

*Lactobacillus helveticus*와 *Streptococcus thermophilus*의 혼합배양에 관한 연구

- 생육특성 및 배양조건 -

윤성식* · 박정길 · 유주현

연세대학교 공과대학 식품공학과 *한국야쿠르트 연구소
(1985년 6월 11일 수리)

Studies on the mixed culture of *Lactobacillus helveticus* and *Streptococcus thermophilus* in milk

- Growth characteristics and cultural conditions for the mixed culture -

Sung Sik Yoon*, Chung Kil Park and Ju Hyun Yu

Department of Food Engineering, Yonsei University *Hankuk Yakult Institute
(Received June 11, 1985)

To investigate the new Yoghurt starter, *Lactobacillus helveticus* YM-1, which was selected among 14 *Lactobacillus* strains, and *Streptococcus thermophilus* CH-1 were inoculated together in reconstituted non-fat skim milk medium and their growth characteristics and cultural conditions for the mixed culture were examined. The main results of this study were obtained as follows. The typical symbiotic growth was shown between the two strains and pH and temperature for optimal growth were 6.5 and 40°C, respectively. Heat treatment of milk was most effective at 100°C for 30 min. The cell-free filtrate of *Lactobacillus helveticus* YM-1 had stimulatory effect on *Streptococcus thermophilus* CH-1 but the reverse case was slightly observed. Significant difference was observed in the proteolytic activities between *Lactobacillus helveticus* YM-1 and *Streptococcus thermophilus* CH-1. The former liberated 135 µg free amino acid per ml of cultured milk, the latter 35 µg per ml.

Yoghurt는 그 기원이 아직도 확실하지 않으나 터키 지방의 유목민에 의해 최초로 시작되었다는 사실이 일반적으로 인정되고 있으며, 20세기 초에 러시아의 생화학자 Metchnikoff가 장수설(Theory of longevity)을 주창한 이후에 유럽 세국에 전파되기 시작하였으며 현재에는 세계적으로 가장 인기있는 유제품의 하나가 되었다.⁽¹⁾

Yoghurt를 이루고 있는 미생물은 젖산간균인 *Lactobacilli*와 젖산구균인 *Streptococci*로 구성되며, 이 starter의 선발은 제품제조상 가장 중요한 단계라고 할 수 있다. Haenel 등⁽²⁾에 의하면 실제로 Yoghurt 제품들 중에서 분리한 *Lactobacilli*는 *L.*

*bulgaricus*가 70% 이상을 차지하였고, *Streptococci*는 *Streptococcus thermophilus*가 거의 모든 제품에서 출현하였다고 한다. 따라서 *L. bulgaricus*와 *S. thermophilus*는 Yoghurt 특유의 맛과 조직을 형성하는 미생물로 이들에 대해서는 이미 많은 연구가 보고된 바 있다.^(3,4,5) 즉 이 두 균주를 우유배지에 동시에 접종하면 단독배양시보다도 균체생육은 물론 산생성력이 현저하게 촉진되는데, 이와같은 생육촉진 현상은 두 균주의 단백질 분해 활성화와 밀접한 관련이 있다고 알려져 있다. *S. thermophilus*는 단백질 분해능이 상당히 낮으나 Yoghurt뿐만 아니라 soft cheese의 제조에 사용되는 산업적으로 유

용한 미생물이다. 본 연구는 *S. thermophilus* CH-1의 생육촉진을 일으키는 *Lactobacillus* sp.를 찾기 위해서 수종의 젖산균중에서 *L. helveticus* YM-1을 선발하였으며, 새로운 yoghurt starter로서의 가능성을 검토하고자 선발된 *L. helveticus* YM-1과 *S. thermophilus* CH-1을 환원 탈지유배지상에서 단독 및 혼합배양 시키고 일차적으로 그들의 생육특성 및 배양조건을 연구한 결과이다.

실험재료 및 방법

사용균주

본 연구에 사용한 균주는 한국 야쿠르트연구소에 동결보관 중인 14종의 *Lactobacillus* strains과 Denmark의 Christian Hansen 연구소에서 분양받은 *S. thermophilus* CH-1을 사용하였다. 사용균은 공히 121°C, 15분간 가압멸균한 5ml의 환원탈지유(10%, w/v)배지상에서 2일 간격으로 계대배양하였으며 필요에 따라서 5°C 냉장고에 보존하였다.

생육 측정용 배지

Skim milk⁽⁷⁾ (Difco. Co.)를 증류수에 녹여 최종 10% (w/v)가 되도록 하였으며, 100°C, 30분간 멸균하였다.

Starter culture의 제조 및 접종

*Lactobacilli*는 37°C, *Streptococci*는 42°C에서 각각 배양하였으며, 단독배양의 경우는 1.0%씩을, 혼합배양의 경우는 0.5%씩을 접종하여 전체 접종량이 1.0%가 되게 하였다.

Cell-free extracts의 제조

100ml의 MRS 배지⁽⁸⁾에 균주에 따라서 0.2~0.5%의 glycine을 첨가한 다음 12시간 동안 배양하여 자란 균체를 회수하고, Hemme 등⁽⁹⁾의 방법에 따라 제조하였다. 제조한 시료는 -25°C에서 보존하면서 사용하였다.

Cell-free filtrate의 제조

Fig. 1과 같은 방법으로 배양여액을 제조하였다.

Titrateable acidity의 측정

Koberger 등⁽¹⁰⁾의 방법에 준하였다.

Colony count 방법

Lactobacillus 측정용으로는 단독배양시 BCP-agar 배지를, 혼합배양시는 Elliker lactic agar 배지⁽¹¹⁾ (pH 5.4)를 각각 사용하였다. *Streptococcus* 용으로는 Trypticase soy agar 배지⁽¹²⁾ (pH 7.0)를 사용하였다. 기타 실험조작은 Standard count method⁽¹³⁾에 준하여 실시하였으며 37°C, 48시간후 나타난 집

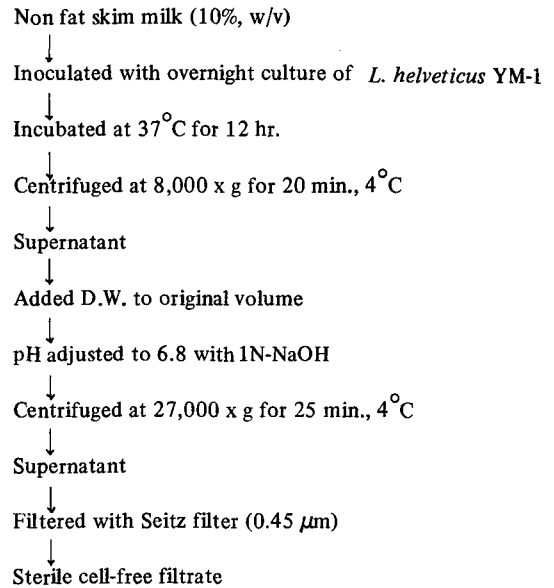


Fig. 1 Procedure of cell-free filtrate preparation.

락수를 관찰기록하였다.

Spectrophotometric assay

탈지우유배지에 대한 젖산균의 생육은 Kanasaki 등⁽¹⁴⁾의 방법에 따랐으며, 상대생육량으로 표시하였다.

Proteolytic activity의 측정

배양후 배지중에 존재하는 12% TCA가용성물질의 함량은 Hull의 방법⁽¹⁵⁾에 준하여 측정하였으며, 미리 작성한 Standard curve로 부터 tyrosine ($\mu\text{g/ml}$)양으로 환산 표시하였다.

결과 및 고찰

젖산균의 Cell-free extracts의 첨가효과

*Lactobacilli*의 단백질 분해효소는 membrane bounded enzyme^(16,17)으로 알려져 있다. 따라서 14종의 *Lactobacillus* strains으로부터 *S. thermophilus* CH-1의 생육을 촉진시키는 균주를 선발하기 위해서 각각의 세포 추출액을 첨가한 결과 *L. helveticus* YM-1이 가장 우수하였다 (Table 1).

단독 및 혼합배양의 영향

일반적으로 젖산발효는 균체생육과 산 생성량이 growth association 관계로 보고되고 있으며⁽¹⁸⁾ 따라서 앞에서 선발한 *L. helveticus* YM-1과 *S. thermophilus* CH-1을 단독 및 혼합배양하여 각각의 산생성량을 조사한 결과는 Fig. 2와 같다. 그릇에 나타난 바와 같이 *L. helveticus*는 4시간이 지나서

Table 1. Effect of cell-free extracts of Lactobacilli on acid production of *Streptococcus thermophilus* CH-1 in milk

Lactobacilli	Strains	Incubation (T.A.)			
		2 h	4 h	6 h	8 h
bulgaricus	12091	2.45	4.50	6.50	7.75
	CH-2	2.45	4.50	6.50	7.90
	HY-4A	2.40	4.35	6.40	7.55
helveticus	YM-1	2.50	4.50	6.90	8.25
	IAM 1042	2.45	3.80	5.15	6.20
	CH-1	2.25	4.00	5.75	6.75
casei	IAM 1043	2.15	4.40	5.50	6.50
	IAM 1045	2.15	4.35	5.25	6.40
	3012	2.30	4.15	6.10	7.00
	YIT 9018	2.25	4.15	6.00	7.00
acidophilus	IAM 1084	2.40	4.30	6.55	8.00
	CHR-27	2.50	4.30	6.55	8.05
thermophilus	1390	2.40	4.05	5.45	6.25
plantarum	IAM 1216	2.40	4.15	5.40	6.30
Control		2.10	3.85	5.00	5.95

Incubation temperature ; $42 \pm 0.5^\circ\text{C}$

Amounts of addition ; 0.5%

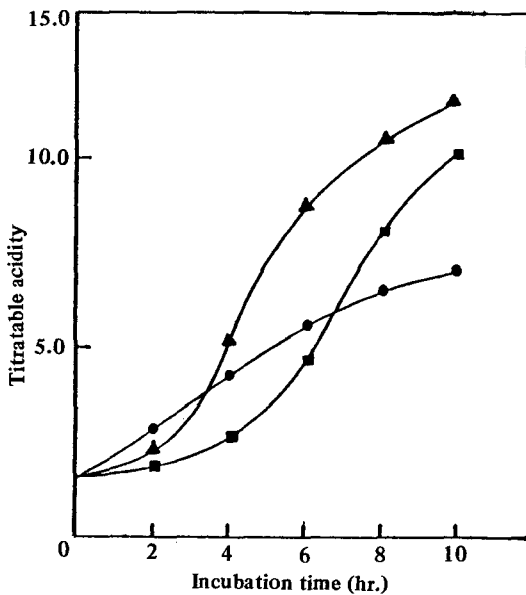


Fig. 2 Acid production of mixed and pure culture of *L. helveticus* and *S. thermophilus* in milk, 42°C .

- ; *L. helveticus* YM-1,
- ; *S. thermophilus* CH-1
- ▲ ; *L. helveticus* YM-1 and *S. thermophilus* CH-1

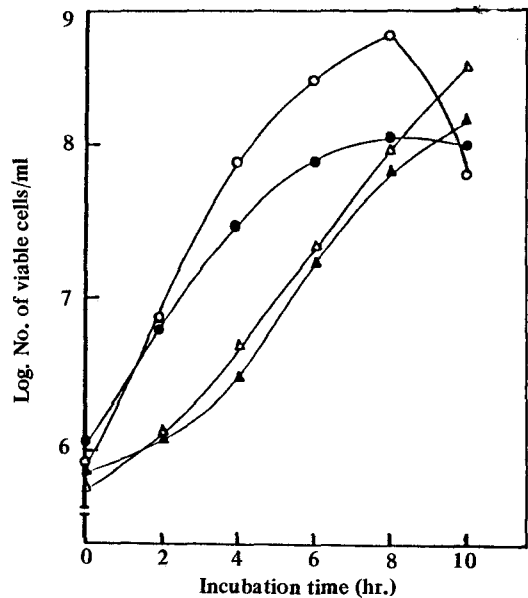


Fig. 3 Growth curves of mixed and pure culture of *L. helveticus* and *S. thermophilus* in milk, 42°C .

- ▲ ; *L. helveticus* YM-1, (pure)
- ; *S. thermophilus* CH-1 (pure)
- △ ; *L. helveticus* YM-1 (mixed)
- ; *S. thermophilus* CH-1 (mixed)

야 균체생육이 활발한 반면 *S. thermophilus*는 생육속도가 빠르고 배양 6시간 후에는 정지기에 들어갔다. 이것은 *S. thermophilus*가 우유배지상에 적응력이 우수하고 영양물질에 대한 경쟁력이 앞서기 때문이라고 생각되었다. 즉 *S. thermophilus*가 가지고 있는 유당 분해효소가 더욱 강력하게 lactose를 분해하여 glucose는 자신이 빠르게 생육하는데 사용하고 나머지 galactose는 *L. helveticus*가 계속해서 이용하기 때문이라고 생각되었다.

Fig. 3은 생균수의 변화를 관찰한 결과이다. 이 경우에도 역시 앞의 결과와 비슷한 경향을 보여 주었다. Moon등⁽⁴⁾은 *L. bulgaricus*와 *S. thermophilus*의 혼합배양시 *L. bulgaricus*의 생육저해가 일어났다고 보고 하였으나 본 연구에서는 그와 같은 현상을 관찰할 수 없었다.

Initial pH의 영향

우유배지의 pH를 3.5에서 9.0까지 조절하여 균체생육을 검토한 결과는 Fig. 4와 같다. *S. thermophilus*는 *L. helveticus*보다 내산성이 상당히 약한 것으로 나타났으며 따라서 빨리 정지기에 들어가는 것으로 판단되었다. 한편 혼합배양시 최적 pH는 6.5였다.

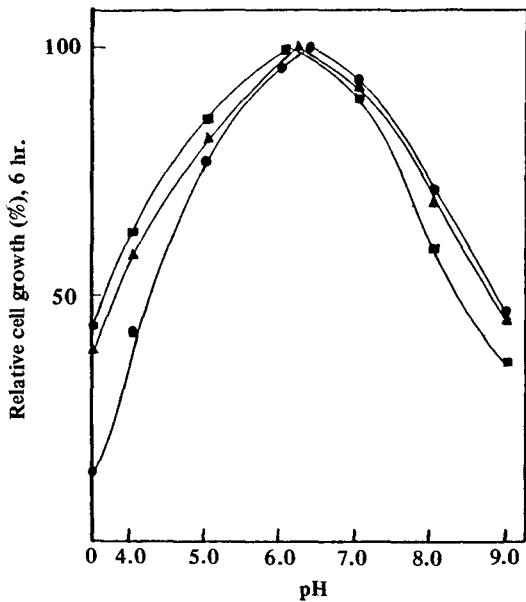


Fig. 4 Effect of initial pH on the growth of mixed and pure culture of *L. helveticus* and *S. thermophilus* in milk.
 ■ ; *L. helveticus*, YM-1 ● ; *S. thermophilus* CH-1
 ▲ ; *L. helveticus* YM-1 and *S. thermophilus* CH-1

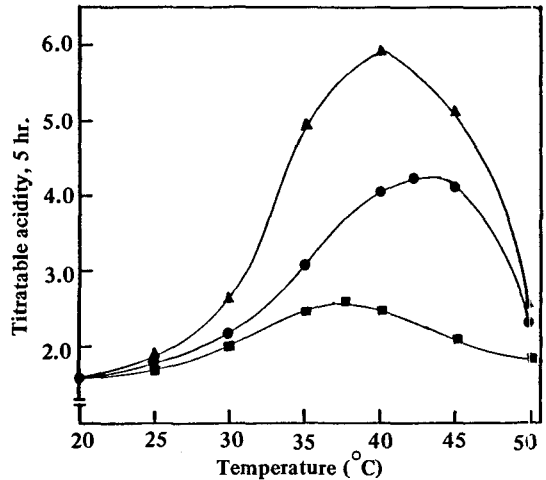


Fig. 5 Effect of incubation temperature on acid production of mixed and pure culture of *L. helveticus* and *S. thermophilus* in milk.
 ■ ; *L. helveticus* YM-1,
 ● ; *S. thermophilus* CH-1,
 ▲ ; *L. helveticus* YM-1 and *S. thermophilus* CH-1

배양온도의 영향

Dutta등⁽¹⁹⁾은 젖산균이 배양온도에 따라서 acid와 flavor 생성량에 큰 변화가 있음을 보고한 바 있으며 일반적으로 thermophilic lactic starter는 42~45°C에서 최고생육을 나타낸다고 한다. Fig. 5는 배양온도의 영향을 조사한 것으로 혼합배양시 최적온도는 40°C였다.

가열처리에 의한 영향

Table 2와 같이 100°C에서 30분간 처리하는 것이 좋았다. Singh등⁽²⁰⁾은 65°C, 30분 및 85°C, 10분동안 가열처리 하면 *L. acidophilus*와 *S. thermophilus*의 산생성에 유리하였다고 주장한 바 있다.

Table 2. Effect of heat treatment of milk on acid production of mixed culture of *L. helveticus* and *S. thermophilus*.

Heat treatment	Titratable acidity		
	<i>S.rhr.</i> CH-1	<i>L.hel.</i> YM-1	Mixed
65°C, 30 min.	4.05	2.70	7.00
85°C, 10 min.	4.60	3.00	7.20
100°C, 30 min.	5.00	3.20	7.60
121°C, 15 min.	4.60	3.10	7.50

Incubated at 42°C for 5 hr. in skim milk.

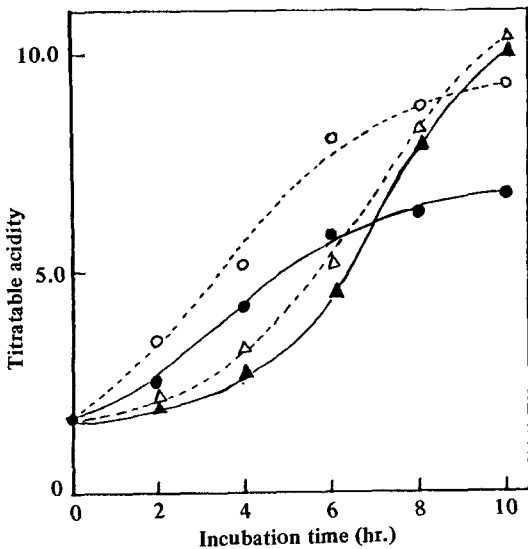


Fig. 6 Effect of cell-free filtrates on acid production of *L. helveticus* and *S. thermophilus* in milk, 42°C.

- △ ; *L. helveticus* with filtrate of *S. thermophilus*
- ; *S. thermophilus* with filtrate of *L. helveticus*
- ▲ ; *L. helveticus*, YM-1
- ; *S. thermophilus* CH-1

그러나 지나친 열처리 는 영양가의 손실은 물론 심한 갈변화(11)를 일으켜 오히려 균의 생육을 저해한다고 한다.

배양여액의 첨가효과

두 균주의 혼합배양에 따른 symbiotic relationship을 살피고자 우유배지에 대한 각각의 12시간 배양액으로 부터 조제한 Cell-free filtrate를 첨가한 결과는 Fig. 6 과 같다. *L. helveticus*에는 *S. thermophilus*의 여액을, *S. thermophilus*에는 *L. helveticus*의 여액을 첨가한 다음 경시적으로 산생성량을 측정 한 결과 *S. thermophilus*의 배양여액은 *L. helveticus*의 생육에 약간의 촉진효과만 보여주었으나 반대로 *L. helveticus*의 여액은 *S. thermophilus*의 생육에 현저한 촉진효과를 나타냈다. 또한, *S. thermophilus*를 단독배양하면서 3시간 후 첨가한 경우도 역시 같은 경향을 나타냈다 (Fig. 7). 따라서 *L. helveticus*의 배양여액에는 *S. thermophilus*의 생육을 촉진시키는 물질이 함유되었다고 생각되었다.

단백질분해 활성의 측정결과

젖산균은 단백질분해 활성이 매우 낮은 것으로

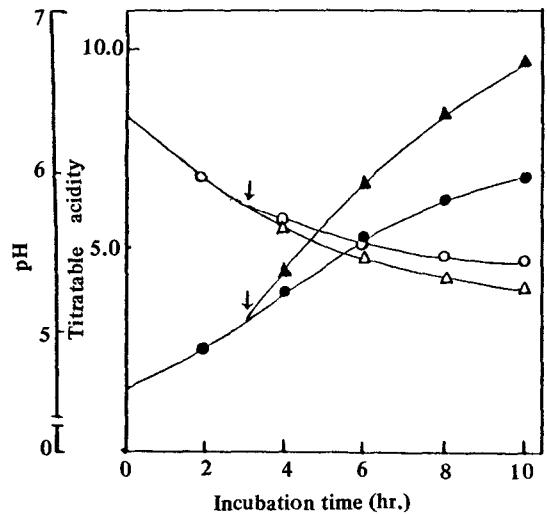


Fig. 7 Effect of addition of cell-free filtrate of *L. helveticus* during the growth of *S. thermophilus* in milk, 42°C.

- ↓ ; Addition time of cell-free filtrate
- ; Titratable acidity, non addition
- ▲ ; Titratable acidity, 5.0% addition
- ; pH, non addition, △ ; pH, 5.0% addition

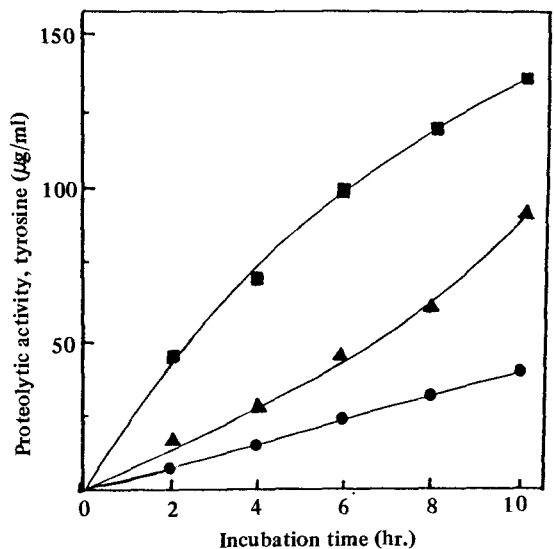


Fig. 8 Proteolytic activity of mixed and pure culture of *L. helveticus* and *S. thermophilus* in milk, 42°C.

- ; *L. helveticus* YM-1,
- ; *S. thermophilus* CH-1
- ▲ ; *L. helveticus* YM-1 and *S. thermophilus* CH-1

Table 3. Effect of heat treatment of milk on acid production and proteolytic activity of mixed culture of *L. helveticus* and *S. thermophilus*.

Heat treatment	Item	Incubation time (hr.)		
		0	4	6
65°C, 30 min.	T.A.	1.50	5.0	7.40
	P.A.	0.06	0.107	0.189
85°C, 10 min.	T.A.	1.60	6.0	8.0
	P.A.	0.075	0.185	0.220
100°C, 30 min.	T.A.	1.60	6.20	8.30
	P.A.	0.090	0.20	0.243
12°C, 15 min.	T.A.	2.0	6.0	8.10
	P.A.	0.17	0.285	0.325

T.A.: Titratable acidity

P.A.: Proteolytic activity at 650 nm.

보고되었으며, Singh⁽²²⁾은 배양일수가 경과함에 따라서 단백질분해 활성이 증가함을 관찰하였고, Poznanski⁽²³⁾등도 *L. bulgaricus*의 작용으로 생긴 casein 분해물이 *S. thermophilus*에 의해 완전히 분해되었다고 주장 하였다. Fig. 8 과 같이 *L. helveticus*는 *S. thermophilus*보다 4 배정도 많은 단백질분해력을 나타냈으며 10시간 배양후 전자와 후자는 각각 135 μ g/ml, 35 μ g/ml의 free-amino산을 생성 하였다. 또 혼합배양시는 배지중의 free-amino산이 활발하게 소모되는 것을 알 수 있었다.

한편 우유배지의 열처리 정도에 따른 단백질분해도를 측정된 결과 가열처리를 많이 할수록 우유의 단백질분해도 비례적으로 증가하였으며, Starter 의 단백질분해활성이 열처리를 적게 받은 milk에서 자란균이 크게 나타났다(Table 3). 이 결과는 Dutta 등⁽¹⁴⁾의 성적과 잘 일치하였다.

요 약

Lactobacillus helveticus YM-1 과 *Streptococcus thermophilus* CH-1 을 환원탈지유 배지에 접종하여 생육특성 및 배양조건을 검토한 결과 두 균은 전형적인 공생을 나타냈으며 혼합배양시 최적 pH와 온도는 각각 6.5와 40°C였다. 또한 두 균 사이에는 단백질 분해력의 차이가 현저하였고 *L. helveticus*의 배양여액에는 *S. thermophilus*의 생육을 촉진시키는 물질이 함유되어 있음을 관찰하였다.

참고문헌

1. Rasic, J. and J.A. Kurmann: Yoghurt, Technical Dairy Publishing House, Copenhagen, Denmark, p 11 (1978)
2. Haenel, H., I. Emanuiloff, L. Natscheff and M.B. Doav: *Milchwissenschaft*, 18, 454 (1963)
3. Bautisa, E.S., R.S. Dahiya and M.L. Speck: *J. Dairy Res.*, 33, 299 (1966)
4. Moon, N.J. and G.W. Reinbold: *J. Milk Food Technol.*, 39 (5), 337 (1976)
5. Singh, J., A. Khanna and H. Chander: *J. Food Protection*, 43 (5), 399 (1980)
6. Cousin, M.A. and E.H. Marth: *J. Food Protection*, 40 (7), 475 (1977)
7. Harrigan, W.F. and M.E. McCane: Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology, Academic Press, London, 54 (1976)
8. De Man, J.C., M. Rogosa and M.E. Sharpe: *J. Appl. Bacteriol.*, 23 (1), 130 (1960)
9. Hemme, D.H., V. Schmal and J.E. Auclair: *J. Dairy Res.*, 48, 139 (1981)
10. Koburger, J.A., M.L. Speck and L.W. Aurand: *J. Bacteriol.*, 85, 1051 (1963)
11. Elliker, P.R., A.W. Anderson and G. Hannesson: *J. Dairy Sci.*, 39, 1611 (1956)
12. Miles, J.J. and J.G. Leeder: *Cultured Dairy Product J.*, Aug, 12 (1981)
13. Martin, E.H.: Standard Method for the Examination of Dairy Products, APHA, 77 (1978)
14. Kanasaki, M., S. Brehenly, A.J. Hiller and G.F. Jago: *Aust. J. Dairy Technol.*, 30, 142 (1975)
15. Hull, M.E.: *J. Dairy Sci.*, 30, 881 (1947)
16. Pearce, L.E., N.A. Skipper and B.D.W. Jarvis: *Appl. Microbiol.*, 27, 933 (1974)
17. Chandan, R.C., P.J. Argyle and G.E. Mathison: *J. Dairy Sci.*, 65, 1408 (1982)
18. Cox, G.C. and R.D. MacBean: *Aust. J. Dairy Technol.*, Mar. 19 (1970)
19. Dutta, S.M., R.K. Kuila, Arora, B.C. and B. Ranganathan: *J. Milk Food Technol.*, 35, 242 (1972)
20. Singh, J.: *Milchwissenschaft*, 38 (6), 347 (1983)
21. Ferretti, A., V.P. Flanagan and J.M. Ruth: *J. Agr. Food Chem.*, 18 (1), 13 (1970)
22. Singh, J. and D.K. Sharma: *Milchwissenschaft*, 38 (3), 148 (1983)
23. Poznanski, S., J. Lenoir, and G. Macquot: *Le Lait*, 48, 261 (1965)