

***Bifidobacterium longum* 및 *Lactobacillus acidophilus* 를 이용한 발효유 제조**

김창한^{1*} · 전한수² · 정재홍²

¹건국대학교 축산대학 축산가공학과, ²해태유업주식회사 기술연구소

Studies on the Preparation of Fermented Milk by *Bifidobacterium longum* and *Lactobacillus acidophilus*

Kim, Chang-Han^{1*}, Han-Soo Jeon² and Jae-Hong Jeong²

¹Department of Animal Products Science, College of Animal Husbandry,
Kon-Kuk University, Seoul 133-701, Korea

²Research Laboratory of Hai Tai Dairy Co., Ltd. Suwon 440-310, Korea

Yoghurt was prepared with *Bifidobacterium longum* TK-100 and *Lactobacillus acidophilus* TK-2070. The prepared yoghurt showed the increase of the titratable acidity under cold storage condition. This was derived from the active *L. acidophilus* TK-2070 on the logarithmic phase rather than from the *B. longum* TK-2070. *B. longum* TK-100 grew well in the facultative anaerobic condition as well as in the strict anaerobic condition. Reinforced clostridial agar medium with 0.1% aniline blue was tried for the differential viable cell counts in the mixed culture and in the yoghurt. *B. longum* TK-2070 had the light gray, blue-dotted colonies of about 2 mm diameter. *L. acidophilus* TK-2070 had the light gray colonies of about 1 mm diameter.

Bifidobacteria는 건강유지에 유용한 장내 세균으로서 Kato(1)와 Bullen(2)은 장내부패의 억제, Mayer는(3) 감염방어작용, Müting(4)은 유해물질의 흡수저해 및 간질환의 치료, Teraguchi 등(5)은 vitamin의 장내 산생성 등에 대하여 보고하였으며, Yuguchi(6)는 백혈병 환자와 난치료성 설사환자, 류머티즘 환자에 계도 유효하였다고 하였다. 또한 *L. acidophilus*의 효과로서 Kim(7)은 acidopuulin, acidolin, lactobacillin, lactocidin, lactolin 등의 항균물질에 의하여 유해세균의 억제와 위장염, 설사, 피부병 herpes, aphtha 구내염 등에 유효하였으며, 그 외에도 항암물질에 의하여 위암 억제에도 유효하였다고 하였다. 神邊(8)도 *L. acidophilus*의 항균작용의 특징으로서 병원성 또는 잠

재적 병원성 세균을 특이적으로 강하게 억제한다고 하였으며, 저 cholesterol 작용과 제암효과에 대하여도 보고하였다. 이러한 bifidobacteria의 영양적 효과와 질병의 예방 및 치료에 미치는 효과로 인하여 일본 및 유럽 등에서는 bifidobacteria를 이용한 제품이 상품화되어 판매되고 있으나(9, 10), 우리나라에서는 아직 그렇지 못한 실정이다. 따라서 본 실험에서는 *B. longum* TK-100과 *L. acidophilus* TK-2070의 혼합배양과 포장방법, differential medium에 의한 *B. longum* TK-100과 *L. acidophilus* TK-2070의 분별 및 발효유 제조의 가능성을 탐색하기 위하여 실시하였다.

재료 및 방법

Key words: *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus acidophilus*, Fermented milk

*Corresponding author

사용균주

일본 Takasago Co., Tokyo Research Lab에서

분양받은 *Bifidobacterium longum* TK-100 및 *Lactobacillus acidophilus* TK-2070을 -70°C 의 deep freezer에 냉동보존하면서 사용하였다.

요구르트 조제

*B. longum*의 스타터는 yeast extract가 0.2% 함유된 12% 멸균 환원유 배지에 1% 접종하여 12시간 배양하였고 *L. acidophilus*의 스타터는 12% 멸균탈지 환원유 배지에 1% 접종하여 37°C 에서 15시간 배양하였으며, culture는 glucose 2%와 yeast extract 0.2%가 함유된 환원탈지유를 멸균 후 스타터로써 준비된 *B. longum*과 *L. acidophilus*를 각각 1%씩 혼합 접종한 후, 37°C 에 배양하여 적정산도, pH 및 생균수의 변화를 관찰하였으며 요구르트의 조제는 시럽과 culture의 비율이 3:1(v/v)이 되도록 혼합하여 무지유고형분 4%의 액상 요구르트를 조제한 후 일부는 삼각 flask에 충전하여 CO_2 로서 공기를 치환시킨 후, butyl rubber plug로 밀전하였으며 일부는 polystyrene bottle에 충전하고 aluminum cap으로 밀전하여 모두 5°C 의 냉장상태로 보존하면서 적정산도, pH 및 생균수의 변화를 조사하였다.

생균수 측정

희석액은 Mitsuoka(11)의 방법에 의하여 조제하였고, 생균수 측정용 배지는 *B. longum*과 *L. acidophilus*의 판별을 위하여 aniline blue 0.1%를 첨가한 reinforced clostridial agar medium (RCAM)을 사용하였다. 한편 plate는 Gas Pak anaerobic jar 내에서 37°C 로 48시간 배양하여 colony의 수를 측정하였다(12).

결과 및 고찰

Differential medium에 의한 colony의 판별

본 실험에서는 혼합배양된 culture로부터 *B. longum* 및 *L. acidophilus*의 구별을 위하여 aniline blue 0.1%를 첨가한 RCAM의 plate 표면에 culture 혹은 요구르트를 희석하여 분산시킨 후 Gas Pak anaerobic jar 내에서 37°C 로 배양하여 생성된 특유한 colony의 성상을 검토한 결과 Fig.1과 같았다.

즉 plate 표면에 생성된 colony의 성상은 *B. longum*의 경우, 직경 2mm 정도의 광택있는 회백색이었고 중심부분은 청색을 나타내었으며, *L. acidophilus*는 직경 1mm 정도의 회백색의 colony로서 육

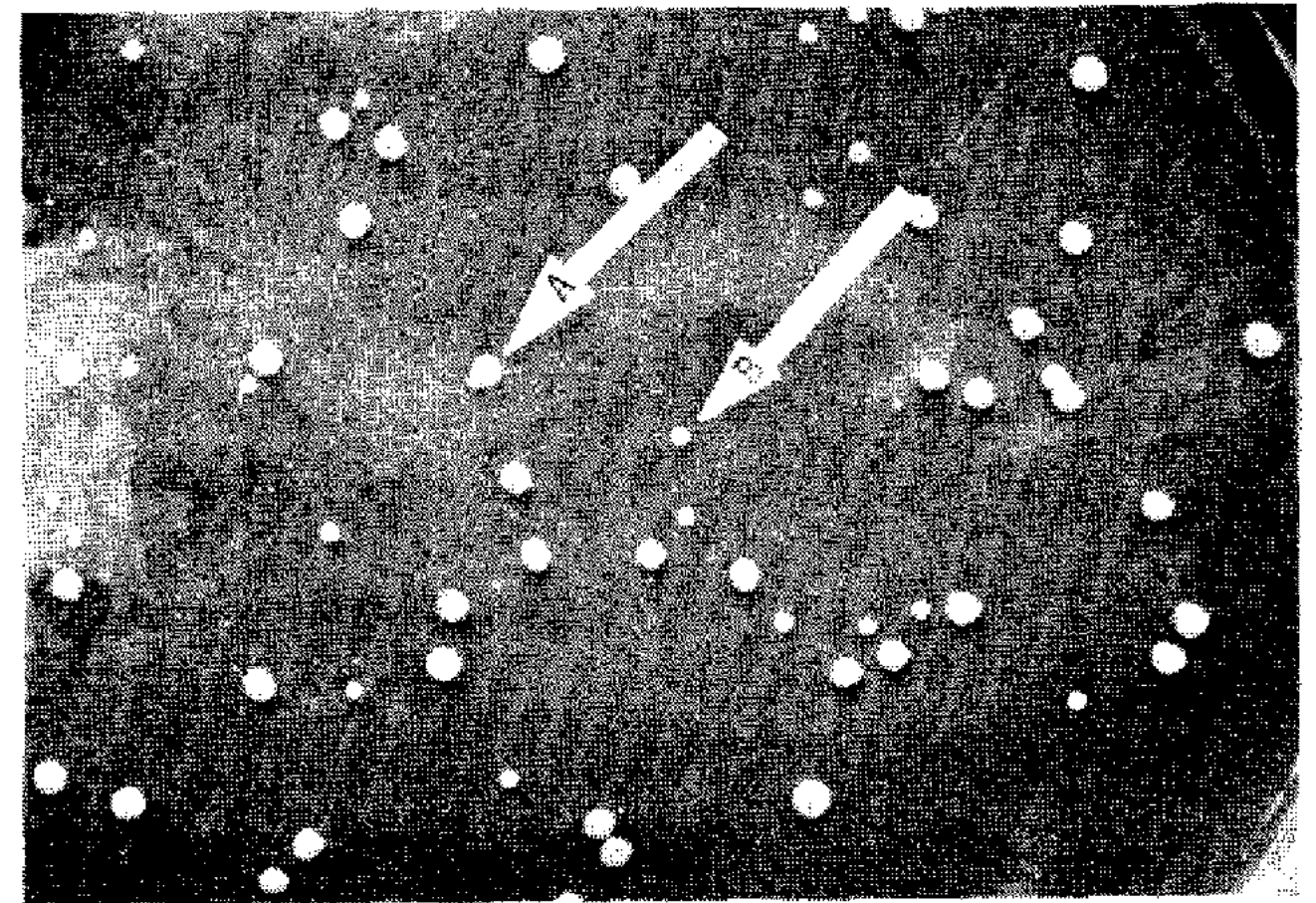


Fig. 1. Colonies of *B. longum* and *L. acidophilus* on RCAM plate incubated for 48 hrs at 37°C anaerobically.

A: *B. longum* TK-100, B: *L. acidophilus* TK-2070

안으로 쉽게 분별이 가능하였다. 이 방법은 B.C.P. 한천배지와 선택배지를 이용한 방법(13), *Bifidobacterium*만을 선택적으로 계수하기 위한 배지 및 방법(14), Petuely의 선택배지에 riboflavin 등을 첨가한 방법(15)보다 매우 간편하였다.

Culture의 배양시간에 따른 변화

B. longum 및 *L. acidophilus*의 생균수는 배양 15시간에 최대치를 나타내나 pH가 4.48로서 보존 중 *B. longum*의 급격한 사멸이 예상되어 요구르트 제조시에는 10시간 배양한 culture를 사용하였는데, 이 때의 pH는 4.88로서 *B. longum*의 활력유지에 적합하였다. Rasic과 Kurman(16)은 pH 4.6에서 bifidobacteria가 완만하게 감소하나 pH 3.4에서는 급격히 감소하며 이는 pH 4.7의 조건에 비하여 2배 빠른 것이라고 하였다. Culture의 배양시간별 생균수 및 pH의 변화는 Fig.2, 3과 같다.

Cultures의 냉장보존 중의 변화

10시간 및 15시간 배양한 culture를 5°C 에 보존하면서 8일 동안 매일 측정된 적정산도, pH 및 유산균수의 변화는 Table 1과 같다. 10시간 배양한 culture에서의 *B. longum*의 초기 생균수는 적었으나 냉장 4일째부터는 생존율이 높아져 생균수가 오히려 더 많았다. 그러므로 culture에서의 산미, 풍미 등의 기호도와 생균수 등에 크게 영향을 주지 않는다면 가능한 한 높은 pH에서 배양을 종료하는 것이 바람직하다고 볼 수 있다. 또한 10시간 배양한 culture는 냉장 1일 후

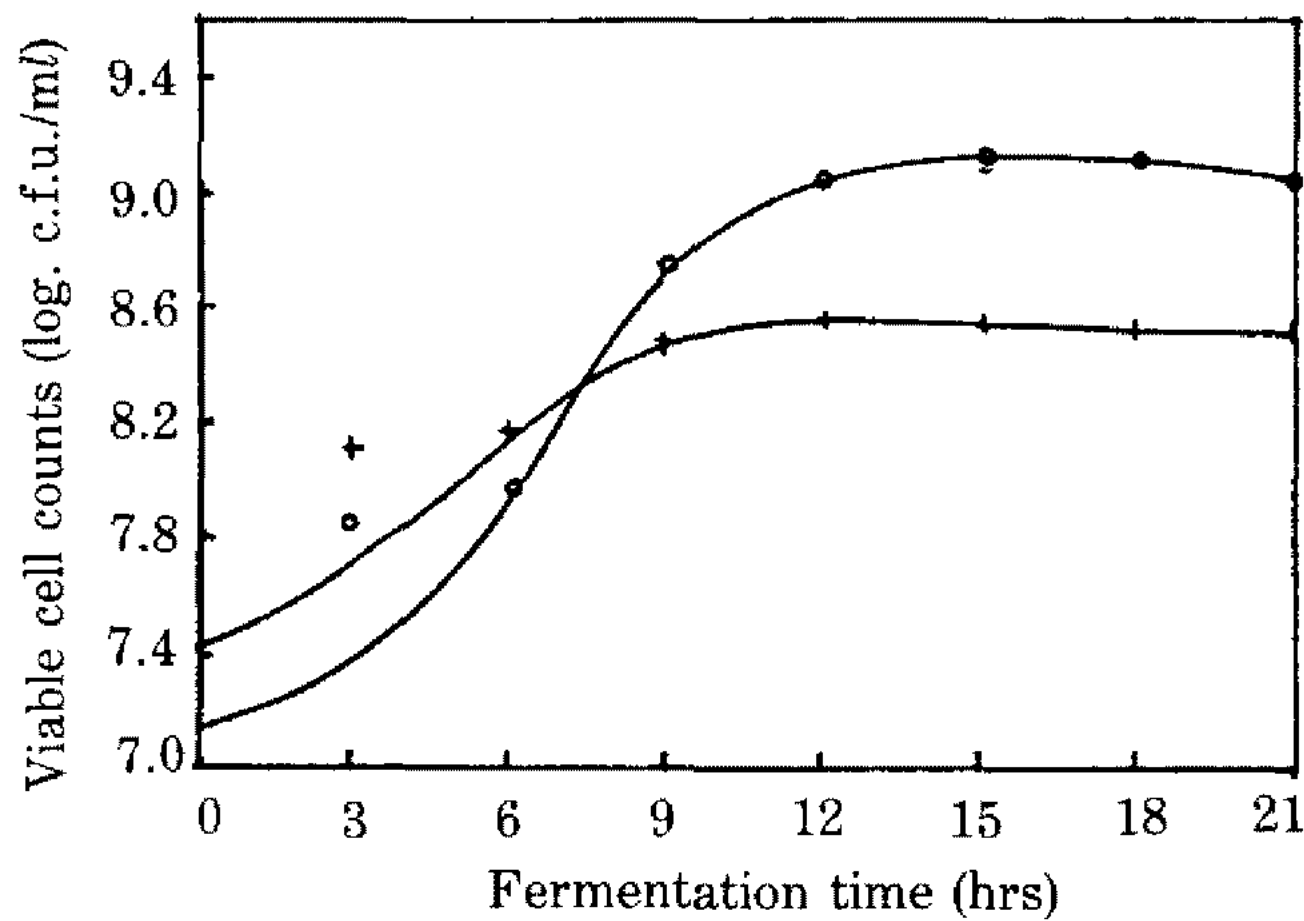


Fig. 2. Growth of *B. longum* and *L. acidophilus* in culture.

○: *B. longum*, +: *L. acidophilus*

적정산도 1.06%, pH4.88 이었으나, 냉장 8일 후에는 적정산도 1.50%, pH4.54로 변화되어, 냉장상태에서도 서서히 산이 생성되었음을 알 수 있다.

*B. longum*과 *L. acidophilus*의 두 균주 중에서 어느 것이 산생성에 더 많이 관여하는지를 알기 위하여 각각 단독배양하여 냉장 상태에서의 적정산도 및 pH의 변화를 측정할 결과는 Table 2와 같다.

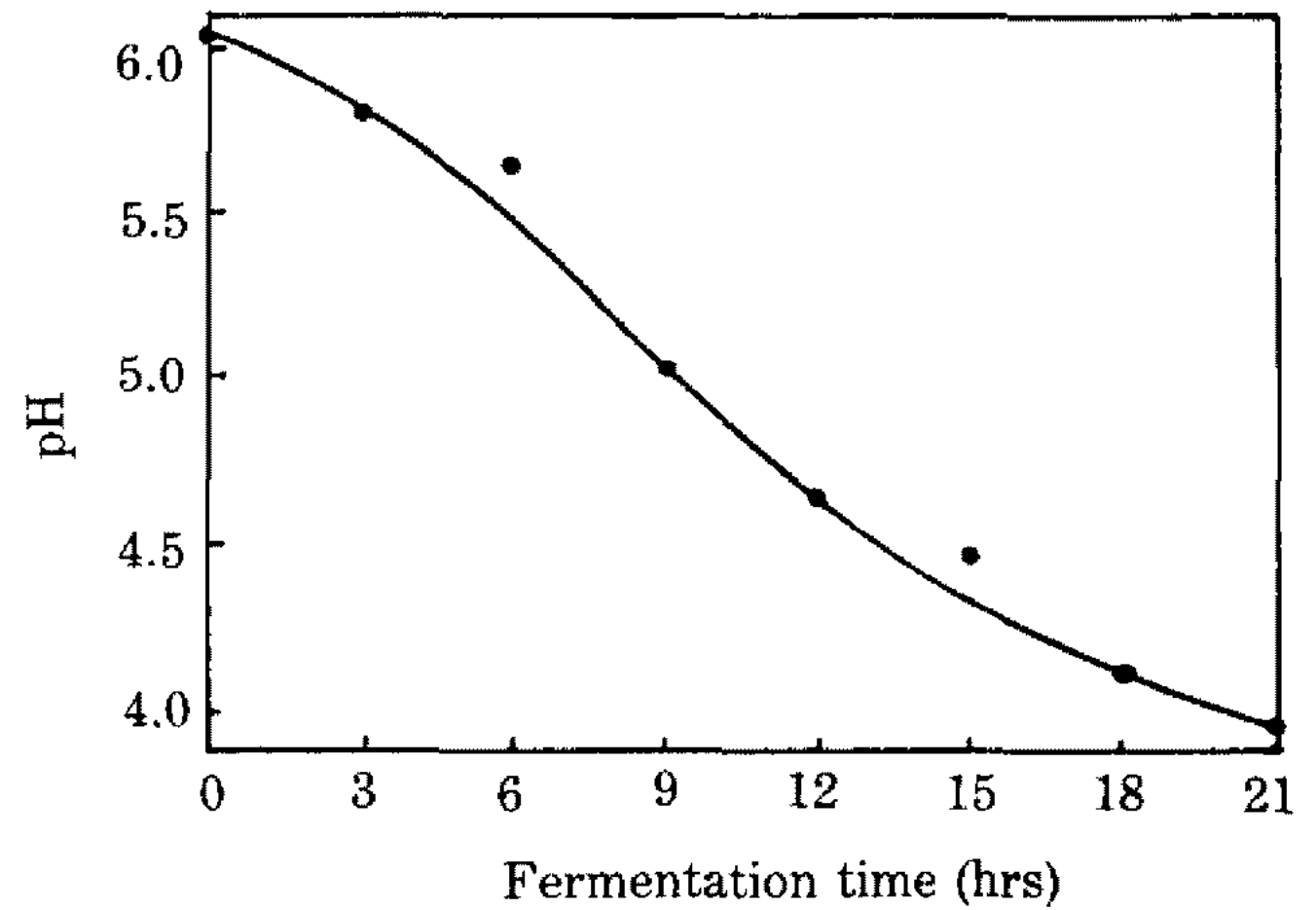


Fig. 3. Changes of pH in culture.

그 결과 *B. longum*으로 배양한 culture는 냉장 중 에서 산생성이 미약하나, *L. acidophilus*는 계속 산이 생성되어 최초 적정산도 0.72%, pH5.16에서 10일째에는 적정산도 1.29%, pH4.40으로 변화되었다. 이것은 *L. acidophilus*가 대수기일 때 배양이 종료되었으므로 어느 정도 활력이 유지되어 냉장 중에서도 서서히 산이 생성된 것으로 보인다.

포장방법에 따른 요구르트의 품질변화

Table 1. Changes of viable cell counts, titratable acidity and pH in cultures at 5°C.

Sort of culture Item Storage (day)	Culture fermented for 10 hrs			Culture fermented for 15 hrs		
	Viable cell counts/ml	T.A. (%)	pH	Viable cell counts/ml	T.A. (%)	pH
1	*B.L 1.2×10^9	1.06	4.88	B.L 1.4×10^9	1.56	4.48
	**L.A 3.3×10^8			L.A 3.4×10^8		
2	B.L 1.2×10^9	1.17	4.78	B.L 1.3×10^9	1.63	4.42
	L.A 3.2×10^8			L.A 3.4×10^8		
3	B.L 1.1×10^9	1.27	4.70	B.L 1.3×10^9	1.69	4.38
	L.A 3.0×10^8			L.A 3.2×10^8		
4	B.L 1.1×10^9	1.35	4.65	B.L 7.2×10^8	1.74	4.35
	L.A 2.9×10^8			L.A 2.5×10^8		
5	B.L 7.0×10^8	1.40	4.61	B.L 5.5×10^8	1.78	4.32
	L.A 2.9×10^8			L.A 2.5×10^8		
6	B.L 5.7×10^8	1.44	4.58	B.L 2.5×10^8	1.82	4.30
	L.A 2.9×10^8			L.A 2.5×10^8		
7	B.L 4.9×10^8	1.47	4.56	B.L 1.2×10^8	1.84	4.29
	L.A 2.6×10^8			L.A 2.4×10^8		
8	B.L 2.0×10^8	1.50	4.54	B.L 1.0×10^7	1.85	4.28
	L.A 2.0×10^8			L.A 2.0×10^8		

*B.L : *Bifidobacterium longum*, **L.A: *Lactobacillus acidophilus*

Table 2. Changes of titratable acidity and pH by different lactic acid bacteria in 16% reconstituted skim milk supplemented with 2% glucose and 0.2% yeast extract at 5°C.

Sort of culture Item Storage (day)	<i>B. longum</i> TK-100		<i>L. acidophilus</i> TK-2070	
	T.A. (%)	pH	T.A. (%)	pH
Initial	0.80	5.12	0.72	5.16
1	0.84	5.12	0.74	5.10
2	0.84	5.12	0.84	5.01
3	0.84	5.12	0.90	4.95
4	0.85	5.12	0.98	4.89
5	0.85	5.12	1.06	4.82
6	0.85	5.13	1.12	4.71
7	0.85	5.13	1.18	4.66
8	0.85	5.13	1.25	4.54
9	0.85	5.13	1.28	4.49
10	0.85	5.13	1.29	4.40

포장방법에 따른 요구르트의 냉장 상태에서의 품질변화를 연구하기 위하여 삼각 flask 에 요구르트를 충전하고 CO₂로서 공기를 치환시킨 후 butyl rubber 로 밀전한 것과, polystyrene 용기에 요구르트를 충전하고 aluminium cap 으로 밀전한 것을 냉장보존하여 비교하였는데 큰 차이는 없었다(Table 3). Mada(17)는 bifidobacteria 를 이용한 요구르트는 탄수화물의 함량이 높아서 제조 후 보존기간이 오래 경과되면(제조 후 5-6 일) 생균수의 감소가 현저하고 용존산소 및 pH에 대하여도 감수성이 높기 때문에 제품 중에서 생균수를 일정하게 유지하는 것이 곤란하다고 하였으며 시판하고 있는 요구르트 중의 bifidobacteria 의 생균수는 10⁴-10⁸ c.f.u./ml(제조 후 1-4 일째)라고 하였다. Rasic 과 Kurman(16)은 bifidobacteria 가 10⁶-10⁸ c.f.u./ml 함유된 요구르트는 품질이 좋은 것이라고 하였는데, 본 실험에서 제조한 요구르트는 포장방법과는 관계없이 냉장 상태에서 7 일까지 *B. longum* 의 생균수가 3×10⁸ c.f.u./ml 까지 유지되는 것으로 보아 통성혐기조건에서도 잘 적응한 것으로 보인다.

Table 3. Changes of viable cell counts, titratable acidity and pH in the different packaging conditions of yoghurt at 5°C.

Method of packaging Item Storage (day)	Butyl rubber plug			P.S bottle		
	Viable cell counts/ml	T.A. (%)	pH	Viable cell counts/ml	T.A. (%)	pH
Initial	*B.L 3.0×10 ⁸ **L.A 1.5×10 ⁸	0.28	4.85	B.L 3.0×10 ⁸ L.A 1.5×10 ⁸	0.28	4.85
1	B.L 1.9×10 ⁸ L.A 1.5×10 ⁸	0.31	4.73	B.L 2.0×10 ⁸ L.A 1.5×10 ⁸	0.31	4.72
2	B.L 6.0×10 ⁷ L.A 1.4×10 ⁸	0.35	4.66	B.L 8.0×10 ⁷ L.A 1.5×10 ⁸	0.35	4.65
3	B.L 4.0×10 ⁷ L.A 1.5×10 ⁸	0.36	4.62	B.L 2.0×10 ⁷ L.A 1.5×10 ⁸	0.35	4.62
4	B.L 2.0×10 ⁷ L.A 1.5×10 ⁸	0.38	4.52	B.L 2.0×10 ⁷ L.A 1.5×10 ⁸	0.36	4.52
5	B.L 1.0×10 ⁷ L.A 1.5×10 ⁸	0.40	4.49	B.L 1.0×10 ⁷ L.A 1.5×10 ⁸	0.38	4.51
6	B.L 8.0×10 ⁶ L.A 1.3×10 ⁸	0.42	4.38	B.L 6.0×10 ⁶ L.A 1.4×10 ⁸	0.40	4.48
7	B.L 6.0×10 ⁶ L.A 1.2×10 ⁸	0.45	4.35	B.L 6.0×10 ⁶ L.A 1.4×10 ⁸	0.41	4.40
8	B.L 3.0×10 ⁶ L.A 1.0×10 ⁸	0.48	4.33	B.L 3.0×10 ⁶ L.A 1.2×10 ⁸	0.42	4.37

*B.L : *Bifidobacterium longum*, **L.A: *Lactobacillus acidophilus*

요 약

B. longum TK-100 및 *L. acidophilus* TK-2070 으로 혼합배양한 culture 로 제조한 요구르트는 냉장 상태에서 산생성이 되었는데 이는 *B. longum* TK-100 에 의한 것보다는 대수기의 *L. acidophilus* TK-2070 에 의하여 거의 생성되었다. *B. longum* TK-100 은 편성 혐기조건 뿐만 아니라 통성혐기조건에서도 생육이 좋은 것으로 나타났다. 또한 *B. longum* 과 *L. acidophilus* 는 냉장보존 중인 요구르트 내에서도 생존도가 양호하므로 발효유의 제조, 개발에 혼합 starter로서의 이용이 가능하다고 하겠다. 한편 aniline blue 0.1% 가 함유된 RCAM plate 상에 나타난 *B. longum* TK-100 의 colony 는 직경 약 2mm 의 광택있는 회백색의 중심에 청색을 나타내었고, *L. acidophilus* TK-2070 의 colony 는 직경 약 1mm 의 회백색을 나타내어 쉽게 분별할 수 있었다.

참고문헌

1. Kato, H.: *Paediatrics Universitatis Tokyo*, 3, Sept. (1959).
2. Bullen, C.L., P.V. Tearle and A.T. Willis: *J. Med. Microbiol.*, 9, 325 (1976).
3. Mayer, J.B.: *M Schr. Kinderheilk*, 114, 67-73 (1966).
4. Muting, D., W. Escherich and J.B. Mayer: *Amer. J. Proctol.*, 19, 336 (1968).
5. Teraguchi, S., M. Uehara, K. Ogasa and T. Mitsuoka: *Jap. J. Bact.*, 33, 755 (1978).
6. Yuguchi, H.: *Jap. J. Dairy and Food Sci.*, 33, A160 (1984).
7. Kim, K.: *Cultured Dairy Products J.*, 20, 13 (1985).
8. 神邊道雄: *New Food Ind.*, 28, 41 (1986).
9. 務台方彦: *New Food Ind.*, 20, 17 (1978).
10. Rasic, J.L. and J.A. Kurman: *Yoghurt*, Tech. Dairy Publ. House Denmark, 362 (1978).
11. 光岡知足: *ビフィズス菌.*, ヤクルト本社, 43 (1979).
12. 光岡知足: *腸内菌の世界.*, 叢文社, 47 (1984).
13. Shimada, K., M. Mada, M. Mutai, A. Suzuki and H. Konuma: *J. Food Hyg. Soc. Jap.*, 18, 537 (1977).
14. Teraguchi, S., M. Uehara, K. Ogasa and T. Mitsuoka: *Jap. J. Bact.*, 33, 753 (1978).
15. Tanaka, R. and M. Mutai: *Appl. Envr. Microbiol.*, 40, 866 (1980).
16. Rasic, J.L. and J.A. Kurman: *Bifidobacteria and their role*. Birkhauser, 127 (1983).
17. Mada, M.: *Jap. J. Dairy and Food Sci.*, 30, 216 (1981).

(Received November 10, 1989)