

# 乳酸菌 醱酵에 관한 動力學的 研究(第二報)

醱酵에 미치는 溫度의 影響

李根泰\* · 李明淑\* · 韓鳳浩\*

## KINETIC STUDIES OF LACTIC ACID FERMENTATION(PART 2)

### INFLUENCE OF TEMPERATURE ON FERMENTATION

Keun-Tai LEE\* Myeong-Sook LEE\*, and Bong-Ho HAN\*

To know the influence of temperature on the fermentation process, a strain of *Lactobacillus bulgaricus* was experimentally cultured under three different temperature conditions of 39°C, 42°C and 45°C at pH 5.8 and mechanical agitation of 500rpm.

During 20 hour's fermentation, the microbial growth attained the maximum concentration under the conditions mentioned above. However, the culturing conditions resulted different outcomes in terms of maximum concentration of the microbes and the residual concentration of substrate. Among the three temperature conditions, the fermentation at 45°C was most effective and the maximum specific growth rate was 0.58/hr. Activation energy deduced from the Arrhenius equation was 9,220cal/mole and entropy was -34.74 cal/°K mole. Activation enthalpy was 9,845 cal/mole and free energy was 19,800 cal/mole.

#### 緒 論

微生物은 菌種에 따라 生育하기 適當한 環境因子 即 培養溫度, pH, 영양분등의 條件이 決定되어 있다. 이중 培養溫度는 微生物 代謝에 큰 影響을 미치는 因子로 菌體의 成長, 代謝産物의 生成등 生理的, 物理的 特性에 影響을 미친다고 알려져 있다.

Foter and Rahn(1936)과 Ng(1969)는 培養溫度에 따른 菌體의 기질 利用率을 測定하여 生育適溫 보다 培養온도가 낮아질수록 菌體의 기질 이용율은 낮아진다고 하였다.

Marr등(1963)은 一定한 溫度범위에서 菌體의 成長速度를 Arrhenius式으로 圖示하되 培養온도와 直線的인 관계를 나타낸다고 하였고 Brown and Rose(1969)는 培養온도에 따라 菌體의 化學的 組成이 단

라진다고 報告하였다. Randall and Nakayama(1971)는 培養온도의 上昇에 따라 菌體의 活性이 活潑하여지 기질이용율과 energy 生成은 왕성해지나 体内 成分으로의 전환율은 거의 一定하다고 報告하였다. 本 實驗에서는 最近 급격한 成長을 보이고 있는 乳酸菌 飲料工業에 많이 利用되는 *Lactobacillus bulgaricus*를 使用하여 培養온도를 變化시켰을때 일어나는 발효효과와 열역학적 考察로 다음과 같은 結果를 얻었기에 報告한다.

#### 材料 및 方法

##### 1. 使用菌株

日本 乳業技術協會에서 分讓받은 *Lactobacillus bulgaricus*를 nutrient agar에 수회 繼代 培養한 것을 使用하였다.

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

2. 醱酵用 培地

醱酵用 培地の 組成은 Table 1과 같으며 이를 100°C에서 30分間 蒸氣加熱殺菌하여 使用하였다.

Table 1. Composition of medium

|                                 |       |
|---------------------------------|-------|
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 1g    |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 1g    |
| MgSO <sub>4</sub>               | 0.4g  |
| NaCl                            | 0.02g |
| FeSO <sub>4</sub>               | 0.02g |
| Yeast extract                   | 2g    |
| Dextrose                        | 40g   |
| Distilled water                 | 1l    |

3. 醱酵裝置

本實驗에 使用한 裝置는 Bench scale Fermentor (New Brunswick, Model 19)이다. 本 裝置의 構造는 Fig. 1과 같으며 溫度, 溶存 酸素量이 自動으로 記錄되며 pH 自動調節裝置와 自動소포장치가 附屬되어 있다.

4. 培養條件

醱酵槽에서의 醱酵條件은 Table 2에 表示하였다. 種菌培養은 本 培養과 同一 組成의 培地에서 24時間 振盪培養하였고 이 菌體를 本 培養液에 spectrophotometer (spectronic 20)로서 吸光度 0.10이 되도록 稀釋시켰다. 또 培養槽 內에는 pH測定 및 調節裝置에 의하여 1N-NaOH가 自動으로 供給되도록 하였다.

Table 2. Culture condition

|                  |         |
|------------------|---------|
| Fermentor volume | 7l      |
| working volume   | 3.5l    |
| Agitation        | 500rpm  |
| pH               | 5.8     |
| Temperature      | 39~45°C |

5. 培養溫度

*L. bulgaricus*의 生育適溫으로 알려진 45°C와 그외에 42°C, 39°C를 比較하여 回分式으로 醱酵하였다.

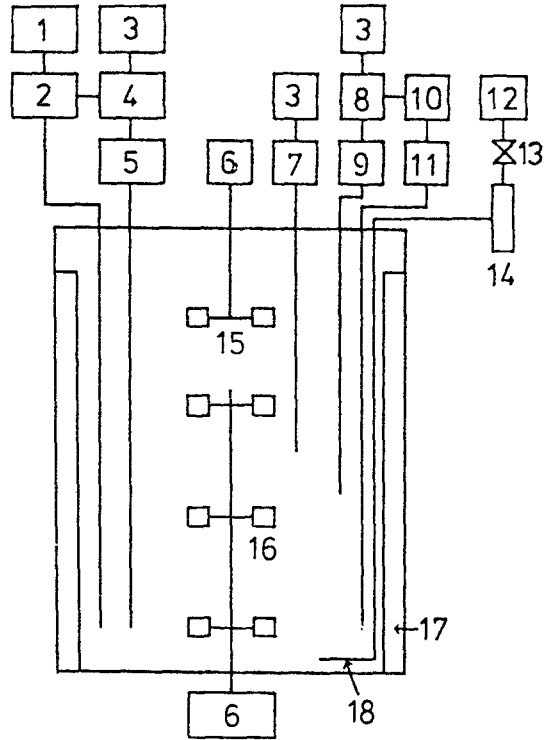


Fig. 1. Schematic diagram of the experimental set-up.

- 1. Alkali solution
- 2. feeding pump
- 3. Recorder
- 4. pH controller
- 5. pH meter
- 6. moter
- 7. D. O. meter
- 8. Temperature controller
- 9. thermometer
- 10. Heat exchanger
- 11. Heating and cooling water pump
- 12. air pump
- 13. needle valve
- 14. flow meter
- 15. baffle
- 16. foam breaker
- 17. impeller
- 18. air sparger

6. 最適攪拌條件의 檢討

교반效果의 最適條件은 Gasing out method(1971)로 求하였다. 即 酸素의 移動速度는 두相의 境界面에 있어서

$$\frac{1}{V} \frac{dw}{dt} = K_L(C^* - C_L), \quad \frac{1}{V} dw = dC$$

로 나타낼 수 있으며 式을 初期條件  $t=0, C_L=C_0$ 로 積分하면

$$I_n(C^* - C_L) = -K_L t + I_n(C^* - C_0)$$

로 풀수있다. 式에서

$v$ : 培養液量[cm<sup>3</sup>]

$w$ : 酸素移動量[mol]

- C: 本液中 酸素濃度[mol/cm<sup>3</sup>]
- C\*: 液面에 있어서의 飽和酸素濃度[mol/cm<sup>3</sup>]
- C<sub>L</sub>: 액체내面에 있어서의 酸素濃度[mol/cm<sup>3</sup>]
- K<sub>L</sub>a: 酸素 移動容量係數[l/hr]
- t: 時間[min]

이다. 即 증류수 3.5l를 實驗裝置에 넣고 염화코발트 촉매存在下에서 포화아황산 나트륨액 2ml를 加하여 용존산소의 농도를 쫓아가이 오게 낮추고 교반속도를 變化시켜 飽和되는 용존산소를 自動記錄하여 罫紙에서 (C\*-C<sub>L</sub>)의 對數값에 對하여 時間 t를 圖示하여 얻은 直線의 기울기로부터 K<sub>L</sub>a값을 구한후 이를 교반속도와 比較하여 最適條件을 求하였다.

### 7. 菌體量의 測定

一定한 時間 間隔으로 適當量(約 10ml)의 培養液을 取하여 0.1% zephiramine 1~2방울 加한뒤 必要에 따라 稀釋하여 0.1~0.15의 吸光度를 갖게 調節한뒤 spectrophotometer (spectronic 20)로서 610nm에서의 吸光度를 測定하였으며 菌體量은 吸光度에 稀釋倍數를 곱하여 UOD(ultimate optical density)로 表示하였다. 이때 吸光度 1單位는 1.2×10<sup>5</sup>의 菌體數를 가지며 한 個體重量은 건조중량 6.0×10<sup>-5</sup>gm에 相當한다.

### 8. 葡萄糖의 定量

殘渣의 葡萄糖은 phenol-黃酸法(1957)으로 定量하였다. 即 80% phenol-용액 0.05ml에 당소量이 1ml 당 10~40μg되게 稀釋한 試料 2ml와 농황산 5ml를 加하여 20~30°C에 20分間 放置한 다음 spectrophotometer로서 490nm에서의 吸光度를 測定하여 標準品과 比較하여 定量하였다.

### 9. 菌體의 基質利用率

기질 이용율 K는 다음式으로 求할 수 있다. 즉  

$$K = (G - G_0) / C$$

이다. 여기서

- G: 一定時間 培養後의 菌體量(mg/ml)
- G<sub>0</sub>: 배양初期의 菌體量(mg/ml)
- C: 배양초기의 葡萄糖量(mg/ml)

이다. 菌體量은 UOD로 表示된 菌體濃도에 UOD 1單位가 갖는 菌體數와 個體重量을 곱하여 나타내었다

### 10. 熱力學的 解釋

醱酵에서 培養溫도의 범위가 그리 넓지 않다면 最大比增殖速度的 溫度依存性은 Arrhenius 式의 積分

型에 依해 圖示化 할 수 있다. 즉

$$\log Kr = -E/(2.303RT) + \log A$$

이므로 最大比增殖速度的 對數값과 絕對溫도의 역수는 直線關係를 나타내므로 그 기울기와 절편에서 活性化 energy와 活性化 entropy를 구할수 있다. 위에서 구한 값들을 다음式에 適用하여 活性化 反應熱과 活性化 free energy를 구할수 있다. 즉

$$\Delta H^* + RT = E$$

$$\Delta G^* = \Delta H^* - T\Delta S^*$$

이다. 罫紙에서

Kr; 比反應速度常數(=最大比증식 속도μmax)  
 [hr<sup>-1</sup>]

E; activation energy defined by Arrhenius equation[cal/mole]

ΔH\*; heat of reaction of activation[cal/mole]

ΔS\*; entropy change of activation[cal/°K mole]

ΔG\*; free energy change of activation[cal/mole]

R; Gas constant[1.987 cal/°K mole]

T; absolute Temperature[°K]

A; frequency factor[hr<sup>-1</sup>]

## 結果 및 考察

回分式 醱酵에 있어서 培養溫도를 각각 39°C, 42°C, 45°C로 變化시켰을때의 醱酵效果를 比較하기爲하여 菌體의 濃度, 葡萄糖의 消費, 乳酸의 生成, 最大比增殖速度, 그리고 기질이용율을 檢討한 結果와 菌體内の 熱力學的 解釋은 다음과 같다.

### 1) 最適攪拌條件

Gasing out method에 依하여 求한 교반효과는

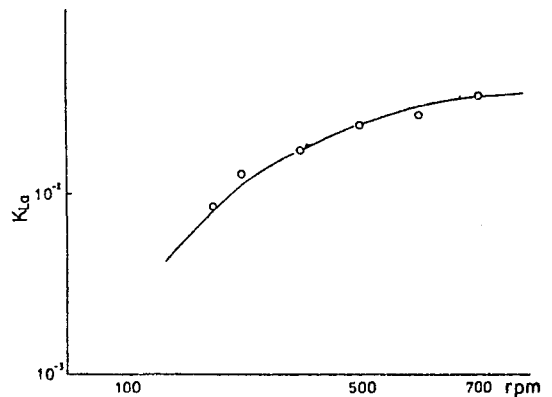


Fig. 2. Dissolved oxygen saturation with agitation speeds.

Fig. 2와 같다. 증류수 온도 45°C에서는 교반속도의 증가에 따라 용존산소의 포화속도가 빨라졌으며 교반속도 500~700 rpm에서 산소이동용량계수( $K_L a$ )의 값은 큰 차이가 없으므로 500rpm을最適으로 하였다.

### 2. 菌體의 增殖

溫度的變化에 따른 菌體增殖은 Fig. 3과 같다. 39°C, 42°C, 45°C에서 배양한 結果 最高濃度에 달하는 培養時間은 모두 20時間이었고 그때의 濃度는 각각 2.3UOD/ml, 2.6UOD/ml, 2.8UOD/ml이었다.

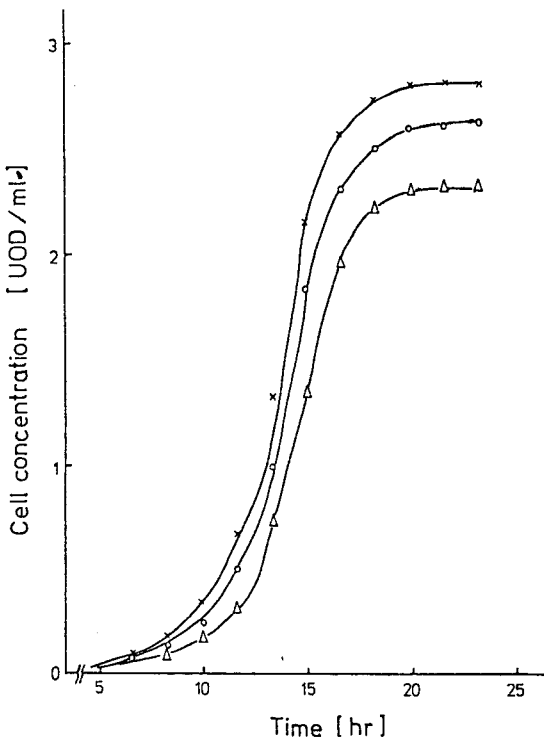


Fig. 3. Growth curve of *L. bulgaricus* at different temperatures.  
 X-X 45°C, O-O 42°C, Δ-Δ 39°C.

### 3. 葡萄糖의 變化

培養溫度에 따른 葡萄糖의 消費는 Fig. 4와 같다. 45°C에서의 消費速度는 39°C에서 보다 빠르고, 배양30時間까지는 계속 감소하나 그후는 서서히 감소하는 傾向을 나타내었다. 배양 30時間에서 葡萄糖殘量은 39°C, 42°C, 45°C에서 각각 18.3g/l, 15.0g/l, 10.0g/l이었다.

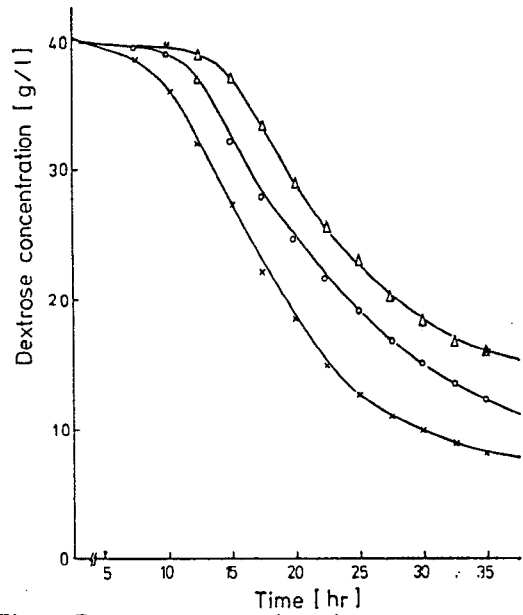


Fig. 4. Dextrose consumption of *L. bulgaricus* at different temperatures.  
 X-X 45°C, O-O 42°C, Δ-Δ 39°C.

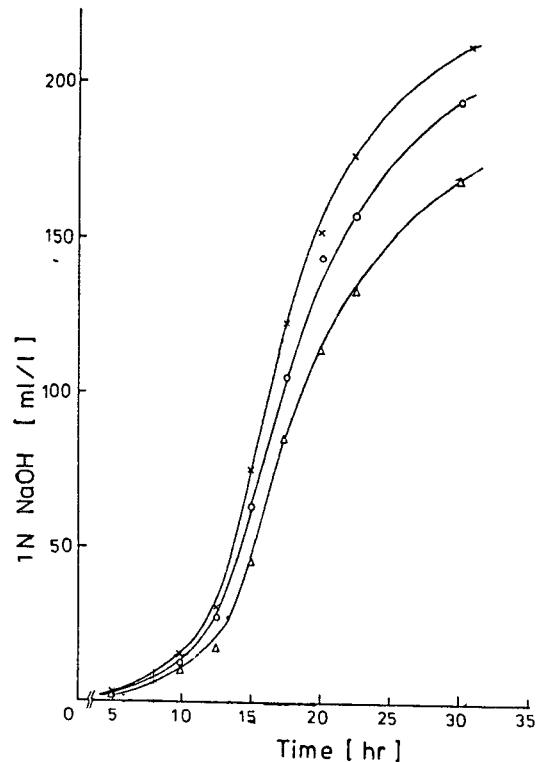


Fig. 5. Effect of temperature on acid production.  
 X-X 45°C, O-O 42°C, Δ-Δ 39°C.

4) 乳酸의 生成

葡萄糖의 分解로 生成되는 乳酸量의 生成 傾向을 알아보기 위해 pH측정장치와 자동조절장치에 의하여 발효조내의 pH를 5.8로 一定하게 유지시키기 위해 공급된 1N-NaOH량을 매시간 측정하여 Fig.5에 나타내었다. 이는 *L. bulgaricus*의 증식과 비슷한 경향을 나타내었다.

5) 菌體의 增殖速度

微生物의 增殖速度( $dx/dt$ )에 對한 菌體의 濃도(UOD/ml)의 關係는 Fig.6과 같다. 그 기온기로부터 구한 最大比增殖速度( $\mu_{max}$ )의 값은 배양온도 39°C, 42°C, 45°C에 각각 0.42hr<sup>-1</sup>, 0.48hr<sup>-1</sup>, 0.58hr<sup>-1</sup>을 나타내었다.

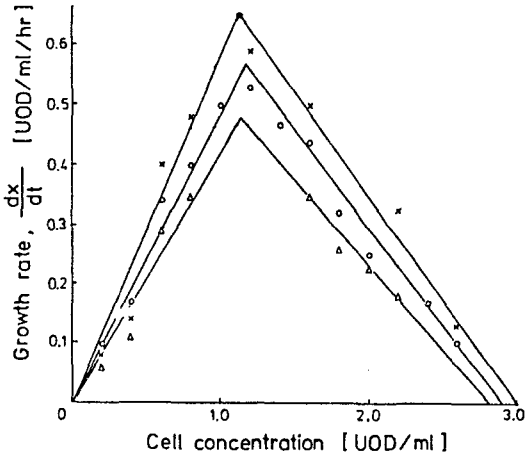


Fig.6. Specific growth rate of *L. bulgaricus* at different temperatures.

X-X 45°C, O-O 42°C, Δ-Δ 39°C.

6) 葡萄糖 消費와 Saturation constant(Ks).

最大比增殖速度( $\mu_{max}$ )와 Saturation constant(Ks)를 1回 醱酵로서 結定하는 方法으로 효소反應係에 적용하는 Henri-Michaelis Menten(1976)式과 같은 Monod(1949)式의 積分型을 使用하였다. 즉 Fig.4의 結果를 Lee and Lee(1978)의 方法으로  $\frac{1}{t} \ln \frac{S_0}{S}$ 에 對해  $-\frac{S_0-S}{t}$ 를 圖示하면 Fig.7과 같다. 여기서 구한 最大比增殖速度는 배양온도 39°C, 42°C, 45°C에서 각각 0.57hr<sup>-1</sup>, 0.48hr<sup>-1</sup>, 0.40hr<sup>-1</sup>이 있으며 Ks값은 각각 4.57mg/ml, 5.6mg/ml, 6.627

mg/ml이었다. Fig.6에서 구한 最大比增殖速度 값과 Fig.7에서 구한 값이 잘 一致하는것을 미루어 細菌 증식계에도 Monod式의 積分型을 적용할수 있다고 생각된다.

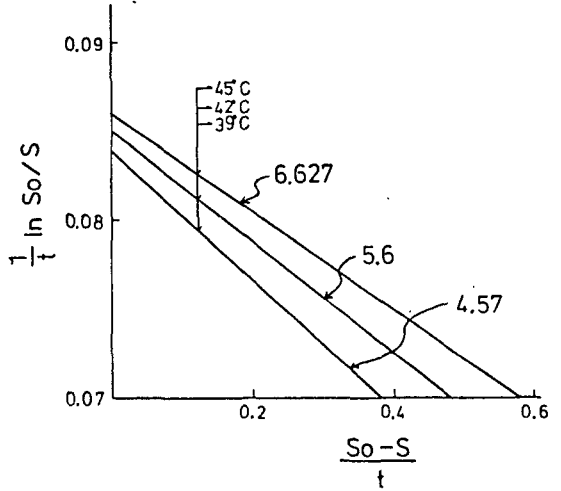


Fig.7. Plot of the integrated Monod equation.

7) 菌體의 기질이용율

배양온도에 따른 기질의 이용율은 39°C, 42°C, 45°C에서 각각 0.415, 0.468, 0.505였다.

8) 熱力學的 해석

最大比增殖速度의 대수값과 절대온도의 역수를 Arrhenius式에 의해 圖示하면 Fig.8과 같다. Fig.8의 기온기에서 구한 活性化 energy(E)의 값은 9,220 cal/mol이었고 절편값에서 구한 活性化 entropy ( $\Delta S^*$ )

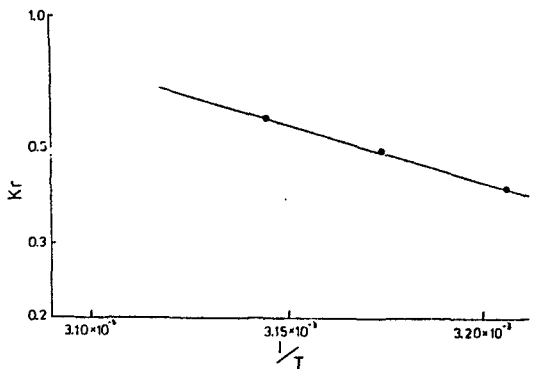


Fig.8. Arrhenius plot of growth rate

는 배양온도 39°C, 42°C, 45°C에서 각각 -31.71cal/°K mol, -31.74cal/°K mol, -31.76cal/°K mol이었다. 활성화 반응열(DH\*)는 9,840cal/mol, 9,846cal/mol, 9,850cal/mol이었으며 활성화 free energy(ΔG\*)는 19,700cal/mol, 19,800cal/mol, 19,800cal/mol로 배양온도의 변화에 따라 대체로 비슷한 값을 나타내었다.

Randall and Nakayama(1971)은 위와같은 방법으로求한 *Pseudomonas fluorescens*의 활성화 energy는 1,660 cal/mol라고 報告하였고 Ng(1969)는 *E. coli*의 활성화 energy는 13,200cal/mol였다고 報告하였다. 위의 結果로 미루어 高溫菌이 저온菌보다 溫度變化에 對한 感受성이 低다는 것을 알 수 있다.

### 要 約

乳酸菌 飲料工業에서 重要な 位置을 차지하는 *L. bulgaricus*의 배양溫度에 依한 醱酵 效果 및 兒학자 科 參照 要約하면 다음과 같다.

- 1) *L. bulgaricus*를 20時間 배양時 菌體는 最高濃도에 달했고 배양온도 39°C, 42°C, 45°C에서 각각 2.3UOD/ml, 2.6UOD/ml, 2.8UOD/ml로 나타났다.
- 2) 배양 30시간때 葡萄糖 殘量은 배양온도 39°C, 42°C, 45°C에서 각각 18.3g/l, 15.0g/l, 10.0g/l이었다.
- 3) 最大比增殖速度는 배양온도 39°C, 42°C, 45°C에서 각각 0.42hr<sup>-1</sup>, 0.48hr<sup>-1</sup>, 0.58hr<sup>-1</sup>이었고 Saturation constant는 4.57mg/ml, 5.6mg/ml, 6.627mg/ml이었다.
- 4) 기질이용율은 배양온도 39°C, 42°C, 45°C에서 각각 0.415, 0.468, 0.505이었다.
- 5) 活性化 energy는 9,220cal/mol배양온도의 변화에 따른 평균치로 活性化 entropy는 -31.74cal/°K mol, 反應熱은 9,845cal/mol free energy는 19,800cal/mol이었다.

### 參 考 文 獻

- Aiba, S., A. E. Humphrey and N. F. Millis(1973): Biochemical Engineering. 2nd ed. p.103~110, p.173~174, University of Tokyo Press.
- Brown, C.M and A.H.Rose(1969): Effects of temperature on composition and cell volume of *Candida utilis*. J. Bacteriol. 97, 261~272.
- Foter, M. J. and O. Rahn(1936): Growth and fermentation of Bacteria near their minimum temperature. J. Bacteriol. 32, 485~497.
- Lee, K. T and K. H. Lee(1978): Effect of phenol and Catechol Derivatives on oxygen transfer in the fermentation. Bull. Korean. Fish. Soc. 11(4), 205~211.
- 李京熙(1978): phenol 誘導體의 glucon酸 醱酵에 미치는 動力學的 研究. 釜山水產大學 理學博士學位請求論文
- Marr, A. G., E. H. Nilson and D. J. Clark(1963): The maintenance requirement of *Escherichia coli*. Ann. N. Y. Acad. Sci. 102, 536~548.
- Monod, J(1949): The growth of bacterial cultures. Ann. Review of Microbial. 3, 371.
- Ng, H(1969): Effect of decreasing growth temperature on cell yield of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 98, 232~237.
- 日本化學會編(1957): 實驗化學講座. Vol. 23, p. 421. 丸善
- Palumbo, S. A and L. D. Witter(1969): Influence of temperature on glucose utilization by *Pseudomonas fluorescens*. Appl. Microbial. 18, 137~141.
- Randall, H. M and T. O. M. Nakayama(1971): Influence of temperature on substrate and energy conversion in *Pseudomonas fluorescens*. App. Microbial. 22(5), 772~776.
- 山田浩一(1971): 食品工業微生物學. p. 281. 光臨書院.