

보안과제( ), 일반과제(○)

## 비피도박테리아 증식능 유청발효물 생산

(Production of fermented whey presenting bifidogenic growth stimulator)

(주)제이케이뉴트라

농림수산식품부

# 제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “비피도박테리아 증식능 유청발효물 생산” 과제의 보고서로 제출합니다.

2011년 10월 31일

주관연구기관명 : (주)제이케이뉴트라

주관연구책임자 : 이 종 광

공 동 연 구 원 : 문 기 성

연 구 원 : 고 응 혁

연 구 원 : 엄 지 은

연 구 원 : 김 경 숙

# 요 약 문

## I. 제 목

비피도박테리아 증식능 유청발효물 생산

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

본 연구의 목적은 치즈 제조 시 부산물로 생산되는 유청을 활용하여 *Leuconostoc mesenteroides* CJNU 0147 및 *Lactobacillus casei* CJNU 0588 균주 배양 후 비피도박테리아 증식능 유청발효물 생산하고 이를 사업화하는 것이다.

자연 치즈의 생산을 통해서 부산물로 유청이 얻어지며, 그 생산량은 치즈 생산량의 약 10배에 이르는 것으로 알려져 있다. 최근 들어 치즈의 소비량이 급속도로 증가하면서 유청 생산량도 많이 증가하는 추세여서 이를 활용하여 다양한 기능성 소재를 개발하려는 시도들이 산업체를 중심으로 활발하게 이뤄지고 있다.

인체 장내는 다양한 미생물이 복잡한 생태계를 이루며 서식하고 있고 유익균과 유해균이 균형을 이루어 장내 건강이 유지되고 있으나 그 균형이 깨져 유해균이 우세하면 다양한 위·장관 관련 질환이 발생한다. 특히 유아기와는 달리 중장년 이후가 되면 다양한 장내 환경적 변화로 인해 비피도박테리아와 같은 유익균의 수가 많이 줄어드는 경향이 있는데 건강수명 연장을 위해서는 정상적인 장내균총으로 회복하는 것이 중요하다. 그러한 목적으로 사용하는 것이 프리토올리고당(fructooligosaccharide; FOS)과 같은 프리바이오틱스(prebiotics), 프로바이오틱스(probiotics) 및 이를 병용한 신바이오틱스(synbiotics)이다. 특히 장내 대표적 유익균인 비피도박테리아에 대한 선택적인 증식을 유도하는 프리바이오틱스에 대한 연구는 오래 전부터 활발하게 진행되고 있다.

따라서, 유청발효를 통해 비피도박테리아를 선택적으로 증식시키는 소재를 개발할 경우 건강 기능성 소재로 각광을 받을 수 있어 고부가가치 창출의 가능성이 높으므로 선행연구를 통해 분리 및 선발된 *Leuconostoc mesenteroides* CJNU 0147 및 *Lactobacillus casei* CJNU 0588 균주를 이용한 비피도박테리아 증식능 유청발효물의 산업적 생산 및 이의 사업화는 학문 및 경제적 측면에서 아주 중요하다고 판단된다.

## III. 연구개발의 내용 및 범위

### 1. 비피도박테리아 증식능 향상을 위한 최적 유청발효조건 확립

3L 발효조를 이용하여 목적균주(*Leuconostoc mesenteroides* CJNU 0147, *Lactobacillus casei* CJNU 0588)의 배양조건(단일/혼합균주, 온도, 호기/혐기)을 달리하며 생산된 유청발효물의 비피도박테리아 증식능을 비교하여 최적의 유청발효조건을 확립한다. 비피도박테리아에 대한 증식효과는 시험균주(*Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium lactis*)를 접종한 배지 (1/10 RCM

broth)에 유청발효물(배양액 원심분리 후 멸균 여과액)을 첨가하여 적정시간 (7-10시간) 배양 후 흡광도 (OD<sub>600</sub>)와 생균수 (viable cell counts, CFU/mL)를 측정하여 대조구(유청)와 비교·평가한다.

## 2. 유청발효물 파일럿 생산 및 시제품화(액상, 분무건조분말, 동결건조분말)

실험실 규모(3L)에서 확립된 비피도박테리아 증식능 유청발효물 생산 최적조건을 100L 발효조(75L 유청배지)에 적용하여 배양한 다음 액체상태의 유청발효물을 살균과정과 분무 및 동결건조를 통해 액상 및 분말화하여 시제품을 제작한다.

## 3. 시제품의 비피도박테리아 증식능 검증 및 기존 제품과의 비교평가

살균과정과 분무 및 동결건조를 통해 생산된 시제품의 비피도박테리아 증식능을 검증하고 또한 분무 및 동결건조 유청발효물 시제품에 남아있는 스타터 균주(*Leuconostoc mesenteroides* CJNU 0147, *Lactobacillus casei* CJNU 0588)의 균수를 측정하여 기존 제품과는 차별화된 전략으로 제품을 개발한다. 비피도박테리아 증식인자 혹은 프리바이오틱스 (prebiotics)로 널리 이용되는 프럭토올리고당(Fructooligosaccharide; FOS)을 양성대조구로 사용하여 유청발효물 시제품의 비피도박테리아 증식능과 비교 평가한다.

## 4. 발효유에 포함된 비피도박테리아 보존 및 증식능 검증

발효유에 프로바이오틱스 개념으로 첨가되는 비피도박테리아가 유청발효물 시제품 첨가 시 그 보존력이 향상되는지를 확인한다. 이를 위해 실험실에서 발효유를 제조한 후 유청발효물 시제품을 농도별(1, 5%)로 첨가하여 발효유가 유통되는 조건 (10°C)에서 보관하면서 경시적으로 비피도박테리아의 생균수를 측정하여 그 유효성을 평가한다.

# IV. 연구개발결과

## 1. 비피도박테리아 증식능 향상을 위한 최적 유청발효조건 확립

단일/혼합균주, 온도(20, 25, 30°C) 및 호기/혐기 배양조건에 따른 유청발효물의 비피도박테리아 증식효과를 비교한 결과 혼합균주를 사용하고 20°C에서 외부 가스공급 없는 조건에서 생산된 유청발효물의 비피도박테리아 증식능이 가장 우수한 것으로 나타났다. 최적조건으로 생산된 유청발효물의 비피도박테리아 보존력을 확인한 결과 대조구(무첨가, 유청첨가)에 비해 보존력이 우수했으며 다소의 증식력도 보였다. 또한 열에 대한 안정성 실험을 수행한 결과 100°C와 121°C에서 15min간 처리했을 때 비피도박테리아 증식능이 다소 감소했지만 80°C에서는 비교적 증식능이 안정하게 유지되었다.

## 2. 유청발효물 파일럿 생산 및 시제품화(액상, 분무건조분말, 동결건조분말)

실험실 규모(3L)에서 확립된 최적조건으로 파일럿 규모(100L)의 배양기에서 유청발효물(75L)을 생산한 다음 살균과정(액상)과 분무 및 동결건조를 통해 액상 및 분말 시제품을 제작하였다.

## 3. 시제품의 비피도박테리아 증식능 검증 및 기존 제품과의 비교평가

세 가지 제형의 시제품을 이용하여 비피도박테리아 증식능을 검증한 결과 모든 시료에서 증식능이 확인되었으며 특히 동결건조 분말 시료의 경우 양성대조구로 사용한 프럭토올리고당 (Fructooligosaccharide; FOS) 보다 다소 높은 증식능을 보였다.

#### 4. 발효유에 포함된 비피도박테리아 보존 및 증식능 검증

발효유 제조 후 비피도박테리아 균주(*B. lactis*)와 동결건조 유청발효물을 첨가한 후 경시적으로 20일 까지 *B. lactis* 균주의 생균수를 측정된 결과 1.5일 이후에 대조구(*B. lactis* 균주만 첨가)와 차이를 보이기 시작했으며 특히 5.5일 이후 양성대조구로 사용한 프럭토올리고당과 비교했을 때 동결건조 유청발효물의 비피도박테리아 보존력이 우수한 것으로 나타났다.

### V. 연구개발결과의 활용계획

1. *Leuconostoc mesenteroides* CJNU 0147 및 *Lactobacillus casei* CJNU 0588 균주를 이용하여 최적 조건으로 생산된 비피도박테리아 증식능 유청발효물 개발에 관한 특허출원 및 사업화
2. 상기 최적조건 확립에 대한 국내외 논문 게재
3. 다양한 유산균의 유청발효를 통한 신규 기능성 소재의 발굴
4. 추가적인 연구를 통해 생산된 유청발효물의 비피도박테리아 증식인자 규명(분리 및 동정) 및 대량생산 방법 확립

# SUMMARY

## I. Title

Production of whey fermentation presenting bifidogenic growth stimulator activity

## II. Objective and Significance

The objective of this study is to produce and commercialize whey fermentation presenting bifidogenic growth stimulator (BGS) using *Leuconostoc mesenteroides* CJNU 0147 and *Lactobacillus casei* CJNU 0588.

Cheese whey is a byproduct from natural cheese manufacture and its production scale is 10 times as that of the cheese. In these days, the consumption of natural cheese dramatically increased, resulting in the increase of whey production. This situation triggers many industries to develop functional materials by using rich whey.

Complex ecosystems exist in human gastrointestinal (GI) tracts and the balance between beneficial and harmful bacteria is maintained in healthy people. In some cases, however the balance is destroyed and harmful bacteria are predominant, which might causes GI-related diseases. Unlike infants, old aged people are susceptible to change of GI microbiota, resulting in the reduction of ratio of bifidobacteria in the microbiota. Therefore, it is very important to recover the ratio of bifidobacteria to expand their healthy life span. For that purpose, prebiotics such as fructooligosaccharide (FOS), probiotics and synbiotics (prebiotics plus probiotics) are broadly used. Particularly, prebiotics which can selectively stimulate the growth of bifidobacteria are actively studied for long time.

In this respect, it is very important to develop and commercialize the whey fermentation presenting BGS activity using *Leuconostoc mesenteroides* CJNU 0147 and *Lactobacillus casei* CJNU 0588 because it might be value-added food material.

## III. Contents and Scope

### 1. Optimal conditions for production of whey fermentation presenting BGS activity

To investigate the optimal conditions for the production of whey fermentation presenting BGS activity, single/mixed culture, temperature, and aerobic/anaerobic conditions are evaluated. Briefly, at first, the optimal conditions for the single and mixed cultures are determined, the optimal temperature is evaluated, and finally the effect of oxygen is investigated. For the tests, 1.5 L of 10% (w/v) whey medium in a 3 L jar fermenter (Fermentec Co., Cheongwon, Korea) is used. In the case of single culture, CJNU 0147 and

CJNU 0588 strains are inoculated into the medium at a final concentration of 1%. In the case of mixed culture, both strains are inoculated simultaneously into the medium at a final concentration of 0.5%. To investigate the optimal temperature for the production, the whey fermentations are produced at 20, 25, and 30°C. To test the air conditions of the culture for BGS activity, aerobic conditions with atmosphere and anaerobic conditions with nitrogen gas are applied to the jar fermenter. During fermentation under both conditions, sampling are performed at 0, 12, 24, 36, and 48 h, and viable cell counts expressed as cfu (colony forming unit)/mL are evaluated. The BGS activity are tested using 24 and 48 h samples. pH values are automatically measured and displayed by the jar fermenter.

## 2. Pilot-scale production of whey fermentation and preparation of prototypes (liquid, spray-dried powder, freeze-dried powder)

Exactly 0.5% (w/v) of both freeze-dried cells (*Leu. mesenteroides* CJNU 0147;  $4.68 \times 10^9$ , *L. casei* CJNU 0588;  $3.44 \times 10^9$  cfu/g) is inoculated in 75 L of whey medium (10%,w/v), sterilized at 60°C for 30 min, and cultured for 48 h under optimal conditions as previously investigated. The whey fermentation is sterilized or concentrated and spray-dried or freeze-dried and the resulting samples are stored at 4°C until use.

## 3. BGS activity of prototypes and comparison with FOS

Prototypes of whey fermentation such as sterilized liquid whey fermentation, spray-dried whey fermentation powder, and freeze-dried whey fermentation powder are tested for BGS activity and the activity is compared with FOS as a positive control for BGS.

## 4. Verification of maintenance and growth stimulation of bifidobacteria in yogurt

Maintenance of bifidobacteria (*Bifidobacterium lactis*) in yogurt where prototypes of whey fermentation are added as a BGS is evaluated. To do this experiment a yogurt is manufactured in our laboratory and prototypes of whey fermentation are added to the yogurt with the bifidobacterial strain. Viable cell count of the bifidobacterial strain is measured during storage at 10°C.

# IV. Results

## 1. Optimal conditions for production of whey fermentation presenting BGS activity

In the single culture of *Leu. mesenteroides* CJNU 0147, the pH value decreased to 5.2 after 48 h, and the viable cell count reached 8.8 Log cfu/mL. In the *L. casei* CJNU 0588 culture, the pH value decreased to 4.9, and the viable cell count reached 8.9 Log cfu/mL. In the mixed culture of *Leu. mesenteroides* CJNU 0147 and *L. casei* CJNU 0588, the pH value decreased to 4.7, and the viable cell count reached 8.1 Log cfu/mL. The viable cell counts and pH values of the single cultures were higher than those of the mixed culture. However, BGS activity of the whey fermentation from the mixed culture was slightly

higher than those of the single cultures. Therefore the mixed culture was concluded to be the best for the production of whey fermentation presenting BGS activity. Next, the optimal temperature was evaluated using the mixed culture. At 20°C, the pH value decreased to 5.7, and the viable cell count reached 8.0 Log cfu/mL after 48 h. At 25°C, the pH value decreased to 5.3, and the viable cell count reached 8.7 Log cfu/mL after 48 h. At 30°C, the pH value decreased to 4.7, and the viable cell count reached 8.5 Log cfu/mL after 48 h. As expected, the cell growth was fastest at 30°C, as the highest viable cell count actually reached 9.0 Log cfu/mL after 36 h. However, the BGS activity of the whey fermentation did not correlate with cell growth, as the BGS activities of both bifidobacterial strains were highest at 20°C. Therefore, 20°C was chosen as the optimal temperature for the production of whey fermentation. Finally, the optimal air conditions for BGS production were tested under previously optimized conditions, such as mixed culture and 20°C. Under aerobic conditions with atmosphere, the pH value decreased to 5.8, and the viable cell count reached 8.4 Log cfu/mL after 48 h. On the other hand, the pH value decreased to 5.7, and the viable cell count reached 8.7 Log cfu/mL after 48 h under anaerobic conditions with nitrogen gas. The BGS activities of the whey fermentation samples prepared under anaerobic conditions were slightly higher than those of the whey fermentation samples under aerobic conditions; however, there was no difference between anaerobic conditions and a condition without air supply. From the results, the conditions without air was chosen for the optimal production of whey fermentation presenting BGS activity.

## 2. Heat stability of optimally produced whey fermentation

To evaluate food process applicability, the heat stability of optimally produced whey fermentation was tested. When the BGS activity of whey fermentation at 25°C was considered as 100%, decreases in activity were 9.92, 15.15, and 17.93% for *B. lactis* strain and 7.63, 11.66, and 15.12% for *B. longum* strain at 80, 100, and 121°C for 15 min, respectively. Though the BGS activity slightly decreased at high temperatures, the rate of reduction was not significant. Therefore, the whey fermentation could be applied to various food processes with mild heat treatment.

## 3. BGS activity of prototypes and comparison with FOS

Prototypes of whey fermentation such as sterilized liquid whey fermentation, spray-dried whey fermentation powder, and freeze-dried whey fermentation powder were tested for BGS activity and the activity was compared with FOS as a positive control for BGS. Prototypes of liquid, spray-dried, and freeze-dried whey fermentation were still showed BGS activity for the *B. lactis* and *B. longum* strain. Particularly the BGS activity of freeze-dried whey fermentation powder was a little bit stronger than that of FOS.

## 4. Verification of maintenance and growth stimulation of bifidobacteria in yogurt

From the results of viable cell count of *B. lactis* strain in yogurt which was also added

with bifidogenic growth stimulators such as FOS as a positive control and freeze-dried whey fermentation as the test sample, the difference was appeared after 1.5day and the maintenance activity for *B. lactis* was higher than that of FOS.

#### V. Opinion for Future Use

1. Application of whey fermentation presenting BGS activity which was optimally produced by using *Leu. mesenteroides* CJNU 0147 and *L. casei* CJNU 0588 strains for patents and its commercialization.
2. Publication of above optimized conditions for production of whey fermentation presenting BGS activity.
3. Application of whey fermentation technology developed in this study to production of various functional food materials
4. Isolation and identification of compounds in the whey fermentation presenting BGS activity via further studies and development of their mass production method.

# CONTENTS

Chapter 1.	Introduction	11
Paragraph 1.	Objective of the study	11
Paragraph 2.	Significance of the study	11
Paragraph 3.	Scope of the study	11
Chapter 2.	State of Art	13
Chapter 3.	Contents and Results	21
Paragraph 1.	Optimal conditions for production of whey fermentation presenting BGS activity	21
Paragraph 2.	Pilot-scale production of whey fermentation and preparation of prototypes	35
Paragraph 3.	BGS activity of prototypes and comparison with fructooligosaccharide	37
Paragraph 4.	Verification of maintenance and growth stimulation of bifidobacteria in yogurt	43
Chapter 4.	Achievement and Contribution	45
Chapter 5.	Plan for Use	46
Chapter 6.	Foreign Scientific Information Acquired	48
Chapter 7.	References	49

# 목 차

제 출 문		1
요 약 문		2
SUMMARY		5
CONTENTS		9
목 차		10
제 1 장	서론	11
제 1 절	연구개발의 목적	11
제 2 절	연구개발의 필요성	11
제 3 절	연구개발의 범위	11
제 2 장	국내외 기술개발 현황	13
제 3 장	연구개발 수행내용 및 결과	21
제 1 절	비피도박테리아 증식능 향상을 위한 최적 유청발효조건 확립	21
제 2 절	유청발효물 파일럿 생산 및 시제품화(액상, 분무건조분말, 동결건조분말)	35
제 3 절	시제품의 비피도박테리아 증식능 검증 및 기존 제품과의 비교평가	37
제 4 절	발효유에 포함된 비피도박테리아 보존 및 증식능 검증	43
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	45
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획	46
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	48
제 7 장	참고문헌	49

# 제 1 장 서 론

## 제 1 절 연구개발의 목적

본 연구의 목적은 자연치즈 제조 시 부산물로 생산되는 유청을 이용하여 *Leuconostoc mesenteroides* CJNU 0147 및 *Lactobacillus casei* CJNU 0588 균주를 이용한 비피도박테리아 증식능 유청발효물의 산업적 생산 및 이를 사업화하는 것이다.

## 제 2 절 연구개발의 필요성

자연 치즈의 생산을 통해서 부산물로 유청이 얻어지며, 그 생산량은 치즈 생산량의 약 10배에 이르는 것으로 알려져 있다. 최근 들어 치즈의 소비량이 급속도로 증가하면서 유청 생산량도 많이 증가하는 추세여서 이를 활용하여 다양한 기능성 소재를 개발하려는 시도들이 산업체를 중심으로 활발하게 이뤄지고 있다.

인체 장내는 다양한 미생물이 복잡한 생태계를 이루며 서식하고 있고 유익균과 유해균이 균형을 이루어 장내 건강이 유지되고 있으나 그 균형이 깨져 유해균이 우세하면 다양한 위·장관 관련 질환이 발생한다. 특히 유아기와는 달리 중장년 이후가 되면 다양한 장내 환경적 변화로 인해 비피도박테리아와 같은 유익균의 수가 많이 줄어드는 경향이 있는데 건강수명 연장을 위해서는 정상적인 장내균총으로 회복하는 것이 중요하다. 그러한 목적으로 사용하는 것이 프럭토올리고당(fructooligosaccharide; FOS)과 같은 프리바이오틱스(prebiotics), 프로바이오틱스(probiotics) 및 이를 병용한 신바이오틱스(synbiotics)이다. 특히 장내 대표적 유익균인 비피도박테리아에 대한 선택적인 증식을 유도하는 프리바이오틱스에 대한 연구는 오래 전부터 활발하게 진행되고 있다.

따라서, 유청발효를 통해 비피도박테리아를 선택적으로 증식시키는 소재를 개발할 경우 건강 기능성 소재로 각광을 받을 수 있어 고부가가치 창출의 가능성이 높으므로 선행연구를 통해 분리 및 선발된 *Leuconostoc mesenteroides* CJNU 0147 및 *Lactobacillus casei* CJNU 0588 균주를 이용한 비피도박테리아 증식능 유청발효물의 산업적 생산 및 이를 사업화하는 학문 및 경제적 측면에서 아주 중요하다고 판단된다.

## 제 3 절 연구개발 범위

### 1. 비피도박테리아 증식능 향상을 위한 최적 유청발효조건 확립

3L 발효조를 이용하여 목적균주(*Leuconostoc mesenteroides* CJNU 0147, *Lactobacillus casei* CJNU 0588)의 배양조건(단일/혼합균주, 온도, 호기/혐기)을 달리하여 생산된 유청발효물의 비피도박테리아 증식능을 비교하여 최적의 유청발효조건을 확립한다. 비피도박테리아에 대한 증식효과는 시험균주(*Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium lactis*)를 접종한 배지 (1/10 RCM broth)에 유청발효물(배양액 원심분리 후 멸균 여과액)을 첨가하여 적정시간 (7-10시간) 배양

후 흡광도 (OD<sub>600</sub>)와 생균수 (viable cell counts, CFU/mL)를 측정하여 대조구(유청)와 비교·평가한다.

## 2. 유청발효물 파일럿 생산 및 시제품화(액상, 분무건조분말, 동결건조분말)

실험실 규모(3L)에서 확립된 비피도박테리아 증식능 유청발효물 생산 최적조건을 100L 발효조(75L 유청배지)에 적용하여 배양한 다음 액체상태의 유청발효물을 살균과정과 분무 및 동결건조를 통해 액상 및 분말화하여 시제품을 제작한다.

## 3. 시제품의 비피도박테리아 증식능 검증 및 기존 제품과의 비교평가

살균과정과 분무 및 동결건조를 통해 생산된 시제품의 비피도박테리아 증식능을 검증하고 분무 및 동결건조 유청발효물 시제품에 남아있는 스타터 균주(*Leuconostoc mesenteroides* CJNU 0147, *Lactobacillus casei* CJNU 0588)의 균수를 측정하여 기존 제품과는 차별화된 전략으로 제품을 개발한다. 비피도박테리아 증식인자 혹은 프리바이오틱스 (prebiotics)로 널리 이용되는 프럭토올리고당(Fructooligosaccharide; FOS)을 양성대조구로 사용하여 유청발효물 시제품의 비피도박테리아 증식능과 비교 평가한다.

## 4. 발효유에 포함된 비피도박테리아 보존 및 증식능 검증

발효유에 프로바이오틱스 개념으로 첨가되는 비피도박테리아가 유청발효물 시제품 첨가 시 그 보존력 향상 여부를 확인한다. 이를 위해 실험실에서 발효유를 제조한 후 유청발효물 시제품을 농도별(1, 5%)로 첨가하여 발효유가 유통되는 조건 (10℃)에서 보관하면서 경시적으로 비피도박테리아의 생균수를 측정하여 그 유효성을 평가한다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

자연 치즈의 생산을 통해서 부산물로 유청이 얻어지며, 그 생산량은 치즈 생산량의 약 10배에 이르는 것으로 알려져 있다(1). 최근 들어 웰빙(well-being) 분위기에 힘입어 치즈(특히 자연 치즈)의 소비량이 증대되고 있어 그 생산량 또한 증가하는 추세이며 연쇄적으로 부산물인 유청이 과량으로 생산됨은 쉽게 예측할 수 있다(Fig. 1).

유청의 성분은 대부분 수분이며 유당(4.5%), 단백질(0.8%), 무기염류(1%) 및 젖산 등으로 구성되어 있는데 최근 들어 유청 단백질에 대한 다양한 생리적 기능이 밝혀짐에 따라 유청의 단순 농축, 건조를 통한 식품 및 사료용 제품생산에서 벗어나 제약이나 화장품산업에 까지 그 용도가 확장되고 있는 추세이다(Fig. 2)(2).

유청의 효과적인 활용과 부가가치를 높이기 위해서는 주요 구성성분인 유청단백질, 젖당 및 유청칼슘 등의 성분을 분리하여 식품 등의 첨가물로 이용하는 것이고, 또한 GRAS(Generally Recognized As Safe) 균주를 이용한 유청발효를 통해 생성된 다양한 발효산물을 분석하고 그 생리적 기능을 규명하여 건강기능식품 및 그 소재로 개발하는 것이다(3-6).

유청발효는 유청에 함유된 젖당(lactose)을 이용할 수 있는 유산균 및 프로피온산균 등에 의해 가능하며 사용균주에 따라 다양한 발효산물 즉, 젖산(lactic acid), 초산(acetic acid), 낙산(butyric acid), 프로피온산(propionic acid)등의 각종 유기산과 대사산물을 얻을 수 있다(7-11). 유청발효를 통해서 다양한 발효산물을 생산할 수 있으나 본 연구에서는 향후 기능성 소재로서 각광을 받을 수 있는 비피도박테리아 증식능 유청발효물의 산업적 생산을 그 연구 목표로 설정하였다. 비피도박테리아 증식능 유청발효물 생산을 위한 균주는 선행연구를 통해서 분리 및 선발된 유산균 2균주를 이용하였다(12, 13).

최근 들어 유산균 및 비피도박테리아의 다양한 기능성이 과학적으로 규명됨으로써 이를 이용한 기능성 식품 혹은 의약품 개발을 위한 노력이 전 세계적으로 이루어지고 있다(14). 인체 장내는 다양한 미생물이 복잡한 생태계를 이루며 서식하고 있고 유익균과 유해균이 균형을 이루어 장내 건강이 유지되고 있으나 그 균형이 깨져 유해균이 우세하면 다양한 위·장관 관련 질환이 발생한다(15-16). 보고된 연구결과에 의하면 유아기 때는 비피도박테리아와 같은 유익균의 구성 비율이 높으며 나이가 들면서 유익균은 줄어 들고 유해균의 구성 비율이 증가하는 것으로 나타나며 그 결과 각종 위·장관 관련 질환들이 발생하는 것으로 알려져 있다(Fig. 3)(17). 중·장년 더 나아가 노인들의 장내 건강을 유지하는 방법은 프락토올리고당(fructooligosaccharide; FOS)과 같은 프리바이오틱스(prebiotics)를 섭취하여 장내 유익균(특히 비피도박테리아)을 선택적으로 증식시키는 것과 프로바이오틱스(probiotics) 균주를 규칙적으로 섭취하는 것이다(18-22). 최근에는 프리바이오틱스와 프로바이오틱스를 병용하는 'synbiotics' 개념이 등장해 이 방법을 이용한 대단위 임상연구 결과 노년층의 건강이 향상 되었다는 보고가 있다(EU Cronalife project). 이에 따라 많은 과학자들은 인간에게 유익한 작용을 하는 프로바이오틱스 균주들을 자연계에서 선발하기 위해 많은 연구를 수행하고 있고 그 중 많은 균들이 다양한 형태로 상업화 되었다(14). 세계적으로 기능성소재에 대한 기술개발 경쟁이 치열한 상황에서 다양한 기능성이 입증되었고(23-24) 인체에서 가장 유익한 균으로 인식되는 비피도박테리아에 대한 증식효과를 발휘하는 유청발효물의 생산은 신규소재의 개발을 통한 유청의 고부가가치화 측면에서 산업적으로 중요하다고 판단된다.

선행연구를 통해 비피도박테리아 증식능이 우수한 2개의 유산균주(CJNU 0147, CJNU 0588)를 최종적으로 선발하였으며(Fig. 4) 16S rRNA 유전자 염기서열에 기초한 균주 동정결과 CJNU

0147은 *Leuconostoc mesenteroides*(GenBank accession no. AB362705.1 서열과 99% 일치)로 CJNU 0588은 *Lactobacillus casei*(GenBank accession no. CP000423.1 서열과 99% 일치)로 나타났다(12, 13). 또한 선발균주를 이용한 유청발효물이 선택적으로 비피도박테리아 증식능을 가지는지 검증하기 위해 장내미생물 두 균주(*Escherichia coli*와 *Enterococcus faecalis*)와 병원성미생물 두 균주(*Listeria monocytogenes*와 *Staphylococcus aureus*)를 대상으로 증식효과 유무를 확인한 결과 사용한 균주에 대해서 유의적인 증식효과가 나타나지 않았다(Fig. 5, Fig. 6). 오히려 *E. coli*를 제외한 나머지 균주들에 대해서 미약하지만 유청발효물의 생육 억제효과가 보였다. 이는 유청이나 유청발효물에 포함되어 있는 유기산(특히 젖산)에 의한 생육저해 인 것으로 판단된다.

그럼에도 불구하고 지금까지의 연구결과로는 선발균주(CJNU 0147, CJNU 0588)의 배양을 통한 유청발효물의 우수한 비피도박테리아 증식능을 설명할 수 없다. 다만, 추론을 해보면 유청 속에 함유된 특정 성분들이 발효과정을 통해 비피도박테리아 증식인자로 전환되었을 가능성과 발효 스타터 균주로 사용된 CJNU 0147 및 CJNU 0588 균주가 생산한 물질이 비피도박테리아를 선택적으로 증식시켰을 가능성이 존재한다. 특히, CJNU 0147 균주의 경우 *Leu. mesenteroides* 균주로 동정이 되었는데 이 종(species)의 경우 자당(sucrose) 존재 시 비피도박테리아를 증식시키는 이소말토올리고당(isomaltooligosaccharide)을 생산할 수 있고 또한 비피도박테리아 증식인자로 알려져 있는 1,4-Dihydroxy-2-naphthoic acid(DHNA)도 미량 생산하는 것으로 알려져 있다. 따라서 추가적인 연구를 통해서 유청발효물의 비피도박테리아 증식인자를 규명하는 연구는 반드시 수행되어야 할 것으로 판단된다.

그러나 본 연구개발과제에서는 선행연구를 통해서 선발한 *Leu. mesenteroides* CJNU 0147 및 *L. casei* CJNU 0588 균주를 이용한 배양최적화와 scale-up 연구 등 유청발효물의 산업적 생산에 초점을 맞춰 연구를 수행하였다.

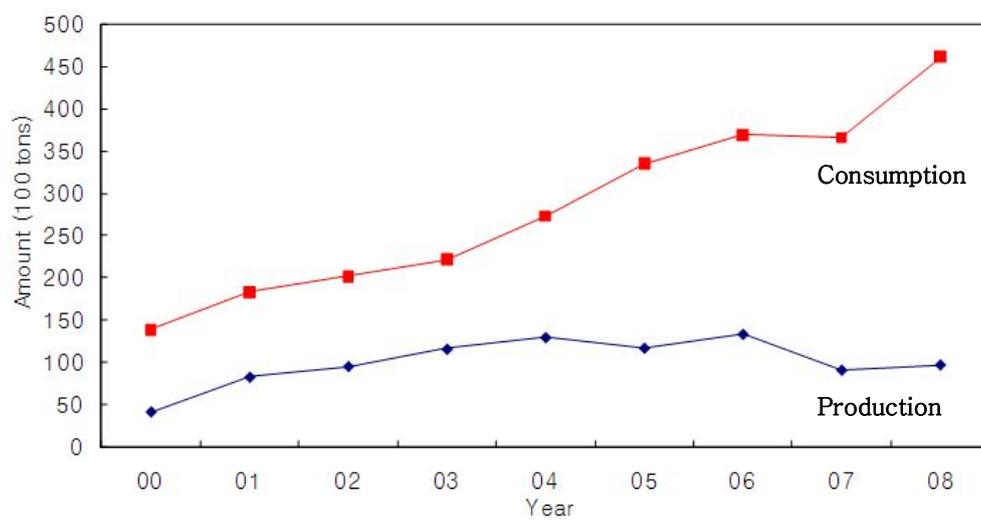


Fig. 1. Trends of production and consumption of domestic natural cheese.

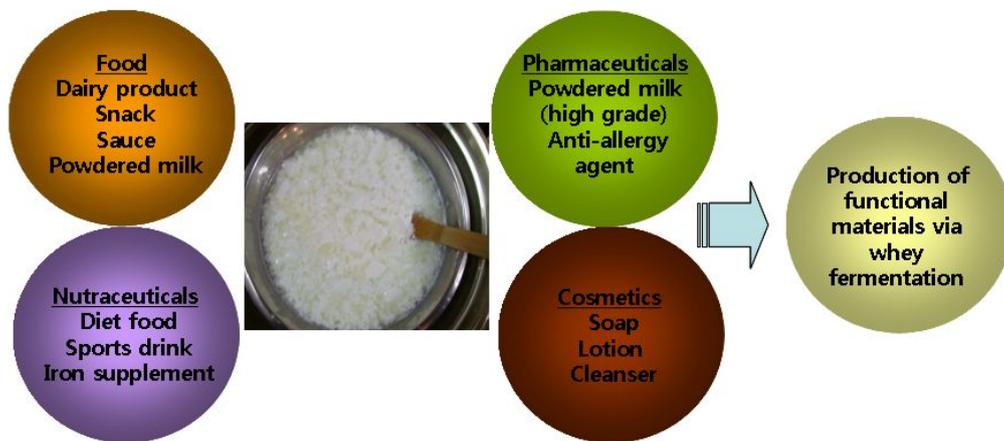


Fig. 2. Applications of cheese whey to several industries and a strategy for the production of value-added materials via whey fermentation.

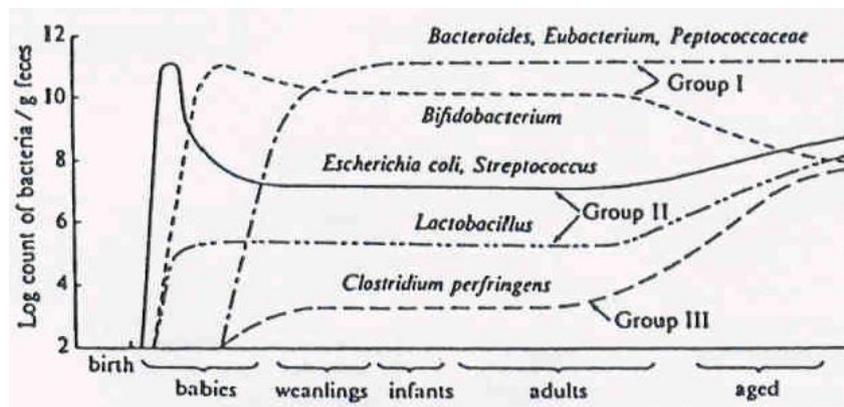


Fig. 3. Changes in fecal flora with aging.

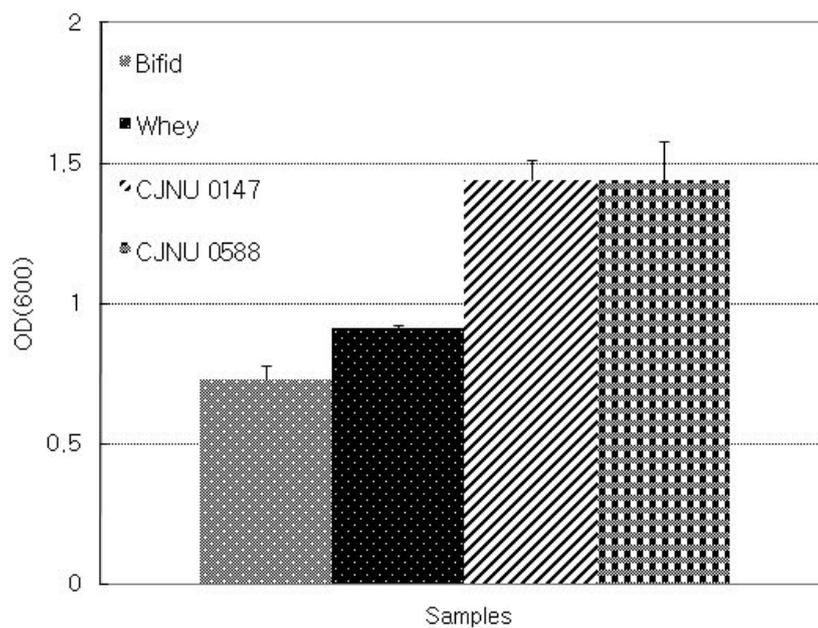


Fig. 4. Bifidogenic Growth Stimulator activity of whey culture supernatant of CJNU 0147 and CJNU 0588. Bifid, *Bifidobacterium longum* FI10564; Whey, *B. longum* plus whey medium; CJNU 0147, *B. longum* plus whey culture supernatant of CJNU 0147; CJNU 0588, *B. longum* plus whey culture supernatant of CJNU 0588. The data represent the mean+standard deviations of triplicate determinations.

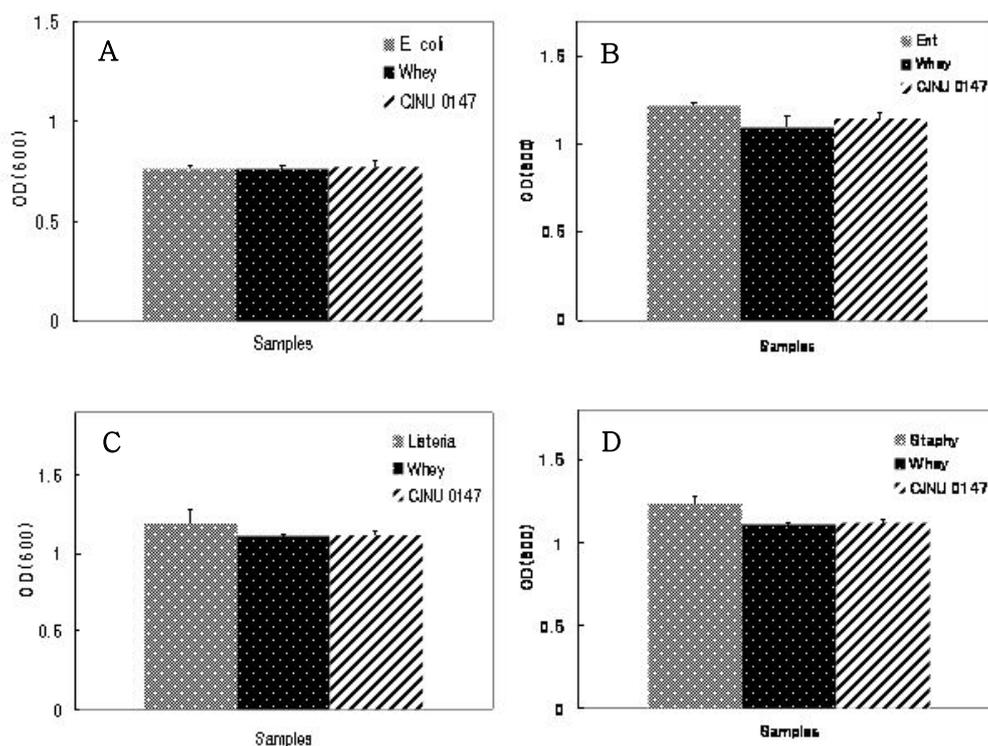


Fig. 5. Growth stimulator activity of whey culture supernatant of *Leuconostoc mesenteroides* CJNU 0147 for other bacteria: *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (A), *Enterococcus faecalis* KFRI 675 (B), *Listeria monocytogenes* ATCC 19111 (C), and *Staphylococcus aureus* ATCC 14458 (D). *E. coli*, *Escherichia coli*; Ent, *Enterococcus faecalis*; Listeria, *Listeria monocytogenes*; Staphy, *Staphylococcus aureus*; Whey, bacteria plus whey medium; CJNU 0147, bacteria plus whey culture supernatant of CJNU 0147. The data represent the mean+standard deviations of triplicate determinations.

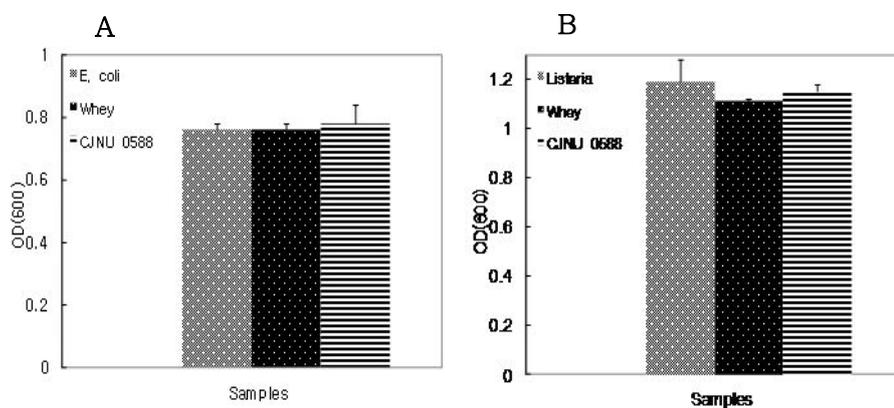


Fig. 6. Growth stimulator activity of whey culture supernatant of *Lactobacillus casei* CJNU 0588 for other bacteria: *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (A) and *Listeria monocytogenes* ATCC 19111 (B). Whey, bacteria plus whey medium; CJNU 0588, bacteria plus whey culture supernatant of CJNU 0588. The data represent the mean+standard deviations of triplicate experiments.

## 제 3 장 연구개발수행내용 및 결과

### 제 1 절 비피도박테리아 증식능 향상을 위한 최적 유청발효조건 확립

#### 1. 실험 재료

##### 가. 사용균주

비피도박테리아 증식능 유청발효물을 생산하기 위해 사용한 유산균주는 *Leuconostoc mesenteroides* CJNU 0147 및 *Lactobacillus casei* CJNU 0588 이였고, 비피도박테리아 균주로는 *Bifidobacterium longum* FI10564와 *Bifidobacterium lactis* BL 750(Culture Systems Inc., Mishawaka, IN, USA)를 사용하였다.

##### 나. 배지

*Leu. mesenteroides* CJNU 0147 및 *L. casei* CJNU 0588의 예비배양을 위해서 MRS broth(Difco, Sparks, MD, USA)를 사용하였고 본 배양은 10%(w/v) 유청배지에서 수행되었다. 비피도박테리아 증식능 실험은 RCM(Reinforced Clostridial Medium, Difco) broth에서 수행하였다.

#### 2. 연구방법

##### 가. 선발균주 배양 최적조건 탐색

비피도박테리아 증식능 유청발효물의 최적 생산조건을 탐색하기 위해서 3L 발효조(Fermentec Co., Cheongwon, Korea)에 10%(w/v) 유청배지 1.5L를 제조하여 멸균한 후 예비배양을 통해 확보된 *Leu. mesenteroides* CJNU 0147 및 *L. casei* CJNU 0588 균주를 배양 조건에 따라 각각 1%씩 접종하였으며, 동시 배양의 경우 각각 0.5%씩 접종하였다. 배양 조건은 단독/혼합배양, 온도(20, 25, 30℃)에 따른 배양 및 호기/혐기배양 등으로 하였다. 즉, 단독(*Leu. mesenteroides* CJNU 0147 혹은 *L. casei* CJNU 0588) 혹은 혼합(*Leu. mesenteroides* CJNU 0147과 *L. casei* CJNU 0588)배양 후 유청발효물의 비피도박테리아 증식능을 확인하여 우수한 조건을 선택하고 그 조건을 이용하여 온도(20, 25, 30℃)에 따른 배양 후 동일한 방법으로 우수한 조건을 선택하며 마지막으로 혐기 및 호기적인 조건에서 배양하여 최종적인 우수 조건을 확립하였다. 모든 실험은 3반복으로 진행하였고 산술평균과 표준편차로 값을 정리하였다. 또한 재현실험을 통해 실험결과의 신뢰성을 확보하였다.

비피도박테리아 증식능을 검증하기 위해서 각각의 조건에서 배양하면서 0, 12, 24, 36, 48h에 해당하는 시료를 채취하였고 시료의 pH, 생균수 및 비피도박테리아 증식능을 종합적으로 분석하였다. 생균수 측정은 채취한 샘플을 10진 희석법으로 희석하여 MRS 고체배지에 도말하여 37℃, 24h 배양 후 형성된 콜로니(colony, 집락)의 수를 측정하여 cfu(colony forming unit)/mL로 나타내었다. 비피도박테리아 증식능 검증을 위해 10mL의 유청배양액을 원심분리(6000rpm,

10min)한 후 상등액을 여과(0.45 $\mu$ m syringe filter, Millipore, Billerica, MA, USA)하여 그 여액 (filtrate)을 시료로 사용하였다. 즉, 5mL RCM broth에 비피도박테리아(*B. longum* 혹은 *B. lactis*)를 2%(v/v) 접종한 후 유청발효물 시료를 100 $\mu$ L씩 첨가하여 혐기적인 조건(GasPak 법)에서 37 $^{\circ}$ C, 10h 배양 후 흡광도(OD<sub>600</sub>)를 측정하여 비피도박테리아 증식유무를 판단하였다. 모든 실험은 3반복으로 진행하였으며 평균값과 표준편차로 표시하였다.

#### 나. 유청발효물 열 안정성 실험

비피도박테리아 증식능을 가진 유청발효물의 산업화 시 동결건조(freeze-drying)보다는 분무 건조(spray-drying) 방식이 경제적이거나 건조 중 열이 발생하므로 열에 불안정한 성분이 비피도 박테리아 증식능을 가진다면 분무건조 방식을 적용하기 어렵다. 이에 따라 비피도박테리아 증식능 유청발효물의 열에 대한 안정성을 조사하였다. 극저온 냉동고(-76 $^{\circ}$ C)에 보관한 *Leu. mesenteroides* CJNU 0147과 *L. casei* CJNU 0588 균주를 MRS broth에서 활성화시켰으며 상기 실험을 통해 확인된 최적조건으로 유청배지에 48h 배양하였다. 유청발효물 동량(1mL)을 분주하여 25 $^{\circ}$ C, 80 $^{\circ}$ C, 100 $^{\circ}$ C, 121 $^{\circ}$ C (autoclave)에서 각각 15min 반응 시킨 후 원심분리(10,000rpm, 10min)하였으며 그 상등액을 취해 syringe filter(0.45 $\mu$ m, Millipore)를 통과시킨 후 여액을 회수하였다. 회수한 여액을 이용하여 3반복 실험으로 비피도박테리아 증식능을 검증하였다. 즉, 5mL RCM broth에 비피도박테리아(*B. longum* 혹은 *B. lactis*)를 2%(v/v) 접종한 후 열처리한 유청발효물 시료를 각각 100 $\mu$ L씩 첨가하여 혐기적인 조건(GasPak 법)에서 37 $^{\circ}$ C, 14h 배양 후 흡광도(OD<sub>600</sub>)를 측정하여 비피도박테리아 증식유무를 판단하였다. 비교평가는 25 $^{\circ}$ C 유청발효물의 비피도박테리아 증식능을 100으로 하여 상대적인 활성화도(%)로 표시하였다.

#### 다. 유청발효물의 저온 저장 비피도박테리아 보존 효과 검증

최적조건으로 생산한 유청발효물을 이용하여 저온 저장 비피도박테리아의 보존 효능을 검증하였다. 5mL MRS broth에 비피도박테리아(*B. lactis*)를 1%(v/v) 접종한 후 유청발효물 시료를 각각 100 $\mu$ L씩 첨가한 후 10 $^{\circ}$ C에서 무혐기적으로 저장하며 시간대별(0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 15 day) *B. lactis*의 생균수를 측정하였다. 생균수의 측정은 채취한 시료를 10진 희석법으로 RCM 고체배지에 도말하여 37 $^{\circ}$ C, 24h, 혐기적 조건으로 배양한 후 형성된 콜로니(colony, 집락)에 대한 호기 배양과 중합효소연쇄반응(Polymerase Chain Reaction; PCR)으로 비피도박테리움 속 균임을 확인하였다. PCR에 사용한 프라이머는 Bif164(5'-GGGTGGTAATGCCGGATG-3')와 Bif662(5'-CCACCGTTACACCGGAA-3')이다.

### 3. 결과

#### 가. 선발균주 배양 최적조건 탐색

유청발효를 통해 비피도박테리아 증식능을 보이는 균주를 이용하여 최적의 유청발효물 생산 조건을 확립하기 위해 여러 조건으로 배양하였다.

균주별(*Leu. mesenteroides* CJNU 0147 단일균주 배양, *L. casei* CJNU 0588 단일균주 배양, *Leu. mesenteroides* CJNU 0147과 *L. casei* CJNU 0588 복합균주 배양) 배양을 통해 가장 높은 비피도박테리아 활성을 보이는 균을 선발하여 온도(20, 25, 30°C)에 따라 각각 배양하였으며, 마지막으로 호기 및 혐기 조건으로 배양하면서 비피도박테리아 증식능에 영향을 미치는지를 조사하였다. *Leu. mesenteroides* CJNU 0147 단독균주 배양의 경우 48h 후 pH는 5.2까지 감소하고 생균수는 8.8 Log cfu/mL에 이르렀다. *L. casei* CJNU 0588 단독균주 배양은 48h 후 pH는 4.9까지 감소하고 생균수는 8.9 Log cfu/mL에 이르렀다. 두 복합균주 배양의 경우 48h 후 pH는 4.7까지 감소하였으며 생균수는 8.1 Log cfu/mL에 이르렀다. 단독균주의 배양보다 복합균주의 배양이 pH는 더 감소하는 반면 생균수는 상대적으로 낮았다(Fig. 7). 동일한 실험에서 24h과 48h 시료에 대해 비피도박테리아 증식능을 추가적으로 검증한 결과 단독균주 배양을 통한 유청발효물 보다는 복합균주의 배양을 통해서 생산된 유청발효물이 비피도박테리아에 대한 증식능이 더 우수한 것으로 나타났다(Fig. 8). 복합균주의 배양에서 생균수가 단독균주 배양에서의 생균수 보다 적은 것을 고려하면 두 균주의 경쟁관계 속에서 비피도박테리아를 증식시키는 대사산물의 생산이 증가했음을 추론해볼 수 있다. 배양 실험결과를 토대로 단독균주 보다는 복합균주를 이용해서 유청발효물을 조제하는 것이 더 경제적임을 확인하였고 복합균주를 이용해서 배양온도에 대한 실험을 수행하였다.

20°C 배양에서 48h 후 pH는 5.7로 감소하였고 생균수는 8.0 Log cfu/mL에 이르렀으며 25°C 배양의 경우 48h 후 pH는 5.3으로 감소하였으며 생균수는 8.7 Log cfu/mL에 이르렀다. 30°C 배양에서는 48h 후 pH는 4.7로 감소했고 생균수는 8.5 Log cfu/mL에 이르렀다. 예상한 바와 같이 30°C에서 균의 증식속도가 가장 빠른 것으로 나타났으며 36h 배양 시료에서는 생균수가 9.0 Log cfu/mL에 이르렀다(Fig. 9). 동일한 실험에서 24h 및 48h 시료에 대해서 비피도박테리아 증식능을 검증하였다. 그 결과 *B. lactis* 균주에 대해서는 20°C, 48h 시료가 가장 높은 증식능을 보였으며 *B. longum* 균주에 대해서는 20°C, 24h 및 48h 시료 모두가 다른 시료에 비해 증식능이 우수한 것으로 나타났다(Fig. 10). 이 결과를 통해 유청발효물의 비피도박테리아에 증식능이 발효물 생산에 사용된 균주의 증식속도와는 무관하다는 것을 알 수 있으며 오히려 균의 증식속도가 낮은 시료에서 활성이 더 높게 나타나는 것을 확인하였다. 보다 정확한 분석이 이루어져야 하지만 유청발효물 속에 포함된 비피도박테리아 증식인자가 1차대사와는 무관할 가능성이 있음을 시사하는 것이다. 이 실험결과를 바탕으로 비피도박테리아 증식능 유청발효물 생산을 위한 최적배양온도는 20°C로 결정하였다.

마지막으로 산소 유무에 따른 유청발효물의 비피도박테리아 증식능을 검증하기 위해서 산소 및 질소 공급과 외부 가스 공급이 없는 배양조건으로 유청발효물을 얻어 생균수, pH 및 비피도박테리아 증식능을 분석하였다. 앞서 확인한 최적배양조건과 더불어 외부가스 공급 없는 조건으로 배양하였을 때 48h 후 pH는 5.8로 감소했고 생균수는 Log 8.5 cfu/mL에 이르렀으며 외부에서 공기를 공급하여 호기적인 조건으로 배양한 결과 48h 후 pH는 5.8로 감소했고 생균수는 Log 8.4 cfu/mL에 이르렀다. 외부에서 질소를 공급하여 혐기적인 조건으로 배양한 결과

48h 후 pH는 5.7로 감소했고 생균수는 Log 8.7 cfu/mL에 이르렀다(Fig. 11). 조건별 pH 및 생균수는 큰 차이가 없었으며 이는 산소의 유무가 균의 증식속도에 큰 영향을 미치지 않는 것을 의미한다. 동일한 실험에서 24h 및 48h 시료를 이용하여 비피도박테리아 증식능을 검증하였는데 호기적인 조건보다는 혐기적인 조건에서의 증식능이 다소 우수한 것으로 나타났으나 외부 가스공급 없는 조건의 유청발효물과는 차이가 없었다(Fig. 12). 그 결과를 바탕으로 외부에서 가스공급을 하지 않는 것이 보다 경제적이기 때문에 그 조건을 비피도박테리아 증식능 유청발효물 생산을 위한 최적조건으로 설정하였다.

결론적으로 비피도박테리아 증식능 유청발효물 생산을 위한 최적조건은 복합균주(*Leu. mesenteroides* CJNU 0147과 *L. casei* CJNU 0588)를 사용하고 20°C에서 배양하며 외부의 가스공급은 없는 조건으로 배양하는 것이다.

#### 나. 유청발효물 열 안정성 실험

유청발효물의 가공적성을 파악하기 위해 열안정성 실험을 수행하였다. 열안정성 실험을 위한 신선한 시료 조제를 위해 앞서 확립한 최적조건으로 유청배양을 수행한 결과 48h 후 pH는 5.8로 떨어졌으며 생균수는 8.5 Log cfu/mL로 나타나 재현성 있는 결과를 얻을 수 있었다(Fig. 13). 시료를 시험관에 분주하여 각각 80, 100, 121°C에서 15min 처리한 후 실온(25°C)에 방치한 유청발효물의 비피도박테리아 증식능과 상대적 비교를 통해 열안정성을 검증하였다. *B. lactis* 균주를 대상으로 비피도박테리아 증식능을 검증한 결과 25°C 시료의 증식능을 100%로 보았을 때 80°C, 100°C 및 121°C에서 각각 9.92%, 15.15%, 17.93%의 소실이 있었으며 *B. longum* 균주를 대상으로 분석한 결과 80°C, 100°C 및 121°C에서 각각 7.63%, 11.66%, 15.12%의 소실이 있었다(Fig. 14, Fig. 15). 사용한 두 균주 중 *B. lactis* 균주보다 *B. longum* 균주에 대한 유청발효물의 안정성이 상대적으로 높은 것으로 나타났다. 전반적으로 처리한 온도에서 비피도박테리아의 증식능이 다소 감소하는 경향이 있으나 고온(80-121°C)에서 장시간(15min) 노출되었다는 것을 감안하면 크게 문제될 수준은 아니며 특히 분무건조 시 짧은 시간 열이 가해지는 점을 고려한다면 유청발효물 조제 후 가공 시 분무건조기를 활용함에 있어 큰 문제가 없을 것으로 판단된다.

#### 다. 유청발효물의 저온 저장 비피도박테리아 보존 효과 검증

최적조건으로 생산한 유청발효물을 이용하여 저온 저장시 비피도박테리아의 보존 효능을 검증한 결과 3일까지 유청 발효물 첨가균과 대조균 사이에 차이가 없었으나 4일째 부터 차이를 보이기 시작하여 마지막 15일째는 다소 큰 차이를 보였다(Fig. 16). 즉, 유청 발효물 첨가균은 초기균수 6.9 Log cfu/mL로 시작하여 15일째 7.1 Log cfu/mL로 증가한 반면 무첨가균의 경우 7.0 Log cfu/mL로 시작하여 15일째 5.6 Log cfu/mL로 많이 감소하는 경향을 보였다. 대조균으로 발효하지 않은 유청을 첨가한 경우에도 초기 균수 7.0 Log cfu/mL로 시작하여 15일째 6.1 Log cfu/mL로 감소하는 경향을 보였다. 이 결과는 유청 발효물이 무혐기적인 액체 배지(MRS broth) 상에 저온 저장 중인 비피도박테리아(*B. lactis*) 균주의 보존 및 일부 증식에 효과가 있음을 의미한다. 이는 또한 상업적으로 판매되는 유제품에 포함된 비피도박테리움속균을 안전하게 유지시키는 방법으로 이용될 수 있을 것이다.

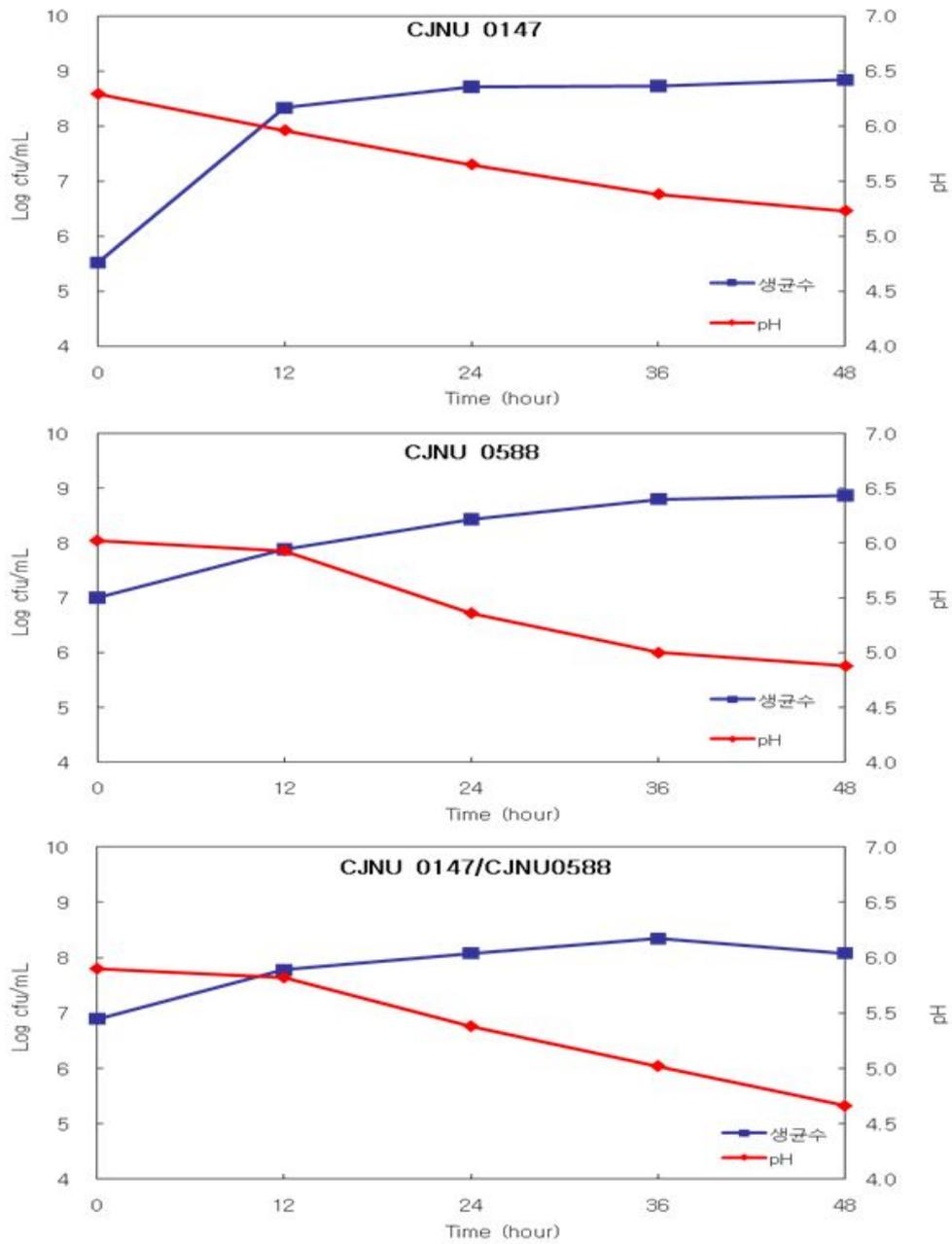


Fig. 7. Viable cell counts and pHs during whey fermentation with single or mixed strains of CJNU 0147 and CJNU 0588.

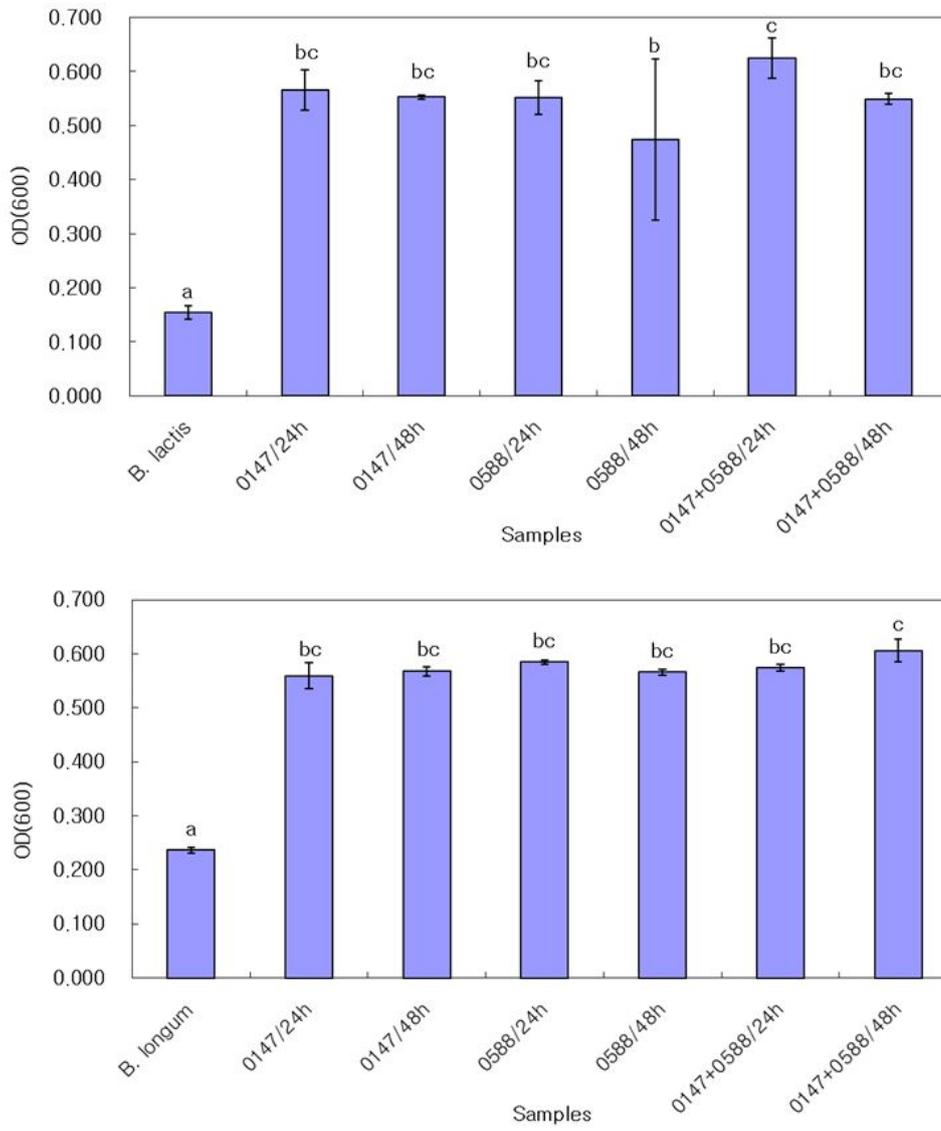


Fig. 8. Bifidogenic growth stimulator activity of whey fermentation samples prepared with single or mixed strains of CJNU 0147 and CJNU 0588.

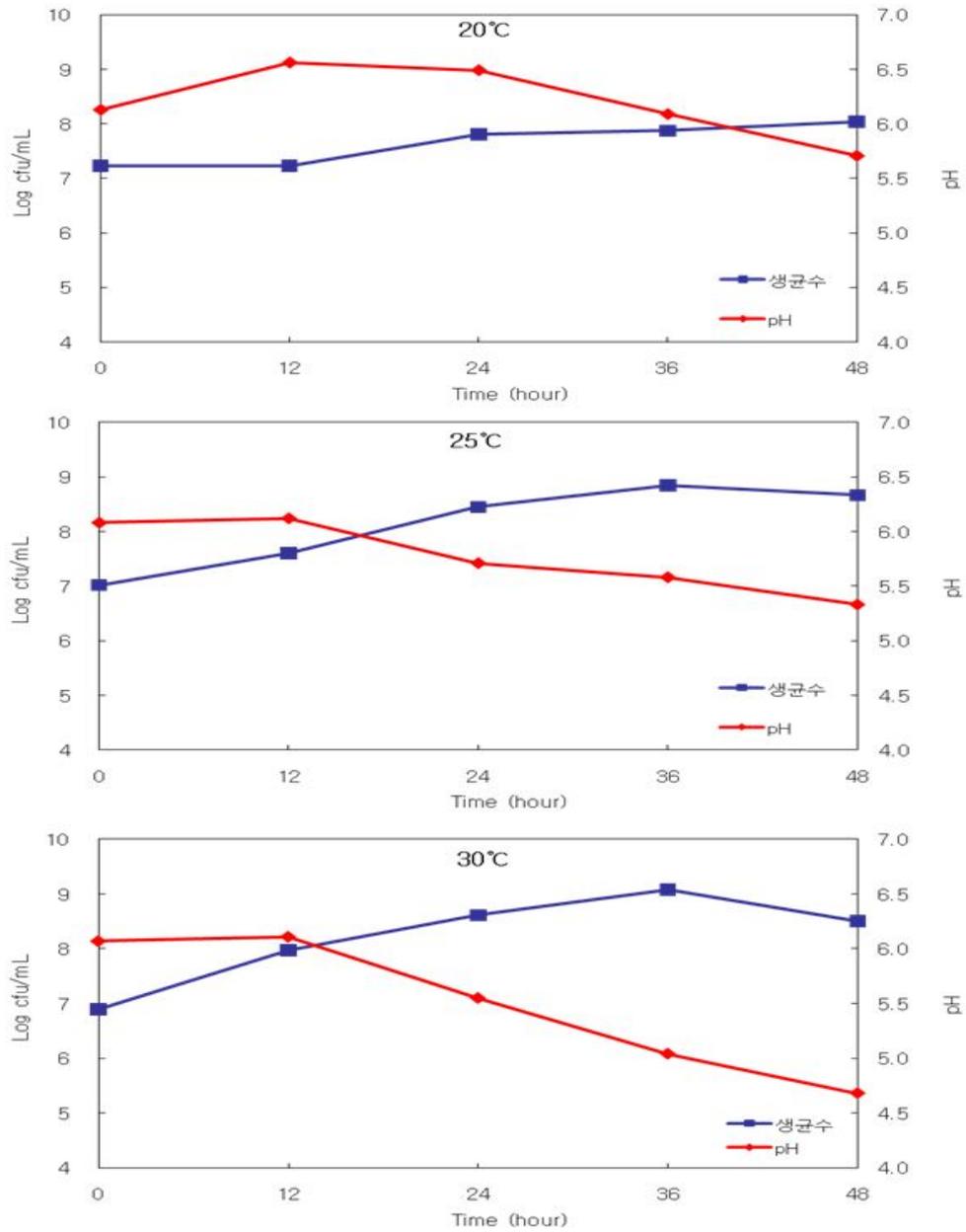


Fig. 9. Viable cell counts and pHs during whey fermentation with mixed strains of CJNU 0147 and CJNU 0588 at different temperatures.

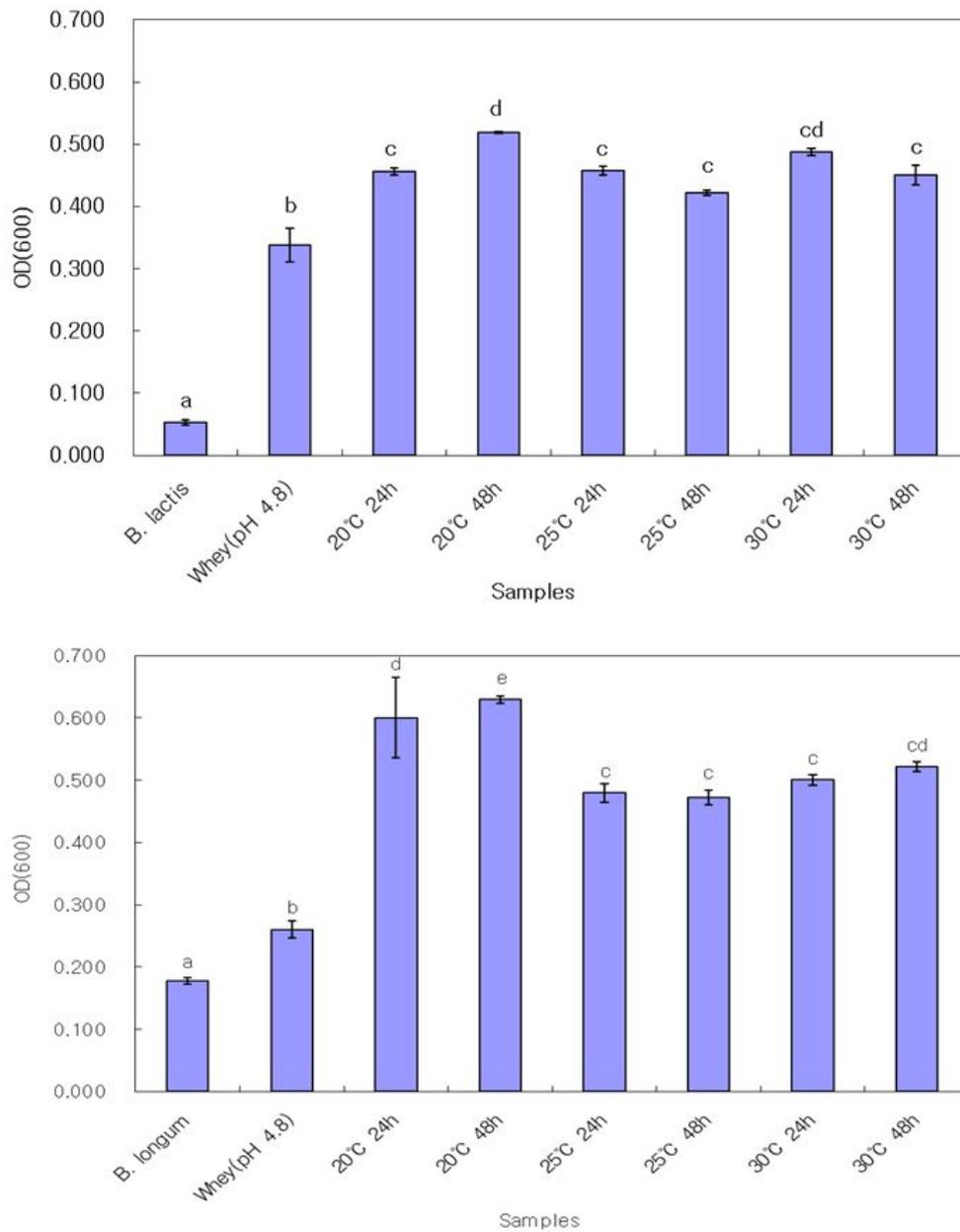


Fig. 10. Bifidogenic growth stimulator activity of whey fermentation samples prepared with mixed strains of CJNU 0147 and CJNU 0588 at different temperatures.

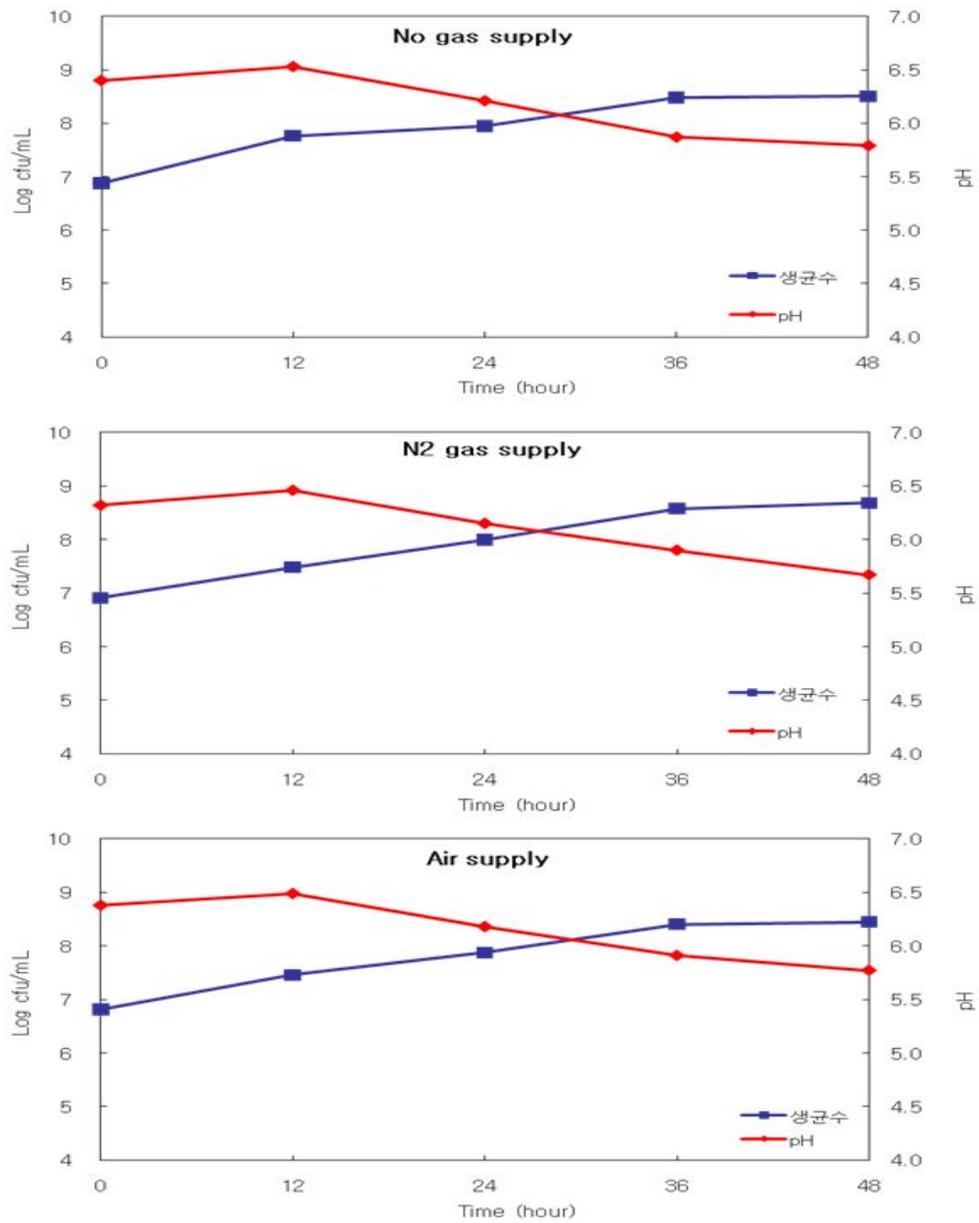


Fig. 11. Viable cell counts and pHs during whey fermentation with mixed strains of CJNU 0147 and CJNU 0588 at different air-conditions.

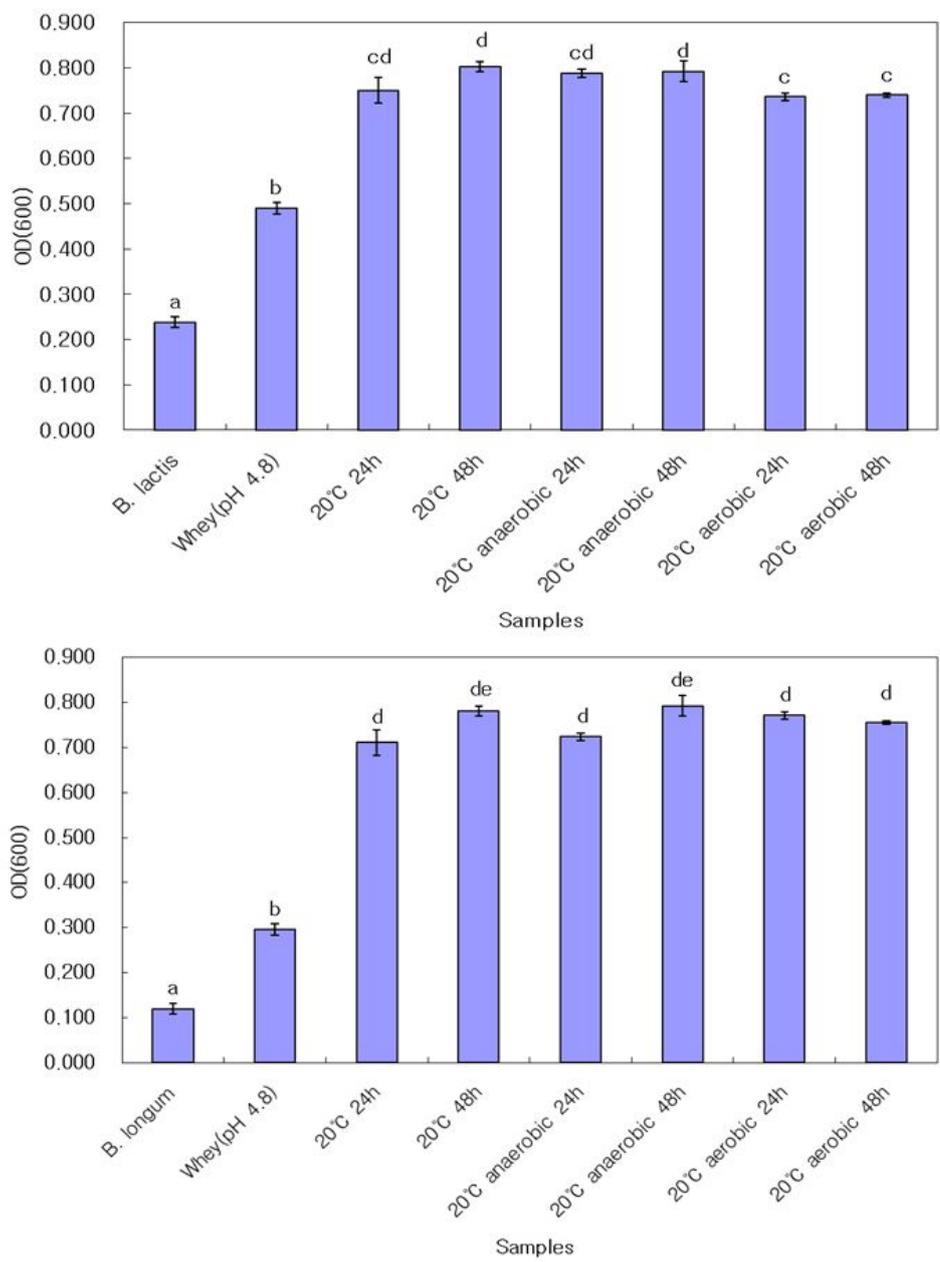


Fig. 12. Bifidogenic growth stimulator activity of whey fermentation samples prepared with mixed strains of CJNU 0147 and CJNU 0588 at different air-conditions.

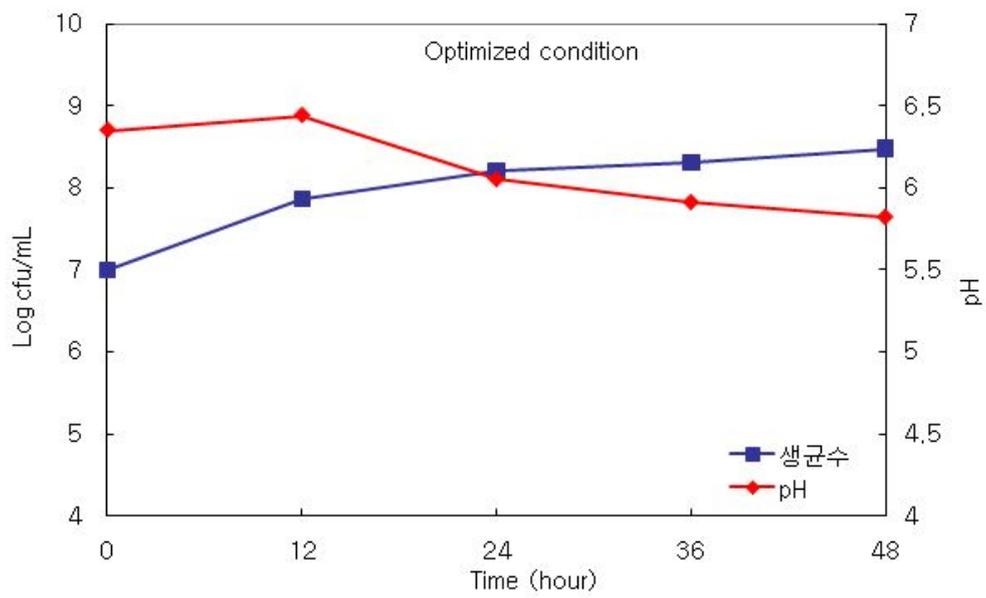


Fig. 13. Viable cell counts and pHs during whey fermentation at optimized condition.

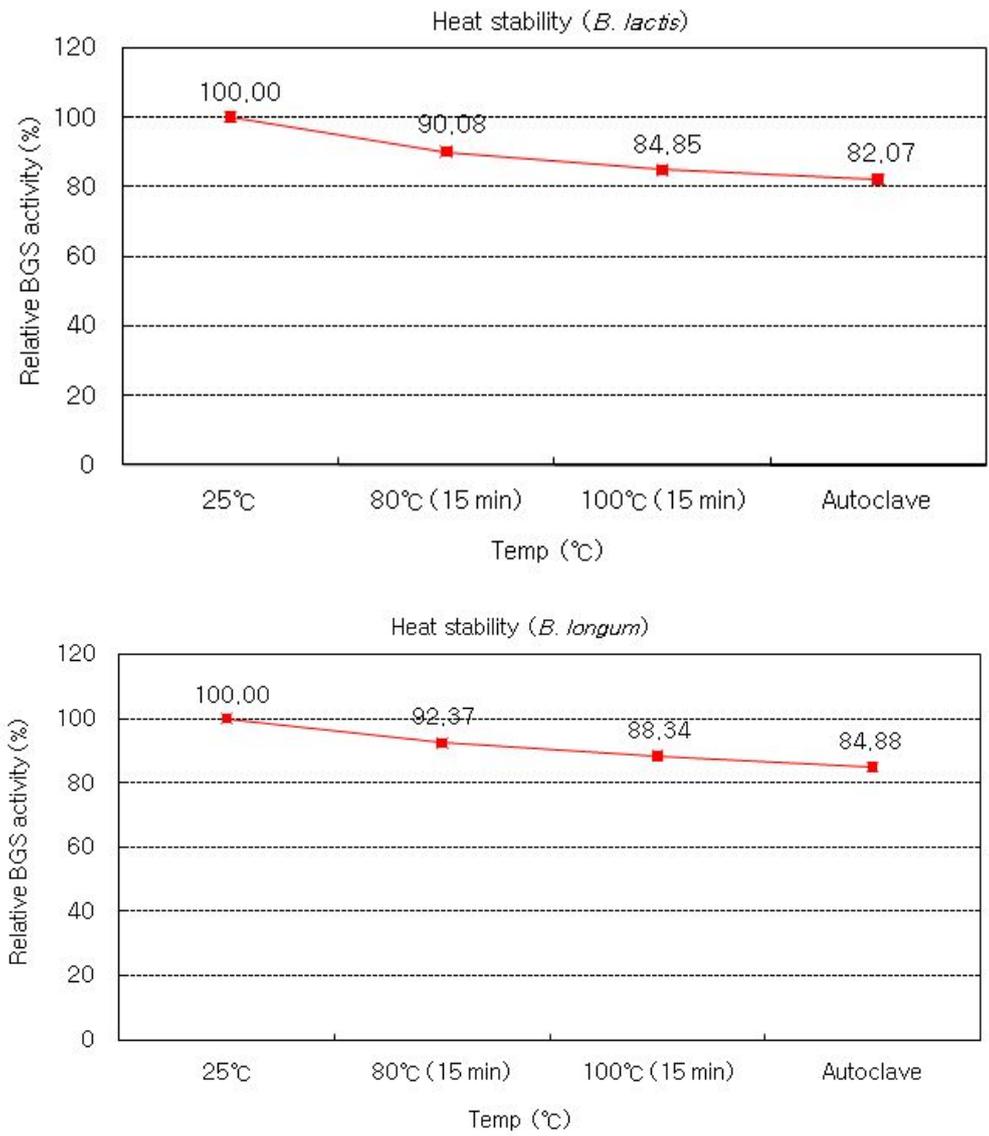


Fig. 14. Heat stability of whey fermentation.

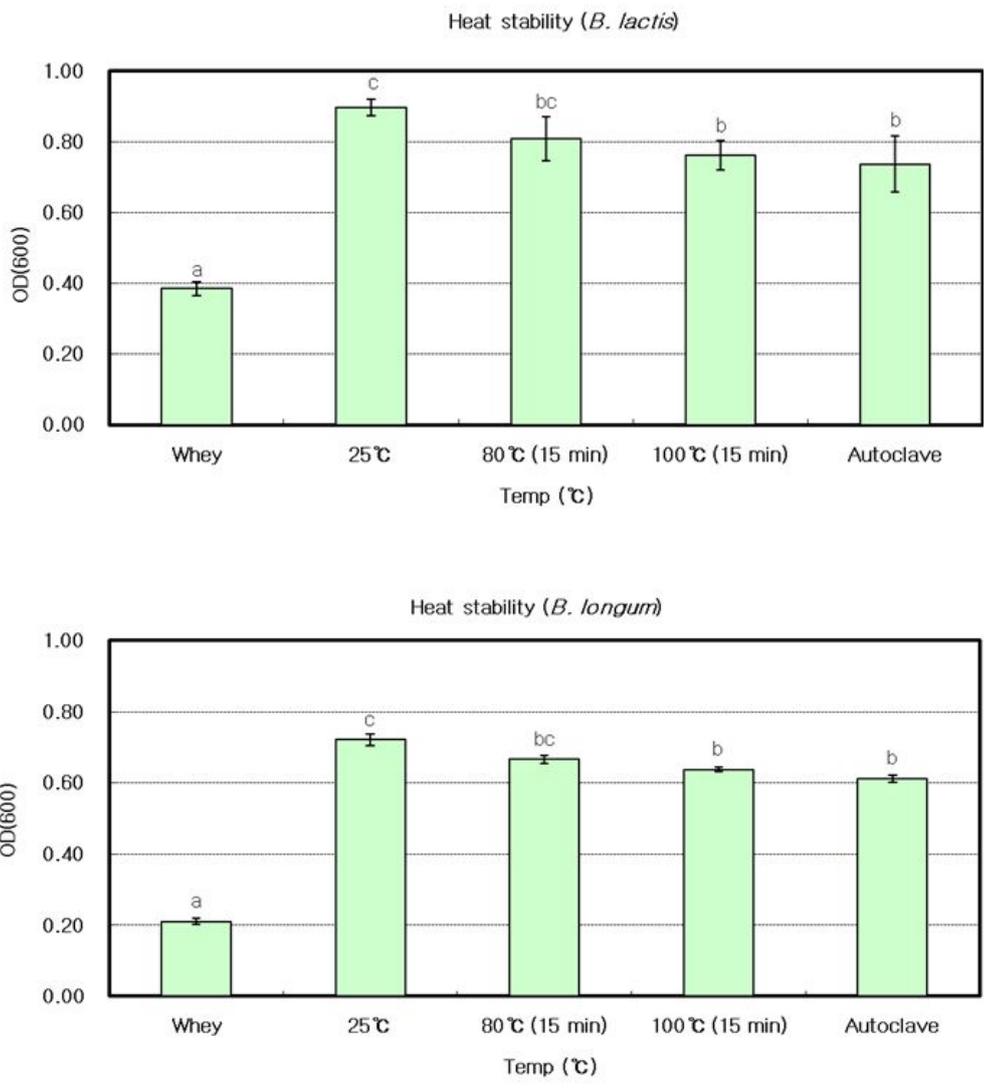


Fig. 15. Bifidogenic growth stimulator activity of whey fermentation samples prepared with mixed strains of CJNU 0147 and CJNU 0588 after heat treatments.

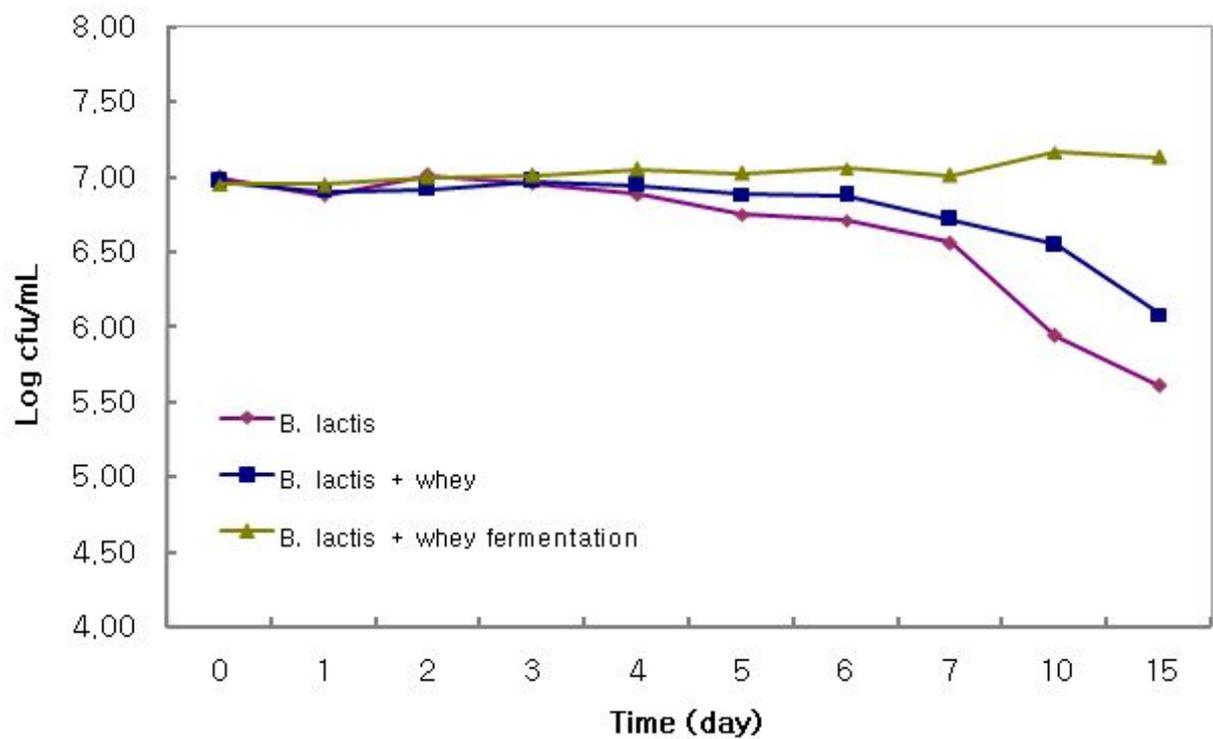


Fig. 16. Changes of viable cell counts of *B. lactis* strain stored at 10°C with whey fermentation.

## 제 2 절 유청발효물 파일럿 생산 및 시제품화(액상, 분무건조분말, 동결건조분말)

### 1. 연구방법

#### 가. 선발균주 분말화

비피도박테리아 증식능을 가지는 *Leu. mesenteroides* CJNU 0147 및 *L. casei* CJNU 0588 균주의 응용범위를 넓히기 위해서 선행연구과제(바이오그린21사업)를 통해 균주 분말화 안정성 실험을 수행하였다. 50L 용량의 발효조에 30L의 탈지분유(단백질 가수분해효소 처리) 배지를 만들어 *Leu. mesenteroides* CJNU 0147과 *L. casei* CJNU 0588 균주를 각각 1% 접종한 다음 30℃에서 48h 배양하였다. 배양액은 대용량 동결건조기를 이용해 건조 하였으며, 동결건조 균주분말은 포장 후 4℃ 저온 저장하였다. 일정 시간이 지난 후 동결 건조된 균주분말에 대한 생균수를 10진 희석법으로 MRS 고체배지(Difco)에서 측정하였으며 유청 배지에서의 균 증식속도 또한 확인하였다.

#### 나. 유청발효물 파일럿 생산

유청발효물의 파일럿 생산을 위해 100L 발효기(한국발효기(주))를 사용하였다. 유청분말을 이용해 75L의 유청배지(10%, w/v)를 조제한 후 60℃, 30min에서 살균처리하였다. 살균된 유청배지에 동결 건조된 유산균주(CJNU 0147, CJNU 0588) 분말 0.5%씩 각각 접종하였으며 앞서 확립한 최적배양 조건으로 48h 배양하였다. 생산된 유청발효물은 세 가지 형태의 제형으로 시제품화 하였다. 살균처리 한 후 액상 형태로 시제품화한 경우와 농축기(20L, Buchii Co.)를 통해 농축(온도: 45℃, 압력: 15 mmHg) 한 후 분무건조기(1kg/h, 분무온도: 97℃)와 동결건조기로 건조한 형태의 시제품을 제작하였다.

### 2. 결과

위와 같은 방법을 이용하여 세 가지 형태의 유청발효물 시제품을 제작하였다(Fig. 17). 액상 형태의 제품은 적용상의 용이성으로 활용도가 높을 것으로 판단되나 보존성의 문제로 짧은 유통기한을 가지는 것이 문제점으로 대두될 수 있다. 분무건조를 통한 유청발효물의 생산은 생산비의 절감(5,000L 배양 시 생산단가: 최종 유청발효물 kg당 약 25,000원)과 장기 보존이 가능하기 때문에 제품의 안정성을 향상시킬 수 있어 적극적으로 추천되는 방법일 수 있지만 건조 시 발생하는 열에 의한 유청발효물 상에 존재하는 유산균주의 사멸과 비피도박테리아 증식능의 감소가 나타나는 단점이 있다. 마지막으로 동결건조를 통한 유청발효물의 생산은 발효 스타터 균주의 생존이 가능하기 때문에 고부가가치의 제품 개발이 용이하고 또한 비피도박테리아 증식능을 향상시킬 수 있어 효율적인 측면에서도 바람직한 제형으로 판단된다. 그럼에도 불구하고 타 제형에 비해 생산비가 높은 것이 단점으로 작용할 수 있다. 따라서 유청발효물의 제형은 적용코자 하는 최종제품의 성격에 따라 달라질 수 있을 것이며 산업화 측면에서는 세 가지 유형의 제품군을 모두 확보하는 것이 바람직할 것으로 판단된다.

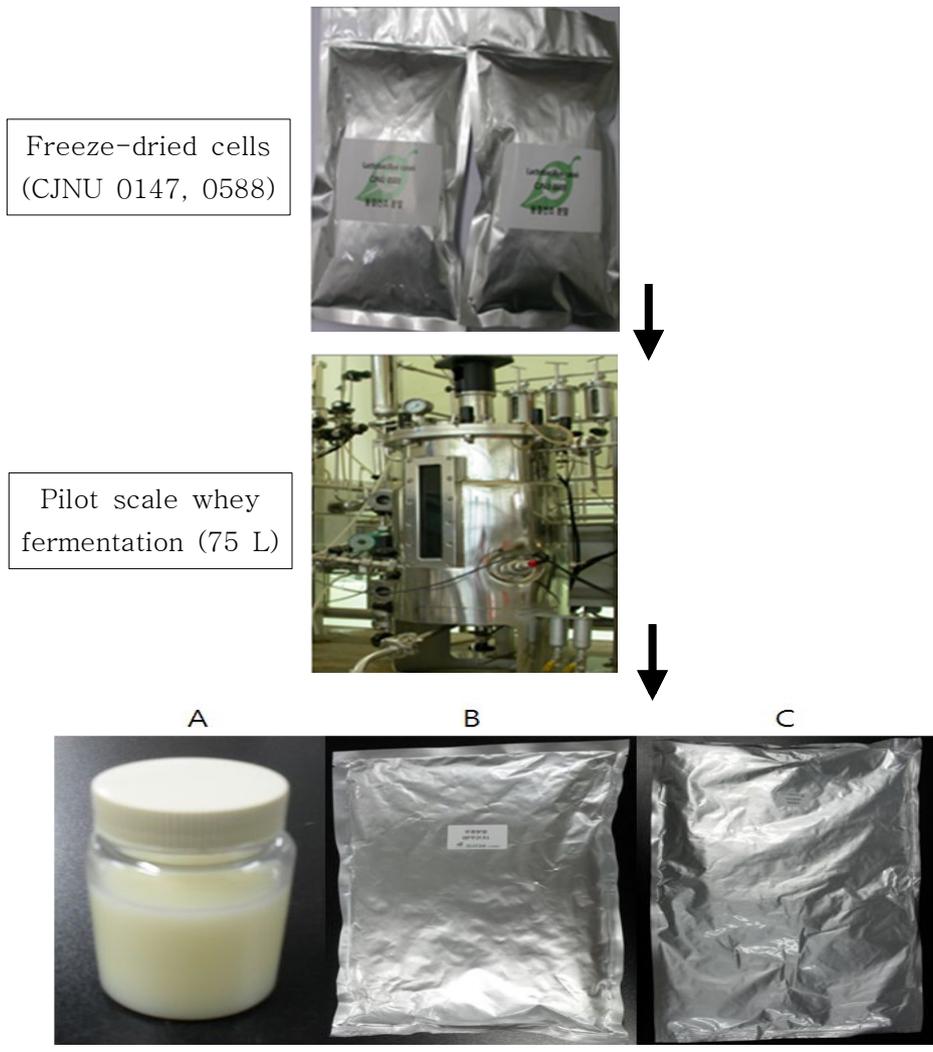


Fig. 17. Pilot scale whey fermentation using freeze-dried cells of CJNU 0147 and CJNU 0588. A: Liquid whey fermentation with sterilization, B: Spray-dried whey fermentation powder, C: freeze-dried whey fermentation powder.

### 제 3 절 시제품의 비피도박테리아 증식능 검증 및 기존 제품과의 비교평가

#### 1. 연구방법

##### 가. 여러 조건의 유청발효물 분말의 상대적인 비피도박테리아 증식능 검증

시제품화를 위하여 100L 발효기(한국발효기(주))에서 유청분말을 이용해 75L의 유청배지(10%, w/v)를 조제한 후 60°C, 30min에서 살균처리하였다. 살균된 유청배지에 동결 건조된 유산균주(CJNU 0147, CJNU 0588) 분말 0.5%씩 각각 접종하였으며 앞서 확립한 최적배양 조건으로 48h 배양하였다. 유청발효물은 농축기(20L, Buchii Co.)를 통해 농축(온도, 45°C; 압력, 15 mmHg)하였으며 분무건조기(1kg/h; 분무온도, 97°C)로 유청발효물 분말을 조제하였다. 이와 같은 살균처리, 분무건조물, 동결건조물의 상대적인 비피도박테리아 증식능을 흡광도 (OD<sub>600</sub>)와 생균수 (viable cell counts, CFU/mL) 측정을 통해 검증하였다. 흡광도 (OD<sub>600</sub>) 측정 실험에서는, 비피도박테리아(*B. lactis*, *B. longum*)를 RCM broth에 2%(v/v) 접종한 후 살균처리한 시료 원액과 water에 10%(w/v)로 녹인 분무건조물, 동결건조물을 원심분리(6000rpm, 10min)한 후 상등액을 여과(0.45µm syringe filter, Millipore, Billerica, MA, USA)하여 그 여액(filtrate)을 각각 2%(v/v) 첨가하여 혐기적으로 37°C, 14h 배양 후 흡광도를 측정하여 대조구와 비교하였다. 또한, 생균수 (viable cell counts, CFU/mL)를 측정 실험에서는, 비피도박테리아(*B. lactis*, *B. longum*)를 RCM broth에 1%(v/v) 접종한 후 살균처리한 시료 원액과 water에 10%(w/v)에 녹인 분무건조물, 동결건조물을 각각 1%(v/v) 첨가하여 37°C, 혐기조건으로 배양하면서 0, 6, 9, 12, 18, 24시간의 샘플의 생균수를 측정하였다. 생균수의 측정은 채취한 시료를 10진 희석법으로 RCM 고체배지에 도말하여 37°C, 24h, 혐기적 조건으로 배양한 후 형성된 콜로니(colony, 집락)에 대한 호기 배양과 중합효소연쇄반응(Polymerase Chain Reaction; PCR)으로 비피도박테리움 속 균임을 확인하였다. PCR에 사용한 프라이머는 Bif164(5'-GGGTGGTAATGCCGGATG-3')와 Bif662(5'-CCACCGTTACACCGGGAA-3')이다.

##### 나. 기존 제품과의 비교평가

프럭토올리고당(Fructooligosaccharide; FOS)은 비피도박테리아 증식인자 혹은 프리바이오틱스 (prebiotics)로 널리 이용되는 물질로 유청발효물 시제품의 비피도박테리아 증식능을 비교평가하였다. 위와 같이 흡광도 (OD<sub>600</sub>)와 생균수 (viable cell counts, CFU/mL) 측정을 통해 검증하였다. 흡광도 (OD<sub>600</sub>) 측정 실험에서는, 비피도박테리아(*B. lactis*, *B. longum*)를 RCM broth에 2%(v/v) 접종한 후, water에 10%(w/v)로 녹인 동결건조물과 FOS를 원심분리(6000rpm, 10min)한 후 상등액을 여과(0.45µm syringe filter, Millipore, Billerica, MA, USA)하여 그 여액(filtrate)을 각각 2%(v/v), 최종농도 5%가 되도록 첨가하여 혐기적으로 37°C, 14h 배양 후 흡광도를 측정하여 대조구와 비교하였다. 생균수 (viable cell counts, CFU/mL) 측정 실험에서는, 비피도박테리아(*B. lactis*, *B. longum*)를 RCM broth에 1%(v/v) 접종한 후 water에 10%(w/v)에 녹인 동결건조물을 1%(v/v), FOS는 최종농도 5%가 되도록 첨가하여 37°C, 혐기조건으로 배양하면서 0, 6, 9, 12, 18, 24시간의 샘플의 생균수를 측정하였다. 생균수의 측정은 채취한 시료를 10진 희석법으로 RCM 고체배지에 도말하여 37°C, 24h, 혐기적 조건으로 배양한 후 형성된 콜로니(colony, 집락)에 대한

호기 배양과 중합효소연쇄반응(Polymerase Chain Reaction; PCR)으로 비피도박테리움 속 균임을 확인하였다. PCR에 사용한 프라이머는 Bif164(5'-GGGTGGTAATGCCGGATG-3')와 Bif662(5'-CCACCGTTACACCGGGAA-3')이다.

## 2. 결과

### 가. 여러 조건의 유청발효물 분말의 상대적인 비피도박테리아 증식능 검증

유청발효물을 분무건조, 동결건조하여 얻은 분말에 대한 비피도박테리아 증식능을 검증하였다. 상대적인 비피도박테리아 증식능을 흡광도 (OD<sub>600</sub>)와 생균수 (viable cell counts, CFU/mL) 측정을 통해 검증하였으며 사용한 비피도박테리아는 *B. lactis*, *B. longum*이다. 흡광도 (OD<sub>600</sub>) 실험의 경우, 유청발효물 분말 첨가 없이 적정시간(14h) 배양한 결과 흡광도(OD<sub>600</sub>)가 0.154, 0.125인데 반해 유청발효물 분말을 첨가한 군에서는 *B. lactis*의 경우 분무건조, 동결건조가 각각 0.525, 0.555였으며 *B. longum*은 분무건조, 동결건조가 각각 0.340, 0.368이었다(Fig. 18). 그러나 유청자체의 활성이 *B. lactis*, *B. longum*이 각각 0.523, 0.347로 유청발효물 분말과 비교했을 때 비슷하였으나, 유청발효물 중 생성되는 lactic acid로 인한 pH 감소가 일부 단백질의 침전에 영향을 주는 점을 고려하여 유청의 pH를 유청발효물과 동일한 수치로 lactic acid를 사용하여 보정한 시료군의 결과 *B. lactis*, *B. longum*이 각각 0.335, 0.210으로 비교적 유청발효물 분말보다 적은 수치를 보였다. 위와 같은 분석결과를 통해 유청발효물의 분무건조 보다 동결건조가 비피도박테리아 증식능이 우수한 것으로 판단하여 이를 시제품으로 선택하였다. 또한 생균수 (viable cell counts, CFU/mL)를 측정한 결과 *B. lactis*, *B. longum* 모두 6시간에서 18시간까지 상대적인 경향을 나타내었으며 24시간에 가까이 갈수록 시료군의 수치가 동일해지는 결과를 확인했다. 특히 *B. longum*의 경우 전체적으로 동결건조가 분무건조보다 우세하였으며, *B. lactis*에서는 12시간에 분무건조가 동결건조보다 높은수치를 보였으나 전, 후를 비교하였을 때 마찬가지로 동결건조물이 비피도박테리아 증식능에 우수한 것으로 판단할 수 있었다(Fig. 19).

### 나. 기존 제품과의 비교평가

위의 결과를 통해 시제품화로서 동결건조물을 선택하였으며, 이를 비피도박테리아 증식능인자 혹은 프리바이오틱스 (prebiotics)로 널리 이용되는 물질인 프럭토올리고당 (Fructooligosaccharide : FOS)을 대조구로 하여 흡광도 (OD<sub>600</sub>)와 생균수 (viable cell counts, CFU/mL) 값을 비교 분석하였다. 흡광도 (OD<sub>600</sub>) 실험의 경우, 사용한 비피도박테리아는 *B. lactis*, *B. longum*이었으며, 유청발효물 분말 첨가 없이 적정시간(14h) 배양한 결과 흡광도 (OD<sub>600</sub>)가 0.562, 0.684인데 반해 위와 마찬가지로 유청발효물의 pH감소가 일부 단백질의 침전에 영향을 주는 점을 고려하여 pH를 보정한 결과 *B. lactis*, *B. longum* 1.086, 1.230으로 유청발효물과 FOS 모두 유청에 비해 비피도박테리아 증식효능이 높음을 확인하였으며, 유청발효물 분말을 첨가한 군에서는 *B. lactis*, *B. longum* 각각 1.360, 1.819였으며, FOS는 1.351, 1.553으로 유청발효물 분말이 FOS에 비해 비피도박테리아 증식효과를 높이 보임을 확인하였다(Fig. 20). 또한 생균수 (viable cell counts, CFU/mL)를 측정한 결과 *B. lactis*를 사용하였을 때, 6시간 이후에 상대적인 경향을 나타내기 시작하면서 9시간에서 뚜렷한 차이를 보이며 12시간까지 일정한 차이를 보인 후 서서히 동일한 수치를 나타내며 24시간에는 일정한 경향을 나타냈다. 이 생균수 측정 결과를 통해 흡광도 결과와 동일하게 FOS보다 유청발효물 분말이 높은 비피도박테리아 증식효능을 나타냄을 확인하였다(Fig. 21).

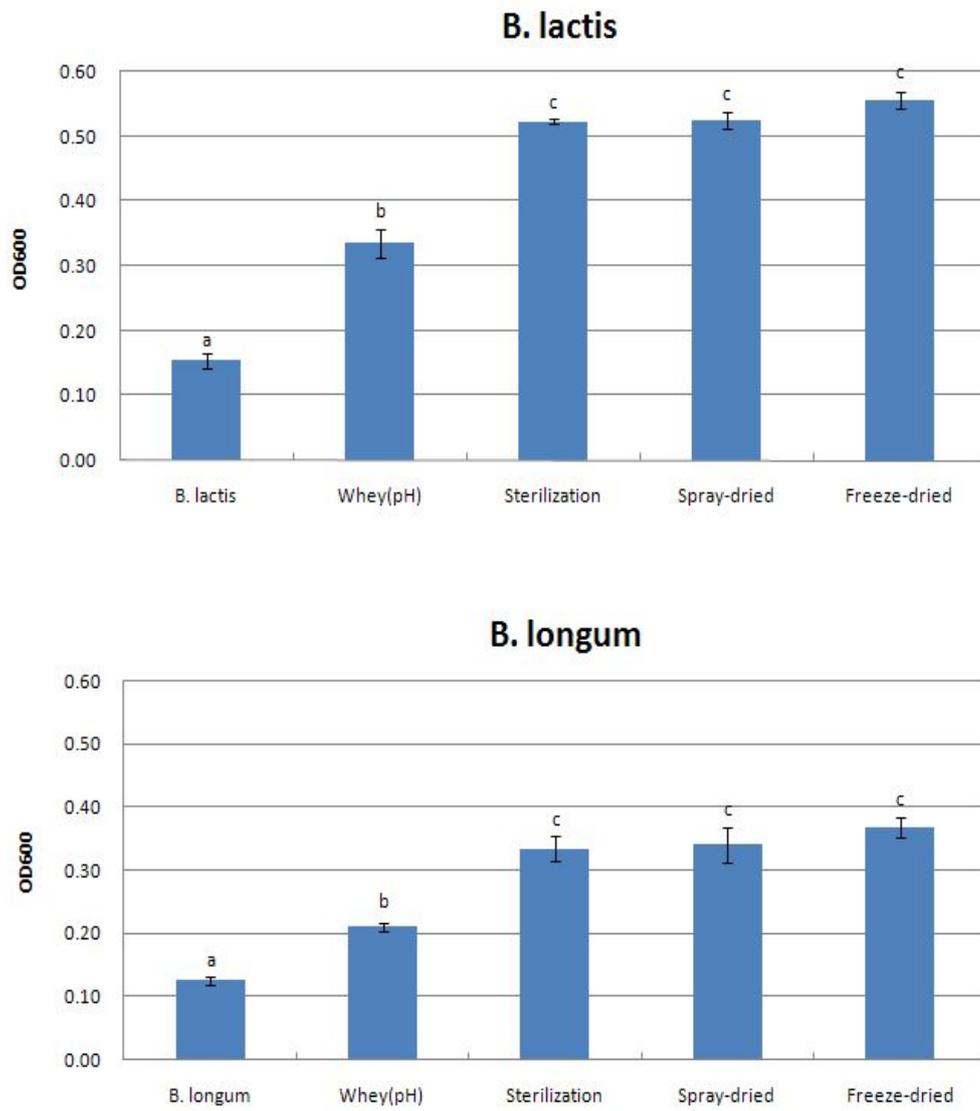


Fig. 18. Bifidogenic growth stimulator activity of whey fermentation prototypes.

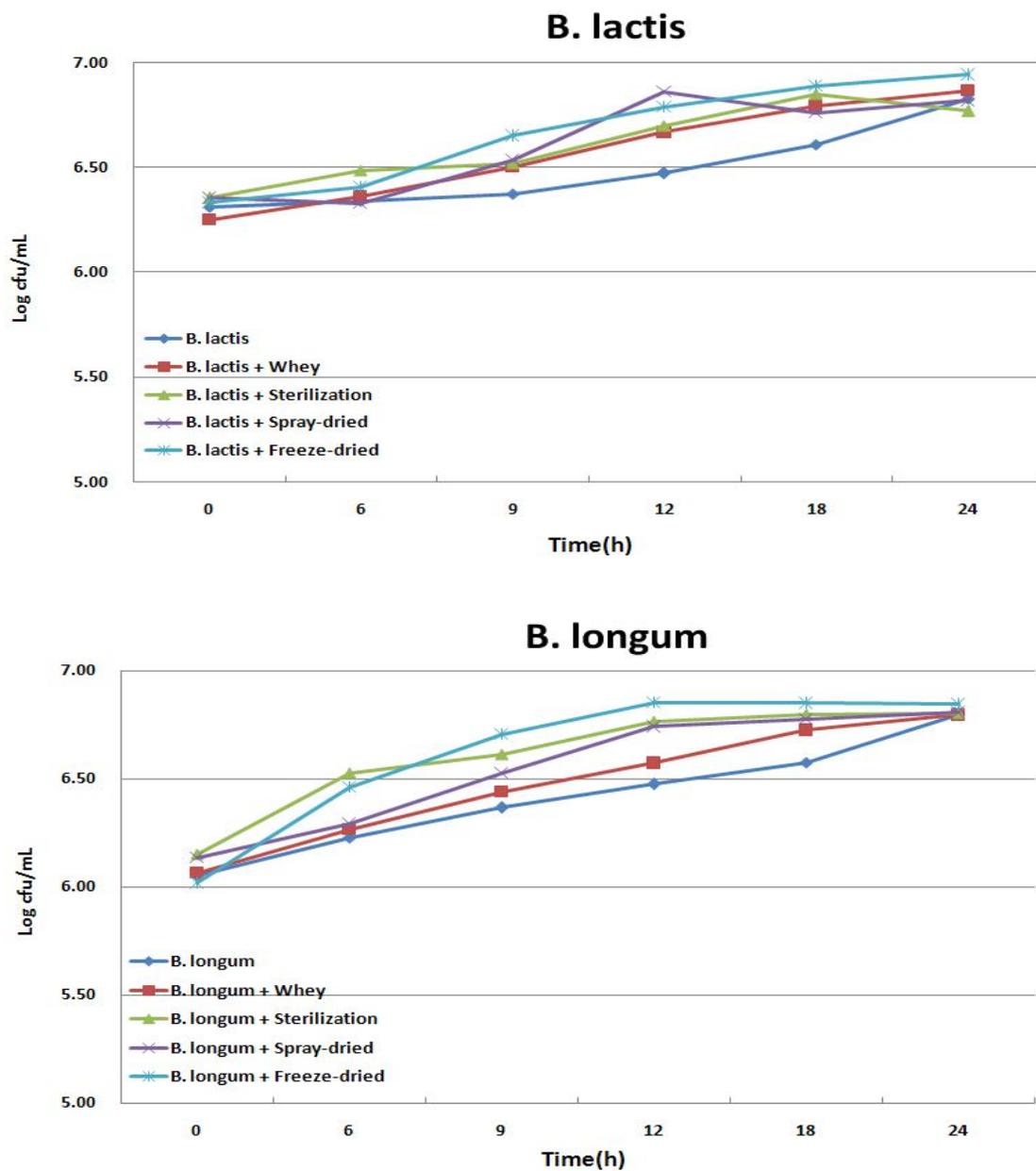


Fig. 19. Viable cell counts of bifidobacteria with whey fermentation prototypes.

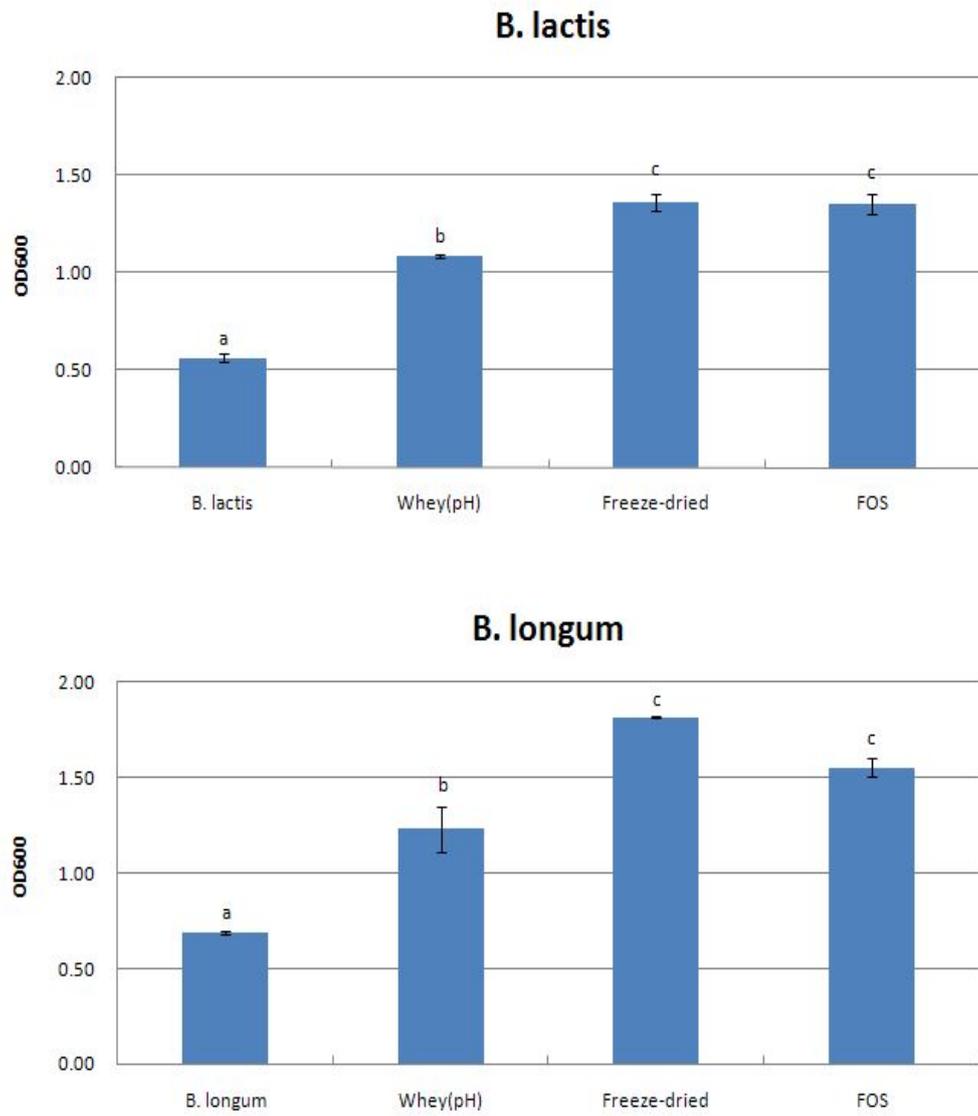


Fig. 20. Comparison of bifidogenic growth stimulator activity of freeze-dried whey fermentation prototype with fructooligosaccharide (FOS).

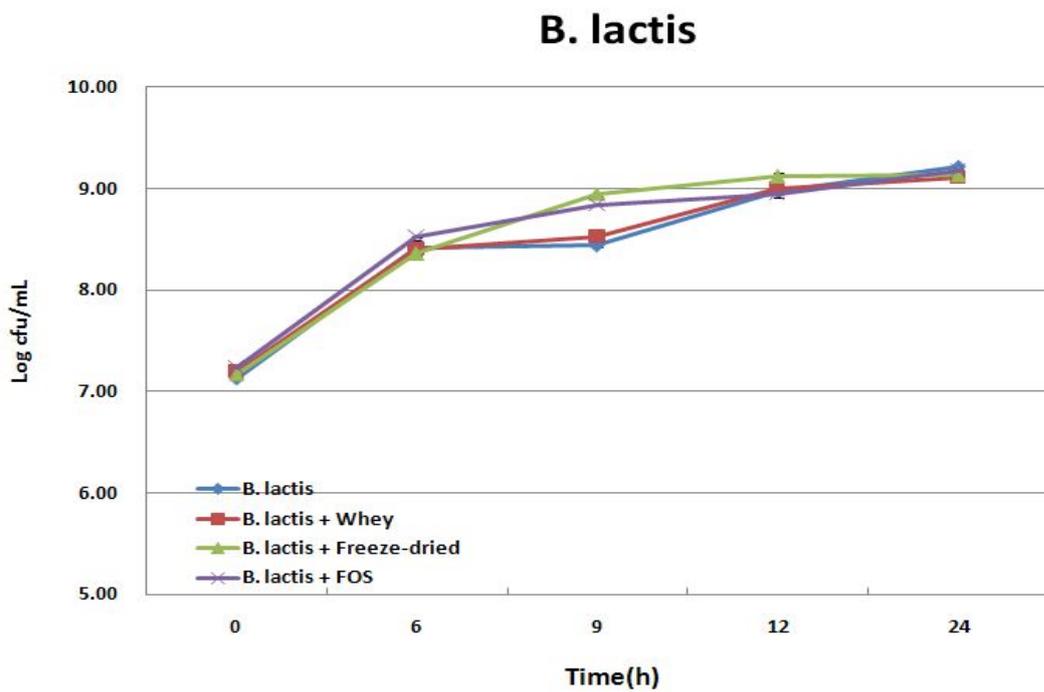


Fig. 21. Comparison of bifidogenic growth stimulator activity of freeze-dried whey fermentation prototype with fructooligosaccharide (FOS) by using viable cell counts.

## 제 4 절 발효유에 포함된 비피도박테리아 보존 및 증식능 검증

### 1. 연구방법

시제품이 실질적으로 발효유에 포함된 비피도박테리아의 보존 및 증식에 미치는 영향을 검증하였다. 본 실험에 사용된 액상요구르트는 탈지분유 16.5%, 포도당 4%를 첨가하여 총고형분을 16.2%로 만든 후 95°C에서 3시간 살균하여 갈변화시킨 후 37°C로 냉각시켰다. 이에 10%(v/w) 탈지유로 37°C에서 2회 계대배양한 *Lactobacillus casei* CJNU 0588 2%를 무균적으로 접종한 후 37°C에서 24h 배양하였으며 이를 균질화시킨 후 균질액 100g에 대하여 설탕 45g과 water 155g을 가하여 제조하였다. 50ml씩 분주된 액상요구르트에 비피도박테리아(*B. lactis*)를 1% 접종한 후 시료를 첨가하지 않은 대조군과 시제품을 최종 농도 1%(w/v), 5%(w/v) 되도록 하는 시험군과 기존 제품인 FOS를 최종 농도 1%(w/v), 5%(w/v)가 되도록 하는 비교군으로 하여 10°C에 저장하면서 12h 간격으로 비피도박테리아(*B. lactis*)의 생균수 (viable cell counts, CFU/mL)를 측정하였다. 생균수의 측정은 채취한 시료를 10진 희석법으로 RCM 고체배지에 도말하여 37°C, 24h, 혐기적 조건으로 배양한 후 형성된 콜로니(colony, 집락)에 대한 호기 배양과 증합효소연쇄반응(Polymerase Chain Reaction; PCR)으로 비피도박테리움 속 균임을 확인하였다. PCR에 사용한 프라이머는 Bif164(5'-GGGTGGTAATGCCGGATG-3')와 Bif662(5'-CCACCGTTACACCGGAA-3')이다.

### 2. 결과

발효유 조제 후 *B. lactis* 균주와 동결건조 유청발효물을 첨가하여 저온(10°C) 저장 시 *B. lactis* 균주의 보존력 향상 여부를 20일까지 확인한 결과 대조구(무첨가구)와 마찬가지로 1.5일까지는 균수가 감소하는 경향을 보였으나 1.5일 이후에는 대조구와 비교했을 때 *B. lactis*의 보존력이 확인되었다. 특히 5.5일 이후 양성대조구로 사용한 프락토올리고당과 비교했을 때 그 보존력이 우수한 것으로 나타났다(Fig. 22). 프락토올리고당은 프리바이오틱스(prebiotics)로서 많은 제품에 적용되고 있는데 이를 5% 적용한 시료보다도 동결건조 유청발효물을 1% 적용한 시료에서의 비피도박테리아 보존력이 우수한 것으로 나타난 것은 상대적으로 적은양의 유청발효물을 사용하더라도 기존의 프락토올리고당 이상의 효능을 발휘할 수 있다는 장점을 가진다. 물론 보다 완벽한 분석을 위해서는 산업적인 규모에서의 기능성 및 유효 농도 측정이 필수적인데 이는 관련 산업체와의 협력 연구를 통해 추가적인 검증이 필요할 것으로 사료된다.

더 나아가 응용적인 측면에서 유청발효물의 활용도를 높이기 위해서는 발효유뿐만 아니라 다양한 유제품에의 적용이 필요한데 분유가 주요대상이 될 수 있다. 분유의 경우 유아들을 대상으로 하고 또 분말 상태의 제형이기 때문에 분무건조 혹은 동결건조 유청발효물의 적용이 용이하여 유아들의 장내에서 주로 발견되는 비피도박테리아 종에 대한 추가적인 증식능의 검증이 수반된다면 기능성 소재로서 분유에 첨가 가능할 것으로 판단된다. 그리고 첨가물의 형태가 아닌 최종 제품으로의 개발도 가능할 것이다. 특히 동결건조 유청발효물의 경우 스타터 균주가 생존해 있어 적정량의 균수만 확보된다면 프로바이오틱스(probiotics) 균주가 함유된 건강 기능식품으로도 상업화가 가능할 것이다. 따라서 상업화 측면에서 보면 유청발효물의 용도를 한정하지 말고 다양한 제품에 적용 가능하도록 범용성을 확대할 필요가 있을 것이다.

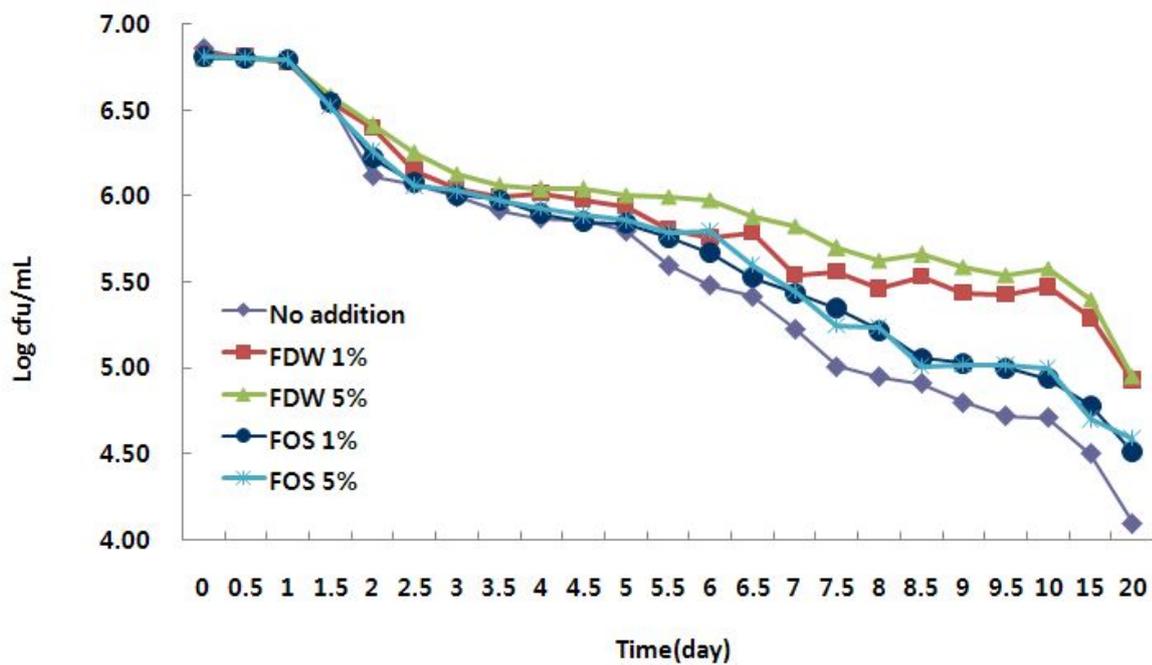


Fig. 22. Viable cell count of *B. lactis* strain in yogurt with bifidogenic growth stimulator. No addition: only *B. lactis* strain was added to yogurt, FDW: freeze-dried whey fermentation was added with *B. lactis* strain in yogurt, FOS: fructooligosaccharide was added with *B. lactis* strain in yogurt.

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제 1 절 목표달성도

당초목표(내용)	당초연구목표 대비 연구결과	달성도(%)
①비피도박테리아 증식능 향상을 위한 최적 유청발효조건 확립	비피도박테리아 증식능 향상을 위한 최적 유청발효조건(CJNU 0147/CJNU 0588 혼합 배양, 20℃, 외부 가스 무공급) 확립.	100
②유청발효물 파일럿 생산 및 시제품화 (분무건조분말 동결건조분말	최적 유청발효조건을 이용하여 파일럿 규모(75L)의 유청발효물을 생산한 다음 이를 세 가지 형태(액상, 분무건조분말, 동결건조분말)의 시제품으로 제작함.	100
③시제품의 비피도박테리아 증식능 검증 및 기존 제품과의 비교평가	세 가지 형태의 시제품을 이용하여 비피도박테리아 증식능을 검증한 결과 모든 시제품에서 효능이 확인되었고 특히 동결건조분말의 경우 양성대조구로 사용한 프락토올리고당 보다 증식능이 다소 우수한 것으로 나타남.	100
④발효유에 포함된 비피도박테리아 보존 및 증식능 검증	발효유 조제 후 <i>B. lactis</i> 균주와 동결건조 유청발효물을 동시에 첨가했을 때 첨가균주에 대한 보존력이 있음을 확인하였음.	100

### 제 2 절 관련분야에의 기여도

1. 유청의 고부가가치화에 기여
2. 파일럿 규모의 비피도박테리아 증식능 유청발효물 시제품 생산을 통해 상품화 가능성 제고
3. 비피도박테리아 증식능 향상을 위한 배양 최적화 조건 확립으로 관련 기술 향상 및 학문적 진보에 기여
4. 기능성 식의약 소재 생산을 위한 유청의 활용도 향상에 기여
5. 궁극적으로 낙농업 및 낙농산업 발전에 기여

## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

### 제 1 절 실용화·산업화 계획

1. 추가적인 산업화 연구를 통해서 과제종료 후 1년 이내에 기술실시 함.
2. 추가적인 실용화 기술개발을 통해서 과제종료 후 2년 이내에 관련 제품을 상품화 함.

### 제 2 절 기술 확산계획

1. 개발기술의 적극적인 활용과 기술향상을 위해서 낙농업체와 연계한 추가연구과제 수행.
2. 개발기술 및 제품의 신뢰성을 확보하기 위해 최종 수요처(낙농업체)를 대상으로 한 적극적인 홍보.
3. 개발기술의 파급효과를 극대화하기 위해 대기업과 연계한 마케팅 전략 수립.

### 제 3 절 지식재산권 확보계획

#### 1. 지식재산권

##### 가. 특허출원(1건, 완료)

발명의 명칭: 락토바실러스 카제이 CJNU 0588 및 류코노스톡 메센테로이데스 CJNU 0147 및 균주의 혼합배양을 통한 비피도박테리움속균 증식방법

출원일자: 2011.06.27.

출원번호: 10-2011-0062293

출원인: (주)제이케이뉴트라, 충주대학교 산학협력단

발명자: 문기성, 이종광, 엄지은

##### 나. 상표등록출원(1건, 완료)

상표명(표장): BIFIDOPLUS

출원일자: 2010.11.10.

출원번호: 40-210-57815

출원인: (주)제이케이뉴트라

## 2. 논문

### 가. 논문게재(1건)

저널명: Food Science and Biotechnology(SCIE), Vol. 20, No. 5, pp. 1451-1455

논문명: Optimal production of fermented whey presenting bifidogenic growth stimulator activity

저자명: JK Lee, JE Eom, HS Shin, WS Shin, and GS Moon

### 나. 논문투고(1건, 심사 중)

저널명: Journal of Food Science and Nutrition

논문명: *Leuconostoc mesenteroides* CJNU 0147 and *Lactobacillus casei* CJNU 0588 improve growth of a *Bifidobacterium lactis* strain in co-cultures

저자명: JE Eom and GS Moon

## 3. 학술발표

### 가. 국제학술발표(1건)

학회명: LAB10(유럽유산균학회, 네덜란드)

일시: 2011.8.28-9.1

논문명: Production of whey fermentation presenting bifidogenic growth stimulator activity using *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus casei*

저자명: GS Moon and JE Eom

## 제 4 절 추가연구, 타 연구 활용 계획

1. 비피도박테리아 증식능 유청발효물에 함유되어 있는 유효성분의 분리 및 규명에 관한 추가 연구가 필요함.
2. 비피도박테리아 증식능 외에 다른 생리활성에 대한 규명으로 유청발효물의 응용성을 향상시키는 연구가 필요함.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

우리 인체의 거의 모든 영역은 공생의 관계 혹은 기생의 관계로 미생물과 접촉하고 있으며 건강한 사람의 경우 전체적으로 50개의 문(phylum)이 존재하고 그 중 4개의 문이 우세한 것으로 알려져 있다. 특히 비피도박테리아가 서식하는 대장의 경우 Bacteroidetes와 Firmicutes가 거의 전부라 해도 과언이 아닐 정도로 많은 부분을 차지하고 있다. 그럼에도 불구하고 약 20-80%의 박테리아는 배양이 불가능한 경우이다(25).

그래서 유럽 쪽의 과학자들을 주축으로 124명의 유럽인의 분변을 metagenomic sequencing 방법을 이용해서 분석한 결과 인간이 가지는 유전자의 수 보다 약 150배 정도 많은 3백 3십만 개의 유전자가 확인 되었고 전체적으로 1,000-1,150개의 박테리아 종(species)이 동정 되었으며 특히 160개 종은 많은 사람들이 공유하고 있는 것으로 나타났다. 이러한 gut microbiome의 분석결과는 인체 생리 및 영양에 장내 미생물이 깊이 관여하고 있다는 것을 보여주고 있고 장내 미생물의 균총 변화가 장 질환 및 비만 등에 영향을 미칠 수 있음을 강하게 시사하는 것이다(26).

지금까지 비피도박테리아에 속하는 많은 종들의 genome sequencing이 완료되었거나 진행 중에 있으며 분석결과를 기초로 했을 때 비피도박테리아가 얼마나 인체 장내환경에 잘 적응할 수 있는지, 그리고 인체 생리에 어떤 영향을 미칠 수 있는 지를 잘 나타내 주고 있다(27).

최근 유럽에서 변종 장출혈성 대장균 감염으로 인해 많은 사람들이 죽었는데 장출혈성 대장균의 대표적인 *E. coli* O157을 비피도박테리아가 acetate 생산을 통해 효율적으로 그 감염을 억제한다는 논문이 발표되었는데 무균 실험용 쥐에 O157을 경구투여 한 경우 7일째 모두 죽었고 감염 억제효과가 약한 비피도박테리아를 O157과 함께 투여한 결과 9일째 모두 죽은 반면 감염 억제효과가 있는 균주와의 동시 투여의 경우 실험한 13일 이후 까지 한 마리도 죽지 않은 것을 관찰하고 감염억제 효과 유무의 비피도박테리아 균주를 비교한 결과 O157 감염을 억제하는 비피도박테리아 균주에서 ABC-type carbohydrate transporter 관련 5개의 연관 부위가 발견되었고 이는 장내 다양한 탄수화물의 이용이 가능함을 의미하고 결론적으로 당 대사의 최종산물 중에 하나인 acetate가 많이 만들어져 항염, 세포자살 억제 및 Stx2 독소의 혈액으로의 이동을 방지하는 것으로 추론되었다(28).

또한 비피도박테리아를 표적항암제의 운반체로 이용하려는 경향도 있는데 종양조직이 가지고 있는 특징 즉, 저 산소상태, 새는 미세혈관, 면역회피, 풍부한 영양분으로 인해 비피도박테리아를 혈관 투여 하면 종양조직으로 이동이 가능하다는 개념인데 비피도박테리아에 항암유전자를 형질전환시키면 암세포를 선택적으로 죽일 수 있을 걸로 기대하고 있다(29).

## 제 7 장 참고문헌

1. Yoon YC, Shin DG, Lee WC, Jeong DK. The analysis of whey and whey products in Korea. Korean J. Food Sci. Ani. Resour. 17: 38-44 (1997)
2. Lagrange V. U.S. whey proteins and new fractions as ingredients in functional dairy products and innovative nutraceuticals. Korean Dairy Technol. 16: 106-118 (1998)
3. Hong SB, Choi DY, Row KH. Separation of whey proteins by high performance membrane chromatography and gel filtration chromatography. HWAHAK KONGHAK 39: 705-708 (2001)
4. Park WP, Park KD. Effect of whey calcium on the quality characteristics of *kimchi*. Korean J. Food Preserv. 11: 34-37 (2004)
5. Lee KW, Kim SK, Kang HS, Park SK, Kim DS. Manufacture of the fermented product by lactic acid bacteria with sweet whey. Korean J. Food Sci. Ani. Resour. 16: 52-61 (1996)
6. Shim YS, Kim JW, Yoon SS. Alcohol fermentation of cheese whey by *Kluyveromyces marxianus* and lactic acid bacteria. Korean J. Food Sci. Technol. 30: 161-167 (1998)
7. Yoo EJ, Heo TR. Preparation of the fermented product by lactic acid bacteria from cheese whey. Korean J. Food Sci. Technol. 23: 471-477 (1991)
8. Liu C, Liu Y, Liao W, Wen Z, Chen S. Simultaneous production of nisin and lactic acid from cheese whey: optimization of fermentation conditions through statistically based experimental designs. Appl. Biochem. Biotechnol. 113-116: 627-638 (2004)
9. Li Y, Shahbazi A. Lactic acid recovery from cheese whey fermentation broth using combined ultrafiltration and nanofiltration membranes. Appl. Biochem. Biotechnol. 129-132: 985-996 (2006)
10. Furuichi K, Katakura Y, Ninomiya K, Shioya S. Enhancement of 1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid production by *Propionibacterium freudenreichii* ET-3 fed-batch culture. Appl. Environ. Microbiol. 73: 3137-3143 (2007)
11. Choi GH, Lee JH, Jo MN, Yoon YC, Paik HD. Growth and antioxidant production of *Bacillus polyfermenticus* SCD in whey protein concentrate (WPC)-based medium. Korean J. Food Sci. Ani. Resour. 28: 105-108 (2008)
12. Moon GS. Bifidobacterial growth stimulation by *Lactobacillus casei* via whey fermentation. J. Food Sci. Nutri. 14: 265-268 (2009)

13. Eom JE, Moon GS. *Leuconostoc mesenteroides* producing bifidogenic growth stimulator via whey fermentation. Food Sci. Biotechnol. 19: 235-238 (2010)
14. Saxelin M, Tynkkynen S, Mattila-Sandholm T, de Vos WM. Probiotics and other functional microbes: from markets to mechanisms. Curr. Opin. Biotechnol. 16: 204-211 (2005)
15. Brigidia P, Vitalia B, Swennena E, Bazzocchib G, Matteuzzia D. Effects of probiotic administration upon the composition and enzymatic activity of human fecal microbiota in patients with irritable bowel syndrome or functional diarrhea. Res. Microbiol. 152: 735-741 (2001)
16. Vitali B, Ndagijimana M, Cruciani F, Carnevali P, Candela M, Guerzoni ME, Brigidi P. Impact of a synbiotic food on the gut microbial ecology and metabolic profiles. BMC Microbiol. 10:4 (2010)
17. Mitsuoka T. Intestinal flora and aging. Nutr. Rev. 50: 438-446 (1992)
18. Amenta M, Cascio MT, Di Fiore P, Venturini I. Diet and chronic constipation. Benefits of oral supplementation with symbiotic zir fos (*Bifidobacterium longum* W11 + FOS Actilight). Acta Biomed. 77: 157-162 (2006)
19. Gueimonde M, Margolles A, de los Reyes-Gavilán CG, Salminen S. Competitive exclusion of enteropathogens from human intestinal mucus by *Bifidobacterium* strains with acquired resistance to bile - A preliminary study. Int. J. Food Microbiol. 113: 228-232 (2007)
20. Kouya T, Misawa K, Horiuchi M, Nakayama E, Deguchi H, Tanaka T, Taniguchi M. Production of extracellular bifidogenic growth stimulator by anaerobic and aerobic cultivations of several propionibacterial strains. J. Biosci. Bioeng. 103: 464-471 (2007)
21. Medina M, Izquierdo E, Ennahar S, Sanz Y. Differential immunomodulatory properties of *Bifidobacterium longum* strains: relevance to probiotic selection and clinical applications. Clin. Exp. Immunol. 150: 531-538 (2007)
22. Kelly G. Inulin-type prebiotics - a review: part 1. Altern. Med. Rev. 13: 316-330 (2008)
23. Chmielewska A, Szajewska H. Systematic review of randomised controlled trials: Probiotics for functional constipation. World J. Gastroenterol. 16: 69-75 (2010)
24. Iannitti T, Palmieri B. Therapeutical use of probiotic formulations in clinical practice. Clin. Nutr. 29: 701-725 (2010)
25. Dethlefsen L, McFall-Ngai M, Relman DA. An ecological and evolutionary perspective

- on human - .microbe mutualism and disease. *Nature* 449: 811-818 (2007)
26. Qin J et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 464: 59-65 (2010)
  27. Turrone F, van Sinderen D, Ventura M. Genomics and ecological overview of the genus *Bifidobacterium*. *Int. J. Food. Microbiol.* in press (2011)
  28. Fukuda S et al. Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature* 469: 543-547 (2011)
  29. Cronin M, Ventura M, Fitzgerald GF, van Sinderen D. Progress in genomics, metabolism and biotechnology of bifidobacteria. *Int. J. Food. Microbiol.* in press (2011)

(편집순서 8)

## 주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.