

## 유산균의 배양 및 건조조건에 관한 연구

제1보 유산균의 배양조건에 관한 연구

윤주천\* 김갑수\* 신원철\*\* 이근억\*\*\* 최승락\*\*\*\* 유주현\*\*\*\*\*

Studies on the Conditions of Cultivation and Drying of Lactic Acid Bacteria

part I. Optimum Cultural Conditions of Lactic Acid Bacteria

Joo-Chun Yoon · Kap-Soo Kim · Won-Cheol Shin,  
Keun-Eok Lee · Seung-Rack Choi · Ju-Hyun Yu

### Abstract

In order to use as a starter after drying, optimum growth conditions of *Str. thermophilus* and *L. bulgaricus* were investigated. The results were as follows.

The growth of *Str. thermophilus* was reached at stationary phase after 12 hours incubation and *L. bulgaricus* was after 6 hours.

*Str. thermophilus* was grown well, in the medium containing 10% of skim milk, 2% of sucrose, 0.1% of KCl and 0.015%(v./v.) of soy-sauce.

In the case of *L. bulgaricus*, 10% of skim milk, 2% of glucose, 0.5% of bacto-peptone, 0.1% of  $K_2HPO_4$  and 0.02% of pyridoxine was suitable for the maximum growth.

### I. 서 론

유산균은 19세기 말에 우유중의 당을 특이하게 발효시켜 우유의 coagulation을 일으키는 bacteria로 분류되면서부터 본격적인 연구가 시작되었으며<sup>1,2)</sup>, 균종에 따라서는 인체에 여러가지 유익한 작용을 한다고 하여<sup>3)</sup>, 20세기

초부터 유산균을 이용한 각종 발효식품의 개발이 시작되었다. 우리나라에서는 1970년대 초에 유산균 발효유가 시판되어 날로 그 소비가 증가되고 있다.

이러한 유산균 발효유의 제조과정에서 중요시 되는 것은 종균의 활성을 장기간 유지시키는 문제이다. 종균을 보존하기 위한 균체 보존 방법은 liquid nitrogen freezing<sup>4,5,6)</sup>, freeze

\* 연세대학교 대학원 식품공학과

\*\* 공과대학 발효공학과 전임강사

\*\*\* 공과대학 발효공학과 조교수

\*\*\*\* 연세대학교 화학과 교수

\*\*\*\*\* 연세대학교 식품공학과 교수

drying<sup>7,8)</sup>, spray drying<sup>9)</sup> 등이 널리 연구되어 왔으며, 이 중에서도 운반이나 저장설비등을 고려할 때 건조를 통한 분말 균체가 여러가지 면에서 유리하다고 할 수 있다. 이러한 건조분말 균체는 계대배양이 필요없이 직접 발효유의 starter로 이용할 수 있는 장점이 있고, 발효후의 pH 조절, 건조시의 보호물질 첨가로 건조후의 활성이 장기간 유지될 수 있다는 보고도 있다<sup>10)</sup>.

건조분말 균체에서 가장 중요한 것은 건조균체당 생균수이며, 이러한 문제는 건조전의 생균수를 최대한으로 높이는 것이 중요하므로<sup>11)</sup>, 본 연구에서는 탈지유를 기본배지를 한 유산균주의 생육최적배지조성을 검토하여 보았다.

## II. 실험재료 및 방법

### 1. 사용균주

연세대학교 식품공학과에 보존되어 있는 *Str. thermophilus*와 *L. bulgaricus*를 사용하였다.

### 2. 배지조성

균주의 보존 및 종균용 배지로서 MRS 배지<sup>12)</sup>를 사용하였으며, 균주의 최적 배양조건 검토를 위한 기본배지로는 탈지유 용액을 사용하였고, 생균수 측정용 배지로는 tomato juice agar 배지에 Bromocresol purple을 0.005% 첨가하여 사용하였다.

### 3. 생균수 측정

10% 탈지유 용액에 MRS 배지에서 15~16시간 배양한 종균을 2.5% 접종하여 9~12시간 발효시킨 후 vortex mixer로 10~15초간 충분히 혼합하였다. 위 혼합액을 0.9% 생리식염수로 적정배수 희석하고 tomato juice agar plate를 사용하여 37°C incubator에서 약 48시간 배양시킨 후 생성되는 colony 수를 측정하여 colony forming unit(C.F.U.)/ml로 하였다.

### 4. 산도의 측정<sup>13)</sup>

시료에 동량의 증류수를 가하여 혼합 희석한

다음 0.1% phenolphthalein 용액을 약 1~2방울 가하고 0.1N NaOH 용액으로 적정하여 미홍색이 30초간 없어지지 않는 점을 종점으로 하였다.

Lactic acid %는 다음 식으로 계산되었다.

$$\text{Lactic acid \%} = \frac{\text{NaOH 적정 ml} \times 0.009}{\text{시료의 용량} \times \text{비중}} \times 100$$

## III. 실험결과 및 고찰

### 1. 생육곡선

H. E. Patterson<sup>14)</sup>에 의하면 유산균주는 생육시간에 따라 유산생성능력이 크게 좌우됨을 보고하고 있다. 즉, 대수기 말기에서 그 능력이 최대가 되고, 그 이후로는 점차 감소함을 보여주고 있다. 본 실험 결과(Fig. 1), *Str. thermophilus*는 12시간, *L. bulgaricus*는 6시간 후에 정지기에 도달하므로, 이에 준하여 발효시간을 결정해야 할 것으로 사료된다. 또한 발효시간이 15시간 지난 후에도 산도의 증가에 의한 생균수의 변화가 현저하지 않아 이후의 실험은 배양시간을 9~12시간으로 하였다.

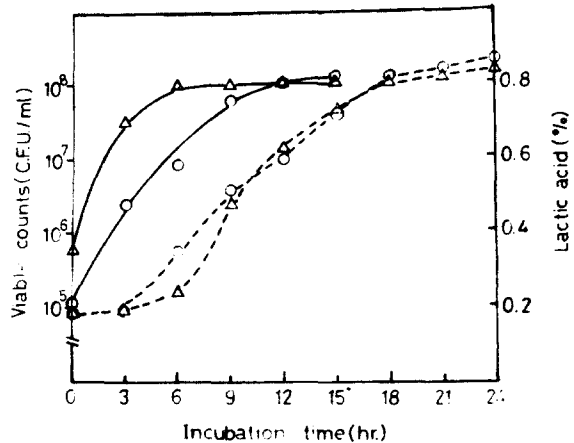


Fig.1. Growth Curves of *Str. thermophilus* and *L. bulgaricus*.

○ *Str. thermophilus* — Viable counts  
 △ *L. bulgaricus* - - - - - Acidity

## 2. 최적 배양조건의 검토

### 1) 탈지유 농도의 영향

탈지유의 농도가 생육에 미치는 영향을 알아보기 위해 탈지유의 농도를 변화시켜 두 균주의 발효후 생균수를 측정해 보았다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 본 실험에서 사용한 *Str. thermophilus*와 *L. bulgaricus*는 탈지유 농도가 약 10% (wt./v.)일 때 생균수가 최대가 될 수 있었다.

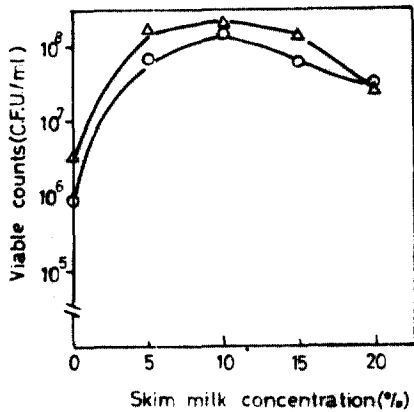


Fig. 2. Effect of Skim Milk Concentration on Viability.

○ *Str. thermophilus*  
 △ *L. bulgaricus*

### 2) 탄소원의 영향

10% 탈지유 용액에 탄소원을 5% (wt./v.)씩 첨가하여 9~12시간 배양 후 형성되는 colony 수를 비교해 본 결과 Fig. 3에서 보는 바와 같이 *Str. thermophilus*는 sucrose, *L. bulgaricus*는 glucose를 첨가할 때 생균수가 최대가 되었다. Sucrose와 glucose의 최적농도를 조사한 실험에서는 (Fig. 4) *Str. thermophilus*와 *L. bulgaricus* 모두 최적배양을 위한 당의 농도가 2%이었다.

### 3) 질소원의 영향

10% 탈지유 배지에 유기 질소원과 무기 질소원을 최종농도가 1% (wt./v.)되게 첨가하여 9~12시간 배양시킨 후 질소원 첨가에 의한 두

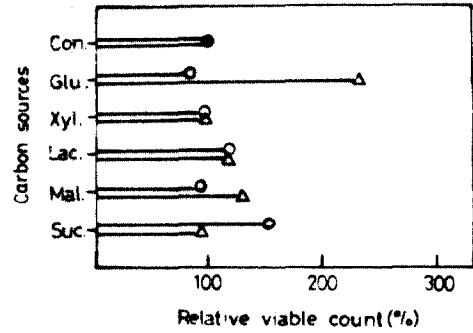


Fig. 3. Effect of Carbon Sources on Viability.

○ *Str. thermophilus*  
 △ *L. bulgaricus*  
 Con.: control    Glu.: glucose  
 Xyl.: xylose    Lac.: lactose  
 Mal.: maltose    Suc.: sucrose

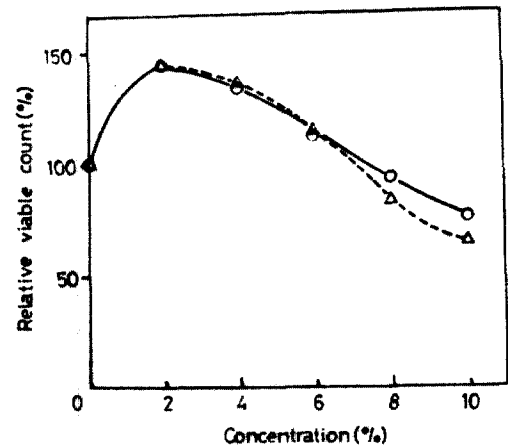


Fig. 4. Effects of Glucose and Sucrose Concentration on Viability.

○ *Str. thermophilus*    — Sucrose  
 △ *L. bulgaricus*    - - - - Glucose

균주의 생육효과를 검토하였다. Fig. 5와 같이 *L. bulgaricus*는 bacto-peptone과 yeast extract를 첨가할 경우 현저한 생육의 증가를 나타내었으나 *Str. thermophilus*는 오히려 감소현상을 보였다. 또 다른 실험에서 *Str. th-*

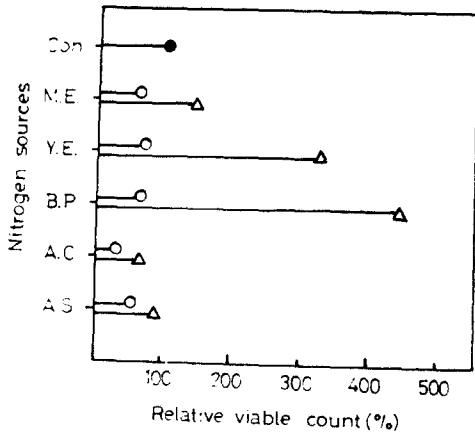


Fig. 5. Effect of Nitrogen Sources on Viability.

○ *Str. thermophilus*  
 △ *L. bulgaricus*

Con. control. M.E.: meat extract  
 Y.E.: yeast extract B.P.: Bacto-peptone  
 A.C.: ammonium chloride  
 A.S.: ammonium sulfate

*ermophilus* 의 [yeast ext. 나 bacto-peptone 첨가에 따른 산도의 증가를 검토해 본 결과 control에 비해 3배 정도 증가함을 알 수 있었다.

*Str. thermophilus* 의 유기질소원 첨가에 의한 생균수의 감소현상은 여러가지 면에서 분석될 수 있겠으나, 이 균주가 *L. bulgaricus* 에 비해 내산성이 현저히 낮음을 감안할 때<sup>15)</sup>, 급격한 생균수의 증가와 함께 산도가 증가하여 사멸한 것으로 사료된다.

한편, 무기질소원에 대해서는 두 균주 모두 영향을 받지 않았다.

*L. bulgaricus* 의 유기 질소원으로서 bacto-peptone 을 선정하여 이의 농도에 따른 생육촉진 효과를 검토한 결과, Fig. 6과 같이 0.5% 첨가시 약 6.5배나 생균수가 증가되었다.

#### 4) 무기염류의 영향

10% 탈지유 배지에 무기염류의 최종농도가 0.05% (w/v.) 되도록 첨가하여 9~12시간 배양시킨 후 생균수의 증가를 실험해 본 결과는 Fig. 7과 같다.

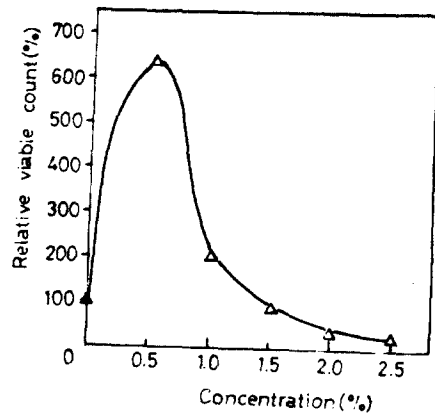


Fig. 6. Effect of Bacto-peptone Concentration on the Growth of *L. bulgaricus*.

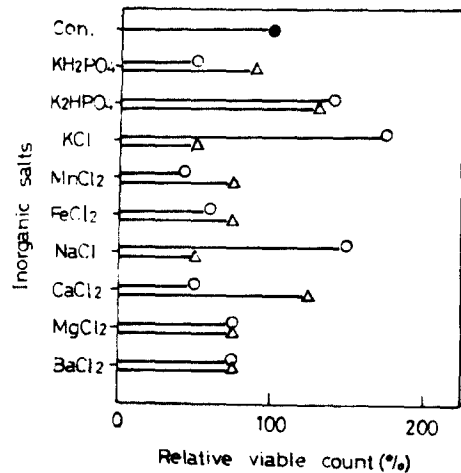


Fig. 7. Effect of Inorganic Salts on Viability.

○ *Str. thermophilus*  
 △ *L. bulgaricus*

*Str. thermophilus* 는 KCl, *L. bulgaricus* 는 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 가 생육에 가장 적합한 것으로 나타났으며, Fig. 8에서 보는 바와 같이 최적배양을 위한 무기염류의 농도는 *Str. thermophilus* 의 경우 KCl 0.05% 이었고 *L. bulgaricus* 의 경우 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1% 이었다.

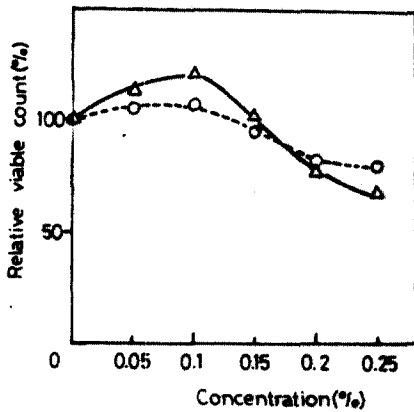


Fig.8. Effects of  $K_2HPO_4$  & KCl Concentration on Viability.

○ *Str. thermophilus*    - - - KCl  
 △ *L. bulgaricus*       - - -  $K_2HPO_4$

5) 생육인자의 영향

배지에 여러가지 생육인자를 최종농도가 0.01% (w/v) 되게 첨가하여 검토한 결과, Fig. 9에서 보는 바와 같이 *Str. thermophilus*는

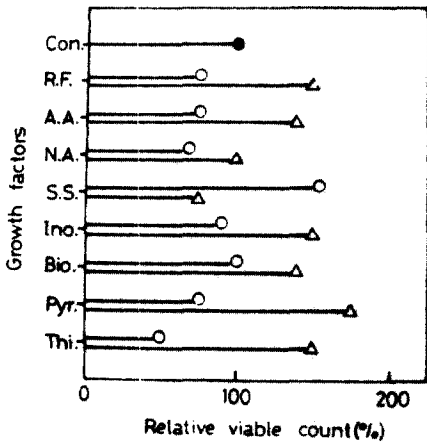


Fig.9. Effect of Growth Factors on Viability.

○ *Str. thermophilus*  
 △ *L. bulgaricus*

Con.: control  
 R.F.: riboflavin    Ino.: inositol  
 A.A.: ascorbic acid    Bio.: biotin  
 N.A.: nicotinic acid    Pyr.: pyridoxin  
 S.S.: soy-sauce        Thi.: thiamin

soy sauce, *L. bulgaricus*는 pyridoxine이 가장 생육에 적합한 인자이었다. 위 생육인자 농도를 달리하여 첨가한 결과 pyridoxine은 0.02% (w/v) 첨가시 생육이 최대가 되고 그 이상 첨가하면 감소하였고, soy sauce는 0.015% (w/v)에서 가장 높은 생균수를 나타내었고 그 이상 첨가해도 생균수의 변화는 없었다. (Fig. 10, Fig. 11)

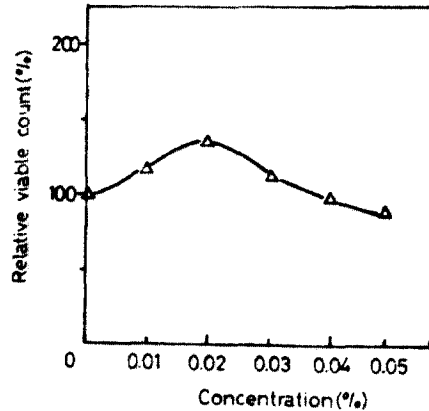


Fig.10. Effect of Pyridoxin Concentration on the Growth of *L. bulgaricus*.

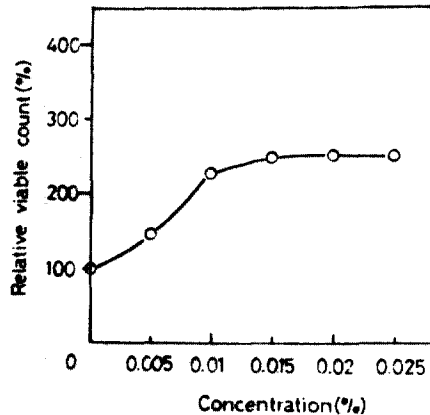


Fig.11. Effect of Soy-sauce Concentration on the Growth of *Str. thermophilus*

#### IV. 결 론

*Str. thermophilus*와 *L. bulgaricus*를 건조 후 종균으로 사용할 목적으로 두 균주를 탈지유 용액을 기본배지로 하여 생육곡선을 결정하고, 최적 배양조건을 검토한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

*Str. thermophilus*는 12시간 배양 후 정지기에 도달했고, 탈지분유 10%에 sucrose 2%, KCl 0.1%, soy sauce 0.015%를 첨가한 배지에서 생균수가 가장 높았으며, *L. bulgaricus*는 6시간 배양 후 생육이 정지되었고, 배지의 최적 배양조건은 탈지분유 10%, glucose 2%, bacto-peptone 0.5%,  $K_2HPO_4$  0.1% pyridoxine 0.02%이었다.

#### 참 고 문 헌

1. Rogers, L. A. and Davis, B. J.: USDA, Bur. Anim. Ind. Bu. **154**, 30 (1912)
2. Orla-Jensen, S.: 'The Lacticacid bacteria'. Andr, Fred. Host. and Son., Copenhagen, (1919)
3. Metchnikoff, E.: 'The Prolongation of Life.' Heinemann, London. (1907)
4. Gibson, C. A., Landerkin, G. B. and Morse, P. M.: Appl. Microbiol. **14**, 665 (1966)
5. Peebles, M. M., Gilliland, S. E. and Speck, M. L.: Appl. Microbiol. **17**, 805 (1969)
6. Porubcan, R. S. and Sellars, R. L.: 'Microbial Technol.' 2nd ed. **1**, 59 (1979)
7. Heckly, R. J.: Adv. Appl. Microbiol. **3**, 1 (1961)
8. Speckman, C. A., Sandin, W. E. and Elliker, P. R.: J. Dairy Sci. **57**, 165 (1973)
9. Porubcan, R. S. and Sellars R. L.: J. Dairy Sci. **58**, 787 (1975)
10. Porubcan, R. S. and Sellars R. L.: U. S. Patent 3,897,307 (1975)
11. Rhee, S. K. and Pack, M. Y.: Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng. **8**, 19 (1980)
12. De Man, J. C., Rogosa, M. and Sharpe, M. E.: J. Appl. Bact. **23**, 130 (1960)
13. 유 주현, 양 한철, 정 동효, 양 응: 식품공학 실험 **2**, 446, 탐구당, (1975)
14. Pattersson, H. E.: Appl. Microbiol. **29**, 133 (1975)
15. Buchanan, R. E. and Biggins, N. E.: 'Bergey's Mannual of Determinative Bacteriology, 8th ed., Williams & Wilkins Co., Baltimore (1974)