

2015년 개정된 식품공전에 따른 국내 시장에서 ‘Bifidus’ 요구르트 제품에 대한 비피더스균수 조사

Report on 'Bifidus' yogurt products in the Korean domestic market reflecting its regulated counting of Bifidobacteria according to revised Food Code 2015

조용수 · 전수현 · 이광원*

Yong Soo Cho, Su-Hyun Chun, and Kwang-Won Lee*

고려대학교 일반대학원 생명공학과

Department of Biotechnology, College of Life Sciences and Biotechnology, Korea University

Abstract

Yogurt, which has long been consumed as a longevity food, is characterized by a large number of lactic acid bacteria. The sales of yogurt market have increased for the past three years due to research findings that the intestinal microbial environment is closely associated with many human diseases and the well-being trend of recent consumers. The recent trends in the yogurt market have focused to low sugar content, functionalities such as enhanced immunity, and yogurt for freezing. In addition, recent yogurt products tend to be labeled for certain lactic acid bacteria having functionality in their products. Many yogurts have names of specific lactic acid bacteria on their products, such as 'Activia' and 'Bifidus'. We monitored the 'Bifidus' products in the market for reflecting its regulated counting

in their products required to contain more than 10 million *Bifidobacteria* according to the revised lactic acid bacteria-counting test of Food Code 2015.

서론

우리 장 내에는 최소 10조 이상의 균들이 미생물 공동체를 이루고 있으며(Savage, 1977), 이러한 장내 미생물 환경은 신체의 체형 및 대사성 질환에 직접적인 영향을 미치고(Backhed 등, 2004) 대장암 발병과도 연관되어 있으며(Kostic 등, 2012), 중추신경계를 활성화 시키고 우울증과 무기력감 등에도 영향을 미친다고 알려져 있다(Foster과 Neufeld, 2013). 장내 미생물이 신체의 여러 질병과 연관됨이 알려짐에 따라 장 건강에 효과적인 발효유에 대한 관심이 높아졌으며(Fuller, 1991), *Bifidobacterium* 속 및 *Lactobacillus* 속

*Corresponding author: Kwang-Won Lee

Department of Biotechnology, College of Life Science and Biotechnology, Korea University, Anam-Dong, Sungbuk-Gu, Seoul 02841, Korea

Tel: +82-2-3290-3027

Fax: +82-2-927-1970

E-mail: kwangwon@korea.ac.kr

Received March 9, 2018; revised March 20, 2018; accepted March 20, 2018

Table 1. Summary of the specific activity of the specific lactic acid bacteria studied.

Probiotic species studied	Outcomes	Reference
<i>Bifidobacterium longum</i> BB536	Significantly reduce the period of throat by 46% Tend to reduce the duration of fever, runny nose, and cough	Lau <i>et al.</i> , 2018
<i>Bifidobacterium longum</i> NCC3001	Significantly decreased depression Does not affect anxiety and Irritable Bowel Syndrome	Pinto-Sanchez <i>et al.</i> , 2017
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BB-12	Significantly increase in fecal secretory IgA and anti-poliovirus-specific IgA Tend to increase in anti-rotavirus-specific IgA	Holscher <i>et al.</i> , 2012
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BB-12	Tend to reduce the diarrhea date Tend to shorter episodes of diarrhea	Chouraqui <i>et al.</i> , 2004
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BB-12	No differences were observed in gastrointestinal symptoms, otitis media or use of antibiotics Significantly reduce the risk of respiratory infection	Taipale <i>et al.</i> , 2016
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> FC	Significantly increase in defecation frequency and stool volume	Ozaki <i>et al.</i> , 2018
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Significantly increase in the activities of digestive enzymes Decrease the vibrio counts in the intestine	Adel <i>et al.</i> , 2017
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	2.9% reduction of serum cholesterol concentration	Anderson and Gilliland, 1999
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Significantly inhibited increases in serum cholesterol concentration	Gilliland <i>et al.</i> , 1985
<i>Lactobacillus casei</i> strain GG	Reduced the duration of acute diarrhea	Isolauri <i>et al.</i> , 1991
<i>Lactobacillus casei</i> strain GG	When the strain was administered 8 days after the vaccine administration, the response of the rotavirus-specific IgM secreting cells was increased.	Isolauri <i>et al.</i> , 1995

등 발효유에 함유된 각 유산균들 개별의 생리활성이 보고되면서(Table 1), 발효유 제조사들은 각종 생리활성이 두드러진 *Bifidobacterium* 속, *S. thermophilus*, *L. acidophilus*, L-GG 유산균 등 특정 유산균들의 함유 여부를 제품에 표시하고 홍보에 활용함으로써 매출액 신장에 노력을 하고 있다.

식품의 기준 및 규격 개정고시 2015-78호 이후로 국내 식품공전의 유산균 시험법의 분류는 총 유산균 수 측정방법과 유산간·구균 및 비피더스균 측정방법으로 재분류 되었고, 기존의 비피더스균 측정에 사용되었던 Briggs liver agar (BL agar)가 총 유산균 수 측정 배지로 변경되었고, 또한 비피더스균 측정에 사용되었던 *Bifidobacterium* selective agar (BS agar)가 삭제되었으며, transgalacto-oligosaccharides with mupirocin agar (TOS-MUP agar)가 비피더스균 측정에 새로이 추가되

었고, 총 유산균 수 측정을 위해서 de Man Rogosa and Sharpe agar (MRS agar)가 추가되었다(MFDS, 2015). 한편 황색으로 변한 집락만 계수하는 방법으로 기존 유산간·구균 산정에 사용되던 bromocresol purple (BCP) 첨가배지는 2016년 12월(MFDS, 2016a), 유산간·구균 산정에는 변동 없이 모든 집락을 계수하여 총 유산균 수도 측정할 수 있도록 개정되었다. 식품의약품안전처는 ‘유산균 및 비피더스균, 장출혈성 대장균의 효율적인 검사를 위한 배지성분 추가 및 시험법 개정’이라는 이유로, 기존 비피더스균 산정에 사용되던 BL agar를 총 유산균 수 산정으로 바로잡았으나, 발효유 제조사들이 개별적으로 표시하고 있는 *S. thermophilus*, *L. acidophilus*, L-GG 유산균 등 개별의 특정 유산균 균주의 함량 측정 및 동정 방법은 아직 추가되지 않았다.

따라서 본 연구진은 발효유 시장의 트렌드를 파악하

고, 2015년 식품공전 유산균 수 시험법 개정이 3년 지난 현시점에서 *Bifidobacterium*을 1천만 마리 이상 함유하고 있다고 표시한 시중 유통 중인 ‘비피더스’ 제품을 대표적인 사례로 모니터링 함으로써 각 제조사의 발효유 내 유산균 정도관리 실태를 파악하고 이에 관한 제도관리의 필요성을 점검하기 위하여 본 연구를 수행하였다.

본론

1. 발효유와 유산균

발효유는 원유 또는 유가공품을 유산균 및 효모로 발효시킨 것으로 러시아의 생물학자 메치니코프(Elie Metchnikoff)가 불가리아 농민들의 장수비결이 발효 유임을 발견한 이후로 많은 사람들이 관심을 가지게 되었다(Brown과 Valiere, 2004). 이후 계속된 연구로 발효유는 노년층의 골흡수(bone resorption)를 막아주며(Bonjour 등, 2013), 당뇨병 발생 위험을 낮추주고(Margolis 등, 2011), 면역력을 증진시켜 주며(Makino 등, 2010), 사람의 인지능력 및 기억력에도 개선효과가 있음이 밝혀졌다(Crichton 등, 2010). 또한 사람의 장내 미생물 환경이 신체의 체형에 직접적인 영향을 미친다는 연구가 보고되었고(Backhed 등, 2004), 유산균 섭취가 장내 미생물 환경을 개선한다는 점이 보고됨에 따라(Fuller, 1991), 유산균을 다량 함유한 발효유는 웰빙 식단의 트렌드가 되고 있다.

유산균(lactic acid bacteria)은 비피더스균, 유산간균, 유산구균 등과 같이 유당과 포도당을 이용하여 유산을 만드는 미생물을 총칭한다(MFDS, 2016b). 비피더스균은 1960년대 이전에는 *Lactobacillus* 속의 *Lactobacillus bifidus*로 분류되었으나, 현재는 *Bifidobacterium* 속에 속하는 균을 칭하며, 그 중에는 *Bifidobacterium longum* BB536가 감기증세를 완화함이 밝혀졌으며(Lau 등, 2018) *Bifidobacterium longum* NCC3001의 섭취는 우울감을 감소시켜준다고 보고되었다(Pinto-Sanchez 등, 2017). 또한 *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*는

Web of Science 검색 결과(Web-of-Science, 2018), 장내 면역을 강화하고(Holscher 등, 2012) 급성의 감염성 설사를 억제하는(Chouraqui 등, 2004) 등 그 효능을 보고하는 300여 편의 논문이 검색되었다. 유산간균은 *Lactobacillus* 속에 속하는 균을 칭하며, 관상동맥 심장 질환 예방(Anderson과 Gilliland, 1999) 및 혈청 콜레스테롤 수치 감소(Gilliland 등, 1985)에 효과적인 *Lactobacillus acidophilus*와, 급성 설사를 막아주고(Isolauri 등, 1991) 면역력 향상(Isolauri 등, 1995) 등에 효과적인 *Lactobacillus casei* 등이 발효유에 널리 사용된다. 유산구균에 속하는 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FC는 배변활동을 도우며(Ozaki 등, 2018), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*는 소화를 돕고 장내 환경을 개선해 준다는 연구가 보고되었다(Adel 등, 2017). 유산균에 속하는 각종 균주들에 대해서 Table 1과 같이 그 생리활성에 관한 연구가 많이 진행되어 왔다.

2. 발효유에 대한 국내 기준 및 규격

국내 식품공전(MFDS, 2018b) 상에 명시된 기준 및 규격에 따르면, 발효유는 유산균의 함량에 따라 발효유와 농후 발효유로 나뉘며 발효유의 경우 총 유산균 수를 1 mL 당 1천만 마리 이상, 농후 발효유의 경우 1 mL 당 1억 마리 이상으로 기준 규격이 설정되어 있다. 또한, 현행 유산균 시험법은 식품공전 4.9.1 유산균수 측정방법과 4.9.2 유산간·구균 및 비피더스균 측정방법(MFDS, 2018a)으로 분류되어 있으며 전자의 시험법은 일반적으로 총 유산균 수를 측정할 때 사용되며 후자의 시험법은 유산간·구균의 단순 첨가 제품을 시험하거나 유산간·구균과 비피더스균을 따로 구분해서 산정해야 할 때 사용하도록 되어 있다.

현행 식품공전의 유산균 시험법(MFDS, 2018a)은 2015년 10월 개정(MFDS, 2015)되었으며, 2015년 개정 이전의 비피더스균 산정 배지였던 BL agar에서는 *Bifidobacterium* 속의 균 이외에도 *Lactobacillus* 속의 균도 집락을 형성할 수 있으므로 기존의 비피더스균 산정 배지에서 현행의 총 유산균 수 산정 배지로 변

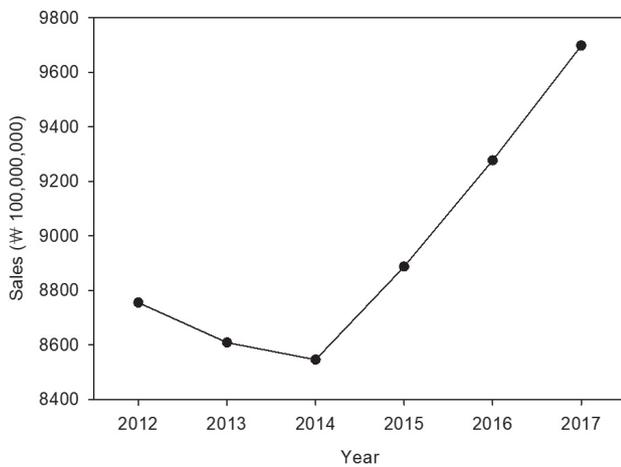


Fig. 1. Changes in sales of yogurt retail market by year

경되었고, TOS-MUP agar에 들어간 TOS와 sodium propionate 성분은 비피더스균 성장에는 필수적인 요소이지만 다른 유산균들은 이용할 수 없고, mupirocin 이 다른 대부분 유산균들이 성장을 저해하므로(Rada, 1997) TOS-MUP agar가 새로이 비피더스균 산정 배지로 추가되었다(MFDS, 2015).

또한 유산균이 균주에 따라 각자 다른 생리활성을 보인다는 많은 연구들이 보고(Table 1)됨에 따라 발효유 제조업체들은 총 유산균 함량만 표시하기 보다는 임상적으로 입증된 여러 우수 균주를 분리해 첨가하고 표시한 뒤, 이를 타제품과의 차별화 전략으로 이용하는 발효유가 대부분이다. ‘식품 등의 표시기준’에서는 무분별한 우수 균주 함유 표시를 막기 위해 특정 유산균의 함유 사실을 표시할 때에는 해당하는 균의 함량을 함께 표시하도록 규정하고 있다(MFDS, 2016b).

3. 국내 발효유 시장 현황

국내 발효유 시장의 매출액 규모를 살펴보면(Fig. 1), 2012년부터 멈춰 있던 발효유 시장 성장세는 발효유 제조사들의 신제품 출시 등의 노력에 따라 2014년 8,546억 원 규모에서 2015년 8,887억 원 규모로 약 4% 성장했고, 2016년 9,277억 원 규모로 약 4% 성장, 2017년 9,698억 원으로 약 5%정도 오름세를 보이며 꾸준히

성장하고 있다(aTFIS, 2012-2017). 지속적인 발효유 시장의 성장은 제조사의 신제품 출시와 연관성을 보이며, 2015년에는 샐러드 및 과일과 함께 발효유를 섭취하는 트렌드에 따라 대용량 요거트의 판매가 급증하였고 당성분을 첨가하지 않은 발효유 제품들이 출시되었다(Korean Agro-Fisheries & Food Trade Corp., 2015). 2016년에는 얼려 먹는 발효유 판매가 급증하였고, 저당 발효유들이 출시 되었으며(Korean Agro-Fisheries & Food Trade Corp., 2016), 2017년 발효유 시장 트렌드는 면역력 강화와 같은 기능성 발효유들의 등장이었다(Korean Agro-Fisheries & Food Trade Corp., 2017).

이와 별개로 예전부터 진행되어왔던 발효유 시장의 또 하나의 트렌드는 타사 제품과의 차별성을 위해 효능이 입증된 특정균의 함유 사실을 표시하고 홍보해온 점이다. *Bifidobacterium actiregularis* 학명에서 상표명을 딴 ‘액티비아’와 *Bifidobacterium*의 학명을 딴 ‘비피더스’ 등 제품의 상표까지 특정균의 학명을 이용하는 제품도 있었다. ‘액티비아’ 제품은 해외 발효유 제조사에 의해 2009년 국내에 처음 출시 되었으며, 제품 한 병당 비피더스 액티레굴라리스 10억 마리 함유로 표시하고 있다. ‘비피더스’ 상표명을 사용하는 제품은 1996년 처음 출시되었으며, 이후 여러 제조사들이 ‘비피더스’ 상표명의 제품을 출시하여 한 때 상표권 분쟁이 일기도 하였다. 현재 시중 유통 중인 발효유 ‘비피더스’ 제품은 모든 제조사에서 자체적으로 1 mL 당 비피더스균 1천만 마리 이상 함유로 표시하고 있다.

4. 시중 비피더스 제품 균 수 분석 및 동정의 필요성

1996년부터 특정 유산균을 상품명으로 한 ‘비피더스’ 제품이 출시되어 유통되고 있다. ‘비피더스’ 제품과 다른 발효유와의 차이는 일반적으로 발효유에 표기하는 총 유산균 수 만이 아니라, 제품에 사용된 특정 유산균인 비피더스균의 함량을 별도로 표기할 필요가 있다는 점이다.

비피더스균의 함량 측정에는 2007년 이전부터 BL agar가 사용되어 왔으나(MFDS, 2007) BL agar는 비선택배지이며 첨가된 혈액 defibrinated horse blood가 손

상된 균의 회복을 돕기 때문에(Park과 Ji, 2016) 현행 식품공전(MFDS, 2018a)의 총 유산균 수 측정에 사용 중인 MRS agar보다도 유산균을 더 많이 검출하므로(Park과 Ji, 2016) 2015년 10월, BL agar는 기존 비피더스균의 함량 측정에서 총 유산균 함량측정에 사용하도록 변경되었다(MFDS, 2015). 한편 유산간·구균 함량 측정에는 BCP 첨가배지에 형성된 황색의 집락을 계수하는 방법으로 기존 시험법과 변경이 없었으나(MFDS, 2015), BCP 첨가배지에 형성된 모든 집락을 계수하여 총 유산균 수 함량측정에도 사용할 수 있도록 개정되어(MFDS, 2016a) 현행 총 유산균 수 측정에 사용될 수 있는 배지는 BL agar, MRS agar 및 BCP 첨가배지 세 가지로 규정되어 있다(MFDS, 2018a). 비피더스균 수 측정에 새로이 추가된 방법은 TOS-MUP agar를 사용하는 방법으로, 이와 함께 보편적으로 비피더스균 수 산정에 사용되어온 BS agar보다 *Bifidobacterium*을 더 정확히 측정할 수 있고 다른 유산균의 생장도 효과적으로 저해할 수 있다(Park과 Ji, 2016). 따라서 1996년부터 지금까지 유통 판매되고 있는 ‘비피더스’ 제품 내 비피더스균의 함량 표기가 현재에도 제대로 이루어지고 있는지 확인하기 위해, 비피더스균 함량을 별도로 표시하고, 제품의 이름을 ‘비피더스’로 사용하는 A, B, C社の 액상형 비피더스 사과(이하 ‘비피더스 사과’라고 함) 제품에 대하여 총 유산균 및 비피더스균 함량 분석을 구매 직후와 유통기한 종료일에 각각 실시하였으며, 16S rRNA gene PCR 동정을 통해 *Bifidobacterium* 속의 여부를 확인하였다. 사용된 primer의 염기서열로는 universal primer인 27F primer (5'-GTTTGATCCTG-GCTCAG-3')와 1492R primer (5'-TACGGCTACCTT-GTTACGACTT-3')가 이용되었다.

4.1 시중 비피더스 제품 구입 및 비피더스균 산출 방법

본 연구에 사용한 발효유는 현재 시중에서 쉽게 접할 수 있는 A, B, C社の ‘비피더스 사과’ 제품이며 유통기한이 2일 이상 차이가 나지 않도록 각 4개씩 총 12개를 동일한 날, 동일한 장소에서 구매하였다. 모든 제품은 4℃에 보관하였다.

Table 2. Bifidobacterial counts at the beginning and at the end of the shelf life

		Bifidobacterial contents (CFU/mL)	
		Measured number of bacteria	
	Labeled number of bacteria	Purchase day	Expiration day
A 社	≥ 10,000,000	118,200,000 ± 34,076,385 ^a	103,700,000 ± 29,750,210 ^a
B 社	≥ 10,000,000	2,791,000 ± 1,309,219 ^b	2,122,000 ± 824,065 ^b
C 社	≥ 10,000,000	29,300,000 ± 12,542,926 ^b	14,700,000 ± 9,839,970 ^b

Values are the mean±S.D. of five independent experiments performed in duplicate. Different letters indicate significant differences at $P<0.05$ by Tukey's HSD tests.

2015년 개정된 현행 식품공전(MFDS, 2018a)에 따르면 비피더스균을 유산간·구균과 구분해서 산정하는 경우는 TOS-MUP agar를 사용하도록 되어있으며 총 유산균 수 또는 유산간·구균의 산정에는 BCP 첨가배지를 사용하도록 규정되어 있다. 따라서 본 연구진은 총 유산균의 집락을 계수하기 위해 Eiken chemical 社の BCP plate count agar (Tochigi, Japan)를 사용하였으며, 비피더스균의 집락을 계수하기 위하여 MB cell 社の TOS-MUP agar (Seoul, Korea)를 사용하였다. 총 유산균 및 비피더스균의 산출을 위해 2018년 현재 고시된 식품공전 중 7. 일반시험법 4.9 유산균수 시험방법(MFDS, 2018a)을 이용하였다.

4.2 유통기한에 따른 균 산출 및 변화

구매 당일 3社 제품에 대하여 각각 총 유산균 수와 비피더스균 수를 측정하였고, 유통기한 종료일에도 총 유산균 수와 비피더스균 수를 한번 더 측정하였다. 3社 제품 모두 유통기한이 종료되면 다시 제품들을 구매하는 방식으로 위의 시행을 총 5회 반복하였다.

그 결과 A 社 제품의 비피더스균 함량이 구매 초기 제품 및 유통기한 당일 제품에 관계없이 유의적으로 B, C 社の 비피더스균 함량에 비해 많았다(Table 2). A 社の 구매 당일 제품에서 비피더스균 함량은 1 mL 당

Table 3. Lactic acid bacterial counts at the beginning and at the end of the shelf life

Lactic acid bacterial contents (CFU/mL)			
Labeled number of bacteria	Measured number of bacteria		
	Purchase day	Expiration day	
A 社 ≥ 10,000,000	400,000,000 ± 119,373,364 ^a	386,000,000 ± 78,533,432 ^a	
B 社 ≥ 10,000,000	636,000,000 ± 92,830,491 ^b	701,000,000 ± 263,638,009 ^{ab}	
C 社 ≥ 10,000,000	966,000,000 ± 81,348,018 ^c	818,000,000 ± 288,066,833 ^b	

Values are the mean ± S.D. of five independent experiments performed in duplicate. Different letters indicate significant differences at $P < 0.05$ by Tukey's HSD tests.

118,200,000마리였고 유통기한 당일 제품 103,700,000마리였다. 가장 비피더스균 함량이 낮은 B 社 제품보다 구매당일 제품에서 약 42배 이상, 유통기한 당일 제품에서 약 48배 이상 비피더스균을 많이 함유하고 있었다.

A, B, C 社 모두 비피더스균 수를 제품 1 mL 당 10,000,000마리 이상으로 표시하였으나 B 社 제품의 비피더스균 함량은 구매 초기 제품에서 1 mL 당 2,791,000마리, 유통기한 당일 제품에서 1 mL 당 2,122,000마리가 함유되어 있었으며, 표시해 놓은 10,000,000마리에 현저히 못 미치는 수치로 표시기준에 미달했다. B 社의 비피더스균 함량이 자체적으로 표시해 놓은 함량에 미치지 못하는 이유는 B 社의 비피더스균 수 정도관리가 아직 새롭게 개정된 식품공전 시험법을 반영하지 못한 것으로 사료된다.

총 유산균의 함량은 BCP 첨가배지에 형성된 모든 집락을 계수하는 경우 산출할 수 있고, 황색으로 변한 집락만을 계수하는 경우 다른 유산균을 제외한 유산간구균의 함량을 산출할 수 있다(MFDS, 2018a). 본 연구진은 3 社의 '비피더스' 제품이 유산간구균에 대해서 언급하고 있지 않으므로 유산간구균에 초점을 두지 않고 총 유산균의 함량을 측정했다. A, B, C 3 社의 총 유산균 함량 분석 결과(Table 3), 구매 당일에는 C, B, A 社 순으로 유의적인 차이를 보이며 총 유산균이 함

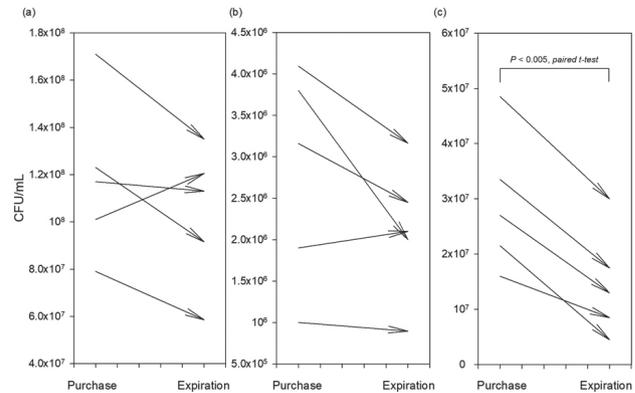


Fig. 2. Comparison of reduction number of colony forming unit (CFU) of *Bifidobacterium* reduction at the day of purchase and the expiration date of each product of (a) A, (b) B, and (c) C companies.

유되어 있었으며($p < 0.05$), 유통기한 당일 제품에서는 총 유산균 함량에 유의적인 차이를 보이지 않았다. 식품공전 상 발효유는 1 mL 당 1천만 마리 이상으로 유산균 수 규격이 설정되어 있고 3 社 제품의 유산균 함량 모두 이를 초과하는 수치였다.

구매 당일과 유통기한 당일의 각각의 분석 시료 당 비피더스균 함량 변화 추이를 'before-after graph'를 이용해 paired t-test로 분석한 결과 Fig. 2와 같이 나타났다. 그 결과 A, B, C 社 제품 모두의 비피더스균 함량은 감소하는 경향을 보였으나 A와 B 社는 유의미한 차이를 보이지 않았고, C 社에서만 유의미한 감소를 보였다($p < 0.05$). 구매 당일과 유통기한 당일의 각각의 분석 시료 당 총 유산균 함량 변화 추이를 'before-after graph'를 이용해 paired t-test로 분석한 결과 Fig. 3과 같이 나타났다, 총 유산균 함량은 유통기한 당일이 되어도 구매 당일의 유산균 함량과 유의미한 차이를 보이지 않았다.

요거트의 pH는 일반적으로 4.6 미만이고(Tamime, 2002) 비피더스균의 산성에 대한 내성은 종에 따라 다양하기 때문에(Maus과 Ingham, 2003) 요거트 내에서 비피더스균의 생존은 일반적으로 시간의 흐름에 따라 감소한다(Adhikari 등, 2000; Klaver 등, 1993; Lankaputhra 등, 1996). 또한 발효유는 시간이 지남에 따라 생성된 산이 지속적으로 누적되어 그 조성이 변하고 유산균의 생장이 어렵게 된다(Kroger과 Weaver,

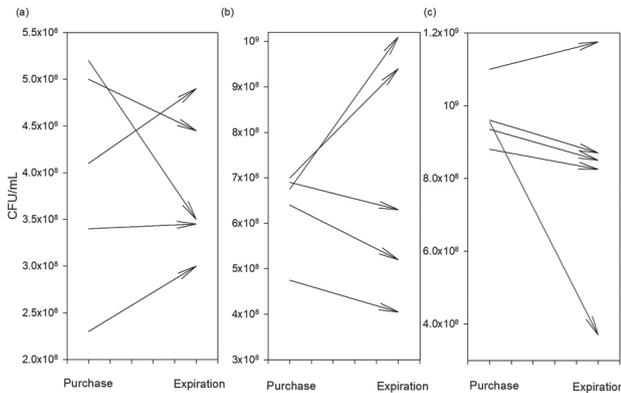


Fig. 3. Comparison of reduction number of CFU of lactic acid bacterial reduction at the day of purchase and the expiration date of each product of (a) A, (b) B, and (c) C companies

1973). 하지만 발효유 제조 시 시스테인, 유청 단백질, 산-카세인 가수분해물 또는 트립톤의 첨가를 통하여 비피더스균의 생존능력을 개선시킬 수 있으며 시스테인의 첨가를 통해 *Streptococcus thermophilus*의 생존능력을 개선시킬 수 있고(Dave과 Shah, 1998), 마늘즙 첨가를 통해 전반적으로 유산균의 생장이 촉진될 수 있는 등(Lee 등, 2009), 발효유 조성에 따라 발효유 내 유산균의 생존 능력을 향상시킬 수 있다. C社의 비피더스균 함량이 유의적으로 감소함이 관찰됨에 따라 제품 조성에 대한 추가적인 연구가 필요한 것으로 사료된다.

4.3 비피더스균 집락 검증

TOS-MUP agar에서 형성된 집락이 비피더스균이 맞는지 확인 하기 위하여 하나의 plate 당 임의로 세 개의 집락을 선택해 대전 솔젠트(Solgent, Daejeon Korea)에 16S rRNA 염기서열 분석을 하였다. TOS-MUP agar에서 형성된 집락의 16S rRNA 분석 결과, 하나의 double peak가 떠 정확한 동정을 할 수 없었던 집락을 제외하고는 모두 비피더스균임이 확인되었고, 그 중 *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* strain YIT 4121으로 확인되었다(Table 4). *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* strain YIT 4121 기준에 발효유제품에서도 발견된 바 있고(Nyanzi 등, 2016), 아직까지 단일 균주에 대한 연구는 진행되지 않았지만 상위 분류인 *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*는 이미 많은 연구결과가 나와있으며 섭취 시 설사와 배탈을 막아주며(Chouraqui 등, 2004), 호흡기를 건강하게 지켜주고(Taipale 등, 2016), 장내 미생물 및 장내 환경을 극적으로 개선해 준다는 보고가 있다(Nishida 등, 2004).

결론

소비자들의 유산균에 대한 지식 수준 향상과 웰빙 트렌드로 인해 최근 3년간 대용량 발효유, 저당 발효유, 기능성 발효유가 주를 이뤘고, 이전부터는 이와 별개로 임상적으로 효능이 입증된 특정 유산균의 함유 여

Table 4. Results of 16S rRNA gene PCR analysis of colony formed on TOS-MUP agar

Sample Name	Description	Identities(%)
A社-1	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> strain YIT 4121 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99
A社-2	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> strain YIT 4121 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100
A社-3	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> strain YIT 4121 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99
B社-1	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> strain YIT 4121 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100
B社-2	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> strain YIT 4121 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99
B社-3	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> strain YIT 4121 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100
C社-1	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> strain YIT 4121 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100
C社-2	<i>Enterococcus faecium</i> strain NBRC 100486 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	90 Double peak
C社-3	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> strain YIT 4121 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99

부를 표시하여 다른 제품과의 차별성을 마케팅에 활용하는 제품이 주를 이뤘다. 2009년에 출시된 ‘액티비아’와 1996년에 출시된 ‘비피더스’ 등과 같이 특정 유산균의 학명이 곧바로 그 제품명으로 사용되는 제품도 꾸준히 소비되고 있다.

국내 식품공전의 유산균 시험법(MFDS, 2018a)은 2015년 10월 그 분류와 사용되는 배지의 내용이 개정되었다. 기존 비피더스균 측정에 사용되었던 BL agar가 총 유산균 수 시험에 사용되도록 변경되었고, 비피더스균 측정에는 새로운 TOS-MUP agar가 추가되었다. 제조사들은 이러한 관련 시험법의 개정에 정확히 반영할 필요가 있다. 또한 관리 기관들도 개정 이전부터 출시된 제품이라 할지라도 개정된 시험법을 토대로 제품이 생산되고 유통되고 있는지에 대한 지속적인 모니터링 및 관리가 필요하다. 하지만 본 연구진의 모니터링 결과, 식품공전 유산균 수 시험법이 개정된 지 3년이 지난 현 시점에서 시중 유통 중인 3社 ‘비피더스’ 제품 중 비피더스균 함량이 제품에 명시된 함량에 미치지 못한 경우를 확인하였다.

발효유의 트렌드는 1년이 다르게 변화한다. 하지만 식품공전의 유산균 시험법이 개정된 지 3년이 지난 지금, 제품에 표시된 사항에 미달된 제품에 대하여 제조사의 반영 노력이나 적용 관리가 필요한 실정이다. 본 연구진이 수행한 비피더스균 이외에도 수 많은 유산균들의 학명이 각종 발효유 제품에 표시되어 있으나, 아직까지 해당 유산균 함량만을 산출할 수 있는 시험법은 없는 실정이다. 이 또한 검증할 수 있는 시험법을 식품공전 유산균 시험법에 반영하는 것이 필요하며, 제조사도 자발적으로 발효유 유산균 정도관리에 노력을 하여야 할 것이다.

감사의 글

실험장비 및 시설을 제공한 고려대학교 CJ 식품 안전관, 식품생의학연구소에 감사드립니다.

Reference

- Adel M, El-Sayed AM, Yeganeh S, Dadar M, Giri SS. Effect of potential probiotic *Lactococcus lactis* Subsp. *lactis* on growth performance, intestinal microbiota, digestive enzyme activities, and disease resistance of *Litopenaeus vannamei*. *Probiotics Antimicrob Proteins* 9: 150-156 (2017)
- Adhikari K, Mustapha A, Grun IU, Fernando L. Viability of microencapsulated *bifidobacteria* in set yogurt during refrigerated storage. *J. Dairy Sci.* 83: 1946-1951 (2000)
- Anderson JW, Gilliland SE. Effect of fermented milk (yogurt) containing *Lactobacillus acidophilus* L1 on serum cholesterol in hypercholesterolemic humans. *J. Am. Coll. Nutr.* 18: 43-50 (1999)
- aTFIS. *Retail market sales by product*. Food information statistics system (2012-2017)
- Backhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, Semenkovich CF, Gordon JI. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 15718-15723 (2004)
- Bonjour JP, Benoit V, Payen F, Kraenzlin M. Consumption of yogurts fortified in vitamin D and calcium reduces serum parathyroid hormone and markers of bone resorption: a double-blind randomized controlled trial in institutionalized elderly women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 98: 2915-2921 (2013)
- Brown AC, Valiere A. Probiotics and medical nutrition therapy. *Nutr. Clin. Care* 7: 56-68 (2004)
- Chouraqui JP, Van Egroo LD, Fichot MC. Acidified milk formula supplemented with *bifidobacterium lactis*: impact on infant diarrhea in residential care settings. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 38: 288-292 (2004)
- Clarivate Analytics, *Bifidobacterium animalis subsp. lactis*, Available from: http://apps.webofknowledge.com/CitationReport.do?product=WOS&search_mode=CitationReport&SID=5ADOXilmQSYwmoNbS5N&page=1&cr_pqid=60&viewType=summary&colName=WOS. Accessed March 9, 2018.
- Crichton GE, Murphy KJ, Bryan J. Dairy intake and cognitive health in middle-aged South Australians. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 19: 161-171 (2010)
- Dave RI, Shah NP. Ingredient supplementation effects on viability of probiotic bacteria in yogurt. *J. Dairy. Sci.* 81: 2804-2816 (1998)
- Foster JA, Neufeld K-AM. Gut-brain axis: how the microbiome influences anxiety and depression. *Trends Neurosci.* 36: 305-312 (2013)
- Fuller R. Probiotics in human medicine. *Gut* 32: 439-442 (1991)
- Gilliland SE, Nelson CR, Maxwell C. Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 377-381 (1985)
- Holscher HD, Czerkies LA, Cekola P, Litov R, Benbow M, Santema S, Alexander DD, Perez V, Sun S, Saavedra JM, Tappenden KA. *Bifidobacterium lactis* Bb12 enhances intestinal antibody response in formula-fed infants: a randomized, double-blind, controlled trial. *J. Parenter. Enteral. Nutr.* 36: 106S-117S (2012)
- Isolauri E, Joensuu J, Suomalainen H, Luomala M, Vesikari T. Improved immunogenicity of oral D x RRV reassortant rotavirus vaccine by *Lactobacillus casei* GG. *Vaccine* 13: 310-312 (1995)
- Isolauri E, Juntunen M, Rautanen T, Sillanaukee P, Koivula T. A human *Lactobacillus* strain (*Lactobacillus casei* sp strain GG) promotes recovery

- from acute diarrhea in children. *Pediatrics* 88: 90-97 (1991)
- Klaver FAM, Kingma F, Weerkamp AH. Growth and survival of *Bifidobacterium* in milk. *Neth. Milk Dairy J.* 47: 151-164 (1993)
- Korean Agro-Fisheries & Food Trade Corp. S, Korea. *Processed food market report-yogurt market.* (2015)
- Korean Agro-Fisheries & Food Trade Corp. S, Korea. *Processed food market report-yogurt market.* (2016)
- Korean Agro-Fisheries & Food Trade Corp. S, Korea. *Processed food market report-yogurt market.* (2017)
- Kostic AD, Gevers D, Pedamallu CS, Michaud M, Duke F, Earl AM, Ojesina AI, Jung J, Bass AJ, Taberner J, Baselga J, Liu C, Shivdasani RA, Ogino S, Birren BW, Huttenhower C, Garrett WS, Meyerson M. Genomic analysis identifies association of *Fusobacterium* with colorectal carcinoma. *Genome Res.* 22: 292-298 (2012)
- Kroger M, Weaver JC. Confusion About Yogurt-Compositional and Otherwise. *J. Milk. Food Technol.* 36: 388-391 (1973)
- Lankaputhra WEV, Shah NP, Britz ML. Survival of *bifidobacteria* during refrigerated storage in the presence of acid and hydrogen peroxide. *Milchwissenschaft* 51: 65-70 (1996)
- Lau AS, Yanagisawa N, Hor YY, Lew LC, Ong JS, Chuah LO, Lee YY, Choi SB, Rashid F, Wahid N, Sugahara H, Xiao JZ, Liong MT. *Bifidobacterium longum* BB536 alleviated upper respiratory illnesses and modulated gut microbiota profiles in Malaysian pre-school children. *Benef. Microbes.* 9: 61-70 (2018)
- Lee SG, Lee YJ, Kim MK, Han GS, Jeong SG, Jang A, Chae HS, Kim DH, Ham JS. Quality Characteristics and inhibitory activity against *Staphylococcus aureus* KCCM 40510 of yogurts manufactured with garlic juice. *Korean. J. Food. Sci. An.* 29: 500-505 (2009)
- Makino S, Ikegami S, Kume A, Horiuchi H, Sasaki H, Orii N. Reducing the risk of infection in the elderly by dietary intake of yoghurt fermented with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* OLL1073R-1. *Br. J. Nutr.* 104: 998-1006 (2010)
- Margolis KL, Wei F, de Boer IH, Howard BV, Liu S, Manson JE, Mossavar-Rahmani Y, Phillips LS, Shikany JM, Tinker LF, Women's Health Initiative I. A diet high in low-fat dairy products lowers diabetes risk in postmenopausal women. *J. Nutr.* 141: 1969-74 (2011)
- Maus JE, Ingham SC. Employment of stressful conditions during culture production to enhance subsequent cold- and acid-tolerance of *bifidobacteria*. *J. Appl. Microbiol.* 95: 146-154 (2003)
- MFDS. *Food Code, amended by notification No. 2007-48.* Ministry of Food and Drug Safety (2007)
- MFDS. *Food Code, amended by notification No. 2015-78.* Ministry of Food and Drug Safety (2015)
- MFDS. *Food Code, 7. General test method, 4.9. Lactic acid bacteria content, notification No. 2016-154.* Ministry of Food and Drug Safety (2016a)
- MFDS. *Guidelines for livestock products labeling standard.* Ministry of Food and Drug Safety (2016b)
- MFDS. *Food Code, 7. General test method, 4.9. Lactic acid bacteria content, notification No. 2018-8.* Ministry of Food and Drug Safety (2018a)
- MFDS. *Food Code, notification No. 2018-8, 18-4 Fermented milks.* Ministry of Food and Drug Safety (2018b)
- Nishida S, Gotou M, Akutsu S, Ono M, Hitomi Y, Nakamura T, Iino H. Effect of yogurt containing *Bifidobacterium lactis* BB-12 on improvement of defecation and fecal microflora of healthy female adults. *Milk Science (Japan)* (2004)
- Nyanzi R, Jooste PJ, Eloff JN. Multi-Loci Gene Sequencing and Identification of *Bifidobacteria* Strains Isolated from Dairy and Pharmaceutical Sources in South Africa. *Food Biotechnol.* 30: 30-48 (2016)
- Ozaki K, Maruo T, Kosaka H, Mori M, Mori H, Yamori Y, Toda T. The effects of fermented milk containing *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FC on defaecation in healthy young Japanese women: a double-blind, placebo-controlled study. *Int. J. Food. Sci. Nutr.* 1-8 (2018)
- Park H. Verification and Improvement of selective medium for *Bifidobacterium* and lactic acid bacteria, The Graduate School, Seoul National University. (2016)
- Pinto-Sanchez MI, Hall GB, Ghajar K, Nardelli A, Bolino C, Lau JT, Martin FP, Cominetti O, Welsh C, Rieder A, Traynor J, Gregory C, De Palma G, Pigrau M, Ford AC, Macri J, Berger B, Bergonzelli G, Surette MG, Collins SM, Moayyedi P, Bercik P. Probiotic *Bifidobacterium longum* NCC3001 reduces depression scores and alters brain activity: a pilot study in patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 153: 448-459 e8 (2017)
- Rada V. Detection of *bifidobacterium* species by enzymatic methods and antimicrobial susceptibility testing. *Biotechnol Tech* 11: 909-912 (1997)
- Savage DC. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annu. Rev Microbiol.* 31: 107-133 (1977)
- Taipale TJ, Pienihakkinen K, Isolauri E, Jokela JT, Soderling EM. *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 in reducing the risk of infections in early childhood. *Pediatr. Res.* 79: 65-69 (2016)
- Tamime AY. Fermented milks: a historical food with modern applications--a review. *Eur. J. Clin. Nutr.* 56 Suppl 4: S2-S15 (2002)