

## 클로버꽃 식醋에서 分離한 醋酸菌의 生理學的 研究

梁 熙 天·崔 東 晟

全北大學校 農科大學 農化學科

(1979년 9월 3일수리)

### Physiological Characteristics of Acetic Acid Bacteria isolated from Clover Flower Vinegar

Hee Cheon Yang and Dong Sung Choi

Department of Agricultural Chemistry, College of Agriculture, Jeonbug National University

#### Abstract

Physiological characteristics of the acetic acid bacteria isolated from the clover flower vinegar were studied and the results were summarized as follows.

1. The strains No. 1, 3, 5 were employed. By their biochemical properties observed, they seemed to belong to *Acetobacter aceti*. Particularly, the strain No. 3 had the highest productivity of acetic acid.
2. When the acetic acid bacteria preincubated in 7°Bx Koji extract was inoculated to 3°Bx Koji extract added 0.15% yeast extract the productivity and peroxidation of acetic acid increased considerably.
3. 3°Bx Koji extract added 0.005 to 0.01% of  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  was good in the maintenance of high concentration of acetic acid.
4. Initial optimum pH of media was 6.0.
5. 2 to 4% of ethanol concentration brought a good result of the productivity and peroxidation of acetic acid in short terms.

#### 緒 言

식초는 아주 오랜 옛날부터 製造, 利用되어 온 醱酵食品의 하나로서 調味料로서는 물론 醫藥品, 美容劑, 溶媒로서 우리 日常生活과 밀접한 關係를 맺어왔다<sup>(1)</sup>. 그런데 급격한 經濟成長으로 인한 分業化 時代에서는 대량공급을 위한 大規模生産을 필연적으로 요구하게 되었으며, 장기간 발효를 요하는 釀造醋보다는 原價面에 훨씬 유리한 合成醋나 混合醋의 과잉공급을 초래하였다. 값싼 合成醋나 混合醋는 식초 고유의 風味가 없을 뿐만 아니라 人體에도 유해하여 國民보건에도 나쁜 影響을 미치고 있다. 最近에 있어서는 自然食品에의 요구 傾向이 강해져서 보다 安全度가 높으며 고유의 風

味를 갖는 釀造醋의 消費를 증가시키고 있다.

식초의 製造方法과 風味 등에 대해서 많은 研究가 이루어져 있고, 또한 酸化醱酵의 代表的인 菌인 초산균의 研究도 Kutzing (1837)의 發見이래 많은 研究가 이루어져 있다.<sup>(1,2,6)</sup> 우리나라에서는 그동안 식초에 대한 研究가 거의 이루어지지 않았는데 最近에 徐等<sup>(4)</sup>의 果實加工副産物을 利用한 食醋제조시험이 있고, 著者 등<sup>(3)</sup>이 농촌 어디에서나 쉽게 구할 수 있는 클로버꽃을 原料로 하여 農家에서 손쉽게 釀造할 수 있는 食醋製造시험을 한 바 있다.

그런데 Bergey의 分類에 의하면 초산균은 ethanol을 酸化하여 초산을 生成한 뒤 탄산가스과 물로 分解하는 能力을 갖는 것과 그 能力을 갖지

않는 2群으로 나뉘었다. 초산의 再分解現象, 即 過酸化는 食醋製造에서 바람직하지 못한 現象이지만, (2,6) 이 代謝變換의 기구는 초산균의 生理化學의인 면에서 대단히 흥미로운 點일 뿐만 아니라 식초 製造技術에도 參考가 될 수 있기에 이번 實驗에서는 클로버꽃 식초에서 分離한 초산균에 대해서 酸生成 및 過酸化를 일으키는 基本的 培養條件에 대한 研究를 시도하였다.

## 材料 및 方法

### 1. 菌 株

클로버꽃으로 釀造한 식초에서 分離한 醋酸菌 (3) 5種을 선별하여 실험의 편의상 No. 1~5라 命名하여 使用하였다.

### 2. 培地 및 培養方法

Koji extract를 基本培地로 하고 이것에 必要에 따라 補助原料로서 glucose, peptone, yeast ext., ammonium sulfate, sodium acetate, potassium phosphate, monobasic magnesium sulfate 등을 가하였다. 綿絨殺菌한 250ml 三角후라스크에 培地 95ml를 넣어 蒸氣殺菌 後 99.5%(v/v) ethanol 5ml를 無菌的으로 가하여 5% ethanol 濃도가 되게 하였다. 供試菌의 液體培養液을 1白金耳 接種하여 30°C에서 靜置培養하였다.

### 3. 測定方法

1) 酸度: 醱酵液 1ml를 취하여 phenolphthalein을 指示藥으로 하여 0.1N NaOH 용액으로 中和滴定하여 그 적정치 (ml)를 滴定酸도로 하였다. (6,7)

2) 還元糖: Somogyi法 (8)에 의하여 定量하였다.

3) 總窒素: Micro-Kjeldahl法 (9)에 의하여 定量하였다.

4) pH: Sargent-welch NX pH meter로 測定하였다.

5) 菌數計測: Sodium acetate agar media (10)

를 利用, 常法 (11,12)에 따라 計測하였다.

## 結果 및 考察

### 1. 供試菌株의 選擇

Bergey의 分類 (5)에 따르면 *Acetobacter aceti*의 生理的 特徵의 하나는 5-keto gluconate 및 2-keto gluconate의 生成이다. glucose 10g, yeast extract 500mg, water 100ml, pH 4~5의 選擇培地에 保管중인 No. 1~5菌을 接種, 30°C에서 10日間 靜置培養한 後 Bial orcin反應 (13) 시험으로 5-keto-gluconate의 生成有無를 確認하여 陽性인 No. 1, 3, 5菌株만을 本實驗에 供試 使用하였다.

### 2. 選擇된 菌株의 性狀

선택된 菌株의 最大酸度, 最大酸도에 이르는 時間, 最大酒精抵抗量은 7°Bx Koji extract 30ml를 100ml 三角후라스크에 分注하여 15 lbs로 15分間 滅菌, 冷却한 후 무균적으로 95% ethanol을 1% 간격으로 첨가하여 3~16% 사이로 각각 조절한 다음 液體培養液을 2白金耳 接種, 培養하면서 經時적으로 測定하였다. 일반 性상은 Table 1 및 Fig. 1과 같다.

### 3. Koji extract 濃度の 影響

炭素源으로서 利用하는 Koji extract를 主原料로 利用해서 醱酵에 미치는 Koji extract의 濃度の 影響에 대해서 實驗하였다. 即 Koji extract (Bx 17~18°)를 1, 2, 3, 4, 5, 7 및 10°Bx가 되게 爲로 희석한 다음 低濃度の Koji extract 배지에는 50°Bx의 糖分 含量과 동일하게 glucose를 添加하여 (Table 2) 補糖의 效果에 대해서도 아울러 검토하였던 바 Table 3과 같은 結果를 얻을 수 있었다.

Table 3의 結果에 의하면 Koji extract 濃도가 7°Bx, 10°Bx의 경우에는 生酸量은 7일 내지 8일

Table 1. General characteristics of three strains

No. of strain	Size (μ)	Oxidation of substrate			Maximum acidity (w/v%)	Time reached to maximum acidity (hr)	Maximum ethanol conc. of resistance (v/v%)
		ethanol	acetic acid	glucose			
1	0.4 x 0.8	+	+	+	7.15	134	14
3	0.5 x 1.0	+	+	+	7.59	111	13
5	0.5 x 1.0	+	+	+	6.71	141	13

\* : positive

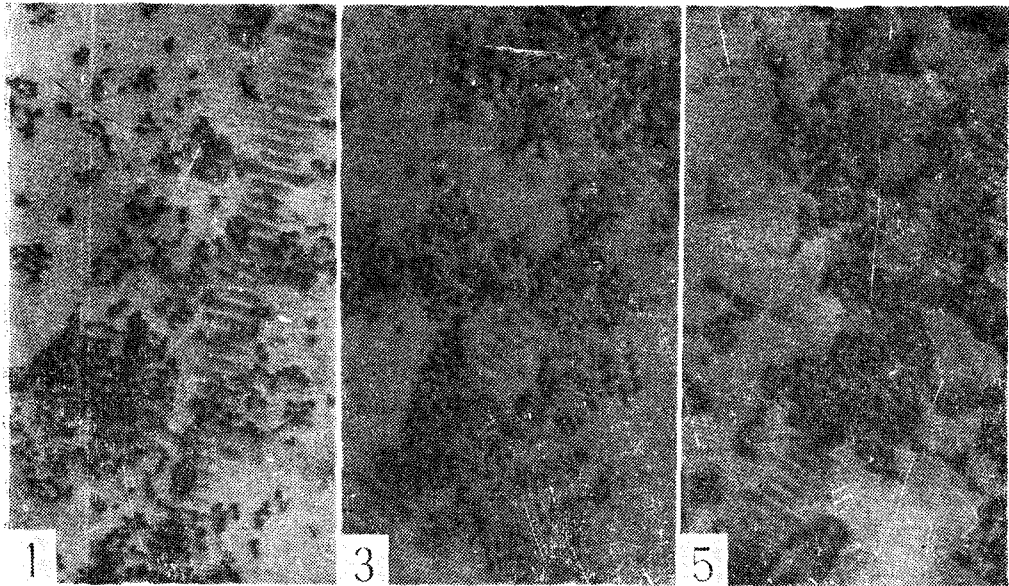


Fig. 1 Microscopic photograph of three strains (basic fuchsin solution: 10 ml saturated alcoholic basic fuchsin and 90 ml of 3% phenol, 15×40 times)

Table 2. Concentration of koji extract.

No. of flask	Koji ext. (°Bx)	Addition of glucose (g/100ml)	Reducing sugar as glucose (g/100ml)
1	10	.....	8.72
2	7	.....	6.11
3	5	.....	4.36
4	4	.....	3.49
5	4	0.87	4.36
6	3	.....	2.61
7	3	1.75	4.36
8	2	.....	1.74
9	2	2.62	4.36
10	1	.....	0.87
11	1	3.49	4.36

pH of medium; 4.0

경이 最高度에 달하며, 3°~5°Bx의 경우에는 서서히 증가하였고 1°Bx, 2°Bx의 경우 酸度の 상승은 매우 느렸으며 No. 1 菌의 경우에는서는 피막은 형성되었으나 ethanol을 거의 酸化하지 못하였다.

Glucose를 添加한 것은 無添加의 것과 비교해서 生酸속도 및 生酸量의 차이가 認定되었다. Tomoyeda等<sup>(6)</sup>의 報告와 本 實驗結果를 비교하여 볼때, 高濃度の Koji extract에서는 일치하는 경향이었으나 低濃度の Koji extract에서는 일치하지 않았다. 이는 供試菌株과 ethanol濃度, 배양

기組成 등의 차이에 기인하지 않나 생각된다. 菌數는 Koji extract濃도에 비례하고 있는데 低濃度の Koji extract의 경우 補糖의 效果는 어느 정도 인정되나 糖 이외의 영양분이 부족함을 알 수 있었다. De Ley와 Schell (1959)<sup>(14)</sup>은 *A. aceti*는 소비 glucose의 約 80%를 gluconate로 전환하며 나머지 20%를 炭素源과 에너지源으로 사용한다고 하였는데 補糖만으로는 酸生成에 必要한 모든 영양소가 충분히 供給될 수 없는 것으로 생각된다.

#### 4. 窒素源 添加의 影響

앞에서 살핀 바와 같이 低濃度の Koji extract에서는 glucose로만 補糖하면, 대조구에 비하여 菌數가 적은데, 이것은 糖 이외의 다른 영양분이 모자라는 때문인 것으로 볼 수 있다. 초산균의 營養要求性에 대해서는 Iibuchi,<sup>(15)</sup> Nakayama<sup>(16)</sup>의 특히 微量要素等에 대해서는 Ameyama와 Kondo,<sup>(17,18)</sup> Hijikata等<sup>(18,20)</sup>의 상세한 研究가 있으나 本 實驗에서는 天然培地로서 Koji extract를 利用하여 窒素源으로 peptone, yeast extract, ammonium sulfate를 添加해서 그 影響을 조사하였다. 各 窒素源添加量은 Koji extract (7°Bx)의 全窒素量과 同量 및 2倍量이 되게끔 3°Bx Koji extract에 添加하여 Table 4와 같은 培地를 만들었고 本 培地에 供試菌株을 接種, 醱酵를 행한 結果는 Table 5와 같다.

**Table 3.** Relation between concentration of koji ext. and acetic acid fermentation.

No. of strain	culture time (day)	No. of flask	Acidity										pH*	cell count** (x10 <sup>7</sup> )
			3	4	5	6	7	8	9	10	12			
1	1		2.3	3.9	5.3	6.3	6.4	6.5	6.4	6.2	6.0	2.65		
	2		2.0	3.1	3.4	3.6	3.7	3.8	3.7	3.6	3.7	2.82		
	3		1.2	1.9	2.0	2.4	2.2	2.2	2.2	2.2	2.2	2.96		
	4		1.5	1.7	1.8	1.8	1.9	1.8	1.8	2.0	2.3	2.93		
	5		1.1	1.9	2.0	2.1	2.3	2.2	2.1	2.2	2.8	2.91		
	6		1.1	1.4	1.4	1.4	1.4	1.5	1.4	1.4	1.6	2.97		
	7		1.4	1.7	1.8	1.8	1.8	1.6	1.7	1.8	1.8	2.93		
	8		0.6	0.8	0.9	1.1	1.1	1.2	1.1	1.1	1.2	2.93		
	9		1.2	1.4	1.4	1.5	1.4	1.4	1.4	1.4	1.5	2.85		
	10		0.3	0.3	0.3	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	3.12		
	11		0.3	0.7	0.8	0.9	0.8	1.0	0.9	0.9	1.5	2.95		
3	1		6.0	7.7	7.6	7.6	7.6	7.9	8.0	8.1	7.3	2.63	9.2	
	2		2.4	5.5	7.1	7.0	7.2	7.7	7.7	7.9	6.7	2.67	7.0	
	3		3.9	4.1	4.4	4.2	4.4	4.4	4.3	4.5	4.6	2.78	5.3	
	4		3.7	3.8	3.7	3.8	3.8	4.0	3.9	4.0	4.4	2.84	4.0	
	5		0.7	3.1	4.2	4.3	4.6	4.6	4.5	4.6	4.6	2.76	4.8	
	6		3.1	3.5	3.5	3.4	3.4	3.4	3.4	3.4	3.5	2.76	2.5	
	7		3.5	3.6	3.6	3.5	3.5	3.6	3.7	3.8	4.1	2.80	2.8	
	8		2.0	2.1	2.3	2.1	2.1	2.4	2.2	2.2	3.3	2.76	2.0	
	9		2.7	2.7	3.0	2.8	2.7	2.9	2.9	3.0	3.5	2.76	2.4	
	10		0.3	0.3	0.5	0.8	0.8	0.9	0.9	1.1	1.4	2.94	0.2	
	11		0.5	0.8	1.1	1.3	1.4	1.4	1.5	1.6	1.6	2.80	0.4	
5	1		3.2	6.2	7.5	7.8	7.8	7.7	7.8	7.5	7.1	2.66		
	2		4.4	6.8	7.2	7.6	7.7	8.0	7.7	7.3	6.9	2.61		
	3		3.3	5.3	5.4	5.9	5.9	6.4	5.8	6.1	5.7	2.64		
	4		3.3	4.9	5.2	5.3	5.2	5.2	5.0	5.4	4.9	2.71		
	5		4.0	5.2	5.2	5.5	5.5	5.6	5.4	5.5	5.2	2.69		
	6		2.7	3.7	3.8	3.9	4.0	4.0	3.9	4.0	3.7	2.73		
	7		2.3	4.1	4.3	4.7	4.5	4.7	4.2	4.5	4.4	2.64		
	8		2.0	2.5	2.5	2.8	2.5	2.5	2.5	2.7	3.0	2.77		
	9		2.5	3.8	3.5	3.7	3.7	3.8	3.7	3.5	3.5	2.62		
	10		0.3	0.4	0.5	0.9	1.2	1.3	1.4	1.7	2.0	2.60		
	11		0.8	1.0	1.3	1.5	1.5	1.9	2.1	2.3	2.5	2.70		

\*: pH after 10 days culture, \*\*: cell count after 10 days culture

이 結果에 의하면 사용한 질소원 중 yeast ext. 가 가장 有效하였으며 peptone도 有效하였다. peptone 添加區와 yeast extract 添加區에서는 2 倍量 添加區가 同量添加區보다 生産속도가 빨랐으며 生酸量은 많거나 거의 같았는데 ammonium sulfate 添加區에서는 오히려 반대되는 경향이있다. 이것은 Koji extract의 炭素源은 거의 glucose 이기 때문에 *Acetobacter* 중 *lactophillic* 菌은 窒

素源으로 암모니아염, 炭素源으로 乳酸을 함유하는 배지에서 대단히 빠르게 生育하나 窒素源으로 암모니아염과 炭素源으로서 glucose 만을 함유한 배지에서는 生育이 빈약하다고 한 Brown과 Rainbow<sup>(21)</sup>의 見解와 一致되는 現象으로 볼 수 있다. ammonium sulfate를 添加했을 경우에도 酸生成이 增大하는 경향을 認定할 수 있었지만 큰 効果는 없었는데 이것은 Iibuchi 等<sup>(15)</sup>의 報告와 一致

**Table 4.** Compositon of medium (Nitrogen source)

No. of flask	Koji ext. (°Bx)	Peptone (mg/100ml)	Yeast extract. (mg/100ml)	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (mg/100ml)	Total N
1	7	.....	.....	.....	31.59
2	5	.....	.....	.....	22.56
3	3	.....	.....	.....	13.53
4	3	447.7	.....	.....	63.18
5	3	447.7	.....	.....	63.18
6	3	.....	151.8	.....	31.59
7	3	.....	417.2	.....	63.18
8	3	.....	.....	85.15	31.59
9	3	.....	.....	234.09	63.18

Nitrogen content of three N-sources was as follows: peptone, 11.09%; yeast extract., 11.9%, and (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 21.21%.

**Table 5.** Effect of nitrogen source on the acetic acid fermentation.

No. of strain	Culture time(day) No. of flask	3	4	5	6	7	8	9	10	cell count* (x 10 <sup>7</sup> )
		Acidity								
1	1	1.0	2.1	3.4	3.8	3.7	3.8	3.9	3.8	
	2	1.1	1.9	2.0	2.4	2.2	2.2	2.2	2.2	
	3	1.5	1.7	1.8	1.8	1.9	1.8	1.8	2.0	
	4	2.7	3.7	4.0	4.4	3.9	3.9	4.0	3.9	
	5	3.4	3.8	4.5	4.6	4.4	4.2	4.2	4.2	
	6	4.4	5.8	6.8	7.4	7.0	7.0	7.0	6.3	
	7	4.3	6.3	6.9	7.1	6.8	6.9	6.8	6.8	
	8	3.4	3.7	3.8	4.2	4.3	3.9	4.2	3.8	
	9	1.5	2.4	2.7	2.9	2.9	2.8	2.9	2.7	
3	1	2.4	5.5	7.1	6.9	7.2	7.7	7.7	7.9	7.0
	2	3.9	4.1	4.4	4.2	4.4	4.4	4.3	4.5	5.3
	3	3.1	3.5	3.5	3.4	3.4	3.6	3.4	3.4	2.5
	4	3.1	3.5	4.0	4.1	4.0	4.6	5.8	6.4	3.7
	5	3.6	3.8	4.7	4.8	5.1	5.4	6.3	6.2	4.1
	6	4.7	6.2	8.1	8.2	7.5	7.6	7.0	6.5	9.0
	7	5.4	6.6	8.1	8.2	7.3	7.4	6.9	6.3	8.9
	8	3.5	3.5	4.2	4.2	4.1	4.2	4.4	4.1	3.1
	9	1.8	1.6	2.1	2.5	2.4	3.0	4.0	3.8	2.0
5	1	4.4	6.9	7.2	7.6	7.7	8.0	7.8	7.3	
	2	3.3	5.3	5.4	5.9	5.9	6.4	6.3	6.0	
	3	2.7	3.7	3.8	3.9	4.0	4.0	4.0	4.0	
	4	3.1	3.7	4.0	4.2	4.1	4.4	4.1	4.2	
	5	3.3	4.3	4.6	4.9	4.8	5.2	5.6	5.5	
	6	5.4	7.4	7.6	8.1	7.7	7.6	7.1	6.2	
	7	5.8	7.6	8.0	8.2	7.5	7.6	7.0	6.7	
	8	3.9	4.6	4.5	4.7	4.6	4.5	4.1	4.0	
	9	2.6	2.9	2.9	3.6	3.0	3.1	3.1	2.9	

\*: cell count after 10 days culture.

하는 경향이였다. 7°Bx Koji extract의 窒素量의 同量 添加區와 2倍量 添加區간의 菌數를 비교하여 보면 yeast extract 添加區에서는 2倍量 加한 경우와 同量 加한 경우에 큰 차이가 없었고, peptone 添加區에서는 2倍量 加한 경우가 약간 많았으나 ammonium sulfate 添加區에서는 2倍量 添加한 쪽이 同量 添加한 쪽보다 菌數가 더 적어 無添加區와 거의 같은 程度임을 알 수 있다. Nakayama<sup>6)</sup>와 Hijikata<sup>19)</sup>은 食醋醱酵시 lag phase의 단축에는 glutamate, alanine, aspartate의 添加가 效果가 있다고 하였는데, yeast extract에는 비타민類·有機鹽類 특히 아미노酸을 많이 함유하기 때문에<sup>22)</sup> 동량만 添加하여도 食醋醱酵菌의 營養이 充分히 供給되는 것으로 생각된다. 물론 同量 添加區보다 2倍量 添加區에서 生酸속도, 即 lag phase의 단축효과가 컸으나 減酸은 同量 添加區인 No. 6의 배지에서 더 순조로웠기에 無機鹽類의 影響을 제외한 以後의 實驗에서는 이 배지를 使用하였다.

#### 5. 前培養 差에 의한 影響

食醋醱酵菌의 前培養이 순조로운 減酸現象에 影響을 미치는지를 確認한 目的으로, No. 3菌株를 使用하여 acetate agar 斜面培地(A)<sup>10)</sup>와 淸酒寒天

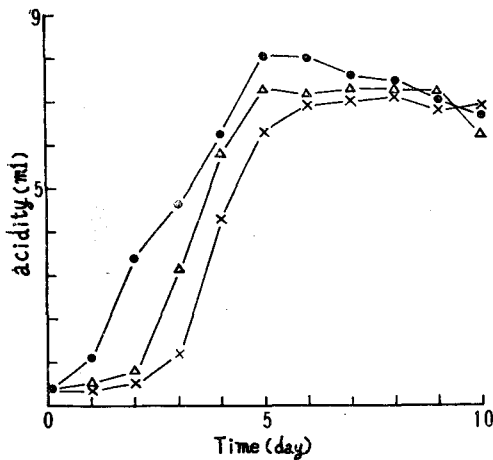


Fig. 2 Effect of inoculum method on the acetic acid fermentation.

A; one loopful cells grown on the sodium acetate agar slant was inoculated.

B; one loopful cells grown on the Chungju agar slant was inoculated.

C; pellicle grown on the koji ext. media was inoculated.

斜面培地(B)<sup>23)</sup>에서 직접 Table 4의 No. 6배지에 접종한 것과 미리 7°Bx Koji extract 液體培地(C)에 供試菌株를 前培養한 것을 같은 條件으로 접종하여 그 醱酵경과를 추적하여본 結果는 Fig. 2와 같다. 그림에서 보는 대로 C는 A,B보다 生酸속도가 빠르며 最高酸度에 도달한 後의 減酸現象이 分明한 것을 알 수 있다. 이런 現象은 C의 경우 前培養에 의해서 일단 酸生成과 減酸作用을 경험하였으므로 菌體가 初産 分解 酵素活性이 강해졌기 때문인 것으로 볼 수 있으나 이점에 대해서는 더 깊은 研究가 必要할 것으로 생각한다.

#### 6. 無機鹽의 影響

無機鹽 添加時의 影響을 알아보기 위해 sodium acetate, potassium phosphate, mono basic, magnesium sulfate를 3°Bx Koji extract에 Table 6에서와 같이 자기 濃度別로 添加하였다. sodium acetate는 微生物의 無機鹽 影響에 관한 實驗에 잘 쓰이지 않으나 acetate agar media (Pringsheim, 1950)<sup>10)</sup>에 0.01% 添加한 例가 있고, A. aceti가 ethanol 등처럼 sodium acetate를 酸化할 수 있는 能力이 있다는 報告도 있으므로<sup>1)</sup> 本 實驗에서 이것의 添加를 시도하였다. 本 實驗의 結果는 Table 7와 같다.

Table 6. Concentration of mineral salts

No. of flask	Sodium acetate	Potassium phosphate, monobasic	Magnesium sulfate
1	0.005	.....	.....
2	0.01	.....	.....
3	0.05	.....	.....
4	0.1	.....	.....
5	.....	0.005	.....
6	.....	0.01	.....
7	.....	0.05	.....
8	.....	0.1	.....
9	.....	.....	0.005
10	.....	.....	0.01
11	.....	.....	0.05
12	.....	.....	0.1

pH of media : 4.0

3菌株 모두 Table 5의 flask No.3의 대조구에 비하여 生酸量이 增大하였으며 특히 No.1 菌株는 무기염 요구 경향이 강하여 lag phase의 단축, 酸生成속도의 증대경향이 뚜렷하였고, 대조구에 비하여 3-4배의 酸生成량을 얻을 수 있었으며

Table 7. Effect of mineral salts on the acetic acid fermentation.

No. of strain	Culture time(day)	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Fnal pH
	No. of flask	Acidity									
1	1	2.1	3.6	4.3	4.8	4.4	4.5	4.5	4.7	4.3	2.64
	2	1.6	3.4	4.2	4.4	4.4	5.0	4.5	4.4	4.1	2.68
	3	1.9	3.2	3.9	4.4	4.0	4.5	4.3	4.2	4.0	2.78
	4	2.0	3.5	4.1	4.2	4.1	4.1	4.1	4.3	3.9	2.82
	5	2.1	4.1	5.2	5.8	5.6	5.7	5.9	5.9	5.2	2.53
	6	2.6	4.2	5.3	5.4	5.3	5.3	5.2	5.2	5.1	2.61
	7	1.7	3.9	5.2	5.7	5.6	5.6	5.7	5.8	5.2	2.63
	8	2.2	4.4	5.5	5.8	5.7	6.1	6.5	6.3	5.9	2.57
	9	2.2	4.2	5.5	6.5	6.1	6.2	6.5	6.2	5.8	2.51
	10	2.2	4.1	5.1	6.0	6.0	6.2	6.1	6.0	6.0	2.52
	11	0.9	4.0	4.3	5.0	4.8	5.0	4.9	5.0	4.8	2.60
	12	0.2	0.4	1.8	4.1	4.2	4.3	4.3	4.4	3.9	2.63
3	1	1.7	3.3	3.9	3.9	4.2	3.9	3.9	3.8	3.7	2.66
	2	1.8	3.7	4.2	4.4	4.4	4.2	4.3	4.3	4.4	2.63
	3	2.4	3.9	4.2	4.4	4.3	4.9	4.7	4.5	4.2	2.79
	4	2.3	3.3	3.5	3.6	3.8	3.7	3.9	4.3	4.8	2.88
	5	1.5	3.0	3.6	3.6	3.6	3.6	3.5	3.7	3.6	2.70
	6	1.7	2.9	4.1	4.2	4.6	4.5	4.5	4.5	4.8	2.61
	7	1.6	3.2	4.4	4.6	4.7	4.7	4.6	4.4	4.4	2.67
	8	1.8	3.5	4.2	4.3	4.4	4.4	4.1	3.7	3.4	2.74
	9	1.6	3.6	4.0	4.1	4.3	4.1	4.1	3.6	3.5	2.62
	10	1.9	3.7	4.4	4.6	4.5	4.8	4.9	5.0	4.9	2.61
	11	2.0	3.5	4.2	4.2	4.1	4.2	4.2	4.2	4.2	2.62
	12	1.6	3.2	3.8	3.9	4.0	4.0	4.2	4.1	4.1	2.62
5	1	1.0	3.9	4.3	4.7	5.0	5.5	5.3	5.2	4.8	2.58
	2	1.2	3.5	4.8	4.8	4.9	4.9	5.0	5.0	5.1	2.65
	3	1.7	4.0	5.0	5.3	5.6	5.6	6.2	5.8	5.5	2.68
	4	1.8	4.0	5.5	5.8	5.8	5.8	5.8	6.0	6.0	2.85
	5	0.6	2.8	4.5	4.4	4.6	4.6	4.6	4.9	4.9	2.63
	6	0.6	2.8	4.5	4.5	4.6	4.8	4.9	5.1	5.2	2.58
	7	0.7	3.0	4.5	4.5	4.2	4.2	4.5	4.7	4.3	2.71
	8	1.0	3.4	4.1	4.4	4.3	4.2	4.3	4.4	4.5	2.67
	9	0.8	3.4	5.0	5.5	5.5	5.5	5.6	5.7	5.5	2.53
	10	0.7	3.2	4.8	4.9	4.9	5.0	5.2	5.2	5.0	2.58
	11	0.8	3.4	4.1	4.4	4.2	4.1	4.3	4.5	4.3	2.57
	12	1.2	3.8	4.0	4.1	4.4	4.3	4.4	4.4	4.4	2.59

No.3 菌株은 No.1 菌株나 No.5 菌株에 비하여 增酸效果가 크지 않았다. magnesium sulfate를 添加한 경우 醱酵 10日後의 pH가 最低 2.51로 低下하였고, 全體의으로 다른 無機鹽 添加區보다 pH가 낮았다. Loitsyanskaya (1964)<sup>(2)</sup>에 의하면 ethanol 濃度 5% 程度에 *A. aceti*를 배양하면 ethanol의 消費에 수반하여 초산의 生成과 菌의

增殖을 볼 수 있지만 초산에 의한 pH의 低下는 菌의 增殖을 抑制하여 잠시동안의 lag phase를 나타내고, 다음에 초산의 감소 即 과산화 現象으로 pH가 상승하여야 菌體가 增殖을 계속한다고 하였고, Nakayama<sup>(24)</sup>는 *Acetobacter* 胞細內的 助酵素들이 ethanol로부터의 초산 生成에 모두 消費되어버림으로써 초산의 과산화에는 技能을

나타내지 못한다고 시사하였는데, magnesium sulfate 添加區가 他 無機鹽添加區보다 pH가 낮 으면서도 酸도가 높은 수준으로 유지된 것을 보면  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 의  $Mg^{++}$ 가 이와같은 作用을 促進 시켜 주었거나 또는  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 의 添加가 초 산균의 pH에 대한 低抗性을 增大하여 초산의 과 산화를 방지하고 最大酸도에 이르는데 도움을 주 지 않았나 생각할 수 있으나 이 點에 대해서는 더 깊은 研究가 必要한 것으로 생각한다.

無機鹽의 添加量에 따르는 生酸量의 增加 경향 은 認定할 수 없었고, 오히려 일반적으로 0.005~ 0.01% 添加區가 0.05~0.1% 添加區보다 生酸量 이 많은 경향이였다. 各 供試菌株에 대한 各 無機 鹽類의 添加效果는 No.1 菌株에서는  $MgSO_4 \cdot 7 H_2O \cdot KH_2PO_4 \cdot CH_3COONa$ 의 順이였고, No.3 菌株에서는 거의 비슷하였으며, No.5 菌株에서는  $CH_3COONa \cdot MgSO_4 \cdot 7H_2O \cdot KH_2PO_4$  順이였다. 3 個菌株 모두에 대해서 最高酸도面을 고려하는데  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 를 0.005~0.1% 添加하는 것이 적 당하다고 생각된다.

### 7. 初發 pH의 影響

培地의 初發 pH가 菌의 生育과 生酸속도에 미 치는 影響을 검토하기 위하여 No.1 菌을 가지고 初發 pH를 1N HCl 과 1N NaOH 로써 2~8로 조 절하여 발효시킨 結果는 Fig. 3과 같다.

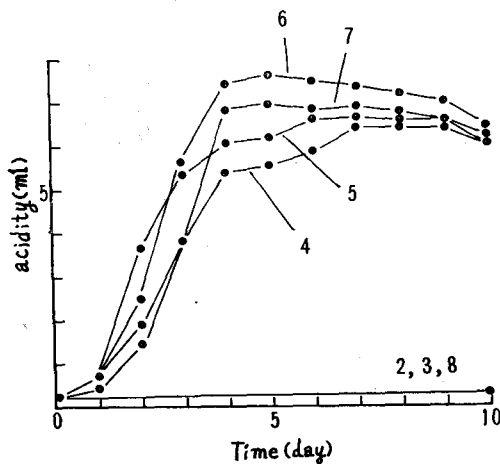


Fig. 3 Effect of initial pH of the medium on the acetic acid fermentation. The number in the figure shows pH values.

生酸이 계속됨에 따라 培養液의 pH는 低下하 여 최종적으로 2.5~3.0으로 되었다. 供試菌은 pH 2.3과 8에서 生育이 인정되지 않았으나 pH 4~7

의 넓은 生育 pH域을 가졌으며, 특히 pH 5의 경 우에 lag phase가 가장 짧았고, pH 6의 경우 lag phase가 pH 5보다는 다소 길었으나 더 높은 最大 酸도를 나타내었다.

Tomoyeda等<sup>(6)</sup>은 pH 4에서 가장 빠른 生酸속 도 및 最大酸도를 갖는다고 보고 하였고, Pringsheim<sup>(10)</sup>은 acetate agar 培地의 pH를 7.4~7.6 으로 Iibuchi等<sup>(15)</sup>은 選擇培地와 保管培地의 pH 를 각각 3.7과 6.4로 조절하였으며 Nakayama<sup>(16)</sup>는 *A. aceti*를 利用한 實驗에서 培養액의 pH를 3.2로, Harada<sup>(25)</sup> 固體培地의 pH를 6.0~6.5로 조절하였고, Bergey의 分類<sup>(5)</sup>에 따르면 초산균 의 生育최적 pH는 5.4~6.3이며 Miyaji<sup>(13)</sup>는 3.5~6.5라 하였는데 本 實驗條件에서는 pH 6.0 이 최적 pH임을 알 수 있었다.

### 8. Ethanol 濃도의 影響

우리나라의 食品規格 基準에서나 美國의 FDA 는 모두 식초가 4% 以上の 초산을 함유토록 規

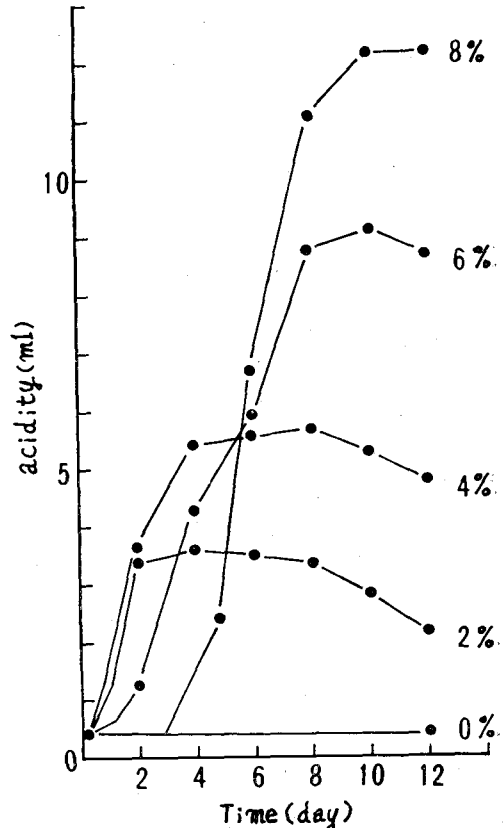


Fig. 4. Effect of ethanol concentration on the acetic acid fermentation. The number in the figure shows the ethanol concentration.



定하고 있으며, 또한 食醋에는 0.5% 以下の ethanol 을 함유해야 하며 理論上 1%의 ethanol (v/v%)로부터 1% 以上の 초산(w/v%)이 생성 되어야 한다<sup>(26)</sup>.

따라서 必要한 培地의 ethanol 濃度は 4.5% 程度면 充分하다고 본다. 그동안 化學醋의 맛에 길 들어진 消費者들간에 醞酵醋의 酸味が 弱하다는 評이 있기도 하며 또한 食品工業에서 高濃度の 초산을 함유한 식초가 요구되고 있기 때문에 培地中の ethanol 濃도가 醞酵에 미치는 영향을 No.3 菌株로 검토하였다. 即 6°Bx Koji extract 50ml 에 窒素源으로서 Table 4의 No.6과 같은 量의 yeast extract 를 넣고 소요량의 물을 加하여 殺菌後 이것에 培地中の ethanol 濃도가 0, 2, 4, 6, 8 % (v/v)가 되게끔 ethanol 을 加하여 全量을 100 ml 로 하였다.

발효결과를 圖示하면 Fig. 4와 같다. 알콜농도 6% 以上에서는 lag phase 가 길어져 菌의 發育이 늦고 生酸속도가 늦어지는 것을 알 수 있다. 그리고 最高酸도에 빨리 도달할수록 초산의 과산화가 明確히 인정되었으며 8% 以上の 농도에서는 實驗 期間內에서는 과산화의 진행을 관찰하기가 어려웠다. 無添加區의 경우에는 菌의 生育은 認定할 수 있었으나 生酸의 有無는 확인하기 어려웠고 短期間에 초산의 生成 및 과산화를 일으키는 ethanol 농도로서는 2~4%가 적합하였다.

Nakayama<sup>(24)</sup>는 *Acetobacter* 에 의한 ethanol 酸化로 高濃度の 초산을 추적하기 위해서는 세포 내의 particle-bound enzymes, co-enzymes, cytochrome system 의 조절이 必要하며, 이로서 ethanol 酸化 및 과산화 조절이 가능하다고 하였는데 本 實驗에서의 供試菌으로도 充分히 高濃度の 식초를 양조할 수 있을 것으로 생각되며, 이것의 高濃度 生酸機構나 交互효소 等に 대해서는 앞으로 더 깊은 研究가 있어야 될 것으로 생각한다.

## 요 약

클로버꽃 食醋에서 分離한 초산균에 대한 生理學的 研究를수행하여 다음 結果를 얻었다.

1. 供試菌株는 No. 1, 3, 5 菌株로 그 生化學的 諸性質로 보아 *Acetobacter aceti* 에 속하는 菌으로 볼 수 있으며, 특히 No. 3 菌이 초산生成能이 우수하였다.

2. 3°Bx Koji extract 에 yeast extract. 0.15 %를 添加한 培地에다 7°Bx Koji extract 에서

前培養한 菌을 接種·培養했을때 酸生成 및 過酸化 現象이 현저하였다.

3. 3°Bx Koji extract 에  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  를 0.005 - 0.01% 添加하였을때 酸도가 높은 수준으로 유지되었다.

4. 培地의 초발치적 pH는 6.0이었다.

5. 短期間에 초산의 生成 및 과산화를 일으키는 ethanol 濃도로서는 2-4%가 適合하였다.

## 참고문헌

1. Perlman, D.: *Applied Microbiology* 81~133 (Vol. 20), A.P., (1976)
2. 鮮井勇宣: 日本醞協誌, 33(2, 3), 74~77(1975)
3. 梁熙天, 金鏞揮, 洪載植, 權涌周: 全北大 農大 論文集, 9, 68~78(1978)
4. 徐奇奉, 閔丙蓉, 김정옥, 신동화, 구영조: 農開公食品研究事業報告, 375~398(1976)
5. Buchanan, R.E. and N.E. Gibbons: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (8th ed.) 276~278, Williams & Wilkins, (1974)
6. 友枝序夫, 清水英世, 大矢正弘, 長谷川誠: 日本醞協誌, 27, 434~438(1969)
7. 山田正一: 釀造分析法, 235 産業圖書, (1956)
8. 朴圓記外: 食品化學實驗 수학사, p 136~137, (1975)
9. 柳洲鉉外: 食品工學實驗 I 594~595, 연세대학교 공학부 식품공학과, 탐구당, (1975)
10. Norris, J.R. and D.W. Ribbons: *Methods in Microbiology* (Vol. 3A), A.P., (1970)
11. Eklund, C. and C.E. Lankford: *Laboratory Manual for General Microbiology*, 26~29 (1977)
12. 東京大學部 農藝化學室編 實驗農藝化學下: 205~206 鮮食書店, (1978)
13. 宮路憲二: 應用菌學下, 227~231, 310 岩波書店. (1971)
14. De Ley, J. and Schell, J.: *Biochim. Biophys. Acta* 25, 154(1959)
15. 飯淵貞明, 服部堯: 日本醞協誌, 33, 398~403 (1975)
16. 中山重徳: 日本醞協誌, 33, 273~280(1975)
17. Ameyama M. and Kondo K.: *Agri. Biol. Chem.*, 30, 203(1966)
18. Ameyama M. and Kondo K.: *Agri. Biol.*

- Chem., **31**, 724(1967)
19. 土方康世, 奥村一, 照井堯造: 日本醸工誌, **50**(1), 7~12(1972)
  20. 土方康世, 奥村一, 照井堯造: 日本醸工誌, **50**(1), 13~20(1972)
  21. Brown C.D. and Rainbow, C.: J. Gen. Microbiol., **15**, 61~69 (1956)
  22. 化學大辭典編集委員會: 化學大辭典 3卷, 共立出版, p 603(1975)
  23. 柳洲鉉外: 食品工學實驗 II, 연세대학교 공학부 식품공학과, 탐구당, p 396(1975)
  24. Nakayama, T.: J. Biochem. (Tokyo), **46**, 1217~1225(1959)
  25. 原田篤也, 棉造孝: 日本醸工誌, **49**(10), 836~841(1971)
  26. 강진성外: 과실채소가공학 p 910~917, 대한교과서 주식회사, (1971)