

Gluconacetobacter persimmonis KJ145^T를 이용한 Bacterial Cellulose 및 식초의 동시 생산에 관한 연구

정용진[†] · 여수환* · 이오석*

계명대학교 식품가공학과
*계명대학교 전통미생물자원개발 및 산업화연구센터

Study on the Simultaneous Production of the Bacterial Cellulose and Vinegar by *Gluconacetobacter persimmonis* KJ145^T

Yong-Jin Jeong[†], Soo-Hwan Yeo* and Oh-Seuk Lee*

Dept. of Food Science and Technology, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea
*TMR Center, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

Abstract

The changes of component through simultaneous production of bacterial cellulose and vinegars by *G. persimmonis* KJ145^T were examined. As a results, pH was decreased to 3.22 at 8 days of fermentation and total acidity showed 4.66 which was the highest at the 8 days of fermentation. Brix didn't show any changes during the fermentation period. Free sugars of fermentation broth were consist of fructose, glucose and sucrose. The fructose concentration of fermentation broth was maintained highly during fermentation period (until the final 10 days) without a remarkable decrease. The cell growth of *G. persimmonis* KJ145^T was very rapidly increased from the 2 days of fermentation and increased most at the 4 days of fermentation. The productivity of bacterial cellulose was increased in proportion to the fermentation period. Malic acid, succinic acid and oxalic acid were detected as a organic acid of vinegar. The concentration of acetic acid was rapidly increased from the 2 days and reached highest concentration at 8 days. In conclusion, the results indicated that the 8 days was the optimal fermentation period to produce the bacterial cellulose and vinegar by *G. persimmonis* KJ145^T simultaneously.

Key words: *Gluconacetobacter persimmonis* KJ145^T, bacterial cellulose, static culture, vinegar, simultaneous production

서 론

오랜 역사를 지닌 식초는 동·서양을 막론하고 일상생활에서 많이 사용되고 있는 발효식품으로 알콜발효와 초산발효에 의한 양조식초와 빙초산, 물, 향신료 및 착색료 등을 사용하여 제조하는 합성식초로 구별할 수 있다(1). 우리나라는 예로부터 가정에서 다양한 양조식초를 제조하여 왔으며, 그 종류에는 쌀식초, 보리식초, 밀식초, 매실초, 감식초 및 사과식초 등이 널리 알려져 있다(2). 최근에는 각종 과일 및 곡류를 이용한 천연 양조식초의 소비가 급증하고 있다(3). 특히, 사과는 국내 과일 중에서 생산과 소비가 가장 많지만 생산된 사과의 85%만이 생과로 소비되고 있으며, 그 나머지도 오렌지, 키위 등 외국으로부터 수입되는 과실의 영향으로 수요가 급감하고 있는 추세이다. 이에 따라 상품성이 낮은 10~15% 정도의 사과와 과잉 생산된 사과는 가공용으로 이용되고 있지만 이 또한, 주스 시장의 침체로 인해 제대로 활용되지 않아 사과농축액이 해마다 누적되어 가는 실정임으로 보다 효

율적인 활용이 절실히 요구되고 있다(4). 식초 발효과정에서 종종 피막을 형성하는 초산균은 “곤약균 또는 vinegar plant”라는 이름으로 매우 오래 전부터 알려져 있으며, 그 종류로는 *Acetobacter xylinum*, *A. pasteurianus*, *A. hansenii* 등이 있다(5). 초산균이 형성하는 피막성분은 식물체의 세포벽을 구성하고 있는 cellulose와 동일하게 glucose가 β -1,4 glucosidic linkage를 형성하고 있어 bacterial cellulose라고 한다(5-10). Bacterial cellulose와 식물체 유래의 cellulose의 차이점은 중합도가 다르며, 식물체 cellulose가 lignin과 hemicellulose 및 기타 side chain이 결합되어 있는 것과 달리, bacterial cellulose는 순수한 glucose만이 결합하고 있는 homopolysaccharide이다. 또한 수소결합에 의한 3차원적 망상구조를 이루고 있으며, 결정도가 매우 높고, 보수성, 흡착성이 우수하고 원하는 형태로 성형이 가능하며, 특히 고강도, 고탄력의 특징을 가지고 있어 산업적으로 여러 용도로 연구, 개발 및 이용되고 있다(6-10). 식품산업에서도 bacterial cellulose는 난소화성, 고점성의 특성 때문에 식품의 증량제, 선도 유지제

[†]Corresponding author. E-mail: yjjeong@kmu.ac.kr
Phone: 82-53-580-5557, Fax: 82-53-580-5162

및 조직감 향상제 등에 널리 이용될 수 있으며, 현재 다양한 형태의 식이섬유의 식품소재로 개발되고 있다(9,10). 한편 저자 등은 재래식 감식초에서 bacterial cellulose 생성능이 우수하고 알칼내성이 비교적 높은 *Gluconacetobacter persimmonis* KJ145^T를 분리·동정하여 bacterial cellulose를 생산을 위한 배양조건을 보고한 바 있다(11). 본 연구는 그 속보로써 산업적으로 다양한 활용성이 높은 bacterial cellulose 및 식초의 동시생산에 따른 성분변화를 조사하였다.

재료 및 방법

균주 및 배지조성

Bacterial cellulose와 식초제조에 사용한 균주는 전보와 같이(11) *Gluconacetobacter persimmonis* KJ145^T(이전의 균주명; *Gluconacetobacter persimmonensis*, KCCM 10354, KCTC 10175BP)를 사용하였으며, 종배양에는 yeast extract 0.5%, peptone 0.5%, Na₂HPO₄ 0.27%, citric acid 0.115%, glucose 2.0%(pH 6.0)으로 구성된 Hestrin & Schramm(이하 HS)배지(12)를 사용하였다. 사과농축액(50° Brix)을 4°C에 보관하면서 필요할 때마다 10° Brix로 희석하고, 에탄올 5%를 첨가하여 0.1 N NaOH로 pH를 6.0으로 조절한 다음 bacterial cellulose와 식초를 동시에 생산하기 위한 배지로 사용하였다.

균주배양 및 배양방법

G. persimmonis KJ145^T의 종배양은 Lee 등(11)의 방법으로 배양하여 사용하였다. 즉, 각 플라스크에 20 mL HS배지를 넣고 121°C에서 15분간 autoclave하고 방냉한 다음 균주를 접종하여 30°C, 250 rpm으로 48시간 동안 배양하였다. 배양액을 4°C에서 18,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 균체를 회수한 후 생리식염수(0.85% NaCl)를 사용하여 2번 세척한 후, 동량의 생리식염수용액에 재현탁하여 그 액을 사용하였다.

Bacterial cellulose 및 식초의 동시생산

G. persimmonis KJ145^T의 식초 및 bacterial cellulose의 동시 생산을 위하여 사과배지(10° Brix, pH 6.0)에 에탄올 5%(v/v)를 첨가한 후, 30°C에서 정지배양하면서 생성된 bacterial cellulose 생산량과 식초성분 중에 유리당 및 유기산의 변화를 조사하였다.

Bacterial cellulose 생산량 측정

생성된 bacterial cellulose 생산량은 전보에 보고한 방법(11)에 따라 측정하였다. 즉 생성된 bacterial cellulose를 증류수로 충분히 세척하고 0.25 N NaOH용액에 침지시켜 하루동안 정지한 다음 동량의 0.25 N acetic acid를 넣어 중화한 후, 다시 증류수로 충분히 세척하여 배지성분 및 균체와 불순물을 제거한 후 80°C dry oven에서 건조하여 건조중량을 측정하였다.

식초의 이화학적 특성측정

pH변화는 pH meter(Metrohm 691, Swiss)를 사용하여

측정하였으며, 총산은 1% phenolphthalein을 지시약으로 하여 0.1 N NaOH 규정용액으로 중화 적정하여 초산함량으로 환산하였다.

유기산 및 유리당의 분석

유기산 및 유리당의 분석은 먼저 발효액을 hexane으로 처리하여 유지성분을 제거하고 sep-pak C₁₈ cartridge로 색소 및 단백질 성분을 제거한 후 0.45 µm membrane filter로 여과하여 HPLC(high performance liquid chromatography)로 분석하였으며, 이때 분석조건은 다음과 같다(13). 즉, 유기산을 분석하기 위해 Waters HPLC 2690에 µ-Bondapak C₁₈ column을 장착하여 10 mM KH₂PO₄(pH 2.3)를 0.6 mL/min의 유속으로 흘리면서 5 µL를 주입하여 UV검출기로 분석하였다. 유리당의 분석은 waters HPLC 2690에 Shimpack NH₂를 사용하였고 전개용매로는 80% acetonitril를 0.6 mL/min의 유속으로 시료 5 µL를 주입하여 RI로 분석하였다.

결과 및 고찰

Bacterial cellulose 및 식초의 동시생산

Bacterial cellulose의 발효과정에서 발생하는 부산물인 발효액을 식초로 음료용이나 조미료 등으로 이용하기 위해서는 발효액의 총산이 4.0이상이어야만 한다. *G. persimmonis* KJ145^T는 Fig. 1의 결과와 같이 배지 초기 에탄올 농도가 2% 일 때 bacterial cellulose를 가장 많이 생산하였으며, 총산이 가장 많이 생산되는 배지의 초기 에탄올 농도는 7%(v/v)이었다. 배지의 초기 에탄올 농도가 7%(v/v)까지는 에탄올 농도가 높을수록 많은 양의 초산이 생산되었으며, bacterial cellulose 생산량은 2% 이상의 에탄올 농도에서는 감소하는 경향이었다. 따라서 배지의 초기 에탄올 농도를 적절히 조절함으로써 많은 양의 bacterial cellulose를 생산하거나 높은 산도의 발효액을 얻을 수 있다. 본 연구에서는 bacterial cel-

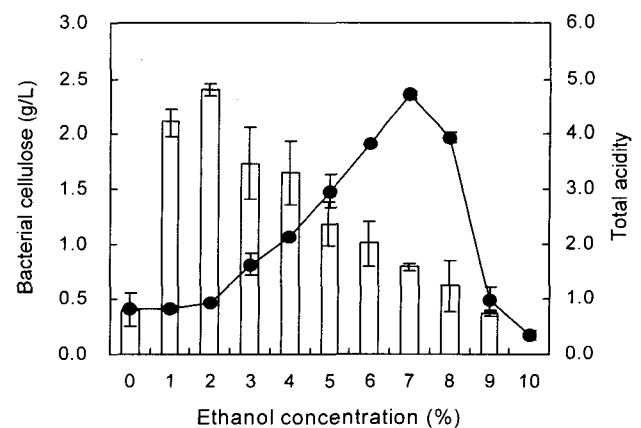


Fig. 1. Effect of ethanol concentration on bacterial cellulose production in static culture.

Data were presented as mean ± SD (n=3).
□, bacterial cellulose; ●, total acidity.

lulose와 식초를 동시에 생산할 수 있는 2~7% 범위내의 임의 농도 5%(v/v)의 에탄올을 배지에 첨가하여 발효기간에 따른 bacterial cellulose 생산량과 발효 여액의 성분변화를 조사하였다.

pH 및 총산의 변화

발효기간이 경과함에 따라 발효액의 pH 및 총산의 변화를 조사한 결과는 Fig. 2에 나타내었다. 배양시간이 길어질수록 *G. persimmonis* KJ145^T가 생육한 발효액의 pH는 초기 6.0에서 점차 낮아져 배양 8일차에 3.22에 도달하였으며, 이후에는 거의 변화가 없었다. 이러한 결과는 *G. persimmonis* KJ145^T 균주가 생성하는 각종 유기산과 초산의 영향으로 보이며, 총산은 배양 2일째부터 급격히 상승하기 시작하여 배양 8일째 4.66으로 최고점에 도달하였으나 배양시간이 8일이 경과하면 재산화되어 서서히 감소하는 경향을 나타내었다. 이러한 결과는 Seo 등(4)이 *Acetobacter* sp. PA97균주, 사과농축액을 사용하여 초산발효를 행한 보고한 결과와 유사한 경향을 나타내었으나, 생산된 총산의 함량에 있어서 상당한 차이가 있었다. 이러한 원인은 초산발효 방법 및 사용된 균주, 초기 배지성분의 차이에서 비롯된 것으로 추정되었다.

Brix의 변화

Bacterial cellulose와 식초의 동시발효과정에 일어나는 brix의 변화는 Fig. 3과 같다. Brix의 변화는 배양초기 11.4에서 배양 2일에 10.8로 감소하는 경향을 나타내었지만 그 이후 뚜렷한 변화를 거의 찾아 볼 수 없었다. 이러한 결과는 Lee 등(11)이 보고한 예와 비슷하였으며, brix의 수치에 큰 변화가 없는 것은 당이 소비되는 만큼 부산물인 초산을 비롯한 유기산이 생성되고, 생성된 유기산이 brix에 영향을 미치지 때문인 것으로 보인다. 이러한 결과는 Cho와 Sohn(14)의 연구결과에서 당 함량과 brix사이의 오차가 발생하는 원인이 무기염류와 유기산 때문이라고 확인된 바 있다.

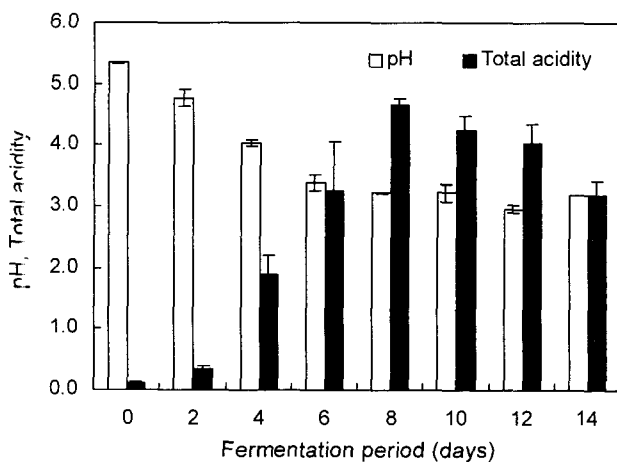


Fig. 2. Changes of pH and total acidity during bacterial cellulose fermentation. Data were presented as mean ± SD (n=3).

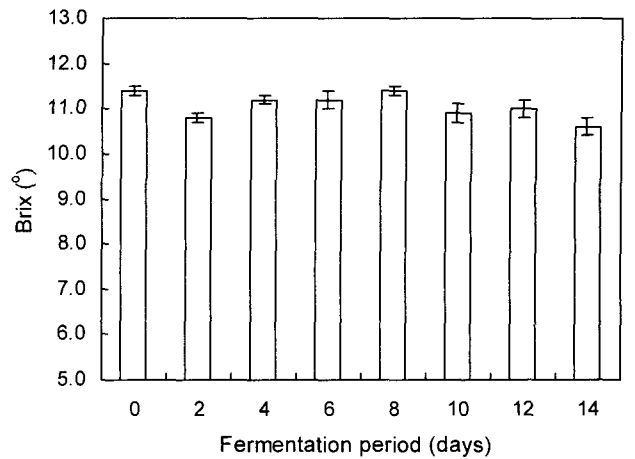


Fig. 3. Changes of brix during bacterial cellulose fermentation.

Data were presented as mean ± SD (n=3).

유리당의 변화

농축사과 주스를 이용하여 bacterial cellulose와 식초를 동시 생산함에 있어서 발효과정 중에 일어나는 발효액의 당 성분 변화를 조사한 결과는 Table 1에 나타내었다. 발효전의 사과주스 성분은 fructose, glucose 및 sucrose 등이 대부분이었으며 이러한 당구성 성분은 Cho와 Sohn(14)이 보고한 사과의 당 조성(fructose, glucose, sucrose 및 sorbitol)과는 매우 유사하였으나 단지 sorbitol은 검출되지 않았으며, 각 성분의 함량 또한 상당한 차이가 있었다. 그 이유로서는 저자들이 수행한 실험에서는 농축 사과주스를 사용하였으나 Cho와 Sohn(14)은 사과 과즙 그 자체를 분석하였기 때문인 것으로 추정된다. 발효액의 당 성분은 발효 전에 fructose, glucose 및 sucrose가 각각 4537, 2924, 967 mg%으로 fructose의 함량이 가장 높게 나타났다. 본 실험에 사용한 *G. persimmonis* KJ145^T는 배양시간이 경과할수록 fructose, sucrose 및 glucose를 에너지원으로 이용하였으나, 각각의 이용속도에 있어서는 상당한 차이가 있는 것으로 추정되었다. 특히, glucose에 대한 이용성은 매우 커서 빠른 속도로 소비되었지만, 이와는 달리 fructose 및 sucrose의 경우, 적은 양이 이용되었다. Sucrose의 경우는 배양초기 967 mg%이던 것이 배양 2일에 920 mg% 10일에 767 mg%로 함량이 감소하는 것으로 보아 *G. persimmonis* KJ145^T균주가 sucrose를 분해하는 것을 알 수 있었다 또한 sucrose가 분해되어 fructose와 glucose가 생성되지만

Table 1. Changes of free sugar contents during bacterial cellulose and vinegars fermentation

Fermentation period (days)	Free sugars (mg%)		
	Fructose	Glucose	Sucrose
0	4537	2924	967
2	4434	2769	920
4	4362	2503	912
6	4198	1944	840
8	4237	1618	858
10	4127	1042	767

이들의 농도가 크게 증가하지 않은 것으로 보아 발효과정 중에 단당류가 지속적으로 이용됨을 알 수 있었다. 그러나 이들 단당류의 발효여액에 잔존하는 양에는 상대적으로 큰 차이가 있어 이용효율이 다름을 알 수 있었다.

Bacterial cellulose 및 균체량의 변화

배양기간에 따른 bacterial cellulose 생산량과 균 증식을 조사한 결과는 Fig. 4와 같다. *G. persimmonis* KJ145^T 균주는 배양초기부터 활발히 증식하여 배양 2일에 대수증식기에 도달하였고, 배양 6일에는 정지기에 도달하였다. 또한 bacterial cellulose 생산량은 배양시간이 길어질수록 생산량이 증가하는 경향으로, 배양 14일에 5.07 g/L에 도달하였으며, 이후로도 더 생산될 것으로 추정된다. 그러나 bacterial cellulose와 초산을 동시에 생산하기 위해서는 Fig. 2에 나타낸 바와 같이 배양 8일이 최적기간일 것으로 판단되었다. 이러한 결과는 bacterial cellulose만을 생산하고자 할 때, 최적발효기간이 14~16이라는 Lee 등(11)의 결과보다는 배양기간이 2배나 짧은 장점이 있지만, 상대적으로 bacterial cellulose의 생산량이 감소하는 단점이 있다.

유기산 및 초산의 변화

Bacterial cellulose와 식초를 동시에 생산하면서 발효액 중에서 부산물로 생산되는 각종 유기산의 함량변화를 Fig. 5에 나타내었다. 발효액 중에서 검출된 유기산은 배양 전에 oxalic acid, malic acid, citric acid, succinic acid 및 acetic acid가 확인되었으며, 각각 58.36, 492.51, 0.39, 70.01 mg% 농도로 존재하였다. 따라서 발효초기에는 malic acid의 농도가 가장 높았으며, 발효시간이 경과함에 따라 malic acid의 함량은 감소하고, 상대적으로 succinic acid 함량은 급격히 증가하여 배양 4일에 최고치에 도달하였다. 또한, tartaric acid는 배양 6일에 24.22 mg%가 확인되었지만 그 이후로는 검출되지 않았다. 이와 달리, oxalic acid 생산량은 배양시간이 경과함에 따라 서서히 증가하는 경향을 나타내었다. 한편 식초의

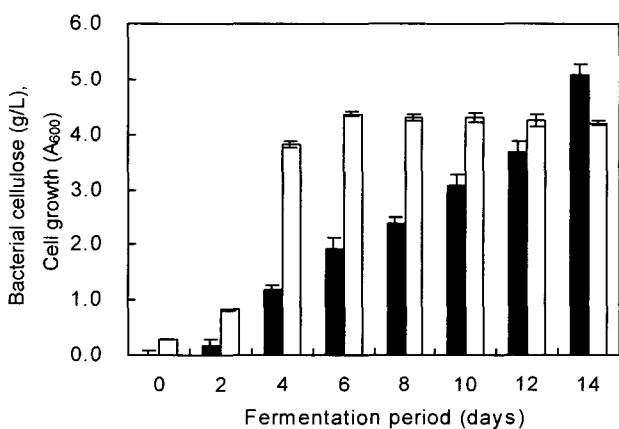


Fig. 4. Changes of cell growth and bacterial cellulose during bacterial cellulose fermentation.

Data were presented as mean ± SD (n=3).

■, bacterial cellulose; □, cell growth (A₆₀₀).

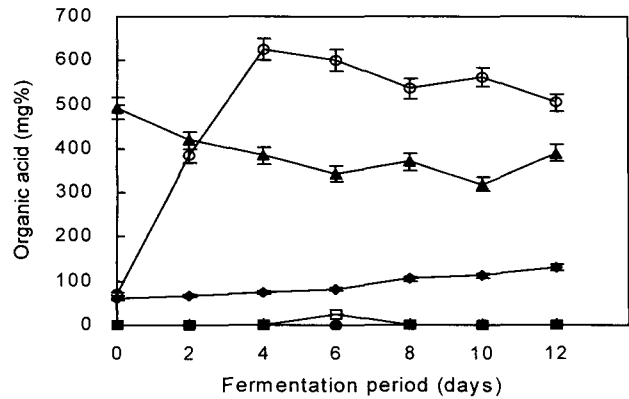


Fig. 5. Changes of organic acid during bacterial cellulose fermentation.

◆ Oxalic acid, □ Tartaric acid, ▲ Malic acid, ● Citric acid, ○ Succinic acid.

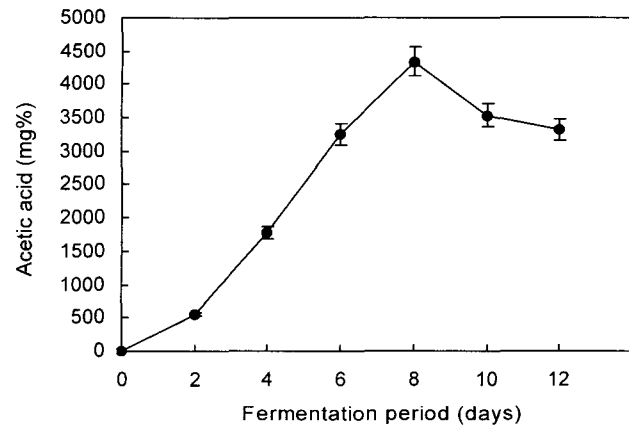


Fig. 6. Changes of acetic acid during bacterial cellulose fermentation.

주성분인 acetic acid는 Fig. 6에서 보는 바와 같이 발효 2일 (548.90 mg%)부터 서서히 증가하기 시작하여, 4일에 1767.91 mg%, 6일에 3256.80 mg%, 8일에는 최고생산량인 4334.15 mg%를 생산하였으나 배양 10일부터는 급격히 감소하였다. 이러한 결과는 Fig. 2에 나타낸 바와 같이, 배양 8일째에 초산이 최고치를 나타낸 후 서서히 감소하는 결과와 유사한 경향이었다. 따라서 bacterial cellulose와 초산을 동시에 생산하기 위한 최적배양기간은 8일로 추정되었다.

요 약

G. persimmonis KJ145^T를 사용하여 bacterial cellulose와 식초 동시생산에 따른 성분변화를 조사하였다. 그 결과 pH는 배양 8일째에 3.22로 감소하는 경향이었으며, 초산은 8일째에 가장 높은 4.66으로 나타났다. Brix는 배양기간 동안 거의 변화가 없었으며, 유리당은 fructose, glucose 및 sucrose로 구성되어 있고 fructose는 배양 종료 후, 10일째에도 거의 감소하지 않고 높게 나타났다. *G. persimmonis* KJ145^T 균체는 배양 2일부터 급격히 증가하여 4일에 가장 높게 나타났으며,

bacterial cellulose는 배양기간이 길수록 증가하는 경향을 나타내었다. 발효액의 유기산은 malic acid, succinic acid, oxalic acid 등이 검출되었으며, acetic acid는 발효 2일째부터 급격히 증가하여 8일째에 가장 높게 생성되었다. 따라서 bacterial cellulose와 초산을 동시에 생산하기 위한 최적배양기간은 8일 정도로 나타났다.

감사의 글

본 연구 과제는 계명대학교 전통미생물자원개발 및 산업화연구센터(RRC)의 지원에 의하여 수행된 결과의 일부이며 연구비 지원에 감사 드립니다.

문 헌

1. Kwon SH, Jeong EJ, Lee GD, Jeong YJ. 2000. Preparation method of fruit vinegars by two stage fermentation and beverage including vinegar. *Food Industry and Nutrition* 5: 18-24.
2. Jeong YJ, Shin SR, Kang MJ, Seo CH, Won CY, Kim KS. 1996. Preparation and quality evaluation of the quick fermented persimmon vinegar using deteriorated sweet persimmon. *J East Asian of Dietary Life* 6: 221-227.
3. Jeong YJ, Seo JH, Lee GD, Park NY, Choi TH. 1999. The quality comparison of apple vinegar by two stages fermentation with commercial apple vinegar. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 28: 353-358.
4. Seo JH, Lee GD, Jeong YJ. 2001. Optimization of the vinegar fermentation using concentrated apple juice. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 30: 460-465.
5. Jeong YJ, Lee IS. 2000. A view of utilizing cellulose produced by *Acetobacter* bacteria. *Food Industry and Nutrition* 5: 22-29.
6. Jonas R, Farah LF. 1998. Production and application of microbial cellulose. *Polym Degrad Stab* 59: 101-106.
7. Vandamme EJ, Baets SD, Vanbaelen A, Joris K, Wulf PD. 1998. Improved production of bacterial cellulose and its application potential. *Polym Degrad Stab* 59: 93-99.
8. Klemm D, Schumann D, Udhardt U, Marsch S. 2001. Bacterial synthesized cellulose-artificial blood vessels for microsurgery. *Prog Polym Sci* 26: 1561-1603.
9. Jeong YJ, Lee IS. 2000. A view of utilizing cellulose produced by *Acetobacter* bacteria. *Food Industry and Nutrition* 5: 22-29.
10. Lee OS, Jeong YJ. 2001. Industrial application and biosynthesis of bacterial cellulose. *Food Industry and Nutrition* 6: 10-14.
11. Lee OS, Jang SY, Jeong YJ. 2002. Culture condition for the production of bacterial cellulose with *Gluconacetobacter persimmonus* KJ145. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 31: 572-577.
12. Hestrin S, Schramm M. 1954. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. 2. Preparation of freeze dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose. *Biochem J* 58: 345-352.
13. Jeong YJ, Seas KI, Kim KS. 1996. Physicochemical properties of marketing and intensive persimmon vinegars. *J East Asian of Dietary Life* 6: 355-363.
14. Cho RK, Sohn MR. 1998. New approach of nondestructive evaluation for sweetness in apple fruit using near-infrared spectroscopy. *J Kor Soc Hort Sci* 39: 745-750.

(2003년 5월 9일 접수; 2003년 9월 19일 채택)