

발 간 등 록 번 호

11-1543000-000837-01

비만억제능 젖산균 분리 및 이를 이용한 발효유 개발  
(Development of fermented milk by using  
lactic acid bacteria for anti-obesity)

한국식품연구원

농 립 축 산 식 품 부

# 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “비만억제능 젓산균 분리 및 이를 이용한 발효유 개발” 과제의 보고서로 제출합니다.

2014년 12월 24일

주관연구기관명 : 한국식품연구원

주관연구책임자 : 임 상 동

연 구 원 : 하 상 근

연 구 원 : 최 인 욱

연 구 원 : 김 기 성

연 구 원 : 이 명 기

연 구 원 : 도 정 룡

연 구 원 : 남 영 도

연 구 원 : 성 기 승

연 구 원 : 조 성 아

연 구 원 : 박 선 영

위탁연구기관명 : 천안연암대

위탁연구책임자 : 박 승 용

참 여 기 업 명 : 임실치즈농협

연 구 원 : 양 해 동

# 요 약 문

## I. 제 목

비만억제능 젖산균 분리 및 이를 이용한 발효유 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

- 비만억제 및 체중조절에 효과를 나타낼 수 있는 젖산균을 선발하기 위하여 젖산균에 의한 발효산물을 탐색하고 궁극적으로 비만억제능이 우수한 프로바이오틱스 균주를 선발, 동정하고자 함.
- 비만억제 젖산균주의 최적 배양기술을 확립하고 균주의 특성과 대사산물을 동정, 비만의 억제에 작용하는 분자적 기전을 구명하며 체내 지방흡수 저해효과를 통해 입증하고자 함
- 발효유에 대한 최적 배합비를 설정하고, 현장에서 적용하기 위하여 젖산균을 동결건조하여 분말화하며, 동물모델을 이용하여 최종제품의 효능평가를 통해 기능성 발효유를 개발하고자 함

## III. 연구개발 내용 및 범위

### 1. 젖산균 분리 및 수집

- Modified MRS agar를 이용 원유 및 분변 등에서 젖산균 분리 및 수집
- 분리균주에서 우유 응고여부 조사

### 2. 비만억제능 균주 선발

- Anti-lipase activity(porcine pancreatic lipase이용)
- Anti-adipogenic activity(3T3-L1 cell line 이용)

### 3. 선발 젖산균주 동정

- Gram염색, 현미경 관찰, 포자생성, 호기적 및 혐기적 성장, catalase 생성, 15℃ 및 45℃에서의 성장, glucose로부터 가스생성, arginine으로부터 ammonia 생성 등의 시험, 당발효 시험, 16S rDNA sequencing

### 4. 선발 젖산균의 특성조사

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

### 5. 최적 배양기술 확립

- 기질농도, 균주의 접종량 및 배양조건(온도, 시간)별 최적배양조건 확립
- 6. 발효산물 분리동정
  - 유기용매 분획, Column Chromatography 등을 이용하여 항비만 소재 분획 및 동정
- 7. 체내 균총 변화 및 지방 흡수 저해효과
  - 선발된 probiotics를 급여 후 쥐 장내에서의 균총변화 추적(pyrosequencing with 16S rRNA)
  - 체내 지방흡수 저해효과(in vivo)
  - 쥐 무게와 혈중 지질농도 변화
  - 부고환 지방세포 크기 변화
- 8. 최적 배합조성물 개발 및 상업적 이용 위한 젓산균 분말화
  - 최적 배합조성물 개발
  - 제품 개발 및 이화학적 특성 조사
  - 젓산균 동결건조 분말화
- 9. 비만억제 작용기작 규명
  - Western blotting 을 통해 지방축적 및 지방산산화에 관여하는 PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$  등의 mRNA 발현차이 비교
- 10. 동물모델을 이용한 발효유의 비만억제 효능평가
  - 실험동물의 식이 효율 및 체중 변화
  - 혈액분석

#### IV. 연구개발 결과

##### 1. 젓산균 분리 및 수집

###### 가. 원유에서 젓산균 분리

서울우유 관할 원유검사소(경기도 및 강원도 일부), 전북 축산시험연구소 및 경북 가축위생시험소에서 지원받아 1,222개의 균주를 분리하였으며, 발효유에 적합하기 위해서는 skim milk를 응고시킬 수 있는 산생성 능력이 있어야 하므로 10% 환원탈지분유에 분리균주를 접종한 후 37°C에서 18시간 및 24시간 배양하여 응고된 균주가 598개 균주이었다.

###### 나. 신생아 분변에서 젓산균 분리

순천향병원 및 한강성심병원 산부인과 신생아실에서 지원받아 32명의 분변으로부터 분리하였다. bifidobacteria는 43개 균주를 수집, 보관하였고, 젓산균은 86개를

수집하였다.

#### 다. 성인 분변에서 젖산균 분리

한국식품연구원 직원 및 가족에서 지원받아 47명의 분변으로부터 분리하였다. bifidobacteria는 52개 균주를 수집, 보관하였고, 젖산균은 187개를 수집하였다.

### 2. 비만억제능 균주 선발

원유에서 분리된 젖산균 중 10% 환원탈지유에 응고반응을 보인 598개와 분변에서 분리한 젖산균 273개, bifidobacteria균 95개를 대상으로 anti-lipase activity 실험 결과 lipase 억제활성이 높은 균주 12종을 선발하여, 3T3-L1 cell을 이용한 Anti-adipogenic activity 실험을 실시하였다.

### 3. 선발 젖산균주 동정

Gram염색, 현미경 관찰, 포자생성, 호기적 및 혐기적 성장, catalase 생성, 15°C 및 45°C에서의 성장, glucose로부터 가스생성, arginine으로부터 ammonia 생성 등의 시험, 당발효 시험, 16SrDNA sequencing 등을 분석한 결과 선발된 12종의 젖산균 중 Enterococcus 균주가 7종, Lactobacillus 균주가 2종, Weissella 균주가 3종으로 동정되었다.

### 4. 선발 젖산균의 특성조사

1차년도에서 비만억제능이 높은 균주 12종 중 산 생성 속도와 비만억제능을 감안하여 3종의 젖산균을 선발한 다음, 발효유의 종균으로서 적합한지의 여부를 실시하였다.

*Weissella sp.* F22와 *L. plantarum* Q180 균주는 40°C가, *E. faecalis* MD366 균주는 37°C가 적정온도로 나타났다. *Weissella sp.* F22 균주는 다른 2종의 균주에 비해 Streptomycin, Lincomycin에 대하여 내성이 강한 반면 Bacitracin에 대해서는 내성이 약한 것으로 나타났다. *Enterococcus faecalis* MD366 균주는 다른 2종의 균주에 비해 내성이 강한 것으로 나타났으며, 특히 Gentamycin, Kanamycin, Neomycin, Vancomycin에 대하여 내성이 강한 것으로 나타났다.

*Lactobacillus plantarum* Q180 균주는 특히 Lincomycin과 Penicillin-G에 대해 내성이 약한 것으로 나타났다. 젖산균 3종 모두 Benzopyrene을 발암성 물질로 전환시키는 발암효소인  $\beta$ -glucuronidase의 경우에는 효소활성이 없는 것으로 나타나 안전성을 확인할 수 있었으며, 또한 3종 모두 담즙에 대한 내성이 있었다. *Weissella sp.* F22 균주와 *L. plantarum* Q180 균주가 *E. faecalis* MD366 균주보다 pH에 대한

내성이 강한 것으로 나타났으며, *E. faecalis* MD366 균주가 다른 2종의 젖산균보다 항균력이 있는 것으로 나타났다.

#### 5. 최적 배양기술 확립

비만억제능이 우수한 *L. plantarum* Q180 균주의 반응표면실험 결과 비만억제능 젖산균 최적배양조건은 환원탈지유 농도 9.54%, 배양온도 37.16°C, 배양시간 28.25h 이었으며, 그에 따른 예상값은 pH 4.47, 55.55%의 anti-lipase activity, 20.48%의 anti-adipogenic activity로 나타났다.

#### 6. 발효산물 분리동정

발효유로부터 ODS AQ colume, Vydac C18 column, Superdex peptide HR column을 이용하여 순차적으로 분리, 정제한 peptide의 N-말단으로부터 아미노산 배열은 Asp-Thr-Ile-Ser-Ala-Gln로 나타났으며, lipase 억제활성은 IC<sub>50</sub>이 2,817 ug/mL로 나타났다.

#### 7. 체내 균총 변화 및 지방 흡수 저해효과

##### 가. 균총변화 추적 (pyrosequencing with 16S rRNA)

일반식이 대조군인 A군은 실험시작 전에 비해 6주 후 Bacteroidetes보다 Firmicutes가 증가하였고, 고지방식이 대조군인 B군은 Bacteroidetes가 약간 증가하였다. 상업균주 식이군인 C군은 실험시작 전에 비해 6주 후 Firmicutes보다 Bacteroidetes가 크게 증가하였다. *L. plantarum* Q180 식이군(10<sup>8</sup> CFU/day)인 D군과 *L. plantarum* Q180 식이군(10<sup>9</sup> CFU/day)인 E군은 다른 균주에 비해 가장 Bacteroidetes가 증가하였다. *Weissella* sp. F22 식이군인 F군은 Bacteroidetes가 약간 증가하였고, *E. faecalis* MD366식이군인 G군 역시 Bacteroidetes가 증가하였지만 크게 증가하지는 않았다. 일반식이 대조군 및 상업균주군에 비해 *L. plantarum* Q180 식이군이 비만억제효과가 있는 것으로 나타났다.

##### 나. 체내 지방흡수 저해효과

비만 억제능이 우수한 균으로 선정된 *Weissella* sp. F22, *E. faecalis* MD366, *L. plantarum* Q180 균주의 체내 지방흡수 저해효과 실험을 실시하였다. 0시간의 Triglyceride(TG) 함량에 대한 시간 별 TG 함량의 비율을 나타낸 결과, *L. plantarum* Q180로 제조한 발효유를 투여한 D군이 3시간까지 0시간 대비 38.4%의 증가를 보이다가 5시간 후 0시간대보다 17.7% 감소를 나타내어 가장 우수한 지방흡수 저해효과를 갖는 것으로 나타났다.

#### 다. 쥐 무게와 혈중 지질농도 변화

사육 6주 후 일반식이 대조군인 A군의 평균 무게는 26.30g, 고지방식이 대조군인 B군의 평균 무게는 28.84g, ABT-3 ( $10^9$  CFU/day)균주를 경구투여한 C군은 28.74g, *Lactobacillus plantarum* Q180 ( $10^8$  CFU/day)균주를 경구투여한 D군은 29.57g, *Lactobacillus plantarum* Q180 ( $10^9$  CFU/day)균주를 경구투여한 E군은 28.29g, *Weissella* sp. F22 ( $10^9$  CFU/day)균주를 경구투여한 F군은 28.44g, *Enterococcus faecalis* MD366 ( $10^9$  CFU/day)균주를 경구투여한 G군은 27.95g으로 A군과 D군을 제외하고는 유의적인 차이가 없었지만( $p < 0.05$ ), 고지방식이 대조군과 비교하여 E군은 13.70%, F군은 11.29%, G군은 18.10% 체중 증가량이 감소하였다. 부고환 지방무게의 경우 E군과 G군이 다른 군에 비해 적게 나타났으나 고지방식이 대조군과의 유의적 차이는 없었다. 간 효소치인 AST와 ALT는 각군의 값의 차이는 보여지나 유의적인 차이는 없는 것으로 나타났다. 혈청의 중성지방(TG)의 농도는 A군의 경우  $81.00 \pm 12.77$  mg/dL 이었고, 이에 비해 고지방식이대조군(B)은  $110.00 \pm 21.34$  mg/dL으로 정상식이군에 비해 증가하여 나타났다. C군과 D군, F군 그리고 G군은 고지방식이대조군과 비슷한 값을 나타내었으나, E군은  $88.67 \pm 5.35$  mg/dL으로 정상식이군과 비슷한 수준을 나타내었다.

#### 라. 부고환 지방조직 세포 크기

부고환 지방세포의 크기를 측정하여 지방세포 크기의 분포를 본 결과 B군을 제외한 모든 군에서  $2,000 \mu\text{m}^2$  크기의 지방세포가 가장 많이 분포하였으며, 고지방식이 대조군인 B군에서는  $5,000 \mu\text{m}^2$  이상 크기의 큰 지방세포가 가장 많이 분포였다. H&E 염색액으로 염색된 지방세포를 현미경으로 관찰해 보았을 때 역시 육안으로도 지방세포의 크기가 차이 나는 것을 알 수 있었다.

### 8. 최적 배합조성물 개발 및 상업적 이용 위한 젓산균 분말화

#### 가. 제품 개발 및 이화학적 특성 조사

원유 80.682%와 탈지분유 3.318%를 첨가하고 65°C에서 배합하여 완전히 녹인 후 90°C에서 5분간 살균하였으며, 40°C로 냉각시킨 다음 상업균주인 ABT-3 균주를 0.1% 접종하고, 최종 pH 4.4으로 감소할 때까지(40°C, 5시간) 배양한 액에 *Lactobacillus plantarum* Q180 균주( $10^8$  CFU/mL)를 혼합한 후 딸기잼 또는 블루베리잼과 올리고당 5%, 액상과당 2%를 첨가하고 교반하여 호상발효유를 제조하였다. 딸기잼 4%를 첨가한 발효유(A), 6%를 첨가한 발효유(B), 8%를 첨가한 발효유(C), 블루베리잼 4%를 첨가한 발효유(D), 6%를 첨가한 발효유(E), 8%를 첨가한 발효유

(F)의 이화학적 성분을 조사한 결과 pH는 4.3이었으며 고형분함량은 21.46~24.65%, 젖산균수는  $7.33 \times 10^9 \sim 4.66 \times 10^9$  CFU/mL, 적정산도는 0.95~1.05%이었다.

#### 나. 최적 배합조성물 개발

개발제품의 배합비를 보면, 원유 80.682%, 탈지분유 3.318%, 올리고당 5%, 액상과당 2%, 블루베리잼과 8% 정제수 1%이었다

#### 다. 젖산균 동결건조 분말화

##### 1) *Lactobacillus plantarum* Q180 배양조건

*L. plantarum* Q180을 70 L Bio-fermentor 시스템에 대량 배양하는 조건으로 MRS 생장배지 30리터에 0.1%량의 *L. plantarum* Q180 배양액을 접종하여 38°C의 온도에서 배양한 결과,  $1.48 \times 10^{10}$ /mL의 생균을 얻을 수 있었다.

*L. plantarum* Q180의 생장데이터를 분석한 결과 1개 세포의 중량은  $6.65 \times 10^{-8}$  g/cell 이었으며, 1g당 생균수는  $8.09249E+12$ , 비증식속도는 0.0366/min 이며, 배양조건하에서 세대시간(generation time)은 18.9515분, 생장유도기(lag time)는 21.65시간이었다.

*L. plantarum* Q180 MRS 배양액을 3,500rpm으로 원심분리하여 총 487g의 wet cell을 회수하였으며, cell 회수율은 0.974% 이었으며, wet cell의 수분함량은 73.3%, 생균수는  $2.24 \times 10^{11}$ /mL 이었다.

##### 2) 동결건조 스타터 개발

Cell pellet의 동결상해를 줄이기 위하여 cryogenic agents로서 특수조제 분말(SIMP)을 첨가하여 혼합한 후, 저온동결기(Freezer, Operon 사, 한국)에서 동결 온도 -27°C로 동결시켰다.

동결된 *L. plantarum* Q180의 cell을 진공건조기(수분증발용량 50kg, Operon 사, 한국)에서 냉열기 온도 -50°C, 냉열판 온도 -25°C, 4,500 mtorr의 진공조건 하에서 24시간 동결 건조한 결과, 수분함량 5.1%의 스타터 건조 분말(cell pellet) 1.75g을 생산할 수 있었다.

Cell pellet의 동결상해를 줄이기 위한 cryogenic agents로서 SIMP를 첨가한 cell pellet의 결과, 동결건조에 의한 세포 생존률은 99% 이상인 것으로 나타났다.

##### 3) 요구르트 배양 및 저장 중 변화

상업용 DVS 형 요구르트 스타터인 ABT-4, *L. plantarum* Q180 스타터를 각각 0.1% 단독 또는 두 균주를 0.05%씩 혼합 접종하여 요구르트 발효 베이스를 제조한 결과, 최종 생균수에 도달하는 시간에 차이는 있었으나, 6시간 경과 시 ABT-4는 생균수가 최대에 이른 후 감소하기 시작한 반면 *L. plantarum* Q180과 혼



합 또는 단독 접종한 요구르트의 배양 중 생균수는 15시간까지 계속 증가하였다.

15시간 후 배양을 종료한 3개 처리구(ABT, ABT+LPL, LPL)의 요구르트를 2℃로 저장하여 12시간 및 24시간 경과 후 생균수를 측정된 결과, 24시간 경과시 ABT-4 는 생균수가 감소한 반면 *L. plantarum* Q180(LPL)과 혼합 또는 단독으로 배양한 요구르트의 배양 중 생균수는 계속 유지하였다.

#### 9. 비만억제 작용기작 규명

Western blotting 방법을 이용하여 지방산 산화에 관여하는 PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$  의 mRNA 발현차이를 비교한 결과 3T3-L1 세포의 지방분해시에 *L. plantarum* Q180 ( $10^8$  CFU/g) 균주를 400 ug/mL 농도로 처리한 세포에서 무처리구 대비 PPAR $\gamma$ 의 발현은 46.07%, C/EBP $\alpha$ 의 발현은 35.16% 감소하였다.

#### 10. 동물모델을 이용한 발효유의 비만억제 효능평가

##### 가. 실험동물의 식이 효율 및 체중 변화

실험동물을 군 당 6마리씩 일반식이 대조군(A), 생리식염수를 경구투여한 고지방식이 대조군(B), 상업균주인 ABT-3(CHR HANSEN)균주와 *Lactobacillus plantarum* Q180 균주를 혼합배양한 발효유를 경구투여한 군(C), ABT-3균주와 *Lactobacillus plantarum* Q180 균주를 혼합배양하고 가르시니아 캄보지아를 첨가한 발효유를 경구투여한 군(D), *Lactobacillus plantarum* Q180을 이용한 발효유를 경구투여한 군(E), *Lactobacillus plantarum* Q180로 배양하고 가르시니아 캄보지아를 첨가한 발효유를 경구투여한 군(F) 등 6군으로 나누고 8주간 사육한 결과 고지방식이 대조군인 B군의 체중 증가량이 293.46g으로 가장 많은 증가를 보였으며 E군, C군, D군, F군, A군 순으로 체중 증가량이 감소하였다. C군은 고지방식이군 대비 체중이 5.14% 감소하였으며, D군은 6.5%, E군은 3.36%, F군은 10.81% 감소하여 *L. plantarum* Q180 균주로 배양하고 가르시니아 캄보지아를 첨가한 발효유를 경구투여한 군에서 체중 감소율이 가장 뛰어났다.

##### 나. 혈액분석

혈액 분석 결과 ALT수치는 각 군간의 값의 차이는 보여지나 유의적 차이는 없었으며 AST 수치는 C군에서 가장 작은 수치를 나타내었다. 혈청의 중성지방(TG)의 농도의 경우 정상식이군과 프로바이오틱스 급여군에서 모두 고지방식이 대조군인 B군에 비해 유의적으로 적은 수치를 나타내었으며, 아디포넥틴의 경우 각 군간의 유의차를 보이지 않았고, 렙틴의 경우 고지방식이 대조군인 B군에서 가장 많이 증가하였으며 프로바이오틱스 급여 군은 정상식이 대조군인 A군보다는 증가하였지만 B군 대비 유의적으로 감소함을 보였다.

## V. 연구성과 및 성과활용 계획

본 연구에서 분리된 항비만 젖산균은 그동안 기능성 있는 외국의 수입종균에 의해 생산되는 발효유를 국내에서 생산함으로써 국제 경쟁력 향상과 동시에 수입대체 효과가 있을 것으로 예상된다. 또한 본 연구결과는 참여업체에서 기술이전을 통하여 실용화할 것으로 예상되며, 3건의 특허출원을 통하여 산업재산권을 확보하였고, 한국축산식품학회에 2편, 한국식품과학회에 1편, ISP(International Scientific Conference on Probiotics and Prebiotics)에 1편 발표하였으며, 논문 4편을 게재하였다.

앞으로 참여업체에 기술이전을 통하여 상품화하기 위하여 제품출시 기획 및 시장 조사를 하고 신제품 출시 전 대량생산을 위한 생산공정 최적화와 같은 scale up 실험 등 일련의 단계를 거쳐 만족스런 결과가 나올 경우 업체에서 바로 생산에 돌입할 것으로 예측되므로, 계속적으로 업체와 유기적인 협조 하에 제품생산이 될 수 있도록 협조를 할 계획으로 있다.

# SUMMARY

## I. Title

Development of fermented milk by using lactic acid bacteria for anti-obesity

## II. Objective of research

The objective of the study was to select probiotics strains with excellent anti-obesity ability by exploring fermented product with selected lactic acid bacteria.

It was to establish optimum culture technology of lactic acid bacteria with anti-obesity and prove absorption inhibition effect of internal deposit fat by investigating molecular mechanism of anti-obesity, strain's feature and metabolic identification.

It was to optimize the formula of fermented milk and do confrication through freeze drying of lactic acid bacteria for field application. It was also to develop fermented milk through efficacy assessment of final product by using animal test.

## III. Research scope and area

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

- Collection and isolation of lactic acid bacteria from feces and raw milk using Modified MRS agar
- Investigation of milk coagulation through isolated lactic acid bacteria

### 2. Selection of lactic acid bacteria for anti-obesity effect

- Anti-lipase activity (by using porcine pancreatic lipase)
- Anti-adipogenetic acitivity (by using 3T3 - L1 cell line)

### 3. Identification of lactic acid bacteria

- Experiment of gram staining, fractography, spore creation, aerobic and anaerobic growth, catalase creation, growth at 15°C and 45°C, gas formation

from glucose, ammonia formation from arginine, glucose fermentation and 16S rDNA sequencing etc.

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 culture technology
  - substrate concentration, strain's seed volume, optimum cultivation condition by culture time and temperature
6. Identification of fermentation product
  - Identification of anti-obesity material by using organic solvent graduation and Column Chromatography
7. Changes of intestinal microbial flora and absorption inhibition effect of internal deposit fat
  - Tracking of changes of intestinal microbial flora in rat after administering selected probiotics
  - Absorption inhibition effect of internal deposit fat (in vivo)
  - Variation of body weight and blood lipid concentration in rat
  - Variation of epididymal adipocyte size
8. Confrication of selected lactic acid bacteria for commercial exploitation and development of optimum formula
  - Setting of optimum formula for fermented milk
  - Developing of product and investigating of physico-chemical characteristics
  - Confrication of selected lactic acid bacteria through freeze drying
9. Investigation of anti-obesity underlying mechanism
  - Comparison of mRNA expression difference with PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$  concerning accumulation of fat and fatty acid oxidation through Western blotting
10. Efficacy assessment of fermented milk by using animal test
  - Diet efficiency and variation of body weight of animal
  - Blood analysis

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

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

###### 1) 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). 1,222 bacteria were isolated from modified MRS media. 598 bacteria were further isolated after the microbes were inoculated on 10% the reconstituted skim milk to check acid production ability which can coagulate skim milk followed by incubation at 37°C for 18 and 24hr.

###### 2) Isolation of lactic acid bacteria from infant feces

32 new-born infant feces were collected under support of Soon Chun Hyang Hospital and Hangan Sungshim Hospital. 43 bifidobacteria and 86 lactic acid bacteria were isolated after incubation at 37°C for 18 and 24hr.

###### 3) Isolation of lactic acid bacteria from adults feces

47 adult feces were collected from staffs and their family members of KFRI. 52 *bifidobacteria* and 187 lactic acid bacteria were isolated.

##### 2. Collection of lactic acid bacteria with anti-obesity ability

Lactic acid bacteria isolated from raw milk were further isolated after the microbes were inoculated on 10% the reconstituted skim milk followed by incubation at 37°C for 18 h and 24 h, respectively. 598 strains were selected from them. Anti-lipase activities of 598 lactic acid bacteria isolated from raw milk and 273 lactic acid bacteria and 95 *bifidobacteria* were tested. Based on the anti-lipase activity experiment's result, 12 strains with strong anti-lipase activity were investigated anti-adipogenic activity.

### 3. Identification of selected lactic acid bacteria

7 *Enterococcus* sp, 2 *Lactobacillus* sp and 3 *Weissella* sp was identified by experiment of gram staining, fractography, spore creation, aerobic and anaerobic growth, catalase creation, growth at 15°C and 45°C, gas formation from glucose, ammonia formation from arginine, glucose fermentation and 16S rDNA sequencing from 12 selected lactic acid bacteria.

### 4. Characteristics of selected lactic acid bacteria

Sitability as starter culture for the fermented milk production has surveyed through the anti-obesity ability and acid formation speed of 3 selected lactic acid bacteria from 12 strains which have strong anti-obesity ability.

The optimum temperature of *Weissella* sp. F22 and *L. plantarum* Q180's was 40°C and *E. faecalis* MD366's optimum temperature was 37°C. *Weissella* sp. F22 was weaker resistant to the Bacitracin, but it was stronger resistant to the Streptomycin, Lincomycin than *L. plantarum* Q180 and *E. faecalis* MD366. *Enterococcus faecalis* MD366 has shown stronger resistance, especially Gentamycin, Kanamycin, Neomycin and Vancomycin than *Weissella* sp. F22 and *L. plantarum* Q180.

*Lactobacillus plantarum* Q180 has shown weak resistant to the Lincomycin and Penicillin-G. *Weissella* sp. F22, *L. plantarum* Q180 and *E. faecalis* MD366 could confirm safety through no  $\beta$ -glucuronidase activity that Benzopyrene is converted to carcinogenic substance and has bile tolerance. *Weissella* sp. F22 and *L. plantarum* Q180 had stronger pH tolerance than *E. faecalis* MD366. *E. faecalis* MD366 shown stronger antibacterial activity than *Weissella* sp. F22 and *L. plantarum* Q180.

### 5. Establishment of optimum culture technology

The optimum culture condition of anti-obesity lactic acid bacteria was 9.54% skim milk, 37.16°C culture temperature and 28.25 h culture time through response surface experiment's result of *L. plantarum* Q180 which has strong anti-obesity ability. According to response surface experiment's predictive value was pH 4.47, anti-lipase activity 55.55% and 20.48% anti-adipogenic activity.

## 6. Separation identification of fermented product

Amino acid sequence from N terminus of gradually separated and refined peptide by using ODS AQ column, Vydac C18 column and Superdex peptide HR column from fermented milk was Asp-Thr-Ile-Ser-Ala-Gln and anti-lipase activity ( $IC_{50}$ ) was 2,817  $\mu\text{g/mL}$ .

## 7. Contrification of selected lactic acid bacteria for commercial exploitation and development of optimum mix formula

### 1) Tracking of variation of intestinal microbial flora (pyrosequencing with 16s rRNA)

After 6 weeks, A group, control group fed with general diet, increased Firmicutes more than Bacteroidetes and B group, control group fed with high-fat diet, more increased before starting experiment. Also, C group, fed with commercial strain diet, increased Bacteroidetes more than Firmicutes before starting experiment. D group, fed with *L. plantarum* Q180 ( $10^8$  CFU/day), and E group, fed with *L. plantarum* Q180 ( $10^9$  CFU/day), increased Bacteroidetes more than groups fed with another strains. F group, fed with *Weissella* sp diet, slightly increased Bacteroidetes. G group, fed with *E. faecalis* MD366, also slightly increased Bacteroidetes. Therefore, D group, fed with *L. plantarum* Q180 ( $10^8$  CFU/day), and E group, fed with *L. plantarum* Q180 ( $10^9$  CFU/day), more effected anti-obesity than control group fed with general diet and group fed with commercial strain diet.

### 2) Absorption inhibition effect of internal deposit fat

It has implemented that absolute inhibition effect of internal deposit fat with *L. plantarum* Q180, *E. faecalis* MD366 and *Weissella* sp. selected lactic acid bacteria showing strong anti-obesity. The results showed Triglyceride (TG) content ratio classified by time about TG content on 0 h. Consequently, D group, fed with fermented milk with *L. plantarum* Q180, showed the strongest absorption inhibition effect of internal deposit fat as D group increased 34.8% TG content until 3 h and decreased 17.7% TG content after 5 h compared to 0 h.

### 3) Variation of body weight and blood lipid concentration in rat

After rearing 6 weeks, A, B, C, D, E, F, G group's average body weight was 26.30, 28.84, 28.74, 29.57, 28.29, 28.44, 27.95g. These groups were no significant difference except A and D group ( $p < 0.05$ ). However, compared with group B, weight increase amount in group E, F and G was respectively decreased 13.70%, 11.29% and 18.10%. In case of epididymal weight, E and G group had less weight compared to other groups but no significant difference with control group fed with high fat diet. The AST and ALT had difference each group but no significant difference. A group's TG concentration of serum was  $81.00 \pm 12.77$  mg/dL. On the contrary, B group was  $110.00 \pm 21.34$  mg/dL increased compared to control group. The C, D, F and G group was similar to group fed with high fat diet but E group was similar to control group.

### 4) Variation of epididymal adipocyte size

The result of adipocyte size's distribution to measure epididymal adipocyte size was much spread  $2,000 \mu\text{m}^2$  of adipocyte size on all groups and B group was much spread more than  $5,000 \mu\text{m}^2$  of adipocyte size. When observing dyed adipocyte size with H&E dye solution through microscope, it showed difference of adipocyte size with the naked eye.

## 8. Contrifaction of selected lactic acid bacteria for the commercialization and development of optimum mix formula

### 1) Investigation of physiochemical property

80.682% of raw milk and 3.318% of skim milk was mixed and dissolved at  $65^\circ\text{C}$ , and pasteurized at  $90^\circ\text{C}$  for 5 minutes and controlled to  $40^\circ\text{C}$  and inoculated ABT-3 strain as commercial strain and mixed *L. plantarum* Q180 ( $10^8$  CFU/mL) in culture solution until pH up to 4.4, followed by the addition and agitation of strawberry or blueberry jam, 5% of oligosaccharide and 2% of liquid fructose. The result of physiochemical property of the fermented milk added 4% of strawberry jam (A), the fermented milk added 6% of strawberry jam (B), the fermented milk added 8% of strawberry jam (C), the fermented milk added 4% of blueberry jam (D), the fermented milk added 6% of blueberry jam (E), the fermented milk added 8% of blueberry jam (F) was 4.3 of pH, 21.46~24.65% of



solid content,  $7.33 \times 10^9 \sim 4.66 \times 10^9$  CFU/mL and 0.95~1.05% optimal acidity.

## 2) Development of optimum mix formula

Compounding ratio of development product was 80.682% of raw milk, 3.318% of skim milk, 5% of oligosaccharide, 2% liquid fructose, 8% of blueberry jam and 1% of purified water.

## 3) Confrication of selected lactic acid bacteria through freeze drying

### a. Fermentation condition of *Lactobacillus plantarum* Q180

On the condition of mass culture in 70 L Bio-fermentor system, *L. plantarum* Q180 culture was inoculated in the 30 L of MRS growth medium and incubated at 38°C.  $1.48 \times 10^{10}$ /mL of viable bacteria was obtained.

Growth data of *L. plantarum* Q180 was analyzed. The weight of one cell was  $6.65 \times 10^{-8}$  g/cell, and the number of viable bacteria per 1 g was 8.09249E+12. Specific growth rate was 0.0366/min, and generation time was 18.9515 minutes under culture condition. Moreover, the growth lag time was 21.65 hours.

Total 487 g of wet cell was harvested by centrifugation of *L. plantarum* Q180 culture at 3,500rpm. Cell recovery rate was 0.974%, and the water content of the wet cell was 73.3%. The number of viable bacteria was  $2.24 \times 10^{11}$ /mL.

### b. Development of freeze-drying starter

To reduce the freezing injury of cell pellet, especially prepared powder (SIMP) was added as the cryogenic agents. It was frozen in the low temperature freezer (Freezer, Operon Inc., Korea) at -27°C.

The Freezed cell of *L. plantarum* Q180 was freeze-dried in vacuum drier (50kg of water evaporative capacity, Operon Inc., Korea) at -50°C of chiller and -25°C of the chiller plated cell, under 4,500 mtorr of vacuum condition, for 24 h. 1.75 g of dried powder starter was produced and water content of the stater was 5.1%.

Cell survival rate of the cell pellet added SIMP, as cryogenic agents for reducing freezing in jury, was showed over 99%.

### c. Fermentation of yogurt and change during storage

Three yogurt fermentation bases were produced using ABT-4 starter,

commercial DVS-type yogurt starter, and *L. plantarum* Q180 starter. 0.1% of ABT-4 or *L. plantarum* Q180 was inoculated and 0.05% of ABT-4 and *L. plantarum* Q180 were inoculated. Among the three yogurt bases, there was no difference in time to reach the final number of bacteria. However, the number of viable bacteria in yogurt base produced by ABT-4 was started to reduced after 6 h. The number of viable bacteria in yogurt bases produced by *L. plantarum* Q180 or mixed culture was continually increased until 15 h.

After 15 h, the three yogurt (ABT, ABT+LPL, LPL) terminated the fermentation were stored at 2°C for 12 h or 24 h. As the results of count of the viable bacteria, the number of viable bacteria of the yogurt fermented by ABT-4 was decreased. However, it was maintained in the yogurt fermented by *L. plantarum* Q180 or mixed culture.

#### 9. Investigation of anti-obesity underlying mechanism

The results of comparison of mRNA expression difference with PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$  concerning accumulation of fat and fatty acid oxidation through Western blotting decreased 46.07% of PPAR $\gamma$  and 35.16% of C/EBP $\alpha$ 's expression in treated cell with 400 $\mu$ g/mL concentration of *L. plantarum* Q180 ( $10^8$  CFU/day) compared to control when resolving fat of 3T3-L1 cell.

#### 10. Efficacy assessment of fermented milk by using animal test

##### 1) Diet efficiency and variation of body weight of animal

To understand the body weight gain of 6 kinds of treatment was tried to the Sprague-Dawley rat. The treatment was control group fed with normal diet(A), control group fed with high-fat diet administered orally physiological saline(B), a group fed with fermented milk made with *L. palnatarum* Q180 and ABT-3(CHR HANSEN)(C), a group fed with fermented milk made with *L. palnatarum* Q180 and ABT-3(CHR HANSEN) added garsinia canbogia (D), a group fed with fermented milk made with *L. palnatarum* Q180(E) and a group fed with fermented milk made with *L. palnatarum* Q180 added garsinia canbogia(F). After raising 8 weeks, B group, control group fed with high-fat diet administered orally physiological saline, increased 293.46 of body weight gain and decreased in order of E, C, D, F, A group. Compared with group B, weight increase amount in group C, D, E, and F was respectively decreased

5.14%, 6.5%, 3.36%, and 10.81%. Weight reduction ratio is the highest in group F, the rat fed with fermented milk made with *L. palnatarum* Q180 added garsinia canbogia.

## 2) Blood analysis

In case of ALT, there was no significant difference but showed different values of each group. In case of AST, there was the lowest in C group. In the concentration of blood serum TG, a group fed with normal diet and a group fed with probiotics showed the lowest value compared to B group. In case of adiponectin, there was no significant difference. Leptin was the biggest increase in B group fed with high-fat diet. In case of group fed with probiotics, it was increased compared to A group but decreased compared to B group.

## V. Results Achievements and Their Application Plans

In the study, it was expected to improve the international competitiveness and import-substituting effect to produce fermented milk through lactic acid bacteria with domestic anti-obesity ability in the country instead imported strain. Also, results of this study, commercialization is expected through a technology transfer to participated company. The result of this study has applied 3 patents and presented 2 posters in the Korean journal of food science of animal resources and 1 poster in the Korean Journal of Food Science and Technology. 1 poster in the International Scientific Conference on Probiotics and Prebiotics (ISP). Moreover, 4 papers was published.

In the future, through the market planning and survey research it will be commercialized in participated company through the technology transfer. Moreover, before the marketing of new product, several scale-up tests will be conducted such as process optimization for mass production. When we obtain satisfied product through series of process, company could start to manufacture the commercial product. So cooperation with company will be continued until commercialization.

# CONTENTS

<b>Chapter 1. Outlines of the Project .....</b>	<b>22</b>
<b>Chapter 2. R &amp; D status of Domestic and Overseas .....</b>	<b>24</b>
1. Market trend of fermented milk .....	24
2. Art status of domestic and abroad .....	27
<b>Chapter 3. Contents of the Project and Its Results .....</b>	<b>30</b>
1. Materials .....	30
2. Methods .....	31
3. Results and discussion .....	48
a. Isolation and collection of lactic acid bacteria .....	48
b. Selection of lactic acid bacteria for anti-obesity effect .....	49
c. Identification of lactic acid bacteria .....	73
d. Characteristics of selected lactic acid bacteria .....	89
e. Establishment of optimum culture technology .....	101
f. Separation identification of fermentation product .....	106
g. Variation of intestinal microbial flora and absolute inhibition effect of internal deposit fat .....	111
h. Confrication of selected lactic acid bacteria for commercial exploitation and development of optimum mix composition .....	127
i. Investigation of anti-obesity underlying mechanism .....	139
j. Efficacy assessment of fermented milk by using animal test .....	140
<b>Chapter 4. Goal Accomplishment and Substantial Contributions .....</b>	<b>146</b>
<b>Chapter 5. Result Achievements and Their Application Plans .....</b>	<b>148</b>
<b>Chapter 6. Overseas informations on Science and Technology     during the Project Years .....</b>	<b>149</b>
<b>Chapter 7. References .....</b>	<b>156</b>
<b>Appendix .....</b>	<b>159</b>

# 목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 .....	22
제 2 장 국내외 기술개발 현황 .....	24
제 1 절 발효유의 시장현황 .....	24
제 2 절 국내외 기술 현황 .....	27
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 .....	30
제 1 절 재료 .....	30
제 2 절 방법 .....	31
제 3 절 연구결과 및 고찰 .....	48
1. 젖산균 분리 및 수집 .....	48
2. 비만억제능 균주 선발 .....	49
3. 선발 젖산균주 동정 .....	73
4. 선발 젖산균의 특성조사 .....	89
5. 최적 배양기술 확립 .....	101
6. 발효산물 분리동정 .....	106
7. 체내 균총 변화 및 지방 흡수 저해효과 .....	111
8. 최적 배합조성물 개발 및 상업적 이용 위한 젖산균 분말화 .....	127
9. 비만억제 작용기작 규명 .....	139
10. 동물모델을 이용한 발효유의 비만억제 효능평가 .....	140
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	146
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획 .....	148
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	149
제 7 장 참고문헌 .....	156
부록 .....	159

## 제 1 장 연구개발과제의 개요

최근 사회의 다변화, 고령화 및 소비자의 다양한 욕구증대 등으로 인하여 세분화된 소비계층을 겨냥한 신제품들이 판매되고 있으나 제품의 라이프사이클이 크게 줄어드는 경향을 보이고 있다. 건강기능식품 시대의 도래와 함께 첨단 기능성 소재들이 등장됨에 따라 유통계에서도 이들 소재를 응용한 연구개발과 공정개선을 통한 신제품을 출시하고 있다. 그러나 저출산율과 수입개방 등으로 국내 액상유제품의 소비가 줄어들고 유통기간이 긴 치즈 등 가공유제품은 수입이 증가됨에 따라 국내 낙농산업은 커다란 어려움에 처해 있다. 따라서 국내 유가공업체는 원유소비 증대와 유제품의 국제경쟁력을 확보하기 위하여 유제품 중 특히 유통기간이 짧은 액상유제품인 발효유의 다양화, 고급화를 위한 기술개발 및 유제품의 적극적인 홍보 등의 전략이 필수적이다. 이를 위해서는 종래 단순가공에 의한 유제품의 생산에서 탈피하여 새로운 공정 개발, 기능성 소재 탐색 등으로 생산비 절감, 수출증대, 다양한 형태의 건강지향적 기능성 유제품 개발에 노력을 해야 할 것으로 보이며, 단순히 외국의 기능성 물질을 첨가하거나 Probiotic 균을 수입하여 생산하는 것을 지양하고 자체 개발한 제품을 통해 국제경쟁력을 키워나가야 할 것이다.

현대사회에서 비만은 식습관과 생활습관의 변화로 인해 지속적으로 증가하여 세계적으로 건강과 보건의에 대해 부정적인 영향을 미치고 있다. 비만은 만성대사성 질환의 원인으로 동맥경화와 심근경색 등의 심혈관질환, 고혈압, 고지혈증, 제 2형 당뇨병 등과 같은 심각한 질환의 발병률을 증가시키며 퇴행성 관절염이나 일부 암질환 등의 원인이 되기도 한다(Lew, 1985; Spiegelman과 Flier, 2001) (Fig. 1). 이에 세계 보건기구에서는 비만을 하나의 현상이나 증상이 아닌 질병으로 분류하고 있다(McGee, 2005). 이는 한국도 예외가 아니다. 최근 국민건강보험공단이 2002년부터 2013년까지의 일반건강검진 빅데이터 1억 902만 8689건을 활용해, 고도비만 현황 및 초고도 비만에 대해 분석한 결과 초고도 비만율은 2002년 0.2%에서 2013년 0.5%로 상승해 지난 12년간 2.9배 증가하였으며, 고도 비만율은 2002년 2.5%에서 2013년 4.2%로 1.7배 증가하였다. 특히 20~30대 초고도 비만유병율이 10년간 약 4배 이상 증가하였다고 발표하였다 (국민건강보험공단, 2014). 이 때문에 비만을 개선하기 위한 방법에 대한 관심 또한 증대하고 있다.

한편, 비만억제 발효유에 관한 연구는 한국야쿠르트가 2012년 출시한 다이어트 건강기능식품 'LOOK(룩)'을 출시한 것 외에는 변화가 없었다. 체지방 합성 억제와 연소, 원활한 배변활동 등 3가지 장점을 내세운 LOOK은 '일상생활 속 다이어트'를

표방하고 있다. 제품의 주성분인 HCA(가르시니아캄보지아)는 식품의약품안전처가 인정한 탄수화물 지방전환 억제와 지방합성을 억제하는 기능성 물질, 생리활성화를 유도하는 천연물 소재인 판두라틴(panduratin) 추출물 또한 6종의 유산균 중 ‘락토 바실러스 케베티스 HY7601’은 비만억제 효능에 관한 특허를 받아 눈길을 끌었다.

본 과제와의 차이점은 본 과제는 지방분해 및 지방합성 억제를 동시에 만족하는 젖산발효 젖산균을 이용한 발효유 제품 개발이고, 한국야쿠르트 측에서 출시한 제품은 지방합성 억제 천연소재가 주이고 여기에 6종의 유산균 중 1종이 비만억제 효능 있는 젖산균을 첨가하였다는 점이 차이가 있다. 또한 국내에서 개발된 젖산균을 이용하여 제품을 만듦으로써 시장확대 및 젖산균의 수입대체효과와 더 나아가 외국에 수출할 수 있는 국제경쟁력을 키울 수 있으리라 여겨진다.

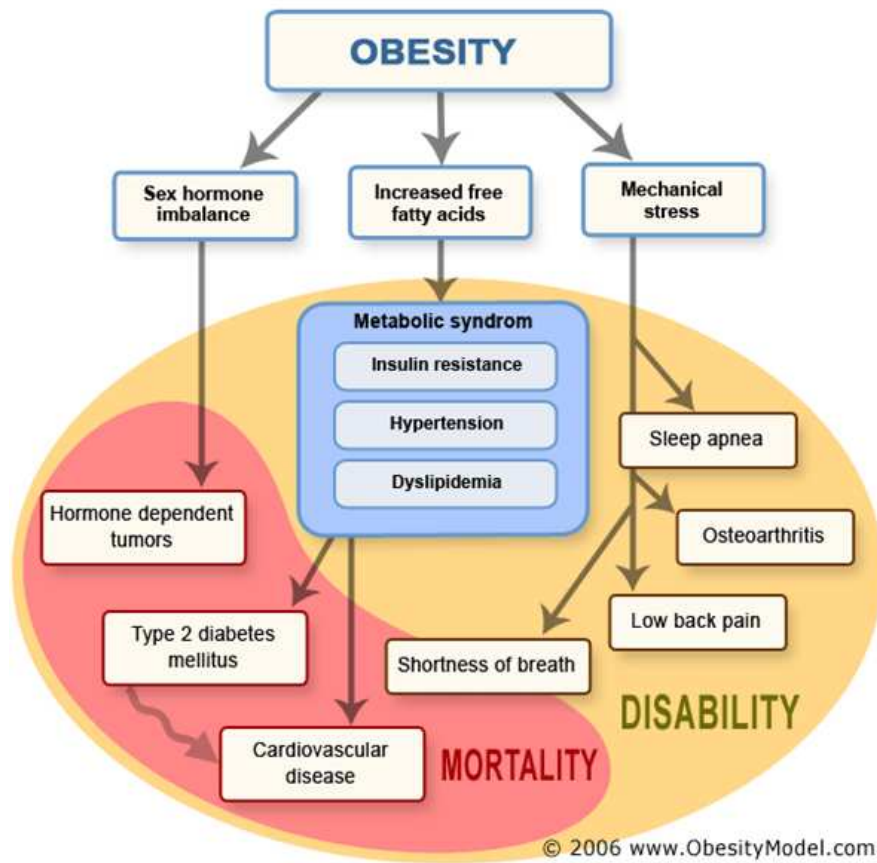


Fig. 1. Impact of obesity on health

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1 절. 발효유의 시장 현황

#### 1. 낙농산업의 현황

현재 국내 낙농산업은 낙농가수는 감소하는 반면 호당생산량 및 호당사육두수는 증가하고 있어 원유생산량은 2011년을 제외하고는 210만톤 내외를 유지하고 있다.

Table 1. The trends of dairy industry

구 분	2009	2010	2011	2012	2013
원유생산량(톤)	2,109,732	2,072,696	1,889,150	2,110,698	2,093,072
낙농가 수(호)	6,767	6,347	6,068	6,007	5,830
호당생산량(kg)	25,961	25,892	26,305	28,481	30,224
착유우두수(두)	208,136	204,923	190,901	209,106	205,812
호당사육두수(두)	66	68	67	70	73

주) 원유생산량 : 2,028,320톤(2014)

자료 : 낙농통계연감(2014)

우리나라 원유의 소비는 주로 시유 등에 주로 이용되고 있는데 백색시유의 소비에 따라 원유 수급의 차이를 보이고 있는 추세를 보이고 있다. 매년 75% 내외의 비율로 음용유에 이용되었으나 2014년의 경우 69.9%로 낮아짐에 따라 원유의 재고가 급격히 늘어나 2011년 1,648톤에서 2013년 7,328톤이었다가 2014년 11월 현재 16,816톤으로 급격히 증가하는 현상을 보이고 있다. 이외에도 국내 유제품 총소비량은 2013년 3,582,185톤으로 약간씩 증가하고는 있지만 국산원유 소비량은 오히려 줄어들었다. 국산원유 소비가 이처럼 줄고 있는 것은 경기둔화와 유제품 가격인상에 따른 소비부진, 출산을 저하, 우유에 대한 부정적인 인식확산 등 복합적인 요인들이 작용하고 있기 때문으로 분석되고 있다. 작년 5월 중국이 국산 우유의 살균방법을 문제 삼아 수출을 전면 불허한 것도 원유의 수요감소에 일조를 한 것으로 평가되고 있다. 백색 시유의 소비가 감소되는 반면 치즈의 소비가 증가됨에 따라 치즈의 수



입량은 2010년 60,924톤에서 2014년 87,962톤으로 매년 증가하고 있다. 이런 상황에서 호주 및 EU 등 낙농 선진국 들이 FTA 등을 무기삼아 수출에 적극 나설 경우 유제품의 수입량은 더욱 급증할 것으로 보인다.

따라서 유통기간이 짧고 상대적으로 부가가치가 높으며, 시장 성장 잠재력이 높은 품목인 발효유시장을 낙농선진국 및 주변국에 빼앗기지 않고 지키기 위해 정부의 낙농정책 변화 및 유업체의 노력이 절실히 요구된다.

## 2. 우리나라 발효유 소비 현황

최근 유가공 시장의 침체에도 불구하고 웰빙이 접목된 식품을 선호하는 소비자가 증가하면서 발효유 시장이 부각되고 있다. 현재, 국내 발효유시장의 연간 매출규모는 약 1조 4000억원으로 이 가운데 장과 위, 간 발효유 등 기능성발효유가 전체 발효유 시장의 40%를 차지하고 있다.

기존의 기능성에서 최근에는 천연원료만을 사용해 맛을 강조한 제품과 500 mL 등 대용량 발효유, 노화를 방지해주는 항산화성분을 첨가하는 등 발효유의 개념이 한층 더 새로워지면서 시장에 활기를 주고 있다.

이에 따라 국내 유가공기업들이 앞 다퉈 차별화된 프리미엄급 발효유 제품을 내놓으면서 시장 선점에 주력하고 있다.

Table 2. Production and consumption trends of fermented milk

구분		2014	2013	2012	2011	2010	2009
생 산	액상발효유	429,077	456,571	444,753	395,214	373,322	268,404
	호상발효유	99,502	117,101	112,886	126,791	129,282	177,334
	수입(액상)	254	198	120	108	79	63
	수입(호상)	33	2	4	27	3	2
	계	528,866	573,872	557,763	522,140	502,686	445,803
소 비	액상발효유	424,525	449,737	438,740	389,703	367,454	262,408
	호상발효유	99,263	117,173	112,855	126,984	129,252	177,170
	수출(액상)	5,656	6,395	6,100	5,349	5,369	5,991
	수출(호상)	105	38	20	0	2	3
	계	529,549	573,343	557,715	522,036	502,077	445,572

자료 : 낙농통계연감(2014)

2014년에는 무첨가, 저당, 대용량 플레인 발효유 제품 개발 경쟁이 심화되고 있다. 2013년에 상반기 9%에서 2014년에는 14%로 5% 상승하였다. 매일유업, 남양유업 및 한국야쿠르트 등이 무첨가 제품 개발에 승부수를 던진 대표적인 발효유 업체들

이다. 5000억원대에 육박하는 락먹는 발효유 시장은 빙그레 ‘요플레’가 시장점유율 20%대를 차지한 가운데 동원 F&B ‘요러브’, 남양유업 ‘락먹는 불가리스’, 한국야쿠르트의 ‘슈퍼 100’, 매일유업의 ‘퓨어’, 다논코리아 ‘액티비아’ 등이 치열한 경쟁을 펼치고 있다.

국내 발효유 시장은 한국야쿠르트가 절대적인 점유율을 보유하고 있다. 업계자료에 따르면 유산균 음료시장에서 한국야쿠르트는 40%를 상회하고, 뒤를 이어 남양유업, 빙그레, 매일유업 등이 10% 정도이며, 서울우유 6.7%, 푸르밀 5.5%, 다농 2.4%, 기타 7.4%로서 치열한 경쟁을 벌이고 있다.

## 제 2 절. 국내외 기술 현황

### 1. 국내 기술 현황

#### 가. 기능성 식품소재에 의한 항비만 효과

항비만 효능을 나타내는 기능성 식품소재에 대한 연구가 활발하게 이루어져 *Garcinia cambogia* 과실의 껍질에서 추출한 성분인 hydroxycitrate, carnitine, conjugated linoleic acid, 식이섬유 등의 소재들이 항비만소재로 활용되며 또한 이를 활용한 다양한 형태의 비만억제용 제품이 소개되고 있다. 생약소재로 인삼, 녹차, 오디, 누에, 허브추출물, 인삼열매 등은 독성이 없어 당뇨치료의 보조제로서 초점되어 왔다. 이와 같이 다양한 소비자의 요구에 맞춘 여러 가지 형태의 제품들이 시장에 소개되고 있으나 그 중에는 부적절한 체중감소 및 신체적 부작용 발생 등의 문제가 대두되기 때문에 일상적으로 섭취하여 온 식품의 섭취를 통한 비만억제가 상당히 중요하며 이에 대해서도 많이 보고되고 있다.

발아현미가 고지방식을 섭취한 흰쥐에서 5주 경과 후 유의적 차이는 없었지만 체중 증가량이 가장 낮았고 혈중 중성 지질 및 콜레스테롤에서도 가장 낮은 값을 보였다고 하였으며(Choi 등, 2006), 지방흡수 억제 뿐만 아니라 탄수화물의 흡수 억제 또한 견비한 방법으로 호박열수 추출물에서 췌장 lipase 활성 저해와 지방세포 분화 억제에 대한 지방흡수 억제물질과 울무 열수에서  $\alpha$ -amylase 활성 저해에 대한 탄수화물 흡수 억제물질이 첨가된 비만개선 식이조성물이 동물실험시 체중증가가 고지방 식이만 섭취한 군보다 13% 억제효과가 있었다(Kim 등, 2003)고 하였다.

#### 나. 발효제품에 의한 항비만 효과

김치에서 분리된 젖산균으로 발효시킨 두유(10 mug/mL)로 처리된 지방세포 3T3-L1는 triglyceride의 함량을 줄였고, 세포분화를 억제하였으나, 고지방식이 쥐에 급여한 결과 체중감소는 없는 반면 LDL 콜레스테롤 농도가 유의있게 감소하였다고 보고하였다(Kim 등, 2008). 식물성 젖산균을 이용하여 대두로 배양·발효해 만든 젖산균 생산물질은 생리활성을 높여 주고, 장내 pH를 산성으로 이끌어 감염에 대한 방어를 높여 준다. 특히 대두가 발효되면서 분비하는 유산, 단쇄지방산, 펩티드, 아미노산, 비타민 등은 장내 환경을 개선시켜 주고 스트레스를 억제해 주며 혈압을 조정해 준다. 또한 유산균생산물질의 대두변환물질인 이소플라본이나 사포닌, 펩티드 등은 갱년기 장애와 콜레스테롤을 경감시키고, 당뇨병을 예방할 수 있게 해 준다.

다. 젖산균 자체에 의한 항비만 효과

김치젖산균추출물 분말은 고지방식이를 섭취한 흰쥐에서 체중저하뿐만 아니라 복부지방의 축적을 억제하는 효과가 있었으며, 그 효과는 김치젖산균 추출물에 함유되어 있는 젖산균 세포벽 성분이 지방을 흡수하여 배설됨으로써 체내로 흡수되는 지방의 양이 줄어들었기 때문이라 하였고, 젖산균 중 *L. acidophilus*, *Streptococcus thermophilus*, *L. bulgaricus*, *Bifidobacteria* 등은 콜레스테롤을 흡수하는 작용이 있음이 보고되어 있어 이들 젖산균이 함유된 식품을 섭취하면 장내에서 콜레스테롤을 흡수하여 체내로 흡수되는 양이 줄어들 것이라고 보고되었다(권, 2004). 또한 모유에서 분리한 *Lactobacillus gasseri* BNR17이 2형당뇨 마우스 모델에서 혈당과 체중에 미치는 효과에 관한 연구(Yun 등, 2009)에서 하루에 2회 경구투여(부형제가 든 분말) 후 12주 동안 급여한 결과 혈당을 낮추는 효과는 있었으나 체중감소는 없었다고 하였다.

## 2. 국외 기술 현황

가. 기능성 식품소재에 의한 항비만 효과

대두단백은 체지방 축적을 줄이고, 인슐린 저항성, 비만 개선에 효과가 있지만 장기간 복용시 알러지 유발 가능성이 있다는 보고서가 있다(Velasquez과 Bhatena, 2007).

나. 발효제품에 의한 항비만 효과

*Enterococcus faecium*과 *Lactobacillus juguti*로 발효시킨 isoflavone을 강화한 두유제품이 3주간 고콜레스테롤 식이로 고콜레스테롤 증을 유발시킨 juvenile rat에 지방조직, 지질, 혈당에 미치는 영향에 대해 조사한 결과 젖산균이 후복막지방에 대해 isoflavone의 지방생성 억제 효과를 강화시켰다고 보고하였다(Manzoni 등, 2005). 젖산 발효식품인 Chinese yam은 *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus*와 *Bifidobacterium bifidus*를 이용하여 발효시킨 제품으로 변비와 비만 개선 효과가 있다는 특허가 있다.

유아 및 성인분변에서 분리한 *Lactobacillus gasseri* SBT2055 균주에 의한 발효유를 SD rat에 급여한 결과 control에 비해 혈청 leptin 농도를 32% 낮추었고 지방세포의 비대화를 억제한다고 하였으며, 2009년에는 여원 쥐와 비만 쥐에 4주동안 급여한 결과 여원 쥐에서 control(탈지유 급여)에 비해 지방조직 중량이 23% 낮추었고, 지방세포 크기를 28%, 혈청 leptin 농도를 36% 낮춘 반면 비만 쥐에서는 효

과가 없었지만 콜레스테롤 억제효과가 있었다(Hamad 등, 2009)고 하였다. 최근 일본 유산균학회 발표(09. 7)에 따르면 사람에게 12주일에 걸쳐 하루에 요구르트 200g을 섭취한 결과 내장지방의 면적이 섭취 전과 비교해 4.6% 감소하고, 피하지방의 면적은 3.3% 감소하였다고 밝혔다.

다. 젖산균 자체에 의한 항비만 효과

Lactobacillus는 자율신경활동에 영향을 주고 혈당과 심혈관 기능을 조절한다는 일부 증거가 있다. *Lactobacilli paracasei* ST11(NCC2461)은 체중과 비정상 지방 중량을 감소시킨다(Tanida 등, 2008)는 연구보고가 있다.

## 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

매일유업에서 제조한 맛있는 우유 GT를 구입하여 사용하였다.

#### 3. 탈지분유

매일유업에서 제조한 단백질 35.0%, 유지방 1.0%, 탄수화물(유당) 52%인 제품을 사용하였다.

#### 4. 액상과당

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

#### 5. 올리고당

CJ(주)에서 제조한 프락토올리고당 50%이상(수분제외)인 제품을 사용하였다.

#### 6. 딸기잼

오뚜기(주)에서 제조한 딸기 56.19%인 제품을 사용하였다.

#### 7. 블루베리잼

오뚜가(주)에서 제조한 블루베리 40%인 제품을 사용하였다.

#### 8. 젖산균 스타터

본 실험에 사용된 균주는 시중 유업체에서 발효유에 사용하는 상업용 균주로서 CHR HANSEN에서 생산한 ABT-3와 ABT-4 냉동 건조된 균주를 구입하여 사용하였다.

#### 9. 분변

신생아 분변은 순천향병원 및 한강성심병원 산부인과 신생아실에서 지원받아 32명의 분변을 사용하였고, 성인분변은 한국식품연구원 가족 47명을 대상으로 사용하였다.

#### 10. 세포주

세포 배양 실험에 이용된 3T3-L1 지방 전구세포는 미국 ATCC에서 분양받아 사용하였다.

## 제 2 절 방법

### 1. 젖산균의 분리 및 수집

#### 가. 원유에서 젖산균 분리

서울우유 중부, 남부, 서부지도소 관할 원유검사소(경기도 및 강원도 일부), 전북 축산시험연구소 및 경북 가축위생시험소에서 지원받아 목장별 원유를 채취하여 MRS배지에서 Bromcresol purple과 sodium azide를 첨가한 plate에 smear한 후 37°C에서 48시간 배양한 다음 노란색 colony중 각기 다른 모양의 colony를 선발하였고 순수분리를 위해 MRS agar에 streaking하여 얻어진 colony를 triptic soy agar slant에 37°C에서 18시간 배양한 다음 보관하였다. 발효유에 적합하기 위해서는 skim milk를 응고시킬 수 있는 산생성 능력이 있어야 하므로 10% 환원탈지분유에 분리균주를 접종한 후 37°C에서 24시간 배양하여 응고된 균주를 선발하였다.

#### 나. 신생아 분변에서 젖산균 분리

분변시료는 배변 즉시 3시간 이내에 미생물 시험을 실시하였다. bifidobacteria 분리는 채취된 분변을 균일하게 혼합한 후 혐기 희석액으로  $10^3 \sim 10^4$  cfu/mL 수준까지 희석한 후 미리 만들어 놓은 BS agar plate에 희석된 시료 100  $\mu$ l를 도말한 후 anaerobic jar에 gas pak을 넣고 37°C에서 3일간 혐기적으로 배양하였다. 분리된 bifidobacteria는 paraffin oil이 중층된 modified BL broth를 사용하여 37°C에서 18~24시간 배양하여 균주를 보관하였다. 젖산균 분리는 modified MRS(glucose→lactose) (임 등, 2011)에서 분리하였으며 다른 과정은 원유와 동일한 방법으로 분리하였고, 37°C에서 12시간 및 24시간 배양하여 응고된 균주를 선발하였다.

#### 다. 성인 분변에서 젖산균 분리

분변 시료는 배변 즉시 paraffin oil이 중층된 modified Blood-Glucose-Liver (BL) broth가 담긴 15 mL의 멸균된 polypropylene tubes에 넣어 12시간 이내에 미생물 시험을 실시하였다. 채취된 분변으로부터 bifidobacteria 분리 및 젖산균 분리는 신생아 분변과 동일한 실험방법으로 실시하여 bifidobacteria 균주를 수집, 보관하였으며, 젖산균은 37°C에서 12시간 및 24시간 배양하여 응고된 균주를 선발하였다.

### 2. 비만억제능 균주 선발

#### 가. Anti-lipase activity (porcine pancreatic lipase이용)

Lipase 억제활성은 Lee 등(1993)의 방법에 따라, Porcine pancreatic lipase를 이용하여 lipase 활성저해 정도를 측정하였다. p-Nitrophenylpalmitate(PNP)를

acetonitrile에 10mM 농도로 녹인 후 얻어진 용액을 다시 ethanol(1:2 = acetonitrile : ethanol)에 녹여 결과적으로 3.33mM의 PNP 용액을 만들어 사용하였다. Porcine pancreatic lipase는 5 mg/mL의 농도로 증류수에 녹여 사용하였다. 다음과 같은 농도로 reaction mixture를 만들어 37°C에서 10분간 반응시켰다(Table 3). 반응 후 405nm에서 absorbance를 측정하며 blank는 enzyme을 증류수로, control은 시료를 용매로 대체하였다. 각각 농도별 시료마다 enzyme을 뺀 blank의 absorbance를 측정하여 시료의 색상을 보정하였다.

Lipase inhibition activity(%) = {1-(A/B)} x 100  
 A ; 시료의 absorbance, B ; control의 absorbance

Table 3. The composition of the reaction solution

Total reaction mixture	200 $\mu$ l
Enzyme(porcine pancreatic lipase)	0.30 mg/mL
Sample	0.1 mg/mL
PNP	0.167 mM
Tris-HCl buffer	0.061 M(pH 8.5)

#### 나. MTT assay

선발된 균주가 3T3-L1 cell에 세포독성을 나타내는지 측정하기 위하여 Mosmann (1983)의 방법에 따라 MTT assay를 수행하였다. 3T3-L1 세포를  $1 \times 10^5$  cell/well 농도로 96 well plate에 분주한 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 배양한 다음 배지를 제거하고 균주를 10, 100, 1000 ug/mL 농도로 100 uL씩 넣고 24시간 배양 후 5 mg/mL로 제조한 MTT 용액을 20 uL를 첨가하여 4시간 동안 반응시켰다. 상등액을 제거하고 DMSO 용액을 100 uL 첨가하고 30분 후 ELISA reader를 이용하여 550nm의 파장에서 측정하였다.

#### 다. Anti-adipogenic activity 측정(3T3-L1 cell line 이용)

3T3-L1 세포배양 방법은 Hemati 등(1997)의 방법을 변형하여 사용하였다. Adipogenesis(지방세포분화) 측정은 3T3-L1 cell line을 분화시키고 지방축적(adipogenesis)을 유도하여 특정한 소재의 첨가가 지방축적에 미치는 영향을 측정하는 방법으로서 pre-adipocyte 상태의 3T3-L1 cell에 dexamethasone, 3-isobuthylmethyl-xanthine 그리고 insulin으로 처리하여 cell의 분화(differentiation)를 유도하면



PPAR $\gamma$  등의 지방합성촉진 인자들의 발현이 일어나고 궁극적으로 지방의 세포내 축적이 이루어진다. 대체적으로 3T3-L1 cell의 pre-adipocyte 기간을 포함하여 9일 안에 지방의 축적이 일어나며 이들 축적된 지방구를 Oil Red O 용액으로 추출하고 520nm에서 흡광도를 측정함으로써 세포내 지방축적 정도를 측정하였다(Ramirez-Zacarias 등, 1992).

### 3. 선발 젖산균주 동정

분리·선정된 젖산 균주는 MRS 액체배지에서 2회 이상 계대 배양하여 활성을 높인 후 실험에 사용하였다. 젖산균의 동정은 Hammes 등(1992)의 방법에 의하여 실시하였다. 순수 분리된 균주는 Gram염색, 포자생성, 호기적 및 혐기적 생장, Catalase생성, 15°C 및 45°C에서의 생장, glucose로부터 가스 생성, arginine으로부터 ammonia생성, 현미경 관찰과 Lactobacillus 균은 API 50CHL kit(API bioMerieux, France)를, Streptococcus 균은 API Strep20 kit 를 이용하여 당 발효 실험을 실시하였다. 젖산균의 DNA sequence는 universal primer 27F(5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3')와 1492R(5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3')를 사용하였으며, solvent EF-Taq을 사용하여 PCR을 실시하였다. 증폭과정은 95°C, 15분을 한 후 95°C, 20초; 50°C, 40초; 72°C, 1분 30초를 30회 시행하였으며 72°C, 5분으로 마무리 하였다. 서열분석은 PCR product를 solvent PCR purification kit로 purify한 후 ABI 3730XL DNA sequencer로 자동분석 하였다.

### 4. 선발 젖산균의 특성조사

#### 가. 젖산균의 생장

젖산균의 생장은 생균수, pH를 측정하여 시험하였다. 생균수는 10% 탈지분유 150 mL에 젖산균을 1 mL용 피펫 1 drop 접종한 후 34°C, 37°C, 40°C에서 3시간 간격으로 24시간까지 배양한 각 시료를 0.1% peptone용액에 희석하여 BCP plate count agar 평판에서 부어 굳힌 후 35°C에서 48시간 배양하여 계수하였고, 온도 및 시간별로 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°C에서 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°C에서 48시간

배양한 후 육안으로 관찰하여 생장여부를 결정하였다. 항생제 내성측정은 2배 희석 방법을 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.

#### 다. 효소활성 시험

MRS 액체배지에서 30°C, 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°C에서 5시간 배양한 다음 효소반응 시켰다. 효소활성은 표준색상표를 비교하여 0~5의 수치로 표시하였으며, 대조구 이외의 alkaline phosphatase, esterase(C4), esterase lipase(C8), lipase(C14), leucine arylamidase, valine arylamidase, cystine arylamidase, trypsin, chymotrypsin, acid phosphatase, naphthol-AS-BI-phospho-hydrolase,  $\alpha$ -galactosidase,  $\beta$ -galactosidase,  $\beta$ -glucuronidase,  $\alpha$ -glucosidase,  $\beta$ -glucosidase, N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase,  $\alpha$ -mannosidase,  $\beta$ -fucosidase 효소의 활성을 측정하였다.

#### 라. 내담즙성 실험

Gilliland와 Walker(1990)의 방법에 따라 MRS 액체배지에서 37°C, 18시간 배양된 균주를 0.05% cysteine이 함유된 MRS 액체배지에 0.3% oxgall을 첨가한 배지와 대조구로서 oxgall을 첨가하지 않은 배지에 각각 1% 접종하였다. 37°C의 incubator에서 7시간까지 혐기배양하면서 시간 별로 BCP plate count agar 평판에서 부어 굳힌 후 37°C에서 48시간 혐기배양하여 계수하였다.

#### 마. pH 내성 실험

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

#### 바. 항균력 실험

Gilliland와 Speck(1977)의 방법에 따라 항균력 측정에 사용한 지시균인 *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* 및 *Staphylococcus aureus*는 한국식품연구원으로 부터 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.

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

#### 사. 균주 동결건조(균주활력시험)

젖산균 세포는 균체 회수용 원심분리기 (Domeo Co., Japan)를 16,000 rpm/min으로 회전시켜 cell paste 형태로 회수하였다. 동결보호제로서 glycerol(50 mL) + polydextrose(25g)(Food grade, Samyang Co., Korea)으로 배합하여 10% 환원탈지유 500 mL에 첨가한 후 121°C에서 5분간 멸균하여 냉각하였다. 첨가구에 cell paste를 150g 첨가하고 -45°C로 동결한 후 동결건조기(Freeze Dryer, 증발용량 50kg, Operon, Korea)에서 냉열기 온도 -50°C, 냉열관 온도 -20°C, 84 mtorr의 진공하에서 건조하여 FD cell powder를 제조하였다. 균주활력시험을 위해 10% 탈지유에 FD cell powder를 0.1% 접종한 후 40°C에서 18시간 배양한 다음 다시 10% 탈지유 150 mL에 1 drop 접종한 후 3시간 간격으로 24시간까지 배양한 각 시료를 0.1% peptone용액에 희석하여 BCP plate count agar 평판에서 부어 굳힌 후 35°C에서 48시간 배양하여 계수하였고, 시간별로 pH 변화를 측정하였다. 이때 pH는 pH meter(Mettler model 345, England)로 측정하였다.

### 5. 최적배양기술 확립

#### 가. 조건설정

비만 억제능이 우수한 균으로 선정된 *Lactobacillus plantarum* Q180 균주의 배양조건을 최적화하기 위하여 다음과 같이 실험을 실시하였다. 환원 탈지유의 농

도(9%, 10%, 11%), 배양온도(34°C, 37°C, 40°C), 배양시간(21 h, 30.5 h, 40 h)의 3가지 독립변수와 수준을 설정하였으며, 종속변수로는 pH와 Anti-adipogenic activity, Anti-lipase activity를 설정하였다. 통계처리는 MINITAB statistical software (Version 13, Minitab Inc., USA)를 사용하였다.

#### 나. 배양조건의 최적화를 위한 반응표면실험법

실험계획은 중심합성계획(Central composite design, Box and Wilson, 1951)을 적용하였다. 독립변수로는 예비실험과 마찬가지로 환원탈지유 농도 (% ,  $X_1$ ), 배양온도 (°C,  $X_2$ ), 배양시간 (h,  $X_3$ ) 을 설정하였다. 독립변수의 중심 값과 범위는 예비실험을 바탕으로 설정되었으며, -1, 0, 1,의 3가지 수준으로 부호화하였다. 종속변수로는 pH(pH,  $Y_1$ ), Anti-lipase activity (% ,  $Y_2$ ), Anti-adipogenic activity(% ,  $Y_2$ )를 설정하였으며, lipase와 adipogenic 억제율이 가장 높고 pH는 4.4 를 동시에 만족하는 최적화를 실시하였다. 통계 분석 결과를 바탕으로 반응표면 모델 식을 구하고 반응표면 그래프(Response surface plots)는 Maple software (Version 7, Waterloo Maple Inc., Canada)를 이용하여 3차원으로 나타내었다.

## 6. 발효산물 분리동정

### 가. 한외여과

10% 환원탈지유에 *Lactobacillus plantarum* Q180를 1% 접종하고 37°C에서 pH 4.4에 도달할 때까지 배양시켜 얻어진 발효산물을 cut-off 10,000 dalton의 membrane을 장착한 한외여과 장치로 10,000 dalton 이상의 획분과 10,000 dalton 이하의 획분으로 분리하고 이것을 다시 1,000 dalton의 membrane으로 한외여과하여 1,000~10,000 dalton의 획분과 1,000 dalton 이하의 획분으로 분리하고 감압농축 후 진공동결 건조하여 peptide를 제조하였다.

### 나. ODS AQ column에 의한 reverse-phase chromatography

한외여과로 분획한 peptide를 ODS AQ를 충전한 column (26×300 mm,  $V_t$  : 1,865 mL)으로 분리정제하였다. 이때 용출액은 water와 ethanol을 이용하였고, 유속은 1 mL/min로 용출시켜 10 mL씩 분취하였으며, 215nm, 280nm에서 detection하고, 각 peak를 모아 감압농축한 후 진공 동결건조하였다.

다. Vydac C18 column에 의한 reverse-phase chromatography

ODS AQ column으로 분획한 peptide를 vydac column (10×250 mm, Vt : 19.6 mL)으로 분리정제하였다. 이때 용출액은 0.1% TFA in water와 0.1% TFA in ACN을 용매로 하여 gradient 조건에서 분리하였다. 유속은 2 mL/min로 용출시켜 2 mL씩 분취하였으며, 215nm, 280nm 조건에서 detection하고, 각 peak를 모아 감압농축한 후 진공 동결건조 하였다.

라. Superdex peptide HR column에 의한 reverse-phase chromatography

Vydac C18 column으로 분획한 peptide를 Superdex peptide column (10×30 mm, Vt: 24 mL)을 이용하여 분리정제하였다. 이 때 용출액은 HPLC용 water를 이용하였고, 유속은 0.5 mL/min로 용출시켜 1 mL씩 분취 하였으며, 215nm, 280nm에서 detection하고, 각 peak를 모아 감압농축한 후 진공 동결건조하였다.

마. 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 측정 한 다음 시료 20 uL를 사용하여 분석하였다.

바. Anti-lipase activity 분석

진공동결건조하여 얻어진 분획물을 Porcine pancreatic lipase를 이용하여 lipase 활성저해 정도를 측정하였다. 각 반응용액을 위의 표와 같은 농도로 reaction mixture를(Table 3) 만들어 37°C에서 10분간 반응시킨 후 405nm에서 absorbance를 측정하였다.

Lipase inhibition activity(%) = {1-(A/B)} x 100

A ; 시료의 absorbance, B ; control의 absorbance

## 7. 체내 균총 변화 및 지방 흡수 저해효과

가. 실험 균주의 준비

비만억제능이 우수한 균으로 선정된 *Weissella* sp. F22 (10<sup>9</sup> CFU), *Enterococcus faecalis* MD366 (10<sup>9</sup> CFU), *Lactobacillus plantarum* Q180 (10<sup>8</sup>, 10<sup>9</sup>

CFU)균주는 Lactobacilli MRS broth (Difco, USA)에서 37°C, 18시간 배양하였으며 배양 후 15,000 rpm 에서 15 분간 원심분리한 후 배지는 제거하고 증류수로 세 번 더 세척하여 남아있는 MRS 배지를 제거해 주었다. 세척한 균체는 생리식염수 (0.9%)에 희석하여 준비하였다.

#### 나. 실험동물 및 식이

본 연구에서는 6주령의 C57BL/6J 마우스를 (주)두얼 바이오텍(Seoul, Korea)으로부터 구입하여 1주간 적응시킨 뒤 실험에 사용하였다. 실험 기간 중에 사육실 온도는 20±2°C, 습도는 55±10%, 명암은 12시간 주기로 자동 조절하였다. 실험 동물은 1주간의 정상 식이 후에 난괴법에 의거하여 7개의 군으로 분리하였다. 실험군은 정상식이군(A; n=6), 고지방식이 대조군(B; n=6), 고지방 식이를 섭취시키며 상업균주 ABT-3 (CHR HANSEN)의 균체(10<sup>9</sup> CFU)를 생리식염수(0.9%)에 희석하여 경구투여한 군(C, n=6), 고지방 식이를 섭취시키며 *L. plantarum* Q180의 균체(10<sup>8</sup> CFU)를 생리식염수(0.9%)에 희석하여 경구투여한 군(D, n=6), 고지방 식이를 섭취시키며 *L. plantarum* Q180의 균체(10<sup>9</sup> CFU)를 생리식염수(0.9%)에 희석하여 경구투여한 군(E, n=6), 고지방 식이를 섭취시키며 *Weissella* sp. F22의 균체(10<sup>9</sup> CFU)를 생리식염수(0.9%)에 희석하여 경구투여한 군(F, n=6), 고지방 식이를 섭취시키며 *E. faecalis* MD366의 균체(10<sup>9</sup> CFU)를 생리식염수(0.9%)에 희석하여 경구투여한 군(G, n=6)으로 구분하였다.

물과 사료는 자유로이 섭취시켰으며, A군과 B군에는 생리식염수를, 나머지 군은 각각의 균 희석 액을 하루에 한번씩 경구투여 하였다(2.5 µg/g bodyweight).

시험군은 고지방식이로 6주간 비만을 유도하였고, 실험에 사용된 고지방식은 34.3%의 지방, 27.3%의 탄수화물, 34.3%의 단백질로 구성되어 5.1 kcal/g의 열량을 내며, 정상식은 4.2%의 지방, 64.7%의 탄수화물, 18.6%의 단백질로 구성되어 3.7 kcal/g의 열량을 낸다. 자세한 조성비는 Table 4와 같다. 본 연구에서의 모든 동물실험은 서울대학교 의과대학 실험동물운영위원회(Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC)의 승인 하에 수행하였다.

Table 4. The Formula of normal diet and high fat diet

Formula	g/kg	
	Normal diet	High fat diet
Casein	210.0	265.0
L-Cystine	3.0	4.0
Maltodextrin	50.0	160.0
Sucrose	325.0	90.0
Lard	20.0	310.0
Soybean Oil	20.0	30.0
Cellulose	37.15	65.5
Mineral Mix, AIN-93G-MX(94046)	35.0	48.0
Calcium Phosphate, dibasic	2.0	3.4
Vitamin Mix, AIN-93-VX(94047)	15.0	21.0
Choline Bitartrate	2.75	3.0
Food Color	0.1	0.1

#### 다. 균총분석

분변시료는 균총을 분석하기 위하여 첫날과 6주 마지막날에 수집하였고, DNA 추출하기 전에  $-80^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다. 미생물 함량을 분석하기 위하여 genomic DNA는 제조자의 지시에 따라 G-spin<sup>TM</sup> Genomic DNA Extraction Kit(iNtRON Biotechnology, Seoul, Korea)를 사용하여 모든 쥐의 분변시료로부터 추출하였다. 추출된 DNA는 bacterial 16S rRNA gene의 V1에서 V3 hyper-variable regions을 타겟 primer (V1-9F: 5'-X-AC-GAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' and V3-541R: 5'-X-AC-WTTACCGCGGCTGCTGG-3')을 사용하여 증폭하였다. 본 연구에서는 7-11까지 base pairs의 바코드를 사용하였다. 16S rRNA genes을 증폭하기 위하여 PCR은 universal primer 8F와 338R로 수행하였다. 증폭과정은 PE2400 thermal cycler (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA)를 이용하여  $95^{\circ}\text{C}$ , 120초를 한 후  $95^{\circ}\text{C}$ , 20초;  $58^{\circ}\text{C}$ , 30초;  $72^{\circ}\text{C}$ , 30초를 35회 시행하였으며,  $72^{\circ}\text{C}$ , 10분으로 마무리 하였다. 서열 분석은 PCR product를 QIA Quick PCR Purification kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA)로 purify한 후 샷건 시퀀싱 표준 시약과 Genome Sequencer FLX (Roche, New Jersey, USA)을 이용하여 분석하였다. Pyrosequencing된 16s rDNA 조각의 길이는 118 부터 528 base pairs, 평균 길이는 472 base pairs이며, Pyrosequencing 데이터는 ERP000935 번호의 EMBL SRA database에서 분석하였다.

#### 라. 체내 지방흡수 저해효과

sprague-dawley 종 수컷 1마리 당 올리브기름 0.5 mL와 발효유 2.0 mL를 경구투여 한 후 1시간 간격으로 안와채혈법으로 5시간까지 채혈하였다. 대조군은 발효유 대신에 증류수를 투여하였다. 채혈한 혈액은 3,000 rpm에서 15분간 원심분리 후 혈장을 분리하여 분석시료로 사용하였다. 분리한 혈청의 지질은 lipoprotein lipase를 이용한 분석키트로 550nm에서 비색정량하였다.

#### 마. 체중과 장기 무게 측정 및 혈액 분석

체중은 일주일에 한 번씩 같은 시각에 측정하였고 장기무게는 실험종료일 전 12시간 절식시킨 다음 안구에서 채혈 후, 경추 탈골하였다. 채혈한 다음 응고되는 것을 방지하기 위하여 응고방지 tube에 담아 ice bath에 20분 방치 하였다. 채혈시료는 3000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 혈청을 분리하고 실험에 사용하기 전까지 냉장보관 한 후, 녹십자(Yong-In, Korea)에 의뢰하여 분석하였다. 장기는 적출하여 생리식염수로 세척한 후 여과지로 수분을 제거하고 칭량하였다. 혈중지질(TG, HDL, LDL)과 혈중 단백질 농도, 간기능 수치(AST, ALT)는 녹십자분석실에 의뢰하여 분석하였다.

#### 바. 부고환 지방조직 세포의 크기 측정

부고환 지방세포의 크기를 측정하기 위해 Hirsch 와 Gallian (1968)의 방법에 따라 적출된 부고환 지방조직을 10% formalin으로 고정한 뒤 250  $\mu$ m의 나일론 필터에 통과시켜 섬유 조직과 작은 조직들을 제거한 후 PBS로 세척하여 완전히 제거하였다. 고정된 조직은 동결절편기를 이용하여 18  $\mu$ m으로 절편 하였으며, H&E (hematoxylin and eosin)지방 염색방법으로 지방세포를 염색하였다(van Goor 등, 1986). 염색 후 60% isopropanol을 이용하여 탈색한 뒤 현미경 하에서 디지털 카메라를 이용하여 이미지를 측정하였다. 지방세포의 크기 분석을 위해 Image J Software (National Institute of Health, Maryland, USA)을 이용하여 지방세포의 직경을 측정하였다.

### 8. 최적 배합조성물 개발 및 상업적 이용 위한 젯산균 분말화

#### 가. 이화학 성분분석

##### 1) 고형분

칭량관에 정제해사 15 g과 작은 유리봉을 넣고, 105 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C의 건조기(Ciculation



air cool sterilize oven, Seoul Scientific Co., Korea)에서 항량이 될 때 까지 건조한 다음 데시케이터에 방냉하여 무게를 잰 후 시료 약 4 g을 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  $\pm 1$  mg 이하가 될 때를 최종무게로 하였다.

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

W : 시료의 사용량(g)

W<sub>0</sub> : 칭량관의 무게(g)

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

## 2) 적정산도

시료를 철저히 혼합한 다음, 37 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C로 가온한 뒤 시료 9 g에 증류수 18 mL를 가하여 희석하고 1% 페놀프탈레인 용액 0.5 mL를 첨가한 다음 0.1N NaOH용액으로 30초간 분홍색이 지속될 때 까지 적정하였다.

0.1N NaOH용액 1mL = 0.009g 젖산

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

## 3) pH 측정

시료를 적당량 크기의 비커에 넣고 pH meter로 측정하였다.

## 4) 젖산균수

시료 11 g을 무균적으로 채취하여 99 mL 펌톤용액에 넣어 7초 동안 30cm 간격으로 25회 세게 흔들어 준 후 십진법으로 희석하고 BCP(Brom cresol purple) 평판측정용 배지에 희석시료를 넣어 35 $^{\circ}$ C에서 48시간 배양한 다음 발생한 황색의 집락을 젖산균의 집락으로 계측하였다.

## 5) 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

기타의견 :

#### 나. 젖산균 동결건조 분말화

산업용 동결건조 스타터 제조는 천안연암대학에 위탁하여 실행하였다.

##### 1) *Lactobacillus plantarum* Q180 배양조건

스타터를 대량 생산하는데 적합한 합성배지 조성비 실험으로서 실험실용 *Lactobacillus* MRS 배지와 가격이 저렴한 당밀을 탄소원으로 하는 산업용 성장배지를 조제하여 성장수준을 비교하였으며, 5 L Double fermenter(Ko-Biotech)를 이용하여 배양하였다. 생균수 측정은 일반적인 젖산균 측정용 BCP배지를 사용하여 집락을 출현시켰으며, 전형적인 yellow zone을 생성하는 집락을 계수하였다.

생균수로 *L. plantarum* Q180의 생육속도를 계산하고 3,500rpm (Domo co., Japan)으로 원심분리하여 배지에서 배양한 젖산균의 세포를 회수하였다.

##### 2) 동결건조 스타터 개발

*L. plantarum* Q180을 3회 이상 계대배양을 통하여 활력을 회복시켰다. 대량 배양을 위하여 70 L bio-fermenter (Ko-Biotech Co.) 시스템에 MRS broth 50L를 121℃에서 15분간 멸균하고 38℃로 냉각한 후 *L. plantarum* Q180을 18시간 배양한 *Lactobacillus* MRS broth 500 mL를 멸균상태 하에 발효탱크에 접종하였다. Fermenter의 배양온도는 38±0.5℃로 조정하였고, 배지는 40rpm의 속도로 완만하게 교반하였다. 배양 중 배지에 산소의 공급은 하지 않았다. 2.0 NaOH 또는 1N KOH 용액을 멸균된 reservoir에 채워서 배지의 pH가 5.60 이상 유지되도록 하였다.

*L. plantarum* Q180을 배양 24시간 때에 세포를 회수하였다. 70L Bio-fermenter에서 배양 24시간 때에 온도를 12℃로 냉각하여 배양을 종료한 후 70% 알코올 용액으로 살균 처리한 원심분리용 저장탱크에 이송하였다. 세포회수에는 균체 세포회수용 원심분리기 (Domo Co. Japan)를 사용하여 cell pellet으로 농축하였다. -50℃로 동결하는 중 세포 원형질 이탈에 의한 사멸률을 줄이고 생존률을 높이기 위하여 동결보호제를 처리하였다. 동결보호제로서 일반 탈지분유(SMP)와 특수조제 분말(SIFMP)을 선정하여 Table 5와 같이 혼합하여 121℃에서 5분간 멸균하여 냉각하였다.

동결건조한 *L. plantarum* Q180 스타터 분말을 4℃의 냉장온도에서 보관하면서 4주, 8주 후 꺼내어 MRS agar plate에서 생균수를 측정하여 보존성을 조사하였다.

Table 5. The confrication condition of *Lactobacillus plantarum* Q180 culture

스타터 명	Cell Paste	동결보호제	첨가량	
			MRS broth	SMP/SIFMP
FD-A	53.25g	New MRS+SMP	32mL	58.2g
FD-LPL	53.25g	New MRS+SIFMP	32mL	58.2g

3) 요구르트 배양 및 저장 중 변화

Table 6과 같이 요구르트 발효 균주로서 CHR HANSEN사의 ABT-4 스타터와 *L. plantarum* Q180 동결건조 분말을 중량대비 50:50 비율로 혼합한 것과 각각의 균주를 요구르트 배합액에 접종하였다. 발효액의 조제는 Table 7과 같이 하였으며, Table 8과 같은 공정을 거쳐 제조하였다. 제조된 총 3종의 요구르트 베이스 또는 과즙을 첨가한 요구르트 시료를 멸균 플레이트에 넣고 BCP 한천배지를 pouring 하였을 때 24시간 후에 출현하는 전형적인 집락의 수로 측정하였다.

Table 6. Treatment of strain for yogurt fermentation

처리구	접종비율 (배양액,%)	접종량	
		시료A	시료B
<i>L. palntarum</i> Q180 단독 첨가	0.1	0.92g	1.00g
ABT-4 균주 단독첨가	0.1	0.95g	0.97g
혼합 첨가	0.1	0.49g+0.54g	0.51g+0.54g

Table 7. Compound of fermented solution

발효액 제조				
	재료명	투입비율(%)	첨가량	
	우유	95.0	950	
	탈지분유(SIMP)	4.9	49.9	
	유산균 분말	0.1	0.1	
	계	100	1,000	
조제순서				
발효액조제 : 65℃ 가온한 우유 200 mL에 탈지분유 50g을 첨가하여 용해시킨 후 750 mL의 우유를 첨가한다.				
열처리 : 121℃에서 2분간 열처리를 한다.				
유산균분말 : 3개 처리구를 준비하여 각각 0.1%량 접종한다. CHR HANSEN사의 ABT-4 스타터 단독				

<i>L. plantarum</i> Q180(LPL) 동결건조 분말과 ABT-4 스타터 1:1로 혼합 <i>L. plantarum</i> Q180 동결건조 분말 단독				
배양 : 38℃에서 12~18시간 배양한다.				
시럽 혼합 : 요구르트 배양액에 아래의 성분표와 같이 당류 및 정제수를 첨가한다.				
<b>시럽의 조제</b>				
	<b>재료명</b>	<b>투입량(%)</b>	<b>첨가량</b>	
	올리고당	5.9	42/700	
	물엿	2.4	17/700	
	잼류	9.5	66/700	
	정제수	1.2	8.5/700	
	계	19	132.5g	

Table 8. Yogurt manufacturing

제조 단계			제조 내용	
전처리	원료혼합		19:00	
	균질	압력		
		시간		
	가온	시작	19:00	
		종료	19:28	
	살균 및 냉각	살균	시작	19:28
종료			19:45	17분
냉각		시작	19:48	38℃
		종료	20:05	17분
스타터		종류	3종류	동결건조 LPL 스타터, ABT-4, 두 균주 혼합 배양
		시간	20:05	
교반		시작	20:05	5분
		종료	20:10	
배양	배양	시작	20:10	ABT-4, 혼합18시간
		종료	(+1일)14:10	LPL스타터 18시간

후처리	냉각저장	시작	14:10	배양 종료 후 3°C 냉장고
		종료	(+1일)11:00	
	충진	시작		미 실시
		종료		

## 9. 비만억제 작용기작 규명

Western blotting 방법은 Rhye 등(2014)의 방법을 약간 변형하여 사용하였다. 지방산산화에 관여하는 PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$ 의 mRNA 발현차이 비교하기 위하여 적정량의 단백질을 10~12% sodium dodecyl sulfate (SDS)-PAGE에 분리한 후, PVDF membrane으로 전이시켰다. 단백질 전이된 membrane을 5% skim milk를 처리하여 비특이적인 단백질에 대한 blocking을 실시하고, C/EBP $\alpha$ , PPAR $\gamma$ ,  $\beta$ -actin 단백질 항체를 4°C에서 하룻밤 각각 반응 처리하였다. TBS-T로 세척한 후에 각각의 단백질 항체에 알맞은 2차 항체로 반응 하여 ECL 시약을 처리하여 X-ray film에 감광시켜 타겟 단백질 발현량을 관찰하였다.

## 10. 동물모델을 이용한 발효유의 비만억제 효능평가

### 가. 실험동물 및 식이

생후 7주령 된 Sprague-Dawley계 숫컷 흰쥐(200~230 g)를 (주)한림실험동물(Seoul, Korea)에서 분양 받아 사용하였다. 사육온도는 22±2°C, 습도는 50±5%, 명암주기는 12시간으로 조절하였고, 1주일간 실험환경에 적응시킨 후 물과 실험식이 (Table 4)는 자유롭게 섭취하도록 하였다. 실험군은 총 6군으로 A군을 제외한 나머지 5군은 고지방식이로 비만을 유도하였으며, 8주간 일정시간에 300 mL/성인 체중 60kg (= 1 mL/200g rat)을 1일 기준으로 경구투여 하였다. 그룹은 생리식염수를 경구투여한 일반식이 대조군(A), 생리식염수를 경구투여 한 고지방식이 대조군(B), 상업균주인 ABT-3 (CHR HANSEN)균주와 *Lactobacillus plantarum* Q180 균주를 혼합배양한 발효유를 경구투여한 군(C), ABT-3균주와 *Lactobacillus plantarum* Q180 균주를 혼합배양하고 가르시니아 캄보지아를 첨가한 발효유를 경구투여한 군(D), *Lactobacillus plantarum* Q180를 이용한 발효유를 경구투여한 군(E), *Lactobacillus plantarum* Q180로 배양하고 가르시니아 캄보지아를 첨가한 발효유를 경구투여한 군(F)으로 나누었으며 군 당 6마리의 실험동물을 사용하였다.

#### 나. 체중, 식이섭취량 및 식이효율

체중은 일주일에 한 번씩 같은 시각에 측정하였고, 실험 식이는 자유롭게 섭취하도록 하면서 일주일간의 식이섭취량을 측정하였다. 식이효율(FER)은 체중증가량과 식이섭취량으로부터 아래의 식으로 계산하였다.

$$\text{FER} = \text{Weight gain(g)}/\text{Food intake(g)} \times 100$$

#### 다. 혈액 분석 및 장기 무게 측정

장기무게는 실험종료일 전 12시간 절식시킨 다음 안구에서 채혈 후, 경추 탈골하였다. 채혈한 다음 응고되는 것을 방지하기 위하여 응고방지 tube에 담아 ice bath에 20분 방치 하였다. 채혈시료는 3000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 혈청을 분리하고 실험에 사용하기 전까지 냉장보관 하였다. 간, 신장, 비장, 부고환지방, 내장지방, 신장지방은 적출하여 생리식염수로 세척한 후 여과지로 수분을 제거하고 칭량하였다. 혈중지질(TG, HDL, LDL)과 혈중 단백질 농도, 간기능 수치(AST, ALT)는 녹십자분석실에 의뢰하여 분석하였다. 혈청 중 leptin과 adiponectin은 R&D system 사 (R&D system, Minnesota, USA)의 quantikine ELISA kit를 이용하여 제조사에서 제시한 방법에 따라 분석하였다. Adiponectin의 검출범위는 0.062~4 ng/mL이었으며, leptine의 검출범위는 0.156~10 ng/mL이었다.

### 11. 통계처리

본 연구의 실험 결과는 실험군당 평균과 표준편차를 계산하였고, SAS V8 프로그램 (SAS Institute INC., Cary, USA)을 이용하여 one-way ANOVA를 실시한 후  $p < 0.05$  수준에서 Duncan's multiple range test에 의하여 각 실험군의 평균치간의 유의성을 검정하였다.

## 제 3 절 연구결과 및 고찰

### 1. 젖산균 분리 및 수집

#### 가. 원유에서 젖산균 분리

서울우유 중부, 남부, 서부지도소 관할 원유검사소(경기도 및 강원도 일부), 전북 축산시험연구소, 경북 가축위생시험소에서 지원받아 목장별 원유를 채취하여 MRS배지에서 Bromocresol purple과 sodium azide를 첨가한 plate에 smear한 후 37°C에서 48시간 배양한 다음 노란색 colony중 각기 다른 모양의 colony를 선별하였고 순수분리를 위해 MRS agar에 streaking하여 얻어진 colony를 triptic soy agar slant에 37°C에서 18시간 배양하여 1,222개의 균주를 분리하였다. 발효유에 적합한 균주를 분리하기 위해서는 skim milk를 응고시킬 수 있어야 하므로 10% 환원 탈지분유에 분리균주를 접종한 후 37°C에서 18시간 및 24시간 배양하였고, 이 때 응고된 균주가 598개 균주이었다.

#### 나. 신생아 분변에서 젖산균 분리

순천향병원 및 한강성심병원 산부인과 신생아실에서 지원받아 32명의 분변으로부터 분리하였다. 분변시료는 배변 즉시 3시간 이내에 미생물 시험을 실시하였다. bifidobacteria 분리는 채취된 분변을 균일하게 혼합한 후 혐기 희석액으로  $10^3 \sim 10^4$  cfu/mL 수준까지 희석한 후 미리 만들어 놓은 BS agar plate에 희석된 시료 100 $\mu$ l를 도말한 후 anaerobic jar에 gaspak을 넣고 37°C에서 3일간 혐기적으로 배양하였다. 분리된 bifidobacteria는 paraffin oil이 중층된 modified BL broth를 사용하여 37°C에서 18~24시간 배양하여 43개 균주를 보관하였다. 젖산균 분리는 modified MRS(glucose→lactose)에서 분리하였으며 다른 과정은 원유에서 분리한 방법과 동일하게 하여 86개 균주를 수집하였다.

#### 다. 성인 분변에서 젖산균 분리

한국식품연구원 직원 및 가족에서 지원받아 47명의 분변으로부터 분리하였다. 분변시료는 배변 즉시 paraffin oil이 중층된 modified Blood-Glucose-Liver (BL) broth가 담긴 15 mL의 멸균된 polypropylene tube에 넣어 실험실로 수송하여 12시간 이내에 미생물 시험을 실시하였다. 채취된 분변으로부터 bifidobacteria 분리 및 젖산균 분리는 신생아 분변과 동일한 실험방법으로 실시하여 bifidobacteria는 52개 균주를 수집, 보관하였고, 젖산균은 187개를 수집하였다(Table 9).



Table 9. Lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from raw milk and feces

Strains	Raw milk	feces	
		infant	adult
sample number	-	32	47
MRS media isolated strain	1,222	86	187
10% Skim Milk coagulation(24 h incubation)	598	-	-
Bifidobacteria strain	-	43	52

## 2. 비만억제능 균주 선발

원유와 분리한 균주 중 10% 환원 탈지유에서 37℃에서 24시간 배양하여 응고반응을 보인 598개와 분변에서 분리한 젖산균 273개, bifidobacteria균 95 균주에 대해 anti-lipase activity 실험을 실시하였다(Table 10~17).

Table 10. Skim milk coagulation and anti-lipase activity of strain isolated from the raw milk of middle Kyungki province

sample	skim milk coagulation		anti-lipase activity(%)	sample	skim milk coagulation		anti-lipase activity(%)
	18 h	24 h			18 h	24 h	
A-1		+	30.16	A-41			
A-2				A-42	+	+	57.25
A-3				A-43			
A-4				A-44		+	16.39
A-5	+	+	63.71	A-45			
A-6	+	+	62.09	A-46			
A-7				A-47	+	+	39.41
A-8	+	+	49.39	A-48	+	+	41.97
A-9		+	31.67	A-49	+	+	26.10
A-10				A-50	+	+	53.62
A-11				A-51			
A-12				A-52			
A-13		+	21.09	A-53		+	30.92
A-14				A-54			
A-15		+	30.46	A-55		+	17.46
A-16				A-56		+	29.51
A-17				A-57			
A-18		+	29.85	A-58			
A-19		+	36.47	A-59		+	21.20
A-20		+	28.44	A-60		+	22.48
A-21				A-61			
A-22				A-62			
A-23				A-63		+	30.58
A-24		+	23.21	A-64			
A-25				A-65			
A-26				A-66		+	10.28
A-27				A-67		+	27.11
A-28	+	+	61.42	A-68		+	13.67
A-29	+	+	64.68	A-69			
A-30				A-70			
A-31				A-71		+	30.27
A-32				A-72			
A-33		+	19.86	A-73			
A-34				A-74			
A-35		+	16.38	A-75	+	+	55.63
A-36				A-76			
A-37				A-77			
A-38	+	+	21.94	A-78		+	20.82
A-39				A-79			
A-40				A-80		+	22.37

sample	skim milk coagulation		anti-lipase activity(%)	sample	skim milk coagulation		anti-lipase activity(%)
	18 h	24 h			18 h	24 h	
A-81				A-121		+	30.84
A-82	+	+	23.52	A-122			
A-83	+	+	31.64	A-123		+	21.55
A-84		+	30.25	A-124		+	3.28
A-85	+	+	52.79	A-125		+	30.79
A-86	+	+	66.51	A-126			
A-87				A-127		+	26.04
A-88	+	+	51.71	A-128			
A-89	+	+	40.34	A-129			
A-90				A-130		+	22.07
A-91				A-131		+	19.74
A-92		+	5.21	A-132		+	16.00
A-93				A-133			
A-94		+	21.08	A-134			
A-95				A-135		+	9.05
A-96	+	+	22.30	A-136		+	3.00
A-97	+	+	47.89	A-137			
A-98	+	+	29.10	A-138		+	14.73
A-99	+	+	31.00	A-139			
A-100				A-140		+	19.08
A-101				A-141			
A-102	+	+	61.83	A-142			
A-103	+	+	63.49	A-143			
A-104	+	+	60.85	A-144			
A-105	+	+	41.02	A-145			
A-106	+	+	57.44	A-146	+	+	61.55
A-107	+	+	53.61	A-147	+	+	30.28
A-108				A-148			
A-109		+	19.43	A-149		+	12.66
A-110		+	10.52	A-150			
A-111				A-151		+	26.83
A-112				A-152			
A-113	+	+	55.29	A-153			
A-114		+	22.61	A-154	+	+	27.11
A-115				A-155	+	+	58.79
A-116				A-156	+	+	30.56
A-117	+	+	55.86	A-157			
A-118				A-158			
A-119		+	18.47	A-159			
A-120		+	10.94	A-160		+	27.08

sample	skim milk coagulation		anti-lipase activity(%)	sample	skim milk coagulation		anti-lipase activity(%)
	18 h	24 h			18 h	24 h	
A-161				A-201			
A-162				A-202		+	16.39
A-163		+	22.19	A-203			
A-164		+	16.08	A-204	+	+	40.32
A-165				A-205			
A-166		+	10.67	A-206			
A-167				A-207	+	+	20.94
A-168				A-208	+	+	53.09
A-169		+	13.13	A-209			
A-170		+	21.67	A-210		+	21.48
A-171				A-211		+	9.31
A-172		+	19.83	A-212			
A-173				A-213	+	+	56.59
A-174		+	20.94				
A-175		+	8.27				
A-176		+	19.47				
A-177		+	5.50				
A-178		+	16.73				
A-179							
A-180		+	22.26				
A-181							
A-182							
A-183							
A-184	+	+	58.10				
A-185		+	16.73				
A-186	+	+	31.02				
A-187							
A-188		+	20.31				
A-189		+	20.69				
A-190							
A-191							
A-192	+	+	65.23				
A-193							
A-194							
A-195		+	5.58				
A-196							
A-197							
A-198	+	+	57.25				
A-199							
A-200		+	40.31				

sample	skim milk coagulation		anti-lipase activity(%)	sample	skim milk coagulation		anti-lipase activity(%)
	18 h	24 h			18 h	24 h	
B-1				B-41	+	+	38.05
B-2	+	+	54.78	B-42			
B-3				B-43	+	+	54.73
B-4		+	17.08	B-44		+	30.28
B-5				B-45		+	58.19
B-6	+	+	54.77	B-46	+	+	40.29
B-7				B-47	+	+	36.07
B-8		+	48.62	B-48			
B-9	+	+	26.50	B-49		+	31.22
B-10	+	+	54.00	B-50			
B-11		+	56.55	B-51	+	+	25.39
B-12	+	+	40.29	B-52	+	+	30.30
B-13	+	+	36.05	B-53			
B-14	+	+	31.20	B-54		+	19.82
B-15		+	6.34	B-55			
B-16				B-56			
B-17	+	+	33.25	B-57	+	+	55.42
B-18		+	21.76	B-58			
B-19				B-59	+	+	50.45
B-20	+	+	57.34	B-60	+	+	41.23
B-21	+	+	41.80	B-61			
B-22				B-62			
B-23	+	+	59.83	B-63	+	+	52.83
B-24				B-64			
B-25				B-65			
B-26		+	30.59	B-66		+	16.08
B-27		+	21.22	B-67		+	21.69
B-28				B-68			
B-29				B-69			
B-30	+	+	59.02	B-70			
B-31	+	+	56.18	B-71		+	32.10
B-32		+	52.76	B-72			
B-33	+	+	31.29	B-73		+	22.96
B-34				B-74		+	13.21
B-35	+	+	52.95	B-75			
B-36				B-76			
B-37		+	30.92	B-77	+	+	28.45
B-38		+	57.84	B-78			
B-39				B-79	+	+	35.49
B-40	+	+	53.98	B-80	+	+	29.31

sample	skim milk coagulation		anti-lipase activity(%)	sample	skim milk coagulation		anti-lipase activity(%)
	18 h	24 h			18 h	24 h	
B-81	+	+	40.46	B-121		+	17.15
B-82		+	13.60	B-122		+	13.00
B-83	+	+	36.06	B-123			
B-84				B-124	+	+	21.03
B-85	+	+	39.00	B-125		+	19.35
B-86				B-126			
B-87				B-127		+	9.28
B-88	+	+	42.30	B-128			
B-89				B-129	+	+	33.10
B-90		+	31.33	B-130			
B-91				B-131			
B-92	+	+	54.45	B-132		+	20.76
B-93		+	11.08	B-133		+	30.18
B-94				B-134			
B-95				B-135	+	+	49.63
B-96		+	10.64	B-136			
B-97		+	11.95	B-137			
B-98		+	23.91	B-138	+	+	54.99
B-99				B-139		+	22.07
B-100		+	29.06	B-140	+	+	19.52
B-101				B-141			
B-102		+	9.37	B-142	+	+	56.31
B-103				B-143			
B-104				B-144		+	10.33
B-105		+	15.39	B-145			
B-106		+		B-146	+	+	29.54
B-107	+	+	47.96	B-147			
B-108				B-148		+	40.81
B-109				B-149			
B-110		+	10.28	B-150			
B-111				B-151	+	+	63.35
B-112				B-152			
B-113	+	+	28.30	B-153			
B-114				B-154		+	15.09
B-115	+	+	30.59	B-155			
B-116	+	+	29.10	B-156			
B-117				B-157			
B-118		+	22.05	B-158			
B-119				B-159	+	+	31.39
B-120		+	14.69	B-160			

sample	skim milk coagulation		anti-lipase activity(%)	sample	skim milk coagulation		anti-lipase activity(%)
	18 h	24 h			18 h	24 h	
B-161							
B-162		+	3.31				
B-163							
B-164							
B-165		+	5.54				
B-166		+	10.91				
B-167		+	22.47				
B-168							
B-169	+	+	60.99				
B-170							
B-171		+	20.67				
B-172							
B-173		+	20.64				
B-174							
B-175		+	19.88				
B-176		+	20.04				
B-177		+	15.76				
B-178							
B-179		+	5.31				
B-180							
B-181							
B-182	+	+	66.41				
B-183		+	33.99				
B-184							

Table 11. Skim milk coagulation and anti-lipase activity of strain isolated from the raw milk of western Kyungki province

sample	skim milk coagulation		anti-lipase activity(%)	sample	skim milk coagulation		anti-lipase activity(%)
	18 h	24 h			18 h	24 h	
C-1	+	+	58.27	C-41		+	22.07
C-2				C-42	+	+	31.13
C-3		+	16.73	C-43			
C-4				C-44			
C-5		+	16.21	C-45		+	29.40
C-6		+	24.85	C-46		+	17.08
C-7				C-47		+	25.37
C-8	+	+	41.07	C-48			
C-9				C-49		+	31.09
C-10		+	30.09	C-50		+	24.02
C-11				C-51			
C-12				C-52			
C-13	+	+	55.44	C-53			
C-14		+	40.18	C-54	+	+	54.27
C-15				C-55			
C-16				C-56		+	38.46
C-17		+	38.43	C-57			
C-18		+	10.22	C-58			
C-19		+	5.39	C-59	+	+	26.90
C-20				C-60			
C-21		+	21.27	C-61			
C-22				C-62			
C-23		+	26.17	C-63		+	31.47
C-24		+	22.04	C-64			
C-25				C-65		+	31.55
C-26		+	16.58	C-66			
C-27				C-67	+	+	33.13
C-28		+	5.11	C-68	+	+	61.32
C-29				C-69			
C-30				C-70		+	30.94
C-31	+	+	25.94	C-71			
C-32		+	13.41	C-72	+	+	54.14
C-33				C-73		+	21.22
C-34				C-74			
C-35		+	31.66	C-75		+	16.84
C-36		+	25.70	C-76			
C-37				C-77			
C-38				C-78	+	+	29.43
C-39	+	+	48.48	C-79			
C-40	+	+	61.97	C-80		+	14.06



sample	skim milk coagulation		anti-lipase activity(%)	sample	skim milk coagulation		anti-lipase activity(%)
	18 h	24 h			18 h	24 h	
C-81				C-121		+	10.94
C-82				C-122			
C-83	+	+	21.81	C-123			
C-84				C-124	+	+	16.26
C-85	+	+	70.07	C-125			
C-86				C-126	+	+	55.22
C-87		+	31.28	C-127			
C-88				C-128			
C-89				C-129		+	20.36
C-90	+	+	38.79	C-130			
C-91		+	22.06	C-131			
C-92	+	+	51.09	C-132		+	17.48
C-93				C-133			
C-94				C-134			
C-95				C-135		+	18.54
C-96		+	17.46	C-136			
C-97		+	19.47	C-137			
C-98		+	26.31	C-138	+	+	47.93
C-99				C-139		+	31.55
C-100				C-140			
C-101		+	14.57	C-141			
C-102				C-142			
C-103		+	22.68	C-143			
C-104				C-144			
C-105	+	+	17.56	C-145	+	+	22.68
C-106				C-146		+	37.94
C-107		+	15.62	C-147	+	+	34.43
C-108		+	29.73	C-148			
C-109				C-149		+	6.22
C-110		+	30.31	C-150			
C-111				C-151			
C-112		+	26.74	C-152	+	+	42.16
C-113				C-153			
C-114				C-154			
C-115				C-155		+	15.37
C-116		+	38.66	C-156			
C-117				C-157			
C-118				C-158			
C-119	+	+	38.57	C-159	+	+	29.43
C-120		+	22.04	C-160			

sample	skim milk coagulation		anti-lipase activity(%)	sample	skim milk coagulation		anti-lipase activity(%)
	18 h	24 h			18 h	24 h	
C-161	+	+	26.27	C-201		+	2.21
C-162				C-202			
C-163				C-203			
C-164		+	7.07	C-204	+	+	45.08
C-165				C-205			
C-166		+	31.08	C-206		+	16.00
C-167				C-207			
C-168				C-208	+	+	21.33
C-169	+	+	53.37	C-209	+	+	27.08
C-170				C-210			
C-171		+	19.82	C-211		+	22.71
C-172		+	22.64	C-212			
C-173				C-213			
C-174				C-214		+	25.46
C-175				C-215			
C-176	+	+	42.60				
C-177							
C-178	+	+	68.98				
C-179							
C-180		+	30.64				
C-181							
C-182							
C-183							
C-184		+	31.22				
C-185		+	14.36				
C-186							
C-187		+	21.52				
C-188							
C-189							
C-190							
C-191		+	5.31				
C-192		+	22.88				
C-193							
C-194							
C-195		+	13.61				
C-196		+	40.96				
C-197							
C-198							
C-199							
C-200		+	38.03				

Table 12. Skim milk coagulation and anti-lipase activity of strain isolated from the raw milk of Kyungsang province

sample	skim milk coagulation		anti-lipase activity(%)	sample	skim milk coagulation		anti-lipase activity(%)
	18 h	24 h			18 h	24 h	
D-1				D-41		+	19.81
D-2	+	+	23.75	D-42			
D-3				D-43			
D-4		+	31.58	D-44			
D-5		+	18.22	D-45	+	+	10.05
D-6				D-46			
D-7		+	22.94	D-47		+	37.64
D-8				D-48			
D-9				D-49	+	+	10.09
D-10		+	17.06	D-50			
D-11				D-51			
D-12		+	10.31	D-52			
D-13				D-53			
D-14	+	+	34.28	D-54		+	36.88
D-15				D-55			
D-16				D-56		+	22.06
D-17		+	19.11	D-57		+	29.37
D-18				D-58			
D-19		+	30.94	D-59			
D-20				D-60	+	+	10.36
D-21		+	10.37	D-61	+	+	29.52
D-22				D-62			
D-23				D-63			
D-24		+	22.25	D-64		+	14.55
D-25				D-65			
D-26	+	+	19.76	D-66			
D-27				D-67			
D-28	+	+	22.05	D-68		+	15.61
D-29	+	+	20.64	D-69			
D-30		+	38.99	D-70			
D-31				D-71			
D-32		+	16.67	D-72			
D-33		+	28.03	D-73		+	33.97
D-34				D-74			
D-35		+	21.05	D-75			
D-36				D-76			
D-37				D-77		+	10.31
D-38				D-78			
D-39	+	+	25.49	D-79	+	+	56.72
D-40				D-80			

sample	skim milk coagulation		anti-lipase activity(%)	sample	skim milk coagulation		anti-lipase activity(%)
	18 h	24 h			18 h	24 h	
D-81				D-121			
D-82				D-122	+	+	52.46
D-83		+	13.36	D-123	+	+	4.17
D-84		+	22.94	D-124			
D-85				D-125			
D-86				D-126			
D-87		+	27.73	D-127			
D-88				D-128			
D-89		+	5.31	D-129			
D-90		+	10.94	D-130		+	12.08
D-91				D-131		+	6.61
D-92				D-132			
D-93		+	41.00	D-133		+	31.94
D-94				D-134			
D-95		+	50.31	D-135	+	+	7.58
D-96				D-136	+	+	4.97
D-97				D-137			
D-98		+	22.97	D-138			
D-99				D-139			
D-100				D-140	+	+	34.56
D-101	+	+	4.17	D-141			
D-102				D-142	+	+	24.81
D-103	+	+	9.72	D-143	+	+	19.79
D-104	+	+	37.12	D-144	+	+	96.78
D-105				D-145			
D-106				D-146			
D-107		+	15.06	D-147	+	+	10.13
D-108				D-148			
D-109		+	16.35	D-149	+	+	4.17
D-110				D-150	+	+	5.87
D-111				D-151	+	+	39.39
D-112				D-152			
D-113				D-153			
D-114	+	+	31.53	D-154	+	+	9.66
D-115		+	15.72	D-155	+	+	14.49
D-116	+	+	22.54	D-156	+	+	5.09
D-117	+	+	8.71	D-157	+	+	50.76
D-118				D-158	+	+	35.23
D-119		+	16.94	D-159			
D-120				D-160		+	20.31

sample	skim milk coagulation		anti-lipase activity(%)	sample	skim milk coagulation		anti-lipase activity(%)
	18 h	24 h			18 h	24 h	
D-161	+	+	6.38	D-201	+	+	27.66
D-162		+	31.26	D-202		+	22.87
D-163				D-203		+	10.31
D-164				D-204			
D-165	+	+	38.83	D-205	+	+	18.34
D-166		+	27.06	D-206			
D-167				D-207			
D-168				D-208		+	20.65
D-169				D-209			
D-170				D-210			
D-171	+	+	4.98	D-211		+	24.81
D-172	+	+	6.72	D-212			
D-173				D-213		+	30.82
D-174	+	+	5.47	D-214			
D-175	+	+	39.02	D-215	+	+	62.31
D-176	+	+	21.69	D-216		+	22.68
D-177	+	+	18.18	D-217	+	+	50.90
D-178				D-218	+	+	59.37
D-179	+	+	4.45	D-219			
D-180	+	+	8.23	D-220	+	+	36.74
D-181				D-221		+	30.68
D-182	+	+	8.05	D-222			
D-183		+	4.21	D-223			
D-184				D-224			
D-185		+	31.64	D-225			
D-186				D-226		+	17.62
D-187				D-227		+	21.27
D-188		+	16.55	D-228			
D-189				D-229			
D-190				D-230			
D-191	+	+	31.25	D-231	+	+	46.21
D-192	+	+	17.94	D-232			
D-193	+	+	24.44	D-233		+	15.66
D-194	+	+	18.75	D-234			
D-195				D-235	+	+	19.37
D-196		+	16.29	D-236		+	22.74
D-197		+	26.38	D-237			
D-198				D-238	+	+	32.67
D-199				D-239	+	+	12.78
D-200		+	19.31	D-240	+	+	40.44

sample	skim milk coagulation		anti-lipase activity(%)	sample	skim milk coagulation		anti-lipase activity(%)
	18 h	24 h			18 h	24 h	
D-241				D-281			
D-242				D-282		+	33.15
D-243	+	+	59.66	D-283			
D-244	+	+	44.58	D-284			
D-245				D-285		+	29.74
D-246		+	28.33	D-286			
D-247				D-287			
D-248				D-288			
D-249	+	+	25.66	D-289	+	+	43.47
D-250	+	+	45.27	D-290	+	+	70.74
D-251		+	27.33	D-291			
D-252				D-292			
D-253	+	+	30.58	D-293	+	+	6.82
D-254				D-294			
D-255				D-295		+	18.05
D-256	+	+	7.90	D-296		+	21.77
D-257				D-297			
D-258	+	+	32.01	D-298			
D-259		+	27.45	D-299	+	+	16.58
D-260				D-300			
D-261	+	+	37.78	D-301			
D-262		+	21.36	D-302			
D-263				D-303		+	26.94
D-264	+	+	5.55	D-304			
D-265	+	+	58.64	D-305			
D-266				D-306	+	+	27.70
D-267		+	33.64	D-307			
D-268				D-308	+	+	4.21
D-269	+	+	15.91	D-309			
D-270		+		D-310	+	+	30.29
D-271				D-311		+	24.13
D-272				D-312			
D-273		+	28.60	D-313			
D-274		+	19.23	D-314		+	35.77
D-275				D-315		+	26.44
D-276				D-316			
D-277		+	17.64	D-317			
D-278				D-318			
D-279				D-319	+	+	22.31
D-280	+	+	60.08	D-320		+	17.95

sample	skim milk coagulation		anti-lipase activity(%)	sample	skim milk coagulation		anti-lipase activity(%)
	18 h	24 h			18 h	24 h	
D-321		+	22.75	D-361		+	17.00
D-322				D-362		+	16.08
D-323		+	34.06	D-363			
D-324		+	28.57	D-364	+	+	29.26
D-325				D-365			
D-326	+	+	26.48	D-366	+	+	65.03
D-327				D-367			
D-328		+	24.01	D-368			
D-329				D-369	+	+	62.29
D-330				D-370			
D-331		+	39.42	D-371		+	10.59
D-332				D-372		+	23.76
D-333	+	+	30.11	D-373			
D-334				D-374		+	22.84
D-335		+	19.82	D-375			
D-336				D-376		+	15.43
D-337				D-377			
D-338				D-378			
D-339				D-379		+	35.96
D-340		+	22.07	D-380			
D-341		+	10.94	D-381			
D-342				D-382		+	38.61
D-343				D-383			
D-344							
D-345							
D-346	+	+	10.38				
D-347	+	+	10.34				
D-348	+	+	26.17				
D-349		+	29.10				
D-350		+	6.94				
D-351							
D-352							
D-353							
D-354		+	31.48				
D-355							
D-356		+	22.67				
D-357							
D-358							
D-359	+	+	53.37				
D-360	+	+	15.06				

Table 13. Skim milk coagulation and anti-lipase activity of strain isolated from the raw milk of Junla province

sample	skim milk coagulation		anti-lipase activity(%)	sample	skim milk coagulation		anti-lipase activity(%)
	18 h	24 h			18 h	24 h	
E-1		+	28.33	E-41			
E-2				E-42	+	+	31.28
E-3				E-43			
E-4				E-44	+	+	18.62
E-5	+	+	69.31	E-45			
E-6				E-46			
E-7	+	+	15.62	E-47		+	40.32
E-8		+	30.37	E-48		+	13.29
E-9				E-49			
E-10				E-50			
E-11		+	29.84	E-51		+	18.57
E-12		+	15.09	E-52			
E-13				E-53		+	22.43
E-14				E-54			
E-15		+	15.44	E-55			
E-16	+	+	73.54	E-56	+	+	10.09
E-17				E-57			
E-18				E-58		+	11.65
E-19	+	+	18.13	E-59			
E-20				E-60			
E-21		+	30.64	E-61		+	27.34
E-22				E-62			
E-23				E-63			
E-24		+	22.71	E-64			
E-25		+	10.66	E-65		+	10.31
E-26				E-66			
E-27				E-67			
E-28		+	13.82	E-68			
E-29		+	26.72	E-69	+	+	9.09
E-30				E-70	+	+	5.82
E-31		+	22.89	E-71			
E-32				E-72			
E-33				E-73		+	28.74
E-34	+	+	19.50	E-74			
E-35				E-75		+	29.38
E-36		+	41.06	E-76			
E-37				E-77	+	+	1.89
E-38				E-78			
E-39		+	29.74	E-79			
E-40				E-80	+	+	8.43



sample	skim milk coagulation		anti-lipase activity(%)	sample	skim milk coagulation		anti-lipase activity(%)
	18 h	24 h			18 h	24 h	
E-81				E-121		+	46.67
E-82				E-122		+	31.33
E-83	+	+	8.81	E-123			
E-84	+	+	6.32	E-124		+	29.05
E-85				E-125			
E-86				E-126			
E-87		+	27.44	E-127		+	28.52
E-88				E-128		+	15.00
E-89		+	30.68	E-129			
E-90				E-130			
E-91				E-131			
E-92				E-132	+	+	17.10
E-93	+	+	6.39	E-133			
E-94	+	+	8.23	E-134	+	+	20.55
E-95				E-135		+	14.82
E-96				E-136			
E-97	+	+	21.99	E-137			
E-98		+	9.03	E-138		+	16.37
E-99				E-139			
E-100				E-140			
E-101		+	45.68	E-141			
E-102				E-142			
E-103	+	+	33.43	E-143			
E-104	+	+	35.63	E-144		+	19.84
E-105				E-145			
E-106				E-146		+	22.71
E-107	+	+	15.54	E-147			
E-108				E-148			
E-109	+	+	39.96	E-149	+	+	29.08
E-110				E-150			
E-111		+	17.43	E-151		+	19.65
E-112				E-152			
E-113				E-153			
E-114				E-154		+	34.82
E-115				E-155		+	28.56
E-116		+	25.99	E-156			
E-117		+	26.32	E-157			
E-118				E-158			
E-119		+	40.48	E-159		+	17.46
E-120				E-160	+	+	25.30

sample	skim milk coagulation		anti-lipase activity(%)	sample	skim milk coagulation		anti-lipase activity(%)
	18 h	24 h			18 h	24 h	
E-161		+	30.31	E-201	+	+	36.12
E-162				E-202		+	30.64
E-163				E-203		+	29.51
E-164		+	27.44	E-204			
E-165				E-205	+	+	15.90
E-166				E-206	+	+	26.02
E-167		+	18.64	E-207			
E-168				E-208			
E-169				E-209			
E-170		+	39.42	E-210			
E-171		+	28.66	E-211	+	+	18.07
E-172		+	35.94	E-212	+	+	29.01
E-173				E-213			
E-174				E-214			
E-175		+	30.17	E-215			
E-176				E-216	+	+	17.81
E-177				E-217	+	+	11.78
E-178				E-218		+	5.49
E-179	+	+	20.87	E-219			
E-180		+	18.69	E-220		+	11.84
E-181	+	+	17.88	E-221			
E-182				E-222			
E-183				E-223	+	+	9.44
E-184				E-224			
E-185	+	+	17.49	E-225			
E-186	+	+	18.72	E-226			
E-187	+	+	17.46	E-227	+	+	11.85
E-188	+	+	25.55				
E-189							
E-190		+	21.58				
E-191							
E-192		+	37.94				
E-193							
E-194	+	+	37.54				
E-195							
E-196	+	+	26.21				
E-197							
E-198							
E-199		+	21.67				
E-200		+	18.04				

Table 14. Anti-lipase activity of lactic acid bacteria isolated from adult feces

sample	anti-lipase activity(%)	sample	anti-lipase activity(%)	sample	anti-lipase activity(%)
F-1	23.47	F-41	27.38	F-81	53.26
F-2	35.9	F-42	30.29	F-82	54.86
F-3	26.82	F-43	26.91	F-83	52.53
F-4	25.78	F-44	5.06	F-84	46.73
F-5	42.72	F-45	30.62	F-85	49.75
F-6	44.91	F-46	24.33	F-86	42.44
F-7	21.35	F-47	29.51	F-87	35.84
F-8	10.68	F-48	8.35	F-88	41.01
F-9	9.31	F-49	27.41	F-89	40.93
F-10	43.01	F-50	16.96	F-90	43.87
F-11	40.63	F-51	21.54	F-91	41.40
F-12	39.94	F-52	35.30	F-92	30.82
F-13	65.80	F-53	33.47	F-93	29.26
F-14	6.56	F-54	22.95	F-94	13.32
F-15	40.29	F-55	46.65	F-95	9.05
F-16	59.80	F-56	52.85	F-96	25.16
F-17	47.82	F-57	14.38	F-97	10.13
F-18	29.25	F-58	42.47	F-98	21.54
F-19	45.95	F-59	33.31	F-99	44.02
F-20	41.01	F-60	34.43	F-100	9.74
F-21	27.06	F-61	29.05	F-101	30.88
F-22	68.01	F-62	23.07	F-102	52.04
F-23	3.46	F-63	20.14	F-103	8.32
F-24	73.12	F-64	26.13	F-104	6.56
F-25	38.09	F-65	22.81	F-105	30.89
F-26	42.56	F-66	10.05	F-106	20.96
F-27	2.06	F-67	41.50	F-107	10.75
F-28	5.68	F-68	45.70	F-108	40.99
F-29	21.16	F-69	50.98	F-109	54.59
F-30	40.24	F-70	55.83	F-110	40.45
F-31	33.90	F-71	49.90	F-111	24.87
F-32	15.20	F-72	47.67	F-112	23.22
F-33	10.13	F-73	50.41	F-113	68.16
F-34	9.61	F-74	53.61	F-114	8.71
F-35	32.19	F-75	50.52	F-115	30.29
F-36	5.07	F-76	49.84	F-116	19.87
F-37	16.34	F-77	48.41	F-117	8.79
F-38	15.27	F-78	52.12	F-118	28.97
F-39	20.55	F-79	55.20	F-119	30.24
F-40	19.64	F-80	51.49	F-120	13.29

sample	anti-lipase activity(%)	sample	anti-lipase activity(%)	sample	anti-lipase activity(%)
F-121	47.55	F-161	29.08		
F-122	35.67	F-162	27.71		
F-123	33.79	F-163	8.78		
F-124	8.62	F-164	54.45		
F-125	10.64	F-165	35.38		
F-126	25.68	F-166	29.77		
F-127	9.71	F-167	39.85		
F-128	18.73	F-168	20.04		
F-129	43.56	F-169	47.26		
F-130	60.92	F-170	39.20		
F-131	59.12	F-171	14.03		
F-132	29.11	F-172	32.24		
F-133	16.63	F-173	27.10		
F-134	56.55	F-174	40.57		
F-135	9.63	F-175	50.35		
F-136	10.90	F-176	42.83		
F-137	12.56	F-177	50.76		
F-138	38.77	F-178	55.02		
F-139	54.31	F-179	64.75		
F-140	20.77	F-180	83.60		
F-141	31.59	F-181	60.49		
F-142	27.45	F-182	48.54		
F-143	18.72	F-183	62.13		
F-144	9.84	F-184	54.37		
F-145	20.66	F-185	70.90		
F-146	39.79	F-186	58.33		
F-147	17.62	F-187	61.33		
F-148	24.59				
F-149	18.62				
F-150	22.21				
F-151	32.83				
F-152	48.93				
F-153	0.54				
F-154	10.29				
F-155	21.11				
F-156	29.78				
F-157	18.95				
F-158	32.27				
F-159	35.61				
F-160	26.63				

Table 15. Anti-lipase activity of lactic acid bacteria isolated from infant feces

sample	anti-lipase activity(%)	sample	anti-lipase activity(%)	sample	anti-lipase activity(%)
G-1	29.04	G-41	42.72	G-81	21.35
G-2	6.21	G-42	25.78	G-82	9.31
G-3	30.76	G-43	10.68	G-83	10.68
G-4	35.11	G-44	23.47	G-84	39.94
G-5	19.84	G-45	25.78	G-85	47.82
G-6	21.54	G-46	8.23	G-86	19.07
G-7	22.69	G-47	10.21		
G-8	18.41	G-48	29.25		
G-9	31.08	G-49	45.95		
G-10	27.55	G-50	33.97		
G-11	10.05	G-51	43.01		
G-12	46.17	G-52	35.63		
G-13	19.44	G-53	21.58		
G-14	22.08	G-54	29.64		
G-15	29.31	G-55	35.90		
G-16	34.08	G-56	30.58		
G-17	44.94	G-57	44.91		
G-18	55.55	G-58	19.28		
G-19	6.11	G-59	1.99		
G-20	21.76	G-60	26.82		
G-21	30.77	G-61	40.29		
G-22	16.05	G-62	21.22		
G-23	39.15	G-63	31.08		
G-24	10.06	G-64	55.44		
G-25	5.69	G-65	15.54		
G-26	31.18	G-66	19.49		
G-27	20.44	G-67	22.67		
G-28	19.67	G-68	44.91		
G-29	28.08	G-69	10.58		
G-30	20.13	G-70	59.80		
G-31	38.05	G-71	9.31		
G-32	19.27	G-72	30.47		
G-33	35.61	G-73	40.63		
G-34	42.71	G-74	43.01		
G-35	30.62	G-75	5.54		
G-36	42.72	G-76	6.38		
G-37	40.63	G-77	6.56		
G-38	6.39	G-78	21.06		
G-39	21.35	G-79	37.58		
G-40	33.43	G-80	39.96		

Table 16. Anti-lipase activity of Bifidobacteria strain isolated from adult feces

sample	anti-lipase activity(%)	sample	anti-lipase activity(%)
H-1	10.22	H-41	8.16
H-2	6.38	H-42	30.68
H-3	29.47	H-43	27.04
H-4	20.64	H-44	30.33
H-5	18.55	H-45	18.05
H-6	16.37	H-46	16.37
H-7	14.91	H-47	19.24
H-8	27.33	H-48	16.00
H-9	22.08	H-49	52.38
H-10	26.34	H-50	19.37
H-11	26.19	H-51	22.21
H-12	20.74	H-52	10.64
H-13	17.03		
H-14	15.64		
H-15	10.21		
H-16	17.93		
H-17	22.88		
H-18	23.07		
H-19	19.33		
H-20	15.41		
H-21	28.65		
H-22	6.41		
H-23	17.60		
H-24	23.99		
H-25	21.08		
H-26	10.31		
H-27	16.85		
H-28	13.96		
H-29	5.61		
H-30	39.74		
H-31	25.66		
H-32	49.38		
H-33	26.33		
H-34	17.04		
H-35	40.22		
H-36	5.38		
H-37	50.61		
H-38	22.75		
H-39	19.34		
H-40	21.86		

Table 17. Anti-lipase activity of Bifidobacteria strain isolated from infant feces

sample	anti-lipase activity(%)	sample	anti-lipase activity(%)
I-1	3.27	I-41	23.81
I-2	10.78	I-42	20.76
I-3	19.36	I-43	15.33
I-4	17.05		
I-5	29.34		
I-6	10.88		
I-7	14.02		
I-8	13.55		
I-9	29.34		
I-10	38.51		
I-11	50.05		
I-12	16.39		
I-13	15.24		
I-14	22.68		
I-15	10.81		
I-16	5.50		
I-17	19.64		
I-18	17.05		
I-19	14.33		
I-20	31.92		
I-21	49.28		
I-22	37.66		
I-23	31.05		
I-24	5.50		
I-25	36.84		
I-26	21.38		
I-27	22.39		
I-28	46.73		
I-29	40.21		
I-30	38.92		
I-31	9.05		
I-32	16.53		
I-33	17.35		
I-34	21.29		
I-35	18.62		
I-36	29.86		
I-37	30.57		
I-38	10.08		
I-39	26.03		
I-40	15.69		

lipase 억제활성 결과가 높은 12개 균주를 선발하여 3T3-L1 cell에 세포독성을 나타내는지 측정하기 위하여 MTT assay를 수행한 결과 12개 균주 모두 100ug/mL 농도수준 이하에서 세포의 생존력에 영향을 주지 않아 세포독성이 없는 것으로 나타났다( $p < 0.05$ )(Fig. 2).

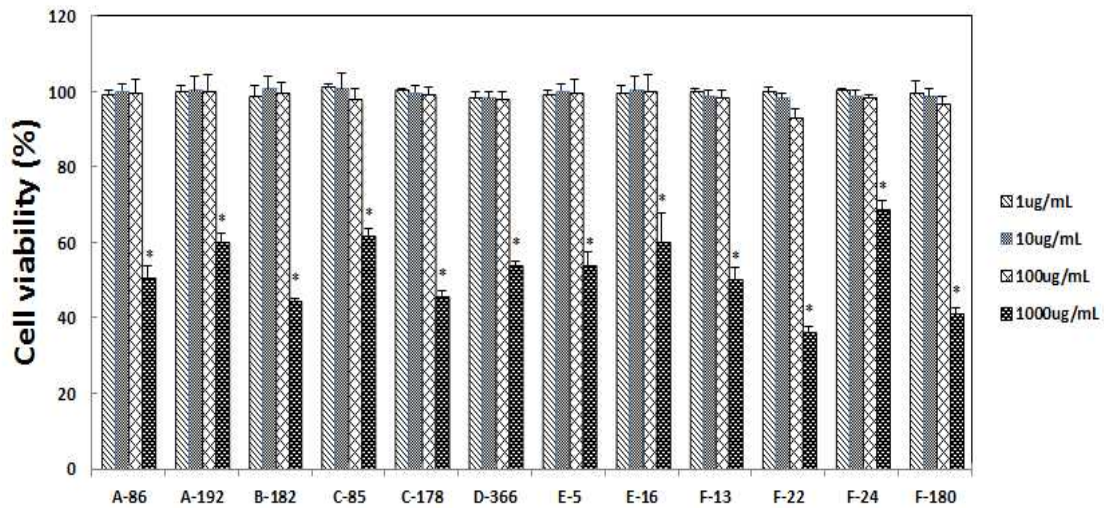


Fig. 2. The effects of 12 kinds of selected strains on proliferation of 3T3-L1 adipocytes

\* significant difference from control at  $p < 0.05$

3T3-L1 세포의 지방 분화시에 12개의 균주를 각각 10 ug/mL와 100 ug/mL의 농도로 처리하여 Anti-adipogenic activity를 실험한 결과 D-366균주가 10 ug/mL 농도로 첨가했을 시 8.16%, 100 ug/mL 농도로 첨가 시 27.36%로 지방분화억제 효과가 가장 높은 것으로 나타났고, 100 ug/mL 농도로 첨가 시 C-178 균주가 19.3%, F-180 균주가 14.63%, C-85 균주가 13.41%로 높게 나타났다. E-16균주의 경우 11.52%, A-192와 F-22 균주는 각각 10.51%, 10.78%로 control 대비 약 10% 정도의 지방분화 억제 효과를 보였고, A-86 균주와 B-182 균주는 6.62%와 3.08%의 지방분화율을 나타냈으며, 나머지 3 균주는 지방 분화 억제율을 보이지 않았다(Fig. 3). 본 결과로 볼 때 D-366, C-178, F-180, C-85, E-16, F-22, A-192, A-86 순으로 지방분화 억제율이 우수하였고 나머지 네 균주는 지방 분화 억제 효과가 없었다.



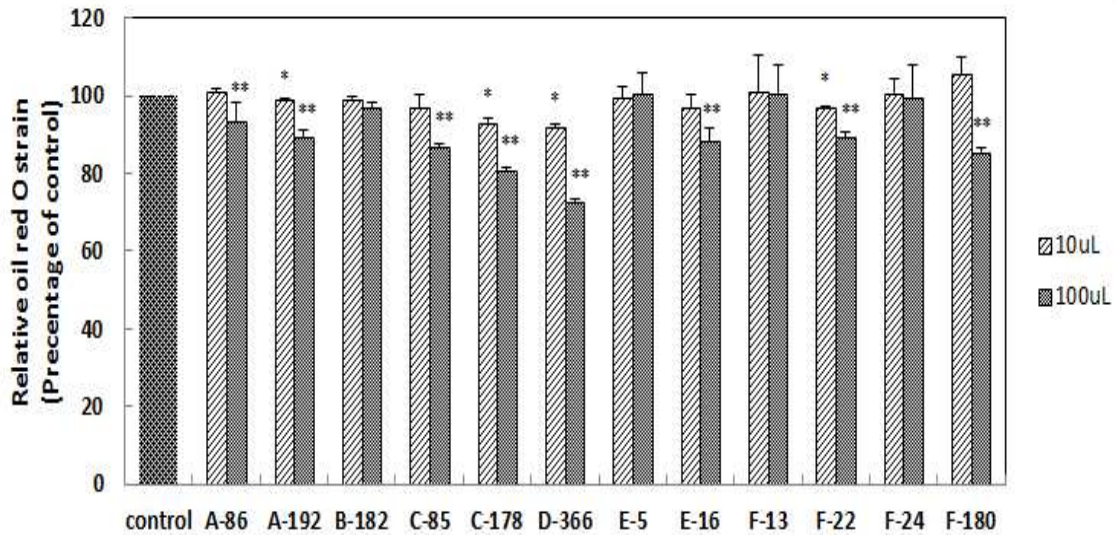


Fig. 3. Anti-adipogenic activity of 12 kinds of selected strains

\* significant difference from control at  $p < 0.05$

\*\* significant difference from the concentration of 10ug/mL at  $p < 0.05$

### 3. 선발 젖산균주 동정

비만억제능이 우수한 젖산균 12 균주의 genus와 species를 결정하기 위하여 생리적, 생화학적 시험을 하였다. 선발된 균주들은 공히 Gram 양성을 나타내었고 현미경으로 관찰 시 7종은 cocci 형태였고, 5종은 rod 형태이었으며, 산소유무와 상관 없이 잘 성장하였고, catalase와 운동성은 음성으로 나타났다. 또한 모든 균주가 15°C에서 성장하지 않았고, 8종이 45°C에서 성장하였으며, glucose와 arginine으로부터 각각 gas와 암모니아를 생성하지 않았다. 당 발효 시험은 간균일 경우 API 50 CHL kit(BioMereux, France)를 이용하였고, 구균일 경우 API 20 STREP kit를 이용하여 실시하였다(Table 18).

Table 18. Biochemical and physiological characteristics of lactic acid bacteria isolated from raw milk and feces.

strains	A86	A192	B182	C85	C178	D366	E5	E16	F13	F22	F24	F180
Gram stain	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cell morphology	cocci	cocci	rod	cocci	cocci	cocci	cocci	cocci	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	A86	A192	C85	C178	D366	E5	E16
Pyruvate	+	+	+	+	+	+	+
Hippurate	-	-	-	-	-	-	-
Esculin	+	+	+	+	+	+	+
Pyrrolidonyl 2 naphthylamide	+	+	+	+	+	+	+
6-Bromo-2-naphyl- $\alpha$ -D-glucuronate	-	-	-	-	-	-	-
Naphtol AS-BI $\beta$ -D-glucuronate	-	-	-	-	-	-	-
2-naphthyl- $\beta$ -D-galactopyranoside	-	+	-	+	-	-	-
2-naphthyl phosphate	-	-	-	-	-	-	-
L-leucine-2naphthylamide	+	+	+	+	+	+	+
Arginine	+	+	+	+	+	+	+
Ribose	+	+	+	+	+	+	+
L-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-
Mannitol	+	+	+	+	+	+	+
Sorbitol	+	-	+	-	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+	+	+
Trehalose	+	+	+	+	+	+	+
Inulin	-	-	-	-	-	-	-
Raffinose	-	-	-	-	-	-	-
Starch	+	-	+	-	+	+	+
Glycogen	-	-	-	-	-	-	-

**API50 CHL**

Strains	B 182	F13	F22	F24	F 180	Strains	B 182	F13	F22	F24	F 180
Control	-	-	-	-	-	Esculin ferric citrate	-	+	+	+	+
Glycerol	-	-	-	-	-	Salicin	-	+	+	+	+
Erythritol	-	-	-	-	-	D-Celiobiose	-	+	+	+	+
D-Arabinose	-	-	-	-	-	D-Maltose	+	+	+	+	+
L-Arabinose	-	+	+	+	+	D-Lactose	+	+	+	+	+
D-Ribose	+	+	+	+	+	D-Melibiose	+	+	+	+	+
D-Xylose	-	+	+	+	-	D-Saccharose	+	+	+	+	+
L-Xylose	-	-	-	-	-	D-Trehalose	+	+	-	+	+
D-Adonitol	-	-	-	-	-	Inulin	-	-	-	-	-
Methyl-βD-Xylopyranoside	-	-	-	-	-	D-Melezitose	-	+	-	-	+
D-Galactose	+	+	+	+	+	D-Raffinose	+	-	-	+	+
D-Glucose	+	+	+	+	+	Amidon(starch)	-	-	-	-	-
D-Fructose	+	+	+	+	+	Glycogen	-	-	-	-	-
D-Mannose	+	+	+	+	+	Xylitol	-	-	-	-	-
L-Sorbose	-	-	-	-	-	Gentiobiose	-	+	+	+	+
L-Rhamnose	-	-	-	+	-	D-Turanose	-	-	-	-	+
Dulcitol	-	-	-	-	-	D-Lyxose	-	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	-	D-Tagatose	-	+	+	-	-
D-Mannitol	+	+	+	+	+	D-Fucose	-	-	-	-	-
D-Sorbitol	-	+	+	-	+	L-Fucose	-	-	-	-	-
Methyl-αD-Mannopyranoside	-	+	+	-	+	D-Arabitol	-	-	-	-	-
Methyl-αD-Glucopyranoside	-	-	-	-	-	L-Arabitol	-	-	-	-	-
N-AcetylGlucosamine	-	+	+	+	+	potassium Gluconate	+	+	+	-	+
Amygdalin	-	+	+	+	+	potassium 2-KetoGluconate	-	-	+	-	-
Arbutin	-	+	+	+	+	potassium 5-KetoGluconate	-	-	-	-	-

16S rRNA 유전자 부분을 universal primer를 이용한 PCR로 증폭하여 서열분석 하였다. 분석된 염기서열을 그대로 이용하여 BLAST search한 결과(Table 19) 젓산균에 따라 99%의 상동성을 보였다.

Query	3	TAGGCGGCTGGCTCC-AAAAGGTTACCTCACCGACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGT	61
Sbjct	1451	 TAGGCGGCTGGCTCCAAAAGGTTACCTCACCGACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGT	1392
Query	62	GTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCGGGAACGTATTCACCGCGCGTGCTGATCCGCGAT	121
Sbjct	1391	 GTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCGGGAACGTATTCACCGCGCGTGCTGATCCGCGAT	1332
Query	122	TACTAGCGATTCCGGCTTCATGCAGGCGAGTTGCAGCCTGCAATCCGAAGTGAAGAGC	181
Sbjct	1331	 TACTAGCGATTCCGGCTTCATGCAGGCGAGTTGCAGCCTGCAATCCGAAGTGAAGAGC	1272
Query	182	TTTAAGAGATTTGCATGACCTCGCGGTCTAGCGACTCGTGTACTTCCCATTGTAGCACG	241
Sbjct	1271	 TTTAAGAGATTTGCATGACCTCGCGGTCTAGCGACTCGTGTACTTCCCATTGTAGCACG	1212
Query	242	TGTGTAGCCCCAGGTCAATAAGGGGCAATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTT	301
Sbjct	1211	 TGTGTAGCCCCAGGTCAATAAGGGGCAATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTT	1152
Query	302	TGTCACCGGCAGTCTCGCTAGAGTGCCCAACTAAATGATGGCAACTAACAAATAGGGTTG	361
Sbjct	1151	 TGTCACCGGCAGTCTCGCTAGAGTGCCCAACTAAATGATGGCAACTAACAAATAGGGTTG	1092
Query	362	CGCTCGTTGCGGGAACTGACCCCAACATCTCAGCAGCAGAGCTGACGACAACCATGCACC	421
Sbjct	1091	 CGCTCGTTGCGGGAA-CTTAAACCCCAACATCTCAGCAGCAGAGCTGACGACAACCATGCACC	1033
Query	422	ACCTGTCACCTTTGTCCCCGAAGGGAAAGCTCTATCTCTAGAGTGGTCAAAGGATGTCAAG	481
Sbjct	1032	 ACCTGTCACCTTTGTCCCCGAAGGGAAAGCTCTATCTCTAGAGTGGTCAAAGGATGTCAAG	973
Query	482	ACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGG	541
Sbjct	972	 ACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGG	913
Query	542	CCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAACCTTGCGGTGCTACTCCCAGGCGGAGTGTCTAA	601
Sbjct	912	 CCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAACCTTGCGGTGCTACTCCCAGGCGGAGTGTCTAA	853
Query	602	TGCGTTTGCTGCAGCACTGAAGGGGCGGAAACCCCTCCAACACTTAGCACTCATCGTTTACG	661
Sbjct	852	 TGCGTTTGCTGCAGCACTGAAGGGGCGGAAACCCCTCCAACACTTAGCACTCATCGTTTACG	793
Query	662	GCCTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTCGAGCCTCAGCGTCA	721
Sbjct	792	 GCCTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTCGAGCCTCAGCGTCA	733
Query	722	GTTACAGACCAGAGAGCCCGCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCATATATCTACGCATTTTAC	781
Sbjct	732	 GTTACAGACCAGAGAGCCCGCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCATATATCTACGCATTTTAC	673
Query	782	CGCTACACATGGAATTCCACTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTCTCCAGTTTCCAATGACC	841
Sbjct	672	 CGCTACACATGGAATTCCACTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTCTCCAGTTTCCAATGACC	613
Query	842	CTCCCCGGTTGAGCCGGGGCTTTTACATCAGACTTAAGAAACCGCTGCGCTCGCTTTA	901
Sbjct	612	 CTCCCCGGTTGAGCCGGGGCTTTTACATCAGACTTAAGAAACCGCTGCGCTCGCTTTA	553
Query	902	CGCCCAATAAATCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATATACCGCGGCTGCTGGCACGTA	961
Sbjct	552	 CGCCCAATAAATCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATATACCGCGGCTGCTGGCACGTA	494
Query	962	GTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGATACCGTCAGGGGACGTTCAAGTACTAACGTCCTTGT	1021
Sbjct	493	 GTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGATACCGTCAGGGGACGTTCAAGTACTAACGTCCTTGT	434
Query	1022	TCTTCTCTAAACAACAGAGTTTTACGATCCGAAAACCTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCTC	1081
Sbjct	433	 TCTTCTCTAAACAACAGAGTTTTACGATCCGAAAACCTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCTC	374
Query	1082	GGTCAGACTTTTCGTCCATTTGCCGAAGAATTCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGG	1141
Sbjct	373	 GGTCAGACTTTTCGTCCATTTGCCGAAGA-TTCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGG	315
Query	1142	CCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCCCTCTCAGGTCGGCTATGCATCGTGGCCTT	1201
Sbjct	314	 CCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCCCTCTCAGGTCGGCTATGCATCGTGGCCTT	255
Query	1202	GGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATGCACCGCGGGTCCATCCATCAGCGACACCC	1261
Sbjct	254	 GGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATGCACCGCGGGTCCATCCATCAGCGACACCC	195
Query	1262	GAAAGCGCCTTTCACTCTTATGCCATGCGGCATAAACTGTTATGCGGTTATGACACCTGT	1321
Sbjct	194	 GAAAGCGCCTTTCACTCTTATGCCATGCGGCATAAACTGTTATGCGGTTATGACACCTGT	135
Query	1322	TTCCAAGTGTTATCCCCCTCTGATGGGTAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTCGGCCA	1381
Sbjct	134	 TTCCAAGTGTTATCCCCCTCTGATGGGTAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTCGGCCA	75
Query	1382	CTCCTCTTTCCAATTGAGTGCAAGCACTCGGGAGGAAAGAAGCGTTCGACTGCATTATAG	1441
Sbjct	74	 CTCCTCTTTCCAATTGAGTGCAAGCACTCGGGAGGAAAGAAGCGTTCGACTGCATTATAG	15
Query	1442	C 1442	
Sbjct	14	 C 14	

Fig. 4. 16S rRNA sequencing of A-86 strain

Query	4	CACCTTAGGCGGCTGGCTCC-AAAAGGTTACCTCACCGACTTCGGGTGTTACAAACTCTC	62
Sbjct	1483	 CACCTTAGGCGGCTGGCTCCAAAAGGTTACCTCACCGACTTCGGGTGTTACAAACTCTC	1424
Query	63	GTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAAGGCCGGGAACGTAATTCACCGCGCGTGCTGATCC	122
Sbjct	1423	 GTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAAGGCCGGGAACGTAATTCACCGCGCGTGCTGATCC	1364
Query	123	GCGATTACTAGCGATTCGGGCTTCATGCAGGCGAGTGCAGCCTGCAATCCGAACTGAGA	182
Sbjct	1363	 GCGATTACTAGCGATTCGGGCTTCATGCAGGCGAGTGCAGCCTGCAATCCGAACTGAGA	1304
Query	183	GAAGCTTTAAGAGATTTGCATGACCTCGCGGTCTAGCGACTCGTTGTACTTCCCATTGTA	242
Sbjct	1303	 GAAGCTTTAAGAGATTTGCATGACCTCGCGGTCTAGCGACTCGTTGTACTTCCCATTGTA	1244
Query	243	GCACGTGTGTAGCCCAAGTCAATAAGGGGCA TGATGATTTGACGTCA TCCCCACCTT CCTC	302
Sbjct	1243	 GCACGTGTGTAGCCCAAGTCAATAAGGGGCA TGATGATTTGACGTCA TCCCCACCTT CCTC	1184
Query	303	CGGTTTGTACCGGCAGTCTCGCTAGAGTGCCCAACTAAATGATGGCAACTAACAA TAAG	362
Sbjct	1183	 CGGTTTGTACCGGCAGTCTCGCTAGAGTGCCCAACTAAATGATGGCAACTAACAA TAAG	1124
Query	363	GGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAAACCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAAACCATG	422
Sbjct	1123	 GGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAAACCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAAACCATG	1064
Query	423	CACCACCTGTCACTTTGTCCCCGAAGGGAAAGCTCTATCTCTAGAGTGGTCAAAGGATGT	482
Sbjct	1063	 CACCACCTGTCACTTTGTCCCCGAAGGGAAAGCTCTATCTCTAGAGTGGTCAAAGGATGT	1004
Query	483	CAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCCACATGCTCCACCGCTTGTG	542
Sbjct	1003	 CAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCCACATGCTCCACCGCTTGTG	944
Query	543	CGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAACCTTGCGGTGGTACTCCCAGGGCGGAGTGC	602
Sbjct	943	 CGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAACCTTGCGGTGGTACTCCCAGGGCGGAGTGC	884
Query	603	TTAATGCGTTTGTGTCAGCACTGAAGGGCGGAAACCCCTCCAACACTTAGCACTCATCGTT	662
Sbjct	883	 TTAATGCGTTTGTGTCAGCACTGAAGGGCGGAAACCCCTCCAACACTTAGCACTCATCGTT	824
Query	663	TACGGCGTGGACTACCAAGGATCTAATCCTGTTTGTCCCCACGCTTTCGAGCCTCAGC	722
Sbjct	823	 TACGGCGTGGACTACCAAGGATCTAATCCTGTTTGTCCCCACGCTTTCGAGCCTCAGC	764
Query	723	GTCAAGTACAGACCCAGAGAGCCGCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCATATATCTACGCATT	782
Sbjct	763	 GTCAAGTACAGACCCAGAGAGCCGCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCATATATCTACGCATT	704
Query	783	TCACCGCTACACATGGAATTCACCTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTCTCCAGTTTCCAAT	842
Sbjct	703	 TCACCGCTACACATGGAATTCACCTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTCTCCAGTTTCCAAT	644
Query	843	GACCCTCCCCGGTTGAGCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGCTCGC	902
Sbjct	643	 GACCCTCCCCGGTTGAGCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGCTCGC	584
Query	903	TTTACGCCCAATAAATCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTAATACCGCGGCTGCTGGCAC	962
Sbjct	583	 TTTACGCCCAATAAATCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTAATACCGCGGCTGCTGGCAC	524
Query	963	GTAGTTAGCCGTGGCTTCTGGTTAGATACCGTCAGGGGACGTTCAAGTACTAACGTCCT	1022
Sbjct	523	 GTAGTTAGCCGTGGCTTCTGGTTAGATACCGTCAGGGGACGTTCAAGTACTAACGTCCT	464
Query	1023	TGTTCTTCTCTAACAAACAGAGTTTTACGATCCGAAAACCTTCTTCACTCACGCGGCGTGTG	1082
Sbjct	463	 TGTTCTTCTCTAACAAACAGAGTTTTACGATCCGAAAACCTTCTTCACTCACGCGGCGTGTG	404
Query	1083	CTCGGTCAGACTTTCGTCATTGCCGAAGATTCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTG	1142
Sbjct	403	 CTCGGTCAGACTTTCGTCATTGCCGAAGATTCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTG	344
Query	1143	GGCCGTGTCTCAGTCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCGGCTATGCATCGTGGCC	1202
Sbjct	343	 GGCCGTGTCTCAGTCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCGGCTATGCATCGTGGCC	284
Query	1203	TTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATGCACCGCGGGTCCATCCATCAGCGACAC	1262
Sbjct	283	 TTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATGCACCGCGGGTCCATCCATCAGCGACAC	224
Query	1263	CCGAAAGCGCCTTTCACCTCTTATGCCATGCGGCATAAACTGTTATGCGGATTTAGCACCT	1322
Sbjct	223	 CCGAAAGCGCCTTTCACCTCTTATGCCATGCGGCATAAACTGTTATGCGGATTTAGCACCT	164
Query	1323	GTTCCTCAAGTGTATCCCCCTCTGATGGGTAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTCGCGC	1382
Sbjct	163	 GTTCCTCAAGTGTATCCCCCTCTGATGGGTAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTCGCGC	104
Query	1383	CACTCCTCTTTCCAATTGAGTGCAAGCACTCGGGAGGAAAGAAGCGTTTCGACT-GCATGT	1441
Sbjct	103	 CACTCCTCTTTCCAATTGAGTGCAAGCACTCGGGAGGAAAGAAGCGTTTCGACTTGCATGT	44
Query	1442	ATAGCNCGCCCCC 1454	
Sbjct	43	 ATAGCNCGCCCCC 31	

Fig. 5. 16S rRNA sequencing of A-192 strain

Query	1	CTGTCACCATTAGGCGGCTGGCTCCTAAAAGGTTACCCACCGACTTTGGGTGTTACAAA	60
Sbjct	1478	CTGTCAACC-TTAGGCGGCTGGCTCCTAAAAGGTTACCCACCGACTTTGGGTGTTACAAA	1420
Query	61	CTCTCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTAATCACCGCGGCATGCT	120
Sbjct	1419	CTCTCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTAATCACCGCGGCATGCT	1360
Query	121	GATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCGTGCAGGCGAGTGCAGCCTGCAGTCCGAAC	180
Sbjct	1359	GATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCGTGCAGGCGAGTGCAGCCTGCAGTCCGAAC	1300
Query	181	TGAGAACGGTTTTAAGAGATTTGCTTGCCCTCGCGAGTTCGCGACTCGTTGTACCGTCCA	240
Sbjct	1299	TGAGAACGGTTTTAAGAGATTTGCTTGCCCTCGCGAGTTCGCGACTCGTTGTACCGTCCA	1240
Query	241	TTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGGCATGATGATCTGACGTCGTCCCCACCT	300
Sbjct	1239	TTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGGCATGATGATCTGACGTCGTCCCCACCT	1180
Query	301	TCCTCCGGTTTTGTACCCGCACTCTCACTAGAGTGCCCAACTTAATGCTGGCAACTAGTA	360
Sbjct	1179	TCCTCCGGTTTTGTACCCGCACTCTCACTAGAGTGCCCAACTTAATGCTGGCAACTAGTA	1120
Query	361	ACAAGGGTTGCGCTCGTTGGCGGGGAACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGA	420
Sbjct	1119	ACAAGGGTTGCGCTCGTT-GC-GGGA-CTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGA	1063
Query	421	CGACCATGCACCACTGTCAATTGCGTTCCCGAAGGAAACGCCCTATCTCTAGGGTTGGCG	480
Sbjct	1062	CGACCATGCACCACTGTCAATTGCGTTCCCGAAGGAAACGCCCTATCTCTAGGGTTGGCG	1003
Query	481	CAAGATGTCAAGACCTGGTAAGGGTCTTCGCGTAGCTTCGAATTAACCCACATGCTCCA	540
Sbjct	1002	CAAGATGTCAAGACCTGGTAA-GGTCTTCGCGTAGCTTCGAATTAACCCACATGCTCCA	944
Query	541	CCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTCAACCTTGCGGTGCTACTCCCCAG	600
Sbjct	943	CCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTCAACCTTGCGGTGCTACTCCCCAG	884
Query	601	GCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTCCGCACTGAAGGGCGGAAACCCCTCCAACACCTAGCA	660
Sbjct	883	GCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTCCGCACTGAAGGGCGGAAACCCCTCCAACACCTAGCA	824
Query	661	CTCATCGTTTTACGGCATGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTGCTACCCATGCTTTCG	720
Sbjct	823	CTCATCGTTTTACGGCATGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTGCTACCCATGCTTTCG	764
Query	721	AGTCTCAGCGTCAGTGCAGACCAAGGTAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTCTTCCATATAT	780
Sbjct	763	AGTCTCAGCGTCAGTGCAGACCAAGGTAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTCTTCCATATAT	704
Query	781	CTACGCATTCACCGCTACACATGGAGTTCACACTACCCTCTCTGCACTCAAGTTATCCA	840
Sbjct	703	CTACGCATTCACCGCTACACATGGAGTTCACACTACCCTCTCTGCACTCAAGTTATCCA	644
Query	841	GTTTTCCGATGCACTTCTCCGGTTAAGCCGAAGGCTTTCACATCAGACTTAGAAAAACCGCC	900
Sbjct	643	GTTTTCCGATGCACTTCTCCGGTTAAGCCGAAGGCTTTCACATCAGACTTAGAAAAACCGCC	584
Query	901	TGCACTCTCTTACGCCCAATAAATCCCGGATAACGCTTGCCACCTACGTAATACCGCGG	960
Sbjct	583	TGCACTCTCTTACGCCCAATAAATCC-GGATAACGCTTGCCACCTACGTAATACCGCGG	525
Query	961	GCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGACTTCTGGTTAAATACCGTCAACGTATGAACAGTT	1020
Sbjct	524	-CTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGACTTCTGGTTAAATACCGTCAACGTATGAACAGTT	466
Query	1021	ACTCTCATACGTGTTCTTCTTTAACAACAGAGCTTACGAGCCGAAACCCCTTCTTCACTC	1080
Sbjct	465	ACTCTCATACGTGTTCTTCTTTAACAACAGAGCTTACGAGCCGAAACCCCTTCTTCACTC	406
Query	1081	ACGCGGTGTTGCTCCATCAGGCTTGCGCCCATTTGTGGAAGATTCCTACTGCTGCCTCCC	1140
Sbjct	405	ACGCGGTGTTGCTCCATCAGGCTTGCGCCCATTTGTGGAAGATTCCTACTGCTGCCTCCC	346
Query	1141	GTAGGAGTATGGGCCGTGTCTCAGTCCCATTTGTGGCCGATCAGTCTCTCAACTCGGCTAT	1200
Sbjct	345	GTAGGAGTATGGGCCGTGTCTCAGTCCCATTTGTGGCCGATCAGTCTCTCAACTCGGCTAT	286
Query	1201	GCATCATCGCCTTGGTAGGCCGTTACCCACCAACAAGCTAATGCACCGCAGGTCCATCC	1260
Sbjct	285	GCATCATCGCCTTGGTAGGCCGTTACCCACCAACAAGCTAATGCACCGCAGGTCCATCC	226
Query	1261	AGAAGTGATAGCGAGAAGCCATCTTTAAGCGTTGTTTCATGCGAACAACGTTGTTATGCG	1320
Sbjct	225	AGAAGTGATAGCGAGAAGCCATCTTTAAGCGTTGTTTCATGCGAACAACGTTGTTATGCG	166
Query	1321	GTATTAGCATCTGTTTCCAAATGTTGTCCCCGCTTCTGGGCAGGTTACCTACGTGTTAC	1380
Sbjct	165	GTATTAGCATCTGTTTCCAAATGTTGTCCCCGCTTCTGGGCAGGTTACCTACGTGTTAC	106
Query	1381	TCACCCGTCGCGCACTCGTTGGCGACCAAAAATCAATCAGGTGCAAGCACCATCAATCAAT	1440
Sbjct	105	TCACCCGTCGCGCACTCGTTGGCGACCAAAAATCAATCAGGTGCAAGCACCATCAATCAAT	46
Query	1441	TGGGCCAACGCGT-CGACT-GCATGTATAGCAC	1471
Sbjct	45	TGGGCCAACGCGTTCGACTTGCATGTATAGCAC	13

Fig. 6. 16S rRNA sequencing of B-182 strain

Query	1	CTTAGGGCGGCTGGCTCC-AAAAGGTTACCTCACCGACTTCGGGTGTTACAAAACCTCTCGTG	59
Sbjct	1452	CTTAGGGCGGCTGGCTCCAAAAAGGTTACCTCACCGACTTCGGGTGTTACAAAACCTCTCGTG	1393
Query	60	GTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTACCAGCGGCGTGCTGATCCGCG	119
Sbjct	1392	GTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTACCAGCGGCGTGCTGATCCGCG	1333
Query	120	ATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGCAGGCGAGTTGCAGCCTGCAATCCGAACTGAGAGAA	179
Sbjct	1332	ATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGCAGGCGAGTTGCAGCCTGCAATCCGAACTGAGAGAA	1273
Query	180	GCTTTAAGAGATTTGCATGACCTCGCGGTCTAGCGACTCGTTGTACTTCCCATTTGTAGCA	239
Sbjct	1272	GCTTTAAGAGATTTGCATGACCTCGCGGTCTAGCGACTCGTTGTACTTCCCATTTGTAGCA	1213
Query	240	CGTGTGTAGCCAGGTCAATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCAATCCCCACCTTCCTCCGG	299
Sbjct	1212	CGTGTGTAGCCAGGTCAATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCAATCCCCACCTTCCTCCGG	1153
Query	300	TTTGTACCAGGCACTCGCTAGAGTGCCCAACTAAATGATGGCAACTAACAAATAAGGGT	359
Sbjct	1152	TTTGTACCAGGCACTCGCTAGAGTGCCCAACTAAATGATGGCAACTAACAAATAAGGGT	1093
Query	360	TGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCCATGC	419
Sbjct	1092	TGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCCATGC	1035
Query	420	ACCACCTGTCACTTTGTCCCGAAGGGAAAGCTCTATCTCTAGAGTGGTCAAAGGATGTCT	479
Sbjct	1034	ACCACCTGTCACTTTGTCCCGAAGGGAAAGCTCTATCTCTAGAGTGGTCAAAGGATGTCT	975
Query	480	AAGACCTGGTAAGGTTCCTTCGCGTTCGCTTCGAAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGC	539
Sbjct	974	AAGACCTGGTAAGGTTCCTTCGCGTTCGCTTCGAAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGC	915
Query	540	GGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAACCTTGCGGTTCGACTCCCCAGGCGGAGTGCT	599
Sbjct	914	GGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAACCTTGCGGTTCGACTCCCCAGGCGGAGTGCT	855
Query	600	TAATGCGTTTGCTGCAGCACTGAAGGGCGGAAACCCCTCCAACACTTAGCACTCATCGTTT	659
Sbjct	854	TAATGCGTTTGCTGCAGCACTGAAGGGCGGAAACCCCTCCAACACTTAGCACTCATCGTTT	795
Query	660	ACGGCGTGGACTACCAGGATCTAATCCTGTTCGCTCCCCACGCTTTCGAGCCTCAGCG	719
Sbjct	794	ACGGCGTGGACTACCAGGATCTAATCCTGTTCGCTCCCCACGCTTTCGAGCCTCAGCG	735
Query	720	TCAGTTACAGACCAGAGAGCCGCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCATATATCTACGCATTT	779
Sbjct	734	TCAGTTACAGACCAGAGAGCCGCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCATATATCTACGCATTT	675
Query	780	CACCGCTACACATGGAATTCACCTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTCTCCAGTTTCCAATG	839
Sbjct	674	CACCGCTACACATGGAATTCACCTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTCTCCAGTTTCCAATG	615
Query	840	ACCCTCCCCGTTGAGCCGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGCTCGCT	899
Sbjct	614	ACCCTCCCCGTTGAGCCGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGCTCGCT	555
Query	900	TTACGCCCAATAAATCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCAGCGGCTGCTGGCAG	959
Sbjct	554	TTACGCCCAATAAATCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCAGCGGCTGCTGGCAG	495
Query	960	TAGTTAGCCGTGGCTTCTGGTTAGATACCGTCAGGGGACGTTCACTTACTAACGTCCTT	1019
Sbjct	494	TAGTTAGCCGTGGCTTCTGGTTAGATACCGTCAGGGGACGTTCACTTACTAACGTCCTT	435
Query	1020	GTTCCTTCTCTAACAAACAGAGTTTACGATCCGAAAACCTTCTTCACTCAGCGGGCGTTGC	1079
Sbjct	434	GTTCCTTCTCTAACAAACAGAGTTTACGATCCGAAAACCTTCTTCACTCAGCGGGCGTTGC	375
Query	1080	TCGGTCAGACTTTTCGTCCATTGCCGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGG	1139
Sbjct	374	TCGGTCAGACTTTTCGTCCATTGCCGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGG	315
Query	1140	GCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCCCTCAGGTCGGCTATGCAATCGTGGCCT	1199
Sbjct	314	GCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCCCTCAGGTCGGCTATGCAATCGTGGCCT	255
Query	1200	TGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATGCACCGCGGGTCCATCCATCAGCGACACC	1259
Sbjct	254	TGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATGCACCGCGGGTCCATCCATCAGCGACACC	195
Query	1260	CGAAAGCGCCTTTCACTCTTATGCCATGCGGCATAAACTGTTATGCGGTATTAGCACCTG	1319
Sbjct	194	CGAAAGCGCCTTTCACTCTTATGCCATGCGGCATAAACTGTTATGCGGTATTAGCACCTG	135
Query	1320	TTTCCAAGTGTATCCCCCTCTGATGGGTAGGTACCCACGTGTACTCACCCGTCCGCC	1379
Sbjct	134	TTTCCAAGTGTATCCCCCTCTGATGGGTAGGTACCCACGTGTACTCACCCGTCCGCC	75
Query	1380	ACTCCTCTTTCCAATTGAGTGCAAGCACTCGGGAGGAAAGAAGCGTTCGACTGCATGTAT	1439
Sbjct	74	ACTCCTCTTTCCAATTGAGTGCAAGCACTCGGGAGGAAAGAAGCGTTCGACTGCATGTAT	15
Query	1440	AGC 1442	
Sbjct	14	AGC 12	

Fig. 7. 16S rRNA sequencing of C-85 strain



Query	10	CGGCG-GCT-ATA-ATGC-AGTCGAACGCTTCTTTTTCCACCGGAGCTTGCTCCACCGGA	65
Sbjct	1	CGGCGTGCTAATACATGCAAGTCGAACGCTTCTTTTTCCACCGGAGCTTGCTCCACCGGA	60
Query	66	AAAAGAGGAGTGGCGAACGGGTGAGTAAACACGTGGGTAACCTGCCCATCAGAAAGGGGATA	125
Sbjct	61	AAAAGAGGAGTGGCGAACGGGTGAGTAAACACGTGGGTAACCTGCCCATCAGAAAGGGGATA	120
Query	126	ACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAATCAAAACCGCATGGTTTTGATTTGAA	185
Sbjct	121	ACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAATCAAAACCGCATGGTTTTGATTTGAA	180
Query	186	AGGCGCTTTGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTA	245
Sbjct	181	AGGCGCTTTGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTA	240
Query	246	ACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTTGGGAC	305
Sbjct	241	ACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTTGGGAC	300
Query	306	TGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAA	365
Sbjct	301	TGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAA	360
Query	366	AGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTGT	425
Sbjct	361	AGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTGT	420
Query	426	TAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCC	485
Sbjct	421	TAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCC	480
Query	486	ACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTT	545
Sbjct	481	ACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTT	540
Query	546	ATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAA	605
Sbjct	541	ATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAA	600
Query	606	CCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCAT	665
Sbjct	601	CCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCAT	660
Query	666	GTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGG	725
Sbjct	661	GTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGG	720
Query	726	TCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTA	785
Sbjct	721	TCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTA	780
Query	786	GTCCACGCCGTAACCGATGAGTGCTAAGTGTTGGAGGGTTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAG	845
Sbjct	781	GTCCACGCCGTAACCGATGAGTGCTAAGTGTTGGAGGGTTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAG	840
Query	846	CTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATT	905
Sbjct	841	CTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATT	900
Query	906	GACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCT	965
Sbjct	901	GACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCT	960
Query	966	TACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTCCCCTTCGGGGGCAAAG	1025
Sbjct	961	TACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTCCCCTTCGGGGGCAAAG	1020
Query	1026	TGACAGGTGGTGATGGTTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCA	1085
Sbjct	1021	TGACAGGTGGTGATGGTTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCA	1080
Query	1086	-CGAGCGCAACCCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTAGTTGGGNACTCTAGCCAAGACTGC	1144
Sbjct	1081	ACGAGCGCAACCC-TTATTGTTAGTTGCCATCATTAGTTGGGCACTCTAGCAAGACTGC	1139
Query	1145	CGNNGACaa 1153	
Sbjct	1140	CGGTGACAA 1148	

Fig. 8. 16S rRNA sequencing of C-178 strain

Query	4	TAGGCGGCTGGCTCC-AAAAGGTTACCTCACCGACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGT	62
Sbjct	1452	TAGGCGGCTGGCTCCAAAAAGGTTACCTCACCGACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGT	1393
Query	63	GTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTACCGCGGCGTGCTGATCCGCGAT	122
Sbjct	1392	GTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTACCGCGGCGTGCTGATCCGCGAT	1333
Query	123	TACTAGCGATTCCGGCTTCATGCAGGCGAGTGCAGCCTGCAATCCGAACTGAGAGAAAGC	182
Sbjct	1332	TACTAGCGATTCCGGCTTCATGCAGGCGAGTGCAGCCTGCAATCCGAACTGAGAGAAAGC	1273
Query	183	TTTAAGAGATTTGCATGACCTCGCGGTCTAGCGACTCGTGTACTTCCCATTTGTAGCACG	242
Sbjct	1272	TTTAAGAGATTTGCATGACCTCGCGGTCTAGCGACTCGTGTACTTCCCATTTGTAGCACG	1213
Query	243	TGTGTAGCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCGGTT	302
Sbjct	1212	TGTGTAGCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCGGTT	1153
Query	303	TGTCACCGGCAGTCTCGCTAGAGTGCCCAACTAAATGATGGCAACTAACAAATAAGGGTTG	362
Sbjct	1152	TGTCACCGGCAGTCTCGCTAGAGTGCCCAACTAAATGATGGCAACTAACAAATAAGGGTTG	1093
Query	363	CGCTCGTTGCGGGACTTAACCCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACC	422
Sbjct	1092	CGCTCGTTGCGGGACTTAA-CCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACC	1034
Query	423	ACCTGTCACTTTGTCCCAAAAGGGAAGGCTCTATCTCTAGAGTGGTCAAAGGATGTCAAG	482
Sbjct	1033	ACCTGTCACTTTGTCCCAAAAGGGAAGGCTCTATCTCTAGAGTGGTCAAAGGATGTCAAG	974
Query	483	ACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGG	542
Sbjct	973	ACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGG	914
Query	543	CCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAACCTTGCAGTCTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAA	602
Sbjct	913	CCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAACCTTGCAGTCTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAA	854
Query	603	TGCGTTTGTGCAGCACTGAAGGGCGGAAACCCTCCAACACTTAGCACTCATCGTTTACG	662
Sbjct	853	TGCGTTTGTGCAGCACTGAAGGGCGGAAACCCTCCAACACTTAGCACTCATCGTTTACG	794
Query	663	GCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCACCGCTTTCGAGCCTCAGCGTCA	722
Sbjct	793	GCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCACCGCTTTCGAGCCTCAGCGTCA	734
Query	723	GTTACAGACCAGAGAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCATATATCTACGCATTTTAC	782
Sbjct	733	GTTACAGACCAGAGAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCATATATCTACGCATTTTAC	674
Query	783	CGCTACACATGGAATTCACCTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTCTCCAGTTTCCAATGACC	842
Sbjct	673	CGCTACACATGGAATTCACCTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTCTCCAGTTTCCAATGACC	614
Query	843	CTCCCCGGTTGAGCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGCTCGCTTTA	902
Sbjct	613	CTCCCCGGTTGAGCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGCTCGCTTTA	554
Query	903	CGCCCAATAAATCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAG	962
Sbjct	553	CGCCCAATAAATCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAG	494
Query	963	TTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGATACCGTCAGGGGACGTTTCACTTACTAACGTCCTTGT	1022
Sbjct	493	TTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGATACCGTCAGGGGACGTTTCACTTACTAACGTCCTTGT	434
Query	1023	CTTCTCTAACAAACAGAGTTTTACGATCCGAAAACCTTCTTCACTCACGCGGCGTGTCTCG	1082
Sbjct	433	CTTCTCTAACAAACAGAGTTTTACGATCCGAAAACCTTCTTCACTCACGCGGCGTGTCTCG	374
Query	1083	GTCAGACTTTCGTCCATTGCCGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCC	1142
Sbjct	373	GTCAGACTTTCGTCCATTGCCGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCC	314
Query	1143	GTGTCTCAGTCCAGTGTGGCCGATCACCCCTCTCAGGTGGCTATGCATCGTGGCCTTGG	1202
Sbjct	313	GTGTCTCAGTCCAGTGTGGCCGATCACCCCTCTCAGGTGGCTATGCATCGTGGCCTTGG	254
Query	1203	TGAGCCGTTACCTACCAACTAGCTAATGCACCGCGGGTCCATCCATCAGCGACACCCGA	1262
Sbjct	253	TGAGCCGTTACCTACCAACTAGCTAATGCACCGCGGGTCCATCCATCAGCGACACCCGA	194
Query	1263	AAGCGCCTTTCACTCTTATGCCATGCGGCATAAACTGTTATGCGGTATTAGCACCTGTTT	1322
Sbjct	193	AAGCGCCTTTCACTCTTATGCCATGCGGCATAAACTGTTATGCGGTATTAGCACCTGTTT	134
Query	1323	CCAAGTGTTATCCCCCTCTGATGGGTAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTCGCCACT	1382
Sbjct	133	CCAAGTGTTATCCCCCTCTGATGGGTAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTCGCCACT	74
Query	1383	CCTCTTTCCAAATTGAGTGCAAGCACTCGGGAGGAAAGAAGCGTTTCGACTTGCATGTAT	1440
Sbjct	73	CCTCTTTCCAAATTGAGTGCAAGCACTCGGGAGGAAAGAAGCGTTTCGACTTGCATGTAT	16

Fig. 9. 16S rRNA sequencing of D-366 strain

Query	1	CTTAGGGCGGCTGGCTCC-AAAAGGTTACCTCACCGACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTG	59
Sbjct	1449	CTTAGGGCGGCTGGCTCCAAAAAGGTTACCTCACCGACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTG	1390
Query	60	GTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAAACGTATTCACCGCGGCGTGCTGATCCGCG	119
Sbjct	1389	GTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAAACGTATTCACCGCGGCGTGCTGATCCGCG	1330
Query	120	ATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGCAGGCGAGTTGCAGCCTGCAATCCGAACTGAGAGAA	179
Sbjct	1329	ATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGCAGGCGAGTTGCAGCCTGCAATCCGAACTGAGAGAA	1270
Query	180	GCTTTAAGAGATTTGCATGACCTCGCGGTCTAGCGACTCGTTGTACTTCCCATTTGTAGCA	239
Sbjct	1269	GCTTTAAGAGATTTGCATGACCTCGCGGTCTAGCGACTCGTTGTACTTCCCATTTGTAGCA	1210
Query	240	CGTGTGTAGCCAGGTGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTATCCCCACCTTCCTCCGG	299
Sbjct	1209	CGTGTGTAGCCAGGTGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTATCCCCACCTTCCTCCGG	1150
Query	300	TTTGTACCAGGCACTCGCTAGAGTGCCTAACTAAATGATGGCAACTAACAAATAGGGT	359
Sbjct	1149	TTTGTACCAGGCACTCGCTAGAGTGCCTAACTAAATGATGGCAACTAACAAATAGGGT	1090
Query	360	TGCGCTCGTTGCGGGACTTAAACCCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCA	419
Sbjct	1089	TGCGCTCGTTGCGGGACTTAA-CCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCA	1031
Query	420	CCACCTGTCACTTTGTCCCCGAAGGGAAAGCTCTATCTCTAGAGTGGTCAAAGGATGTCA	479
Sbjct	1030	CCACCTGTCACTTTGTCCCCGAAGGGAAAGCTCTATCTCTAGAGTGGTCAAAGGATGTCA	971
Query	480	AGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTCGCTTCGAATTAACCCACATGCTCCACCGCTTGTGCG	539
Sbjct	970	AGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTCGCTTCGAATTAACCCACATGCTCCACCGCTTGTGCG	911
Query	540	GGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAACCTTGCAGTTCGCTACTCCCCAGGCGGAGTGCTT	599
Sbjct	910	GGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAACCTTGCAGTTCGCTACTCCCCAGGCGGAGTGCTT	851
Query	600	AATGCGTTTGTGCAGCACTGAAGGGCGGAAACCCCTCCAACACTTAGCACTCATCGTTTA	659
Sbjct	850	AATGCGTTTGTGCAGCACTGAAGGGCGGAAACCCCTCCAACACTTAGCACTCATCGTTTA	791
Query	660	CGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCCCGACGCTTCGAGCCTCAGCGT	719
Sbjct	790	CGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCCCGACGCTTCGAGCCTCAGCGT	731
Query	720	CAGTTACAGACCAGAGAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCATATATCTACGCATTTTC	779
Sbjct	730	CAGTTACAGACCAGAGAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCATATATCTACGCATTTTC	671
Query	780	ACCGCTACACATGGAATTCACCTCTCCTCTCTGCACCTCAAGTCTCCAGTTTCCAATGA	839
Sbjct	670	ACCGCTACACATGGAATTCACCTCTCCTCTCTGCACCTCAAGTCTCCAGTTTCCAATGA	611
Query	840	CCCTCCCCGGTTGAGCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGCTCGCTT	899
Sbjct	610	CCCTCCCCGGTTGAGCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGCTCGCTT	551
Query	900	TACGCCCAATAAATCCGGACAACGCTTGCCACCTACGATTAACCGCGCTGCTGGCACGT	959
Sbjct	550	TACGCCCAATAAATCCGGACAACGCTTGCCACCTACGATTAACCGCGCTGCTGGCACGT	491
Query	960	AGTTAGCCGTGGCTTCTGGTTAGATACCGTCAGGGGACGTTAGTTACTAACGTCCTTG	1019
Sbjct	490	AGTTAGCCGTGGCTTCTGGTTAGATACCGTCAGGGGACGTTAGTTACTAACGTCCTTG	431
Query	1020	TTCTTCTCTAACAAACAGAGTTTTACGATCCGAAAACCTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCT	1079
Sbjct	430	TTCTTCTCTAACAAACAGAGTTTTACGATCCGAAAACCTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCT	371
Query	1080	CGGTGAGACTTTCGTCCATTGCCGAAGATTCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGG	1139
Sbjct	370	CGGTGAGACTTTCGTCCATTGCCGAAGATTCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGG	311
Query	1140	CCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCCCTCTCAGGTCCGGCTATGCA TCGC-GGCCT	1198
Sbjct	310	CCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCCCTCTCAGGTCCGGCTATGCA TCGCTGGCCT	251
Query	1199	TGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATGCAACCGCGGTCCATCCATCAGCGACACC	1258
Sbjct	250	TGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATGCAACCGCGGTCCATCCATCAGCGACACC	191
Query	1259	CGAAAGCGCCTTTCACCTCTTATGCCATGCGGCATAAAGTGTATGCGGTATTAGCACCTG	1318
Sbjct	190	CGAAAGCGCCTTTCACCTCTTATGCCATGCGGCATAAAGTGTATGCGGTATTAGCACCTG	131
Query	1319	TTTCCAAGTGTATCCCCCTCTGATGGGTAGGTTACCCACGTGTACTCACCCGTCCGCC	1378
Sbjct	130	TTTCCAAGTGTATCCCCCTCTGATGGGTAGGTTACCCACGTGTACTCACCCGTCCGCC	71
Query	1379	ACTCCTCTTTCCAATTGAGTGCAAGCACTCGGGAGGAAAGAAAGCGTTCGACTTGCAT-TA	1437
Sbjct	70	ACTCCTCTTTCCAATTGAGTGCAAGCACTCGGGAGGAAAGAAAGCGTTCGACTTGCATGTA	11
Query	1438	T 1438	
Sbjct	10	T 10	

Fig. 10. 16S rRNA sequencing of E-5 strain

Query	1	CTTAGGCGGCTGGCTCC-AAAAGGTTACCTCACCGACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTG	59
Sbjct	1452	CTTAGGCGGCTGGCTCCAAAAGGTTACCTCACCGACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTG	1393
Query	60	GTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTTTCAACCGGGCGTGTGATCCGCG	119
Sbjct	1392	GTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTTTCAACCGGGCGTGTGATCCGCG	1333
Query	120	ATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGCAGGCGAGTTGCAGCCTGCAATCCGAACTGAGAGAA	179
Sbjct	1332	ATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGCAGGCGAGTTGCAGCCTGCAATCCGAACTGAGAGAA	1273
Query	180	GCTTTAAGAGATTTGCATGACCTCGCGGTCTAGCGACTCGTTGTACTTCCCATTTGTAGCA	239
Sbjct	1272	GCTTTAAGAGATTTGCATGACCTCGCGGTCTAGCGACTCGTTGTACTTCCCATTTGTAGCA	1213
Query	240	CGTGTGTAGCCAGGTCATAAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCCTCCGG	299
Sbjct	1212	CGTGTGTAGCCAGGTCATAAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCCTCCGG	1153
Query	300	TTTGTACCCGGCAGTCTCGTAGAGTGCCCAACTAAATGATGGCAACTAACAATAAGGGT	359
Sbjct	1152	TTTGTACCCGGCAGTCTCGTAGAGTGCCCAACTAAATGATGGCAACTAACAATAAGGGT	1093
Query	360	TGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCA	419
Sbjct	1092	TGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCA	1034
Query	420	CCACCTGTCACTTTGTCCCCGAAGGGAAAGCTCTATCTCTAGAGTGGTCAAAGGATGTCA	479
Sbjct	1033	CCACCTGTCACTTTGTCCCCGAAGGGAAAGCTCTATCTCTAGAGTGGTCAAAGGATGTCA	974
Query	480	AGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTGTCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCG	539
Sbjct	973	AGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTGTCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCG	914
Query	540	GGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAACCTTGCGGTGCTACTCCCCAGGCGGAGTGCTT	599
Sbjct	913	GGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAACCTTGCGGTGCTACTCCCCAGGCGGAGTGCTT	854
Query	600	AATGCGTTTGTGTCAGCACTGAAGGGCGGAAACCCCTCCAACACTTAGCACTCATCGTTTA	659
Sbjct	853	AATGCGTTTGTGTCAGCACTGAAGGGCGGAAACCCCTCCAACACTTAGCACTCATCGTTTA	794
Query	660	CGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCCCCACGCTTTCGAGCCTCAGCGT	719
Sbjct	793	CGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCCCCACGCTTTCGAGCCTCAGCGT	734
Query	720	CAGTTACAGACCAGAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCATATATCTACGCATTTTC	779
Sbjct	733	CAGTTACAGACCAGAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCATATATCTACGCATTTTC	674
Query	780	ACCGCTACACATGGAATTCACCTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTCTCCCAGTTTCCAATGA	839
Sbjct	673	ACCGCTACACATGGAATTCACCTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTCTCCCAGTTTCCAATGA	614
Query	840	CCCTCCCCGGTTGAGCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAAACCGCCTGCGCTCGCTT	899
Sbjct	613	CCCTCCCCGGTTGAGCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAAACCGCCTGCGCTCGCTT	554
Query	900	TACGCCCAATAAAATCCGGACAACGCTTGCCACCTACGATTAACCGCGGCTGCTGGCACGT	959
Sbjct	553	TACGCCCAATAAAATCCGGACAACGCTTGCCACCTACGATTAACCGCGGCTGCTGGCACGT	494
Query	960	AGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGATACCGTCAGGGGACGTTTCAAGTACTAACGTCCTTG	1019
Sbjct	493	AGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGATACCGTCAGGGGACGTTTCAAGTACTAACGTCCTTG	434
Query	1020	TTCTTCTCTAACAACAGAGTTTTACGATCCGAAAACCTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCT	1079
Sbjct	433	TTCTTCTCTAACAACAGAGTTTTACGATCCGAAAACCTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCT	374
Query	1080	CGGTGAGACTTTTCGTCCATTGCCGAAGATTCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGG	1139
Sbjct	373	CGGTGAGACTTTTCGTCCATTGCCGAAGATTCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGG	314
Query	1140	CCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCCCTCTCAGGTGCGCTATGCATCGCGGCCCTT	1199
Sbjct	313	CCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCCCTCTCAGGTGCGCTATGCATCGTGGCCCTT	254
Query	1200	GGTGAGCCGTTACCTACCAACTAGCTAATGCAACCGCGGGTCCATCCATCAGCGACACCC	1259
Sbjct	253	GGTGAGCCGTTACCTACCAACTAGCTAATGCAACCGCGGGTCCATCCATCAGCGACACCC	194
Query	1260	GAAAGCGCCTTCACTCTTATGCCATGCGGCATAAACTGTTATGCGGTATTAGCACCTGT	1319
Sbjct	193	GAAAGCGCCTTCACTCTTATGCCATGCGGCATAAACTGTTATGCGGTATTAGCACCTGT	134
Query	1320	TTCCAAGTGTATCCCCCTCTGATGGGTAGGTTACCCACGTGTACTACCCCGTCCGCCA	1379
Sbjct	133	TTCCAAGTGTATCCCCCTCTGATGGGTAGGTTACCCACGTGTACTACCCCGTCCGCCA	74
Query	1380	CTCCTCTTTCCAATTGAGTGCAAGCACTCGGGAGGAAAGAAGCGTTCGACTTGCAAT-TAT	1438
Sbjct	73	CTCCTCTTTCCAATTGAGTGCAAGCACTCGGGAGGAAAGAAGCGTTCGACTTGCAATGTAT	14

Fig. 11. 16S rRNA sequencing of E-16 strain

Query	1	TTAGACGGCTGGCTCCCGAAGGT TACCCACCGGCTTTGGGTGTTACAAACTCTCATGGT	60
Sbjct	1470	TTAGACGGCTGGCTCCCGAAGGT TACCCACCGGCTTTGGGTGTTACAAACTCTCATGGT	1411
Query	61	GTGACGGGGCGGTGTGTACAAGACCCGGGAACGTATTCACCGGGCGTGTGATCCGCGAT	120
Sbjct	1410	GTGACGGGGCGGTGTGTACAAGACCCGGGAACGTATTCACCGGGCGTGTGATCCGCGAT	1351
Query	121	TACTAGCGATTCCGACTTCA TGTAGGGCAGTTGCAGCCTACAA TCCGA ACTGAGACGTAC	180
Sbjct	1350	TACTAGCGATTCCGACTTCA TGTAGGGCAGTTGCAGCCTACAA TCCGA ACTGAGACGTAC	1291
Query	181	TTTAAAGATTAGCTCACCCCTCGCGGGT TGGCAACTCGT TGTATACGCCATTGTAGCAGC	240
Sbjct	1290	TTTAAAGATTAGCTCACCCCTCGCGGGT TGGCAACTCGT TGTATACGCCATTGTAGCAGC	1231
Query	241	TGTGTAGCCAGGT CATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTT	300
Sbjct	1230	TGTGTAGCCAGGT CATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTT	1171
Query	301	TGTACCGGCAGTCTCACTAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTAGTAA T AAGGGTTG	360
Sbjct	1170	TGTACCGGCAGTCTCACTAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTAGTAA T AAGGGTTG	1111
Query	361	CGCTCGTTGCGGGACTTAAACCAACA TCTCAGCACA CGAGCTGACGACAACCA TGCACCA	420
Sbjct	1110	CGCTCGTTGCGGGACTTAAACCAACA TCTCAGCACA CGAGCTGACGACAACCA TGCACCA	1051
Query	421	CCTGTACCTTGTCCCGAAGGGAACACTCCATCTCTGGAGTTGTCAAGGGATGTCAAGA	480
Sbjct	1050	CCTGTACCTTGTCCCGAAGGGAACACTCCATCTCTGGAGTTGTCAAGGGATGTCAAGA	991
Query	481	CCTGGTAAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAAACCCATGCTCCACCGCTTGTGCGGGT	540
Sbjct	990	CCTGGTAAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAAACCCATGCTCCACCGCTTGTGCGGGT	931
Query	541	CCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAACCTTTCGCGTTCGTACTCCCCAGGCGGAGTGTCTAAT	600
Sbjct	930	CCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAACCTTTCGCGTTCGTACTCCCCAGGCGGAGTGTCTAAT	871
Query	601	GCGTTAGCTGCGGCACTTAAAGGGCGGAAACCTCAAACACCTAGCACTCATCGTTTACGG	660
Sbjct	870	GCGTTAGCTGCGGCACTTAAAGGGCGGAAACCTCAAACACCTAGCACTCATCGTTTACGG	811
Query	661	TGTGGACTACGAGGTATCTAATCCTGTTTGTACCCACACTTTCGAGCCTCAACGTGAG	720
Sbjct	810	TGTGGACTACGAGGTATCTAATCCTGTTTGTACCCACACTTTCGAGCCTCAACGTGAG	751
Query	721	TTACAGTCCAGAAAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTCTTCCATATATCTACGCATTTACC	780
Sbjct	750	TTACAGTCCAGAAAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTCTTCCATATATCTACGCATTTACC	691
Query	781	GCTACACATGGAGTTCACCTTTCTCTACTGCACTCAAGTCA TCCAGTTTCCAAAGCAAT	840
Sbjct	690	GCTACACATGGAGTTCACCTTTCTCTACTGCACTCAAGTCA TCCAGTTTCCAAAGCAAT	631
Query	841	TCCTCAGTTGAGCTGAGGGCTTTCACCTCAGACTTAAATAACCGTCTGCGCTCGCTTTAC	900
Sbjct	630	TCCTCAGTTGAGCTGAGGGCTTTCACCTCAGACTTAAATAACCGTCTGCGCTCGCTTTAC	571
Query	901	GCCCAATAAATCCGGATAACGCTTGAACATACGTATACCGCGGCTGCTGGCACGTATT	960
Sbjct	570	GCCCAATAAATCCGGATAACGCTTGAACATACGTATACCGCGGCTGCTGGCACGTATT	511
Query	961	TAGCCGTTCCCTTCTGGTAAGATACCGTCAACATTGAACAGTACTCTCAATGTCAATTC	1020
Sbjct	510	TAGCCGTTCCCTTCTGGTAAGATACCGTCAACATTGAACAGTACTCTCAATGTCAATTC	451
Query	1021	TTCTCTTACAACAGTGTTTTACGAGCCGAAACCTTTCATCACACACGCGGGCTTGTCCA	1080
Sbjct	450	TTCTCTTACAACAGTGTTTTACGAGCCGAAACCTTTCATCACACACGCGGGCTTGTCCA	391
Query	1081	TCAGGCTTTTCGCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTATGGGCCG	1140
Sbjct	390	TCAGGCTTTTCGCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTATGGGCCG	331
Query	1141	TGTCTCAGTCCCATTTGTGGCCGATCAGTCTCTCAACTCGGCTATGCATCATCGCCTTGGT	1200
Sbjct	330	TGTCTCAGTCCCATTTGTGGCCGATCAGTCTCTCAACTCGGCTATGCATCATCGCCTTGGT	271
Query	1201	AAGCCATTACCTTACCAACTAGCTAATGCACCGCGGGACCATCTCTTAGTGATAGCAGAA	1260
Sbjct	270	AAGCCATTACCTTACCAACTAGCTAATGCACCGCGGGACCATCTCTTAGTGATAGCAGAA	211
Query	1261	CCATCTTTTAAATAACAACCATGCGGTTGTCAATTGTTATACGGTATTAGCATCTGTTTCC	1320
Sbjct	210	CCATCTTTTAAATAACAACCATGCGGTTGTCAATTGTTATACGGTATTAGCATCTGTTTCC	151
Query	1321	AAATGTTATCCCCTGCTAAGAGGTAGGTTTCCCACGTGTTACTCACCCGTTCGCCACTCT	1380
Sbjct	150	AAATGTTATCCCCTGCTAAGAGGTAGGTTTCCCACGTGTTACTCACCCGTTCGCCACTCT	91
Query	1381	TTGCAATGTCCATCGTCATATCTGAGCAAGCTCTTCAAATCAGTTGAACCAACAAAGCGTT	1440
Sbjct	90	TTGCAATGTCCATCGTCATATCTGAGCAAGCTCTTCAAATCAGTTGAACCAACAAAGCGTT	31
Query	1441	CGACT-GCATGTATAGCNCCC 1460	
Sbjct	30	CGACTTGCATGTATAGCACCC 10	

Fig. 12. 16S rRNA sequencing of F-13 strain

Query	2	TTAGACGGCTGGCTCCCGAAGGTTACCCCAACCGGCTTTGGGTGTTACAAACTCTCATGGT	61
Sbjct	1473	TTAGACGGCTGGCTCCCGAAGGTTACCCCAACCGGCTTTGGGTGTTACAAACTCTCATGGT	1414
Query	62	GTGACGGGCGGTGTGTACAAGA CCGGGGAACGTATTCACCGCGGCGTGCTGATCCGCGAT	121
Sbjct	1413	GTGACGGGCGGTGTGTACAAGA CCGGGGAACGTATTCACCGCGGCGTGCTGATCCGCGAT	1354
Query	122	TACTAGCGATTCCGACTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAACTGAGACGTAC	181
Sbjct	1353	TACTAGCGATTCCGACTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAACTGAGACGTAC	1294
Query	182	TTTAAGAGATTAGCTCACCCCTCGCGGGTTGGCAACTCGTTGTATAAGCCATTGTAGCAGG	241
Sbjct	1293	TTTAAGAGATTAGCTCACCCCTCGCGGGTTGGCAACTCGTTGTATAAGCCATTGTAGCAGG	1234
Query	242	TGTGTAGCCAGGTCATAAGGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTT	301
Sbjct	1233	TGTGTAGCCAGGTCATAAGGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTT	1174
Query	302	TGTCACCGGCAGTCTCACTAGAGT GCCCAACTGAATGCTGGCAACTAGTAATAAGGGTTG	361
Sbjct	1173	TGTCACCGGCAGTCTCACTAGAGT GCCCAACTGAATGCTGGCAACTAGTAATAAGGGTTG	1114
Query	362	CGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCAGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCA	421
Sbjct	1113	CGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCAGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCA	1054
Query	422	CCTGTACCTTGTCCCGAAGGGAAACGCTCCCATCTCTGGAGTTGTCAAGGGATGTCAAG	481
Sbjct	1053	CCTGTACCTTGTCCCGAAGGGAAACGCTCCCATCTCTGGAGTTGTCAAGGGATGTCAAG	995
Query	482	ACCTGGTAAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCCACATGCTCCACCGCTTGTGCGG	541
Sbjct	994	ACCTGGTAAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCCACATGCTCCACCGCTTGTGCGG	936
Query	542	GTCCCGTCAATTCCCTTTGAGTTTCAACCTTGCGGTCGTA CTCCCAAGGCGGAGTGCTTA	601
Sbjct	935	GTCCCGTCAATTCCCTTTGAGTTTCAACCTTGCGGTCGTA CTCCCAAGGCGGAGTGCTTA	876
Query	602	ATGCGTTAGCTGCGCACTTAAGGGCGGAAACCCCTCAAACACCTAGCACTCATCGTTTAC	661
Sbjct	875	ATGCGTTAGCTGCGCACTTAAGGGCGGAAACCCCTCAAACACCTAGCACTCATCGTTTAC	816
Query	662	GGTGTGGACTACCAAGGATCTAATCCTGT TGTACCCACACTTCGAGCCTCAACGTC	721
Sbjct	815	GGTGTGGACTACCAAGGATCTAATCCTGT TGTACCCACACTTCGAGCCTCAACGTC	756
Query	722	AGTTACAGTCCAGAAAGCCGCGCTTCGCCACTGGTGTCTTCCATATATCTACGCATTTCA	781
Sbjct	755	AGTTACAGTCCAGAAAGCCGCGCTTCGCCACTGGTGTCTTCCATATATCTACGCATTTCA	696
Query	782	CCGCTACACATGGAGTCCACTTTCTCTACTGCACTCAAGTCATCCAGTTTCCAAAGCA	841
Sbjct	695	CCGCTACACATGGAGTCCACTTTCTCTACTGCACTCAAGTCATCCAGTTTCCAAAGCA	636
Query	842	ATTCCTCAGTTGAGCTGAGGGCTTTCACCTCAGACTTAAATAACCGTCTGCGCTCGCTTT	901
Sbjct	635	ATTCCTCAGTTGAGCTGAGGGCTTTCACCTCAGACTTAAATAACCGTCTGCGCTCGCTTT	576
Query	902	ACGCCCAATAAATCCGGATAACGCTTGGAAACATACGTATACCGCGGCTGCTGGCACGTA	961
Sbjct	575	ACGCCCAATAAATCCGGATAACGCTTGGAAACATACGTATACCGCGGCTGCTGGCACGTA	516
Query	962	TTTAGCCGTTCCCTTTCTGGTAAGATACCGTCAACATTTGAACAGTTACTCTCAATGTCAT	1021
Sbjct	515	TTTAGCCGTTCCCTTTCTGGTAAGATACCGTCAACATTTGAACAGTTACTCTCAATGTCAT	456
Query	1022	TCTTCTCTTACAACAGTGT TTTACGAGCCGAAACCCCTTCATCACACACGCGGCGTTGCTC	1081
Sbjct	455	TCTTCTCTTACAACAGTGT TTTACGAGCCGAAACCCCTTCATCACACACGCGGCGTTGCTC	396
Query	1082	CATCAGGCTTTCGCCCATTTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTATGGGC	1141
Sbjct	395	CATCAGGCTTTCGCCCATTTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTATGGGC	336
Query	1142	CGTGTCTCAGTCCCATTTGTGGCCGATCAGTCTCTCAACTCGGCTATGCATCATCGTCTTG	1201
Sbjct	335	CGTGTCTCAGTCCCATTTGTGGCCGATCAGTCTCTCAACTCGGCTATGCATCATCGTCTTG	276
Query	1202	GTGAGCCATTACCTCACCAACTAACTAATGCACCGCGGGACCATCTCTTAGTGATAGCAG	1261
Sbjct	275	GTGAGCCATTACCTCACCAACTAACTAATGCACCGCGGGACCATCTCTTAGTGATAGCAG	216
Query	1262	AACCATCTTTTAAAGTAGCAACCATGCGGTTGCTATTGTTATACGGTATTAGCATCTGTTT	1321
Sbjct	215	AACCATCTTTTAAAGTAGCAACCATGCGGTTGCTATTGTTATACGGTATTAGCATCTGTTT	156
Query	1322	CCAAATGTTATCCCTGCTAAGAGGTTAGGTTTCCCACGTGTTACTCACCCGTTGCCACT	1381
Sbjct	155	CCAAATGTTATCCCTGCTAAGAGGTTAGGTTTCCCACGTGTTACTCACCCGTTGCCACT	96
Query	1382	CTTTGCAATGTCCATCGTCATATCTGAGCAAGCTCTTCAAATCAGTTGAACCAAAAGCG	1441
Sbjct	95	CTTTGCAATGTCCATCGTCATATCTGAGCAAGCTCTTCAAATCAGTTGAACCAAAAGCG	36
Query	1442	TTCGACTGCAT-TATAGC 1458	
Sbjct	35	TTCGACTGCATGTATAGC 18	

Fig. 13. 16S rRNA sequencing of F-22 strain

Query	3	TTAGACGGCTGGCTCCCGAAGGTTACCCCAACGGCTTTGGGTGTTACAAACTCTCATGGT	62
Sbjct	1466	TTAGACGGCTGGCTCCCGAAGGTTACCCCAACGGCTTTGGGTGTTACAAACTCTCATGGT	1407
Query	63	GTGACGGGCGGTGTGTACAAGACCCGGGAACGTATTCACCGCGGCGTGCTGATCCGCGAT	122
Sbjct	1406	GTGACGGGCGGTGTGTACAAGACCCGGGAACGTATTCACCGCGGCGTGCTGATCCGCGAT	1347
Query	123	TACTAGCGATTCCGACTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAACTGAGACGTAC	182
Sbjct	1346	TACTAGCGATTCCGACTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAACTGAGACGTAC	1287
Query	183	TTTAAGAGATTAGCTCACCCCTCGCGGGTTGGCAACTCGTTGTATACGCCATTGTAGCAGG	242
Sbjct	1286	TTTAAGAGATTAGCTCACCCCTCGCGGGTTGGCAACTCGTTGTATACGCCATTGTAGCAGG	1227
Query	243	TGTGTAGCCAGGTCATAAGGGGCGATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTT	302
Sbjct	1226	TGTGTAGCCAGGTCATAAGGGGCGATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTT	1167
Query	303	TGTCACCGGCAGTCTCACTAGAGTGCCCAACTAAATGCTGGCAACTAGTAATAAGGGTTG	362
Sbjct	1166	TGTCACCGGCAGTCTCACTAGAGTGCCCAACTAAATGCTGGCAACTAGTAATAAGGGTTG	1107
Query	363	CGCTCGT-GCGGGACTTAAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCAC	421
Sbjct	1106	CGCTCGTGCGGG-ACTTAA-CCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCAC	1049
Query	422	CACCTGTCACTTGTCCCCGAAGGGAACGCTCCCATCTCTGGAGTTGTCAAGGGATGTCA	481
Sbjct	1048	CACCTGTCACTTGTCCCCGAAGGGAACGCTCC-ATCTCTGGAGTTGTCAAGGGATGTCA	990
Query	482	AGACCTGGTAAGGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCCACATGCTCCACCGCTTGTGC	541
Sbjct	989	AGACCTGGTAAGG-TTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCCACATGCTCCACCGCTTGTGC	931
Query	542	GGGTCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAACCTTGCGGTCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCT	601
Sbjct	930	GGGTCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAACCTTGCGGTCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCT	871
Query	602	TAATGCGTTAGCTGCGGCACCTAAGGGCGGAAACCCTCAAACACCTAGCACTCATCGTTT	661
Sbjct	870	TAATGCGTTAGCTGCGGCACCTAAGGGCGGAAACCCTCAAACACCTAGCACTCATCGTTT	811
Query	662	ACGGTGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCCTGTTTGTACCCACACTTTCGAGCCCTCAACG	721
Sbjct	810	ACGGTGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCCTGTTTGTACCCACACTTTCGAGCCCTCAACG	751
Query	722	TCAGTTACAGTCCAGAAAGCCGCGCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCATATATCTACGCATTT	781
Sbjct	750	TCAGTTACAGTCCAGAAAGCCGCGCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCATATATCTACGCATTT	691
Query	782	CACCGCTACACATGGAGTCCACTTTCCTCTACTGCACTCAAGTCAATCCAGTTCCAAAG	841
Sbjct	690	CACCGCTACACATGGAGTCCACTTTCCTCTACTGCACTCAAGTCAATCCAGTTCCAAAG	631
Query	842	CAATTCCTCAGTTGAGCTGAGGGCTTTCACCTTCAGACTTAAATAACCGTCTGCGCTCGCT	901
Sbjct	630	CAATTCCTCAGTTGAGCTGAGGGCTTTCACCTTCAGACTTAAATAACCGTCTGCGCTCGCT	571
Query	902	TTACGCCCAATAAATCCGGATAACGCTTGGAACATACGATTACCGCGGCTGCTGGCAGG	961
Sbjct	570	TTACGCCCAATAAATCCGGATAACGCTTGGAACATACGATTACCGCGGCTGCTGGCAGG	511
Query	962	TATTTAGCCGTTCCTTTCTGGTAAGATACCGTCACACATGAACAGTTACTCTCAATGTC	1021
Sbjct	510	TATTTAGCCGTTCCTTTCTGGTAAGATACCGTCACACATGAACAGTTACTCTCAATGTC	451
Query	1022	ATTCTTCTCTTACAACAGTGTTTTACGAGCCGAAACCCTTCATCACACACGCGGCGTTG	1081
Sbjct	450	ATTCTTCTCTTACAACAGTGTTTT-ACGAGCCGAAACCCTTCATCACACACGCGGCGTTG	392
Query	1082	CTCCATCAGGCCTTTCGCCCATTTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTA	1141
Sbjct	391	CTCCATCAGGC-TTTCGCC-ATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTA	334
Query	1142	TGGGCCGTGTCTCAGTCCCATTTGTGGCCGATCAGTCTCTCAACTCGGCTATGCATCATCG	1201
Sbjct	333	TGGGCCGTGTCTCAGTCCCATTTGTGGCCGATCAGTCTCTCAACTCGGCTATGCATCATCG	274
Query	1202	TCTTGGTGAACATTACCTCACCAACTAACTAATGCACCGCGGGACCATCTCTTAGTGAT	1261
Sbjct	273	TCTTGGTGAACATTACCTCACCAACTAACTAATGCACCGCGGGACCATCTCTTAGTGAT	214
Query	1262	AGCAGAACCATCTTTAAGTAGCAACCATGCGGTTGCTATTGTTATACGGTATTAGCATC	1321
Sbjct	213	AGCAGAACCATCTTTAAGTAGCAACCATGCGGTTGCTATTGTTATACGGTATTAGCATC	154
Query	1322	TGTTTCCAAATGTTATCCCCTGCTAAGAGGTAGGTTTCCACGTTACTCACCCGTTTCG	1381
Sbjct	153	TGTTTCCAAATGTTATCCCCTGCTAAGAGGTAGGTTTCCACGTTACTCACCCGTTTCG	94
Query	1382	CCACTCTTTGCAATGTCCATCGTCATATCTGAGCAAGCTCTTCAAATCAGTTGAACCACA	1441
Sbjct	93	CCACTCTTTGCAATGTCCATCGTCATATCTGAGCAAGCTCTTCAAATCAGTTGAACCACA	34
Query	1442	AAGCGTTCGACTGCAT-TATAGCN-CCCCC	1469
Sbjct	33	AAGCGTTCGACTGCATGTATAGCTGCCCCC	4

Fig. 14. 16S rRNA sequencing of F-24 strain

Query	2	TTA GGC GGT GGT CCT AAA A GBT TA C C C C A C C G A C T T T G G G T G T T A C A A A C T C T C A T G G	61
Sbjct	1459	TTA GGC GGT GGT CCT AAA A GBT TA C C C C A C C G A C T T T G G G T G T T A C A A A C T C T C A T G G	1400
Query	62	TGT G A C G G G G G T G T G T A C A A G G C C C G G G A A C G T A T T C A C G C G G C A T G C T G A T C G C G A	121
Sbjct	1399	TGT G A C G G G G G T G T G T A C A A G G C C C G G G A A C G T A T T C A C G C G G C A T G C T G A T C G C G A	1340
Query	122	TT A C T A G C G A T T C C G A C T T C A T G T A G G G O G A G T T G C A G C C T A C A A T C G A A C T G A G A A T G G	181
Sbjct	1339	TT A C T A G C G A T T C C G A C T T C A T G T A G G G O G A G T T G C A G C C T A C A A T C G A A C T G A G A A T G G	1280
Query	182	C T T T A A G A G A T T A G C T T A C T C T C G O G A G T T O G C A A C T O G T T G T A C C A T C C A T T G T A G C A C	241
Sbjct	1279	C T T T A A G A G A T T A G C T T A C T C T C G O G A G T T O G C A A C T O G T T G T A C C A T C C A T T G T A G C A C	1220
Query	242	G T G T G T A G C C C A G G T C A T A A G G G G C A T G A T G A T T T G A O G T C A T C C C C A C C T T C C T C G G G T	301
Sbjct	1219	G T G T G T A G C C C A G G T C A T A A G G G G C A T G A T G A T T T G A O G T C A T C C C C A C C T T C C T C G G G T	1160
Query	302	T T G T C A C C G G C A G T C T C A C C A G A G T G C C C A C T T A A T G C T G G C A A C T G A T A A T A A G G G T T	361
Sbjct	1159	T T G T C A C C G G C A G T C T C A C C A G A G T G C C C A C T T A A T G C T G G C A A C T G A T A A T A A G G G T T	1100
Query	362	G C G C T C G T T G C G G G A C T T A A C C C A A C A T C T C A C G A C A O G A G C T G A C G A C A A C C A T G C A C C	421
Sbjct	1099	G C G C T C G T T G C G G G A C T T A A C C C A A C A T C T C A C G A C A O G A G C T G A C G A C A A C C A T G C A C C	1040
Query	422	A C C T G T A T C C A T G T C C C G A A G G G A A C G T C T A A T C T C T T A G A T T T G C A T A G T A T G T C A A G	481
Sbjct	1039	A C C T G T A T C C A T G T C C C G A A G G G A A C G T C T A A T C T C T T A G A T T T G C A T A G T A T G T C A A G	980
Query	482	A C C T G G T A A G G T T C T T C G O G T A G C T T C G A A T T A A A C C A C A T G C T C C A C C G C T T G T G C G G G	541
Sbjct	979	A C C T G G T A A G G T T C T T C G O G T A G C T T C G A A T T A A A C C A C A T G C T C C A C C G C T T G T G C G G G	920
Query	542	C C C C G T C A A T T C C T T T G A G T T T C A G C C T T G C G G C C G T A C T C C C C A G G C G G A A T G C T T A A	601
Sbjct	919	C C C C G T C A A T T C C T T T G A G T T T C A G C C T T G C G G C C G T A C T C C C C A G G C G G A A T G C T T A A	860
Query	602	T G C G T T A G C T G C A G C A C T G A A G G G O G G A A O C C T C C A A C A C T T A G C A T T C A T O G T T T A O G	661
Sbjct	859	T G C G T T A G C T G C A G C A C T G A A G G G O G G A A O C C T C C A A C A C T T A G C A T T C A T O G T T T A O G	800
Query	662	G T A T G G A C T A C C A G G G T A T C T A A T C C T G T T T G C T A C C C A T A C T T T C G A G C C T C A G O G T C A	721
Sbjct	799	G T A T G G A C T A C C A G G G T A T C T A A T C C T G T T T G C T A C C C A T A C T T T C G A G C C T C A G O G T C A	740
Query	722	G T T A C A G A C C A G A C A G C C G C C T T C G C C A C T G G T G T T C T T C C A T A T A T C T A C G C A T T T C A C	781
Sbjct	739	G T T A C A G A C C A G A C A G C C G C C T T C G C C A C T G G T G T T C T T C C A T A T A T C T A C G C A T T T C A C	680
Query	782	O G C T A C A C A T G G A G T T C C A C T G T C C T C T T C T G C A C T C A A G T T T O C C A G T T T C O G A T G C A C	841
Sbjct	679	O G C T A C A C A T G G A G T T C C A C T G T C C T C T T C T G C A C T C A A G T T T O C C A G T T T C O G A T G C A C	620
Query	842	T T C T T C G G T T G A G C C G A A G G C T T T C A C A T C A G A C T T A A A A A A C O G C C T G O G C T C G C T T T A	901
Sbjct	619	T T C T T C G G T T G A G C C G A A G G C T T T C A C A T C A G A C T T A A A A A A C O G C C T G O G C T C G C T T T A	560
Query	902	O G C C C A A T A A A T C C G G A C A A C G C T T G C C A C C T A O G T A T T A O C G O G G C T G C T G G C A O G T A G	961
Sbjct	559	O G C C C A A T A A A T C C G G A C A A C G C T T G C C A C C T A O G T A T T A O C G O G G C T G C T G G C A O G T A G	500
Query	962	T T A G C C G T G G C T T T C T G G T T A A A T A C C G T C A A T A C C T G A A C A G T T A C T C T C A G A T A T G T T	1021
Sbjct	499	T T A G C C G T G G C T T T C T G G T T A A A T A C C G T C A A T A C C T G A A C A G T T A C T C T C A G A T A T G T T	440
Query	1022	C T T C T T T A A C A C A G A G T T T T A C G A G C O G A A A C C C T T C T T C A C T C A O G C G G C G T T G C T C C	1081
Sbjct	439	C T T C T T T A A C A C A G A G T T T T A C G A G C O G A A A C C C T T C T T C A C T C A O G C G G C G T T G C T C C	380
Query	1082	A T C A G A C T T T C G T C C A T T G T G G A A G A T T C C C T A C T G C T G C C T C C C G T A G G A G T T T G G G C C	1141
Sbjct	379	A T C A G A C T T T C G T C C A T T G T G G A A G A T T C C C T A C T G C T G C C T C C C G T A G G A G T T T G G G C C	320
Query	1142	G T G T C T C A G T C C C A A T G T G G C O G A T T A O C C T C T C A G G T C G G C T A C G T A T C A T T G C C A T G G	1201
Sbjct	319	G T G T C T C A G T C C C A A T G T G G C O G A T T A O C C T C T C A G G T C G G C T A C G T A T C A T T G C C A T G G	260
Query	1202	T G A G C C G T T A C C C C A C C A T C T A G C T A A T A C G C C G C G G G A C C A T C C A A A A G T G A T A G C C G A	1261
Sbjct	259	T G A G C C G T T A C C C C A C C A T C T A G C T A A T A C G C C G C G G G A C C A T C C A A A A G T G A T A G C C G A	200
Query	1262	A G C C A T C T T T C A A G C T C G G A C C A T G C G G T C C A A G T T G T T A T G C G G T A T T A G C A T C T G T T T	1321
Sbjct	199	A G C C A T C T T T C A A G C T C G G A C C A T G C G G T C C A A G T T G T T A T G C G G T A T T A G C A T C T G T T T	140
Query	1322	C C A G G T G T T A T C C C C G C T T C T G G G C A G G T T T C C C A C G T G T T A C T C A C C A G T T C G C C A C T	1381
Sbjct	139	C C A G G T G T T A T C C C C G C T T C T G G G C A G G T T T C C C A C G T G T T A C T C A C C A G T T C G C C A C T	80
Query	1382	C A C T C A A A T G T A A A T C A T G A T G C A A G C A C C A A T C A A T A C C A G A G T T O G T T C G A C T G C A T G	1441
Sbjct	79	C A C T C A A A T G T A A A T C A T G A T G C A A G C A C C A A T C A A T A C C A G A G T T O G T T C G A C T G C A T G	20
Query	1442	T A T A G C A C 1449	
Sbjct	19	T A T A G C A C 12	

Fig. 15. 16S rRNA sequencing of Q-180 strain



Table 19. 16S rRNA sequencing of 12 kinds of selected strains

strains	Description	score (bits)	Identities (%)	Anti-lipase activity(%)	Anti-adipogenic activity(%)
A-86	<i>Enterococcus faecalis</i>	2625	99%	66.51	6.62
A-192	<i>Enterococcus faecium</i>	2662	99%	65.23	10.51
B-182	<i>Lactobacillus sp.</i>	2662	99%	66.41	3.08
C-85	<i>Enterococcus faecalis</i>	2645	99%	70.07	13.41
C-178	<i>Enterococcus faecium</i>	2067	99%	68.98	19.3
D-366	<i>Enterococcus faecalis</i>	2643	99%	65.03	27.36
E-5	<i>Enterococcus faecalis</i>	2636	99%	69.31	-0.39
E-16	<i>Enterococcus faecalis</i>	2634	99%	73.54	11.52
F-13	<i>Weissella confusa</i>	2676	99%	65.80	-0.63
F-22	<i>Weissella sp.</i>	2667	99%	68.01	10.78
F-24	<i>Weissella cibaria</i>	2647	99%	73.12	0.55
F-180	<i>Lactobacillus plantarum</i>	2675	99%	83.60	14.63

선발된 12종의 젖산균 중 *Enterococcus* 균주가 7종, *Lactobacillus* 균주가 2종, *Weissella* 균주가 3종으로 나타났다.

#### 4. 선발 젖산균의 특성조사

비만억제능이 높은 균주 12종 중 산 생성 속도와 비만억제능(10% 환원탈지유에서 1% 접종 후 18시간 배양)을 감안하여 3종의 젖산균을 선발하여 특성조사를 실시하였다. 다음 이하는 F22 균주(*Weissella sp.*)는 *Weissella sp.* F22, F180 균주(*Lactobacillus plantarum*)는 *Lactobacillus plantarum* Q180, D366 균주(*Enterococcus faecalis*)는 *Enterococcus faecalis* MD366 균주로 각각 명명하였다.

##### 가. 젖산균의 생장

Fig. 16~21에서 보는 바와 같이 젖산균 3종의 생장속도를 알기 위하여 10% 환원탈지유 150 mL에 젖산균 배양액을 1 mL용 피펫으로 1 방울 접종한 후 34°C, 37°C, 40°C 별로 3시간 간격으로 24시간까지 배양시험 한 결과는 다음과 같다.

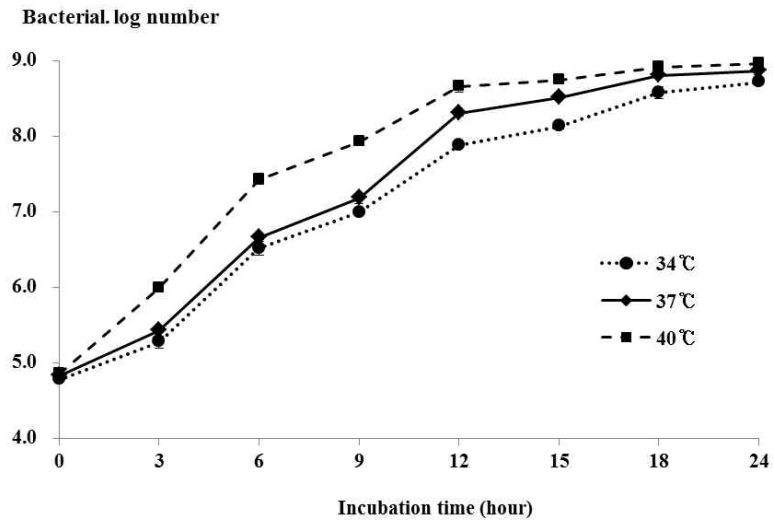


Fig. 16. Growth of *Weissella* sp. F22 in 10% reconstituted skim milk at various temperatures

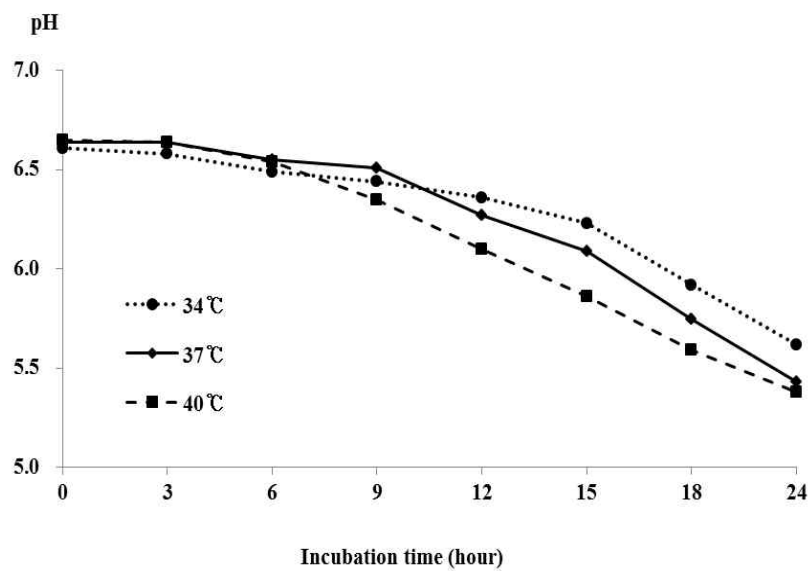


Fig. 17. pH changes of 10% reconstituted skim milk during the growth of *Weissella* sp. F22 at various temperature

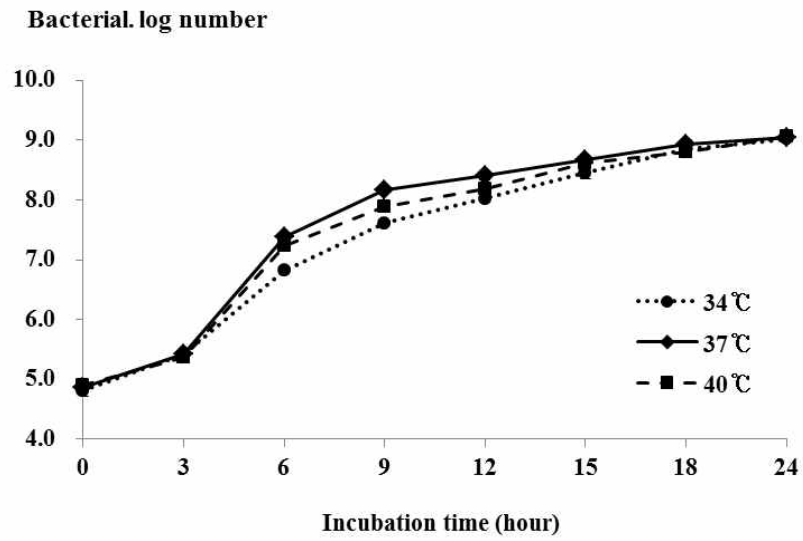


Fig. 18. Growth of *Enterococcus faecalis* MD366 in reconstituted 10% skim milk at various temperatures

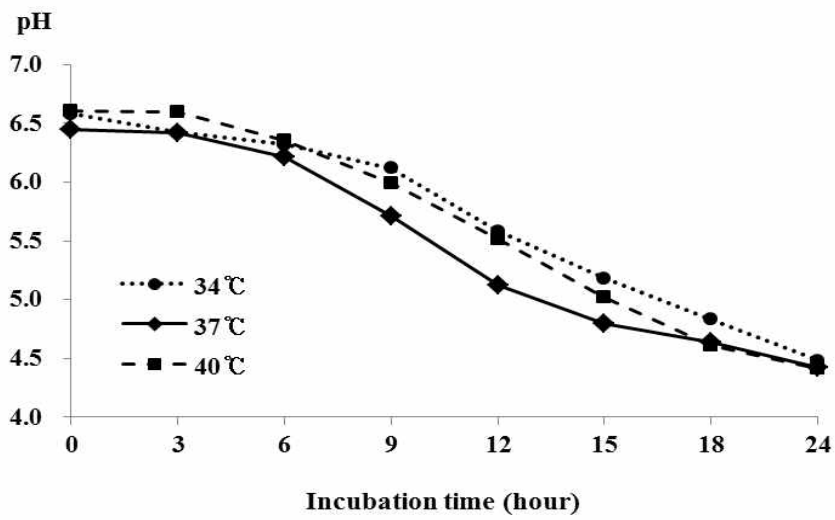


Fig. 19. pH changes of 10% reconstituted skim milk during the growth of *Enterococcus faecalis* MD366 at various temperature

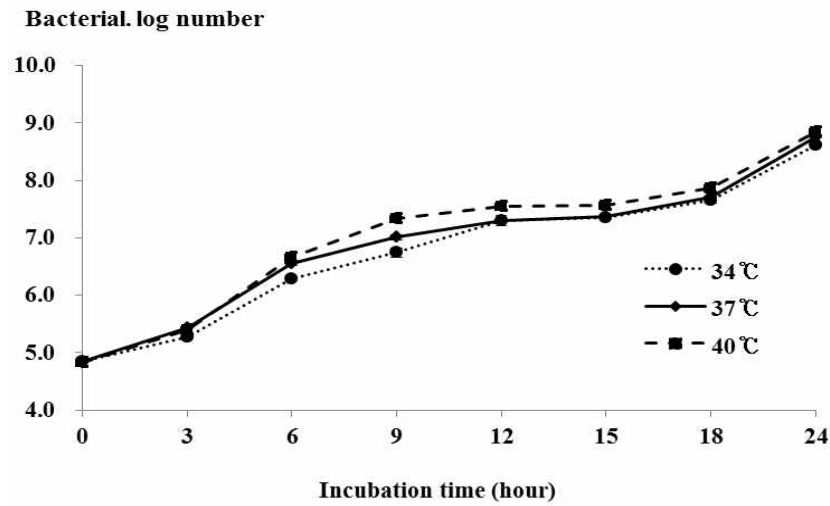


Fig. 20. Growth of *Lactobacillus plantarum* Q180 in 10% reconstituted skim milk at various temperatures

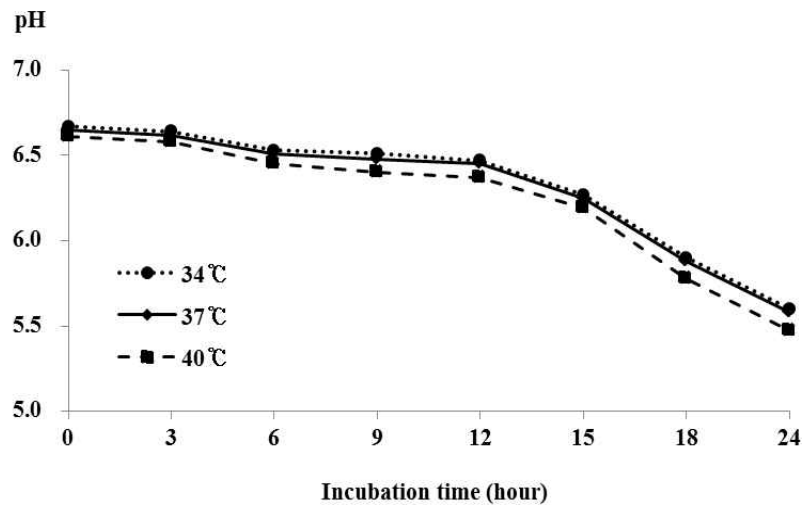


Fig. 21. pH changes of 10% reconstituted skim milk during the growth of *Lactobacillus plantarum* Q180 at various temperature

*Weissella* sp. F22 균주는 대수기까지 12시간이 소요되었고, 40°C, 37°C, 34°C 순으로 성장하였으며, pH 역시 같은 경향으로 산 생성을 보임에 따라 40°C가 가장 적정온도로 나타났다. *Enterococcus faecalis* MD366 균주는 대수기까지 9시간이 소요되었고, 37°C, 40°C, 34°C 순으로 성장하였으며, pH 역시 같은 경향으로 산 생성을 보임에 따라 37°C가 가장 적정온도로 나타났다.

*Lactobacillus plantarum* Q180 균주는 37°C와 40°C에서 거의 비슷하게 성장하였으며, pH 역시 같은 경향으로 산 생성을 보였으나 큰 차이는 나타나지 않았다.

나. 항생제 내성시험

항생제 내성 시험은 tryptic soy broth(Difco)를 사용하여 2배 희석방법에 의해 성장여부를 관찰하여 최저억제농도(MIC) 값을 정하였으며, 그 결과는 Table 20에서 보는 바와 같다.

Table 20. Antibiotics susceptibility of lactic acid bacteria

Antimicrobial agents	strains		
	<i>Weissella</i> sp. F22	<i>E. faecalis</i> MD366	<i>L. plantarum</i> Q180
————— minimal inhibitory concentrations( $\mu\text{g/ml}$ ) —————			
Aminoglycosides			
Amikacin	320	640	40
Gentamycin	20	2560	10
Kanamycin	400	6400	100
Neomycin	400	6400	25
Streptomycin*	1600	400	200
$\beta$ -lactams			
Penicillin-G*	5	160	10
Methicillin	80	320	40
Oxacillin	30	480	30
Ampicillin	320	320	320
Gram-positive spectrum			
Bacitracin*	3.75	60	15
Rifampicin	30	15	960
Novobiocin	30	7.5	7.5
Lincomycin	800	100	12.5
Gram-negative spectrum			
Polymyxin B*	2400	4800	1200
Broad spectrum			
Chloramphenicol	40	40	40
Vancomycin*	1600	6400	1600

\* : units/ml

*Weissella* sp. F22 균주는 다른 2종의 균주에 비해 Streptomycin, Lincomycin에 대하여 내성이 강한 반면 Bacitracin에 대해서는 내성이 약한 것으로 나타났다. *Enterococcus faecalis* MD366 균주는 다른 2종의 균주에 비해 내성이 강한 것으로 나타났으며, 특히 Gentamycin, Kanamycin, Neomycin, Vancomycin에 대하여 내성

이 강한 것으로 나타났다. *Lactobacillus plantarum* Q180 균주는 다른 2종의 균주에 비해 Rifampicin에 대한 내성이 강한 반면, Amikacin, Neomycin, Lincomycin에 대해서는 내성이 약한 것으로 나타났다.

#### 다. 효소 활성 시험

젖산균 3종의 효소활성은 API ZYM kit를 사용하여 실시하였으며, 그 결과는 Table 21에서 보는 바와 같다.

Table 21. Enzyme patterns of lactic acid bacteria

Enzyme	Strains		
	<i>Weissella</i> sp. F22	<i>E. faecalis</i> MD366	<i>L. plantarum</i> Q180
Alkaline phosphatase	1	2	1
Esterase(C4)	1	2	2
Esterase Lipase(C8)	0	2	2
Lipase(C14)	1	1	1
Leucine arylamidase	2	2	3
Valine arylamidase	2	1	2
Cystine arylamidase	0	1	2
Trypsin	2	2	1
$\alpha$ -chymotrypsin	0	1	1
Acid phosphatase	4	4	1
Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase	2	3	3
$\alpha$ -galactosidase	2	2	2
$\beta$ -galactosidase	1	2	4
$\beta$ -glucuronidase	0	2	1
$\alpha$ -glucosidase	1	0	3
$\beta$ -glucosidase	1	0	1
N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase	0	0	4
$\alpha$ -mannosidase	0	0	3
$\alpha$ -fucosidase	1	0	2

\* : 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.

*Weissella* sp. F22 균주는 Acid phosphatase에 대해 효소활성이 4를 나타내었다. *Enterococcus faecalis* MD366 균주는 Acid phosphatase에 대해 효소활성이 4를 나

타내었고, Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase에 대해 3을 나타내었다. *Lactobacillus plantarum* Q180 균주는  $\beta$ -galactosidase와 N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase에 대해 효소활성이 4를 나타내었고, Leucine arylamidase, Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase,  $\alpha$ -glucosidase와  $\alpha$ -mannosidase에 대해 효소활성이 공히 3을 나타내었다. 특히 젓산균 3종 모두 Benzopyrene을 발암성 물질로 전환시키는 발암효소인  $\beta$ -glucuronidase의 경우에는 효소활성이 없거나 낮게 나타나 안전성을 확인할 수 있었다.

#### 라. 담즙내성 시험

담즙에 대한 균주의 내성을 시험하기 위하여 oxgall(Difco)을 첨가하지 않은 것과 첨가한 배지에서 각 균주의 내성을 시험한 결과는 각각 Fig. 22~24에서 보는 바와 같다.

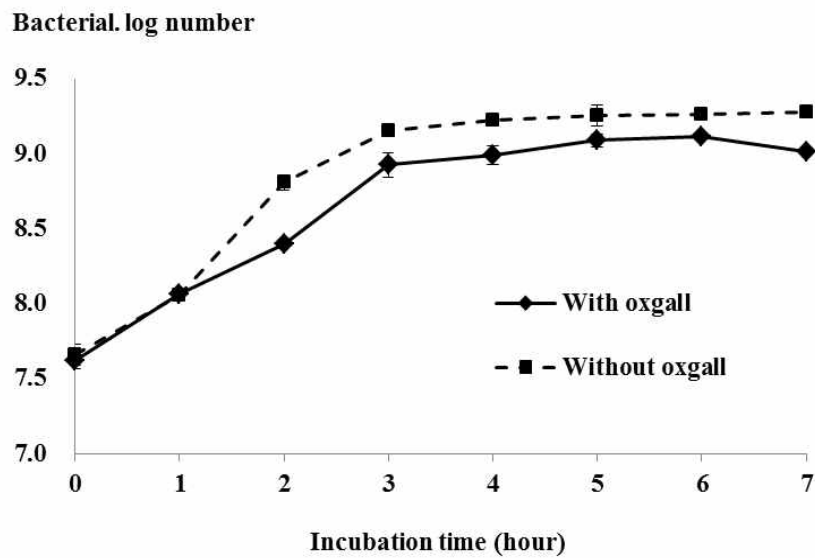


Fig. 22. Growth of *Weissella* sp. F22 in MRS broth containing 0.05% L-cysteine with or without 0.3% oxgall.

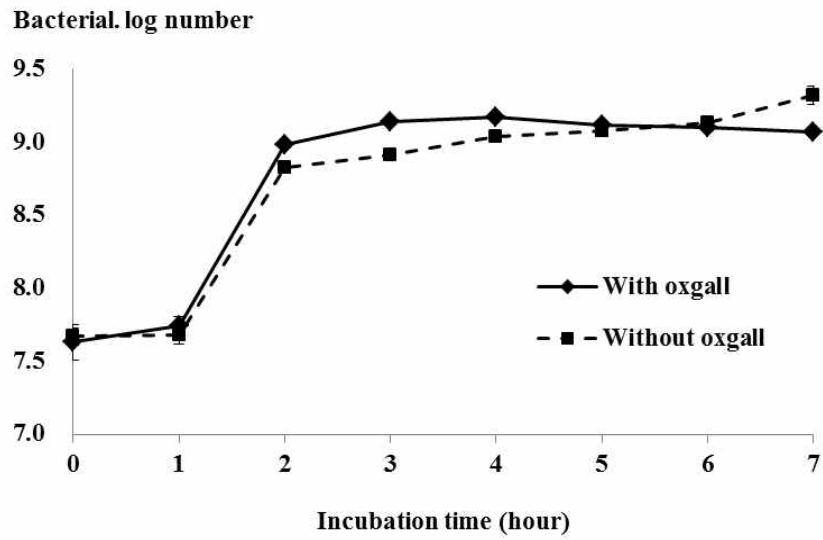


Fig. 23. Growth of *Enterococcus faecalis* MD366 in MRS broth containing 0.05% L-cysteine with or without 0.3% oxgall.

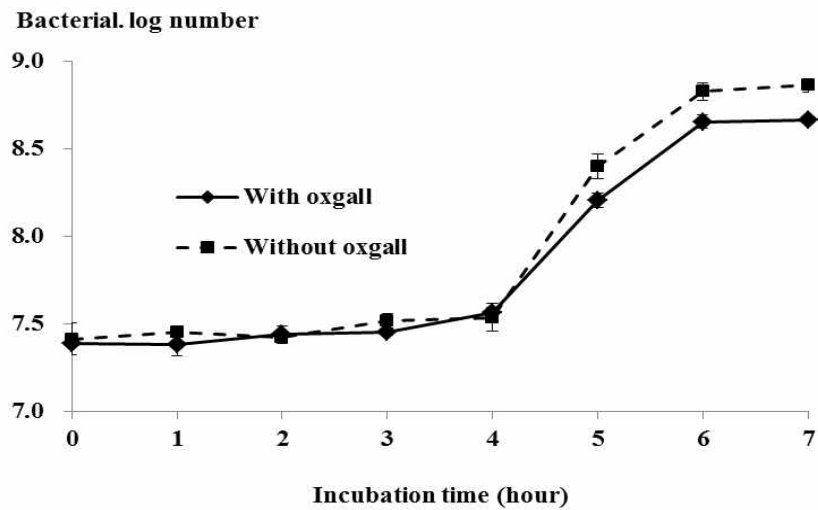


Fig. 24. Growth of *Lactobacillus plantarum* Q180 in MRS broth containing 0.05% L-cysteine without 0.3% oxgall

3종의 젖산균이 oxgall을 첨가하지 않은 경우와 첨가한 경우 약간의 차이는 있었지만 비슷하게 성장하는 추세를 보여 담즙에 대한 내성이 있는 것으로 나타났다.



마. pH 내성 시험

위산과 비슷한 정도의 pH에 대한 내성을 알아보기 위하여 젖산균주를 pH 2, 3, 4 및 6.4의 증류수에서 3시간까지의 생존여부를 시험한 결과는 Fig. 25~27에서 보는 바와 같다.

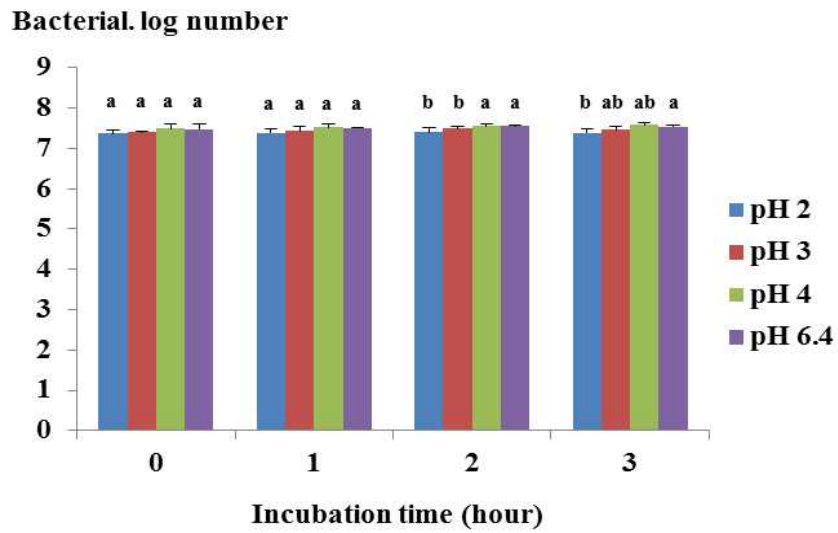


Fig. 25. Survival of *Weissella* sp. F22 after three hours in HCl(pH 2,3,4,6.4)

\* Initial log count before pH treatment : 7.45

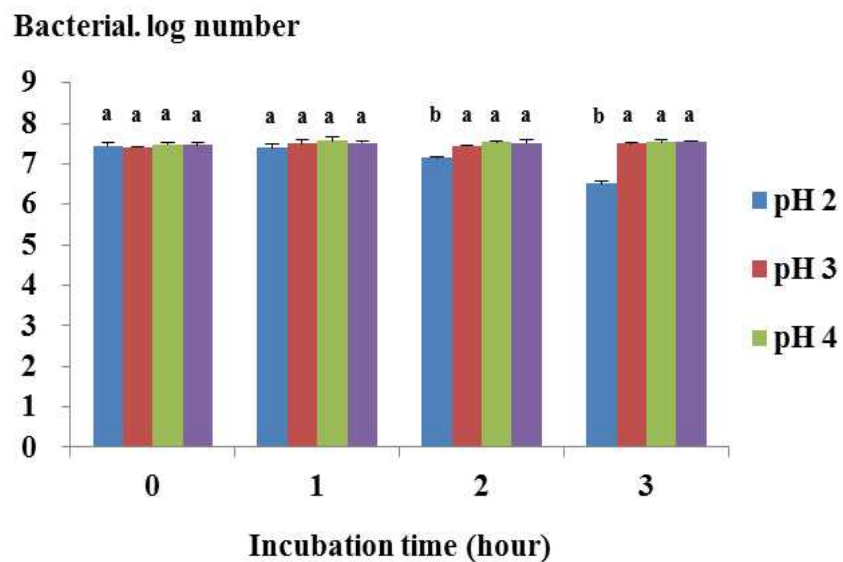


Fig. 26. Survival of *Enterococcus faecalis* MD366 after three hours in HCl(pH 2,3,4,6.4)

\* Initial log count before pH treatment : 7.45

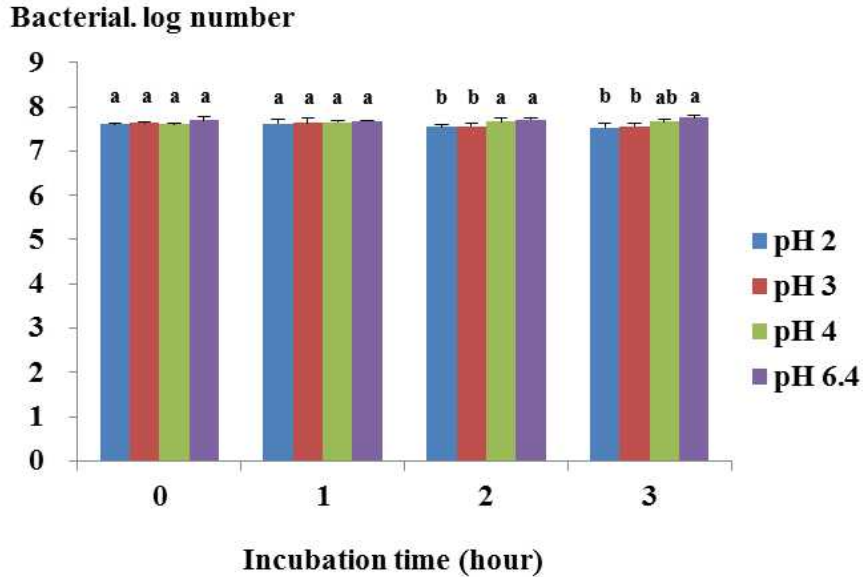


Fig. 27. Survival of *L. plantarum* Q180 after three hours in HCl (pH 2,3,4,6.4)

\* Initial log count before pH treatment : 7.65

*Weissella* sp. F22 균주는 pH 2에서 0시간일 때  $2.3 \times 10^7$  CFU/mL이던 것이 1시간 경과 후  $2.5 \times 10^7$  CFU/mL, 2시간 경과 후  $2.6 \times 10^7$  CFU/mL, 3시간 경과 후  $2.5 \times 10^7$  CFU/mL 로서 젖산균 수가 8.0% 증가하는 것으로 나타났다. pH 3에서는 0시간일 때  $2.6 \times 10^7$  CFU/mL이던 것이 1시간 경과 후  $3.0 \times 10^7$  CFU/mL, 2시간 경과 후  $3.1 \times 10^7$  CFU/mL, 3시간 경과 후  $2.9 \times 10^7$  CFU/mL 로서 젖산균 수가 11.5% 증가하는 것으로 나타났으며, pH 4와 6.4에서도 각각 22.5%와 16.6%의 증가를 보임에 따라 pH에 영향을 받지 않는 것으로 나타났다. *Enterococcus faecalis* MD366균주는 pH 2에서 0시간일 때  $2.8 \times 10^7$  CFU/mL이던 것이 1시간 경과 후  $2.6 \times 10^7$  CFU/mL, 2시간 경과 후  $1.4 \times 10^7$  CFU/mL, 3시간 경과 후  $3.3 \times 10^6$  CFU/mL 로서 젖산균 수가 감소하는 것으로 나타났다. pH 3에서 0시간일 때  $2.6 \times 10^7$  CFU/mL이던 것이 1시간 경과 후  $3.1 \times 10^7$  CFU/mL, 2시간 경과 후  $2.8 \times 10^7$  CFU/mL, 3시간 경과 후  $3.2 \times 10^7$  CFU/mL 로서 젖산균 수가 23% 증가하는 것으로 나타났으나, pH 4와 6.4에서는 각각 8.6%와 18.8%의 증가를 보임에 따라 pH 2를 제외하고는 pH에 영향을 받지 않는 것으로 나타났다. *Lactobacillus plantarum* Q180균주는 pH 2에서 0시간일 때  $4.1 \times 10^7$  CFU/mL이던 것이 1시간 경과 후  $4.1 \times 10^7$  CFU/mL, 2시간 및 3시간 경과 후 공히  $3.5 \times 10^7$  CFU/mL로 로서 젖산균 수가 14.63% 감소하는 것으로 나타났다. pH 3에서 0시간일 때  $4.2 \times 10^7$

CFU/mL이던 것이 1시간 경과 후  $4.4 \times 10^7$  CFU/mL, 2시간 경과 후  $3.7 \times 10^7$  CFU/mL, 3시간 경과 후  $3.6 \times 10^7$  CFU/mL 으로서 젖산균 수가 14.2% 감소하는 것으로 나타났다. pH 4와 6.4는 각각 9.8%와 14.3% 증가하는 경향을 보였다.

바. 항균력 시험

젖산균이 식중독균에 대해 어느 정도 억제하는지를 측정하기 위해 혼합배양을 실시한 결과는 Table 22~24과 같다.

Table 22. Inhibition of pathogens by *Weissella* sp. F22 in MRS broth

Pathogens	Growth				Inhibition (%)
	Pathogens <sup>a</sup>		<i>Weissella</i> sp. F22 <sup>a</sup>		
	CFU/mL	pH	CFU/mL	pH	
<i>Escherichia coli</i>	$1.2 \times 10^8$	6.46	$1.8 \times 10^8$	5.54	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	$2.0 \times 10^6$	6.48	$8.0 \times 10^5$	5.50	60.0
<i>Staphylococcus aureus</i>	$1.5 \times 10^8$	6.54	$1.9 \times 10^7$	5.40	87.3

\* Initial count of *Weissella* sp. F22 :  $3.3 \times 10^6$  CFU/mL

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

Table 23. Inhibition of pathogens by *Enterococcus faecalis* MD366 in MRS broth

Pathogens	Growth				Inhibition (%)
	Pathogens <sup>a</sup>		<i>E. faecalis</i> MD366 <sup>a</sup>		
	CFU/mL	pH	CFU/mL	pH	
<i>Escherichia coli</i>	$1.0 \times 10^6$	6.52	$3.0 \times 10^5$	5.60	70.0
<i>Salmonella typhimurium</i>	$3.0 \times 10^6$	6.53	$1.0 \times 10^6$	5.66	66.7
<i>Staphylococcus aureus</i>	$4.2 \times 10^8$	6.55	$1.5 \times 10^8$	5.62	64.3

\* Initial count of *Enterococcus faecalis* MD366:  $4.7 \times 10^6$  CFU/mL

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

Table 24. Inhibition of pathogens by *Lactobacillus plantarum* Q180 in MRS broth

Pathogens	Growth				Inhibition (%)
	Pathogens <sup>a</sup>		<i>L. plantarum</i> Q180 <sup>a</sup>		
	CFU/mL	pH	CFU/mL	pH	
<i>Escherichia coli</i>	2.0×10 <sup>8</sup>	6.44	8.7×10 <sup>7</sup>	5.60	56.5
<i>Salmonella typhimurium</i>	7.2×10 <sup>6</sup>	6.42	4.7×10 <sup>6</sup>	5.53	34.7
<i>Staphylococcus aureus</i>	3.3×10 <sup>8</sup>	6.44	1.7×10 <sup>8</sup>	5.56	48.5

\* Initial count of *Lactobacillus plantarum* Q180 : 3.6×10<sup>6</sup> CFU/mL

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

*Weissella* sp. F22 균주는 *Salmonella typhimurium*에 대해 60.0%의 항균력과 *Staphylococcus aureus*에 대해 87.3%로서 비교적 높은 항균력을 보인 반면 *Escherichia coli*에 대한 항균력이 없었다. 배양 후 pH 변화를 보았을 때 대조구인 식중독균은 pH가 6.46~6.54이며, 혼합배양액은 pH 5.40~5.54으로 혼합배양과정에서 생성된 젖산의 영향으로 억제효과가 약간은 있었지만 크게 좌우하지는 않은 것으로 사료되었다. *Enterococcus faecalis* MD366 균주는 *Escherichia coli*에 대해 70.0%의 항균력이 있었고, *Salmonella typhimurium*에 대해 66.7%로서 높은 항균력을 보였으며, *Staphylococcus aureus*에 대해 64.3%로서 비교적 높은 항균력을 보였다. 배양 후 pH 변화를 보았을 때 대조구인 식중독균은 pH가 6.52~6.55이며, 혼합배양액은 pH 5.60~5.62이었다. *Lactobacillus plantarum* Q180 균주는 *Escherichia coli*에 대해 56.5%의 항균력이 있었고, *Salmonella typhimurium*에 대해 34.7%, *Staphylococcus aureus*에 대해 48.5%의 항균력을 보였다. 배양 후 pH 변화를 보았을 때 대조구인 식중독균은 pH가 6.42~6.44이며, 혼합배양액은 pH 5.53~5.60으로 혼합배양과정에서 생성된 젖산의 영향으로 억제효과가 약간은 있었지만 크게 좌우하지는 않은 것으로 사료되었다.

따라서 3종의 젖산균 중 *Enterococcus faecalis* MD366 균주가 다른 2종의 젖산균보다 항균력이 강한 것으로 나타났다.

## 5. 최적배양기술 확립

### 가. 조건설정

비만 억제능이 우수한 균으로 선정된 *Lactobacillus plantarum* Q180 균주의 배양조건을 최적화하기 위하여 다음과 같이 실험을 실시하였다. 환원 탈지유의 농도(9%, 10%, 11%), 배양온도(34℃, 37℃, 40℃), 배양시간(21 h, 30.5 h, 40 h)의 3가지 독립변수와 수준을 설정하였으며(Table 25), 종속변수로는 pH와 Anti- adipogenic activity, Anti-lipase activity를 설정하였다.

Table1 25. levels of incubation conditions of *Lactobacillus plantarum* Q180

Independent variables	Symbol	Level		
		-1	0	1
Skim milk (%)	X <sub>1</sub>	9	10	11
Incubation temp. (°C)	X <sub>2</sub>	34	37	40
Incubation time (h)	X <sub>3</sub>	20	30.5	41

Table1 26. Central composite design of *Lactobacillus plantarum* Q180

Trial No.	Coded			Uncoded		
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>
1	-1	-1	-1	9	34	20
2	1	-1	-1	11	34	20
3	-1	1	-1	9	40	20
4	1	1	-1	11	40	20
5	-1	-1	1	9	34	41
6	1	-1	1	11	34	41
7	-1	1	1	9	40	41
8	1	1	1	11	40	41
9	-1.68179	0	0	8.3182	37	30.5
10	1.68179	0	0	11.6818	37	30.5
11	0	-1.68179	0	10	31.9546	30.5
12	0	1.68179	0	10	42.0454	30.5
13	0	0	-1.68179	10	37	12.8412
14	0	0	1.68179	10	37	48.1588
15	0	0	0	10	37	30.5
16	0	0	0	10	37	30.5
17	0	0	0	10	37	30.5

나. 비만억제능 젓산균 최적배양조건 확립을 위한 반응표면 실험

*Lactobacillus plantarum* Q180 균주를 MRS broth 배지에 2차 계대하여 실험에 사용하였고, 각 농도별로(9%, 10%, 11%) 제조된 환원 탈지유 용액에 *Lactobacillus plantarum* Q180 균주를 1% 접종하여 다음과 같은 조건(Table 26)으로 실험을 진행하였다. 각 조건 별로 *Lactobacillus plantarum* Q180 균주를 배양하여 pH와 anti-lipase activity 실험 후, 진공 동결건조하여 anti-adipogenic activity 실험을 시행하였다. 실험결과에 따른 종속변수 값은 Table 27에 나타내었으며, Fig. 28은 각 조건별로 *Lactobacillus plantarum* Q180 균주를 배양한 배양액을 anti-adipogenic activity 실험한 결과, 3T3-L1 cell의 지방축적정도를 oil red O 염색법을 통해 나타내고 사진촬영한 것이다. 통계처리는 MINITAB statistical software (Version 13, Minitab Inc., USA)를 사용하였고, 비만억제능 젓산균 최적배양조건은 환원탈지유 농도 9.54%, 배양온도 37.16℃, 배양시간 28.25 h으로 나타났다(Table 28). 그에 따른 예상 값은 pH 4.47, anti-lipase activity 55.55%, anti-adipogenic activity 20.48% 이었고, 실제 실험결과는 pH 4.50, anti-lipase activity 53.86%, anti-adipogenic activity 19.25%로 나타났다(Table 29).

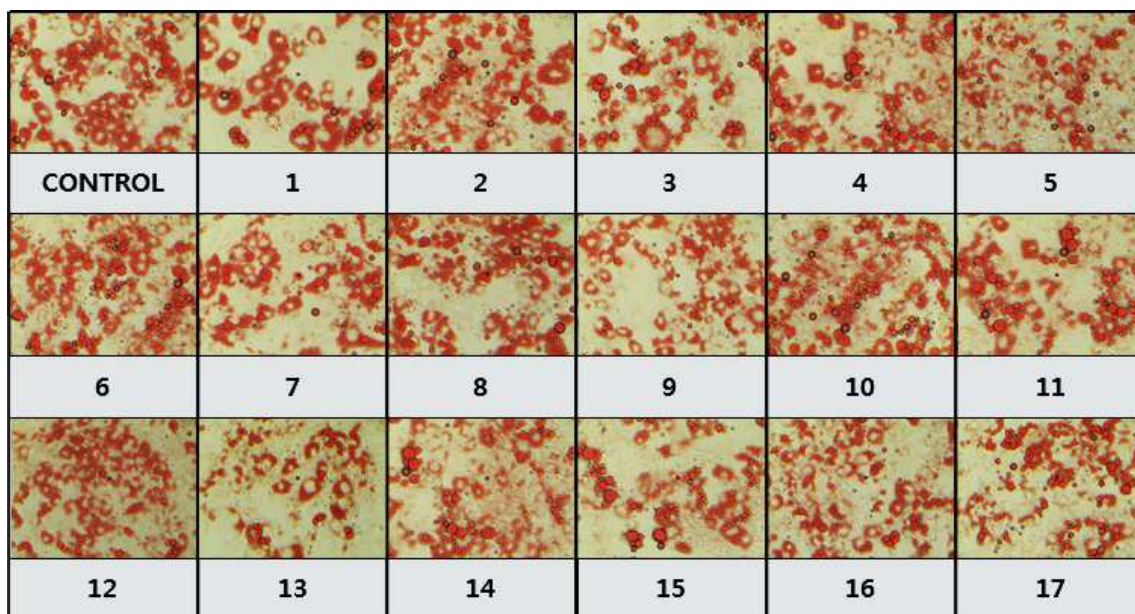


Fig 28. Photomicrographs of Oil red O staining for triglycerides in 3T3-L1 cells. CONTROL, normal cells; 1~17, cells treated with *Lactobacillus plantarum* Q180 incubated in central composite design condition.

Table 27. Central composite design and dependent variables by RSM computer program for the optimization of incubation condition for *Lactobacillus plantarum* Q180

Run No.	Coded levels of variables			responsee		
	X <sub>1</sub> *	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	Y <sub>1</sub> *	Y <sub>2</sub>	Y <sub>3</sub>
1	-1	-1	-1	5.56	22.92	19.1736
2	1	-1	-1	5.87	11.94	-2.3922
3	-1	1	-1	4.70	46.49	13.7369
4	1	1	-1	4.72	5.41	5.9442
5	-1	-1	1	5.38	55.40	10.2936
6	1	-1	1	5.44	51.05	-4.0232
7	-1	1	1	4.14	67.44	12.2871
8	1	1	1	4.29	33.47	5.5817
9	-1.68179	0	0	4.43	48.65	26.7851
10	1.68179	0	0	4.63	56.54	-2.5734
11	0	-1.68179	0	6.02	5.58	13.9181
12	0	1.68179	0	4.72	47.20	5.763
13	0	0	-1.68179	5.40	21.75	30.0471
14	0	0	1.68179	4.23	60.71	10.1124
15	0	0	0	4.55	56.60	18.4487
16	0	0	0	4.43	53.75	16.4552
17	0	0	0	4.40	56.54	15.0054

\*X<sub>1</sub> : skim milk (%), X<sub>2</sub> : incubation temp. (°C), X<sub>3</sub> : incubation time (h)

\*Y<sub>1</sub> : pH, Y<sub>2</sub> : anti-lipase activity, Y<sub>3</sub> : anti-adipogenic activity

Table 28. Optimal conditions of pH, anti-lipase activity, anti-adipogenic activity

dependent	independent variables	critical value		predicted value	stationary point
		coded	uncoded		
Y <sub>1</sub>	X <sub>1</sub>	0	10	4.4	Target
	X <sub>2</sub>	0	37		
	X <sub>3</sub>	0.2419	33.040		
Y <sub>2</sub>	X <sub>1</sub>	-1.6818	8.3182	67.42	Maximum
	X <sub>2</sub>	1.4017	41.2051		
	X <sub>3</sub>	0.6063	36.9661		
Y <sub>2</sub>	X <sub>1</sub>	-1.4677	8.4677	31	Maximum
	X <sub>2</sub>	-0.5395	35.3821		
	X <sub>3</sub>	-1.6818	12.8412		
Multiple response optimization	X <sub>1</sub>	-0.4572	9.5428		
	X <sub>2</sub>	0.0548	37.1644		
	X <sub>3</sub>	-0.2134	28.2593		

Table 29. Predicted results of verification under optimized conditions

dependent	predicted value	experimental value
Y <sub>1</sub> (pH)	4.47	4.50
Y <sub>2</sub> (anti-lipase activity)	55.55	52.86
Y <sub>3</sub> (anti-adipogenic activity)	20.48	19.25



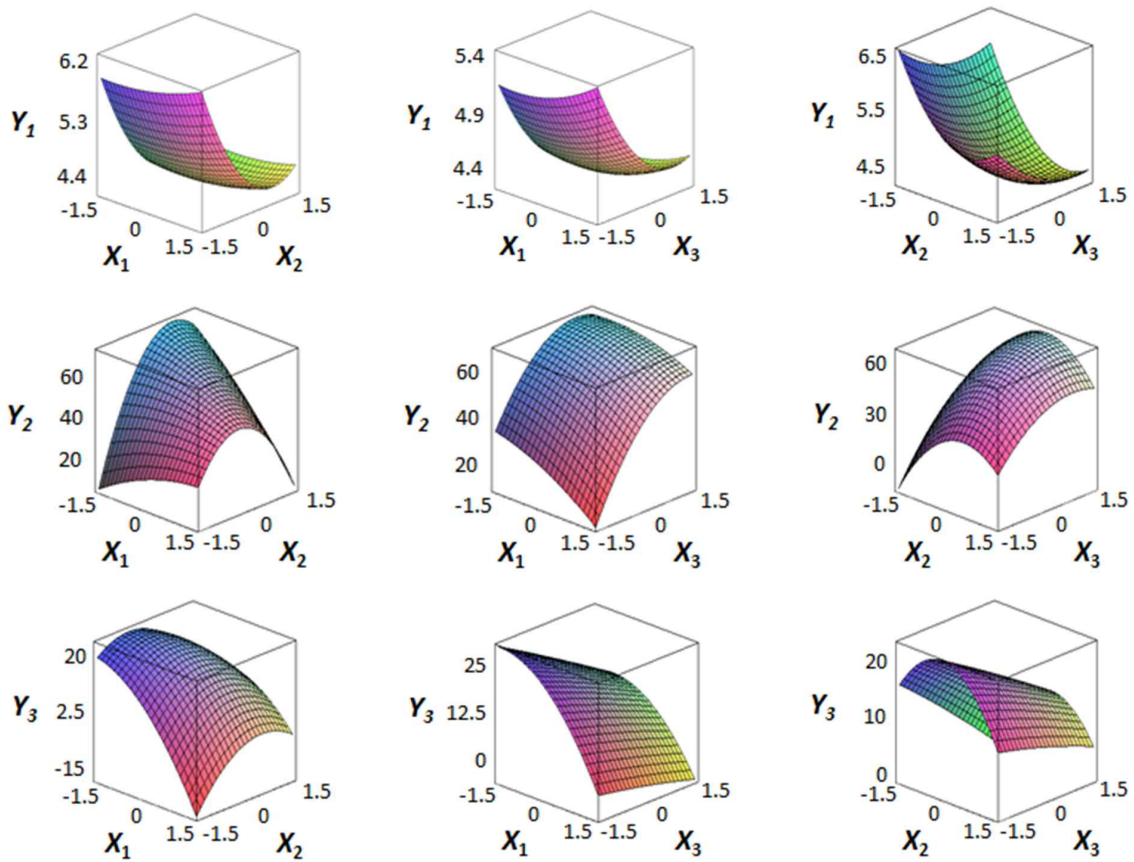


Fig. 29. Response surface plots for the effect of independent variables on dependent.  $X_1$  (skim milk con.),  $X_2$  (incubation temp.),  $X_3$  (incubation time),  $Y_1$  (pH),  $Y_2$ (anti-lipase activity),  $Y_3$ (anti-adipogenic activity)

## 6. 발효산물 분리동정

### 가. 한외여과 (Ultrafiltration)

10% 환원탈지유에 *Lactobacillus plantarum* Q180을 1% 접종하고 37°C에서 pH 4.4에 도달할 때까지 배양시켜 얻어진 발효산물을 cut-off 10,000과 1,000 membrane으로 ultrafiltration한 결과, MW 1,000이하가 96.10%, MW 1,000~10,000이 1.64%, MW 10,000이상이 2.25%였으며, anti-lipase activity 효과는 MW 1,000~10,000 분획물이 MW 1,000 이하보다 약간 높았으나 수율을 감안하여 MW 1,000 이하 분획물을 ODS AQ column을 이용하여 재분획하였다. 위의 결과로부터 저분자의 peptide가 lipase 저해효과를 갖는 것으로 나타났다(Table 30).

Table 30. Fractionation of lipase inhibitors by ultrafiltration from fermented milk by *Lactobacillus plantarum* Q180

	anti-lipase activity(%)	yeild(%)
1,000 MW below	46.83±2.54	96.10
1,000~10,000 MW	49.85±5.83	1.64
10,000 MW above	7.73±4.01	2.25

### 나. ODS AQ column에 의한 reverse-phase chromatography

MW 1,000 이하 획분을 감압농축 후 진공 동결건조하여 ODS AQ column으로 분획하여 얻어진 peak에 따라 FMO1, FMO2, FMO3로 명명하였다(Fig 30). FMO1, FMO2, FMO3 획분을 각각 감압농축한 후 진공 동결건조하여 수율을 측정하고 anti-lipase activity 실험을 시행하였다. 그 결과, FMO1 획분의 lipase 저해 효과가 28.57%로 가장 높았고, 수율 또한 89.7%로 가장 높게 나타났다(Table 31).

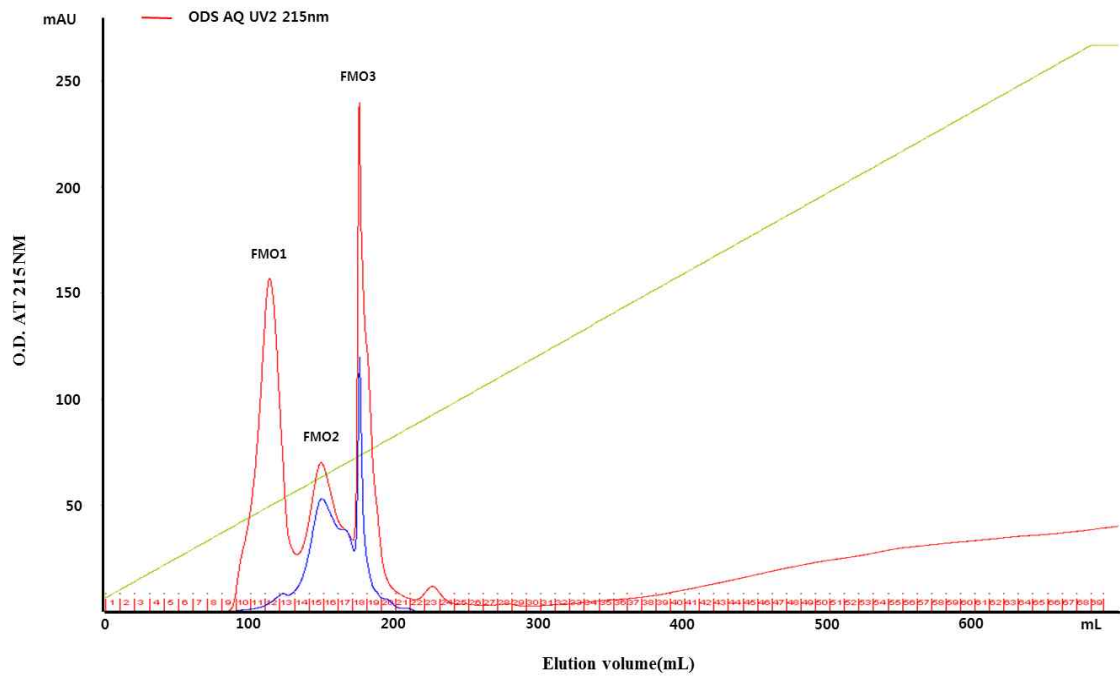


Fig. 30. Reverse phase column chromatogram of fermented milk by *Lactobacillus plantarum* Q180 on ODS AQ(2.6 × 30cm)  
 Eluent : A solution (water), B solution (ethanol)  
 Flow rate : 10 mL/min Fraction : 10 mL/tube  
 Fractionation : FMO1(tube on, 10~13), FMO2(tube on, 14~17),  
 FMO3(tube on, 18~20)

Table 31. Purification of lipase inhibitory peptide by ODS-AQ column from fermented milk peptide

	anti-lipase activity(%)	yield(%)
FMO1	73.32±0.02	89.72
FMO2	71.43±0.03	5.89
FMO3	-	4.40

다. Vydac C18 column에 의한 reverse-phase chromatography

ODS AQ column으로 분획하여 얻어진 FMO1, FMO2, FMO3 중 수율과 anti-lipase activity가 가장 높았던 FMO1 획분을 Vydac column으로 재분획하였으며, peak에 따라 FMO1V1, FMO1V2로 명명하였다(Fig. 31). FMO1V1, FMO1V2 획

분을 각각 감압농축한 후 진공 동결건조하여 수율을 측정하고 anti-lipase activity 실험을 시행하였다. 그 결과, FMO1V2획분의 lipase 저해활성에서 IC<sub>50</sub>이 2,880 ug/mL로 더 우수하였으며, 수율은 30.40%였다(Table 32).

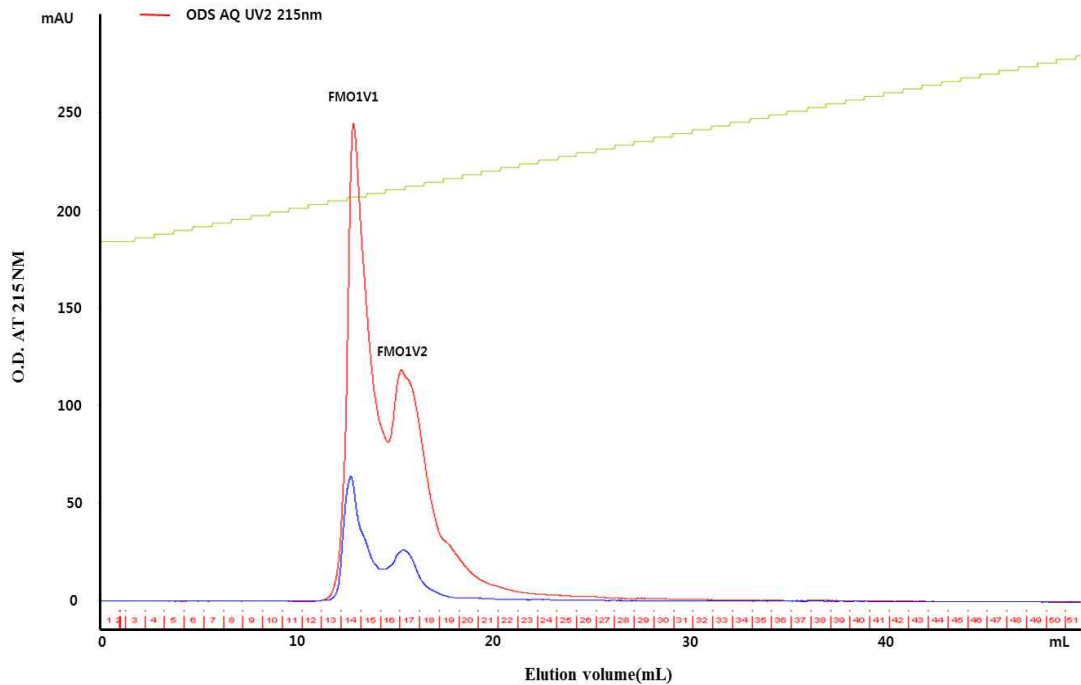


Fig. 31. Reverse phase column chromatogram of fermented milk by *Lactobacillus plantarum* Q180 on Vydac 218TP column (1.0 × 25cm)

Eluent : A solution (0.1% TFA in water), B solution (0.1% TFA in ACN)

Flow rate : 2 mL/min, Fraction : 1 mL/tube

Fractionation : FMO1V1(tube on, 13~16), FMO1V2(tube on, 17~21)

Table 32. Purification of lipase inhibitory peptide by Vydac 218TP column from fermented milk peptide

	anti-lipase activity(%)	IC <sub>50</sub>	yield(%)
FMO1V1	>100%	3,592 ug/mL	63.59
FMO1V2	>100%	2,880 ug/mL	36.40

라. Superdex peptide HR column에 의한 reverse-phase chromatography

Vydac C18 column으로 분획하여 얻어진 FMO1V1, FMO1V2 중 lipase 억제

활성이 우수했던 FMO1V2 획분을 Superdex peptide HR column으로 재분획하였으며, peak에 따라 FMO1V2S1, FMO1V2S2, FMO1V2S3, FMO1V2S4, FMO1V2S5로 명명하였다(Fig. 32). 각각의 획분을 감압농축한 후 진공동결건조하여 수율을 측정하고 anti-lipase activity 실험을 시행하였다. 그 결과, FMO1V2S1 획분의 lipase 저해활성에서 IC<sub>50</sub>이 2,931 ug/mL로 더 우수하였으며, 수율은 30.54%였다(Table 33).

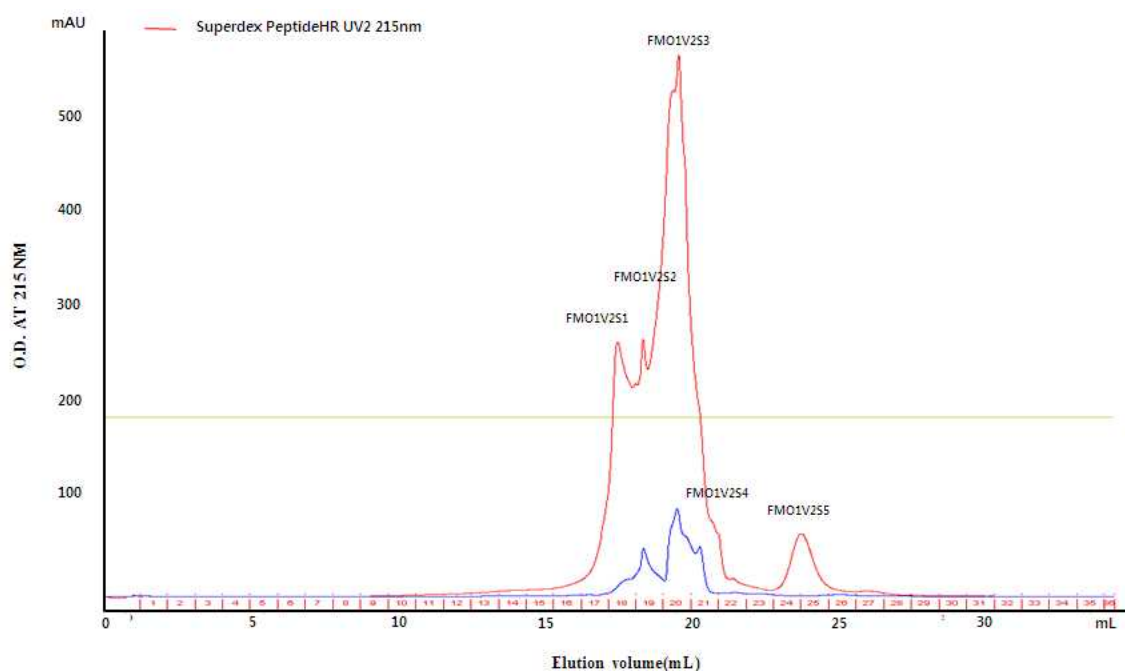


Fig. 32. Reverse phase column chromatogram of fermented milk by *Lactobacillus plantarum* Q180 on Superdex Peptide HR column (1.0×30cm)

Eluent : Water

Flow rate : 0.5 mL/min, Fraction : 1 mL/tube

Fractionation : FMO1V2S1(tube on, 17~18), FMO1V2S2(tube on, 19),  
 FMO1V2S3(tube on, 20), FMO1V2S4(tube on, 21),  
 FMO1V2S5(tube on, 24~25)

Table 33. Purification of lipase inhibitory peptide by Superdex Peptide HR column from fermented milk peptide

	anti-lipase activity(%)	IC <sub>50</sub>	yield(%)
FMO1V2S1	>100%	2,931 ug/mL	30.54
FMO1V2S2	>100%	3,079 ug/mL	36.21
FMO1V2S3	91.42±2.02	-	29.21
FMO1V2S4	89.12±1.98	-	3.63
FMO1V2S5	-	-	0.41

lipase 억제활성이 우수했던 FMO1V2S1 획분을 Superdex peptide HR column으로 재분획하여, peak에 따라 FMO1V2S1S1, FMO1V2S1S2로 명명하였다(Fig. 33). 각각의 획분을 감압농축한 후 진공동결건조하여 수율을 측정하고 anti-lipase activity 실험을 시행하였다. 그 결과, FMO1V2S1S1 획분의 lipase 저해활성에서 IC<sub>50</sub>이 2,817 ug/mL로 더 우수하였으며, 수율 또한 73.92%로 우수하였다(Table 34).

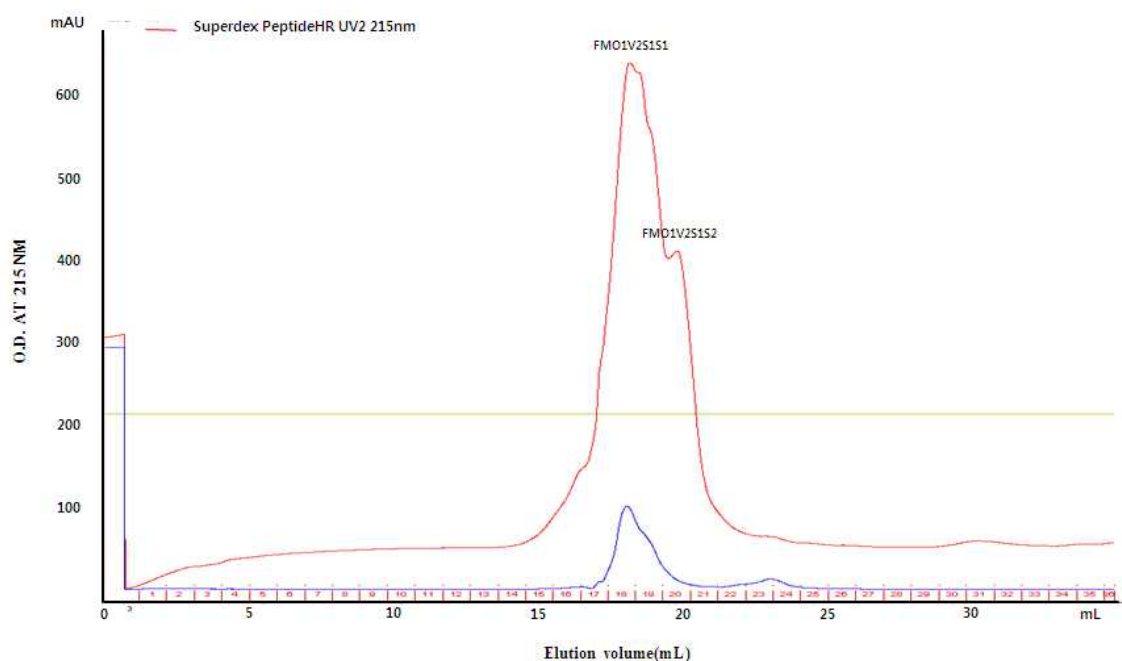


Fig. 33. Reverse phase column chromatogram of fermented milk by *Lactobacillus plantarum* Q180 on Superdex Peptide HR column (1.0×30cm)

Eluent : Water

Flow rate : 0.5 mL/min, Fraction : 1 mL/tube

Fractionation : FMO1V2S1S1(tube on, 16~19),

FMO1V2S1S2(tube on, 20~21)

Table 34. Purification of lipase inhibitory peptide by Superdex Peptide HR column from fermented milk peptide

	anti-lipase activity(%)	IC <sub>50</sub>	yield(%)
FMO1V2S1S1	>100%	2,817 ug/mL	73.92
FMO1V2S1S2	>100%	3,000 ug/mL	26.07

마. 아미노산 배열(amino acid sequence)의 분석

발효유로부터 ODS AQ colome, Vydac C18 column, Superdex peptide HR column을 이용하여 순차적으로 분리, 정제한 peptide의 N-말단으로부터 아미노산 배열은 Asp-Thr-Ile-Ser-Ala-Gln로 나타났으며, lipase 억제활성은 IC<sub>50</sub>이 2,817 ug/mL로 나타났다.

## 7. 체내 균총 변화 및 지방 흡수 저해효과

가. 선발된 probiotics를 급여 후 쥐 장내에서의 균총변화 추적

비만억제능이 우수한 균으로 선정된 *Weissella* sp. F22, *Enterococcus faecalis* MD366, *Lactobacillus plantarum* Q180와 상업균주 ABT-3(CHR HANSEN)의 균체 (10<sup>8</sup>, 10<sup>9</sup> CFU)를 생리식염수(0.9%)에 희석하여 고지방식이로 비만이 유도된 실험 동물(C57BL/6J mice 수컷)에게 6주간 경구투여 하였다. 일반식이 대조군과 고지방식이 대조군은 생리식염수를 경구투여하였다. 이때, 실험시작 전 분변시료와 6주 후 분변시료를 수집하였다.

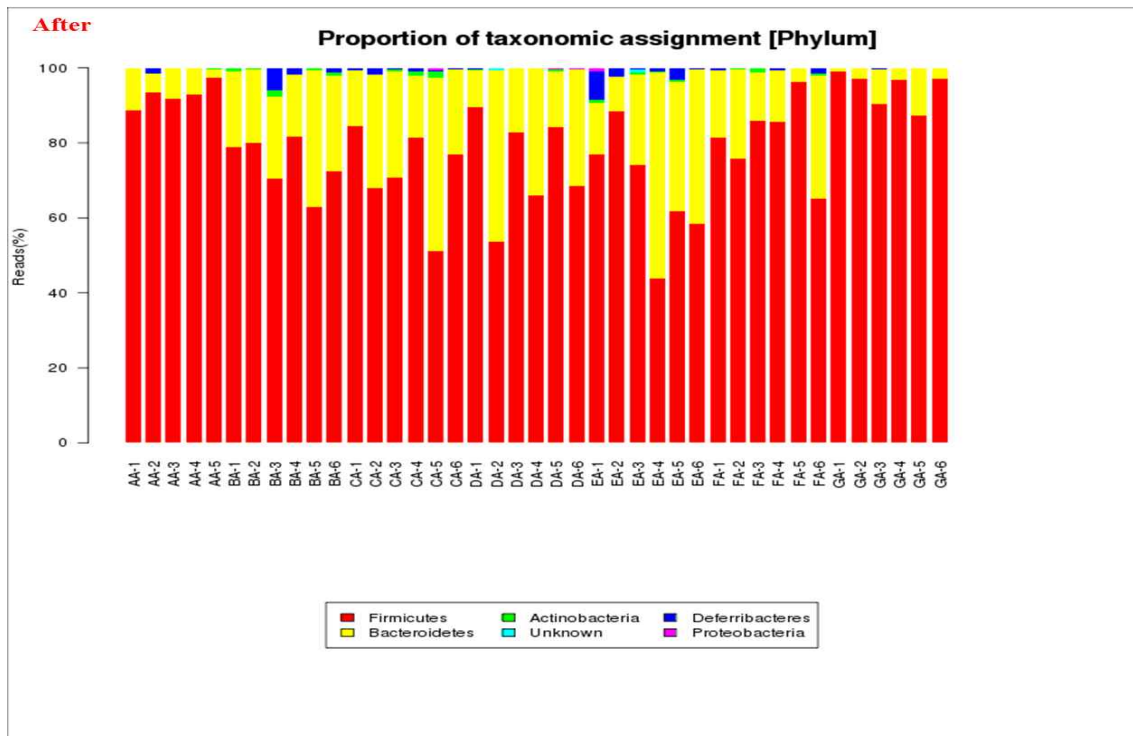
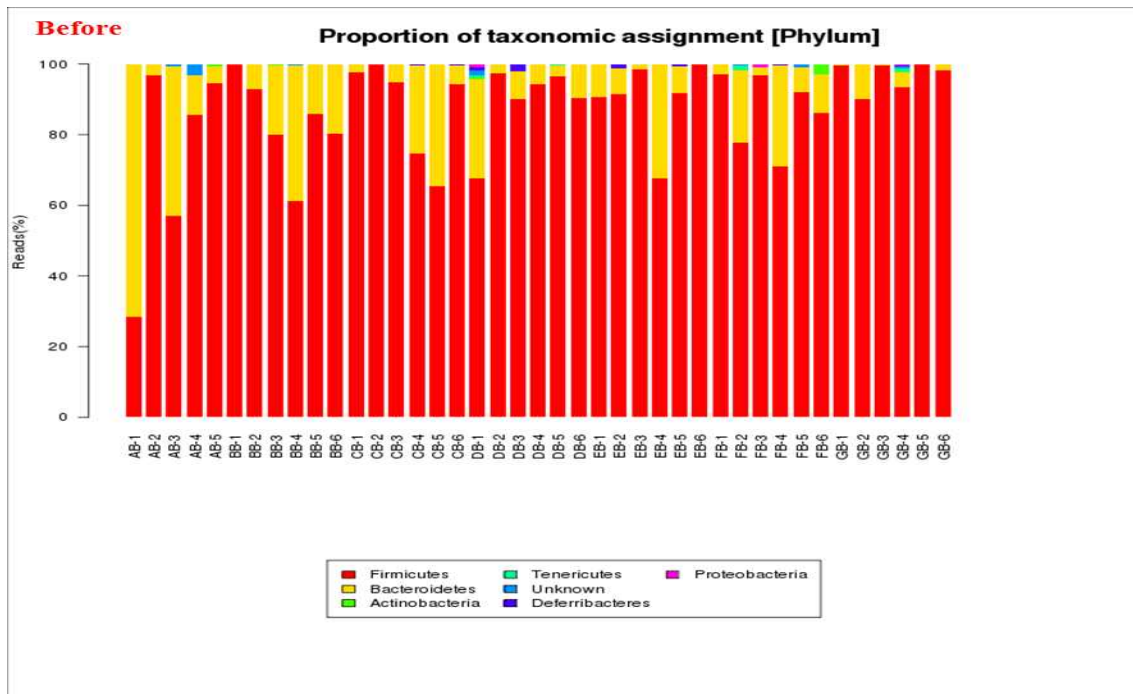


Fig. 34. Proportion of taxonomic assignment [Phylum] of mice fed high fat diet with lactic acid bacteria for 0 and 6 weeks.

A, normal diet; B, high fat diet; C, high fat diet with ABT-3(CHR HANSEN) ( $10^9$  CFU/day); D, high fat diet with *L. plantarum* Q180 ( $10^8$  CFU/day); E, *L. plantarum* Q180 ( $10^9$  CFU/day); F, *Weissella* sp. F22 ( $10^9$  CFU/day); G, *E. faecalis* MD366 ( $10^9$  CFU/day)



Phylum 수준에서, 일반식이 대조군인 A군은 실험시작 전에 비해 6주 후 Bacteroidetes보다 Firmicutes가 증가하였고, 고지방식이 대조군인 B군은 Bacteroidetes가 약간 증가하였다. 상업균주 식이군인 C군은 실험시작 전에 비해 6주 후 Firmicutes보다 Bacteroidetes가 크게 증가하였다. *L. plantarum* Q180 식이군 ( $10^8$  CFU/day)인 D군과 *L. plantarum* Q180 식이군( $10^9$  CFU/day)인 E군은 다른 군주에 비해 가장 Bacteroidetes가 증가하였다. *Weissella* sp. F22 식이군인 F군은 Bacteroidetes가 약간 증가하였고, *E. faecalis* MD366식이군인 G군 역시 Bacteroidetes가 증가하였지만 크게 증가하지는 않았다(Fig. 34).

이는 Turnbaugh 등(2009)이 Nature 지를 통해 미국 Washington 대학 유전자 연구팀이 완벽한 실험을 통해 장내의 수백종의 세균 중에서 2종류의 세균이 가장 많은데 하나는 Firmicutes, 또 하나는 Bacteroidetes로서, 비만자는 Firmicutes가 Bacteroidetes보다 7배나 많은 반면 여원자는 Firmicutes보다 Bacteroidetes가 많다고 입증하였다. 또한 Ley 등 (2006)은 마우스를 통한 실험에서 비만한 마우스에서 Firmicutes의 비율이 증가하고 Bacteroidetes가 감소함을 확인하였다. 본 실험 결과에서도 일반식이 대조군 및 상업균주군에 비해 *L. plantarum* Q180 식이군이 비만 억제효과가 있는 것으로 나타났다.

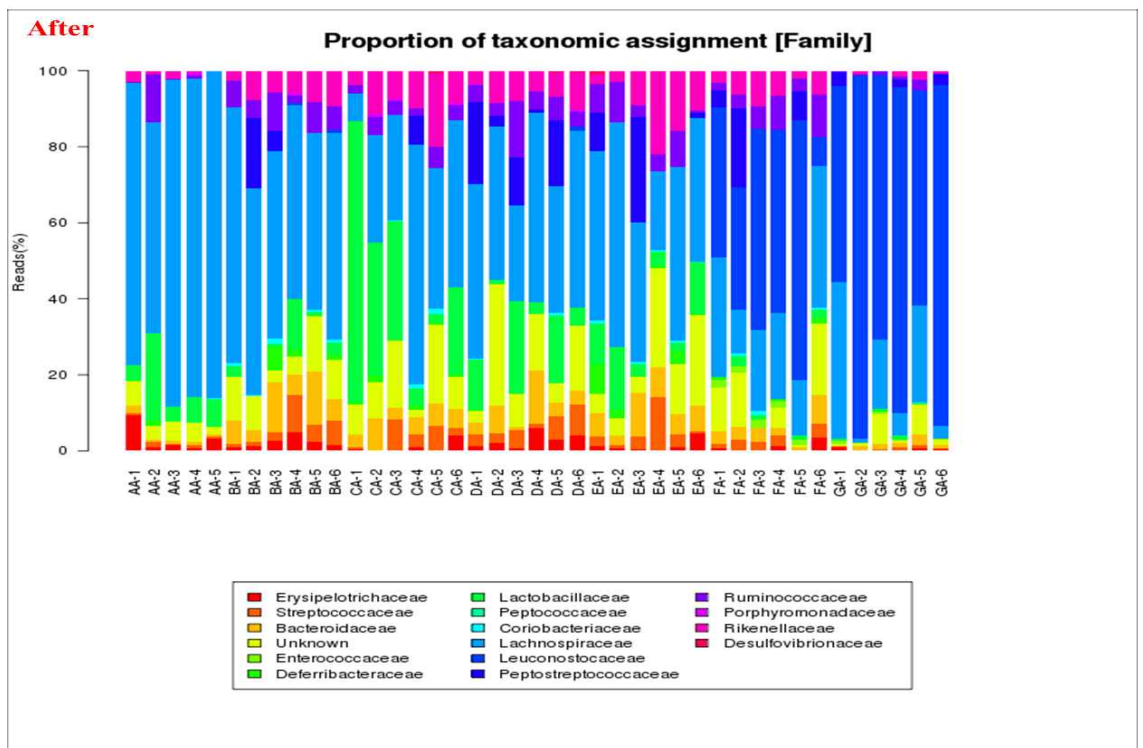
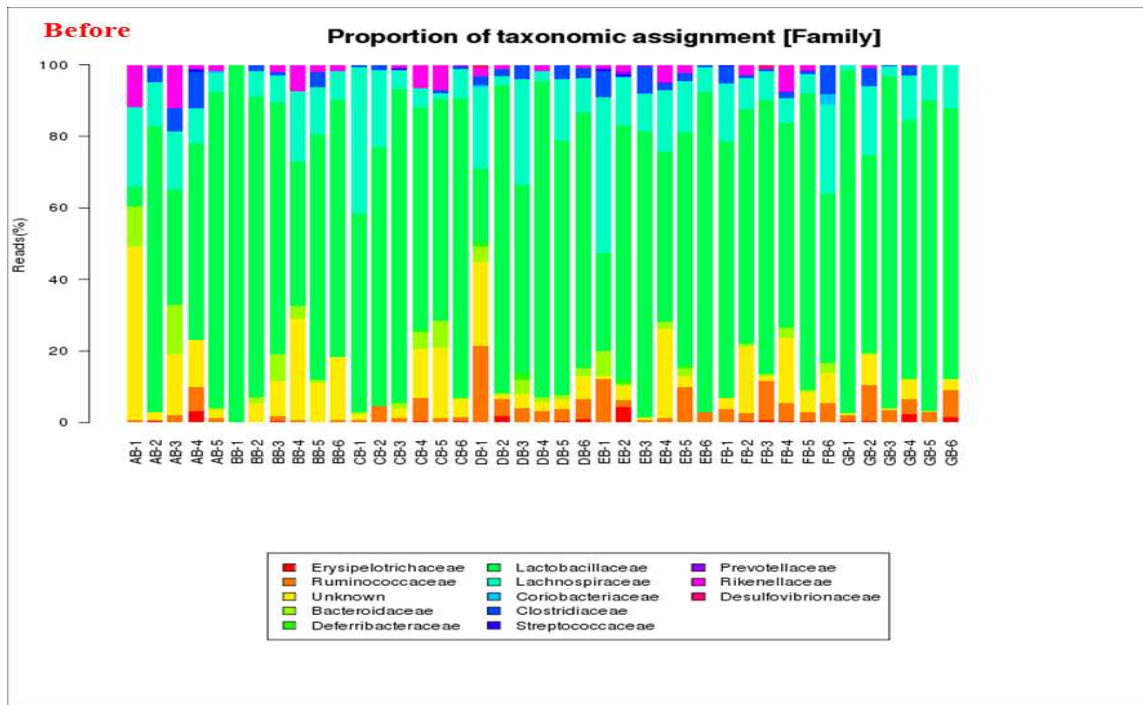


Fig. 35. Proportion of taxonomic assignment [Family] of mice fed high fat diet with lactic acid bacteria for 0 and 6 weeks.

A, normal diet; B, high fat diet; C, high fat diet with ABT-3(CHR HANSEN) ( $10^9$  CFU/day); D, high fat diet with *L. plantarum* Q180 ( $10^8$  CFU/day); E, *L. plantarum* Q180 ( $10^9$  CFU/day); F, *Weissella* sp. F22 ( $10^9$  CFU/day); G, *E. faecalis* MD366 ( $10^9$  CFU/day)

Family 수준에서, 전반적으로 실험시작 전에는 모든 실험구에서 Lactobacillaceae 속이 우점하였으나 6주 후에는 일반식이대조군인 A가 Lachnospiraceae 속이 가장 높게 우점하였고, 상업균주 식이군인 C는 Lactobacillaceae 속이 다른 군에 비해 높은 비율을 차지하였다. D와 E군은 Lachnospiraceae 속이 가장 높게 우점한 가운데 Lactobacillaceae와 Peptostreptococcaceae 속이 일부 차지하였다. F와 G군은 Leuconostocaceae 속이 우점하였다(Fig. 35).

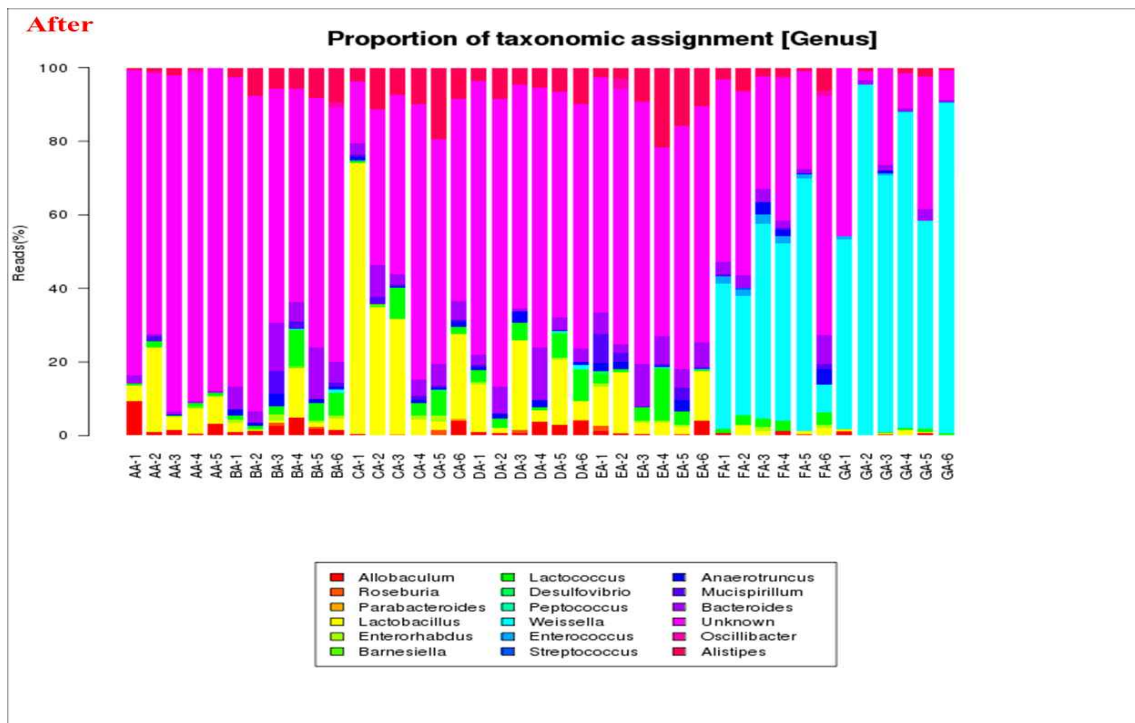
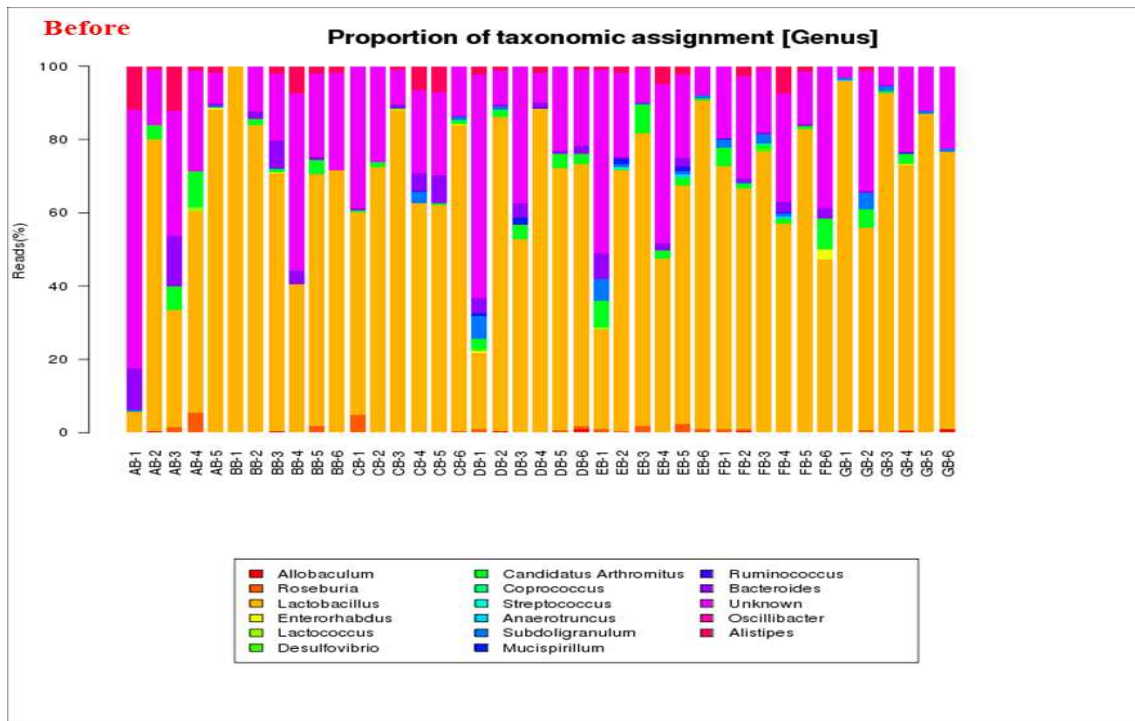


Fig. 36. Proportion of taxonomic assignment[genus] of mice fed high fat diet with lactic acid bacteria for 0 and 6 weeks.

A, normal diet; B, high fat diet; C, high fat diet with ABT-3(CHR HANSEN) ( $10^9$  CFU/day); D, high fat diet with *L. plantarum* Q180 ( $10^8$  CFU/day); E, *L. plantarum* Q180 ( $10^9$  CFU/day); F, *Weissella* sp. F22 ( $10^9$  CFU/day); G, *E. faecalis* MD366 ( $10^9$  CFU/day)

Genus 수준에서, 전반적으로 실험시작 전에는 모든 실험구에서 *Lactobacillus* 종이 가장 많이 분포하였으나, 6주 후에는 미지균이 가장 많이 차지하였다. 상업균주식이균인 C는 *Lactobacillus* 종이 비교적 높게 분포하였다. D와 E 군은 미지균이 가장 많았고, 일부 *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Bacteroides* 종이 분포하였으며, F와 G 군은 *Weissella* 종이 많이 차지하였다(Fig. 37).

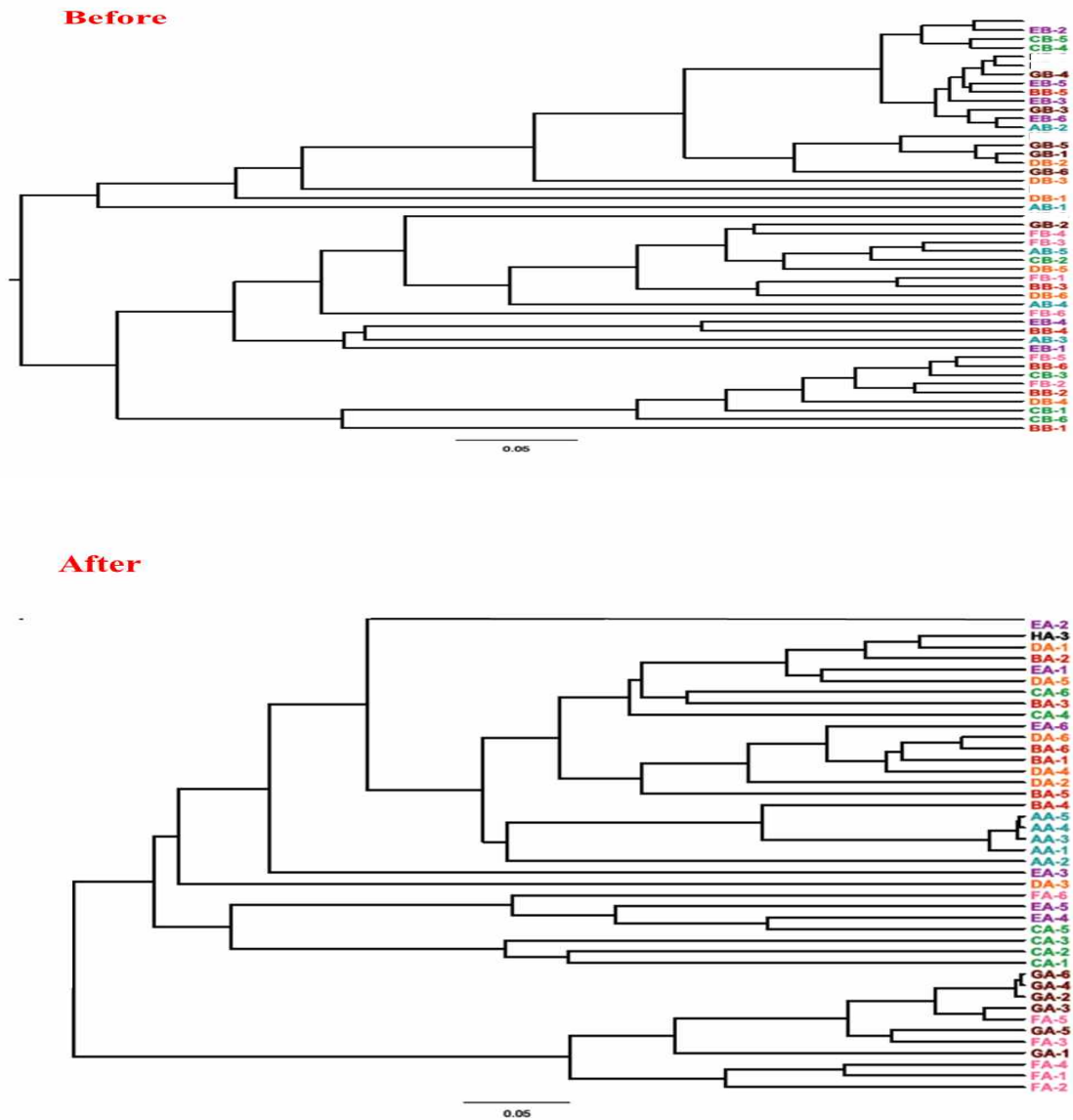


Fig. 37. phylogenetic tree of mice fed high fat diet with lactic acid bacteria for 0 and 6 weeks.

A, normal diet; B, high fat diet; C, high fat diet with ABT-3(CHR HANSEN) ( $10^9$  CFU/day); D, high fat diet with *L. plantarum* Q180 ( $10^8$  CFU/day); E, *L. plantarum* Q180 ( $10^9$  CFU/day); F, *Weissella* sp. F22 ( $10^9$  CFU/day); G, *E. faecalis* MD366 ( $10^9$  CFU/day)

전반적으로 실험시작 전에는 모든 군간에 균의 분포가 고루 분포하였다. 6주 후에는 일반식이 대조군인 A군, *Weissella* sp. F22 식이균인 F군, *E. faecalis* MD366 식이균인 G군이 가장 가깝게 분포하였고, 고지방식이 대조군인 B군은 비교적 가깝게 분포하였으며, 상업균주식이균인 C군은 2개로 나뉘어 분포하였다. 그러나 *L. plantarum* Q180식이균인 D군과 E군은 비교적 넓게 분포하였다(Fig. 38).

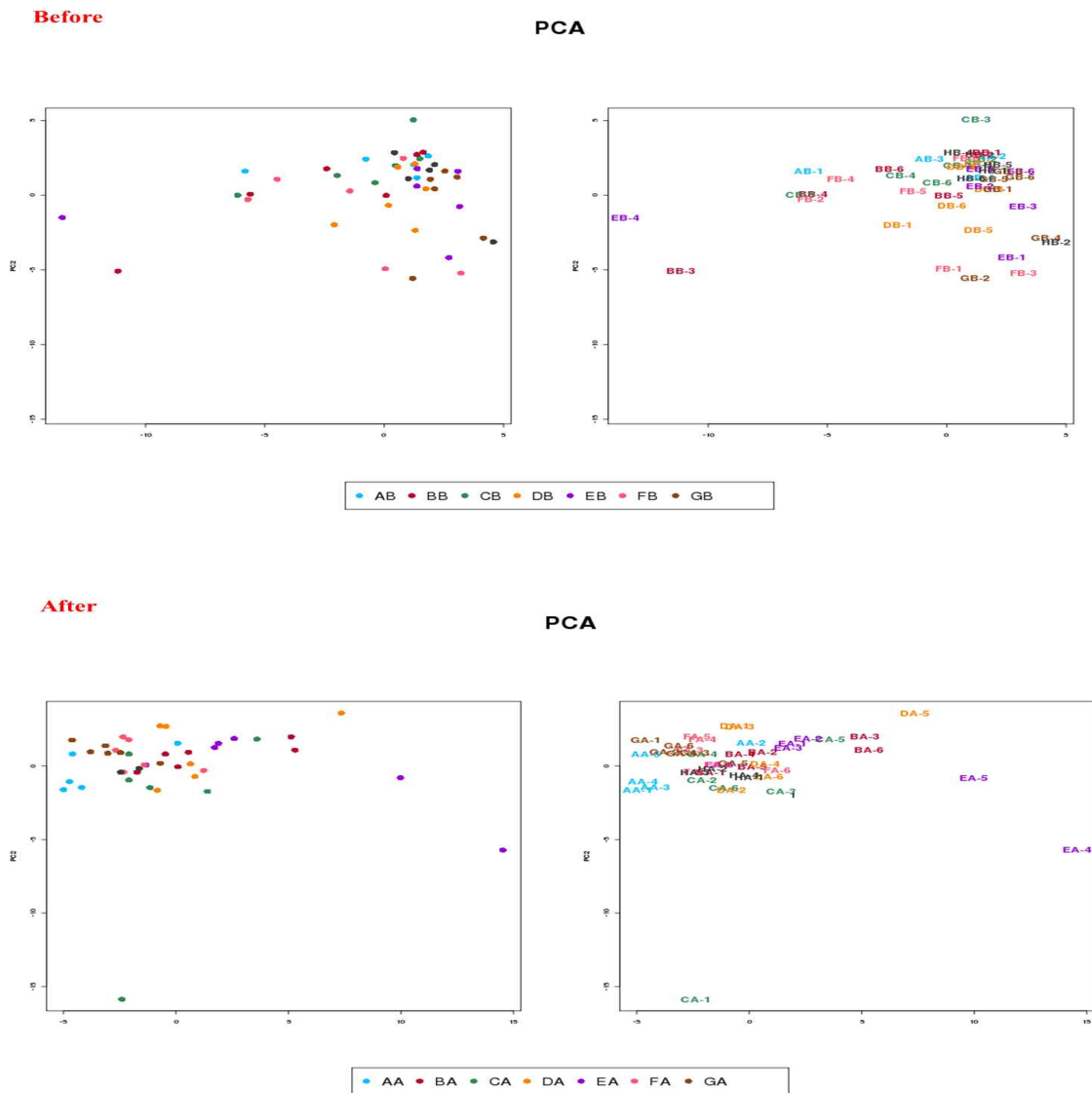


Fig. 38. PCA of mice fed high fat diet with lactic acid bacteria for 0 and 6 weeks.

A, normal diet; B, high fat diet; C, high fat diet with ABT-3(CHR HANSEN) ( $10^9$  CFU/day); D, high fat diet with *L. plantarum* Q180 ( $10^8$  CFU/day); E, *L. plantarum* Q180 ( $10^9$  CFU/day); F, *Weissella* sp. F22 ( $10^9$  CFU/day); G, *E. faecalis* MD366 ( $10^9$  CFU/day)

전반적으로 실험시작 전에는 B와 E군 1 개체씩을 제외하고 전체적으로 모여 있는 분포를 보였고 6주 후 역시 상업균주 식이균인 C군 1개체를 제외하고 다른 군과 비슷한 분포를 보였다. 다만, *L. plantarum* Q180 ( $10^9$  CFU/day) 식이균인 E 군만이 다른 군에 비해 넓게 분포하는 경향을 보였다(Fig. 38).

#### 나. 체내 지방흡수 저해효과 (in vivo)

비만 억제능이 우수한 균으로 선정된 *Weissella* sp. F22, *E. faecalis* MD366, *L. plantarum* Q180 균주의 체내 지방흡수 저해효과 실험을 실시하였다. 0 시간의 Triglyceride(TG) 함량에 대한 시간 별 TG 함량의 비율을 나타낸 결과는 Fig. 39에서 보는 바와 같다. B, D, E 군은 3시간대까지 TG의 함량이 증가하다가 4 시간대부터 감소하는 것을 볼 수 있고, C와 F군은 4시간까지 증가하다가 감소하는 양상을 보였다. 올리브기름과 D.W를 투여한 대조군 B군은 3시간 후 103.5% 증가하였다가, 5시간대에 0시간과 비슷한 수치를 나타내었고, 상업균주 ABT-C 균주로 제조한 발효유를 투여한 C군은 4시간까지 68.2% 증가하였고, 5시간 후 0시간대보다 17.2%의 증가를 보였다. *L. plantarum* Q180로 제조한 발효유를 투여한 D군은 3시간까지 0시간대비 38.4%의 증가를 보이다가 5시간 후 0시간대보다 17.7% 감소를 나타내었고, *Weissella* sp. F22로 제조한 발효유를 투여한 E군은 3시간 후 102.2% 증가하였고, 5시간 후 60.2%의 증가를 나타내었다. *E. faecalis* MD366로 제조한 발효유를 투여한 F군은 4시간까지 134.1%의 증가를 나타내었고, 5시간 후 40.4%의 증가를 보였다.

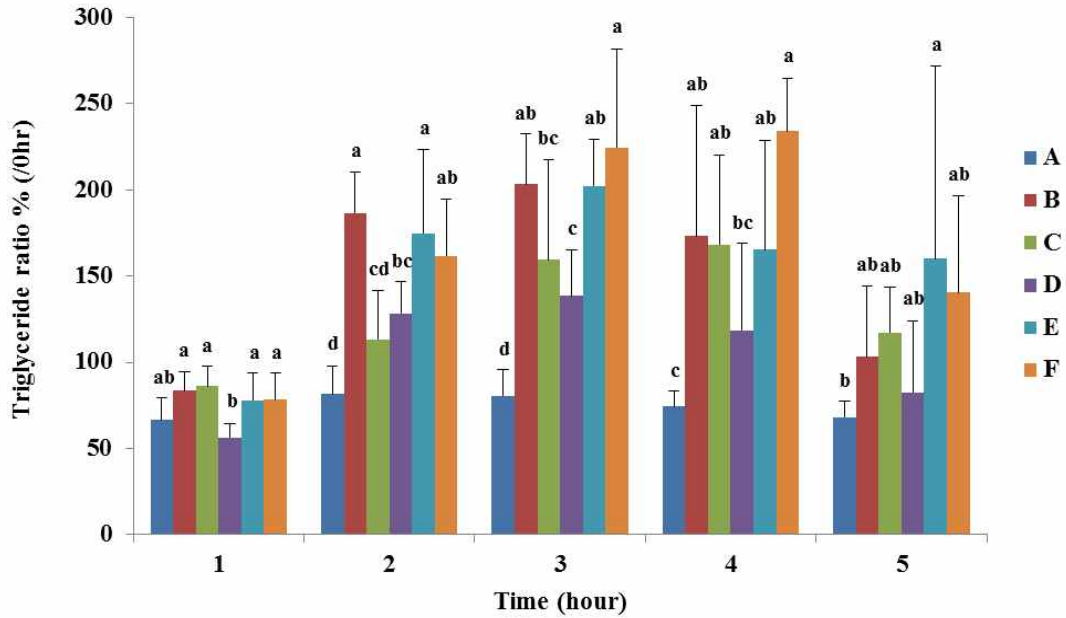


Fig. 39. Changes in Triglyceride gain of rat orally administrated with olive oil and fermented milk for 5 hours Values are mean±SD of 7 rat per group.

<sup>1)</sup>A, distilled water; B, olive oil and distilled water ; C, olive oil and fermented milk by ABT-3(CHR HANSEN); D, olive oil and fermented milk by *L. plantarum* Q180; E, olive oil and fermented milk by *Weissella* sp. F22; F, olive oil and fermented milk by *E. faecalis* MD366.

<sup>a~c</sup>Means with the same letter are not significantly different. (p<0.05).

다. 선발된 probiotics를 급여 후 쥐 무게와 혈중 지질농도 변화

비만억제능이 우수한 균으로 선정된 *Weissella* sp. F22, *Enterococcus faecalis* MD366, *Lactobacillus plantarum* Q180와 상업균주 ABT-3(CHR HANSEN)의 균체( $10^8$ ,  $10^9$  CFU/day)를 생리식염수(0.9%)에 희석하여 고지방식이로 비만이 유도된 실험동물(C57BL/6J mice)에게 6주간 경구투여 한 후, 혈액과 장기를 적출하여 실험하였다. 이 때, 일반식이 대조군과 고지방식이 대조군은 생리식염수를 경구투여하였다. 사육기간 중 쥐의 체중은 주1회 측정하였으며, 그에 따른 체중변화는 Fig. 40에 나타내었다. 사육 6주 후 일반식이 대조군인 A군의 평균 무게는 26.30g, 고지방식이 대조군인 B군의 평균 무게는 28.84g, ABT-3 ( $10^9$  CFU/day)균



주를 경구투여한 C군은 28.74g, *Lactobacillus plantarum* Q180( $10^8$  CFU/day) 균주를 경구투여한 D군은 29.57g, *Lactobacillus plantarum* Q180( $10^9$  CFU/day) 균주를 경구투여한 E군은 28.29g, *Weissella* sp. F22( $10^9$  CFU/day) 균주를 경구투여한 F군은 28.44g, *Enterococcus faecalis* MD366( $10^9$  CFU/day) 균주를 경구투여한 G군은 27.95g으로 A군과 D군을 제외하고는 유의적인 차이가 없었지만( $p < 0.05$ ), 고지방식이 대조군과 비교하여 E군은 13.70%, F군은 11.29%, G군은 18.10% 체중 증가량이 감소하였다(Table 35).

각 대조군과 실험군의 간과 신장 및 고환의 장기조직과 부고환 지방은 채혈 후 즉시 적출하여 생리식염수에 행군 후 표면의 수분을 제거하여 중량을 측정하였고, 그 결과는 Table 36에 나타내었다. 부고환 지방무게의 경우 E군과 G군이 다른 군에 비해 적게 나타났으나 고지방식이 대조군과의 유의적 차이는 없었다. 또한 각 개체에서 적출된 부고환 지방 중 해당군의 무게 평균과 유사한 부고환 지방의 사진을 Fig. 41에 나타내었으며, 육안으로도 E군과 G군의 부고환 지방이 다른 군에 비해 작은 것을 확인할 수 있었다.

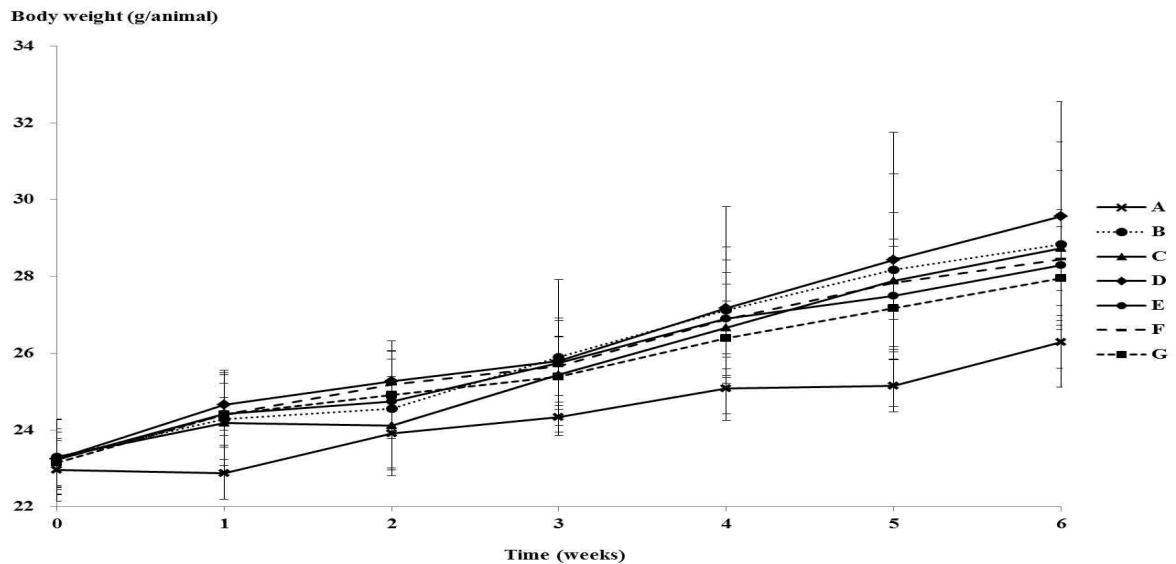


Fig. 40. Changes in body weight gain of mice fed high fat diet with lactic acid bacteria for 6 weeks

Values are mean±SD of 6 mice per group.

<sup>1)</sup>A, normal diet; B, high fat diet; C, high fat diet with ABT-3 (CHR HANSEN) ( $10^9$  CFU/day); D, high fat diet with *L. plantarum* Q180 ( $10^8$  CFU/day); E, *L. plantarum* Q180 ( $10^9$  CFU/day); F, *Weissella* sp. F22 ( $10^9$  CFU/day); G, *E. faecalis* MD366 ( $10^9$  CFU/day).

not significant differences ( $p < 0.05$ )

Table 35. Body weight changes of mice for 6 weeks

	A <sup>1)</sup>	B	C	D	E	F	G
<b>Body weight(g/mice)</b>							
Initial	22.96 ±0.82	23.30 ±0.98	23.30 ±0.97	23.24 ±0.79	23.22 ±0.72	23.23 ±0.71	23.14 ±0.59
Final	26.30 ±0.70	29.17 ±3.72	28.74 ±2.01	29.27 ±1.93	28.29 ±1.44	28.44 ±1.20	27.95 ±1.34
Wt. gain	3.33 ±0.56	5.87 ±6.57	5.44 ±1.64	6.02 ±1.39	5.06 ±1.37	5.20 ±1.43	4.80 ±1.52
Wt. gain rate (%) <sup>2)</sup>	0	76.11	69.16	80.81	54.96	56.21	44.22
Wt. lose rate (%) <sup>3)</sup>	42.21	0	7.35	-2.66	13.70	11.29	18.10

Values are mean±SD of 6 mice per group.

<sup>1)</sup>A, normal diet; B, high fat diet; C, high fat diet with ABT-3 (CHR HANSEN) ( $10^9$  CFU/day); D, high fat diet with *L. plantarum* Q180 ( $10^8$  CFU/day); E, *L. plantarum* Q180 ( $10^9$  CFU/day); F, *Weissella* sp. F22 ( $10^9$  CFU/day); G, *E. faecalis* MD366 ( $10^9$  CFU/day).

<sup>2)</sup>Weight gain rate compared to ND group (group A)

<sup>3)</sup>Weight gain loss compared to HFD group (group B)

not significant differences ( $p < 0.05$ )

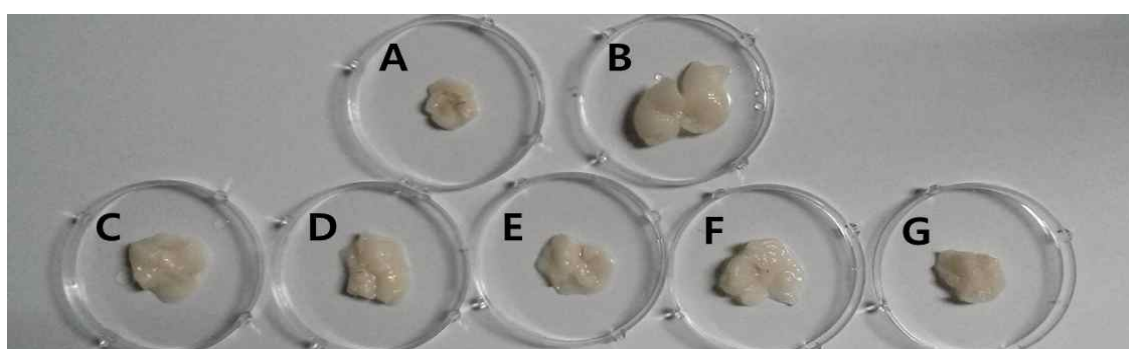


Fig. 41. Pictures of epididymal adipose tissue of mice fed high fat diet with lactic acid bacteria for 6 weeks.

<sup>1)</sup>A, normal diet; B, high fat diet; C, high fat diet with ABT-3 (CHR HANSEN) ( $10^9$  CFU/day); D, high fat diet with *L. plantarum* Q180 ( $10^8$  CFU/day); E, *L. plantarum* Q180 ( $10^9$  CFU/day); F, *Weissella* sp. F22 ( $10^9$  CFU/day); G, *E. faecalis* MD366 ( $10^9$  CFU/day).

Table 36. Weights of liver, kidney and epididymal adipose tissue of mice fed high fat diet with lactic acid bacteria for 6 weeks.

	Liver weight(g)	Kidney weight(g)	Spleen weight(g)	Epididymal AT(g)
A <sup>1)</sup>	0.90±0.05 <sup>a</sup>	0.29±0.02 <sup>b</sup>	0.06±0.01 <sup>b</sup>	0.31±0.05 <sup>b</sup>
B	0.89±0.08 <sup>a</sup>	0.33±0.02 <sup>a</sup>	0.07±0.01 <sup>ab</sup>	0.81±0.41 <sup>a</sup>
C	0.87±0.06 <sup>a</sup>	0.32±0.01 <sup>a</sup>	0.07±0.01 <sup>ab</sup>	0.76±0.23 <sup>a</sup>
D	0.97±0.15 <sup>a</sup>	0.33±0.02 <sup>a</sup>	0.07±0.01 <sup>a</sup>	0.76±0.20 <sup>a</sup>
E	0.98±0.09 <sup>a</sup>	0.34±0.01 <sup>a</sup>	0.08±0.01 <sup>a</sup>	0.65±0.23 <sup>a</sup>
F	0.87±0.02 <sup>a</sup>	0.32±0.01 <sup>a</sup>	0.07±0.00 <sup>a</sup>	0.74±0.16 <sup>a</sup>
G	0.87±0.08 <sup>a</sup>	0.32±0.01 <sup>a</sup>	0.07±0.01 <sup>a</sup>	0.63±0.12 <sup>a</sup>

Values are mean±SD of 6 mice per group.

<sup>1)</sup>A, normal diet; B, high fat diet; C, high fat diet with ABT-3 (CHR HANSEN) (10<sup>9</sup> CFU/day); D, high fat diet with *L. plantarum* Q180 (10<sup>8</sup> CFU/day); E, *L. plantarum* Q180 (10<sup>9</sup> CFU/day); F, *Weissella* sp. F22 (10<sup>9</sup> CFU/day); G, *E. faecalis* MD366 (10<sup>9</sup> CFU/day).

<sup>a-b</sup>Means with the same letter are not significantly different. (p<0.05).

간 효소치인 AST(aspartate transaminase)와 ALT(alanine transaminase)는 간장과 심장에 다량 분포하며 간세포 손상 시 농도가 현저히 상승하므로 이 활성도는 간질환의 지표가 된다. AST와 ALT는 Table 37에 나타난 것과 같이, 각군의 값의 차이는 보여지나 유의적인 차이는 없는 것으로 나타났다.

Table 37. Activities of AST, ALT in mice fed high fat diet with lactic acid bacteria for 6 weeks

(U/L)

	A	B	C	D	E	F	G
AST	144.80 ± 70.07	139.33 ± 50.35	139.67 ± 50.47	142.17 ± 60.18	150.33 ± 48.51	156.33 ± 62.11	159.17 ± 58.99
ALT	56.40 ± 25.97	147.40 ± 13.24	140.67 ± 70.46	84.40 ± 23.16	126.00 ± 32.70	177.67 ± 118.59	166.17 ± 121.44

Values are mean±SD of 6 mice per group.

<sup>1)</sup>A, normal diet; B, high fat diet; C, high fat diet with ABT-3 (CHR HANSEN) ( $10^9$  CFU/day); D, high fat diet with *L. plantarum* Q180 ( $10^8$  CFU/day); E, *L. plantarum* Q180 ( $10^9$  CFU/day); F, *Weissella* sp. F22 ( $10^9$  CFU/day); G, *E. faecalis* MD366 ( $10^9$  CFU/day).

not significantly different. (p<0.05)

비만억제능이 우수한 균으로 선정된 *Weissella* sp. F22, *Enterococcus faecalis* MD366, *Lactobacillus plantarum* Q180와 상업균주 ABT-3(CHR HANSEN)의 투여가 혈청 지질 농도에 미치는 영향은 Table 38과 같다. 혈청의 중성지방(TG)의 농도는 정상식이군(A)의 경우  $81.00 \pm 12.77$  mg/dL 이었고, 이에 비해 고지방식이대조군(B)은  $110.00 \pm 21.34$  mg/dL으로 정상식이군에 비해 증가하여 나타났다. ABT-3 ( $10^9$  CFU/day)균주를 경구투여한 C군과 *Lactobacillus plantarum* Q180 ( $10^8$  CFU/day)균주 경구투여군(D), *Weissella* sp. F22 ( $10^9$  CFU/day) 균주 경구투여군(F), *Enterococcus faecalis* MD366 ( $10^9$  CFU/day) 균주 경구투여군은 고지방식이대조군과 비슷한 값을 나타내었으나, *Lactobacillus plantarum* Q180 ( $10^9$  CFU/day) 균주 경구투여군(E)은  $88.67 \pm 5.35$  mg/dL으로 정상식이군과 비슷한 수준을 나타내었다.

Table 38. Lipid levels of plasma in mice fed high fat diet with lactic acid bacteria for 6 weeks.

(mg/dL)

	Total cholesterol	Triglyceride	LDL cholesterol	HDL cholesterol
A	137.00±13.10 <sup>c</sup>	81.00±12.77 <sup>c</sup>	14.40±2.30 <sup>b</sup>	127.20±11.30 <sup>c</sup>
B	173.00±8.88 <sup>ab</sup>	110.00±21.34 <sup>a</sup>	18.50±1.87 <sup>b</sup>	163.17±7.19 <sup>ab</sup>
C	162.33±7.09 <sup>b</sup>	114.33±15.55 <sup>a</sup>	16.00±2.45 <sup>b</sup>	153.50±6.28 <sup>b</sup>
D	180.33±8.33 <sup>a</sup>	112.33±15.72 <sup>a</sup>	19.67±3.67 <sup>b</sup>	165.33±6.74 <sup>ab</sup>
E	181.83±18.53 <sup>a</sup>	88.67±5.35 <sup>bc</sup>	25.00±9.27 <sup>a</sup>	167.83±15.84 <sup>a</sup>
F	174.83±14.27 <sup>ab</sup>	111.17±17.12 <sup>a</sup>	17.67±3.93 <sup>b</sup>	161.00±11.44 <sup>ab</sup>
G	163.50±6.69 <sup>b</sup>	107.67±21.57 <sup>ab</sup>	17.17±2.32 <sup>b</sup>	156.00±5.10 <sup>ab</sup>

Values are mean±SD of 6 mice per group.

<sup>1</sup>A, normal diet; B, high fat diet; C, high fat diet with ABT-3 (CHR HANSEN) (10<sup>9</sup> CFU/day); D, high fat diet with *L. plantarum* Q180 (10<sup>8</sup> CFU/day); E, *L. plantarum* Q180 (10<sup>9</sup> CFU/day); F, *Weissella* sp. F22 (10<sup>9</sup> CFU/day); G, *E. faecalis* MD366 (10<sup>9</sup> CFU/day).

<sup>a-c</sup> Means with the same letter are not significantly different. (p<0.05).

#### 라. 지방세포 크기 측정

지방세포 크기의 측정은 항비만 효능을 입증할 수 있는 효과적인 방법으로 알려져 있으며, 고지방식을 섭취하였을 경우 지방세포의 중성지방 축적을 증가시켜 지방 세포의 크기가 증가하게 된다(Park 등, 2005). 부고환 지방세포의 크기를 측정한 결과는 Fig. 42와 같다. 지방세포 크기의 분포를 본 결과 B군을 제외한 모든 군에서 2,000  $\mu\text{m}^2$  크기의 지방세포가 가장 많이 분포하였으며, 고지방 식이 대조군인 B 군에서는 5,000  $\mu\text{m}^2$  이상 크기의 지방세포가 가장 많이 분포하는 것으로 보아 프로바이오틱스의 급여가 고지방 식이로 인한 지방세포 축적을 억제해 주었을 것으로 사료된다. H&E 염색액으로 염색된 지방세포를 현미경으로 관찰해 보았을 때 역시 육안으로도 지방세포의 크기가 차이나는 것을 알 수 있었다.

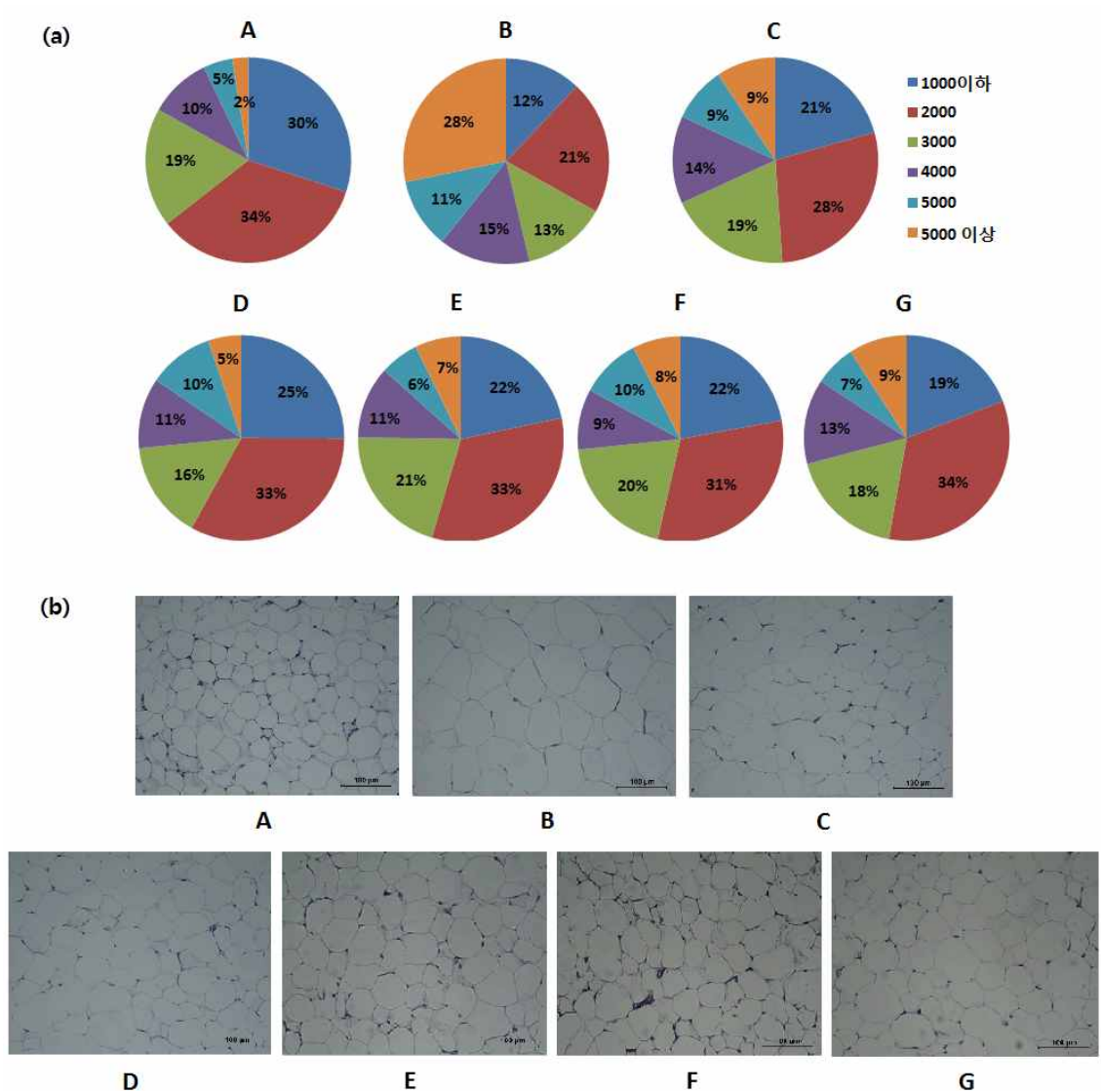


Fig. 42. Changes in adipocyte size of the epididymal fat pads in mouse.

All values are mean±SD of 6 mice per group; (a) Percentage of cell number; (b)

Photograph of the epididymal fat pads in mouse (original magnification × 200).

<sup>1)</sup>A, normal diet; B, high fat diet; C, high fat diet with ABT-3 (CHR HANSEN) ( $10^9$  CFU/day); D, high fat diet with *L. plantarum* Q180 ( $10^8$  CFU/day); E, *L. plantarum* Q180 ( $10^9$  CFU/day); F, *Weissella* sp. F22 ( $10^9$  CFU/day); G, *E. faecalis* MD366 ( $10^9$  CFU/day).

## 8. 최적 배합조성물 개발 및 상업적 이용 위한 젖산균 분말화

### 가. 배합비

상업균주인 ABT-3 균주를 이용하여 발효한 플레인 발효액에 *Lactobacillus plantarum* Q180 균주( $10^8$  CFU/mL)를 혼합한 후, 딸기잼과 블루베리잼을 농도별로 첨가하여 배합조성비(Table 39)를 설정한 다음 관능검사를 실시한 결과는 Table 40과 같다.

Table 39. Mix formula of developed products using selected strain

재료	배합비(%)					
	A	B	C	D	E	F
원유	80.682	80.682	80.682	80.682	80.682	80.682
탈지분유	3.318	3.318	3.318	3.318	3.318	3.318
올리고당	5	5	5	5	5	5
액상과당	2	2	2	2	2	2
딸기잼	4	6	8	-	-	-
블루베리잼	-	-	-	4	6	8
정제수	5	3	1	5	3	1
Total	100	100	100	100	100	100

Table 40. Sensory evaluation of developed products using selected strain<sup>1)</sup>

Mean±Std

	색	맛	조직감	종합적 기호도	구입의사
Control <sup>2)</sup>	7.00±1.78 <sup>ab</sup>	4.77±1.79 <sup>b</sup>	5.23±2.20 <sup>b</sup>	5.46±1.66 <sup>b</sup>	4.54±1.98 <sup>c</sup>
Control <sup>3)</sup>	4.31±2.32 <sup>d</sup>	6.36±1.2 <sup>a</sup>	5.85±1.77 <sup>b</sup>	5.62±1.80 <sup>b</sup>	5.38±1.80 <sup>ab</sup>
A	6.15±1.46 <sup>abc</sup>	6.31±1.60 <sup>a</sup>	6.46±1.13 <sup>ab</sup>	6.38±1.61 <sup>ab</sup>	6.08±1.80 <sup>ab</sup>
B	6.15±1.46 <sup>abc</sup>	6.31±2.18 <sup>a</sup>	6.54±1.45 <sup>ab</sup>	6.77±1.54 <sup>ab</sup>	6.54±1.51 <sup>ab</sup>
C	5.15±1.57 <sup>cd</sup>	6.83±1.27 <sup>a</sup>	6.23±1.69 <sup>ab</sup>	6.15±1.91 <sup>ab</sup>	6.00±1.78 <sup>ab</sup>
D	5.54±1.51 <sup>cd</sup>	5.62±1.19 <sup>ab</sup>	6.15±1.63 <sup>ab</sup>	5.54±1.33 <sup>b</sup>	5.62±1.12 <sup>bc</sup>
E	6.77±1.79 <sup>ab</sup>	6.38±1.61 <sup>a</sup>	6.31±1.38 <sup>ab</sup>	6.33±1.44 <sup>ab</sup>	6.46±1.39 <sup>ab</sup>
F	7.38±1.89 <sup>a</sup>	6.85±1.82 <sup>a</sup>	7.46±1.20 <sup>a</sup>	7.46±1.27 <sup>a</sup>	7.31±1.49 <sup>a</sup>

<sup>1)</sup>1~9점까지의 점수를 13명의 평가단에 의해 평가한 점수의 평균값이다.

<sup>2)</sup>Control: 플레인발효유

<sup>3)</sup>Control: 도마슈노(매일유업)

<sup>a-d</sup> Means with the same letter within the row are not significantly different. (p<0.05).

표 40의 결과를 보면 색, 맛, 조직감, 종합적 기호도, 구입의사의 모든 항목에서 ABT-3균주로 발효하고 *Lactobacillus plantarum* Q180 균주(10<sup>8</sup> CFU/mL)를 혼합한 발효유에 블루베리잼을 8% 첨가한 발효유가 가장 높은 점수를 얻었다. 또한 다른 균에 있어서도 전반적으로 대조군보다 관능평가가 우수하거나 비슷한 점수를 보였다.



나. 이화학적 특성조사

이화학 성분을 분석한 결과는 다음 Table 41과 같다.

Table 41. pH and titratable acidity of developed products using selected strain

	pH	고형분 (%)	젖산균수 (CFU/mL)	적정산도(%)
Control <sup>1)</sup>	4.40	15.60±6.29	7.63×10 <sup>9</sup>	0.95
Control <sup>2)</sup>	4.06	18.97±0.16	8.06×10 <sup>9</sup>	0.94
A	4.38	21.46±0.16	7.33×10 <sup>9</sup>	1.05
B	4.37	22.69±0.14	7.46×10 <sup>9</sup>	1.02
C	4.36	24.65±0.23	7.66×10 <sup>9</sup>	0.95
D	4.35	21.51±0.09	7.50×10 <sup>9</sup>	1.00
E	4.36	22.54±0.03	7.53×10 <sup>9</sup>	0.97
F	4.36	23.47±0.20	7.53×10 <sup>9</sup>	1.02

<sup>1)</sup>Control: 플레인발효유

<sup>2)</sup>Control: 도마슈노(매일유업)

ABT-3균주로 발효하고 *Lactobacillus plantarum* Q180 균주(10<sup>8</sup> CFU)를 혼합한 발효유에 딸기잼 4%를 첨가한 발효유(A), 6%를 첨가한 발효유(B), 8%를 첨가한 발효유(C), 블루베리잼 4%를 첨가한 발효유(D), 6%를 첨가한 발효유(E), 8%를 첨가한 발효유(F)의 이화학적 성분을 조사한 결과 pH는 4.3이었으며 고형분함량은 21.46~24.65%, 젖산균수는 7.33×10<sup>9</sup>~4.66×10<sup>9</sup> CFU/mL, 적정산도는 0.95~1.05%이었다. 이는 호상발효유의 경우 무지유고형분 8.0%, 젖산균수 1억 CFU/mL 이상이어야 하는 축산물의 가공기준 및 성분규격(2014)에 모두 합격이었다.

다. 제조공정

원유 80.682%와 탈지분유 3.318%를 첨가하고 65°C에서 배합하여 완전히 녹인 후 90°C에서 5분간 살균하였으며, 40°C로 냉각시킨 다음 상업균주인 ABT-3 균주를 0.1% 접종하고, 최종 pH 4.4으로 감소할 때까지(40°C, 5시간) 배양한 액에 *Lactobacillus plantarum* Q180 균주( $10^8$  CFU/mL)를 혼합한 후 블루베리잼 8%, 올리고당 5%, 액상과당 2% 및 정제수 1%를 첨가하고 교반하여 호상발효유를 제조하였다(Fig. 43, 44).

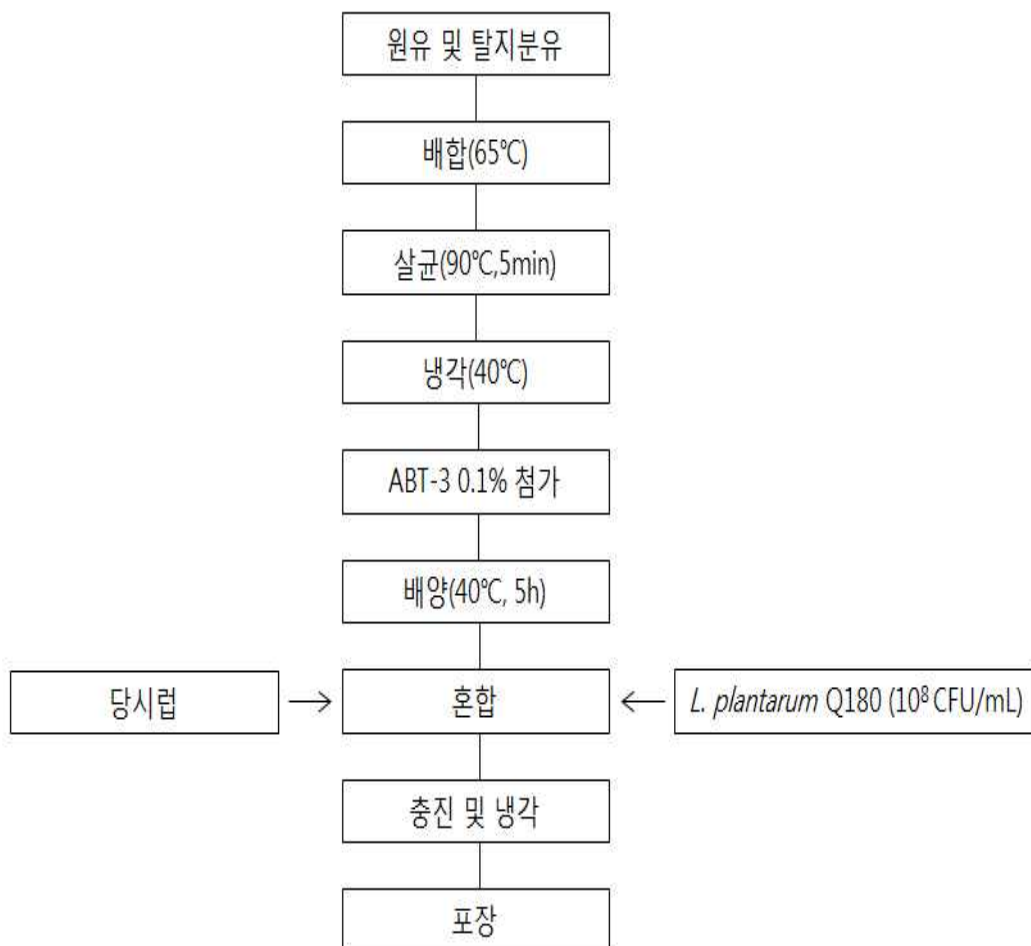


Fig. 43. The manufacturing process of fermented yogurt



Fig. 44. The prototype of fermented milk for anti-obesity

라. 젖산균 동결건조 분말화

1) *Lactobacillus plantarum* Q180 배양조건

5 L Double fermentor를 이용하여 실험실용 *Lactobacillus* MRS 배지와 molasse 를 이용한 산업용 MRS배지에서 생장을 비교한 결과, Table 42와 같이 배양 24시간까지 배양시간별 생균수는 두 배지 간에 큰 차이가 없었으나 최고 생균수 도달 수준에 차이가 있었다.

Table 42. Change of viable bacteria in the experimental and industrial growth medium

배양시간	Lac. MRS broth	Mod. MRS broth
	CFU/mL	CFU/mL
0 h	$8.2 \times 10^6$	$5.8 \times 10^6$
6 h	$1.2 \times 10^8$	$6.6 \times 10^7$
12 h	$1.4 \times 10^9$	$1.6 \times 10^9$
24 h	$1.4 \times 10^{10}$	$4.2 \times 10^9$

따라서 본 연구에서는 가격이 높은 *Lactobacillus* MTS broth에서 *L. plantarum* Q180을 배양하는 것이 바람직한 것으로 결정하고, 성장 및 계대배양에 사용하였다. 또한, *L. plantarum* Q180의 성장데이터를 분석한 결과는 Table 43과 같다.

Table 43. Growth rate of *Lactobacillus plantarum* Q180

	계산식	계산결과
세포 중량	$1.73\text{g}/1.4 \times 10^{10}$	$6.65 \times 10^{-8} \text{ g/cell}$
비증식속도 (k)	$k = 1/t \ln n/n_0$ $= 1/1,440 \times \ln (1.4 \times 10^{10} / 8.2 \times 10^6)$ $= 1/300 \times 2.303 \times \log (5.8 \times 10^6)$ $= 1/300 \times 2.303 \times \log 5.8 + 4$ $= 1/300 \times 2.303 \times 0.7634 + 4$ $= 1/300 \times 2.303 \times 4.7634$	0.0366/min
평균 세대 시간 (T)	$0.693/k = 0.693/0.044244$	18.9515분
유도기 (L)	$= (1.4 \times 10^{10} - 8.2 \times 10^6) / (t - L)$ $= \log 2 / T$ $= 10.146 - 7.914 / t = 0.301 / 18.95\text{분}$ $t = 2.232 \times 18.95 / 0.301 = 34.96 / 0.301$ $= 140.55\text{분}$ $L = 1440\text{분} - 140.55\text{분} = 1,299.45\text{분}$	21.65시간

세포회수 실험결과 *Lactobacillus* MRS 배지 3리터 + Modified MRS 배지 3리터를 처리하여 세포회수 총 중량은 31g/3L MRS 배지였다. 세포펠렛의 수분함량은 83.3% 였으며, 세포 건조중량은 5.18g/3L MRS 배지였다. 세포 생산량은 1.73g/L MRS 배지였으며 세포회수율은 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{세포 회수율} : (8.09249\text{E}+12 \times 5.18) - 1.4 \times 10^{10}/\text{mL} \times 3000 \text{ mL} = \underline{99.8\%}$$

(펠렛 g당 생균수 x 총 펠렛 중량 - 여액 mL당 생균수 x 여액 량)

## 2) 동결건조 스타터 개발

Table 44에서 보는 바와 같이 18시간 배양한 접종액의 생균수가  $4.9 \times 10^{10}/\text{mL}$ 으로 매우 높은 수준이었으며, 이를 접종한 후 18시간 때에  $2 \times 10^{11}/\text{mL}$ 의 생균수에 도달하였다. 이때에 젖산균 세포를 회수하는 것이 좋을 것으로 나타났다. 발효 탱크에 멸균 산소는 공급하지 않았으며, 배양 중 pH를 5.6 이상으로 유지하기 위하여 2N NaOH를 공급하였으나 급격한 생균의 증가가 이루어지는 12시간 이후에는

pH 5.23 수준까지 떨어졌다.

Table 44. Change of viable bacteria during fermentation in 70 L fermenter

배양시간	Controlled pH	생균수(CFU/mL)	
접종액(18 h)	-	$5.0 \times 10^{10}$	$4.8 \times 10^{10}$
0 h	6.55	$1.0 \times 10^8$	$9.6 \times 10^7$
6 h	6.32	$2.8 \times 10^8$	$3.62 \times 10^8$
12 h	5.87	$4.6 \times 10^9$	$5.20 \times 10^9$
18 h	5.23	$2.65 \times 10^{11}$	$1.12 \times 10^{11}$
24 h	5.12	$9.80 \times 10^{10}$	$1.07 \times 10^{10}$

\* 0시간대의 생균수는 (18 시간 배양한 MRS의 생균수 x 접종량) / 배지량으로 추정하였음.

\*\* 배지의 pH는 자동 조절되도록 하였으며, 산소농도는 교반에 의해 생성된 용존산소의 농도의 양임.

70 L Bio-fermentor에서 배양한 배양액을 원심분리하여 회수한 cell pellet의 중량은 48.5g이었으며, 수분함량 (적외선수분함량 분석기 FD 600, Japan)은 5.1%였다 (Fig. 45, Table 45).



Fig. 45. Harvested cell pellet

Table 45. Composition of the harvested cell pellet

중량	수분함량(%)	생균수(CFU/g)
48.5g	5.1%	$86 \times 10^{10}$

Cell pellet의 분말화 단계별 생균수를 측정하기 위하여 첨가한 동결보호제의 종류에 따라 동결보호제 혼합 전/후, 예비동결 후, 동결건조 전/후로 나누어 생균수를 측정한 결과는 Table 46과 같다.

Table 46. Change of viable bacteria by confrication steps of cell pellet (CFU/g)

제조단계	동결보호제 종류	
	New MRS+SMP	New MRS+SIMP
동결보호제 혼합 후	$>300 \times 10^{10}$	$>300 \times 10^{10}$
진공건조 전	$>300 \times 10^9$	$>300 \times 10^9$
진공건조 후	$81 \times 10^{10}$	$88 \times 10^{10}$

최종 제품은 요구르트 제조에 적용하여 배양시간인 7시간 이내에 생장을 하는지 확인하기 위한 활력 실험 및 냉장 보존조건 하에서 생존균수 유지에 관한 데이터를 확보하기 위한 실험을 실시하였다. 냉장 저장중의 *L. plantarum* Q180 동결건조 스타터의 생존력을 알아보고자 저장 8주 후의 생균수를 측정한 결과는 Table 47과 같다. 저장 8주 후까지 생균수의 생존률은 크게 변화하지 않았다.

Table 47. Survival bacteria count of freeze-dried *Lactobacillus plantarum* Q180 stater during cold storage

냉장 일수	동결보호제 종류	
	SMP	SIMP
진공 건조 후	$2.01 \times 10^{11}$	$5.91 \times 10^{11}$
냉장 4주일 후	$9.94 \times 10^{10}$	$1.79 \times 10^{11}$
냉장 8주일 후	$6.80 \times 10^{10}$	$9.50 \times 10^{10}$

### 3) 요구르트 배양 및 저장 중 변화

3 종류의 스타터를 4%의 탈지분유를 첨가한 발효 베이스에 적용하여 18시간

배양하였을 때의 물리적 특성은 커드 강도와 시네리시스(syneresis) 발생 면에서 모두 만족할 만한 수준이었으며, 특히 *L. plantarum* Q180 단독으로 배양한 LPL 발효 베이스의 커드 강도가 가장 만족스러웠다.

배양 6시간 때 커드의 응결이 시작되는 시점에서 물리적 충격을 가하였을 때 이미 커드가 응결되고 있던 ABT-4 함유 발효베이스 2 처리구는 모두 미세커드 입자가 발생되었고 그 중 혼합균주 접종 처리구에서 심한 syneresis가 발생하였다. LPL 접종 발효 베이스는 6시간 때까지 커드 응결이 시작되지 않아 미세 커드 입자 및 syneresis 현상이 전혀 나타나지 않았다.

*L. plantarum* Q180(LPL) 동결건조분말의 스타터로서의 활력을 조사하고자 요구르트 베이스를 제조하여 배양 중 생균수 변화를 실험한 결과는 Table 48과 Fig. 46과 같다.

Table 48. Change of viable bacteria count of 3 kinds of starter during fermentation (Log. number)

	0 h	6 h	18 h
ABT-4	8.36	9.75	9.54
ABT+LPL	8.26	9.89	9.00
LPL	7.69	9.23	9.48

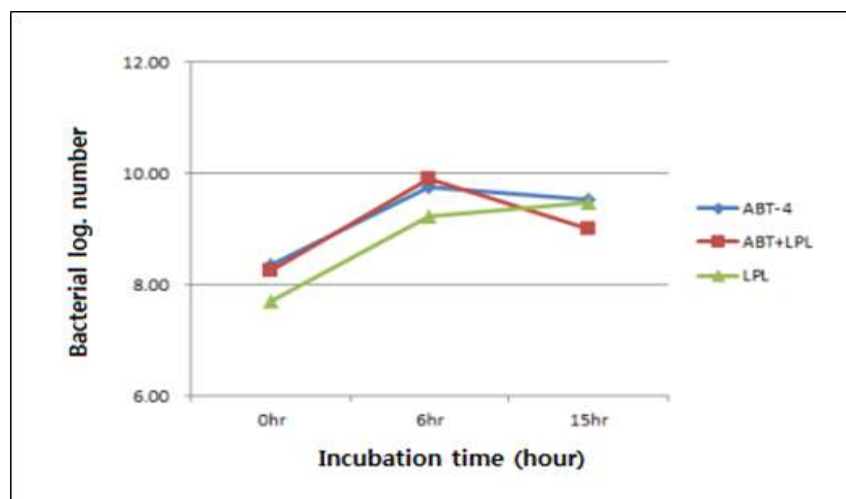


Fig. 46. Change of viable bacteria count of 3 kinds of starter during fermentation

발효 베이스 배양 중 생균수는 접종 생균의 접종비율이 0.1%로서 비교적 높은 수준이었으며, 동결 건조 스타터의 생균수도  $10^{11}/\text{mL}$  수준을 유지하고 있어서 0.1% 접종하였음에도  $10^7/\text{mL}$  이상으로 배양이 시작되었다. *L. plantarum* Q180은 짧은 시간의 유도기를 거치는 동안 생균수가  $10^{10}/\text{mL}$  가까이 증가하여 동결 건조 후의 활력성 회복이 매우 좋았음을 입증하였다. 상업용 균주 ABT-4와 비교해 보아도 ABT-4 배양액의 생균수 증가와 큰 차이가 없는 것으로 판단된다. ABT-4 균주에는 초기 산생성력이 우수한 젖산구균인 *S. thermophilus*의 초기 증식이 매우 빨랐으며, 동결건조 스타터는 초기 생육에는 좀 더 긴 유도기가 필요하였다. 이와 같은 결과는 동결보호제로서 첨가한 New MRS+SIMP의 *L. plantarum* Q180 세포의 냉동 중 cryogenic effect가 매우 좋았다는 것을 말해주는 결과이다.

요구르트 베이스 발효 중 젖산 생성을 담당해야 하는 상업용 스타터인 CHR HANSEN사의 ABT-4균주를 혼합하여 접종하여 *L. plantarum* Q180 단독으로 배양한 경우와 비교하였다. 두 처리구의 산생성력은 아래의 Table 49와 Fig. 47에서 나타난 바와 같이 *L. plantarum* Q180은 ABT-4균주에 비하여 초기 산 생성이 미진하였음을 알 수 있었다. 두 균주를 동일한 양으로 혼합접종한 배양액에서는 젖산 생성력에 비하여 약간 낮은 수준을 보였으나 요구르트 제품 제조에는 적합한 범위 내에 있었다.

Table 49. Change of pH and acidity of 3 kinds of starter during fermentation

	0 h		6 h		18 h	
	Acidity	pH	Acidity	pH	Acidity	pH
ABT-4	0.13	6.65	0.46	4.54	1.05	4.10
ABT+LPL	0.14	6.64	0.34	4.67	0.98	4.09
LPL	0.13	6.65	0.15	6.42	0.76	4.28

(%)



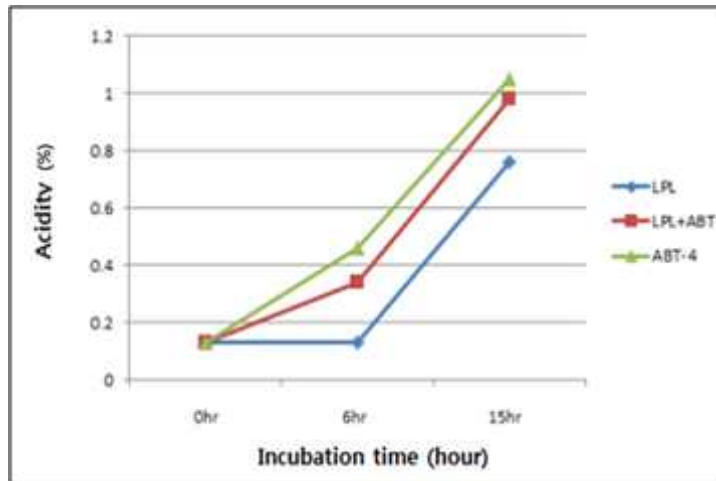


Fig. 47. Change of acidity of 3 kinds of starter during fermentation

Flavored 요구르트 조성을 갖도록 하기 위하여 발효베이스에 당과 잼을 첨가한 요구르트를 제조하여 냉장 저장 중 생균수의 변화를 보면 Table 50과 Fig. 48과 같다.

Table 50. Change of viable bacteria count of yogurt fermented by 3 kinds of starter during cold storage

(Log. number)

	0 h	12 h	24 h
ABT-4	11.64	12.08	9.30
ABT+LPL	10.41	9.78	11.60
LPL	11.56	11.20	11.50

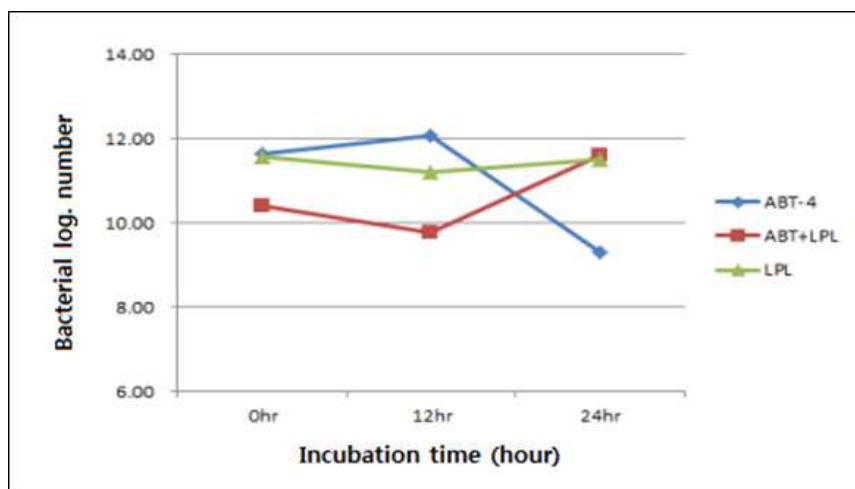


Fig. 48. Change of viable bacteria count of yogurt fermented by 3 kinds of starter during cold storage

ABT-4균주는 12시간까지 왕성한 증식을 보여 12시간 경과시  $10^{12}$  이상 증식하였으나, *S. thermophilus*의 과도한 젖산 생성에 의하여 젖산에 약한 *L. acidophilus* 및 *S. thermophilus*의 생균수가 급속도로 감소한 것으로 나타났다. 반면에 혼합 접종한 요구르트는 냉장저장 12시간대의 측정에러가 있는 것으로 보이지만 24시간 때까지 저온에서 생균수 감소가 적은 것은 *L. plantarum* Q180의 높은 생존력 때문인 것으로 판단된다. 이와 같은 결과는 *L. plantarum* Q180 단독으로 배양한 발효 베이스의 생균수가 높게 유지된 결과로 볼 수 있겠지만, 본 연구에서는 젖산에 대한 내성 실험이 진행된 것이 아니어서 *L. plantarum* Q180 균주의 젖산 생성력이 비교적 약했기 때문에 높은 생존력을 유지하고 있는 것이라고 생각된다.

발효 베이스에 당과 잼을 첨가한 후 냉장저장 24시간까지 산도와 pH의 변화를 보면 Table 51과 Fig. 49에서 보는 바와 같이 산도는 약간 증가하였고, pH는 감소하는 경향을 보였다.

Table 51. Change of pH and acidity of yogurt fermented by 3 kinds of starter during cold storage

	0 h		12 h		24 h	
	Acidity (%)	pH	Acidity (%)	pH	Acidity (%)	pH
ABT-4	1.05	3.98	1.18	3.96	1.25	3.95
ABT+LPL	0.98	4.04	1.03	4.01	1.14	3.91
LPL	0.76	4.15	0.92	4.12	1.05	4.10

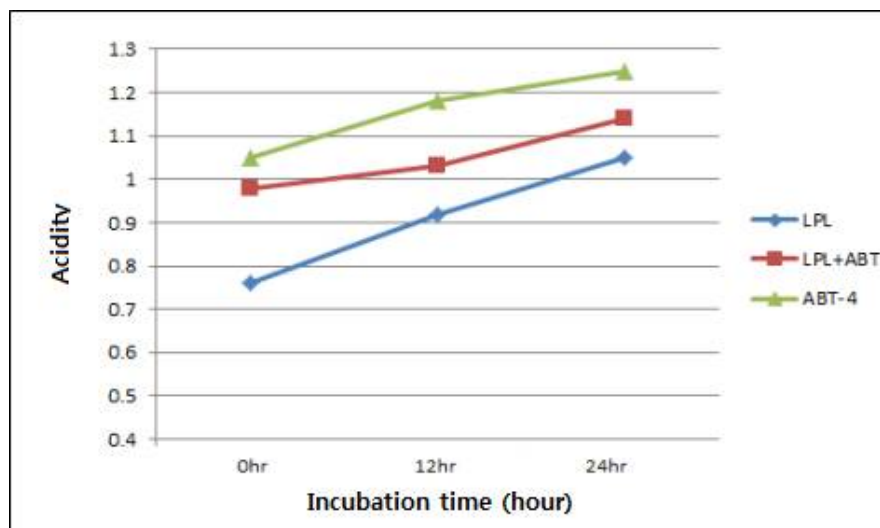


Fig 49. Change of acidity of yogurt fermented by 3 kinds of starter during cold storage

## 9. 비만억제 작용기작 규명

Western blotting 방법을 이용하여 지방산 산화에 관여하는 PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$ 의 mRNA 발현차이를 비교한 결과는 Fig. 50과 같다.

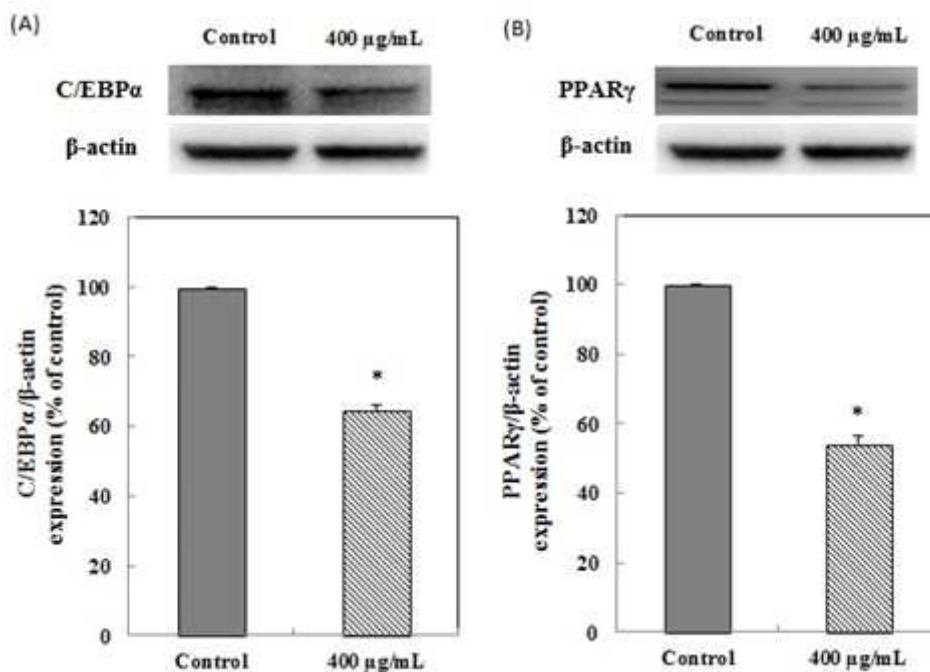


Fig. 50. The effects of *Lactobacillus plantarum* Q180 on C/EBP $\alpha$ (A) and PPAR $\gamma$  (B) expression in 3T3-L1 adipocyte.

3T3-L1 preadipocytes were stimulated to differentiation in the presence of *L. plantarum* Q180 (400  $\mu$ g/mL). Cell lysates were prepared and subjected to western blotting to detect C/EBP $\alpha$  and PPAR $\gamma$ . \*  $P < 0.05$  different from control ( $t$ -test).

3T3-L1 세포의 지방분해시에 *L. plantarum* Q180 ( $10^8$  CFU/g) 균주를 400  $\mu$ g/mL 농도로 처리한 세포를 western blot한 결과, 무처리구 대비 PPAR- $\gamma$ 의 발현은 46.07%, C/EBP $\alpha$ 의 발현은 35.16% 감소하여 지방분해를 돕는 전사인자의 발현을 억제함을 확인하였다.

## 10. 동물모델을 이용한 발효유의 비만억제 효능평가

### 가. 실험동물의 식이 효율 및 체중 변화

실험동물을 군 당 6마리씩 일반식이 대조군(A), 생리식염수를 경구투여 한 고지방식이 대조군(B), 상업균주인 ABT-3 (CHR HANSEN)균주와 *Lactobacillus plantarum* Q180 균주를 혼합배양한 발효유를 경구투여한 군(C), ABT-3균주와 *Lactobacillus plantarum* Q180 균주를 혼합배양하고 가르시니아 캄보지아를 첨가한 발효유를 경구투여한 군(D), *Lactobacillus plantarum* Q180를 이용한 발효유를 경구투여한 군(E), *Lactobacillus plantarum* Q180로 배양하고 가르시니아 캄보지아를 첨가한 발효유를 경구투여한 군(F) 등 6군으로 나누고 8주간 사육하였다. 8주간의 실험 기간 동안 총 식이섭취량, 체중 및 식이효율을 Table 52와 Fig. 51에 나타내었다.

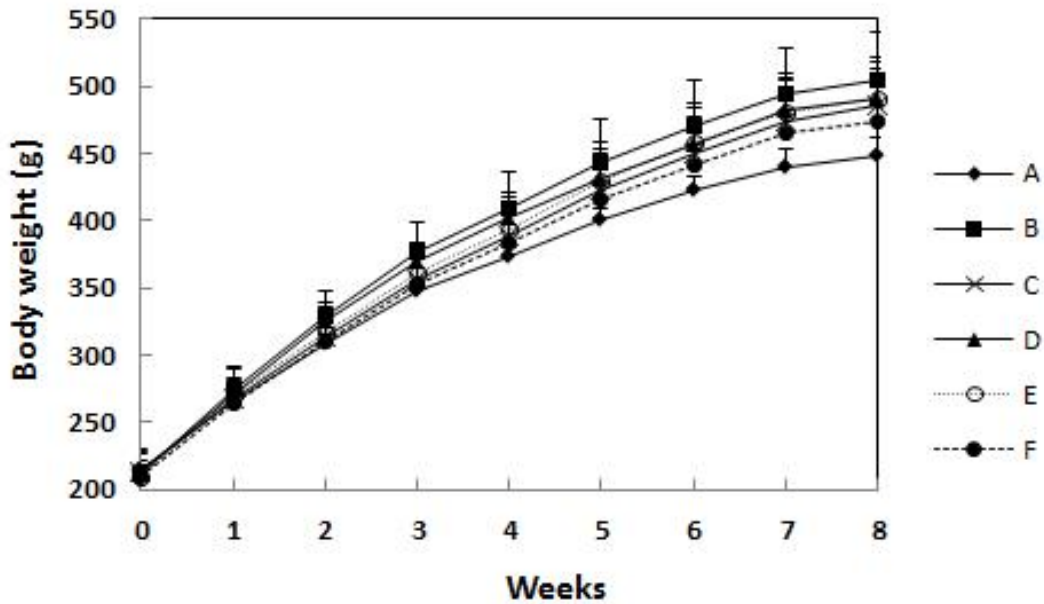


Fig. 51. Body weight change of SD Rat fed experimental diets.

Values are mean±SD of 6 mice per group.

Table 52. Body weight changes, food intakes and food efficiency ratio of rats fed osteo-active product for 8 weeks

	A <sup>1)</sup>	B	C	D	E	F
<b>Body weight(g/rat)</b>						
Initial	215.01 ±12.75 <sup>a</sup>	210.93 ±19.31 <sup>a</sup>	212.62 ±8.63 <sup>a</sup>	213.72 ±12.48 <sup>a</sup>	209.93 ±8.36 <sup>a</sup>	209.57 ±7.50 <sup>a</sup>
Final	447.61 ±14.12 <sup>b</sup>	504.39 ±35.34 <sup>a</sup>	485.18 ±36.28 <sup>a</sup>	490.91 ±22.23 <sup>a</sup>	491.07 ±27.56 <sup>a</sup>	473.98 ±12.69 <sup>ab</sup>
Wt. gain	232.60 ±15.15 <sup>b</sup>	293.46 ±27.68 <sup>a</sup>	272.56 ±29.25 <sup>a</sup>	277.18 ±26.91 <sup>a</sup>	281.14 ±19.24 <sup>a</sup>	264.40 ±8.71 <sup>a</sup>
Wt. gain rate (%) <sup>2)</sup>	0	23.96	17.59	15.91	19.79	10.56
Wt. lose rate (%) <sup>3)</sup>	19.33	0	5.14	6.50	3.36	10.81
<b>Food intake</b>						
Total(g/rat)	1049.14 ±27.60 <sup>a</sup>	978.94 ±51.74 <sup>b</sup>	902.73 ±84.89 <sup>c</sup>	894.20 ±31.28 <sup>c</sup>	904.04 ±66.64 <sup>c</sup>	849.67 ±64.87 <sup>c</sup>
Weekly(g/wk/rat)	130.63 ±11.34 <sup>a</sup>	120.79 ±14.51 <sup>b</sup>	113.64 ±16.93 <sup>cd</sup>	111.37 ±16.92 <sup>cd</sup>	113.80 ±17.55 <sup>bc</sup>	105.13 ±16.13 <sup>d</sup>
<b>FER<sup>4)</sup></b>	22.20 ±1.85 <sup>b</sup>	30.09 ±4.50 <sup>a</sup>	30.22 ±2.29 <sup>a</sup>	31.05 ±3.53 <sup>a</sup>	31.17 ±2.33 <sup>a</sup>	31.24 ±2.26 <sup>a</sup>

<sup>1)</sup>A, normal diet; B, high fat diet; C, high fat diet with yogurt fermented with ABT-3 and *L. plantarum* Q180; D, high fat diet with yogurt added Garcinia Cambogia and fermented with ABT-3 and *L. plantarum* Q180; E, high fat diet with yogurt fermented with *L. plantarum* Q180; F, high fat diet with yogurt added Garcinia Cambogia and fermented with *L. plantarum* Q180

<sup>2)</sup>Weight gain rate compared to ND group (group A)

<sup>3)</sup>Weight gain loss compared to HFD group (group B)

<sup>4)</sup>FER : Food efficiency ratio, Wt. gain(g)/Food intake(g) × 100

Values are mean±SD of 6 rat per group. <sup>a~d</sup> Means with the same letter within the row are not significantly different. (p<0.05).

실험동물의 초기 체중은 209.57~213.72g이었다. 8주 동안 실험식이의 공급으로 고지방식이 대조군인 B군의 체중 증가량이 293.46g으로 가장 많은 증가를 보인 반면 일반식이 대조군은 232.60g으로 가장 적게 증가를 보였다. 체중 증가량은 *Lactobacillus plantarum* Q180를 이용한 발효유를 경구투여한 군(E), ABT-3군주와

*Lactobacillus plantarum* Q180 균주를 혼합배양하고 가르시니아 캄보지아를 첨가한 발효유를 경구투여한 군(D), 상업균주인 ABT-3 (CHR HANSEN)균주와 *Lactobacillus plantarum* Q180 균주를 혼합배양한 발효유를 경구투여한 군(C), *Lactobacillus plantarum* Q180로 배양하고 가르시니아 캄보지아를 첨가한 발효유를 경구투여한 군(F) 순으로 적게 나타났다. C군은 고지방식이군 대비 체중이 5.14% 감소하였으며, D군은 6.5%, E군은 3.36%, F군은 10.81% 감소하여 *L. plantarum* Q180 균주로 배양하고 가르시니아 캄보지아를 첨가한 발효유를 경구투여한 군에서 체중 감소율이 가장 뛰어났다.

각 대조군과 실험군의 간과 신장, 비장, 부고환지방, 내장지방 및 신장지방은 채혈 후 즉시 적출하여 생리식염수에 헹군 후 표면의 수분을 제거하여 중량을 측정하였고, 그 결과는 Table 53에 나타내었다.

Table 53. Weights of liver, kidney and epididymal adipose tissue of rat fed high fat diet with lactic acid bacteria for 8 weeks.

	Liver weight (g)	Kidney weight (g)	Spleen weight (g)	Epididymal fat pad (g)	Visceral fat (g)	Kidney fat (g)
A <sup>1)</sup>	11.29±1.06 <sup>b</sup>	2.75±0.15 <sup>a</sup>	0.97±0.04 <sup>ab</sup>	7.07±1.20 <sup>c</sup>	2.58±0.26 <sup>b</sup>	7.80±1.42 <sup>b</sup>
B	12.72±1.30 <sup>a</sup>	2.80±0.12 <sup>a</sup>	0.85±0.15 <sup>b</sup>	12.33±2.71 <sup>a</sup>	4.63±0.83 <sup>a</sup>	13.97±2.43 <sup>a</sup>
C	12.59±1.18 <sup>a</sup>	2.77±0.18 <sup>a</sup>	0.92±0.07 <sup>ab</sup>	9.89±2.09 <sup>ab</sup>	3.97±0.99 <sup>a</sup>	12.68±2.29 <sup>a</sup>
D	12.62±0.40 <sup>a</sup>	2.80±0.23 <sup>a</sup>	1.07±0.15 <sup>a</sup>	9.80±1.58 <sup>ab</sup>	3.59±0.86 <sup>ab</sup>	11.87±1.57 <sup>a</sup>
E	12.74±0.70 <sup>a</sup>	2.87±0.21 <sup>a</sup>	0.96±0.12 <sup>ab</sup>	9.44±2.08 <sup>bc</sup>	3.61±1.25 <sup>ab</sup>	12.02±3.92 <sup>a</sup>
F	12.62±1.04 <sup>a</sup>	2.75±0.06 <sup>a</sup>	0.92±0.19 <sup>ab</sup>	9.02±2.26 <sup>bc</sup>	3.46±0.95 <sup>ab</sup>	11.80±3.05 <sup>a</sup>

<sup>1)</sup>A, normal diet; B, high fat diet; C, high fat diet with yogurt fermented with ABT-3 and *L. plantarum* Q180; D, high fat diet with yogurt added Garcinia Cambogia and fermented with ABT-3 and *L. plantarum* Q180; E, high fat diet with yogurt fermented with *L. plantarum* Q180; F, high fat diet with yogurt added Garcinia Cambogia and fermented with *L. plantarum* Q180

Values are mean±SD of 6 rat per group. <sup>a~c</sup>Means with the same letter within the row are not significantly different. (p<0.05).

부고환 지방 무게의 경우 C와 D군에서 고지방식이 대조군에 비해 무게가 약간 감소하였으며, E군과 F군에서는 고지방식이군에 비해 무게가 유의적으로 감소하여 상업균주와 혼합한 발효유 보다는 *L. plantarum* Q180 균주를 단일로 사용한 발효

유에서 지방 무게 감소 효과가 더 나타났다. 내장지방에 있어서도 유의차는 보이지 않았지만 D, E, F군에서 무게가 감소하였다.

#### 나. 혈액 분석

비만억제능이 우수한 균으로 선정된 *Lactobacillus plantarum* Q180와 상업균주 ABT-3(CHR HANSEN) 그리고 가르시니아 캄보지아의 급여가 간질환의 지표가 되는 간 효소치인 AST와 ALT의 수치에 미치는 영향은 Table 54와 같다. ALT수치는 각 군간의 값의 차이는 보여지나 유의적 차이는 없었으며 AST 수치는 상업균주와 *Lactobacillus plantarum* Q180 균주로 발효한 발효유를 경구투여한 C군에서 가장 작은 수치를 나타내었다.

Table 54. Activities of AST, ALT in mice fed high fat diet with lactic acid bacteria for 8 weeks

(U/L)

	A	B	C	D	E	F
AST	119.33 ± 30.36 <sup>a</sup>	108.17 ± 31.33 <sup>a</sup>	76.00 ± 3.41 <sup>b</sup>	92.67 ± 9.54 <sup>ab</sup>	86.83 ± 6.55 <sup>ab</sup>	83.50 ± 11.59 <sup>ab</sup>
ALT	54.17 ± 47.34 <sup>a</sup>	48.17 ± 9.85 <sup>a</sup>	35.00 ± 6.72 <sup>a</sup>	38.17 ± 3.13 <sup>a</sup>	36.17 ± 4.75 <sup>a</sup>	39.83 ± 3.60 <sup>a</sup>

Values are mean±SD of 6 rat per group.

<sup>1)</sup>A, normal diet; B, high fat diet; C, high fat diet with yogurt fermented with ABT-3 and *L. plantarum* Q180; D, high fat diet with yogurt added Garcinia Cambogia and fermented with ABT-3 and *L. plantarum* Q180; E, high fat diet with yogurt fermented with *L. plantarum* Q180; F, high fat diet with yogurt added Garcinia Cambogia and fermented with *L. plantarum* Q180

not significantly different. (p<0.05)

비만억제능이 우수한 균으로 선정된 *Lactobacillus plantarum* Q180과 상업균주 ABT-3(CHR HANSEN) 그리고 가르시니아 캄보지아의 투여가 혈청 지질 농도에 미치는 영향은 Table 55와 같다. 혈청의 중성지방(TG)의 농도의 경우 정상식이군과 프로바이오틱스 급여군에서 모두 고지방식이 대조군인 B군에 비해 유의적으로 적은 수치를 나타내어 프로바이오틱스의 급여가 고지방식으로 인한 중성지방의 축적을 감소시켜 주었을 것으로 사료된다.

Table 55. Lipid levels of plasma in mice fed high fat diet with lactic acid bacteria for 8 weeks.

	A	B	C	D	E	F
Total cholesterol (mg/dL)	83.17 ±11.96 <sup>a</sup>	91.33 ±18.93 <sup>a</sup>	80.83 ±12.19 <sup>a</sup>	87.00 ±15.81 <sup>a</sup>	94.67 ±14.53 <sup>a</sup>	79.50 ±7.42 <sup>a</sup>
Triglyceride (mg/dL)	108.00 ±17.31 <sup>b</sup>	144.33 ±40.71 <sup>a</sup>	104.67 ±18.15 <sup>b</sup>	96.00 ±7.85 <sup>b</sup>	90.50 ±7.26 <sup>b</sup>	93.83 ±22.57 <sup>b</sup>
LDL cholesterol (mg/dL)	9.33 ±3.08 <sup>c</sup>	12.50 ±2.07 <sup>abc</sup>	10.00 ±1.67 <sup>bc</sup>	13.17 ±4.07 <sup>ab</sup>	15.67 ±2.94 <sup>a</sup>	11.33 ±1.86 <sup>bc</sup>
HDL cholesterol (mg/dL)	73.00 ±10.47 <sup>a</sup>	73.33 ±16.61 <sup>a</sup>	68.17 ±10.61 <sup>a</sup>	74.17 ±14.77 <sup>a</sup>	80.33 ±11.62 <sup>a</sup>	69.50 ±7.79 <sup>a</sup>
Total protein (g/dL)	6.90 ±0.13 <sup>a</sup>	6.75 ±0.16 <sup>a</sup>	6.78 ±0.12 <sup>a</sup>	6.85 ±0.10 <sup>a</sup>	6.57 ±0.08 <sup>b</sup>	6.77 ±0.10 <sup>a</sup>
Glucose (mg/dL)	104.17 ±3.37 <sup>b</sup>	121.00 ±7.95 <sup>a</sup>	117.83 ±6.34 <sup>a</sup>	116.00 ±9.12 <sup>a</sup>	122.50 ±4.75 <sup>a</sup>	120.83 ±7.44 <sup>a</sup>

Values are mean±SD of 6 rat per group.

<sup>1)</sup>A, normal diet; B, high fat diet; C, high fat diet with yogurt fermented with ABT-3 and *L. plantarum* Q180; D, high fat diet with yogurt added *Garcinia Cambogia* and fermented with ABT-3 and *L. plantarum* Q180; E, high fat diet with yogurt fermented with *L. plantarum* Q180; F, high fat diet with yogurt added *Garcinia Cambogia* and fermented with *L. plantarum* Q180

<sup>a~c</sup> Means with the same letter are not significantly different. (p<0.05).

비만으로 동반되는 인슐린 저항성 및 이와 관련된 대사 이상들을 악화시키거나 지방산의 산화와 당대사 등 생체 내 에너지 대사에 주요한 역할을 하는 아디포카인의 농도는 Table 56과 같다(Kim 등, 2005). 지방세포에서 가장 많이 분비되는 사이토카인의 하나로 비만으로 체지방량이 많아지면 혈중 농도가 낮게 나타나는 아디포넥틴의 경우 각 군간의 유의차를 보이지 않았으며 렙틴의 경우 고지방식이 대조군인 B군에서 가장 많이 증가하였으며 프로바이오틱스 급여 군은 정상식이 대조군인 A군보다는 증가하였지만 B군 대비 유의적으로 감소함을 보였다.



Table 56. Adipocytokine levels of plasma in mice fed high fat diet with lactic acid bacteria for 8 weeks.

	A	B	C	D	E	F
adiponectin (ng/mL)	3.26 ±0.55 <sup>a</sup>	2.99 ±0.39 <sup>a</sup>	3.10 ±0.24 <sup>a</sup>	2.83 ±0.32 <sup>a</sup>	3.04 ±0.58 <sup>a</sup>	3.25 ±0.84 <sup>a</sup>
leptin (pg/mL)	315.05 ±20.71 <sup>c</sup>	532.76 ±135.92 <sup>a</sup>	426.55 ±46.14 <sup>b</sup>	408.16 ±61.19 <sup>b</sup>	426.61 ±64.87 <sup>b</sup>	413.76 ±42.19 <sup>b</sup>

Values are mean±SD of 6 rat per group.

<sup>1)</sup>A, normal diet; B, high fat diet; C, high fat diet with yogurt fermented with ABT-3 and *L. plantarum* Q180; D, high fat diet with yogurt added Garcinia Cambogia and fermented with ABT-3 and *L. plantarum* Q180; E, high fat diet with yogurt fermented with *L. plantarum* Q180; F, high fat diet with yogurt added Garcinia Cambogia and fermented with *L. plantarum* Q180

<sup>a-c</sup> Means with the same letter are not significantly different. (p<0.05).

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

비만 억제효과가 있는 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 목장원유와 신생아 및 성인에서 분변을 채취하였다. 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 Modified MRS배지를 제조하여 1495개의 젖산균을 분리하였으며 BS배지로부터 95개의 bifidobacteria 균주를 분리하였다.

또한 발효유에 적합하기 위해서는 skim milk를 응고시킬 수 있는 산생성 능력이 있어야 하므로 10% 환원탈지분유에 원유에서 분리한 균주를 접종한 후 37°C에서 18시간과 24시간 배양하여 응고된 598개의 균주를 선별하였고, 분변에서 분리한 젖산균 273개, bifidobacteria균 95개와 함께 비만억제능 실험을 실시하였다.

비만 억제능 균주를 선별하기 위하여 anti-lipase activity를 실험한 결과 lipase 억제활성이 높은 균주 12종을 선별하여, 3T3-L1 cell을 이용한 anti-adipogenic activity 실험을 실시하였으며, 현미경관찰, Gram stain, 당 발효실험 및 16S rRNA 염기서열 등의 일련의 생화학적, 유전학적 실험을 통하여 균을 동정하였다. 비만 억제능이 있는 균주 12종 중 산 생성 속도와 비만억제능을 감안하여 3종의 젖산균을 선별하여, 발효유의 종균으로서 적합한지의 여부를 검증하기 위하여 젖산균의 성장, 향생제 15종에 대한 내성시험, API ZYM kit를 이용한 효소활성 시험, 0.3% oxgall 첨가 배지에서의 담즙내성 시험, pH 내성 시험, 식중독균에 대한 항균력 시험을 실시하였다. 한편, 비만 억제능이 우수한 *L. plantarum* Q180 균주를 대상으로 최적 배양기술을 확립하였으며 비만억제 작용기작을 규명하였고, *L. plantarum* Q180 균주로 발효한 발효유로부터 아미노산을 분리 동정하였다. *L. plantarum* Q180, *E. faecalis* MD366, *Weissella* sp. F22의 세 균주를 이용한 동물실험으로 체내 균총변화와 지방흡수 저해 효과, 혈중 지질농도변화, 지방조직 세포 크기 변화 등의 비만 억제 효과를 확인하였다. 또한 최적 배합조성비를 개발하였는데, 원유 80.682%와 탈

지분유 3.318%를 첨가하고 65℃에서 배합하여 완전히 녹인 후 90℃에서 5분간 살균하였으며, 40℃로 냉각시킨 다음 상업균주를 0.1%(v/v)로 접종하고, 최종 pH 4.4으로 감소할 때까지 배양하였다. 발효가 완료된 후 다양한 소재와 *L. plantarum* Q180 균주( $10^8$  CFU/mL)를 첨가하여 호상발효유를 제조한 다음 관능검사를 실시하여 최적 배합조성물을 완성하였고, 개발제품에 대한 이화학적 특성조사를 실시하였다. 이와 같은 결과를 근거로 하여 동물모델을 이용한 발효유의 비만억제 효능평가 실험을 실시한바 목표를 100% 달성하였다.

따라서 본 연구결과를 통해 관련분야에의 기여도를 보면

#### 가. 기술적 측면

- 비만억제능 젖산균주 개발은 발효유뿐만 아니라 치즈에 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
- 비만억제능 젖산균주를 이용한 발효유제품은 동물실험을 통한 입증기술은 일본 설인유업을 제외하고는 국내외적으로 없음으로 대외 기술적 우위 확보

#### 나. 경제 · 산업적 측면

- 비만억제 발효유를 개발함으로써 소비기반 및 경쟁력 확보
  - 2014년말 현재 1.5조억원의 발효유 시장 중 예상시장을 10%로 예측할 때 1,500억원으로 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 기술개발로 유제품의 예상 잠식율을 10%로 낮추더라도 100억원의 수입대체 효과가 있을 것으로 예상됨.
- 비만억제 예방 식품시장에 참여
- 연간 100억원 규모의 젖산균 스타터 수입대체효과
- 질병 예방에 의한 의료비 부담 연간 100억원 절감 효과
- 청소년 및 성인의 비만억제를 통한 보건 향상으로 국민 생산성 증진

## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

본 연구에서 분리된 항비만 기능성 젖산균은 그동안 기능성 있는 외국의 수입종균에 의해 생산되는 발효유를 국내에서 생산함으로써 국제 경쟁력 향상과 동시에 수입대체효과가 있을 것으로 예상된다. 또한 본 연구결과는 참여업체인 임실치즈연구소에서 기술이전을 통하여 실용화할 것으로 예상되며, 3건의 특허출원을 통하여 산업재산권을 확보하였고, 한국축산식품학회에 2편, 식품과학회에 1편, ISP에 1편 발표하였으며, 논문 4편을 게재하였다.

앞으로 참여업체에 기술이전을 통하여 상품화하기 위하여 제품출시 기획 및 시장조사를 하고 신제품 출시 전 대량생산을 위한 생산공정 최적화와 같은 scale up 실험 등 일련의 단계를 거쳐 만족스런 결과가 나올 경우 업체에서 바로 생산에 돌입할 것으로 예측되므로, 계속적으로 업체와 유기적인 협조 하에 제품생산이 될 수 있도록 협조를 할 계획으로 있다.

본 연구에서 얻어진 *Lactobacillus plantarum* 균주의 경우 발효유에 적용 가능한지를 식품의약품안전처 식품기준과에 문의한 결과 이미 통용되어 사용하는 균주이기 때문에 사용가능하다는 의견이므로 추가로 신 균주 여부 및 안전성에 대한 검토가 필요가 없는 것으로 판단된다.

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 연구개발과정에서 수집한 해외과학 기술정보

### 1. Regulation of abdominal adiposity by probiotics (*Lactobacillus gasseri* SBT2055) in adults with obese tendencies in a randomized controlled trial

Author(s): Kadooka, Y., Sato, M., Imaizumi, K., Ogawa, A., Ikuyama, K., Akai, Y., Okano, M., Kagoshima, M. and Tsuchida, T.

Source: European Journal of Clinical Nutrition 64: 636-643.

Published: 2010

Abstract:

Background/Objectives: In spite of the much evidence for the beneficial effects of probiotics, their anti-obesity effects have not been well examined. We evaluated the effects of the probiotic *Lactobacillus gasseri* SBT2055 (LG2055) on abdominal adiposity, body weight and other body measures in adults with obese tendencies.

Subjects/Methods: We conducted a multicenter, double-blind, randomized, placebo-controlled intervention trial. Subjects (n=87) with higher body mass index (BMI) (24.2-30.7 kg/m<sup>2</sup>) and abdominal visceral fat area (81.2-178.5 cm<sup>2</sup>) were randomly assigned to receive either fermented milk (FM) containing LG2055 (active FM; n=43) or FM without LG2055 (control FM; n=44), and were asked to consume 200 g/day of FM for 12 weeks. Abdominal fat area was determined by computed tomography.

Results: In the active FM group, abdominal visceral and subcutaneous fat areas significantly (P<0.01) decreased from baseline by an average of 4.6% (mean (confidence interval): -5.8 (-10.0, -1.7) cm<sup>2</sup>) and 3.3% (-7.4 (-11.6, -3.1) cm<sup>2</sup>), respectively. Body weight and other measures also decreased significantly (P<0.001) as follows: body weight, 1.4% (-1.1 (-1.5, -0.7) kg); BMI, 1.5% (-0.4 (-0.5, -0.2) kg/m<sup>2</sup>); waist, 1.8% (-1.7 (-2.1, -1.4) cm); hip, 1.5% (-1.5 (-1.8, -1.1) cm). In the control group, by contrast, none of these parameters decreased significantly. High-molecular weight adiponectin in serum increased significantly (Po0.01) in the active and control groups by 12.7% (0.17 (0.07, 0.26) mg/mL) and 13.6% (0.23 (0.07, 0.38) mg/mL), respectively.

Conclusion: The probiotic LG2055 showed lowering effects on abdominal

adiposity, body weight and other measures, suggesting its beneficial influence on metabolic disorders.

## **2. Effect of *Lactobacillus acidophilus* NCDC 13 supplementation on the progression of obesity in diet-induced obese mice**

Author(s): Arora, T., Anastasovska, J., Gibson, G., Tuohy, K., Sharma, R. K., Bell, J. and Frost, G.

Source: British Journal of Nutrition 108: 1382–1389.

Published: 2012

Abstract: There is an increased interest in investigating the relationship between the gut microbiota and energy homeostasis. Probiotics are health beneficial microbes mainly categorised under the genus *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*, which when administered in adequate amounts confer health benefits to the host, and have been implicated in various physiological functions. The potential role of probiotics in energy homeostasis is a current and an emerging area of research. In the present study, *Lactobacillus acidophilus* NCDC 13 was used to evaluate its anti-obesity potential in diet-induced obese (C57BL/6) mice. The probiotic bacterial culture was administered in Indian yogurt preparation called 'dahi', prepared using native starter cultures, and compared with control dahi containing only dahi starter cultures. The dietary intervention was followed for 8 weeks, and whole-body fat composition, and liver and muscle adiposity were measured using MRI. Changes in gut microbiota were assessed by fluorescent in situ hybridisation in faeces and caecal contents. The feeding of the probiotic brought no changes in body-weight gain, food and dahi intake when compared with the control dahi-fed animals. No significant changes in body fat composition, liver and muscle adiposity were also observed. At the end of the dietary intervention, a significant increase ( $P < 0.05$ ) in the number of total Bifidobacterium was observed in both faeces and caecal contents of mice as a result of probiotic dahi administration. Thus, *L. acidophilus* NCDC 13 supplementation could be beneficial in shifting the gut microbiota balance positively. However, its anti-obesity potential could not be established in the present study and warrants further exploration.

### **3. Probiotic characteristics of lactic acid bacteria isolated from kimchi**

Author(s): Chang, J. H., Shim, Y. Y., Cha, S. K. and Chee, K. M.

Source: Journal of applied microbiology 109: 30–220.

Published: 2010

Abstract:

AIMS: The present work was aimed at identifying strains of lactic acid bacteria (LAB) from kimchi, with properties suitable for use as starter cultures in yogurt fermentation.

METHODS AND RESULTS: A total of 2344 LAB strains were obtained from two different sources, one group consisted of commercial LAB strains from kimchi, and the second group consisted of those strains isolated from various types of kimchi. The LAB strains from both groups were screened for resistance to biological barriers (acid and bile salts), and the four most promising strains were selected. Further analysis revealed that KFRI342 of the four selected strains displayed the greatest ability to reduce the growth of the cancer cells, SNU-C4. The in vivo efficacy of strains in quinone reductase induction assay was evaluated, and the extent of DNA strand breakage in individual cells was investigated using the comet assay. Strain KFRI342 was identified as *Lactobacillus acidophilus* by 16S rRNA sequence analysis, showed protection against tumour initiation and imparted immunostimulation as well as protection against DNA damage.

CONCLUSIONS: Strain KFRI342, which showed probiotic characteristics reducing cancer cell growth, could be a suitable starter culture for yogurt fermentation because of its strong acid production and high acid tolerance.

SIGNIFICANCE AND IMPACT OF THE STUDY: This is the first report to describe a bacterium, isolated from kimchi, *Lact. acidophilus* KFRI342 which has the probiotic characteristics and the acid tolerance needed for its use as a starter culture in yogurt fermentation.

### **4. Targeting gut microbiota in obesity: effects of prebiotics and probiotics**

Author(s): Delzenne, N. M., Neyrinck, A. M., Bäckhed, F. and Cani, P. D.

Source: Nature reviews. Endocrinology 7: 46–639.

Published: 2011

Abstract: At birth, the human colon is rapidly colonized by gut microbes. Owing to their vast number and their capacity to ferment nutrients and secrete bioactive compounds, these gastrointestinal microbes act as an environmental factor that affects the host's physiology and metabolism, particularly in the context of obesity and its related metabolic disorders. Experiments that compared germ-free and colonized mice or analyzed the influence of nutrients that qualitatively change the composition of the gut microbiota (namely prebiotics) showed that gut microbes induce a wide variety of host responses within the intestinal mucosa and thereby control the gut's barrier and endocrine functions. Gut microbes also influence the metabolism of cells in tissues outside of the intestines (in the liver and adipose tissue) and thereby modulate lipid and glucose homeostasis, as well as systemic inflammation, in the host. A number of studies describe characteristic differences between the composition and/or activity of the gut microbiota of lean individuals and those with obesity. Although these data are controversial, they suggest that specific phyla, classes or species of bacteria, or bacterial metabolic activities could be beneficial or detrimental to patients with obesity. The gut microbiota is, therefore, a potential nutritional and pharmacological target in the management of obesity and obesity-related disorders.

**5. Supplementation of *Lactobacillus curvatus* HY7601 and *Lactobacillus plantarum* KY1032 in diet-induced obese mice is associated with gut microbial changes and reduction in obesity.**

Author(s): Park, D. Y., Ahn, Y. T., Park, S. H., Huh, C. S., Yoo, S. R., Yu, R., Sung, M. K., McGregor, R. A. and Choi, M. S.

Source: PloS one 8: e59470.

Published: 2013

Abstract:

OBJECTIVE: To investigate the functional effects of probiotic treatment on the gut microbiota, as well as liver and adipose gene expression in diet-induced obese mice.

DESIGN: Male C57BL/6J mice were fed a high-fat diet (HFD) for 8 weeks to induce obesity, and then randomized to receive HFD+probiotic (*Lactobacillus*



*curvatus* HY7601 and *Lactobacillus plantarum* KY1032, n=9) or HFD+placebo (n=9) for another 10 weeks. Normal diet (ND) fed mice (n=9) served as non-obese controls.

**RESULTS:** Diet-induced obese mice treated with probiotics showed reduced body weight gain and fat accumulation as well as lowered plasma insulin, leptin, total-cholesterol and liver toxicity biomarkers. A total of 151,061 pyrosequencing reads for fecal microbiota were analyzed with a mean of 6,564, 5,274 and 4,464 reads for the ND, HFD+placebo and HFD+probiotic groups, respectively. Gut microbiota species were shared among the experimental groups despite the different diets and treatments. The diversity of the gut microbiota and its composition were significantly altered in the diet-induced obese mice and after probiotic treatment. We observed concurrent transcriptional changes in adipose tissue and the liver. In adipose tissue, pro-inflammatory genes (TNF $\alpha$ , IL6, IL1 $\beta$  and MCP1) were down-regulated in mice receiving probiotic treatment. In the liver, fatty acid oxidation-related genes (PGC1 $\alpha$ , CPT1, CPT2 and ACOX1) were up-regulated in mice receiving probiotic treatment.

**CONCLUSIONS:** The gut microbiota of diet-induced obese mice appears to be modulated in mice receiving probiotic treatment. Probiotic treatment might reduce diet-induced obesity and modulate genes associated with metabolism and inflammation in the liver and adipose tissue.

## **6. High-fat diet-induced obesity is attenuated by probiotic strain *Lactobacillus paracasei* ST11 (NCC2461) in rats.**

Author(s): Tanida, M., Shen, J., Maeda, K., Horii, Y., Yamano, T., Fukushima, Y. and Nagai, K.

Source: Obesity research & clinical practice 2: 159-169.

Published: 2011

**Abstract:** In a recent study, we obtained some evidences that probiotic strain *Lactobacillus* affects the autonomic nerve activities and regulates blood glucose and cardiovascular function. In the study presented here, we found that long-term ingestion of the *lactobacillus* strain *Lactobacillus paracasei* ST11 (NCC2461) reduced body weight and abdominal fat weight. To investigate possible role of autonomic nerves in anti-obesity action of NCC2461, we

examined the effects of intraduodenal (ID) injection of the *Lactobacillus* strain *L. paracasei* ST11 (NCC2461) on sympathetic nerve activity innervating white adipose tissue (WAT-SNA) in urethane-anesthetized rats, and found that it accelerated WAT-SNA. Moreover, intraduodenal (ID) injection of NCC2461 increased in sympathetic nerve activity innervating brown adipose tissue (BAT-SNA) and decreased in hepatic vagal nerve activity (HVNA). In addition, using conscious rats, we examined the effects of intra-gastric (IG) injection of NCC2461 on lipolysis and BAT thermogenesis, and observed that it clearly elevated the plasma FFA level, BAT temperature and abdominal temperature. Thus, these data suggest that the NCC2461 affects autonomic nerves, enhances lipolysis, and reduces body weight in rats.

#### **7. *Lactobacillus plantarum* LG42 Isolated from Gajami Sik-Hae Inhibits Adipogenesis in 3T3-L1 Adipocyte**

Author(s): Park, J. E., Oh, S. H. and Cha, Y. S.

Source: BioMed Research International ID460927

Published: 2013

Abstract: We investigated whether lactic acid bacteria isolated from gajami sik-hae (GLAB) are capable of reducing the intracellular lipid accumulation by downregulating the expression of adipogenesis-related genes in differentiated 3T3-L1 cells. The GLAB, *Lactobacillus plantarum* LG42, significantly decreased the intracellular triglyceride storage and the glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) activity in a dose-dependent manner. mRNA expression of transcription factors like peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) $\gamma$  and CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) $\alpha$  involved in adipogenesis was markedly decreased by the GLAB treatment. Moreover, the GLAB also decreased the expression level of adipogenic markers like adipocyte fatty acid binding protein (aP2), leptin, GPDH, and fatty acid translocase (CD36) significantly. These results suggest that the GLAB inhibits lipid accumulation in the differentiated adipocyte through downregulating the expression of adipogenic transcription factors and other specific genes involved in lipid metabolism.

## 8. Effects of milk fermented by *Lactobacillus gasseri* SBT2055 on adipocyte size in rats

Author(s): Sato, M., Uzu, K., Yoshida, T., Hamad, E. M., Kawakami, H., Hiroaki Matsuyama, H., Abd El-Gawad, I. A. and Imaizumia, K.

Source: British Journal of Nutrition 99: 1013-1017.

Published: 2008

Abstract: Despite adequate scientific evidence of the potential benefits of probiotics to human health or disease prevention, their contribution to the growth of adipose tissue remains to be established. Four-week-old male Sprague-Dawley rats were fed a diet containing skim milk (control diet) or skim milk fermented by *Lactobacillus gasseri* SBT2055 (LGSP diet) for 4 weeks. Their body weight gain, adipose tissue weight, adipocyte size distribution profile, blood and hepatic lipids, and serum leptin, glucose and adiponectin levels were determined. There was a significant reduction in average adipocyte size in mesenteric white adipose tissue ( $P = 0.004$ ). Moreover, the rats fed the LGSP diet displayed greater numbers of small adipocytes from mesenteric and retroperitoneal adipose tissues than did those on the control diet. Whereas adiponectin concentrations did not differ between the groups, serum leptin concentrations were decreased to 32 % in the LGSP diet group compared with the control group. Concentrations of serum glucose and lipids, and liver lipids, except for the liver TAG level, were similar in the two groups. These results indicate a possible role for a fermented milk product in the regulation of adipose tissue growth.

## 제 7 장 참고문헌

1. Box, G. E. P. and Wilson, K. B. 1951. On the experimental attainment of optimum condition. J. Roy. Statist. Soc. Ser. B. 13: 1-38.
2. Choi, H. D., Kim, Y. S., Choi, I. W., Seog, H. M. and Park, Y. D. 2006. Anti-obesity and cholesterol-lowering effects of germinated brown rice in rats fed with high fat and cholesterol diets. Korean J. Food Sci. Technol. 38: 674-678.
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. Cul. Dairy Prod. J. 28:11-14.
4. Gilliland, S. E. and Speck, M. L. 1977. Deconjugation of bile acids by intestinal lactobacilli. Appl. Environ. Microbiol. 33:15-18.
5. 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.
6. van Goor, H., Gerrits, P. O., and Grond, J. 1986. The application of lipid-soluble stains in plastic-embedded sections. Histochemistry 85, 251-253.
7. Hamad. E. M., Sato, M., Uzu, K. Yoshida, T., Hifashi, S., Kawakami, H., Kadooka, Y., Matsuyama, H., Abd El-Gawad, I. A. and Imaizumi, K. 2009. Milk fermented by *Lactobacillus gasseri* SBT2055 influences adipocyte size via inhibition of dietary fat absorption in Zucker rats. British J. Nutr. 101: 716-724.
8. Hammes, W. P., Weiss, N. and Holzapfel, W. 1992. The genera *Lactobacilli* and *Carnobacterium*. pages 1563-1578 in The Prokaryotes. 2nd ed, Springer-Verlag, NewYork. USA.
9. Hemati, N., Ross, S. E., Erickson, R. L, Groblewski, G. E. and MacDuygald, O. A. 1997. Signaling pathways through which insulin regulates CCAAT/enhancer binding protein- $\alpha$  (C/EBP- $\alpha$ ) phosphorylation and gene expression in 3T3-L1 adipocytes. Forrelation with CLUT4 gene expression. J. Biol. Chem. 272:25913-25919.
10. Hirsch, J. and Gallian, E. 1968. Methods for the determination of adipose cell

- size in man and animals. *J. Lipid Res.* 9: 110-119.
11. Kim, J. Y., Shin, H. W., Jeong, I. K., Cho, S. W., Min, S. J., Lee, S. J., Park, C. Y., Oh, K. W., Kim, H. K., Kim, D. M., Yu, J. M., Ihm, S. H., Choi, M. G., Yoo, H. J. and Park, S. W. 2005. The relationship of adiponectin, leptin and ghrelin to insulin resistance and cardiovascular risk factors in human obesity. *Korean J. Med.* 69: 631-641.
  12. Kim, N. H., Moon, P. D., Kim, S. J., Choi, I. Y., An, H. J., Myung, K. Y., Jeong, H. J., Um, J. Y., Hong, S. H. and Kim, H. M. 2008. Lipid profile lowering effect of Soypro™ fermented with lactic acid bacteria isolated from Kimchi in high-fat diet-induced obese rats. *BioFactors* 33:49-60.
  13. Kim, S. G., An, G. H., Yoon, S. W., Lee, Y. C. and Ha, S. D. 2003. A study on dietary supplement to reduce obesity by the mechanism of decreasing lipid and carbohydrate absorption. *Korean J. Food Sci. Technol.* 35: 519-526.
  14. Kwon, J. Y., Cheigh, H. S. and Song, Y. O. 2004. Weight reduction and lipid lowering effects of kimchi lactic acid powder in rats fed high fat diets. *Korean J. Food Sci.* 36: 1014-1019.
  15. Lee, Y. P., Chung G. H., and Rhee, J. S. 1993. Purification and characterization of *Pseudomonas fluorescens* SIKW1 lipase expressed in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1169: 156-164.
  16. Ley, R. E., Turnbaugh, P., Klein, S., Gordon, J. I. 2006. Microbial ecology human gut microbes associated with obesity. *Nature* 444: 1022-1023.
  17. Lew, E. A. 1985. Mortality and weight: insured lives and the American Cancer Society studies. *Annals of Internal Medicine.* 103:1024-1029.
  18. Lim, S. D., Kim, K. S. and Do, J. R. 2011. Physiological characteristics and production of vitamin K<sub>2</sub> by *Lactobacillus fermentum* LC272 isolated from raw milk. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.* 31:513-520.
  19. Manzoni, M. S. J., Rossi, E. A., Carlos, I. Z., Vendramini, R. C., Duarte, A. C. G. O., Damaso, A. R. 2005. Fermented soy product supplemented with isoflavones affected fat depots in juvenile rats. *Nutrition* 21: 1018-1024.
  20. McGee, D. L. 2005. Body mass index and mortality: a metaanalysis based on person-level data from twenty-six observational studies. *Ann. Epidemiol.* 15: 7-97.
  21. Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival:

- Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* 62: 55-63.
22. Park, S. H., Ko, S. K. and Chung, S. H. 2005. *Euonymus alatus* prevents the hyperglycemia and hyperlipidemia induced by high-fat diet in ICR mice. *J. Ethnopharmacol.* 102:326-335.
  23. Ramirez-Zacarias, J. L., Castro-Munozledo, F. and Kuri-Harcuch, W. 1992. Quantitation of adipose conversion and triglycerides by staining intracytoplasmic lipids with Oil red O. *Histochem.* 97:493-497.
  24. Rhyu, J., Kim, M. S., You, M. K., Bang, M. A., and Kim, H. A. 2014. Pear pomace water extract inhibits adipogenesis and induces apoptosis in 3T3-L1 adipocytes. *Nutr. Res. Pract.* 8: 33-39.
  25. Spiegelman, B. M. and Flier, J. S. 2001. Obesity and the regulation of energy balance. *Cell.* 104:531-543.
  26. Tanida. M., Shen, J., Maeda, K. Horii, Y., Yamano, T., Fukushima, Y. and Nagai, K. 2008. High-fat diet-induced obesity is attenuated by probiotic strain *Lactobacillus paracasei* ST11 (NCC2461) in rats. *Obes. Res. Clin. Pract.* 2: 159-169.
  27. Turnbaugh, P. J., Hamady, M., Yatsunencko, T., Cantarel, B. L., Duncan, A., Ley, R. E., Sogin, M. L., Jones, W. J., Roe, B. A., Affourtit, J. P., Egholm, M., Henrissat, B., Heath, A. C., Knight, R., and Gordon, J. I. 2009. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* 457: 480-484.
  28. Velasquez, M. T., Bhatena, S. J. 2007. Role of dietary soy protein in obesity. *Int. J. Med. Sci.* 4: 72-82.
  29. Yun, S. I., Park. H. O. and Kang, J. H. 2009. Effect of *Lactobacillus gasseri* BNR17 on blood glucose levels and body weight in a mouse model of type 2 diabetes. *J. Appl. Microbiol.* 107: 1681-1686.
  30. 국민건강보험공단, 2014
  31. 낙농통계연감. 2014. 농림축산식품부·낙농진흥회.
  32. 축산물의 가공기준 및 성분규격. 2014. 식품의약품안전처.

## 부 록

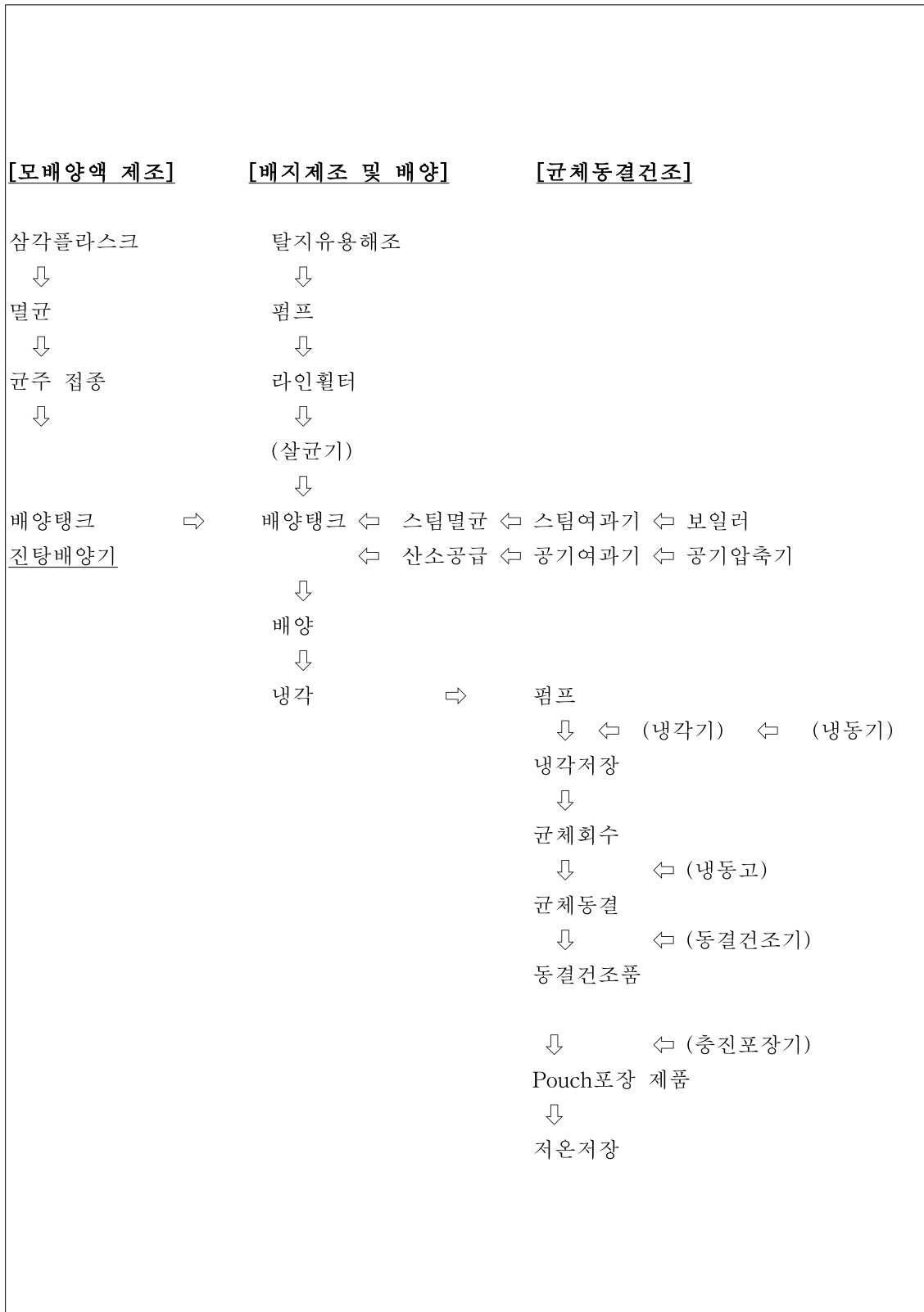
### 1. 젖산균 스타터 동결 건조품의 사양과 규격

젖산균 스타터 동결건조품의 사양과 규격을 다음과 같이 정하고 제조품의 생산규격화를 위한 기초자료로 활용토록 한다.

#### 1) 동결 건조품의 사양

항목	사양	비고
성상	젖산간균이 함유된 건조 탈지유 분말로써 Freeze dried 된 스타터로서의 일반적인 특성을 지녀야 한다.	
생균수	본 젖산균 성장최적배지에서 출현하는 집락수가 $5 \times 10^{10} \sim 1 \times 10^{11}/g$ 수준이어야 한다.	발효유 배양시간 내에 일정한 산도에 도달하여 우유를 응고시켜야 한다 (연구내용참조).
오염균수 대장균군 대장균 O157H7 포자 <i>Bacillus cereus</i> <i>Stap. aureus</i> <i>Clostridium spp.</i> 효모 및 곰팡이	스타터로서 bulk 용량의 발효유 제조과정중 이상발효가 나타나지 않아야 하며, 분말자체에 유해한 식중독균이 함유되지 않아야 한다.	
수분 함량	포장상태에서 공기중 수분을 흡습하여 활력에 영향을 주지 않아야 한다.	예비생산을 통하여 적정 수분함량을 결정키로 한다.
건조물 특성	포장단위로 무정형의 입자 상태이거나 또는 형태를 가진 건조물로서 본 발효시 원료용액에 잘 분산되어야 한다.	
포장 단위 재질	포장재질은 수분, 빛 및 공기를 차단하는 재질이어야 하며, 진공포장 또는 가스를 치환하는 무균포장이어야 한다.	

2) 발효 및 동결건조품의 제조공정도





### 3) *L. plantarum* Q180 동결건조 스타터의 상업적 규격

제품명 : Biobalance(가칭)

#### 제품 및 조성

Freeze dried concentrated lactic cultures for direct vat inoculation of skim milk and skim milk bases. This culture have been isolated from raw milk and identified by the Korea Food Research Institute and subjected to no genetic modification.

균명 : *Lactobacillus plantarum* Q180

포장단위 : Sachet of 20g  
Carton box of 20 sachets

#### 균주의 활력검사 (Test of culture)

For viability of *L. plantarum* :

Substrate Sterilized reconstituted milk (12% TS)

Heated to 20 minutes at 110°C.

Standardized to pH 6.60.

Fermentation Temperature : 38°C.

Fermentation Time : 4 h

Inoculation Level : 0.01%

Changes of pH obtained : +1.0

Viable cell numbers :  $1 \times 10^{10}$  CFU/mL

(축산물의 가공기준 및 성분규격 검사법)

사용방법 : 380 L 발효유 탱크에 20g Sachet 1봉을 무균적으로 접종한다.

미생물 및 화학물질 규격 : 별표 참조

저장방법 : 5°C 이하의 냉장실에 보관하여 6개월 이내에 사용한다. 개봉한 것은 오염의 위험이 있으므로 재사용을 금합니다.

주의사항 : 생물학적 물품이므로 이 분말을 흡입하거나 안면에 심하게 노출되지 않도록 주의 바랍니다.

항목	제품 규격기준	검사방법	비고
오염 미생물			예비 생산 후 규격기준을 제시하기로 한다.
Total coliform count Enterococci	<1 in 1g <20 in 1g	IDF 73A 1985 Gelose Bile, esculine, sodium azide in 48 h at 37°C	
Yeast & Moulds	<1 in 1g	IDF 94B 1990	
Salmonella	음성 in 25g	IDF 93B 1995	
<i>Staphylococcus. aureus</i> <i>Listeria monocytogenes</i>	음성 in 25g 음성 In 25g	IDF 60A 1978 NF V08-055	
중금속			
Cadmium	<1 mg/kg		
Arsenic	<1 mg/kg		
Lead	<1 mg/kg		
Mercury	<1 mg/kg		

#### 4) 요구르트 배합표

발효액제조							
조성	재료명	투입량(kg)					
	원유	95					
	탈지분유	4.9					
	유산균 분말	0.1					
	계	100					
조제순서							
<b>발효액조제</b> : 65℃로 가온한 원유 10kg에 탈지분유 3.9kg을 첨가하여 진탕용해시킨 후 85kg의 원유를 첨가한다.							
<b>열처리</b> : 90℃에서 10~30분간 또는 제조하고자 하는 요구르트 제조공정과 동일한 열처리를 한다.							
<b>젖산균분말</b> : 동결건조 젖산균 분말을 배양하고자 하는 시간 또는 비만억제물질 생성시간에 맞추어 0.01~0.1%량 첨가한다.							
<b>배양</b> : 38℃에서 12~18시간 배양한다. 이때 비만억제물질 생성 pH 수준에 도달하여야 한다.							
<b>시럽혼합</b> : 풍미 요구르트 제조의 경우 아래의 성분표와 같이 당류 및 정제수를 첨가한다.							
시럽의조제							
	재료명	투입량(kg)					
	올리고당	5.9					
	액상과당	2.4					
	잼류	9.5					
	정제수	1.2					
	계	19					
발효액조성표							
재료명	배합비(%)	투입량(kg)	성분조성				
			단백질	지방	당	수분	TS(%)
원유	80.76	96.1	3.0752	3.4596	4.3245	84.568	11.532
탈지분유	2.77	3.3	1.056	1.188	1.485	0.033	3.267
유산균분말	0.42	0.5	0.016	0.018	0.0225	0.44	0.06
계	84.03	100	4.2472	4.6656	5.832	85.041	14.859
배합물조성표							
재료명	배합비(%)	투입량(kg)	성분조성				
			단백질	지방	당	수분	TS(%)
발효액	84.03	100	4.2472	4.6656	5.832	85.041	14.859
올리고당	4.96	5.9	0	0	4.425	1.475	4.425
액상과당	2.02	2.4	0	0	1.8	0.6	1.8
잼류	7.98	9.5	0	0	4.75	4.75	4.7
정제수	1.01	1.2	0	0	0	1.2	0
계	100	119	4.2472	4.6656	16.807	93.066	25.784

## 2. 천안연암대학 Pilot Fermenter 생산시설



Fig. 52. Entrance door of fermenter room



Fig. 53. 5L Double fermenter



Fig. 54. 10L Auto controlled Fermenter



Fig. 55. 70L Auto controlled Fermenter



Fig. 56. Auto controlled 700L fermenter



Fig. 57. Cell Preservation Tank



Fig. 58. High speed centrifuge for Cell Harvest



Fig. 59. Vaccum Freeze Dryer