

면역증진 젖산균을 이용한 모짜렐라 치즈 개발
(Development of Mozzarella Cheese by Lactic acid
bacteria for immunomodulating activity)

연구기관
한국식품연구원

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “면역증진 젓산균을 이용한 모짜렐라 치즈 개발” 과제의 보고서로 제출합니다.

2010년 05월 29일

주관연구기관명 : 한국식품연구원

주관연구책임자 : 임 상 동

세부연구책임자 : 김 기 성

세부연구책임자 : 성 기 승

연 구 원 : 김 영 봉

연 구 원 : 이 남 혁

연 구 원 : 양 승 용

연 구 원 : 전 기 흥

연 구 원 : 조 성 아

위탁연구기관명 : 천안연암대학

위탁연구책임자 : 한 동 운

참 여 기 업 명 : 임실치즈농협

연 구 원 : 양 해 동

요 약 문

I. 제 목

면역증진 젖산균을 이용한 모짜렐라 치즈 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

본 연구의 목적은 원유, 성인 및 신생아 분변에서 면역증진 젖산균 탐색 및 발굴하여 젖산균 특성조사와 최적 배양조건을 설정한 다음 모짜렐라 치즈를 개발하고 동물실험을 통해 효능이 입증된 제품을 개발하고자 하는데 그 목적이 있다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 젖산균 분리 및 수집

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

2. 면역증진 균주 선발

- NO 분비능 측정
- Interleukin-1a 분비능 측정
- TNF α 분비능 측정

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, 16S rDNA sequencing

4. 선발 젖산균의 특성조사

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

5. 모짜렐라 치즈 제조를 위한 최적 배양조건 확립

- 배양온도별 : 30°C, 35°C, 40°C
- 젖산균 접종량별 : 0.1%, 0.5%, 1%, 2.0%
- 측정항목 : 커드와 모짜렐라 치즈의 면역활성, 젖산균수, 적정산도

6. 제조공정 설정

원유 유지방 함량, 살균온도 및 시간, 냉각온도, 스타터 첨가량 및 렌넷 첨가, 커드차르기(유청의 적정산도), 가온(유청온도, 유청배출 때의 적정산도), 스트레칭 온

도, 성형온도, 냉각온도, 염농도 및 온도, 염지시간, 건조실 습도, 건조온도 및 시간 등을 설정

7. 이화학적 특성 조사

- 타제품과의 면역증진(in vitro) 비교
- 치즈의 수율, 질소화합물, 아미노산함량, 단백질의 전기영동, 유기산, 조직특성, 관능검사 등 분석

8. 동물모델을 이용한 모짜렐라 치즈의 면역 증진 효능 평가

- 면역관련 장기무게 측정
- Interlukine-1 β 측정
- TNF- α 측정
- Interlukine-6 측정
- 백혈구 및 비장 조직검사

IV. 연구개발 결과

1. 젖산균 분리 및 수집

가. 원유에서 젖산균 분리

서울우유 중부, 북부, 서부지도소 관할 원유검사소(경기도 및 강원도 일부), 전북 축산시험연구소, 경북 가축위생시험소 및 제주도 축산진흥원에서 지원받아 목장별 원유를 채취하여 MRS배지에서 Bromocresol purple과 sodium azide를 첨가한 plate에 smear한 후 37 $^{\circ}$ C에서 48시간 배양한 다음 노란색 colony중 각기 다른 모양의 colony를 선발하였고 순수분리를 위해 MRS agar에 streaking하여 얻어진 colony를 triptic soy agar slant에 37 $^{\circ}$ C에서 18시간 배양하여 1,054개의 균주를 분리하였다. 모짜렐라 치즈에 적합한 균주를 분리하기 위해서는 skim milk를 응고시킬 수 있어야 하므로 10% 환원탈지분유에 분리균주를 접종한 후 37 $^{\circ}$ C에서 24시간 배양하였고, 이 때 응고된 균주가 598개 균주이었다.

나. 신생아 분변에서 젖산균 분리

순천향병원 및 한강성심병원 산부인과 신생아실에서 지원받아 45명의 분변으로부터 분리하였다. 분변시료는 배변 즉시 3시간 이내에 미생물 시험을 실시하였다. bifidobacteria 분리는 채취된 분변을 균일하게 혼합한 후 혐기 희석액으로 10³~10⁴ cfu/ml 수준까지 희석한 후 미리 만들어 놓은 BS agar plate에 희석된 시료 100 μ l를 도말한 후 anaerobic jar에 gas pak을 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 3일간 혐기적으로 배양하였다. 분리된 bifidobacteria는 paraffin oil이 증충된 modified BL broth를 사용하여

37°C에서 18~24시간 배양하여 67개 균주를 보관하였다. 젖산균 분리는 modified MRS(glucose→lactose)에서 분리하였으며 다른 과정은 원유에서 분리한 방법과 동일하게 하여 37°C에서 18시간 및 24시간 배양하여 응고된 균주 42개를 분리하였다.

다. 성인 분변에서 젖산균 분리

한국식품연구원 직원 및 가족에서 지원받아 50명의 분변으로부터 분리하였다. 분변시료는 배변 즉시 paraffin oil이 증충된 modified Blood-Glucose-Liver (BL) broth가 담긴 15ml의 멸균된 polypropylene tube에 넣어 실험실로 수송하여 12시간 이내에 미생물 시험을 실시하였다. 채취된 분변으로부터 bifidobacteria 분리 및 젖산균 분리는 신생아 분변과 동일한 실험방법으로 실시하여 bifidobacteria는 91개 균주를 수집, 보관하였고, 젖산균은 87개를 수집하였으며, 이 중 37°C에서 18시간 및 24시간 배양하여 응고된 균주 42개 균주를 분리하였다.

라. 균주에서 우유 응고여부 조사

모짜렐라 치즈에 적합하기 위해서는 skim milk를 응고시킬 수 있는 산생성 능력이 있어야 하므로 10% 환원탈지분유에 분리균주를 접종한 후 37°C에서 18시간과 24시간 배양하여 응고된 균주가 각각 645개 균주와 682개 균주이었다.

2. 면역활성 균주 선발

원유와 분변에서 분리한 균주 중 10% 환원탈지분유에서 37°C에서 24시간 배양하여 응고된 균주만 선택하여 면역활성 실험을 실시하였다. 분리된 균을 MRS broth에 접종한 다음 37°C에서 12시간 배양한 후(약 10^9 이 될 때까지) 1,500×g, 15분간 원심분리하여 cell를 수집하였다. MRS broth는 suction한 후 Hanks' buffered salt solution 1.5ml로 부유 시킨 후 100°C에서 50분 동안 열처리하여 반응성 질소종 분비능과 IL-1α 및 TNF시험을 실시한 결과 질소종 분비능은 10uM 이상을 나타낸 균수가 19개이고, 40uM 이상을 나타낸 균수가 1개이며, IL-1α 분비능은 500pg/ml 이상을 나타낸 균수가 285개, 2500pg/ml 이상을 나타낸 균수가 245개이었다. 또한 TNF 분비능은 1000pg/ml 이상을 나타낸 균주는 151개, 2,000pg/ml 이상을 나타낸 균주는 146개로서 최종 13개 균주를 선발하였다.

3. 면역활성 균주 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 및 16S rRNA 염기서열 한 결과 얻어진 균주명은 *Lactobacillus plantarum* 4 균주, *Lactobacillus fermentum* 2 균주, *Lactobacillus acidophilus* 1 균주, *Lactobacillus sakei* 1 균주, *Streptococcus thermophilus* 1 균주, *Enterococcus faecalis* 2균주, *Streptococcus salivarius* 1 균주, *Streptococcus macedonicus* 1 균주가 동정되었다.

4. 선발 젖산균의 특성조사

1차년도에서 면역활성이 높은 균주 13종 중 산 생성 속도와 면역활성능을 감안하여 5종의 젖산균(*Lactobacillus fermentum* 450, *Streptococcus salivarius* O39, *Enterococcus faecalis* 683 균주, *Streptococcus macedonicus* 743, *Lactobacillus fermentum* 782 균주)를 선발한 다음, 모짜렐라 치즈의 종균으로서 적합한지의 여부를 실시하였다.

4종의 젖산균주는 40℃가, *S. salivarius* O39 균주는 37℃가 적정온도로 나타났다. *E. faecalis* 683 균주는 타 균주에 비해 항생제 내성이 강한 반면 *S. salivarius* O39 균주와 *L. fermentum* 782균주는 내성이 약하였다. 젖산균 5종 모두 Benzopyrene을 발암성 물질로 전환시키는 발암효소인 β -glucuronidase의 경우에는 효소활성이 없는 것으로 나타나 안전성을 확인할 수 있었다. 5 균주 중 *S. salivarius* O39와 *E. faecalis* 683 균주가 *L. fermentum* 782, *S. macedonicus* 743, *L. fermentum* 782 균주보다 담즙에 대한 내성이 있었다. *S. salivarius* O39 균주, *E. faecalis* 683 균주와 *L. fermentum* 782균주가 *L. fermentum* 450 균주와 *S. macedonicus* 743 균주보다 pH에 대한 내성이 강한 것으로 나타난 반면 *S. macedonicus* 743균주는 pH에 대한 내성이 약하였으나 항균력이 가장 강한 것으로 나타났다.

5. 모짜렐라 치즈 제조를 위한 최적 배양조건 확립

Vancomycin에 내성이 높아 위해논란이 있는 *E. faecalis* 683 균주를 배제하고 4종의 균주를 대상으로 배양온도 별(30℃, 35℃, 40℃), 균주의 접종량 별(0.1%, 0.5%, 1.0%, 2.0%)로 최적조건을 설정하였다. *L. fermentum* 450 균주를 이용하여 치즈 제조시 1~2% 접종하여 40℃에서 배양할 경우와 2.0% 접종하고 30℃에서 배양할 경우 가공적성, 면역활성 및 수율 등이 적합하였다. *S. salivarius* O39 균주를 이용하여 치즈 제조시 가공적성 및 수율은 0.1~1% 접종하고 35℃에서 배양할 경우와 면역활성과 수율은 2.0% 접종하고 30℃에서 배양할 경우가 적합하였다. *S. macedonicus* 743 균주를 이용하여 치즈 제조 시 2% 접종하여 32℃에서 배양할

경우 타 균주에 비해 가장 제조시간이 단축되었고, 가공적성 및 면역활성이 우수하였다. *L. fermentum* 782 균주를 이용하여 치즈 제조시 2% 접종하여 35℃에서 배양할 경우 가공적성, 면역활성 및 수율 등이 적합하였다.

6. 제조공정 설정

원유를 살균(63℃/30분 또는 72~73℃/15초)하고 32℃로 냉각한 다음 선발된 젖산균 *S. macedonicus* 743을 2% 접종하며, 30분간 교반한 후 렌넷 230 μ l/Kg 첨가한 다음 4~5분간 교반하였다. 염화칼슘을 원유에 대해 약 0.01~0.02% 첨가하고 25~35분간 정치하여 커드를 형성시켰다. 유청의 적정산도가 0.1~0.12%일 때(약 81분 소요) 커드를 자르고 가온하여 유청온도를 43℃까지 상승시켰다. 53분 정도 교반하면서 유청산도가 0.17~0.18%가 되면 유청을 배출하였고 43℃에서 210분 동안 퇴적시켜 응집된 커드에서 용출되는 유청산도가 0.6~0.65%가 되게 한 다음 72~75℃의 열수로 스트레칭과 65~70℃에서 성형한 후 5℃로 냉각하였다. 염지는 염 농도가 18~20보메, 온도는 12℃, 염지시간은 20분정도로 하였으며, 건조 시 상대습도는 80~90%, 온도 및 시간은 10℃/2~3일로 하였다.

7. 이화학적 특성 조사

S. macedonicus 743 균주로 제조된 모짜렐라 치즈와 상업용 스타터로 제조된 모짜렐라 치즈와의 면역활성능을 비교한 결과 시중제품 및 외국제품에 비해 면역분비능이 높은 것으로 나타났으며, *S. macedonicus* 743 균주를 상업균주와 혼합하여도 면역활성능이 우수한 것으로 나타났다. *S. macedonicus* 743 균주로 제조된 모짜렐라 치즈가 상업용 스타터로 제조된 모짜렐라 치즈보다 단백질 함량이 높고 지방이 낮았으며, 총 아미노산 역시 높았으나 유리아미노산은 낮은 값을 나타내었다. 또한 비단백태질소화합물은 높은 반면 수용성질소화합물, 아미노태질소화합물, 수율 및 유기산은 낮았다. 관능검사 결과는 *S. macedonicus* 743 균주로 제조된 모짜렐라 치즈가 가장 우수하였다.

8. 동물실험

Streptococcus macedonicus 743 젖산균의 면역활성 증진 효과를 알아보기 위하여 수컷 마우스를 대상으로 하여 상업균주(TCC-3, CHR.HANSEN A/S)를 스타터로 사용하여 제조한 모짜렐라 치즈 함유 사료(그룹 A), *Streptococcus macedonicus* 743 균주를 스타터로 사용하여 제조한 모짜렐라 치즈 함유 사료(그룹 B), *S. macedonicus* 743 균주와 상업균주를 1 : 1 비율로 혼합하여 제조한 모짜렐라 치즈함유 사료(그룹 C)

를 설정하여 경투투여 방법으로 급여하였다. 대조군은 일반 사료만을 투여하여 음성 대조군(그룹 D)을 두었다.

각 실험군은 그룹별로 15두씩을 배정하였고 각각 사료 급여개시 후 7주 후에 안락사 시켜 혈액과 복강 마크로파지를 회수하고 흉선과 비장을 포함하여 간, 심장, 폐, 신장, 고환, 대뇌, 소뇌 등 실질 장기를 채취하여 포르말린에 고정하였다.

S. macedonicus 743의 첨가가 수컷 마우스의 면역기능에 미치는 영향에 대해 알아본 결과 *S. macedonicus* 743 균주로 제조된 치즈 함유 사료를 투여한 그룹에서 마우스의 증체량과 체중이 사료만 투여한 대조군 그룹에 비하여 증가하는 경향을 보였으나 증체량 증가의 유의성 있는 차이는 보이지 않았다. *S. macedonicus* 743 균주로 제조된 치즈 함유 사료 투여 후 7주령에 안락사 시킨 마우스의 각 장기의 무게에서도 간, 신장, 심장, 폐, 고환, 대뇌의 무게 차이에서 유의성을 확인할 수 없었다. 비장계수와 흉선계수는 *S. macedonicus* 743 균주로 제조된 치즈 함유 사료 그룹 B에서만 유의성 있는 증가를 보였고($p < 0.05$) 그룹 A, C에서는 다소 증가하는 경향을 보였으나 유의성은 인정되지 않았다. 말초혈액 중 사이토카인(IL-1 β , IL-6, TNF- α)의 수치는 B, C 그룹에서 유의성 있는 증가가 관찰되어($p < 0.05$) *S. macedonicus* 743 균주로 제조된 치즈 함유 사료가 동물의 면역 증진에 역할을 하는 것으로 나타났다. 활성화된 마크로파지에서 생성되는 것으로 알려진 IL-1 β , IL-6, TNF- α 를 측정하기 위하여 각 그룹으로부터 혈청과 복강 마크로 파지 배양액에 대하여 ELISA를 실시한 결과, 그룹 B, C에서 유의성 있게 나타났고 그룹 D에서도 대조군에 비해 증가하는 소견을 보였다. 백혈구 백분율 계산에서는 neutrophils이 그룹 A에서 대조군에 비해 다소 높게 났으나 다른 군에서는 큰 차이를 보이지 않았다. 동물의 생체 내에서 세포성 면역과 체액성 면역을 담당하는 것으로 알려진 림프구는 B그룹과 C그룹에서 대조군에 비해 증가하는 결과를 보여 실험 물질이 면역세포의 활동에 영향을 미치는 것으로 나타났다.

이상의 결과를 종합해보면 *S. macedonicus* 743 균주로 제조된 치즈와 상업균주와 혼합하여 제조된 모짜렐라 치즈의 경구투여는 복강 마크로파지의 활성화에 관여하여 생체 내에서 면역기능을 증가시킬 수 있는 가능성이 있는 것으로 생각되었다. 본 실험에 이용된 C57BL/6계 마우스는 SPF 마우스로 병원체에 의한 감염이나 질환 형성이 없었던 것으로 외부에서 병원체나 감염원의 영향을 받아 생체 면역기능이 저하된 상태에서는 식이의 종류와 면역활성 물질의 함량에 좀 더 큰 영향을 받을 수 있으므로 병원성 세균이나 바이러스 감염 시의 면역활성에 관한 연구도 함께 수행되면 좋은 결과를 얻을 수 있을 것으로 판단된다.

SUMMARY

I. Title

Development of Mozzarella Cheese by Lactic acid bacteria for immunomodulating activity

II. Objective of research

The objective of the study was to develop Mozzarella Cheese by immunomodulating activity, which was isolated from lactic acid bacteria under specific conditions.

III. Research scope and area

1. Collection and isolation of lactic acid bacteria
2. Selection of lactic acid bacteria having immunomodulating activity
3. Identification of lactic acid bacteria
4. Characteristics of selected lactic acid bacteria
 - Growth of lactic acid bacteria, antibiotic tolerance, enzyme activity test, bile tolerance, pH tolerance, antibacterial activity
5. Optimization of cultivation condition for the Mozzarella cheese production
 - Incubation temperature
 - The addition dosage of lactic acid bacteria
6. Designing of cheese making process
 - Establishment of pasteurizing of raw milk, adding of starter and rennet, cutting, cooking, stretching, forming, cooling, salting, and drying condition
7. Physico-chemical characteristics
 - Comparison of immunomodulating activity with other Mozzarella cheese in vitro
 - Survey of physico-chemical characteristics
8. Animal experiments

- Measurement of organ weights, IL-1 β , TNF- α , IL-6, white blood cells and spleen tissue

IV. Result of research and suggestion of application

1. Collection and isolation of lactic acid bacteria

a. Isolation of lactic acid bacteria from raw milk

Raw milk was collected from several farms under support of Raw milk testing lab. within the jurisdiction of Central, North, Western guidance division (part of Kyoung Gi Do and Gang Won Do)in Seoul Dairy Cooperation, Provincial institute for livestock promotion(Jeonbuk, Kyoungbuk, Jeju). 1054 bacteria were isolated from modified MRS media. 598 bacteria were further isolated after the microbes were inoculated on 10% the reconstituted skim milk followed by incubation at 37°C for 24hr.

b. Isolation of lactic acid bacteria from infant feces

45 new-born infant feces were collected under support of Soon Chun Hyang Hospital and Hangang Sungshim Hospital. 67 bifidobacteria were isolated and 42 coagulated lactic acid bacteria were isolated after incubation at 37°C for 18 and 24hr.

c. Isolation of lactic acid bacteria from adults feces

50 adult feces were collected from staffs and their family members of KFRI. 91 bifidobacteria and 87 lactic acid bacteria were isolated. 42 coagulated lactic acid bacteria were isolated after incubation at 37°C for 18 and 24hr.

d. Collection of lactic acid bacteria having milk coagulation capacity

645 and 682 bacteria were further isolated after the microbes were inoculated on 10% the reconstituted skim milk followed by incubation at 37°C for 18hr and 24hr, respectively.

2. Selection of lactic acid bacteria having immunomodulating activity

Microbes possessing IL-1 α secreting activity over 500pg/ml counted 285, and

those over 2500pg/ml counted 245. Microbes producing nitric oxide over 10uM counted 19, while those over 40uM counted 1. Microbes possessing TNF secreting activity over 1000pg/ml counted 151, while those over 2000pg/ml counted 146. 13 microbes were selected lastly.

3. Identification of lactic acid bacteria

Identification of lactic acid bacteria having immunomodulating activity were *Lactobacillus plantarum* 4 strains, *Lactobacillus fermentum* 2 strains, *Lactobacillus acidophilus* 1 strains, *Lactobacillus sakei* 1 strain, *Streptococcus thermophilus* 1 strains, *Enterococcus faecalis* 2 strains, *Streptococcus salivarius* 1 strain, *Streptococcus macedonicus* 1 strain as a result of Gram staining, fractography, sporogenesis, aerobic and anaerobic growth, catalase formation, growth in 15°C and 45°C, gas formation from glucose, ammonia formation from arginine, sugar fermentation test and 16S rRNA sequencing.

4. Characteristics of selected lactic acid bacteria

Among 13 species of lactic bacteria with immuno modulating activity selected from the 1st year study, 5 species of lactic bacteria (*Lactobacillus fermentum* 450, *Streptococcus salivarius* O39, *Enterococcus faecalis* 683, *Streptococcus macedonicus* 743, *Lactobacillus fermentum* 782) was selected regarding acid producing speed and immunomodulating activity and then investigated the possibility of starter culture for the production of Mozzarella cheese.

The optimum temperature of 4 kinds of lactic acid bacteria and *S salivarius* O39 was 40°C and 37°C, respectively. *E. faecalis* 683 has comparatively strong antibiotic resistance but *S. salivarius* O39 and *L. fermentum* 782 has weak antibiotic resistance. It was possible to understand the safety of selected 5 lactic bacteria by the confirmation of no β -glucuronidase activity transferring benzopyrene to calcinogen. Among 5 lactic bacteria, *S. salivarius* O39 and *E. faecalis* 683 has shown higher bile juice resistance than *L. fermentum* 782, *S. macedonicus* 743, *L. fermentum* 782. *S. salivarius* O39, *E. faecalis* 683 and *L. fermentum* 782 has shown higher pH resistance than *L. fermentum* 450 and *S. macedonicus* 743. on the other hand, *S. macedonicus* 743 has shown weak pH resistance but strongest antibiotic resistance.

5. Optimization of cultivation condition for the Mozzarella cheese production

Optimum temperature(30°C, 35°C, 40°C) and dosage(0.1%, 0.5%, 1.0%, 2.0%) of *L. fermentum* 450 and *S. salivarius* O39 has studies with the removal of *E. faecalis* 683 of high resistance on the Vancomycin. In case of cheese making with the starter culture of *L. fermentum* 450, incubation at 40°C with 1~2% addition or 30°C with 2.0% addition was the best condition for the process control, immunomodulatory activity and yield. In case of cheese making with the starter culture of *S. salivarius* O39, incubation at 35°C with 0.1~1% addition was the best for the process control and cheese yield on the other hand incubation at 30°C with 2.0% addition was the best for the immunomodulatory activity.

In case of cheese making with the starter culture of *S. macedonicus* 743, incubation at 32°C with 2% addition was the best for the process control and immunomodulatory activity with minimum processing time. On the other hand cheese making with the starter culture of *L. fermentum* 782, incubation at 35°C with 2% addition was the best for the process control, immunomodulatory activity and cheese yield.

6. Designing of cheese making process

2% of *S. macedonicus* 743 starter culture was added on the 32°C milk after pasteurization at 63°C 30 minutes or 72~73°C, 15 seconds and agitated for 4~5 minutes after addition of 230 μ l/Kg of rennet. Curd was made by the setting the milk 25~35 minutes after addition of 0.01~0.02% Calcium chloride. Cutting the curd was done at 0.1~0.12% acidity(81 minutes later) and heating the cheese vat up to 43°C. Whey was removed at the acidity of 0.17~0.18% by the agitation for 53 minutes and continue to cheddaring for 210 minutes up to the acidity of 0.6~0.65% followed by the stretching at 72~75°C and moulding at 65~70°C and then cool down to 5°C. Salting was done with the solution of 18~20 Brix at 12°C for 20 minutes and drying condition was 80~90% RH at 10°C for 2~3 day.

7. Physico-chemical characteristics

Based on the comparison of immunomodulatory activity of Mozzarella cheese made of *S. macedonicus* 743 starter and commercial starter, *S. macedonicus* 743

starter added cheese was higher than commercial starter cheese. And Mozzarella cheese made of mixed starter of *S. macedonicus* 743 and commercial starter has shown excellent immunomodulating activity. Mozzarella cheese made of *S. macedonicus* 743 starter has revealed higher protein and total amino acids and low fat contents than that of commercial starter. And Mozzarella cheese made of *S. macedonicus* 743 starter has revealed higher non protein nitrogen but lower water soluble nitrogen, amino nitrogen, organic acids and yield than that of commercial starter.

8. Animal experiments

We investigated the immunomodulatory action of *Streptococcus macedonicus* 743 in male C57BL/6 mice. Mice were treated with Mozzarella Cheese added three kinds of fed with *S. macedonicus* 743, FD-DVS TCC-3 and *S. macedonicus* 743 : FD-DVS TCC-3(1:1) for 7 weeks, respectively. This study was performed to investigate the immunomodulative effects of *S. macedonicus* 743 in mice, using in vivo experiments. Three kinds of cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF- α) production by peritoneal macrophages cultured with experimental feed was orally administered into mice, and isolated macrophages were used as experimental model. In vivo experiment, six weeks old mice were fed *S. macedonicus* 743, FD-DVS TCC-3 and *S. macedonicus* 743 : FD-DVS TCC-3(1:1) was orally administered everyday for seven weeks. For the basic data, body weight and physiological parameters such as organ weight and spleen index were observed. No significant differences of body gain weight were recorded in various groups of animals. The production of cytokine (IL-1 β , IL-6, TNF- α) which was secreted by macrophages was detected by ELISA assay using the cytokine kit. *S. macedonicus* 743 group significantly increased the production of TNF- α compared to the control group. The IL-1 β production was more significantly enhanced in the group threatened with *S. macedonicus* 743 than the skim milk group.

The result of this study may suggest that the supplementation of *S. macedonicus* 743 can regulate the cytokine production capacity by the activated macrophages in mice. As reported in this study, *S. macedonicus* 743 showed a stimulatory effect on immune functions in mice.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	15
Chapter 2. Art status of domestic and abroad	17
1. Market trend of cheese	17
2. Art status of domestic and abroad	20
Chapter 3. Scopes and results of the research project	24
1. Materials	24
2. Method	25
3. Result and discussion	39
a. Isolation and collection of lactic acid bacteria	39
b. Selection of lactic acid bacteria having immunomodulating activity	40
c. Identification of lactic acid bacteria	75
d. Characteristics of selected lactic acid bacteria	81
e. Optimization of cultivation condition for the Mozzarella cheese production	99
f. Designing of cheese making process	120
g. Physico-chemical characteristics	122
h. Animal experiments	134
Chapter 4. Attainability of the research goal and contribution to related fields	142
Chapter 5. Application of research results	144
Chapter 6. Acquisition of foreign scientific informations during this research	145
Chapter 7. Reference	155

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	15
제 2 장 국내외 기술개발 현황	17
제 1 절 치즈의 시장현황	17
제 2 절 국내외 기술 현황	20
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	24
제 1 절 재료	24
제 2 절 방법	25
제 3 절 연구결과 및 고찰	39
1. 젖산균 분리 및 수집	39
2. 면역증진 균주 선발	40
3. 면역증진 균주 동정	75
4. 선발 젖산균의 특성조사	81
5. 모짜렐라 치즈 제조를 위한 최적 배양조건 확립	99
6. 제조공정 설정	120
7. 이화학적 특성 조사	122
8. 동물모델을 이용한 모짜렐라 치즈의 면역증진 효능평가	134
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	142
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	144
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	145
제 7 장 참고문헌	155

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 유업계에서도 이들 소재를 응용한 연구개발과 공정개선을 통한 신제품을 출시하고 있다. 최근 웰빙 열풍으로 건강에 관심이 많아진 소비자들이 치즈에 주목하고 있다. 치즈는 뼈를 형성하는 칼슘과 근육을 형성하는 단백질이 풍부하여 성장기 어린이들에게는 필수 음식으로 알려져 있다. 우유를 먹으면 배탈이 나는 사람도 소화·흡수가 잘되는 치즈로 칼슘과 단백질 등의 영양을 보충할 수 있기 때문에 우유대체식품으로 각광 받고 있다. 그러나 1970년 100만 명을 넘었던 신생아 수가 2000년 63만 명, 2005년에는 43만 명으로 줄어드는 등 출산율이 저하가 계속되고 있어 분유의 소비가 감소하고 있다. 우유시장마저 축소되고 있어 치즈시장이 향후 우유, 분유시장을 대체하는 수입 창출의 돌파구가 될 것이라 점쳐지고 있다. 치즈시장은 2000년까지만 해도 1690억 원 규모로 분유 4000억 원 시장의 절반에도 못 미쳤지만 2005년 2900억원으로 분유와 같은 규모로 확대 되었고, 2008년의 시장규모는 4,800억원으로 분유시장을 넘어섰다. 때문에 매일유업, 남양유업도 분유전쟁에서 치즈전쟁으로 무대를 옮겼고 서울우유, 동원테어리푸드도 치즈사업에 더욱 주력하고 있는 등 기업들의 치즈전쟁이 점점 치열해지고 있다.

치즈시장이 이처럼 급성장하는 것은 와인 시장 팽창에 편승, 와인과 음식궁합이 맞는 안주용으로 치즈를 선호하는데다 피자 등 서구 음식을 선호하는 식문화의 변화와 우유 소비가 한계점에 이르면서 우유 대체식품으로 맛과 종류가 다양한 치즈로 소비자 선호가 전환하는 사례도 늘고 있는 것으로 풀이되고 있다.

그러나 프랑스와 이탈리아 등지에서 완제품 형태로 수입되는 고급 치즈는 국산 치즈보다 가격이 싸다. 전체 치즈시장의 5%를 차지하는 고급 치즈의 운송료와 36%의 관세를 포함하면 현지 가격보다 2배가 넘는 가격이지만 국내에서 만든 치즈보다 원유 가격 차이 때문에 저렴하다. 치즈 원료인 원유 가격이 워낙 차이가 나기 때문에 한국에서 직접 치즈를 만들면 수입품보다 20% 이상 비쌀 수밖에 없는 실정이다. 최근에는 우루과이 아르헨티나 등 중남미 국가에서 모짜렐라 치즈의 수입이 늘고 있어 국내 피자시장에서의 국산치즈 수요가 줄고 있다. 고급 치즈의 인기가 날로 증가해 가는 가운데 수입 치즈의 싼 가격은 국내 치즈 제조 기업들에게 위협이 되고 있다. 치즈시장의 이 같은 움직임은 국내 치즈 인지도가 약한 가운데 경기위축

에 따른 소비 감소에다 수입업체를 통해 수입치즈가 대거 유입돼 가격경쟁력에서 밀려난 것으로 풀이 되고 있다.

기존의 치즈용 스타터는 숙성치즈의 경우 *Lactococcus lactis*와 *Lactococcus cremoris*로 구성된 혼합균주를 사용하여 우유의 유당을 발효하여 젖산생성, 방향물질 생성, 단백분해효소 및 지방분해효소 생성 등의 목적에 사용되고 있고 모짜렐라 치즈는 *Lactobacillus bulgaricus*와 *Streptococcus thermophilus*로 구성된 혼합균주를 사용하여 젖산생성 목적에 사용되고 있으나 건강 기능성이 있는 젖산균을 이용한 치즈제품은 전무하다. 국내의 치즈제품은 검은콩, 시금치, 당근을 소재로 한 가공치즈와 칼슘, DHA 첨가 등 청소년 중심의 가공치즈가 주류를 이루고 있으나 가공치즈의 원료인 자연치즈는 거의 100% 수입에 의존하기 때문에 국내 원유소비와는 무관하므로 국내 원유를 이용한 치즈 개발의 필요성이 요구되고 있다. 자연치즈는 외국에 비해 가격 경쟁력이 떨어지나 원유소비를 확대시키기 위한 유통기간이 짧아 경쟁력 있는 모짜렐라 치즈 개발이 요구된다.

이에 따라 본 연구를 통하여 면역기능이 있는 젖산균을 이용한 모짜렐라 치즈를 개발하여 국내 원유 소비 촉진 및 국제경쟁력을 향상시킴으로써, 국내 원유를 이용한 유 및 유제품의 시장을 확보하는 것이 급선무로 보여 진다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절. 치즈의 시장 현황

1. 낙농산업의 현황

현재 국내 낙농산업은 시유 생산에 국한되어 있는 상황에서 출산율의 저하로 인한 음용 인구감소, 차음료 소비강세, 국제 곡물가 인상, 원유대 인상 등으로 시유의 소비량이 감소 또는 정체되는 추세이지만 치즈 시장은 매년 꾸준한 성장세를 이어가고 있다.

올해 1월부터 낙농제품에 대한 관세분류가 45개 품목에서 74개로 세분화되고, 치즈는 종전의 6개 품목에서 12개 품목으로 세분류되어 향후 FTA 협상에 있어서 품목별 협상전략을 차별화하는데 도움이 되겠지만, 지난해 한-미 FTA 체결 이후 현재 진행 중인 한-EU FTA가 체결되고 우리나라와 인접한 일본 및 중국과의 FTA가 체결될 경우 북해도산 시유의 수입과 원유생산비가 낮은 중국으로부터 원유수입이 가능하게 되어 모든 유제품에 대한 수입이 가능하게 될 수 있다.

따라서 원유 소비량이 많아 상대적으로 부가가치가 높고, 시장 성장 잠재력이 높은 낙농산업의 마지막 성장 품목인 치즈시장을 낙농선진국 및 주변국에 빼앗기지 않고 지키기 위해 정부의 낙농정책 변화 및 유업체의 노력이 절실히 요구된다.

2. 우리나라 치즈 수입 현황

1993년 이전까지는 수입량이 200톤 정도의 적은 규모로 수입개방 이전까지는 소비량의 대부분을 국내생산량이 차지하였다. 그러나 1995년 수입개방 이후 수입량이 11,076톤으로 급격하게 늘어난 후 2009년 수입량은 49,023톤으로 14년간 4.4배로 수입량이 증가하였다. 우리나라의 2009년 전체 유제품 수입량은 500,971천\$, 176,197톤으로 무역수지는 428,077천\$ 적자이며, 유제품 수입액 중에서 가장 큰 비중을 차지하는 치즈의 수입액은 189,917천\$로 전체 유제품 수입액의 37.9%를 차지하고 있다.

표 1. 년도별 치즈의 수출입 동향

		2009	2008	2007	2006	2005
수출 (A)	물량(톤)	130	110	52	230	319
	금액(천\$)	608	508	431	1,161	1,657
	원유환산량 (수출)	1,448	1,225	577	2,551	3,547
수입 (B)	물량(톤)	49,023	47,385	49,471	44,017	44,017
	금액(천\$)	189,917	238,876	178,992	146,219	143,526
	원유환산량 (수입)	544,696	526,492	549,670	489,068	489,071
무역수지(A-B)		-189,309	-238,368	-178,562	-145,059	-141,870

자료 : 관세청

낙농선진국과 FTA 체결 및 향후 DDA 협상결과에 따라 치즈 수입에 대한 관세는 하락할 것으로 예상되기 때문에 국산 자연치즈에 비해 더욱 가격경쟁력이 갖춰짐에 따라 치즈의 수입량은 더 증가할 것으로 보인다.

3. 우리나라 치즈 소비 현황

국민소득 1만 달러를 돌파한 1995년 치즈 소비량은 12,417톤이었으나 국민소득 2만 달러에 접어든 2009년에는 약 5배 이상 증가한 71,574톤으로 나타났다. 그러나 일본의 1인당 치즈 소비량은 2000년 1.9kg 정도로 이후에는 아주 완만한 증가 추세로 볼 때 우리나라도 일본과 비슷한 수준의 소비량 수준까지 치즈 소비는 계속 증가할 것으로 예상된다. 이 수치는 일본의 치즈 소비량 28만여t과 비교할 때 우리나라 치즈 시장은 앞으로 성장 여지가 매우 크다고 볼 수 있다. 시유의 1인당 소비량은 34kg 내외로 수년간 정체했지만 1인당 치즈 소비량은 지속적인 성장세를 보이고 있다. 최근에는 자연 치즈 1.06kg, 가공 치즈 0.38kg으로 총 1.44kg을 소비하고 있다.

1인당 20kg 안팎인 유럽 선진국 소비량과 비교할 때는 아직 미미한 수준이지만 치즈 소비는 계속 증가할 것으로 전망된다.

표 2. 년도별 우유 및 치즈 소비량

년 도		2009	2008	2007	2006	2005	
국내소비량	총량(톤)	3,036,455	2,980,812	3,054,290	3,070,140	3,028,287	
	1인당	62.3	61.3	63	63.6	62.7	
1인당소비량 (kg)	치즈	자연	1.1	1.1	0.8	0.8	0.7
		가공	0.4	0.4	0.6	0.6	0.5

자료 : 농림수산물식품부

주) 1. 우유소비량 총량: 국내원유생산량+전기이월+수입-수출-재고

2. 우유소비량 1인당: 국내우유소비총량/인구수

3. 1인당 유제품별 소비량: 유제품별소비량/인구수

표 3. 년도별 치즈의 생산 및 소비 동향

(단위 : 톤)

		2009	2008	2007	2006	2005	2004
생산	자연치즈	7,682	9,702	9,076	13,347	11,692	12,959
	가공치즈	15,517	15,314	15,290	14,582	12,032	11,337
	수입(자연)	44,762	43,731	34,734	29,724	29,045	27,613
	수입(가공)	4,261	3,655	14,740	14,309	14,987	13,739
	계	72,222	72,402	73,840	71,962	67,756	65,648
소비	자연치즈	51,755	52,993	44,419	43,445	41,382	38,837
	가공치즈	19,688	18,959	29,969	28,709	26,908	24,759
	수출(자연)	57	91	23	165	176	15
	수출(가공)	74	19	28	64	146	278
	계	71,574	72,062	74,439	72,383	68,612	63,889

자료 : 농림수산물식품부

4. 우리나라 치즈 시장 규모

국내 치즈 매출액은 2006년 3343억원, 2007년 4017억원, 2008년 4814억원으로 해마다 20% 정도 성장하고 있다. 국내에서는 2004년 이후 가공치즈의 소비량을 자연치즈가 추월한 후 지금까지 그 추세가 이어지고 있다. 자연치즈 소비의 대부분은 피자치즈이며 가공치즈 시장에서는 슬라이스 형태가 대부분을 차지하고 있다. 슬라이스 치즈와 피자치즈 등에 국한된 시장에서 탈피하고자 국내 유업체들은 까망베르, 브리 등 자연치즈 생산에 직접 뛰어들었고, 소매용 자연치즈는 와인시장의 성장

과 더불어 수입 치즈 전문업체들에 의해 다양한 종류가 수입되어 판매되고 있지만 전체 치즈시장 규모에 비교하면 아직까진 미미한 수준이다. 2008년 주요 유업체(서울, 상하, 남양, 동원)의 치즈 판매량을 보면 슬라이스 치즈 10,891t, 소매용·업소용 피자 치즈 13,170t, 기타 치즈 1,081t으로 총 25,142t이며 업체별 시장점유율은 서울 42%, 상하 39%, 남양 13%, 동원 6%로 추정된다. 또한 서울우유, (주)상하, 동원데어리푸드, 남양유업 등의 대기업들이 가공치즈 및 업소용 피자치즈에 대한 경쟁이 심화되고 있는 가운데 델리취, 썬리취, 조흥화학 등 소규모 업체들도 수입 피자치즈의 소분 판매에 적극적으로 나서고 있으며 향후 중저가형 업소용 가공치즈 시장에 뛰어들 것으로 예측된다.

제 2 절. 국내외 기술 현황

1. 국내 기술 현황

천연소재의 면역활성효과에 대한 연구는 주로 한약재 및 버섯류를 대상으로 한 결과가 많이 보고되고 있다. 유 등(1982)은 38종의 한약재를 대상으로 L1210 세포 성장 억제물질을 검색한 결과 그 중 6종인 계피, 지실, 황연, 인삼, 황백, 황금 등이 항암제원으로 유망시 되는 한약재라고 제시하였다. 이와 하(1994)는 10종의 생약제를 대상으로 대식세포의 TNF 및 neopterin 유리에 미치는 영향을 조사한 결과에서 복분자가 가장 높은 것으로 나타났다고 하였으며, 정과 김(2000)은 13종 허브추출물의 면역증강효과에 대한 in vitro(Nitric Oxide test)실험에서 sage만이 표준시료의 37% 정도의 활성을 나타내었다고 하였다. Kang 등(2001)은 마늘성분인 알리신이 쥐복막 macrophage에 미치는 면역증강 효과 실험에서 면역증강활성 특히 macrophage 분비 및 세포활성에 효과가 있다고 하였다. 양철학 교수팀은 1997년 한국생화학회 학술대회에서 한약재인 백령과 육두구에서 분리한 항암성분 (모모르딘 I, 모모르딘 II)을 배양된 폐암과 혈액암세포에 투입했을 경우 암세포수가 줄어드는 것을 확인하였다고 발표한 바 있다.

상황버섯의 Meshima와 같은 다당체는 현재 항암 및 면역요법제 등으로 널리 사용되어지고 있는데, 균사체 배양추출물로부터 항암 활성(Chung 등, 1993)이 있다고

하였다.

해조류 중에는 이 등(1992)이 파래와 곤피에서 당단백질을 추출하여 Sarcoma-180 cell에 대한 항암효과와 면역활성효과를 검토한 결과 파래와 곤피는 50mg/kg을 투여했을 때 각각 68.72%와 43.04%의 항암저지율을 보였다고 하였다.

류 등(1989)은 모자반, 톳, 미역 및 다시마를 대상으로 단백다당체를 추출하여 종양 성장저지율이 실험한 결과 미역이 100mg/kg/day로 10일간 투여했을 때 69.76%로 가장 높았고, 수면 연장율은 다시마가 25.22%로 가장 높은 효과를 나타내었다고 하였다.

젖산균의 항종양활성에 관한 연구로는 Park 등(1998)이 신생아 분변에서 항종양활성을 지닌 *Enterococcus faecalis* 2B4-1 균주를 분리한 바 있으며, 면역활성에 관한 연구로는 김 등(2004)이 김치로부터 분리한 *Lactobacillus brevis* FSB-1을 대상으로 전균체, 세포벽, 세포질 및 균체의 획분으로 각각 분리하고 장관면역 활성을 측정 한 결과, 골수세포 증식활성의 경우 세포벽 및 세포질 획분에서 상대적으로 높은 활성을 농도 의존적으로 보인 반면, 직접적인 골수세포 증식활성은 나타내지 않았다고 하였고, 마크로파지 활성화능은 전균체, 세포벽, 세포질 획분에서 상대적으로 높은 활성을 보였으며, splenocyte mitogen 활성의 경우 이들 획분에서 공히 대조군의 약 200%이상의 활성증가가 관찰되었다고 하였다. 국내에서 개발된 젖산균을 이용하여 제품을 만듦으로써 제품 및 젖산균의 수입 대체효과와 더 나아가 외국에 수출할 수 있는 국제경쟁력을 키울 수 있는 방안이 요구되고 있다.

2. 국외 기술 현황

Phellinus linteus(상황버섯 또는 목질진흙버섯)의 자실체 열수 추출물은 소화기 계통의 암에 저지효과 (Ikekawa, 1968)가 있다고 하였으며, 상황버섯에서 추출된 다당체의 항종양작용에 대한 기작은 확실히 밝혀지지 않았으나, 이들이 주로 macrophage나 complement system 등의 면역체계를 활성화시켜 항종양 효과를 나타내는 것으로 보고되고 있다(Suzuki 등, 1980). 특히, Okuda 등(1972)은 항종양활성과 serum hemolytic activity의 손실이 밀접한 관계가 있음을 입증하여 보체계 성분의 활성화가 항종양 작용에 관여함을 관찰하였다. Mizuno(1989)는 아가리쿠스버섯 내에 베타글루칸 성분이 면역기능을 활성화시켜 암을 억제한다고 발표하였으며, 삼중대학에서 쥐실험결과 1일 투여량 10mg 주입시켰을 때 완치율이 90.0%, 저지율

이 99.4%였다고 하였다. Mizuno 등(2001)은 표고버섯으로부터 추출한 다당류가 임파구 T cell을 증가시키고, 높은 수준의 면역증가 활성을 갖고 있다고 보고하였다. Sava 등(2001)은 홍차잎에서 유래된 멜라닌유사 색소를 8주령 쥐에게 50~200mg MLP/체중kg 경구투여 한 결과 B cell이 활성화되었다고 하였다.

키토산과 키틴 및 키토산 올리고당 등은 면역증강성을 나타내며 이들 물질은 천연 다당으로서 암치료에 이용되고 있는 lentinan, pachymaran 및 sizofiran 등과 같이 항암 및 항종양성을 보인다는 결과들이 발표되고 있다. 戶倉(1986)은 키틴 및 키토산 유도체를 대상으로 BALB/C 계 마우스의 동일계 종양 Meth-A에 대한 종양생육저지 활성을 검토한 결과 DAC-70(70% 탈아세틸화 키틴)이 매우 강한 저지효과를 보이고 또한 생존한 마우스에 동일한 종양을 재이식하고 2주후에 관찰한 결과 거듭 높은 저지효과를 보였다고 보고하였다. 이상과 같은 DAC-70키토산의 높은 종양저지활성원인에 대하여 검토한 바, DAC-70 키토산은 면역계의 항체생산, 킬러T세포생산, natural killer 세포생산, 활성화 helper T세포의 유도, 인터페론에 의한 macrophage의 활성화 등 작용을 하는 것으로 확인되었다. Suzuki 등(1986) 및 Tokoro 등(1988)은 키틴 및 키토산 올리고당의 면역부활효과를 검토할 목적으로 ddy 마우스식 Sarcoma 180 고형종양과 BALB/C 계 마우스의 동일계 종양 Meth-A에 대하여 키틴 및 키토산 올리고당을 정맥 내 투여한 결과 6량체 키틴 및 키토산 올리고당이 항종양성을 나타내고 있음을 확인하였다. 키틴 올리고당은 Lewis lung carcinoma에 대하여 항종양 전이 억제효과를 보였고 지연형 면역응답이나 cytokine, interleukine 등의 생산 활성화, natural killer cell의 활성화 반응을 촉진시키고 있음이 확인되어 이러한 작용들이 항종양성을 보이는 이유로 분석되고 있다. 6-7량체의 키틴 및 키토산 올리고당은 항원성이 적고 체내에 축적되지 않아 의학적인 응용이 매우 유리할 것으로 전망되고 있다.

치즈에서 젖산균은 종균으로 사용되며, 건강에 유익한 특징을 갖고 있으며, 특히 면역학적인 효과에 관심이 집중되고 있다. 젖산균이 면역의 힘을 강화하는데도 크게 이바지하는 것으로 밝혀져 있다. 우리의 몸은 음식물과 함께 병원균이나 바이러스 등 이물질이 들어오면 IgA(면역글로불린A)항체가 이들을 공격하거나 이들이 만들어내는 독소를 무독화(無毒化)하는데, 젖산균의 어떤 균주엔 이 IgA항체의 생산을 돕는 작용이 있다. 그래서 인체에 유해한 병원균 등이 입을 통해 체내로 들어왔을 때 젖산균을 계속 섭취하고 있는 사람이라면 섭취하지 않는 사람보다 병원체를

공격하는 IgA 항체의 생산량이 훨씬 많아져 면역력이 강화되는 것이다. 이 때 젖산균은 살아있는 균(생균)만이 아니라 죽은 균(사균)도 유용한 역할을 한다. 즉 죽은 젖산균의 세포는 장내에 있는 유해물질을 흡착하여 몸 밖으로 배출시키는 작용을 하기 때문이다. 그것은 식이섬유가 장관을 청소하는 것과 같은 효과라 할 수 있다. 면역반응의 증가는 식중독균에 의한 감염에 저항성 증가와 연관이 있으며, 항암성은 젖산균과 연관이 있는 것으로 제시되고 있다. 젖산균은 macrophage와 lymphocyte 활성화, T-cell과 B-cell 증식, natural killer-cell 기능 등 면역기능을 자극한다. Marin 등(1997)은 *Lactobacillus* spp.가 RAW 264.7 Macrophage와 EL-4 Thymoma cell line에 미치는 영향에 관한 보고를 보면, 자극받지 않은 RAW 264.7 cell에서 대부분의 lactobacilli는 10^6 - 10^8 /ml 농도에서 대조구와 비교할 때 최대 411배까지 TNF- α 를 생산하였고, 10^8 /ml 농도에서는 88배까지 IL-6이 생산되었다고 하였다. 또한 lipopolysaccharide로 RAW 264.7를 동시 자극을 하면 각각 4.2-10.6배와 1.8-8.7배 향상되었다고 하였다. Perdigon 등(1986a,b)은 *Lactobacillus acidophilus*와 *L. casei* 혼합균주를 쥐에 급여한 후 macrophage와 lymphocyte 활성이 증가되었다고 하였으며, 또한 *L. casei*와 *L. bulgaricus* 혼합균주를 쥐에 경구투여한 후 복막 macrophage가 활성화되었다고 하였다. 유사한 결과는 *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*에서도 경구투여하였을 때(Perdigon 등, 1987), 쥐에게 주사로 열로 사멸된 *L. casei*를 주입하였을 때(Saito 등, 1987) 발견되었다. 이와 같은 결과는 열로 사멸시킨 젖산균은 RAW 264.7 macrophage culture에서 IL-6와 TNF- α 의 생성을 자극한다고 결론지었다(Marin 등, 1997, 1998). Tejada-Simon과 Pestka(1999)는 열로 사멸시킨 Bifidobacterium, *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. casei*, *L. gasseri*, *L. helveticus*, *L. reuteri*와 *Streptococcus thermophilus* 등의 cell, 이들의 cell wall, 세포질 추출물이 in vitro 상에서 RAW 264.7 macrophage cell line에서 cytokine과 nitric oxide(NO)생성 및 증식에 대해 조사한 결과 젖산균 cell wall과 세포질 fraction은 macrophage를 자극시켜 TNF- α , IL-6와 NO를 유의성 있게 생성함으로써 젖산균은 macrophage와 기타 면역세포에 자극을 주어 cytokine과 NO를 생성하고 이들 cell wall과 세포질 역시 기여한다고 하였다. Medici 등(2004)의 보고에 따르면, *Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacillus acidophilus* 및 *L. paracasei*로 제조된 프로바이오틱 후레쉬치즈가 장내에서 중요한 면역활성을 발휘할 수 있는 유제품임을 BALB/c mouse 실험을 통해 입증하였다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 재료

1. 원유

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

2. 시유

서울우유에서 제조한 시유를 구입하여 사용하였다.

3. 탈지분유

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

4. 젖산균 스타터

모짜렐라 치즈를 제조하기 위하여 송원통상에서 수입한 상업균주(LATIC ACID BACTERIA FD-DVS TCC-3 : *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*와 *Streptococcus thermophilus*로 구성된 혼합균주, CHR. Hansen 제품)를 0.03% 사용하였다.

5. 응유효소

송원통상에서 수입한 렌넷(NATUREN 290, CHR. Hansen 제품)을 원유 100kg 당 23ml을 사용하였다.

6. 분변

신생아 분변은 순천향병원 및 한강성심병원 산부인과 신생아실에서 지원받아 55명의 분변을 사용하였고, 성인분변은 한국식품연구원 가족 63명을 대상으로 사용하였다.

7. 세포주

세포 배양 실험에 이용된 cell line인 RAW264.7(monocyte; macrophage, mouse)은 한국 세포주 은행에서 분양받아 사용하였다.

8. 동물실험용 배지

RPMI medium 1640의 GIBCO BRL (Grand Island, NY, USA) 제품을 사용하였고, fetal bovine serum (FBS), lipopolysaccharide (LPS), concanavalin A (ConA), thioglycollate, sodium bicarbonate, ammonium chloride, TRIZMA®base,

TRIZMA®hydrochloride, trypan blue solution (0.4%), DMSO (dimethyl sulfide), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) 등의 시약은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였고 사이토카인 kit는 ELISA cytokine kit (R&D system, USA)를 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 선별하였고 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 선별하였다.

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 μ 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)에서 분리하였으며 다른 과정은 원유와 동일한 방법으로 분리하였고, 37°C에서 18시간 및 24시간 배양하여 응고된 균주를 선별하였다.

다. 성인 분변에서 젖산균 분리

분변 시료는 배변 즉시 paraffin oil이 중층된 modified Blood-Glucose-Liver (BL) broth가 담긴 15ml의 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 18시간 및 24시간 배양하여 응고된 균주를 선별하였다.

2. 면역증진 균주선발

가. 세포 배양

세포 배양시 사용된 배지는 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium, with or without phenol red, Gibco)을 사용하였다. 배양 플라스크, 피펫, microplate (96-well) 등은 멸균된 제품들을 이용하였으며, 배양병 등 초자기구들은 autoclave 에서 121°C, 15 lb에서 15분간 가압 멸균한 후 사용하였다. 배지는 3차 증류수로 용해한 후 sterilized filter(0.22 μ m pore size)로 여과하여 멸균한 다음 10% fetal bovine serum과 1% streptomycin-penicillin를 첨가하여 이용하였으며, 세포 세척 및 계대 배양시 37°C을 유지하면서 사용하였다.

세포는 배양 플라스크 바닥에 confluent하게 자랐을 때 부착된 세포를 분리하여 이용하였다. DMEM이 담긴 배양 플라스크에 세포를 각각 37°C, 5% CO₂를 유지하면서 CO₂ incubator에서 배양하였다. Anchorage-dependent한 세포는 배지를 제거하고 trypsin-EDTA(0.05% trypsin, 0.53mM EDTA · 4Na)를 37°C에서 5분간 처리하였다. 이들 세포를 분리한 후, 1000 rpm에서 5분간 원심분리 한 다음 상정액을 제거하고 다시 배지를 넣어 원심 분리하는 과정을 3번 반복하였다. 이렇게 얻어진 세포를 배지에 분산시킨 후 일정한 세포수로 맞추어 사용하였다. 세포는 freezing용 배지를 첨가하여 -70°C liquid nitrogen tank에 보관 후 사용직전에 해동하여 배양하였다.

나. 반응성 질소종 분비능

96-well plate에 시료 20 μ L 및 RAW264.7(2×10^5 /well) 100 μ L를 넣고 48시간 동안 CO₂ incubator에서 37°C를 유지하면서 배양하였다. 배양액 중의 NO 농도는 microplate assay를 이용하여 측정하였다. 먼저 48시간 동안 배양한 후 상정액 50 μ L aliquots를 취하여 같은 용량의 Griess 시약 (1% sulfanilamide/0.1% naphthylethylene diamine dihydrochloride in 2.5% H₃PO₄)을 넣고 실온에서 10분간 반응시켰다. 이 때 ELISA reader (Molecular Device, USA)로 540nm에서의 흡광도를 측정하였다. NO의 표준물질로는 sodium nitrite를 사용하였다.

다. Interleukin-1 α 분비능

RAW264.7(2×10^5 /well) 100 μ L와 시료 20 μ L를 96-well plate에 넣어 37°C, 5%의 CO₂ incubator에서 48시간 동안 배양한 후 상정액을 취해 대식세포가 분비하는 Interleukin-1 α (IL-1 α)을 enzyme-linked immuno-sorbent assay(ELISA)를 이용하여 측정하였다. 즉, anti-mIL-1 α 단일 클론 항체가 코팅된 microtiter plate(Mouse

IL-1 α ELISA, comabiotech, KOREA)에 항체의 비특이적인 반응을 방지하기 위하여 blocking 시약(3% BSA용액, w/v)을 가한 다음 Tween 20이 0.05%(v/v) 함유된 0.01M PBS(PBST, pH 7.4) 세척용 완충액으로 3회 세척하였다. 세척한 plate에 biotinylated anti-mIL-1 α 항체를 50 μ L씩 넣고, 표준 IL-1 α 또는 배양한 시료액을 50 μ L씩 well에 주입하고, 25 $^{\circ}$ C에서 2시간 배양하였다. 배양한 plate를 세척용 완충액으로 다시 3회 세척하고, 1.5 μ g/mL 농도의 streptavidin-conjugated horse reddish peroxidase 100 μ L씩 가한 다음 25 $^{\circ}$ C에서 30분 반응시킨 후 세척용 완충액으로 3회 세척하였다. 여기에 발색기질용액(3,3',5,5'- tetramethyl benzidine)을 100 μ L 첨가하여 25 $^{\circ}$ C에서 30분간 발색반응을 시킨 후 1.0N sulfuric acid를 100 μ L씩 가해 반응을 정지시켰다. 이것을 ELISA reader(Molecular device, USA)로 450nm에서 흡광도를 측정하여 작성한 표준곡선에서 IL-1 α 함량을 계산하였다.

라. Tumor necrosis factor 분비능

Microtiter plate(Mouse TNF- α ELISA, Comabiotech)에 표준 TNF- α 또는 배양한 시료액 및 biotinylated anti-mTNF을 50 μ L씩 well에 주입하고 25 $^{\circ}$ C에서 2시간 배양하였다. 배양한 plate를 세척용 완충액으로 다시 5회 세척하고 HRP-conjugated anti-mTNF을 100 μ L씩 넣어 25 $^{\circ}$ C에서 30분 배양한 다음 세척용 완충액으로 5회 세척하였다. 여기에 기질(3,3',5,5'- tetramethyl benzidine)을 100 μ L 첨가하여 25 $^{\circ}$ C에서 30분간 발색반응을 시킨 후 1.0N sulfuric acid를 100 μ L씩 가해 반응을 정지시킨 다음 ELISA reader로 450nm에서 흡광도를 측정하여 작성한 표준곡선에서 TNF- α 함량을 계산하였다.

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 성장, Catalase생성, 15 $^{\circ}$ C 및 45 $^{\circ}$ C 에서의 성장, 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, solgent EF-Taq을 사용하여 PCR을 실시하였다. 증폭

과정은 95℃, 15분을 한 후 95℃, 20초; 50℃, 40초; 72℃, 1분30초를 30회 시행하였으며 72℃, 5분으로 마무리 하였다. 서열분석은 PCR product를 solgent PCR purification kit로 purify한 후 ABI 3730XL DNA sequencer로 자동분석 하였다.

4. 선발 젓산균의 특성조사

가. 젓산균의 생장

젓산균의 생장은 생균수, pH를 측정하여 시험하였다. 생균수는 10% 탈지분유 150ml에 젓산균을 1ml용 피펫 1drop 접종한 후 34, 37, 40℃에서 3시간 간격으로 24시간까지 배양한 각 시료를 0.1% peptone용액에 희석하여 BCP plate count agar 평판에서 부어 굳힌 후 35℃에서 48시간 배양하여 계수하였고, 온도 및 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℃에서 18시간 배양한 후 0.1% peptone용액에 적정농도로 희석하였다. 각 항생제가 각 농도별로 포함된 tryptic soy 액체배지에 $10^5 \sim 10^6$ cfu/ml 수준으로 접종하여 30℃에서 48시간 배양한 후 육안으로 관찰하여 성장여부를 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℃, 18시간동안 배양한 균주를 생리식염수로 희석하여 $10^5 \sim 10^6$ cfu/ml 수준의 시료를 조제한 후 API ZYM kit(API bioMerieux, France)를 이용하여 30℃에서 5시간 배양한 다음 효소반응 시켰다. 효소활성은 표준색상

표를 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, α -galactosidase, β -galactosidase, β -glucuronidase, α -glucosidase, β -glucosidase, N-acetyl- β -glucosaminidase, α -mannosidase, β -fucosidase 효소의 활성을 측정하였다.

라. 내담즙성 실험

Gilliland와 Walker(1990)의 방법에 따라 0.05% cysteine이 함유된 MRS액체배지에 0.3% oxgall을 첨가한 후 liquid paraffin을 증층한 다음 MRS액체배지에서 37°C, 18시간 배양된 각각의 균주를 1% 접종하여 37°C의 water bath에서 배양하면서 시간별로 OD₆₂₀값을 측정하였다.

마. pH 내성 실험

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

바. 항균력 실험

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

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

5. 모짜렐라 치즈 제조를 위한 최적 배양조건 확립

젖산균의 최적배양조건을 설정하기 위하여 배양조건별 면역증진을 측정하였다. 원유를 살균(72~73℃)하고 온도별(30℃, 35℃, 40℃)로 냉각한 다음 선발된 젖산균을 접종(0.1%, 0.5%, 1%, 2.0%)하며, 30분간 교반한 후 렌넷을 첨가한 다음 4~5분간 교반하였다. 염화칼슘을 원유에 대해 약 0.01~0.02%첨가하고 25~35분간 정치하여 커드를 형성시켰다. 유청의 적정산도가 0.1~0.12%일 때 커드를 자르고 가온하여 유청온도를 43℃까지 상승시켰다. 2시간 정도 교반하면서 유청산도가 0.17~0.18%가 되면 유청을 배출하고 43℃에서 2시간동안 퇴적시켜 응집된 커드에서 용출되는 유청산도가 0.6~0.65%가 되게 한 다음 72~75℃의 열수로 스트레칭과 65~70℃에서 성형한 후 5℃로 냉각하였다. 염지는 염농도가 18~20보메, 온도는 12℃, 염지시간은 20분정도로 하며, 건조 시 상대습도는 80~90%, 온도 및 시간은 10℃/2~3일로 하였다. 시료는 동결건조 하여 PBS에 녹인 후 121℃, 15min 멸균한 후 면역증진 시료로 사용하였고, 이때 시료농도는 100µg/ml와 1,000µg/ml으로 하였다.

가. 적정산도

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

0.1N NaOH용액 1ml= 0.009g 젖산

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

나. 젖산균수

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

6. 제품분석

가. 일반성분 및 pH

원유, Cheese 및 유청의 일반성분은 A.O.A.C(1980) 및 Kosikowski (1982)의 방법으로 분석하며, cheese의 pH는 pH meter를 사용하여 측정하였다.

나. 젖산균수 측정

(1) 젖산간균 및 구균 : 표준평판법으로 실시하며, 배지는 BCP plate count agar를 사용하여 35℃에서 72시간 호기 또는 혐기배양한 후 발생한 황색의 집락을 계측하였다.

(2) 비피더스균 : BS배지를 이용하여 37℃에서 48~72시간 혐기배양하며, 이하 축산물의 가공기준 및 성분규격(2005)에 따랐다.

다. 적정산도의 측정 :

시료액 10ml를 취하여 증류수를 가하여 100ml로 하고 그 20ml를 페놀프탈레인 지시약 2-3 방울을 가해 0.1N NaOH로 적정한 후 acetic acid 함량으로 환산하였다. (1ml=0.06g CH₃COOH)

라. 수용성질소화합물 정량

김(1976)의 방법에 따라 cheese 5g에 증류수 20ml를 넣고 잘 분쇄 및 균질화한 다음 4000 x g에서 20분간 원심분리하여 지방을 제거하고 Whatman No.2 여과지로 여과하며 이러한 과정을 반복하여 최종량이 50ml가 되도록 한 후 Kjeldahl방법으로 정량하였다.

마. 비단백태질소화합물 정량

Vanderpoorten(1972)의 방법에 따라 cheese 5g을 증류수 10ml에 분쇄 및 균질화하고 4000 x g에서 20분간 원심분리하여 지방을 제거하고 상징액을 동량의 24% Trichloroacetic acid(TCA)용액과 잘 혼합한 후 Whatman No.2 여과지로 여과한 용액을 Kjeldahl방법으로 정량하였다.

바. 아미노태질소화합물의 정량

아미노태질소화합물의 정량은 Jarrett등(1982)의 방법을 변경시켜서 다음과 같이 실시하였다. 즉 세절한 cheese 5g에 2% sodium citrate용액 25ml를 가하고 homogenizer를 사용하여 균질시킨 다음 0℃에서 20분간 10,000 x g로 원심분리하고 지방층을 제거한 상징액을 cheese 균질액으로 하였다. cheese 균질액 5ml에 15.8 M sulphuric acid 3.5ml와 33.3% phosphotungstic acid(PTA) 1.5ml를 가하고

vortexing하여 혼합한 다음 4°C에서 하룻밤 정치하여 단백질을 완전히 침전시켰다. 이 추출물을 Whatman 542 여과지로 여과하여 여액중의 질소량을 Kjeldahl방법으로 분석하고 cheese 1g당 nitrogen(mg)으로 표시하였다.

사. Cheese casein의 전기영동

전기영동은 Laemmli(1970)의 방법에 따라 실시하였다. 즉, 전기영동시 resolving gel을 만드는데 필요한 gel buffer는 tris 18.15g을 증류수 50ml에 용해시킨 후 1N HCl로 적정하면서 pH8.8로 조정하고 최종량을 100ml로 하여 4°C에 보관하면서 사용하였다. Stacking gel buffer는 0.5M Tris-HCl, pH6.8을 사용하였다. Running buffer는 tris 12g, glycine 57.6g, 10% SDS 용액 40ml를 증류수에 용해시키면서 pH를 8.8로 조절한 다음 최종량을 4L로 하여 4°C에 보관하면서 사용시에 증류수로 4배 희석하였다. 시료는 2-mercaptoethanol 10%를 함유하는 sample treatment buffer(tris-HCl-buffer, 20% glycerol, 4% SDS, pH6.8, 0.2% bromophenol blue)에 절단전 커드는 1:12로, 치즈커드는 1:96으로 희석해 시료로 사용하였다.

Separating gel은 resolving gel buffer 5ml와 30% acrylamide-0.8% N,N'-methylene bisacrylamide 8.0ml을 섞은 다음 촉매제로 10% ammonium persulfate용액 150 μ l를 첨가하고 10% SDS 200 μ l와 TEMED(N,N,N',N'-tetramethylethylene diamide) 20 μ l를 넣고 최종량이 20ml이 되도록 증류수로 조절한 후 충분히 혼합시켜서 전기영동용 유리판에 주입하여 gel을 형성시켰다. gel을 굳힌 후 30% Acrylamide-0.8% bisacrylamide 1.3ml와 0.5M Tris-HCl, pH6.8 buffer, 10% SDS 100 μ l, 10% ammonium persulfate 70 μ l, TEMED 10 μ l를 넣은 후 최종량을 증류수로 조절한 다음 충분히 섞은 Stacking gel을 separating gel위에 주입하고 comb을 꽂아 well을 형성하였다. 전기영동은 준비된 gel을 전기영동장치(AE 6450, ATTO, Japan)에 설치하고 running buffer를 채운 다음 준비된 시료중 5 μ l를 gel상단에 투입하고 유리판당 5mA의 일정한 전류로 4시간 동안 영동시켰다. 염색은 전기영동이 끝난 후 gel을 유리판으로 부터 분리시켜 1%의 Commassie blue R-250용액으로 1시간 염색시킨 다음 탈색용액(50% methanol, 10% acetic acid에 침지하여 탈색시킨 gel을 사진 촬영하였다.

아. 아미노산 분석

(1) 총아미노산

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

(가) 시료의 산가수분해 및 전처리

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

(나) 시료의 유도체화

유리관(6x50mm)에 여과된 시료 50µl를 취하여 관 밑바닥에 조심스럽게 담고 workstation에서 gauge torr가 50-60mm torr가 될 때까지 건조시킨 다음, methanol 200µl, H₂O 200µl, trimethylamine 100µl을 혼합한 용액을 30µl씩 가하고 vortex하여 workstation에서 50mm torr가 되도록 재건조한 다음 유도체시약 (methanol 350µl, H₂O 50µl, trimethylamine 50 µl, phenyl-isothiocyanate(PITC)50µl의 혼합액) 30µl를 첨가하고 vortex한 후 상온에서 10-20분간 정치하였다가 workstation에서 다시 건조한 다음 methanol 30µl를 첨가하여 vortex한 후 재차 건조시켰다. 건조된 시료에 PICO-TAG sample diluent 200µl를 첨가하여 교반하고 10 µl를 취하여 HPLC에 분석용으로 주입하였다.

(다) 아미노산 표준용액

16종의 아미노산(2.5µmol/ml)과 cysteine(1.25µmol/ml)이 함유되어 있는 표준용액을 0.1N HCl용액으로 10배 희석하여 20분간 초음파처리하고 0.45µm syringe filter로 여과하여 10µl를 HPLC에 주입하였다.

(라) 이동상

이동상으로 사용한 eluent A는 0.14M sodium acetate trihydrate와 0.05% TEA(triethyl amine)에 HPLC용 증류수를 가하여 1L로 정용한 다음 H₃PO₄로 pH6.4로 조정한 후 여과하였다. 분석이 끝나고 다른 시료를 주입하기 전의 세척용 eluent B는 60% acetonitrile을 사용하였다.

(마) 분석

분석시 칼럼의 온도는 40°C로 조정하였으며, attenuation 128, chart speed 1.0이었고, 주입한 시료량은 10µl 였다. 분석에 사용한 기기는 Table 4와 같다.

Table 4. Instruments used for amino acid analysis

Waters Pico-Tag column (3.9 x 150mm, φ 4µm)
Jasco PU-980 Pump x 2
Jasco HG-980-30 High pressure gradient module
Jasco 851-AS Autosampler
Jasco UV-975 UV/Vis Detector(254nm)
Jasco 807-IT Intergrator

(2) 유리아미노산

균질한 검체 약 1 g을 정밀히 달아 약 10배량을 물을 가해 비등 수욕상에서 가열하여 응고시킨 다음 여과하여 물 층을 취하였다. 잔사는 2~3회 소량의 물로 세정하고, 세액은 앞서의 물과 합하였다. 지방이 있는 경우에는 에테르로 추출하여 제거하였다. 물 층을 감압 하에 농축 건조하여 얻은 잔사를 0.2N 구연산나트륨 완충액(pH 2.2) 또는 0.02N 염산으로 용해하여 일정량으로 하여 0.45um filter를 사용하여 여과하였다.

자. 유기산

Marsili 등(1981)의 방법에 따라 분석하였으며 전처리 및 HPLC 분석조건은 다음과 같다.

(1) 시료 전처리

5g의 시료에 5ml의 deionized water, 20ml의 acetonitrile을 가하여 50ml 원심분리관에서 2분간 흔들여 준 다음 7,000 x g에서 5분간 원심분리한 다음 상정액을 0.2um membrane filter로 여과하여 HPLC분석용 시료로 하였다.

(2) 분석

유기산 분석은 Table 5의 조건에 따라 분석하며, 분석된 chromatogram은 표준용액의 머무름시간과 면적을 비교하여 함량을 계산하였다.

Table 5. Analytical conditions of HPLC for organic acid

Instrument	: JASCO HPLC system
Column	: C ₁₈ (3.9 x 150mm)
Mobile phase	: 0.008N H ₂ SO ₄
Flow rate	: 0.6ml/min
Detector	: UV detector at 210nm(Gilson)

차. Cheese의 수율

Cheese의 수율은 얻어진 curd의 양을 사용된 탈지유의 양으로 나누어 계산하였다. 또한 실제 curd양을 계산하기 위해 container의 무게를 빼어줌으로써 계산하였다.

카. 조직특성조사

cheese의 조직특성은 Harvey 등(1982)의 방법을 응용하여 Texture analyzer(Stable Micro Systems사, Model TA-XT2, 영국)을 사용하여 texture profile analysis를 실시하였다.

타. 전자현미경 관찰

(1) 젓산균

MRS한천 배지상에 젓산균을 도말한 후 30℃에서 24시간동안 배양하였다. 한천배지상에 나타난 균락을 5 x 5mm의 정사각형으로 잘라낸 후 다음과 같이 고정 및 탈수하였다. 절단된 균락이 있는 한천조각을 2.5% glutaraldehyde수용액으로 실온에서 90분간 고정하였다. 0.033M cacodylate 완충액(pH 7.0)으로 3회 세척하여 2% osmic acid 수용액으로 실온에서 60분간 고정하며 다시 cacodylate buffer로 세척하였다. 고정된 시료는 50%, 75%, 90%, 95% 그리고 100% 알콜에서 2회 각 40분씩 탈수하고 amyl acetate에서 2회 탈수하였다. 탈수된 시료는 CO₂ gas로 critical point dryer(Hitachi HCP2, Japan)에서 건조하여 aluminium SEM stub에 mounting 한 후 ion coating기(Eiko IB-3, Japan)로 금으로 도포한 후 주사전자현미경(Hitachi S-570, Japan)으로 20KV 진공도(air pressure) 10⁻⁴ mmHg의 조건에서 관찰하였다.

(2) 커드 및 치즈

시료의 전처리에는 Glaser 등(1979)의 방법에 따라 2.0% glutaraldehyde가 들어 있는 pH4.5, 0.05M 인산완충액에 시료를 즉시 담군 다음 6~12시간 동안 얼음에 유지시켰다. 입자는 알콜에 탈수시킨 후 amylacetate에 옮긴 다음 동결건조기에서 건조하고 dissecting microscope로 절단한 다음 Sputter coater를 사용하여 20nm 두께의 금으로 도포한 후 주사 전자현미경으로 전압(accelerating voltage) 20KV, 진공도(air pressure) 10⁻⁴ mmHg의 조건에서 관찰하였다.

파. 관능검사

제조된 cheese는 한국식품연구원 연구원들에 의해 관능검사를 실시하였으며 외관(색), 향, 맛, 조직감 및 종합적 기호도 등의 항목에 대하여 9점 직선척도법을 사용하여 9점(가장 좋다)에서 1점(가장 싫다)까지로 표시하였고, 통계분석은 통계 Package인 SAS(statistical Analysis System)를 이용하여 검정하였으며 처리별 평균간의 유의성 검정은 Duncan's multiple range test로 검정하였다(Steel과 Torrie, 1980).

7. 동물실험

가. 사료 조제 및 투여량 선정

본 실험에 사용한 면역활성 증진 시료는 상업균주(FD-DVS TCC-3, CHR.HANSEN A/S)를 스타터로 사용하여 제조한 모짜렐라 치즈(A), *Streptococcus macedonicus* 743 균주를 스타터로 사용하여 제조한 모짜렐라 치즈(B), *S. macedonicus* 743 균주와 상업균주를 1 : 1 비율로 혼합하여 제조한 모짜렐라 치즈(C)를 각각 사료에 1% 수준으로 혼합하여 조제하였다. 대조군에는 일반사료만 급여하였다(D).

나. 실험동물 및 설계

실험에 사용된 동물은 (주)코아텍에서 생후 35일령 평균체중 20g인 SPF C57BL/6 마우스 수컷 120마리를 사용하였다. 1주간 순화사육 기간을 거쳐 사육기간 중 일반 증상을 관찰하여 증상이 없고 체중감소가 없는 건강한 동물을 골라 임의배치법에 의하여 15마리씩 4군으로 나누어 총 7주 동안 대조군에는 일반 고형사료를, 투여군에는 조제한 실험용 혼합사료를 자유식이 방법으로 투여하며 사육하였다. 검역, 순화, 사육기간 및 시험기간 중 동물은 온도 $20\pm 2^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $50\pm 5\%$, 환기횟수 10-12회/hr, 조명시간은 오전 7시부터 오후 7시까지, 조도는 150-200Lux로 조정하여 사육하였다. 사육상자에는 시험유형, 시험번호, 시험물질, 군번호, 개체번호, 성별, 투여용량, 투여액량, 실험기간 및 시험책임자를 기재한 개체식별카드를 부착하였다. 개체식별은 유성매직을 이용하여 개체식별법에 따라 꼬리에 표시하였다.

다. 관찰 및 검사 항목

(1) 일반증상 관찰

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

(2) 체중 측정

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

(3) 사료 섭취량 및 음수량 측정

사육상자별로 당일 급여 및 급수 총량과 익일 잔량을 투여 개시 후 7주간 매주 1회 측정하여 사료 섭취량 및 음수섭취량을 군별로 1일 소비량을 표시하였다.

(4) 장기중량 및 크기측정

시험기간 중 폐사한 동물이나 시험 종료후 모든 생존동물에 대하여 ehter 마

취후 채혈하고 안락사 시킨 다음 육안적으로 모든 장기를 검사하였다. 모든 시험 동물은 비장과 흉선을 포함하여 간장, 신장(좌우), 폐장, 심장, 고환(좌우), 대뇌, 소뇌 등의 절대장기 중량 및 체중에 대한 상대장기 중량을 측정하였다.

(5) 마우스 비장 지수(Spleen index) 및 흉선 지수(Thymus Index) 산정

실험용 식이 급여 7주 후에 무균적으로 마우스의 비장과 흉선을 적출하여 무게를 측정한다음 동물의 체중에 따른 변이를 없애고 이를 표준화하기 위해 적출한 비장 및 흉선의 무게와 마우스 체중을 이용하여 아래의 공식에 의하여 비장지수와 흉선 지수를 구하였다.

$$\text{Spleen Index} = \frac{\text{비장무게(g)}}{\text{마우스체중}} \times 100$$

$$\text{Thymus Index} = \frac{\text{흉선무게(g)}}{\text{마우스체중}} \times 100$$

(6) 혈청 분리 및 마크로파지 분리배양

실험 마우스는 실험용 식이 투여 7주후에 혈액을 채취하여 혈청을 분리하여 냉동보관 하였고 마우스의 복강 마크로파지 회수를 위하여 실험 마우스의 복강에서 RPMI-1640 medium을 이용하여 복강 마크로파지를 회수하였다. 회수된 마크로파지를 RPMI-1640 medium으로 세척한 다음 세포수가 1×10^6 cells/mL RPMI-1640이 되도록 RPMI-1640 medium에 희석하였다. 이 희석액을 96-well plate의 각 well에 200 μ L씩 분주한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 2시간 동안 배양하여 마크로파지 세포가 각각 F의 well plate의 기벽에 부착하여 monolayer를 형성시켰다. 두 시간 후, non-adherent cell들은 세척하여 제거하고 10% fetal bovine serum(FBS)을 함유한 RPMI-1640 medium을 각 well에 180 μ L씩 분주하고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 재 배양하면서 사이코카인 측정에 사용하였다.

(7) 사이토카인 (IL-1 β , IL-6, TNF- α) 분비능 측정

S. macedonicus 743 균주로 제조된 모짜렐라 치즈 투여군과 상업용 젓산균으로 제조된 치즈 투여군과 두 가지 균주를 1:1로 혼합하여 제조된 치즈 그룹과 대조군을 7주간 경구 투여한 후 각 그룹의 마우스에서 혈액을 채취하여 혈청을 분리하여 혈액중의 사이토카인 (IL-1 β , IL-6, TNF- α)의 분비량을 각각 측정하였다.

복강 대식세포 배양액의 사이토카인 측정을 위해서는 복강 대식세포를 분리하여 비부착성 세포를 제거하고 부착성 세포만을 얻은 후, 10%-FBS RPMI 1640, 900 μ L와 대식세포를 활성화시키는 mitogen인 LPS와 배지를 100 μ L를 첨가한 후 37°C, 5% CO₂ incubator (Lab. Tech.)에서 48시간 배양하였다. 배양 상층액을 분리

하여 배양액에 축적된 IL-1 β , IL-6, TNF- α 의 양을 ELISA 사이토카인 kit (R&D system, USA)를 사용하여 측정하였다.

(8) 백혈구 백분율 계산 및 조직검사

백혈구 백분율계산은 wright' stain을 이용하였고 각각의 식이군에서 비장의 여포변연부의 크기 및 배중심의 형성정도를 비교하기 위해 절제된 비장과 흉선을 포함한 모든 실질 조직을 10% formalin 용액에 1주 이상 충분히 고정시킨 후 모든 장기조직은 파라핀 포매기(Leica, vaccum infiltration Processor)에 포매하여 초박절편기(MC57BL/6otom, Leica)로 2~3 μ m절편을 만들어 Hematoxylin & Eosin stain으로 염색하여 광학현미경하에서 검정하였다.

라. 통계처리

본 연구의 모든 실험 결과는 t-test 및 ANOVA 분석을 이용하여 유의성 검정을 실시하였다.

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 1,054개의 균주를 분리하였다. 모짜렐라 치즈에 적합한 균주를 분리하기 위해서는 skim milk를 응고시킬 수 있어야 하므로 10% 환원탈지분유에 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 45명의 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 μ 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 67개 균주를 보관하였다. 젖산균 분리는 modified MRS(glucose→lactose)에서 분리하였으며 다른 과정은 원유에서 분리한 방법과 동일하게 하여 72개 균주를 수집하였으며, 37°C에서 18시간 및 24시간 배양하여 응고된 균주 42개를 분리하였다.

다. 성인 분변에서 젖산균 분리

한국식품연구원 직원 및 가족에서 지원받아 50명의 분변으로부터 분리하였다. 분변시료는 배변 즉시 paraffin oil이 중층된 modified Blood-Glucose-Liver (BL) broth가 담긴 15ml의 멸균된 polypropylene tube에 넣어 실험실로 수송하여 12시간 이내에 미생물 시험을 실시하였다. 채취된 분변으로부터 bifidobacteria 분리 및 젖

산균 분리는 신생아 분변과 동일한 실험방법으로 실시하여 bifidobacteria는 91개 균주를 수집, 보관하였고, 젖산균은 87개를 수집하였으며, 이 중 37℃에서 18시간 및 24시간 배양하여 응고된 균주 42개 균주를 분리하였다.

Table 6. 원유 및 분변에서 분리한 젖산균 및 bifidobacteria 균수

분리 균수	원유	분변	
		신생아	성인
sample 갯수	-	45	50
MRS 분리 균수	1,054	72	87
10% skim milk 응고반응(24시간 배양)	598	42	42
Bifidobacteria 분리 균수	-	67	91

2. 면역증진 균주 선발

원유와 분변에서 분리한 균주 중 10% 환원탈지분유에서 37℃에서 24시간 배양하여 응고된 균주만 선택하여 면역활성 실험을 실시하였다.

분리된 균을 MRS broth에 접종한 다음 37℃에서 12시간 배양한 후(약 10^9 이 될때 까지) 1,500×g, 15분간 원심분리하여 cell를 수집하였다. MRS broth는 suction한 후 Hanks' buffered salt solution 1.5ml로 부유 시킨 후 100℃에서 50분 동안 열처리하여 반응성 질소종 분비능과 IL-1 α 분비능 및 TNF 분비능 실험을 한 결과는 표 7~15에 나타내었다. 이때 시료농도는 1,000 μ g/ml이었다.

Table 7 . 경기도 중부지역 원유에서 분리한 균주의 탈지유 응고여부와 면역활성능

sample	skim milk 응고반응		IL-1 α 농도 (pg/ml)	TNF농도 (pg/ml)	질소종 (uM)
	18hr	24hr			
A-1					
A-2					
A-3					
A-4	+	+	>2500	>2000	0.53
A-5					
A-6	+	+	>2500	27.05	0.50
A-7	+	+	>2500	27.54	0.67
A-8	+	+	>2500	21.09	3.83
A-9					
A-10	+	+	32.49	41.93	0.02
A-11					
A-12					
A-13	+	+	>2500	76.66	1.52
A-14	+	+	53.27	63.13	0.53
A-15	+	+	>2500	19.72	0.47
A-16					
A-17	+	+	>2500	15.93	0.58
A-18	+	+	>2500	16.18	0.47
A-19					
A-20					
A-21					
A-22					
A-23					
A-24					
A-25					
A-26					
A-27	+	+	>2500	14.87	0.50
A-28	+	+	27.88	15.64	0.58
A-29	+	+	>2500	47.75	0.53
A-30	+	+	4.95	21.75	0.95
A-31					
A-32	+	+	17.16	-	0.90
A-33					
A-34	+	+	2.67	18.37	0.71
A-35					
A-36					
A-37					
A-38	+	+	1.56	21.32	0.33
A-39	+	+	>2500	>2000	1.37
A-40					
A-41					
A-42	+	+	5.28	18.18	0.73

sample	skim milk 응고반응		IL-1 α 농도 (pg/ml)	TNF농도 (pg/ml)	질소종 (μ M)
	18hr	24hr			
A-43	+	+	20.49	25.72	0.37
A-44					
A-45	+	+	>2500	>2000	-
A-46	+	+	>2500	>2000	-
A-47					
A-48					
A-49					
A-50	+	+	539.02	19.40	0.04
A-51	+	+	>2500	>2000	0.60
A-52					
A-53	+	+	14.87	34.12	1.87
A-54	+	+	>2500	>2000	-
A-55	+	+	52.94	5.19	0.94
A-56					
A-57					
A-58	+	+	195.30	21.04	0.49
A-59					
A-60					
A-61	+	+	>2500	>2000	0.98
A-62	+	+	>2500	59.06	2.59
A-63	+	+	1.63	23.27	0.47
A-64	+	+	>2500	18.3	0.42
A-65	+	+	>2500	>2000	-
A-66	+	+	44.68	12.32	0.51
A-67	+	+	>2500	>2000	1.03
A-68	+	+	0.33	24.36	0.47
A-69					
A-70					
A-71					
A-72					
A-73	+	+	2.13	27.64	0.81
A-74	+	+	252.03	29.40	0.49
A-75	+	+	>2500	>2000	0.66
A-76	+	+	>2500	>2000	0.75
A-77	+	+	159.04	49.30	0.28
A-78	+	+	>2500	>2000	0.47
A-79					
A-80	+	+	39.34	195.30	0.94
A-81					
A-82	+	+	29.30	32.05	0.94
A-83					
A-84					
A-85					
A-86					

sample	skim milk 응고반응		IL-1a 농도 (pg/ml)	TNF 농도 (pg/ml)	질소종 (uM)
	18hr	24hr			
A-87	+	+	>2500	>2000	0.50
A-88					
A-89					
A-90	+	+	>2500	>2000	0.66
A-91					
A-92	+	+	35.02	392.10	0.93
A-93					
A-94	+	+	58.29	40.40	0.48
A-95	+	+	79.27	5.41	0.41
A-96	+	+	12.66	27.83	0.89
A-97					
A-98					
A-99					
A-100					
A-101	+	+	34.61	27.64	1.70
A-102					
A-103	+	+	1.79	27.09	0.47
A-104					
A-105					
A-106	+	+	7.13	35.59	0.65
A-107	+	+	>2500	19.45	0.58
A-108					
A-109	+	+	26.93	39.49	0.49
A-110					
A-111	+	+	>2500	21.19	0.49
A-112					
A-113	+	+	>2500	21.88	0.42
A-114					
A-115					
A-116					
A-117					
A-118					
A-119					
A-120	+	+	53.92	39.40	0.58
A-121	+	+	>2500	21.19	0.60
A-122					
A-123					
A-124					
A-125					
A-126					
A-127	+	+	>2500	15.14	0.88
A-128	+	+	>2500	20.06	2.79
A-129	+	+	65.62	19.49	0.42
A-130					

sample	skim milk 응고반응		IL-1 α 농도 (pg/ml)	TNF농도 (pg/ml)	질소종 (uM)
	18hr	24hr			
A-131					
A-132	+	+	57.21	28.20	0.50
A-133	+	+	7.45	21.49	0.57
A-134					
A-135					
A-136					
A-137					
A-138	+	+	>2500	26.00	0.38
A-139					
A-140					
A-141					
A-142	+	+	93.10	105.39	0.39
A-143					
A-144	+	+	>2500	12.61	1.60
A-145	+	+	375.43	3.52	0.29
A-146					
A-147					
A-148					
A-149					
A-150	+	+	1.79	22.73	0.68
A-151					
A-152	+	+	>2500	20.67	0.73
A-153	+	+	>2500	23.44	0.71
A-154					
A-155					
A-156					
A-157	+	+	>2500	>2000	54.35

Table 8 . 경기도 남부지역 원유에서 분리한 균주의 탈지유 응고여부와 면역활성능

sample	skim milk 응고반응		IL-1 α 농도 (pg/ml)	TNF농도 (pg/ml)	질소종 (uM)
	18hr	24hr			
B-1					
B-2	+	+	0.13	12.19	0.39
B-3					
B-4					
B-5	+	+	>2500	39.22	0.50
B-6	+	+	>2500	81.54	1.86
B-7					
B-8					
B-9	+	+	>2500	438.96	25.04
B-10					
B-11					
B-12					
B-13	+	+	2.13	27.64	0.81
B-14					
B-15					
B-16					
B-17					
B-18	+	+	3.85	16.73	0.68
B-19	+	+	14.87	19.47	0.39
B-20	+	+	0.69	17.76	0.62
B-21					
B-22					
B-23		+	11.87	18.47	0.39
B-24	+	+	0.13	12.19	0.84
B-25	+	+	3.29	52.4	0.29
B-26	+	+	>2500	>2000	-
B-27	+	+	>2500	>2000	1.97
B-28		+	>2500	>2000	1.62
B-29					
B-30					
B-31					
B-32	+	+	27.55	23.07	0.75
B-33	+	+	0.87	>2000	0.41
B-34	+	+	17.54	26.94	0.19
B-35	+	+	>2500	>2000	0.66
B-36	+	+	>2500	>2000	0.50
B-37	+	+	1.19	>2000	0.75
B-38	+	+	7.69	22.18	0.68
B-39	+	+	>2500	>2000	0.49
B-40					
B-41		+	10.28	15.93	0.43
B-42					
B-43					

sample	skim milk 응고반응		IL-1a 농도 (pg/ml)	TNF 농도 (pg/ml)	질소종 (uM)
	18hr	24hr			
B-44					
B-45					
B-46	+	+	4.31	19.54	0.44
B-47	+	+	2.13	27.64	0.81
B-48					
B-49					
B-50					
B-51					
B-52	+	+	8.19	2.95	0.19
B-53	+	+	84.67	36.84	0.73
B-54	+	+	9.64	15.83	0.63
B-55	+	+	11.1	26.92	1.93
B-56	+	+	>2500	>2000	0.62
B-57					
B-58					
B-59	+	+	35.02	94.03	0.43
B-60	+	+	311.49	296.86	6.17
B-61	+	+	>2500	378.84	9.47
B-62					
B-63	+	+	18.92	112.03	0.91
B-64	+	+	0.13	12.19	0.39
B-65	+	+	>2500	52.31	0.46
B-66		+	11.87	18.47	0.39
B-67					
B-68					
B-69	+	+	>2500	>2000	0.39
B-70					
B-71	+	+	>2500	34.69	0.83
B-72					
B-73					
B-74					
B-75	+	+	17.54	26.94	0.19
B-76	+	+	>2500	66.68	1.35
B-77	+	+	>2500	>2000	1.13
B-78	+	+	3.85	16.73	0.68
B-79					
B-80					
B-81	+	+	64.09	23.60	0.66
B-82	+	+	9.64	15.83	0.63
B-83	+	+	4.31	19.54	0.44
B-84	+	+	27.55	23.07	0.75
B-85	+	+	518.85	254.95	4.19
B-86					
B-87					

sample	skim milk 응고반응		IL-1 α 농도 (pg/ml)	TNF농도 (pg/ml)	질소종 (uM)
	18hr	24hr			
B-88					
B-89					
B-90	+	+	>2500	>2000	0.39
B-91					
B-92	+	+	>2500	>2000	-
B-93					
B-94					
B-95		+	2.13	27.64	0.81
B-96					
B-97					
B-98	+	+	>2500	>2000	2.14
B-99		+	5.39	16.73	0.84
B-100		+	638.29	1045.39	0.94
B-101	+	+	>2500	>2000	0.35
B-102	+	+	>2500	>2000	8.50
B-103	+	+	>2500	>2000	2.80
B-104	+	+	70.43	11.37	0.24
B-105	+	+	>2500	>2000	0.47
B-106	+	+	10.28	15.93	0.43
B-107		+	729.05	1205.34	0.83
B-108					
B-109					
B-110					
B-111	+	+	21.94	39.64	0.15
B-112	+	+	14.87	19.47	0.39
B-113	+	+	>2500	>2000	0.50
B-114	+	+	>2500	>2000	0.52
B-115					
B-116					
B-117					
B-118	+	+	>2500	>2000	0.71
B-119	+	+	5.05	26.25	0.62
B-120					
B-121	+	+	>2500	20.43	0.37
B-122	+	+	11.87	18.47	0.39
B-123					
B-124					
B-125	+	+	2.84	7.75	0.78
B-126	+	+	>2500	>2000	0.38
B-127	+	+	>2500	>2000	0.53
B-128	+	+	>2500	>2000	0.68
B-129	+	+	35.96	26.55	0.58
B-130	+	+	17.54	26.94	0.19

sample	skim milk 응고반응		IL-1 α 농도 (pg/ml)	TNF농도 (pg/ml)	질소종 (uM)
	18hr	24hr			
B-131					
B-132					
B-133					
B-134	+	+	>2500	>2000	0.38
B-135	+	+	0.13	12.19	0.39
B-136					
B-137					
B-138	+	+	0.35	>2000	0.49
B-139	+	+	61.54	18.88	0.81
B-140					
B-141					
B-142					
B-143	+	+	51.20	93.20	0.92
B-144	+	+	0.36	25.89	0.73
B-145					
B-146					
B-147	+	+	>2500	64.12	1.09
B-148					
B-149	+	+	>2500	60.19	0.49
B-150					
B-151	+	+	61.54	23.82	0.68
B-152					
B-153	+	+	28.67	13.64	0.36
B-154	+	+	69.23	26.18	0.53
B-155	+	+	13.97	22.02	0.16
B-156	+	+	4.39	31.27	3.04
B-157	+	+	40.24	16.20	0.37
B-158					
B-159					
B-160	+	+	>2500	>2000	0.38
B-161					
B-162	+	+	3.85	16.73	0.68
B-163					
B-164					
B-165					
B-166	+	+	205.39	-	0.39
B-167					
B-168					
B-169					
B-170					
B-171	+	+	0.13	12.19	0.39
B-172					
B-173					
B-174					

sample	skim milk 응고반응		IL-1 α 농도 (pg/ml)	TNF농도 (pg/ml)	질소종 (uM)
	18hr	24hr			
B-175	+	+	493.2	84.39	0.29
B-176	+	+	48.39	17.29	0.83
B-177		+	172.39	14.92	0.47
B-178					
B-179					
B-180					
B-181					
B-182					
B-183	+	+	42.55	11.28	0.55
B-184					
B-185	+	+	11.87	18.47	0.39
B-186					
B-187					
B-188					
B-189					
B-190	+	+	2.13	27.64	0.81
B-191					
B-192	+	+	39.40	29.38	0.98
B-193					
B-194					
B-195					
B-196	+	+	194.20	19.39	1.93
B-197					
B-198					
B-199	+	+	14.87	19.47	0.39
B-200					
B-201	+	+	0.13	32.19	0.27
B-202					
B-203					
B-204					
B-205	+	+	244.11	17.86	13.59
B-206					
B-207					
B-208					
B-209					
B-210	+	+	3.85	16.73	0.68
B-211					
B-212					
B-213					
B-214					
B-215	+	+	54.92	4.86	20.75
B-216					
B-217					
B-218					

sample	skim milk 응고반응		IL-1 α 농도 (pg/ml)	TNF농도 (pg/ml)	질소종 (uM)
	18hr	24hr			
B-219					
B-220					
B-221					
B-222	+	+	8.19	2.95	0.19
B-223	+	+	21.94	39.64	0.15
B-224	+	+	4.31	19.54	0.44
B-225	+	+	10.28	15.93	0.43
B-226	+	+	5.39	16.73	0.84
B-227	+	+	27.55	23.07	0.75
B-228					
B-229					
B-230	+	+	0.13	12.19	0.39
B-231					
B-232	+	+	243.51	0.26	0.51
B-233	+	+	330.45	27.00	0.73
B-234		+	118.41	0.59	0.80
B-235	+	+	137.30	13.11	0.59
B-236					
B-237	+	+	237.77	23.16	9.51
B-238	+	+	177.26	13.12	0.47
B-239					
B-240					
B-241	+	+	97.77	6.92	-
B-242					
B-243					
B-244	+	+	151.26	13.11	12.63
B-245		+	112.76	13.18	0.62
B-246					
B-247					
B-248					
B-249					
B-250	+	+	199.12	14.67	0.80
B-251					
B-252	+	+	52.72	5.46	9.62
B-253					
B-254	+	+	104.17	7.25	7.25
B-255					
B-256					
B-257	+	+	144.81	16.12	0.41
B-258	+	+	286.81	20.29	0.87
B-259					
B-260					
B-261					
B-262	+	+	151.26	13.11	12.63

sample	skim milk 응고반응		IL-1 α 농도 (pg/ml)	TNF농도 (pg/ml)	질소종 (uM)
	18hr	24hr			
B-263					
B-264	+	+	25.74	4.53	0.93
B-265		+	68.54	8.52	13.89
B-266	+	+	214.19	26.63	1.92
B-267	+	+	112.29	8.22	15.78
B-268					
B-269	+	+	187.09	16.82	0.92
B-270	+	+	113.21	11.21	1.29
B-271	+	+	145.83	12.68	0.34
B-272	+	+	201.59	14.92	-
B-273					
B-274	+	+	106.19	7.39	0.41
B-275	+	+	132.89	5.69	0.13
B-276		+	85.45	8.32	0.72
B-277					
B-278	+	+	176.80	16.88	0.83
B-279	+	+	130.45	12.05	0.68
B-280					
B-281	+	+	112.76	13.18	0.62
B-282					
B-283					
B-284	+	+	101.27	12.82	-
B-285					
B-286					

Table 9 . 경기도 서부지역 원유에서 분리한 균주의 탈지유 응고여부와 면역활성능

sample	skim milk 응고반응		IL-1 α 농도 (pg/ml)	TNF농도 (pg/ml)	질소종 (uM)
	18hr	24hr			
C-1					
C-2	+	+	175.67	0.13	8.31
C-3	+	+	170.67	0.50	13.18
C-4					
C-5					
C-6	+	+	257.89	0.78	1.64
C-7					
C-8		+	84.67	36.84	0.73
C-9					
C-10	+	+	213.55	9.83	0.89
C-11	+	+	156.87	14.19	0.24
C-12					
C-13	+	+	0.45	17.26	1.32
C-14					
C-15					
C-16	+	+	>2500	56.01	0.46
C-17					
C-18	+	+	146.40	12.58	0.89
C-19					
C-20	+	+	168.97	14.51	0.98
C-21					
C-22	+	+	>2500	>2000	0.49
C-23	+	+	>2500	>2000	0.38
C-24					
C-25					
C-26	+	+	>2500	35.82	0.47
C-27					
C-28					
C-29	+	+	291.14	16.82	0.03
C-30	+	+	247.54	16.39	0.77
C-31	+	+	114.56	11.41	0.51
C-32					
C-33	+	+	>2500	13.56	0.46
C-34	+	+	3.85	16.73	0.68
C-35					
C-36	+	+	27.55	23.07	0.75
C-37					
C-38					
C-39					
C-40	+	+	0.13	12.19	0.39
C-41	+	+	72.07	0.93	13.30
C-42					
C-43					

sample	skim milk 응고반응		IL-1a 농도 (pg/ml)	TNF 농도 (pg/ml)	질소종 (uM)
	18hr	24hr			
C-44	+	+	69.38	>2000	1.06
C-45	+	+	14.87	19.47	0.39
C-46					
C-47					
C-48	+	+	89.91	22.16	0.99
C-49					
C-50	+	+	261.03	18.46	0.59
C-51					
C-52					
C-53	+	+	14.42	15.64	0.47
C-54	+	+	>2500	35.76	0.89
C-55					
C-56	+	+	>2500	16.61	0.62
C-57					
C-58	+	+	114.44	10.56	0.17
C-59					
C-60	+	+	217.95	15.04	0.97
C-61	+	+	259.09	12.20	0.20
C-62	+	+	292.06	24.65	0.88
C-63					
C-64	+	+	17.54	26.94	0.19
C-65					
C-66	+	+	>2500	>2000	0.36
C-67					
C-68					
C-69	+	+	2.84	23.66	0.88
C-70	+	+	177.73	32.28	0.42
C-71	+	+	11.87	18.47	0.39
C-72					
C-73		+	2.13	27.64	0.81
C-74					
C-75	+	+	268.24	10.69	0.97
C-76					
C-77	+	+	>2500	24.26	0.42
C-78	+	+	15.32	25.89	1.45
C-79		+	5.39	16.73	0.84
C-80					
C-81					
C-82					
C-83	+	+	24.61	12.93	1.01
C-84					
C-85					
C-86	+	+	>2500	>2000	0.68
C-87					

sample	skim milk 응고반응		IL-1a농도 (pg/ml)	TNF농도 (pg/ml)	질소종 (uM)
	18hr	24hr			
C-88	+	+	41.54	30.36	0.81
C-89					
C-90	+	+	21.81	15.00	1.64
C-91	+	+	>2500	23.82	0.92
C-92					
C-93	+	+	2.05	25.12	0.71
C-94					
C-95	+	+	16.67	7.80	0.62
C-96	+	+	81.63	11.28	0.06
C-97					
C-98					
C-99	+	+	0.67	24.56	0.39
C-100	+	+	4.31	19.54	0.44
C-101	+	+	0.13	27.05	0.62
C-102	+	+	>2500	>2000	0.47
C-103					
C-104	+	+	>2500	>2000	11.30
C-105	+	+	0.35	26.81	0.60
C-106					
C-107	+	+	147.06	10.54	0.20
C-108					
C-109	+	+	226.67	17.86	0.54
C-110	+	+	289.23	9.62	0.20
C-111					
C-112	+	+	1.98	24.91	0.68
C-113					
C-114	+	+	134.41	15.79	0.27
C-115					
C-116					
C-117	+	+	0.13	12.19	0.39
C-118					
C-119	+	+	21.94	39.64	0.15
C-120	+	+	1.74	18.85	0.66
C-121					
C-122	+	+	211.04	12.71	0.95
C-123	+	+	194.28	13.85	0.47
C-124	+	+	172.64	12.58	0.77
C-125	+	+	165.32	10.98	0.41
C-126	+	+	69.72	14.89	0.31
C-127					
C-128					
C-129	+	+	56.30	18.53	0.90
C-130	+	+	85.03	11.73	0.04
C-131					

sample	skim milk 응고반응		IL-1a 농도 (pg/ml)	TNF 농도 (pg/ml)	질소종 (uM)
	18hr	24hr			
C-132					
C-133	+	+	>2500	20.06	0.50
C-134	+	+	0.38	23.73	0.66
C-135	+	+	0.84	18.37	0.49
C-136					
C-137	+	+	3.02	19.47	0.83
C-138	+	+	59.62	20.43	0.78
C-139	+	+	14.87	19.47	0.39
C-140	+	+	2.13	27.64	0.81
C-141	+	+	>2500	24.56	0.49
C-142	+	+	6.69	35.67	7.20
C-143					
C-144	+	+	>2500	55.67	0.47
C-145	+	+	>2500	>2000	0.49
C-146	+	+	651.54	22.69	29.12
C-147	+	+	3.85	16.73	0.68
C-148					
C-149					
C-150	+	+	>2500	23.27	2.37
C-151					
C-152		+	100.34	18.01	0.25
C-153					
C-154	+	+	15.21	75.45	2.45
C-155					
C-156		+	90.58	17.79	0.46
C-157	+	+	155.26	151.91	0.73
C-158	+	+	206.67	12.63	0.33
C-159	+	+	270.99	22.17	0.30
C-160					
C-161		+	292.59	62.72	0.05
C-162	+	+	>2500	>2000	10.52
C-163					
C-164	+	+	17.54	26.94	0.19
C-165	+	+	0.13	12.19	0.39
C-166					
C-167	+	+	1.36	26.00	0.58
C-168	+	+	>2500	26.8	0.53
C-169	+	+	2.13	27.64	0.81
C-170	+	+	>2500	20.06	0.98
C-171	+	+	9.38	42.61	1.09
C-172	+	+	86.97	45.3	0.99
C-173					
C-174					
C-175	+	+	5.39	16.73	0.84

sample	skim milk 응고반응		IL-1 α 농도 (pg/ml)	TNF농도 (pg/ml)	질소종 (uM)
	18hr	24hr			
C-176					
C-177	+	+	27.55	23.07	0.75
C-178					
C-179					
C-180	+	+	4.23	17.82	0.58
C-181	+	+	>2500	>2000	0.49
C-182					
C-183					
C-184					
C-185	+	+	>2500	57.07	4.46
C-186	+	+	>2500	>2000	0.44
C-187	+	+	>2500	28.17	0.93
C-188	+	+	210.14	195.48	4.16
C-189					
C-190	+	+	>2500	>2000	0.66
C-191					
C-192					
C-193	+	+	105.04	30.17	0.84
C-194	+	+	248.84	28.13	0.69
C-195	+	+	140.09	13.53	0.48
C-196	+	+	81.35	38.28	0.71
C-197					
C-198	+	+	234.09	51.01	0.82
C-199	+	+	52.17	46.33	0.75
C-200	+	+	49.11	20.57	0.31
C-201	+	+	110.22	31.55	0.01
C-202	+	+	129.75	15.89	0.04
C-203					
C-204	+	+	138.10	42.05	0.62
C-205		+	>2500	27.70	0.58
C-206					
C-207		+	>2500	16.69	0.83
C-208					
C-209	+	+	217.65	19.08	0.61
C-210		+	128.57	19.73	0.37
C-211	+	+	250.00	17.28	0.28
C-212					
C-213	+	+	161.78	17.61	0.42
C-214					
C-215	+	+	182.29	8.94	0.05
C-216	+	+	165.46	5.25	0.80
C-217					
C-218	+	+	287.50	7.70	0.35
C-219	+	+	11.87	18.47	0.39

sample	skim milk 응고반응		IL-1 α 농도 (pg/ml)	TNF농도 (pg/ml)	질소종 (uM)
	18hr	24hr			
C-220					
C-221		+	112.23	26.13	0.26
C-222	+	+	2.13	27.64	0.81
C-223					
C-224					
C-225	+	+	0.46	23.27	2.26
C-226					
C-227	+	+	>2500	40.18	0.47
C-228	+	+	0.13	12.19	0.39
C-229					
C-230	+	+	230.74	16.60	0.88
C-231					
C-232					

Table 10. 경상북도 지역 원유에서 분리한 균주의 탈지유 응고여부와 면역활성능

sample	skim milk 응고반응		IL-1 α 농도 (pg/ml)	TNF농도 (pg/ml)	질소종 (uM)
	18hr	24hr			
D-1	+	+	>2500	22.55	0.37
D-2					
D-3	+	+	154.45	68.13	0.48
D-4					
D-5	+	+	0.13	25.45	0.58
D-6					
D-7	+	+	1.79	22.18	0.47
D-8					
D-9	+	+	0.13	22.18	0.68
D-10	+	+	>2500	>2000	0.50
D-11					
D-12	+	+	>2500	>2000	0.39
D-13	+	+	>2500	73.02	0.62
D-14					
D-15					
D-16	+	+	14.87	19.47	0.39
D-17					
D-18	+	+	>2500	>2000	0.44
D-19					
D-20		+	154.45	68.13	0.48
D-21	+	+	216.56	14.67	0.39
D-22					
D-23	+	+	>2500	55.06	0.98
D-24	+	+	3.85	16.73	0.68
D-25	+	+	>2500	>2000	0.88
D-26					
D-27		+	254.45	59.52	0.25
D-28					
D-29	+	+	>2500	46.25	2.38
D-30					
D-31	+	+	154.45	68.13	0.48
D-32					
D-33	+	+	>2500	37.45	0.38
D-34	+	+	>2500	38.93	0.37
D-35	+	+	217.71	3.17	0.04
D-36					
D-37	+	+	>2500	44.25	0.49
D-38					
D-39	+	+	258.67	7.63	0.82
D-40	+	+	0.13	12.19	0.39
D-41					
D-42	+	+	49.64	27.24	0.52
D-43	+	+	3.60	31.27	2.63

sample	skim milk 응고반응		IL-1a 농도 (pg/ml)	TNF 농도 (pg/ml)	질소종 (uM)
	18hr	24hr			
D-44	+	+	>2500	52.91	3.04
D-45	+	+	>2500	>2000	-
D-46	+	+	9.32	15.00	0.49
D-47	+	+	>2500	23.6	0.57
D-48	+	+	>2500	>2000	-
D-49					
D-50	+	+	115.12	11.80	0.25
D-51	+	+	-	4.20	0.25
D-52					
D-53	+	+	>2500	16.73	0.58
D-54					
D-55	+	+	>2500	>2000	0.83
D-56					
D-57	+	+	17.54	26.94	0.19
D-58	+	+	>2500	27.00	0.40
D-59	+	+	>2500	>2000	1.37
D-60	+	+	>2500	52.36	0.47
D-61	+	+	>2500	>2000	0.71
D-62					
D-63					
D-64	+	+	1.91	34.26	0.66
D-65	+	+	2.24	27.94	0.49
D-66	+	+	9.86	24.93	0.88
D-67	+	+	>2500	38.70	0.77
D-68	+	+	2.17	16.90	0.47
D-69					
D-70	+	+	125.89	13.11	-
D-71	+	+	>2500	>2000	0.77
D-72					
D-73	+	+	155.50	24.81	0.91
D-74	+	+	266.05	18.37	0.53
D-75	+	+	217.83	6.56	0.80
D-76	+	+	153.59	13.70	0.11
D-77					
D-78	+	+	16.67	10.89	0.62
D-79	+	+	0.21	27.70	0.97
D-80	+	+	0.31	40.77	2.24
D-81					
D-82	+	+	>2500	>2000	1.37
D-83					
D-84	+	+	>2500	>2000	1.91
D-85					
D-86					
D-87	+	+	>2500	51.26	0.57

sample	skim milk 응고반응		IL-1a 농도 (pg/ml)	TNF 농도 (pg/ml)	질소종 (uM)
	18hr	24hr			
D-88					
D-89	+	+	188.87	18.50	0.28
D-90	+	+	234.38	23.67	0.68
D-91					
D-92	+	+	215.23	17.12	0.62
D-93	+	+	271.88	21.41	0.46
D-94					
D-95	+	+	>2500	>2000	1.49
D-96	+	+	1.04	21.75	0.71
D-97	+	+	253.49	17.83	0.84
D-98					
D-99	+	+	2.13	27.64	0.81
D-100	+	+	0.13	12.19	0.39
D-101					
D-102	+	+	5.39	16.73	0.84
D-103	+	+	>2500	22.31	0.71
D-104					
D-105	+	+	243.52	21.59	0.04
D-106	+	+	243.75	22.66	0.73
D-107	+	+	215.63	10.47	0.08
D-108		+	254.57	13.11	0.03
D-109	+	+	203.66	16.39	0.40
D-110	+	+	21.81	19.47	0.39
D-111	+	+	>2500	32.06	1.76
D-112					
D-113	+	+	250.00	15.22	0.01
D-114					
D-115	+	+	>2500	28.89	0.46
D-116	+	+	>2500	41.27	0.38
D-117					
D-118	+	+	11.87	18.47	0.39
D-119					
D-120	+	+	>2500	43.35	0.42
D-121	+	+	>2500	>2000	0.86
D-122	+	+	14.87	19.47	0.39
D-123					
D-124					
D-125	+	+	0.12	15.15	0.89
D-126	+	+	>2500	19.90	0.26
D-127					
D-128	+	+	>2500	>2000	0.52
D-129					
D-130	+	+	222.79	13.34	0.07
D-131					

sample	skim milk 응고반응		IL-1a 농도 (pg/ml)	TNF 농도 (pg/ml)	질소종 (uM)
	18hr	24hr			
D-132	+	+	272.74	9.48	0.14
D-133	+	+	127.81	10.05	0.76
D-134	+	+	296.05	15.89	0.86
D-135					
D-136	+	+	231.41	9.94	0.43
D-137					
D-138	+	+	222.79	13.34	0.07
D-139	+	+	231.41	9.94	0.43
D-140	+	+	>2500	>2000	1.69
D-141	+	+	>2500	>2000	0.57
D-142					
D-143	+	+	2.76	49.49	1.19
D-144					
D-145	+	+	272.74	9.48	0.14
D-146					
D-147	+	+	3.85	16.73	0.68
D-148	+	+	>2500	>2000	0.86
D-149					
D-150		+	127.81	10.05	0.76
D-151	+	+	296.05	15.89	0.86
D-152		+	296.59	11.56	0.01
D-153	+	+	229.17	13.04	0.57
D-154	+	+	145.34	17.23	0.38
D-155					
D-156	+	+	0.13	12.19	0.39
D-157	+	+	2.13	27.64	0.81
D-158	+	+	258.93	18.12	0.96
D-159					
D-160	+	+	27.55	23.07	0.75
D-161					
D-162					
D-163	+	+	>2500	54.95	0.37
D-164					
D-165	+	+	254.36	15.42	0.61
D-166	+	+	271.55	15.22	0.87
D-167	+	+	234.71	9.06	0.59
D-168					
D-169	+	+	>2500	20.80	0.25
D-170	+	+	>2500	25.45	0.47
D-171					
D-172					
D-173	+	+	5.39	16.73	0.84
D-174					
D-175	+	+	13.49	25.12	0.60

sample	skim milk 응고반응		IL-1 α 농도 (pg/ml)	TNF농도 (pg/ml)	질소종 (uM)
	18hr	24hr			
D-176					
D-177	+	+	>2500	25.45	0.88
D-178					
D-179	+	+	>2500	17.82	1.81
D-180	+	+	0.35	12.19	0.95
D-181	+	+	0.33	16.18	0.47
D-182					
D-183	+	+	>2500	26.24	3.60
D-184					
D-185	+	+	1.91	14.87	0.41
D-186	+	+	581.45	1204.64	0.79
D-187					
D-188	+	+	>2500	31.42	0.64
D-189	+	+	39.66	>2000	2.22
D-190					
D-191					
D-192	+	+	12.98	41.11	1.36
D-193					
D-194					
D-195	+	+	1.04	28.50	0.39
D-196	+	+	>2500	27.73	1.51
D-197	+	+	>2500	28.50	0.39
D-198					
D-199	+	+	115.00	12.27	-
D-200		+	296.39	3.65	0.14
D-201	+	+	264.26	6.48	0.02
D-202					
D-203					
D-204	+	+	4.52	24.36	0.68
D-205	+	+	>2500	>2000	11.55
D-206					
D-207	+	+	19.04	31.87	0.49
D-208					
D-209	+	+	25.71	29.94	0.46
D-210					
D-211	+	+	4.52	26.55	0.28
D-212	+	+	>2500	>2000	6.08
D-213					

Table 11. 전라북도 지역 원유에서 분리한 균주의 탈지유 응고여부와 면역활성능

sample	skim milk 응고반응		IL-1 α 농도 (pg/ml)	TNF농도 (pg/ml)	질소종 (uM)
	18hr	24hr			
E-1		+	230.52	-	0.46
E-2					
E-3	+	+	>2500	55.00	5.04
E-4	+	+	14.78	>2000	2.54
E-5					
E-6	+	+	230.45	9.86	0.66
E-7	+	+	101.11	16.62	0.31
E-8	+	+	>2500	>2000	2.41
E-9					
E-10					
E-11	+	+	>2500	>2000	0.73
E-12					
E-13	+	+	>2500	52.91	0.38
E-14	+	+	0.13	12.19	0.39
E-15	+	+	2.13	27.64	0.81
E-16					
E-17	+	+	244.67	175.00	0.34
E-18	+	+	232.54	53.21	0.06
E-19		+	105.12	-	0.75
E-20	+	+	247.25	27.18	0.18
E-21	+	+	14.87	19.47	0.39
E-22					
E-23	+	+	27.55	23.07	0.75
E-24					
E-25	+	+	19.63	49.82	0.76
E-26					
E-27	+	+	17.54	26.94	0.19
E-28	+	+	10.28	15.93	0.43
E-29	+	+	>2500	>2000	0.86
E-30	+	+	>2500	>2000	0.41
E-31	+	+	>2500	>2000	0.50
E-32	+	+	>2500	19.34	0.67
E-33					
E-34	+	+	248.60	42.32	0.04
E-35	+	+	261.08	58.88	0.76
E-36	+	+	235.52	11.01	0.60
E-37	+	+	230.52	21.95	0.83
E-38					
E-39					
E-40	+	+	4.31	19.54	0.44
E-41	+	+	>2500	41.04	0.46
E-42	+	+	>2500	21.75	1.75
E-43					

sample	skim milk 응고반응		IL-1a 농도 (pg/ml)	TNF 농도 (pg/ml)	질소종 (uM)
	18hr	24hr			
E-44	+	+	271.08	57.58	0.06
E-45	+	+	261.08	10.45	0.75
E-46					
E-47	+	+	268.11	44.62	0.62
E-48					
E-49	+	+	11.87	18.47	0.39
E-50		+	257.08	55.18	0.26
E-51	+	+	213.88	51.38	0.43
E-52					
E-53	+	+	107.45	41.61	0.61
E-54	+	+	3.85	16.73	0.68
E-55					
E-56					
E-57	+	+	>2500	>2000	1.22
E-58	+	+	104.40	30.49	0.39
E-59	+	+	>2500	27.64	0.38
E-60	+	+	5.39	16.73	0.84
E-61					
E-62	+	+	21.94	39.64	0.15
E-63					
E-64	+	+	11.29	26.93	0.45
E-65	+	+	9.84	16.83	0.75
E-66					
E-67	+	+	>2500	14.72	0.52
E-68					
E-69	+	+	>2500	>2000	0.68
E-70	+	+	84.67	36.84	0.73
E-71	+	+	15.20	29.46	0.69
E-72					
E-73	+	+	9.64	15.83	0.63
E-74	+	+	0.13	12.19	0.39
E-75					
E-76					
E-77	+	+	2.13	27.64	0.81
E-78	+	+	52.90	87.35	0.13
E-79	+	+	73.99	25.91	0.84
E-80	+	+	15.28	41.86	0.29
E-81					
E-82					
E-83	+	+	27.55	23.07	0.75
E-84					
E-85	+	+	283.32	31.53	0.19
E-86	+	+	211.36	55.56	0.75
E-87	+	+	503.94	1023.42	0.93

sample	skim milk 응고반응		IL-1 α 농도 (pg/ml)	TNF농도 (pg/ml)	질소종 (μ M)
	18hr	24hr			
E-88	+	+	104.02	31.18	0.75
E-89	+	+	235.12	25.06	0.18
E-90					
E-91	+	+	11.83	16.38	0.37
E-92	+	+	0.38	5.39	0.72
E-93	+	+	238.55	60.63	0.06
E-94					
E-95	+	+	124.10	35.88	0.54
E-96					
E-97	+	+	35.02	94.03	0.43
E-98	+	+	87.93	10.24	0.94
E-99					
E-100					
E-101	+	+	8.19	2.95	0.19
E-102	+	+	84.67	36.84	0.73
E-103	+	+	9.64	15.83	0.63
E-104	+	+	11.09	26.92	1.93
E-105	+	+	14.87	19.47	0.39
E-106	+	+	4.31	19.54	0.44
E-107					
E-108					
E-109	+	+	10.28	15.93	0.43
E-110	+	+	0.13	12.19	0.39
E-111	+	+	>2500	>2000	1.58
E-112	+	+	>2500	>2000	1.65
E-113	+	+	>2500	>2000	2.17
E-114					
E-115	+	+	>2500	24.66	1.65
E-116	+	+	11.68	16.36	2.67
E-117					
E-118	+	+	>2500	21.82	0.97
E-119					
E-120	+	+	27.55	23.07	0.75
E-121					
E-122	+	+	4.66	>2000	0.39
E-123					
E-124	+	+	>2500	55.64	1.37
E-125	+	+	27.40	20.79	2.54
E-126	+	+	2.38	20.65	0.88
E-127					
E-128	+	+	34.84	23.60	0.66
E-129	+	+	4.93	22.83	1.03
E-130					
E-131	+	+	261.22	30.88	0.04

sample	skim milk 응고반응		IL-1 α 농도 (pg/ml)	TNF농도 (pg/ml)	질소종 (uM)
	18hr	24hr			
E-132					
E-133		+	287.24	47.44	0.70
E-134		+	105.80	25.89	0.27
E-135					
E-136	+	+	147.20	54.10	0.06
E-137	+	+	236.58	40.32	0.24
E-138	+	+	101.44	26.21	0.34
E-139					
E-140	+	+	7.93	20.63	2.33
E-141	+	+	268.20	57.93	0.65
E-142					
E-143	+	+	200.52	11.08	0.63
E-144		+	218.75	11.95	0.40
E-145	+	+	170.90	8.32	0.73
E-146					
E-147	+	+	2.13	27.64	0.81
E-148	+	+	>2500	33.47	0.56
E-149					
E-150					
E-151	+	+	21.94	46.92	0.18
E-152	+	+	11.87	18.47	0.39
E-153					
E-154					
E-155	+	+	0.13	12.19	0.39
E-156	+	+	17.54	26.94	0.19
E-157					
E-158	+	+	>2500	103.42	6.17
E-159					
E-160	+	+	18.92	112.03	0.91
E-161					
E-162					
E-163	+	+	35.02	94.03	0.43
E-164	+	+	602.56	1003.72	0.83
E-165	+	+	9.64	15.83	0.63
E-166					

Table 12. 신생아 분변에서 분리한 균주의 탈지유 응고여부와 면역활성능

sample	skim milk 응고반응		IL-1 α 농도 (pg/ml)	TNF농도 (pg/ml)	질소종 (uM)
	18hr	24hr			
F-1	+	+	183.08	-	1.34
F-2					
F-3	+	+	179.98	9.86	0.56
F-4	+	+	138.06	16.62	1.04
F-5					
F-6					
F-7	+	+	180.60	9.34	14.86
F-8	+	+	253.91	53.21	2.28
F-9	+	+	196.60	-	1.29
F-10					
F-11	+	+	195.86	27.18	0.14
F-12					
F-13					
F-14					
F-15	+	+	353.07	49.82	2.21
F-16		+	89.99	42.32	0.81
F-17					
F-18	+	+	66.04	58.88	1.21
F-19					
F-20	+	+	7.53	11.01	1.64
F-21					
F-22	+	+	158.48	21.95	12.58
F-23					
F-24					
F-25					
F-26	+	+	109.38	57.58	0.98
F-27					
F-28	+	+	189.26	10.45	1.41
F-29		+	145.01	44.62	1.45
F-30					
F-31					
F-32	+	+	221.63	55.18	16.82
F-33					
F-34	+	+	215.95	51.38	1.58
F-35	+	+	101.27	41.61	1.14
F-36					
F-37	+	+	135.86	31.53	1.33
F-38	+	+	226.43	55.56	0.18
F-39	+	+	>2500	>2000	7.00
F-40	+	+	229.33	60.63	0.22
F-41					
F-42	+	+	117.51	31.18	10.56
F-43	+	+	182.72	25.06	0.15

sample	skim milk 응고반응		IL-1 α 농도 (pg/ml)	TNF농도 (pg/ml)	질소종 (uM)
	18hr	24hr			
F-44					
F-45		+	166.77	57.93	1.22
F-46					
F-47					
F-48		+	258.13	54.10	0.37
F-49	+	+	157.42	40.32	1.20
F-50	+	+	62.46	26.21	0.78
F-51					
F-52	+	+	>2500	>2000	30.21
F-53	+	+	138.67	39.41	1.14
F-54					
F-55	+	+	93.33	58.59	0.28
F-56					
F-57	+	+	149.00	45.93	1.72
F-58	+	+	5.88	339.90	0.94
F-59					
F-60	+	+	146.59	45.53	1.25
F-61					
F-62	+	+	145.01	21.37	1.45
F-63					
F-64	+	+	91.52	26.04	1.28
F-65	+	+	77.99	39.70	10.92
F-66	+	+	147.58	57.65	1.47
F-67	+	+	149.00	37.27	0.84
F-68					
F-69		+	94.32	28.07	1.17
F-70					
F-71	+	+	128.52	49.80	1.68
F-72	+	+	154.05	50.87	0.17

Table 13. 성인분변에서 분리한 균주의 탈지유 응고여부와 면역활성능

sample	skim milk 응고반응		IL-1 α 농도 (pg/ml)	TNF농도 (pg/ml)	질소종 (uM)
	18hr	24hr			
G-1	+	+	2.37	>2000	2.35
G-2					
G-3					
G-4					
G-5					
G-6					
G-7	+	+	>2500	>2000	0.56
G-8	+	+	>2500	>2000	3.74
G-9					
G-10					
G-11	+	+	>2500	67.42	0.72
G-12					
G-13					
G-14	+	+	0.99	>2000	0.72
G-15					
G-16					
G-17					
G-18					
G-19					
G-20					
G-21					
G-22					
G-23					
G-24					
G-25					
G-26					
G-27	+	+	>2500	>2000	0.81
G-28					
G-29	+	+	>2500	65.81	8.47
G-30					
G-31	+	+	>2500	74.07	2.46
G-32	+	+	>2500	>2000	2.89
G-33					
G-34					
G-35					
G-36	+	+	>2500	27.69	0.98
G-37					
G-38	+	+	57.21	24.72	2.99
G-39	+	+	>2500	>2000	3.74
G-40	+	+	>2500	28.36	0.98
G-41					
G-42					
G-43	+	+	2.17	36.36	2.26

sample	skim milk 응고반응		IL-1a농도 (pg/ml)	TNF농도 (pg/ml)	질소종 (uM)
	18hr	24hr			
G-44	+	+	120.31	119.93	10.95
G-45	+	+	59.03	25.39	9.19
G-46					
G-47					
G-48					
G-49					
G-50					
G-51					
G-52					
G-53					
G-54	+	+	14.93	98.03	0.39
G-55	+	+	23.73	170.68	13.77
G-56					
G-57	+	+	>2500	29.98	0.52
G-58					
G-59	+	+	414.375	>2000	18.70
G-60					
G-61	+	+	6.00	33.18	0.72
G-62	+	+	>2500	55.07	1.09
G-63	+	+	>2500	19.37	0.45
G-64	+	+	7.21	16.70	0.35
G-65	+	+	52.64	23.86	0.96
G-66	+	+	4.80	29.81	0.80
G-67	+	+	61.36	38.68	0.88
G-68					
G-69					
G-70	+	+	>2500	22.72	0.79
G-71	+	+	15.77	32.61	8.15
G-72	+	+	>2500	>2000	8.15
G-73	+	+	>2500	>2000	-
G-74	+	+	>2500	>2000	1.97
G-75	+	+	>2500	>2000	1.62
G-76					
G-77					
G-78					
G-79	+	+	27.55	23.07	0.75
G-80	+	+	0.87	>2000	0.41
G-81	+	+	17.54	26.94	0.19
G-82	+	+	>2500	>2000	0.66
G-83	+	+	>2500	>2000	0.50
G-84	+	+	1.19	>2000	0.75
G-85	+	+	7.69	22.18	0.68
G-86	+	+	>2500	>2000	0.49
G-87	+	+	>2500	>2000	24.18

Table 14. 신생아 분변에서 분리한 Bifidobacteria의 면역활성능

sample	IL-1 α 농도 (pg/ml)	TNF농도 (pg/ml)	질소종 (uM)	sample	IL-1 α 농도 (pg/ml)	TNF농도 (pg/ml)	질소종 (uM)
H-1	835.29	41.61	1.85	H-44	1000	>2000	-
H-2	865.85	33.18	1.62	H-45	>2500	13.11	5.77
H-3	264.39	16.70	-	H-46	946.67	>2000	-
H-4	>2500	55.08	-	H-47	1048.68	14.67	3.97
H-5	>2500	21.95	1.36	H-48	1290.91	>2000	0.28
H-6	788.89	29.82	1.44	H-49	>2500	5.46	0.58
H-7	82.85	>2000	-	H-50	118.5	>2000	0.50
H-8	>2500	55.08	1.80	H-51	118.5	7.25	-
H-9	898.73	19.38	1.78	H-52	111.92	>2000	1.97
H-10	959.46	>2000	1.76	H-53	1126.98	20.29	0.94
H-11	>2500	58.88	1.90	H-54	71.57	>2000	1.59
H-12	>2500	27.18	0.17	H-55	22.30	42.32	-
H-13	780.65	33.18	1.78	H-56	910.26	-	2.87
H-14	>2500	-	1.69	H-57	290.74	13.11	1.66
H-15	1014.29	19.38	1.90	H-58	>2500	-	-
H-16	>2500	37.27	0.97	H-59	320.05	4.53	0.81
H-17	>2500	23.86	1.71	H-60	1290.91	8.22	0.35
H-18	1126.98	16.18	2.23	H-61	21.10	>2000	-
H-19	260.61	>2000	1.97	H-62	-	12.68	0.92
H-20	>2500	55.18	2.22	H-63	469.20	14.92	2.09
H-21	-	11.01	2.04	H-64	390.99	38.68	0.98
H-22	>2500	50.87	1.87	H-65	430.35	7.39	0.21
H-23	>2500	38.68	1.95	H-66	125.41	5.69	1.25
H-24	1028.99	51.38	2.04	H-67	111.25	8.32	1.19
H-25	22.30	-					
H-26	910.26	28.69	1.66				
H-27	290.74	16.62	1.73				
H-28	>2500	-	0.89				
H-29	>2500	16.70	1.88				
H-30	1290.91	35.08	2.16				
H-31	21.10	-	1.99				
H-32	310.65	-	0.21				
H-33	469.20	20.91	1.95				
H-34	390.99	22.35	2.23				
H-35	430.35	20.58	0.26				
H-36	125.41	12.54	2.55				
H-37	111.25	11.89	-				
H-38	320.05	8.12	0.87				
H-39	310.65	-	-				
H-40	815.64	29.82	2.32				
H-41	>2500	10.45	0.72				
H-42	-	6.92	0.92				
H-43	>2500	23.86	2.60				

Table 15. 성인 분변에서 분리한 Bifidobacteria의 면역활성능

sample	IL-1 α 농도 (pg/ml)	TNF농도 (pg/ml)	질소중 (uM)	sample	IL-1 α 농도 (pg/ml)	TNF농도 (pg/ml)	질소중 (uM)
I-1	>2500	64.33	0.79	I-44	48.44	18.18	-
I-2	>2500	>2000	0.55	I-45	468.39	25.72	1.29
I-3	1.58	>2000	0.46	I-46	193.69	>2000	2.47
I-4	>2500	>2000	1.45	I-47	0.1372	>2000	0.75
I-5	515.66	27.70	-	I-48	230.92	>2000	1.64
I-6	>2500	>2000	1.99	I-49	1016.41	34.12	2.24
I-7	>2500	>2000	0.93	I-50	1290.91	24.36	3.93
I-8	44.23	24.73	-	I-51	>2500	27.54	-
I-9	>2500	>2000	0.55	I-52	849.12	32.61	1.80
I-10	>2500	>2000	1.16	I-53	>2500	>2000	0.89
I-11	480.40	16.70	-	I-54	231.40	>2000	1.32
I-12	5.097	>2000	4.27	I-55	>2500	>2000	1.94
I-13	0.14	>2000	0.69	I-56	>2500	21.09	2.46
I-14	>2500	136.77	1.86	I-57	186.48	>2000	0.82
I-15	506.36	19.38	-	I-58	338.90	>2000	1.76
I-16	>2500	>2000	1.87	I-59	>2500	-	1.87
I-17	>2500	>2000	0.89	I-60	668	21.49	2.27
I-18	>2500	110.22	0.90	I-61	473.84	26.00	1.68
I-19	>2500	110.22	0.02	I-62	>2500	27.09	0.75
I-20	1018.94	55.08	-	I-63	>2500	12.61	0.85
I-21	>2500	>2000	4.57	I-64	>2500	35.59	-
I-22	>2500	>2000	2.82	I-65	89.87	22.73	-
I-23	51.72	76.66	-	I-66	826.57	20.67	2.07
I-24	23.10	19.72	-	I-67	>2500	23.44	1.90
I-25	50.86	16.18	1.03	I-68	858.01	19.45	1.83
I-26	80.34	-	-	I-69	21.45	27.05	-
I-27	258.07	28.36	-	I-70	>2500	>2000	2.04
I-28	19.60	36.36	-	I-71	154.57	59.06	0.98
I-29	353.98	119.94	1.66	I-72	256.52	23.27	0.87
I-30	1002.24	170.68	2.05	I-73	>2500	18.30	-
I-31	>2500	>2000	1.84	I-74	21.81	>2000	1.28
I-32	826.57	29.99	-	I-75	21.45	>2000	0.65
I-33	636.84	-	-	I-76	95.93	-	-
I-34	>2500	>2000	0.07	I-77	19.80	20.06	0.86
I-35	19.30	14.87	-	I-78	19.50	19.49	-
I-36	21.20	15.64	-	I-79	>2500	28.20	1.37
I-37	17.72	47.75	1.37	I-80	476.04	-	2.24
I-38	92.98	21.75	1.09	I-81	252.10	15.14	0.92
I-39	19.90	33.18	-	I-82	>2500	5.41	-
I-40	971.57	18.37	-	I-83	>2500	27.83	1.69
I-41	435.95	21.32	1.11	I-84	49.22	21.19	0.95
I-42	386.98	>2000	1.23	I-85	52.61	21.88	-
I-43	19.30	-	2.89	I-86	>2500	27.64	-

sample	IL-1 α 농도 (pg/ml)	TNF농도 (pg/ml)	질소종 (uM)	sample	IL-1 α 농도 (pg/ml)	TNF농도 (pg/ml)	질소종 (uM)
I-87	97.48	21.19	9.67	I-90	26.85	>2000	0.91
I-88	>2500	83.56	1.93	I-91	56.34	32.84	0.82
I-89	>2500	>2000	0.36				

상기 표 7~15에서 보는 바와 같이 원유에서 분리된 젖산균보다는 분변에서 분리된 Bifidobacteria 균이 높은 면역활성을 나타내었다.

다음 표 16은 반응성 질소종, IL-1 α 및 TNF 별로 면역활성 분포를 나타낸 결과로서 질소종 분비능은 40uM 이상을 나타낸 균수가 1개이며, IL-1 α 분비능은 500pg/ml 이상을 나타낸 균수가 285개이며, 2500pg/ml 이상을 나타낸 균수가 245개이었다.

Table 16. 분리된 젖산균의 면역 활성 분포

질소종 (uM)	균 수	백분율 (%)	IL-1 α (pg/ml)	균 수	백분율 (%)	TNF (pg/ml)	균 수	백분율 (%)
9 이하	821	97.25	99 이하	325	38.78	99이하	668	79.52
10~19	13	1.54	100~299	206	24.58	100~999	21	2.50
20~29	4	0.47	300~499	24	2.86	1000~2000	5	0.59
30~39	1	0.11	500~2499	40	4.77	2000 이상	146	17.38
40 이상	1	0.11	2500 이상	245	29.16			

TNF 분비능을 시험한 결과 1000pg/ml 이상을 나타낸 균수가 151개, 2,000pg/ml 이상을 나타낸 균수가 146개를 나타내었다.

한편, 젖산균을 선발하기 위한 기준으로 우선 모짜렐라 치즈에 적합하기 위하여 젖산 생성속도가 빠르고, 면역활성이 높은 13균주를 선발하였는데, 표 12는 선발균주와 상업균주와의 면역활성 비교 결과로서 젖산균을 10% skim milk에 1% 접종하고 37°C에서 24시간 배양한 다음 동결건조하여 PBS에 녹인 후 121°C에서 15분간 멸균한 후 면역활성 시료로 사용하였다. 이때 시료농도는 1,000 μ g/ml이었다.

Table 17. 상업균주, 한국식품연구원에서 보관 젖산균주 및 분리균주의 면역활성능 비교

보관 젖산균	출 처	IL-1α (pg/ml)	TNF (pg/ml)	NO (uM)	pH
ABT-L ^{*1)}	Rhodia Inc.	491.15±31.86	>2000	18.35±0.36	-
<i>Lactobacillus acidophilus</i> *	Rhone-poulenc	24.26±3.81	>2000	17.68±0.73	-
ABT-D ^{*2)}	Rhone-poulenc	394.63±5.37	>2000	18.53±1.04	-
<i>Bifidobacterium longum</i> *	Rhone-poulenc	558.25±99.22	>2000	20.08±0.26	-
ST-1 (<i>Streptococcus thermophilus</i>)*	Culture Sytems, Inc.	303.41±68.56	>2000	17.70±0.66	-
ST-5 (<i>Streptococcus thermophilus</i>)*	Culture Sytems, Inc.	164.65±10.74	>2000	16.70±0.51	-
<i>Lactobacillus acidophilus</i> *	Culture Sytems, Inc.	121.56±9.42	>2000	14.50±0.23	-
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	ATCC 11506, IFO 3205	722.20±16.40	>2000	23.91±2.53	-
<i>Lactobacillus cremoris</i>	KFRI 00349	736.23±10.02	>2000	18.40±3.40	-
<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis</i>	ATCC 7830, IFO 3376	815.39±9.08	>2000	18.14±3.05	-
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	ATCC 33409	740.53±2.39	>2000	11.22±1.13	-
<i>Lactobacillus amylophilus</i>	NRRL B-4437	835.25±4.11	>2000	18.20±3.77	-
<i>Lactobacillus reuteri</i>	KFRI 00661	736.23±2.02	>2000	28.30±11.23	-
선발균주 A157		>2500	>2000	54.35±3.43	4.5
선발균주 B9		>2500	438.96	25.04	4.6
선발균주 B102		>2500	>2000	8.50	4.8
선발균주 C104		>2500	>2000	11.30±1.58	4.5
선발균주 C162		>2500	>2000	10.52±1.58	4.7
선발균주 D205		>2500	>2000	11.55±2.95	4.7
선발균주 E158		>2500	103.42	6.17	4.7
선발균주 F39		>2500	>2000	7.00	4.9
선발균주 F52		>2500	>2000	30.21	4.9
선발균주 G39		>2500	>2000	3.74	4.9
선발균주 G59		414.375	>2000	18.70	4.6
선발균주 G72		>2500	>2000	8.15	4.8
선발균주 G87		>2500	>2000	24.18±1.11	4.7

주) * 상업균주

¹⁾ ABT-L : *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium longum*, *Streptococcus thermophilus*

²⁾ ABT-D : *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium longum*, *Streptococcus thermophilus*

표 17에서 보는 바와 같이 분리된 젖산균 균주가 상업균주에 비해 IL-1a 분비능이 높았고, 특히 A157 균주는 상업균주에 비해 면역능이 우수한 균주로 나타났다.

3. 면역증진 균주 동정

미생물의 분류학적 동정은 Hammes 등[The prokaryotes, 1563-1578, 2nd Edition, Springer-Verlag Co.(1992)]의 방법에 따라 수행하였으며, 그 결과는 표 18에서 보는 바와 같다.

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

Stains	A157	B9	B102	C104	C162	D205	E158
Gram stain	+	+	+	+	+	+	+
cell morphology	cocci	cocci	rod	rod	cocci	rod	rod
spore formaiton	-	-	-	-	-	-	-
Motility	-	-	-	-	-	-	-
Aerobic growth	+	+	+	+	+	+	+
Anaerobic growth	+	+	+	+	+	+	+
Catalase	-	-	-	-	-	-	-
Growth at 15°C	-	-	-	-	-	-	-
Growth at 45°C	+	+	+	+	+	+	+
Gas from glucose	-	-	-	-	-	-	-
Ammonia from arginine	-	-	-	-	-	-	-

Stains	F39	F52	G39	G59	G72	G87
Gram stain	+	+	+	+	+	+
cell morphology	rod	rod	cocci	rod	rod	cocci
spore formaiton	-	-	-	-	-	-
Motility	-	-	-	-	-	-
Aerobic growth	+	+	+	+	+	+
Anaerobic growth	+	+	+	+	+	+
Catalase	-	-	-	-	-	-
Growth at 15°C	+	+	-	-	-	-
Growth at 45°C	-	-	+	+	+	+
Gas from glucose	-	-	-	-	-	-
Ammonia from arginine	-	-	-	-	-	-

API 50 CH

Strains	B102	C104	D205	E158	Strains	B102	C104	D205	E158
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- β D-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- α D-Mannopyranoside	+	-	-	-	D-Arabitol	-	-	-	-
Methyl- α D-Glucopyranoside	-	-	-	-	L-Arabitol	-	-	-	-
N-AcetylGlucosamine	+	-	-	+	Potassium Gluconate	+	+	+	-
Amygdalin	+	-	-	-	Potassium 2-KetoGluconate	-	-	-	-
Arbutin	+	-	-	+	Potassium 5-KetoGluconate	-	-	-	-

Strains	F39	F52	G59	G72		F39	F52	G59	G72
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- β D-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- α D-Mannopyranoside	+	+	+	+	D-Arabitol	-	-	-	-
Methyl- α D-Glucopyranoside	-	-	-	-	L-Arabitol	-	-	-	-
N-AcetylGlucosamine	+	+	+	+	Potassium Gluconate	+	+	+	+
Amygdalin	+	+	+	+	Potassium 2-KetoGluconate	-	-	-	-
Arbutin	+	+	+	+	Potassium 5-KetoGluconate	-	-	-	-

API 20 STREP

Strains	A157	B9	C162	G39	F31	Strains	A157	B9	C162	G39	F31
Pyruvate	+	+	+	+	+	Ribose	-	+	+	+	+
Hippurate	-	+	+	-	-	L-Arabinose	-	-	-	+	+
Esculin	-	+	+	+	+	Mannitol	-	+	+	+	+
Pyrrolidonyl	-	+	+	-	+	Sorbitol	-	+	+	+	+
2-naphthylamide	+	-	-	-	-	Lactose	+	+	+	+	+
6-Bromo-2-naphthyl- α -D-glucuronate	-	-	-	-	-	Trehalose	-	+	+	+	+
Naphtol AS-BI β -D-glucuronate	-	-	-	+	+	Inulin	-	-	-	-	-
2-naphthyl- β -D-galactopyranoside	-	-	-	-	-	Raffinose	-	-	-	-	-
2-naphthyl phosphate	+	+	+	+	+	Starch	-	+	+	-	+
L-leucine-2-naphthylamide	-	+	+	-	-	Glycogen	-	-	-	-	-
Arginine											

이들 13개 균주는 공히 그래프 양성이고, 8개 균주는 간균, 다른 5종은 구균이었으며, 산소유무와 상관없이 잘 성장하였고, 카탈라제와 운동성은 음성이었다. 또한, 15°C에서는 F39와 F52 균주가 성장한 반면 다른 11개 균주가 성장하지 못하였으나 45°C에서는 반대 현상을 보였으며, 모든 균주 공히 포도당(glucose)으로부터 가스(gas)와, 아르기닌(arginine)으로부터 암모니아를 생성하지 않았다. 간균은 API 50CHL kit(API bioMerieux, France)를, 구균은 API 20 STREP kit(API bioMerieux, France)를 이용하여 당 발효 시험을 실시하였다.

Table 19. The output of BLAST

Strains	Accession	Description	score (bits)	Identities (%)
A157	EU163501.1	<i>Streptococcus macedonicus</i> strain 905 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2779	99
B9	EF653454.1	<i>Enterococcus faecalis</i> strain 47/3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2803	99
B102	EU419597.1	<i>Lactobacillus plantarum</i> strain KLDS 1.0607 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2829	99
C104	AB362628.1	<i>Lactobacillus fermentum</i> gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NRIC 0147	2866	99
C162	AB362599.1	<i>Enterococcus faecalis</i> gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NRIC 0110	2660	98
D205	EU407607.1	<i>Lactobacillus fermentum</i> strain LB21 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2855	99
E158	AY763430.1	<i>Lactobacillus acidophilus</i> strain LH5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2833	99
F39	EU419598.1	<i>Lactobacillus plantarum</i> strain KLDS 1.0610 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2847	99
F52	EU419598.1	<i>Lactobacillus plantarum</i> strain KLDS 1.0610 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2817	99
G39	AM696917.1	<i>Streptococcus thermophilus</i> 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2783	99
G59	EU419598.1	<i>Lactobacillus plantarum</i> strain KLDS 1.0610 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2863	99
G72	CR936503.1	<i>Lactobacillus sakei</i> strain 23K complete genome	2876	99
G87	AY188352.1	<i>Streptococcus salivarius</i> strain ATCC 7073 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	2783	99

표 19는 16S rRNA 유전자 부분을 universal primer를 이용한 PCR로 증폭하여 서열분석 하였고, 분석된 염기서열을 그대로 이용하여 BLAST search한 결과 *Lactobacillus plantarum* 4 균주, *Lactobacillus fermentum* 2 균주, *Lactobacillus acidophilus* 1 균주, *Lactobacillus sakei* 1 균주, *Streptococcus thermophilus* 1 균

주, *Enterococcus faecalis* 2 균주, *Streptococcus salivarius* 1 균주, *Streptococcus macedonicus* 1 균주가 동정되었다.

4. 선발 젖산균의 특성조사

1차년도에서 면역활성이 높은 균주 13종 중 산 생성 속도와 면역활성(10% 환원탈지유에서 1% 접종 후 18시간 배양)을 감안하여 5종의 젖산균을 선발하여 특성 조사를 실시하였다. 다음 이하는 D205 균주(*Lactobacillus fermentum*)는 *Lactobacillus fermentum* 450, G87 균주(*Streptococcus salivarius*)는 *Streptococcus salivarius* O39, C162 균주(*Enterococcus faecalis*)는 *Enterococcus faecalis* 683, A157 균주(*Streptococcus macedonicus*)는 *Streptococcus macedonicus* 743, C104 균주(*Lactobacillus fermentum*)는 *Lactobacillus fermentum* 782균주로 각각 명명하였다.

가. 젖산균의 성장

Fig. 1~10에서 보는 바와 같이 젖산균 5종의 성장속도를 알기 위하여 10% 환원탈지유 150ml에 젖산균 배양액을 1ml용 피펫으로 1방울 접종한 후 34℃, 37℃, 40℃ 별로 3시간 간격으로 24시간까지 배양시험 한 결과는 다음과 같다.

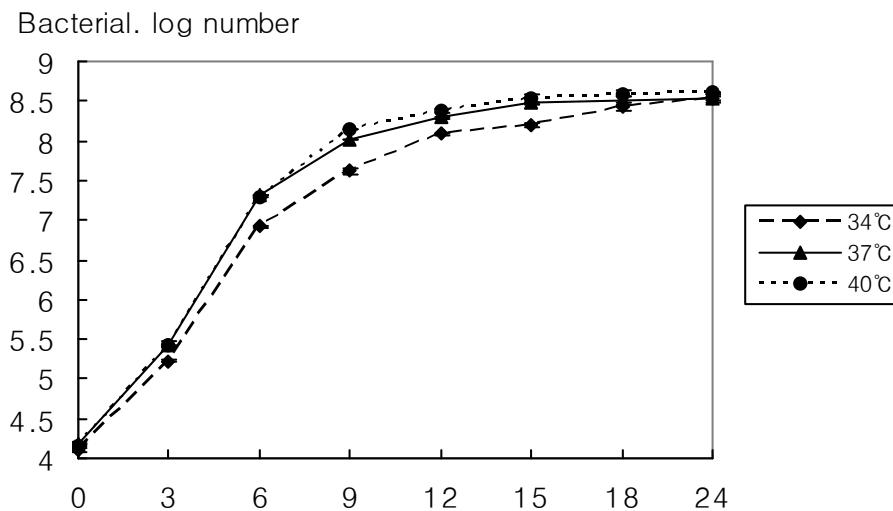


Figure 1. Growth of *Lactobacillus fermentum* 450 in 10% reconstituted skim milk at various temperatures

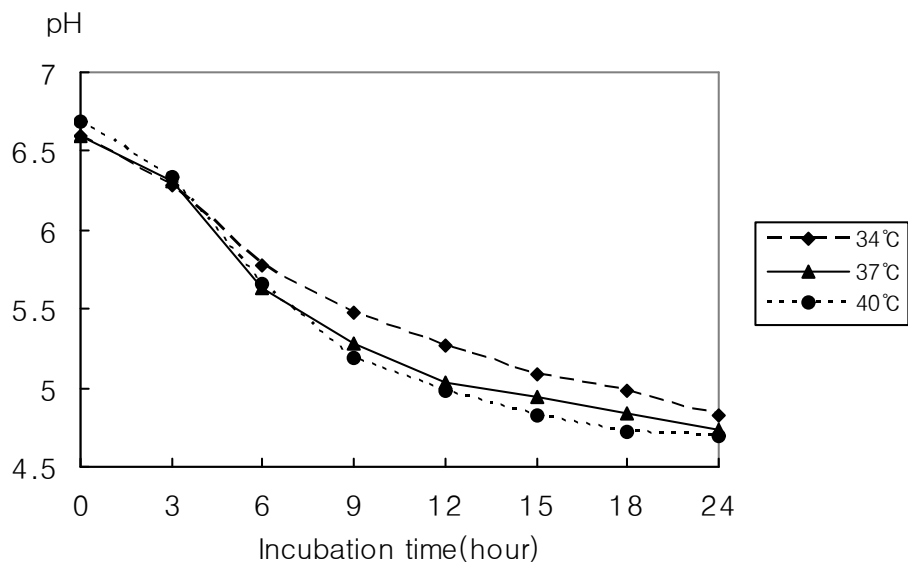


Figure 2. pH changes of 10% reconstituted skim milk during the growth of *Lactobacillus fermentum* 450 at various temperature

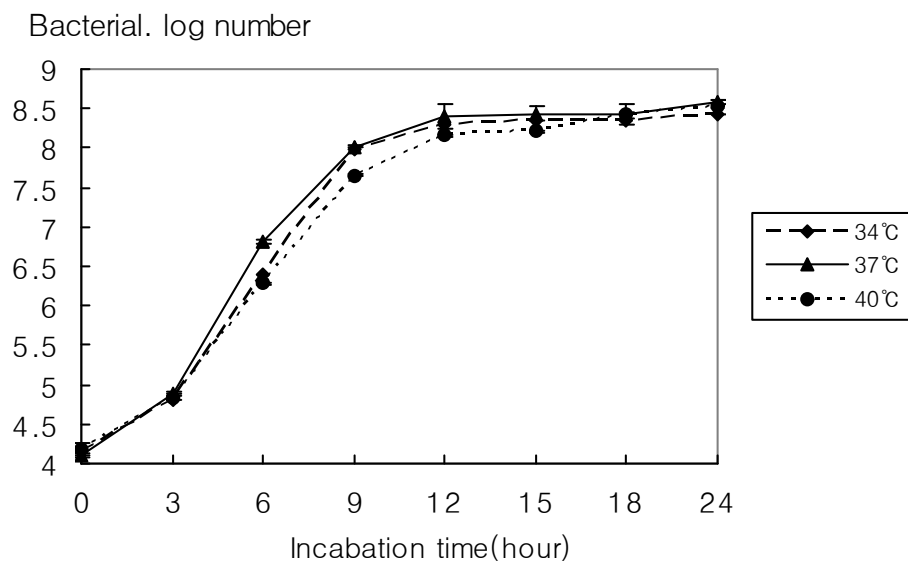


Figure 3. Growth of *Streptococcus salivarius* O39 in 10% reconstituted skim milk at various temperatures

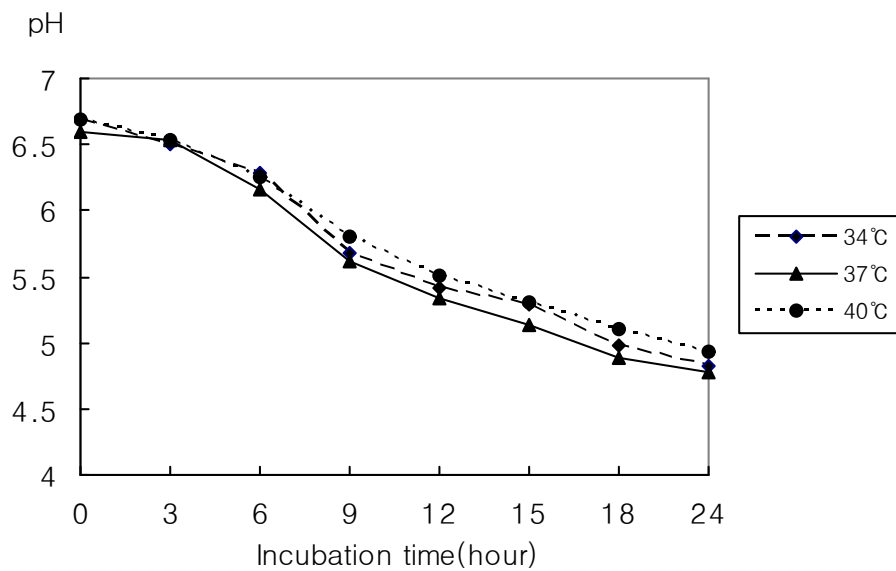


Figure 4. pH changes of 10% reconstituted skim milk during the growth of *Streptococcus salivarius* O39 at various temperature

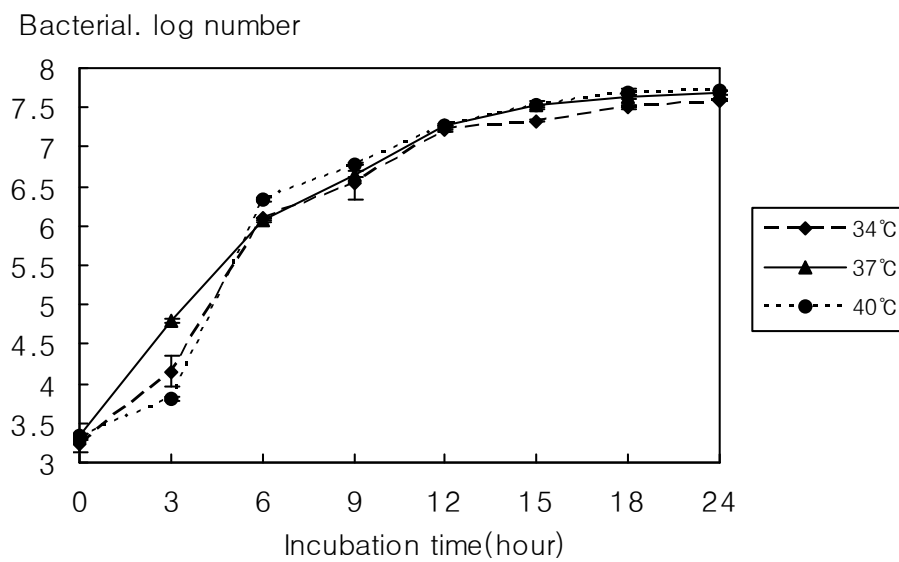


Figure 5. Growth of *Enterococcus faecalis* 683 in 10% reconstituted skim milk at various temperatures

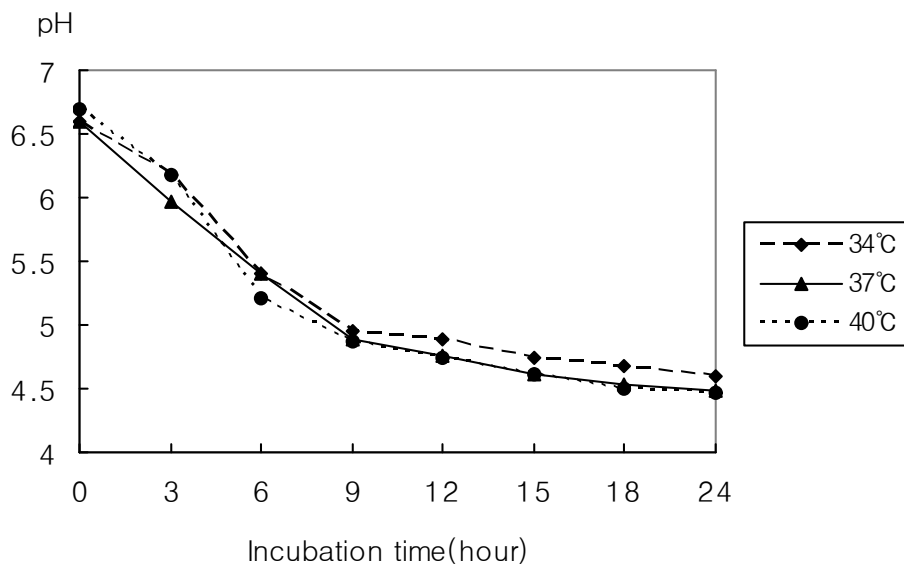


Figure 6. pH changes of 10% reconstituted skim milk during the growth of *Enterococcus faecalis* 683 at various temperature

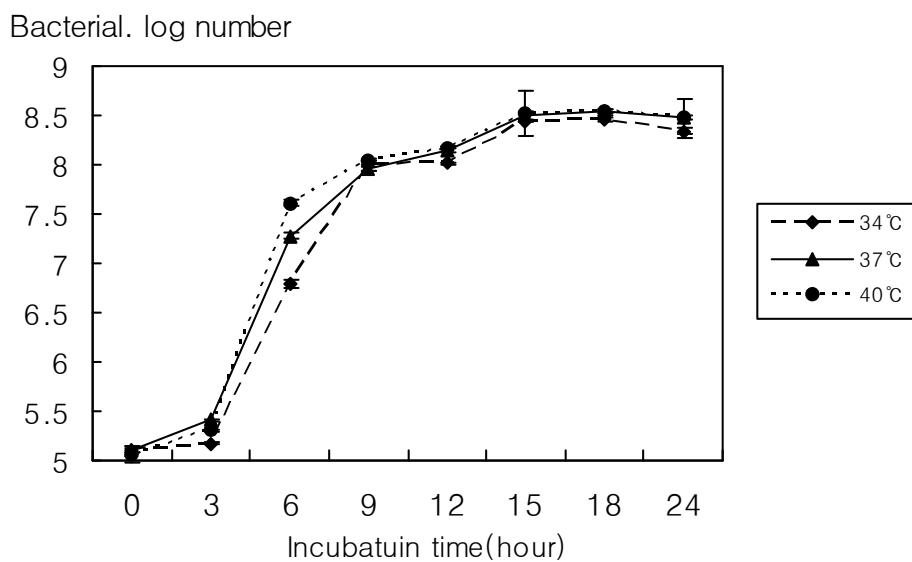


Figure 7. Growth of *Streptococcus macedonicus* 743 in 10% reconstituted skim milk at various temperatures

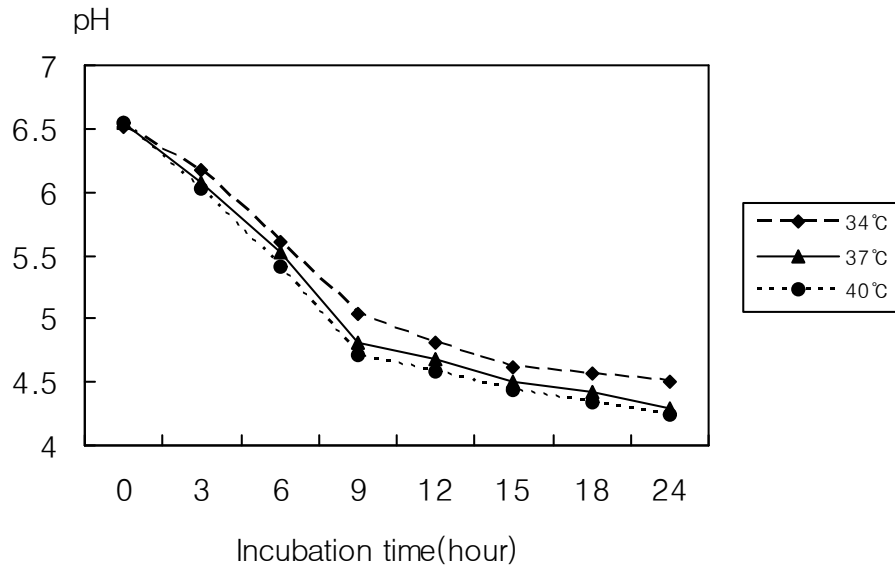


Figure 8. pH changes of 10% reconstituted skim milk during the growth of *Streptococcus macedonicus* 743 at various temperature

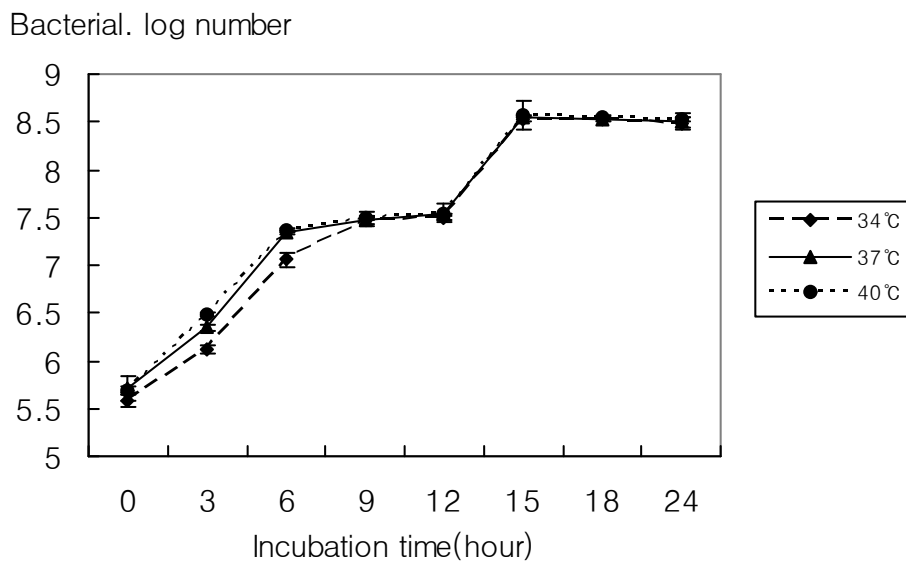


Figure 9. Growth of *Lactobacillus fermentum* 782 in 10% reconstituted skim milk at various temperatures

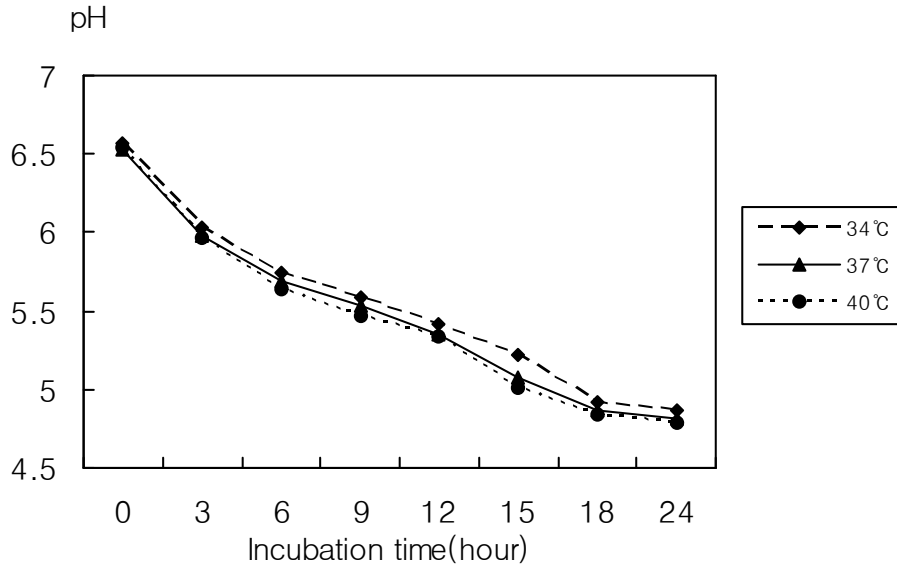


Figure 10. pH changes of 10% reconstituted skim milk during the growth of *Lactobacillus fermentum* 782 at various temperature

Lactobacillus fermentum 450 균주는 대수기까지 6시간이 소요되었고, 37°C와 40°C에서 거의 비슷하게 성장하였으며, pH는 40°C가 가장 빠른 산 생성을 보임에 따라 40°C가 가장 적정온도로 나타났다. *Streptococcus salivarius* O39 균주는 대수기까지 9시간이 소요되었고, 37°C, 34°C, 40°C 순으로 성장하였으며, pH 역시 같은 경향으로 산 생성을 보임에 따라 37°C가 가장 적정온도로 나타났다.

Enterococcus faecalis 683 균주는 대수기까지 6시간이 소요되었고, 40°C, 37°C, 34°C 순으로 성장하였으며, pH 역시 같은 경향으로 산 생성을 보임에 따라 40°C가 가장 적정온도로 나타났다. *Streptococcus macedonicus* 743 균주는 40°C, 37°C, 34°C 순으로 성장하였으며, pH 역시 같은 경향으로 산 생성을 보임에 따라 40°C가 적정온도로 나타났다. *Lactobacillus fermentum* 782 균주는 40°C, 37°C, 34°C 순으로 성장하였고, pH 역시 같은 경향으로 산 생성을 보였으나 큰 차이는 나타나지 않았다.

나. 항생제 내성

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 *L. fermentum* 450, *S. salivarius* O39, *E. faecalis* 683, *S. macedonicus* 743, *L. fermentum* 782

Antimicrobial agents	strains				
	<i>L. fermentum</i> 450	<i>S. salivarius</i> O39	<i>E. faecalis</i> 683	<i>S. macedonicus</i> 743	<i>L. fermentum</i> 782
————— minimal inhibitory concentrations($\mu\text{g}/\text{ml}$) —————					
Aminoglycosides					
Amikacin	160	320	640	640	80
Gentamycin	10	40	1280	1280	320
Kanamycin	3200	400	3200	400	200
Neomycin	1600	8.75	1600	400	200
Streptomycin*	200	800	1600	400	200
β -lactams					
Penicillin-G*	10	5	40	20	20
Methicillin	20	20	320	160	80
Oxacillin	8	4	60	4	60
Ampicillin	640	640	1280	640	640
Gram-positive spectrum					
Bacitracin*	50	50	50	10	20
Rifampicin	7.5	7.5	15	7.5	3.75
Novobiocin	2.5	5	5	2.5	2.5
Lincomycin	10	20	800	800	20
Gram-negative spectrum					
Polymyxin B*	1200	300	600	75	300
Broad spectrum					
Chloramphenicol	20	40	40	80	40
Vancomycin*	6.25	3.12	800	100	6.25

* : units/ml

Lactobacillus fermentum 450 균주는 다른 4종의 균주에 비해 Kanamycin, Neomycin, Polymyxin B에 대하여 내성이 강한 반면 Gentamycin, Lincomycin, Chloramphenicol에 대해서는 내성이 약한 것으로 나타났다. *Streptococcus salivarius* O39 균주는 다른 4종의 균주에 비해 내성이 약한 것으로 나타났으며, 특히 Neomycin, Penicillin-G, Vancomycin에 대해 내성이 더 약하였다. *Enterococcus faecalis* 683 균주는 타 균주에 비해 가장 강한 내성을 나타내었고 특히 Streptomycin, Penicillin-G, Methicillin, Ampicillin과 Vancomycin에 대해 내성이 강한 것으로 나타났다. *Streptococcus macedonicus* 743 균주는 Amikacin, Gentamycin,

Lincomycin에 대해 강한 내성을 나타낸 반면, Oxacillin, Bacitracin, Polymyxin B에 대해 내성이 약한 것으로 나타났다. *Lactobacillus fermentum* 782 균주는 다른 4종의 균주에 비해 비교적 약한 내성이 나타났으며, 특히 Amikacin, Kanamycin, Rifampicin에 대한 내성이 더 약한 것으로 나타났다.

다. 효소 활성

젖산균 5종의 효소활성은 API ZYM kit를 사용하여 실시하였으며, 그 결과는 Table 21에서 보는 바와 같다.

Table 21. Enzyme patterns of *L. fermentum* 450, *S. salivarius* O39, *E. faecalis* 683, *S. macedonicus* 743, *L. fermentum* 782

Enzyme	Strains				
	<i>L. fermentum</i> 450	<i>S. salivarius</i> O39	<i>E. faecalis</i> 683	<i>S. macedonicus</i> 743	<i>L. fermentum</i> 782
Alkaline phosphatase	0	0	0	0	0
Esterase(C4)	0	4	2	0	1
Esterase Lipase(C8)	1	4	4	0	3
Lipase(C14)	1	0	4	1	0
Leucine arylamidase	5	5	1	5	5
Valine arylamidase	0	4	0	2	2
Cystine arylamidase	0	3	0	2	3
Trypsin	0	0	0	0	0
α -chymotrypsin	0	0	0	0	0
Acid phosphatase	4	4	4	5	3
Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase	3	3	5	3	2
α -galactosidase	1	0	0	3	5
β -galactosidase	1	1	1	0	5
β -glucuronidase	0	0	0	0	0
α -glucosidase	1	1	0	1	4
β -glucosidase	0	0	0	0	0
N-acetyl- β -glucosaminidase	0	0	0	0	0
α -mannosidase	0	0	0	0	0
α -fucosidase	0	0	0	0	0

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

5종의 젖산균은 Alkaline phosphatase, Trypsin, α -chymotrypsin, β -glucuronidase, β -glucosidase, N-acetyl- β -glucosaminidase, α -mannosidase 및 α -fucosidase 등의

효소에 대해 활성이 없는 것으로 나타났다. *Lactobacillus fermentum* 450균주는 Leucine arylamidase에 대해 효소활성이 5이었고, Phosphatase acide는 효소활성이 4를 나타내었다. *Streptococcus salivarius* O39 균주는 다른 4종의 젖산균에 비해 Esterase와 Valine arylamidase가 4로서 높은 활성을 나타내었고, Leucine arylamidase에 대해 효소활성이 5를 나타내었다. *Enterococcus faecalis* 683 균주는 Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase에 대해 효소활성이 5를 나타내었고, Esterase Lipase, Lipase와 Phosphatase acide에 대해 효소활성이 공히 4를 나타내었다. *Streptococcus macedonicus* 743 균주는 Acid phosphatase에 대한 효소활성이 다른 4종의 젖산균에 비해 높게 나타났고, Leucine arylamidase 또한 5로 높게 나타났으며 α -galactosidase에 대한 효소활성도 3으로 나타났다. *Lactobacillus fermentum* 782 균주는 Leucine arylamidase, α -galactosidase, β -galactosidase에 대한 효소활성이 5로 높게 나타났고 α -glucosidase에 대한 효소활성도 4로서 높은 활성을 나타내었다. 특히 젖산균 5종 모두 Benzopyrene을 발암성 물질로 전환시키는 발암효소인 β -glucuronidase의 경우에는 효소활성이 없는 것으로 나타나 안전성을 확인할 수 있었다.

라. 담즙내성

담즙에 대한 균주의 내성을 시험하기 위하여 oxgall(Difco)을 첨가하지 않은 것과 첨가한 배지에서 각 균주의 내성을 시험한 결과는 각각 Fig. 11~15에서 보는 바와 같다.

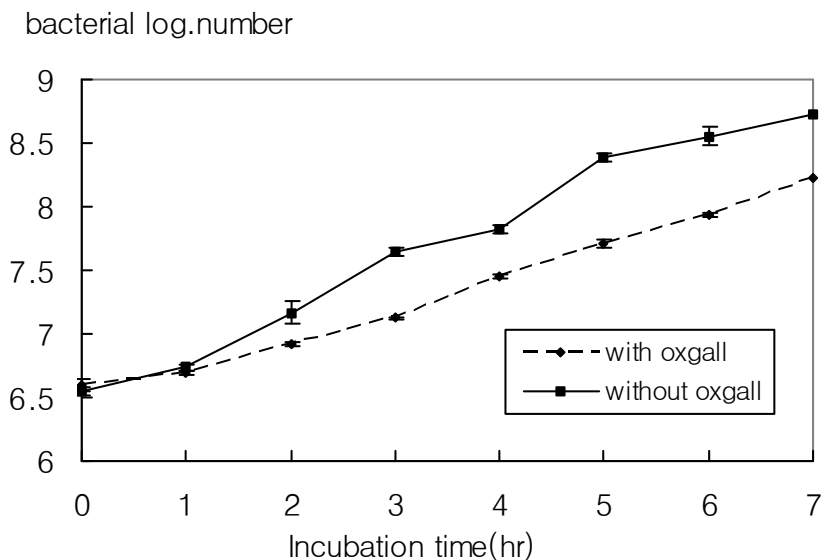


Fig. 11. Growth of *Lactobacillus fermentum* 450 in MRS broth containing 0.05% L-cysteine with or without 0.3% oxgall.

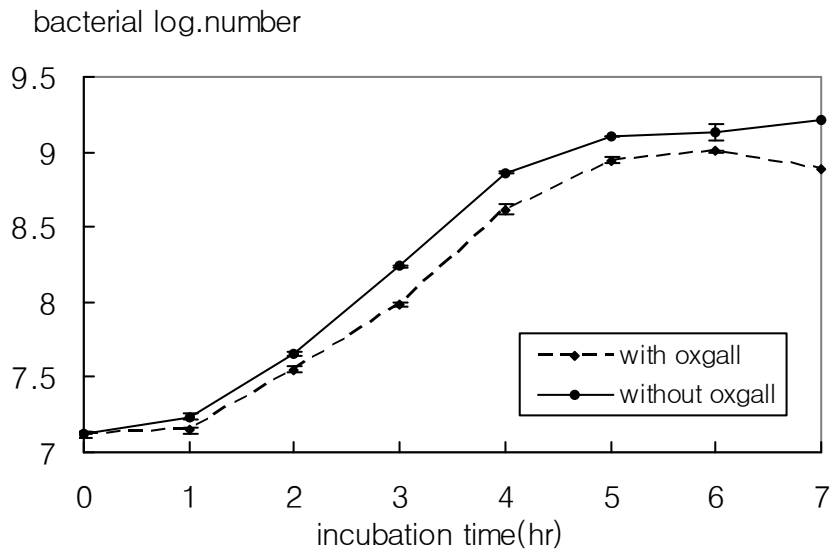


Fig. 12. Growth of *Streptococcus salivarius* O39 in MRS broth containing 0.05% L-cysteine with or without 0.3% oxgall.

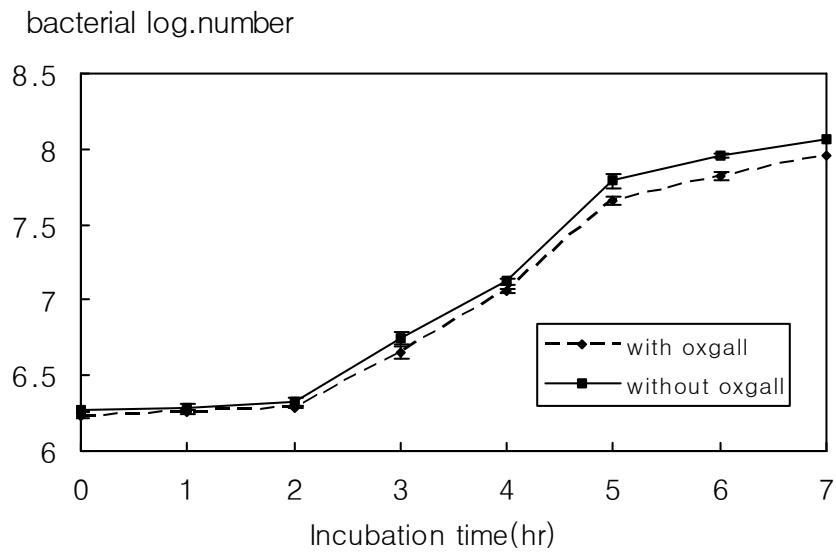


Fig. 13. Growth of *Enterococcus faecalis* 683 in MRS broth containing 0.05% L-cysteine without 0.3% oxgall

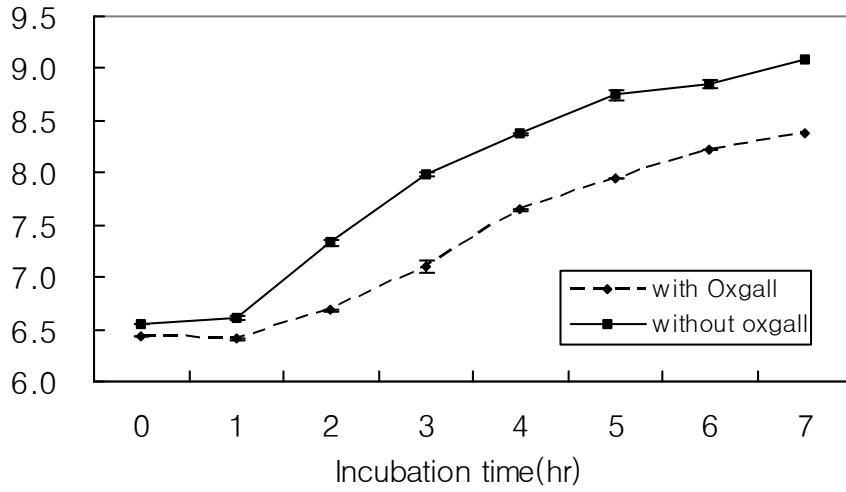


Fig. 14. Growth of *Streptococcus macedonicus* 743 in MRS broth containing 0.05% L-cysteine with or without 0.3% oxgall.

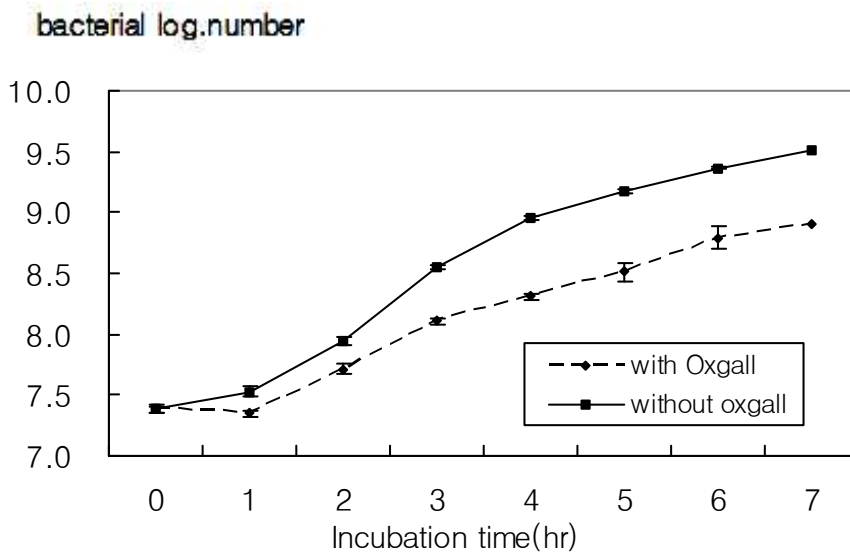


Fig. 15. Growth of *Lactobacillus fermentum* 782 in MRS broth containing 0.05% L-cysteine with or without 0.3% oxgall.

5종의 젖산균이 oxgall을 첨가하지 않은 경우와 첨가한 경우 약간의 차이는 있었지만 비슷하게 성장하는 추세를 보였다. 5 균주 중 *Lactobacillus fermentum* 782, *Streptococcus macedonicus* 743, *Lactobacillus fermentum* 782 균주가 같은 성장

추세를 보였고, *Streptococcus salivarius* O39와 *Enterococcus faecalis* 683 균주가 같은 성장 추세를 보였는데 후자가 더 담즙에 대한 내성이 있었다.

마. pH 내성

위산과 비슷한 정도의 pH에 대한 내성을 알아보기 위하여 젖산균주를 pH 2, 3, 4 및 6.4의 증류수에서 3시간까지의 생존여부를 시험한 결과는 Fig. 16~20에서 보는 바와 같다.

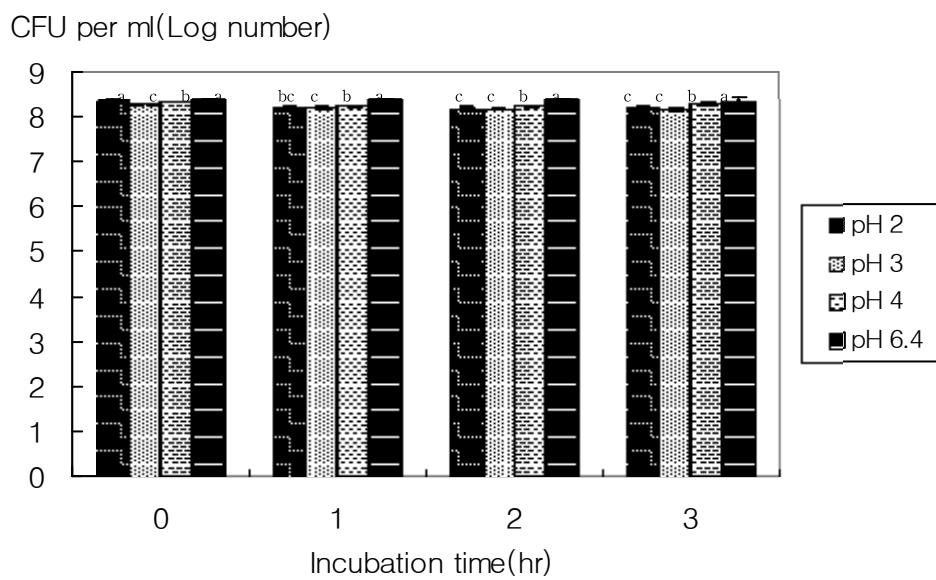


Fig. 16. Survival of *Lactobacillus fermentum* 450 after three hours in HCl(pH 2,3,4,6.4)

* Initial log count before pH treatment : 8.40

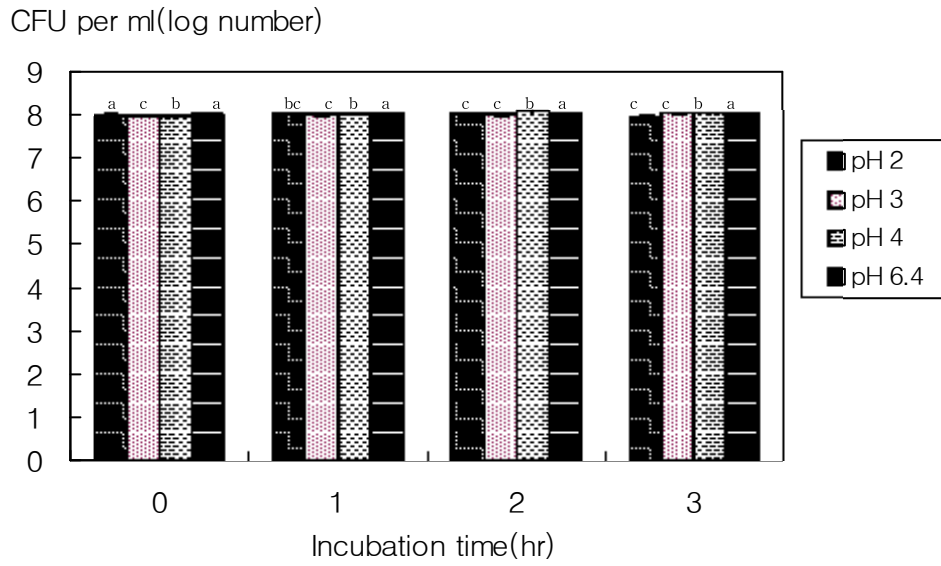


Fig. 17. Survival of *Streptococcus salivarius* O39 after three hours in HCl(pH 2,3,4,6.4)
 * Initial log count before pH treatment : 8.01

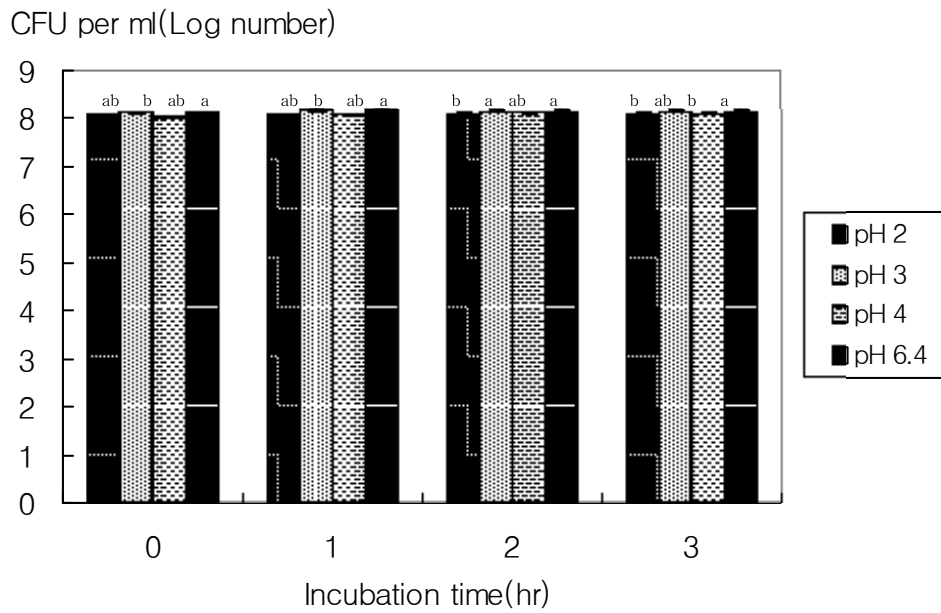


Fig. 18. Survival of *Enterococcus faecalis* 683 after three hours in HCl (pH 2,3,4,6.4)
 * Initial log count before pH treatment : 8.15

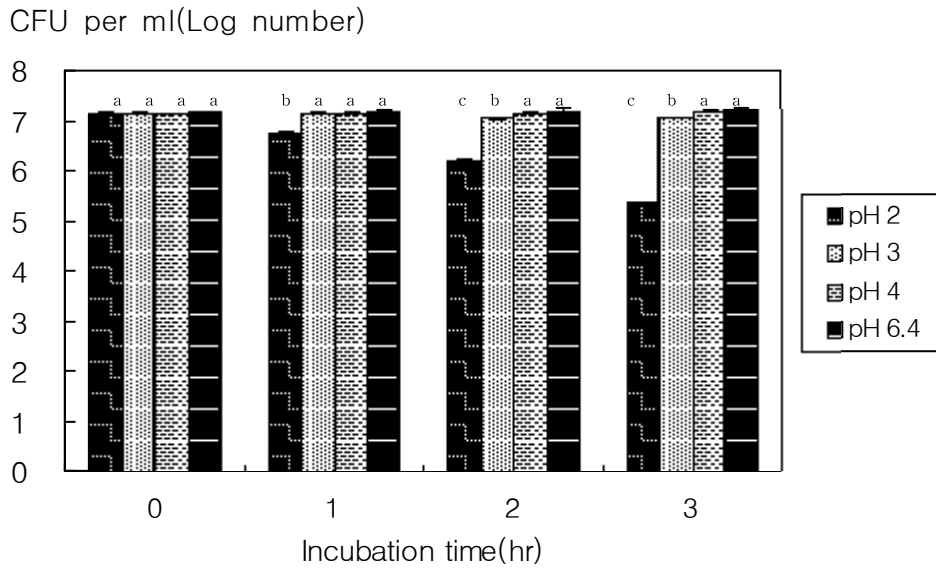


Fig. 19. Survival of *Streptococcus macedonicus* 743 after three hours in HCl(pH 2,3,4,6.4)
 * Initial log count before pH treatment : 7.11

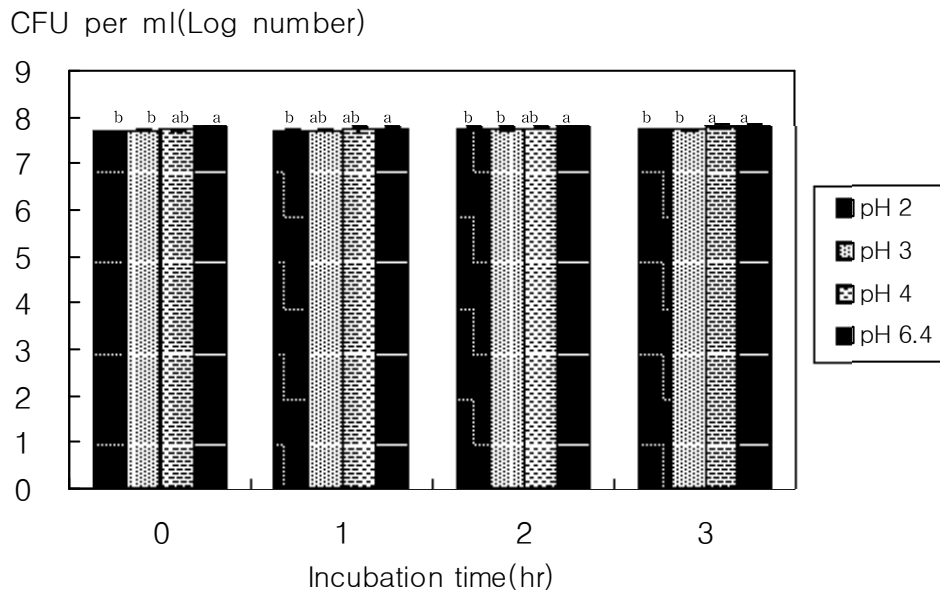


Fig. 20. Survival of *Lactobacillus fermentum* 782 after three hours in HCl(pH 2,3,4,6.4)
 * Initial log count before pH treatment : 7.76

Lactobacillus fermentum 450 균주는 pH 2에서 0시간일 때 2.4×10^8 cfu/ml이던 것이 1시간 경과 후 1.7×10^8 cfu/ml, 2시간 경과 후 1.6×10^8 cfu/ml, 3시간 경과 후 1.6×10^8 cfu/ml 로서 젖산균 수가 33% 감소하는 것으로 나타났다. pH 3에서 0시간

일 때 2.0×10^8 cfu/ml이던 것이 1시간 경과 후 1.6×10^8 cfu/ml, 2시간 경과 후 1.5×10^8 cfu/ml, 3시간 경과 후 1.5×10^8 cfu/ml 로서 젖산균 수가 25% 감소하는 것으로 나타났으나, pH 4와 6.4는 각각 9%와 8%의 감소를 보임에 따라 거의 변화가 없었다. *Streptococcus salivarius* O39 균주는 pH 2에서 0시간일 때 9.5×10^7 cfu/ml이던 것이 1시간 경과 후 1.1×10^8 cfu/ml, 2시간 경과 후 1.1×10^8 cfu/ml, 3시간 경과 후 8.6×10^7 cfu/ml 로서 젖산균 수가 9% 감소하는 것으로 나타났다. pH 3에서 0시간일 때 9.1×10^7 cfu/ml이던 것이 1시간 경과 후 9.7×10^7 cfu/ml, 2시간 경과 후 1.0×10^8 cfu/ml, 3시간 경과 후 1.1×10^8 cfu/ml 로서 젖산균 수가 21% 증가하는 것으로 나타났으나, pH 4와 6.4는 각각 26%와 10%의 증가를 보임에 따라 pH 2를 제외하고는 오히려 증가하는 경향을 보였다.

Enterococcus faecalis 683 균주는 pH 2에서 0시간일 때 1.3×10^8 cfu/ml이던 것이 1시간 경과 후 1.2×10^8 cfu/ml, 2시간 및 3시간 경과 후 공히 1.3×10^8 cfu/ml로서 젖산균 수 감소가 없는 것으로 나타났다. pH 3에서 0시간일 때 1.4×10^8 cfu/ml이던 것이 1시간 경과 후 1.5×10^8 cfu/ml, 2시간 경과 후 1.5×10^8 cfu/ml, 3시간 경과 후 1.4×10^8 cfu/ml 으로서 역시 젖산균 수 감소가 없었다. pH 4와 6.4는 각각 18%와 7% 증가하는 경향을 보였다.

Streptococcus macedonicus 743균주는 pH 2에서 0시간일 때 1.4×10^7 cfu/ml이던 것이 1시간 경과 후 5.7×10^6 cfu/ml, 2시간 경과 후 1.5×10^6 cfu/ml, 3시간 경과 후 2.1×10^5 cfu/ml로서 젖산균 수가 98% 감소하는 것으로 나타났다. pH 3에서 0시간일 때 1.4×10^7 cfu/ml이던 것이 3시간 경과 후 1.1×10^7 cfu/ml 로서 젖산균 수가 19% 감소하는 것으로 나타났으며, pH 4와 6.4는 각각 9%와 15%의 증가를 보였다.

Lactobacillus fermentum 782균주는 0시간일 때 5.2×10^7 cfu/ml이던 pH 2, 3, 4, 6.4 모두 각각 8%, 4%, 10%, 6% 증가하는 경향을 보여 pH 내성이 강한 것으로 나타났다. 이와 같은 결과로 볼 때 *Streptococcus salivarius* O39 균주, *Enterococcus faecalis* 683 균주와 *Lactobacillus fermentum* 782균주가 *Lactobacillus fermentum* 450 균주와 *Streptococcus macedonicus* 743 균주보다 pH에 대한 내성이 강한 것으로 나타난 반면 특히 *Streptococcus macedonicus* 743균주는 pH에 대한 내성이 약하였다.

바. 항균력

젖산균이 식중독균에 대해 어느 정도 억제하는지를 측정하기 위해 혼합배양을 실시한 결과는 Table 22~26과 같다.

Table 22. Inhibition of pathogens by *Lactobacillus fermentum* 450 in MRS broth

Pathogens	Growth				Inhibition (%)
	Pathogens ^a		<i>L. fermentum</i> 450 ^a		
	CFU/ml	pH	CFU/ml	pH	
<i>Escherichia coli</i>	9.8×10 ⁷	6.41	1.6×10 ⁸	5.46	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	8.3×10 ⁶	6.40	3.0×10 ⁶	5.43	63.86
<i>Staphylococcus aureus</i>	9.2×10 ⁷	6.49	9.0×10 ⁷	5.42	2.17

* Initial count of *Lactobacillus fermentum* 450 : 5.0×10⁶CFU/ml^a Determined after 6h of incubation at 37°CTable 23. Inhibition of pathogens by *Streptococcus salivarius* O39 in MRS broth

Pathogens	Growth				Inhibition (%)
	Pathogens ^a		<i>S. salivarius</i> O39 ^a		
	CFU/ml	pH	CFU/ml	pH	
<i>Escherichia coli</i>	9.8×10 ⁷	6.41	5.0×10 ⁷	5.96	48.98
<i>Salmonella typhimurium</i>	8.3×10 ⁶	6.40	1.1×10 ⁶	5.36	86.75
<i>Staphylococcus aureus</i>	9.2×10 ⁷	6.49	2.9×10 ⁷	5.36	68.48

* Initial count of *Streptococcus salivarius* O39 : 6.0×10⁶CFU/ml^a Determined after 6h of incubation at 37°CTable 24. Inhibition of pathogens by *Enterococcus faecalis* 683 in MRS broth

Pathogens	Growth				Inhibition (%)
	Pathogens ^a		<i>Enter. faecalis</i> 683 ^a		
	CFU/ml	pH	CFU/ml	pH	
<i>Escherichia coli</i>	9.8×10 ⁷	6.41	1.1×10 ⁸	5.36	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	8.3×10 ⁶	6.40	8.3×10 ⁶	5.35	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	9.2×10 ⁷	6.49	4.5×10 ⁷	5.36	51.09

* Initial count of *Enterococcus faecalis* 683 : 7.2×10⁶CFU/ml^a Determined after 6h of incubation at 37°C

Table 25. Inhibition of pathogens by *Streptococcus macedonicus* 743 in MRS broth

Pathogens	Growth				% Inhibition
	Pathogens ^a		<i>S. macedonicus</i> 743 ^a		
	CFU/ml	pH	CFU/ml	pH	
<i>Escherichia coli</i>	7.0×10 ⁶	6.41	1.4×10 ⁶	5.66	80.00
<i>Salmonella typhimurium</i>	9.5×10 ⁶	6.40	3.0×10 ⁶	5.96	68.42
<i>Staphylococcus aureus</i>	1.3×10 ⁷	6.41	2.4×10 ⁶	5.61	81.54

* Initial count of *S. macedonicus* 743: 6.0×10⁶CFU/ml

^a Determined after 6h of incubation at 37°C

Table 26. Inhibition of pathogens by *Lactobacillus fermentum* 782 in MRS broth

Pathogens	Growth				% Inhibition
	Pathogens ^a		<i>L. fermentum</i> 782 ^a		
	CFU/ml	pH	CFU/ml	pH	
<i>Escherichia coli</i>	7.0×10 ⁶	6.41	1.2×10 ⁶	5.46	82.86
<i>Salmonella typhimurium</i>	9.5×10 ⁶	6.40	4.7×10 ⁶	5.63	50.53
<i>Staphylococcus aureus</i>	1.3×10 ⁷	6.41	4.3×10 ⁶	5.56	66.92

* Initial count of *L. fermentum* 782 : 5.0×10⁶CFU/ml

^a Determined after 6h of incubation at 37°C

Lactobacillus fermentum 450 균주는 *Salmonella typhimurium*에 대해 63.86%로서 비교적 높은 항균력을 보인 반면 *Escherichia coli*와 *Staphylococcus aureus*에 대해 항균력이 없었다. 배양 후 pH 변화를 보았을 때 대조구인 식중독균은 pH가 6.40~6.49이며, 혼합배양액은 pH 5.42~5.46으로 혼합배양과정에서 생성된 젖산의 영향으로 억제효과가 약간은 있었지만 크게 좌우하지는 않은 것으로 사료되었다. *Streptococcus salivarius* O39 균주는 *Escherichia coli*에 대해 48.98%의 항균력이 있었고, *Salmonella typhimurium*에 대해 86.75%로서 높은 항균력을 보였으며, *Staphylococcus aureus*에 대해 68.48%로서 비교적 높은 항균력을 보였다. 배양 후 pH 변화를 보았을 때 대조구인 식중독균은 pH가 6.40~6.49이며, 혼합배양액은 pH 5.36~5.96이었다. *Enterococcus faecalis* 683 균주는 *Escherichia coli*와 *Salmonella typhimurium*에 대해 항균력이 없었고, 다만, *Staphylococcus aureus*에 대해 51.09%로서 비교적 항균력이 있었다. 배양 후 pH 변화를 보았을 때 대조구인 식중독균은 pH가 6.40~6.49이며, 혼합배양액은 pH 5.35~5.36으로 혼합배양과정에서 생성된 젖산의 영향으로 억제효과가 약간은 있었지만 크게 좌우하지는 않은 것으로 사료되었

다. *Streptococcus macedonicus* 743 균주는 *Escherichia coli*에 대해 80%, *Staphylococcus aureus*에 대해 81.54%의 높은 억제력을 나타내었고, *Salmonella typhimurium*에 대해서도 68.42%의 비교적 높은 항균활성을 나타내었다. 배양 후 pH 변화를 보았을 때 대조구인 식중독균은 pH가 6.40~6.41이며, 혼합배양액은 pH 5.61~5.96으로 혼합배양과정에서 생성된 젖산의 영향으로 억제효과가 약간은 있었지만 크게 좌우하지는 않은 것으로 사료되었다. *Lactobacillus fermentum* 782 균주는 *Escherichia coli*에 대해 82.86%로 높은 항균력을 나타내었고, *Salmonella typhimurium*에 대해 50.53%, *Staphylococcus aureus*에 대해 66.92%로 비교적 높은 항균력을 나타내었다. 배양 후 pH 변화를 보았을 때 대조구인 식중독균은 pH가 6.40~6.41이며, 혼합배양액은 pH 5.46~5.63으로 혼합배양과정에서 생성된 젖산의 영향으로 억제효과가 약간은 있었지만 크게 좌우하지는 않은 것으로 사료되었다.

따라서 5종의 젖산균 중 *Streptococcus macedonicus* 743 균주가 다른 4종의 젖산균보다 항균력이 강한 것으로 나타났다.

5. 모짜렐라치즈 제조를 위한 최적 배양조건 확립

젖산균의 특성조사에서 얻어진 결과에 따라 *Enterococcus faecalis* 683이 Vancomycin에 대한 내성이 강하여 위해성 논란이 있어 4종 균주에 대해 최적조건을 설정하였다. Fig. 21은 젖산균에 따른 배양온도 및 접종량 별 모짜렐라 치즈의 최적 조건을 설정하기 위한 제조공정도이다.

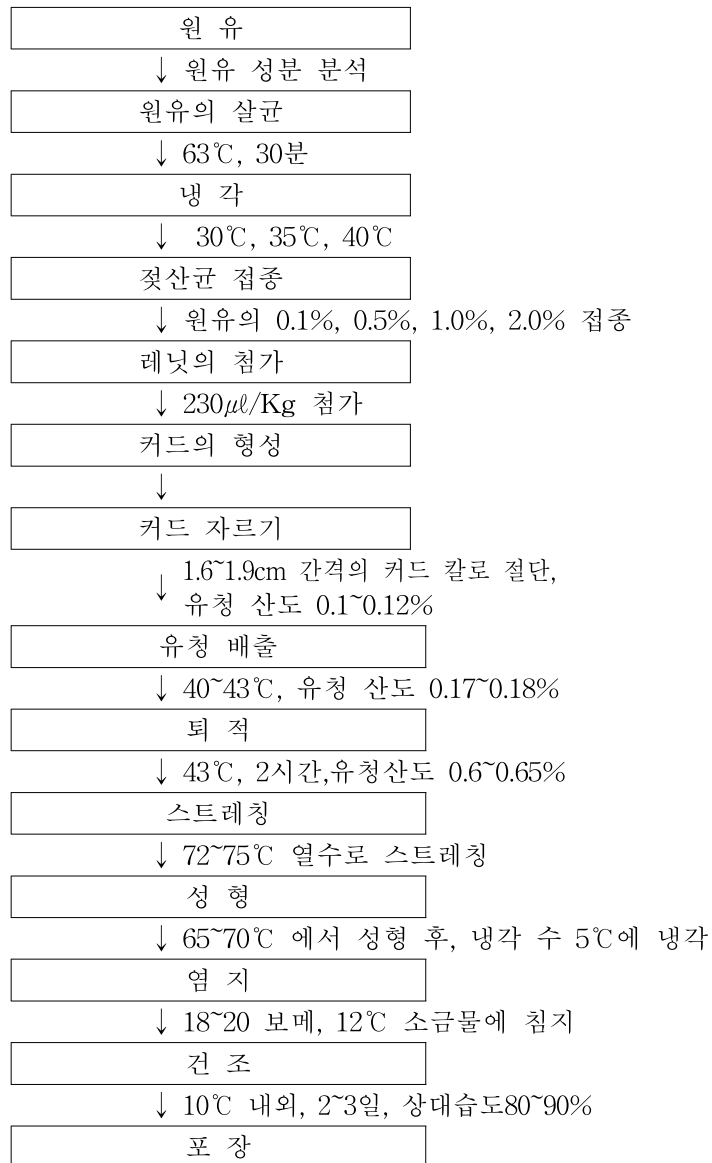


Fig. 21. 배양온도 및 접종량별 모짜렐라 치즈의 제조공정도

나. 모짜렐라 치즈의 제조 특성

(1) 치즈 제조 중 화학적 및 미생물학적 변화

표 27에서 보는 바와 같이 원유의 일반성분 함량은 접종량 간 치즈의 차이를 없애기 위하여 동일한 원료유를 사용하였으며, 원유의 총균수는 5.3×10^4 cfu/ml와 2.5×10^4 cfu/ml 이었고, 살균유에서는 2.9×10^3 cfu/ml와 2.3×10^3 cfu/ml 이었다.

Table 27. Properties of experimental cheese

cheese lot	<i>Lactobacillus fermentum</i> 450				<i>Streptococcus salivarius</i> O39			
	0.1%	0.5%	1.0%	2.0%	0.1%	0.5%	1.0%	2.0%
Raw milk								
Fat(%)	4.18±0.01				4.18±0.01			
Protein(%)	3.16±0.01				3.21±0.01			
Lactose(%)	4.72±0.01				4.74±0.01			
Total solid(%)	12.75±0.01				12.83±0.01			
Pasterized milk								
Fat(%)	4.18±0.01				4.18±0.01			
Protein(%)	3.19±0.01				3.23±0.01			
Lactose(%)	4.78±0.01				4.75±0.01			
Total solid(%)	12.87±0.01				12.85±0.01			
Whey								
- Incubation tem. 30°C								
Fat(%)	0.84±0.01	0.79±0.01	0.82±0.01	0.71±0.01	0.74±0.01	0.74±0.01	0.71±0.01	0.74±0.01
Protein(%)	1.08±0.01	0.98±0.01	0.94±0.01	0.97±0.01	0.97±0.01	0.97±0.01	0.95±0.01	0.97±0.01
Lactose(%)	4.62±0.01	4.67±0.01	4.81±0.01	4.87±0.01	4.88±0.01	4.88±0.01	4.66±0.01	4.98±0.01
Total solid(%)	7.24±0.01	7.14±0.01	7.29±0.01	7.25±0.01	7.29±0.01	7.29±0.01	7.03±0.01	7.39±0.01
- Incubation tem. 35°C								
Fat(%)	0.98±0.01	1.03±0.01	0.84±0.01	0.86±0.01	0.84±0.01	0.76±0.01	0.82±0.01	0.84±0.01
Protein(%)	0.92±0.01	0.89±0.01	0.92±0.01	0.90±0.01	0.93±0.01	0.92±0.01	0.93±0.01	0.89±0.01
Lactose(%)	4.91±0.01	4.88±0.01	4.93±0.01	4.81±0.01	4.75±0.01	4.93±0.01	4.82±0.01	4.86±0.01
Total solid(%)	7.50±0.01	7.51±0.01	7.30±0.01	7.27±0.01	7.24±0.01	7.30±0.01	7.26±0.01	7.28±0.01
- Incubation tem. 40°C								
Fat(%)	1.12±0.01	1.04±0.01	0.94±0.01	0.78±0.01	0.83±0.01	0.91±0.01	1.03±0.01	1.12±0.01
Protein(%)	0.91±0.01	0.89±0.01	0.90±0.01	0.89±0.01	0.78±0.01	0.89±0.01	1.02±0.01	0.88±0.01
Lactose(%)	4.84±0.01	4.76±0.01	4.86±0.01	4.89±0.01	4.14±0.01	4.97±0.01	4.81±0.01	4.84±0.01
Total solid(%)	7.57±0.01	7.40±0.01	7.39±0.01	7.26±0.01	6.46±0.01	7.46±0.01	7.55±0.01	7.53±0.01
Viable bacterial count								
Raw milk(CFU/ml)	5.3×10^4				2.5×10^4			
Pasterized milk(CFU/ml)	2.9×10^3				2.3×10^3			

cheese lot	<i>Streptococcus macedonicus</i> 743		<i>Lactobacillus fermentum</i> 782	
inoculation(%)	1.0%	2.0%	1.0%	2.0%
Raw milk				
Fat(%)	4.60±0.00		4.60±0.00	
Protein(%)	3.18±0.01		3.18±0.01	
Lactose(%)	4.65±0.02		4.65±0.02	
Total solid(%)	13.12±0.01		13.12±0.01	
Pasterized milk				
Fat(%)	4.60±0.00		4.60±0.00	
Protein(%)	3.20±0.01		3.20±0.01	
Lactose(%)	4.66±0.01		4.66±0.01	
Total solid(%)	13.15±0.02		13.15±0.02	
Whey				
Incubation tem. 32°C				
Fat(%)	0.84±0.01	0.78±0.00	0.74±0.01	0.74±0.01
Protein(%)	1.10±0.01	1.00±0.01	0.97±0.01	0.97±0.01
Lactose(%)	4.82±0.00	4.88±0.00	4.88±0.01	4.88±0.01
Total solid(%)	7.47±0.01	7.35±0.01	7.29±0.01	7.29±0.01
Incubation tem. 35°C				
Fat(%)	0.70±0.01	0.72±0.01	0.84±0.01	0.76±0.01
Protein(%)	1.07±0.00	1.04±0.01	0.93±0.01	0.92±0.01
Lactose(%)	4.92±0.01	5.01±0.00	4.75±0.01	4.93±0.01
Total solid(%)	7.42±0.01	7.47±0.00	7.24±0.01	7.30±0.01
Viable bacterial count				
Raw milk(CFU/ml)	2.9 x 10 ⁴		2.9 x 10 ⁴	
Pasterized milk(CFU/ml)	1.5 x 10 ³		1.5 x 10 ³	

두 번째 사용한 원유의 총균수는 2.9×10^4 cfu/ml이었고, 살균유에서는 1.5×10^3 cfu/ml이었다. 치즈 제조시 배출 유청 중의 성분함량을 보면 *Lactobacillus fermentum* 450 균주를 0.5% 접종하고 30°C에서 배양할 때와 *Streptococcus salivarius* O39 균주를 0.1% 접종하고 40°C에서 배양할 때, 또한 *Streptococcus macedonicus* 743 균주와 *Lactobacillus fermentum* 782 균주는 2% 접종하고 32°C에서 배양할 때 총고형분 함량이 가장 적음에 따라 치즈 수율이 높을 것으로 예측되었다.

(2) 제조시간

모짜렐라 치즈의 각 제조단계별 시간은 Table 28에서 보는 바와 같다.

Lactobacillus fermentum 450 균주의 경우 40℃에서 배양하고 2.0% 접종하는 조건에서 490분으로서 가장 시간이 단축된 반면 35℃에서 0.1% 접종하는 조건에서는

Table 28. Time schedule of Mozzarella cheese making

(단위 : min)

Incubation Tem.	Inoculation vol.	Whey TA (0.1-0.12%)도달시간		유청배출 TA (0.17-0.18%)도달시간		퇴적 후 유청 TA (0.6-0.65%)도달시간		총 제조 시간	
		LF450	SSO39	LF450	SSO39	LF450	SSO39	LF450	SSO39
30℃	0.1%	150	118	390	455	620	735	670	785
	0.5%	110	111	360	426	600	696	650	746
	1.0%	80	98	310	363	535	678	585	728
	2.0%	70	95	280	350	485	620	535	670
35℃	0.1%	189	108	494	230	726	410	776	460
	0.5%	197	103	432	240	632	428	682	478
	1.0%	65	100	320	237	455	422	505	472
	2.0%	63	95	383	230	550	410	600	460
40℃	0.1%	86	115	380	245	570	435	620	485
	0.5%	81	97	373	357	583	622	633	672
	1.0%	80	95	323	370	443	600	493	650
	2.0%	75	85	318	270	440	480	490	530

Incubation Tem.	Inoculation vol.	Whey TA (0.1-0.12%)도달시간		유청배출 TA (0.17-0.18%)도달시간		퇴적 후 유청 TA (0.6-0.65%)도달시간		총 제조 시간	
		SM743	LF782	SM743	LF782	SM743	LF782	SM743	LF782
32℃	1.0%	90	93	145	260	361	570	411	620
	2.0%	81	93	134	240	344	535	394	585
35℃	1.0%	80	93	180	203	370	513	420	563
	2.0%	65	91	150	180	347	478	397	528

* LF450; *L. fermentum* 450, SSO39; *S. salivarius* O39, SM743; *S. macedonicus* 743, LF782; *L. fermentum* 782

가장 늦게 776분이 소요됨에 따라 제조시간 단축을 위해서는 40℃에서 1-2% 접종하는 것이 적합한 것으로 나타났다. *Streptococcus salivarius* O39 균주는 35℃에서 배양할 경우 타 온도 및 접종량 조건보다 시간이 단축되는 것으로 나타났으며, 40℃, 30℃ 순으로 시간이 단축됨에 따라 35℃에서 2% 접종하는 것이 적합한 것으

로 나타났다. *Streptococcus macedonicus* 743 균주는 32℃와 35℃에서 배양하는 경우 비슷한 시간이 소요되는 것으로 나타났으며 32℃에서 2% 접종하는 것이 394분으로 제조시간이 가장 단축되었다. *Lactobacillus fermentum* 782 균주는 35℃에서 배양하는 경우가 32℃에서 배양하는 경우보다 시간이 단축되었으며 35℃에서 2% 접종하는 것이 528분으로 제조시간이 가장 단축되었다.

따라서 4 균주 간에는 *Streptococcus macedonicus* 743 균주가 제조시간을 단축시키기 위해선 가장 적합한 것으로 나타났다.

(3) 제조과정 중의 가공적성

(가) *Lactobacillus fermentum* 450

① 스타터 접종 온도 40℃

스타터 접종 온도 40℃에서 접종량 0.1%, 0.5%, 1.0%, 2.0%일 때 유청 적정 산도가 0.1~0.12% 도달 시(Fig. 22), 유청배출 적정산도(0.17~0.18%) 도달 직후(Fig. 23) 및 최종제품(Fig. 24)에 대한 사진은 다음과 같다.

커드를 자를 때 전체적으로 커드의 strength가 약한 경향이 있었으나 유청배출 과정 중에는 스타터 2.0%를 접종한 커드가 가장 상태가 좋았다. 유청배출 직후 커드의 strength는 전체적으로 괜찮았으나 스타터 0.5%를 접종한 커드가 조금 약한 strength를 보였다. 스트레칭 시 전체적으로 스트레칭이 잘 이루어졌으나 스타터 0.5%, 0.1% 접종한 커드보다 스타터 2.0%, 1.0% 접종한 커드가 스트레칭이 더 잘 이루어졌으며, 최종제품의 겉 표면이 매끈하고 윤기가 났다.



Fig. 22. Whey TA 0.1~0.12% 도달 직후 사진
(왼쪽부터 스타터 접종량 0.1%, 0.5%, 1.0%, 2.0%)



Fig. 23. 유청배출 TA(0.17~0.18%) 도달 직후 사진
(왼쪽부터 스타터 접종량 0.1%, 0.5%, 1.0%, 2.0%)



Fig. 24. 최종제품 사진
(왼쪽부터 스타터 접종량 0.1%, 0.5%, 1.0%, 2.0%)

② 스타터 접종 온도 35℃

스타터 접종 온도 35℃에서 접종량 0.1%, 0.5%, 1.0%, 2.0%일 때 유청 적정 산도가 0.1~0.12% 도달 시(Fig. 25), 유청배출 적정산도(0.17~0.18%) 도달 직후(Fig. 26) 및 최종제품(Fig. 27)에 대한 사진은 다음과 같다.



Fig. 25. Whey TA 0.1~0.12% 도달 직후 사진
(왼쪽부터 스타터 접종량 0.1%, 0.5%, 1.0%, 2.0%)



Fig. 26. 유청배출 TA(0.17~0.18%) 도달 직후 사진
(왼쪽부터 스타터 접종량 0.1%, 0.5%, 1.0%, 2.0%)

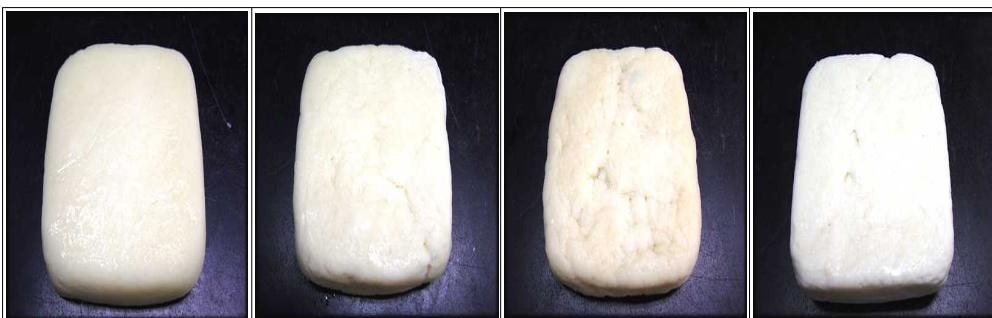


Fig. 27. 최종제품 사진
(왼쪽부터 스타터 접종량 0.1%, 0.5%, 1.0%, 2.0%)

커드를 자를 때 전체적으로 커드의 strength가 약하여 순두부 같은 현상이 나타났으며 유청배출 과정 중에 스타터 0.1%를 접종한 커드에서 탁한 우유 빛의 유청이 배출되었다. 스타터 2.0% 접종한 커드가 스타터 양이 가장 많았음에도 불구하고 유청배출 TA(0.17~0.18%) 도달까지의 시간이 스타터 1.0% 접종한 것보다 오래 걸렸으나 커드의 strength나 성상은 가장 좋았다. 유청배출 직후 커드는 대체적으로 적절한 strength를 나타내었다. 스트레칭 시 전체적으로 스트레칭이 잘 이루어지지 않고 커드가 끊어지는 현상이 나타났으며 스타터 0.1% 접종한 커드는 비교적 스트레칭이 잘 이루어졌다. 또한 스트레칭 시 전체적으로 탁한 우유 빛의 물이 용출되는 것을 관찰할 수 있었다. 최종제품은 탄력성이 떨어지고 겉 표면이 건조하며 단단하게 굳어져 보이고 수율도 다른 제품들에 비해 떨어졌다.

③ 스타터 접종 온도 30℃

스타터 접종 온도 30℃에서 접종량 0.1%, 0.5%, 1.0%, 2.0%일 때 유청 적정산도가 0.1~0.12% 도달 시(Fig. 28), 유청배출 적정산도(0.17~0.18%) 도달 직후(Fig. 29) 및 최종제품(Fig. 30)에 대한 사진은 다음과 같다.

커드를 자를 때 전체적으로 커드의 strength는 약간 약한 정도였으나 비교적 괜찮았다. 유청배출 직후 커드는 전체적으로 모두 적절한 strength를 나타내었으며 유청배출도 잘 이루어졌고 제조시간 또한 비교적 짧고 안정적이었다. 스트레칭 시 전체적으로 스트레칭이 잘 이루어졌으며 최종제품의 표면도 매끈하고 윤기가 나며 탄력성도 적당했다. 수율도 평균 11% 정도로 정상적이었다.

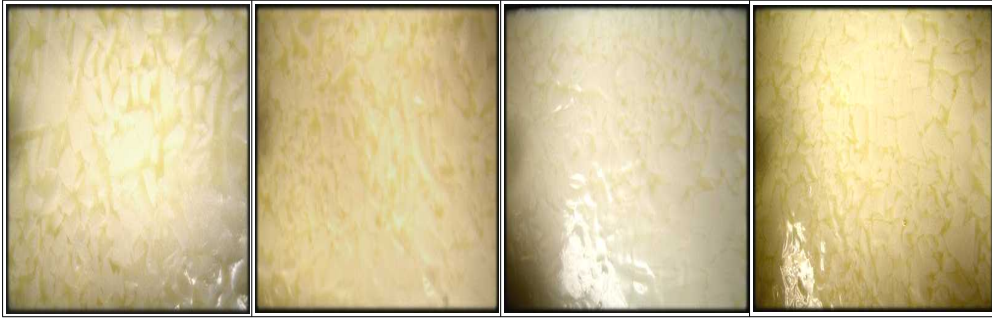


Fig. 28. Whey TA 0.1~0.12% 도달 직후 사진
(왼쪽부터 스타터 접종량 0.1%, 0.5%, 1.0%, 2.0%)



Fig. 29. 유청배출 TA(0.17~0.18%) 도달 직후 사진
(왼쪽부터 스타터 접종량 0.1%, 0.5%, 1.0%, 2.0%)



Fig. 30. 최종제품 사진
(왼쪽부터 스타터 접종량 0.1%, 0.5%, 1.0%, 2.0%)

(나) *Streptococcus salivarius* O39

① 스타터 접종 온도 40℃

스타터 접종 온도 40℃에서 접종량 0.1%, 0.5%, 1.0%, 2.0%일 때 유청 적정 산도가 0.1~0.12% 도달 시(Fig. 31), 유청배출 적정산도(0.17~0.18%) 도달 직후(Fig. 32) 및 최종제품(Fig. 33)에 대한 사진은 다음과 같다.



Fig. 31. Whey TA 0.1~0.12% 도달 직후 사진
(왼쪽부터 스타터 접종량 0.1%, 0.5%, 1.0%, 2.0%)

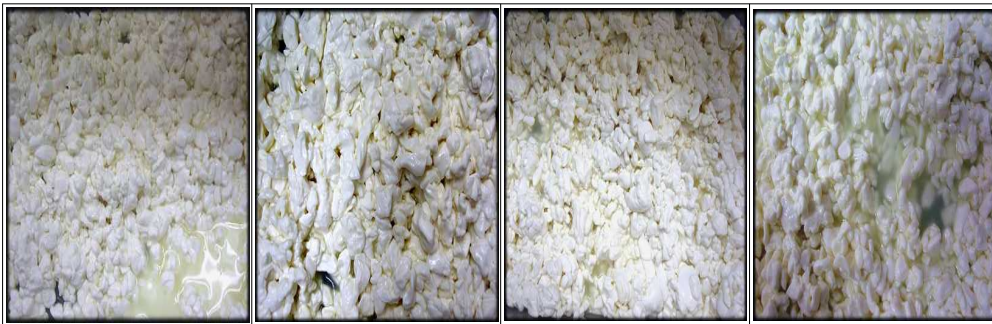


Fig. 32. 유청배출 TA(0.17~0.18%) 도달 직후 사진
(왼쪽부터 스타터 접종량 0.1%, 0.5%, 1.0%, 2.0%)



Fig. 33. 최종제품 사진
(왼쪽부터 스타터 접종량 0.1%, 0.5%, 1.0%, 2.0%)

커드 자를 때 커드의 전체적으로 커드의 strength는 적절하였고 유청 배출도 잘 이루어졌으나 특이적으로 스타터 0.1% 접종한 제품이 스타터 2.0% 접종한 제품보다 제조시간이 약 1시간 정도 적게 걸렸다. 그러나 스타터 0.1% 접종한 제품이 스트레칭을 위해 열수에 넣었을 때 커드가 풀어지며 용해되는 현상이 나타나 스트레칭 단계를 거치지 못하고 결착이 되지 않아 제품으로 만들 수가 없었다. 전반적으로는 스트레칭이 비교적 잘 이루어지지 않았으며 최종제품의 탄력성 또한 떨어지고 단단하였으며 겉 표면도 건조하고 수율 또한 떨어졌다.

② 스타터 접종 온도 35℃

스타터 접종 온도 35℃에서 접종량 0.1%, 0.5%, 1.0%, 2.0%일 때 유청 적정 산도가 0.1~0.12% 도달 시(Fig. 34), 유청배출 적정산도(0.17~0.18%) 도달 직후(Fig. 35) 및 최종제품(Fig. 36)에 대한 사진은 다음과 같다.



Fig. 34. Whey TA 0.1~0.12% 도달 직후 사진
(왼쪽부터 스타터 접종량 0.1%, 0.5%, 1.0%, 2.0%)



Fig. 35. 유청배출 TA(0.17~0.18%) 도달 직후 사진
(왼쪽부터 스타터 접종량 0.1%, 0.5%, 1.0%, 2.0%)



Fig. 36. 최종제품 사진
(왼쪽부터 스타터 접종량 0.1%, 0.5%, 1.0%, 2.0%)

커드 자를 때 커드의 strength는 적절하였으나 유청 배출시 커드의 strength가 다소 약하여 부서지는 현상이 나타났으며, 특이적으로 전체적인 제조 시간이 비슷하게

나타났다. 스트레칭은 전체적으로 잘 되었으며 최종제품의 탄력성은 좋았고 겉 표면 또한 매끈하고 윤기가 나고 수율 또한 스타터 2.0% 접종한 제품을 제외하고는 비교적 좋았다.

③ 스타터 접종 온도 30℃

스타터 접종 온도 30℃에서 접종량 0.1%, 0.5%, 1.0%, 2.0%일 때 유청 적정 산도가 0.1~0.12% 도달 시(Fig. 37), 유청배출 적정산도(0.17~0.18%) 도달 직후(Fig. 38) 및 최종제품(Fig. 39)에 대한 사진은 다음과 같다.

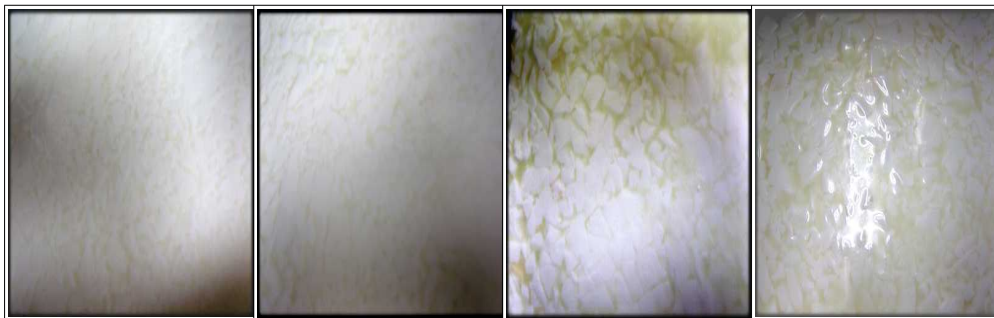


Fig. 37. Whey TA 0.1~0.12% 도달 직후 사진
(왼쪽부터 스타터 접종량 0.1%, 0.5%, 1.0%, 2.0%)



Fig. 38. 유청배출 TA(0.17~0.18%) 도달 직후 사진
(왼쪽부터 스타터 접종량 0.1%, 0.5%, 1.0%, 2.0%)



Fig. 39. 최종제품 사진
(왼쪽부터 스타터 접종량 0.1%, 0.5%, 1.0%, 2.0%)

커드를 자를 때 커드의 strength는 조금 약한 정도였으며 유청 배출은 잘 이루어졌다. 유청 배출 후 커드의 strength는 적절하였고 스트레칭 시 스타터 2.0% 접종한 제품은 스트레칭이 비교적 잘 이루어졌으나 스타터 1.0%, 0.5% 접종한 제품은 스트레칭이 잘 되지 않았으며 0.1% 접종한 제품은 그 보다는 스트레칭이 잘 이루어졌다. 최종제품은 스타터 2.0%와 0.1% 접종한 제품을 제외하고는 탄력성이 떨어져 단단하고 겉 표면도 건조하였다. 수율은 스타터 2.0% 접종한 제품을 제외하고는 좋지 않았다.

(다) *Streptococcus macedonicus* 743

스타터 접종 온도 32℃와 35℃에서 접종량 1.0%, 2.0%일 때 유청 적정산도가 0.1~0.12% 도달 시(Fig. 40), 유청배출 적정산도(0.17~0.18%) 도달 직후(Fig. 41) 및 최종제품(Fig. 42)에 대한 사진은 다음과 같다.

커드를 자를 때 커드의 strength는 전 조건에서 모두 적당하였으며, 유청 배출 또한 잘 이루어졌다. 유청 배출 후 커드의 strength는 적절하였으나 스트레칭 시 초기에 끊어지는 현상이 나타났으나 비교적 잘 이루어졌고, 35℃에서 스타터를 배양한 제품보다는 32℃에서 스타터를 배양한 제품이 더 잘 이루어졌다. 최종제품 또한 32℃에서 스타터를 배양한 제품이 탄력성과 제품의 외형 면에서 조금 더 나았다. 수율은 전제품에서 비교적 좋은 결과가 나타났다.



Fig. 40. Whey TA 0.1~0.12% 도달 직후 사진
(왼쪽부터 스타터 접종량 32°C-1.0%, 2.0%, 35°C-1.0%, 2.0%)



Fig. 41. 유청배출 TA(0.17~0.18%) 도달 직후 사진
(왼쪽부터 스타터 접종량 32°C-1.0%, 2.0%, 35°C-1.0%, 2.0%)

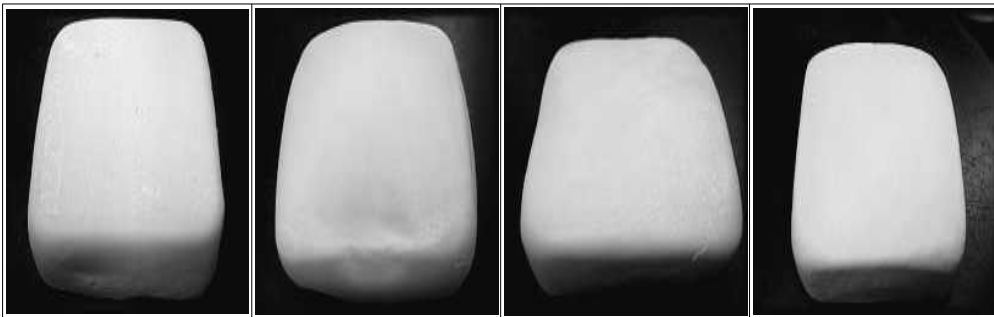


Fig. 42. 최종제품 사진
(왼쪽부터 스타터 접종량 32°C-1.0%, 2.0%, 35°C-1.0%, 2.0%)

(라) *Lactobacillus fermentum* 782

스타터 접종 온도 32°C와 35°C에서 접종량 1.0%, 2.0%일 때 유청 적정산도가 0.1~0.12% 도달 시(Fig. 43), 유청배출 적정산도(0.17~0.18%) 도달 직후(Fig. 44) 및 최종제품(Fig. 45)에 대한 사진은 다음과 같다.



Fig. 43. Whey TA 0.1~0.12% 도달 직후 사진
(왼쪽부터 스타터 접종량 32°C-1.0%, 2.0%, 35°C-1.0%, 2.0%)



Fig. 44. 유청배출 TA(0.17~0.18%) 도달 직후 사진
(왼쪽부터 스타터 접종량 32°C-1.0%, 2.0%, 35°C-1.0%, 2.0%)

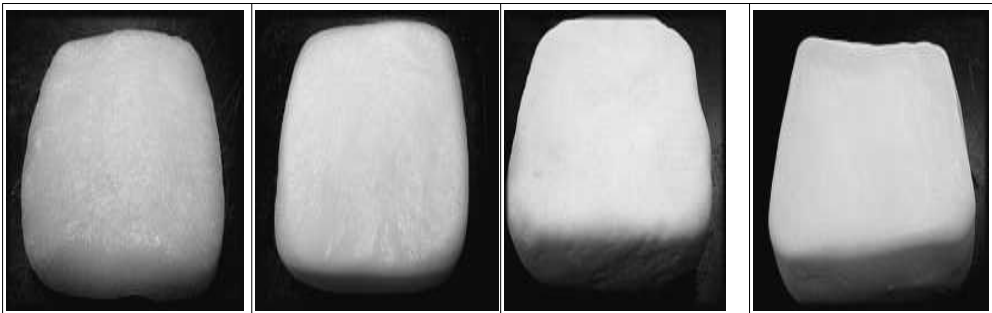


Fig. 45. 최종제품 사진
(왼쪽부터 스타터 접종량 32°C-1.0%, 2.0%, 35°C-1.0%, 2.0%)

커드를 자를 때 커드의 strength는 35°C에서 스타터 2.0%를 접종한 것을 제외하는 조금 약한 정도였으며 유청 배출은 잘 이루어졌다. 유청 배출 후 커드의 strength는 적절하였으나 32°C에서 스타터 1.0% 접종한 제품은 스트레칭 시 커드가 약간 풀어지는 현상이 나타났고, 35°C에서 스타터 2.0% 접종한 제품을 제외하고는 끊어지는 현상이 나타나 스트레칭이 잘 되지 않았다. 최종제품은 탄력성이 떨어져 단단하고 겉 표면도 건조하였다. 수율은 35°C에서 스타터 2.0% 접종한 제품을 제외하고는 비

교적 낮게 나타났다.

(4) 제조과정 중의 젖산균수 변화

모짜렐라 치즈 제조과정 중의 젖산균 수 변화를 보면 다음 표 29와 같다.

L. fermentum 450 균주는 스타터 첨가 시 10^6 cfu/ml, cutting전 커드에서는 10^7 cfu/g 이었고, 가온 후 커드에서는 10^9 cfu/g이었으며, 최종제품에서는 10^7 cfu/ml을 나타내었다. 반면 *S. salivarius* O39 균주는 스타터 첨가 시 10^7 cfu/ml, cutting전 커드에서는 10^8 cfu/g이었고, 가온 후 커드에서는 10^8 cfu/g이었으며, 최종제품에서는 10^7 cfu/g을 나타내었다. *S. macedonicus* 743 균주는 스타터 첨가 시 10^6 cfu/ml, cutting전 커드에서는 10^7 cfu/g이었고, 가온 후 커드에서는 10^8 cfu/g이었으며, 최종제품에서는 10^7 cfu/ml을 나타내었다. *L. fermentum* 782 균주는 스타터 첨가 시 10^6 cfu/ml, cutting전 커드에서는 10^7 cfu/g이었고, 가온 후 커드에서는 10^8 cfu/g이었으며, 최종제품에서는 10^7 cfu/ml을 나타내었다. 따라서 처음 접종 시 *S. salivarius* O39 균주의 양이 1 log 값 정도 많았으나 점차 줄어들어 가온 후 커드 상태에서는 오히려 *L. fermentum* 450 균주의 양이 많았다. 최종 제품에서의 젖산균수가 가장 많은 조건은 *L. fermentum* 450 균주의 경우 2% 접종하고 40℃에서 배양할 경우이었으며, *S. salivarius* O39 균주는 2% 접종하고 30℃와 35℃ 배양하는 경우, *S. macedonicus* 743균주는 2% 접종하고 32℃ 배양하는 경우이었으며, *L. fermentum* 782 균주 또한 2% 접종하고 32℃ 배양하는 경우로 나타났다.

표 29. 제조과정 중의 젖산균수 변화

Incubation Tem.	Inoculation vol.	스타터 첨가 시(cfu/ml)				cutting 전 커드(cfu/g)			
		LF450 ¹⁾	SSO39	SM743 ²⁾	LF782 ²⁾	LF450	SSO39	SM743 ²⁾	LF782 ²⁾
30℃	0.1%	1.2×10^6	1.9×10^7	-	-	1.8×10^7	4.8×10^7	-	-
	0.5%	5.0×10^6	5.1×10^7	-	-	2.8×10^7	7.1×10^7	-	-
	1.0%	8.9×10^6	9.6×10^7	6.9×10^6	8.0×10^6	3.9×10^7	3.8×10^8	4.1×10^7	3.8×10^8
	2.0%	1.7×10^7	1.3×10^8	2.3×10^7	2.8×10^7	8.7×10^7	5.5×10^8	8.9×10^7	9.6×10^7
35℃	0.1%	8.2×10^5	1.2×10^7	-	-	6.9×10^6	1.4×10^8	-	-
	0.5%	3.7×10^6	2.8×10^7	-	-	9.7×10^6	2.2×10^8	-	-
	1.0%	6.5×10^6	9.5×10^7	5.8×10^6	7.4×10^6	4.2×10^7	3.6×10^8	3.5×10^7	5.1×10^7
	2.0%	1.2×10^7	1.4×10^8	2.4×10^7	2.6×10^7	6.2×10^7	5.2×10^8	9.8×10^7	1.2×10^8
40℃	0.1%	7.1×10^5	4.2×10^7	-	-	6.5×10^6	1.9×10^8	-	-
	0.5%	1.2×10^6	8.2×10^7	-	-	7.5×10^7	3.4×10^8	-	-
	1.0%	4.4×10^6	9.4×10^7	-	-	5.2×10^7	5.7×10^8	-	-
	2.0%	9.2×10^6	1.1×10^8	-	-	3.0×10^9	9.5×10^8	-	-

Incubation Tem.	Inoculation vol.	가운 후 커드(cfu/g)				최종제품(cfu/g)			
		LF450 ¹⁾	SSO39	SM743 ²⁾	LF782 ²⁾	LF450	SSO39	SM743 ²⁾	LF782 ²⁾
30°C	0.1%	2.9x10 ⁹	1.0x10 ⁹	-	-	3.8x10 ⁷	4.2x10 ⁷	-	-
	0.5%	2.5x10 ⁹	9.5x10 ⁸	-	-	3.7x10 ⁷	4.5x10 ⁷	-	-
	1.0%	2.4x10 ⁹	8.0x10 ⁸	9.4x10 ⁸	1.8x10 ⁹	4.7x10 ⁷	6.2x10 ⁷	5.1x10 ⁷	2.9x10 ⁷
	2.0%	1.6x10 ⁹	6.2x10 ⁸	1.0x10 ⁹	2.9x10 ⁹	5.6x10 ⁷	8.5x10 ⁷	8.6x10 ⁷	7.4x10 ⁷
35°C	0.1%	2.2x10 ⁹	1.9x10 ⁹	-	-	2.8x10 ⁷	5.2x10 ⁷	-	-
	0.5%	1.5x10 ⁹	1.7x10 ⁹	-	-	3.7x10 ⁷	5.5x10 ⁷	-	-
	1.0%	1.3x10 ⁹	1.3x10 ⁹	1.3x10 ⁹	4.5x10 ⁹	4.9x10 ⁷	7.3x10 ⁷	6.0x10 ⁷	9.5x10 ⁸
	2.0%	1.2x10 ⁹	1.3x10 ⁹	3.1x10 ⁹	3.4x10 ⁹	6.2x10 ⁷	8.4x10 ⁷	7.7x10 ⁷	2.3x10 ⁷
40°C	0.1%	1.6x10 ⁹	2.4x10 ⁹	-	-	5.3x10 ⁷	4.4x10 ⁷	-	-
	0.5%	2.7x10 ⁹	1.9x10 ⁹	-	-	6.6x10 ⁷	4.6x10 ⁷	-	-
	1.0%	4.7x10 ⁹	1.5x10 ⁹	-	-	7.9x10 ⁷	6.7x10 ⁷	-	-
	2.0%	8.8x10 ⁹	1.4x10 ⁹	-	-	9.4x10 ⁷	7.5x10 ⁷	-	-

¹⁾ LF450; *L. fermentum* 450, SSO39; *S. salivarius* O39, SM743; *S. macedonicus* 743, LF782; *L. fermentum* 782

²⁾ *S. macedonicus* 743, *L. fermentum* 782 균주로 제조된 치즈는 32°C, 35°C에서 1.0%, 2.0% 만 제조하였음

(5) 최종 제품의 총고형분

모짜렐라 치즈의 총고형분 및 수율을 보면 다음 표 30~31과 같다.

표 30. 모짜렐라 치즈의 총고형분

Incubation Tem.	Inoculation vol.	<i>L. fermentum</i> 450	<i>S. salivarius</i> O39	<i>S. macedonicus</i> 743*	<i>L. fermentum</i> 782*
30°C	0.1%	51.51±0.00 ^c	51.30±0.03 ^d	-	-
	0.5%	50.30±0.00 ^d	56.42±0.05 ^a	-	-
	1.0%	54.81±0.01 ^a	54.47±0.05 ^b	46.31±0.03 ^a	51.67±0.01 ^c
	2.0%	53.77±0.02 ^b	51.04±0.03 ^d	45.25±0.03 ^b	49.90±0.06 ^c
35°C	0.1%	54.87±0.00 ^a	46.50±0.01 ^e	-	-
	0.5%	52.08±0.00 ^c	53.98±0.00 ^c	-	-
	1.0%	54.20±0.05 ^a	47.93±0.04 ^e	46.84±0.10 ^c	47.38±0.02 ^a
	2.0%	52.92±0.01 ^b	44.58±0.01 ^f	45.37±0.06 ^d	46.53±0.04 ^b
40°C	0.1%	52.32±0.02 ^b	-	-	-
	0.5%	51.20±0.00 ^c	54.53±0.00 ^b	-	-
	1.0%	50.11±0.01 ^d	52.89±0.03 ^c	-	-
	2.0%	50.58±0.05 ^d	51.85±0.04 ^d	-	-

* *S. macedonicus* 743, *L. fermentum* 782 균주로 제조된 치즈는 32°C, 35°C에서 1.0%, 2.0%만 제조하였음

각 균주 별 유의차 검정(p<0.05)

표 31. 모짜렐라 치즈의 수율

Incubation Tem.	Inoculation vol.	<i>L.fermentum</i> 450	<i>S.salivarius</i> O39	<i>S.macedonicus</i> 743*	<i>L.fermentum</i> 782*
30℃	0.1%	11.78	10.08	-	-
	0.5%	11.12	9.03	-	-
	1.0%	11.12	10.41	10.04	9.74
	2.0%	11.41	11.83	10.87	9.82
35℃	0.1%	8.13	10.37	-	-
	0.5%	9.08	11.39	-	-
	1.0%	11.37	10.81	10.15	9.12
	2.0%	8.49	9.57	10.47	10.26
40℃	0.1%	10.68	0.11	-	-
	0.5%	10.42	8.67	-	-
	1.0%	11.16	8.96	-	-
	2.0%	12.35	8.44	-	-

* *S.macedonicus* 743, *L.fermentum* 782 균주로 제조된 치즈는 32℃, 35℃에서 1.0%, 2.0% 만 제조하였음

일반적으로 총고형분 함량이 높으면 수율이 낮아지는 경향이 있으며, 조직감에 많은 영향을 미치는 것으로 나타났다. 전반적으로 총고형분이 50% 전후에서 조직감과 윤기가 있었으며, 고형분 함량이 증가할수록 윤기가 떨어지고 잘 늘어나는 성질이 떨어지며, 딱딱하였다. *L.fermentum* 450 균주는 1~2% 접종하고 40℃에서 배양 시 적합하였으며, *S.salivarius* O39 균주는 0.1~1% 접종하고 35℃에서 배양 시 적합하였다. 또한 *S.macedonicus* 743 균주는 큰 차이는 나타나지 않았으나 1~2% 접종하고 32℃에서 배양 시 적합하였으며, *L.fermentum* 782 균주는 1% 접종하고 35℃에서 배양 시 적합한 것으로 나타났다. 따라서 4 균주 중 *macedonicus* 743 균주를 1~2% 접종하고 32℃에서 배양하는 것이 고형분 함량이 가장 낮은 것으로 나타났다.

(6) 최종제품의 면역증진

모짜렐라 치즈의 면역증진 결과를 보면 다음 표 32와 같다.

표 32. 모짜렐라 치즈의 면역증진

Incubation Tem.	Inoculation vol.	sample content (ug/ml)	TNF(pg/ml)			
			<i>L. fermentum</i>	<i>S. salivarius</i>	<i>S.macedonicus</i>	<i>L. fermentum</i>
			450	O39	743	782
30℃	0.1%	1000	1953.66±23.26 ^b	1298.50±24.20 ^d	-	-
		100	645.37±15.38 ^b	598.85±5.81 ^b	-	-
	0.5%	1000	1046.52±46.52 ^e	1085.28±35.53 ^e	-	-
		100	424.30±0.00 ^c	567.84±18.69 ^c	-	-
	1.0%	1000	1116.30±23.26 ^d	1314.01±34.89 ^d	>2000 ^a	1472.10±25.31 ^b
		100	414.61±8.87 ^c	316.81±7.68 ^c	741.22±29.75 ^b	434.74±16.94 ^a
	2.0%	1000	>2000 ^a	1469.07±37.38 ^c	>2000 ^a	1532.38±17.54 ^a
		100	829.51±17.76 ^a	412.68±5.81 ^d	946.38±18.32 ^a	435.12±21.95 ^a
35℃	0.1%	1000	633.74±5.81 ^g	1833.48±24.20 ^b	-	-
		100	167.68±1.68 ^f	318.75±4.43 ^e	-	-
	0.5%	1000	511.45±15.37 ⁱ	>2000 ^a	-	-
		100	335.21±20.40 ^d	589.16±13.42 ^b	-	-
	1.0%	1000	585.28±13.42 ^h	>2000 ^a	>2000 ^a	1204.82±6.54 ^c
		100	294.54±6.70 ^e	579.47±8.88 ^{bc}	582.32±26.04 ^c	401.22±15.27 ^b
	2.0%	1000	1093.04±23.26 ^d	>2000 ^a	>2000 ^a	1490.00±21.90 ^b
		100	301.32±6.04 ^e	910.92±24.20 ^a	764.10±11.00 ^b	435.86±9.54 ^a
40℃	0.1%	1000	318.75±4.43 ^j	1320.38±23.17 ^d	-	-
		100	161.86±4.44 ^f	424.30±12.10 ^b	-	-
	0.5%	1000	891.54±6.71 ^f	1976.80±37.38 ^a	-	-
		100	292.60±12.09 ^e	320.68±4.42 ^f	-	-
	1.0%	1000	556.21±12.10 ^h	1492.33±40.18 ^c	-	-
		100	407.83±1.67 ^c	224.56±4.43 ^e	-	-
	2.0%	1000	1348.90±23.26 ^c	1976.86±24.10 ^a	-	-
		100	292.60±8.87 ^e	591.10±0.00 ^d	-	-

Incubation Tem.	Inoculation vol.	sample content (ug/ml)	IL-1a(pg/ml)			
			<i>L. fermentum</i>	<i>S. salivarius</i>	<i>S.macedonicus</i>	<i>L. fermentum</i>
			450	O39	743	782
30°C	0.1%	1000	505.56±9.62 ^d	281.93±8.67 ^e	-	-
		100	94.74±2.75 ^{cde}	81.91±0.60 ^h	-	-
	0.5%	1000	575.02±30.05 ^c	483.24±12.50 ^c	-	-
		100	99.59±1.59 ^{bc}	97.51±1.59 ^c	-	-
	1.0%	1000	569.46±17.35 ^c	713.93±31.56 ^a	743.38±18.34 ^b	834.23±19.57 ^a
		100	98.21±2.16 ^{bcd}	110.69±2.16 ^a	126.64±51.82 ^{ab}	138.44±17.43 ^a
	2.0%	1000	569.46±17.35 ^c	563.90±17.35 ^b	815.24±36.53 ^a	803.12±25.39 ^a
		100	98.21±4.20 ^{bcd}	102.37±1.59 ^b	141.26±28.07 ^a	153.28±9.14 ^a
35°C	0.1%	1000	451.31±8.67 ^e	433.26±13.39 ^d	-	-
		100	91.27±3.34 ^e	97.58±1.59 ^{gh}	-	-
	0.5%	1000	666.70±16.67 ^a	395.78±4.81 ^{de}	-	-
		100	109.99±1.59 ^a	92.66±2.16 ^{ef}	-	-
	1.0%	1000	575.02±22.05 ^c	413.82±4.17 ^d	602.76±24.90 ^c	691.42±4.98 ^c
		100	93.35±4.20 ^{de}	91.97±1.04 ^{de}	98.36±19.34 ^c	91.54±13.20 ^b
	2.0%	1000	513.89±12.73 ^d	381.89±8.33 ^{de}	613.12±27.44 ^c	702.68±15.06 ^b
		100	91.62±2.08 ^e	82.95±2.13 ^c	104.82±11.24 ^b	89.20±11.19 ^b
40°C	0.1%	1000	448.53±8.67 ^e	445.76±11.02 ^{cd}	-	-
		100	85.38±2.08 ^f	85.38±1.04 ^g	-	-
	0.5%	1000	513.89±12.73 ^d	415.21±28.80 ^{cd}	-	-
		100	90.58±3.12 ^e	88.85±3.18 ^f	-	-
	1.0%	1000	661.14±2.16 ^a	569.46±17.35 ^b	-	-
		100	106.87±12.73 ^a	98.90±2.75 ^c	-	-
	2.0%	1000	613.91±17.35 ^b	484.63±1.048 ^c	-	-
		100	100.98±3.12 ^b	95.78±1.04 ^{cd}	-	-

Incubation Tem.	Inoculation vol.	sample content (ug/ml)	질소종(μM)			
			<i>L.fermentum</i>	<i>S. salivarius</i>	<i>S.macedonicus</i>	<i>L.fermentum</i>
			450	O39	743	782
30°C	0.1%	1000	1.84±0.07 ^d	1.81±0.09 ^e	-	-
		100	-	-	-	-
	0.5%	1000	1.61±0.05 ^e	0.96±0.06 ^g	-	-
		100	-	-	-	-
	1.0%	1000	2.00±0.02 ^c	1.85±0.08 ^e	8.31±1.92 ^c	10.83±1.64 ^a
		100	-	-	-	-
2.0%	1000	2.66±0.05 ^a	2.51±0.05 ^b	15.76±1.03 ^a	11.24±2.01 ^a	
	100	-	-	-	-	
35°C	0.1%	1000	2.01±0.03 ^c	1.68±0.04 ^f	-	-
		100	-	-	-	-
	0.5%	1000	1.55±0.45 ^e	2.07±0.07 ^d	-	-
		100	-	-	-	-
	1.0%	1000	1.99±0.05 ^{cd}	1.82±0.45 ^e	8.67±2.09 ^c	6.17±1.37 ^c
		100	-	-	-	-
2.0%	1000	2.68±0.03 ^a	2.42±0.21 ^c	10.17±1.74 ^b	7.69±0.61 ^b	
	100	-	-	-	-	
40°C	0.1%	1000	1.33±0.13 ^f	2.46±0.12 ^c	-	-
		100	-	-	-	-
	0.5%	1000	2.45±0.03 ^b	1.81±0.05 ^e	-	-
		100	-	-	-	-
	1.0%	1000	2.04±0.09 ^c	2.09±0.04 ^d	-	-
		100	-	-	-	-
2.0%	1000	2.41±0.02 ^b	2.78±0.05 ^a	-	-	
	100	-	-	-	-	

주) * 시료량 1000ug/ml : 배양온도 및 접종량 별 유의차 검정

** 시료량 100ug/ml : 배양온도 및 접종량 별 유의차 검정

L. fermentum 450 균주 2.0% 접종하고 30°C로 배양하여 제조된 치즈에서 시료농도가 1,000ug/ml일 때 TNF 값이 2,000 pg/ml 이상을 나타낸 반면 *S. salivarius* O39 균주 0.5~2.0% 접종하고 35°C로 배양하여 제조된 치즈에서 2,000 pg/ml 이상을 나타내었다. *S. macedonicus* 743 균주는 시료농도가 1,000 ug/ml일 때 전 조건에서 TNF 값이 2,000 pg/ml 이상을 나타내었으며, *L. fermentum* 782 균주 2.0% 접종하고 30°C에서 배양하여 제조된 치즈에서 1532 pg/ml을 나타내었다. IL-1α 값은 *L. fermentum* 450 균주 0.5% 접종하고 35°C로 배양하여 제조된 치즈와 1.0~2.0% 접종하고 40°C로 배양하여 제조된 치즈에서 600pg/ml 이상의 값을 나타내었다. 반면 *S. salivarius* O39 균주 1.0% 접종하고 30°C로 배양하여 제조된 치즈에서 713.93

pg/ml을 나타내었다. *S. macedonicus* 743 균주 2.0% 접종하고 32℃ 접종하여 제조된 치즈에서 815 pg/ml로 가장 높은 값을 나타낸 반면, *L. fermentum* 782 균주 1.0~2.0% 접종하고 32℃에서 접종하여 제조된 치즈에서 800 pg/ml 이상으로 높은 값을 나타내었다. NO 값은 전반적으로 낮은 값을 보였는데, *L. fermentum* 450 균주 2.0% 접종하고 35℃로 배양하여 제조된 치즈에서 2.68μM인 반면 *S. salivarius* O39 균주 2.0% 접종하고 40℃로 배양하여 제조된 치즈에서 2.78μM의 값이 나타났다. 또한 *S. macedonicus* 743 균주 2.0% 접종하고 32℃에서 접종하여 제조된 치즈에서 15.76μM으로 가장 높은 값을 나타내었고, *L. fermentum* 782 균주 1.0~2.0% 접종하고 32℃에서 접종하여 제조된 치즈에서 10μM 이상으로 비교적 높은 값을 나타내었다.

6. 제조공정 설정

제조시간, 가공적성, 면역능력 등을 감안하여 볼 때 *Streptococcus macedonicus* 743 균주로 제조된 모짜렐라 치즈가 가장 우수함에 따라 다음과 같이 제조공정을 설정하였다. 원유를 살균(63℃/30분 또는 72~73℃/15초)하고 32℃로 냉각한 다음 젖산균을 2% 접종하며, 30분간 교반한 후 렌넷 230μl/Kg 첨가한 다음 4~5분간 교반하였다. 염화칼슘을 원유에 대해 약 0.01~0.02%첨가하고 25~35분간 정치하여 커드를 형성시켰다.

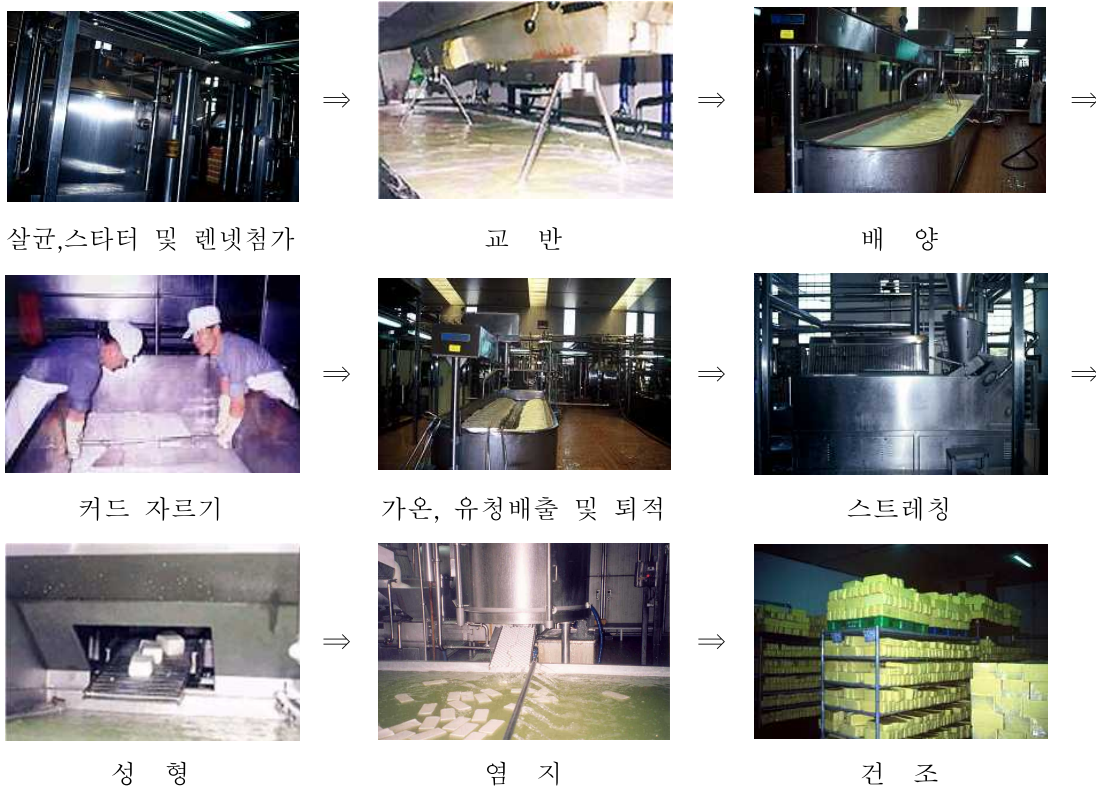


그림 46. 모짜렐라 치즈 제조공정

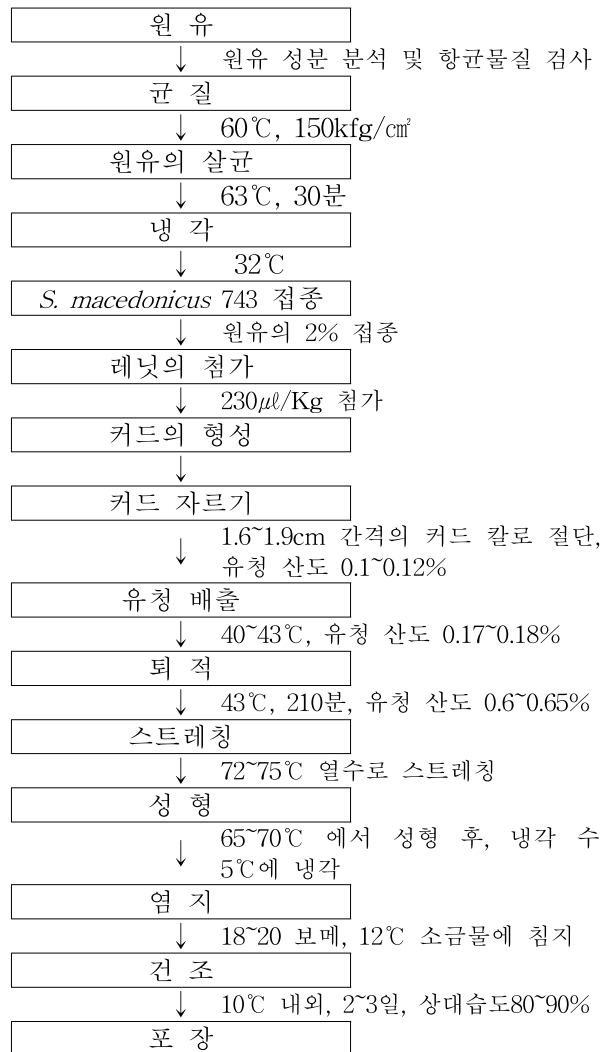


그림 47. *Streptococcus macedonicus* 743 균주로 제조된 모짜렐라 치즈 제조과정

유청의 적정산도가 0.1~0.12%일 때(약 81분 소요) 커드를 자르고 가운데 유청은 43°C까지 상승시켰다. 53분 정도 교반하면서 유청산도가 0.17~0.18%가 되면 유청을 배출하였고 43°C에서 210분 동안 퇴적시켜 응집된 커드에서 용출되는 유청산도가 0.6~0.65%가 되게 한 다음 72~75°C의 열수로 스트레칭과 65~70°C에서 성형한 후 5°C로 냉각하였다. 염지는 염농도가 18~20보메, 온도는 12°C, 염지시간은 20분정도로 하였으며, 건조 시 상대습도는 80~90%, 온도 및 시간은 10°C/2~3일로 하였다.

7. 이화학적 특성 조사

가. 타제품과의 면역증진 비교

표 33에서 보는 바와 같이 *S. macedonicus* 743 균주로 제조된 모짜렐라 치즈와 상업용 스타터로 제조된 모짜렐라 치즈와의 면역활성능을 비교한 결과 시중제품 및 외국제품에 비해 면역분비능이 높은 것으로 나타났으며, *S. macedonicus* LC743 균주를 상업균주와 혼합하여도 면역활성능이 우수한 것으로 나타났다.

Table 33. The comparison of immunomodulating activity of Mozzarella cheese manufactured by selected and commercial strains

Sample	TNF- α (pg/ml)	IL-1 α (pg/ml)	NO(uM)
TCC-3*	1518.33 \pm 116.81 ^c	186.39 \pm 17.50 ^d	3.22 \pm 0.83 ^d
<i>S. macedonicus</i> 743	>2000 ^a	743.38 \pm 8.77 ^a	8.31 \pm 1.92 ^a
<i>S. macedonicus</i> 743 + TCC-3*	1820.00 \pm 38.41 ^b	535.82 \pm 5.49 ^b	8.70 \pm 0.04 ^a
상하 후레쉬 모짜렐라	1181.46 \pm 10.01 ^e	83.53 \pm 10.60 ^e	4.97 \pm 1.22 ^c
서울우유 피자치즈	1829.02 \pm 15.68 ^b	98.33 \pm 4.70 ^e	5.75 \pm 0.37 ^{bc}
임실 피자치즈	>2000 ^a	481.18 \pm 29.25 ^c	6.08 \pm 0.21 ^b
덴마크 모짜렐라	1200.88 \pm 18.90 ^e	171.61 \pm 16.15 ^d	5.97 \pm 0.08 ^b
상하슈레드(뉴질랜드산)	1392.71 \pm 27.83 ^d	96.51 \pm 7.55 ^e	4.77 \pm 0.15 ^c

* 상업균주(FD-DVS TCC-3 : *Lactobacillus bulgaricus*와 *Streptococcus thermophilus*로 구성된 혼합균주, CHR.HANSEN A/S) ($p < 0.05$)

나. 이화학적 특성 비교

(1) 일반성분

최종제품의 수분함량은 B 제품이 53.16%로서 가장 높았으며, A와 C제품에 비해 유의차가 있었으며, 단백질 함량은 유의차는 없었지만 B제품이 높았다. 그러나 지방 함량은 C제품이 가장 높은 것으로 나타났다.

Table 34. chemical composition of cheese

Cheese	moisture(%)	protein(%)	fat(%)
A	51.45±0.42 ^b	23.64±0.40 ^a	23.06±0.36 ^b
B	53.16±0.10 ^a	26.42±0.39 ^a	20.52±0.38 ^c
C	50.75±0.68 ^b	24.43±0.35 ^a	24.64±0.57 ^a

A : 상업균주(FD-DVS TCC-3 : *Lactobacillus bulgaricus*와 *Streptococcus thermophilus*로 구성된 혼합균주, CHR.HANSEN A/S) 로 제조된 치즈

B : *Streptococcus macedonicus* 743로 제조된 치즈

C : 상업균주 + *Streptococcus macedonicus* 743 균주로 제조된 치즈

(2) pH, 적정산도 및 젖산균수

C 제품은 젖산균 증식이 높고 산 생성이 다른 제품에 비해 높기 때문에 pH 값이 가장 낮고 적정산도는 높은 결과를 얻은 반면 B제품은 가장 낮은 결과를 얻었다.

Table 35. pH, TA and count of lactic acid bacteria in cheese

Cheese	pH	Titratable acidity (%)	Lactic acid bacteria(cfu/g)
A	4.7	0.68	5.7x10 ⁷
B	4.9	0.65	5.1x10 ⁷
C	4.6	0.72	6.0x10 ⁷

A : 상업균주(FD-DVS TCC-3 : *Lactobacillus bulgaricus*와 *Streptococcus thermophilus*로 구성된 혼합균주, CHR.HANSEN A/S) 로 제조된 치즈

B : *Streptococcus macedonicus* 743로 제조된 치즈

C : 상업균주 + *Streptococcus macedonicus* 743 균주로 제조된 치즈

(3) 질소화합물 정량

각 치즈에 존재하는 질소화합물을 분석한 결과는 Table 36에서 보는 바와 같다. 수용성질소화합물과 아미노태질소화합물의 경우 A제품이 0.479%와 0.08mg/g로서 B, C 제품에 비해 유의성이 있는 반면, 비단백태질소화합물은 B제품이 0.051%로서 유의성을 보였다.

Table 36. Nitrogen composition of cheese

Cheese	수용성질소화합물 (%N)	비단백태질소화합물 (%N)	아미노태질소화합물 (Nmg/g)
A	0.479±0.01 ^a	0.030±0.00 ^b	0.080±0.00 ^a
B	0.384±0.02 ^b	0.051±0.00 ^a	0.060±0.00 ^c
C	0.404±0.01 ^b	0.036±0.00 ^b	0.069±0.00 ^b

A : 상업균주(FD-DVS TCC-3 : *Lactobacillus bulgaricus*와 *Streptococcus thermophilus*로 구성된 혼합균주, CHR.HANSEN A/S) 로 제조된 치즈

B : *Streptococcus macedonicus* 743로 제조된 치즈

C : 상업균주+ *Streptococcus macedonicus* 743 균주로 제조된 치즈

(4) Cheese casein의 전기영동

polyacrylamide gel 전기영동에 의해 조사한 절단 전 커드와 모짜렐라 치즈 casein의 변화는 Fig. 48에서 보는 바와 같다.

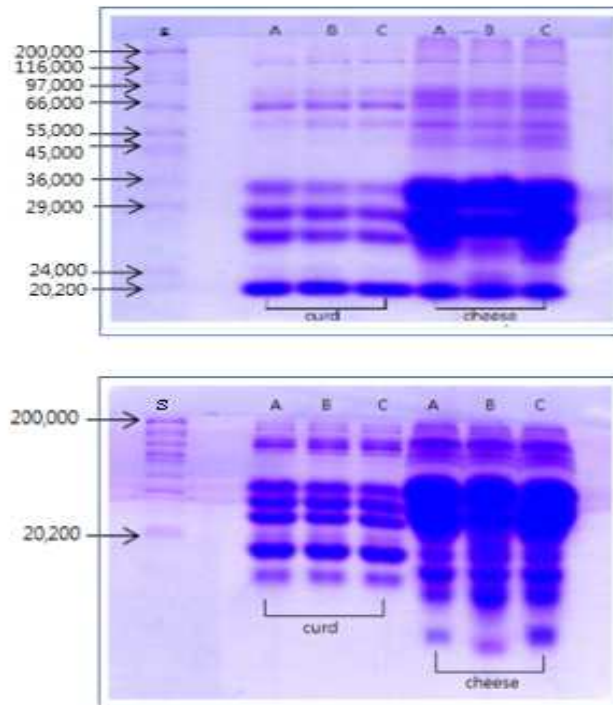


Fig. 48. Electrophoretic patterns of milk protein in curd before cutting and cheese on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis

S: molecular weight standard,

A : 상업균주(FD-DVS TCC-3 : *Lactobacillus bulgaricus*와 *Streptococcus thermophilus*로 구성된 혼합균주, CHR.HANSEN A/S) 로 제조된 치즈

B : *Streptococcus macedonicus* 743로 제조된 치즈

C : 상업균주 + *Streptococcus macedonicus* 743 균주로 제조된 치즈

젖산균 종류별로 제조된 절단전 커드와 치즈에서 α_{s1} -casein 및 β -casein은 거의 영향을 받지 않았는데, 이는 숙성치즈가 아니기 때문에 분해가 일어나지 않은 것으로 보인다.

(5) 아미노산 분석

(가) 구성아미노산

각 cheese에 존재하는 구성아미노산을 분석한 결과는 Table 37과 같다. 구성 아미노산은 B제품이 32,396.37mg%로서 가장 많은 양의 아미노산을 함유하고 있었고 A와 B 제품이 각각 29,145.31mg%와 28,832.38mg%로서 비슷한 양을 함유하고 있었다. 전 cheeses에 공통적으로 많이 함유하고 있는 아미노산은 Glutamine, Proline, Leucine 및 Lysine이었으며, Cysteine을 제외하고는 B 제품이 가장 많은 아미노산을 함유하였다.

Table 37. Total amino acid composition in cheese

Cheese	단위(mg/100g)		
	A	B	C
Asp	1990.57	2184.76	1950.71
Thr	1033.27	1135.87	1013.49
Ser	1590.68	1761.95	1569.40
Glu	6416.34	7133.01	6355.42
Pro	2991.49	3340.64	2984.04
Gly	505.33	553.22	496.37
Ala	766.03	829.66	756.11
Cys	29.96	23.65	21.94
Val	1830.35	2032.08	1808.07
Met	790.38	888.09	786.56
Ile	1323.56	1466.47	1307.50
Leu	2769.75	3074.99	2734.53
Tyr	1561.66	1758.27	1555.77
Phe	1452.74	1626.34	1442.68
Lys	2226.27	2503.68	2198.86
His	821.58	918.56	815.40
Arg	1045.35	1165.13	1035.53
합계	29,145.31	32,396.37	28,832.38

A : 상업균주(FD-DVS TCC-3 : *Lactobacillus bulgaricus*와 *Streptococcus thermophilus*로 구성된 혼합균주, CHR.HANSEN A/S) 로 제조된 치즈

B : *Streptococcus macedonicus* 743로 제조된 치즈

C : 상업균주+ *Streptococcus macedonicus* 743 균주로 제조된 치즈

(나) 유리아미노산

각 cheese에 존재하는 유리아미노산을 분석한 결과는 Table 38과 같다. 총 유리아미노산은 C제품이 141.29mg%로서 가장 많은 양의 유리아미노산을 함유하고 있었고 B제품이 10.51mg%로서 가장 적은 양을 함유하고 있었다. 전 cheeses에 공통적으로 많이 함유하고 있는 아미노산은 Glutamine이었으며, 아미노산 중 Alanine, Leucine, Lysine, Arginine은 A제품에서, Alanine, Phenylalanine, Arginine은 B제품에서, Alanine, leucine, Phenylalanine, Lysine, Proline은 C제품에서 각각 가장 많이 함유하고 있는 반면, Cystine은 3종류의 cheese에서 공통적으로 함유하고 있지 않았다. A제품은 Methionine이 상대적으로 적었고, B제품은 Glycine, Methionine, Histidine이 함유되어 있지 않았으며, C제품은 Methionine이 상대적으로 적었다.

Table 38. Free amino acid composition in cheese

Cheese	단위(mg/100g)		
	A	B	C
Asp	1.15	0.30	1.27
Thr	1.17	0.43	1.64
Ser	0.95	0.31	0.88
Glu	16.77	3.08	22.67
Gly	1.08	-	1.00
Ala	10.80	1.29	11.20
Val	2.29	0.28	3.74
Cys	-	-	-
Met	0.43	-	0.71
Ile	1.08	0.13	1.61
Leu	13.63	0.56	23.27
Tyr	7.03	0.72	9.06
Phe	9.90	1.14	13.41
Lys	17.22	0.38	21.64
His	5.03	-	5.54
Arg	10.45	1.12	13.27
Pro	9.49	0.77	10.38
합계	108.47	10.51	141.29

A : 상업균주(FD-DVS TCC-3 : *Lactobacillus bulgaricus*와 *Streptococcus thermophilus*로 구성된 혼합균주, CHR.HANSEN A/S) 로 제조된 치즈

B : *Streptococcus macedonicus* 743로 제조된 치즈

C : 상업균주+ *Streptococcus macedonicus* 743 균주로 제조된 치즈

(6) 유기산

각 cheese에 존재하는 유기산을 분석한 결과는 Table 39와 Fig. 49와 같다.
Table. Organic acid contents of cheese

Cheese	Lactic acid(mg/ml)
A	809.80±72.41 ^a
B	668.09±31.26 ^b
C	725.84±61.28 ^{ab}

- A : 상업균주(FD-DVS TCC-3 : *Lactobacillus bulgaricus*와 *Streptococcus thermophilus*로 구성된 혼합균주, CHR.HANSEN A/S) 로 제조된 치즈
 B : *Streptococcus macedonicus* 743로 제조된 치즈
 C : 상업균주+ *Streptococcus macedonicus* 743 균주로 제조된 치즈

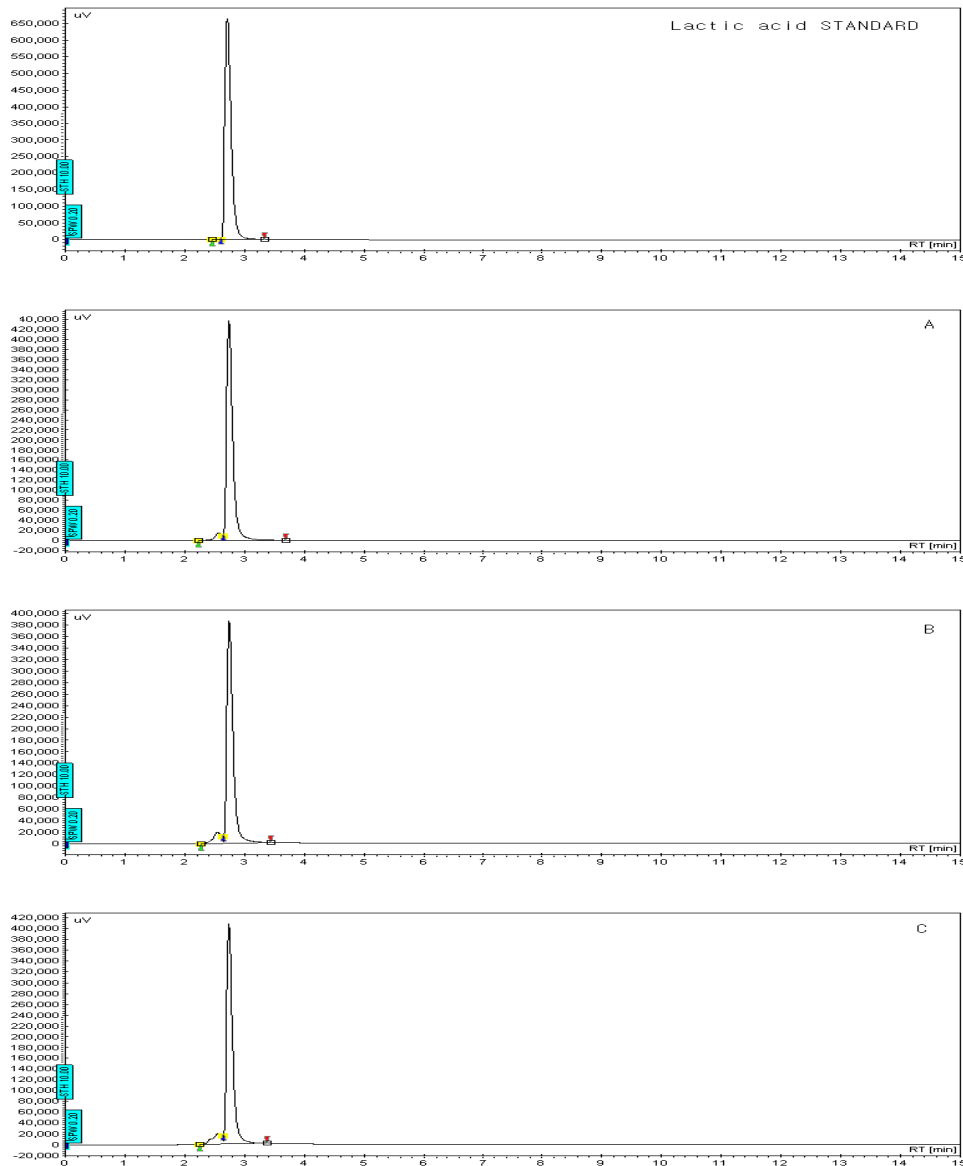


Fig. 49. Chromatogram of organic acid contents in Mozzarella cheese

Marsili 등(1981)에 따르면 cottage cheese의 경우 Orotic, Citric, Lactic, Uric, Hippuric acid 등이 분리되었다고 보고한 것과는 달리 Lactic acid만 분리되었다. 함량 간 비교를 보면 A 제품이 809.80mg/ml로서 가장 많은 함량을 나타낸 반면 B제품이 668.09mg/ml으로 가장 낮은 함량을 보였다.

(7) Cheese의 수율

각 cheese의 수율을 분석한 결과는 Table 40과 같다.

Table 40. yield of cheese

Cheese	yield (%)
A	11.13
B	9.98
C	10.90

A : 상업균주(FD-DVS TCC-3 : *Lactobacillus bulgaricus*와 *Streptococcus thermophilus* 로 구성된 혼합균주, CHR.HANSEN A/S) 로 제조된 치즈

B : *Streptococcus macedonicus* 743로 제조된 치즈

C : 상업균주+ *Streptococcus macedonicus* 743 균주로 제조된 치즈

상업균주에 의해 제조된 A제품이 수율이 가장 높은 반면, *Streptococcus macedonicus* 743 균주로 제조된 B제품이 9.98%로서 가장 낮은 값을 보였다.

(8) 조직특성조사

(가) 커드

젖산균 종류에 따라 절단전의 커드의 조직특성을 분석한 결과는 Table 41과 Fig. 50과 같다.

Table 41. Rheological properties of curd before cutting by TPA test

Curd	A	B	C
Hardness	61.33±0.93 ^a	57.87±2.68 ^a	56.55±6.98 ^a
Fracturability	4.60±1.01 ^a	3.25±0.58 ^a	2.73±1.58 ^a
Adhesiveness	-0.69±0.20 ^a	-2.65±0.82 ^a	-1.17±1.18 ^a
Springiness	0.97±0.02 ^a	0.96±0.00 ^a	0.96±0.05 ^a
Cohesiveness	0.55±0.02 ^a	0.51±0.01 ^a	0.53±0.03 ^a
Gumminess	33.96±0.67 ^a	30.29±0.03 ^a	29.73±9.61 ^a
Chewiness	32.92±0.00 ^a	29.07±3.24 ^a	28.23±7.81 ^a

A : 상업균주(FD-DVS TCC-3 : *Lactobacillus bulgaricus*와 *Streptococcus thermophilus* 로 구성된 혼합균주, CHR.HANSEN A/S) 로 제조된 커드

B : *Streptococcus macedonicus* 743로 제조된 커드

C : 상업균주+ *Streptococcus macedonicus* 743 균주로 제조된 커드

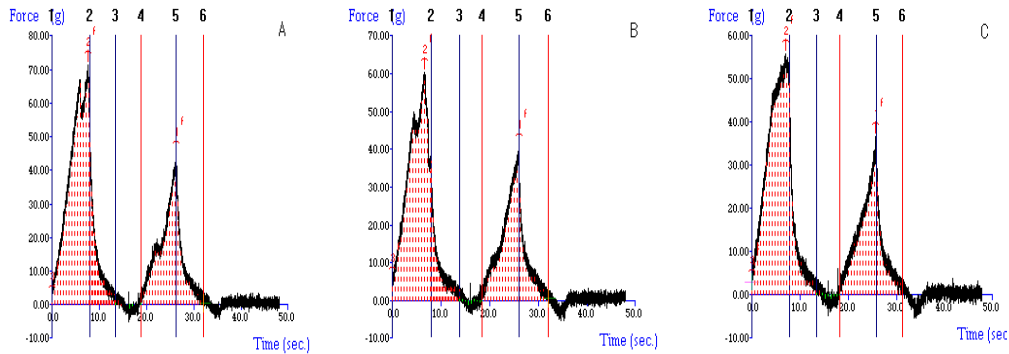


Fig. 50. Rheological properties of curd before cutting by TPA test

Hardness, 즉 커드의 경도는 상업균주로 제조된 절단전 커드(A)에서 61.33g으로 가장 경도가 높았으며, B, C 커드 순이었으나 치즈에서는 반대의 결과를 보였는데, 이와같이 절단전 커드의 경도가 높게되면 치즈에서는 떨어지는 경향을 보였는데, 이는 절단시 pH에 의한 영향과 치즈내의 수분함량등에 의해 기인되는 것으로 생각된다.

Fracturability는 깨짐성을 나타내는 수치로서 A 커드가 4.60으로 가장 높았고 B, C 커드 순이었다.

Adhesiveness는 부착성을 나타내는 수치로서 좌표상에서 음(-)의 부하가 걸리는 정도를 의미하고, 그 값이 Adhesiveness>Cohesiveness일 경우는 측정용 prove에 시료가 달라붙는 특성을 갖는 것으로 해석되나 절단전 커드 B, C, A 순으로 부착성이 높게 나타났다.

Springiness, 즉 탄성도는 3종류의 절단 전 커드 간에는 큰 차이가 없었다.

Cohesiveness는 식품조직을 이루는 성분들의 결합력을 나타내는 수치로서 이 수치가 높을수록 시료의 복원력 또는 결합력이 큰 것으로 간주할 수 있는데, 각 시료간 큰 차이가 없었으나 A, C, B 커드 순이었으며, Gumminess는 반고체상태의 식품을 붕괴시켜 삼키기 좋은 정도로 만드는데 필요한 물리량을 나타내는 수치로서 경도에서와 마찬가지로 비슷한 경향을 나타내었다. Chewiness는 A, B, C 커드 순으로 높은 값을 나타내었다.

(나) cheese

TPA(Texture profile analysis) test에 의한 치즈의 조직특성을 분석한 결과는 Table 42와 Fig. 51과 같다.

Table 42. Rheological properties of cheese by TPA test

Cheese	A	B	C
Hardness	2822.47±253.03 ^b	9862.84±282.01 ^a	2755.51±848.23 ^b
Fracturability	4.93±1.85 ^a	2.94±1.52 ^a	3.29±5.23 ^a
Adhesiveness	-60.78±32.22 ^{ab}	-17.33±15.90 ^a	-116.12±39.31 ^b
Springiness	0.65±0.03 ^b	1.74±0.03 ^a	0.60±0.16 ^b
Cohesiveness	0.59±0.04 ^b	0.81±0.02 ^a	0.61±0.01 ^b
Gumminess	1661.18±256.80 ^b	8029.04±461.30 ^a	1672.17±493.38 ^b
Chewiness	1083.21±192.11 ^b	13966.11±571.35 ^a	1058.55±526.50 ^b

A : 상업균주(FD-DVS TCC-3 : *Lactobacillus bulgaricus*와 *Streptococcus thermophilus* 로 구성된 혼합균주, CHR.HANSEN A/S) 로 제조된 치즈

B : *Streptococcus macedonicus* 743로 제조된 치즈

C : 상업균주+ *Streptococcus macedonicus* 743 균주로 제조된 치즈

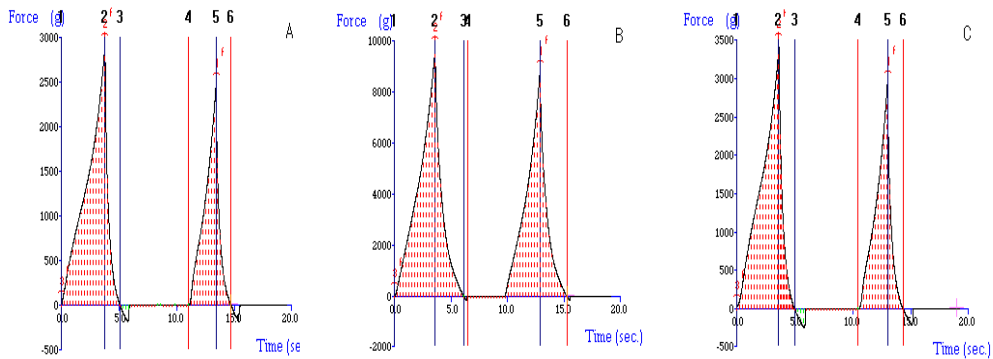


Fig. 51. Rheological properties of cheese by TPA test

Hardness, Springiness, Cohesiveness, Gumminess, Chewiness는 B 제품이, Fracturability는 A제품이, Adhesiveness는 C제품이 각각 높은 값을 나타냄으로써 커드에서와는 다른 양상을 보였다.

(9) 전자현미경 관찰

SEM 전자현미경으로 젖산균을 관찰한 결과는 Fig. 52에서 나타난 것과 같이 *Streptococcus macedonicus* 743 균주는 연쇄상 구형으로 동일한 형태를 가졌으며, 세포벽 주변에는 점질물질과 같은 것이 없이 매끄러운 상태를 나타내었다.

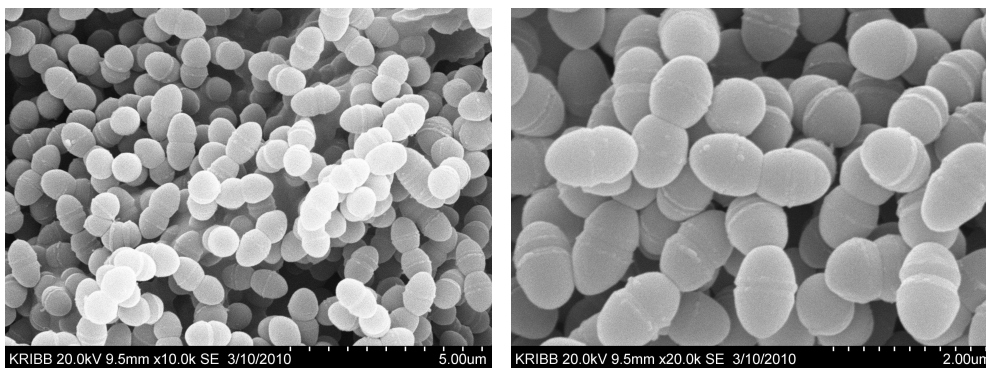


Fig. 52. Scanning electron micrographs of *Streptococcus macedonicus* 743

Fig. 53~54는 상업균주로 제조된 커드와 치즈를, Fig. 55~56은 *Streptococcus macedonicus* 743 균주로 제조된 커드와 치즈를 전자현미경에 각각 나타낸

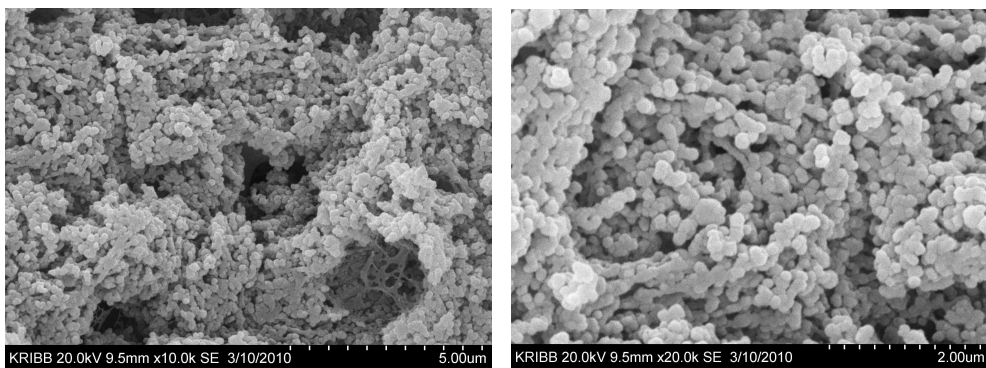


Fig. 53. Scanning electron micrographs of curd before cutting manufactured by commercial starter

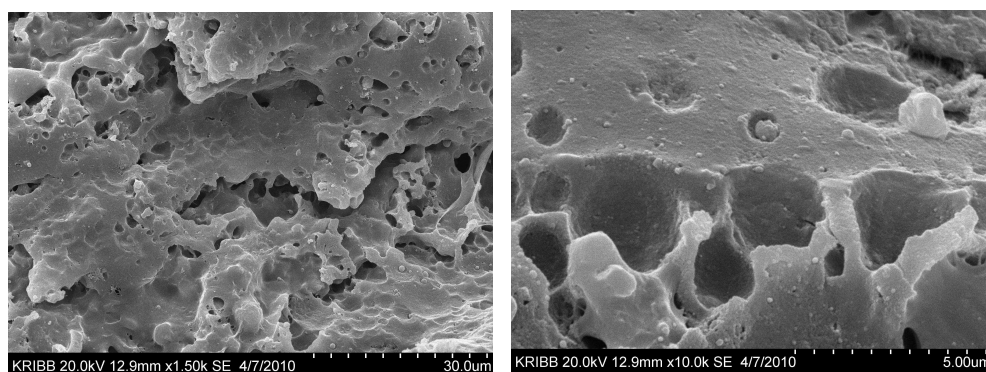


Fig. 54. Scanning electron micrographs of cheese manufactured by commercial starter

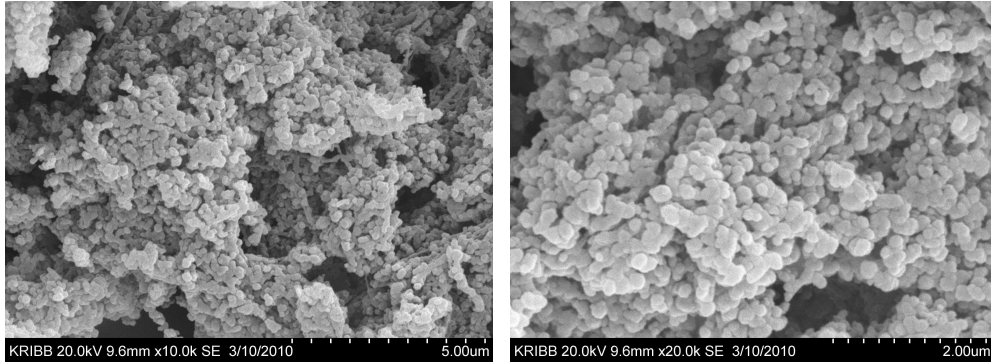


Fig. 55. Scanning electron micrographs of curd before cutting manufactured by *S. macedonicus* 743

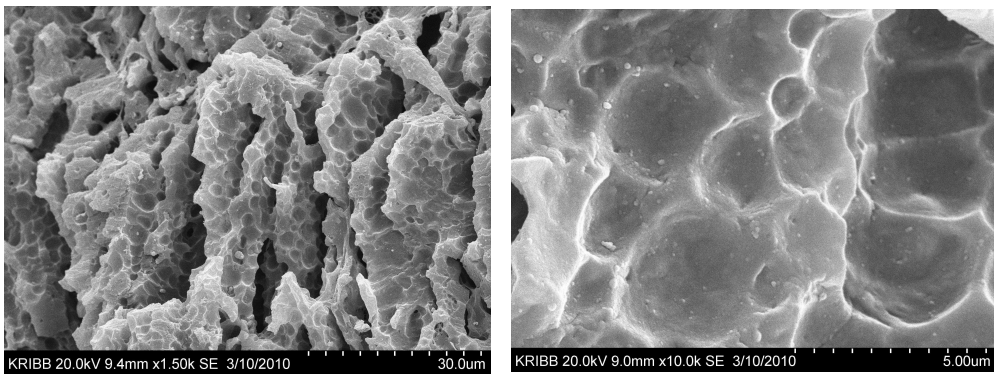


Fig. 56. Scanning electron micrographs of cheese manufactured by *S. macedonicus* 743

것으로 절단 전 커드의 경우 공히 10,000배 확대한 사진의 결과를 보면 케이신 마이셀이 사슬이나 실형태로 연결되어 그물모양을 이루거나 작은 덩어리형태로 뭉쳐져 있고 케이신 마이셀 사이에는 동공부분이 관찰되었으며, 커드 cutting전보다 cheese의 케이신 마이셀이 더 크고 개개의 마이셀이 더 많이 덩어리 형태를 이루고 있었다.

치즈의 경우 1,500배 확대한 사진의 결과를 보면 상업균주로 제조된 치즈는 표면이 거친 모습을 보인 반면 *Streptococcus macedonicus* 743 균주로 제조된 치즈는 케이신 마이셀이 작은 덩어리가 뭉쳐져 있어 작은 계곡을 형성하고 있음을 볼 수 있었다. 10,000배 확대했을 때 상업균주로 제조된 치즈는 달 표면과 같이 매끈하다가 움푹파인 형태를 보인 반면 *Streptococcus macedonicus* 743 균주로 제조된 치즈는 전체적으로 오목 들어간 형태를 보였다. 또한 모짜렐라 치즈는 cutting 전의 커드보다 다공성이 적고 커드가 더 촘촘한데 이는 케이신 집단의 크기가 증가함에 따라 다공성이 감소한다는 Glaser 등(1980)의 보고와 일치하였다.

(10) 관능검사

3종의 젖산균으로 제조된 치즈의 관능검사 결과는 Table 43에서 보는 바와 같다.

Table 43. Sensory evaluation of cheese

Cheese	외관(색)	향	맛	조직감	종합적인 기호도
A	5.20±0.79 ^b	5.30±1.34 ^a	5.33±1.22 ^{ab}	5.90±1.10 ^{ab}	5.50±1.27 ^a
B	6.70±0.48 ^a	5.33±0.87 ^a	6.00±1.00 ^a	5.00±0.71 ^b	6.33±1.32 ^a
C	5.60±0.97 ^b	5.20±1.48 ^b	5.22±1.20 ^b	6.44±1.01 ^a	5.66±1.58 ^a

* Sensory test by 14 experienced persons. As the values increase from 1 to 9, the intensity of sensory characteristics increases.

Mean values with same letters were not significantly different at the 5% level

A : 상업균주(FD-DVS TCC-3 : *Lactobacillus bulgaricus*와 *Streptococcus thermophilus*로 구성된 혼합균주, CHR.HANSEN A/S)로 제조된 치즈

B : *Streptococcus macedonicus* 743로 제조된 치즈

C : 상업균주+ *Streptococcus macedonicus* 743 균주로 제조된 치즈

외관(색)에 있어서 B제품이 6.7로서 유의성이 있었으며, 향에 있어서도 B와 A제품 간에는 유의성이 없는 반면 C제품과는 유의차가 인정되었다. 맛에 있어서는 B제품이 유의성이 인정되었다. 조직에 있어서는 C제품이 가장 높은 점수로서 유의성이 있었다. 종합적 기호도에 있어서는 B, C, A 제품 순이었으나 유의성이 인정되지 않았다. 따라서 B 제품은 유의성은 인정되지는 않았지만 외관, 향, 맛 및 종합적기호도가 우수한 것으로 보였으며, 조직에 있어서 가장 낮은 점수를 받은 것은 수분함량이 높아 조직이 무르기 때문에 선호도가 낮은 것으로 생각된다.

8. 동물모델을 이용한 모짜렐라 치즈의 면역증진 효능평가

가. 실험용 치즈사료 섭취가 마우스 체중 증가에 미치는 영향

실험 기간에 따른 체중 변화를 보면 동일 기간 내에 실험군의 평균 체중은 유의성 있는 차이를 보이지 않아 실험에 사용한 *Streptococcus macedonicus* 743 균주와 상업균주(FD-DVS TCC-3, CHR.HANSEN A/S)가 마우스의 체중에 큰 영향을 미치지 않는다는 것을 보여주었다.

군 간의 체중과 체중 변화량의 유의차가 인정되지 않은 것은 전체 열량 소비량에 차이가 없는 경우에는 체중에 영향을 미치지 않는다는 연구와 유사한 것으로 각 식이군에서 식이 섭취량에서는 주령별로 다소의 차이를 보였으나, 유의할 만한 변화가 나타나지 않아 *Streptococcus macedonicus* 743 투여가 증체량에는 영향을 주지 않는 것으로 나타났다.

그룹별로는 A군과 B, C 군의 체중이 일반 사료만 섭취한 대조군에 비해서 증가한 것으로 나타났으나, 유의할 만한 변화로 인정되지 않았다. 한편, 4그룹의 체중과 체중 변화량은 매주 거의 유사하게 나타났는데 이는 각 군에서 식이 섭취량에서 경미한 차이를 보였으나 열량 소비량은 비슷하였기 때문으로 여겨진다.

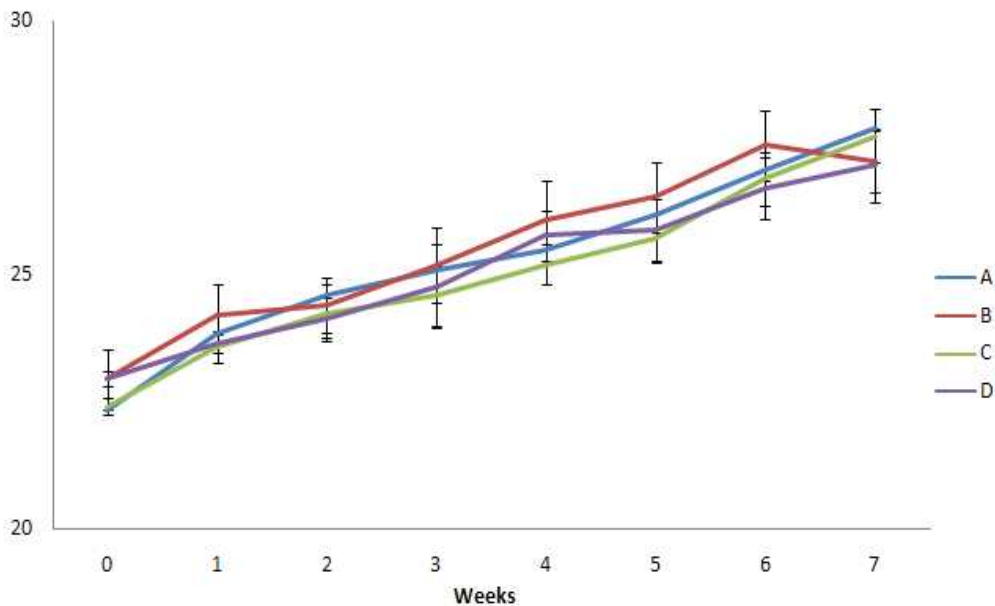


Fig. 57. Body weight changes of C57BL/6 mice fed experimental diets(g/mice) for 7 weeks.

나. 장기무게 및 비장, 흉선 지수

전체 실험 기간 중 간 무게는 대조군에 비해서 A,B 식이군에서 다소 높게 나타났으며, C군에서는 상대적으로 낮았다(Table 44). 그러나 전체적으로 대조군에 비하여 유의성 있는 변화를 보이지는 않았고 A, B그룹에서는 다른 심장과 폐, 고환의 무게에서 증가하는 경향을 보였으나, 상대장기 무게에서 유의성이 인정되지 않았다. 따라서 *Streptococcus macedonicus* 743 균주와 상업균주로 제조된 모짜렐라 치즈의 급여는 장기의 무게에 유의할만한 변화를 유발하지 않는 것으로 생각된다.

Table 44. Organ weight changes of C57BL/6 mice fed experimental diets(g/mice) for 7 weeks.

Group	A	B	C	D
Liver	1.31±0.12 ^a	1.30±0.08	1.22±0.11	1.20±0.05
Spleen	0.06±0.02	0.07±0.02	0.07±0.01	0.06±0.01
Kidney	0.39±0.04	0.38±0.05	0.38±0.04	0.37±0.04
Lung	0.19±0.04	0.19±0.03	0.18±0.03	0.19±0.02
Thymus	0.06±0.01	0.05±0.02	0.06±0.02	0.07±0.02
Heart	0.16±0.02	0.16±0.02	0.15±0.02	0.16±0.03
Testis	0.20±0.04	0.21±0.04	0.20±0.03	0.20±0.02
Cerebrum	0.32±0.01	0.30±0.02	0.32±0.03	0.31±0.02
Cerebellum	0.10±0.01	0.11±0.01	0.11±0.03	0.11±0.01

비장지수와 흉선 지수는 B그룹에서 유의성 있는 증가가 관찰되었다(P<0.05) (Fig. 58). 이 결과는 *Streptococcus macedonicus* 743 균주와 상업균주로 제조된 치즈 함유 사료는 마우스의 면역활성에 영향을 미칠 수 있음을 보여주는 것이다.

일반적으로 생체 내 면역기능 측정 기준으로 인지되는 간 무게, 비장 계수와, 갑상선 계수는 식이 성분에 의해 유의적인 영향을 받는다고 한다. 식이로 인한 체내 이들 측정치의 차이는 곧 부분적으로 lymphocyte 생성 능력이 차이를 초래하고 이것은 특정 질환 감염 시의 더욱 큰 영향을 받는다고 Martin 등(1977)과 Meade와 Mertin(1976)은 설명하고 있다.

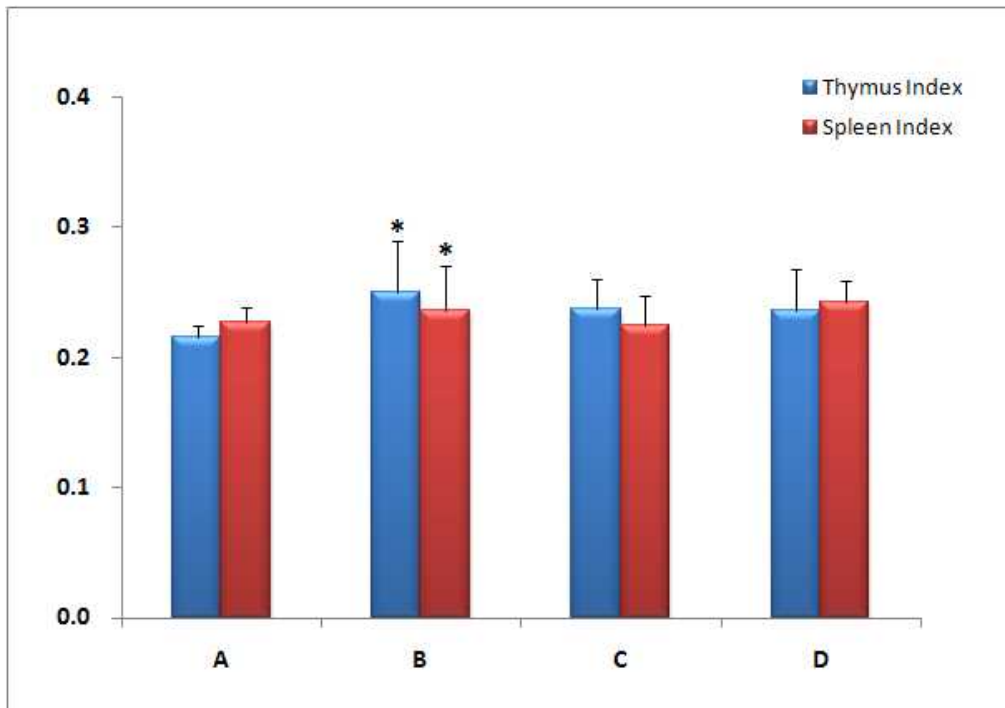


Fig. 58. Lymphatic organ index changes of C57BL/6 mice peritoneal macrophages cultured with *Streptococcus macedonicus* 743, TCC-3(Chr. Hansen A/S), *S. macedonicus* 743 + TCC-3 and control.

* Significant difference from control at $p < 0.05$.

다. 치즈 식이투여가 마우스의 혈액과 복강 대식세포 활성화에 미치는 영향

대식세포는 외부 항원물질에 대한 1차 방어를 담당하는 면역세포로서 반응 중간 대사물질, cytokine 및 phagocytosis를 통해 숙주 내 항원물질을 제거할 수 있다. 대식세포는 세균이나 이물질을 탐식하기 위해 염증반응과 관련된 다양한 종류의 사이토카인을 분비한다. 대식세포가 분비하는 cytokine들 중 TNF- α 와 IL-1 β , IL-6 등은 대식세포가 활성화 되었을 때 분비하는 대표적인 cytokine으로 널리 알려져 있다. 본 연구에서는 실험용 식이를 7주간 급여한 후 마우스의 혈액을 채취하여 혈청을 분리하고 마우스 복강 대식세포를 분리 배양하여 혈청과 대식세포에서 분비되는 cytokine의 양을 측정하였다.

대식세포 활성화의 지표로 혈중 TNF- α 와 IL-1 β , IL-6의 함량을 ELISA 사이토카인 kit (R&D system, USA)를 사용하여 측정한 결과는 Figure 59에 나타난 바와 같다.

IL-1 β 는 그룹 B에서 유의성 있게 증가하였고 A, C 그룹에서도 증가하는 경향

을 보였으며, TNF- α 는 A, B, C, 그룹 모두에서 증가하였으며 특히 그룹 B에서 가장 높게 나타났다. IL-6는 그룹 B에서 가장 높았고 그룹 A와 C에서도 증가하였다.

복강 마크로파지 활성화에 관여하는 사이토카인의 검사결과 TNF- α 와 IL-1 β , IL-6 모두 B군에서 유의성 있는 증가가 관찰되어 *S. macedonicus* 743 균주로 제조된 치즈 함유 사료가 마우스의 면역기능을 증강시킬 수 있음을 시사하였다.

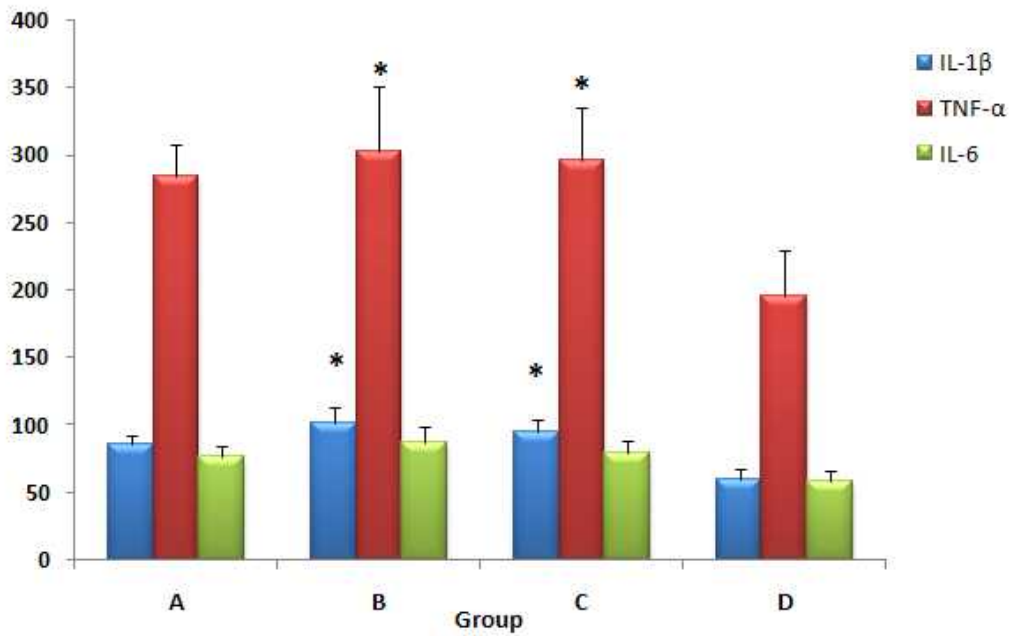


Fig. 59. IL-1 β (pg/ml), TNF- α (pg/ml), IL-6(pg/ml) production by C57BL/6 mice peritoneal macrophages cultured with *Streptococcus macedonicus* 743, TCC-3(Chr. Hansen A/S), *S. macedonicus* 743 + TCC-3 and control.

* Significant difference from control at $p < 0.05$.

마우스의 대식세포 활성화의 지표로 혈청 중 TNF- α 와 IL-1 β , IL-6의 함량을 ELISA 사이토카인 kit (R&D system, USA)를 사용하여 측정한 결과는 Figure 60에 나타나 바와 같다. IL-1 β 는 그룹 A, B, C에서 증가하는 경향을 보였으나 유의성이 나타나지 않았고, TNF- α 는 A, B, C그룹 모두에서 유의성 있게 증가하였으며 특히 그룹 B에서 가장 높게 나타났다. IL-6는 그룹 B와 C에서 유의성 있게 높게 나타났고 그룹 A에서는 유의성이 관찰되지 않았다. 매크로파지 활성화에 관여하는 사이토카인의 검사결과 TNF- α 와 IL-1 β , IL-6 모두 B군에서 유의성 있는 증가가 관찰되어 *S. macedonicus* 743 균주로 제조된 치즈 함유 사료의 급여가 마우스의 면역기능을 증강시킬 수 있음을 시사하였다.

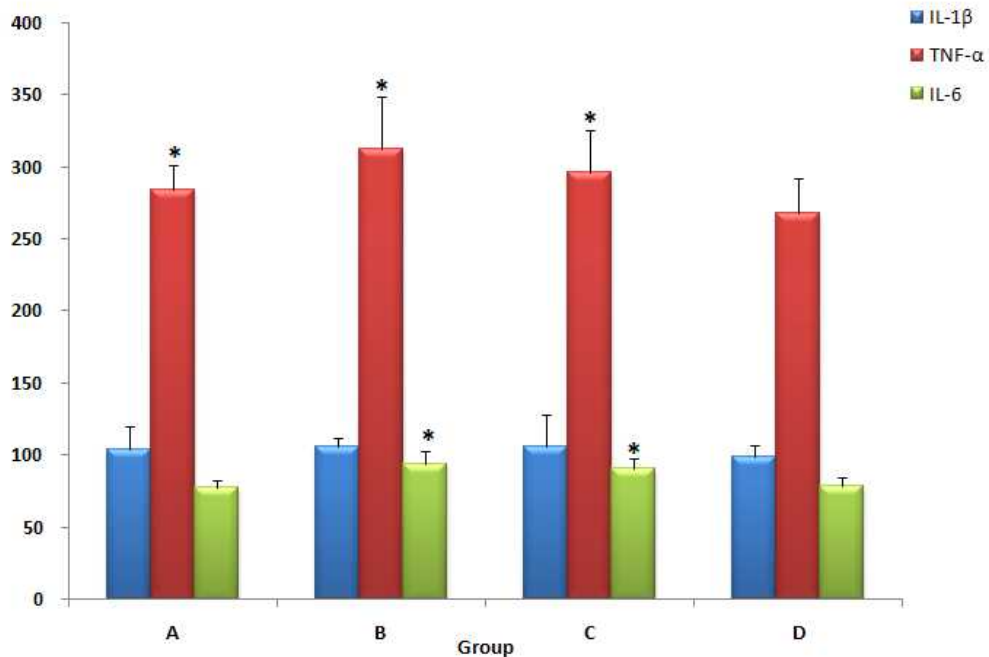


Fig. 60. Serum IL-1 β , TNF- α , IL-6 concentration in C57BL/6 mice fed experimental diets(g/mice) with *Streptococcus macedonicus* 743, TCC-3(Chr. Hansen A/S), *S. macedonicus* 743 + TCC-3 and control for 7 weeks.

* Significant difference from control at $p < 0.05$.

라. 백혈구 백분율 계산 및 조직 검사

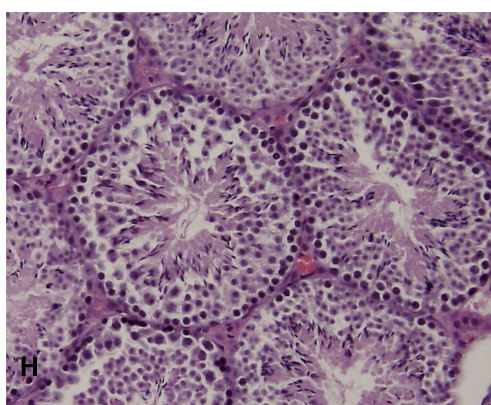
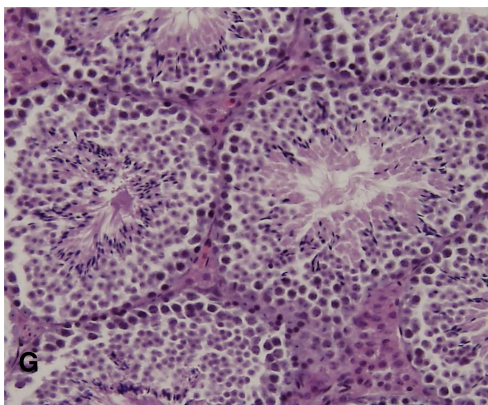
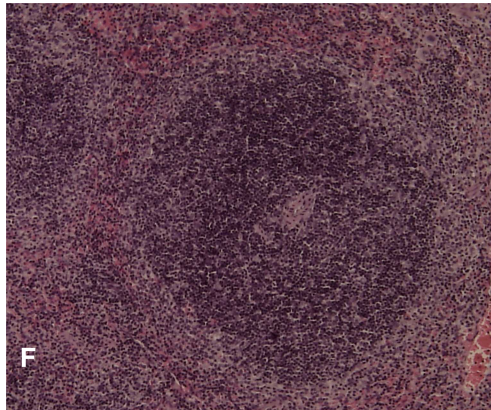
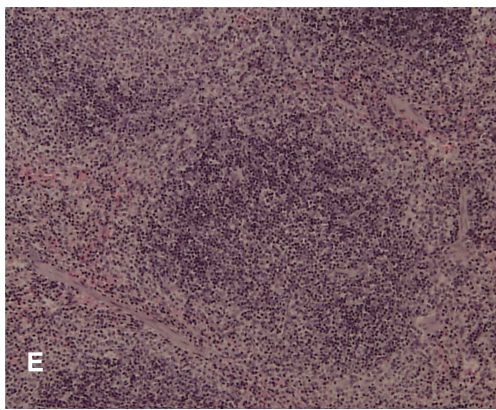
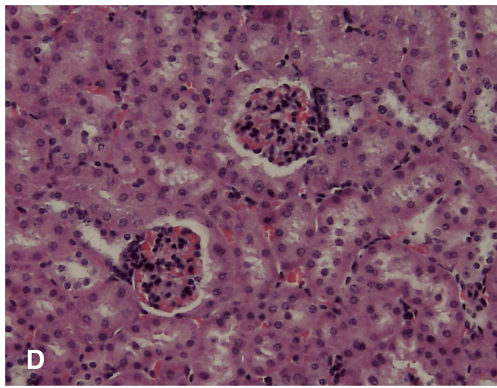
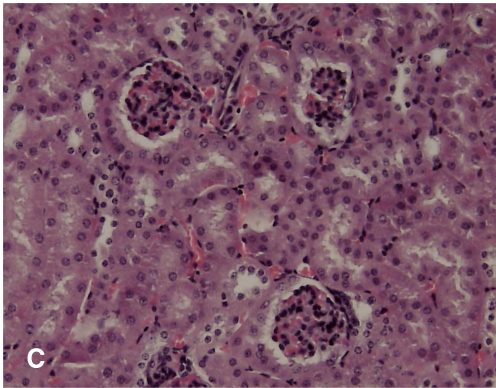
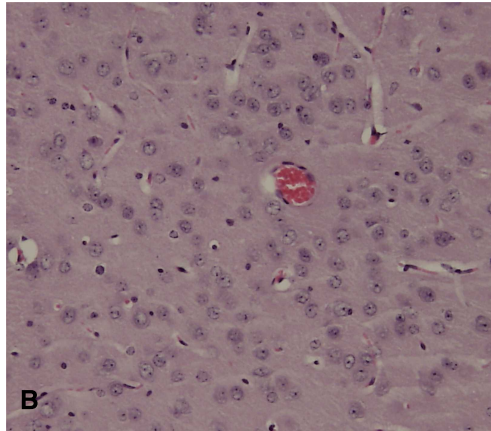
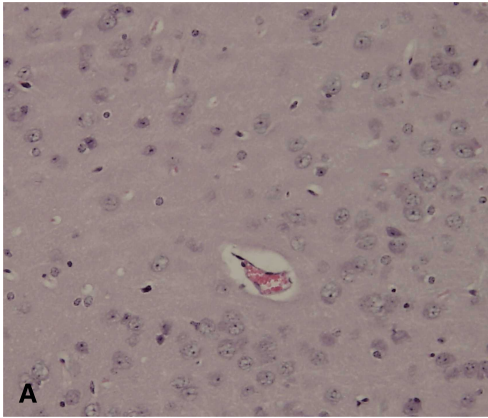
백혈구 백분율 계산에서는 생체 내에서 면역반응에 주요한 역할을 하는 것으로 알려진 림프구는 A, C 군이 대조군에 비해 증가하는 결과를 보였다(Table 45). 식이의 양과 종류에 따라 비장 조직이 B 세포 부분과 T 세포 부분의 증식도가 차이를 보인다는 Mary 등(1983)의 보고가 있으나 본 실험에서는 비장 조직을 광학 현미경으로 관찰한 결과 실험 기간 중 A 군에서 white pulp 가 가장 심하게 증식되어 활발한 면역반응을 예상할 수 있었고 B 군에서도 약간의 white pulp 증식 소견이 관찰되었으며, C군에서는 종 중심에서의 림프구의 유리가 관찰되었다(Fig. 61). 기타 간, 신장, 폐장을 포함한 다른 장기에 대한 조직검사에서는 실험식이 급여군과 대조군에서 모두 정상적인 소견을 보였다. 간 조직 검사에서는 B, C군에서 약간의 공포변성이 관찰되었고 B군에서는 국소성으로 변성된 단핵세포침윤소가 관찰되었으나 이는 D 그룹의 대조군 마우스에서도 동일한 소견이 관찰되어 실험에 사용된 식이와는 관계가 없었던 것으로 생각된다.

Table 45. Differential white cell counts of C57BL/6 mice fed experimental diets(g/mice) with *Streptococcus macedonicus* 743, TCC-3(Chr. Hansen A/S), *S. macedonicus* 743 + TCC-3 and control for 7 weeks.

Group	Neutrophils	Lymphocytes	Monocytes	Eosinophils	Basophils
A	11.78(±3.26) ^a	86.12(±4.04) ^b	1.14(±0.25)	0.52(±0.45)	0.44(±0.55)
B	12.24(±6.52)	85.82(±7.64)	1.46(±0.82)	0.58(±0.24)	0.44(±0.55)
C	11.75(±3.33)	86.25(±3.06)	1.46(±0.54)	0.41(±0.63)	0.49(±0.68)
D	13.14(±5.84) ^b	84.14(±7.65)	1.46(±0.62)	0.68(±0.36)	0.56(±0.48)

a : Mean±S.D.

b : Significant difference from control at p<0.05.



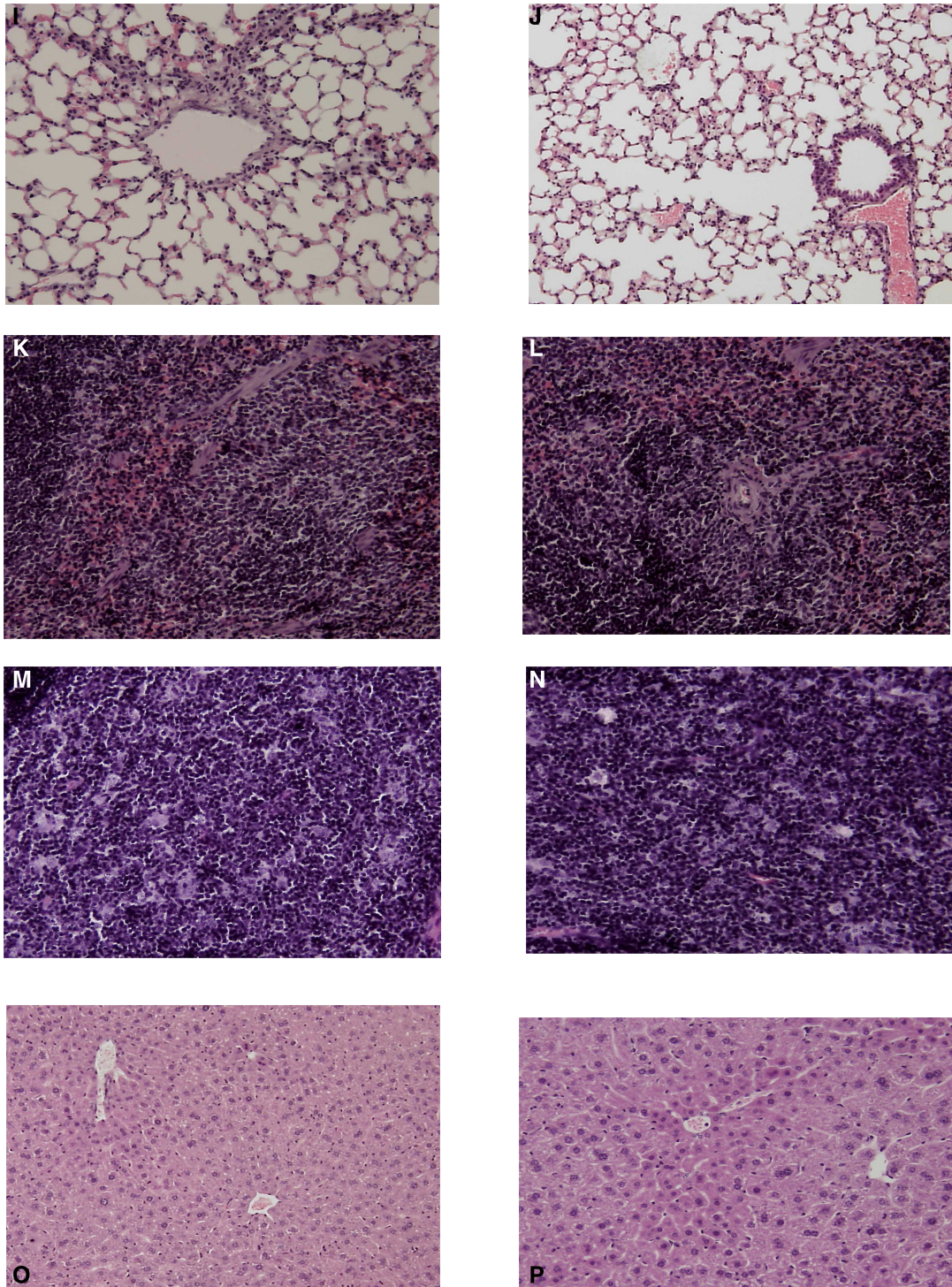


Fig. 61. Photograph and light microscopic findings in the male C57BL/6 mice spleen, thymus, lung, liver, kidney, cerebrum, testis from three experimental diets and control groups. In the control mice was spleen appear normal(E). The treated mice showed enlargement and lymphocyte depletion (M). In the experimental diet fed mice and control mice was lung, liver, kidney, cerebrum, testis showed normal appearance. Hematoxylin & Eosin. Magnification: 200×.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

면역증진 젖산균을 분리하고, 이를 이용하여 모짜렐라 치즈를 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. 모짜렐라 치즈를 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 1054개의 젖산균을 분리하였다.

또한 모짜렐라 치즈에 적합하기 위해서는 skim milk를 응고시킬 수 있는 산생성능력이 있어야 하므로 10% 환원탈지분유에 분리균주를 접종한 후 37°C에서 18시간과 24시간 배양하여 응고된 균주가 각각 645개 균주와 682개 균주이었다.

면역증진 균주를 선별하기 위하여 반응성 질소종 분비능과 IL-1 α 및 TNF시험을 거쳐 13종의 젖산균을 선별하였다. 선별된 젖산균을 현미경관찰, Gram stain, 당 발효실험 및 16S rRNA 염기서열 등의 일련의 생화학적, 유전학적 실험을 통하여 균을 동정하였다. 산 생성 속도와 면역활성능을 감안하여 5종의 젖산균을 선별하여, 모짜렐라 치즈의 종균으로서 적합한지의 여부를 검증하기 위하여 젖산균의 생장, 항생제 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, Vancomycin에 내성이 높아 위해논란이 있는 *E. faecalis* 683 균주를 배제하고 4종의 균주를 대상으로 배양온도 별(30°C, 35°C, 40°C), 균주의 접종량 별(0.1%, 0.5%, 1.0%, 2.0%)로 제조시간, 가공적성, 면역활성 및 수율 등을 감안하여 최적조건을 설정하였다. 이 중 가장 우수한 *S. macedonicus* 743 균주를 이용하여 제조공정을 설정하였고, 여기서 얻어진 모짜렐라 치즈에 대해 국내 및 수입치즈와의 면역활성 및 이화학적 특성 조사를 실시하였고, 이와 같은 결과를 근거로 하여 동물모델을 이용한 모짜렐라 치즈의 면역증진 효능평가 실험을 실시한바 목표를 100% 달성하였다.

따라서 본 연구결과를 통해 관련분야에의 기여도를 보면

가. 기술적 측면

- 면역증진 젓산균주 개발은 유제품뿐만 아니라 식품 전반에 이용 가능함으로 제품의 다양화를 유도하여 신기술 개발에 이용할 수 있음
- 외국에 비해 우유의 기능성 물질에 대한 연구가 미약함에 따라 이를 계기로 보다 활발한 연구 촉진
- 면역증진 젓산균주를 이용한 모짜렐라 치즈에 대한 동물실험을 통한 입증 기술은 국내외적으로 없음으로 대외 기술적 우위 확보

나. 경제 · 산업적 측면

- 면역증진 모짜렐라 치즈를 개발함으로써 소비기반 및 경쟁력 확보
원유생산에 비해 소비가 저하되어 분유재고가 2010년 3월말 현재 6,344톤으로 09년 11월말 4,099톤을 기점으로 다시 증가 추세에 있어 면역증진 모짜렐라 치즈를 개발하여 분유 재고를 감소케 함으로써 낙농가 소득증대 및 유가공업체의 경쟁력 향상에 기여할 것으로 보임
- 본 제품 개발로 모짜렐라 치즈 시장 확대
2008년말 현재 4,814억원의 치즈 시장 중 예상시장을 10%로 예측할 때 480억원으로 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.
- 연간 100억원 규모의 젓산균 스타터 수입대체효과
- 질병 예방에 의한 의료비 부담 연간 100억원 절감 효과

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

본 연구에서 분리된 면역증진 젓산균은 그동안 기능성 있는 외국의 수입종균에 의해 생산되는 모짜렐라 치즈를 국내에서 생산함으로써 국제 경쟁력 향상과 동시에 수입대체효과가 있을 것으로 예상된다. 또한 본 연구결과는 참여업체에서 기술이전을 통하여 실용화할 것으로 예상되며, *Streptococcus macedonicus* 743 균주는 특허출원을 통하여 산업재산권을 확보하였고, 한국축산식품학회에 2편 발표하였으며, 논문 1편을 게재하였다.

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

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

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학 기술정보

1. Effects of kefir supernatant and lactic acid bacteria isolated from kefir grain on cytokine production by macrophage

Author(s): Hong, Wei-Sheng; Chen, Hsi-Chia; Chen, Yen-Po; Chen, Ming-Ju (cmj@ntu.edu.tw)

Source: International Dairy Journal Volume: 19 Issue: 4 Pages: 244-251
Published: APR 2009

Abstract: The objective of this study was to investigate the in vitro immuno-modulating capacity and mechanisms of lactic acid bacteria (LAB) isolated from kefir grains and their individual supernatants by cytokine profiles through a toll-like receptor pathway. Results demonstrated that kefir supernatants, obtained from kefir fermented more than 24 h, induced the production of pro-inflammatory cytokines in RAW 264.7 cells. Among four LAB isolated from kefir grains and their supernatants, *Lactobacillus kefir-anofaciens* MI and its supernatant had strong potential to induce in vitro production of tumor necrosis factor (TNF)-alpha, interleukin (IL)-1 beta, IL-6 and IL-12 in RAW 264.7 cells and murine peritoneal macrophages. Moreover, blocking toll-like receptor (TLR)-2 using anti-TLR-2 mAb and TLR-2(-/-) mice showed a significant inhibition ($p < 0.05$) of IL-6 and TNF-alpha production. These findings indicated that kefir influenced the secretion of pro-inflammatory cytokines TNF-alpha and IL-6 through TLR-2, which would potentially have beneficial effects on promotion of cell-mediated immune responses against tumors and also against intracellular pathogenic infections. The putative immunomodulin in the kefir supernatant was also characterized and may be a protein with a molecular mass larger than 30 kDa.

2. Effect of probiotics on biotechnological characteristics of yoghurt : a review.

Author(s): Sarkar, S

Source: British Food Journal Volume: 110 Issue: 7 Pages: 717-740 Published: 2008

Abstract: Probiotics are known to extend health benefits and therefore may be included during yoghurt manufacture to enhance its prophylactic properties. Different probiotic strains may exhibit diverse biotechnological behaviour in

association with yoghurt cultures; therefore, interactive behaviour amongst probiotic and yoghurt cultures must be evaluated prior to their commercial application. This study assessed the effect of inclusion of different probiotic cultures on various biotechnological (technological, dietetic and prophylactic) characteristics of yoghurt cultures. Yoghurt was assessed for technological characteristics based on acidification and flavour production, dietetic characteristics based on proteolytic activity, vitamin synthesis and L (+) lactic acid production and prophylactic characteristics based on beta-galactosidase activity, antibacterial spectrum, viability in product as well as during gastro-intestinal transit, intestinal colonization, immunomodulation, anti-carcinogenicity and hypocholesterolemic effects. Different probiotic cultures exhibited diverse technological, dietetic and prophylactic behaviour in association with yoghurt cultures. Functional properties of traditional yoghurt could be enhanced with the combined introduction of probiotic cultures such as *Bifidobacterium bifidum*, *B. infantis* and *Lactobacillus acidophilus*, and the resulting product may be recommended for consumption as a dietary adjunct.

3. Immunomodulatory effect of oral administration of milk fermented with *Lactobacillus helveticus* in mice.

Author(s): Kamlesh Meena, Suman Kapila, Rattan Chand, Haque, E, Surjeet Singh, Aggarwal, PK

Source: Milchwissenschaft Volume: 63 Issue: 1 Pages: 27-29 Published: 2008

Abstract: The immunomodulatory potential of oral administration of *Lactobacillus helveticus*-fermented milk and cell free supernatant after fermentation in mice was investigated. Mice were fed for a period of 2, 5 or 8 consecutive days with *L. helveticus* fermented milk, cell free supernatant. The control group was fed only milk. The immune response was assessed by analysing lysosomal enzymes, beta-galactosidase and beta-glucuronidase, phagocytic activity of peritoneal macrophages and lymphocyte proliferation index at the end of feeding periods. The mice fed with *L. helveticus* fermented milk and cell free supernatant showed significant increased lysosomal enzymes levels and phagocytic activity in peritoneal macrophages in comparison to control group. Similarly, lymphocyte proliferation index was also higher in fermented milk and cell free supernatant group. Results indicated that lactic acid bacteria as well as immunoactive component released in milk had positive impacts on non specific (phagocytic activity) and specific immune response (lymphocyte proliferation).

4. Antiallergic effects of *Lactobacillus pentosus* strain S-PT84 mediated by modulation of Th1/Th2 immunobalance and induction of IL-10 production

Author(s): Nonaka, Yuji (yuji_nonaka@suntory.co.jp); Izumo, Takayuki; Izumi, Fumi; Maekawa, Toshihiro; Shibata, Hiroshi; Nakano, Aoi; Kishi, Atsuko; Akatani, Kaoru; Kiso, Yoshinobu

Source: International Archives of Allergy and Immunology Volume: 145 Issue: 3 Pages: 249-257 Published: 2008

Abstract: Background: Many types of fermented food are consumed in Japan. Although some are produced by plant-origin lactic-acid bacteria (LAB) fermentation, the physiological functions of such bacteria remain unclear. We therefore isolated LAB of plant origin from Kyoto pickles and determined the immunological activity of heat-killed preparations of plantorigin LAB. Methods: The *Lactobacillus pentosus* strain S-PT84 was selected from among 16 LAB of plant origin as the strongest interleukin (IL)-12-inducing strain. IL-12- and IL-10-inducing activities were determined with macrophages from BALB/c mice. The in vivo immunomodulating effect of S-PT84 was determined with BALB/c mice fed S-PT84. The antiallergic activity of S-PT84 was examined in ovalbumin (OVA)/alum-administered BALB/c mice. Results: The *L. pentosus* strain S-PT84 induced production of both IL-12 and IL-10 in vitro. S-PT84 enhanced splenic natural-killer activity and modulated the T helper (Th) type 1/type 2 balance toward a Th1-dominant state. In the OVA-induced allergy model, orally administered S-PT84 lowered serum IgE levels and suppressed active cutaneous anaphylaxis reaction and splenic IL-4 production. IL-10 production from splenocytes of OVA-immunized mice was upregulated by feeding S-PT84. Conclusions: Despite heat-killing, S-PT84 exhibited antiallergic effects by modulating the Th1/Th2 balance and inducing regulatory T cells. The *L. pentosus* strain S-PT84, which is of plant origin and isolated from a traditional Japanese food, is expected to be useful for treatment of many immune diseases including allergies, tumors, infectious diseases and auto-immune diseases.

5. Immunomodulatory effect of oral administration of milk fermented with *Lactobacillus helveticus* in mice.

Author(s): Kamlesh Meena, Suman Kapila, Rattan Chand, Haque, E, Surjeet Singh, Aggarwal, PK

Source: Milchwissenschaft Volume: 62 Issue: 4 Pages: 415-417 Published: 2007

Abstract: The immunomodulatory potential of oral administration of milk

fermented with *Lactobacillus helveticus* and cell free supernatant after fermentation in mice was investigated. Mice were fed for a period of 2, 5 or 8 consecutive days with *L. helveticus* fermented milk and cell free supernatant. The control group was fed only milk. The immune response was assessed by analysing lysosomal enzymes (beta-galactosidase and beta-glucuronidase), phagocytic activity of peritoneal macrophages and lymphocyte proliferation index at the end of feeding periods. Mice fed with *L. helveticus* fermented milk and cell free supernatant showed significant increased lysosomal enzymes levels and phagocytic activity in peritoneal macrophages in comparison to the control group. Similarly, the lymphocyte proliferation index was also higher in the fermented milk and cell free supernatant group. Results indicated that lactic acid bacteria as well as the immunoactive component released in milk had a positive impact on non specific (phagocytic activity) and specific immune response (lymphocyte proliferation).

6. Immunomodulatory effects of probiotics in different stages of life.

Author(s): Nova, E, Warnberg, J, Gomez-Martinez, S, Diaz, LE, Romeo, J, Marcos, A

Source: British Journal of Nutrition Volume: 98 Issue: Suppl. 1 Pages: 1) S90-S95 Published: 2007

Abstract: The immunomodulatory properties of lactic acid bacteria (LAB) and foods containing them (e.g. fermented milks) is a topic currently under investigation. Individuals could potentially benefit from the inclusion of LAB in the diet at different times during the life cycle. This paper considers the immunomodulatory effects of probiotics in different stages of life. One of the most accepted specific uses of probiotic bacteria is the prevention of atopic eczema in infants with family history of the disease who receive the probiotic bacteria early, through supplementation of the gestating mother and orally after birth. Immune enhancing effects have also been suggested to be beneficial in diarrhoea treatment, especially in children infected with rotavirus and in malnourished patients, infants and adolescents, whose capacity to produce interferon-gamma can be increased after LAB-containing yoghurt intake. Regarding young people and adults, investigations have been conducted exploring the immunomodulation by LAB in subjects under stressful situations, in the prevention of urinary tract infections in fertile women and in the treatment of allergy. However, the beneficial effects of probiotics in these conditions remain controversial and the scientific evidence provided so far is not considered to be

conclusive. The elderly population has been the focus of investigations aimed at identifying the capacity of probiotics to counteract the immunosenescence process by increasing phagocytic and natural killer cell activities and to protect against infection. The mechanisms involved in the different effects attributed to LAB remain to be clarified. Moreover, considering that the immunomodulatory properties are strain-specific, defining the optimal dose of a certain bacteria or combination of bacteria strains and the duration of treatment for a desired effect in a target population group is essential in order to substantiate health claims.

7. Immunomodulatory function and probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from Mongolian fermented milk.

Author(s): Kimura, M, Danno, K, Yasui, H

Source: Bioscience and Microflora Volume: 25 Issue: 4 Pages: 147-155 Published: 2006

Abstract: This study investigated the occurrence of lactic acid bacteria with cellular or humoral immunomodulatory activity among 51 strains isolated from Mongolian fermented milk, by measuring the inductive activity of IL-12 and gamma-interferon (INF-gamma) or the immunoglobulins, IgM, IgG and IgA. 2 strains induced large quantities of IL-12 and INF-gamma and had cellular immunomodulatory function, whereas 3 strains induced large quantities of IgA and demonstrated humoral immunomodulatory activity. The probiotic properties of these 5 strains were studied by measuring their tolerance to stomach acid, bile and pancreatic fluid and their adherence to human enterocyte-like Caco-2 cells in in vitro tests. Results showed that the N-17 strain (*Lactobacillus plantarum*), which induced large quantities of IgA, strongly tolerated stomach acid, bile and pancreatic fluid and expressed strong adherence to human enterocyte-like Caco-2 cells. In addition, survival of the N-17 strain during passage through the gastrointestinal tract of mice was examined after 6, 12, 24, 36, 48, 60 and 72 h of oral administration. 6 h after oral administration, the highest numbers of viable cells of the strain appeared in faeces, and almost all of the administered bacteria were recovered within 48h. Results suggest that *L. plantarum* N-17 is an excellent probiotic strain which has humoral immunomodulatory function and may be useful as a carrier for an oral vaccine.

8. Evaluation of immunomodulation by *Lactobacillus casei* Shirota:

Immune function, autoimmunity and gene expression

Author(s): Baken, Kirsten A.; Ezendam, Janine (Janine.Ezendam@rivm.nl);

Gremmer, Eric R.; de Klerk, Arja; Pennings, Jeroen L. A.; Matthee, Bianca; Peijnenburg, Ad A. C. M.; van Loveren, Henk

Source: International Journal of Food Microbiology Volume: 112 Issue: 1 Pages: 8-18 Published: OCT 15 2006

Abstract: Lactic acid bacteria are claimed to have immunomodulating effects. Stimulation as well as suppression of T helper (Th)1 mediated immune responses, have been described for various strains. Experiments involving *Lactobacillus casei* Shirota (LcS) detected mainly enhancement of innate immune responses and promotion of Th1 mediated immune reactivity. To confirm and further investigate modulation of Th1 responses and development of autoimmune disease by LcS, the consequences of oral administration of LcS were assessed in several experiments. The effect of LcS varied between the different models. No modulation was found in the mitogen-induced cell proliferation and cytokine release assays in mesenteric lymph nodes of Wistar rats. LcS inhibited the Th1 mediated immune response in an adapted murine Local Lymph Node Assay (LLNA) in BALB/c mice, whereas experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in Lewis rats was aggravated. These varying effects on Th1 responses indicate that beneficial as well as harmful effects on immune related disorders could occur after LcS consumption. Since microarray analysis is suggested to be more sensitive and predictive than functional tests, gene expression profiling was included as an alternative endpoint in the testing of immunomodulation. The detected gene expression profiles did not reflect the effects of LcS on the immune system. Microarray analysis may therefore have no more predictive value than immune function assays when investigating immunomodulation by probiotics. To gain further insight into effects of probiotics on immune function, experiments including cytokine assays and gene expression analysis combined with disease models could be useful.

9. Immunomodulating capacity of kefir

Author(s): Vinderola, Celso G.; Duarte, Jairo; Thangavel, Deepa; Perdigon, Gabriela; Farnworth, Edward; Matar, Chantal (matarc@umoncton.ca)

Source: Journal of Dairy Research Volume: 72 Issue: 2 Pages: 195-202 Published: MAY 05

Abstract: Kefir is a fermented milk produced by the action of lactic acid bacteria, yeasts and acetic acid bacteria, trapped in a complex matrix of polysaccharides and proteins. Beyond its inherent high nutritional value as a source of proteins and calcium, kefir has a long tradition of being regarded as

good for health in countries where it is a staple in the diet. However, published human or animal feeding trials to substantiate this view are not numerous. The aim of this work was to determine the immunomodulating capacity of kefir on the intestinal mucosal immune response in mice and to demonstrate the importance of dose and cell viability on this response. BALB/c mice were fed with commercial kefir ad libitum (diluted 1/10, 1/50, 1/100 or 1/200) or pasteurized kefir (diluted 1/6, 1/10, 1/50, 1/100) for 2, 5 or 7 consecutive days. At the end of each feeding period, the bacterial translocation assay was performed in the liver. Small intestine structure was studied by haematoxylin-eosin staining and light microscopy. The number of IgA⁺ and IgG⁺ cells was also determined. For the functional doses chosen, cytokines (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, TNF- α and IFN- γ) were determined. Kefir and pasteurized kefir were able to modulate the mucosal immune system in a dose-dependent manner. Kefir was administered 10-times more diluted than pasteurized kefir, but it induced an immunomodulation of similar magnitude, indicating the importance of cell viability. The results suggest that a Th1 response was controlled by Th2 cytokines induced by kefir feeding. Pasteurized kefir would induce both Th2 and Th1 responses. This is the first study in vivo regarding the mechanisms involved in the immunomodulating capacity of the oral administration of kefir containing viable or heat-inactivated bacteria at different doses.

10. Gut mucosal immunomodulation by probiotic fresh cheese

Author(s): Medici, M. (mmedici@cerela.org.ar); Vinderola, C. G.; Perdigon, G.

Source: International Dairy Journal Volume: 14 Issue: 7 Pages: 611-618

Published: July 2004

Abstract: Probiotic Fresh Cheese (PFC) is a suitable vehicle for the oral administration of *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis* (lactic acid starter bacteria), *Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacillus acidophilus* and *L. paracasei* (probiotic bacteria). PFC warrants adequate viability of the bacteria (60 days after manufacture) and protects against acidity in vitro. The aim of this work was to evaluate the effect of PFC on the mucosal immune response in vivo. BALB/c mice were fed for 2, 5 or 7 consecutive days with PFC (108 cells/day/mouse). Mice fed with conventional balanced diet or with Control Fresh Cheese (CFC) were used as controls. The immune response (phagocytic activity of peritoneal macrophages, number of IgA⁺ producing cells in the small and large intestine and ratio of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes in the small intestine) was evaluated at the end of each feeding period. The presence of each

probiotic bacterium and total PFC microflora as bacterial antigens in Peyer's patches or in immune cells associated with the villi of the small intestine or in nodules and crypts of the large intestine was determined by using fluorescein isothiocyanate (FITC)-labelled bacteria. Histological preparations of the small and large intestine were performed 30 min after the administration of FITC-labelled bacteria. A significant increase in the phagocytic activity of peritoneal macrophages, in the number of IgA⁺ producing cells and in the CD4⁺ /CD8⁺ ratio was observed in the small intestine after 5 days treatment with PFC whereas no significant differences were observed in the large intestine. These values returned to control values 8d following PFC withdrawal. In the large intestine, no significant differences were observed respect to controls. FITC-labelled pure cultures of *R. bifidum* and *L. paracasei* were identified mainly in Peyer's patches (small intestine) whereas *L. acidophilus* was mainly located in the large intestine. CFC microflora was found in lower levels than PFC microflora. This study demonstrates that PFC is a dairy product that enables *Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacillus acidophilus* and *L. paracasei* to exert important immunomodulating effects in the gut. Copyright 2004 Elsevier Ltd. All rights reserved.

11. Immunostimulating and anti-cancer effects of *Pediococcus pentosaceus* EROM101 isolated from Korea.

Author(s): Song Mi-Kyung; Woo, Seok-Gyu; Jang, Jung-Soon; Kim, Jung-Hak; Kim, Hwa-Young; Hong, Seong-Gil; Lee, Byung-Wook; Park, Mi-Hyun (mhpark@erom.eromlife.co.kr); Chung, Kun Sub

Source: Korean Journal of Microbiology and Biotechnology Volume: 31 Issue: 4 Pages: 355-361 Published: December 2003

Abstract: Immunostimulating effects of lactic acid bacteria as biological response modifier is a subject of growing interest, but the knowledge of these focused on some bacteria as *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. In this study, we investigated the effects of *Pediococcus pentosaceus* EROM101 on the immunostimulating and anti-cancer activity in murine model. *P. pentosaceus* was mainly found in Kimchi and fermented sea food and is facultatively anaerobic, catalase-negative, gram-positive cocci arranged in pairs, tetrads and clusters. The immunostimulating effects of *P. pentosaceus* EROM101 were evaluated using IgA production assay of Peyer's patch and proliferation assay of exudated immune cells of Balb/C mice fed *P. pentosaceus* EROM101 for 3 weeks. The macrophage and splenocyte proliferation were enhanced by orally

administrated of *P. pentosaceus* EROM101. Also, IgA production in Peyer's patch increased by *P. pentosaceus* EROM101. Anti-cancer activity of *P. pentosaceus* EROM101 was appeared in Sarcoma 180 tumor-bearing ICR mice. However, this bacterium lysate itself appeared to have noncytotoxic substance against Sarcoma 180 cell in vitro. These results suggested that *P. pentosaceus* EROM101 reinforce immune system and therefore was revealed to be anti-cancer activity in mice.

12. A novel immunostimulating aspect of *Lactobacillus gasseri*: Induction of "Gasserokine" as chemoattractants for macrophages

Author(s): Kitazawa, Haruki; Ino, Tomohiko; Kawai, Yasushi; Itoh, Takatoshi; Saito, Tadao

Source: International Journal of Food Microbiology Volume: 77 Issue: 1-2 Pages: 29-38 Published: 25 July, 2002

Abstract: The chemotactic activity of the culture supernatants from 14 strains of *Lactobacillus acidophilus* and *L. gasseri* was examined for murine macrophages. Significant macrophage chemotactic activity was observed in three strains of *L. acidophilus* and all strains of *L. gasseri*. The highest activity was observed in the supernatant (1131-sup) from 24-h cultures of *L. gasseri* JCM1131T. The chemotactic factor from 1131-sup, designated as "Gasserokine", was purified by the C18 reverse phase and ion-exchange chromatography. The purity of Gasserokine was checked by HPLC with the reverse-phase mode. The chemotactic activity of Gasserokine was also observed for human monocytes. The macrophage chemotaxis induced by *L. gasseri* JCM1131T culture supernatants was discovered to be a new biological function exerted by probiotic lactic acid bacteria. Therefore, the activity is expected to be used for one of the functional parameters in the immunomodulating properties of probiotic lactic acid bacteria.

13. Immunostimulatory actions of lactobacilli: Mitogenic induction of antibody production and spleen cell proliferation by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Lactobacillus acidophilus*

Author(s): Easo, J. G.; Measham, J. D.; Munroe, J.; Green-Johnson, J. M.

Source: Food and Agricultural Immunology Volume: 14 Issue: 1 Pages: 73-83 Published: March, 2002

Abstract: We investigated the ability of heat-treated *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Lactobacillus acidophilus* to act as direct inducers of

antibody production and cellular proliferation. Yogurt starter-derived strains of *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *L. acidophilus* induced high levels of antibody production by murine splenocytes in vitro. Both IgM and IgG isotypes were produced. In contrast, two different strains, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (ATCC 11977) and *L. acidophilus* (ATCC 521) did not induce antibody production by murine splenocytes. While all four strains were able to induce some degree of splenocyte proliferation, the yogurt starter-derived strain of *L. acidophilus* was the most potent inducer. These results indicate a mitogenic effect of certain strains of lactobacilli on murine splenocytes, resulting in polyclonal antibody production. The ability of heat-treated lactic acid bacteria to induce antibody production and proliferation suggests the involvement of a heat-resistant structural component in non-specific activation of the immune system by these strains of lactic acid bacteria.

14. Immunomodulating effects of milks fermented by *Lactobacillus helveticus* and its non-proteolytic variant.

Author(s): Matar, C, Valdez, JC, Medina, M, Rachid, M, Perdigon, G

Source: Journal of Dairy Research Volume: 68 Issue: 4 Pages: 601-609

Published: 2001

Abstract: Effects of milks fermented by *Lactobacillus helveticus* and its non-proteolytic variant on mucosal and tumoral immunity were studied by oral administration of milk to mice (3 ml/mouse, daily) for 3, 5 and 7 days. Immune response was assessed by analysing activity of peritoneal macrophages, and cells secreting IgA connected with gut- and bronchial-associated lymphoid tissue. Number of cells was determined by direct immunofluorescence. Antitumour activity was monitored by studying regression of subcutaneously implanted fibrosarcomas. After 3 days of feeding milk fermented by *L. helveticus* wild type, number of cells secreting IgA increased significantly at both intestinal and bronchial levels, indicating that cellular migration had occurred. There was no effect when milk fermented by the non-proteolytic variant of *L. helveticus* was administered. Both fermented milks (wild type or its variant) exhibited effects on activity of peritoneal macrophages, which might be indirectly correlated with regression of the fibrosarcoma. Although the mechanism by which lactic acid bacteria enhance the immune system is not clear, it is suggested that the bioactive compounds released during milk fermentation might contribute to immunoenhancing properties of these products. By releasing biopeptide, lactic acid bacteria have important implications in modulation of the host's immune response, most specifically its cellular immune response.

제 7 장 참고문헌

1. A.O.A.C. 1980. Official Methods of Analysis. 13th ed., Association of Official Analytical Chemists. Washington, D.C.
2. Chung, K. S., Kim, S. S., Kim, H. S., Kim, K. Y., Han, M. W., and Kim, K. H. 1993. Effect of Kp, an antitumor protein-polysaccharide from mycelial culture of *Phellinus linteus* on the humoral immune response of tumorbearing ICR mice to sheep red blood cells. Arch. Pharm. Res. 16 : 336~338.
3. Clark, P. A., Cotton, L. N., and Martin, J. H. 1993. Selection of bifidobacteria for use as dietary adjuncts in cultured dairy foods : II-Tolerance to simulated pH of Human Stomachs. Cultured Dairy Products J. 28(4) : 11~14.
4. Gilliland, S. E., and Speck, M. L. 1977. Antagonistic action of *Lactobacillus acidophilus* toward intestinal and foodborne pathogens in associative cultures. J. Food Prot. 40(12) : 820~823.
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. Glaser, J., Carroad, P. A., and Dunkley, W. L. 1979. Surface structure of cottage cheese curd by electron microscopy. J. Dairy Sci. 62 : 1058~1068.
7. Hammes, W. P., Weiss, N., and Holzapfel, W. 1992. The Genera *Lactobacilli* and *Carnobacterium*. pp. 1563-1578. In *The prokaryotes*. 2nd Edition. Springer-Verlag. New York.
8. Harvey, C. D., Morris, H. A., and Jenness, R. 1982. Relation between melting and textural properties of process Cheddar cheese. J. Dairy Sci. 65 : 2291~2295.
9. Ikekawa, T., Nakanishi, M., Uehara, N., and Chihara, G. 1968. Antitumor action of some basidiomycetes, especially *Phellinus linteus*. Gann 59 : 155~157.
10. Jarrett, W. D., Aston, J. W. and Dulley, J. R. 1982. A simple method for estimating free amino acids in Cheddar cheese. Aust. J. Dairy Technol. 37 :

55~58.

10. Kang, N. S., Moon, E. Y., Cho, C. G., and Pyo, S. 2001. Immunomodulating effect of garlic component, allicin, on murine peritoneal macrophages. *Nutrition Research*. 21(4) : 617~626.
11. Kosikowski, F.V. 1982. Cheese and fermented milk foods. 2nd ed. Edwards Brothers, Inc., Ann. Arbor.
12. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature*. 227 : 680~685.
13. Law, B. A. and Wigmore, A. 1982. Accelerated cheese ripening with food grade proteinases and intracellular enzymes from starter *streptococci*. *J. Dairy Res.*, 50 : 519~525.
14. Marin, M. L., Lee, J. H., Murtha, J., Ustunol, Z., and Pestka, J. J. 1997. Differential cytokine production in clonal macrophage and T-cell lines cultured with bifidobacteria. *J. Dairy Sci.* 80 : 2713~2720.
15. Marin, M. L., Tejada-Simon, M. V., Lee, J. H. Murtha, J., Ustunol, Z., and Pestka, J. J. 1998. Stimulation of cytokine production in clonal macrophage and T-cell models by *Streptococcus thermophilus* : comparison with *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus bulgaricus*. *J. Food Prot.* 61(7) : 859~864.
16. Marsili, R. T., Ostapenko, H., Simmons, R. E., and Green, D. E. 1981. High Performance Liquid Chromatographic determination of organic acid in dairy products. *J. Food Science.* 46(1) : 52~57.
17. Martin, J., Meade, C. J., and Hunt, R. 1977. Importance of the spleen for the immuno inhibitory action of linoleic acid in mice. *Int Archs Allergy Appl Immunol.* 53 : 469~473.
18. Mary, L., Kathleen, M. N., and Paul, M. N. 1983. The effects of quality and quantity of dietary fat on the immune system. *J Nutr.* 113 : 951~961.
19. Meade, C. J., and Mertin, J. 1976. The mechanism of immunoinhibition by arachidonic and linoleic acid : effect on the lymphoid and reticuloendothelial systems. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 51 : 2~24.
20. Medici, M., Vinderola, C. G., and Perdognon, G. 2004. Gut mucosal immuno-

modulation by probiotic fresh cheese. *Int. Dairy J.* 14 : 611~618

21. Mizuno, M., Minato, K., Kawakami, S., Tatsuoka, S., Denpo, Y., and Tsuchida, H. 2001. Contents of anti-tumor polysaccharides in certain mushrooms and their immunomodulating activities. *Food Science and Technology Research.* 7(1) : 31~34.
22. Mizuno, T. 1989. Pharmacological and Gastronomic effects of Fungi and its Applications. *The chemical Times*, Kanto Chemical Col., Inc. 131(1) : 12~21.
23. Okuda, T., Yoshioka, Y., Ikekawa, T., Chihara, G., and Nishioka, K. 1972. anticomplementary activity of antitumor polysaccharides. *Nature New Biol.* 238 : 59~60.
24. Park, S. J., Lim, D. S., Yoon, S. K., Baek, Y. J., and Kim, C. H. 1998. Isolation and Identification of *Enterococcus faecalis* 2B4-1 Containing Antitumor substances. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 26(6) : 471~475.
25. Perdigon, G., Nader de Macias, M. E., Alvarez, S., Medici, M., Oliver, G., and Pesce de Ruiz Holgado, A. A. 1986. Effect of a mixture of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus* administered orally on the immune system in mice. *J. Food Prot.* 49(12) : 986~989.
26. Perdigon, G., Nader de Macias, M. E., Alvarez, S., Medici, M., Oliver, G., and Pesce de Ruiz Holgado, A. A. 1986. Effect of perorally administered lactobacilli on macrophage activation in mice. *Infect. Immun.* 53(2) : 404~410.
27. Perdigon, G., Nader de Macias, M. E., Alvarez, S., Oliver, G., and Pesce de Ruiz Holgado, A. A. 1987. Enhancement of immune response in mice fed with *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus acidophilus*. *J. Dairy Sci.* 70 : 919~926.
28. Saito, H., Tomioka, H., and Nagashima, K. 1987. Protective and therapeutic efficacy of *Lactobacillus casei* against experimental murine infections due to *Mycobacterium fortuitum* complex. *J. Gen. Microbiol.* 133 : 2843~2851.
29. Sava, V. M., Galkin, B. N., Meng, Y. H., Ping, C. Y., and Huang, G. S. 2001. A novel melanin-like pigment derived from black tea leaves with immunostimulating activity. *Food Research International.* 34(4) : 337~343.

30. Steel, R. G. and Torrie, D. 1980. Principles and Procedures of Statistics. 2nd eds. McGraw-Hill Book Co., Inc., New York.
31. Suzuki, I., Hashimoto, K., Oikawa, S., Sato, K., Osawa, M., and Yadomae, T. 1980. Antitumor and immunomodulating activities of a β -glucan obtained from liquid-cultured *Grifola flondosa*. Chem. Pharm. Bull. 37 : 410~413.
32. Suzuki, K., Mikami, T., Okawa, Y., Tokoro, A., Suzuki, S., and Suzuki, M. 1986. Antitumor effect of hexa-N-acetyl-chitohexaose and chitohexaose. Carbohydr. Res., 151 : 403~408.
33. Tejada-Simon, M. V., and Pestka, J. J. 1999. Proinflammatory cytokine and nitric oxide induction in murine macrophages by cell wall and cytoplasmic extracts of lactic acid bacteria. J. food Prot. 62(12) : 1435~1444.
34. Tokoro, A., Tatewaki, K., Suzuki, T., Mikami, S., and Suzuki, M. 1988. Growth inhibitory effect of hexa-N-acetyl-chitohexaose and chitohexaose against Meth-A solid tumor. Chemical Pharmaceutical Bulletin. 36(2) : 784~790.
35. Vanderpoorten, R. and Weckx, M. 1972. Breakdown of casein by rennet and microbial milk clotting enzymes. Neth. Milk Dairy J. 26 : 47~59.
36. White, J. A., Hart, R. J., and Fry, J. C. 1986. An evaluation of Waters Pico-Tag system for the amino acid analysis of food materials. J. Automatic Chemistry. 8(4) : 167, 170~177.
37. 戸倉清一. 1986. キチン, キトサンの生理活性について. 月刊フーヅケミカル. p.29.
38. 김성영, 신광순, 이호. 2004. *Lactobacillus brevis* FSB-1의 균체성분에 의한 면역증진 활성. 한국식품영양과학회지. 33(9) : 1552~1559.
39. 김영교, 1976. 치즈의 숙성에 관한 연구. 3. 체다치즈의 수용성질소화합물. 한국축산학회지, 18 : 176~181.
40. 류병호, 김동석, 조경자, 신동분. 1989. 해조류의 Sarcoma-180에 대한 항암효과. 한국식품과학회지. 21 : 595~600.
41. 유성호, 문경호, 박무영. 1982. 한약재로부터 L1210 세포생장 억제물질의 검색. 한국산업미생물학회지. 10(1) : 53~58.
42. 이영숙, 김동석, 류병호, 이성호. 1992^d. 파래와 곤피에서 추출한 당단백질의 Sarcoma-180 cell에 대한 항암효과 및 면역활성. 한국영양식량학회지. 21(5) : 544~550.
43. 이인선, 하영득. 1994. 생약제가 면역세포 활성화에 미치는 영향. 한국영양식량

- 학회지. 23(1) : 150~155.
44. 정하열, 김현배. 2000. 13종 허브추출물의 수퍼옥사이드 소거능과 세포 독성 및 면역증강 효과의 in vitro계 검색. 한국식품과학회지. 32(3) : 699~705.
45. 축산물의 가공기준 및 성분규격. 2005. 국립수의과학검역원.