

시판 요구르트 중 *Lactobacilli* 및 *Bifidobacteria*의 안정성 및 내산성 연구

이범진* · Cui Jinghao · 박옥선 · 고준수¹ · 안태석² · 박승용³

강원대학교 약학대학, ¹강원대학교 축산대학,

²강원대학교 자연대학, ³연암축산원에대학 축산학과

시판 요구르트 제품중 *Lactobacilli* 및 *Bifidobacteria*의 안정성과 내산성을 비교 고찰하였다. 요구르트 제품중 *Lactobacilli* 및 *Bifidobacteria*의 안정성 및 내산성은 제품들간에 큰 차이가 있음을 고찰하였다. 요구르트 제품중 *Lactobacilli* 및 *Bifidobacteria*의 생존률은 저장중 시간이 지남에 따라 점차 감소하였으나 10^7 - 10^8 cfu/ml로의 생존률을 나타내었다. 요구르트 제품중 *Lactobacilli* 및 *Bifidobacteria*의 생존률은 pH가 낮아짐에 따라 점차로 감소하였다. 인공위액에서 2시간 노출시킨 후 *Lactobacilli* 및 *Bifidobacteria*의 생존률은 3개의 제품에서 10^4 - 10^6 cfu/ml 이상이었으나 캡슐제품에 함유된 *Bifidobacteria*의 생존률은 10^8 cfu/ml 이상으로 크게 향상되었다.

KEY WORDS □ Survival, stability, gastric acid resistance, *Lactobacilli*, *Bifidobacteria*-loaded capsules

*Bifidobacteria*은 그람 양성의 절대 혐기성 균으로 사람 및 동물의 장내에 존재하고 분기된 Y자, V자, 만곡 및 곤봉형 등의 다양한 형태를 지니고 있다(13). 1899년 Tisser에 의하여 최초로 발견된 이래 많은 연구가 진행되어 인간의 건강에 매우 중요한 역할을 하고 있음이 밝혀졌다. 모유 영양아의 최우세 균총으로 알려진 *Bifidobacteria*에 대한 과학적인 관심은 모유 영양아가 인공유 영양아에 비하여 전염병에 대한 질환이 적은 경향이 있다는 임상학적 연구와 *Bifidobacteria*가 결장에서 감염에 대한 저항 역할을 할 것이라는 고찰에 의해 크게 증진되었다(1, 14). 최근 연구결과에 따르면 *Bifidobacteria*는 유해 미생물의 증식 억제 효과(4, 10, 11), 면역기능의 강화(8, 15), 발암물질의 제거(5, 7, 18, 21) 및 혈청 내 cholesterol 함량을 감소시키는 효과(16, 19) 등 인체 건강증진 효과가 있다(3). 그리고 당 대사에서 특이적인 fructose-6-phosphate phosphoketolase가 존재하여 다른 *Lactobacilli*와는 다른 독특한 경로를 통해 glucose로부터 lactic acid 및 acetic acid를 생산한다(13). 이때 생산되는 유기산에 의해 대장내 pH가 저하됨으로서 인체에 유해한 세균의 생육이 저해된다. 또한 생성된 산이 암모니아와 아민을 이온 형태로 전환시켜 장내 흡수를 저해함으로써 좋은 정장 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다(6). 이와 같이 *Bifidobacteria*의 인류건강에 대한 유익한 작용이 밝혀지기 시작함에 따라 식품에의 응용이 시도되었으며, Mayer에 의하여 최초로 *Bifidobacteria*가 유아용 식품 제조에 이용되었다(13). 또한 *Bifidobacteria*를 특정한 생장물질과 함께 식품 또는 식품보조제로서의 이용 가능성을 모색하게 되었다.

유제품에 이용되는 *Bifidobacteria*는 인간유래의 *B. bifidum*, *B. breve*, *B. longum* 및 *B. adolescentis* 등이 있다(2).

현재 *Bifidobacteria*를 이용한 제품은 많은 나라에서 다양한 형태로 시판되고 있으며 우리 나라에서도 여러 가지 유제품이 시판되고 있는 실정이다(9). 그러나 *Bifidobacteria*는 극도로 혐기성이고 생장에 필요한 영양 조건이 복잡하고 까다롭기 때문에 고유의 활성을 유지하는데 매우 큰 어려움이 있다(9, 17). 특히 경구투여시 인체 위장관내 위산과 담즙에 의해 대부분의 *Bifidobacteria*는 사멸되어 소장 및 대장에 도달하는 양은 상당히 제한되어 있다. 따라서 *Bifidobacteria*가 인체 장관 내에서 생리적 활성을 충분히 발휘하기 위하여 내산성을 지닌 균주의 선발, 영양인자첨가 및 내산성 증진을 위한 다양한 기술과 방법을 사용하여 유제품의 건강증진 효과를 최적화 할 수 있다(2, 17, 20). 최근 내산성이 약한 유산균들을 캡슐처리 하여 인체의 위액에 안전하게 장에 도달시킴으로써 유산균의 생존률을 높히려는 연구가 많이 이루어지고 있다.

본 연구의 목적은 시판 요구르트중 *Bifidobacteria* 및 *Lactobacilli*의 안정성과 다양한 pH조건에서 내산성을 비교 고찰하고자 하였다. 특히 내산성이 강화된 시판 *Bifidobacteria* 함유 캡슐과 타 요구르트 제품들간의 차이점을 집중적으로 고찰하였다.

재료 및 방법

유제품 및 배지

Bifidobacteria 및 *Lactobacilli*를 함유한 시판중인 캡슐 요구르트 및 다른 요구르트제품을 시중에서 구입하여 사용하였다. 본 실험에 사용한 *Bifidobacteria* 함유 캡슐은 식물성 유지에 *Bifidobacteria*를 분산한 다음 지용성피막으로 봉입 처리를 하여 내산성을 강화한 것으로 캡슐요구르트 제품은

*To whom correspondence should be addressed
Tel: 0361-250-6919, Fax: 0361-242-3654
E-mail: bjl@cc.kangwon.ac.kr

*Bifidobacteria*가 캡슐내와 외부 시럽중에 균등히 분산된 제품이었다. BL agar, *Lactobacilli* MRS broth, Bacto-Agar 및 yeast extract는 Difco laboratories (Detroit, USA)에서 구입하였다. BCP plate count agar는 Tanabe Seiyaku Co. Ltd.(Osaka, Japan)에서 구입하였다. 기타 시약은 일급 혹은 특급을 사용하였다.

생균수의 측정

생균수 측정시 *Lactobacilli*의 경우 BCP plate count agar 24.6 g을 1000 ml 증류수에 가하여 가열용해 한 다음 121°C에서 15분간 고압증기 멸균한 후 55°C 수욕에서 보존하였다. Plating한 후 호기상태로 37°C에서 72시간 배양한 후 colony수를 측정하였다.

*Bifidobacteria*는 BL agar 배지에 1.5%(w/v) sodium propionate, 0.005%(w/v) paromomycin sulfate, 0.01%(w/v) neomycin 및 0.3%(w/v) lithium chloride를 첨가하여(BS 배지) 조제한 후 121°C에서 15분간 고압증기멸균 후 사용전까지는 55°C 수욕에서 보존하였다. 균을 멸균 페트리접시에 접종 후 위 BS 배지를 무균적으로 약 15 ml를 분주하여 경화하였다. Anaerobic jar(BBL)에 gas-pak(BBL), anaerobic indicator strip 및 catalyst 넣어 혐기상태를 만들어 준 다음 37°C에서 72시간 배양한 후 colony수를 측정하였다.

특히 캡슐을 함유한 요구르트 및 캡슐은 실험 전 homogenizer를 사용하여 12,000-14,000 rpm 조건하에 5분간 처리하여 coating 층을 파괴한 후 colony수를 측정하였다.

안정성 연구

요구르트중에서의 *Lactobacilli* 및 *Bifidobacteria*의 안정성을 측정하기 위하여 4°C의 항온항습기에 일정시간 보존한 후 제품중의 *Lactobacilli* 및 *Bifidobacteria*의 생존률을 정서적으로 상기와 같은 방법으로 측정하였다. *Bifidobacteria*를 함유하는 캡슐 요구르트의 경우 캡슐을 진공 여과 분리하여 시럽 및 캡슐중의 균수를 따로 측정하였다.

인공 위액에서의 내산성 연구

요구르트 제품을 흔들어서 충분히 혼합한 다음 2ml를 취하고 200 ml 인공위액(pH 1.5, 0.5% yeast extract 및 0.05% L-cysteine HCl)에 가하였다. 인공위액에서 30 min, 60 min 및 120 min 노출시킨 후 즉시 1N NaOH를 사용하여 혼합용액의 pH를 6.8로 조정하였다. 실험 중에서 균의 사멸을 감소하기 위하여 인공위액에 일정량 영양인자 및 항산화제를 첨가하였다. 중화된 시료 1ml를 취하여 호기성 *Lactobacilli* 및 혐기성 *Bifidobacteria*의 생존률을 상기와 같은 방법으로 측정하였다. 한편 캡슐중에 함유된 *Bifidobacteria*의 내산성은 캡슐 1g을 취하여 100 ml 인공 위액에서 위와 같은 방법으로 처리한 후 생존률을 상기와 같은 방법으로 측정하였다.

다양한 pH 조건에서의 내산성 연구

다양한 pH 조건에서의 *Lactobacilli* 및 *Bifidobacteria*의 내산성을 고찰하기 위하여 4종의 요구르트 시료 2ml 및 비피더스균 함유 캡슐 1g를 취하여 pH 1.5, pH 2.5, pH 3.5 및

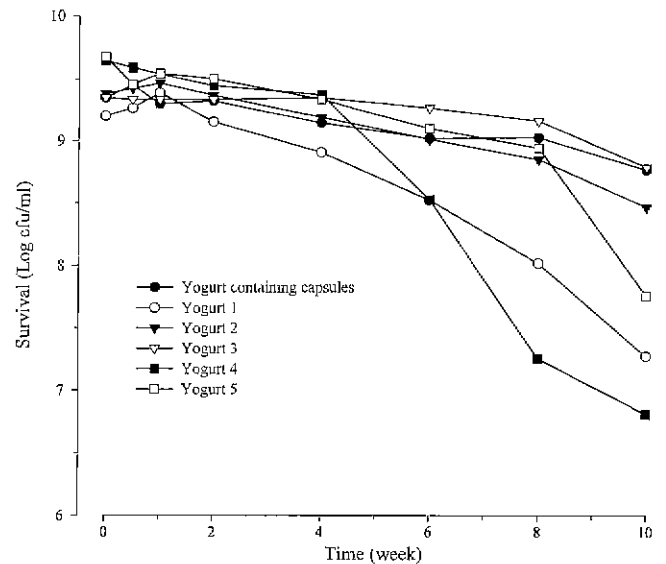


Fig. 1. Stability of aerobic *Lactobacilli* in commercial yogurts during the storage at 4°C.

pH 6.8의 NaCl-HCl(0.5% yeast extract 및 0.05% L-cysteine HCl 첨가) 용액 100 ml에 가하였다. 다양한 pH 용액에 120 min 노출시킨 후 *Lactobacilli* 및 *Bifidobacteria*의 생존률을 상기와 같은 방법으로 측정하였다. 한편 요구르트 제품1은 시판제품의 생산이 중단되어 내산성 실험에서는 제외하였다.

결과 및 고찰

안정성 연구

4°C의 보존조건에서 캡슐 함유 요구르트 및 다른 요구르트 제품에 함유된 호기성 유산균 *Lactobacilli*의 안정성을 Fig. 1에 나타내었다. 모든 요구르트 제품중 시간이 지남에 따라 *Lactobacilli*의 생존률은 저하하는 양상을 보여주었다. 10주 후 요구르트 3 및 캡슐함유 요구르트에서 *Lactobacilli*의 생존률은 다소 높게 나타났으나 대체로 모든 제품에서 10^7 - 10^8 cfu/ml 수준을 유지하였다. 즉 요구르트 중 호기성 유산균인 *Lactobacilli*는 4°C의 보존조건에서 양호한 생존률을 유지할 수 있음을 알 수 있다. 유제품중에서 *Lactobacilli*의 생존률에 따른 안정성은 사용한 *Lactobacilli*의 종류, 배양시간, 첨가물질 및 유제품 제조방법에 따라 큰 차이를 나타낼 수 있다. 그러나 본 실험에서 사용한 캡슐함유 요구르트 및 타 요구르트 제품에서의 *Lactobacilli*는 유통기간중 양호한 생존률을 나타낸 것으로 사료된다.

4°C의 보존조건에서 캡슐 함유 요구르트 및 다른 요구르트 제품중에 함유된 *Bifidobacteria*의 안정성을 Fig. 2에 나타내었다. 시간이 지남에 따라 *Bifidobacteria*의 생존률은 저하하는 양상을 보여주었으나 10주 후에도 10^7 - 10^8 cfu/ml 생존률을 유지하였다. 캡슐제품에서는 시럽 및 캡슐중에 모두 *Bifidobacteria*를 함유하고 있어 캡슐자체 보다 생균수가 더 많았다. 그러나 요구르트 제품들간에 생존률은 큰 차이를 나타내었다. 그러나 시판 요구르트중 *Lactobacilli* 및 *Bifidobacteria*의 생존률은 보존기간중에 양호함을 알 수 있었다.

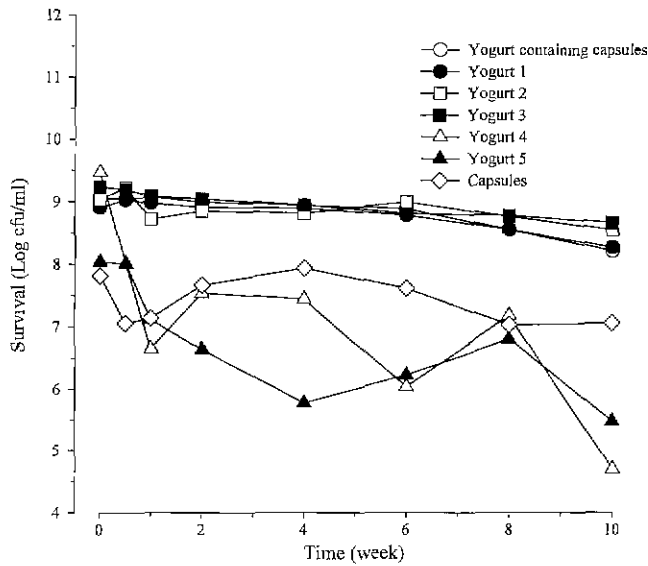


Fig. 2. Stability of anaerobic *Bifidobacteria* in commercial yogurts during the storage at 4°C.

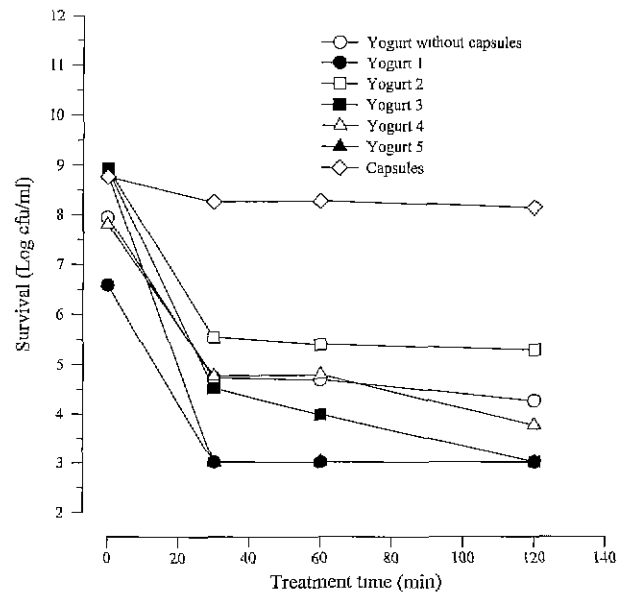


Fig. 4. Survival of anaerobic *Bifidobacteria* in commercial yogurts after exposure to simulated gastric juice (pH 1.5) as a function of treatment time.

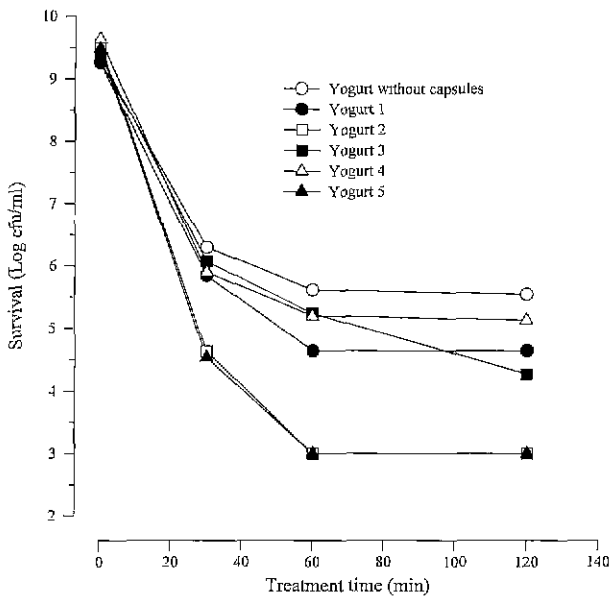


Fig. 3. Survival of aerobic *Lactobacilli* in commercial yogurts after exposure to simulated gastric juice (pH 1.5) as a function of treatment time.

유산균중 *Bifidobacteria*는 극도로 혐기성이고 생장에 필요한 영양 조건이 복잡하기 때문에 유제품중에서 오랜 시간동안 높은 생존률을 유지하는데 매우 큰 어려움이 있다(9, 17).

인공 위액에서의 내산성 연구

인공 위액(pH 1.5)에서의 처리시간에 따른 요구르트중 호기성 *Lactobacilli*의 생존률을 Fig. 3에 나타내었다. 요구르트 제품들중 호기성 *Lactobacilli*의 생존률은 처리 시간에 따라 급속히 감소하는 경향을 나타내었으며 또한 제품들간에 큰 차이를 나타내었다. 즉 요구르트 제품중 *Lactobacilli*

는 위산에 저항 할 수 있도록 처리되지 않았으므로 균의 생존률이 위산에 노출된 시간이 증가함에 따라 사멸됨을 알 수 있었다. 그러나 *Lactobacilli*의 생존률은 사용한 균주의 종류에 따라 차이가 있을 수 있다. 인공위액에 2시간 처리 후 요구르트 2 및 5에서는 10^6 cfu/ml에서 10^3 cfu/ml 이하까지 현저하게 감소하였다. 캡슐함유 요구르트 시럽 및 4에서는 *Lactobacilli*의 생존률은 10^5 - 10^6 cfu/ml으로 다른 제품에서보다 높음을 알 수 있었다. 즉 요구르트 제품을 복용할 때 위산에 내산성이 높은 유산균을 함유한 제품은 보다 생존률이 우수하여 유익한 생리활성을 나타낼 것으로 사료된다.

인공 위액(pH 1.5)에서의 처리시간에 따른 요구르트중 *Bifidobacteria*의 생존률을 Fig. 4에 나타내었다. 인공위액에서 2시간 노출시켰을 때 요구르트중 *Bifidobacteria*의 생존률은 10^3 - 10^5 cfu/ml이었으나 캡슐함유 제품의 경우 10^8 cfu/ml 상으로 높은 생존률을 유지하였다. 즉 캡슐함유 유제품의 경우 위산에 견딜 수 있는 코팅물질로 *Bifidobacteria*를 봉입하였으므로 인공위액에서의 내산성이 증가되어 생존률이 증가된 것으로 사료된다. *Bifidobacteria* 및 기타 유산균을 유제품에 사용하여 인체에 효과적인 작용을 하려면 정확한 균주의 선별, 여러 가지 보호제첨가 및 내산성물질을 응용하여 캡슐 처리 하는 경우에 보다 위산에 저항할 수 있으며 생존률을 높이고 장내정착률을 증가할 수 있을 것으로 사료된다.

다양한 pH조건에서의 내산성

다양한 pH 조건에서의 요구르트중 호기성 *Lactobacilli* 및 혐기성 *Bifidobacteria*의 생존률을 Fig. 5 및 6에 각각 나타내었다. 모든 제품에서 *Lactobacilli*의 생존률은 pH 변화에 따라 현저한 차이를 보여주었으며 pH가 저하함에 따라 균주의 생존률도 크게 감소하였다. 요구르트 3 및 4 중 *Lactobacilli*의 생존률은 pH 2.5에서 10^7 cfu/ml 수준을 유지하였

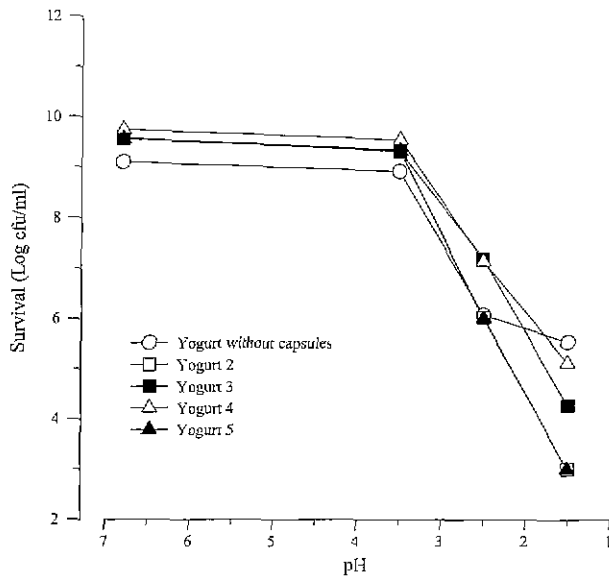


Fig. 5. Dependence of survival of aerobic *Lactobacilli* in commercial yogurts on pH.

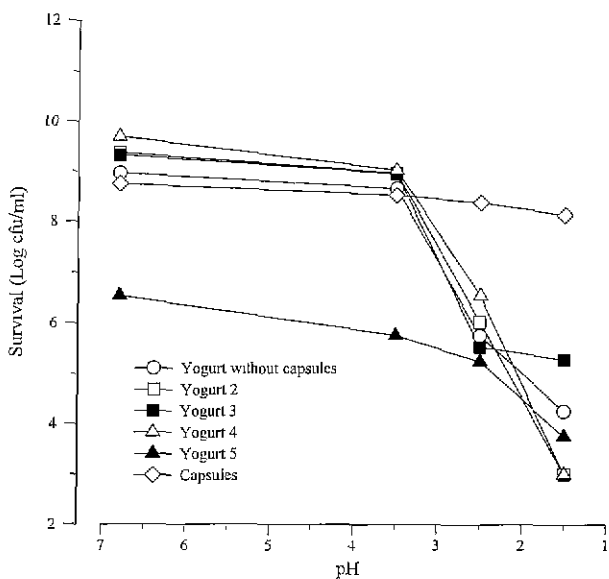


Fig. 6. Dependence of survival of anaerobic *Bifidobacteria* in commercial yogurts on pH.

으며 캡슐을 분리한 시럽, 요구르트 2 및 5는 다소 낮은 생존률을 나타내었다(10^5 - 10^6 cfu/ml). 그러나 pH 3.5이상에서는 모든 요구르트 제품중 *Lactobacilli*의 생존률은 비슷하였으나(10^8 - 10^9 cfu/ml) pH가 낮아짐에 따라 제품들간의 생존률의 차이를 나타내었다.

*Bifidobacteria*의 생존률은 pH 1.5 및 pH 2.5에서 현저하게 저하되었으나 *Bifidobacteria* 함유 캡슐의 경우는 다른 요구르트 제품에 비하여 좋은 내산성을 보였다(10^7 - 10^8 cfu/ml). 그러나 *Bifidobacteria*는 약한 내산성 가지고 있음에도 불구하고 pH 3.5 및 pH 6.8에서는 대체로 높은 생존률을 유지하였다(10^7 - 10^9 cfu/ml). 그러나 요구르트 5는 비교적 낮은

생존률을 나타내었다(10^5 - 10^6 cfu/ml). 따라서 위산에 견딜 수 있도록 유산균을 처리함으로써 생존률을 높이고 아울러 장내 정착률을 높이는 일은 매우 중요하다고 사료된다.

한편 인체 위장관의 pH는 음식물 복용전 후, 복용한 음식물 종류에 따라서 현저한 차이를 나타낸다. 음식물 복용전 위액의 pH는 1.2-2.0이나 음식물 복용후 위액의 pH는 3.0-7.0 사이에서 변화한다(22). 따라서 유산균을 함유하는 유제품의 내산성을 강화하는 것도 중요하지만 공복보다는 식후에 복용하는 것이 유산균의 생존률을 증진하는데 또한 중요하다고 사료된다.

감사의 말

본 연구는 한국미생물학회의 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. 고준수, 권일경, 안중진, 윤영호. 1987. Bifidobacteria에 의한 우유발효와 유산박테리아를 이용한 *Bifidobacterium bifidum* ATCC 11863의 이용성증진에 관한 연구. *Korean J. Dairy Sci.* 9, 211-219.
2. 김영주, 백승천, 유제현. 1995. *Bifidobacterium infantis* 420에 의한 요구르트 Base제조시 올리고당 및 생육촉진물질의 효과. *Korean J. Dairy Sci.* 17, 167-173.
3. Bouhnik Y, B. Flourié, C. Andrieux, N. Bisetti, F. Brie and J.C. Rambaud. 1996. Effects of *Bifidobacterium* sp. fermented milk ingested with or without inulin on colonic bifidobacteria and enzymatic activities in healthy humans. *Eur. J. Clin. Nutr.* 50, 269-273.
4. Gibson, G.R. and X. Wang. 1994. Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* 77, 412-420.
5. Grill, J.P., J. Crociani and J. Ballongue. 1995. Effect of bifidobacteria on nitrites and nitrosamines. *Appl. Microbiol.* 20, 328-330.
6. Kailasapathy, K. and S. Rybka. 1997. *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* spp.-their therapeutic potential and survival in yogurt. *Australian J. Dairy Technol.* 52, 28-35.
7. Kampmann, E.A. Goldbohm, V.D. Brandt and P. Veer. 1994. Fermented dairy products, calcium and colorectal cancer in the Netherlands Cohort Study. *Cancer Res.* 54, 3186-3190.
8. Link, A.H., F. Rochat, K.Y. Saudan, O. Mignot and J. M. Aeschlimann. 1994. Modulation of a specific humoral immune response and changes in intestinal flora mediated through fermented milk intake. *Immunol. Med. Microbiol.* 10, 55-64.
9. Micanel, N., I.N. Haynes and M.J. Playne. 1997. Viability of probiotic cultures in commercial Australian yogurts. *Australian J. Dairy Technol.* 52, 24-27.
10. Misra, A.K. and R.K. Kuila. 1995. Antimicrobial substances from *Bifidobacterium bifidum*. *Indian J. Dairy Sci.* 48, 612-614.
11. Moore, W.E. and L.H. Moore. 1995. Intestinal floras of populations that have a high risk of colon cancer. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3202-3207.

12. Pool, B.L., C. Neudecker, I. Domizlaff, S. Ji, U. Schillinger, C. Rumney, M. Moretti, I. Vilarini, S.R. Scasse-lati and I. Rowland. 1996. Lactobacillus and Bifidobacterium-mediated antigenotoxicity in the colon of rats. *Nutr. Cancer* **26**, 365-380.
13. Rasic J.L.J. and J.A. Kurmann. 1983. Bifidobacteria and their role, pp. 3-7. Birkhauser Verlag Basel. Boston. Stuttgart.
14. Saavedra, J.M., N.A. Bauman, I. Oung, J.A. Perman and R.H. Yolken. 1994. Feeding of Bifidobacterium bifidum and Streptococcus thermophilus to infants in hospital for prevention of diarrhoea and shedding of rotavirus. *Lancet* **344**, 1046-1049.
15. Schiffrin, E.J., F. Rochat, H.A. Link, J.M. Aeschlimann and A.H. Donnet. 1995. Immunomodulation of human blood cells following the ingestion of lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.* **78**, 491-497
16. Seki, M., M. Igarashi, Y. Fukuda, S. Simamura, T. Kawashima and K. Ogasa. 1978. The effect of Bifidobacterium cultured milk on the "regularity" among aged group. *Nutr. Food.* **4**, 379-387.
17. Shah, N.P., W.E.V. Lankaputhra, M.L. Britz and W.S. A. Kyle. 1995. Survival of Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium bifidum in commercial yoghurt during refrigerated storage. *Int. Dairy J.* **5**, 515-521.
18. Singh, J., A. Rivenson, M. Tomita, S. Shimamura, N. Ishibashi and B.S Reddy. 1997. Bifidobacterium longum, a lactic acid-producing intestinal bacterium inhibits colon cancer and modulates the intermediate biomarkers of colon carcinogenesis. *Carcinogenesis* . **18**, 833-841.
19. Tahri, K., J.P. Grill and F. Schneider. 1996 Bifidobacteria strain behavior toward cholesterol: Coprecipitation with bile salts and assimilation. *Current Microbiol.* **33**, 187-193.
20. Tamime A.Y., Marshall and Robinson. 1995. Microbiological and technological aspects of milks fermented by bifidobacteria. *J. Dairy Res.* **62**, 151-187.
21. Van't, V.P., J. Dekker, J.W.J. Lamers, F.J. Kok, E.G. Schouten, H. Brants, F. Sturmans and R.J.J Hermus. 1989. Consumption of fermented milk products and breast cancer: A case-control study in the Netherlands. *Cancer Res.* **49**, 4020-4023.
22. Dressman, J.B., R.R. Berardi, L.C. Dermentzoglou, R.L. Russell, S.P. Schmaltz, J.L. Barnett, and K. Jarvenpaa. 1990. Upper gastrointestinal pH in young, healthy men and woman. *Pharm. Res.* **7**, 756-761.

(Received December 26, 1998/Accepted March 15, 1999)

ABSTRACT: Stability and Gastric Acid Resistance of Lactobacilli and Bifidobacteria in Commercial Yogurts

Beom-Jin Lee*, Cui Jing-Hao, Ok-Sun Park, Juhn Soo Goh¹, Tae Seok Ahn², and Seung Yong Park³ (Department of Pharmaceutics, ¹Department of Animal Products Processing, ²Department of Environmental Science, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea ³Department of Dairy Science, Yonam College of Animal Husbandary and Horticulture, Chonan 333-800, Korea)

Stability and gastric acid resistance of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria* in commercial yogurts were investigated. It was noted that there was significant differences of stability and gastric acid resistance among yogurts. The survival of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria* in commercial yogurts decreased as a function of time during storage and showed in the range of 10^7 - 10^8 cfu/ml. The lower the pH was, the lower survival of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* was observed. The survival of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria* in three yogurts appeared to be 10^3 - 10^4 cfu/ml. In the case of yogurt containing *Bifidobacteria*-loaded capsules, the gastric acid resistance of the *Bifidobacteria* was greatly enhanced and the survival after treatment in a gastric juice for 120 min was over 10^8 cfu/ml.