

醱酵槽中の細菌成長에 미치는 Phenol 誘導體의 影響

李 京 熙* · 李 根 泰**

EFFECTS OF PHENOL DERIVATIVES ON BACTERIAL GROWTH

Kyung-Hee LEE* and Keun-Tai LEE**

Henri-Michaelis-Menten model for predicting the behavior of culture of *Brevibacterium flavum* under carbon limiting condition has been evaluated on a chemostat growing in the presence of the phenol derivatives: guaiacol, o-vanillin and vanillin. It is found that Henri-Michaelis-Menten model could be applicable to the evaluation of the growth rate of cells in the phenol derivatives.

The marked enhancing abilities of the cells treated by the phenol derivatives during fermentation were ascribed to the formation of charge-transfer complex between the phenol-derivatives and oxygen which supplies oxygen effectively to the fermentation system.

緒 論

미생물 발효에 있어서 중요한 變數로는 기질의 감소, 대사산물의 축적, 중간체의 생성 또는 소실, 균체농도 등을 들수있다.

이러한 變數들을 수학적 모형으로 설명한다는 것은 매우 어려운 문제이지만 필요한 것이다.

미생물체의 수학적 모형은 여러가지가 보고되고 있으나 대표적인 것으로는 Michaelis-Menten식과 유사한 실험식인 Monod(1949) 식 즉 $\mu = \frac{\mu_{max} S}{K_s + S}$ 가 가장 많이 활용된다.

이 식에서 μ 는 계증식속도, μ_{max} 는 최대비증식속도, K_s 는 Saturation Constant, S 는 제한기질의 농도이다.

이 식의 합리적 해석은 많이 있으나 생체내에서 일어나는 복잡한 대사과정이 각각 다른 동력학적 형태를 가지고 있으므로 미생물의 성장속도를 간단한 식으로 해석한다는 것은 어려운 점이었다.

미생물의 성장은 제한기질 이외에도 대사산물의 축적과 균체농도, 산소등에 의해 크게 영향을 받는다. 그러나 이러한 제한된 醱酵進行을 계속적으로 진행시키기 위한 方法의 하나로써 약품첨가의 영향을 시도하고 있다.

즉 野田等(1976)은 alcohol발효, 장유발효, 酵母類 및 數種의 미생물은 菌體濃度와 대사산물의 농도가 比較的 높아도 이들에 크게 억제받지않고 增殖함을 관찰 하였다.

그들은 이들 발효 생산물중에서 n 전자 doner인 phenol 유도체중 guaiacol, vanillin, o-vanillin등을 分離 檢出하였으며 이들 화합물의 존재나 처리로 미생물의 발효속도가 증가하고 호흡량의 증가한다는 것을 밝혔으며 南場等(1977)은 酒粕中 초산균의 발효촉진물질로써 n 전자 doner인 glycerol을 分離同定하여 이 물질을 발효촉진제라고 발표하였다.

또 Romeo등(1977)은 발효에 있어서 morphine 및 codeine의 첨가로써 세균성장과 호흡증가 현상이 두드러짐을 관찰하였다. 그래서 억제 인자로서 대사물

* 釜山大學校 藥學大學, College of Pharmacy, Busan National University.

** 釜山水產大學 食品工學科, National Fisheries University of Busan.

의 존재내지 높은 세균농도에 의해서도 세균 성장이 나 발효 및 호흡증가는 phenol 유도체나 glycerol 또는 morphine의 존재하에서 진행될수 있다는 것을 발견하였다.

따라서 phenol 유도체나 glycerol 및 morphine등의 세균처리가 호흡능의 증가를 유발하여 그결과 세균성장의 촉진에 따르는 대사산물의 생성촉진을 유도할수 있으리라 생각된다.

그리하여 산소요구량이 많고 glutamin산 발효 능력이 있는 *Brevibacterium flavum*의 guaiacol, vanillin, o-vanillin의 존재하에서 처리한 균과 처리하지 않는 균과의 glutamin산 발효에 응용하고자 세균성장의 영향에 대하여 관찰하고 그 결과를 비교 검토하였다.

材料 및 方法

1) 理 論

細菌增殖의 動力學的 해석에는 아래의 경험적인 Monod式이 利用된다.

$$\mu = \frac{dx}{dt} = \frac{\mu_{max} S}{K_s + S} \dots\dots\dots(1)$$

- 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]

그러나 이식에서 μ , μ_{max} 및 K_s 를 구하는 데는 基質의 濃度を 달리한 同一條件의 실험을 반복하여야 하는 어려움과 실험오차 및 재현성 등의 문제점이 있다. 그러므로 本實驗에서는 回分醱酵槽內에서 μ_{max} , K_s 를 쉽게 결정하는 方法으로써 효소반응계에 적용하는 Henri-Michaelis menten (1976)식과 같은 Monod式의 적분형에서 μ_{max} 및 K_s 값을 구하였다.

식(1)을 제한기질의 消費速度 $\left\{ \frac{ds}{dt} \right\}$ 로 표시하면 다음과 같다.

$$\mu_{max} dt = - \frac{K_s + S}{S} dS \dots\dots\dots(2)$$

식(2)를 발효시작 時間(t_0)에서 임의의 時間(t)까지 기질의 초기농도(S_0)에서 임의 時間 t 에서의 농도(S)까지 적분하면.

$$\int_{t_0}^t \mu_{max} dt = - \int_{S_0}^S \frac{K_s + S}{S} dS \text{로 나타내어}$$

진다(Strayer and Tiedje, 1978).

이때 μ_m 및 K_s 는 상수이므로

$$\mu_{max} \int_{t_0}^t dt = -K_s \int_{S_0}^S \frac{dS}{S} - \int_{S_0}^S dS \text{ 이다.}$$

$$\mu_{max} t = -K_s \ln \frac{S}{S_0} - (S - S_0) \dots\dots\dots(3)$$

式(3)을 다시 정리하면

$$\frac{1}{t} \ln \frac{S_0}{S} = - \frac{1}{K_s} \frac{S_0 - S}{t} + \frac{\mu_{max}}{K_s} \dots\dots(4)$$

과 같은 문제를 얻을수 있다.

2) 醱酵用培地

醱酵用培地の 조성은 Table. 1과 같으며 이를 증류수 1ℓ에 녹여 NaOH 수용액으로 pH6.8로 조절하고 100°C에서 30分間 가열 살균하여 使用하였다.

Table 1. Composition of culture medium

MgSO ₄ ·7H ₂ O	1gm
(NH ₄) ₂ SO ₄	1gm
(NH ₄) ₂ HPO ₄	4gm
MnSO ₄	trace
FeSO ₄	trace
Thiamine	300ppm
Biotin	2.5gm
Glucose	50gm

3) 使用菌株

*Brevibacterium flavum*을 nutrient agar에 數回 繼代培養하여 使用하였다.

4) 菌株培養 및 phenol 誘導體 處理方法

guaiacol, vanillin 및 o-vanillin을 各各 300, 300, 20ppm씩 含有한 上記 醱酵用培地 500ml에 菌株을 接種하고 30°C에서 24時間 진탕 배양하였다.

균체는 원심분리(4000rpm)하여 수회 배지용액으로 세척한 다음 적당량의 배지에 현탁하여 phenol 유도체 처리균으로 사용하였다.

5) 醱 酵

배지 50ml를 넣은 500ml 용량의 진탕플라스크에 吸光度 0.1이 되도록 phenol 유도체 처리균을 접종하고 30°C에서 왕복진탕(150회/min)하면서 14時間 발효시켰다.

6) 菌体量の 測定

두시간마다 발효액 일정량을 취하고, 필요에 따라 증류수로 희석하여 吸光度가 0.1~0.15되게 조절한 후 610nm에서 分光光度計(varian 635型)를 사용하여 吸光度를 측정하였다.

균체량은 吸光度에 稀釋培數를 곱하여 ultimate optical density (UOD/ml)로 표시하였다.

7) 포도당의 測定

殘量の 포도당은 phenol-황산法(1957)으로 측정하였다. 즉 80% phenol-용액 0.05ml에 당함량이 10~70μgm인 sample 2ml를 넣어 진한황산 5ml를 가하고 20°C~30°C에서 20分間 방치한후 610nm에서 吸光度를 測定하여 표준품과 比較 定量하였다.

實驗結果

回分式 발효에 의한 醱酵過程에서 動力學的 變數인 最大 比增殖速度(μ_{max})와 saturation constant (K)를 求하기 위하여 細菌의 濃度 및 포도당의 量을 2時間마다 測定하였다.

1) 細菌의 增殖

phenol 誘導체인 guaiacol, vanillin과 o-vanillin으로 처리한 細菌을 醱酵用 培地에서 14時間 배양하였을 때의 細菌增殖曲線은 Fig. 1과 같다. 14時間 醱酵後의 細菌濃度(UOD/ml)는 guaiacol 處理菌의 경우 2.5UOD/ml, vanillin 處理菌은 2.1 UOD/ml, o-vanillin 處理菌인 경우 3.7UOD/ml 있으며 無處理菌의 細菌濃度는 1.4UOD/ml이었다.

2) 포도당 濃度の 變化

醱酵過程中 포도당의 消費曲線은 Fig. 2와 같다. 醱酵初期의 포도당 消費는 o-vanillin 處理菌이 빠른 편이나 14時間後의 포도당 殘量은 guaiacol 處理菌의 경우와 비슷하였다. 그때의 포도당 殘量은 guaiacol 處理菌의 경우 15mg/ml, o-vanillin 處理菌은 1.6mg/ml였으나 vanillin 處理菌은 35mg/ml였고 無處理菌의 경우는 4.5mg/ml였다.

3) 細菌의 增殖速度

細菌의 增殖速度(dx/dt)와 細菌濃度(UOD/ml)의

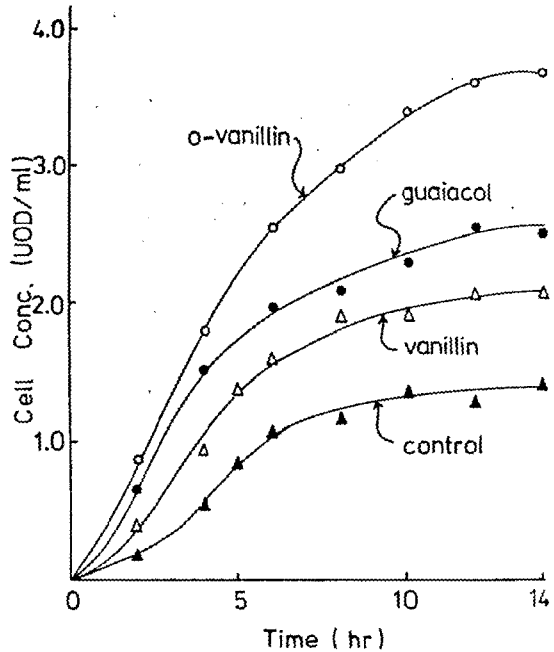


Fig. 1. Growth curves of *Brevibacterium flavum* treated with phenol derivatives.

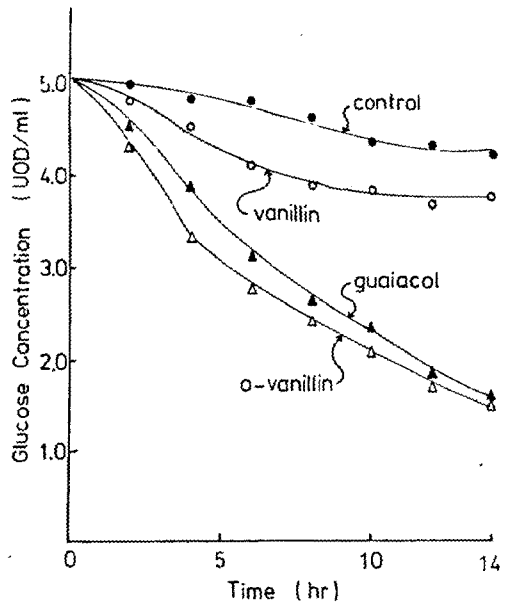


Fig. 2. Glucose consumption of *Brevibacterium flavum* treated with phenol derivatives.

關係는 Fig. 3과 같다.

Fig. 3의 기울기로 부터 求한 細菌의 最大比增殖速度(μ_{max})는 guaiacol 處理菌인 경우 0.45hr⁻¹, vanillin 處理菌에서는 0.62hr⁻¹, o-vanillin 處理菌

은 $0.38hr^{-1}$ 이었으며 無處理菌에 있어서는 $0.65hr^{-1}$ 였다.

4) 포도당 消費와 saturation constant

Fig. 1의 결과를 식(4)에 적용하여 $t \ln S/S_0$ 에 대한 $-\frac{S_0-S}{t}$ 를 표시하면 Fig. 4.와 같다.

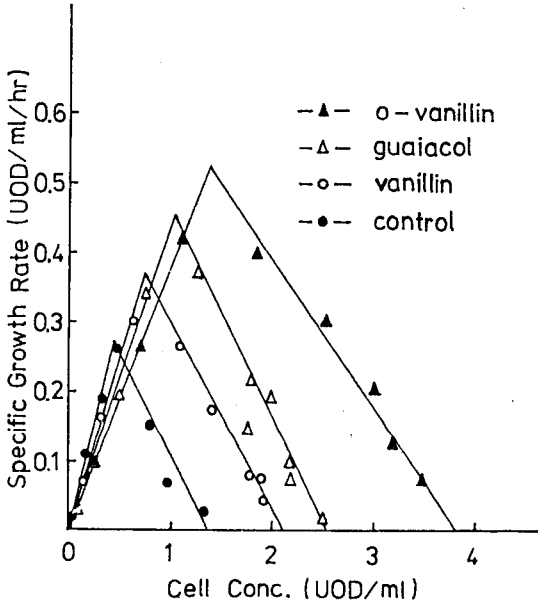


Fig. 3. Specific growth rate of *Brevibacterium flavum* treated with phenol derivaties.

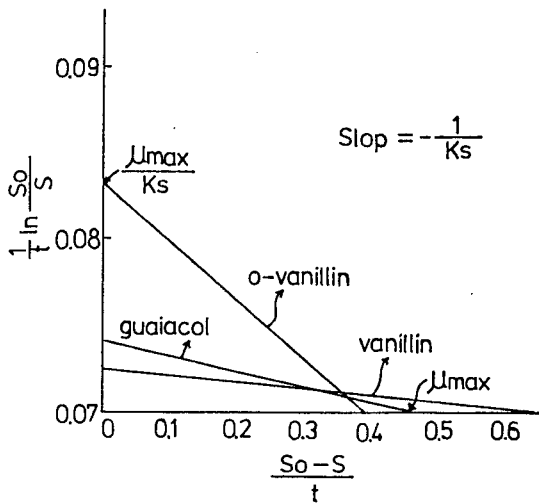


Fig. 4. Plot of the integrated Monod Equation.

포도당 농도에 대한 saturation constant를 Fig. 4에서 구한 결과 0-vanillin 處理菌인 경우 $4.76mg/ml$, guaiacol 處理菌은 $6.01mg/ml$ 였고, vanillin 處理菌은 $8.76mg/ml$ 였다. 또한 최대비증식속도(μ_{max})는 0-vanillin 處理菌의 경우 $0.39hr^{-1}$, guaiacol 處理菌은 $0.463hr^{-1}$ 였으며 vanillin 處理菌에서는 $0.63hr^{-1}$ 였다.

考 察

π -전자 donor인 phenol 誘導體중 guaiacol, 0-vanillin, vanillin으로 處理한 *Brevibacterium flavum*의 mutant를 glutamin산 醱酵에 응용하였을 때 細菌增殖이 無處理菌에 比하여 현저하게 增加하였다. 즉 無處理菌의 細菌濃度는 $1.40UOD/ml$ 인데 比하여 guaiacol 處理菌, vanillin 處理菌, 0-vanillin 處理菌은 各各 2.5, 2.1, 3.7 UOD/ml 이었다. 이와같은 현상은 phenol 유도체 處理가 細菌增殖을 促進한다고 볼 수 있다. 이 현상은 野田等(1976)이 phenol 誘導體로 處理한 酵母에서 얻은 結果와 類似하여 同一한 機構라고 推定된다.

Romeo등(1977)은 細菌增殖에 미치는 morphine 및 codeine의 영향을 respiratory chain의 형성으로 설명하면서도 호흡억제제로 알려진 2,4-dinitro phenyl, rotenone 및 amyral은 저해제의 역할이 없다고 하였다. 그러나 이러한 현상은 phenol 誘導體가 酸素와 電荷移動錯化물을 形成함으로써 細菌이 必要로 하는 酸素供給을 원활히 하였으리라 믿어진다.

일반적으로 好氣性 醱酵에 있어서 酸素의 供給은 細菌濃도에 크게 영향을 받는다. 즉 細菌濃도가 커지면 酸素가 培地속으로 용해될때 空氣와 液体사이에서 細菌이 insulator로써 作用하여 酸素의 溶解을 방해한다.

따라서 배양계내의 細菌이 必要로하는 酸素의 부족을 일으켜 細菌成長이 억제된다. 이러한 경우, 細菌을 phenol 誘導體로 處理함으로써 phenol 誘導體가 가지고 있는 $-OH$ 基와 $-OCH_3$ 基가 벤젠핵内の π 전자 의 밀도를 증가시키고, 이 전자는 전자수용체인 산소와 電荷移動錯化물을 形成하여 酸素가 液体속으로 원활하게 녹아 들어갈 수 있다고, 믿어진다. 따라서 높은 細菌濃도에 依한 insulator에도 불구하고 phenol 유도체 처리균을 使用함으로써 酸素가 계속적으로 供給되어 지속적인 細菌增殖이 이루어

진다고 생각된다.

本實驗에 적용한 Monod式의 적분형에서 μ_{max} 및 K_s 는 단일 발효조에서 얻은 基質의 消費量으로부터 간단하게 구할수 있었으며 그 결과는 Fig. 3에서 얻은 값과 비교적 잘 일치하였다.

따라서 細菌增殖系에도 Henri-michaelis menten 式과 같은 Monod式의 적분형은 적용할 수 있다고 본다.

結論 및 要約

Glutamin산 발효능이 있는 *Brevibacterium flavum*의 mutant를 phenol 誘導體인 guaiacol, vanillin, 0-vanillin의 존재 하에서 增殖시켜 이 처리군을 배양한 결과 無處理菌에 比較하여 增殖效果가 현저히 컸으며 그때의 動力學的 結果는 다음과 같다.

1) phenol 誘導體로써 處理한 *Brevibacterium flavum*의 mutant를 14時間 발효시켰을때 細菌의 濃度는 guaiacol 處理菌, 0-vanillin 處理菌, vanillin 處理菌 各各 2.5, 3.7, 2.1 UOD/ml 있었고 無處理菌은 1.4UOD/ml였다.

2) 醱酵 14時間後 포도당의 殘量은 guaiacol 處理菌 0-vanillin 處理菌, vanillin 處理菌의 경우 各各 1.5, 1.6, 3.5 mg/ml 있었고, 無處理菌에서는 4.5 mg/ml였다.

3) 최대비증식속도(μ_{max})는 guaiacol 處理菌, 0-vanillin 處理菌, vanillin 處理菌 各各 0.45, 0.38, 0.62 hr⁻¹이었으며 Monod式의 적분형으로 구한값과도 비교적 잘 一致하였다.

4) saturation constant(K_s)는 guaiacol 處理菌, 0-vanillin 處理菌, vanillin 處理菌 各各 6.01, 4.76, 8.76mg/ml였다.

參 考 文 獻

- Monod, J. (1949) : The growth of bacterial cultures. Ann. Review of Microbiol. 3, 371-377.
- 南場毅·竹内德男(1977): 酒粕中の 醱酵促進 物質의 分畫. 日本食品工業會誌, 24(11), 570-575.
- 野田文雄·逆井利夫·横塚保(1976): 醬油諸味の 醱酵에 關する研究, (第5報), -바니린 그아야콜과 오요비바니린異性體의 抗從生物作用에 關하여-. 日本食品工業會誌 23(2), 59-66.
- 野田文雄·逆井利夫·横塚保(1976): 醬油諸味の 醱酵에 關する研究, (第6報) -바니린, 올손바니린과 오요비 그아야콜의 醬油酵母醱酵能 增強作用에 關하여-. 日本食品工業會誌 23(2), 67-73.
- Segel, I. H. (1976) : Biochemical Calculations. 2nd ed. p.245-246. John Willey & Sons. N. Y.
- Romeo, J., M. Scheraga, and W. W. Umbreit (1977): Stimulation of the growth and respiration of a methylotrophic bacterium by morphine. Appl. Environ. Microbiol. 34(5), 661-614.
- Strayer, R. F. and J. M. Tiedje (1978) : Kinetic parameters of the conversion of methane precursors to methane in a hypereutrophic lake sedimentation. Appl. Environ. Microbiol. 36, 330-340.