

Corn Steep Liquor를 이용한 젖산균의 생산배지에 관한 연구

안영태 · 김근배* · 인영민 · 정석근 · 함준상 · 김동운 ·

이경옥** · 김선기** · 김현옥**

농촌진흥청 축산기술연구소

*Department of Food Science and Agricultural Chemistry, McGill University

**서울대학교 동물자원학과

A Study on the Production Medium of Lactic Acid Bacterial Cells by Using Corn Steep Liquor

Y. T. Ahn, G. B. Kim*, Y. M. In, S. G. Jeong,

J. S. Ham, D. W. Kim, K. U. Lee**, S. K. Kim** and H. U. Kim**

National Livestock Research Institute, RDA

*Department of Food Science and Agricultural Chemistry, McGill University

**Department of Animal Science and Technology, Seoul National University

Abstract

Utilization of corn steep liquor as nitrogen and carbon sources for the growth of lactic acid bacterial cells has been studied and the optimal composition of the production medium has been investigated using response surface methodology, which showed that the concentration of corn steep liquor and yeast extract ($p < .01$) and the cross interaction of the components ($p < .05$) influenced the growth of *Lactobacillus fermentum* LDTM CG1. The optimal concentration of corn steep liquor, yeast extract, and Tween 80 was 10.77, 3.39, and 1.69%, respectively for the maximal viable cells of *L. fermentum*. For *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* LDTM PP1, the corn steep liquor concentration ($p < .01$) and the cross interaction between corn steep liquor and β -glycerophosphate disodium salt influenced the growth of *Lc. lactis* ssp. *lactis*. The optimal concentration of corn steep liquor and β -glycerophosphate disodium salt was 3.5 and 4.38%, respectively for the maximal viable cells of *Lc. lactis* ssp. *lactis*. The content of lactic acid and acetic acid produced by *L. fermentum* in MRS broth and the optimal test medium were 0.166, 0.114 and 0.273, 0.081 M, respectively and those by *Lc. lactis* ssp. *lactis* in M17glc broth and optimal test medium were 0.089, 0.003 and 0.189, 0.003 M, respectively. In conclusion, corn steep liquor is thought to be a good nitrogen and carbon sources for the growth of *L. fermentum* and *Lc. lactis* ssp. *lactis*.

Key words : corn steep liquor, *Lactobacillus fermentum*, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, optimal medium, response surface methodology.

서 론

Corn steep liquor(옥침수)는 옥수수로부터 전분 생산시의 주 부산물이며, 성분은 생산 공정단계와 지역에 따라 약간의 차이가 있으나, 국내에서 생산되는 corn steep liquor는 50% 이

하의 수분, 0.5% 이상의 아미노태질소, 3% 이상의 총질소, 10% 이하의 환원당, 15% 이하의 젖산과 150 ppm 이하의 아황산을 함유하고 있다⁽¹⁾. 경제적인 측면에서 값싼 corn steep liquor를 이용하여 inositol, phytin과 몇몇 비타민 B군의 생산 연구들이 진행되어 왔으며, 항생제 생산과 발효 산업에서 주로 미생물 배양을 위하여 탄소, 질소, 미량 영양소 공급원으로서 복합배지에 첨가 사용되고 있다. Amartey와 Jefries⁽²⁾는 질소 공급원인 yeast extract, peptone

Corresponding author : H. U. Kim, Department of Animal Science and Technology, Seoul National University, Suwon, Kyungkido, 441-744, Korea.

등이 함유된 배지와 이 질소 공급원들을 corn steep liquor로 대체한 배지에서 *Pichia stipitis* CBS 6054의 D-xylose로부터 ethanol 생산을 비교 실험한 결과, corn steep liquor가 xylose를 발효하는 yeast의 성장과 활력을 유지할 수 있는 우수한 영양소라고 하였다. Molina 등⁽³⁾도 corn steep liquor를 탄소 공급원으로서 *Xanthomonas campestris*의 batch 배양에 첨가하였을 때 세포의 성장률, 점도, xanthan 생산을 촉진시켰다고 하였다. 이 밖에도 *Aspergillus niger* F2078의 내열성 acid protease 생산⁽⁴⁾, *Aspergillus niger* #57의 glucoamylase⁽⁵⁾, *Aspergillus niger* NCIM 1207⁽⁶⁾과 *Penicillium pinophilum*⁽⁷⁾의 cellulase 생산에서도 corn steep liquor가 좋은 질소 공급원임이 입증되었다. 또한 까다로운 영양요구성을 갖고 있는 젖산균에서도⁽⁸⁾ 우유를 corn steep liquor로 대체한 합성배지⁽⁹⁾가 개발되어 젖산균을 함유하는 식품의 산업적 생산이 가능하게 되었다. 또한 효소와 미생물 배양의 최적조건을 설정하기 위한 방법으로 실험계획법의 한 분야인 반응 표면 분석(Response surface methodology)을 이용하여 *Bifidobacterium longum*의 다당류 생산 최적화⁽¹⁰⁾ 그리고 *Lactococcus* sp.의 성장 및 bacteriocin 생산 최적화⁽¹¹⁾에 관한 연구결과들이 보고되고 있다.

이 연구는 젖산균의 성장을 위한 질소 및 탄소 공급원으로서 corn steep liquor의 이용 가능성을 시험하고 반응 표면 분석을 사용하여 젖산균의 최적 성장을 지원하는 생산배지 개발에 있어 기초자료로 제시하고자 시행하였다.

재료 및 방법

미생물과 배지

시험에 사용한 균주는 서울대학교 농업생명과학 유가공학 및 낙농미생물학 연구실에 보관 중인 *Lactobacillus fermentum* LDTM CG1과 *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* LDTM PP1을 사용하였다.

L. fermentum LDTM CG1은 가금의 분에서 분리 동정한 균주이고 *Lc. lactis* ssp. *lactis* LDTM PP1은 돼지의 분에서 분리 동정한 균주로서, 시험 전에 *L. fermentum* LDTM CG1은 MRS 액체배지에서, *Lc. lactis* ssp. *lactis*

Table 1. Composition of basal media for the growth of lactic acid bacteria

	CSL-L medium: <i>L. fermentum</i>	CSL-Lc medium: <i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i>
Corn steep liquor	7%	7%
Glucose	2%	2%
Yeast extract	5%	-
KH ₂ PO ₄	0.1%	-
K ₂ HPO ₄	0.2%	-
Tween 80	1%	-
β -Glycerophosphate disodium salt(sigma)	-	1.9%

LDTM PP1은 lactose를 glucose로 대체한 M17glc 액체배지에서 각각 2회 계대배양한 후 사용하였다.

Corn steep liquor를 주성분으로 하는 배지의 기본 조성은 Table 1과 같으며, 48%의 수분, 52%의 총고형분, 10%의 환원당, 15%의 젖산, 0.5%의 아미노태질소, 3%의 총질소, 그리고 150 ppm의 아황산을 함유하고 있는 corn steep liquor를 (주)세원으로부터 구입하여 젖산균 배지의 주성분으로 사용하였으며, 식품용 glucose와 yeast extract는 각각 삼양 제넥스와 제일 Universal로부터 구입하여 사용하였다. 그리고 젖산균의 성장을 개선하기 위해 간균에는 시약급의 Tween 80^(12,13)을, 구균에는 시약급 β -glycerophosphate disodium salt⁽¹⁴⁾를 구입하여 첨가하였다. 기타 시약급의 KH₂PO₄과 K₂HPO₄를 구입하여 사용하였으며, 배지의 pH는 각 성분을 혼합한 다음 10 N NaOH를 사용하여 pH 6.5로 조절한 후 멸균하여 사용하였다.

반응 표면 분석을 이용한 젖산균 생산배지의 최적화

1) *Lactobacillus fermentum*용 배지

예비 실험을 통해 Table 1의 기본 배지 성분 중에서 이 균주의 성장과 배양시 중요한 corn steep liquor, yeast extract, 그리고 Tween 80에 대하여 중심합성계획법(central composite design)에 의해 17개 처리 조합으로 실험을 계획하였으며⁽¹⁵⁾, 3개의 요인은 다음과 같이 압호

화(coding)하였다.

$$\begin{aligned} x_1 &= (\text{Corn steep liquor} - 7)/2 \\ x_2 &= (\text{Yeast extract} - 5)/2 \\ x_3 &= (\text{Tween 80} - 1)/0.5 \end{aligned}$$

암호화한 요인들의 수준은 Table 2에서 보는 바와 같으며, 반응변수에 대한 3가지 요인 효과는 다음과 같은 2차 다항회귀모형(second order polynomial regression model)으로 평가하였으며⁽¹⁶⁾, y는 반응변수 즉 생균수로 나타내었다.

$$y = \beta_0 + \beta_{1x_1} + \beta_{2x_2} + \beta_{3x_3} + \beta_{11x_1^2} + \beta_{22x_2^2} + \beta_{33x_3^2} + \beta_{12x_1x_2} + \beta_{13x_1x_3} + \beta_{23x_2x_3} + \epsilon$$

y : response variables
 β_0 : intercept
 β_{1-23} : regression coefficients
 x_{1-3} : independent variables
 ϵ : random error

2) *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*용 배지

Table 1의 기본 배지 조성중에서 corn steep liquor, β -glycerophosphate disodium salt에 대하여 중심합성계획법에 의해 11개 처리 조합으로 실험을 계획하였으며⁽¹⁵⁾, 반응변수에 대한 2가지 요인 효과는 아래와 같은 2차 다항회귀모형으로 평가하였으며⁽¹⁶⁾, 암호화한 요인들의 수준은 Table 3에서 보는 바와 같다.

$$y = \beta_0 + \beta_{1x_1} + \beta_{2x_2} + \beta_{11x_1^2} + \beta_{22x_2^2} + \beta_{12x_1x_2} + \epsilon$$

y : response variables
 β_0 : intercept
 β_{1-12} : regression coefficients
 $x_{1,2}$: independent variables
 ϵ : random error

통계분석은 SAS package를 이용하였으며, 반응 표면 분석은 REREG procedure를 사용하였다⁽¹⁷⁾. 또한 모델들이 적합한가를 조사하기 위하여 적합결여 검정(lack of fit)을 하였으며, 3차원 반응도는 G3D procedure를 사용하였다⁽¹⁸⁾.

젖산균의 배지 종류와 산 생성

위 시험에서 corn steep liquor를 주성분으로 하는 최적화된 배지, MRS 또는 M17glc 액체 배지에서 산 생성량을 비교시험하기 위하여, *L. fermentum* LDTM CG1을 MRS 액체배지와 위 시험에서 설정된 최적배지에 1%를 접종하여 37°C에서 10시간 배양한 후, 이 농⁽¹⁹⁾의 방법에 따라 시료를 전처리 하였다. *Lc. lactis* ssp. *lactis* LDTM PP1은 M17glc 액체배지, 최적배지에 1%를 접종하고 37°C에서 10시간 배양한 다음 *L. fermentum*과 동일하게 처리하였다.

각각의 액체배지에 5배의 0.0085 N H₂SO₄를 첨가하고, 2시간 방치한 다음 4,000 rpm으로 원심분리하여 상등액을 수집하였다. 이 상등액을 0.45 μ m의 여과지를 이용하여 여과하고 이 여액을 시료로 사용하였다.

HPLC는 Shimadzu Model LC-6A(Japan)

Table 2. Coded factor levels in the central composit design for the effect of medium composition on the yields of viable cell

Factor	$-\sqrt{3}$	-1	0	+1	$+\sqrt{3}$
Corn steep liquor(x_1)	3.35	5	7	9	10.46
Yeast extract(x_2)	1.54	3	5	7	8.46
Tween 80(x_3)	0.13	0.5	1	1.5	1.87

Table 3. Coded factor levels in the central composit design for the effect of medium composition on the yields of viable cell

Factor	$-\sqrt{2}$	-1	0	+1	$+\sqrt{2}$
Corn steep liquor(x_1)	4.1716	5	7	9	9.8284
β -Glycerophosphate disodium salt(x_2)	0.5858	1	2	3	3.4142

를 사용하였으며, UV/Visible detector(Shimadzu, SPD-6AV, Japan)를 사용하여 210 nm 에서 분석을 실시하였다. 시료의 주입량은 20 μ l이었으며, 이동상은 0.0085 N H₂SO₄를 사용하였고 유속은 0.6 ml/min이었다. 칼럼은 Aminex HPX-87H(Bio-Rad, U.S.A.)를 사용하였으며, 칼럼의 온도는 65°C이었다. 정량분석은 Intergrator(Shimadzu, CR4A, Japan)를 이용하여 피크의 면적을 측정하였다.

결과 및 고찰

반응 표면 분석에 의한 젖산균 생산배지의 최적화

예비시험에서 MRS와 M17glc 배지의 조성을 기본으로 하여 질소와 탄소 공급원을 corn steep liquor로 대체한 Table 1의 기본 조성의 액체배지를 제조하여 두 젖산균을 생장을 시험한 결과, *Lactobacillus fermentum* LDTM CG1의 생장은 배지에 첨가되는 corn steep liquor, yeast extract, 그리고 Tween 80의 함량에 크게 영향을 받았으며, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* LDTM PP1의 생장은 corn steep liquor와 β -glycerophosphate의 함량에 크게

영향을 받는 것으로 나타났다(미발표). 따라서 이 성분들을 중심합성계획법(central composite design)에 의해 젖산 간균은 17개 처리 조합으로, 젖산 구균은 11개 처리 조합으로 실험을 실시하였다.

Sigh 등⁽⁴⁾은 옥침수 및 urea, casein, peptone, beef extract, groundnut meal을 유기 질소 공급원으로 사용하여 *Aspergillus niger* F2078의 내열성 acid protease 생산을 시험한 결과 옥침수가 peptone 다음으로 효소생산이 우수하였다고 하였다. 무다이 등⁽⁹⁾은 옥침수를 이용하여 우유가 들어 있지 않은 합성배지에서 *Bifidobacterium longum*, *B. bifidum*, *Lactobacillus acidophilus*를 함유하는 식품의 산업적 생산을 가능하게 하였다. 한편, 배지에 첨가된 Tween 80 또는 oleic acid는 젖산 간균의 생장을 촉진효과가 있으며⁽¹³⁾, 동결 및 -196°C 저장시에도 젖산 간균의 활력을 유지하는 효과가 있는 것으로 보고되고 있다⁽¹²⁾. 한편 최적 생장 pH가 pH 6~6.5인 젖산구균⁽²⁰⁾의 배양시 중화제로 sodium hydroxides보다는 ammonium hydroxides 또는 calcium hydroxides를 사용하여 pH를 유지하는 것이 더 많은 세포를 생산할 수 있지만, 그 결과 생산된 세포의 활력이 다소

Table 4. Effect of medium composition on the growth of *L. fermentum* LDTM CG1

	Concentration(%)			Viable cells($\times 10^7$ cfu/ml)
	Corn steep liquor	Yeast extract	Tween 80	
1	8	2.26	1	177
2	8	2.26	2	174
3	8	4.26	1	228
4	8	4.26	2	254
5	12	2.26	1	205
6	12	2.26	2	261
7	12	4.26	1	207
8	12	4.26	2	247
9	10	3.26	1.45	304
10	10	3.26	1.45	278
11	10	3.26	1.45	265
12	7	3.26	1.45	229
13	13	3.26	1.45	265
14	10	2	1.45	225
15	10	5	1.45	218
16	10	3.26	0.74	239
17	10	3.26	2.16	253

Table 5. Analysis of variance for the growth of *L. fermentum* LDTM CG1

Source	df ^{a)}	Growth	
		SS ^{b)}	Prob>F
Model	9	17504	0.0050
Linear terms	3	3689.982832	0.0311
Quadratic terms	3	10576	0.0018
Cross product terms	3	3237.900335	0.0418
Total error	7	1602.157671	
Lack of fit	5	813.491004	0.8163
Pure error	2	788.666667	
R ^{2c)}			0.9161

^{a)} Degrees of freedom, ^{b)} Sum of squares, ^{c)} Coefficient of determination for second-order model.

떨어진다⁽²¹⁾. Terzaghi와 Sandine⁽¹⁴⁾은 1.9% β-glycerophosphate disodium salt를 복합배지에 첨가한 결과 젖산 균의 생장이 개선되었으며, 이것은 젖산균이 생성하는 산을 중화시키는 배지의 완충력이 향상되었기 때문이라고 하였다.

1) *L. fermentum*의 최적화 배지

Coding된 값에 따라 배지 조성이 다른 17개의 처리구에 대한 *L. fermentum* LDTM CG1의 생균수를 측정된 결과는 Table 4와 같다. 전체 mode과 1차항(linear term)에 대한 유의성은 p<0.01로 나타났고, 2차항(quadratic term)과 교호항(cross product term)에서는 5% 수준에서 유의성이 있었다. 또한 적합성 결여(lack-of-fit) 검정에서 유의성이 나타나지 않아 시험에 사용한 model이 적절함을 알 수 있었다(Table 5). 한편, Table 6의 회귀분석에서 보는 바와 같이 corn steep liquor와 yeast extract의 농도가 *L. fermentum* LDTM CG1의 생장에 큰 영향을 미치며(p<.01), corn steep liquor와 yeast extract의 교호 작용이 생장

Table 6. Regression coefficient for the growth of *L. fermentum* LDTM CG1

Parameter	Growth	
	Estimate	Prob> T
β ₀ (Intercept)	-876.233142	0.0036
β ₁ (X ₁)	104.321101	0.0079
β ₂ (X ₂)	287.497626	0.0004
β ₃ (X ₃)	137.209618	0.1794
β ₁ ² (X ₁ ²)	-4.147989	0.0146
β ₂ ² (X ₂ ²)	-29.055222	0.0006
β ₃ ² (X ₃ ²)	-72.821397	0.0132
β ₁₂ (X ₁ X ₂)	-8.937500	0.0124
β ₁₃ (X ₁ X ₃)	9.051913	0.1338
β ₂₃ (X ₂ X ₃)	3.452680	0.7559

X₁ = Corn steep liquor, X₂ = Yeast extract, X₃ = Tween 80.

에 영향을 미치는 것으로 나타났다(p<.05).

고유벡터(eigenvector)와 고유치(eigenvalue)는 Table 7에 나타난 바와 같고 고유치가 (-)값만 존재하므로 정상점(stationary point)

Table 7. Canonical analysis of response surface of the three response variables corn steep liquor, yeast extract, and Tween 80 for the growth of *L. fermentum* LDTM CG1

Eigenvalues	Eigenvectors		
	Corn steep liquor	Yeast extract	Tween 80
-22.466488	0.795660	-0.351768	0.493137
-40.128224	-0.372032	0.358684	0.856118
-76.820707	0.478035	0.864642	-0.154522

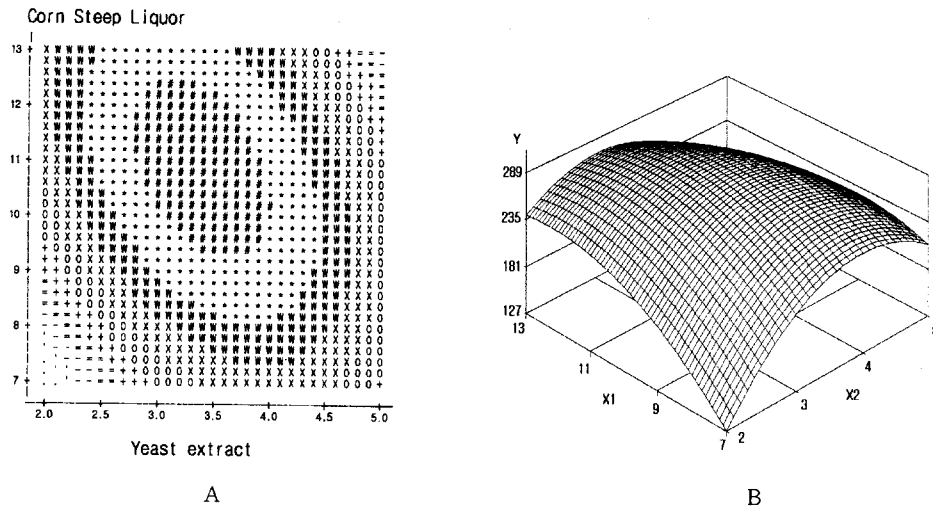


Fig. 1. Effect of corn steep liquor and yeast extract on the growth of *L. fermentum* LDTM CG1 at 1.69% Tween 80.

A: Contour plot

Each symbol indicates yields(viable cells number $\times 10^7$ cfu/ml) of *L. fermentum* LDTM CG1 cells. ...: 122.5~140.0, '": 140.0~157.5, ---: 157.5~175.0, ===: 175.0~192.5, +++: 192.5~210.0, OOO: 210.0~227.5, XXX: 227.5~245.0, WWW: 245.0~262.5, ***: 262.5~280.0, ###: 280.0~297.5.

B: 3D

X₁=Corn steep liquor, X₂=Yeast extract, Y=Viable cells number $\times 10^7$ cfu/ml.

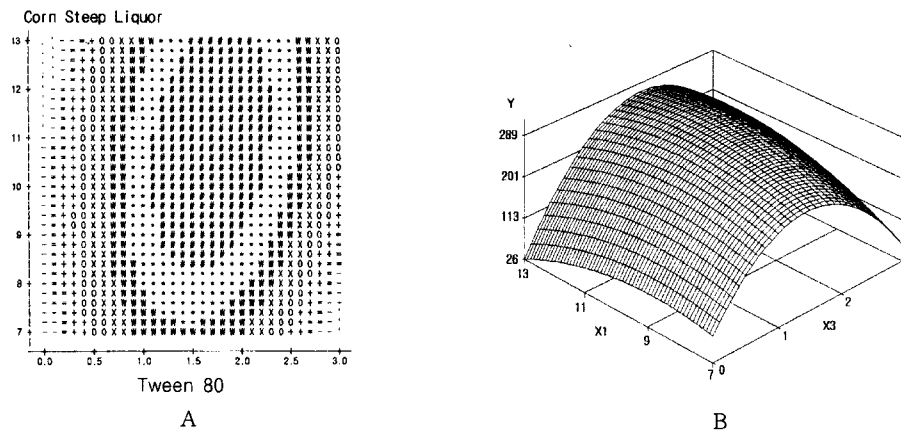


Fig. 2. Effect of corn steep liquor and Tween 80 on the growth of *L. fermentum* LDTM CG1 at 3.39% yeast extract.

A: Contour plot

Each symbol indicates yields(viable cells number $\times 10^7$ cfu/ml) of *L. fermentum* LDTM CG1 cells. ...: 25.71~52.04, '": 52.04~78.37, ---: 78.37~104.70, ===: 104.70~131.03, +++: 131.03~157.36, OOO: 157.36~183.68, XXX: 183.68~210.01, WWW: 210.01~236.34, ***: 236.34~262.67, ###: 262.67~289.00.

B: 3D

X₁ = Corn steep liquor, X₃ = Tween 80, Y = Viable cells number $\times 10^7$ cfu/ml.

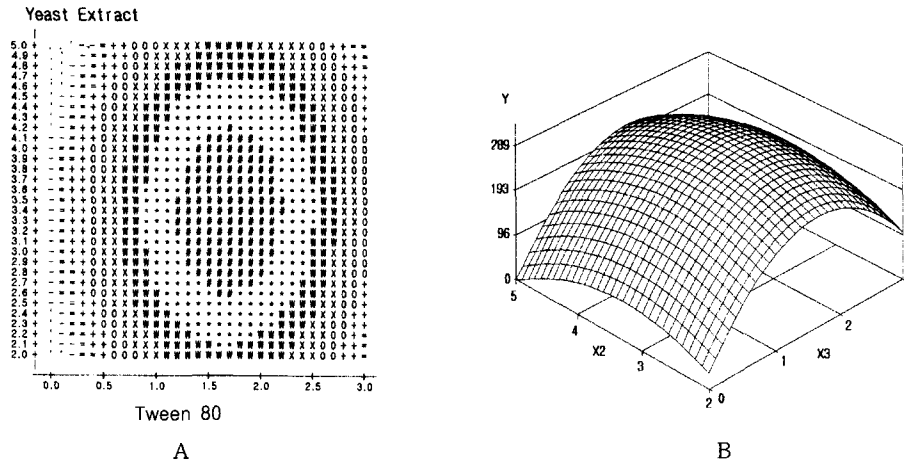


Fig. 3. Effect of yeast extract and Tween 80 on the growth of *L. fermentum* LDTM CG1 at 10.76% corn steep liquor.

A: Contour plot

Each symbol indicates yields(viable cells number $\times 10^7$ cfu/ml) of *L. fermentum* LDTM CG1 cells. ...: 0~30, '": 30~60, ---: 60~90, = = =: 90~120, +++: 120~150, OOO: 150~180, XXX: 180~210, WWW: 210~240, ***: 240~270, ###: 270~300.

B: 3D

X_2 =Yeast extract, X_3 =Tween 80, Y=Viable cells number $\times 10^7$ cfu/ml.

이 최대값이었으며, RSREG 방법에 의해 예측된 생장의 정상점은 10.77% corn steep liquor, 3.39% yeast extract, 1.69% Tween 80이었으며, 각 성분들의 SAS에 의한 contour plot과 3차원 반응도는 Fig. 1, 2, 그리고 3에 나타나 있다.

2) *Lc. lactis* ssp. *lactis*의 최적화 배지

Coding된 값에 따라 배지 조성이 다른 11개의 처리구에 대한 *Lc. lactis* ssp. *lactis* LDTM PP1의 생균수를 측정된 결과는 Table 8과 같다. 전체 mode, 1차항(linear term), 그리고 2차항(quadratic term)에 대한 유의성은 $p < 0.01$ 로 나타났고, 교호항(cross product term)에서는

Table 8. Effect of medium composition on the growth of *Lc. lactis* ssp. *lactis* LDTM PP1

	Concentration(%)		Viable cells($\times 10^7$ cfu/ml)
	Corn steep liquor	β -Glycerophosphate disodium salt	
1	0.6	1.5	101
2	0.6	3.5	112.5
3	3.4	1.5	205
4	3.4	3.5	367
5	2	2.5	283
6	2	2.5	332.5
7	2	2.5	326
8	0	2.5	0
9	4	2.5	321.5
10	2	1	177.5
11	2	4	358

Table 9. Analysis of variance for the growth of *Lc. lactis* ssp. *lactis* LDTM PP1

Source	df ^{a)}	Growth	
		SS ^{b)}	Prob>F
Model	5	148390	0.0006
Linear terms	2	105971	0.0003
Quadratic terms	2	36757	0.0032
Cross product terms	1	5662.562500	0.0472
Total error	5	4129.739877	
Lack of fit	3	2682.573211	0.4765
Pure error	2	1447.166667	
R ^{2c)}			0.9729

a) Degrees of freedom, b) Sum of squares, c) Coefficient of determination for second-order model.

Table 10. Regression coefficient for the growth of *Lc. lactis* ssp. *lactis* LDTM PP1

Parameter	Growth	
	Estimate	Prob> T
β_0 (Intercept)	-145.547367	0.1656
β_1 (X ₁)	168.598474	0.0056
β_2 (X ₂)	121.721256	0.0972
β_1^2 (X ₁ ²)	-40.876733	0.0011
β_2^2 (X ₂ ²)	-24.641310	0.0761
β_{12} (X ₁ X ₂)	26.875000	0.0472

X₁=Corn steep liquor, X₂= β -glycerophosphate disodium salt.

5% 수준에서 유의성이 있었다. 또한 적합성 검정(lack-of-fit) 검정에서 유의성이 나타나지 않아 시험에 사용한 model이 적절함을 알 수 있었다(Table 9).

Table 10의 회귀분석에서 보는 바와 같이 corn steep liquor의 농도가 *Lc. lactis* ssp. *lactis* LDTM PP1의 성장에 큰 영향을 미치며(p<0.01), corn steep liquor와 β -glycerophosphate disodium salt의 교호 작용이 성장에 영향을 미치는 것으로 나타났다(p<0.05).

고유벡터(eigenvector)와 고유치(eigenvalue)는 Table 11에 나타난 바와 같고 고유치가 (-)값만 존재하므로 정상점(stationary point)이 최대값이었으며, RSREG 방법에 의해 예측된 성장의 정상점은 3.5% corn steep liquor, 4.38% β -glycerophosphate disodium salt였으

Table 11. Canonical analysis of response surface of the two response variables corn steep liquor and β -glycerophosphate disodium salt for the growth of *Lc. lactis* ssp. *lactis* LDTM PP1

Eigenvalues	Eigenvectors	
	Corn steep liquor	β -Glycerophosphate disodium salt
-42.061634	0.315037	0.949079
-176.888247	0.949079	-0.315037

며, 각 성분들의 SAS에 의한 contour plot과 3차원 반응도는 Fig. 4에 나타나 있다.

배지 종류별 젖산균의 산 생성

HPLC를 이용하여 MRS 액체배지, 10.77% corn steep liquor, 3.39% yeast extract, 1.69% Tween 80이 첨가된 CSL1 액체배지에서 배양한 *L. fermentum* LDTM CG1과 M17glc 액체배지, 3.5% corn steep liquor, 4.38% β -glycerophosphate disodium salt가 첨가된 CSL2 액체배지에서 배양한 *Lc. lactis* ssp. *lactis* LDTM PP1의 산 생성을 비교하였다(Table 12). *L. fermentum*은 전형적인 hetero 젖산 발효를 하였고, *Lc. lactis* ssp. *lactis* LDTM PP1은 homo 젖산 발효를 하였으며, MRS 액체배지와 M17glc 액체배지에서 보다 corn steep liquor를 사용하여 제조된 최적화 배지에서 젖산의 생성량이 많았다.

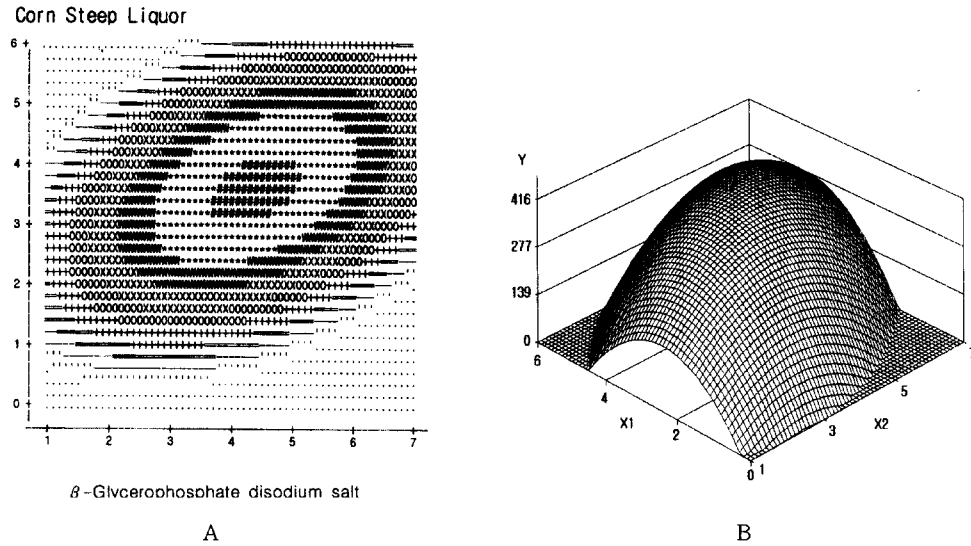


Fig. 4. Effect of corn steep liquor and β-glycerophosphate disodium salt on the growth of *Lc. lactis* ssp. *lactis* LDTM PP1.

A: Contour plot

Each symbol indicates yields(viable cells number × 10⁷ cfu/ml) of *Lc. lactis* ssp. *lactis* LDTM PP1 cells.: 0~45, '": 45~90, ---: 90~135, ===: 135~180, +++: 180~225, OOO: 225~270, XXX: 270~315, WWW: 315~360, ***: 360~405, ###: 405~450.

B: 3D

X₁=Corn steep liquor, X₂=β-Glycerophosphate disodium salt, Y=Viable cells number × 10⁷ cfu/ml.

Table 12. Acid production of *L. fermentum* LDTM CG1 and *Lc. lactis* ssp. *lactis* LDTM PP1 in various culture media

	Acid produced	
	Lactic acid(M)	Acetic acid(M)
<i>L. fermentum</i> LDTM CG1 in MRS broth	0.166	0.114
<i>L. fermentum</i> LDTM CG1 in CSL1 ¹⁾	0.273	0.081
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> LDTM PP1 in M17glc broth	0.089	0.003
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> LDTM PP1 in CSL2 ²⁾	0.189	0.003

¹⁾ Contain 10.77% corn steep liquor, 3.39% yeast extract, 1.69% Tween 80, 2% glucose, 0.1% KH₂PO₄, and 0.2% K₂HPO₄.

²⁾ Contain 3.5% corn steep liquor, 4.38% β-glycerophosphate disodium salt, and 2% glucose.

요 약

젖산균의 생장을 위한 질소, 탄소 공급원으로서 corn steep liquor의 이용 가능성을 시험하고 반응 표면 분석(Response surface methodology)을 이용하여 젖산균의 최적 성장 배지

조성을 연구하였다.

반응 표면 분석에서 *L. fermentum*의 성장배지에 첨가된 corn steep liquor와 yeast extract의 농도(p<0.01) 그리고 corn steep liquor와 yeast extract의 교호 작용(p<0.05)이 *L. fermentum*의 생장에 큰 영향을 미치는 것으로 나

타났으며, 이때 생균수가 최대인 corn steep liquor의 함량은 10.77%, yeast extract는 3.39%, Tween 80은 1.69%으로 예측되었다. 한편, *Lc. lactis* ssp. *lactis*의 성장배지는 corn steep liquor의 농도($p < 0.01$) 그리고 corn steep liquor와 β -glycerophosphate disodium salt의 교호 작용($p < 0.05$)이 *Lc. lactis* ssp. *lactis*의 성장에 큰 영향을 미치는 것으로 나타났으며 이때 생균수가 최대인 corn steep liquor의 함량은 3.5%, β -glycerophosphate disodium salt는 4.38%로 예측되었다.

MRS broth와 예측된 최적 배지에서 *L. fermentum*의 젖산과 초산의 생성량은 각각 0.166, 0.114과 0.273, 0.081 M이고, M17glc broth와 최적 배지에서 *Lc. lactis* ssp. *lactis*의 젖산과 초산의 생성량은 각각 0.089, 0.003과 0.189, 0.003 M이었다.

따라서 corn steep liquor는 *L. fermentum*와 *Lc. lactis* ssp. *lactis*의 성장을 위해 질소 또는 탄소 공급원으로서 배지에 첨가될 수 있는 우수한 농업 부산물로 판단된다.

참고문헌

1. 김희수 : Microencapsulation에 의한 *Lactobacillus acidophilus* IFO 3205의 생존에 관한 연구. 서울대학교 박사학위논문(1991).
2. Amartey, S. and Jeffries, T. W. : Comparison of corn steep liquor with other nutrients in the fermentation of D-xylose by *Pichia stipitis* CBS 6054. *Biotechnol. Lett.*, 16, 211 (1994).
3. Molina, O., Fitzsimons, R. and Perotti, N. : Effect of corn steep liquor on xanthan production by *Xanthomonas campestris*. *Biotechnol. Lett.*, 15, 495 (1993).
4. Singh, A., Ghosh, V. K. and Ghosh, P. : Production of thermostable acid protease by *Aspergillus niger*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 18, 177 (1994).
5. Sinkar, V. P. and Lewis, N. F. : Increased glucoamylase production using agricultural by-products. *J. Food Biochem.*, 4, 159 (1980).
6. Gokhale, D. V., Patil, S. G. and Bastawde, K. B. : Optimization of cellulase production by *Aspergillus niger* NCIM 1207. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 30, 99 (1991).
7. Brown, J. A., Collin, S. A. and Wood, T. M. : Enhanced enzyme production by the cellulolytic fungus *Penicillium pinophilum* mutant strain NTG III-6. *Enzyme Microb. Technol.*, 9, 176 (1987).
8. Speck, M. L. : Starter culture growth and action in milk. *J. Dairy Sci.*, 45, 1281 (1962).
9. 무다이 마사히코, 마다 미쓰오, 시마다 기요히로 : Bifidobacteria를 함유하는 음식물의 제조방법. 대한민국 특허 82-2 (1982).
10. 허철성 : *Bifidobacterium longum* HS 90의 다당류 생산에 관한 연구. 서울대학교 박사학위논문 (1994).
11. 김상교, 오세종, 이상준, 백영진, 박연희 : 반응표면 분석에 의한 *Lactococcus* sp. HY 449의 성장 및 bacteriocin 생산의 최적화. 한국산업미생물학회지, 22, 522 (1994).
12. Goldberg, I. and Eschar, L. : Stability of lactic acid bacteria to freezing as related to their fatty acid composition. *Appl. Environ. Microbiol.*, 33, 489 (1977).
13. Noh, D. O., Kim, S. H. and Gilliland, S. E. : Incorporation of cholesterol into cellular membrane of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. *J. Dairy Sci.*, 80, 3107 (1997).
14. Terzaghi, B. E. and Sandine, W. E. : Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Appl. Microbiol.*, 29, 807 (1975).
15. 임명준 : 최신 실험설계법. 형설출판사, 서울 (1993).
16. 박성현 : 응용실험계획법. 영지문화사, 서울 (1990).
17. SAS. : SAS/STAT User's Guide, Release 6.04, SAS Institute, Cary, NC., U.S.A. (1988).
18. SAS. : SAS/GRAPH User's Guide, Release 6.04, SAS Institute, Cary, NC., U.S.A. (1988).

19. 이경욱, 하영식, 백승천, 문지웅 : HPLC를 이용한 유제품의 유기산 분석법 비교. 한국 낙농학회회지, 17, 136 (1995).
20. Cogan, T. M., Buckley, D. J. and Condon, S. : Optimum growth parameters of lactic streptococci used for the production of concentrated cheese starter culture. *J. Appl. Bacteriol.*, 34, 403 (1971).
21. Lloyd, G. T. and Pont, E. G. : Some properties of frozen concentrated starters produced by continuous culture. *J. Dairy Res.*, 40, 157 (1973).
-

(2000년 5월 22일 접수)