

배양조건에 따른 유산균수 비교시험

김은아 · 광해수 · 박정남
서울우유협동조합 기술연구소

The Effect of Various Culture Conditions on Lactic Acid Bacteria Count

Eun-Ah Kim, Hae-Soo Kwak and Joung-Nam Park
Seoul Dairy CO-OP, Institute of Dairy Food Research

Abstract

This study was carried out to compare lactic acid bacteria count of liquid type yogurts with various experimental conditions during shelf-life period. The conditions were media (BCP and Elliker agar), incubation conditions (aerobic and anaerobic), dilution waters (saline and phosphate buffer) and dilution methods (10 and 100 times). All of the samples were incubated at 37°C for 72 hrs. In the case of counting *L. acidophilus* as a yogurt starter culture, there were differences on dilution waters and incubation conditions, but were no difference on media and dilution methods. In the case of counting *L. jugurti* and mixed strain with *L. acidophilus* and *L. casei*, there were differences on media, incubation conditions and dilution waters, but was no difference on dilution methods. For *L. casei* in the yogurt, media and dilution methods were shown slightly different viable cell count, but incubation conditions were not shown difference. In the case of counting *L. bulgaricus*, there were differences on media, incubation conditions and dilution methods, but was no difference on dilution waters. Therefore, the measurement of lactic acid bacteria count may be effective if preferred experimental conditions are selected for different types of strain.

Key words : yogurt, lactic acid bacteria count, culture conditions

서 론

발효유는 1910년 Metchinikoff⁽¹⁾의 불로장수설이 발표되면서부터 전세계적으로 그 보급이 확산되었으며, 우리나라에서도 최근에 와서 건강식품의 중요성과 더불어 매년 그 소비량이 증가되고 있는 실정이다. 발효유에는 수십종의 유산균이 이용되고 있는데 유산균은 1858년 Louis Pasteur⁽²⁾에 의해 처음 발견되었고 분류학적으로는 *Lactobacillus* sp., *Streptococcus* sp., *Leuconostoc* sp., *Pediococcus* sp. 및 *Bifidobacterium* sp. 등이 포함된다⁽³⁾. 국내에서 많이 소비되는 액상요구르트 균주는 주로 *Lactobacillus* sp.를 사용하는데 각 제조회사에 따라 다양한 균종이 이용되고 있다. 이 유산균들은 균주마다 복잡한 영양 요구성을 지닌 배양이 까다로운 미생물의 하나로서 Elliker⁽⁴⁾, Rogosa 등⁽⁵⁻⁷⁾은 유산균의 선택배지에 대한 연구를 보고한 바 있다. 또한 Oblinger⁽⁸⁾, Hughtanen⁽⁹⁾, Butterfield 등⁽¹⁰⁾은 total viable cell count를 측정함에 있어서 여러 회석액(phosphate buffered distilled water(D.W.)), D.W., 0.1% or 0.5% peptone in D.W.,

0.85% NaCl in D.W.)의 적합여부를 비교 연구하였는데 실험재료의 종류에 따라 가장 적합한 회석액이 다른 것으로 나타났고, Hausler⁽¹¹⁾, King 등⁽¹²⁾은 회석과정에서 시간이 경과함에 따른 회석액내의 세균의 치사율에 대해 보고하였다. 그러나 현재 각 발효유 생산공장의 품질관리과와 여러 종의 제품을 실험하는 곳에서는 식품공전에서 제시한 일반적인 유산균수 측정방법⁽¹³⁾을 사용하고 있기 때문에 각 균주마다 배양조건에 따른 효과적인 균수의 측정이 되고 있지 않은 실정이다. 그 이유는 total count를 측정할 때 균종의 특성에 따른 배지의 선택, 배양상태, 회석액, 회석방법 등의 배양조건에 따른 종합적인 연구가 아직 없었기 때문이다. 이에 본 연구는 유산균 발효유(액상요구르트)의 정확한 품질평가를 위한 유산균수 측정에 있어서 식품공전의 방법보다 오차가 적고 최대한의 결과를 산출해 낼 수 있는 배양조건을 규명하는데 그 목적을 두었다.

재료 및 방법

재료

본 실험을 위하여 시판되고 있는 액상요구르트 여섯

Corresponding author : Hae-Soo Kwak, Seoul Dairy CO-OP, Institute of Dairy Food Research, Banwol Industrial Complex, Kyonggi-do, 425-110

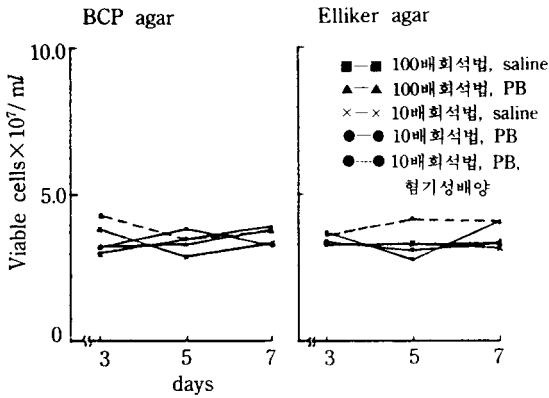


Fig. 1. Comparison of *L. acidophilus* viable cell counts with various culture conditions in liquid type yogurt

가지 제품을 구입하였으며 각 제품에 사용된 유산균은 *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. casei*(I), *L. casei*(II), *L. casei*+*L. acidophilus*(1:1), *L. jugurti*이다. 유산균수 측정에 사용한 배지는 BCP agar(Eiken)와 Elliker agar(Difco)이고 희석수는 0.85% saline과 phosphate buffer(PB)를 사용하였다.

유산균수 측정

액상요구르트의 유효기간(7일)동안 제품별로 3, 5, 7일 또는 2, 4, 7일로 3회 유산균수를 측정하였고 pH와 산도도 측정하였다. 희석수와 희석방법은 saline을 사용한 100배 희석법(100배), phosphate buffer를 사용한 100배, saline을 사용한 10배, PB를 사용한 10배로 네 가지 방법으로 각각 두 가지 배지를 병행하였고 혐기성배양은 Gas-Pak Jar(Difco)를 사용하였다. 모든 실험은 37°C에서 72시간 배양 후 균수를 count하였으며 결과는 4회 반복하여 평균을 내었다.

결과 및 고찰

유산균수에 대한 배양조건의 영향

액상요구르트는 현재 다양한 유산균을 이용하여 많은 제품들이 시판되고 있기 때문에 각각 균종의 특성에 적당한 시험방법을 알아보기 위해서 앞서 설명한 여러 실험조건으로 비교 검토하였는데 그 결과는 Figs. 1~6에 나타난 바와 같다.

Fig. 1은 *L. acidophilus*를 균주로 제조한 액상요구르트를 여러 배양조건에 따라 유산균수의 차이를 관찰한 것인데, BCP agar와 Elliker agar에서 거의 같은 결과를 보이고 있으며 두 경우 모두 혐기성배양에서 인산완충용액을 희석수로 사용한 경우 유산균의 수치가 더 높았고 희석방법에서는 차이가 없었으며 보존기간 중 일정한

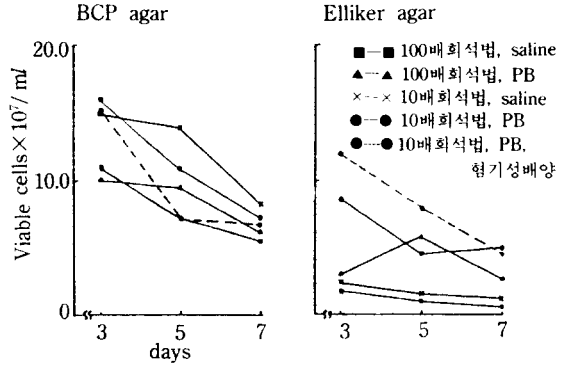


Fig. 2. Comparison of *L. bulgaricus* viable cell counts with various culture conditions in liquid type yogurt

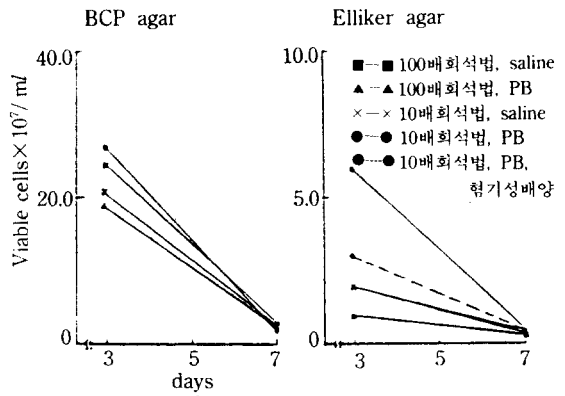


Fig. 3. Comparison of *L. casei*(I) viable cell counts with various culture conditions in liquid type yogurt

균수를 유지하고 있었다. *L. acidophilus*는 통성혐기성 유산균 중에서도 배양이 까다로운 균종으로서 다양한 당이용능과 bile salt에 대한 내성 등을 이용하여 배양방법을 연구한 보고가 있다⁽¹⁴⁾.

Fig. 2는 *L. bulgaricus*를 균주로 사용한 경우인데 Elliker agar에서 배양했을 때 BCP agar에서보다 균수가 일반적으로 낮았으나 혐기성배양에서는 높은 수치를 보였고 BCP agar에서 10배 희석방법과 생리식염수를 사용하였을 경우 결과가 좋았으며 전반적으로 보존기간 중에는 균수가 현저히 감소하는 경향을 보이고 있다. *L. bulgaricus*는 *S. thermophilus*와 혼합하여 사용되는 대표적인 요구르트 균주로서 많은 연구가 되어왔다^(15,16).

Figs. 3과 4에서는 모두 *L. casei*를 균주로 이용한 액상요구르트이지만 두 균주의 특성이 매우 상이한 것으로 관찰되었다. 전자의 경우 유산균수가 보사부 기준치(1.0×10^7 CFU/ml 이상) 이하(제조일로부터 3일 이후)이므로 3일과 7일에서만 실험하였는데 유효기간 후기에서는 기준치에 훨씬 못 미치는 낮은 수치(3.0×10^6 CFU/ml)

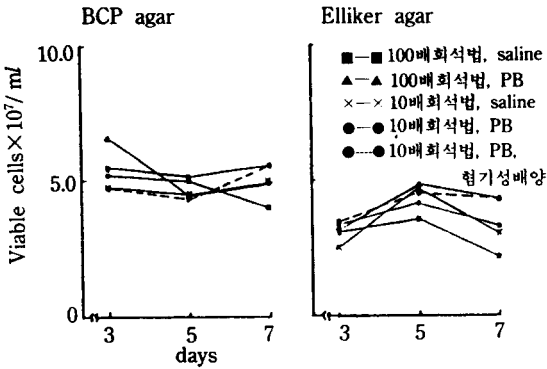


Fig. 4. Comparison of *L. casei*(II) viable cell counts with various culture conditions in liquid type yogurt

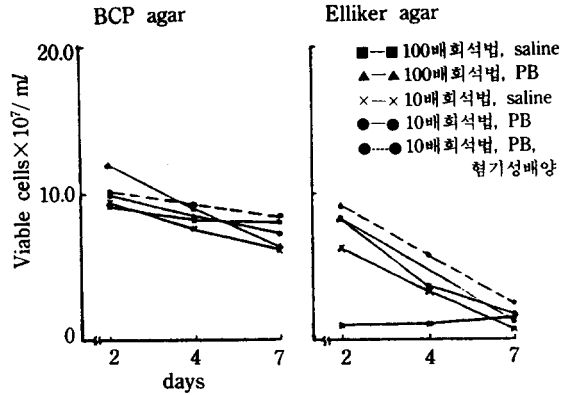


Fig. 6. Comparison of *L. jugurti* viable cell counts with various culture conditions in liquid type yogurt

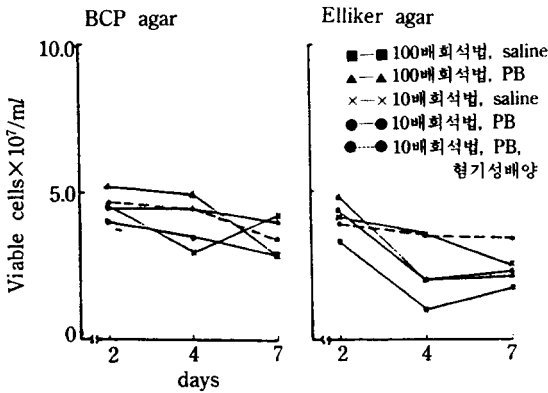


Fig. 5. Comparison of *L. casei* + *L. acidophilus* (1 : 1) viable cell counts with various culture conditions in liquid type yogurt

를 나타내었다. 반면에 후자는 수치가 아주 높았으며(5.3×10^8 CFU/ml) 보존기간 중 일정한 균수를 유지하고 있었다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 *L. casei*(I)는 BCP 배지와 10배 희석법을 사용하였을 때 평균수치가 높았고 배양상태는 차이가 없었으며 Elliker 배지를 사용했을 때 PB 희석액에서 높은 수치를 나타내었다. Fig. 4 *L. casei*(II)는 Fig. 3에서와는 달리 BCP 배지와 PB에서 유산균 수치가 높았고 배양상태와 희석방법에는 차이가 없었다.

Fig. 5는 *L. casei*와 *L. acidophilus*의 동량혼합균주를 사용한 액상요구르트를 실험한 결과로써 BCP배지가 Elliker 배지보다 유산균수가 높게 나왔으며 혐기성배양과 PB, 100배 희석법을 사용했을 때 가장 높은 수치를 보였다.

실험한 여섯 가지 균주 모두 BCP 배지에서 유산균수가 높거나 같게 나온 것은 Elliker 배지에서는 생육이 잘되어 colony는 크지만 BCP agar에서는 배지 색깔에 의해 colony가 분명히 확인되기 때문인 것으로 BCP 배

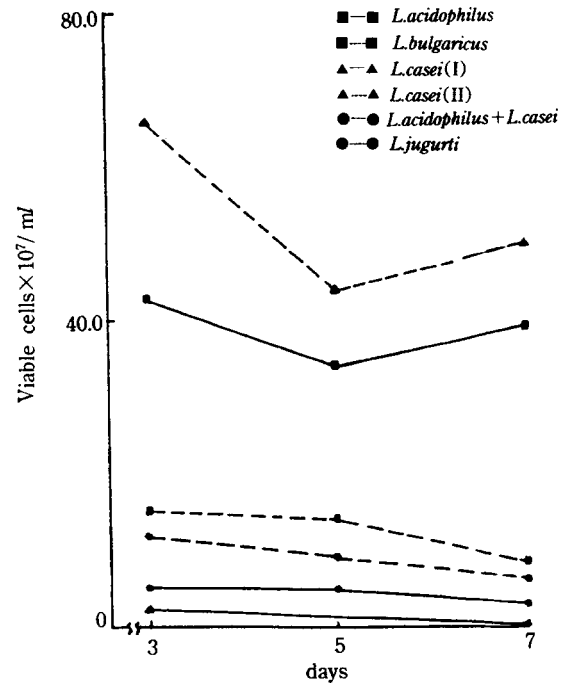


Fig. 7. Comparison of number of lactic acid bacteria as starter culture of liquid type yogurts under optimum experimental conditions

지가 유산균 count용으로는 적당한 것으로 사료된다.

Fig. 6은 *L. jugurti*를 균주로 사용한 액상요구르트의 경우인데 BCP 배지와 PB, 100배 희석방법을 사용했을 때 유효기간 초기에는 유산균수가 다른 조건에서 보다 높았으나 보존기간 중 유산균수의 감소경향은 *L. bulgaricus*(Fig. 2)의 경우와 유사했고 혐기성 배양시 다른 균종에 비해 가장 큰 증가를 보였다. 희석방법에 대해서는 실험전반에 걸쳐 뚜렷한 차이가 나타나지 않은 것으로 보아 100배 희석방법이 효율적이라고 생각된다.

위의 결과로 미루어 보아 요구르트의 유산균수 측정은 균주의 종류에 따라 가장 적절한 실험조건을 선택하여 실시하는 것이 효과적이라고 사료된다.

최적조건에서의 유산균수 비교

비교한 배양조건 중 배지와 회석방법에서는 유의성을 발견하지 못했으나 배양상태와 회석수는 균주에 따른 차이가 있었는데 여섯 가지 균종별로 가장 좋은 실험 조건으로 배양한 결과는 Fig. 7과 같다. 상단의 두 균주인 *L. casei*(II)와 *L. acidophilus*는 각각 유산균수가 5.3×10^8 CFU/ml, 3.8×10^8 CFU/ml로써 기준치인 1.0×10^7 CFU/ml을 40~50배 가량 초과했으며 하단에 있는 나머지 균주는 *L. bulgaricus*(1.24×10^8 CFU/ml), *L. jugurti*(9.1×10^7 CFU/ml), *L. acidophilus*+*L. casei*(4.4×10^7 CFU/ml), *L. casei*(I) (1.5×10^7 CFU/ml)의 순서로 나타났다.

본 실험의 결과에 의하면 여러 종류의 액상요구르트 유산균수를 일률적으로 검사할 경우 혐기성배양, BCP agar, PB, 100배 회석법을 사용하는 것이 적합하다고 사료된다. 또한 요즈음 국내 요구르트 시장도 호상요구르트 등 여러 종류의 제품들이 계속 개발되고 있는 실정으로 유산균수 검사에 있어서 본 실험에서 사용한 조건외에 배양온도 및 plating 방법, 배지 등을 다양하게 사용하여 더욱 정확한 균주별 배양조건을 확립하는 것이 필요하며 요구르트 제품의 질을 향상시키기 위해서는 유산균수뿐 아니라 장내 세균총에 미치는 영향, 장내 정착성과 담즙내성 등을 고려하는 것이 타당하다고 생각되는 바이다. 이러한 유산균의 생리적 특성을 고려한 기초실험결과를 바탕으로 각 제품의 균주 특성에 따른 품질평가 방법을 제시하는 것이 합리적일 것이다.

요 약

본 실험에서는 균주의 특성에 따른 유산균수 시험방법의 적합 여부를 알아보기 위해 액상요구르트 제품들을 유효기간 중 여러 실험조건으로 비교 검토하였다. 비교한 실험조건은 배지(BCP, Elliker agar), 배양상태(aerobic, anaerobic), 회석수(saline, phosphate buffer), 회석방법(10배, 100배)이었으며 37°C에서 72시간 배양하였다. *L. acidophilus* 균주를 사용한 액상요구르트의 경우, 배지와 회석방법에 따른 차이는 거의 없었고 회석수와 배양상태에서는 약간의 차이가 있었다. *L. jugurti* 균주와 *L. acidophilus*+*L. casei* 혼합균주의 경우 배지, 배양상태, 회석수에서 차이가 있었고 회석방법에는 거의 차이가 없었다. *L. casei*의 경우 배지, 회석방법에서 약간의 차이를 나타냈으며 배양상태는 유산균수에 영향이 없었다. *L. bulgaricus*의 경우는 배지, 배양상태, 회석방법에 따라

차이가 있었고 회석수는 차이가 없었다. 그러므로, 요구르트의 유산균수 측정은 균주의 종류에 따라 가장 좋은 실험조건을 선택하여 실시하는 것이 효과적인 시험방법으로 사료된다.

문 헌

1. Metchnikoff, E. : *Ann. Inst. Pasteur Pav.*, 22, 929 (1908)
2. Pasteur, L. : *Me'moire sur la fermentation appele'e lactique. Me'm. Soc. Imp. Sci. Agri. Art Lille Ser. 2*, 5, 13(1858)
3. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol.II. Waverly Press. Inc., (1986)
4. Elliker, P.R., Anderson, A.M. and Hannesson, G. : An agar culture medium for lactic *Streptococci* and *Lactobacilli*. *J. Dairy Sci.*, 39, 1611(1956)
5. Rogosa, M., Mitchell, J.A. and Wiseman, R.F. : A selective medium for the isolation and enumeration of oral and faecal *Lactobacilli*. *J. Bact.*, 62, 132(1951)
6. De Man, J.C., Rogosa, M. and Sharpe, M.E. : A medium for the cultivation of *Lactobacilli*. *J. Appl. Bact.*, 23(1), 130(1960)
7. Briggs, M. : An improved medium for *Lactobacilli*. *J. Dairy Res.*, 20, 36(1953)
8. Oblinger, J.L. and Kennedy Jr., J.E. : Evaluation of diluents used for total counts. *J. Milk Food Technol.*, 39, 114(1976)
9. Huhtanen, C.N., Brazis, A.R., Arledge, W.L., Donnelly, C.B., Ginn, R.E., Randolph, H.E. and Koch, E.J. : A comparison of phosphate buffered and D.W. dilution blanks for the standard plate count of raw milk bacteria. *J. Milk Food Technol.*, 38, 264(1975)
10. Butterfield, C.T. : The selection of a dilution water for bacteriological examination. *J. Bacteriol.*, 23, 355 (1932)
11. Hausler Jr., W.J., Jensen, J.P. and Creamer, C.H. : Interval plating : A simplified method to determine suitability of distilled water as a dilution fluid. *J. Milk Food Technol.*, 39, 848(1976)
12. King, W.L. and Hurst, A. : A note on the survival of some bacteria in different diluents. *J. Appl. Bacteriol.*, 26, 504(1963)
13. 식품공전. 한국식품공업협회, 이문인쇄소(1988)
14. Hull, R.R. and Roberts, A.V. : Differential enumeration of *L. acidophilus* in yoghurt. *Aust. J. Dairy Technol.*, 39, 160(1984)
15. Lee, S.Y., Vedamuthu, E.R., Washam, C.J. and Rein-

bold, G.W. : An agar medium for the differential enumeration of yoghurt starter bacteria. *J. Milk Food Technol.*, 37, 272(1974)

for differentiation of rods and cocci in yoghurt. *J. Dairy Sci.*, 69, 2569(1986)

16. Matalon, M.E. and Sandine, W.E. : Improved media

(1990년 4월 26일 접수)