

전통발효 식초에서 분리한 *Acetobacter* sp.의 특성

박종필¹⁾·김성준¹⁾·유진철²⁾·표병식³⁾·김시욱⁴⁾
조선대학교 유전공학과¹⁾, 조선대학교 약학과²⁾
동신대학교 식품영양학과³⁾, 조선대학교 환경학과⁴⁾

Some Properties of *Acetobacter* sp. Isolated from Traditional Fermented Vinegar

Jong-Phil Park¹⁾, Sung-Jun Kim¹⁾, Jin-Cheol Ryu²⁾,
Byoung-Sik Pyo³⁾ and Si-Wouk Kim⁴⁾

Department of Genetic Engineering¹⁾, Department of Phamacology, Chosun University,²⁾
Department of Food Nutrition, Dongshin University³⁾
Department of Environmental Science, Chosun University, Kwangju 501-759, Korea⁴⁾

ABSTRACT

Two strains were isolated from the vinegar of Korean traditional fermented rice wine and the vinegar of fermented persimmon, respectively. These strains, designated as KM and BPV, were identified as the genus *Acetobacter* with respect to morphological, physiological, and biochemical characteristics. The isolates oxidized ethanol to acetate and over-oxidized acetate or lactate to CO₂ and H₂O. They were positive in catalase test, while being negative in oxidase, gelatin liquefaction, VP test, H₂S production and indole formation tests. No γ -pyrones were produced from glucose and fructose. KM was tolerant of 11% ethanol while BPV was relatively sensitive to ethanol at a higher concentration than 5%. The guanine-plus-cytosine contents of the DNA of KM and BPV strains were 53.8 and 56.6 mol%, respectively. The cellular fatty acid compositions contained in these isolates were saturated straight-chain C_{14:0} and C_{16:0}, and unsaturated straight-chain C_{18:1}. Major ubiquinone system of KM was Q-9, but that of BPV was Q-10. In morphophysiological and biochemical aspects, KM strain was similar to *Acetobacter pasteurianus*. However, BPV strain was different from other *Acetobacter* type strains.

서 론

Acetic acid bacteria는 두 종의 속 즉, *Gluconobacter*와 *Acetobacter*로 분류되며 당과 알코올을 초산으로 산화시킬 수 있는 능력을 가지고 있는 세균의 집단을 말한다. 초산균은 그람 음성이며 내산성의 편성 호기성 간균 또는 구균으로 포자는 형성하지 않는다(1). *Gluconobacter*와 *Acetobacter*의 차이

점은 *Gluconobacter*는 알코올보다 당을 더 선호하며 초산을 재산화시킬 수 있는 능력이 없는 반면 대부분의 *Acetobacter*는 초산과 젖산을 재산화시킬 수 있는 능력을 가지고 있다(2). 재산화(overoxidation)과정이란 에탄올을 초산으로 만들고 이어서 초산을 CO₂와 H₂O로 산화시키는 두 가지 과정을 의미한다. 또한 지방산 조성에 있어서 *Gluconobacter*는 straight-chain C_{14:0} saturated acid를 가지고 있지

않으나 *Acetobacter*는 이 지방산을 가지고 있다는 점에서 상호 서로 구분되어진다(3). *Acetobacter*는 주로 alcoholic juice가 존재하는 곳에서 많이 발견되며, 이와 같은 *Acetobacter*에 대한 연구는 Persoon (4)이 sour wine과 beers에서 최초로 보고함으로써 시작되었다. 그 후 다양한 발효식품으로부터 *Acetobacter*의 분리에 관한 연구가 보고되어 왔으며(5-8), 지금까지 알려진 대표적인 species는 *A. aceti*, *A. pasteurianus*, *A. liquefaciens* 그리고 *A. hanseni* 등이 있다(21). 최근에는 최적 성장 pH가 4.0이며 methane, methanol, methylamine 등의 환원된 C₁-화합물에서도 성장이 가능한 *A. methanolicus*가 분리되었고(9) pH 2.5에서도 높은 nitrogenase activity를 나타내며 고농도의 당에서도 성장하고 glucose로부터 gluconic acid를 생성할 수 있는 *A. diazotrophicus*에 대해서도 보고가 되어왔다(10).

*Acetobacter*속은 식초생산을 위해서 산업적으로 매우 중요하기 때문에 새로운 균주의 분리와 함께 초산균의 개량을 위해서 recombinant DNA techniques(11)과 spheroplast fusion의 방법을 이용한 돌연변이체 획득에 대해서도 연구되고 있다(12). 그러나 아직까지도 한국 고유의 전통적인 방법으로 발효 제조된 식초에 서식하는 acetic acid bacteria에 대한 분류학적, 유전학적 연구가 미비한 실정에 있는 바 본 연구에서는 한국 고유의 전통적인 발효방법으로 제조한 막걸리식초와 감식초에서 *Acetobacter* 균주를 분리하여 생리생화학적인 특성을 연구하고 산업화에 응용할 수 있는 새로운 균주의 개발에 필요한 기초자료를 얻고자 하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 배지

본 실험에 사용한 균주는 전남 구례 막걸리식초와 전북 부안지방의 감식초로부터 분리하여 각각 KM과 BPV라 명명하였으며 대조 균주로서는 *Acetobacter aceti*(ATCC 23746), *A. pasteurianus*(ATCC 9428), *A. methanolicus*(ATCC 43581)를 사용하였다. 분리 배지로는 modified Carr medium(2% yeast extract, 0.5% peptone, 3% ethanol, 0.0022% bromocresol-purple, pH 6.8)을 사용하였으며(13), modified Carr media에 agar를 2.0~2.5% 넣어 고체 평판배지로 사용하였다. 균주의 동정용 배지는 GYC 배지(5% glucose, 1% yeast extract, 3% CaCO₃, 2.5% agar)와 YCE 배지(1% yeast

extract, 2% CaCO₃, 2% ethanol, 2% agar)를 사용하였다(14).

균주의 분리

전남 구례 및 전북 부안지방에서 각각 24개월 이상 발효 숙성시킨 막걸리식초, 감식초로부터 acetic acid bacteria를 분리하였다. 분리방법은 막걸리와 감식초를 각각 Carr 배지 50ml에 접종하여 28℃에서 3~4일 동안 150rpm으로 진탕배양한 후 혼탁도가 증가한 배지를 다시 동일조성의 새로운 배지에 접종하는 과정을 수차 반복하였다. 그 후 지시약으로서 bromocresol-purple 이 첨가된 고체배지에 streaking하여 28℃에서 3~4일간 배양하고 자색에서 노란색으로 그리고 다시 자색으로 환원되는지를 관찰한 다음 여기서 나타난 colony를 동일조성의 고체배지에 여러 번 streaking하는 방법으로 단일 colony를 순수 분리하여 GYC agar slant에 접종하여 보관하였다. 이하의 균주 배양은 특이한 경우를 제외하고는 모두 28℃에서 수행하였다.

성장조건

균의 성장은 UVICON 930 spectrophotometer(d=1cm)를 이용하여 660nm에서 흡광도를 측정함으로써 관찰하였다. 균체의 성장에 미치는 pH의 영향을 알아보기 위해 pH를 3.0~8.0으로 조절한 Carr broth에 접종한 후 5일간 배양하면서 조사하였다. 온도에 의한 성장여부를 판별하기 위해서 Carr broth에 균을 접종하여 22℃~40℃ 범위에서 5일간 배양한 후 성장유무를 관찰하였다.

생리생화학적 특성

초산 저항성 실험은 초산농도를 1~7%로 조절한 GYP 배지(3% glucose, 0.5% yeast extract, 0.2% peptone, 1.5% agar) 50ml에 균을 접종하여 5일간 배양한 후 조사하였다. NaCl에 대한 내성 실험은 SM배지(0.5% yeast extract, 5% glucose)에 NaCl 농도를 0~3%로 조절한 배지를 사용하였고 에탄올에 따른 내성을 조사하기 위해서 농도를 3~12%로 조절한 배지에 분리한 균을 접종하고 5일간 배양한 후 관찰하였다. Bromocresol-purple이 첨가되지 않은 Carr 평판배지에 항생제 disc(BBL Sensi-Disc)를 올려 놓은 다음 5일간 배양하여 항생제 내성 실험을 하였으며, 검색시약으로서 bromocresol-purple이나 bromocresol-green을 사용한 Basal medium(1% yeast extract, 0.5% NaCl, 1% test sub-

strate)을 사용하여 산 생성여부를 판별하였다. Glycerol로부터 ketogenesis가 일어나는지를 알아보기 위해 3% glycerol이 첨가된 YEP 배지(1% yeast extract, 0.5% peptone)에 균을 접종한 후 5일간 배양한 다음 Fehling 용액을 배양액에 1~2방울 떨어뜨린 후 오렌지색으로의 변색유무로 glycerol이 dihydroxyacetone으로 전환되는가를 관찰하였고, 5% glucose 또는 5% fructose가 첨가된 YPC 배지(0.5% yeast extract, 0.5% peptone, 0.5% CaCO₃)에 균주를 접종하고 7일간 배양한 후 배양액에 5% FeCl₃ 용액을 3~4방울 떨어뜨려 reddish violet 색으로 변하는지 여부로 Ferric chloride 실험을 행하였다. Gluconate peptone broth(0.15% peptone, 0.1% yeast extract, 0.1% dipotassium phosphate, 4% potassium gluconate, pH 7.0)을 이용하여 2-ketogluconic acid 형성 여부를 판별하였으며 실험은 MacFaddin의 방법(15)을 참고하였다.

한편 탄소원의 이용 여부를 알아보기 위해서 KM 균주는 growth factor로서 0.05% yeast extract broth를 사용하였으며 BPV 균주는 0.07% yeast extract broth를 사용하였다. 실험에 사용한 탄소원으로는 ethanol, methanol, propanol, butanol, formaldehyde, iso-amylalcohol 등의 alcohol 종류(0.3%, v/v)와 mannitol, sorbitol, inositol, dulcitol, arabitol, glucose, fructose, cellobiose, sorbose, raffinose, arabinose 등의 당 또는 당 알코올(1%, v/v)을 사용하였다. 기타 생리화학적 실험은 API 20E, API 50CH Kit(Bio-Merieux, France)를 이용하여 catalase, oxidase, citrate utilization, hydrolysis of urea and lactose, arginine dehydrolase, H₂S와 indole의 형성, sodium lactate에서 acetyl-methyl carbinol의 형성, nitrate 환원, gelatin liquefaction 등을 실험하였다.

Ubiquinone system

Ubiquinone system은 Yamada 등(16)의 방법에 따라 TLC plate(HPTLC-Fertigplatten Merck, Art No. 13724, RP-18, F254S, 10×10cm)에 균체의 농축 추출물을 점적하고 acetonitrile-acetone (20:80) 혼합 용액에 넣어 전개한 후 자외선을 조사하여 chromatogram을 관찰하였다.

DNA 염기조성

DNA는 Marmur(17)의 방법에 따라 추출하였다. 추출된 DNA의 guanine과 cytosine 함량은 Tama-

oka 등(18)의 방법에 따라 high-performance liquid chromatography(HPLC)함으로써 측정하였다. HPLC는 L-3000 detector(Hitachi)와 D-2000 integrator(Hitachi)를 사용하였으며 Cosmosil packed column RP-18(4.6×150mm)(Nacalai tesque)를 사용하여 실시하였다. 표준 DNA는 Yamasa사(Japan) 제품(Code No. 7160)을 사용하였다.

세포 내 지방산 조성

분리한 균주 KM과 BPV의 세포 내 지방산 조성은 Ikemoto 등(19)의 방법을 이용하였다. 지방산 조성은 coated fused silica capillary column(Dura bond-1, 0.25mm×30m)이 장착된 gas chromatograph(Shimadzu GC 14A)로 분석하였고 column, injector, detector의 온도는 각각 180°C, 250°C, 250°C이었다.

결과 및 고찰

균주의 분리 및 동정

전통적인 방법으로 발효 숙성시킨 막걸리식초와 감식초로부터 ethanol을 재산화시키는 균주를 분리하여 이를 KM과 BPV로 명명하였다. 이 균주들은 분리원이 독특하고 한국 고유의 초산 생산 균주로 사료되어 이들에 대한 여러 가지 특성을 조사하였다. 분리 균주는 모두 Gram 음성균으로 운동성은 없었으며 색소를 형성하지도 않았고, Carr 배지에서 dark-orange colonies를 형성하였다. KM은 rod 형



Fig. 1. Electron micrograph of a *Acetobacter* sp. KM. Negative staining was done with 2.0% phosphotungstic acid. The bar equals to 1 μ m.

태로 크기는 $0.5 \times 1.8 \sim 2.0 \mu\text{m}$ 이고(Fig. 1), BPV는 short-rod 형태로 크기는 $1.0 \times 1.2 \mu\text{m}$ 이었다. Ethanol이 첨가된 배지에 indicator로 bromocresol purple을 첨가하여 균을 배양시켰을 때 산이 생성되면 pH의 변화로 purple이 yellow로 변하게 되고 산이 다시 CO_2 로 재산화 되는 경우 yellow가 다시 purple로 환원되는 것으로 알려져 있다(13). 분리 균주 KM과 BPV가 이러한 색깔의 변화를 나타내는 것으로 보아 이들이 초산 발효 균주임을 확인할 수 있었다.

생리생화학적 특성

분리 균주의 생리생화학적인 특성은 Table 1에 나타내었다. Catalase 반응에 대해서는 양성인데 반해 oxidase, Voges-Proskauer test, indol production, H_2S production, gelatin liquefaction, urea test의 반응은 음성으로 나타났다. 두 균주 모두 최적 성장 온도는 $28^\circ\text{C} \sim 30^\circ\text{C}$ 였고, 최적 pH는 5.5~6.5 사이였지만 KM의 경우는 40°C 의 고온에서도 잘 성장하였으며, KM, BPV 두 균주 모두 pH 8.0에서도 성장하였다.

에탄올 농도가 2~3%일 때 두 균주 모두 좋은 성장을 보여주었으며 EYC 배지에서의 세대시간은 KM이 1.72시간 그리고 BPV가 1.87시간이었다. 성장에 필요한 최소 요구 인자로서 KM은 0.05% yeast extract를, BPV는 0.07% yeast extract를 필요로 하였다.

탄소원의 이용에 대해서 분리 균주 모두 glucose, mannitol, saccharose, fructose, arabinose, n-propanol 등을 이용하였지만 formaldehyde, iso-amylalcohol, phenol 등은 이용하지 못하였다.

KM은 glucose와 mannose에서, BPV는 ribose, glycerol, glucose, maltose 등에서 산을 생성하였지만 sucrose, fructose, cellulose, starch로부터는 두 균주 모두가 산을 생성하지 못하였다. 초산에 대한 내성은 두 균주가 모두 6%까지 내성을 보여 주었으며 에탄올 내성은 KM의 경우는 11%까지, BPV는 5%까지 내성을 나타내었다.

질소원으로서 L-아미노산의 이용면에서는 두 균주 모두 alanine, glutamic acid, proline, valine 등을 이용할 수 있었으나 KM의 경우 arginine, aspartic acid, cysteine, glycine, histidine, isoleucine, leucine, lysine, methionine, phenylalanine, serine, tryptophane, threonine에서는 성장하지 못했으며 BPV의 경우는 cysteine, tryptophane, tyrosine에서

성장하지 못했다.

한편 항생제 내성은 KM의 경우 ampicillin, streptomycin, ripampicin, nalidixic acid, erythromycin에 대해 민감하였으며 BPV의 경우는 tetracycline, ampicillin, streptomycin, rifampicin, nalidixic acid에 민감하였다. 그러나 두 균주 모두 chloramphenicol, cephalothin, gentamycin 등에 대해서는 내성을 나타내었다.

분리 균주와 *Gluconobacter*, *Acetobacter*의 특성을 비교하여 Table 2에 나타내었다. KM과 BPV 모두 에탄올 및 초산과 젖산을 CO_2 와 H_2O 로 재산화 하였으며 glycerol로부터 dihydroxyacetone의 생성 여부를 보면 KM은 negative 반응을, BPV의 경우에는 positive 반응을 보였으며 glucose와 fructose로부터 γ -pyron의 형성, GYC 배지에서 water-soluble brown pigment의 형성에 대해서는 두 균주 모두 negative 반응을 보여주었다. 또한 DNA 염기 조성의 경우는 KM이 53.8mol%, BPV는 56.6mol%의 G+C 함량을 보여 일반적인 *Acetobacter*의 특성과 유사하였으며, 세포 내 지방산의 함량에 있어서 KM은 major component로 $\text{C}_{18:1}$ straight-chain monounsaturated fatty acid(67.5%)와 minor component로 $\text{C}_{14:0}$ straight-chain saturated fatty acid(9.6%)의 지방산을 가지고 있었고 BPV 균주 역시 major component로 $\text{C}_{18:1}$ straight-chain monounsaturated fatty acid(41.0%)와 minor component로 $\text{C}_{14:0}$ straight-chain saturated fatty acid(19.3%)의 지방산을 가지고 있었다. 이는 *Gluconobacter*와 *Acetobacter*는 branched chain fatty acid를 가지고 있지 않고 major component로서 $\text{C}_{18:1}$ straight-chain monounsaturated fatty acid를 가지고 있으며 *Gluconobacter*와 *Acetobacter*의 주요한 차이점은 $\text{C}_{14:0}$ straight-chain saturated fatty acid의 유무에 따라 구별된다는 Yamada 등(3)의 보고에 따라 KM과 BPV를 *Acetobacter* 속으로 동정하였다. 지금까지 밝혀져 있는 *Acetobacter* 중에서 ubiquinone system으로 Q-9 system을 가지고 있는 균주들은 *A. aceti*와 *A. pasteurianus*이며 *A. xylinum*, *A. liquefaciens*, *A. methanolicus*, *A. polyoxogene*, *A. diazotrophicus*는 Q-10을 가지고 있는 것으로 알려져 있다(10). 분리 균주 KM은 major ubiquinone system으로서 Q-9을 가지고 있었으나 BPV는 Q-10을 가지고 있었다.

이상과 같은 결과를 비교해 보면 분리 균주중에서 KM은 *A. aceti*, *A. methanolicus*, *A. diazotrophicus*

Table 1. Physiological and biochemical characteristics of the isolates.

Characteristics	KM	BPV	Characteristics	KM	BPV
Gram stain	-	-	Urea test	-	-
Motility	-	-	Tryptophane deaminase	-	-
Fragellation	-	-	Indol production	-	-
Pigmentation	-	-	Growth on single		
Growth at			L-amino acid as sole		
30°C	+	+	source of nitrogen		
37°C	+	-	Proline	+	+
40°C	+	-	Valine	W	+
pH 4.0	+	+	Asparagine	W	+
PH 8.0	+	+	Glutamine	W	+
Growth on			Glycine	-	+
SM medium			Leucin	+	-
+ 0.5% NaCl	+	+	Threonine	-	+
+ 1.0% NaCl	+	+	Tryptophane	-	-
+ 2.0% NaCl	-	-	Substrate utilization		
+ 5.0% Ethanol	+	+	Methanol	+	-
+ 10.0% Ethanol	+	-	n-propanol	+	+
0.5% yeast extract			n-butanol	+	W
+ 20% D-glucose	+	-	D-mannitol	+	+
+ 25% D-glucose	+	+	Sorbitol	+	+
+ 30% D-glucose	W	-	Inositol	W	-
Growth on			Dulcitol	W	-
acetic acid(6%)	+	+	L-xylose	+	+
VP test	-	-	L-arabitol	+	+
Gelatin liquefaction	-	-	Cellobiose	W	+
Gatalase	+	+	Sorbose	+	-
Oxidase test	-	-	Raffinose	W	-
Arginine dehydrolase	-	+	Arabinose	+	+
Lysine decarboxylase	-	-	Resistance to antibiotics		
Sodium citrate			30 µg Kanamycin	I	I
utilization	-	-	30 µg Tetracyclin	I	S
H ₂ S production	-	-	10 µg Ampicillin	S	S
Acid produced from			10 µg Streptomycin	S	S
Glucose	+	+	5 µg Rifampicin	S	S
Mannose	+	+	30 µg Nalidixic acid	S	S
Ribose	-	+	15 µg Erythromycin	S	R
Glycerol	-	+	30 µg Chloramphenicol	R	R
Maltose	-	+	30 µg Cephalothin	R	R
			10 µg Gentamycin	R	R

Symbols: - ; negative, + ; positive, W ; weakly positive, I ; intermediate, S ; sensitive, R ; resistance

*SM contains 0.5% yeast extract and 5% glucose.

Table 2. Comparison of characteristics of the isolates with those of *Gluconobacter* and *Acetobacter*.^a

Characteristics	<i>Gluconobacter</i>	<i>Acetobacter</i>	KM	BPV
Fragellation	polar(or none)	peritrichous(or none)	none	none
Overoxidation of ethanol	—	+	+	+
Oxidation of acetate and DL-lactate to CO ₂ & H ₂ O	—	+	+	+
Formation of brown water soluble pigments on GYC agar	—	D	—	—
DHA from glycerol	+	D	—	+
FeCl ₃ reaction in				
Glucose	D	D	—	—
Fructose	+	—	—	—
Type of ubiquinone				
Q ₉	—	D	+	—
Q ₁₀	+	D	—	+
Cellular fatty acid type	18:1	18:1, 14:0	18:1, 14:0	18:1, 14:0
Carbon sources for growth				
Acetate	—	D	+	+
Lactate	—	D	+	+
Guanine plus cytosine content of DNA(mol %)	57-64	51-65	53.8	56.6

^a data for *Gluconobacter* and *Acetobacter* from De Ley *et al.*(20)

D different reactions in different taxa, + ; positive, — ; negative, DHA ; Dihydroxyacetone.

Table 3. Characteristics that differentiate the species of the genus *Acetobacter* and the isolates.

Characteristics	<i>A. aceti</i> ^a	<i>A. liquefaciens</i> ^a	<i>A. pasteurianus</i> ^a	<i>A. hanseni</i> ^a	<i>A. methanolicus</i> ^b	<i>A. diazotrophicus</i> ^c	KM	BPV
Formation of water-soluble brown pigments on GYC medium	—	+	—	—	—	+	—	—
γ-pyrone from								
D-glucose	—	d	—	—	—	+	—	+
D-fructose	—	+	—	—	—	+	—	—
2-ketogluconic acid from glucose	+	+	d	+	—	+	—	+
Ketogenesis from glycerol	+	+	—	+	W	d	—	+
Growth on the following								
Carbon source								
Ethanol	+	+	d	—	W	+	+	+
Methanol	—	—	—	—	+	—	+	—
Dulcitol	—	—	—	—	—	—	W	—
Acid produced from								
Mannitol	—	—	—	—	d	+	—	—
Fructose	—	—	—	—	—	ND	—	—

Characteristics	<i>A. aceti</i> ^a	<i>A. liquefaciens</i> ^a	<i>A. pasteurianus</i> ^a	<i>A. bamsenii</i> ^a	<i>A. methanolicus</i> ^b	<i>A. diazotrophicus</i> ^c	KM	BPV
Growth in the presence of 30% D-glucose	-	-	-	-	-	+	W	-
Growth in the presence of 10% ethanol	-	-	d	-	-	-	+	-
Ubiquinone type	Q ₉	Q ₁₀	Q ₉	ND	Q ₁₀	Q ₁₀	Q ₉	Q ₁₀
Guanine-plus-cytosine of DNA(mol %)	56-60	62-65	53-63	58-63	62	61-63	53.8	56.6

^a Data from De Ley *et al.*(21), and this study; ^b Data from Uhlig *et al.*(9), and this study; ^c Data from Gillis *et al.*(22)
+; positive, -; negative, d; 11 to 90% of the strains are positive, w; weakly positive, ND; not determined

등과는 여러 특성면에서 현저한 차이점이 있었지만 pigment 형성, γ -pyrone의 생성, ketogenesis 그리고 mannitol과 fructose에서의 산생성, ubiquinone type과 DNA 염기 조성 등에서 *A. pasteurianus*와 유사한 특징을 가지고 있는 것으로 나타났다(Table 3). 그러나 탄소원 이용을 조사한 결과 *A. pasteurianus*는 methanol, dulcitol, sorbose, cellobiose 등을 거의 이용하지 못한 반면 KM은 이들을 탄소원으로 이용하였으며 Voges-Proskauer 반응에서 KM은 *A. pasteurianus*와는 대조적으로 negative 반응을 보였으며 D-glucose로부터는 2-ketogluconic acid를 생성하지 못하는 것이 차이점으로 나타났다. 특히 Uhlig 등(9)은 *A. pasteurianus*는 methanol을 유일한 탄소원으로 이용하여 성장하지 못한다고 보고하였다. 그러나 KM 균주의 경우는 methanol이 함유된 배지에서 잘 자랐으며 또한 ethanol 대신 methanol이 함유된 Frateur's modified Hoyer vitamin 배지에서도 성장함을 관찰하였으며 *A. pasteurianus*가 asparagine, glutamine, proline, valine 등의 L-아미노산을 질소원으로 이용하지 못한 반면 KM 균주는 비교적 좋은 성장을 보여주었다.

한편 BPV 균주를 Table 3에 나타낸 바와 같이 대조 균주의 특성과 비교했을 때 ubiquinone system으로 Q₁₀을 가지고 있는 점으로 보아 *A. liquefaciens*, *A. methanolicus* 그리고 *A. diazotrophicus* 등의 종으로 분류될 수도 있으나 DNA 염기 조성비와 여러 가지 생리생화학적 특성을 비교했을 때 이들과는 다른 것으로 나타났다. 특히 *A. methanolicus*와는 methanol을 탄소원으로 이용할 수 없다는 점에서, *A. diazotrophicus*와는 질소 고정을 할 수 없다는 점에서 가장 중요한 차이점을 보였다. *A. liquefaciens*와는 비교적 그 특성이 유사한 것으로 보이나 DNA의 염기 조성비에서 큰 차이를 보이고 GYC

배지에서 brown pigment를 형성하지 않는다는 점과 D-fructose에서 γ -pyrone을 생성하지 못한다는 점에서 차이를 나타내고 있다. 이상과 같은 결과들은 *Acetobacter* 속에 대한 기존의 여러 보고들과 비교해 보았을 때 분리 균주 KM은 *A. pasteurianus*와 가장 유사한 특성을 보였으나 BPV의 경우에는 다른 대조 균주와 여러 특성 면에서 많은 차이점을 나타내었기 때문에 새로운 종일 가능성이 높은 것으로 사료되었고, 더 이상의 특성을 비교하기 위해선 현재까지의 *Acetobacter* 속에 대한 분류체계가 미흡함을 고려할 때 DNA-DNA hybridization 실험 등의 분자 유전학적 연구가 요구된다.

요 약

한국 고유의 방법으로 발효시킨 막걸리 식초와 감 식초로부터 초산생성균을 분리하여 각각 KM, BPV라 명명하였다. 분리균주는 모두 그람 음성균으로 운동성이 없었으며 포자를 형성하지 않았다. 두 균주는 에탄올로부터 초산을 생성하였으며 초산과 젖산을 CO₂와 H₂O로 재산화시켰다. 분리 균주 모두 catalase test에서는 양성반응을, oxidase, gelatin liquefaction, VP test, H₂S와 indole formation test에서는 음성반응을 나타내었다. 또한 glucose와 Fructose로부터 γ -pyrone을 형성하지는 못하였다. BPV의 경우 glucose로부터 2-ketogluconic acid를 생성하였지만 KM의 경우 2-ketogluconic acid를 생성하지 못했다. KM의 경우 ethanol 11%까지도 성장이 가능하였지만 BPV는 5% 이하에서만 성장하였다. KM과 BPV의 지방산의 조성에서는 C_{18:1}과 C_{14:0} 지방산들이 특징적으로 존재하였으며 ubiquinone system은 KM이 Q₉이고 BPV는 Q₁₀이었다. DNA의 Guanine-plus-cytosine content는 KM이

52.8, BPV는 56.6mol%이었다. 여러 생리생화학적 특성을 비교해 볼 때 KM 균주는 *Acetobacter pasteurianus*와 그 특성이 유사하나 BPV 균주는 기존의 *Acetobacter* 대조 균주와 그 특성이 다른 것으로 사료된다.

감 사

본 연구는 교육부 기초과학연구소 조성비(BSRI-91-424)로 수행되었으며 연구비 지원에 감사드립니다.

참고문헌

1. T. Asai, H. Iizuka and K. Komagata(1964), *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **10**, 95.
2. T. Asai(1968), Acetic acid bacteria, University of Tokyo Press, Tokyo.
3. Y. Yamada, M. Nunoda, T. Ishikawa and Y. Tahara(1981), *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **27**, 405.
4. C. H. Person(1822), *Mycologia Europaea*, **1**, 96.
5. T. Takahashi(1907), Bulletin of the College of Agriculture of the University of Tokyo, **7**, 531.
6. J. L. Shimwell(1984), Wallerstein Laboratories Communications, **11**, 27.
7. P. Dupuy(1957), *Annales de Technologie*, **2**, 217.
8. G. C. Turtura, F. Casaliccio and B. Biavati (1973), *Annali di Microbiologia ed Enzimologia*, **23**, 157.
9. H. Uhlig, K. Karbaum and A. Steudel(1986), *Int. J. System. Bacteriol.*, **36**, 317.
10. M. M. Attwood, J. P. van Dijken and J. T. Pronk(1991), *J. Ferment. Bioeng.*, **72**, 101.
11. T. Okumura, T. Uozumi and T. Beppu(1985), *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 1011.
12. M. Fukaya, H. Tagami, K. Tayama H. Okumura, Y. Kawamura and T. Beppu(1989), *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 2435.
13. J. G. Carr(1968), Identification methods for microbiologists(B. M. Gibbs and D. A. Shapton ed), part B, P. 1, Academic press, London.
14. J. Frateur(1950), *Cellule Rec. Cytol. Histol.*, **53**, 285.
15. J. F. Macfaddin(1980), Biochemical tests for identification of medical bacteria, 2nd ed., p. 137. The Williams and Wilkins Co., Baltimore.
16. Y. Yamada, G. Inouye, Y. Tahara and K. Kondo(1976), *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **22**, 285.
17. J. Marmur(1961), *J. Mol. Biol.*, **3**, 208.
18. J. Tamaoka and K. Komagata(1984), *FEMS Microbiol. Lett.*, **25**, 125.
19. S. Ikemoto, K. Katoh and K. Komagata (1978), *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **24**, 41.
20. J. De Ley and F. Gossele(1984), Bergy's Manual of Systematic Bacteriology, 9th ed., p. 268, The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
21. J. De Ley, M. Gillis and J. Swings(1984), Bergy's Manual of Systematic Bacteriology (N. R. Krieg and J. G. Holt ed.), Vol. I, p. 267, The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
22. M. Gills, K. Kersters, B. Hoste, D. Janssens, R. M. Kroppenstedt, M. P. Stephan, K. R. S. Teixeira, J. Bobereiner and J. De Ley(1989), *Int. J. System. Bacteriol.*, **39**, 361.