pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 36, No. 2, pp. 188~195 (2021)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2021.36.2.188

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

유통 발효유 제품에 사용된 유산균 동정 및 생균수 측정

강태선*
상지대학교 보건의료과학대학 식품영양학과

Viable Cell Counts and Identification of Species Used for Commercial Fermented Milk Products

Tae Sun Kang*
Department of Food and Nutrition, College of Health Science, Sangji University, Wonju, Korea

(Received February 26, 2021/Revised March 29, 2021/Accepted April 20, 2021)

ABSTRACT - In this study, viable cell counts and species used for fermented milk products (n=20) sold on the South Korean market were analyzed and compared with their label claims. In the case of viable cell counts, all products showed 2.7×10^{7}-5.6×10^{10} CFU/mL, which satisfied the standard requirements (over 1.0×10^{7}-1.0×10^{8} CFU/mL) suggested by the Food Code of South Korea. Sequences of 16S ribosomal RNA gene amplified from pure cultures for each product were analyzed and compared with the NCBI GenBank database. Identified species were *Lactobacillus paracasei, L. acidophilus, L. plantarum, L. rhamnosus, L. helveticus, L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactococcus lactis*, and *Streptococcus thermophilus,* all of which have been approved as probiotic microorganisms in South Korea. The frequency in use of these lactic acid bacteria was as follows: *L. paracasei* (n=7), *L. acidophilus* (n=5), *L. helveticus* (n=5), *S. thermophilus* (n=3), *L. rhamnosus* (n=2), *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (n=2), *L. plantarum* (n=1), and *Lc. lactis* (n=1). Therefore, labeling information declaring probiotic species used should contribute to the improvement of consumer rights and trust.

Key words: Probiotics, Lactic Acid Bacteria, 16S Ribosomal RAN, Yogurt

최근 코로나 바이러스로 인하여 건강에 대한 국민들의 관심이 커지고 있다. 건강기능식품 시장의 경우 2019년 4.5조 규모로 2017년 대비 9.6% 성장하였으며, 과거 건강을 위한 중장년층 대상 홍삼, 비타민 제품군에서 다이어트, 눈 건강, 갱년기 여성 건강 등 전(全) 연령대를 대상으로 하는 맞춤형 제품군들로 다변화하고 있다. 2020년 식품의약품통계연보에 따르면 매출액 기준으로 프로바이오틱스(probiotics) 제품의 경우 2017년 2,173억(4순위)에서 2019년 4,593억(3순위)로 증가하여 비타민 및 무기질 제품의 매출액(2,701억, 4위)을 초과하였다[1]. 세계보건기구(WHO)에서는 프로바이오틱스를 “일정량을 섭취하였을 때 건강에 도움을 줄 수 있는 살아있는 미생물”로 정의하고 있다[2]. 대한민국 『건강기능식품의 기준 및 규격(고시 제 2019-149호)』에서는 프로바이오틱스 제품에 사용될 수 있는 미생물을 19종 (*Lactobacillus acidophilus, L. casei, L. gasseri, L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus, L. helveticus, L. fermentum, L. paracasei, L. plantarum, L. reuteri, L. rhamnosus, L. salivarius, Lactococcus lactis, Enterococcus faecium, E. faecalis Streptococcus thermophilus, Bifidobacterium bifidum, B. breve, B. longum, B. animalis* ssp. *lactis*)으로 제한하고 있으며, 기능성을 인정받기 위해서는 이러한 19종의 살아있는 미생물 또는 이를 혼합한 균이 100,000,000 CFU/g 이상 함유되어야 한다[3].

프로바이오틱스 제품의 판매가 증가함에 따라 과대광고 또는 제품 부적합 판정 빈도가 증가하고 있는 실정이다. 최근 한국소비자원의 조사에 따르면 “시중에 판매 중인 프로바이오틱스 제품 15종을 대상으로 품질, 안전성, 표시 적합성 등을 조사한 결과 대부분 제품에 포함된 균종이 3-19종이라고 광고했지만 실제 성분의 90% 이상은 대표

*Correspondence to: Tae Sun Kang, Department of Food and Nutrition, College of Health Science, Sangji University, Wonju 26339, Korea
Tel: +82-33-738-7642, Fax: +82-33-738-7652
E-mail: missa1976@sangji.ac.kr

Copyright © The Korean Society of Food Hygiene and Safety. All rights reserved. The Journal of Food Hygiene and Safety is an Open-Access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License(http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution,and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Table 1. Standard requirements for fermented-milk products[6)]

Items	Type of product					
	Fermented milk (FM)	Thick-fermented milk (TFM)	Fermented cream (FC)	Thick-fermented-cream (TFC)	Fermented-butter milk (FBM)	Fermented-milk power (FMP)
Water contents (%)	-	-	-	-	-	Below 5.0
Milk solids (%)	-	-	-	-	-	Over 85
Non-fat milk solids (%)	Over 3.0	Over 8.0	Over 3.0	Over 8.0	Over 8.0	-
Fat (%)	-	-	Over 8.0	Over 8.0	Below 1.5	-
Lactic acid bacteria	Over 10^7 CFU/mL	Over 10^8 CFU/mL[a]	Over 10^7 CFU/mL	Over 10^8 CFU/mL[a]	Over 10^7 CFU/mL	-

[a]In case of frozen products, over 10^7 CFU/mL.

균 1-2종에 치우쳐 있다.”고 밝혔다[4)]. 식품의약품안전처에 따르면 “최근 3년간 통관 및 유통 단계에서 부적합 판정을 받은 수입 프로바이오틱스 제품의 비율이 각각 0.54%와 1.25%에 달해 수입자의 안전관리 책임을 강화하고자 국내에서 유통 중인 수입 프로바이오틱스 제품 중 최근 3년간 3회 이상 부적합 판정을 받은 제품에 대해 검사명령제를 시행한다.”고 밝혔다[5)].

이러한 프로바이오틱스 열풍이 불면서 가정에서 쉽게 접할 수 있는 발효유 시장도 함께 성장하고 있는 추세이다. 대한민국『식품의 기준 및 규격(제2021-26호)』에서는 발효유류를 “원유 또는 유가공품을 유산균 또는 효모로 발효시킨 것이거나, 이에 식품 또는 식품첨가물을 가한 것”으로 정의하고 있으며, 식품 유형에 따른 규격을 별도로 지정하고 있다(Table 1)[6)]. 제품에 사용된 유산균 수의 경우 식품 유형별 규격을 제시하고 있으나 사용된 개별 균종에 대한 기준은 없는 실정이다. 따라서 소비자들이 기능성이 함유된 발효유 제품을 선택하기 위해서는 발효유 제조에 사용된 균주의 종류 및 생균수 정보를 정확히 제시해 줄 필요가 있다.

전통적으로 유산균은 표현형(그람염색 등) 및 탄수화물의 발효 패턴(miniaturized biochemical test kits (API strips) 등)에 따라 분류하였으나, 이러한 방법만으로는 프로바이오틱 제품에 널리 사용되는 젖산균(*Lactobacillus*) 및 비피더스균(*Bifidobacterum*)의 정확한 동정이 어렵다고 보고되었다[7)]. 최근 DNA 분석에 기반한 다양한 방법들(fluorescent amplified fragment length polymorphism, repetitive DNA element-PCR fingerprinting 등)이 프로바이오틱 미생물 분류에 널리 활용되고 있다[7-10)]. 이중 16S ribosomal RNA (16S rRNA) 등의 표준화된 유전자의 염기서열(약 550 bp)을 분석 및 비교하여 프로바이오틱스 미생물의 종을 확인하는 방법이 활발히 사용되고 있다. 표준(ATCC) 유산균 균주를 대상으로 한 선행 연구에 따르면 16S rRNA 유전자 염기서열 정보를 이용한 종판별은 재현성이 뛰어난 효과적인 방법으로 보고되었다[9,10)]. 발효유 제품으로부터 순수분리된 유산균을 대상으로 DNA를 추출한 후 16S rRNA 유전자를 선택적으로 증폭하여 염기서열을 분석하였으며, 분석된 염기서열을 미국국립보건원(NCBI) GenBank 데이터베이스에 등록되어있는 생물종의 염기서열과 비교함으로써 발효유 제품의 모니터링을 실시하였다.

따라서 본 연구에서는 국내 유통 중인 발효유 제품의 유산균 생균수 및 사용 균주를 동정하고 제품의 표시사항과 비교함으로써 발효유 제품의 정확한 정보를 제공하고자 하였다.

Materials and Methods

발효유 제품

본 연구에서는 국내에서 유통 중인 20개 발효유 제품을 분석대상으로 사용하였다. 식품 유형별로는 발효유 제품이 8개, 농후발효유 제품이 11개, 크림발효유 제품이 1개였으며, 이들 제품에 관련된 정보는 Table 2에 요약하였다. 발효유 제품 구매 후 모든 시료는 4°C에서 보관하였으며, 제품에 표시된 유통기간 내에 생균수 측정 및 DNA 추출을 완료하였다.

유산균 배양 및 생균수 측정

발효유 제품의 유산균 생균수는 식품공전 시험법 중『유산균수』방법을 사용하여 측정하였다[11)]. 검사시료 25 g 또는 mL에 멸균생리식염수 225 mL를 가하고 균질화하여 10^{-1} 시험용액을 제작하였다. 멸균생리식염수 9 mL에 10^{-1} 시험용액 1 mL를 가하여 10^{-2} 시험용액을 제작하였으며, 동일한 조작으로 10^{-8} 시험용액까지 제작하였다. 각 희석배수의 시험용액 0.1 mL를 MRS 평판배지에 접종하여 멸균초자봉으로 도말하였다. 시료가 접종된 MRS 평판배지는 37°C에서 48-72시간 혐기배양 후 생성된 집락수를 측정하고 희석배수를 곱하여 검사시료 g 또는 mL 당 생균수를 산출하였으며, 발효유 제품의 최종 생균수는 3회 측정치의 평균을 사용하였다. 생균수 측정을 위한 평판배지 배양 후 형성된 집락의 모양, 색 등의 형태에 따라 평판

Table 2. Results of viable cell counts and species identification for lactic acid bacteria isolated from fermented-milk products

No.	Type of product	Labeling claims	Viable cells		Identified species		
			CFU/mL	Compliance[a]	Accession No.	Identity(%)	Species[b]
S1	TFM (liquid)[c]	LAB, Probiotics (more than 100 million/mL)	1.1×10^{9}	C	MT515983.1	99.62	***Lactobacillus paracasei*** *Lactobacillus casei*
					MT645504.1	99.42	***Lactobacillus acidophilus***
S2	TFM (liquid)	Multi-LAB (more than 100 million/mL) Patented LAB (Lp299v, more than 10 million/mL)	1.5×10^{8}	C	MT613640.1	100	***Lactobacillus plantarum***
S3	FM (liquid)	Multi-LAB (more than 100 billion/130 mL) Bifidobacterium (BB12, 0.0008%)	5.9×10^{9}	C	MT613491.1	100	***Lactobacillus acidophilus***
S4	TFM (liquid)	Bifidus regularis (more than 1.6 billion/210 mL)	2.3×10^{9}	C	MT579932.1	99	***Lactococcus lactis***
S5	TFM (liquid)	LAB	3.3×10^{9}	C	MK100834.1	99.39	***Streptococcus thermophilus***
S6	TFM (liquid)	LAB (more than 100 million/mL)	9.9×10^{9}	C	MK329243.1	99.81	***Lactobacillus rhamnosus***
S7	FM (liquid)[b]	LAB (more than 50 billion/280 mL) *L. casei* HY2782 (more than 60 million/280 mL)	1.7×10^{8}	C	MT613613.1	100 99.80	***Lactobacillus paracasei*** *Lactobacillus casei*
					CP002081.1	100 99.80	***Lactobacillus helveticus*** *Lactobacillus acidophilus*
S8	FM (liquid)	Bifidobacterium (more than 30 million/mL)	1.2×10^{9}	C	HM057944.1	100	***Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus***
S9	TFM (solid)	LAB (more than 100 billion/200 g)	1.9×10^{10}	C	CP049052.1	100	***Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus***
S10	TFM (solid)	LAB (more than 100 million/g)	4.5×10^{10}	C	MT083998.1	100	***Lactobacillus acidophilus***
S11	TFM (solid)	LAB (more than 10 billion/80 g) *L. casei* 431 (0.00014%)	1.6×10^{10}	C	MT626061.1	100	***Lactobacillus paracasei***
S12	FC (solid)	LAB (more than 10 million/g)	4.7×10^{9}	C	MT613635.1	98.15	***Streptococcus thermophilus***
S13	TFM (solid)[c]	LAB (*S.thermophilus, L. acidophilus, Bifidobacterium,* L-GG, more than 500 million/g)	1.7×10^{10}	C	MT611888.1 MT645504.1	100	***Lactobacillus rhamnosus*** ***Lactobacillus acidophilus***
S14	TFM (liquid)	LAB 0.017% (*L. bularicus*, *S. thermophilus, L. rhamnosus, L. acidophilus* LA-5, *L. acidophilus* NCFM, *L. helveticus* LAFTI L10, *L. casei* 431, *B. lactis* BB-12, *B. lactis* Bi-07)	3.3×10^{9}	C	MT613622.1 MT457679.1 MW063498.1	100	***Lactobacillus paracasei*** *Lactobacillus casei* *Lactobacillus acidophilus*
S15	FM (liquid)	LAB (*L. casei*, L-GG, more than 100 million/mL)	1.9×10^{8}	C	M626061.1	100	***Lactobacillus paracasei***
S16	FM (liquid)	LAB (more than 800 million/80 mL)	3.9×10^{7}	C	CP002081.1 LC071810.1	100	***Lactobacillus helveticus*** *Lactobacillus gallinarum*
S17	FM (liquid)[c]	LAB (*L. casei*, more than 10 million/mL)	5.6×10^{7}	C	MT626061.1	100	***Lactobacillus paracasei***
					CP002081.1 MN159069.1	100 99.80	***Lactobacillus helveticus*** *Lactobacillus acidophilus*
S18	FM (liquid)	LAB (more than 10 million/mL)	2.7×10^{7}	C	CP002081.1 LC071810.1	100 99.80	***Lactobacillus helveticus*** *Lactobacillus gallinarum*

Table 2. (Continued) Results of viable cell counts and species identification for lactic acid bacteria isolated from fermented-milk products

No.	Type of product	Labeling claims	Viable cells		Identified species		
			CFU/mL	Compliance[a]	Accession No.	Identity(%)	Species
S19	TFM (liquid)[c]	Multi-LAB (*S. thermophilus, L. acidophilus, B. lactis*, more than 1.6 billion/mL), LAB (*L. bulgaricus*, more than 100 million/150 mL), Fruit LAB (*L. plantarum*, more than 1 million/150 mL)	5.6×10^{10}	C	MT613636.1 MT645504.1	100	***Streptococcus thermophilus*** ***Lactobacillus acidophilus***
S20	FM (liquid)[c]	LAB (*L. casei*, more than 10 million/mL)	2.0×10^{9}	C	MT613622.1 MT473682.1 MW063498.1 MN368268.1 MN159069.1 LC071810.1	100 100 99.80 99.80	***Lactobacillus paracasei*** *Lactobacillus casei* *Lactobacillus acidophilus* ***Lactobacillus helveticus*** *Lactobacillus acidophilus* *Lactobacillus gallinarum*

[a]Viable cell counts were compared with the standard requirements suggested in Table 1. C and NC represent compliance and non-compliance, respectively.
[b]Bold means finally identified species.
[c]FM: fermented milk, TFM: thick-fermented milk, FC: fermented cream, LAB: lactic acid bacteria.

배지 당 2-5개의 집락을 선정하여 순수분리하였다. 순수분리된 집락 중 그람염색 양성, 카탈라아제(catalase) 음성으로 확인된 집락을 유산균으로 판정하고 이후 최종 균주의 판정을 위한 유전자 분석에 사용하였다.

DNA 추출 및 16S rRNA 유전자의 증폭

순수분리된 집락을 MRS 액체배지에 접종하여 37°C에서 48시간 혐기배양 후 DNA 추출에 사용하였다. DNA의 추출은 AccuPower Genomic DNA Extraction Kit (Bioneer, Daejeon, Korea)를 이용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 수행하였다. 추출된 DNA의 농도 및 순도는 Epoch (BioTek, Winooski, VT, USA)를 사용하여 확인하였다. 순수분리된 유산균의 종판별을 위하여 16S rRNA 유전자를 목적 유전자로 선정하였으며, Khan 등[12]이 제시한 프라이머 및 증폭 조건에 따라 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 장비를 이용하여 PCR을 수행하였다. 반응액 조성은 AccuPower PCR PreMix (Bioneer, Daejeon, Korea)를 이용하여 10 μM의 정방향(5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′) 및 역방향(5′-ACGCTTGCACCCTCCGTATT-3′) 프라이머를 각각 1 μL, 10 ng/μL 농도의 주형 DNA 1 μL를 첨가하였으며, 총 반응액이 부피가 20 μL가 되도록 멸균증류수를 첨가하였다. PCR 증폭 조건은 초기변성(94°C, 5분) 후 변성(94°C, 30초), 결합(52°C, 30초), 신장(72°C, 1분) 과정을 30회 반복하였으며, 최종신장 (72°C, 5분) 후 반응을 종료하였다. PCR 후 증폭산물은 Accuprep PCR Purification Kit (Bioneer, Daejeon, Korea)를 이용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 정제하였다. 정제 후 염기서열의 분석은 16S rRNA 유전자 증폭에 사용한 정방향 및 역방향 프라이머를 이용하여 ㈜바이오니아(Daejeon, Korea)에 의뢰하여 수행하였다.

유전정보를 이용한 유산균 종판별 및 계통발생분석

분석된 16S rRNA 유전자 염기서열(약 550 bp)은 BioEdit version 7.0.5[13] 프로그램을 이용하여 질적 점수(quality score)를 확인하였으며 질적 점수 기준 20을 적용하여 증폭된 염기서열의 양 말단을 포함하는 불확실 염기서열들을 편집하였다[14]. 편집된 16S rRNA 유전자 염기서열 정보는 미국국립보건원에서 제공하는 검색 기능 BLAST 검색[15]을 이용하여 분석하였으며, 99% 이상의 염기서열 유사도(identity)를 보이는 종을 순수분리된 집락의 유산균 종으로 판별하였다. 최종 판별된 종의 추가 검증을 위하여 molecular evolutionary genetics analysis (MEGAX) 프로그램을 이용하여 계통발생분석(phylogenetic analysis)을 수행하였다. 편집된 16S rRNA 유전자 염기서열들을 ClustalW 방법을 이용하여 정렬한 후 각 염기서열의 양 말단을 동일하게 편집하여 507 bp의 단편들을 생성한 후 계통발생도(phylogenetic tree) 분석에 사용하였다. 계통발생도는 kimura 2-parameter 모델 및 1,000 bootstrap 반복을 설정한 maximum likelihood 방법을 이용하여 구성하였다. 외집단(outgroup)으로는 고초균(*Bacillus subtilis*; Accession No. MT645308.1)의 16S rRNA 유전자 염기서열을 사용하였다.

Results and Discussion

발효유 제품의 유산균 생균수 측정

본 연구에서 사용된 발효유 제품의 유형은 발효유(n=8), 농후발효유(n=11), 크림발효유(n=1) 제품으로, 『식품의 기준 및 규격(제2021-26호)』에서는 발효유 및 크림발효유의 경우 10^7 CFU/mL 이상, 농후발효유의 경우 10^8 CFU/mL 이상의 규격을 제시하고 있다(Table 1)[6]. Table 2에서 확인할 수 있듯이 크림발효유 제품의 경우 4.7×10^9 CFU/mL로 제품 유형 규격보다 100배 높은 생균수가 측정되었다. 발효유 제품은 2.7×10^7 CFU/mL-5.9×10^9 CFU/mL의 생균수를 보여 제품 유형 규격을 만족시켰으며, 평균 1.2×10^9 CFU/mL로 규격보다 100배 많은 생균수가 측정되었다. 농후발효유 제품의 경우 1.5×10^8 CFU/mL-5.6×10^{10} CFU/mL의 생균수를 보여 모든 제품이 생균수 규격을 만족시켰으며, 평균 1.6×10^{10} CFU/mL로 발효유 제품보다 10배 많은 생균수가 측정되었다. 농후발효유 제품을 액상형(1.1×10^{10} CFU/mL)과 호상형(2.4×10^{10} CFU/mL)으로 구별하여 생균수를 비교하였을 경우 호상형 농후발효유 제품에서 두배 많은 유산균 생균수가 측정되었다. S5 및 S14 제품의 경우 표시사항에 생균수 정보를 제시하지 않아 표시사항과의 직접 비교는 수행할 수 없었으나, 분석에 사용된 발효유 제품은 식품유형별 규격 또는 제품의 표시사항에 제시되어있는 생균수 기준을 만족시켰다. 생균수 측정 후 형성된 집락은 모양, 색 등의 형태에 따라 순수분리하였으며 이후 유산균의 동정 실험에 사용하였다.

순수분리된 유산균의 동정

발효유 제품에서 순수분리된 유산균 균주의 동정을 위해 16S rRNA 유전자를 선택적으로 증폭하여 염기서열을 분석하였다. 편집된 염기서열 정보는 GenBank 데이터베이스에 등록되어있는 염기서열들과 비교하여, 염기서열 유사도(identity, %), 비교범위(coverage, %), 및 매칭점수(match score)를 기준으로 종을 판별하였다. 순수분리 후 14개 제품에서는 1종류의 미생물 집락이, 6개 제품(S1, S7, S13, S17, S19, S20)에서는 2종류의 미생물 집락이 관찰되어 염기서열 분석에 사용되었다. 16S rRNA 유전자 염기서열 정보를 이용한 유산균 종판별 결과는 Table 2에 정리하였으며, 20개 제품에 사용된 유산균 균주는 *Lactobacillus* 6종 (*L. paracasei, L. acidophilus, L. plantarum, L. rhamnosus, L. helveticus, L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*), *Lactococcus* 1

종 (*Lc. lactis*), *Streptococcus* 1종 (*S. thermophilus*)으로 모두 『건강기능식품의 기준 및 규격(고시 제2019-149호)』에서 제시한 프로바이오틱스 제품에 사용될 수 있는 미생물에 포함되었다. 각각의 제품에서 동정된 유산균의 빈도로는 *L. paracasei* (S1, S7, S11, S14, S15, S17, S20) 균주가 가장 많은 7개 제품에서 동정되었으며, *L. acidophilus* (S1, S3, S10, S13, S19)와 *L. helveticus* (S7, S16, S17, S18, S20) 균주는 각각 5개 제품에서 확인되었다. 3개 제품(S5, S12, S19)에서는 *S. thermophilus* 균주가 확인되었으며 *L. rhamnosus* (S6, S13)와 *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (S8, S9) 균주는 각각 2개 제품에서 동정되었다. *Lactobacillus plantarum* (S2)과 *Lc. lactis* (S4) 균주는 각각 1개 제품에서 확인되었다(Table 2).

분석에 사용된 14(70%)개 제품의 표시사항에는 특정 균주명이 아닌 유산균(주), 프로바이오틱스 유산균, 복합유산균, 특허유산균, 과일유산균, 비피더스균 등의 일반명만을 표시하였다. 이중 S7 제품(표시사항: 유산균, 500억마리 이상; *L. casei* HY2782, 6,000만마리 이상)과 S11 제품(표시사항: 유산균, 100억마리 이상; *L. casei* 431, 0.00014%)의 경우 일반명과 특정 유산균 학명을 명시하였으나 *L. casei* 균주의 경우 표시사항에 제시된 유산균의 생균수 보다 800~7,000배 적은 양이 사용되었다. 각각 제품에서 순수분리된 유산균 균주의 BLAST 검색 결과 S7 제품에서는 *L. paracasei*와 *L. acidophilus*가 동정되었으며, S11 제품에서는 *L. paracasei*가 동정되었다. 6개 제품(S13, S14, S15, S17, S19, S20)의 경우 표시사항에 유산균 균주의 학명을 표시하였다. *Lactobacillus casei* 균주를 사용하였다고 표시사항에 명시한 3개 제품(S15, S17, S20)의 경우 BLAST 검색 결과 S15 제품에서는 *L. paracasei*가 S17 및 S20 제품에서는 *L. paracasei*와 *L. helveticus*가 각각 동정되었다. 1개 이상의 유산균 학명을 명시한 3개 제품(S13, S14, S19)에서 순수분리된 유산균 균주의 BLAST 검색 결과 S13 (표시사항: *S. thermophilus, L. acidophilus*) 제품에서는 *L. rhamnosus*와 *L. acidophilus*가, S14 (표시사항: *L. bulgaricus, S. thermophilus, L. rhamnosus, L. acidophilus* LA-5, *L. acidophilus* NCFM, *L. helveticus* LAFTI L10, *L. casei* 431, *B. lactis* BB-12, *B. lactis* Bi-07) 제품에서는 *L. paracasei*가, S19 (표시사항: *S. thermophilus, L. acidophilus, B. lactis, L. bulgaricus, L. plantarum*) 제품에서는 *S. thermophilus*와 *L. acidophilus*가 각각 동정되었다(Table 2).

본 연구에서는 국내 유통 중인 발효유 제품의 유산균 생균수를 측정하고 사용된 유산균을 동정하여 제품의 표시사항과 비교하였다. 생균수의 경우 모든 제품이 표시사항 또는 『식품의 기준 및 규격(제2021-26호)』에서 제시된 규격을 준수하였다. 그러나 발효유류의 규격에 유산균수에 대한 규격은 정의하고 있으나 프로바이오틱스 제품에 널리 사용되고 있는 비피더스균(*Bifidobacterium*)의 생균수에 관한 규격은 정의하고 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 식품공전 시험법 중 『유산균수』의 측정 방법을 사용하여 생균수를 측정하였다. 이러한 실험결과는 유산균과 비피더스균을 구분하여 산정하지 않기 때문에 비피더스균의 생균수가 정확히 반영되지 못할 수 있는 한계를 지니고 있다.

16S rRNA 유전자 염기서열 정보를 이용하여 발효유 제품에서 순수분리된 유산균의 종동정 결과 *Lactobacillus*, *Lactococcus*, 및 *Streptococcus* 속 8종의 프로바이오틱스 미생물이 사용된 것으로 확인되었다. S13, S14, S19 제품의 경우 표시사항에 비피더스균을 사용했다고 표시하였으나, 이는 생균수 측정 후 순수분리된 미생물 집락을 대상으로 종판별 실험을 수행하여 비피더스균 속의 미생물들이 동정되지 않은 것으로 판단된다. 또한 순수분리된 하나의 미생물 집락이 BLAST 검색 기준 내에서 2종 이상의 유산균으로 동정되는 것이 확인되었다. *Lactobacillus paracasei*, *L. casei*, *L. acidophilus*는 염기서열 유사도 99.62-100% 범위에서 교차 동정되었으며, *L. helveticus*, *L acidophilus*, *L. galinarum*은 염기서열 유사도 99.80-100% 범위에서 교차 동정되었다(Table 2). 동정된 유산균의 검증 및 최종 판별을 위하여 16S rRNA 유전자 염기서열 정보를 이용하여 계통발생분석을 수행하였다(Fig. 1). 외집단으로 사용한 고초균은 분석에 사용된 유산균과는 독립된 그룹(clade)를 형성하였으며, BLAST 검색 결과 단일 종으로 분석된 S6, S13-1 (*L. rhamnosus*), S2 (*L. plantarum*), S4 (*Lc. lactis*), S12, S5, S19-1 (*S. thermophilus*), S8, S9 (*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*), S1-2, S13-2, S3, S10, S19-2 (*L. acidophilus*) 역시 각각 독립된 그룹을 형성하였다. 그러나 BLAST 검색 결과 2종 이상의 유산균으로 동정된 S20-1 (*L. paracasei*, *L. casei*, *L. aciophilus*), S14 (*L. paracasei*, *L. casei*, *L. aciophilus*), S7 (*L. paracasei*, *L. casei*), S1 (*L. paracasei*, *L. casei*)의 경우 *L. paracasei* 단일 종으로 검색된 S15, S17-1, S11과 동일한 그룹을, *L. aciophilus* 단일 종으로 검색된 S1-2, S13-2, S3, S10, S19-2와는 서로 다른 그룹을 형성하였다. 따라서 S20-1, S14, S7, S1의 경우 *L. paracasei*로 최종 판정하였다. S17-2, S18, S16, S7-2, S20-2의 경우 *L. helveticus*, *L. aciophilus*, *L. gallinarum*으로 교차 동정되었으나, *L. aciophilus*와는 다른 그룹을 형성하였다. Table 2에서 확인할 수 있듯이 BLAST 검색 결과 염기서열 유사도가 *L. helveticus* (100%)가 다른 두 종인 *L. aciophilus* (99.8%)와 *L. gallinarum* (99.8%)에 비하여 높게 측정되었다. 이러한 결과를 바탕으로 S17-2, S18, S16, S7-2, S2는 최종 *L. helveticus*로 판정하였다.

대표적 발효유 중 하나인 요거트는 *S. thermophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 등의 스타터 균주를 이용하여 제조하며, 이러한 스타터 균주들은 주로 발효에 관여한다고 알려져 왔다[2]. 최근 프로바이틱스 제품 열풍이 불

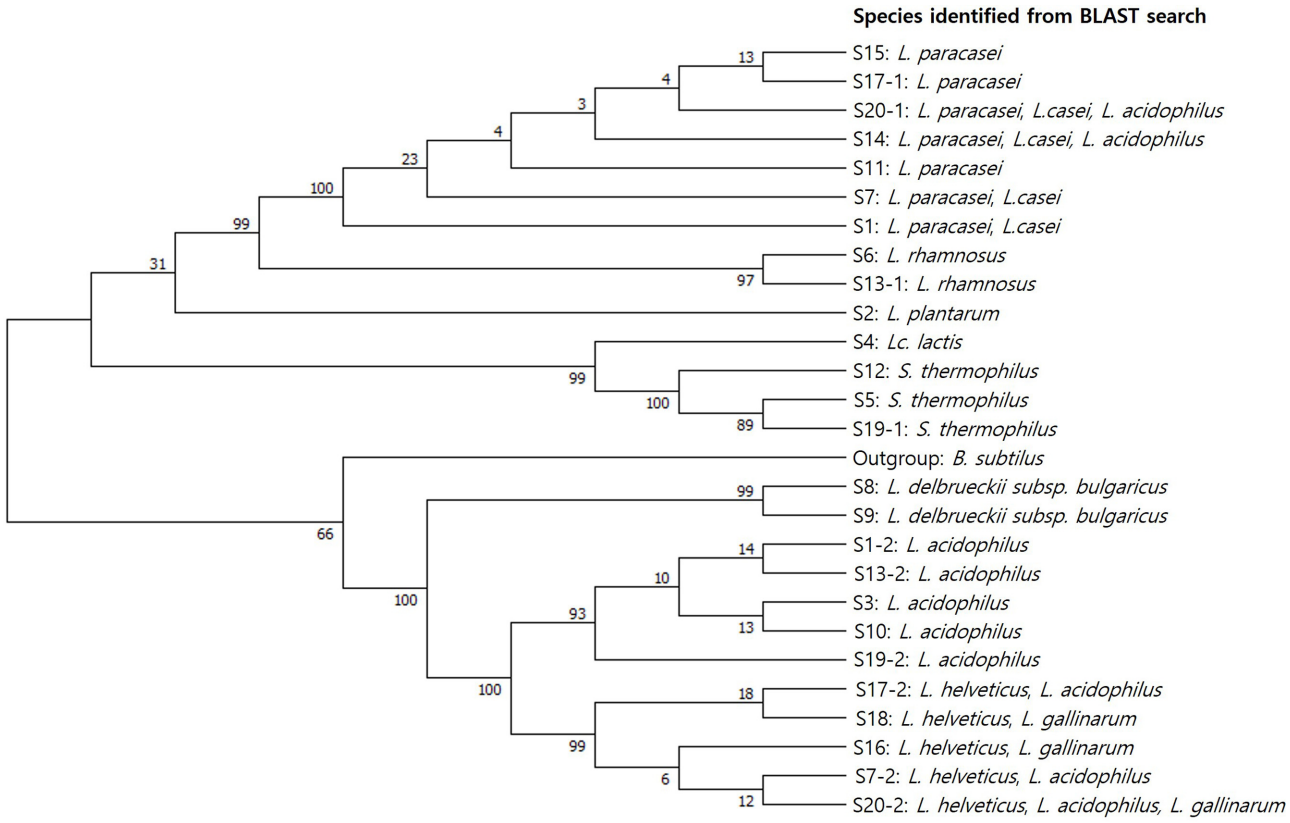

Fig. 1. Phylogenetic tree of species identified from commercial fermented-milk products.

면서 기능성 프로바이오틱스 미생물을 포함하는 다양한 종류의 발효유 제품들이 출시되고 있다. 그러나 본 연구에서 살펴본 바와 같이 대다수의 발효유 제품들은 프로바이오틱 미생물의 학명 등 정확한 정보를 제공하지 않고 유산균, 복합유산균 등의 일반명만을 표시하였다. 보다 적은 생균수를 포함하고 있음에도 불구하고, 표시사항에 제품 전체 부피 또는 무게 당 생균수 정보(S16; 8억마리/80 mL 이상)를 제시한 제품의 경우 단위 부피 또는 무게 당 생균수 정보(S15; 1억마리/mL 이상)를 제시한 제품보다 많은 생균수를 포함하고 있다고 소비자를 오해시킬 수 있다. 유전정보를 이용한 유산균 종판별 결과 최근 발표된 프로바이오틱스 제품의 실태조사 결과와 같이 분석에 사용된 발효유 제품에서는 대표균 1-2종만이 측정되었다[5]. 제품의 표시사항(*L. casei*)과 BLAST 검색 결과(*L. paracasei*)의 불일치 또한 측정되었다. Yeung 등[9]이 수행한 선행 연구에서는 16S rRNA 유전자 염기서열 정보, 탄수화물의 발효 패턴, 지방산 메틸에스터 분석을 이용하여 상용화된 프로바이오틱 제품의 유산균을 동정하였다. 분석 제품(n=58)의 44.8%에서 표시사항과의 불일치가 측정되었으며, 이러한 불일치는 두 종의 유산균(*L. aciophilus*, *L. casei*)에서 주로 측정되었다. 특히 분석에 사용된 모든 *L. casei* 균주들은 *L. paracasei*로 동정되었으며, 이러한 불일치의 한 원인으로 분자생물학적 분류 방법의 도입에 따른 유산균 분류체계의 변화를 들었다[9,16]. 이러한 불일치의 또 다른 원인으로는 프로바이오틱스 제품의 생산에 사용되는 스타터 균주 자체의 잘못된 동정을 들 수 있다. 선행 연구에 따르면 상업적으로 사용되는 스타터 균주의 28%가 속(genus) 또는 종(species) 수준에서 잘못 동정되었으며, 이러한 원인으로 적합하지 않은 균주 분류 방법(API strips 등)의 사용을 들었다[10]. 따라서 이러한 선행 연구들은 본 연구에서 수행한 방법 및 최종 유산균 종판별의 적절성을 설명할 수 있다.

이상의 결과에서 살펴보았듯이 프로바이틱스 미생물의 정확한 동정 및 분류는 프로바이오틱스 제품 생산에 중요한 과정으로, 제품 생산 전(스타터 컬처 분석)과 제품 생산 후(최종 제품 분석)에 적용되어 비의도적인 표시사항 불일치를 방지할 수 있을 것이다. 더 나아가 소비자 알권리 및 신뢰도 향상을 위하여 사용된 프로바이틱스 미생물의 보다 정확한 정보(균주명 및 생균수 등)의 제공이 필요할 것으로 판단된다.

국문요약

본 연구는 국내 유통 중인 호상형 및 액상형 요거트 등

20개 발효유 제품의 유산균 생균수 및 사용 균주를 분석하여 제품의 표시사항과 비교하였다. 분석 제품의 생균수는 2.7×10^{7}-5.6×10^{10} CFU/mL의 범위로 『식품의 기준 및 규격(제2021-26호)』의 기준치(1.0×10^{7}-1.0×10^{8} CFU/mL 이상)를 만족하였다. 순수분리된 유산균의 16S ribosomal RNA 유전자 염기서열 정보를 미국국립보건원(NCBI) GenBank 데이터베이스에 등록되어있는 생물종의 염기서열과 비교함으로써 제품에 사용된 유산균의 종을 동정하였다. 동정된 균주는 *Lactobacillus* 6종(*L. paracasei, L. acidophilus, L. plantarum, L. rhamnosus, L. helveticus, L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*), *Lactococcus* 1종(*Lc. lactis*), *Streptococcus* 1종(*S. thermophilus*)으로 모두 『건강기능식품의 기준 및 규격(고시 제2019-149호)』에서 제시한 프로바이오틱스 제품에 사용될 수 있는 미생물로 확인되었다. 제품별 균주 사용 빈도는 *L. paracasei* (n=7), *L. acidophilus* (n=5), *L. helveticus* (n=5), *S. thermophilus* (n=3), *L. rhamnosus* (n=2), *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (n=2), *Lactobacillus plantarum* (n=1), *Lc. lactis* (n=1) 순으로 조사되었다. 소비자 알권리 및 신뢰도 향상을 위하여 사용된 프로바이틱스 미생물의 균주명 등의 제공이 필요할 것으로 판단된다.

Conflict of interests

The authors declare no potential conflict of interest.

ORCID

Tae Sun Kang https://orcid.org/0000-0001-5939-6247

References

1. Ministry of Food and Drug Safety, (2021, April 19). Food and drug statistical yearbook. Retrieved from https://www.mfds.go.kr/brd/m_371/view.do?seq=30719&srchFr=&srchTo=&srchWord=&srchTp=&itm_seq_1=0&itm_seq_2=0&multi_itm_seq=0&company_cd=&company_nm=&page=1
2. Guarner, F., Perdigon, G., Corthier, G., Salminen, S., Koletzko, B., Morelli, L., Should yoghurt cultures be considered probiotic?. *Br. J. Nutr.*, **93**, 783-786 (2005).
3. Ministry of Food and Drug Safety, (2021, April 19). Probiotics, health functional food code. Retrieved from https://www.mfds.go.kr/brd/m_211/view.do?seq=14416
4. KBS NEWS, (2021, April 19). Most commercial probiotic products contain only 1~2 strains of probiobics. Retrieved from http://news.kbs.co.kr/news/view.do?ncd=4499979&ref=A
5. Yonhap NEWS, (2021, April 19). The ministry of food & drug safety commands imported probiotics products with repeated incongruity records to be inspected. Retrieved from https://www.yna.co.kr/view/AKR20210209053000530?input=1195m
6. Ministry of Food and Drug Safety, (2021, April 19). Fermented-milk products, Food Code. Retrieved from https://www.foodsafetykorea.go.kr/foodcode/01_03.jsp?idx=39
7. Drisko, J., Bischoff, B., Giles, C., Adelson, M., Rao, R.V.S., McCallum, R., Evaluation of five probiotic products for label claims by DNA extraction and polymerase chain reaction analysis. *Dig. Dis. Sci.*, **50**, 1113-1117 (2005).
8. Coeuret, V., Gueguen, M., Vernoux, J.P., Numbers and strains of lactobacilli in some probiotic products. *Int. J. Food microbiol.*, **97**, 147-156 (2004).
9. Yeung, P.S.M., Sanders, M.E., Kitts, C.L., Cano, R., Tong, P.S., Species-specific identification of commercial probiotic strains. *J. Dairy Sci.*, **85**, 1039-1051 (2002).
10. Huys, G., Vancanneyt, M., D'Haene, K., Vankerckhoven, V., Goossens, H., Swings, J., Accuracy of species identity of commercial bacterial cultures intended for probiotic or nutritional use. *Res. Microbiol.*, **157**, 803-810 (2006).
11. Ministry of Food and Drug Safety, (2021, April 19). Enumeration of lactic acid bacteria, food code. Retrieved from https://www.foodsafetykorea.go.kr/foodcode/01_03.jsp?idx=374
12. Khan, N.H., Kang, T.S., Grahame, D.A., Haakensen, M.C., Ratanapariyanuch, K., Reaney, M.J., Korber, D.R., Tanaka, T., Isolation and characterization of novel 1, 3-propanediol-producing Lactobacillus panis PM1 from bioethanol thin stillage. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **97**, 417-428 (2013).
13. Nucleics, (2021, April 29). BioEdit review. Retrieved from https://www.nucleics.com/DNA_sequencing_support/Trace_viewer_reviews/BioEdit/
14. Kang, T.S., Monitoring of commercial products sold on sushi buffet restaurants in South Korea using DNA barcode. *J. Food Hyg. Saf.*, **35**, 45-50 (2020).
15. U.S. National Library of Medicine, (2021, April 29). Basic local alignment search tool. Retrieved from https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
16. Collins, M.D., Phillips, B.A., Zanoni, P., Deoxyribonucleic acid homology studies of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* sp. nov., subsp. *paracasei* and subsp. *tolerans*, and *Lactobacillus rhamnosus* sp. nov., comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **39**, 105-108 (1989).