

**ACE 억제활성 젖산균주 선발 및  
이를 이용한 항고혈압 발효유 개발 연구**

**Development of Antihypertensive Fermented milk  
by ACE inhibitory activity of Lactic acid bacteria**

연구기관  
한국식품연구원

농 립 부

# 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “ACE 억제활성 젓산균주 선발 및 이를 이용한 항고혈압 발효유 개발 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2007년 05월 24일

주관연구기관명 : 한국식품연구원

총괄연구책임자 : 임 상 동

세부연구책임자 : 차 성 관

연 구 원 : 김 기 성

연 구 원 : 성 기 승

연 구 원 : 양 승 용

연 구 원 : 도 정 룡

연 구 원 : 이 혜 원

참 여 기 업 명 : 임실치즈농협

연 구 원 : 양 해 동

# 요 약 문

## I. 제 목

ACE 억제활성 젖산균주 선발 및 이를 이용한 항고혈압 발효유 개발 연구

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

본 연구의 목적은 원유에서 ACE 억제활성 젖산균 탐색 및 발굴하여 젖산균 특성조사와 발효조건을 설정한 다음 발효유를 개발하고 동물실험을 통해 효능이 입증된 제품을 개발하고자 하는데 그 목적이 있다.

## III. 연구개발 내용 및 범위

### 1. 젖산균 분리 및 수집

- Bromcresol purple첨가 Milk agar를 이용 원유에서 젖산균 분리 및 수집
- 분리균주에서 우유 응고여부 조사

### 2. ACE 억제활성 균주 선발

- 분리균주를 이용한 발효유 제조
- Protease activity 측정

### 3. ACE 억제활성 균주 동정

- 당발효 시험, 현미경관찰, Gram 염색, 호기적 및 혐기적 성장, catalase생성, 15℃ 및 45℃에서의 성장, glucose로부터 가스생성, arginine으로부터 ammonia 생성 등의 시험

### 4. 선발 젖산균의 특성조사

- 젖산균의 성장, 항생제 내성시험, 효소활성 시험, 담즙내성 시험, pH 내성 시험, 항균력 시험

### 5. ACE 억제활성 젖산균 최적배양조건 설정

- 배지조건 : 환원 탈지유 농도별 ACE 억제 활성 측정
- ACE 억제 젖산균주의 접종량별 ACE 억제 활성 측정
- 배양조건(온도, 시간)별 ACE 억제 활성 측정

6. 최적 배합조성물 개발
  - 발효유에 첨가되는 소재에 대한 기본 Base 설정
  - 관능평가에 의한 최적 배합비 설정
7. 제품 개발 및 이화학적 특성 조사
  - 제조공정 설정
  - ACE 함량 및 이화학 성분 분석
8. 발효유에서의 항고혈압 peptide 분리
  - 한외여과
  - Sephadex G-25 column에 의한 gel permeation chromatography
  - ODS AQ column에 의한 reverse-phase chromatography
  - Vydac C18 column에 의한 reverse-phase chromatography
  - Superdex peptide column에 의한 gel permeation chromatography
  - 아미노산 배열(amino acid sequence) 분석
9. 동물실험
  - 고혈압쥐(SHR)를 대상으로 경구투여
  - 혈압측정

#### IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

##### 1. 젖산균 분리 및 수집

###### 가. 원유에서 젖산균 분리

서울우유 중부, 북부, 서부지도소 관할 원유검사소(경기도 및 강원도 일부), 전북 축산시험연구소, 경북 가축위생시험소 및 제주도 축산진흥원에서 지원받아 목장별 원유를 채취하여 MRS배지에 Bromcresol purple과 sodium azide를 첨가한 plate에 smear한 후 37℃에서 48시간 배양한 다음 노란색 colony중 각기 다른 모양의 colony를 선별하였고 순수분리를 위해 MRS agar에 streaking하여 얻어진 colony를 triptic soy agar slant에 37℃에서 18시간 배양한 다음 보관하였다. 이때 1,505개의 균주를 분리하였다.

###### 나. 균주에서 우유 응고여부 조사

발효유에 적합하기 위해서는 skim milk를 응고시킬 수 있는 산생성 능력이 있어야 하므로 10% 환원탈지분유에 분리균주를 접종한 후 37℃에서 24시간과 48시간 배양하여 응고된 균주가 각각 512개 균주와 1,037개 균주이었다.

## 2. ACE 억제활성 균주 선발

분리균주 중 B46 균주는 ACE 억제율이 97.90%, K14 균주는 76.96%, K29 균주는 80.63%, K61 균주는 86.34%, K354 균주는 82.01%, K359 균주는 83.08%이었다.

## 3. ACE 억제활성 균주 동정

동정된 균주명은 B46 균주 : *Enterococcus faecalis*, K14 균주 : *Lactobacillus plantarum*, K29 균주 : *Lactobacillus brevis*, K61 균주 : *Lactococcus lactis* ssp *lactis*, K354 균주 : *Lactobacillus zeae*, K359 균주 : *Lactobacillus plantarum*이었다.

## 4. 선발 젖산균의 특성조사

ACE 억제율이 높은 균주 17종 중 산 생성 속도와 ACE 억제율을 감안하여 6종의 젖산균을 선발하여 특성조사를 실시하여 동정된 젖산균은 *Enterococcus faecalis* B46, *Lactobacillus plantarum* K14, *Lactobacillus brevis* K29, *Lactococcus lactis* ssp *lactis* K61, *Lactobacillus zeae* K354, *Lactobacillus plantarum* K359로 각각 명명하였다.

### 가. 젖산균 생장

*Lactobacillus plantarum* K14, *Lactobacillus brevis* K29, *Lactococcus lactis* ssp *lactis* K61, *Lactobacillus zeae* K354, *Lactobacillus plantarum* K359 균주 공히 40°C, *Enterococcus faecalis* B46 균주는 37°C가 최적온도로 나타났다.

### 나. 항생제 내성 시험

*Enterococcus faecalis* B46 균주는 5종의 *Lactobacillus* 균주에 비해 Methicillin, Ampicillin 및 Vancomycin을 제외하고 항생물질에 대한 내성이 강한 것으로 나타났다. 5종의 *Lactobacillus* 균들은 Polymyxin B와 Vancomycin에 대해 내성이 강한 반면, Amikacin, Gentamycin 및 Penicillin-G에는 내성이 약한 것으로 나타났다.

### 다. 효소활성

*E. faecalis* B46은 5종의 *Lactobacillus* 균주에 비해 Alkaline phosphatase,

Esterase, Acid phosphatase 및 Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase에서 효소 활성이 높게 나타난 반면, Leucine arylamidase 및  $\beta$ -galactosidase에서는 효소활성이 없는 것으로 나타났다. *Lactobacillus plantarum* K14균주는 다른 5종의 젖산균에 비해  $\beta$ -galactosidase가 높은 활성을 나타내었고, *Lactobacillus brevis* K29, *Lactococcus lactis* K61 및 *Lactobacillus zeae* K354균주는 Leucine arylamidase, *Lactococcus lactis* K61 및 *Lactobacillus zeae* K354균주는 Esterase Lipase에 대해 효소활성이 있었다.

#### 라. 담즙내성

oxgall을 첨가하지 않은 경우와 첨가한 경우간에 큰 차이를 나타내지 않아 7종의 젖산균 모두 담즙내성이 있는 것으로 나타났다.

#### 마. pH 내성

*Lactobacillus brevis* K29 균주가 다른 5종의 젖산균에 비해 pH에 대한 내성이 강한 것으로 나타났으며, 다른 젖산균 역시 pH 2와 pH 3에서 3시간까지 내산성이 있는 것으로 나타났다.

#### 바. 항균력

*E. faecalis* 46 균주는 *Escherichia coli*에 대해 억제력이 없었으나, *Salmonella typhimurium*에 대해 68.42%, *Staphylococcus aureus*에 대해 16.67%의 억제력을 보였다. 5종의 *Lactobacillus* 균은 공히 *Escherichia coli* 와 *Staphylococcus aureus*에 대해 억제효과가 없는 것으로 나타났으며, 다만, *Salmonella typhimurium*에 대해 *Lactobacillus zeae* K354 균주가 60.2%의 억제효과를 나타내 타 균주에 비해 가장 높은 억제율을 보였다.

### 5. ACE 억제활성 젖산균 최적배양조건 설정

환원탈지유 12%에 *E. faecalis* 46 균주 1%를 첨가하여 40℃, 배양시간 9시간일 때 최대 100%의 억제율을 나타내었다. 5종의 *Lactobacillus* 균 중에서 발효유의 최적 pH 조건을 감안하였을 때 *Lactobacillus zeae* K354 균주가 ACE 억제율이 69.2%로서 가장 높았으며, 이때의 최적조건은 환원탈지유 10%, 균첨가량 0.1%, 배양온도 37℃, 배양시간 15시간이었다.

## 6. 최적 배합조성물 개발

개발제품의 배합비를 보면, 원유 80.776%, 탈지분유 3.234%, 올리고당 5.0%, 액상과당 2.0%, 딸기잼(또는 블루베리잼이나 포도잼) 8.0%, 정제수 1.0%이었다.

## 7. 제품 개발 및 이화학적 특성 조사

각각의 발효조에 원유 96.15%, 탈지분유 3.85%를 첨가하고 65°C에서 배합하여 완전히 녹인 후 90°C에서 5분간 살균하였으며, 37°C로 냉각시킨 다음 *Lactobacillus zeae* K354 균주(발효조 A)와 *Enterococcus faecalis* B46 균주(발효조 B)를 1.0%(v/v)로 접종하고, 최종 pH 4.17과 6.51로 감소할 때까지 배양하였다. 이때 *Enterococcus faecalis* B46 균주를 이용한 발효액(발효조 B)은 90°C에서 5분간 열처리하며, 두 배양액을 조합탱크에 비율함량에 맞춰 발효조 A와 B를 혼합(전체의 84%)한 다음 딸기잼(또는 블루베리잼 또는 포도잼) 8.0%, 올리고당 5%, 액상과당 2%, 정제수 1.0%를 첨가하고 교반하여 호상발효유를 제조하였다. 단일 균주를 사용할 경우는 발효조 A와 동일하다.

*Lactobacillus zeae* K354 단독 균주에 의한 발효유 제품과 혼합제품의 성분을 보면, 각각 무지유고형분 10.0%와 10%, 유지지방 3.43%와 3.38%, 젖산균수  $2.6 \times 10^9$  CFU/mL와  $1.2 \times 10^9$  CFU/mL, ACE 억제율은 88.6%와 98.8%이었다.

## 8. 발효유에서의 항고혈압 peptide 분리

발효유로부터 Sephadex G-25 column, ODS AQ column, Vydac column을 이용하여 순차적으로 분리, 정제한 peptide의 N-말단으로부터 아미노산 배열은 Tyr-Val-Ala로 나타났으며, ACE 저해활성은 IC<sub>50</sub>이 1.4μM로 나타났다.

## 9. 동물실험

ACE 억제활성균주를 이용한 발효유의 항고혈압 증진 효과를 알아보기 위하여 수컷 랫트 30두를 대상으로 하여 *Lactobacillus zeae* K354 균주만 이용 발효유를 투입한 그룹 A, *Lactobacillus zeae* K354 균주 이용 발효유와 *Enterococcus faecalis* B46 균주이용 발효유(90°C, 5분 열처리)를 5 : 5 비율로 혼합한 발효유를 투입한 그룹 B와 남양유업의 항고혈압 발효유(프로젝트 102-80)를 투입한 그룹 C를 설정하여 이 제제의 임상적용 경로인 경구투여 방법을 선택하여 각각의 발효

유를 각각 5ml/kg/day씩 위내로 직접 투여하였다. 혈압의 변화를 측정한 결과 5주까지는 유의성이 없었으나 6주 후부터 대조군에 비해 처리군이 유의성이 있었다.



# SUMMARY

## I. Title

Development of Antihypertensive Fermented milk by ACE inhibitory activity of lactic acid bacteria

## II. Objective of research

The objective of the study was to develop antihypertensive fermented milk by ACE inhibitory activity, which was isolated from lactic acid bacteria under specific conditions.

## III. Research scope and area

1. Collection and isolation of lactic acid bacteria
2. Selection of lactic acid bacteria having ACE inhibitory activity
3. Identification of lactic acid bacteria
4. Characteristics of selected lactic acid bacteria
  - Growth of lactic acid bacteria, antibiotic tolerance, enzyme activity test, bile tolerance, pH tolerance, antibacterial activity
5. Establishment of optimum cultivation condition of lactic acid bacteria having ACE inhibitory activity
  - Medium condition
  - The addition dosage of lactic acid bacteria ACE inhibitory activity
  - Fermentation condition
6. Development of optimum formula
  - Selection of best materials added to fermented milk
  - Establishment of optimum formula by Sensory test
7. Product development and physicochemical properties
  - Establishment of processing technology
  - ACE inhibitory ratio and physicochemical analysis

#### 8. Isolation of an antihypertensive peptide from fermented milk

- Ultrafiltration
- Gel permeation chromatography by Sephadex G-25 column
- Reverse-phase chromatography by ODS AQ column
- Reverse-phase chromatography by Vydac C18 column
- Gel permeation chromatography by Superdex peptide column
- Analysis of amino acid sequence

#### 9. Animal experiments

- Measurement of blood pressure

### IV. Result of research and suggestion of application

#### 1. Collection and isolation of lactic acid bacteria

##### a. Isolation of lactic acid bacteria from raw milk

Raw milk was collected from several farms under support of Raw milk testing lab. within the jurisdiction of Central, North, Western guidance division (part of Kyoung Gi Do and Gang Won Do) in Seoul Dairy Cooperation, Provincial institute for livestock promotion (Jeonbuk, Kyoungbuk, Jeju). 1,505 bacteria were isolated from modified MRS media.

##### b. Collection of lactic acid bacteria having milk coagulation capacity

512 and 1,037 bacteria were further isolated after the microbes were inoculated on 10% the reconstituted skim milk followed by incubation at 37°C for 24hr and 48hr, respectively.

#### 2. Selection of lactic acid bacteria having ACE inhibitory activity

ACE inhibitory ratio in individual strain was 97.90% in B46, 76.96% in K14, 80.63% in K29, 86.34% in K61, 82.01% in K354, 83.08% in K359, respectively.

#### 3. Identification of lactic acid bacteria

Designation of lactic acid bacteria having ACE inhibitory activity were  
B46 : *Enterococcus faecalis*, K14 : *Lactobacillus plantarum*, K29 :  
*Lactobacillus brevis*, K61 : *Lactococcus lactis* ssp *lactis*, K354 : *Lactobacillus*

*zeae*, K359 : *Lactobacillus plantarum* as a result of Gram staining, fractography, sporogenesis, aerobic and anaerobic growth, catalase formation, growth in 15°C and 45°C, gas formation from glucose, ammonia formation from arginine, and sugar fermentation test.

#### 4. Characteristics of selected lactic acid bacteria

##### a. Growth of lactic acid bacteria

Optimal growth temperature of *Enterococcus faecalis* B46 was 37°C, while that of the other 5 lactic acid bacteria was 40°C.

##### b. Antibiotic tolerance

*Enterococcus faecalis* B46 had stronger antibiotic resistance than 5 Lactobacilli except antibiotics such as Methicillin, Ampicillin and Vancomycin. 5 Lactobacilli had strong resistance against Polymyxin B and Vancomycin, while these had weak resistance against Amikacin, Gentamycin and Penicillin-G.

##### c. Enzyme activity test

*Enterococcus faecalis* B46 showed higher activity on Alkaline phosphatase, Esterase, Acid phosphatase and Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase, *Lactobacillus plantarum* K14 on  $\beta$ -galactosidase, *Lactobacillus brevis* K29, *Lactococcus lactis* K61 and *Lactobacillus zeae* K354 on Leucine arylamidase, *Lactococcus lactis* K61 and *Lactobacillus zeae* K354 on Esterase Lipase than the other microbes.

##### d. Bile tolerance

7 lactic acid bacteria were seldomly affected by bile salt.

##### e. pH tolerance

*Lactobacillus brevis* K29 had stronger resistance than the other microbes. Also, All lactic acid bacteria were seldomly affected by pH after three hours in pH 2 and pH 3.

##### f. Antibacterial activity

*Enterococcus faecalis* B46 did not resist *Escherichia coli* but resist *Salmonella typhimurium* for 68.42% and *Staphylococcus aureus* for 16.67%. And

5 kinds of *Lactobacillus* did not resist the *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* but *Lactobacillus zeae* K354 resists *Salmonella typhimurium* for 60.2% and it shown highest resist activity among all selected lactic acid bacteria.

5. Establishment of optimum cultivation condition in lactic acid bacteria having ACE inhibitory activity

a. *Enterococcus faecalis* B46

Incubation at 40°C for 9hrs with 12% reconstituted skim milk and 1% *Enterococcus faecalis* B46 shown pH 5.76 and 100% of ACE inhibitory ratio.

b. *Lactobacillus zeae* K354

Incubation at 37°C for 15hrs with 10% reconstituted skim milk, 0.1% *Lactobacillus zeae* K354 shown pH 4.14 and 69.4% of ACE inhibitory ratio.

6. Development of optimal formula

The formulae for the developed products was 80.776% raw milk, 3.234% skim milk powder, 5.0% oligosaccharide, 2.0% fructose syrup, 8.0% strawberry jam(or blue berry jam or grape jam) and 1.0% water.

7. Product development and physicochemical properties

One percent of *Lactobacillus zeae* K354(fermentor A) and *Enterococcus faecalis* B46(Fermentor B) were inoculated and fermented until pH of the mixture, which was mixed with 96.15% raw milk, 3.85% skim milk powder followed by autoclaved at 90°C for 5 min and cooled to 37°C, reached to 4.17 and 6.51. Fermentor B was heated at 90°C for 5 min and combined with fermentor A to produce fermented milk of having 8.0% of straw berry(or blue berry or grape)jam, 5.0% oligosaccharide, 2.0% fructose syrup, and 1.0% water. The product by *Lactobacillus zeae* K354 and Mixed product contained non-fat milk solid 10.0% and 10.0%, milk fat 3.43% and 3.38%, lactic acid bacteria  $2.6 \times 10^9$ CFU/mL and  $1.2 \times 10^9$ CFU/mL, ACE inhibitory ratio was 88.6% and 98.8%, respectively.

#### 8. Isolation of an antihypertensive peptide from fermented milk

ACE inhibitory peptides were isolated by Sephadex G-25 column, ODS AQ column, Vydac column from fermented milk. The amino acid sequence of the ACE inhibitory peptides were Tyr-Val-Ala. The IC<sub>50</sub> of this peptide for ACE was 1.4µM.

#### 9. Animal experiments

To examine antihypertensive ability effect of fermented milk, SHR rats were arranged into 4 groups and control group was fed with brine, group A was fed solely with *Lactobacillus zae* K354 added fermented milk. Group B was fed with mixture of *Lactobacillus zae* K354 inoculated and *Enterococcus faecalis* B46 inoculated ones(90°C, 5 min heating) with 5 : 5 ratios. Group C was fed with antihypertensive fermented milk of Nam Yang dairy company.

There was no significant difference in blood pressure between groups until 5 weeks, but significant difference between control and fermented milk fed groups after 6 weeks.

# CONTENTS

Chapter 1. Introduction .....	17
Chapter 2. Art status of domestic and abroad .....	20
1. Market and development trend of fermented milk .....	20
2. Art status of domestic and abroad .....	23
Chapter 3. Scopes and results of the research project .....	27
1. Materials .....	27
2. Method .....	28
3. Result and discussion .....	43
a. Isolation and collection of lactic acid bacteria .....	43
b. Selection of lactic acid bacteria having ACE inhibitory activity .....	43
c. Identification of lactic acid bacteria .....	68
d. Characteristics of selected lactic acid bacteria .....	72
e. Establishment of optimum cultivation condition in lactic acid bacteria having ACE inhibitory activity .....	93
f. Development of optimum formula .....	111
g. Product development and physicochemical properties .....	116
h. Isolation of an antihypertensive peptide from fermented milk .....	119
i. Animal experiments .....	124
Chapter 4. Attainability of the research goal and contribution to related fields .....	130
Chapter 5. Application of research results .....	133
Chapter 6. Reference .....	134

# 목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 .....	17
제 2 장 국내외 기술개발 현황 .....	20
제 1 절 발효유의 시장현황 및 제품개발 동향 .....	20
제 2 절 국내외 기술 현황 .....	23
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 .....	27
제 1 절 재료 .....	27
제 2 절 방법 .....	28
제 3 절 연구결과 및 고찰 .....	43
1. 젖산균 분리 및 수집 .....	43
2. ACE 억제활성 균주 선발 .....	43
3. ACE 억제활성 균주 동정 .....	68
4. 선발 젖산균의 특성조사 .....	72
5. ACE 억제활성 젖산균 최적배양조건 설정 .....	93
6. 최적 배합조성물 개발 .....	111
7. 제품 개발 및 이화학적 특성 조사 .....	116
8. 발효유에서의 항고혈압 peptide 분리 .....	119
9. 동물실험 .....	124
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	130
제 5 장 연구개발결과의 활용계획 .....	133
제 6 장 참고문헌 .....	134

여 백



## 제 1 장 연구개발과제의 개요

최근 각종 암, 고혈압, 당뇨병 등에 대한 치료제를 자연자원에서 찾고자 하는 시도가 미국 국립 암연구소(NCI)를 비롯 미국립보건원, 중국 과학원 약물연구소, 일본 과학기술청 등 세계 각국에서 추진되고 있으며 이미 식물 및 바다생물들로부터 신종 항암물질인 Bryostatin, Dolasstatin, Halomon 등을 개발하여 연간 수백억불의 새로운 시장을 개척하는 등 신 기능성 물질 탐색분야는 21세기의 최대 첨단 산업으로 급성장하고 있고 이에 대한 선진국들의 연구조사비 투자도 천문학적인 수치에 이르고 있다. 국내에서도 대학, 국립연구소 또는 일반 기업체 연구소 등 80여 회사 연구소들이 생명공학산업에 새로이 도전하고 있으며 일부 중견 기업연구소는 새로운 기능성 물질을 개발하여 해외에 로열티를 받고 수출하는 등 그 시장성이 날로 증대되고 있다. 국내 학계 및 기업을 중심으로 이루어지고 있는 기능성 식품관련 연구는 항산화, 항암, 순환기 질환, 장내균총 조절, 당뇨조절 등에 초점을 두고 있으며 다양한 원료 및 제품 개발에 투자하고 있다. 하지만 아직 대부분이 수입된 기능성 원료에 의존하고 있어 국내 기능성 식품산업이 국제경쟁력을 가지기 위해서는 우리만의 고유한 신기술이나 외국 신기술을 방어 또는 대체할 기술의 확보가 요구되고 있다. 즉 우리 고유의 농산식품이나 한약재소재와 같이 수천년간의 임상경험을 바탕으로 한 기능성 소재의 발굴 및 이의 작용기전을 밝히는 것이 필요하다. 최근 국민들의 평균수명이 높아지면서 고령화 인구비율이 증가하는 추세이며, 개개인은 건강한 활동력을 유지하면서 장수하고자 하는 욕구가 증대되고 있지만 피로, 스트레스, 잘못된 식생활 등으로 면역력이 저하되어 암 등 성인병이 발생되고 있는 실정이다. 따라서, 기능성 식품을 필두로 예방의학의 중요성이 부각되고 있으며 관련 제품들에 대한 잠재적 수요는 폭발적으로 증가할 것으로 사료된다.

국내의 발효유제품은 저가에서 고가의 기능성 드링크류가 주도하고 있으며, 국내에 개발된 제품으로는 위궤양을 일으키는 원인중의 하나인 헬리코박터 파이로리를 사멸시키는 기능성 발효유, 혈중 콜레스테롤 저하 발효유, 식중독을 유발하는 O-157 대장균, 포도상구균, 살모넬라균, 리스테리아균 등 유해세균을 사멸시키는 발효유 등 주로 젖산균을 이용한 제품이 주류를 이루고 있다. 또한, 경기침체에 의

한 우유소비 둔화로 분유재고는 2003년 3월 17,161톤이었으나 젓소도태 및 검은콩 우유제품 신장 등으로 2006년 5월말 현재 11,111톤으로 감소되었으나 아직도 적정 분유 재고량 3,000톤보다 많은 재고를 가지고 있어 유업체 및 낙농가의 피해가 큼에 따라 발효유의 소비촉진을 통하여 주재료인 분유 소비촉진 유도 방안이 절실히 요구되고 있다.

유제품 가격, 경쟁력 취약에 따른 시유 위주생산으로 국내원유의 소비는 점차 줄어들고 있어, 다양한 유제품 소비욕구를 국내 잉여 원유로 대체할 수 있도록 유제품 개발이 시급하다.

국내 기능성 식품은 1989년 건강보조식품과 특수영양식품을 제도화하고 해당품목이 늘어나면서 특허출원이 지속적으로 늘어나고 있으나 일본이 미국시장과 유럽에 각각 119건 63건의 특허를 출원한 반면, 우리나라는 미국에만 18건으로 일본의 1/10 수준에 불과할 뿐더러 외국에서 경쟁할 수 있을 정도의 핵심기술이 거의 없는 실정이다.

유럽연합시장 역시 미국과 일본이 각각 271건, 63건을 출원하고 있지만 우리나라는 거의 없는 실정이며 미국과 일본이 국내 시장에 각각 87건, 74건을 출원하고 있는 것에 비하여도 아주 낮은 수준 뿐만 아니라 2002년 기준 약 1조 3,500억원 규모를 형성한 국내 건강보조 식품 시장은 수입완제품이 17%를 차지하고 있으며 국내 제조품이더라도 핵심소재의 80% 이상이 수입되고 있다.

소득수준의 향상과 식생활 개선으로 원유의 소비는 그동안 계속 증가하여 왔다. 1980년대에는 1인당 원유소비량이 29kg 정도이었으나 1990년대에는 평균 48kg이며, 2000년에는 59.2kg에 이르러 소비량이 비약적으로 증가하였다. 그동안 국내 원유수급은 다소 불균형을 이루었으나 1990년 이전까지는 늘어나는 소비를 충당할 수 있어 국내 유제품 소비를 거의 자급하여 왔다. 그러나 1990년 초부터 순차적으로 시작된 유제품의 수입이 1995년에 완전 개방되어 값싼 혼합탈지분유와 원료치즈가 대량 수입되었고, 이로서 원유의 자급율도 하락하게 되었다. 탈지분유와 원료치즈 시장이 외국산으로 거의 대체된 1996년 이후는 자급율이 20%나 떨어진 80%선에 머무르고 있다. 국내산 원유는 대부분이 시유의 생산에 사용되고 있으며, 가격경쟁력을 잃은 원료유제품은 외국산으로 거의 모두 대체되었다. 1999년에는 이러한 현상이 더욱 심화되어 원유의 자급율은 하락하고 원유의 소비는 시유 생산에 대한 의존도가 더욱 높아졌다. 시유의 국산 원유 총생산량에 대한 점유비율은

77.7%를 차지하고 있으며, 점유비율은 점점 증가할 것으로 예상된다. 농촌경제연구원 발표한 2000년 농업전망을 보면 수입자유화에 따라 국산 원유생산량의 시유 소비 비율이 2005년에는 86%로 점차 높아지고, 2010년에는 98%로 국내산 원유의 대부분은 시유에 사용하고, 일반 유제품은 수입원료로 대체 생산될 것으로 전망하고 있다. 또한 우유 및 유제품의 주 소비자가 어린이 및 청소년층에 집중되어 있는데 반해 어린이 출생비율이 감소추세에 있음에 따라 소비증가는 정체 내지는 완만한 증가세를 보이고 있는 실정이다.

한편, 사회적으로 문제가 되고 있는 고혈압은 우리나라 성인의 약 20% 정도가 혈압이 높고 이중 20% 정도는 중증 고혈압이며, 나머지 80%가 중등도 고혈압이라고 한다. 건강보험공단 지역의보노조 따르면 02. 9 ~ 03. 9까지 1년간 건강보험 진료기록을 분석한 결과 고혈압 환자는 3,554천명으로 조사되었는데 성별로는 남자(246만명)보다 여자(281만명)가 더 많았으며 연령별로는 60대가 전체의 28.6%로 가장 많았고, 50대(23.5%), 70대 이상(22.8%), 40대(16.9%), 30대(6%) 순으로 연령이 증가할수록 고혈압이 흔한 것으로 조사되었는데, 이것은 과거 망국병이라던 결핵의 2%, 부자병이라고 하는 당뇨병의 3%, 그리고 요즘 국민병이라고 말하는 간염의 8%보다 훨씬 많은 수치이다.

이에 따라 본 연구를 통하여 ACE 억제능이 있는 젖산균을 이용한 발효유제품을 개발하여 국내 원유 소비 촉진 및 국제경쟁력을 향상시킴으로써, 국내 원유를 이용한 유 및 유제품의 시장을 확보하는 것이 급선무로 보여진다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1 절. 발효유의 시장현황 및 제품개발 동향

#### 1. 시장현황

소비자들의 기호가 70년대와 80년대 초까지는 발효유 시장의 대부분을 차지했던 액상 발효유에서 80년대 말부터는 소비 패턴의 변화와 고급화·기능화 되면서 점차적으로 농후 발효유로 소비패턴의 전환이 이루어져 90년대 초 액상과 호상 발효유 제품의 시장 점유비율(매출액 기준)이 61.7%와 34.3%였으나 2000년에는 액상, 호상, 드링크 발효유의 비율이 43.2%, 20.6%, 36.2%를 나타내었고, 2004년에는 36%, 18%, 46%로서 드링크 발효유의 비율이 증가하고 있는 추세이다. 발효유 시장은 지속적인 신제품 개발로 2000년에는 9% 증가한 8,400억원, 2001년에는 1조원, 2005년에는 1.2조원 대에 이를 것으로 전망된다. 최근에는 한국야쿠르트(메치니코프, 율, 쿠퍼스), 남양유업(불가리스, 위력), 매일유업(장에는 GG, 구트), 롯데햄우유(루테리), 빙그레(닥터캡슐녹차), 서울우유(헤파스) 등 기능성 드링크발효유 경쟁이 치열하다.

#### 2. 발효유의 제품개발 동향

유럽국가를 비롯한 미국·일본 등 세계 여러나라 발효유의 특징은 소비자들의 건강지향성, 자연지향성 욕구에 맞추어 기능성을 강조한 제품들이 활발하게 개발되고 있다. 즉 식이 섬유나 올리고당 또는 키토산, DHA & EPA 등과 같은 기능성 소재를 첨가한 제품, 저지방 및 당류 대체에 의한 저칼로리제품 또는 인체에 유용한 효과를 나타내는 유산균을 스타터로 사용한 프로바이오틱(probiotic) 제품 등이 개발 시판되고 있다. 몇가지 예를들면 다음과 같다.

##### 가. 인체에 유용한 효과 발휘하는 유산균주 사용

정장작용, 면역부활작용, 노화억제, 항종양효과, 혈중 콜레스테롤치 저하 등의 효과가 있는 유산균주를 선발 또는 유전공학적 방법으로 육종하여 스타터로 사용한다. 즉 사람의 장내에서 분리한 균주로 혈중 암모니아 감소, 장내부패균의 증식

억제, 부패산물 생성효소의 감소, 면역활성효과, 항암효과, 설사예방, 칼슘흡수촉진 등의 효능이 입증되어 최근 각광을 받고있는 Bifidus균과 역시 사람으로부터 분리, 선발한 균주로서 장내 정착성이 높고 설사를 완화해 주고 유해균의 증식억제 효과가 있는 *L. casei* GG의 사용, 콜레스테롤치의 저하가 임상적으로 입증되었다고 하는 *Enterobacter* 균주나 *L. acidophilus* Gilliland, 면역부활과 항암효과가 높고 설사를 완화해주고 유해균의 증식억제의 효과가 있는 *L. casei* Shriota 또는 정상 효과가 입증되었다는 *L. acidophilus* Lcl 등을 이용한 제품개발이 활발하게 이루어지고 있다. 최근에는 위장질환의 원인균인 *Helicobacter pylori*의 성장을 억제하는 두가지 유산균을 개발해 종균으로 사용한 제품이 출시되고 있다.

#### 나. 올리고당 첨가로 장내 유해균 증식 억제

장내 비피더스균 증식인자로서 최근 각광을 받고 있는 올리고당을 첨가하여 장내 유해균의 증식을 억제함으로써 병원균에 의한 감염방지와 변비를 예방한다는 요쿠르트 제품들도 시장점유율을 넓혀가고 있다. 올리고당은 소당류 또는 과당류라고도 불리우며, 2분자 이상 6분자 이하의 단당류가 탈수적으로 축합된 것으로 지금까지 개발된 생리적 기능성을 올리고당은 20여 종류에 이르고 있다. 이 당의 특징은 사람의 소화효소로서 분해되지 않고 산이나 알칼리에도 비교적 강하여 위산의 범위에서 분해되지 않는 난소화성 당류로서 장내까지 이행되어 비피더스균의 증식에 이용되며, 저칼로리 당류로서 칼슘 및 철분의 흡수를 촉진하고 항우식성 (치석형성방지)기능도 있는 것으로 알려지고 있다. 그러므로 올리고당 섭취에 의해 장내 비피더스균이 증가함으로써 장의 연동운동이 활발해지고, 유해균의 증식이 억제되기 때문에 병원성균의 감염방지와 변비예방에 효과가 있다는 것이다.

#### 다. 후로즌 요쿠르트(Frozen yougrt)

후로즌 요쿠르트는 아이스크림에 요쿠르트를 첨가하여 만든 것으로 미국의 아이스 크림 시장에서 10%정도의 점유율을 차지할 정도로 최근 판매량이 증가하고 있다. 이와 같이 후로즌 요쿠르트가 인기를 끌고 있는 이유는 기존 아이스크림보다 지방함량이 적은데다 아이스크림의 미각적 특징을 살리면서 요쿠르트가 갖고 있는 여러 가지 장점이 더해지기 때문이다. 후로즌요쿠르트에는 유산균이 제품에 살아 있는 것과 살균처리하여 유산균이 사멸된 것이 있으며, 아직까지 세계적으로 공통된 명확한 규정이 없으며 국가마다 차이가 있다.

#### 라. 코코아 첨가 휘핑 요쿠르트

건강식품으로 무설탕, 저지방 과즙요쿠르트 또는 혈압을 낮추고 혈중콜레스테롤치 저하효과가 있다고 선전하는 코코아 첨가 휘핑크림 요쿠르트 등이 개발되고 있다.

마. 커스터드와 요쿠르트 겸용

대용식 또는 간식용으로 요쿠르트 밑바닥에 커스터드를 깔아 커스터드와 요쿠르트의 맛을 함께 즐길 수 있는 제품이 젊은이들 사이에 인기를 끌고 있다.

바. 향 첨가 요쿠르트

그 외에 키위과즙이나 허브(라벤더·카모밀) 또는 카레·생강 등을 첨가하여 기존 요쿠르트에 독특한 맛을 부여한 제품들도 시판되고 있다.

## 제 2 절. 국내외 기술 현황

### 1. 국내 기술 현황

현대 성인병의 대표적인 질환인 고혈압의 대부분을 차지하고 있는 본태성고혈압은 renin-angiotensin계가 혈압조절에 매우 중요한 역할을 한다.

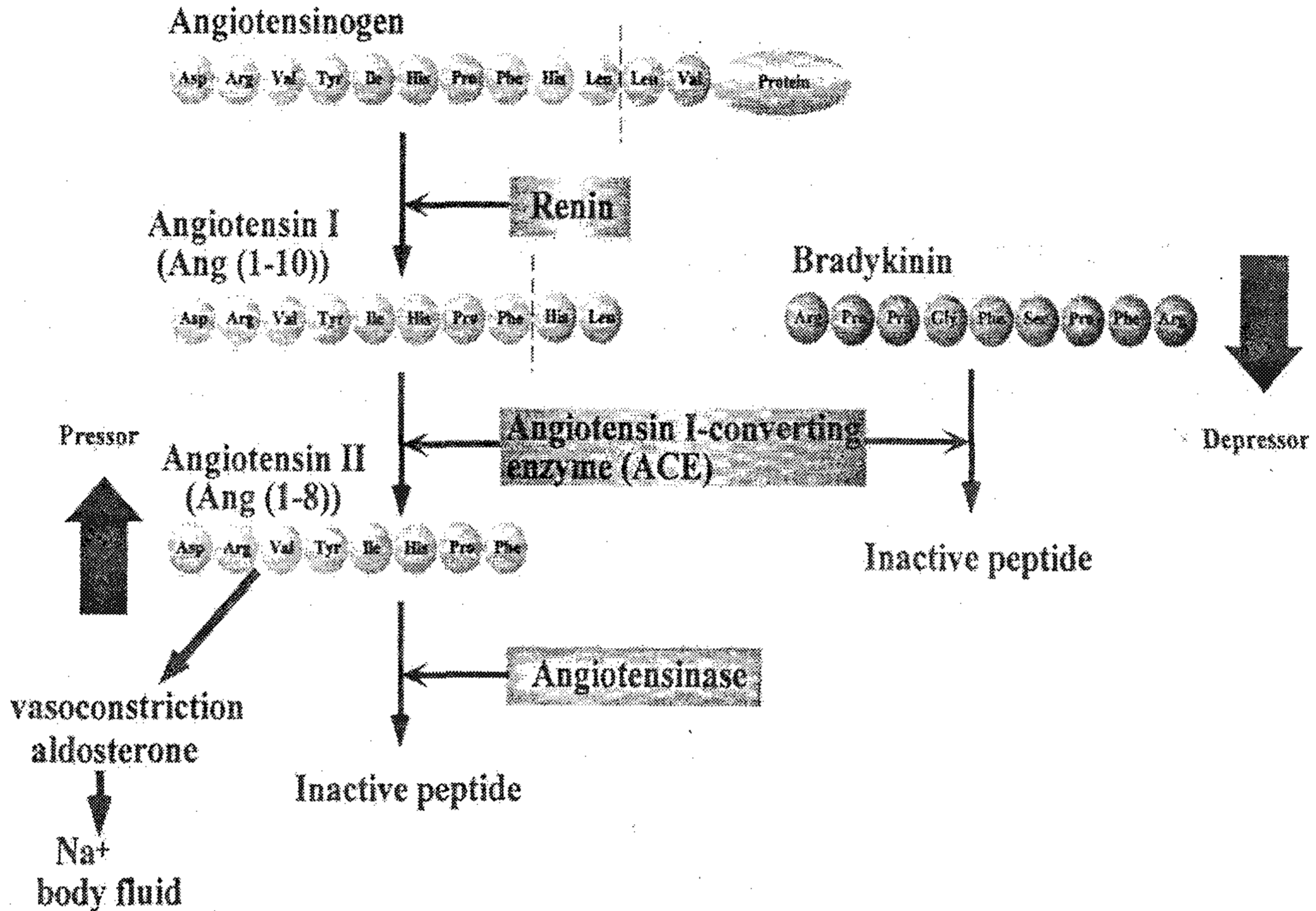


Fig. 1. 循環 Renin - Angiotensin 系

즉 angiotensinogen이 renin의 특이적 분해를 받아서 angiotensin I을 생성하는데, 이는 다시 angiotensin 전환효소(ACE)에 의하여 혈관수축작용을 하는 angiotensin II를 생성한다. ACE는 또한 혈관이완작용을 가진 bradykinin을 분해하여 불활성화 시킴으로써 결과적으로 혈압을 상승하는 역할을 한다. 이와같이 혈압의 상승에는 ACE의 관여가 크므로 혈압의 강하에는 ACE의 저해가 필수적이고, 또한 ACE 저해제들이 고혈압 치료제로서의 개발가능성이 제시되면서 고혈압 예방 및 치료에 있어서 ACE 저해제의 중요성이 부각되고 있다.

국내에서는 키토산올리고당이 ACE 저해활성과 SHR의 혈압에 미치는 영향을 검토한 바 ACE 저해활성은 3량체가 0.9 $\mu$ mole로 가장 우수하였고, 2.14mg/kg을 SHR에 경구투여한 결과 4시간 후 8주령 및 21주령 SHR 모두 최저혈압을 보였고, 이 때의 혈압강하는 8주령 SHR 27 $\pm$ 4.8mmHg, 21주령 SHR 36 $\pm$ 4.3mmHg으로 나타났다고 하였다(홍 등, 1998). 황(1997)은 메주 유래의 *B. subtilis* SCB-3으로 제조된 된장의 ACE 저해효과 실험결과 숙성 60일째에 저해활성이 가장 높았으며, 이 때 IC<sub>50</sub>은 0.31mg/ml라고 하였다. 조 등(2000)은 *Bacillus natto*를 접종한 납두의 발효과정중 ACE 저해 peptide를 정제하였고, 1mg으로 74.74%의 저해율을 보였다고 하였다. 김 등(1999)은 전통된장으로부터 분자량이 759.63인 아미노기를 갖는 비펩타이드와 271.33인 arginine-proline 2개의 ACE 저해물질을 분리하였다. 조 등(1993)은 한국산 녹차에서 탄닌을 분리하여 ACE 저해효과를 측정한 결과 acetone 추출물에서 ACE 저해효과가 있었고, galloyl tannin류가 nongalloyl tannin류보다 활성이 더 우수하였으며, 구조적 이성체에서도 (+)-catechin보다 (-)-epicatechin류가 효소저해효과가 더 좋았다고 하였다. 한편, 국내에서는 천연소재의 항고혈압에 관한 연구 외에는 큰 진전이 없었으나 2005년 6월에 남양유업에서 프로젝트 102-80이라는 제품명으로 혈압을 낮추는 발효유가 출시되고 있다. 이 제품의 주요기능은 혈관수축작용의 원인이 되는 노르아드레날린의 분비를 억제하고, 콜레스테롤 및 중성지방을 저하시키며, 혈압상승의 원인이 되는 나트륨을 체외로 배출시켜 혈압을 낮추는 메카니즘 적용하고 있다. 주요 발효 균주는 독일 Wiseby 사에서 도입한 *S. thermophilus*와 *L. bulgaricus* 혼합 균주로서 단순히 발효하는데 이용되고 있고 혈압 관련한 소재로서 FK-23 유산균(균종: Enterococcus)을 일본 가와이 유산균연구소에서 사균체 형태로 공급하여 사용하고 있으며, 추가로 에리스리톨, 화이버 줄과 천연물질 추출물(RGP-HC90, ONC-129, YQ2)을 첨가한 제품이 판매되고 있다. 국내에서 개발된 젓산균을 이용하여 제품을 만듦으로써 제품 및 젓산균의 수입대체효과와 더 나아가 외국에 수출할 수 있는 국제경쟁력을 키울 수 방안이 요구되고 있다.

## 2. 국외 기술 현황

ACE 저해제로서는 1960년대 말 *Bothrops jararaca* 독사의 독에서 BPSs가 발견되었고(Cushman과 Ondetti, 1979) BPFs 중 nonapeptide인 SQ20881이 Engel 등



(1972)에 의해서 우수한 ACE 저해제로 제시되었다. 1977년 ACE의 강력한 저해제인 Captopril(2-D-mercaptopropanoyl-L-proline)이 개발되었고 이후 Enalapril, Benazepril 등 수종의 ACE저해제가 상품화되어 고혈압 치료제로서 이용되고 있으나 마른기침, 식욕부진, 미각이상, 발진, 백혈구 감소 등 각종 부작용이 많다(水島裕와 宮本昭正, 1996). Suzuki 등(1983)은 일상적으로 섭취하는 94개 식품에서 ACE 저해활성을 조사하여, 그 중 대두식품, 다류, 패류, 과실류 및 메밀에서 ACE 저해활성을 찾아냈다. 이러한 식품중에 ACE 저해활성을 가지는 물질은 비교적 저분자 물질이 관여하는 것으로 추정하였다.

이외에도 식품관련분야에서의 ACE 저해제로서는 우유(Maruyama 등<sup>a</sup>, 1987; Maruyama 등, 1985; Maruyama 등<sup>b</sup>, 1987), 대두(Kinoshita 등, 1993), 옥수수(Miyoshi 등, 1991), 정어리(Seki 등, 1993), 참치 (Kohama, 1988)등의 단백질 가수분해물, 돼지혈장(Hazato와 Kase, 1986)에서 분리된 peptide 등이 주로 C말단에 proline을 가지는 peptide류, 감귤 및 과실류의 flavonoid 배당체류(Ohara 등, 1989), 차성분의 카테킨류(Hara 등, 1987) 등을 들 수 있다. 그러나 이들 성분은 천연물이라는 측면에서 안전성이 높지만 ACE 저해에 대한 역가가 Captopril 보다 최소한 20배 이상 낮아 강력한 ACE저해능을 가지는 천연물질에 대한 탐색이 지속적으로 이루어지고 있다.

식품산업에서 젖산균에 의한 우유 발효는 물론 식품 단백질의 효소분해로부터 분리된 ACE 억제물질은 기능성 식품으로 부각되고 있다. 현재 스타터 젖산균에 의해 우유 발효중 방출된 biopeptide는 상당한 관심이 되고 있다. Smacchi와 Gubbetti(2000)는 선발균주인 *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 와 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*가 항고혈압 peptide를 생성하였다고 하였으며, *Lactobacillus helveticus*와 *Saccharomyces cerevisiae*로 제조된 칼피스는 항고혈압 biopeptide를 함유하였고 생체실험에서 ACE의 억제와 혈압 감소를 보였다고 하였다. Ashar과 Chand(2003)는 ACE 억제를 목적으로 in vitro상에서 22개의 젖산균을 선발하여 이들 중 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*와 *Lactobacillus helveticus* whey fraction에서 ACE 억제율이 72%와 78%로 가장 높았다고 하였다. 배양조건으로는 젖소 표준우유에 1%접종하고 37℃에서 8시간 배양했을 때 최고 88%까지 억제되었다고 하였다.

ACE 억제 peptide는 유단백의 효소분해(Maruyama와 Suzuki, 1982; Maruyama

등, 1985; Maruyama 등, 1987; Karaki 등, 1990; Yamamoto 등, 1994; Maeno 등, 1996; Mullally 등, 1997, Abubakar 등, 1998; Pihlanto-Leppala 등, 1998; Pihlanto-Leppala 등, 2000; Roy 등, 2000)와 여러 미생물에 의한 우유의 발효 (Yamamoto 등<sup>a, b</sup>, 1994; Yamamoto 등, 1999; Gobbetti 등, 2000) 및 유단백 sequence에 따른 peptide의 화학합성(Maruyama 등<sup>a,b</sup>, 1987; Kohmura 등, 1990; Meisel, 1993; Mullally 등, 1996; Maeno 등, 1996; Abubakar 등, 1998; Yamamoto 등, 1999; Gobbetti 등, 2000; Pihlanto-Leppala 등, 2000)으로 생성된다.

우유발효의 스타터인 젖산균은 세포표면 단백분해효소를 합성하고 유단백을 가수분해하며 배지에서 일부 peptide를 방출할 수 있다(Zevaco와 Gripon, 1988; Yamamoto 등, 1993; Juillard 등<sup>a</sup>, 1995; Gilbert 등, 1997). peptide는 박테리아 성장에 모두 사용되지 않기 때문에 많은 양의 peptide가 발효 중에 축적된다(Juillard 등<sup>b</sup>, 1995). 젖산균 중 *L. helveticus*는 우유배지에서 강력한 단백분해활성을 가진다(Moineau와 Goulet<sup>a,b</sup>, 1991; Yamamoto 등<sup>a</sup>, 1994; Matar 등, 1996; Barrette, 2000). 흥미롭게도 일부 *L. helveticus*는 우유발효 중(Yamamoto 등<sup>b</sup>, 1994; Yamamoto 등, 1999; Sipola 등, 2002)이거나 단백분해효소에 의한 casein 단백분해(Yamamoto 등<sup>a</sup>, 1994; Maeno 등, 1996)로 ACE 억제 peptide를 생산해낸다. 또한 스타터로서 *L. helveticus*로 발효된 일부 유제품은 in vivo상에서 항고혈압 활성이 입증되었다(Yamamoto 등<sup>b</sup>, 1994; Nakamura 등<sup>a</sup>, 1995; Nakamura 등<sup>b</sup>, 1995; Nakamura 등, 1996; Hata 등, 1996; Fuglsang 등, 2002; Seppo 등, 2002; Sipola 등, 2002). Maeno 등(1996)의 보고에 따르면 우유발효에 의해 생성된 peptide의 ACE 억제활성은 소화효소의 작용으로 변화될 수 있다고 하였는데, 실제로 in vitro상에서 낮은 ACE 억제활성(IC<sub>50</sub>=1000 $\mu$ M)을 보인 peptide  $\beta$  169-175를 carboxypeptidase A로 가수분해시켜 본태성 고혈압 쥐(SHR)에 경구투여시켰을 때 뚜렷한 고혈압 감소를 보였다고 하였다.

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1 절 재료

#### 1. 원유

서울우유 중부, 북부, 서부지도소 관할 원유검사소(경기도 및 강원도 일부), 전북 축산시험연구소, 경북 가축위생시험소 및 제주도 축산진흥원에서 지원받아 목장별 원유를 사용하였다.

#### 2. 시유

서울우유에서 제조한 시유를 구입하여 사용하였다.

#### 3. 탈지분유

서울우유협동조합에서 제조한 단백질 35.0%, 유지방 1.0%, 탄수화물(유당) 52.5%, 회분 및 기타 8.5%, 수분 3.0%인 제품을 사용하였다.

#### 4. 액상과당

삼양제넥스에서 제조한 과당 55%이상, 포도당 39%이상, 올리고당 6%이하인 제품을 사용하였다.

#### 5. 올리고당

대상(주)에서 제조한 이소말토올리고당 99%, 말토올리고당 1%인 제품을 사용하였다.

#### 6. 딸기잼

동원 F&B에서 제조한 딸기 45%(국산), 백설탕, 이소말토올리고당, 물엿, 포도당, 펙틴, 구연산으로 구성된 제품(61brix)을 사용하였다.

#### 7. 블루베리잼

(주)오뚜기에서 제조한 블루베리 40%(캐나다산), 백설탕, 물엿, 액상포도당, 펙틴, 구연산, 구연산나트륨으로 구성된 제품(61.5brix)을 사용하였다.

#### 8. 포도잼

동원 F&B에서 제조한 포도 54.7%(국산27.4%, 미국산27.3%), 정백당, 물엿, 함수결정포도당, 이소말토올리고당, 펙틴, 로커스트콩검, 구연산으로 구성된 제품(61brix)을 사용하였다.

## 제 2 절 방법

### 1. 젖산균의 분리 및 수집

각 목장별 원유를 수거하여 사용하였으며, peptone 희석액으로 총미생물이  $10^6 \sim 10^7$  cfu/ml 수준으로 희석하여  $\text{NaN}_3$ 를 첨가한 개선된 MRS배지(Table 1)에 0.1ml씩 평면도말법으로 접종한 후 37°C에서 48시간 배양하고 각 균락을 개선된 MRS배지에서 순수분리한 다음 노란색으로 변한 균락을 잠정적 젖산균으로 선발하였다. 선발된 균주는 개선된 MRS배지에 3회 백금이로 도말한 후 호기배양하여 순수분리 하였고 여기서 얻어진 colony는 tryptic soy agar slant에 37°C에서 18시간 배양한 다음 보관하였다.

Table 1. Composition of Modified MRS agar

Component	gram/liter
Proteose Peptone #3	10.0
Beef Extract	10.0
Yeast Extract	5.0
Lactose	20.0
Tween 80	1.0
Ammonium Citrate	2.0
Sodium Acetate	5.0
Magnesium Sulfate	0.1
Manganese Sulfate	0.05
Dipotassium Phosphate	2.0
Sodium Azide	0.25
Bromocresol purple	0.04
Agar	15.0

### 2. Protease activity 측정

#### 가. 시료의 전처리

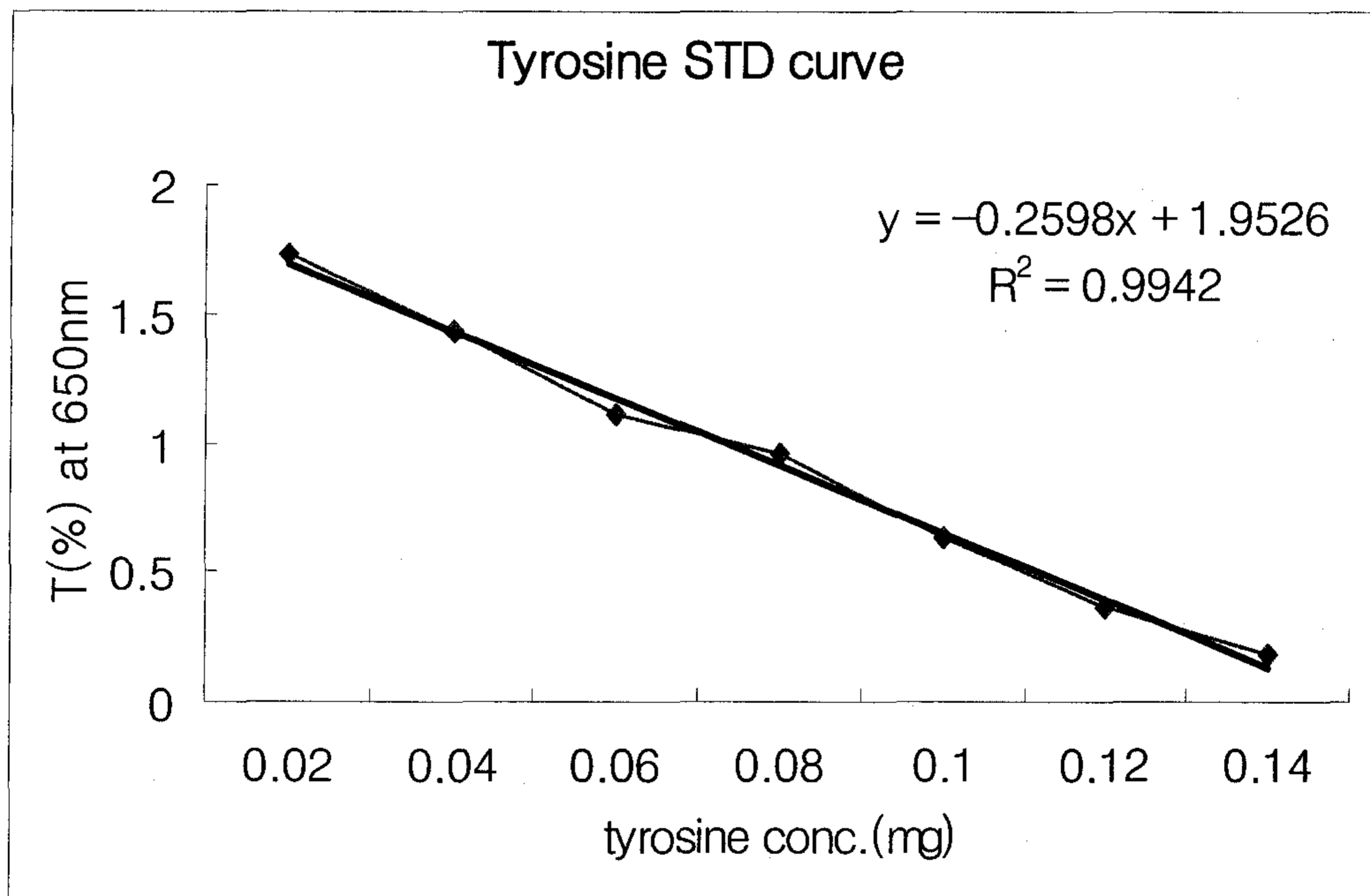
10% 환원탈지분유를 65°C에서 30분간 살균하여 단백질 분해력 측정배지로 사용한다. MRS 액체배지에서 18시간 배양된 각 균주를 1% 접종하고 37°C에서 16시간 배양하면서 Hull(1947)의 방법에 따라 시료 5ml를 취하여 0.72N trichloroacetic acid 10ml과 섞어 흔든 후 10분간 정치한 다음 whatman No. 42 여과지에 여과된

시료를 다시 5ml 취하여 sodium carbonate-sodium tetraphosphate solution 10ml 와 잘 섞었다. phenol reagent 3ml를 다시 섞어서 5분동안 잘 흔들어 청색 발색시킨 후 spectrophotometer를 이용하여 650nm에서 측정 한 값을 미리 만들어진 tyrosine standard 의 값으로 환산하여 값을 구하였다.

나. Tyrosine standard solution

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
tyrosine	500	1000	1500	2000	2500	3000	3500	4000	4500	5000
TCA	4500	4000	3500	3000	2500	2000	1500	1000	500	0

Tyrosine standard solution은 tyrosine을 농도를 달리하여 총 volume 5ml 되도록 TCA로 맞추었다. spectrophotometer를 이용하여 650nm에서 흡광도를 측정하여 이 값으로 표준곡선을 그리고 시료의 흡광도를 대입하여 tyrosine 농도를 구하였다.



### 3. ACE 억제 활성 측정

#### 가. Whey fraction 조제

발효유 중 우유의 ACE 억제활성을 측정하기 위하여 10% skim milk에 젖산균 1% 접종하여 배양해서 얻어진 커드를 6,000 rpm에서 10분간 원심분리한 다음 상층액을 whey fraction으로 사용하였다.

#### 나. ACE 억제활성 측정법

Cushman과 Cheung(1971)의 방법에 준하여 실시하였다. NaCl을 0.3M 함유한 0.1M sodium borate buffer(pH8.3)에 기질 Hip-His-Leu 2.5mM을 녹인액 50 $\mu$ l, ACE 50 $\mu$ l와 whey fraction 50 $\mu$ l를 혼합하였으며, 대조구는 whey fraction 대신 증류수 50 $\mu$ l를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시키고 1N HCl 250 $\mu$ l 첨가로 반응을 중지시켰다. 다시 여기에 ethylacetate 1.5ml를 가하여 15초간 교반한 후 3,000 rpm에서 5분간 원심분리시켜 상층액 1ml을 취하였다. 이 상층액을 121 $^{\circ}$ C에서 30분간 가열하여 완전히 건조시킨 뒤 증류수 3ml를 가하여 용해시킨 다음 228nm에서 흡광도를 측정하여 ACE 저해율을 구하였다.

$$\text{저해율(\%)} = 1 - \frac{(S - S.C)}{(C - C.C)} \times 100$$

S : 시료의 흡광도

S.C : 시료 대조구의 흡광도

C : blank의 흡광도

C.C : blank의 대조구 흡광도

### 4. ACE 억제 활성 균주의 동정

분리선발된 젖산균주는 MRS 액체배지에서 2회이상 계대배양하여 활력을 회복시킨 후 실험에 사용하였다. 젖산균의 동정은 Hammes 등(1992)의 방법에 의하여 실시하였다. 순수분리된 균주는 Gram염색, 포자생성, 호기적 및 혐기적 성장, catalase생성, 15 $^{\circ}$ C 및 45 $^{\circ}$ C에서의 성장, glucose로 부터 가스생성, arginine으로 부터 ammonia 생성, 현미경관찰과 API 50CHL kit와 API 20 STREP kit(API

bioMerieux, France)를 이용하여 당 발효 시험을 실시한 결과를 ATB identification system(bioMerieux, France)에 입력하여 젖산균의 genus와 species 를 결정하였다.

## 5. 선발 젖산균의 특성조사

### 가. 젖산균의 생장

젖산균의 생장은 생균수, pH를 측정하여 시험하였다. 생균수는 10% 탈지분유 150ml에 젖산균을 1ml용 피펫 1drop 접종한 후 34, 37, 40℃에서 3시간 간격으로 24시간까지 배양한 각 시료를 0.1% peptone용액에 희석하여 BCP plate count agar 평판에서 부어 굳힌 후 35℃에서 48시간 배양하여 계수하였고, 온도 및 시간 별로 pH 변화를 측정하였다. 이때 pH는 pH meter(Mettler model 345, England)로 측정하였다.

### 나. 항생제 내성 시험

항생제 내성 시험은 MRS액체배지에 각 균주를 접종하여 30℃에서 18시간 배양한 후 0.1% peptone용액에 적정농도로 희석하였다. 각 항생제가 각 농도별로 포함된 tryptic soy 액체배지에  $10^5 \sim 10^6$  cfu/ml 수준으로 접종하여 30℃에서 48시간 배양한 후 육안으로 관찰하여 생장여부를 결정하였다. 항생제 내성측정은 2배 희석방법을 사용하였으며, 억제된 가장 낮은 농도를 MIC(Minimal inhibitory concentration) 값으로 결정하였다. 항생제는 Sigma Chemical Co.(USA)로 부터 구매하여 사용하였다. 항생제는 Amikacin, Gentamicin, Kanamycin, Neomycin, Streptomycin, Penicillin-G, Methicillin, Oxacillin, Ampicillin, Bacitracin, Rifampicin, Novobiocin, Lincomycin, Polymyxin B 및 Chloramphenicol를 시험에 사용하였다.

### 라. 효소활성 시험

MRS 액체배지에서 30℃, 18시간동안 배양한 균주를 생리식염수로 희석하여  $10^5 \sim 10^6$  cfu/ml 수준의 시료를 조제한 후 API ZYM kit(API bioMerieux, France)를 이용하여 30℃에서 5시간 배양한 다음 효소반응 시켰다. 효소활성은 표준색상표를 비교하여 0 ~ 5의 수치로 표시하였으며, 대조구 이외의alkaline

phosphatase, esterase(C4), esterase lipase(C8), lipase(C14), leucine arylamidase, valine arylamidase, cystine arylamidase, trypsin, chymotrypsin, acid phosphatase, naphthol-AS-BI-phosphohydrolase,  $\alpha$ -galactosidase,  $\beta$ -galactosidase,  $\beta$ -glucuronidase,  $\alpha$ -glucosidase,  $\beta$ -glucosidase, N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase,  $\alpha$ -mannosidase,  $\beta$ -fucosidase 효소의 활성을 측정하였다.

#### 마. 내담즙성 실험

Gilliland와 Walker(1990)의 방법에 따라 0.05% cysteine이 함유된 MRS액체 배지에 0.3% oxgall을 첨가한 후 liquid paraffin을 증층한 다음 MRS액체배지에서 37°C, 18시간 배양된 각각의 균주를 1%접종하여 37°C의 water bath에서 배양하면서 시간별로 OD<sub>620</sub>값을 측정하였다.

#### 바. pH 내성 실험

Clark 등(1993)의 방법에 따라 37% HCl을 증류수에 섞어 pH 1,2,3용액과 대조구로서 pH 6.4용액을 제조하였고, 제조된 pH용액 10ml에 0.05% cysteine이 함유된 MRS액체배지에서 37°C, 24시간 배양된 각각의 균주를 1ml씩을 섞은 후 37°C에서 배양하면서 0, 1, 2, 3시간 후의 생균수를 37°C, 48시간 혐기 배양한 다음 계수하였다.

#### 사. 항균력 실험

Gilliland와 Speck(1977)의 방법에 따라 항균력 측정에 사용한 지시균인 *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* 및 *Staphylococcus aureus*는 한국식품연구원으로부터 분양받았으며, 지시균의 증식배지로서 *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*는 nutriunt 액체배지에서 호기적으로 37°C, 24시간 배양하였다. 혼합배양 및 대조군에 사용된 배지는 MRS 액체배지로서 젖산균과 지시균을 각각 접종하여 37°C에서 24시간 배양하였다. 선택배지로서 *Escherichia coli*는 EMB agar, *Salmonella typhimurium*은 Bismuth sulfite agar, *Staphylococcus aureus*는 Baird parker agar를 사용하여 37°C에서 6시간 배양하였다. 젖산균에 의한 지시균의 억제율은 다음의 식으로 구하였다.



$$\% \text{ Inhibition} = \frac{(\text{대조군의 균수 CFU/ml}) - (\text{혼합배양 후의 균수 CFU/ml})}{(\text{대조군의 균수 CFU/ml})}$$

## 5. 제품분석

### 가. 수분

칭량관에 정제해사 15g과 작은 유리봉을 넣고, 105±1℃ 의 건조기(Circulation air cool strilize oven, Seoul Scientific Co., Korea)에서 항량이 될 때 까지 건조한 다음 데시케이터에 방냉하여 무게를 잰 후 시료 약 4g을 정확히 달아 앞의 칭량관에 넣고 수욕조상에서 내용물을 때때로 저어 섞으면서 가열하였다. 대부분의 수분을 증발시킨 후 앞의 건조기에 옮겨 3시간 건조시킨 후 칭량관을 꺼내어 데시케이터에 30분간 방냉하고 무게를 재었다. 이 조작을 여러번 반복하고 반복간의 무게 차이가 ±1mg이하가 될 때를 최종무게로 하였다.

$$\text{시료 중 수분(\%)} = (W_1 - W_0)/W \times 100$$

W : 시료의 사용량(g)

W<sub>0</sub> : 칭량관의 무게(g)

W<sub>1</sub> : 건조 후 시료가 들어 있는 칭량관의 무게(g)

### 나. 단백질

시료 0.5-1g을 정확히 달아서 분해촉매제(Kjeltabs auto, Tecator, Sweden) 2 tablets(1 tablet:1.5g K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 7.5mg Se), 진한황산 12ml와 함께 분해플라스크에 넣고 단백질 분해장치(Digestion system 20 1015 digester, Tecator, Sweden)에서 약 350℃로 가열하였다. 분해플라스크의 내용액이 투명해지면 실온으로 냉각하고 증류수 75ml로 희석한 후 증류적정장치(Kjeltec Auto 1030 Analyzer, Tecator, Sweden)를 사용하여 0.1N HCl 적정량을 구한 다음 다음과 같은 계산식으로 단백질 함량을 구하였다.

$$\text{시료중 단백질 함량(\%)} = \frac{0.1 \times \text{ml HCl} \times f \times 14.007 \times 6.25}{\text{mg 시료} \times 100}$$

f : 0.1N HCl의 보정계수

#### 다. 유지방

국제표준방법(IDF 50B : 1986)에 의해 조지방을 분석하였다. 시료를 약 1 ~ 2g을 비이커에 정량한 후 8 ~ 10ml HCl을 첨가한 다음 시료용액이 까맣게 태우지 않도록 주의하면서 모든 입자가 완전히 용해될 때까지 열판 위에서 서서히 가열하였다. 완전히 용해된 시료용액을 냉각하여 분액깔대기에 옮긴 다음 EtOH 10ml을 첨가하여 혼합한 후 여기에 Diethyl ether 25ml, Light petroleum 25ml로 연속하여 세척하였다. 용매를 가한 후 분해플라스크에 마개를 막고 1분간 격렬하게 흔들어준 다음 30분정도 정치하여 상층액을 무게를 알고 있는 지방수기에 모았고 나머지 용액을 분액깔때기에 모은 다음 Ether와 Light petroleum를 각각 15ml 첨가하여 2차, 3차 추출하였다. 여기에서 얻은 상층액을 같은 지방수기에 모은 후 용매를 evaporator에서 증발시킨 다음 지방수기를 dry oven에서 1시간 정도 건조한 후 데시케이터에서 실온으로 방냉한 후 무게를 측정하였다. 측정무게의 차이가  $\pm 1\text{mg}$ 이하가 될 때까지 이 조작을 반복하여 최종무게로 하였다.

$$\text{시료 중 지방(\%)} = (W_1 - W_0) / W \times 100$$

W : 시료의 중량(g)

W<sub>1</sub> : 건조 후 지방수기의 중량(g)

W<sub>0</sub> : 수기중량(g)

#### 라. 회분

시료를 약 1-2g을 정량하여 무게를 알고 있는 자제도가니아에 취하고 전기로(Muffle furnace, Blue-M, U.S.A)에 넣고 온도를 350℃까지 서서히 올리고 연기가 더 이상 나지 않으면 다시 550℃까지 온도를 올려서 약 3시간 동안 회화시켰다. 회화가 끝난 후 자제도가니를 데시케이터에 넣어 실온으로 방냉한 다음 무게를 측정하였다. 이 조작을 여러 번 반복하고 반복간의 무게의 차이가  $\pm 1\text{mg}$ 이하가 될 때를 최종무게로 하였다.

$$\text{시료 중 조회분(\%)} = (W_1 - W_0) / W \times 100$$

W<sub>1</sub> : 회화 전의 자제도가니의 무게(g)

W<sub>0</sub> : 회화 후의 자제도가니 무게(g)

W : 시료의 사용량(g)

마. 적정산도

시료를 철저히 혼합한 다음, 37±1℃로 가온한 뒤 시료 9g에 증류수 18ml를 가하여 희석하고 1% 페놀프탈레인 용액 0.5ml를 첨가한 다음 0.1N NaOH용액으로 30초간 분홍색이 지속될 때 까지 적정하였다.

0.1N NaOH용액 1ml= 0.009g 젖산

$$\text{적정산도(젖산\%)} = \frac{0.1N \text{ NaOH 적정량(ml)} \times 0.009}{\text{시료량(g)}} \times 100$$

바. 젖산균수

시료 11g을 무균적으로 채취하여 99ml 펩톤용액에 넣어 7초동안 30cm간격으로 25회 세계 흔들어 준 후 십진법으로 희석하고 BCP(Brom cresol purple) 평판 측정용 배지에 희석시료를 넣어 35℃에서 48시간 배양한 다음 발생한 황색의 집락을 유산균의 집락으로 계측하였다.

사. 총아미노산 분석

Cheese의 아미노산분석은 White 등(1986)의 PICO-TAG method에 따라 다음과 같이 HPLC를 이용하여 분석한다.

1) 시료의 산가수분해 및 전처리

유리관(25x150mm)에 40mg의 단백질함량이 되도록 시료를 취하고 6N HCl 15ml를 첨가한 후 30초간 질소가스로 치환하고 즉시 마개를 닫아 110℃의 오븐에서 24시간 가수분해시키고 냉각한 다음 시료 1ml를 취하여 0.45µm syringe filter로 여과하여 아미노산 분석용 시료로 사용한다.

2) 시료의 유도체화

유리관(6x50mm)에 여과된 시료 50µl를 취하여 관 밑바닥에 조심스럽게 담고 workstation에서 gauge torr가 50-60mm torr가 될 때까지 건조시킨 다음, methanol 200µl, H<sub>2</sub>O 200µl, trimethylamine 100µl을 혼합한 용액을 30µl씩 가하고 vortex하여 workstation에서 50mm torr가 되도록 재건조한 다음 유도체시약(methanol 350µl, H<sub>2</sub>O 50µl, trimethylamine 50 µl, phenyl-isothiocyanate(PITC)50 µl의 혼합액) 30µl를 첨가하고 vortex한 후 상온에서 10-20분간 정치하였다가 workstation에서 다시 건조한 다음 methanol 30µl를 첨가하여 vortex한 후 재차

건조시킨다. 건조된 시료에 PICO-TAG sample diluent 200 $\mu$ l를 첨가하여 교반하고 10 $\mu$ l를 취하여 HPLC에 분석용으로 주입한다.

### 3) 아미노산 표준용액

16종의 아미노산(2.5 $\mu$ mol/ml)과 cysteine(1.25 $\mu$ mol/ml)이 함유되어 있는 표준용액을 0.1N HCl용액으로 10배 희석하여 20분간 초음파처리하고 0.45 $\mu$ m syringe filter로 여과하여 10 $\mu$ l를 HPLC에 주입한다.

### 4) 이동상

이동상으로 사용한 eluent A는 0.14M sodium acetate trihydrate와 0.05% TEA(triethyl amine)에 HPLC용 증류수를 가하여 1L로 정용한 다음 H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>로 pH6.4로 조정한 후 여과하였다. 분석이 끝나고 다른 시료를 주입하기 전의 세척용 eluent B는 60% acetonitrile을 사용한다.

### 5) 분석

분석시 칼럼의 온도는 40 $^{\circ}$ C로 조정하였으며, attenuation 128, chart speed 1.0이었고, 주입한 시료량은 10 $\mu$ l였다. 분석에 사용한 기기는 Table 2와 같다.

Table 2. Instruments used for amino acid analysis

---

Waters Pico-Tag column (3.9 x 150mm,  $\phi$  4 $\mu$ m)

Jasco PU-980 Pump x 2

Jasco HG-980-30 High pressure gradient module

Jasco 851-AS Autosampler

Jasco UV-975 UV/Vis Detector(254nm)

Jasco 807-IT Intergrator

---

### 사. 관능검사

제품의 관능검사는 한국식품연구원내의 연구원들로 실시하였으며, 제품의 색, 맛, 조직감, 종합적기호도 및 구입의사를 9점 기호척도법으로 실시하여 그 결과를 통계처리에 의한 유의성 검정을 하였다.

# 관 능 검 사

날짜 :    년    월    일

성명 :

본 시료는 발효유의 관능평가입니다.

본 시료를 시식하신 후 9점 만점으로 아래의 평가기준에 따라 다음 항목에 대하여 평가하여 주시기 바랍니다.

----- 채점기준 -----

## 관능평가기준

9점:극도로 좋다. 8점:대단히 좋다. 7점:보통으로 좋다. 6점:약간 좋다.

5점:좋지도 싫지도 않다. 4점:약간 싫다. 3점:보통으로 싫다. 2점:대단히 싫다.

1점:극도로 싫다.

시료번호	색	맛	조직감	종합적기호도	구입의사

## 6. 발효유에서의 항고혈압 peptide 분리

### 가. Peptide의 함량 및 분자량 측정

Peptide의 함량은 Superdex peptide column을 장착한 AKTA explorer 100(pharmacia Biotech)을 이용하여 면적비로 계산하였다. peptide 표준품으로는 Angiotensin II(Sar-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe, MW 1002.2)를 사용하였다(Fig. 2). peptide의 분자량도 Superdex peptide column으로 측정하였으며, 이때 사용한 peptide 표준품으로는 Cytochrome C(M.W. 12,500), Aprotinin(M.W. 6,500), ACTH(M.W. 2,934), Substance P(M.W. 1,348), Angiotensin II(M.W. 1,002) 그리고 Glycyl-L-Leucine(M.W. 188)을 사용하였다(Fig. 3).

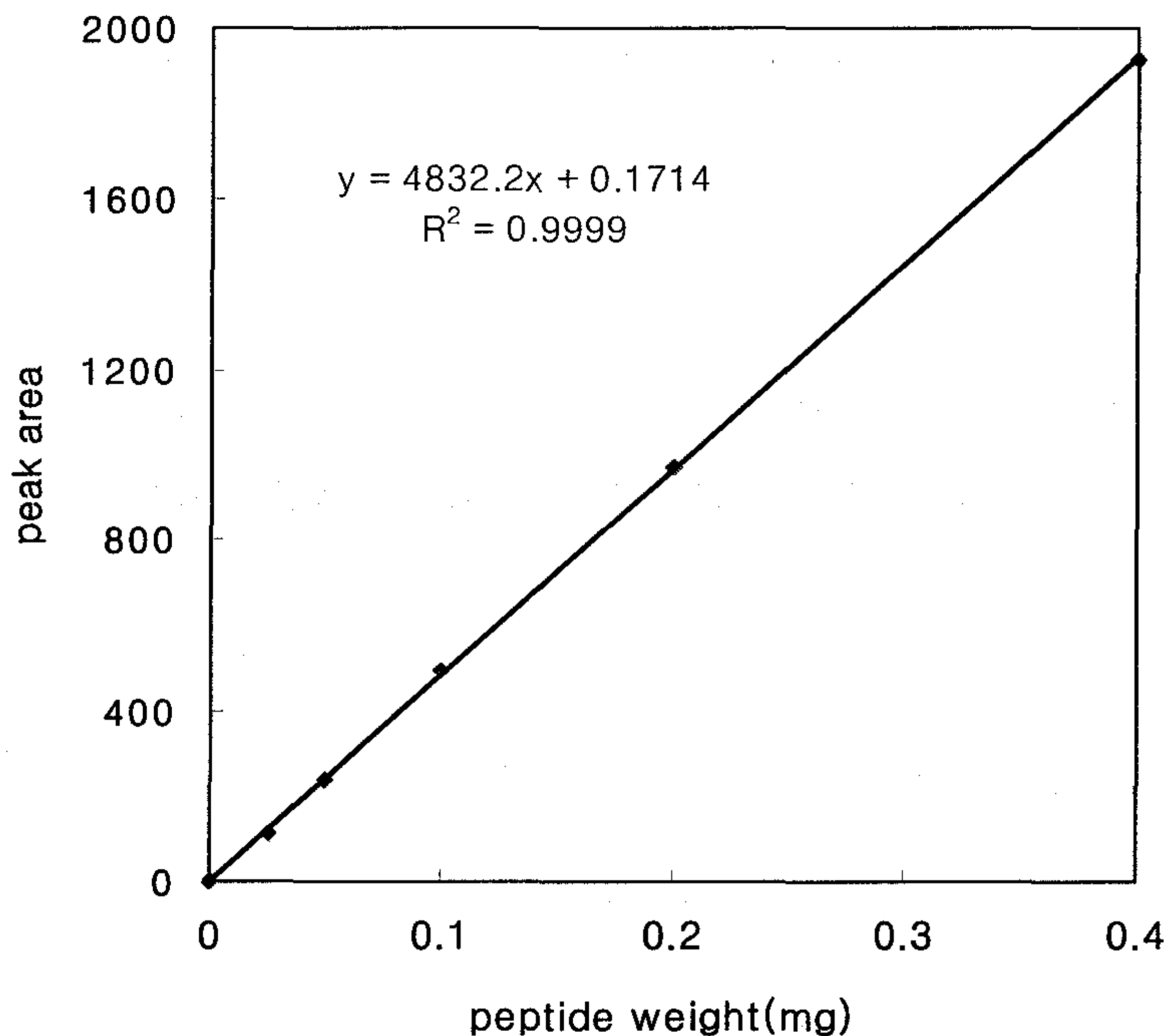


Fig. 2. Standard curve for peptide contents by HPLC.

Standard peptide used was Angiotensin II

(Sar-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe, MW 1002.2)

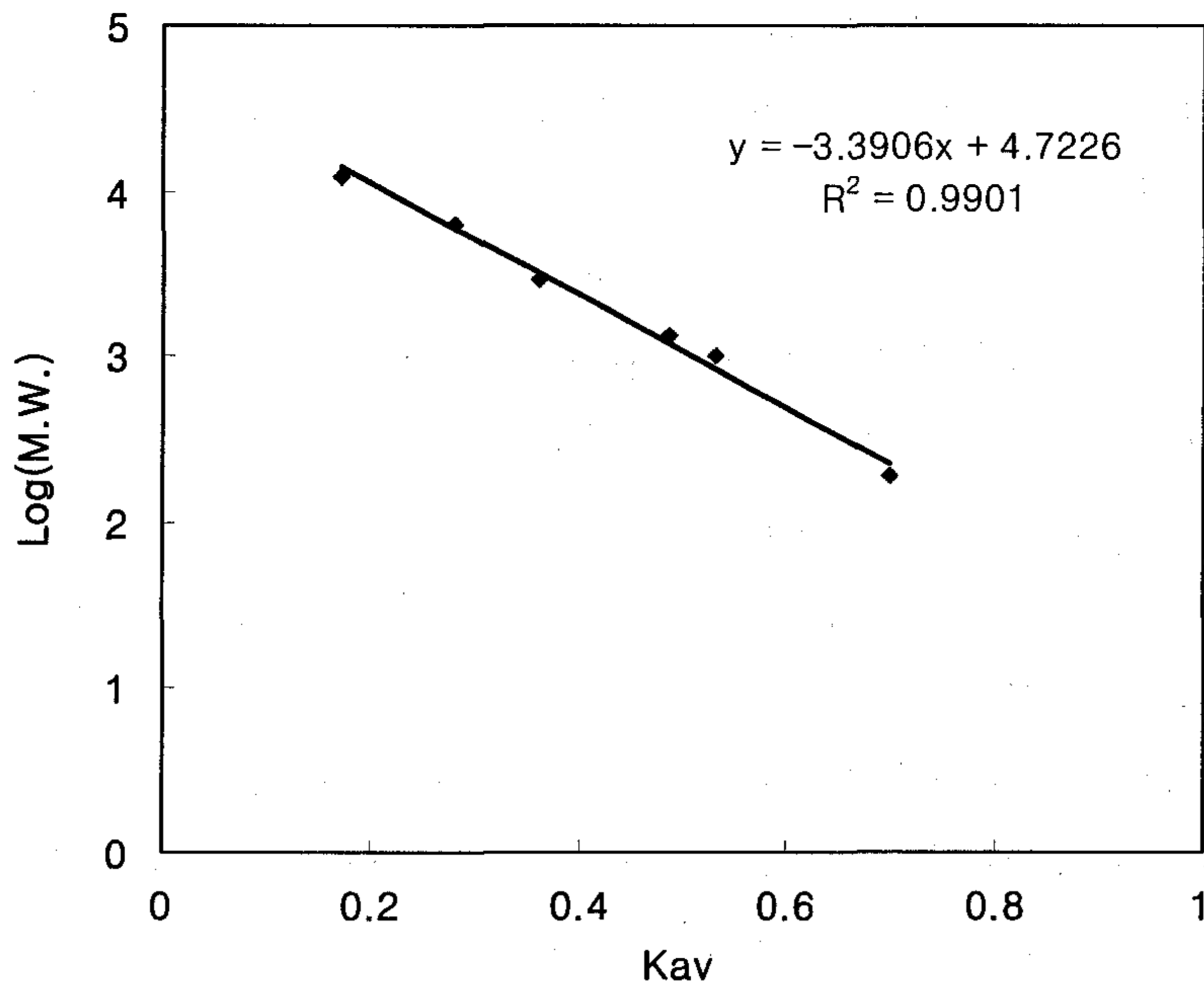


Fig. 3. Standard curve for peptide molecular weight.

Standard peptides used were Cytochrome C(M.W. 12,500), Aprotinin(M.W. 6,500), ACTH(M.W. 2,934), Substance P(M.W. 1,348), Angiotensin II(M.W. 1,002) and Glycyl-L-Leucine(M.W. 188)

#### 나. Peptide의 분리 정제

##### 1) 한외여과(Ultrafiltration)

발효유를 cut-off 10,000 dalton의 membrane(YM10, Amicon Co.)을 장착한 한외여과장치(Amicon Co)로 10,000 dalton이상의 획분과 10,000 dalton이하의 획분으로 분리하고 감압농축 후 진공동결 건조하여 발효유 peptide를 제조하였다.

##### 2) Sephadex G-25 column에 의한 gel permeation chromatography

Ultrafiltration에 의해 분리한 발효유 peptide를 Sephadex G-25를 충전한 column(50 x 950mm, Vt : 1,865ml)으로 분리 정제하였다. 이때 용출액은 0.1M trifluoroacetic acid(TFA), 유속은 2.2 ml/min로 용출시켜 20ml씩 분취 하였으며, 280 nm에서 흡광도를 측정하고, 각 peak를 모아 감압농축한 후 진공동결건조하였다.

##### 3) ODS AQ column에 의한 reverse-phase chromatography

Sephadex G-25 column으로 분획한 peptide를 ODS AQ를 충전한 column(26 x

300mm, Vt : 160ml)으로 분리 정제하였다. 이때 용출액은 HPLC용 water를 A용매, HPLC용 ethanol을 B용매로하여 gradient조건에서 분리하였다. 유속은 1 ml/min로 용출시켜 10ml씩 분취 하였으며, 215nm, 280nm에서 detection하고, 각 peak를 모아 감압 농축한 후 진공 동결 건조하였다.

#### 4) Vydac C18 column에 의한 reverse-phase chromatography

ODS AQ column으로 분획한 peptide를 Vydac column(10 x 250mm, Vt : 19.6ml)으로 분리정제하였다. 이때 용출액은 0.1%TFA in water를 A용매, 0.1% TFA in acetonitrile(ACN)을 B용매로 하여 gradient 조건에서 분리하였다. 유속은 2 ml/min로 용출시켜 2ml씩 분취 하였으며, 215nm, 280nm에서 detection하고, 각 peak를 모아 감압 농축한 후 진공 동결 건조하였다.

#### 5) Superdex peptide column에 의한 gel permeation chromatography

Vydac C18 column으로 분획한 peptide를 Superdex peptide column(10 x 30mm, Vt : 24ml)을 이용하여 분리정제하였다. 이때 용출액은 HPLC용 water, 유속은 0.5 ml/min로 용출시켜 1ml씩 분취 하였으며, 215nm, 280nm에서 detection하고, 각 peak를 모아 감압 농축한 후 진공 동결건조하였다.

#### 다. 아미노산 배열(amino acid sequence)의 분석

발효유에서 분리한 peptide의 아미노산 배열 분석은 Procise™(Perkin Elmer, protein sequencing system, Foster, C.A., USA)을 이용하였다. 분석시 Bio-Brene액을 처리하여 standard를 측정하는 다음, 시료 20 $\mu$ l를 사용하여 분석하였다.

## 7. 동물실험

### 가. 시료 조제 및 투여량 선정

본 실험에 사용한 ACE 억제활성균주를 이용한 발효유의 항고혈압 증진 효과를 알아보기 위하여 수컷 SHR 랫트 30두를 대상으로 하여 *Lactobacillus zeae* K354 균주만 이용 발효유를 투입한 그룹 A, *Lactobacillus zeae* K354 균주 이용 발효유와 *Enterococcus faecalis* B46 균주이용 발효유(90 $^{\circ}$ C, 30min 열처리)를 5 : 5 비율로 혼합한 발효유를 투입한 그룹 B와 남양유업의 항고혈압 발효유(프로젝트 102-80)를 투입한 그룹 C를 설정하여 이 제제의 임상적용 경로인 경구투여 방법을 선택하여 각각의 발효유를 각각 5ml/kg/day씩 위내로 직접 투여하였다.



대조군은 생리식염수를 두었다. 시료 용량은 시판되고 있는 드링크 발효유 150ml 2개 용량/성인 체중 60kg을 1일 기준으로 결정하였다.

#### 나. 실험동물 및 설계

실험에 사용된 동물은 중앙실험동물에서 생후 8주령 평균체중 250g인 SHR (SLC사, 일본) 수컷 랫트 30마리를 사용하였다. 1주간 순화사육 기간을 거쳐 사육 기간 중 일반 증상을 관찰하여 증상이 없고 체중감소가 없는 건강한 동물을 28두를 골라 임의로 7마리씩 4군으로 나누어 총 7주 동안 유산균 발효유를 포함한 실험 식이를 급여하여 사육하였다. 검역, 순화, 사육기간 및 시험기간 중 동물은 온도  $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ , 상대습도  $50\pm 5\%$ , 환기횟수 10-12회/hr, 조명시간은 오전 7시부터 오후 7시까지, 조도는 150-200Lux로 조정하여 사육하였다.

#### 다. 관찰 및 검사 항목

##### 1) 일반증상 관찰

시험 기간 중에 매일 오전 10~11시 사이에 1회 실시한다. 관찰방법은 일반 임상증상의 여부 (anorexia, salivation, diarrhea, polyuria, vomiting, anuria, fecal change 등)에 따라 그 정도등을 기록하였다.

##### 2) 체중 측정

모든 동물에 대하여 투여개시 전, 투여개시 후, 시험종료 시까지 매주 1회 측정하였다.

##### 3) 사료 섭취량 측정

사육 상자별로 당일 급여 및 급수 총량과 익일 잔량을 투여개시 후 4주간 매주 1회 측정하여 사료 섭취량을 군별로 1일 소비량을 표시하였다.

##### 4) 장기중량 및 크기측정

시험기간 중 폐사한 동물이나 시험 종료 후 모든 생존동물에 대하여 ether 마취 후 채혈하고 안락사 시킨 다음 육안적으로 모든 장기를 검사하였다. 모든 시험동물은 비장과 흉선을 포함하여 간장, 신장(좌우), 폐장, 심장, 고환(수컷:좌우) 등의 절대 장기 중량 및 체중에 대한 상대 장기 중량을 측정하였다.

##### 5) 혈압측정

랫트의 수축기압은 tail cuff blood pressure meter(INDIR, Model LE5002,

Spain)로 측정하였으며, 측정 전에 렫트의 꼬리동맥의 맥박을 감지하기 위하여 32°C에서 30분간 유지하였다.

#### 라. 조사항목과 분석방법

체중과 식이섭취량은 7일 간격으로 조사하고, 장기무게는 실험종료일 전 12시간 절식시킨 다음 ethyl ether로 마취시켜 실험동물을 희생시켜서 장기를 적출하여 여과지로 닦아내고 칭량하였다. 혈중지질(TC, TG, HDL, LDL 콜레스테롤)은 녹십자분석실에 의뢰하여 분석하였다.

실험결과는 SAS package를 이용하여 실험군당 평균±표준편차로 표시하고, 실험군간 평균치의 통계적 유의성은 Duncan's multiple range test에 의해  $p < 0.05$  수준에서 검정하였다.

## 제 3 절 연구결과 및 고찰

### 1. 젖산균 분리 및 수집

서울우유 중부지도소 관할 원유검사소에서 지원받아 경기도, 경상도, 전라도, 제주도 소재 목장에서 원유를 채취하여 MRS배지에 Bromcresol purple과 sodium azide를 첨가한 plate에 smear한 후 37°C에서 48시간 배양한 다음 노란색 colony 중 각기 다른 모양의 colony를 선발하였고 순수분리를 위해 MRS agar에 streaking하여 얻어진 colony를 tryptic soy agar slant에 37°C에서 18시간 배양한 다음 보관하였다. 이때 1505개의 균주를 분리하였다.

### 2. ACE 억제활성 균주 선발

가. 발효유에 적합하기 위해서는 skim milk를 응고시킬 수 있는 산 생성 능력이 있어야 하므로 10% 환원탈지분유에 분리균주를 접종한 후 37°C에서 24시간과 48시간 배양하여 응고된 균주가 각각 512개 균주와 1037개 균주이었다(표 3).

나. 10% 환원탈지분유에 24시간 내에 응고시킨 분리균주를 1% 접종한 후 37°C에서 16시간 배양한 다음 pH와 단백질 분해력 측정을 위해 Tyrosine 농도를 측정 한 결과는 다음 표 3~8과 같다.

표 3. 경기도 중부지역에서 분리한 균주의 탈지유 응고여부와 배양후의 pH 및 단백질 분해력

sample	skim milk 응고 반응		pH	tyrosine conc.(mg)		sample	skim milk 응고 반응		pH	tyrosine conc.(mg)	
	24hr	48hr		0 hr	16 hr		24hr	48hr		0 hr	16 hr
A-1		+				A-41	+	+	4.72	0.63	0.54
A-2		+				A-42		+			
A-3		+				A-43		+			
A-4	+	+	4.81	0.59	0.53	A-44	+	+	5.81	0.57	0.82
A-5		+				A-45		+			
A-6		+				A-46	+	+	5.66	0.59	0.56
A-7		+				A-47		+			
A-8		+				A-48		+			
A-9		+				A-49		+			
A-10	+	+	4.92	0.59	4.55	A-50		+			
A-11						A-51	+	+	5.06	0.56	3.59
A-12		+				A-52	+	+	5.15	0.59	0.51
A-13	+	+	4.79	0.75	3.74	A-53		+			
A-14		+				A-54	+	+	5.01	0.57	0.58
A-15						A-55	+	+	5.05	0.60	3.13
A-16	+	+	4.80	0.74	2.17	A-56	+	+	4.85	0.66	4.15
A-17						A-57	+	+	5.48	0.59	0.97
A-18						A-58	+	+	4.62	0.69	3.60
A-19						A-59		+			
A-20						A-60		+			
A-21						A-61	+	+	4.85	0.71	4.29
A-22						A-62	+	+	4.96	0.74	0.82
A-23						A-63	+	+	5.62	0.66	0.71
A-24						A-64	+	+	5.08	0.56	1.12
A-25						A-65	+	+	4.59	0.53	0.80
A-26						A-66	+	+	5.72	0.48	0.77
A-27	+	+	5.48	0.62	0.87	A-67	+	+	5.02	0.50	4.49
A-28	+	+				A-68		+			
A-29	+	+	4.99	0.52	1.61	A-69		+			
A-30		+				A-70	+	+	4.99	0.57	6.20
A-31	+	+	4.99	0.72	0.37	A-71	+	+	4.82	0.44	6.53
A-32	+	+	6.19	0.52	3.02	A-72	+	+	6.23	0.52	1.22
A-33	+	+	5.69	0.78	1.67	A-73		+			
A-34		+				A-74	+	+	5.75	0.54	1.06
A-35						A-75		+			
A-36		+				A-76		+			
A-37		+				A-77					
A-38	+	+	5.52	0.46	1.06	A-78	+	+	5.34	0.61	1.07
A-39	+	+	4.91	0.60	7.36	A-79	+	+	5.93	0.57	1.51
A-40	+	+	4.89	0.63	5.29	A-80	+	+	5.05	0.71	3.79

sample	skim milk 응고 반응		pH	tyrosine conc.(mg)		sample	skim milk 응고 반응		pH	tyrosine conc.(mg)	
	24hr	48hr		0 hr	16 hr		24hr	48hr		0 hr	16 hr
A-81	+	+	6.11	0.60	1.44	A-121		+			
A-82	+	+	6.25	0.58	0.95	A-122		+			
A-83						A-123	+	+	5.94	0.45	0.73
A-84	+	+	6.01	0.66	1.15	A-124	+	+	4.80	0.49	0.56
A-85	+	+	5.90	0.55	2.47	A-125					
A-86	+	+	5.85	0.54	0.75	A-126	+	+	5.16	0.55	1.88
A-87	+	+	5.14	0.48	3.41	A-127	+	+	4.87	0.28	0.32
A-88		+				A-128					
A-89	+	+	5.01	0.36	3.41	A-129		+			
A-90	+	+	5.08	0.76	4.89	A-130		+			
A-91	+	+	5.43	0.58	0.85	A-131	+	+	5.03	0.56	1.61
A-92	+	+	5.25	0.61	4.44	A-132					
A-93						A-133					
A-94		+				A-134					
A-95						A-135	+	+	5.84	0.43	3.06
A-96		+				A-136					
A-97		+				A-137		+			
A-98		+				A-138	+	+	5.00	0.56	2.60
A-99						A-139	+	+	6.06	0.58	0.41
A-100						A-140					
A-101						A-141		+			
A-102						A-142		+			
A-103		+				A-143		+			
A-104	+	+	5.87	0.58	1.41	A-144		+			
A-105		+				A-145	+	+	4.51	0.45	0.58
A-106	+	+	5.81	0.53	1.28	A-146	+	+	4.47	0.45	0.52
A-107		+				A-147					
A-108						A-148	+	+	5.58	0.58	1.32
A-109						A-149	+	+	4.78	0.40	2.15
A-110						A-150	+	+	5.68	0.44	1.14
A-111	+	+	4.98	0.42	8.37	A-151	+	+	5.55	0.42	2.32
A-112		+				A-152					
A-113						A-153	+	+	4.96	0.31	0.63
A-114						A-154	+	+	5.12	0.39	0.65
A-115	+	+	5.84	0.61	0.98	A-155	+	+	4.96	0.43	0.51
A-116		+				A-156	+	+	4.87	1.19	6.36
A-117	+	+	5.52	0.45	1.42	A-157	+	+	4.90	0.59	3.96
A-118	+	+	5.71	0.43	0.86	A-158					
A-119		+				A-159					
A-120		+				A-160		+			

sample	skim milk 응고 반응		pH	tyrosine conc.(mg)		sample	skim milk 응고 반응		pH	tyrosine conc.(mg)	
	24hr	48hr		0 hr	16hr		24hr	48hr		0 hr	16 hr
A-161	+	+	5.65	0.45	5.24	A-201		+			
A-162						A-202		+			
A-163	+	+	5.78	0.48	0.72	A-203		+			
A-164						A-204		+			
A-165						A-205	+	+	5.81	0.43	2.54
A-166	+	+	5.03	0.52	2.93	A-206					
A-167						A-207		+			
A-168						A-208					
A-169						A-209		+			
A-170						A-210		+			
A-171	+	+	4.69	0.47	1.66	A-211		+			
A-172						A-212					
A-173	+	+	4.59	0.96	1.48	A-213	+	+	6.00	0.39	0.52
A-174		+	5.51	0.39	0.50	A-214		+			
A-175	+	+	5.88	0.41	0.82	A-215		+			
A-176		+				A-216					
A-177		+				A-217		+			
A-178		+				A-218		+			
A-179	+	+	4.99	0.65	3.75	A-219	+	+	5.50	0.44	1.03
A-180						A-220		+			
A-181	+	+	4.89	0.53	3.17	A-221					
A-182	+	+	6.02	0.39	0.91	A-222		+			
A-183						A-223		+			
A-184	+	+	6.05	0.42	0.54	A-224		+			
A-185						A-225		+			
A-186	+	+	4.96	0.40	2.17	A-226	+	+	4.98	0.28	1.18
A-187	+	+	4.81	0.48	1.26	A-227		+			
A-188						A-228		+			
A-189						A-229	+	+	5.17	0.53	2.09
A-190		+				A-230	+	+	4.91	0.32	5.92
A-191						A-231	+	+	5.37	0.64	2.98
A-192		+				A-232	+	+	5.47	0.43	1.61
A-193						A-233		+			
A-194		+				A-234		+			
A-195		+				A-235		+			
A-196						A-236	+	+	5.12	0.58	2.48
A-197		+				A-237	+	+	5.58	0.64	0.98
A-198		+				A-238	+	+	5.02	0.50	6.84
A-199		+				A-239		+			
A-200		+				A-240	+	+	5.06	0.53	2.93

sample	skim milk 응고 반응		pH	tyrosine conc.(mg)		sample	skim milk 응고 반응		pH	tyrosine conc.(mg)	
	24hr	48hr		0 hr	16 hr		24hr	48hr		0 hr	16 hr
A-241						A-281					
A-242	+	+	5.58	0.34	0.52	A-282					
A-243	+	+	4.67	0.59	3.01	A-283					
A-244	+	+	5.15	0.49	2.57	A-284		+			
A-245						A-285	+	+	5.19	0.59	1.74
A-246		+				A-286		+			
A-247	+	+	4.64	0.49	1.22	A-287	+	+	4.82	0.57	7.69
A-248	+	+	5.32	0.38	1.96	A-288		+			
A-249						A-289		+			
A-250	+	+	5.92	0.10	2.14	A-290		+			
A-251		+				A-291	+	+	5.54	0.61	0.80
A-252	+	+	4.99	0.52	1.61	A-292	+	+	6.06	0.49	0.85
A-253	+	+	5.21	0.49	4.55	A-293		+			
A-254	+	+	5.61	0.53	0.57	A-294	+	+	6.23	0.31	0.67
A-255	+	+	5.51	0.64	0.68	A-295					
A-256	+	+	5.19	0.51	4.29	A-296		+			
A-257	+	+	4.79	0.70	3.34	A-297	+	+	6.28	0.43	0.55
A-258	+	+	5.11	0.44	4.19	A-298		+			
A-259		+				A-299	+	+	6.05	0.42	0.54
A-260		+				A-300	+	+	6.06	0.68	1.77
A-261	+	+	4.93	0.43	8.11	A-301		+			
A-262	+	+	4.84	0.50	11.36	A-302					
A-263	+	+	5.82	0.57	2.26	A-303		+			
A-264						A-304		+			
A-265		+				A-305		+			
A-266		+				A-306	+	+	5.04	0.43	3.01
A-267		+				A-307	+	+	6.35	0.47	0.58
A-268	+	+	5.20	0.65	0.50	A-308					
A-269		+				A-309		+			
A-270						A-310					
A-271		+				A-311	+	+	6.30	0.37	0.46
A-272	+	+	5.09	0.56	0.80	A-312		+			
A-273						A-313		+			
A-274						A-314					
A-275	+	+	5.71	0.49	0.42	A-315		+			
A-276						A-316	+	+	6.12	0.48	0.49
A-277	+	+	4.62	0.45	3.92	A-317					
A-278		+				A-318					
A-279						A-319	+	+	5.48	0.62	0.87
A-280	+	+	5.96	0.48	10.20	A-320					

sample	skim milk 응고 반응		pH	tyrosine conc.(mg)		sample	skim milk 응고 반응		pH	tyrosine conc.(mg)	
	24hr	48hr		0 hr	16 hr		24hr	48hr		0 hr	16 hr
A-321						A-361		+			
A-322	+	+	4.99	0.52	1.61	A-362	+	+	5.93	0.49	0.66
A-323		+				A-363	+	+	5.22	0.56	2.66
A-324						A-364		+			
A-325		+				A-365		+			
A-326		+				A-366					
A-327						A-367					
A-328						A-368	+	+	5.80	0.45	1.52
A-329						A-369	+	+	6.26	0.52	0.68
A-330						A-370					
A-331						A-371					
A-332	+	+	5.01	0.53	3.77	A-372					
A-333						A-373					
A-334	+	+	5.84	0.42	0.57	A-374		+			
A-335	+	+	5.16	0.50	4.47	A-375		+			
A-336		+				A-376	+	+	4.97	0.47	3.23
A-337						A-377	+	+	5.89	0.49	0.68
A-338						A-378	+	+	6.01	0.66	1.35
A-339						A-379					
A-340						A-380	+	+	5.00	0.57	4.47
A-341		+				A-381		+			
A-342		+				A-382	+	+	5.11	0.44	2.54
A-343		+				A-383	+	+	5.97	0.49	0.69
A-344		+				A-384		+			
A-345		+				A-385		+			
A-346						A-386		+			
A-347		+				A-387					
A-348						A-388	+	+	5.38	0.51	0.70
A-349						A-389	+	+	6.15	0.41	0.51
A-350		+				A-390		+			
A-351		+				A-391		+			
A-352		+				A-392		+			
A-353		+				A-393		+			
A-354		+				A-394	+	+	6.33	0.65	1.17
A-355						A-395		+			
A-356		+				A-396		+			
A-357						A-397		+			
A-358		+				A-398	+	+	5.86	0.38	0.56
A-359						A-399		+			
A-360	+	+	5.11	0.52	3.75	A-400	+	+	5.17	0.53	2.09



sample	skim milk 응고 반응		pH	tyrosine conc.(mg)		sample	skim milk 응고 반응		pH	tyrosine conc.(mg)	
	24hr	48hr		0 hr	16 hr		24hr	48hr		0 hr	16 hr
A-401	+	+	6.25	0.50	0.95	A-441		+			
A-402						A-442		+			
A-403	+	+	6.29	0.52	0.61	A-443					
A-404	+	+	5.06	0.63	2.93	A-444	+	+	5.06	0.48	1.75
A-405	+	+	6.36	0.54	0.67	A-445		+			
A-406		+				A-446	+	+	5.12	0.56	1.21
A-407	+	+	5.13	0.55	1.65	A-447	+	+	5.08	0.69	1.48
A-408	+	+	5.99	0.45	2.13	A-448	+	+	5.29	0.62	0.94
A-409	+	+	4.87	0.66	6.20	A-449	+	+	5.12	0.56	1.29
A-410	+	+	5.80	0.55	6.63	A-450		+			
A-411	+	+	5.22	0.63	1.38	A-451					
A-412	+	+	5.83	0.57	4.15	A-452		+			
A-413		+				A-453	+	+	4.64	0.45	4.70
A-414	+	+	5.89	0.57	3.16	A-454		+			
A-415		+				A-455		+			
A-416	+	+	4.99	0.65	5.04	A-456					
A-417		+				A-457		+			
A-418						A-458		+			
A-419		+				A-459					
A-420						A-460		+			
A-421						A-461	+	+	5.40	0.61	2.09
A-422	+	+	5.46	0.40	1.18	A-462					
A-423						A-463		+			
A-424	+	+	5.10	0.39	1.15	A-464		+			
A-425		+				A-465					
A-426		+				A-466		+			
A-427		+				A-467					
A-428	+	+	5.96	0.60	1.81	A-468		+			
A-429		+				A-469					
A-430						A-470					
A-431						A-471	+	+	5.08	0.35	4.67
A-432		+				A-472					
A-433						A-473	+	+	4.94	0.60	4.89
A-434		+				A-474					
A-435	+	+	4.72	0.56	1.41	A-475	+	+	5.21	0.65	1.45
A-436	+	+	5.27	0.63	0.75	A-476					
A-437	+	+	4.85	0.45	4.19	A-477	+	+	4.94	0.61	3.48
A-438		+				A-478					
A-439	+	+	5.08	0.43	2.22	A-479	+	+	5.51	0.52	0.87
A-440	+	+	4.92	0.41	3.19	A-480					

sample	skim milk 응고 반응		pH	tyrosine conc.(mg)		sample	skim milk 응고 반응		pH	tyrosine conc.(mg)	
	24hr	48hr		0 hr	16 hr		24hr	48hr		0 hr	16 hr
A-481	+	+	5.63	0.45	1.24	A-521					
A-482	+	+	4.99	0.65	3.75	A-522					
A-483		+				A-523					
A-484						A-524	+	+	4.79	0.52	4.29
A-485						A-525					
A-486						A-526					
A-487	+	+	4.89	0.53	3.17	A-527					
A-488		+				A-528	+	+	5.04	0.48	3.27
A-489		+				A-529					
A-490	+	+	5.07	0.54	0.97	A-530		+			
A-491		+				A-531					
A-492		+				A-532		+			
A-493		+				A-533		+			
A-494		+				A-534					
A-495	+	+	5.82	0.57	2.26	A-535		+			
A-496	+	+	5.27	0.44	0.83	A-536		+			
A-497	+	+	5.80	0.39	0.76	A-537		+			
A-498						A-538					
A-499						A-539					
A-500						A-540	+	+	5.31	0.63	2.25
A-501	+	+	5.33	0.60	0.92	A-541					
A-502	+	+	5.16	0.47	3.34	A-542					
A-503	+	+	5.19	0.59	1.74	A-543		+			
A-504	+	+	5.33	0.61	1.54	A-544		+			
A-505	+	+	5.11	0.66	1.68	A-545		+			
A-506	+	+	4.99	0.58	2.48	A-546	+	+	5.14	0.56	3.84
A-507	+	+	6.06	0.68	1.77	A-547	+	+	4.99	0.60	1.84
A-508						A-548					
A-509						A-549	+	+	4.91	0.62	0.97
A-510						A-550	+	+	6.06	0.58	3.21
A-511	+	+	4.90	0.59	1.15	A-551		+			
A-512	+	+	4.93	0.51	1.43	A-552		+			
A-513						A-553		+			
A-514		+				A-554		+			
A-515	+	+	5.57	0.53	2.21	A-555		+			
A-516		+				A-556	+	+	5.58	0.73	0.98
A-517	+	+	4.92	0.42	4.00	A-557	+	+	5.78	0.46	1.11
A-518	+	+	5.59	0.49	3.98	A-558	+	+	5.68	0.58	1.74
A-519	+	+	6.20	0.57	0.70	A-559	+	+	5.81	0.43	2.54
A-520		+									

표 4. 경기도 서부지역에서 분리한 균주의 탈지유 응고여부와 배양후의 pH 및 단백질 분해력

sample	skim milk 응고 반응		pH	tyrosine conc.(mg)		sample	skim milk 응고 반응		pH	tyrosine conc.(mg)	
	24hr	48hr		0 hr	16 hr		24hr	48hr		0 hr	16 hr
B-1	+	+	5.10	0.43	1.73	B-41					
B-2		+				B-42	+	+	5.39	0.37	1.94
B-3		+				B-43		+			
B-4						B-44	+	+	5.54	0.36	1.69
B-5	+	+	4.82	0.48	5.582	B-45					
B-6		+				B-46					
B-7	+	+	5.53	0.64	2.36	B-47		+			
B-8		+				B-48	+	+	4.82	0.36	5.98
B-9		+				B-49	+	+	5.12	0.36	2.32
B-10	+	+	5.35	0.49	2.30	B-50	+	+	5.25	0.43	2.12
B-11		+				B-51		+			
B-12		+				B-52					
B-13		+				B-53					
B-14	+	+	5.20	0.53	2.47	B-54		+			
B-15						B-55		+			
B-16	+	+	4.89	0.57	5.80	B-56	+	+	5.12	0.45	2.21
B-17	+	+	4.81	0.62	9.05	B-57					
B-18		+				B-58		+			
B-19		+				B-59	+	+	5.13	0.37	1.49
B-20	+	+	5.26	0.59	11.36	B-60		+			
B-21						B-61					
B-22						B-62		+			
B-23		+				B-63	+	+	4.93	0.44	2.61
B-24		+				B-64		+			
B-25	+	+	5.18	0.49	9.05	B-65		+			
B-26		+				B-66	+	+	4.88	0.38	6.73
B-27		+				B-67		+			
B-28						B-68					
B-29						B-69		+			
B-30		+				B-70	+	+	5.12	0.24	1.43
B-31	+	+	5.05	0.49	10.20	B-71		+			
B-32		+				B-72					
B-33		+				B-73					
B-34		+				B-74					
B-35	+	+	5.10	0.56	1.90	B-75	+	+	5.42	0.41	1.70
B-36	+	+	5.40	0.44	1.67	B-76		+			
B-37		+				B-77		+			
B-38						B-78		+			
B-39						B-79	+	+	5.04	0.54	2.05
B-40	+	+	5.23	0.47	1.65	B-80	+	+	5.46	0.38	1.90

sample	skim milk 응고 반응		pH	tyrosine conc.(mg)		sample	skim milk 응고 반응		pH	tyrosine conc.(mg)	
	24hr	48hr		0 hr	16 hr		24hr	48hr		0 hr	16 hr
B-81	+	+	5.40	0.43	4.11	B-121	+	+	6.06	0.48	1.56
B-82		+				B-122		+			
B-83	+	+	4.80	0.28	1.17	B-123		+			
B-84	+	+	4.92	0.39	2.23	B-124					
B-85	+	+	5.59	0.46	4.73	B-125	+	+	4.77	0.52	3.92
B-86		+				B-126		+			
B-87						B-127		+			
B-88						B-128	+	+	4.84	0.47	5.52
B-89		+				B-129	+	+	4.88	0.43	6.73
B-90	+	+	4.79	0.37	4.06	B-130	+	+	4.98	0.40	5.80
B-91		+				B-131					
B-92	+	+	6.20	0.47	6.12	B-132	+	+	4.84	0.41	3.23
B-93						B-133		+			
B-94		+				B-134		+			
B-95	+	+	5.31	0.48	6.12	B-135	+	+	4.90	0.61	5.42
B-96		+				B-136	+	+	5.20	0.35	2.54
B-97						B-137		+			
B-98						B-138					
B-99		+				B-139					
B-100	+	+	5.14	0.43	5.92	B-140		+			
B-101		+				B-141	+	+	5.72	0.55	2.12
B-102	+	+	4.99	0.52	1.61	B-142		+			
B-103		+				B-143	+	+	5.66	1.17	2.30
B-104		+				B-144	+	+	5.17	0.82	1.98
B-105	+	+	5.12	0.42	1.43	B-145					
B-106		+				B-146					
B-107						B-147	+	+	5.10	0.48	1.42
B-108		+				B-148		+			
B-109	+	+	5.25	0.46	7.21	B-149		+			
B-110		+				B-150	+	+	5.63	0.54	2.06
B-111	+	+	5.58	0.58	1.32	B-151		+			
B-112		+				B-152		+			
B-113		+				B-153					
B-114	+	+	4.78	0.40	1.15	B-154		+			
B-115		+				B-155	+	+	5.73	0.64	1.42
B-116		+				B-156	+	+	4.86	0.38	1.94
B-117	+	+	5.68	0.44	1.14	B-157					
B-118	+	+	5.81	0.31	1.18	B-158		+			
B-119	+	+	4.91	0.45	5.04	B-159		+			
B-120		+				B-160	+	+	4.96	0.39	1.77

sample	skim milk 응고 반응		pH	tyrosine conc.(mg)		sample	skim milk 응고 반응		pH	tyrosine conc.(mg)	
	24hr	48hr		0 hr	16 hr		24hr	48hr		0 hr	16 hr
B-161	+	+	5.03	0.56	1.61	B-201	+	+	5.05	0.36	5.52
B-162		+				B-202	+	+	4.88	0.36	5.63
B-163		+				B-203		+			
B-164						B-204		+			
B-165	+	+	4.86	0.53	1.20	B-205	+	+	4.94	0.42	1.68
B-166		+				B-206	+	+	4.89	0.59	7.69
B-167		+				B-207					
B-168						B-208					
B-169	+	+	4.83	0.56	4.67	B-209		+			
B-170		+				B-210	+	+	4.99	0.31	11.36
B-171		+				B-211	+	+	5.47	0.50	11.36
B-172						B-212					
B-173	+	+	4.78	0.49	1.94	B-213					
B-174		+				B-214		+			
B-175		+				B-215	+	+	5.82	0.53	3.94
B-176	+	+	4.79	0.48	1.54	B-216		+			
B-177		+				B-217	+	+	5.14	0.53	5.00
B-178		+				B-218	+	+	6.53	0.86	2.94
B-179						B-219		+			
B-180						B-220		+			
B-181	+	+	4.82	0.50	4.89	B-221	+	+	5.46	0.45	1.61
B-182	+	+	5.40	0.41	7.69						
B-183	+	+	4.82	0.61	6.73						
B-184											
B-185											
B-186											
B-187											
B-188	+	+	4.80	0.59	6.28						
B-189		+									
B-190		+									
B-191	+	+	5.05	0.40	6.84						
B-192		+									
B-193											
B-194	+	+	4.81	0.35	1.44						
B-195		+									
B-196		+									
B-197	+	+	4.74	0.50	4.83						
B-198		+									
B-199	+	+	5.40	0.46	6.53						
B-200	+	+	5.75	0.44	5.42						

표 5. 경기도 북부지역에서 분리한 균주의 탈지유 응고여부와 배양후의 pH 및 단백질 분해력

sample	skim milk 응고 반응		pH	tyrosine conc.(mg)		sample	skim milk 응고 반응		pH	tyrosine conc.(mg)	
	24hr	48hr		0 hr	16 hr		24hr	48hr		0 hr	16 hr
	C-1	+		+	5.93		0.53	1.12		C-41	+
C-2		+				C-42		+			
C-3		+				C-43	+	+	5.35	0.53	1.75
C-4	+	+	5.85	0.58	1.14	C-44	+	+	6.41	0.46	11.36
C-5	+	+	4.92	0.52	7.69	C-45		+			
C-6	+	+	6.29	0.60	10.20	C-46					
C-7						C-47					
C-8						C-48	+	+	6.44	0.50	15.21
C-9						C-49		+			
C-10	+	+	5.73	0.57	1.06	C-50	+	+	6.19	0.52	3.02
C-11		+				C-51					
C-12		+				C-52					
C-13	+	+	5.28	0.66	0.48	C-53	+	+	5.69	0.78	1.67
C-14		+				C-54		+			
C-15		+				C-55	+	+	5.52	0.46	1.06
C-16	+	+	5.75	0.61	1.30	C-56					
C-17		+				C-57					
C-18		+				C-58		+			
C-19	+	+	6.06	0.47	0.59	C-59	+	+	6.20	0.41	10.20
C-20	+	+	5.30	0.55	0.83	C-60		+			
C-21		+				C-61		+			
C-22						C-62	+	+	5.30	0.50	0.25
C-23						C-63		+			
C-24	+	+	5.32	0.62	1.14	C-64					
C-25		+				C-65					
C-26		+				C-66					
C-27	+	+	5.16	0.55	4.22	C-67	+	+	4.90	0.49	5.29
C-28		+				C-68		+			
C-29		+				C-69	+	+	5.37	0.46	1.47
C-30	+	+	4.88	0.59	9.05	C-70	+	+	5.78	0.65	2.44
C-31	+	+	6.10	0.52	15.21	C-71	+	+	5.64	0.58	1.78
C-32	+	+	4.90	0.38	7.69	C-72		+			
C-33						C-73					
C-34						C-74					
C-35						C-75		+			
C-36						C-76	+	+	4.95	0.52	9.05
C-37	+	+	5.06	0.47	7.69	C-77		+			
C-38	+	+	5.37	0.64	2.98	C-78	+	+	5.28	0.44	3.24
C-39	+	+	5.17	0.40	2.00	C-79		+			
C-40						C-80	+	+	5.57	0.44	1.76

sample	skim milk 응고 반응		pH	tyrosine conc.(mg)		sample	skim milk 응고 반응		pH	tyrosine conc.(mg)	
	24hr	48hr		0 hr	16 hr		24hr	48hr		0 hr	16 hr
C-81	+	+	4.86	0.33	5.92	C-121	+	+	5.86	0.75	0.80
C-82	+	+	5.74	0.48	0.83	C-122	+	+	6.18	0.39	2.15
C-83	+	+	5.68	0.40	6.53	C-123	+	+	6.42	0.42	2.04
C-84		+									
C-85											
C-86		+									
C-87	+	+	5.98	0.44	1.67						
C-88	+	+	4.97	0.48	4.98						
C-89											
C-90		+									
C-91	+	+	5.63	0.59	7.71						
C-92	+	+	5.20	0.52	1.70						
C-93		+									
C-94	+	+	5.02	0.49	7.08						
C-95		+									
C-96	+	+	5.74	0.43	8.11						
C-97		+									
C-98	+	+	5.74	0.36	3.05						
C-99											
C-100		+									
C-101	+	+	5.48	0.45	1.88						
C-102		+									
C-103											
C-104	+	+	5.41	0.41	1.93						
C-105		+									
C-106	+	+	5.46	0.47	1.42						
C-107											
C-108	+	+	4.92	0.53	5.98						
C-109		+									
C-110		+									
C-111	+	+	5.84	0.49	3.11						
C-112											
C-113		+									
C-114	+	+	6.08	0.66	9.53						
C-115		+									
C-116	+	+	5.39	0.54	1.52						
C-117											
C-118		+									
C-119	+	+	5.16	0.55	1.88						
C-120	+	+	5.97	0.63	5.08						

표 6. 경상도 지역에서 분리한 균주의 탈지유 응고여부와 배양후의 pH 및 단백질 분해력

sample	skim milk 응고 반응		pH	tyrosine conc.(mg)		sample	skim milk 응고 반응		pH	tyrosine conc.(mg)	
	24hr	48hr		0 hr	16 hr		24hr	48hr		0 hr	16 hr
D-1	+	+	4.83	0.40	1.09	D-41	+	+	4.83	0.47	0.52
D-2	+	+	5.08	0.44	1.29	D-42	+	+	5.10	0.45	0.63
D-3		+				D-43		+			
D-4	+	+	4.70	0.31	0.91	D-44	+	+	4.74	0.37	0.76
D-5		+				D-45					
D-6						D-46	+	+	4.74	0.44	0.66
D-7						D-47		+			
D-8	+	+	4.79	0.47	0.37	D-48	+	+	4.93	0.38	1.43
D-9		+				D-49					
D-10	+	+	5.15	0.48	0.92	D-50	+	+	4.79	0.43	0.82
D-11	+	+	4.89	0.43	1.07	D-51					
D-12						D-52					
D-13	+	+	4.77	0.43	1.24	D-53	+	+	4.77	0.28	0.85
D-14		+				D-54		+			
D-15	+	+	4.81	0.43	0.92	D-55		+			
D-16						D-56	+	+	4.74	0.39	1.73
D-17						D-57					
D-18						D-58	+	+	4.77	0.52	1.65
D-19						D-59		+			
D-20						D-60	+	+	4.79	0.42	2.28
D-21	+	+	5.00	0.40	0.89	D-61					
D-22	+	+	4.85	0.41	0.68	D-62	+	+	4.88	0.46	2.75
D-23						D-63					
D-24						D-64	+	+	4.74	0.45	2.81
D-25	+	+	4.80	0.61	0.64	D-65					
D-26						D-66	+	+	4.79	0.48	5.80
D-27	+	+	4.50	0.35	1.50	D-67					
D-28	+	+	4.93	0.55	0.95	D-68		+			
D-29		+				D-69	+	+	4.88	0.24	0.70
D-30						D-70		+			
D-31	+	+	4.66	0.37	0.75	D-71	+	+	4.89	0.41	0.70
D-32						D-72					
D-33						D-73	+	+	4.79	0.46	1.47
D-34						D-74					
D-35						D-75					
D-36	+	+	4.84	0.54	0.99	D-76	+	+	4.89	0.56	2.93
D-37		+				D-77					
D-38						D-78					
D-39	+	+	4.84	0.64	0.79	D-79		+			
D-40	+	+	4.77	0.52	0.76	D-80	+	+	4.67	0.44	3.70



sample	skim milk 응고 반응		pH	tyrosine conc.(mg)		sample	skim milk 응고 반응		pH	tyrosine conc.(mg)	
	24hr	48hr		0 hr	16 hr		24hr	48hr		0 hr	16 hr
D-81	+	+	4.62	0.47	2.12	D-121		+			
D-82						D-122		+			
D-83		+				D-123	+	+	4.81	0.48	1.15
D-84						D-124	+	+	5.15	0.46	1.93
D-85	+	+	4.70	0.59	3.01	D-125		+			
D-86		+				D-126	+	+	4.64	0.44	1.82
D-87	+	+	4.67	0.49	2.57	D-127					
D-88						D-128					
D-89						D-129					
D-90	+	+	5.15	0.49	1.22	D-130	+	+	4.49	0.36	0.55
D-91		+				D-131		+			
D-92						D-132	+	+	4.99	0.36	0.65
D-93						D-133		+			
D-94	+	+	4.64	0.38	1.96	D-134		+			
D-95		+				D-135	+	+	5.29	0.53	0.62
D-96		+				D-136		+			
D-97						D-137					
D-98						D-138					
D-99	+	+	4.49	0.39	0.66	D-139	+	+	4.94	0.56	0.65
D-100		+				D-140					
D-101		+				D-141					
D-102	+	+	4.62	0.56	0.92	D-142		+			
D-103						D-143	+	+	4.73	0.49	0.58
D-104		+				D-144		+			
D-105	+	+	4.73	0.37	1.83	D-145					
D-106		+				D-146					
D-107		+				D-147	+	+	5.02	0.59	0.59
D-108	+	+	4.70	0.36	1.59	D-148	+	+	4.73	0.40	0.55
D-109	+	+	4.78	0.50	2.11	D-149		+			
D-110						D-150		+			
D-111						D-151		+			
D-112						D-152	+	+	5.39	0.35	0.56
D-113						D-153	+	+	5.15	0.50	0.59
D-114	+	+	5.04	0.41	2.54	D-154		+			
D-115						D-155	+	+	4.78	0.37	0.67
D-116		+				D-156					
D-117						D-157					
D-118	+	+	4.72	0.61	1.23	D-158	+	+	5.62	0.44	0.48
D-119						D-159	+	+	5.04	0.38	0.74
D-120		+				D-160					

sample	skim milk 응고 반응		pH	tyrosine conc.(mg)		sample	skim milk 응고 반응		pH	tyrosine conc.(mg)	
	24hr	48hr		0 hr	16 hr		24hr	48hr		0 hr	16 hr
D-161						D-201					
D-162						D-202	+	+	5.06	0.45	3.21
D-163	+	+	4.72	0.53	0.55	D-203		+			
D-164						D-204					
D-165		+				D-205					
D-166	+	+	4.62	0.43	0.66	D-206	+	+	5.33	0.35	4.44
D-167						D-207					
D-168						D-208					
D-169	+	+	4.74	0.45	1.16	D-209					
D-170		+				D-210	+	+	5.34	0.51	1.39
D-171	+	+	5.19	0.54	0.75						
D-172		+									
D-173											
D-174											
D-175	+	+	4.70	0.49	1.10						
D-176	+	+	4.79	0.50	0.58						
D-177		+									
D-178											
D-179		+									
D-180	+	+	4.71	0.39	0.67						
D-181	+	+	4.83	0.56	0.61						
D-182											
D-183											
D-184		+									
D-185	+	+	5.58	0.64	6.12						
D-186		+									
D-187											
D-188	+	+	4.84	0.56	0.72						
D-189	+	+	4.84	0.37	0.68						
D-190		+									
D-191	+	+	5.60	0.48	0.79						
D-192		+									
D-193		+									
D-194	+	+	5.46	0.46	1.53						
D-195		+									
D-196	+	+	4.78	0.39	1.26						
D-197	+	+	4.46	0.64	2.98						
D-198											
D-199	+	+	5.45	0.32	1.11						
D-200		+									

표 7. 전라도 지역에서 분리한 균주의 탈지유 응고여부와 배양후의 pH 및 단백질 분해력

sample	skim milk 응고 반응		pH	tyrosine conc.(mg)		sample	skim milk 응고 반응		pH	tyrosine conc.(mg)	
	24hr	48hr		0 hr	16 hr		24hr	48hr		0 hr	16 hr
E-1						E-41					
E-2		+				E-42					
E-3		+				E-43		+			
E-4	+	+	4.71	0.65	3.62	E-44		+			
E-5						E-45	+	+	5.12	0.39	1.09
E-6						E-46					
E-7						E-47					
E-8		+				E-48		+			
E-9	+	+	5.44	0.54	0.89	E-49	+	+	5.20	0.58	0.92
E-10						E-50		+			
E-11						E-51					
E-12	+	+	4.95	0.50	3.81	E-52					
E-13		+				E-53	+	+	5.31	0.49	0.72
E-14		+				E-54					
E-15	+	+	5.12	0.43	0.92	E-55					
E-16		+				E-56	+	+	5.09	0.50	0.96
E-17						E-57		+			
E-18	+	+	5.39	0.70	0.57	E-58		+			
E-19						E-59					
E-20						E-60		+			
E-21	+	+	4.73	0.40	7.52	E-61					
E-22		+				E-62	+	+	4.74	0.46	0.45
E-23						E-63					
E-24	+	+	4.93	0.53	4.52	E-64					
E-25						E-65		+			
E-26	+	+	4.75	0.57	7.08	E-66	+	+	5.01	0.58	1.50
E-27						E-67		+			
E-28						E-68					
E-29						E-69					
E-30	+	+	4.74	0.62	6.73	E-70	+	+	4.71	0.52	0.61
E-31						E-71					
E-32						E-72					
E-33	+	+	4.74	0.76	0.60	E-73		+			
E-34						E-74					
E-35						E-75	+	+	5.25	0.50	4.00
E-36		+				E-76					
E-37	+	+	5.30	0.49	0.68	E-77					
E-38		+				E-78		+			
E-39	+	+	4.96	0.51	0.52	E-79		+			
E-40		+				E-80		+			

sample	skim milk 응고 반응		pH	tyrosine conc.(mg)		sample	skim milk 응고 반응		pH	tyrosine conc.(mg)	
	24hr	48hr		0 hr	16 hr		24hr	48hr		0 hr	16 hr
E-81	+	+	5.42	0.64	5.98	E-121		+			
E-82						E-122		+			
E-83		+				E-123		+			
E-84		+				E-124	+	+	5.16	0.46	0.71
E-85						E-125	+	+	4.63	0.61	1.11
E-86		+				E-126		+			
E-87		+				E-127		+			
E-88		+				E-128		+			
E-89	+	+	4.82	0.51	0.70	E-129		+			
E-90		+				E-130		+			
E-91						E-131					
E-92						E-132	+	+	4.70	0.54	6.20
E-93						E-133					
E-94	+	+	5.09	0.61	5.29	E-134					
E-95		+				E-135		+			
E-96						E-136	+	+	5.15	0.52	7.89
E-97						E-137		+			
E-98	+	+	5.25	0.61	0.55	E-138		+			
E-99						E-139	+	+	4.73	0.47	0.64
E-100						E-140		+			
E-101		+				E-141		+			
E-102		+				E-142	+	+	5.47	0.52	6.73
E-103	+	+	5.12	0.57	0.48	E-143	+	+	5.07	0.49	0.80
E-104						E-144					
E-105						E-145					
E-106						E-146					
E-107		+				E-147					
E-108	+	+	5.12	0.59	1.95	E-148		+			
E-109						E-149	+	+	4.75	0.57	1.44
E-110						E-150		+			
E-111						E-151		+			
E-112	+	+	4.87	0.76	0.97	E-152	+	+	5.20	0.52	4.73
E-113						E-153					
E-114						E-154					
E-115						E-155	+	+	4.87	0.63	5.68
E-116		+				E-156					
E-117		+				E-157					
E-118	+	+	4.97	0.49	0.41	E-158	+	+	4.69	0.56	5.57
E-119		+				E-159		+			
E-120		+				E-160	+	+	4.78	0.60	5.08

sample	skim milk 응고 반응		pH	tyrosine conc.(mg)		sample	skim milk 응고 반응		pH	tyrosine conc.(mg)	
	24hr	48hr		0 hr	16 hr		24hr	48hr		0 hr	16 hr
E-161	+	+	4.70	0.62	1.14	E-201	+	+	5.06	0.68	0.66
E-162		+				E-202					
E-163		+				E-203					
E-164		+				E-204					
E-165		+				E-205		+			
E-166						E-206	+	+	4.64	0.69	2.31
E-167						E-207					
E-168						E-208		+			
E-169						E-209	+	+	5.40	0.31	0.74
E-170		+				E-210					
E-171		+				E-211					
E-172		+				E-212	+	+	4.81	0.95	6.53
E-173						E-213		+			
E-174		+				E-214		+			
E-175						E-215		+			
E-176						E-216		+			
E-177		+				E-217	+	+	5.36	0.52	0.93
E-178	+	+	4.72	0.58	6.12	E-218		+			
E-179		+				E-219		+			
E-180						E-220					
E-181						E-221	+	+	5.51	0.50	0.59
E-182	+	+	4.95	0.73	5.20	E-222		+			
E-183						E-223	+	+	5.57	0.53	0.58
E-184		+				E-224	+	+	5.21	0.48	1.26
E-185	+	+	5.52	0.46	5.33	E-225					
E-186						E-226					
E-187						E-227		+			
E-188		+				E-228					
E-189	+	+	4.64	0.58	0.66	E-229	+	+	5.50	0.50	1.03
E-190		+				E-230					
E-191						E-231		+			
E-192						E-232	+	+	5.34	0.63	0.70
E-193	+	+	5.88	0.61	0.91	E-233		+			
E-194		+				E-233					
E-195		+				E-235	+	+	5.19	0.66	1.09
E-196	+	+	5.20	0.43	0.68	E-236					
E-197		+				E-237		+			
E-198		+				E-238					
E-199	+	+	5.30	0.58	0.87	E-239		+			
E-200		+				E-240		+			

sample	skim milk 응고 반응		pH	tyrosine conc.(mg)		sample	skim milk 응고 반응		pH	tyrosine conc.(mg)	
	24hr	48hr		0 hr	16 hr		24hr	48hr		0 hr	16 hr
E-241	+	+	5.07	0.54	0.66	E-281					
E-242		+				E-282		+			
E-243		+				E-283	+	+	5.16	0.60	0.73
E-244						E-284					
E-245	+	+	4.72	0.64	4.89	E-285		+			
E-246		+				E-286	+	+	4.66	0.61	4.06
E-247						E-287		+			
E-248	+	+	4.73	0.66	5908	E-288					
E-249		+				E-289					
E-250						E-290	+	+	5.17	0.58	0.6
E-251	+	+	4.82	0.59	5.08	E-291		+			
E-252						E-292		+			
E-253						E-293					
E-254						E-294					
E-255						E-295	+	+	4.99	0.46	0.59
E-256						E-296					
E-257						E-297					
E-258						E-298		+			
E-259						E-299					
E-260						E-300		+			
E-261						E-301					
E-262	+	+	4.68	0.58	4.13	E-302					
E-263		+				E-303		+			
E-264		+				E-304		+			
E-265	+	+	5.19	0.59	0.60	E-305		+			
E-266						E-306		+			
E-267						E-307		+			
E-268	+	+	5.40	0.57	0.66	E-308		+			
E-269						E-309		+			
E-270						E-310					
E-271	+	+	5.63	0.60	0.71	E-311					
E-272						E-312					
E-273						E-313					
E-274		+				E-314					
E-275		+				E-315					
E-276	+	+	4.81	0.63	6.95	E-316					
E-277		+				E-317					
E-278						E-318		+			
E-279						E-319		+			
E-280	+	+	5.24	0.63	0.87	E-320		+			

표 8. 제주도 지역에서 분리한 균주의 탈지유 응고여부와 배양후의 pH 및 단백질 분해력

sample	skim milk 응고 반응		pH	tyrosine conc.(mg)		sample	skim milk 응고 반응		pH	tyrosine conc.(mg)	
	24hr	48hr		0 hr	16 hr		24hr	48hr		0 hr	16 hr
F-1						F-41					
F-2		+				F-42		+			
F-3		+				F-43		+			
F-4		+				F-44		+			
F-5		+				F-45					
F-6	+	+	4.82	0.40	11.20	F-46					
F-7						F-47		+			
F-8						F-48					
F-9		+				F-49		+			
F-10	+	+	4.74	0.45	12.21	F-50		+			
F-11		+				F-51	+	+	4.51	0.44	11.36
F-12						F-52					
F-13						F-53					
F-14	+	+	4.70	0.52	10.68	F-54		+			
F-15						F-55		+			
F-16		+				F-56		+			
F-17		+				F-57	+	+	5.00	0.61	10.20
F-18	+	+	4.96	0.49	10.04	F-58					
F-19		+				F-59					
F-20		+				F-60					
F-21	+	+	4.50	0.71	9.22	F-61		+			
F-22		+				F-62		+			
F-23		+				F-63		+			
F-24		+				F-64	+	+	4.66	0.56	4.98
F-25						F-65		+			
F-26						F-66					
F-27						F-67					
F-28	+	+	4.75	0.48	9.18	F-68					
F-29						F-69					
F-30		+				F-70					
F-31		+				F-71					
F-32						F-72		+			
F-33	+	+	4.68	0.47	9.00						
F-34											
F-35		+									
F-36		+									
F-37		+									
F-38		+									
F-39											
F-40		+									

표 3~8에서 보는바와 같이 512개의 분리균주 중 Tyrosine 농도가 10이상인 균주가 17개, 6이상 10 미만인 균주가 47개이었다.

표 9는 시중에 유통되고 있는 발효유의 단백질 분해력에 대해 검사한 결과 매일 유업의 GG제품이 Tyrosine 농도가 9.05mg으로 가장 높은 값을 나타내었다. 이에 따라 시중제품에 비해 단백질 분해력이 더 높은 균주가 분리되었음을 보여 주고 있다.

표 9. 시중에 판매되는 발효유의 배양후의 pH 및 단백질분해력

시료	제조회사	pH	Tyrosine conc.(mg)
닥터캡슐(포도)	빙그레	4.18	1.81
요플레(블루베리)	빙그레	4.28	6.12
불가리스(딸기)	남양유업	4.18	3.63
위 력	남양유업	4.17	3.55
probio GG(오렌지)	매일유업	4.08	9.05
구 트	매일유업	4.17	3.49
덴마크 요쿠르트	디엠푸드	3.96	4.93
비 요 뜨	서울우유	4.13	1.49

단백질 분해력이 높은 64개의 균주를 대상으로 ACE 억제활성 실험을 실시하였다. ACE 억제활성 실험결과는 표 10~11에 나타내었다.



표 10. 단백질 분해력 10이상인 균주의 ACE 저해율과 16시간 배양 후의 pH

No.	균주명	ACE 저해율(%)	pH
1	A111	89.82	4.84
2	A117	39.58	5.96
3	B8	65.03	5.26
4	B10	23.08	5.05
5	B77	47.69	4.99
6	B78	62.18	5.47
7	C4	20.56	6.29
8	C13	57.82	6.10
9	C19	28.67	6.41
10	C20	80.73	6.44
11	C24	45.82	6.20
12	F1	75.65	4.82
13	F2	83.25	4.74
14	F3	32.36	4.70
15	F4	30.63	4.96
16	F8	50.00	4.51
17	F9	97.45	5.00

표 11. 단백질 분해력 6이상 10미만인 균주의 ACE 저해율과 16시간 배양 후의 pH

No.	균주명	ACE저해율 (%)	pH	No.	균주명	ACE저해율 (%)	pH
1	A11	81.55	4.91	31	C38	79.17	5.63
2	A30	49.40	4.99	32	C40	64.88	5.02
3	A31	92.86	4.82	33	C41	42.26	5.74
4	A49	19.05	4.98	34	C48	41.67	6.08
5	A70	4.17	4.87	35	D77	78.57	4.46
6	A95	47.02	5.02	36	E6	88.10	4.73
7	A110	92.26	4.93	37	E8	95.24	4.75
8	A119	70.83	4.82	38	E9	41.07	4.74
9	A157	91.07	4.87	39	E31	43.45	4.70
10	A158	75.60	5.80	40	E32	93.45	5.15
11	B7	27.98	4.81	41	E34	43.45	5.47
12	B9	4.17	5.18	42	E42	78.57	4.72
13	B22	48.21	4.88	43	E52	52.98	4.81
14	B32	73.21	6.20	44	E68	97.62	4.80
15	B33	2.38	5.31	45	F5	57.74	4.50
16	B37	28.57	5.25	46	F6	11.90	4.75
17	B46	97.9	4.88	47	F7	19.05	4.68
18	B65	8.33	5.40				
19	B66	80.36	4.82				
20	B67	96.43	4.80				
21	B68	86.31	5.05				
22	B71	7.74	5.40				
23	B76	77.38	4.89				
24	B83	50.60	4.75				
25	C3	90.48	4.92				
26	C12	64.88	4.88				
27	C14	76.19	4.90				
28	C15	97.02	5.06				
29	C30	80.36	4.95				
30	C35	92.86	5.68				

표 10과 11에서 보는바와 같이 단백질 분해력이 우수한 64개 균주의 ACE 억제율을 측정된 결과, 억제율이 90 이상인 균주 12개 균주를 ACE 억제율이 우수한 균주로 1차 선발하였다.

한편, 최근 Enterococcus 균에 대한 건강 위해 가능성이 제기됨에 따라 추가로 Lactobacillus 균을 선발코저 Gram 염색한 후 rod 형태의 균락만을 대상으로 ACE 억제율을 측정된 결과를 표 12에 나타내었다.

표 12. 원유에서 분리한 rod형태 균주의 ACE 억제율

No.	균주명	skim milk 응고 반응		ACE저해율 (%)	No.	균주명	skim milk 응고 반응		ACE저해율 (%)
		24hr	48hr				24hr	48hr	
1	K1	+	+	0	37	K369	+	+	22.99
2	K2	+	+	0	38	K370	+	+	30.20
3	K14	+	+	76.96	39	K371	+	+	20.38
4	K4	+	+	21.47	40	K372	+	+	51.50
5	K5	+	+	0	41	K373	+	+	27.36
6	K6	+	+	0	42	K374	+	+	44.99
7	K29	+	+	80.63	43	K375	+	+	75.65
8	K8	+	+	65.45	44	K376	+	+	49.01
9	K9	+	+	0	45	K377	+	+	17.90
10	K10	+	+	0	46	K378	+	+	63.09
11	K11	+	+	57.59	47	K379	+	+	27.48
12	K12	+	+	67.02	48	K380	+	+	45.58
13	K13	+	+	72.77	49	K381	+	+	37.66
14	K14	+	+	75.39	50	K382	+	+	76.10
15	K61	+	+	86.34	51	K383	+	+	70.78
16	K348	+	+	42.51	52	K384	+	+	34.22
17	K349	+	+	65.57	53	K385	+	+	48.54
18	K350	+	+	60.49	54	K386	+	+	50.43
19	K351	+	+	21.33	55	K387	+	+	62.62
20	K352	+	+	72.44	56	K388	+	+	59.90
21	K353	+	+	64.75	57	K389	+	+	41.09
22	K354	+	+	82.01	58	K390	+	+	59.19
23	K355	+	+	58.00	59	K391	+	+	53.74
24	K356	+	+	36.71	60	K392	+	+	69.24
25	K357	+	+	69.36	61	K393	+	+	25.00
26	K358	+	+	62.85	62	K394	+	+	30.91
27	K359	+	+	83.08	63	K395	+	+	35.53
28	K360	+	+	60.25	64	K396	+	+	68.53
29	K361	+	+	47.71	65	K397	+	+	46.76
30	K362	+	+	65.22	66	K398	+	+	62.26
31	K363	+	+	52.09	67	K399	+	+	49.01
32	K364	+	+	38.13	68	K400	+	+	45.11
33	K365	+	+	36.35	69	K401	+	+	71.25
34	K366	+	+	58.24	70	K402	+	+	36.35
35	K367	+	+	60.96	71	K403	+	+	50.91
36	K368	+	+	46.53	72	K404	+	+	41.80

### 3. ACE 억제활성 균주 동정

ACE 억제활성이 높은 17개 균주를 동정하였고, 그 결과는 표 13에 나타내었다.

표 13. 선발균주의 현미경 morphology 및 생화학적 특성을 통한 동정

strains	A31	A110	A157	B46	B67	C3	C15	C35	E8	E32	E68	F9
Gram stain	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cell morphology	cocci	cocci	cocci	cocci	cocci	cocci	cocci	cocci	cocci	cocci	cocci	cocci
Spore formation	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Motility	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Aerobic growth	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Anaerobic growth	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Catalase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth at 15°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth at 45°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gas from glucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ammonia from arginine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

strains	K14	K29	K61	K354	K359
Gram stain	+	+	+	+	+
Cell morphology	rod	rod	rod	rod	rod
Spore formation	-	-	-	-	-
Motility	-	-	-	-	-
Aerobic growth	+	+	+	+	+
Anaerobic growth	+	+	+	+	+
Catalase	-	-	-	-	-
Growth at 15°C	+	+	+	+	+
Growth at 45°C	+	+	+	+	+
Gas from glucose	-	-	-	-	-
Ammonia from arginine	-	-	-	-	-

API 20 STREP

Strains	A31	A110	A157	B46	B67	C3	C15	C35	E8	E32	E68	F9
Pyruvate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hippurate	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-
Esculin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Pyrrolidonyl 2 naphthylamide	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6-Bromo-2-naphthyl- $\alpha$ -D-glucuronate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Naphthol AS-BI $\beta$ -D-glucuronate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-naphthyl- $\beta$ -D-galactopyranoside	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-naphthyl phosphate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-leucine-2-naphthylamide	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+
Arginine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ribose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sorbitol	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Trehalose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Inulin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Raffinose	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Starch	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-
Glycogen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

API 50 CHL

Strains	K 14	K 29	K 61	K 354	K 359	Strains	K 14	K 29	K 61	K 354	K 359
Glycerol	-	-	-	-	-	D-xylose	-	-	-	-	-
Erythritol	-	-	-	-	-	L-xylose	-	-	-	-	-
D-arabinose	-	-	-	-	-	Adonitol	-	-	-	-	-
L-arabinose	+	+	+	+	+	$\beta$ -Methyl-D-Xyloside	-	-	-	-	-
Ribose	+	+	+	+	+	Galactose	+	+	+	+	+
Glucose	+	+	+	+	+	Sucrose	+	+	+	+	+
Fructose	+	+	+	+	+	Trehalose	+	-	-	+	+
Mannose	+	+	+	+	+	Inulin	-	-	-	-	-
Sorbose	-	-	-	-	-	Melezitose	-	-	-	+	+
Rhamnose	+	-	-	+	+	Raffinose	-	-	-	-	-
Dulcitol	-	-	-	-	-	Starch	-	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	-	Glycogen	-	-	-	-	-
Mannitol	+	+	+	+	+	Xylitol	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-	Gentiobiose	+	+	+	+	-
$\alpha$ -Methyl-D-Mannoside	+	-	-	-	-	D-turanose	-	-	-	-	-
$\alpha$ -Methyl-D-Glucoside	-	-	-	-	-	D-lyxose	-	-	-	-	-
N acethy glucosamine	+	+	+	+	+	D-tagatose	-	+	+	-	-
Amygdalin	+	+	+	+	+	D-fucose	-	-	-	-	-
Arbutin	+	+	+	+	+	L-fucose	-	-	-	-	-
Esculin	+	+	+	+	+	D-arabitol	-	-	-	-	-
Salicin	+	+	+	+	+	L-arabitol	-	-	-	-	-
Cellobiose	+	+	+	+	+	Gluconate	-	-	-	-	-
Maltose	+	+	+	+	+	2-keto-gluconate	-	-	-	-	-
Lactose	+	+	+	+	+	5-keto-gluconate	-	-	-	-	-
Melibiose	+	+	+	-	-						

ATB identification system에 입력한 결과 동정된 균주명과 ID값은 다음과 표 14와 같다.

Table 14. ACE inhibitory ratio and identification of lactic acid bacteria

Strain	Identification(%)		ACE inhibitory ratio(%)
A31	<i>Enterococcus faecalis</i>	95.8	92.86
A110	<i>Enterococcus faecalis</i>	81.2	92.26
A157	<i>Enterococcus faecalis</i>	99.7	91.07
B46	<i>Enterococcus faecalis</i>	98.0	97.90
B67	<i>Enterococcus faecalis</i>	99.2	96.43
C3	<i>Enterococcus faecalis</i>	99.7	90.48
C15	<i>Enterococcus faecalis</i>	99.2	97.02
C35	<i>Enterococcus faecalis</i>	99.1	92.86
E8	<i>Enterococcus faecalis</i>	99.7	95.24
E32	<i>Enterococcus faecalis</i>	98.0	93.45
E68	<i>Enterococcus faecalis</i>	91.1	97.62
F9	<i>Enterococcus faecium</i>	98.7	97.45
K14	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99.9	76.96
K29	<i>Lactobacillus brevis</i>	99.1	80.63
K61	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>	95.9	86.34
K354	<i>Lactobacillus zeae</i>	99.3	82.01
K359	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99.4	83.08

Enterococcus 균주 12종 중 B46 균주가 ACE 억제율이 97.90%로서 가장 높았으며, Lactobacillus 균주 중에서는 K61 균주가 86.34%로서 가장 높았다.

#### 4. 선발 젖산균의 특성조사

ACE 억제율이 높은 균주 17종 중 산 생성 속도와 ACE 억제율(10% 환원탈지유에서 1%접종 후 18시간 배양)을 감안하여 6종의 젖산균을 선발하여 특성조사를 실시하였다. 다음 이하는 B46 균주(*Enterococcus faecalis*)는 *Enterococcus faecalis* B46, K14 균주(*Lactobacillus plantarum*)는 *Lactobacillus plantarum* K14, K29 균주(*Lactobacillus brevis*)는 *Lactobacillus brevis* K29, K61 균주(*Lactococcus lactis ssp lactis*)는 *Lactococcus lactis ssp lactis* K61, K354 균주(*Lactobacillus zeae*)는 *Lactobacillus zeae* K354, K359 균주(*Lactobacillus plantarum*)는 *Lactobacillus plantarum* K359로 각각 명명하였다.

##### 1) 젖산균의 생장

Fig. 4~15에서 보는 바와 같이 젖산균 6종의 생장속도를 알기 위하여 10%



환원탈지유 150ml에 젖산균 배양액을 1ml용 피펫으로 1방울 접종한 후 34°C, 37°C, 40°C별로 3시간 간격으로 24시간까지 배양시험 한 결과는 다음과 같다.

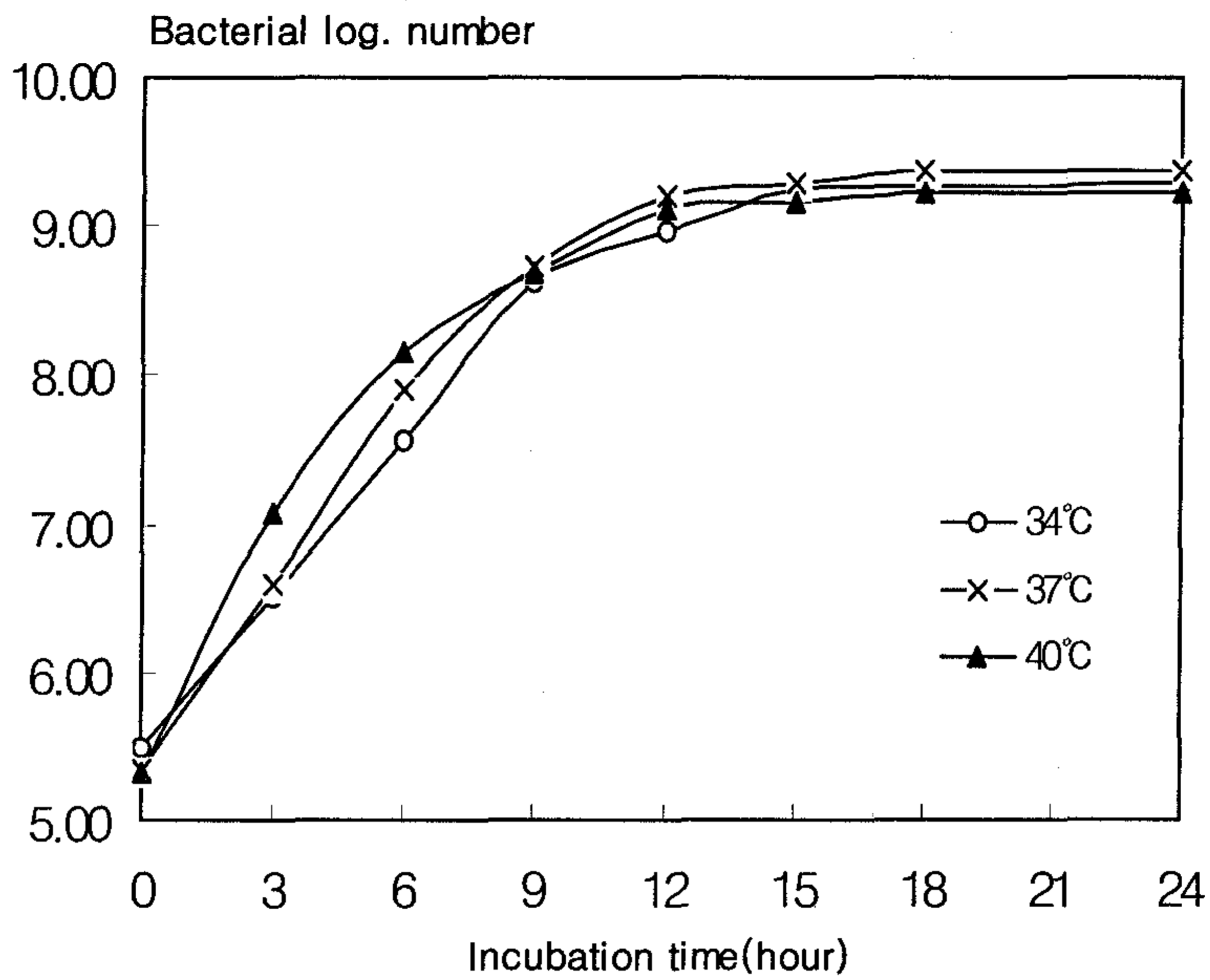


Figure 4. Growth of *Enterococcus faecalis* B46 in 10% reconstituted skim milk at various temperatures

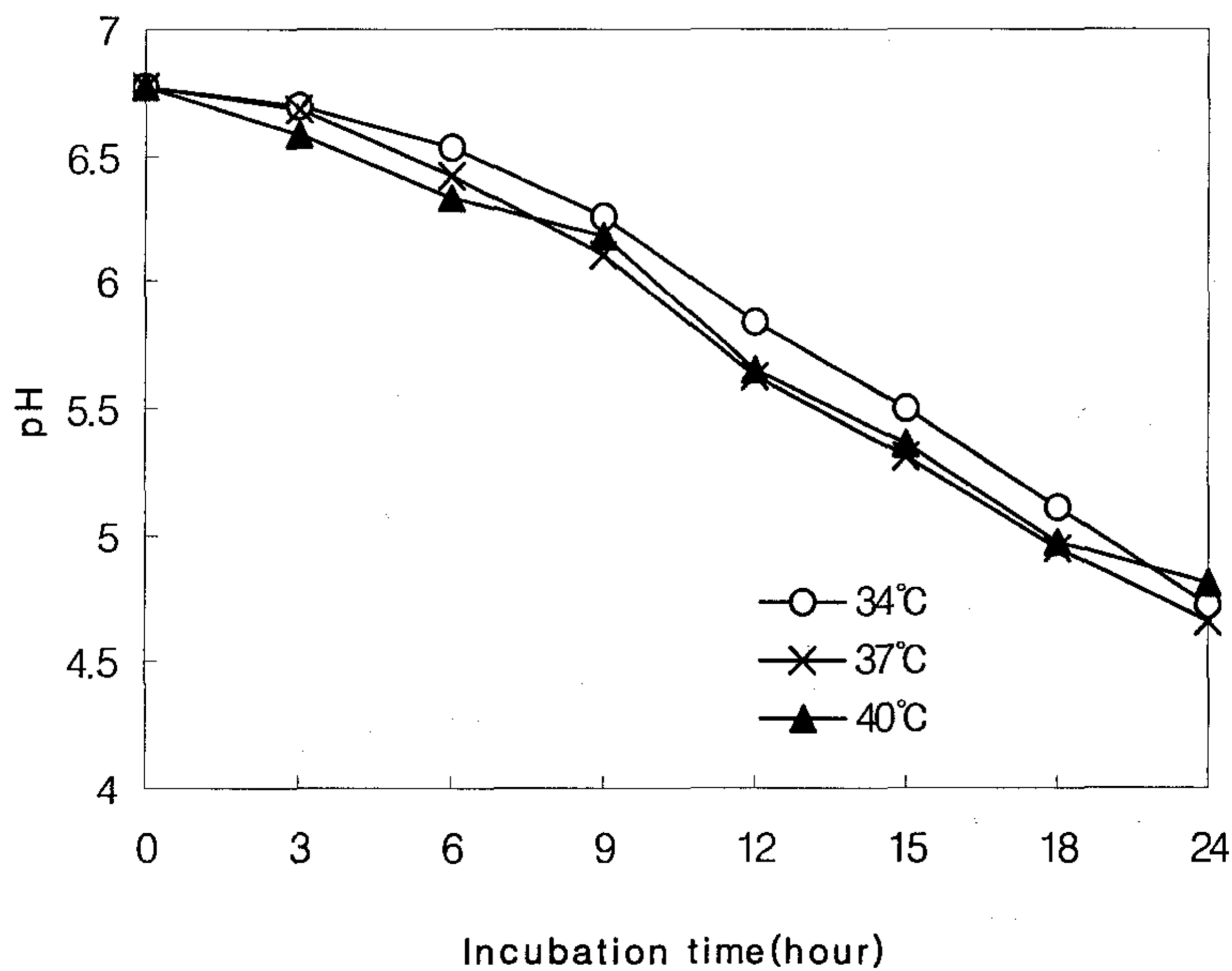


Figure 5. pH changes of 10% reconstituted skim milk during the growth of *Enterococcus faecalis* B46 at various temperature

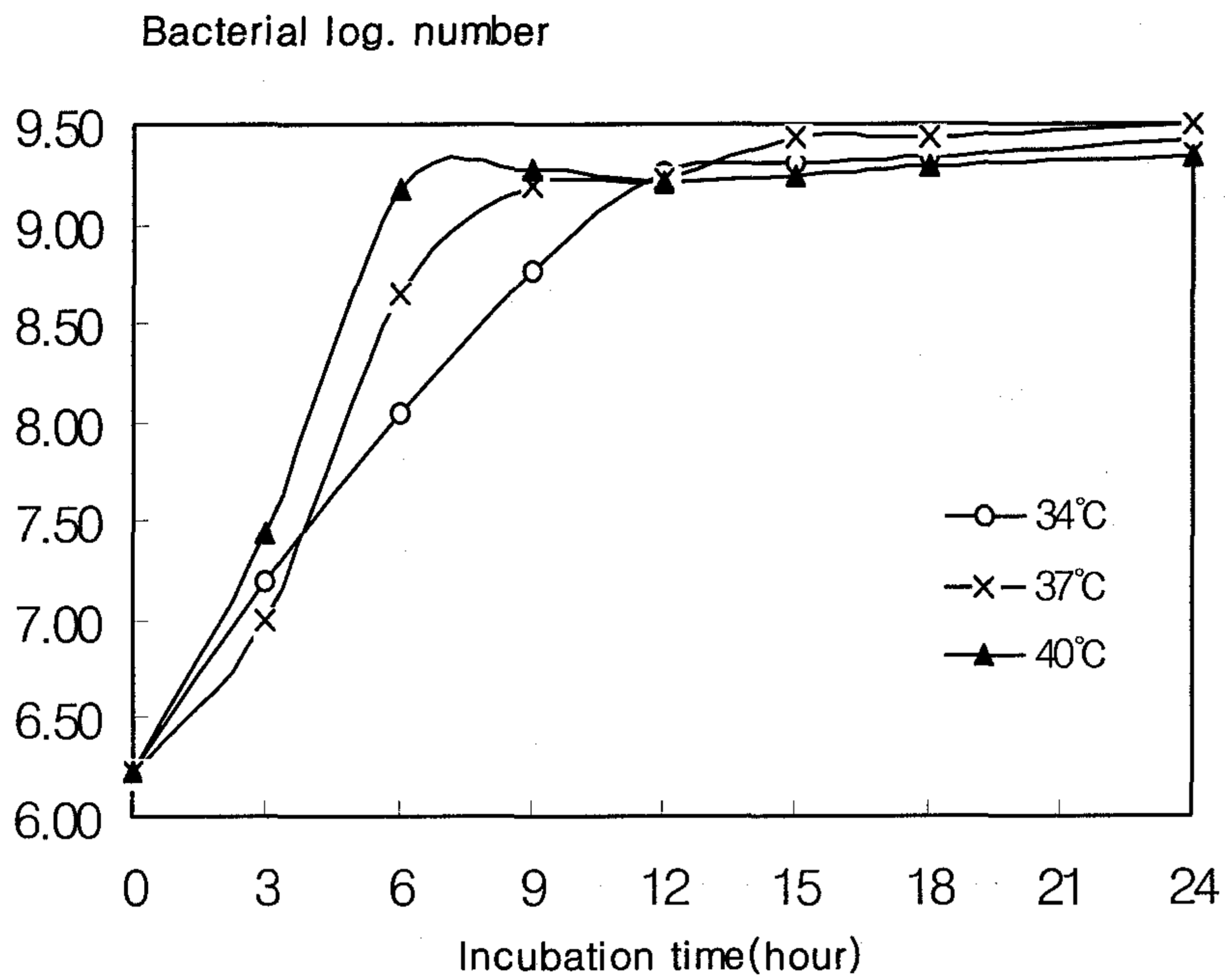


Figure 6. Growth of *Lactobacillus plantarum* K14 in 10% reconstituted skim milk at various temperatures

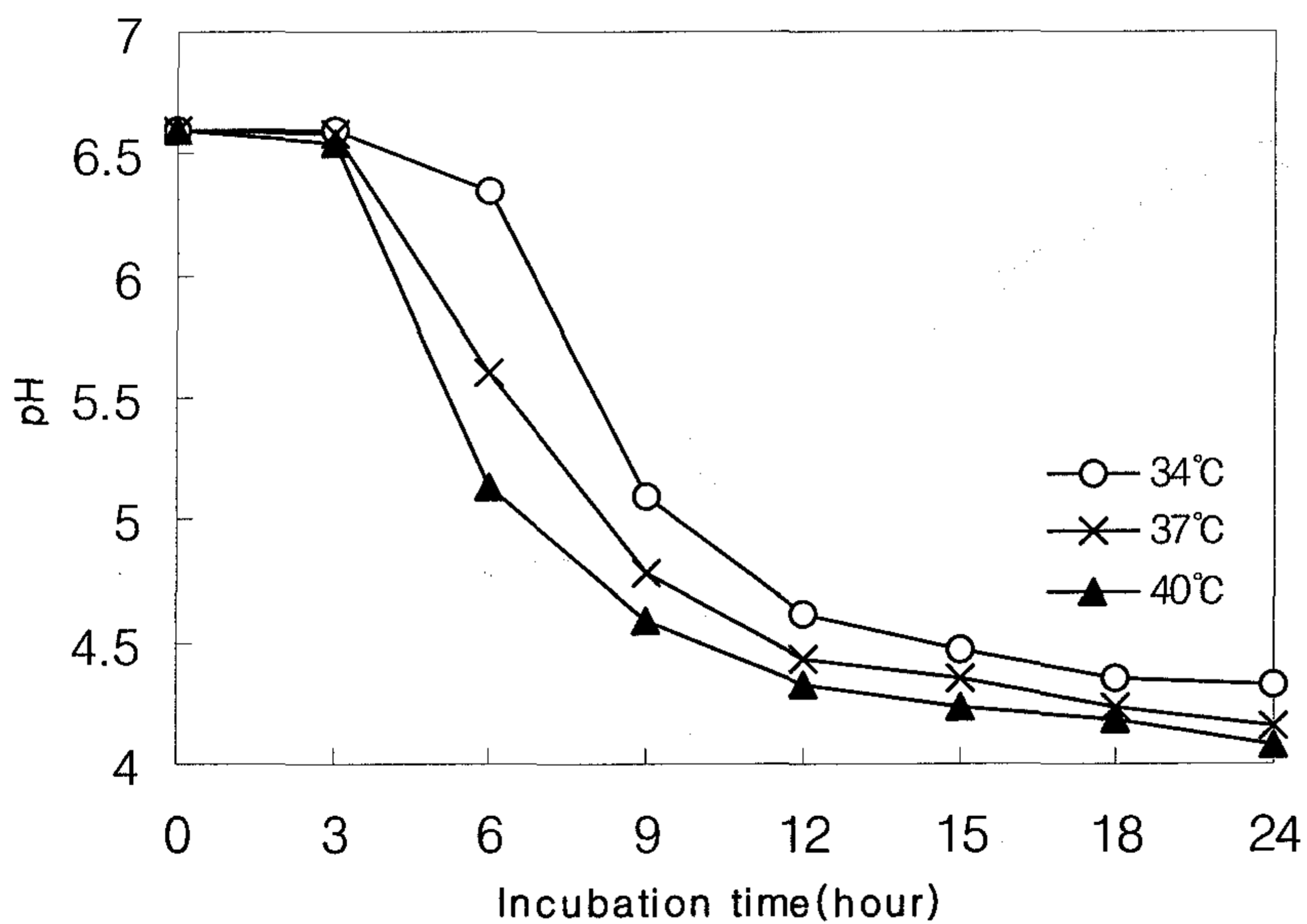


Figure 7. pH changes of 10% reconstituted skim milk during the growth of *Lactobacillus plantarum* K14 at various temperature

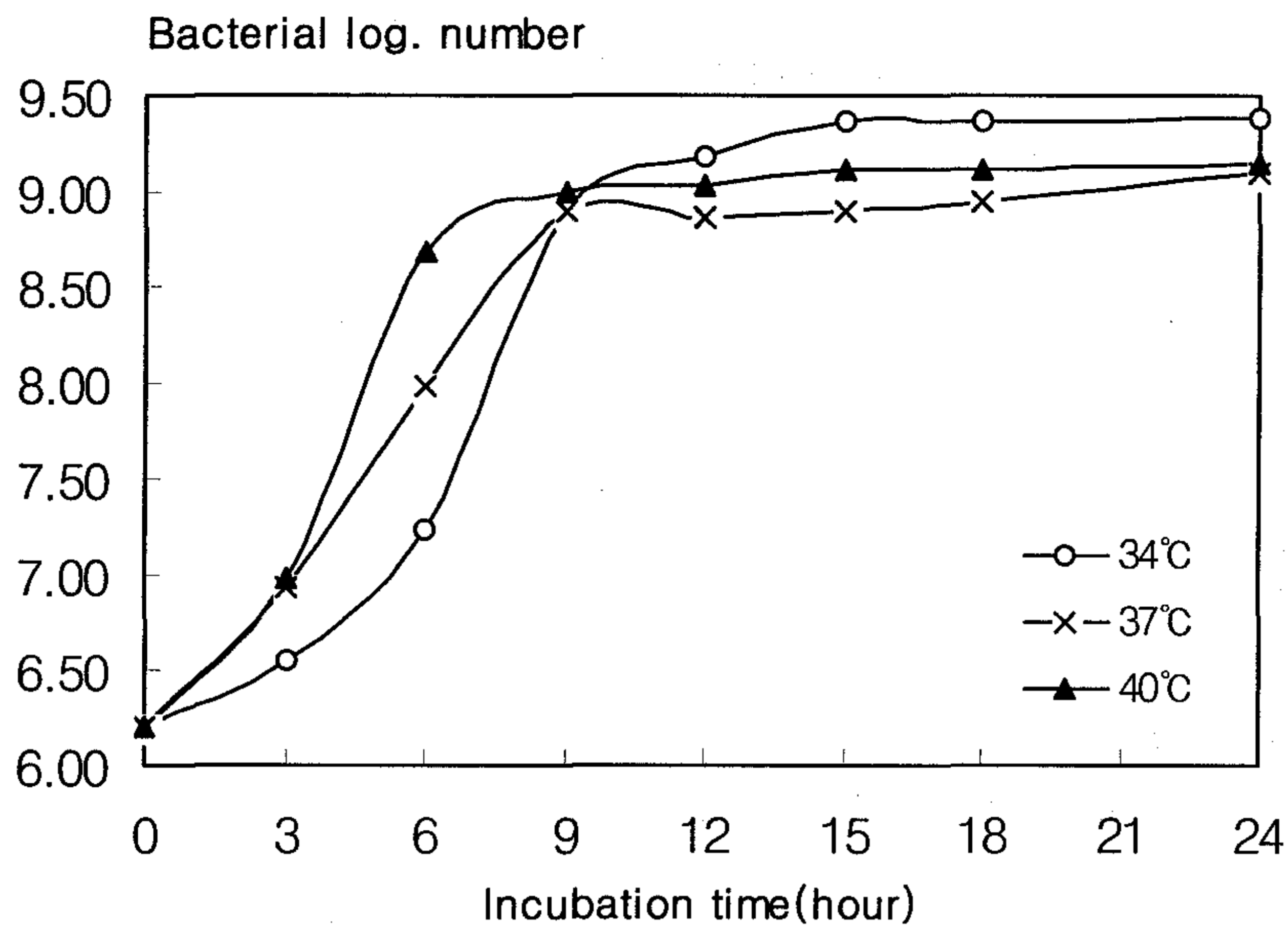


Figure 8. Growth of *Lactobacillus brevis* K29 in 10% reconstituted skim milk at various temperatures

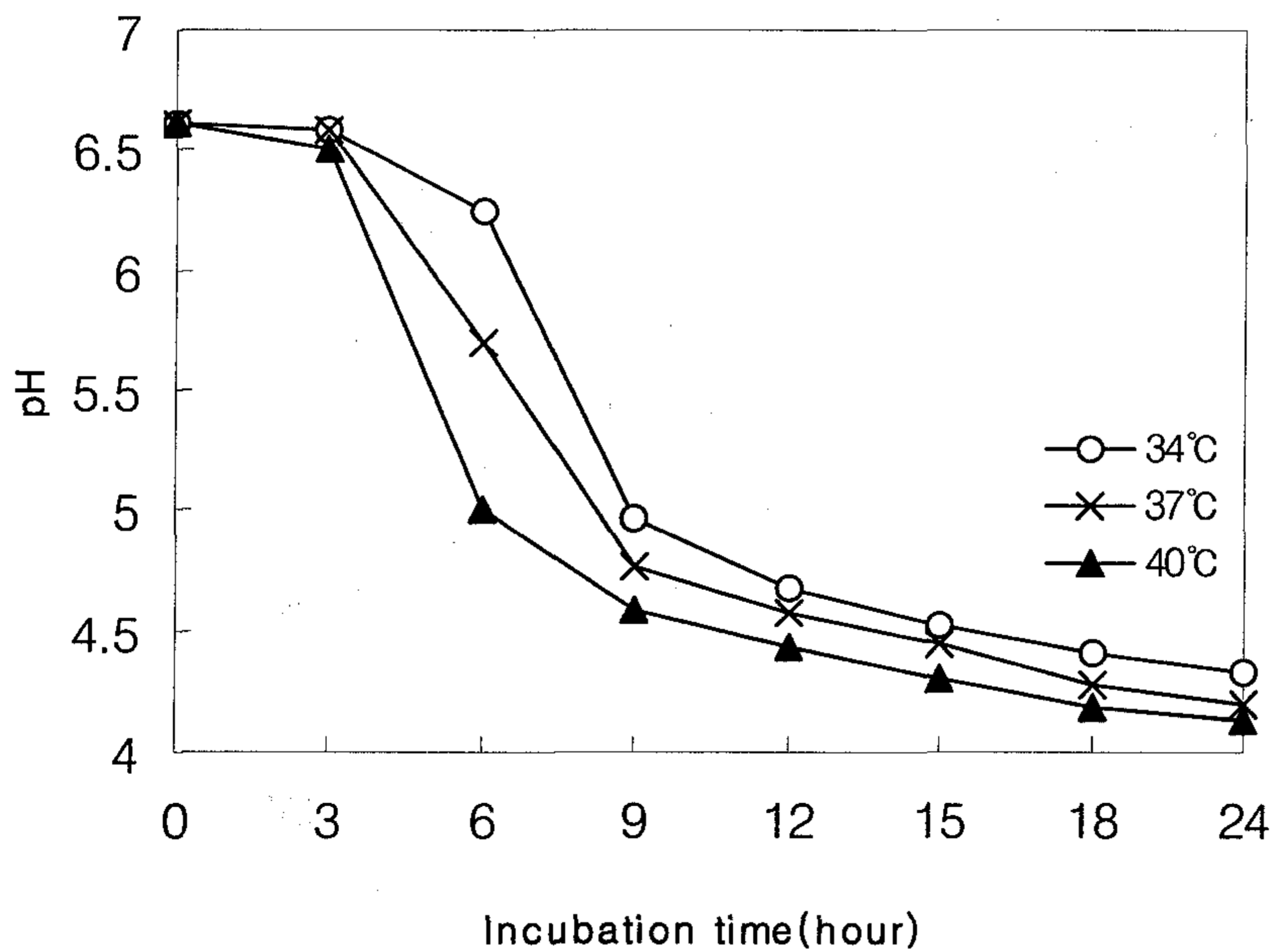


Figure 9. pH changes of 10% reconstituted skim milk during the growth of *Lactobacillus brevis* K29 at various temperature

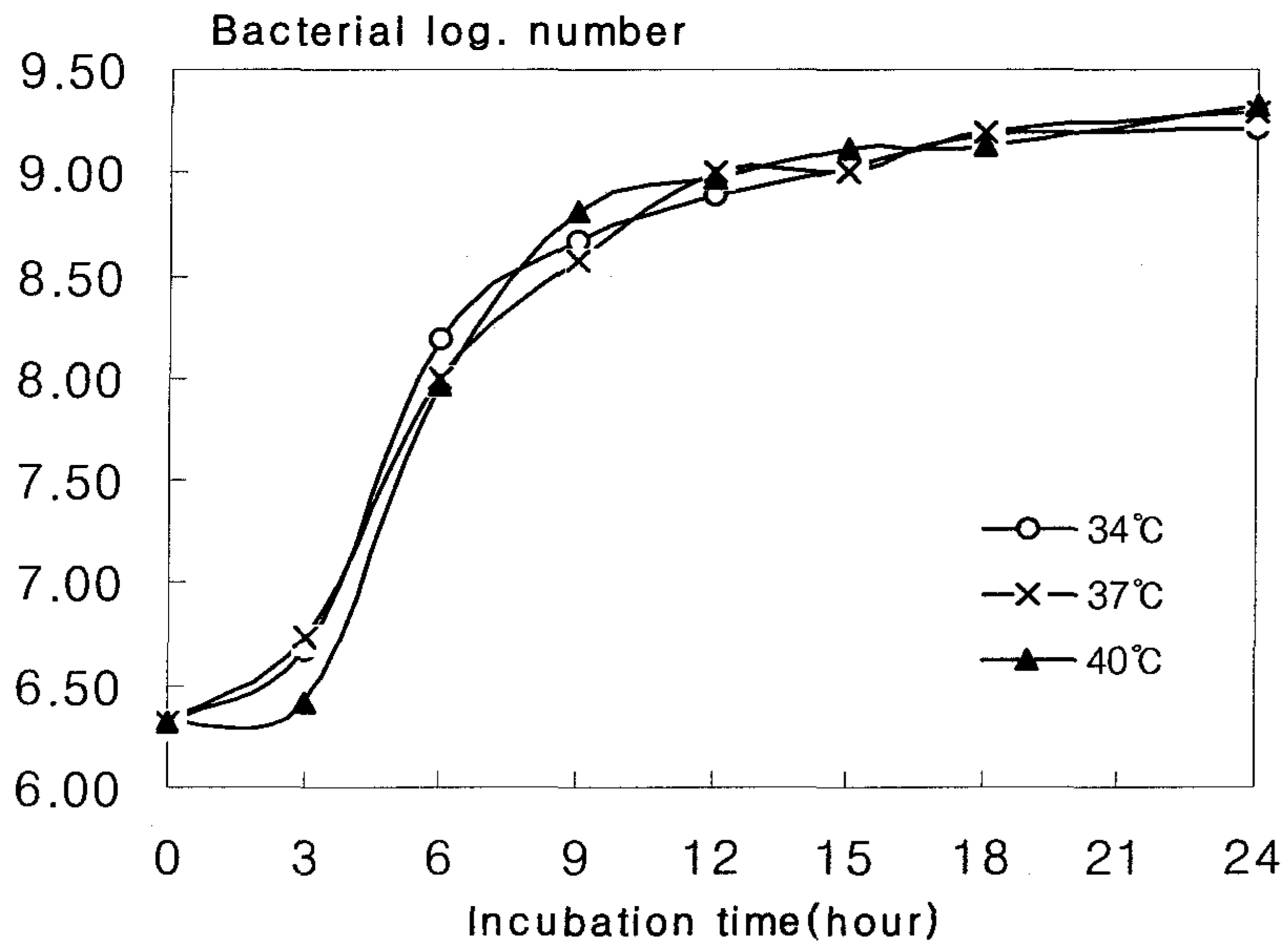


Figure 10. Growth of *Lactococcus lactis* K61 in 10% reconstituted skim milk at various temperatures

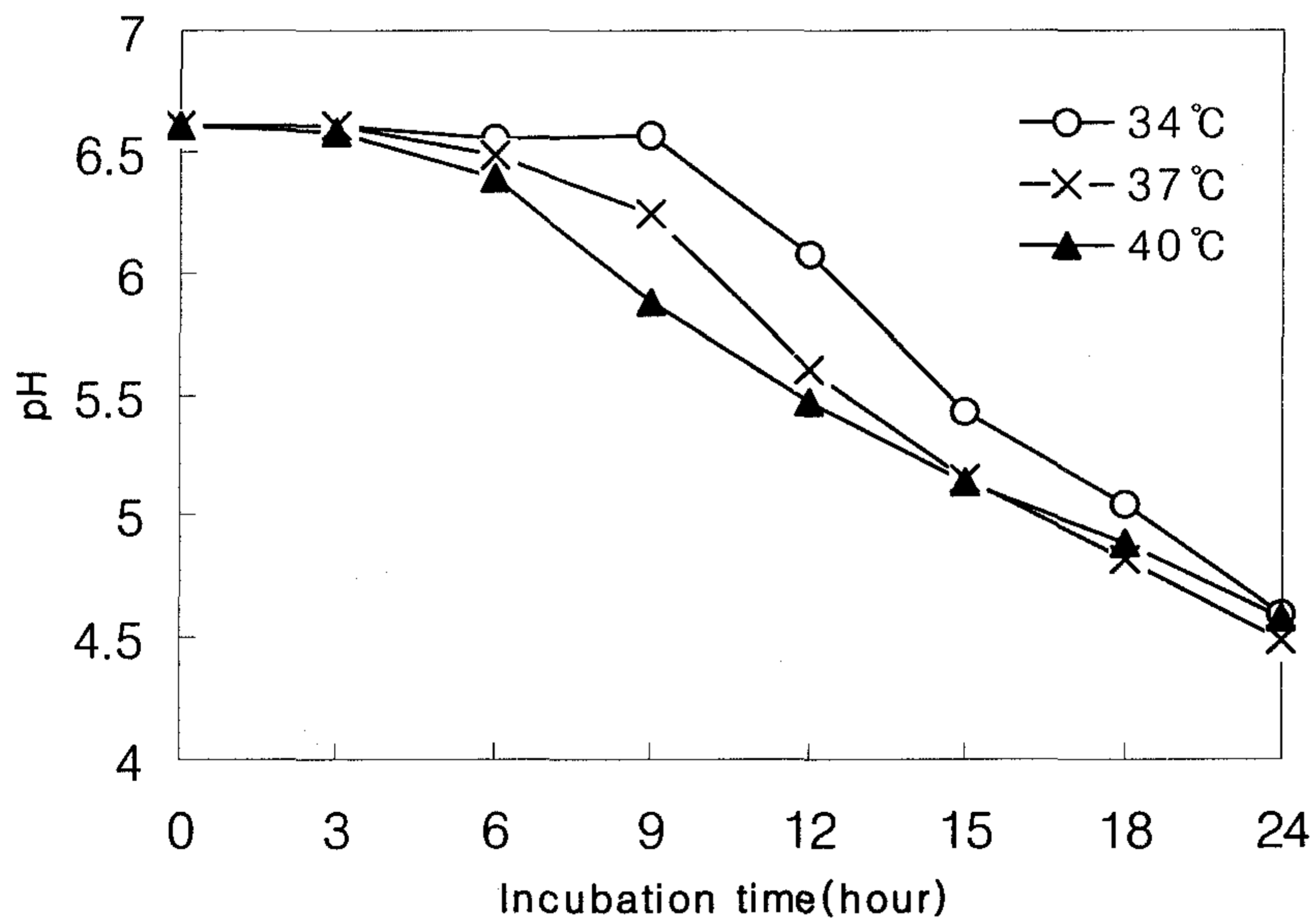


Figure 11. pH changes of 10% reconstituted skim milk during the growth of *Lactococcus lactis* K61 at various temperature

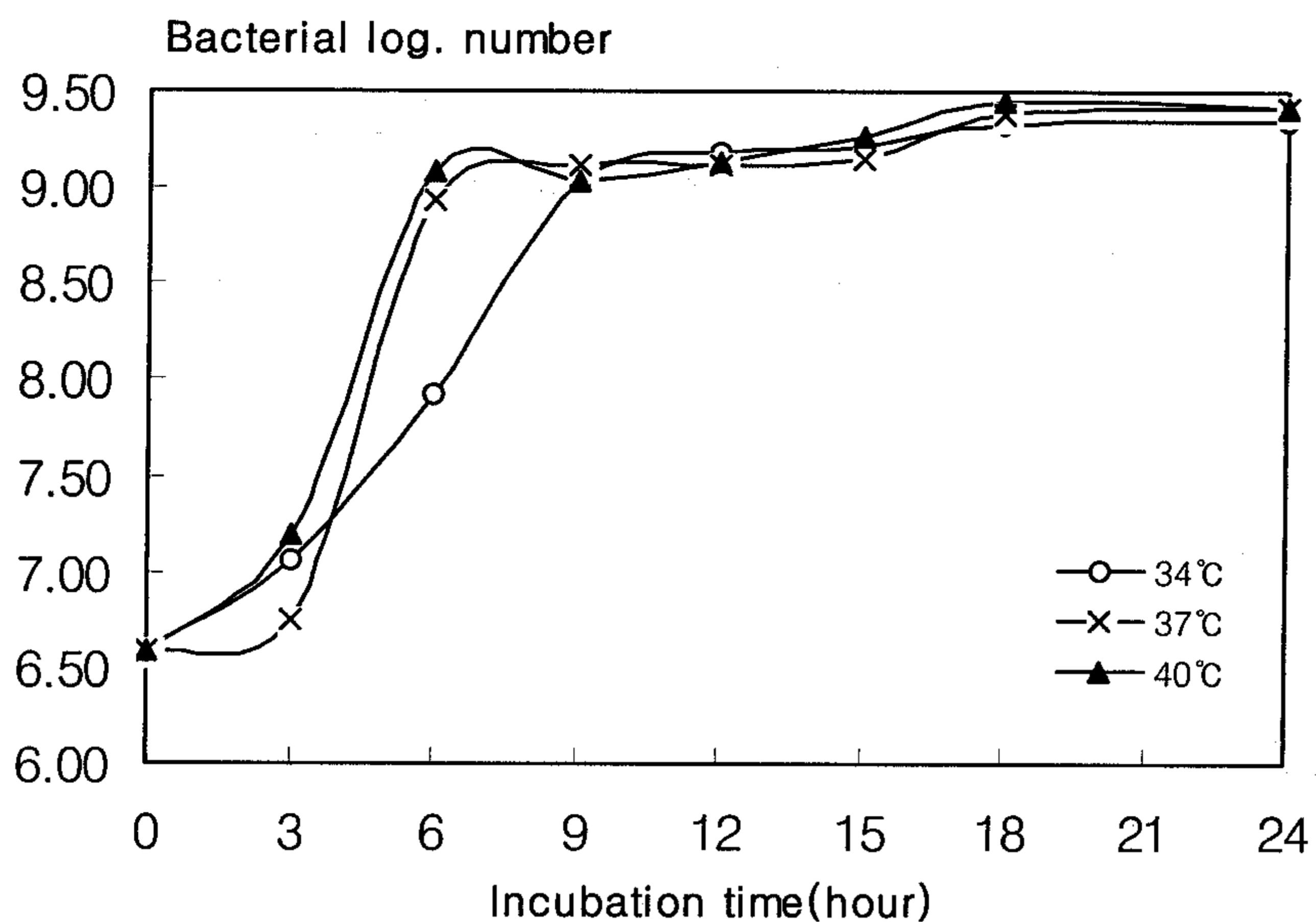


Figure 12. Growth of *Lactobacillus zeae* K354 in 10% reconstituted skim milk at various temperatures

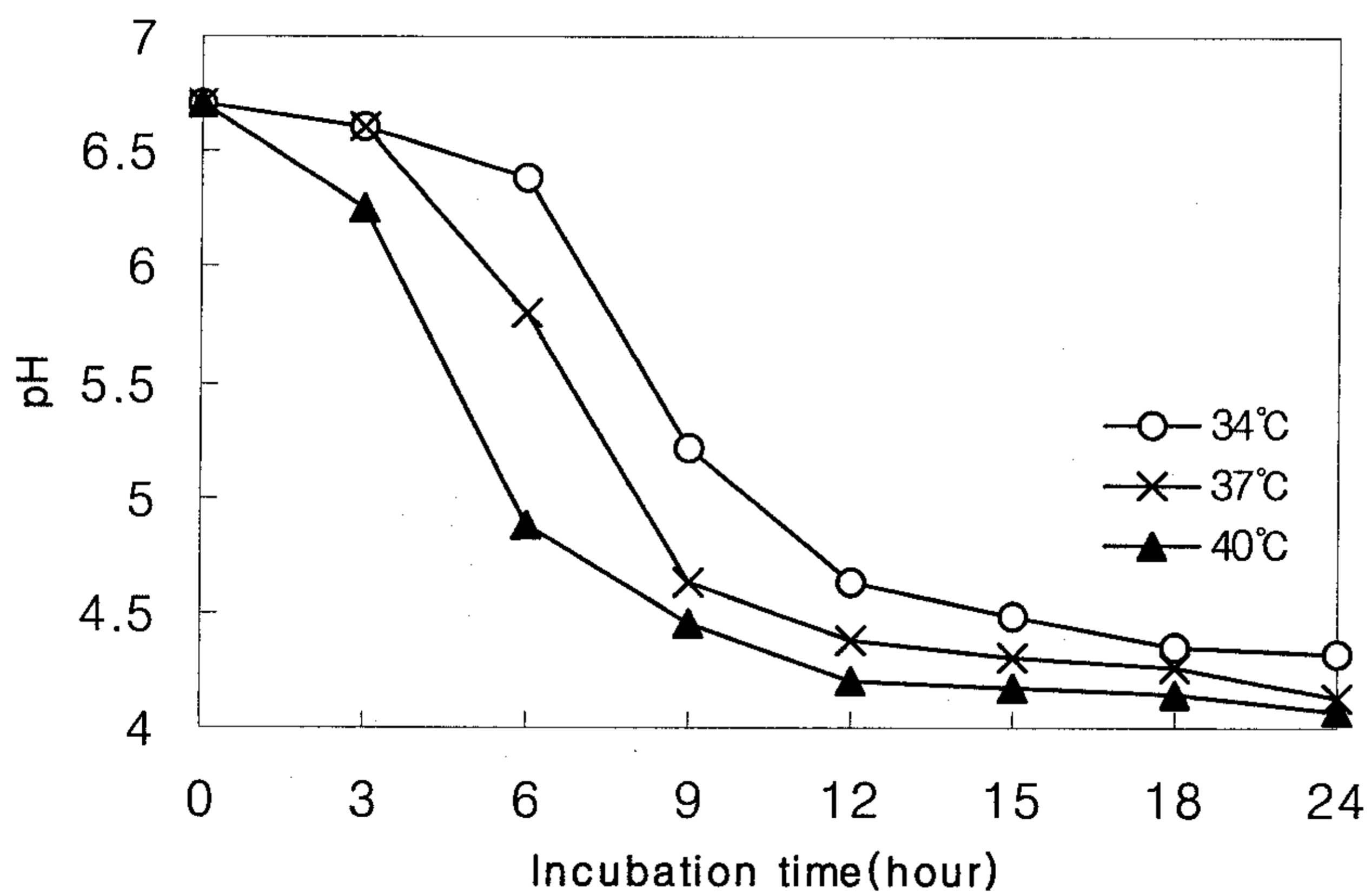


Figure 13. pH changes of 10% reconstituted skim milk during the growth of *Lactobacillus zeae* K354 at various temperature

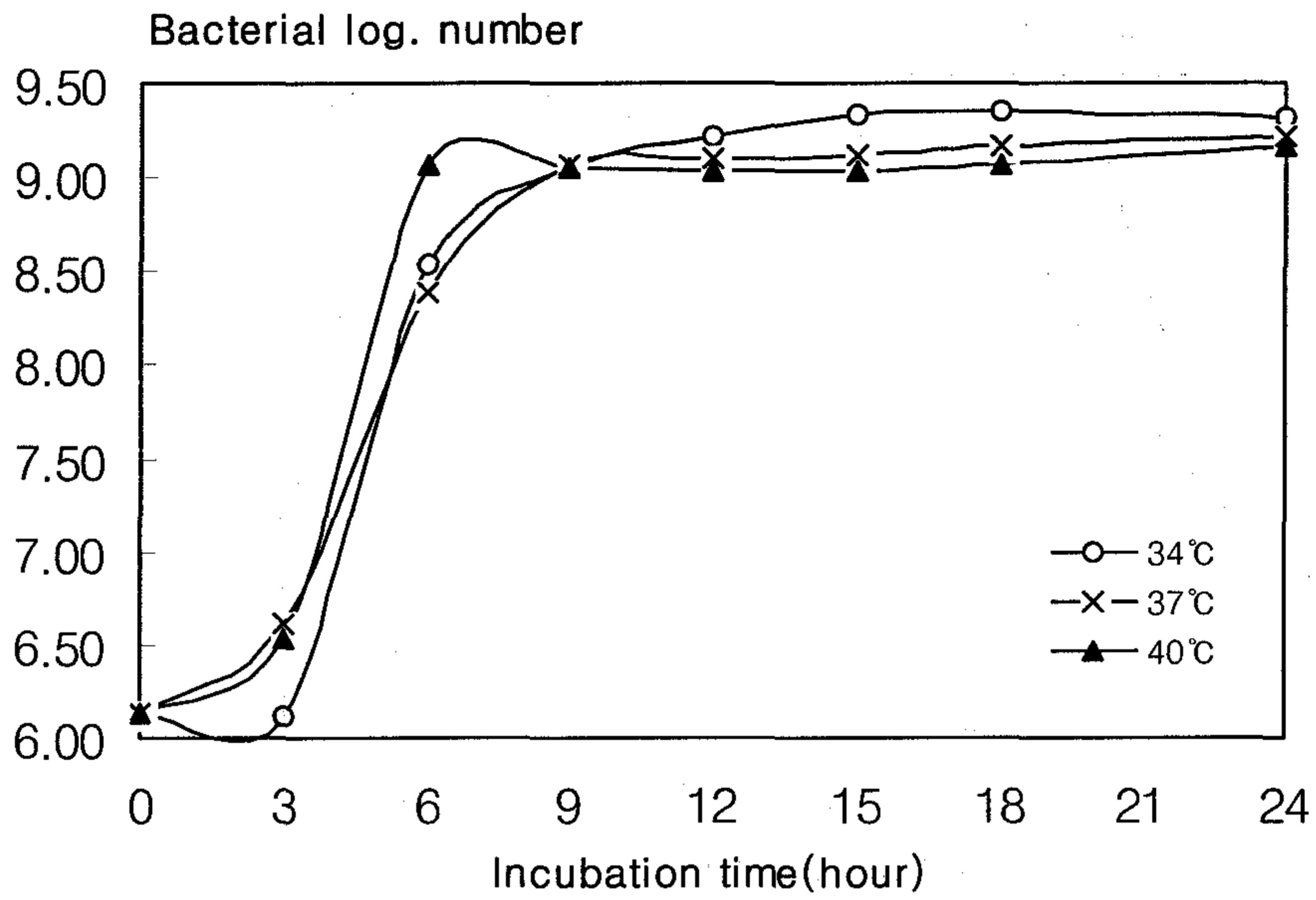


Figure 14. Growth of *Lactococcus plantarum* K359 in 10% reconstituted skim milk at various temperatures

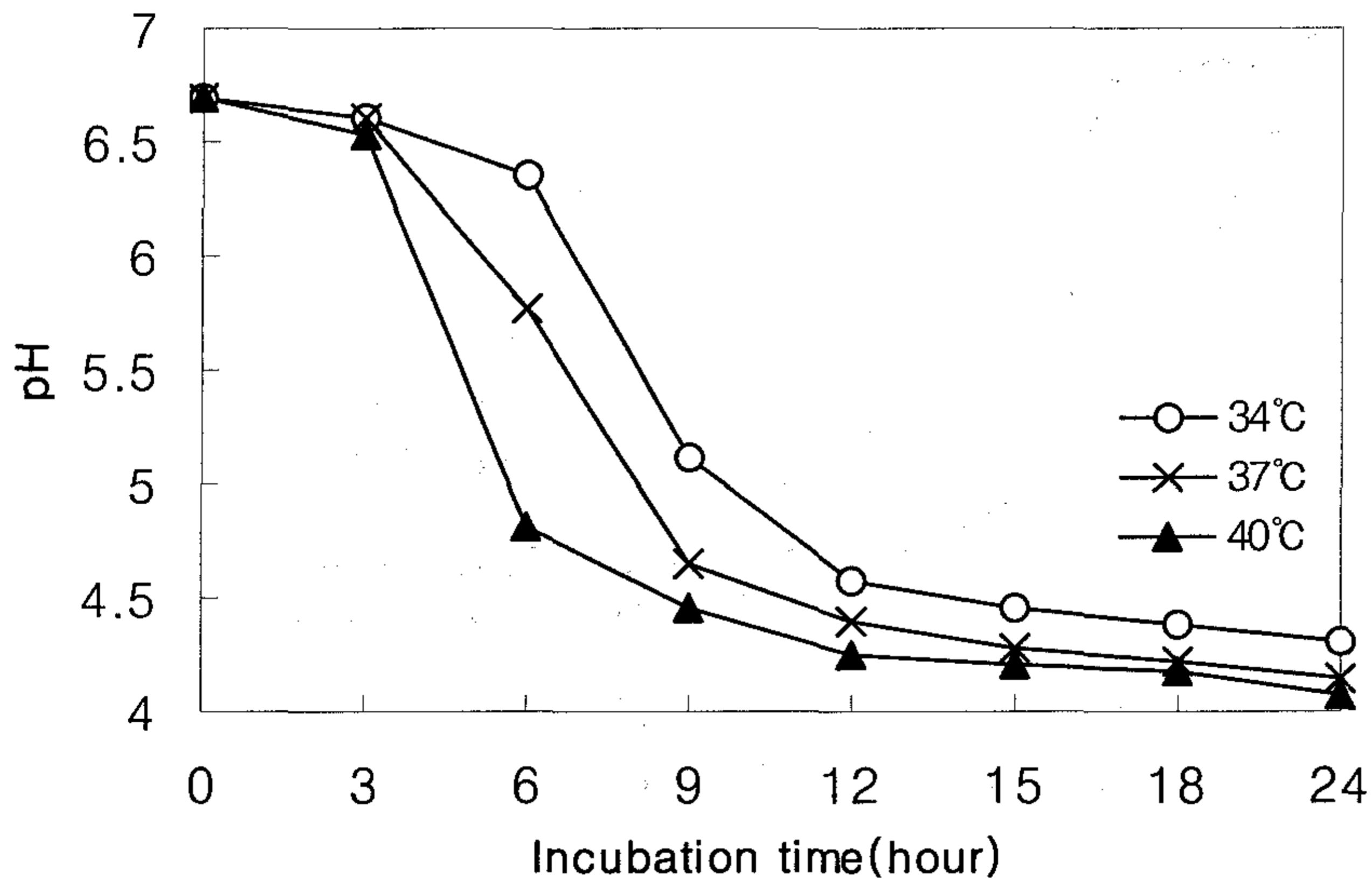


Figure 15. pH changes of 10% reconstituted skim milk during the growth of *Lactococcus plantarum* K359 at various temperature

*Enterococcus faecalis* B46 균주는 homo 발효를 하는 균주로서 34℃, 37℃와 40℃ 배양시 대수기까지 12시간이 소요되었고, pH는 발효유 적정 pH 4.3-4.4에 도달하는데 27시간이 소요됨에 따라 온도간에는 큰 영향이 없었지만 37℃가 가장 적정 온도로 나타났다.

*Lactobacillus plantarum* K14 균주는 homo 발효를 하는 균주로서 34℃ 배양시 대수기까지 12시간이 소요되었고, pH는 발효유 적정 pH 4.3-4.4에 도달하는데 18-24시간이 소요되었다. 37℃ 배양에서는 대수기까지 9시간, pH는 15시간이 소요된 반면, 40℃ 배양에서는 대수기까지 6시간, pH는 12시간이 소요됨에 따라 배양 온도가 증가할수록 배양시간이 단축됨에 따라 40℃가 가장 적정온도로 나타났다.

*Lactobacillus brevis* K29 균주는 hetero 발효를 하는 균주로서 34℃ 배양시 대수기까지 9시간이 소요되었고, pH는 발효유 적정 pH 4.3-4.4에 도달하는데 18-24시간이 소요되었다. 37℃ 배양에서는 대수기까지 9시간, pH는 15-18시간이 소요된 반면, 40℃ 배양에서는 대수기까지 6시간, pH는 12-15시간이 소요됨에 따라 배양 온도가 증가할수록 배양시간이 단축됨에 따라 40℃가 가장 적정온도로 나타났다.

*Lactococcus lactis* K61 균주는 homo 발효를 하는 균주로서 앞선 균주에 비해 온도 간 큰 차이가 없는 것으로 나타났는데, 대수기까지 공히 9시간이 소요되었고, 산 생성능력은 타 균주에 비해 낮아 적정 발효 pH에 도달하는데 24시간이 소요됨에 따라 제품화하는데 많은 시간이 소요될 것으로 보인다. 통상적으로

*Lactococcus lactis* 균주는 중온성균으로 체다, 고다 및 경질치즈의 스타터로 사용되는 균으로 최적 생육온도는 30℃로 알려져 있지만 분리 선발된 균주는 미미하지만 40℃가 산생성능이 많은 것으로 나타났다. *Lactobacillus zeae* K354 균주는 homo 발효를 하는 균주로서 34℃ 배양시 대수기까지 9시간이 소요되었고, pH는 발효유 적정 pH 4.3-4.4에 도달하는데 18시간이 소요되었다. 37℃ 배양에서는 대수기까지 6시간, pH는 12-15시간이 소요된 반면, 40℃ 배양에서는 대수기까지 6시간, pH는 10시간 전후 소요됨에 따라 배양온도가 증가할수록 배양시간이 단축됨에 따라 40℃가 가장 적정온도로 나타났다.

*Lactobacillus plantarum* K359 균주는 homo 발효를 하는 균주로서 34℃와 37℃ 공히 대수기까지 6시간 소요되었고, pH는 34℃가 24시간, 37℃가 14시간 소요된 반면, 40℃ 배양에서는 대수기까지 6시간, pH는 11시간 전후로 나타났으며, 적정온도는 40℃로 나타났다.

2) 항생제 내성

항생제 내성 시험은 tryptic soy broth(Difco)를 사용하여 2배희석방법에 의해 성장여부를 관찰하여 최저억제농도(MIC) 값을 정하였으며, 그 결과는 Table 15에서 보는 바와 같다.

Table 15. Antibiotics susceptibility of *Enterococcus faecalis* B46, *Lactobacillus plantarum* K14, *Lactobacillus brevis* K29, *Lactococcus lactis* K61, *Lactobacillus zeae* K354 and *Lactobacillus plantarum* K359

Antimicrobial agents	strains					
	<i>E. faecalis</i> B46	<i>L. plantarum</i> K14	<i>L. brevis</i> K29	<i>L. lactis</i> K61	<i>L. zeae</i> K354	<i>L. plantarum</i> K359
————— minimal inhibitory concentrations( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) —————						
Aminoglycosides						
Amikacin	320	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25
Gentamycin	640	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25
Kanamycin	1600	100	100	100	100	50
Neomycin	200	12.5	200	12.5	12.5	50
Streptomycin*	1600	100	100	100	50	100
$\beta$ -lactams						
Penicillin-G*	10	0.156	0.078	0.078	0.156	0.156
Methicillin	40	160	160	160	160	160
Oxacillin	120	7.5	7.5	1.325	7.5	3.75
Ampicillin	2.5	20	20	20	20	20
Gram-positive spectrum						
Bacitracin*	7.5	0.312	10	10	0.312	0.625
Rifampicin	1200	60	15	120	30	3.75
Novobiocin	15	10	0.039	0.039	0.312	40
Lincomycin	400	20	20	20	20	20
Gram-negative spectrum						
Polymyxin B*	12000	1200	2400	2400	1200	4800
Broad spectrum						
Chloramphenicol	80	20	10	10	10	5
Vancomycin*	250	800	800	400	1600	3200

\* : units/ml



*Enterococcus faecalis* B46 균주는 5종의 *Lactobacillus* 균주에 비해 Methicillin, Ampicillin 및 Vancomycin을 제외하고 항생물질에 대한 내성이 강한 것으로 나타났다. 5종의 *Lactobacillus* 젖산균은 Amikacin, Gentamycin, Methicillin, Ampicillin, Lincomycin 등의 항생물질에 대하여 동일한 저항성을 보였으며, 특히 *Lactobacillus plantarum* K14 균주는 다른 4종의 균주에 비해 Chloramphenicol에 대하여 내성이 강한 반면 Neomycin, Bacitracin과 Polymyxin B에 대해서는 내성이 약한 것으로 나타났다. *Lactobacillus brevis* K29 균주는 Neomycin과 Oxacillin이 내성이 강한 반면 Penicillin-G과 Novobiocin에 대해서는 약하였다. *Lactococcus lactis* K61 균주는 Rifampicin에 대해 내성이 강하였으나 Neomycin, Penicillin-G, Oxacillin, Novobiocin 및 Vancomycin에는 약하였다. *Lactobacillus paracasei* K354 균주는 Oxacillin에 대해 내성이 강한편이나 Neomycin, Streptomycin, Bacitracin 및 Polymyxin B에는 약하였다. *Lactobacillus plantarum* K359 균주는 Novobiocin, Polymyxin B 및 Vancomycin에 대해 내성이 강한 반면 Kanamycin 과 Chloramphenicol에는 약하였다. 특히 5종의 *Lactobacillus* 균들은 Polymyxin B와 Vancomycin에 대해 내성이 강한 반면, Amikacin, Gentamycin 및 Penicillin-G에는 내성이 약한 것으로 나타났다.

### 3) 효소 활성

젖산균 6종의 효소활성은 API ZYM kit를 사용하여 실시하였으며, 그 결과는 Table 16에서 보는 바와 같다.

*E. faecalis* B46은 5종의 *Lactobacillus* 균주에 비해 Alkaline phosphatase, Esterase, Acid phosphatase 및 Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase에서 효소 활성이 높게 나타난 반면, Leucine arylamidase 및  $\beta$ -galactosidase에서는 효소활성이 없는 것으로 나타났다.

5종의 *Lactobacillus* 균주는 Alkaline phosphatase, Lipase, Valine arylamidase, Cystine arylamidase, Trypsine,  $\alpha$ -chymotrypsine, Phosphatase acide,  $\alpha$ -galactosidase,  $\beta$ -glucuronidase,  $\alpha$ -glucosidase,  $\beta$ -glucosidase, N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase,  $\alpha$ -mannosidase 및  $\alpha$ -fucosidase 등의 효소에 대해 활성이 없는 것으로 나타났다.

Table 16. Enzyme patterns of *Enterococcus faecalis* B46, *Lactobacillus plantarum* K14, *Lactobacillus brevis* K29, *Lactococcus lactis* K61, *Lactobacillus zeae* K354 and *Lactobacillus plantarum* K359

Enzyme	Strains					
	B46	K14	K29	K61	K354	K359
Alkaline phosphatase	5	0	0	0	0	0
Esterase(C4)	4	1	1	2	3	2
Esterase lipase(C8)	2	1	1	2	2	0
Lipase(C14)	0	0	0	0	0	0
Leucine arylamidase	0	2	3	3	3	2
Valine arylamidase	0	0	0	0	0	0
Cystine arylamidase	0	0	0	0	0	0
Trypsin	0	0	0	0	0	0
Chymotrypsin	0	0	0	0	0	0
Acid phosphatase	3	0	0	0	0	0
Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase	3	1	1	1	1	1
$\alpha$ -galactosidase	0	0	0	0	0	0
$\beta$ -galactosidase	0	4	1	2	1	3
$\beta$ -glucuronidase	0	0	0	0	0	0
$\alpha$ -glucosidase	0	0	0	0	0	0
$\beta$ -glucosidase	0	0	0	0	0	0
N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase	0	0	0	0	0	0
$\alpha$ -mannosidase	0	0	0	0	0	0
$\alpha$ -fucosidase	0	0	0	0	0	0

\* : A value ranging from 0 to 5 is assigned to the standard color, Zero represents a negative ; 5 represent a reaction of maximum intensity. Values 1 through 4 represent intermediate reactions depending on the level of intensity. The approximate activity may be estimated from the color strength ; 1 corresponds to the liberation of 5 nanomoles, 2 to 10 nanomoles, 3 to 20 nanomoles, 4 to 30 nanomoles and 5 to 40 nanomoles or more.

*Lactobacillus plantarum* K14균주는 다른 5종의 젖산균에 비해  $\beta$ -galactosidase 가 4로서 높은 활성을 나타내었고, *Lactobacillus brevis* K29, *Lactococcus lactis* K61 및 *Lactobacillus zeae* K354균주는 Leucine arylamidase에 대해 효소활성이 공히 3을 나타내었고, *Lactococcus lactis* K61 및 *Lactobacillus zeae* K354균주는

Esterase Lipase에 대해 공히 2를 나타내었다. 특히 젓산균 6종 모두 Benzopyrene을 발암성 물질로 전환시키는 발암효소인  $\beta$ -glucuronidase의 경우에는 효소활성이 없는 것으로 나타나 안전성을 확인할 수 있었다.

#### 4) 담즙내성

담즙에 대한 균주의 내성을 시험하기 위하여 oxgall(Difco)을 첨가하지 않은 것과 첨가한 배지에서 각 균주의 내성을 시험한 결과는 각각 Fig. 16~ 21에서 보는 바와 같다.

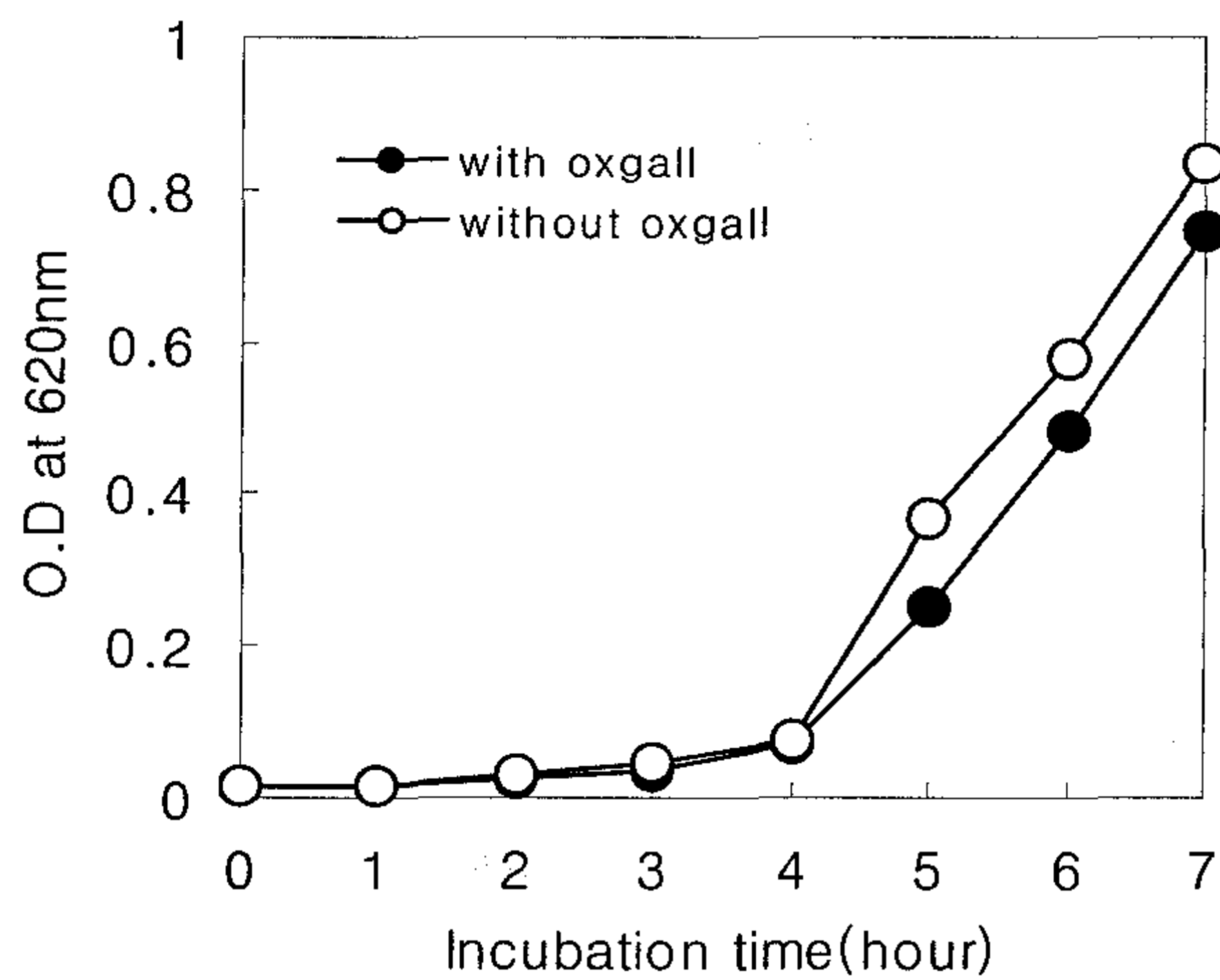


Fig. 16. Growth of *Enterococcus faecalis* B46 in MRS broth containing 0.05% L-cysteine with 0.3% oxgall and without 0.3% oxgall

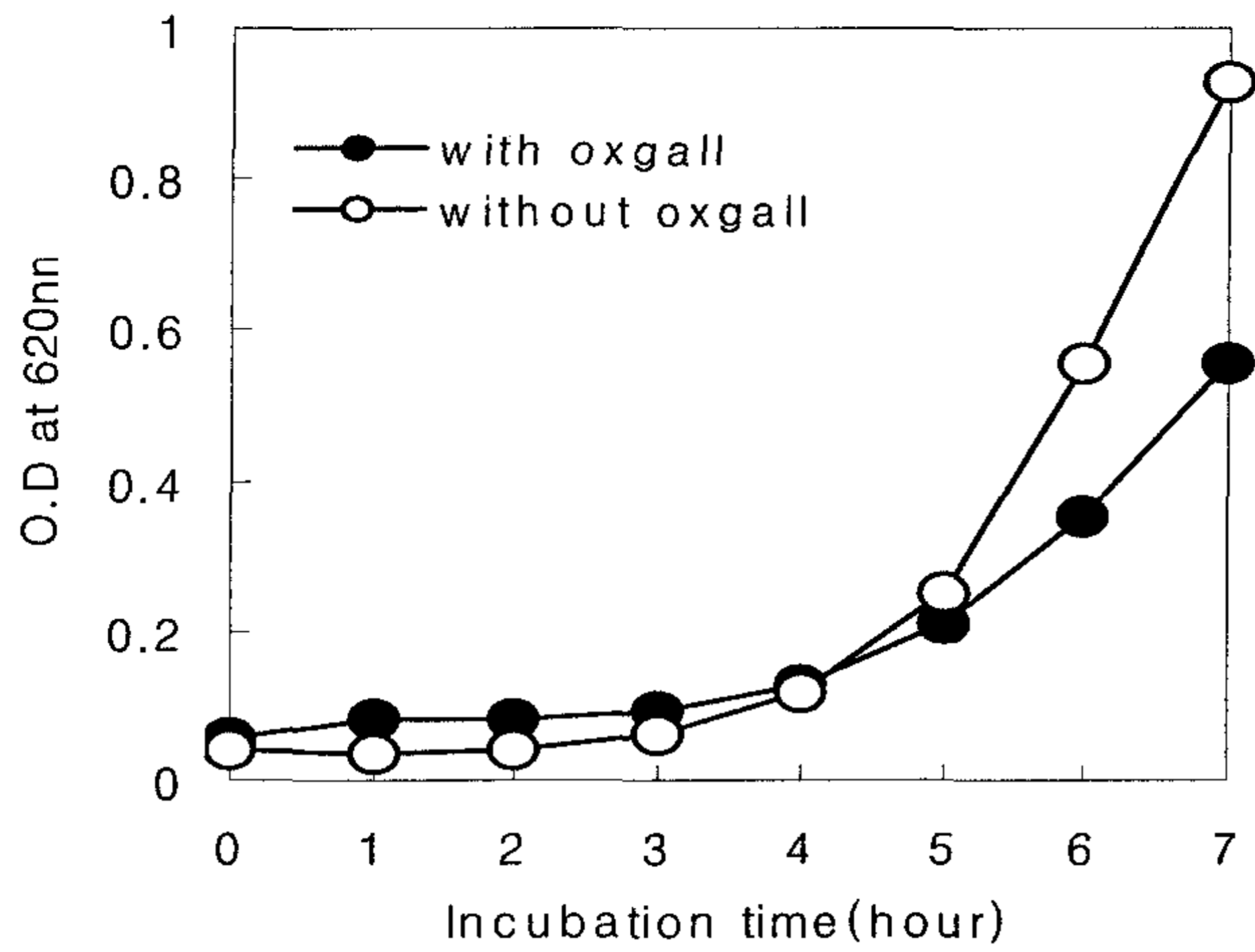


Fig. 17. Growth of *Lactobacillus plantarum* K14 in MRS broth containing 0.05% L-cysteine with 0.3% oxgall and without 0.3% oxgall

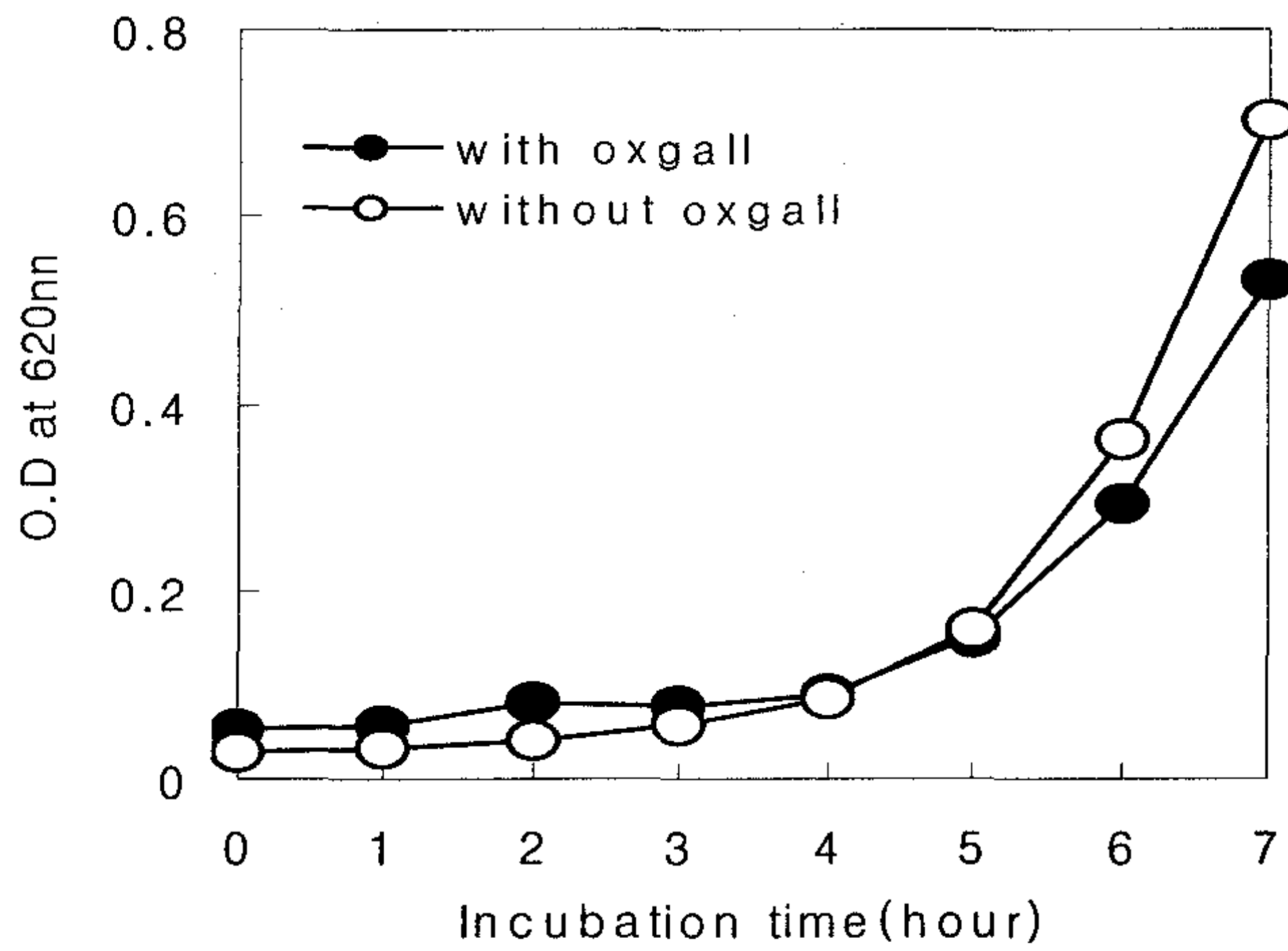


Fig. 18. Growth of *Lactobacillus brevis* K29 in MRS broth containing 0.05% L-cysteine with 0.3% oxgall and without 0.3% oxgall

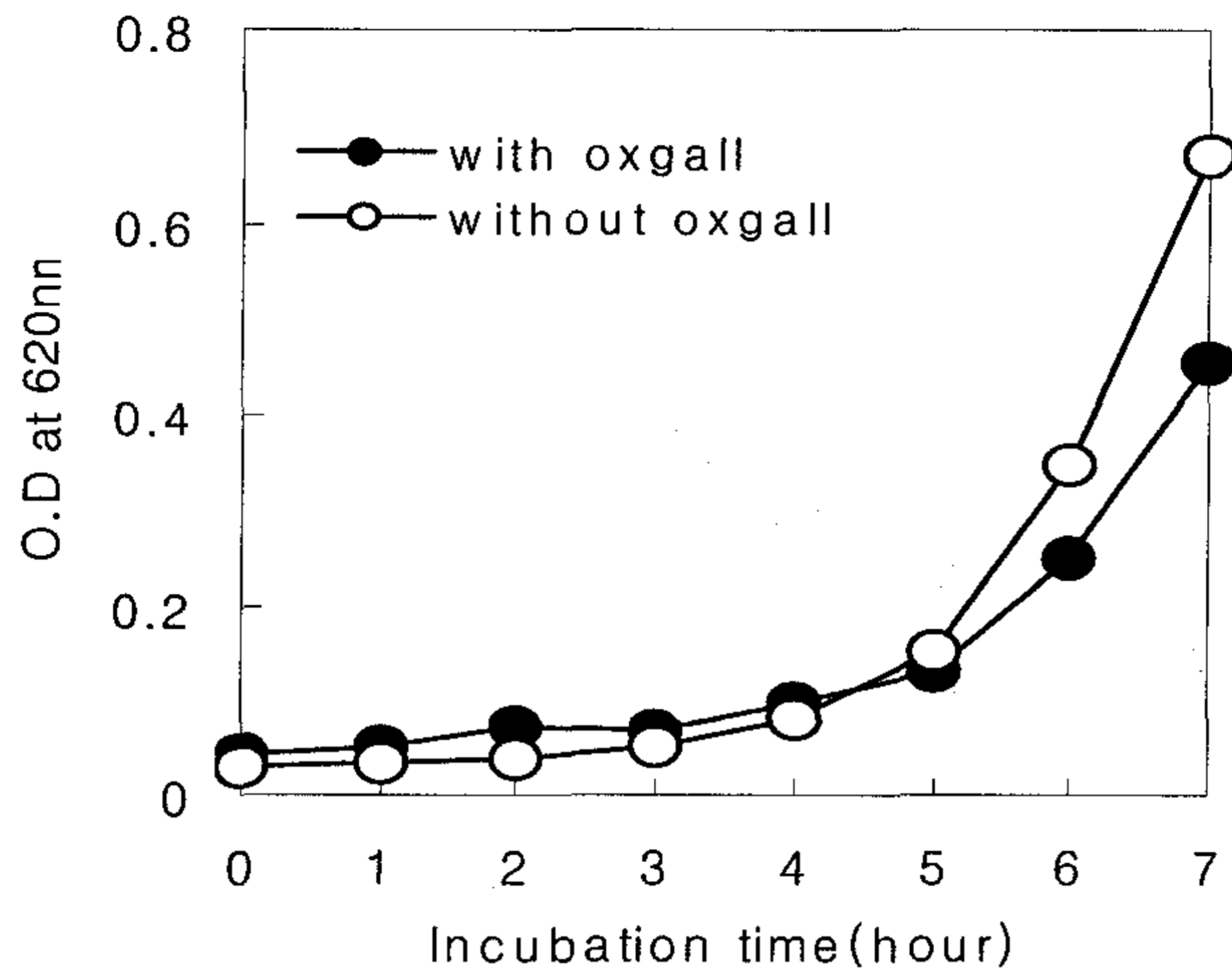


Fig. 19. Growth of *Lactococcus lactis* K61 in MRS broth containing 0.05% L-cysteine with 0.3% oxgall and without 0.3% oxgall

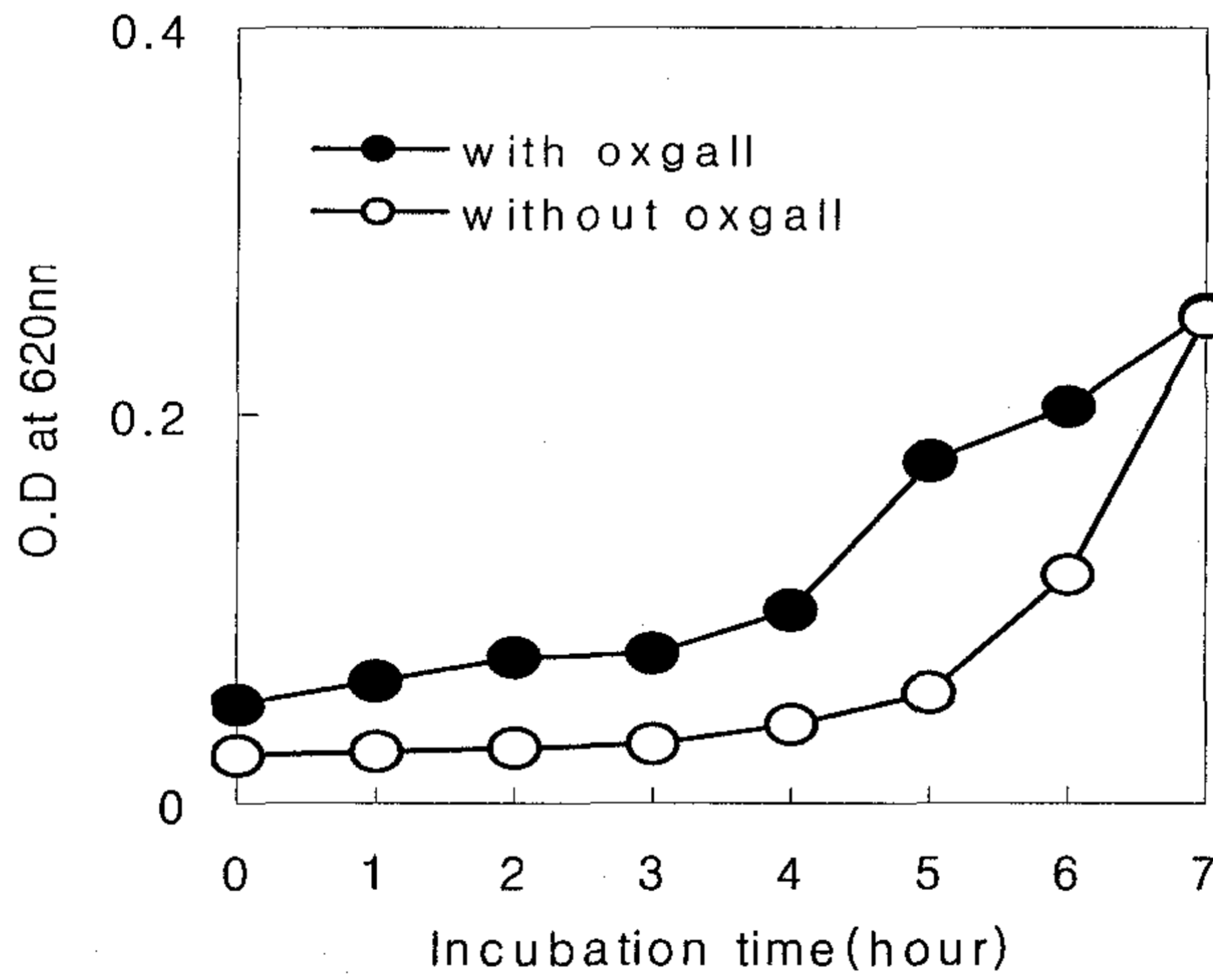


Fig. 20. Growth of *Lactococcus zeae* K354 in MRS broth containing 0.05% L-cysteine with 0.3% oxgall and without 0.3% oxgall

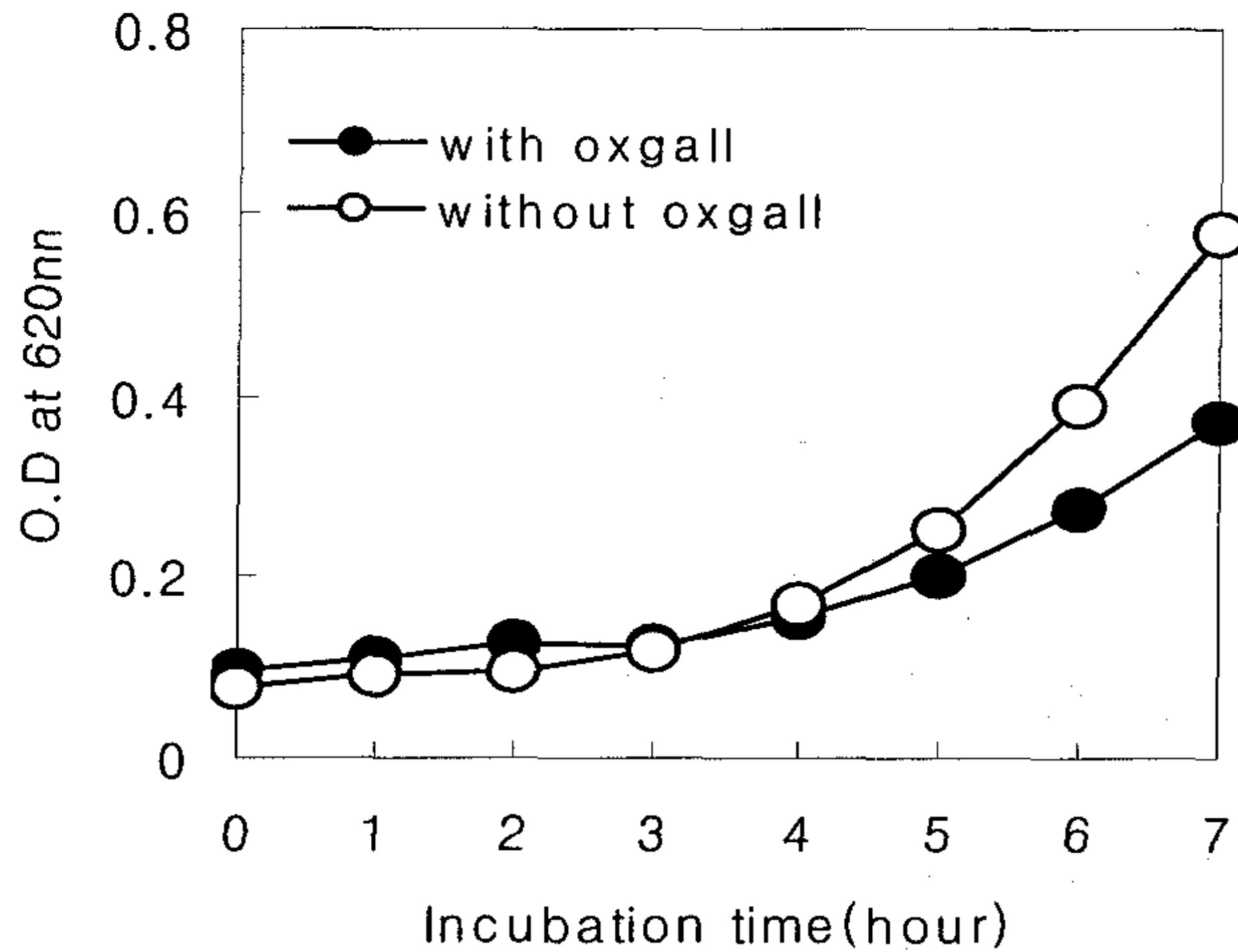


Fig. 21. Growth of *Lactobacillus plantarum* K359 in MRS broth containing 0.05% L-cysteine with 0.3% oxgall and without 0.3% oxgall

Fig. 16~ 21에서 보는 바와 같이 oxgall을 첨가하지 않은 경우와 첨가한 경우 간에 OD값이 차이가 있기는 하나 *Enterococcus faecalis* B46은 4시간 이후, 기타 5종의 *Lactobacillus* 균주는 공히 5시간 이후에 성장속도가 빠르게 나타나는 추세를 보였으며, 최종 7시간까지는 동일한 순으로 성장하였다.

OD값이 0.3에 도달하는데 소요되는 시간을 측정한 결과를 보면 oxgall 무첨가구는 *Enterococcus faecalis* B46 균주가 4.7시간, *Lactobacillus plantarum* K14 균주가 5.2시간, *Lactobacillus plantarum* K359 균주가 5.4시간, *Lactobacillus brevis* K29와 *Lactococcus lactis* K61 균주가 5.8시간, *Lactobacillus zeae* K354 균주는 OD값에 도달하지는 못하였지만 대략 7.3시간이 소요될 것으로 예상된다. oxgall 첨가구는 *Enterococcus faecalis* B46 균주가 5.2시간, *Lactobacillus plantarum* K14 균주는 5.7시간, *Lactobacillus brevis* K29 균주는 6.1시간, *Lactococcus lactis* K61 균주와 *Lactobacillus plantarum* K359 균주 공히 6.4시간이었으며, *Lactobacillus zeae* K354 균주는 대략 8시간이 소요될 것으로 예상되었다.

이는 임 등(1996)에 따르면, 상업용 혼합균주가 5.68시간 소요되었다는 보고와 비교해 볼 때 분리한 젖산균이 oxgall에 크게 영향을 받지 않은 것으로 나타났다. 또한 *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121과 *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4962의 경우 0.3% oxgall 무첨가시 2.73시간과 3.97시간을, 첨가시는 2.93시간과 5.27시간을 각각 나타냈다고 보고한 바 있다(Gilliland 와 Walker, 1990). Cha와

Kim(1994)은 0.3% oxgall 첨가시 *Bifidobacterium longum* KFRI 977이 3.5시간, *Bifidobacterium infantis* KFRI 974는 5시간, *Bifidobacterium bifidum* KFRI 973은 6시간을 각각 나타났다고 한 결과와 비교해 볼 때 담즙에 대한 내성이 상업균주와 비슷한 것으로 나타났다.

### 5) pH 내성

위산과 비슷한 정도의 pH에 대한 내성을 알아보기 위하여 젖산균주를 pH 2, 3, 4 및 6.4의 증류수에서 3시간까지의 생존여부를 시험한 결과는 Fig. 22~27에서 보는 바와 같다.

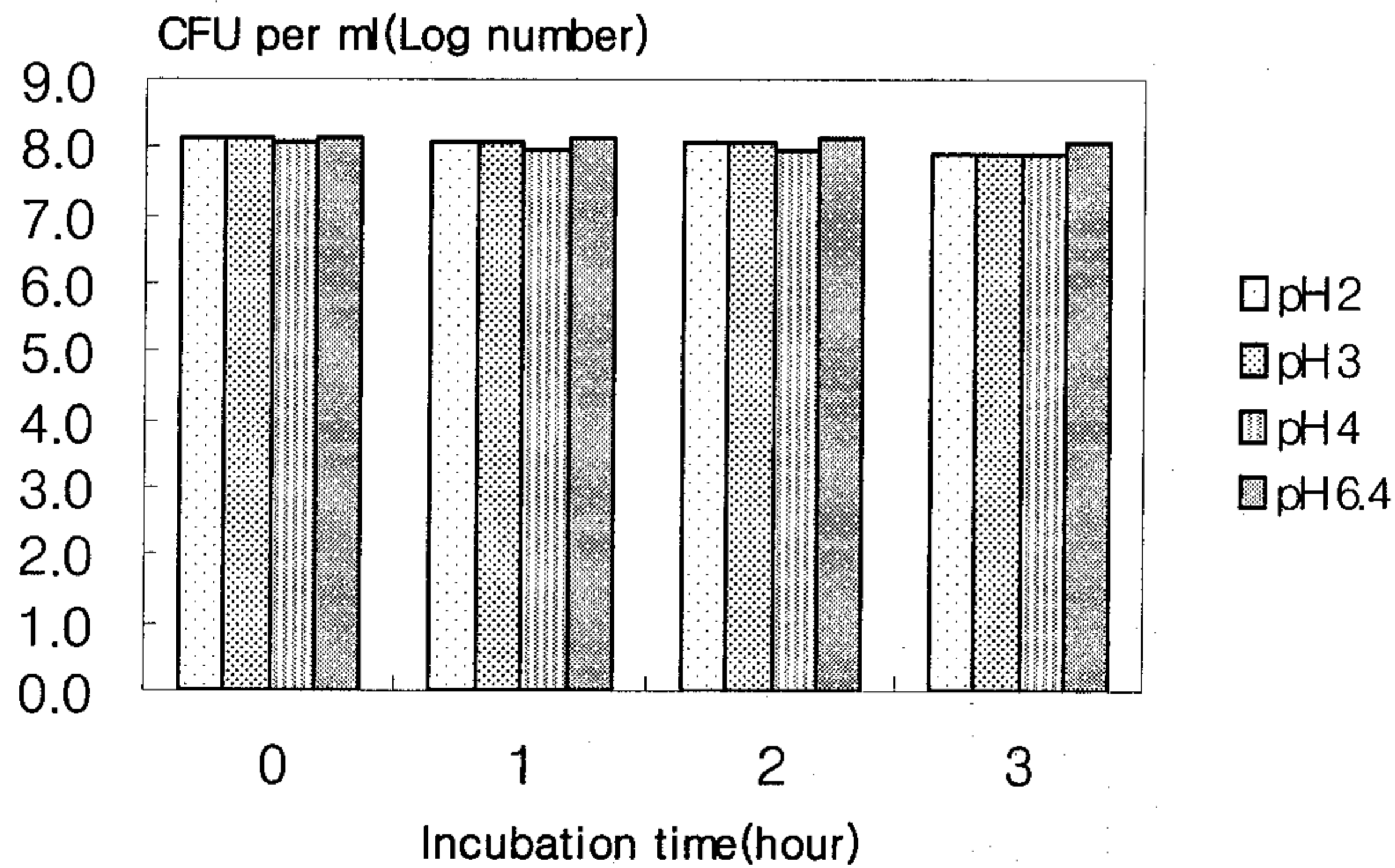


Fig. 22. Survival of *Enterococcus faecalis* B46 after three hours in HCl (pH 2,3,4,6.4)

\* Initial log count before pH treatment : 8.16

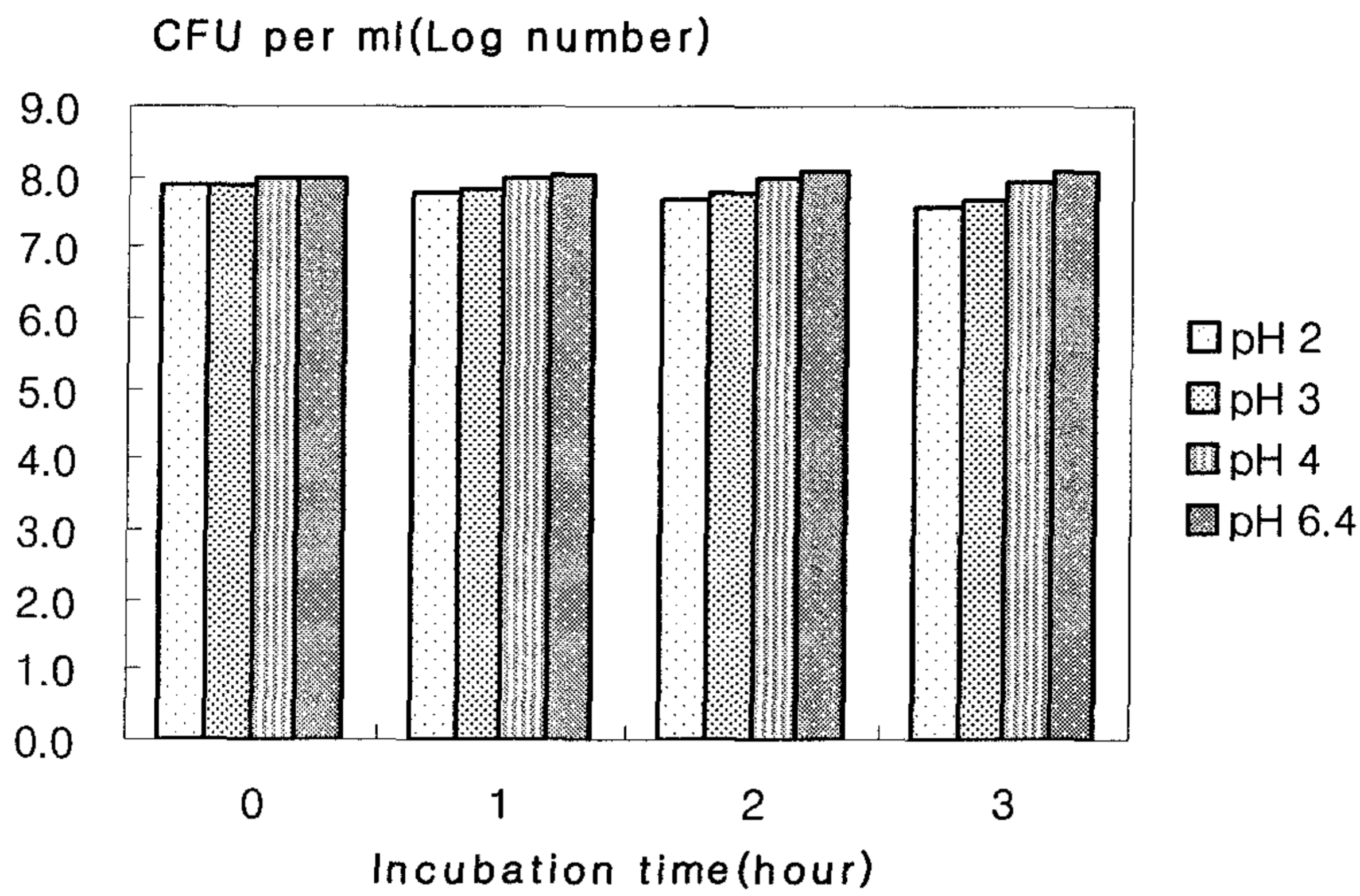


Fig. 23. Survival of *Lactobacillus plantarum* K14 after three hours in HCl (pH 2,3,4,6.4)

\* Initial log count before pH treatment : 7.86

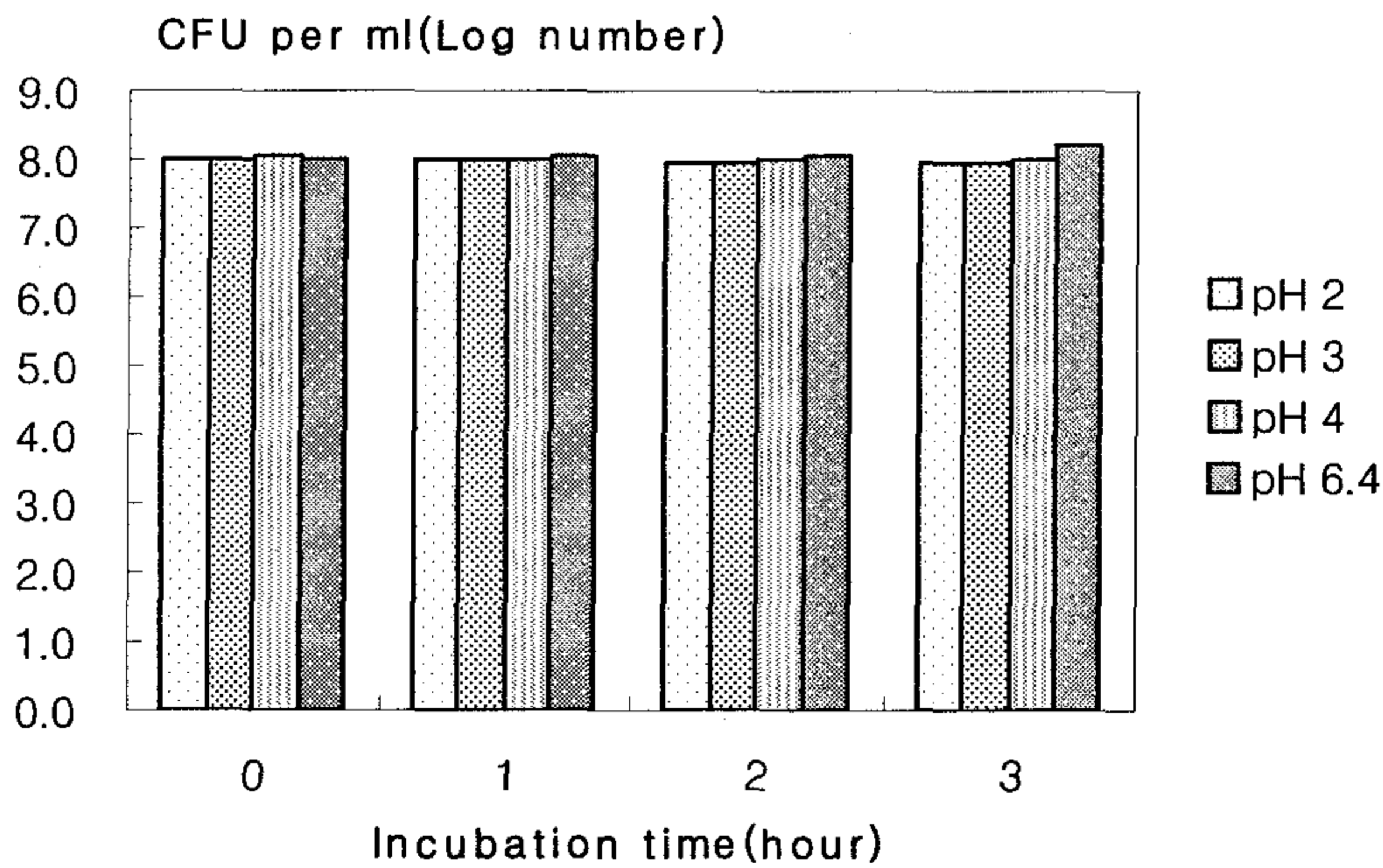


Fig. 24. Survival of *Lactobacillus brevis* K29 after three hours in HCl (pH 2,3,4,6.4)

\* Initial log count before pH treatment : 7.98



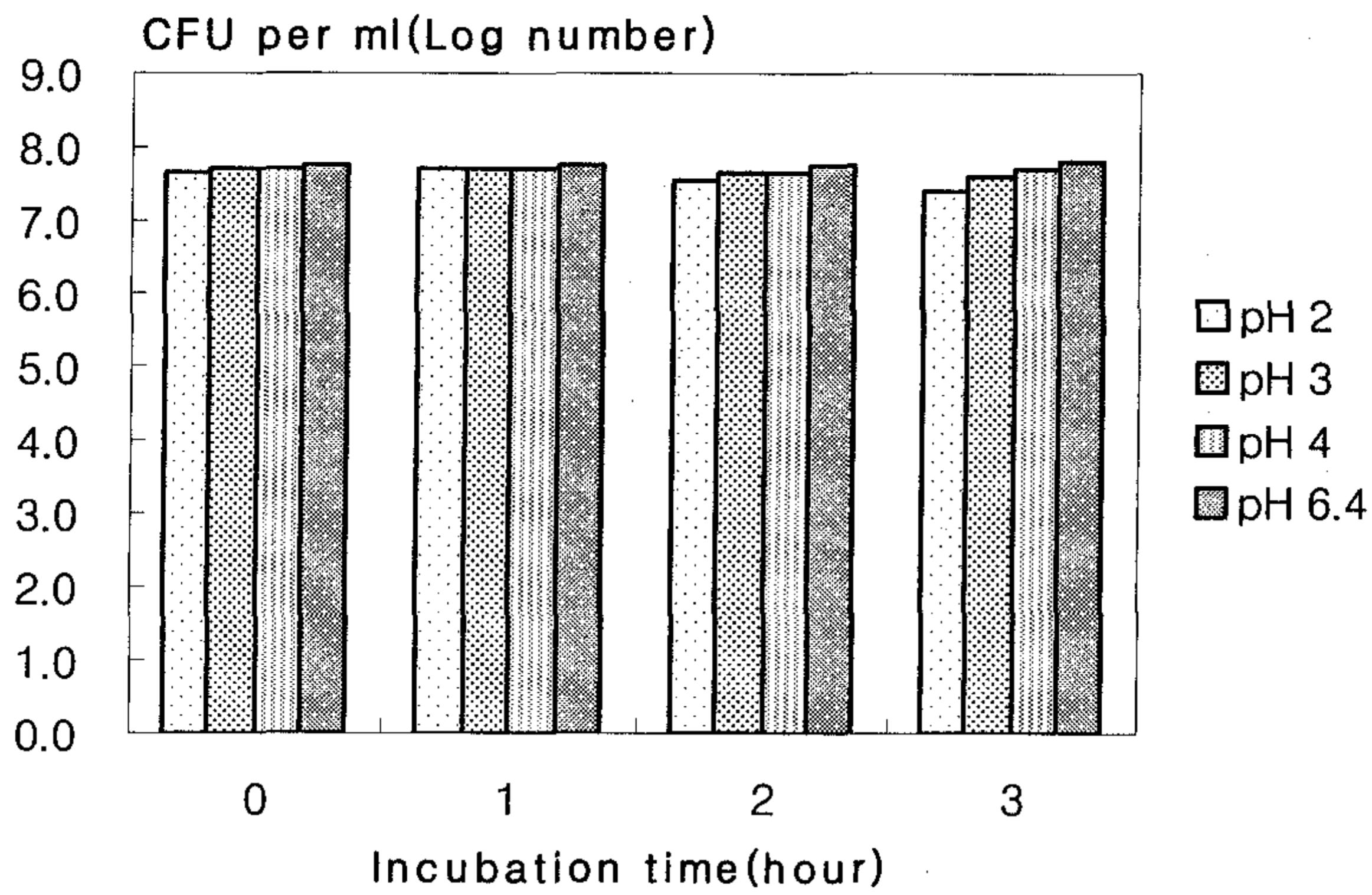


Fig. 25. Survival of *Lactococcus lactis* K61 after three hours in HCl (pH 2,3,4,6.4 )

\* Initial log count before pH treatment : 7.66

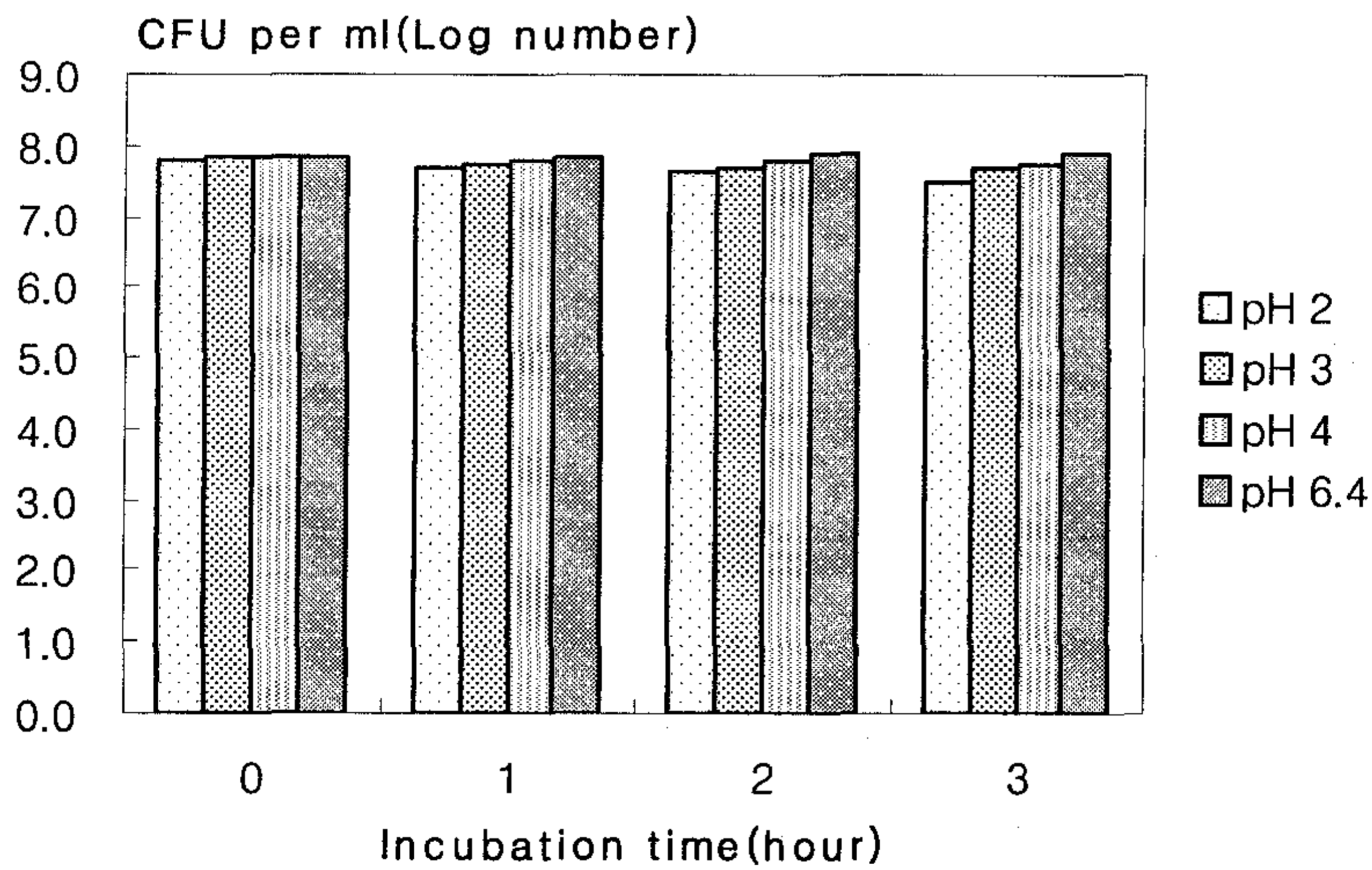


Fig. 26. Survival of *Lactobacillus zeae* K354 after three hours in HCl (pH 2,3,4,6.4)

\* Initial log count before pH treatment : 7.79

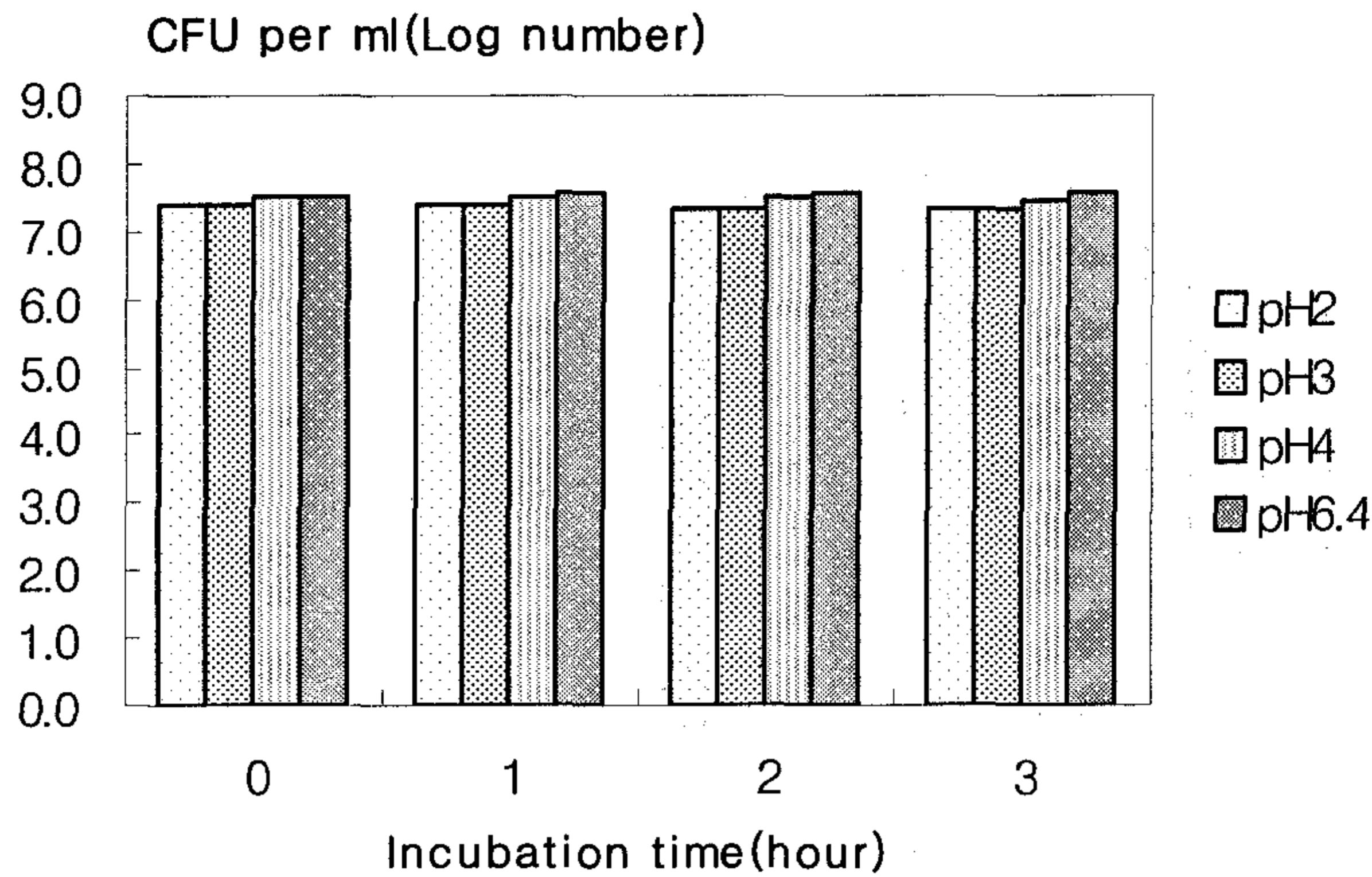


Fig. 27. Survival of *Lactococcus plantarum* K359 after three hours in HCl (pH 2,3,4,6.4 )

\* Initial log count before pH treatment : 7.39

*Enterococcus faecalis* B46 균주는 pH 2와 pH 3에서 0시간일 때  $1.4 \times 10^8$ cfu/ml 이던 것이 3시간 경과 후  $8.0 \times 10^7$ cfu/ml로서 젖산균 수가 43% 감소하는 것으로 나타났다. pH 4에서는 3시간 경과 후  $8.5 \times 10^7$ cfu/ml로서 젖산균 수가 35% 감소하였다. *Lactobacillus plantarum* K14 균주는 pH 2에서 0시간일 때  $7.3 \times 10^7$ cfu/ml이던 것이 1시간 경과 후  $5.9 \times 10^7$ cfu/ml, 2시간 경과 후  $4.5 \times 10^7$ cfu/ml, 3시간 경과 후  $3.8 \times 10^7$ cfu/ml로서 젖산균 수가 48% 감소하는 것으로 나타났다. pH 3에서 0시간일 때  $7.7 \times 10^7$ cfu/ml이던 것이 1시간 경과 후  $6.6 \times 10^7$ cfu/ml, 2시간 경과 후  $6.0 \times 10^7$ cfu/ml, 3시간 경과 후  $4.7 \times 10^7$ cfu/ml로서 젖산균 수가 39% 감소하는 것으로 나타났으나, pH 4와 6.4는 거의 변화가 없었다. *Lactobacillus brevis* K29 균주는 pH 2와 3에서 3시간 경과 후 젖산균 수가 약 10% 감소하는 것으로 나타났으며, pH 4와 pH 6.4는 거의 변화가 없었다. *Lactococcus lactis* K61 균주는 pH 2와 3에서 3시간 경과 후 젖산균 수가 각각 42%와 10% 감소하는 것으로 나타났으며, pH 4와 pH 6.4는 거의 변화가 없었다. *Lactobacillus zeae* K354 균주는 pH 2와 3에서 3시간 경과 후 젖산균 수가 각각 48%와 29% pH 4에서도 19% 감소하는 것으로 나타났으나 pH 6.4는 거의 변화

가 없었다. *Lactococcus plantarum* K359 균주는 pH 2와 3에서 3시간 경과 후 젖산균 수가 각각 16%와 18%로서 pH간에는 거의 차이가 없었고, pH 4에서는 9% 감소하는 것으로 나타났으나 pH 6.4는 거의 변화가 없었다.

이와 같은 결과로 볼 때 pH 2에서는 *Lactobacillus brevis* K29 균주가 다른 5종의 젖산균에 비해 pH에 대한 내성이 강한 것으로 나타났으며, 다른 젖산균 역시 pH 2와 pH 3의 증류수에서는 3시간까지 생존률에 큰 영향이 없는 것으로 나타났다.

#### 6) 항균력

젖산균이 식중독균에 대해 어느 정도 억제하는지를 측정하기 위해 혼합배양을 실시한 결과는 Table 17~21과 같다.

Table 17. Inhibition of pathogens by *Enterococcus faecalis* B46 in MRS broth

Pathogens	Growth				Inhibition (%)
	Pathogens <sup>a</sup>		<i>E. faecalis</i> B46		
	CFU/ml	pH	CFU/ml	pH	
<i>Escherichia coli</i>	6.5×10 <sup>6</sup>	6.87	6.1×10 <sup>7</sup>	6.45	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	1.8×10 <sup>6</sup>	6.83	3.0×10 <sup>6</sup>	6.60	68.42
<i>Staphylococcus aureus</i>	9.5×10 <sup>6</sup>	7.02	1.5×10 <sup>8</sup>	6.63	18.91

\* Initial count of *Enterococcus faecalis* B46 : 1.8×10<sup>6</sup>CFU/ml

<sup>a</sup> Determined after 6hr of incubation at 37°C

Table 18. Inhibition of pathogens by *Lactobacillus plantarum* K14 in MRS broth

Pathogens	Growth				Inhibition (%)
	Pathogens <sup>a</sup>		<i>L. plantarum</i> K14 <sup>a</sup>		
	CFU/ml	pH	CFU/ml	pH	
<i>Escherichia coli</i>	9.2×10 <sup>6</sup>	6.56	1.2×10 <sup>8</sup>	5.66	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	1.45×10 <sup>7</sup>	6.55	6.7×10 <sup>6</sup>	5.66	53.5
<i>Staphylococcus aureus</i>	3.2×10 <sup>4</sup>	6.55	2.2×10 <sup>8</sup>	5.62	-

\* Initial count of *Lactobacillus plantarum* K14: 1.7×10<sup>6</sup>CFU/ml

<sup>a</sup> Determined after 6hr of incubation at 37°C

Table 19. Inhibition of pathogens by *Lactobacillus brevis* K29 in MRS broth

Pathogens	Growth				Inhibition (%)
	Pathogens <sup>a</sup>		<i>L. brevis</i> K29 <sup>a</sup>		
	CFU/ml	pH	CFU/ml	pH	
<i>Escherichia coli</i>	9.2×10 <sup>6</sup>	6.56	3.3×10 <sup>8</sup>	5.66	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	1.45×10 <sup>7</sup>	6.55	8.2×10 <sup>6</sup>	5.62	43.2
<i>Staphylococcus aureus</i>	3.2×10 <sup>4</sup>	6.55	2.6×10 <sup>8</sup>	5.59	-

\* Initial count of *Lactobacillus brevis* K29 : 1.6×10<sup>6</sup>CFU/ml

<sup>a</sup> Determined after 6hr of incubation at 37°C

Table 20. Inhibition of pathogens by *Lactococcus lactis* K61 in MRS broth

Pathogens	Growth				Inhibition (%)
	Pathogens <sup>a</sup>		<i>L. lactis</i> K61 <sup>a</sup>		
	CFU/ml	pH	CFU/ml	pH	
<i>Escherichia coli</i>	9.2×10 <sup>6</sup>	6.56	3.6×10 <sup>8</sup>	5.71	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	1.45×10 <sup>7</sup>	6.55	8.0×10 <sup>6</sup>	5.65	44.7
<i>Staphylococcus aureus</i>	3.2×10 <sup>4</sup>	6.55	3.5×10 <sup>8</sup>	5.72	-

\* Initial count of *Lactococcus lactis* K61 : 2.0×10<sup>6</sup>CFU/ml

<sup>a</sup> Determined after 6hr of incubation at 37°C

Table 21. Inhibition of pathogens by *Lactobacillus zeae* K354 in MRS broth

Pathogens	Growth				Inhibition (%)
	Pathogens <sup>a</sup>		<i>L. plantarum</i> K354 <sup>a</sup>		
	CFU/ml	pH	CFU/ml	pH	
<i>Escherichia coli</i>	9.2×10 <sup>6</sup>	6.56	2.3×10 <sup>8</sup>	5.64	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	1.45×10 <sup>7</sup>	6.55	5.8×10 <sup>6</sup>	5.67	60.2
<i>Staphylococcus aureus</i>	3.2×10 <sup>4</sup>	6.55	7.7×10 <sup>8</sup>	5.76	-

\* Initial count of *Lactobacillus zeae* K354 : 3.8×10<sup>6</sup>CFU/ml

<sup>a</sup> Determined after 6hr of incubation at 37°C

Table 22. Inhibition of pathogens by *Lactobacillus plantarum* K359 in MRS broth

Pathogens	Growth				Inhibition (%)
	Pathogens <sup>a</sup>		<i>L. plantarum</i> K359 <sup>a</sup>		
	CFU/ml	pH	CFU/ml	pH	
<i>Escherichia coli</i>	9.2×10 <sup>6</sup>	6.56	9.3×10 <sup>6</sup>	6.36	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	1.45×10 <sup>7</sup>	6.55	6.0×10 <sup>6</sup>	6.40	58.1
<i>Staphylococcus aureus</i>	3.2×10 <sup>4</sup>	6.55	4.0×10 <sup>5</sup>	6.30	-

\* Initial count of *Lactobacillus plantarum* K359 : 1.4×10<sup>6</sup>CFU/ml

<sup>a</sup> Determined after 6hr of incubation at 37°C

*E. faecalis* 46 균주는 *Escherichia coli*에 대해 억제력이 없었으나, *Salmonella typhimurium*에 대해 68.42%, *Staphylococcus aureus*에 대해 16.67%의 억제력을 보였다. 5종의 *Lactobacillus* 균은 공히 *Escherichia coli* 와 *Staphylococcus aureus*에 대해 억제효과가 없는 것으로 나타났으며, 다만, *Salmonella typhimurium*에 대해 *Lactobacillus zeae* K354 균주가 60.2%의 억제효과를 나타내 타 균주에 비해 가장 높은 억제율을 보였고, 이때 대조구인 식중독균은 pH 6.55이며, 혼합배양액은 pH 5.67이었다.

## 5. ACE 억제활성 젖산균주 최적배양조건 설정

젖산균의 특성조사에서 얻어진 결과에 따라 선발된 6종의 젖산균이 내산성 및 내담즙성에 크게 영향을 받지 않음에 따라 인체에서 생존 가능성이 있음에 따라 6종 모두 최적조건을 설정하였다.

### 가. *Enterococcus faecalis* B46

#### 1) 환원탈지유 함량과 젖산균 첨가량이 ACE 억제율에 미치는 영향

환원탈지유에 *Enterococcus faecalis* B46 균주를 첨가량별로 접종하고 37°C에서 15시간 배양한 후 ACE 억제율을 측정한 결과는 다음 Table 23과 같다.

Table 23. The effect of the addition dosage of reconstituted skim milk and *Enterococcus faecalis* B46 on ACE inhibitory ratio during 15hr incubation at 37°C

starter(%) \ skim milk(%)	0.1	0.5	1
	ACE inhibitory ratio(%)		
8	98.8±0.4	99.3±0.3	99.5±0.0
10	99.4±0.3	99.5±0.3	97.9±0.5
12	99.1±0.3	96.4±2.6	99.8±0.0

환원탈지유 함량과 젖산균 첨가량 간 ACE 억제율에 큰 영향이 없었으나, 환원탈지유 12%와 균 첨가량이 1%일 때 최대 99.8%의 억제율을 나타내었다.

2) 배양온도 및 시간이 ACE 억제율과 pH에 미치는 영향

상기에서 얻어진 최적조건인 환원 탈지유 농도 12%에 균 접종량 1.0%를 첨가하고, 배양온도별로 3시간 간격 24시간으로 배양한 후 ACE 억제율을 측정한 결과는 다음 Fig. 28-30과 같다.

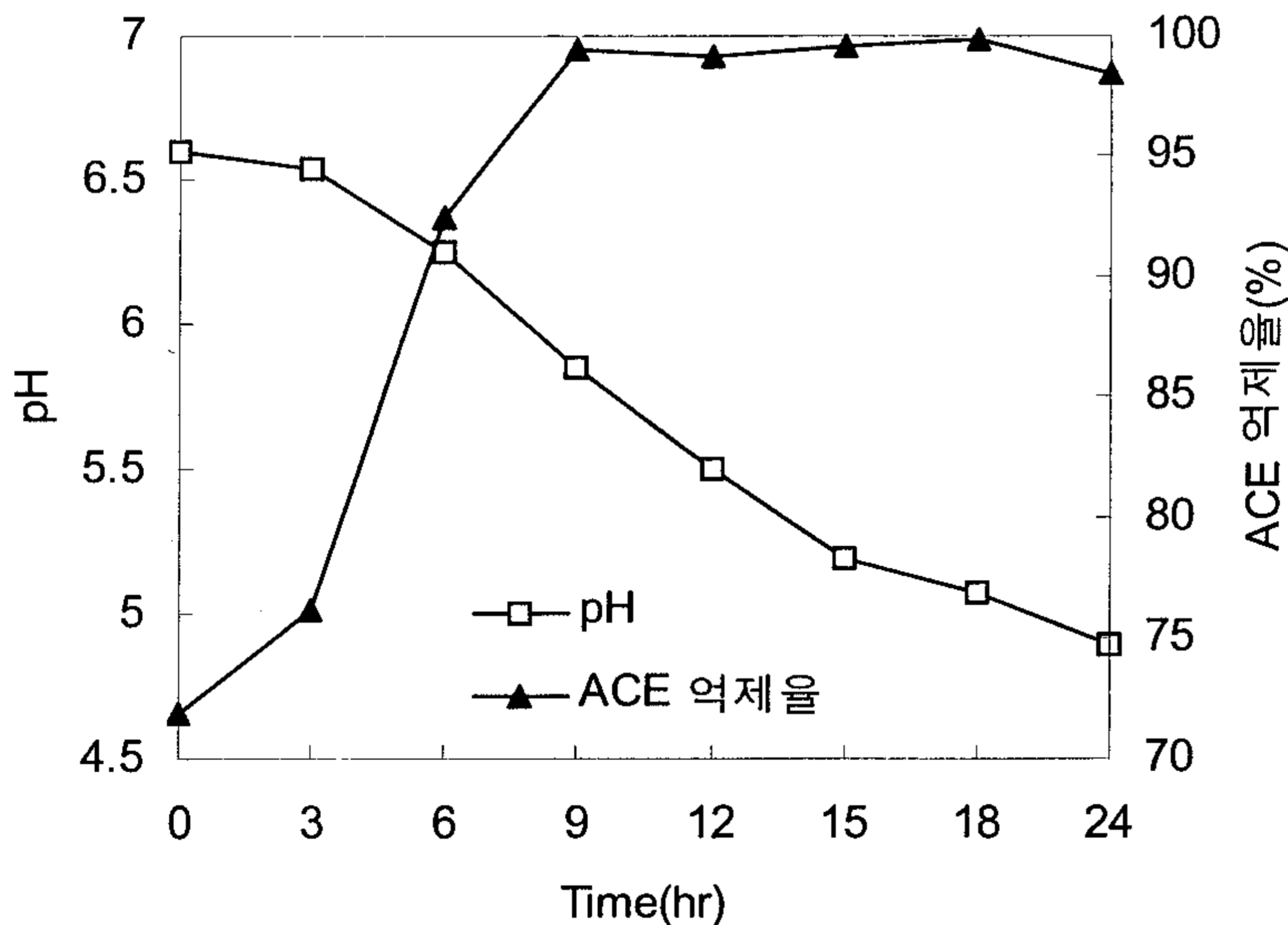


Fig. 28. The effect of incubation time on pH and ACE inhibitory ratio in 12% reconstituted skim milk added 1.0% *Enterococcus faecalis* B46 at 34°C

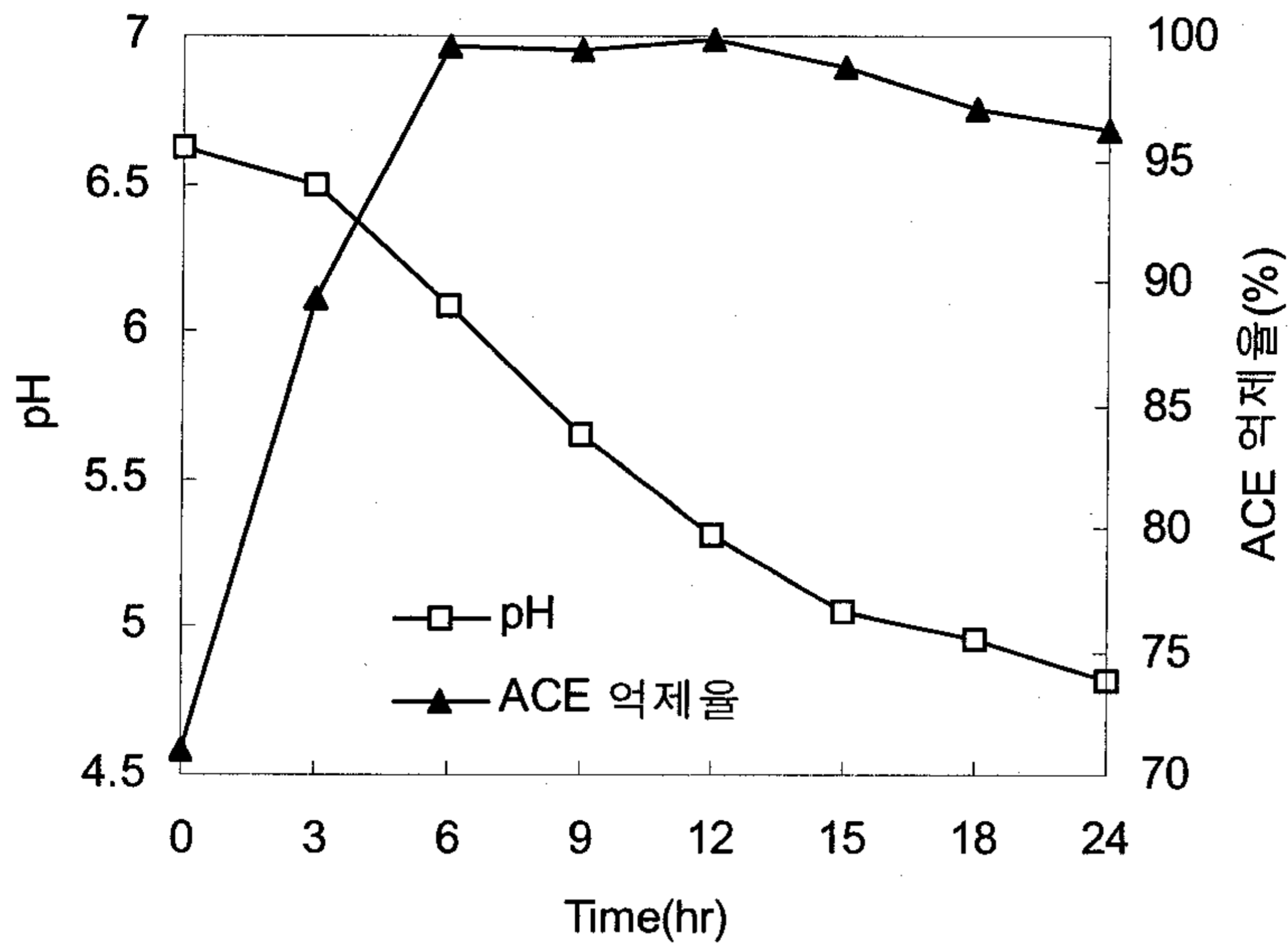


Fig. 29. The effect of incubation time on pH and ACE inhibitory ratio in 12% reconstituted skim milk added 1.0% *Enterococcus faecalis* B46 at 37°C

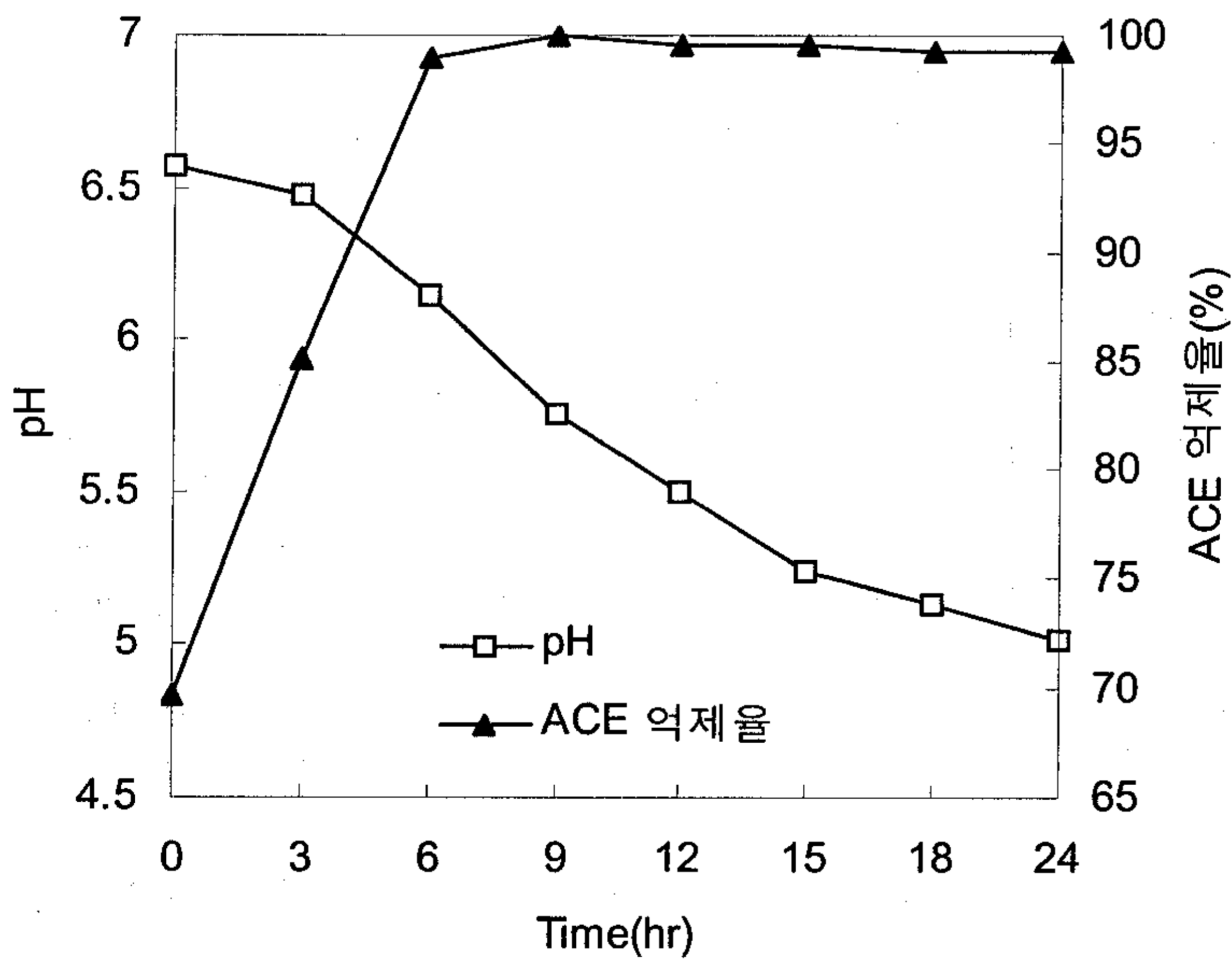


Fig. 30. The effect of incubation time on pH and ACE inhibitory ratio in 12% reconstituted skim milk added 1.0% *Enterococcus faecalis* B46 at 40°C

34℃에서 6시간 배양할 때 ACE 억제율이 92.4%로서 급격히 상승하다가 9시간이 후 부터는 99% 이상의 억제율을 보였으며 18시간일 때 최대 99.8%의 억제율을 보였으나 24시간일 때 98.5%로서 약간 감소하는 경향을 보였다. 37℃에서는 6시간 배양할 때 ACE 억제율이 99.6%로서 급격히 상승하다가 12시간일 때 최대 ACE 억제율이 99.8%까지 상승하다가 이후 감소하는 경향을 보였다. 40℃에서는 6시간 배양할 때 ACE 억제율이 98.9%로서 급격히 상승하다가 9시간일 때 최대 ACE 억제율이 100%까지 상승하다가 이후 감소하는 경향을 보였다. 따라서 이 균은 ACE 억제율은 우수하지만 발효유 제조시 최적 pH 조건인 pH 4.3-4.4에 도달하는데 시간이 너무 오래 소요되는 것과 위해성 논란이 있는 문제점이 있어 단독 균주로 스타터를 사용하기 보다는 배양액을 열처리하여 사멸시킨 후 *Lactobacillus* 젖산균에 의한 발효액과 혼합하여 사용하는 것이 바람직 할 것으로 사료된다.

나. *Lactobacillus plantarum* K14

1) 환원탈지유 함량과 젖산균 첨가량이 ACE 억제율에 미치는 영향

환원탈지유에 *Lactobacillus plantarum* K14균주를 첨가량별로 접종하고 37℃에서 15시간 배양한 후 ACE 억제율을 측정한 결과는 다음 Table 24와 같다.

Table 24. The effect of the addition dosage of reconstituted skim milk and *Lactobacillus plantarum* K14 on ACE inhibitory ratio during 15hr incubation at 37℃

starter(%) \ skim milk(%)	0.1	0.5	1
	ACE inhibitory ratio(%)		
8	54.2±5.2	66.1±2.4	66.6±13.0
10	45.6±7.0	63.9±0.6	64.1±6.7
12	56.7±4.4	60.3±3.0	66.7±1.9

환원탈지유 함량 간에는 차이가 없었고 젖산균 첨가량이 증가할수록 ACE 억제율이 증가하는 경향을 보였으며, 환원탈지유 12%와 균 첨가량이 1%일 때 최대 66.7%의 억제율을 나타내었다.



2) 배양온도 및 시간이 ACE 억제율과 pH에 미치는 영향

상기에서 얻어진 최적조건인 환원 탈지유 농도 12%에 균 접종량 1.0%를 첨가하고, 배양온도별로 3시간 간격 24시간으로 배양한 후 ACE 억제율을 측정된 결과는 다음 Fig. 31-33과 같다.

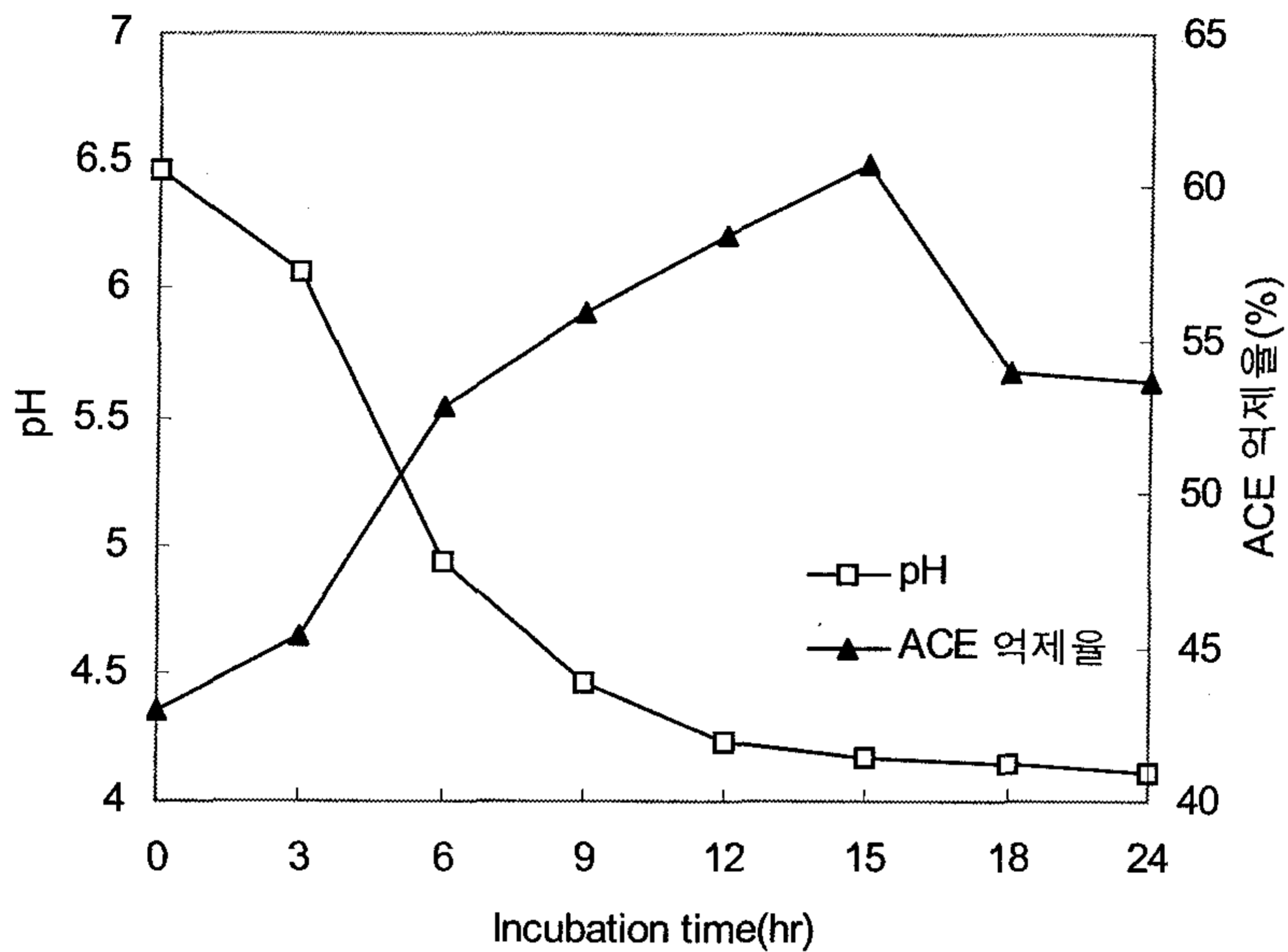


Fig. 31. The effect of incubation time on pH and ACE inhibitory ratio in 12% reconstituted skim milk added 1.0% *Lactobacillus plantarum* K14 at 34°C

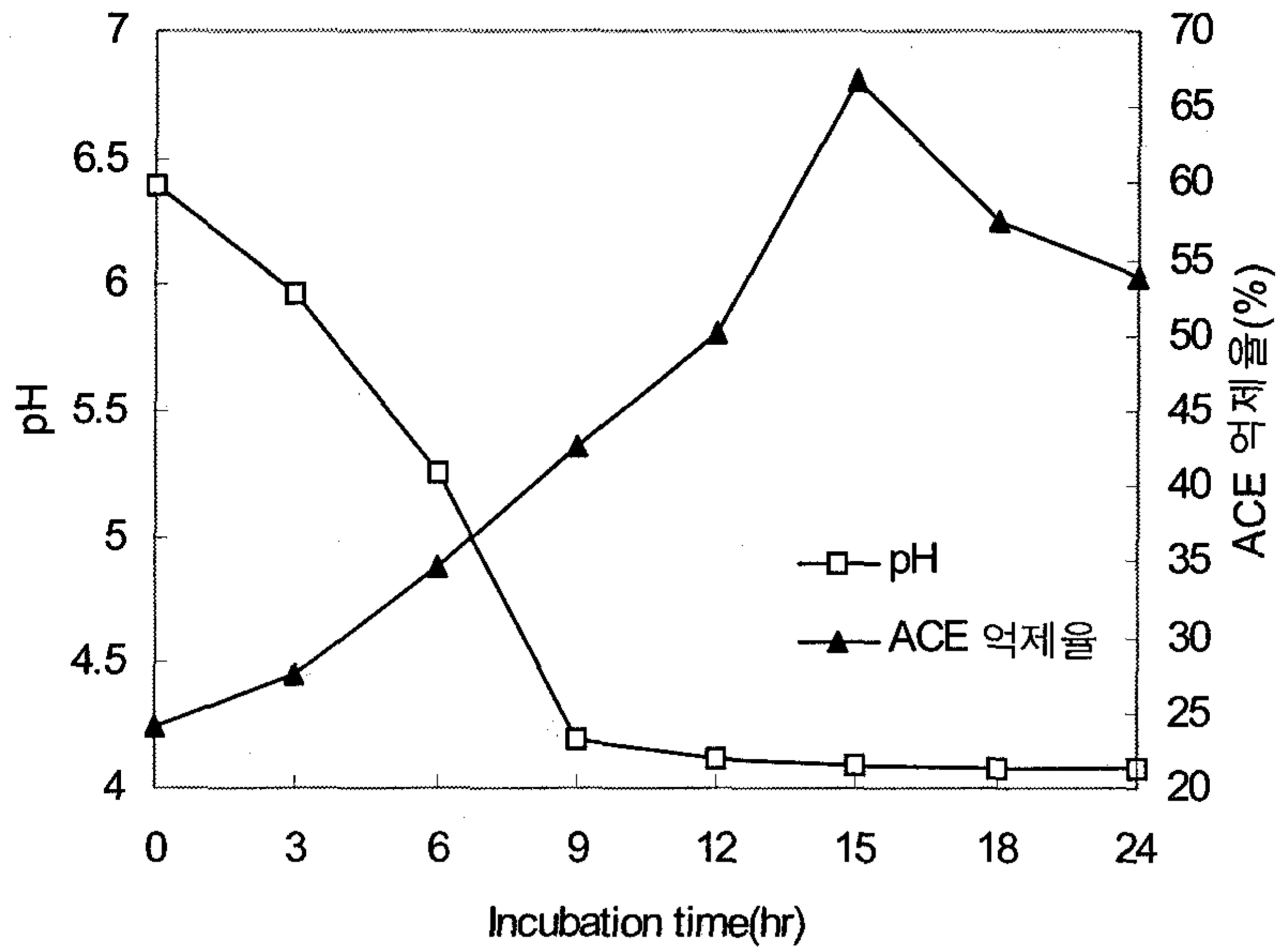


Fig. 32. The effect of incubation time on pH and ACE inhibitory ratio in 12% reconstituted skim milk added 1.0% *Lactobacillus plantarum* K14 at 37°C

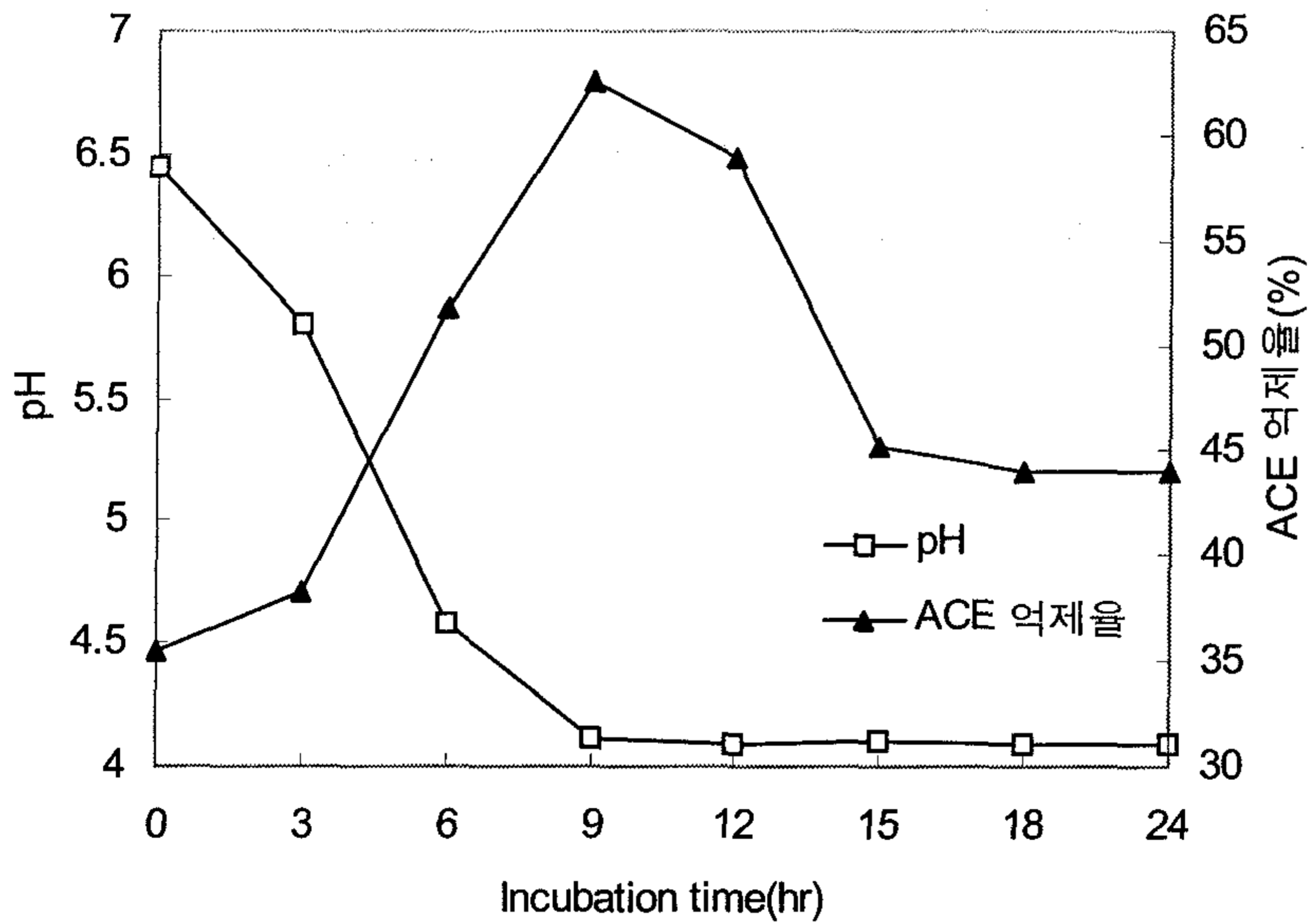


Fig. 33. The effect of incubation time on pH and ACE inhibitory ratio in 12% reconstituted skim milk added 1.0% *Lactobacillus plantarum* K14 at 40°C

34℃에서 15시간 배양할 때 최대 ACE 억제율이 60.7%까지 상승하다가 이후 감소하는 경향을 보였고, 발효유의 최적 pH 조건이 pH 4.3-4.4임을 감안하면 약 57%의 ACE 억제율이 예상된다.

37℃에서 15시간 배양할 때 최대 ACE 억제율이 66.7%까지 상승하다가 이후 감소하는 경향을 보였고, 최적 pH 조건을 감안하면 약 42%의 ACE 억제율이 예상된다. 40℃에서는 9시간 배양할 때 62.6%의 억제율을 보이다가 감소하였는데, 최적 pH 조건을 감안하면 약 58%의 ACE 억제율이 예상된다.

다. *Lactobacillus brevis* K29

1) 환원탈지유 함량과 젖산균 첨가량이 ACE 억제율에 미치는 영향

환원탈지유에 *Lactobacillus brevis* K29균주를 첨가량별로 접종하고 37℃에서 15시간 배양한 후 ACE 억제율을 측정된 결과는 다음 Table 25와 같다.

Table 25. The effect of the addition dosage of reconstituted skim milk and *Lactobacillus brevis* K29 on ACE inhibitory ratio during 15hr incubation at 37℃

starter(%) skim milk(%)	0.1	0.5	1
	ACE inhibitory ratio(%)		
8	45.8±6.3	46.7±3.7	45.6±5.4
10	58.6±0.6	60.1±5.9	65.6±2.2
12	68.8±0.9	58.3±4.3	78.0±2.2

환원탈지유 함량이 증가할수록, 젖산균 첨가량이 증가할수록 ACE 억제율이 증가하는 경향을 보였으며, 환원탈지유 12%와 균 첨가량이 1%일 때 최대 78.0%의 억제율을 나타내었다.

2) 배양온도 및 시간이 ACE 억제율과 pH에 미치는 영향

상기에서 얻어진 최적조건인 환원 탈지유 농도 12%에 균 접종량 1.0%를 첨가하고, 배양온도별로 3시간 간격 24시간으로 배양한 후 ACE 억제율을 측정된 결과는 다음 Fig. 34-36과 같다.

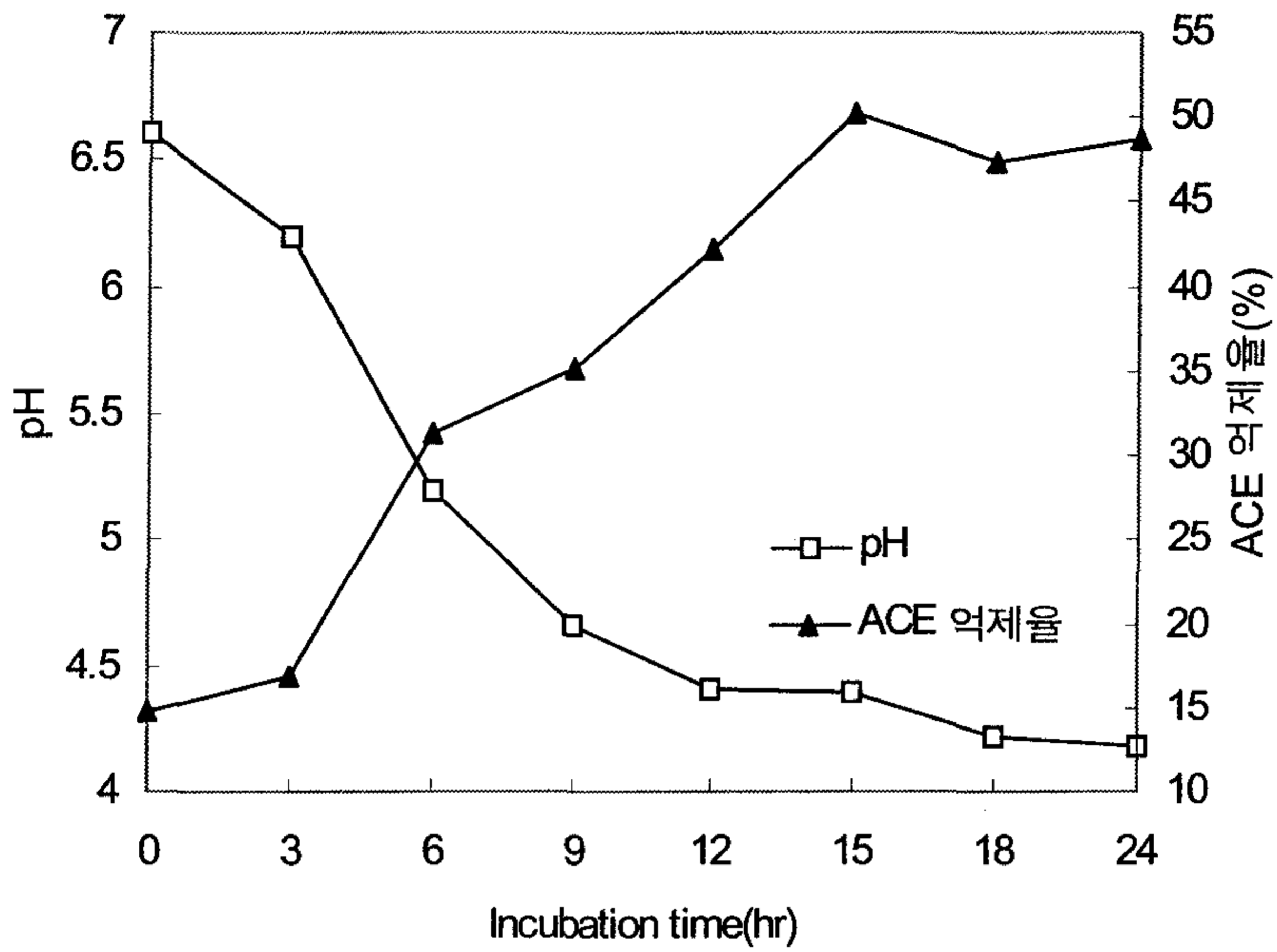


Fig. 34. The effect of incubation time on pH and ACE inhibitory ratio in 12% reconstituted skim milk added 1.0% *Lactobacillus brevis* K29 at 34°C

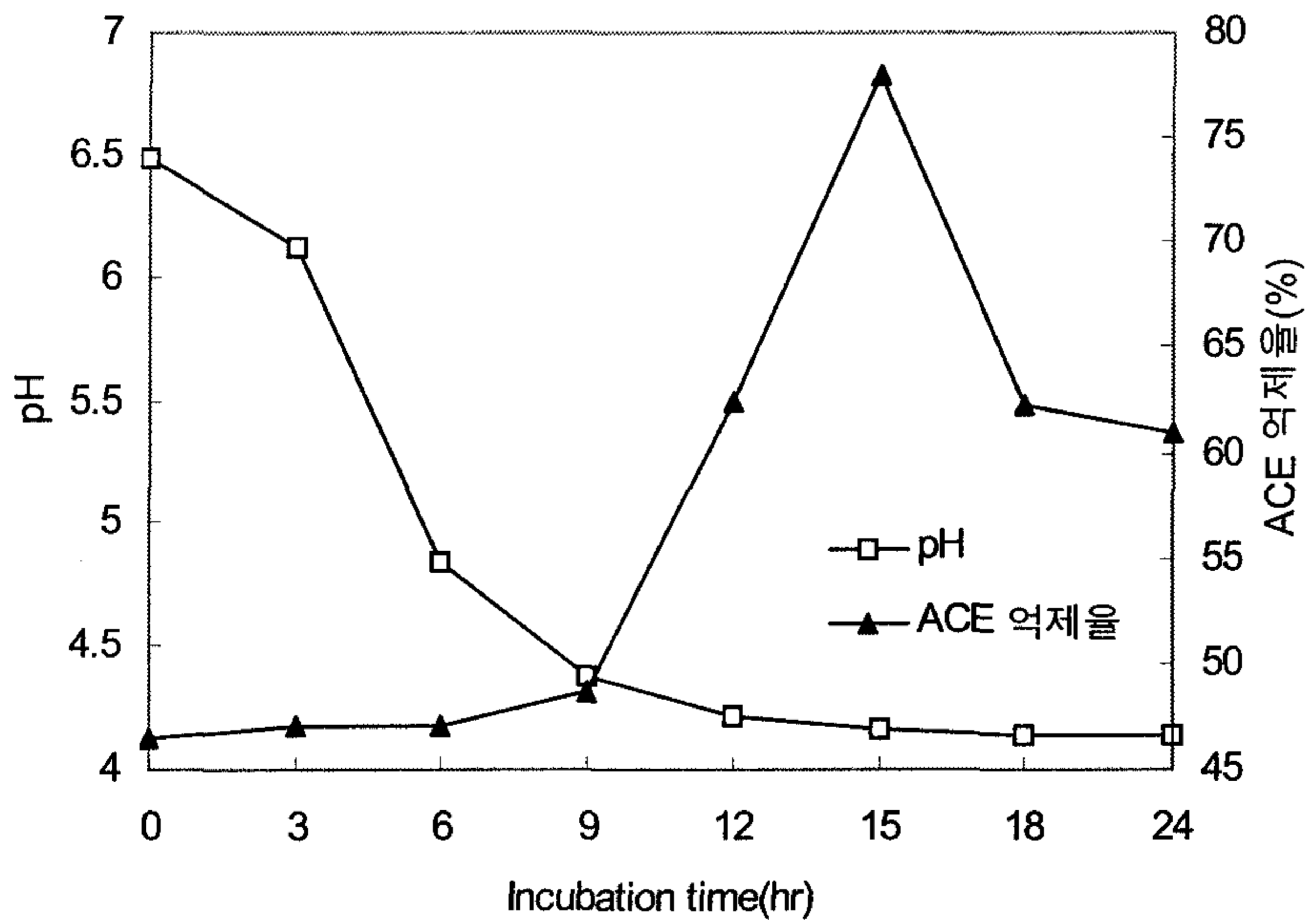


Fig. 35. The effect of incubation time on pH and ACE inhibitory ratio in 12% reconstituted skim milk added 1.0% *Lactobacillus brevis* K29 at 37°C

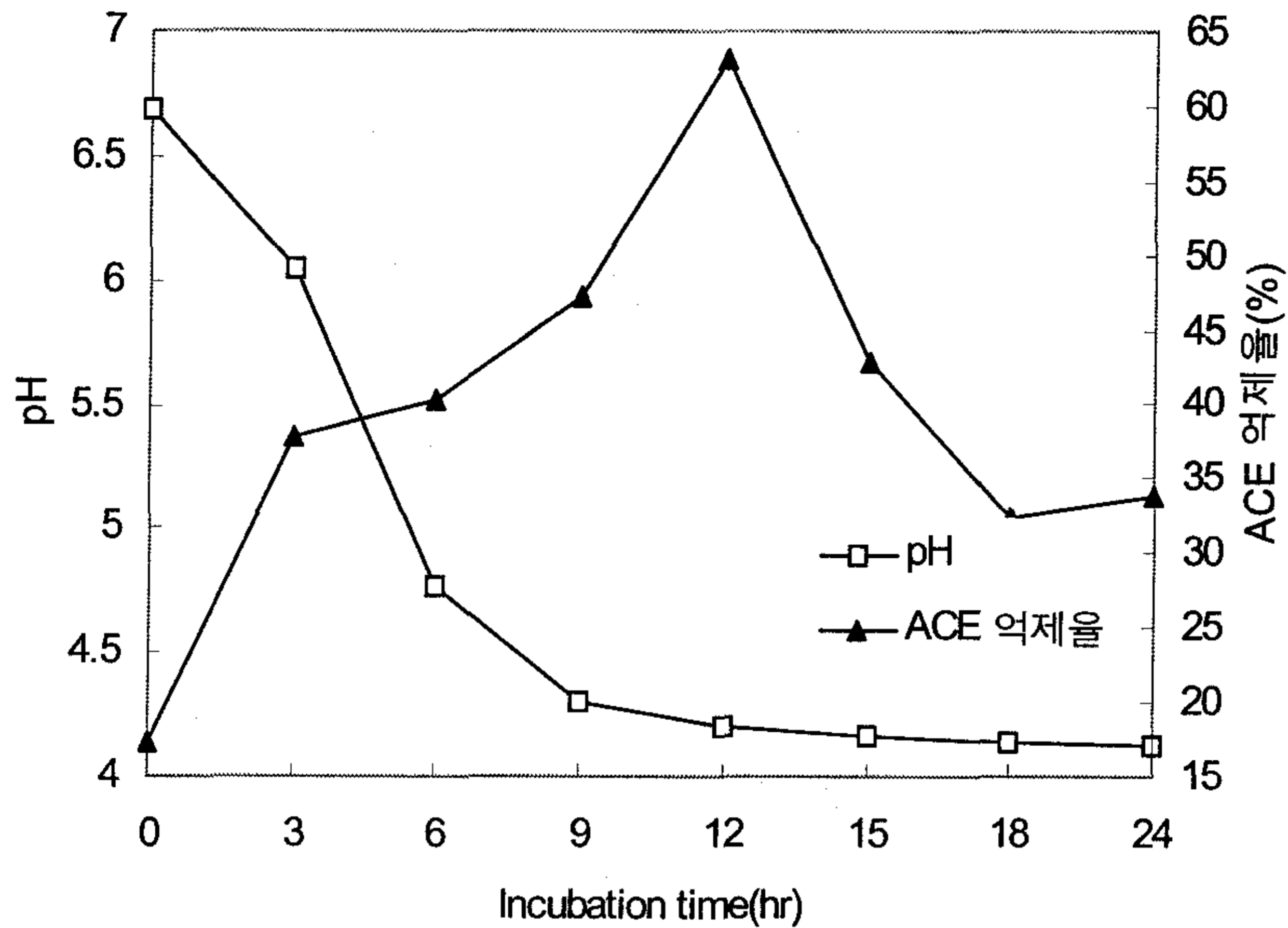


Fig. 36. The effect of incubation time on pH and ACE inhibitory ratio in 12% reconstituted skim milk added 1.0% *Lactobacillus brevis* K29 at 40°C

34°C에서 15시간 배양할 때 최대 ACE 억제율이 50.2%까지 상승하다가 이후 감소하는 경향을 보였고, 발효유의 최적 pH 조건이 pH 4.3-4.4임을 감안하면 동일한 ACE 억제율이 예상된다.

37°C에서 15시간 배양할 때 최대 ACE 억제율이 78.0%까지 상승하다가 이후 감소하는 경향을 보였고, 최적 pH 조건을 감안하면 약 54%의 ACE 억제율이 예상된다. 40°C에서는 12시간 배양할 때 63.2%의 억제율을 보이다가 감소하였는데, 최적 pH 조건을 감안하면 약 47%의 ACE 억제율이 예상된다.

라. *Lactococcus lactis* K61

1) 환원탈지유 함량과 젖산균 첨가량이 ACE 억제율에 미치는 영향

환원탈지유에 *Lactococcus lactis* K61 균주를 첨가량별로 접종하고 37°C에서 15시간 배양한 후 ACE 억제율을 측정된 결과는 다음 Table 26과 같다.

Table 26. The effect of the addition dosage of reconstituted skim milk and *Lactococcus lactis* K61 on ACE inhibitory ratio during 15hr incubation at 37°C

starter(%) skim milk(%)	0.1	0.5	1
	ACE inhibitory ratio(%)		
8	51.0±0.9	41.6±11.3	56.7±5.6
10	63.3±2.3	51.7±6.8	70.4±1.0
12	56.5±3.2	57.5±0.5	43.1±1.8

젖산균 첨가량이 0.1%와 1.0%일 때 환원탈지유 10%에서 가장 높은 ACE 억제율을 보인 반면, 젖산균 첨가량이 0.5%에서는 환원탈지유 함량이 증가할수록 ACE 억제율이 증가하였으며, 환원탈지유 10%와 균 첨가량이 1.0%일 때 최대 70.4%의 억제율을 나타내었다.

2) 배양온도 및 시간이 ACE 억제율과 pH에 미치는 영향

상기에서 얻어진 최적조건인 환원 탈지유 농도 10%에 균 접종량 1.0%를 첨가하고, 배양온도별로 3시간 간격 24시간으로 배양한 후 ACE 억제율을 측정한 결과는 다음 Fig. 37-39와 같다.

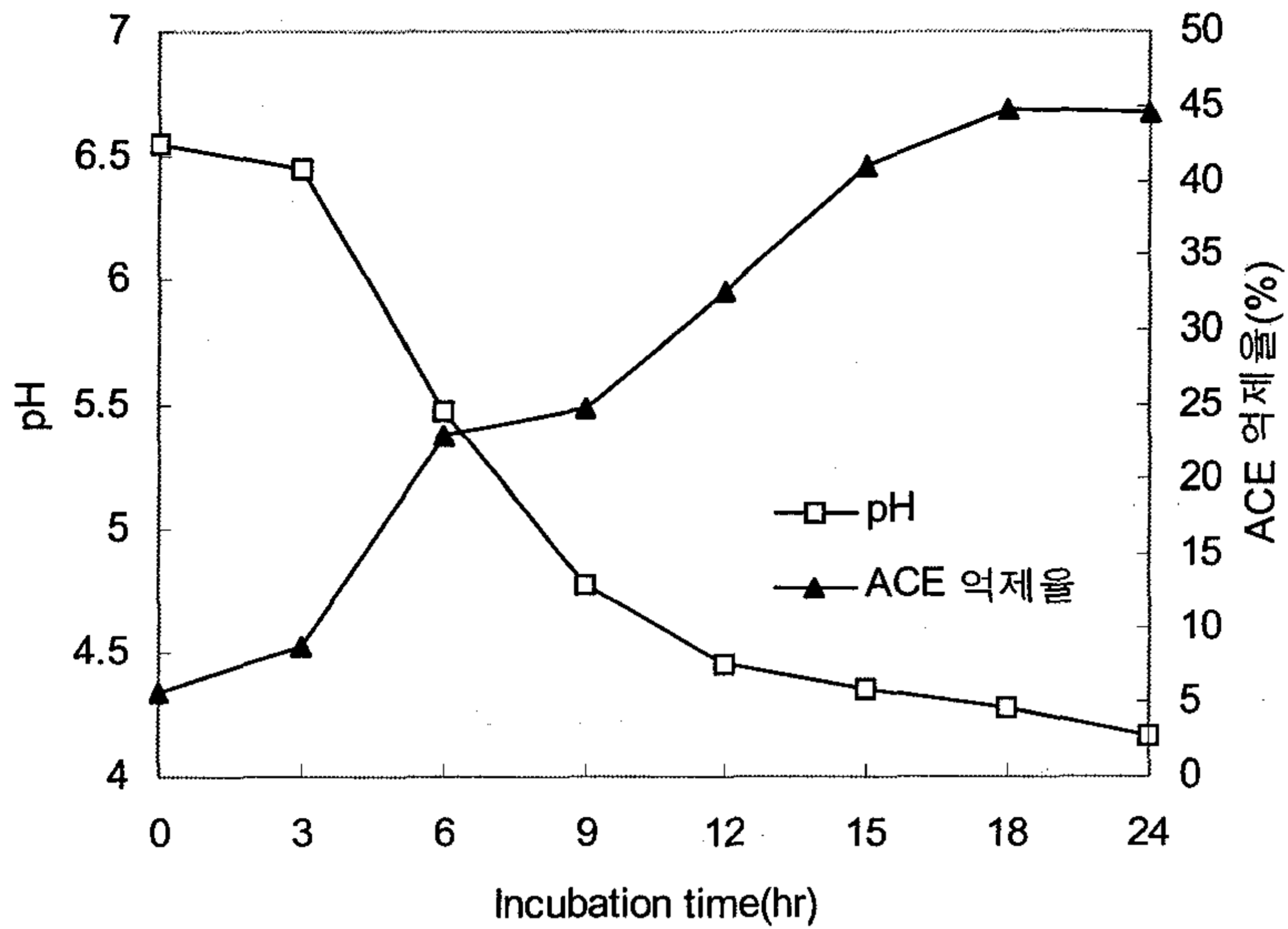


Fig. 37. The effect of incubation time on pH and ACE inhibitory ratio in 12% reconstituted skim milk added 1.0% *Lactococcus lactis* K61 at 34°C

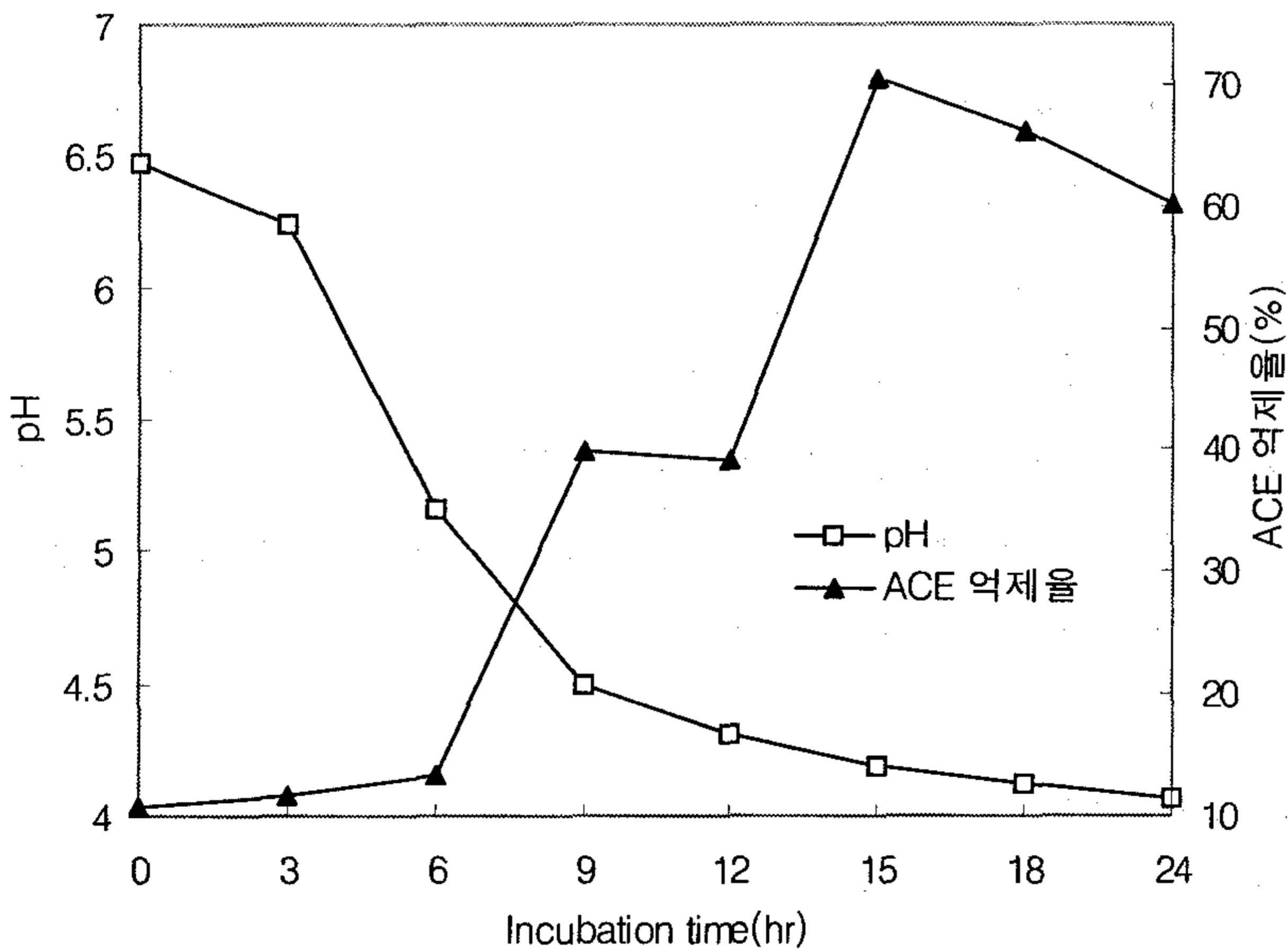


Fig. 38. The effect of incubation time on pH and ACE inhibitory ratio in 12% reconstituted skim milk added 1.0% *Lactococcus lactis* K61 at 37°C

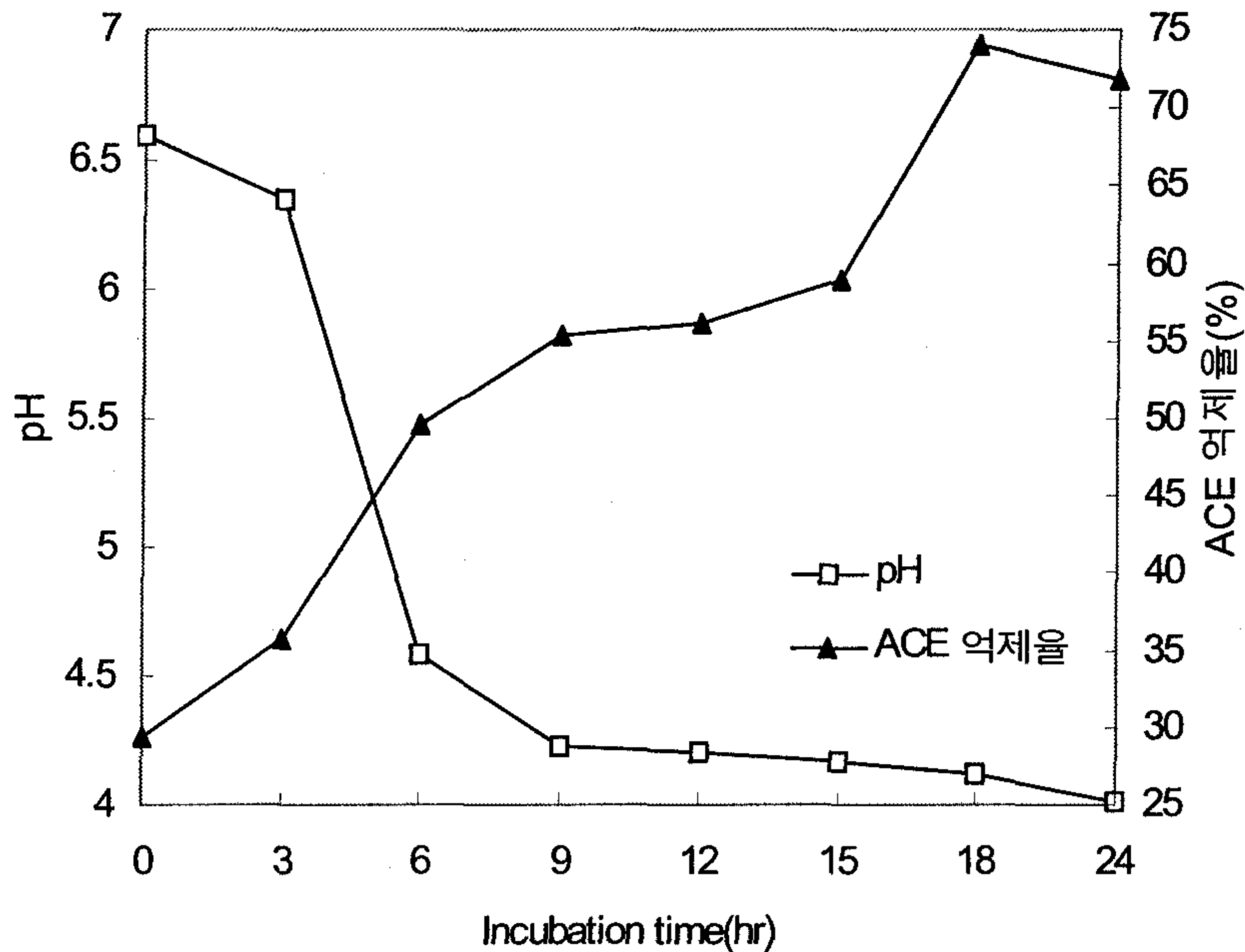


Fig. 39. The effect of incubation time on pH and ACE inhibitory ratio in 12% reconstituted skim milk added 1.0% *Lactococcus lactis* K61 at 40°C

34°C에서 18시간 배양할 때 최대 ACE 억제율이 44.7%까지 상승하다가 이후 감소하는 경향을 보였고, 발효유의 최적 pH 조건이 pH 4.3-4.4임을 감안하면 약 38%의 ACE 억제율이 예상된다.

37°C에서 15시간 배양할 때 최대 ACE 억제율이 70.4%까지 상승하다가 이후 감소하는 경향을 보였고, 최적 pH 조건을 감안하면 약 39.1%의 ACE 억제율이 예상된다. 40°C에서는 18시간 배양할 때 74.0%의 억제율을 보이다가 감소하였는데, 최적 pH 조건을 감안하면 약 54%의 ACE 억제율이 예상된다.

마. *Lactobacillus zeae* K354

1) 환원탈지유 함량과 젖산균 첨가량이 ACE 억제율에 미치는 영향

환원탈지유에 *Lactobacillus zeae* K354 균주를 첨가량별로 접종하고 37°C에서 15시간 배양한 후 ACE 억제율을 측정한 결과는 다음 Table 27과 같다.



Table 27. The effect of the addition dosage of reconstituted skim milk and *Lactobacillus zae* K354 on ACE inhibitory ratio during 15hr incubation at 37°C

starter(%) skim milk(%)	0.1	0.5	1
	ACE inhibitory ratio(%)		
8	42.0±5.7	56.4±2.1	60.9±7.2
10	69.2±3.3	68.9±6.7	68.5±2.3
12	68.9±8.3	55.5±3.1	60.9±7.2

젖산균 첨가량과 상관없이 환원탈지유 10%에서 가장 높은 ACE 억제율을 보였고, 환원탈지유가 8%에서는 젖산균 첨가량이 증가할수록 ACE 억제율이 증가하였지만, 환원탈지유가 12%에서는 젖산균 첨가량이 0.1%일 때 가장 높은 68.9%의 억제율을 나타내었다. 이때 유의성은 없지만 환원탈지유 10%이고 젖산균 첨가량이 0.1%일 때 최대 69.2%의 ACE 억제율을 보였다.

## 2) 배양온도 및 시간이 ACE 억제율과 pH에 미치는 영향

상기에서 얻어진 최적조건인 환원 탈지유 농도 10%에 균 접종량 0.1%를 첨가하고, 배양온도별로 3시간 간격 24시간으로 배양한 후 ACE 억제율을 측정된 결과는 다음 Fig. 40-42와 같다.

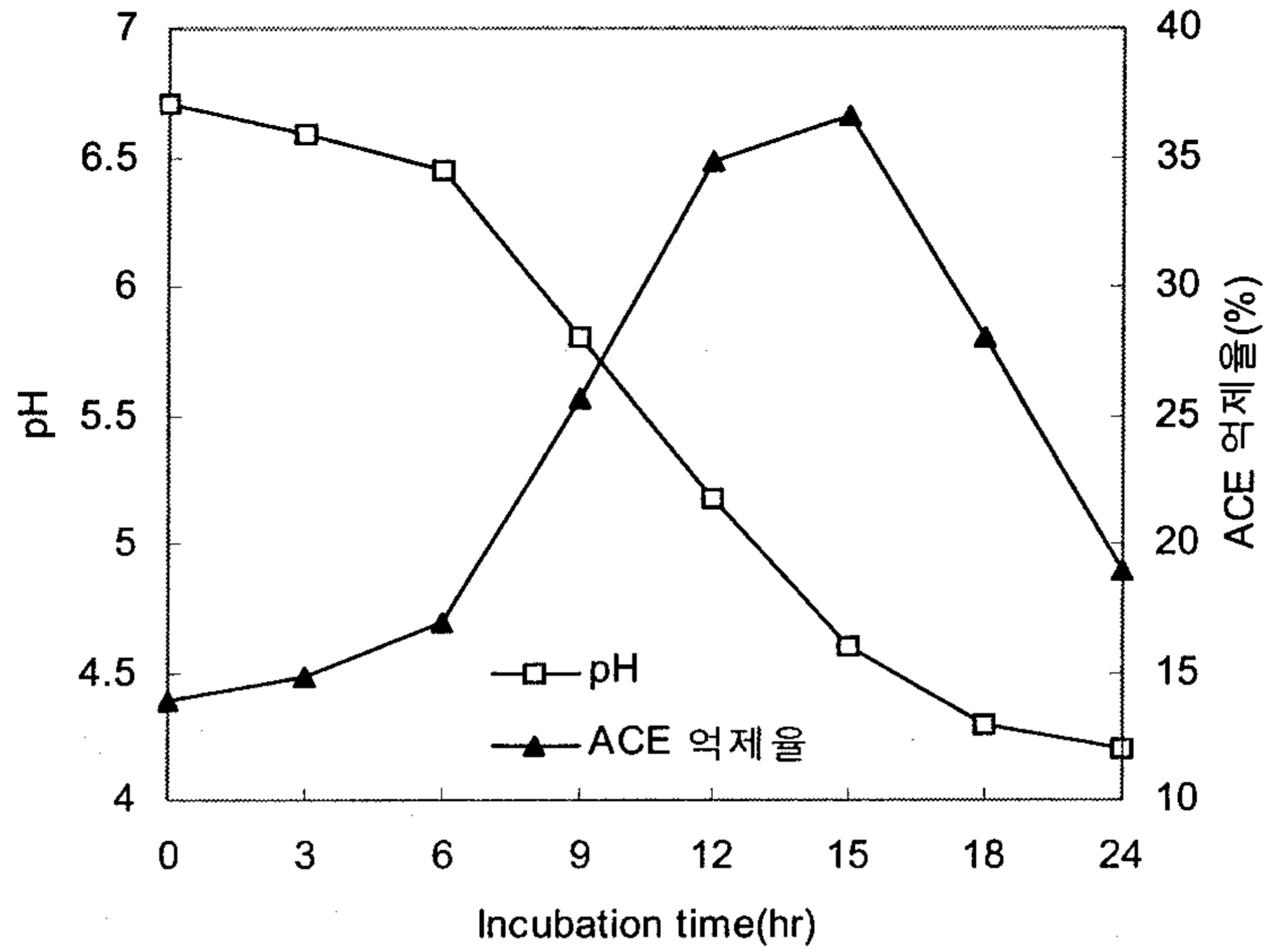


Fig. 40. The effect of incubation time on pH and ACE inhibitory ratio in 10% reconstituted skim milk added 0.1% *Lactobacillus zae* K354 at 34°C

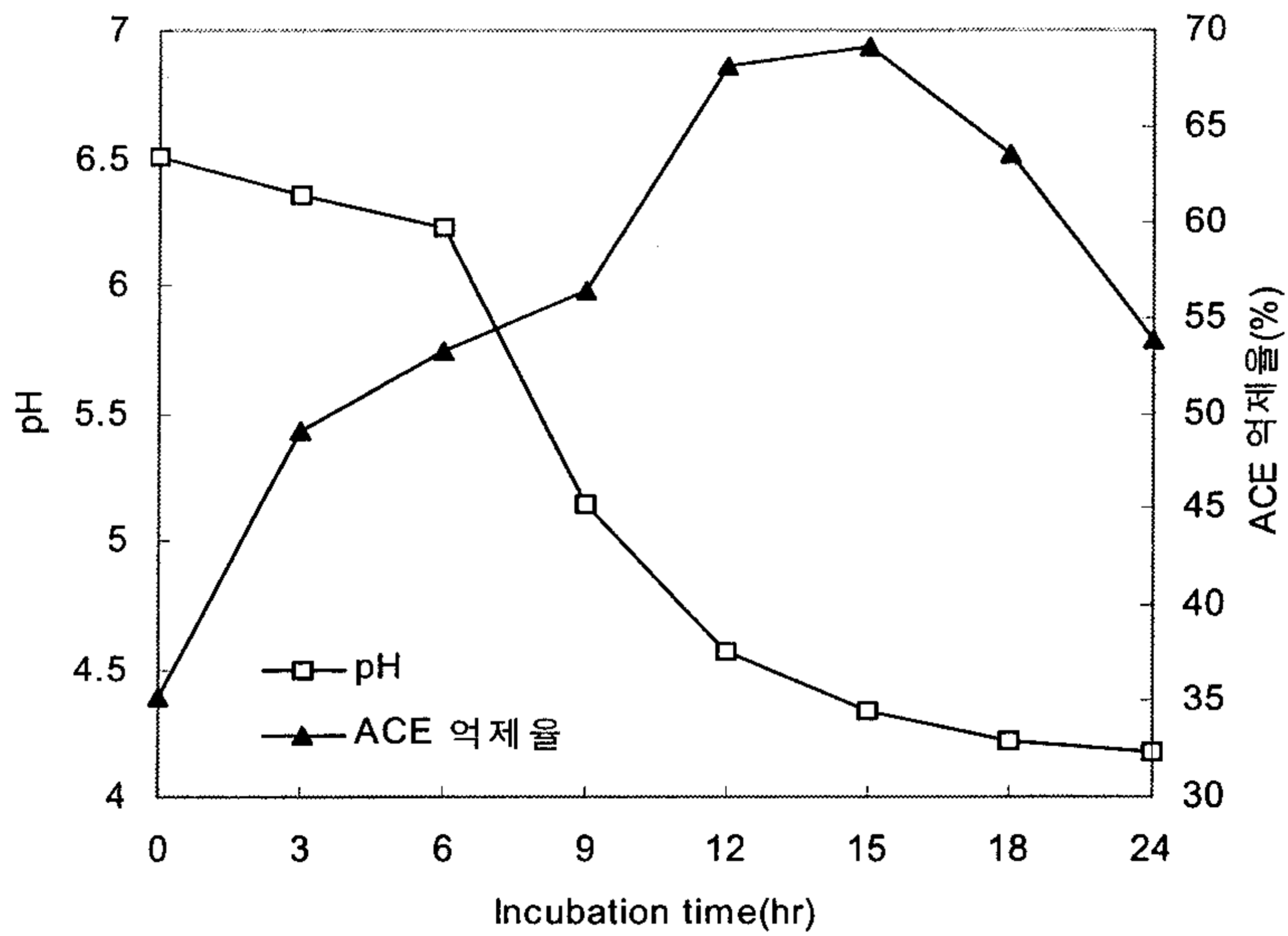


Fig. 41. The effect of incubation time on pH and ACE inhibitory ratio in 10% reconstituted skim milk added 0.1% *Lactobacillus zae* K354 at 37°C

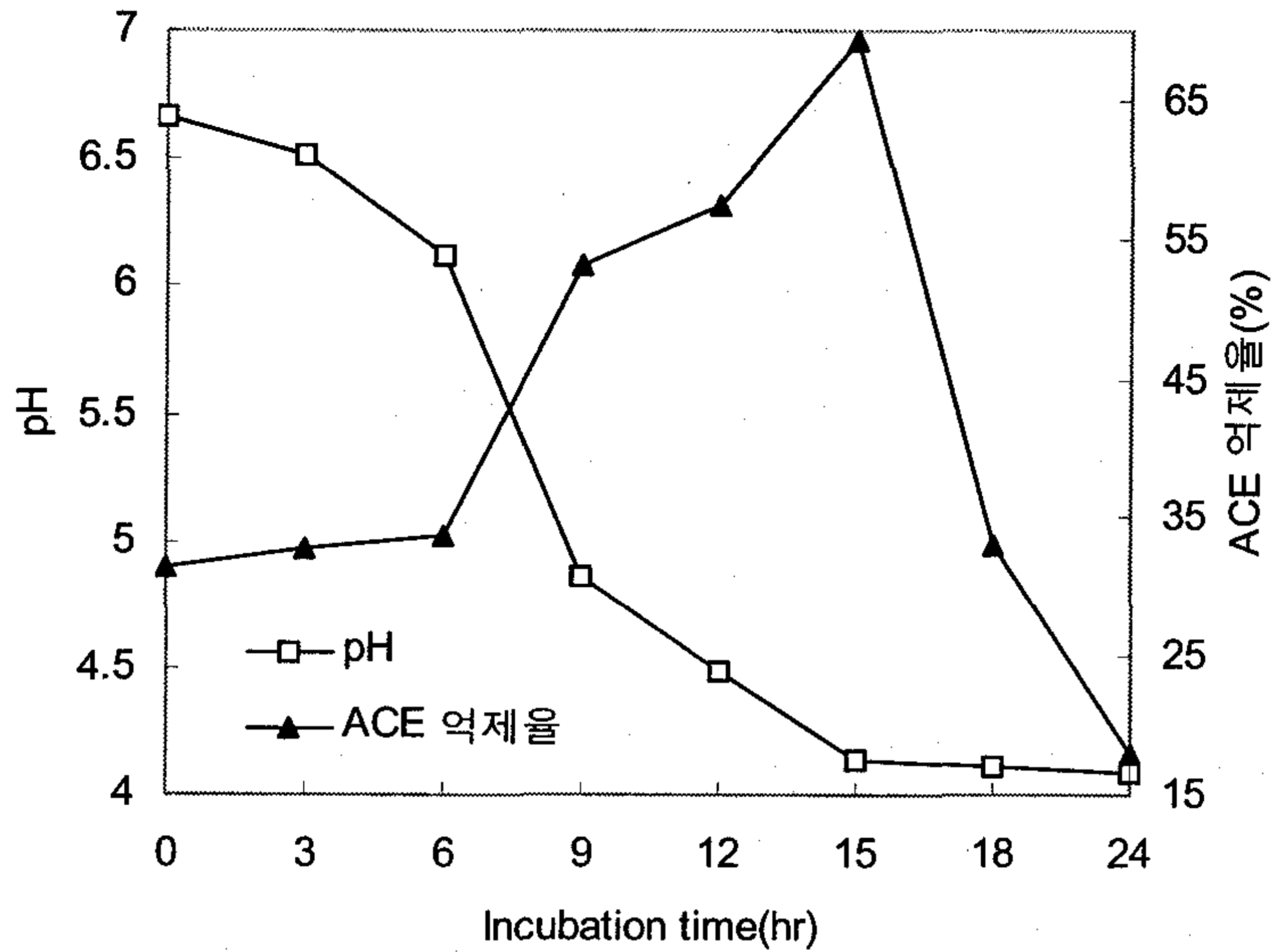


Fig. 42. The effect of incubation time on pH and ACE inhibitory ratio in 10% reconstituted skim milk added 0.1% *Lactobacillus zeae* K354 at 40°C

34°C에서 15시간 배양할 때 최대 ACE 억제율이 36.6%까지 상승하였고, 발효유의 최적 pH 조건이 pH 4.3-4.4임을 감안하면 3시간 이상 배양해야 할 것으로 보이며, 약 40%의 ACE 억제율이 예상된다.

37°C에서 15시간 배양할 때 최대 ACE 억제율이 69.2%까지 상승하였고, 이때가 최적 pH 조건이었다. 40°C에서는 15시간 배양할 때 69.4%의 억제율을 보였는데, 최적 pH 조건을 감안하면 약 62%의 ACE 억제율이 예상된다.

바. *Lactobacillus plantarum* K359

1) 환원탈지유 함량과 젖산균 첨가량이 ACE 억제율에 미치는 영향

환원탈지유에 *Lactobacillus plantarum* K359 균주를 첨가량별로 접종하고 37°C에서 15시간 배양한 후 ACE 억제율을 측정한 결과는 다음 Table 28과 같다.

Table 28. The effect of the addition dosage of reconstituted skim milk and *Lactobacillus plantarum* K359 on ACE inhibitory ratio during 15hr incubation at 37°C

skim milk(%) \ starter(%)	0.1	0.5	1
	ACE inhibitory ratio(%)		
8	46.9±12.3	39.5±2.0	46.7±1.0
10	55.5±0.2	51.5±5.0	60.7±4.5
12	44.5±6.4	43.0±8.2	54.7±0.3

젖산균 첨가량과 상관없이 환원탈지유 10%에서 가장 높은 ACE 억제율을 보였고, 젖산균 첨가량이 0.5%에서는 0.1%에 비해 약간 감소하는 경향이 있었지만 전체적으로 볼 때 1.0%가 가장 높은 ACE 억제율을 보였으며, 환원탈지유 10%와 균 첨가량이 1.0%일 때 최대 60.7%의 억제율을 나타내었다.

2) 배양온도 및 시간이 ACE 억제율과 pH에 미치는 영향

상기에서 얻어진 최적조건인 환원 탈지유 농도 10%에 균 접종량 1.0%를 첨가하고, 배양온도별로 3시간 간격 24시간으로 배양한 후 ACE 억제율을 측정한 결과는 다음 Fig. 43-45와 같다.

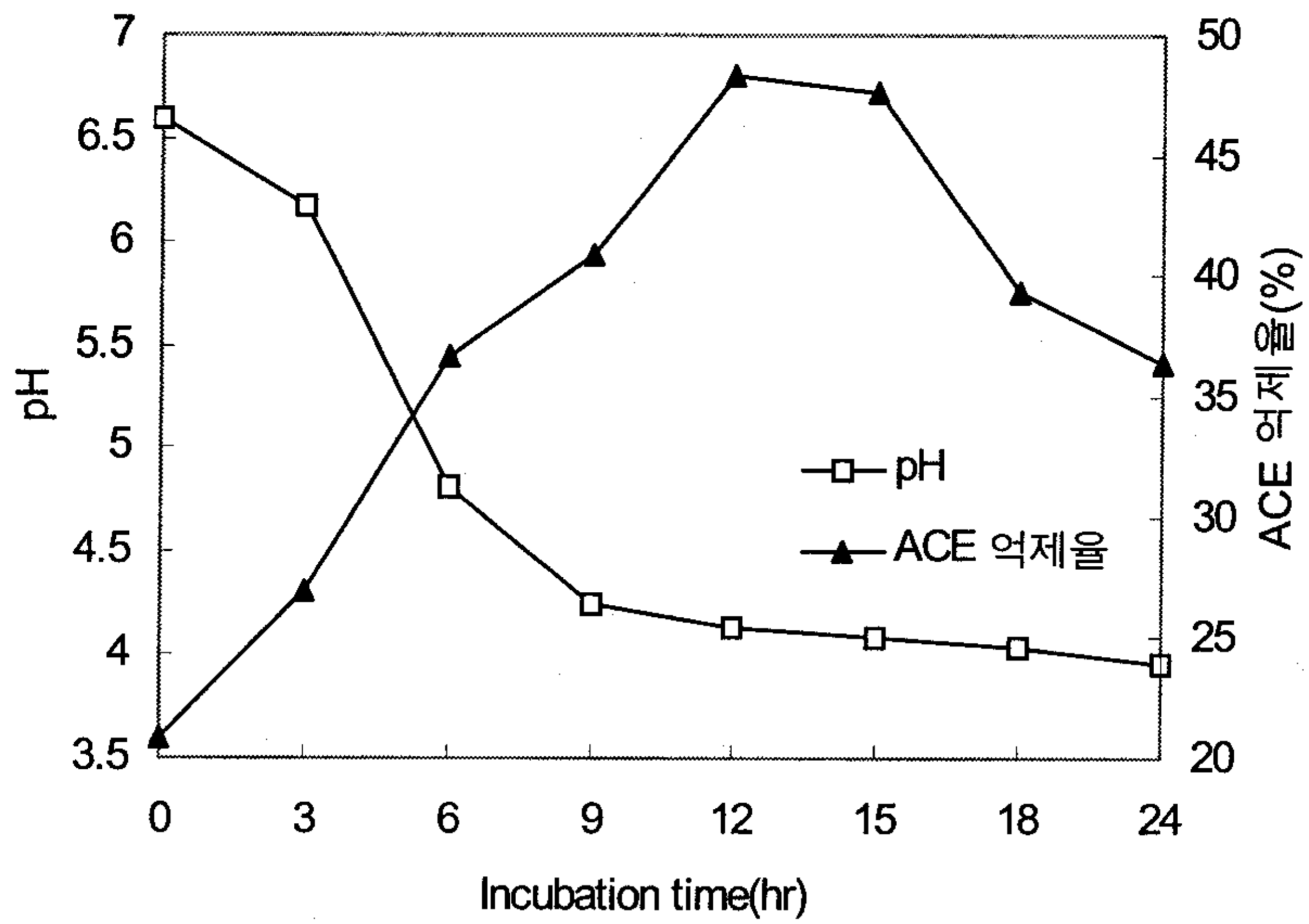


Fig. 43. The effect of incubation time on pH and ACE inhibitory ratio in 10% reconstituted skim milk added 1.0% *Lactobacillus plantarum* K359 at 34°C

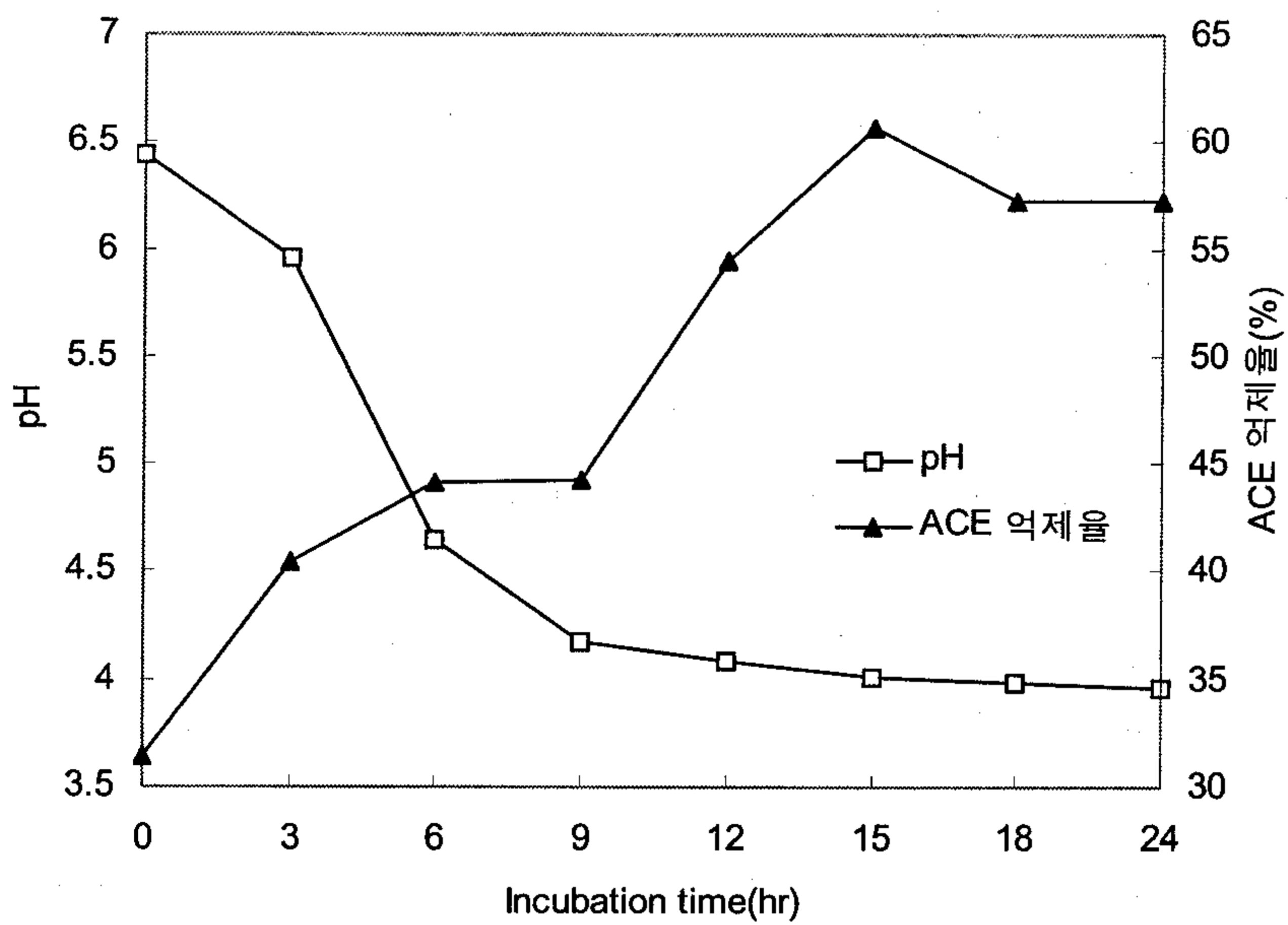


Fig. 44. The effect of incubation time on pH and ACE inhibitory ratio in 10% reconstituted skim milk added 1.0% *Lactobacillus plantarum* K359 at 37°C

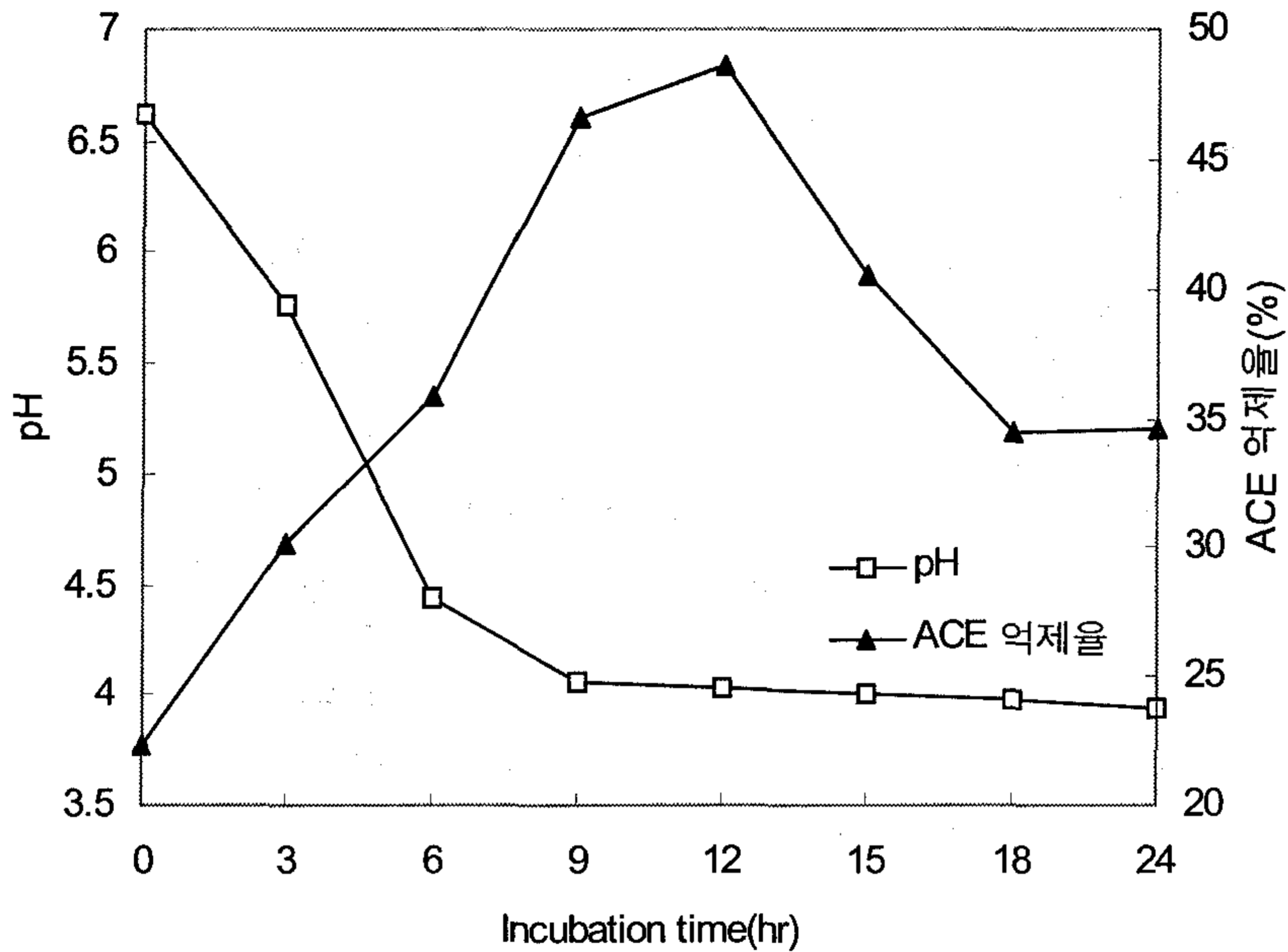


Fig. 45. The effect of incubation time on pH and ACE inhibitory ratio in 10% reconstituted skim milk added 1.0% *Lactobacillus plantarum* K359 at 40°C

34°C에서 12시간 배양할 때 최대 ACE 억제율이 48.4%까지 상승하다가 이후 감소하는 경향을 보였고, 발효유의 최적 pH 조건이 pH 4.3-4.4임을 감안하면 약 41%의 ACE 억제율이 예상된다.

37°C에서 15시간 배양할 때 최대 ACE 억제율이 60.7%까지 상승하다가 이후 감소하는 경향을 보였고, 최적 pH 조건을 감안하면 약 44%의 ACE 억제율이 예상된다. 40°C에서는 12시간 배양할 때 48.6%의 억제율을 보이다가 감소하였는데, 최적 pH 조건을 감안하면 약 38%의 ACE 억제율이 예상된다.

이와 같이 5종의 *Lactobacillus* 균을 이용하여 ACE 억제율을 측정한 결과 *Lactobacillus brevis* K29 균주가 78.0%로서 가장 높았는데, 이때의 최적조건은 환원탈지유 12%, 젖산균 첨가량 1.0%, 배양온도 37°C, 배양시간 15시간이었다. 그러나, 발효유의 최적 pH 조건을 감안하였을 때는 *Lactobacillus zeae* K354 균주가 ACE 억제율이 69.2%로서 가장 높았는데, 이때의 최적조건은 환원탈지유 10%, 젖산균 0.1%, 배양온도 37°C, 배양시간 15시간이었다.

## 6. 최적 배합조성물 개발

### 가. 제조 공정

*Lactobacillus zeae* K354 균주를 이용한 발효유는 ACE 억제율이 *Enterococcus faecalis* B46 균주를 이용한 발효유에 비해 낮은 문제점이 있고, 또한 최근 대두되고 있는 Enterococci 균에 대한 위해성 논란이 대두되고 있어 보다 ACE 억제율이 높고 안정적인 제품개발을 위해 *Lactobacillus zeae* K354 균주를 이용한 발효액에 *Enterococcus faecalis* B46 균주를 이용하여 배양한 발효액을 열처리하고 혼합하는 방법이 강구되었다. 이때 열처리한 발효액에서의 ACE 억제율이 감소하는지 여부를 다음 표 29에 나타내었다.

표 29. *Enterococcus faecalis* RMB46 균주를 이용한 발효액을 90℃에서 5분간 살균에 의한 ACE 저해율 변화

구 분	살균 발효액	비살균 발효액
ACE 저해율(%)	99.6±1.7	97.1±1.7

표 29에서 보는 바와 같이 거의 열에 영향이 없는 것으로 나타남에 따라 혼합하여도 문제가 없는 것으로 나타났다.

또한, *Enterococcus faecalis* B46균주에 의한 발효액은 쓴맛이 강하여 기호성이 떨어지는 문제점 때문에 배양시간별로 쓴 맛의 정도를 측정된 결과 6시간이 쓴 맛이 가장 적었고, 이때 ACE 억제율이 98.9%로서 이 때 첨가하는 것이 바람직하였다.

표 30. 배양시간별 쓴 맛의 정도와 ACE 억제율

배양시간	쓴맛정도	<i>E. faecalis</i> B46균주에 의한 발효액 pH <sup>1)</sup>	혼합발효액의 pH <sup>2)</sup>	혼합발효액의 ACE 억제율(%)
6	+	6.51	4.73	99.1±0.8
9	+++	5.88	4.63	99.6±1.9
12	+++	5.54	4.52	99.6±0.2
15	+++	5.31	4.50	99.0±0.5
18	+++	5.05	4.42	98.6±2.1

<sup>1)</sup> 37℃에서 1% 접종

<sup>2)</sup> 40℃에서 *Lactobacillus zeae* K354 균주 1% 접종 후 24시간 발효액(I, pH 4.17)과 *Enterococcus faecalis* B46 균주 이용 발효액을 제조한 다음 90℃, 5분간 열처리한 제품(II)을 5 : 5 비율로 혼합

이에 따라 원유 96.05%와 탈지분유 3.85%를 첨가하고 65℃에서 배합하여 완전히 녹인 후 90℃에서 30분간 살균하였으며, 40℃로 냉각시킨 다음 선택균주를 1%(v/v)로 접종하고, 최종 pH 4.4으로 감소할 때까지 배양하였다. 발효가 완료된 후 다양한 소재를 첨가하여 호상발효유를 제조한 다음 관능검사를 실시하여 최적 배합조성물을 완성하였다.

#### 나. 배합비

플레인 발효액에 딸기잼을 농도별로 첨가하여 배합조성비(표 31)를 설정한 다음 관능검사를 실시한 결과는 표 32-37과 같다.

표 31. 선발균주를 이용한 개발제품의 배합비

재 료	배합비(%)		
	A	B	C
원 유	80.776	80.776	80.776
탈지분유	3.234	3.234	3.234
올리고당	5	5	5
액상과당	2	2	2
딸기잼 또는 블루베리잼 또는 포도잼	4	6	8
정 제 수	5.0	3.0	1.0
Total	100	100	100

표 32는 *Lactobacillus zeae* K354 균주 이용 발효유(I)와 *Enterococcus faecalis* B46 균주 이용 발효유를 제조한 다음 90℃, 5분간 열처리한 제품(II)을 5 : 5 비율로 혼합한 딸기 발효유의 관능검사 한 결과이다.



표 32. I과 II를 5 : 5 비율로 혼합한 딸기 발효유의 관능적 품질평가<sup>1)</sup>

Mean±Std

관능기준 딸기잼	색	맛	조직감	종합적 기호도	구입의사
control <sup>2)</sup>	6.00±1.63 <sup>a</sup>	5.84±1.62 <sup>a</sup>	5.76±1.83 <sup>a</sup>	5.84±1.51 <sup>a</sup>	6.00±1.77 <sup>a</sup>
A	5.76±1.69 <sup>a</sup>	5.26±1.10 <sup>a</sup>	5.61±1.31 <sup>a</sup>	5.72±1.34 <sup>a</sup>	5.41±1.69 <sup>a</sup>
B	5.84±1.46 <sup>a</sup>	5.92±1.04 <sup>a</sup>	5.43±1.16 <sup>a</sup>	5.69±1.57 <sup>a</sup>	5.68±1.51 <sup>a</sup>
C	5.42±1.11 <sup>a</sup>	5.97±1.38 <sup>a</sup>	5.56±1.07 <sup>a</sup>	5.73±1.43 <sup>a</sup>	5.76±1.43 <sup>a</sup>

<sup>1)</sup> 1~9점까지의 점수를 13명의 평가단에 의한 평균값이다.

<sup>2)</sup> 남양유업 120/80이다.

<sup>a,b</sup> 같은 평가기준에서 동일한 문자는 SNK 다중 비교의 5% 수준에서 통계적으로 유의성이 없음을 의미한다.

표 33은 *Lactobacillus zeae* K354 균주만을 이용 딸기 발효유(I)의 관능검사 한 결과이다.

표 33. *Lactobacillus zeae* K354 균주 이용 딸기 발효유의 관능적 품질평가<sup>1)</sup>

Mean±Std

관능기준 딸기잼	색	맛	조직감	종합적 기호도	구입의사
control <sup>2)</sup>	5.76±1.42 <sup>a</sup>	5.46±1.89 <sup>a</sup>	5.38±1.89 <sup>a</sup>	5.69±1.65 <sup>a</sup>	5.23±1.64 <sup>a</sup>
A	6.07±1.60 <sup>a</sup>	5.46±1.80 <sup>a</sup>	5.61±1.26 <sup>a</sup>	5.61±1.50 <sup>a</sup>	5.53±1.39 <sup>a</sup>
B	6.00±1.29 <sup>a</sup>	6.15±1.14 <sup>a</sup>	5.69±1.25 <sup>a</sup>	6.23±1.01 <sup>a</sup>	5.92±1.11 <sup>a</sup>
C	5.84±1.57 <sup>a</sup>	6.53±1.26 <sup>a</sup>	6.07±0.86 <sup>a</sup>	6.30±0.94 <sup>a</sup>	6.07±1.03 <sup>a</sup>

<sup>1)</sup> 1~9점까지의 점수를 13명의 평가단에 의한 평균값이다.

<sup>2)</sup> 남양유업 120/80이다.

<sup>a,b</sup> 같은 평가기준에서 동일한 문자는 SNK 다중 비교의 5% 수준에서 통계적으로 유의성이 없음을 의미한다.

표 34는 *Lactobacillus zeae* K354 균주 이용 발효유(I)와 *Enterococcus faecalis* B46 균주 이용 발효유를 제조한 다음 90℃, 5분간 열처리한 제품(II)을 5 : 5 비율로 혼합한 블루베리 발효유의 관능검사 한 결과이다.

표 34. I과 II를 5 : 5 비율로 혼합한 블루베리 발효유의 관능적 품질평가<sup>1)</sup>

Mean±Std

관능기준 딸기잼	색	맛	조직감	종합적 기호도	구입의사
control <sup>2)</sup>	5.53±1.35 <sup>a</sup>	5.69±2.43 <sup>a</sup>	5.61±1.16 <sup>a</sup>	5.61±2.46 <sup>a</sup>	5.38±2.05 <sup>a</sup>
A	5.46±1.46 <sup>a</sup>	5.41±1.20 <sup>a</sup>	5.23±1.59 <sup>a</sup>	5.28±1.83 <sup>a</sup>	5.12±1.98 <sup>a</sup>
B	5.92±1.75 <sup>a</sup>	5.53±1.76 <sup>a</sup>	5.51±1.76 <sup>a</sup>	5.49±1.16 <sup>a</sup>	5.21±1.11 <sup>a</sup>
C	6.15±1.82 <sup>a</sup>	5.92±1.81 <sup>a</sup>	5.39±2.06 <sup>a</sup>	5.51±1.82 <sup>a</sup>	5.33±1.91 <sup>a</sup>

<sup>1)</sup> 1~9점까지의 점수를 13명의 평가단에 의한 평균값이다.

<sup>2)</sup> 남양유업 120/80이다.

<sup>a,b</sup> 같은 평가기준에서 동일한 문자는 SNK 다중 비교의 5% 수준에서 통계적으로 유의성이 없음을 의미한다.

표 35는 *Lactobacillus zae* K354 균주만을 이용 블루베리 발효유(I)의 관능검사한 결과이다.

표 35. *Lactobacillus zae* K354 균주 이용 블루베리 발효유의 관능적 품질평가<sup>1)</sup>

Mean±Std

관능기준 딸기잼	색	맛	조직감	종합적 기호도	구입의사
control <sup>2)</sup>	6.00±1.47 <sup>a</sup>	5.38±1.80 <sup>a</sup>	5.46±1.56 <sup>a</sup>	5.38±1.60 <sup>a</sup>	5.23±1.64 <sup>a</sup>
A	5.46±1.33 <sup>a</sup>	5.53±1.45 <sup>a</sup>	5.61±1.80 <sup>a</sup>	5.84±1.34 <sup>a</sup>	5.23±1.58 <sup>a</sup>
B	6.15±1.34 <sup>a</sup>	5.69±1.60 <sup>a</sup>	5.92±1.32 <sup>a</sup>	5.84±1.40 <sup>a</sup>	5.53±1.33 <sup>a</sup>
C	6.53±1.50 <sup>a</sup>	6.07±1.55 <sup>a</sup>	6.15±1.28 <sup>a</sup>	6.53±1.12 <sup>a</sup>	6.23±1.64 <sup>a</sup>

<sup>1)</sup> 1~9점까지의 점수를 13명의 평가단에 의한 평균값이다.

<sup>2)</sup> 남양유업 120/80이다.

<sup>a,b</sup> 같은 평가기준에서 동일한 문자는 SNK 다중 비교의 5% 수준에서 통계적으로 유의성이 없음을 의미한다.

표 36은 *Lactobacillus zae* K354 균주 이용 발효유(I)와 *Enterococcus faecalis* B46 균주 이용 발효유를 제조한 다음 90℃, 5분간 열처리한 제품(II)을 5 : 5 비율로 혼합한 포도 발효유의 관능검사 한 결과이다.

표 36. I과 II를 5 : 5 비율로 혼합한 포도 발효유의 관능적 품질평가<sup>1)</sup>

		Mean±Std				
딸기잼	관능기준	색	맛	조직감	종합적 기호도	구입의사
	control <sup>2)</sup>		5.92±1.12 <sup>a</sup>	5.76±1.84 <sup>a</sup>	5.76±1.43 <sup>a</sup>	5.84±1.43 <sup>a</sup>
A		5.89±1.26 <sup>a</sup>	5.26±1.35 <sup>a</sup>	5.16±1.26 <sup>a</sup>	5.27±1.62 <sup>a</sup>	5.39±1.55 <sup>a</sup>
B		5.91±1.32 <sup>a</sup>	5.86±1.56 <sup>a</sup>	5.49±1.02 <sup>a</sup>	5.43±1.11 <sup>a</sup>	5.43±1.29 <sup>a</sup>
C		5.99±1.91 <sup>a</sup>	5.73±1.38 <sup>a</sup>	5.68±1.73 <sup>a</sup>	5.78±1.08 <sup>a</sup>	5.57±1.84 <sup>a</sup>

<sup>1)</sup> 1~9점까지의 점수를 13명의 평가단에 의한 평균값이다.

<sup>2)</sup> 남양유업 120/80이다.

<sup>a,b,c</sup> 같은 평가기준에서 동일한 문자는 SNK 다중 비교의 5% 수준에서 통계적으로 유의성이 없음을 의미한다.

표 37은 *Lactobacillus zae* K354 균주만을 이용 포도 발효유(I)의 관능검사한 결과이다.

표 37. *Lactobacillus zae* K354 균주 이용 포도 발효유의 관능적 품질평가<sup>1)</sup>

		Mean±Std				
딸기잼	관능기준	색	맛	조직감	종합적 기호도	구입의사
	control <sup>2)</sup>		6.15±1.51 <sup>a</sup>	5.38±0.96 <sup>a</sup>	6.07±1.80 <sup>a</sup>	5.46±1.26 <sup>a</sup>
A		6.15±0.68 <sup>a</sup>	5.46±1.45 <sup>a</sup>	5.15±1.40 <sup>a</sup>	5.46±1.26 <sup>a</sup>	5.23±1.30 <sup>a</sup>
B		6.26±1.01 <sup>a</sup>	6.34±1.43 <sup>a</sup>	5.84±1.34 <sup>a</sup>	6.23±1.36 <sup>a</sup>	5.92±1.44 <sup>a</sup>
C		6.07±1.18 <sup>a</sup>	6.15±1.14 <sup>a</sup>	6.00±0.81 <sup>a</sup>	5.84±1.21 <sup>a</sup>	5.61±1.38 <sup>a</sup>

<sup>1)</sup> 1~9점까지의 점수를 13명의 평가단에 의한 평균값이다.

<sup>2)</sup> 남양유업 120/80이다.

<sup>a,b</sup> 같은 평가기준에서 동일한 문자는 SNK 다중 비교의 5% 수준에서 통계적으로 유의성이 없음을 의미한다.

표 32-37의 결과를 보면 *Lactobacillus zae* K354 균주 이용 발효유(I)와 *Enterococcus faecalis* B46 균주 이용 발효유를 제조한 다음 90°C, 5분간 열처리한 제품(II)을 5 : 5 비율로 혼합한 제품의 경우는 과일잼을 8% 첨가하였을 때가 가장 높은 점수를 얻었으며, 대조구에 비해 약간 낮은 점수를 얻었지만 유의성은

없는 것으로 나타났다. 이는 *Enterococcus faecalis* B46 균주 이용 발효유에서 약간 쓴 맛이 남아 있어서 영향을 미치기 때문으로 보인다. 반면, *Lactobacillus zeae* K354 균주를 단독으로 사용한 발효유 제품의 경우는 딸기잼과 블루베리잼 8%, 포도잼 6%를 첨가하였을 때가 관능평가가 우수하였고, 대조구보다 높은 점수를 보였다.

## 7. 제품 개발 및 이화학적 특성 조사

### 가. 제품개발

#### 1) 혼합균주 사용할 경우

가) 발효조 A : 원유 96.15%, 탈지분유 3.85%를 첨가하고 65℃에서 배합하여 완전히 녹인 후 90℃에서 5분간 살균하였으며, 40℃로 냉각시킨 다음 *Lactobacillus zeae* K354 균주를 1.0%(v/v)로 접종하고, 최종 pH 4.17로 감소할 때까지 배양하였다.

나) 발효조 B : 원유 96.15%, 탈지분유 3.85%를 첨가하고 65℃에서 배합하여 완전히 녹인 후 90℃에서 5분간 살균하였으며, 37℃로 냉각시킨 다음 *Enterococcus faecalis* B46 균주를 1.0%(v/v)로 접종하고, 최종 pH 6.51로 감소할 때까지 배양한 다음 90℃에서 5분간 열처리하였다.

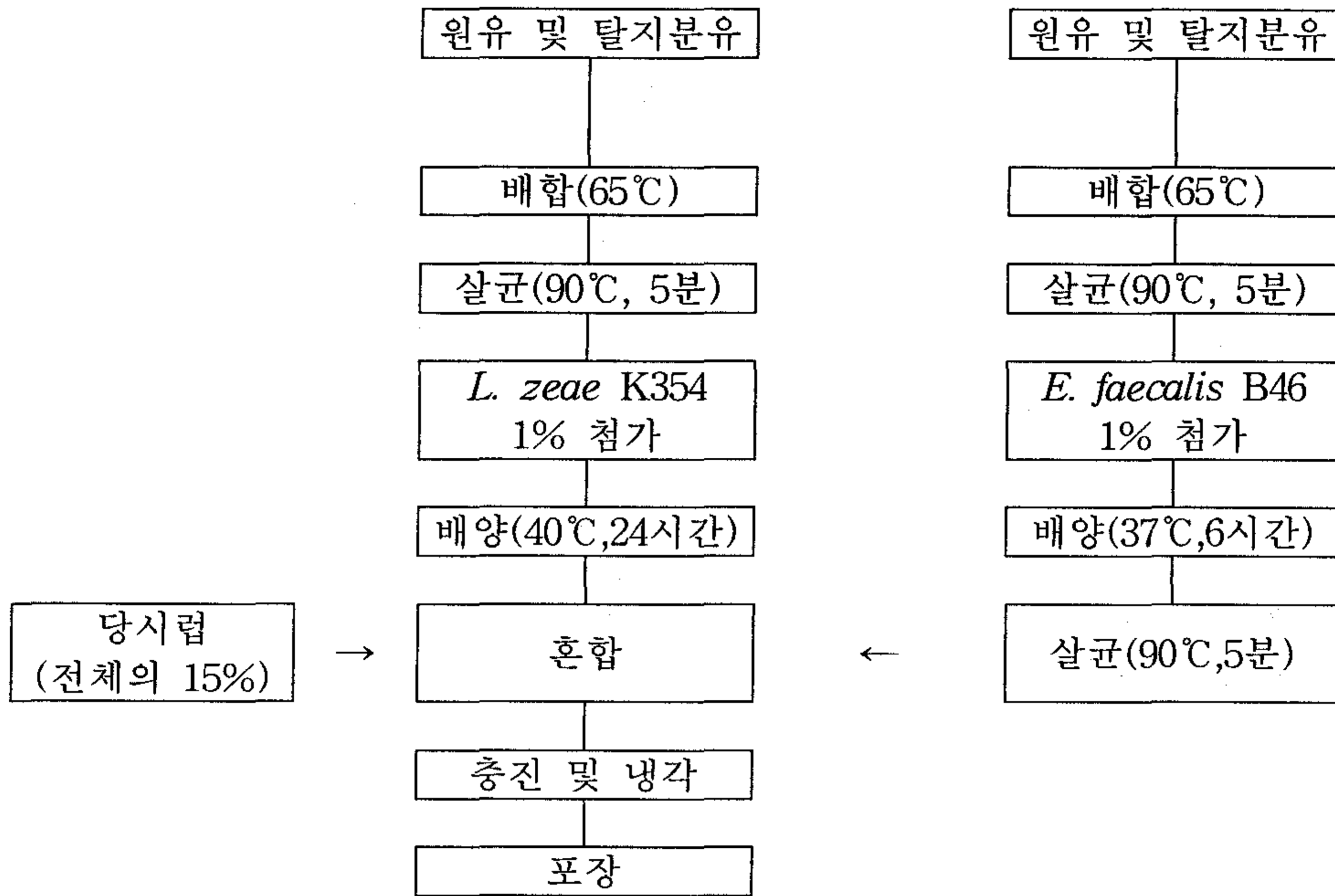
다) 조합탱크 : 비율함량에 맞춰 발효조 A와 B를 혼합(전체의 84%)한 다음 딸기잼 (또는 블루베리잼 또는 포도잼)8.0%, 올리고당 5%, 액상과당 2%, 정제수 1.0%를 첨가하고 교반하여 호상발효유를 제조하였다.

#### 2) 단일균주 사용할 경우

발효조 A : 원유 96.15%, 탈지분유 3.85%를 첨가하고 65℃에서 배합하여 완전히 녹인 후 90℃에서 5분간 살균하였으며, 40℃로 냉각시킨 다음 *Lactobacillus zeae* K354 균주를 1.0%(v/v)로 접종하고, 최종 pH 4.4으로 감소할 때까지 배양한 액(전체의 84%)에 딸기잼(또는 블루베리잼 또는 포도잼)8.0%, 올리고당 5%, 액상과당 2%, 정제수 1.0%를 첨가하고 교반하여 호상발효유를 제조하였다.

나. 제조공정 설정

1) 혼합균주 사용할 경우



2) 단일균주 사용할 경우

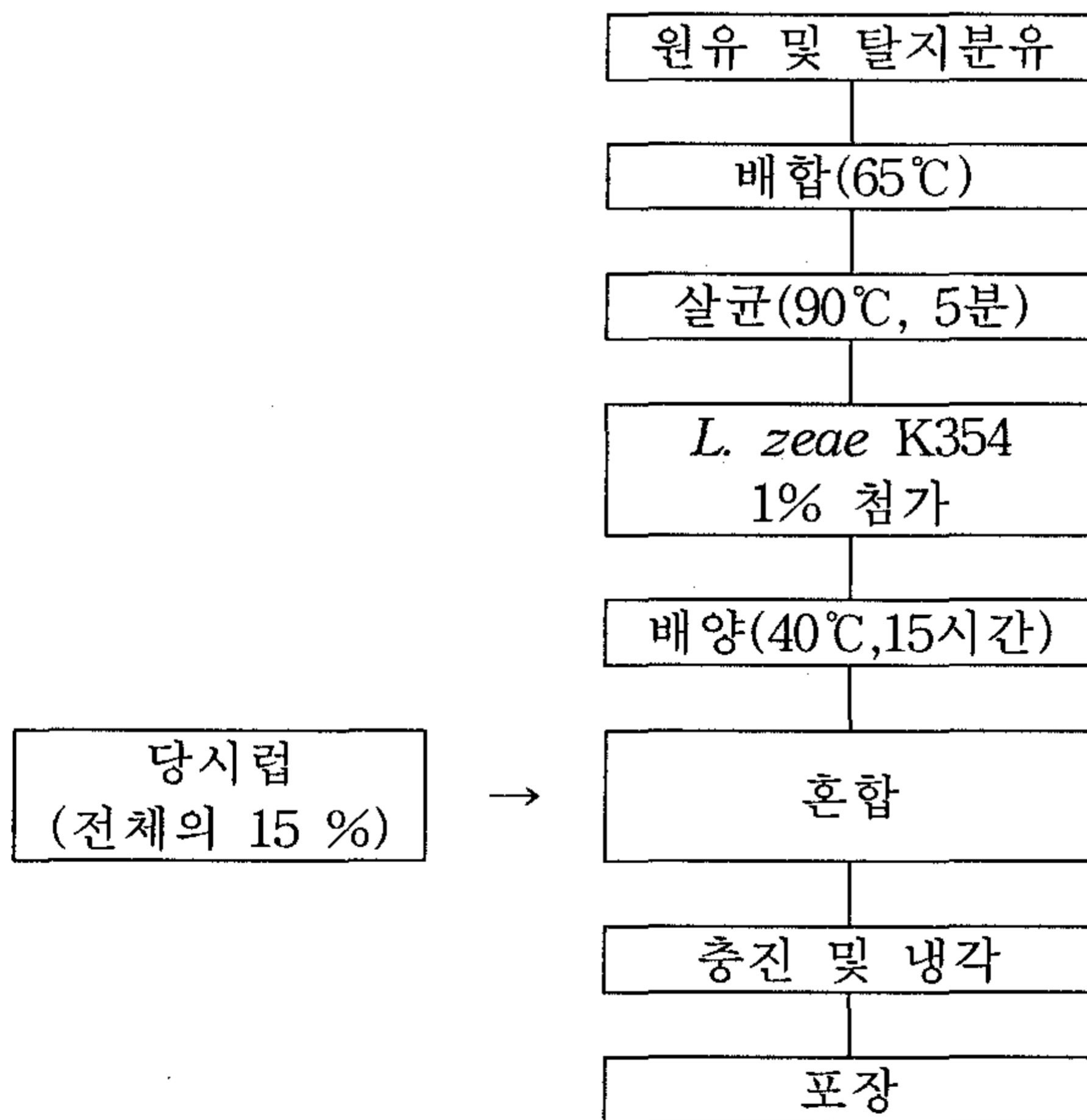


Fig. 46. 호상발효유의 제조공정도

다. ACE 저해율 및 이화학 성분 분석

상기와 같이 제조한 후 ACE 저해율 및 이화학 성분 분석 결과는 다음 표 38과 같다.

표 38. 개발 제품의 ACE 저해율 및 이화학 성분 분석

성분 제품	적정산도 (%)	수 분 (%)	단백질 (%)	지 방 (%)	회 분 (%)	ACE저해율 (%)	젖산균수 (cfu/ml)
A <sup>1)</sup>	1.3	83.77±1.31	4.26±0.2	3.43±0.13	0.92±0.01	88.6±1.8	2.6×10 <sup>9</sup>
B <sup>2)</sup>	1.25	84.25±1.24	4.43±0.04	3.38±0.25	0.92±0.05	98.8±2.9	1.2×10 <sup>9</sup>

<sup>1)</sup> *Lactobacillus zeae* K354 균주 이용 발효유

<sup>2)</sup> *Lactobacillus zeae* K354 균주 이용 발효유(I)와 *Enterococcus faecalis* B46 균주 이용 발효유(II)의 혼합비 = 5 : 5 발효유

표 39. 개발 제품의 총 아미노산 분석

아미노산	단위 : mg/100g	
	A <sup>1)</sup>	B <sup>2)</sup>
아스파르트산(Aspartic acid)	336.8	339.6
세린(Serine)	34.0	237.4
글루탐산(Glutamic acid)	910.7	900.4
글리신(Glycine)	79.4	80.6
히스티딘(Histidine)	113.7	115.9
스레오닌(Threonine)	172.9	171.3
알기닌(Arginine)	131.5	125.2
알라닌(Alanine)	158.1	154.0
프롤린(Proline)	460.2	468.3
시스테인(Cystein)	16.8	19.6
티로신(Tyrosine)	179.7	148.1
발린(Valine)	273.6	275.7
메치오닌(Methionine)	117.6	114.5
리신(Lysine)	353.1	357.3
이소로이신(Isoleucine)	217.6	219.6
로이신(Leucine)	426.4	422.1
페닐알라닌(Phenylalanine)	232.8	209.2
total	4,414.9	4,358.9

<sup>1)</sup> *Lactobacillus zeae* K354 균주 이용 발효유

<sup>2)</sup> *Lactobacillus zeae* K354 균주 이용 발효유(I)와 *Enterococcus faecalis* B46 균주 이용 발효유(II)의 혼합비 = 5 : 5 발효유

*Lactobacillus zeae* K354 단독 균주에 의한 발효유 제품과 혼합제품의 성분을 보면, 각각 무지유고형분 10.0%와 10%, 유지방 3.43%와 3.38%, 젖산균수  $2.6 \times 10^9$  CFU/mL와  $1.2 \times 10^9$  CFU/mL, ACE 억제율은 88.6%와 98.8%이었다. 축산물 가공 기준 및 규격(2005)에 따르면, 호상발효유의 경우 무지유고형분 8.0%, 젖산균수 1억 cfu/ml 이상으로서 모두 합격이었으며, 다만 B제품은 배양조가 2개가 필요하고 공정이 복잡한 단점이 있는 반면, ACE 억제율이 높다는 장점이 있어 업체의 상황에 따라 선택하는 것이 바람직할 것으로 사료된다.

## 8. 발효유에서의 항고혈압 peptide 분리

### 가. 발효유의 전처리 조건

*Lactobacillus zeae* K354 균주를 접종하여 제조된 발효유를 원심분리하여 상층액을 취하여 peptide 분획용 원료로 사용하였다.

### 나. 발효유의 분획

발효유를 membrane으로 분획한 결과, MW 1000이하가 60.68%, 1000~3,000이 23.14%, 3,000~10,000이 3.61% 그리고 1만 이상이 12.56%로 나타나 대부분이 분자량 1000이하로 나타났다.

Table 40. Recovery rates of fermented milk<sup>1)</sup> hydrolysate after ultra filtration

Membrane	Recovery rates (%)
whole	100
10,000 Da 이상	12.56
3,000 - 10,000 Da	3.61
1,000 - 3,000 Da	23.14
1,000 Da 이하	60.68

<sup>1)</sup> fermented milk : 원유 96.15%와 탈지분유 3.85%에 *Lactobacillus zeae* K354 균주를 접종하고, 최종 pH 4.4으로 감소할 때까지 배양한 액

다. Membrane으로 분획한 발효유의 항고혈압 효과

Membrane으로 분획한 발효유 500 $\mu$ g을 첨가했을 때 발효유의 ACE저해 효과는 10 kDa 이상에서는 35.6%, 10 - 3 kDa에서는 32.4%, 3 - 1 kDa에서는 28.7% 그리고 1 kDa 이하에서는 23.8%로 나타났다. 일반적으로 1 kDa 이하에서 ACE저해 효과가 높은 것으로 나타나는 데 본 시료에서 10 kDa 이상에서 ACE저해 효과가 높게 나타난 것으로 보아 저분자획분 중에는 유당의 함량이 높은 것으로 사료된다.

Table 41. ACE inhibitory activity of fermented milk hydrolysate

	membrane			
	10. kDa 이상	10 - 3 kDa	3 - 1 kDa	1 kDa 이하
ACE inhibitory activity (%)	35.6 $\pm$ 0.6	32.4 $\pm$ 2.5	28.7 $\pm$ 4.5	23.8 $\pm$ 1.3

\* concentration 10mg/mL

라. Column에 의한 발효유 peptide의 분리정제

발효유의 peptide를 Sephadex G-25수지를 충전한 gel permeation column, ODS AQ column, Vydac column, Superdex peptide column을 이용하여 순차적으로 분리, 정제하였으며 그 결과를 요약하면 다음과 같다. 먼저 Sephadex G-25수지를 충전한 gel permeation chromatography는 저분자의 단백질을 분리할 때 주로 사용되며, 이 과정에서 저분자의 염을 제거할 수 있다. 한외 여과하여 얻은 1만 이하의 획분을 Sephadex G-25 column으로 분획하여, 4개의 획분을 얻었고(Fig. 47), 이들 획분을 동결건조하여 PS1, PS2, PS3, PS4 그리고 PS5로 하였고, 이 가운데 PS2획분의 ACE저해효과가 가장 좋았다(Table 42). 그리고 PS2획분의 함량이 79.4%로 대부분을 차지하였다(Table 42). 이들 결과로 보아, ACE저해활성 peptide제조를 위한 효소 가수분해조건이 매우 효과적으로 설정되었음을 알 수 있었다. 그리고 ACE 저해효과가 가장 좋은 PS2획분을 ODS AQ column을 사용하여 6개의 획분으로 분획 하여, PS201, PS202, PS203, PS204, PS205 그리고 PS206로 하였고(Fig. 48), 이들 획분을 2ml로 농축하여 ACE저해효과를 측정하였다. Matsuda 등(1992)은 ODS충진 칼럼을 이용하여



peptide를 분획하였을 때 에탄올 농도 10-25%에서 분획된 peptide가 ACE저해효과가 좋았다는 보고하였으며, 본 연구 결과에서도 에탄올 농도 10%부근에서 분리된 PS2O3 획분의 ACE저해효과가 가장 좋은 것으로 나타났다(Table 43). PS2O3 획분을 Vydac column으로 재분획하여 8개의 획분으로 분취하였다(Fig. 48). 단백질 가수분해물부터 peptide의 분리정제에 있어서 RPC에 의한 분리법은 매우 효과적인 방법으로 알려져 있다. PS2O3획분을 Vydac column으로 재분획하여 PS2O3V1(tube no 9-10), PS2O3V2(tube no 17-20), PS2O3V3(tube no 21-22), PS2O3V4(tube no 23-25), PS2O3V5(tube no 26-30), PS2O3V6(tube no 31-35) 그리고 PS2O3V7(tube no 49-52) 획분으로 분취하였다(Fig. 49). 이 가운데 PS2O3V6획분의 ACE저해효과가 가장 좋았다(Table 44). MS2O3V6획분을 3% acetonitrile을 사용하여 isocratic 조건에서 재분획하여 1ml로 농축하고 50 $\mu$ l를 첨가하여 ACE저해효과를 측정한 결과, PS2O3V6V3가 66.5%의 효과를 나타내었으며 그 외에는 효과가 없는 것으로 나타났다. 이 Superdex peptide column으로 재정제하여 얻고 여기에서 분리한 단일 peak의 peptide를 모아 아미노산 배열을 분석하였다.

Table 42. Purification of ACE inhibitory peptide by Sephadex G-25 column from fermented milk

sample	contents(%)	ACE inhibitory ratio, %	
		100 $\mu$ g	200 $\mu$ g
PS1	6.8	13.8	20.7
PS2	79.4	45.3	69.2
PS3	11.7	44.9	66.9
PS4	1.8	43.2	65.4
PS5	0.3	45.1	68.2

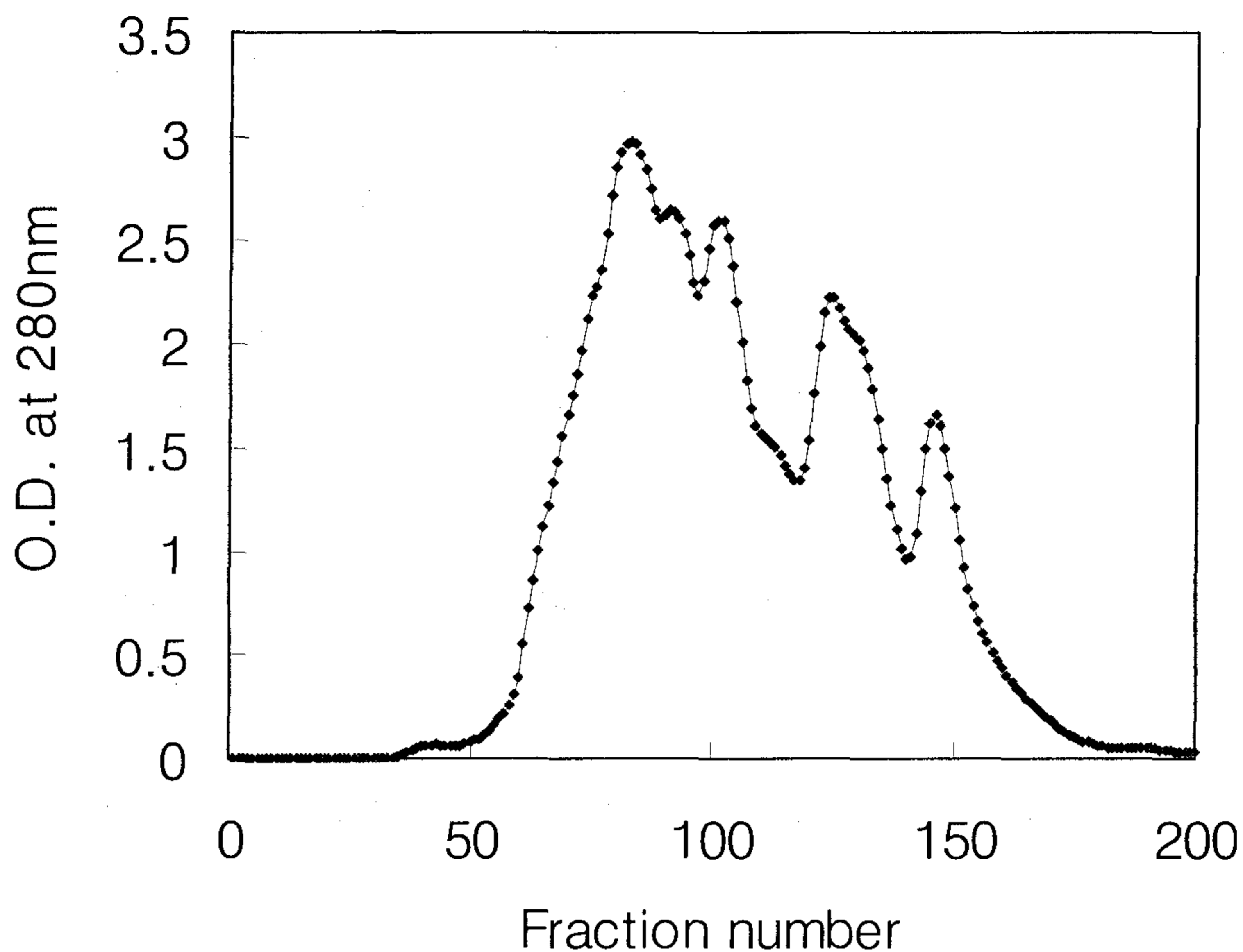


Fig. 47. reversed-phase chromatogram of fermented milk peptide on ODS AQ column

Eluent : 0.1 M TFA in water Flow rate : 2.2 ml/min

Fraction : 20ml/tube

Fractionation : PS1(tube no. 41-63), PS2(64-89),  
PS3(90-116), PS4(117-139), PS5(140-180)

Table 43. Purification of ACE inhibitory peptide by ODS-AQ column from fermented milk peptide(PS2).

sample	contents(%)	ACE inhibitory ratio, %
PS201	43.2	91.8
PS202	6.1	76.1
PS203	7.5	94.0
PS204	10.3	79.3
PS205	8.7	78.3
PS206	24.2	89.5

\* sample : adding 50 $\mu$ l among each fraction 2ml

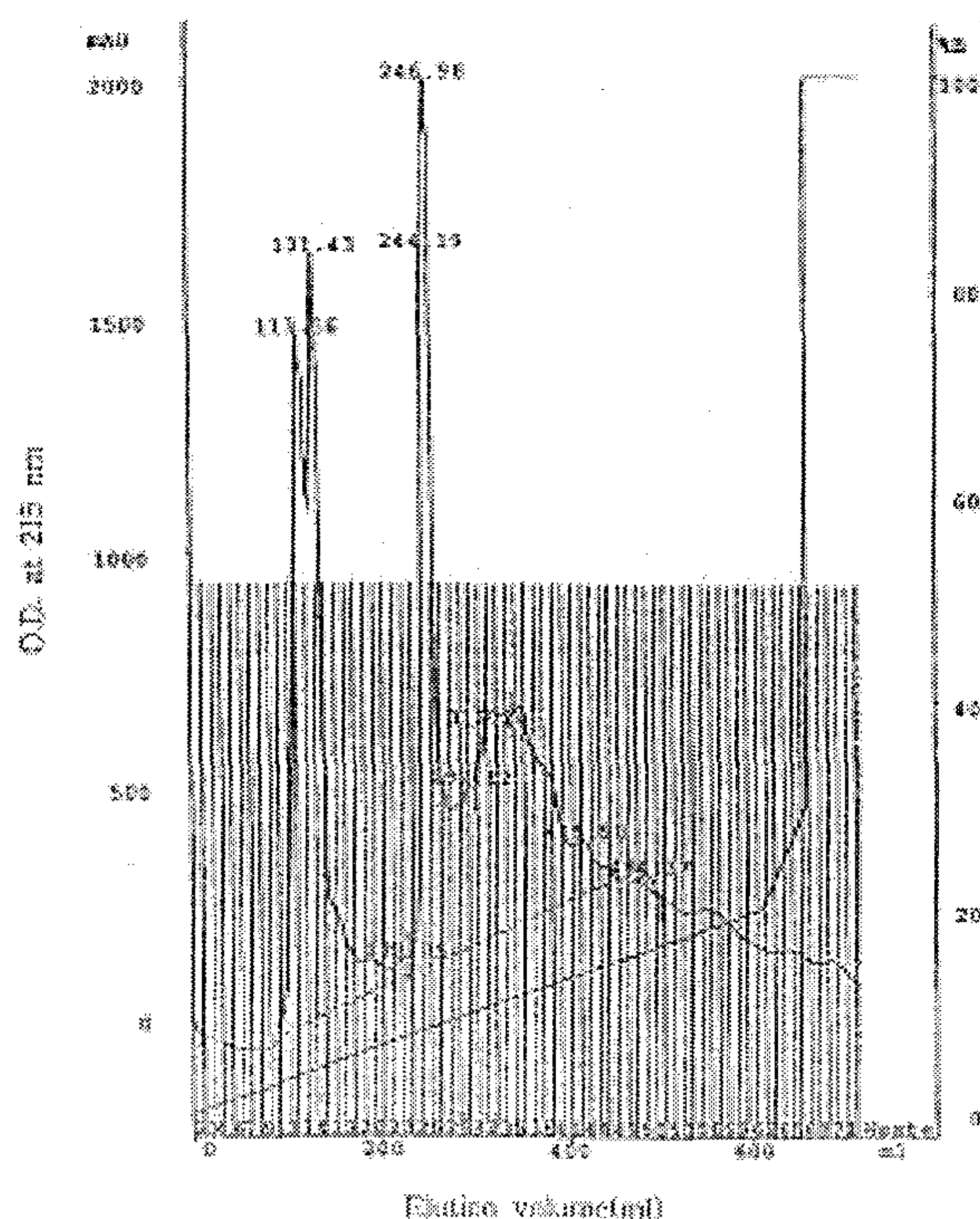


Fig. 48. reversed-phase chromatogram of fermented milk peptide on Vydac 218TP column

Table 44. Purification of ACE inhibitory peptide by Vydac 218TP column fermented milk peptide

sample	contents(%)	ACE inhibitory ratio, %
PS2O3V1	12.1	15.3
PS2O3V2	15.6	42.1
PS2O3V3	10.7	25.4
PS2O3V4	16.9	51.2
PS2O3V5	15.6	69.8
PS2O3V6	23.3	94.4
PS2O3V7	5.8	65.6

\* sample : adding 50 $\mu$ l among each fraction 1ml

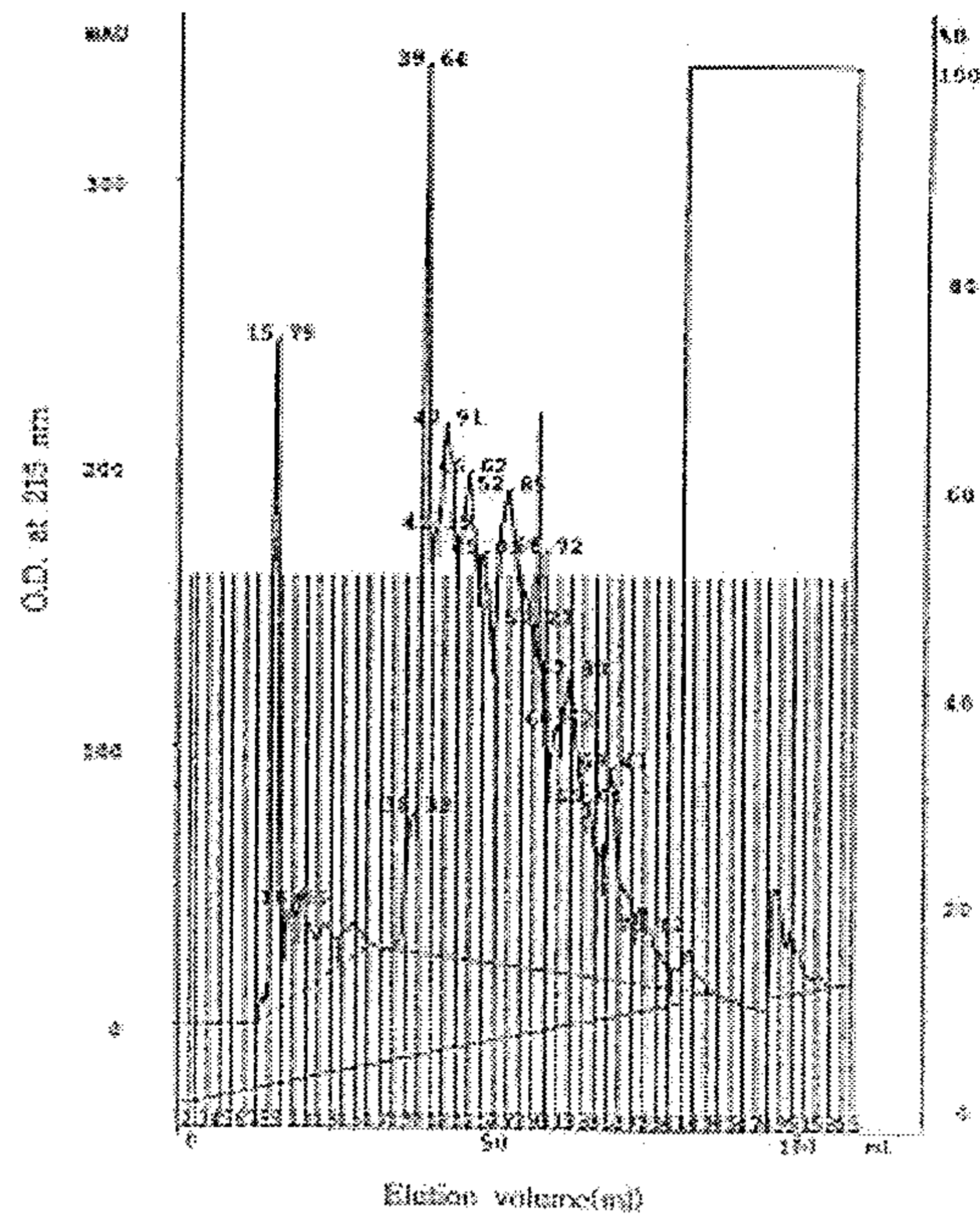


Fig. 49. reversed-phase chromatogram of fermented milk peptide on Vydac 218TP column

마. 아미노산 배열(amino acid sequence)의 분석

발효유로부터 Sephadex G-25 column, ODS AQ column, Vydac column을 이용하여 순차적으로 분리, 정제한 peptide의 N-말단으로부터 아미노산 배열은 Tyr-Val-Ala로 나타났으며, ACE 저해활성은 IC<sub>50</sub>이 1.4μM로 나타났다.

9. 동물실험

가. 식이섭취량 및 체중변화

실험 기간에 따른 체중 변화를 보면 동일 기간 내에 실험군의 평균 체중은 처리군과 대조군에서 유의성 있는 차이를 보이지 않아 실험에 사용한 *Lactobacillus zae* K354 젖산균 함유 발효유가 랫트의 체중 변화에 큰 영향을 미치지 않는다는 것을 보여주었다.

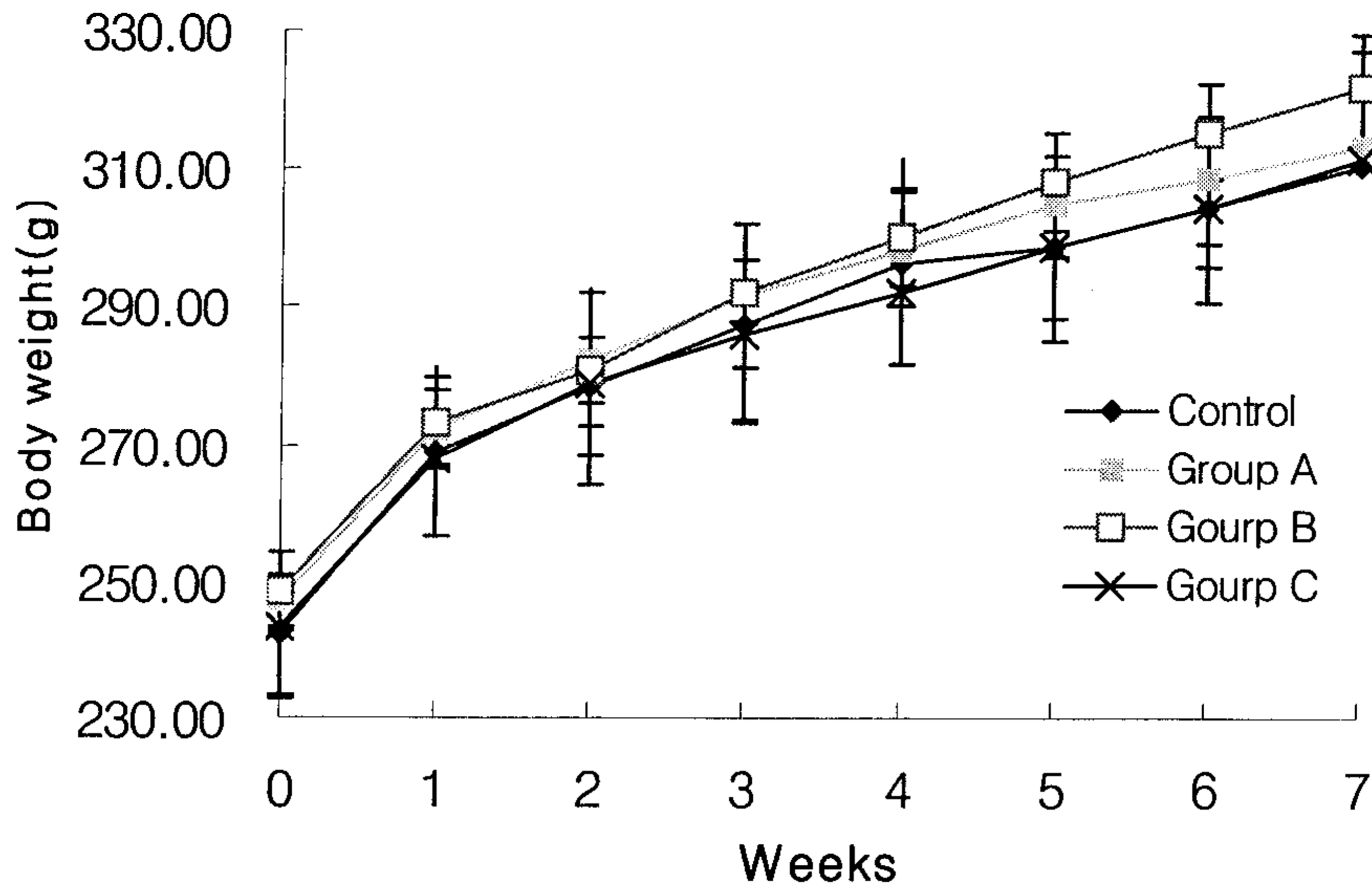


Figure 50. Body weight change of SHR Rat fed experimental diets(g/rat)

Table 45. Body weight change of SHR Rat fed experimental diets(g/rat)

Weeks	0	1	2	3	4	5	6	7
control <sup>1)</sup>	242.45± 9.25 <sup>a</sup>	268.82± 12.45 <sup>a</sup>	278.43± 14.30 <sup>a</sup>	287.11± 13.36 <sup>a</sup>	296.49± 14.99 <sup>a</sup>	298.59± 13.68 <sup>a</sup>	304.57± 13.87 <sup>a</sup>	310.77± 12.62 <sup>a</sup>
A <sup>2)</sup>	247.17± 3.80 <sup>a</sup>	272.29± 5.46 <sup>a</sup>	282.33± 9.85 <sup>a</sup>	291.69± 10.35 <sup>a</sup>	298.35± 8.38 <sup>a</sup>	304.85± 7.36 <sup>a</sup>	308.46± 9.38 <sup>a</sup>	313.34± 13.74 <sup>a</sup>
B <sup>3)</sup>	248.54± 5.63 <sup>a</sup>	273.26± 6.54 <sup>a</sup>	280.82± 4.78 <sup>a</sup>	292.29± 4.55 <sup>a</sup>	300.08± 7.10 <sup>a</sup>	308.25± 7.17 <sup>a</sup>	315.43± 6.93 <sup>a</sup>	322.07± 6.72 <sup>a</sup>
C <sup>4)</sup>	243.34± 10.45 <sup>a</sup>	268.10± 11.48 <sup>a</sup>	278.66± 10.27 <sup>a</sup>	285.98± 13.05 <sup>a</sup>	292.26± 10.60 <sup>a</sup>	298.53± 10.35 <sup>a</sup>	304.47± 8.68 <sup>a</sup>	311.65± 7.70 <sup>a</sup>

Mean±Std(n=7)

<sup>1)</sup> 대조군으로써 식염수를 먹인 group

<sup>2)</sup> *Lactobacillus zeae* K354균으로 발효시킨 발효유를 먹임.

<sup>3)</sup> *Lactobacillus zeae* K354 균주 이용 발효유(I)와 *Enterococcus faecalis* B46 균주 이용 발효유를 제조한 다음 90°C, 5분간 열처리한 제품(II)을 5 : 5 비율로 혼합하여 먹임.

<sup>4)</sup> 시중 발효유 남양유업의 120/80 발효유를 먹임.

<sup>a,b</sup> 같은 평가기준에서 동일한 문자는 SNK 다중 비교의 5% 수준에서 통계적으로 유의성이 없음을 의미한다.

식이군 간의 체중과 체중 변화량의 유의차가 인정되지 않은 것은 전체 열량 소비량에 차이가 없는 경우에는 체중에 영향을 미치지 않는다는 연구(Kent 등, 1989; Kim 등, 1989)와 유사한 것으로 처리군과 대조군 간의 식이 섭취량에서는 다소의 차이를 보였으나, 유의할 만한 변화가 나타나지 않아 *Lactobacillus zeae* K354 젖산균 함유 발효유는 렛트의 증체와는 상관이 없는 것으로 나타났다. 그룹별로는 그룹 B가 다른 그룹에 비해서 다소 증가한 것으로 나타났다.

#### 나. 장기무게 측정

젖산균 투여 후 7주령에 안락사 시킨 SHR rat의 각 장기의 무게에서도 유의성을 확인할 수 없었다. 따라서 대조군과 처리군 간에 젖산균 발효유에 의한 영향이 없는 것으로 나타났다.

Table 46. Organ weight changes of SHR Rat fed experimental diets  
(organ weight/100g)

	간	신장	비장	고환	신장지방	고환지방
control <sup>1)</sup>	12.29±0.93 <sup>a</sup>	2.68±0.08 <sup>a</sup>	0.47±0.04 <sup>a</sup>	2.77±0.22 <sup>a</sup>	1.63±0.30 <sup>a</sup>	1.65±0.22 <sup>a</sup>
A <sup>2)</sup>	11.99±0.65 <sup>a</sup>	2.65±0.25 <sup>a</sup>	0.50±0.06 <sup>a</sup>	2.68±1.03 <sup>a</sup>	1.72±0.34 <sup>a</sup>	1.82±0.19 <sup>a</sup>
B <sup>3)</sup>	12.50±1.46 <sup>a</sup>	2.63±0.12 <sup>a</sup>	0.51±0.05 <sup>a</sup>	2.68±0.09 <sup>a</sup>	1.66±0.39 <sup>a</sup>	1.79±0.19 <sup>a</sup>
C <sup>4)</sup>	12.15±0.64 <sup>a</sup>	2.54±0.13 <sup>a</sup>	0.50±0.05 <sup>a</sup>	2.82±0.15 <sup>a</sup>	2.06±0.54 <sup>a</sup>	1.81±0.23 <sup>a</sup>

Mean±Std(n=7)

<sup>1)</sup> 대조군으로써 식염수를 먹인 group

<sup>2)</sup> *Lactobacillus zeae* K354균으로 발효시킨 발효유를 먹임.

<sup>3)</sup> *Lactobacillus zeae* K354 균주 이용 발효유(I)와 *Enterococcus faecalis* B46 균주 이용 발효유를 제조한 다음 90°C, 5분간 열처리한 제품(II)을 5 : 5 비율로 혼합하여 먹임.

<sup>4)</sup> 시중 발효유 남양유업의 120/80 발효유를 먹임.

<sup>a,b</sup> 같은 평가기준에서 동일한 문자는 SNK 다중 비교의 5% 수준에서 통계적으로 유의성이 없음을 의미한다.

#### 다. 혈압 측정

실험 기간에 따른 혈압의 변화를 측정한 결과 5주까지는 유의성이 없었으나 6주후부터 대조군과 처리군(A, B군) 및 남양유업의 120/80 발효유(C군)간 유의성이 나타나기 시작하였다. 이는 젖산균이 분비하는 단백분해효소에 의해 casein으로부터 유래된 peptide가 혈압을 낮춘다는 보고(Yamamoto 등, 1996)와 일치한 결과를

얻었다.

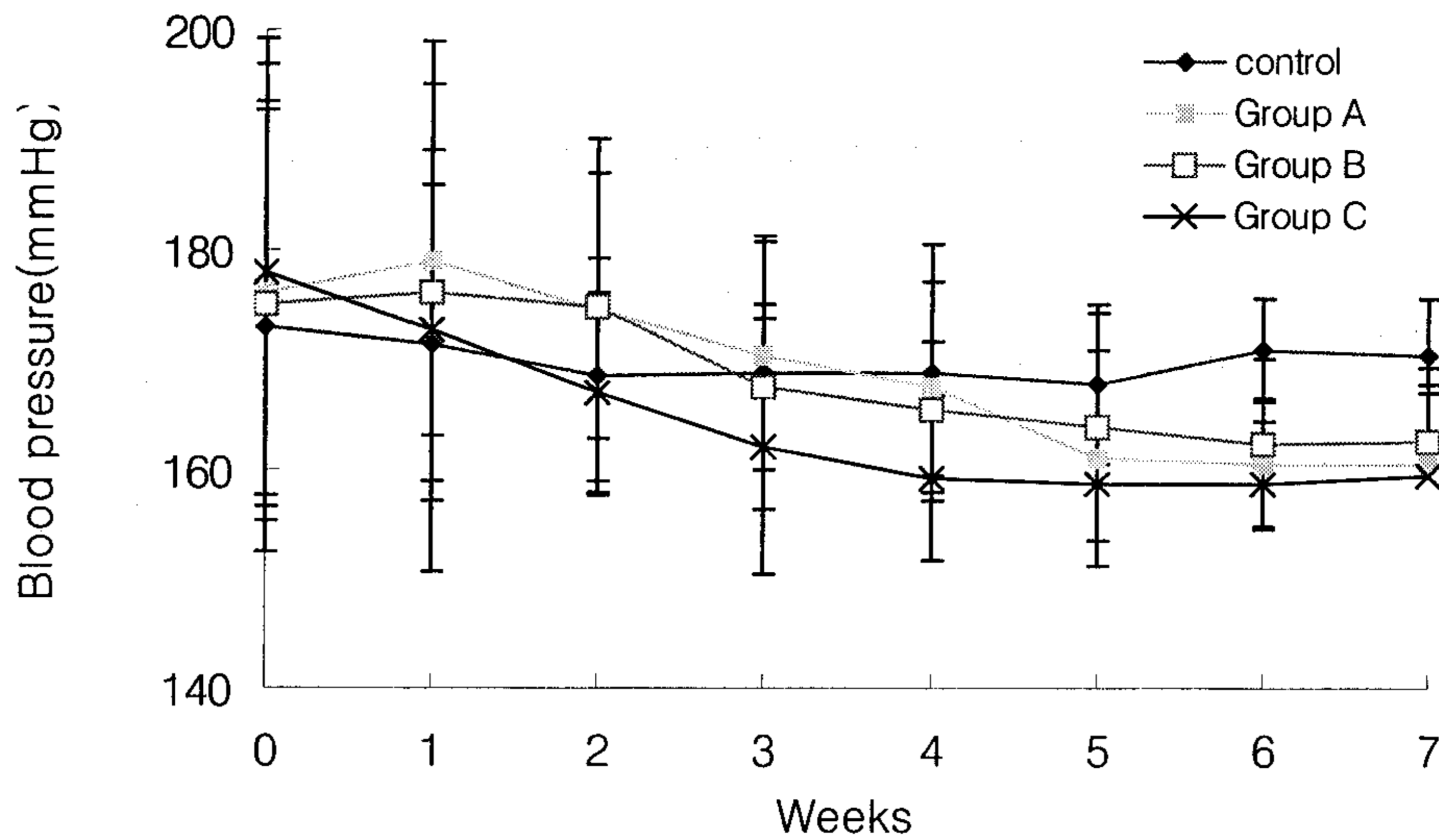


Figure 51. Blood pressure change of SHR Rat fed experimental diets

Table 47. Blood pressure change of SHR Rat fed experimental diets

(Unit : mmHg)

Weeks	0	1	2	3	4	5	6	7
control <sup>1)</sup>	172.92±20.53 <sup>a</sup>	171.56±14.41 <sup>a</sup>	168.45±10.86 <sup>a</sup>	168.86±11.60 <sup>a</sup>	168.86±11.60 <sup>a</sup>	167.86±7.31 <sup>a</sup>	172.57±4.58 <sup>a</sup>	170.43±5.16 <sup>a</sup>
A <sup>2)</sup>	176.20±11.81 <sup>a</sup>	181.59±7.83 <sup>a</sup>	174.52±4.68 <sup>a</sup>	170.40±3.40 <sup>a</sup>	167.60±5.31 <sup>a</sup>	161.00±8.62 <sup>a</sup>	160.40±4.92 <sup>b</sup>	160.40±5.96 <sup>b</sup>
B <sup>3)</sup>	175.19±17.43 <sup>a</sup>	176.06±13.02 <sup>a</sup>	174.90±12.02 <sup>a</sup>	167.43±7.52 <sup>a</sup>	165.57±6.05 <sup>a</sup>	163.86±10.33 <sup>a</sup>	162.43±7.61 <sup>b</sup>	162.50±6.21 <sup>b</sup>
C <sup>4)</sup>	177.88±21.35 <sup>a</sup>	172.50±22.24 <sup>a</sup>	164.14±11.44 <sup>a</sup>	160.86±13.02 <sup>a</sup>	159.14±7.52 <sup>a</sup>	158.57±4.23 <sup>a</sup>	158.57±5.86 <sup>b</sup>	159.43±7.57 <sup>b</sup>

Mean±Std(n=7)

<sup>1)</sup> 대조군으로써 식염수를 먹인 group

<sup>2)</sup> *Lactobacillus zeae* RMK354균으로 발효시킨 발효유를 먹임.

<sup>3)</sup> *Lactobacillus zeae* RMK354 균주 이용 발효유(I)와 *Enterococcus faecalis* RMB46 균주 이용 발효유를 제조한 다음 90℃, 5분간 열처리한 제품(II)을 5 : 5 비율로 혼합하여 먹임.

<sup>4)</sup> 시중 발효유 남양유업의 120/80 발효유를 먹임.

<sup>a,b</sup> 같은 평가기준에서 동일한 문자는 SNK 다중 비교의 5% 수준에서 통계적으로 유의성이 없음을 의미한다.

라. 혈중 지질농도 측정

발효유 처리군 별 랫트의 지질농도에 미치는 영향은 표 48과 같다.

Table 48. Blood pressure change of SHR Rat fed experimental diets

(Unit : mg/dl)

Weeks Group	Total Cholesterol	HDL Cholesterol	LDL Cholesterol	Triglyceride
control <sup>1)</sup>	70.71±2.63 <sup>a</sup>	28.14±1.21 <sup>a</sup>	7.00±0.58 <sup>a</sup>	120.71±22.48 <sup>a</sup>
A <sup>2)</sup>	68.57±3.21 <sup>ab</sup>	26.71±0.95 <sup>b</sup>	6.71±1.11 <sup>ab</sup>	110.71±20.03 <sup>a</sup>
B <sup>3)</sup>	65.57±1.90 <sup>b</sup>	26.14±1.07 <sup>b</sup>	6.00±0.00 <sup>b</sup>	96.14±18.48 <sup>a</sup>
C <sup>4)</sup>	66.14±3.29 <sup>b</sup>	26.29±1.38 <sup>b</sup>	5.86±0.38 <sup>b</sup>	116.29±20.38 <sup>a</sup>

Mean±Std(n=7)

<sup>1)</sup> 대조군으로써 식염수를 먹인 group

<sup>2)</sup> *Lactobacillus zeae* RMK354균으로 발효시킨 발효유를 먹임.

<sup>3)</sup> *Lactobacillus zeae* RMK354 균주 이용 발효유(I)와 *Enterococcus faecalis* RMB46 균주 이용 발효유를 제조한 다음 90℃, 5분간 열처리한 제품(II)을 5 : 5 비율로 혼합하여 먹임.

<sup>4)</sup> 시중 발효유 남양유업의 120/80 발효유를 먹임.

<sup>a,b</sup> 같은 평가기준에서 동일한 문자는 SNK 다중 비교의 5% 수준에서 통계적으로 유의성이 없음을 의미한다.

1) 총콜레스테롤(Total Cholesterol)

콜레스테롤이란 몸에 있는 지질의 일종으로 지방산과 결합되어있는 에스터형 과 유리형의 두가지가 있는데 이들을 합한 것을 총콜레스테롤이라고 하는데, 정상적인 Rat의 총콜레스테롤 함량은 50~100mg/dl 이라고 보고되고 있다(이, 1994). 대조군에 비해 발효유를 급여한 처리군이 유의성이 인정되었고. 특히 B군이 가장 낮은 수치를 나타내었다.

2) HDL(고밀도 지단백질)

간 및 소장에서 합성되어 혈액을 타고 온몸을 순환하며 세포내에 있는 여분의 콜레스테롤을 회수하여 간으로 이동시키는 역할을 한다. 대조군이 발효유를 급여



한 처리군에 비해 유의성이 있었다.

### 3) LDL(저밀도 지단백질)

LDL은 콜레스테롤의 가장 많은 양을 운반하며 말초 세포로 콜레스테롤을 공급하기도 하지만 관상동맥경화증을 일으키는 가장 위험한 지단백질이며, 비만자이다. 대조군에 비해 발효유를 급여한 처리군이 유의성이 인정되었고, 특히 C군이 가장 낮은 수치를 나타내었다.

### 4) TG(중성지방)

체내에 있는 지방의 일종으로 체내의 에너지 중 사용되지 않는 것은 피하지방으로 축적되는데 그 대부분이 중성지방이다. 대조군과 처리군 간에는 유의성이 인정되지는 않았지만 발효유를 급여한 처리군이 특히 B군이 가장 낮은 수치를 나타내었다.

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

ACE 억제활성 젖산균을 분리하고, 이를 이용하여 발효유를 개발하기 위하여 가급적 환경이 다른 여러 지역에서 많은 원유를 대상으로 다양한 젖산균의 분리가 필요됨에 따라 경기도, 경상도, 전라도, 제주도 등 전국 지역에서 목장원유를 채취하였고, 발효유를 생산하기 위하여 젖산균이 우유를 응고시키고, 산 생성이 우수하여야 할 요건이 필수적임에 따라 젖산균 분리를 위해 MRS배지의 구성성분인 glucose 대신 lactose로 대체하였고, 젖산생성 유무를 확인하기 위하여 Bromcresol purple를, Gram 양성균 만을 선별하기 위하여 sodium azide를 추가로 첨가하여 Modified된 MRS배지를 제조하여 1505개의 젖산균을 분리하였다.

또한 발효유에 적합하기 위해서는 skim milk를 응고시킬 수 있는 산생성 능력이 있어야 하므로 10% 환원탈지분유에 분리균주를 접종한 후 37°C에서 24시간과 48시간 배양하여 응고된 균주가 각각 512개 균주와 1,037개 균주이었다.

ACE 억제활성 균주를 선별하기 위하여 10% 환원탈지분유에 24시간 내에 응고시킨 분리균주를 1% 접종한 후 37°C에서 16시간 배양한 다음 pH와 단백질 분해력 측정을 위해 Tyrosine 농도를 측정한 결과 512개의 분리균주 중 Tyrosine 농도가 10이상인 균주가 17개, 6이상 10 미만인 균주가 47개이었다. 단백질 분해력이 우수한 64개 균주의 ACE 억제율을 측정한 결과, 억제율이 90 이상인 균주가 12개로 ACE 억제율이 우수한 균주로 1차 선별하였다. 최근 Enterococcus 균에 대한 건강 위해 가능성이 제기됨에 따라 추가로 Lactobacillus 균을 선별코저 Gram 염색한 후 rod 형태의 균락(72개 균주)만을 대상으로 ACE 억제율을 측정하여 5개의 균주를 선별하였다. 선별된 젖산균을 현미경관찰, Gram stain, 당 발효실험 등의 일련의 생화학적실험을 통하여 균을 동정하였다.

ACE 억제활성이 높은 젖산균 중 6종을 선별하여, 발효유의 종균으로서 적합한지의 여부를 검증하기 위하여 젖산균의 성장, 젖산균의 단백질분해, 항생제 15종에 대한 내성시험, API ZYM kit를 이용한 효소활성 시험, 0.3% oxgall 첨가 배지에서 담즙내성 시험, pH 내성 시험, 식중독균에 대한 항균력 시험을 실시하였다. 한편, ACE 억제활성 젖산균주의 최적배양조건을 설정하기 위하여 특성조사에서 선별된 균주를 이용하여 환원탈지유(8%, 10%, 12%) 및 젖산균 첨가량(0.1%, 0.5%, 1.0%)별로 37°C에서 15시간 배양한 후 ACE 억제율을 측정하여 환원탈지유 농도 및 젖산균 첨가량을 선정하였고, 선정된 환원 탈지유 농도 및 젖산균 첨가량에 배양온도별(34°C, 37°C, 40°C)로 3시간 간격으로 24시간까지 배양시킨 다음 ACE 억제율을 측정하여 배양온도 및 배양시간을 선정하였다.

한편, 배합비 설정시 국산 원유의 함량을 높여서 실시하였는데, 원유 96.15%와 탈지분유 3.85%를 첨가하고 65℃에서 배합하여 완전히 녹인 후 90℃에서 5분간 살균하였으며, 40℃로 냉각시킨 다음 선택균주를 1%(v/v)로 접종하고, 최종 pH 4.4으로 감소할 때까지 배양하였다. 발효가 완료된 후 다양한 소재를 첨가하여 호상 발효유를 제조한 다음 관능검사를 실시하여 최적 배합조성물을 완성하였고, 개발 제품에 대한 ACE 억제율과 이화학적 특성조사를 실시하였다. 한편, *Lactobacillus zeae* K354 균주를 접종하여 제조된 발효유를 이용하여 발효유에서의 항고혈압 peptide를 분리하고 아미노산 배열을 분석하였다. 이와 같은 결과를 근거로 하여 동물에서의 고혈압 억제효과 실험을 실시한바 목표를 100% 달성하였다.

따라서 본 연구결과를 통해 관련분야에의 기여도를 보면

#### 가. 기술적 측면

- ACE 억제활성 젖산균주 개발은 유제품 뿐만 아니라 식품 전반에 이용 가능함으로 제품의 다양화를 유도하여 신기술 개발에 이용할 수 있음
- 외국에 비해 우유의 기능성 물질에 대한 연구가 미약함에 따라 이를 계기로 보다 활발한 연구 촉진
- ACE 억제활성 젖산균주를 이용한 발효유제품은 동물실험을 통한 입증기술은 국내외적으로 없음으로 대외 기술적 우위 확보

#### 나. 경제 · 산업적 측면

- ACE 억제활성 발효유를 개발함으로써 소비기반 및 경쟁력 확보  
원유생산에 비해 소비가 저하되어 분유재고가 2006년 5월말 현재 11,111톤으로 증가됨으로써 ACE 억제활성 발효유를 개발하여 분유 재고를 감소케 함으로써 낙농가 소득증대 및 유가공업체의 경쟁력 향상에 기여할 것으로 보임
- 본 제품 개발로 발효유 시장 확대  
2005년말 현재 1.2조억원의 발효유 시장 중 예상시장을 10%로 예측할 때 1,200억원으로 예상됨
- 본 제품 개발로 유제품의 수입대체 효과  
유제품의 예상 잠식율이 분유 20%, 치즈 70%, 버터 및 연유 20%로 예측되며, 이를 금액으로 환산하면, 101,110백만원의 피해가 예상됨에 따라 본 기술개발

로 유제품의 예상 잠식율을 10%로 낮추더라도 100억원의 수입대체 효과가 있을 것으로 예상됨.

- 연간 100억원 규모의 젖산균 스타터 수입대체효과
- 질병 예방에 의한 의료비 부담 연간 100억원 절감 효과

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

본 연구에서 분리된 ACE 억제활성 젖산균은 그동안 기능성 있는 외국의 수입종균에 의해 생산되는 발효유를 국내에서 생산함으로써 국제 경쟁력 향상과 동시에 수입대체효과가 있을 것으로 예상된다. 또한 본 연구결과는 참여업체에서 기술이전을 통하여 실용화할 것으로 예상되며, *Lactobacillus zeae* K354와 *Enterococcus faecalis* B46 균주는 특허출원을 통하여 산업재산권을 확보하였고, 한국축산식품학회에 2편 발표하였다. 추후 전문학술지에 논문게재를 실시할 계획으로 있다.

앞으로 참여업체에서 선발된 젖산균을 상업화하기 위해 동결조건된 분말로 제조하여야 하며, 또한 동결건조 후에도 활력이 유지되어야 실제로 활용할 것으로 보인다. 따라서 일련의 단계를 거쳐 만족스런 결과가 나올 경우 업체에서 바로 생산에 돌입할 것으로 예측되므로, 계속적으로 업체와 유기적인 협조하에 제품생산이 될 수 있도록 협조를 할 계획으로 있다.

현재의 유가공 및 낙농산업은 가격경쟁력이 외국에 비해 떨어지기 때문에 국내에서 생산되는 원유는 대부분이 시유, 가공유 및 발효유 등 액상유제품에 사용되고 유제품은 수입유제품으로 대체되는 현 상황에서 원유 소비를 확대시킬 수 있는 제품개발이 지속되어 가격보다는 품질 또는 기능성 제품으로 경쟁력을 키워나가야 할 것으로 보인다.

## 제 6 장 참고문헌

1. Abubakar, A., Saito, T., Kitazawa, H., Kawai, Y. and Itoh, T. 1998. Structural analysis of new antihypertensive peptides derived from cheese whey protein by proteinase K digestion. *J. Dairy Sci.* 81 : 3131~3138.
2. Barrette, B. 2000. Identification de peptides inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine-I (ACE) dans des laits fermentes par *Lactobacillus helveticus*. These, Departement des sciences des aliments et nutrition, Universite Laval, Quebec, Canada.
3. Clark, P. A., Cotton, L. N., and Martin, J. H. 1993. Selection of bifidobacteria for use as dietary adjuncts in cultured dairy foods : II-Tolerance to simulated pH of Human Stomachs. *Cultured Dairy Products J.* 28(4) : 11~14.
4. Cushman, D.W. and Cheung, H.S. 1971. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-coverting enzyme of rabbit lung. *Biochemical Pharma.* 20 : 1637~1648.
5. Cushman, D.W. and Ondetti, M.A. 1979. In *Progress in medical chemistry.* Elsevier. North Holland. Amsterdam. 17 : 41.
6. Engel, S.L., Schaeffer, T.R., Gold, B.I. and Rubin, B. 1972. Inhibition of pressor effects of angiotensin I and augmentation of depressor effects of bradykinin by synthetic peptides. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 140 : 240~245.
7. Gilbert, C., Blanc, B., Frot-Coutaz, J., Portalier, R. and Atlan, D. 1997. Comparison of cell surface proteinase activities within the *Lactobacillus* genus. *J. Dairy. Res.* 64 : 561~571.
8. Gilliland, S. E., and Speck, M. L. 1977. Antagonistic action of *Lactobacillus acidophilus* toward intestinal and foodborne pathogens in associative cultures. *J. Food Prot.* 40(12) : 820~823.
9. Gilliland, S. E., and Walker, D. K. 1990. Factors to consider when selecting

- a culture of *Lactobacillus acidophilus* as a dietary adjunct to produce a hypocholesterolemic effect in humans. *J. Dairy Sci.* 73 : 905~911.
10. Gobbetti, M., Ferranti, P., Smacchi, E., Goffreredi, F. and Addeo, F. 2000. Production of angiotensin-I-converting-enzyme-inhibitory peptides in fermented milks started by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SS1 and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FT4. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 : 3898~3904.
  11. Hammes, W. P., Weiss, N., and Holzapfel, W. 1992. The Genera *Lactobacilli* and *Carnobacterium*. pp. 1563-1578. In *The prokaryotes*. 2nd Edition. Springer-Verlag. New York.
  12. Hara, Y., Matsuzaki, T. and Suzuki, T. Angiotensin I converting enzyme inhibiting activity of tea components. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 61(7) : 803~808.
  13. Hazato, T. and Kase, R. 1986. Isolation of angiotensin-converting enzyme inhibitor from porcine plasma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 139(1) : 52~55.
  14. Hull, M. E. 1947. Studies on milk proteins. II. Colorimetric determination of the partial hydrolysis of the proteins in milk. *J. Dairy Sci.* 30 : 881~884.
  15. Juillard, V., Laan, H., Kunji, E. R. S., Jeronimus-Stratingh, C. M., Bruins, A. P. and Konings, W. N. 1995. The extracellular P1-type proteinase of *Lactococcus lactis* hydrolyzes  $\beta$ -casein into more than one hundred different oligopeptides. *J. Bacteriol.* 177 : 3472~3478.
  16. Karaki, H., Doi, K., Sugano, S., Uchiwa, H., Sugai, R., Murakami, U. and Takemoto, S. 1990. Antihypertensive effect of tryptic hydrolysate of milk casein in spontaneously hypertensive rats. *Comparative Biochem. and Physiol.* 96 : 367~371.
  17. Kohmura, M., Nio, N. and Ariyoshi, Y. 1990. Inhibition of angiotensin-converting enzyme by synthetic peptide fragments of human  $\kappa$ -casein. *Agric. Biol. Chem.* 54 : 835~836.
  18. Kinoshita, E., Yamakoshi, J. and Kikachi, M. 1993. Purification and

- identification of angiotensin converting enzyme inhibitor from soy sauce. *Biosci. Biotech. Biochem.* 57(7) : 1107~1110.
19. Kohama, Y. 1988. Isolation of angiotensin converting enzyme inhibitor from tuna muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 155(1) : 332~336.
  20. Maeno, M., Yamamoto, N. and Takano, T. 1996. Identification of an antihypertensive peptide from casein hydrolysate produced by a proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *J. Dairy. Sci.* 79 : 1316~1321.
  21. Manisha N. Ashar and Rattan Chand, 2003. ACE-Inhibitory activity of lactic acid bacteria in fermented milks. *Milchwissenschaft* 58(1/2).
  22. Matar, C., Amiot, J., Savoie, L. and Goulet, J. 1996. The effect of milk fermentation by *Lactobacillus helveticus* on the release of peptides during in vitro digestion. *J. Dairy. Sci.* 79 : 971~979.
  23. Maruyama, S., Mitachi, H., Tankata, H., Tomizuka, N. and Suzuki, H. 1987. Studies on the active site and antihypertensive activity of angiotensin I converting enzyme inhibitors derived from casein. *Agric. Biol. Chem.* 51(6) : 1581~1586.
  24. Maruyama, S., Nakagomi, K., Tomizuka, N. and Suzuki, H. 1985. Angiotensin converting enzyme inhibitor derived from an enzymatic hydrolysate of casein. *Agric. Biol. Chem.* 49(5) : 1405.
  25. Maruyama, S., Mitachi, H., Awaya, J., Kurono, M., Tomizuka, N. and Suzuki, H. 1987. Angiotensin I converting enzyme inhibitor activity of the C-terminal hexapeptide of  $\alpha$ -casein. *Agric. Biol. Chem.* 51(9) : 2557~2561.
  26. Maruyama, S. and Suzuki, H. 1982. A peptide inhibitor of angiotensin I converting enzyme in the tryptic hydrolysate of casein. *Agric. Biol. Chem.* 46 : 1393~1394.
  27. Matsuda, H., Isohizaki, T., Morita, H., Nagaoka, T., Osajima, K. and Osajima, Y. 1992. Digestion of peptides from sardin muscle that inhibit Angiotensin I converting enzyme by intestinal enzyme of pag. *Nippon nogeikagaku Kaishi*, 66(11), 1645~1647(in Japanese).
  28. Meisel, H. 1993. Casokinins as bioactive peptides in the primary structure



- of casein. In K. D. Schwenke and R. Mothes, Food proteins: Structure and functionality. 66~75. New York:VCH.
29. Miyoshi, S., Ishikawa, H., Kaneko, T., Jukui, F., Tanaka, H. and Maruyama, S. 1991. Structure and activity of angiotensin converting enzyme inhibitors in an  $\alpha$ -zein hydrolysate. *Agric. Biol. Chem.* 55(5) : 1313~1318.
  30. Moineau, S. and Goulet, J. 1991. Effect of feeding fermented milks on the pulmonary macrophage activity in mice. *Milchwissenschaft.* 46 : 551~554.
  31. Mullally, M. M., Meisel, H. and FitzGerald, R. J. 1996. Synthetic peptides corresponding to  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin sequences with angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler.* 377 : 259~260.
  32. Mullally, M. M., Meisel, H. and FitzGerald, R. j. 1997. Identification of a novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptide corresponding to a tryptic fragment of bovine  $\beta$ -lactoglobulin. *FEBS Letters.* 402 : 99~101.
  33. Nakamura, Y., Yamamoto, N., Sakai, K., Okubo, A., Yamazaki, S. and Takano, Y. 1995. Purification and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitors from sour milk. *J. Dairy Sci.* 78(4) : 777~783.
  34. Nakamura, Y., Yamamoto, N., Sakai, K. and Takano, T. 1995. Antihypertensive effect of sour milk and peptides isolated from it that are inhibitors to angiotensin I-converting enzyme. *J. Dairy. Sci.* 78 : 1253~1257.
  35. Ohara, T., Ohinata, H., Muramatsu, N., Oike, T. and Matsubara, T. 1989. Enzymatic degradation of rutin in processing of buckwheat noodles. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi.* 36(2) : 121.
  36. Pihlanto-Leppala, A., Rokka, T. and Korhonen, H. 1998. Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides derived from bovine milk proteins. *Int. J. Dairy* 8 : 325~331.
  37. Pihlanto-Leppala, A., Koskinen, P., Piilola, K., Tupasela, T. and Korhonen, H. 2000. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of whey protein digests: Concentration and characterization of active peptides. *J.*

- Dairy Res. 67 : 53~64.
38. Roy, M. K., Watanabe, Y. and Tamai, Y. 2000. Yeast protease B-digested skimmed milk inhibits angiotensin-I-converting-enzyme activity. *Biotechnol. and Appl. Biochem.* 40 : 95~100.
  39. Seki, E., Osajima, K., Matsui, T. and Osajima, Y. 1993. Separation and purification of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from heated sardine meat by treatment with alkaline protease. *Nippon Shokuhin Kogyo Fakkaishi*, 40(11) : 783~791.
  40. Sipola, M., Finckenberg, P., Korpela, R., Vapaatalo, H. and Nurminen, M. L. 2002. Effect of long-term intake of milk products on blood pressure in hypertensive rats. *J. Dairy Res.* 69 : 103~111.
  41. Smacchi, E., Gubbetti, M. 2000. Bioactive peptides in dairy products: synthesis and interaction with proteolytic enzymes. *Food Microbiol.* 17 : 129~141.
  42. Suzuki, T., Ishikawa, N. and Meguro, H. 1983. Angiotensin I converting enzyme inhibiting activity in foods. *Nippon Nogeikagaku Kaishi.* 57 : 1143~1146.
  43. Yamamoto, N., Akino, A. and Takano, T. 1993. Purification and specificity of a cell-wall associated proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *J. Biochem.* 114 : 740~745.
  44. Yamamoto, N., Akino, A. and Takano, T. 1994. Antihypertensive effect of the peptides derived from casein by an extracellular proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *J. Dairy Sci.* 77 : 917~922.
  45. Yamamoto, N., Akino, A. and Takano, T. 1994. Antihypertensive effects of different kinds of fermented milk in spontaneously hypertensive rats. *Biosci, Biotechnol. and Biochem.* 58 : 776~778.
  46. Yamamoto, N., Akino, A. and Takano, T. 1999. Purification and characterization of an antihypertensive peptide from a yogurt-like product fermented by *Lactobacillus helveticus* CPN4. *J. Dairy Sci.* 82 : 1388~1393.
  47. Zevaco, C. and Gripon, J.-C. 1988. Properties and specificity of a cell-wall

- proteinase from *Lactobacillus helveticus*. *Le Lait*. 68 : 398~408.
48. 水島裕, 宮本昭正. 1996. 今日の治療薬, 南江堂, 東京, 505~506.
  49. 김남철. 1999. 한국낙농산업의 생존전략과 전망 : '99 낙농발전 대책. 한국낙농학회. p.9-22.
  50. 김승호, 이윤진, 권대영. 1999. 전통된장으로부터 Angiotensin Converting Enzyme 저해물질의 분리. 한국식품과학회지. 31(3) : 848~854.
  51. 농림부. 2002. 한국유가공협회
  52. 도정룡. 2000. 고등어 유래 항고혈압 peptide의 분리 정제. 한국수산학회지. 33(2) : 153~157.
  53. 이영순. 1994. 실험동물의학. 서울대학교출판부. p268.
  54. 조영제, 안봉전, 최청. 1993. 한국산 녹차로부터 분리한 Flavan-3-ol 화합물의 Angiotensin Converting Enzyme 저해효과. 한국식품과학회지. 25(3) : 238~242.
  55. 조영제, 차원섭, 복수경, 김명욱, 천성숙, 최응규, 김순희, 박경숙. 2000. 납두 발효과정 중 Angiotensin Converting Enzyme 저해물질의 생성 및 분리. 한국식품영양과학회지. 29(4) : 737~742.
  56. 홍상필, 김명희, 오세욱, 한찬규, 김용현. 1998. Chitosan 올리고당의 안지오텐신 전환효소 활성 억제 및 SHR에서의 고혈압 억제 특성. 한국식품과학회지. 30(6) : 1476~1479.
  57. 황종현. 1997. 메주 유래의 *B. subtilis* SCB-3으로 제조된 된장의 Angiotensin I Converting Enzyme 저해효과. 한국식품영양과학회지. 26(5) : 775~783.