

Propionibacterium freudenreichii KFCC 31227과 *Lactobacillus acidophilus* KFCC 32825의 단독 및 혼합배양에 의한 영양성분의 상호작용

민윤식 · 김기철 · 이명열 · 이웅수

충주산업대학교 식품공학과, 충북대학교 식품공학과

초록 : S.G.Y.배지(skim milk, glucose, yeast extract)와 S.M.W.배지(skim milk whey). 배지에 *P. freudenreichii* KFCC 31227과 *L. acidophilus* KFCC 32825를 단독 또는 혼합배양 후, 두 균주의 생육 및 유기산 생성에 미치는 발효여액의 영향과 당의 변화 및 이용 효과를 검토한 결과, 자신의 발효여액보다는 상대편의 발효여액에서 그리고 단독배양보다는 혼합배양에서 생육이나 산 생성의 효과가 촉진되었으며, 배지중의 glucose 및 lactose의 이용효과를 보면 *P. freudenreichii* KFCC 31227 단독 배양시 lactose를, *L. acidophilus* KFCC 32825 단독 배양시 glucose를 생육이나 산 생성에 더 잘 이용하였다. 또한 두 균주의 혼합배양시에는 단독배양에 비해 발효에 glucose나 lactose를 이용하는 시간이 더욱 단축되는 결과로 나타났다. 이것은 혼합배양시 두 균주의 상호작용에 의한 synergism 효과에 기인된 것으로 생각된다(1993년 8월 16일 접수, 1993년 9월 22일 수리).

Debarry(1839)는 미생물의 혼합배양에 의한 상호작용은 배지의 조성과 배양조건 등에 따라서 변화될 수도 있고 commensalism과 competition이 동시에 작용할 수도 있기 때문에 배지의 조성과 배양조건은 상호작용 형태를 결정 짓는 미생물의 유전적 형질만큼 중요하다 하였다.¹⁾

즉, 동종 또는 이종 균주간의 혼합배양에 의한 발효 산물의 생산이나 균의 생육상태는 배양조건에 따라서 단일 균주의 단독배양과 비교하여 뚜렷한 특징이 있음을 의미한다. 전보²⁾에서는 propionic acid와 lactic acid를 생산하는 두균주 *P. freudenreichii* KFCC 31227과 *L. acidophilus* KFCC 32825간의 단독배양과 혼합배양의 특성을 검토한 결과 균의 생육도와 유기산 생성량등에서 혼합배양시 월등한 synergism의 효과가 있음을 밝혔다.

우유중의 탄수화물은 주로 lactose로서 5%내외를 함유하고 있다.³⁾ lactose는 주로 유산균에 의해서 발효되어 유산을 생성하나 균종에 따라 발효할 수 있는 당의 종류가 상이하다고 하였다.⁴⁻⁵⁾

유산균에 의한 lactose의 대사는 EMP와 Leloir경로를 통해서 이루어 진다고 하며⁶⁻⁷⁾ 대사 경로에 따라서 균의 생육속도와 유산생성량 또한 차이가 있다고 했다.

*Propionibacterium*에 속하는 균종 또한 lactose를 비롯한 각종 당을 발효하여 propionic acid를 포함한 각종 유기산을 생산한다.

본 연구에서는 전보에 이어 이러한 두 균주를 단독 및 혼합배양하면서 synergism의 효과는 두 균주간의 어떠한 성분에 의해 상호 촉진되는가를 알아보기 위해 각균주의 발효여액의 영향과 배지중의 당을 이용한 유기산 생성 및 균의 생육도등에 미치는 상호작용을 검토하였다.

재료 및 방법

사용균주

본 실험에 사용한 균주는 한국종균협회에서 분양 받은 *L. acidophilus* KFCC 32825와 *P. freudenreichii* KFCC 31227를 사용하였다.

생육배지

Skim milk(Difco)를 증류수에 녹여 10%(w/v)용액으로 만든 후 100°C에서 30분간 멸균한 후 glucose 3%, yeast extract 0.3%를 무균적으로 첨가하여 사용하였다(S.G.Y.

배지). 또한 skim milk(10%,w/v)에 1N-HCl를 가하여 pH를 4.2로 조절한다음 5°C 냉장고에서 6시간 정치하여 침전된 단백질을 여과하고 그 여액을 1N-NaOH를 사용하여 pH 6.7-6.9로 조절하여 끓인 후 냉각하여 생기는 침전물을 제거한 액을 skim milk whey로 하였다. 이 whey를 시험관에 10 ml씩 분주하고 100°C에서 30분간 멸균하여 5°C 냉장고에 보관하면서 실험에 사용하였다(S.M.W 배지).

Starter의 배양과 접종

P. freudenreichii KFCC 31227은 sodium lactate배지⁸⁾에서 30°C, 24시간 배양하고 *L. acidophilus* KFCC 32825는 MRS broth⁹⁾에서 37°C, 8시간 간격으로 2회이상 계대 배양한 후 다시 1회 더 계대 배양하여 660 nm에서의 흡광도가 0.30이 될 때까지 증식시켰다. 혼합배양시 두 균의 접종비율을 상이하게 할 때는 두 균주 배양액의 흡광도가 서로 일정비율이 되고 그 합이 0.30이 되도록 증식시켰다. 그 다음 본실험에서 단독배양시는 2.0%(v/v)가 되도록 하였다.

균체의 생육측정

24시간 및 8시간마다 3회 계대배양한 *P. freudenreichii* KFCC 31227과 *L. acidophilus* KFCC 32825의 배양여액을 S.M.W.배지에 10 ml를 넣은 시험관에 단독 또는 혼합접종하여 37°C에서 배양하면서 일정시간 간격으로 660 nm에서의 흡광도를 측정하여 균체의 생육도로 나타내었다.

산도의 측정 및 유기산 분석

Screw capped test tube(1.5×12 cm)에 S.G.Y.배지를 10 ml씩 분주하여 배양한 다음 생성된 유기산을 0.1N-NaOH 용액으로 중화적정하였다. 이때 소비 ml수를 적정산도로 표시하였다. 생성된 유기산은 HPLC 방법¹⁰⁻¹¹⁾에 의하여 propionic acid와 latic acid를 분석하였다.

배양여액의 조제

S.G.Y.배지에서 배양여액을 배지로 하였을 때 산 생성 효과를 검토하기 위해서 *P. freudenreichii* KFCC 31227은 30°C, 48시간, *L. acidophilus* KFCC 32825는 37°C, 8시간, 각각배양시킨 다음 냉동원심분리기(Hitachi Model 55-p)로 4°C에서 12,000 rpm으로 30분간 원심분리하였다. Pellet는 제거하고 상정액을 모은 후 1N-NaOH 용액으로 pH 6.8이 되도록 조정하였다. 이것은 다시 34,000 rpm에서 25분 동안 재 원심분리하고 상정액을 취하여 Millipore membrane filter(pore size, 0.45µm)로 여과하여

배양여액으로 하였다.

배양여액의 산생성속진효과

L. acidophilus KFCC 32825 발효여액에 *P. freudenreichii* KFCC 31227를 그리고 *P. freudenreichii* KFCC 31227의 발효여액에 *L. acidophilus* KFCC 32825를 각각 접종하여 30°C에서 배양하면서 경시적인 유기산 함량과 적정산도를 측정하였으며 각 균주의 발효여액에 두 균을 접종하여 혼합발효시 30°C에서 혼합배양하면서 경시적으로 유기산 함량과 적정산도를 측정하였다.

당류의 분석¹²⁾

Richmond 등의 방법을 일부 변형하여 실시하였다. 즉 시료중의 단백질을 일부 변형시켜 침전 제거할 목적으로 시료 10 ml를 acetonitrile에 가하여 혼합한 후 20,000 rpm에서 20분 동안 원심분리(Sakuma Model 50-1)하여 얻은 상정액을 여과지로 여과하고 membrane filter를 통과시켜 얻은 여액을 SEP-PAK C18 cartridge (Waters사)로 지질, 단백질, 색소를 제거한 후 HPLC로 분석하였다.

결과 및 고찰

배양여액의 영향

P. freudenreichii KFCC 31227과 *L. acidophilus* KFCC

Table 1. Effect of each cultured broth filtrate on acid production.

Strain	Strains of cultured broth filtrate	Culture time (hr)	Relative acid production (%)
<i>P. freudenreichii</i> KFCC 31227	<i>L. acidophilus</i> KFCC 32825	0	100
		8	105
		16	110
		24	115
		32	130
<i>L. acidophilus</i> KFCC 32825	<i>P. freudenreichii</i> KFCC 31227	40	130
		48	125
		0	100
		8	100
		16	103
<i>P. freudenreichii</i> KFCC 31227	<i>L. acidophilus</i> KFCC 32825	24	105
		32	110
		40	105
		48	103

Culture time: *P. freudenreichii* KFCC 31227, 72hr.
L. acidophilus KFCC 32825, 48hr.

32825를 S.G.Y.배지에 각각 접종하여 경시적으로 배양한 것을 pH 4.2 로 조절하여 침전된 단백질을 제거한 후 조제한 S.G.Y.배양여액에 상대방의 균을 각각 배양하여 산생성에 미치는 영향을 검토한 결과는 Table 1. 과 같았다. *L. acidophilus*를 32시간 및 40시간 배양시킨 여액에 *P. freudenreichii*를 배양할 때와 *P. freudenreichii*를 역시 32시간 배양시킨 여액에 *L. acidophilus*를 배양할 때의 상대적인 산 생성 효과는 각각 130% 및 110%로 가장 높은 수치를 나타내었다.

이러한 결과에 따라 32시간 발효시킨 *L. acidophilus* 여액과 *P. freudenreichii*의 발효여액에 *L. acidophilus*와 *P. freudenreichii*를 단독 또는 혼합배양하면서 균 생육도, 산 생성등을 검토한 결과는 Fig. 1. 2. 3. 4. 5.와 같다. Fig. 1. 에서는 *L. acidophilus*의 배양여액과 *P. freudenreichii*의 배양여액에 *L. acidophilus*를 배양한 것으로 48시간까지 성장이 계속되어 자신의 배양여액에서는 0.58, 상대방의 배양여액에서는 0.47로 나타났다. Fig. 2.에서는 *P. freudenreichii*를 자신 및 상대방의 배양여액에서 배양한 결과로서 자신의 배양여액 보다는 상대방의 배양여액에서 전 배양 시간에 걸쳐 월등한 생육촉진 효과가 나타났으며 48시간대에서는 약 2.5배 이상이 증가되었다. 이것은 Fig. 1.에서 나타난 결과와는 비교되는 것으로서 *L. acidophilus*가 *P. freudenreichii*의 영향을 받는 것보다 *P. freudenreichii*가 *L. acidophilus*의 상대적 영향을 더욱 많이 받는다는 것을 나타낸 결과라고 볼 수 있다. Fig. 3.

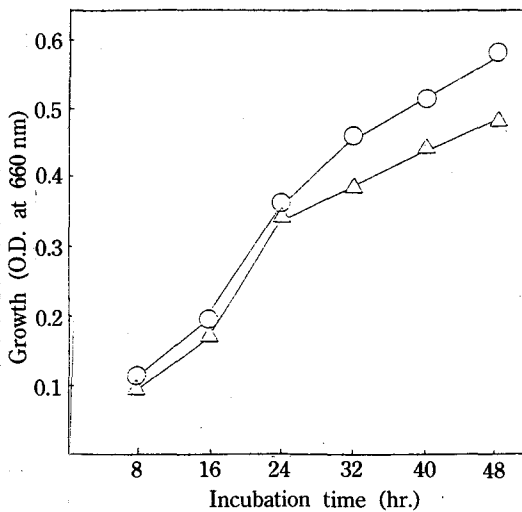


Fig. 1. Effect of culture filtrate of *L. acidophilus* KFCC 32825 on the growth in skim milk whey medium.
○, *L. acidophilus* KFCC 32825; △, *P. freudenreichii* KFCC 31227

과 Fig. 4.에서는 자신 및 상대방의 배양여액에서의 산 생성 결과를 나타낸 것으로서 자신의 배양여액에서 보다는 상대방의 배양여액에서 총산의 증가를 나타냈으며 *P. freudenreichii*가 *L. acidophilus*의 배양여액에서 배양될 때 자신의 배양여액에서 더욱 많은 총산의 증가현상이 나타났다. Fig. 5.에서는 각각의 발효여액에 두 균주를

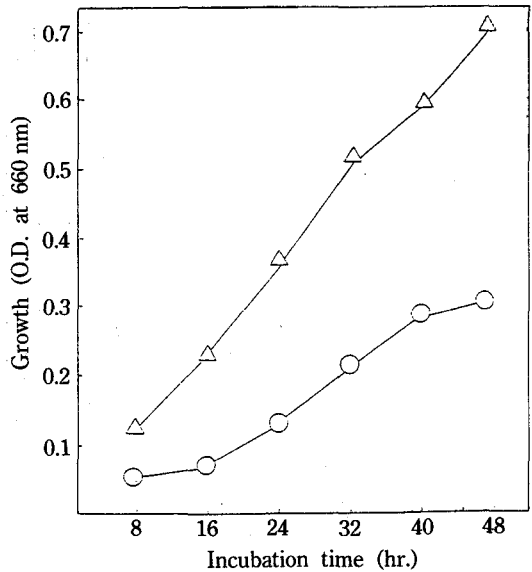


Fig. 2. Effect of culture filtrate of *P. freudenreichii* KFCC 31227 on the growth in skim milk whey medium
○, *P. freudenreichii* KFCC 31227; △, *L. acidophilus* KFCC 32825

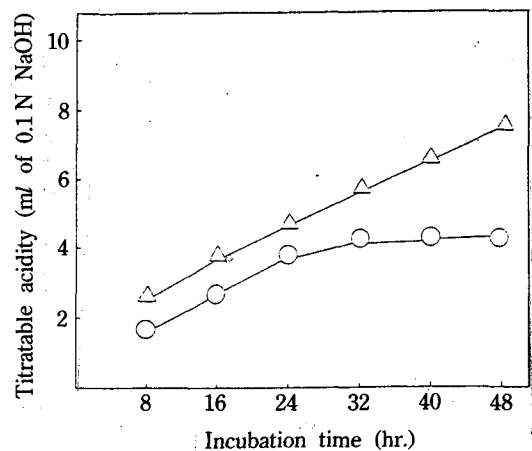


Fig. 3. Effect of culture filtrate of on the acid production by *L. acidophilus* KFCC 32825
○, *L. acidophilus* KFCC 32825; △, *P. freudenreichii* KFCC 31227

혼합배양하였을 경우 생성되는 lactic acid 와 propionic acid의 함량을 나타낸 것으로서 lactic acid의 경우 *L. acidophilus*의 배양여액에 배양하였을 때 최대함량은 32시간 배양에서 23 mg% 였으나 *P. freudenreichii*의 배양여액에서는 16시간에 80 mg%, 24시간에 85 mg%로 월등한 촉진효과를 나타내었고 propionic acid 의 경우 상대편의 배양여액에서는 32시간배양에 최대 42 mg%, 40시간에 40 mg% 로 나타났으며 자신의 배양여액에서는 이보다 훨씬 낮은 값으로 16시간에 19 mg%, 24시간에 18.5

mg%로서 약 2배의 촉진효과를 나타냈다.

당류의 영향

HPLC 당분석 방법으로 배지중 당의 이용과 배지중에 존재하는 당의 구성을 검토하였다. *P. freudenreichii*와 *L. acidophilus*를 경시적으로 각각 단독 또는 혼합배양 하면서 당의 변화를 나타낸 것은 Fig. 6, 7, 8.과 같았다. Fig. 6.은 *L. acidophilus*만을 단독으로 발효할 경우 glucose 양은 계속 감소되어 48시간에서는 2.4%까지 감소되어 전 발효기간에 *L. acidophilus*는 배지중의 glucose를 잘 이용하였다. 그러나 lactose 의 경우에는 4시간 발효에서 92%로 감소하였으나 40~48시간대에서 81~88%로 감소됨을 알 수 있었다. 이것은 *L. acidophilus*의 단독 배양시 glucose 등의 단당류는 잘 발효할 수 있으나 lactose, oligosaccharide 등의 소당류등은 발효능력이 없거나 상당히 적은 것으로 생각되는 결과이다. Premi 등⁴⁾은 *L. acidophilus*속은 대체적으로 β -galactosidase와 phospho- β -galactosidase 두 효소를 함유하고 있다고 했으며 젖산균들은 일반적으로 glucose, lactose, fructose, maltose 등을 잘 이용했다고 했고 lactose는 유산균이 생산하는 β -galactosidase에 의해 glucose와 fructose 등의 단당류를 가수분해 할 수 있다고 했다. 그러나 류⁵⁾의 보고에 의하면 실험에 사용한 유산균중 *L. acidophilus*는 sucrose, lactose 등의 oligosaccharide 등을 분해하지 못하여 그 생육에 이용치 못하고 이미 분해 생성된 단당류 즉, glucose, fructose, galactose 등만을 발효에 잘 이용할 수 있다고 했다. 이상의 결과로부터 본실험에 사용한 *L. acidophilus*는 glucose 등의 단당류는 자화발효가 가능하나 lactose 는 류⁵⁾의 보고서에서와 같이 lac-

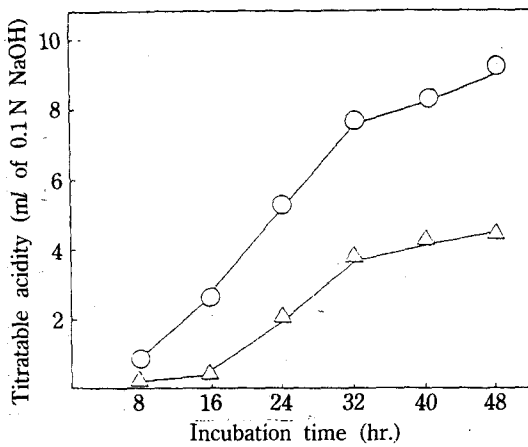


Fig. 4. Effect of culture filtrate of on the acid production by *P. freudenreichii* KFCC 31227
○, *L. acidophilus* KFCC 32825; △, *P. freudenreichii* KFCC 31227

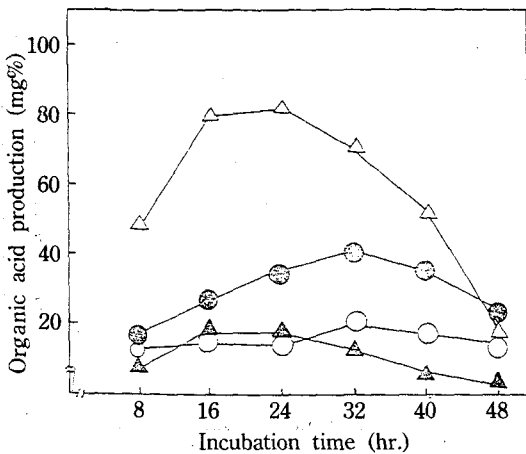


Fig. 5. Effect of culture filtrate on the organic acid production by mixed culture
○, Lactic acid of *L. acidophilus* KFCC 32825; ●, Propionic acid of *L. acidophilus* KFCC 32825; △, Lactic acid of *P. freudenreichii* KFCC 31227; ▲, Propionic acid of *P. freudenreichii* KFCC 31227

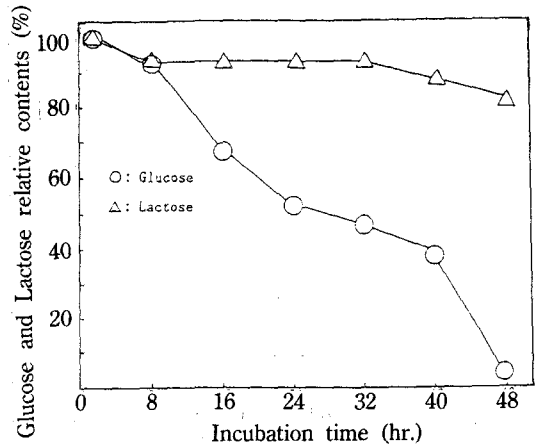


Fig. 6. Changes of glucose and lactose contents in S.G.Y. medium during fermentation by *L. acidophilus* KFCC 32825. ○, glucose; △, lactose

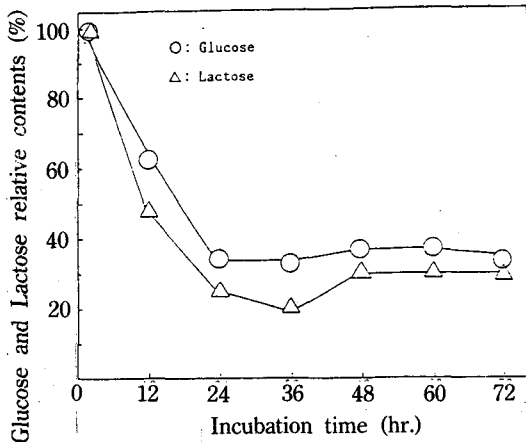


Fig. 7. Changes of glucose and lactose contents in S.G.Y. medium during fermentation by *P. freudenreichii* KFCC 31227. O, glucose; Δ, lactose

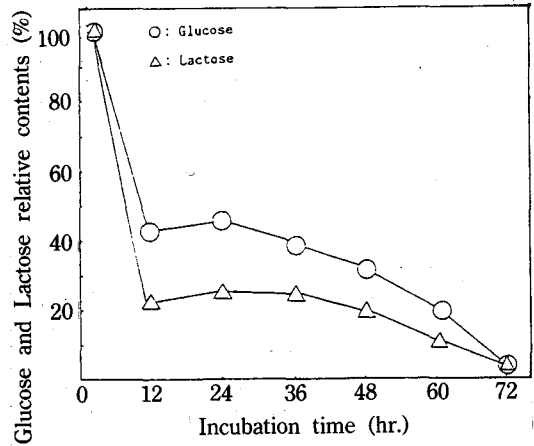


Fig. 8. Changes of glucose and lactose contents in S.G.Y. medium during fermentation by *L. acidophilus* KFCC 32825 and *P. freudenreichii* KFCC 31227. O, glucose; Δ, lactose

tase 의 효소생산이 적어 그 발효 능력이 저하되는 현 상임을 알 수 있었다. 또한 *P. freudenreichii*만으로 단 독발효시킨 상태에서 경시적으로 당의 변화를 검토한 결과를 Fig. 7.에 나타내었다. Glucose, lactose를 72시간 까지 발효시킨 결과로 glucose 보다 lactose 가 전 발 효기간을 통해 감소량이 큼을 알 수 있었으며 72시간 대에서의 glucose는 34%, lactose는 30% 수준으로 감소 되었다. 이러한 것은 *P. freudenreichii*는 glucose에 있어서는 *L. acidophilus*보다 발효능력이 떨어지나 lactose에 있어서는 더 잘 발효할 수 있다는 것을 나타낸 결과이다. Hettinga 등¹³⁾은 *Propionibacterium*의 당이용성 보고에서 *P. freudenreichii*는 sucrose, maltose, lactose를 발효하지 못하나 그 외의 모든 단당류를 발효이용할 수 있다고 하였으며 *P. shermanii*는 sucrose, maltose만 발효하지 못하고 그 외의 모든 단당류등을 발효이용할 수 있다고 하였다. 그러나 균종에 따라 또는 배지조성과 기타 환경, 특히 yeast extract 첨가시 그것의 어떤 성분에 의해 sucrose, maltose 또는 lactose등도 발효이용할 가능성이 있다고 하였다. Sherman 등¹⁴⁾은 *Propionibacterium*은 lactose와 lactate를 자화발효하여 propionic acid와 acetic acid를 생산할 수 있으며 cheese를 만드는 동안 lactic acid의 형성에 yeast extract가 존재함으로써 *Propionibacterium*속 균이 발육 촉진됨을 확인했다. 이러한 결과에서 *P. freudenreichii*의 단독발효시 lactose의 감소는 배지중에 첨가된 yeast extract 영향이 큰 것이라고 생각되며 yeast extract 의 어떤성분이 관여하는가는 추후 더욱 연구하여야 될 것으로 생각된다. Fig. 8.은 *P. freudenreichii*와 *L. acidophilus*를 혼합배양하여 glucose 및 lactose 를 발효시킨 결과로서 각균주 단독배양에서의 결

과와 마찬가지로 glucose 와 lactose 의 양은 점진적으로 감소되고 그 감소되는 비율은 단독발효에서 보다 더 빠르게 진행되어 72시간에서는 잔존 glucose 5.8%, lactose 2.2%로서 배지중의 거의 모든 당이 분해되어 발효에 이용되는 것을 알 수 있으며 이것은 양균주가 배지중 존재하는 당을 서로 경쟁적으로 그 성장에 이용한 결과라고 믿어지며 산 생성 및 성장을 등에서 단독배양에서 보다 혼합배양에서 더 촉진효과가 나타나는 이유는 배 지중 이러한 당을 더 효율적으로 이용하여 상대편 균이 이용 가능한 상태로서의 분해산물을 더 많이 공급해주 므로서 생기는 결과라고 믿어진다. 즉, *P. freudenreichii*는 우선적으로 배지중 glucose 를 이용하여 성장하면서 *L. acidophilus*가 잘 이용하지 못하는 배지중의 lactose 를 분해하여 glucose, fructose 등의 단당류를 생성하며 이때 생성된 단당류를 *L. acidophilus*가 이용 성장하면서 lactic acid 를 생산하면 이 lactic acid 를 *P. freudenreichii*가 재차 이용 성장하여 propionic acid 등을 생산하는 synergism 또는 commensalism의 관계가 형성됨을 알 수 있었다. 이러한 것은 Jannifer 등¹⁵⁾ Lee 등¹⁶⁾이 보고한 것과 같이 *P. shermanii* 등의 *Propionibacteria*는 배지중에 glucose 와 lactic acid 가 공존시 오히려 lactic acid 를 더 선호하여 성장에 이용한다고 하였으며 Fredrickson 등¹⁷⁾은 *P. shermanii*와 *L. plantarum*의 혼합배양시 glucose 만 존재하고 lactic acid 가 존재치 않는 배지에서 처음엔 glucose 를 위한 경쟁으로 시작하다가 *L. plantarum*이 glucose 를 먼저 이용하여 성장하면서 lactic acid 를 배지내로 방출하면 *P. shermanii*는 lactic acid 를 이용하여 성장하므로 최초의 경쟁은 재빨리 commensalism

으로 전환된다고 하였다. 이러한 보고들로 미루어보아 본 실험에 사용한 L. *acidophilus*가 생산한 lactic acid를 P. *freudenreichii*가 이용하여 성장할 수 있다고 생각한다.

참 고 문 헌

1. Megee, R. D., Drake, J. F., Fredrickson, A. G. and Tsuchiya, H. M.: Canadian J. Microbiol., 18 : 1733 (1972)
2. 민윤식, 김기철: J. Agr. Sci. Chungbuk National University, 10 : 141(1992)
3. Alm, L.: J. Dairy Sci., 65: 346(1982)
4. Premi, L. W., Sandine, E., and Ellker, P. K.: Appl. Microbiol., 24(1) : 51(1972)
5. 류인덕: 연세대학교 박사학위논문: (1986)
6. Bissett, D. L. and Anderson, R. L.: J. Bacteriol., 117 : 318(1974)
7. Thompson. J.: J. Bacteriol., 144 : 683(1980)
8. Elmer H.: In 'Standard Methods for the Examination of Dairy Products'. 14 th ed., p.67(1972)
9. Alm. L.: J. Dairy Sci., 65 : 346(1982)
10. Thomas, M., Anderson, A., and Robert Schwartz, D.: Appl. Environmental Microbiol., 51(2): 427-428 (1986)
11. Rajakyla, E. J.: Chromatogr. 218 : 695-701(1981)
12. Richmond, M. L., Barfuss, B. R., Harte. J. I., and Stein, C. M.: J. Dairy. Sci, 65(8) : 1394(1982)
13. Hettinga, D. H. and Reinbold, G. W.: J. Milk Food. Technol., 35(5) : 295(1971)
14. Sherman, J. H. and Shaw, R. M.: J. Gen. Physiol. 3 : 657(1921)
15. Jennifer, A. P. and Nancy, J.: Appl. Environ. Microbiol., 44(3) : 715(1982)
16. Lee, I. H., Fredrickson, A. G. and Tsuchiya, H. H.: Appl. Microbiol., 28(5) : 831(1974)
17. Lee, I. H., Fredrickson, A. G. and Tsuchiya, H. H.: Bioengineering, 18 : 513(1976)

Identification of the growth stimulatory components in the single and mixed cultures of *Propionibacterium freudenreichii* KFCC 31227 and *Lactobacillus acidophilus* KFCC 32825.

Yun-Sik Min, Ki-Cheul Kim, Myong-Yur Lee and Ung-Soo Lee (Department of Food Engineering, Chungju National University, 383-879, Korea, Department of Food Engineering Chungbuk National University, Cheongju, 360-763, Korea.)

Abstract : The effects of culture broth filtrates, sugar changes and utilization on the growth and acid production of P. *freudenreichii* KFCC 31227 and L. *acidophilus* KFCC 32825 were investigated in S.G.Y. (Skim milk, glucose, yeast extract) and SMW (skin milk whey) medium by the single and mixed cultures. The growth and acid production by mixed culture and in cultured broth filtrate of the other party were more affected than those of single culture and self-cultured broth filtrate. When the two strains were cultured, P. *freudenreichii* KFCC 31227 utilized with lactose more than glucose and L. *acidophilus* KFCC 32825 was glucose more than lactose in the growth and acid production. The mixed culture of two strains was more affected to sugar utilization than single culture. This result was considered due to the synergistic effect by interaction of these two strains in mixed culture.