

Whey 배지의 살균방법 및 yeast extract 첨가가 *Propionibacterium freudenreichii* KCCM 31227의 생육특성에 미치는 영향

이정훈 · 윤미숙 · 이시경*

건국대학교 응용생물화학과

Effect of Whey Broth's Sterilization Method and Yeast Extract on Growth Characteristics of *Propionibacterium freudenreichii* KCCM 31227

Jeong-Hoon Lee, Mi-Suk Yun and Si-Kyung Lee*

Department of Applied Biology & Chemistry, KonKuk University

Received October 25, 2006; Accepted January 26, 2007

This study was carried out to evaluate the growth characteristics of *Propionibacterium freudenreichii* KCCM 31227 and production of organic acids in whey broth. Bacterial growth and increase rate of TTA (Total Titratable Acidity) were analysed. Log numbers of *Propionibacterium freudenreichii* KCCM 31227 was at the highest peak at 7.5×10^7 cfu/ml in fermentation of 72 hr in 12% whey broth treated with low temperature long time method (60°C, 30 min) containing 1% yeast extract. TTA value of 12% whey broth treated with low temperature long time method and containing 1% yeast extract showed the highest peak at 5.2 in fermentation of 72 hr. The increase rate of cells and TTA in whey broth revealed almost the same tendency. Production of propionic and acetic acids showed higher value in the whey broth treated with low temperature long time method.

Key words: *Propionibacterium freudenreichii* KCCM 31227, whey broth, growth characteristics, TTA, propionic acid

서 론

Propionibacteria는 일반적으로 Gram(+), catalase(+), 무포자, 비운동성, 통성혐기성의 간균으로¹⁾, swiss 치즈에서 특징적인 치즈 향과 눈을 형성한다. Propionibacteria에 의한 발효는 많은 양의 propionic acid를 생산하고 부산물로 acetic acid와 CO₂가 생성되며 비타민 B₁₂를 합성하는데도 이용된다. 발효에는 여러 기질이 이용되는데 lactate는 propionibacteria의 성장에 중요한 기질이며, yeast extract는 lactic acid 발효를 최고에 이르도록 한다. Wood 등²⁾은 질소원으로 ammonium sulfate를 함유하는 합성배지에서 propionibacteria의 발효와 성장에 yeast extract는 필수적이라 하였다. 혼합배양시 다른 미생물이 propionibacteria의 증식과 발효에 미치는 영향은 촉진과 저해 효과를 동시에 나타내는데, *Lactobacillus lactis*는 *Propionibacterium peterssonii*의 발효에 지연효과를 나타내고, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus acidophilus* 등은 특정한 propionibacteria의 증식에 저해를 나타낸다. *Lactobacillus helveticus*는 대사물

질로 biotin과 pantothenate를 생산하여 propionibacteria의 증식을 촉진한다³⁾.

Propionic acid(CH₃CH₂COOH)는 중요한 유기산의 하나로 식품이나 화학공업에 널리 이용하고 있다⁴⁾. 석유화학방법에 의한 propionic acid의 상업적 생산은 경제적이지만 제조에 환경오염의 문제를 야기한다. Propionibacteria에 의한 발효공정은 환경친화적이고 whey나 옥수수 같은 값싼 원료를 이용하기 때문에 폐기물 처리의 효과는 물론 가격적 생산경쟁력도 있다^{5,6)}. 또한 발효공정으로 만들어진 propionic acid는 천연물질이기 때문에 석유화학적 방법으로 만든 것보다 식품이나 사료의 보존료로 선호되고 있다. Whey를 기질로 하여 배양 시 살균방법이 lactic acid bacteria와 propionibacteria의 증식에 영향을 미치는데 Thomas 등⁷⁾은 *P. shermanii*로 propionic acid를 생산하는데 whey농도를 증가시켜 고압증기멸균한 경우 propionic acid의 생산이 감소하였고 저온살균하였을 경우에는 감소하지 않았다고 하였으며 yeast extract 농도를 5 g/에서 10 g/로 증가시키면 고압증기멸균에서 저해 효과가 감소한다고 하였다. Lactose는 고압증기멸균에 의해 lactulose[4-(O-β-D)-galacto-pyranosyl-D-fructofuranose]로 전환되는데 대부분의 미생물들은 lactulose를 발효시키지 못하고⁸⁾, 높은 농도의 lactulose는 bacteria의 증식을 억제한다⁹⁾.

*Corresponding author
Phone: +82-2-450-3759; Fax: +82-2-456-7183
E-mail: lesikyung@konkuk.ac.kr

따라서 본 연구는 whey 배지에 *Lactobacillus acidophilus* KCCM 32820과 *Propionibacterium freudenreichii* KCCM 31227로 2단계 배양시 살균방법과 yeast extract가 *Propionibacterium freudenreichii* KCCM 31227의 생육특성에 미치는 영향 및 살균 조건에 따른 유기산 생성을 조사하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 배지. 한국미생물보존센터에서 분양받은 *L. acidophilus* KCCM 32820과 *P. freudenreichii* KCCM 31227로 *L. acidophilus* KCCM 32820의 계대배양용 배지는 MRS (peptone 10 g/l, beef extract 10 g/l, yeast extract 5 g/l, glucose 20 g/l, diammonium-citrate 3 g/l, sodium acetate 5 g/l, tween 80 1 ml, K_2HPO_4 2 g/l, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g/l, $MnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g/l, pH 6.2-6.6)를 사용하였다. *P. freudenreichii* KCCM 31227의 계대배양용 배지는 RCM(yeast extract 3.0 g/l, beef extract 10.0 g/l, peptone 10.0 g/l, soluble starch 1.0 g/l, glucose 5.0 g/l, cysteine hydrochloride 0.5 g/l, NaCl 5.0 g/l, sodium acetate 3.0 g/l, pH 6.8)이었고 균수 측정용으로는 RCM에 agar를 첨가하여 사용하였다.

Whey 배지. 체다 치즈를 제조하고 얻은 부산물을 분무 건조하여 만든 dry sweet whey(Calpro Co., Ltd., USA)를 6%와 12%로 제조 후 고압증기멸균 및 저온살균하여 배양배지로 하였다.

***L. acidophilus* KCCM 32820의 starter culture.** *L. acidophilus* KCCM 32820을 MRS에 접종하여 starter culture를 제조하였다. MRS를 55 g 취하여 증류수 1,000 ml에 10분간 용해 후 cap tube에 각각 10 ml씩 분주하였다. 각각의 배지를 고압증기멸균(121°C, 15분) 후 냉각시켜 평균 0.5 ml를 접종하였다. 35°C의 인큐베이터에서 16시간 배양하여 균수가 $1-2 \times 10^7$ cfu/ml 되도록 하였다.

***P. freudenreichii* KCCM 31227의 starter culture.** *P. freudenreichii* KCCM 31227을 RCM(reinforced clostridial medium, Oxoid CM 149)에 접종하여 starter culture를 제조하였다. RCM을 40 g 취하여 증류수 1,000 ml에 10분간 용해 후 cap tube에 각각 10 ml씩 분주하였다. 각각의 배지를 고압증기멸균(121°C, 15분) 후 냉각시켜 평균 0.5 ml를 접종하였다. 35°C의 인큐베이터에서 3일간 배양하여 균수가 $1-2 \times 10^7$ cfu/ml 되도록 하였다.

살균방법 및 yeast extract에 의한 *P. freudenreichii* KCCM 31227의 생균수 및 whey 배지의 총산도 변화. 6%와 12%로 제조한 whey 배지에 yeast extract를 0, 0.5, 1.0% 첨가하고, 5 N NaOH로 pH를 6.5로 조절 후 고압증기멸균 및 저온 살균하였다. 멸균한 배지를 냉각 후 *L. acidophilus* 32820을 1.0% 접종하여 35°C에서 36시간 배양 후 yeast extract를 각각 0, 0.5, 1.0% 첨가하여 동일한 방법으로 재 멸균하였다. 배지를 35°C까지 냉각 후 *P. freudenreichii* 31820을 1.0% 접종하여 35°C에서 3일간 배양하면서 6시간 단위로 생균수와 총산도를 측정하였다. 같은 방법으로 배양하면서 6시간 단위로 whey 배지의 pH를 5 N NaOH로 6.5 조절하였을 때의 총산도도 측정하였다.

생균수는 표준평판법¹⁰⁾에 의하여 미리 준비한 0.85% 생리식염수 9 ml가 들어 있는 시험관에 배양한 *P. freudenreichii* KCCM 31820을 1 ml 취하여 10배 단계로 희석하였다. 각 단계 희석액 1 ml를 멸균 펠트리접시 2매 이상씩에 무균상태에서 취하고 배지를 분주하였다. GasPAK system(CO₂ environment, BBL)에 CO₂를 충전 후 35°C의 인큐베이터에서 72시간 배양하여 나타난 균락수를 측정하여 *P. freudenreichii* KCCM 31227의 생균수를 산출하였다. 총산도는 AACC(02-31)¹¹⁾ 방법에 따라 배양액 10 ml를 삼각플라스크에 취하여 증류수 90 ml를 혼합 후 1.0% phenolphthalein-50% ethanol 지시약을 수적 가하여 0.1 N NaOH(F=1.0)(DaeJung Chemical & Metals Co., Ltd., Korea) 용액으로 적정하여 소모 ml를 총산도로 하였다.

생성된 유기산 측정. 6% whey broth에 *L. acidophilus* KCCM 32820을 1% 접종하여 35°C에서 36시간 배양 후 5 N NaOH로 pH를 6.5로 조절하여 고압증기멸균 및 저온살균한 whey broth에 *P. freudenreichii* KCCM 31227을 1% 접종하여 85 rpm의 35°C 인큐베이터에서 72시간 배양하면서(12시간마다 pH 6.5로 조절) 12시간 단위로 유기산 양을 HPLC(LC1100 Series, Hewlett Packard Co., Ltd., USA)로 측정하였다. 채취한 시료를 12,000 rpm의 원심분리기(Supra21K, Hanil Co., Korea)에서 원심분리 후 상등액을 취하여 millipore membrane filter (pore size 0.45 μm)로 여과하여 분석에 사용하였다. 분석은 Aminex HPX-87H ion exclusion type(L300 mm×7.8 mm, USA)의 column을 사용하였으며 이동상은 35°C에서 5 mM H₂SO₄ 용액으로 0.6 ml/min의 속도로 흘러서 215 nm에서 ADC (RI Detector)로 검출하였다.

결과 및 고찰

살균방법 및 yeast extract의 첨가가 *P. freudenreichii* KCCM 31227의 생균수 변화에 미치는 영향. 고압증기멸균(121°C, 15분)한 6%와 12%의 whey 배지에 *L. acidophilus* KCCM 32820을 35°C에서 36시간 배양하여 yeast extract를 0, 0.5, 1.0% 첨가 후 5 N NaOH로 pH를 6.5로 조절하여 고압증기멸균한 whey 배지에 *P. freudenreichii* KCCM 31227을 접종 후 72시간 배양하면서 12시간 단위로 생균수를 측정된 결과는 Fig. 1과 같다. Fig. 1(A)에서 6% whey 배지에 yeast extract 첨가에 관계없이 접종 후의 생균수는 2.5×10^5 cfu/ml 전후이었으나 배양시간이 경과함에 따라 yeast extract 첨가가 많을수록 높은 균수를 나타내 배양 72시간에 yeast extract를 1% 첨가하였을 때 3.2×10^7 cfu/ml로 가장 높은 생균수를 나타냈다. 배양 24시간까지는 균수의 증가 속도가 느렸으나, 24시간부터 60시간까지 균수가 대수적으로 증가하였다.

또한 Fig. 1(B)에서 12% whey 배지에 yeast extract를 첨가하지 않았을 때의 균수는 균 접종 후 3.0×10^5 cfu/ml이었으나 배양시간이 경과함에 따라 6% whey 배지에서와 같이 yeast extract 첨가가 많을수록 높은 균수를 나타내 배양 72시간에 yeast extract를 1% 첨가하였을 때 6.5×10^7 cfu/ml로 가장 높은 생균수를 나타냈다. 균의 증식곡선은 6% whey 배지에서와 동일한 경향을 나타냈으나 동일한 배양시간대에 6% whey 배지

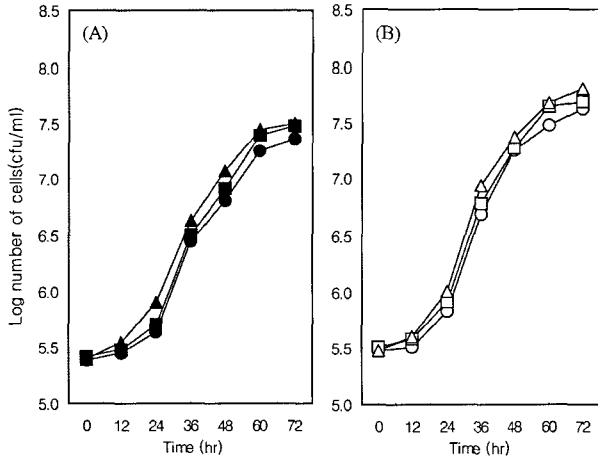


Fig. 1. Changes in Log number of *P. freudenreichii* KCCM 31227 in whey broth sterilized for 15 min at 121°C after culturing *L. acidophilus* KCCM 32820 for 36 hr. (A) ●: 6% whey broth, ■: 6% whey broth with 0.5% yeast extract, ▲: 6% whey broth with 1.0% yeast extract. (B) ○: 12% whey broth, □: 12% whey broth with 0.5% yeast extract, △: 12% whey broth with 1.0% yeast extract.

에서보다 많은 균수를 나타냈다. 이러한 현상은 whey 배지를 고압증기멸균하면 미생물 증식에 필요한 여러 가지 인자가 파괴되어 나타난 현상으로 Huhtanen 등⁹은 whey 배지를 고압 증기 멸균하였을 때 파괴된 비타민, 아미노산, 당 등을 yeast extract 첨가로 보충되어 *Propionibacterium*의 증식에 도움을 준다고 하여 본 실험의 결과와 일치하였다. *Propionibacterium*은 증식이 매우 느린 혐기성 균으로 본 실험에서 배양 24시간부터 60시간까지 균수가 대수적으로 증가하였는데 이것은 Elizabeth 등¹²이 보고한 *P. freudenreichii* var. *shermanii*의 증식은 40-80시간 사이에 가장 활발하여 이때에 높은 균수가 검출되었다는 결과보다는 빠른 시간이었다.

한편 저온살균한 6%와 12% whey 배지에 *L. acidophilus* KCCM 32820을 35°C에서 36시간 배양 후 yeast extract를 첨가하고 pH를 6.5로 조절하여 저온살균한 whey 배지에 *P. freudenreichii* KCCM 31227을 72시간 배양하면서 12시간 단위로 생균수를 측정된 결과는 Fig. 2와 같다. Fig. 2(A)에서 6% whey 배지에 yeast extract 첨가에 관계없이 접종 후의 생균수는 2.5×10^5 cfu/ml 전후 이었으나 배양시간이 경과함에 따라 yeast extract 첨가가 많을수록 높은 균수를 나타내 배양 72시간에 yeast extract 1% 첨가하였을 때 4.2×10^7 cfu/ml로 가장 높은 생균수를 나타냈는데 이것은 고압증기멸균하였을 때의 3.2×10^7 cfu/ml 보다 다소 높은 결과였다. 증식경향도 고압증기멸균한 whey 배지와 유사하여 yeast extract의 첨가량이 많을수록 높은 균수를 나타냈다. 또한 Fig. 2(B)에서와 같이 12% whey 배지에 yeast extract를 첨가하지 않았을 때의 균수는 균 접종 후 3.0×10^5 cfu/ml 정도 이었으나 배양시간이 경과함에 따라 6% whey 배지에서와 같이 yeast extract 첨가가 많을수록 높은 균수를 나타내 배양 72시간에 yeast extract를 1% 첨가하였을 때 7.5×10^7 cfu/ml로 가장 높은 생균수를 나타내 6% whey 배지에서의 4.2×10^7 cfu/ml보다 3.2×10^7 cfu/ml 만큼 높은 균수를 보여주었다. 배양 48시간까지는 yeast extract 첨가량에 관

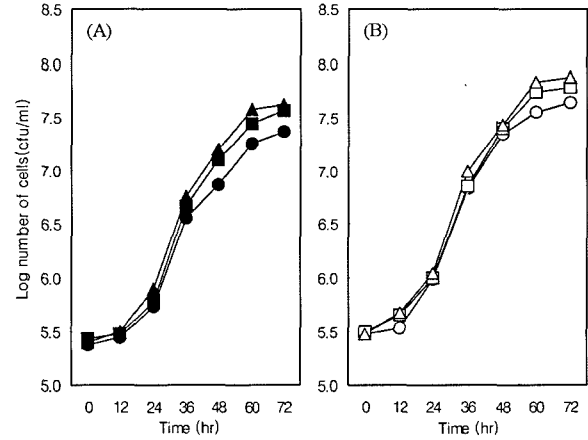


Fig. 2. Changes in Log number of *P. freudenreichii* KCCM 31227 in whey broth pasteurized for 30 min at 60°C after culturing *L. acidophilus* KCCM 32820 for 36 hr. (A) ●: 6% whey broth, ■: 6% whey broth with 0.5% yeast extract, ▲: 6% whey broth with 1.0% yeast extract. (B) ○: 12% whey broth, □: 12% whey broth with 0.5% yeast extract, △: 12% whey broth with 1.0% yeast extract.

계없이 균수의 차이가 크지 않았으나 48시간부터 균수의 차이를 나타냈다. 이상의 실험결과는 Thomas 등⁷이 고압증기멸균 및 저온살균한 whey 배지에서 *Propionibacterium* 배양시 살균 조건이 균 증식에 미치는 효과에 관한 연구에서 저온살균이 고압증기멸균보다 균의 생육에 저해효과가 적었다고 한 연구 결과와 일치하였다. Inn 등¹³은 lactate 배지의 pH를 6.5로 조절하고 *P. shermanii*를 접종하여 27°C에서 회분식으로 배양하였을 때 균수는 8시간부터 32시간까지 대수적으로 증가하여 32시간에 10^9 cfu/ml을 나타냈다고 하였으며, Jennifer 등¹⁴은 lactate 배지에서 *P. shermanii*의 증식은 접종 초기에는 log cell number가 8.25, 배양 12시간에 9.0, 24시간에 9.4, 36시간에 9.3이었다는 결과보다 다소 낮은 균수이나 균수의 증가 경향은 유사하였다.

살균방법 및 yeast extract의 첨가가 *P. freudenreichii* KCCM 31227에 의한 산생성에 미치는 영향. 고압증기멸균한 6%와 12% whey 배지에 *L. acidophilus* KCCM 32820을 접종하여 35°C에서 36시간 배양 후, yeast extract를 가하고 pH를 6.5로 조절하여 다시 고압증기멸균한 배지에 *P. freudenreichii* KCCM 31227을 접종하여 72시간 배양하면서 12시간 단위로 배양액의 총산도 값을 측정된 결과는 Fig. 3과 같다. Fig. 3(A)에서 6% whey 배지에 yeast extract 첨가에 관계없이 총산도 값은 1.2였으나 배양 시간이 경과함에 따라 총산도 값이 증가하였고 yeast extract 첨가량이 많을수록 총산도 값이 높게 나타났다. 배양 72시간에 yeast extract 1% 첨가한 whey 배지에서 4.2로 가장 높은 값을, yeast extract를 첨가하지 않은 whey 배지에서 3.3으로 가장 낮은 값을 나타냈다. 총산도 값의 증가는 균의 증식곡선 경향과 유사함을 보여 주었다. Fig. 3(B)에서 12% whey 배지에 yeast extract 첨가에 관계없이 초기 총산도 값이 1.4이었으나 배양 시간이 경과함에 따라 총산도 값은 증가하여 배양 72시간에 yeast extract 1% 첨가한 whey 배지에서 4.6으로 가장 높은 값을 나타냈다. 6% whey 배지에서와 동일하게 총산도 값의 증가 경향은 yeast extract를 많이 첨가한 whey 배지에서 높은 값을 나타냈으나 증가경향은 yeast extract

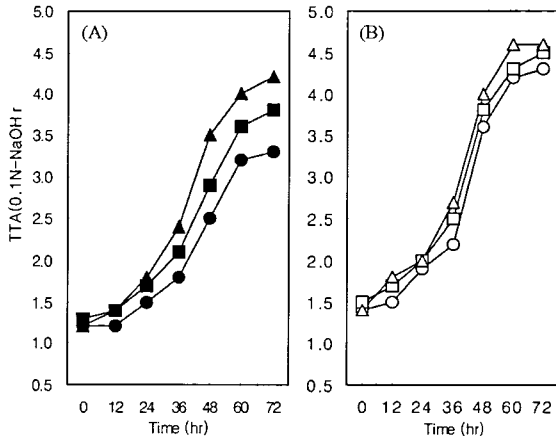


Fig. 3. Changes of total titratable acidity(TTA) in whey broth sterilized for 15 min at 12 °C and cultured by *P. freudenreichii* KCCM 31227 after culturing *L. acidophilus* KCCM 32820 for 36 hr. (A) ●: 6% whey broth, ■: 6% whey broth with 0.5% yeast extract, ▲: 6% whey broth with 1.0% yeast extract. (B) ○: 12% whey broth, □: 12% whey broth with 0.5% yeast extract, △: 12% whey broth with 1.0% yeast extract.

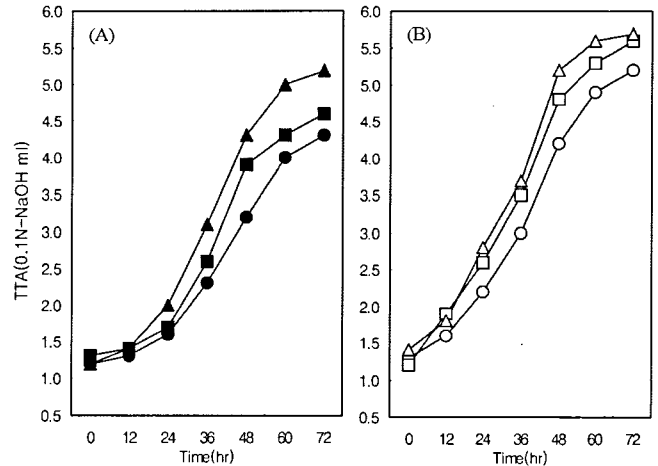


Fig. 4. Changes of total titratable acidity(TTA) in whey broth pasteurized for 30 min at 60°C and cultured by *P. freudenreichii* KCCM 31227 after culturing *L. acidophilus* KCCM 32820 for 36 hr. (A) ●: 6% whey broth, ■: 6% whey broth with 0.5% yeast extract, ▲: 6% whey broth with 1.0% yeast extract. (B) ○: 12% whey broth, □: 12% whey broth with 0.5% yeast extract, △: 12% whey broth with 1.0% yeast extract.

의 첨가량에 따라 6% whey 배지에서보다 차이가 적었다. Yeast extract 첨가량이 많을수록 총산도 값이 높은 것은 yeast extract가 *P. freudenreichii* KCCM 31227의 증식에 영향을 주었기 때문으로 생각되는데, Wood 등¹⁵⁾은 *Propionibacterium*의 증식과 발효에 yeast extract는 영양원을 제공하는 필수물질이라고 하였다. 이상의 결과는 고압증기멸균한 6%와 12% whey 배지에 각각 *P. freudenreichii*를 단독으로 72시간 배양하였을 때 총 산도가 각각 2.0 및 2.5이었다고 하여¹⁵⁾ 2단계로 배양한 본 실험에서 높게 나타났다.

한편 저온살균한 6%와 12% whey 배지에 *L. acidophilus* KCCM 32820을 1% 접종하여 35°C에서 36시간 배양 후 yeast extract를 가하고, pH를 6.5로 조절하여 다시 저온살균한 배지에 *P. freudenreichii* KCCM 31227을 접종하여 72시간 배양하면서 12시간 단위로 배양액의 총산도 값을 측정된 결과는 Fig. 4와 같다. Fig. 4(A)에서 6% whey 배지에 yeast extract 첨가에 관계없이 초기 총산도 값은 1.2였으나 배양 시간이 경과함에 따라 총산도 값이 증가하였고 yeast extract 첨가량이 많을수록 총산도 값이 높게 나타났다. 배양 72시간에 yeast extract 1% 첨가한 whey 배지에서 5.2로 가장 높은 값을, yeast extract를 첨가하지 않은 whey 배지에서 4.3으로 가장 낮은 값을 나타냈다. 총산도 값의 증가는 고압증기멸균한 whey 배지에서와 동일한 경향을 보였다. Fig. 4(B)에서 12% whey 배지에 yeast extract 첨가에 관계없이 총산도 값이 1.3이었으나 배양 시간이 경과함에 따라 총산도 값은 증가하여 배양 72시간에 yeast extract 1% 첨가한 whey 배지에서 5.7로 가장 높은 값을 나타냈다. 6% whey 배지에서와 동일하게 총산도 값의 증가 경향은 yeast extract를 많이 첨가한 whey 배지에서 높은 값을 나타냈다. Lee 등¹⁶⁾은 저온살균한 6%와 12% whey 배지에 *P. freudenreichii*를 단독으로 72시간 배양시 총산도가 각각 2.3 및 2.9이었다고 하여 2단계 배양한 본 실험에서 총산도 값이 높게 나타났다.

Champagne 등¹⁷⁾은 *P. shermanii* B-123은 lactose 보다 lactate 배지에서 증식이 잘되기 때문에 whey를 *L. helveticus*로 발효시키고 NaOH나 Ca(OH)₂로 중화하여 고정화시킨 *P. shermanii* B-123을 접종하여 37°C에서 발효시켰을 때 발효율이 최대였다고 하여 본 실험의 결과와 일치하였다. 또한 whey 배지에서의 *P. freudenreichii* KCCM 31227에 의한 산 생성에 관한 실험에서 whey 배지에 *P. freudenreichii* KCCM 31227을 단독으로 발효시킬 때보다¹⁶⁾ *L. acidophilus* KCCM 32820으로 whey 배지의 lactose를 lactate로 전환 후 yeast extract를 첨가하여 *P. freudenreichii* KCCM 31227을 배양하였을 때 총산도 값이 높았으며, 고압증기 멸균 시 보다 저온살균 한 12% whey 배지의 총 산도 값이 가장 높았다.

유기산의 변화. 6% whey broth에 *L. acidophilus* KCCM 32820을 접종하고 35°C에서 36시간 배양 후 pH를 6.5로 조절하여 고압 증기멸균 및 저온살균한 whey broth에 *P. freudenreichii* KCCM 31227을 접종하여 72시간 배양하면서(12 시간마다 pH 6.5로 조절) 12시간 단위로 유기산 양을 측정된 결과는 Fig. 5와 같다. *L. acidophilus* KCCM32820을 72시간 배양 후 *P. freudenreichii* KCCM 31227을 접종하였을 때의 lactic acid 양은 저온살균 시 10.2 mg/ml이었던 것이 배양 24시간에 8.2 mg/ml, 72시간에 3.8 mg/ml로 감소하였고, 고압증기 멸균시에는 균 접종 후 10.5 mg/ml이었던 것이 배양 24시간에 9.6 mg/ml, 72시간에 4.4 mg/ml로 감소하여 배양시간에 따라 고압증기멸균보다 저온살균한 whey broth에서 lactic acid가 낮게 검출되었다. 이는 whey 배지를 고압증기 멸균시 보다 저온살균시에 미생물의 증식이 다소 높았던 것에 기인하는 것으로 생각된다.

Propionic acid 생성량은 저온살균시 균 접종 후 0 mg/ml, 24시간에 1.2 mg/ml, 72시간에 4.2 mg/ml이었고, 고압증기 멸균시에는 균 접종 후 0 mg/ml, 24시간에 1.0 mg/ml, 72시간에 4.0

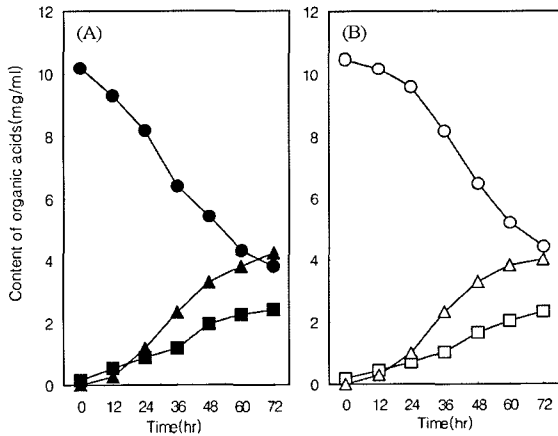


Fig. 5. Changes of organic acids in 6% whey broth cultured by *P. freudenreichii* KCCM 31227 after culturing *L. acidophilus* KCCM 32820 for 36 hr. (A) 6% whey broth pasteurized for 30 min at 60°C, ●: Lactic acid, ■: Acetic acid, ▲: Propionic acid. (B) 6% whey broth sterilized for 15 min at 121°C, ○: Lactic acid, □: Acetic acid, △: Propionic acid.

mg/ml로 저온살균한 whey broth에서 propionic acid의 생성이 다소 높았다. Jennifer 등¹⁴⁾은 *Propionibacterium*을 이용한 propionic acid 발효에 기질로 lactose나 glucose보다 lactate를 선호한다고 하였고, homo lactic acid bacteria인 *L. acidophilus*와 *P. shermanii*의 혼합배양은 *P. shermanii*를 단독으로 배양시킬 때보다 발효시간이 단축되고 propionic acid 생산수율이 높아졌다고 하였다. Acetic acid 생성량은 저온살균시 균 접종 후 0.15 mg/ml, 24시간에 0.9 mg/ml, 72시간에 2.4 mg/ml이었고, 고압증기 멸균시에는 균 접종 후 0.2 mg/ml, 24시간에 0.72 mg/ml, 72시간에 2.34 mg/ml로 저온살균한 whey broth에서와 유사 하였다. Propionic acid와 acetic acid의 생성비율은 저온살균한 whey broth에서 72시간에 1.75 : 1이었고 고압증기멸균한 whey broth에서 1.70 : 1로 저온살균한 broth에서 propionic acid의 비율이 높았다. Vaughan¹⁸⁾은 lactose에 *P. freudenreichii* subsp. *shermanii*를 접종하여 propionic acid와 acetic acid를 생산할 때 lactose의 농도에 따라 두 산의 생성비율은 달라진다고 하였고, EL-Hagarawy 등¹⁹⁾은 lactose와 glucose를 기질로 하여 10종의 *P. shermanii*를 배양하였을 때 propionic acid와 acetic acid의 생성비율은 2 : 1 정도라 하여 본 실험의 결과와 유사하였다.

초 록

P. freudenreichii KCCM 31227을 whey 배지에서 배양시 whey 배지의 살균방법 즉, 고압증기멸균(121°C, 15분), 저온살균(60°C, 30분) 방법과 배양액에 yeast extract를 0.5, 1% 첨가하였을 때 생균수와 총산도를 측정하여 *P. freudenreichii* KCCM 31227의 생육특성을 조사하였다. 6% whey 배지보다는 12% whey 배지에서, yeast extract 0.5% 보다는 1.0% 첨가 시 생균수가 높았고, 12% whey 배지에 yeast extract를 1.0% 첨가하고 저온살균하였을 때 배양 72시간에 7.5×10^7 cfu/ml로 가장 높은 생균수를 나타냈다. 총산도는 12% whey 배지에 yeast

extract를 1.0% 첨가하여 저온살균하였을 때 5.2로 가장 높았다. 배양 72시간 동안 생균수와 총산도의 증가는 유사한 경향을 보여 주었다. Propionic acid와 acetic acid의 생성은 고온살균보다 저온살균에서 높게 검출되었다.

Key words: *Propionibacterium freudenreichii*, 생육특성, 유청배지, 프로피온산

참고문헌

- Hettinga, D. H. and Reinbold, G. W. (1972) The propionic acid bacteria. I. Growth. *J. Milk Food Technol.* **35**, 295-301.
- Wood, H. G. and Werkman, C. H. (1936) Mechanism of glucose dissimilation by the propionic acid bacteria. *Biochem J.* **30**, 618-623.
- Hunter, J. E. and Frazier, W. C. (1961) Gas production by associated swiss cheese bacteria, Department of Bacteriology University of Wisconsin, Madison, p. 2176-2186.
- Supaporn, S. B. E. (2005) Metabolic engineering for enhanced propionic acid fermentation by *Propionibacterium acidipropionici*. Ph D dissertation, The Ohio State Univ.
- Huang, Y. L., Zhang, W. Z., Cheung, C. M. and Yang, S-T. (2002) Production of carboxylic acids from hydrolyzed corn meal by immobilized cell fermentation in a fibrous-bed bioreactor. *Biores. Technol.* **82**, 51-59.
- Yang, S-T., Tang, I. C. and Zhu, H. (1992) A novel fermentation process for calcium magnesium acetate (CMA) production from cheese whey. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **34/35**, 569-583.
- Thomas, M. A., Elizabeth, A. B., Nelson, G. and Robert, D. S. (1986) Inhibitory effect of autoclaving whey-based medium on propionic acid production by *Propionibacterium shermanii*. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**, 427-428.
- Thyanithy, K., Harding, G. and Wase, D. A. J. (1982) Rearrangement of lactose on sterilization. *Biotechnol. Lett.* **4**, 423-424.
- Huhtanen, C. N., Parrish, F. W. and Hicks, K. B. (1980) Inhibition of bacterial growth by lactulose preparations. *Appl. Environ. Microbiol.* **40**, 171-173.
- Min, K. C., Shim, U. M., Lee, J. U., Cho, S. G., Kim, Y. G., Son, G. M., Son, W. S. and Cho, N. C. (2000) Laboratory of food microbiology. KangMunKag, Korea pp. 199-202.
- American Association of Cereal Chemists. (1985) Approved methods of AACC. 02-31.
- Elizabeth, A. B., Thomas, M. A., Nelson, G. and Robert, D. S. (1987) Propionic acid fermentation of ultra-high-temperature sterilized whey using mono- and mixed cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**, 434-437.
- Inn, I. H., Fredrickson, A. G. and Tsuchiya, H. M. (1974) Diauxic growth of *Propionibacterium shermanii*. *Appl. Microbiol.* **28**, 831-835.
- Jennifer, A. P. L. and Nancy, J. M. (1982) Commensalistic interaction between *L. acidophilus* and *P. shermanii*. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**, 715-722.
- Wood, H. C. (1981) Metabolic cycles in the fermentation by propionic acid bacteria. *Cutt. Top. Cell Regul.* **18**, 255-287.

16. Lee, J. H., Cha, W. J., Paik, H. D. and Lee, S. K. (2006) Growth characteristics of *L. acidophilus* KCCM 32820 and *P. freudenreichii* KCCM 31227 in whey broth. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **49**, 1-6.
17. Champagne, C. P., Baillargeon-Cotet. and Goulet, J. (1989) Whey fermentation by immobilized cells of *Propionibacterium shermanii*. *J. Appl. Bacteriol.* **66**, 175-184.
18. Vaughan, L. C. (1998) Polysaccharide production by propionibacteria during lactose fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 1892-1895.
19. EL-Hagarawy, I. S., Slatter, W. L. and Harper, W. J. (1956) Organic acid production by propionibacteria. I. Effect of strains, pH, carbon source and intermediate fermentation products. Department of Dairy Technology, The Ohio State Univ., Columbus, No. 10:56, p. 579-587.