

MRS 및 유청 배지에서 *Lactobacillus helveticus* ATCC 55163의 생육 특성과 효모 추출물의 영향

윤 미 숙
서울보건대학 식품가공과

Effects of Yeast Extract and Growth Characteristics of *Lactobacillus helveticus* ATCC 55163 in MRS and Whey Broth

Mi-Suk Yun

Dept. of Food Technology, Seoul Health College, 121 Yongjidong, Sungnamchi, 461-250, Korea

Abstract

In this study, the growth characteristics of *Lactobacillus helveticus* ATCC 55163 were evaluated. The species was cultured in three different types of broths which included the MRS broth, 6%, 12% whey broth, and 6%, 12% whey broth containing 1% yeast extract, respectively. Exponential phase of *Lactobacillus helveticus* ATCC 55163 was within the range of 3 to 24 hours in the MRS broth and whey broth. The pH value of the whey broth dramatically decreased within the range of 3 to 24 hours. On the contrary, the total titratable acidity(TTA) of whey broth dramatically increased within the same range. During the same time, the lowest pH was showed in the 12% whey broth containing 1% yeast extract, and the highest TTA was showed in the same whey broth. Therefore, the concentration of whey broth and the yeast extract affected the multiplication of the *Lactobacillus helveticus* ATCC 55163 seriously through the research.

Key words: growth characteristics, *Lactobacillus helveticus*, MRS broth, whey broth

서 론

젖산은 화학적 합성이나 미생물 발효로 제조한다. 미생물 발효에 의한 젖산 생성은 균체 농도, 균의 증식 속도, 이용되는 기질의 종류 등에 따라 다르다. 발효 공정에 이용하는 기질은 치즈 제조 시 부산물로 생산되는 치즈 유청이나 옥수수 폐기물을 주로 이용하고 있다. 우유 가공 산업에서 발생하는 많은 양의 치즈 유청의 산업적 이용은 여러 가지 경제적 장점을 가지고 있는데¹⁾ 이것은 유청에 유기물인 많은 양의 유

당이 함유되어 있기 때문이다. 유당은 이당류로 유산균 발효에 의하여 젖산으로 전환된다. 미생물 발효에 의한 젖산의 생산 방법은 회분식, 연속식, 투석연속식, 고정화 효소법 등²⁾이 이용되고 있다. *L. helveticus*는 젖산균으로 고온균이며 산에 저항성이 강하고 이상 발효형이다^{3,4)}. 스위스 치즈 숙성에 중요한 균으로 Mozzarella 치즈 제조에도 이용한다. 최근에는 *L. helveticus* 중 어떤 종은 exopolysaccharide를 생산하는 것으로 알려져 있다⁵⁾. *L. helveticus*는 우유 배지에서 *Streptococcus thermophilus*나 *L. bulgaricus*보다 두 배의 젖

† Corresponding author : Mi-Suk Yun, Dept. of Food Technology, Seoul Health College, 121 Yongjidong, Sungnamchi, 461-250, Korea.

Tel : +82-31-740-7141, E-mail : yunms@shjc.ac.kr

산을 생산하고⁹⁾ DL형의 젖산을 생산하는데 L형은 인체 내의 대사에서 발견되기 때문에 장에 쉽게 흡수된다.

젖산은 유기산으로 의약품, 식품, 산업적으로 널리 이용하고 있다. 또한 산제, 보존료, 생물학적으로 분해 가능한 플라스틱 생산이나 다른 유기산 생산을 위한 기질로도 이용하고 있다⁷⁾. *L. helveticus*는 우유 배지에서 강한 단백질 분해력을 가지고 있으며⁸⁾, 어떤 종은 우유 발효 동안 angiotensin I-converting enzyme(ACE)을 저해하는 펩타이드를 생산하는 것으로 알려졌고 단백질 분해 효소 때문에 카제인을 분해하는 것으로도 알려졌다⁹⁾. *L. helveticus*로 발효시킨 유제품은 항고혈압 활성이 있다는 것이 증명되었고^{10,11)}, 유산균과 발효식품은 소비자에게 영양학적으로나 항돌연변이성, 항암성 등과 같은 장점을 부여한다.

본 연구에서는 *L. helveticus* ATCC 55163을 MRS와 유청 배지에서 배양 시 흡광도, 생균수, pH, 총 산도 등을 측정하여 균의 생육 특성과 효모 추출물이 균의 증식에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 사용균주 및 배지

미생물은 한국미생물보존센터에서 분양받은 *Lactobacillus helveticus* ATCC 55163이었고, 계대배양용 배지는 MRS 배지(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 801 ml, K₂HPO₄ 2 g/l, MgSO₄ · 7H₂O 0.2 g/l, MnSO₄ · 7H₂O 0.2 g/l, pH 6.2~6.6)를 사용하였으며 균수 측정용은 계대 배양용 배지에 환천을 첨가하여 사용하였다.

2. Starter Culture 배양

L. helveticus ATCC 55163을 MRS 배지에 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 0.1 ml를 접종 후 35°C의 인큐베이터에서 24시간 배양하여 균수가 1~2×10⁷ cfu/ml 되도록 하였다.

3. 유청 배지

체다 치즈를 제조하고 얻은 부산물을 분무 건조하여 만든 유청 분말(Calpro Co., Ltd., USA)을 6%와 12% 농도 용액으로 제조 후 저온살균(60°C, 30분)하여 배양배지로 하였다.

4. MRS 배지에서 흡광도, pH, 총 산도 측정

MRS 배지의 pH를 7.0으로 조절하여 멸균한 500 ml에 *L. helveticus* ATCC 55163을 1% 접종하여 35°C 인큐베이터에서 배양하면서 3시간 단위로 36시간까지 흡광도에 의한 생균수, pH 및 총 산도 값의 변화를 측정하였다. 흡광도는 Spectrophotometer(8452A Diode Array Spectrophotometer, Hewlett Packard Co., Ltd., USA)로 660 nm에서 측정하였고, pH는 pH meter(MP 220, Mettler Toledo, Switzerland)로 측정하였으며, 총 산도는 AACC (02-31)¹²⁾ 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 총 산도로 하였다.

5. 유청 배지에서 생균수, pH 및 총 산도 측정

저온 살균한 6%와 12% 유청 배지와 각각에 효모 추출물 1%를 첨가한 유청 배지에 *L. helveticus* ATCC 55163을 1% 접종하여 85 rpm의 35°C 인큐베이터에서 배양하면서 3시간 단위로 36시간까지 생균수, pH 및 총 산도를 측정하였다. 생균수는 표준평판법¹³⁾에 의하여 미리 준비한 0.85% 생리식염수 9 ml가 들어 있는 시험관에 배양한 유산균을 1 ml 취하여 10배 단계로 희석하였다. 각 단계 희석액 1 ml를 멸균 페트리접시 2매 이상씩에 무균 상태에서 취하고 배지를 분주하였다. GasPAK system (CO₂ environment, BBL)에 CO₂를 충전한 35°C의 인큐베이터에서 36시간 배양하여 나타난 균락수를 측정하여 생균수를 산출하였다. pH와 총 산도는 MRS 배지에서와 동일한 방법으로 측정하였다.

결과 및 고찰

1. MRS 배지에서 *L. helveticus* ATCC 55163의 성장 곡선

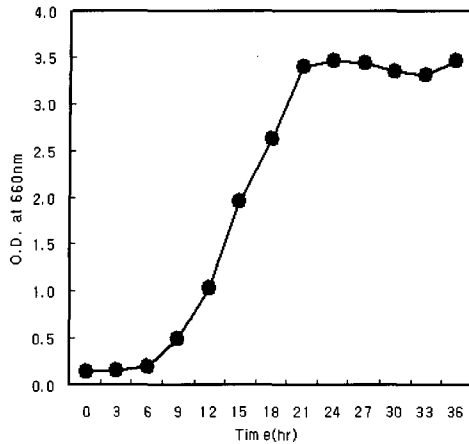


Fig. 1. O.D.(Optical Density) variation of MRS broth cultured by *L. helveticus* ATCC 55163 for 36hr.

MRS 배지의 pH를 7.0으로 조절하여 멸균한 500 ml 에 *L. helveticus* ATCC 55163을 1% 접종하여 35°C 인 큐베이터에서 배양하면서 3시간 단위로 36시간까지 흡광도를 측정된 결과는 Fig. 1과 같다. 배양 초기의 흡광도 값은 0.14, 3시간에는 0.17로 거의 변화가 없어 유도기로 나타났다. 배양 3시간 이후부터 21시간까지 흡광도 값은 급격히 증가하여 배양 21시간에 3.40으로 이 시간대가 대수기로 나타났다. 배양 21시간 이후에는 흡광도 값이 약간 감소하는 경향을 보여 정지기 이후임을 보여 주었다.

Abdeltif 등¹⁴⁾은 유청 permeate 분말 57 g/l (유당 48 g/l)에 *L. helveticus*를 42°C에서 배양 시 초기 pH를 젖산과 염산으로 5.9, 4.63, 4.34, 4.04로 조절하였을 때 젖산을 첨가하여 pH를 5.9로 조절하였을 경우 균체 농도가 배양 7시간에 7.9 g/l로 최대의 농도를 보여 이 시간 전후가 대수기라고한 결과와 일치하였다.

2. MRS 배지에서 pH 및 총 산도 변화

MRS 배지의 pH를 7.0으로 조절하여 멸균한 500 ml 에 *L. helveticus* ATCC 55163을 1% 접종하여 35°C 인 큐베이터에서 배양하면서 3시간 단위로 36시간까지 pH 및 총 산도를 측정된 결과는 Fig. 2와 같다. 초기 pH 값 6.51은 배양 6시간까지 서서히 감소하다가 6시간 이후부터 15시간까지 급격히 감소하는 경향을 나타냈고, 15시간부터 30시간까지 완만한 감소를 보이다가 이후에는 거의 변화가 없었다. 총 산도 값은 배양 3시간까지 약간의 증가를 보이다 3시간 이후부터

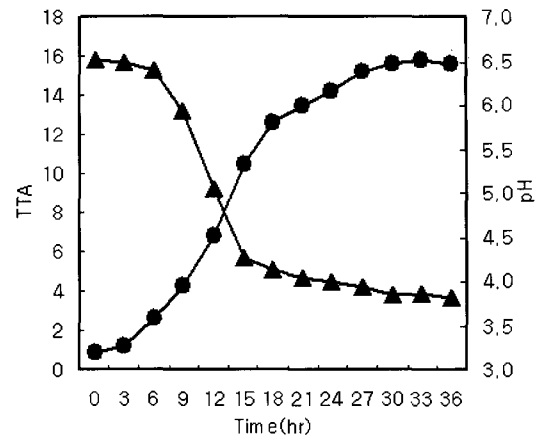


Fig. 2. pH and TTA variation of MRS broth cultured by *L. helveticus* ATCC 55163 for 36hr. ▲ : pH, ● : TTA.

27시간까지 급격한 증가 현상을 나타냈고 이후에는 다시 증가폭이 둔화되었다.

pH와 총 산도 값은 반비례 현상을 나타냈는데, 이것은 균의 증식이 진행되면서 생성된 산에 의하여 pH가 저하되고, 생성된 산이 총 산도 값으로 측정되기 때문이다. 본 실험으로 *L. helveticus* ATCC 55163의 유도기는 0~3시간, 대수기는 3~27시간, 정기기는 27시간 이후로 나타났다. Torino 등¹⁵⁾은 115°C에서 20분 살균한 10% 환원우유에 *L. helveticus* ATCC 15807을 37°C에서 60시간 회분식으로 배양하였을 때 초기 pH를 6.2로 조절시 배양 24시간 이내에 유당이 전부 소모되어 최대 젖산 생성량은 425 mM이라 하였고, Chantal 등¹⁶⁾은 우유를 *L. helveticus*로 발효 시 NaOH로 pH를 6.0으로 조절하였을 때 균수는 배양 24시간에 10^8 cfu/ml이었고, 젖산 생성량은 4.2 g/100 ml이라 하여 균의 증식이나 산 생성은 24시간 이내에 이루어진다고 하였다.

3. 유청 배지에서 생균수 변화

저온 살균한 6%와 12% 유청 배지와 각각에 효모 추출물 1%를 첨가한 유청 배지에 *L. helveticus* ATCC 55163을 1% 접종하여 85 rpm의 35°C 인큐베이터에서 배양하면서 3시간 단위로 36시간까지 생균수를 측정된 결과는 Fig. 3과 같다. 배양 36시간 동안 6% 유청 배지, 12% 유청 배지, 6%에 효모 추출물 1% 첨가한 유청 배지, 12%에 효모 추출물 1% 첨가한 유청 배지 순으로 생균수가 높게 검출되었으나 12% 유청 배지

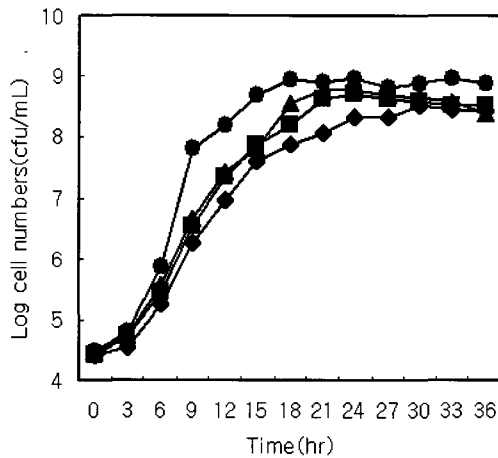


Fig. 3. Viable log cell numbers of whey broth cultured by *L. helveticus* ATCC 55163 for 36hr. ◆ : 6% whey broth, ■ : 12% whey broth, ▲ : 6% whey broth added 1% yeast extract, ● : 12% whey broth added 1% yeast extract.

와 6%에 효모 추출물 1% 첨가한 유청 배지에서의 생균수 차이는 아주 적었다. 배양 3시간부터 배양 21시간까지 생균수가 급격히 증가하여 이 시간대가 대수기로 나타났으며 배양 21시간을 정점으로 생균수 증가가 없었다. Ghaly 등¹⁷⁾은 유청의 유당 농도를 50 g/l, 75 g/l, 100 g/l, 150 g/l로 하여 *L. helveticus*로 배양 시 75 g/l의 농도에서 증식이 가장 활발하여 배양 15시간에 균수가 3.2×10^8 cfu/ml 이라고 하였는데 본 실험에서는 배양 15시간에 12%에 효모 추출물을 1% 첨가한 유청 배지에서 4.8×10^8 cfu/ml를 나타내 Ghaly 등의 연구 결과보다 약간 높은 생균수를 나타냈으나 최고의 생균수는 배양 21시간에 12%에 효모 추출물을 1% 첨가한 유청 배지에서 1.8×10^9 cfu/ml 이었다.

4. 유청 배지에서 pH 변화

저온 살균한 6%와 12% 유청 배지와 각각에 효모 추출물을 1% 첨가한 유청 배지에 *L. helveticus* ATCC 55163을 1% 접종하여 85 rpm의 35°C 인큐베이터에서 배양하면서 3시간 단위로 36시간까지 pH를 측정할 결과는 Fig. 4와 같다. 유청 배지에서 배양 시 유청 농도나 효모 추출물 첨가에 관계없이 초기 pH 값은 6.52에서 6.58 사이였으나 배양 시간이 경과함에 따라 3시간 이후부터 급격히 낮아져 배양 24시간에는 6% 유청 배

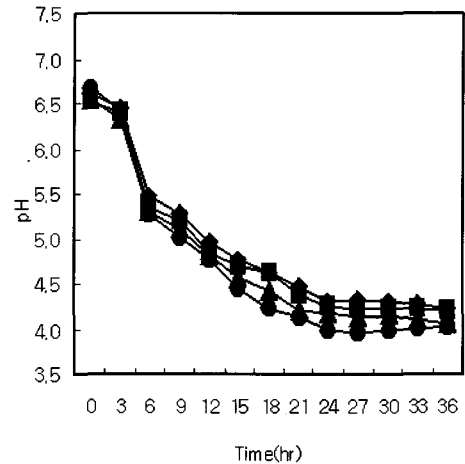


Fig. 4. pH variation of whey broth cultured by *L. helveticus* ATCC 55163 for 36hr. ◆ : 6% whey broth, ■ : 12% whey broth, ▲ : 6% whey broth added 1% yeast extract, ● : 12% whey broth added 1% yeast extract.

지가 4.3, 12% 유청 배지가 4.26, 6%에 효모 추출물을 1% 첨가한 유청 배지가 4.18, 12%에 효모 추출물을 1% 첨가한 유청 배지가 3.98로 12%에 효모 추출물을 1% 첨가한 유청 배지에서 가장 낮은 값을 보였다. 이후에는 pH 값이 낮아지는 경향이 매우 완만하여 거의 변화를 나타내지 않았다. Adolf 등¹⁸⁾은 *L. helveticus*의 증식과 젖산 생성에 관한 연구에서 pH, 유청 permeate, 효모 추출물 농도 등이 미치는 영향을 분석한 결과 최적 pH는 5.5이었고, 효모 추출물 농도는 10 g/l, 유청 permeate 농도는 100 g/l일 때 가장 높았고, 젖산의 생성은 배양 9시간부터 30시간까지 꾸준히 증가한다 하여 본 실험에서 pH가 낮아지는 시간대와 일치하였다.

Amrane 등¹⁹⁾도 회분식 배양에서 *L. helveticus*의 증식과 젖산 생성에 관한 효모 추출물의 영향 연구에서 배양 7시간에 균수가 정점을 이루었으며 효모 추출물 20 g/l와 30 g/l 첨가 시 가장 높은 균수를 나타내 효모 추출물이 균의 증식에 영향을 주었다는 결과보다 다소 늦은 시간이나 경향은 유사하였다.

5. 유청 배지에서 총 산도 변화

저온 살균한 6%와 12% 유청 배지와 각각에 효모 추출물을 1% 첨가한 유청 배지에 *L. helveticus* ATCC 55163을 1% 접종하여 85 rpm의 35°C 인큐베이터에서

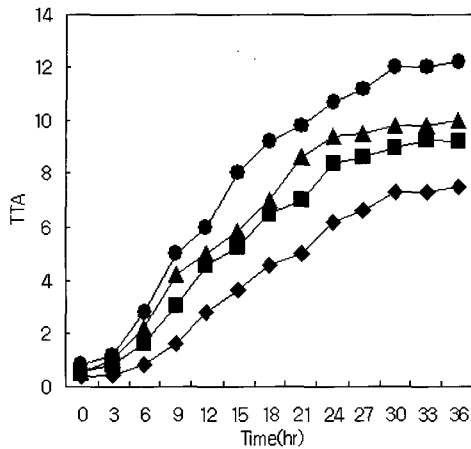


Fig. 5. TTA Variation of whey broth cultured by *L. helveticus* ATCC 55163 for 36hr.

◆ : 6% whey broth, ■ : 12% whey broth, ▲ : 6% whey broth added 1% yeast extract, ● : 12% whey broth added 1% yeast extract.

배양하면서 3시간 단위로 36시간까지 총 산도를 측정 한 결과는 Fig. 5와 같다. 배양 초기 총 산도 값은 0.4에서 0.8사이였으나 배양 시간이 경과함에 따라 30시간까지 급격히 증가하는 경향을 나타냈다.

배양 30시간에 6% 유청 배지에서 7.3, 12% 유청 배지에서 9, 6%에 효모 추출물을 1% 첨가한 유청 배지에서 9.8, 12%에 효모 추출물을 1% 첨가한 유청 배지에서 12로, 12%에 효모 추출물을 1% 첨가한 유청 배지에서 가장 높은 값을 나타내 산의 생성에 유청 농도와 효모 추출물이 영향을 주었다. Ulrich 등²⁰⁾은 유청 ultrafiltrate에 효모 추출물을 첨가하여 *L. helveticus* 배양 시 균 성장과 산 생성에 관한 연구에서 효모 추출물을 10 g/l 첨가하였을 때 생산성이 최적이었다고 하였고, Abdeltif²¹⁾는 유청 permeate 57 g/l 용액에 *L. helveticus* 배양 시 대수기는 2~10시간이었고, 유당도 8시간까지 거의 소모되어 젖산의 생성이 배양 9시간에 최대치를 나타냈다고 하였는데, 본 실험에서 유청 농도가 높고 효모 추출물을 첨가하였을 때 총 산도 값이 높은 시간대와 일치하였다.

요 약

Lactobacillus helveticus ATCC 55163을 MRS 및 6%, 12% 유청 배지와 각각에 효모 추출물을 1% 첨가한 유

청 배지에서 배양하여 흡광도, pH, 총 산도 값을 측정 하므로써 생육 특성을 분석하였다. MRS 및 유청 배지에서의 대수기는 3~21시간으로 나타났고, 유청 배지에서의 pH는 3~24시간에 급격한 감소현상을, 총 산도 값은 이 시간대에 급격히 증가하는 반비례 현상을 보였다. 같은 시간대에 12% 유청 배지에 효모 추출물을 1% 첨가하였을 때 다른 시험구보다 높은 생균수, 낮은 pH 값과 높은 총 산도 값을 보여 유청 농도와 효모 추출물이 균의 증식에 영향을 주었다.

참고문헌

- González, SMI. The biotechnological utilization of cheese whey: a review. *Biores. Technol.* 57:1-11. 1996
- Vick Roy, TB, Blanch, HV and Wilke, CR. Lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii* in a hollow fiber fermentation. *Biotechnol. Lett.* 4:483-488. 1982
- Torino, MI, Taranto, MP and Font de Valdez, G. Citrate catabolism and production of acetate and succinate by *Lactobacillus helveticus* ATCC 15807. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 69:79-85. 2005
- Denis, R, Jacques, G and Anh, L. Batch fermentation of whey ultrafiltrate by *Lactobacillus helveticus* for lactic acid production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 24:206-213. 1986
- Torino, MI, Mozzi, F and Font de Valdez, G. Exopolysaccharide biosynthesis by *Lactobacillus helveticus* ATCC 15807. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68:259-265. 2005
- Matteuzzi, D. Lactic acid production in milk and DNA homology relationship in the species *Lactobacillus jugurti*. *Can. J. Microbiol.* 18:1893-1895. 1972
- Lipinsky, ES and Sinclair, RG. Is lactic acid a commodity chemicals? *Chem. Eng. Prog.* 82:26-32. 1986
- Matar, C, Amiot, J, Savoie, L and Goulet, J. The effect of milk fermentation by *Lactobacillus helveticus* on the release of peptides during *in vitro* digestion. *J. Dairy Sci.* 79:971-979. 1996
- Sipola, M, Finckenberg, P, Korpeal, R, Vapaatalo, H and Nurminen, ML. Effect of long-term intake of

- milk products on blood pressure in hypertensive rats. *J. Dairy Res.* 69:103-111. 2002
10. Nakamura, Y, Yamamoto, N, Sakai, K, Okubo, A, Yamazaki, S and Takano, T. Purification and characterization of angiotensin I -converting enzyme inhibitors from sour milk. *J. Dairy Sci.* 78:777-783. 1995a
 11. American Association of Cereal Chemists. Approved methods of AACC. 02-31. 1985
 12. Nakamura, Y, Yamamoto, N, Sakai, K and Takano, T. Antihypertensive effect of sour milk and peptides isolated from it that are inhibitors to angiotensin I -converting enzyme. *J. Dairy Sci.* 78:1253-1257. 1995b
 13. Min, KC, Shim, UM, Lee, JU, Cho, SG, Kim, YG, Son, GM, Son, WS and Cho, NC. Laboratory of food microbiology. pp. 199-202. KangMunKag, Korea. 2000
 14. Abdeltif, A and Yves, P. Differentiation of pH and lactic acid effects on the various growth and production phases of *Lactobacillus helveticus*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 74:33-40. 1999
 15. Torino, MI, Taranto, MP and Font de Valdez, G. Mixed-acid fermentation and polysaccharide production by *Lactobacillus helveticus* in milk cultures. *Biotechnol. Lett.* 23:1799-1802. 2001
 16. Chantal, M, Jean, A, Laurent, S and Jacques, G. The effect of milk fermentation by *Lactobacillus helveticus* on the release of peptides during *in vitro* digestion. *J. Dairy Sci.* 79:971-979. 1996
 17. Ghaly, AE, Tango, MSA, Mahmoud, NS and Avery, AC. Batch propagation of *Lactobacillus helveticus* for production of lactic acid from lactose concentrated cheese whey with microaeration and nutrient supplementation. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 20:65-75. 2004
 18. Adolf, WS, Jules, T and Christophe, L. *Lactobacillus helveticus* growth and lactic acid production during pH-controlled batch cultures in whey permeate/yeast extract medium. Part 1, multiple factor kinetic analysis. *En. Microbial. Technol.* 30:176-186. 2002
 19. Amrane, A and Prigent, Y. Influence of yeast extract concentration on batch cultures of *Lactobacillus helveticus*: growth and production coupling. *Biotechnol. Lett.* 15:239-244. 1993
 20. Ulrich, K and Jurgen, W. Rapid lactic acid production at high cell concentrations in whey ultrafiltrate by *Lactobacillus helveticus*. *En. Microbial. Technol.* 24:297-302. 1999
 21. Abdeltif, A. Batch cultures of supplemented whey permeate using *Lactobacillus helveticus*: unstructured model for biomass formation, substrate consumption and lactic acid production. *En. Microbial. Technol.* 28:827-834. 2001

(2006년 9월 12일 접수; 2006년 12월 6일 채택)