

감식초로부터 분리한 *Acetobacter* sp.의 내산성에 관한 연구

심규창 · 이갑상* · 김동한¹ · 류일환 · 이정성²

원광대학교 생명자원과학대학, ¹목포대학교 식품영양학과, ²식품의약품안전청 식품규격과

Studies on the Acid Tolerance of *Acetobacter* sp. Isolated from Persimmon Vinegar

Kyu-Chang Sim, Kap-Sang Lee*, Dong-Han Kim¹, Il-Hwan Ryu and Jung-Sung Lee²

College of Life Science and Natural Resources, Wonkwang University

¹Department of Food and Nutrition, Mokpo National University

²Division of food standard, Korea food and drug administration

The microbial properties and acid tolerance of the three kinds of *Acetobacter* sp. isolated from persimmon vinegar were investigated. Acid tolerance was also evaluated. *Acetobacter* sp. were gram negative, short rod, non-pore forming and motile. They reacted positively catalase, methyl red, oxidation fermentation, Voges-Proskauer and nitrate reduction tests and negative to hydrogen sulfide test and ONPG. *Acetobacter* sp. showed normal growth curve in Carr broth and there was no significant difference between isolates and (standard on) typical strains such as *Acetobacter aceti* (KCTC1010), *Acetobacter liquefaciens* (KCTC2804), *Acetobacter diazotrophicus* (KCTC 2859). Optimum temperature and initial ethanol concentration in incubation were 30°C and 6%, respectively. Growth and acid production of *Acetobacter* sp. were suppressed by the concentration of above 4% acetic acid. The amount of Mg⁺⁺ release from *Acetobacter* sp. cells in medium was increased by acetic acid, and almost in the concentration of 6% acetic acid. Glycolysis by *Acetobacter* sp. had optimal pH about 6.0 to 7.0 and more stable in acidic condition than in alkaline. The H⁺-ATPase of *Acetobacter* sp. S-1 and S-3 showed a maximal activity between pH values of approximately 5.5 to 7.5 and 6.0 to 7.5, respectively.

Key words: persimmon vinegar, *Acetobacter* sp., acid tolerance

서 론

초산발효는 초산균의 작용으로 알코올이 산화되어 초산을 생성하는 호기적 발효로서 대표적인 초산균은 *Acetobacter aceti*, *Acetobacter pasteurianus* 등과 *Gluconobacter oxydans* 가 있고, Gram 음성이며 운동성의 호기성 간균 또는 구균으로 포자는 형성하지 않는다. 또한 *Gluconobacter* sp.는 알코올보다 당을 더 선호하며 초산을 재 산화시킬 수 있는 능력이 없는 반면 *Acetobacter* sp.는 초산을 재 산화시킬 수 있는 TCA 회로를 가지고 있다⁽¹⁾.

*Acetobacter*는 주로 알코올이 존재하는 곳에서 많이 발견되며, *Acetobacter*에 대한 연구로는 Person⁽¹⁰⁾이 포도주와 맥주에서 최초로 보고함으로써 시작되었다. 그 후, 다양한 발효식품으로부터 *Acetobacter* sp.의 분리에 관한 연구가 보고

되었으며^(5,18,19,20), 발효조건과 식초 제조에 관한 연구로는 오⁽²⁴⁾ 등은 배를 이용한 식초의 발효조건, 이⁽⁹⁾ 등은 유가식 배양에 의한 고산도 식초의 생산, 김⁽²²⁾ 등의 보리 식초 제조에 관한 연구가 보고되었다. *Acetobacter*는 그 대사산물인 초산에 의해 생육이 저해되거나 산 생성량이 감소하는데, 이는 고농도의 식초 제조시 제품의 품질에 중요한 영향을 미칠 것으로 사료된다. 일반적으로 초산과 같은 유기산에 의한 미생물의 생육억제 기작은 세포의 외부환경에 있어 대부분이 약산인 유기산의 함량이 증가하게 되면 비 해리 상태의 유기산 양이 증가하게 되고 이 비 해리 상태의 유기산은 미생물의 세포막을 통해 세포 내로 유입된다. 세포 내로 유입된 유기산은 다시 해리 되어 세포질의 pH를 저하시켜 세포내의 여러 가지 대사과정을 저해할 뿐만 아니라 세포막의 선택적인 투과성과 관련된 양자기동력(proton motive force)을 와해시켜 결국 영양분의 수송을 저해하여, 미생물의 생육을 억제하는 것으로 알려져 있다^(1,4). 이에 대한 방어 기작은 막 결합 H⁺-ATPase(membrane bound H⁺-ATPase)의 활성화와 그 양이 관여한다는 보고가 있다. 즉, 세포 내로 유입된 proton은 H⁺-ATPase에 의해 세포 외로 방출되어 세포내의 pH 향

*Corresponding author : Kap-Sang Lee, College of Life Science and Natural Resources, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea
 Tel: 82-63-850-6675
 Fax: 82-63-850-6675
 E-mail: microsim@lycos.co.kr

상성(pH homeostasis)을 유지할 수 있다는 것이다. 이때의 반응은 에너지 의존성으로 알려져 있다^{3,6)}. 따라서 미생물의 세포막에 존재하는 H⁺-ATPase의 활성과 그 효소학적 특성은 미생물의 내산성과 매우 밀접한 관계가 있다고 할 수 있다. 최근까지 식초에 관한 많은 연구가 다방면에서 진행되어 왔으나 식초산 발효와 그 품질에 매우 중요한 초산균의 내산성과 관련된 보고는 전무한 실정이다.

따라서 본 실험에서는 한국의 전통 발효식품인 감식초로부터 *Acetobacter* sp.의 분리 및 내산성을 평가함으로써 감식초의 품질 및 보존성 향상에 관한 연구에 기초 자료로 제공하고자 한다.

재료 및 방법

사용 균주

본 실험에 사용한 균주는 전북 고산감식초(고산감골식품)와 호종감식초(호종식품)로부터 분리하였으며, 표준균주로는 *Acetobacter aceti*(KCTC1010), *Acetobacter liquefaciens*(KCTC 2804), *Acetobacter diazotrophicus*(KCTC 2859)를 한국유전자은행에서 분양 받았다. 감식초로부터 초산균을 분리하기 위한 배지 조성은 Table 1과 같다. Table 1의 배지에서 에탄올과 CaCO₃를 뺀 나머지를 120°C에서 15분간 살균하여 70°C로 냉각한 다음 에탄올과 180°C에서 3시간 살균한 CaCO₃를 무균적으로 첨가하여 잘 흔들고 petri dish에서 감식초를 접종하고 30°C에서 4일간 배양하여 colony주위에 투명한 환을 형성하는 초산균을 분리하고 평판배양을 반복하여 순수 분리하였다.

고산도 생산 균주의 선별

감식초로부터 순수 분리한 초산균중 고산도 생산 균주를 선별하기 위한 액체배지는 Table 2와 같다. 순수 분리하여 보관중인 초산균을 접종하여 30°C에서 2~3일간 배양한 것을 종초로 하여 Table 2의 배지 200 mL를 삼각플라스크에 넣어

Table 1. Modified YCE medium for isolation of acetic acid bacteria

Glucose	3.0%
Peptone	1.0%
Beef extract	1.0%
Ethanol	4.0%
CaCO ₃	1.0%
Agar	1.5%
pH	7.0

Table 2. Medium for selection of acetic acid bacteria

Glucose	0.5%
Glycerine	1.0%
Peptone	0.2%
Yeast extract	0.2%
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.05%
Acetic Acid	2.0%
Ethanol	4.0%
pH	3.0

30°C에서 7일간 배양한 후 초산 생산능이 가장 우수한 균을 선별하여 실험에 사용하였다.

분리균의 형태학적 및 생화학적 특성조사

분리균의 형태학적 특성은 균의 모양과 크기 및 colony의 특징을 검정하였으며, 생화학적 특성은 esculin(esculin sesquihydrate) 가수분해, 카제인 가수분해, catalase 시험, citrate 이용시험, decarboxylase 시험, gelatin 액화시험, hydrogen sulfide 생성시험, indole 생성시험, KCN 검정시험, methylred 검정시험, 질산환원시험, oxidase 시험, 산화발효 검정(oxidation-fermentation test) 시험, urease 시험, Voges-Proskauer 검정시험²⁵⁾ 등을 통해 측정하였다.

표준 균주와 분리균의 일반성장 측정

표준 균주와 분리된 균을 modified Carr broth(yeast extract 2%, peptone 0.5%, ethanol 6%, pH 6.8)에 접종(4%, v/v)한 후 30°C의 항온기에서 72시간 배양하면서 경시적인 균의 생육을 spectrophotometer를 이용하여 660 nm에서 비색 정량 하였다.

산도 측정

배양액 10 mL를 취하여 증류수로 희석하고 phenolphthalein을 지시약으로 하여 0.1 N NaOH 용액으로 적정하였다¹⁾.

배양온도의 영향

분리된 균주의 증식 최적 온도는 배양온도를 20, 30, 40°C로 조정하고 modified Carr broth에 7일간 정지 배양하면서 경시적인 균의 증식과 초산의 생성량을 조사하였다.

초기 에탄올 농도의 영향

Carr broth에서 에탄올의 농도를 3, 6, 9, 12%로 조정한 후 분리균을 접종(4%, v/v)하여 30°C에서 정지 배양하면서 5일 후 균의 증식과 산 생성량을 측정하였다.

분리균의 내산성 조사

배양액의 초산농도가 *Acetobacter* sp.의 생육에 미치는 영향을 조사하기 위해 agar plate에서 회수한 균체를 saline solution으로 세척한 후 생균수가 약 10⁷/mL 수준이 되도록 현탁 하였다. Modified Carr broth에 초산을 각각 0~6% 첨가하고, 균체 현탁액 10%를 접종한 후 30°C로 배양하면서 경시적인 균의 증식을 660 nm에서 흡광도로 측정하였다.

Glycolysis assay

Bender¹⁾의 방법을 변형하여 회수된 *Acetobacter* sp. 균체를 0.85% NaCl으로 세척한 후에 세포 내에 잔존하는 glucose를 소모시키기 위해 1.0 mM MgCl₂가 포함된 PPB saline solution에서 30°C로 30분간 배양시켰다. 이 배양액을 원심분리(10,000×g, 20 min)하여 균체를 회수하고 세척한 다음 1.0 mM MgCl₂와 13.9 mM glucose가 첨가된 saline solution(pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0)에 현탁하고 30°C에서 2시간 배양한 후 이 배양액을 즉시 원심분리(10,000×g, 20 min)하여 상정액을 얻었다. 얻어진상정액을 glucose assay kit(Sigma Chem-

Table 3. Operating conditions for atomic absorptionspectrophotometer

Lamp current	3.5 (mA)
Wavelength	228.8 (nm)
Spectral band pass	0.5 (nm)
Optimum working range	0.5~2.0 (µm/mL)
Fuel	acetylene
Support	air
Flame stoichiometry	oxidizing

ical Co., USA)을 사용하여 glucose를 정량 분석하였고, glycolysis 수준은 최초 첨가된 glucose량에 대하여 *Acetobacter* sp.에 의해 대사 된 양의 비율로 하였다.

세포질내의 Mg⁺⁺ 누출

Acetobacter sp. 균체를 Carr broth에서 48시간 배양하고 배양액으로부터 균체를 회수하여 saline solution으로 현탁액을 만든 후, 초산을 이용하여 현탁액의 pH를 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 및 7.0으로 조정하고 실온에 2시간 방치하였다. 그 후 현탁액은 즉시 원심분리(10,000×g, 20 min)하여 상정액을 취하고 atomic absorption spectrophotometer(AAS Varian spectra AA 30/40, USA)로 Mg⁺⁺ 함량을 측정하여 균체로부터 누출된 Mg⁺⁺량으로 하였다⁽²³⁾. 이때 균체 내의 총 Mg⁺⁺ 함량은 초기 현탁액을 HNO₃:HClO₄(2:1, v/v)로 분해하여 AAS로 정량 하였다. AAS 분석조건은 Table 3과 같다.

분리균의 H⁺-ATPase 분리 및 활성측정

Carr broth에서 48시간 배양한 *Acetobacter* sp. 균체를 회수, 세척하여 0.4 M sucrose와 2.0 mM MgSO₄이 함유한 75 mM Tris buffer(pH 7.5)에 현탁 시키고 20분간 초음파 처리(Danbary Model LC 500, 16 kHz)로 균을 파쇄 한 후 원심분리(5,000×g, 20 min, 4°C)하여 파쇄되지 않은 cell debris를 제거하였다. Cell debris가 제거된 상정액은 DNase와 RNase (10 µg/mL, Sigma Chemical Co., USA)를 각각 처리하여 실온에서 45 분간 방치하였다. 이 액을 다시 원심분리(35,000 ×g, 20 min, 4°C)하여 cell membrane fraction을 얻고 -20°C에서 보관하면서 실험에 사용하였다. 조효소액은 cell membrane fraction을 10% glycerol과 10 mM MgSO₄이 함유된 50 mM Tris buffer(pH 7.0)에 현탁하여 제조하였다. 조효소액 중의 단백질 정량은 Lowry 등⁽⁸⁾의 방법을 사용하였다.

ATPase활성은 Sutton⁽¹⁶⁾의 방법에 준하여 100 µL의 조효소액에 10 mM MgCl₂와 5 mM ATP(Sigma Chemical Co., USA)를 함유한 50 mM Tris maleate buffer(pH 7.5) 900 µL를 가하고 37°C에서 10분간 반응시킨 후 3 mL 증류수와 1 mL의 3.5 N H₂SO₄ 용액으로 반응을 정지시켰다. 이 반응 용액에 3.5% (NH₄)₆Mo₇O₂₄용액을 1 mL 가한 후 2.1% NaHSO₃에 0.7% developer(Kodak, D-76)를 혼합한 용액 1 mL를 첨가하고 실온에서 20분간 방치한 후 spectrophotometer(Varian DMS 200, USA)로 흡광도(660 nm)를 측정하였다. 효소의 활성은 1분당 1 µM의 inorganic phosphate를 유리시키는 효소의 양을 1 unit로 하였다.

Table 4. 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 µm	0.5×2.0 µm	0.6×2.0 µm

+: positive, -: negative

Table 5. 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

결과 및 고찰

초산균의 분리 및 형태학적 특성

Carr 배지에서 투명한 환을 형성하는 독립된 colony가 에 탄을 이용하여 초산을 생성 할 능력이 있는 *Acetobacter* sp.라 보고 두 시료로부터 19종의 균을 분리하였다. 분리된 균들은 순수 분리하고 YCE slant에 접종배양한 후 -20°C의 deep freezer에 보관하면서 실험에 사용하였다. 보관중인 19종의 분리 균들 중에서 초산 생성능이 가장 우수한 3종의 *Acetobacter* sp.를 분리하여 S-1, S-2, S-3로 명명하였다.

분리 균들의 형태학적 특성은 Table 4에 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 특성과 일치하고 있다.

생화학적 특성

3종의 분리 균들은 Table 5와 같이 모두 catalase, methyl red, oxidation fermentation, Voges-Proskauer 및 nitrate reduction test에서는 양성반응을 나타내었으나 hydrogen sulfide와 ONPG test에서는 음성반응을 나타내었다. Esculin, KCN 및 casein test에서는 *Acetobacter* sp. S-1과 *Acetobacter* sp.

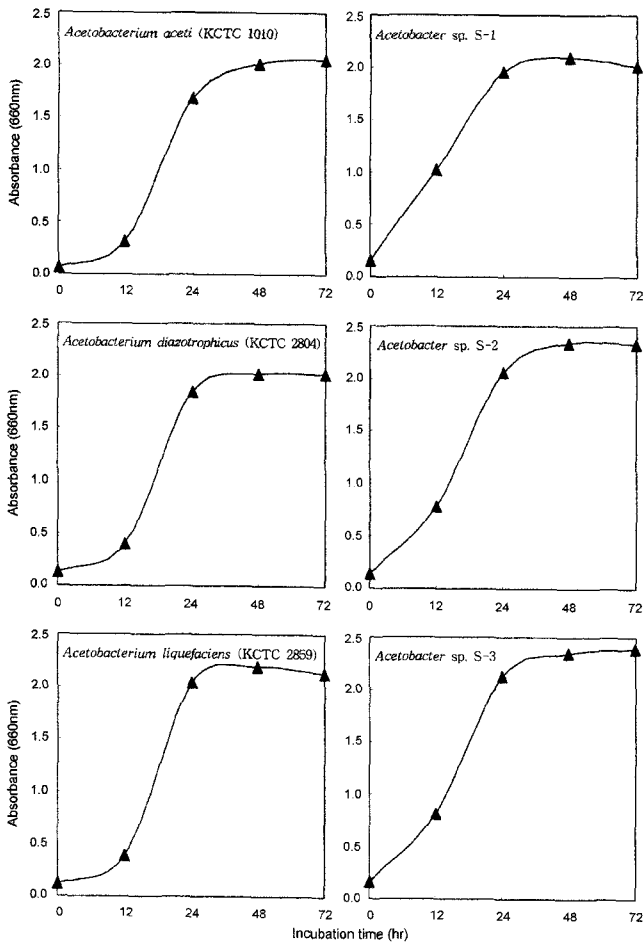


Fig. 1. Growth of typical strains of acetic acid bacteria and isolated strains from persimmon vinegar during incubation at 30°C in Carr broth.

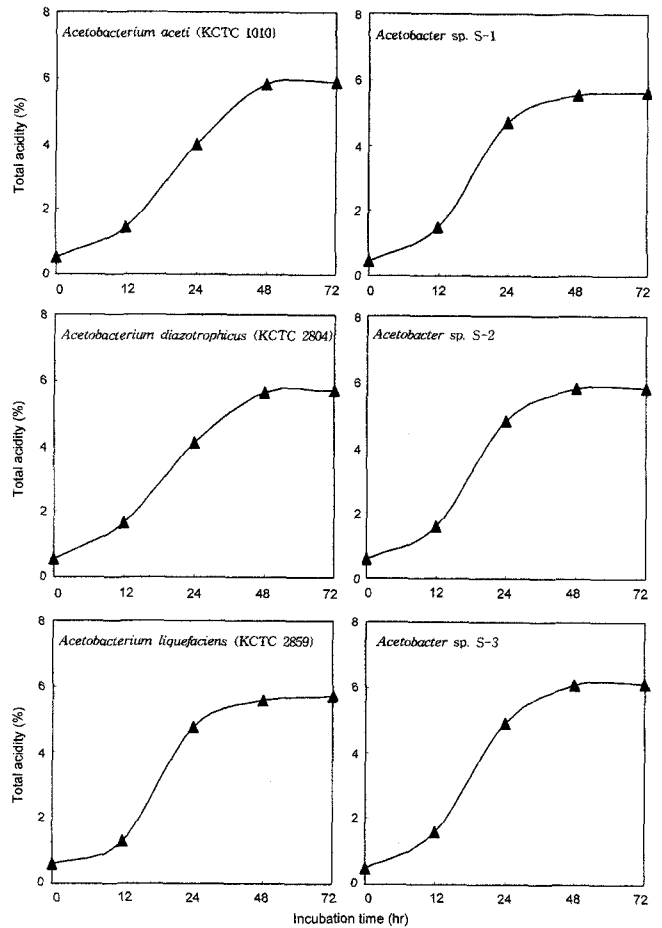


Fig. 2. Acid production in typical strains of acetic acid bacteria and isolated strains from persimmon vinegar during fermentation at 30°C in Carr broth.

S-3이 양성반응을 Acetobacter sp. S-2가 음성반응을 나타내었고, urease와 indole test에서 S-1과 S-3은 음성반응을, S-2는 양성반응을 나타내었다. 따라서 S-1과 S-3 균주는 생화학적으로 유사하나 S-2 균과는 일부 차이가 있었다.

분리균의 배양학적 특성

감식초로부터 분리한 Acetobacter sp. S-1, S-2, S-3의 배양학적 특성을 표준균주와 비교하여 균의 생육과 산 생성량을 측정함으로써 평가한 결과는 Fig. 1, 2와 같다. Carr broth에서 분리균 Acetobacter sp. S-1, S-2 및 S-3의 생육곡선은 균주 간에 큰 차이가 없고 표준균주인 Acetobacterium aceti, Acetobacterium diazotrophicus 및 Acetobacterium liquefaciens와도 차이가 없이 일반적인 미생물에서 보여지는 정상 생육곡선을 나타내었다. 즉, 유도기는 분리된 Acetobacter sp. S-1, S-2, S-3와 표준 균주 간에 큰 차이 없이 뚜렷하게 나타나지 않았고 대수기는 약 12-48 시간 정도였으며, 그 이후의 균수의 변화는 거의 없었다. Carr broth에서 Acetobacter sp. S-1, S-2, S-3 배양액의 총산도 변화는 균의 생육곡선과 같은 경향이었으며, 표준균주인 Acetobacterium aceti, Acetobacterium diazotrophicus 및 Acetobacterium liquefaciens와 큰 차이가 없었다. 즉, 배양시작 후 12시간 동안은 분리 균

주와 표준 균주 모두 산 생성이 거의 없었으나 배양 12시간에서 24시간까지는 산 생성량이 급격히 증가하여 총산도로 약 6.0%에 도달하였으며 그 이후 큰 변화가 없었다. 표준 균주와 Acetobacter sp. S-1, S-2, S-3 모두 총산의 양이 5-6%로 비슷하였으나 그 중 Acetobacter sp. S-3번 균주가 6.2%로 가장 높은 산도를 나타내었으며, 균의 증식도 활발한 것으로 조사되었다.

배양온도의 영향

배양온도에 따른 분리균의 산 생성량의 변화를 표준 균주와 비교 검토한 결과는 Fig. 3과 같다. 즉, 감식초에서 분리된 Acetobacter sp. S-1, S-2 및 S-3간에 큰 차이가 없었으며, 배양온도는 30°C일 때가 40°C와 20°C일 때보다 산 생성능이 우수하였다.

초산발효는 배양온도가 너무 낮으면 발효속도가 늦어지고, 너무 높으면 에탄올 및 초산의 손실이 일어나며 풍미를 잃게 되는데(7,13,14), 본 실험에서 분리한 Acetobacter sp. S-1, S-2, S-3 세 균주의 최적 생육적온은 30°C로 에탄올과 초산의 휘발을 억제할 수 있는 온도로 생각되어 초산 발효에 유용한 균주로 판단된다.

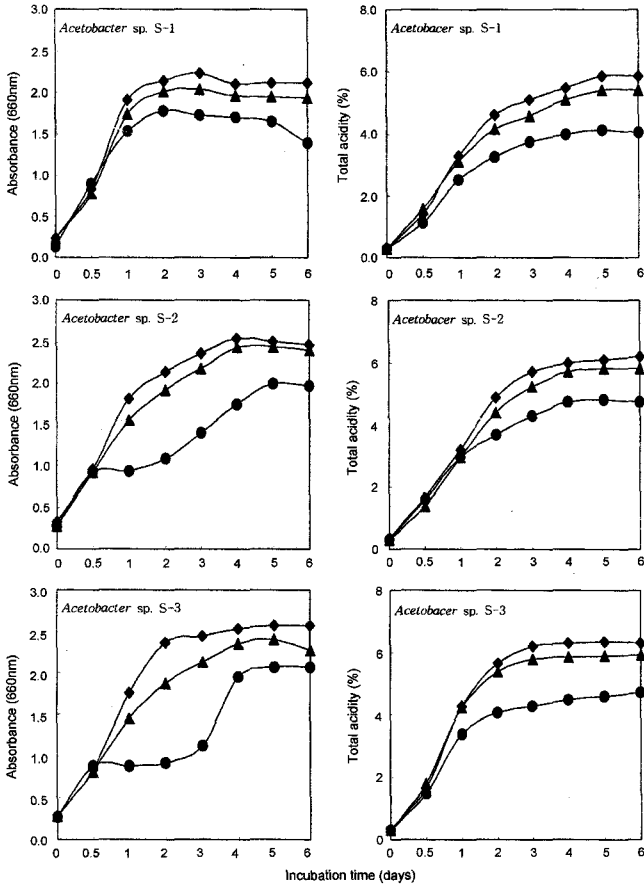


Fig. 3. Growth of *Acetobacter* sp. isolated from persimmon vinegar and acid production at different temperatures during fermentation in Carr broth.
 -●- : 20°C, -◆- : 30°C, -▲- : 40°C

에탄올 내성

Acetobacter sp.는 에탄올을 산화하여 초산을 생성하는 미생물로서 초기 에탄올의 농도가 균의 생육과 산 생성에 매우 중요하다. 초기 에탄올 농도가 초산 생성에 미치는 영향을 조사하기 위해 *Acetobacter* sp.를 에탄올이 3, 6, 9, 12%로 조정된 배지에서 5일간 배양한 후 pH 및 총산도의 변화를 측정하는 결과는 Table 6과 같다.

Acetobacter sp. S-2와 S-3은 에탄올이 6% 첨가된 배지에서 산 생성이 가장 우수하여 배양 5일 후 총산도는 각각 5.33, 5.40% 이었으나, *Acetobacter* sp. S-1은 3.96%로 낮은 수준이었다. 그러나 에탄올 9% 배지에서 *Acetobacter* sp. S-1, S-2 및 S-3의 산생성은 약 2.48~2.93% 이었으며, 12% 첨가구에서 산 생성은 미미하였다. 12% 에탄올 첨가구에서 산 생성량이 미미했던 것은 첨가된 에탄올에 의해 분리균의 증식이 억제되었거나 초산을 생산하는 대사과정이 저해를 받았을 것으로 사료되었다. 양⁽²⁾ 등은 클로버꽃 식초에서 분리한 *Acetobacter* sp.에서 에탄올의 농도가 높아지면 균의 lag phase가 길어져 균의 생육이 늦고 산 생성능이 낮아진다고 하였으며, 초산발효를 위한 에탄올 농도는 본 연구의 결과인 6%보다 낮은 약 4%가 적합하다고 보고하고 있어 *Acetobacter* sp. S-2, S-3가 고농도의 초산발효에 이용하기에 적합할 것으로 사료되었다. 김⁽¹²⁾, 정⁽¹⁵⁾ 등은 초기 에탄올농도 8%에서는

Table 6. Influence of initial ethanol concentration on the acid production of *Acetobacter* sp. isolated from persimmon vinegar

Strains	Concentration	pH		Total acidity	
		0 hr	after 5 day	0 hr	after 5 day
S-1	3%	6.18	3.24	0.61	3.60
	6%	6.18	3.19	0.64	3.96
	9%	6.20	4.14	0.62	2.93
	12%	6.30	4.99	0.62	1.95
S-2	3%	6.01	3.31	0.71	3.53
	6%	6.03	3.15	0.67	5.33
	9%	6.11	4.03	0.64	2.48
	12%	6.12	4.85	0.63	1.95
S-3	3%	5.91	3.40	0.73	3.23
	6%	6.00	3.05	0.70	5.40
	9%	6.11	3.90	0.63	2.69
	12%	6.16	5.00	0.66	1.94

유도기가 길어졌으나 후기에 양호한 발효가 진행된다고 하였고 오⁽²⁴⁾, 김⁽¹⁷⁾ 등도 유사한 결과를 보였다.

내산성

초산농도를 0~6%로 조정된 Carr broth에 감식초로부터 분리한 *Acetobacter* sp. S-1, S-2, S-3을 접종하여 균의 생육을 측정하는 결과는 Table 7과 같다. 초산이 2% 첨가된 배지에서 *Acetobacter* sp. S-1, S-2 및 S-3는 초산이 첨가되지 않은 대조구보다 균의 생육이 약간 억제되었지만 정상적인 생육곡선을 나타내었다. 초산 4% 첨가구에서 3종의 분리균 모두 log phase가 다소 연장되었을 뿐만 아니라 최고의 균수에 도달된 정지기의 흡광도가 대조구에 비해 비교적 많이 낮았으며, 초산 6% 첨가구에서는 시험 균주 모두가 증식하지 못한 것으로 나타났다. 현재 초산 발효산업에서 제품의 품질에 악영향을 미치는 *Mycoderma* 등과 같은 산막 효모와 다른 여러 가지 잡균의 오염을 방지할 목적으로 초기 산도를 약 2%로 조절하고 있는데 분리된 *Acetobacter* sp. S-1, S-2 및 S-3는 모두 산도 2%에서 생육이 양호하였으므로 초산발효 산업에 이용하기 적합한 균이라 사료되었다. 한편 초산 농도 4% 이상에서 균의 생육이 저해된 것은 배양액내의 초산이 *Acetobacter* sp.의 세포막의 외부와 직접 접촉하여 세포막의 선택적 투과성에 관여하는 membrane bound enzyme의 활성을 저하시켜 영양분의 세포내 유입이나 세포내에 존재하는 노폐물의 방출을 방해함으로써 야기된 것으로 사료되며, 또한 비 해리 상태의 초산이 세포내로 유입되어 H⁺을 방출함으로써 세포질내의 pH를 저하시키고 이로 인해 세포내 대사과정이 저해된 것으로 생각된다⁽²³⁾.

***Acetobacter* sp.로부터 Mg⁺⁺ 누출**

일반적으로 미생물은 산에 노출되면 일차적으로 세포막에 존재하는 active transport protein이 불활성화되어 세포막의 선택적인 투과성 기작이 손상을 입게되고 이로 인해 세포내의 cytosolic materials가 세포외로 누출된다고 알려져 있다⁽¹⁶⁾. 따라서 초산에 의한 *Acetobacter* sp. 세포내에 존재하는 Mg⁺⁺ 누출 수준을 측정함으로써 세포막 손상에 미치는 산의 영향

Table 7. Influence of initial acetic acid concentration on growth of *Acetobacter* sp. isolated from persimmon vinegar

(unit: absorbance)

Strains	Concentration of acetic acid	Incubation time (hr)				
		0	12	24	48	72
S-1	0%	0.19	1.00	1.90	2.00	1.98
	2%	0.20	0.98	1.96	1.94	1.96
	4%	0.19	0.41	0.98	1.79	1.77
	6%	0.20	0.24	0.31	0.45	0.39
S-2	0%	0.19	0.70	2.01	2.30	2.24
	2%	0.17	0.60	1.78	2.11	2.13
	4%	0.19	0.31	0.98	1.78	1.69
	6%	0.18	0.20	0.24	0.33	0.34
S-3	0%	0.19	0.81	2.14	2.20	2.19
	2%	0.17	0.69	2.11	2.24	2.18
	4%	0.17	0.40	0.98	1.77	1.77
	6%	0.19	0.20	0.36	0.50	0.50

을 평가하였으며, 그 결과는 Fig. 4와 같다. *Acetobacter* sp. S-1는 초산농도 2~5%에서 누출된 Mg⁺⁺이 극소량이었으나, 6%에서는 거의 대부분이 세포내 Mg⁺⁺(85%)이 누출되었다. *Acetobacter* sp. S-2 와 S-3는 2~5%의 초산농도에서는 *Acetobacter* sp. S-1에 비하여 많은 양의 Mg⁺⁺ 누출되었으며 6%의 초산농도에서는 각각 34, 45%정도로 *Acetobacter* sp. S-1의 85%보다 상당히 적은 양의 Mg⁺⁺이 누출되었다.

이상의 결과로 볼 때 *Acetobacter* sp. S-1, S-2 및 S-3는 초산에 의해 세포막의 선택적인 투과성이 저하되어 세포질 내의 Mg⁺⁺의 누출이 야기되었고, 초산의 농도가 증가할수록 Mg⁺⁺누출량이 증가하나 그 정도는 균주에 따라 다른 것으로 판단되었다.

Glycolysis

초산의 농도 변화에 따른 *Acetobacter* sp. S-1, S-2, S-3의 glycolysis 수준을 배지내에 첨가된 glucose의 대사량으로 측정한 결과는 Fig. 5와 같다. 즉, *Acetobacter* sp. S-1, S-2, S-

3의 glycolysis을 위한 최적 pH는 pH 6.5정도로, 이⁽²¹⁾ 등이 보고한 *Lactobacillus brevis*와 비슷한 결과를 나타내었다. 중성인 pH 7.0을 기준으로 낮은 쪽의 pH에서 glycolysis 능력은 비교적 안정적이어서 glucose량이 50% 대사된 pH는 *Acetobacter* sp. S-1 및 S-3가 pH 3.8, S-2가 pH 4.5 정도였다. 반면 pH 7.0보다 높은 쪽의 pH에서는 glycolysis능력이 매우 민감하여 pH 8.5에서 대사된 glucose량은 40% 이하가 되었다. 또한 *Acetobacter* sp. S-1과 S-3는 pH 3.0에서 대사된 glucose량이 최대 값에 비해 약 20%정도이었고, *Acetobacter* sp. S-2에서는 약 12%정도로 나타났으며, pH 9.0에서는 *Acetobacter* sp. S-1이 약 18%, S-2나 S-3가 약 7%정도로 낮게 나타났다. 이러한 결과로 볼 때 감식초에서 분리한 *Acetobacter* sp.는 알칼리보다는 산성의 환경에서 생육이 용이하다고 추론할 수가 있다.

H⁺-ATPase 분리 및 활성

세포내로 유입된 proton은 세포막 결합성 H⁺-ATPase에 의해 세포외로 방출되어 세포내의 pH 항상성을 유지하게 되어, H⁺-ATPase 활성은 미생물의 내산성과 밀접한 관계가 있

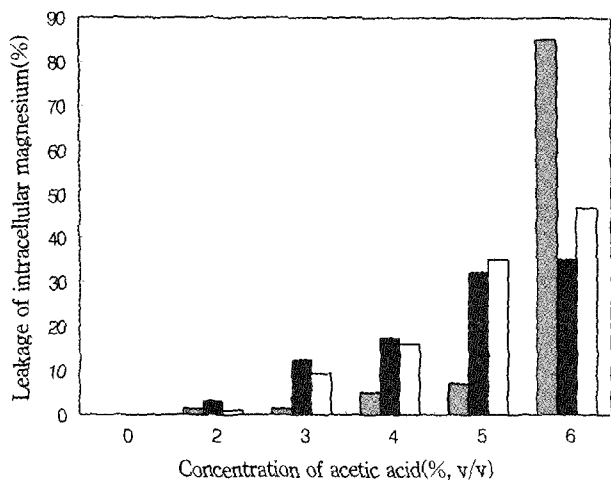


Fig. 4. Effects of acid damage on the magnesium leakage from *Acetobacter* sp. isolated from persimmon vinegar. ▨ : *Acetobacter* sp. S-1, ▤ : *Acetobacter* sp. S-2, □ : *Acetobacter* sp. S-3

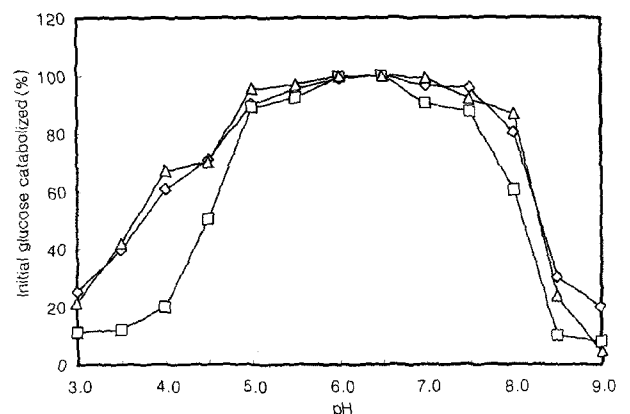


Fig. 5. pH sensitivities of glycolysis by *Acetobacter* sp. isolated from persimmon vinegar. -◇- : S-1, -□- : S-2, -△- : S-3

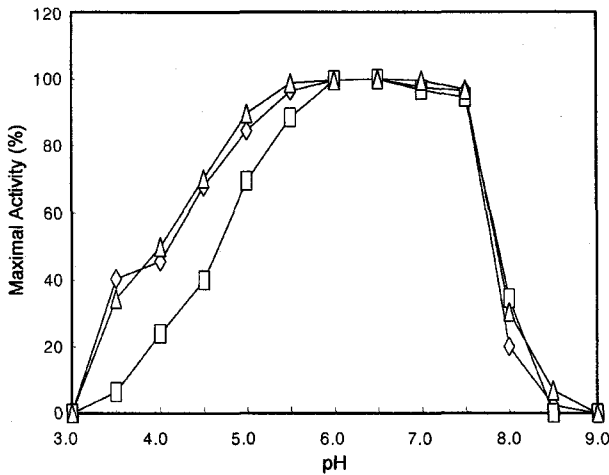


Fig. 6. pH profile in the membrane-bound ATPase activity of *Acetobacter* sp. isolated from persimmon vinegar.
-◇-: S-1, -□-: S-2, -△-: S-3

는 것으로 보고되고 있다^(3,6,23). *Acetobacter* sp. S-1, S-2, S-3 세포의 세포막에서 분리한 H⁺-ATPase의 활성에 대한 pH의 영향을 평가한 결과는 Fig. 6과 같다. *Acetobacter* sp. S-1, S-3 균주의 H⁺-ATPase의 최적 pH는 약 pH 5.5~7.5이며 그 이상의 pH에서는 활성이 급격히 감소하여 최대활성 값의 50%의 활성을 갖는 pH는 약 pH 7.8 정도이었고, pH 9.0에서는 그 활성이 거의 소실되는 것으로 나타났다. 즉 pH가 낮아질 때의 활성 감소 폭이 비교적 완만하여 50%의 활성을 갖는 pH는 pH 4.0 정도였으나, pH 3.0에서 H⁺-ATPase 활성은 거의 소실되었다.

균주 간에는 *Acetobacter* sp. S-2가 S-1, S-3에 비하여 낮은 pH에서 효소활성의 저해가 심하여 50%의 활성을 갖는 pH는 pH 4.7 정도이어서, 고농도 초산발효에 적합한 균주로는 *Acetobacter* sp S-3가 양호하였다.

요 약

감식초로부터 초산 생성능이 우수한 *Acetobacter* sp. S-1, S-2 및 S-3를 분리·동정하고 그 미생물학적 특성과 내산성을 평가하였다. 분리 균들은 모두 Gram 음성의 단간균으로 포자를 형성하지 않았고 운동성이 있었으며, catalase, methyl red, oxidation fermentation, Voges-Proskauers 및 nitrate reduction 시험에서 양성반응을 나타내었고 hydrogen sulfide와 ONPG 시험에서는 음성반응을 나타내었다. 분리균들은 Carr 배지내에서 표준 균주인 *Acetobacter aceti*, *Acetobacter liquefaciens*, *Acetobacter diazotrophicus*와 큰 차이 없이 정상적인 생육곡선을 나타내었으며, 산 생성의 경향도 비슷하였다. 배양최적온도는 30°C이었으며 최적 초기에탄올 농도는 6%이었다. 분리된 *Acetobacter* sp. 균주들은 4% 이상의 초산농도에서 그 생육과 산 생성이 억제되었다. 초산의 농도가 증가할수록 *Acetobacter* sp. 세포내의 Mg⁺⁺누출량이 증가하여 6% 초산농도에서는 거의 대부분의 Mg⁺⁺이 누출되었다. 분리균들의 glycolysis 능력은 알칼리에서보다 산성 쪽에서 더 안정적이었으며 최적 pH는 6.0~7.0이었다. *Acetobacter* sp. S-1

과 S-3의 H⁺-ATPase의 최적 pH는 5.5~7.5이었고 *Acetobacter* sp. S-2는 pH 6.0~7.5이었다.

감사의 글

본 연구는 원광대학교 교내 연구비(2001) 지원에 의해 수행되었습니다.

문 헌

- Bender, G.R. and Marquis, R.E. Membrane ATPase and acid tolerance of *Actinomyces viscosus* and *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 2120-2124 (1990)
- Freese, E., Sheu, W. and Galliers, E. Function of lipophilic acids and antimicrobial food additives. *Nature* 241: 321-325 (1973)
- Hong, J.H., Lee, G.M. and Hur, S.H. Production of vinegar using deteriorated destringent persimmons during low temperature storage. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 25: 123-128 (1996)
- Jeong, S.T., Kim, J.G., Chang, H.S., Kim, Y.B. and Choi, J.U. Optimum condition of acetic acid fermentation for persimmon vinegar preparation and quality evaluation of persimmon vinegar. *Korean Soc. Post-Harvest Science & Technol.* 3: 171-178 (1996)
- Kim, C.J., Park, Y.J., Lee, S.K. and Oh, M.J. Studies on the induction of available mutant of acetic acid bacteria by UV light irradiation and NTG treatment.-On the organic acids composition of apple wine vinegar. *Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng.* 9: 139-143 (1981)
- Kim, D.H. Studies on the production of vinegar from Fig. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 28(1): 53-60 (1998)
- Kim, H.J. and Jo, J.S. Studies on the production of vinegar from Koryangju distillers grain. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* 9: 191-196 (1981)
- Kim, H.J., Park, S.H., and Park, C.H. Studies on the production of vinegar from barley. *Korean J. Food Sci. Technol.* 17: 350-354 (1985)
- Kim, Y.J., Kang, S.H. and Kang, S.K. Studies on the acetic acid fermentation using maesil juice. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 25(4): 695-700 (1996)
- Ko, E.J., Hur, S.S. and Choi, Y.H. The establishment of optimum cultural conditions for manufacturing garlic vinegar. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 27: 102-109 (1998)
- Krige, N.R. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. 1, pp. 267-278 In: *Acetobacteraceae*. Ley, J.D., Gillis, M. and Swings, J.(eds.), Williams & Wilkins, Baltimore, USA (1984)
- Kwon, L.B., Chun, H.S. and Kim, S.J. Isolation and characterization of *Acetobacter* sp. CS strains from Haenam vinegar. *Kor. J. Microbiol.* 31(2): 99-104 (1993)
- Lee, D.S., Ryu, I.W., Lee, K.S., Shin, Y.S. and Chun, S.H. Optimization in the preparation of *Aloe* vinegar by *Acetobacter* sp. and inhibitory effect against lipase activity. *J. Kor. Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* 42(2): 105-110 (1999)
- Lee, K.S., Shin, Y.S. and Lee, C.H. Acid tolerance of *Lactobacillus brevis* isolated from *Kimchi*. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 30: 1399-1403 (1998)
- Lee, Y.C., Jang, O.Y., Kim, H.W., Choi, C.U. Yoon, S.K. Physicochemical characteristics of traditional vinegars in Andong province. *J. Kor. Soc. Diet. Culture* 14:17-33 (1999)
- Lee, Y.C., Park, M.S., Kim, H.C., Park, K.B., Yoo, Y.J., Ahn, I.K. and Son, S.H. Production of high acetic acid vinegar by single stage fed-batch culture. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* 21: 511-512 (1993)
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-269 (1951)
- Oh, Y.J. A study on cultural conditions for acetic acid production

- employing pear juice. J. Kor. Soc. Food Nutr. 21: 377-380 (1992)
19. Park, H.P., Kim, S.J., Ryu, J.C., Pyo, B.S. and Kim, S.W. Some properties of *Acetobacter* sp. isolated from traditional fermented vinegar. Kor. J. Biotech. Bioeng. 8: 397-401(1993)
20. 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. Kor. Acad. Dent. Health, 19: 447-456 (1995)
21. Person, C.H. Mycologia Europaea. 1: 96 (1822)
22. Shin, Y.S., Kim, S.H. and Lee, K.S. Survivals of lactic acid bacteria and its characteristics under the acidic and anaerobic condition. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 23: 373-379 (1995)
23. Shin, Y.S. Studies on the lactic acid bacteria and its activities in the condition of intestine. Ph. D. thesis, Wonkwang Univ. Iksan, Korea (1995)
24. Sutton, S.V.W. and Marquis, R.E. Membrane associated and solubilized ATPase of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis*. J. Dent. Res. 66: 1095-1099 (1987)
25. Yang, H.C., and Choi, D.S. Physiological characteristics of acetic acid bacteria isolated from clover flower vinegar. J. Kor. Agric. Chem. Soc. 22: 150-159 (1979)

(2001년 2월 26일 접수)