

乳酸菌醱酵에 관한 動力學的研究(第4報)*

—連續培養에 있어서의 動力學的研究—

李 根 泰 · 梁 賢 錫

釜山水產大學 食品工學科

Kinetic Studies of Lactic Acid Fermentation(Part 4)*

—Kinetic Studies on Continuous Cultivation—

Keun-Tai LEE and Hyeun-Suk YANG

Department of Food Science and Technology, National Fisheries University
of Busan, Namgu. Busan, 608 Korea

The behavior of continuous flow culture of *Lactobacillus bulgaricus* was investigated by application of Monod's kinetic model. The parameters obtained from Monod's chemostat theory successfully predicted the behavior of the chemostat. Then, it was found that Monod's kinetics were applicable to the growth rate dependence on glucose concentration.

Under steady-state condition, the maximum growth rate, saturation constant, and wash out were found to be 0.62/hr, 7.69 g/l, 0.51/hr of continuous culture. And the optimum condition for the highest cell production was 0.41/hr in dilution rate, and at that point the cell production rate was 0.178g/l·hr.

緒 論

Lactobacillus bulgaricus 는 유산균 발효공업에 있어서 제품에 독특한 flavor를 제공하는 균종으로 알려져 널리 이용되고 있는 균종의 하나이다. 따라서 그에 대한 연구(Ueno 등 1966, Bills 등 1972, Hägaström 등 1980)도 대단히 활발하다.

그런데 미생물의 생육은 생리적인 특성이나 여러 가지 화학적인 인자에 의한 영향 이외에도 교반동의 물리적특성, 장치의 형태, 배양조건 등에 따라 다양한 변화를 보이는것은 주지의 사실이다(Ueno 등 1966). 특히 호기성 미생물의 경우에는 배양액내의 용존산소의 농도가 미치는 영향이 상당히 크므로 용존산소의 농도를 높이기 위하여 기계적 장치의 효과를 극대화 하려는 노력(Hassan 등 1977, Fukuda 등 19

78, Fujie 등 1980) 이 계속되고 있으며 guaiacol, vanillin 등 phenol 유도체 및 morphine 등의 유기약품 첨가에 의한 호흡능의 증가효과(Romeo 등 1977) 등 생산성을 높이기 위한 적극적인 방법들이 많이 보고되고 있다.

이러한 관점에서 저자들은 전보(Lee 등 1979a, 1979b, 1981)에서 *Lactobacillus bulgaricus* 의 생육에 미치는 온도, pH 및 기계적 교반의 효과와 호흡효소에 미치는 phenol 유도체의 영향을 검토한바 있다.

근년 유산균 음료의 생산 및 소비가 급격히 증가하면서 유산균을 이용한 발효공업은 많은 진전을 보이고 있으나 유산균 제품의 생산공정은 잡균에 의한 오염, mutation의 가능성, 그외의 발효과정에 영향을 미치는 인자 및 동력학적 해명이 불충분한점

* 본 研究는 1981年度 文敎部 學術研究助成費로 이루어진 것임

등의 이유로해서 연속식 보다는 대부분이 회분식배양을 이용하고 있는 실정이다. 그러나 회분식배양은 저생산성, 준비과정 및 유도기와 정상기때의 시간의 낭비등 여러가지 해결하여야할 문제점을 안고있으며 특히 시간의 낭비라는 이유로해서 yeast 생산 및 양조공업등에서는 점차 연속식공정으로 전환되어가는 실정이다. 그런데 반하여 연속배양은 단위장치에 대한 생산성이 높을뿐만 아니라 작업시간의 단축과 중간 및 최종제품의 내용이 일정하다는것 등 여러가지 잇점으로 인하여 멀지않아서 실용화 될것으로 예상된다.

이러한 관점에서 본연구에서는 연속배양에 있어서 Monod의 chemostat 이론의 적용여부 및 동력학적 특성을 규명하기 위하여 전보에서 밝힌바있는 회분식배양에서의 최적조건을 본연속배양에 적용하여 얻은 결과를 보고하는 바이다.

材料 및 方法

1. 使用菌株

일본유업기술협회에서 분양받은 *Lactobacillus bulgaricus*를 skim milk에 수회 계대배양하며 보존하였고, 이것을 연속배양시와 같은 조성의 배지에서 진탕배양 한것을 starter로서 사용하였다.

2. 醱酵用培地

배지의 조성은 Table 1과 같으며 이를 121°C에서 15분간 증기가열멸균하여 사용하였다. 그러나 glucose는 멸균과정중 상호반응에 의한 손실을 막기위하여 별도로 분리하여 멸균하였다.

Table 1. Composition of culture medium

Ingredient	Concentration
K ₂ HPO ₄	1g
KH ₂ PO ₄	1g
MgSO ₄	0.4g
NaCl	0.02g
Fe ₂ SO ₄	2g
Yeast extract	2g
Glucose	40g
Distilled water	1l

3. 醱酵裝置

본실험에 사용한 장치는 Bench Scale Fermentor

(New Brunswick, Model 19)였다. 본장치의 구조는 Fig. 1과 같으며 장치의 조립에 필요한 관은 Tygon tube(R-3603)를 사용하였다.

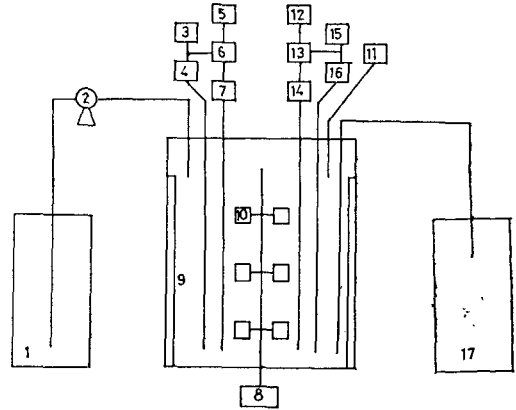


Fig. 1. Schematic diagram of experimental set up.

- | | |
|----------------------------|----------------------------------|
| 1. Feed vessel | 2. Peristaltic pump |
| 3. Alkali solution | 4. Feeding pump |
| 5. Recorder | 6. pH controller |
| 7. pH meter | 8. Motor |
| 9. Baffle plate | 10. Impeller |
| 11. Level controller | 12. Recorder |
| 13. Temperature controller | 14. Thermometer |
| 15. Heat exchanger | 16. Heating & cooling water pump |
| 17. Product receiver | |

4. 培養條件

발효조내에서의 배양조건은 Table 2에 표시하였다. Starter는 24시간동안 진탕배양한것을 사용하였고 pH 자동조절을 위하여 2N NaOH 용액을 pH controller로서 공급하였다. 연속배양의 전단계로서 행한 회분식배양의 조건도 Table 2와 같다.

Table 2. Culture conditions for fermentation

Fermentor volume	7l
Working volume	5l
Agitation	500rpm
pH	5.8
Temperature	45°C

5. 菌體量의 測定

균체량의 측정에는 각각의 희석율(dilution rate)에서 체류시간(retention time)의 4배의 시간이 경과한후 3시간이상 일정한 균체량을 나타낼때 이를 정상

상태값으로 하고 중량법으로 구하였다. 즉 배양액 50 ml를 취하여 0.45 μm의 membrane filter에서 감압여과하고 증류수로서 3회 세척한다음 105°C의 dry oven에서 24시간 건조하여 함량을 구하였다.

6. Glucose의 定量

배양중 배양액중에 잔존하는 glucose는 phenol-H₂SO₄ 法(1957)으로 정량하였다.

結果 및 考察

*Lactobacillus bulgarius*를 이용한 회분 및 연속배양의 결과는 다음과 같다.

1. 回分式培養

연속배양을 행하기 위한 진단계로서 회분배양을 행한 결과는 Fig. 2와 같다. 균체량은 배양시작후 6시간 이후부터 증가하기 시작하여 16시간 경과후부터 정상기에 도달하였고 대수기의 균체량으로부터 구한 최대비증식속도는 0.52 hr⁻¹ 이었다(pirt, 1975). 배양과정중 pH의 조절을 위하여 공급된 2N NaOH 소비량으로부터 유산의 생성량을 추정할수 있었으며 균체의 증식에 따른 유산의 생성은 증식관련형임을 보여준다. 그리고 배양 24시간이 경과된후의 잔당농도는 4.5 g/l였다.

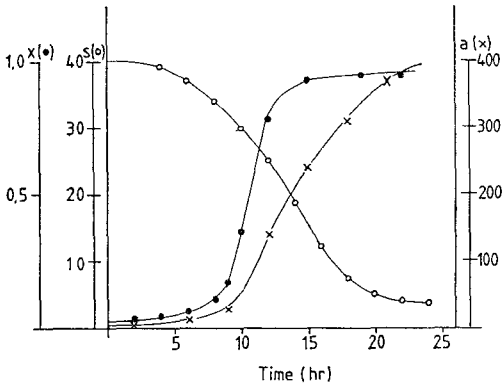


Fig. 2. The time course of glucose consumption, S(g/l), cell concentration, X(g/l), and acid production, a(ml/l).

2. 連續培養

Parameter의 決定

각각의 회석율에 따른 정상상태(steady-state val-

ue) 값은 Table 3과 같으며 parameter의 결정방법은 Oliva등(1979)이 이용한 double reciprocal Lineweaver-Burk plot를 사용하였다.

Table 3. Steady-state values for continuous cultivation of *L. bulgarius* on the present medium(glucose 40 g/l)

Dilution rate (hr ⁻¹)	Glucose concn in fermentor (g/l)	Cell concn (g/l)	Yield coef-ficient (g/l)	Cell production rate (g/l·hr)
0.102	3.0	0.55	0.015	0.056
0.190	3.6	0.53	0.015	0.101
0.331	7.0	0.46	0.014	0.152
0.414	16	0.43	0.018	0.178
0.452	26	0.34	0.017	0.154
0.490	34	0.10	0.017	0.050

즉

$$D^{-1} = \left(\frac{K_s}{V_{max} \cdot S_0} \right) \left(\frac{S}{S_0} \right)^{-1} + \frac{1}{V_{max}} \quad (1)$$

여기서

D=dilution rate, hr⁻¹

K_s=saturation constant, g/l

V_{max}=maximum growth rate, hr⁻¹

S₀=glucose concentration in the feed vessel, g/l

S=glucose concentration in the fermentor, g/l

이다.

(1)식에 의하여 D⁻¹와 (S/S₀)⁻¹을 plot한 결과는 Fig. 3과 같으며 이때 기울기와 절편은 최소자승법

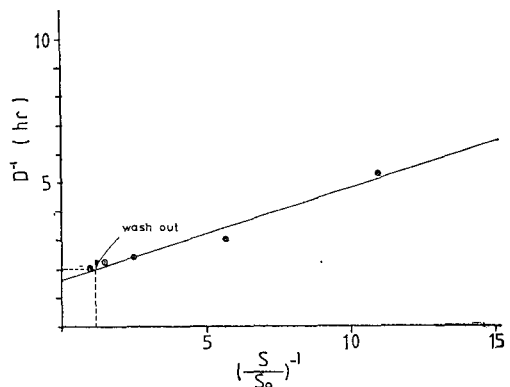


Fig. 3. Lineweaver-Burk plot of dilution rate versus relative glucose concentration. S₀=40g/l.

(least square method)으로서 구하였다. Fig. 3에서 최대비증식속도(V_{max})는 D^{-1} 축의 절편으로부터 0.62 hr^{-1} 로 나타났고 saturation constant(K_s)는 직선의 기울기로 부터 7.69 g/l 로 나타났다. 그리고 $\frac{S}{S_0} = 1$ 일때의 D^{-1} 값으로부터 구하여진 washout는 0.51 hr^{-1} 으로서 비교적 V_{max} 값으로부터 떨어져 있다. 이러한 현상은 직선의 기울기가 큰것에 기인하므로 결국 배양액중의 기질농도가 높기때문이거나 또는 기질의 감소속도가 늦기때문이라고 생각된다. wash out는 회분식 배양결과에서 나타난 최대비증식속도 0.52 hr^{-1} 와 거의 같은 값을 나타내었으며 이때의 최대비증식속도 (V_{max})와 연속배양시의 회석율에 따른 균체량의 관계는 Fig. 4와 같다. 즉, 연속배양에서 구한 wash out와 회분식 배양에서의 최대비증식속도가 거의 같은값을 보이고 있으며 회석율이 감소함에 따라서 균체량이 증가되는 경향으로 보아서 본실험 model은 Monod의 chemostat 이론과 (Pirt, 1975) 좋은 연관을 보인다는것을 알수있다.

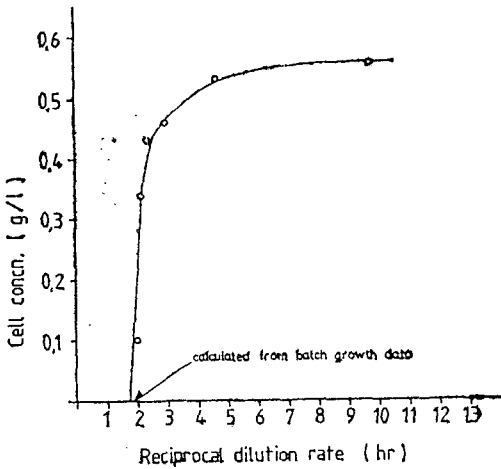


Fig. 4. Determination of maximum growth rate in continuous cultivation.

Cell Yield Coefficient 및 Cell Production Rate 각각의 회석율에 따른 yield coefficient 및 cell production rate는 Table 3과 같다. yield coefficient는 회석율이 높을수록 증가하는 경향을 보이다가 wash out 부근에서는 감소하는 경향을 보이고 있다. 이것은 불충분한 교반, 배양중 생성된 배양액내의 고형물량의 증가, 제한기질인 glucose 농도의 영향으로 생각되며 이러한 현상은 Tramer(1973), Bills 등 (1972), Humphrey 등 (1965)에 의하여 보고된바 있다. 본 실험에서는 이들값의 산술평균값

0.016 g/l 를 yield coefficient로서 사용하였다. 그리고 cell production rate는 0.049 $g/l \cdot hr$ 에서부터 0.178 $g/l \cdot hr$ 까지의 분포를 보이고 있으며 0.718 $g/l \cdot hr$ 일때의 회석율은 0.414 hr^{-1} 이므로 본 연속배양 model에서의 최적운전조건은 회석율이 0.414 hr^{-1} 일때이다.

Monod의 Chemostat 이론과의 연관

이상에서 구한 parameter에 의한 Monod의 chemostat 이론값과 실험에 의한 측정값과의 연관은 Fig. 5와 같다. Fig. 4에서도 예상되었던 바와 같이 Fig. 5는 이론값과 실험값과의 좋은 연관을 보이고 있다.

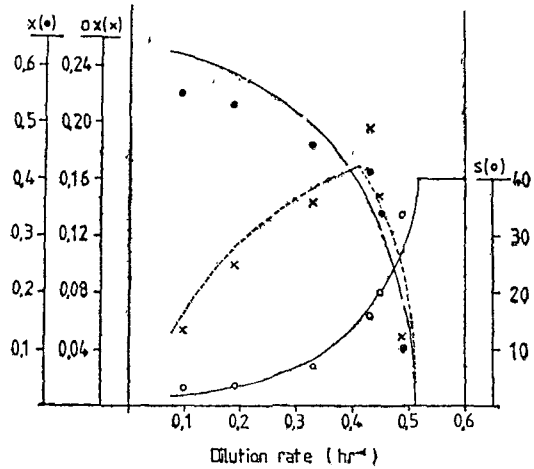


Fig. 5. Comparison of experimental(marks) and theoretical(lines) results. Symbols: the cell production rate is $DX(g/l \cdot hr)$, and the others are the same as in Fig. 2.

그러나 균체량은 회석율이 낮을때와 wash out 부근에서는 상당한 차이를 나타내고 있다. 이는 역시 parameter를 구할때 밝힌바와 같이 주로 배양액중의 glucose 농도에 기인한다고 생각된다. Bills 등(1972)이 보고한바에 의하면 유산균의 증식에 있어서 배양액내의 sucrose 농도가 4% 이상 일때 증식의 지연 현상이 나타난다고 보고하였으며 Stocklin(1969)과 Ueno 등 (1966)도 8~10.5%에서 같은 효과가 나타난다고 보고하였다. 한편 Tramer(1973)은 *Lactobacillus bulgaricus*는 특히 배양액중의 고형물의 농도에 민감하며 24% 정도의 고형물 농도에서 증식의 지연현상이 나타난다는것을 보고하였다. 또 Sinclair 등 (1975)은 *Candida utilis*의 연속배양에 있어서 이와 비슷한 현상을 보고하였다. 즉 제한기질의 농도를 0.2 g/l 에서 5 g/l 까지 변화시켰을 경우 고농도 부분에서 균체량의 실험값과 이론값과는

상당한 오차를 보이고 있다고 지적하였다. 그러므로 제한기질의 농도가 높은 경우에는 Monod의 chemostat 이론을 적용시키기 위하여서는 충분한 검토가 행해져야 할것으로 생각된다.

要 約

*Lactobacillus bulgaricus*를 glucose를 제한기질로 하는 합성배지에서 連續培養한 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 본실험 model은 Monod의 chemostat 이론을 적용시킬수 있다.
2. 본실험 model에서의 최대 cell production rate는 0.178 g/l·hr로서 회색율 0.414hr⁻¹ 일때이다.
3. 연속배양 결과 saturation constant(K_s)는 7.69 g/l, 최대비증식속도(V_{max})는 0.62 hr⁻¹ 이었다.
4. wash out 현상은 0.51 hr⁻¹에서 일어났으며 cell yield coefficient는 0.016 g/l 이었다.

文 献

Bills, D. D., Yang, C. S., M. E. Morgan and F. W. Bodyfelt. 1972. Effect of sucrose on the production of acetaldehyde and acid by yoghurt culture bacteria. J. Dairy Sci. 55, 1570—1573.

Dubois, M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers and F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 28, 350.

Fujie, K., N. Ishihara, and H. Kubota. 1980. Mass transfer coefficient of dispersed fine bubble in electrolytic solution, J. Ferment. Technol. 58(5), 477—484.

Fukuda, H., T. Shiotami, W. Okada and H. Morikawa. 1978. Oxygen transfer in a new tower bioreactor containing a draft tube and perforated plates. J. Ferment. Technol. 56(6), 619—625.

Hägaström, M. H. and N. L. Molin. 1980. Factors regulating product formation in *Streptococcus lactis*. 6th International

Ferment. Sym. held in London, Canada, July 20—25.

Hassan, I. T.M. and C. W. Robinson. 1977. Oxygen transfer in mechanically agitated aqueous systems containing dispersed hydrocarbon. Biotechnol. Bioeng. 19, 661—682.

Lee, K. T. and B. H. Han. 1979a. Kinetic studies of lactic acid fermentation(part 1). Effect of mechanical agitation on fermentation. Bull. Korean Fish. Soc.12(3), 155—160.

Lee, K. T., M. S. Lee and B. H. Han. 1979b. Kinetic studies of lactic acid fermentation (part 2). Influence of temperature on fermentation. Bull. Korean Fish. Soc.12 (3), 161—166.

Lee, K. T. and H. S. Yang. 1981. Kinetic studies of lactic acid fermentation(part 3). Effect of phenol derivatives on fermentation. Bull. Korean Fish. Soc.14(4), 212—216.

日本化學會編. 1957. 實驗化學講座. Vol. 23, p. 421. 丸善·東京.

Oliva, R. U. and Y. D. Hang. 1979. Continuous removal of lactic acid from wastewater by *Candida utilis*. Appl. and Environ. Microbiol. 38(5), 1027—1028.

Pette, J. W. and H. Lolkema. 1950. Yoghourt. 1. Symbiosis and antibiosis in mixed cultures of *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. Neth. Milk Dairly J. 4, 197—208.

Pirt, S. J. 1975. Principles of microbe and cell cultivation. 4—14. Jhon Wiley & Son, New York.

Romeo, J., M. Scherage and W. W. Umbreit. 1977. Stimulation of the growth and respiration of a methylotrophic bacterium by morphine. Appl. and Environ. Microbiol. 34, 611—614.

Sinclair, C. G. and D. N. Ryder. 1975. Models for the continuous culture of microorganisms under both oxygen and carbon limiting

- condition. *Biotechnol. Bioeng.* 17, 375—398.
- Stocklin, P. 1973. The production and handling of yoghurt on a commercial scale. *Cult. Dairyprod. J.* 4(3), 6.
- Tramer, T. 1973. Yoghourt cultures. *J. Soc. Dairy Technol.* 26, 16—21.
- Ueno, J., R. Hanabusa,, R. Nakai, K. Musashi, S. Kaneko, and M. Kanbe. 1966. Studies on continuous yoghurt manufacture : its equipment and microbiological problems. 17th Int. Dair. Congr. F.617.