

## 초산 생성을 위한 발효공정의 최적화

신진아 · 오남순\*  
공주대학교 식품공학과

### Optimization of Fermentation Process for Acetic Acid Production

Jin-A Shin and Nam-Soon Oh\*

Department of Food Science and Technology, Kongju National University

#### Abstract

Various conditions of acetic acid fermentation by *Acetobacter aceti* B20 strain were investigated and evaluated to optimize the fermentative production of acetic acid. The effects of the initial ethanol concentration on growth and acid productivity in a flask and fermentor were also studied. The growth of *A. aceti* B20 strain was inhibited as the concentration of ethanol increased. However, the highest total acidity and fermentation yield were 5.34% and 56.1%, respectively when the initial concentration of ethanol was 7% in the batch fermentation. Although the concentration of initial glucose influenced the growth rate of B20 strain, it did not influence the total acidity in the flask culture. When the agitation speed increased, the growth, total acidity and fermentation yield were all improved. In fed-batch fermentation, total acidities and fermentation yields were 7.14-8.76% and 39.1-53.0%, respectively, and their values mostly depended on the feeding methods.

**Key words:** *Acetobacter aceti*, vinegar, fed batch, acetic acid fermentation

## 서 론

식초의 제조는 전통적으로 에탄올 발효와 병행하여 이루어져 왔으며, 술의 종류만큼이나 다양한 종류의 식초가 제조되고 있다(Ha & Kim, 2000; Jeoung & Lee, 2000). 유구한 역사성을 갖는 발효식품인 식초는 음식에 산미를 부여하는 조미료뿐만 아니라 민간요법 등에서 다양한 용도로 널리 사용되어 왔다(Woo et al., 2004). 식초의 제조방법은 전통적인 병행발효의 정치배양방법과 통기진탕배양의 속성방법으로 구분할 수 있으며, 현재 대부분의 상업적 생산은 속성방법으로 제조되고 있다. 초산의 생성과정은 효모에 의한 탄수화물의 알코올 발효와 초산균에 의한 알코올의 산화적 초산발효의 2단계로 이루어진다. 알코올로부터의 산화적 초산발효만을 본다면, 이론적인 최대수율은 증량비로 1.304에 이른다(Jeoung & Lee, 2000). 그러나 초산균의 종류에 따라 acetic acid 생성능이 다르며(Kim & Choi, 2005; Kang et al., 2006), 식초품질 관정의 지표가 되는 총

산함량이 좌우되기 때문에 균주선택이 매우 중요하다(Gullo & Guidici, 2008; Park et al., 1994). 일반적으로 최종산도는 초산균주의 초산 생성능과 발효방법(Lee et al., 1992; Lee et al., 1993; Kim et al., 1994; Nishiwaka, 1997)에 의해 달라진다. 따라서 효과적인 식초 생산을 위하여 우수 초산균의 확보와 발효방법의 개발은 산업화에 중요한 요소가 된다. 본 연구는 초산 발효액으로부터 분리, 동정된 균주의 효과적인 초산생성을 위한 발효공정을 최적화하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 균주

실험균주는 농가의 초산발효액에서 분리하여 동정한 *Acetobacter aceti* B20 균주를 사용하였다.

### 배지

균주보존용 사면배지는 YPD agar 배지(Difco, Detroit, MI, USA)를 사용하였으며, 종균배양용 액체배지는 MRS 배지(Difco)를 사용하였다. 초산발효용 배지는 yeast extract 5 g/L, peptone 3 g/L, dextrose 20 g/L의 기본 조성을 가진 배지를 사용하였으며, 실험목적에 따라서 포도당과 에탄올의 첨가농도를 달리하였다.

Corresponding author: Nam-Soon Oh, Department of Food Science and Technology, Kongju National University, Yesan 340-802, Korea  
Tel: +82-41-330-1485; Fax: +82-41-333-9610  
E-mail: nsoh@kongju.ac.kr

Received April 19, 2010; revised July 5, 2010; accepted July 7, 2010

### 발효조건

냉장고에 보존 중인 균주는 YPD 사면배지에 접종하고, 30°C의 항온기에서 24시간 동안 배양하여 활성화시킨 후 사용하였다. 종균배양은 활성화된 균주 1 백금이를 MRS 액체배지 20 mL에 접종하고 27°C, 180 rpm의 진탕배양기 (SI-600R, Lab Companion, Daejeon, Korea)에서 24시간 동안 배양하였다. 초산발효는 발효용 배지에 2%의 종균을 접종한 후 정해진 조건에서 수행하였다. 발효실험은 플라스크와 fermentor(5 L, Value Bioreactor, Hanil Science Industrial Co. Ltd., Daejeon, Korea)를 이용하여 수행하였다. 플라스크 발효실험은 300 mL baffle 달린 삼각 플라스크에 살균된 배양액 50 mL에 2%의 종균량을 접종하여 72시간 동안 배양하면서 실험인자에 대한 조사를 수행하였다. Fermentor 발효실험은 실험목적에 따라 기질(에탄올 또는 포도당)의 농도와 환경조건을 달리하면서 수행하였다. Fermentor 발효 시 배양액을 autoclave(DA-AC-60, Dong A Scientific Co., Shiheung, Korea)에 충전한 후 121°C에서 15분간 살균하고, 2%의 종균량인 60 mL를 접종하였으며, 발효조의 최종액량을 3 L로 맞추어 발효를 수행하였다. Fermentor에서의 발효는 온도 27°C, 교반속도 500 rpm, 통기량 1 vvm의 조건을 기준으로 초산발효를 수행하였다.

### 발효방법

Batch식은 초기 에탄올 농도(에탄올 농도는 이하 전부 %, w/v입)를 5%, 7%, 10%로 시작하여 초산발효를 수행하였으며, Fed-batch식은 초기 에탄올 농도를 7%로 하여 배양한 후 에탄올 농도가 약 2% 정도에 이르렀을 때 배양액량 대비 3%의 에탄올을 feeding하면서 생성되는 초산량과 발효수율을 측정하였다.

### 생육측정

균주의 생육은 UV-Visible spectrophotometer(V-570, Jasco, Tokyo, Japan)를 이용하여 600 nm에서의 흡광도로 측정하였다.

### 총산의 측정

총산은 1% phenolphthalein을 지시약으로 하여 0.1 N-NaOH 용액으로 적정하여 소요된 0.1 N NaOH 용액의 양을 초산으로 환산하였다.

### 에탄올 측정

250 mL의 환저플라스크에 CaCO<sub>3</sub> 1 g, 시료 1 g, 증류수 100 mL를 넣고 가열 증류하여 수기에 증류액이 70-80% 채워지면 가열을 중지하고 증류수로 100 mL로 맞추었다. 증류액 1 mL와 0.2 N 중크롬산칼륨(K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) 2 mL, 진한 황산(H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 1 mL를 순서대로 넣은 뒤 냉암소에서 1시간 방치한 후 590 nm에서 흡광도로 측정하여 미리 작성해 놓

은 표준곡선을 이용하여 계산하였다.

모든 실험은 3회 반복 실험하여 평균치로 나타내었다.

### 발효수율

발효수율은 이론적인 초산생성량에 대한 순수초산생성량을 백분율로 나타내었다.

$$\text{발효수율(\%)} = \frac{\text{최종산도(\%, w/v)} - \text{초기산도(\%, w/v)}}{\text{초기에탄올 농도(\%, w/v)} \times 1.304} \times 100$$

## 결과 및 고찰

### Flask 배양에서 에탄올 농도의 영향

초산 생성 배지에 에탄올을 각각 0, 2, 4% 첨가하여 플라스크 배양을 통해 균주의 생육과 초산생성능을 조사하여 Table 1에 나타내었다. 에탄올 무첨가인 경우 *Acetobacter aceti* B20균주의 생육과 초산생성이 매우 낮았다. 또한 4%의 농도로 첨가된 경우의 생육은 무첨가보다 더욱 억제되었으며, 결국 초산이 거의 생성되지 않았다. 본 결과로부터 B20 균주의 생육을 위하여 포도당보다 에탄올이 더 좋은 탄소원이지만, 고농도의 에탄올에서는 생육이 억제되며, 따라서 초산 생성능도 낮아지는 것으로 생각된다. 이와 같은 현상은 통기교반이 불충분한 플라스크 배양에서 산소공급의 한계성에서도 부분적인 원인을 찾아 볼 수 있을 것으로 생각된다. 초산 생성에 대한 초기 에탄올 첨가농도의 효과를 조사한 연구(Shin et al., 2003; Kim et al., 1996)에서도 에탄올의 농도가 높을수록 산 생성이 억제됨을 지적한 바 있으나, 에탄올에 대한 초산균의 내성 정도에 따라서 그 효과가 다르게 나타나는 것으로 생각된다.

### Flask 배양에서 포도당 농도의 영향

플라스크 배양 시 포도당 첨가량을 1-10%의 범위에서 조절한 후 진탕배양하였으며, 초산생성에 미치는 영향을

**Table 1. Effects of initial ethanol concentration on the growth and total acidity of *Acetobacter aceti* B20 by flask culture**

	Ethanol concentration (%)		
	0	2	4
Growth ( $A_{600nm}$ )	0.751	2.571	0.094
Total acidity (%)	0.24	1.86	0.18

**Table 2. Effects of initial glucose concentration on the growth and total acidity of *Acetobacter aceti* B20 by flask culture**

	Glucose concentration (%) <sup>1)</sup>				
	1	3	5	7	10
Growth ( $A_{600nm}$ )	2.662	2.778	2.585	2.530	2.433
Total acidity (%)	2.16	2.34	2.22	2.16	1.98

<sup>1)</sup>Initial ethanol concentration was 2%.

**Table 3. Effects of culture temperature on the growth and total acidity of *Acetobacter aceti* B20 by flask culture<sup>1)</sup>**

	Culture temperature (°C)				
	21	24	27	30	33
Growth ( $A_{600nm}$ )	2.417	2.743	2.746	2.729	2.511
Total acidity (%)	1.62	1.68	1.80	1.80	1.74

<sup>1)</sup>Initial ethanol and glucose concentrations were all 2% in the flask culture medium.

Table 2에 나타내었다. Flask 배양 시 *Acetobacter aceti* B20 균주는 포도당 농도가 3%일 때 균주 생육이 제일 좋았으며, 농도가 높아질수록 생육이 저해되는 것으로 보인다. 초산 생성은 균주 생육과 관련이 깊은 growth-associated type이기 때문에 균주 생육이 억제되면 초산생성도 함께 저해되는 특징이 본 연구에서도 나타났다. 이러한 결과는 초산발효에서 당 농도가 높아지면 초산생성이 저해를 받는다는 연구 결과(Jeong et al., 1996)와도 유사하였다.

**Flask 배양에서 배양온도의 영향**

초산발효에서 균주의 생육과 초산 생성능에 미치는 온도 영향을 조사하여 Table 3에 나타내었다. 24°C와 30°C 사이의 온도에서 *Acetobacter aceti* B20 균주의 생육과 초산 생성은 유사하였으나, 이보다 낮거나 높은 온도에서는 생육과 초산 생성이 모두 저해되는 경향을 보였다. 이는 Kim (1999)의 무화과를 이용한 식초발효를 위하여 27-30°C의 발효온도를 제안하였으며, 배를 이용한 식초발효에서도 최적 온도가 28°C라는 보고(Oh et al., 1992)와 유사한 결과였다. 초산 발효에서 배양온도가 너무 낮으면 발효 속도가 늦어지고, 너무 높으면 에탄올 및 초산 손실이 일어나 풍미를 잃게 된다는 연구보고(Kim et al., 1996)를 고려해 볼 때 *Acetobacter aceti* B20 균주의 최적 발효온도는 27±3°C 범위로 생각된다.

**Fermentor 교반속도의 영향**

교반속도에 따른 *Acetobacter aceti* B20균주의 초산발효에 미치는 영향을 조사하고자 150, 300, 500 rpm의 교반속도에서 120시간 발효실험을 수행한 후의 생육과 초산 생성능을 Table 4에 나타내었다. 교반속도가 높아질수록 *Acetobacter*

**Table 4. Effects of agitation rate on the growth and total acidity of *Acetobacter aceti* B20 strain during fermentation<sup>1)</sup>**

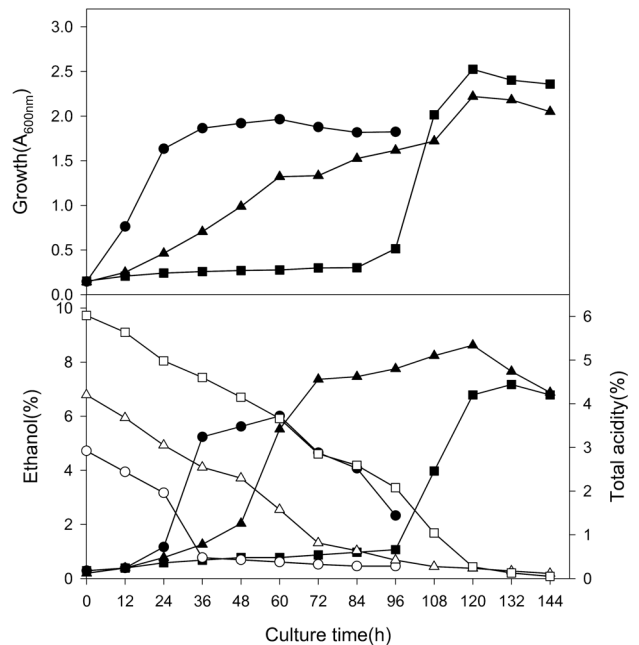
Agitation rate (rpm)	Growth ( $A_{600nm}$ )	Max. total acidity (%)	Fermentation yield (%)
150	1.257	2.28	23.0
300	1.561	3.12	32.9
500	2.218	5.34	57.2

<sup>1)</sup>Initial ethanol concentration was 7% and this batch fermentation was performed for 120 hours.

*aceti* B20 균주의 생육도가 증가하였으며, 초산 생성은 150 rpm에서 산도가 2.28%, 300 rpm에서 3.12%, 500 rpm일 때 5.34%로 증가하였다. 발효수율도 교반속도에 따라서 증가하여 500 rpm에서 57.2%에 도달하여 저속의 교반과 비교하여 큰 차이를 보였다. 이러한 결과는 교반속도의 증가에 따라 초산 생성능이 증가했다(Park et al., 1994)는 보고와 유사한 결과이며, 특히 초산생성은 에탄올의 산화반응 과정이고, 낮은 산도에서 균주의 생육능 향상을 위하여 용존산소 농도가 중요하다는 것을 말해준다. 따라서 *Acetobacter aceti* B20균주를 이용한 산업적 초산발효 시 fermentor 용량에 따른 교반속도의 scale up 기술이 요구된다.

**Batch식 발효**

초기 에탄올 농도를 5, 7, 10%로 조절하여 batch식 발효에서 *Acetobacter aceti* B20 균주의 초산 생성을 조사하였다(Fig. 1). *Acetobacter aceti* B20 균주는 초기 에탄올 농도 5%에서 생육은 36시간 동안 배양한 이후에 정지기에 도달하였으나 10%일 때는 84시간 이후에 균주 성장이 시작되었다. 이는 에탄올 농도가 높아짐에 따라 에탄올에 대한 내성의 차이로 균의 생육이 억제되기 때문에 생육 유도가 길어진 것으로 생각된다. 초산생성은 에탄올 농도가 5%인 경우는 발효 60시간째 최대인 3.72%에 도달하였으며, 에탄올 농도가 7%일 때는 발효 120시간째 산도가 5.34%로 가장 높았다. 반면 에탄올 농도 10%에서는 균주

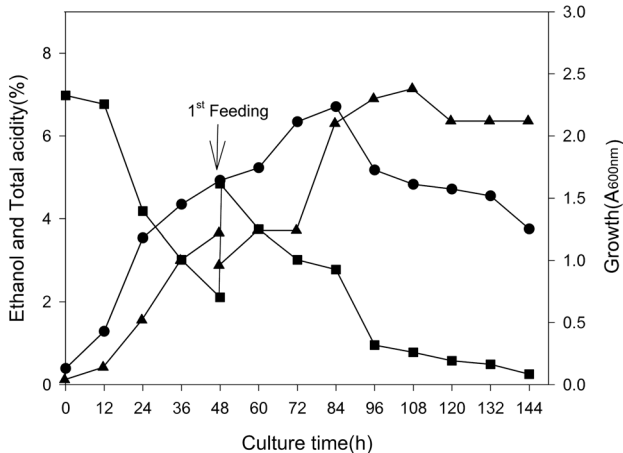


**Fig. 1. Effects of initial ethanol concentration on growth and acetic acid production by batch fermentation of *Acetobacter aceti* B20 strain. Ethanol concentration: 5%(●), 7%(▲), 10%(■). Closed symbols indicate growth and total acidity and open symbols indicate ethanol concentration.**

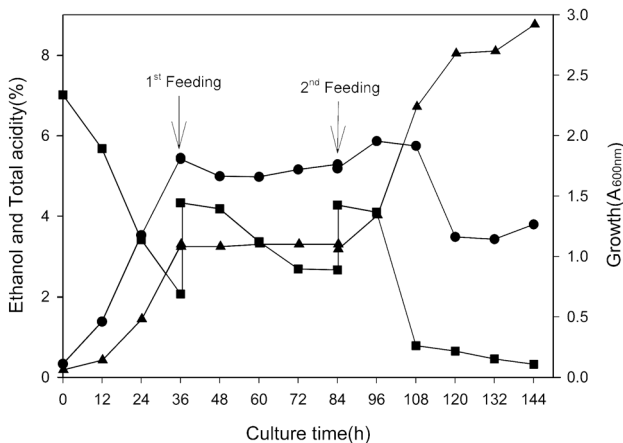
의 생육과 함께 초산 생성이 시작되었으며, 132시간째 산도가 4.4%로 에탄올 7%일 때보다 초산생성량이 적었다. 이는 *A. aceti* KCTC 1010 균주를 이용한 초산발효(Son et al., 2003)에서 에탄올 농도가 4%인 경우 최대 초산 생성을 보인 것과 차이가 있으나 이는 균종에 따른 알코올 내성도의 차이에서 기인되는 것으로 생각된다. 한편 Kim et al.(1996)의 연구결과는 에탄올 농도가 6%일 때 가장 높은 초산 생성도를 보였으며, Lee et al.(1992)의 연구에서는 초기 에탄올 농도는 5%인 경우가 초산 생산성이 가장 좋다고 하였다. 이와 같은 초기 에탄올 농도에 관한 연구결과들을 볼 때 5-6% 범위가 초산 생성을 위한 최적의 농도로 생각되지만, 사용하는 균주의 성질과 배양조건에 따른 차이가 있을 것으로 생각된다.

**Fed-batch식 발효**

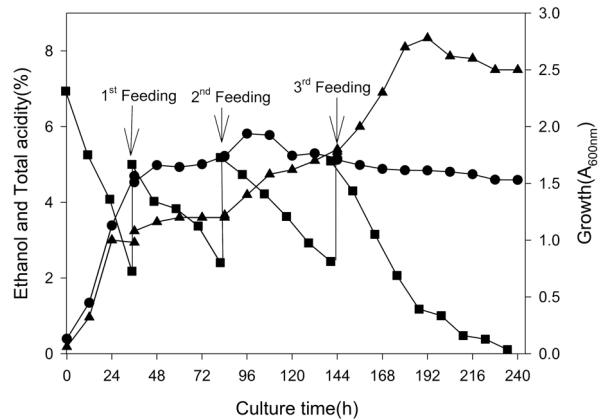
간헐적으로 feeding 횟수를 달리한 fed-batch식 초산발효



**Fig. 2.** Periodical change of concentrations of ethanol, acidity and growth by fed-batch fermentation of *Acetobacter aceti* B20 strain. Growth(●), Ethanol(■), Total acidity(▲).



**Fig. 3.** Periodical change of concentrations of ethanol, acidity and growth by fed-batch fermentation of *Acetobacter aceti* B20 strain. Growth(●), Ethanol(■), Total acidity(▲).



**Fig. 4.** Periodical change of concentrations of ethanol, acidity and growth by fed-batch fermentation of *Acetobacter aceti* B20 strain. Growth(●), Ethanol(■), Total acidity(▲).

를 수행하면서 균주의 생육과 초산 생성에 미치는 영향을 비교하고 분석하였다(Fig. 2, Fig. 3, Fig. 4). 초기 에탄올 농도를 7%로 조절하고 발효를 진행하여 에탄올 농도가 약 2%로 떨어졌을 때 초기 배양액 용량을 기준으로 3%의 에탄올을 추가하였다. Fig. 2는 에탄올을 1회 feeding한 경우의 발효도이다. 총 발효시간은 144시간이었다. 균주의 생육은 84 시간까지는 증가하였으나 그 이후 점차적으로 감소되는 경향을 보였다. 초산 생성량은 108시간 짜 7.14%로 최고에 이르렀으나 첨가된 에탄올이 거의 소비된 144시간 짜는 6.36%로 감소하였다. Fig. 3은 에탄올을 2회 feeding하였을 때의 발효도이다. 균주의 생육은 108시간 이후에 감소하기 시작하였으며, 초산 생성은 144시간 짜 8.76%로 최고에 도달하였다. Fig. 4는 에탄올을 3회 feeding한 경우의 발효도를 나타낸 것으로 192시간째 8.34%로 최고의 초산 생성량을 보였으며, 240시간 후에 발효가 종료되었다.

**발효수율의 비교**

Table 5에서 *Acetobacter aceti* B20 균주의 발효방법에 따른 발효수율을 비교하였으며, 발효수율은 이론적인 초산 생성량에 대한 순수초산생성량을 백분율로 나타내었다. *Acetobacter aceti* B20 균주의 batch식 발효에서 초기 에탄올 농도를 5, 7, 10%로 조절하였을 때 각각 53.9, 56.1, 27.1%로 초기 에탄올 농도를 7%로 하는 경우 발효수율이 가장 높았다. Fed-batch 발효인 경우는 발효수율은 feeding한 횟수에 따라서 1회 53.0%, 2회 50.6%, 3회 feeding한 경우는 39.1%로 feeding 횟수의 증가에 따라 발효수율이 감소하였다. 또한 초기 에탄올 농도를 7%로 발효하는 batch식 발효가 다른 fed-batch식 발효에 비하여 높은 발효수율을 보였다. Shin & Jeong(2003)은 batch식으로 진행된 초산발효에서 초기 에탄올 농도를 5%로 조절하는 경우 68%의 발효수율을 얻었으며, 초기 에탄올 농도가 7%인

**Table 5. Fermentation yields by batch and fed-batch fermentation**

Fermentation method	Initial ethanol conc. (%)	Feeding times	Total added ethanol conc. (%)	Fermentation yield (%)
Batch	5	Non	5	53.9
	7		7	56.1
	10		10	27.1
Fed-batch	7	1 (3%)	10	53.0
		2 (3%-3%)	13	50.6
		3 (3%-3%-3%)	16	39.1

경우는 발효수율이 58%에 이르러 본 연구의 결과와 매우 유사한 수율을 보였다.

### 요 약

플라스크 실험과 fermentor 발효실험으로 분리균주인 *Acetobacter aceti* B20 균주의 초산발효를 위한 몇가지 조건을 최적화하였다. 통기교반 조건이 제한된 flask 실험에서 B20 균주의 생육은 에탄올 농도에 민감하게 반응하여 4%의 에탄올 농도에서는 거의 생육이 되지 않았으며, 초산 생성량도 미미하였다. Flask 배양에서 B20 균주의 생육은 포도당 농도가 3%일 때 가장 좋았으나 농도가 증가할수록 생육이 저해되었다. 27°C와 30°C의 온도에서 *A. aceti* B20 균주의 생육과 초산생성은 유사하였으며, 이보다 낮거나 높은 온도에서는 생육과 초산 생성이 모두 저하되었다. B20 균주의 최적 발효온도는 27±3°C 범위로 생각된다. Fermentor의 교반속도가 높아질수록 B20 균주의 생육도와 초산생성량이 증가하여 500 rpm일 때 초산농도 5.34%, 발효수율은 57.2%이었다. Batch식 발효에서 초기 에탄올 농도가 7%일 때 발효 120시간째 산도가 5.34%로 가장 높았으며, 이 때의 발효수율은 56.1%로 가장 양호하였다. Fed-batch식 발효에서 초산농도는 2회 feeding할 때 144시간째 8.76%로 최고에 도달하였으며, 이 때 발효수율은 50.6%로 feeding 횟수가 증가할수록 낮게 나타났다.

### 참고문헌

Ha YD, Kim KS. 2000. Civilization history of vinegar. Food Ind. Nutr. 5: 1-6.  
 Gullo M., Guidici P. 2008. Acetic acid bacteria in traditional balsamic vinegar: Phenotypic traits relevant for starter cultures selection. Intl. J. Food Microbiol. 125: 46-53.  
 Jeoung YJ, Lee MH. 2000. A view and prospect of vinegar industry. Food Ind. Nutr. 5: 7-12.

Kang SK, Jang MJ, Kim YD. 2006. Isolation and culture conditions of *Acetobacter* sp. for the production of citron(*Citrus junos*) vinegar. Korean J. Food Preserv. 13: 357-362.  
 Kim DH. 1999. Studies on the production of vinegar from fig. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 28(1): 53-60.  
 Kim ML, Choi KH. 2005. Sensory characteristics of citrus vinegar fermented by *Gluconacetobacter hansenii* CV1. Korean J. Food Cookery Sci. 21(2): 243-249.  
 Kim SD, Jang KS, Kim MK. 1994. Fermentation of apple vinegar in the farmhouse. J. the East Asian Soc. Diet. Life 4: 75-86.  
 Kim YD, Kang SH, Kang SG. 1996. Studies on the acetic acid fermentation using maesil juice. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 25(4): 695-700.  
 Lee YC, Lee GY, Kim HC, Park KB, Yoo YJ, Ahn PU, Choi CU, Son SH. 1992. Production of high acetic acid vinegar using two stage fermentation. Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 20: 663-667.  
 Lee YC, Park MS, Kim HC, Park KB, Yoo YJ, Ahn IK, Son SH. 1993. Production of high acetic acid vinegar by single stage fed-batch culture. Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 21: 511-512.  
 Nishiwaki A. 1997. Analysis of a two-stage fermentor with cell recycling for continuous acetic acid production. J. Ferment. Bioeng. 83: 565-570.  
 Oh YJ. 1992. A study on cultural conditions for acetic acid production employing pear juice. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 21(4): 377-380.  
 Park KS, Chang DS, Jho HR, Park UY. 1994. Investigation of the cultural characteristics high concentration ethanol resistant *Acetobacter* sp. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 23(4): 666-670.  
 Park KS, Lee MS, Mok JS, Chang DS. 1994. Investigation of the condition of acetic acid fermentation with high concentration ethanol resistant *Acetobacter* sp. FM-10. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 23: 845-848.  
 Shin JS, Jeong YJ. 2003. Changes in the components of acetic acid fermentation of brown rice using raw starch digesting enzyme. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 32(3): 381-387.  
 Woo SM, Jang SY, Kim OM, Youn KS, Jeong YJ. 2004. Antimicrobial effects of vinegar on the harmful food-born organisms. Korean J. Food Preserv. 11: 117-121.