

Chlorella 추출물 첨가가 Yoghurt Starter의 산 생성 및 증식에 미치는 영향

조은정 · 남은숙 · † 박신인
경원대학교 식품영양학과

Effect of Chlorella Extract on Acid Production and Growth of Yoghurt Starter

Eun-Jung Cho, Eun-Sook Nam and † Shin-In Park

Dept. of Food and Nutrition, Kyungwon University

Abstract

The effect of chlorella extract on the growth and acid production of yoghurt starter was investigated in order to prepare the yoghurt added with chlorella extract. The various levels of chlorella extract powder were added to skim milk medium and the medium was fermented by single or mixed culture of 4 types of lactic acid bacteria such as *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, and *Lactobacillus bulgaricus*. The changes in acid production(pH, titratable acidity) and number of viable cells of the medium during fermentation in skim milk added with chlorella extract powder have determined. When chlorella extract powder was added to skim milk medium at the levels of 0.5%, 1.0%, 2.0%, and 3.0%, the addition of 0.5% chlorella extract powder with the single culture of *Str. thermophilus*, *Lac. casei*, and *Lac. bulgaricus* showed the highest number of viable cell counts after 9 hours incubation. And also all single cultures of the yoghurt starter produced the higher amounts of acid with the addition of 0.5% chlorella extract powder. When chlorella extract powder was added to the medium at the levels of 0.25%, 0.5%, 1.0%, and 2.0%, the addition of lower lever(0.25~0.5%) of chlorella extract powder with the mixed culture of the lactic acid bacteria showed more the acidity of pH and the number of viable cell counts. Among the treatments tested, the addition of 0.25% chlorella extract powder with the mixed culture of *Str. thermophilus* and *Lac. casei* produced the highest number of viable cell counts after 12 hours incubation. Therefore it was suggested to manufacture the yoghurt with the addition of 0.25% chlorella extract powder and the inoculation of mixed culture of *Str. thermophilus* and *Lac. casei* for on the stimulation of growth of the yoghurt starter.

Key words : chlorella extract, yoghurt starter, acid production, growth.

서론

Chlorella는 1890년 네덜란드 과학자인 Beijerinck에 의해 발견되었으며¹⁾, 엽록소를 갖는 단세포 녹조로서

구형의 세포이고 크기는 보통 2~10 μ m이다²⁾. Chlorella는 광합성 능력을 갖고 있기 때문에 빛의 존재하에서 간단한 무기염 배지에 탄산가스를 통해줌으로써 유기물을 합성하여 용이하게 생육할 수 있고 빠른 번식력

† Corresponding author : Shin-In Park, Department of Food and Nutrition, Kyungwon University, San 65 Bokjungdong, Sujunggu, Songnam, Kyunggido, 461-701, Korea.

Tel : 82-31-750-5969, Fax : 82-31-750-5974, E-mail : psin@kyungwon.ac.kr

과 성장 속도를 갖고 있으며^{2,3)}, 단백질, 엽록소, 비타민, 무기질 등의 다양한 영양 성분을 함유하고 있다⁴⁾.

Chlorella 추출물은 chlorella 열수 추출물로서 chlorella 분말을 물에 현탁한 후 90℃ 이상의 온도에서 가열하여 chlorella 분말에 함유되어 있는 유용 성분을 열수 추출한 후 원심분리 등의 방법을 이용하여 chlorella 균체의 불용성 물질을 제거하고 이를 농축 또는 분말 건조한 것으로 아미노산, 단백질, 펩타이드, 당류, 비타민, 무기질 및 chlorella 성장 촉진 인자(chlorella growth factor)의 주요 성분으로 알려진 핵산 관련 물질 등을 함유하고 있다⁵⁾.

Chlorella 추출물에 함유되어 있는 이러한 성분들은 동식물의 성장 촉진 효과, 면역 증강 작용, 세포 부활 작용, 간 기능 개선 및 혈압 강하 작용, 콜레스테롤 감소 효과 등의 효능이 있는 것으로 나타났다^{5,6)}. 최근에는 chlorella가 건강보조식품으로 활용이 급격히 증가되고 있는 추세로 chlorella 추출물은 유아용 이유식, 어린이 영양제, 건강 음료, 기능성 식품 등의 식품 첨가물로 이용할 수 있으며, 또한 백반, 면류, 빵류, 유산균 음료 등에 첨가하여 식감과 이취 개선 및 정미 효과 등을 올릴 수 있는 것으로 알려져 있다. 그러나 국내에서는 chlorella 분말을 첨가한 설기떡의 제조⁷⁾와 김치 숙성⁸⁾에 관한 연구가 있었고, chlorella 추출물을 식품에 적용시킨 연구로는 박⁹⁾이 식빵에 첨가하여 품질 특성을 보고한 것뿐으로 아직까지 chlorella 추출물을 이용한 새로운 기능성 식품 개발에 대한 연구는 드문 실정이다.

본 연구에서는 다양한 생리적 활성이 규명되어 있는 chlorella 추출물을 이용한 기능성 yoghurt의 제조 가능성을 검토하고자 하였다. 따라서 chlorella 추출물을 수준별로 첨가하여 chlorella 추출물 첨가가 *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus bulgaricus*를 yoghurt starter로 단독 및 혼합 배양하여 발효 중 유산균의 산 생성 및 증식에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 실험 재료

본 실험에 사용한 chlorella 추출물은 대상(주)에서 시판하고 있는 chlorella 추출물 분말(chlorella growth factor, CGF, OD 10,000) 제품을 사용하였다. 이 chlorella 추출물 분말 제품의 일반 성분은 한국보건산업진흥원에서 분석된 것으로 Table 1과 같았다.

2. 사용 균주 및 배지

Table 1. Chemical compositions of chlorella extract powder(CEP)¹⁾

	Compounds	Unit	Content
General components	Moisture	%	2.28
	Protein	%	66.91
	Fat	%	0.92
	Carbohydrates	%	22.73
	Fiber	%	7.29
	Ash	%	7.16
	pH		5.86
Vitamins	Vatamin A	µg/100g.RE	944.35
	Vatamin C	mg/100g	390.07
	Niacin	mg/100g	151.53
	Folic acid	mg/100g	248.23
Minerals	Calcium	mg/100g	211.40
	Potassium	mg/100g	4,159.00
	Phosphorus	mg/100g	3,747.60
	Magnesium	mg/100g	834.10
	Sodium	mg/100g	550.40
Amino acids	Lysine	mg/100g	2,193
	Aspartic acid	mg/100g	2,692
	Glutamic acid	mg/100g	4,434
	Alanine	mg/100g	2,404
	Valine	mg/100g	1,680
	Leucine	mg/100g	1,854
	Cysteine	mg/100g	1,943

¹⁾ 한국보건산업진흥원, 한국식품연구원, 2001.

본 실험에 사용한 유산균은 냉동 건조된 *Str. thermophilus*(TH-3), *Lac. acidophilus*(La-5), *Lac. casei*(L. casei 01), *Lac. bulgaricus*(Lb-12)를 CHR HANSEN사(Denmark)로부터 구입하여 사용하였다. 유산균은 멸균된 Lactobacilli MRS broth(Difco, USA) 배지에서 37℃ incubator에 약 15시간 가량 2회 계대 배양하여 활력을 기른 후 멸균(110℃, 15분)된 10%(w/v) skim milk (Difco, USA) 배지에 1%(v/v) 접종한 것을 생육 활성 실험에 사용하였다. 생균수 측정용 배지는 Lactobacilli MRS agar(Difco, USA)를 멸균(121℃, 15분)하여 사용하였다.

3. 시 약

Chlorella 추출물 첨가 발효액의 적정산도 측정에는 NaOH(Sigma, USA)를 사용하였으며, 생균수 측정용

생리식염수로 NaCl(Sigma, USA)을 사용하였다.

4. Chlorella 추출물의 유산균 생육에 미치는 영향

Chlorella 추출물이 유산균의 증식에 미치는 영향을 조사하기 위하여 단독균주인 경우에는 chlorella 추출물 분말을 농도별(0.5%, 1.0%, 2.0%, 3.0%)로 10%(w/v) skim milk 배지에 첨가한 후 계대 배양한 유산균 *Str. thermophilus*, *Lac. acidophilus*, *Lac. casei*, *Lac. bulgaricus*를 각각 1%(v/v)씩 접종하고 37°C에서 24시간 동안 배양하면서 시간별(0, 3, 6, 9, 12, 15, 24시간)로 생균수와 pH 및 적정산도를 측정하였다. 혼합균주인 경우에는 chlorella 추출물 분말을 0.25%, 0.5%, 1.0%, 2.0% 농도로 10%(w/v) skim milk 배지에 첨가하여 계대 배양한 *Str. thermophilus*와 *Lac. acidophilus*, *Str. thermophilus*와 *Lac. casei*, *Str. thermophilus*와 *Lac. bulgaricus*를 혼합균주로 하여 각각 1:1로 1%(v/v) 접종하고 37°C에서 24시간 배양하면서 시간별(0, 3, 6, 9, 12, 15, 24시간)로 생균수와 pH 및 적정산도의 변화를 조사하였다.

1) 생균수 측정

유산균의 생균수 측정은 시간별로 채취한 시료를 멸균한 0.85% 생리식염수로 십진 희석한 후, pour plate method¹⁰⁾로 MRS agar 배지에 접종하여 37°C에서 48~72시간 배양한 후 형성된 colony 수를 계수하였다.

2) pH 및 적정산도 측정

pH 측정은 pH meter(ORION, model 420A)로 측정하였고, 산도는 시료 10mL를 취하여 0.1N NaOH로 pH가 8.3이 될 때까지 적정하였으며 아래의 식에 따라 계산하여 젖산량(%)으로 환산하였다¹¹⁾.

$$\text{산도(lactic acid, \%)} = \frac{0.1N \text{ NaOH 소비량(mL)} \times 0.1N \text{ NaOH 역가(f)} \times 0.009}{\text{시료채취량(mL)}} \times 100$$

결과 및 고찰

1. Chlorella 추출물 첨가에 의한 단독균주의 생육 효과

1) 배양 중 생균수의 변화

Chlorella 추출물 분말의 첨가 농도(0.5%, 1.0%, 2.0%, 3.0%)에 의한 *Str. thermophilus*, *Lac. acidophilus*, *Lac. casei*와 *Lac. bulgaricus* 등의 유산균 증식에 미치는 영향을 조사한 결과를 Fig. 1~Fig. 4에 나

타내었다.

*Str. thermophilus*는 Fig. 1에서와 같이 배양 6시간 후 대조구(1.21×10^8 CFU/mL)에 비하여 chlorella 추출물 분말 0.5~3.0% 첨가구($4.64 \times 10^8 \sim 7.51 \times 10^8$ CFU/mL)에서는 다소 빨리 성장하였으며, 9시간에는 chlorella 추출물 분말 0.5% 첨가구는 가장 많은 균수(2.90×10^9 CFU/mL)를 나타내며 배양 후 24시간까지 계속 대조구에 비해 높은 균수를 유지하였다. 그러나 1.0% 이상 첨가구에서는 배양 24시간에는 대조구에 비하여 약간 적은 균수를 보였다.

*Lac. acidophilus*는 Fig. 2에서 보여지는 바와 같이 chlorella 추출물 분말 첨가구에서는 배양 후 6시간에는 대조구(2.25×10^8 CFU/mL)보다 약간 높은 균수($3.00 \times 10^8 \sim 6.40 \times 10^8$ CFU/mL)를 나타내었고, 24시간

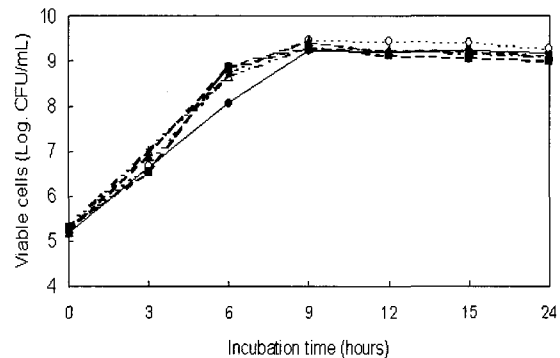


Fig. 1. Changes in viable cell counts by *Streptococcus thermophilus* in skim milk added with chlorella extract powder(CEP).

—●— ; CEP 0.0%, ...○... ; CEP 0.5%, —▲— ; CEP 1.0%, ..△— ; CEP 2.0%, —■— ; CEP 3.0%

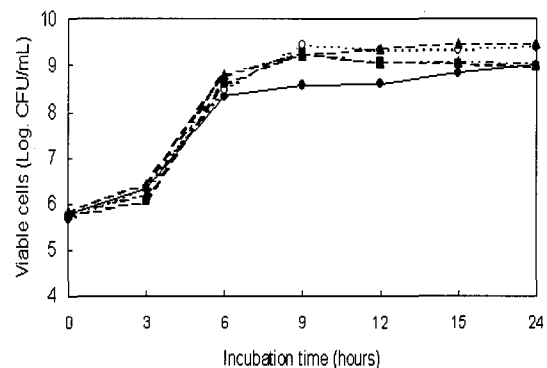


Fig. 2. Changes in viable cell counts by *Lactobacillus acidophilus* in skim milk added with chlorella extract powder(CEP).

—●— ; CEP 0.0%, ...○... ; CEP 0.5%, —▲— ; CEP 1.0%, ..△— ; CEP 2.0%, —■— ; CEP 3.0%

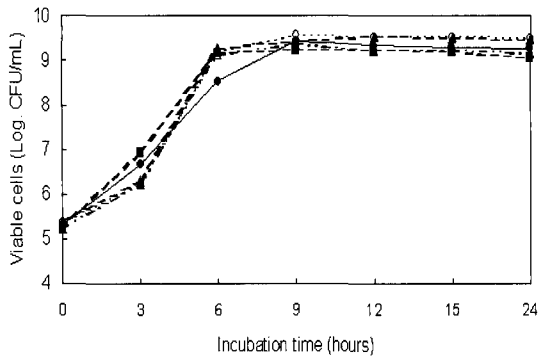


Fig. 3. Changes in viable cell counts by *Lactobacillus casei* in skim milk added with chlorella extract powder(CEP).

●— ; CEP 0.0%, ○···· ; CEP 0.5%, ▲— ; CEP 1.0%, △— ; CEP 2.0%, ■— ; CEP 3.0%

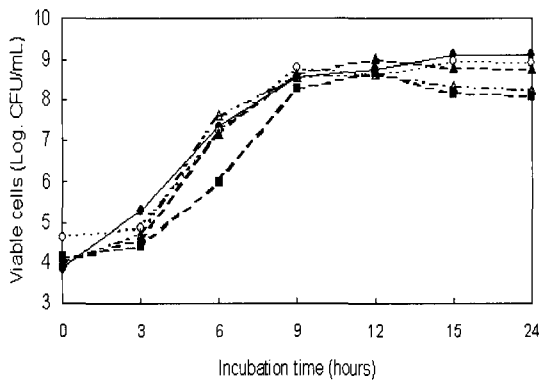


Fig. 4. Changes in viable cell counts by *Lactobacillus bulgaricus* in skim milk added with chlorella extract powder(CEP).

●— ; CEP 0.0%, ○···· ; CEP 0.5%, ▲— ; CEP 1.0%, △— ; CEP 2.0%, ■— ; CEP 3.0%

배양시에는 chlorella 추출물 분말을 0.5%와 1.0% 첨가하였을 때 다른 첨가구에 비해 균수가 높게 나타났다.

*Lac. casei*도 chlorella 추출물 분말을 첨가하였을 때 배양 6시간에 대조구에 비하여 빠른 성장을 보였으며, 배양 후 24시간에는 *Lac. acidophilus*와 마찬가지로 0.5%와 1.0% 첨가구에서 균의 생육이 높게 나타났다. 특히 chlorella 추출물 분말을 0.5% 첨가하여 9시간 배양하였을 때 3.63×10^9 CFU/mL로 가장 많은 생균수를 나타내었다. 반면 chlorella 추출물 분말의 첨가량을 2.0%와 3.0%로 하였을 때는 배양 9시간 이후부터 대조구에 비해서 균수가 약간 감소하는 현상을 보였다 (Fig. 3).

Fig. 4에 나타난 *Lac. bulgaricus*의 경우를 보면

chlorella 추출물 분말 첨가에 의해 *Lac. bulgaricus*의 생육에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 나타났으며 배양 후 9시간에 chlorella 추출물 분말 0.5%와 1.0% 첨가구에서는 대조구보다 약간 많은 균수를 보였고, 1.5% 첨가구에서는 대조구와 비슷한 균수가 유지되었으나, 배양 12시간 후부터는 첨가량과 상관없이 대조구보다 낮은 균수를 나타내었다.

이상의 결과를 보면 *Str. thermophilus*, *Lac. casei*와 *Lac. bulgaricus*는 chlorella 추출물 분말 0.5% 첨가시 9시간 배양에서, 그리고 *Lac. acidophilus*는 1.0% 첨가시 15시간 배양에서 최대 균수를 나타내었으며, 이들 중 *Lac. casei*가 0.5% 첨가시 배양 9시간에 3.63×10^9 CFU/mL로 가장 높은 생균수를 보였다. Chlorella 추출물 분말은 본 실험에 사용된 유산균의 배양 중 초기에 유산균의 생육에 영향을 미쳐 생육 촉진 효과를 나타내었으며, 0.5% 수준의 저농도 첨가량에서 생육이 가장 촉진되었음을 알 수 있었다. 윤²⁾은 *Str. thermophilus*와 *Lac. acidophilus*에 chlorella를 첨가하므로써 균의 생장이 증가되었으나 그 첨가량은 *Str. thermophilus*는 1.5%에서, *Lac. acidophilus*는 2.0%에서 가장 우수하였으며, 첨가량이 이 이상이 되었을 때에는 두 균 모두 생균수가 감소하였다고 보고하여 본 실험의 결과와 유사하게 나타났다.

2) 배양 중 pH 및 적정산도의 변화

Chlorella 추출물 분말을 각각 0.5%, 1.0%, 2.0%, 3.0% 첨가하여 *Str. thermophilus*, *Lac. acidophilus*, *Lac. casei*와 *Lac. bulgaricus*를 접종하여 37°C에서 24시간 동안 배양하면서 pH와 적정산도의 변화를 대조구와 비교 관찰한 결과는 Table 2, Table 3, Table 4, Table 5와 같았다. Chlorella 추출물 분말 자체의 pH가 5.86(Table 1)으로 약산성인 특성으로 인해 이를 skim milk 배지에 첨가하면 배지의 pH는 6.60~6.73의 범위이었으나 chlorella 추출물 분말의 첨가 농도가 증가할수록 배지의 pH는 저하하였고 적정산도는 증가하였다.

*Str. thermophilus*의 경우 Table 2에 나타난 바와 같이 chlorella 추출물 분말 0.5~3.0% 첨가구에서 배양 6시간에 pH 6.68, 적정산도 0.15%인 대조구에 비하여 급격히 pH가 낮아지고(pH 5.04~5.42) 적정산도가 높아지는(0.59~0.62%) 경향을 나타내었으며, chlorella 추출물 분말 첨가구 중 0.5% 첨가구가 다른 첨가구보다 9시간 후부터 배양 기간 동안 계속 최저의 pH와 최고의 적정산도를 보였다.

Table 3에서 보면 *Lac. acidophilus*는 배양 9시간에

Table 2. Changes in acid production by *Streptococcus thermophilus* in skim milk added with chlorella extract powder(CEP)

Property	Treatments	Incubation time(hours)						
		0	3	6	9	12	15	24
pH	CEP 0.0%	6.66	6.76	6.68	5.30	4.59	4.40	4.31
	CEP 0.5%	6.60	6.60	5.04	4.56	4.50	4.46	4.40
	CEP 1.0%	6.42	6.50	5.12	4.76	4.72	4.69	4.63
	CEP 2.0%	6.32	6.40	5.29	4.99	4.96	4.94	4.89
	CEP 3.0%	6.28	6.34	5.42	5.06	5.06	5.03	4.98
Titratable acidity(%)	CEP 0.0%	0.12	0.13	0.15	0.44	0.70	0.79	0.88
	CEP 0.5%	0.15	0.16	0.59	0.75	0.78	0.80	0.85
	CEP 1.0%	0.19	0.19	0.59	0.74	0.77	0.78	0.82
	CEP 2.0%	0.25	0.25	0.59	0.73	0.76	0.78	0.78
	CEP 3.0%	0.30	0.30	0.62	0.78	0.78	0.78	0.81

Table 3. Changes in acid production by *Lactobacillus acidophilus* in skim milk added with chlorella extract powder(CEP)

Property	Treatments	Incubation time(hours)						
		0	3	6	9	12	15	24
pH	CEP 0.0%	6.73	7.06	7.04	6.95	6.63	5.96	4.26
	CEP 0.5%	6.73	6.93	6.17	4.98	4.57	4.37	4.08
	CEP 1.0%	6.53	6.80	5.78	4.93	4.69	4.53	4.34
	CEP 2.0%	6.45	6.62	5.89	5.18	4.99	4.79	4.66
	CEP 3.0%	6.44	6.55	6.01	5.24	5.14	4.92	4.72
Titratable acidity(%)	CEP 0.0%	0.11	0.10	0.11	0.12	0.16	0.29	0.89
	CEP 0.5%	0.14	0.12	0.26	0.62	0.78	0.88	1.13
	CEP 1.0%	0.17	0.15	0.39	0.68	0.78	0.90	0.97
	CEP 2.0%	0.23	0.22	0.41	0.68	0.77	0.88	0.94
	CEP 3.0%	0.26	0.24	0.41	0.73	0.79	0.86	1.06

Table 4. Changes in acid production by *Lactobacillus casei* in skim milk added with chlorella extract powder(CEP)

Property	Treatments	Incubation time(hours)						
		0	3	6	9	12	15	24
pH	CEP 0.0%	6.69	6.70	6.53	5.13	4.65	4.02	3.94
	CEP 0.5%	6.65	6.56	4.85	4.57	4.53	4.08	3.99
	CEP 1.0%	6.63	6.48	4.97	4.75	4.73	4.31	4.23
	CEP 2.0%	6.50	6.40	5.18	4.98	4.96	4.58	4.50
	CEP 3.0%	6.38	6.34	5.26	5.08	5.06	4.68	4.57
Titratable acidity(%)	CEP 0.0%	0.12	0.14	0.18	0.50	0.68	0.77	0.84
	CEP 0.5%	0.16	0.16	0.63	0.73	0.73	0.78	0.81
	CEP 1.0%	0.18	0.20	0.64	0.73	0.75	0.77	0.80
	CEP 2.0%	0.24	0.24	0.66	0.73	0.74	0.76	0.78
	CEP 3.0%	0.28	0.28	0.68	0.77	0.75	0.81	0.87

Table 5. Changes in acid production by *Lactobacillus bulgaricus* in skim milk added with chlorella extract powder(CEP)

Property	Treatments	Incubation time(hours)						
		0	3	6	9	12	15	24
pH	CEP 0.0%	6.60	6.78	6.48	5.01	4.45	4.49	4.29
	CEP 0.5%	6.59	6.68	6.23	4.30	4.19	4.20	4.10
	CEP 1.0%	6.48	6.60	6.20	4.53	4.49	4.30	4.21
	CEP 2.0%	6.38	6.45	6.07	4.76	4.71	4.52	4.43
	CEP 3.0%	6.32	6.36	6.19	5.08	5.00	4.91	4.72
Titratable acidity(%)	CEP 0.0%	0.13	0.13	0.18	0.58	0.89	1.04	1.31
	CEP 0.5%	0.17	0.16	0.22	0.93	1.15	1.25	1.35
	CEP 1.0%	0.19	0.20	0.26	0.87	0.92	1.01	1.16
	CEP 2.0%	0.25	0.26	0.36	0.91	0.97	1.01	1.09
	CEP 3.0%	0.32	0.32	0.36	0.82	0.89	0.93	1.04

chlorella 추출물 분말 첨가구에서 pH가 크게 하락하였고 적정산도가 크게 상승하였다. 특히 chlorella 추출물 분말을 0.5% 첨가하였을 때 24시간 배양 후 다른 첨가구에 비하여 가장 낮은 pH인 4.08, 가장 높은 적정산도인 1.13%를 나타내었다.

*Lac. casei*는 Table 4에서와 같이 chlorella 추출물 분말을 0.5%, 1.0%, 2.0%, 3.0% 첨가한 모든 실험구에서 6시간 배양 후 pH가 각각 4.85, 4.97, 5.18, 5.26으로 대조구(pH 6.53)보다 pH의 하락폭이 가장 컸으며, 적정산도도 각각 0.63%, 0.64%, 0.66%, 0.68%로 가장 증가폭이 큰 것으로 나타났다. 또한 chlorella 추출물 분말을 0.5% 첨가한 경우 24시간 배양 후에도 다른 첨가구보다 산 생성이 많았다.

*Lac. bulgaricus*는 chlorella 추출물 분말을 0.5% 첨가한 실험구에서 9시간 배양 후부터 대조구(pH 5.01, 적정산도 0.58%)에 비하여 pH가 4.30으로 낮아지고, 적정산도는 0.96%로 높아졌으나, 2.0%와 3.0% 첨가구에서는 배양 24시간 후 대조구에 비하여 산 생성량이 증가되지 않았다(Table 5).

이러한 결과는 Fig. 1~Fig. 4의 결과와 일치하는 것으로 chlorella 추출물 분말 0.5% 첨가시 *Str. thermophilus*, *Lac. acidophilus*, *Lac. casei*, *Lac. bulgaricus* 등의 유산균 생육이 촉진되어 산 생성을 촉진시켰다는 것을 알 수 있었다. 이것은 신 등¹²⁾이 Bios 2000, yeast extract, HPN 95, BGP 90-A와 같은 성장 촉진제를 원유 배지에 첨가하였을 때 *Lac. bulgaricus*, *Str. thermophilus*, *Lac. acidophilus* 등의 유산균의 경우에 산 생성과 pH 저하 효과가 우수하였다고 보고한 연구와 매우 흡사한 결과로 나타났으나, 세균수 면에서 *Str. thermophilus*의 경우 촉진 효과가 나타나지 않았고 *Lac.*

*bulgaricus*와 *Lac. acidophilus*는 약간의 효과가 나타났다고 발표한 결과와는 다르게 나타났다. 한편 윤²⁾은 *Str. thermophilus*의 경우 chlorella 첨가량 1.5% 수준에서, 그리고 *Lac. acidophilus*는 첨가량 2.0%에서 pH와 산도의 변화가 최대로 증가하였으나 chlorella 첨가량이 이보다 증가할 때에는 오히려 그 효과가 반비례하였다고 보고하여 본 실험의 결과와 비슷한 경향을 나타내었다. 유산균은 제한된 생합성 능력을 지니고 있으므로 아미노산, 비타민, purine, pyrimidine 등의 복합 영양소를 필요로 한다¹³⁾. 그러므로 Table 1에 나타난 바와 같이 chlorella 추출물 분말에는 66.91%의 높은 단백질과 Vitamin A, C, niacin, folic acid 등의 비타민, K, P, Mg, Na, Ca 등의 다양한 무기질, glutamic acid, aspartic acid, alanine, lysine, cysteine 등의 아미노산과 같은 물질들이 함유되어 있기 때문에 chlorella 추출물 분말 첨가에 의해 유산균의 초기 생육이 촉진되었으며, 따라서 대조구보다 산 생성이 높았던 것으로 사료되었다.

2. Chlorella 추출물 첨가에 의한 혼합균주의 생육 효과

1) 배양 중 생균수의 변화

Chlorella 추출물 분말 첨가 농도(0.25%, 0.5%, 1.0%, 2.0%)에 의한 혼합균주들의 유산균수의 변화를 조사하기 위하여 *Str. thermophilus*와 *Lac. acidophilus*, *Str. thermophilus*와 *Lac. casei*, *Str. thermophilus*와 *Lac. bulgaricus* 등의 혼합균주를 접종한 후 37°C에서 24시간 배양하면서 생균수를 측정하였으며 그 결과는 Fig. 5~Fig. 7에 나타내었다.

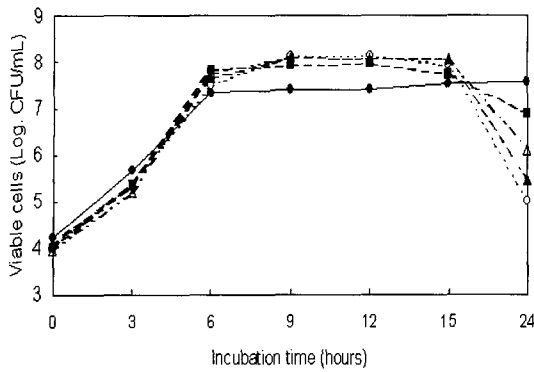


Fig. 5. Effect of chloroella extract powder(CEP) on growth of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus acidophilus*.

—●— ; CEP 0.0%, ...○... ; CEP 0.25%, —▲— ; CEP 0.5%, ··△· ; CEP 1.0%, —■— ; CEP 2.0%

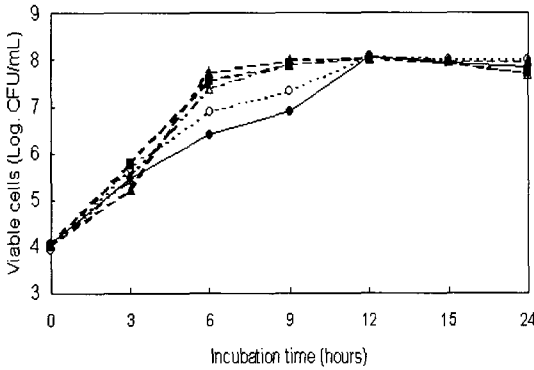


Fig. 6. Effect of chloroella extract powder(CEP) on growth of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus casei*.

—●— ; CEP 0.0%, ...○... ; CEP 0.25%, —▲— ; CEP 0.5%, ··△· ; CEP 1.0%, —■— ; CEP 2.0%

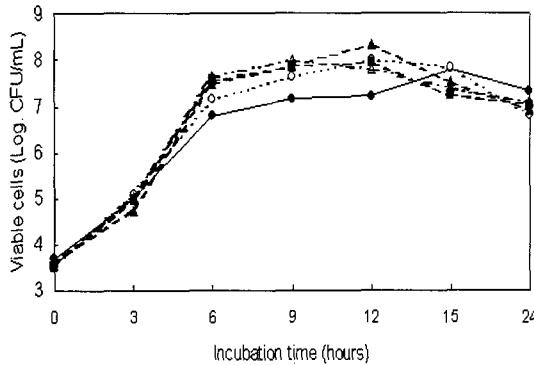


Fig. 7. Effect of chloroella extract powder(CEP) on growth of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*.

—●— ; CEP 0.0%, ...○... ; CEP 0.25%, —▲— ; CEP 0.5%, ··△· ; CEP 1.0%, —■— ; CEP 2.0%

*Str. thermophilus*와 *Lac. acidophilus* 혼합균주의 경우 Fig. 5에서 보는 바와 같이 chlorella 추출물 분말 0.25% 첨가구에서 배양 12시간 후 1.38×10^8 CFU/mL로 최대 균수를 보이며 4.10의 log cycle이 증가하였으나 15시간 후부터 균수가 감소하기 시작하여 배양 24시간에는 대조구에 비하여 크게 생균수(1.00×10^5 CFU/mL)가 하락하였다.

*Str. thermophilus*와 *Lac. casei*를 혼합 배양하였을 때 12시간 배양 후 chlorella 추출물 분말 0.25% 첨가시 1.13×10^8 CFU/mL로 생균수가 가장 높아 4.12의 log cycle 증가를 나타내었으며, 배양 24시간에는 생균수가 9.73×10^7 CFU/mL로 약간의 감소 현상을 보였다 (Fig. 6).

Fig. 7에서 알 수 있듯이 *Str. thermophilus*와 *Lac. bulgaricus*의 혼합균주를 접종한 경우 단독균주로 *Lac. bulgaricus*를 배양한 Fig. 4의 결과와는 달리 chlorella 추출물 분말의 첨가량에 상관없이 chlorella 추출물 분말 첨가구에서 모두 배양 12시간까지 유산균의 생장이 활발해졌으며, 0.5% 첨가구에서 2.15×10^8 CFU/mL로 균수가 최대로 나타났다. 그러나 배양 15시간 후부터 chlorella 추출물 분말을 첨가한 모든 실험구에서 대조구에 비해 균수가 하락하였다. 이것은 이 등¹⁴⁾이 *Str. thermophilus*와 *Lac. bulgaricus*를 혼합 배양시킨 경우 이들의 공생작용에 의해 단독 배양의 경우보다 유산균의 성장 및 젖산의 생성이 증진되었다고 보고한 결과와 일치되었다.

이상의 결과를 보면 저농도(0.25~0.5%)의 chlorella 추출물 분말 첨가에 의해 유산균 혼합균주의 증식이 촉진되었다. 정 등¹⁵⁾은 1.0% 다시마 열수 추출물이 첨가된 yogurt에서 무첨가구에 비해 오히려 미미하나마 적은 유산균수를 나타내었고 0.5% 첨가 농도에서 균수가 최고에 달하였는데, 이는 1.0% 다시마 열수 추출물의 성분 중 알긴산의 성분 함량이 너무 높아 유산균의 생육을 어느 정도 저해한 것으로 사료되었다고 보고하였다. 이와 마찬가지로 본 실험에서도 chlorella 추출물 분말 첨가량의 농도가 높은 경우 chlorella 추출물 분말에 함유된 성분의 과도한 양으로 인해 유산균의 생육에 부적당한 환경 인자를 제공하여 유산균의 생육이 억제되었던 것으로 추정되었다.

2) 배양 중 pH 및 적정산도의 변화

Chlorella 추출물 분말을 농도별(0.25%, 0.5%, 1.0%, 2.0%)로 skim milk에 첨가한 후 혼합균주(*Str. thermophilus*와 *Lac. acidophilus*, *Str. thermophilus*와 *Lac. casei*, *Str. thermophilus*와 *Lac. bulgaricus*)를 배양하여 24시간

동안 pH와 적정산도의 변화를 관찰한 결과를 Table 6~Table 8에 요약하였다.

Chlorella 추출물 분말을 0.25~2.0% 첨가하였을 때 모든 혼합균주 실험구에서 배양 9시간 후에 대조구에 비하여 pH가 크게 하락하였고 적정산도가 크게 상승하여 산 생성량이 향상되었음을 알 수 있었다. Chlorella 추출물 분말 0.25% 첨가시 12시간 배양 후 *Str. thermophilus*와 *Lac. acidophilus*의 경우(Table 6) pH 3.91, *Str. thermophilus*와 *Lac. casei*(Table 7)는 pH 4.33, *Str. thermophilus*와 *Lac. bulgaricus*(Table 8)는 pH 4.13으로 0.5~2.0%의 더 높은 농도로 chlorella 추출물 분말을 첨가하였을 때보다 가장 낮은 pH를 보였으며, 이러한 현상은 배양 24시간 후에도 같은 경향으로 나타났다.

일반적으로 yoghurt의 발효에는 혼합 starter를 사용하여 균종 상호간에 공생작용이 나타나서 균의 생육을 촉진시키고 제품의 성분에 대한 작용도 효과를 높일 수 있도록 한다. 전통적으로 yoghurt의 제조에는 *Str. thermophilus*와 *Lac. bulgaricus* 혼합균주가 사용되어 왔으나, 최근에는 유산균 중에서 인체 유용 작용이 탁월하여 probiotics로 분류되는 *Lac. acidophilus*, *Lac. casei*, bifidobacteria 등이 함께 사용되고 있다¹⁶⁾. 따라서 본 실험에서도 chlorella 추출물 분말을 첨가한 yoghurt를 제조하기 위한 혼합 starter로 *Str. thermophilus*와 *Lac. casei* 혼합균주를 사용하고 chlorella 추출물 분말 첨가 농도는 0.25%로 하는 것이 이들 유산균의 생육을 촉진하여 생균수와 산 생성량이 높게 나타나 가장 바람직한 것으로 사료되었다.

Table 6. Effect of chlorella extract powder(CEP) on acid production of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus acidophilus*

Property	Treatments	Incubation time(hours)						
		0	3	6	9	12	15	24
pH	CEP 0.0%	6.54	6.57	6.41	6.15	5.59	4.56	3.86
	CEP 0.25%	6.51	6.52	5.48	4.19	3.91	3.78	3.63
	CEP 0.5%	6.45	6.46	5.24	4.26	3.99	3.85	3.69
	CEP 1.0%	6.39	6.37	5.12	4.37	4.11	4.08	3.94
	CEP 2.0%	6.27	6.27	5.08	4.62	4.45	4.37	4.24
Titratable acidity(%)	CEP 0.0%	0.14	0.15	0.19	0.23	0.35	0.69	1.07
	CEP 0.25%	0.16	0.16	0.39	0.87	1.05	1.16	1.43
	CEP 0.5%	0.18	0.18	0.47	0.84	1.02	1.15	1.39
	CEP 1.0%	0.21	0.21	0.56	0.86	1.01	1.09	1.23
	CEP 2.0%	0.26	0.27	0.65	0.85	0.96	1.04	1.12

Table 7. Effect of chlorella extract powder(CEP) on acid production of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus casei*

Property	Treatments	Incubation time(hours)						
		0	3	6	9	12	15	24
pH	CEP 0.0%	6.60	6.58	6.03	5.13	4.50	4.28	4.04
	CEP 0.25%	6.53	6.52	5.18	4.54	4.33	4.27	4.15
	CEP 0.5%	6.47	6.46	5.03	4.50	4.38	4.37	4.26
	CEP 1.0%	6.39	6.38	4.86	4.51	4.49	4.47	4.40
	CEP 2.0%	6.27	6.25	4.84	4.73	4.71	4.70	4.63
Titratable acidity(%)	CEP 0.0%	0.14	0.15	0.24	0.46	0.75	0.90	1.01
	CEP 0.25%	0.17	0.17	0.48	0.68	0.78	0.79	0.86
	CEP 0.5%	0.19	0.19	0.54	0.75	0.78	0.81	0.83
	CEP 1.0%	0.21	0.22	0.63	0.83	0.84	0.89	0.90
	CEP 2.0%	0.27	0.28	0.73	0.79	0.84	0.83	0.86

Table 8. Effect of chlorella extract powder(CEP) on acid production of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*

Property	Treatments	Incubation time(hours)						
		0	3	6	9	12	15	24
pH	CEP 0.0%	6.47	6.53	6.35	6.04	5.77	5.72	4.36
	CEP 0.25%	6.45	6.46	5.56	4.51	4.13	3.95	3.65
	CEP 0.5%	6.42	6.39	5.26	4.47	4.22	4.07	3.80
	CEP 1.0%	6.31	6.31	5.08	4.50	4.36	4.22	4.07
	CEP 2.0%	6.21	6.20	5.12	4.72	4.59	4.46	4.27
Titratable acidity(%)	CEP 0.0%	0.15	0.15	0.19	0.25	0.30	0.35	0.72
	CEP 0.25%	0.17	0.17	0.36	0.70	0.85	1.02	1.29
	CEP 0.5%	0.19	0.19	0.48	0.77	0.86	0.94	1.16
	CEP 1.0%	0.23	0.23	0.58	0.80	0.84	0.92	1.08
	CEP 2.0%	0.30	0.30	0.63	0.81	0.88	1.01	1.09

요약

Chlorella 추출물을 첨가한 yoghurt를 개발하기 위한 기초 연구로 chlorella 추출물의 첨가가 yoghurt starter의 산 생성 및 증식에 미치는 영향을 조사하였다. *Str. thermophilus*, *Lac. acidophilus*, *Lac. casei*, *Lac. bulgaricus*를 단독균주 및 혼합균주로 접종하여 배양하면서 생균수와 pH 및 적정산도를 측정하였다. 단독균주의 경우 chlorella 추출물 분말의 첨가 농도(0.5%, 1.0%, 2.0%, 3.0%)를 달리 하였을 때 *Str. thermophilus*, *Lac. casei*와 *Lac. bulgaricus*는 chlorella 추출물 분말 0.5% 첨가시 9시간 배양에서, 그리고 *Lac. acidophilus*는 1.0% 첨가시 15시간 배양에서 최대 균수를 나타내었으며, 이들 중 *Lac. casei*가 0.5% 첨가시 배양 9시간에 3.63×10^9 CFU/mL로 가장 높은 생균수를 보였다. 또한 이들 유산균의 산 생성도 chlorella 추출물 분말을 0.5% 첨가하였을 때 가장 많이 증가하였다. 혼합균주의 경우 chlorella 추출물 분말을 0.25%, 0.5%, 1.0%, 2.0%로 첨가하였을 때 저농도(0.25~0.5%)의 chlorella 추출물 분말 첨가에 의해 모든 유산균 혼합균주의 증식이 촉진되었고, pH가 크게 하락하였으며 적정산도가 크게 상승하였다. *Str. thermophilus*와 *Lac. casei*를 혼합 배양하였을 때 chlorella 추출물 분말 0.25% 첨가시 12시간 배양 후 1.13×10^8 CFU/mL로 생균수가 가장 높아 4.12의 log cycle 증가를 나타내었다. 따라서 chlorella 추출물 첨가 yoghurt 제조시 chlorella 추출물 분말을 0.25% 첨가하여 혼합 starter로 *Str. thermophilus*와 *Lac. casei* 혼합균주를 사용하는 것이 이들 유산균의 생육이 촉진되어 가장 적합한 것으로 나타났다.

참고문헌

1. 강기림 : 발효조와 유사 노지 환경에서 배양된 chlorella powder의 물리적 성질 비교, 고려대학교 석사학위논문(2000)
2. 윤동훈 : Chlorella 세포질이 유산균의 생장에 미치는 영향, 고려대학교 석사학위논문(1980)
3. 김창한 : 무기물이 클로렐라 생육에 미치는 영향, *건대학술지*, **28**, 245~251(1984)
4. 이유경, 이홍금 : 조류(Algae)의 산업적 이용, *생물산업*, **15**(2), 19~24(2002)
5. 한재갑, 강기권, 김진국, 김상환 : 클로렐라 추출물 현황 및 전망, *식품과학과 산업*, **35**(2), 64~69(2002)
6. 백승화 : *Chlorella ellipsoidea* 첨가 식이가 흰쥐의 혈청 지질 성분 및 효소 활성도에 미치는 효과, 명지대학교 박사학위논문(1989)
7. 박민경, 이재민, 박찬현, 인만진 : 클로렐라를 첨가한 설기떡의 품질 특성, *한국식품영양과학회지*, **31**(2), 225~229(2002)
8. 박민경, 인만진, 정영철 : 프락토올리고당과 클로렐라가 김치 숙성에 미치는 영향, *한국식품영양과학회지*, **31**(5), 760~764(2002)
9. 박신인 : Chlorella growth factor 첨가가 식빵의 품질 특성에 미치는 영향, *한국식생활문화학회지*, **18**(4), 356~364(2003)
10. Vanderzant, C.H. and Splittstoesser, D.F. : Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 3rd ed., American Health Association

- tion, p.80(1992)
11. 한만숙 : 유산균 발효유의 적정 산도 측정에 관한 연구, *동대논집*, **9(1)**. 221~231(1979)
 12. 신용국, 이경옥, 백승천, 김수광 : 성장 촉진제에 의한 유산균의 성장 특성에 관한 연구, *한국낙농학회지*, **20(1)**. 69~74(1998)
 13. Madigan, M.T., Martinko, J.M. and Parker, J. : Brock Biology of Microorganisms, 10th ed., Prentice Hall, pp.504~506(2003)
 14. 이신호, 구영조, 신동화 : *L. bulgaricus*와 *S. thermophilus*의 단독 및 혼합 배양에 의한 요구르트의 이화학적·미생물학적 특성, *한국식품과학회지*, **20(2)**. 140~147(1988)
 15. 정은자, 방병호 : 다시마 추출물이 요구르트 품질에 미치는 영향, *한국식품영양학회지*, **16(1)**. 66~71(2003)
 16. 임광세 : 유산균의 건강 증진 효과, *한국식품영양학회지*, **16(1)**. 93~103(2003)
-
- (2003년 12월 1일 접수)