J. Korean Soc. Food Nutr.
23 (5), 845 ~ 848 (1994)

고농도 에탄올 내성균 *Acetobacter* sp. FM-10을 이용한 초산 발효조건 검토

박권삼 · 이명숙* · 목종수 · 장동석†
부산수산대학교 식품공학과
*부산수산대학교 미생물학과

Investigation of the Condition of Acetic Acid Fermentation with High Concentration Ethanol Resistant *Acetobacter* sp. FM-10

Kwon-Sam Park, Myung-Suk Lee*, Jong-Soo Mok and Dong-Suck Chang†
Dept. of Food Science and Technology, National Fisheries University of Pusan, Pusan 608-737, Korea
**Dept. of Microbiology, National Fisheries University of Pusan, Pusan 608-737, Korea*

Abstract

The fermenting conditions for acetic acid production with *Acetobacter* sp. FM-10 which could grow in the medium containing 10% ethanol were investigated. Initial concentration of acetic acid in broth medium affected greatly to the fermentation speed. For example, the acetic acid production increased proportionally by the increasing of initial concentration of acetic acid up to 0.75%, while it decreased rapidly in case of the acetic acid concentration was higher than 1.0%. When the cultivation was started with broth medium containing 5% ethanol, the additional adding ethanol during the fermentation was not significantly increased the acidity of the medium. The acidity of the medium containing 10% ethanol was reached to 8.3% after shaking cultivation for 10 days with 150rpm shaking speed. Acetic acid production with shaking cultivation was faster than static cultivation by about 10 days under the same condition except shaking. In acetic acid fermentation with the batch style fermentor, the optimum fermentation condition was 700rpm of agitation speed and 5L/min of air flow rate in 3L culture medium.

Key words : *Acetobacter* sp., acetic acid fermentation, fermentor

서 론

초산균은 절대 호기성이기 때문에 균이 증식함에 따라 균막을 형성하므로써 미생물의 호흡활성을 저해하게 된다. 따라서 저해 요인을 방지하고 효소활성을 증진시키려는 연구로서 Hanssan과 Robinson[1]의 기계적인 교반과 Ho 등[2]의 *air lift fermentation*방법 등이 있으며, 유기약품 첨가에 의한 발효 효율 증진에 관한 연구로는 acetic acid와 에탄올 첨가에 의한 초산균 증식의 상승효과에 관한 Akira 등[3]의 보고가 있다. 近藤 등[4]은 ceramic honeycomb-monolith 담체에 의한 고정화 초산균에 의한 식초제조, Akira[5]는 polyprolene fibers에 고정화한 초산균에 의한 식초제조에 관한 연구를 보고한 바 있으나 고농도 에탄올 내성균의 개발과 개발균주에 의한 초산발효에 관한 연구는 그다지 많지 않다. 초산균의 증식은 에탄올 농도가 높을수록 bactericidal 현상과 대사 중간생성물에 의한 발효억제현상[6,7]에 의하여 증식이 억제되기 때문에 고농도의 에탄올에서 증식이 가능하고 발효속도가 빠른 균주를 개발한다면 고산도 식초를 생산할 수 있으며 경제성과 수율면에서도 유리하다 하겠다.

저자들은 초산생산 수율을 높이기 위하여 재래식 식초 발효공장의 종초로 부터 에탄올 10%에서 잘 증식하는 *Acetobacter* sp. FM-10을 에탄올 순양법으로 개발하였는데[8] 본 연구에서는 초산생산 효율을 높이기 위하여 발효조건을 정치배양시 초기 초산농도 및 초기

†To whom all correspondence should be addressed

에탄올 농도가 초산생성에 어떠한 영향을 미치는 가를 살펴보았으며, 또한 진탕배양 및 발효조 배양시 발효효율을 비교 · 검토하였다.

재료 및 방법

사용배지 및 균주

초산 생산용 배지는 1% yeast extract, 5% glucose 및 10% ethanol이 함유된 배지를 사용하였으며, 균주는 고농도 에탄올 내성균인 *Acetobacter* sp. FM-10[8]을 사용하였다.

배양방법

진탕배양의 경우 1L 삼각 플라스크에 배지를 200ml가 되게하여 24시간 증균한 *Acetobacter* sp. FM-10을 배양액의 0.1%가 되게 접종한 후, 진탕배양기 (Lab-Line Instruments Inc., Model 3595, U.S.A.)에서 교반속도를 100, 150, 180rpm으로 각각 달리하면서 30°C에서 배양하였고, 발효조 배양은 total volume 및 working volume이 각각 5L 및 3L의 발효조 KF-601 (한국 발효조 Co.)을 사용하여 교반속도를 300, 500, 700rpm과 통기량을 1, 3, 5, 7L/min으로 각각 달리하면서 30°C에서 배양하였다.

산도측정

산도의 측정은 전보[8]와 동일하다.

에탄올 정량

분별증류장치를 이용하여 배양액 중의 에탄올을 가열증류시켜 포집한 후 비중계를 이용하여 정량하였다[9].

결과 및 고찰

정치배양에 의한 발효효율 검토

정치배양시 *Acetobacter* sp. FM-10의 초산생성 최적 조건을 검토한 결과, 전보[8]에서 처럼 에탄올 10%, 포도당 5%, yeast extract 1%가 함유된 배지를 이용하여 30°C에서 배양하였을 경우, 배양 20일 만에 최고 산도치인 9.0%에 도달하여 초산생성 최적 조건임을 알 수 있었다.

따라서 본 보에서는 *Acetobacter* sp. FM-10의 정치배양시 초기 초산농도와 발효 도중에 에탄올 농도의 증가가 초산 발효에 어떠한 영향을 미치는지를 살펴보았다.

초기 초산농도에 따른 발효효율 검토

배양초기 배지의 초산 농도가 초산 생성속도에 어떠한 영향을 미치는 가를 알아 보기 위하여 초산생산용 배지에 초산농도를 0~1.0% 까지 0.25% 단위로 각각 달리 첨가하여 30°C에서 정치배양을 하면서 실험한 결과를 Fig. 1에 나타내었다.

배지의 초기 초산농도가 0.75% 까지는 초산생성에 큰 차이는 없었으며, 초기 초산농도가 높을수록 생성되는 초산량은 조금씩 증가하는 경향을 나타내었으나, 1% 농도에서는 초산생성이 현저히 저해되었다.

재래식 식초발효 공장에서 발효 배양을 마치고 1/3~1/4 정도의 배양액을 남겨서 이를 다음 발효시의 종초로 이용하는데, 이 때 종초의 과다 첨가로 인하여 배양전 배지의 초산농도가 1% 이상이 되면 초산 생산이 크게 감소하므로 종초의 첨가량에 세심한 주의가 필요하다 하겠다.

발효 도중에 에탄올농도의 증가가 초산발효에 미치는 영향

Acetobacter sp. FM-10 균주에 대하여 초산생산용 배지에 처음 부터 에탄올을 10% 첨가한 배양액에서의 초산 생성속도와 초기 에탄올 농도가 5%인 배양액에서 배양하다가 에탄올이 거의 소모된 시점에 다시 에탄올을 1%씩을 추가했을 때의 초산 생성속도 및 에탄올 소비속도를 30°C에서 정치배양하면서 살펴본 결과는 Fig. 2와 같다.

처음부터 에탄올이 10% 첨가된 배양액의 경우에는 배양 6일 경에 산도치는 0.5%, 잔존 에탄올량은 9.1%였으며, 배양 12일 경에 산도치는 4.2%, 잔존 에탄올

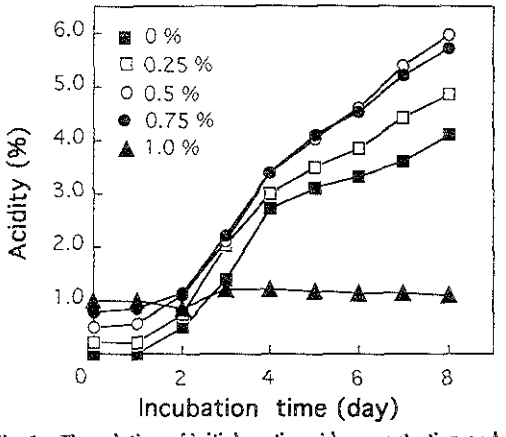

Fig. 1. The relation of initial acetic acid concentration and production rates of acetic acid for static culture with *Acetobacter* sp. FM-10 at 30°C.

량은 4.3%였으며, 배양 20일 경에 최고 산도치인 9.0%에 이르렀으며 이 때의 에탄올 잔존량은 0.8%였다. 그러나 에탄올이 5% 첨가된 배양액의 경우에는 배양 6일 만에 산도가 4.9%, 잔존 에탄올량은 0.3%로 10% 첨가구 보다 빠르게 진행되었다. 그러나 배양 6일 만에 또 배양 18일 경에 각각 에탄올을 1%씩 추가해 주고 배양하여도 산도는 증가하지 않고 5% 정도로 거의 변화가 없었다.

이러한 실험결과로 보아 배양 도중에 에탄올을 첨가해 주게되면 이미 그 농도의 에탄올에 적응되어 있던 균이 변화된 에탄올의 농도에 다시 적응하기가 힘들었기 때문으로 사료된다. 따라서 고농도의 초산을 얻기 위해서는 처음부터 에탄올을 10% 첨가한 상태에서 배양을 시작해야 한다는 것을 알 수 있었다.

진탕배양에 의한 발효효율 검토

진탕속도에 의한 발효효율을 검토하기 위하여 10% 에탄올을 함유하는 초산 생산용배지에 *Acetobacter* sp. FM-10을 접종한 후, 30°C에서 각각 100, 150, 180rpm의 속도로 진탕배양하면서 산도의 변화를 조사한 결과는 Fig. 3과 같다.

전보[9]에서와 같이 정치배양시 배양 20일 경에 최고 산도치인 9.0%에 도달한 뒤 서서히 감소하였고, 진탕배양의 경우 100rpm에서는 배양 12일 만에, 150rpm에서는 배양 10일 만에 그리고 180rpm에서 배양 8일 만에 산도치가 8.3%로 각각 최고에 달한 뒤 서서히 감소하는 경향을 나타내었다. 즉, 100rpm 이상으로 진탕배양시키면 정치배양에 비하여 최고 산도치는 약간 낮았으나, 진탕속도가 빠를수록 산 생성속도가 증가함을 알 수 있었다.

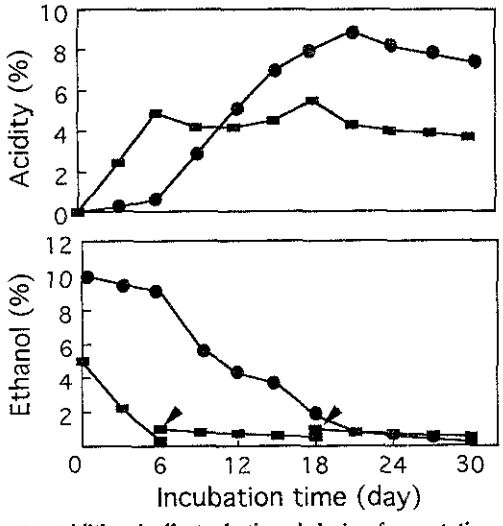

Fig. 2. Additional effect of ethanol during fermentation of acetic acid with *Acetobacter* sp. FM-10 at 30°C.
●, Initial ethanol concentration 10%
■, Initial ethanol concentration 5%
▶, Added 1% ethanol

발효조 배양에 의한 발효효율 검토

Batch식 발효조를 이용한 발효에서 통기량과 교반속도에 의한 발효 초기 초산 생성속도를 알아보기 위하여 초산 생산용배지에 *Acetobacter* sp. FM-10을 접종한 후, 30°C에서 통기량을 5L/min으로 고정하고, 교반속도를 300, 500, 700rpm으로 각각 달리했을 때는 배양 60시간만에 산도는 300rpm의 경우 3.2%였고, 500rpm은 4.3%였으며, 700rpm의 경우는 6.6%로 700rpm에서 초산 생성속도가 가장 빨랐다(Fig. 4).

교반속도를 700rpm으로 고정하고 통기량을 1, 3, 5, 7L/min으로 각각 달리하여 실험한 결과, 통기량이 1L/min일 때는 배양 60시간 만에 산도는 2.9%였으며, 3L/min일 때는 4.1%, 5L/min일 때는 6.6%, 7L/min은 5.3%로 통기량이 5L/min일 때 초기 초산 생성속도가 가장 빨랐다(Fig. 5). 김과 이[10]도 *Acetobacter aceticus*을 glucose 배지에 접종하여 심부배양할 경우 700rpm, 1.25vvm에서 초산생성이 가장 좋아 60시간에 12%의 초산이 생성된다고 보고하였으며, 일반적으로 심부배양의 경우 표면배양법 보다 10배 정도 초산 생성속도가 빠르다고 알려져 있다[11].

따라서 발효조에서 배양할 경우, 교반속도 700rpm 및 통기량 5L/min/3L working volume에서 초산 생성속도가 가장 우수하였다.

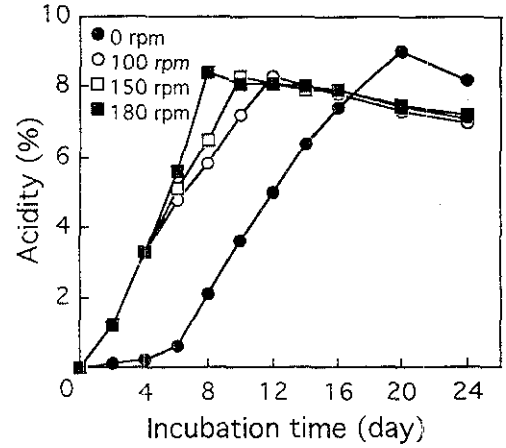

Fig. 3. Effect of shaking speeds in the shaking culture of *Acetobacter* sp. FM-10 at 30°C.

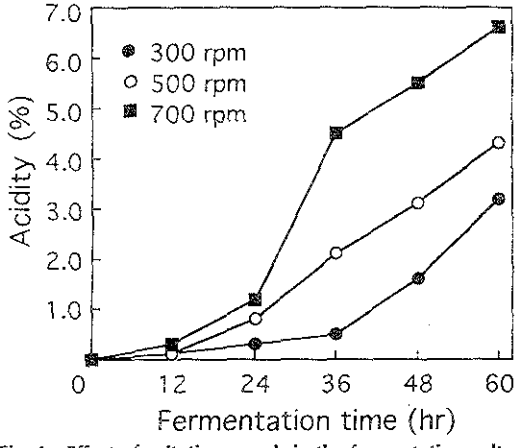

Fig. 4. Effect of agitation speeds in the fermentation culture of *Acetobacter* sp. FM-10 at 30°C.
Air flow rate ; 5L/min, Working volume ; 3L

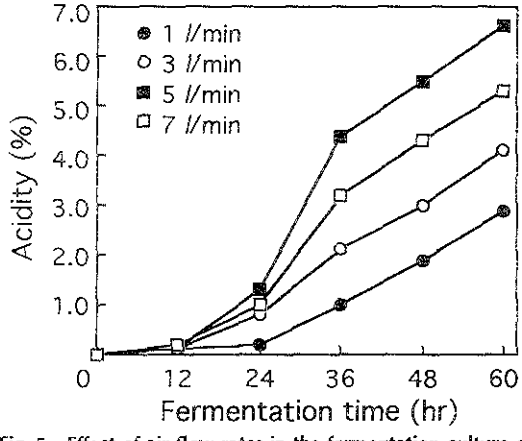

Fig. 5. Effect of air flow rates in the fermentation culture of *Acetobacter* sp. FM-10 at 30°C.
Agitation speed ; 700rpm, Working volume ; 3L

요 약

10%의 고농도 에탄올에 내성을 나타내는 *Acetobacter* sp. FM-10의 초산 발효조건을 검토한 결과, *Acetobacter* sp. FM-10을 이용하여 정치배양했을 경우, 배양액의 초기 초산농도는 초산 생성속도에 큰 영향을 미쳤는데, 0.75% 농도 까지는 초기 초산농도가 높을수록 좋았으나, 1% 부터는 초산생성이 현저히 저해되었다. 한편, 배지의 초기 에탄올 농도를 5%로 하여 배양하다가 배양액속의 에탄올이 소모된 시점에서 에탄올을 1%씩 추가시켜 주었을 경우에 배양 초기 부터 10%의 에탄올 배지에서 배양시킨 경우 보다 발효수율이 현등히 저하되어 주목할만한 산도 증가는 나타나지 않았다. 100 rpm 이상으로 진탕배양하였을 때 진탕속도가 증가할수록 최고 산도에 도달하는 시간이 빨라졌으며, 150rpm에서는 배양 10일 만에 최고 산도가 8.3%에 도달하여 정치배양 보다 최고산도에 이르는 시간이 10일 정도 빨랐다. 발효조에서 초산생산 최적조건은 교반속도 700rpm, 통기량 5L/min였다.

문 헌

1. Hanssan, I. T. M. and Robinson, C. W. : Oxygen transfer in mechanically agitated aqueous system containing dispersed hydrocarbon. *Biotech. Bioeng.*, **19**, 661 (1977)
2. 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)
3. 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)
4. 近藤正夫, 鈴木康之, 加藤 熙 : ハニカム狀セラミックモノリスを擔體とする固定化醋酸菌による食醋の製造. 醱酵工學, **66**, 393 (1988)
5. Akira, O. : Vinegar production with growth on a fibrous support. *J. Ferment. Technol.*, **63**, 57 (1985)
6. Romeo, J., Scherage, M. and Umbrait, W. W. : Stimulation of the growth and respiration of a methylotrophic bacterium by morphine. *Appl. Environ. Microbiol.*, **34**, 611 (1977)
7. 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)
8. 박권삼, 장동석, 조학래, 박욱연 : 고농도 에탄올 내성 초산균의 개발 및 배양특성. 한국영양식량학회지, **23**, 666 (1994)
9. 近藤榮昭, 谷正 則, 別府道子, 七山征子 : 食品加工學實驗 · 實習書. 光生館, p.34 (1983)
10. 김상우, 이근태 : *Acetobacter aceti*균의 심부배양에 의한 초산발효의 동력학적 연구. 한국수산학회지, **25**, 301 (1992)
11. Ebney, H. and Follman, H. : Acetic acid biotechnology 3. Verlag Chemie Weinhein, p.389 (1983)

(1994년 6월 21일 접수)