

배양 조건에 따른 유산균의 Diacetyl 생성

김동욱 · 정소영 · 박기문 · 최춘언
오투기식품(주), 오투기 식품연구소

The Effects of Culture Conditions on the Diacetyl Production by Lactic Acid Bacteria

Dong-Wook Kim, So-Young Chung, Ki-Moon Park and Chun-Un Choi

Ottogi Food Research Institute, Anyang

Abstract

Streptococcus diacetylactis and *Leuconostoc cremoris* were isolated from commercial culture and the effects of culture conditions on the diacetyl production by these strains and their mixture(1:1) were investigated. Optimum temperatures and culture times for the diacetyl production by *Str. diacetylactis*, *Leu. cremoris* and their mixture were 60hr at 22°C (diacetyl content, 2.24ppm), 48hr at 22°C (2.29ppm) and 48hr at 22°C (2.21ppm), respectively. Optimum initial pH for the diacetyl production by *Str. diacetylactis*, *Leu. cremoris* and the mixture were all 4.8(4.32, 6.66, 7.30ppm, respectively) and optimum sodium citrate concentrations(% w/v) were 0.30(2.58ppm), 0.1(2.54ppm) and 0.1(2.52ppm), respectively. The diacetyl contents were gradually increased according as inoculation rates(% w/v) were increased. The amounts of diacetyl produced under optimum conditions at 24hr incubation by *Str. diacetylactis*, *Leu. cremoris* and the mixture were 4.40, 6.59 and 7.25ppm, respectively. The most effective factor affecting diacetyl production under optimum condition was pH.

Key words: *Streptococcus diacetylactis*, *Leuconostoc cremoris*, diacetyl production

서 론

지금까지 밝혀진 버터의 향기 성분으로는 휘발성 유기산 및 휘발성 carbonyl 화합물이 주종을 이루고-있으며 이중 휘발성 carbonyl 화합물의 일종인 diacetyl은 버터와 같은 유제품의 독특하고도 바람직한 향기 성분으로 알려져 있다⁽¹⁻⁷⁾.

이러한 diacetyl은 유산균에서 citrate fermentation pathway⁽⁸⁾를 통해 생성되어지며, 이 경로의 전구체로 쓰이는 citrate는 flavor 저장중 diacetyl의 안정화에도 기여하게 된다^(3,4).

유산균의 diacetyl 생성에 관여하는 대표적 효소로는 citrate lyase, acetolactate synthase, diacetyl reductase, acetoin reductase 등으로 4효소 모두 constitutive enzymes이며, citrate에 의해 부분적으로 acetolactate synthase는 induction 되고 diacetyl

reductase, acetoin reductase는 repression 되는 것으로 보고되어 있다⁽⁸⁾.

현재 낙농 산업에 가장 많이 사용되는 diacetyl 생성 균주로는 *Streptococcus diacetylactis*와 *Leuconostoc* species로 밝혀져 있다^(4,5,11) 그러나, 이 균주들에 의한 diacetyl 생성 연구로는 *Str. diacetylactis*에서 배양 온도⁽¹⁰⁾ 및 시간^(9,10)에 따른 diacetyl 생성 보고가 몇편 있을 뿐 전반적인 배양 조건에 따른 연구 보고는 이루어져 있지 않으며, *Leuconostoc* species에 있어서도 diacetyl 생성 조건에 대하여 보고되어 있지 않은 실정이다.

따라서, 본 연구에서는 *Str. diacetylactis*와 *Leu. cremoris*를 commercial culture로부터 분리한 후 멸균된 10%(w/v) 환원 탈지유에 단독 및 혼합(1:1) 배양하면서 diacetyl 생성에 미치는 배양 조건에 대하여 검토하였기에 보고한다.

재료 및 방법

사용 균주의 분리 및 보존

Corresponding author: Dong-Wook Kim, Ottogi Food Research Institute, 160, Pyeongchon-dong, Anyang, Kyeonggi-do, 430-070

유산 균류으로 이루어진 commercial culture로부터 Kempler 등⁽¹²⁾의 방법에 따라 Table 1의 배지를 사용하여 diacetyl 생성 균을 분리한 후 Bergey's manual of determinative bacteriology 등⁽¹³⁻¹⁵⁾에 따라 동정하였고, 이중 diacetyl 생성능이 우수한 *Streptococcus diacetylactis* 및 *Leuconostoc cremoris*를 실험 균주로 선정하였다. 분리 균은 멸균된 환원 탈지유(10%, w/v)에서 30°C, 24시간 배양한 후 4°C에 보관하면서 1주일마다 계대 배양하였다.

Table 1. Medium composition for detection of diacetyl producing bacteria

Non-fat milk	10.0g
Milk protein-hydrolysate peptone	2.5g
Dextrose	5.0g
Agar	15.0g
Solution I ^{a)}	10.0ml
Solution II ^{b)}	10.0ml
Distilled water	1000.0ml
pH 6.0	

a) 10% Potassium ferricyanide

b) 1g of Ferric citrate and 1g of Sodium citrate in 40ml distilled water

사용 배지

균주의 보존 및 실험용 배지로는 115°C에서 20분간 가압 멸균한 10% (w/v) 환원 탈지유를 사용하였다.

Starter culture의 제조 및 접종

가압 멸균된 10% (w/v)의 환원 탈지유에, 30°C에서 탈지유가 응고할 때까지 배양한 보존 균주를 3% (v/v) 접종하여 30°C에서 18시간 배양후 starter로써 사용하였고 starter 접종량은 단독 배양의 경우는 2% (v/v)씩을, 혼합 배양의 경우는 1% (v/v)씩을 접종하여 전체 접종량이 2% (v/v)되게 하였다.

배양 조건

배양 온도 18, 22, 26, 30°C에서 각각 72시간 동안 배양하면서 12시간 마다 diacetyl을 측정하여 배양 온도 및 시간에 따른 diacetyl 생성량을 관찰하였으며, pH, 접종량 및 citrate 농도에 따른 diacetyl 생성량은 22°C에서 24시간 배양후 diacetyl을 분석하여 비교하였다.

Diacetyl 및 미생물 생육도 측정

Diacetyl은 Pack 등⁽¹⁶⁾의 방법을 일부 변형시켜 Fig. 1과 같이 측정하였으며 균 생육도는 M₁₇ broth 배지에 균을 2% (v/v, 2×10⁶/ml) 접종해 온도별로 배양하면서 Klett-Summerson photoelectric colorimeter(Klett manufacturing Co., New York)로 흡광도를 측정하여 Klett unit로 나타내었다.

결과 및 고찰

사용 균주의 분리 및 동정

Commercial culture로부터 diacetyl 생성 능력이 우수한 균주들을 선별한 후 동정한 결과 Table 2와 같은 성질을 갖고 있어 이중 diacetyl 생성능이 가장 좋다고 생각되는 No. 7과 No. 14(Fig. 2)를 실험 균주로 선정하였다.

Str. diacetylactis의 최적 생육 온도

분리된 Str. diacetylactis를 M₁₇ broth에 접종후 온도별로 배양하면서 생육도를 측정한 결과는 Fig. 3과 같다. 26, 30, 34°C에서 비슷한 생육을 보였으나, 전반적인

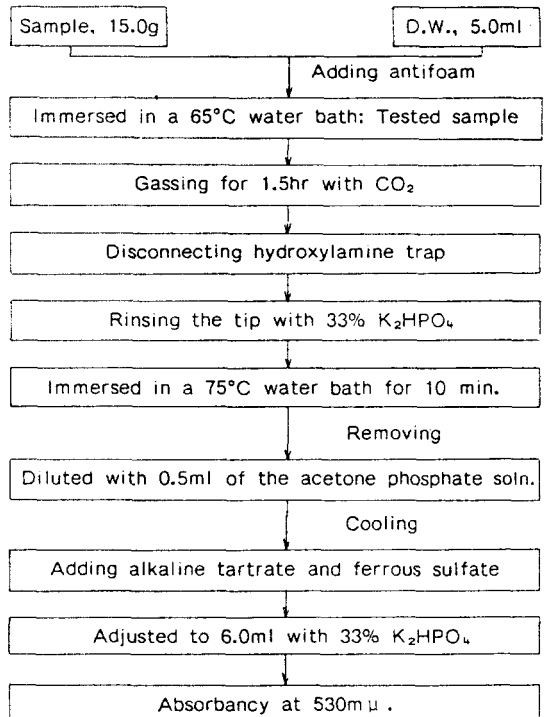


Fig. 1. Modified method for diacetyl determination

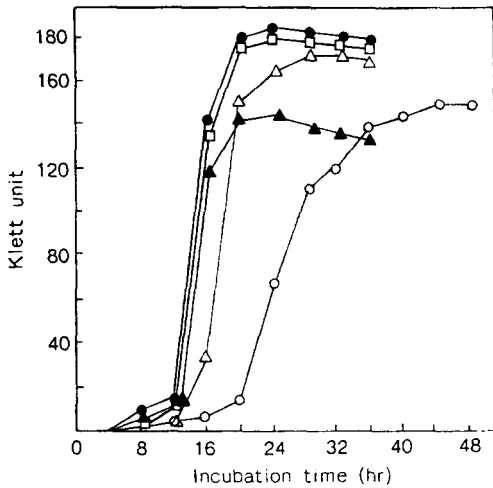


Fig. 4. Growth response of *Leu. cremoris* to various temperatures in the M_{17} broth medium.

○—○: 22°C ●—●: 34°C
 △—△: 26°C ▲—▲: 38°C
 □—□: 30°C

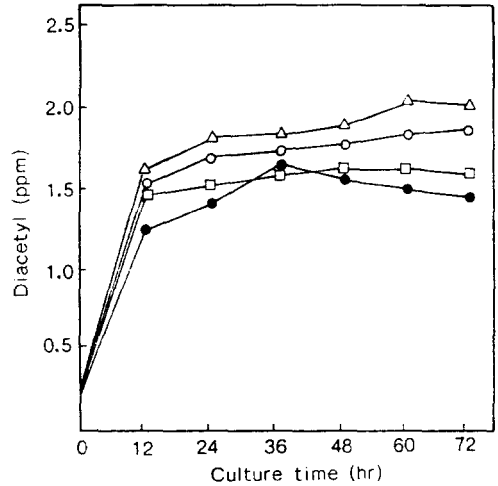


Fig. 5. Effect of temperature and culture time on diacetyl production of *Str. diacetylactis*.

○—○: 18°C □—□: 26°C
 △—△: 22°C ●—●: 30°C

*Str. diacetylactis*의 diacetyl 생성에 미치는 배양 온도 및 시간의 영향

*Str. diacetylactis*를 멸균된 10% (w/v) 환원 탈지유에 접종해 배양 온도 및 시간을 달리하면서 diacetyl 생성량을 조사한 결과는 Fig. 5와 같다. 배양 22°C에서 전반적으로 diacetyl 생성량이 가장 많았으며 다음이 18°C였고, 30°C 배양에서는 비교적 diacetyl 생성량이 저조하였다. 이는 생육도와는 대조적인 결과로써 저온에서 diacetyl이 많이 생성되었다는 연구 결과^(5,10)와 유사한 경향을 보여주고 있다.

배양 시간의 영향을 보면 각각의 온도에서 배양 12시간까지 급속한 diacetyl 생성량을 보인후 약간씩 증가하다가 일정한 시점을 중심으로 조금씩 감소하거나 일정한 수준을 유지하는 경향을 나타내었다. 이는 Joseph 등⁽⁹⁾과 Yadav 등⁽¹⁰⁾의 실험 결과와 유사한 것으로 이러한 원인은 배지내 citrate 농도가 줄어들면서 diacetyl reductase가 생성되기 때문으로 생각된다^(8,17). 22°C에서 60시간 배양시 diacetyl 생성량은 2,24ppm으로 최대치를 보였다.

*Leu. cremoris*의 diacetyl 생성에 미치는 배양 온도 및 시간의 영향

*Leu. cremoris*를 18, 22, 26, 30°C에서 72시간까지 배양하면서 diacetyl 생성량을 측정 한 결과는 Fig. 6과

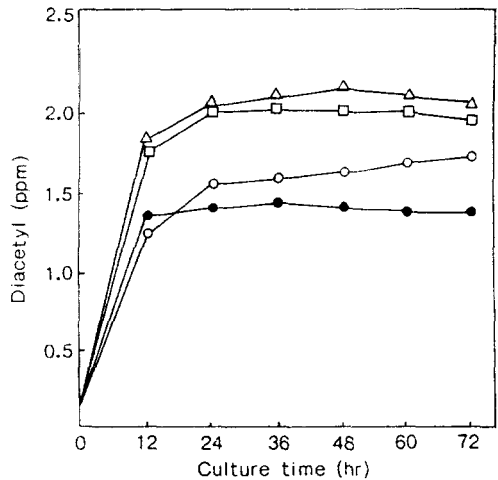


Fig. 6. Effect of temperature and culture time on diacetyl production of *Leu. cremoris*.

○—○: 18°C □—□: 26°C
 △—△: 22°C ●—●: 30°C

같다. 각 온도중 배양 22°C에서 전반적으로 제일 많은 diacetyl 생성량을 보였고 30°C 배양시 가장 저조한 diacetyl 생성량을 보여 *Str. diacetylactis*와 같은 경향을 보였다. 그러나 *Str. diacetylactis*와는 달리 26°C 배양시 18°C 보다 diacetyl이 많이 생성되는 것으로 나타났다. 배양 시간의 영향을 보면 *Str. diacetylactis*와 비

숙한 경향을 보여 각각의 온도에서 배양 12시간에 이르러 일정한 수준의 diacetyl 생성량을 보인후 서서히 증가하다가 일정 시간을 중심으로 약간 감소하거나 그 수준을 유지하는 것으로 밝혀졌다. 22°C에서 48시간 배양시 diacetyl 생성량은 2, 29ppm 으로 최대치를 보였다.

혼합 배양시 diacetyl 생성에 미치는 배양 온도 및 시간의 영향

Fig. 7은 *Str. diacetylactis* 와 *Leu. cremoris* 를 멸균된 10%(w/v) 환원 탈지유에 혼합 접종해 배양 온도 및 시간을 달리하면서 diacetyl 생성을 분석한 결과이다.

배양 전 기간에 걸쳐 배양 온도 22°C에서 제일 많은 diacetyl을 생성하였으며 그 다음은 26, 18, 30°C 순이었다. 이러한 결과는 *Leu. cremoris* 배양시와 비슷한 경향을 보여주는 것으로써 혼합 배양시는 *Leu. cremoris* 에 의해 diacetyl 생성이 주로 이루어지는 것으로 추정해 볼 수 있다. 각 온도별 배양 시간에 있어서는 배양 12시간까지 diacetyl 생성이 급속히 이루어졌고 그 이후는 diacetyl 생성이 서서히 이루어졌다. 대부분 배양 36~48 시간에 최고의 diacetyl 생성량을 보인 후 감소하였으며 최대치는 22°C에서 48시간 배양했을 때로 2, 21 ppm 을 나타냈다.

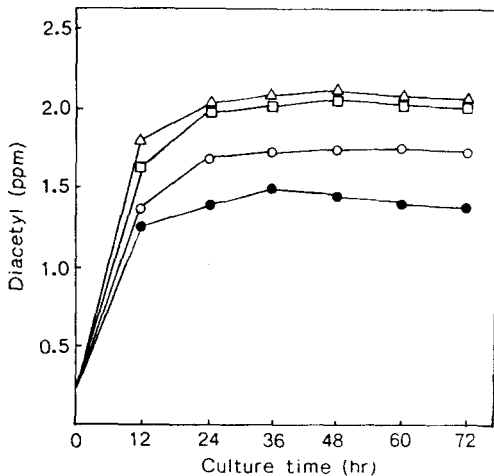


Fig. 7. Effect of temperature and culture time on diacetyl production of *Str. diacetylactis* plus *Leu. cremoris*.
 ○—○: 18°C □—□: 26°C
 △—△: 22°C ●—●: 30°C

Diacetyl 생성에 미치는 초기 pH 의 영향

각 배지의 초기 pH 를 30% lactic acid 로 조절하여 22°C에서 24시간 배양한 결과는 Fig. 8과 같다. pH 가 낮아질 수록 diacetyl 생성량은 증가하여 *Str. lactis* 등으로 실험한 De Giori 등⁽⁶⁾의 실험 결과와 유사함을 나타냈으며, 특히 pH 5.4에서 4.8로 변화시 diacetyl 생성량은 급격히 증가하였다. pH 5.4~6.6 사이에선 모두 비슷한 diacetyl 생성량을 보였으나 pH 4.8~5.4에선 혼합(7, 30ppm) 및 *Leu. cremoris* 단독 배양(6, 66 ppm)의 경우가 *Str. diacetylactis* 단독 배양(4, 32ppm)의 경우보다 훨씬 많은 diacetyl 생성량을 보였다. 이 실험 결과로 보아 *Leu. cremoris* 가 *Str. diacetylactis* 보다 낮은 pH 에서 diacetyl 생성력이 뛰어난 것으로 보인다.

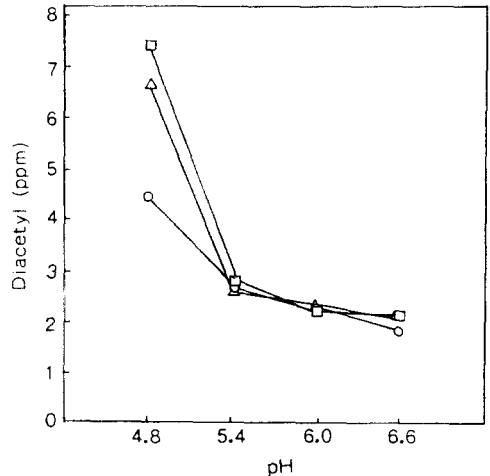


Fig. 8. Effect of initial pH on diacetyl production at 24hr incubation.
 ○—○: *Str. diacetylactis*
 △—△: *Leu. cremoris*
 □—□: *Str. diacetylactis*+*Leu. cremoris*

Starter 양에 따른 diacetyl 생성

Starter 양을 1, 2, 3%(v/v)되게 접종하여 22°C에서 24시간 배양후 생성된 diacetyl 양을 분석한 결과는 Fig. 9와 같다. Starter 양이 많을 수록 diacetyl 생성량은 증가하였으나 그 증가 폭은 크지 않았다. 각각의 starter 양에서 *Leu. cremoris* 와 혼합배양의 경우 서로 비슷한 diacetyl 생성량을 보였고, *Str. diacetylactis* 단독 배양의 경우보다 diacetyl 생성량이 많았다.

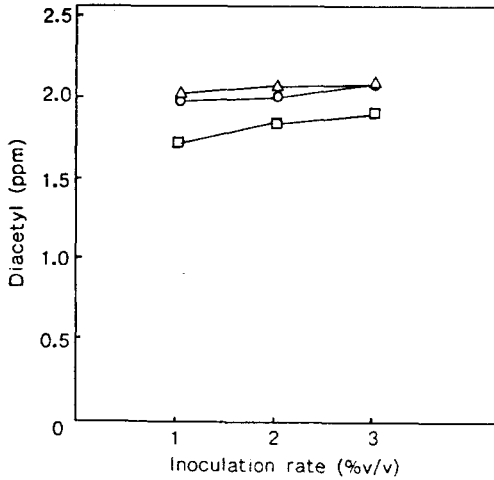


Fig. 9. Effect of inoculation rate on diacetyl production at 24hr incubation.

○—○: *Str. diacetylactis*
 △—△: *Leu. cremoris*
 □—□: *Str. diacetylactis* + *Leu. cremoris*

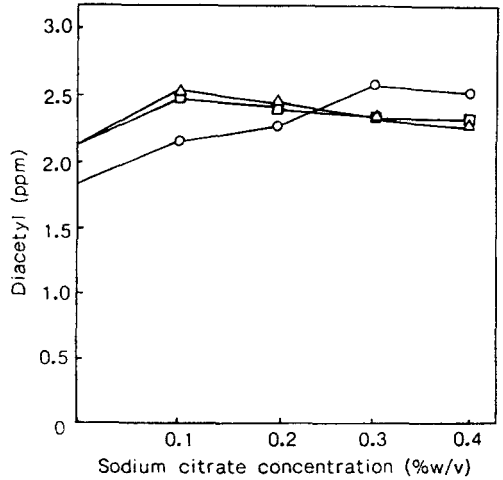


Fig. 10. Effect of sodium citrate on diacetyl production at 24hr incubation.

○—○: *Str. diacetylactis*
 △—△: *Leu. cremoris*
 □—□: *Str. diacetylactis* + *Leu. cremoris*

Diacetyl 생성에 미치는 citrate 의 농도

Diacetyl 생성의 전구체로 쓰이는 citrate를 sodium citrate 형태로 배지에 0.1~0.4%(w/v)되게 첨가하여 22°C에서 24시간 배양한 결과는 Fig. 10과 같다. *Leu. cremoris* 와 혼합 배양의 경우는 각각 0.1% 첨가시 2.54, 2.52ppm, *Str. diacetylactis* 의 경우는 0.3% 첨가시 2.58ppm으로 가장 많은 diacetyl 생성을 보였다. 이것은 배지내에 일정 농도의 citrate가 있을 때 diacetyl 생성이 우수하다^(3,4)는 것을 뒷받침하는 것이라 할 수 있다. 또한 citrate 무첨가시에도 많은 양의 diacetyl이 생성된 것은 배지 자체에 citrate가 함유^(4,18)돼 있기 때문으로 생각된다.

최적 조건에서의 diacetyl 생성

각각의 균주에 대해 앞에서 밝혀진 최적 조건하에서 24시간 배양한 결과 *Str. diacetylactis*는 4.40, *Leu. cremoris*는 6.59, 혼합 배양의 경우는 7.25ppm의 diacetyl 생성량을 보였으며 이 값은 단순히 환원 탈지유 배지에서 생육 최적 온도로 24시간 배양했을 경우보다 3~5배 많은 생성량이다. 또한 이것은 초기 pH를 4.8로 했을 때의 diacetyl 생성량과 비슷한 것으로 diacetyl 생성에 영향을 미치는 여러 조건중에서도 특히 초기 pH의 영향은 매우 큰 것으로 나타났다.

요 약

Str. diacetylactis 와 *Leu. cremoris*를 commercial culture로부터 분리한 후 멸균된 10%(w/v) 환원 탈지유에 단독 및 혼합(1:1) 배양하면서 diacetyl 생성에 미치는 배양 조건에 대하여 검토하였다. 생육 최적 온도는 *Str. diacetylactis*의 경우 30°C, *Leu. cremoris*는 34°C로 나타났으나, diacetyl 생성 최적 온도는 모두 22°C로, 2%(v/v) starter 접종시 *Str. diacetylactis*, *Leu. cremoris* 그리고 혼합 배양일 경우 diacetyl 생성량은 각각 배양 60, 48, 48 시간에 2.24, 2.29, 2.21ppm으로 최대치를 보인후 감소하는 경향을 나타내었다.

배지내 초기 pH는 pH 4.8에 모두 최고의 diacetyl 생성량을 보여 각각 4.32, 6.66, 7.30ppm을 나타내었다.

Starter 접종량이 많아질 수록 diacetyl 생성량은 증가하였지만 증가폭은 크지 않았으며 diacetyl의 전구 물질인 citrate를 sodium citrate 형태로 농도별로 첨가하였을 때 0.3, 0.1, 0.1%(w/v) 첨가시에 각각 2.58, 2.54, 2.52ppm으로 최대치를 보였다. 최적 조건하에서 24시간 배양시 diacetyl 생성량은 각각 4.40, 6.59, 7.25ppm으로 나타났으며, diacetyl 생성에 가장 큰 영향을 미치는 것은 초기 pH인 것으로 밝혀졌다.

문 헌

1. Jönsson, H., Pettersson, H.E. and Andersson, K. : Aroma distillate and method for preparing same. *U. S. Patent*, 4, 454, 160(1984)
2. 김동훈 : 식품화학, 탐구당, 서울, p.150(1979)
3. Frank, J.F. : Improving the flavor of cultured butter milk. *Cul. Dairy Prod. J.*, 19, 6(1984)
4. Kempler, G.M. : Production of flavor compounds by microorganism. *Adv. Appl. Microbiol.*, 29, 29(1983)
5. De Giori, G.S., De Valdez, G.F., De Ruiz Holgado, A. P. and Oliver, G. : Effect of pH and temperature on diacetyl production by lactic acid bacteria. *Milchwissenschaft*, 41(2), 80(1986)
6. Kempler, G.M. and McKay, L.L. : Biochemistry and genetics of citrate utilization in *Streptococcus lactis* ssp. *diacetylactis*. *J. Dairy Sci.*, 64, 1527(1981)
7. Andres, C. : Concentrated natural butter flavor. *Food Process.*, 44, 76(1983)
8. Cogan, T.M. : Constitutive nature of the enzymes of citrate metabolism in *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis*. *J. Dairy Res.*, 48, 489(1981)
9. Joseph, A.M. and Appachar, S.R. : Effect of ripening cream with selected lactic acid bacteria on the quality of ghee. *J. Dairy Res.*, 47, 411(1980)
10. Yadav, J.S. and Appachar, S.R. : Effect of ripening cream with *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis* on the flavor of ghee. *J. Dairy Res.*, 52, 547(1980)
11. Mortensen, B.K. and Danmark, H. : Manufacturing of cultured butter using lactic concentrates. *Milchwissenschaft.*, 37(7), 402(1982)
12. Kempler, G.M. and McKay, L.L. : Improved medium for detection of citrate-fermenting *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 39(4), 926(1980)
13. Buchaman, R.E. and Gibbons, N.E. : *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed, The Williams-Wilkins Co., Baltimore, U.S.A.(1974)
14. Starr, M.P., Stop, H., Trüper, H.G., Balows. A. and Schlegel, H.G. : *The Prokaryotes*, springer-verlag, Berlin, p.1614(1981)
15. Skinner, F.A. and Lovelock, D.W. : *Identification Methods for Micro-biologists*, 2nd ed. Academic press, p.233(1979)
16. Pack, M.Y., Sandine, W.E., Elliker, P.R., Day, E.A. and Lindsay, R.C. : Owades and Jakovac method for diacetyl determination in mixed-strain starters. *J. Dairy Sci.*, 47, 981(1964)
17. Collins, E.B. : Biosynthesis of flavor compounds by microorganisms. *J. Dairy Sci.*, 55, 1022(1972)
18. 양 용·양한철 : 축산식품가공학, 보성문화사, 서울, p. 214(1984)

(1988년 10월 14일 접수)