

乳酸菌 醱酵에 關한 動力學的 研究(第一報)

醱酵에 미치는 機械的 攪拌의 影響

李 根 泰* · 韓 鳳 浩*

KINETIC STUDIES OF LACTIC ACID FERMENTATION(PART 1)

EFFECT OF MECHANICAL AGITATION ON FERMENTATION

Keun-Tai LEE* and Bong-Ho HAN*

Mechanical agitation in fermentation process enhances the fermentation activity of microbes by means of oxygen supply and frequent collision with substrate. However, the fermentation activity of microaerophilic bacteria is inhibited by the excess oxygen resulted from the mechanical agitation.

On this account, a strain of *Lactobacillus bulgaricus* was cultured to know the inhibition effect of the mechanical agitation and determine the optimum conditions for the process of lactic acid fermentation.

The growth rate of *L. bulgaricus* and the consumption rate of the substrate revealed an identical pattern in changes. The two rates were constant in the range of the modified Reynolds number of 1×10^5 to 5×10^5 while they showed linear increase in the range of the modified Reynolds number of 5×10^5 to 10×10^5 . Under the conditions of the modified Reynolds number more than 10×10^5 , the both rates decreased. At the modified Reynolds number of 10×10^5 , the maximum specific growth rate and the saturation constant of *L. bulgaricus* were 0.58/hr and 6.74g/l, respectively.

緒 論

醱酵에 있어서 微生物의 成長은 基質의 濃度, 代謝産物의 축적, 中間體의 生成 또는 消失 및 菌體의 濃度 이외에 醱酵장치 및 操作條件에 따라 많은 차이를 보인다.

이러한 제한된 醱酵進行을 계속적으로 유지하기 위하여 野田等(1976), 南場과 竹内(1977), Romeo等(1977)은 약품첨가에 의한 영향을 고찰하였으며 Khan and Chose(1973)는 citric acid 醱酵에 있어서의 攪拌效果를 검토하였다.

近年 유산균을 利用한 음료의 生産 및 消費가 급격히 증가하면서 유산균 醱酵工業은 많은 진전을 보이고 있다.

高濃度の 乳酸菌을 含有하는 培養液을 만드는 方法으로는 Peebler等(1969)의 半合成培地에서 pH를 조절하는 方法, Gilland等(1970)의 *Leuconostoc citrovorum* 培養에 關한 연구등이 있다. 특히 Petterson(1975)은 半合成培地를 使用하여 高濃度の 乳酸菌을 含有한 培養液을 얻는데 成功하였다.

그러나 乳酸菌을 多量含有한 培養液을 大量生産하기 위하여서는 機械的 特性이 고려되어야 하며 특히 微好氣性인 乳酸菌의 경우에 있어서는 窒氣의 산소 공급이 醱酵에 미치는 영향은 매우 중요한 것으로 생각된다.

이러한 관점에서 乳酸菌의 動力學的 特性을 고려하지 않을 수 없으므로 本實驗에서는 乳酸菌 醱酵의 機械的 特性中 重要한 攪拌效果 및 動力學的 特性值를 검토하였다.

* 釜山水産大學 食品工學科, Dept. of Food science and Technology, National Fisheries University of Busan

材料 및 方法

1) 使用 菌株

日本乳業技術協會에서 분양받은 *Lactobacillus bulgaricus*를 nutrient agar에 수회 계대 배양하여 使用하였다.

2) 醱酵用 培地

발효용 배지의 組成은 Table 1과 같으며 이문

Table 1. Composition of medium

K ₂ HPO ₄	1g
KH ₂ PO ₄	1g
MgSO ₄	0.4g
NaCl	0.02g
FeSO ₄	0.02g
yeast extract	2g
Dextrose	40g
Distilled water	1l

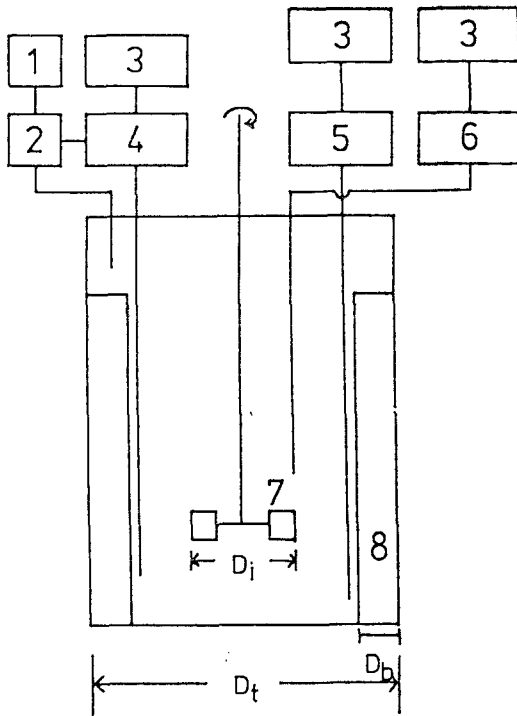


Fig. 1. Experimental apparatus.

- 1. Alkali solution
- 2. Alkali feeding pump
- 3. Recorder
- 4. pH meter
- 5. DO meter
- 6. Thermometer
- 7. Agitator
- 8. Baffle

$D_i=4cm, D_b=1.2cm, D_t=11cm$

중류수 1l에 녹여 NaOH 수반적으로 pH를 5.8로 조절한 다음 110°C에서 30分間 殺菌하여 使用하였다.

3) 발효장치

발효는 Fig. 1과 같은 규격의 용량 2l 유리제 발효조를 使用하였다. 본 장치에는 온도 및 용존산소가 自動的으로 기록 될 수 있도록 하였고 pH자동조절장치 및 자동스포장치가 부착되어 있었다.

4) 배양조건

발효조에서의 발효조건은 Table 2에 表示하였으나 nutrient broth에 계대배양한 배양액 4%를 집중하여 菌體濃度를 Spectro-photometer (Shimadzu spectronic 20)로서 0.05의 吸光度를 갖게 조절하였다. 또 발효조에는 pH測定 및 調節裝置에 의하여 1N-NaOH수용액이 自動的으로 供給되도록 하였으며 Modified Reynolds number $1 \times 10^5 - 2 \times 10^6$ 범위에서 30時間 醱酵시켰다.

Table 2. Culture condition

Conditions	
Fermentor volume	2.0l
Working volume	1.0l
Inoculum	4.0%
Agitation	100~1,000rpm
Temperature	45°C
pH	5.8

5) 교반에 의한 배양액의 유동상태

기계적 攪拌에 의한 醱酵槽內에서의 培養液의 流動狀態는 攪拌槽의 크기 및 幾何學의 모양, 攪拌速度, impeller의 크기 및 모양, baffle의 數종의 장치 특성과 培養液의 密度 및 粘度에 따라 다르므로 이러한 因子를 각각의 影響을 집약하여 Modified Reynolds number(1973)로 表示하였다.

즉 攪拌槽內에서 液体의 흐름은 液体의 慣性力과 粘性力의 比, 즉 impeller의 modified Reynolds number로 表示하면

$$N_{Re} = \frac{\text{慣性力}}{\text{粘性力}} = \frac{\rho n^2 D_i^3}{\mu n / D_i} = \frac{\rho n D_i^2}{\mu}$$

여기서 N_{Re} : modified Reynolds number[—]

ρ : 배양액의 平均密度[g/cm³]

μ : 배양액의 平均粘度[g/cm, sec]

n ; impeller의 회전속도[1/sec]

D_i ; impeller의 직경[cm]

이다.

6) 산소이동 용량계수(K_{La})의 測定

Modified Reynolds number에 對한 酸素의 移動-용량계수(K_{La})는 Gasing out method (1971)를 利用하여 산소의 포화도를 Dissolved oxygen analyzer (NBS models DO-50)로 측정하여 決定하였다.

7) 菌體量의 測定

메시시간마다 一定量의 培養液을 取하여 0.1% zephiramine 1~2방울을 加한 水에 必要에 따라 중류수로 稀釋하고 吸光度 0.1~0.16범위로 調整하여 610 nm에서 分光光度計(Varian 635형)을 使用하여 吸광도를 測定하였다. 菌體量은 吸광도에 稀釋倍數를 곱하여 Ultimate optical density(UOD/ml)로 表示하였다. 이때 optical density 1單位는 1.2×10^6 의 菌體數를 가지며 한 個體重량은 乾操重量 6.0×10^{-5} gm에 해당한다.

8) 葡萄糖의 測定

殘量의 葡萄糖은 Phenol-H₂SO₄法(1957)으로 定量하였다. 즉 80% Phenol용액 0.05ml에 糖含量이 10~70 μ gm인 試料 2ml를 넣어 진한 황산 5ml를 加하고 20~30°C에서 30分間 放置한후 490nm에서 吸광도를 測定하여 標準品과 比較 定量하였다.

實驗 結果

回分式 醱酵에 依한 醱酵過程의 動力學的 變數인 最大比增殖速度(μ_{max})와 saturation constant (K_s)를 구하기 위하여 細菌의 濃度 및 葡萄糖의 濃度變化를 測定한 結果는 다음과 같다.

1) 산소이동 용량계수(K_{La})의 變化

酸素移動-용량계수(K_{La})의 N_{Re} 에 對한 變化는 Fig. 2와 같다. 즉 K_{La} 의 變化는 攪拌에 依한 醱酵液의 液面比가 거의 없는 5×10^5 까지는 變化가 없으나 液面比가 생기는 5×10^5 이상의 범위에서는 N_{Re} 의 增加에 따라 급격히 증가함을 알수 있다.

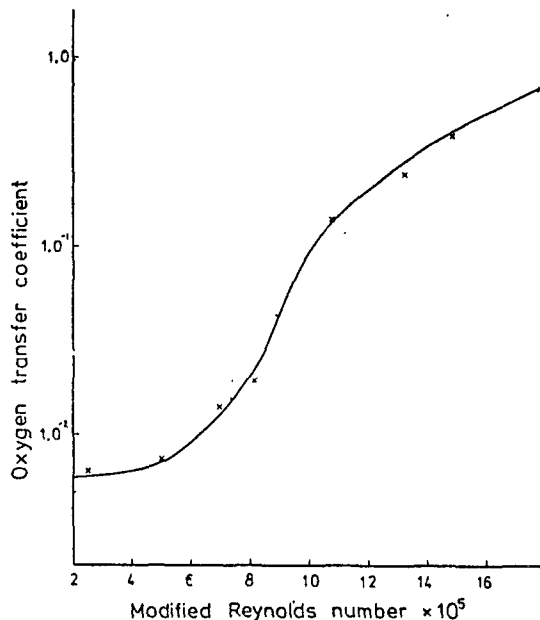


Fig. 2. Volumetric oxygen transfer coefficient with modified Reynolds number.

2) 細菌의 增殖

*L. bulgaricus*를 醱酵用 培地에서 Modified Rey-

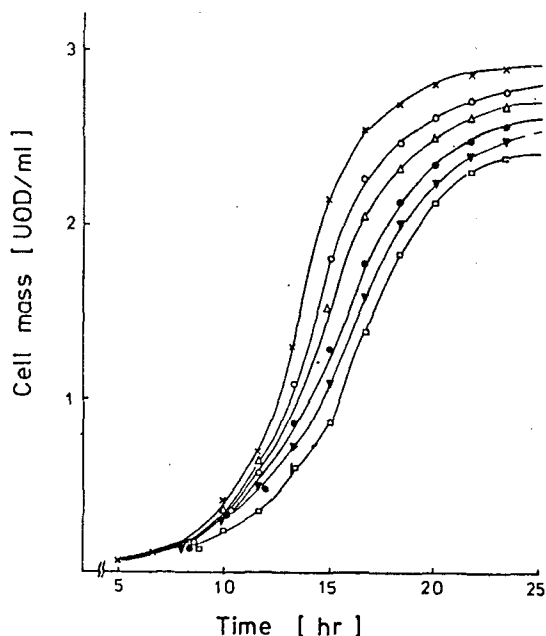


Fig. 3. Growth curves of *L. bulgaricus* with N_{Re} .
 $N_{Re} = 5 \times 10^5$ □-□ 8×10^5 △-△
 6×10^5 ▼-▼ 9×10^5 ○-○
 7×10^5 ●-● 10×10^5 ×-×

nolds number (N_{Re}) $2 \times 10^5 \sim 2 \times 10^6$ 범위에서 30시간 배양하였을 때 細菌의 증식곡선은 Fig. 3과 같다. 24시간 발효후 세균의 농도는 Modified Reynolds number (N_{Re})의 변화에 대하여 $2.4 \sim 2.9 \text{ UOD/ml}$ 의 범위에 있었다.

3) 포도당의 變化

醱酵過程中 葡萄糖의 消費曲線은 Fig. 4와 같다. 포도당은 세균의 증식과 같이 N_{Re} 2×10^5 에서 4×10^5 범위까지는 거의 一定하게 감소하나 N_{Re} 가 5×10^5 이상일 때 부터 급격하게 증가함을 알 수 있었다. 24시간 발효후 포도당 잔량농도는 $8.3 \sim 18.0 \text{ g/l}$ 였다.

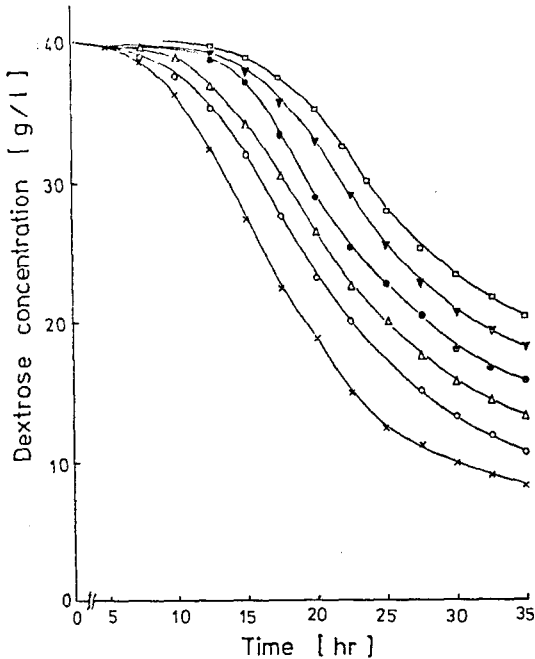


Fig. 4. Dextrose consumption of *L. bulgaricus* with N_{Re} .

$N_{Re} = 5 \times 10^5$ □—□ 8×10^5 △—△
 6×10^5 ▼—▼ 9×10^5 ○—○
 7×10^5 ⊗—⊗ 10×10^5 ×—×

4) Lactic acid의 生成

醱酵過程中 生成되는 lactic acid의 量을 pH를 一定하게 유지하기 위하여 加해주는 1N-NaOH 수용액 양으로 환산하면 Fig. 5와 같다. Fig. 5에서 산생 속도는 *L. bulgaricus*의 증식속도와 유사함을 알 수 있다.

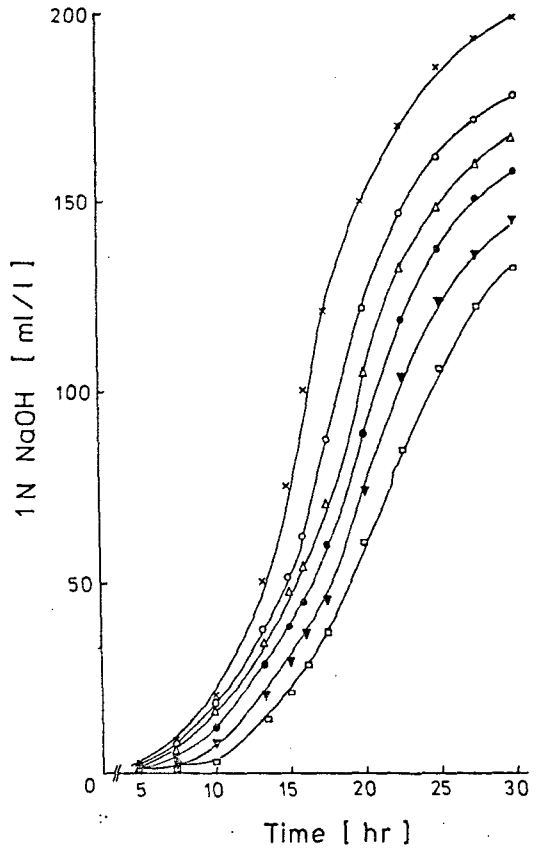


Fig. 5. Effect of N_{Re} on acid production.

$N_{Re} = 5 \times 10^5$ □—□ 8×10^5 △—△
 6×10^5 ▼—▼ 9×10^5 ○—○
 7×10^5 ⊗—⊗ 10×10^5 ×—×

5) 세균의 증식속도

세균의 증식속도(dx/dt)와 세균농도(UOD/ml)의 관계는 Fig. 6과 같다. Fig. 6으로부터 구한 세균의 最大比増殖速度(μ_{max})는 N_{Re} 가 2×10^5 에서 5×10^5 범위까지는 거의 同一한 값으로 $\mu_{max} = 0.28 \text{ hr}^{-1}$, 5×10^5 에서 1×10^6 까지는 N_{Re} 의 증가에 따라 최대비 증식속도(μ_{max})도 증가하여 N_{Re} 가 1×10^6 인 때 최대비 증식속도(μ_{max})가 0.58 hr^{-1} 로 최대값을 나타내고 1×10^6 이상으로 N_{Re} 가 증가하면 최대비 증식속도는 도리어 감소하는 경향을 나타내었다.

6) 葡萄糖 消費와 saturation constant (K_s)

一回 醱酵로서 最大比増殖速度(μ_{max}), K_s 를 쉽게

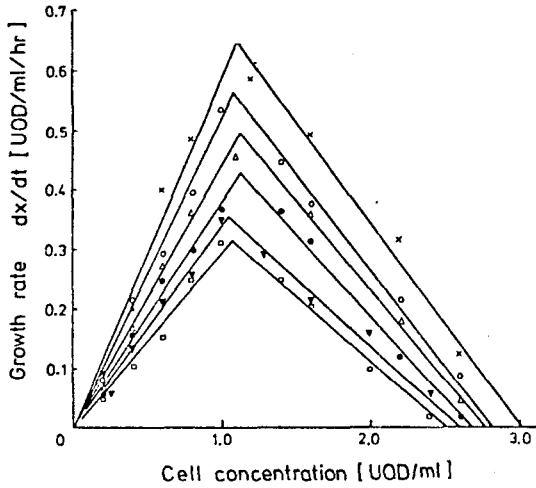


Fig. 6. Specific growth rate of *L. bulgaricus* with N_{Re} .

$N_{Re}=5 \times 10^5$ □-□ 8×10^5 △-△
 6×10^5 ▼-▼ 9×10^5 ○-○
 7×10^5 ●-● 10×10^5 ×-×

決定하는 方法으로써 酵素反應系에 적용하는 Henri-Michaelis Menten(1976)式과 같은 Monod(1949) 式의 積分型으로 μ_{max} 및 K_s 값을 구하였다.

즉 Fig. 4의 結果를 Lee and Lee(1978)의 方法으로 $\frac{1}{t} \ln \frac{S_0}{S}$ 에 대한 $-\frac{S_0-S}{t}$ 를 表示하면 Fig. 7과 같다. Fig. 7에서 求한 최대비증식속도(μ_{max}) 및 saturation constant(K_s)의 값은 Table. 3과 같으며 N_{Re} 1×10^6 인 경우 各各 $0.58hr^{-1}$, $6.74mg/ml$ 였다.

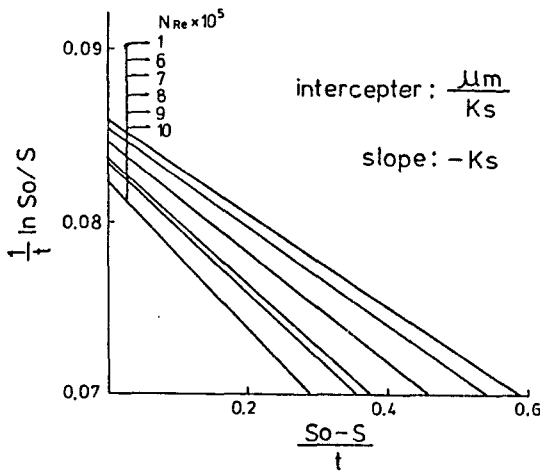


Fig. 7. Plot of the integrated Monod equation.

Table 3 The effect of N_{Re} on the μ_{max} and K_s

N_{Re}	1×10^5	6×10^5	7×10^5	8×10^5	9×10^5	1×10^6
μ_{max}	0.28	0.36	0.375	0.46	0.54	0.58
K_s	3.44	4.40	4.58	5.70	6.42	6.74

考 察

微生物의 增殖, 基質의 消費 및 産物의 生成에 미치는 裝置 및 操作條件의 影響을 考察하기 위하여 행한 本 實驗結果 機械的 攪拌의 影響은 매우 큰 것임을 알수있다. 攪拌의 效果는 基質과 微生物의 충돌회수를 增加시켜 微生物의 增殖, 基質의 消費 및 産物의 生成을 촉진하며 液內的 各成分 濃度를 均一하게 유지시킨다.

또한 液面을 통한 酸素移動에 큰 影響을 미친다. Fig. 3의 結果 酸素移動容量 係數(K_{La})는 Modified Reynolds number의 增加에 따라 增加하나 細菌의 增殖은 Modified Reynolds number 1×10^6 까지는 K_{La} 값과 같은 傾向을 보이나 1×10^6 以上の 범위에서는 도리어 감소한다. 이러한 結果는 攪拌의 效果가 갖는 충돌회수의 增加와 酸素移動의 촉진이 서로 경쟁적으로 作用하는 것으로 考察된다.

즉 微好氣性인 *L. bulgaricus*의 경우, 菌體와 基質과의 충돌회수가 증가함에 따라 菌體의 增殖, 糖의 消費 및 産物의 生成은 增加한다. 그러나 液面을 통하여 移動 溶解되는 酸素의 量은 어느程度까지는 微生物의 증식에 必要하지만 그 以上の 溶存酸素는 오히려 阻害作用이 있는 것으로 생각되며 *L. bulgaricus*의 경우 最大酸素移動容量係數(K_{La})는 $N_{Re}=1 \times 10^6$ 에 해당하는 $0.1hr^{-1}$ 이었다.

本 實驗의 結果 *L. bulgaricus*를 利用한 lactic acid醱酵에 Monod式의 積分型을 적용한 結果를 Fig. 6과 比較하여 잘 一致하므로 細菌增殖系에도 Monod式의 積分型을 적용할 수 있다고 생각된다.

要 約

Lactic acid醱酵能이 있는 *L. bulgaricus*의 增殖에 미치는 機械的 攪拌의 效果 및 動力學的 結果는 다음과 같다.

1) *L. bulgaricus*를 30時間 醱酵시켰을때 細菌의 濃度는 液面變化가 적은 $N_{Re}=1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^5$ 범위

에서는 2.4 UOD/ml로 同一 하였으며 $N_{Re}=1 \times 10^6$ 일때 2.9UOD/ml로 가장 높은 값이었다.

2) 醱酵 30時間後 葡萄糖의 殘量은 $N_{Re}=1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 범위에서 18g/l, $N_{Re}=1 \times 10^6$ 인 경우 8.3g/l이었다.

3) 最大比增殖速度 (μ_{max})는 $N_{Re}=1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 에서 $0.28hr^{-1}$, $N_{Re}=1 \times 10^6$ 에서 $0.58hr^{-1}$ 이었다.

4) Saturation constant (K_s)는 $N_{Re}=1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 에서 3.44g/l, $N_{Re}=1 \times 10^6$ 에서 6.74g/l이었다.

文 獻

- Aiba, S., A. E. Humphrey and N. F. Millis (1973): Biochemical Engineering. 2nd. ed. p. 173~174. University of Tokyo press.
- Gilliland, S. E., E. D. Anna and M. L. Speck (1970): Concentrated cultures of *Leuconostoc citrovorum*. Appl. Microbial. 19, 890
- Khan, A. H and T. K. Ghoso (1973): Kinetics of citric acid fermentation by *Aspergillus niger*. J. Ferment. Technol. 51(10), 734.
- Lee, K. H. and K. T. Lee (1978): Effect of phenol derivatives of bacterial growth. Bull. Korean. Fish. Soc. 11(4), 213.
- Monod, J. (1949): The growth of bacterial cultures. Ann. Review of Microbial. 3, 371.
- 南場毅·竹内徳男(1977): 酒粕中の醱酵足進物質の分離. 日本食品工業會誌. 24(11), 570.
- 野田文雄·逆井利夫·横塚保(1976): 醬油諸味の醱酵に關する研究. (第5報). パニリングアヤコールおよびベニリン異性体の抗微生物作用について. 日本食品工業會誌. 23(2), 59.
- 日本化學會編(1957): 實驗化學講座. Vol. 23, p. 421. 丸善
- Peebles, M. M., S. E. Gilliland and M. L. Soeck (1969): Preparation of concentrated lactic *Streptococcus starters*. Appl. Microbial. 17, 805.
- Petterson, H. E. (1975): Studies on batch production of bacterial concentration. Appl. Microbial, 29, 133.
- Romeo, J., M. Scheraga and W. W. Umbreit (1977): Stimulation of the growth and respiration a methilotrophic bacterium by morphine. Appl. Environ Microbal. 34(5), 661.
- Segel, I. H. (1976): Biochemical calculations. 2nd. ed, p. 245~246. John. Willey and Sons. N. Y.
- 山田浩一(1971): 食品工業微生物學, p. 281. 光琳書院