

정치배양종 식초 오염균의 생육특성과 cellulose 생산

장원영* · 주경호 · 이재하 · 백창규
 오투기중앙연구소

Growth Characteristics and Production of Cellulose of Microorganisms in Static Culture Vinegar

One-Young Jang*, Kyung-Ho Joo, Jae-Ha Lee and Chang-Gyu Baik
 Ottogi Research Center

The characteristics of a strain that contaminates the manufacturing of rice vinegar by *Acetobacter pasteurianus* was investigated. Conditions for inhibiting pellicle formation and growth of the contaminant, which occurs during static culture and storage, were also observed. Examining the morphological, cultural, and physiological characteristics and measuring the amount of cellulose production during static culture for 14 day, we found that the strain was known to be *Acetobacter xylinum*. No growth was observed below 10°C as well as over 40°C. Also, the extent of growth was limited when the concentrations of ethanol, NaCl, and acetic acid were more than 10%, 1.5%, and 7%, respectively.

Key words: *Acetobacter pasteurianus*, rice vinegar, contamination, *Acetobacter xylinum*, static culture

서 론

*Acetobacter*는 그람 음성이고 내산성의 편성 호기성 간균 또는 구균으로 포자는 형성하지 않으며⁽¹⁾, 알코올보다 당을 더 선호하고 초산을 재산화시키는 능력이 없는 *Gluconobacter*에 비해 초산과 젖산을 재산화시킬 수 있는 특징이 있다⁽²⁾. 재산화(overoxidation)과정이란 에탄올을 이용하여 초산을 생성하고 이어서 초산을 CO₂와 H₂O로 산화시키는 두 가지 과정을 의미한다. *Acetobacter*는 주로 알코올이 존재하는 곳에서 많이 발견되며, 지금까지 알려진 대표적인 종으로는 *Acetobacter aceti*, *A. pasteurianus*, *A. liquefaciens*, *A. xylinum* 그리고 *A. methanolicus* 등이 있다^(1,3). *Acetobacter*속이 식초생산을 위해서 산업적으로 매우 중요하기 때문에 많은 연구자들은 새로운 균주의 분리와 함께 초산균의 개량을 위해서 유전자 재조합 기술을 이용한 주요 효소의 클로닝과 spheroplast fusion을 이용한 돌연변이체 획득에 대해서 연구하고 있다⁽⁴⁾.

*Acetobacter*는 호기적 조건에서 정치배양 중에 배양액 표

면에 얇은 균막(pellicle) 형태의 셀룰로오스를 형성하며, 그 중에서도 *Acetobacter xylinum*은 cellulose 합성 생산 균주중 가장 우수하여 미생물 셀룰로오스 연구대상으로 이용되어 왔다^(5,6). 1886년 Brown⁽⁷⁾에 의해 다양한 세균 중에 초산균(*Acetobacter spp.*)에 속하는 균주가 식물 유래의 셀룰로오스와는 미세구조 및 특성이 다른 셀룰로오스를 합성한다는 것이 처음 보고된 이후, 지난 30여년간 셀룰로오스 생합성에 대한 연구가 활발하게 진행되었다⁽⁸⁾. Williams와 Cannon⁽⁹⁾은 *A. xylinum*에 있어서의 셀룰로오스 역할에 대해 보고하였는데 셀룰로오스는 호기성 환경에 세포를 유지시키며, 셀룰로오스 균막은 UV light의 치사 효과로부터 세포를 방어하고, *A. xylinum*의 집락을 형성케 해주어 영양원으로 같은 기질을 사용하는 경쟁자로부터 방어효과 및 세포에 습기를 제공하여 건조를 막는다고 하였다.

그러나 이러한 *A. xylinum*은 셀룰로오스를 생산하는 초산균으로 많은 각광을 받고 있지만 산업적으로 정치배양 식초를 생산하는 공장에서는 식초 제품을 오염시키고 초산을 재산화시키는 균으로 문제시 되고 있으나, 아직까지 국내에서는 식초 제품을 오염시키는 초산균에 관한 연구가 미미한 상태이다.

본 연구는 정치배양 식초의 발효과정, 숙성과정에서 오염되거나 식초를 사용하는 도중에 오염되어 식초 표면에 균막을 형성시키고, 식초를 혼탁하게 만들며 침전을 발생시켜 제품의 품질을 저하시키는 초산균의 생육특성과 셀룰로오스 생산능력을 밝히고자 하였다.

*Corresponding author : One-Young Jang, Ottogi Research Center, 166-4 Pyeongchun-dong, Dongan-gu, Anyang, Kynggi-do 430-070, Korea
 Tel: 82-31-421-2135
 Fax: 82-31-421-2133
 E-mail: wyjang@ottogi.co.kr

Table 1. Media and composition

Carr's Medium for identification	3.0%	Yeast extract
	2.0%	Ethanol
	0.0022%	Bromocresol green
	2.0%	Agar pH 6.0
H and S Medium for cellulose formation	2.0%	Glucose
	0.5%	Yeast extract
	0.5%	Polypeptone
	0.675%	Sodium phosphate, Dibasic 12hydrate
	0.115%	Citric acid monohydrate pH 6.0
GYC Medium for colony	5.0%	Glucose
	1.0%	Yeast extract
	3.0%	Calcium carbonate
	2.5%	Agar
Frateur Medium	3.0%	Ethanol
	1.0%	Yeast extract
	1.0%	Polypeptone
	1.0%	Calcium carbonate
	2.0%	Agar

재료 및 방법

초산균 및 배지

본 실험에 사용한 초산균은 식초공장에서 *Acetobacter pasteurianus*로 정치배양중인 현미식초와 숙성과정에 오염되어 균막이 형성된 초산균을 분리하여 실험에 사용하였다.

초산균의 분리 배지로는 Carr 배지⁽¹⁰⁾를, 셀룰로오스 합성여부를 확인하기 위한 배지로는 H and S 배지⁽¹⁰⁾를, 콜로니 관찰을 위한 배지는 GYC 배지⁽¹¹⁾를, 에탄올의 산화능을 확인하기 위한 배지로는 Frateur 배지⁽¹⁾를 사용하였으며, 그 조성은 Table 1에 정리하였다. 이때 모든 배양은 30°C에서 실시하였으며 혼탁도가 증가한 배지를 동일 조성의 새로운 배지에 접종하는 과정을 수차례 반복하였고 정치배양은 배지 200 mL이 담긴 500 mL Erlenmeyer flask를 이용하여 30°C, 7일간 배양하였다.

초산균의 분리

식초공장에서 *Acetobacter pasteurianus*로 정치배양중인 현미식초와 숙성과정에서 오염되어 균막이 형성된 현미식초로부터 균주를 분리하여 실험에 사용하였다. 균막이 형성된 현미식초 1 mL을 HS배지 500 mL에 접종하여 30°C에서 7일간 정치배양한 후 혼탁도가 증가한 배지를 동일 조성의 새로운 배지에 접종하는 과정을 수차례 반복하였다. 그 후 지시약으로 bromocresol-green이 첨가된 고체배지에 streaking하여 30°C에서 3~4일간 배양하고 녹색에서 노란색으로 그리고 다시 녹색으로 환원되는지를 관찰한 다음 여기에서 나타난 콜로니를 동일 조성의 고체배지에 계대 배양하는 방법으로 단일 콜로니를 순수 분리하여 GYC agar slant에 접종하여 보관하였다. 이렇게 순수 분리된 균주를 HS배지 플라스크에서 정치배양하면서 계대 배양하여 사용하였다.

셀룰로오스의 생산량 측정

정치배양액내에 형성된 균막을 증류수로 세척하여 배양액

성분을 제거하였다. 세척된 균막을 100 mL의 0.5 N NaOH용액에 넣어 100°C에서 1시간 동안 가열하여 세포를 용균시킨 다음, 다시 300 mL의 증류수에 넣고 24시간 동안 세척하였다. 최종적으로 회수한 균막을 105°C의 dry oven에서 항량이 될 때까지 건조하였다. 건조된 균막을 데시케이터에서 방냉한 후, 건조하여 그 중량을 측정하여 셀룰로오스의 생산량으로 나타내었다^(11,12).

당 및 gluconic acid 측정

배양액 중의 잔존 glucose 및 gluconic acid의 측정은 배양상등액을 0.2 µm syringe filter(Sartorius Co., Germany)를 사용하여 여과한 후 HPLC(Agilent 1100series, USA)로 분석하였다. 먼저 glucose의 분석은 zorbax column(4.6×150 mm, 30°C)을 사용하여 이동상은 75% acetonitrile을 1.4 mL/min의 유속으로 용출하였으며, 검출은 RI detector(Refractometer Differential, Agilent, USA)로 분석하였다. Gluconic acid는 zorbax eclipse XDB-C18 column(4.6×150 mm, 30°C)을 사용하였으며, 이때 0.1% H₃PO₄의 이동상을 0.8 mL/min의 유속으로 용출하고 Diode array detector(25°C)을 사용하여 210 nm에서 측정하였다.

생리학적 특성 조사

Glycerol로부터 ketogenesis가 일어나는지를 알아보기 위해 YEG 고체배지(1% yeast extract, 3% glycerol, 2% agar)에 균을 접종한 후 3~5일간 30°C에서 배양시킨 다음 Fehlings용액을 배지 위에 몇 방울 떨어뜨린 후 오렌지색으로의 변색 유무로 glycerol이 dihydroxyacetone으로 전환되는지를 결정하였다. 에탄올과 NaCl에 대한 내성 실험은 SM배지(0.5% yeast extract, 5% glucose)에 NaCl 0.5~1.5%와 에탄올 5~10%를 각각 첨가한 배지에 분리 균주를 접종하여 7일간 정치배양시킨 후 관찰하였다. GYC 고체배지에 균을 접종하여 7일간 배양시킨 후 brown pigment 형성 유무를 확인하였으며, D-

glucose의 농도에 따른 내성 실험은 yeast extract 0.5%에 20~30%의 D-glucose를 각각 첨가한 배지에 균을 접종하여 관찰하였다. Glucose 3%와 fructose 5%를 각각 함유한 YPC배지(0.5% yeast extract, 0.5% peptone, 0.5% CaCO₃)에 균을 접종한 후 7일간 배양한 다음 Ferric chloride 5% 용액을 떨어 뜨려 보라색으로 변하면 glucose와 fructose를 이용하여 γ -pyrone을 생성하는 양성반응으로 결정하였다. 초산 저항성 실험은 초산 농도를 4~10%로 조절한 GYP배지(3% glucose, 0.5% yeast extract, 0.2% peptone, 1.5% agar)에 균을 접종한 다음 7일간 배양한 후 조사하였으며, 기타 생리학적 실험은 API 20NE Kit(Bio-Merieux, France)를 이용하여 catalase, oxidase, citrate utilization, hydrolysis of urea and lactose, arginine dehydrolase, H₂S와 indole의 형성, sodium lactate에서 acetyl-methylcarbinol의 형성, nitrate 환원, gelatin liquefaction 등을 실험하였다. 실험균주의 셀룰로오스 합성 여부를 형광성으로 확인하기 위해서 Williams와 Cannon⁽⁹⁾의 방법에 따라 0.01% Tinopal이 포함된 H and S 고체배지에 희석 접종하여 배양한 후 UV를 조사하여 형광성 유무를 판정, 그에 따라 셀룰로오스 합성여부를 결정하였다.

결과 및 고찰

식초 오염 초산균의 분리 및 형태학적 특징

식초공장에서 *Acetobacter pasteurianus*로 정치배양중인 현미식초와 숙성과정에서 균에 오염되어 균막이 형성된 현미식초 1 mL을 HS배지 500 mL에 접종하여 30°C에서 7일간 정치 배양한 후 균막을 형성하는 플라스크로부터 동일 조성의 새로운 배지에 접종하는 과정을 수차례 반복하여 균주를 순수 분리하여 RVX로 명명하였다.

순수 분리한 초산균 RVX의 형태학적 특징을 관찰하여 그 결과를 Table 2에 나타내었다. 분리한 균주는 gram 음성이고, 간균의 형태를 하고 있으며, colony의 형태는 round form이었으며, 흰색을 띄며 불투명하였다.

식초 오염 초산균의 생리학적 특징

순수 분리한 균주 RVX의 생리학적 특징을 관찰하여 그 결과를 Table 3에 나타내었다. 분리한 균주 RVX는 에탄올을

Table 2. Morphological and cultural characteristics of the strain RVX

Characteristics	Strain RVX
Gram reaction	- ¹⁾
Cell shape	rod
Colony	white
Opacity	opaque
Growth or carbon sources:	
Ethanol	+ ²⁾
Methanol	-
Sodium acetate	-
Growth in the presence of	
7% Acetic acid	-
10% Acetic acid	-
Growth in the presence of	
0.5% NaCl	+
1.0% NaCl	+
1.5% NaCl	-
Growth in the presence of	
7% ethanol	w ³⁾
10% ethanol	-
Growth in the presence of	
20% D-gulcose	+
30% D-gulcose	+
Cellulose formation	+

¹⁾ -: negative, ²⁾+: positive, ³⁾w: weakly positive.

초산으로 산화시키고 다시 이산화탄소와 물로 재산화시키는 산화경로를 가지고 있는 것으로 판단된다. 또한 pH 지시제로서 bromocresol green이 첨가된 Carr medium에서 분리한 균주의 콜로니 주변부는 배양시간 경과에 따라 green에서 yellow로 다시 green으로 색깔변화를 나타내어 상기의 결과를 다시 한번 확인할 수 있었으며, 이에 따라 분리한 균주 RVX는 *Acetobacter*속에 속하는 것으로 추정되었다. 문헌에 기재되어 있는 *Acetobacter*속과 *Gluconobacter*속의 대표적인 생리학적 특성을 분리한 균주 RVX와 비교한 결과는 Table 3에서 보는 바와 같다. 즉 분리한 균주 RVX는 ethanol, acetate를 과산화할 수 있었으며, glucose와 fructose로부터 γ

Table 3. Comparison of characteristics of the strain RVX with *Acetobacter* and *Gluconobacter*

Characteristics	<i>Gluconobacter</i>	<i>Acetobacter</i>	Strain RVX
Overoxidation of ethanol	- ¹⁾	+ ²⁾	+
Oxidation of acetate to CO ₂ and H ₂ O	-	+	+
Ketogenesis (DHA from glycerol)	+	+	+
Formation of brown water soluble pigments on GYC agar	-	-	-
H ₂ S formation	-	-	-
Catalase	-	+	+
Acid produced from glucose	+	+	+
Indole production	-	-	-
Urease	-	-	-
γ -pyrone from 5% glucose	+	-	-
γ -pyrone from 5% fructose	+	-	-

¹⁾ -: negative, ²⁾+: positive.

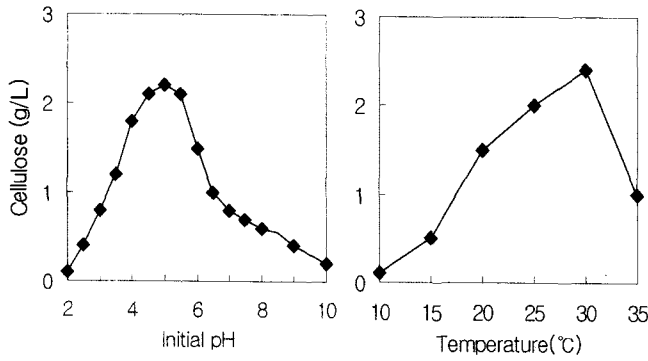


Fig. 1. Effect of initial pH and temperature on the production of cellulose by the strain RVX on a static culture condition.

pyrone을 생성할 수 없었고, glycerol로부터 dihydroxyacetone을 생성하는 ketogenesis반응에서는 양성을 나타내었다. 이상과 같은 실험결과를 토대로 분리한 균주 RVX는 *Acetobacter*속 에 포함됨을 알 수 있었다.

초산균의 생육조건과 셀룰로오스의 생산

초산균의 pH의 영향에 대한 실험은 배지를 pH 2에서 pH 10까지 각각 조절한 후 초산균을 접종하고 30°C에서 14일간 배양하였으며, 배양 온도의 영향은 10°C에서 35°C까지 5°C 간격으로 14일간 정치배양한 후 셀룰로오스의 생산량을 측정하여 Fig. 1에 나타내었다. 먼저 초기 pH의 영향으로 배지 pH 8.0 이상과 pH 4.0이하에서는 리터당 1g 미만의 적은 양의 셀룰로오스가 생성되었으며, 초기 pH 5.0이었을 때 셀룰로오스 생산량이 가장 많았고 pH 4.0~7.0 사이에서도 비교적 높은 셀룰로오스 생산성을 보였다. 이것은 Ko 등⁽¹³⁾이 pH 5.0에서 셀룰로오스 최대 생산량을 보였다고 한 것과 유사하며, Masaoka 등⁽¹⁴⁾은 초기 pH 3.5~7.0 사이에서 셀룰로오스 생산량이 높았으며 pH 5.0에서 가장 좋은 생산성을 나타냈다고 하였다.

배양온도에 따른 셀룰로오스의 생산은 25°C보다 30°C에서 셀룰로오스 생산성이 더욱 좋았으며, Ko 등⁽¹³⁾과 Park 등⁽¹⁵⁾도 이와 같이 30°C에서 생산성이 높게 나타났다고 하였고, 대부분의 *Acetobacter*속 균주는 25~30°C에서 가장 세포의 생육이 좋으며, 최적 온도는 30°C라고 보고되고 있다⁽¹⁶⁾. 반면 15°C와 35°C에서는 균체가 성장하기는 하였지만 셀룰로오스 생산량은 극히 적은 양이었고, 10°C 이하에서는 균체가 생육할 수 없었다.

*Acetobacter*속 균주들은 진탕배양에서 전단력에 의하여 셀룰로오스의 생산성이 정치배양하는 경우보다 낮게 나타나기 때문에 본 배양실험은 삼각 flask에서 14일간 정치배양하면서 배양시간에 따른 셀룰로오스의 생산과 pH의 변화, 균체의 생육, 셀룰로오스의 생산을 위한 탄소원으로서 glucose의 변화 및 glucose로부터 전환된 gluconic acid의 변화 등을 조사하였으며 그 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 초산균은 48시간까지 glucose의 농도를 급격히 감소시켰으며, 이후 완만한 추세를 보였고, 또한 셀룰로오스의 생산량도 이와 같은 경향을 나타내어 점차 증가하다가 9~10일 경과하였을 때 2.1~2.2 g/L로 배양기간 중에 최대의 셀룰로오스의 생산량을 나

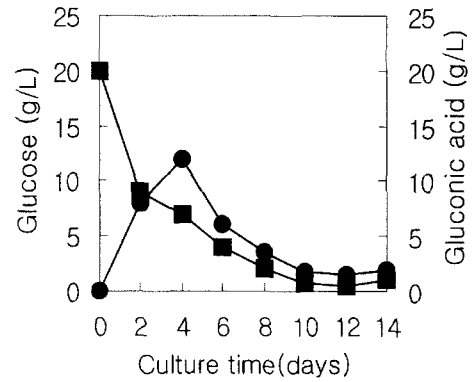


Fig. 2. Time courses of glucose, gluconic acid by the strain RVX at 30°C and pH 5.5 on a static culture condition.

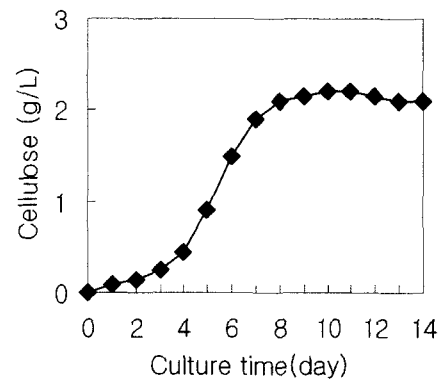


Fig. 3. Time courses of cellulose production by the strain RVX at 30°C and pH 5.5 on a static culture condition.

타냈으며, Ko 등⁽¹³⁾도 이와 같이 유사한 결과를 보였다. Toda 등⁽¹⁷⁾은 정치배양 초기에 셀룰로오스의 생산량이 낮은 것은 glucose가 gluconic acid로 산화하기 때문이라고 하였고, 이때 셀룰로오스의 생산량은 10일 경과했을 때 glucose 1g당 0.15g의 셀룰로오스를 생산했는데 이 결과는 본 초산균의 생산량과 유사하였다.

셀룰로오스의 생산량이 많아지면서 pH 수치가 낮아지는 것은 glucose의 산화에 의해 생성된 gluconic acid와 초산발효에 의한 acetic acid의 생성에 의한 것이다^(5,18). 배지의 gluconic acid의 생성량은 초산균을 접종한 후 glucose의 소비와 비례적으로 증가하다가 감소하였는데, 본 실험에서 나타난 결과가 Ko 등⁽¹³⁾과 Park 등⁽¹⁵⁾이 glucose를 기질로 초산균 생육을 실험한 결과 *Acetobacter*속 균주가 배양초기와 증식기에 glucose를 gluconic acid로 전환시키며 glucose가 거의 감소된 시점부터는 전환된 gluconic acid를 소비하면서 셀룰로오스를 생산한다고 보고한 결과와 유사하였다.

위의 실험을 바탕으로 식초공장에서 정치배양중인 현미식초 생산과정과 숙성과정에서 식초제품을 오염시키는 초산균의 특성을 검토하여 본 결과, 셀룰로오스 생산량이 많은 *Acetobacter xylinum*의 유연균으로 분류할 수 있었다.

이와 같이 식초 제품을 오염시키는 초산균의 생육에 관하여 배양조건 및 생육억제 방법을 검토하여 공장에서 식초 제품을 생산하거나 가정에서 식초 제품을 사용할 경우에 오염 초산균으로 인해 제품의 품질이 저하되는 것을 방지할 수 있

우리라 사료된다.

요 약

식초공장에서 *Acetobacter pasteurianus*로 정치배양중인 식초 생산과정과 숙성중인 현미식초를 오염시켜 균막을 형성한 것으로부터 균을 분리하여 식초를 오염시키는 균의 특성을 밝히고자 하였다. 공장에서 식초제품을 생산하거나 가정에서 식초제품을 사용할 경우에 오염을 일으키는 초산균의 생육에 관하여 배양조건 및 생육억제 방법을 검토하였다. 초산균에 오염되어 균막이 형성된 식초로부터 초산균을 분리하여 형태학적, 배양적 및 생리학적 특성을 검토한 결과 *Acetobacter*속에 포함됨을 알 수 있었다. 그리고 정치배양 기간 동안에 셀룰로오스 생산량을 확인하고자 14일간 배양한 결과 두꺼운 셀룰로오스를 생성하여 *Acetobacter xylinum*으로 판단되었으며 7%이상의 초산농도와 10%의 에탄올농도, 1.5%의 NaCl농도, 10°C 이하와 40°C 이상의 온도에서 생육할 수 없었다.

문 헌

- Krieg, N.R. and Holt, J.G. Bergeys Manual of Systematic Bacteriology. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, MD, USA (1984)
- Asai, T. Acetic Acid Bacteria. University of Tokyo Press, Tokyo. (1964)
- Uhlig, H., Karbaum, K. and Steudel, A. *Acetobacter methanolicus* sp. nov., and acidophilic facultatively methylotrophic bacterium. Int. J. Syst. Bacteriol. 36: 317-322 (1986)
- Inoue, R., Sunakawa, M., Mori, A. and Fukuda, M. Cloning and sequencing of the gene encoding the 72-kilodalton dehydrogenase subunit of alcohol dehydrogenase from *Acetobacter aceti*. J. Bacteriol. 171: 3115-3122 (1989)
- Kuga, S. Bacterial cellulose. The possibility of raw material for paper making fiber. Mokchae Konghak 20: 3-8 (1992)
- Toyosaki, H., Naritomi, T., Seto, A., Matsuoka, M., Tsuchida, T. and Yoshinaga, F. Screening of bacterial cellulose-producing *Acetobacter* strains suitable for agitated culture. Biosci. Biotechnol. Biochem. 59: 1498-1502 (1995)
- Brown, A.J. An acetic ferment which forms cellulose. J. Chem. Soc. 49: 432-439 (1886)
- Dudman, W.F. Cellulose production by *Acetobacter acetigenum* and other *Acetobacter* spp. J. Gen. Microbiol. 21: 312-326 (1959)
- Williams, W.S. and Cannon, R.E. Alternative environmental roles for cellulose produced by *Acetobacter xylinum*. Appl. Environ. Microbiol. 55: 2448-2452 (1989)
- Schramm, M. and Hestrin, S. Factors affecting production of cellulose at the air/liquid interface of a culture of *A. xylinum*. J. Gen. Microbiol. 11: 123-129 (1954)
- Borzani, W. and de Souza, S.J. Mechanism of the film thickness increasing during the bacterial production of cellulose on non-agitated liquid media. Biotechnol. Lett. 17: 1271-1272 (1995)
- Embuscado, M.E., BeMiller, J.N. and Marks, J.S. Isolation and partial characterization of cellulose produced by *Acetobacter xylinum*. Food Hydrocol. 10: 75-82 (1996)
- Ko, J.Y., Shin, K.S., Yoon, B.D. and Choi, W.Y. Isolation and identification of *Acetobacter xylinum* GS11 producing cellulose. Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 28: 139-146 (2000)
- Masaoka, S., Ohe, R. and Sakota, N. Production of cellulose from glucose by *Acetobacter xylinum*. J. Ferment. Bioeng. 75: 18-22 (1993)
- Park, S.H., Yang, Y.K., Hwang, J.W., Lee, C.S. and Pyun, Y.R. Microbial cellulose fermentation by *Acetobacter xylinum* BRC5. Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 25: 598-605 (1997)
- Robert, E.C., and Steven, M.A. Biogenesis of bacterial cellulose. Microbiol. 17: 435-447 (1991)
- Toda, K., Asakura, T., Fukaya, M., Entani, E. and Kawamura, Y. Cellulose production by acetic acid-resistant *Acetobacter xylinum*. J. Ferment. Bioeng. 84: 228-231 (1997)
- Park, J.P., Kim, S.J., Ryu, J.C., Pyo, B.S. and Kim, S.W. Some properties of *Acetobacter* sp. isolated from traditional fermented vinegar. Korean J. Biotechnol. Bioeng. 8: 397-404 (1993)

(2003년 8월 14일 접수; 2003년 10월 10일 채택)