

# 乳酸菌醱酵에 관한 動力學的 研究 (第三報)

## 醱酵에 미치는 Phenol 誘導體의 影響

李 根 泰 · 梁 賢 錫

釜山水產大學 食品工學科

### Kinetic Studies of Lactic Acid Fermentation (Part 3)

#### Effect of Phenol Derivatives on Fermentation

Keun-Tai LEE and Hyeun-Suk YANG

Department of Food Science and Technology, National Fisheries University of Busan,  
Namgu, Busan, 601-01 Korea

The growth of *Lactobacillus bulgaricus* treated with vanillin, ortho-vanillin and guaiacol was studied on synthetic medium in mechanically agitated chemostat culture.

The exponential-phase growth rate exhibited a maximum at the cells treated with 50 ppm vanillin. That stimulation, however, appears to be an effect on growth rate rather than total cell growth. And the others were inhibited by the chemicals.

Much greater inhibition in growth of the cells treated with 100 ppm of each chemical than ones treated with 50 ppm was observed after 25 hour fermentation.

For aerobic microbes, the alcohol dehydrogenase reaction is enhanced for the reproduction of NAD, which consequently cause to stimulate fermentation. For micro-aerophilic microbes, however, the same effect was not observed at the present study at least in the case of cell concentration. However except for one treated with 50 ppm vanillin the same effect was observed in the case of growth rate.

From the result using the glucose as a substrate, it was found that the cell concentrations measured in terms of ultimate optical density (UOD/ml), were 0.96 and 0.92, when treated with 50 and 100 ppm vanillin; 0.40 and 0.45 when treated with ortho-vanillin 50 and 100 ppm; 0.49 and 0.47, when treated with guaiacol 50 and 100 ppm. The specific growth rates were 0.44, 0.15, 0.28, 0.29, 0.37, and 0.34; the specific production rates were 0.35, 0.15, 0.16, 0.22, 0.28, and 0.26 and the glucose concentrations (g/l) after 25 hour fermentation were 23.5, 32.8, 31.5, 29.5, 28.0 and 28.8, these all in the same sequences as the first.

### 緒 論

미생물 발효에 있어서 발효의 효율을 증대시키는 방법에 대해 근년 많은 연구자들에 의하여 보고되고 있다.

특히 호기성 미생물인 경우에는 증식 및 호흡에 요구되는 용존산소의 농도를 증가시키고자 시도한 Hassan 等(1977), Ho 等(1977), Phillips 等(1961)의 機械的 방법과 Aiba 等(1961), Ziminski 等(1960)의 有機藥品 첨가방법이 보고되고 있다.

더욱 적극적인 방법으로 Romeo 등(1977)은 菌體의 증식에 미치는 morphine 및 codeine의 촉진효과를 보고하였으며 南場 등(1977)은 glycerol이 초산발효를 촉진시킨다는 것을 보고하였다.

이들 유기약품은 대사중간생성물이나 독소 등에 영향을 미쳐 제한된 발효과정을 계속적으로 진행시켜 주는 효과를 인정받고 있다.

또 野田 등(1976d)은 *Saccharomyces rouxii*에 의한 醬油醱酵중 호흡효소계에 작용하는 Phenol 유도체의 특성을 보고한 바 있다.

즉, 이들 Phenol 유도체는 호기성 세균의 cytochrome c oxidase의 생합성을 저해하여 NADH로부터 해당작용에 필요한 NAD의 재생을 방해함으로써 결과적으로 NAD 재생을 위한 alcohol dehydrogenase의 활력이 증가되어 발효촉진 효과를 나타낸다고 보고하였다.

본 실험에서는 cytochrome c oxidase와 carboxylase negative이며 미호기성인 *Lactobacillus bulgaricus*를 사용하여 Phenol 유도체중 vanillin, orthovanillin, guaiacol을 첨가하여 다음과 같은 결과를 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 skim milk에 수회 繼代培養한 것을 사용하였다.

### 2. 醱酵用 培地

발효용 배지의 組成은 Table 1과 같으며 이를 121°C에서 15분간 증기가열살균하여 사용하였다.

Table 1. Composition of culture 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
Fe <sub>2</sub> SO <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)였다. 本裝置의 構造는 Fig. 1과 같으며 온도자동조절장치와 pH controller를 부착 사용하였다.

### 4. 培養條件

醱酵槽內에서의 培養條件은 Table 2에 표시하였으며 lactose broth에 제대 배양시킨 종균을 Spectrophotometer (Tokyo-electric ANA-75)로서 0.05

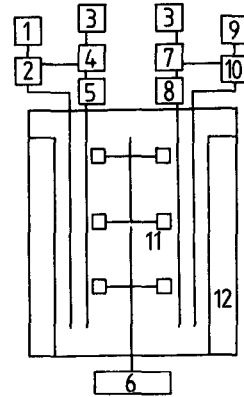


Fig. 1. Schematic diagram of experimental setup.

1. Alkali solution
2. Feeding pump
3. Recorder
4. pH controller
5. pH meter
6. Motor
7. Temperature controller
8. Thermometer
9. Heat exchanger
10. Heating and cooling water pump
11. Impeller
12. Baffle plate

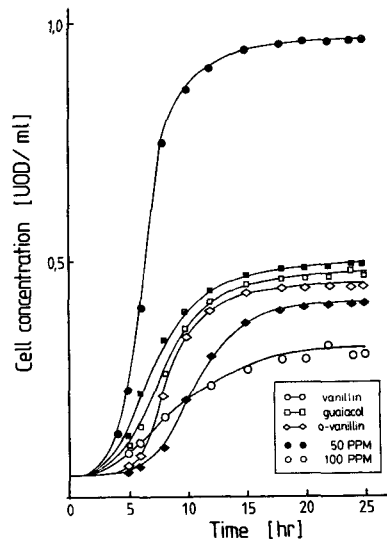


Fig. 2. Growth curves of *L. bulgaricus* treated with phenol derivatives.

의 吸光度를 갖게 조절하였다.

5. 種菌培養 및 Phenol 誘導體 處理方法

guaiacol, vanillin 및 ortho-vanillin 을 각각 50 ppm 과 100 ppm 씩 含有한 lactose broth 500 ml 에 균주를 접종하고 35°C 에서 19시간 배양시켰다. 균체는 원심분리 (4000 rpm) 하여 수회 배지용액으로

Table 2. Culture condition

Fermentor volume	7 l
Working volume	3.5 l
Agitation	500 rpm
pH	5.8
Temperature	45°C

세척한 다음 적당량의 배지용액에 현탁시켜 phenol 유도체 처리균으로 使用하였다.

6. 菌體量의 測定

두시간마다 배양액 일정량(약 10 ml)을 취하고 필요에 따라 증류수로 희석하여 흡광도가 0.1~0.15 되게 조절한 후 610 nm에서 Spectro photometer 로서 측정하였다. 균체량은 吸光度에 희석배수를 곱하여 ultimate optical density (UOD/ml)로 표시하였다.

7. 포도당의 定量

殘量의 포도당은 phenol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>法(1978)으로 定量하였다. 즉 80% phenol 용액 0.05 ml에 당함량이 10~70 µg 되게 희석한 sample 2 ml와 진한황산(96% 이상) 5 ml를 加하여 20~30°C에서 20分間 방치한 후 610 nm에서 吸光度를 측정하여 표준품과 비교 定量하였다.

結 果

回分式醱酵에 의한 약품처리효과를 비교하기 위하여 균체농도 및 포도당 농도를 두시간마다 측정하였다.

1. 菌體의 增殖

phenol 유도체인 guaiacol, vanillin, o-vanillin 으로 처리한 세균을 25 시간 동안 배양했을 때의 세균증식곡선은 Fig. 2와 같다.

25 시간 배양후의 균체농도(UOD/ml)는 guaiacol 처리균의 경우 100 ppm이 0.47, 50 ppm이 0.49 이고

vanillin 처리균의 경우 100 ppm이 0.29, 50 ppm이

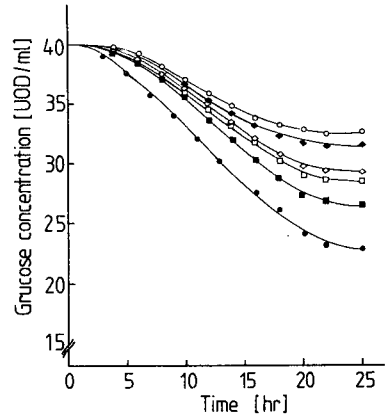


Fig. 3. Glucose consumption of *L. bulgaricus* treated with phenol derivatives. Symbols were the same as in Fig. 2.

0.96이며 o-vanillin 처리균의 경우 100 ppm이 0.45, 50 ppm이 0.40이었고 무처리균의 경우는 2.83이었다.

2. 포도당농도의 변화

발효과정중 포도당의 소비곡선은 Fig. 3과 같다. 포도당의 소비는 vanillin 50 ppm 처리균이 가장 빨랐으며 vanillin 100 ppm 처리균이 가장 늦었다.

25시간 발효후의 포도당 殘量은 vanillin 처리균의 경우 100 ppm이 32.8 g/l 이고 50 ppm이 23.5 g/l, o-vanillin 처리균의 경우 100 ppm이 29.5 g/l, 50 ppm이 31.5 g/l, guaiacol 처리균의 경우는 100 ppm이 28.8 g/l, 50 ppm이 28 g/l 였으며 무처리 균의 경우는 9 g/l 였다.

3. 菌體의 增殖速度

微生物의 增殖速度(dx/dt)에 대한 균체의 농도(UOD/ml) 관계는 Fig. 4와 같다.

Specific growth rate 는 vanillin 50 ppm 과 100 ppm 처리균이 각각 0.44, 0.15 였으며 o-vanillin의 경우 50 ppm과 100 ppm 처리균이 각각 0.28, 0.29 였고 guaiacol 50 ppm과 100 ppm을 처리했을 경우가 각각 0.37, 0.34 이었으며 무처리균의 경우는 0.43 이었다.

4. 乳酸의 生成

포도당의 分解로 生成되는 乳酸의 生成傾向을 알

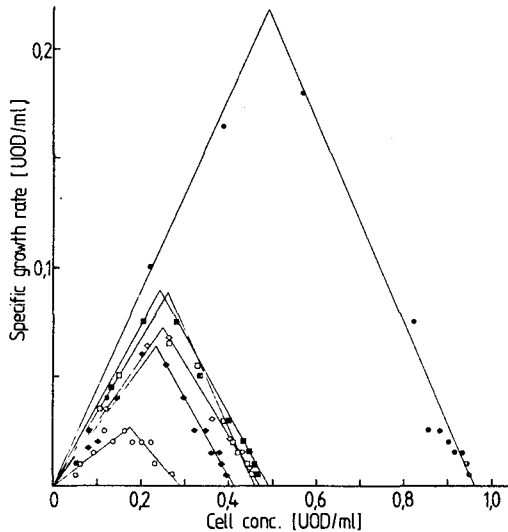


Fig. 4. Specific growth rate of *L. bulgaricus* treated with phenol derivatives. Symbols were the same as in Fig. 2.

기 위해 pH controller에 의해 공급되는 2N-NaOH 량을 매시간 측정하여 대수기때의 specific production rate로서 Table 3에 나타내었다.

Specific production rate는 vanillin 50 ppm과 100 ppm 처리군의 경우 0.36, 0.15 였으며 o-vanillin 50 ppm과 100 ppm 처리군의 경우 0.16, 0.22 였고 guaiacol 50 ppm 및 100 ppm 처리군의 경우는 0.28, 0.26 이었다.

Table 3. Specific production rate of *L. bulgaricus* treated with phenol derivatives

Compound	Vanillin		O-vanillin		Guaiacol	
Concentration	50	100	50	100	50	100
Specific production rate	0.36	0.15	0.16	0.22	0.28	0.26

### 考 察

호기성 미생물의 호흡 효소계에 영향을 미치는 guaiacol, vanillin, ortho-vanillin으로 전처리한 *Lactobacillus bulgaricus*를 합성배지에서 25시간동안 배양시킨 결과 균체량의 경우로 보아서는 모두 무처리군의 경우보다 감소하였다.

이와같은 현상은 野田 등(1976e)이 *Saccharomyces rouxii*를 사용하여 EMP pathway의 최종단계인 alcohol dehydrogenase 활성의 증가를 보고한데 반

하여 *Lactobacillus bulgaricus*의 경우에는 역시 최종 단계에 NADH 환원시의 효소 lactic acid dehydrogenase에는 영향을 미치지 않는다고 추정된다.

그러나, vanillin 50 ppm 처리군의 경우에는 무처리군의 경우보다 specific growth rate가 미소한 차이로 증가한 것을 볼 수 있다.

Romeo 등(1977)은 Methylotropic bacterium에 morphine을 첨가하여 growth rate 보다는 최종 균체량의 증가 효과를 보았다. 이러한 결과는 morphine이 발효 중간 생성물들 중에서 발효를 저해시키는 독성 물질과 결합하여 균체량의 증가를 얻은 것으로 보고하였다.

그러나, 본실험에서는 반대로 vanillin 50 ppm 처리군의 경우에 균체량은 무처리군의 2.83 UOD/ml로 적어졌으나 specific growth rate는 증가되었다.

이러한 결과는 Fig. 2에서 볼 수 있는 바와 같이 Romeo 등(1977)의 실험에서 처럼 대사 중간 생성물들에 의한 발효 억제 현상을 볼 수 있다.

그러므로, 연속 배양등 적절한 대사 방해 물질의 제거 방법이 선행된다면 본 실험의 specific growth rate의 증가 효과를 이용할 수 있을 것으로 기대된다.

vanillin 50 ppm 이외의 약물 처리에 있어서의 전반적인 성장 억제 현상은 野田 등(1976 a, b, c)의 보고와 같이 bacteriocidal 현상으로 생각된다.

Specific production rate (Table 3)도 역시 specific growth rate와 비슷한 경향을 띠는데, 이는 *Lactobacillus bulgaricus*의 유산 생성은 균체의 증식에 의존한다는 것과 증식관련형임을 보여준다.

### 要 約

호흡효소계의 영향을 미치는 vanillin, o-vanillin, guaiacol을 lactic acid 발효능이 있는 *Lactobacillus bulgaricus*에 처리한 후 합성배지에서 25시간동안 발효시킨 결과를 요약하면 다음과 같다.

1) 25시간 배양 후 도달한 균체농도는 vanillin 처리군의 경우 50 ppm, 100 ppm에서 각각 0.96 UOD/ml, 0.29 UOD/ml, 이고 o-vanillin의 경우 50 ppm, 100 ppm이 각각 0.40 UOD/ml, 0.45 UOD/ml이며 guaiacol의 경우 50 ppm, 100 ppm이 각각 0.49 UOD/ml, 0.47 UOD/ml로 나타났다.

2) 배양후 포도당 잔량은 vanillin의 경우 50 ppm, 100 ppm이 각각 23.5 g/l, 32.8 g/l 이고 o-vanillin의 500 ppm, 100 ppm이 각각 31.5 g/l, 29.5 g/l 이며 guaiacol은 50 ppm, 100 ppm이 각각 28.0 g/l, 28.8

g/l였다.

3) specific growth rate는 vanillin의 경우 50 ppm 및 100 ppm이 각각  $0.44 \text{ hr}^{-1}$ ,  $0.15 \text{ hr}^{-1}$ 이고 o-vanillin의 경우 50 ppm, 100 ppm이 각각  $0.28 \text{ hr}^{-1}$ ,  $0.29 \text{ hr}^{-1}$ 이며 guaiacol의 경우는 50 ppm, 100 ppm이 각각  $0.37 \text{ hr}^{-1}$ ,  $0.34 \text{ hr}^{-1}$ 이었다.

4) specific production rate는 vanillin의 경우 50 ppm 및 100 ppm 각각  $0.36 \text{ hr}^{-1}$ ,  $0.15 \text{ hr}^{-1}$ 이고 o-vanillin의 경우 50 ppm, 100 ppm이 각각  $0.16 \text{ hr}^{-1}$ ,  $0.22 \text{ hr}^{-1}$ 이며 guaiacol의 경우 50 ppm, 100 ppm이 각각  $0.28 \text{ hr}^{-1}$ ,  $0.26 \text{ hr}^{-1}$ 이었다.

## 文 献

- Aiba, S. and T. Yamada. 1961. Oxygen absorption in bubble aeration. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 7, 100—107.
- 野田文雄・逆井利夫・横塚保. 1976a. 醬油諸味の醱酵に関する研究, 第四報. 醬油中の酵母生育阻害, 醱酵能増強成分の固定について. *日食工誌* 23(2), 53—58.
- 野田文雄. 逆井利夫・横塚保. 1976b. 醬油諸味の醱酵に関する研究, 第五報. バニリン, グアヤコールおよびバニリンの異性體の抗微生物作用について. *日食工誌* 23(2), 59—56.
- 野田文雄・逆井利夫・横塚保. 1976c. 醬油諸味の醱酵に関する研究, 第六報. オルソバニリン, バニリンおよび グアヤコールの醬油酵母醱酵能増強作用について. *日食工誌* 23(2), 67—72.
- 野田文雄・逆井利夫・横塚保. 1976d. 醬油諸味の醱酵に関する研究, 第七報. *Saccharomyces rouxii*의 呼吸能, 醱酵能에 對する 오르소바니린의 影響. *日食工誌* 23(2), 74—78.
- 野田文雄・逆井利夫・横塚保. 1976e. 醬油諸味の醱酵に関する研究. 第八報. *Saccharomyces rouxii*의 呼吸系에 對する 오르소바니린의 影響. *日食工誌* 23(2), 80—83.
- Hassan, I. T. M. and C. W. Robinson. 1977. Oxygen transfer in mechanically agitated aqueous system containing dispersed hydrocarbon. *Biotech. Bioeng.* 19, 661—682.
- Ho, C. S., L. E. Erickson and L. T. Fan. 1977. Modeling and stimulation of oxygen transfer in air lift fermentor. *Biotech. Bioeng.* 19, 1053—1522.
- 日本化學會. 1978. 實驗化學講座. Vol. 20, pp.1270. 丸善. 東京.
- Phillips, K. L., H. R. Sallans and J. F. T. Spencer. 1961. Oxygen transfer in fermentation. I and E. C. 53, 749—754.
- Romeo, J., M. Scherage and W. W. Umbreit. 1977. Stimulation of the growth and respiration of a nethylotrophic bacterium, by morphine. *Appl. and Environ. Microbiol.* 34, 611—614.
- 南場毅・竹内徳男. 1977. 酒粕中の醱酵促進物質の分割. *日食工誌* 24(11), 570—575.
- Ziminski, S. A., C. C. Goodwin and R. L. Hill. 1960. The effect of some organic substances on oxygen absorption in bubble aeration. *Tappi.* 43, 1029—1036.