

유청배지에 *Lactobacillus acidophilus* KCCM 32820과
Propionibacterium freudenreichii KCCM 31227로 혼합배양시
유기산 생성에 관한 연구

이 정 훈¹

안산공과대학 호텔조리과

Study on the Production of Organic Acid by Fermentation with
Mixed Culture of *Lactobacillus acidophilus* KCCM 32820 and
Propionibacterium freudenreichii KCCM 31227 in Whey Broth

Jeong-Hoon Lee¹

Dept. of Hotel Culinary Arts, Ansan College of Technology

Abstract

This study was carried out to evaluate the growth characteristics of *Lactobacillus acidophilus* KCCM 32820 and *Propionibacterium freudenreichii* KCCM 31227 and the production of propionic and acetic acids in 5% and 10% whey broth by mixed culture of *L. acidophilus* KCCM 32820 and *P. freudenreichii* KCCM 31227. Exponential phase of *L. acidophilus* KCCM 32820 was in the range of 6~12 hrs and *P. freudenreichii* KCCM 31227 was in the range of 36~108 hrs. In the mixed culture, production of propionic acid was shown to be greater value in the 10% whey broth than in the 5% whey broth and to be greater value in the low temperature for a long time than in sterilization by autoclave. Maximum production of propionic acid was 8.88 mg/mL in the 10% whey broth fermented at 120hrs. Production of acetic acid was revealed to be greater value in the 10% whey broth than in the 5% whey broth. The production quantity ratio of propionic acid to acetic acid was shown between 2:1~3:1 during the fermentation process.

Key words : *Lactobacillus acidophilus* KCCM 32820, *Propionibacterium freudenreichii* KCCM 31227, exponential phase, propionic acid, acetic acid.

I. 서 론

Propionic acid는 공업적으로 n-butane의 산화로 acetic acid를 만들 때나 액상의 propane이나 propionaldehyde의 산화로 제조하여(Supaporn · Shang-Tian 2005) 매우 경제적이거나, 점차 미생물 발효를 이용한

생합성 방법을 이용하고 있다. 미생물에 의한 방법으로 propionibacteria가 glucose와 lactose를 이용하여 propionate, acetate, CO₂ 및 기타 산을 생성한다 (Playne 1985). Propionic acid 생산에 전통적으로 사용되어온 기질은 유청, 당밀, 설탕, xylose(Carrondo *et al.* 1988) 등인데, propionibacteria에 의한 pro-

“본 연구는 2005학년도 안산공과대학 학술연구비 지원으로 수행되었음.”

☎ : 교신저자, 011-715-2526, jh19526@act.ac.kr, 경기도 안산시 초지동 671

propionic acid 발효는 높은 생산비, 낮은 생산성, 느린 미생물 증식, 생성된 propionic acid나 acetic acid 등에 의하여 저해를 받는다(Hettinga · Reinbold 1972) 미생물 발효로 생산하는데 어려움이 있다.

유청을 기질로 하여 propionic acid를 생산할 때 유청 농도나 살균조건이 propionibacteria의 증식에 영향을 미친다. Thomas 등(Thomas *et al.* 1986)은 *Propionibacterium shermanii*로 propionic acid 생산 시 유청의 살균방법에 따른 연구로 저온살균이 고압증기멸균보다 효과적이라고 하였고, Gorden과 Kalan(Gorden · Kalan 1974)은 유청을 고압증기멸균하면 갈변반응으로 단백질의 자유 아미노 그룹이 유당의 aldehyde 그룹과 반응하여 영양 손실을 가져와 propionibacteria의 증식에 저해를 준다고 하였다.

Propionic acid는 산업적으로 곡물보존제, 항공방이제, 제초제 등에 이용하는데(Grinstead *et al.* 1992) 특히, 식품산업에서 propionic acid나 그 염은 빵의 보존료로 이용하는 것은(Suomalainen · Mayra-Makinen 1999) 이들이 약산이며 곰팡이와 *Bacillus* 속의 증식을 억제하기 때문이다. 또한 propionibacteria는 인간의 건강에 유익한 folic acid나 비타민 B₁₂를 생산하고 bacteriocins로 propionicin PLG-1, jensesiin G를 생산하며, 저칼로리당인 trehalose 등을 생산한다(Jeroen *et al.* 2002). Tsutomu 등(Tsutomu *et al.* 1994)은 propionibacteria가 장내의 bifidobacteria의 증식을 촉진한다고 하였고, Hiroharu 등(Hiroharu *et al.* 1997)은 *Propionibacterium freudenreichii*가 생산한 물질 중 bifidobacteria 증식 촉진제를 분리하였다. Ara(Ara 2003)는 propionic acid가 체내에서 칼슘의 흡수를 촉진하고, 혈중 콜레스테롤 농도를 저하시킬 뿐만 아니라, propionibacteria는 정장작용, 면역효과, 항암효과 등이 있다고 하였다.

본 연구에서는 *L. acidophilus* KCCM 32820과 *P. freudenreichii* KCCM 31227의 성장곡선을 구하였고, 치즈제조시 부산물로 발생하는 유청을 기질로 하여 고압증기멸균과 저온살균 후 *L. acid-*

ophilus KCCM 32820과 *P. freudenreichii* KCCM 31227로 혼합배양시 생성된 propionic acid와 acetic acid 양을 정량함으로써 미생물 생합성으로 생성된 유기산을 산업적으로 이용하기 위한 기초자료를 얻고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험재료

1) 사용균주 및 배지

유청 발효용 미생물로 한국미생물보존센터에서 분양받은 *Lactobacillus acidophilus* KCCM 32820과 *Propionibacterium freudenreichii* KCCM 31227을 사용하였고 *L. acidophilus* KCCM 32820의 계대배양용 배지는 lactobacilli MRS 배지(Difco Co.)를 사용하였으며, 균수 측정은 lactobacilli MRS 배지에 agar를 첨가하여 사용하였다. *P. freudenreichii* KCCM 31227의 계대배양용 배지는 RCM(reinforced clostridial medium, Oxoid CM 149)을 사용하였고 균수 측정은 RCM에 agar를 첨가하여 사용하였다.

2) 유청 배지 제조

치즈를 제조하고 얻은 부산물을 분무건조로 만든 dry sweet 유청(Calpro Co., Ltd., USA)을 5%와 10% 농도로 제조하여 고압증기 멸균(121℃에서 15분) 및 저온살균(65℃에서 30분) 후 유기산 생성용 유청 배지로 사용하였다.

2. 실험방법

1) *L. acidophilus* KCCM 32820과 *P. freudenreichii* KCCM 31227의 starter culture 제조

Lactobacilli MRS 배지 55 g을 증류수 1,000 mL에 10분간 용해한 후 cap tube 10개에 각각 10 mL씩 분주하였다. 별도로 배지 500 mL를 삼각플라

스크에 취하고 agar 7.5 g을 첨가하여 면전하였다. 각각의 배지를 121°C의 고압증기 멸균기에서 15분간 살균 후 냉각시켜 2 mL를 한국미생물보존센터에서 분양 받은 *L. acidophilus* KCCM 32820 종균에 넣어 희석한 후 1 mL씩 취하여 cap tube 2개에 접종하여 *L. acidophilus* KCCM 32820 starter culture를 제조하였다. 35°C의 인큐베이터에서 16시간 배양하여 균수가 $1 \sim 2 \times 10^7$ cfu/mL 되도록 하였고, 계대배양을 2회 더 하여 활성이 강한 균을 실험에 사용하였다. 같은 방법으로 RCM 40 g을 취하여 증류수 1,000 mL에 10분간 용해 후 살균하여 만든 배지로 *P. freudenreichii* KCCM 31227의 starter culture를 제조하였다.

2) *L. acidophilus* KCCM 32820의 성장곡선

Lactobacilli MRS 배지의 pH를 7.0으로 조절하여 멸균한 500 mL에 *L. acidophilus* KCCM 32820을 1% 접종하여 35°C 인큐베이터에서 배양하면서 3시간 단위로 36시간까지 OD(optical density) 값의 변화를 측정하여 성장곡선을 구하였다. OD는 Spectrophotometer(8452A Diode Array Spectrophotometer, Hewlett Packard Co., Ltd., USA)로 660 nm에서 측정하였다.

3) *P. freudenreichii* KCCM 31227의 성장곡선

RCM의 pH를 7.0으로 조절하여 멸균한 500 mL에 *P. freudenreichii* KCCM 31227을 1% 접종 후 35°C 인큐베이터에서 120시간 배양하면서 12시간 단위로 OD값을 측정하여 성장곡선을 구하였으며 *L. acidophilus* KCCM 32820 측정과 동일한 방법으로 측정하였다.

4) 유기산 함량 측정

5%와 10% 유청 배지를 5 N NaOH로 pH를 6.5로 조절하여 고압증기멸균 및 저온살균 후 *L. acidophilus* KCCM 32820과 *P. freudenreichii* KCCM

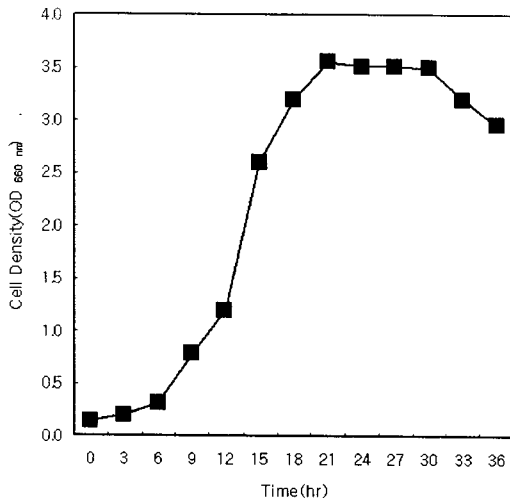
31227을 각각 1% 접종하여 35°C의 인큐베이터에서 배양하였다. 120시간 배양하면서 12시간 단위로 5 N NaOH로 pH를 6.5로 조절하였고, pH 조절 전 생성된 propionic acid와 acetic acid를 HPLC(LC1100 Series, Hewlett Packard Co., Ltd., USA)로 측정하였다. 채취한 시료를 12,000 rpm의 원심분리기(Supra21K, Hanil Co., Korea)에서 원심분리 후 상등액을 취하여 millipore membrane filter(pore size 0.45 μ m)로 여과하여 분석에 사용하였다. 분석은 Aminex HPX-87H ion exclusion type(L300 mm \times 7.8 mm, USA)의 column을 사용하였으며 이동상은 35°C에서 5 mM H₂SO₄ 용액을 0.6 mL/min의 속도로 흘려서 215 nm에서 ADC(RI Detector)로 검출하였다. Propionic acid 및 acetic acid 표준용액은 각각을 1 mL씩 평량하여 100 mL 메스플라스크에 채우고 증류수를 넣어 100 mL로 한 후 magnetic stirrer로 10분간 용해시키고 0.45 μ m membrane 필터로 여과하여 제조하였다.

III. 결과 및 고찰

1. *L. acidophilus* KCCM 32820의 성장곡선

Lactobacilli MRS 배지 500 mL에 *L. acidophilus* KCCM 32820을 1% 접종하여 35°C 인큐베이터에서 배양하면서 3시간 단위로 36시간까지 OD 값의 변화를 측정한 결과는 Fig. 1과 같다.

균 접종 후 OD값은 0.15이었고 배양 6시간에 0.32로 이 시간대에 곡선의 증가가 완만하여 *L. acidophilus* KCCM 32820의 유도기로 나타났고, 6시간 경과부터 곡선이 급격히 증가하여 배양 18시간에 3.2, 배양 21시간에 3.56으로 최대값을 나타내 이 시간대가 대수기로 나타났다. 배양 21시간을 정점으로 균수가 감소하여 21시간 이후가 정지기 및 쇠퇴기임을 보여 주었다. Lan-Szu와 Bart(Lan-Szu · Bart 1999)는 사람의 장에서 분리한 *L. acidophilus* ATCC 33200을 pH 6.8의 lactobacilli MRS 배지에서 배양시 대수기가 4~8시간이라고

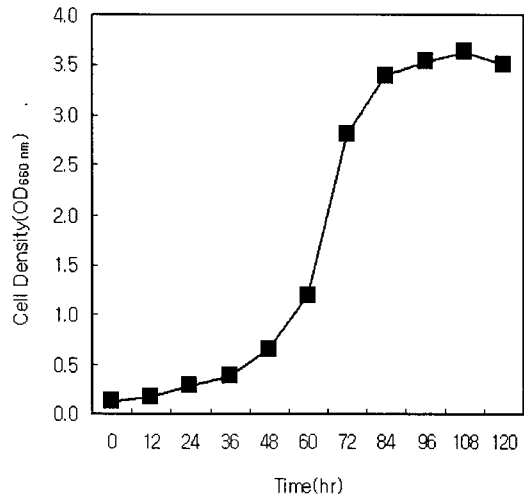


〈Fig. 1〉 Growth curve of *L. acidophilus* KCCM 32820 in lactobacilli MRS broth.

한 것보다는 긴 시간이었으나 Lee 등(Lee *et al.* 1984)이 탈지대두유를 배지로 하여 *L. acidophilus*를 37°C에서 24시간 배양하였을 때의 대수기가 12시간이라고 한 것과는 유사한 경향을 나타냈다. Shang-Tian과 Yan (Shang-Tian · Yan 1995)은 7.9% whey lactose 용액의 pH를 7.0으로 조절하여 32°C에서 고정화한 *L. acidophilus*를 recycle 회분식으로 180시간 배양하였을 때 OD 값은 배양 50시간에 4.2로 최대라고 하였는데, 본 실험에서는 배양 21시간에 3.56로 나타나 이의 결과보다 다소 낮은 값을 보여 주었다.

2. *P. freudenreichii* KCCM 31227의 성장곡선

RCM 500 mL에 *P. freudenreichii* KCCM 31227을 1% 접종하여 35°C 인큐베이터에서 120시간 배양하면서 12시간 단위로 OD값을 측정된 결과는 Fig. 2와 같다. 균 접종 후 OD값은 0.12이었고 배양 36시간에 0.38로 이 시간대에 곡선의 증가가 완만하여 *P. freudenreichii* KCCM 31227의 유도기로 나타났고, 36시간 경과부터 곡선이 급격히 증가하여 배양 72시간에 2.8, 배양 108시간에 3.64로 최대값을 나타내 이 시간대가 대수기로 나

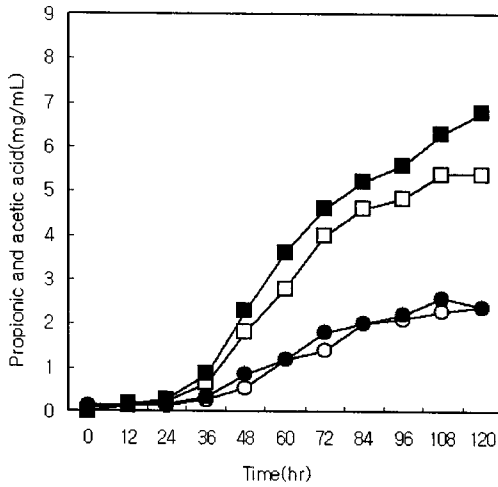


〈Fig. 2〉 Growth curve of *P. freudenreichii* KCCM 31227 in RC medium.

타났으며 108시간을 정점으로 균수가 감소하였다. Vaughan(Vaughan 1988)은 lactate 배지에 *P. freudenreichii* subsp. *shermanii*를 접종하여 30°C에서 배양하였을 때 600 nm에서 측정된 OD 값은 배양 17시간에 0.3, 47시간에 1.3이라 한 결과보다는 낮은 OD값을 나타냈으나, Min(Min 1992)이 10% skim milk whey에 *P. freudenreichii*를 접종하여 30°C에서 배양한 후 660 nm에서 OD 값을 측정된 결과 24시간에 0.15, 36시간에 0.40, 48시간에 0.55, 72시간에 0.80이라고 한 결과보다 본 실험에서의 OD 값이 높아 skim milk whey보다는 RCM에서 잘 자라는 것으로 나타났다. 또한 Inn 등(Inn *et al.* 1974)은 glucose 0.41 g/L 배지의 초기 pH를 6.5로 하여 *P. shermanii*를 접종한 후 27°C에서 배양한 결과 14시간에 균 농도가 10⁹ cfu/mL에 도달했다고 하였다.

3. 5% 유청 배지에서 유기산 생성

5% 유청 배지를 5 N NaOH로 pH를 6.5로 조절하여 고압증기멸균 및 저온살균 후 *L. acidophilus* KCCM 32820과 *P. freudenreichii* KCCM 31227을 각각 1% 접종하여 35°C의 인큐베이터에서 혼합 배양하면서 12시간 단위로 propionic acid 및 acetic



〈Fig. 3〉 Production of propionic and acetic acid in 5% whey broth cultured by *L. acidophilus* KCCM 32820 and *P. freudenreichii* KCCM 31227.

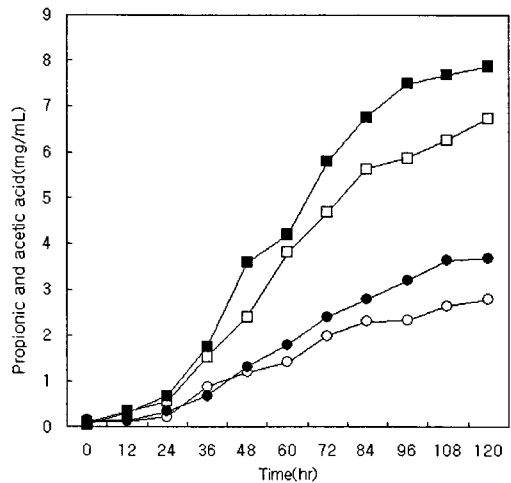
■ : propionic acid of the whey broth pasteurized for 30 min at 60°C, □ : propionic acid of the whey broth sterilized for 15 min at 121°C, ● : acetic acid of the whey broth pasteurized for 30 min at 60°C, ○ : acetic acid of the whey broth sterilized for 15 min at 121°C.

acid 생성량을 측정된 결과는 Fig. 3과 같다. Propionic acid 생성량은 고압증기멸균하였을 경우, 배양 24시간에 0.24 mg/mL, 배양 72시간에 4 mg/mL, 배양 120시간에 5.4 mg/mL를 나타냈고, 저온살균하였을 경우 배양 24시간에 0.28 mg/mL, 배양 72시간에 4.6 mg/mL, 배양 120시간에 6.8 mg/mL를 나타내 고압증기멸균보다 저온살균이 propionic acid 생성에 효과적임을 보여 주었다. 저온살균한 경우, propionic acid 생성량은 36시간부터 120시간까지 꾸준한 증가경향을 나타냈다. Acetic acid 생성량은 살균방법에 관계없이 유사한 생성 경향을 보여 주었다. Gorden과 Kalan(Gorden · Kalan 1974)은 유청을 고압증기멸균하면 갈변반응이 일어나 단백질의 자유 아미노 그룹이 lactose의 aldehyde 그룹과 반응하여 영양 손실을 가져오기 때문에 미생물 증식에 저해를 준다고 하였다. EL-Hagarawy 등(EL-Hagarawy *et al.* 1956)은 lactose와 glucose를 기질로 하여 10종의 *P. shermanii*를 9일간 배양

할 때 propionic acid와 acetic acid의 생성비율은 2 : 1 정도라고 하였다.

4. 10% 유청 배지에서 유기산 생성

10% 유청 배지를 5 N NaOH로 pH를 6.5로 조절하여 고압증기멸균 및 저온살균 후 *L. acidophilus* KCCM 32820과 *P. freudenreichii* KCCM 31227을 각각 1% 접종하여 35°C의 인큐베이터에서 배양하면서 12시간 단위로 propionic acid 및 acetic acid 생성량을 측정된 결과는 Fig. 4와 같다. Propionic acid 생성량은 고압증기멸균하였을 경우 배양 24시간에 0.56 mg/mL, 배양 72시간에 4.68 mg/mL, 배양 120시간에 6.74 mg/mL를 나타냈고, 저온살균하였을 경우 배양 24시간에 0.68 mg/mL, 배양 72시간에 5.8 mg/mL, 배양 120시간에 7.88 mg/mL를 나타내 10% 유청 배지에서도 고압증기멸균보다 저온살균이 propionic acid 생성에 효과적임을 보여 주었다. 배양 84시간까지는 저온살균



〈Fig. 4〉 Production of propionic and acetic acid in 10% whey broth cultured by *L. acidophilus* KCCM 32820 and *P. freudenreichii* KCCM 31227.

■ : propionic acid of the whey broth pasteurized for 30 min at 60°C, □ : propionic acid of the whey broth sterilized for 15 min at 121°C, ● : acetic acid of the whey broth pasteurized for 30 min at 60°C, ○ : acetic acid of the whey broth sterilized for 15 min at 121°C.

이 고압증기멸균보다 약간 많은 propionic acid를 생산하였으나 84시간 이후부터 120시간까지 시간이 경과함에 따라 생산량의 격차가 더 커졌다. Acetic acid도 저온살균이 고압증기멸균보다 시간의 경과에 따라 많은 양의 생성을 나타냈다.

Thomas 등(Thomas *et al.* 1986)은 *P. shermanii*로 propionic acid를 생산하는데 배지의 유청 농도를 증가시켜 고압증기멸균한 경우 propionic acid의 생산이 감소하였으나 저온살균하였을 경우에는 감소하지 않았고, yeast extract 농도를 5 g/L에서 10 g/L로 증가시키면 고압증기멸균에서 저해가 적었다고 하였다. Lactose는 고압증기멸균에 의해 lactulose(4-(O-β-D)-galacto-pyranosyl-D-fructofuranose)로 전환되어 미생물이 발효시키지 못한다고 Thyanithy 등(Thyanithy *et al.* 1982)은 보고하였다. 한편, Shang-Tian과 Yan(Shang-Tian · Yan 1995)은 lactose를 기질로 하여 propionic acid를 생산할 때 최적 pH는 6.5이나 이보다 낮은 pH에서는 발효율과 수율이 낮았고, yeast extract나 trypticase를 첨가하면 발효율과 수율이 증가한다고 하였다.

IV. 요약

L. acidophilus KCCM 32820과 *P. freudenreichii* KCCM 31227의 성장곡선 및 5%와 10% 유청 배지를 고압증기멸균 및 저온살균하여 *L. acidophilus* KCCM 32820과 *P. freudenreichii* KCCM 31227을 혼합배양시 생성되는 propionic acid와 acetic acid 양을 측정하였다. *L. acidophilus* KCCM 32820의 대수기는 6~21시간, *P. freudenreichii* KCCM 31227의 대수기는 36~108시간으로 나타났다. 혼합배양시 propionic acid의 생성량은 5% 유청 배지보다는 10% 유청 배지에서, 고압증기 멸균보다는 저온살균에서 많은 양이 생성되었다. Propionic acid의 최대 생산량은 10% 유청 배지를 저온살균하였을 때 배양 120시간에 7.88 mg/mL이었다. Acetic acid도 5%보다는 10% 유청 배지에서 높은 생성

량을 나타냈고 그 생성량은 배양시간이 경과함에 따라 propionic acid 생성량의 2 : 1~3 : 1이었다.

참고문헌

1. Supaporn S · Shang-Tian Y (2005) : Enhanced propionic acid fermentation by *Propionibacterium acidipropionici* mutant obtained by adaptation in a fibrous-bed bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* 91:325-337.
2. Playne MJ (1985) : Propionic acid and butyric acids. In: Comprehensive Biotechnology, vol. 3. Moo-Young M(ed.) Pergamon Press, New York, USA p. 731-755.
3. Carrondo MJT · Crespo JPSG · Moura MJ (1988) : Production of propionic acid using a xylose utilizing *Propionibacterium*. Biotechnical Engineering Laboratory, Department of Chemistry p. 295-310.
4. Hettinga DH · Reinbold GW (1972) : The propionic acid bacteria-A review II. Metabolism. *J. Milk Food Technol.* 35:358-372.
5. Thomas MA · Elizabeth AB · Nelson G · Robert DS (1986) : Inhibitory effect of autoclaving whey-based medium on propionic acid production by *Propionibacterium shermanii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 51:427-428.
6. Gorden WG · Kalan EB (1974) : Proteins of Milk. In: Webb BH, Johnson AH, Alford JA(ed.). Fundamentals of dairy chemistry, 2nd ed. The AVI Publishing Co., Westport, Connecticut, USA p. 102-103.
7. Grinstead DA · Barefoot SF · Jensenin G (1992) : A heat-stable bacteriocin produced by *Propionibacterium jensenii* p126. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:215-220.
8. Suomalainen TJ · Mayra-Makinen AM (1999) : Propionic acid bacteria as protective cultures

- in fermented milks and breads. *Lait* 79:165-174.
9. Jeroen H · Jan H · Helena S · Eddy S (2002) : Nutraceutical production by propionic acid bacteria. *Lait* 82:103-112.
 10. Tsutomu K · Hiroharu M · Megumi I · Sachiko M (1994) : Growth stimulator for bifidobacteria produced by propionic acid bacteria *freudenreichii* and intestinal bacteria. *J. Dairy Sci.* 77:393-404.
 11. Hiroharu M · Yoshio S · Naoki T · Tomonori K · Yoshihiro Y · Sachiko M · Hiroko S · Tsutomu K (1997) : Isolation and structural identification of bifidogenic growth stimulator produced by *Propionibacterium freudenreichii*. *J. Dairy Sci.* 80:1959-1964.
 12. Ara K (2003) : Science of propionic acid bacteria. *New Food Industry* 45:58-63.
 13. Lan-Szu C · Bart W (1999) : Isolation and characterization of acid- and bile tolerant isolates from strains of *Lactobacillus acidophilus*. *J. Dairy Sci.* 82(1):23-31.
 14. Lee JS · Ko YT · Paik JK (1984) : Effects of defatted soy milk on the growth of *L. acidophilus*. *J. Korean Agri. Chem.* 27(1):7-13.
 15. Shang-Tian Y · Yan H (1995) : A novel recycle batch immobilized cell bioreactor for propionate production from whey lactose. *Biotechnol. Bioeng.* 45(5):379-386.
 16. Vaughan LC (1988) : Polysaccharide production by propionibacteria during lactose fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 54(7):1892-1895.
 17. Min YS (1992) : The organic acid production by mixed culture of *Propionibacterium freudenreichii* KFCC 31227 and *Lactobacillus acidophilus* KFCC 31227. Ph. D. dissertation, Chungbuk Univ., Korea.
 18. Inn IH · Fredrickson AG · Tsuchiya HM (1974) : Diauxic growth of *Propionibacterium shermanii*. *Appl. Microbiol.* 28:831-835.
 19. EL-Hagarawy IS · Slatter WL · Harper WJ (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.
 20. Thayanithy K · Harding G · Wase DAJ (1982) : Rearrangement of lactose on sterilization. *Biotechnol. Lett.* 4:423-424
-

2007년 1월 17일 접수

2007년 3월 10일 게재확정