

발 간 등 록 번 호
11-1541000-001074-01

보안과제(), 일반과제(○)

108059-3

비타민 K₂ 생산 젖산균 분리
및 이를 이용한 발효유 개발
(Development of fermented milk by using
Lactic acid bacteria for Vitamin K₂)

젖산균 개발 및 제품화(제1세부)
(Selection of lactic acid bacteria and development of product)

젖산균 및 제품 특성조사(제2세부)
(Characteristic survey of lactic acid bacteria and product)

골강화 효능평가(제3세부)
(Effective evaluation for bone strength)

한국식품연구원

농 립 수 산 식 품 부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “비타민 K₂ 생산 젖산균 분리 및 이를 이용한 발효유 개발” 과제의 보고서로 제출합니다.

2011년 06월 24일

주관연구기관명 : 한국식품연구원

주관연구책임자 : 임 상 동

세부연구책임자 : 김 기 성

세부연구책임자 : 김 인 호

연 구 원 : 도 정 룡

연 구 원 : 성 기 승

연 구 원 : 조 성 아

연 구 원 : 조 혜 정

연 구 원 : 신 지 영

참 여 기 업 명 : 임실치즈농협

연 구 원 : 양 해 동

요 약 문

I. 제 목

비타민 K₂ 생산 젖산균 분리 및 이를 이용한 발효유 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

본 연구의 목적은 원유, 성인 및 신생아 분변에서 비타민 K₂ 생성 젖산균 탐색 및 발굴하여 젖산균 특성조사와 최적 배양조건을 설정한 다음 발효유를 개발하고 동물실험을 통해 골 강화효능이 입증된 제품을 개발하고자 하는데 그 목적이 있다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 젖산균 분리 및 수집

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

2. 비타민 K₂ 생산 균주 선발

- 배지(Rogosa medium(또는 MRS medium), 환원탈지유)에서의 비타민 K₂ 생산 여부
- TLC, HPLC, Mass Spectrometry 통해 정량 및 확인

3. 선발 젖산균주 동정

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

4. 골세포계 골강화 활성 구축 및 기초 시험

- 세포계 골 강화 활성 시스템 구축

5. 선발 젖산균의 특성조사

- 젖산균의 성장, 항생제 내성시험, 효소활성 시험, 담즙내성 시험, pH 내성 시험, 항균력 시험, 균주 동결건조(균주활력시험)

6. 젖산균주의 최적비타민 K₂ 생산 조건 확립

- 비타민 K₂ 생산증진 위한 배양조성물 탐색
- 탄소원, 질소원, 미량원소별 비타민 K₂ 생산 효율 분석
- 비타민 K₂ 생산증진 위한 발효조건 설정

7. 세포계 골 강화 활성 검증 및 이화학적 특성

- 세포계 골 강화 활성 검증
 - 골 강화 성분의 이화학적 특성
8. 최적 배합조성물 개발
- 발효유에 첨가되는 소재에 대한 기본 배합비 설정
 - 소재별 첨가수준 설정
 - 발효유에 대한 최적 배합비 설정
9. 제조공정 설정 및 이화학적 특성조사
- 제조공정 설정
 - 비타민 K₂ 함량 및 이화학 성분 분석
10. 동물모델을 이용한 발효유의 골강화 활성 및 성분 특성
- 동물계 골 강화 활성 시스템 구축
 - 시료의 투여 및 기초대사
 - 골강화 활성 검색

IV. 연구개발 결과

1. 젖산균 분리 및 수집

가. 원유에서 젖산균 분리

서울우유 관할 원유검사소(경기도 및 강원도 일부), 전북 축산시험연구소 및 경북 가축위생시험소에서 지원받아 2,173개의 균주를 분리하였으며, 발효유에 적합하기 위해서는 skim milk를 응고시킬 수 있는 산생성 능력이 있어야 하므로 10% 환원탈지분유에 분리균주를 접종한 후 37℃에서 18시간 및 24시간 배양하여 응고된 균주가 958개 균주이었다.

나. 신생아 분변에서 젖산균 분리

순천향병원 및 한강성심병원 산부인과 신생아실에서 지원받아 45명의 분변으로부터 분리하였다. bifidobacteria는 59개 균주를 수집, 보관하였고, 젖산균은 81개를 수집하였으며, 이 중 37℃에서 18시간 및 24시간 배양하여 응고된 균주가 43개 균주이었다.

다. 성인 분변에서 젖산균 분리

한국식품연구원 직원 및 가족에서 지원받아 50명의 분변으로부터 분리하였다. bifidobacteria는 87개 균주를 수집, 보관하였고, 젖산균은 86개를 수집하였으며, 이 중 37℃에서 18시간 및 24시간 배양하여 응고된 균주가 41개 균주이었다.

2. 비타민 K₂ 생산 균주 선발

분리된 젖산균 2,340개 중 10% 환원탈지유에 응고반응을 보인 1,042개와 bifidobacteria균 146개를 대상으로 TLC에서 비타민 K₂ 양성을 보인 167개 균주를 선발하였다. HPLC 분석을 통해 Rogosa medium에서는 10 µg/kg 미만이 167 균주 중 154균주이었으며, 10-20µg/kg 미만이 1개, 20-30µg/kg 미만이 4개, 30-40µg/kg 미만이 6개이었으며, 40µg/kg 이상이 2개로 나타났다. 반면 탈지유에 배양하여 얻어진 비타민 K₂ 함량은 10 µg/kg 미만이 160개, 10-20µg/kg 미만이 3개였으며, 20-30 µg/kg 미만이 3개, 30µg/kg 이상이 1개로서, 최종 13개 균주를 선발하였다.

3. 선발 젖산균주 동정

Gram염색, 현미경 관찰, 포자생성, 호기적 및 혐기적 성장, catalase 생성, 15°C 및 45°C에서의 성장, glucose로부터 가스생성, arginine으로부터 ammonia 생성 등의 시험, 당발효 시험, 16S rDNA sequencing 등을 분석한 결과 선발된 13종의 젖산균 중 *Enterococcus faecalis* 균주가 4종, *Enterococcus durans* 2종, *Enterococcus* sp. 1종, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 균주가 1종, *Lactobacillus plantarum* 1종, *Lactobacillus curvatus* ssp. *curvatus* 1종, *Lactobacillus fermentum* 1종, *Streptococcus macedonicus* 균주가 2종으로 나타났다.

4. 골세포계 골강화 활성 구축 및 기초 시험

가. 시료의 세포 생존능 측정

인체 유사 조골세포주인 Saos-2 cell에 대해 대두 추출물과 vitamin D₃를 농도별로 조제한 다음 이들의 세포 증식능을 측정하기 위해 MTT assay로 검색한 결과 Saos-2 cell 시험계에서 대두추출물과 vitamin D₃의 세포증식능은 농도에 따라 100% 이상의 정상 증식능을 양호하게 나타내었다. 농도별 증식능은 1×10⁻⁴ mg/ml 농도에서 최고 증식능을 나타내었으며 농도 증가에 따라 감소하는 경향을 보였다.

나. Sample의 Alkaline phosphatase(ALP) 활성 측정

Saos-2 cell 시험계에서 ALP 활성은 대두추출물은 1×10⁻³ mg/ml 농도에서, vitamin D₃는 1×10⁻⁴ mg/ml 농도에서 가장 높은 ALP 활성을 나타내었으며 농도 증가에 따라 감소하는 경향을 보였다. 양성대조구의 조골세포 증식능은 식품유래 대두추출물이 vitamin D₃보다 모든 농도에서 높은 경향을 보였으며 특히 1×10⁻³ mg/ml 농도에서 대두추출물은 vitamin D₃보다 1.5배 이상 높은 ALP 활성을 나타내었다.

5. 선발 젖산균의 특성조사

1차년도에서 비타민 K₂ 함량이 높은 균주 13종 중 산 생성 속도와 비타민 K₂ 함량을 감안하여 4종의 젖산균(*L. fermentum* 272, *E. durans* 581, *S. macedonicus* 301, *S. macedonicus* 351)을 선발하여 특성조사를 실시하였다.

4종 모두 최적 성장조건은 40℃로 나타났으나 산 생성 속도가 비교적 완만한 편이었다. *L. fermentum* 272 균주는 Gentamycin과 Polymyxin B에 대하여, *Enterococcus durans* 581 균주는 Streptomycin, Penicillin-G에 대해, *Streptococcus macedonicus* 301 균주와 *Streptococcus macedonicus* 351는 앞 선 두 균주에 비해 전반적으로 내성이 약한 편이었고, 다만 Vancomycin에 대해 내성이 강한 것으로 나타났다. *Streptococcus macedonicus* 균주 두 균주 간에는 *Streptococcus macedonicus* 351균주가 내성이 강한 편이었다. 4종의 젖산균은 α-galactosidase, β-glucuronidase, β-glucosidase 및 N-acetyl-β-glucosaminidase 등의 효소에 대해 활성이 없는 반면 Leucine arylamidase 및 Acid phosphatase에 대해 높은 효소활성을 가지는 것으로 나타났다. 특히 젖산균 4종 모두 Benzopyrene을 발암성 물질로 전환시키는 발암효소인 β-glucuronidase의 경우에는 효소활성이 없는 것으로 나타나 안전성을 확인할 수 있었으며, *Streptococcus macedonicus* 301 균주를 제외하고는 담즙내성이 있었다. 4 균주 공히 pH 2와 pH 3의 증류수에서도 3시간까지 생존률에 큰 영향이 없는 것으로 나타나 pH 내성이 있었다. 4종의 젖산균 중 *Streptococcus macedonicus* 301 균주를 제외하고 *Salmonella typhimurium*와 *Staphylococcus aureus*에 대해 항균력이 있는 반면 *Escherichia coli*에 대해 항균력이 없는 것으로 나타났다. 균주를 동결건조하여 균 활력시험 결과 동결에 의한 영향이 없는 것으로 나타났다.

6. 젖산균주의 최적비타민 K₂ 생산 조건 확립

선발 젖산균의 특성조사를 통해 4종의 젖산균 중 담즙내성이 약한 *Streptococcus macedonicus* 301 균주와 비타민 K₂ 함량이 낮은 *E. durans* 581균주를 배제하고 *L. fermentum* 272 균주와 *S. macedonicus* 351 균주를 대상으로 최적 생산조건을 확립하였다.

탄소원은 *Lactobacillus fermentum* 272 균주의 경우 D-Galactose, D-Glucose, D-Fructose, D-Mannose를, *Streptococcus macedonicus* 351 균주는 D-Galactose, D-Glucose, D-Fructose, D-Mannose, Sorbitol을 선정하였고, 질소원은 ISP, Yeast extract, Soy milk를 선정하였으며, 미량원소는 KH₂PO₄, MgSO₄·7H₂O, FeSO₄·7H₂O, MnSO₄·4H₂O, CaCl₂를 선정하였다.

Lactobacillus fermentum 272 균주는 skim milk 10%를 Base로 하고 여기에 질소원 중에서 ISP 1.0% 첨가했을 때 비타민 K₂ 함량이 65 μ g/L으로 가장 높은 함량을 보였고, Soy milk 1.0%도 대조구보다 높은 56.59 μ g/L 값을 나타내었다. 탄소원 중에서는 Ribose 1%일 때 25.45 μ g/L을, 미량원소 중에서 KH₂PO₄이 39.55 μ g/L 값을 나타내었다. *Streptococcus macedonicus* 351 균주는 대조구인 배합 배지가 가장 높은 16.11 μ g/L 값을 나타내었다.

최적 생산조건으로 *Lactobacillus fermentum* 272 균주는 ISP 1.0%, Ribose 1%, KH₂PO₄ 0.2%를 함유한 skim milk 10% 배지에 1% 접종하였고, *Streptococcus macedonicus* 351 균주는 yeast extract 0.5%, CaCl₂ 0.2%, L-cysteine · HCl 0.03%를 함유한 skim milk 10% 배지에 1% 접종하여 40℃에서 6시간 간격으로 비타민 K₂ 함량, pH 및 젖산균수의 변화를 측정하였을 때 *L. fermentum* 272 균주는 발효 유 관능적 최적 pH가 4.3을 감안할 때 대략 배양 23시간, 80 μ g/L으로 예측되었으며, *S. macedonicus* 351 균주는 24시간, pH 4.5일 때 비타민 K₂ 함량이 13.95 μ g/L이었다.

7. 세포계 골 강화 활성 검증 및 이화학적 특성

가. 세포계 골 강화 활성 검증

Lactobacillus fermentum 272와 *Streptococcus macedonicus* 351 이용한 발효유의 세포증식효과는 각각 1 \times 10⁻⁸mg/ml~1 \times 10⁻¹mg/ml에서 증식능이 농도에 비례하여 대조구의 103~110%와 99~119%를 나타내었다. 식품 Positive control인 대두추출물보다는 세포증식 면에서 다소 떨어졌으나, 농도 전반에 걸쳐 세포증식 경향을 확인할 수 있었다.

Lactobacillus fermentum 272의 경우 ALP 활성이 1 \times 10⁻¹mg/ml에서 101%로 시작하여 증가하다 1 \times 10⁻⁴mg/ml의 농도에서 114%로 최고값을 나타낸 후 차차 감소하여 1 \times 10⁻⁸mg/ml에서 101%에 도달하였다. *Streptococcus macedonicus* 351의 경우 ALP 활성이 1 \times 10⁻¹mg/ml에서 100%로 시작하여 증가하다 1 \times 10⁻⁴mg/ml의 농도에서 109%로 최고값을 나타낸 후 차차 감소하여 1 \times 10⁻⁸mg/ml에서 103%에 도달하였다.

대두추출물보다 다소 낮은 값을 나타냈지만 비타민 1,25(OH)₂D₃와는 비슷한 경향을 보였고 시판발효유보다는 다소 높은 값을 나타내었다.

나. 골 강화 성분의 이화학적 특성

온도에 따른 골세포 활성화 변화를 보면 *Lactobacillus fermentum* 272와

Streptococcus macedonicus 351를 이용한 발효유는 살균온도를 80℃~90℃, 가열시간을 5~30분으로 증가시켰을 때 90℃에서 30분 열처리한 조건이 ALP 효소 활성이 유지됨을 관찰할 수 있었다.

pH에 따른 골세포 활성화 변화를 보면 *Lactobacillus fermentum* 272를 이용한 발효유는 pH 2에서 102%의 증식능을 보였고, pH 7에서 107%, pH 10에서는 99%의 세포증식을 나타내었다. *Streptococcus macedonicus* 351을 이용한 발효유는 pH 2에서 105%의 증식능을 보였고, pH 7에서 119%, pH 10에서 102%의 증식능을 보였다. *Lactobacillus fermentum* 272와 *Streptococcus macedonicus* 351를 이용한 발효유는 pH 변화에 따라 증식능이 유지됨을 알 수 있었다.

Lactobacillus fermentum 272를 이용한 발효유의 pH에 따른 ALP 효소 활성도는 pH 2에서 99%, pH 7에서 126%, pH 10에서 100%인 반면 *Streptococcus macedonicus* 351을 이용한 발효유는 pH 2에서 92%, pH 7에서 114%, pH 10에서 91%로서 pH 변화에 따라 약간의 변화가 있었지만 대조구 대비 90%이상의 활성도를 보였다.

Lactobacillus fermentum 272와 *Streptococcus macedonicus* 351를 이용한 발효유 모두 pH의 변화에서 ALP 효소 활성도를 유지하여 체내활성의 가능성을 확인할 수 있었다.

8. 최적 배합조성물 개발

개발제품의 배합비를 보면 *Lactobacillus fermentum* 272 균주(또는 ABT-D 균주와 1:1로 혼합)를 이용한 제품의 경우, 원유 78.76%, 탈지분유 3.24%, ISP 0.83%, KH₂PO₄ 0.17%, 올리고당 2.0%, 과당 5.0%, 딸기잼(45%) 10%이었다. *Lactobacillus fermentum* 272, *Streptococcus macedonicus* 351, ABT-D 균주를 35:35:30 비율로 혼합배양한 발효유의 경우 원유 79.15%, 탈지분유 3.24%, yeast extract 0.415%, CaCl₂ 0.166%, L-cysteine · HCl 0.025%, 올리고당 2.0%, 과당 5.0%, 딸기잼(45%) 10%이었다.

9. 제조공정 설정 및 이화학적 특성조사

가. 제조공정 설정

1) *Lactobacillus fermentum* 272 균주와 ABT-D 균주를 혼합하여 제조된 발효유 원유 94.89%, 탈지분유 3.91%, ISP 1.0%, KH₂PO₄ 0.2%를 첨가하고 65℃에서 배합하여 완전히 녹인 후 90℃에서 5분간 살균하였으며, 40℃로 냉각시킨 다음 *Lactobacillus fermentum* 272 균주와 상업균주 ABT-D 균주를 0.5% 씩 1.0%(v/v)

로 접종하고, 최종 pH 4.4으로 감소할 때까지 배양한 액(전체의 83%)에 딸기잼 10.0%, 올리고당 2%, 액상과당 5%를 첨가하고 교반하여 호상발효유를 제조하였다.

2) *L. fermentum* 272 균주, *S. macedonicus* 351 균주, ABT-D 균주 혼합

원유 95.37%, 탈지분유 3.90%, yeast extract 0.5%, CaCl₂ 0.2%, L-cysteine · HCl 0.03%를 첨가하고 65°C에서 배합하여 완전히 녹인 후 90°C에서 5분간 살균하였으며, 40°C로 냉각시킨 다음 *Lactobacillus fermentum* 272, *Streptococcus macedonicus* 351, ABT-D 균주를 35:35:30 비율로 1.0%(v/v)로 접종하고, 최종 pH 4.4으로 감소할 때까지 배양한 액(전체의 83%)에 딸기잼 10.0%, 올리고당 2.0%, 액상과당 5.0%를 첨가하고 교반하여 호상발효유를 제조하였다.

나. 이화학적 특성조사

L. fermentum 272 균주와 ABT-D 균주를 혼합하여 제조된 발효유 제품과 *L. fermentum* 272, *S. macedonicus* 351와 ABT-D 균주를 혼합하여 제조된 발효유 제품 공히 적정산도가 0.12%이었고 성분을 보면, 각각 무지유고형분 9.87%와 9.91%, 유지방 3.12%와 3.08%, 젖산균수 1.4x10⁹ CFU/mL와 1.6x10⁹ CFU/mL, 비타민 K₂ 함량은 53.1µg/L와 38.8µg/L이었다.

10. 동물모델을 이용한 발효유의 골강화 활성 및 성분 특성

비타민 K₂ 생산 젖산균으로 제조된 발효유가 골 강화 효능이 있는지 알아보기 위하여 암컷 Sprague-Dawley 랫트를 대상으로 탈지유를 급여한 위군(sham)과 탈지유를 급여한 대조군(control), *Lactobacillus fermentum* 272 균주를 이용한 발효유(A), *Lactobacillus fermentum* 272와 ABT-D 균주를 50:50으로 혼합 배양한 발효유(B), B에 vitamin D₃ 0.1µg/랫트 kg 첨가한 발효유(C), *Lactobacillus fermentum* 272, *Streptococcus macedonicus* 351, ABT-D 균주를 35:35:30 비율로 혼합배양한 발효유(D), D에 vitamin D₃ 0.1µg/랫트 kg 첨가한 발효유(E), 상업균주(ABT-D)를 이용한 발효유(F) 등 8군으로 나누었으며 경구투여 방법을 선택하여 각각의 발효유를 랫트 위내로 5ml/kg/day를 2회 나누어 직접 투여하였다.

체중 증가량은 control 군이 가장 높았고 처리군과 sham 군 순이었다. 총식이섭취량과 한주(one week) 간의 식이 섭취량도 같은 경향을 보였다. 식이효율 (FER: Food efficiency ratio)은 sham군이 다른 처리군 간에 유의차가 있었지만, control군과 처리군 간에는 유의차가 없었다. 발효유 투여 후 6주령에 안락사 시킨 랫트의 간 무게는 난소 절제군이 sham 군보다 높게 나타났으나 신장의 경우 유의차가 없

었다. 자궁의 무게는 sham 군이 가장 높았으며 난소절제군은 약 7배 정도 유의적으로 낮게 나타났다. GOT는 control 군이 가장 낮고 E 군이 가장 높았으나 유의차가 없었다. GPT는 F 군이 가장 낮고 C 군이 가장 높았으나 역시 유의차가 없었다. 혈청 ALP 농도는 C 처리군이 가장 높은 반면 대조군이 가장 낮았으며, 시료 처리군은 sham군에 비해 다소 높았다. 혈청 Osteocalcin은 난소절제인 대조군에 비해 sham군이 다소 높은 경향을 보였으며, B와 C 처리군이 가장 높은 값을 보였고 대조군에 비해 유의성이 있었다.

혈중 칼슘 농도는 난소 절제군이 sham군에 비해 혈청 칼슘농도가 낮았다. 칼슘과 인의 비율에 있어서는 control군이 낮았고, C 군이 가장 높았다. 대퇴골 및 경골의 물리적 변화도 측정에서 sham 군과 시료 처리군 간에 차이가 있었고, 특히 C 처리군이 약간 우수하였다. 대퇴골의 골밀도(bone mineral density)는 sham군과 C 처리군이 가장 우수하였고, 대조군과 F 군이 유의성 있게 가장 낮았다. 경골의 골밀도는 C 처리군이 sham 군보다 더 높은 값을 얻었고 대조군과 F 군이 가장 낮았으며, 유의차가 있었다. BMC(bone mineral content)는 대퇴골의 경우 C, D, E 처리군이 가장 우수하였고, 대조군과 F 군이 가장 낮았다. 경골의 경우도 C 처리군이 가장 높았고, 대조군과 F 군이 가장 낮았으며, 유의차가 있었다.

이상의 결과를 종합해보면 C 처리군이 골 강화 효과가 있는 것으로 생각되었다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

본 연구에서 분리된 비타민 K₂ 젯산균은 그동안 기능성 있는 외국의 수입종균에 의해 생산되는 발효유를 국내에서 생산함으로써 국제 경쟁력 향상과 동시에 수입대체효과가 있을 것으로 예상된다. 또한 본 연구결과는 참여업체에서 기술이전을 통하여 실용화할 것으로 예상되며, 2건의 특허출원을 통하여 산업재산권을 확보하였고, 한국축산식품학회에 2편 발표하였으며, 논문 2편 게재 중에 있다. 특히 한국축산식품학회 제 43차 정기학술발표대회(2011. 5. 20)에서 우수 포스터상을 수상한 바 있다.

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

SUMMARY

I. Title

Development of fermented milk by using lactic acid bacteria for vitamin K₂

II. Objective of research

The objective of the study was to develop fermented milk containing vitamin K₂, which was isolated from lactic acid bacteria under specific conditions.

III. Research scope and area

1. Collection and isolation of lactic acid bacteria
2. Selection of lactic acid bacteria for vitamin K₂ production
3. Identification of lactic acid bacteria
4. Preparation and assay on human-like Osteoblast cell
5. Characteristics of selected lactic acid bacteria
 - Growth of lactic acid bacteria, antibiotic tolerance, enzyme activity test, bile tolerance, pH tolerance, antibacterial activity
6. Optimization of cultivation condition of lactic acid bacteria for vitamin K₂ production
 - Medium
 - Carbon, nitrogen, and mineral source
 - Fermentation condition
7. Assay on human-like Osteoblast cell and physiochemical properties
8. Development of optimum formula
 - Selection of best materials added to fermented milk
 - Establishment of optimum formula by Sensory test
9. Designing of fermented milk making process and physico-chemical characteristics
 - Establishment of processing technology
 - Vitamin K₂ concentration and analysis of physicochemical ingredients

10. Animal test for the osteoblast cell activity and composition test

IV. Result of research and suggestion of application

1. Collection and isolation of lactic acid bacteria

1) Isolation of lactic acid bacteria from raw milk

Raw milk was collected from several farms under support of Raw milk testing lab. within the jurisdiction of Central, North, Western guidance division (part of Kyoung Gi Do and Gang Won Do)in Seoul Dairy Cooperation, Provincial institute for livestock promotion(Jeonbuk, Kyoungbuk, Jeju). 2173 bacteria were isolated from modified MRS media. 958 bacteria were further isolated after the microbes were inoculated on 10% the reconstituted skim milk followed by incubation at 37°C for 24hr.

2) Isolation of lactic acid bacteria from infant feces

45 new-born infant feces were collected under support of Soon Chun Hyang Hospital and Hangang Sungshim Hospital. 59 bifidobacteria were isolated and 43 coagulated lactic acid bacteria were isolated after incubation at 37°C for 18 and 24hr.

3) Isolation of lactic acid bacteria from adults feces

50 adult feces were collected from staffs and their family members of KFRI. 91 bifidobacteria and 87 lactic acid bacteria were isolated. 41 coagulated lactic acid bacteria were isolated after incubation at 37°C for 18 and 24hr.

4) Collection of lactic acid bacteria having milk coagulation capacity

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

2. Selection of lactic acid bacteria for vitamin K₂ production

167 of vitamin K₂ Positive strain was selected from 1042 of milk coagulating strain and 146 of bifidobacteria through the TLC test of vitamin K₂ positive reaction. Surveying the vitamin K₂ level in Rogosa Medium of selected strains,

154 strain were less than $10\mu\text{g}/\text{Kg}$, 1 strain were less than $10\text{--}20\mu\text{g}/\text{Kg}$, 4 strain were less than $20\text{--}30\mu\text{g}/\text{Kg}$, 6 strain were less than $30\text{--}40\mu\text{g}/\text{Kg}$ and 2 strain were higher than $40\mu\text{g}/\text{Kg}$. On the other hand, the vitamin K_2 level in the skim milk media, 160 strains were less than $10\mu\text{g}/\text{Kg}$, 3 strains were less than $10\text{--}20\mu\text{g}/\text{Kg}$, 3 strains were $20\text{--}30\mu\text{g}/\text{Kg}$ and one strain was higher than $30\mu\text{g}/\text{Kg}$ so that 13 strains were selected.

3. Identification of lactic acid bacteria

Identification of lactic acid bacteria for vitamin K_2 production were *Enterococcus faecalis* 4 strains, *Enterococcus durans* 2 strains, *Enterococcus* sp. 1 strain, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 1 strain, *Lactobacillus plantarum* 11 strain, *Lactobacillus curvatus* ssp *curvatus* 1 strain, *Lactobacillus fermentum* 1 strain, *Streptococcus macedonicus* 2 strains as a result of Gram staining, fractography, sporogenesis, aerobic and anaerobic growth, catalase formation, growth in 15°C and 45°C , gas formation from glucose, ammonia formation from arginine, sugar fermentation test and 16S rRNA sequencing.

4. Preparation and assay on human-like osteoblast cell

1) Cell survival test of sample

Based on the MTT assay of Saos-2 cell, cell increase effect of soybean extract and Vitamin D_3 has shown normal increase rate higher than 100%. The highest cell increasing rate was occurred with the concentration of 1×10^{-4} mg/ml and it was decreased by the increased concentration.

2) Activity of Alkaline phosphatase(ALP) of sample

In the Saos-2 cell test system, the highest ALP activity was occurred with soybean extract of 1×10^{-3} mg/ml concentration and Vitamin D_3 of 1×10^{-4} mg/ml concentration but it was decreased by the increased concentration. The ALP activity of soybean extract with 1×10^{-3} mg/ml concentration was 1.5 times higher than Vitamin D_3 .

5. Characteristics of selected lactic acid bacteria

Based on the speed of acid production and vitamin K_2 , 4 strains of lactic

bacteria has selected and characterized (*L. fermentum* 272, *E. durans* 581, *S. macedonicus* 301, *S. macedonicus* 351). The optimum temperature was 40°C for 4 selected lactic bacteria. *L. fermentum* 272 was weak resistant to the gentamycin and polymyxin B, but *Enterococcus durans* 581 was weak resistant to the streptomycin and penicillin-G, on the other hand, *Streptococcus macedonicus* 301 and *Streptococcus macedonicus* 351 has shown weaker resistance than *L. fermentum* 272 and *Enterococcus durans* 581 but stronger to the vancomycin. Selected 4 strains of lactic bacteria was lack of α -galactosidase, β -glucuronidase, β -glucosidase and N-acetyl- β -glucosaminidase but strong in leucine arylamidase and acid phosphatase activity. especially, 4 strains of lactic bacteria was lack of β -glucuronidase (calcinogene producing enzyme) and resistant to the bile juice except *Streptococcus macedonicus* 301 strain. 4 strains of selected lactic acid bacteria was survive in the low pH 2-3 for 3 hours. 4 selected lactic acid bacteria was resistant to the *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus* except *Streptococcus macedonicus* 301, but not resistant to the *Escherichia coli*. Based on the activity test of freeze dried lactic bacteria, there was no influence of freeze drying process.

6. Optimization of cultivation condition of lactic acid bacteria for vitamin K₂ production

Optimum production condition of vitamin K₂ by *L. fermentum* 272 and *S. macedonicus* 351 was established by the removing *Streptococcus macedonicus* 301 *E. durans* 581 strain.

D-Galactose, D-Glucose, D-Fructose, D-Mannose were selected carbon source of *Lactobacillus fermentum* 272 and D-Galactose, D-Glucose, D-Fructose, D-Mannose, Sorbitol were the selected carbon source for the *Streptococcus macedonicus* 351. ISP, Yeast extract, Soy milk were the selected nitrogen source and KH₂PO₄, MgSO₄ · 7H₂O, FeSO₄ · 7H₂O, MnSO₄ · 4H₂O, CaCl₂ KH₂PO₄, were selected as a minor components. The highest vitamin K₂ production of *Lactobacillus fermentum* 272 strain to 65 μ g/L was available in the 10% skim milk and 1% ISP media but 56.59 μ g/L was possible in the 1% soy milk media.

In the 1% ribose, the vitamin K₂ level was 25.45 μ g/L and in the KH₂PO₄ the vitamin K₂ level was 39.55 μ g/L. 1% *Lactobacillus fermentum* 272 was inoculated

in 10% skim milk containing 1% ISP, 1% Ribose, 0.2% KH_2PO_4 and 1% *Streptococcus macedonicus* 351 was inoculated in 10% skim milk containing 0.5% yeast extract, 0.2% CaCl_2 , 0.03% L-cysteine · HCl and incubated at 40°C for 6 hours to check the vitamin K_2 level and pH. *L. fermentum* 272 produced 80 $\mu\text{g/L}$ of vitamin K_2 at pH 4.3 for 23 hours incubation and *S. macedonicus* 351 produced 13.95 $\mu\text{g/L}$ of vitamin K_2 at pH 4.5 for 24 hours incubation.

7. Assay on human-like osteoblast cell and physiochemical properties

1) Assay on human-like Osteoblast cell activity

The osteoblast cell activity of fermented milk produced by *Lactobacillus fermentum* 272 and *Streptococcus macedonicus* 351 was $1 \times 10^{-8} \text{mg/ml} \sim 1 \times 10^{-1} \text{mg/ml}$ and it was 103~110% and 99~119% compared to the control. The ALP activity of *Lactobacillus fermentum* 272 was started with 101% at $1 \times 10^{-1} \text{mg/ml}$ and maximized to 114% at $1 \times 10^{-4} \text{mg/ml}$ and then reached to 101% at $1 \times 10^{-8} \text{mg/ml}$. The ALP activity of *Streptococcus macedonicus* 351 was started with 100% at $1 \times 10^{-1} \text{mg/ml}$ and maximized to 109% at $1 \times 10^{-4} \text{mg/ml}$ and then reached to 103% at $1 \times 10^{-8} \text{mg/ml}$. It is lower than soybean extract, higher than commercial fermented milk and similar to the $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.

2) Physiochemical properties

The ALP activity of fermented milk produced from *Lactobacillus fermentum* 272 and *Streptococcus macedonicus* 351 was maintained by the pasteurization at 90°C for 30 minutes. The osteoblast cell activity of fermented milk produced by *Lactobacillus fermentum* 272 at pH 2, pH 7 and pH 10 was 102%, 107% and 99% respectively. The osteoblast cell activity of fermented milk made with *Streptococcus macedonicus* 351 at pH 2, pH 7 and pH 10 was 105%, 119% and 102% respectively. The osteoblast cell activity of fermented milk made with the mixture of *Lactobacillus fermentum* 272 and *Streptococcus macedonicus* 351 at various pH was maintained. The ALP activity of fermented milk made with *Lactobacillus fermentum* 272 at pH 2, pH 7 and pH 10 was 99%, 126% and 100%, respectively. On the other hand, the ALP activity of fermented milk made with *Streptococcus macedonicus* 351 at pH 2, pH 7 and pH 10 was 92%, 114% and 91%, respectively. And it is more than 90% activity compared to the

control. The ALP activity of fermented milk made with the mixture of *Lactobacillus fermentum* 272 and *Streptococcus macedonicus* 351 maintained at all pH range and it may be possible to maintain in the human activity.

8. Development of optimum formula

In case of *Lactobacillus fermentum* 272 strain, the optimum formula was 78.76% of raw milk, 3.24% of skim milk, 0.83% of ISP, 0.17% of KH_2PO_4 , 2% of oligosaccharide, 5% of fructose and 10% of strawberry jam(45%). In case of mixed strain of *Lactobacillus fermentum* 272, *Streptococcus macedonicus* 351, ABT-D strain, the optimum formula was 79.15% of raw milk, 3.24% of skim milk, 0.415% of yeast extract, 0.166% of CaCl_2 , 0.025% of L-cysteine · HCl 0.025%, 2% of oligosaccharide, 5% of fructose and 10% of strawberry jam(45%).

9. Designing of fermented milk making process and physico-chemical characteristics

A. Production process

1) Fermented milk made by mixture of *Lactobacillus fermentum* 272 and ABT-D

Gel type yoghurt was produced by inoculation of 0.5% of *Lactobacillus fermentum* 272 and 0.5% of ABT-D in the 94.89% of raw milk containing 3.91% of skim milk, 1% of ISP, 0.2% of KH_2PO_4 2% that has pasteurized at 90°C for 5 minutes and controlled to 40°C and fermented to pH 4.4 followed by the addition and agitation of 10.0% of strawberry jam, 2% of oligosaccharide and 5% of liquid fructose.

2) Fermented milk made by mixture of *L. fermentum* 272, *S. macedonicus* 351 and ABT-D

Gel type yoghurt was produced by inoculation of 1% mixture of *Lactobacillus fermentum* 272, *Streptococcus macedonicus* 351 and ABT-D with the rate of 35:35:30 in the 95.37% of raw milk containing 3.90% of skim milk, 0.5% of yeast extract, 0.2% of CaCl_2 , 0.03% of L-cysteine · HCl that has pasteurized at 90°C for 5 minutes and controlled to 40°C and fermented to pH 4.4 followed by the addition and agitation of 10.0% of strawberry jam, 2% of oligosaccharide and 5% of liquid fructose.

B. Physico-chemical properties

The titrable acidity, SNF, fat content, cell density and Vitamin K₂ level of yoghurt of 2 strain mixture (*L. fermentum* 272 and ABT-D) was 0.12%, 9.8%, 3.12%, 1.4×10^9 CFU/mL and $53.1 \mu\text{g/L}$, respectively, on the other hand. 3 strain mixture (*L. fermentum* 272, *S. macedonicus* 351 and ABT-D) was 0.13%, 9.91%, 3.08%, 1.6×10^9 CFU/mL and $38.8 \mu\text{g/L}$, respectively.

10. Animal test for the osteoblast cell activity and composition test

To understand the osteoblast cell activity of fermented milk 8 kinds of treatment was tried to the Sprague-Dawley rat. The treatment was 1) sham group fed with skim milk, 2) control fed with skim milk 3) treatment fed with fermented milk made with *Lactobacillus fermentum* 272(A) 4) treatment fed with fermented milk made with *Lactobacillus fermentum* 272 and ABT-D by 50:50 ratio(B) 5) treatment fed with fermented milk 4 mixed with vitamin D₃ $0.1 \mu\text{g/rat kg}$ (C) 6) treatment fed with fermented milk made with *Lactobacillus fermentum* 272, *Streptococcus macedonicus* 351, ABT-D with the ratio of 35:35:30(D) 7) treatment fed with fermented milk 6 mixed with vitamin D₃ $0.1 \mu\text{g/rat kg}$ (E) 8) treatment fed with fermented milk made with commercial starter culture ABT-D(F). Each meal was fed with artificially to the stomach with the volume of 5ml/kg/day, 2 times every day.

Highest body weight increase was found in the control followed by treatment and sham. total intake and weekly intake of feed was same trend. FER (Food Efficiency Ratio) of sham group and other treatment was significantly different but control group. After 6 months of fermented milk feeding, liver weight of artificially dead group was heavier than the sham group but no differences in the weight of kidney. The uterus weight of sham group was the heaviest but ovary removed group was significantly light.

In case of GOT, there was no significant difference but lowest in control and highest in E group. In case of GPT, there was no significant difference but lowest in F group and highest in C group. On the blood ALP, lowest in control group and highest in C group. In the blood serum osteocalcin, sham group was higher than control group. B and C group was highest and control group was lowest significantly.

Calcium concentration of blood in every removed group was lower than sham group. The ratio of calcium and phosphorus in control group was low and highest in the C group. In case of physical changes of femur and neck bone, sham group and treatment group has differences, especially C group was excellent. The bone mineral density of femur of sham group and C group was excellent but low in the control and F group significantly. The bone mineral density of neck bone of C group was higher than sham group and control group and F group was low significantly. In case of bone mineral content of femur, group C, D, E was excellent but low in control and group F. In case of bone mineral content of neck bone, C group was highest and control and F group was lowest significantly.

Based on the previous results, it is conclude that the group C has osteoblast cell activity

V. Results Achievements and Their Application Plans

Lactic acid bacteria for vitamin K₂ production obtained from this study would contribute to strengthen international competitiveness as well as import substitute effect. Also, results of this study could be industrialization through a technology transfer to participated company. The result of this study has applied 2 patents and presented 2 times and in publishing 2 papers in the Korean journal of food science of animal resources. Especially this presentation received excellent prize in the 43th annual meeting of Korean Sdciety of Food Science of Animal Resources.

To commercialize obtained lactic acid bacteria, freeze dried powder type product need to be developed and also activity should be sustained. When we obtain satisfied product, company could start to manufacture the commercial product. So we are planning to cooperate with company until company can produce commercial product.

CONTENTS

Chapter 1. Outlines of the Project	21
Chapter 2. R & D status of Domestic and Overseas	22
1. Market trend of fermented milk	22
2. Art status of domestic and abroad	24
Chapter 3. Contents of the Project and Its Results	30
1. Materials	30
2. Methods	31
3. Results and discussion	49
a. Isolation and collection of lactic acid bacteria	49
b. Selection of lactic acid bacteria for vitamin K ₂ production	50
c. Identification of lactic acid bacteria	89
d. Preparation and assay on human-like osteoblast cell	93
e. Characteristics of selected lactic acid bacteria	95
f. Optimization of cultivation condition of lactic acid bacteria for vitamin K ₂ production	110
g. Assay on human-like osteoblast cell and physiochemical properties	115
h. Development of optimum formula	119
i. Designing of fermented milk making process and physico-chemical characteristics	121
j. Animal experiments	125
Chapter 4. Goal Accomplishment and Substantial Contributions	134
Chapter 5. Result Achievements and Their Application Plans	136
Chapter 6. Overseas informations on Science and Technology during the Project Years	137
Chapter 7. References	145

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	21
제 2 장 국내외 기술개발 현황	22
제 1 절 발효유의 시장현황	22
제 2 절 국내외 기술 현황	24
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	30
제 1 절 재료	30
제 2 절 방법	31
제 3 절 연구결과 및 고찰	49
1. 젖산균 분리 및 수집	49
2. 비타민 K ₂ 생산 균주 선발	50
3. 선발 젖산균주 동정	89
4. 골세포계 골강화 활성 구축 및 기초 시험	93
5. 선발 젖산균의 특성조사	95
6. 젖산균주의 최적비타민 K ₂ 생산 조건 확립	110
7. 세포계 골 강화 활성 검증 및 이화학적 특성	115
8. 최적 배합조성불 개발	119
9. 제조공정 설정 및 이화학적 특성 조사	121
10. 동물모델을 이용한 발효유의 골강화 활성 및 성분 특성	125
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	134
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	136
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	137
제 7 장 참고문헌	145

제 1 장 연구개발과제의 개요

최근 사회의 다변화, 고령화 및 소비자의 다양한 욕구증대 등으로 인하여 세분화된 소비계층을 겨냥한 신제품들이 판매되고 있으나 제품의 라이프사이클이 크게 줄어드는 경향을 보이고 있다. 건강기능식품 시대의 도래와 함께 첨단 기능성 소재들이 등장됨에 따라 유업계에서도 이들 소재를 응용한 연구개발과 공정개선을 통한 신제품을 출시하고 있다. 국민건강보험공단 건강보험정책연구원이 2005년부터 2009년까지 건강보험 진료비를 분석한 바에 따르면 ‘골다공증질환’의 건강보험 진료환자가 2005년 45만명에서 2009년 74만명으로 나타나 최근 4년 간 연평균 13%씩 증가하고 있는 것으로 나타났다. 여성이 남성보다 13.1배 많았으나 남자환자는 4년 간 2배 이상 증가하는 추세다. 일반적으로 중장년의 여성들은 폐경기에 즈음하여 난소의 기능이 저하되면서 여성호르몬 에스트로겐의 분비가 급격히 감소한다. 따라서 여성이 폐경기를 맞게 되면 뼈의 칼슘 용출이 제대로 제어되지 않아 칼슘이 과도하게 용출된다. 또한 나이가 들면 소화기능이 약해져 칼슘을 섭취해도 흡수가 제대로 되지 않아 더욱 뼈에서 칼슘 용출량이 급격히 늘어나게 되어 결국 골다공증이 나타나게 되는 것이다. 골다공증 치료분야의 세계시장은 2007년 92억 달러이며, 주요 7개국가(미국, 일본, 5EU)의 시장규모는 76억달러로서, '09년 매출규모는 미국 36억 달러, 일본 14억달러, 5EU 18억달러 순이었다. 국내 골다공증 치료제 시장은 2007년 기준 1,300억원의 시장을 형성하고 있으며, 향후 3년간 연평균 34% 성장 증가추세에 있다. 골다공증의 약물요법으로는 L-Ca-Asparaginate, Ca-gluconate, Ca-Lactase 등 뼈에 칼슘을 보충해 주는 칼슘제제, 노인의 골다공증에 유효한 Calcitol, Calcitriol 같은 Vitamin D 제제, 호르몬 보충요법인 Estrogen 제제, 뼈에 칼슘을 운반하는 호르몬인 Calcitonin의 칼시토닌제제, Ipriflavone 유도체 등이 있으며 세계적으로 MSD의 포사맥스(비호르몬성 골다공증 치료제로 Bisphosphonate제제)와 릴리의 에비스타가 최근 가장 많이 쓰이는 약물이다. 그러나 이러한 약물들은 부수적으로 부작용이 동반됨으로 대체제로서 젯산균 및 이를 이용한 제품이 질병예방의 대안이 될 수 있으리라 예상된다. 따라서 비타민 K₂를 생산하는 젯산균으로 발효유나 치즈를 생산하게 되면 골다공증을 예방하고 더 나아가 약물복용의 대체제로서 이용 가능성이 높다고 하겠다.

이에 따라 본 연구를 통하여 비타민 K₂를 생산하는 젯산균을 이용한 발효유를 개발하여 국내 원유 소비 촉진 및 국제경쟁력을 향상시킴으로써, 국내 원유를 이용한 유 및 유제품의 시장을 확보하는 것이 급선무로 보여 진다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절. 발효유의 시장 현황

1. 낙농산업의 현황

현재 국내 낙농산업은 시유 생산에 국한되어 있는 상황에서 출산율의 저하로 인한 음용 인구감소, 차음료 소비강세, 국제 곡물가 인상, 원유대 인상 및 구제역 파동 등으로 시유의 소비량 및 생산량이 감소 또는 정체되는 추세이다.

표 1. 낙농산업 동향

구 분	2006	2007	2008	2009	2010
원유생산량(톤)	2,176,340	2,187,824	2,138,802	2,109,591	2,072,694
낙농가 수(호)	8,311	7,835	7,323	6,885	6,472
호당생산량(kg)	261,863	279,237	292,066	306,404	320,256
착유우두수(두)	234,621	227,916	221,337	217,429	208,699
호당착유우두수(두)	28	29	30	32	32

원유생산량은 2007년을 기점으로 약간 하향세를 보이고 있고 낙농가 수와 착유우 두수는 감소세가 뚜렷한 반면 호당 생산량은 증가하고 있다.

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

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

2. 우리나라 발효유 소비 현황

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

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

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

표 2. 발효유(액상,호상) 생산 및 소비 동향

구분		2010	2009	2008	2007	2006	2005	2004
생 산	액상발효유	373,322	268,404	289,227	309,183	330,776	326,755	363,296
	호상발효유	129,282	177,334	165,704	176,035	173,484	155,683	161,175
	수입(액상)	76	65	75	100	118	66	130
	수입(호상)	3	2	0	0	0	2	1
	계	502,683	445,805	455,006	485,318	504,378	482,506	524,602
소 비	액상발효유	367,781	262,908	284,205	303,738	323,999	320,777	356,230
	호상발효유	129,252	177,170	165,643	175,937	173,399	155,756	161,319
	수출(액상)	5,039	5,493	4,875	5,637	6,932	6,488	6,658
	수출(호상)	2	3	0	6	0	0	16
	계	502,074	445,574	454,723	485,318	504,330	483,021	524,223

자료 : 낙농편람(2010, 농림부·낙농진흥회)

국내 발효유 시장은 한국야쿠르트가 절대적인 점유율을 보유하고 있다. 업계자료에 따르면 지난해 유산균 음료시장에서 한국야쿠르트는 42%를 차지하였고, 뒤를 이어 남양유업 15%, 빙그레 11%, 매일유업 10%, 서울우유 6.7%, 푸르밀 5.5%, 다농 2.4%, 기타 7.4%로서 치열한 경쟁을 벌이고 있다. 최근 롯데칠성음료가 발효유 사업에 뛰어들면서 어떻게 지각변동이 일어날지 커다란 소용돌이가 일어날 가능성이 높다.

제 2 절. 국내외 기술 현황

1. 국내 기술 현황

혈액 중에는 혈청 100 ml당 10 mg에 해당하는 극소량의 칼슘이 늘 일정한 농도로 용해되어 있다. 이러한 혈중 칼슘의 항상성은 우리가 식사를 통해 섭취하는 칼슘과 소변, 대변, 땀으로 배출하는 칼슘의 균형을 통해 유지된다. 그런데 칼슘의 섭취나 흡수가 부족해 혈중 칼슘농도가 떨어지게 되면 우리 몸은 부갑상선 호르몬을 분비해 뼈에 있는 칼슘이 용출되어 혈중 칼슘의 항상성을 유지하게 된다.

일반적으로 중장년의 여성들은 폐경기에 즈음하여 난소의 기능이 저하되면서 여성호르몬 에스트로겐의 분비가 급격히 감소한다. 따라서 여성이 폐경기를 맞게 되면 뼈의 칼슘 용출이 제대로 제어되지 않아 칼슘이 과도하게 용출된다. 또한 나이가 들면 소화기능이 약해져 칼슘을 섭취해도 흡수가 제대로 되지 않아 더욱 뼈에서 칼슘 용출량이 급격히 늘어나게 되어 결국 골다공증이 나타나게 되는 것이다. 국내에서는 Pack 등 (2004)의 연구에서 신장이식 후 발생한 골다공증 치료에 있어서 비타민 K₂ 치료는 대퇴부에 발생한 골다공증에 효과적이며, 그 효과 정도는 기존 치료 비타민 D₃와 칼슘제재의 병합투여 효과와 비슷한 정도가 있다고 보고되었고, Huh 등(2005)은 폐경기 여성에서의 비타민 K₂ 단독 투여시 골형성 표지자가 호르몬제 병용투여 보다 통계적으로 유의하게 효과가 있다고 발표하였다. 이는 비타민 K₂가 연질캡셀에 의한 골형성 표지자의 상승이 호르몬에 의한 골형성 표지자의 저하를 충분히 상쇄시킬 수 있음을 입증한 결과이다.

비타민 K₂ 생산균에 관한 연구로는 Lee 등(1998)은 항진균성 항생물질을 생산하는 *Bacillus* sp. LAM 97-44 균주가 *Bacillus*속 세균의 전형적인 isoprenoid 쇠가 7개인 menaquinone(MK-7)을 가지고 있었으며, Kim 등(2009)이 *Lactobacillus casei* 393으로 제조된 발효유가 난소절제 쥐에 급여하였을 때 골 손실 예방효과가 있다고 보고한 바 있다. 비타민 K₂를 생산하는 젖산균에 관한 연구는 전무한 실정이다.

2. 국외 기술 현황

가. 비타민 K의 자연계분포

천연에서는 비타민 K₁(phylloquinone)과 비타민 K₂(menaquinone-n)가 있는데, 비타민 K₁은 식물에서는 녹황색 야채와 해조류에 많이 함유되어 있으며, 비타민 K₂는 주로 미생물에 의해 만들어지고 isophenyl기 측쇄의 길이에 따라 동족체가 존재하여 menaquinone(MK) 1-14로 분류된다(Shearer, 1990).

비타민 K₁은 녹차, 순무, 잎, 브로콜리, 양배추, 상추와 같은 녹색잎이 무성한 채소에 많이 함유되어 있으며, 특히 비타민 K₂는 Natto에 가장 많이 함유되어 있다 (Table 3)(Shearer 등, 1996; Schurgers 등, 1999).

Table 3. Dietary sources of vitamin K

Food source	$\mu\text{g}/100\text{g}$	
	Vitamin K ₁	Vitamin K ₂
Meat	0.5-5	1-30
Fish	0.1-1	0.2-4
Fruit	0.1-3	-
Green vegetable	100-700	-
Grains	0.5-3	-
Natto	20-40	900-1200
Cheese	0.5-10	40-90
Other milk products	0.5-15	0.2-50
Eggs	0.5-2.5	10-25
Margarin and plant oils	50-200	-

- : Not detected

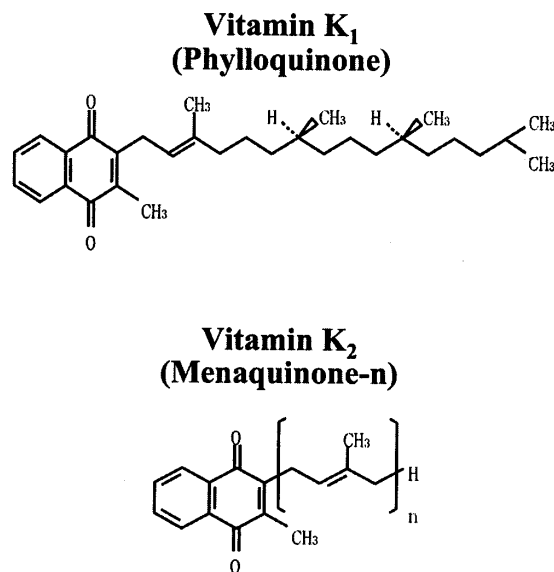


Fig. 1. Chemical structure of vitamin K₁ and K₂(Kaneki 등, 2006)

Table 4. Property of vitamin K

분류	Vitamin K ₁	Vitamin K ₂	Vitamin K ₃
Source	식물에 의해 합성	장내 미생물총에 의해 합성	합성 유도체
효능	섭취 후 1일이면 소실	5일 이상 효능 발휘	vitamin K ₂ 에 비해 2배 이상 활성
분포	상추, 시금치, 브로콜리, 녹차, 순무잎, 양배추	육류, 발효식품, Natto	-
안전성	30mg/day(허용상한 섭취량, 미국, 일본)		
권장량	성인 남성 120 μ g/day, 여성 90 μ g/day		
결핍증	신생아 출혈 - 뇌출혈, 출혈 성향 증가		

2. 비타민 K₂ 생산균 및 함량

Tani 등(1986)은 *Flavobacterium meningosepticum* mutant가 배양액 L당 MK 함량이 34mg이었고, 건조 cell g 당 5.5mg이었다고 하였다. Sato 등(2001)은 natto에서 분리한 *B. subtilis* MH-1와 diphenylamine 내성 돌연변이 균주인 D200-41을 10% 대두추출물, 5% glycerol, 0.5% yeast extract와 0.05% K₂HPO₄(pH 7.3) 배지에 37°C에서 1일 교반 배양 후 45°C 5일 정지 배양했을 때 최대 MK 함량이 60 mg/L 이었다고 하였다. Tsukamoto 등(2001)은 비타민 K₂(menaquinone-7)가 골단백인 osteocalcin의 카르복실화에 중요한 역할을 하며, Natto제품이 다른 식품에 비해 높은 MK7을 함유하고 있다고 하였다. 이들은 *B. subtilis* mutant 균주로 생산된 Natto 제품의 MK7함량이 1719 μ g/100g natto으로서 상업균주로 제조된 natto 제품에 비해 2배 더 높은 함량을 보였다고 하였다. Hojo 등(2007)은 Propionibacteria가 주요 menaquinone(비타민 K₂)인 tetrahydromenaquinone-9(MK-9 (4H))을 생산한다고 밝혔으며, propionibacteria로 발효시킨 치즈 중 Norwegian Jarlsberg 치즈와 에멘탈 치즈가 아펜젤라 치즈나 그루웨어 치즈보다 MK-9 함량이 200-650ng/g으로서 매우 높은 함량을 나타내었다고 하였다.

비타민 K를 생산하는 젖산균에 관한 연구로는 Morishita 등(1999)이 발표하였는데 *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* YIT 2001과 *Leuconostoc lactis* YIT 3001 균주가 환원탈지유나 두유배지에 배양되었을 때 menaquinone(비타민 K₂) 함량이 29-123 μ g/L으로 나타나 유제품이나 기타 식품 발효용 스타터로 사용될 수 있음을 시사하였다. 국내에서는 Lee 등(1998)이 항진균성 항생물질을 생산하는 *Bacillus* sp. LAM 97-44 균주가 *Bacillus*속 세균의 전형적인 isoprenoid 쇄가 7개인 menaquinone (MK-7)을 가지고 있었음을 밝힌 바 있다.

3. 비타민 K₂가 골 대사에 미치는 영향

비타민 K는 혈액응고 인자 내에 glutamic acid를 카복실화(carboxylation)시키고, 골 대사에 있어서 osteocalcin이라는 단백질의 카복실화를 통하여 중요한 역할을 한다(Sadowski 등, 1993; Kohlmeier 등, 1996). 뼈에 존재하는 osteocalcin은 일명 bone Gla(γ -carboxyl- glutamic acid) protein이라고 불리우는 단백질로서 칼슘과 결합할 수 있는 Gla를 3개 포함하고 있는데, 비타민 K가 칼슘이 결합할 수 있도록 보조인자 역할을 한다(Vermeer, 1990; Hauschka 등., 1989). 비타민 K의 부족이나 결핍으로 인하여 카복실화가 되지 않은 오스테오칼신(under carboxylated osteocalcin)은 칼슘과 결합할 수 없으며, under-carboxylation 상태로 혈액 속으로 흘러나오게 된다(Merle and Delmas, 1990). 따라서 혈액 중에 under carboxylated osteocalcin의 증가는 비타민 K의 결핍과 관계되어 있음을 시사하였다(Price, 1988; Vermeer, 1990). 비타민 K와 골 건강에 관한 역학조사(Table 5)와 골에 미치는 영향(Table 6)에 대해 조사한 바에 따르면 비타민 K 결핍은 osteocalcin의 불활성화로 인해 골밀도의 감소를 일으키고 골질의 위험성을 증가시키며, 비타민 K를 낮게 섭취하게 되면 엉덩이 골절 위험성 증가와 밀접한 관계가 있다고 하였다.

Table 5. Epidemiologic Studies of Vitamin K and Bone Health^a

Subjects	Variables Studied	Outcome	Reference
113 postmenopausal women	UcOC, BMD	UcOC and BMD inversely related	Jie et al.(1996)
72,327 women	Vitamin K intake, hip fracture rate, BMD	Vitamin K intake of >109 μ g/day reduced risk of hip fracture by 30%; no correlation between vitamin K and BMD	Feskanish et al. (1999)
888 men and women	Vitamin K intake, hip fracture rate, BMD	65% reduced risk of fractures in highest quartile of vitamin K intake compared with lowest quartile	Booth et al. (2000)
104 elderly women with hip fractures; 255 controls	UcOC, hip fracture rate, BMD	UcOC (not total OC) predicted fracture risk independently of femoral BMD	Vergnaud et al. (1997)
195 elderly women ^b	UcOC, hip fracture rate	Fracture risk 5.9 times higher in women with elevated UcOC at start of study	Szulc et al. (1993)
183 elderly women ^c	UcOC, hip fracture rate	Fracture risk 3.1 times higher in women with elevated UcOC at start of study	Szulc et al. (1996)
212 women	UcOC, BMD	UcOC was independent marker for BMD in women 1 -10 yr postmenopause	Knapen et al. (1998)

^aUcOC = undercarboxylated osteocalcin level, BMD = bone mineral density, OC = osteocalcin level.

^b18-month prospective study.

^cThree-year follow-up study.

Table 6. Intervention Studies of Vitamin K's Effect on Bone Variables^a

Subjects	Treatment	Outcome	Reference
92 postmenopausal women with osteoporosis	Group D: Vitamin D ₃ 0.75 µg/day Group K: Menaquinone 45mg/day Group DK: D and K treatment Group C: Calcium 2 g/day All treatments for 2 yr	BMD improved more in group DK than in group D or group K; increase in lumbar spine BMD significantly greater in group DK than group C	Iwamoto et al. (2000)
219 healthy men and women	Phytonadione 1 mg/day for 2 wk	In all treated groups, mean UcOC decreased from 7.6% to 3.4%; age and sex did not affect the decrease	Binkley et al. (2000)
100 healthy adults	Phytonadione 250, 375, 500, or 1000 µg/day or placebo for 2 wk	Phytonadione 1000 µg/day produced greatest carboxylation of OC	Binkley et al. (2002)
21 healthy older women	Phytonadione 18 µg/day for 4wk, then 86, 200, and 450µg/day, each for 2 wk	Carboxylation of OC not restored by phytonadione 450 µg/day	Booth et al. (2003)
23 postmenopausal women	Phytonadione 80 µg/day, vitamin D ₃ 350 - 400 units/day, both, or placebo for 1 yr	Phytonadione at study dosage needed to attain premenopausal %carbOC	Schaafsma et al. (2000)
46 women with osteoporosis	Menaquinone 45 mg/day for 2 yr	Treated group had fewer new vertebral fractures (13) than placebo group (30)	Shiraki et al. (2000)
20 elderly women with osteoporosis	Calcium 200 mg/day for 2 wk with or without menaquinone 45 mg/day	Menaquinone group had reduction in UcOC without change in OC	Miki et al. (2003)
20 postmenopausal women	Phytonadione 1 mg/day for 2 wk with or without vitamin D ₂ 400 units/day	Carboxylation of OC improved in both groups; vitamin D ₂ had no effect	Douglas et al. (1995)
113 women with fractures and 91 women without fractures	Menaquinone 45 mg/day, vitamin D ₃ 1 µg/day, or both for 4 wk	UcOC decreased in menaquinone groups but not group receiving vitamin D ₃ only	Takahashi et al. (2001)
94 postmenopausal women with osteoporosis (84 controls, 10 treated)	Menaquinone 45 mg/day with either conjugated estrogens 0.625 mg/day or medroxyprogesterone acetate 2.5 mg/day for 1 yr	Menaquinone - hormonal treatment improved BMD that had been decreasing during hormonal treatment alone	Hidaka et al. (2002)

^aBMD = bone mineral density, UcOC = undercarboxylated osteocalcin level, OC = osteocalcin level, %carbOC = percentage of total osteocalcin that is carboxylated.

비타민 K₂는 조골세포를 활성화하고, 뼈의 형성을 촉진하는 역할을 하는데 그 기전은 γ -carboxylase의 cofactor로써 osteocalcin의 glutamine acid residue를 γ -carboxyl glutamic acid를 갖는 γ -carboxylated osteocalcin을 만들고 이는 hydroxyapatite와 결합하여 뼈의 석회화를 촉진한다(Hauschka 등, 1989; Shearer, 1995). Szulc 등(1994)은 혈액의 under carboxylated osteocalcin의 농도가 높은 그룹이 낮은 그룹에 비하여 골밀도가 낮은 것으로 보고하였다. 또한 Lambert 등(1986)과 Sadowski 등(1993)의 연구에서는 혈액내의 비타민 K 농도가 연령과 상관성이 있다고 보고하였다. 위와 같은 연구 결과는 비타민 K가 골밀도에 영향을 미치는 중요한 인자임을 시사하는 것이라고 할 수 있다.

비타민 K₂는 Osteocalcin의 Gla화 이외에도 골 조직에 직접 작용하는 것으로 알려지고 있다. 비타민 K₂ 제제(성분은 비타민 K₂-4)는 골다공증의 골량 및 동통의 개선 약으로서 이미 이용되고 있어 골 작용을 가진 영양소로서 예방차원의 효과도 기대할 수 있다. 효과면에서 현재 효능의약품 용도로 사용하고 있는 menaquinone-4(MK-4)와 비교하여 menaquinone-7(MK-7)에도 비슷한 효과가 있는 것으로 알려져 있는데, In vitro 실험계에서는 MK-4가 가장 활성이 높았지만 in vivo에서는 MK-7과 활성이 비슷한 것으로 보고되고 있다.

또한, 대퇴골 골석환자와 퇴행성 골다공증 환자는 정상인에 비해 혈액 중의 MK-7 농도가 저하되어 있다는 연구보고가 유럽과 일본에서 발표되고 있다. 최근 일본에서 골다공증 환자 17명을 대상으로 임상시험연구에서 비타민 K₂를 1일 45mg 28일간 복용한 결과 비타민 K에 의해 불활성형 Osteocalcin이 현저하게 저하되는 연구결과도 있었다. Kaneki 등(2001)은 natto를 주로 섭취하는 동경지역 일본 폐경기 여성, 거의 섭취하지 않는 히로시마지역 일본 폐경기 여성, 영국에 사는 영국 폐경기 여성을 대상으로 임상실험 결과 혈청 MK-7 농도가 $5.26 \pm 6.13 \text{ ng/ml}$, $1.22 \pm 1.85 \text{ ng/ml}$ 와 $0.37 \pm 0.2 \text{ ng/ml}$ 으로 나타나 natto 섭취가 혈청 MK-7의 함량을 유의하게 증가시키며, 대퇴부 골절의 위험을 줄인다고 하였다. 또한 Tsukamoto 등(2001)은 지원자 48명을 대상으로 3개의 MK-7(865, 1295, 1730 $\mu\text{g}/100\text{g}$)함량이 함유된 natto(50g)를 3 그룹으로 나누어 1일 1회 14일간 섭취하게 한 후 혈청 MK-7을 측정된 결과 natto를 섭취하지 않은 정상인은 발견되지 않았고, 1295 μg 이나 1730 μg MK-7/100g 함유하는 natto를 섭취한 그룹은 혈청 MK-7과 감마 카르복실화된 osteocalcin 농도가 증가하였다고 하였다. natto 내의 MK-7 섭취는 osteocalcin의 감마 카르복실화를 자극함으로써 골 형성에 중요한 역할을 한다고 결론지었다. 역학적으로는 골다공증 환자의 혈중 비타민 K 농도가 정상인 보다 낮으며, Gla화 되지 않은 Osteocalcin의 혈청농도가 높은 고령자의 경우, 골다공증에 걸릴 위험이 높다고 알려져 있다. 또한 natto 소비량과 여성의 대퇴골 분석에 의한 상관관계가 있다는 것이 알려지면서 비타민 K₂, 특히 MK-7의 혈중농도에 차이가 있다는 것이 밝혀져서 MK-7과 골다공증 예방에 관여한다는 것이 알려졌다. 이와 같이 비타민 K₂는 골형성의 촉진과 골흡수 억제 2가지 작용에 의해 칼슘대사를 정상적으로 조절하는 물질로 알려져 있으며, 이외에도 장관으로부터 칼슘의 흡수를 촉진하는 새로운 작용도 보고되고 있다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 재료

1. 원유

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

2. 시유

매일유업에서 제조한 맛있는 우유 GT를 구입하여 사용하였다.

3. 탈지분유

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

4. 액상과당

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

5. 올리고당

CJ(주)에서 제조한 프락토올리고당 55%이상(수분제외)인 제품을 사용하였다.

6. Ribose

태왕물산에서 제조한 D-ribose인 제품을 사용하였다.

7. 분리대두단백(ISP)

분리대두단백은 미국산으로 광일(주)에서 수입한 제품을 사용하였다.

8. 딸기잼

오뚜기(주)에서 제조한 딸기 45%인 제품을 사용하였다.

9. Yeast extract

IC FOOD CO에서 제조한 Yeast extract KA02인 제품을 사용하였다.

10. L-ctsteine

Daebong LS에서 제조한 L-ctsteine HCl H₂O (FOOD)인 제품을 사용하였다.

11. CaCl₂

OCI주식회사에서 제조한 CaCl₂ (식품첨가물)인 제품을 사용하였다.

12. KH₂PO₄

제2인산칼륨은 98%의 함량으로 대영화학(주)에서 제조한 제품을 사용하였다.

13. Vitamin D₃

스위스산으로 대홍약품에서 수입한 제품을 사용하였다.

14. 젖산균 스타터

본 실험에 사용된 균주는 시중 유업체에서 발효유에 사용하는 상업용 균주로서 ABT-D(*Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium longum*, *Streptococcus thermophilus*로 구성된 혼합균주, Groupe Rhone-poulence) 냉동 건조된 균주를 삼익유가공(주)에서 구입하여 사용하였다.

15. 분변

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

16. 세포주

세포 배양 실험에 이용된 인간유사조골세포주인 Saos-2 cell은 한국 세포주 은행에서 분양받아 사용하였다.

제 2 절 방법

1. 젖산균의 분리 및 수집

가. 원유에서 젖산균 분리

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

나. 신생아 분변에서 젖산균 분리

분변시료는 배변 즉시 3시간 이내에 미생물 시험을 실시하였다. bifidobacteria 분리는 채취된 분변을 균일하게 혼합한 후 혐기 희석액으로 $10^3 \sim 10^4$ cfu/ml 수준까지 희석한 후 미리 만들어 놓은 BS agar plate에 희석된 시료 100 μ l를 도말한 후 anaerobic jar에 gas pak을 넣고 37°C에서 3일간 혐기적으로 배양하였다. 분리된 bifidobacteria는 paraffin oil이 중층된 modified BL broth를 사용하여 37°C에서 18~24시간 배양하여 균주를 보관하였다. 젖산균 분리는 modified MRS(glucose→

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

다. 성인 분변에서 젖산균 분리

분변 시료는 배변 즉시 paraffin oil이 증층 된 modified Blood-Glucose-Liver (BL) broth가 담긴 15ml의 멸균된 polypropylene tubes에 넣어 12시간 이내에 미생물 시험을 실시하였다. 채취된 분변으로부터 bifidobacteria 분리 및 젖산균 분리는 신생아 분변과 동일한 실험방법으로 실시하여 bifidobacteria 균주를 수집, 보관하였으며, 젖산균은 37°C에서 18시간 및 24시간 배양하여 응고된 균주를 선발하였다.

2. 비타민 K₂ 생산 균주 선발

가. 시료전처리

분리 선발된 젖산균주는 MRS 액체배지에서 2회 이상 계대 배양하여 활성을 높인 후 Morishita 등(1999)의 방법을 변형하여 만든 modified Rogosa medium (표 7)에 접종하여 30°C에서 48시간동안 배양하였다. 균체는 modified Rogosa medium에서 2,460xg 15분간 원심분리하여 회수하였고, 식염수로 2회 씻어낸 다음 동결 건조하였다. 환원 탈지유(Reconstituted skim milk, 표 8)에 젖산균주를 접종하여 37°C에서 18시간동안 배양 후 회수없이 사용하였다.

Table 7. Composition of modified Rogosa medium

Component	gram/liter
Dextrose	20.0
Trypticase peptone	20.0
Tryptose peptone	3.0
Yeast extract	5.0
Tri-Ammonium citrate	2.0
K ₂ PO ₄	3.0
K ₂ HPO ₄	3.0
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.575
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.034
MnSO ₄ · 4H ₂ O	0.1
L-Cysteine · HCl	0.2
Sodium acetate	1.0
Tween 80	1.0

Table 8. Composition of reconstituted skim milk

Component	gram/liter
Skim milk powder	100.0
Yeast extract	5.0
CaCl ₂	2.0
L-Cysteine · HCl	0.3

나. TLC를 전개시키기 위한 Bacteria cell 및 배양액에서의 비타민 K₂ 추출

동결 건조된 cell이나 배양액 50mg은 암소에서 1시간동안 클로로포름-메탄올 (2:1) 50ml로 2회 추출하였다. 추출물은 4000rpm으로 15분 동안 원심분리하였고, 상층액은 농축하여 건조하였다. 건조된 잔기는 헥산 10ml로 용해시키고, SEP-PAK silica cartridge에 주입하였다.

비타민 K₂는 hexane-diethyl ether(9:1)로 용출하고, 용출액은 질소 흐름 하에서 농축, 건조하였다. 소량의 acetone이나 에탄올을 첨가하여 재 용해시켰다.

다. TLC

추출물은 petroleum ether-diisopropyl ether(9:1) 용매로 silica gel plate상에 전개하였다. 비타민 K₂는 gel-pattern analysis system(spot를 표준 menaquinone-4와 비교)에 의해 확인하였다.

라. HPLC를 이용한 비타민 정량

Tsukamoto 등(2001)의 방법에 따라 그림 와 같이 동결건조된 균체를 증류수 10ml에 1g 넣어 분쇄기(Ultra-Turrax, IKA-WERKE, Germany)를 이용하여 균질하였으며, 환원탈지유 배지에서 배양된 균체는 균질하여 시료로 이용하였다. Filter paper No.2(Whatman, International Ltd, England)에 여과된 용액 5ml를 갈색튜브로 옮기고 동량의 2-propanol 용액을 넣고 15분간 균질하였다. Hexane 6ml를 첨가하고 15분간 균질 및 정치한 후 상등액 4ml를 갈색튜브에 옮긴 다음 추출액은 질소농축하였으며 0.1ml methanol 용액에 용해시켰다. 용해된 용액을 0.45µm cellulose acetate filter(Adantec, Tokyo Roshi Kaishi, Ltd. Japan)에 여과하여 빛이 차단된 튜브에 담아 사용하였다(Fig. 2).

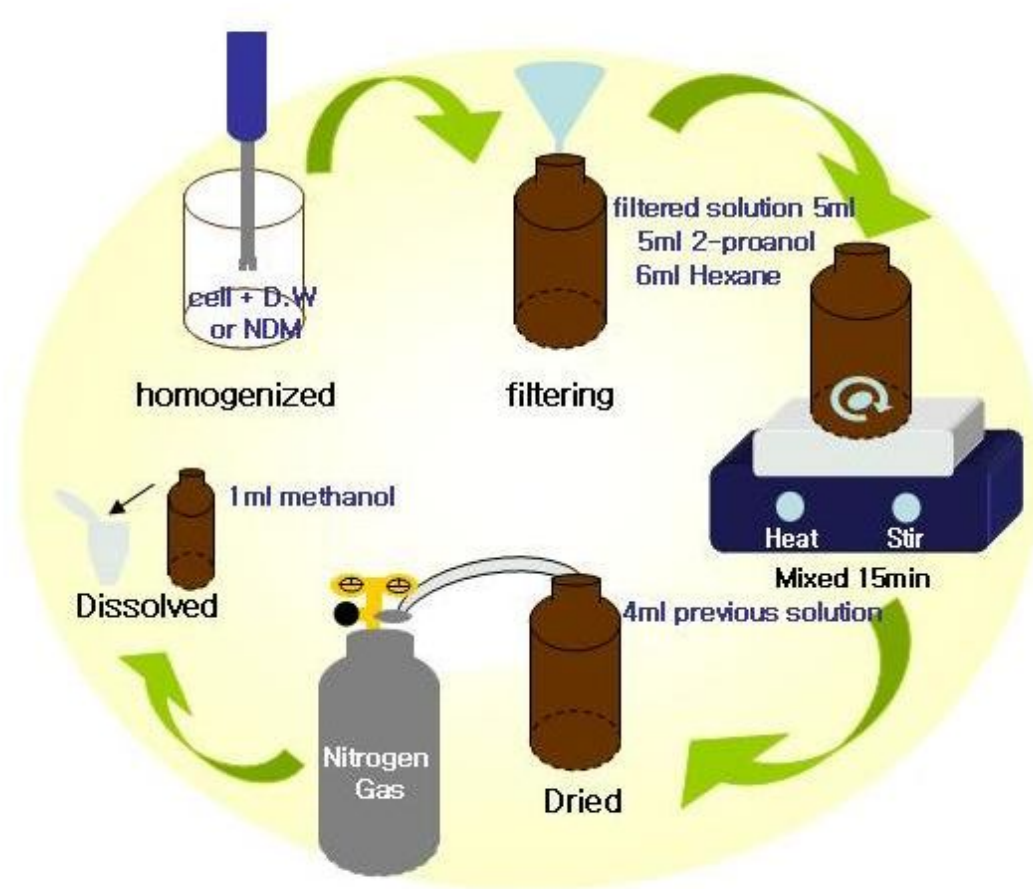


Fig. 2. Preparation of vitamin K₂ from extracts of lactic acid bacteria

표준 비타민 K₂(menaquinone-4, Sigma Chemical, St Louis, MO, USA)는 methanol로 용해 0.1-1.0ppm 범위에서 검량선을 작성하였으며, HPLC는 표 9에 제시된 조건으로 분석하였다.

Table 9. Operation condition of HPLC for the determination of Vitamin K₂ contents

Parameters	Operation conditions
Detector	UV-2075 PLUS (Jasco co., Tokyo, Japan)
UV Wavelength	254nm
Column	Delta pac C18 5 μ 300Å (3.9 \times 150mm) (Waters, Japan)
Mobile Phase	Methyl Alcohol
Oven Temperature	35 $^{\circ}$ C
Flow rate	0.8 ml/min
Injection Volume	20 μ l

마. LC/Mass를 이용한 비타민 K₂ 확인

Vitamin K₂를 분리 동정하기 위하여 ultra performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight(UPLC-Q-TOF)를 사용하였다. UPLC에 장착된 ACQUITY UPLC BHE C₁₈ column (1.7 μ M, 2.1 \times 100 mm)을 methanol로 equilibration시킨 후 시료 8 μ L를 주입하였다. 시료는 methanol로 5분간 flow rate 0.3 mL/min으로 isocratic elution하였다. 분리된 eluent는 photodiode array (PDA)detector를 이용하여 254 nm에서 흡광도를 측정하였으며 연속으로 Q-TOF를 이용하여 mass spectrum를 측정하였다. Q-TOF는 ES-negative 조건에서 분석하였으며 capillary와 sample cone voltage는 각각 2.5과 15 kV이고 source 온도와 desolvation 온도는 각각 110 $^{\circ}$ C, 300 $^{\circ}$ C이며, desolvation과 cone 속도는 각각 700 L/h와 20 L/h 조건에서 수행하였다. precursor 분석을 위한 collision cell energy는 2 V를 사용하였으며 물질 동정 시에는 collision cell energy를 10-30 V로 올리면서 사용하였다. 200 pmole leucine을 lock mass로 사용하였다. 물질의 동정은 elemental composition으로 물질을 1차 screening 한 후 online database (www. chemsider.com)를 이용하여 2차 screening 하였으며 최종 표준물질을 이용하여 동정하고 정량 분석하였다. 시료의 전처리 조건은 HPLC와 동일한 Fig. 2의 방법에서 얻은 시료를 사용하였다.

3. 선발 젖산균주 동정

분리·선정된 젖산 균주는 MRS 액체배지에서 2회 이상 계대 배양하여 활성을 높인 후 실험에 사용하였다. 젖산균의 동정은 Hammes 등(1992)의 방법에 의하여 실시하였다. 순수 분리된 균주는 Gram염색, 포자생성, 호기적 및 혐기적 성장, Catalase생성, 15 $^{\circ}$ C 및 45 $^{\circ}$ C 에서의 성장, glucose로부터 가스 생성, arginine으로부터 ammonia생성, 현미경 관찰과 Lactobacillus 균은 API 50CHL kit(API bioMerieux, France)를, Streptococcus 균은 API Strep20 kit 를 이용하여 당 발효 실험을 실시하였다. 젖산균의 DNA sequence는 universal primer 27F(5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3')와 1492R(5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3')를 사용하였으며, solvent EF-Taq을 사용하여 PCR을 실시하였다. 증폭 과정은 95 $^{\circ}$ C, 15분을 한 후 95 $^{\circ}$ C, 20초; 50 $^{\circ}$ C, 40초; 72 $^{\circ}$ C, 1분30초를 30회 시행하였으며 72 $^{\circ}$ C, 5분으로 마무리 하였다. 서열분석은 PCR product를 solvent PCR purification kit로 purify한 후 ABI 3730XL DNA sequencer로 자동분석 하였다.

4. 세포계 골 강화 활성 구축 및 기초 시험

가. 세포시험용 검액 제조

세포 실험에 positive control로서 대두와 vitamin D₃를 사용하였다. 대두 추출물

은 저분자 및 고분자를 광범위하게 포함하기 위하여 80% ethanol 용액으로 추출하였고 40°C에서 감압농축 시킨 후 동결건조하였다. 본 실험에 사용 시 대두추출물과 vitamin D₃를 DMSO에 용해한 후 농도별로 희석하였으며, DMSO의 최종농도는 0.1% 이하로 하였다.

나. Saos-2 세포의 세포증식 실험

1) Saos-2 세포의 선별 및 세포 배양

인체 조골 유사 세포인 Saos-2 cell은 한국세포주은행(서울)으로부터 분양 받아 사용하였고, 1% penicillin-streptomycin (100 unit/ml, Gibco, BRL, U.S.A)과 10% fetal bovine serum (Gibco, BRL, U.S.A)을 함유하는 RPMI 1640 배지(Gibco, BRL, U.S.A)를 사용하여 5% CO₂가 유지되는 37°C humidified incubator에서 배양하였다.

2) Saos-2 세포의 생존능 측정

세포증식 실험은 Mosmann(1983)의 방법에 따라 96 well plate에 2×10^4 cells/well의 농도로 세포를 분주하고 Dimethylsulfoxide(DMSO, Sigma Chemical Co., Louis, Mo, USA)에 용해한 시료들을 최종농도 $1 \times 10^{-1} \sim 1 \times 10^{-4}$ mg/ml가 되도록 첨가하여 (DMSO 최종농도 : 0.05%) 배양하였다. 72시간 후 MTT(3-[4,5-dimethyl-thiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma Co., U.S.A) solution을 최종농도 0.5 mg/ml가 되도록 첨가하여 4시간 배양한 후 생성된 formazan 결정을 DMSO로 용해시켜 540 nm의 흡광도를 ELISA (Ceres UV 900C, Bio-tech instrument, USA)로 측정하였다.

3) Saos-2 세포에서의 Alkaline phosphatase(ALP) 활성측정

Majeska와 Rodan(1982)의 방법에 따라 무색의 p-nitrophenyl-phosphate를 노란색의 p-nitrophenol과 phosphate로 분해를 촉진시키는 ALP 활성을 측정하였다. 96 well plate에 2×10^6 cells/well이 되도록 분주한 Saos-2 cell에 각 농도별 시료를 첨가하고 48 시간 배양하였다. 배양 후 Ice 상에서 10% Triton x-100/in PBS(final conc.) 5 μ l/well, 1% Triton x-100/in PBS(final conc.) 300 μ l/well를 넣어 용해시킨 후 초음파 분쇄하고 원심분리(14,000 rpm, 20min, 4°C)하였다. 원심분리 후 상층액을 4 μ l씩 96 well plate에 놓고 ALP test kit reagent(Thermo Trace kinetic method kit)를 200 μ l씩 첨가한 후 microplate reader(405 nm)를 이용하여 1분간 반응시킨 후 2분간 측정하여 control % 비로 비교하였다.

5. 선발 젖산균의 특성조사

가. 젖산균의 생장

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

나. 항생제 내성 시험

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

다. 효소활성 시험

MRS 액체배지에서 30℃, 18시간동안 배양한 균주를 생리식염수로 희석하여 $10^5 \sim 10^6$ cfu/ml 수준의 시료를 조제한 후 API ZYM kit(API bioMerieux, France)를 이용하여 30℃에서 5시간 배양한 다음 효소반응 시켰다. 효소활성은 표준색상표를 비교하여 0~5의 수치로 표시하였으며, 대조구 이외의 alkaline phosphatase, esterase(C4), esterase lipase(C8), lipase(C14), leucine arylamidase, valine arylamidase, cystine arylamidase, trypsin, chymotrypsin, acid phosphatase, naphthol-AS-BI-phospho-hydrolase, α -galactosidase, β -galactosidase, β -glucuronidase, α -glucosidase, β -glucosidase, N-acetyl- β -glucosaminidase, α -mannosidase, β -fucosidase 효소의 활성을 측정하였다.

라. 내담증성 실험

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

마. pH 내성 실험

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

바. 항균력 실험

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

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

사. 균주 동결건조(균주활력시험)

젖산균 세포는 균체 회수용 원심분리기 (Domeo Co., Japan)를 16,000 rpm/min으로 회전시켜 cell paste 형태로 회수하였다. 동결보호제로서 glycerol (50ml) + polydextrose(25g)(Food grade, Samyang Co., Korea)으로 배합하여 10% 환원탈지유 500 mL에 첨가한 후 121℃에서 5분간 멸균하여 냉각하였다. 첨가구에 cell paste를 150g 첨가하고 -45℃로 동결한 후 동결건조기(Freeze Dryer, 증발용량 50 kg,

Operon, Korea)에서 냉열기 온도 -50℃, 냉열관 온도 -20℃, 84 mtorr의 진공 하에서 건조하여 FD cell powder를 제조하였다. 균주활력시험을 위해 10% 탈지유에 FD cell powder를 0.1% 접종한 후 40℃에서 18시간 배양한 다음 다시 10% 탈지유 150ml에 1 drop 접종한 후 3시간 간격으로 24시간까지 배양한 각 시료를 0.1% peptone-용액에 희석하여 BCP plate count agar 평판에서 부어 굳힌 후 35℃에서 48시간 배양하여 계수하였고, 시간별로 pH 변화를 측정하였다. 이때 pH는 pH meter(Mettler model 345, England)로 측정하였다.

6. 젖산균주의 최적비타민 K₂ 생산 조건 확립

가. 비타민 K₂ 생산증진 위한 배양조성물 탐색

젖산균 2종의 비타민 K₂ 생산증진 위한 배양조성물 탐색을 위하여 탄소원 선정은 MRS 액체배지에서 40℃, 18시간 배양된 각각의 균주를 MRS 배지 조성 중 Glucose(20g/L) 대신 25종의 탄소원으로 대체 첨가된 MRS 배지에 1% 접종하였고, 40℃에서 18시간 배양한 다음 UV-spectrophotometer를 이용하여 620nm에서 optical density(OD)를 측정 후 선정하였으며, 질소원과 미량원소는 MRS 배지조성, Rogosa 배지조성 및 시중 식용가능한 소재를 감안하여 선정하였다.

나. 탄소원, 질소원, 미량원소별 비타민 K₂ 생산 효율 분석

선발된 젖산균주를 이용하여 skim milk 10%를 Base로 하고 여기에 탄소원, 질소원 및 미량원소별로 첨가한 다음 40℃에서 18시간 또는 24시간 배양한 다음 비타민 K₂ 함량을 측정하였다.

다. 비타민 K₂ 생산증진 위한 발효조건 설정

Lactobacillus fermentum 272 균주는 ISP 1.0%, Ribose 1%, KH₂PO₄ 0.2%를 함유한 skim milk 10% 배지에 1% 접종하였고, *Streptococcus macedonicus* 351 균주는 yeast extract 0.5%, CaCl₂ 0.2%, L-cysteine · HCl 0.03%를 함유한 skim milk 10% 배지에 1% 접종하여 40℃에서 6시간 간격으로 비타민 K₂ 함량, pH 및 젖산균수의 변화를 측정하여 최적의 발효조건을 설정하였다.

7. 세포계 골 강화 활성 검증 및 이화학적 특성

가. 세포계 골 강화 활성 검증

1) 시료의 제조

가) 시료

골강화 세포계 실험을 위한 시료군은 일반식품으로서 골강화 효과가 있는 것으로 알려진 대두(soybean) 추출물, 골다공증시험에서 vitamin 계열의 Positive control로서 사용되는 1,25(OH)₂D₃, A사 발효유, vitamin K₂ 생산 발효유이다.

나) 시료의 확보

Lactobacillus fermentum 272 균주는 ISP 1.0%, Ribose 1%, KH₂PO₄ 0.2%를 함유한 skim milk 10% 배지를 대상으로, *Streptococcus macedonicus* 351 균주는 yeast extract 0.5%, CaCl₂ 0.2%, L-cysteine · HCl 0.03%를 함유한 skim milk 10% 배지를 대상으로 각각 90℃에서 30분간 살균한 후 1% 접종하였고, 40℃에서 18시간 배양하였다. 각각의 발효된 환원 탈지유는 동결 건조하였다.

다) 세포시험용 검액 제조

A사 발효유와 vitamin K₂ 생산발효유를 동결 건조하여 분말을 얻었다. 본 실험에 사용 시 DMSO에 용해한 후 희석하여 농도별로 사용하였고, DMSO의 최종 농도는 0.1% 이하로 하였다.

2) 세포계 골강화 활성 시스템 및 검색

가) 골 활성 세포계 시험법의 구축 및 골강화 활성 검색

(1) 세포 생존능 측정

Mosmann(1983)의 방법에 따라 2×10⁴cells/well이 되도록 조절하여 각 농도별 sample과 함께 96 well plate에 분주하고 2일간 배양하였다. 배양액으로만 세포 배양한 시험군을 대조군으로 하고, sample 군은 농도별(1×10⁻¹~10⁻⁸ mg/ml)로 적용하였으며 positive control로는 vitamin 1,25(OH)₂D₃(Sigma Co., U.S.A), 그리고 식품 자체 control로 대두를 사용하였다. 분석당일 MTT(3-[4,5-dimethyl- thiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma Co., U.S.A) solution(0.5 mg/ml. final conc.)을 well당 20 μl씩 적용시킨 후 4시간동안 배양하고 배양액을 제거한 후 dimethyl- sulfoxide(DMSO)를 150 μl씩 넣어 5분간 방치하면서 MTT formazan을 용해하였으며, 5분후 ELISA reader로 흡광도(540nm, 25℃)를 측정하여 control % 비로 비교하였다.

(2) Alkaline phosphatase(ALP) 활성 측정

인간 유사 조골세포주인 Saos-2 cell에서 조골세포의 활성을 나타내는 지표로 사용되는 Alkaline phosphatase (ALP) 증가활성을 측정하였으며 조골세포에서

ALP의 활성을 증가시키는 것으로 보고된 vitamin 1,25(OH)₂D₃(Sigma Co., U.S.A)와 식품 대두를 positive control로 사용하였다. Majeska와 Rodan(1982)의 방법에 따라 무색의 p-nitrophenyl-phosphate를 노란색의 p-nitrophenol과 phosphate로 분해를 촉진시키는 ALP 활성을 측정하였다. 먼저 MTT 실험과 같이 Saos-2 cell을 2×10⁴ cells/well이 되도록 조절하여 각 농도별 sample과 함께 96 well plate에 분주하고 48 시간 배양하였다. 배양액만으로 한 세포군을 대조군으로 하고 sample 군은 농도별(1×10⁻¹~10⁻⁸ mg/ml)로 적용하였으며, vitamin 1,25(OH)₂D₃, 대두를 positive control로 사용하였다. 배양액은 48시간 배양 후 Ice 상에서 10% Triton x-100/in PBS(final conc.) 5 μl/well, 1% Triton x-100/in PBS(final conc.) 300 μl/well를 넣어 용해시킨 후 sonication(15 sec)하고 원심분리(14,000 rpm, 20min, 4℃)하였다. 원심분리 후 상층액을 4 μl씩 96well plate에 놓고 ALP test kit reagent(Thermo Trace kinetic method kit)를 200 μl씩 첨가한 후 microplate reader(405 nm)를 이용하여 1분간 반응시킨 후 2분간 측정하여 control % 비로 비교하였다.

나. 골 강화 성분의 이화학적 특성

1) 온도에 따른 골세포 활성화 변화

발효유의 골기질 강화 활성성분의 가공 중 안정성을 조사하기 위하여 활성이 높았던 추출물 (1×10⁻⁴ mg/ml)을 대상으로 가열온도와 가열시간에 따른 골세포 증식능과 효소활성도를 조사하였다. 가열온도와 가열시간은 80℃에서 30분, 90℃에서 5분, 90℃에서 30분간으로 하였다.

2) pH에 따른 골세포 활성화 변화

발효유의 뼈기질 강화 성분의 체내활성을 간접 시험하고자 산성(pH 2), 중성(pH 7), 염기성(pH 10) 조건에서 추출물의 pH 변화에 따른 골세포 증식능과 효소활성도를 조사하였다.

8. 제품분석

가. 수분

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

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

W : 시료의 사용량(g)

W₀ : 칭량관의 무게(g)

W₁ : 건조 후 시료가 들어 있는 칭량관의 무게(g)

나. 단백질

시료 0.5-1g을 정확히 달아서 분해촉매제(Kjeltabs auto, Tecator, Sweden) 2 tablets(1 tablet:1.5g K₂SO₄, 7.5mg Se), 진한황산 12ml와 함께 분해플라스크에 넣고 단백질 분해장치(Digestion system 20 1015 digester, Tecator, Sweden)에서 약 350℃로 가열하였다. 분해플라스크의 내용액이 투명해지면 실온으로 생각하고 증류수 75ml로 희석한 후 증류적정장치(Kjeltec Auto 1030 Analyzer, Tecator, Sweden)를 사용하여 0.1N HCl 적정량을 구한 다음 다음과 같은 계산식으로 단백질 함량을 구하였다.

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

f : 0.1N HCl의 보정계수

다. 유지방

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

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

W : 시료의 중량(g)

W₁ : 건조 후 지방수기의 중량(g)

W₀ : 수기중량(g)

라. 회분

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

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

W₁ : 회화 전의 자제도가니의 무게(g)

W₀ : 회화 후의 자제도가니 무게(g)

W : 시료의 사용량(g)

마. 적정산도

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

0.1N NaOH용액 1ml= 0.009g 젓산

$$0.1N \text{ NaOH 적정량(ml)} \times 0.009$$

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

바. 젓산균수

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

사. 관능검사

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

관 능 검 사

날짜 : 년 월 일
성명 :

본 시료는 발효유의 관능평가입니다.

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

----- 채점기준 -----

관능평가기준

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

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

1점:극도로 싫다.

시료번호	색	맛	조직감	종합적기호도	구입의사

9. 동물모델을 이용한 발효유의 골강화 활성 및 성분 특성

가. 실험동물 및 식이

생후 7주령 된 Sprague-Dawley계 암컷 흰쥐(180~200 g)를 (주)한림실험동물(Seoul, Korea)에서 분양 받아 사용하였다. 사육온도는 22±2℃, 습도는 50±5%, 명암 주기는 12시간으로 조절하였고, 1주일간 실험환경에 적응시킨 후 실험 식이를 제공하였으며, 물과 실험 식이(AIN-93M, Table 10)는 자유롭게 섭취하도록 하였다. 실험군은 총 8군으로 탈지유를 급여한 위군(sham)과 탈지유를 급여한 대조군(control), *Lactobacillus fermentum* 272 균주를 이용한 발효유(A), *Lactobacillus fermentum* 272와 ABT-D 균주를 50:50으로 혼합 배양한 발효유 (B), B에 vitamin D₃ 0.1µg/랫트 kg 첨가한 발효유(C), *Lactobacillus fermentum* 272, *Streptococcus macedonicus* 351, ABT-D(상업혼합균주)를 35:35:30 비율로 혼합배양한 발효유(D), D에 vitamin D₃ 0.1µg/랫트 kg 첨가한 발효유(E), ABT-D를 이용한 발효유(F)로 나누었으며 군 당 8마리의 실험동물을 사용하였다. 임상 적용 경로인 경구투여 방법을 선택하여 각각의 발효유를 랫트 위내로 오전과 오후에 걸쳐 각각 500µl씩 직접 투여하였다. 시료용량은 시판되는 드링크 발효유 150ml/성인 체중 60kg을 1일 2회 기준으로 하였다.

Table 10. Composition of the experimental diets(g/kg diets)

Components	Contents
Corn Starch	450
Casein High Nitrogen	140
Sucrose	100
Soybean Oil	40
Fiber Cellulose FCC	50
Ca-Deficient 93M Salt Mix	40
AIN-93Vx Vitamin Mix	10
Dyetrose	150
L-Cystine	5.5
t-BHQ	0.5
Choline Bitartrate	14

나. 난소적출(ovariectomy)

7 주령된 암흰쥐를 대상으로 난소적출(卵巢剔出)실험을 수행하였다. 난소적출은 에틸에테르(ethyl ether)로 흰쥐를 마취시킨 다음 요각으로부터 10~15 mm전방, 척추로부터 15~20 mm 하방부위의 피부를 10~15 mm정도 절개하였다. 그 다음 절개구를 통하여 가위의 둔연이나 핀셋으로 피부가 자유로이 움직일 수 있도록 복벽

과 분리시킨 다음 복벽을 5~7 mm정도 근섬유의 방향으로 절개하여 바로 밑의 난소를 싸고 있는 백색의 지방조직을 서서히 끌어내어 반전시키면 난소가 노출시켰다. 그 다음 난관-자궁접합부에서 혈관이나 지방조직을 함께 결찰하고 결찰부위의 난소를 절제한 후 자궁과 지방조직을 복강내로 밀어 넣어 복벽과 피부를 각각 1~2개소 봉합하였다. 절개부위는 염증방지를 위하여 페니실린을 도포하였다. sham군은 난소를 절제하지 않고 위장 대조군 수술을 시행하였다.

다. 체중, 식이섭취량 및 식이효율

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

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

라. 혈액, 장기 시료

혈액은 실험동물을 12시간 동안 절식시킨 후 안구에서 채혈 후, 경추 탈골하였다. 채혈한 다음 응고되는 것을 방지하기 위하여 응고방지 tube에 담아 ice bath에 20분 방치 하였다. 채혈시료는 3000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 혈청을 분리하고 실험에 사용하기 전까지 냉장보관 하였다. 간, 신장 및 자궁 등 장기는 적출하여 0.9 % 생리 식염수로 세척한 후 여과지(Whatman No. 2)로 수분을 제거하고 중량을 측정하였다.

마. 혈액 분석

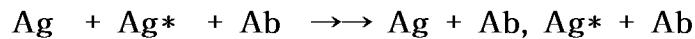
1) GOT와 GPT활성 측정

혈액 중의 aspartic acid와 α -ketoglutaric acid는 oxalacetic acid와 L-glutamic acid로 변화한다. 생성된 oxalacetic acid는 조효소 NADH의 존재하에 MDH의 작용으로 malate가 생성되고 NADH가 NAD^+ 로 산화될 때 340 nm에서 흡광도의 감소를 측정하는 GOT 활성은 AST reagents (Bayer, USA)를 사용하고 IFCC법에 따라 autoanalyzer (ADVIA 1650, Bayer, Japan)로 분석하였다. L-alanine과 α -ketoglutaric acid는 pyruvic acid와 L-glutamic acid로 변화한다. 생성된 pyruvate는 조효소 NADH의 존재하에 LDH 작용으로 acetate가 생성되고 NAD^- 가 NAD^+ 로 산화될 때 파장 340 nm에서 흡광도의 감소를 측정하는 GPT 활성은 ALT reagents (Bayer, USA)를 사용하여 위와 동일한 방법으로 분석하였다.

2) 혈액의 ALP, Osteocalcin 분석

혈청에서의 Alkaline phosphatase 활성은 Buffer/Enzyme Reagents와 ALT co-enzyme으로 구성된 ALP reagents (Bayer, USA)를 사용하여 autoanalyzer(ADVIA 1650, Bayer, Japan)로 분석하였다.

Osteocalcin은 competitive method법으로 autoanalyzer(ADVIA 1650, Bayer, Japan)를 이용하여 분석하였다. 그 원리는 아래와 같다



- Ag : Serum

- Ag* : ¹²⁵I-labelled Osteocalcin)

- Ab : polyclonal sheep anti-h-Osteocalcin

Tube에 STD 및 control, sample을 labeling 한 후, 50 ul를 첨가하고, tracer를 250 ul 씩 첨가하여 mixing 후 4~8 °C에서 20~24 시간동안 incubation 하였다. Tube의 내용물을 완전 흡입 해 내고 washing buffer 2 ml로 tube를 washing 한 후 1분 이내에 Y-counter에서 activity를 측정하며, 그 결과는 각각의 binding percentage를 구하고 logit-log graph를 이용해 standard curve를 만들고 각각의 농도값을 산출하였다.

$$\%B = \frac{(\text{검체의 평균 CPM} - \text{NSB CPM})}{(\text{MB 평균 CPM} - \text{NSB NSB CPM})} \times 100$$

3) 혈액의 Ca, inorganic P 분석

Calcium은 OCPC(O-Creosolphthalain Complex)과 알카리 용액에서 violet의 복합물을 형성한다. 이러한 원리를 이용하여 혈청의 calcium 함량은 calcium reagents(Bayer, USA)를 이용하여 chemistry autoanalyzer(ADVIA 1650, Bayer, Japan)로 454 nm에서 분석하여 자동분석계산법으로 결과를 산출하였다. Inorganic P는 황산 환경에서 phosphate이온과 molybdate가 반응하여 phosphomolybdate 복합물을 생성한다. 이러한 원리로 부터 sulfuric acid와 phosphate reagent로 이루어진 Inorganic Phosphorus Reagent kits (Bayer, USA)를 이용하여 chemistry autoanalyzer(ADVIA 1650, Bayer, Japan)로 340nm에서 분석하였다.

바. 대퇴골 및 경골의 변화 측정

1) 대퇴골 및 경골의 발골

Ovariectomized rat 사육 12주 후 해부하고 흰쥐의 좌·우측 경골 및 대퇴골을 분리한 후 냉동 및 formalin 처리하여 보관하였다.

2) 물리적 변화도 측정

가) 골의 무게, 길이 및 두께의 측정

양쪽 경골과 대퇴골의 근육, 지방, 인대 등을 제거한 후 무게를 측정하였다. 골의 길이와 두께는 Digimatic caliper(Mitutoyo, Japan)로 측정하였다.

나) 골의 BMD 및 BMC의 측정

오른쪽 경골과 대퇴골의 BMD(bone mineral density) 및 BMC(bone mineral content)를 pDEXA Forearm X-Ray Bone Densitometer (CooperSargical Company, Northland)를 이용하여 측정하였다.

사. 통계처리

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

제 3 절 연구결과 및 고찰

1. 젖산균 분리 및 수집

가. 원유에서 젖산균 분리

서울우유 중부, 남부, 서부지도소 관할 원유검사소(경기도 및 강원도 일부), 전북 축산시험연구소, 경북 가축위생시험소에서 지원받아 목장별 원유를 채취하여 MRS배지에서 Bromocresol purple과 sodium azide를 첨가한 plate에 smear한 후 37°C에서 48시간 배양한 다음 노란색 colony중 각기 다른 모양의 colony를 선별하였고 순수분리를 위해 MRS agar에 streaking하여 얻어진 colony를 triptic soy agar slant에 37°C에서 18시간 배양하여 2,173개의 균주를 분리하였다. 발효유에 적합한 균주를 분리하기 위해서는 skim milk를 응고시킬 수 있어야 하므로 10% 환원 탈지분유에 분리균주를 접종한 후 37°C에서 18시간 및 24시간 배양하였고, 이 때 응고된 균주가 958개 균주이었다.

나. 신생아 분변에서 젖산균 분리

순천향병원 및 한강성심병원 산부인과 신생아실에서 지원받아 45명의 분변으로부터 분리하였다. 분변시료는 배변 즉시 3시간 이내에 미생물 시험을 실시하였다. bifidobacteria 분리는 채취된 분변을 균일하게 혼합한 후 혐기 희석액으로 $10^3 \sim 10^4$ cfu/ml 수준까지 희석한 후 미리 만들어 놓은 BS agar plate에 희석된 시료 100 μ l를 도말한 후 anaerobic jar에 gaspak을 넣고 37°C에서 3일간 혐기적으로 배양하였다. 분리된 bifidobacteria는 paraffin oil이 중층된 modified BL broth를 사용하여 37°C에서 18~24시간 배양하여 59개 균주를 보관하였다. 젖산균 분리는 modified MRS(glucose→lactose)에서 분리하였으며 다른 과정은 원유에서 분리한 방법과 동일하게 하여 81개 균주를 수집하였으며, 37°C에서 18시간 및 24시간 배양하여 응고된 균주 43개를 분리하였다.

다. 성인 분변에서 젖산균 분리

한국식품연구원 직원 및 가족에서 지원받아 50명의 분변으로부터 분리하였다. 분변시료는 배변 즉시 paraffin oil이 중층된 modified Blood-Glucose-Liver (BL) broth가 담긴 15ml의 멸균된 polypropylene tube에 넣어 실험실로 수송하여 12시간 이내에 미생물 시험을 실시하였다. 채취된 분변으로부터 bifidobacteria 분리 및 젖산균 분리는 신생아 분변과 동일한 실험방법으로 실시하여 bifidobacteria는 87개 균주를 수집, 보관하였고, 젖산균은 86개를 수집하였으며, 이 중 37°C에서 18시간 및

24시간 배양하여 응고된 균주 41개 균주를 분리하였다.

Table 11. Lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from raw milk and feces

Strains	Raw milk	feces	
		infant	adult
sample number	-	45	50
MRS media isolated strain	2,173	81	86
10% Skim Milk coagulation(24hr incubation)	958	43	41
Bifidobacteria strain	-	59	87

2. 비타민 K₂ 생산 균주 선발

원유와 분변에서 분리한 균주 중 10% 환원 탈지유에서 37°C에서 24시간 배양하여 응고반응을 보인 704개와 bifidobacteria균 146 균주이었다(Table 12~22).

가. TLC를 이용한 Vitamin K₂의 생성유무 확인

응고반응을 보인 균주를 Rogosa medium에 접종하여 배양하고, 원심분리하여 얻어진 cell을 동결건조한 후 Fig. 2와 같이 전처리를 하고 Table 23과 같은 TLC 조건으로 전개한 결과 Vitamin K₂ 생성유무를 Fig. 3에서처럼 확인할 수 있었다.

Table 23. Operation condition of TLC for the determination of Vitamin K₂ contents

Silica gel plate	60F ₂₅₄ plate ; Merck, Darmstat, Germany
Mobile Phase	petroleum ether - diisopropyl ether (9:1)
UV densitometry	254nm

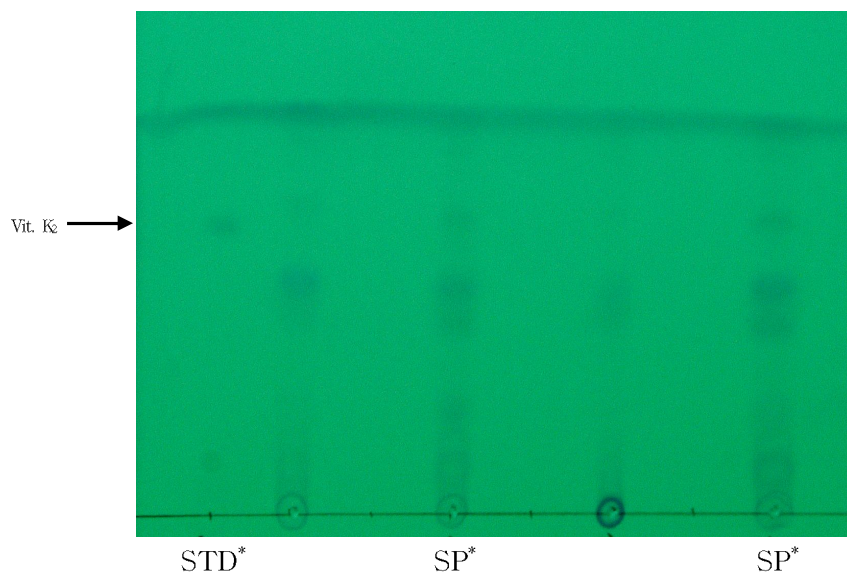


Fig. 3. Confirmation of Vitamin K₂ in the lactic acid bacteria extract by TLC

* STD : Standard Vitamin K₂ spot

* SP : Extract of Vitamin K₂ in lactic acid bacteria

Table 12. Skim milk coagulation and Vitamin K₂ production of strain isolated from the raw milk of middle Kyungki province

Strain	Skim Milk coagulation		pH	Vitamin K ₂ production	Strain	Skim Milk coagulation		pH	Vitamin K ₂ production
	18hr	24hr				18hr	24hr		
A-1					A-46	+	+	4.97	—
A-2	+	+	4.75	±	A-47	+	+	4.66	—
A-3					A-48				
A-4					A-49				
A-5		+	5.05	—	A-50				
A-6	+	+	4.63	—	A-51				
A-7					A-52	+	+	4.92	—
A-8					A-53	+	+	4.95	±
A-9					A-54	+	+	4.92	—
A-10					A-55	+	+	4.81	—
A-11					A-56	+	+	4.87	—
A-12					A-57				
A-13	+	+	4.47	±	A-58				
A-14					A-59	+	+	4.88	—
A-15					A-60		+	5.05	—
A-16					A-61	+	+	4.61	—
A-17					A-62				
A-18	+	+	4.72	—	A-63		+	5.04	—
A-19	+	+	4.84	+	A-64	+	+	4.95	—
A-20	+	+	4.78	—	A-65	+	+	4.82	—
A-21					A-66		+	4.74	—
A-22					A-67				
A-23		+	4.62	—	A-68				
A-24	+	+	4.80	+	A-69	+	+	4.79	—
A-25	+	+	4.75	—	A-70				
A-26	+	+	4.77	—	A-71	+	+	4.77	—
A-27	+	+	4.73	—	A-72				
A-28					A-73				
A-29					A-74				
A-30					A-75	+	+	4.90	—
A-31					A-76	+	+	4.92	—
A-32	+	+	4.72	—	A-77	+	+	4.82	±
A-33	+	+	4.74	—	A-78	+	+	4.89	—
A-34	+	+	4.85	—	A-79				
A-35	+	+	4.75	—	A-80				
A-36	+	+	4.76	+	A-81	+	+	4.83	±
A-37	+	+	4.92	—	A-82	+	+	4.76	—
A-38		+	5.04	—	A-83	+	+	4.68	—
A-39	+	+	4.73	—	A-84	+	+	4.92	—
A-40					A-85	+	+	4.67	+
A-41		+	5.07	—	A-86				
A-42					A-87				
A-43					A-88				
A-44					A-89				
A-45					A-90	+	+	4.73	—

Strain	Skim Milk coagulation		pH	Vitamin K ₂ production	Strain	Skim Milk coagulation		pH	Vitamin K ₂ production
	18hr	24hr				18hr	24hr		
A-91					A-136				
A-92	+	+	4.74	—	A-137				
A-93					A-138	+	+	4.80	±
A-94					A-139		+	5.02	—
A-95	+	+	4.69	—	A-140				
A-96					A-141				
A-97					A-142				
A-98	+	+	4.78	—	A-143	+	+	4.67	—
A-99		+	5.06	—	A-144		+	5.03	—
A-100		+	4.62	—	A-145				
A-101	+	+	4.80	±	A-146				
A-102	+	+	4.76	—	A-147	+	+	4.72	—
A-103	+	+	4.77	—	A-148				
A-104	+	+	4.92	—	A-149	+	+	4.80	—
A-105	+	+	4.76	±	A-150				
A-106	+	+	4.66	—	A-151		+	5.09	—
A-107		+	4.65	—	A-152				
A-108					A-153	+	+	4.83	—
A-109					A-154	+	+	4.65	+
A-110					A-155	+	+	4.67	—
A-111	+	+	4.99	—	A-156	+	+	4.67	—
A-112	+	+	4.98	±	A-157	+	+	4.74	—
A-113	+	+	4.80	—	A-158				
A-114	+	+	4.82	—	A-159				
A-115					A-160	+	+	4.84	—
A-116					A-161				
A-117					A-162	+	+	4.61	—
A-118	+	+	4.80	+	A-163				
A-119	+	+	4.83	—	A-164				
A-120					A-165				
A-121	+	+	4.76	—	A-166				
A-122		+	5.05	—	A-167				
A-123					A-168				
A-124					A-169				
A-125		+	5.08	—	A-170				
A-126	+	+	4.72	—	A-171	+	+	4.91	—
A-127	+	+	4.76	—	A-172				
A-128	+	+	4.75	—	A-173				
A-129		+	5.08	—	A-174				
A-130	+	+	4.77	—	A-175				
A-131					A-176				
A-132					A-177				
A-133					A-178				
A-134	+	+	4.80	—	A-179				
A-135	+	+	4.82	—	A-180				

Strain	Skim Milk coagulation		pH	Vitamin K ₂ production	Strain	Skim Milk coagulation		pH	Vitamin K ₂ production
	18hr	24hr				18hr	24hr		
A-181					A-226				
A-182					A-227	+	+	4.87	—
A-183	+	+	4.79	+	A-228				
A-184					A-229				
A-185	+	+	4.80	—	A-230				
A-186					A-231	+	+	4.71	—
A-187					A-232				
A-188					A-233				
A-189					A-234				
A-190	+	+	4.95	—	A-235	+	+	4.98	—
A-191					A-236	+	+	4.63	±
A-192					A-237				
A-193					A-238				
A-194					A-239				
A-195					A-240				
A-196					A-241				
A-197					A-242				
A-198					A-243				
A-199		+	4.76	—	A-244	+	+	4.80	—
A-200					A-245		+	5.01	—
A-201					A-246				
A-202					A-247		+	5.09	—
A-203					A-248				
A-204	+	+	4.98	—	A-249				
A-205					A-250				
A-206					A-251				
A-207	+	+	4.93	—	A-252				
A-208					A-253				
A-209					A-254				
A-210					A-255	+	+	4.84	—
A-211					A-256				
A-212					A-257	+	+	4.88	—
A-213	+	+	4.72	—	A-258				
A-214	+	+	4.82	—	A-259				
A-215					A-260		+	5.03	+
A-216					A-261	+	+	4.76	—
A-217	+	+	4.99	—	A-262	+	+	4.95	—
A-218					A-263				
A-219					A-264		+	4.83	—
A-220					A-265				
A-221					A-266				
A-222									
A-223									
A-224	+	+	4.97	—					
A-225		+	5.06	—					

Table 13. Skim milk coagulation and Vitamin K₂ production of strain isolated from the raw milk of middle Kyungki province(additional experiment)

Strain	Skim Milk coagulation		pH	Vitamin K ₂ production	Strain	Skim Milk coagulation		pH	Vitamin K ₂ production
	18hr	24hr				18hr	24hr		
1	+	+	5.64	+	46	+	+	5.22	+
2	+	+	5.28	+	47	+	+	5.26	+
3					48	+	+	4.88	-
4					49	+	+	5.19	+
5	+	+	5.13	-	50	+	+	4.93	+
6	+	+	5.15	-	51	+	+	5.56	-
7					52				
8	+	+	5.18	-	53	+	+	4.63	-
9	+	+	5.17	-	54	+	+	5.06	-
10					55				
11					56	+	+	5.06	-
12	+	+	5.25	-	57	+	+	5.23	-
13					58	+	+	4.73	-
14	+	+	5.31	-	59	+	+	4.8	-
15	+	+	4.97	-	60	+	+	4.94	-
16	+	+	5.14	+	61	+	+	4.7	+
17	+	+	4.76	-	62	+	+	4.66	-
18					63	+	+	5.1	-
19	+	+	4.76	-	64	+	+	4.66	-
20	+	+	5.29	-	65	+	+	4.77	
21					66				
22	+	+	5.22	+	67				
23	+	+	4.85	-	68	+	+	5.28	-
24	+	+	4.8	-	69				
25	+	+	5.22	+	70	+	+	5.26	-
26					71				
27					72	+	+	4.69	-
28	+	+	5.29	+	73	+	+	4.64	+
29					74	+	+	4.88	-
30	+	+	5.35	-	75	+	+	4.89	-
31	+	+	5.35	-	76	+	+	5.27	-
32	+	+	4.88	+	77				
33	+	+	4.84	-	78				
34	+	+	4.79	-	79				
35	+	+	4.79	-	80				
36	+	+	4.84	-	81				
37	+	+	4.78	-	82				
38					83	+	+	4.65	-
39					84	+	+	5.2	-
40					85	+	+	4.62	-
41	+	+	4.74	-	86				
42					87				
43					88				
44	+	+	5.23	-	89	+	+	4.76	-
45					90	+	+	5.32	-

Strain	Skim Milk coagulation		pH	Vitamin K ₂ production	Strain	Skim Milk coagulation		pH	Vitamin K ₂ production
	18hr	24hr				18hr	24hr		
91	+	+	5.36	-	136				
92					137	+	+	4.79	-
93					138	+	+	4.85	-
94					139				
95	+	+	4.82	-	140	+	+	4.83	-
96					141				
97					142				
98					143	+	+	4.92	-
99					144	+	+	4.79	-
100	+	+	5.63	-	145	+	+	4.9	-
101	+	+	5.18	-	146				
102	+	+	4.71	-	147				
103					148				
104	+	+	4.89	-	149				
105	+	+	4.84	-	150				
106	+	+	4.93	-	151	+	+	5.28	-
107	+	+	5.01	-	152	+	+	4.9	-
108					153				
109	+	+	5.24	-	154	+	+	5.25	-
110	+	+	5.25	+	155	+	+	5.29	-
111					156				
112	+	+	5.12	-	157				
113	+	+	4.83	-	158	+	+	4.84	-
114	+	+	4.91	-	159				
115					160				
116					161				
117	+	+	4.96	+	162	+	+	5.23	-
118					163				
119					164	+	+	4.81	-
120					165	+	+	5.12	-
121					166				
122	+	+	5.01	-	167				
123	+	+	4.68	-	168	+	+	5.13	-
124					169	+	+	5.3	-
125					170	+	+	5.26	-
126	+	+	5.09	-	171				
127	+	+	5.12	-	172				
128	+	+	5.28	-	173	+	+	4.93	-
129					174				
130	+	+	5.2	-	175				
131					176	+	+	5.26	-
132					177				
133	+	+	4.87	-	178	+	+	5.05	-
134	+	+	4.75	-	179				
135					180	+	+	4.91	-

Strain	Skim Milk coagulation		pH	Vitamin K ₂ production	Strain	Skim Milk coagulation		pH	Vitamin K ₂ production
	18hr	24hr				18hr	24hr		
181	+	+	5.26	-	226	+	+	5.28	-
182					227				
183	+	+	5.05	-	228				
184					229	+	+	4.97	-
185	+	+	4.91	-	230	+	+	4.97	-
186	+	+	4.97	-	231	+	+	5.04	-
187	+	+	5.28	-	232	+	+	5.01	-
188	+	+	5.22	-	233	+	+	4.98	-
189	+	+	5.27	-	234	+	+	4.61	-
190					235	+	+	5.2	-
191	+	+	4.81	-	236	+	+	5.23	-
192	+	+	4.8	-	237	+	+	4.87	-
193					238	+	+	5.22	-
194					239	+	+	5.24	-
195					240	+	+	5.22	-
196					241	+	+	4.86	-
197					242	+	+	4.89	-
198					243	+	+	5.2	-
199	+	+	5.22	+	244	+	+	5.2	-
200	+	+	5.05	-	245	+	+	5.41	-
201	+	+	4.75	-	246				
202	+	+	4.74	-	247				
203					248				
204	+	+	5.11	-	249				
205	+	+	5.09	-	250				
206	+	+	5.09	-	251	+	+	5.36	-
207					252	+	+	5.36	-
208					253				
209	+	+	5.26	+	254	+	+	5.17	-
210					255	+	+	5.16	-
211					256				
212					257	+	+	5.13	-
213	+	+	5.24	-	258	+	+	5.19	-
214	+	+	5.23	+	259				
215	+	+	5.23	-	260	+	+	5.35	-
216	+	+	5.08	-	261	+	+	5.33	-
217	+	+	4.81	-	262				
218	+	+	5.96	+	263	+	+	5.18	-
219	+	+	5.92	-	264				
220	+	+	5.4	-	265	+	+	5.21	-
221					266	+	+	5.2	-
222	+	+	5.42	-	267	+	+	5.22	-
223	+	+	5.39	-	268				
224	+	+	5.28	-	269				
225	+	+	4.64	-	270	+	+	5.36	-

Strain	Skim Milk coagulation		pH	Vitamin K ₂ production	Strain	Skim Milk coagulation		pH	Vitamin K ₂ production
	18hr	24hr				18hr	24hr		
271					316				
272	+	+	4.7	+	317	+	+	5.08	-
273	+	+	5.21	-	318	+	+	5.06	+
274	+	+	5.22	-	319	+	+	5.36	-
275	+	+	5.12	-	320				
276					321	+	+	4.91	-
277					322	+	+	4.91	-
278					323	+	+	4.91	-
279	+	+	5.38	-	324	+	+	5.14	-
280					325	+	+	5.17	-
281					326	+	+	5.16	-
282	+	+	4.97	-	327				
283					328	+	+	5.31	-
284					329	+	+	5.36	-
285					330	+	+	5.23	-
286					331	+	+	5.43	+
287					332	+	+	5.52	-
288					333	+	+	5.07	-
289	+	+	5.23	-	334	+	+	5.43	-
290	+	+	5.18	-	335				
291					336				
292	+	+	5.11	-	337				
293					338				
294					339	+	+	4.73	-
295					340	+	+	5.07	-
296					341	+	+	4.86	-
297					342				
298					343				
299					344	+	+	5.22	-
300	+	+	5.04	-	345	+	+	5.22	-
301	+	+	4.74	+	346	+	+	5.29	-
302	+	+	5.01	-	347				
303					348				
304					349	+	+	5.18	-
305					350	+	+	5.17	-
306					351				
307	+	+	5.22	-	352				
308	+	+	5.22	-	353				
309	+	+	5.44	-	354				
310	+	+	5.44	-	355				
311	+	+	4.82	-	356				
312	+	+	5.15	-	357				
313	+	+	5.23	-	358				
314	+	+	5.38	-	359				
315					360	+	+	4.87	-

Strain	Skim Milk coagulation		pH	Vitamin K ₂ production	Strain	Skim Milk coagulation		pH	Vitamin K ₂ production
	18hr	24hr				18hr	24hr		
361					406	+	+	4.72	-
362					407	+	+	4.71	-
363	+	+	5.24	+	408				
364					409				
365					410				
366	+	+	5.36	-	411				
367					412				
368					413				
369					414				
370	+	+	5.28	-	415				
371	+	+	5.23	-	416				
372	+	+	5.28	-	417				
373	+	+	5.28	-	418				
374	+	+	5.24	-	419				
375	+	+	5.25	-	420				
376					421				
377	+	+	4.95	-	422				
378	+	+	4.69	-	423				
379	+	+	4.68	-	424				
380	+	+	4.87	-	425				
381	+	+	4.86	-	426				
382	+	+	4.87	-	427				
383	+	+	5.29	-	428				
384	+	+	4.83	-	429				
385					430				
386					431				
387					432				
388					433				
389					434				
390					435				
391					436				
392					437				
393					438				
394					439				
395					440				
396					441				
397					442	+	+	4.63	-
398					443	+	+	4.68	-
399					444				
400					445	+	+	4.54	-
401	+	+	4.76	-	446				
402					447				
403					448				
404					449				
405					450				

Strain	Skim Milk coagulation		pH	Vitamin K ₂ production	Strain	Skim Milk coagulation		pH	Vitamin K ₂ production
	18hr	24hr				18hr	24hr		
451	+	+	5.12	-	496	+	+	5.09	-
452	+	+	4.79	-	497	+	+	5.11	-
453					498	+	+	5.06	+
454					499	+	+	5.14	-
455					500				
456					501				
457	+	+	4.72	-	502				
458					503				
459	+	+	4.92	-	504				
460					505				
461					506				
462					507	+	+	4.78	-
463					508				
464	+	+	4.64	-	509	+	+	4.82	-
465					510	+	+	4.71	-
466	+	+	4.72	-	511				
467					512				
468					513				
469					514	+	+	5.07	-
470					515	+	+	4.73	-
471					516				
472					517				
473					518				
474	+	+	5.13	-	519	+	+	4.76	-
475	+	+	5.15	-	520	+	+	4.74	-
476					521				
477	+	+	4.84	-	522				
478					523				
479					524				
480					525				
481					526	+	+	4.88	-
482					527				
483					528				
484	+	+	5.12	-	529				
485					530				
486					531				
487					532				
488					533				
489	+	+	5.04	-	534	+	+	4.72	-
490	+	+	5.12	-	535				
491	+	+	5.08	-	536	+	+	4.72	-
492	+	+	4.61	-	537	+	+	4.71	-
493	+	+	5	-	538	+	+	5	-
494	+	+	4.58	-	539				
495	+	+	5.04	-	540				

Strain	Skim Milk coagulation		pH	Vitamin K ₂ production	Strain	Skim Milk coagulation		pH	Vitamin K ₂ production
	18hr	24hr				18hr	24hr		
541	+	+	4.97	-	586				
542	+	+	4.94	-	587				
543	+	+	5.01	-	588	+	+	4.57	-
544					589				
545					590				
546					591				
547					592				
548					593				
549					594	+	+	4.74	-
550					595				
551					596				
552	+	+	4.85	-	597				
553					598				
554					599				
555	+	+	5.13	-	600				
556					601				
557					602				
558					603	+	+	4.9	-
559					604				
560					605				
561					606				
562					607				
563					608				
564	+	+	4.86	-	609				
565	+	+	4.84	-	610	+	+	4.76	-
566	+	+	4.84	-	611	+	+	4.75	-
567					612	+	+	4.76	-
568					613	+	+	4.76	-
569					614				
570					615	+	+	4.81	-
571					616	+	+	4.8	-
572					617	+	+	4.79	-
573					618				
574	+	+	4.72	-	619				
575					620				
576	+	+	4.69	-	621				
577	+	+	4.56	-	622				
578	+	+	4.68	-	623	+	+	4.66	-
579					624				
580					625				
581	+	+	4.57	+	626				
582	+	+	4.73	-	627				
583					628				
584					629				
585					630	+	+	4.83	-

Strain	Skim Milk coagulation		pH	Vitamin K ₂ production	Strain	Skim Milk coagulation		pH	Vitamin K ₂ production
	18hr	24hr				18hr	24hr		
631	+	+	5.08	-	676				
632	+	+	4.85	-	677				
633	+	+	4.86	-	678				
634	+	+	4.92	-	679				
635					680				
636					681	+	+	4.85	
637					682				
638					683				
639	+	+	4.83	-	684				
640	+	+	5.19	+	685	+	+	4.79	-
641	+	+			686	+	+	4.79	-
642					687	+	+	5.21	+
643					688				
644	+	+	5.09	-	689				
645					690				
646	+	+	5.13	-	691				
647					692	+	+	4.67	-
648					693				
649					694	+	+	5.23	-
650					695				
651	+	+	4.77	-	696				
652	+	+	5.26	+	697				
653					698	+	+	4.77	-
654	+	+	4.61	-	699				
655	+	+	5.06	-	700	+	+	5.01	-
656	+	+	4.76	-	701				
657	+	+	4.77	-	702				
658					703				
659	+	+	4.78	-	704				
660	+	+	4.8	-	705				
661					706				
662					707				
663					708				
664					709				
665					710				
666					711				
667	+	+	4.75		712	+	+	4.72	-
668					713	+	+	5.16	-
669	+	+	5.21		714				
670					715				
671	+	+	4.76		716	+	+	4.84	-
672					717	+	+	4.85	-
673					718				
674					719	+	+	4.91	-
675					720				

Strain	Skim Milk coagulation		pH	Vitamin K ₂ production	Strain	Skim Milk coagulation		pH	Vitamin K ₂ production
	18hr	24hr				18hr	24hr		
721					766				
722	+	+	4.87	-	767				
723	+	+	4.9	-	768				
724					769				
725	+	+	4.88	-	770				
726	+	+	4.91	-	771				
727					772	+	+	4.81	-
728					773				
729	+	+	4.85	-	774				
730	+	+	4.84	-	775				
731					776				
732					777				
733					778				
734					779				
735					780				
736					781				
737					782	+	+	4.7	-
738					783				
739	+	+	4.63	-	784	+	+	4.88	-
740	+	+	4.65	-	785				
741					786				
742					787				
743	+	+	4.78	-	788				
744	+	+	4.78	-	789				
745					790				
746					791				
747					792				
748	+	+	4.84	-	793				
749					794				
750					795				
751					796				
752					797				
753					798				
754					799				
755					800				
756									
757									
758									
759	+	+	5.13	-					
760									
761									
762	+	+	4.94	-					
763									
764									
765									

Table 14. Skim milk coagulation and Vitamin K₂ production of strain isolated from the raw milk of southern Kyungki province

Strain	Skim Milk coagulation		pH	Vitamin K ₂ production	Strain	Skim Milk coagulation		pH	Vitamin K ₂ production
	18hr	24hr				18hr	24hr		
B-1					B-46				
B-2	+	+	4.91	—	B-47				
B-3	+	+	4.72	±	B-48				
B-4		+	4.99	—	B-49				
B-5					B-50				
B-6					B-51				
B-7					B-52				
B-8	+	+	4.75	—	B-53				
B-9					B-54				
B-10					B-55				
B-11	+	+	4.84	—	B-56				
B-12					B-57				
B-13	+	+	4.96	—	B-58	+	+	4.75	—
B-14					B-59	+	+	4.74	—
B-15	+	+	4.86	+	B-60	+	+	4.73	—
B-16	+	+	4.80	—	B-61				
B-17					B-62	+	+	4.85	—
B-18	+	+	4.82	±	B-63	+	+	4.68	—
B-19					B-64	+	+	4.74	—
B-20					B-65	+	+	4.72	—
B-21					B-66	+	+	4.71	—
B-22					B-67	+	+	4.81	—
B-23					B-68				
B-24	+	+	4.69	+	B-69	+	+	4.82	—
B-25	+	+	4.71	±	B-70	+	+	4.84	±
B-26	+	+	4.63	—	B-71	+	+	4.93	—
B-27					B-72	+	+	4.48	—
B-28					B-73				
B-29					B-74				
B-30	+	+	4.68	+	B-75	+	+	4.83	—
B-31					B-76				
B-32					B-77				
B-33					B-78				
B-34					B-79	+	+	4.94	—
B-35					B-80				
B-36					B-81				
B-37	+	+	4.70	±	B-82				
B-38					B-83				
B-39					B-84				
B-40					B-85				
B-41					B-86				
B-42	+	+	4.44	—	B-87				
B-43					B-88				
B-44	+	+	4.86	—	B-89		+	5.08	—
B-45	+	+	4.81	—	B-90		+	5.04	—

Strain	Skim Milk coagulation		pH	Vitamin K ₂ production	Strain	Skim Milk coagulation		pH	Vitamin K ₂ production
	18hr	24hr				18hr	24hr		
B-91					B-136				
B-92	+	+	4.65	±	B-137				
B-93	+	+	4.76	—	B-138				
B-94	+	+	4.70	±	B-139				
B-95		+	5.08	—	B-140				
B-96		+	5.00	—	B-141				
B-97	+	+	4.65	—	B-142				
B-98					B-143				
B-99					B-144	+	+	4.96	±
B-100	+	+	4.66	—	B-145				
B-101					B-146				
B-102	+	+	4.93	—	B-147	+	+	4.95	—
B-103					B-148				
B-104					B-149				
B-105	+	+	4.69	—	B-212	+	+	4.79	+
B-106	+	+	4.72	—	B-151				
B-107					B-152	+	+	4.83	—
B-108					B-153	+	+	4.90	—
B-109					B-154				
B-110	+	+	4.87	—	B-155				
B-111	+	+	4.86	±	B-156				
B-112	+	+	4.61	—	B-157	+	+	4.74	—
B-113	+	+	4.61	—	B-158				
B-114					B-159				
B-115	+	+	4.80	—	B-160				
B-116					B-161	+	+	4.79	—
B-117					B-162				
B-118					B-163		+	5.09	—
B-119					B-164				
B-120					B-165	+	+	4.68	—
B-121					B-166	+	+	4.75	—
B-122					B-167				
B-123					B-168	+	+	4.76	—
B-124					B-169	+	+	4.78	+
B-125					B-170				
B-126					B-171	+	+	4.74	—
B-127					B-172				
B-128					B-173	+	+	4.95	—
B-129					B-174	+	+	4.87	—
B-130		+	4.96	±	B-175				
B-131					B-176	+	+	4.83	±
B-132		+	4.95	—	B-177				
B-133					B-178				
B-134					B-179				
B-135					B-180				

Strain	Skim Milk coagulation		pH	Vitamin K ₂ production	Strain	Skim Milk coagulation		pH	Vitamin K ₂ production
	18hr	24hr				18hr	24hr		
B-181	+	+	4.79	—	B-226	+	+	4.69	±
B-182	+	+	4.88	—	B-227	+	+	4.66	—
B-183	+	+	4.81	—	B-228		+	5.00	—
B-184	+	+	4.49	±	B-229	+	+	4.68	—
B-185	+	+	4.84	±	B-37	+	+	4.79	+
B-186					B-231				
B-187					B-232				
B-188					B-233	+	+	4.74	—
B-189	+	+	4.82	—	B-234				
B-190					B-235				
B-191	+	+	4.86	—	B-236				
B-192					B-237				
B-193					B-238				
B-194	+	+	4.81	—	B-239				
B-195	+	+	4.80	—	B-240				
B-196					B-241	+	+	4.80	±
B-197					B-242	+	+	4.70	—
B-198	+	+	4.76	—	B-243				
B-199					B-244	+	+	4.69	—
B-200					B-245				
B-201	+	+	4.93	—	B-246	+	+	4.76	—
B-202					B-247				
B-203	+	+	4.68	—	B-248				
B-204	+	+	4.64	—	B-249	+	+	4.81	—
B-205	+	+	4.81	—	B-250				
B-206	+	+	4.75	—	B-251				
B-207	+	+	4.69	—	B-252				
B-208	+	+	4.72	—	B-253				
B-209	+	+	4.72	—	B-254				
B-210					B-255				
B-211					B-256				
B-212					B-257	+	+	4.83	—
B-213					B-258	+	+	4.70	—
B-214	+	+	4.66	—	B-259				
B-215					B-260				
B-216	+	+	4.73	—	B-261	+	+	4.77	—
B-217					B-262	+	+	4.82	+
B-218		+	5.03	—	B-263				
B-219	+	+	4.78	—	B-264	+	+	4.73	—
B-220	+	+	4.80	—	B-265	+	+	4.68	±
B-221	+	+	4.83	—	B-266				
B-222	+	+	4.83	—	B-267				
B-223					B-268				
B-224					B-269				
B-225	+	+	4.90	—	B-270				

Strain	Skim Milk coagulation		pH	Vitamin K ₂ production	Strain	Skim Milk coagulation		pH	Vitamin K ₂ production
	18hr	24hr				18hr	24hr		
B-271									
B-272	+	+	4.62	±					
B-273	+	+	4.71	—					
B-274									
B-275									
B-276									
B-277	+	+	4.73	—					

Table 15. Skim milk coagulation and Vitamin K₂ production of strain isolated from the raw milk of western Kyungki province

Strain	Skim Milk coagulation		pH	Vitamin K ₂ production	Strain	Skim Milk coagulation		pH	Vitamin K ₂ production
	18hr	24hr				18hr	24hr		
C-1	+	+	4.72	-	C-46				
C-2					C-47				
C-3	+	+	4.83	+	C-48	+	+	4.82	-
C-4					C-49				
C-5	+	+	4.77	-	C-50				
C-6	+	+	4.70	-	C-51				
C-7	+	+	4.71	-	C-52				
C-8					C-53				
C-9					C-54	+	+	4.76	-
C-10	+	+	4.57	-	C-55	+	+	4.78	-
C-11	+	+	4.73	-	C-56				
C-12					C-57				
C-13	+	+	4.76	-	C-58	+	+	4.67	±
C-14					C-59				
C-15					C-60		+	5.05	-
C-16					C-61				
C-17					C-62	+	+	4.92	-
C-18					C-63				
C-19					C-64	+	+	4.95	-
C-20					C-65	+	+	4.78	±
C-21					C-66	+	+	4.97	-
C-22					C-67				
C-23					C-68		+	5.06	-
C-24					C-69				
C-25	+	+	4.76	-	C-70	+	+	4.72	-
C-26	+	+	4.83	-	C-71		+	5.06	-
C-27					C-72				
C-28	+	+	4.64	-	C-73		+	5.02	-
C-29					C-74	+	+	4.73	-
C-30					C-75				
C-31					C-76				
C-32	+	+	4.92	-	C-77	+	+	4.67	-
C-33	+	+	4.81	+	C-78				
C-34					C-79	+	+	4.37	-
C-35					C-80	+	+	4.66	-
C-36					C-81	+	+	4.59	-
C-37					C-82	+	+	4.64	-
C-38					C-83				
C-39					C-84				
C-40					C-85				
C-41	+	+	5.00	-	C-86				
C-42	+	+	4.82	-	C-87				
C-43					C-88				
C-44					C-89	+	+	5.01	-
C-45	+	+	5.00	-	C-90				

Strain	Skim Milk coagulation		pH	Vitamin K ₂ production	Strain	Skim Milk coagulation		pH	Vitamin K ₂ production
	18hr	24hr				18hr	24hr		
C-1	+	+	4.72	-	C-46				
C-2					C-47				
C-3	+	+	4.83	+	C-48	+	+	4.82	-
C-4					C-49				
C-5	+	+	4.77	-	C-50				
C-6	+	+	4.70	-	C-51				
C-7	+	+	4.71	-	C-52				
C-8					C-53				
C-9					C-54	+	+	4.76	-
C-10	+	+	4.57	-	C-55	+	+	4.78	-
C-11	+	+	4.73	-	C-56				
C-12					C-57				
C-13	+	+	4.76	-	C-58	+	+	4.67	±
C-14					C-59				
C-15					C-60		+	5.05	-
C-16					C-61				
C-17					C-62	+	+	4.92	-
C-18					C-63				
C-19					C-64	+	+	4.95	-
C-20					C-65	+	+	4.78	±
C-21					C-66	+	+	4.97	-
C-22					C-67				
C-23					C-68		+	5.06	-
C-24					C-69				
C-25	+	+	4.76	-	C-70	+	+	4.72	-
C-26	+	+	4.83	-	C-71		+	5.06	-
C-27					C-72				
C-28	+	+	4.64	-	C-73		+	5.02	-
C-29					C-74	+	+	4.73	-
C-30					C-75				
C-31					C-76				
C-32	+	+	4.92	-	C-77	+	+	4.67	-
C-33	+	+	4.81	+	C-78				
C-34					C-79	+	+	4.37	-
C-35					C-80	+	+	4.66	-
C-36					C-81	+	+	4.59	-
C-37					C-82	+	+	4.64	-
C-38					C-83				
C-39					C-84				
C-40					C-85				
C-41	+	+	5.00	-	C-86				
C-42	+	+	4.82	-	C-87				
C-43					C-88				
C-44					C-89	+	+	5.01	-
C-45	+	+	5.00	-	C-90				

Strain	Skim Milk coagulation		pH	Vitamin K ₂ production	Strain	Skim Milk coagulation		pH	Vitamin K ₂ production
	18hr	24hr				18hr	24hr		
C-91					C-136				
C-92		+	5.09	±	C-137				
C-93					C-138		+	5.07	±
C-94		+	5.04	—	C-139	+	+	4.73	—
C-95					C-140	+	+	4.67	±
C-96	+	+	5.00	—	C-141				
C-97					C-142				
C-98					C-143				
C-99					C-144				
C-100					C-145				
C-101	+	+	4.82	+	C-146				
C-102		+	5.19	+	C-147		+	5.05	—
C-103					C-148				
C-104					C-149				
C-105					C-150				
C-106	+	+	4.76	—	C-151				
C-107					C-152	+	+	4.72	—
C-108					C-153				
C-109	+	+	4.75	—	C-154				
C-110					C-155	+	+	4.72	±
C-111	+	+	4.88	—	C-156	+	+	4.94	—
C-112	+	+	4.73	—	C-157		+	5.06	—
C-113	+	+	4.92	—	C-158	+	+	4.89	—
C-114					C-159				
C-115					C-160	+	+	4.68	—
C-116					C-161				
C-117					C-162	+	+	4.98	—
C-118					C-163	+	+	4.99	—
C-119	+	+	4.76	±	C-164				
C-120					C-165	+	+	4.96	—
C-121	+	+	4.93	—	C-166				
C-122					C-167	+	+	4.78	—
C-123					C-168	+	+	4.64	—
C-124					C-169	+	+	4.96	—
C-125	+	+	4.98	—	C-170				
C-126	+	+	4.96	—	C-171	+	+	4.80	—
C-127	+	+	4.70	—	C-172	+	+	4.76	—
C-128	+	+	4.75	—	C-173				
C-129	+	+	4.75	—	C-174				
C-130	+	+	4.80	—	C-175	+	+	4.75	—
C-131					C-176	+	+	4.88	—
C-132					C-177	+	+	4.69	±
C-133					C-178		+	5.08	±
C-134					C-179				
C-135					C-180				

Strain	Skim Milk coagulation		pH	Vitamin K ₂ production	Strain	Skim Milk coagulation		pH	Vitamin K ₂ production
	18hr	24hr				18hr	24hr		
C-181	+	+	4.98	—					
C-182									
C-183									
C-184									
C-185									
C-186									
C-187									
C-188									
C-189	+	+	4.88	—					
C-190	+	+	4.69	—					
C-191									
C-192									
C-193									
C-194									
C-195		+	5.02	±					
C-196		+	5.01	—					
C-197									
C-198									
C-199		+	5.04	—					
C-200		+	5.01	—					
C-201	+	+	4.72	±					

Table 16. Skim milk coagulation and Vitamin K₂ production of strain isolated from the raw milk of Kyungsang province

Strain	Skim Milk coagulation		pH	Vitamin K ₂ production	Strain	Skim Milk coagulation		pH	Vitamin K ₂ production
	18hr	24hr				18hr	24hr		
D-1	+	+	4.86	—	D-46				
D-2	+	+	4.98	—	D-47				
D-3	+	+	4.96	—	D-48	+	+	4.84	—
D-4					D-49	+	+	4.86	—
D-5					D-50				
D-6	+	+	4.79	—	D-51				
D-7	+	+	4.65	—	D-52	+	+	4.80	±
D-8	+	+	4.64	—	D-53	+	+	4.66	—
D-9	+	+	4.89	±	D-54				
D-10	+	+	4.95	±	D-55				
D-11					D-56				
D-12	+	+	4.77	—	D-57	+	+	4.59	—
D-13	+	+	4.86	—	D-58				
D-14					D-59				
D-15	+	+	4.78	—	D-60	+	+	4.67	—
D-16					D-61		+	5.15	±
D-17	+	+	4.80	—	D-62		+	5.14	±
D-18					D-63				
D-19	+	+	4.82	—	D-64	+	+	4.82	—
D-20					D-65	+	+	4.66	—
D-21		+	5.04	+	D-66	+	+	4.83	—
D-22	+	+	4.89	±	D-67		+	4.64	—
D-23	+	+	4.64	+	D-68				
D-24					D-69				
D-25	+	+	4.73	—	D-70				
D-26	+	+	4.62	—	D-71				
D-27					D-72	+	+	4.74	—
D-28		+	4.98	—	D-73				
D-29		+	4.55	—	D-74	+	+	4.62	—
D-30		+	5.05	—	D-75				
D-31		+	4.71	—	D-76				
D-32					D-77				
D-33		+	4.72	±	D-78				
D-34		+	4.81	—	D-79				
D-35	+	+	4.70	—	D-80				
D-36					D-81				
D-37	+	+	4.79	+	D-82				
D-38					D-83	+	+	4.66	±
D-39					D-84				
D-40		+	4.82	±	D-85				
D-41					D-86				
D-42	+	+	4.92	—	D-87				
D-43					D-88				
D-44	+	+	4.90	—	D-89				
D-45	+	+	4.60	—	D-90				

Strain	Skim Milk coagulation		pH	Vitamin K ₂ production	Strain	Skim Milk coagulation		pH	Vitamin K ₂ production
	18hr	24hr				18hr	24hr		
D-91					D-136				
D-92					D-137				
D-93					D-138	+	+	4.62	—
D-94					D-139	+	+	4.67	—
D-95		+	5.06	—	D-140		+	4.50	—
D-96	+	+	4.84	—	D-141				
D-97	+	+	4.88	—	D-142				
D-98	+	+	4.69	+	D-143				
D-99	+	+	5.09	—	D-144				
D-100	+	+	4.73	—	D-145		+	4.51	—
D-101					D-146		+	4.98	—
D-102					D-147		+	4.65	—
D-103	+	+	4.82	—	D-148	+	+	4.68	—
D-104					D-149		+	4.67	—
D-105					D-150	+	+	4.68	—
D-106					D-151		+	5.16	—
D-107					D-152	+	+	4.65	—
D-108					D-153				
D-109					D-154				
D-110		+	4.60	—	D-155				
D-111		+	5.01	—	D-156	+	+	4.63	—
D-112		+	4.69	—	D-157		+	5.19	—
D-113		+	4.60	—	D-158				
D-114					D-159				
D-115					D-160				
D-116					D-161	+	+	4.61	±
D-117					D-162				
D-118					D-163				
D-119					D-164	+	+	4.55	—
D-120	+	+	4.62	—	D-165				
D-121		+	4.89	—	D-166				
D-122	+	+	4.93	—	D-167				
D-123		+	5.02	—	D-168	+	+	4.73	—
D-124					D-169				
D-125					D-170				
D-126					D-171				
D-127					D-172				
D-128		+	4.56	—	D-173				
D-129	+	+	4.61	±	D-174	+	+	4.66	—
D-130					D-175	+	+	4.53	—
D-131					D-176	+	+	4.60	—
D-132					D-177	+	+	4.44	—
D-133		+	5.18	—	D-178				
D-134					D-179	+	+	4.82	—
D-135					D-180	+	+	4.65	±

Strain	Skim Milk coagulation		pH	Vitamin K ₂ production	Strain	Skim Milk coagulation		pH	Vitamin K ₂ production
	18hr	24hr				18hr	24hr		
D-181	+	+	4.57	—	D-226				
D-182		+	4.77	—	D-227				
D-183	+	+	4.58	—	D-228				
D-184					D-229				
D-185					D-230		+	5.07	—
D-186					D-231				
D-187					D-232				
D-188					D-233				
D-189	+	+	4.74	—	D-234				
D-190	+	+	4.47	±					
D-191	+	+	4.53	—					
D-192	+	+	4.50	—					
D-193									
D-194	+	+	4.74	—					
D-195	+	+	4.66	—					
D-196									
D-197									
D-198									
D-199									
D-200									
D-201	+	+	4.84	—					
D-202	+	+	4.87	—					
D-203	+	+	4.80	—					
D-204	+	+	4.69	—					
D-205									
D-206		+	5.08	±					
D-207		+	5.01	—					
D-208		+	4.99	—					
D-209									
D-210									
D-211									
D-212	+	+	4.79	+					
D-213									
D-214									
D-215	+	+	4.65	±					
D-216	+	+	4.75	—					
D-217		+	5.06	—					
D-218		+	5.01	—					
D-219		+	5.03	—					
D-220									
D-221									
D-222									
D-223									
D-224		+	4.96	—					
D-225									

Table 17. Skim milk coagulation and Vitamin K₂ production of strain isolated from the raw milk of Junla province

Strain	Skim Milk coagulation		pH	Vitamin K ₂ production	Strain	Skim Milk coagulation		pH	Vitamin K ₂ production
	18hr	24hr				18hr	24hr		
E-1	+	+	4.63	-	E-46		+	4.86	-
E-2					E-47	+	+	5.02	-
E-3	+	+	4.96	-	E-48	+	+	4.65	-
E-4		+	5.11	-	E-49	+	+	4.79	-
E-5					E-50				
E-6					E-51	+	+	4.85	-
E-7		+	5.00	-	E-52		+	4.71	-
E-8					E-53				
E-9		+	4.99	-	E-54	+	+	4.88	-
E-10	+	+	4.68	-	E-55				
E-11		+	5.29	-	E-56		+	4.74	-
E-12		+	4.86	-	E-57	+	+	4.54	-
E-13	+	+	4.48	-	E-58				
E-14	+	+	4.48	-	E-59				
E-15					E-60				
E-16	+	+	4.66	-	E-61	+	+	4.53	±
E-17		+	5.21	-	E-62				
E-18					E-63				
E-19					E-64				
E-20					E-65				
E-21					E-66	+	+	4.53	-
E-22	+	+	4.92	+	E-67	+	+	4.53	-
E-23					E-68				
E-24		+	5.12	-	E-69	+	+	4.56	±
E-25	+	+	5.07	-	E-70				
E-26	+	+	4.92	-	E-71				
E-27		+	5.06	-	E-72				
E-28		+	5.28	-	E-73		+	4.69	-
E-29	+	+	4.62	-	E-74				
E-30					E-75				
E-31		+	5.15	-	E-76				
E-32	+	+	4.99	-	E-77				
E-33					E-78				
E-34	+	+	4.92	-	E-79	+	+	4.56	-
E-35	+	+	4.67	-	E-80	+	+	4.52	-
E-36					E-81	+	+	4.52	-
E-37					E-82				
E-38					E-83				
E-39	+	+	4.77	-	E-84	+	+	4.46	-
E-40					E-85		+	5.30	-
E-41					E-86	+	+	4.78	-
E-42					E-87	+	+	4.65	-
E-43	+	+	4.79	-	E-88				
E-44	+	+	4.73	-	E-89	+	+	4.92	-
E-45	+	+	4.46	-	E-90	+	+	4.88	-

Strain	Skim Milk coagulation		pH	Vitamin K ₂ production	Strain	Skim Milk coagulation		pH	Vitamin K ₂ production
	18hr	24hr				18hr	24hr		
E-91					E-136	+	+	4.39	—
E-92					E-137				
E-93	+	+	4.97	—	E-138				
E-94					E-139		+	4.65	—
E-95					E-140				
E-96					E-141	+	+	4.49	—
E-97					E-142		+	4.73	—
E-98	+	+	4.95	—	E-143				
E-99	+	+	5.02	—	E-144				
E-100					E-145	+	+	4.92	—
E-101	+	+	4.93	—	E-146		+	5.38	—
E-102	+	+	4.75	—	E-147				
E-103					E-148				
E-104	+	+	5.03	—	E-149	+	+	4.41	—
E-105	+	+	5.04	—	E-150	+	+	4.38	—
E-106	+	+	5.02	—	E-151				
E-107	+	+	4.73	—	E-152				
E-108					E-153	+	+	4.97	—
E-109	+	+	4.80	—	E-154	+	+	4.95	—
E-110	+	+	4.97	—	E-155	+	+	4.42	—
E-111					E-156	+	+	4.42	—
E-112	+	+	5.03	—	E-157	+	+	4.46	±
E-113					E-158				
E-114	+	+	4.43	—	E-159	+	+	5.02	—
E-115					E-160				
E-116		+	4.75	+	E-161				
E-117					E-162				
E-118					E-163				
E-119	+	+	4.72	—	E-164		+	4.66	—
E-120		+	4.73	—	E-165				
E-121					E-166				
E-122					E-167	+	+	4.93	—
E-123					E-168		+	5.22	—
E-124	+	+	4.83	—	E-169				
E-125	+	+	4.78	—	E-170	+	+	4.67	—
E-126					E-171	+	+	4.90	—
E-127					E-172				
E-128	+	+	4.42	—	E-173				
E-129					E-174		+	5.39	—
E-130	+	+	4.50	—	E-175	+	+	4.71	—
E-131	+	+	4.39	±	E-176				
E-132	+	+	4.40	—	E-177		+	4.59	—
E-133	+	+	4.39	±	E-178				
E-134	+	+	4.42	—	E-179				
E-135	+	+	4.39	—	E-180		+	5.14	—

Strain	Skim Milk coagulation		pH	Vitamin K ₂ production	Strain	Skim Milk coagulation		pH	Vitamin K ₂ production
	18hr	24hr				18hr	24hr		
E-181					E-226				
E-182					E-227				
E-183					E-228				
E-184					E-229		+	5.00	+
E-185					E-230				
E-186	+	+	4.46	-	E-231				
E-187	+	+	4.41	-	E-232	+	+	4.64	-
E-188					E-233	+	+	5.01	-
E-189		+	4.89	±	E-234	+	+	5.11	-
E-190					E-235	+	+	5.03	-
E-191	+	+	4.95	-	E-236	+	+	4.58	-
E-192	+	+	4.66	-	E-237	+	+	4.75	-
E-193	+	+	4.89	-	E-238	+	+	4.46	-
E-194					E-239				
E-195					E-240				
E-196					E-241				
E-197		+	4.88	-	E-242				
E-198	+	+	5.05	-	E-243				
E-199					E-244		+	5.04	-
E-200	+	+	4.51	±	E-245				
E-201					E-246				
E-202	+	+	4.51	-	E-247	+	+	4.51	-
E-203					E-248	+	+	4.54	±
E-204	+	+	4.48	-	E-249				
E-205	+	+	4.45	-	E-250				
E-206					E-251				
E-207					E-252				
E-208					E-253				
E-209					E-254				
E-210					E-255		+	5.07	-
E-211					E-256				
E-212		+	4.99	-	E-257				
E-213					E-258				
E-214	+	+	4.46	-	E-259		+	5.05	±
E-215	+	+	4.46	-	E-260				
E-216	+	+	4.39	-	E-261				
E-217	+	+	4.39	±	E-262		+	5.19	-
E-218	+	+	4.39	-	E-263	+	+	5.20	-
E-219					E-264				
E-220					E-265				
E-221					E-266				
E-222					E-267				
E-223									
E-224									
E-225	+	+	4.54	+					

Table 18. Skim milk coagulation and Vitamin K₂ production of strain isolated from the raw milk of Jeju province

Strain	Skim Milk coagulation		pH	Vitamin K ₂ production	Strain	Skim Milk coagulation		pH	Vitamin K ₂ production
	18hr	24hr				18hr	24hr		
F-1					F-46	+	+	4.64	—
F-2					F-47				
F-3		+	5.03	—	F-48				
F-4	+	+	4.83	—	F-49				
F-5					F-50	+	+	4.78	—
F-6					F-51	+	+	4.88	—
F-7					F-52				
F-8		+	4.65	—	F-53				
F-9	+	+	4.50	+	F-54	+	+	4.95	—
F-10		+	5.04	—	F-55	+	+	4.91	—
F-11					F-56	+	+	5.61	—
F-12	+	+	4.53	+	F-57				
F-13					F-58	+	+	4.69	—
F-14	+	+	4.62	±	F-59	+	+	4.56	—
F-15		+	5.06	—	F-60				
F-16	+	+	4.66	—	F-61		+	5.08	—
F-17	+	+	4.67	—	F-62				
F-18					F-63	+	+	4.70	±
F-19					F-64				
F-20	+	+	4.46	+	F-65	+	+	4.88	—
F-21	+	+	4.53	—	F-66	+	+	4.96	—
F-22	+	+	4.53	—	F-67	+	+	4.93	—
F-23	+	+	4.53	—	F-68	+	+	4.96	±
F-24		+	4.70	—	F-69				
F-25					F-70				
F-26					F-71		+	4.96	—
F-27					F-72		+	5.14	—
F-28		+	5.03	—	F-73				
F-29					F-74	+	+	4.66	—
F-30					F-75	+	+	4.50	—
F-31		+	5.11	±	F-76	+	+	4.69	—
F-32	+	+	4.80	—	F-77				
F-33		+	4.86	—	F-78		+	4.54	—
F-34	+	+	4.93	—	F-79	+	+	4.71	—
F-35	+	+	4.75	±	F-80				
F-36					F-81	+	+	4.60	—
F-37	+	+	4.88	—	F-82				
F-38	+	+	4.69	—	F-83		+	5.30	—
F-39		+	5.06	—	F-84	+	+	4.82	—
F-40					F-85				
F-41					F-86	+	+	4.82	—
F-42		+	4.88	—	F-87	+	+	4.73	—
F-43	+	+	4.87	—	F-88				
F-44					F-89				
F-45	+	+	4.76	±	F-90				

Strain	Skim Milk coagulation		pH	Vitamin K ₂ production	Strain	Skim Milk coagulation		pH	Vitamin K ₂ production
	18hr	24hr				18hr	24hr		
F-91	+	+	4.54	—					
F-92		+	4.58	—					
F-93									
F-94	+	+	4.96	—					
F-95	+	+	5.01	±					
F-96									
F-97	+	+	5.07	—					
F-98									
F-99	+	+	4.94	—					
F-100									
F-101									
F-102	+	+	4.90	—					
F-103		+	4.96	—					
F-104									
F-105									
F-106	+	+	4.74	—					
F-107		+	5.12	—					
F-108									
F-109		+	4.94	±					
F-110									
F-111									
F-112	+	+	4.88	—					
F-113									
F-114									
F-115									
F-116									
F-117		+	4.67	±					
F-118									
F-119									
F-120									
F-121									
F-122	+	+	4.5	+					
F-123									
F-124									
F-125									
F-126									
F-127									
F-128		+	4.57	+					

Table 19. Skim milk coagulation and Vitamin K₂ production of strain isolated from infant manure

Strain	Skim Milk coagulation		pH	Vitamin K ₂ production	Strain	Skim Milk coagulation		pH	Vitamin K ₂ production
	18hr	24hr				18hr	24hr		
G-1	+	+	4.79	—	G-46				
G-2				—	G-47				
G-3	+	+	4.80	—	G-48				
G-4	+	+	4.96	—	G-49		+	4.70	—
G-5	+	+	4.88	—	G-50		+	4.81	—
G-6					G-51				
G-7					G-52	+	+	4.73	—
G-8	+	+	4.94	±	G-53				
G-9					G-54	+	+	4.93	—
G-10					G-55				
G-11	+	+	4.89	—	G-56	+	+	4.75	—
G-12	+	+	4.67	—	G-57				
G-13					G-58	+	+	4.74	—
G-14					G-59	+	+	4.74	±
G-15	+	+	4.94	—	G-60				
G-16		+	4.96	—	G-61	+	+	4.80	—
G-17					G-62				
G-18					G-63				
G-19					G-64				
G-20	+	+	4.86	—	G-65	+	+	4.96	—
G-21	+	+	4.87	±	G-66	+	+	4.72	—
G-22					G-67				
G-23	+	+	4.71	—	G-68				
G-24					G-69				
G-25					G-70	+	+	4.62	—
G-26	+	+	4.93	—	G-71	+	+	4.74	—
G-27	+	+	4.66	—	G-72		+	5.19	—
G-28		+	4.86	—	G-73				
G-29					G-74				
G-30	+	+	4.67	—	G-75				
G-31					G-76				
G-32		+	5.11	—	G-77	+	+	4.70	—
G-33	+	+	4.94	—	G-78	+	+	4.79	—
G-34					G-79		+	4.71	±
G-35					G-80	+	+	4.83	—
G-36	+	+	4.94	—	G-81	+	+	4.61	—
G-37	+	+	4.67	—					
G-38	+	+	4.66	—					
G-39									
G-40		+	5.12	—					
G-41									
G-42	+	+	4.82	+					
G-43	+	+	4.80	—					
G-44									
G-45									

Table 20. Skim milk coagulation and Vitamin K₂ production of strain isolated from adult manure

Strain	Skim Milk coagulation		pH	Vitamin K ₂ production	Strain	Skim Milk coagulation		pH	Vitamin K ₂ production
	18hr	24hr				18hr	24hr		
H-1					H-46	+	+	4.62	±
H-2					H-47				
H-3					H-48	+	+	4.73	—
H-4		+	5.04	—	H-49	+	+	4.70	—
H-5	+	+	4.72	—	H-50				
H-6					H-51				
H-7	+	+	4.62	±	H-52				
H-8					H-53	+	+	4.78	—
H-9	+	+	4.74	—	H-54		+	5.04	—
H-10					H-55				
H-11		+	5.19	—	H-56		+	5.04	+
H-12					H-57				
H-13	+	+	4.70	—	H-58	+	+	4.69	—
H-14	+	+	4.79	—	H-59	+	+	4.69	—
H-15	+	+	4.71	—	H-60				
H-16					H-61	+	+	4.74	—
H-17					H-62				
H-18					H-63				
H-19	+	+	4.83	—	H-64				
H-20	+	+	5.58	—	H-65				
H-21					H-66				
H-22					H-67	+	+	4.68	—
H-23	+	+	4.84	—	H-68				
H-24	+	+	4.84	—	H-69				
H-25					H-70				
H-26	+	+	4.60	—	H-71	+	+	4.65	—
H-27					H-72				
H-28	+	+	4.64	+	H-73	+	+	4.62	—
H-29	+	+	4.78	±	H-74				
H-30					H-75				
H-31					H-76	+	+	4.59	±
H-32					H-77	+	+	4.82	—
H-33	+	+	4.46	—	H-78				
H-34					H-79				
H-35	+	+	4.95	—	H-80	+	+	4.71	—
H-36		+	5.06	—	H-81				
H-37					H-82				
H-38	+	+	4.86	—	H-83	+	+	4.71	—
H-39	+	+	4.84	—	H-84	+	+	4.81	—
H-40					H-85	+	+	4.89	±
H-41	+	+	4.60	—	H-86		+	5.14	—
H-42									
H-43									
H-44	+	+	4.49	±					
H-45									

Table 21. Vitamin K₂ production of bifidobacteria isolated from infant manure by TLC

Strain	Vitamin K ₂ production	Strain	Vitamin K ₂ production
I-1	—	I-31	—
I-2	—	I-32	—
I-3	—	I-33	—
I-4	—	I-34	—
I-5	+	I-35	—
I-6	—	I-36	—
I-7	—	I-37	—
I-8	—	I-38	—
I-9	—	I-39	—
I-10	—	I-40	—
I-11	—	I-41	—
I-12	—	I-42	—
I-13	—	I-43	—
I-14	—	I-44	—
I-15	—	I-45	—
I-16	—	I-46	—
I-17	±	I-47	—
I-18	—	I-48	—
I-19	±	I-49	—
I-20	—	I-50	±
I-21	—	I-51	—
I-22	—	I-52	—
I-23	—	I-53	—
I-24	—	I-54	—
I-25	—	I-55	—
I-26	—	I-56	—
I-27	—	I-57	—
I-28	—	I-58	—
I-29	—	I-59	—
I-30	+		

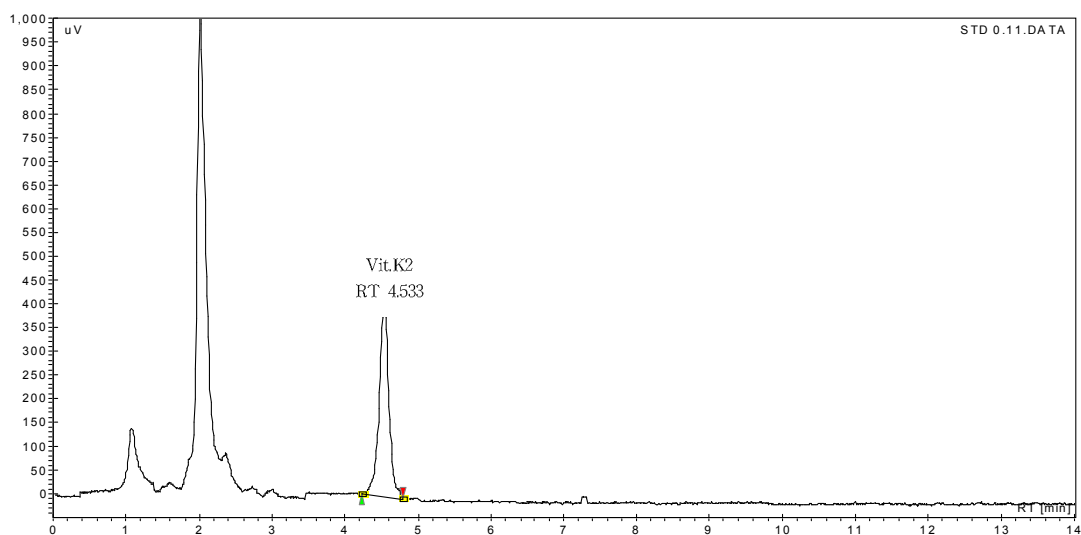
Table 22. Vitamin K₂ production of bifidobacteria isolated from the adult manure by TLC

Strain	Vitamin K ₂ production	Strain	Vitamin K ₂ production
J-1	—	J-45	—
J-2	—	J-46	—
J-3	—	J-47	—
J-4	—	J-48	—
J-5	±	J-49	—
J-6	—	J-50	±
J-7	—	J-51	—
J-8	±	J-52	—
J-9	—	J-53	—
J-10	—	J-54	—
J-11	—	J-55	—
J-12	—	J-56	—
J-13	—	J-57	—
J-14	—	J-58	—
J-15	—	J-59	—
J-16	—	J-60	+
J-17	—	J-61	—
J-18	—	J-62	—
J-19	—	J-63	—
J-20	—	J-64	—
J-21	—	J-65	—
J-22	—	J-66	—
J-23	—	J-67	—
J-24	±	J-68	—
J-25	—	J-69	—
J-26	—	J-70	—
J-27	—	J-71	—
J-28	—	J-72	—
J-29	—	J-73	±
J-30	—	J-74	—
J-31	+	J-75	—
J-32	—	J-76	—
J-33	—	J-77	—
J-34	—	J-78	—
J-35	—	J-79	—
J-36	—	J-80	—
J-37	—	J-81	—
J-38	—	J-82	—
J-39	—	J-83	—
J-40	—	J-84	—
J-41	—	J-85	+
J-42	—	J-86	+
J-43	—	J-87	—
J-44	—		

나. HPLC를 이용한 Vitamin K₂의 정량

TLC 확인을 통하여 비타민 K₂ 생성이 확인된 138개 균주에서 추출된 용출액과 비타민 K₂ 표준 용액을 HPLC로 분석한 chromatogram은 Fig. 4와 같다. 이때 vitamin K₂는 표준품과 시료 간에 retention time이 4.533분으로 동일한 시간대에 검출된 면적을 기준으로 계산하여 시료의 비타민 K₂ 함량을 계산하였다.

A.



B.

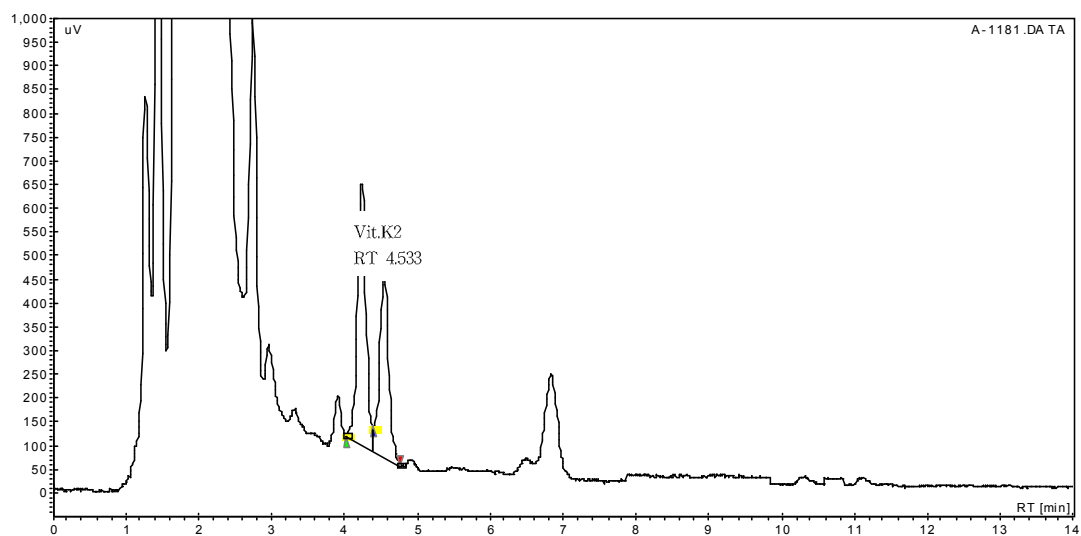


Fig. 4. Chromatogram of Vitamin K₂

A. Standard, B. Sample

Table 24. Vitamin K₂ content of selected lactic acid bacteria by HPLC

Strain	Vitamin K ₂ content($\mu\text{g}/\text{kg}$)		Strain	Vitamin K ₂ content($\mu\text{g}/\text{kg}$)	
	Rogosa medium	Skim milk		Rogosa medium	Skim milk
A-2	3.57	1.47	C-65	5.71	1.17
A-13	4.51	1.15	C-79	29.63	8.98
A-19	3.21	0.86	C-92	3.21	0.69
A-24	2.42	0.64	C-101	4.81	1.44
A-36	3.10	0.93	C-102	4.89	1.47
A-53	6.86	2.06	C-119	6.14	1.75
A-77	5.74	1.82	C-138	5.23	1.15
A-81	6.20	0.89	C-140	5.03	1.04
A-85	3.25	0.98	C-155	4.65	1.53
A-101	3.61	1.04	C-177	4.50	1.53
A-105	1.99	0.70	C-178	3.24	0.79
A-112	3.43	1.01	C-195	4.75	1.34
A-118	37.48	11.42	C-201	6.62	1.99
A-138	5.03	1.31	D-9	4.06	1.22
A-154	12.98	3.79	D-10	5.14	1.45
A-183	2.86	0.68	D-21	5.24	1.75
A-236	4.55	1.73	D-22	4.54	1.63
A-260	30.75	9.52	D-23	6.53	1.69
B-3	5.64	1.96	D-33	4.36	1.13
B-15	7.58	2.72	D-37	2.33	0.70
B-18	5.91	1.00	D-40	1.11	0.33
B-24	4.71	1.14	D-52	1.30	0.53
B-25	5.18	1.55	D-61	5.39	1.26
B-30	24.06	7.22	D-62	4.43	1.33
B-37	5.43	1.36	D-83	5.34	1.60
B-70	5.48	1.46	D-98	35.70	10.81
B-92	2.74	0.28	D-129	3.26	0.89
B-94	5.33	1.06	D-161	4.37	1.13
B-111	6.48	1.47	D-180	4.38	1.31
B-130	3.15	0.59	D-190	1.95	0.59
B-144	5.00	1.05	D-206	5.06	1.52
B-150	4.30	1.92	D-212	34.54	10.63
B-169	5.06	1.25	D-215	5.06	1.25
B-176	6.08	1.28	E-22	3.34	1.00
B-184	3.14	0.47	E-61	1.69	0.51
B-185	4.39	1.23	E-69	4.09	1.32
B-226	3.96	1.91	E-116	1.84	0.55
B-230	4.36	1.13	E-131	5.32	1.60
B-241	4.21	1.62	E-133	4.60	1.82
B-262	27.66	9.73	E-157	1.01	0.37
B-265	5.78	1.73	E-189	2.19	0.66
B-272	2.21	0.66	E-200	4.06	1.23
C-3	6.65	2.00	E-217	6.60	1.98
C-33	4.62	1.93	E-225	1.46	0.44
C-58	4.59	1.83	E-229	1.59	0.58

Strain	Vitamin K ₂ content($\mu\text{g}/\text{kg}$)		Strain	Vitamin K ₂ content($\mu\text{g}/\text{kg}$)	
	Rogosa medium	Skim milk		Rogosa medium	Skim milk
E-248	4.23	1.72	J-5	4.33	1.13
E-259	6.43	1.39	J-8	3.32	1.00
F-9	57.95	27.39	J-24	5.21	1.46
F-12	2.18	0.56	J-31	1.18	0.25
F-14	6.56	1.79	J-50	2.59	0.48
F-20	6.18	1.58	J-60	3.22	0.77
F-31	3.88	1.61	J-73	4.12	1.42
F-35	4.84	1.54	J-85	3.28	0.84
F-45	5.84	1.57	J-86	1.38	0.21
F-54	4.78	1.34	1	3.52	1.65
F-57	3.26	0.89	2	3.72	1.76
F-59	1.46	0.44	16	4.28	1.87
F-65	4.45	1.43	22	4.64	2.02
F-76	3.06	0.29	25	4.59	1.96
F-80	2.34	0.70	28	3.35	1.68
F-90	5.60	1.86	32	5.30	2.26
F-95	5.49	1.56	46	4.33	2.10
F-109	3.36	1.01	47	3.24	1.17
F-117	2.43	0.37	49	3.57	1.26
F-122	1.47	0.44	50	3.82	1.82
F-128	2.51	0.57	61	7.32	2.98
G-8	2.26	0.86	73	8.65	3.77
G-21	3.31	0.99	110	2.91	1.22
G-42	1.19	0.36	117	4.23	1.82
G-59	1.22	0.57	199	3.83	1.31
G-79	2.16	0.65	209	2.82	0.80
H-7	4.10	1.32	214	3.75	1.33
H-28	2.51	0.75	218	2.39	0.78
H-29	1.33	0.47	272	184.94	63.93
H-44	2.03	0.51	301	38.54	27.65
H-46	1.16	0.53	318	6.38	2.41
H-56	2.52	0.76	331	3.25	0.86
H-76	3.55	1.07	363	2.73	0.72
H-85	5.41	1.62	498	4.02	1.88
I-5	3.34	1.00	581	36.12	20.25
I-17	4.53	1.63	640	3.86	1.80
I-19	2.23	0.67	652	4.28	1.83
I-30	1.30	0.42	687	3.66	1.27
I-50	5.23	1.37			

상기 Table 24는 선발 균주를 Rogosa medium에 접종하여 배양하고, 원심분리하여 얻어진 cell을 동결건조한 cell과 Skim milk에 접종하여 얻어진 배양액에서의 비타민 K₂를 추출하여 HPLC로 분석한 결과로서 분리된 젖산균 2,340개 중 10% 환원탈지유에 응고반응을 보인 1,042개와 bifidobacteria균 146개를 대상으로 TLC에서

비타민 K₂ 양성을 보인 167개 균주를 선발하였다. HPLC 분석을 통해 Rogosa medium에서는 10 µg/kg 미만이 167 균주 중 154균주이었으며, 10-20µg/kg 미만이 1개, 20-30µg/kg 미만이 4개, 30-40µg/kg 미만이 6개이었으며, 40µg/kg 이상이 2개로 나타났다. 반면 탈지유에 배양하여 얻어진 비타민 K₂ 함량은 10 µg/kg 미만이 160개, 10-20µg/kg 미만이 3개였으며, 20-30µg/kg 미만이 3개, 30µg/kg 이상이 1개로서, 최종 13개 균주를 선발하였다. 특히 272 균주는 Rogosa medium에서 184.94µg/L, 환원탈지유배지에서 63.93µg/L을 나타내 가장 많이 나온 것이 확인되었다. 272 균주의 경우 비타민 K₂ 생성량은 배양액이 환원탈지유배지에 비하여 약 3배 정도 많이 나왔으며, 타 균주의 경우도 마찬가지로 비슷한 경향을 보였는데 각 균주에 따라 배지에서의 생성량이 차이가 있는 것으로 나타났다.

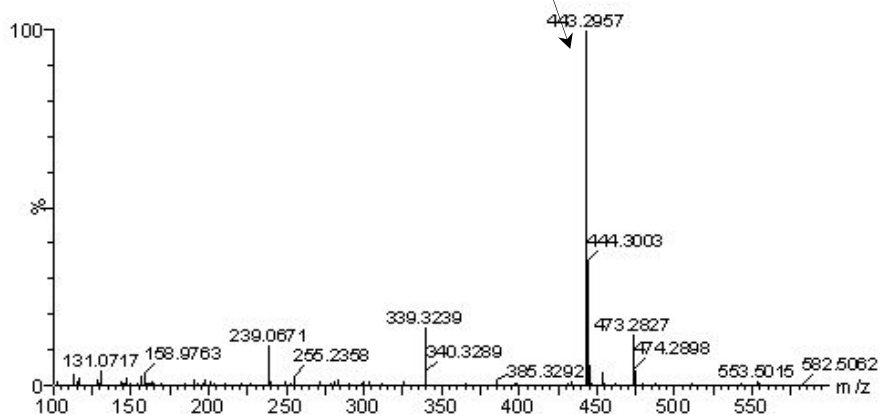
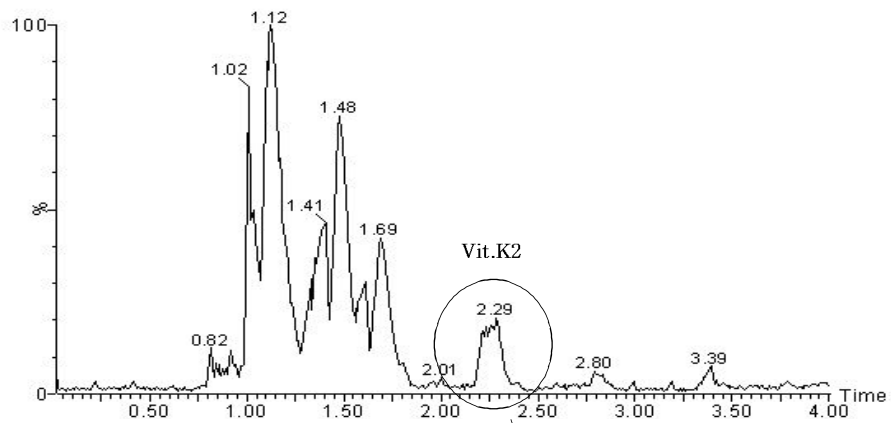
Morishita 등(1999)의 결과에서는 *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* 2균주의 비타민 K₂(MK-7)의 생산량은 각각 90µg/L와 29µg/L 이었다고 하였고, Hojo 등(2007)은 Gruyere 치즈에서의 MK-4 농도는 81-96ng/g인 반면 Appenzeller 치즈는 각각 43과 52ng/g이라고 한 결과와 비교했을 때 본 연구결과가 약간 높은 함량을 보였다.

다. LC/MS(UPLC-Q-TOF)를 이용한 Vitamin K₂의 확인

선발된 균주를 대상으로 Vitamin K₂를 분리 동정하기 위하여 ultra performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight (UPLC-Q-TOF)를 사용하였다. 물질의 동정은 elemental composition으로 물질을 1차 screening 한 후 online database (www.chemsider.com)를 이용하여 2차 screening 하였으며 최종 표준물질을 이용하여 동정하였으며, LC-MS를 이용하여 분리동정한 결과 선발된 균주의 product ion인 444.3003m/z를 확인하였고, Fig. 5에 나타내었다. Table 25에서와 같이 비타민 K₂(MK-4) 표준품 특성과 비교하여 nominal mass인 444Da 범주에 속함에 따라 선발된 균주에 의해 생성된 물질이 비타민 K₂임을 확인할 수 있었다.

Table 25. Inherent properties of standard vitamin K₂(menaquinone-4)

Parameters	Inherent properties
Empirical formula	C ₃₁ H ₄₀ O ₂
Molecular weight	444.6481
Normal mass	444 Da
Monoisotopic mass	444.302831 Da
Systematic name	2-methyl-3-[(2E,6E,10E)-3,7,11,15-tetramethylhexadeca-2,6,10,14-tetraenyl]naphthalene-1,4-dione



MSMS

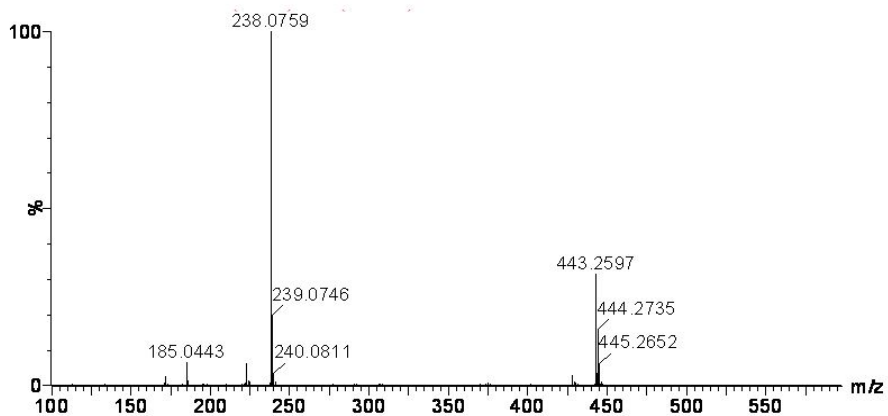


Fig. 5. Identification of Vitamin K₂ by LC/Mass Spectrometry

3. 선발 젖산균주 동정

vitamin K₂ 생산이 높은 젖산균 13균주의 genus와 species를 결정하기 위하여 생리적, 생화학적 시험을 하였다. 선발된 균주들은 공히 Gram 양성을 나타내었고 현미경으로 관찰 시 10종은 cocci 형태, 3종은 rod 형태이었다. 산소유무와 상관없이 잘 성장하였고, catalase와 운동성은 음성으로 나타났다. 또한 15°C와 45°C에서 성장하였으며, glucose와 arginine으로부터 각각 gas와 암모니아를 생성하지 않았다. 당 발효 시험은 간균일 경우 API 50 CHL kit(BioMereux, France)를 이용하였고, 구균일 경우 API 20 STREP kit를 이용하여 실시하였다(Table 26)

Table 26. Biochemical and physiological characteristics of lactic acid bacteria isolated from raw milk and feces.

strains	A118	A154	A260	B15	B30	B262	C79	D98	D212	F9	272	301	581
Gram stain	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cell morphology	cocci	cocci	cocci	rod	cocci	rod	cocci	cocci	cocci	cocci	rod	cocci	cocci
Spore formation	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Motility	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Aerobic growth	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Anaerobic growth	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Catalase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth at 15°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
Growth at 45°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gas from glucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ammonia from arginine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

API 20 STREP

Strains	A118	A154	A260	B30	C79	D98	D212	F9	301	581
Pyruvate	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
Hippurate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Esculin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pyrrolidonyl 2 naphthylamide	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
6-Bromo-2-naphyl- α -D-glucuronate	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
Naphtol AS-BI β -D-glucuronate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-naphthyl- β -D-galactopyranoside	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-naphthyl phosphate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-leucine-2naphthylamide	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
Arginine	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
Ribose	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
L-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mannitol	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+
Sorbitol	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Trehalose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inulin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Raffinose	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Starch	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+
Glycogen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

API50 CHL

Strains	B15	B262	272	Strains	B15	B262	272
Control	-	-	-	Esculin ferric citrate	+	+	-
Glycerol	+	-	-	Salicin	+	+	-
Erythritol	-	-	-	D-Celiobiose	+	+	-
D-Arabinose	-	-	-	D-Maltose	+	+	-
L-Arabinose	+	-	-	D-Lactose	+	+	-
D-Ribose	+	+	+	D-Melibiose	+	-	-
D-Xylose	-	-	-	D-Saccharose	+	-	+
L-Xylose	-	-	-	D-Trehalose	+	-	+
D-Adonitol	-	-	-	Inulin	-	-	-
Methyl- β D-Xylopyranoside	-	-	+	D-Melezitose	+	-	-
D-Galactose	+	+	+	D-Raffinose	-	-	+
D-Glucose	+	+	+	Amidon(starch)	-	-	-
D-Fructose	+	+	+	Glycogen	-	-	-
D-Mannose	+	+	+	Xylitol	-	-	-
L-Sorbose	-	-	-	Gentiobiose	+	+	-
L-Rhamnose	-	-	-	D-Turanose	+	-	-
Dulcitol	-	-	-	D-Lyxose	-	-	-
Inositol	-	-	-	D-Tagatose	-	+	-
D-Mannitol	+	+	+	D-Fucose	-	-	-
D-Sorbitol	-	-	-	L-Fucose	-	-	-
Methyl- α D-Mannopyranoside	+	-	-	D-Arabitol	-	-	-
Methyl- α D-Glucopyranoside	-	-	-	L-Arabitol	-	-	-
N-AcetylGlucosamine	+	+	-	potassium Gluconate	-	-	+
Amygdalin	+	-	-	potassium 2-KetoGluconate	-	-	-
Arbutin	+	-	-	potassium 5-KetoGluconate	-	-	-

16S rRNA 유전자 부분을 universal primer를 이용한 PCR로 증폭하여 서열분석하였다. 분석된 염기서열을 그대로 이용하여 BLAST search한 결과(Table 27) 젓산균에 따라 98-100%의 상동성을 보였다.

Table 27. Identification of lactic acid bacteria selected by 16S rRNA sequence

strains	Description	score (bits)	Identities (%)
A-118	<i>Enterococcus faecalis</i> ¹⁾		93%
A-154	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	2853	100%
A-260	<i>Enterococcus durans</i>	2845	99%
B-15	<i>Lactobacillus plantarum</i>	1426	99%
B-30	<i>Enterococcus</i> sp.	2811	99%
B-262	<i>Lactobacillus curvatus</i> ssp <i>curvatus</i>	2839	99%
C-79	<i>Enterococcus faecalis</i>	1933	98%
D-98	<i>Enterococcus faecalis</i>	2845	99%
D-212	<i>Enterococcus faecalis</i>	2807	99%
F-9	<i>Streptococcus macedonicus</i>	1937	98%
272	<i>Lactobacillus fermentum</i>	2863	99%
301	<i>Streptococcus macedonicus</i>	2813	100%
581	<i>Enterococcus durans</i>	2831	99%

¹⁾ATB identification system에 입력한 결과임

선발된 13종의 젖산균 중 *Enterococcus faecalis* 균주가 4종, *Enterococcus durans* 2종, *Enterococcus* sp. 1종, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 균주가 1종, *Lactobacillus plantarum* 1종, *Lactobacillus curvatus* ssp *curvatus* 1종, *Lactobacillus fermentum* 1종, *Streptococcus macedonicus* 균주가 2종으로 나타났다.

vitamin D₃ 또한 1×10^{-4} mg/ml 농도에서 120.08%로 가장 높은 세포 증식능을 나타내었으며 1×10^{-3} mg/ml의 농도에서는 118.52%로 높았고 1×10^{-2} mg/ml의 농도에서는 107.07%를 나타내었다. 1×10^{-1} mg/ml의 농도에서는 94.75%를 나타내어 배양액만 넣어준 control군에 비해 낮은 값을 나타내었다.

Saos-2 cell 시험계에서 대두추출물과 Vitamin D₃의 세포증식능은 농도에 따라 100% 이상의 정상 증식능을 양호하게 나타내었다. 농도별 증식능은 1×10^{-4} mg/ml 농도에서 최고 증식능을 나타내었으며 농도 증가에 따라 감소하는 경향을 보였다. 양성대조구의 조골세포 증식능은 식품유래 대두추출물이 Vitamin D₃보다 모든 농도에서 높은 경향을 보였다.

나. Sample의 Alkaline phosphatase(ALP) 활성 측정

ALP는 거의 모든 조직에 존재하며 특히 골조직에 존재하는 ALP는 골 성장이 활발히 일어날 때 그 활성이 증가한다(Lim 등, 2007). 따라서 인간 유사 조골세포주인 Saos-2 cell에서 조골세포의 활성을 나타내는 지표로 사용되는 Alkaline phosphatase (ALP) 증가활성을 측정하였다 (Fig. 7).

Positive control로 사용한 대두 추출물은 1×10^{-4} mg/ml 농도에서 178.36%로 높은 ALP 활성을 나타내었으며 1×10^{-3} mg/ml의 농도에서는 206.43%로 가장 높은 활성을 나타내었다. 1×10^{-2} mg/ml의 농도에서는 152.63%의 높은 ALP 활성을 나타내었고 1×10^{-1} mg/ml의 농도에서는 122.22%를 보였으며 농도가 증가할수록 ALP 활성은 다소 감소하는 경향을 보였다.

Vitamin D₃는 1×10^{-4} mg/ml 농도에서 140.93%로 가장 높은 ALP 활성을 나타내었으며 1×10^{-3} mg/ml의 농도에서는 135.00%로 높았고 1×10^{-2} mg/ml의 농도에서는 131.57%를 나타내었다. 1×10^{-1} mg/ml의 농도에서는 112.86%를 나타내어 다른 농도에 비해 다소 낮은 활성을 보였다.

Saos-2 cell 시험계에서 ALP 활성은 대두추출물은 1×10^{-3} mg/ml 농도에서, Vitamin D₃는 1×10^{-4} mg/ml 농도에서 가장 높은 ALP 활성을 나타내었으며 농도 증가에 따라 감소하는 경향을 보였다. 양성대조구의 조골세포 증식능은 식품유래 대두추출물이 Vitamin D₃보다 모든 농도에서 높은 경향을 보였으며 특히 1×10^{-3} mg/ml 농도에서 대두추출물은 Vitamin D₃보다 1.5배 이상 높은 ALP 활성을 나타내었다. Fig. 6의 세포 증식능과 비교할 때 세포 증식능이 높아질수록 ALP 활성 역시 증가함을 보였다.

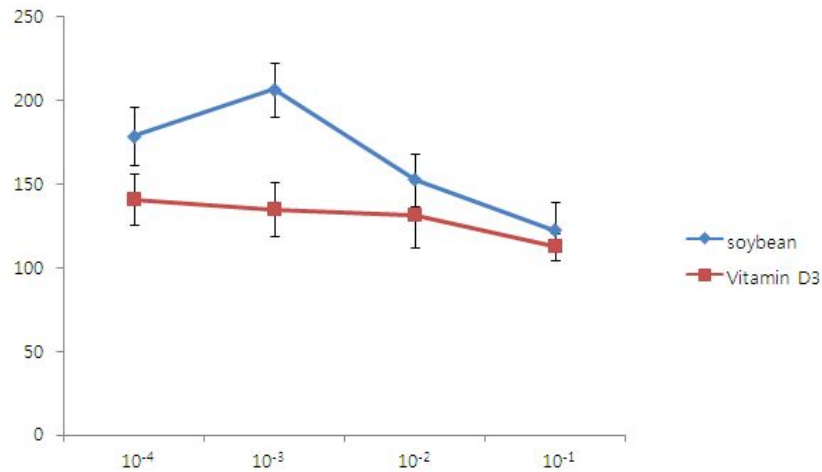


Fig. 7. Alkaline phosphatase (ALP) activities on Saos-2, human osteoblast-like cells in the presence of soybean extract and vitamin D₃.

5. 선발 젖산균의 특성조사

1차년도에서 비타민 K₂ 함량이 높은 균주 13종 중 산 생성 속도와 비타민 K₂ 함량을 감안하여 4종의 젖산균을 선발하여 특성조사를 실시하였다. 다음 이하는 272 균주(*Lactobacillus fermentum*)는 *Lactobacillus fermentum* 272, 581 균주 (*Enterococcus durans*)는 *Enterococcus durans* 581, 301 균주(*Streptococcus macedonicus*)는 *Streptococcus macedonicus* 301, F9 균주(*Streptococcus macedonicus*)는 *Streptococcus macedonicus* 351균주로 각각 명명하였다.

가. 젖산균의 생장

젖산균 4종의 생장속도를 알기 위하여 10% 환원탈지유 150ml에 젖산균 배양액을 1ml 용 피펫으로 1방울 접종한 후 34℃, 37℃, 40℃별로 3시간 간격으로 24시간 까지 배양시험 한 결과는 Fig. 8~15에서 보는 바와 같다.

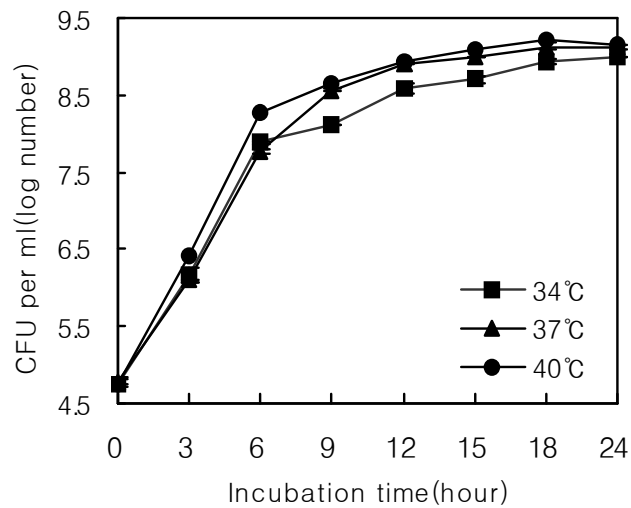


Fig. 8. Growth of *Lactobacillus fermentum* 272 in 10% reconstituted skim milk at various temperatures.

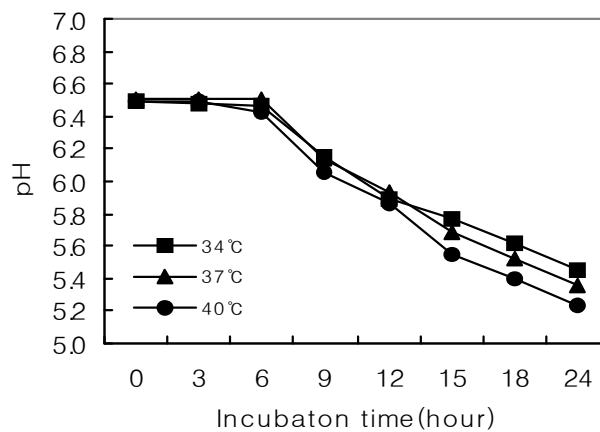


Fig. 9. pH change of *Lactobacillus fermentum* 272 in 10% reconstituted skim milk at various temperatures.

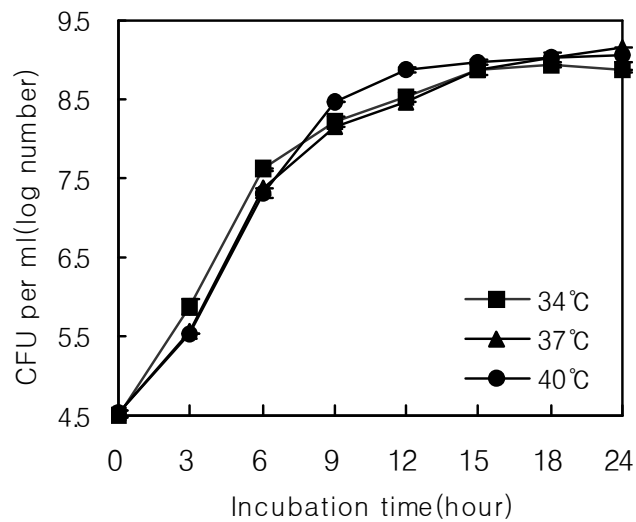


Fig. 10. Growth of *Enterococcus durans* 581 in 10% reconstituted skim milk at various temperatures.

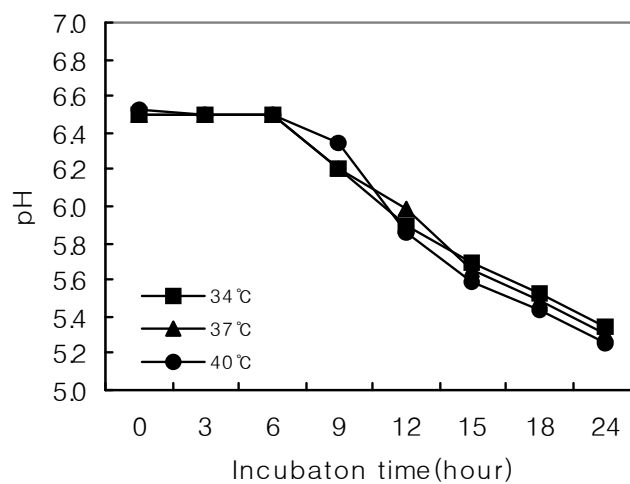


Fig. 11. pH change of *Enterococcus durans* 581 in 10% reconstituted skim milk at various temperatures.

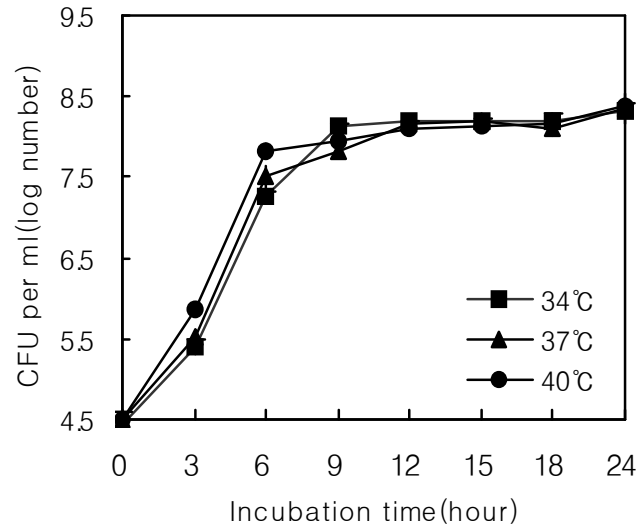


Fig. 12. Growth of *Streptococcus macedonicus* 301 in 10% reconstituted skim milk at various temperatures.

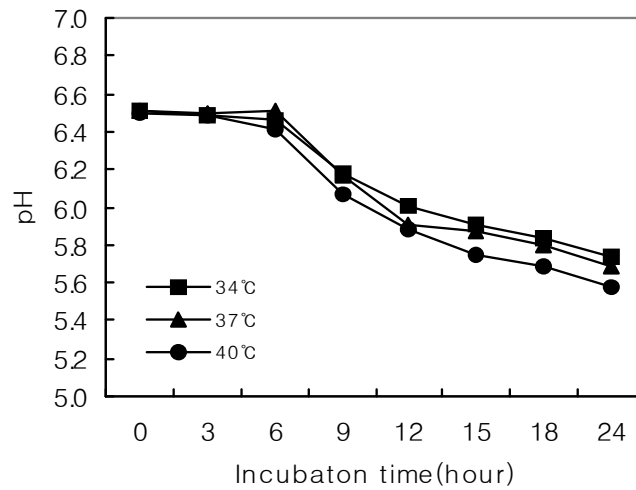


Fig. 13. pH change of *Streptococcus macedonicus* 301 in 10% reconstituted skim milk at various temperatures.

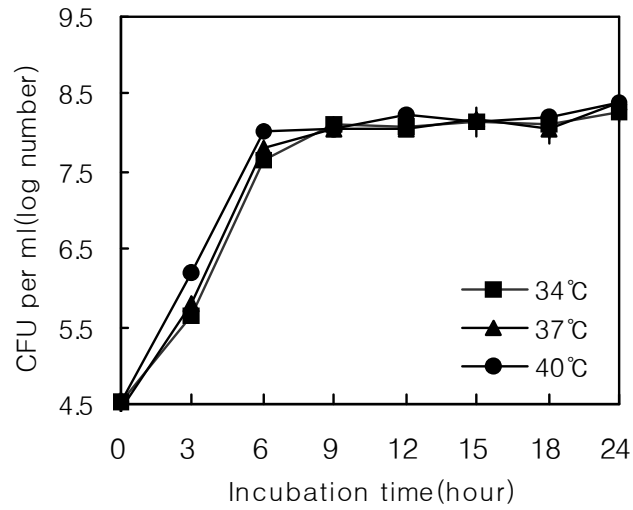


Fig. 14. Growth of *Streptococcus macedonicus* 351 in 10% reconstituted skim milk at various temperatures.

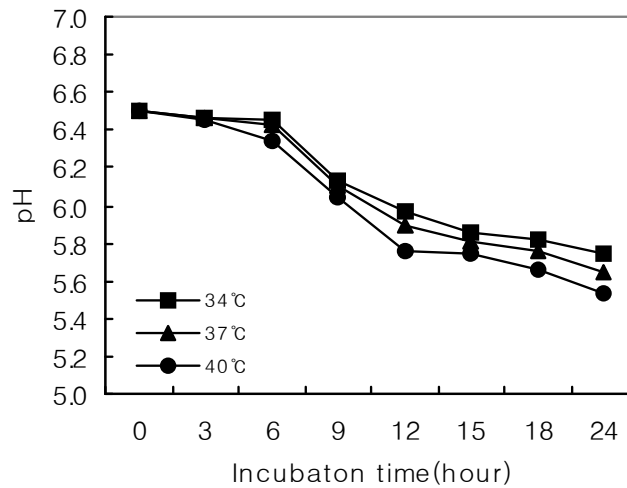


Fig. 15. pH change of *Streptococcus macedonicus* 351 in 10% reconstituted skim milk at various temperatures.

4종 모두 최적 성장조건은 40°C로 나타났으나 산 생성 속도가 비교적 완만한 편이었다. 세부적으로 보면, *Lactobacillus fermentum* 272는 대수기까지 6시간이 소요되

었고, 37°C와 40°C에서 거의 비슷하게 성장하였으며, pH는 40°C가 가장 빠른 산 생성을 보임에 따라 40°C가 가장 적정온도로 나타났다. *Enterococcus durans* 581 균주는 대수기까지 9시간이 소요되었고, 40°C, 37°C, 34°C 순으로 성장하였으며, pH 역시 같은 경향으로 산 생성을 보임에 따라 40°C가 가장 적정온도로 나타났다. *Streptococcus macedonicus* 301 균주와 *Streptococcus macedonicus* 351 균주는 공히 대수기까지 6시간이 소요되었고, 40°C, 37°C, 34°C 순으로 성장하였으며, pH 역시 같은 경향으로 산 생성을 보임에 따라 40°C가 가장 적정온도로 나타났다.

나. 항생제 내성시험

항생제 내성 시험은 tryptic soy broth(Difco)를 사용하여 2배 희석방법에 의해 성장여부를 관찰하여 최저억제농도(MIC) 값을 정하였으며, 그 결과는 Table 28에서 보는 바와 같다.

Table 28. Antibiotics susceptibility of lactic acid bacteria

Antimicrobial agents	Strains			
	<i>L. fermentum</i> 272	<i>E. durans</i> 581	<i>S. macedonicus</i> 301	<i>S. macedonicus</i> 351
————— minimal inhibitory concentrations($\mu\text{g}/\text{ml}$) —————				
Aminoglycosides				
Amikacin	200.0	200.0	25.0	5.0
Gentamycin	1600.0	800.0	50.0	800.0
Kanamycin	10.0	10.0	2.5	2.5
Neomycin	120.0	120.0	1.9	120.0
Streptomycin*	2400.0	4800.0	18.8	75.0
β -lactams				
Penicillin-G*	0.5	15.0	0.5	0.5
Methicillin	60.0	60.0	1.9	1.9
Oxacillin	400.0	400.0	100.0	200.0
Ampicillin	25.0	25.0	6.3	6.3
Gram-positive spectrum				
Bacitracin*	160.0	160.0	2.5	5.0
Rifampicin	0.1	0.1	1.9	1.9
Novobiocin	320.0	320.0	320.0	160.0
Lincomycin	40.0	40.0	10.0	10.0
Gram-negative spectrum				
Polymyxin B*	160.0	80.0	20.0	80.0
Broad spectrum				
Chloramphenicol	2.5	2.5	1.3	2.5
Vancomycin*	7.8	7.8	62.5	62.5

* : units/ml

L. fermentum 272 균주는 Gentamycin과 Polymyxin B에 대하여 다른 3종의 젓산균보다 저항성이 있는 반면 Rifampicin과 Chloramphenicol에 대해서는 내성이 약한 것으로 나타났다. *Enterococcus durans* 581 균주는 Streptomycin, Penicillin-G에 대해 내성이 강한 반면 Rifampicin에 대해서는 *L. fermentum* 272 균주와 함께 내성이 약한 것으로 나타났다. *Streptococcus macedonicus* 301 균주와 *Streptococcus macedonicus* 351 균주는 앞 선 두 균주에 비해 전반적으로 내성이 약한 편이었고, 다만 Vancomycin에 대해 내성이 강한 것으로 나타났다. *Streptococcus macedonicus* 두 균주 간에는 *Streptococcus macedonicus* 351 균주가 내성이 강한 편이었다.

다. 효소 활성 시험

젓산균 3종의 효소활성은 API ZYM kit를 사용하여 실시하였으며, 그 결과는 Table 29에서 보는 바와 같다.

Table 29. Enzyme patterns of lactic acid bacteria

	Strains			
	<i>L. fermentum</i> 272	<i>E. durans</i> 581	<i>S. macedonicus</i> 301	<i>S. macedonicus</i> 351
Alkaline phosphatase	1	0	0	1
Esterase(C4)	4	2	0	2
Esterase lipase(C8)	4	4	1	3
Lipase(C14)	0	0	0	1
Leucine arylamidase	5	5	5	5
Valine arylamidase	2	3	1	1
Cystine arylamidase	2	3	1	1
Trypsin	1	1	1	0
Chymotrypsin	1	1	1	0
Acid phosphatase	5	4	5	5
Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase	4	2	4	4
α -galactosidase	0	0	0	0
β -galactosidase	2	0	0	0
β -glucuronidase	0	0	0	0
α -glucosidase	0	0	2	0
β -glucosidase	0	0	0	0
N-acetyl- β -glucosaminidase	0	0	0	0
α -mannosidase	0	0	1	0
α -fucosidase	0	0	1	0

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

4종의 젖산균은 α -galactosidase, β -glucuronidase, β -glucosidase 및 N-acetyl- β -glucosaminidase 등의 효소에 대해 활성이 없는 반면 Leucine arylamidase 및 Acid phosphatase에 대해 높은 효소활성을 가지는 것으로 나타내었다. *L. fermentum* 272 균주는 Esterase, Esterase lipase 및 Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase에 대해 효소활성이 4이었고, 다른 3종의 균주에 비해 β -galactosidase의 효소활성이 2를 나타내었다. *E. durans* 581 균주는 Esterase lipase에 대해 효소활성이 4를 나타내었고, 다른 3종의 균주에 비해 Valine arylamidase 와 Cystine arylamidase가 3을 나타내었다. *S. macedonicus* 301 균주는 Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase에 대해 효소활성이 4이었고, 다른 3종의 균주에 비해 α -glucosidase가 2를 나타내었다. *S. macedonicus* 351 균주는 Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase에 대해 효소활성이 4를 나타내었고, *S. macedonicus* 301 균주에 비해 Alkaline phosphatase, Esterase, Esterase lipase, Lipase에 대해 효소활성이 높은 반면 Trypsin, Chymotrypsin, α -glucosidase, α -mannosidase, α -fucosidase에 대해 효소활성이 낮았다. 특히 젖산균 4종 모두 Benzopyrene을 발암성 물질로 전환시키는 발암효소인 β -glucuronidase의 경우에는 효소활성이 없는 것으로 나타나 안전성을 확인할 수 있었다.

라. 담즙내성 시험

담즙에 대한 균주의 내성을 시험하기 위하여 oxgall(Difco)을 첨가하지 않은 것과 첨가한 배지에서 각 균주의 내성을 시험한 결과는 각각 Fig. 16~19에서 보는 바와 같다.

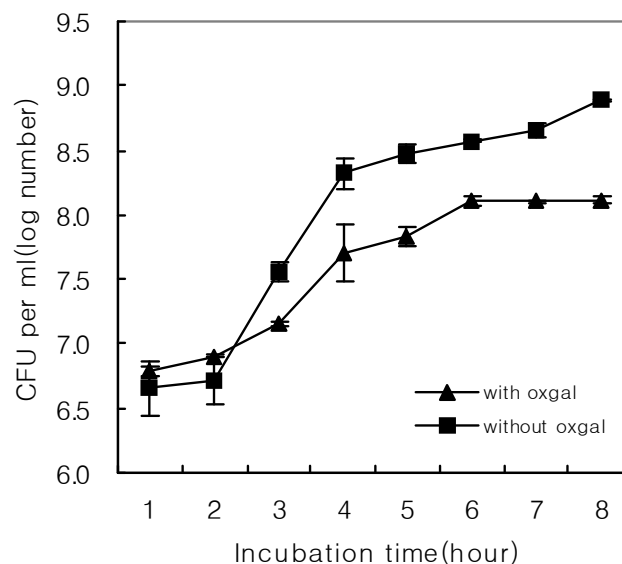


Fig. 16. Growth of *Lactobacillus fermentum* 272 in MRS broth containing 0.05% L-cysteine with or without 0.3% oxgall.

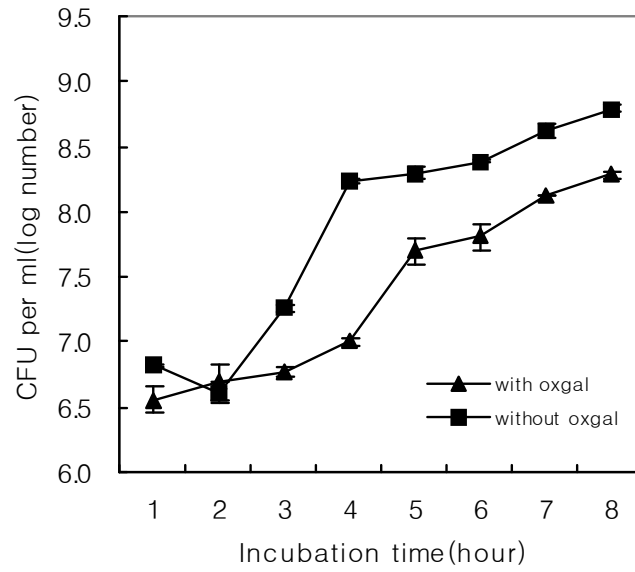


Fig. 17. Growth of *Enterococcus durans* 581 in MRS broth containing 0.05% L-cysteine with or without 0.3% oxgall.

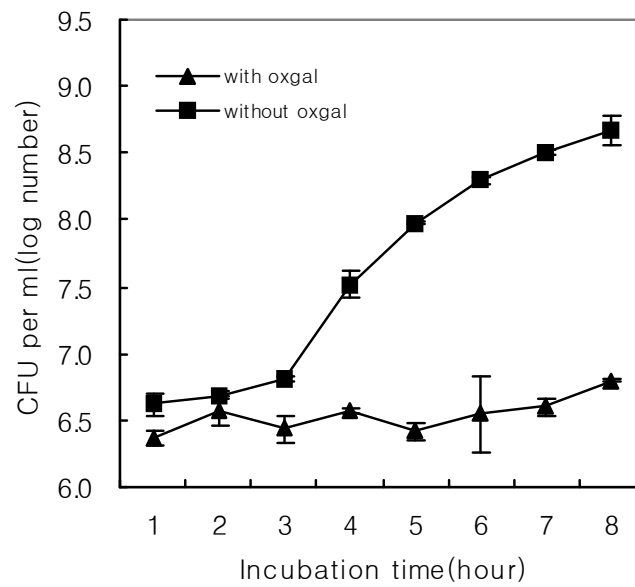


Fig. 18. Growth of *Streptococcus macedonicus* 301 in MRS broth containing 0.05% L-cysteine with or without 0.3% oxgall.

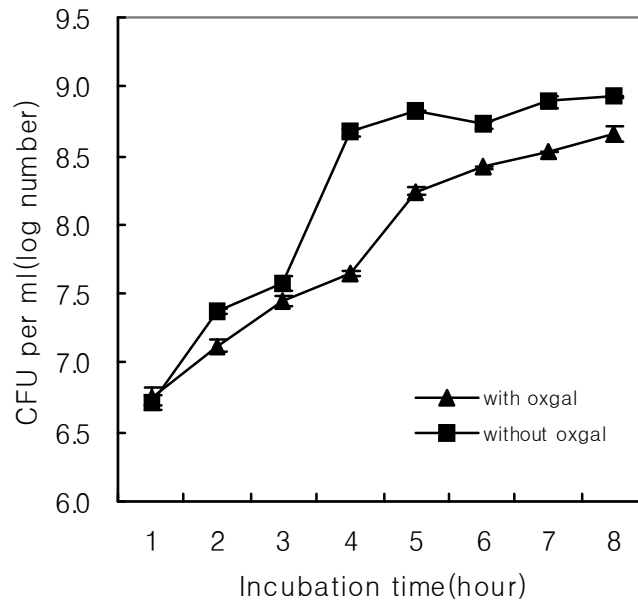


Fig. 19. Growth of *Streptococcus macedonicus* 351 in MRS broth containing 0.05% L-cysteine with or without 0.3% oxgall.

3종의 젖산균이 oxgall을 첨가하지 않은 경우와 첨가한 경우 간에 약 0.5log 값 차이는 있었지만 비슷하게 성장하는 추세를 보여 전반적으로 담즙에 대한 내성이 있는 반면, *Streptococcus macedonicus* 301 균주는 타 균주에 비해 영향을 가장 많이 받는 것으로 나타났다.

마. pH 내성 시험

위산과 비슷한 정도의 pH에 대한 내성을 알아보기 위하여 젖산균주를 pH 2, 3, 4 및 6.4의 증류수에서 3시간까지의 생존여부를 시험한 결과는 Fig. 20~23에서 보는 바와 같다.

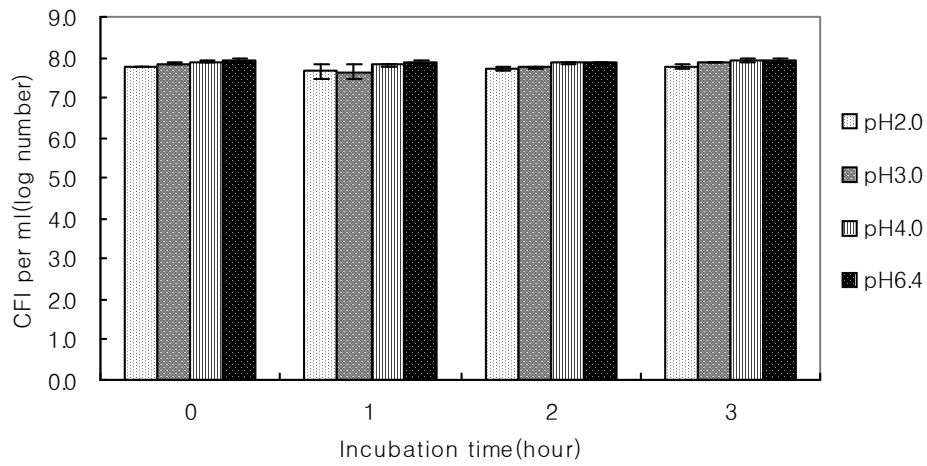


Fig. 20. Survival of *Lactobacillus fermentum* 272 after 3hrs in HCL solution (pH 2, 3, 4, 6.4)

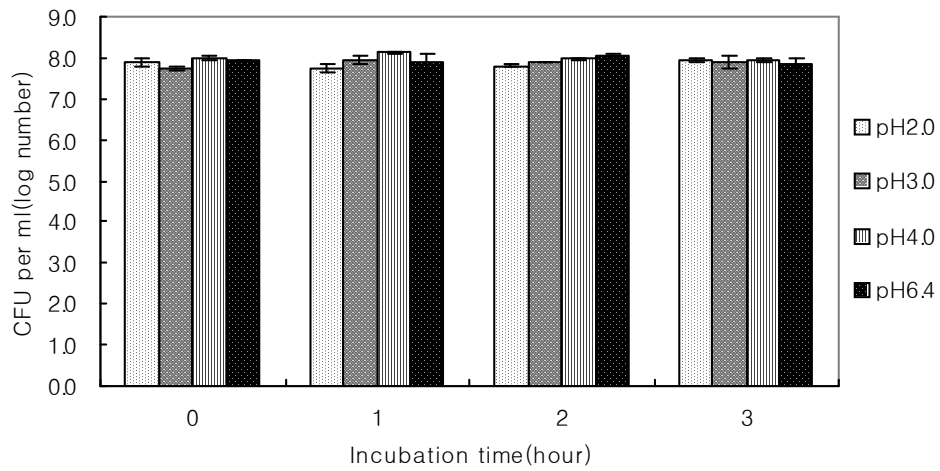


Fig. 21. Survival of *Enterococcus durans* 581 after 3hrs in HCL solution (pH 2, 3, 4, 6.4)

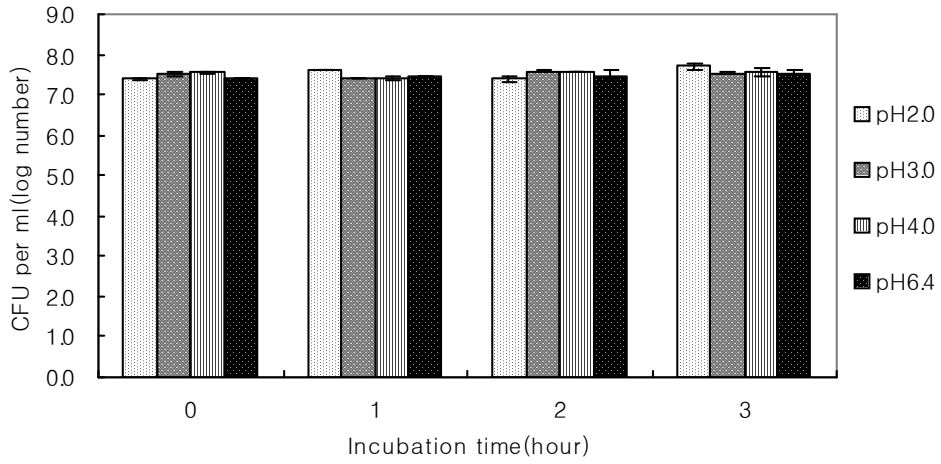


Fig. 22. Survival of *Streptococcus macedonicus* 301 after 3hrs in HCL solution (pH 2, 3, 4, 6.4)

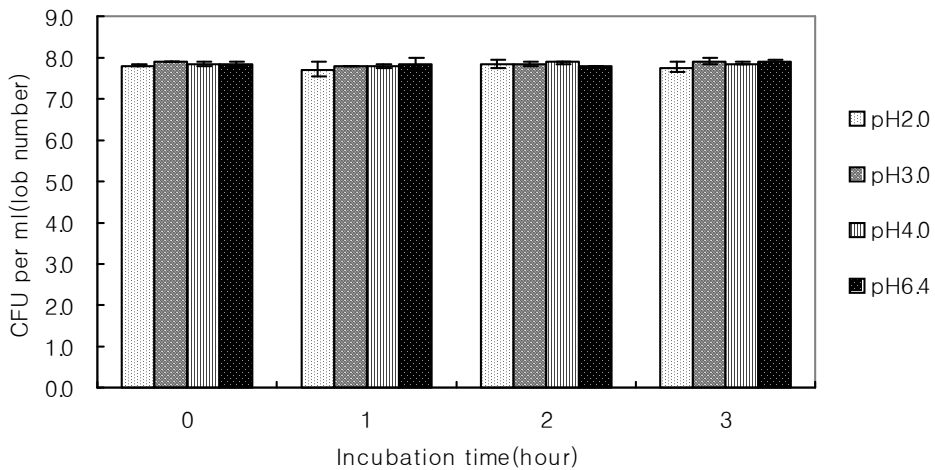


Fig. 23. Survival of *Streptococcus macedonicus* 351 after 3 hrs in HCL solution (pH 2, 3, 4, 6.4)

이와 같은 결과로 볼 때 비교적 4 균주 공히 pH 2와 pH 3의 증류수에서는 3시간까지 생존률에 큰 영향이 없는 것으로 나타났다.

바. 항균력 시험

젖산균이 식중독균에 대해 어느 정도 억제하는지를 측정하기 위해 혼합배양을 실시한 결과는 Table 30~33과 같다.

Table 30. Inhibition of pathogens by *Lactobacillus fermentum* 272 in MRS broth

Pathogens	Growth				Inhibition (%)
	Pathogens ^a		<i>L. fermentum</i> 272 +Pathogens		
	CFU/ml	pH	CFU/ml	pH	
<i>Escherichia coli</i>	2.80×10 ⁷	6.65	5.25×10 ⁸	4.81	0.00
<i>Salmonella typhimurium</i>	7.00×10 ⁷	6.48	1.15×10 ⁶	4.75	83.64
<i>Staphylococcus aureus</i>	1.55×10 ⁸	6.53	2.15×10 ⁷	4.83	86.12

* Initial count of *Lactobacillus fermentum* 272 : 1.54×10⁶CFU/ml^a Determined after 6h of incubation at 37°CTable 31. Inhibition of pathogens by *Enterococcus durans* 581 in MRS broth

Pathogens	Growth				Inhibition (%)
	Pathogens ^a		<i>E. durans</i> 581 +Pathogens		
	CFU/ml	pH	CFU/ml	pH	
<i>Escherichia coli</i>	2.80×10 ⁷	6.65	8.80×10 ⁸	4.71	0.00
<i>Salmonella typhimurium</i>	7.00×10 ⁷	6.48	1.33×10 ⁶	4.78	81.00
<i>Staphylococcus aureus</i>	1.55×10 ⁸	6.53	2.65×10 ⁷	4.78	82.85

* Initial count of *Enterococcus durans* 581 : 1.27×10⁶CFU/ml^a Determined after 6h of incubation at 37°CTable 32. Inhibition of pathogens by *Streptococcus macedonicus* 301 in MRS broth

Pathogens	Growth				Inhibition (%)
	Pathogens ^a		<i>S. macedonicus</i> 301 +Pathogens		
	CFU/ml	pH	CFU/ml	pH	
<i>Escherichia coli</i>	2.80×10 ⁷	6.65	1.51×10 ⁷	5.54	46.25
<i>Salmonella typhimurium</i>	7.00×10 ⁷	6.48	4.30×10 ⁶	5.56	38.57
<i>Staphylococcus aureus</i>	1.55×10 ⁸	6.53	1.44×10 ⁸	5.69	7.12

* Initial count of *Streptococcus macedonicus* 301 : 1.14×10⁶CFU/ml^a Determined after 6h of incubation at 37°C

Table 33. Inhibition of pathogens by *Streptococcus macedonicus* 351 in MRS broth

Pathogens	Growth				Inhibition (%)
	Pathogens ^a		<i>S. macedonicus</i> 351 +Pathogens		
	CFU/ml	pH	CFU/ml	pH	
<i>Escherichia coli</i>	2.80×10 ⁷	6.65	1.14×10 ⁹	4.84	0.00
<i>Salmonella typhimurium</i>	7.00×10 ⁷	6.48	1.23×10 ⁶	4.82	82.50
<i>Staphylococcus aureus</i>	1.55×10 ⁸	6.53	1.72×10 ⁷	4.85	88.90

* Initial count of *Streptococcus macedonicus* 351 : 4.55×10⁶CFU/ml

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

Lactobacillus fermentum 272 균주는 *Salmonella typhimurium*와 *Staphylococcus aureus*에 대해 각각 83.64%와 86.12%로서 비교적 높은 항균력을 보인 반면 *Escherichia coli*에 대해 항균력이 없었다. 배양 후 pH 변화를 보았을 때 대조구인 식중독균은 pH가 6.48-6.65이며, 혼합배양액은 pH 4.75-4.83으로 혼합배양과정에서 생성된 젖산의 영향으로 억제효과가 약간은 있었지만 크게 좌우하지는 않은 것으로 사료되었다.

Enterococcus durans 581 균주는 *Salmonella typhimurium*와 *Staphylococcus aureus*에 대해 각각 81.00%와 82.85%로서 비교적 높은 항균력을 보인 반면 *Escherichia coli*에 대해 항균력이 없었다. 배양 후 pH 변화를 보았을 때 대조구인 식중독균은 pH가 6.48-6.65이며, 혼합배양액은 pH 4.71-4.78이었다.

Streptococcus macedonicus 301 균주는 *Escherichia coli*와 *Salmonella typhimurium*에 대해 각각 46.25%와 38.57%의 항균력을 보인 반면, *Staphylococcus aureus*에 대해 7.129%로서 매우 낮은 항균력을 보였다.. 배양 후 pH 변화를 보았을 때 대조구인 식중독균은 pH가 6.48-6.65이며, 혼합배양액은 pH 5.54-5.69이었다.

Streptococcus macedonicus 351 균주는 *Salmonella typhimurium*와 *Staphylococcus aureus*에 대해 각각 82.50%와 88.90%로서 비교적 높은 항균력을 보인 반면 *Escherichia coli*에 대해 항균력이 없었다. 배양 후 pH 변화를 보았을 때 대조구인 식중독균은 pH가 6.48-6.65이며, 혼합배양액은 pH 4.82-4.85이었다.

따라서 4종의 젖산균 중 *Streptococcus macedonicus* 301 균주를 제외하고 *Salmonella typhimurium*와 *Staphylococcus aureus*에 대해 항균력이 있는 반면 *Escherichia coli*에 대해 항균력이 없는 것으로 나타났다.

사. 균주 동결건조

동결 건조된 균주가 활력이 있는지를 파악하기 위하여 10% 탈지유에 FD cell powder를 0.1% 접종한 후 40℃에서 18시간 배양한 다음 다시 10% 탈지유 150ml에 1 drop 접종한 후 3시간 간격으로 24시간까지 배양한 각 시료를 0.1% peptone 용액에 희석하여 BCP plate count agar 평판에서 부어 굳힌 후 35℃에서 48시간 배양하여 계수하였고, 시간별로 pH 변화를 측정된 결과는 Fig. 24~25와 같다.

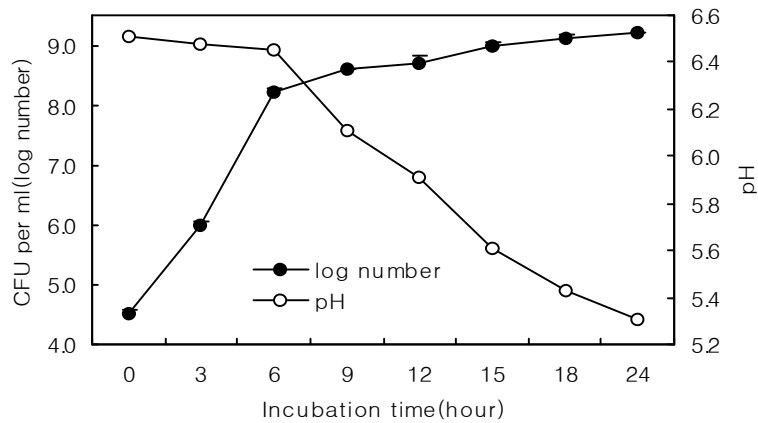


Fig. 24. Growth and pH change of *Lactobacillus fermentum* 272 in 10% reconstituted skim milk at various temperatures.

Lactobacillus fermentum 272는 대수기까지 6시간이 소요되었고, 24시간 경과 시 pH 5.3으로 나타났는데, 동결건조하지 않은 Fig. 3과 4에서와 비교했을 때 대수기는 6시간 동일하였고, pH는 24시간 경과 시 5.2를 보임에 따라 거의 차이가 없었다.

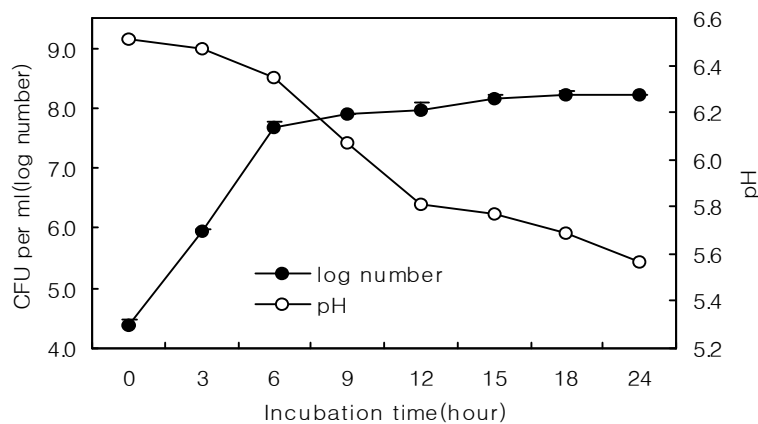


Fig. 25. Growth and pH change of *Streptococcus macedonicus* 351 in 10% reconstituted skim milk at various temperatures.

Streptococcus macedonicus 351은 대수기까지 6시간이 소요되었고, 24시간 경과 시 pH 5.57을 나타낸 반면 Fig. 9와 10에서와 비교했을 때 대수기는 6시간 동일하였고, pH는 24시간 경과시 5.54를 보임에 따라 거의 차이가 없었다.

6. 젖산균주의 최적비타민 K₂ 생산 조건 확립

가. 비타민 K₂ 생산증진 위한 배양조성물 탐색

선발 젖산균의 특성조사를 통해 4종의 젖산균 중 담즙내성이 약한 *Streptococcus macedonicus* 301 균주와 비타민 K₂ 함량이 낮은 *E. durans* 581균주를 배제하고 *L. fermentum* 272 균주와 *S. macedonicus* 351 균주를 대상으로 최적 생산조건을 확립하였다.

1) 탄소원

젖산균 2종의 비타민 K₂ 생산증진 위한 배양조성물 탐색을 위하여 탄소원 선정은 MRS 액체배지에서 40°C, 18시간 배양된 각각의 균주를 MRS 배지 조성 중 Glucose(20g/L) 대신 25종의 탄소원으로 대체 첨가된 MRS 배지에 1% 접종하였고, 40°C에서 18시간 배양하여 OD₆₂₀값을 측정한 결과는 Table 34와 같다.

Table 34. Effect of carbon source on growth of Lactic acid bacteria

Carbon source \ Strains	<i>L. fermentum</i> 272(OD ₆₂₀)	<i>S macedonicus</i> 351(OD ₆₂₀)
L-Arabinose	1.23	1.21
D-Ribose	1.37	1.27
D-Galactose	1.60	1.58
D-Glucose	1.73	1.78
D-Fructose	1.59	1.67
D-Mannose	1.51	1.59
Mannitol	1.22	1.21
Sorbitol	1.04	1.66
α-Methyl-D-Mnnoside	1.17	1.01
N-Acethyl-Glucosamine	1.01	1.09
Amygdalin	1.14	1.09
Arbutin	1.02	1.10
Esculin	1.01	1.15
Salicin	1.13	1.07
Cellobiose	1.07	1.10
Maltose	1.25	1.23
Lactose	1.68	1.64
Melibiose	1.09	1.00
Sucrose	1.20	1.25
Trehalose	1.16	1.08
Melezitose	1.13	1.00
Raffinose	1.07	1.00
Gentiobiose	1.10	1.04
D-Tagatose	1.00	1.07
Gluconate	1.09	1.00

Table 34에서 보는 바와 같이 *Lactobacillus fermentum* 272는 D-Galactose, D-Glucose, D-Fructose, D-Mannose, Lactose를 첨가하였을 경우 OD값이 1.50이상으로 높게 나왔으며, *Streptococcus macedonicus* 351은 D-Galactose, D-Glucose, D-Fructose, D-Mannose, Lactose, Sorbitol을 첨가하였을 경우 OD값이 1.50이상으로 높게 나오에 따라 OD값이 1.50이상인 것을 선발하였고. 다만, Lactose는 *Lactobacillus fermentum* 272, *Streptococcus macedonicus* 351 모두에서 성장이 우수하였으나 발효유 제조시 우유 base를 이용함에 따라 선정에서 제외하였다.

2) 질소원 및 미량원소

질소원과 미량원소는 MRS 배지조성, Rogosa 배지조성 및 시중 식용가능한 소재를 감안하여 질소원은 ISP, Yeast extract, Soy milk를 선정하였고, 미량원소는 KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, CaCl_2 를 선정하였다.

나. 탄소원, 질소원, 미량원소별 비타민 K₂ 생산 효율 분석

선발된 젖산균주를 이용하여 skim milk 10%를 Base로 하고 여기에 탄소원, 질소원 및 미량원소별로 첨가한 다음 40°C에서 18시간 또는 24시간 배양한 다음 비타민 K₂ 함량과 pH를 측정한 결과는 다음 Table 35와 같다.

Table 35. Effect of carbon, nitrogen and mineral source on vitamin K₂ contents according to lactic acid bacteria

Source \ Incubation Time		<i>L. fermentum</i> 272			<i>S. macedonicus</i> 351		
		Vit. K ₂ ($\mu\text{g/L}$)	pH		Vit. K ₂ ($\mu\text{g/L}$)	pH	
			18hrs	24hrs		18hrs	24hrs
Nitrogen	Yeast extract 0.5%	0.00	4.50		0.00	4.48	
	Yeast extract 1.0%	8.75	4.42		6.50	4.49	
	Soy milk 0.5%	0.00		4.73	5.50		4.67
	Soy milk 1.0%	56.59	4.55		12.75		4.64
	ISP ¹⁾ 0.5%	15.23		4.88	5.00		4.89
	ISP 1.0%	65.00	4.50		4.63		4.80
Carbon	Sorbitol 1%				4.63		4.76
	Mannose 1%	6.02		4.79	2.75	4.52	
	Galactose 1%	10.23		4.86	4.13		4.70
	Ribose 1%	25.45	4.45		5.25		4.80
	Glucose 1%	0.00	4.55		3.75	4.57	
	Fructose 1%	6.36		4.68	3.25	4.59	

Mineral	MgSO ₄ · 7H ₂ O 0.01%	5.34		4.77	2.63		4.77
	KH ₂ PO ₄ 0.2%	39.55		4.62	0.00		5.03
	FeSO ₄ · 7H ₂ O 0.0034%	11.02		4.91	6.13		4.73
	MnSO ₄ · 4H ₂ O 0.005%	23.07		4.86	2.63		4.67
	CaCl ₂ 0.2%	15.91		4.81	0.00		4.91
control ²⁾		33.03	4.47		16.11	4.57	

ISP¹⁾ : Isolated Soy Protein

control²⁾ : skim milk 10% + yeast extract 0.5% + CaCl₂ 0.2% + L-cysteine · HCl 0.03%

Lactobacillus fermentum 272 균주는 skim milk 10%를 Base로 하고 여기에 질소원 중에서 ISP 1.0% 첨가했을 때 비타민 K₂ 함량이 65 μ g/L으로 가장 높은 함량을 보였고, Soy milk 1.0%도 대조구보다 높은 56.59 μ g/L 값을 나타내었다. 탄소원 중에서는 Ribose 1%일 때 25.45 μ g/L을, 미량원소 중에서 KH₂PO₄이 39.55 μ g/L 값을 나타내었다. *Streptococcus macedonicus* 351 균주는 대조구인 복합 배지가 가장 높은 16.11 μ g/L 값을 나타내었다.

다. 비타민 K₂ 생산증진 위한 발효조건 설정

Lactobacillus fermentum 272 균주는 ISP 1.0%, Ribose 1%, KH₂PO₄ 0.2%를 함유한 skim milk 10% 배지에, *Streptococcus macedonicus* 351 균주는 yeast extract 0.5%, CaCl₂ 0.2%, L-cysteine · HCl 0.03%를 함유한 skim milk 10% 배지에 각각 90 $^{\circ}$ C에서 30분간 살균한 후 1% 접종하여 40 $^{\circ}$ C에서 6시간 간격으로 24시간까지 비타민 K₂ 함량, pH 및 젖산균수의 변화를 측정하여 최적의 발효조건을 설정한 결과는 Fig. 26~27과 같다.

Fig. 26. Change of pH, LAB and Vitamin K₂ in skim milk 10% containing ISP 1.0%, Ribose 1%, KH₂PO₄ 0.2% by *Lactobacillus fermentum* 272 at 40 $^{\circ}$ C.

Fig 1에서 보는 바와 같이 배양 6시간 일 때 Vitamin K₂ 함량이 28.91 μ g/L로 증가되었고, 배양 24시간일 때 pH 4.2이었으며, 이때 Vitamin K₂ 함량이 85.12 μ g/L로서 꾸준히 증가되었다. 발효유 관능적 최적 pH가 4.3을 감안할 때 대략 80 μ g/L으로 예측되었다.

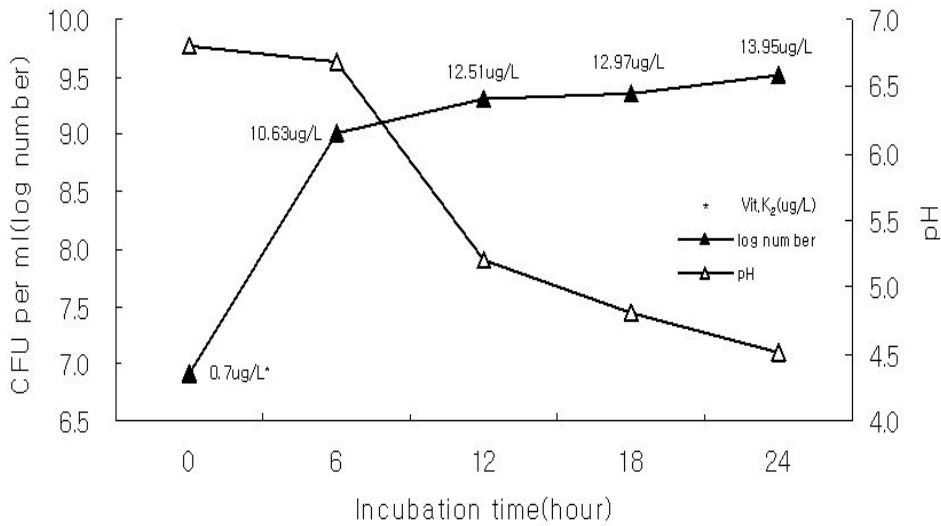
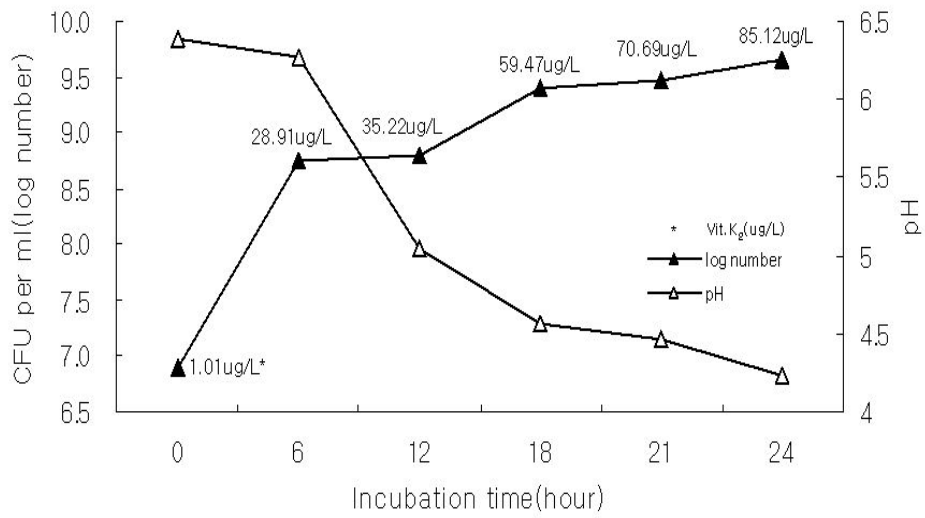


Fig. 27. Change of pH, LAB and Vitamin K₂ in skim milk 10% containing yeast extract 0.5%, CaCl₂ 0.2%, L-cysteine · HCl 0.03% by *Streptococcus macedonicus* 351 at 40°C.

배양 6시간 일 때 Vitamin K₂ 함량이 10.63 μ g/L로 증가되었고, 배양 24시간일 때 pH 4.5이었으며, 이때 Vitamin K₂ 함량이 13.95 μ g/L로서 꾸준히 증가되었다. 그러나 *Lactobacillus fermentum* 272 균주에 비해 Vitamin K₂ 함량이 많이 낮은 결과를 보였다.

7. 세포계 골 강화 활성 검증 및 이화학적 특성

가. 세포계 골 강화 활성 검증

1) 세포 생존능 측정

인체 유사 조골세포주인 Saos-2 cell에 대해 세포의 정상적인 형성을 확인하였다. 세포의 생육상태 확인은 골다공증시험에서 vitamin 계열의 positive control로서 사용되는 1,25(OH)₂D₃와 식품 중 골생성 활성이 알려진 대두 추출물을 양성대조군(positive control)으로 하였으며 세포 증식능은 MTT assay로 검색하였다(Fig. 28).

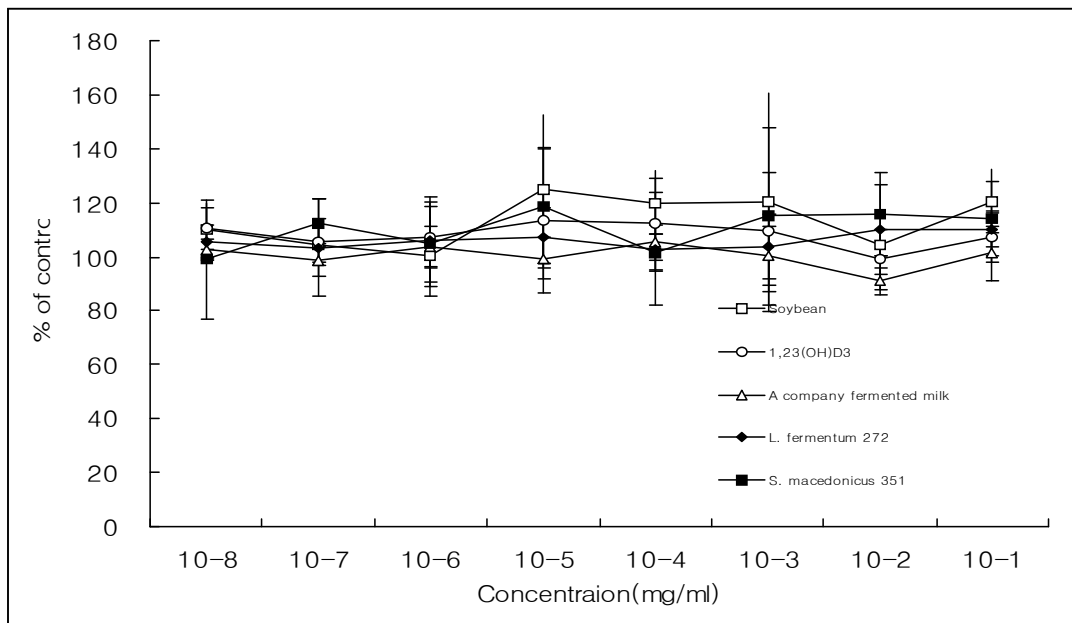


Fig. 28. Cell proliferation effects of soybean extract, vitamin 1,25(OH)₂D₃,

A company fermented milk, fermented milk using by *L. fermentum* 272 and *S. macedonicus* 351 on Saos-2, human osteoblast-like cells.

대두추출물의 경우는 모든 농도에서 대조구의 100%를 상회하여 대조구의 104~125%로서 다른 처리구에 비해 가장 높은 세포증식 효과를 나타내었다. vitamin 1,25(OH)₂D₃의 경우 모든 농도에서 증식능이 일정하여 대조구의 99~114%를 나타내었다.

Lactobacillus fermentum 272와 *Streptococcus macedonicus* 351 이용한 발효유의 세포증식효과는 각각 1×10⁻⁸mg/ml~1×10⁻¹mg/ml에서 증식능이 농도에 비례하여 대조구의 103~110%와 99~119%를 나타내었다. 식품 positive control인 대두추출물보다는 세포증식 면에서 다소 떨어졌으나, 농도 전반에 걸쳐 세포증식 경향을 확인할 수 있었다. 시판 발효유의 세포증식효과는 1×10⁻⁸mg/ml~1×10⁻¹mg/ml에서 증

식능이 91~105%를 나타내었으며 *Lactobacillus fermentum* 272와 *Streptococcus macedonicus* 351를 이용한 발효유보다 세포증식 면에서 다소 떨어지는 경향을 나타내었다.

2) Alkaline phosphatase(ALP) 활성 측정

ALP는 거의 모든 조직에 존재하며 특히 골조직에 존재하는 ALP는 골 성장이 활발히 일어날 때 그 활성이 증가한다. 따라서 인간 유사 조골세포주인 Saos-2 cell에서 조골세포의 활성을 나타내는 지표로 사용되는 Alkaline phosphatase (ALP) 증가활성을 측정하였다 (Fig. 29).

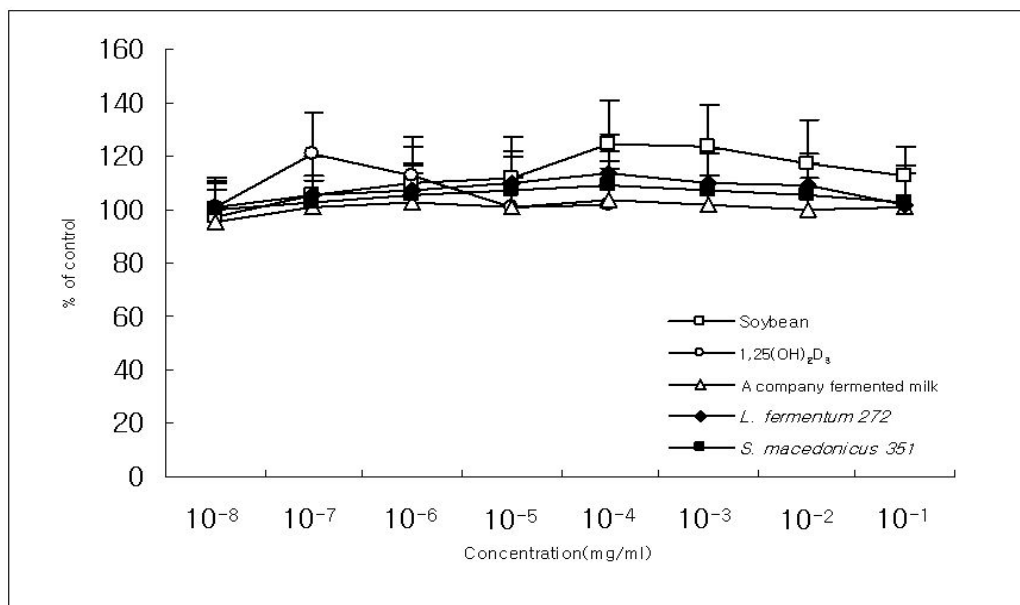


Fig. 29. Alkaline phosphatase(ALP) activities of soybean extract, vitamin 1,25(OH)₂D₃, A company fermented milk, fermented milk using by *L. fermentum* 272 and *S. macedonicus* 351 on Saos-2, human osteoblast-like cells

Lactobacillus fermentum 272와 *Streptococcus macedonicus* 351을 이용한 발효유의 인간유사 세포계 골기질 강화 활성을 시험하고 ALP 활성으로 나타내었다. *Lactobacillus fermentum* 272의 경우 ALP 활성이 1×10⁻¹mg/ml에서 101%로 시작하여 증가하다 1×10⁻⁴mg/ml의 농도에서 114%로 최고값을 나타낸 후 차차 감소하여 1×10⁻⁸mg/ml에서 101%에 도달하였다. *Streptococcus macedonicus* 351의 경우 ALP 활성이 1×10⁻¹mg/ml에서 100%로 시작하여 증가하다 1×10⁻⁴mg/ml의 농도에서 109%

로 최고값을 나타낸 후 차차 감소하여 1×10^{-8} mg/ml에서 103%에 도달하였다. 대두추출물보다 다소 낮은 값을 나타냈지만 vitamin $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 와는 비슷한 경향을 보였고 시판발효유보다는 다소 높은 값을 나타내었다. 가장 높은 활성을 나타낸 농도는 *Lactobacillus fermentum* 272와 *Streptococcus macedonicus* 351 모두 1×10^{-4} mg/ml에서 각각 114%, 109%로 추후 이화학적 실험시 기준 농도로 활용하였다.

나. 골강화 성분의 이화학적 특성

1) 온도에 따른 골세포 활성화 변화

Lactobacillus fermentum 272와 *Streptococcus macedonicus* 351를 이용한 발효유의 살균온도와 시간에 따른 골세포 증식능을 Fig. 30에 나타내었다.

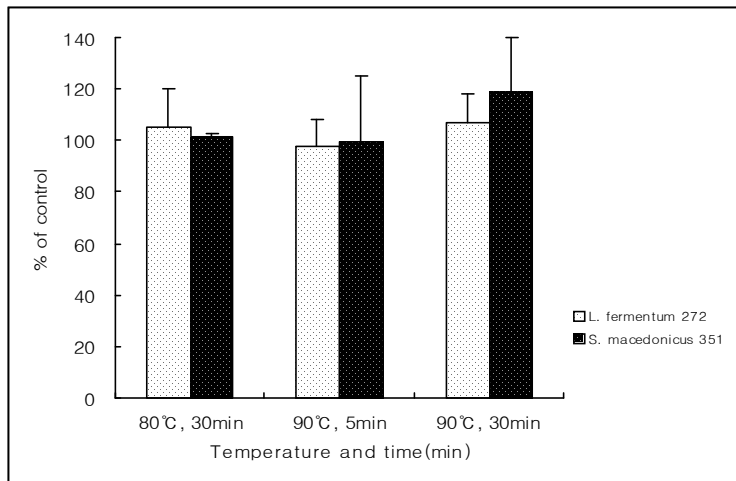


Fig. 30. Cell proliferation effects of *L. fermentum* 272 and *S. macedonicus* 351 on various heating times and temperatures

Lactobacillus fermentum 272와 *Streptococcus macedonicus* 351를 이용한 발효유는 살균온도를 80°C~90°C, 가열시간을 5~30분으로 증가시켰을 때 세포 증식이 유지됨을 관찰할 수 있었다.

Lactobacillus fermentum 272와 *Streptococcus macedonicus* 351를 이용한 발효유의 살균온도와 시간에 따른 ALP 효소활성도는 Fig. 31에 나타내었다.

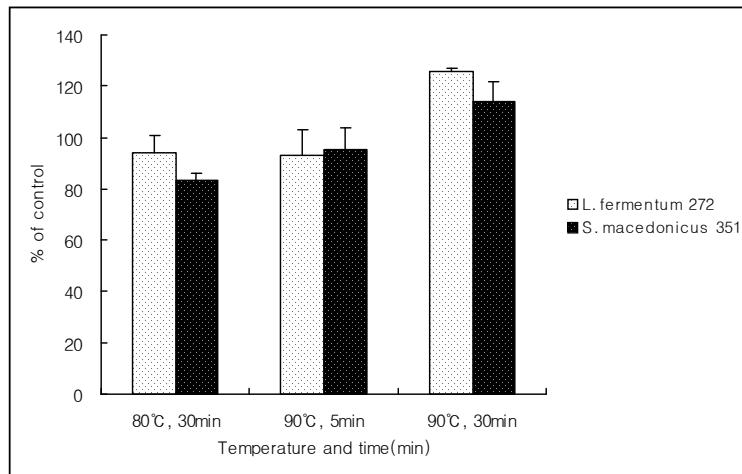


Fig. 31. Alkaline phosphatase(ALP) activities of *L. fermentum* 272 and *S. macedonicus* 351 on various heating times and temperatures

Lactobacillus fermentum 272와 *Streptococcus macedonicus* 351를 이용한 발효유는 살균온도를 80°C~90°C, 가열시간을 5~30분으로 증가시켰을 때 90°C에서 30분 열처리한 조건이 ALP 효소 활성이 유지됨을 관찰할 수 있었다.

2) pH에 따른 골세포 활성화 변화

Lactobacillus fermentum 272와 *Streptococcus macedonicus* 351를 이용한 발효유의 뼈기질 강화 성분의 체내활성을 간접 판단하고자 산성(pH 2), 중성(pH 7), 염기성(pH 10) 조건에서 발효유의 pH 변화에 따른 골세포 증식능(Fig. 32)을 조사하였다.

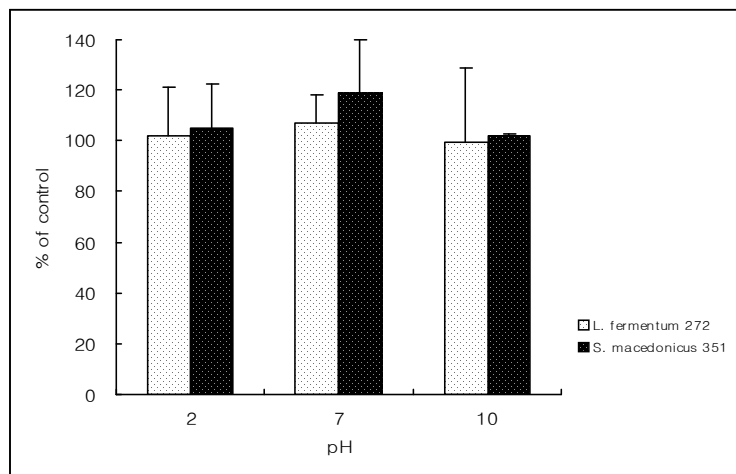


Fig. 32. Cell proliferation effects of *L. fermentum* 272 and *S. macedonicus* 351 on various pH

Lactobacillus fermentum 272를 이용한 발효유는 pH 2에서 102%의 증식능을 보였고, pH 7에서 107%, pH 10에서는 99%의 세포증식을 나타내었다. *Streptococcus macedonicus* 351을 이용한 발효유는 pH 2에서 105%의 증식능을 보였고, pH 7에서 119%, pH 10에서 102%의 증식능을 보였다. *Lactobacillus fermentum* 272와 *Streptococcus macedonicus* 351를 이용한 발효유는 pH 변화에 따라 증식능이 유지됨을 알 수 있었다.

Lactobacillus fermentum 272를 이용한 발효유의 pH에 따른 ALP 효소 활성도(Fig. 33)는 pH 2에서 99%, pH 7에서 126%, pH 10에서 100%인 반면 *Streptococcus macedonicus* 351을 이용한 발효유는 pH 2에서 92%, pH 7에서 114%, pH 10에서 91%로서 pH 변화에 따라 약간의 변화가 있었지만 대조구 대비 90%이상의 활성도를 보였다. 따라서 ALP 효소 활성도가 유지됨에 따라 체내활성의 가능성을 확인할 수 있었다.

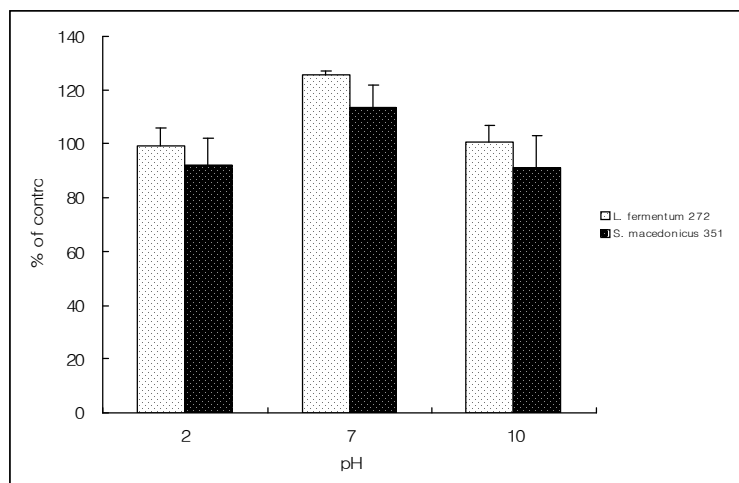


Fig. 33. Alkaline phosphatase(ALP) activities of *L. fermentum* 272 and *S. macedonicus* 351 on various pH

8. 최적 배합조성물 개발

플레인 발효액에 딸기잼을 농도별로 첨가하여 배합조성비(표 36, 38)를 설정한 다음 관능검사를 실시한 결과는 표 37, 39와 같다.

이때, 비타민 K₂ 생산 효율을 높이기 위하여 탄소원 중 ribose가 선정되었으나 가격이 60,000원/kg으로 너무 고가이고, 차상위 탄소원인 galactose는 식품첨가물에 등재되어 있지 않아 차차상위인 fructose로 대체하였다.

표 36. *Lactobacillus fermentum* 272 균주(또는 ABT-D 균주와 1:1로 혼합 균주)를 이용한 딸기 발효유의 배합비

(단위 : %)

sample	A, C	B, D
원유	78.76	78.76
탈지분유	3.24	3.24
ISP	0.83	0.83
KH ₂ PO ₄	0.17	0.17
올리고당	2	2
과당	5	5
딸기잼	8	10
정제수	2	
합계	100	100

주) A, B : *Lactobacillus fermentum* 272 균주 단독으로 제조된 발효유

C, D : *Lactobacillus fermentum* 272 균주와 상업균주 ABT-D 균주를 1 : 1로 혼합하여 제조된 발효유

표 37은 *Lactobacillus fermentum* 272 균주 단독 또는 ABT-D 균주와 1:1로 혼합 하여 제조된 딸기 발효유의 관능검사 한 결과이다.

Lactobacillus fermentum 272 균주 단독으로 제조된 발효유인 A와 B제품은 *Lactobacillus fermentum* 272 균주 자체가 hetero 균주로 인해 산 맛이 떨어지고 또한 조직감도 떨어지는 문제점이 있었다. *Lactobacillus fermentum* 272 균주와 상업균주 ABT-D 균주를 1 : 1로 혼합하여 제조된 발효유인 C와 D제품은 조직감이 많이 개선되었고, 기호성도 많이 향상되어 상업제품과 유사한 결과를 보였다.

표 37. *Lactobacillus fermentum* 272 균주(또는 ABT-D 균주와 1:1로 혼합 균주)를 이용한 딸기 발효유의 관능적 품질평가¹⁾

Mean±Std

관능기준 시료	외관(색)	맛	조직감	전반적인 기호도	구입의사
control ²⁾	6.00±1.12 ^{b3)}	6.85±1.07 ^{ab}	6.85±1.34 ^a	6.85±1.07 ^a	6.69±1.25 ^a
A	7.38±1.12 ^a	5.85±1.21 ^b	5.35±1.07 ^b	5.54±1.27 ^b	5.00±0.82 ^b
B	7.85±0.69 ^a	6.54±1.51 ^{ab}	5.00±1.41 ^b	6.00±1.53 ^{ab}	5.54±1.27 ^b
C	7.54±1.27 ^a	6.85±0.90 ^{ab}	6.38±0.96 ^a	6.23±1.36 ^{ab}	6.38±1.39 ^{ab}
D	7.46±0.97 ^a	7.38±1.12 ^a	6.54±0.78 ^a	7.09±1.11 ^a	6.69±0.75 ^a

¹⁾ 1~9점까지의 점수를 13명의 평가단에 의한 평균값

²⁾ N유업 떠먹는 불가리스 딸기맛 제품

³⁾ $p > 0.05$

표 38. 혼합균주¹⁾를 이용한 딸기 발효유의 배합비

(단위 : %)

sample	E	F
원유	79.15	79.15
탈지분유	3.24	3.24
yeast extract	0.415	0.415
CaCl ₂	0.17	0.17
L-cysteine · HCl	0.025	0.025
올리고당	2	2
과당	5	5
딸기잼	8	10
정제수	2	
합계	100	100

¹⁾ *L. fermentum* 272 균주 : *S. macedonicus* 351 균주 : ABT-D 균주 = 35 : 35 : 30 비율로 혼합하여 제조된 발효유

표 39는 *L. fermentum* 272 균주, *S. macedonicus* 351 균주와 상업균주인 ABT-D 균주를 혼합하여 제조된 딸기 발효유의 관능검사 한 결과이다.

전반적으로 대조구의 색이 E와 F 제품에 비해 유의성이 있는 것을 제외하고 다른 항목에 서는 유의성이 없었지만 B제품이 가장 높은 관능점수를 얻었다.

표 39. 혼합균주를 이용한 딸기 발효유의 관능적 품질평가¹⁾

Mean±Std

시료 \ 관능기준	외관(색)	맛	조직감	전반적인 기호도	구입의사
control ²⁾	6.00±1.12 ^{b3)}	6.85±1.07 ^a	6.85±1.34 ^a	6.85±1.07 ^a	6.69±1.25 ^a
E	7.54±0.97 ^a	6.53±1.48 ^a	6.54±1.13 ^a	6.63±1.36 ^a	6.54±1.39 ^a
F	7.38±1.26 ^a	7.24±1.98 ^a	6.69±1.49 ^a	7.14±1.51 ^a	7.00±1.63 ^a

¹⁾ 1~9점까지의 점수를 13명의 평가단에 의한 평균값

²⁾ N유업 떠먹는 불가리스 딸기맛 제품

³⁾ $p > 0.05$

9. 제조공정 설정 및 이화학적 특성조사

가. 제조공정 설정

1) *Lactobacillus fermentum* 272 균주와 ABT-D 균주 혼합

원유 94.89%, 탈지분유 3.91%, ISP 1%, KH_2PO_4 0.2%를 첨가하고 65℃에서 배합하여 완전히 녹인 후 90℃에서 5분간 살균하였으며, 40℃로 냉각시킨 다음 *Lactobacillus fermentum* 272 균주와 상업균주 ABT-D 균주를 0.5% 씩 1.0%(v/v)로 접종하고, 최종 pH 4.4으로 감소할 때까지 배양한 액(전체의 83%)에 딸기잼 10.0%, 올리고당 2%, 액상과당 5%를 첨가하고 교반하여 호상발효유를 제조하였다.

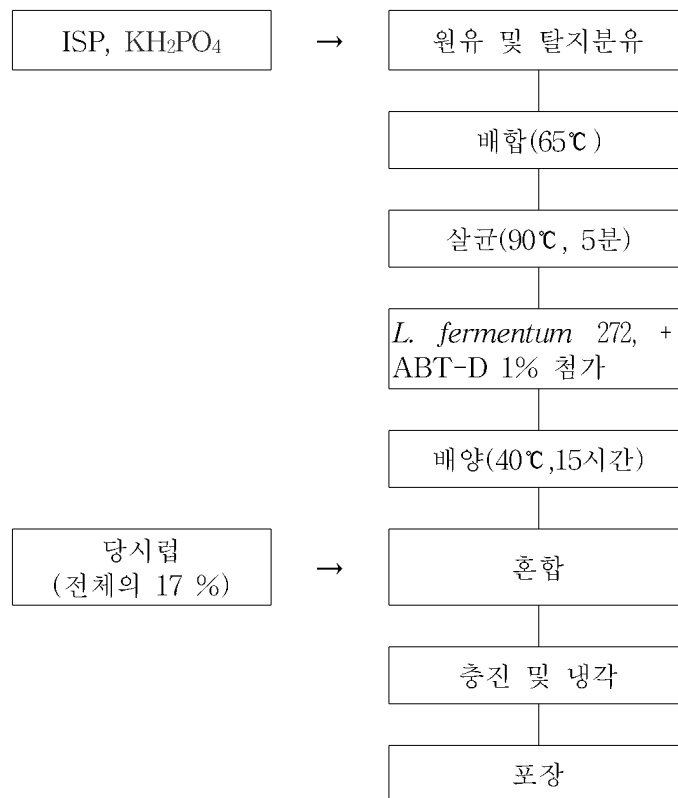


Fig. 34. 호상발효유의 제조공정도

2) *L. fermentum* 272 균주, *S. macedonicus* 351 균주, ABT-D 균주 혼합

원유 95.37%, 탈지분유 3.90%, yeast extract 0.5%, CaCl_2 0.2%, L-cysteine · HCl 0.03%를 첨가하고 65℃에서 배합하여 완전히 녹인 후 90℃에서 5분간 살균하였으며, 40℃로 냉각시킨 다음 *Lactobacillus fermentum* 272, *Streptococcus macedonicus* 351, ABT-D 균주를 35:35:30 비율로 1.0%(v/v)로 접종하고, 최종 pH 4.4으로 감소할 때까지 배양한 액(전체의 83%)에 딸기잼 10.0%, 올리고당 2%, 액상과당 5%를 첨가하고 교반하여 호상발효유를 제조하였다.

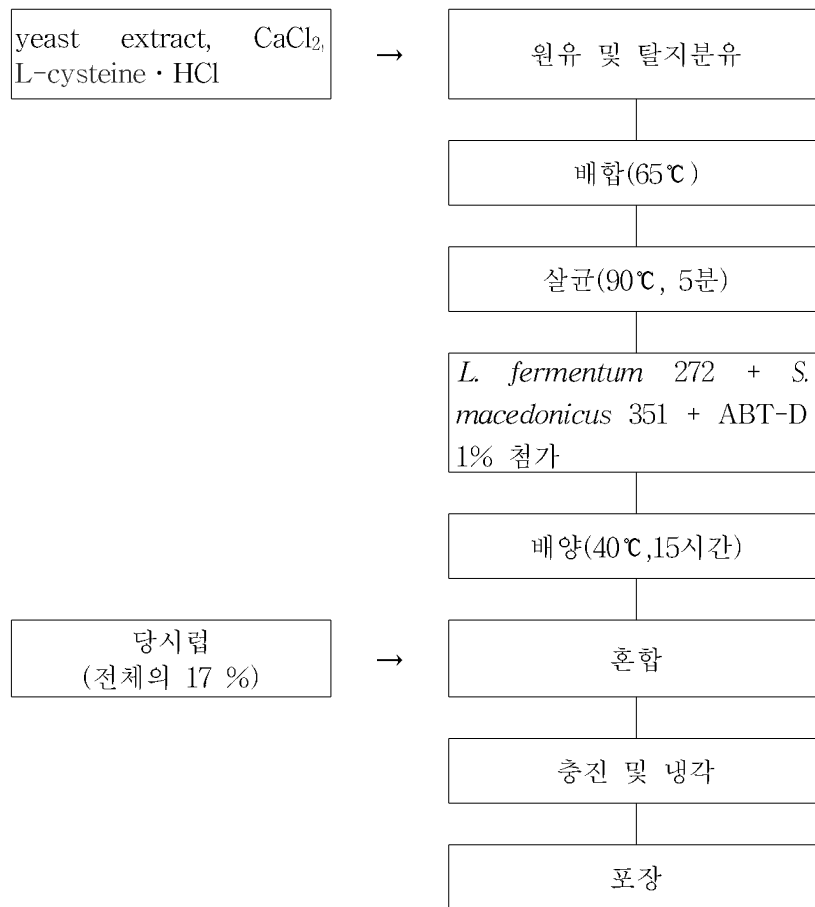


Fig. 35. 호상발효유의 제조공정도

나. 이화학적 특성조사

상기와 같이 제조한 후 비타민 K₂ 함량 및 이화학 성분 분석 결과는 다음 표 40과 같다.

표 40. 개발 제품의 비타민 K₂ 함량 및 이화학 성분 분석

성분 제품	적정산도 (%)	수 분 (%)	단백질 (%)	지 방 (%)	회 분 (%)	비타민 K ₂ 함량(μg/L)	젖산균수 (cfu/ml)
A ¹⁾	0.12	75.03±1.31	4.12±0.2	3.12±0.13	0.92±0.01	53.1±1.8	1.4x10 ⁹ ±3.9x10 ⁷
B ²⁾	0.12	76.10±1.24	4.45±0.04	3.08±0.25	0.92±0.05	38.8±2.9	1.6x10 ⁹ ±5.1x10 ⁷

¹⁾ *Lactobacillus fermentum* 272 균주와 ABT-D 균주 혼합 이용 발효유(혼합비 = 5 : 5)

²⁾ *L. fermentum* 272, *S. macedonicus* 351와 ABT-D 균주 이용 발효유(혼합비 = 35 : 35 : 30)

L. fermentum 272 균주와 ABT-D 균주 혼합하여 제조된 발효유 제품과 *L. fermentum* 272, *S. macedonicus* 351와 ABT-D 균주 혼합하여 제조된 발효유 제품 공히 적정산도가 0.12%이었고 성분을 보면, 각각 무지유고형분 9.87%와 9.91%, 유지방 3.12%와 3.08%, 젖산균수 1.4×10^9 CFU/mL와 1.6×10^9 CFU/mL, 비타민 K₂ 함량은 53.1 μ g/L와 38.8 μ g/L이었다. 축산물 가공기준 및 규격(2010)에 따르면, 호상발효유의 경우 무지유고형분 8.0%, 젖산균수 1억 cfu/ml 이상으로서 모두 합격이었으며, 다만 A제품이 B제품보다 균주관리가 용이하고 비타민 K₂ 함량이 높다는 장점이 있다.



그림 36. 비타민 K₂ 함유 발효유 시제품

10. 동물모델을 이용한 발효유의 골강화 활성 및 성분 특성

가. 난소절제 실험동물의 식이 효율 및 체중 변화

실험동물을 군 당 8마리씩 8 군으로 나누고 난소절제술을 시행하여 골다공증을 유발하고, 일주일간의 회복기간을 거친 후 골다공증 예방 및 치료효능을 가진 조성물을 6주간 공급하였다. 6주간의 실험 기간 동안 총 식이섭취량, 체중 및 식이 효율을 Table 41와 Fig. 37에 나타내었다.

Table 41. Body weight changes, food intakes and food efficiency ratio of rats fed osteo-active product for 6 weeks

	sham	control	A	B	C	D	E	F
Body weight(g/rat)								
Initial	222.71 ±10.84 ^b	240.99 ±16.09 ^a	240.87 ±8.89 ^a	240.57 ±14.61 ^a	240.61 ±11.87 ^a	240.80 ±9.29 ^a	240.50 ±11.96 ^a	239.90 ±8.96 ^a
Final	273.05 ±9.07 ^b	341.91 ±28.11 ^a	324.22 ±25.77 ^a	334.46 ±30.61 ^a	334.80 ±31.83 ^a	325.90 ±28.83 ^a	337.11 ±26.51 ^a	324.72 ±34.98 ^a
Wt. gain	50.34 ±5.22 ^b	104.44 ±16.17 ^a	82.99 ±20.52 ^a	91.81 ±119.63 ^a	93.91 ±28.82 ^a	81.71 ±26.82 ^a	97.45 ±20.83 ^a	84.85 ±37.08 ^a
Food intake								
Total(g/rat)	701.08 ±187.62 ^b	903.81 ±42.56 ^a	851.76 ±60.64 ^{ab}	974.03 ±29.79 ^a	958.41 ±73.72 ^a	891.95 ±17.05 ^a	897.85 ±29.54 ^a	830.80 ±14.62 ^{ab}
Weekly(g/wk/rat)	108.51 ±31.42 ^b	142.30 ±7.44 ^a	133.63 ±12.34 ^a	154.01 ±5.36 ^a	151.40 ±12.44 ^a	140.33 ±7.16 ^a	141.31 ±9.49 ^a	130.13 ±47.98 ^a
FER⁴⁾	6.77 ±0.74 ^b	11.78 ±1.70 ^a	10.35 ±2.06 ^a	10.64 ±1.99 ^a	10.82 ±2.36 ^a	10.10 ±3.13 ^a	11.36 ±2.10 ^a	10.11 ±3.44 ^a

1) Values are means±SD

2) Values with different superscript within the row are significantly different at $\alpha=0.05$ by Duncan's multiple range test.

3) FER : Food efficiency ratio, Wt. gain(g)/Food intake(g) × 100

실험동물의 초기 체중은 222.71~240.99g이었다. 6주 동안 실험식이의 공급으로 control의 체중 증가량이 104.44g으로 가장 많은 증가를 보인 반면 sham(위대조군)은 50.34g으로 가장 적게 증가를 보여 타 처리군에 비해 유의차가 있었다. 이와 같이 난소 제거 수술을 받은 control 및 처리군은 개복 수술만 받은 sham군에 비해 체중 증가량이 높게 나타났다. Fig. 37에서 보면 0주에서 3주간 까지 체중증가량이 가장 컸으며, 그 이후부터는 완만한 증가세를 보였는데, 특히 sham 군이 타 처리군에 비해 뚜렷이 구분이 되었다. 이러한 난소 절제로 유발된 체중 증가 현상은 기존

의 연구에서도 이미 보고된 바 있다. 골아세포와 지방세포는 같은 배아세포에서 분화되는데 에스트로겐은 같은 배아세포에서 골아 세포의 분화를 촉진하는 반면에 지방세포의 분화는 억제시킨다는 보고에 근거할 때 난소 제거 후 에스트로겐 결핍으로 인한 체중 증가는 지방조직 축적에서 기인된 것이라 고려하였다.

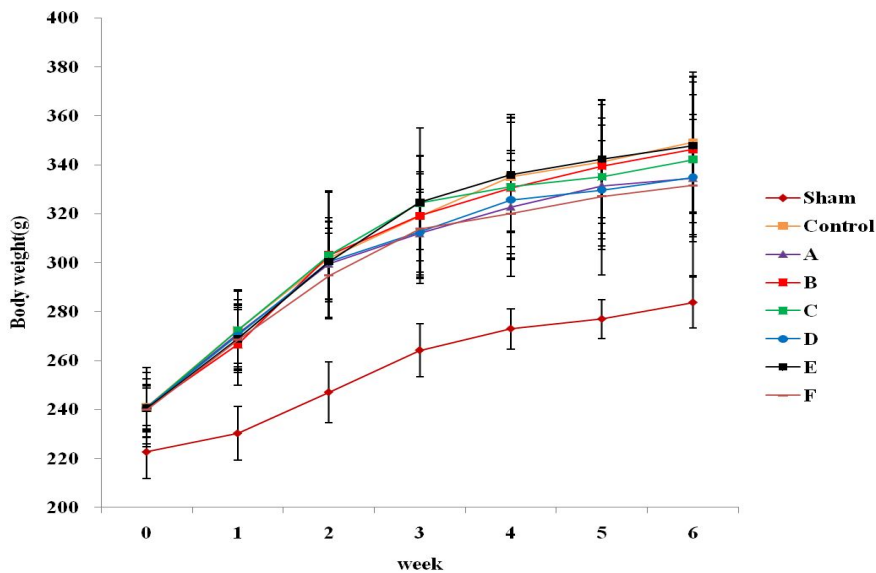


Fig. 37. Body weight change of SD Rat fed experimental diets

총 식이섭취량의 경우 sham군의 701.08g은 대조구 및 타 처리구에 비해 유의차가 있었으며, 한주간의 식이 섭취량의 경우도 총 식이섭취량과 마찬가지로 같은 경향을 보였다

총 식이섭취량과 체중증가량을 고려하여 산출한 식이효율 (FER: Food efficiency ratio)의 경우도, sham군이 6.77로서 다른 처리군 간에 유의차가 있었지만, control군과 처리군 간에는 유의차가 없었다. 식이효율은 체중증가량을 식이섭취량으로 나눈 것이므로 난소절제 시에 sham군보다 식이효율이 높은 것은 난소절제군의 체중 증가율이 높은 것과 관련이 있다. Jeong(1997)의 연구에서 난소절제군의 식이효율이 sham군보다 더 높게 나타나 본 결과와 동일하였고, 난소절제 후 체중증가와 식이효율의 증가는 난소절제로 인한 에스트로겐 분비감소와 식이섭취량의 증가에 기인하는 것으로 나타난 보고와 동일하였다.

나. 난소절제 실험동물의 장기무게 변화

난소절제 실험동물의 간, 신장, 자궁을 절제한 후 무게변화를 조사하였다 (Table 42).

Table 42. Organ weights of rats fed osteo-active product for 6 weeks

Organ weight(g)	sham	control	A	B	C	D	E	F
Liver	7.57 ±0.35 ^b	8.47 ±1.12 ^{ab}	8.46 ±1.12 ^{ab}	8.83 ±1.00 ^a	8.96 ±1.35 ^a	8.05 ±0.77 ^{ab}	8.73 ±0.94 ^{ab}	7.96 ±1.28 ^{ab}
Kidneys	1.96 ±0.12 ^{ns}	2.02 ±0.18	1.97 ±0.06	1.99 ±0.10	1.96 ±0.28	2.01 ±0.22	1.97 ±0.17	1.96 ±0.28
Uterus	0.65 ±0.36 ^a	0.13 ±0.03 ^b	0.07 ±0.03 ^b	0.10 ±0.03 ^b	0.11 ±0.02 ^b	0.14 ±0.03 ^b	0.14 ±0.03 ^b	0.14 ±0.02 ^b

1) Values are means±SD

2) ns: not significant

3) Values with different superscript within the row are significantly different at $\alpha = 0.05$ by Duncan's multiple range test.

간 무게는 난소를 절제한 control군 및 처리군이 난소를 절제하지 않은 sham군 보다 높게 나타났는데, 이는 체중 증가와 관련이 있지 않았나 사료된다. 신장의 경우 sham군이 1.96 g이었고, control 군이 2.02 g으로 유의차가 없었다. 자궁의 무게는 sham군이 0.65 g으로 가장 높았으며 난소절제한 군은 0.07 g~0.14 g으로 약 7배 정도 유의적으로 낮게 나타났으며, 이는 골형성 호르몬 유사활성과 관련이 있는 것으로 판단하였다.

다. 혈액내 지표 검색

1) GOT와 GPT활성

혈청의 GOT와 GPT활성을 Table 43에 나타내었다.

Table 43. GOT and GPT activities of rats fed osteo-active product for 6 weeks

Parameters (U/L)	sham	control	A	B	C	D	E	F
GOT	88.86 ±10.61 ^{ns}	84.50 ±9.90	89.00 ±13.94	96.63 ±21.54	91.63 ±8.85	100.13 ±20.51	101.00 ±27.97	88.50 ±10.89
GPT	43.71 ±5.06 ^{ns}	38.13 ±2.59	34.88 ±5.06	41.13 ±7.64	44.88 ±19.47	42.38 ±8.53	40.88 ±6.92	33.88 ±7.57

1) Values are means±SD

2) Values with different superscript within the row are significantly different at $\alpha = 0.05$ by Duncan's multiple range test.

혈청 중의 GOT(Glutamic oxalacetic transaminase), GPT(Glutamic pyruvic transaminase)의 활성은 알콜, 사염화탄소, 유기용매와 기타 독성물질에 의한 간 실질세포의 장해 발생시 혈 중으로의 방출이 항진되어 나타나는 간장해의 지표로 이때 GOT의 활성이 GPT에 비하여 높게 나타나는 것으로 알려졌다.

이처럼 GPT, GOT 활성은 정상상태에서는 효소의 활성이 낮으나 심장, 간, 근육, 혈구 등의 조직이 병적 상태에 빠지거나 혹은 붕괴되어 질병이 발생하면 세포 내에 존재하는 효소가 다량으로 혈중에 유출되어 활성이 증가하는 효소로 만성간염, 급성간염, 지방간, 알콜성 간염, 간암 등 주로 간세포의 변성이나 괴사를 반영한다. 본 실험에서 GOT는 control 군이 84.50 U/L로 가장 낮은 반면, E 군이 101.00 U/L로서 가장 높았으나 유의차는 없는 것으로 나타났다. GPT의 경우는 상업균주에 의한 발효유인 F 군이 33.88 U/L로 가장 낮은 반면, C 군이 44.88 U/L로 가장 높았으나 역시 유의차가 없는 것으로 나타났다.

2) 혈액의 ALP, Osteocalcin 분석

혈청 ALP의 활성은 포괄적인 골생성 (bone formation)의 지표로서 가장 유익하게 사용되며 조골세포의 활성을 반영한다. Osteocalcin은 조골세포에 의해 합성되며 뼈의 extracellular matrix에 결합된다. 새로 결합된 osteocalcin의 일부는 순환계로 방출되는데 osteocalcin과 조직학적으로 증명된 골형성 정도와 좋은 상관성을 나타내므로 혈청 중 osteocalcin의 농도는 조골세포의 활성도를 직접적으로 반영한다고 볼 수 있다. 혈청 ALP(Alkaline phosphatase)와 Osteocalcin 함량을 측정하여 Fig. 38, 39에 각각 나타내었다.

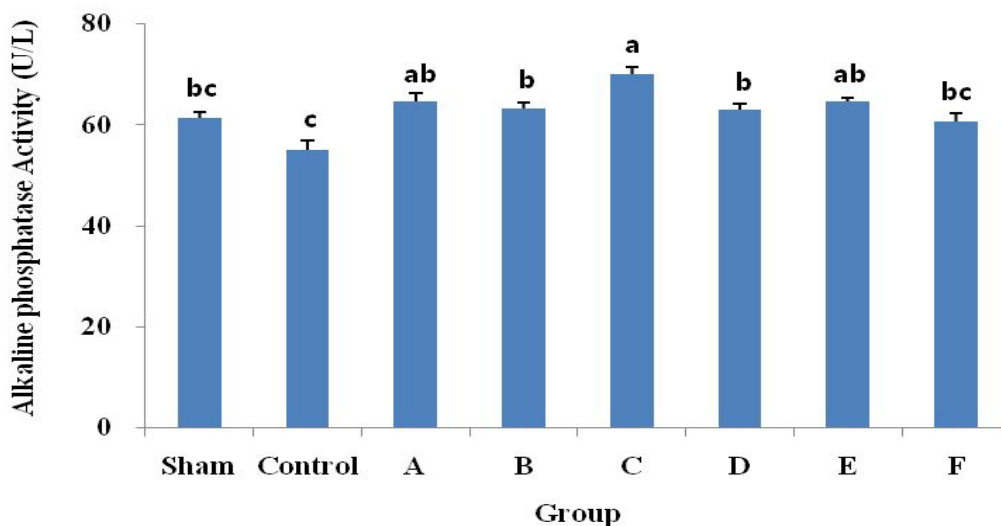


Fig. 38. The changes of alkaline phosphatase activity of rats fed osteo-active product for 6 weeks

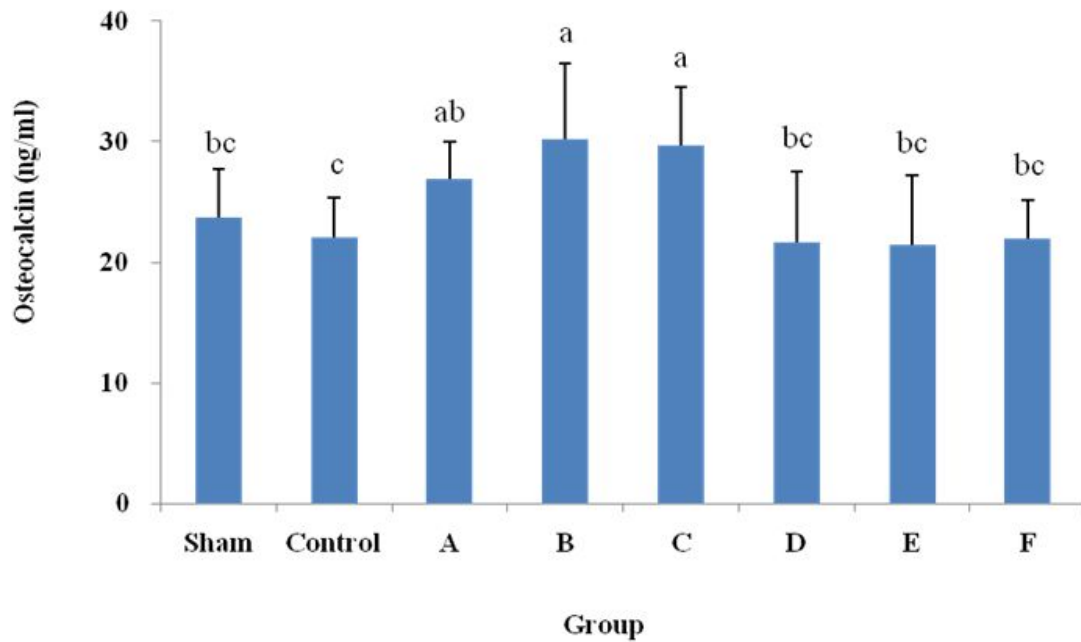


Fig. 39. The changes of osteocalcin contents of rats fed osteo-active product for 6 weeks

혈청 ALP 농도는 C 처리군이 가장 높은 반면 대조군이 가장 낮았으며, 시료 처리군은 sham군에 비해 다소 높았다. 이는 Kim 등(1996)의 난소 절제 쥐는 sham군에 비해 혈청 ALP의 농도가 높았다고 한 것과 일치하였다. 일반적으로 난소 절제 수술은 골형성의 생화학적 지표인 혈청 ALP의 증가를 유도하고 난소 절제시 ALP 활성의 증가는 에스트로겐 결핍으로 bone turnover가 증가되었기 때문이라고 보고되고 있다.

혈청 Osteocalcin은 난소절제인 대조군에 비해 sham군이 다소 높은 경향을 보였다. 에스트로겐의 골보호 기전은 골 turnover rate를 감소시키면서 골손실을 방지하는 것으로 알려져 있다. Fandi 등은 난소 절제한 흰쥐에게 genistein을 주사했을 때 혈청 osteocalcin 수준을 증가시켰다고 보고하였으며, 본 연구에서는 B와 C 처리군의 혈청 osteocalcin이 가장 높은 값을 보였고 대조군에 비해 유의성이 있었다.

3) 혈액의 Ca, P 분석

실험동물의 체내 칼슘과 인의 함량을 Table 44에 나타내었다.

Table 44. Calcium, Inorganic phosphorus and Ca/P ratio in Serum

Parameters	sham	control	A	B	C	D	E	F
Ca(mg/dL)	11.46±	10.75±	10.08±	10.34±	11.42±	11.21±	11.36±	11.05±
	0.42 ^{ns}	0.32	0.26	0.33	0.25	0.21	0.29	0.28
P(mg/dL)	6.23	6.26	5.51	5.68	6.68	6.71	6.24	6.39
	±0.68 ^{ns}	±0.44	±0.47	±0.55	±0.91	±0.55	±0.97	±0.43
Ca/P	1.84±	1.72±	1.83±	1.82±	1.86±	1.76±	1.82±	1.73±
	0.14 ^{ns}	0.36	0.28	0.31	0.27	0.42	0.34	0.29

1) Values are means±SD

2) ns: not significant

3) Values with different superscript within the row are significantly different at $\alpha = 0.05$ by Duncan's multiple range test.

혈중 칼슘 농도는 내적, 외적 변화에 대해 항상성을 유지하므로 실험 요인에 따른 변화에도 칼슘 농도는 보통 정상 범위 내에 있는 것으로 보고되어 있다. 본 연구에서도 혈청 칼슘의 농도에서 모든 군은 흰쥐의 혈청 칼슘 농도의 정상수준 (7.2~13.0 mg/dl) 내에 포함되었다. 난소 절제군은 sham군에 비해 혈청 칼슘농도가 유의성은 없었지만 낮았다. 이 결과는 Choi (2009)가 sham군에 비하여 난소 절제군이 낮았다고 한 결과와 Kim 등(1996)이 sham군에 비하여 난소 절제군이 시간이 지남에 따라 혈청 칼슘이 감소하는 경향을 나타내었다고 보고한 것과 일치하였다.

혈청 인의 농도는 실험군 간에 유의적인 차이가 나타나지 않았으며 모두 정상 수준 (3.11~11.0 mg/dl) 내에 포함되었다. Jeong 등(1997)의 연구에서 혈청 인은 난소절제에 의한 변화보다는 식이 칼슘의 차이에 따른다고 제시하였고, Choi (2009)의 연구에서도 혈청 인이 난소절제 시에 유의차가 없다고 하여 본 연구 결과와 일치하였다. 칼슘과 인의 농도보다는 칼슘/인의 비율이 중요할 수 있으며 비율이 높은 경우 골흡수 감소, 골형성 반응과 관련이 있는 것으로 알려져 있다. 칼슘과 인의 비율에 있어서는 control군이 1.72로 비교적 낮았으며, C 처리군이 가장 높아 bone turnover 및 mineralization이 활성화 되는 것으로 간접 확인하였다.

라. 대퇴골 및 경골의 물리적 변화도 측정

1) 골의 무게, 길이 및 두께 측정

난소절제 수술 후 6주 사양 후 경골과 대퇴골의 형태적 조사를 Table 45에 나타내었다.

Table 45. Weight, length and diameter of left femur and tibia bone in experimental groups

	Femur			Tibia		
	weight (g)	length (mm)	diameter (mm)	weight (g)	length (mm)	diameter (mm)
sham	0.67±0.05 ^c	35.30±0.59 ^c	4.11±0.48 ^{ns}	0.54±0.03 ^d	39.15±0.68 ^b	2.35±0.07 ^{ab}
control	0.74±0.04 ^{ab}	36.33±0.68 ^{ab}	3.95±0.62	0.61±0.04 ^{ab}	40.62±0.58 ^a	2.35±0.10 ^{ab}
A	0.70±0.05 ^{bc}	35.90±0.87 ^b	3.90±0.25	0.57±0.04 ^{cd}	40.17±0.87 ^a	2.25±0.12 ^b
B	0.74±0.09 ^{ab}	36.29±0.82 ^{ab}	4.00±0.19	0.61±0.08 ^{ab}	40.62±1.09 ^a	2.40±0.14 ^a
C	0.76±0.09 ^a	35.86±0.96 ^b	4.01±0.03	0.64±0.08 ^a	40.22±0.92 ^a	2.41±0.18 ^a
D	0.74±0.04 ^{ab}	36.28±0.75 ^{ab}	3.94±0.31	0.62±0.03 ^{ab}	40.59±0.83 ^a	2.35±0.12 ^{ab}
E	0.73±0.05 ^{ab}	36.57±0.57 ^a	3.98±0.14	0.60±0.05 ^{abc}	40.73±0.74 ^a	2.34±0.12 ^{ab}
F	0.71±0.04 ^{bc}	36.25±0.59 ^{ab}	3.88±0.18	0.58±0.03 ^{bc}	40.53±0.71 ^a	2.31±0.07 ^{ab}

1) Values are means±SD

2) ns: not significant

대퇴골의 경우 무게는 C 처리군이 가장 무거웠으며, control, B, D, E 처리군, A와 F군, 난소절제 하지 않은 sham 군 순이었으며, 유의차가 있었다. 이는 *Lactobacillus fermentum* 272 균주가 생성하는 비타민 K₂와 비타민 D₃의 영향이 있지 않았나 사료된다. 길이는 E 처리군이 36.57 mm로서 sham군 35.30. mm에 비해 유의차가 있었다. 직경은 sham 군이 4.11 mm, 난소절제군이 3.88~4.01 mm보다 다소 두꺼웠으나 유의적인 차이는 없었다. 경골의 경우 무게는 대퇴골의 경우와 마찬가지로 C 처리군이 가장 무거웠고, sham 군이 0.54 g으로 가장 가벼웠으며 유의차가 있었다. 길이는 sham 군이 39.15 mm를 나타내었고, 난소절제군은 40.17~40.73 mm를 나타내었으며, 유의차가 있었다. 직경은 B와 C 처리군이 A 처리군에 비해 유의차가 있었다. 전반적으로 대퇴골 및 경골에서 sham 군과 타 처리군 간에 차이가 있었고, 특히 C 처리군이 약간 우수한 결과를 보였다.

2) 골의 BMD (bone mineral density) 측정

발골 시료의 femur와 tibia의 골밀도를 DEXA로 분석하여 Fig. 40에 나타내었다.

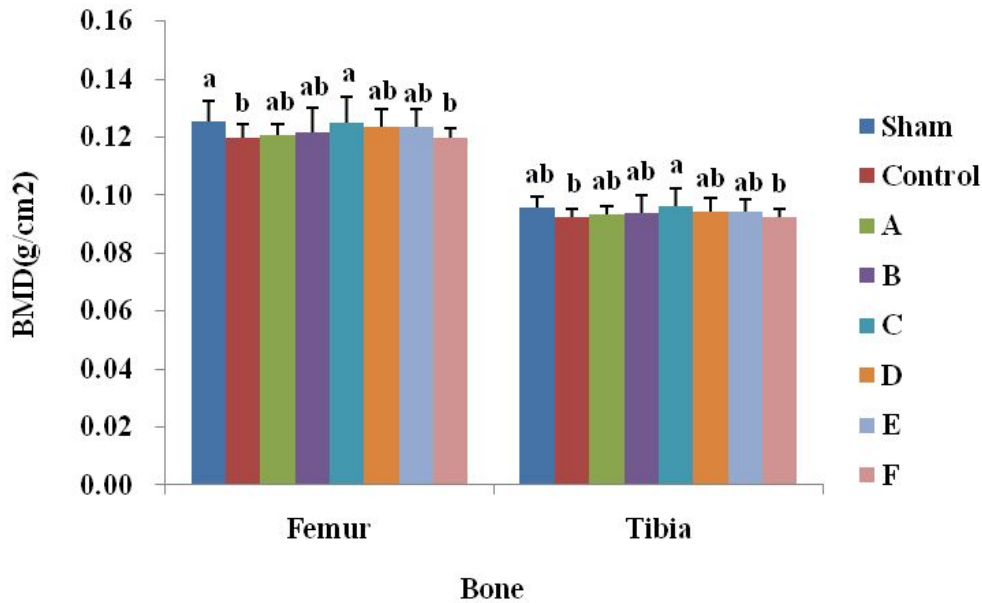


Fig. 40. Bone mineral density of right femur bone after 6 week administration since ovariectomy surgery

발골한 대퇴골의 골밀도 즉, BMD(bone mineral density)는 sham 군과 C 처리군이 가장 우수하였고, 다음은 A, B, D, E 처리군 이었으며, 대조군과 상업균주에 의한 발효유인 F 군이 가장 낮았으며, 유의차가 있었다.

경골의 BMD는 대퇴골의 BMD에 비해 낮게 나왔으며, C 처리군이 sham 군보다 더 높은 값을 얻음으로써 골 강화 효과가 있는 것으로 예측되었다. 대퇴골의 BMD와 마찬가지로 대조군과 상업균주에 의한 발효유인 F 군이 가장 낮았으며, 유의차가 있었다.

3) 골의 BMC (bone mineral content) 측정

발골 시료의 femur와 tibia의 BMC를 DEXA로 분석하여 Fig. 41에 나타내었다.

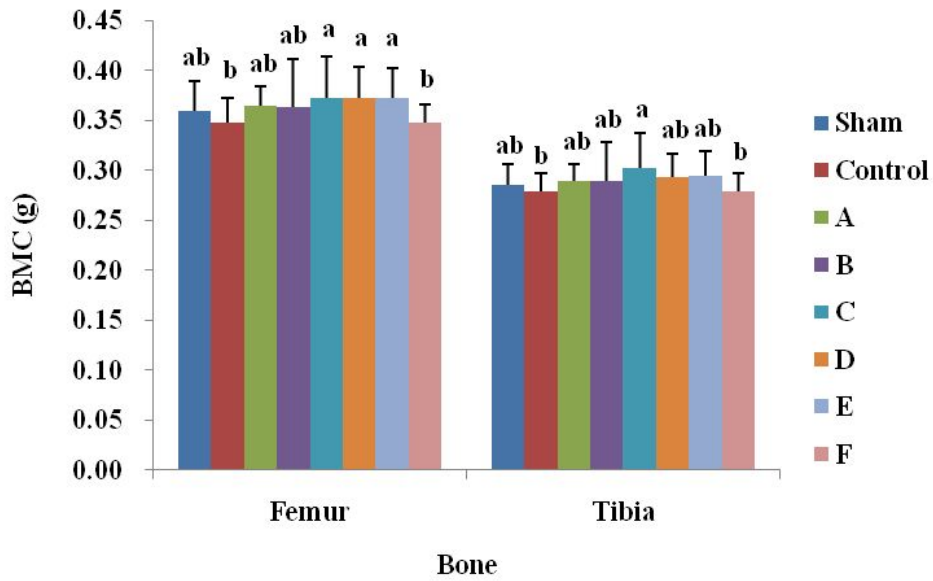


Fig. 41. Bone mineral content of right femur bone after 6 week administration since ovariectomy surgery

발골한 대퇴골의 BMC(bone mineral content)는 C, D, E 처리군이 가장 우수하였고, 다음은 sham 군, A와 B 처리군이었으며, 대조군과 상업균주에 의한 발효유인 F 군이 가장 낮았다.

경골의 BMC는 BMD와 마찬가지로 C 처리군이 가장 높았고, 대조군과 상업균주에 의한 발효유인 F 군이 가장 낮았으며, 유의차가 있었다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

비타민 K₂ 젖산균을 분리하고, 이를 이용하여 발효유를 개발하기 위하여 가급적 환경이 다른 여러 지역에서 많은 원유를 대상으로 다양한 젖산균의 분리가 필요됨에 따라 경기도, 경상도, 전라도, 제주도 등 전국 지역에서 목장원유와 신생아 및 성인에서 분변을 채취하였다. 발효유를 생산하기 위하여 젖산균이 우유를 응고시키고, 산 생성이 우수하여야 할 요건이 필수적임에 따라 젖산균 분리를 위해 MRS배지의 구성성분인 glucose 대신 lactose로 대체하였고, 젖산생성 유무를 확인하기 위하여 Bromcresol purple를, Gram 양성균 만을 선별하기 위하여 sodium azide를 추가로 첨가하여 Modified MRS배지를 제조하여 1054개의 젖산균을 분리하였다.

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

비타민 K₂ 젖산균주를 선별하기 위하여 Rogosa medium과 환원탈지유에서의 비타민 K₂ 생산 여부를 TLC, HPLC, Mass Spectrometry 통해 정량 및 확인을 거쳐 13종의 젖산균을 선별하였다. 선별된 젖산균을 현미경관찰, Gram stain, 당 발효실험 및 16S rRNA 염기서열 등의 일련의 생화학적, 유전학적 실험을 통하여 균을 동정하였다. 비타민 K₂ 함량이 높은 균주 13종 중 산 생성 속도와 비타민 K₂ 생성능을 감안하여 4종의 젖산균을 선별하여, 발효유의 종균으로서 적합한지의 여부를 검증하기 위하여 젖산균의 성장, 항생제 15종에 대한 내성시험, API ZYM kit를 이용한 효소활성 시험, 0.3% oxgall 첨가 배지에서의 담즙내성 시험, pH 내성 시험, 식중독균에 대한 항균력 시험을 실시하였다. 한편, 담즙내성이 약한 *Streptococcus macedonicus* 301 균주와 비타민 K₂ 함량이 낮은 *E. durans* 581균주를 배제하고 *L. fermentum* 272 균주와 *S. macedonicus* 351 균주를 대상으로 최적 생산조건을 확립하였다. 한편, 배합비 설정시 국산 원유의 함량을 높여서 실시하였는데, 원유 96.15%와 탈지분유 3.85%를 첨가하고 65°C에서 배합하여 완전히 녹인 후 90°C에서 5분간 살균하였으며, 40°C로 냉각시킨 다음 선택균주를 1%(v/v)로 접종하고, 최종 pH 4.4으로 감소할 때까지 배양하였다. 발효가 완료된 후 다양한 소재를 첨가하여 호상발효유를 제조한 다음 관능검사를 실시하여 최적 배합조성물을 완성하였고, 개발제품에 대한 비타민 K₂ 생성능과 이화학적 특성조사를 실시하였다. 이와 같은 결

과를 근거로 하여 동물모델을 이용한 발효유 의 골강화 효능평가 실험을 실시한바 목표를 100% 달성하였다.

따라서 본 연구결과를 통해 관련분야에의 기여도를 보면

가. 기술적 측면

- 기존의 발효유는 장, 위, 간, 고혈압, 당뇨 관련 기능성 발효유가 개발되어 있으나 골다공증을 예방할 수 있는 건강 기능성이 있는 젖산균을 이용한 발효유 제품은 전무함
- 비타민 K₂ 생산 젖산균주를 이용한 발효유 개발 기술로 유제품 외에도 식품에 이용가능성을 높임으로써 식품산업전반에 기여도를 높일 것으로 사료됨
- 외국에 비해 비타민 K₂ 생산 젖산균에 대한 연구가 전무함에 따라 이를 계기로 보다 활발한 연구 촉진

나. 경제 · 산업적 측면

- 비타민 K₂ 함유 발효유를 개발함으로써 소비기반 및 경쟁력 확보
인간 수명연장에 따른 고령인구의 증가로 골다공증에 대한 관심이 고조되고 있으며, 폐경기 여성이나 노인에게서 나타나는 골절의 주된 원인이 된다. 국내에는 약 200만명의 골다공증 환자가 있는 것으로 추산됨에 따라 소비기반이 확보되어 있으며, 국제경쟁력이 있음
- 본 제품 개발로 발효유 시장 확대
2010년말 현재 1.4조억원의 발효유 시장 중 예상시장을 10%로 예측할 때 1,400 억원으로 예상됨
- 본 제품 개발로 유제품의 수입대체 효과
유제품의 예상 잠식율이 분유 20%, 치즈 70%, 버터 및 연유 20%로 예측되며, 이를 금액으로 환산하면, 101,110백만원의 피해가 예상됨에 따라 본 기술개발로 유제품의 예상 잠식율을 10%로 낮추더라도 100억원의 수입대체 효과가 있을 것으로 예상됨.
- 연간 100억원 규모의 젖산균 스타터 수입대체효과
- 질병 예방에 의한 의료비 부담 연간 100억원 절감 효과

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

본 연구에서 분리된 비타민 K₂ 젖산균은 그동안 기능성 있는 외국의 수입종균에 의해 생산되는 발효유를 국내에서 생산함으로써 국제 경쟁력 향상과 동시에 수입대체효과가 있을 것으로 예상된다. 또한 본 연구결과는 참여업체에서 기술이전을 통하여 실용화할 것으로 예상되며, ‘비타민 K₂ 생성능을 가지는 신균주 스트렙토코커스 마세도니커스 W351’와 ‘비타민 K₂ 생성능을 가지는 신균주 락토바실러스 퍼멘텀 LC272’ 등 2건의 특허출원을 통하여 산업재산권을 확보하였고, 한국축산식품학회에 2편 발표하였으며, 논문 2편 게재 중에 있다. 특히 한국축산식품학회 제 43차 정기학술발표대회(2011. 5. 20)에서 우수 포스터상을 수상한 바 있다.

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

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

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

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학 기술정보

1. *Sporolactobacillus putidus* sp nov., an endospore-forming lactic acid bacterium isolated from spoiled orange juice

Author(s): Fujita, Rieko (rfujita@mitsui-norin.co.jp); Mochida, Kaoru; Kato, Yuko; Goto, Keiichi

Source: International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology
Volume: 60 Issue: Part 7 Pages: 1499-1503

Published: JUL 2010

Abstract: A Gram-positive, endospore-forming, lactic acid bacterium was isolated from spoiled orange juice. The organism, strain QC81-06(T), grew microaerobically or anaerobically at 30-45 degrees C (optimum 35 degrees C) and pH 3.5-5.5 (optimum pH 4.5), and produced acid from various sugars. D-Lactic acid was produced. It contained menaquinone-7 as the major isoprenoid quinone. The G+C content of the genomic DNA was 47.5 mol%. The predominant cellular fatty acids of the strain were iso-C-16:0, anteiso-C-15:0 and anteiso-C-17:0. Phylogenetic analyses based on the 16S rRNA gene and gyrB gene (DNA gyrase B subunit gene) revealed that strain QC81-06(T) clustered with *Sporolactobacillus* species but the strain was clearly distinct from other *Sporolactobacillus* species with significant bootstrap values. The levels of 16S rRNA gene and gyrB gene sequence similarities between strain QC81-06(T) and the other strains of the cluster were 96.0-97.0% and 75.1-77.2%, respectively. On the basis of these results, strain QC81-06(T) should be classified as a novel *Sporolactobacillus* species for which the name *Sporolactobacillus putidus* is proposed. The type strain is strain QC81-06(T) (=DSM 21265(T)=JCM 15325(T)).

2. Effects of a *Lactobacillus casei* 393 fermented milk product on bone metabolism in ovariectomised rats

Author(s): Jong Gun Kim, Eungsuk Lee, Sae Hun Kim, Kwang Youn Whang, Sejong Oh and Jee-Young Imm

Source: Int. Dairy J. 19:690-695.

Published: JUL 2009

Abstract : The effects of a *Lactobacillus casei* 393 fermented milk product (FMP) on bone metabolism were examined. FMP ($>0.1 \text{ mg mL}^{-1}$) supplementation significantly increased osteoblastic MC3T3-E1 cells proliferation whereas skim milk powder supplementation did not show any positive effect up to 1 mg mL^{-1} . The FMP (1%) supplemented ovariectomised rats had increased bone weight, bone mineral density, and bone breaking force compared with control ovariectomised rat. In addition, the activity of tartrate resistant acid phosphatase, a biomarker of osteoclasts, was significantly reduced in the FMP group. Based on the results, the *L. casei* 393 FMP had a preventative effect on bone loss in ovariectomised rats.

3. Crystal structure of MqnD (TTHA1568), a menaquinone biosynthetic enzyme from *Thermus thermophilus* HB8

Author(s): Ryoichi Araia, Kazutaka Murayama, Tomomi Uchikubo-Kamo, Madoka Nishimoto, Mitsutoshi Toyama, Seiki Kuramitsu, Takaho Terada, Mikako Shirouzu and Shigeyuki Yokoyama

Source: Journal of Structural Biology, Volume 168, Issue 3, Pages 575-581

Published: December 2009

Abstract : In many microorganisms, menaquinone is an essential lipid-soluble electron carrier. Recently, an alternative menaquinone biosynthetic pathway was found in some microorganisms [Hiratsuka, T., Furihata, K., Ishikawa, J., Yamashita, H., Itoh, N., Seto, H., Dairi, T., 2008. An alternative menaquinone biosynthetic pathway operating in microorganisms. *Science* 321, 1670 - 1673]. Here, we report the 1.55 \AA crystal structure of MqnD (TTHA1568) from *Thermus thermophilus* HB8, an enzyme within the alternative menaquinone biosynthetic pathway. The structure comprises two domains with α/β structures, a large domain and a small domain. L(+)-Tartaric acid was bound to the pocket between the two domains, suggesting that this pocket is a putative active site. The conserved glycine residues at positions 78, 80 and 82 seem to act as hinges, allowing the substrate to access the pocket. Highly conserved residues, such as Asp14, Asp38, Asn43, Ser57, Thr107, Ile144, His145, Glu146, Leu176 and Tyr234, are located at this pocket, suggesting that these residues are involved in substrate binding and/or catalysis, and especially, His145 could function as a

catalytic base. Since humans and their commensal intestinal bacteria, including lactobacilli, lack the alternative menaquinone biosynthetic pathway, this enzyme in pathogenic species, such as *Helicobacter pylori* and *Campylobacter jejuni*, is an attractive target for the development of chemotherapeutics. This high-resolution structure may contribute toward the development of its inhibitors.

4. An Alternative Menaquinone Biosynthetic Pathway Operating in Microorganisms

Author(s): Tomoshige Hiratsuka, Kazuo Furihata, Jun Ishikawa, Haruyuki Yamashita, Nobuya Itoh, Haruo Seto and Tohru Dairi

Source: Science Vol. 321 no. 5896 pp. 1670-1673

Published: September 2008

Abstract : In microorganisms, menaquinone is an obligatory component of the electron-transfer pathway. It is derived from chorismate by seven enzymes in *Escherichia coli*. However, a bioinformatic analysis of whole genome sequences has suggested that some microorganisms, including pathogenic species such as *Helicobacter pylori* and *Campylobacter jejuni*, do not have orthologs of the men genes, even though they synthesize menaquinone. We deduced the outline of this alternative pathway in a nonpathogenic strain of *Streptomyces* by bioinformatic screening, gene knockouts, shotgun cloning with isolated mutants, and in vitro studies with recombinant enzymes. As humans and commensal intestinal bacteria, including lactobacilli, lack this pathway, it represents an attractive target for the development of chemotherapeutics.

5. A new look at bone health.

Author(s): Banks G

Source: Prepared Foods 176 (7) : NS3, NS5-NS6, NS8, NS10

Published: 2007

Abstract: The importance of a healthy diet for maintaining bone health and reducing the onset of osteoporosis, which mainly affects women after the age of 50, is discussed with reference to: the need to ensure good bone health in early

childhood and adolescence to reduce the risk of developing osteoporosis in later life; the link between Ca and reducing the risk of osteoporosis; and research showing that vitamin K₂, P, Mg, prebiotics and soy isoflavones improve bone health and may be suitable as ingredients for inclusion in food supplements and fortified foods to reduce the risk of developing osteoporosis.

6. Vitamin K-containing dietary supplements: comparison of synthetic vitamin K₁ and natto-derived menaquinone-7.

Author(s): Schurgers LJ, Teunissen KJ, Hamulyák K, Knapen MH, Vik H, Vermeer C.

Source: *Blood*. 15;109(8):3279-83.

Published: 2007 Apr

Abstract: Vitamin K is a cofactor in the production of blood coagulation factors (in the liver), osteocalcin (in bone), and matrix Gla protein (cartilage and vessel wall). Accumulating evidence suggests that for optimal bone and vascular health, relatively high intakes of vitamin K are required. The synthetic short-chain vitamin K(1) is commonly used in food supplements, but recently the natural long-chain menaquinone-7 (MK-7) has also become available as an over-the-counter (OTC) supplement. The purpose of this paper was to compare in healthy volunteers the absorption and efficacy of K(1) and MK-7. Serum vitamin K species were used as a marker for absorption and osteocalcin carboxylation as a marker for activity. Both K(1) and MK-7 were absorbed well, with peak serum concentrations at 4 hours after intake. A major difference between the 2 vitamin K species is the very long half-life time of MK-7, resulting in much more stable serum levels, and accumulation of MK-7 to higher levels (7- to 8-fold) during prolonged intake. MK-7 induced more complete carboxylation of osteocalcin, and hematologists should be aware that preparations supplying 50 µg/d or more of MK-7 may interfere with oral anticoagulant treatment in a clinically relevant way.

7. Vitamin K₂ supplementation improves hip bone geometry and bone strength indices in postmenopausal women

Author(s): Knapen MH, Schurgers LJ, Vermeer C.

Source: Osteoporos Int. 18(7):963-972.

Published: 2007 Jul

Abstract: Vitamin K mediates the synthesis of proteins regulating bone metabolism. We have tested whether high vitamin K(2) intake promotes bone mineral density and bone strength. Results showed that K(2) improved BMC and femoral neck width, but not DXA-BMD. Hence high vitamin K(2) intake may contribute to preventing postmenopausal bone loss.

8. Vitamin K intake and calcifications in breast arteries

Author(s): Maas AH, van der Schouw YT, Beijerinck D, Deurenberg JJ, Mali WP, Grobbee DE, van der Graaf Y.

Source: Maturitas. 56(3):273-279.

Published: 2007 Mar

Abstract: Vitamin K is an important co-factor in the production of proteins that inhibit vascular calcification. A low dietary Vitamin K intake has been associated with aortic and coronary calcifications and an elevated cardiovascular risk. Calcifications in the arteries of the breasts have also been associated with cardiovascular risk, but whether there is a relation with a low Vitamin K intake has not yet been studied.

We conducted a cross-sectional study among 1689 women, aged 49-70 years. Dietary Vitamins K₁ and K₂ intake was calculated from a validated food frequency questionnaire. Breast arterial calcifications (BAC) were assessed on standard screening mammograms by two independent radiologists. With a general linear model mean Vitamins K₁, K₂ and Vitamin K₂ subtypes were calculated for women with BAC and without, adjusted for age, smoking, diabetes, intake of saturated fat, mono-unsaturated fat, poly-unsaturated fat and protein- and calcium-intake.

BAC was less common in the highest (9%) quartile of Vitamin K₂ intake,

compared to the lowest (13%) (OR 0.7, 95% CI 0.5-1.1) and not different across quartiles of Vitamin K₁ intake. Mean Vitamin K₂ levels and mean levels of Vitamin K₂ subtypes MK-5 through MK-10 were lower in the participants with BAC (p=0.01) compared to participants without BAC. However, after adjustment for aging, smoking, diabetes and dietary factors the association of mean Vitamin K₂ intake with BAC was no longer significant. Calcifications in breast arteries are not associated with a lower dietary intake of Vitamin K.

9. Analysis of vitamin K in green tea leaves and infusions by SPME-GC-FID

Author(s): Reto, M.; Figueira, M. E.; Filipe, H. M.; Almeida, C. M. M.

Source: Food Chemistry 100(1):405 - 411

Published: 2007

Abstract: The usual methods for determination vitamin K are laborious. With the aim of replacing them by a simpler method that requires fewer solvents, lower analytical levels and allows reporting of results in a smaller period of time, a procedure based on solid-phase microextraction (SPME) and gas chromatography with flame ionization detector (GC-FID) was developed. This method was used to analyse vitamin K in green tea leaves and infusions from nine brands of green tea commercialised in Portugal. The best analytical conditions were obtained using PDMS 7µm fibre using immersion extraction at 40°C, for 45 min and 1300 rpm. The linear range for vitamins K₁ and K₂ was defined. The detection limits obtained with PDMS fibre and GC/FID were 0.16 and 0.07mg/L for vitamins K₁ and K₂, respectively. In all analysed infusions the concentration of vitamin K was lower than the detection limit of the developed method, however, the concentration of vitamin K₁ present in tea leaves was between 120 and 625 µg/100g.

10. Quantitative measurement of tetrahydromenaquinone-9 in cheese fermented by propionibacteria

Author(s): K. Hojo, a, , R. Watanabea, T. Moria and N. Taketomoa

Source: Journal of Dairy Science, Volume 90, Issue 9, Pages 4078-4083

Published: 2007 September

Abstract: Propionibacteria produce tetrahydromenaquinone-9 [MK-9 (4H)] as a major menaquinone (vitamin K₂). This study aimed to determine the MK-9 (4H) concentration in commercial propionibacteria-fermented cheese. The MK-9 (4H) concentration was quantified using an HPLC instrument with a fluorescence detector after postcolumn reduction. Among the various cheese samples, the MK-9 (4H) concentration was highest in Norwegian Jarlsberg cheese, followed by Swiss Emmental cheese. In contrast, the MK-9 (4H) concentrations in Appenzeller or Gruyère cheeses were extremely low or undetected. Likewise, the concentrations in Comte and Raclette cheeses were lower than those in Jarlsberg and Emmental cheeses. In the present study, the MK-9 (4H) concentration in cheese showed a correlation with the viable propionibacterial cell count and propionate concentration. This implies that the increase in propionibacteria contributed to the generation of MK-9 (4H) in cheese. We presumed, based on these results, that Swiss Emmental and Norwegian Jarlsberg cheeses contain a meaningful amount of vitamin K because of their high MK-9 (4H) concentrations (200 to 650 ng/g).

11. *Enterococcus camelliae* sp. nov., isolated from fermented tea leaves in Thailand

Author(s): Sukontasing S, Tanasupawat S, Moonmangmee S, Lee JS, Suzuki K.

Source: Int J Syst Evol Microbiol. 57(Pt 9):2151-4.

Published: 2007 Sep

Abstract: A Gram-positive and catalase-negative coccus that formed chains, strain FP15-1(T), isolated from fermented tea leaves ('miang'), was studied systematically. The strain was facultatively anaerobic and produced l-lactic acid from glucose. Demethylmenaquinone (DMK-7) was the major menaquinone. Straight-chain unsaturated fatty acids C(16 : 1) and C(18 : 1) were the dominant components. The DNA G+C content was 37.8 mol%. On the basis of 16S rRNA and RNA polymerase alpha subunit (rpoA) gene sequence analysis, strain FP15-1(T) was closely related to *Enterococcus italicus* KCTC 5373(T), with 99.2 and 93.8 % similarity, respectively. The strain could be clearly

distinguished from *E. italicus* ATCC 5373(T) by low DNA-DNA relatedness (< or =33.8 %) and phenotypic characteristics. Therefore, this strain represent a novel species of the genus *Enterococcus*, for which the name *Enterococcus camelliae* sp. nov. is proposed. The type strain is FP15-1(T) (=KCTC 13133(T) =NBRC 101868(T) =NRIC 0105(T) =TISTR 932(T) =PCU 277(T)).

12. Enhancement of 1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid production by Propionibacterium freudenreichii ET-3 fed-batch culture

Author(s): Furuichi K, Katakura Y, Ninomiya K, Shioya S.

Source: Appl Environ Microbiol. 73(10):3137-43.

Published: 2007 May

Abstract: The production of 1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid (DHNA) was investigated using a fed-batch culture of *Propionibacterium freudenreichii* ET-3. DHNA is a precursor of menaquinone (MK) and is transformed to MK by combination with an isoprenoid unit. We found that ET-3 stopped MK production and increased DHNA production in an anaerobic fed-batch culture by maintaining the lactose concentration at approximately zero. The maximum DHNA concentration observed in the anaerobic fed-batch culture was markedly higher than the maximum DHNA concentration observed in an anaerobic batch culture. Moreover, MK or DHNA production was affected by the lactose feeding rate; this suggests that lactose metabolism participates in the syntheses of these products. On the other hand, accumulation of propionate was found to inhibit DHNA production in the fed-batch culture. Based on the fact that ET-3 increases DHNA production in an aerobic culture by consuming propionate, we carried out a cultivation experiment in which an anaerobic fed-batch culture was switched to an anaerobic batch culture and found that the DHNA production was increased to a greater extent than the DHNA production in an anaerobic fed-batch culture. These results suggest that DHNA production by ET-3 is markedly influenced by carbon source limitation and the oxygen supply.

제 7 장 참고문헌

1. Binkley, N. C., Krueger, D. C. and Engelke, J. A. 2000. Vitamin K supplementation reduces serum concentrations of undergamma-carboxylated osteocalcin in healthy young and elderly adults. *Am. J. Clin. Nutr.* 72:1523-1528.
2. Binkley, N. C., Krueger, D. C. and Kawahara, T. N. 2002. A high phylloquinone intake is required to achieve maximal osteocalcin gamma-carboxylation. *Am. J. Clin. Nutr.* 76:1055-1060.
3. Booth, S. L., Martini, L. and Peterson, J. W. 2003. Dietary phylloquinone depletion and repletion in older women. *J. Nutr.* 133:2565-2569.
4. Booth S. L., Tucker, K. L. and Chen, H. 2000. Dietary vitamin K intakes are associated with hip fracture but not with bone mineral density in elderly men and women. *Am. J. Clin. Nutr.* 71:1201-1208.
5. Choi, M. J. 2009. Effects of arginine supplementation on bone mineral density and bone markers in OVX rats. *Korean J. Nutr.* 42(4):309-317.
6. Clark, P. A., Cotton, L. N. and Martin, J. H. 1993. Selection of bifidobacteria for use as dietary adjuncts in cultured dairy foods : II- Tolerance to simulated pH of Human Stomachs. *Cultured Dairy Products J.* 28(4):11-14.
7. Douglas, A. S., Robins, S. P. and Hutchison, J. D. 1995. Carboxylation of osteocalcin in postmenopausal osteoporotic women following vitamin K and D supplementation. *Bone.* 17:15-20.
8. Feskanish, D., Weber, P. and Willett, W. C. 1999. Vitamin K intake and hip fractures in women: a prospective study. *Am. J. Clin. Nutr.* 69:74-79.
9. Gilliland, S. E. and Speck, M. L. 1977. Antagonistic action of *Lactobacillus acidophilus* toward intestinal and foodborne pathogens in associative cultures. *J. Food Prot.* 40(12):820-823.
10. Gilliland, S. E. and Walker, D. K. 1990. Factors to consider when selecting a culture of *Lactobacillus acidophilus* as a dietary adjunct to produce a hypocholesterolemic effect in humans. *J. Dairy Sci.* 73:905-911.
11. Hauschka, P., Lian, J. B., Cole, D. E. C. and Gundberg, C. M. 1989.

- Osteocalcin and matrix Gla protein: Vitamin K-dependent proteins in bone. *Physiological Reviews* 69(3):990-1047.
12. Hidaka, T., Hasegawa, T. and Fujimura, M. 2002. Treatment for patients with postmenopausal osteoporosis who have been placed on HRT and show a decrease in bone mineral density: effects of concomitant administration of vitamin K₂. *J. Bone Miner. Metab.* 20:235-239.
 13. Hojo, K., Watanabe, R., Mori, T. and Taketomo, N. 2007. Quantitative measurement of tetrahydromenaquinone-9 in cheese fermented by propionibacteria. *J. Dairy Sci.* 90: 4078-4083.
 14. Huh, M., Mun, Y. J., Lim, H. S., Jo, H. H., Kim, M. A., Kim, E. J., Kim, J. H. and Kim, J. H. 2005. The Effects of vitamin K₂(Glakay) and vitamin K₂ plus hormone replacement therapy on bone mineral density and bone metabolism in postmenopausal women. *J. Korean Menopause* 11:206-212.
 15. Iwamoto, J., Takeda, T. and Ichimura, S. 2000. Effect of combined administration of vitamin D₃ and vitamin K₂ on bone mineral density of the lumbar spine in postmenopausal women with osteoporosis. *J. Orthop. Sci.* 5:546-551.
 16. Jeong, H. K., Kim, J. Y. and Lee, H. S. 1997. The effect of dietary calcium and phosphate levels in calcium and bone metabolism in rats. *The Korean Nutrition Society.* 30(7):813-824.
 17. Jie, K. S., Bots, M. L. and Vermeer, C. 1996. Vitamin K status and bone mass in women with and without aortic atherosclerosis: a population-based study. *Calcif. Tissue Int.* 59:352-356.
 18. Kaneki, M., Hodges, S. J., Hosoi, T., Fujiwara, S., Lyons, A., Crean, S. J., Ishida, N., Nakagawa, M., Takechi, M., Sano, Y., Mizuno, Y., Hoshino, S., Miyao, M., Inoue, S., Horiki, K., Shiraki, M., Ouchi, Y. and Orimo, H. 2001. Japanese fermented soybean food as the major determinant of the large geographic difference in circulating levels of vitamin K₂: possible implications for hip-fracture risk. *Nutrition* 17(4):315-321.
 19. Kaneki, M., Hosoi, T., Ouchi, Y. and Orimo, H. 2006. Pleiotropic actions of vitamin K: protector of bone health and beyond. *Nutrition* 22(7):845-852.
 20. Kim, J. G., Lee, E. S., Kim, S. H., Whang, K. Y., Oh, S. J. and Imm, J. Y. 2009. Effects of a *Lactobacillus casei* 393 fermented milk product on bone

- metabolism in ovariectomised rats. *Int. Dairy J.* 19:690-695.
21. Kim, K. H., Choi, M. J. and Lee, I. K. 1996. The effect of dietary calcium level on bone mineral density and bone mineral content in ovariectomized female rats. *Korean J Nutrition.* 29(6):590-596.
 22. Knapen, M. H., Nieuwenhuijzen Kruseman, A. C. and Wouters, R. S. 1998. Correlation of serum osteocalcin fractions with bone mineral density in women during the first 10 years after menopause. *Calcif. Tissue Int.* 63:375-379.
 23. Kohlmeier, H., Salomon, A., Saupe, J. and Shearer, M. J. 1996. Transport of vitamin K to bone in humans. *J. Nutr.* 126:1192S-1196S.
 24. Lambert, W. E., De Leenheer, A. P. and Baert, E. J. 1986. Wet-chemical postcolumn reaction and fluorescence detection analysis of the reference interval of endogenous serum vitamin K. *Anal. Biochem.* 158:257-261.
 25. Lee, N. W., Kim, C. S., Do, J. H., Jung, I. C., Lee, H. W. and Yi, D. H. 1998. Isolation and identification of *Bacillus* sp. Lam 97-44 producing antifungal antibiotics. *Agri. Chem. and Biotechnol.* 41(3):208-212.
 26. Lim, S. Y., Leem, J. Y., Lee, C. S., Jang, Y. J., Park, J. W. and Yoon, S. 2007. Antioxidant and cell proliferation effects of *Acanthopanax senticosus* extract in human osteoblast-like MG-63 cell line. *J. Food Sci. Technol.* 39(6): 694-700.
 27. Majeska, R. J. and Rodan, G. A. 1982. Alkaline phosphatase inhibition by parathyroid hormone and isoproterenol in a clonal rat osteosarcoma cell line : Possible mediation by cyclic AMP. *Calcif Tissue Int* 34:59~66.
 28. Merle, B. and Delmas, P. D. 1990. Normal carboxylation of circulating osteocalcin(bone Gla-protein) in Paget's disease of bone. *Bone Miner.* 11:237-245.
 29. Miki, T., Nakatsuka, K. and Naka, H. 2003. Vitamin K₂ (menaquinone 4) reduces serum undercarboxylated osteocalcin level as early as 2 weeks in elderly women with established osteoporosis. *J. Bone Miner. Metab.* 21:161-165.
 30. Morishita, T., Tamura, N., Makino, T. and Kudo, S. 1999. Production of menaquinones by lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.* 82:1897-1903.
 31. Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assays for cellular growth and

- survival : application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* 65:55-63.
32. Pack, J. A., Sin, M. T., Joen, Y. J., Woo, S. Y., Yoon, J. M., Choi, B. S., Yang, C. W., Kim, Y. S., Kim, S. Y., Chang, Y. S. and Bang, B. K. 2004. The therapeutic effect of menatertrenone(Vitamin K₂) on posttransplant osteoporosis in real transplant recipient. *Korean J. Nephrol.* 23(6):934-941.
 33. Price, P. A. 1988. Role of vitamin K-dependent proteins in bone metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* 8:565-583.
 34. Sadowski, J. A., Hood, S. J., Dallal, G. E. and Garry, P. J. 1993. Phylloquinone in plasma from elderly and young adults: Factors influencing its concentration. *Am. J. Clin. Nutr.* 50:100-108.
 35. Sato, T., Yamada, Y., Ohtani, Y., Mitsui, N., Murasawa, H. and Araki, S. 2001. Production of menaquinone(vitamin K₂)-7 by *Bacillus subtilis*. *J. Biosci. Bioeng.* 91 (1):16-20.
 36. Schaafsma, A., Muskiet, F. A. and Storm, H. 2000. Vitamin D₃ and vitamin K₁ supplementation of Dutch ostmenopausal women with normal and low bone mineral densities: effects on serum 25-hydroxyvitamin D and carboxylated osteocalcin. *Eur. J. Clin. Nutr.* 54:626-631.
 37. Schurgers, L. J., Geleijnse, J. M., Grobbee, D. E., Pols, H. A., Hofman, P. A., Witteman, J. C. M. and Vermeer, C. 1999. Nutritional intake of vitamin K₁ (phylloquinone) and K₂ (menaquinone) in the Netherlands. *J. Nutr. Environ Med.* 9(2):115-122
 38. Shearer, M. J. 1990. Vitamin K and vitamin K-dependent proteins. *Br. J. Haematol.* 75:156-162.
 39. Shearer, M. J. 1995. Vitamin K. *Lancet* 345:229-234.
 40. Shearer, M. J., Bach, A. and Kohlmeyer, M. 1996. Chemistry, nutritional sources, tissue distribution and metabolism of vitamin K with special reference to bone health. *J. Nutr.* 126:1181S-1186S.
 41. Shiraki, M., Shiraki, Y. and Aoki, C. 2000. Vitamin K₂ (menatertrenone) effectively prevents fractures and sustains lumbar bone mineral density in osteoporosis. *J. Bone Miner. Res.* 15:515-521.
 42. Szulc, O., Arlot, M., Chapuy, M., C., Duboeuf, F., Meunier, P. J. and Delmas P. D. 1994. Serum undercarboxylated osteocalcin correlates with hip bone

- mineral density in elderly women. *J. Bone Miner. Res.* 9(10):1591-1595.
43. Szulc, P., Chapuy, M. C. and Meunier, P. J. 1993. Serum undercarboxylated osteocalcin is a marker of the risk of hip fracture in elderly women. *J. Clin. Invest.* 91:1769- 1774.
 44. Szulc, P., Chapuy, M. C. and Meunier, P. J. 1996. Serum undercarboxylated osteocalcin is a marker of the risk of hip fracture: a three year follow-up study. *Bone* 18:487- 488.
 45. Takahashi, M., Naitou, K. and Ohishi, T. 2001. Effect of vitamin K and/or D on undercarboxylated and intact osteocalcin in osteoporotic patients with vertebral or hip fractures. *Clin. Endocrinol.* 54:219-224.
 46. Tani, Y., Asahi, S. and Yamada, H. 1986. Menaquinone (vitamin K₂)-6 production by mutants of *Flavobacterium meningosepticum*. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 32(2):137-45.
 47. Tsukamoto, Y., Kasai, M. and Kakuda, H. 2001. Construction of a *Bacillus subtilis* (Natto) with high productivity of vitamin K₂ (menaquinone-7) by analog resistance. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65(9):2007-2015.
 48. Vergnaud, P., Garnero, P. and Meunier, P. J. 1997. Undercarboxylated osteocalcin measured with a specific immunoassay predicts hip fracture in elderly women: the EPIDOS study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82:719-724.
 49. Vermeer, C. 1990. Review article: γ -carboxyglutamate-containing proteins and the vitamin K-dependent carboxylase. *Biochem. J.* 266:625-636.
 50. 낙농편람. 2010. 농림부·낙농진흥회.
 51. 축산물의 가공기준 및 성분규격. 2010. 국립수의과학검역원.