

전통 안동식혜로부터 젖산균 및 효모의 분리 및 그 특성

김 성 · 손준호 · 우희섭 · 성태수* · 최 청
영남대학교, *창원전문대학

Isolation and Characterization of Lactic Acid Bacteria and Yeast from Traditional Andong sikhe

Sung Kim, Jun-Ho Son, He-Sob Woo, Tae-Su Seung* and Cheong Choi
Department of Food Science and Technology, Yeungnam University
*Department of Food & Nutrition, Changwon Junior College

Abstract

We isolated seventy two lactic acid bacteria and two hundred yeast from traditional Andong sikhe. Microorganisms were isolate from 4 kinds of traditional Andong sikhe. The optimum temperature and pH for growth of sikhe yeast, No. SCS 5, was 30°C and 4.5, respectively. SCS 5 produced CO₂ gas and 1.5% of alcohol in malt extract broth. SCS 5 was identified as *S. cerevisiae* from the observation of shape of vegetative reproduction, morphological and cultural characteristics, fermentation and assimilation of carbon sources, and physiological characteristics.

Key words: Andong sikhe, lactic acid bacteria, yeast

서 론

전통안동식혜는 엿기름, 식혜밥, 고추가루즙, 무, 생강 등을 혼합하여 숙성되는 동안 단맛과 젖산균 등에 의하여 독특한 맛과 향을 생성하는 채소 발효 식품의 한 종류이다.

복합 채소 발효 식품의 발효 초기에는 *Aeromonas* 속과 *Bacillus* 속이 발현하고 이어서 젖산균이 발효를 주도하며 효모가 알코올을 생성하여 향미에 관여한다⁽¹⁾. 젖산균은 장내 세균의 정상화 작용⁽²⁾, 혈장 콜레스테롤의 저하⁽³⁾, 위장관내 병원균 증식 억제 효과⁽⁴⁾ 등이 있는 것으로 알려져 있다. 식물 특히 채소나 향신료의 즙액이나 추출물을 인공배지에 첨가하면 젖산균의 생육이 촉진된다는 연구들이 보고된 바 있다⁽⁵⁻⁸⁾.

젖산균과 효모의 혼합 발효시 두 균주의 상호작용을 살펴보면, 먼저 젖산균이 채소류 발효에 관여하며⁽⁹⁾, 효모는 젖산균의 증식이 거의 중단된 후 잔유당을 이용하여 성장한다고 한다⁽¹⁰⁾. 주 발효동안 당은 젖산균과 효모에 의해 젖산과 알코올 및 다른 최종산물로 전환되는데 당이 발효동안 불충분하게 발효할 경우 그

대사 생성물은 효모에 의해 발효가 일어난다⁽¹¹⁾. 산도가 높아져 젖산균의 생육이 정지되어도 효모는 계속 생육을 하며 잔유당을 소비함으로써 발효당의 이용능이 높아지며 당을 알코올로 전환시켜 젖산균의 단독발효로 인해 생산되는 젖산량을 조절하여 주면 적절한 산도와 향미를 부여하여 준다⁽¹¹⁾.

따라서 본 연구는 전통안동식혜의 발효 중에 존재하는 대표적인 젖산균과 효모를 순수분리하여 이들 균주를 형태학적, 배양적 및 생리적 특성에 따라 동정하여 분리 균주의 단독, 혼합 발효양상을 조사하여 공정 최적화를 기하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

시료 안동식혜를 제조하기 위한 재료로는 1996년 2월에 대구시 농협공판장에서 구입한 참쌀(*Japonica* type), 무(*Raphanus sativus* L. radish), 생강(*Zingiber officinale* Ginger), 고추가루(*Capsicum annum* L.)를 사용하였다.

안동식혜 제조

최 등⁽¹²⁾이 보고한 경상도 전통안동식혜(이하 안동식

Corresponding author: Cheong Choi, Department of Food Science and Technology, Yeungnam University, Kyeongsan, 214-1, Korea

해)의 제법에 따라 제조하였다. 쌀을 12시간 침지, 물 빼기를 한 다음 100°C에서 30~40분간 증자하여 식혜 밥을 만들었다. 맥아는 15°C에서 7일간 발아시킨 것을 분쇄기로 갈아 20 mesh 이상을 분리하여 고반, 정치시킨 다음 cheese cloth로 여과하여 상징액을 얻는다. 고추가루는 여과된 엿기름물에 넣어 고추물을 추출하였다. 준비된 식혜밥, 3 mm³로 잘게 썬 무, 생강즙, 고추가루 추출물 및 엿기름을 혼합하여 40°C에서 4시간 당화한 후 5°C에서 냉장고 보관하였다.

젖산균의 분리 동정

젖산균의 분리는 Shiogeo와 Toshio 등⁽¹³⁾의 방법 따라 선택배지에서의 전형적인 colony로 젖산균을 분리 동정하였다. 시료 0.1 mL를 m-Enterococcus agar (Difco사)에 도달하여 30°C에서 3일간 배양하여 *Lactococcus* sp.는 붉은색을 *Pediococcus* sp.는 흰색의 집락으로 구분하였고 MRS broth (Difco사)에 0.002% bromophenol blue를 첨가한 선택배지에서 *Lactobacillus* sp.는 전체적으로 담청색 혹은 전체적으로 흰색의 집락, *Leuconostoc* sp.는 전체적으로 암청색의 환이 나타나지 않는 집락으로 구분 분리하였다.

젖산균의 동정은 시료즙액을 Elliker agar (Difco사), MRS agar (Difco사) 평판배지에서의 산 생성능으로 분리하여 Gram 염색, litmus milk의 변화, catalase test, diacetyl 생성검사, salt-tolerant test, arginine으로부터 NH₃ 생성등을 조사하고 그 결과를 Bergey's manual⁽¹⁴⁾, Sharpe⁽¹⁵⁾, Gibbs와 Skinner⁽¹⁶⁾의 방법에 따라 동정하였다.

효모의 분리 및 동정

효모의 분리는 안동식혜를 균질화하여 냉각된 증류수에 혼합한 후 살균된 cheese cloth로 여과하여 pH 3.5로 조정된 malt extract broth (Difco사, 이하 MB)에 1.0% (v/v) 접종하여 48시간 배양한 다음 malt extract agar (Difco사, 이하 MA) 평판 배지에서 효모를 분리하였으며, 동정은 형태학적 검사와 Analytical Profile Index (API) 20C AUX (bioM rieux, France)에 의한 생화학적 검사를 실시하여, Lodder⁽¹⁷⁾와 Kreger-van⁽¹⁸⁾의 분류기준에 의하여 동정하였다.

총균수, pH 및 적정산도 측정

총균수는 시료를 멸균한 0.1% peptone수로 희석한 1 mL를 Bromo cresol purple (BCP) agar (pH 6.0)에 pouring culture method로 접종한 다음 30±1°C와 37±1°C에서 3일 배양한 후 계수하였으며, 혐기성균은 CO₂

incubator에서 배양하면서 측정하였다⁽¹⁹⁾. pH 및 적정산도(젖산 함량)는 시료를 마쇄한 후 여과액을 pH meter로 측정하였으며 산도는 AOAC⁽²⁰⁾의 방법에 따랐다.

효모의 CO₂ 측정

분리된 효모의 CO₂ 생성량 조사를 위해 각각 MB에 한 백금이씩 접종한 후 진탕배양(120 strokes/min)하면서 Durham tube⁽²¹⁾를 사용하여 CO₂ 가스생성정도를 측정하였다.

알코올 함량측정

알코올 생성량 조사는 Bassete와 Ward의 방법⁽²²⁾에 따라 malt extract broth에 접종한 후 4시간 간격으로 채취한 시료 10 mL를 증류용 플라스크에 넣어 증기 발생용 플라스크(1 mL/min)에 연결하였으며, 농축기 끝은 얼음을 가득 채운 ice bath에 넣은 원추형 시험관에 연결하여 4°C이하로 유지하였다. 열을 가하여 5 mL의 증류액을 모아 GC 분석용 시료로 하였다. 표준 물질로는 ethanol을 사용하였다.

효모의 배양특성

MB 배지에서의 최적 성장온도, 탄소원 및 질소원 종류에 따른 효소 생산의 변화, pH 변화, 적정산도 등의 배양특성을 조사 하였다.

결과 및 고찰

젖산균의 분리 및 동정

전통적인 방법에 따라 제조된 안동식혜로부터 젖산균 72 주를 1차 분리하였고 이중 성장이 우수하고 산생성력이 강한 3균주를 2차 선별하여 이들을 LLS 56, LBS 10 및 LAS 47 이라 명명 하였다. 선별된 균들의 형태학적, 배양학적, 생리학적 특성을 검토한 결과(Table 1), 3균주들은 gram 양성이고, 운동성이 없으며, 포자를 형성하지 않는 통성협기성의 간균과 구균으로 catalase와 oxidase는 음성이었고, glucose에서 젖산을 생성하는 등 모든 특성들이 젖산균의 일반적인 특성들과 잘 일치하였다.

LLS 56은 arginine에서 NH₃를 생성하고, lactose, galactose, maltose 및 fructose는 발효하였다. 이상과 같은 LLS 56의 특성은 *Lactococcus lactis*와 거의 일치하므로 *Lactococcus lactis* LLS 56으로 동정하였으며, LBS 47은 *Lactobacillus bulgaricus* LBS 47로 LAS 10은 *Lactobacillus acidophilus* LAS 10으로 각각

Table 1. Characteristics of lactic acid bacteria isolated from Andong sikhe

Characteristics	<i>L. bulgaricus</i> LBS 47	<i>L. acidophilus</i> LAS 10	<i>Lc. lactis</i> LLS 56
Gram stain	+ ¹⁾	+	+
Shape	rods & chain	rods	pair & chain
Cell size	1.4 μm	0.9 μm	0.3 μm
Motility	- ²⁾	-	-
Colony form	circular	circular	circular
Elevation	raised	raised	raised
Margin	convex	convex	smooth
Pigment	yellow	yellow	white
Broth	sediment	sediment	sediment
Gelatin	-	-	-
Catalase	-	-	-
Oxidase	-	-	-
Ammonia from arginine	-	-	+
Growth at 50°C	+	+	-
Growth at 10°C	+	+	+
Growth at pH 9.5	-	-	-
Starch	-	-	-
<u>Fermentation of carbon sources</u>			
Lactose	+	+	+
Galactose	+	+	+
Sorbitol	+	-	v ³⁾
Mannitol	+	+	v
Maltose	+	+	+
Sucrose	+	+	-
Fructose	+	+	+
Cellobiose	+	-	-
Inositol	-	-	-
Inulin	-	-	-
L-Arginine	-	-	+
D-Glucose	+	+	+
Malate	-	-	-
Citrate	-	-	-

¹⁾+: positive response.

²⁾ -: negative response.

³⁾V: variable response.

동정하였다.

배양시간에 따른 균수측정, pH 및 적정산도

안동식혜에서 분리한 LBS 47과 LAS 10균주를 MRS 배지(pH 6.5)에 각각 접종하여 성장의 변화를 나타낸 결과 Fig. 1와 같다. 두 균주 모두 배양 12 시간에 5.2×10^8 CFU/mL, 2.8×10^8 CFU/mL로 성장유도기였으며 배양 20시간에 1.7×10^9 CFU/mL로 성장정지기에 도달하였다. LLS 56 균주는 Elliker배지(pH 6.5)에 단독접종하여 배양한 결과(Fig. 2), 배양 12 시간에 5.1×10^6 CFU/mL로 성장유도기로 나타났으며 배양 24시간에 4.8×10^6 CFU/mL로 정지기에 도달하였다.

이러한 결과는 Mikolajcik와 Hamdam⁽²³⁾에 의한 *L. acidophilus*의 성장정지기 12시간과 비슷하였다. 이는 Subramania와 Shanker⁽²⁴⁾에 의한 *L. acidophilus*-111과

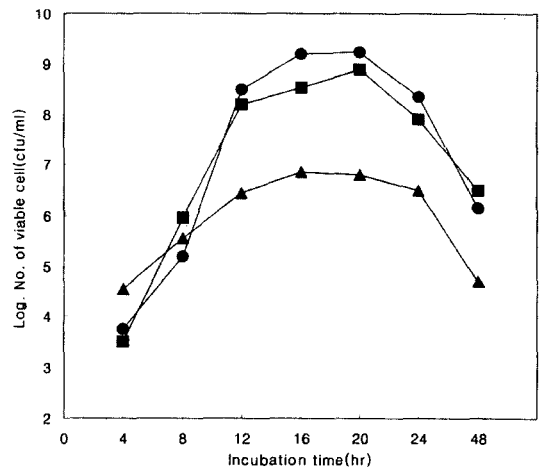


Fig. 1. Growth curve of *L. bulgaricus*. LBS 47: ●—●, *L. acidophilus* LAS 10: ■—■, *Lc. lactis* LLS 56: ▲—▲

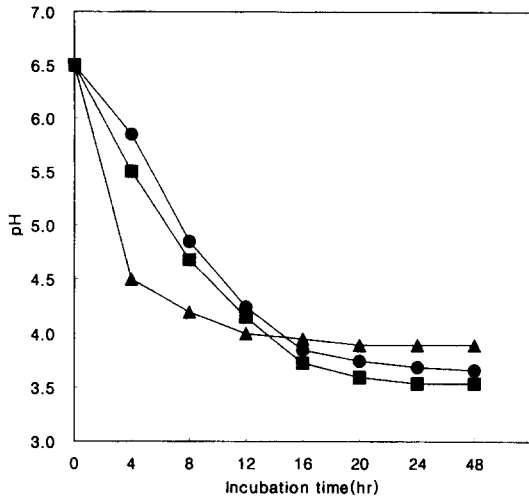


Fig. 2. pH changes during incubation of *L. bulgaricus*. LBS 47: ●—●, *L. acidophilus* LAS 10: ■—■, *L. lactis* LLS 56: ▲—▲.

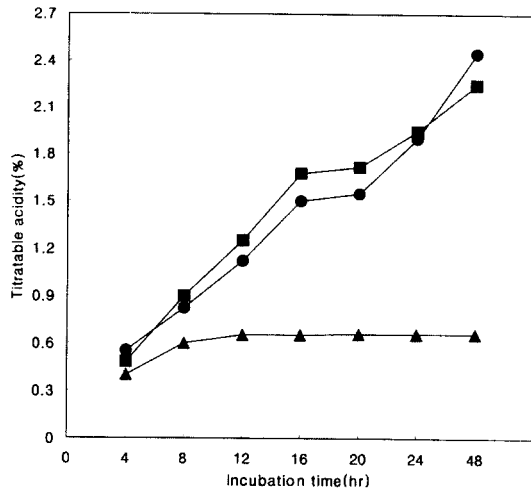


Fig. 3. Changes in titratable acidity during fermentation of *L. bulgaricus*. LBS 47: ●—●, *L. acidophilus* LAS 10: ■—■, *L. lactis* LLS 56: ▲—▲.

1899의 37°C 배양에서 산도 0.19%와 0.24%보다 높게 나타났다.

LBS 47과 LAS 10 균주는 MRS broth에서 37°C에, LLS 56은 Elliker broth에서 30°C에 배양하여 pH 및 적정산도의 변화를 관찰한 결과 Fig. 2, 3과 같다. LLS 56균주는 다른 균주들에 비해 pH가 급격히 떨어져서 배양 12시간에 pH 4.2에 달하였고 LBS 47과 LAS 10균주는 배양 48시간까지 완만하게 낮아졌다. 그러나 3균주 모두 배양 12시간에서 48시간까지는 pH는 3.7~4.2으로 큰 변화는 나타나지 않았다. 적정산도는 LLS

56균주가 배양 4시간에서 8시간에 0.40~0.62 %의 약간 증가하였을 뿐, 그 이후에는 거의 변화가 없었으나, LBS 47과 LAS 10균주의 경우는 배양 48시간까지 배양 초기 0.40~2.30%의 급격하고도 지속적인 증가를 나타내어 LAS 56균주와는 전혀 다른 양상을 보였다.

효모의 분리 및 동정

안동식혜에서 분리된 효모, SCS 5의 형태학적, 배양학적 및 API 20 C AUX analytab kits를 이용한 생화학적 특징은 Table 2, 3과 같다. 효모 SCS 5는 약간 긴 ovoid형이며 분열은 多面(multilateral)에 의해 분열되는 것으로 나타났다. 집락의 형태는 원형으로서, 가운데 부위는 약간 볼록하며, 가장자리는 매끄럽게 나타났다. carotenoid색소의 반응색채는 황갈색을 나타내었고, 집락의 표면과 색채는 호리면서도 부드럽게 나타났다으며, 조직은 점성이 있었다.

탄소원에 따른 이용능은 glucose, galactose, maltose, sucrose 및 raffinose 등은 발효하였으며 glucose, galactose, sorbitol, α-methyl-D-glucoside, maltose, sucrose 및 raffinose 등은 소화하였다. 이상의 실험에서 나타난 결과들로 보아 안동식혜에서 분리된 SCS 5는 *Sacchromyces cerevisiae* SCS 5로 동정하였다. 이는 Kosikowski⁽²⁵⁾, Liu와 Moon⁽²⁶⁾, Marshall 등⁽²⁷⁾의 보고들과 유사한 결과를 나타내었다.

분리균의 특성

Durham tube를 이용하여, SCS-5 균주의 가스 생성 여부를 조사하여 470개의 순수 효모 집락 중 가장 강한 CO₂ 가스 생성을 나타 내었으므로 식혜제조에 이

Table 2. Characteristics of *S. cerevisiae* SCS 5 isolated from Andong sikhe

	Characteristics
<u>Liquid media (MB)¹⁾</u>	
Shape of vegetative cells	ovoid
Vegetative reproduction	budding (multilateral)
Cell size	2.5~5.5 μm
Ascospore	absent
Pseumycellium	present
True-mycellium	absent
<u>Solid media (MA)²⁾</u>	
Surface	circular
Margin	entire
Elevation	tan
Color	shiny
Mucoid	coherent

¹⁾MB: Malt extract broth.

²⁾MA: Malt extract agar.

Table 3. Fermentation and assimilation of carbon sources by *S. cerevisiae* SCS 5 isolated from Andong sikhe

Carbon Compounds	Assimilation	
	24 hr ²⁾	48 hr ³⁾
Glucose	+	+
Galactose	+	+
Cellobiose	-	-
Lactose	-	-
Maltose	+	+
Sucrose	+	+
Trehalose	-	-
Melizitose	-	-
Raffinose	+	+
Carbon compounds	+	+
Glucose	-	-
Glycerole	-	-
2-Keto-D-gluconate	-	-
L-Arabinose	-	-
D-Xylose	-	-
Adonitol	-	-
Xylitol	+	+
Galactose	-	-
Inositol	+	+
Sorbitol	+	+
α-Methyl-D-glucoside	-	-
N-Acetyl-D-glucosamine	-	-
Cellobiose	-	-
Lactose	+	+
Maltose	+	+
Sucrose	-	-
Trehalose	-	-
Melezitose	+	+
Raffinose	+	+

*+: positive -: negative

¹⁾MP: malt extract+bacto peptone

Fermentation at 30°C for 24 hours to obtain a ²⁾first reading and 48 hours to obtain a ³⁾second reading

용하였다. SCS 5균주를 MB (pH 5.4)에서의 알코올 생성정도를 측정한 결과는 Fig. 4와 같다. 배양 4시간 대에 약 10%의 알코올이 생성되기 시작하여 배양 32시간대에는 약 15%의 알코올이 생성되었다. MB (pH 5.4)에 SCS 5균주 1.0% (v/v)의 균현탁액을 접종하여 4-45°C의 범위에서 36시간 진탕배양한 후 660 nm에서 균의 성장을 측정한 결과(Fig. 5), 15°C에서 40°C의 넓은 범위에서 성장을 하였으며 30°C에서 가장 높게 나타났다.

이는 *K. fragilis*⁽²⁸⁾, *T. versatilis* M6과 *T. sphaericae* J28⁽²⁹⁾, *C. pseudotropicalis* NCYC 744⁽³⁰⁾, *K. lactis*⁽³¹⁾의 최적성장온도가 30°C인 것과 비교해 본 결과는 유사하였다.

1.0% (v/v)의 균 현탁액을 접종하고 진탕 배양하면서 8시간 간격으로 채취한 배양물의 균수를 측정한 결

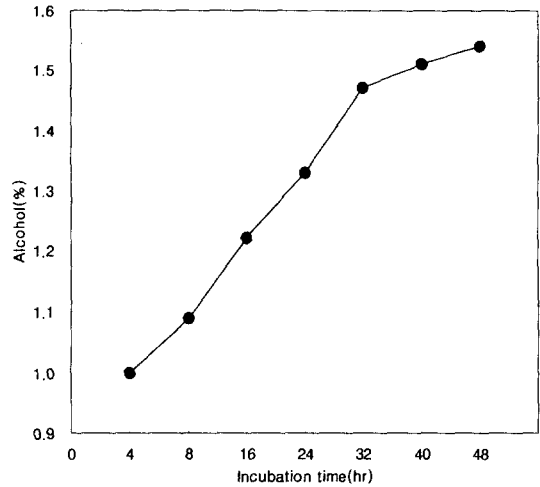


Fig. 4. Alcohol production of *S. cerevisiae* SCS 5 during incubation at 30°C in malt extract broth (pH 5.4).

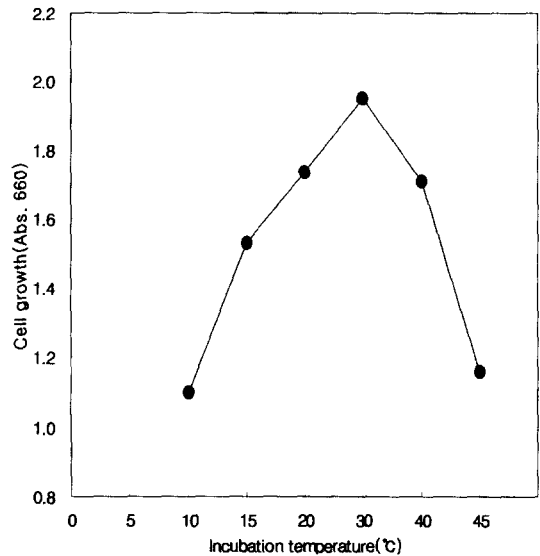


Fig. 5. The growth of *S. cerevisiae* SCS 5 in malt extract broth (pH 5.4) for 45 hrs at different temperatures.

과 Fig. 6에서 보는바와 같이 배양 32시간에 4.9×10^9 CFU/mL로 성장정지기에 도달하였으며 배양 40시간에 1.8×10^9 CFU/mL로 서서히 사멸기로 접어들었다. SCS 5 균주의 균현탁액을 MB에 1.0% (v/v)접종하여 28시간 동안 배양하면서 pH와 적정산도의 변화를 관찰한 결과 Fig. 7과 같다. pH와 적정산도의 변화는 배양 12시간에 pH 4.5과 적정산도 1.23%의 빠른 산생성을 보였으며, 배양 28시간에는 pH 3.3과 산도 0.45% 이었다.

이러한 결과는 Subramanian와 Shanker⁽²⁴⁾에 의한 *S.*

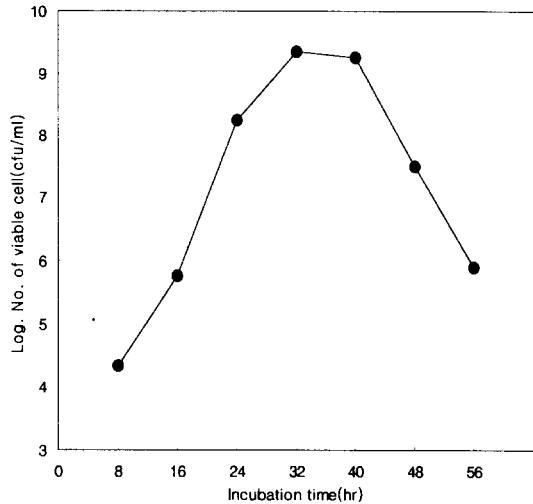


Fig. 6. Cell growth of *S. cerevisiae* SCS 5 in malt extract broth at 30°C.

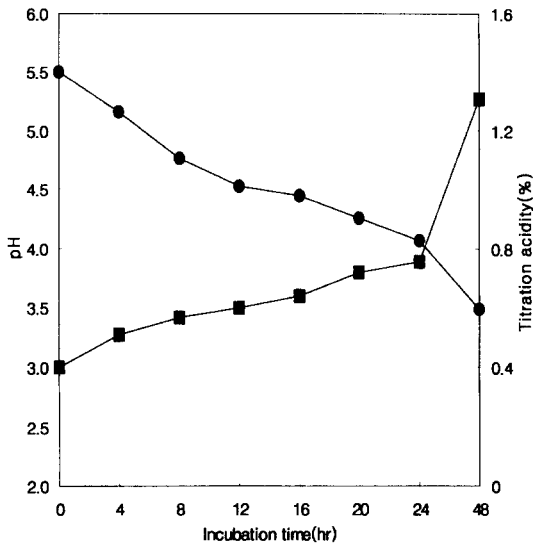


Fig. 7. Changes of pH and titratable acidity during incubation with *S. cerevisiae* SCS 5 in malt extract broth at 30. pH: ●—●, TA: ■—■

*fragilis*의 경우 33°C에서 배양 20시간에 산도 0.34%보다도 높게 나타났으며, 37°C에서 산도 3.38%보다는 낮았다.

요 약

전통안동식혜로부터 젖산균 *L. bulgaricus* LBS 47, *L. acidophilus* LAS 10 및 *Lc. lactis* LLS 56와 효모 *S. cerevisiae* SCS 5을 분리하였다. 분리동정한 균들의 pH, 적정산도 및 균수의 변화를 관찰한 결과, SCS 균

주는 배양 4시간에 pH 4.5으로 가장 낮았으며 LBS과 LAS 균주의 적정산도는 배양 초기 0.40~2.30%로 SCS 균주 보다 큰 변화를 나타내었다. LBS과 LAS 균주의 성장변화는 두 균주 모두 배양 20시간에 1.7×10^6 CFU/mL로 성장 정지기에 도달하였다. SCS 균주는 배양 12시간에 4.8×10^6 CFU/mL로 정지기에 도달하여 SCS 균주가 LBS과 LAS 균주에 비해 균 성장온은 유사하였으나 균수에 있어서는 낮은 결과를 나타내었다. 효모 SCS 균주의 최적 성장온도는 30°C로 나타났다. pH와 적정산도는 배양 12시간에 pH 4.5와 적정산도 1.23%의 빠른 산생성을 보였으며, 균수의 변화는 배양 32시간에 4.9×10^6 CFU/mL로 성장정지기에 도달하였다.

문 헌

- Fleming, H.P., Mcfeeters, R.F. and Thompson, R.L.: Test for susceptibility of fermented vegetables to secondary fermentation. *J. Food Sci.*, **48**, 982-989 (1983)
- Lidbeck, J.G. and Nord, C.E.: Impact of *Lactobacillus acidophilus* on the normal intestinal flora after administration of two antibiotic agents. *Infection.*, **16**, 329-336 (1987)
- Suzuki, Y. and Kaizu, H.: Effect of cultured milk on serum cholesterol concentration in rats which were fed high-cholesterol diets. *Anim. Sci. Technol.*, **62**, 565-567 (1991)
- Reid, G., Bruce, A.W., McGroarty, J.A., Cheng, K.J. and Costerton, J.W.: Is there a role for lactobacilli in prevention of urogenital and intestinal infections. *Clin. Microbiol. Rev.* **3**, 335-344 (1990)
- Stamer, J.R.: Lactic acid fermentation of cabbage and cucumber. In *Biotechnology*, Reed, G.(ed.), Verlage Chemie., **5**, 369 (1983)
- Lewis, C.B., Sun, S. and Montville, T.J.: Production of an amylase-sensitive bacteriocin by at typical *Leuconostoc paramesenteroides* strain. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 143-150 (1992)
- Metcalf, D.G., Hucker, J. and Carpenter, D.C.: A growth factor in certai vegetable juices. *J. Bacteriol.*, **51**, 381-389 (1946)
- Nes, I.F. and Skjelkvale, R.: Effect of natural spices and oleoresins on *Lactobacillus plantarum* in the fermentation of dry sausage. *J. Food Sci.*, **47**, 1618-1625 (1982)
- Daeschel, M.A., Fleming, H.P. and Mcfeeters, R.F.: Mixed culture fermentation of cucumber juice with *Lactobacillus plantarum* and yeasts. *J. Food Sci.*, **53**, 862-869 (1988)
- Fleming, H.P.: Vegetable Fermentations, In "Economic Microbiology" Vol 7. Academic Press. Inc., London, England (1982)
- Fleming, H.P., Mcfeeters, R.F., Thompson, R.L. and Sanders, D.C.: Storage stability of vegetable fermented with pH control. *J. Food Sci.*, **48**, 975-982 (1983)
- Choi C., Seog, H.M., Cho, Y.J., Lim, S.I. and Lee W.J.: A study on establishment of the fermentation process for

- traditional andong *Sikhe* (in Korean). *Korean J. Food Sci. Technol.*, **22**, 724-731 (1990)
13. Miyao, S. and Ogawa, T.: Selective media for enumerating lactic acid bacteria groups from fermented pickles, *Nippon Shokuhin Gakkaish.* **35**, 610-617 (1988)
 14. Kandler, O. and Weiss, N.: Regular, nonsporng Gram positive rods. In Bergeys's Manual of systematic Bacteriology, Sneath, P. H. A., Mair, N. S., sharpe, M. E. and Holt, J. G.(ed.), williams and wilkins, Baltimore. 1, 1208 (1986)
 15. Sharpe, M. E.: Enumeration and studies on Lactobacilli in food products, *Dairy Sci. Abstr.*, **24**, 165 (1962)
 16. Gibbs, B.M. and Skinner, F.A.: Identification methods for microbiologists, A.P. London, New York (1966)
 17. Lodder, T.: The yeasts, North-Holland publishing Co., Netherand, 1st (1970)
 18. Kreger-van Rij, N.J.W.: *The yeasts* : A taxonomic study, Elsevier Science publishers B. V. Amsterdam (1984)
 19. Marth, E.H.: Standard methods for the examination of dairy products, 14th ed. Am. Publ. Health Assoc., Inc., Washington, DC. (1978)
 20. A.O.A.C.: *Official methods of analysis* (13th) official methods of analysis of the association of official analytical chemists (1990)
 21. Bensen, H.J.: Microbiological applications; *A laboratory manual in general microbiology*, 4th. ed. Wm. C. Brown Publishers (1985)
 22. Bassette, R. and Ward, G.: Measuring parts per billion of volatile materials in milk. *J. Dairy Sci.*, **58**, 428-435 (1975)
 23. Mikolajcik, E. M., and Hamdan, I.Y.: *Lactobacillus acidophilus*, I : Growth characteristics and metabolic products. *Cultured dairy products J.*, **11**, 432-439 (1975)
 24. Subramanian, P. and Shanker, P.A.: Commensalistic interaction between *Lactobacillus acidophilus* and lactose-fermenting yeasts in the preparation of acidophilus-yeast milk. *Cultured dairy products J.*, **17**, 243-250 (1985)
 25. Kosikowski, F.V.: Cheese and fermented milk foods, 2nd ed., Edward Brothers. Inc. Ann Arbor, Michigan. 37-42 (1977)
 26. Liu, J.A.P. and Moon, N.J.: Kefir-A 'New' fermented milk products. *Cultured Dairy Products J.*, **18**, 11-12 (1983)
 27. Marshall, V.M., Cole, M.W. and Brooker, B.E.: Observations on the structure of kefir grains and the distribution of the microflora. *Journal of Applied Bacteriology.* **57**, 491-497 (1984)
 28. Mahoney, R.R., Nickerson, T.A. and Whitaker, J.R.: Selection of strain, growth conditions and extraction procedures for optimum production of lactose from *Kluyveromyces fragilis*. *J. dairy sci.*, **58**, 1620-1627 (1975)
 29. Itoh, T., Suzuki, M. and Adachi, S.: Production and characterization of β -galactosidase from lactose-fermenting yeast. *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 899-906 (1982)
 30. Castillo, F.J. and Moreno, B.: Properties of lactose produced by *Candida pseudotropicalis* NCYC 744. *J. Dairy Sci.*, **66**, 1616-1623 (1983)
 31. Dickson, R.C., Dickson, L.R. and Markin, J.S.: Purification and properties of an inducible β -galactosidase isolated from the yeast *Kluyveromyces lactis*. *J. Bacterial.*, **137**, 51-58 (1979)