

원유로부터 *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*의 분리 및 동정

서인영* · 이정준 · 신명수 · 김용재 · 나석환 · 백영진
한국야쿠르트연구소

Isolation and Identification of *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* from Raw Milk

Suh, In-Yeong*, Jeong-Jun Lee, Myeong-Su Shin, Yong-Jae Kim,
Seog-Hwan Na and Young-Jin Baek

Hankuk Yakult Institute, Euiwang, Kyongi-Do 437-020, Korea

Abstract — We established the procedure for isolation of *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* from raw milk. First, urease-producing lactic acid bacteria in raw milk were screened on the HY agar medium containing urea. Thereafter the urease-producing colonies were tested the ability to ferment maltose and to grow at 43°C. We obtained about 400 maltose-negative colonies that grew at 43°C. No significant difference in carbohydrate fermentation test for isolated and type strains (*S. salivarius* subsp. *thermophilus* ATCC 19258 and ST-4) was found. And all of the isolated strains were able to ferment galactose. Furthermore, it was investigated that the cellular fatty acid profiles of isolated strains were similar to that of type strains. These results indicated that the isolated strains from raw milk were *S. salivarius* subsp. *thermophilus*. But when the isolated and type strains were incubated in 12% reconstituted skim milk at 43°C, the isolates produced lactic acid more slowly than the type strains.

지금까지 보고되어 있는 urease 활성을 나타내는 젖산균으로서는 *Enterococcus faecium*(1, 2), *Bifidobacterium*(3-5), 그리고 *Lactobacillus fermentum*(6) 등으로서 이들은 모두 포유동물의 분변이나 장관에서 분리되었다. 반면 이들과 달리 urease 생산 젖산균인 *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*(7)는 살균유나 유제품에서만 분리 보고되고 있다(8, 9).

S. salivarius subsp. *thermophilus*는 요구르트나 치즈생산에 널리 사용되는 고온성 종균임에도 불구하고 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*나 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*와 같은 중온성 균들에 비하여 상대적으로 많은 연구가 진행되지 못한 형편이다(10). 특히 이들의 생태학적인 생육지에 관해서는 현재까지도 확실하지가 않으며, 다만 여러가지 증거로 보아 우유에서 주로 발견되고 있다(11, 12).

S. salivarius subsp. *thermophilus*는 비교적 열에

강한 젖산균으로서, 65°C 에서 30분 정도의 살균처리 조건에서도 균의 생존률이 높다(10). 따라서 지금까지는 *S. salivarius* subsp. *thermophilus*를 분리하는 주요 수단으로써 이러한 열에 강한 특성과 고온에서 생육 가능한 특성을 이용하였다. 즉 원유를 살균 처리한 후 40-45°C 에서 고온배양하여 *S. salivarius* subsp. *thermophilus*만을 우선적으로 배양하고, 이 배양액으로부터 균을 분리하였다. 다만 Shigeo 등은(13) 원유를 직접 고온배양(45°C)하여 *S. salivarius* subsp. *thermophilus*를 분리하였다.

한편 전보(14)에서 우리는 urease 생산 젖산균을 탐색할 수 있는 배지를 개발하였으며, 이 배지를 이용할 경우 원유 속에 내재하는 *S. salivarius* subsp. *thermophilus*를 간편하게 분리할 수 있으리라 생각되었다.

본 연구에서는 *S. salivarius* subsp. *thermophilus*에 관한 유익한 정보를 얻기 위하여 아무런 살균 처리도 하지 않은 원유에서 *S. salivarius* subsp. *thermophilus*만을 순수 분리할 수 있는 방법을 확립하고자 하였다.

Key words: *S. salivarius* subsp. *thermophilus*, isolation, raw milk

*Corresponding author

Table 1. The compositions of CHL media

Component	concentration(%)
Polypeptone	0.1
Yeast extract	0.05
Tween 80	0.01
K ₂ HPO ₄	0.02
Sodium acetate · 3H ₂ O	0.05
Diammonium citrate	0.02
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.002
MnSO ₄ · 4H ₂ O	0.0005
Agar	1.5

재료 및 방법

원유

실험에 사용된 원유는 H 유업(주)으로부터 제공 받았으며, 냉각용 bulk-tank내에 보관중인 원유를 채취하여 실험에 사용하였다.

공시균주

실험에 사용된 공시균주로는 *S. salivarius* subsp. *thermophilus* ATCC 19258과 Christian Hansen사(덴마크)의 ST-4를 사용하였다.

배지

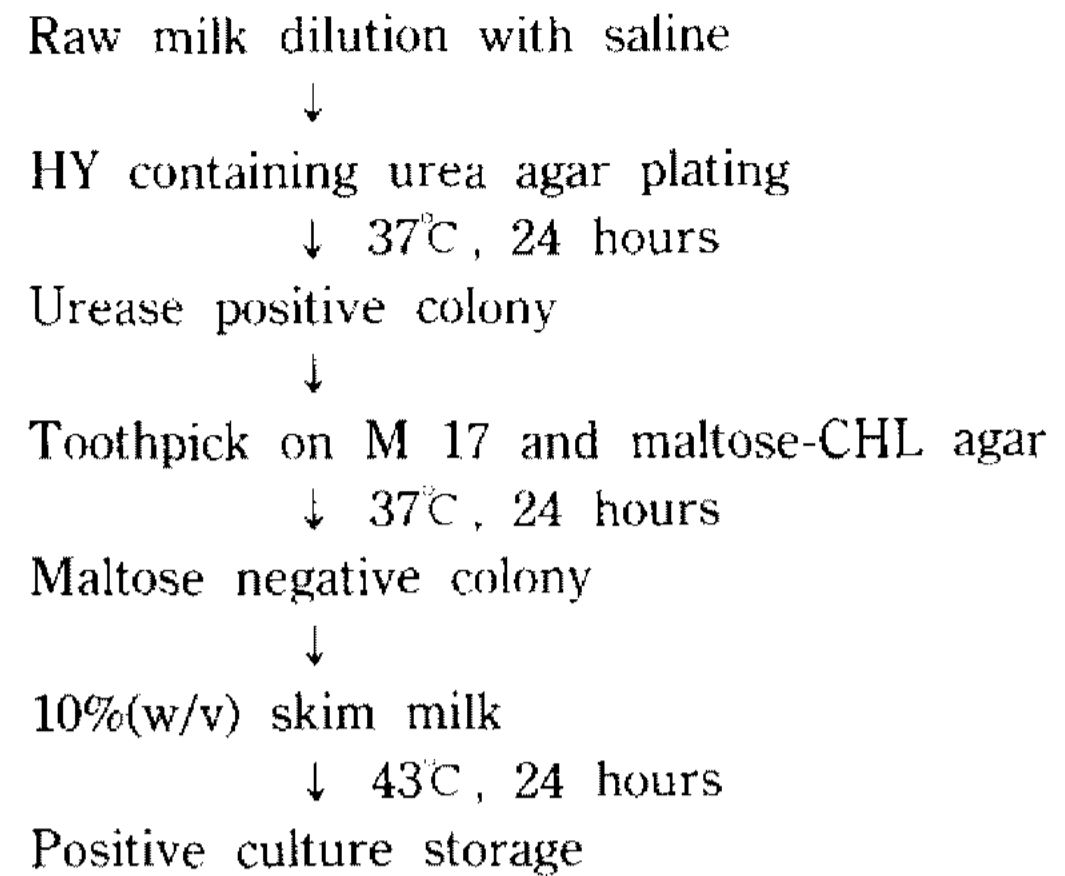
공시균을 비롯한 모든균의 배양에는 M17 배지(15)를 그리고 *S. salivarius* subsp. *thermophilus* 탐색 배지로는 HY 배지(14)와 CHL 배지를 사용하였으며, CHL 배지의 조성은 Table 1에 정리하였다.

균의 분리

멸균 생리 식염수로 적당히 희석시킨 원유를 urea를 함유한 HY 배지에 유제품 검사를 위한 표준 방법(16)에 따라 37°C 에서 24시간 동안 평판배양한 후, urease 활성을 나타내는 균락을 멸균된 이쭉시개로 채취하여, M17 한천배지와 maltose를 유일 탄소원으로 첨가한 CHL 한천배지 위에 찢러 접종한 후, 37°C 에서 24시간 동안 배양하였다. 배양결과 M17 한천배지에서 성장한 균락만을 10%(W/V) 환원 탈지유에 재접종하여 43°C 에서 배양하여 배양된 균을 분리 보존하였으며, 이상의 실험과정을 Fig. 1에 정리하였다.

분리균의 당 발효실험

공시균 및 분리균의 당 발효실험은 API사(프랑스)의 CHL 50 당 test kit를 이용하여 공급회사의 실험

**Fig. 1. Procedure for isolation of *S. salivarius* subsp. *thermophilus* from raw milk****Table 2. The conditions of Gas Chromatography**

Item	Condition
Instrument	Hewlett Packard 5890 series II
Integrator	Hewlett Packard 3396 A
Column	Ultra-2
Detector	FID
Injection vol.	0.6-0.8 μ l
Split ratio	1:50
Oven temp.	170°C
Injector temp.	250°C
Detector temp.	250°C

방법에 따라 수행하였으며, 37°C 에서 48시간 동안 배양하면서 색변화를 관찰하였다.

지방산 분석을 통한 분리균의 동정

공시균 및 분리균을 M17 한천배지에서 2일간 배양한 후 배지표면의 균만을 회수하여 8 ml의 0.5N NaOH와 8 ml의 100% methanol 혼합용액에 현탁한 후 5분간 끓여 비누화 반응을 시켰다. 이에 다시 9 ml의 14% BF₃/methanol(Sigma, 미국)을 혼합하여 3분간 끓인 후, 3 ml의 hexane을 첨가하여 2분간 끓여 지방산을 추출하였다. 추출된 시료를 상온까지 냉각시킨 후 포화 NaCl용액을 반응용기에 가득히 부어, hexane층의 회수를 용이하게 하였다. hexane층을 조심스럽게 회수한 후, 이를 시료로 하여 Table 2에 표시한 조건하에서 gas chromatography를 실시하였다.

결과 및 고찰

원유에서의 균 분리

HY 배지는 urease 생산 젖산균을 탐색하기 위하여 고안된 배지로서 urease 활성을 지닌 *S. salivarius* subsp. *thermophilus*를 분리하기 위하여 먼저 원유속에 내재하는 urease 생산 젖산균만을 탐색할 필요가 있었다. 실험결과 한 plate당 약 800균 정도의 균락이 생성되었으며, 그 가운데서 urease 활성을 나타내는 균락을 plate당 20개씩 총 600여 균락을 무작위로 채취하였다.

S. salivarius subsp. *thermophilus*는 43-45°C의 고온에서 생육 가능한 maltose 음성의 젖산 구균으로 보고되고 있다(11). 따라서 이러한 특성을 이용할 경우 *S. salivarius* subsp. *thermophilus*의 분리가 용이할 것으로 생각되어, 채취균들을 M17 한천배지와 maltose가 유일 탄소원으로 첨가된 CHL 한천배지에 이쭈시개로 찢어 접종하여 43°C에서의 생육 유무를 조사하였다. 그 결과 약 400여개의 채취균이 43°C에서 생육가능한 maltose 음성의 젖산 구균으로 파악되었으며, 이들을 대상으로 당 발효실험을 실시하였다.

분리균의 당 발효실험

S. salivarius subsp. *thermophilus*는 다른 유사한 종류의 젖산균들에 비하여 상당히 소수의 당만을 발효에 이용할 수 있으며(11, 12, 17), 이러한 이용 가능한 당을 조사해 봄으로써 분리균을 *S. salivarius* subsp. *thermophilus*로 동정하는 것이 용이하였다. 즉 분리균들을 49종류의 당에 대하여 산 생성 능력을 조사해 본 결과 공시균인 ATCC 19258이나 ST-4균과 비교하여 커다란 차이점이 없었다(Table 3). 다만 실험된 모든 분리균이 galactose 양성으로 나타난다는 점은 몇가지 예외를 제외하고는(18-20) 현재까지 대부분의 *S. salivarius* subsp. *thermophilus*가 galactose 음성으로 보고된 바(10, 12)와는 차이가 있었다.

반면 모든 분리균들은 당 발효 측면에서 fructose를 이용할 수 있는 균과 그렇지 못한 균으로 크게 대별할 수 있었다. 그리고 그 비율 면에 있어서는 fructose를 이용할 수 있는 균이 약 80% 정도로 fructose 음성균에 비하여 월등히 우세하였으며, 우리는 이러한 fructose의 이용 유무를 기준으로 양성균을 HY 0641로 표기하였으며, 음성균은 HY 0617로 표기하였다. 그리고 Table 3에는 이들 분리균의 당 발효 실험 결과를 공시균과 비교하여 정리하였다.

지방산 분석을 통한 분리균의 동정

분리균의 당 발효 실험 결과 분리균들이 모두 galactose 양성이라는 사실은 지금까지 알려진 *S. salivarius* subsp. *thermophilus*가 galactose 음성균이라는

Table 3. Carbohydrate fermentation test for isolates from raw milk

Carbohydrate	<i>S. thermophilus</i>		isolates	
	ATCC 19258	ST-4	HY 0641	HY 0617
Control	-	-	-	-
Glycerol	-	-	-	-
Erythritol	-	-	-	-
D-Arabinose	-	-	-	-
L-Arabinose	-	-	-	-
Ribose	-	-	-	-
D-Xylose	-	-	-	-
L-Xylose	-	-	-	-
Adonitol	-	-	-	-
β Methyl-xyloside	-	-	-	-
Galactose	w	-	w	+
D-Glucose	+	+	+	+
D-Fructose	+	-	++	-
D-Mannose	-	-	-	-
L-Sorbose	-	-	-	-
Rhamnose	-	-	-	-
Dulcitol	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-
Mannitol	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-
α Methyl-D-mannoside	-	-	-	-
α Methyl-D-glucoside	-	-	-	-
N acetyl glucosamine	-	-	-	-
Amygdaline	-	-	-	-
Arbutine	-	-	-	-
Esculine	-	-	-	-
Salicine	-	-	-	-
Cellobiose	-	-	-	-
maltose	-	-	-	-
Lactose	++	++	++	++
Melibiose	-	-	-	-
Saccharose	++	++	++	++
Trehalose	-	-	-	-
Inuline	-	-	-	-
Melezitose	-	-	-	-
D-Raffinose	-	-	-	-
Amidon	-	-	-	-
Glycogen	-	-	-	-
Xylitol	-	-	-	-
β Gentiobiose	-	-	-	-
D-Turanose	-	-	-	-
D-Lyxose	-	-	-	-
D-Tagatose	-	-	-	-
D-Fucose	-	-	-	-
L-Fucose	-	-	-	-
D-Arabitol	-	-	-	-
L-Arabitol	-	-	-	-
Gluconate	-	-	-	-
2 ceto-gluconate	-	-	-	-
5 ceto-gluconate	-	-	-	-

*w: weak fermentation, +: normal fermentation, ++: fast fermentation, -: no fermentation

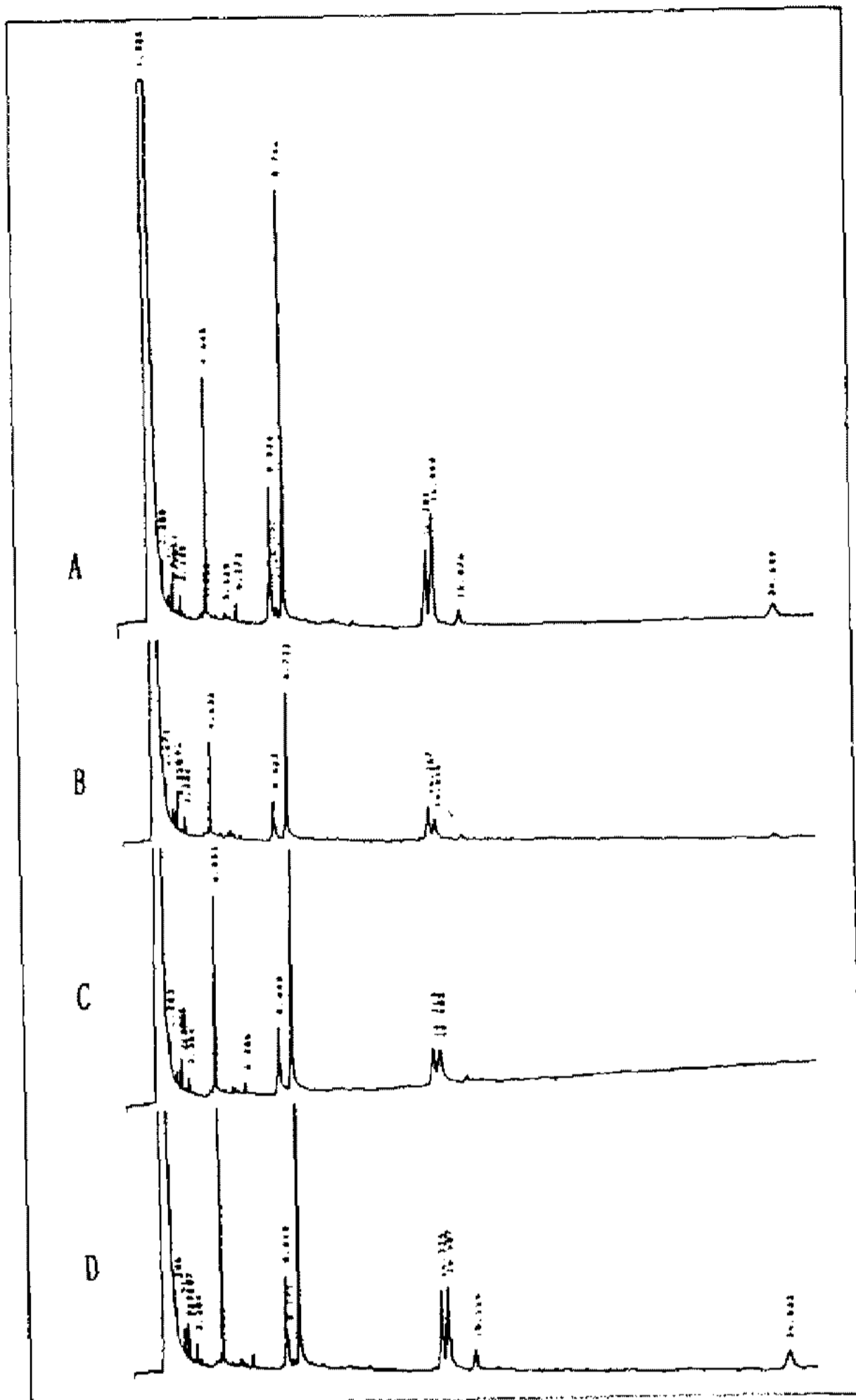


Fig. 2. Fatty acid profiles of *S. salivarius* subsp. *thermophilus* type strains (A: ATCC 19258, B: ST-4) and isolates (C: HY 0641, D: HY 0617).

사실과 비교하여, 분리균이 *S. salivarius* subsp. *thermophilus*가 아닐 가능성도 전혀 배제할 수 없었다. 따라서 우리는 또 다른 미생물 동정법을 이용하여 분리균을 동정할 필요가 있었다.

미생물의 세포막을 구성하는 지방산은 유전적인 근거에 따라 구성되며, 이러한 구성 성분은 미생물의 종류에 따라 독특하게 나타난다. 따라서 세포막의 지방산을 분석하면 미생물의 동정이 가능하며(21), 근래에는 이러한 배경을 바탕으로 미생물을 동정한 보고가 있으며(22, 23), 특히 Farrow와 Collins(24)는 *S. thermophilus*와 *S. salivarius*의 긴 사슬 지방산을 분석함으로써 두 균종간의 분류학적 특성을 조사한 바 있다.

본 연구에서도 공시균과 분리균의 지방산을 분석 비교함으로써 분리균을 동정하고자 하였으며, Fig. 2는 gas chromatography를 이용하여 공시균과 분리균의 지방산 분포를 분석해 본 결과이다. 이 결과 공시균과 분리균과의 지방산 분포는 거의 유사하였으며, 따라서

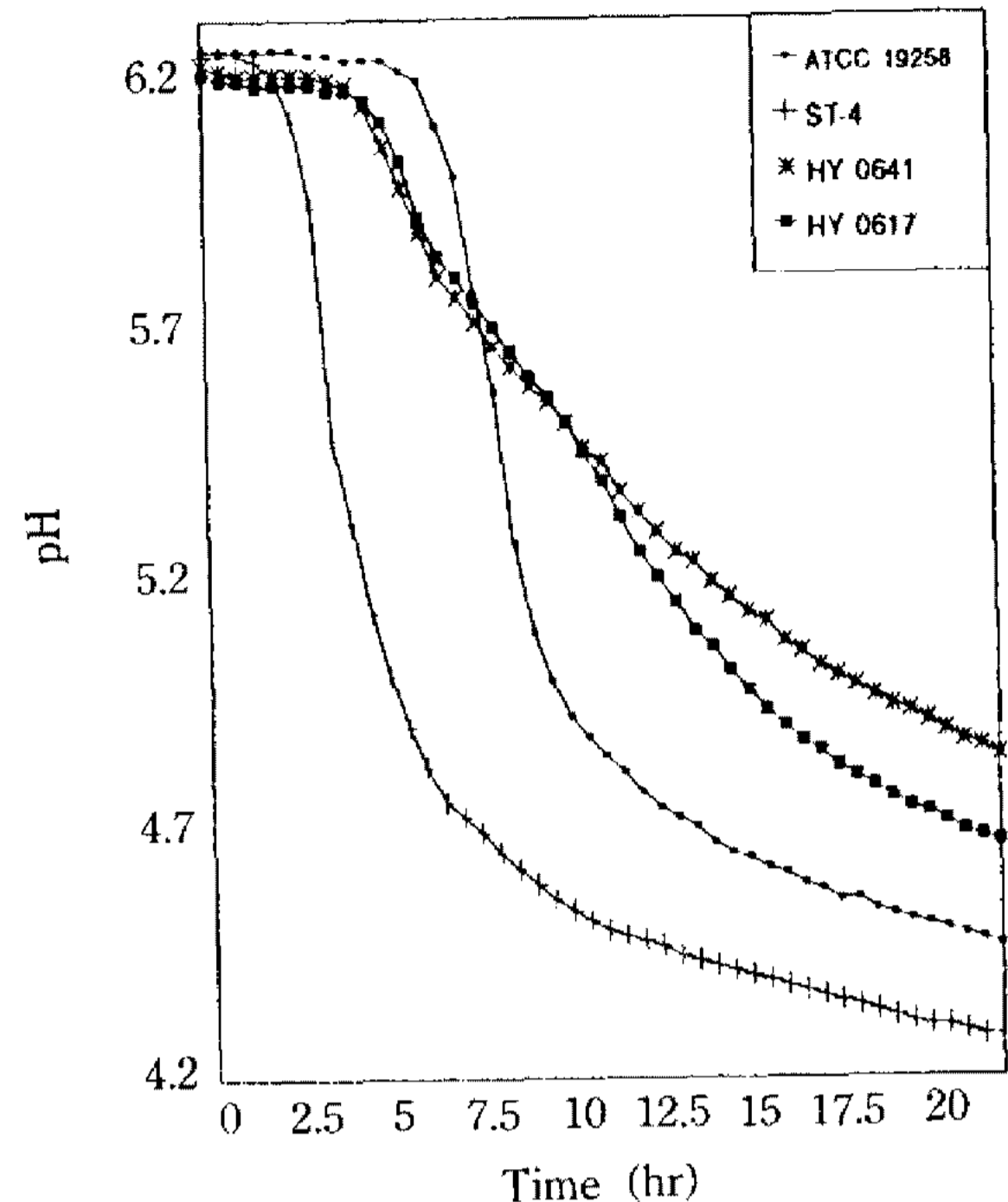


Fig. 3. pH changes in 12% skim milk for *S. salivarius* subsp. *thermophilus* type strains and isolates from raw milk.

분리균은 *S. salivarius* subsp. *thermophilus*임을 확인할 수 있었다.

환원 탈지유에서의 산 생성

Fig. 3은 우유를 배지로 하여 공시균과 분리균과의 43°C 배양에 따른 산 생성 능력을 배양액의 pH를 측정함으로써 비교 분석한 결과이다. 이 결과 공시균들은 대수기에 있어 급격하게 pH가 감소되는 반면, 분리균들은 대수기에 있어서도 완만하게 pH가 감소되는 경향을 나타내었다. 이러한 경향은 공시균과 비교하여 분리균이 갖는 독특한 특성으로 판단되며, 이러한 특성과 당 발효 실험 결과를 종합해 볼 때 분리균이 새로운 종류의 *S. salivarius* subsp. *thermophilus*일 가능성을 전혀 배제할 수 없었다. 그리고 이러한 가능성에 대해서는 앞으로 분리균에 대한 미생물학적 그리고 생화학적 연구를 통하여 자세히 조사해 볼 필요가 있다.

요 약

원유에서 *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*를 직접 분리할 수 있는 방법을 확립하였다. 우선 urea를 첨가한 HY 한천 배지를 이용하여 아무런 열처리도 하지 않은 원유 시료 속에 내재하는 urease 생산 젖산균만을 1차 탐색하였다. 그리고 이들 urease

생산균에 대하여 maltose 이용성과 43°C 에서의 생육 유무를 조사한 결과, 약 400 종류의 maltose 음성의 43°C 에서 생육 가능한 균들을 분리하였다. 한편 각 균의 당 발효능을 조사한 결과 모든 분리균은 공시균인 ATCC 19258이나 ST-4 균과 비교하여 커다란 차이점이 없었다. 그리고 모든 분리균은 galactose를 이용할 수 있었다. 더 나아가 분리균들의 지방산 조성 분포를 조사한 결과도 공시균의 지방산 분포양상과 동일하였다. 이러한 결과를 통하여 원유에서 분리한 분리균을 *S. salivarius* subsp. *thermophilus*로 동정하였다. 그러나 분리균과 공시균을 12% 환원 탈지유를 이용하여, 43°C 에서 배양한 결과, 분리균은 공시균에 비하여 상당히 느리게 젖산을 생산하였다.

참고문헌

- Cook, A.R. 1976. Urease activity in the rumen of sheep and the isolation of ureolytic bacteria. *J. Gen. Microbiol.* **92**: 32-48.
- Cook, A.R. 1976. The elimination of urease activity in *Streptococcus faecium* as evidence for plasmid-coded urease. *J. Gen. Microbiol.* **92**: 49-58.
- Gibbons, R.J. and R.N. Doetsch. 1959. Physiology study of an obligately anaerobic ureolytic bacterium. *J. Bacteriol.* **77**: 417-428.
- Matteuzzi, D. and F. Crociani. 1973. Urease production and DNA-homology in the species *Bifidobacterium suis*. *Arch. Mikrobiol.* **94**: 93-95.
- Crociani, F. and D. Matteuzzi. 1982. Urease activity in the genes *Bifidobacterium*. *Ann. Microbiol.* **133A**: 417-423.
- Varel, V.H., M.P. Bryant, L.V. Holdeman, and W. E.C. Moore. 1974. Isolation of ureolytic *Peptostreptococcus productus* from feces using defined medium: failure of common urease tests. *Appl. Microbiol.* **28**: 594-599.
- Tinson, W., M.C. Broome, A.J. Hiller, and G.R. Jago. 1983. Metabolism of *Streptococcus thermophilus*. 2. production of CO₂ and NH₃ from urea. *Aust. J. Dairy Technol.* **37**: 14-16.
- Jones, D. 1978. Composition and differentiation of the genus *Streptococcus*. Pp.1-40. In F.A. Skinner, and L.B. Quesnel(ed.), *Streptococci*. Academic Press, London.
- Ottogalli, G., A. Galli, and F. Dellaglio. 1979. Taxonomic relationship between *Streptococcus thermophilus* and some other *Streptococci*. *J. Dairy Res.* **46**: 127-131.
- Hutkins, R.W. and H.A. Morris. 1987. Carbohydrate metabolism by *Streptococcus thermophilus*: a review. *J. Food Proc.* **50**: 876-884.
- Sherman, J.M. 1937. The *Streptococci*. *Bacteriological Reviews* **1**: 3-97.
- Hardie, J.M. 1986. Genus *Streptococcus*. Pp.1043-1071. In P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe and J.G. Holt (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology* Vol.2. Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- Shigeo, O., K. Takuji, K. Tsutomu, Y. Hiroya, H. Akimori, T. Susumu, and Y. Tomoko. 1986. Culture containing a viable cell mass of bifidobacteria and lactic acid bacteria. *U.S. Patent.* **4**: 588-595.
- Suh, I.Y., J.J. Lee, M.S. Shin, S.H. Na, and Y.J. Baek. 1993. Agar medium for screening of urease-producing lactic acid bacteria. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **21**: 288-292.
- Terzaghi, B.E. and W.E. Sandine. 1975. Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Appl. Microbiol.* **29**: 807-813.
- Standard methods for the examination of dairy products, 1967. 12th ed. American Public Health Association, Inc.
- Wright, H.D. 1936. Direct fermentation of disaccharides and variation in sugar utilization by *Streptococcus thermophilus*. *J. Path. bacteriol.* **43**: 487-501.
- Thomas, T.D. and V.L. Crow. 1984. Selection of galactose-fermenting *Streptococcus thermophilus* in lactose-limited chemostat cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**: 186-191.
- Hutkins, R., H.A. Norris, and L.L. McKay. 1985. Galactose transport in *Streptococcus thermophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**: 772-776.
- Johnson, M.E. and N.F. Olson. 1985. Nonenzymatic browning of mozzarella cheese. *J. Dairy Sci.* **68**: 3143-3147.
- Moss, C.W. 1981. Gas-liquid chromatography as an analytical tool in microbiology. *J. Chromatography.* **203**: 337-347.
- DeBoer, S.H. and M. Sasser. 1986. Differentiation of *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* and *E. carotovora* ssp. *atroseptica* on the basis of cellular fatty acid composition. *J. Clin. Microbiol.* **1**: 414-419.
- Tisdall, P.A., D.R. DeYoung, G.D. Roberts, and J.P. Anhalt. 1982. Identification of clinical isolates of mycobacteria with gas-liquid chromatography a 10-month follow-up study. *J. Clin. Microbiol.* **16**: 400-402.
- Farrow, J.A.E. and M.D. Collins. 1984. DNA base composition, DNA-DNA homology and long-chain fatty acid studies on *Streptococcus thermophilus* and *Streptococcus salivarius*. *J. Gen. Microbiol.* **130**: 357-362.

(Received December 14, 1993)