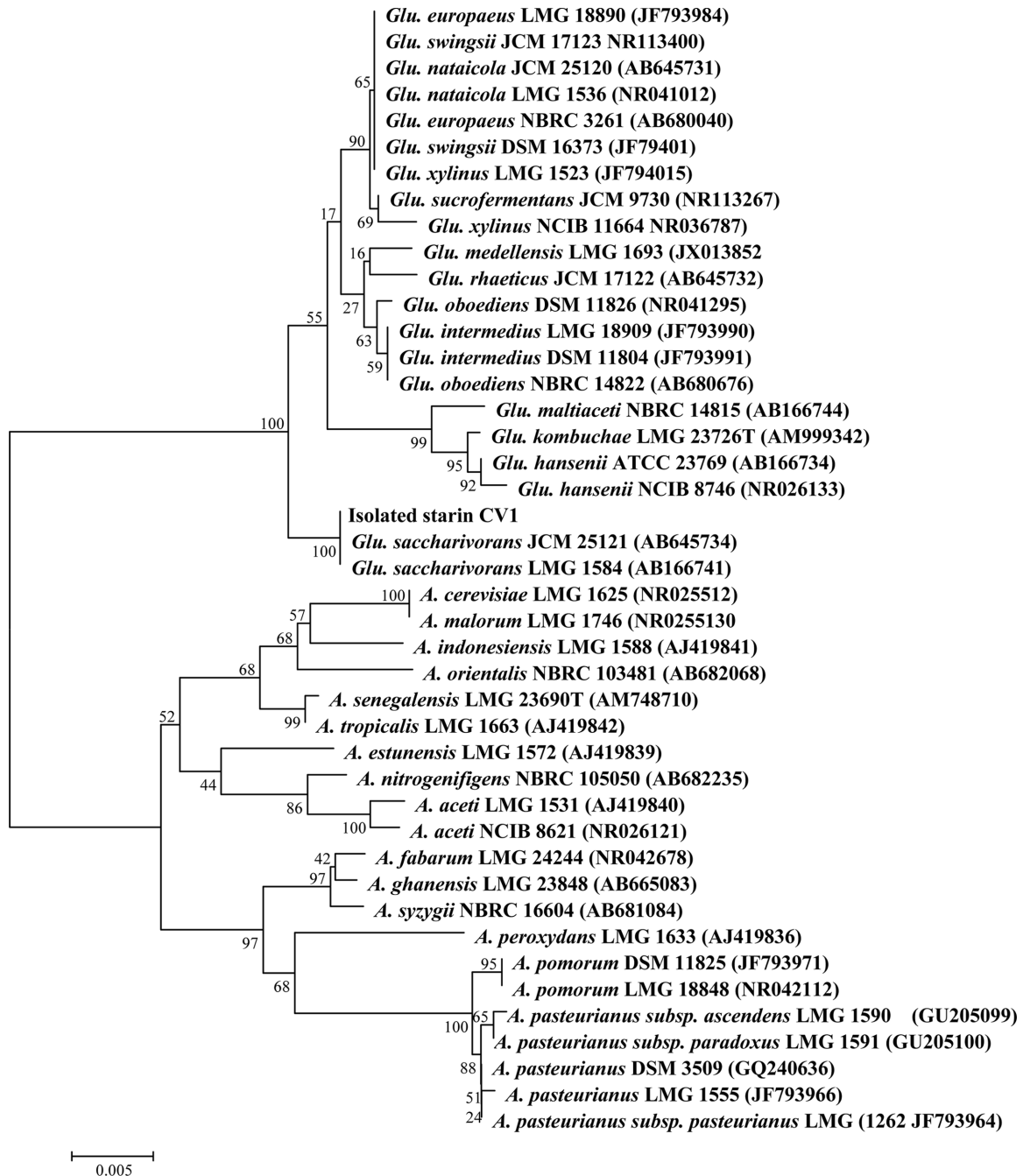


Fig. 2. Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences showing the positions of isolated strain CV1 and the representatives of other related taxa. The tree was constructed from an alignment of the full-length sequence of 16S rRNA from various species using the neighbor-joining method. The number on the nodes corresponds to the bootstrap percentages based on 1,000 pseudoreplicates. The bar denotes the relative branch length. The 16S rRNA sequences are identified by their GenBank accession numbers in parentheses.

은 61.0 mol%로서 Yamada 등[36]이 보고한 *Gluconacetobacter* 속의 G+C 함량 55–66 mol%, quinone의 형태는 Q₁₀이 주요 quinone이고 Q₉도 같이 존재하며, 주요 지방산은 C_{18:1}로 본 연구에서 분리된 균주 CV1은 *Gluconacetobacter* 속의 특징을 가지는 것으로 판단하였다.

분리 균주의 동정

CV1 균주의 16S rDNA 유전자의 염기서열을 분석한 결과는 Fig. 2와 같다. CV1 균주는 *Gluconacetobacter* 속 균주들과 높은 상동성을 나타내었으며 특히, *Glu. saccharivorans* LMG 1582와 16S rDNA 유전자의 염기서열이 99.97% 이상 일치하였다(Fig. 2). 따라서 선발된 CV1 균주는 *Glu. saccharivorans*로 판단되어 *Glu. saccharivorans* CV1으로 동정하였고 16S rDNA 유전자의 염기서열은 GenBank에 등록하였다(AB759966). 또한 초산균 CV1은 *Glu. hansenii* ATCC 23769 (98.23%), *Glu. intermedius* LMG 18909 (98.89%), *Glu. xylinus* NCIB 11664 (98.97%), *Glu. sucrofermentans* JCM 9730 (99.04%) 종과는 유전학적으로 차이가 많았다.

탄소원 이용 특성 분석

CV1 균주의 탄소원 이용능을 조사한 결과, 모든 탄소원에서 생육이 확인되었고, 이당류인 sucrose, fructose, 단당류인 mannose, 지방족 3가 알코올인 glycerol 및 당 알코올인 mannitol에서 CV1 균주의 생육이 우수한 것으로 나타났고 대조균주인 *Glu. hansenii*는 fructose, mannitol, gluconate를 이용하였으나, *A. pasteurianus*와 *A. pomorum*은 mannitol과 lactate 이외의 다른 탄소원을 거의 이용하지 못하는 것으로 나타났다(Table 4). 대부분의 탄소원을 이용하고 biocellulose를 생성하지 않는 *Glu. europaeus*의 탄소 이용능을 보고한 Park 등[23]의 결과와 분리균인 CV1의 탄소원 이용 특성은 유사하였지만 *Acetobacter* 속의 이용 특성과는 다르게 나타내었다.

분리균주의 배양특성 및 초산 생성능 분석

분리균 CV1은 15°C부터 37°C까지 생육이 가능하였으며(Fig. 3A), 초기 pH는 pH 3.0과 3.4에서 생육이 왕성한 반면 pH 2.0에서는 전혀 생육하지 못하였다. 따라서 분리균 CV1의 최적 배양조건은 30°C, pH 3.0 이상으로 추정되었다(Fig. 3B). 에탄올 농도에 따른 초산 생성능을 조사한 결과, 초기 에탄올 농도 10%에서 배양 15일 후에 약 9.3%의 적정산도를 나타냈으며, 9% 에탄올 농도에서는 8.4% 적정산도를 나타내어 9% 이상의 높은 에탄올 농도에서 적정산도 8% 이상의 높은 산 생성능을 나타내는 것으로 판단되었다(Fig. 3C). 이러한 결과는 초산균은 발효온도가 30°C일 때 생육이 가장

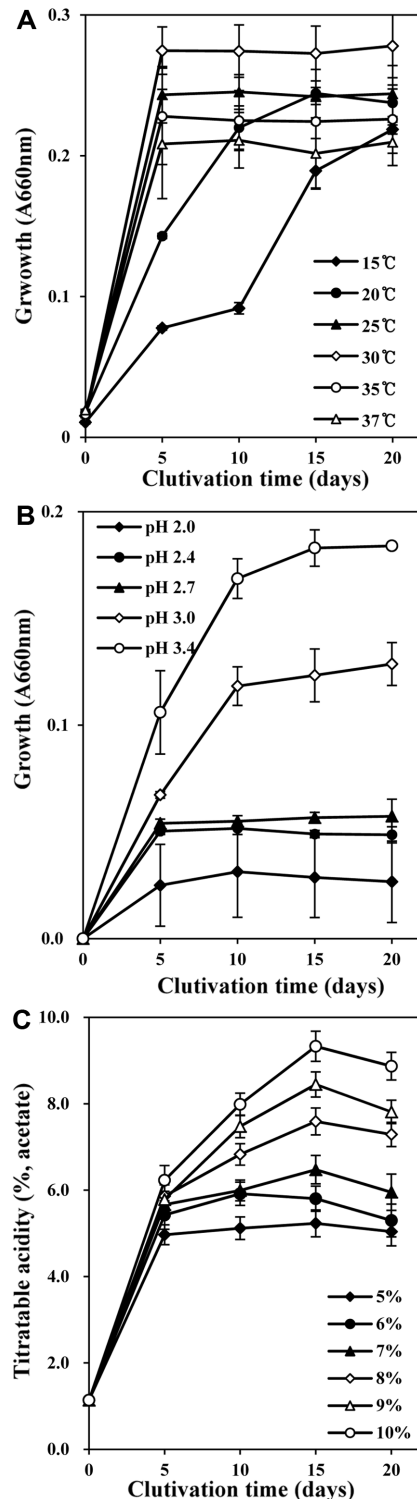


Fig. 3. Effects of temperature (A), initial pH (B), and ethanol concentration (C) on acetic acid production and growth of *Glu. saccharivorans* CV1. Cells were grown at 30°C for 3 days in LM medium supplemented with 6% ethanol (A and B), or with the indicated concentration of ethanol (C).

Table 4. Characteristics of carbon source utilization for strain CV1 and type strain of *Acetobacter* species.

Carbon sources LM broth – Glucose replaced by	Strain CV1	<i>Glu. hansenii</i> KCCM 40230	<i>A. pasteurianus</i> KCTC 12289	<i>A. pomorum</i> KCTC 22319
Sucrose	+++	+	+	+
Lactose	++	+	-	-
Mannose	+++	-	-	-
Rhamnose	++	-	-	-
Galactose	++	-	-	-
Fructose	+++	++	-	-
Maltose	++	-	-	-
Glycerol	+++	+	-	+
Melibiose	++	-	-	-
Xylose	++	-	-	-
Inositol	++	-	-	-
Mannitol	+++	++	+++	++
Sorbitol	++	-	-	-
Arabinose	+	-	-	-
Amygdalin	++	-	-	-
Lactate	+	-	+++	++
Gluconate	+	++	-	-

+++ : very good, ++ : good, + : growth, - : no growth

우수하며 15°C에서 34°C까지 생육이 가능하다는 박 등[2]의 보고와 유사하였고, 초기 총산 1.0%에서 가장 높은 수율 62%로 초산을 생성한다는 Shin 등[29]의 결과와 비교하였을 때, 분리균주 CV1의 초산 생산 수율은 63%로서 유사한 수준을 나타내었다.

요 약

본 연구에서는 정치 배양법으로 고농도의 초산을 생산할 수 있고 에탄올 내성이 우수한 균주를 확보하고자 농가형 발효식초에서 초산균을 분리 및 선별하였고, 이들 초산균의 형태적 특징을 조사한 바, 분리균 CV1은 그람 음성으로 운동성이 없는 간균으로 나타났다. 분리균의 chemotaxonomy를 분석한 결과, meso-DAP이며, 대표 퀴논은 Q₁₀이고, G+C mol 함량은 61.0 mol %로 나타났으며 16S rDNA 유전자의 염기서열을 분석한 결과, *Gluconacetobacter saccharivorans*로 동정되어 *Glu. saccharivorans* CV1로 명명하였다. CV1 초산균의 최적 성장조건은 30°C, pH 3.0 이상으로 판단되었고 에탄올 농도에 따른 초산 생성능은 10% 에탄올 농도에서 9.3%, 9% 에탄올 농도에서는 8.4% 적정산도를 나타내어 고농도 에탄올 조건에서도 높은 산 생성능을 나타내는 우수한 균주로 판단되었다.

Acknowledgments

This work was carried out with the support of "Cooperative Research Program for Agriculture Science & Technology Development (Project No. PJ00943901)" Rural Development Administration, Republic of Korea.

References

1. Cha YJ, Park KJ, Kim DK, Chun HS, Lee BK, Kim KH, et al. 1994. Isolation and characterization of cellulose producing *Acetobacter xylinum* K1 strain. *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22**: 571-576.
2. Chenna R, Sugawara H, Koike T, Lopez R, Gibson TJ, Higgins DG, et al. 2003. Multiple sequence alignment with the clustal series of programs. *Nucleic. Acids Res.* **31**: 3497-3500.
3. Cleenwerck I, De Vos P, De Vuyst L. 2010. Phylogeny and differentiation of species of the genus *Gluconacetobacter* and related taxa based on multilocus sequence analyses of housekeeping genes and reclassification of *Acetobacter xylinum* subsp. *sacrofermentans* as *Gluconacetobacter sacrofermentans* (Toyosaki et al. 1996) sp. nov., comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **60**: 3087-3103.
4. De Ley J, Swings J, Gossele F. 1984. Genus I. *Acetobacter* Beijerinck 1898, 215AL. In *Bergey's Manual of Systematic*

- Bacteriology*, 1, pp. 268-274. Edited by NR Krieg, JG Holt. Baltimore: Williams & Wilkins.
5. Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*. **39**: 783-791.
 6. Ha YD, Kim KS. 2000. Civilization history of vinegar. *Food Indust. Nutr.* **5**: 1-6.
 7. Jeong YJ, Lee MH. 2000. A view and prospect of vinegar industry. *Food Ind. Nutr.* **5**: 7-12.
 8. Jeong YJ. 2009. Current trends and future prospects in the Korean vinegar industry. *Food Sci. Ind.* **42**: 52-59.
 9. Kang SK, Jang MJ, Kim YD. 2006. Isolation and culture conditions of *acetobacter* sp. for the production of citron (*citrus junos*) vinegar. *Koran J. Food Preserv.* **13**: 357-362.
 10. Kim BY, Zucchi TD, Fiedler HP, Goodfellow M. 2012. *Streptomyces cocklensis* sp. nov., a dioxamycinproducing actinomycete. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **62**: 279-283.
 11. Kim SS, Kang HA, Chang KS. 2000. Effect of membrane separation on persimmon vinegar quality. *Food Eng. Prog.* **4**: 167-172.
 12. Kim SW, Park JH, Jun HK. 2008. Analysis of optimum condition for production of an onionic vinegar by tow-step fermentation. *J. Life Sci.* **18**: 1410-1414.
 13. Komagata K, Suzuki K. 1987. Lipid and cell wall analysis in bacterial systematics. *Methods Microbiol.* **19**: 161-206.
 14. Kommanee J, Tanasupawat S, Yukphan P, Malimas T, Muramatsu Y, Nakagawa Y, et al. 2011. *Gluconobacter nephelii* sp. nov., an acetic acid bacterium in the class *Alphaproteobacteria*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **61**: 2177-2122.
 15. Kumar S, Tamura K, Nei M. 2004. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief. Bioinformatics.* **5**: 150-163.
 16. Lane DJ. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, pp. 115-175. Edited by E Stackebrandt and M Goodfellow. Chichester: Wiley.
 17. Lee SH, Kim JC. 2009. A comparative analysis for main components change during natural fermentation of persimmon vinegar. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **38**: 372-376.
 18. Lee SW, Kwon JH, Yoon SR, Woo SM, Jang SY, Yeo SH, et al. 2010. Quality characteristics of brown rice vinegar by different yeasts and fermentation condition. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **39**: 1366-1372.
 19. Lee YC, Lee JH. 2000. A manufacturing process of high-strength vinegar. *Food Ind. Nutr.* **5**: 13-17.
 20. Lim YS, Sul IW. 2004. Isolation of a bacterial strain for fermentation of Omija vinegar. *J. East Asian Soc. Dietary Life* **14**: 508-512.
 21. Lisdiyanti P, Navarro RR, Uchimura T, Komagata K. 2006. Reclassification of *Gluconacetobacter hansenii* strains and proposals of *Gluconacetobacter saccharivorans* sp. nov. and *Gluconacetobacter nataicola* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**: 2101-2111.
 22. Park MH, Lee JO, Lee JY, Yu SJ, Ko YJ, Kim YH, et al. 2005. Isolation and characteristics of acetic acid bacteria for persimmon vinegar fermentation. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **34**: 1251-1257.
 23. Park MH, Lyu DK, Ryu CH. 2002. Characteristics of high acidity producing acetic acid bacteria isolated from Industrial vinegar fermentation. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **31**: 394-398.
 24. Saito H, Miura K. 1963. Preparation of transforming deoxyribonucleic acid by phenol treatment. *Biochim. Biophys Acta* **72**: 619-629.
 25. Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**: 406-425.
 26. Sasser MJ. 1990. Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids. Technical note 101. Newark, DE: Microbial ID Inc.
 27. Schüller G, Hertel C, Hammes WP. 2000. *Gluconacetobacter entanii* sp. nov., isolated from submerged high-acid industrial vinegar fermentations. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**: 2013-2020.
 28. Shin JA, Oh NS. 2010. Optimization of fermentation process for acetic acid production. *Food Eng. Progr.* **14**: 217-221.
 29. Shin JS, Jeong YJ. 2003. Changes in the component of acetic acid fermentation of brown rice using raw starch digesting enzyme. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **32**: 381-387.
 30. Spitaels F, Wieme A, Balzarini T, Cleenwerck I, Van landschoot A, De vuyst L, et al. 2014. *Gluconobacter cerevisiae* sp. nov., isolated from the brewery environment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **64**: 1134-1141.
 31. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. 1997. The clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **25**: 4876-4882.
 32. Tamaoka K, Komagata K. 1984. Determination of DNA base composition by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *FEMS Microbiol. Lett.* **25**: 125-128.
 33. Uhlig H, Karbaum K, Steudel A. 1986. *Acetobacter methanolicus* sp. nov., an acidophilic facultatively methylotrophic bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **36**: 317-322.
 34. Woo KS, Ko JY, Song SB, Lee JS, Kang JR, Oh BG, et al. 2010. Physicochemical characteristics of vinegars fermented from cereal crops with incalgyun. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **39**: 1171-1178.
 35. Yamada Y. 2000. Transfer of *Acetobacter oboediens* Sokollek et al. 1998 and *Acetobacter intermedius* Boesch et al. 1998 to the genus *Gluconacetobacter* as *Gluconacetobacter oboediens* comb. nov. and *Gluconacetobacter intermedius* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**: 2225-2227.
 36. Yamada Y, Kondo K. 1984. *Gluconoacetobacter*, a new subgenus comprising the acetate-oxidizing acetic acid bacteria with ubiquinone-10 in the genus *Acetobacter*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **30**: 297-303.
 37. Yoon HN. 1998. Simultaneous gas chromatographic analysis of ethanol and acetic acid in vinegar. *Korean J. Food. Sci. Technol.* **30**: 1247-1251.