

*Lactobacillus acidophilus*와 *Bifidobacterium bifidum*의 발효 유제품내의 성장

백 현 임 · 허 태 련
인하대학교 공과대학 생물공학과

The Growth of *L. acidophilus* and *B. bifidum* in Fermented Milk Product

Hyun-Im Baek and Tae-Ryeon Heo
Dept. of Biotechnology, College of Engineering
Inha University, Incheon 402-751, Korea

ABSTRACT

The optimal condition for manufacturing the yoghurt by using *B. bifidum* and *L. acidophilus* was studied. Optimal growth condition of *B. bifidum* and fermentation effects of *B. bifidum*, *L. acidophilus* and *Str. thermophilus* in mixed culture were investigated separately. Fermentation conditions of *B. bifidum* was optimized in 12% reconstituted skim milk.

The addition of BIOS 2000 to 12% skimmilk was effective on the growth and acid production of *B. bifidum*. There was asymbiosis among *B. bifidum*, *L. acidophilus* and *Str. thermophilus* in mixed culture which resulted in higher viable cell numbers and acid production. The optimum production of yoghurt was achieved by incubation at 37°C for 8 hours with 5% mixed starter culture (*B. bifidum*+*L. acidophilus*+*Str. thermophilus*). In this case the effective ratio of *B. bifidum*: *L. acidophilus*: *Str. thermophilus* was 2:1:1 on both acid production and viable cell counts.

서 론

Bifidobacteria는 1899년 Pasteur 연구소의 Tissier가 유아의 분변에서 처음으로 분리하여 *Bacillus bifidus*라고 명명하였다(1). Bifidobacteria는 혐기성이고 Gram 양성으로 산균이며 최적 성장 온도는 36~38°C이고 최적 pH는 6.5~7.0이다(2).

Mutai등(3)은 모유영양아의 장내 균총 중에서 이균이 가장 우세하게 나타나는 세균이라고 하였고, Bullen등(4)에 의하면 인공영양아에 비하여 모유영양아에서 bifidobacteria가 많이 검출되었다고 보고하였다.

Bifidobacteria의 유익한 생리작용에 대하여 Bullen(4)은 장내 부패세균의 억제작용을 보고하였으며, Mata등(6)은 Salmonella, Shigella 및 장내병원성 대장균의 장감염에 대하여 보호작용이 있다고 하였다. Mizutani등(7)

은 간질환에 치료효과가 있다고 하였으며 Mutai등(3)은 부패성 bacteria의 성장과 독성 아민류의 생산을 억제하고 phosphoprotein phosphatase의 작용에 의하여 카제인을 탈인산화하여 소화를 증진시키며 유산, 초산, 개미산 등의 생성으로 장내 pH를 저하시키므로써 병원성 세균의 성장을 억제한다고 보고하였다. 강등(8)은 한국 성인의 분변으로부터 bifidobacteria를 분리하여 우유에서의 생육을 관찰하였으며, *Bifidobacterium longum*에 의한 병원성 *E. coli* A2의 생육 저해를 보고하였고(9), 고등(10)은 우유에서의 *B. bifidum*의 성장에 관한 연구로 발효유제품의 제조가능성을 조사하였다.

이러한 Bifidobacteria의 영양적 효과와 질병의 예방 및 발효유제품 생산시의 장점으로 인하여 일본 및 유럽 등지에서는 bifidobacteria를 이용한 제품이 상품화되어 있으나(11, 12) 우리나라에서는 이에 관한 연구나 이관

을 이용한 제품개발이 미진한 상태에 있다. 그 이유로는 bifidobacteria가 편성 혐기성균이고 영양요구가 까다로우며 우유에서의 산 전진이 느리기 때문이다. 또한 Heterofermentative Pathway(fructose-6-phosphate shunt)에 의하여(13) 젖산과 초산을 2:3의 비율로 생성하므로 초산등에 의한 자극성의 냄새와 맛 때문에 기호성의 저하를 나타내기 때문이다.

Cheung과 Nagasawa(14)는 Bifidobacterium과 Lactobacillus와의 혼합 배양의 경우는 각각의 단독배양에 비하여 생균수와 산도가 크게 증가되었으며 B. brevis와 L. acidophilus 또는 B. infantis와 L. acidophilus의 경우는 단독배양에 비하여 L. acidophilus의 생균수는 약간 떨어지나 Bifidobacterium은 크게 증가 되었다고 하였다. 또한 고(12)에 의하여 B. bifidum, L. casei와 Str. thermophilus의 혼합 배양에 대한 보고가 있었다.

L. acidophilus의 효과로서 Kim keating(15)은 acidophilin, acidolin, lactobacillin, lactocidin과 lactolin등의 항균물질에 의하여 유해세균의 억제와 위장염, 설사, 피부병, herpes, aphtha 구내염 등에 유효하였으며, 그외에도 항암물질에 의하여 위암 억제에도 유효하였다고 보고 하였고, Speck(16)도 L. acidophilus의 장내성장 가능성과 식이작용, 건강증진작용에 대하여 보고하였다.

본 연구에서는 bifidobacterium을 이용한 요구르트 제조를 위하여 B. bifidum의 우유에서의 최적 배양조건과 L. acidophilus 및 Str. thermophilus와 혼합배양시의 발효효과를 조사하여 요구르트 제조의 최적조건을 조사하는 것을 연구목적으로 하였다.

재료 및 방법

균주 및 배양조건

본 실험에 사용한 균주는 Denmark의 CHR. Hansen's Laboratory에서 분양받은 냉동건조 형태의 Bifidobacterium bifidum 12 및 Streptococcus thermophilus CH-1, 01606와 한국미생물보존센터(KCCM)에서 사면배지의 형태로 분양받은 Lactobacillus acidophilus ATCC 11506이었다.

이들 균주의 배양방법은 B. bifidum은 BL배지를 시험관에 분주하여 115℃로 15분간 멸균한 후 냉동 건조 형태의 B. bifidum을 접종하여 37℃에서 7시간씩 2회 계대 배양하였다. 이때 산소접촉을 피하기 위하여 유동과라핀을 사용하였으며 1주에 한번씩 pasteur capillary pipette (Superior, W-Germany)으로 계대배양하여 실험에 사용하였다. BL배지의 조성은 Rasic과 Kurmann의 방법과 같다(13). Liver extract solution은 50~60℃에서 1시간

동안 170ml 증류수로 추출하고 10분동안 끓인 후 여과하였다. L-cysteine hydrochloride를 제외한 배지의 모든 성분을 물에 녹여 pH 7.2로 조정한 후 120℃에서 10분간 멸균하였으며 이것을 50℃까지 냉각한 후 5%로 제조된 L-cysteine hydrochloride를 첨가하여 사용하였다.

L. acidophilus는 Lactobacillus MRS agar (Difco) 배지에 사면배지 형태의 L. acidophilus를 백금선으로 접종하여 37℃에서 48시간 배양하여 보관용으로 1개월에 한번씩 계대하고 이것을 다시 Lactobacillus MRS broth (Difco)에 접종하여 37℃에서 12시간 배양하고 이를 다시 멸균된 10% 환원탈지유에 1% 접종하여 37℃로 15시간 2회 계대배양한 것을 실험에 사용하였다.

Str. thermophilus는 냉동 건조 형태의 균주를 멸균된 10% 탈지유에 접종하고 42℃에서 6시간 2회 계대배양하여 실험에 사용하였다.

기질의 농도 및 열처리 효과에 의한 B. bifidum의 성장

실험에 사용된 배지는 멸균 탈지유를 사용하였으며 고형분 함량은 10%, 12%와 15%로 구분하고 2%의 B. bifidum을 접종한 후 37℃에서 배양하면서 48시간 동안 12시간 간격으로 시료를 채취하여 적정산도를 측정하였다.

또한 B. bifidum 성장을 위한 탈지유의 열처리 효과를 알아보기 위하여 85℃/30min, 85℃/15min, 95℃/30min, 95℃/15min와 121℃/15min로 열처리한 탈지유에 2%의 B. bifidum을 접종하여 48시간 동안 12시간 간격으로 적정산도를 측정하였다.

성장촉진물 첨가에 의한 B. bifidum의 성장

위의 실험에서 결정된 농도와 열처리를 받은 환원탈지유에 균성장 촉진물로서 yeast extract, L-cystein·HCl, glucose와 BIOS 2000(Wiesby)를 첨가하고 37℃에서 배양

Table 1. Composition of control and treatments

Sample No.	Microorganisms and additives
Control	B. bifidum + 0
Treat. 1	B. bifidum + 0.05% L-cystein·HCl
Treat. 2	B. bifidum + 0.2% yeast extract
Treat. 3	B. bifidum + 1% glucose
Treat. 4	B. bifidum + 0.2% yeast extract + 1% glucose
Treat. 5	B. bifidum + 1% BIOS 2000
Treat. 6	B. bifidum + 1% BIOS 2000 + 0.2% yeast extract

하면서 pH, 적정산도 및 생균수의 변화를 24시간 동안 12시간 간격으로 측정하여 대조구와 비교하였다. 본 실험에 사용된 대조구(control)와 실험구의 조성은 Table 1과 같다.

L. acidophilus, Str. thermophilus와의 혼합 배양시의 B. bifidum의 성장

일반 유산균과의 혼합배양시의 *B. bifidum*의 성장효과를 알아보기 위하여 *B. bifidum*을 *L. acidophilus* 및 *Str. thermophilus*와 37℃에서 24시간 혼합배양한 후 pH, 적정산도 및 생균수를 측정하였다. 실험에 사용된 대조구와 실험구의 조성은 Table 2와 같다. 이상의 실험 결과로 나온 혼합배양액의 적당한 배양시간을 찾기 위하여 37℃에서 배양하면서 3시간 간격으로 pH, 적정산도 및 생균수를 측정하였다.

Table 2. Composition of microorganisms of control and treatments

sample No.	Mixture ratio of microorganisms
Control	<i>B. bifidum</i> (2%) + 0
Treat. 1	<i>B. bifidum</i> (1%) + <i>L. acidophilus</i> (1%)
Treat. 2	<i>B. bifidum</i> (1%) + <i>Str. thermophilus</i> (1%)
Treat. 3	<i>B. bifidum</i> (1%) + <i>L. acidophilus</i> (0.5%) + <i>Str. thermophilus</i> (0.5%)

혼합배양액(Mixed Culture)의 저장 중의 변화

제조된 혼합배양액을 4℃에 냉장 저장하면서 12일 동안 1~2일 간격으로 pH, 적정산도 및 생균수의 변화를 분석하여 적당한 계대시간을 조사하였다.

요구르트 제조 및 저장중의 변화

위에서 제조된 혼합배양액을 스타터로 하여 요구르트 제조시 요구르트 배양온도와 스타터 접종량을 각각 32℃, 37℃, 42℃와 3%, 5%, 8%로 구분하여 배양하면서 2시간 간격으로 pH와 적정산도를 측정함으로써 요구르트의 배양시간과 조직을 비교하여 요구르트 제조의 최적 조건을 조사하였다.

또한 스타터로 접종되는 균주의 비율이 요구르트 품질에 미치는 영향을 조사하기 위하여 세 균주의 비율을 달리하여 요구르트 배양중의 pH, 적정산도 및 생균수를 2시간 간격으로 측정하였다.

요구르트 제조방법(17)은 Fig. 1과 같다. 요구르트 제조에 이용되는 원료유는 pH 및 적정산도 측정, 메틸렌 블루 환원 시험(Methyleneblue Reduction Test) (18), 항생

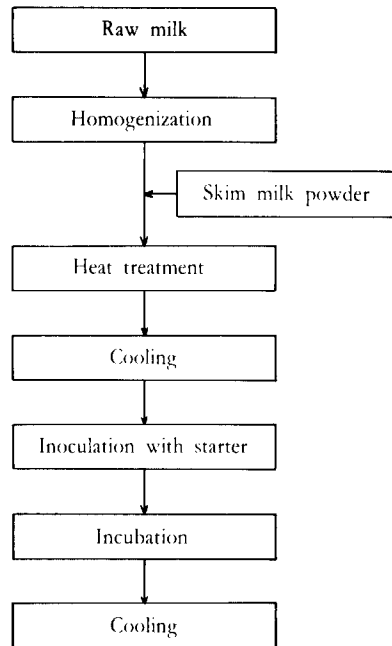


Fig. 1. Manufacture process of yoghurt product.

물질 잔존검사(Triphenyltetrazolium Chloride Test) (18) 및 알콜실험(Alcohol Test) (18)을 시행하였다. 그리고 원료유의 성분 함량 분석은 MILCO SCAN (104 A/B)으로 실행하였으며 MILCO SCAN의 표준화는 지방은 Gerber법(18), 단백질은 Kjeldahl법(18) 그리고 유당은 Iodineethiosulphate법(19)으로 실시하였다. Kjeldahl법에 의한 단백질 분석은 Buchi 342 protein analyzer(Swiss)를 이용하였다.

제조한 요구르트를 4℃에 냉장 저장하면서 12일 동안 1~2일 간격으로 pH, 적정산도 및 생균수를 측정하여 품질변화 유무를 조사하였다.

생균수, pH 및 적정산도의 측정

생균수 검출용 선택배지로 *B. bifidum*은 NPNL-agar medium을 사용하여 혐기배양하였고 *L. acidophilus*와 *Str. thermophilus*는 BCP plate count agar (EIKENCHEMICAL CO., LTD.)를 사용하여 표준 평판 배양법(Standard Plate Count) (20)으로 37℃에서 48시간 호기상태로 배양하였다. NPNL-selective solution의 조성(21)은 Table 3과 같다. BL-agar medium (13) 제조시 L-cysteine hydrochloride를 첨가할 때 NPNL-selective solution을 함께 첨가하였다.

희석액은 本間, 光岡(22)의 방법에 의하여 제조하여

Table 3. Composition of NPNL-selective solution

Composition	Weight of contents (per litre)
Lithium chloride	3.0 g
Nalidixic acid	15mg
Neomycin sulfate	100mg
Paromomycin sulfate	200mg

9ml씩 분주하여 121℃에서 15분간 멸균하여 사용하였다.

*B. bifidum*의 생균수 측정을 위하여 희석된 검체를 medium에 넣고 Gas Pak Anaerobic Jar (BBL)내에서 37℃ 48시간 배양하여 균수를 측정하였다.

적정산도는 Metrohm 665 Dosimat Titrater(Swiss)를 이용하여 AOAC(23)법에 따라 측정하였고, pH는 Metrohm 654 pH-meter(Swiss)를 이용하여 측정하였다.

결과 및 고찰

기질의 농도 및 *B. bifidum*의 성장

환원탈지유의 농도가 *B. bifidum*의 산 생성에 미치는 영향은 Fig. 2와 같이 나타났다. 배지농도 12%와 15%의 경우 처음 12시간 까지는 모두 적정산도 1.09%로 같았으나 24시간 후 부터는 15% 농도에서 산 생성이

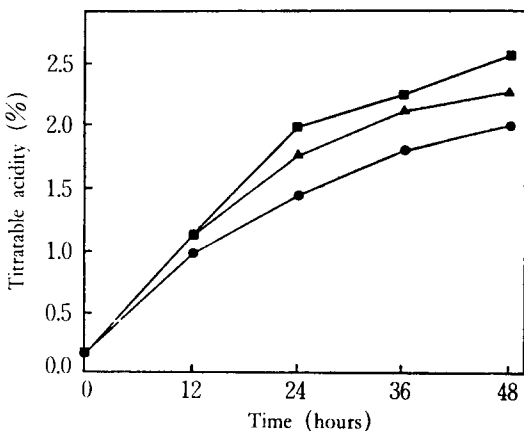


Fig. 2. Influence of substrate concentration on acid production of *B. bifidum*.

- : 10%
- ▲ : 12%
- : 15%

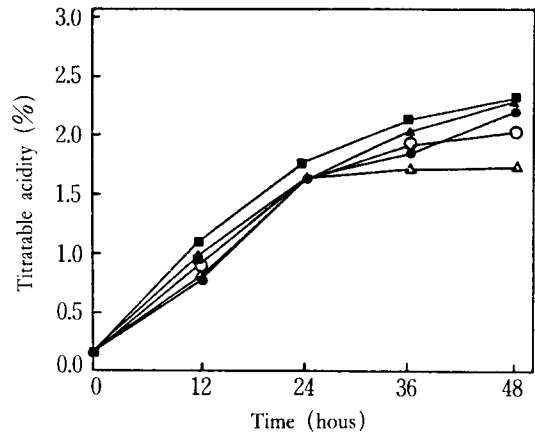


Fig. 3. Influence of heat treatments of substrates on acid production of *B. bifidum* in 12% reconstituted skim milk.

- : 85°C : 30min
- : 95°C : 30min
- : 121°C : 15min
- ▲ : 85°C : 15min
- △ : 95°C : 15min

더 많이 되었다. 그러나 bifidus 균주는 일정한 산도에 도달하거나 계속 떨어지는 산도에 따라 생존력의 비율이 줄어들게 되고 bifidus균의 안정성에 있어 낮은 pH값은 4.4정도이므로 (24) 15%의 농도보다 12%의 농도가 *B. bifidum*의 생존력에 있어서 적합하였다. 또한 균의 배양은 12시간 이전에 끝나므로 12%의 환원탈지유 농도 로도 산 생성에는 큰 문제가 없었다.

12% 환원탈지유의 열처리에 따른 *B. bifidum*의 산 생성은 Fig. 3과 같다. 각 열처리 경우의 산 생성에 큰 차이는 없었으나 95℃로 30분 열처리 한 것이 약간 좋게 나타났다. 이는 Rasic과 Kurmann(13)의 bifidobacteria를 이용한 발효유제품 제조시의 벌크 스타터(bulk starter)의 열처리 결과와 유사하였다. 따라서 우유에서 *B. bifidum*의 성장은 12%의 환원탈지유를 95℃로 30분 열처리하였을때 산 생성이 적당하였다.

성장촉진물 첨가효과

12% 환원탈지유에 성장촉진물로서 L-cysteine-HCl 0.05%, yeast extract 0.2%, glucose 1%와 BIOS 2000 1%를 각각 *B. bifidum*에 첨가하여 37℃에서 24시간 배양 하면서 pH, 적정산도 및 생균수를 측정 한 결과는 Table 4와 같다.

배양 12시간 후 BIOS 2000과 yeast extract를 동시에 첨가한 실험구가 pH 3.85와 적정산도 0.96%로 성장촉진 물을 첨가하지 않은 대조구의 pH 4.65와 적정산도 0.70% 보다 산 진전이 우수하였고, 균수면에서는 BIOS 2000을 첨가한 실험구와 BIOS 2000과 yeast extract를 동시에 첨가한 실험구가 1.1×10^9 (cfu/ml) 수준까지 성장하였다. 배양 24시간 후에는 BIOS 2000을 첨가한 실험구와 BIOS 2000과 yeast extract를 동시에 첨가한 실험구가 각각 pH 3.54와 3.43으로 산 진전이 잘 되었고 균수도 $(1.52 \sim 1.68) \times 10^9$ (cfu/ml) 수준으로 대조구 보다 더 높게 나타났다.

BIOS 2000만 첨가한 것은 산 진전과 균수 유지면에서 yeast extract와 함께 첨가한 것과 큰 차이가 없었으므로 BIOS 2000이 *B. bifidum*의 성장 촉진에 효과가 있는

것으로 나타났다.

혼합배양에 따른 *B. bifidum*의 발효효과

B. bifidum, *L. acidophilus* 및 *Str. thermophilus*를 37℃로 24시간 혼합 배양했을때의 pH, 적정산도 및 생균수는 Table 5와 같다. *B. bifidum*과 *L. acidophilus* 및 *Str. thermophilus*의 세 균주를 혼합배양했을때 *B. bifidum*의 생균수는 10^9 (cfu/ml) 수준으로, *B. bifidum* 단독배양했을 때의 10^8 (cfu/ml) 수준보다 높게 나타났고 산 진전도 빠르게 되었다. 이 결과는 *Str. thermophilus*나 *Lactobacillus* 와 *Bifidobacterium*을 혼합배양 했을때 *Str. thermophilus*의 높은 용존산소 소비 능력에 의해서 혐기성 bifidobacteria의 성장이 촉진된다는 Okonogi(25)등의 보고와 일치되고 있다.

Table 4. Effect of various additives on *B. bifidum* fermentation

Additives	Time Items	Incubation Time					
		12 Hours			24 Hours		
		pH	TA(%)	cfu/ml	pH	TA(%)	cfu/ml
NONE		4.65	0.70	5.0×10^8	3.81	1.23	8.9×10^8
CY		4.54	0.69	2.6×10^8	3.67	1.16	7.3×10^8
YE		3.95	0.95	4.4×10^8	3.56	1.37	8.2×10^8
GL		4.62	0.69	7.9×10^8	3.89	1.06	4.6×10^8
BI		3.95	0.93	1.3×10^9	3.54	1.52	2.0×10^9
YE+GL		3.91	0.90	5.4×10^8	3.66	1.38	6.6×10^8
BI+YE		3.85	0.96	1.1×10^9	3.43	1.68	1.4×10^9

TA: Titratable acidity YE: Yeast extract; 0.2% BI: BIOS 2000; 1%
 CY: L-Cysteine · HCl; 0.05% GL: Glucose; 1%

Table 5. Growth of *B. bifidum*, *L. acidophilus* and *Str. thermophilus* in mixed culture in 12% reconstituted skim milk at 37℃ for 24 hours

Mixed culture	Items	pH	Titratable acidity(%)	Viable cell counts (cfu/ml)
<i>B. bifidum</i>		3.79	1.35	*B: 3.2×10^8
<i>B. bifidum</i> + <i>L. acidophilus</i>		3.98	1.15	B: 6.2×10^8 **L: 1.1×10^9
<i>B. bifidum</i> + <i>Str. thermophilus</i>		3.80	1.36	B: 1.7×10^8 ***S: 8.0×10^7
<i>B. bifidum</i> + <i>L. acidophilus</i> + <i>Str. thermophilus</i>		3.70	1.38	B: 3.3×10^9 L+S: 6.7×10^8

*B: *B. bifidum* **L: *L. acidophilus* ***S: *Str. thermophilus*

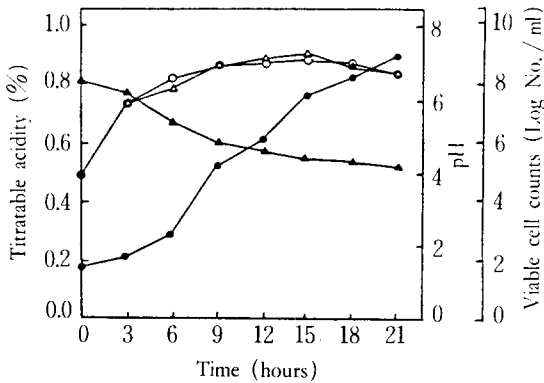


Fig. 4. Changes of titratable acidity and pH of mixed culture and growth of *B. bifidum* and *L. acidophilus*+*Str. thermophilus* in 12% reconstituted skim milk incubated at 37°C.

- : Titratable acidity
- ▲—▲ : pH
- : *B. bifidum*
- △—△ : *L. acidophilus*
- + *Str. thermophilus*

*B. bifidum*과 *L. acidophilus*의 혼합배양에서는 *B. bifidum* 단독배양 했을때보다 *B. bifidum*의 생균수가 약간 증가했으나 모두 10^8 (cfu/ml) 수준이었고, 산 진전도 *B. bifidum* 단독배양시보다 더 잘 되었다. 이는 *B. bifidum*과 *L. acidophilus*를 혼합배양 했을때, 이들 균주 간에 공생(symbiosis) 현상이 있다는 Hansen(26)의 보고와는 약간의 차이가 있었다.

따라서 요구르트 제조를 위한 스타터의 균주는 *B. bifidum*, *L. acidophilus* 및 *Str. thermophilus*의 세 균주를 혼합한 배양액을 사용하는 것이 균수 유지면과 산 진전면에서 적합한 것으로 나타났다.

이 세 균주 혼합배양액을 요구르트 제조를 위한 벌크 스타터로서의 배양시간을 알아보기 위하여 37°C에서 배양하면서 3시간 간격으로 pH, 적정산도 및 생균수의 변화를 Fig. 4에 나타내었다. 그 결과 9시간 부터 *B. bifidum*과 그 밖의 두 유산균의 생균수가 정체기로 들어갔으며, 이 때의 pH 4.79가 요구르트 제조용 스타터의 pH로 적당하였고, bifidobacterium의 균수 안정성을 위한 산도로서 적당하였으므로 배양 후 8~9시간 사이에 이 혼합배양액의 응고 정도로 판단하여 배양을 중지하였다.

혼합배양액의 저장 중의 변화

B. bifidum, *L. acidophilus* 및 *Str. thermophilus*의 세 균주를 혼합하여 37°C에서 8~9시간 배양시킨 혼합배양액을 4°C에 저장하면서 12일 동안 1~2일 간격으로 관찰한 pH, 적정산도 및 생균수의 변화는 Table 6과 같다. 냉장저장 직전의 pH는 4.79, 적정산도는 0.63%이고, 생균수는 *B. bifidum* 및 *L. acidophilus* & *Str. thermophilus* 모두 10^8 (cfu/ml) 수준이었던 것이 냉장 10일 후에는 pH 4.45, 적정산도 0.80%로 되었고 생균수는 모두 10^7 (cfu/ml) 수준으로 낮아졌다. 그러나 이 결과는 일반 요구르트 스타터인 *L. bulgaricus*와 *Str. thermophilus*의 혼합스타터를 저장한 변화에 비해서 pH 및 적정산도의 변화가 거의 없는 것으로 보아 배양 후의 산성의 경향이 없는 것(11)을 알 수 있었다.

그러므로 이들 균주는 내산성이 크고 후 산성이 없으므로 bifidobacteria의 생균수 유지에 좋은 영향을 주고 있다고 생각된다. 냉장 12일 후에도 bifidobacteria의 생존력을 위한 최저 pH인 4.4이하로는 떨어지지 않았으나 균의 안정성을 위하여 혼합 벌크 스타터는 8일 간격으로 계대배양 하는 것이 적당하였다.

요구르트 제조시 배양온도 및 스타터 접종량에 따른 변화

B. bifidum, *L. acidophilus* 및 *Str. thermophilus*의 세 균주 혼합배양액을 벌크 스타터로 하여 요구르트를 제조할 때 요구르트의 배양온도에 따른 pH 및 적정산도의 변화는 Fig. 5와 같다. 배양 후 2시간까지는 32°C와 37°C에서 각각 pH 5.90, 5.80와 적정산도 0.38%, 0.39%로 거의 비슷하였다. 2시간이후부터는 37°C의 배양에서 산 진전이 훨씬 빠르게 되었다. 또한 42°C의 배양에서 산 진전은 가장 우수하였으나 요구르트의 조직이 거칠게 나타났다. 이결과는 요구르트 배양시 너무 높은 온도에서의 배양은 요구르트의 조직을 거칠게 하여 품질에 나쁜 영향을 미친다는 보고와 일치하였다(17).

스타터 접종량을 변화하여 제조한 요구르트의 pH 및 적정산도의 변화는 Fig. 6에 나타나 있다. 여기에서는 8%의 접종량이 산 생성진전면에서는 가장 우수하였으나 요구르트의 조직이 거칠고 유청분리가 많이 되었다. 3% 접종량에서는 적정산도의 증가가 너무 적어 요구르트 생산시 배양시간이 길게 되므로 생산효율이 떨어진다고 볼 수 있다. 37°C에서 8시간 배양 후 pH 4.79, 적정산도 0.85%로 요구르트 품질에 적당한 산도였다.

따라서 세 균주 혼합 스타터를 이용한 요구르트 생산시 5%의 스타터 접종량으로 37°C에서 8시간 배양이 최적조건으로 나타났다.

Table 6. Changes of pH, titratable acidity and viable cell counts in mixed culture at 4°C

Storage(days)	Items	pH	Titratable acidity(%)	Viable cell counts (cfu / ml)
0		4.79	0.63	*B: 5.3×10^8 **L+S: 7.1×10^8
1		4.65	0.65	B: 5.3×10^8 L+S: 6.4×10^8
2		4.62	0.68	B: 4.8×10^8 L+S: 7.3×10^8
4		4.60	0.72	B: 3.9×10^8 L+S: 2.7×10^8
6		4.49	0.75	B: 3.8×10^8 L+S: 1.3×10^8
8		4.48	0.78	B: 2.5×10^8 L+S: 1.1×10^8
10		4.45	0.80	B: 7.8×10^7 L+S: 6.4×10^7
12		4.41	0.80	B: 2.0×10^7 L+S: 2.3×10^7

* B: *B. bifidum*

** L+S: *L. acidophilus*+*Str. thermophilus*

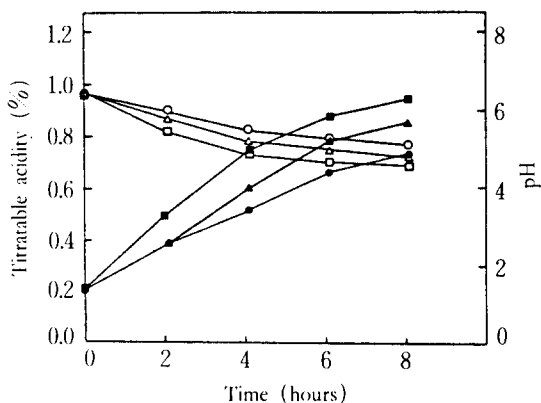


Fig. 5. Change of titratable acidity and pH of yoghurt with various incubation temperature.

Titratable acidity pH
 ●—● : 32°C ○—○ : 32°C
 ▲—▲ : 37°C △—△ : 37°C
 ■—■ : 42°C □—□ : 42°C

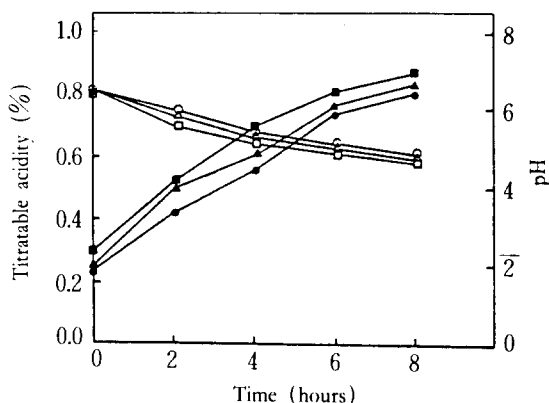


Fig. 6. Change of titratable acidity and pH of yoghurt with various starter dosages.

Titratable acidity pH
 ●—● : 3% ○—○ : 3%
 ▲—▲ : 5% △—△ : 5%
 ■—■ : 8% □—□ : 8%

요구르트 제조시 균주간 비율 및 저장중의 변화

B. bifidum, *L. acidophilus* 및 *Str. thermophilus*의 세 균주를 혼합한 벌크 스타터를 이용하여 요구르트 제조시 세 균주간의 비율이 요구르트의 산 진전과 bifidobacteria의 생존력에 미치는 영향을 조사하기 위하여 세 균주의 비율을 달리하여 요구르트를 배양하면서 2시간 간격으로 pH, 적정산도 및 생균수를 관찰한 결과는 Table 7, 8, 9와 같다.

Table 7에서는 *B. bifidum*의 비율을 달리하여 *B. bifidum*: *L. acidophilus*: *Str. thermophilus*의 혼합비율(B:L:S)을 1:1:1, 2:1:1, 3:1:1로 하여 측정된 것이다. 그 결과 8시간 배양 후 pH와 적정산도는 거의 비슷하였으나 B:L:S가 2:1:1의 비율에서 *B. bifidum*의 생균수가 10^8 (cfu/ml) 수준보다 높은 것으로 나타났다. 이로써

*B. bifidum*의 너무 많은 접종량으로 오히려 균의 생존력이 떨어짐을 알 수 있었다.

Table 8은 *L. acidophilus*의 혼합비율을 달리한 것으로 B:L:S을 1:1:1, 1:2:1, 1:3:1로 하여 pH, 적정산도 및 생균수의 변화를 측정된 것이다.

그결과 *L. acidophilus*의 비율변화는 산 진전이나 생균수에서 요구르트에 큰 영향을 미치지 못하였다. Cheng과 Nagasawa(14)의 *L. acidophilus*와 bifidobacteria의 혼합 배양의 경우 각각의 단독배양에 비하여 *L. acidophilus*의 생균수는 약간 떨어지나 bifidobacteria는 크게 증가되었다는 보고와는 차이가 있었다.

Table 9에서는 *Str. thermophilus*의 혼합비율 변화시의 요구르트의 pH, 적정산도 및 생균수의 변화를 나타냈다. B:L:S가 1:1:2, 1:1:3의 경우 *Str. thermophilus*의

Table 7. Changes of pH, titratable acidity and viable cell counts on *B. bifidum* ratio variation in mixed culture

Incubation time(hrs)	Items Ratio	pH			Titratable acidity(%)		
		A	B	C	A	B	C
0		6.31	6.30	6.30	0.19	0.20	0.20
2		5.70	5.69	5.61	0.30	0.30	0.34
4		5.05	5.02	5.01	0.55	0.57	0.59
6		4.85	4.70	4.72	0.64	0.68	0.67
8		4.64	4.53	4.57	0.78	0.79	0.79

B. bifidum : *L. acidophilus* : *Str. thermophilus*

A = 1 : 1 : 1

B = 2 : 1 : 1

C = 3 : 1 : 1

Incubation time(hrs)	Items Ratio	Viable cell counts (cfu/ml)		
		A	B	C
0	*B	6.7×10^5	2.3×10^6	8.2×10^5
	**L+S	6.7×10^6	6.2×10^6	6.0×10^6
2	B	5.5×10^6	2.2×10^7	3.1×10^6
	L+S	1.6×10^7	4.2×10^7	1.5×10^8
4	B	6.8×10^6	8.4×10^7	9.8×10^6
	L+S	1.8×10^7	1.3×10^8	6.1×10^7
6	B	6.9×10^7	9.2×10^7	6.3×10^7
	L+S	1.9×10^8	1.6×10^8	1.6×10^8
8	B	6.5×10^7	1.4×10^8	8.3×10^7
	L+S	1.2×10^8	3.0×10^8	2.1×10^8

*B: *B. bifidum*

**L+S: *L. acidophilus* + *Str. thermophilus*

Table 8. Changes of pH, titratable acidity and viable cell counts on *L. acidophilus* ratio variation in mixed culture

Incubation time (hrs)	Items Ratio	pH			Titratable acidity (%)		
		A	B	C	A	B	C
0		6.36	6.37	6.31	0.23	0.22	0.23
2		6.01	6.00	5.99	0.32	0.32	0.32
4		5.39	5.39	5.40	0.47	0.46	0.46
6		5.09	5.04	5.11	0.60	0.63	0.59
8		4.87	4.79	4.90	0.72	0.73	0.70

B. bifidum : *L. acidophilus* : *Str. thermophilus*

A = 1 : 1 : 1
 B = 1 : 2 : 1
 C = 1 : 3 : 1

Incubation time (hrs)	Items Ratio	Viable cell counts (cfu/ml)		
		A	B	C
0	*B	1.0×10^6	1.7×10^6	1.7×10^6
	**L.+S	2.2×10^7	1.8×10^7	2.2×10^7
2	B	3.7×10^7	2.5×10^7	1.9×10^7
	L.+S	1.6×10^7	1.3×10^7	9.4×10^7
4	B	5.7×10^7	4.2×10^7	1.7×10^7
	L.+S	1.4×10^7	2.2×10^7	2.0×10^8
6	B	5.3×10^7	3.8×10^7	3.3×10^7
	L.+S	1.2×10^8	1.5×10^8	1.0×10^8
8	B	6.6×10^7	3.1×10^8	2.2×10^7
	L.+S	1.2×10^8	1.3×10^8	4.2×10^8

*B: *B. bifidum*

**L.+S: *L. acidophilus* + *Str. thermophilus*

Table 9. Changes of pH, titratable acidity and viable cell counts on *Str. thermophilus* ratio variation in mixed culture

Incubation time (hrs)	Items Ratio	pH			Titratable acidity (%)		
		A	B	C	A	B	C
0		6.60	6.58	6.61	0.25	0.24	0.24
2		6.15	6.13	6.13	0.34	0.34	0.34
4		5.46	5.44	5.45	0.53	0.54	0.53
6		5.05	5.02	5.02	0.61	0.65	0.65
8		4.83	4.77	4.80	0.71	0.73	0.75

B. bifidum : *L. acidophilus* : *Str. thermophilus*

A = 1 : 1 : 1
 B = 1 : 1 : 2
 C = 1 : 1 : 3

Incubation time (hrs)	Items Ratio	Viable cell counts (cfu / ml)		
		A	B	C
0	*B	7.5×10^6	3.6×10^6	3.5×10^6
	**L+S	2.9×10^7	1.3×10^7	2.6×10^7
2	B	3.0×10^7	4.9×10^6	4.3×10^6
	L+S	4.6×10^7	9.8×10^7	9.9×10^7
4	B	5.0×10^7	6.9×10^7	3.3×10^7
	L+S	1.5×10^8	2.7×10^8	2.4×10^8
6	B	1.3×10^7	8.0×10^7	3.6×10^7
	L+S	1.5×10^8	2.8×10^8	2.0×10^8
8	B	2.6×10^8	6.1×10^7	3.5×10^7
	L+S	3.6×10^8	3.9×10^8	2.0×10^8

*B: *B. bifidum*

**L+S: *L. acidophilus* + *Str. thermophilus*

Table 10. Changes of pH, titratable acidity and viable cell counts in yoghurt at 4°C

Items Storage (days)	pH	Titratable acidity (%)	Viable cell counts (cfu / ml)
0	4.86	0.77	*B: 3.7×10^8
			**L+S: 5.7×10^8
1	4.78	0.80	B: 4.4×10^8
			L+S: 5.9×10^8
2	4.75	0.81	B: 4.7×10^8
			L+S: 5.7×10^8
4	4.75	0.87	B: 2.8×10^8
			L+S: 5.1×10^8
6	4.44	0.90	B: 2.8×10^8
			L+S: 4.1×10^8
8	4.43	0.95	B: 1.2×10^8
			L+S: 3.3×10^8
10	4.43	0.95	B: 1.2×10^8
			L+S: 1.8×10^8
12	4.42	0.95	B: 1.0×10^8
			L+S: 1.8×10^8

* B: *B. bifidum*

**L+S: *L. acidophilus* + *Str. thermophilus*

높은 산 생성능력으로 산 생성은 잘 되었으며 *B. bifidum*의 생균수는 배양 2시간 후부터 10^7 (cfu / ml) 수준보다 높게 나타났다.

따라서 요구르트의 산 진전과 균수 유지면에서 벌크 스타터의 세 균주 비율은 B:L:S가 2:1:1의 비율이 적합

한 것으로 나타났다.

B. bifidum, *L. acidophilus* 및 *Str. thermophilus* 혼합비율을 2:1:1의 비율로 한 벌크 스타터를 5% 겔중하여 37°C에서 8시간 배양한 요구르트를 4°C에서 냉장 저장하였을때의 저장시간에 따른 pH, 적정산도 및 생균수의

변화를 Table 10에 나타내었다. 배양 종료 후의 pH 4.86, 적정산도 0.77%는 저장 12일 후에 pH 4.42, 적정산도 0.95%로 서서히 산진전이 일어났다. 생균수는 *B. bifidum*, *L. acidophilus*와 *Str. thermophilus* 모두가 저장 전이나 저장 12일후에 10^8 (cfu/ml)수준으로 큰 변화가 없었다. 이는 이들 균주가 내산성이 크고 후산성이 없으므로 균의 생존율에 좋은 영향을 미쳤으며 제조된 요구르트는 12일까지 저장이 가능하였다.

요 약

Bifidobacteria를 이용한 요구르트 제조를 위하여 *B. bifidum*의 우유내에서 최적 배양조건과 *B. bifidum*, *L. acidophilus* 및 *Str. thermophilus*의 혼합배양시의 최적조건을 조사하고 요구르트 제조에 적합한 조건을 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

*B. bifidum*의 성장을 위한 탈지유의 농도는, 15% 농도가 12%농도보다 산진전은 잘 되었으나 균의 생존력에서 12% 농도가 적합한 것으로 나타났다.

*B. bifidum*의 성장에 대한 L-cysteine·HCl, yeast extract, glucose와 BIOS 2000의 성장촉진물 첨가효과는 BIOS 2000을 첨가한 것이 산 진전면과 균수 유지면에서 *B. bifidum*의 성장에 큰 효과가 있었다.

B. bifidum, *L. acidophilus*와 *Str. thermophilus*를 혼합하여 배양한 것이 산 진전과 균수면에서 *B. bifidum* 단독 배양한 것보다 좋게 나타났다.

B. bifidum, *L. acidophilus*와 *Str. thermophilus*의 세 균주 혼합배양액을 이용한 요구르트 제조시 접종량은 5%, 배양온도는 37℃와 배양시간은 8시간이 적당하였다. 이 경우 세 균주의 비율은 *B. bifidum*: *L. acidophilus*: *Str. thermophilus*가 2:1:1의 비율이 균수유지와 산 진전면에서 가장 좋은 결과를 보였다.

사 사

본 연구는 산학협동재단의 연구비 지원에 의하여 연구 되었으며 이에 감사 드립니다.

참 고 문 헌

1. J. A. Poupard, I. Husain and R. F. Norris (1973), *Biology of the Bifidobacteria*, 37, 136.
2. BERGEY'S MANUAL OF Systematic Bacteriology (1986), Vol. 2, 1418. Williams & Wilkins.
3. M. Mutai, M. Mada, K. Nakajima, K. Shimada and

- T. Iijima (1978), U. S. Patent 4.
4. C. L. Bullen, P. V. Tearle and A. T. Willis (1976), *J. Med. Microbiol.*, 9, 325.
5. 이재영, 유제현, 강국희(1989), 신제 유가공학, p.127, 향문사.
6. L. J. Mata, and J. L. Urrutia (1971), *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 176, 93.
7. T. Mizutani and T. Mitsuoka (1980), *Cancer Letters*, 11, 89.
8. 강국희, 박용하, 김상희 (1983), 성대논문집, 3, 235.
9. 성문희, 신현정, 강국희 (1985), *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, 13(3), 203.
10. 고준수, 권일경, 김영옥 (1986), 한국 낙농 학회지, 8(1), 48.
11. J. L. Rasic and J. A. Kurmann (1978), *Fermented Fresh Milk Products and Their Cultures*, Vol. 1, p. 39 Technical Dairy Publishing House, Jyllingeve, DK-2720, Vanlose, Denmark.
12. 고준수 (1988), *Korea Dairy Technol.*, 5(2), 75.
13. J. L. Rasic and J. A. Kurmann (1983), *Bifidobacteria and Their Role*, Birkhauser, eds, Verlag, Basel, Boston, Stuttgart.
14. E. B. Cheng and T. Nakasawa (1983), *Japan. J. Zootech. Sci.*, 54(11), 740.
15. Kim Keating (1985), *Cultured Dairy Products J.*, 20(2), 13.
16. M. L. Speck (1976), *J. Dairy Sci.*, 59, 338.
17. A. Y. Tamime and R. K. Robinson (1985), *Yoghurt Science and Technology*, Pergamon Press.
18. H. R. Gary (1985), *Standard Methods for the Examination of Dairy Product*, 15th ed., p.259, Portt City Press.
19. W. Leanard, A. Aurand, W. Edwin and M. R. Wells (1987), *Food Composition and Analysis*, p.567 Avi., New York.
20. 홍재식, 이갑상, 최동성, 노완섭, 배정설(1984), 응용 미생물학, p.69, 지구 문화사.
21. S. Teraguchi, M. Uehara, K. Ogasa and T. Mitsuoka (1978), *일본세포학잡지*, 33(6), 753.
22. 本間道 光岡知足 (1979), *Bifidus Bacteria*, p.43.
23. A. O. A. C. (1984), *Official Methods of Analysis*, 14th ed., p.308 Association of official Analytical chemists, Washington, D. C.
24. G. Reuter (1989), *The Importance of Special Lactic Acid Bacteria in Fermented Milk Products for Human*

- Health, p.3, 국제 학술세미나.
25. S. Okonogi, J. Ono, T. Kudo, A. Hairmastu and S. Teraguchi (1984), Japan, Patent J. 5908-5288-A.
26. R. Hansen (1985), North European Dairy J. 3.
(Received; December 19, 1991, Revised; December 30, 1991, Accepted; January 10, 1992)