

# Whey 배지에서의 *L. acidophilus* KCCM 32820과 *P. freudenreichii* KCCM 31227의 생육특성

이정훈 · 차욱진 · 백현동<sup>1</sup> · 이시경\*

건국대학교 응용생물화학과, <sup>1</sup>건국대학교 동물생명과학부

## Growth Characteristics of *L. acidophilus* KCCM 32820 and *P. freudenreichii* KCCM 31227 in Whey Broth

Jeong-Hoon Lee, Wook-Jin Cha, Hyun-Dong Paik<sup>1</sup> and Si-Kyung Lee\*

Department of Applied Biology & Chemistry, Konkuk University

<sup>1</sup>Division of Animal Life Science, Konkuk University

Received September 27, 2005; Accepted February 14, 2006

This study was carried out to evaluate the growth characteristics of *Lactobacillus acidophilus* KCCM 32820 and *Propionibacterium freudenreichii* KCCM 31227 in MRS (De Man-Rogosa-Sharpe), RCM (Reinforced Clostridial Medium) and whey broth. Bacterial growth, increase rate of TTA (Total Titratable Acidity) and decline rate of pH in broth were the greatest in 9-21 hr after culturing *Lactobacillus acidophilus* KCCM 32820 in MRS. Those were the greatest in 24-60 hr after culturing *Propionibacterium freudenreichii* KCCM 31227 in RCM. However changes of pH and TTA of broth were the greatest in 18-54 hr after culturing *Propionibacterium freudenreichii* in RCM after culturing *Lactobacillus acidophilus* in MRS for 36 hr. Viable cells of *Lactobacillus acidophilus* KCCM 32820 and *Propionibacterium freudenreichii* KCCM 31227 revealed larger numbers in 12% whey broth than in 6% whey broth. These also showed larger numbers in pasteurized whey broth than in sterilized whey broth. *Lactobacillus acidophilus* KCCM 32820 and *Propionibacterium freudenreichii* KCCM 31227 grew best in pasteurized 12% whey broth.

**Key words:** *Lactobacillus acidophilus* KCCM 32820, *Propionibacterium freudenreichii* KCCM 31227, whey broth, growth characteristics

### 서 론

외식산업의 발전과 더불어 빵의 소비는 날로 증가하고 있다. 빵은 밀가루를 주재료로 하여 반죽을 만들어 굽기 과정으로 제조하는데<sup>1)</sup> 많은 양의 수분을 함유하고 있어 미생물 증식이 매우 용이하다. 식빵의 수분활성도는 0.95-0.96로 미생물의 증식에 알맞아<sup>2)</sup> 보관 중 미생물 증식으로 인한 부패로 먹을 수 없게 된다. 빵에 미생물 증식을 억제하고자 sourdough를 이용하는데 sourdough 발효에서 생성되는 lactic acid나 acetic acid는 빵에 오염되는 *Aspergillus niger*, *Cladosporium herbarum*, *Penicillium verrucosum* 등의 곰팡이 증식 억제에 효과가 있다.<sup>3)</sup> Corsetti 등<sup>4)</sup>은 *Lactobacillus sanfrancisco* CB1이 *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Monilia*속 등의 곰팡이 증식에 저해효과가 있으며 유산균 발효 시 함께 생성된 acetic, caproic,

formic, propionic, butyric, *n*-valeric acid 등이 상승효과를 가져온다고 하였다. 이러한 유산균은 비병원성, gram(+), catalase(-), 포자를 형성하지 않는 배양이 까다로운 균으로<sup>5)</sup> *Carnobacterium*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus* 등이 있으며 *Bifidobacterium*과 *Enterococcus*속도 여기에 포함시킨다. 유산균은 우유를 발효하여 발효유를 제조하고, 건강을 위한 항균작용, 항암성 등의 기능과<sup>6)</sup>, 식품에서 산 생성 및 향 증가, 발효식품에서 조직개선 등의 기능이 있고 소화용이 및 영양증가 등의 장점을 부여한다. 또한 빵에 미생물 증식을 억제하기 위한 수단으로 프로피온산염을 첨가한다. 프로피온산염은 일반적으로 화학적 합성으로 제조하나 미생물 발효로도 제조한다. 미생물 발효방법은 치즈를 제조하고 남은 유청을 *Propionibacterium*으로 발효하여 propionic acid를 생산하는 방법이 폭넓게 연구되었고<sup>7,8)</sup>, 발효로 비타민 B<sub>12</sub>를 생산<sup>9)</sup>할 뿐만 아니라 *P. freudenreichii*는 장내에서 *Bifidobacterium adolescentis* 6003의 증식을 촉진하는 물질을 생산한다고 Kenichi 등<sup>10)</sup>은 보고하여 유산균과 마찬가지로 probiotics 미생물로 많은 연구가 필요한 혐

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

기성, 비운동성, 비아포성, gram(+)<sup>1</sup>의 간균이다.

따라서 본 연구에서는 향후 유산균과 *Propionibacterium* 균으로 발효시켜 propionic acid가 함유된 유청을 빵 제조 시에 첨가하여 빵의 풍미, 조직, 맛 및 보존성을 개선시킬 목적으로, *L. acidophilus* 및 *P. freudenreichii* 두 균주를 MRS, RCM, MRS와 RCM 합성배지 및 유청 배지에서 배양시키면서 이들의 생육특성을 조사하였다.

## 재료 및 방법

**사용균주 및 배지.** 미생물은 한국미생물보존센터에서 분양받은 *Lactobacillus acidophilus* KCCM 32820과 *Propionibacterium freudenreichii* KCCM 31227로 *L. acidophilus* KCCM 32820의 계대배양용 배지는 MRS broth(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<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2 g/l, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.2 g/l, MnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.2 g/l, pH 6.2-6.6)를 사용하였고, 균수 측정용으로는 MRS에 agar를 첨가하여 사용하였다. *P. freudenreichii* KCCM 31227의 계대배양용 배지는 RCM(yeast extract 3.0 g/l, beef extract 10.0 g/l, peptone(or tryptose) 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. 합성배지는 MRS와 RCM을 혼합하여 사용하였다.

**유청 배지.** 체다 치즈를 제조하고 얻은 부산물을 분무건조하여 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 MRS broth에 접종하여 starter culture를 제조하였다. MRS 배지 55 g을 증류수 1,000 ml에 10분간 용해 후 cap tube에 각각 10 ml씩 분주하였다. 각각의 배지를 121°C의 고압증기멸균기에서 15분간 살균 후 냉각시켜 종균 0.5 ml를 접종 후 35°C의 인큐베이터에서 16시간 배양하여 균수가 1-2×10<sup>7</sup> cfu/ml 되도록 하였다.

**MRS에서 *L. acidophilus* KCCM 32820의 생육특성.** MRS broth의 pH를 7.0으로 조절하여 멸균한 500 ml에 *L. acidophilus* KCCM 32820을 1% 접종하여 35°C 인큐베이터에서 배양하면서 3시간 단위로 36시간까지 OD(optical density), pH 및 총산도 값의 변화를 측정하였다. OD는 Spectrophotometer(8452A Diode Array Spectrophotometer, Hewlett Packard Co., Ltd., USA)로 660 nm에서 측정하였고, pH는 pH meter(MP 220, Mettler Toledo, Switzerland)로 측정하였으며, 총산도는 AACC(02-31)<sup>11)</sup> 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.

***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 121°C의 고압증기멸균기에서 15분간 살균 후 냉각시켜 종균 0.5 ml를 접종 후 35°C의 인큐베이터에서 3일간 배양하여 균수가 1-2×10<sup>7</sup> cfu/ml 되도록 하였다.

**RCM에서 *P. freudenreichii* KCCM 31227의 생육특성.** RCM의 pH를 7.0으로 조절하여 멸균한 500 ml에 *P. freudenreichii* KCCM 31227을 1% 접종 후 35°C 인큐베이터에서 배양하면서 6시간 단위로 72시간까지 OD, pH 및 총산도 값을 *L. acidophilus* KCCM 32820의 생육특성에서의 측정과 동일한 방법으로 측정하였다.

**합성배지에서 *P. freudenreichii* KCCM 31227의 생육특성.** MRS 배지의 pH를 7.0으로 조절하여 멸균한 500 ml에 *L. acidophilus* KCCM 32820을 1% 접종하여 35°C 인큐베이터에서 36시간 배양 후 RCM을 20 g 용해하여 pH를 7.0으로 조절하였다. 배지를 고압증기멸균 후 *P. freudenreichii* KCCM 31227을 1% 접종하여 35°C 인큐베이터에서 배양하면서 6시간 단위로 72시간까지 OD, pH 및 총산도 값을 측정하였다.

**Whey broth에서 생균수, pH, 총산도 측정.** 고압증기멸균(121°C, 15분) 및 저온살균(60°C, 30분)한 6%와 12% whey broth에 *L. acidophilus* KCCM 32820을 1% 접종하여 85 rpm의 35°C 인큐베이터에서 배양하면서 6시간 단위로 36시간까지 생균수, pH, 총산도 등을 측정하였고 별도로 *P. freudenreichii* KCCM 31227을 1% 접종하여 85 rpm의 35°C 인큐베이터에서 배양하면서 12시간 단위로 72시간까지 같은 항목을 측정하였다. 생균수는 표준평판법<sup>12)</sup>에 의하여 미리 준비한 0.85% 생리식염수 9 ml가 들어 있는 시험관에 배양한 균을 1 ml 취하여 10배 단계로 희석하였다. 각 단계 희석액 1 ml를 멸균 페트리 접시 2매 이상씩에 무균상태에서 취하고 MRS와 RCM을 각각 분주하였다. GasPAK system(CO<sub>2</sub> environment, BBL)에 CO<sub>2</sub>를 충전한 35°C의 인큐베이터에서 배양하여 나타난 균락수를 측정하여 생균수로 하였다. pH와 총산도는 *L. acidophilus* KCCM 32820의 생육특성에서의 측정과 동일한 방법으로 측정하였다.

## 결과 및 고찰

***L. acidophilus* KCCM 32820의 생육특성.** MRS 배지에 *L. acidophilus* KCCM 32820을 36시간 배양하면서 3시간 단위로 균 증식, pH 및 총산도 값을 측정한 결과는 Fig. 1과 같다. 배양시간에 따른 660 nm에서의 OD 값의 변화는 초기 0.11, 배양 9시간에 0.58로 증가폭이 작았으나 배양 9-21시간에 증가폭이 커 배양 21시간에 2.89를 나타냈다. 그러나 배양 21시간 이후에 증가폭이 둔화되었고 30시간 이후에는 균의 성장에 변화가 없어 *L. acidophilus* KCCM 32820의 대수기는 9-21시간으로 나타났다. 이는 Lan-Szu 등<sup>13)</sup>이 사람의 장에서 분리한 *L. acidophilus* ATCC 33200을 MRS 배지에서 배양 시 대수기가 4-8시간 이라고 한 것보다는 긴 시간이었으나, Lee 등<sup>14)</sup>이 탈

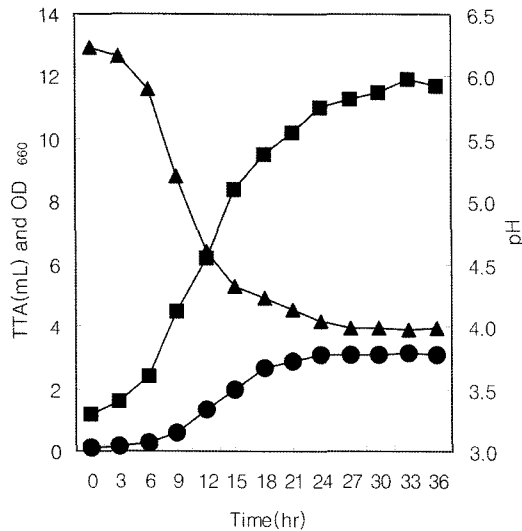


Fig. 1. Changes of OD, pH and TTA in MRS cultured by *L. acidophilus* KCCM 32820. ●: OD, ▲: pH, ■: TTA.

지대두유를 배지로 하여 *L. acidophilus*를 37°C에서 24시간 배양하였을 때의 대수기가 12시간이라고 한 것과는 유사한 결과를 나타냈다. Shang-Tian 등<sup>15)</sup>은 7.9% whey lactose 용액을 이용하여 고정화한 *L. acidophilus*를 recycle 회분식으로 180시간 배양하였을 때 OD 값은 배양 50시간에 4.2로 최대라고 하였는데 본 실험에서는 배양 27시간에 3.12로 나타나 이들의 결과보다 다소 낮은 값을 나타냈다. 한편 배양액의 pH 변화는 초기 6.23이 배양 6시간에 5.9로 저하율이 적었으나 배양 9-21시간 까지 저하율이 컸으며, 배양액의 총산도 값은 초기 1.2에서 배양 9시간에 4.5, 24시간에 11로 나타나 배양 9-24시간에 증가율이 높았다. 이는 균의 생육을 나타내는 OD 값의 변화와 일치하는 경향을 보였다.

***P. freudenreichii* KCCM 31227의 생육특성.** RCM 배지를 이용하여 *P. freudenreichii* KCCM 31227을 72시간 배양하면서 6시간 단위로 균 증식, pH 및 총산도 값을 측정 한 결과는 Fig. 2와 같다. 배양시간에 따른 660 nm에서의 OD 값의 변화는 초기 0.1에서 배양 18시간에 0.25로 증가하였으나 배양 18-60시간에 증가폭이 커 배양 60시간에 3.1을 나타냈다. 그러나 60시간 이후에는 증가폭이 둔화되었고 66시간 이후에는 거의 변하지 않아 *P. freudenreichii* KCCM 31227의 대수기는 18-60시간으로 나타났다.

Vaughan<sup>16)</sup>은 lactate 배지에 *P. freudenreichii* subsp. *shermanii*를 배양하였을 때 OD 값의 변화는 배양 17시간에 0.3, 47시간에 1.3이라 하였고, Min<sup>17)</sup>은 10% skim milk whey에 *P. freudenreichii*를 배양 시 OD 값의 변화를 측정한 결과 배양 24시간에 0.15, 48시간에 0.55, 72시간에 0.80이라고 한 결과보다 본 실험에서의 OD 값이 높게 나타나 lactate나 skim milk whey 보다는 RCM에서 잘 자라는 것으로 나타났다. 한편 *P. freudenreichii* KCCM 32820을 배양시킨 RCM의 pH 변화는 초기 6.47이 배양 12시간에 6.29로 pH 저하가 낮았으나, 배양 18-60시간까지는 pH가 급격하게 저하되어 배양 60시간에 4.05로 가장 낮은 값을 나타냈다. 배양액의 총산도 값은 초기

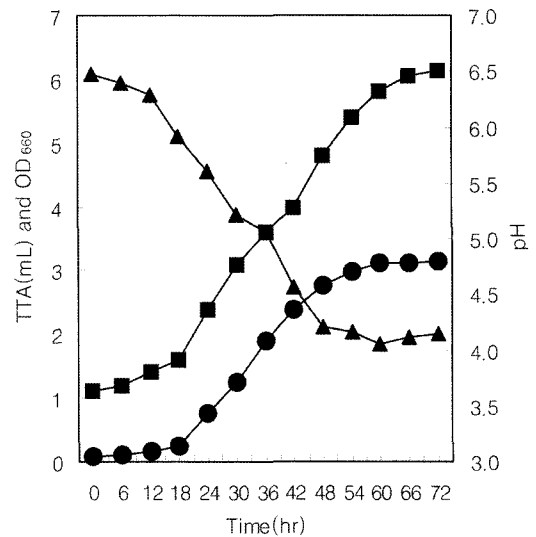


Fig. 2. Changes of OD, pH and TTA in RCM cultured by *P. freudenreichii* KCCM 31227. ●: OD, ▲: pH, ■: TTA.

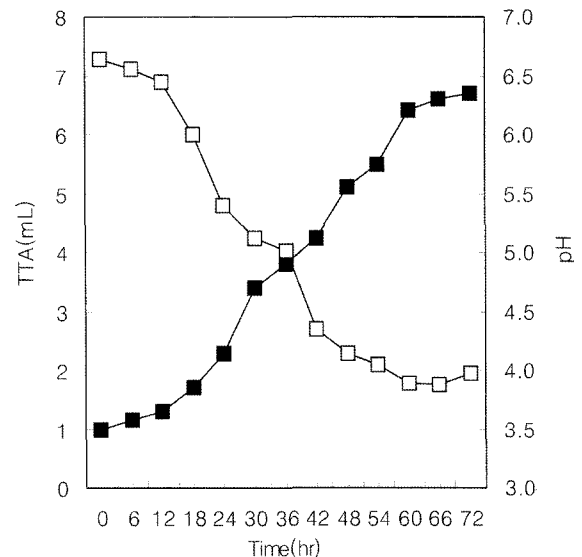


Fig. 3. Changes of pH and TTA in RCM with MRS cultured by *P. freudenreichii* KCCM 31227 after culturing *L. acidophilus* KCCM 32820 for 36 hr. □: pH, ●: TTA.

1.1이 배양 24시간에 2.4, 60시간에 5.8로 배양 24-60시간에 증가폭이 크게 나타났다. 이상의 실험에서 pH 값과 총산도 값의 변화는 OD 값으로 측정 한 균의 성장 경향과 일치하여 균의 성장이 급격히 증가하는 18시간부터 60시간까지 배양액의 pH 값이 급격히 감소하였고 총산도 값은 급격히 증가되었다.

**함성배지에서 *P. freudenreichii* KCCM 31227의 생육특성.** MRS 배지에 *L. acidophilus* KCCM 32820을 36시간 배양 후 그 배양액에 RCM을 용해하고 pH를 6.5로 조절하여 고압증기 멸균한 후 *P. freudenreichii* KCCM 31227을 72시간 배양하면서 6시간 단위로 배양액의 pH 및 총산도 값의 변화를 측정한 결과는 Fig. 3과 같다. 배양시간에 따른 pH 값의 변화는 배양 12시간까지 저하율이 적었으나 18시간부터 54시간까지는 컸고 60시간부터는 저하 현상을 보이지 않았다. 배양시간에 따른 총

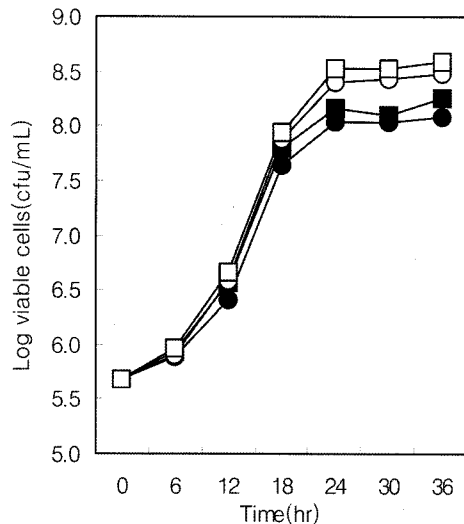


Fig. 4. Changes of viable cells in whey broth cultured by *L. acidophilus* KCCM 32820. ●: 6% whey broth sterilized for 15 min at 121°C, ■: 12% whey broth sterilized for 15 min at 121°C. ○: 6% whey broth pasteurized for 30 min at 60°C, □: 12% whey broth pasteurized for 30 min at 60°C.

산도 값은 배양 12시간까지 증가폭이 적었으나 배양 18시간부터 60시간까지 증가폭이 컸고 60시간 이후에는 증가율이 둔화되었다. 이상의 실험에서 RCM에 *P. freudenreichii* KCCM 31227만을 배양하였을 때보다(Fig. 2) *L. acidophilus* KCCM 32820을 36시간 배양 후 다시 *P. freudenreichii* KCCM 31227을 배양시킨 합성배지에서 산 생성이 많은 것으로 나타났다. 이러한 결과는 Ozadali 등<sup>18)</sup>이 glucose와 lactate를 각각 기질로 하여 *P. acidipropionici* P9로 propionic acid와 acetic acid 생산 시 glucose 보다 lactate를 기질로 선호하였다는 보고와 같은 경향이였다. 이는 MRS 배지에서 *L. acidophilus* KCCM 32820이 탄소원인 glucose를 lactic acid로 전환시키고, 전환된 lactic acid를 *P. freudenreichii* KCCM 31227이 기질로 이용하기 때문에 RCM 배지에서 보다 산을 많이 생성한 것으로 생각된다.

**Whey broth에서 *L. acidophilus* KCCM 32820의 생육특성.** 고압증기멸균(121°C, 15분) 및 저온살균(60°C, 30분)한 6%와 12% whey broth에 *L. acidophilus* KCCM 32820을 접종하여 shaking incubator(85 rpm, 35°C)에서 배양하면서 36시간 동안 생균수를 측정된 결과는 Fig. 4와 같다. 멸균방법이나 whey broth 농도에 관계없이 배양 12시간에서 24시간 까지 균의 증식이 활발하였으나, 배양 24시간 이후에는 균의 증식이 거의 없었다. 또한 같은 whey broth 농도에서 고압증기멸균보다 저온살균하였을 때 균수가 높게 나타났고, 동일한 멸균방법에서는 6%보다 12% whey broth에서 높은 균수를 나타내, 고압증기멸균한 12%보다 저온살균한 6% whey broth에서 균의 생장이 높았다. 이상의 실험에서 *L. acidophilus* KCCM 32820을 whey broth에서 배양 시 고압증기멸균보다는 저온살균시에 균의 생육이 좋은 것으로 나타났다. Andrzej 등<sup>19)</sup>은 가수분해되어 대부분이 glucose로 전환된 옥수수 broth의 pH를 7.2로 조절하여 *L. acidophilus*를 접종한 후 32°C에서 배양할 때 균수의 변화는 20시간에  $10^6$  cfu/mL, 40시간에  $10^{10}$  cfu/mL, 50시간에

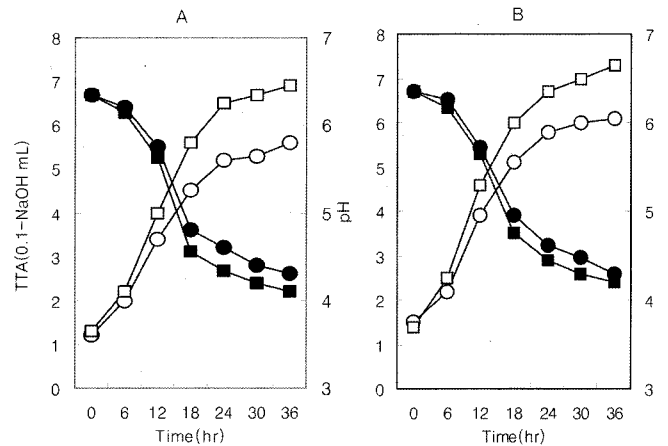
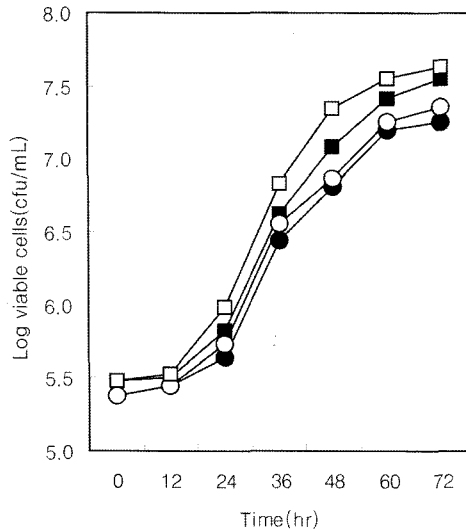


Fig. 5. pH and TTA variation of whey broth cultured by *L. acidophilus* KCCM 32820. (A) ■: pH of 6% whey broth pasteurized for 30 min at 60°C, ●: pH of 6% whey broth sterilized for 15 min at 121°C, □: TTA of 6% whey broth pasteurized for 30 min at 60°C, ○: TTA of 6% whey broth pasteurized for 30 min at 60°C. (B) ■: pH of 12% whey broth pasteurized for 30 min at 60°C, ●: pH of 12% whey broth sterilized for 15 min at 121°C, □: TTA of 12% whey broth pasteurized for 30 min at 60°C, ○: TTA of 12% whey broth pasteurized for 30 min at 60°C.

$10^{12}$  cfu/mL이었으며 50시간 이후에는 균의 생장이 없었다고 하였다. 또한 Lin 등<sup>20)</sup>도 고압증기멸균한 10% 탈지분유에 *B. longum*, *L. acidophilus* 및 *L. bulgaricus*를 접종하여 37°C에서 배양하였을 때 대수기 정점에서의 균수가  $10^9$ - $10^{10}$  cfu/mL이라고 하여 이들 실험에서의 균수가 본 실험에서 보다 다소 높게 나타났다. 또한 저온살균한 whey broth보다 고압증기멸균한 whey broth에서 균수가 적게 검출되는 것은 whey broth를 고압증기멸균 시 영양분의 파괴로 인하여 균의 생장이 다소 낮은 것으로 생각된다. Huhtanen 등<sup>21)</sup>은 whey를 높은 온도에서 가열하면 whey에 함유되어 있는 lactose가 미생물이 분해하기 어려운 lactulose로 변화되어 많은 미생물은 lactulose를 발효시키지 못할 뿐만 아니라<sup>22)</sup>, 고농도의 lactulose는 세균증식을 저해하기 때문이라고 하였는데, 본 실험에서도 동일한 결과를 나타냈다.

한편 고압증기멸균(121°C, 15분) 및 저온살균(60°C, 30분)한 6%와 12% whey broth에 *L. acidophilus* KCCM 32820을 shaking incubator(85 rpm)의 35°C에서 배양하면서 6시간 단위로 36시간까지 pH와 총산도를 측정된 결과는 Fig. 5와 같다. Fig. 5A에서 배양시간에 따른 pH 변화는 6-18시간에 저하율이 컸으나 이후에는 거의 변화가 없었으며, 고압증기멸균보다 저온살균한 whey broth에서 낮은 pH를 나타냈다. 총산도도 배양 6-18시간에 상승률이 컸으나 24시간부터는 거의 변화를 나타내지 않았고 고압증기멸균보다 저온살균한 whey broth에서 많은 양의 산이 생성되었다. Fig. 5B에서도 A에서와 같은 pH와 총산도 변화 경향을 나타냈다. 이는 Yasushi 등<sup>23)</sup>이 *L. acidophilus*를 7%(w/w) cheese whey에서 배양시 초기 pH 6.2가 배양 27시간에 4.5까지 내려갔으나 이후에는 저하가 완만하여 배양 48시간에 4.0이었다고 한 것과 유사한 결과를 나타냈다. Cha<sup>24)</sup>는 밀가루를 기질로 한 *L. acidophilus*로 발효 시 총산도는 42시간에

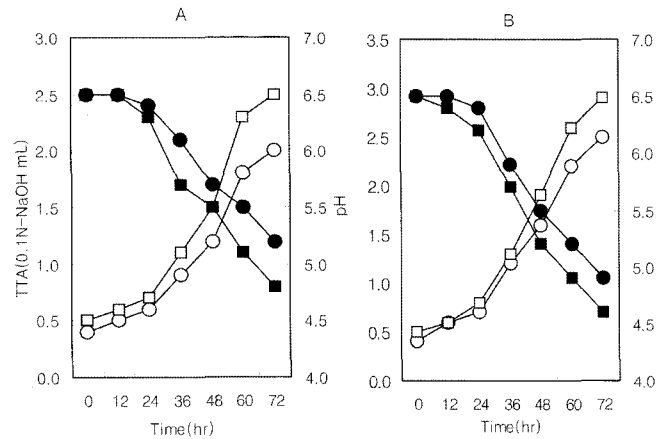


**Fig. 6.** Changes in viable cells of *P. freudenreichii* KCCM 31227 in whey broth sterilized for 15 min at 121°C and pasteurized for 30 min at 60°C after culturing *L. acidophilus* KCCM 32820 for 36 hr. ●: 6% whey broth sterilized for 15 min at 121°C, ■: 12% whey broth sterilized for 15 min at 121°C, ○: 6% whey broth pasteurized for 30 min at 60°C, □: 12% whey broth pasteurized for 30 min at 60°C.

6.5이었고, Min<sup>17)</sup>은 10% skim milk whey broth에 *L. acidophilus* KFCC 32825를 접종하여 30°C에서 72시간 배양하였을 때 총산도가 5.01이라 하여 본 실험의 결과보다 다소 낮은 값을 나타냈다. 이는 배지의 조성 및 균이 상이한데서 기인된 것이라 생각된다.

**Whey broth에서 *P. freudenreichii* KCCM 31227의 생육특성.** 고압증기멸균(121°C, 15분) 및 저온살균(60°C, 30분)한 6%와 12%의 whey broth에 *P. freudenreichii* KCCM 31227을 shaking incubator(85 rpm의 35°C)에서 배양하면서 12시간 단위로 72시간까지 생균수를 측정하는 결과는 Fig. 6과 같다. 멸균방법이나 whey broth 농도에 관계없이 배양 24시간까지는 균수 증가율이 완만하였으나 24시간부터 60시간까지 증가율이 컸고, 60시간 이후에는 증가율이 다시 둔화되어 *P. freudenreichii* KCCM 31227의 대수기는 24-60시간으로 나타났다. 같은 whey broth 농도에서 고압증기멸균보다 저온살균하였을 때 균수가 높게 나타났고, 동일한 멸균방법에서는 6%보다 12% whey broth에서 높은 균수를 나타냈다. Huhtanen 등<sup>21)</sup>은 whey broth를 고압증기멸균하였을 때 비타민, 아미노산, 당 등이 파괴되어 *Propionibacterium*의 증식을 저해한다고 하였는데 본 실험에서도 고압증기멸균보다 저온살균시 균수가 높게 검출되어 같은 결과를 나타냈다. *Propionibacterium*은 증식이 느린 혐기성 균으로 Elizabeth 등<sup>25)</sup>은 *P. freudenreichii* var. *shermanii*의 증식은 40-80시간 사이에 가장 활발하여 이때를 대수기라 하였는데, 본 실험에서는 배양 24-60시간에 균수 증가가 활발하여 다소간 차이를 나타냈다.

또한 고압증기멸균(121°C, 15분) 및 저온살균(60°C, 30분)한 6%와 12%의 whey broth에 *P. freudenreichii* KCCM 31227을 shaking incubator(85 rpm의 35°C)에서 배양하면서 12시간 단위로 72시간까지 pH와 총산도를 측정하는 결과는 Fig. 7과 같다.



**Fig. 7.** pH and TTA variation of whey broth cultured by *P. freudenreichii* KCCM 31227. (A) ■: pH of 6% whey broth pasteurized for 30 min at 60°C, ●: pH of 6% whey broth sterilized for 15 min at 121°C, □: TTA of 6% whey broth pasteurized for 30 min at 60°C, ○: TTA of 6% whey broth pasteurized for 30 min at 60°C. (B) ■: pH of 12% whey broth pasteurized for 30 min at 60°C, ●: pH of 12% whey broth sterilized for 15 min at 121°C, □: TTA of 12% whey broth pasteurized for 30 min at 60°C, ○: TTA of 12% whey broth pasteurized for 30 min at 60°C.

Fig. 7A에서 배양시간에 따른 pH는 배양 24시간까지 거의 변화를 나타내지 않았으나 24-72시간에 pH의 저하율이 컸고 고압증기멸균보다는 저온살균한 whey broth에서 낮은 pH를 나타냈다. 총산도는 배양 24시간까지 상승률이 적었으나 24-72시간에 상승률이 컸고 고압증기멸균보다 저온살균한 whey broth에서 높은 총산도 값을 나타냈다. Fig. 7B에서도 A에서와 같은 pH와 총산도 변화 경향을 나타냈다. Carrondo 등<sup>26)</sup>은 *Propionibacterium* sp.를 이용하여 glucose를 기질로 한 연속배양에서 pH의 변화는 초기에 6.8이었으나 배양 10시간에 6.1, 20시간에 5.5, 30시간에 5.2로 낮아졌다고 하였는데 이는 본 실험의 살균조건이나 whey 농도에 따른 pH 변화와 유사한 경향을 나타냈다.

### 초 록

*Lactobacillus acidophilus* KCCM 32820과 *Propionibacterium freudenreichii* KCCM 31227을 MRS, RCM, MRS와 RCM 합성배지 및 whey broth에 배양하여 OD(Optical Density), pH, 총산도, 생균수 등의 생육특성을 조사하였다. *L. acidophilus* KCCM 32820을 MRS 배지에서 배양시 균 증식, 총산도 값의 증가율 및 pH 저하율은 9-21시간에 가장 컸으며, *P. freudenreichii* KCCM 31227을 RCM 배지에서 배양시에는 균의 증식, 총산도 값의 증가율 및 pH 저하율은 24-60시간에 가장 컸다. 또한 합성배지에서 *P. freudenreichii* KCCM 31227의 pH와 총산도 변화는 18-54시간에 가장 높았다. Whey broth에서는 *L. acidophilus* KCCM 32820이 *P. freudenreichii* KCCM 31227보다 균의 성장이 좋았으며, 두 균 모두 6%보다 12% whey broth에서, 고압증기멸균보다 저온살균한 whey broth에서 높은 균수를 나타냈고, 저온살균한 12% whey broth에서 증식이 가장 높았다.

**Key words:** *Lactobacillus acidophilus* KCCM 32820, *Propionibacterium freudenreichii* KCCM 31227, whey broth, 생육특성

### 참고문헌

- Zayed, G. and Winter, J. (1995) Batch and continuous production of lactic acid from salt whey using free and immobilized cultures of lactobacilli. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **44**, 362-366.
- George, J. B. (1989) In *Basic Food Microbiology*. 2nd ed. Van Nostrand Reinhold pp. 111.
- Johan, S. and Jesper, M. (2005) Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. *Trends Food Sci. Tech.* **16**, 70-78.
- Corsetti, A., Gobbetti, M., Rossi, J. and Damiani, P. (1998) Antimold activity of sourdough lactic acid bacteria: Identification of a mixture of organic acids produced by *Lactobacillus sanfrancisco* CB1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **50**, 253-256.
- Stephen, W., Lars, A., Egon, B. H., Luc, D. V., Svend, L., Liisa, L., Sven, L., Beat, M., Seppo, S. and Atte, V. W. (2004) The lactic acid bacteria, the food chain and their regulation. *Trends Food Sci. Tech.* **15**, 498-505.
- Fernandes, C. F. and Shahani, K. M. (1989) Modulation of antibioticosis by *Lactobacilli* and yogurt and its healthful and beneficial significance. In *yogurt: Nutritional and health Properties*, (Chandan, R. C. ed.), McLean, V. A. pp. 145-160.
- Anderson, T. M., Bodie, E. A., Goodman, N. and Schwartz, R. D. (1986) Inhibitory effect of autoclaving whey-based medium on propionic acid production by *Propionibacterium shermanii*. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**, 427-428.
- Sherman, J. M. (1932) Propionic acid fermentation by the use of mixed strains of propionic bacteria. US Pat. 1,865,146.
- Kaiming, Y., Miyako, S., Sha, J. and Kazuyuki, S. (1996) Efficient Production of Vitamin B<sub>12</sub> from Propionic acid Bacteria under Periodic Variation of Dissolved Oxygen Concentration. *J. Ferment. Bioeng.* **82**, 484-491.
- Kenichi, H., Nobuo, Y. and Naoki, T. (2000) Bifidogenic growth stimulator produced by propionic acid bacteria. *Milk Sci.* **49**, 161-167.
- Approved methods of the American Association of Cereal Chemists(AACC) (1985) Minnesota, pp. 02-31.
- 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) In *Laboratory of food microbiology*. KangMunKag, Seoul, pp. 199-202.
- Lan-Szu, C. and Bart, W. (1999) Isolation and characterization of acid- and bile tolerant isolates from strains of *Lactobacillus acidophilus*. *J. Dairy Sci.* **82**, 23-31.
- Lee, J. S., Ko, Y. T., and Paik, J. K. (1984) Effects of defatted soy milk on the growth of *L. acidophilus*. *J. Korean Agri. Chem.* **27**, 7-13.
- Shang-Tian, Y. and Yan, H. (1995) A novel recycle batch immobilized cell bioreactor for propionate production from whey lactose. *Biotechnol. Bioeng.* **45**, 379-386.
- Vaughan, L. C. (1988) Polysaccharide production by propionibacteria during lactose fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 1892-1895.
- Min, Y. S. (1992) The organic acid production by mixed culture of *Propionibacterium freudenreichii* KFCC 31227 and *Lactobacillus acidophilus* KFCC 31227. Ph. D. thesis, Chungbuk Univ., Chungju.
- Ozadali, F., Glatz, B. A. and Glatz, C. E. (1996) Fed-batch fermentation with and without on-line extraction for propionic and acetic acid production by *Propionibacterium acidipropionici*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **44**, 710-716.
- Andrzej, B., Earl, G. H. and Bonita, A. G. (1993) Survey of propionibacteria for ability to produce propionic acid and acetic acid. *J. Food Prot.* **56**, 50-54.
- Lin, M. Y. and Young, C. M. (2000) Folate levels in cultures of lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* **10**, 409-413.
- Huhtanen, C. N., Parrish, F. W. and Hicks, K. B. (1980) Inhibition of bacterial growth by lactulose preparations. *Appl. Environ. Microbiol.* **40**, 171-173.
- Thayanithy, K., Harding, G. and Wase, D. A. J. (1982) Rearrangement of lactose on sterilization. *Biotechnol. Lett.* **4**, 423-424.
- Yasushi, K., Tomoko, S., Junko, U., Haruki, K., Tadao, S. and Takatoshi, I. (2000) Growth of *Lactobacillus acidophilus* group strains isolated from human intestines in skim milk and cheese whey. *Milk Sci.* **49**, 145-149.
- Cha, U. J. (2003) A study on properties of the flour-ferment with *Lactobacillus acidophilus* and the quality of noodles using the ferment. Ph. D. thesis, Konkuk Univ., Seoul.
- 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.
- Carondo, M. J. T., Crespo, J. P. S. G. and Moura, M. J. (1988) Production of propionic acid using a xylose utilizing *Propionibacterium*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **17**, 295-312.