



유산균 함유 발효유제품에 대한 유산균수 측정 시험법 적용

오윤지 · 이미선 · 안유진 · 안장혁*
KOTITI시험연구원 수질식품사업본부

Application of Measurement Method for Lactic Acid Bacteria Content on Coccus Including Yoghurt

Yunji Oh, Mi Seon Lee, Yu-Jin Ahn, and Jang-Hyuk Ahn*

Water & Food Business Division, KOTITI Testing and Research Institute, Seongnam 462-807, Korea

Abstract: The quantitative analytical method for Lactic Acid Bacteria (LAB) in Korea Food Standard was reviewed in case of measurement for some market yoghurts. Contents of LAB in fermented yoghurt in Korea food market were investigated. BCP plate count agar, PCA with BCP, and MRS were tested for the measurement of LAB. The measured count for LAB in the product were determined as following order; BCP plate count agar > MRS agar > PCA with BCP. The measured LAB range in the product using BCP plate count agar was between 116×10^7 and 180×10^7 CFU/mL, that using MRS agar was between 18.6×10^7 and 23.2×10^7 CFU/mL, and that using PCA with BCP was 3×10^5 and 22×10^5 CFU/mL. As the results, use of proper medium for the accurate LAB measurement including coccus as well as bacillus would be recommended.

Keywords: Yoghurt, lactic acid bacteria, viable count, Gram stain

서 론

유산균은 포도당, 유당 등의 탄수화물을 분해하여 젖산(lactic acid)을 생성하는 세균으로 젖산균이라고도 불리는데, 구균 또는 간균 형태로서 그람양성, 비포자생성 및 카탈라아제 음성의 미생물 특성을 갖고 있다. 생장대사 중에 생성되는 부산물에 따라 동형 발효와 이형 발효 유산균으로 구분되는데, 동형 발효균은 포도당을 이용하여 젖산을 85%이상 생성하는 균이며 *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Lactobacillus* 일부가 속하며, 이형 발효균은 포도당을 이용하여 대사중에 젖산 외에도 초산, 알코올 또는 이산화탄소를 생성하는 균으로 *Leuconostoc*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* 일부가 속한다.

전통적으로 인류가 섭취해 온 유산균을 이용한 식품으로는 요구르트라고 하는 발효유 제품이 가장 많이 이용되고 있다고 할 수 있는데, 최근에는 건강기능에 대한 관심이 고

조되면서 유산균을 이용한 다양한 식품들이 판매되고 있다. 이러한 유산균 활용 가공식품들에 대하여 관리 당국의 법적 규격 관리와 제조회사들의 품질관리를 위하여 다양한 유산균수 측정 시험법들이 활용되고 있는데, 이 중에서 식품공전의 시험법에는 제 9. 일반시험법 3. 미생물시험법 3.9. 유산균수의 측정방법에 크게 3가지로 3.9.1 유산간균 및 구균, 3.9.2 비피더스균(*Bifidobacterium*), 3.9.3 유산균비피더스균 혼합제품으로 고시가 되어 있다. 이 중에서 가장 널리 시험되는 유산간균 및 구균 시험법은 일반세균수 측정방법에 준하여 시험하되 시험용액 제조 희석액을 멸균생리식염수 또는 펩톤식염완충액을 사용하는 것으로 되어 있고, 배지는 BCP첨가 평판측정용배지를 사용하여 35~37°C에서 72±3시간 배양한 후 발생한 황색의 집락을 유산균의 집락으로 계수하는 것으로 되어 있다.

식품공전 유산간균 및 구균 시험법에는 BCP첨가 평판측정용배지만 사용하게 되어있는데 반해 축산물의 가공기준 및 성분규격에서는 유산간균 및 구균 시험방법에 BCP 첨가 평판측정용배지 또는 MRS한천배지도 사용할 수 있게 되어 있다. 다만, 2015년 7월 2일자로 유산균수와 간,구균 시험법으로 구분한 시험법 개정고시안이 의견수렴 중으로 고시되어 있는데, 시험대상 시료의 구균과 간균 함유에 대한 정확한 정보가 없는 경우 명확한 시험법 적용에 어려움이 있을 수 있다. 현재 시험법에 대한 내용을 정리하자면

*Corresponding author: Jang-Hyuk Ahn, Water & Food Business Division, KOTITI Testing & Research Institute, Seongnam 462-807, Korea
Tel: 82-2-3451-7320, Fax: 82-2-3451-7464
E-mail: ppori5470@hotmail.com
Received June 18, 2015; Revised June 21, 2015;
Accepted June 25, 2015

Table 1. Comparison of measurement method for lactic acid bacteria

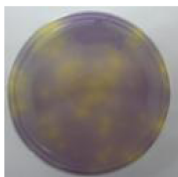





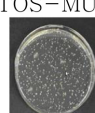
| 구분 | 유산간균 및 구균 | | 비피더스균 | | 혼합제품 | | |
|------------|---|--|--|--|---|---------------------|--|
| 배지 | BCP한천배지(식품,축산물) MRS배지(축산물) | | BL한천배지(식품,축산물) TOS-MUP(축산물) | | BCP 한천배지(식품,축산물)+ BS 한천배지(식품, 축산물), TOS-MUP(축산물) | | |
| 접종 | 시험용액 1 mL와 각 단계 희석액 1mL씩 2배 이상 접종 | | 미리 균화 BL 배지에 희석액 100 uL (식품) / 50 uL (축산물) 분주 후 도말 (2배이상 접종) | | 유산간균 및 구균, 비피더스균 접종법을 따름 | | |
| 배양 | BCP: 35~37°C 호기배양 MRS : 30°C, 72±3시간 호기 또는 혐기 배양 BCP 한천배지 / MRS배지 | | 35~37°C, 72±3시간 혐기 배양 BL한천배지 / TOS-MUP | | 35~37°C, 72±3시간 호기배양(유산간균 및 구균) 혐기배양(비피더스균) BCP / BS / TOS-MUP | | |
| 판정 | <div>BCP</div> <div>MRS</div> | | <div>BL</div> <div>TOS-MUP</div> | | <div>BCP</div> <div>BS</div> | | |
| | <div></div> <div></div> | | <div></div> <div></div> | | <div></div> <div></div> | | |
| | <div>TOS-MUP</div> <div></div> | | | | | | |
| 황색의 집락을 계수 | | | longum: 유갈색~황갈색 bifidum : 유갈색~회색 breve: 유백색~유갈색 | | | 유산간균 및 구균, 비피더스균의 합 | |

Table 1과 같이 요약할 수 있다.

상기 축산물 규격에서는 발효유류를 ‘원유 또는 유가공품을 유산균, 효모로 발효시킨 것’으로 명시하며 이에 ‘다른 식품 또는 식품첨가물 등을 위생적으로 첨가한 것’이라 정의하고 있는데, 발효유류에는 발효유, 농후발효유, 크림 발효유, 농후크림발효유, 발효버터유, 발효유분말이 고시되어 있다. 이 중에서 식품 시장에서 가장 많이 접할 수 있는 제품 유형은 발효유와 농후발효유라고 할 수 있다. 발효유는 무지방고형분이 3% 이상이며 유산균수 또는 효모수가 1 mL당 10,000,000 이상인 것을 말하며, 농후발효유는 무지방고형분이 8% 이상이며 유산균수 또는 효모수가 1 mL당 100,000,000 이상의 것을 말한다.

본 연구에서는 국내 유통 발효유 제품 중 유산균의 함량이 높을 것으로 사료되는 유산균 발효유 제품의 유산균수를 측정함에 있어서 축산물 가공기준 및 성분규격의 기준에서 고시한 방법의 배지를 사용함에 있어서 차이가 나는지를 실험하여 시험법의 적용 오류로 인해 발생할 수 있는 유산균수 측정시의 시험 오류를 확인하여 널리 알리고자 수행하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용된 발효유 제품은 국내의 시장에서 유통 중인 발효유 제품(A제품, B제품으로 명기)을 구입하여 사용하였다. 유산간균 및 구균수 측정을 위한 BCP첨가 평판 측정용 배지인 BCP plate count agar (Eiken Chemical Co.,

Japan)와 PCA with BCP (MB cell, Korea) 2개사 제품과 MRS한천배지(Oxoid, UK)를 사용하였다.

시료 희석에 사용된 멸균생리식염수는 sodium chloride (Samchun, Korea) 8.5 g에 증류수를 가하여 1000 mL 되게 하여 용해한 후 121°C에서 15분간 멸균하여 사용하였다. 유산간균 및 구균수 측정을 위한 BCP plate count agar는 24.6 g을 증류수 1000 mL에 용해한 후 121°C에서 15분간 멸균하여 사용하였고 PCA with BCP는 24.65 g을 1000 mL에 용해한 후 121°C에서 15분간 멸균하여 사용하였다. MRS 한천배지(Oxoid, UK)는 증류수 1000 mL에 62g을 용해한 후 121°C에서 15분간 멸균하여 사용하였다. 혐기성 배양은 Anaerobic jar 3.5 L (Oxoid, UK)에 AnaeroGen 3.5 L (Oxoid, UK)를 넣어 배양하였다.

실험방법

축산물의 가공기준 및 성분규격(2013) 제 3. III. 9. 사) 유산균수의 시험법에 따라 A, B제품 25 mL에 멸균생리식염수를 가하여 250 mL가 되게 하여 10⁻¹의 검액을 만들고, Serial dilution하여 10⁻²~10⁻⁹의 검액을 조제하였다. 10⁻³~10⁻⁹ 단계 희석액 1 mL씩을 6배의 멸균 펠트리디쉬에 무균적으로 취하고 약 45°C로 유지한 2개사 제품 BCP첨가 평판 측정용배지와 MRS배지를 각각 2매씩 15 mL를 무균적으로 분주하였다. 확산 집락의 발생을 억제하기 위해 각각의 배지로 다시 5 mL씩 중첩시켰다. BCP 첨가 평판 측정용배지를 분주하여 응고시킨 디쉬는 35°C에서 72시간 호기배양을 하였고 MRS한천배지를 분주한 디쉬는 30°C에서 72시간 혐기배양하였다. 형성된 황색의 집락을 colony counter (Kastech,

Table 2. Comparison of Viable cell count media of lactic acid bacteria in fermented milk

| Sample | Trial | Media | | |
|--------|-------|---|-------------------------------------|---|
| | | BCP Plate count agar ($\times 10^7$ CFU/mL) | MRS agar ($\times 10^6$ CFU/mL) | PCA with BCP ($\times 10^5$ CFU/mL) |
| A | 1 | 116 | 186 | 4 |
| | 2 | 119 | 187 | 3 |
| B | 1 | 176 | 232 | 22 |
| | 2 | 180 | 230 | 20 |

Korea)로 계수하고, 희석배수를 곱하여 시료 mL당 생균수를 산출하였다.

결과 및 고찰

생균수 측정

국내 유통중인 발효유 A제품과 B제품의 유산균수를 2개 회사의 BCP첨가 평판측정용배지와 MRS한천배지로 생균수 측정 결과 Table 2에 나타내었다. A제품의 유산균수 실험결과 BCP plate count agar > MRS agar > PCA with BCP 순이었고, B 제품의 유산균수 실험결과도 이와 동일하게 BCP plate count agar > MRS agar > PCA with BCP 순서로 측정되었다. MRS한천배지는 락토바실러스속(*Lactobacillus*) 균의 분리 및 배양에서 선택성이 높은 배지로 알려져 있는데(DeMan, 1960), 각 회사마다 유산균 제품에 사용하는 접종 균주가 다르므로 MRS한천배지로 발효유제품의 구균수 측정에는 한계가 있는 것으로 사료된다. MRS 한천배지는 pH 조정에 따라 선택성의 변화가 가능한데, *Lactobacillus acidophilus*와 *Lactobacillus bulgaricus*의 경우, 최적 pH는 4.2로 보통 pH 5~6의 범위에서는 pH의 영향을 거의 받지 않으며 pH 5.0 이하에서는 사멸률이 높아지는 것으로 알려져 있다(강성태 등, 2002).

축산물의 가공기준 및 성분규격(2013) 제 3. VIII. 2. 포) 배지조성 성분과 PCA with BCP배지의 성분 및 조성에 대한 차이가 거의 없음에도 불구하고 PCA with BCP배지를 사용한 경우 유산균수 표시량에 미달하는 결과를 확인할 수 있었다. 이는 배형석(2000)의 발표 자료에서도 논의했던 내용으로, 유통중인 발효유제품을 수거하여 유산균수 측정 결과 식품공전에 제시된 방법에 따라 제조한 BCP배지를 사용하였으나 BCP plate count agar를 사용한 결과에서만 법적 기준에 적합하였다고 하였다. BCP첨가 평판측정용배지 성분에 있는 Peptone을 유산균은 대부분 잘 이용할 수 있으나, 유산구균은 Phytone Peptone만을 이용하므로 다른 Peptone을 첨가한 BCP첨가 평판측정용 배지에서는 유산구균이 주종인 발효유의 유산균 수가 미달되었던 것으로 보

고하였는데, 본 연구에서 최근에 유산구균을 강화한 발효유 제품종의 유산균수를 측정한 실험결과에서도 이와 같은 배지 선택시의 문제를 확인할 수 있었다.

요 약

본 연구에서는 전통적으로 유산균제품에 많이 활용되어 온 유산간균을 이용한 발효유 제품이 아닌 유산구균까지도 활용한 국내 회사의 발효유 제품들을 축산물의 가공기준 및 성분규격(2013) 제 3. III. 9. 사) 유산균수의 시험법에서 제시한 배지로 시험한 결과 유산균수 측정결과에 오류가 있을 수 있음을 확인하였다. 유산구균은 Phytone peptone을 이용하여 집락을 형성하므로 유산간균 뿐만 아니라, 유산구균의 수까지 함께 측정하고자 한다면 Phytone peptone이 함유된 BCP첨가 평판측정용 배지를 사용하는 것이 가장 적절한 시험결과를 도출할 것으로 판단된다.

본 연구결과에서 확인하였듯이, 유산간균 또는 구균의 함유여부에 대한 정보가 없을 경우에 MRS배지만을 사용했을 경우와 유산구균까지도 잘 생장이 되는 Phytone peptone 함유 BCP 첨가 평판측정용 배지를 사용했을 경우의 유산균수 측정결과 차이가 최대 7.8배까지 차이가 난다는 것을 구체적인 수치로 확인하였으므로, 유산구균까지도 측정 가능한 적절한 배지를 선택하여 실험을 수행하여야 할 것이다.

참고문헌

1. 축산물의 가공기준 및 성분규격 (2013) 제3. III. 9. 사) 유산균수, 224~225.
2. 식품공전 (2015) 제9 일반시험법 3. 미생물시험법 3.9 유산균수.
3. 배형석 (2000) 유산균 생균수 측정의 기술적 논쟁과 그 원인.
4. DeMan, J.C., M. Rogosa, and M.E. Sharpe. 1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.* 23:130-135.
5. 강성태, 윤재영 (2002) 식품미생물학 9.2.4 pH (2)미생물에 대한 영향, 288~289.