

발간등록번호

11-1543000-001735-01

프로바이오틱 *Lactobacillus sakei* 사균 분말 생산을
위한 살균공정 개발

(Development of a sterilization process
for probiotic *Lactobacillus sakei* dead cell powder
production)

(주)프로바이오틱

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “프로바이오틱 *Lactobacillus sakei* 사균 분말 생산을 위한 살균공정 개발”(개발기간 : 2015. 12. 11. ~ 2016. 12. 10.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2016. 12. .

주관연구기관명 : (주)프로바이오틱 (대표자) 박용하 (인)



주관연구책임자 : 김병천

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

보고서 요약서

과제고유번호	115043-1	해당 단계 연구 기간	2015.12.11. ~2016.12.10.	단 계 구 분	(해당단계)/ (총 단계)
연구 사업 명	중 사업 명	고부가가치식품기술개발사업			
	세부 사업명				
연구 과제 명	대 과제 명				
	세부 과제명	프로바이오틱 <i>Lactobacillus sakei</i> 사균 분말 생산을 위한 살균공정 개발			
연구 책임자	김병천	해당단계 참여 연구원 수	총: 4명 내부: 4명 외부: 명	해당단계 연구 개발비	정부:48,000천원 민간:16,000천원 계:64,000천원
		총 연구기간 참여 연구원 수	총: 4명 내부: 4명 외부: 명	총 연구개발비	정부:48,000천원 민간:16,000천원 계:64,000천원
연구기관명 및 소속부서명	(주)프로바이오틱 기술연구소			참여기업명: (주)프로바이오틱	
위탁 연구	연구기관명:			연구책임자:	
요약 ○ 고농도의 프로바이오틱 유산균의 사균 제품 생산을 위하여 소형의 마이크로웨이브를 이용할 수 있는 연속 살균 처리 공정을 개발하고, 고압고온 반응기를 이용한 열처리 방법을 제시함 ○ <i>Lactobacillus sakei</i> 사균 분말 시제품 생산 및 사균체 유산균 분말에 포함된 유산균의 유전자 단편화 및 형태적 안정성을 확인 ○ 프로바이오틱 유산균 사균체의 정량을 위한 지방산 정량분석 방법 제시				보고서 면수: 70쪽	

. 국문 요약문

		코드번호	D-01			
연구의 목적 및 내용	<ul style="list-style-type: none"> ○ 연구 목표 <ul style="list-style-type: none"> - 고농도의 프로바이오틱 유산균 사균 분말 제품 생산에 적합한 살균 방법 선정 - <i>Lactobacillus sakei</i> 사균 분말의 변색을 일으키지 않는 최적의 살균 공정 개발 - 시험규모의 발효기에서 생산되는 <i>Lactobacillus sakei</i>을 이용한 사균 분말 시제품 생산 ○ 연구 내용 <ul style="list-style-type: none"> - 분말 제품 생산용 고농도 유산균 (>10¹¹CFU/ml)살균 조건 탐색 - 마이크로웨이브 살균시스템 고안 - 살균후의 유전자서열 변이 조사 - <i>Lactobacillus sakei</i> 배양 및 사균 분말 시제품 생산 					
연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> ○ 고농도의 프로바이오틱 유산균(>10¹¹CFU/ml)의 사균 제품 생산을 위한 마이크로웨이브 연속 살균 처리 공정개발 ○ 고농도의 프로바이오틱 유산균(>10¹¹CFU/ml)의 사균 제품 생산을 위한 열처리 공정 개발 ○ 시험규모의 발효기에서 생산되는 <i>Lactobacillus sakei</i>을 이용한 사균 분말 시제품 생산 ○ 마이크로웨이브 처리 혹은 열처리 사균체 유산균 분말에 포함된 유산균의 형태적 안정성 확인 ○ 프로바이오틱 유산균 사균체의 정량을 위한 지방산 정량분석 방법 제시 					
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 프로바이오틱 유산균 살균 공정을 이용한 사균체 제품 생산 ○ 개별인증형 사균체 프로바이오틱 유산균의 정량을 위한 지방산 분석 방법 적용 ○ 지적재산권 확보 ○ 살균 방법의 이전 및 제품화 ○ 논문 발표 및 학술발표 					
중심어 (5개 이내)	고농도세포	살균	사균	변색	극초단파	

< SUMMARY >

		코드번호	D-02			
Purpose& Contents	<ul style="list-style-type: none"> ○ Purpose <ul style="list-style-type: none"> - Selection of sterilization methods for production of highly concentrated probiotic lactic acid bacteria powder products - Selection of sterilization processes not causing the browning reaction of <i>Lactobacillus sakei</i> powder - Production of <i>Lactobacillus sakei</i> dead cell powder using a pilot fermenter ○ Contents <ul style="list-style-type: none"> - Search sterilization conditions for high-concentration lactic acid bacteria solution (>10¹¹CFU/ml) - Design of microwave sterilization system - Investigation of gene variation after sterilization - Cultivation of <i>Lactobacillus sakei</i> and production of dead bacteria powder 					
Results	<ul style="list-style-type: none"> ○ Development of a continuous microwave sterilization treatment process for production of ghost probiotic lactic acid bacteria (>10¹¹CFU/ml) ○ Development of heat treatment process for production of high concentration of ghost probiotic lactic acid bacteria (>10¹¹CFU/ml) ○ Production of ghost bacteria powder using <i>Lactobacillus sakei</i> cultured in a pilot scale fermenter ○ Confirmation of morphological stability of lactic acid bacteria contained in microwave-treated or heat-treated cells of lactic acid bacteria powder ○ Suggestion of a method for quantitative analysis of fatty acids for the determination of probiotic Lactobacilli 					
Expected Contribution	<ul style="list-style-type: none"> ○ Production of a ghost probiotic products using developed sterilization process ○ Application of fatty acid analysis method for quantification of individual certified probiotic lactic acid bacteria ○ Preparation of a intellectual property ○ Transfer of sterilization methods and commercialization of ghost probiotic cells ○ Paper presentation and academic presentation 					
Keywords	Concentrated cells	Sterilization	Dead cell	Discoloration	Microwave	

< Contents >

1. Outline of research and development project	1
2. Technology development status in domestic and overseas	10
3. Research contents and results	11
4. Achievement of project goal and contribution to related field	65
5. Plan to use research results	67
6. Overseas science and technology information collected during the research proces	67
7. Security rating of R & D achievement	67
8. Research facilities registered in the National Science and Technology Comprehensive Information System	67
9. Implementation of safety measures in laboratories	67
10. Representative Research Results of R & D Project	68
11. Others	69
12. References	70

〈 목 차 〉

1. 연구개발과제의개요	1
2. 국내외 기술개발 현황	10
3. 연구수행 내용 및 결과	11
4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	65
5. 연구결과의 활용계획 등	67
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보	67
7. 연구개발성과의 보안등급	67
8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황	67
9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적	67
10. 연구개발과제의 대표적 연구실적	68
11. 기타사항	69
12. 참고문헌	70

1. 연구개발과제의 개요

1-1. 연구개발 목적

- 고농도의 프로바이오틱 유산균 사균 분말 제품 생산에 적합한 살균 방법 선정
- *Lactobacillus sakei* 사균 분말의 변색을 일으키지 않는 최적의 살균 공정 개발
- 시험규모의 발효기에서 생산되는 *Lactobacillus sakei* 를 이용한 사균 분말시제품 생산

1-2. 연구개발의 필요성

- 프로바이오틱은 살아있는 미생물로 인간의 건강에 도움을 줄 수 있음
- 프로바이오틱의 효과
 - 소화 촉진
 - 살아서 장에 도달
 - 식품의 형태로 섭취 가능
 - 유해균이 장내에서 증식하는 것을 방지
 - 장운동 개선을 도움
 - 건강에 유익한 대사산물을 생산함
- 최근 연구에는 장 점막의 면역에 도움을 줄 수 있는 것으로 알려졌음
- 상용화되어 시판되는 유산균의 제품에 다양한 형태의 제품으로 이용되고 있음
- 유산균 생균(live cell)은 제품에 포함된 유산균을 배양하면 다시 자랄 수 있음
- 사균은 프로바이오틱과 같은 효과가 없는 것으로 생각되었으나, 최근의 연구결과에는 사균이 생균과 동등하거나 더 뛰어난 효과가 보고되고 있음
- 유산균 사균(dead cell) 제품은 제품에 포함된 유산균이 모두 사멸 상태인 제품임
- 유산균 사균(dead cell) 효과: 세포벽의 구조 안정성 (일본 연구팀, Fujiki et al. 2012)
 - 열처리에 의한 면역조절 물질의 조성을 변화하는 구조적 화학적 변화
 - *Lactobacillus plantarum* L-137의 면역조절에서 세포벽(cell wall)의 구조가 면역세포를 자극하는 주요한 요소로 생각됨
 - *Lactobacillus plantarum* L-137의 세포벽이 저온보관에서도 보관시간이 길어지면 불안전해짐 또한 인체의 소화액과 접촉에 의해 세포벽이 약화됨
 - 열처리 사멸은 *Lactobacillus plantarum* L-137의 세포벽이 안정성을 증가하였음
 - 열처리 사멸된 *Lactobacillus plantarum* L-137과 생균과의 비교에서 사멸된 유산균이 더 많은 interleukin-12를 생산하였음
 - 또한 인공장액에서 처리했을 경우도 열처리 사멸된 L-137의 활성은 유지되었음
 - 열처리 사멸된 L-137이 대장염이 유발된 마우스 모델 시험에서 더 높은 효과를 보였음

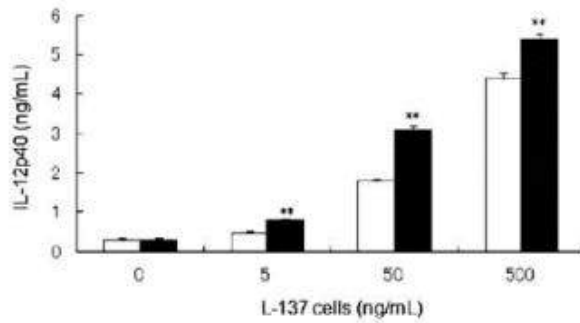


그림 1-1. 열처리 사멸한 *Lactobacillus plantarum* L-137의 Interleukin-12 유도 효과
 열처리 사균에 의한 면역조절물질인 interleukin-12의 생산이 높았음
 흰색 막대, 비열처리 유산균; 검은색 막대 열처리 사멸 유산균

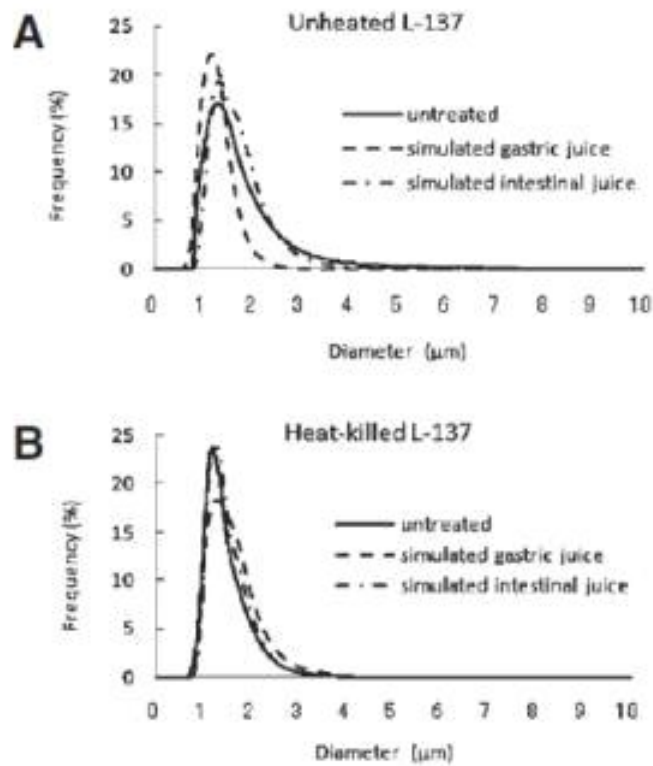


그림 1-2. 생균과 사균 *Lactobacillus plantarum* L-137의 세포 직경 분포
 인공 위액과 인공 장액에 *Lactobacillus plantarum* L-137 생균과 열처리 사균을
 처리한 후, 세포 직경의 분포를 분석함

○ 유산균 사균(dead cell) 효과: 유전자 발현 조절 (유럽 연구팀, Demont et al., 2016)

- *Lactobacillus paracasei* NCC 2461을 이용한 연구
- Human Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs)에서 면역 조절 물질의 증가에서 사균에 의한 IL-10의 생산이 더 높았음
- *Lactobacillus paracasei* NCC 2461은 IL-10의 생산과 조절 FoxP3+의 증가를 유도함
- 이러한 면역물질 생산에서 생균과 열처리 사균은 다른 활성을 나타냄
- 열처리된 유산균은 microRNA의 차별적인 발현을 이용하여 IL10 mRNA의 안정성에 영향을 줌
- 프로바이오틱은 RNA 단편을 가지고 있으며, 열처리로 파쇄된 막을 통해 배출된 RNA 단편이 숙주의 유전자 발현에 영향을 줄 수 있음
- 몇몇의 프로바이오틱 균주에서 miRNA-27a와 70%이상의 상동성을 가지는 서열이 다수 존재함이 확인됨

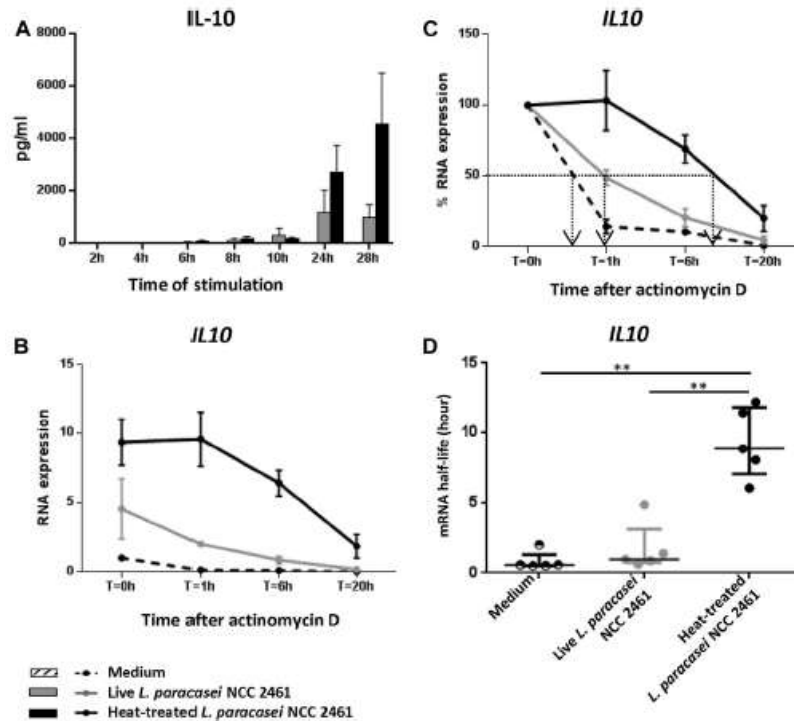


그림 1-3. 생균 혹은 열처리된 *Lactobacillus paracasei* NCC 2461에 의한 PBMCs세포에서 Cytokine 발현

A. 상층액에 분비된 IL-10 단백질

B. 생균 혹은 열처리된 *L. paracasei* NCC 2461에 의해 PBMCs세포에서 증가된 IL10 mRNA 발현

C. PBMCs세포에서 IL10 mRNA의 half-life

D. PBMC 제공자 5명의 시료에서 보이는 IL10 mRNA half-life의 중간 값

Pre-mir-27a sequences tested:

>hsa-mir-27a MI0000085

CUGAGGAGCA **GGGCUUAGCUGCUUGUGAGCA**GGGUCCACACCAAGUCGUG **UUCACAGUGGCUAAGUCCG**CCCCCCAG

Control sequence

Sequence miR-27a

Number of mismatches	Control sequence in miR-27a			Sequence miR-27a		
	4	5	6	4	5	6
<i>L. paracasei</i> NCC 2461	0	0	0	4	14	131
<i>B. longum</i> NCC 3001	0	0	0	2	17	88
<i>B. lactis</i> NCC 2818	0	0	0	0	8	71
<i>L. johnsonii</i> NCC 533	0	0	0	1	4	58
<i>L. rhamnosus</i> NCC 4007	0	0	0	2	22	153
<i>B. longum</i> NCC 2705	0	0	0	1	17	86

그림 1-4. miR-27a의 서열과 6개의 프로바이오틱 균주의 게놈이 가지는 서열에서 70%이상의 유사성을 가지는 염기서열의 수

○ 사균체 제조의 이유

- 일부 생리활성기능은 생균보다 사균이 더 뛰어난 효과를 가지고 있음
- 생균인 경우 저온 보관에서도 세포 구성성분의 분해가 일어나지만 열처리 사균은 안정성이 증가됨
- 사균체는 생균제와는 비슷하거나 뛰어난 생리활성을 보일 수 있음(Demont et al. 2015)
- 사균체의 이용은 생균제 생산 및 판매과정의 균수를 유지하기 위해 필요한 저온 저장 등의 유통과정의 단계가 감소됨
- 생균은 온도 상승으로 사멸함으로 열처리 공정이 필요한 다양한 형태의 생균제 가공제품은 생산하기 곤란함

○ 사균체 제조국 내외의 제조 현황

- 국내: 경희대와 바이오제닉스가 유산균관련 연구에 사균체 생산연구도 포함하여 진행
- 국외: 일본에서는 제품이 생산 판매되고 있음
유럽에서도 꾸준한 연구가 진행 중 임

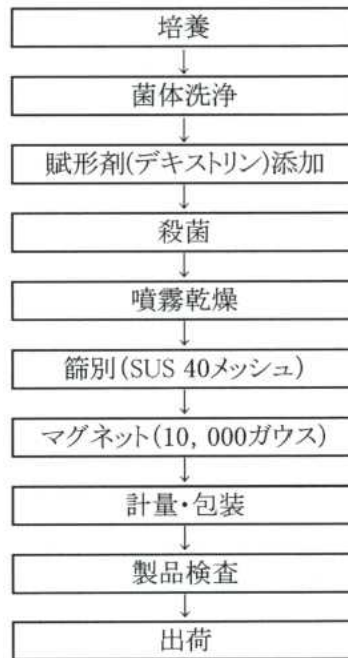




그림 1-5. 일본 K주식회사에서 2010년에 생산한 사균체 생산 공정도

- 현재 일본에서는 기능성 유산균의 경우 생균 뿐 아니라 사균 제품의 수요도 증가하고 있음
- 국내에서 개발된 토종 기능성 유산균의 국외 수요가 증가하고 있음
- 일반적으로 저농도의 유산균 시료에 포함된 유산균은 간단한 열처리로 쉽게 사균으로 전환됨
- 고농도 유산균의 사균화를 위한 열처리는 유산균의 변색을 야기할 수 있음
- 살균공정과 색소 생성과의 상관관계
 - 가열에 의한 당이 함유된 식품처리는 캐러멜화라는 당의 갈변반응을 유발시킴
 - Fructose는 110°C에서 캐러멜화가 진행되고, Galactose, Glucose, Sucrose는 160°C에서 캐러멜화가 진행됨
 - 고농도의 균체를 열처리하는 과정에서 시간이 증가하면 갈변반응에 의한 변색도 증가함
 - 유산균의 세포벽 성분에는 Glucose를 포함한 다양한 육탄당이 포함되어있으므로 열처리에 의한 변색은 당연한 결과임 (Know & Holmwood, 1968)
- 유산균 분말 제품의 생산은 통상적으로 균체를 회수한 후, 동결건조 방법으로 유산균 균체의 수분을 제거하여 유산균의 활성을 유지함

- 분말 형태의 유산균 사균을 만드는 과정에서는 균체의 살균과 분말제품의 변색방지를 모두 충족해야 함
- 특히 배양 후 동결건조를 위해 원심 분리한 유산균은 균체의 농도가 높아짐. 고농도의 균체(>10¹¹CFU/ml)의 경우 고농도의 균체를 용기에 넣은 후 121℃ 고압증기살균기 (autoclave)를 이용한 살균에서 용기 내의 균체 1회의 autoclave 처리에 의해 완전히 살균되지 않음.
- 고농도의 균체(>10¹¹CFU/ml)의 경우 살균 효율을 증진시키기 위해 반복적인 열처리를 하는 경우 열처리 시간의 증가에 따라 갈변화가 유도될 수 있고 최종 분말 형태 제품의 변색일 발생할 수 있음
- 사균체의 수요가 늘어날 것으로 예측되는 현시점에서, 기능성 유산균 균체의 변색이 유발되지 않고, 고농도의 균체 시료를 효과적으로 살균할 수 있는 공정의 개발이 필요함
- 극초단파는 물질이 내부에 에너지를 전달하여 시료 내부의 온도를 올릴 방법임
- 극초단파를 이용한 사균 제조 공정은 균체의 색을 변화시키지 않고 균체를 모두 살균할 수 있는 최적의 방법을 제시할 수 있을 것으로 사료됨
- 기존의 살균기술과 마이크로웨이브 살균기술의 특징 및 장단점 비교 필요

	기존의 살균기술	마이크로웨이브 살균기술
장점	- 기존장비이용	- 고농도 미생물 살균이 용이함 - 열전달 방식이 전자파로 전달 : 2450 MHz의 주파수로 시료 내부와 외부에 동일한 열전달 가능 : 시료 내부 외부 동일하게 열전달 - 균체 변색 없음
단점	- 고농도 미생물 살균이 잘 되지 않음 - 열전달 방식의 차이로 미생물입자 내부로 열전달이 어려움 : 시료외부로부터 내부로 열 전달 - 균체 변색 발생	- 신규장비 필요 - 마이크로웨이브의 장비 제작 및 조립 - 최적 살균조건을 찾기 위한 전자파 조사 방법 결정이 필요함
균체 변색	- 열처리 후 건조 	- 마이크로웨이브 처리 후 건조 

- 열처리에 의해 균체사멸이 원활하게 진행되지 않음을 나타내는 선행연구
 - 고온에서 장시간 처리 후 *Lactobacillus sakei*의 생균수 변화
 - 고농도의 균체를 사멸하기 위해 열처리 시 6일간의 85℃ 처리에서도 최초 사용한 5×10^{10} (CFU/g)의 균은 실험 종료 후에 10^7 (CFU/g) 이상 생존하였음

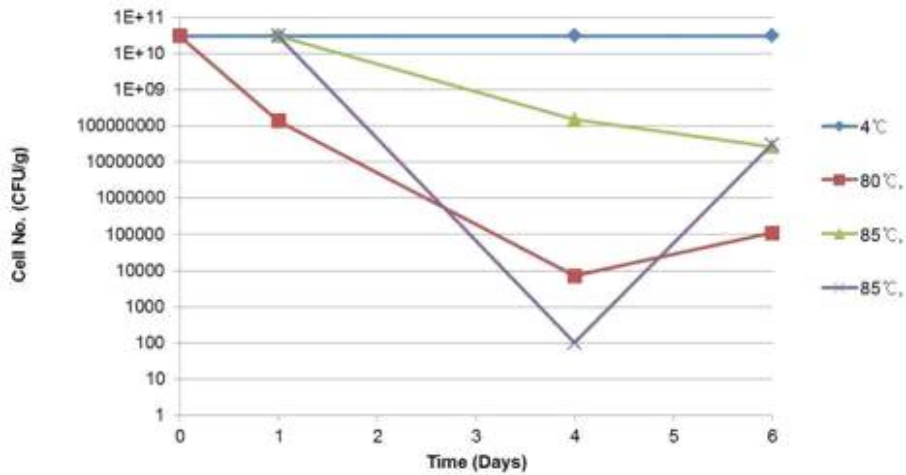


그림 1-6. 열처리 후 균체 사멸

- 열처리에 의한 유산균 분말의 변색: 10^7 (CFU/g) 이상이 생존한 열처리 시료에서 균체의 색이 갈색으로 변색되었음
- 열처리에 의한 유산균 분말의 품질 변화: 장시간 고온 처리 시 균체 시료에서는 탄 냄새가 남



그림 1-7. 사균체 분말 생산을 위한 가열후 분말의 변색

- 마이크로 웨이브에 의한 열전달 방식의 문제점
 - 마이크로 웨이브 파장에 의해 기기내부에서 특정 부분에만 열이 집중되는 현상이 발생
 - 가정용 전자렌지는 하부의 회전판에 의해 시료의 열전달을 도움
 - 고농도 세균의 전자파처리는 열전달의 효율성을 올리는 방법이 필요함
 - 마이크로 웨이브 조사장치내의 열전달이 일정하지 않음

○ 유산균 시장분석

- 기능성 프로바이오틱이 사용된 제품의 시장은 점차 증가하는 추세임

구분	현재의 시장규모(2014년)	예상 시장규모(2015년)
	기능성 프로바이오틱스 적용제품	기능성 프로바이오틱스 적용제품
국내 시장규모	18,000	20,000
산출 근거	식약처 & 한국식품공업협회	

1-3. 연구개발 범위

- 분말 제품 생산용 고농도 유산균 ($>10^{11}$ CFU/ml) 살균 조건 탐색
 - *Lactobacillus sakei* 고농도 균체 살균에 필요한 고압증기처리 및 극초단파 가열 시간 조사
 - 30L 반응기에서 고압증기 처리에 의한 균체 시료의 살균 시간 및 갈변 정도 조사
 - 마이크로웨이브의 열이 가해지는 공간의 anti-nodes 위치 조사
 - Anti-nodes 공간의 살균 시간 및 시료 부피 조사
- 마이크로웨이브 살균시스템 고안
 - 마이크로웨이브 연속 살균 공정 운전
 - 고농도 *Lactobacillus sakei*의 마이크로웨이브 살균 후 변색이 발생하지 않는 조건 조사

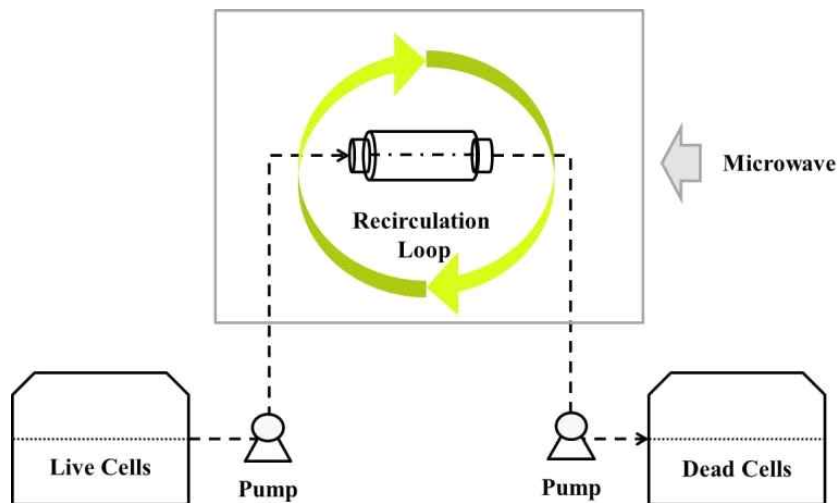


그림 1-8. 고농도 세균의 전자파처리는 연전달의 효율성을 올리기 위한 전자파조사 장치내의 유체 순환장치 사용

- 전자파 살균 후의 유전자서열 변이 조사
 - 전자파 조사에 의한 *Lactobacillus sakei* 유전자 변이 분석
- *Lactobacillus sakei* 배양 및 사균 분말 시제품 생산
 - 파이롯 반응기(>300L)를 이용한 *Lactobacillus sakei* 배양, 균체회수, 최적화 살균 공정을 이용한 살균
 - 살균된 고농도 균체를 동결 건조하여 사균 분말 시제품 생산

2. 국내외 기술개발 현황

- 건강기능식품 개별인증형 유산균 균주의 사균체 제품은 국내에 없음

국내

- 사균체 공정
 - 열처리 및 분무
 - : 바이오제닉스의 초미립자 열처리 유산균 nF1
 - 토탈화 공정
 - : 토탈화 공정을 이용한 *Lactobacillus acidophilus* 함유제제 (동화제약 락테올) - 효능성 검증의 문제로 식품의약품 안전처로부터 판매중단 조치 받음
 - 가열 및 급냉
 - : 유산균 발효액을 적정 온도 및 속도로 간접 가열한 이후 급속 냉각하여 사균체 제조 (셀 바이오텍)
- 사균체의 정량:
 - 락토바실루스아시도필루스균 토탈화동결건조물 정량법 (식품의약품안전청 공정서 DB)
 - : 현미경으로 사균체를 관찰하여 세균수측정용셀(Haemocytometer)를 가지고 대구획 6개(소구획으로 96개) 중 소구획상의 평균 락토바실루스아시도필루스균수(n)를 산출

국외

- 사균체 공정
 - 일본
 - : 열처리 70℃에서 10분 및 초음파처리, 열처리 후 동결건조한 균체를 초음파 처리 후 사용 (Murosaki et al, 1998)
 - 유럽
 - : 열처리 140℃에서 15초, Plate heat exchanger (Alfa Laval RF 372, Alfa Laval Mid Europe AG, Dietlikon, Switzerland)이용, 네슬러 (Demont et al., 2016)

3. 연구수행 내용 및 결과

가. 연구내용

(1) 프로바이오틱 유산균 *Lactobacillus sakei* Probio 65 균주의 산업용 배양(>250L) 및 유산균 균체 확보: 300L 발효기를 이용한 유산균 배양 및 균체 회수

(가) 종균 활성화

① 1차 균주 활성화 (1차 종균)

- ㉠ -70℃ 보관중인 *Lactobacillus sakei* Probio 65 stock을 MRS broth에 접종
- ㉡ 배양기(30℃)에서 배양.

② 2차 균주 활성화 (2차 종균)

- ㉠ 1차 종균을 MRS broth에 접종
- ㉡ 배양기(30℃)에서 배양.

③ 3차 균주 활성화 (3차 종균)

- ㉠ 2차 종균을 pilot 배양용 MRS broth에 접종
- ㉡ 배양기(30℃)에서 배양.

(나) 발효

① 발효조 설비 가동 및 점검

- ㉠ 발효조 system 가동 및 roter 정상 가동 확인
- ㉡ Air compressor 가동 및 air 공급 확인
- ㉢ Steam generator 가동 및 steam 공급 확인

② 배지혼합 공정

- ㉠ 발효조에 일정의 물을 받아놓고 배지 투입
- ㉡ Working volume 확인 (총 vol. - 3차 종균 vol. - Glucose vol.)
- ㉢ 발효조 조작
교반기 속도: 60rpm (Auto mode)

③ 배지멸균

- ㉠ 발효조 조작
압력 : 1.4g/cm³(Auto mode)/culture온도 : 30℃(Auto mode)
멸균온도 : 121℃ , 멸균시간 : 15min / air 볼륨 조절 : 50L/min
medium sterilization → Heat start 작동
- ㉡ 중간점검
: 수시로 기기정상가동 확인 등 점검 실시 (온도)
- ㉢ 공기 여과장치 멸균
: 멸균온도가 121℃가 되면 공기 여과장치 밸브를 개방

스팀주입시간 : 3~5분

㉠ 중간점검

수시로 기기정상가동 확인 등 점검 실시 (온도, 양압 유지 확인)

④ 본배양

㉠ 발효조 온도 확인

배양온도 $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 확인

㉡ 포도당 용액 및 3차 종균 주 발효기로 이송

접종부위 화염살균 하에 종균 접종 및 포도당 주입 진행

㉢ 발효조 조작

배기 밸브 닫기

발효조압($0.5\text{kg}/\text{cm}^3$) 이상 확인 후 공기 공급 차단

교반기 속도 : - 25rpm(Auto mode)

⑤ 배양 후 확인

㉠ 시료 채취 라인 5분간 스팀 멸균 후 배양액 시료 채취.

㉡ 배양 종료 후 냉각 진행

(다) 농축(원심분리)

① 원심분리 준비

㉠ 원심분리기부품 살균

Bowl 멸균 : 수세 세척 후, 화염멸균

Accessory 멸균 : 수세 세척 후 121°C , 15min 멸균

㉡ 발효조 - 원심분리기 라인멸균

수세세척 후 steam 30분간 멸균

㉢ 원심분리기조립 및 라인 연결

원심분리기 bowl, accessory 조립

발효조 - 원심분리기 라인연결

② 원심분리기 가동

㉠ 원심분리기 전원 켜기

㉡ 원심분리기 조작

원심분리기 rpm : 14,000rpm

원심분리기 가동시간 : 5시간

원심분리기 start 버튼 클릭

㉢ 이송 펌프 전원 켜기

㉣ 이송 펌프 조작

이송 펌프 속도 : 100(150L/1hour)

- ㉞ 발효조 조작
 - 원심분리기 14,000rpm 확인 후, 발효조 harvest valve open
- ③ 원심분리기 가동 상태확인
 - ㉠ 원심분리기 가동 초기상태 확인
 - 배양액 유입 흐름상태 및 상등액 harvest상태 확인
 - 원심분리기 소음 확인
 - 배양액 유입속도 확인(25~30L/10min)
 - ㉡ 원심분리기 가동 중간점검
 - 수시로 원심분리기 가동초기상태 확인사항과 동일하게 점검
- ④ 원심분리기 종료
 - ㉠ 발효조 내 배양액 및 harvest 상등액 없음 확인
 - ㉡ 원심분리기 조작
 - 원심분리기 조작 종료 버튼 클릭
 - ㉢ 원심분리기 해체
 - 원심분리기 rpm : 0 확인
 - 원심분리기 accessory 및 bowl 분리

(라) 유산균 균체 회수

- ① 유산균 균체 회수 준비
 - ㉠ 유산균 균체 회수 도구준비
 - 세포 harvest용 주걱, 멸균시트지, 세포 회수 비커
 - ㉡ 무균작업대 청결상태 유지
- ② 유산균 균체 회수 조작
 - ㉠ 멸균 시트지를 무균작업대 작업면에 넓게 펴
 - ㉡ bowl에서 분리한 시트지를 무균작업대에 올림
 - ㉢ 시트지의 세포를 세군데 정도 무작위로 채취
 - ㉣ 세포 harvest용 비커의 무게를 측정
 - ㉤ 주걱을 사용하여 세포를 긁어 회수용 비커에 담음
 - ㉥ 세포 무게를 측정
 - (세포 담은 5L비커 무게 - 초기 5L비커 무게)
- ③ 유산균 균체 보관
 - ㉠ 세포 회수 비커를 완전 밀폐하여 냉동보관

(2) *Lactobacillus sakei* Probio 65 고농도 액상 시료 제작 (1×10^{11} CFU/mL)

(가) 원심분리 시료 단위 무게당 *Lactobacillus sakei* Probio 65 균수 측정

- ① 단위 무게에 포함된 세포수 측정
 - ㉠ 원심분리한 균체 시료 1g을 취함
 - ㉡ 균체 시료 살균수를 주입한 후 균일하게 현탁
 - ㉢ 현탁 된 시료를 10진 희석한 후 도말하여 나타나는 세균 집락의 수를 측정하여 액체 시료내의 균수 측정
 - ㉣ 액체 시료내의 균수를 이용하여 원심분리 시료의 균수 계산

(나) 균체를 현탁 하여 1×10^{11} CFU/mL의 현탁액 조제

- ① 균체 현탁용 살균 수 준비
 - ㉠ 상수를 121°C, 15분 열처리하여 살균
- ② 고농도 균체 현탁액 조제
 - ㉠ 원심분리 시료의 균수에 비례하여 살균수 주입

(3) 고농도 균체의 살균 조건 도출: 고압증기, 극초단파에 의한 살균 효과 검증

(가) 단순가열에 의한 고농도 유산균 시료의 살균

- ① 균체시료 준비 및 열처리
 - ㉠ *Lactobacillus sakei* Probio 65 배양 250L 배양 및 집균
 - ㉡ 균체현탁액 (1.0×10^{11} CFU/mL) 준비
 - ㉢ 시약 병에 균액 분주
 - ㉣ 직열로 가열하여 끓임

(나) 마이크로웨이브 연속살균 장치 고안을 위한 전자파 에너지 조사

- ① *Lactobacillus sakei* Probio 65 농축액의 장시간 마이크로웨이브 처리
 - ㉠ Pro65 Wet cell을 살균수와 혼합하여 생균수가 1×10^{11} CFU/ml 농축액 제조
 - ㉡ 제조된 농축액 1L를 조리용 유리용기에 첨가
 - ㉢ 마이크로웨이브를 10분 간격 30분까지 처리하며 갈변화, 온도, 생균수 측정
- ② 마이크로웨이브 조사 장치의 위치에 따른 초콜릿 녹음 관찰
 - ㉠ 마이크로웨이브 조사 공간에 맞는 사각판에 초콜릿 올림
 - ㉡ 마이크로웨이브 조사 공간의 높이를 다르게 하여 전자파 조사
 - ㉢ 초콜릿의 녹는 정도 측정
- ③ 마이크로웨이브 조사 장치의 위치에 따른 한천의 녹음 관찰

- ㉠ 한천을 물에 녹힌 후 열을 가하여 액화 한 후 사각판에서 균힘
- ㉡ 준비된 한천을 마이크로웨이브에 넣고 전자파 조사
- ㉢ 마이크로웨이브 조사 공간의 높이를 다르게 하여 전자파 조사
- ㉣ 한천의 녹는 정도 측정

(다) 고압증기 반응기에 의한 고농도 균체 시료 살균

① 고농도 균체 시료 준비 및 반응기 장착

- ㉠ 300L Fermenter를 이용, 배양 후 원심분리 하여 Wet cell 회수
- ㉡ 균체에 살균수 주입하여 균체 현탁액 조제
- ㉢ 30L 발효기 공멸균
- ㉣ ㉡의 혼합된 농축액을 공멸균이 완료 된 30L 반응기에 채워 넣음
- ㉤ ㉡의 시료의 최소량

시료의 양은 30L 반응기의 온도계 부분이 잠길 수 있을 정도 유지
농축액의 최소 용량: 7L

② 30L 반응기 작동 및 사균체 생산

- ㉠ 반응기 조작 판넬의 조작을 밸브를 수동으로 설정
- ㉡ 7번, 10번 밸브 열기 (반응기 가열)
- ㉢ 115℃ 가 되었을 때, 7번 밸브 닫기 (가열 중지)
(자켓 안쪽 열기로 인해 밸브를 차단하여도 온도가 계속 상승함)
- ㉣ 121℃가 되었을 때 타이머 가동
- ㉤ 온도가 떨어질 시(ex. 121℃→ 120℃), 7번 밸브 열기
- ㉥ 온도가 계속 떨어지다가 올라갈 시(ex. 118℃→ 119℃), 7번 밸브 닫기
(자켓 안쪽 열기로 인해 밸브를 차단하여도 온도가 계속 상승함)
- ㉦ 4번과 5번의 반복.
- ㉧ 살균 처리 시간이 경과 한 후 냉각

③ 30L Fermenter 냉각

- ㉠ Cool valve, pump valve, 8번, 9번,10번 밸브 열기
- ㉡ 나머지 모든 밸브 닫기
- ㉢ Cooling 시, 오염 주의

④ 고농도 균체 액상 시료 QC 및 분말화

- ㉠ 시료 채취 후 생균수 확인
- ㉡ 사균체 농축액의 동결건조

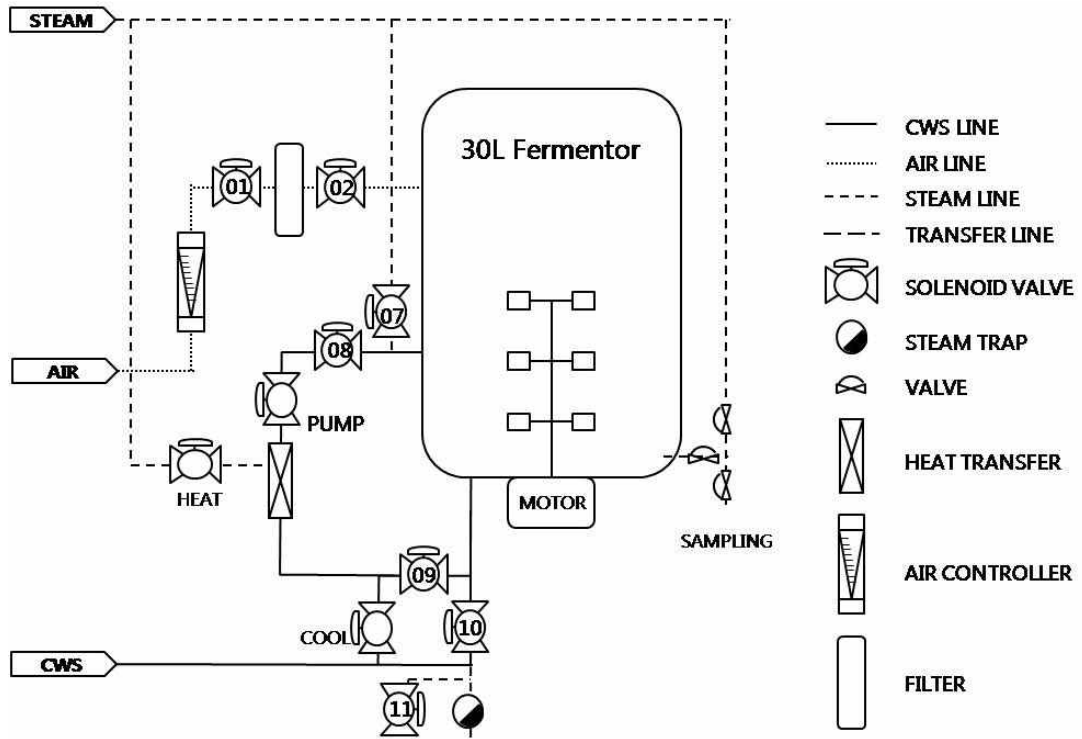


그림 3-1. 고온고압 처리 과정에 교반처리를 위한 30L 고압증기 반응기 모식도

(4) 마이크로웨이브 살균시스템 고안

(가) 고점성 액상 시료의 마이크로웨이브연속 처리를 위한 구조 변경

- ① 마이크로웨이브 조사장치용 전자레인지 구조변경
 - ㉠ 나선형 유리관 장착을 위한 천공
 - ㉡ 천공면의 금속 노출부 차단을 위한 막음장치 부착
- ② 마이크로웨이브 조사장치용 나선형 유리관 제작
 - ㉢ 전자레인지 내부의 크기에 맞추어 유리관 제작
- ③ 마이크로웨이브 조사장치용 나선형 유리관 장착
 - ㉣ 나선형 유리관에 실리콘 튜빙 장착
 - ㉤ 튜빙이 연결된 나선형 유리관을 고온고압살균기에서 살균
 - ㉥ 살균된 나선형 유리관을 마이크로웨이브에 장착
 - ㉦ 살균된 나선형 유리관의 연결 튜빙을 정량펌프에 연결
 - ㉧ 튜빙의 양쪽 말단을 시료 공급병과 시료 배출병에 연결

(나) 마이크로웨이브 조사장치에 의한 고농도 균체 시료 살균

- ① Pilot 발효장비를 이용한 *Lactobacillus sakei* Probio 65 배양 및 균체 회수로 1Kg이상의 wet cell 준비
- ② Wet cell을 살균된 상수와 혼합하여 고농도 유산균 시료 조제
- ③ 마이크로웨이브 조사장치 및 정량 펌프 조립

- ㉠ 나선형 유리관 및 시료용기 고압증기 살균
- ㉡ 나선형 유리관과 마이크로웨이브 장치 조립
- ㉢ 정량펌프 연결 및 작동 확인
- ④ 마이크로웨이브 살균 장치를 이용한 고농도 유산균 시료 살균
 - ㉠ 마이크로웨이브 살균 장치 조립.
 - 나선형 원심관, 유산균 시료 주입라인 및 배출라인 연결
 - ㉡ 유산균 시료 주입라인으로 고농도 유산균 시료 주입
 - ㉢ 마이크로웨이브 주입 전원 끄
 - ㉣ 정량펌프 속도 및 운전 관찰
 - ㉤ 고농도 유산균 시료의 배출 확인
 - ㉥ 배출 시료의 끓음 현상 발생 시 마이크로웨이브 전압량 조절
 - ㉦ 주입라인의 시료가 배출되면 마이크로웨이브 전원 끄
 - ㉧ 정량펌프 끄
 - ㉨ 배출 시료의 생균수 확인용 QC 진행

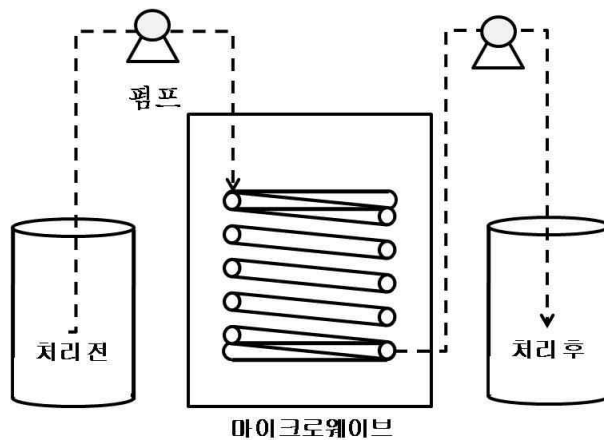


그림 3-2. 연속적 시료 처리를 위한 마이크로웨이브 살균장치 모식도

- (다) 마이크로웨이브 조사장치에 의한 고농도 균체 시료 살균 - 속도 증가
- ① Pilot 발효장비를 이용한 *Lactobacillus sakei* Probio 65 배양 및 균체 회수 하여 1Kg이상의 wet cell 준비
 - ② Wet cell을 살균된 상수와 혼합하여 고농도 유산균 시료 조제
 - ③ 1차 및 2차 마이크로웨이브 조사장치 및 정량 펌프 조립
 - ㉠ 나선형 유리관 및 시료용기 고압증기 살균
 - ㉡ 나선형 유리관과 마이크로웨이브 장치 조립
 - ㉢ 정량펌프 연결 및 작동 확인
 - ④ 단위 시간당 마이크로웨이브 조사량 증가를 위한 살균 장치 병렬 운전

- ㉞ 1차 마이크로웨이브 살균 장치 조립.
 - 나선형 원심관, 유산균 시료 주입라인 및 배출라인 연결
 - 동일한 구조의 2차 마이크로웨이브 살균 장치를 병렬로 연결
- ㉟ 고농도 유산균 시료를 1차 마이크로웨이브 살균 장치로 주입
 - 1차 마이크로웨이브 주입 전원 켜
 - 1차 정량펌프 속도 및 운전 관찰
 - 고농도 유산균 시료의 배출 확인
 - 배출 시료의 끓음 현상 발생하는 경우 마이크로웨이브 전압량 조절
- ㊱ 1차 처리 시료를 2차 마이크로웨이브 살균장치에 주입
 - 2차 마이크로웨이브 주입 전원 켜
 - 2차 정량펌프 속도 및 운전 관찰
 - 고농도 유산균 시료의 배출 확인
 - 배출 시료의 끓음 현상 발생하는 경우 마이크로웨이브 전압량 조절
- ㊲ 주입라인의 시료가 배출되면 마이크로웨이브 전원 끄
- ㊳ 정량펌프 끄
- ㊴ 배출 시료의 생균수 확인용 QC 진행

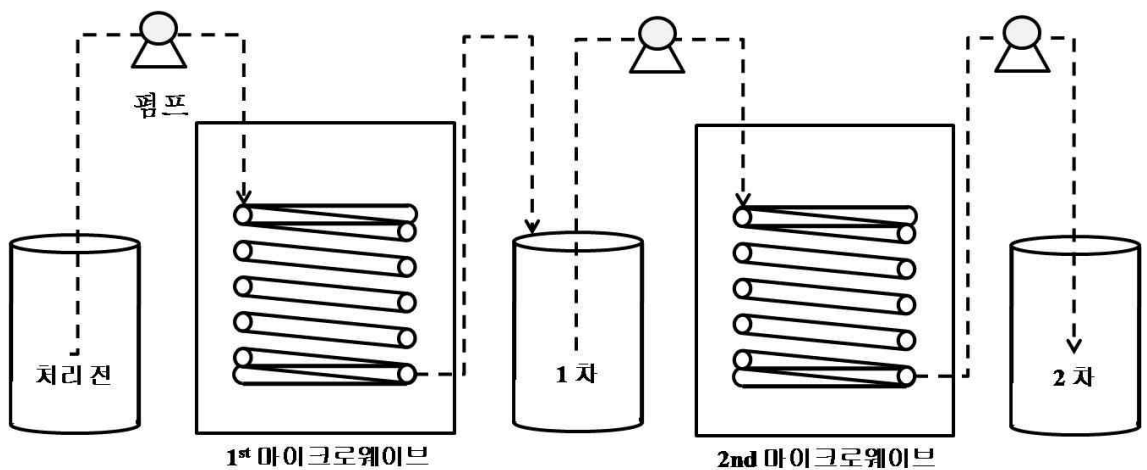


그림 3-3. 마이크로웨이브 처리 강도 증가를 위한 마이크로웨이브 살균장치 직렬연결 모식도

(라) 마이크로웨이브 조사장치에 의한 고농도 균체 시료 살균 관찰

- ① Pilot 발효장비를 이용한 *Lactobacillus sakei* Probio 65 배양 및 균체 회수 하여 1Kg이상의 wet cell 준비
- ② Wet cell을 살균된 상수와 혼합하여 고농도 유산균 시료 조제
- ③ 마이크로웨이브 조사장치 및 정량 펌프 조립

- ④ 마이크로웨이브 조사 시간 및 정량 펌프 속도를 조절하여 살균 시간 조절
 - ㉞ 마이크로웨이브 조사 강도 변화
 - ㉟ 정량펌프의 시료 주입 속도 조절
 - ㊱ 고농도 균체 시료의 갈변화 관찰 및 생균수 측정

(마) 사균체의 변색정도 판별

- ① Pilot 발효장비를 이용한 *Lactobacillus sakei* Probio 65 배양 및 균체 회수 하여 1Kg이상의 wet cell 준비 후 살균된 상수와 혼합하여 고농도 유산균 시료 조제
- ② 살균공정에서 1×10^{11} CFU/mL 농도의 *Lactobacillus sakei* 균주시료가 완전 살균된 후 변색의 정도는 PANTONE 수치로 판별

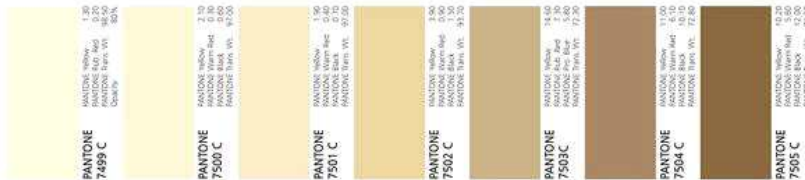


그림 3-4. 사균체 갈변화 정도 판단을 위한 색상표

(5) 전자파 살균 후의 세포의 변이 조사

(가) 마이크로웨이브 처리한 *Lactobacillus sakei* Proio 65의 게놈 DNA 확인

① *Lactobacillus sakei* Pro 65의 게놈 DNA 추출

: PowerSoil® DNA Isolation Kit를 이용

- ㉞ 시료 준비
 - Add soil sample to PowerSoil Bead Tube
 - Add Solution C1
 - Attach to Vortex Adapter
 - Vortex 후 원심분리
- ㉟ 세포 분해
 - Add Solution C2
 - Incubate at 4°C
 - 원심분리
- ㊱ 추출방해물질 제거
 - Add Solution C3
 - Incubate at 4°C
 - 원심분리

- ㉠ 컬럼에 DNA 결합
 - Add Solution C4
 - Load into Spin Filter
 - 원심분리
- ㉡ 이물질 세척
 - Wash with Solution C5
 - 원심분리
- ㉢ DNA 용출
 - Elute with Solution C6
 - 원심분리
- ② 추출된 게놈의 agarose gel 전기영동 확인
 - ㉣ Agarose gel 준비
 - Agarose를 TAE buffer에 넣고 가열하여 녹임
 - Gel tray에 combs을 장착
 - Gel 용액이 굳기 전에 gel 판에 분주
 - Gel이 굳으면 combs 제거 .
 - Gel을 electrophoresis chamber로 이동
 - TAE Buffer로 electrophoresis chamber 채우기
 - ㉤ DNA 시료 gel에 Loading
 - DNA 시료와 6X Sample Loading Buffer 혼합
 - 혼합액을 gel에 loading
 - 마카 DNA를 gel에 loading
 - ㉥ Gel Running
 - Gel을 전기영동 장치에 장착
 - 전극 연결 후 전류 스위치 켜기
 - 15-30분간 전기영동
 - 전류 스위치 끄기
 - ㉦ Gel 염색
 - Gel을 염색통으로 이동
 - DNA 염색시약 EtBr 주입
 - 염색, 25-30 분 .
 - Gel을 염색통에서 꺼내어 세척
 - Gel을 UV 형광판에 올린 후 UV에서 DNA 관찰

(나) 마이크로웨이브 처리한 *Lactobacillus sakei* Probio 65의 유전자 변이 조사

① *Lactobacillus sakei* Probio 65에서 추출한 게놈 DNA를 주형으로 16S rDNA 유전자 증폭

㉠ PCR mix 조건 (전체 20 μ l 반응)

Primer 27 F 1 μ l

Primer 1492 R 1 μ l

SDDW 17 μ l

Template 1 μ l

㉡ PCR PreMix

Component volume(20 μ l)

Top polymerase 1U

Each: dNTP 250 μ m

Tris-HCl(pH 9.0) 10mM

KCl 30mM

MgCl₂ 1.5mM

Stabilizer and tracking dye

㉢ PCR primer 및 Taq polymerase

: Bacteria용 Universal primer

- 27F AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 20mer

- 1492R GGT TAC CTT GTT ACG ACT T 19mer

: Taq polymerase (3종)

- 바이오니아 Taq polymerase

- 제노텍 Taq polymerase

- Tenuto 2X Taq polymerase

㉣ PCR cycle

: PCR tube를 PCR thermal cycler에 넣고 30-35 cycle PCR

1st: 95 $^{\circ}$ C, 3min

2nd: 35 cycle

95 $^{\circ}$ C, 30sec

50 $^{\circ}$ C, 30sec

72 $^{\circ}$ C, 1min 30sec

3rd: 72 $^{\circ}$ C, 10min

4th: 4 $^{\circ}$ C, endless

㉤ PCR 증폭 DNA 단편의 agarose gel 전기영동 확인

② *Lactobacillus sakei* Probio 65의 사균체에서 16S rDNA 유전자 증폭

㉔ 주형 DNA용 시료

- *Lactobacillus sakei* Probio 65 powder 생균/사균
: 십진 희석법을 이용해 -7승까지 희석

(다) 사균체 *Lactobacillus sakei* Probio 65의 형태 변화 관찰

① 균체의 Gram염색 후 현미경 관찰

㉔ Gram 염색

- 균체 시료를 증류수 현탁하여 슬라이드그라스에 얼기
- 알코올 램프를 이용하여 균체 열 고정
- Crystal violet 용액에 30초~1분간 염색 후 세척
- Iodine 용액으로 1분간 반응 후 세척
- Ethanol 용액으로 30초간 탈색
- Safranin 용액으로 30초간 염색 후 세척
- 균체 시료가 고정된 슬라이드그라스 건조
- 오일 적하
- 커버그라스 덮기
- 현미경으로 관찰

(6) 고농도 균체 시료 살균공정을 이용한 *Lactobacillus sakei* Probio 65 사균체 분말 시제품 제조

(가) *Lactobacillus sakei* Probio 65의 산업용 배양 및 균체 시료 준비

- ① 300L 발효기를 이용한 *Lactobacillus sakei* Probio 65의 배양
- ② 배양된 균체를 연속원심분리기를 이용하여 회수
- ③ *Lactobacillus sakei* Probio 65 고농도 균체시료 (1×10^{11} CFU/mL) 살균
 - ㉔ 젖은 무게(wet weight) 기준 중량 2kg 이상의 고농도 균체 현탁액 준비
 - ㉔ 가열 교반 방법을 이용한 고농도 균체시료 살균
 - ㉔ 연속식 마이크로웨이브 조사장치를 이용한 고농도 균체시료 살균

(나) 유산균 동결건조 분말 생산을 위한 예비동결

① 예비동결공정 준비

- ㉔ 동결건조판 멸균
- ㉔ 예비동결공정 도구 멸균.
스테인레스 통, 5L 비커, 600cc 분주컵, 혼합기, 주걱
- ㉔ 동결건조기 전원 켜기, 선반 온도 냉각(-40℃ 설정)

온도가 떨어지기까지 약 2시간 소요

- ㉠ 무균작업대 청결상태를 유지
- ② 사균체 세포 준비 (무균조작)
 - ㉠ 상수(5L)를 취하여 121℃, 15min 살균
 - ㉡ 동결상태의 균체를 해동
 - ㉢ 균체의 무게 측정
 - ㉣ 균체의 무게에 비례하여 살균수와 혼합하여 균체 현탁액 준비
 - ㉤ 사균체 공정을 이용한 살균
: 마이크로웨이브 조사장치 살균 혹은 30L 반응기 살균
- ③ 예비동결 (무균조작)
 - ㉠ 고농도 사균체 용액은 총 부피 확인.
 - ㉡ 사균체 액상 시료를 살균된 동결판에 분주
하나의 동결 판에 1,800~2,200ml의 액상 시료를 분주
 - ㉢ 동결건조기 입구 열기
 - ㉣ 분주한 동결판을 동결건조기에 투입
 - ㉤ 동결건조기 샘플 온도센서를 샘플에 투입
 - ㉥ 동결건조기 입구 닫기

(다) 동결건조 분말 생산을 위한 동결건조

- ① 동결건조기 가동
 - ㉠ 냉동기 동작 : -70℃
예비동결 3시간 이상 소요 후 가동(샘플온도 확인)
 - ㉡ 진공 가동 : 5mTorr
냉동기 -40℃ 이하일 때, 가동 가능
 - ㉢ 프로그램 가동(-40℃ -> +20℃)
- ② 동결건조기 가동상태 중간점검
 - ㉠ 선반온도, 냉동기온도, 샘플온도 점검
 - ㉡ 진공건조기 내부의 진공 상태 유지 점검

(라) 동결건조 분말 생산을 위한분쇄

- ① 동결건조 시료의 분쇄 준비
 - ㉠ 분쇄기 준비
분쇄기를 1시간 70% 알코올에 침지시켜 살균
분쇄기를 40℃ 건조기에서 건조
분쇄기 조립

분쇄기 정상가동 확인

- ㉠ 무균작업대 청결상태 유지
- ㉡ 분말 회수용 주걱 멸균 및 건조
- ㉢ 원말수거용 위생용 지퍼백 준비

② 동결건조 분말의 분쇄

- ㉠ 동결건조기 확인
 - 선반온도, 샘플온도, 육안 정상 확인
- ㉡ 동결건조기 프로그램 종료
 - 프로그램 종료 ->진공해체 ->냉동기 종료 ->선반종료
- ㉢ 동결판에서의 원말 수거
 - 주걱을 사용하여 위생용 지퍼백에 담아 입자의 크기를 축소시킴
- ㉣ 분쇄기 가동
 - 분쇄기에 넣어 10~15초 정도 분쇄
- ㉤ 분쇄상태 육안 확인
- ㉥ 분쇄된 원말을 위생용 지퍼백에 담아 보관

③ 분쇄된 동결건조 분말의 이물검출 준비

- ㉠ 이물검출기(50mesh) 준비
 - 이물검출기(50mesh)를 멸균해서 준비
 - 이물검출기(50mesh)를 60℃ 건조기에서 건조 (24시간 이상 완전 건조)
 - 이물검출기(50mesh) 건조 상태 확인

- ㉡ 무균작업대 청결상태 유지

④ 분쇄된 동결건조 분말의 이물검출

- ㉠ 이물검출기(50mesh)에 분쇄한 원말을 넣고 이물 거르기
- ㉡ 최종 원말 육안상태 확인

⑤ *Lactobacillus sakei* Probio 65 사균체 분말 시료 수거

- ㉠ 사균체 시료 수거용 스푼 살균
- ㉡ 사균체 시료 수거
- ㉢ 사균체 시료 냉장고에 보관 및 품질분석

(마) *Lactobacillus sakei* Probio 65 사균 분말의 QC로 시제품 이용 가능성 확인

① 생균수(유산균수) Q.C 방법

- ㉠ 멸균된 9ml 희석수에 시료1ml를 넣어 vortexing한다.
- ㉡ 멸균된 9ml 희석수에 ①의 희석액 1ml를 순차적으로 희석한다.
- ㉢ MRS배지에 agar를 첨가하여 petri dish에 균한 평판 배지에 10ⁿ배 희석한 희석액 100 μ l을 떨어뜨려 도말한다.

② 오염 확인 Q.C 방법

- ㉔ 멸균된 9ml 희석수에 시료1ml를 넣어 vortexing한다.
- ㉕ ㉔의 희석액 1ml을 petri dish에 분주한 후 오염검사용 배지를 혼합
- ㉖ 배양온도 및 시간
 - PCA, EMB: 35~37℃에서 24~72시간) 배양한다.
 - PDA: 25℃에서 5일간 배양한다.
- ㉗ 배양과정에 오염균 생육 여부 확인"

(7) 균체 지방산 분석을 이용한 사균체 정량 분석

(가) 지방산 추출용 시약 및 표준 시약

표 3-1. 지방산 추출용 용액

시약 명	제조사	비고
Sodium Chloride	Merck	
37% HCl	Merck	
Sodium Hydroxide	Merck	
Methanol	Merck	HPLC grade
n-Hexane	Merck	HPLC grade
Water	B&J	HPLC grade
Methyltert-buthyl ether	B&J	HPLC grade

표 3-2. 지방산 표준물질

시약 명	제조사
Methyl plamitate	Sigma
Glycerul triundecanoate	Sigma

(나) 지방산 추출용 용액 조제, 제조후 1개월 경과시 다시 제조해서 사용

① Reagent 1

- ㉔ Methanol 50ml + NaOH 15g
- ㉕ ㉔용액 + 50 ml DW
- ㉖ 100ml 시약병에 옮긴 후 라벨부착(MIDI-1)

② Reagent 2

- ㉔ 포화 hydrochloride solution을 희석하여 6.00N HCl 제조
- ㉕ 6N HCl 65ml + 55ml Methanol
 - : Methanol에 HCL 을 소량씩 첨가
- ㉖ 시약병으로 옮긴후 라벨부착(MIDI-2)

③ Reagent 3

- ㉔ Hexane 50ml + MTBE(Methyltert-buthyl ether) 50ml

- ㉔ 시약병으로 옮긴 후 라벨링(MIDI-3)
- ④ Reagent 4
 - ㉔ DW 100ml + NaOH 1.2g
 - ㉔ 시약병으로 옮긴 후 라벨링(MIDI-4)
- ⑤ 포화 NaCl 시약
 - ㉔ NaCl 40g + DW 100ml
 - ㉔ 시약병으로 옮긴 후 라벨링(MIDI-5)

(다) 지방산 추출용 절차

- ① 발효조 설비 가동 및 점검
 - ㉔ 사균체 시료의 무게를 측정 후 tube에 넣음
tube의 입구부분은 테프론 테이프로 3~4회 감아 누수 방지
 - ㉔ 0.1mg Glycerol triundecanoate을 넣음
 - ㉔ MIDI-1시약을 1ml 넣고 vortex 후 100°C의 물에 5min 반응 후 vortex 후 100°C에 25min 반응
 - ㉔ 흐르는 물에 식힌 후 MIDI-2시약을 2ml 첨가
 - ㉔ vortex 후 80±1°C, 10±1min 반응
 - ㉔ 흐르는 물로 식힌 후 MIDI-3시약을 1.25ml 첨가
 - ㉔ 10min간 잘 섞어준 후 정치시켜 층이 분리되도록 방치
 - ㉔ 층의 아랫부분을 pasture pipet을 사용하여 제거
 - ㉔ MIDI-4시약을 3ml 넣고 5분간 완전 혼합
 - ㉔ 층이 분리되도록 정치시킨다.(10~30min)
 - ㉔ 층의 가장윗부분의 이물은 MIDI-5시약을 pasture pipette을 사용하여 한방울씩 떨어뜨려 아랫부분으로 이동
 - ㉔ 최종 상층액을 GC vial로 옮긴 뒤 마개를 닫고 라벨링

(라) GC를 이용한 지방산 정성 및 정량

- ① Gas Chromatograph 장비
 - ㉔ 기기: Agilent technologies 6850 gas chromatograph
 - ㉔ 분석 프로그램: Sherlock MIS Software
- ② Gas Chromatograph 운전 조건
 - ㉔ 온도: 170°C to 270°C at 5°C per minute
 - ㉔ 검출기: flame ionization detector
 - ㉔ Carrier gas: Hydrogen
 - ㉔ Makeup gas: Nitrogen

나. 연구결과

- (1) 프로바이오틱 유산균 *Lactobacillus sakei* Probio 65 균주의 산업용 배양 (>200L) 및 유산균 균체 확보: 300L 발효기를 이용한 유산균 배양 및 균체 회수

(가) 원심분리기에 회수된 균체

: 한일 원심분리기의 바울 내에 장착한 시트지의 표면에 부착된 균체

A



B

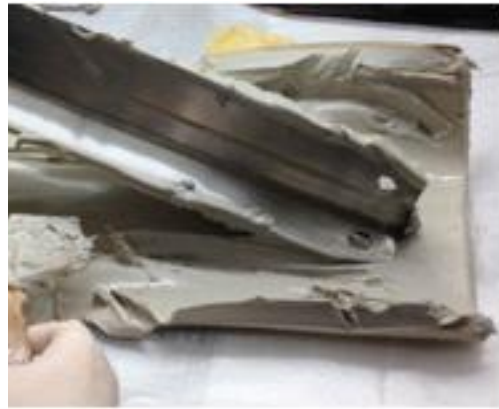


그림 3-5. *Lactobacillus sakei* Probio 65 유산균 균체, 원심분리기 바울의 내벽에 모여진 유산균(A) 및 균체회수(B)

(나) 회수된 후 동결 보관전의 균체 시료

: 500L 배양에 의해 회수된 2Kg의 *Lactobacillus sakei* Probio 65 wet cell의 시료 회수



그림 3-6. 지퍼백에 보관중인 유산균 균체

(2) *Lactobacillus sakei* Probio 65 고농도 액상 시료 제작 (1×10^{11} CFU/mL)

(가) 원심분리 시료 단위 무게당 *Lactobacillus sakei* Probio 65 균수 측정

① 단위 무게에 포함된 세포수 측정

- ㉠ *Lactobacillus sakei* Probio 65를 액체배양한 후 원심 분리하여 균체를 모음
- ㉡ 일정량의 균체 시료에 살균수를 주입한 후 균일하게 현탁하고 균체수를 측정함
- ㉢ MRS 한천평판배지에서 자라는 *Lactobacillus sakei* Probio 65 집락을 5번의 실험을 통하여 측정하여 3.4×10^{11} CFU/g임을 확인 함

표 3-3. *Lactobacillus sakei* Probio 65 원심분리 후 농축한 세포수

시험구	CFU/g
1	3.22E+11
2	3.02E+11
3	3.88E+11
4	3.71E+11
5	3.45E+11
표준편차	3.5E+10
평균	3.45E+11

(나) 균체를 현탁 하여 1×10^{11} CFU/mL의 현탁액 조제

- ① *Lactobacillus sakei* Probio 65 배양 후 원심분리로 농축한 균체 시료의 균수가 3.4×10^{11} CFU/g임으로 1×10^{11} CFU/mL의 고농도 균체시료 조제를 위하여 살균된 상수를 첨가하여 균체시료를 희석함
- ② *Lactobacillus sakei* Probio 65 배양 후 원심분리로 농축한 균체 시료의 무게가 1Kg인 경우 살균수를 첨가하여 전체 부피를 3.4L가 되게 희석함



그림 3-7. 고농도 유산균 균체현탁액 (1×10^{11} CFU/mL)

(3) 고농도 균체의 살균 조건 도출: 고압증기, 극초단파에 의한 살균 효과 검증

(가) 단순가열에 의한 고농도 유산균 시료의 살균

① *Lactobacillus sakei* Probio 65 고농도 균체현탁액 (1×10^{11} CFU/mL) 시료 준비 및 열처리

㉞ *Lactobacillus sakei* Probio 65 균체가 뭉치고 침전물이 발생 함

㉟ 단순가열에 의한 고농도 균체 살균에는 열 조절이 필요함



그림 3-8. 고농도 유산균 균체 (1×10^{11} CFU/mL)의 단순 가열에 의한 침전물 생성

(나) 마이크로웨이브 연속살균 장치 고안을 위한 전자파 에너지 조사

① *Lactobacillus sakei* Probio 65 농축액의 장시간 마이크로웨이브 처리

- ㉔ Pro65 Wet cell을 살균수와 혼합하여 생균수가 1.0×10^{11} CFU/mL 농축액 제조 후 마이크로웨이브를 30분간 처리함과 동시에 10분 간격으로 갈변화, 온도, 생균수 측정한 결과 30분 처리 후에 갈변화가 관찰됨
- ㉕ 마이크로웨이브 처리 후 농축액의 생균수 측정 10분 간격으로 3회 처리한 시료의 생균수를 측정한 결과 처리 시간의 증가에 따라 생균수가 감소하는 것이 확인 되었으나, 갈변이 많이 진행된 30분 처리 시험구에서도 1000CFU/mL이상의 균수가 관찰됨

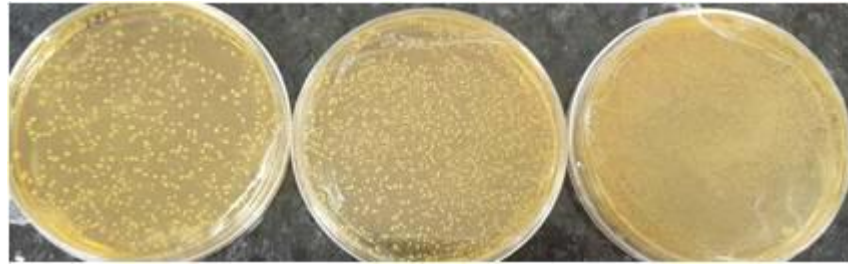
표 3-4. *Lactobacillus sakei* Probio 65 고농도 유산균 균체 (1×10^{11} CFU/mL)의 단순 전자파 가열 후 생존 세포수

시험구 (처리시간, 분)	CFU/mL
1 (10)	> 10000
2 (20)	> 10000
3 (30)	> 1000

- ㉖ 마이크로웨이브 처리 후 농축액의 온도관찰: 30분 처리 시, 유리용기의 겉 부분은 100℃ 이상으로 가열되나, 유리용기 안쪽은 80℃로 온도가 낮음



그림 3-9. *Lactobacillus sakei* Probio 65 농축액의 단순 마이크로웨이브 처리에 의한 갈변화 (유산균 용액 1L를 유리용기에 넣은 후 마이크로웨이브 30분 처리)



A B C

그림 3-10. *Lactobacillus sakei* Probio 65 농축액의 마이크로웨이브 처리 후 생균수 확인
A, 30분 처리; B, 20분 처리; C, 10분 처리

② 마이크로웨이브 조사 장치의 내부 공간 분석

- ㉞ 마이크로웨이브 조사실은 일반 전자렌지를 이용하였음
- ㉞ 규격: 세로 28 cm, 가로 24.5 cm, 높이 18.5 cm

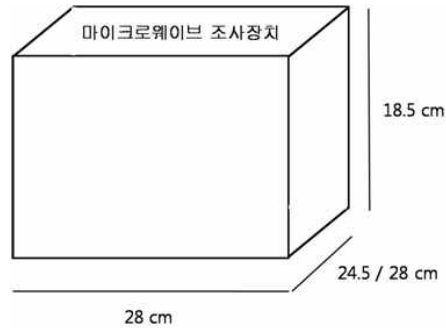


그림 3-11. 사용한 마이크로웨이브 조사장치의 크기

③ 마이크로웨이브 조사 장치의 위치에 따른 초콜릿 녹음 관찰

- ㉞ 전자파 조사용 시료 위치 및 조사 시간

표 3-5. 전자파가 집중되는 위치 조사를 위한 시료 위치 및 조사 시간

높이 (cm)	시간 (초)			
3.8	30s	50s	70s	
	100s	130s	162s	192s
9	30s	60s	90s	
	120s	150s	180s	
12	30s	60s	90s	

- ㉞ 마이크로웨이브 60초 조사 후 초콜릿 녹는 위치
. 상단(12cm) 중앙 부분이 1곳이 녹음

- . 중간(9cm) 녹지 않음
- . 하단(3.8cm) 모서리 부분 4곳이 녹음
- ㉔ 마이크로웨이브 120초 조사 후 초콜릿 녹는 위치
 - . 중간(9cm) 5 곳이 녹음
 - . 하단(3.8cm) 모서리 4곳이 녹음

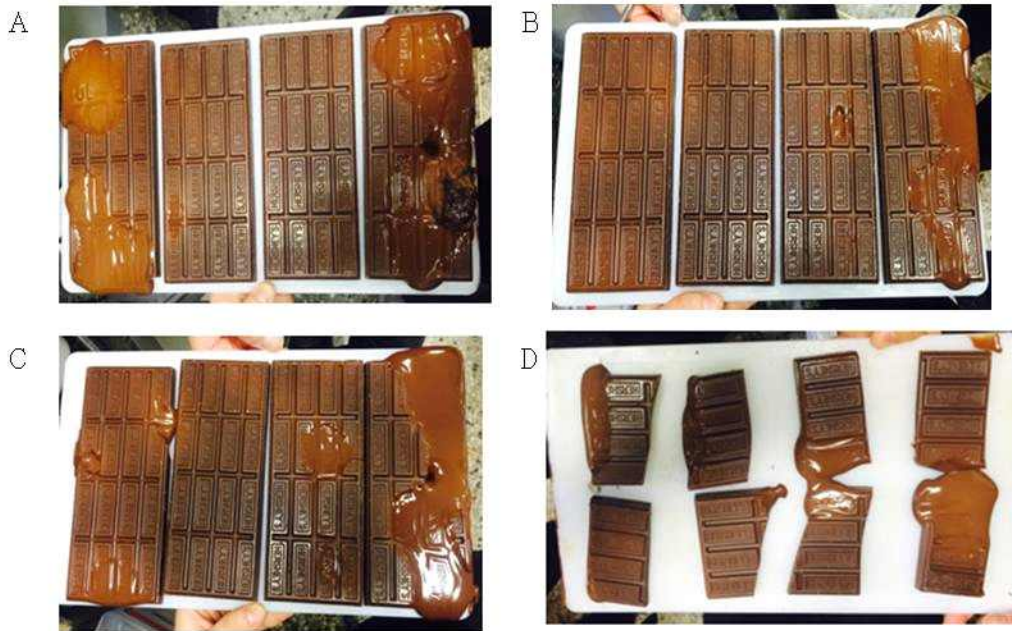


그림 3-12. 전자레인지 내부 위치에 따른 마이크로웨이브 에너지 전달강도 확인

- A, 바닥에서 3.8cm 위치 마이크로웨이브 100초 조사
 - B, 바닥에서 9 cm 위치 마이크로웨이브 90초 조사
 - C, 바닥에서 9 cm 위치 마이크로웨이브 120초 조사
 - D, 바닥에서 12 cm 위치 마이크로웨이브 90초 조사
- ④ 마이크로웨이브 조사 장치의 위치에 따른 한천의 녹음 관찰
- ㉔ 마이크로웨이브 조사장치 내에 전자파가 편중되는 부위를 확인하기 위해 마이크로파에 의해 발생하는 열에 의한 시료의 변화 관찰이 용이한 한천을 이용함
 - ㉔ 한천은 100℃ 이상의 온도에서는 액체 상태로 되고 40℃ 이하의 온도에서는 액화됨으로 준비된 한천을 마이크로웨이브에 넣고 전자파 조사 후 한천의 녹는 정도를 측정함

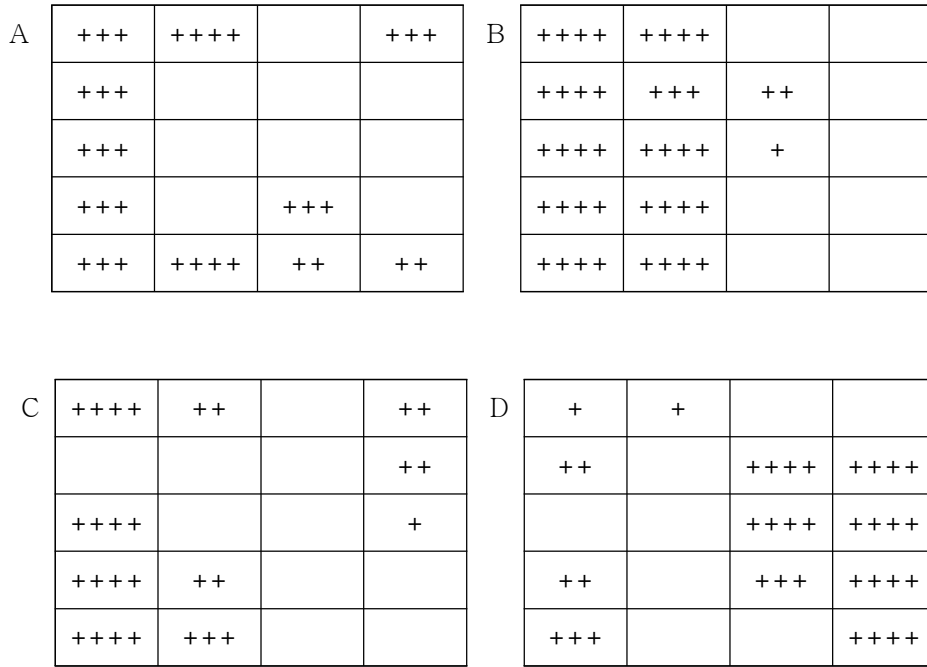


그림 3-13. 전자레인지 다양한 위치에 한천이 녹는 위치 및 강도
 A, 하단; B, 중하단; C, 중상단; D, 상단

㉔ 마이크로웨이브 조사장치 내의 전자파 집중 부위에 근거한 내부 순환관 구조 설계

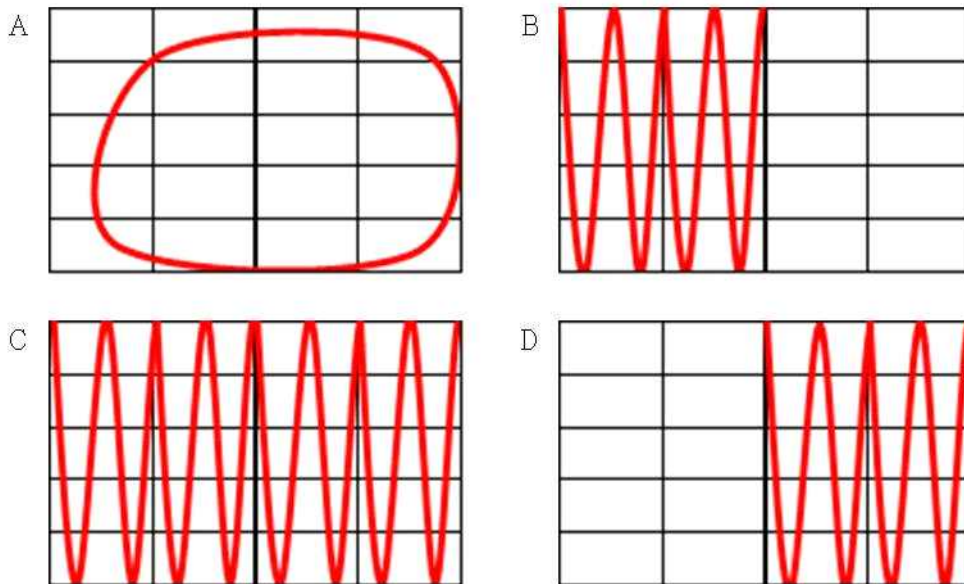


그림 3-14. 전자레인지 다양한 위치를 고려한 Tubing 정렬
 A, 하단; B, 중하단; C, 중상단; D, 상단

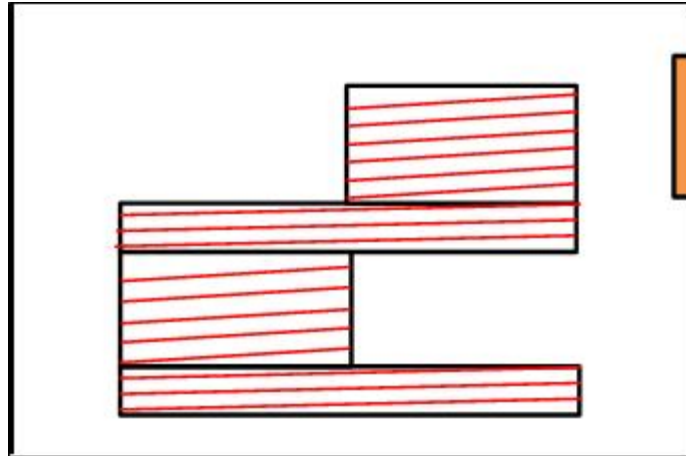


그림 3-15. 전자레인지 다양한 위치를 고려한 Tubing 정렬 측면 예측

(다) 고압증기 반응기에 의한 고농도 균체 시료 살균

- ① *Lactobacillus sakei* Probio 65 고농도 유산균 균체 (1×10^{11} CFU/mL)의 단순 고압증기 멸균기 살균
 - ㉞ 고농도 유산균 균체 4L의 고압증기 멸균기 살균에 의한 균체 색 변화
고압증기 멸균기 처리 121℃, 15분 처리 회수가 증가 할수록 갈변의 강도가 증가함
 - ㉟ 고농도 유산균 균체 4L의 고압증기 멸균기 살균에 의한 생존수
고압증기 멸균기 처리 후 0.1ml의 액상시료에서는 생존이 관찰되지 않았으나, 이 시료를 동결건조한 후 생존수 측정에서는 100CFU/gram이상의 생존이 관찰됨



그림 3-16. *Lactobacillus sakei* Probio 65 농축액의 고압증기멸균기 처리에 의한 갈변화
 4L을 유산균 용액(1×10^{11} CFU/mL)을 5L 유리병에 고압증기멸균기 3회 처리
 A; 고압증기멸균기 처리 전, B; 1회 리, C; 2회 처리, D; 3회 처리

② 30L Fermenter를 이용한 고농도 균체 시료의 살균

- ㉠ *Lactobacillus sakei* Probio 65 유산균 용액(1×10^{11} CFU/mL) 10L를 준비하고 30L 반응기에 주입 후, 반응기의 교반기를 작동하면서 수동으로 작동하면서 반응기 내부의 온도가 121°C 로 유지되게 하여 운전하면서 유산균의 살균을 관찰함
- ㉡ *Lactobacillus sakei* Probio 65 유산균 용액에 포함된 생균은 반응기에서 교반하면서 열을 가하는 경우 60분 처리 후 액체시료에서 생균이 관찰되지 않음
- ㉢ 반응기에서 교반 가열에 의해 살균된 균체 동결건조 분말 1g에서는 생균이 관찰되지 않음
- ㉣ 단순 가열 혹은 단순 고압증기살균기에 의한 살균과 달리 교반하면서 가열하는 경우 살균 효율이 높음



그림 3-17. *Lactobacillus sakei* Probio 65 농축액의 고온고압 교반 살균

(4) 마이크로웨이브 살균시스템 고안

(가) 고점성 액상 시료의 마이크로웨이브연속 처리를 위한 구조 변경

- ① 마이크로웨이브 조사장치용 전자레인지 구조변경
 - ㉠ 사균체 용액을 마이크로웨이브 조사장치인 전자레인지 내부로 연속적인 주입을 위한 관을 연결하여 주기 위하여 홀 가공
 - ㉡ 홀가공은 넣어주는 튜브의 외경에 맞추어 적합한 홀커터 사이즈를 선정하여 가공을 진행 함
 - ㉢ 가공 후 커팅면에 생기는 버(Burr)는 연마재를 이용하여 매끄럽게 한 후 내부의 코팅이 벗겨진 부위를 마이크로웨이브가 직접적으로 조사되지 않게 마감
 - ㉣ 홀 가공후 벗겨진 코팅부위를 보호하며 투입 및 배출 튜브를 고정하기위하여 케이블 그랜드를 사용하여 코팅이 벗겨진 철판의 양쪽표면을 고무로 고정하여 마이크로웨이브가 직접 조사되지 않게 함

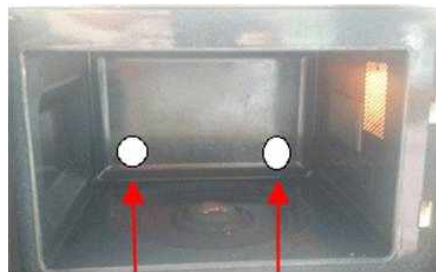


그림 3-18. 마이크로웨이브 조사 장치 구조 변경
화살표는 시료의 주입구와 배출구의 위치

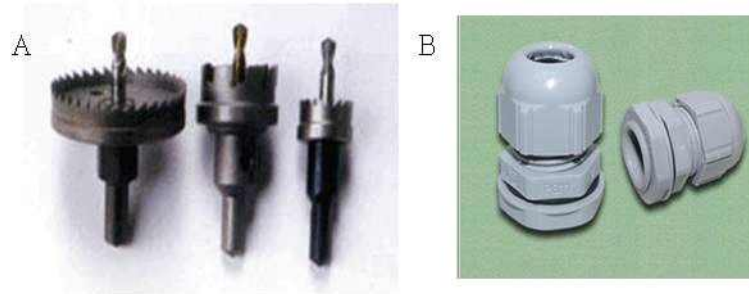


그림 3-19. 마이크로웨이브 조사 장치 구조 변경용 공구 및 마감용 그랜드
A; 홀 커터, B; 홀 마감을 위한 케이블 그랜드

- ㉞ 가공된 홀의 직경은 12mm로 장착할 케이블 그랜드의 외경치수보다 0.5mm 크게 가공하여 취부가 용의하게 함

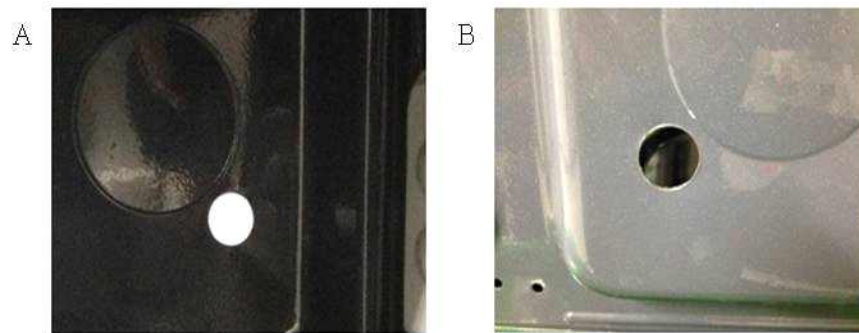


그림 3-20. 홀커팅된 전자레인지의 내부 (A) 및 외부 (B)

- ㉞ 홀가공 후 케이블 그랜드 및 튜브 장착
· 고농도 균체 시료가 외부 저장 공간에서 마이크로웨이브 조사실로 들어올 수 있도록 가공된 홀 부분에 케이블 그랜드 및 튜브를 장착

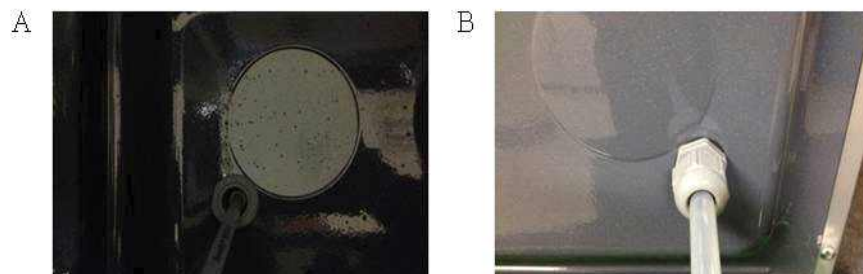


그림 3-21. 케이블 그랜드 및 튜브를 전자레인지에 장착한 후 내부 (A) 및 외부 (B)

- ② 마이크로웨이브 조사장치용 나선형 유리관 제작

㉔ 내경이 5mm인 유리봉을 연결한 후 감아서 나선형 유리관을 제작함

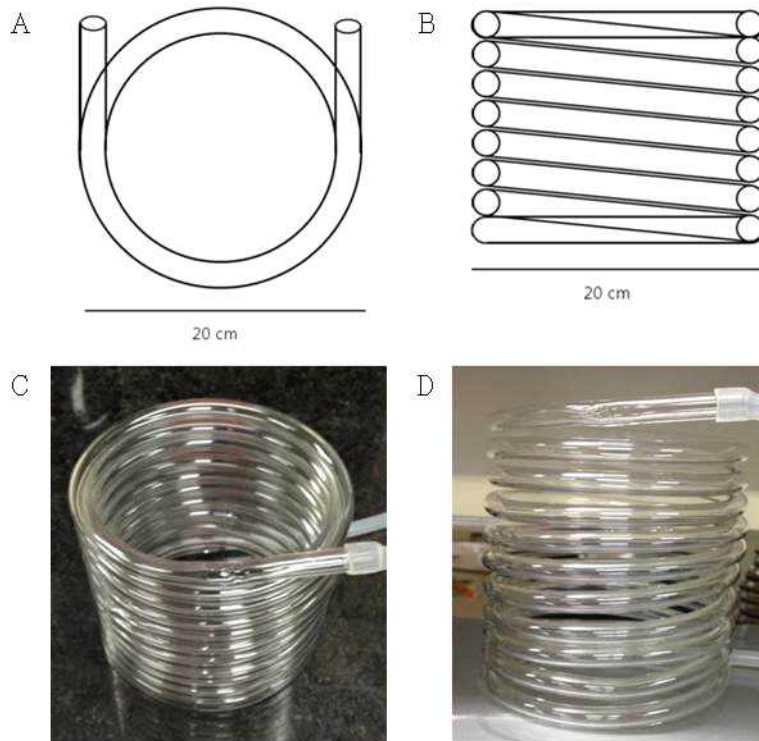


그림 3-22. 마이크로웨이브 연속 조사용 나선형 유리관 설계 및 제작

A; 설계상 단면도, B; 설계상 측면도, C & D; 제작 후 측면도

③ 마이크로웨이브 조사장치용 나선형 유리관 장착

㉕ 나선형 유리관을 튜빙과 연결한 후 전자레인지내에 장착함



그림 3-23. 마이크로웨이브 연속 조사를 위해 전자레인지내에 장착된 나선형유리관



그림 3-24. 마이크로웨이브 연속 조사를 위해 조사장치 구성

(나) 마이크로웨이브 조사장치에 의한 고농도 균체 시료 살균

- ① Pilot 발효장비를 이용한 *Lactobacillus sakei* Probio 65 배양 및 균체 회수하여 *Lactobacillus sakei* Probio 65 유산균 용액(1×10^{11} CFU/mL) 4L를 준비하여 마이크로웨이브 연속 조사장치에서 시료를 처리함
- ② 고농도 유산균 시료 마이크로웨이브 연속 조사 1차
 - ㉠ 시료의 연속 주입 시 배출 시료의 온도 유지를 위해 배출 시료의 온도가 80℃ 이상 되는 것 확인
 - ㉡ 반복해서 조사장치를 통과하는 경우 펌프에서 반응기로 들어가는 쪽의 실리콘 튜빙은 autoclave 한 것으로 교체 한 후 사용
 - ㉢ Pump에서 밀어주는 힘으로 반응기에서 나가는 쪽의 압력 유지함. 펌프속도는 시료의 배출 온도에 따라 조절함
 - ㉣ 마이크로웨이브 처리 시간을 늘리기 위해 1회 처리된 시료를 냉각한 후 5회까지 반복하여 처리 함
 - ㉤ 마이크로웨이브 처리 강도는 최고로 유지하고 시간을 늘리기 위해 1회 처리된 시료를 냉각한 후 5회까지 반복하여 처리 함
 - ㉥ 튜빙은 내경 6.4mm 사용
 - ㉦ 펌프속도 72~95rpm, 처리된 고농도 균체시료 0.1ml에서 생균 관찰되지 않음

③ 고농도 유산균 시료 마이크로웨이브 연속 조사 2차

- ㉠ 마이크로웨이브에 주입되는 시료의 양 조절을 위한 튜빙 변화
- ㉡ 고온으로 배출되는 시료를 바로 마이크로웨이브 조사하는 경우 시료의 끓음 현상이 발생 함
- ㉢ 튜빙은 내경 3.1mm 또는 6.4mm 사용
- ㉣ 마이크로웨이브 강도는 최강, 시료처리 회수는 4회
- ㉤ 튜빙 및 처리회수 증가에 따른 펌프속도
 - 1회 83rpm, 50min, (I.D. 3.1mm)
 - 2회 70rpm, 22min, (I.D. 6.4mm)
 - 3회 69~72rpm, 20min, (I.D. 6.4mm)
 - 4회 72~95rpm, 15min, (I.D. 6.4mm)
- ㉥ 고농도 균체 전체시료량 4L
- ㉦ 펌프속도 72~95 rpm
- ㉧ 1회 처리 및 4회 처리한 고농도 균체시료 0.1ml에서 생균 관찰되지 않음

④ 고농도 유산균 시료 마이크로웨이브 연속 조사 3차

- ㉠ 배출된 시료 교반하여 열전달 균일화 시도, 1차 처리된 시료를 반복해서 처리하는 효율 증가 시도함
- ㉡ 배출되는 시료의 끓음 현상에 의해 연속해서 처리하는 과정에 전자레인지 내부의 원심관에서 균체가 눌러 붙는 현상이 발견되어 전자파 조사 강도 및 펌프의 운전 속도를 조절함
- ㉢ 펌프의 속도 및 전자파의 강도에 비례하여 시료의 온도가 높으면 전자레인지 내부에서 끓음 현상이 관찰됨
- ㉣ 나선형 유리관 표면에 부착된 시료의 제거를 위해 물세척 10분, 1N NaOH 20분, 5N NaOH 20분

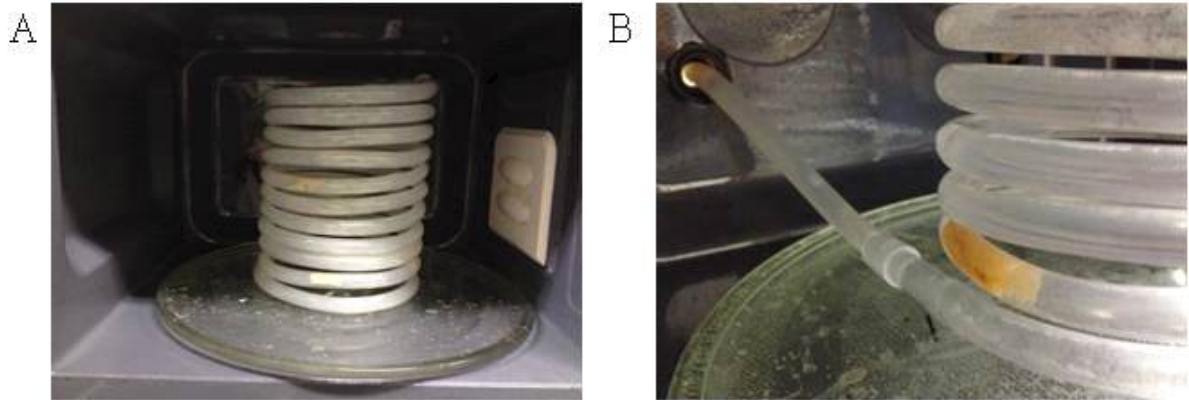


그림 3-25. 마이크로웨이브 연속 조사 중 유체 속도 및 전자파 강도에 의한 시료 탄화

A, 탄화 시료의 5N NaOH를 이용한 세척; B, 탄화시료

⑤ 고농도 유산균 시료 마이크로웨이브 연속 조사 4차 (1차 반복)

- ㉞ 배출된 시료 교반하여 열전달 균일화 시도, 1차 처리된 시료를 반복해서 처리하여 효율 증가 시도함
- ㉞ 처리시간 및 전자레인지 강도 조절을 위해 전자파 강도 조절함
- ㉞ 고농도 균체 시료 4L 처리
- ㉞ 튜빙은 내경 6.4mm 사용
- ㉞ RPM 40~50, 112~140ml/min 혹은 RPM 150~200, 420~560ml/min



그림 3-26. 단독 운전 마이크로웨이브 살균장치 운전

⑥ 고농도 유산균 시료 마이크로웨이브 연속 조사 5차 (2개 연결 처리)

- ㉔ 마이크로웨이브 에너지 조사 시간을 늘리고 기준 시간당 시료의 살균 속도를 높이기 위해 마이크로웨이브 조사장치를 병렬로 연결한 후 고농도 유산균 시료의 살균을 진행하는 효율 증가를 측정함
- ㉕ 튜빙 내경 6.4mm, 시료 4L*3, 전자레인지 강도 최고
- ㉖ 펌프속도 30, 60, 80RPM
- ㉗ 펌프속도 30RPM 으로 1차 처리 후 60 혹은 80RPM으로 2차 처리
- ㉘ 펌프속도 30RPM 으로 1차 처리 후 60 혹은 80RPM으로 2차 처리

A



B



그림 3-27. 마이크로웨이브 살균장치 직렬연결 모식도

A, 2개의 마이크로웨이브 처리 장치; B, 마이크로웨이브 처리장치 병렬연결

(다) 마이크로웨이브 조사장치에 의한 고농도 균체 시료 살균 속도

- ① 정량펌프에 연결관 튜빙의 직경(mm) 및 펌프의 속도(RPM)에 따른 고농도 균체 시료 유체의 흐름 측정
 - ㉠ 사용된 튜빙의 내경 3.1mm 혹은 6.4mm
 - ㉡ 다양한 속도에서 펌프를 작동하고 사균체 시료의 유량 측정
- ② 마이크로웨이브 조사장치 병렬연결 처리시 살균속도
 - ㉠ 고농도 균체 시료 *Lactobacillus sakei* Probio 65 유산균 용액(1×10^{11} CFU/mL) 처리, 직경 6.4 mm 튜빙 사용
 - ㉡ 1차 처리 살균 속도 84ml/min, 2차 처리 살균 속도 168ml/min

표 3-5. 정량이송펌프의 유량

(단위: ml)

속도(RPM)	튜브내경 (mm)	
	3.1	6.4
10	8	28
20	16	56
30	24	84
40	32	112
50	40	140
60	48	168
70	56	196
80	64	224
90	72	252
100	80	280
150	120	420

(라) 마이크로웨이브 조사장치에 의한 고농도 균체 시료 살균 관찰

- ① *Lactobacillus sakei* Probio 65 배양 및 균체 회수 하여 1Kg이상의 wet cell 준비하여 살균된 상수와 혼합하여 고농도 유산균 시료 조제함
- ② 마이크로웨이브 조사장치에서 조사시간 및 정량 펌프 속도를 조절하여 살균
 - ㉠ 조사장치 처리 1회에서는 생균 관찰됨
 - ㉡ 조사장치 처리시간 증가 및 회수 증가 시 생균이 관찰되지 않음
- ③ 고농도 균체 시료가 완전히 사멸하는 연속 마이크로웨이브 처리에서 갈변화가

발생하지 않음

- ④ 연속 마이크로웨이브 처리 장치에 주입되는 고농도 균체의 주입 속도가 빠르면 1차 살균장치를 처리한 후에도 생균이 존재하였음

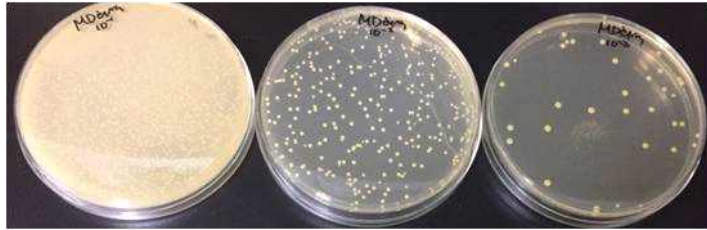


그림 3-28. 마이크로웨이브 살균장치 처리 후 생균 확인

- ⑤ 연속 마이크로웨이브 처리 장치에 주입되는 고농도 균체의 주입 속도가 감소에 의한 생균 감소



그림 3-29. 마이크로웨이브 살균장치 처리 후 생균 확인
살균장치의 처리시간 조정에 의한 완전 살균. 0.1ml의 1×10^{11} CFU/mL 농도의 *Lactobacillus sakei* Probio 65 균주시료에서 생존 균주 관찰되지 않음

(마) 사균체의 변색정도 판별

- ① 살균공정에서 1×10^{11} CFU/mL 농도의 *Lactobacillus sakei* 균주시료를 살균한 후 동결건조 한 시료를 제작한 후 변색의 정도 색상표와 비교함
- ② 동결건조된 사균체의 변색 정도 50% 이하 (PANTONE 7502 C) 로 판단됨



그림 3-30. 마이크로웨이브 처리 사균체 동결건조 진행을 위한 동결판 분주

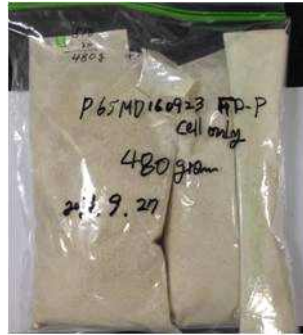


그림 3-31. *Lactobacillus sakei* Probio 65 시료의 마이크로웨이브 처리 사균체

표 3-6. 고농도 균체 살균 방법에 의한 균체 생존 및 갈변

방법	마이크로웨이브	마이크로웨이브	Autoclave	고온고압반응기
용량	1L	4L	4L	10L
처리 전 균수 (CFU/ml)*	1×10^{11}	1×10^{11}	1×10^{11}	1×10^{11}
처리시간 (min)	30	48 (84ml/min)	30	60
특이점	단순마이크로웨이브처리	마이크로웨이브 연속 처리	단순 autoclave 처리	고압반응기 반응
처리 후 균수 (CFU/ml)*	1.0×10^3 이상	1.0×10 이하	1.0×10^3 이상	1.0×10 이하
갈변현상	유	무	유 (살균 반복시)	무
살균효율 (생존률)	$1/10^8$	$1/10^{10}$	$1/10^8$	$1/10^{10}$

* *Lactobacillus sakei* Probio 65를 배양한 후 세포를 농축하여 고농도의 시료로 조제한 후 MRS 한천평판배지에서 생육한 집락의 수를 측정함

(5) 전자파 살균 후의 세포의 변이 조사

(가) 마이크로웨이브 처리한 *Lactobacillus sakei* Proio 65의 게놈 DNA 확인

- ① *Lactobacillus sakei* Probio 65 게놈 DNA를 PowerSoil® DNA Isolation Kit를 이용 추출한 후 agarose gel 전기영동으로 확인 함

㉞ *Lactobacillus sakei* Probio 65 생균체에 비해 사균체의 DNA는 많은 단편화가 진행된 것으로 나타남

㉟ 단편화된 *Lactobacillus sakei* Probio 65의 DNA 크기는 약 1000bp 정도에 집중되는 것으로 나타남

② 추출된 게놈의 agarose gel 전기영동 결과

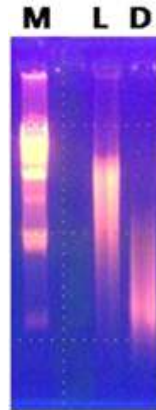


그림 3-32. *Lactobacillus sakei* Probio 65 생균 및 사균에서 추출한 게놈 DNA의 전기영동사진

M: lambda phage Hind 3 marker

L: Genomic DNA extracted from *L. sakei* probio-65 Live cell

D: Genomic DNA extracted from *L. sakei* probio-66 Dead cell

(나) 마이크로웨이브 처리한 *Lactobacillus sakei* Probio 65의 유전자 변이 조사

① *Lactobacillus sakei* Probio 65의 생균 및 사균 whole cell을 PCR 증폭용 주형으로 사용하여 16S rDNA 유전자 증폭한 후 증폭된 DNA 단편을 agarose gel 전기영동으로 확인함

② 생균의 경우 주형으로 사용된 균체의 양이 많은 경우 증폭된 유전자가 확연히 구분되었음

③ *Lactobacillus sakei* Probio 65의 사균체에서는 주형으로 사용된 균체의 양이 많이 포함되어도 유전자가 증폭되지 않음

④ *Lactobacillus sakei* Probio 65의 사균체에서 분리한 게놈은 단편화되어서 주로 500 base의 크기의 DNA만 관찰되었음.

⑤ 1.5 Kb 크기의 16S rDNA 유전자는 증폭되지 않음

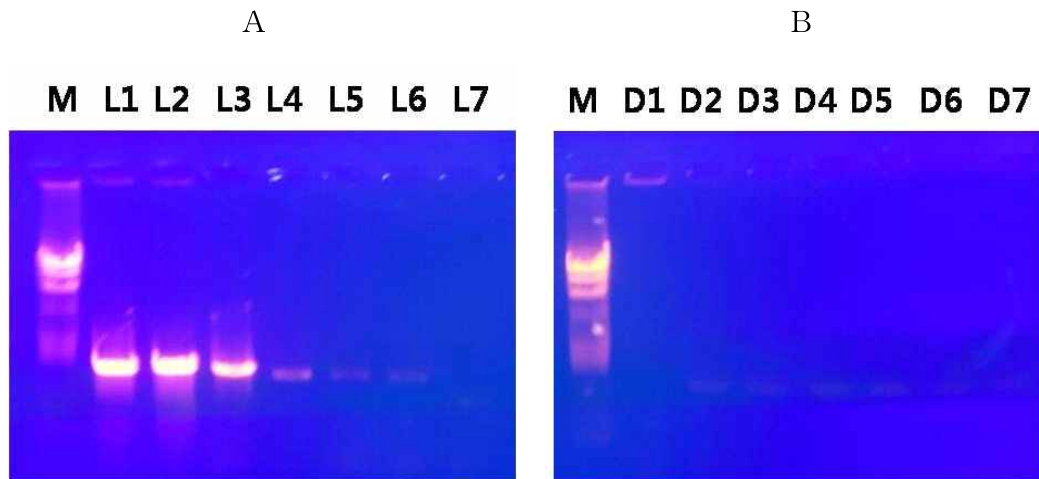


그림 3-33. 생균(A) 및 마이크로웨이브 처리 사균(B)에서 증폭된 유전자의 agarose gel 전기영동 결과. 주형 DNA용 시료는 *Lactobacillus sakei* Probio 65 powder 생균/사균을 십진 희석법을 이용해 -7승까지 희석한 후 사용함.

- ⑥ 사균에 존재할 수 있는 16S rDNA 유전자는 증폭의 확률을 높이기 위해 PCR 증폭 횟수를 증가한 유전자 증폭 및 다른 종류의 DNA 중합효소를 사용한 실험을 실시함
- ㉠ Taq polymerase는 바이오니아 Taq polymerase, 제노텍 Taq polymerase, Tenuto 2X Taq polymerase를 사용함
 - ㉡ PCR cycle은 35로 증가하여 증폭한 후 증폭된 DNA 단편은 agarose gel 전기영동으로 확인함
 - ㉢ Cycle 수를 늘리면 증류수에서도 16S gene의 증폭이 관찰 됨
 - ㉣ A-D의 증폭산물의 양이 A-H의 것 보다 많은 것으로 나타남

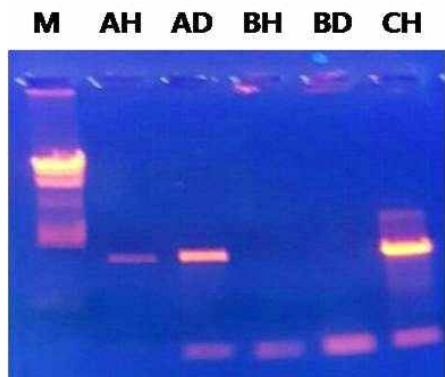


그림 3-34. 다양한 Taq polymerase 사용에 의한 *Lactobacillus sakei* Probio 65 사균의 16S rRNA 유전자 증폭

A-H, Temp; 3차 증류수, 바이오니아 Taq polymerase
 A-D, Temp; 사균 10-3 (마이크로웨이브처리), 바이오니아 Taq polymerase
 B-H, Temp; 3차 증류수, 제노텍 Taq polymerase
 B-D, Temp; 사균 10-3 (마이크로웨이브처리), 제노텍 Taq polymerase
 C-H, Temp; 3차 증류수, Tenuto 2X Taq polymerase
 M, Marker

(다) 사균체 *Lactobacillus sakei* Probio 65의 형태 변화 관찰

① 마이크로웨이브 처리한 균체의 Gram염색 후 현미경 관찰

㉔ *Lactobacillus sakei* Probio 65는 마이크로웨이브 처리에 의해서 형태가 변하거나 세포의 파쇄가 일어나지 않음

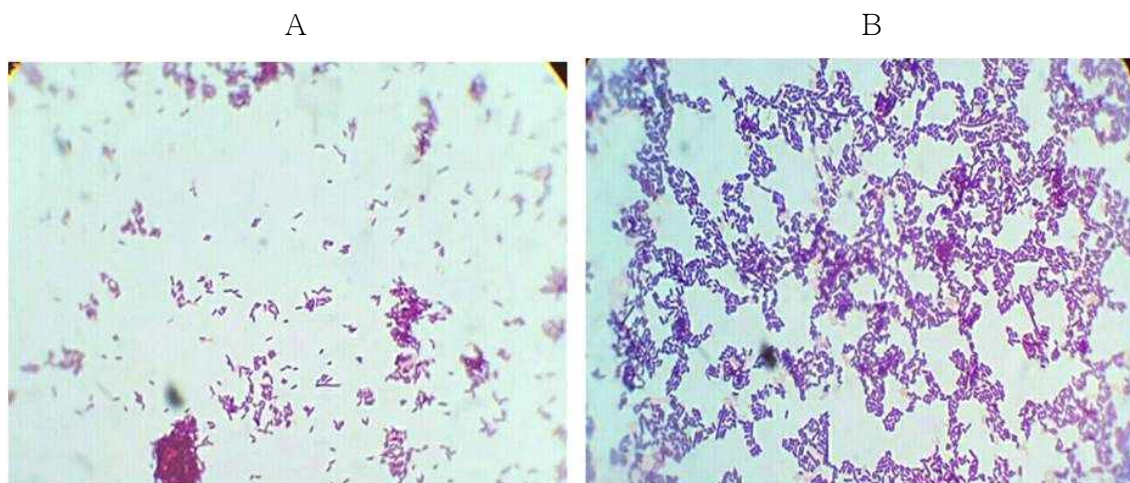


그림 3-35. *Lactobacillus sakei* Probio 65세포의 마이크로웨이브처리에 의한 형태
 A, 처리 전; B, 처리 후

② 고압증기멸균기 처리한 균체의 Gram염색 후 현미경 관찰

㉔ *Lactobacillus sakei* Probio 65는 고압증기멸균기 처리에 의해서 형태가 변하거나 세포의 파쇄가 일어나지 않음

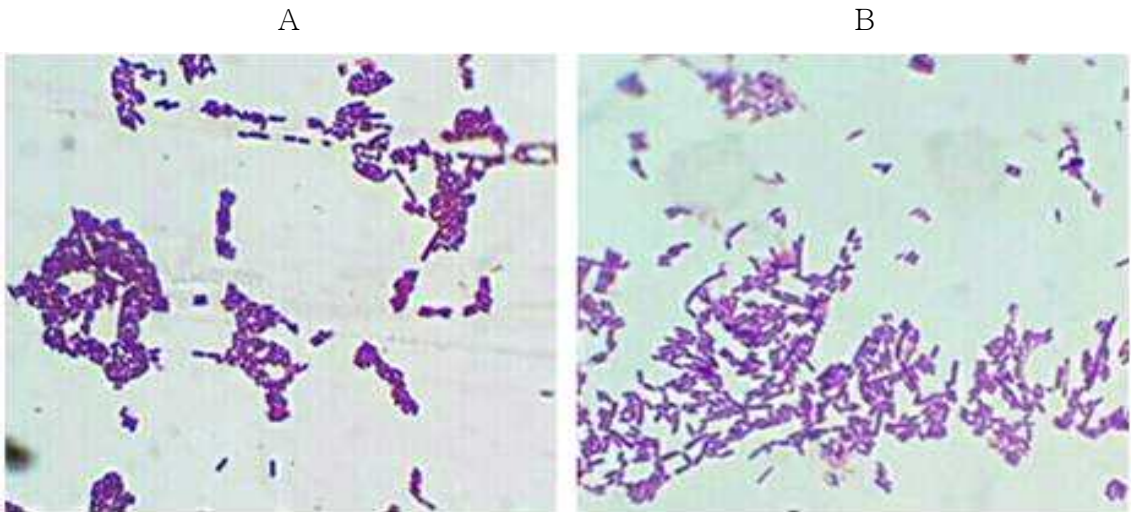


그림 3-36. *Lactobacillus sakei* Probio 65세포의 Autoclave에 의한 형태 변이
A; Autoclave 처리 전, B; Autoclave 처리 후

③ 사균체 동결건조 후 현미경 관찰

㉔ *Lactobacillus sakei* Probio 65는 마이크로웨이브 처리 혹은 고압증기멸균기 처리에 의해서 사균화된 후 동결건조 후에 형태가 변하거나 세포의 파쇄가 일어나지 않음

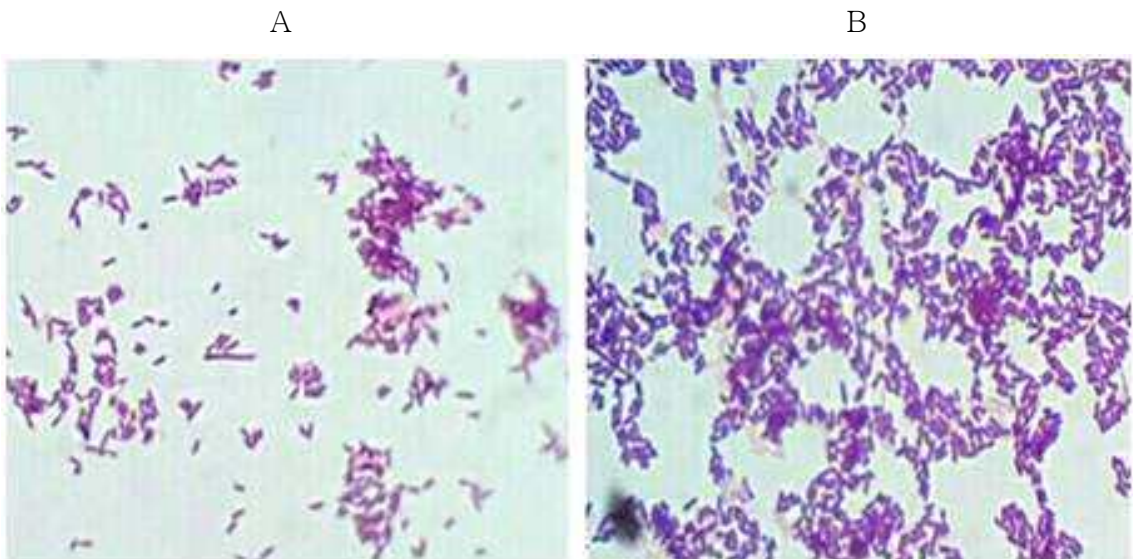


그림 3-37. *Lactobacillus sakei* Probio 65 동결건조 사균의 현미경 사진
A; Autoclave 처리 사균, B; 마이크로웨이브 처리 사균

(6) 고농도 균체 시료 살균공정을 이용한 *Lactobacillus sakei* Probio 65 사균체 분말 시제품 제조

(가) *Lactobacillus sakei* Probio 65의 시제품 제조

- ① *Lactobacillus sakei* Probio 65를 300L 발효기를 이용하여 배양하고 배양된 균체를 연속원심분리기를 이용하여 회수하여 고농도 균체시료(1×10^{11} CFU/mL) 준비. 젖은 무게(wet weight) 기준 균체 중량 2kg 이상의 고농도 균체 현탁액 준비
- ② 준비된 균체시료를 살균한 후 동결건조를 진행한 후 동결건조 균체를 분쇄하여 사균체 시료를 제작함
- ③ 연속마이크로웨이브 처리장치로 살균된 균체는 갈변화 정도가 50% 이하 (PANTONE 7502 C)를 유지하였음
- ④ 사균체 시제품 분말의 세포의 형태는 변화가 없이 유지되었음
- ⑤ 균수를 조정된 사균체 시료의 조제후 분말의 생균은 살균전 기준 1×10^{10} CFU/g의 세포에서 5개 이하의 생균이 확인되었음

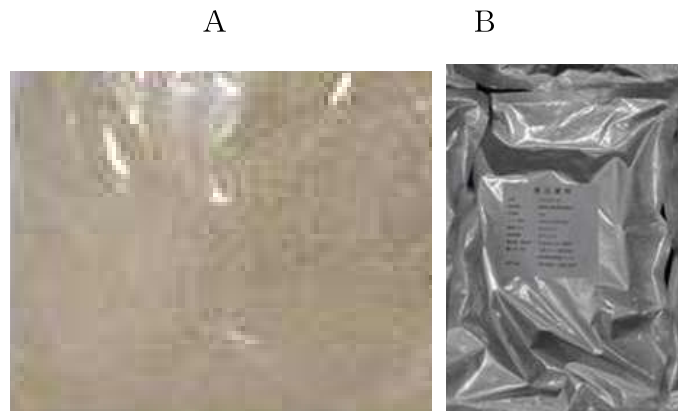


그림 3-38. *Lactobacillus sakei* Probio 65 마이크로웨이브 처리 사균체 분말(A) 및 시제품(B), 사균체 분말은 갈변화 정도가 PANTONE 7502 C이하를 유지함



그림 3-39. 마이크로웨이브 처리 사균체 시료의 생균수 측정 결과, 한천평판배지, 1-5CFU/gram

(마) *Lactobacillus sakei* Probio 65 사균 분말의 QC로 시제품 이용 가능성 확인

① *Lactobacillus sakei* Probio 65 동결건조 분말에 포함된 세포 수 측정

㉔ 균체만 포함된 *Lactobacillus sakei* Probio 65 동결건조 분말 시료에 포함된 세포의 수는 1.2×10^{12} 세포/g 임 (균체 이외의 세포보호제 혹은 부형제가 포함되지 않은 시료를 대상으로 측정함)

표 3-7. *Lactobacillus sakei* Probio 65 건조중량 1gram의 세포 수 측정

사균체	시료	동결건조된 시료의 세포수 (CFU/g)
	1	1.2E+12
	2	1.1E+12
	3	7.3E+11
	4	9.7E+11
	5	1.5E+12
	6	1.4E+12
	7	1.3E+12
	표준편차	2.8E+11
	평균	1.2E+12

② 동결건조 분말의 생균 확인

㉔ *Lactobacillus sakei* Probio 65 동결건조 분말 1g을 살균 증류수 1ml에 혼합 후 MRS 한천 평판배지에 도말한 결과 생균이 관찰되지 않음



그림 3-40. 사균체 시료 1g에 포함된 균체 생육확인

(7) 사균체 정량 분석 방법

(가) 막지방산 성분을 이용한 *Lactobacillus* 사균체 정량

① *Lactobacillus sakei* Probio 65를 열처리하면 생육기능이 제거된 유산균 사균으로 배양으로 그 수를 확인할 수 없음

② *Lactobacillus sakei* Probio 65 세포가 사균으로 바뀐 후에도 그 양을 유지하는

세포구성성분으로 사균의 양을 같음할 수 있음

- ③ 유산균 균체는 일반적인 세균의 세포구성성분과 동일한 성분인 핵산, 지방, 단백질 등의 성분으로 이루어져 있으며, 사균 제조과정에서도 손상을 받지 않는 유산균 세포구성성분으로 지방산, 단백질 함량 등이 있음
- ④ 막 지방산의 경우 배양조건에 따라 그 구성성분의 비율에 약간의 변화가 있기는 하지만 미생물 마다 특이한 프로파일이 있으며, 특정한 유산균도 다른 유산균과 구분되는 여러 지방산의 구성이 나타남
- ⑤ 유산균 균체의 지방산을 GC로 분석하기 위해서는 지방산에 methyl기를 결합한 Fatty acid methyl esters(FAME)형태로 분석하여야 함
- ⑥ *Lactobacillus sakei* Probio 65는 생균 및 사균에서 동일한 지방산 크로마토그램을 나타냄
- ⑦ *Lactobacillus sakei* Probio 65 생균 시료와 사균 시료에서 추출한 지방산 조성과 균체가 포함되지 않은 대조구 시료의 지방산 크로마토그램은 그림과 같음

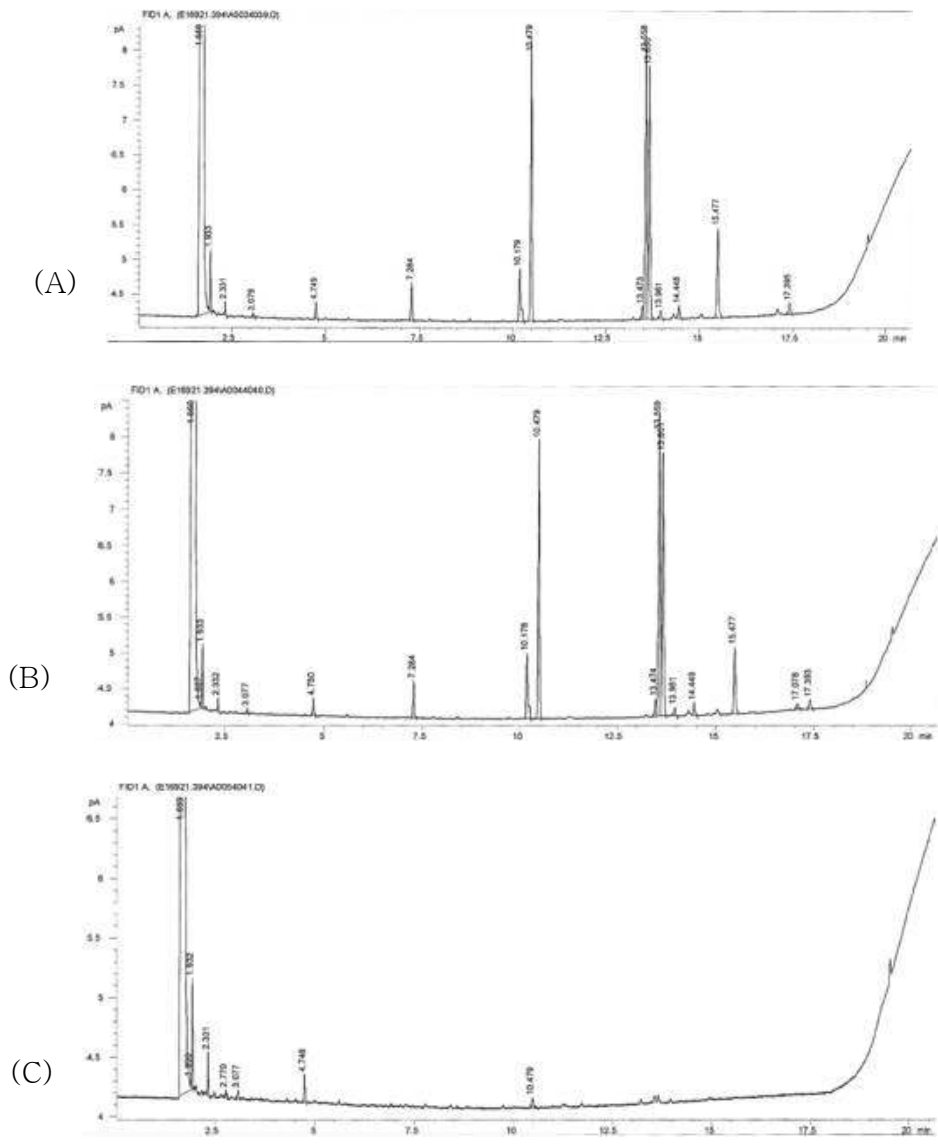


그림 3-41. *Lactobacillus sakei* Probio 65 생균동결건조시료(A), 사균동결건조시료(B) 및 대조구(C)의 막지방산 FAMEs 크로마토그램

(나) 막지방산 palmitic acid을 이용한 *Lactobacillus sakei* Probio 65 사균정량

- ① *Lactobacillus sakei* Probio 65 사균 시료에 포함된 여러 종류의 지방산중 palmitic acid(16:0, hexadecanoic acid)는 methyl palmitate 형태로 검출됨
- ② Methyl palmitate는 *Lactobacillus sakei* Probio 65의 전체 FAMEs에서 차지하는 비율이 높고, 배양조건에 따른 함유량의 편차가 적으며, 지방산 크로마토그램 상에서 다른 지방산의 위치와 차별화가 용이함으로 지표물질로

사용할 수 있음

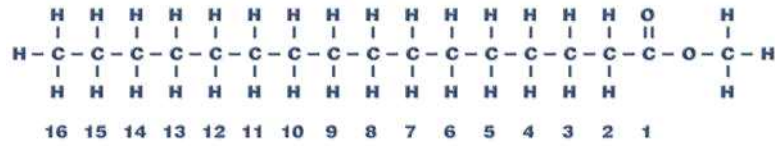


그림 3-42. Methyl palmitate의 구조

(8) 균체 지방산 분석을 이용한 사균체 정량 분석

① 분석에 사용되는 시료의 양 및 조성

㉠ 표준물질

- : Methyl palmitate 1mg + hexane
- ; Methyl palmitate 0.5mg + hexane
- ; Methyl palmitate 0.1mg + hexane
- ; Methyl palmitate 0.01mg + hexane

㉡ 생균 혹은 사균의 동결건조 시료

- : 시료1 10mg
- : 시료2 10mg
- : 시료3 10mg
- : 시료2 10mg + 0.1mg Glycerol triundecanoate
- : 시료3 10mg + 0.1mg Glycerol triundecanoate
- : 시료4 10mg + 0.1mg Glycerol triundecanoate
- : 시료3 100mg + 0.1mg Glycerol triundecanoate
- : 시료4 100mg + 0.1mg Glycerol triundecanoate
- : 시료5 10mg + 0.1mg Glycerol triundecanoate
- : 시료6 10mg + 0.1mg Glycerol triundecanoate

② 다양한 배양 조건에서 배양된 *Lactobacillus sakei* Probio 65의 주요 FAMES

㉠ 미생물 균체는 배양 조건에 의해 지방산의 구성 비율이 조금씩 달라질 수 있음

㉡ 여러 지방산 중에서 methyl palmitate 피크의 면적이 전체 피크면적에서 가장 많은 양을 차지함

표 3-8. 다른 시험구에서 배양한 *Lactobacillus sakei* Probio 65 균체의 지방산 구성

FAME [#]	구성비율 (평균, n=10, %)	표준편차
14:0	3.4	1.5
16:0	26.0	1.6
18:0	1.1	1.2
18:1 w9c	24.2	3.9
Sum F 3 ^{&}	7.4	1.7
Sum F 7	16.2	9.8
Sum F 8	19.1	6.1

[#] 구성비율이 1%이상인 지방산만 포함함

[&] Summed feature 3, 16:1 w7c/16:1 w6c; Summed feature 5, 18:2 w6,9c/18:0 ante; Summed feature 7, un 18.846/19:1 w6c/19cy; Summed feature 8, 18:1 w7c/18:1 w6c

③ 표준물질의 GC-chromatography 분석 후 response area를 이용한 정량선 작성

㉠ 다양한 농도로 조제한 methyl palmitate 표준물질을 GC로 분석한 후 나타나는 response area를 이용한 일차방정식 도출

$$\text{㉡ } Y = 77245 * X + 1880$$

$$X = (Y - 1880) / 77245$$

$$\text{: Methyl palmitate (mg/ml) = (Response area - 1880) / 77245}$$

표 3-9. 다른 양의 농도의 methyl palmitate를 함유한 시료의 GC 분석

Methyl palmitate (mg/ml) [#]	GC chromatogram의 Response area
0	0
0.01	8172
0.1	79342
0.5	394313
1	771221
10	6502000
100	65120000

㉢ Methyl palmitate 정량을 위해서 일정량의 시료를 hexane에 용해하여 사용함, 정량선의 정확도를 높이기 위해 0~1mg/ml농도 범위의 response area를 이용하여 정량선을 작성함

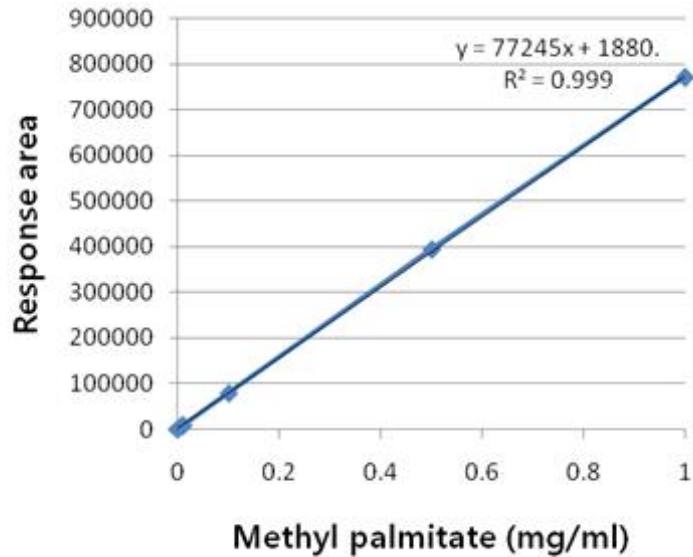


그림 3-43. Methyl palmitate의 양을 나타내는 정량선

- ④ GC-chromatography의 response area를 이용한 palmitic acid(C16:0)의 정량
- ㉠ GC 분석을 위해 Palmitic acid에 methyl 기를 결합시킨 methyl palmitate의 양을 측정함
 - ㉡ 사균 시료의 palmitic acid 양을 측정하기 위해, 세포보호제 혹은 부형제가 포함되지 않고 균체로만 구성된 사균 시료를 준비함
 - ㉢ 제조번호가 상이한 *Lactobacillus sakei* Probio 65 사균 시료 10mg에는 1.2×10^{10} 개의 세포가 포함되어 있음
 - ㉣ 제조번호가 상이한 *Lactobacillus sakei* Probio 65 사균 시료 10mg에 존재하는 막지방산을 추출한 후, GC로 분석함.
 - ㉤ 제조번호가 상이한 *Lactobacillus sakei* Probio 65 사균 시료 10mg/ml의 시료로부터 36 μ g/ml의 methyl palmitate가 검출됨
 - ㉥ *Lactobacillus sakei* Probio 65 세포 1.2×10^{10} 개에서 36 μ g의 methyl palmitate가 검출됨
 - ㉦ 1 μ g의 methyl palmitate의 검출은 *Lactobacillus sakei* Probio 65 3.33×10^8 cell이 추출한 시료에 함유되어 있음을 나타냄

표 3-10. 다른 batch의 *Lactobacillus sakei* Probio 65 사균체 시료에서 추출한 FAME중 methyl palmitate의 response area로 추정된 methyl palmitate의 양

시료 No.	Response area of Methyl palmitate	Methyl palmitate (mg/ml)
1	27372	33.0
2	31776	38.7
3	27574	33.3
4	28430	34.4
5	27574	33.3
6	35405	43.4
7	30362	36.9
8	32436	39.6
9	29354	35.6
10	29849	36.2
평균	29602	36.0
표준편차	2582	3.3

다. 연구개발성과

(1) *Lactobacillus sakei* Probio 65 사균체 분말 분석

(가) 시제품 공인분석기관 검사성적서

① 유산균: 10/g 이하

② 대장균군, *Staphylococcus aureus*, 일반세균, Yeast and Mold

대장균군: 음성 -> 음성

Staphylococcus aureus: 음성 -> 음성

일반세균: 1×10^2 이하 -> 음성

Yeast and Mold: 1×10^2 이하 -> 15

제 2016122032 호			
검사성적서			
발주처명	Label ID	제조일자 (유통기한)	
의뢰인	업체명 (주)프로바이오틱스		
	주소	경남 창원시 마산합포구 마산동 111-18, 306호, 205호	
	성명	박종화	
계좌번호	PRB011000100	검사년월일	2016-12-03
검사뢰의뢰처	홍고송	검사접수번호	2016122032
귀하가 우리 연구원에 검사뢰뢰한 결과는 다음과 같습니다. 검사결과 중 확인자: 김 권 희			
시험항목	결과	검사방법	
유산균수(1g)	10/g		이경희
2017년 1월 20일			
한국기능식품연구원			

제 2016110012 호			
검사성적서			
발주처명	Label ID	제조일자 (유통기한)	2016-10-04
의뢰인	업체명 (주)프로바이오틱스		
	주소	경남 창원시 마산합포구 마산동 111-18, 306호, 205호	
	성명	박종화	
계좌번호	PRB011000100	검사년월일	2016-11-01
검사뢰의뢰처	홍고송	검사접수번호	2016110012
귀하가 우리 연구원에 검사뢰뢰한 결과는 다음과 같습니다. 검사결과 중 확인자: 김 권 희			
시험항목	결과	검사방법	
대장균군	음성		이경희
박테리오파지	음성		이경희
위급균(1g)	검출됨 (보통 불검출, 규약의 불검출)		이경희
유산균수(1g)	20/g		이경희
일반세균수(1g)	15/g		이경희
2016년 11월 10일			
한국기능식품연구원			

그림 3-44. *Lactobacillus sakei* Probio 65 사균체 분말 공인분석기관 검사성적서

(2) 고농도 균체 시료 살균법 지적재산권 확보

(가) 특허출원

발명의 명칭: 마이크로웨이브 처리장치

출원일자: 2016년 11월 08일

출원번호: 10-2016-0147808

출원인: 주식회사 프로바이오틱

발명자: 김병천, 박용하

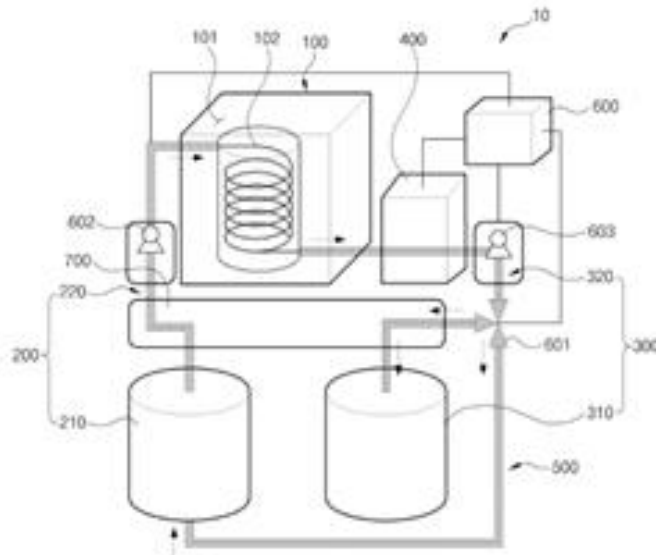


그림 3-45. 마이크로웨이브 처리장치의 대표도

(3) 학술논문 발표

(가) 학술대회 발표

- ① 제목: Application of microwave for the production of ghost probiotics with concentrated Lactobacillus cells

발표학회: 2016 한국생물공학회 춘계학술발표대회 및 국제심포지엄

2016년 4월 20-22일

경주화백컨벤션센터

(나) 논문투고

- ① 제목: Self-medication and antibiotic resistance: Crisis, Current challenges, and prevention

학술지: Saudi Journal of Biological Sciences

내용: 본 논문은 과제의 수행 과정에서 고려하게 된 내용으로 프로바이오틱 유산균의 안전성에 관한 내용을 포함하고 있음

(4) *Lactobacillus sakei* Probio 65 사균체 시제품 판매

(가) 제품발주서

① 국내 회사 1 곳에 국외 1곳에 시제품을 공급함

순서	사진	주요 설명
1		포장 상태 및 라벨 표기사항을 확인한다. (P20160927P8ND1)
2		제품 수량을 확인한다. 1kg x 1ea = 1kg
3		상품서류를 첨부한다.(상온 보관제품)
4		피막스(박음제리플) 한다.
5		배송지 주소를 확인하고 출장을 부착한다.

그림 3-46. 발주제품 포장 및 배송내역

prufinnic Corp.

#204, #205 Biofood Industrialization Center, Jeonbuk Institute for Food-Bioindustry,
111-18, Woonjangdong-gil, Gookjin-gu, Jeonju-si, Jeollabuk-do, Korea
TEL +82-2-722-0651 / FAX +82-2-966-0632

OFFER SHEET

Ref. No. : 프루비이오닉 16-012

Messrs. : 대상주식회사

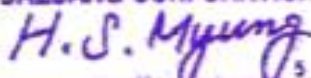
DATE : Nov. 30, 2016

Dear Sir,

We offer you in reply to your kind inquiry of Lactopy as under,

- ① Place of Delivery : 서울시 중랑구 연희동 470, 101-589 대상주식회사
- ② Packing : 1KG in AL pouch
- ③ Origin : Republic of Korea
- ④ Destination : Japan
- ⑤ Payment Terms : 공판통이 후라 달의 달일로부터 60일과 전지여음으로 지급
- ⑥ Offer kept open until : APR. 30, 2016
- ⑦ Others : -

Description	Quantity	Unit Price	Amount
Lactopy D	10KGS	KRW 255,000/KG	KRW 2,550,000
TOTAL	10KGS		KRW 2,550,000/KG

JAESANG CORPORATION

 President H. S. MYUNG



대상주식회사

프루비이오닉

그림 3-47. 제품발주서

(5) *Lactobacillus sakei* Probio 65 사균체 시제품 10Kg 분말 수출

(가) 일본수출 시제품

① 식품소재 제품표시 및 소포장

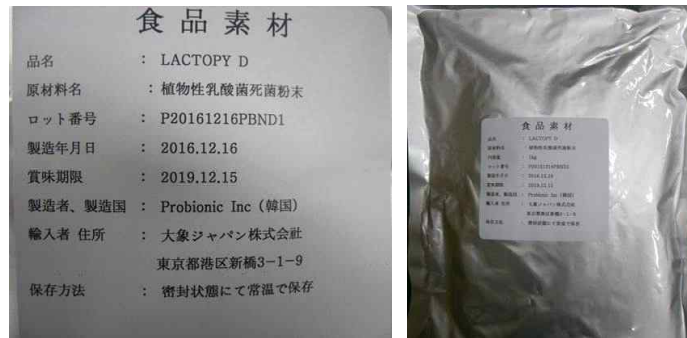


그림 3-48. 사균체 시제품 식품표시 및 소포장

② 식품소재 제품 포장

: 1 Kg 소포장 10개



그림 3-49. 사균체 시제품 10Kg

(6) 사균체 제조공정서

제 조 공 정 서

제품명	<i>Lactobacillus sakei</i> Probio 65 사균	등록번호	314-81-33767
상호	(주)프로바이오틱	사업장소재지	전라북도 전주시 덕진구 원장동길 111-18
전화	070-4923-0650	팩스	02-566-0652

공정	공정조건	기능성지표	수율
종균배양	종균확인: 종균의 16s rDNA 염기서열 확인 배양배지: MRS broth medium* (별첨1) 배양조건: 37°C, 16~18시간 배양 * 배양배지는 종균배양과 본배양에서 동일	유산균 1×10 ⁸ CFU/mL	100
↓			
본배양	배양배지: MRS broth medium (별첨1) 배양조건: 30~37°C, 16~18시간 배양 종균 및 물: 유산균 3% 및 물 91.494% 투입	유산균 2×10 ⁹ CFU/mL	100
↓			
원심분리	회전속도: 15,000rpm 시간: 3~4시간		0.6
↓			
균현탁	세포현탁: 살균수와 혼합 후 균질화	유산균 수 1×10 ¹¹ CFU/g	0.6
↓			
살균	살균조건1*: 마이크로웨이브 연속 처리장치 처리 *2회 연속해서 반복 살균조건2#: 121°C, 15min 열처리 후 상온에서 1일 방치 #3회 연속해서 반복	유산균 수 < 1000 CFU/g	
↓			
예비동결	예비동결조건: 영하40°C/ 6~12시간		
↓			
동결건조	동결건조조건: 5torr, 영하 40°C에서 영상 20°C로 온도 변화, 60시간		
↓			
분쇄	분쇄기에서 분쇄	Methyl palmitate 1.8mg/g	0.19
↓			
사균원말	<i>Lactobacillus sakei</i> Probio 65 사균	Methyl palmitate 1.8mg/g	0.19

(7) 사업화성과 및 매출실적

○ 사업화 성과

항목	세부항목			성 과	
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	0.05억원	
			향후 3년간 매출	2억원	
		관련제품	개발후 현재까지	50억원	
			향후 3년간 매출	200억원	
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : 1% 국외 : 0.1%	
			향후 3년간 매출	국내 : 1% 국외 : 30%	
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : 5% 국외 : 50%	
			향후 3년간 매출	국내 : 20% 국외 : 50%	
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위			위
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위			위

○ 사업화 계획 및 매출 실적

항 목	세부 항목		성 과		
사업화 계획	사업화 소요기간(년)		3		
	소요예산(백만원)		50		
	예상 매출규모 (억원)		현재까지	3년후	5년후
			0.05	2	5
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내	1	3	5
		국외	0.1	0.3	0.5
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획		개별인정형 사균체 프로바이오틱 제품 생산			
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)		현재	3년후	5년후
	수입대체(내수)				
	수 출				

4. 목표달성도 및 관련분야 기여도

4-1. 목표달성도

○ 정량적 성과 목표 달성

평가항목	단위	비중 (%)	개발목표치	달성 (%)
1. 사균체 살균 공정 개발				공정서작성
살균 균체시료 농도 (<i>Lactobacillus sakei</i> 기준)	CFU/mL	20	1×10 ¹¹ 이상	1×10 ¹¹ 살균, 100% (식품공전 기준 실험)
갈변화 정도	PANTONE	20	변색 정도 50% 이하(PANTONE 7502 C)	비변색조달성, 100% (색상표, 분말사진)
고농도 균체 살균 속도	mL/min	20	50 이상	연속살균 50ml/min달 성, 100% (식품공전 실험)
2. 사균체 시제품				
시제품 생산량 (살균전 기준 1×10 ¹⁰ CFU/g)	Kg	10	10 이상	시제품10Kg 확보, 100% (시제품사진)
유산균	CFU/mL	5	10 이하	살균확인, 100% (공인기관분석)
대장균군	CFU/mL	5	0	살균확인, 100% (공인기관분석)
<i>Staphylococcus aureus</i>	CFU/mL	5	0	살균확인, 100% (공인기관분석)
일반세균	CFU/mL	5	1×10 ² 이하	살균확인, 100% (공인기관분석)
Yeast and Mold	CFU/mL	5	1×10 ² 이하	살균확인, 100% (공인기관분석)
3. 상업화 및 활용방안				
사균원료 수효업체 선정 (B2B 형태의 사균제품)	개	5	1개 이상	제품발주서 2개, 100% (발주서)

○ 사업화지표 및 연구기반지표 달성

성과목표	사업화지표								연구기반지표								
	지식재산권		기술이전	사업화					기술인증	학술성과		교육지도	인력양성	정책활용·홍보		기타(타연구활용등)	
	출원	등록		제품화	기술창업	매출창출	고용창출	투자유치		논문				학술발표	정책활용		홍보진시
										SCI	비SCI						
최종목표	1		1	1		1				1	1						
1차년도	1		1	1		1				1	1						
달성	1		1	1		2				1	1						

4-2. 관련분야 기여도

- 프로바이오틱 사균체 제작공정 정립
- 마이크로웨이브 살균 장치를 응용한 환경미생물 처리
- 국내 김치유산균의 가치 향상
- 한류와 대한민국 전통 발효식품의 기능성 증진
- 프로바이오틱 김치유산균의 이용성 증진
- 코팅이 강조되는 생균제 시장에서 벗어나 유산균 시장의 확대
- 생균의 한계를 극복하여 다양한 음식의 첨가 소재로 프로바이오틱 사균체 개발 및 시장 확장에 기여 할 수 있음

5. 연구결과의 활용계획

- *Lactobacillus sakei* Probio 65 사균의 상용화
- 열전달이 용이하지 않은 액상시료의 살균
- 식품 및 환경미생물 처리에 활용
- 유통기한에 의한 제한을 비교적 적게 받는 기능성 식품소재개발
- 기타 사균체 시장의 확대
- 전통 발효식품인 김치에서 분리된 기능성 유산균의 수출 증대

6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

- 관련 사항 없음

7. 연구개발결과의 보안등급

- 보안 관련 없음

8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설장비 현황

- 장비구입 현황 없음

9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

○ 연구실 안전조치

- 1) 실험실 관리, 책임연구원이 연구원의 안전 준수사항을 관리
- 2) 관리위험등급 지정하여 올바른 취급방법으로 보관 및 사용
- 3) 실험실 환기, 소화설비 점검

○ 교육 훈련

- 1) 개요: 실험실의 안전을 확보하고 종사자의 건강을 보호하여 실험 및 연구 활동에 기여하고자 일회 교육 및 소방 훈련 실시
- 2) 교육대상: 기술연구소 연구원 전원 참석
- 3) 교육구분
 - 정기교육: 매월 1회 교육
 - 비정기 임시교육: 사이버 교육 환경안전교육 등 (동영상교육)

10. 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문/ 특허/ 기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국 가	코드번호		D-12	
						Impact Factor	논문게재일 /특허출원일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/인 용횟수 등)
1	특허	마이크로웨이브 처리장치	(주)프로바 이오닉	주관	대한민국		2016.11.08	단독	.
2	논문	Self-medication and antibiotic resistance: Crisis, Current challenges, and prevention	(주)프로바 이오닉	주관	사우디아라 비아	1.78	2017. 1.12.	단독	SCIE
3	기타	Application of microwave for the production of ghost probiotics with concentrated Lactobacillus cells	(주)프로바 이오닉	주관	대한민국	.	2016.4.22.	.	.

11. 기타사항

○ 산업화 및 대량생산을 위한 마이크로웨이브 살균 장치의 규모 확장 방안

- 연속식 마이크로웨이브 살균장치 마이크로웨이브파가 조사되는 구역의 물리적인 공간의 크기의 제한이 없도록 외부에서 연속적으로 시료를 조사장치 내부로 주입하고 배출하도록 설계되고 운영됨
- 살균장치의 규모의 확장을 위해서는 제작된 연속식 마이크로웨이브 살균장치를 병렬로 연결하면 처리 규모 및 속도가 확장될 것으로 사료됨

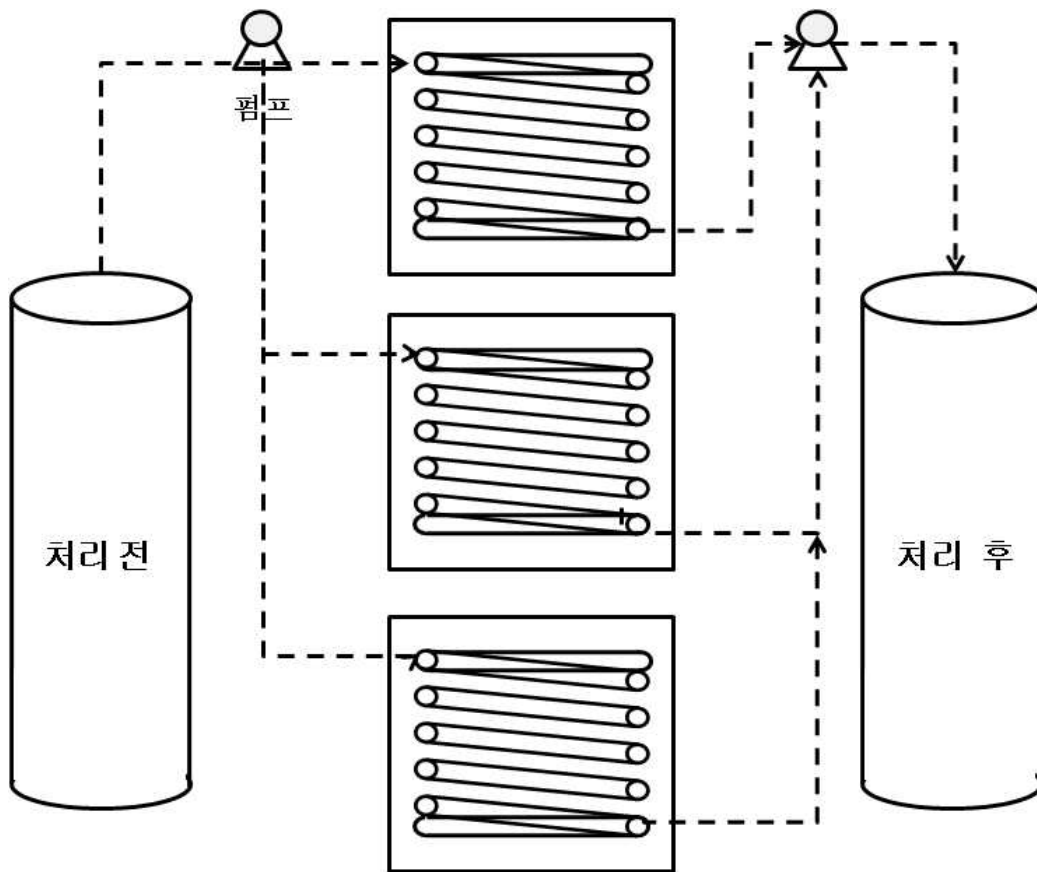


그림 11-1. 처리용량 확장을 위한 마이크로웨이브 살균장치 병렬연결 모식도

12. 참고문헌

- Fujiki, T., Hirose, Y., Yamamoto, Y. & Murosaki, S. (2012). Enhanced immunomodulatory activity and stability in simulated digestive juices of *Lactobacillus plantarum* L-137 by heat treatment. *Biosci Biotechnol Biochem* 76, 918-922.
- Shinji Murosaki, Yoshihiro Yamamoto, Kazue Ito, Takeaki Inokuchi, Hiroaki Kusaka, Hitoshi Ikeda, and Yasunobu Yoshikai, (1998). Heat-killed *Lactobacillus plantarum* L-137 suppresses naturally fed antigen-specific IgE production by stimulation of IL-12 production in mice. *J ALLERGY CLIN IMMUNOL* 102, 57 - 64.
- Demont A, Hacini-Rachinel F, Doucet-Ladevèze R, Ngom-Bru C, Mercenier A, Prioult G, Blanchard C. (2016) . Live and heat-treated probiotics differently modulate IL10 mRNA stabilization and microRNA expression. *J Allergy Clin Immunol.* 137 1264-7.
- Knox, K. W. & Holmwood, K. J. (1968). Structure of the cell wall of *Lactobacilli*. Role of muramic acid phosphate in *Lactobacillus fermenti*. *Biochem J* 108, 363-368.

8. 뒷면지

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.

[별첨 1]

연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 프로바이오틱 <i>Lactobacillus sakei</i> 사균 분말 생산을 위한 살균공정 개발				
	(영문) Development of a sterilization process for probiotic <i>Lactobacillus sakei</i> dead cell powder production				
주관연구기관	(주)프로바이오틱		주 관 연 구 책 임 자	(소속) (주)프로바이오틱	
참 여 기 업	(주)프로바이오틱			(성명) 김병천	
총연구개발비 (64,000천원)	계	64,000,000	총 연 구 기 간	2015.12.11. ~ 2016.12.10.(1년)	
	정부출연 연구개발비	48,000,000	총 연 구 원 수	총 인 원	4
	기업부담금	16,000,000		내부인원	4
	연구기관부담금	0		외부인원	0
<p>○ 연구개발 목표 및 성과</p> <ul style="list-style-type: none"> - 고농도의 프로바이오틱 유산균 사균 분말 제품 생산에 적합한 살균 방법 선정 - <i>Lactobacillus sakei</i> 사균 분말의 변색을 일으키지 않는 최적의 살균 공정 개발 - 시험규모의 발효기에서 생산되는 <i>Lactobacillus sakei</i> 를 이용한 사균 분말시제품 생산 <p>○ 연구내용 및 결과</p> <ul style="list-style-type: none"> - 시험규모 발효기를 이용한 프로바이오틱 유산균 배양, 균체의 회수, 고농도 유산균 시료를 조제함 - 고농도의 프로바이오틱 유산균 시료의 효율적인 멸균 공정을 선정함 - 마이크로웨이브를 이용한 살균시스템 고안함 - 유산균 열처리 및 마이크로웨이브 살균후의 유전자가 단편화됨을 확인함 - 사균 생산 공정을 이용하여 발효기(300L)에서 생산되는 유산균 사균 분말 시제품을 생산함 <p>○ 연구성과 활용실적 및 계획</p> <ul style="list-style-type: none"> - <i>Lactobacillus sakei</i> 사균체 제품의 상용화 - 마이크로웨이브를 이용한 균체 살균관련 학회 발표 및 특허 출원 - 마이크로웨이브를 이용한 유산균 연속 살균 공정의 상용화 - 마이크로웨이브 연속 처리 살균장치를 이용한 선박평형수 및 하수종말처리장 슬러지 살균등의 처리 범위 확장 					

[별첨 2]

자체평가의견서

1. 과제현황

			코드번호	D-15	
			과제번호		
사업구분	농림기술개발사업				
연구분야				과제구분	단위
사업명	고부가가치식품기술개발				주관
총괄과제	기재하지 않음			총괄책임자	기재하지 않음
과제명	프로바이오틱 <i>Lactobacillus sakei</i> 사균 분말 생산을 위한 살균공정 개발			과제유형	(기초, 응용, 개발)
연구기관	(주)프로바이오닉			연구책임자	
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	2015.12.11.~2016.1 2.10.(1년)	48,000	16,000	64,000
	2차년도				
	3차년도				
	4차년도				
	5차년도				
	계				
참여기업	(주)프로바이오닉				
상대국		상대국연구기관			

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2016.12.10.

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
(주)프로바이오닉	연구소장	김병천

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

본인은 평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 본 자료가 전문가 및 전문기관 평가 시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

확 약	
-----	--

I. 연구개발실적

※ 다음 각 평가항목에 따라 자체평가한 등급 및 실적을 간략하게 기술(200자 이내)

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수, **우수**, 보통, 미흡, 불량)

- 개발결과 사균체 생산에 적합한 고압반응기 살균 방안을 제시함
- 소형의 마이크로웨이브를 효과적으로 이용할 수 있게할 수 있는 장비를 고안함

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수, **우수**, 보통, 미흡, 불량)

- 국내 프로바이오틱 유산균의 경쟁력 향상
- 소형 마이크로웨이브 살균 장치의 이용

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수, **우수**, 보통, 미흡, 불량)

- 건강기능식품 사균체 제작에 이용 할 수 있음
- 마이크로웨이브 살균 장치는 식품, 환경 분야의 고점도 시료 살균에 이용할 수 있음

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수, **우수**, 보통, 미흡, 불량)

- 과제의 기획 단계의 연구를 성실히 수행함
- 추가 연구로 사균체의 정량 방법에 대한 방안을 제시함

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (아주우수, **우수**, 보통, 미흡, 불량)

- 특허: 마이크로웨이브 살균 방법 자동화에 대한 방안

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
살균 균체시료 농도 (<i>Lactobacillus sakei</i> 기준)	20	100	1 × 10 ¹¹ CFU/mL 이상의 균체 시료 살균 함, 균체수 측정 data
갈변화 정도	20	100	변색 정도 50% 이하(PANTONE 7502 C) 의 갈변화를 나타남, 동결 건조 시료 사진
고농도 균체 살균 속도	20	100	마이크로웨이브에서 50mL/min이상의 연속살균, 살균속도결과 data
시제품 생산량 (살균전 기준 1 × 10 ¹⁰ CFU/g)	10	100	10Kg 이상의 사균체 시제품 생산, 시제품사진
유산균	5	100	건조 시료의 유산균 10 CFU/g 확인, 공인성적서
대장균군	5	100	건조 시료의 대장균 음성 확인, 공인성적서
<i>Staphylococcus aureus</i>	5	100	건조 시료의 <i>Staphylococcus aureus</i> 음성 확인, 공인성적서
일반세균	5	100	건조 시료의 일반세균 1 × 10 ² CFU/g 이하 확인, 공인성적서
Yeast and Mold	5	100	건조 시료의 진균 1 × 10 ² CFU/g 이하 확인, 공인성적서
사균원료 수효업체 선정 (B2B 형태의 사균제품)	5	100	사균원료 수효업체 2곳에 사균제품 공급, 제품발주서
합계	100점	100%	

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

- 과제 계획서의 내용을 충실히 수행함
- 추가 연구로 사균체의 정량 방법에 대한 방안을 제시함

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

- 장비 직접 제작에 따른 제약

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

○ 마이크로웨이브 살균 장치의 기술 이전

IV. 보안성 검토

○ 연구책임자의 보안성 검토의견, 연구기관 자체의 보안성 검토결과를 기재함

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

1. 연구책임자의 의견

○ 보안 관련성 없음

2. 연구기관 자체의 검토결과

○ 보안 관련성 없음

[별첨 3]

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input checked="" type="checkbox"/> 자유응모과제 <input type="checkbox"/> 지정공모과제	분 야	고부가가치식품개발	
연구과제명	프로바이오틱 <i>Lactobacillus sakei</i> 사균 분말 생산을 위한 살균공정 개발			
주관연구기관	(주)프로바이오틱	주관연구책임자		
연구개발비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	48,000,000	16,000,000	0	64,000,000
연구개발기간	2015.12.11.~2016.12.10.(1년)			
주요활용유형	<input checked="" type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input type="checkbox"/> 기타() <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:)			

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
- 고농도의 프로바이오틱 유산균 사균 분말 제품 생산에 적합한 살균 방법 선정	- 고농도 유산균 시료의 살균을 위한 마이크로웨이브 처리방법 및 열처리 방법 확보 함
- <i>Lactobacillus sakei</i> 사균 분말의 변색을 일으키지 않는 최적의 살균 공정 개발	- 살균 공정에서 사균 분말의 변색이 일어나지 않는 공정 확보 함
- 시험규모의 발효기에서 생산되는 <i>Lactobacillus sakei</i> 를 이용한 사균 분말시제품 생산	- 개발된 살균 공정을 이용하여 <i>Lactobacillus sakei</i> 사균 분말 시제품 생산 함
- 사균체의 유전자 변화 관찰	- 사균체의 DNA 단편화에 관찰 - 사균체 정량을 위한 FAME 방법 적용

* 결과에 대한 의견 첨부 가능

3. 연구목표 대비 성과

성과목표	사업화지표										연구기반지표							
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과		교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용 창출	투자 유치		논문				학술 발표	정책 활용	
											SC I	비 SC I						
최종목표	1			1		1	1					1	1					
연구기간내 달성실적	1			1		1	1					1	1					
달성율(%)	100			100		100	100					100	100					

4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	고농도 프로바이오틱 유산균의 고압고온반응기를 이용한 살균
②	고농도 프로바이오틱 유산균의 마이크로웨이브 살균
③	프로바이오틱 유산균 정량 방법 제시

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장애로 해결	정책 자료	기타
①의 기술		v					v	v		
②의 기술		v				v		v		
③의 기술		v						v		

* 각 해당란에 v 표시

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	○ 프로바이오틱 사균체 건강기능식품 제작 ○ 고농도 프로바이오틱 유산균의 살균
②의 기술	○ 사균체 건강기능식품 제작 ○ 살균공정의 환경미생물 처리 및 식품 분야 응용
③의 기술	○ 식품에 첨가된 프로바이오틱 유산균 정량으로 기능성 원료 평가 기준 제시

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	사업화지표										연구기반지표						
	지식 재산권			기술실시 (이전)		사업화				기술 인 증	학술성과		교육 지 도	인 력 양 성	정책 활용-홍보		기 타 (타 연구 활용 등)
	특 허 출 원	특 허 등 록	품 종 등 록	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출		투 자 유 치	논문			학 술 발 표	정 책 활 용	
										SC I		비 SC I					
최종목표	1			1		1	1					1	1				
연구기간 내 달성실적	1			1		1	1					1	1				
연구종료 후 성과창출 계획																	

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명 ¹⁾	고농도 프로바이오틱 유산균 살균		
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	천원
이전방식 ²⁾	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input checked="" type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타()		
이전소요기간		실용화예상시기 ³⁾	
기술이전시 선행조건 ⁴⁾			

- 1) 핵심기술이 2개 이상일 경우에는 각 핵심기술별로 위의 표를 별도로 작성
- 2) 전용실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 다른 1인에게 독점적으로 허락한 권리
 통상실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 제3자에게 중복적으로 허락한 권리
- 3) 실용화예상시기 : 상품화인 경우 상품의 최초 출시 시기, 공정개선인 경우 공정개선 완료시기 등
- 4) 기술 이전 시 선행요건 : 기술실시계약을 체결하기 위한 제반 사전협의사항(기술지도, 설비 및 장비 등 기술이전 전에 실시기업에서 갖추어야 할 조건을 기재)