

감식초에서 분리한 *Acetobacter* sp.의 생화학적 특성

이 상 복 · 전 승 호*

원광보건대학 식품과학과 · 원광대학교 대학원 농화학과

The Biochemical Characteristics of *Acetobacter* sp. Isolated from Persimmen Vinegar

Sang-Bok Lee · Seung-Ho Chun*

Department of Food Science, Wonkwang Healthy Science College
The Graduate School of Agricultural Chemistry Wonkwang University

Abstract

The following is experimental result of Biochemical characteristics of *Acetobacter* sp.

Acetobacter sp. were gram negative, short rod, non-spore-forming and motile. It reacted positively catalase, methyl red, oxidation fermentation, voges-proskauer and nitrate reduction tests and hydrogen sulfide test negative and ONPG negative. *Acetobacter* sp. showed normal growth curve in Carr broth and there was no significant difference between isolates and type strains such as *Acetobacter aceti*(KCTC 1010), *Acetobacter diazotrophicus*(KCTC 2859), *Acetobacter liquefaciens*(KCTC 2804) and *Acetobacter pasteurianus* (KCTC 1008).

I. 서 론

식초는 오래전부터 이용해온 조미료로 당류나 전분을 함유한 원료를¹⁾ 사용한 알코올 발효로서 대표적인 초산균은 *Acetobacter aceti*, *Acetobacter xylinum*, *Acetobacter pasteurianus*, *Acetobacter suboxydans*, *Acetobacter orleans* 등²⁾이 있고, 초산균은 그람 음성이며, 편성 호기성 간균 또는 구균으로 포자는 형성하지 않는다³⁾.

Acetobacter sp.는 주로 alcoholic juice가 존재하는 곳에서 많이 발견되며, 이와 같은 *Acetobacter* sp.에 대한 연구로는 Person⁴⁾이 sow wine 과 beers에서 최초로 보고함으로써 시작되었다. 그 후, 다양한 발효식품으로부터 *Acetobacter* sp.의

분리에 관한 연구가 보고되었으며^{5~8)}, 오⁹⁾등은 배를 이용한 식초의 발효조건에 대해 연구하였으며, 유가식 배양에 의한 고산도 식초의 생산에 대한 연구는 이¹⁰⁾등이 검토하였으며, 김¹¹⁾등의 보리 식초 제조에 관한 연구가 보고 되었다.

한편, *Acetobacter* sp.는 그 대사 산물인 초산에 의해 생육이 저해되거나 산생성량이 감소하는데, 이는 고농도의 식초 제조시 제품의 품질에 중요한 영향을 미칠 것으로 사료된다. 일반적으로 초산과 같은 유기산에 의한 미생물의 생육억제 기전으로는 세포의 외부환경에 있어 대부분이 약산인 유기산의 함량이 증가하게되면 비해리 상태의 유기산량이 증가하게 되고 이 비해리 상태의 유기산은 미생물의 세포막을 통해 세포내로 유입된다 따라

서 세포내로 유입된 유기산은 다시 해리되어 세포질의 pH를 저하시켜 세포내의 여러 가지 대사과정을 저해할 뿐만 아니라 세포막의 선택적인 투과성과 관련된 양자기동력(proton motive force)을瓦解시켜 결국 영양분의 수송을 저해하여 미생물의 생육을 억제하는 것으로 알려져 있다¹³⁻¹⁴⁾. 이에 대한 방어 기작으로 막결합성 H⁻-ATPase (membrane bound H⁻-ATPase)의 활성화와 그 양이 관여한다는 보고가 있다. 즉, 세포내로 유입된 proton은 H⁻-ATPase에 의해 세포외로 방출되어 세포내의 pH항상성(pH homeostasis)을 유지할 수 있는 것이다. 이때의 반응은 에너지 의존성으로 알려져 있다¹⁵⁻¹⁶⁾.

따라서 본 실험에서는 표준균주와, 감식초에서 분리한 균주를 분리 동정하여 한국의 전통 발효식품인 감식초에 관한 연구에 기초자료로 제공하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 재 료

본 실험에 사용한 균주는 전북 고산 감골식품과 호중식품로부터 분리하였으며, 표준균주로서 *Acetobacter aceti*(KCTC 1010), *Acetobacter diazotrophicus*(KCTC 2859) *Acetobacter liquefaciens*(KCTC 2804), *Acetobacter pasteurianus*(KCTC 1008)를 한국유전자은행에서 분양 받아 사용하였다.

2. 사용배지

초산균을 분리하기 위한 배지 조성은 3.0% glucose, 1.0% peptone, 1.0% beef extract, 2.0% agar, pH7.0 이었으며, 고산도 생성균주를 선별하기 위한 액체 배지는 0.5% glucose, 1.0% glycerine, 0.2% peptone, 0.2% yeast extract, 0.05% MgSO₄·7H₂O, pH는 3.0으로 조성하였다. 또한 carr broth 2% yeast extract, 0.5% peptone을 함유한 배지를 사용하였으며 이때 배지의 pH는 6.8 이었다.

3. 균주의 분리 및 생화학적 특성조사

감식초로부터 순수 분리한 초산균종 고산도 생성균주를 선별하기 위한 액체배지에 접종하고 30℃에서 7일간 배양한 후 호산 생성능력이 가장 우수한 균을 선별하여 실험에 사용하였으며 생화학적 특성은 aesculin(esculin)가수분해, 카제인가수분해, catalase시험, citrate이용시험, decarboxylase검정, gellatin액화시험, hydrogen sulfide생성시험, indole생성시험, KCN검정시험, methyl red검정시험, 질산 환원시, oxidase검정시험, 산화발효검정(oxidationfermentation test; O/F Test; oxiferm test)시험 urease검정시험, Voges-proskauer검정시험¹⁷⁾ 등을 통해 측정하였다.

4. 증식도 측정

진탕배양시 균증식도는 spectrophotometer(Varian DMS 200, U.S.A)를 사용하여 660nm에서 배양액의 흡광도를 나타내었다.

5. 산도측정

산도측정은 phenolphthalein 용액을 지시약으로 하여 0.1 N NaOH 용액으로 중화적정하고 초산균으로 환원하여 나타내었다¹⁸⁾.

6. 배양온도의 영향

분리된 균주의 증식 최적 온도를 검토하기 위해 배양온도를 20, 30, 40℃로 조정하고 7일동안 정지 배양하면서 경시적인 균의 증식과 초산의 생성량을 조사하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 분리균의 형태학적 특성

분리균들의 형태학적 특성을 조사한 결과 초산 생성능력이 가장 우수한 3종의 *Acetobacter* sp. 균주를 분리하여 S-1, S-2, S-3로 명명하였으며 Table 1에 나타낸 바와 같이 S-1, S-2, S-3 균주는 모두 크기 0.5~0.6×2.0 μm인 Gram 음성의 단간균이었고, 포자는 존재하지 않았으며 운동성이 있었다. 이는 *Acetobacter* sp.가 갖는 일반적인 특

Table 1. Morphological characteristics of *Acetobacter* sp. isolated from persimmon vinegar

Characteristics	Strains		
	S-1	S-2	S-3
Gram stain	-	-	-
Shape	Short Rod	Short Rod	Short Rod
Spore	None	None	None
Mobility	+	+	+
Size	0.5×2.0 μ m	0.5×2.0 μ m	0.6×2.0 μ m

+ : positive, - : negative

성과 일치하고 있다.

2. 분리균의 생화학적 특성

3종의 분리균들은 Table 2에 나타낸 바와 같이 모두 catalase, methyl red, oxidation fermentation, Voges-Proskauer 및 nitrate reduction test에서는 양성반응을 나타내었으나 hydrogen sulfide와 O-nitro phenyl- β -D-galacto pyranocide(ONPG) test에서는 음성반응을 나타내었다. 또한 Esculin, KCN 및 casein test에서는 *Acetobacter* sp. S-1과 *Acetobacter* sp. S-3이 양성반응을 *Acetobacter* sp. S-2가 음성반응을 나타내었고, urease와 indole test에서 S-1과 S-3은 음성반응을, S-2는 양성반응을 나타내었다.

3. 분리균의 배양학적 특성

감식초로부터 분리한 *Acetobacter* sp. S-1, S-2, S-3의 배양학적 특성을 표준균주와 비교 하여 균의 생육과 산생성량을 측정함으로써 평가한 결과는 Fig 1~2와 같다. Carr broth 내에서 분리균 *Acetobacter* sp. S-1, S-2 및 S-3의 생육곡선은 균종간의 큰 차이가 없고 표준균주인 *Acetobacterium aceti*(KCTC 1010), *Acetobacterium diazotrophicus* (KCTC 2804) 및 *Acetobacterium liquefaciens* (KCTC 2859)와도 유의적인 차이가 없이 일반적인 미생물에서 보여지는 정상곡선(Normal curve)을 나타내었다. 즉, 유도기는 분리

Table 2. Biochemical characteristics of *Acetobacter* sp. isolated from persimmon vinegar

Characteristics	Strains		
	S-1	S-2	S-3
Esculin	+	-	+
Catalase	+	+	+
Hydrogen sulfide	-	-	-
KCN	+	-	+
Methyl red	+	+	+
ONPG	-	-	-
Oxidase	-	-	+
Oxidation-Fermentation Test	+	+	+
Urease	-	+	-
Voges-Proskauer	+	+	+
Casein	+	-	+
Indole	-	+	-
Nitrate reduction	+	+	+

+ : positive, - : negative

된 *Acetobacter* sp. S-1, S-2, S-3와 표준균주간의 큰 차이 없이 뚜렷하게 나타나지 않았고 대수기는 *Acetobacter* sp. S-1, S-2, S-3와 표준균주간의 유의적인 차이 없이 약 12~48시간 정도였으며, 그 이후의 균수의 변화는 거의 없었다. Carr broth에서 *Acetobacter* sp. S-1, S-2, S-3 배양액의 총산도 변화는 균의 성장형태와 같은 경향이였으며, 표준균주인 *Acetobacterium aceti*(KCTC 1010), *Acetobacterium diazotrophicus*(KCTC 2804) 및 *Acetobacterium liquefaciens*(KCTC 2859)와 큰 차이가 없었다. 즉, 배양시작 후 12시간 동안은 분리균주와 표준균주 모두 산생성이 거의 없었으나 배양 12시간에서 24시간까지는 산생성량이 급격히 증가하여 총산도로 약 6.0%에 도달하였으며 그 이후 큰 변화가 없었다. 표준균주와 *Acetobacter* sp. S-3번 균주가 6.2%로 가장 높은 산도를 나타내었으며, 균의 증식도 활발한 것으로 조사되었다.

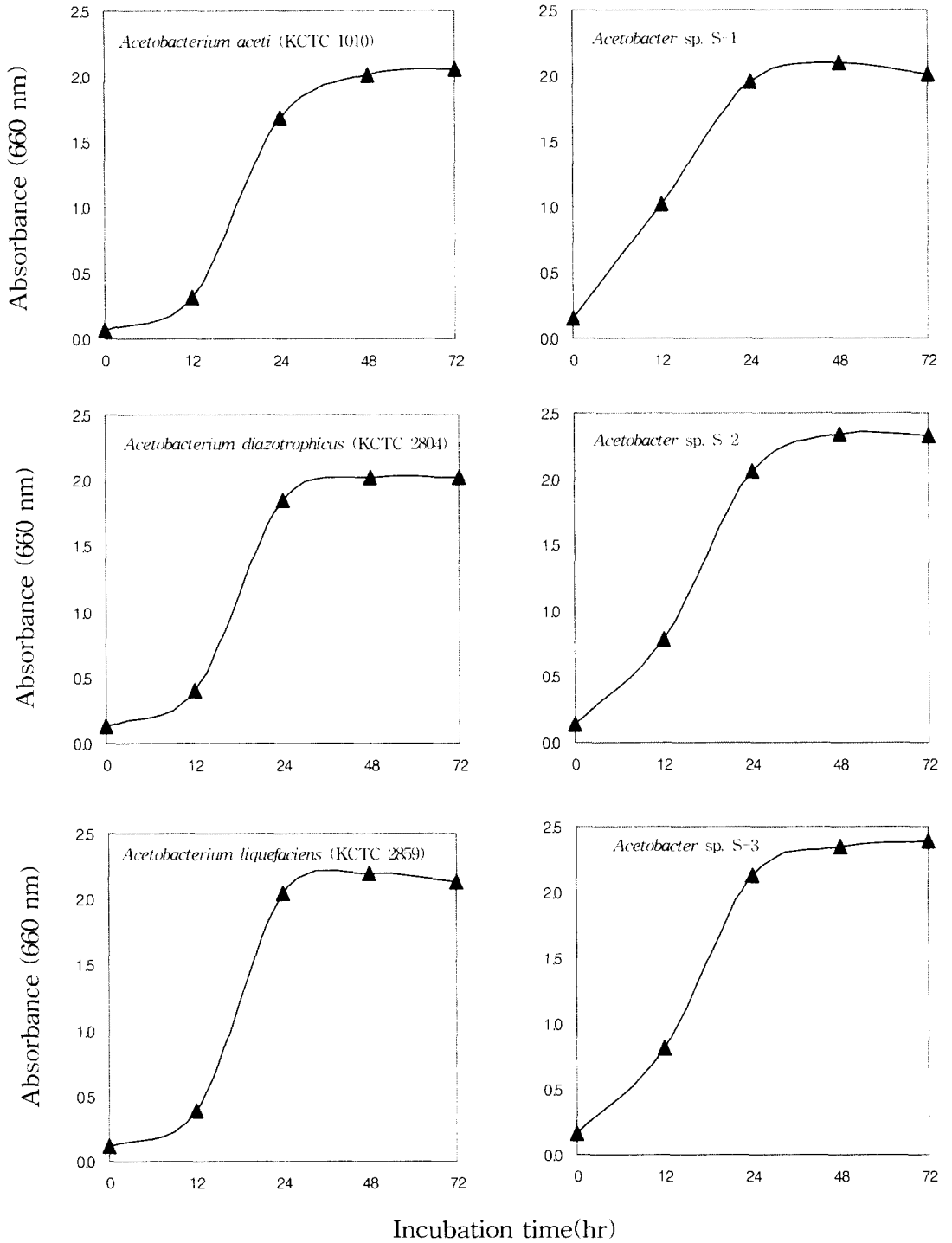


Fig. 1. Growth curve in type strains of *Acetobacter* sp. and *Acetobacter* sp. isolated from persimmon vinegar

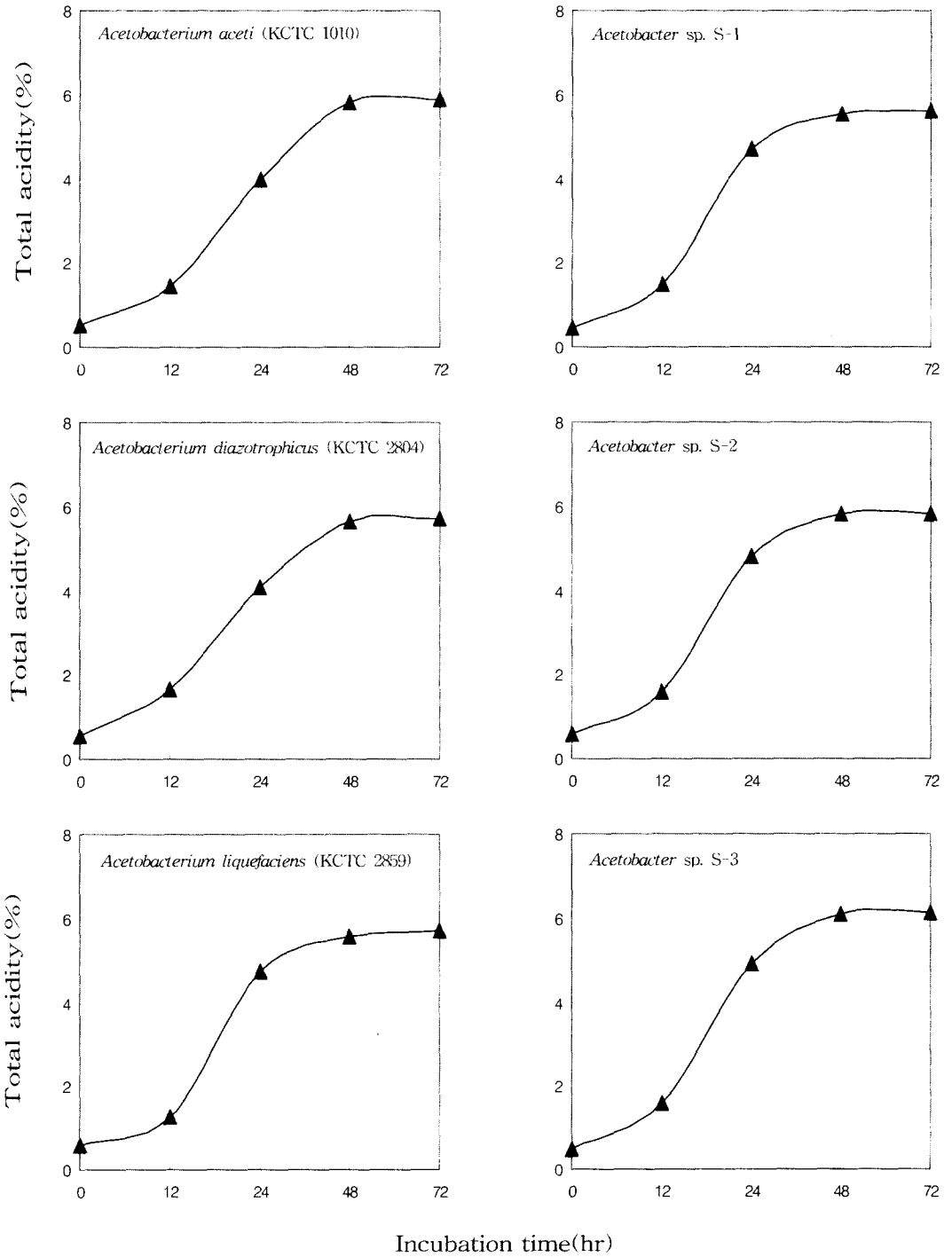


Fig. 2. Acid production in type strains of *Acetobacter* sp. and *Acetobacter* sp. isolated from persimmon vinegar

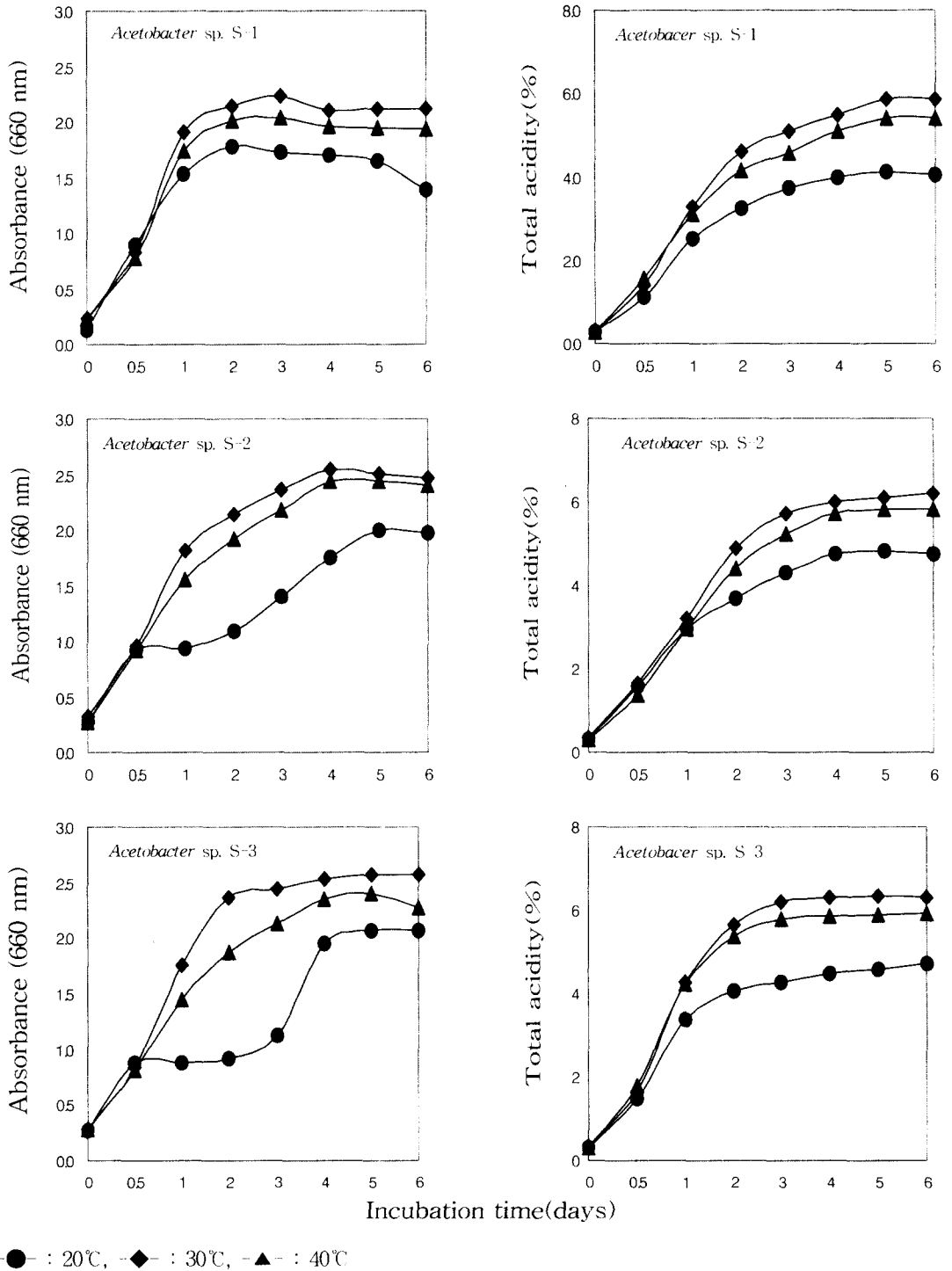


Fig. 3. Cell growths and acid productions of *Acetobacter* sp. isolated from persimmon vinegar according to incubation temperature.

4. 분리균의 균생육과 산생성에 미치는 배양온도의 영향

배양온도에 따른 분리균의 산생성량의 변화를 표준균주와 비교 검토한 결과는 Fig 3과 같다. 즉, 감식초에서 분리된 *Acetobacter* sp. S-1, S-2 및 S-3간에 큰 차이가 없었을 뿐만 아니라 표준균주인 *Acetobacterium aceti*(KCTC 1010), *Acetobacterium diazotrophicus*(KCTC 2804) 및 *Acetobacterium liquefaciens*(KCTC 2859)와도 큰 차이가 없이 배양온도가 30℃일 때가 40℃와 25℃일 때보다 산생성능이 우수하였다.

초산발효시 배양온도가 너무 낮으면 발효속도가 늦어지고, 너무 높으면 ethanol 및 초산의 손실이 일어나며 풍미를 잃게 되는데^{19, 20)}, 본 실험에서 분리한 *Acetobacter* sp. S-1, S-2, S-3 세 균주의 최적 생육적온은 30℃로 비교적 저온이므로 ethanol과 초산의 휘발을 억제할 수 있는 온도로 생각되어 초산 발효에 유용한 균주로 생각된다.

IV. 결 론

본 실험결과 *Acetobacter* sp.의 생화학적 특성은 다음과 같다.

1. 분리균들은 모두 gram 음성의 단간균으로 포자를 형성하지 않았고 운동성이 있었다. catalase, methy red, oxidation fermentation, Voges-proskaues 및 nitrate reduction test에서 양성반응을 나타내었고 hydrogen sulfide와 ONPG test에서는 음성반응을 나타내었다.
2. 분리균들은 Carr 배지내에서 표준균주인 *Acetobacter aceti*(KCTC 1010), *Acetobacter liquefaciens*(KCTC 2804), *Acetobacter pasteurianus*(KCTC 1008), *Acetobacter diazotrophicus*(KCTC 2859)와 큰 차이가 없이 정상적인 생육 곡선을 나타내었으며 산생성의 경향도 비슷하였다.

감사의 글

본 연구의 일부는 1998년도 원광보건대학 학술

연구비에 의하여 수행되었으며, 연구비 지원에 감사드립니다.

V. 참고문헌

1. Lee, K. S. and Kim, D. H.: Food preservation and processing, Hak Mun Sa p160 (1995)
2. Kim, C. J.: Fermentae chemistey, Soo Hak Sa p210 (1998)
3. Asai, T., Iizuka, H. and Komagata, K.: J. Gen. Appl. Microbiol., 10, 95 (1964)
4. Person, C. H.: Mycologia Europaea, 1, 96 (1822)
5. Takahashi, T.: Bulletin of the college of Agriculture of University of Tokyo, 7, 531 (1907)
6. Shimwell, J. L.: Wallerstein Laboratories Communications, 11, 27 (1984)
7. Dupuy, P.: Annales de Technologie, 2, 217 (1957)
8. Turtura, G. C., Casaliccio, F. and Biavati, B.: Annali di Microbiologiaed Enzimologia, 23, 157 (1973)
9. J. Korean Soc. Food Nutr, 21(4), 377~380 (1992)
10. Appl. Environ. Microbiol., 21(5), 511~512 (1993)
11. Studies on the production, J. Food Sci., 17(5), 350~354 (1985)
12. Lee, D. S.: Optimization in the preparation of Aloe Vinegar by *Acetobacter* sp. and Inhibitory Effect againdt Lipase Activity, M. S. Thesis, wonkwang university. p105-110 (1998)
13. Hunter, D. R. and Segel, I. H.: Effect of weak acids on amino acid transport by *Penicillium chrysogenum*: evidence of a proton or charge gradient as the driving force. J. Bacteriol., 113, 1184 (1973)
14. Bender, G. R. and Marquis, R. E.: Membrane ATPase and acid tolerance of *Acti-*

- nomycetes viscosus* and *Lactobacillus plantarium*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 2120 (1990)
15. Shin, Y. S., Kim, S. H. and Lee, K. S.: Survivals of lactic acid bacteria and its characteristics under the acidic and anaerobic condition, *Appl. Environ. Microbiol.*, 23, 373 (1995)
 16. Park, J. S. and Shin, Y. S.: Effect of *Phellodendri cortex* L. on the Activity of glucosyltransferase and human gingival cell, growth and membrane permeability of *Streptococcus mutans* JC-2. *J. Korean Acad. Dent. Health*, 19 447 (1995)
 17. 미생물학실험 : 한국미생물학회편, 아카데미, 231~293 (1987)
 18. Jeong, D. H. and Jang, H. K.: Food analysis. Jin Ro Yean Gu Sa, 283-285 (1979)
 19. 上染康世, 高野光男, 照井曉造 : 酵素工學雜誌 (日本) 50(1), 7-12 (1972)
 20. Helprin, J. J. and Sullivan, M. X.: *J. of Bacteriol.*, 66, 90 (1947)