

우유발효에 이용되는 Starter Culture와 그 특성

김종수·김종우*

축협중앙회 유가공사업본부, 충남대학교 낙농학과*

Starter Clutures for Milk Fermentation and Their Characteristics

Jong Soo Keum and Jong Woo Kim*

National Livestock Cooperatives Federation

Department of Dairy Science, Chungnam National University*

ABSTRACT

All over the world there is an increasing consumer awareness of the potential influence of various foodstuffs on our health. Today dairy products are expected to be more just food. They have to taste well, appeal and give pleasure, provide of well-being, provide specific health benefits and prevent disease. This paper reviews the different types of fermented milks and their microflora and includes recent work on yogurt, soft cheese and buttermilks, kefir and koumiss. There is considerable interest in the new health promoting products which are now available. Meanwhile during the last decade a new generation of fermented milk products containing selected intestinal bacteria has been introduced to the markets. These are discussed in the light of some recent findings on the ability to lower the blood cholesterol concentration and stimulate the immune response and also describes some fermented milk products available, selection criteria for commercial starter cultures.

I. 서론

우유는 여러가지 미생물의 성장을 돕는 배지 (medium)이며, 수세기에 걸쳐 다수의 발효유제품을 생산하는데 유용하게 이용되어 왔다. 이러한 발효공정은 시간이 경과됨에 따라 발전하였고 대부분의 미생물은 특정한 환경조건하에서 성장하는데 잘 적응하였다. 여러가지 전통적인 우유 발효에 사용되는 culture가 분리, 정제되었으며, 실험실에서 이에 대한 특성이 동정 (identification) 되어졌다. 또한 오늘날과 같이 여러 종의 발효유제품에 대한 대량생산이 가능하게 된 것은 특성의

starter culture를 공급하는 전문회사에서 제공한 미리 포장된 culture (prepacked culture)를 발효 탱크 (vat)에 직접 첨가하게 된 결과에 기인한 것이다.

실제적인 yogurt 및 cheese 제조업자에 의한 starter culture 분류와 분류학자 (taxonomist)를 통한 분류간에는 많은 차이점이 있고, 관련자들은 우유발효를 포함한 미생물의 분류에 관하여 기술된 서적을 참고하게 된다 (Garvie, 1984). 유산균에 관한 연구는 계속적으로 진행되어 왔고, 핵산관련 물질 (nucleic acid probe)의 출현과 함께 오늘날 분류학자들은 이 둘간의 관계를 재정립하고 있다 (Betzl 등, 1990; Collins 등, 1991; Hensiek 등,

Table 3. New and old names of various starters and their uses

Type	Old Name	New name	Product
Mesophillic			
O	<i>Streptococcus cremoris</i>	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	Cheddar cheese
	<i>Streptococcus lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	Feta cheese Cottage cheese Quarg
L*	<i>Streptococcus cremoris</i>	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	Continental cheese (with eyes)
	<i>Streptococcus lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	
	<i>Leuconostoc citrovorum</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>cremoris</i>	Lactic butter
	<i>Leuconostoc lactis</i>	<i>Leuconostoc lactis</i>	Feta cheese
D**	<i>Streptococcus cremoris</i>	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	<i>Lactic butter</i>
	<i>Streptococcus lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	
	<i>Streptococcus diacetylactis</i>	Cit ⁺ <i>Lactococci</i> ***	
LD	<i>Streptococcus cremoris</i>	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	Continental cheese (with eyes)
	<i>Streptococcus lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	Mould ripened cheese
	<i>Streptococcus diacetylactis</i>	Cit ⁺ <i>Lactococci</i> ***	Cultured buttermilk
	<i>Leuconostoc citrovorum</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>cremoris</i>	Lactic butter
	<i>Leuconostoc lactis</i>	<i>Leuconostoc lactis</i>	
Thermophillic			
	<i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>Streptococcus salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i>	Yoghurt
	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	Mozzarella cheese
	<i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>Streptococcus salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i>	Emmental cheese
	<i>Lactobacillus helveticus</i>	<i>Lactobacillus helveticus</i>	Grana cheese
	<i>Lactobacillus lactis</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i>	

* L = *Leuconostoc* **D = *Diacetylactis*

*** Cit⁺ = Abbreviation for citrate which is metabolised to flavour and aroma compounds

Table 4. Characteristics of some important culture bacteria

Bacterium (old name)	Optimum growth temp, °C	Max salt tolerance for growth, %	Acid formation, ferment. %	Citric acid ferment.
I Streptococci				
<i>Str. lactis</i>	about 30	4~6.5	0.8~1.0	-
<i>Str. cremoris</i>	25~30	4	0.8~1.0	-
<i>Str. diacetylactis</i>	about 30	4~6.5	0.8~1.0	+
<i>Str. thermophilus</i>	40~45	2	0.8~1.0	-
<i>Leuc. citrovorum</i>	20~25	-	small	+
II Lactobacilli				
<i>Lb. helveticus</i>	40~45	2	2.5~3.0	-
<i>Lb. lactis</i>	40~45	2	1.5~2.0	-
<i>Lb. bulgaricus</i>	40~50	2	1.5~2.0	-
<i>Lb. acidophilus</i>	35~40	-	1.5~2.0	-

가 더 양호한 활성을 유지할 수 있다. 액체질소를 이용하여 -160°C까지 냉동시킬 경우 매우 양호한 상태로 저장이 가능하다. Concentrated, deep-frozen 또는 freeze-dried(lyophilized)같은 형태의 starter culture는 제조업자의 추천에 따라 상

당기간 동안 저장할 수가 있다. Table 5는 Chr. Hansen(Copenhagen, Denmark)에서 추천한 culture의 저장온도와 보존기간을 나타낸 것이다.

1) 미생물적인 상호작용

Table 5. Storage conditions and shelf lives of some concentrated cultures (Chr. Hansen A/ S, Denmark)

Type of culture	Storage	Shelf life, months
1. Freeze-dried DVS	Freezer below -18°C	minimum 12
2. Deep-frozen DVS	Freezer below -45°C	minimum 12
3. Freeze-dried REDI-SET	Freezer below -18°C	minimum 12
4. Deep-frozen REDI-SET	Freezer below -45°C	minimum 12
5. DRI-VAC	Refrigator below +5°C	minimum 12
1. Freeze-dried, superconcentrated culture(for direct inoculation of product)		
2. Deep-frozen		
3. Freeze-dried, concentrated culture(for preparation of bulk starter)		
4. Deep-frozen, concentrated culture(for preparation of bulk starter)		
5. Freeze-dried culture in powder form(for preparation of mother culture)		

대부분의 산업적인 발효유 제조에는 *Lactobacillus helveticus*와 같은 subspecies lactis가 이용되기도 하지만, 주로 *Lactobacillus delbreuckii* ssp. *bulgaricus*가 포함된다. *Lactobacillus*와 *Streptococcus thermophilus*는 우유내에서 모두 유익한 상호작용을 하지만 사용이 규정되어 있는 것은 아니다. 이러한 관계를 proto-cooperation이라 칭한다 (Driessen, 1981). 이는 일반적으로 *Streptococcus*가 *Lactobacillus delbreuckii* ssp. *bulgaricus*에 의해서 유단백질로부터 유리된 유리아미노산과 펩티드에 의해 자극을 받고(Shankar, 1977), 이어 *Lactobacillus*는 활성을 지닌 *Streptococcus thermophilus* 세포에 의해 생성된 formic acid 및 CO₂에 의해서 자극을 받는다(Veringa 등, 1968; Driessen 등, 1982). 그러나 탄수화물에 대한 상이한 반응이 역시 상호작용에 영향을 미칠수도 있다. Single culture에서 일부 당류(lactose, glucose, galactose)는 성장을 자극하지만, mixed culture의 경우 성장률이 감소될 수도 있다(Amoroso와 Nadra, 1990). 이러한 결과는 이들 thermophile을 사용하여 제조한 Swiss cheese의 연구에 의해서도 입증되어졌다.

Mixed culture에서 일차적으로 *Streptococcus*는 lactose를 이용하여 galactose를 분비하고, 유산균은 pH가 4.6으로 떨어질 때까지 active한 상태로 남아있다. 그후에 *Lactobacillus*가 galactose 수준까지 성장하는 반응이 진행된다(Olsen, 1990).

2) Flavor

Yogurt는 3.8~4.2의 pH 범위를 갖는 lactic-sour이다. pH 4.4~4.6의 범위를 지닌 mild yogurt가 여러 소비자들에게 인기가 있으며, 제조 및 유통중에 높은 pH가 유지되도록 제조업체에서는 상당한 노력을 기울이고 있다. 양호한 품질을 지닌 발효제품에서 중요한 향미성분은 acetaldehyde와 diacetyl이다. Yogurt 제조에 사용되는 유산균은 lactose로부터 pyruvate를 경유 acetaldehyde를 생성하거나 또는 *Lactobacillus delbreuckii* ssp. *bulgaricus*의 경우에는 아미노산

threonine을 2차 아미노산인 glycine으로 전환시킨다(Lees와 Jago, 1978 a,b). Diacetyl은 *Streptococcus*에 의해 생성되는 매우 미량의 최종 대사 산물이지만(Groux, 1973), yogurt의 전반적인 aroma와 flavor에 중요한 영향을 미친다.

3) Texture

산업적인 yogurt 제조시 문제점의 한가지는 texture를 유지하는 일이다. 유청이 유출(drain off)되는 cheese와 달리 yogurt는 casein micelle matrix내에 유청을 유지해야 한다. 이는 전통적으로 우유의 총고형분을 16~17%(W/V)로 증가시키는 방법을 이용하며, 한외여과(ultrafiltration)와 역삼투(reverse osmosis)를 이용한 농축물을 사용하기도 하지만 일반적으로 탈지분유를 첨가한다. 또한 우유의 총고형분 함량을 증가시키는 여러 대안들이 현재 검토중에 있고, 가능성이 있는 제품에는 현재 polymer를 생성하는 starter culture의 변이체를 이용하고 있다. *Lactobacillus delbreuckii* ssp. *bulgaricus*와 *Streptococcus thermophilus* 모두는 품질특성에서 texture를 증진시키는 polysaccharide를 생성할 수가 있다.

이들 유산균으로 부터 생성된 polysaccharide는 서로 유사하며 polymer는 glucose, galactose, rhamnose 및 uronic acid를 함유하고 있음이 최근의 연구결과를 통하여 밝혀졌다. 즉, 유산균에 의한 exopolysaccharide(EPS) 생성은 발효유 제조를 위한 starter culture 선택시 고려하여야 할 중요한 특성이다(Mozzi 등, 1994). *Streptococcus thermophilus*에 의한 polysaccharide 생성 조절은 Petit 등(1991)이 수행하였으며, 과량의 lactose를 함유한 batch culture에서 sugar의 80% 이상이 lactate로 대사되었으나, carbon flow가 낮을 때 continuous culture에서 strain은 22% 이상의 polysaccharide를 합성 하였음을 발견하였다. Doco 등(1990)은 일부 *Streptococcus thermophilus* strain에서 생성된 polymer는 하나의 galactosyl, 하나의 glucosyl 및 (1)-linked non-reducing galactosyl group을 지닌 하나의 2-acetamido-2-deoxy galactosyl residue로 이루어져 (1-3)-lin-

ked backbone을 지닌 tetrasaccharide repeating unit로 구성되어 있다고 하였다.

III. Buttermilks

이러한 형태의 발효유는 중온성 starter를 사용하여 제조되고, 이 starter는 또한 curd cheese와 cottage cheese 같은 fresh, soft cheese 제조에도 사용된다. Buttermilk는 대부분 종종 신선한 상태의 우유를 마시는 스칸디나비아 반도에서 인기가 있다. Starter는 *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis*와 *Leuconostoc cremoris*로 구성되어 있고, diacetyl을 생성하는 능력을 지니고 있기 때문에 buttermilk 제조용 starter로 사용된다. 이 중요한 휘발성분은 buttermilk의 품질을 좌우하는 요인으로 작용하며, 제품에 buttery flavour와 aroma 특성을 부여한다.

제품은 유산에 의한 신맛(lactic-sour)과 즉시 따라 마실 수 있는 beverage 형태이며, starter culture가 polysaccharide 생성 strain의 함유 여부에 따라 texture에 차이가 있을 수 있다. 낙농산업 측면에서 이들의 중요성에 기인하여, lactococcal starter가 모든 유제품 관련 lactic acid bacteria에 있어 최상의 연구, 소재가 되고 있다.

1. Buttermilk starter에서 lactose의 흡수와 대사

유산균에 있어 당류 수송의 상세한 기원은 최근에 이르러서 확인되었다. 일반적으로 2가지 기원이 이용되며, 모두는 energy를 필요로 한다. 즉, lactose는 농도 gradient에 대한 permease를 경유 세포로 이송이 가능하다. 이 전이(translocation) system에 사용되는 energy는 막결합 ATPase와 ion pump에 의한 ATP 가수분해 결과로서 세포질(cytoplasmic)막에 의해서 유지된다. 두번째 흡수기전은 phospho-enol-pyruvate(PEP) phospho transferase(PTS)를 경유하는 group 전이이다. Lactose는 phosphorylated derivative로서 세포로 유입되고, galactose 부위는 PEP를 지니

게 된다(Dills 등, 1980).

Lactose의 인산화(phosphorylation)는 lactose가 세포막을 통과함으로써 일어난다.

일단 세포 내부에서 lactose phosphate는 P-β-galactosidase enzyme에 의해 glucose와 galactose-6-phosphate로 분할되고, 두개의 hexose는 동시에 pyruvate로 대사된 후 lactic acid로 전환된다. *Leuconostoc*에서 당류의 흡수에 대한 기작은 거의 알려지지 않고 있다. β-galactosidase는 *Leuconostoc cremoris* ATCC 8081에서 확인되었으며(Singh 등, 1979), 이는 lactose가 permease에 의해 수송됨을 의미하는 것이다.

당류는 lactose가 β-galactosidase의 작용에 의해서 glucose와 galactose로 가수분해되는 phosphoketolase pathway를 통하여 발효가 진행된다(Gunsalus와 Gibbs, 1950). Glucose는 동일한 그램분자 농도(equimolar concentration)의 lactate, ethanol 및 CO₂로 대사되고, galactose는 Leloir pathway를 통하여 glucose-1-phosphate로 대사된다.

2. Citrate 대사

Citrate는 우유에서 종종 0.15%(8mM) 이하로(특히 동절기우유) 중요한 성분은 아니지만 우유와 soft cheese에서 양호한 품질의 flavor를 생성하는데 필수적인 전구물질이다. Citrate는 diacetyl과 CO₂를 생성하는 *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis*와 *Leuconostoc*s에 의해 대사된다. Citrate는 citrate 단독으로 미생물의 성장을 도울 수 있는 energy source로서 사용되지는 않으나 또 다른 탄소원(glucose 또는 lactose)과 함께 상호 대사된다. 이처럼 glucose 존재하에 citrate와 glucose가 이용됨으로서 diacetyl과 acetoin(Cogan, 1981) 및 acetate(Cogan, 1984)가 축적되는 결과를 낳게 된다.

Leuconostoc species에 관한 최근의 연구결과 이들의 상호 대사작용(co-metabolism)은 미생물 성장을 자극하여 glucose의 이용성을 증진시키고, 나아가서 ethanol로부터 acetate와 보다 높은 수

준의 lactate가 생성됨을 확인하였다(Jordan과 Cogan, 1988).

3. Polymer 생성

Yogurt 제조에 중온성 starter를 사용함으로써, 이들 중온성 유산균이 또한 polysaccharide를 생산할 수 있게 된다. Swedish langfil에서 분리한 *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* strain으로부터 생성된 capsular polysaccharide는 rhamnose, glucose, galactose 및 glycerol이 함유되어 있음을 Toba 등(1991)은 보고하였다. Nakajima 등(1990)은 glycerol과 phosphorus는 세포벽의 구성성분인 deacylated lipoteichoic acid의 polymer와 결합된 결과라고 제시하였다.

IV. Kefir와 Koumiss

이들 발효유는 동유럽에서 상당량 생산되며, 서부로 전파되었지만, 일부 서유럽에서는 새로운 제품이 아닐 수도 있다. 예를 들어 북아일랜드의 buttermilk 생산공장이 외관상 Kefir와 유사한 County Fermanagh에서 발견되었다(Thompson 등, 1990). 일반적으로 이들 제품은 유산균과 서로

다른 효모를 포함한 complex mixed flora로 구성 되어 있다.

1. Kefir의 미생물 성상

Kefir는 사용하는 starter의 종류에 있어서 다른 발효유와는 다르다. Yogurt와 buttermilk starter는 우유에 균일하게 분산되어 성장중인 세포의 현탁액으로서 첨가된다. Kefir에 있어 starter는 꽃양배추의 작은 통꽃(cauliflower floret)을 닮은 grain 형태를 지닌다. 이들 구형이고 균일하지가 않으며 형태와 크기(0.5~3.5cm)가 다양하다. 또한 단단하고 탄력이 있으며, 내부의 미생물 균층은 조직 내부에서 일정하지가 않고, grain과 Kefir음료에 함유된 미생물은 서로 다르다(Table 6).

일반적으로 lactobacilli는 grain에 있어 미생물 수의 65~80%를 구성하고 있으며, 나머지 20%는 lactococci, streptococci 및 서로다른 종의 유당 및 비유당 발효성 yeast로 구성된 반면에(Libudzisz와 Piatkiewicz, 1990) lactic streptococci는 Kefir beverage에 보다 우세하게 분포되어 있다(Rosi와 Rossi, 1978). 한편 Table 6에 열거한 미생물 이외에도 선택적인 진균류의 대표균종인

Table 6. Microflora associated with kefir and kefir grains

Micro-organisms	Grain	Beverage
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10 ⁶ /g	10 ⁵ /ml
<i>Candida kefir</i>	10 ⁸ /g	-
<i>Candida pseudotropicalis</i>	-	10 ⁶ /ml
<i>Lactobacillus kefir</i>	10 ⁹ /g	10 ⁶ ~10 ⁸ /ml
<i>Lactobacillus brevis</i>	10 ⁶ /g	10 ⁶ /ml
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	10 ⁸ /g	-
<i>Lactobacillus casei</i>	-	10 ⁶ /ml
<i>Lactobacillus lactis</i>	-	10 ⁹ /ml
<i>Lactobacillus mesenteroides</i>	10 ⁶ /g	10 ⁶ /ml
<i>Acetic acid bacteria</i>	10 ⁸ /g	10 ⁶ /ml

* Marshall(1986)

Candida holmii, *Saccharomyces unisporus* 및 *Kluyveromyces marxianus*(Engel 등, 1986)와 함께 Kefir grain으로부터 점성물질을 생성하는 *Lb. kefiranofaciens*를 분리하였다(Yokoi 등, 1991).

Bottazzi와 Bianchi(1980)는 전자현미경을 이용 Kefir grain 내부의 미생물 균총분포를 조사하였다. Yeast와 lactobacilli수는 불규칙하게 섞여 있지는 않았으나, lactobacilli는 grain 내부에 yeast를 소유한 grain의 말초를 이루고 있었다. 한편 Libudzisz와 Piatkiewicz(1990)은 비유당 발효성 yeast를 Kefir grain의 주변에 유당발효성을 지닌 grain의 보다 깊은 내부층에서 발견하였다. 이들은 이를 lactobacilli로 구성된 부분이라 규정하였고, Marshall 등(1984 a)은 Kefir grain의 thin sheet-like form의 미생물군을 관찰하여 확정하였다.

즉, 구조에 있어서 한 측면은 거의 전체가 짧은 간균형태의 미생물로 구성되어 있는 반면에 다른 쪽은 간균과 큰 yeast cell의 혼합균총으로 이루어져 있다고 보고하였다. 전자현미경 관찰결과 다수의 유산균이 branched polysaccharide의 기질내에 혼재되어 있음을 확인하였다. La Riviere 등(1967)은 polysaccharide는 glucose와 galactose가 1:1의 비율로 구성되어 있음을 확인하였고 이를 "Kefiran"이라 칭하였다.

초기에는 polysaccharide가 lactobacilli(*Lb. kefir*)에 의해 생성되는 것으로 여겨졌으나 Kefir grain의 lactococcus와 lactobacillus 모두는 Kefiran 생성능력을 지니고 있음이 최근의 연구결과 밝혀졌다(Yokoi 등, 1991).

예상한 바와 같이 주어진 미생물 균총에 의해서 Kefir 발효는 복잡하고 아직까지 명확히 그 기전이 밝혀지지는 않았으나, 유산균과 yeast의 공생관계에 의해 진행되는 것으로 알려져 있다. 예를 들어 *Candida holmii*는 선택적으로 galactose를 이용하며, 예외적으로 이 yeast는 inducible hexokinase(phosphorylates glucose)와 constitutive galactokinase를 지니고 있어, glucose 존재하에서 조차 galactose를 우선적으로 이용하게 된다(Ueda 등, 1982).

Lactobacilli 또한 예외적 이어서 Kefir grain에서 최초로 분리한 lactobacilli는 종종 laboratory media가 소모될 때까지 단지 Larabinose 발효를 행하기도 하지만 매우 제한적인 발효능력을 지닌 것으로 나타났다(Marshall 등, 1984 b; Thompson 등, 1990).

2. Koumiss

전통적으로 Koumiss는 말젖으로 제조되며, Kazakhstan 대초원에서는 연간 420,000kg의 Koumiss 생산을 위한 우유공급을 위해서 약 200두의 말을 사육하는 100여개소 이상의 말 사육 목장에서 매일 손착유를 행한다(Kosikowski, 1977). 이 음료는 whey-off 경향이 전혀 없는 균일한 농도를 지닌다. 말젖의 단백질은 rennet에 의한 응고시 육안으로 관찰할 수 있는 curd가 형성되지 않기 때문에 다른 가축의 젖과는 다소 차이가 있다. Rennet은 Koumiss 제조에 사용되지 않지만 발효과정 중에 생성된 산이 유단백질이 미세한 침전물을 형성케 하는 결과를 낳아 현탁액 상태로 남아있게 된다. Koumiss 제조용 starter는 yeast인 *Candida*와 호열성 *Lb. delbreuckii* ssp. *bulgaricus*를 함유하고 있는 것으로 여겨진다(Kosikowski, 1977).

Puhan과 Gallman(1980)은 유산균과 yeast를 개별적으로 첨가하여 우유를 가지고 Koumiss를 생산하는 방법에 관하여 기술하였다. 우유 온도 40℃에서 starter를 접종한 다음, 20~22℃로 배양을 시킨다. 1990년 구소련에서 Mambeteliev는 말젖을 가지고 다단계 공정의 Koumiss 생산에 관한 특허를 획득하였다. Starter는 *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Lactobacterium bulgericum*(*Lb. delbreuckii* ssp. *bulgaricus* ?) 및 *Torula* 속에 속하는 yeast로 구성되어 있다. 첫번째 단계에서 우유를 20~25분간 교반하여 공기를 혼입시킨 다음 실온에서 2~3시간 동안 정치시킨다. 일정한 적정산도에 도달시 여분의 우유를 첨가하여 유지시킨다. 유지 최종단계에서 온도를 16~18℃로 낮추어 2~3시간 다시 정치시킨 후 혼합과 분산을 시킨

다. 최종제품은 yogurt와 유사한 aroma와 함께 산미와 yeast 취를 지닌다.

V. 건강지향 제품

발효제품의 여러가지 건강지향적인 장점을 고찰하는데 있어서는 직, 간접적인 증거를 구분하는 일이 중요한 사항이다. 발효유는 유일한 효과 또는 dried suspension 혹은 우유이외의 carrier media에 대한 미생물 자체의 효능을 검증받을 수도 있다. 그 다음에 발효제품 자체의 미생물 수준에 의한 부수적인 효능이 평가되어야 한다. 효능을 실행하는 미생물의 능력에 관한 정보로서 유용한 결과의 설정이 얻어진 효능의 작용기작을 밝히는데 필요한 실마리를 제공할 수 있다. 또한 특별한 실험실 조건에서 행하는 *in vitro* 시험은 *in vivo* 시험과는 분명한 차이가 있다. 필연적으로 동물 model은 여러가지 믿을 수 있는 정보를 얻을 수 있는 것을 이용해야 하지만, 사람에 대한 추가적인 실험은 용이하지가 않다.

사람에 의한 실험 전환으로 이전의 의문시 되던 건강증진 효과를 평가하기는 어려운 일이다. 건강한 사람이 더 건강해지기를 기대하는가에 대한 의문이 제기되고, 질병예방 효과(prophylactic effects)는 특수한 발명 매체가 없는한 측정하기가 어렵다. *Lactobacillus acidophilus*와 bifidobacteria를 함유한 yogurt의 이용성은 점점 더 증가하는 추세에 있다.

이들 제품제조에 대한 직접적인 주장이 거의 없을지라도, 상술한 미생물을 함유하기 때문에 일반적으로 건강증진 제품으로서 판매 되고 있다.

*Lactobacillus acidophilus*와 bifidobacteria는 건강한 위장관내에 천연적으로 존재하며, 이 천연의 서식지가 미생물을 probiotic organism에 대한 매체로 전환시켜준다. 이러한 probiotic bacteria와 건강개선 및 보호능력을 여러해 동안 상당한 논의 대상이 되었고 여러 연구자들에 의해서 다루어졌다(Deeth와 Tamime, 1981; Alm, 1982; Alm 등, 1983; Gurr, 1987; Fuller, 1989; Fernandez와 Shahani, 1990; Hose와 Sozzi, 1991). 그러나 여

기에는 점점더 많은 주장들이 제시됨으로서 구체화 시켜야 할 사항들이 여전히 남아있다.

전통적인 유산균류를 함유하기도 하는 probiotic-유산균은 위장관내의 환경개선, 변비 완화 및 설사 방지 등의 기능을 지닌다고 Gorbach 등(1988)이 보고하였다. 또한 결장암 예방, 혈중 cholesterol 농도 저하 및 면역체계의 개선 등에 관한 효능이 있는 것으로 알려져 있다.

1. 유당 흡수 및 소화 장애

사람에 있어 개인별 빈약한 유당의 이용성은 심각한 불안감을 야기하여, 이러한 사람들은 심한 위경련과 그로 인한 고통을 겪는다. 이는 장상피 세포를 지나 혈액으로 흡수되는 glucose와 galactose를 방출시키는 이당류의 분해 능력이 없기 때문에 유발된다. 따라서 유당은 위장관내에 남아있는체로 가수분해 되고 위장내의 미생물에 의해서 소화된다. 이러한 경로로 유당이 이용됨으로써 가스가 형성되고, 유당 흡수 및 소화장애 현상이 일어나게 된다.

유산균을 가지고 발효시킨 우유는 유당함량이 감소되며, 생성된 효소는 유당의 소화능력을 지니고 있다. 실험설계시 어려운 점은 미생물 효소의 영향에 의한 것인가 또는 유당 흡수불량의 경감에 의한 것인가를 설정할 때이다. 유산균에서 기원한 일부 유당분해효소는 이들의 기질이 lactose phosphate(효소는 P- β -galactosidase)이기 때문에 위장관내에서 활성을 지니고 있지 않은 것처럼 여겨질 때도 있다. *Lactococci*와 *Lb. acidophilus*는 상술한 type의 효소를 분비하며, 위장관내에서 일어나는 유당의 가수분해를 위해서는 효소 β -galactosidase가 존재하여야만 한다(thermophilic starter와 bifidobacteria에서 발견됨).

간접적인 증거는 H₂ 발산에 기초한 유당가수분해 활성 증상을 지닌 사람으로부터 얻을수가 있다. 이 방법은 소화장애 유당은 하부 장관내에서 보다 많은 수소가스 형성의 원인이 되어 불안한 유당불내증 증상을 일으키는 것을 가정한 것이다(McGill, 1983).

그러나 보다 더 직접적인 증거는 발효유 및 Kefir를 포함하는 규정식의 급여 직전, 직후에 응시자의 plasma galactose 수준을 측정하는 것이다. 즉, 효소 β -galactosidase는 glucose와 galactose를 방출시키는데, 우선 선택적으로 glucos가 대사공정을 거치며, 유당이 효소에 의해 분할된 후 plasma galactose 농도가 증가하게 된다. 이 방법에 대하여 yogurt를 가지고 실시한 초기의 실험은 성공적이지 못하였는데, 이는 yogurt가 이미 상당량의 galactose를 함유하고 있기 때문이라고 설명하였다(Goodenough와 Kleyn, 1976; Schaafsma 등, 1988).

또한 실험발효유로서 Kefir를 가지고 실시한바 Kefir에는 galactose 발효성 *Candida holmii*를 함유한데 반하여, permease를 경유하여 유당을 흡수하는 유산균은 필요한 효소를 함유하지만 galactose는 거의 필요치 않기 때문이다. Guinea pig를 대상으로 실시한 실험에서 비발효유 또는 가열처리된 Kefir와 비교하여 β -galactosidase를 함유한 Kefir 급여후의 plasma galactose 수준에 있어서 증가를 확인하였다.

2. Cholesterol 저하 효과

1989년 Gorbach와 Goldin은 *Lb. acidophilus*의 선발과 분리에 대한 특허 출원을 하였는 바, 이를 계기로 장점막에 흡착하고 담즙에 저항할 수 있는 세포의 필요성이 대두되었다. 이보다 먼저 Gilliland와 Speck(1977)는 glycocholate를 분리하는 능력을 지닌 몇종의 *Lb. acidophilus*와 *Lb. casei*에 관하여 보고하였으며, 분변에서 분리한 6개의 *Lb. acidophilus* 모두는 taucocholate를 분리하는 능력이 있고, 더 이상의 분해가 일어나지 않음을 확인하였다. 혈중 cholesterol 저하 효과에 관한 다수의 연구 결과를 통하여 일부는 정의 관계(Mott 등, 1973; Grunewald, 1982; Gilliland 등, 1985)를 인정한 반면에 다른 연구자들은 혈중 cholesterol 수준에 있어서 어떠한 유의차도 발견하지 못하였다(Nair와 Mann, 1977; Rao 등, 1981; Thompson 등, 1982).

Table 7은 다양한 stain의 미생물을 함유한 우유 배양액을 쥐에게 급여한 후 대조구에 대한 혈청중의 cholesterol 농도 억제율을 나타낸 것이다(Suzuki, 1991).

3. 항종양 활성 및 면역반응 효과

1975년 Bogdanov 등은 항종양 활성(antitumour activity)을 지닌 *Lb. delbreuckii* ssp. *bulgaricus*의 세포벽에서 3개의 glycopeptide를 확인하였다. 이 세포벽 peptide를 sarcoma S-180 cell을 접종하여 8~10일 경과된 쥐에게 정액주사하였다. 투여 후 4~8시간 대에서 종양세포의 검경을 통한 퇴화현상을 감지할 수 있는 정의 효과를 관찰할 수 있었고 24~72시간 대에서는 심각한 회저(necrosis)가 진행되어 후속적으로 완전한 회복 및 면역성이 나타났다.

보다 최근에는 *Lb. delbreuckii* ssp. *bulgaricus*와 *Lb. casei*균의 종양 억제효과에 관한 연구가 진행되었다(Macleod 등, 1990).

즉, 쥐에 있어서 Morris hepatoma No. 7777 종양 세포 증식에 대한 이들 미생물 함유 탈지유 배양액의 동결건조 분말을 투여한 결과 *Lb. casei*와 *Lb. delbreuckii* ssp. *bulgaricus*는 각각 29% 및 58%의 억제 효과를 나타냄을 관찰하였다. 또한 미생물을 가지고 비발효 탈지유, casin 및 가용화된 난백을 대상으로 실험한 결과 어떠한 정의 효과를 얻기 위해서는 탈지유를 발효시켜야만 한다고 결론지었다.

Mihal 등(1990)은 쥐에 있어서 encephalomyocarditis virus 유기성 질병에 대한 *Lb. acidophilus*와 *Lb. casei*의 치료효과를 실험하였다. 특별한 병원성 질환이 없는 쥐에게 virus 감염직전 1일, 4일 및 8일 간격으로 *Lb. acidophilus* 또는 *Lb. casei* 세포(30×10^9 cell) 현탁액을 복강내에 주입시켰다. Virus 감염 저항성은 감염전 4일차에서 강하였고, 처리 후 생존 14일차에서는 *Lb. casei* ssp. *casei*를 급여한 쥐가 가장 크게 나타났다. 이를 근거로 Mihal 등(1990)은 lactobacilli가 면역표적 세포에 의한 interferon의 생산 및 방출을 가능케

Table 7. Effects of cholesterol lowering on fermented milk containing lactic acid bacteria of serum in rats

Strains	No.	Lowering effect(%)	Strains	No.	Lowering effect(%)
<i>L. lactis</i> subsp.	0128	—	<i>E. faecalis</i>	1118	—
<i>lactis</i>	0134	2.3	<i>E. bovis</i>	1401	4.5
	1208	—	<i>E. durans</i>	2038	
<i>S. salivarius</i>	0144	—	<i>L. acidophilus</i>	2050	9.9
subsp. <i>thermophilus</i>	0149	—		2051	26.9
	1015	—		2056	34.3
	1012	13.4		2061	23.0
	1010	10.4		2062	25.0
<i>L. delbrueckii</i>	2101	12.5		2076	13.7
subsp. <i>bulgaricus</i>	2108	1.6		2078	—
	0097	17.0		2079	—
	0098	16.5		2080	—
	0099	37.3		2081	19.0
	0100	20.7		2082	0.5
<i>L. helveticus</i>		9.0	<i>B. longum</i>	2918	—
subsp. <i>jugurti</i>	2161	11.9		2927	13.9
<i>L. casei</i>	2044	0.3		2928	11.9
	2045	—		2936	9.6
	2046	1.3		2937	21.2
	2209	22.4		2933R	28.1
<i>E. faecalis</i>	1107			29	2.5

* — : less than 0%

하여 숙주의 면역 체계를 조절한다고 제안하였다. 또한 발효유 섭취를 통한 비특이성 면역반응의 개시에 관해서는 여러 연구자들에 의해서 수행되었다(Vesely 등, 1985; de Simone 등, 1986; Perdigon 등, 1986, 1987; Goulet 등, 1989).

그러나 생선 세포의 필요 여부 및 이들 미생물이 포함된 규정식을 섭취함으로써 효과가 유지되는지에 관하여는 명확하게 입증되지 않고 있으며, 이들 발효유에 적합한 starter의 선택 및 선발기준 역시 확정되지 않았다.

4. 미생물 상호작용

Yogurt 및 Kefir 발효와 마찬가지로 starter culture로서 선발된 미생물 역시 발효공정이 진행됨에 따라 각각 상호간에 영향을 미친다. Bifidobacteria는 전통적인 호열성 yogurt starter 보다 배양하기가 쉽지 않으나, 우유내에 효모추출액(Klupsch, 1985) 또는 당근즙(Misra와 Kuila, 1989)가 함유되어 있거나 열처리에 의한 가스 배출시(Misra와 Kuila, 1991) bifidus균의 성장을 향상시킬 수도 있다. Oligo당을 포함한 다른 요인

역시 bifidobacteria의 성장을 자극하며, 효소 β -galactosidase의 일부 transferase 생성물도 'bifido' factor로 알려져 있다. 따라서 *Streptococcus thermophilus*와의 조합사용은 bifidobacteria에 유용하게 작용한다.

VI. Probiotic culture와 생물공학

발효 유제품내의 유용균(주로 유산균)은 인체 장내에서 건강유지와 관련하여 중요한 역할을 하며 이를 antibiotics에 반대되는 말로서 probiotics(생균제)라 칭하고 주로 소화증진과 질병예방에 도움을 준다. 유제품은 다수의 생균제를 함유하고 있으며 우유는 *L. acidophilus*와 bifidobacteria 같은 유용균의 이상적인 carrier 및 훌륭한 성장 배지로 알려져 있다.

생균제로서의 효과를 나타내는데에는 yogurt를 포함한 발효유와 sour cream등이 이용되고 있다. 따라서 yogurt는 소비자들에 있어 건강증진 식품으로 인식되어 왔으며, Table 8은 1979년과 1989

년에 있어 각국의 yogurt 소비량을 나타낸 것이다.

Yogurt starter인 *Lactobacillus bulgaricus*와 *Streptococcus thermophilus*는 고유의 장내 균총이 아니기 때문에, 이들 균총에 대한 장내 생존능력 및 역할에 관한 많은 연구가 있었으며(Gilliland, 1990), 또한 병원성 미생물에 대한 억제작용 또는 유당의 소화능력 개선과 관련한 yogurt 발효대상산물의 효과에 대한 광범위한 연구가 진행되었다. 장관을 경유하여 장내를 통과할 능력을 소유하고 있는 것으로 여겨지는 미생물은 *Lactobacillus acidophilus*와 *Bifidobacterium*종(주로 *B. bifidum*, *B. longum*, *B. infantis*)이며 probiotic 함유 제품에 이들 미생물의 이용이 점점 증가하고 있다.

발효유제품 생산에 사용되는 starter culture는 장내에서의 생존능력 및 활성에 따라 3가지 주요 group으로 분류할 수가 있다(Kurmann, 1989).

- 1) Buttermilk, 발효크림 및 quarg 등의 유제품에 이용되는 중온성 culturer이다. 이들 culture는 위를 통과하여 장내에 도달하는 동안

Table 8. Consumption of yogurt in different countries in 1979 and 1989

Country	Yogurt consumption		Increase(%)
	(kg/head/year)		
	1979	1989	
Netherlands	16.2	21.1	30
Switzerland	13.5	17.2	27
France	8.8	15.9	81
Finland	8.0	11.4	43
Germany	6.1	10.6	74
Denmark	9.2	7.9	-14
Austria	5.3	7.5	42
Sweden	3.9	7.3	87
Norway	2.0	4.1	105
United Kingdom	2.4	4.1	71
Japan	1.0	4.0	300
Australia	1.7	3.6	112

* International Dairy Federation(1981, 1991)

생존하지 못하는 것으로 여겨지며, 따라서 장내에서 어떠한 활성도 나타내지 않는다.

- 2) Yogurt에 이용되는 고온성 culture이다. 상술한 바와 같이 *S. thermophilus*와 *L. bulgaricus*는 장내에서 부분적인 생존 능력 및 활성을 지닌 것으로 여겨지나 완전히 규명되지는 않았다.
- 3) 가장 새로운 세대의 유제품으로서 인체의 장내에서 선발한 균총을 함유하는 발효유 제품이다. 이들 미생물은 장내균총을 안정화시키는 능력을 지닌다.

현재 bifidobacteria와 *L. acidophils*를 함유하고 있는 새로운 제품은 프랑스의 경우 전체우유 판매량의 4%, 스웨덴에서는 발효유제품의 약 25%를 점유하고 있다(Hoier, 1992). 전세계적으로는 약 80여종의 bifido-함유 제품이 시중에 유통중에 있

고 유럽의 경우 45개소 이상의 우유공장에서 bifido 제품을 생산중에 있다(Hughes와 Hoover, 1991).

1. Probiotic 낙농 제품의 생산

Culture 및 B-active 효능으로서 비교적 소수의 유제품 발효에 사용되는 미생물은 *L. acidophilus*와 bifidobacteria이다. Table 9는 상술한 미생물을 함유하는 발효제품이 상업적으로 이용되는 예를 나타낸 것이다.

*L. acidophilus*와 bifidobacteria 함유제품은 긴 발효 공정을 거치고, 제품내의 acetic acid에 기인한 얼얼한 맛(piquant taste)때문에 보통 다음과 같은 미생물과 조합하여 사용한다.

- 1) *L. acidophilus* 또는 bifidobacteria와 yog-

Table 9. Same examples of fermented products containing *Lactobacillus acidophilus* and bifidobacteria

Products	Country	Culture other than A/B
Cultura	Denmark, Norway	none
Philus	Sweden	<i>S. thermophilus</i>
BA live	United Kingdom	Yoghurt
A-38	Denmark	Mesophilic LD culture
Acidophilus milk	Sweden	Mesophilic LD culture
Kyr	Italy	Yoghurt
Ofilus	France	<i>S. thermophilus</i>
BIO	France	Yoghurt
Biogarde	Germany	<i>S. thermophilus</i>
Bifigurt	Germany	Only Bifido & <i>S. thermophilus</i>
A-B yoghurt	France	none
B-Active	France	Yoghurt
Yoplus	Australia	Yoghurt
Milky*	Italy	none
Nu-trish a/B milk*	USA	none

* Non fermented milk

** Modified after Driessen & Boar(1987), Robinson(1989), Kurmann & Rasic(1988)

hurt bacteria

- 2) *L. acidophilus* 또는 bifidobacteria와 *S. thermophilus*
- 3) *L. acidophilus* 또는 bifidobacteria와 증은성 aromatic culture

한편 일본의 경우처럼 drink Yakult에 장내 균총인 *L. casei*를 이용하기도 한다(Tamime과 Robinson, 1988). *L. casei*는 인체의 장관내에서 *L. acidophilus* 및 bifidobacteria와 비슷한 특성을 지닌다. 1984년 일본의 Yakult 생산량은 약 130,000 ton으로 추정하고 있다(Tamime과 Robinson, 1988). 유럽 낙농시장에도 새로운 probiotic culture를 연구중에 있으며, Finland에서는 1990년에 건강한 사람에서 분리한 *L. casei* strain이 함유된 발효 신제품 Gefilus를 생산하기 시작하였다. 대부분의 발효유제품 제조시 *L. acidophilus*와 bifidobacteria는 단독으로 또는 다른 starter와 함께 발효공정 초기에 우유에 첨가된다.

1987년 *L. acidophilus*와 bifidobacteria가 함유된 최초의 비발효유제품이 미국에서 출시되었다. 신선한 유제품에 culture가 첨가되며, 적절한 냉장온도에서 저장시 약간의 또는 어떠한 발효공정도 일어나지 않아 맛이 신선한 우유와 유사하고, Italy에서도 이와 유사한 제품이 판매되고 있다(Hoover와 Hughes, 1991).

*L. acidophilus*와 bifidobacteria만을 사용하여 양질의 발효유제품을 생산하는 일은 우유가 이들 미생물에 대한 빈약한 성장배지가 됨으로써 낙농산업 측면에서는 대단한 모험이다.

Bifidobacteria는 초산과 유산을 각각 3:2 비율로 생성하기 때문에, 과도한 생육은 식초같은 맛과 aroma를 지닌 제품을 생산하게 된다. 따라서 strain의 신중한 선택과 제조공정의 조절이 대사물질과 최종 제품의 pH 조절을 위해서 필요하다. Denmark의 Cultura 제품을 model system으로 여길 수가 있는데, 이는 culture 공급자간의 협동체제이며, 주요 유업체에서는 우유에서 symbiotic 성장 양상을 지니는 *L. acidophilus*와 bifidobacteria를 공급받고 있다.

Yogurt 제조용 우유는 단백질 함량을 3.8~4.

0%로 증량시키는 전처리 공정을 거친다. 37°C로 냉각시킨 다음 *L. acidophilus*와 bifidobacteria culture를 분리하여 우유에 접종한다.

만일 freeze-dried DVS culture 사용시에는 각각의 culture 25 g을 우유 1000L에 대해 첨가한다. 우유내에서 *L. acidophilus*와 bifidobacteria의 성장이 비교적 느리기 때문에 발효시간은 37~40°C에서 14~16 시간까지 연장된다. 발효 종료 시점에서 *L. acidophilus*와 bifidobacteria의 미생물 수준은 각각 $2\sim4\times 10^8$ cfu/ml 및 $1\sim2\times 10^8$ cfu/ml에 이르고, pH 4.4~4.2에서 3주간 저장했을 경우 1×10^7 cfu/ml 이상으로 유지되고 있음을 발견하였다(Anon, 1990). Cultura 제품은 stirred yogurt와 유사한 점도를 지니며, 최종제품내에 약 0.2%의 초산이 함유되기 때문에 신선하면서도 얼얼한 맛을 나타낸다.

2. Culture 선별기준

Culture 공급자에 의한 probiotic 유제품 생산을 위해 선별된 미생물은 다음의 3가지 주요한 기준을 만족시켜야만 한다.

- 1) 전통적인 발효유용 culture 선발시에, 선별된 strain은 단독 또는 다른 strain과 조합하여 배양할때 우유를 비교적 빠르게 발효시킬 수 있어야만 한다. 선발된 strain은 또한 발효 제품내에서 높은 균수를 유지하도록 증식하여야만 하고, 저장중의 높은 생균수를 유지하기 위하여 강한 내산성을 지녀야만 한다. 건강 식품으로서의 기능 발휘를 위해서 1일 최저 치료 효과를 나타내는 섭취량은 $10^8\sim 10^9$ cfu/ml의 생균수를 함유한 제품 100g을 섭취하는 것과 같고 유통기한 종료시 생균수는 최저 10^6 cfu/ml 수준을 유지할 수 있어야 한다(Kurmann과 Rasic, 1991). 더우기 선발된 strain은 양호한 맛과 조직특성을 지닌 제품을 생산할 수 있어야 하며, 선발 과정은 실제적인 제품을 생산할 수 있을때에만 성취될 수 있다.
- 2) 장내에서의 기능 발휘를 위해서는 선발된 장

내 균총이 장내에 도달되도록 다수의 미생물이 상부 장관내 통과시 생존할 수 있어야 하고, strain은 하부 장관내의 담즙산에 대한 내성을 지녀야 한다. 위액조건(pH 1~4)에 대한 저항성, 담즙산에 대한 내성, 장내에 존재하는 효소(lysozyme)에 대한 저항성 및 소화과정 중에 생성된 1차 phenol 같은 유독한 대사산물에 대한 저항성 등의 몇가지 *in vitro* 실험을 통하여 상부장관 통과시의 자극 효과 및 하부 장관내 환경등의 영향을 평가하였다(Kurmann, 1988).

3) Strain을 상업적으로 대량 생산할 수 있어야 한다는 점이 culture 공급업자에 있어서는 매우 중요하다. 우유내에서 bifidobacteria의 성장이 느리기 때문에 존재하는 다른 미생물과 경쟁적이지 않고 숫적으로 쉽게 우세해질 수 있다. 우유공장에서 bifidobacteria 함유 bulk starter를 생산할 경우 무균 상태를 유지해야 하며 높은 수준의 미생물이 유지될 수 있도록 하기 위한 특별한 성장 촉진제(growth-promoting media)를 필요로 한다. 개별적인 미생물종과 그리고 고도로 농축된 culture(DVS)를 가공중인 우유에 첨가하기 위한 bifidobacteria와 *L. acidophilus* starter의 생산은 요구되는 맛과 bifidobacteria와 lactobacilli의 최종 비율을 조절하는데 있어 편리성을 제공한다.

DVS culture용으로 선발된 strain은 원할한 상태의 상업적인 발효유 생산을 위해서 미생물 수는 $10^{10} \sim 10^{11}$ cfu/g 수준까지 농축시킬 수 있어야 하고, 또한 생산된 culture는 원심분리, pellet 동결 또는 동결건조 공정 및 저장과 유통수송 중에 만족할만한 안정성을 유지하여야만 한다.

3. 치료학적 효과

대장내의 미생물 수준은 매우 높아 최대 10^{12} cfu/g 수준에 이르고, 소장내에서는 상당히 낮아 $10^4 \sim 10^8$ cfu/g, 위내에서는 낮은 pH때문에 단지 $10^1 \sim 10^2$ cfu/g 수준을 유지한다.

포유아(breast-fed baby)의 우세한 장내 미생물 균총은 bifidobacteria 특히 *Bifidobacterium bifidum* 이다. 우유섭취에서 혼합식으로 전환되는 시점인 이유기에 미생물총 역시 변화한다. 유아형의 bifidobacteria가 성인에서 우세한 균총인 *Bifidobacterium longum*과 *Bifidobacterium longum*과 *B. adolescentis*로 대체된다. 동시에 *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Eubacterium* 및 혐기성 streptococci 같은 혐기성 미생물이 우세하게 된다. 성인형 미생물 총은 다소 안정성을 유지하지만, 중년 말기에는 장내 미생물 총에 있어 다시 변화를 일으킨다. 한가지 특징적인 변화는 bifidobacteria 숫자의 급격한 감소와 *Clostridium perfringens*(일명 Welch's bacillus)의 증가를 들 수가 있다.

장내 미생물 총의 변화는 연령의 변화뿐만 아니라, stress, diet, 의약품, 미생물 오염 및 변비 같은 외적 요인에 의해서도 영향을 받는다. 어떠한 장애일지라도 장내 미생물총에 변화를 유발시킬 수 있으며, 거의 언제나 해로운 결과를 초래하게 된다. Probiotic 낙농제품을 섭취함으로써 장내 미생물총의 올바른 균형 유지와 재설정에 유용한 역할을 기대할 수가 있다.

즉, bifidobacteria와 *L. acidophilus* 함유 제품의 잠재적인 건강 유지 및 치료학적 효과를 규명하기 위한 여러 시도가 있었고, 일반적으로 다음과 같은 사항을 들 수가 있다(Gilliland, 1990; Modler 등, 1990).

- 1) 장내균총의 안정화
- 2) 유당 불내증의 감소
- 3) 혈중 cholesterol 수준 저하
- 4) 항암활성
- 5) 면역체계 활성화

상술한 바와 같이 *L. acidophilus*와 bifidobacteria의 항암활성은 잘 알려져 있으며 장내에서 두 균종에 의해 생성된 초산과 유산이 pH를 낮춤으로써 여러가지 잠재적인 병원성균과 부패균의 성장을 억제하여 결과적으로 장내질환을 예방하게 된다. Chr. Hansen사에서 여행자의 설사방지를 위한 *L. acidophilus*와 bifidobacteria의 효과를 연구한 결과 일단의 이집트 여행객의 경우 1일

3회 1개의 capsule(3×10^9 cfu)을 복용한 결과 설사 빈도가 현저히 낮아졌음을 발견하였다(Black 등, 1989).

4. 생물공학의 응용

1980년대에 낙농발효와 관련된 lactococci가 특정의 유전적 변화기전에 관련되어 있음이 알려졌고(Davis와 Gasson, 1981; McKay; 1985). 1990년대에 이르러서 lactobacilli의 유전적 개량 효과에 관한 연구결과가 발표되었다. 이는 전기적인 변형을 통하여 다른 유전적 특징을 지닌 구조적인 변이체로의 전환 가능성을 보여 주었고, 다양한 개량효과를 얻을 수가 있었다(McKay와 Baldwin, 1990). 중요한 특성을 나타내는 새로운 starter의 개발은 분명하게 확인해야할 사항들이 있다. 이들은 가끔 유당대사, casein 가수분해, citrate로부터 diacetyl 생성 및 exo-polymer 같이 우유 발효와 관련이 있는 것은 분명하게 밝혀졌으나 다른 활성 및 특성은 아직 명확하지가 않다. Probiotic 효과를 위장관내에서 찾고자 할 경우에는 우유에 있어 미생물의 상호작용이 매우 중요한 역할을 한다. 항균성 요소, bacteriocin 및 다른 대사물질(H_2O_2 , 유산)등은 생물공학적 기법을 통하여 전사, 과다 발현 또는 조절이 가능해진다. 그러나 다른 건강 증진 효과의 조절과 통제는 기전이 아직까지 명확치 않기 때문에 향후 계속적인 연구를 필요로 한다. 또한 산업적인 발효공정에 응용시에는 starter 미생물에 도입된 DNA가 발효공정중에 변화하지 않고 안정한 상태로 발현되는 것이 필수적인 요소이다.

5. 법적인 고려사항

현재까지 probiotic 낙농제품은 치료효과와 관련된 막연한 주장을 가지고 시장 진출을 하였으며 또 다른 시장 참여 전략을 찾는 중에 있다. 일부 국가에서는 소비자의 관심을 부드럽고 크림 맛(mild and creamy taste)을 지닌 제품으로 유도

하였고, 이들 제품은 L(+)-유산 함유하고 있는 것이 사실이다. Mild yogurt란 용어는 건강(healthy)과 천연(natural)제품으로서 정상적인 yoghurt에 대한 소비자의 개념으로 부터 차별화하여 유용하게 사용되어져 왔다. 그러나 다른 나라의 경우 이들 제품은 애매한 용어보다는 "health claim"을 가지고 시장에 진출하였다.

Denmark의 Cultura 제품 포장에는 "keeps your stomach going"이란 문구를, 일부 다른 나라에서는 "are good for us" 또는 "contribute to restore the natural balance & secure a good digestion"이란 용어를 사용하기도 한다. 지금도 건강효과와 관련된 법적인 규제는 매우 엄격하며 대부분의 국가에서 식품 포장지에 건강효과의 표시를 불허하고 있는 상태이다.

VII. 인용문헌

1. Alm, L. 1982. Effect of fermentation on lactose, glucose and galactose content in milk and suitability of fermented milk products for lactose intolerant individuals. J. Dairy Sci. 65:346-352.
2. Alm, L., D. Humbel, E. Ryd-Kjellen, and G. Setterberg. 1983. The effect of acidophilus milk in the treatment of constipation in hospitalized geriatric patients. Symposia of Swedish Nutrition Foundation XV:131-138.
3. Anon. 1990. Chr. Hansen's Lab. A/S nu-trish Cultures. Technical bulletin.
4. Amoroso, M. J. and M. C. Manca de Nadra. 1990. A new mixed culture of *Lactobacillus delbreuckii* ssp. *bulgaricus* and *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* isolated from commercial yoghurt. Microbiologie, Aliments, Nutrition. 8:105-113.
5. Black, F. T., P. L. Anderson, J. Oerskov, K. Gaarslev, & S. Laulund. 1989. Prophylactic efficacy of lactobacilli on traveller's

- diarrhoea. *Travel Medicine*:333-335.
6. Bylund, G. 1995. Dairy processing handbook. Tetra Pak Processing Systems AB, Lund, Sweden
 7. Betzl, D., W. Ludwig, and K. H. Schliefer. 1990. Identification of lactococci and enterococci by colony hybridization with 23S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Applied. and Envir. Microbiol.* 56:2927-2929.
 8. Bogdanov, I.G., P. G. Dalev, A. I. Gurevich, M. N. Kolosov, V. P. Markova, L. A. Plemyannikova, and I. B. Sorokina. 1975. Antitumour glycopeptides from *Lactobacillus bulgaricus* cell wall. *FEBS Letters.* 57:259-261.
 9. Bottazzi, V. and F. Bianchi. 1980. A note on scanning electron microscopy of microorganisms associated with the kefir granule. *J. Applied Bact.* 48:265-268.
 10. Cogan, T. M. 1981. Constitutive nature of the enzymes of citrate metabolism in *Streptococcus lactis* ssp. *diacetylactis*. *J. Dairy Res.* 48:489-495.
 11. Cogan, T. M. 1984. Acetolactate synthetase of *Leuconostoc lactis* and its regulation of acetoin production. *J. Dairy Res.* 51:597-604.
 12. Cogan, T. M. 1987. Co-metabolism of citrate and glucose by *Leuconostoc* ssp.:effects on growth, substrates and products. *J. Applied Bacteriol.* 63:551-558.
 13. Collins, M. D., U. Rodrigues, C. Ash, M. Aguirre, J. A. E. Farrow, A. Martinez-Murcia B. A. Phillips, A. M. Williams, and S. Wallbanks. 1991. Phylogenetic analysis of the genus *Lactobacillus* and related lactic acid bacteria as determined by reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *FEMS Microbiol. Letters.* 77:5-12.
 14. Davies, F. L. and M. J. Gasson. 1981. Reviews of the progress of dairy science: genetics of lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.* 48:363-375.
 15. Deeth, H. C. and A. Y. Tamime. 1981. Yoghurt:nutritive and therapeutic aspects. *J. Food Prot.* 44:78-86.
 16. De Simone, C., B. Bianchi Salvadori, R. Negri, M. Ferrazzi, K. Baldinelli, and R. Vesely. 1986. The adjuvant effect of yoghurt on production of gamma-interferon by Con A stimulated human peripheral blood lymphocytes. *Nutrition Reports International.* 33:419-433.
 17. Dills, S. S., A. Aperson, M. R. Schmidt, and M. H. Saie. 1980. Carbohydrate transport in bacteria. *Microbiological Reviews.* 44:385-418.
 18. Doco, T., J. M. Wieruszkeski, and B. Fournet. 1990. Structure of an exocellular polysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus*. *Carbohydrate Res.* 198:313-321.
 19. Driessen, F. M. 1981. Modern trends in the manufacture of yoghurt. *IDF Bulletin.* 179:107-115.
 20. Driessen, F. M., F. Kingma, and J. Stadhouders. 1982. Evidence that *Lactobacillus bulgaricus* in yoghurt is stimulated by carbon dioxide produced by *Streptococcus thermophilus*. *Neth. Milk and Dairy J.* 36:135-144.
 21. Driessen, F. M. and R. de Boer. 1989. Fermented milks with selected intestinal bacteria:a healthytrend in new products. *Neth. Milk Dairy J.* 43:367-382.
 22. Engel, G., U. Krusch, and M. Teuber. 1986. Microbiological composition of kefir 1. Yeasts. *Milchwissenschaft.* 41:418-421.
 23. Fernandez, C. F. and K. M. Shahani. 1990.

- Anticarcinogenic and immunological properties of dietary lactobacilli. *J. Food Protect.* 53:704-710.
24. Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. *J. Applied Bacteriol.* 66:365-378.
 25. Garvie, E. I. 1984. Taxonomy and identification of bacteria important in cheese and fermented milks. In *Advances in the Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milks*. Davies, F. L. and Law, B. A., eds. London: Elsevier Applied Science.
 26. Gilliland, S. E. 1990. Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Reviews.* 87:175-188.
 27. Gilliland, S. E. and M. L. Speck. 1977. Deconjugation of bile acids by intestinal lactobacilli. *Applied and Environmental Microbiol.* 33:15-18.
 28. Gilliland, S. E., C. R. Nelson, and C. Maxwell. 1985. Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Applied and Environmental Microbiol.* 49:377-381.
 29. Goodenough, E. R. and D. H. Kleyn. 1976. Influence of viable yoghurt microflora on digestion of lactose by the rat. *J. Dairy Sci.* 59:601-606.
 30. Gorbach, S. L. and B. R. Goldin. 1989. *Lactobacillus* strains and methods of selection. US Patent 4839281.
 31. Gorbach, S. L., M. Barza, M. Guiliano, and N. V. Jacobus. 1988. Colonisation resistance of the human intestinal flora: testing the hypothesis in normal volunteers. *European J. Clinical Microbiol. and Infectious Diseases.* 7:98-102.
 32. Goulet, J., L. Saucier, and S. Moineau. 1989. Stimulation of the non-specific immune response of mice by fermented milks. In *Yoghurt-nutritional and Health Properties*. Chandan R. ed. New York: National Yoghurt Association.
 33. Groux, M. 1973. Flavour components of yoghurt. *Le Lait.* 53:146-153.
 34. Grunewald, K. K. 1982. Serum cholesterol levels in rats fed skim milk fermented by *Lactobacillus acidophilus*. *J. Food Sci.* 42:2078-2079.
 35. Gunsalus, I. C. and M. Gibbs. 1950. The heterolactic fermentation. II. Position of C¹⁴ in the products of glucose dissimilation by *Leuconostoc mesenteroides*. *J. Bio. Chem.* 194:871-875.
 36. Gurr, M. I. 1987. Nutritional aspects of fermented milk products. *FEMS Microbiological Reviews.* 46:337-342.
 37. Hensiek, R., G. Krupp, and E. Stackebrandt. 1992. Development of diagnostic oligonucleotide probes for four lactobacillus species occurring in the intestinal tract. *Systematic and Applied Microbiol.* 15:123-128.
 38. Hoier, E. 1992. Use of probiotic starter cultures in dairy products. *Food Australia.* 44: 418-420.
 39. Hoover, D. G. and D. B. Hughes. 1991. Current status and future trends of bifidobacteria-related research and products in the USA. *Bifidobacteria Microflora* 10:113-121.
 40. Hose, H. and T. Sozzi. 1991. Probiotics, fact or fiction. *J. Chem. Technol. and Biotechnol.* 51:540-567.
 41. Hughes, D. B. and D. G. Hoover. 1991. Bifidobacteria: their potential for use in American dairy products. *Food Technol.* April:74-83.
 42. International Dairy Federation, 1981. Consumption Statistics for Milk and Milk Products. Document No. 131.

43. International Dairy Federation. 1991. Consumption Statistics for Milk and Milk Products. Document No. 254.
44. Jordon K. N. and T. M. Cogan. 1988. Production of acetolactate by *Streptococcus diacetylactis* and *leuconostoc* ssp. J. Dairy Res. 55:227-238.
45. Klupsch. 1985. Method for making kefir. European Patent Application EP 0148 300 A1.
46. Kosikowski, F. V. 1977. Cheese and Fermented Milk Foods. 2nd ed. Michigan: Edwards Bros.31. Kurmann, J. A. and J. L. J. Rasic. 1988. Technology of fermented special products. In Fermented Milks. Bull. IDF. 227:101-109.
47. Kurmann, J. A. 1984. The production of fermented milks in the world. II. Aspects of the production of fermented milks. IDF Bulletin, 179:16-26.
48. Kurmann, J. A. 1988. Starters with selected intestinal bacteria. In Fermented Milks. Bull. IDF. 227:41-55.
49. Kumann, J. A. 1989. Eine neue Generation fermentierter Milchprodukte mit ausgewählten Intestinalbakterien für eine günstigere ernährungsphysiologische Wirkung. In Neue Entwicklungen bei den Sauermilchprodukten:50-61. Liebefeld Bern, Schweizerische Milchkommission.
50. Kurmann, J.A. and J. L. J. Rasic. 1991. Health potential of products containing bifidobacteria. In Robinson RK(ed). Therapeutic Properties of Fermented Milks. Elsevier Applied Food Science, London.
51. La Riviere, J. W. M., P. Kooiman, and K. Schmidt. 1967. Kefiran, a novel polysaccharide produced in the kefir grain by *Lactobacillus brevis*. Archiv für Mikrobiologie. 59:269-278.
52. Larsen, N. E. 1987. Production of yogurt. Marketing Bulletin. Pasilac-Danish Turnkeny Dairies Ltd.
53. Lees, G. R. and G. R. Jaago. 1978 a. Role of acetaldehyde in metabolism:a review. I. Enzymes catalysing reactions involving acetaldehyde. J. dairy Sci. 61:1205-1215.
54. Lees, G. R. and G. R. Jaago. 1978 b. Role of acetaldehyde in metabolism:a review. II. The metabolism acetaldehyde in cultured dairy products. J. dairy Sci. 61:1216-1224.
55. Libudzisz, Z. and A. Piatkiewicz. 1990. Kefir production in poland. Dairy Industries Int. 55:31-33.
56. Macleod, A, K. Osimek, M. Stiles, V. Baracos, and F. Wolfe. 1990. The effect of *Lactobacillus casei* on the proliferation of Morris hepatoma no. 7777 tumours in Buffalo rats. Milchwissenschaft. 45:566-571.
57. Mambeteliev, D. B. 1990. Production of koumiss. USSR Patent SU1 544 341.
58. McGill, D. B. 1983. Diagnostic test for lactase deficiency. In Milk Intolerances and Rejection, pp 35-41. Delmont J, ed. Basel:Karger.
59. McKay, L. L. 1985. Roles of plasmids in starter cultures. In Bacterial Starter Cultures for Foods. Gilliland, S. E., ed. Florida:CRC Press.
60. McKay, L. L. and K. A. Baldwin. 1990. Applications of biotechnology: present and future improvements in lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Reviews. 87:3-14.
61. Marshall, V. M. 1986. The microflora and production of fermented milks. In Progress in Industrial Microbiol. 23:1-44. Adams, M. R., ed. Oxford:Elsevier.
62. Marshall, V. M., W. M. Cole, and B. E. Brooker. 1984 a. Observations on the

- structure of kefir grains and the distribution of the microflora. *J. Applied Bacteriol.* 57:491-497.
63. Marshall, V. M., W. M. Cole, and J. A. E. Farrow. 1984 b. A note on the heterofermentative lactobacillus isolated from kefir grains. *J. Applied Bacteriol.* 56:503-505.
 64. Mihal, V., V. Lackovic, M. Plockova, and P. Brezina. 1990. Protective effect of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* on encephalomyocarditis virus induced disease in mice. *Food and Agric. Immun.* 2:205-209.
 65. Misra, A. K. and R. K. Kuila. 1991 b. The selection of bifidobacteria for the manufacture of fermented milks. *Australian J. Dairy Technol.* 46:24-26.
 66. Modler, H. W, R. C. McKellar, and M. Yaguchi. 1990. Bifidobacteria and bifidogenic factors. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* 23:29-41.
 67. Mott, G. E., R. W. Moore, H. E. Redmond, and R. Reiser. 1973. Lowering of serum cholesterol by intestinal bacteria in cholesterol-fed piglets. *Lipids.* 8:428-431.
 68. Mozzi, F., G. S. De Giori, G. Oliver, and F. De Valdez. 1994. Effect of culture pH on the growth charact and polysaccharide production by *Lactobacillus casei*. *Milch-wissenschaft.* 49:667-669.
 69. Nair, C. R. and C. V. Mann. 1977. A factor in milk which influences cholesterolaemia in rats. *Atherosclerosis.* 26:363-367.
 70. Nakajima, H., S. Toyoda, T. Toba, T. Itoh, T. Mukai, H. Kitazawa, and S. Adachi. 1990. A novel phosphopolysaccharide for slime-forming *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* SBT 0495. *J. Dairy Sci.* 73:1472-1477.
 71. Olsen, N. F. 1990. The impact of lactic acid bacteria on cheese flavor. *FEMS Microbiol. Reviews.* 87:131-148.
 72. Perdigon, G., M. E. Nader de Macia, S. Alvarez, G. Oliver, M. Media, and A. A. Pesce de Ruiz Holgado. 1986. Effect of mixture of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus* administered orally on the immune system in mice. *J. Food Protect.* 49:986-989.
 73. Perdigon, G., M. E. Nader de Macia, S. Alvarez, G. Oliver, and A. A. Pesce de Ruiz Holgado. 1987. Enhancement of immune responses in mice fed with *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus acidophilus*. *J. Dairy Sci.* 70:919-926.
 74. Petit, C., J. P. Grill, N. Maazouzi, and R. Marczak. 1991. Regulation of polysaccharide fermentation by *Streptococcus thermophilus* in batch and fed-batch cultures. *Applied Microbiol. and Biotechnol.* 36:216-221.
 75. Puhon, Z. and P. Gallman. 1980. Ultrafiltration in the manufacture of koumiss and quark. *Cultured Dairy Products J.* 15:12-14.
 76. Rao, D. R., C. B. Chawan, and S. R. Pulusani. 1981. Influence of milk and thermophilus milk on plasma cholesterol levels and hepatic cholesterologenesis in rats. *J. Food Sci.* 46:1339-1341.
 77. Robinson, R. K. 1989. Special yoghurts the potential health benefits. *Dairy Ind. Int.* 54:23-25.
 78. Rosi, J. and J. Rossi. 1978. The kefir micro-organisms: the lactic acid bacteria. *Scienza & Tecnica Lattiero Casearia.* 29:291-305.
 79. Schaafsms, G., P. Derikx, P. R. Dekker,

- and H. de Waard. 1988. Nutritional aspects of yoghurt. I. Microbial lactase activity and digestion of lactose. Netherlands Milk and Dairy J. 42:121-124.
80. Shankar, P. A. 1977. Interrelationships of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. Ph D thesis, reading University, UK.
 81. Singh, H. P., M. V. R. Rao, and S. M. Dutta. 1979. Partial purification and properties of *Leuconostoc citrovorum* beta-galactosidase. Milchwissenschaft. 34:475-477.
 82. Suzuki, Y. 1991. Effects of lactic acid bacteria on metabolism of serum cholesterol in rats. Japanese J. Dairy and Food Sci. 40: A283-A288.
 83. Tamime, A. Y. and R. K. Robinson. 1988. Fermented milks and their future trends. Part II. Technological aspects. Dairy Res. 55:281-30.
 84. Thompson, L. U., D. J. A. Jenkins, V. Amer, R. Reichert, A. Jenkins, and J. Kamulsky. 1982. Effect of fermented and unfermented milks on serum cholesterol. American J. Clinical Nutrition. 36:1106-1111.
 85. Thompson, J. K., D. E. Johnston, R. J. Murphy, M. A. Collins. 1990. Characteristics of a milk fermentation from rural Northern Ireland which resembles kefir. Irish J. Food Sci. and Technol. 14:35-49.
 86. Toba, T., T. Kotani, and S. Adachi. 1991. Casular polysaccharide of a slime-forming *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* LAPT 3001 isolated from Swedish fermented milk langfil. Int. J. Food Microbiol. 12:167-172.
 87. Ueda, M., S. Isasawa, N. Miyata, and K. Ahiko. 1982. Hexosephosphorylating activities of *Torulopsis holmii* KY5 isolated from kefir grain. Agric. and Biol. Chem. 46:2637-2643.
 88. Veringa, H. A., T. E. Galesloot, and H. Davelaar. 1968. Symbiosis in yoghurt. II. Symbiosis and identification of growth factor for *Lactobacillus bulgaricus* produced by *Streptococcus thermophilus*. Neth. Milk and Dairy J. 36:135-144.
 89. Vesely, R., R. Negri, B. BianchiSalvadori, D. Lavezzari, and C. De Simone. 1985. Influence of a diet additioned with yoghurt on the mouse immune system. J. Immun. and Immunopharmacol. 51:30-35.
 90. Yokoi, H., T. Watanabe, Y. Fujii, T. Mukai, T. Toba, and S. Adachi. 1991. Some taxonomical characteristics of encapsulated *Lactobacillus* sp. KPB167B isolated from kefir grains and characterization of its extracellular polysaccharide. International J. Food Microbiol. 13:257-267.