

乳製品中の 耐熱性細菌에 관한 연구

제 1 보 原乳와 市乳中の 耐熱性細菌의 分布

崔 炳 圭

建國大學校 畜産大學 畜産加工學科
(1975년 11월 15일)

Studies on the Thermoduric Bacteria in Raw Milk and Dairy Products

Part I. Distribution of Thermoduric Bacteria in Raw Milk and City Milk

by

Byung-Kyu Choi

Department of Animal Food Technology, College of Animal Husbandry, Kon Kuk University
(Received November 15, 1975)

Abstract

1. Three hundred and thirty three strains of thermoduric bacteria from raw milk, H.T.S.T. sterilized milk and U.H.T. sterilized milk in the market were isolated after heat treatment at 65°C for 30 minutes.
2. By microscopical and physiological examination, including the tests for proteolysis and lipolysis, the isolates were identified as 125 strains of *Bacillus stearothermophilus*, 69 strains as *Bacillus coagulans*, 57 strains as *Bacillus subtilis*, 76 strains as *Bacillus cereus* and 3 strains as *Lactobacillus thermophilus*.
3. The susceptibility of the selected thermoduric strains to heat, the vegetative cells of some strains in skim milk survived the heat treatment at 65°C for 30 minutes or 85°C for 20 minutes but not survived at 100°C for 10 minutes.

서 론

젖산균 starter로 만들어지는 yoghurt, 가당산유음료, 젖산균음료 등의 발효유(醱酵乳)는 국민의 보건영양상 중요한 유제품으로 그 수요는 점차 증대되고 있다. 이들 제품의 품질은 원료 생우유의 유질(乳質)과 제조 및 제조후 보존 중의 취급에도 영향이 되겠지만 특히 원료유와 발효중 제조공정에 있어서 내열성세균

의 존재는 제품의 품질과 풍미에 큰 영향을 주고 있다. (1,2)

더욱 최근에는 식품을 고온으로 보존하려는 시도가 늘어나고 있으며 또한 급후 고온균에 의한 식품의 변질이 식품위생상 중요한 문제로 야기될 것으로 생각된다.

본 실험에서는 발효유용 원료생유(원유) 및 시유에 존재하는 내열성세균의 실태를 파악하기 위하여 우선

균을 분리 증명하고 한편 기본배지에 이들 균을 접종 배양하여 생육의 상태와 대사의 성상을 규명한 실험의 일부를 보고한다.

실험 방법

1. 재료와 일반세균 및 내열성세균의 분리와 계수방법

9일 증의 생유 20점과 시판 시유 40점 (HTST 살균유 20점, UHST 살균유 20점)을 공시 시료로 하여 일반세균은 상법⁽⁸⁾에 따라 평판법으로 다음의 내열성세균의 경우와 같이 계수하였다. 한편 내열성세균의 경우는 미리 water bath에서 65°C, 30분간 가열처리한 다음 그대로를 38°C, 24시간 배양한 것을 내열성세균을 함유한 시료로 하였다.⁽⁹⁾ 내열성세균의 수는 Table 1의 한천배지를 사용하여 60°C에서 48시간 배양한 다음 발육된 colony를 계수하여 시료 1ml 중의 균수로 표시하였다.

한편 이 colony를 계수한 다음 평판회색법에 따라 한균주단을 순수분리하여 균의 동정시험을 하였다.

2. 내열성균의 동정

순수분리된 내열성균주의 성질과 동정을 위하여 건경하여서 균의 형태 한천배지에서의 colony의 성상, 액체배양에 있어서 발육상태, Gram 염색성, litmus-milk의 변화, 프자형성, 산소요구성, 당의 발효성 등의 일반성질은 상법⁽⁸⁾에 따라 조사하였다. 이들의 결과로부터 Bergey's Manual 제7판⁽⁶⁾과 제8판⁽⁷⁾에 따라 균종을 동정하였다.

Table 1. Composition of medium for thermoduric bacteria.

Meat extract	5 g
Polypeptone	5 g
Yeast extract	5 g
Malt extract	5 g
Glucose	5 g
Lactose	5 g
Sucrose	5 g
Starch	5 g
KCl	10 g
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	0.5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 g
MnSO ₄ ·4H ₂ O	5 mg
FeSO ₄ ·7H ₂ O	5 mg
Agar	1.5 g
Dist. water	1000 ml
pH	6.5

특히 단백질분해성 판정에는 탈지유를 함유한 표준 한천배지로 38°C, 48시간 배양하여 colony주위에 생성되는 투명환의 유무로부터 판정하였다.⁽⁸⁾ 한편 지방분해성은 victorian blue로 염색지방을 균일히 분산시킨 한천배지로 배양한후 변색된 colony를 양성으로 판정하였다.⁽⁹⁾

3. 내열성 시험

분리동정한 균주를 가당 boullion배지에서 38°C, 24시간 배양하여 이를 water bath중에서 소경온도를 유지하여둔 탈지유 10 ml에다 첨가하여 65°C, 30분간, 85°C, 20분간 및 100°C 10분으로 처리한 후에 급냉하여 잔존수를 상법의 측정법⁽¹⁰⁾에 따라 계수하였다. 한편 시험결과에서 공시균의 생존율을 구하여 내열성의 성질을 검토하였다.⁽⁹⁾

결과 및 고찰

1. 일반세균과 내열성 세균

각종 시료에 있어서 일반세균수(數)와 내열성세균수를 증균법(增菌法)으로 판정한 결과는 Table 2, Table 3, Table 4와 같다.

Table 2, Table 3, Table 4와 같이 원유는 살균우유에 비하여 무수히 많은 일반미생물이 오염되어 있는 것을 알 수 있다. 한편 살균우유라 할지라도 살균온도

Table 2. Bacterial counts of raw milk.

Sample No.	Standard plate counts (×10 ⁴ /ml)	Thermoduric plate counts
R-1	360	<1
R-2	290	<1
R-3	450	<1
R-4	580	<1
R-5	510	2
R-6	260	<1
R-7	3,000	65
R-8	910	<1
R-9	1,100	50
R-10	2,800	50
R-11	600	5
R-12	8,800	2
R-13	2,900	90
R-14	860	<1
R-15	780	<1
R-16	560	<1
R-17	10,200	4
R-18	380	<1
R-19	720	<1
R-20	8,400	2
Total	44,360	281

Table 3. Bacterial counts of high temperature short time sterilized milk.(city milk)

Sample No.	Standard plate counts	Thermoduric plate counts
H- 1	20	8
H- 2	800	1
H- 3	15	1
H- 4	50	5
H- 5	1,500	10
H- 6	80	2
H- 7	35	10
H- 8	600	1
H- 9	21	1
H-10	25	1
H-11	10	1
H-12	450	5
H-13	68	2
H-14	20	0
H-15	300	3
H-16	650	1
H-17	900	5
H-18	620	2
H-19	700	1
H-20	1,200	6
Total	8,055	66

Table 4. Bacterial counts of ultra high temperature sterilized milk.(city milk)

Sample No.	Standard plate counts	Thermoduric plate counts
U- 1	<1	<1
U- 2	<1	<1
U- 3	<1	<1
U- 4	30	8
U- 5	<1	<1
U- 6	<1	<1
U- 7	<1	<1
U- 8	<1	<1
U- 9	<1	<1
U-10	8	3
U-11	<1	<1
U-12	<1	<1
U-13	<1	<1
U-14	<1	<1
U-15	5	<1
U-16	2	<1
U-17	<1	<1
U-18	10	2
U-19	<1	<1
U-20	<1	<1
Total	70	31

에 따라 달라 high temperature short time(이하 HTST) sterilized milk(75°C, 15초 간 살균)는 ultra high temperature(이하 UHT) sterilized milk(130°C, 2초, 135°C 4초, 146°C 3초 간 살균)에 비하여 월등히 많은 일반세균이 오염되어 있음을 알 수 있었다.

그리고 일반세균수와 내열성세균수와 의 상관관계는 전혀 없어 일반세균수는 무수히 많아도 내열성세균수는 아주 적을때가 많았다.

내열성세균의 분포비율은 원유에 있어서는 160만 분지 1인데 비하여 UHT sterilized milk에 있어서는 약 반이고, HTST sterilized milk에서는 122분지 1이였다. UHT sterilized milk에서는 역시 고온으로 처리하기 때문에 일반세균은 거의 사멸되는 것으로 생각된다.

내열성세균의 분포는 살균처리방법에 따라 달라 UHT sterilized milk에서는 HTST sterilized milk에 비하여 약 반으로 감소되었다.

이들 내열성세균의 유래원은 규명하기가 어렵겠지만 생유와 살균처리 온도에 따라 내열성세균의 분포상태는 아주 다르다.

2. 내열성균의 동정

이상의 raw milk, HTST sterilized milk 및 UHT sterilized milk 등 40점에서 분리된 내열성세균의 총수는 377균주였다.

이중 330균주는 동정되어 그 결과는 Table 5와 같다. 그러나 나머지 47균주는 동정되지 못하였다.

공시 시료를 미리 가열처리 후 24시간 배양을 행하였으므로 내열성이 강한 균종이 선택적으로 분리된 것 같다. 즉 분리균주는 *Bacillus stearothermophilus* 125균주, *Bacillus coagulans* 69균주, *Bacillus subtilis* 57균주, *Bacillus cereus* 76균주, *Lactobacillus thermophilus* 3균주의 2속(屬) 5종으로 분리동정되었다.

이상과 같이 거의 모든 균주는 호기성으로 포자를 형성하는 *Bacillus*속이었다.

*Bacillus*속으로 동정된 것중 내열성 총균수에 대한 비율은 *Bacillus stearothermophilus*가 33.15%, *Bacillus coagulans*가 18.3%, *Bacillus subtilis*가 15.1%, *Bacillus cereus*가 20.16%, *Lactobacillus thermophilus*가 0.08%였다. 더욱이 균종과 제품의 종류와는 상관없이 *Bacillus stearothermophilus*가 1/3를 차지하였다.

Lamanna씨⁽¹¹⁾ 등은 내열성세균을 60°C 혹은 그 이상의 온도에서도 잘 생육하는 균종을 말하였고 이들은 60°C에서 생육하고 30°C 이하에서 생육하지 않은 것을 stenothermophile, 60°C에서 30°C 이하에서 생육가능한 것을 eurithermophile이라 하였다.

Table 5. The properties of thermoduric bacteria isolated from raw milk and city milk.

Groups	I	II	III	IV	V	VI
Pigmentation of colony	Yellowish white	Yellowish white	Grayish white	Grayish white	Grayish white	
Cell morphology	rod 0.5~0.9 ×2.3~5.0 μ	rod 0.8~1.4 ×2.0~6.5 μ	rod 0.7~0.8 ×2.5~3.0 μ	rod 0.8~1.2 ×2.0~6.0 μ	longyrod 0.6~ 1.0×1.3~9.0 μ	
Motility	-	+	-	-	-	
Spore formation	+	+	+	+	+	
Gram stain	+	+	+	+	+	
Aerobic growth	+	+	+	+	+	
Anaerobic growth	-	+	-	+	+	
Catalase	+	+	+	+	+	
Litmus milk	slightly acid	slightly acid	slightly acid	slightly acid	slightly acid	
Gas production from sugar	-	-	-	-	+	
Production of indole	-	-	±	±	-	
Production of nitrite	±	-	+	+	-	
Production of acetoin	-	-	-	+	-	
Acid from glucose	+	+	+	+	+	
Acid from mannose	+	±	+	±	+	
Acid from sucrose	+	±	+	+	+	
Acid from arabinose	±	+	+	-	-	
Acid from xylose	+	+	+	-	-	
Acid from lactose	+	+	-	-	+	
Acid from starch	+	±	±	±	+	
Acid from glycerol	+	±	?	+	-	
Acid from mannitol	±	±	+	-	?	
Proteolysis	+	+	+	+	-	
Lipolysis	-	-	-	-	-	
Starch hydrolysis	+	+	+	+	±	
Numbers of isolated strains	125	69	57	76	3	47
Percentage(%)	33	18	15	20	0.08	12
Identification	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	<i>Bacillus coagulans</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Lactobacillus thermophilus</i>	unknown

우유나 유제품에 있어서 고온성균은 젖산균, 유포자간균, 방사선균이 분포되어 있다고 하며⁽¹²⁾ 살균유나 분유에는 *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus coagulans*, *Lactobacillus thermophilus* 등이 오염되어 있다고 한다.⁽¹³⁾

우리나라의 원유나 시유에는 濱木⁽¹³⁾씨 등이 보고한 이외에 *Bacillus cereus*와 *Bacillus subtilis*가 오염되어 있음을 알 수 있었다.

3. 내열성균의 내열성

분리동정된 *Bacillus stearothermophilus* 12균주, *Bacillus coagulans* 7균주, *Bacillus subtilis* 6균주,

Bacillus cereus 7균주, *Lactobacillus thermophilus* 3균주 등 36균주만을 택하여 탈지유배지에 있어서 65°C, 30분간, 85°C 20분간 및 100°C 10분간의 가열처리로 잔존되는균을 미가열구의 경우와 비교하여 그의 생존율을 조사한 결과는 Table 6 과 같다.

이상의 Table 6과 같이 *Bacillus stearothermophilus* No. H-12-5, No. U-3-8, *Bacillus coagulans*, No. U-18-10, *Bacillus subtilis* No. H-7-8, *Bacillus cereus* No. H-20-5, *Lactobacillus thermophilus* No. U-10-1 등을 내열성이 높아 65°C에서 30분간의 가열처리에도 50~70% 정도 생존하고 있음을 알 수 있었다.

Table 6. Percent survival of thermophilic bacteria when exposed to various heat treatment in skim milk

Species and strains No.	Percent survival after various heat treatment		
	65°C, 30 min	85°C, 20 min	95°C, 10 min
<i>Bacillus stearothermophilus</i>			
H-5-10	18.7	2.0	0
H-17-20	26.8	1.5	0
R-13-21	12.0	0.0	0
H-12-5	72.3	53.6	0
U-3-7	42.8	8.7	0
H-17-5	16.3	0.0	0
U-3-3	38.6	1.8	0
H-7-5	3.8	0.0	0
U-3-8	54.0	43.6	0
H-20-6	7.6	0.0	0
U-4-3	8.7	1.0	0
H-20-15	5.8	0.0	0
<i>Bacillus coagulans</i>			
H-5-8	7.8	1.0	0
H-4-5	23.2	1.8	0
U-4-1	7.0	0.0	0
U-18-10	49.5	6.6	0
R-17-58	6.7	0.0	0
H-10-13	16.6	2.3	0
H-5-19	13.3	0.1	0
<i>Bacillus subtilis</i>			
U-10-5	8.0	0	0
H-7-8	67.0	9.6	0
H-5-42	6.3	0.5	0
R-13-13	5.7	0	0
H-7-6	16.3	0.4	0
H-12-4	10.2	0	0
H-12-3	9.7	0.1	0
<i>Bacillus cereus</i>			
H-10-1	18.7	1.4	0
R-13-10	4.7	0	0
H-20-5	50.8	20.3	0
H-20-3	12.0	0.1	0
R-13-33	4.3	0	0
U-4-4	5.0	0	0
H-6-8	8.8	0.1	0
H-15-2	6.7	0.1	0
<i>Lactobacillus thermophilus</i>			
U-10-1	65.6	19.3	0

U-4-3	20.1	3.0	0
H-15-3	25.7	0	0

특히 내열성이 가장 강한 균주로는 *Bacillus stearothermophilus* No. H-12-5, No. U-3-8이었고 그 다음이 *Bacillus cereus* No. H-20-5, *Lactobacillus thermophilus* No. U-10-1이었다.

한편 이들 균주들은 85°C 20분간 가열하면 4균주를 제외하면 거의 사멸되었고 100°C에서 10분간 가열처리로는 모든 시료균은 다 사멸되었다.

이상의 결과는 兵衛等^(14,15)의 연구결과와 유사한 경향을 나타내나 내열성시험에 사용된 균은 대수기의 것인데도 불구하고 내열성은 높으므로 만약 이들 균주가 우유에 함유되거나 발효유의 원료우유에 존재된다면 살균과 기타 여러가지 취급을 신중히 하지 않으면 안 될 것이다.

한편 우유와 유제품에서 자주 발견되는⁽¹⁶⁾ *Streptococcus thermophilus*, *Bacillus calidolactis*, *Bacillus polymyxa* 등의 균주는 없었다.

요 약

1. 원유의 시유 40건에서 내열성균으로 생각되는 330균주의 세균이 분리되었다.
2. 현미경적 관찰, 생리적시험, 단백질분해성과 지방분해성으로 보아 *Bacillus stearothermophilus* 125균주, *Bacillus coagulans* 69균주, *Bacillus subtilis* 57균주, *Bacillus cereus* 76균주, *Lactobacillus thermophilus* 3균주로 동정되었다.
3. 이들 반이상의 균주들은 skim milk배지에서 85°C, 15분간 처리에도 생존할 수 있었다.

문 헌

1. 藤原彰夫 : 食品衛生學雜誌(日本), 5, 59, 63, 68 (1964).
2. Cuthert, W.A. : Intern. Dairy Fed. Anu. Bull. 4, 10 (1964).
3. 厚生省編纂 : 衛生檢査指針(Ⅲ), 協同醫書出版, 東京, p. 33 (1959).
4. Amer. Publ. Health Assoc. : Standard Methods for the Examination of Dairy Products, 11th Ed., p. 142 (1960).
5. 乳業技術講座編集委員會編 : 牛乳製品檢査, 朝倉書店, 東京. p. 238 (1965).
6. Robert, S. B., Murray, E.G.D. and Smith, M. : Bergey's Manual of Determinative Bacteriology,

- 7th Ed. The Williams Wilkins Comp., Baltimore (1957).
7. Buchanan, R. E. and Gibbons, N. E.: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th Ed. The Williams Wilkins Comp., Baltimore (1973).
 8. Foster, E. M.: *Dairy Microbiology*, Prentice Hall Inc., New York. 141, (1967).
 9. Stadhour, J.: *Intern. Dairy Fed.*, VI-DOC-35, (1966).
 10. 中西武雄, 兵庫裕: 酪農科學の研究, 12, 1 (1963).
 11. Lamanna, C. and Mallette, M. R.: *Basic Bacteriology*, 2nd Ed. (1969).
 12. Galesloot, T. E. and Labot, S. H.: *Neth. Milk Dairy J.*, 13, 155 (1959).
 13. 浜本典男, 廣田哲二: 食品衛生學雜誌(日本) 5, 355 (1964).
 14. 中西武雄, 兵庫裕: 酪農科學の研究, 13, 91 (1964).
 15. 兵庫裕: 酪農科學の研究, 14, 1 (1966).
 16. Thomas, S. B., Jones, M. and Druce, R. G.: *Dairy Ind.*, 28, 212 (1963).