

Acetobacter aceti菌의 深部培養에 의한 醋酸醱酵의 動力學的 研究

金相武 · 李根泰*

江陵大學校 水産資源開發學科

*釜山水産大學校 食品工學科

Kinetic Studies on Submerged Acetic Acid Fermentation of *Acetobacter aceti*

Sang-Moo KIM and Keun-Tai LEE

Department of Fisheries Resources Development KangNung National University,
Kangnung 210-702, Korea

*Department of Food Science and Technology National Fisheries University of Pusan
Pusan 608-737, Korea

In order to determine the optimal conditions for the process of acetic acid fermentation, the kinetics of *Acetobacter aceti* fermentation in submerged batch cultures were studied at different agitation speeds and air flow rates.

The maximum cell concentration was noted after about 48 hr fermentation and the time course of *Acetobacter aceti* fermentation showed a distinct feature of growth-associated product formation.

At agitation speeds 700, 500, and 300 rpm fixed on air flow rate 1 v/v/M, specific growth rates were 3.97×10^{-2} , 3.82×10^{-2} , and $2.04 \times 10^{-2} \text{ hr}^{-1}$, saturation constants were 61.4, 64.6, and 69.4 mg/ml, and volumetric oxygen transfer coefficients were 0.9337, 0.4468, and 0.1701 min^{-1} , respectively. At air flow rates 1.25, 1.00, and 0.75 v/v/M fixed on agitation speed 500 rpm, specific growth rates were 3.90×10^{-2} , 3.82×10^{-2} , and $2.37 \times 10^{-2} \text{ hr}^{-1}$, saturation constants were 63.4, 64.6, and 64.9 mg/ml, and volumetric oxygen transfer coefficient were 0.4923, 0.4468, and 0.3509 min^{-1} , respectively.

結 言

醱酵産業에 있어서 微生物의 成長은 基質의 濃度 이외에 醱酵裝置 및 操作條件에 따라 많은 차이가 있다.

微生物의 增殖 및 代謝에 影響을 미치는 많은 要因들 가운데서 好氣性醱酵에 있어서는 酸素의 效果에 對한 研究에 重點을 두고 있다. 即, 酸素는 反應의 制限因子이고, 酸素가 液體속으로 移動하는 速度는 微生物의 增殖 및 代謝에 큰 影響을 미치며, 醱酵裝置의 設計와 條件에 重要한 因子로 다루고

있다. 氣體에서 液體로 移動하는 酸素의 移動裝置를 크게 나누어, 酸素의 溶液에 대한 物理的인 吸收와 菌體의 溶存酸素消費速度로 나누어 생각할 수 있으나 많은 實驗 結果 溶液에 對한 物理的인 吸收는 律速으로 알려져 있다. 따라서 氣泡의 크기 및 上昇速度, 氣泡과 溶液의 接觸時間 및 氣泡의 分布 등과 機體-液體의 接觸面에 있어서 境膜抵抗 및 微生物 分子層 등이 酸素移動에 影響하는 重要한 因子로 간주되고 있다.

微生物은 종종 pellet를 形成한다. 形成된 pellet는 菌體가 增殖함에 따라 成長하여 培養液의 密度를

높게 하여 酸素가 液體속으로 移動하는 것을 妨害하는 要因이 되어 結局에는 微生物의 呼吸活性을 阻害하게 된다. 따라서 一般적으로 이런 阻害要因을 防止하고 酸素의 移動速度를 빠르게 하여 培養液中的 溶存酸素濃度를 增加시켜 醱酵增進效果를 얻으려는 研究를 많이 하고 있다.

이들 研究로는 酸素의 溶解速度를 促進시키는 方法으로서 Hanssan 등(1977)의 機械的인 攪拌, Ho 등(1977)의 air lift fermentation, 그리고 Phillips and Johnson(1961)의 horizontal rotating fermentation 등의 方法들이 있다.

本 實驗에서는 醋酸醱酵工程의 最適條件을 決定하기 위하여 醋酸生成力은 強하나 ethanol을 自화하지 못하는 特性을 가진 *Acetobacter aceti sub-sp. orleanensis* 菌을 使用하여 醱酵에 미치는 機械的인 攪拌과 通氣의 影響을 分析하였다.

材料 및 方法

1. 使用菌株

本 實驗에 使用한 菌株는 *Acetobacter aceti sub-sp. orleanensis* IFO 13752이며 이를 本 實驗에 使用한 培地와 같은 組成의 培地에서 數回 繼代培養하여 使用하였다.

2. 醱酵用培地

醱酵用 培地의 組成은 Table 1과 같으며 이를 121°C에서 15分間 蒸氣 加熱하여 使用하였으며 糖은 별도로 121°C에서 10分間 加熱 殺菌하여 使用하였다.

Table 1. Composition of culture medium.

Dextrose	80g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1g
KH ₂ PO ₄	1g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.25g
Yeast extract	2g
Distilled water	1l

3. 醱酵裝置

本 實驗에 使用한 裝置는 Bench Scale Fermentor, Model 19(New Brunswick, U. S. A.)를 使用하였으며 여기에 溫度自動調節裝置와 pH controller,

D. O. meter, Air filter 및 Dual channel Recorder, Model R-12(Rikadenki Kogyo Co. Ltd., Japan)을 附着하여 使用하였다.

4. 培養條件

醱酵曹內에서의 培養條件을 Table 2와 같이 하였다. 種菌培養은 本 培養과 同一組成의 培地에서 24時間 振湯培養하였으며 이 菌體를 本 培養液에 吸光度가 0.05 되도록 懸탁하여 使用하였다.

Table 2. Culture conditions for fermentation.

Fermenter volume	7l
Working volume	4l
pH	5.0
Temperature	30°C
Agitation speed	300, 500, 700 r.p.m.
Aeration speed	1.25, 1.00, 0.75 v/v/M

5. 菌體量의 測定

一定時間마다 培養液 一定量을 취하여 必要에 따라 稀釋하여 吸光度가 0.1~0.5 되도록 調節한 후 spectrophotometer, ANA-75(Tokyo Photoelectric Co., Japan), 610nm에서 測定하였다. 菌體量은 吸光度에 稀釋倍數를 곱하여 Ultimate optical density (UOD)/1ml로 表示하였다.

6. 糖의 定量

남아있는 糖은 Phenol-H₂SO₄法(李 · 李, 1978)으로 定量하였다. 即, 80% phenol溶液 0.05ml에 糖含量이 1ml당 10~70μg되게 稀釋한 試料 2ml를 넣은 다음에 진한황산 5ml를 加하여 25°C에서 30分間 放置한 다음 490nm에서 吸光度를 測定하여 標準品과 比較 定量하였다.

7. 酸素移動容量係數(K_L)의 測定

醱酵中の 酸素移動容量係數의 決定은 degassing dissolved oxygen trace technique(Wang and Humphrey, 1968)로서 測定하였다. 即, 培養中에 通氣를 中斷하면 溶存酸素의 變化速度는 直線的으로 減少하여 (1)式으로 表示된다.

$$dC/dt = -rm \tag{1}$$

단, C: 酸素移動量, mg/l; t: 時間, min; r: 單位時間當 酸素消費速度常數, min⁻¹; m: 培養液中的 菌體濃度, mg/l.

다시 通氣하였을 때의 溶存酸素濃度の 變化를 다음과 같이 나타낼 수 있다.

$$dC/dt = K_{La}(C_s - C_t) - rm \quad (2)$$

단, K_{La} : 酸素移動容量係數, min^{-1} ; C_t : 培養液中의 酸素濃度, mg/l ; C_s : 實驗條件에서 培地の 飽化濃度, mg/l .

(2)式을 初期條件으로 $t=0$ 및 $C_t=C_0$ 로 하여 積分하면,

$$K_{La}(C_s - C_t) - rm = \{K_{La}(C_s - C_0) - rm\}e^{-K_{La}t} \quad (3)$$

이때, 時間이 충분히 經過하면 (3)式의 우변은 0에 가까워지므로 이때의 溶存酸素濃度を C라고 하면 (4)式으로 나타낼 수 있다.

$$K_{La} = rm / (C_s - C) \quad (4)$$

즉, 培養中 通氣를 일시 멈추면, 溶存酸素의 減少速度는 rm 과 같고, 또 頂上에 이르렀을 때의 溶存酸素濃度は C가 된다. 菌體를 除外한 培地에서 C_s 를 測定해 두고 (4)式에서 K_{La} 를 구하였다.

8. 細菌의 增殖速度와 Saturation constant(K_s)의 決定

最大比增殖速度(μ_{max})와 Saturation constant(K_s)를 1回 醱酵로서 決定하는 方法으로 醱酵反應系에 適用하는 Michaelis-Menten式과 같은 Monod(1949)式의 積分型을 使用하였다. 即, 細菌增殖의 動力學的 解析에는 아래의 경험적인 Monod式이 利用된다.

$$\mu = 1/x \cdot dx/dt = \mu_{max} \cdot S / (K_s + S) \quad (5)$$

where, μ : specific growth rate, hr^{-1} ; μ_{max} : maximum specific growth rate, hr^{-1} ; S: concentration of substrate, mg/ml ; K_s : saturation constant, mg/ml .

式(5)를 制限氣質의 消費速度(dS/dt)로 表示하면 다음과 같다.

$$\mu_{max} dt = -(K_s + S) / S \cdot ds \quad (6)$$

式(6)을 醱酵始作時間(t_0)에서 임의의 時間(t)까지, 氣質의 初期濃度(S_0)에서 임의의 時間 t 에서의 濃度(S)까지 積分하면,

$\int_{t_0}^t \mu_{max} \cdot dt = -\int_{S_0}^S (K_s + S) / S \cdot dS$ 로 나타내어진다 (Strayer and Tiedje, 1978).

이때, μ_{max} 및 K_s 는 常數이므로,

$\mu_{max} \int_{t_0}^t dt = -K_s \int_{S_0}^S dS/S - \int_{S_0}^S dS$ 로 表示된다. 이것을 이항정리하면,

$$\mu_{max} \cdot t = -K_s \ln S/S_0 - (S - S_0) \quad (7)$$

로 된다. 式(7)을 다시 정리하면 式(8)과 같이 된다.

$$1/t \ln S_0/S = -1/K_s (S_0 - S) / t + \mu_{max} / K_s \quad (8)$$

式(8)에서 y축에 $-1/t \ln S_0/S$, x축에 $(S_0 - S) / t$ 로 圖式하여 μ_{max} 및 K_s 를 구하였다.

結果 및 考察

1. 菌體의 增殖

通氣速度를 $1v/v/M$ 으로 固定하고 攪拌速度를 달리했을 때와 攪拌速度를 500rpm으로 固定하고 通氣速度를 달리하였을 경우의 菌體增殖를 각각 Fig. 1과 Fig. 2에 表示하였다. 菌體는 培養 48時間에 停滯期에 도달하였으며 그때의 最終菌體量은 攪拌速度 700, 500 및 300rpm에 있어서는 4.9, 4.0 및 1.75 UOD/ml이었으며, 通氣速度 1.25, 1.00 및 0.75v/v/M에서는 각각 4.5, 4.0 및 2.68UOD/ml이었다. 攪拌는 基質과 微生物의 衝突回數를 增加시켜 微生物의 增殖, 氣質의 消費 및 生産物의 生成을 促進하며 液內의 各成分의 濃度を 均一하게 維持시키며 液

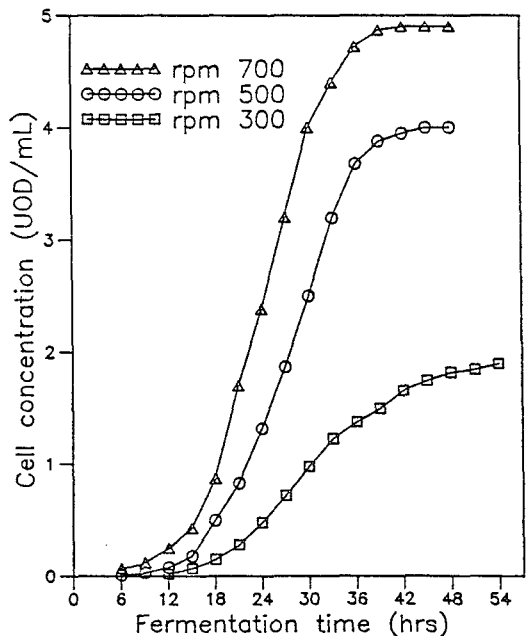


Fig. 1. Growth curve of *Acetobacter aceti* at different agitation speeds.

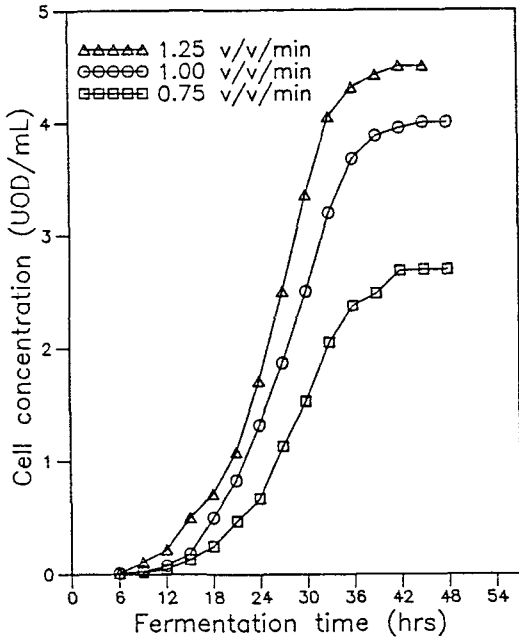


Fig. 2. Growth curve of *Acetobacter aceti* at different air flow rates.

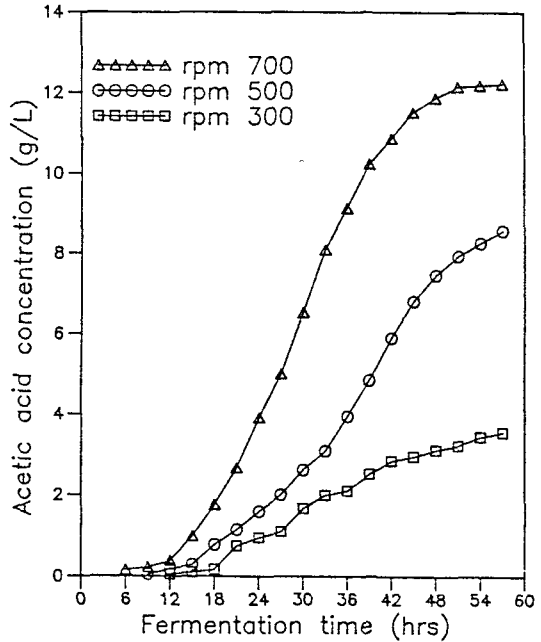


Fig. 3. Effect of agitation speeds on acid production of *Acetobacter aceti*.

面을 통한 酸素移動에 큰 影響을 미쳐 醱酵效果를 增進시키는 作用을 한다(Hansson and Robinson, 1977).

通氣에 의한 醱酵增殖은 어느 程度까지는 通氣量이 增加함에 따라 酸素移動量이 增加하여 微生物의 成長이 增大하나, 微生物이 利用할 수 있는 酸素量은 限定되어 있기 때문에 餘分의 量은 利用되지 못하고 排出되어 버리게 되어 浪費가 되므로 適當한 攪拌과 通氣를 행하는 것이 重要하다(Ho 등, 1977; phillips and Johnson, 1961).

2. 醋酸의 生成

糖의 分解로 生成되는 醋酸의 生成傾向을 알기 위해 pH 測定裝置와 自動調節裝置에 의하여 醱酵槽内の pH를 一定하게 維持시키기 위하여 供給된 1N NaOH量을 醋酸量으로 換算한 것을 역시 Fig. 3 및 Fig. 4에 表示하였다.

培養 48時間에서의 酸生成量은 攪拌速度 700, 500 및 300rpm일 때 11.82, 7.26 및 5.28g/l이었으며, 通氣速度 1.25, 1.00 및 0.75v/v/min일 때는 각각 10.3, 8.4 및 6.1g/l이었다. *Acetobacter aceti*菌의 酸生成傾向은 菌의 增殖과 비슷한 데, 이로 보아 *Acetobacter aceti*菌은 增殖關聯型 菌이라는 것을 알 수 있으며 攪拌速度 및 通氣速度가 빠를수록 醋酸生成量은 增加하였다.

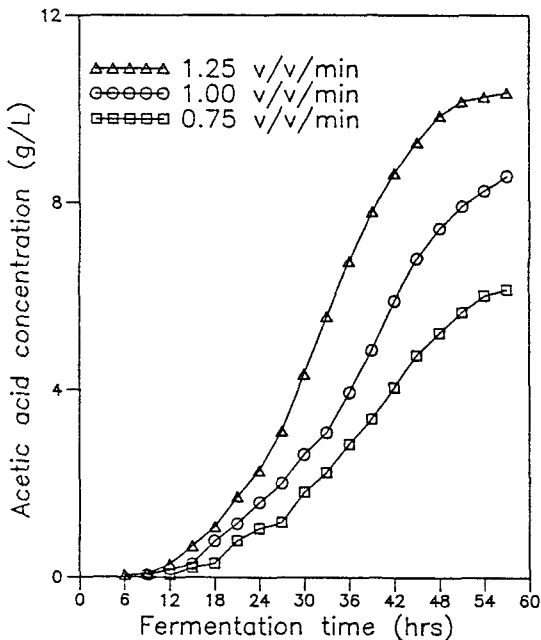


Fig. 4. Effect of air flow rates on acid production of *Acetobacter aceti*.

3. 糖의 消費

攪拌 및 通氣速度를 달리했을 때의 糖의 消費를

각각 Fig. 5 및 Fig. 6에 表示하였다. 糖의 消費速度는 菌體增殖이 빠를 수록 즉, 攪拌 및 通氣速度가 높을수록 빨랐으며, 培養 48時間까지는 消費速度가 增加하였으나 그 後는 서서히 減少하는 傾向을 나타내었으며 培養 48時間에 消費된 糖量은 攪拌速度 700, 500 및 300rpm에 있어서는 51.5, 44.9 및 32.5g/l이었으며, 通氣速度 1.25, 1.00 및 0.75v/v/M에서는 각각 49.9, 44.9 및 35.0g/l이 消費되었다.

4. 細菌의 增殖速度와 Saturation constant(Ks)

最大比增殖速度(μ_{max})와 Saturation constant(Ks)를 1回 醱酵로서 決定되는 方法으로 Monod(1949)式의 積分型을 使用하여 Fig. 5와 Fig. 6에서의 糖의 消費結果를 $-1/t \ln S_0/S$ 에 對해 $(S_0 - S)/t$ 를 圖示하여 使用하였다. 여기에서 구한 μ_{max} 값과 K_s 값은 Table 3 및 4에 나타내었다.

攪拌 및 通氣速度를 增加하였을 때에 最大比增殖速度(μ_{max})는 增加하였으나 Saturation constant(Ks)는 減少하였다.

5. 酸素移動容量係數(K_{La})의 變化

酵素中에 測定한 酸素移動容量係數의 값을 Table 5에 表示하였다. 攪拌과 通氣에 의한 K_{La} 의 差異가 아주 크다는 것을 알 수 있다. 가스吸收速度는

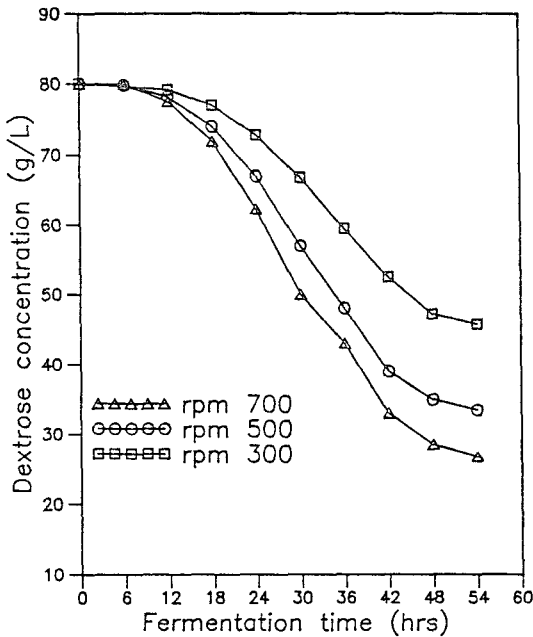


Fig. 5. Dextrose consumption of *Acetobacter aceti* at different agitation speeds.

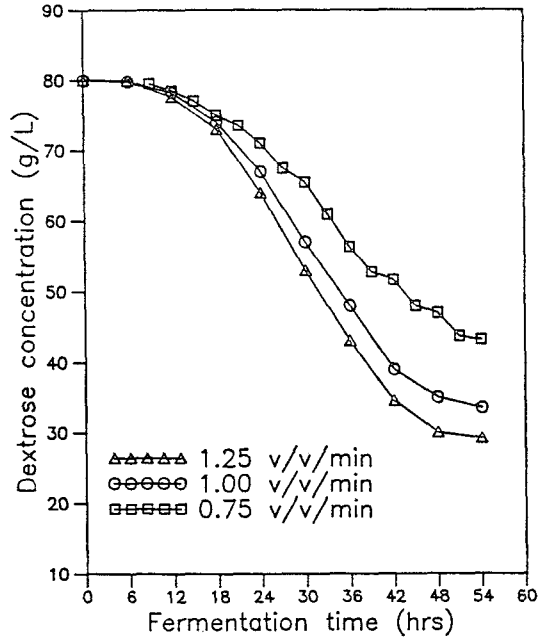


Fig. 6. Dextrose consumption of *Acetobacter aceti* at different air flow rates.

細胞의 不活性運動에 의하여 氣體-液體 表面의 바로 근처에 있는 攪拌에 의하여 加速化된다고 하였으며(Aiba and Yamada, 1961), 微生物의 細胞가 液體로 酸素移動係數에 상당한 影響을 미친다고 했으나 本 實驗에서는 별 影響이 없는 것으로 나

Table 3. The effects of agitation speeds on μ_{max} and K_s .

Agitation speeds (r.p.m.)	μ_{max} (hr^{-1})	K_s (mg/ml)
700	3.97×10^{-2}	61.4
500	3.82×10^{-2}	64.6
300	2.04×10^{-2}	69.4

Table 4. The effects of air flow rates on μ_{max} and K_s .

Air flow rates (v/v/min)	μ_{max} (hr^{-1})	K_s (mg/ml)
1.25	3.90×10^{-2}	63.4
1.00	3.82×10^{-2}	64.6
0.75	2.37×10^{-2}	64.9

Table 5. Calculated volumetric oxygen transfer coefficient data for the growth of *Acetobacter aceti* at different agitation speeds and air flow rates.

Agitation speeds (r.p.m.)	UOD	K_{La} (min^{-1})	Air flow rates (v/v/min)	UOD	K_{La} (min^{-1})
700	1.39	0.5937	1.25	0.30	0.4923
500	0.72	0.4468	1.00	0.72	0.4468
300	0.13	0.1701	0.75	0.20	0.3259

타났다. Kataoka 등(1979)은 呼吸速度는 溶存酸素와는 無關하며 液體로의 酸素移動은 微生物의 死滅細胞와 生細胞 등의 存在에 의하여 거의 影響을 받지 않는다고 했는데, 이들 差異의 要因은 表面作用을 지니는 有機物質과 같은 汚染物의 存在에 의한 것으로 보인다고 報告하였다. 왜냐하면 氣體吸收速度는 氣體-液體 사이의 接觸面의 汚染에 의하여 주로 影響을 받는 것으로 알려져 있기 때문이다.

要 約

醋酸醱酵能이 強하고 強好氣性菌인 *Acetobacter aceti*菌의 醋酸醱酵에 있어서 攪拌과 通氣速度를 달리했을 때의 醱酵에 미치는 影響을 要約하면 다음과 같다.

- 1) 攪拌 및 通氣를 달리했을 때에 菌의 增殖, 酸生成 및 氣質消費는 상당한 差異가 있었으며 培養 48時間에 菌體는 停滯期에 到達하였다.
- 2) *Acetobacter aceti*菌의 酸 醱酵傾向은 增殖關聯型이었다.
- 3) 通氣速度는 1v/v/M일 때, 攪拌速度 700, 500 및 300rpm에서의 最大比增殖速度는 각각 3.97×10^{-2} , 3.82×10^{-2} 및 $2.04 \times 10^{-2} \text{ hr}^{-1}$ 이었으며, saturation constant(Ks)는 61.4, 64.6 및 69.4mg/ml, 그리고 酸素移動容量係數는 각각 0.9337, 0.4468 및 0.1701 min^{-1} 이었다.
- 4) 攪拌速度 500rpm일 때, 通氣速度 1.25, 1.00 및 0.75v/v/M에서의 最大比增殖速度는 각각 $3.90 \times$

10^{-2} , 3.82×10^{-2} 및 $2.37 \times 10^{-2} \text{ hr}^{-1}$, saturation constant(Ks)는 63.4, 64.6 및 64.9mg/ml, 酸素移動容量係數는 각각 0.4923, 0.4468 및 0.3509 min^{-1} 이었다.

參 考 文 獻

Aiba, S. and T. Yamaha. 1961. Oxygen absorption in bubble aeration. J. Gen. Appl. Microbiol., 7, 100~107.

Hanssan, 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 fermenter. Biotech. Bioeng., 19, 1503~1522.

Kataoka, H., H. Taketomi, S. Mukataka, and J. Takahashi. 1979. Influence of microbial cells on oxygen absorption rate in wetted-wall column. J. Ferment. Technol., 57(5), 468~473.

李京熙 · 李根泰. 1978. 醱酵曹中の 細菌 成長에 미치는 phenol 誘導體의 影響. 韓水誌, 11(4), 213~217.

Monod, J. 1949. The growth of bacterial cultures. Ann. Rev. Microbiol., 3, 371~377.

Phillips, D. H. and M. S. Johnson. 1961. Measurement of dissolved oxygen in fermentations. J. Biochem. Microbial. Technol. Eng., 3, 261.

Strayer, R. F. and J. H. Tiedje. 1978. Kinetic parameters of the conversion of methane precursors to methane in a hypereutrophic lake sedimentation. Appli. Environ. Microbiol., 36, 330~340.

Wang, D. I. C. and A. E. Humphrey. 1968. Development in agitation and aeration of fermentation system. Hockenhull ed., Progress in Industrial Microbiology. CRC press, 8, 934.

1991년 10월 29일 접수
1992년 7월 4일 수리