

최 중
연구보고서

농촌형 발효유 제조를 위한 고기능
유산균주의 개발에 관한 연구

Studies on the multi-functional lactic acid
bacterial starter for farm-style fermented
milk

발효유의 저장성 향상을 위한 균주개발 이용체계에
관한 연구

Development of culture systems to extend
shelf-life of fermented milk

서울대학교 동물자원학과
(한국식품개발연구원)

농 립 부

641.3
L2936

19904400

최 중
연구보고서

농촌형 발효유 제조를 위한 고기능
유산균주의 개발에 관한 연구

Studies on the multi-functional lactic acid
bacterial starter for farm-style fermented
milk

발효유의 저장성 향상을 위한 균주개발 이용체계에
관한 연구

Development of culture systems to extend
shelf-life of fermented milk

서울대학교 동물자원학과
(한국식품개발연구원)

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “농촌형 발효유 제조를 위한 고기능 유산균주의 개발”(세부과제 “발효유 저장성 향상을 위한 균주개발 이용체계 연구”)의 최종보고서로 제출합니다.

1998. 12. 15.

주관연구기관명 : 서울대학교
총괄연구책임자 : 김 현 옥 교수
연 구 원 : 허 철 성 박사
연 구 원 : 김 근 배
연 구 원 : 안 영 태
협동연구기관명 : 한국식품개발연구원
협동연구책임자 : 김 왕 준 박사
연 구 원 : 차 성 관 박사

요 약 문

I. 제 목

농촌형 발효유 제조를 위한 고기능 유산균주의 개발

(세부과제 “발효유의 저장성 향상을 위한 균주개발 이용체계 연구”)

II. 연구개발의 목적 및 중요성

이 연구는 건강한 한국인의 장에 서식하며 내산성 및 인체의 장내에서 cholesterol 흡수 저하효과 등의 기능성이 우수한 젖산균을 분리하여 그 기능성을 시험하고 농촌형 발효유 제조에 사용할 수 있도록 젖산균의 이용체계를 연구하며 bacteriocin을 생산하며 공생관계의 젖산균과 프로피온산균의 혼합배양액을 이용하여 발효유의 저장성을 향상시키는 것을 목적으로 한다.

낙농선진국들에서 발효유와 젖산균에 의한 혈중 cholesterol 저하효과가 발표되고 있으나, 우리나라에서는 아직 이 분야의 연구가 미약한 상태이며, 혈중 cholesterol 저하효과에 있어 젖산균의 종류에 따라 큰 차이가 있어 혈중 cholesterol 저하효과가 높은 젖산균주의 선발, 효과의 검증에 대한 연구가 필요하다. 또한 젖산균의 경우 숙주 특이적이므로 인체에서 유래한 젖산균이 인체 내에서 정착 가능성이 높아 한국인의 장에서 유래한 젖산균을 사용하여 제조한 발효유를 섭취할 경우 한국인에서 젖산균의 유용효과를 극대화시킬 수 있으므로 이에 관한 연구가 필요하다.

한편, 한국시장에서 가장 많이 판매되는 과실요구르트는 냉장 유통되고 있지만 과실로부터 유입된 효모와 곰팡이의 성장으로 유통 중에 변질의 위험이 높다. 유통중의 변질을 예방하고 안전성을 증진시키기 위해 젖산균의 이용에 대해 많은 연구가 진행되고 있으나 국내에서는 이들에 대한 단편적인 연구에 그치고 있으며 체계적인 연구개발과 항균성 젖산균 이용체계의 연구가 미흡하다.

따라서 한국인의 장에 적합한 젖산균주를 이용하여 발효유를 제조함으로써 국민의 영양과 건강을 증진시킬 수 있을 뿐만 아니라 발효유 소비의 증가로 낙농민의 소득을 증가시킬 수 있다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1. 농촌형 발효유제조를 위한 고기능 유산균주의 개발

우수한 젖산균을 확보하기 위하여 한국의 건강한 성인들의 분과 현재 시판되고 있는 발효유제품에서 젖산균주들을 분리하였으며, 확립된 선발방법을 토대로 cholesterol 흡수 저하효과가 우수하고 발효유 제조에 적합한 젖산균주를 선발하였다. 선발이 완료된 젖산균주들은 미생물학적 동정방법에 근거하여 동정하였으며 인체의 장에서 생존 가능성을 시험하는 동시에 시험관에서 이들 젖산균주들에 의한 cholesterol 흡수 저하효과 현상과 이에 영향하는 요인에 대해 시험하였다. 선발된 젖산균주들을 이용하여 농촌형 발효유 제조에 적합하도록 공정을 단순화하며 젖산균주들이 최적 성장을 할 수 있도록 배양온도, 영양소 첨가, 탈지유의 열처리 등을 시험하였고 최종적으로 발효유를 제조하여 발효유의 저장성 향상을 위해 개발된 pediocin 제제를 첨가한 후 발효유의 저장성을 시험하였다.

2. 발효유의 저장성 향상을 위한 균주개발 이용체계 연구

Bacteriocin을 생산하는 젖산균을 발효소시지로부터 분리동정하고 이들의 항균범위를 조사하여 가장 항균범위가 넓은 균주를 선발하였으며, 프로피온산균은 미국의 대학, 균주보존기관(ATCC) 및 Emmental cheese로부터 구입 또는 분리동정하고 Gram 음성 및 효모를 억제하는 프로피온산균을 선발하였으며 선발 젖산균주와 혼합배양 중 유기산의 경시적 변화를 조사하여 두 균주의 공생관계를 시험하였다. 또한 두 균주를 YEG broth, skim milk + 1% glucose + 1% yeast extract, skim milk + 1% glucose + 1% yeast extract에서 혼합배양중 유기산 및 당의 경시적변화를 시험하였다.

Bacteriocin의 분리를 위하여 pH adsorption/desorption 방법으로 회수하여 RP-HPLC로 정제한 후 LC-Mass로 분자량을 측정하고 bacteriocin 생산균주의 배양과 titer의 향상을 위한 저가배지를 개발하였으며, 선발젖산균주의 보존을 방법을 연구하였다.

IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

1. 농촌형 발효유제조를 위한 고기능 유산균주의 개발

성인분변으로부터 약 101종을, 발효유와 정장제로부터 29종의 젖산균주를 분리하였고, cholesterol 흡수 저하효과가 우수한 젖산균주의 선발방법으로 복합담즙산 분해 능력이 높은 균주를 선발하기 위하여 bile extract의 분해활성을 시험하였으며 복합담즙산 분해능력이 우수한 분리젖산균들 중에서 발효유제조에 적합한 12종의 젖산균주를 선발하여 동정한 결과 2종은 *Lactobacillus acidophilus*로, 10종은 *Enterococcus*로 판명되었으며, 유제품과 정장제에서 분리된 젖산균들 중 bile acid deconjugation 능력이 우수한 젖산균들은 *Lactobacillus acidophilus*와 *Enterococcus*로 판명되었고 사람의 분에서 분리된 *L. acidophilus* HF0401과 *L. acidophilus* HF0404의 내산성과 담즙산 내성이 가장 우수하게 나타났다.

담즙산, Tween 80, 염들의 첨가에 의한 젖산균의 cholesterol 불용성화에 미치는 영향을 시험한 결과 bile extract를 첨가하지 않은 배지를 제외하고 모든 배지에서 젖산균에 의해 잔존 cholesterol 함량이 감소하였는데 이는 젖산균이 용해되어 있는 cholesterol를 흡수하기보다는 주로 젖산균의 복합담즙산 분해에 의해 생성된 유리 담즙산과 cholesterol이 결합하여 침전되는 것으로 판단된다. 한편, 배지내의 Tween 80과 염들은 실험실조건에서 젖산균에 의한 cholesterol과 담즙산의 침전에 매우 큰 영향을 미치는 것으로 나타났으며, 일반적으로 계면활성제인 Tween 80이 없는 배지에서 잔존 cholesterol 함량이 적었다. 한편, bile salts hydrolase 활성을 시험한 결과 *L. acidophilus* 두 균주의 bile salts hydrolase의 최적 pH는 5.0~5.4 이었다.

선발젖산균주의 농촌형 발효유제조에 이용체계를 연구한 결과 선발 젖산균의 최적 생장온도는 40℃이었으며, 탈지유를 110℃로 열처리 할 때에는 yeast extract와 peptone 첨가가 생장을 크게 향상시키는 것으로 나타났고 생장을 크게 억제하지 않는 최대 고형분 함량은 25%이었다.

탈지유의 열처리조건은 젖산균의 생장에 영향을 미쳤으며, 열처리 온도가 높을수록 젖산균의 생장이 좋지 못하였고, 탈지유에서의 생장이 원유에서 보다 좋은 것으로 나타났다. 농촌형 발효유제조에 적합한 탈지유의 열처리는 91 또는

92 °C에서 30분간으로 판단된다.

발효유 제조후 pediocin 제제를 첨가하여 발효유의 저장성 시험과 관능시험을 한 결과 pediocin 제제 첨가량이 10^2 AU/ml 이상이 되어야 발효유의 저장성이 개선되었고 풍미나 기호도에서도 가장 높은 것으로 나타났다.

이 연구를 통해 얻어진 자료, 기술, 성과물들이 낙농민들에게 전수되어 민간 낙농 단체에서 고 부가가치의 발효유를 제조해서 소비자에게 공급함으로써 낙농민의 소득증대와 국민 건강 증진에 이바지하는 것이 타당하다. 따라서 이 연구의 성과물들인 균주, 균주 이용체계 방법, 등을 연구협력업체가 보관관리하고 농민단체가 요구할 때에는 기술협조하므로써 외국의 발효유제품에 대해 국제 경쟁력을 가질 수 있고 이를 통해 국내 발효유제품의 소비 증가와 낙농민의 소득증대, 국내 낙농산업의 발전을 이룰 수 있을 것으로 판단된다.

2. 발효유의 저장성 향상을 위한 균주개발 이용체계 연구

Bacteriocin을 생산하는 4균주의 젖산균을 발효소시지로부터 분리동정하고, 이들의 항균범위를 조사하여 가장 항균범위가 넓은 균주(*Pediococcus acidilactici*, Ped M)를 선발하였으며, 프로피온산균은 미국의 대학, 균주보존기관(ATCC) 및 Emmental cheese로부터 구입 또는 분리동정하였고 Gram 음성 및 호모를 억제하는 프로피온산균을 선발하였으며 혼합배양 중 유기산의 경시적 변화를 조사하여 두 균주가 공생관계에 있음을 확인하였다. Ped M과 프로피온산균 혼합배양액은 단독배양액의 경우보다 bacteriocin의 항균범위가 확장되었고 두 균주를 YEG broth, skim milk + 1% glucose + 1% yeast extract, skim milk + 1% glucose + 1% yeast extract에서 혼합배양중 유기산 및 당의 경시적변화를 시험하여 target organic acid인 acetic acid와 propionic acid가 가장 많이 생성되는 parameter 등을 결정하였다.

분리정제된 Bacteriocin의 분자량은 4,617 Da이었으며, bacteriocin 생산균주(Ped M)의 배양과 titer의 향상을 위한 저가배지인 TGE broth를 개발하였고, 발효기간중 배지의 pH를 일정하게(pH 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0) 조절하여 pediocin 생산량(cfu/ml 및 AU/ml)을 조사한 결과 pH 5.5로 조절한 TGE broth가 가장 높은 bacteriocin 생산을 보여주었다. 한편, Ped M 균주의 보존을 위한

cryoprotectant는 -170°C 에서 glycerol 15%첨가가 가장 우수하였다.

Pediocin 제제는 항균범위가 확장되어 발효유의 저장중 문제가 되는 효모 및 세균을 억제할 수 있는 안전성이 확인된 천연 보존제로 활용이 가능하며, 냉장 온도에서 생장이 가능한 내냉성균의 억제가 가능하고, 식중독 및 병원미생물을 효과적으로 억제할 수 있는 식품의 천연보존제로 사용이 가능하다. 한편, 현행 식품공전에 bacteriocin이 항생제로 규정되어있는데 이를 개정함이 바람직한 것으로 판단된다.

SUMMARY

I. Subject

Studies on the multi-functional lactic acid bacterial starter for farm-style fermented milk

(Sub-project - "Development of culture systems to extend the shelf-life of fermented milk")

II. Objective and Significance

Securing very good lactic acid bacterial strain resistant to low pH and bile, which possess good cholesterol-precipitating activity, and development of lactic acid bacterial starter for farm-style yogurt are the objectives of this study. To achieve these objectives, many lactic acid bacteria have been isolated from the fecal samples of healthy Korean, fermented milk, and probiotic capsules on the market. These lactic acid bacterial isolates have been examined for the resistance to low pH and bile and for the growth in the milk. The propionic acid bacteria and lactic acid bacteria from fermented sausage have been studied for the bacteriocin as well.

Hypocholesterolemic effects of fermented milk and lactic acid bacteria have been well published, but the studies on hypocholesterolemic activity of lactic acid bacteria and yogurt are not very well documented in Korea. Furthermore the mechanism of hypocholesterolemic activity of lactic acid bacteria is not clarified yet. Lactic acid bacteria are known to be host specific for their normal habitats. It is reasonable trying to isolate the acid-resistant as well as bile-resistant lactic acid bacterial strain, which is the good remover of cholesterol from the intestinal tracts. If such a super lactic acid bacterium could be utilized in making homemade or farm style yogurt, it will be the super yogurt in which the super lactic acid bacteria survive long in the

yogurt, in acidic stomach environment, and in hostile small intestinal tract where bile is excreted in large quantities. They block the absorption of bile acids and cholesterol, and inhibit the growth of the cancer cells. Furthermore the super lactic acid bacteria isolated from healthy Korean are expected to perform best in the intestinal environment of Korean.

Consumption of fruit yogurt in Korea is fairly large in volume, which are marketed or delivered in plastic cups or bottles stored cold, and their shelf-life is around one week which are vulnerable to deterioration usually by yeasts or molds. To extend the shelf-life and secure the safety of these yogurts, bacteriocin-producing lactic acid bacteria have been suggested to suppress the Gram-negatives as well as the yeasts or molds.

It will be very significant that our lactic acid bacteria isolated from the healthy Korean will survive the intestinal environments, promote the health of many Korean, and provide the better nutrition, while many dairy farmer's cooperative using these lactic acid bacteria would bring more money to them.

III. Contents and Scope of Research

To obtain the good lactic acid bacterial strains for the farm-style yogurt, the fecal samples from healthy Korean adults, many fermented milk products, and probiotic capsules on the market have been collected and the lactic acid bacteria grown on the MRS agar were selected based upon their resistance to low pH and bile. Selected lactic acid bacteria were identified and studied on the capability of precipitation of cholesterol in the medium and the growth in milk. The growth of the selected lactic acid bacterial strains in milk has been optimized by the fermentation temperature, nutrient supplementation, and heat treatment of milk. Pediocin preparation was tested in our fermented milk expecting longer shelf-life.

Bacteriocin produced by a lactic acid bacterial strain from fermented

sausage was proved to be useful and its antimicrobial activity was examined in the yogurt. Propionic acid bacteria inhibiting Gram negative bacteria as well as molds and yeasts were studied. In mixed culture of lactic acid bacterial isolates with propionic acid bacteria, the production of organic acid was studied and the bacteriocin was purified by RP-HPLC and then characterized. The production of the bacteriocin was studied for the commercial production medium.

IV. Results and Recommendation

1. 101 strains of lactic acid bacteria were isolated from the fecal samples and 29 strains from fermented milks and probiotic capsules. Lactic acid bacterial isolates were selected based upon the resistance to low pH and bile and then cholesterol precipitating activity was tested. Lactic acid bacterial isolates having strong cholesterol precipitating activity expressed high deconjugating activity of bile salts. 12 strains were selected as the possible candidates as yogurt starter bacteria. They identified two of them as *Lactobacillus acidophilus* strains and 10 as *Enterococcus* strains. *L. acidophilus* HF0401 and *L. acidophilus* HF0404 isolated from human feces were found to be the most tolerant to low pH and bile acids and had high deconjugating activity of bile salts.

2. Salts in MRS broth increased slightly the precipitation of cholesterol from the medium but tween 80 suppressed strongly the precipitation of cholesterol. Cholesterol did not seem to be assimilated but the lactic acid bacteria deconjugated the conjugated-bile acids into free bile acids using their bile salt hydrolase, which seemed to be coprecipitated with cholesterol in the medium. pH 5.0~5.5 seemed to be the optimum pH for bile salt hydrolase of two *L. acidophilus* strains.

3. Optimum growth temperature of selected lactic acid bacteria was found to

be 40°C, and supplementation with yeast extract and peptone improved greatly the growth of them in skim milk heated at 110°C for 30 minutes, and the highest total solid content of skim milk supporting the growth of the lactic acid bacterial isolates was 25% w/w. As heating temperature raised, skim milk needed to be supplemented more with peptone or yeast extracts for the proper growth. They grew better in skim milk than in raw milk. The skim milk for good farm-style yogurt has to be heated at 91 or 92°C for 30min for good quality of yogurt. When pediocin preparation(10^2 AU/ml) was added to yogurt manufactured, the shelf-life of the yogurt was extended up to 9 days at 5°C with the good flavor and preference.

4. This farm-style yogurt made using our new lactic acid bacterial strains would be the good dairy product, which could be made easily in a small factory with the minimum input of the capital and the technicians, and promote the income of the dairy farmers as well as the health of the people. This farm-style yogurt could help the competitive power of Korean dairy farmers on this global market and to increase the consumption of fermented milk products.

5. Four strains of bacteriocinogenic lactic acid bacteria isolated from various fermented foods were tentatively identified as *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* based upon morphology, catalase, oxidase, and API 50CHL. Among them, *Pediococcus acidilactici*(Ped M) strain produced a bacteriocin of wide antimicrobial spectrum. Mixed culture study of Ped M and two propionibacteria(P5 and P126) revealed that they are not antagonistic each other, rather they are on commensalistic interaction. Of particular interest, antagonistic effect of the mixed culture system(Ped M + P5) was higher than that of single culture.

6. Bacteriocin, designated as Pediocin AcM, produced by *P. acidilactici* was purified by pH dependent adsorption/desorption and RP-HPLC. The molecular weight of Pediocin AcM was determined to be 4,617 Da by LC-Mass. Production of acetic acid reached its maximum after 90 hr in Ped M and P5 coculture. While, production of propionic acid reached maximum after 90 hr in Ped M and P126 coculture. The optimum pH for the production of Pediocin AcM was pH 5.5 and from which the highest AU(4×10^3 AU/ml) was obtained. Preservation of Ped M at -170°C with 15% glycerol as a cryoprotectant evidenced the highest viability. Pediocin having a wide antimicrobial spectrum could be used as a food biopreservative to prevent yeast and mould deteriorating fermented milk during storage, also, psychrotrophs able to grow at refrigerator and pathogens.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	14
Section 1. Objective and Scope of Research	14
Section 2. Significance of Research	14
Chapter 2. Studies on the multi-functional lactic acid bacterial starter for farm-style fermented milk	16
Section 1. Introduction	16
Section 2. Contents	18
Section 3. Results and Discussion	25
Section 4. Conclusion	71
Section 5. Reference	73
Chapter 3. Development of culture system to extend the shelf-life of fermented milk	74
Section 1. Introduction	74
Section 2. Contents	75
Section 3. Results and Discussion	81
Section 4. Conclusion	101
Section 5. Reference	102

목 차

제 1 장 서 론	14
제 1 절 연구개발의 목적과 범위	14
제 2 절 연구개발의 중요성	14
제 2 장 농촌형 발효유제조를 위한 고기능 유산균주의 개발	16
제 1 절 서 론	16
제 2 절 연구 내용	18
제 3 절 연구 결과 및 고찰	25
제 4 절 결 론	71
제 5 절 참고문헌	73
제 3 장 발효유의 저장성 향상을 위한 균주개발 이용체계 연구	74
제 1 절 서 론	74
제 2 절 연구내용	75
제 3 절 연구 결과 및 고찰	81
제 4 절 결 론	101
제 5 절 참고문헌	102

본 문

제 1 장 서 론

제 1 절 연구개발의 목적과 범위

이 연구는 건강한 한국인의 장에 서식하며 내산성, 담즙산 내성 및 인체의 장 내에서 cholesterol 흡수 억제효과 등의 기능성이 우수한 젖산균을 분리하여 그 기능성을 시험하고 농촌형 발효유 제조에 사용할 수 있도록 젖산균의 이용체계를 연구하고 bacteriocin을 생산하며 공생관계의 젖산균과 프로피온산균의 혼합 배양액을 이용하여 발효유의 저장성을 향상시키는 것을 목적으로 한다.

제 2 절 연구개발의 중요성

건강증진 효과가 높은 젖산균을 효과적으로 이용하려면 젖산균이 위의 높은 산도에서도 살아남고 담즙산에 대해서도 저항성이 있어야하며 건강증진 기능이 인정되어야 된다.

낙농선진국들에서 발효유와 젖산균에 의한 cholesterol 흡수 억제효과가 발표되고 있으나, 우리나라에서는 아직 이 분야의 연구가 미약한 상태이며, cholesterol 흡수 억제효과에 있어 젖산균의 종류에 따라 큰 차이가 있어 cholesterol 흡수 억제효과가 높은 젖산균주의 선발, 효과의 검증에 대한 연구가 필요하다. 또한 젖산균의 경우 숙주특이적이므로 인체에서 유래한 젖산균이 인체 내에서 정착 가능성이 높아 한국인의 장에서 유래한 젖산균을 사용하여 제조한 발효유를 섭취할 경우 한국인에서 젖산균의 유용효과를 극대화시킬 수 있으므로 이에 관한 연구가 필요하다.

한편, 한국시장에서 가장 많이 판매되는 과실요구르트는 냉장 유통되고 있지만 과실로부터 유입된 효모와 곰팡이의 성장으로 유통 중에 변질의 위험이 높다. 유통중의 변질을 예방하고 안전성을 증진시키기 위해 젖산균의 이용에 대해 많은 연구가 진행되고 있으나 국내에서는 이들에 대한 단편적인 연구에 그치고 있으며 체계적인 연구개발과 항균성 젖산균 이용체계의 연구가 미흡하다.

따라서 한국인의 장에 적합한 젖산균주를 이용하여 발효유를 제조함으로써 국민의 영양과 건강을 증진시킬 수 있을 뿐만 아니라 발효유 소비의 증가로 낙농민의 소득을 증가시킬 수 있다.

이러한 고기능성의 젖산균주나 또는 젖산균주의 복합이용 체계를 개발하여 국내의 농촌형 유가공장에서 발효유를 생산하게 되면 우유의 가공유통에서 발생하는 높은 부가가치를 농촌에 획기적으로 환원시킬 수 있을 것이며 동시에 국민의 건강과 식품안전성을 위해 크게 기여할 것으로 생각된다.

제 2 장 농촌형 발효유제조를 위한 고기능 유산균주의 개발

제 1 절 서 론

현대 산업사회를 살아가는 사람들의 가장 큰 관심사는 건강이며, 건강은 우리가 섭취하는 식품과 매우 밀접한 관계가 있다는 사실이 널리 알려져 있다. 더욱이 현대인의 가장 큰 건강의 관심은 암, 심장질환, 및 식품의 안전성에 집중되고 있다. 따라서 건강을 증진시킬 수 있는 기능을 가진 균형된 영양의 식품이 강조되고 있으며 이러한 식품으로서 요구르트(yogurt)가 세계인의 관심이 되고 있다.

요구르트는 우유(대부분이 탈지유)를 젖산균(lactic acid bacteria, LAB)으로 발효시켜 얻어지는 발효식품으로서 젖산균의 건강증진효과와 거의 완전해 가까운 영양성분을 가진 우유의 장점을 최대한 살리고 과일 등을 첨가한 최고의 건강영양식품이다. 더욱이 제조하기 쉽고 자연적이어서 농촌형 유가공장에 적합한 식품이며 낙농민이 생산한 원유의 부가가치를 최대로 농촌에 환원할 수 있는 식품으로 인정되고 있다.

요구르트제조에 핵심은 젖산균이며 젖산균은 인체에서 암세포의 성장억제, cholesterol 흡수 억제효과, 면역증진, 인체에 무해한 항균물질의 생산 등의 유익한 기능을 가지고 있으며 따라서 장수인의 장기에 서식하는 젖산균이 사람의 건강에 중요한 일을 하는 것으로 확인되고 있으며 장수하는 한국인의 장에 서식하는 고기능성의 젖산균에 대하여 많은 관심이 집중되고 있다.

cholesterol은 세포막, 담즙산, 스테로이드 호르몬(steroid hormone), 바이타민 D의 전구물질로서 동물체에서는 필수적인 생체성분이지만 cholesterol의 과다섭취는 흡연 및 비만 등의 다른 요인과 결부되어 혈중 콜레스테롤 수준을 증가시키며 동맥경화증과 심장병을 포함한 순환기계 질병을 유발시키는 것으로 알려져 있다.

세계 최대의 관심사인 성인의 순환기계 질병은 혈중 cholesterol의 증가로 인

한 것이며 혈중 cholesterol을 낮추기 위한 여러 방법이 시도되고 있으나 최근에 발효유를 많이 섭취하므로써 혈중 cholesterol수준을 저하시킬 수 있다는 사실이 확인되고 있어서 동맥경화증의 중요한 예방수단으로서 관심이 집중되고 있다.

제 2 절 연구 내용

1. 우수한 젖산균주의 확보

균주 보관이 쉽고 각종 기능성이 우수하고 호기적 성장을 할 수 있는 젖산균을 수집하기 위하여 20세 이상의 성인 51명으로부터 변시료를 채취하였다.

멸균된 면봉을 이용하여 변을 채취한 다음 0.02% sodium azide(NaN_3)가 첨가된 MRS 액체배지가 담긴 15 ml 시험관에 넣고 살균된 가위를 이용하여 면봉의 1/3 부분을 잘라 넣고 37°C에서 24시간 배양하였다. 24시간 배양액을 0.02% sodium azide가 첨가된 MRS 액체 배지에 백금이를 이용하여 접종한 후 37°C에서 24시간 배양하였다. 다음 0.02% sodium azide가 첨가된 MRS 한천배지에 백금으로 도말 접종한 다음 37°C에서 약 2일간 배양한 다음 MRS 한천 배지상에 성장한 특징적인 균락을 백금으로 채집하여 MRS 액체배지에 접종하고 다시 37°C에서 24시간 배양하였다. 이 결과 얻어진 균주들을 원심분리(7,000 rpm, 15min)하여 상등액을 멸균된 20% 탈지유로 치환하여 냉동(-70°C)보관하면서 연구에 사용하였다.

한편, 시판되고 있는 3개 업체의 발효유제품 4종과 시판되고 있는 정장제를 구입하여 젖산균주를 분리하고 위와 같은 방법으로 냉동(-70°C)보관하면서 시험에 사용하였다.

2. Cholesterol 흡수 억제효과 우수하고 발효유 제조에 적합한 젖산균주의 선발

가. 젖산균의 복합 담즙산(conjugated bile acid) 분해(deconjugation) 및 선발

젖산균의 복합 담즙산 분해는 Dashkevicz와 Feighner(1989)의 agar plate assay를 개선하여 각각의 복합 담즙산을 MRS 배지에 0.5% 첨가하여 유가공학 연구실에 보관중인 6종의 젖산균, 시판 발효유 제품에서 분리된 젖산균주들, 그리고 성인 분변에서 분리된 약 101종의 젖산균주에 대해 시험하였다.

Oxgall은 Difco(Detroit, U.S.A.)로부터, Bile extract(porcine), Bile (bovine), TCA(taurocholic acid), TCDCA(taurochenodeoxycholic acid), TDCA(taurodeoxycholic acid) GCDCA(glycochenodeoxycholic acid) 그리고

시험에 사용하였으며, 사람의 분, 발효유제품 그리고 정장제에서 분리된 젖산균들에 대해 bile extract를 이용하여 복합담즙산 분해를 시험한 결과에 근거하여 복합담즙산 분해력이 가장 강한 균주를 선발하였다.

나. 젖산균의 포도당 발효

분리된 101종의 균주에 대해 hot loop 시험법(김, 1988)을 사용하여 gas 생성을 시험하였다.

다. 배양온도에 따른 젖산균주의 생장과 탈지유의 발효

Bile extract deconjugation과 hot loop 시험에서 선발된 67종(인체에서 분리된 62종, 의약품에서 분리된 5종)의 젖산균주들을 37℃와 42℃에서 UV visible spectrophotometer(Shimadzu Co. Japan)를 이용하여 생장시험을 하였다.

또한 8% 탈지유에서 젖산균주들의 생장을 시험하여 생성되는 커드를 관찰하여 발효유 제조용 starter로서의 적합성을 시험하였다.

3. 선발 젖산균주의 동정

탈지유에서 발효유 제조에 적합한 커드를 형성하는 젖산균주 12종에 대해 Bergey's Manual(1986)에 근거하여 현미경 관찰, 생장온도 시험, pH 9.6 및 6.5% NaCl에서 생장, catalase 생성 시험 그리고 혈액배지에서 용혈시험, 당이 용성 등을 시험하였고 최종적으로 API kit 50 CHL과 API kit 20 STREP(API, bioMérieux, France)을 이용하여 동정하였다.

4. 선발 젖산균주의 bile acid deconjugation

선발된 젖산균주중에서 동정이 완료된 젖산균주에 대해 Dashkevicz와 Reighner(1989)의 plate assay를 개선한 방법으로 젖산균주의 taurocholic acid, taurochenodeoxycholic acid, taurodeoxycholic acid, glycocholic acid, glycochenodeoxycholic acid 및 glycodeoxycholic acid의 deconjugation을 비교 시험하였다.

5. 선발 젖산균주의 내산성 및 담즙산 내성

선발된 젖산균주의 담즙산 내성과 내산성을 유제품과 의약품에서 분리된 *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* 그리고 *Enterococcus faecium* 과 비교 시험하였다. 담즙산 내성은 Gilliland 등(1984)의 방법을 개선하여 0.2% sodium thioglycollate가 첨가된 MRS broth에 Oxgall(Difco)을 0.3% 또는 0.5%를 첨가한 후 37°C에서 배양하면서 UV visible spectrophotometer(Shimadzu Co. Japan)를 이용하여 생장을 시험 확인하였다.

시험균주들의 내산성은 Berrada 등(1991)의 방법을 개선하여 각각의 시험균주들을 0.2% sodium thioglycollate가 첨가된 MRS Thio broth에서 24시간 배양한 후 1.25 N HCl로 배양액 pH를 2.0으로 낮추고 다시 37°C에서 배양하면서 30분 간격으로 시료를 채취하였다. 채취한 시료는 먼저 8.5 ml의 0.1% peptone과 0.5 ml의 0.5 N NaOH 용액에서 중화 희석한 후 9 ml의 0.1% peptone 용액에서 연속 희석하여 평판에 도말 접종하고 배양한 후 생균수를 측정하였다.

6. 선발 젖산균주의 in vitro cholesterol 침전 시험

분리 선발된 젖산균주들의 cholesterol 침전을 유제품과 의약품에서 분리된 *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* 그리고 *Enterococcus faecium* 과 비교 시험하였다.

Gilliland 등(1985)의 cholesterol assimilation 방법을 개선하여 plate assay에서 bile acid deconjugation 현상이 나타난 0.2% bile extract(sigma)를 첨가하여 배지에서 cholesterol 침전을 시험하였다.

가. *L. acidophilus*의 cholesterol 불용성화에 미치는 요인

담즙산, Tween 80, 염들의 첨가에 의한 젖산균의 cholesterol 불용성화에 미치는 영향을 시험하고자 bile extract, Tween 80, 그리고 salts(ammonium citrate, sodium acetate, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$, dipotassium phosphate 각각 첨가 또는 빼고 배지를 제조하여 cholesterol을 첨가한 후 각 균주배양액을 접종하여 배양한 다음 잔존 cholesterol 양을 측정하여 시험하였다.

나. cholesterol의 *L. acidophilus* 세포벽 흡착

10, 50, 100 ml의 MRS broth에서 24시간 배양한 *L. acidophilus* 균주들을 12,000 × g, 4°C에서 20분간 원심분리된 후 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 6.4)를 각각 5, 10, 15 ml에 분산한 다음 열처리(121°C, 16 min)하고 다시 원심분리와 세척을 반복한 후 균체를 5 ml의 MRS Thio broth(0.2% bile extract 첨가)에 분산하여 약 100 µg/ml의 cholesterol이 함유된 9 ml의 MRS Thio broth(0.2% bile extract 첨가)에 접종, 24시간 37°C에서 배양한 후 잔존 cholesterol 양 측정하여 세포에 흡착된 cholesterol 양을 시험하였다.

7. Bile salt hydrolase 활력 시험

0.2% sodium thioglycollate가 첨가된 MRS 배지와 0.3% bile extract와 0.2% sodium thioglycollate가 첨가된 200 ml MRS 배지에 선발균주의 배양액을 1% 접종하여 37°C에서 3일간 배양한 후 각각을 10,000 × g, 5°C, 10분간 원심분리(Supra 25K, Hanil, Korea)하였다. 원심분리 후 상등액은 다시 0.45 µm filter를 이용하여 여과한 후 멸균된 광구병에 옮겨 냉장 보관하면서 시험에 사용하였고 수집된 균체는 sodium acetate 완충용액(50 mM, pH 4.0, 20 ml)으로 두 번 세척하여 10,000 × g, 5°C, 10분간 원심분리하고 sodium acetate 완충용액(50 mM, pH 5.4)에 다시 분산시켜 최종 부피를 20ml로 조절한 후 세포파쇄용 Ultrasonic processor(VCX-400 Watt, Sonics & Materials Inc., USA)를 이용하여 5°C에서 세포를 파쇄하였다. 세포파쇄 후 다시 7,000 rpm, 5°C, 20분간 원심분리하고 0.45 µm filter를 이용하여 여과한 후 냉장 보관하면서 시험에 사용하였다.

Bile salts hydrolase 활성 시험은 plate assay와 agar diffusion method(Tramer와 Fowler, 1964)를 개선하여 시행하여 복합담즙산 분해 활성결과 나타난 환의 지름을 측정하여 시험하였다.

8. 선발균주의 우유에서의 성장

가. 최적 성장 온도

세대기간을 측정하였고 탈지유의 열처리는 85℃ 30분과 110℃ 30분으로 나누어 시험하였다. MRS 배지에서 두 번 계대 배양된 균주의 배양액을 탈지유(12%)에 0.02% 접종하여 4시간 간격으로 균락수를 측정하였다.

나. 영양소

두 균주에 에너지원인 glucose, yeast extract, 그리고 단백질 공급원인 proteose peptone을 첨가해 필수영양소 요구를 시험하였다. 첨가량은 glucose 1.5%, yeast extract 0.3%, proteose peptone 2%로 과량 첨가하였다. 탈지유의 열처리는 85℃ 30분과 110℃ 30분으로 나누어 시험하였으며 12% 탈지유에 균주 배양액을 0.02% 접종하여 40℃에서 배양하였다.

다. 고형분 함량

Tamine과 Robinson(1985)의 방법으로 증류수에 탈지분유를 8, 12, 16, 20%로 나누어 용해시킨 후 85℃ 30분, 110℃ 30분 열처리하고, 균주 배양액을 0.02% 접종 후 40℃에서 배양하였다.

생장이 저하되는 고형분 함량을 알기 위해 8, 12, 14, 16, 20, 24, 26, 28, 32, 40%의 탈지유를 만들고 여기에 균주 배양액 2%를 접종하여 12시간 후의 pH 변화를 조사하였다. 탈지유는 85℃에서 30분 동안 열처리하였다.

라. 열처리

원유와 탈지유를 저온 장시간 살균처리인 63℃ 30분과 Galeslout과 Hassing(1969)이 제시한 발효유제조를 위한 최적의 열처리인 85℃ 30분, 120℃ 30분, 그리고 UHT 열처리시에 두 균주의 생장을 시험하였다.

1) 최적의 열처리 온도 선정

63, 85, 90, 92, 93, 95, 110℃에서 30분 동안 열처리한 후 균주 배양액을 0.02% 접종하여 세대기간을 측정하여 최적의 생장을 보이는 열처리 온도를 선정하였다.

2) 열처리에 의한 단백질의 변화

유단백질의 변화는 전기영동을 통해 측정하였다. 전기영동은 Laemmli 법에 따라 실시하였다. 사용된 시료는 90과 95℃에서 30분 동안 열처리하였고, 일부는 직접 전기영동을 하여 전체 유단백질의 변화를 확인하였으며, 일부는 탈지유에 0.1 N HCl을 첨가하여 pH를 4.6조정한 후 filter(whatman, No.1)로 걸러서 유청단백질의 변화를 전기영동하여 확인하였다. Laemmli gel제조시, 분리 gel은 12% acrylamide와 2.7% bisacrylamide를, stacking gel은 7% acrylamide와 2.7% bisacrylamide를 혼합하여 제조하였다. 탈지유를 전기영동할 때에는 시료를 추적염료액(10% sucrose 용액에 bromophenol blue를 1%를 녹임)과 1:1로 혼합하여 사용하였고 유청단백질을 전기영동할 때에는 상대적으로 낮은 유청단백질 농도를 고려해 시료와 추적염료액을 2:1로 혼합하였다.

9. yogurt 제조 및 pediocin 첨가

두 균주가 최적으로 성장할 수 있는 여러 환경요인을 설정한 후 이를 바탕으로 yogurt를 제조 시험하였다(Fig. 1).

원유나 고흡분 12% 탈지유를 준비하여 91~ 92℃로 30분간 멸균하였다. 그리고 MRS 배지에서 두번 계대배양한 *L. acidophilus* HF0401 균주와 *S. thermophilus* 를, 고흡분 12% 탈지유를 110℃에서 30분간 멸균하고 0.3% yeast extract를 첨가한 다음 계대 배지에 1:1로 2% 접종하고 이를 다시 2%를 12% 탈지유에 첨가하여 배양시켰다. 배양온도는 40℃로 하였다. 12시간 배양하여 pH 4.1~4.2에 도달하면 즉시 5℃로 냉각시켰고 여기에 10% sucrose, 10% 증류수, 0.05% 풍미료를 혼합하여 첨가하였다. 제조된 yogurt 양은 3 ℓ 이었고 sucrose와 증류수는 멸균하여 사용하였다.

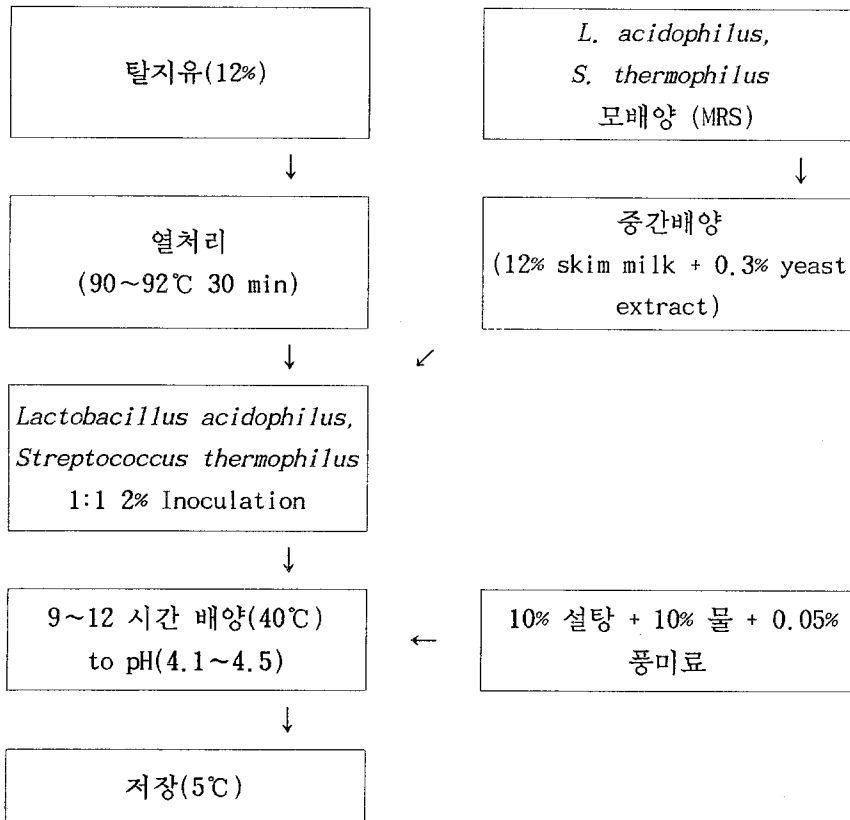


Fig 1. 요구르트 제조공정도.

가. pediocin첨가

Pediococcus에서 분리된 bacteriocin인 pediocin을 제조된 yogurt에 첨가하여 5°C에 저장하면서 생존 미생물 수를 시험하였고 최종농도가 10^1 , 10^2 , 10^3 AU/ml 이 되도록 제조된 yogurt에 pediocin을 첨가하였다.

나. 관능시험

pediocin 첨가량이 기호성에 어떤 영향을 미치는지 조사 시험하였다. 제조된 yogurt는 서울대학교 농생대 학부 및 대학원생 18명의 관능검사원에 의하여 삼점검사(triangle test)를 이용한 차이식별검사(discriminative test)와 기호도 검사(consumer preference test)가 이루어졌다.

제 3 절 연구 결과 및 고찰

1. 젖산균주의 분리

0.02% NaN_3 가 첨가된 MRS 평판배지를 이용하여 성인분변으로부터 약 101종의 젖산균주를 분리하였으며, 발효유와 정장제로부터 29종의 젖산균주를 분리하였다.

2. cholesterol 흡수 억제효과가 우수하고 발효유 제조에 적합한 젖산균주의 선발

가. 젖산균의 복합 담즙산(conjugated bile acid) 분해(deconjugation)

유가공학 연구실에 보관중인 6종의 젖산균에 대해 Dashkevicz와 Feighner(1989)의 agar plate assay 방법을 수정하여 예비 실험을 하였으며, 결과는 Table 1과 같다.

Table 1에서 보듯이 bile acid의 종류에 따라 젖산균의 복합 담즙산 분해 정도가 다른 것으로 나타났다. 분해의 결과로 균락 주변에 침전 환이 나타나는 경우와 불투명한 과립성 백색 균락이 나타나는 경우가 있다. 불투명한 과립성 백색 균락은 TDCA와 GDCA의 분해 과정에서만 나타나고 이러한 현상은 Dashkevicz와 Feighner(1989)의 agar plate assay에서도 관찰되었다.

한편, bile extract에서 복합담즙산 분해활성을 나타낸 대부분의 균주들이 각각의 복합담즙산에 대해 분해활성을 나타내 복합담즙산 분해활성이 높은 균주를 선발할 때 선발방법으로 사용 가능한 것으로 나타났다.

각각의 시험균주들의 MRS 배지에서의 성장과 복합 담즙산의 분해는 Figure 2에 보여지고 있다. Plate assay에서 관찰되는 미생물에 의한 복합담즙산 분해 현상은 bile salts hydrolase 활력의 존재, 배지의 낮은 pH에 의해 나타나며, di-, trihydroxy taurine-conjugated bile acids의 pK_a 값과 관계가 있다.

수용액에서 taurine 복합체의 pK_a 는 pH 1.9이고 비복합담즙산의 pK_a 는 대략 pH 5.0이므로 산성 pH에서 비복합담즙산은 양자를 얻어 침전되고 taurine 복합체는 완전히 이온화된 상태로 용액에 남게 된다. 반면, glycine 복합체의 pK_a 는 대략 pH 3.9로 산성 pH에서 부분적으로 침전될 수 있다.

Table 1. Deconjugation of bile salts by lactic acid bacteria under anaerobic condition

Deconjugation of	Strain					
	150	CG1	L111	PD1	651	471
Oxgall	-	-	-	-	- ^c	-
Bile extract	+	+++	+	+++	+	+++
Bile (bovine)	+	+	+	+	-	+
TCDCA	++	++	+	+	-	+
TCA	+	+	+	+	-	+
TDCA	- ^a	- ^a	+ ^b	+ ^b	-	- ^a
GCDCA	-	+	-	+	-	+
GDCA	+++ ^b	+++ ^b	- ^c	+++ ^b	+ ^b	+++ ^b

^a : Opaque granular white colonies

^b : Precipitate halos around colonies and of opaque granular white colonies

^c : Cell growth inhibited

- : No precipitate halos around colonies

+ : Moderate precipitate halos around colonies

++ : Big precipitate halos around colonies

+++ : Very big precipitate halos around colonies

150 : *Lactobacillus acidophilus* LDTM 4356

L111 : *Lactobacillus acidophilus* LDTM 4962

CG1 : *Lactobacillus fermentum* LDTM CG1

651 : *Lactobacillus brevis* ATCC 14869

471 : *Lactobacillus plantarum* ATCC 10012

PD1 : *Lactococcus lactis lactis* LDTM PD1

한편, Gilliland와 Speck(1977)은 lactobacilli는 glycocholate 및 taurocholate 등(bile acids)을 deconjugation하며 더 이상 분해하지는 않는 성질이 있으며 pH 6의 혐기상태에서 이 기능이 가장 활발하였다고 하였다.

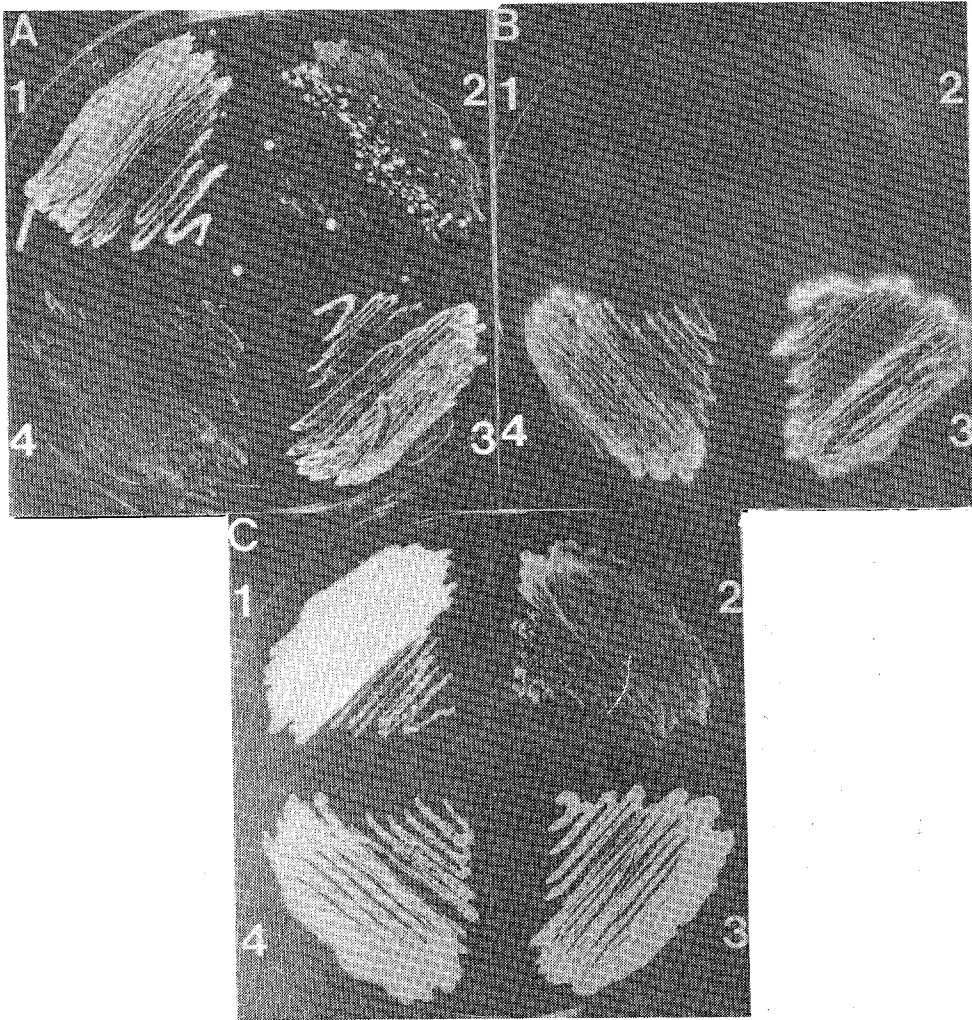


Figure 2. Alteration of conjugated bile salts by lactic acid bacteria.

1: *L. acidophilus* LDTM 4962, 2: *L. brevis* LDTM 14869

3: *L. plantarum* ATCC 10012, 4: *L. lactis lactis* LDTM PDI

A: MRS agar

B: MRS agar containing 0.5% bile extract(precipitate halos around colonies)

C: MRS agar containing 0.5% taurodeoxycholic acid(opaque granular white colonies)

Table 2는 호기 상태에서 젖산균에 의한 복합 담즙산의 분해를 시험한 결과 담즙산 분해 활성이 약하게 나타났으며, Gilliland와 Speck(1977)은 *L. acidophilus*의 복합담즙산 분해에는 낮은 산화·환원전위가 필요하다고 하였다.

Table 2. Deconjugation of bile acids by lactic acid bacteria under aerobic condition

Deconjugation of	Strain				
	150	CG1	L111	651	471
Oxgall	-	-	-	-	-
Bile extract	-	++	-	-	++
TCDCA	-	-	-	-	-
TCA	-	-	-	-	-
GCDCA	- ^a	-	- ^a	- ^a	++

^a : Cell growth inhibited

- : No precipitate halos around colonies

+ : Moderate precipitate halos around colonies

++ : Big precipitate halos around colonies

+++ : Very big precipitate halos around colonies

150 : *Lactobacillus acidophilus* LDTM 4356

L111 : *Lactobacillus acidophilus* LDTM 4962

CG1 : *Lactobacillus fermentum* LDTM CG1

651 : *Lactobacillus brevis* ATCC 14869

471 : *Lactobacillus plantarum* ATCC 10012

나. 복합담즙산 분해활성이 높은 젖산균주의 선발

성인의 분변으로부터 분리된 젖산균과 시판 중인 발효유 제품, 그리고 정장제에서 분리된 젖산균에 대해 bile extract가 첨가된 MRS 배지에서 복합 담즙산 분해 시험을 실시하였으며, 그 결과는 Table 3, 4에서 보는 바와 같다.

101종의 분리된 젖산균 중에서 36종이 균락 주위에 담즙산 침전 환이 나타나지 않거나 생장이 억제(30종)되었다. Bile extract가 첨가된 배지에서는 tauro- 또는 glycodeoxycholic acid의 분해 결과 관찰되는 불투명한 백색 균락이 나타나지 않았으나 분해력이 강하게 나타난 균주들 중에 bile extract 분해 결과 황금빛을 띄는 백색 균락을 형성하는 균주들도 있었다.

Table 3. Bile salts deconjugating of lactic bacterial isolates from human feces

Deconjugation of bile salts	Samples			
	-	+	++	+++
No. of isolates	36	3	9	53

- : No precipitate halos around colonies
- + : Moderate precipitate halos around colonies
- ++ : Big precipitate halos around colonies
- +++ : Very big precipitate halos around colonies

발효유 제품과 정장제로부터 분리된 균들에 대한 시험에서는 13종의 균주가 활성이 강하게 나타났다(Table 4).

Table 4. Bile salts deconjugation of lactic bacterial isolates from fermented milk and probiotic capsules

No. of isolates	Deconjugation of bile salts			
	-	+	++	+++
	8	-	8	13

- : No precipitate halos around colonies
- + : Moderate precipitate halos around colonies
- ++ : Big precipitate halos around colonies
- +++ : Very big precipitate halos around colonies

다. 선발된 젖산균의 포도당 발효 형태 연구

성인 분변에서 분리 선발된 101종의 젖산균에 대해 hot loop 시험법으로 gas 생성정도를 시험하여 3등급으로 구분하였다(Table 5).

66종의 젖산균들이 생장 중에 gas를 생성하지 않는 것으로 관찰되어 포도당을 호모형 발효법으로 이용하는 것으로 확인되었으며 나머지 35종의 젖산균들은 gas를 생성하므로써 헤테로형 발효를 하는 것으로 나타났고 gas 생성량은 균주에 따라 차이가 많은 것으로 관찰되었다.

Table 3과 5에서 사람의 분에서 분리된 균주 중에서 2종만이 bile extract deconjugation 활성을 나타냈으며 헤테로 발효를 하였다.

Table 5. Number of gas-producing lactic acid bacterial isolates from human feces

No. of isolates	Gas not produced	Gas produced		
		+	++	+++
	66	11	17	7

+ : Moderate Production of gas

++ : Big Production of gas

+++ : Very big Production of gas

라. 배양온도에 따른 생장과 탈지유에서의 생장

시험결과 54종은 37°C에서 보다 42°C에서 빠르게 생장하였으며 12종은 생장에 차이가 없었으며 단지 1종만의 생장이 느린 것으로 관찰되었다.

8%의 탈지유에서 젖산균들의 생장을 시험한 결과 12종이 발효유 제조용 starter로서 적합한 커드를 형성하였으며 4종은 단백질 분해력이 높아 적당하지 않았다. 그리고 15종은 커드 형성이 미약하였으며, 36종은 탈지유에서 생장하지 않았다.

3. 선발 젖산균주의 동정

발효유 제조에 적합하다고 인정되는 12종의 젖산균주중 2종은 *Lactobacillus acidophilus*로 10종은 *Enterococcus*로 판명되었다. 한편, 유제품과 정장제에서 분리된 젖산균주들 중 bile acid deconjugation 능력이 우수한 젖산균주들은 *Lactobacillus acidophilus*와 *Enterococcus*로 판명되었다.

최종적으로 복합담즙산 분해능력이 높고 발효유제조에 적합한 *Lactobacillus acidophilus* HF0401과 *Lactobacillus acidophilus* HF0404 2균주를 연구목적에 맞는 젖산균으로 판단하였으며 이들의 생화학적 특성을 시험한 결과는 Table 6, 7에서 보는 바와 같다.

Table 6. Characteristics of lactic acid bacterial isolates

Characteristics	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
	HF0401	HF0404
Morphology	Rod	Rod
Growth at 45°C	+	+
Growth at 15°C	-	-
Gas from glucose	-	-
Catalase production	-	-

Table 7. Carbohydrates fermentation of lactic acid bacterial isolates

Carbohydrates	<i>L. acidophilus</i> HF0401	<i>L. acidophilus</i> HF0404
Glycerol	-	-
Erythritol	-	-
D-Arabinose	-	-
L-Arabinose	-	-
Ribose	-	-
D-Xylose	-	-
L-Xylose	-	-
Adonitol	-	-
β Methyl-xyloside	-	-
Galactose	+	+
D-Glucose	+	+
D-Fructose	+	+
D-Mannose	+	+
L-Sorbose	-	-
Rhamnose	-	-
Dulcitol	-	-
Inositol	-	-
Mannitol	-	-
Sorbitol	-	-
α Methyl-D-mannoside	-	-
α Methyl-D-glucoside	-	-
N Acethyl glucosamine	+	+
Amygdaline	-	-
Arbutine	-	-
Esculine	+	+
Salicine	-	-
Cellobiose	+	+
Maltose	+	+
Lactose	+	+
Melibiose	-	-
Sucrose	+	+
Trehalose	+	+
Inuline	-	-
Melezitose	-	-
D-Raffinose	+	+
Amidon	+	+
Glycogene	-	-
Xylitol	-	-
β Gentiobiose	+	+
D-Turanose	-	-
D-Lyxose	-	-
D-Tagatose	+	+
D-Fucose	-	-
L-Fucose	-	-
D-Arabitol	-	-
L-Arabitol	-	-
Gluconate	-	-
2 keto-gluconate	-	-
5 keto-gluconate	-	-

4. 선발 젖산균주의 bile acid deconjugation

실험결과(Table 8), 선발된 *L. acidophilus* HF0401과 *L. acidophilus* HF0404는 bile acid deconjugation 활력이 우수하였고 glycochenodeoxycholic acid와 glycodeoxycholic acid에서도 0.05% 농도인 경우 bile acid deconjugation이 관찰되었다.

Table 8. Hydrolysis of conjugated bile acid by lactic acid bacterial isolates on MRS agar

Bile salts	<i>L. acidophilus</i> HF0401	<i>L. acidophilus</i> HF0404	<i>L. casei</i> (isolated from fermented milk)	<i>E. faecium</i> (isolated from probiotic capsules)
TCA	+++	+++	-	++
TCDCa	+	++	-	++
TDCA	+	++ ^a	-	+
GCA	++	+++	-	++
GCDCA	- ^b	- ^b	- ^b	-
GDCA	- ^b	- ^b	- ^b	++ ^a

^a : Precipitate halos around colonies and of opaque granular white colonies

^b : Cell growth inhibited

- : No precipitate halos around colonies

+ : Moderate precipitate halos around colonies

++ : Big precipitate halos around colonies

+++ : Very big precipitate halos around colonies

5. 선발 젖산균주의 담즙산 내성 및 내산성

선발된 젖산균주중에서 발효유 starter로서 적합한 *L. acidophilus* HF0401과 *L. acidophilus* HF0404의 담즙산 내성을 유제품과 정장제에서 분리된 젖산균주들 그리고 항암 효과가 확인된 *Lactobacillus casei*와 비교 시험하였다(Fig. 3, 4).

시험 결과 배지에 담즙산을 포함시키므로써 *L. acidophilus*(발효유 제품에서 분리), *L. acidophilus* HF0401, 그리고 *L. acidophilus* HF0404의 대수생장기에 약간 생장이 지연되는 것으로 관찰되었지만 담즙산 내성이 있는 것으로 판단되며, 인체에서 분리된 *L. acidophilus* HF0401과 *L. acidophilus* HF0404가 발효유

제품에서 분리된 *L. acidophilus*보다 담즙산 내성이 더 우수하였다. *L. casei*는 담즙산에 의해 생장이 크게 영향받아 현저히 성장억제가 나타났고 0.5% oxgall을 함유한 배지에서는 배양 10시간 후부터 성장하기 시작했다. 한편, 정장제에서 분리된 *E. faecium*은 대조구와 담즙산 처리구에서 거의 동일한 성장을 나타내 담즙산 내성이 가장 우수한 것으로 나타났다.

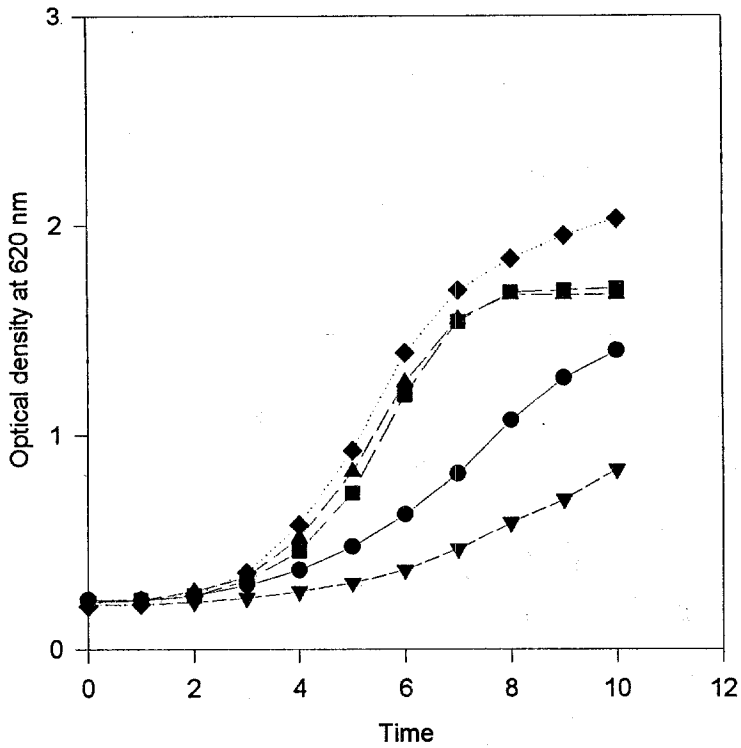


Figure 3. Growth of lactic acid bacteria in MRS Thio broth containing 0.3% oxgall.

- *L. acidophilus*(isolated from fermented milk)
- *L. acidophilus* HF0401
- ▲- *L. acidophilus* HF0404
- ▼- *L. casei*(isolated from fermented milk)
- ◆- *E. faecium*(isolated from probiotic capsules)

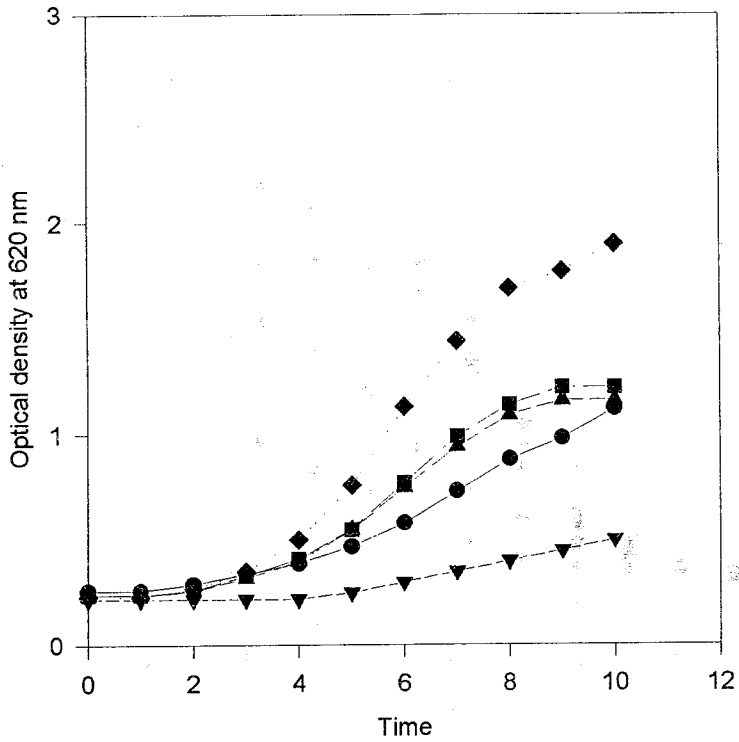


Figure 4. Growth of lactic acid bacteria in MRS Thio broth containing 0.5% oxgall.

- *L. acidophilus*(isolated from fermented milk)
- *L. acidophilus* HF0401
- ▲- *L. acidophilus* HF0404
- ▼- *L. casei*(isolated from fermented milk)
- ◆- *E. faecium*(isolated from probiotic capsules)

Berrada 등(1991)의 방법을 개선하여 선발된 *L. acidophilus*의 내산성을 유제품과 의약품에서 분리된 젖산균들과 비교 시험한 결과 분리 선발된 *L. acidophilus* 균들이 매우 우수한 내산성을 가진 것으로 확인되었다(Fig. 5).

pH 2.0의 MRS Thio broth에서 *L. acidophilus* HF0401과 *L. acidophilus* HF0404를 제외한 대부분의 젖산균들은 30분 후부터 생존균수가 급격하게 감소하였다. 특히, *L. casei*는 다른 시험 균주들에 비해 생존균수 감소율이 매우 크게 나타나 90분 후에는 거의 생존하지 못했다.

이상의 시험결과 분리 선발된 *L. acidophilus* HF0401과 *L. acidophilus* HF0404는 발효유 제조용 starter 개발에서 젖산균이 갖추어야 할 가장 중요한 특성인 담즙산 내성과 내산성의 조건을 충분히 갖추고 있어 장내 생존력이 탁월하고 우수한 건강증진 효과 및 고기능성을 발휘하리라 판단된다.

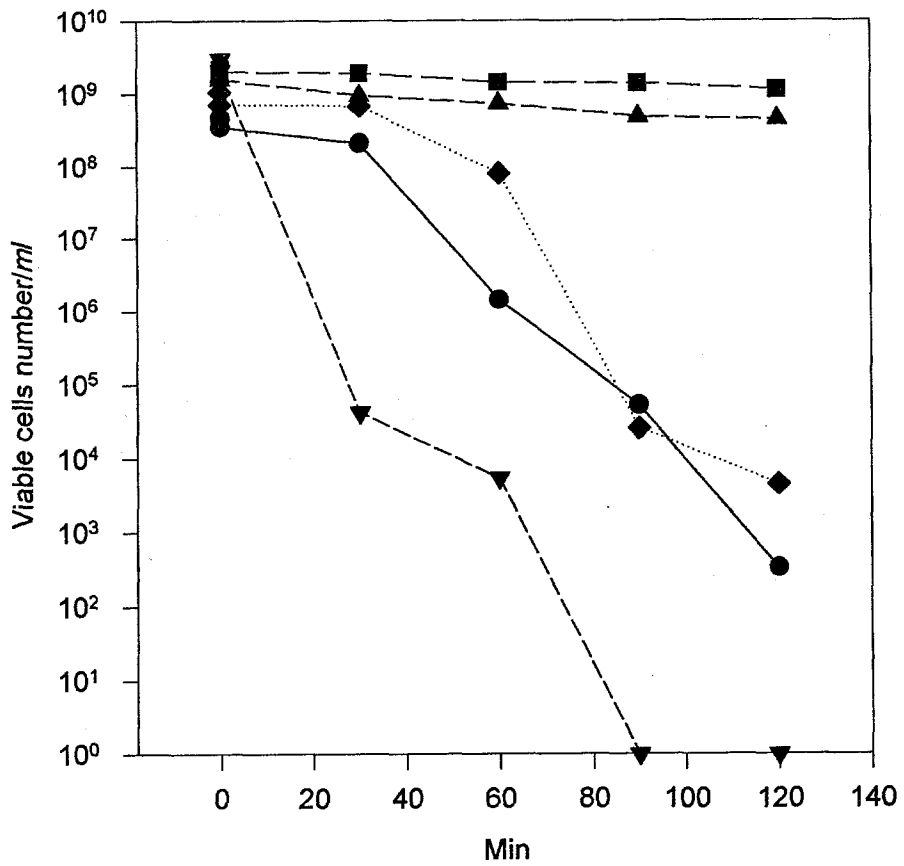


Figure 5. Survival of lactic acid bacteria in MRS Thio broth adjusted to pH 2.0 with 1.25 N HCl.

- *L. acidophilus*(isolated from fermented milk)
- *L. acidophilus* HF0401
- ▲- *L. acidophilus* HF0404
- ▼- *L. casei*(isolated from fermented milk)
- ◆- *E. faecium*(isolated from probiotic capsules)

6. 선발 젖산균주의 in vitro-cholesterol 침전

Bile salt deconjugation 시험에서 기질로 사용된 bile extract(sigma)를 배지에 첨가하여 젖산균의 cholesterol 불용성화를 시험하였다. 또한 배지성분중에 cholesterol의 불용성화에 영향을 미치는 요인을 찾고자 MRS 배지에서 lipoprotein인 Tween 80, 그리고 salts(ammonium citrate, sodium acetate, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$, dipotassium phosphate)를 각각 빼고 배지를 제조하여 시험하였으며 그 결과는 Table 9, 10, 11, 그리고 12에서 보는 바와 같다.

Table 9. Effect of media on cholesterol reduction of *L. acidophilus* HF0401 in MRS Thio broth containing 0.2% bile extract and 0.2% sodium thioglycollate

Media	pH	Cholesterol precipitated (%)
Control (MRS broth without 0.2% bile extract)	4.17	0
MRS broth	4.75	27.76
MRS broth without Salts	4.63	24.75
MRS broth without Tween 80	4.96	49.84
MRS broth without Salts and Tween 80	5.08	47.49

Table 10. Effect of media on cholesterol reduction of *L. acidophilus* HF0404 in MRS Thio broth containing 0.2% bile extract and 0.2% sodium thioglycollate

Media	pH	Cholesterol precipitated (%)
Control (MRS broth without 0.2% bile extract)	4.04	0
MRS broth	4.71	25.26
MRS broth without Salts	4.62	30.04
MRS broth without Tween 80	4.95	49.49
MRS broth without Salts and Tween 80	5.16	41.64

Table 11. Effect of media on cholesterol reduction of *L. acidophilus* ATCC43121 in MRS Thio broth containing 0.2% bile extract and 0.2% sodium thioglycollate

Media	pH	Cholesterol precipitated (%)
Control (MRS broth without 0.2% bile extract)	4.30	0.88
MRS broth	4.43	25.95
MRS broth without Salts	4.30	25.95
MRS broth without Tween 80	4.53	55.63
MRS broth without Salts and Tween 80	4.47	53.63

Table 12. Effect of media on cholesterol reduction of *L. acidophilus* isolated from fermented milk in MRS Thio broth containing 0.2% bile extract and 0.2% sodium thioglycollate

Media	pH	Cholesterol precipitated (%)
Control (MRS broth without 0.2% bile extract)	4.11	0.44
MRS broth	4.28	26.74
MRS broth without Salts	4.37	19.05
MRS broth without Tween 80	4.50	52.02
MRS broth without Salts and Tween 80	4.58	43.95

위 시험 결과에서 젖산균들은 bile extract를 첨가하지 않은 대조구를 제외한 담즙산이 첨가된 모든 배지에서 용해되어 있는 cholesterol 함량을 크게 낮추는 것으로 관찰되었으며, 이는 젖산균에 의한 용해되어 있는 cholesterol 동화 (assimilation)보다는 주로 젖산균의 복합담즙산 분해에 의해 생성된 유리 담즙산과 cholesterol이 결합하여 침전되는 것으로 판단된다. 한편, 배지내의 Tween 80과 염들은 실험실조건에서 젖산균에 의한 cholesterol과 담즙산의 침전에 매우 큰 영향을 미치는 것으로 나타났으며, 일반적으로 계면활성제인 Tween 80이 없는 배지에서 잔존 cholesterol 함량이 적었는데 이것은 계면활성제인 Tween 80이 젖산균의 복합담즙산 분해에 의해 생성된 유리 담즙산과 cholesterol이 침

전되는 것을 억제하고 배지 내에 용해되어 있도록 하기 때문인 것으로 판단된다. 한편 배지에 용해되어 있는 양이온들은 cholesterol과 흡착하는 물리적 현상을 나타내는 것으로 알려져 있는데 아마도 이러한 물리적 성질에 의해 염들을 첨가한 배지에서 잔존 cholesterol 양이 다소 감소한 것으로 판단된다 이러한 현상은 담즙산을 첨가하지 않은 배지에 젖산균을 접종하여 배양한 배지의 잔존 cholesterol 양을 측정한 결과에서도 확인되었다.

Table 13, 14, 15, 그리고 16은 각각의 *L. acidophilus* 균주들의 균체를 열처리한 후 시험관에서 cholesterol 흡착을 시험한 결과로서 균체의 농도가 증가할수록 잔존하는 cholesterol 양이 감소하는 것이 관찰되어 균체가 약간의 cholesterol을 흡착하지만 주된 cholesterol 침전이 젖산균체에 의한 것이 아님을 보여주고 있다. 일반적으로 pH가 낮은 배양액에서 잔존하는 cholesterol 양이 적은 것으로 나타났으며, 이것은 Table 9, 10, 11, 그리고 12의 결과에서 나타났듯이 주로 *L. acidophilus* 균주들이 성장하면서 생성하는 복합담즙산 분해 효소의 활력에 따라 나타나는 현상으로 판단된다.

Table 13. Effect of *L. acidophilus* HF0401 cell material on the removal of cholesterol

Cell preparation	Removal of Cholesterol (%)	
	%	pH
Cells from 10ml of culture with heat treatment	1.07	6.74
Cells from 10ml of culture without heat treatment	43.73	4.98
Cells from 50ml of culture with heat treatment	5.02	6.79
Cells from 50ml of culture without heat treatment	41.58	5.23
Cells from 100ml of culture with heat treatment	5.74	6.78
Cells from 100ml of culture without heat treatment	37.28	5.2

Table 14. Effect of *L. acidophilus* HF0404 cell material on the removal of cholesterol

Cell preparation	Removal of Cholesterol (%)	
	%	pH
Cells from 10ml of culture with heat treatment	1.12	7.11
Cells from 10ml of culture without heat treatment	46.07	4.57
Cells from 50ml of culture with heat treatment	1.5	7.07
Cells from 50ml of culture without heat treatment	49.44	4.25
Cells from 100ml of culture with heat treatment	3.37	7.06
Cells from 100ml of culture without heat treatment	50.19	4.22

Table 15. Effect of *L. acidophilus* ATCC43121 cell material on the removal of cholesterol

Cell preparation	Removal of Cholesterol (%)	
	%	pH
Cells from 10ml of culture with heat treatment	0.98	6.92
Cells from 10ml of culture without heat treatment	33.12	5.86
Cells from 50ml of culture with heat treatment	4.92	6.92
Cells from 50ml of culture without heat treatment	51.98	4.05
Cells from 100ml of culture with heat treatment	10.17	6.94
Cells from 100ml of culture without heat treatment	48.52	4.02

Table 16. Effect of *L. acidophilus* cell material isolated from fermented milk on the removal of cholesterol

Cell preparation	Removal of Cholesterol (%)	
	%	pH
Cells from 10ml of culture with heat treatment	0.0	6.91
Cells from 10ml of culture without heat treatment	49.64	4.3
Cells from 50ml of culture with heat treatment	5.76	6.90
Cells from 50ml of culture without heat treatment	50.37	4.25
Cells from 100ml of culture with heat treatment	9.00	6.91
Cells from 100ml of culture without heat treatment	48.21	4.14

복합담즙산은 소장 내에서 cholesterol이 흡수되도록 도움을 주지만 비복합담즙산은 복합담즙산 만큼 cholesterol을 용해하지 못하므로 복합담즙산 분해활성은 장내 cholesterol 흡수에 큰 영향을 미치는 것으로 보고되고 있다. 또한 cholic acid 그리고 chenodeoxycholic acid 같은 유리 담즙산은 복합담즙산보다 용해되기 어려워 대부분 장간순환에 의해 흡수가 되지 않고 분으로 배출되기 쉽기 때문에 간에서는 분으로 배출된 양만큼의 부족한 복합담즙산을 보충하기 위해 cholesterol을 이용하여 새로운 복합담즙산을 생성하므로 결국은 체내의 혈중 cholesterol을 감소시킨다.

많은 연구자들은 발효유 또는 젖산균에 의한 혈중 cholesterol 저하효과의 기작을 규명하고자 하였지만 현재까지 젖산균에 의한 혈중 cholesterol 저하효과의 기작은 명확하게 설명되어지고 있지 않다. 그러나 현재까지의 연구들을 종합해볼 때 젖산균이 cholesterol을 assimilation(동화) 또는 세포내로 incorporation한다는 가설과 젖산균의 복합 담즙산 분해에 의해 생성된 유리 담즙산이 cholesterol과 함께 불용성 침전물을 형성하여 장내에서 cholesterol 흡수를 억제하며 따라서 간에서 cholesterol이 담즙산으로 전환되도록 한다는 가설이 있고 그 이외에 cholesterol이 젖산균의 세포벽에 흡착되어 흡수가 저지된다는 가설이 있다. 그 예로 Gilliland 등(1985)은 *L. acidophilus*를 bile(oxgall 0.5%이하) 존재 하에 MRS broth에서 혐기적으로 배양할 때에만 배양액내의 cholesterol을 소화하였으며, bile함량 0.4% 이하에서는 bile함량에 비례하여 cholesterol이 cell에 축적되었다고 하며 bile에 대한 저항성과 cholesterol소화 능력이 큰 균주가 혈중 cholesterol수준을 저하시키는 능력이 높다고 하였다. 한편, Klaver와 van der Meer(1993)는 Gilliland 등(1985)의 *L. acidophilus*에 의한 cholesterol소화에 대한 주장을 시험하기 위해 *L. acidophilus*와 *Bifidobacterium bifidum*을 cholesterol과 0.5% bile salt(oxgall)를 첨가하여 배양하면서 시험한 결과 배양 중에 이들 미생물은 담즙산을 deconjugation시켜서 cholesterol과 bile salts가 함께 침전하였으며 conjugated bile salts는 발견되지 않았다고 하고 유산균이 cholesterol을 소화하는 것이 아니라 deconjugation시켜서 산성환경에서 cholesterol과 deconjugated bile salts가 함께 침전하는 것이라고 주장하였다. 또한 Walker와

Gilliland(1993)도 19개의 *Lactobacillus acidophilus* 균주를 이용하여 bile 존재 하에 성장, sodium taurocholate의 deconjugation, 그리고 cholesterol의 assimilation을 시험하였는데 일반적으로 cholesterol을 assimilation하는 대부분의 균주들은 deconjugation activity와 bile resistance를 나타냈다고 하였고 대수성장기 말에서 최대의 deconjugation activity를 나타냈고 또한 이때 최대의 cholesterol assimilation을 나타냈다고 하였다.

한편, Hosono와 Tono-Oka(1995)는 젖산균들에 의한 cholesterol 흡착을 시험한 결과 *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*가 높은 cholesterol 흡착능력을 갖고 있으며 이는 물리적 현상이며 세포벽과 관련이 있고 주로 peptidoglycan을 세포벽 구성성분으로 하는 Gram 양성균들이 Gram 음성균에 비해 높은 cholesterol 흡착능력을 갖고 있다고 하였다. 또한 이러한 물리적 흡착 현상은 양이온들에 의해 저지된다고 하였다.

7. Bile salt hydrolase 활성

시험결과(Table 17, Fig. 6), *L. acidophilus* 균주의 bile salt hydrolase 활성은 pH 5.0~5.4에서 매우 높은 것으로 나타나 효소의 최적 pH는 5.0~5.4 부근인 것으로 판단된다. Grill 등(1995)은 *Bifidobacterium longum* BB536으로부터 정제된 복합담즙산 분해효소의 최적 pH는 5.5~6.5라고 하였으며, Gilliland와 Speck(1977)은 *L. acidophilus* NCFM의 resting cells(휴식세포)의 bile salt hydrolase의 최적 pH는 6.0부근이라고 하였다.

복합담즙산 분해 효소는 장내 소화관에 존재하는 박테리아에서 발견된 효소로 *Lactobacillus* sp. strain 100-100, *Bifidobacterium longum* BB536, *Clostridium perfringens* MCV815, *Bacteroides fragilis* ssp. *fragilis*에서 복합담즙산 분해효소가 분리 정제되었으며, 이 효소들은 glycine과 taurine 복합담즙산에 대해 활성을 나타냈으며, 일부 효소는 taurine 복합담즙산보다 glycine 복합담즙산에 대해 더 높은 활성을 나타냈다.

Table 17. Activity of bile salts hydrolase of *L. acidophilus* isolates

Cell preparation	<i>L. acidophilus</i> HF0401					<i>L. acidophilus</i> HF0404				
	pH					pH				
	4.5	5.0	5.4	6.0	7.0	4.5	5.0	5.4	6.0	7.0
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	+	++	+++	w	-	+	++	+++	++	-
3	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
4	+	++	+++	w	-	+	+	++	-	-
5	+	++	+++	w	-	++	+++	+++	++	-

1: Sodium acetate buffer(50 mM, pH 5.4)

2: Cells from MRS Thio broth

3: Spent broth from MRS Thio broth

4: Cells from MRS Thio broth with 0.3% bile extract

5: Spent broth MRS Thio broth with 0.3% bile extract

+: precipitate halos < 2.0 cm, ++: 2.0 cm ≤ precipitate halos < 2.5 cm

+++ : precipitate halos ≥ 2.5 cm

Table 17에서 보듯이 두 균주간에 복합담즙산 분해효소의 활력에 다소 차이를 나타냈다. Bile extract를 첨가하지 않은 상태에서는 두 균주 모두 세포내에서 복합담즙산 분해효소의 활성이 높았다. 한편, bile extract를 첨가한 상태에서 *L. acidophilus* HF0401은 세포내 그리고 배양액에서 모두 활력이 높았으나, *L. acidophilus* HF0404는 배양액에서 복합담즙산 분해 효소의 활성이 매우 높아 bile extract 첨가시 복합담즙산 분해 효소를 세포밖으로 많이 분비하는 것으로 판단된다. Lundem과 Savage(1990)는 *Lactobacillus* sp. stain 100-100에서 복합담즙산 분해효소의 활성은 세포내에서 관찰되었고, 복합담즙산에 의해 유도된다고 하면서 복합담즙산이 세포내로 이동하여 세포내에서 복합담즙산이 분해된다고 하였다. 한편, Walker와 Gilliland(1993)는 복합담즙산 분해 활성은 세포의 성장과 관련이 있고 산성 pH 환경에 의해 억제된다고 하였다.

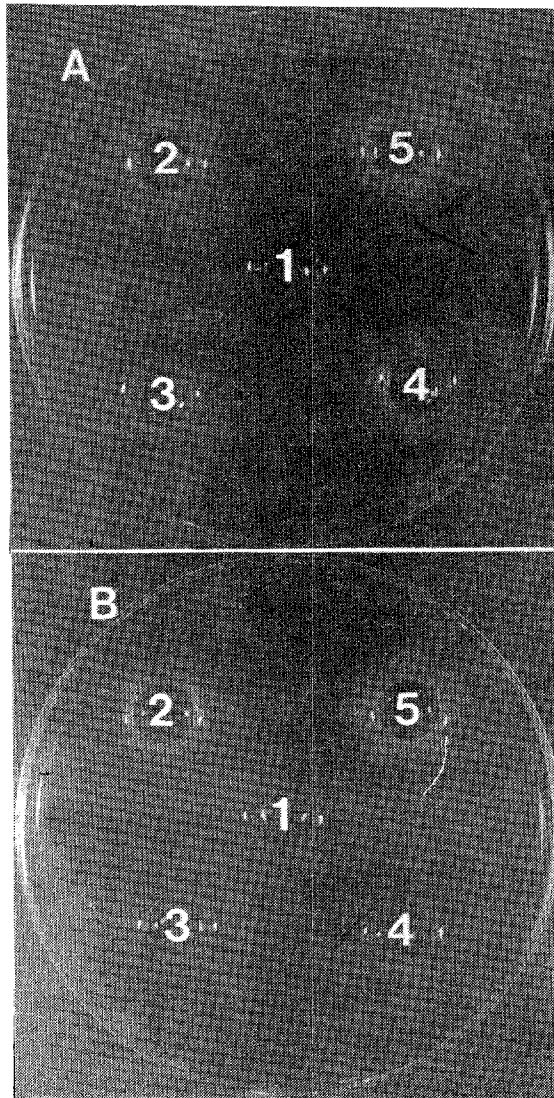


Figure 6. Precipitation halo formed by *L. acidophilus* isolates at pH 5.4.

A: *L. acidophilus* HF0401

B: *L. acidophilus* HF0404

1: Sodium acetate buffer(50 mM, pH 5.4)

2: Cells from MRS Thio broth

3: Spent broth from MRS Thio broth

4: Cells from MRS Thio broth with 0.3% bile extract

5: Spent broth MRS Thio broth with 0.3% bile extract

8. 선발젖산균주의 이용

가. 최적 생장온도

85°C와 110°C에서 30분간 열처리한 탈지유(12%)에서 *L. acidophilus* HF0401과 HF0404의 배양액을 0.02% 접종하고 37, 40, 42°C에서 배양하였다. 16시간 배양하면서 세대시간을 측정한 결과는 Fig. 7, 8과 같다.

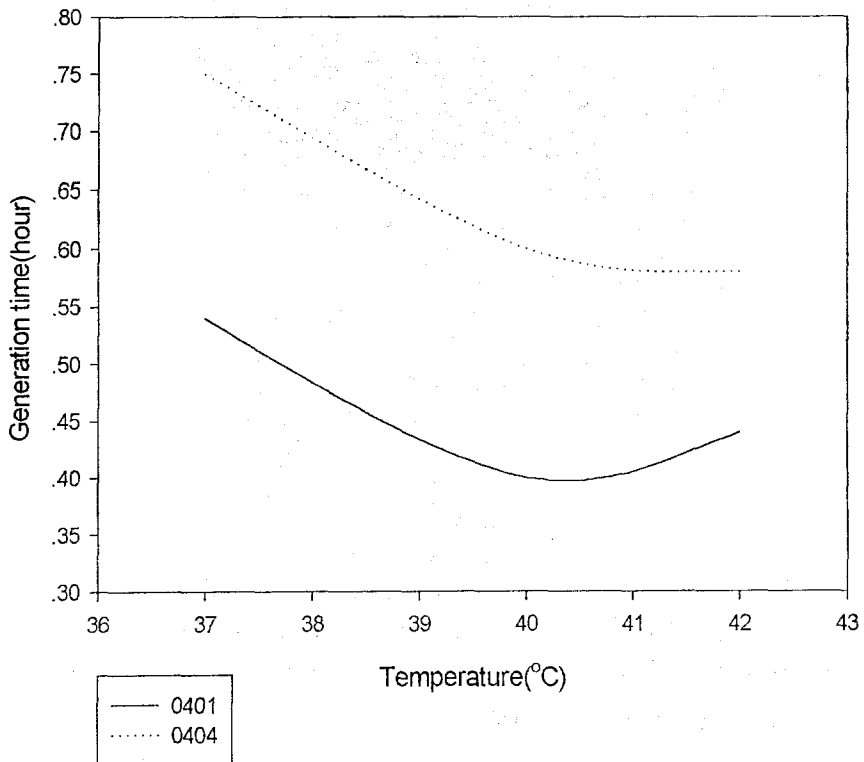


Figure 7. Generation time of *L. acidophilus* HF0401 and 0404 at several temperatures(37, 40, 42°C) in milk treated at 85°C for 30 min.

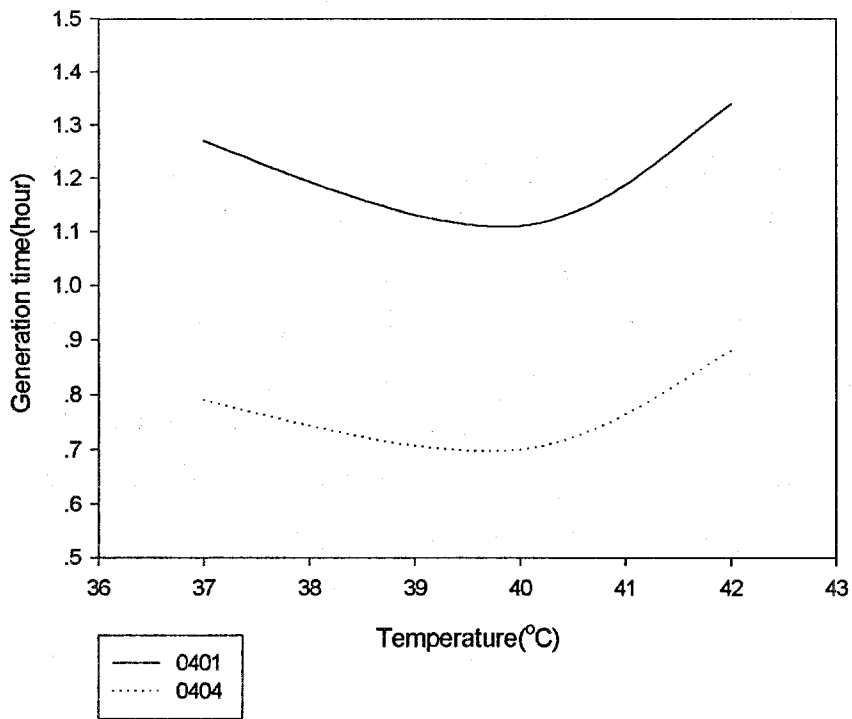


Figure 8. Generation time of *L. acidophilus* HF0401 and 0404 at several temperatures(37, 40, 42°C) in milk treated at 110°C for 30 min.

Fig 7과 8에서 보는 바와 같이 40℃가 최적의 성장 온도임을 알 수 있고 우유를 110℃에서 30분 열처리 시에는 HF0404가, 85℃에서 30분 열처리시에는 HF0401이 보다 빠른 성장을 보이는 것을 알 수 있다.

나. 영양소

85와 110℃에서 30분간 열처리한 우유에 glucose, yeast extract, peptone을 1.5%, 0.3%, 2%로 과량 첨가하여 두 균주의 성장을 시험한 결과(Fig. 9, 10, 11, 12), 110℃에서 열처리하면 yeast extract와 peptone 첨가가 성장을 크게 향상시키는 것으로 나타났으나 85℃에서 열처리 시에는 영양소 첨가에 따른 성장의 차이가 크게 나타나지 않았다. 또한 glucose 첨가시에도 성장의 변화가 거의 없는 것을 알 수 있는데 우유에서 *L. acidophilus* HF0401과 0404에게 부족한 영양소가 당이 아니라 단백질이라는 것과 열처리에 의하여 젖산균이 이용할 수 없는 형태로 단백질이 변질 된다는 것을 알 수 있었다.

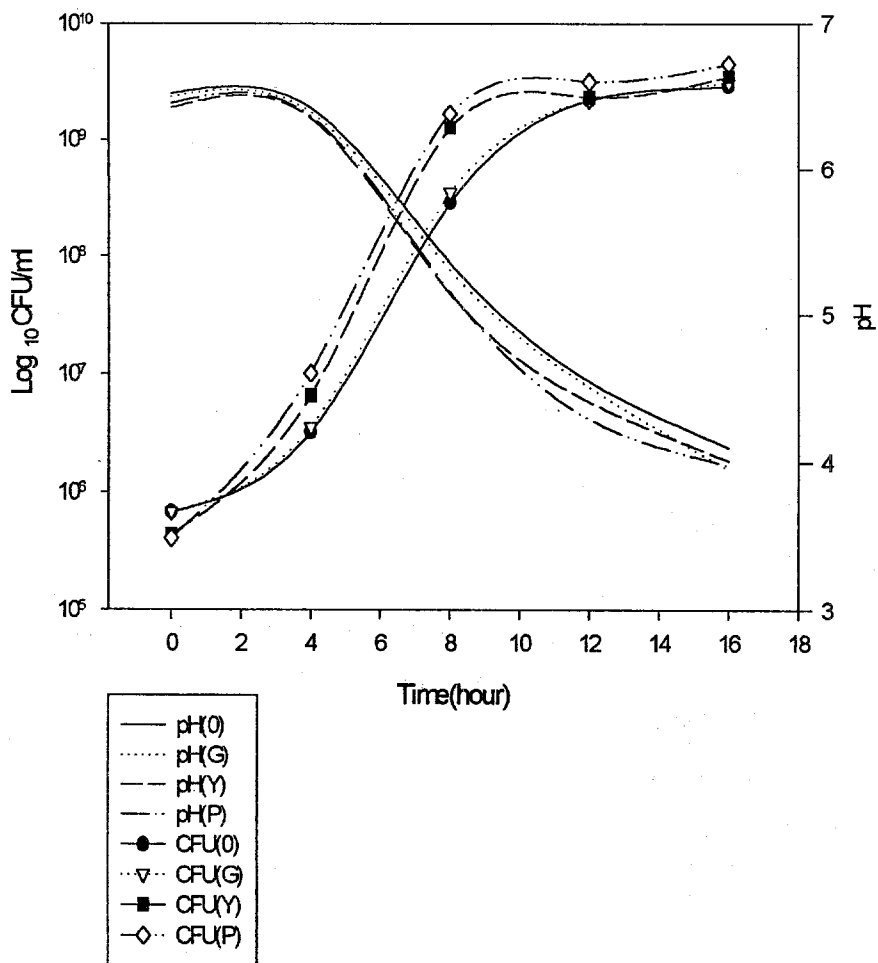


Figure 9. Effect of glucose, yeast extract, peptone on the growth of *L. acidophilus* HF0401 in milk treated at 85°C for 30 min.

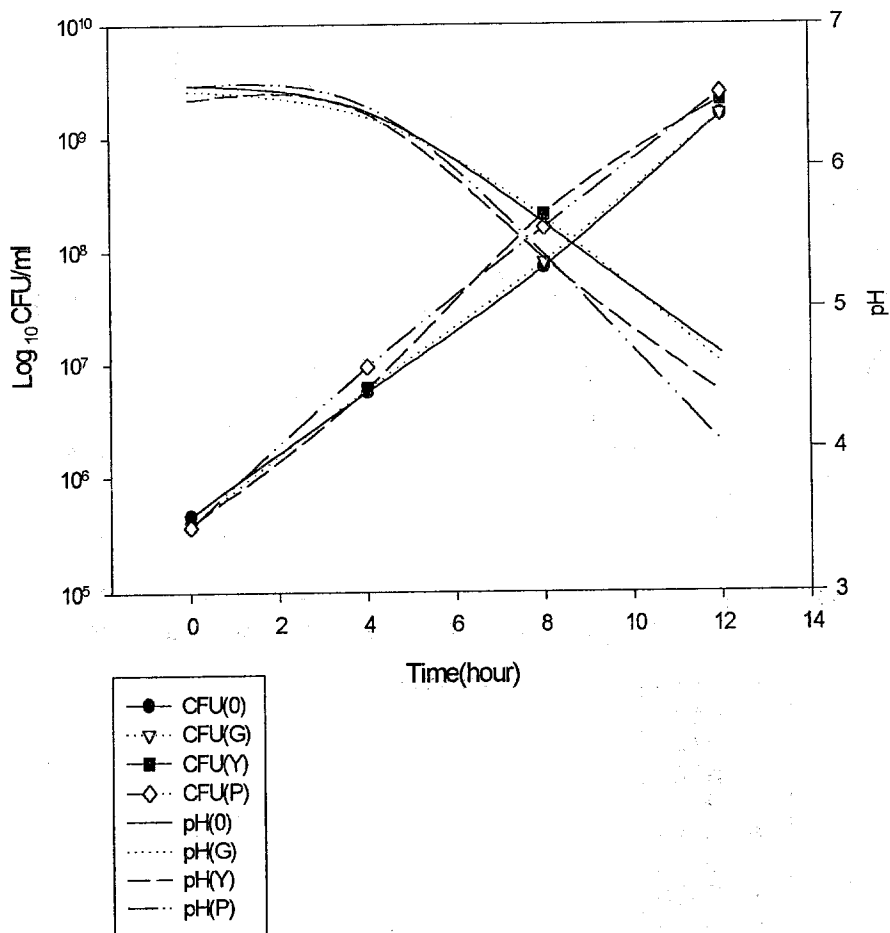


Figure 10. Effect of glucose, yeast extract, peptone on the growth of *L. acidophilus* HF0404 in milk treated at 85°C for 30 min.

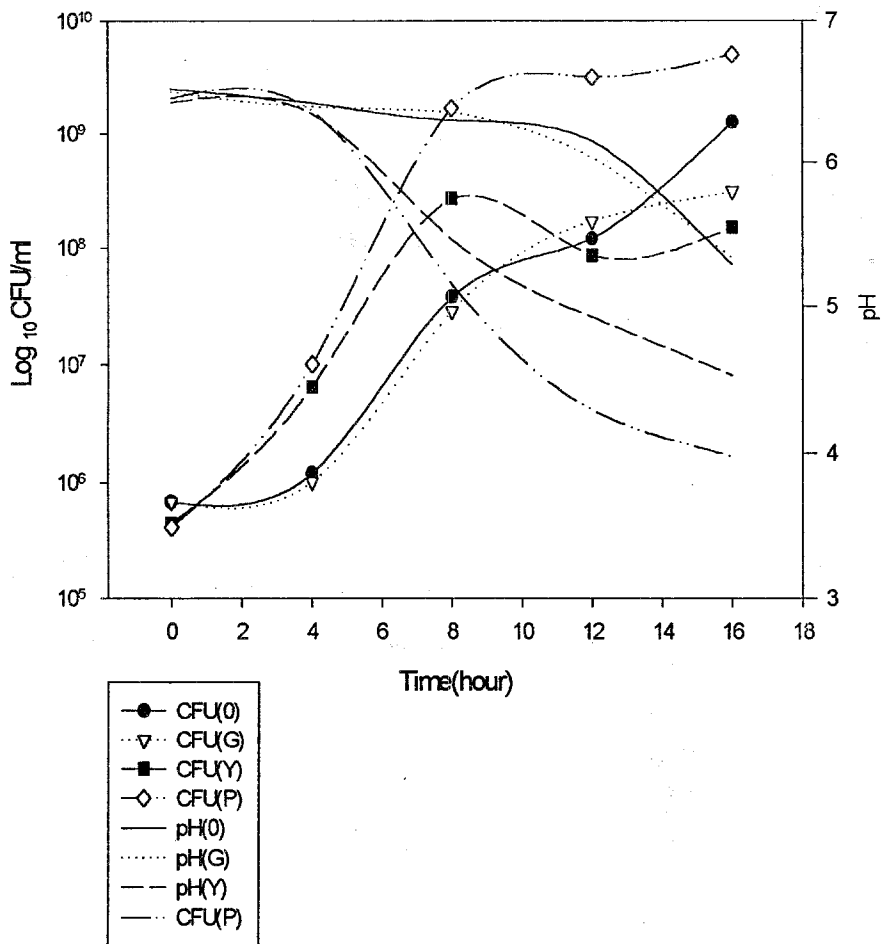


Figure 11. Effect of glucose, yeast extract, peptone on the growth of *L. acidophilus* HF0401 in milk treated at 110°C for 30 min.

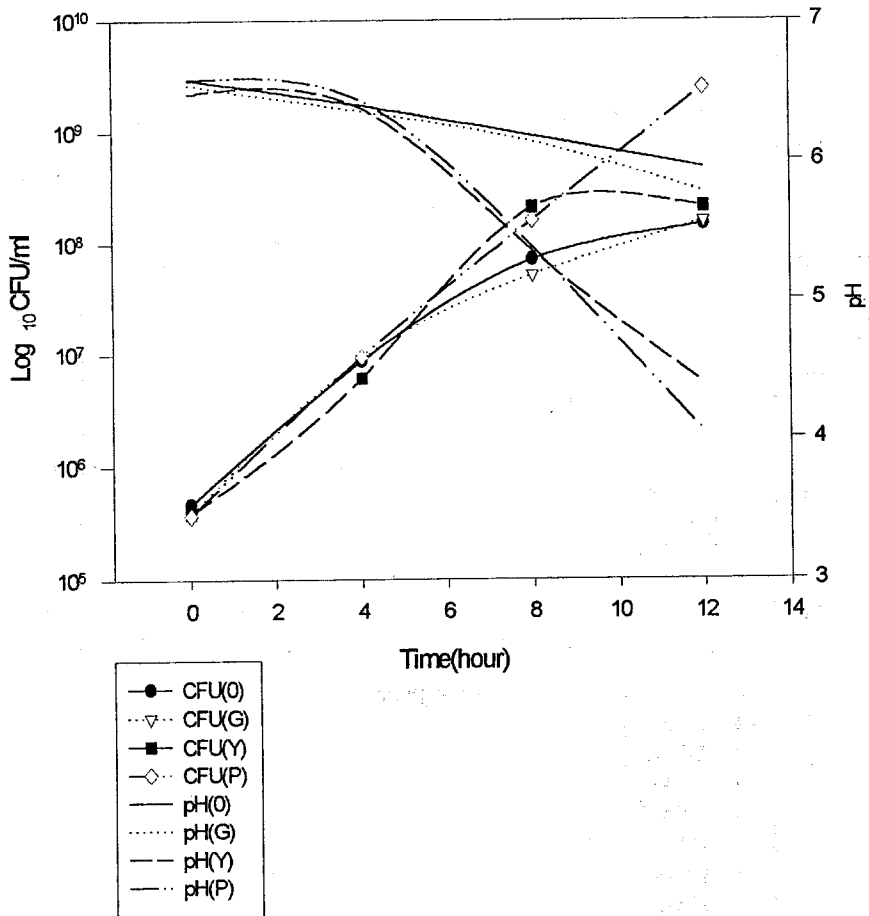


Figure 12. Effect of glucose, yeast extract, peptone on the growth of *L. acidophilus* HF0404 in milk treated at 110°C for 30 min.

이와 같은 결과는 MRS 성분과 pH, 온도가 *L. acidophilus*에 미치는 영향에 대한 통계학적 분석을 한 Taillandier 등(1996)의 연구에서도 찾을 수 있는데 그들은 *L. acidophilus*의 생장에 온도, peptone, yeast extract, sodium acetate, sodium citrate, (glucose, pH) 또는 (pH, glucose) 순으로 영향을 미친다고 하

여 온도와 단백질원의 중요성을 강조하였다. 또한 Desmazeud(1990)도 yeast extract를 첨가하였을 때 젖산균의 생장이 크게 향상되었다고 하였다.

시험결과에 의하면 첫째, 우유에서 *L. acidophilus* HF0401과 0404에게 부족한 영양소는 당이 아니라 단백질이며 단백질의 첨가가 이들 젖산균의 생장을 향상시켰다. *L. acidophilus*가 저분자의 peptide을 분해 이용하는 protease나 peptidase 활성은 높으나 고분자의 단백질을 분해해내는 proteinase 활성은 상당히 낮다는 Sasaki(1995)의 연구에서와 같이 이들 *L. acidophilus* 균주도 polypeptide나 peptone을 분해 이용하는 능력은 높지만 casein을 oligopeptide 형태로 분해할 수 있는 단백질분해능력이 낮다는 것이다. 따라서 이들은 고분자의 casein은 분해이용하지 못하지만 저분자의 peptone이나 yeast extract를 첨가하였을 때에는 이들의 생장이 많이 향상되었던 것이다.

둘째, 110℃ 열처리 시에 첨가영양소에 따라 생장의 차이가 반면 85℃ 열처리에서는 큰 차이가 없었다. 이는 열처리 온도가 높아지면 우유내 단백질, 특히 저분자의 유청단백질에 변화가 일어나 젖산균이 이용할 수 없는 형태로 변했기 때문인 것으로 생각된다.

다. 고형분 함량

SNF 함량이 젖산균의 생장에 미치는 영향을 확인하기 위해 고형분 함량이 다른 우유에 젖산 종균을 2% 접종후 12시간 배양하면서 pH를 측정하여 생장에 미치는 영향을 시험하였다(Fig. 13).

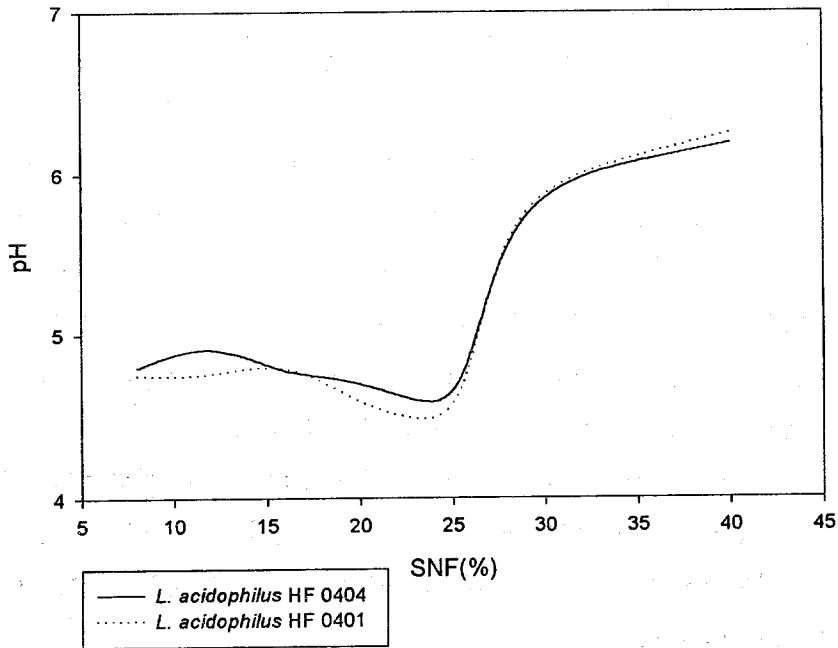


Figure 13. pH changes of the cultured milk at different SNF contents.

위 그림에서 보는 바와 같이 25%까지는 SNF함량이 증가함에 따라 생장에 따른 pH하강 정도가 뚜렷했으나 25% 이상의 고형분 농도에서는 급격히 생장이 떨어지는 것을 알 수 있다. 이는 25% 이후로 수분활동도가 생장에 영향을 미쳐 미생물 생장이 억제되는 것으로 보여준다. 이는 yogurt 제조시 총 고형분 함량이 25%를 넘지 말아야 한다는 Pulay와 Krasz gkaf(1974)의 결론이 *L. acidophilus* HF0401과 0404균주에도 적용된다는 것을 의미한다. 또한 고형분 농도 25%까지는 고형분 함량이 증가할수록 pH가 따라서 떨어진 것을 알 수 있는데, 이는 젖산균이 이용 가능한 유청단백질과 peptides 등의 함량이 고형분 함량이 증가함 (Desmazeaud, 1990)에 따라 함께 증가해 이용 가능한 단백질원이 늘어났기 때문인 것으로 생각된다.

라. 열처리

영양소가 미생물에 미치는 영향에서도 보여진 바와 같이, 열처리가 미생물 성장에 지대한 영향을 미칠 것으로 예상되어 원유와 탈지유(12%)에 63°C(30 min), 85°C(30 min), 110°C(30 min)에서 열처리하거나, UHT 처리하고 두 균주를 0.02% 접종하여 성장을 비교하였다(Fig. 14, 15, 16, 17).

시험결과, 우유는 고온으로 처리할수록 젖산균의 생장이 좋지 못했으며 63°C와 85°C에서의 열처리는 UHT 처리 및 110°C에서의 열처리와 현저한 차이가 나는 것을 알 수 있다. 탈지유에서의 젖산균 생장이 원유에서 보다 좋은 것으로 나타났다. Ramos(1978)가 실험한 결과에 따르면 열처리 온도를 올릴수록 casein 함량은 증가하고 그 외의 유청단백질은 감소한다고 하였으며 이들 단백질상의 변화가 위와 같은 결과에 큰 영향을 미쳤다는 것을 알 수 있다.

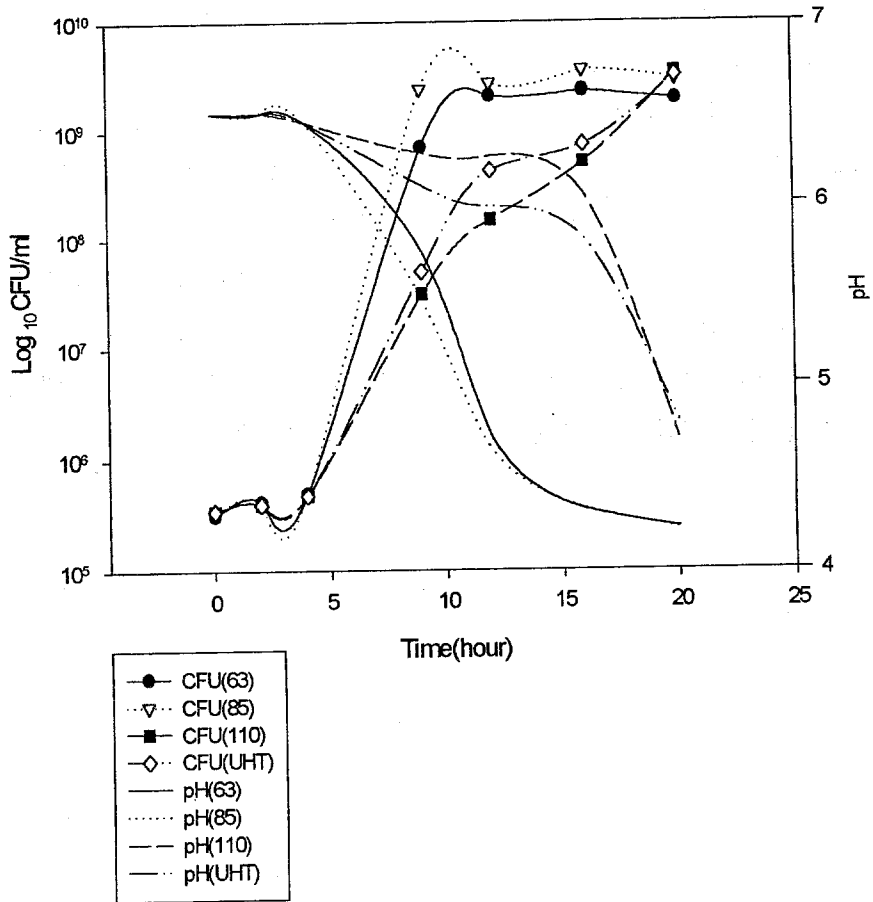


Figure 14. Growth of *L. acidophilus* HF0401 in skim milk heated at different temperatures for 30 min.

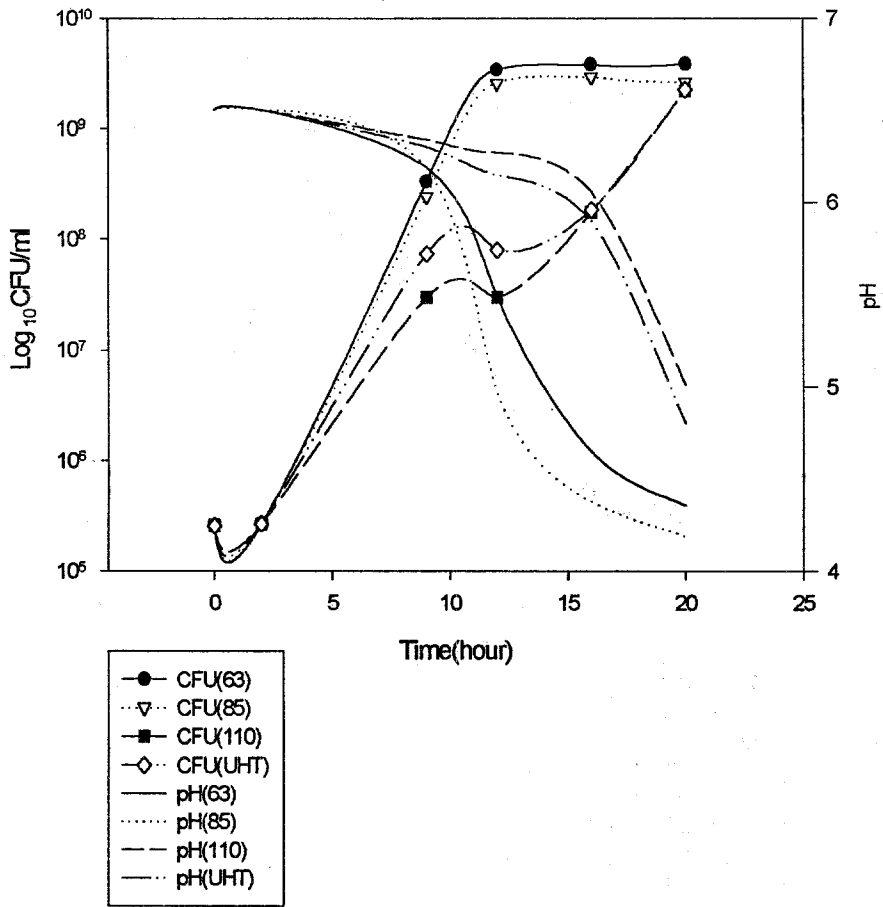


Figure 15. Growth of *L. acidophilus* HF0404 in skim milk heated at different temperatures for 30 min.

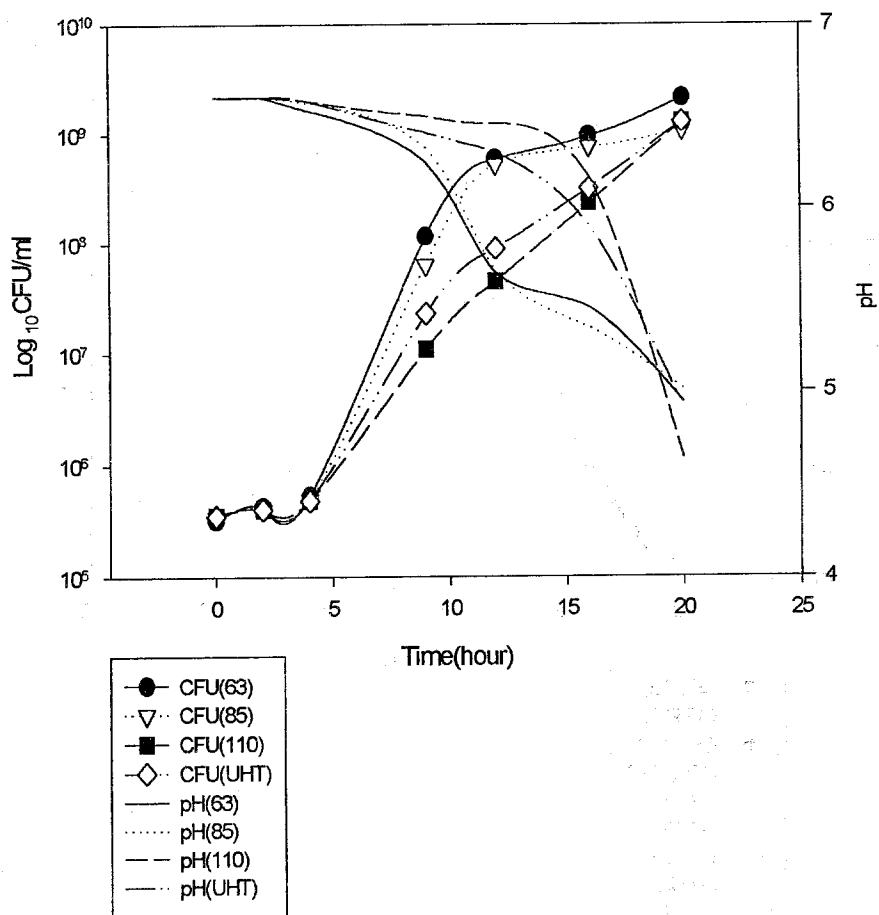


Figure 16. Growth of *L. acidophilus* HF0401 in raw milk heated at different temperatures for 30 min.

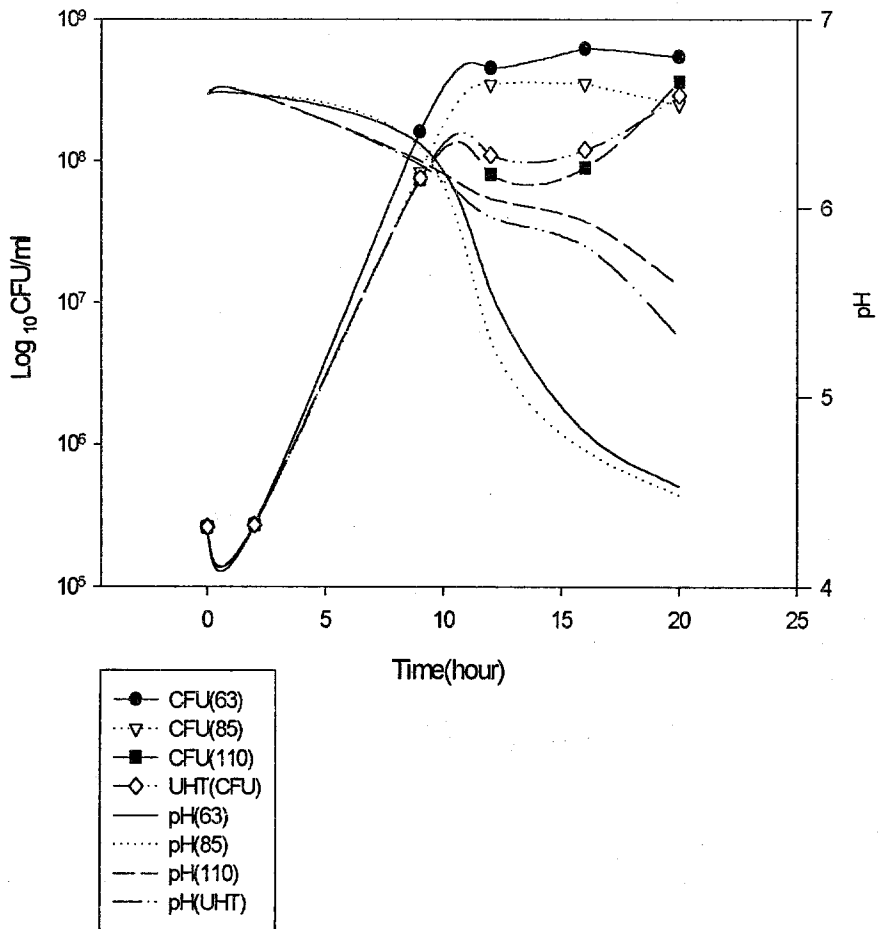


Figure 17. Growth of *L. acidophilus* HF0404 in raw milk heated at different temperatures for 30 min.

yogurt의 일반적인 열처리 온도는 85°C에서 30분이고 이 열처리 온도에서 yogurt 물성이 가장 좋은 것으로 알려져 있다. 그러나 최근에는 내냉성 미생물과 포자형성 미생물을 억제하기 위해 보다 높은 온도의 열처리를 하는 경향이 있으므로 최적의 젖산균 성장을 지원하는 열처리를 알기 위해 85°C, 90°C, 92°C, 93°C, 95°C, 110°C에서 30분간 열처리 후 젖산균 배양액을 0.02% 접종하여 세대기간을 측정 시험하였다(Fig. 18, 19).

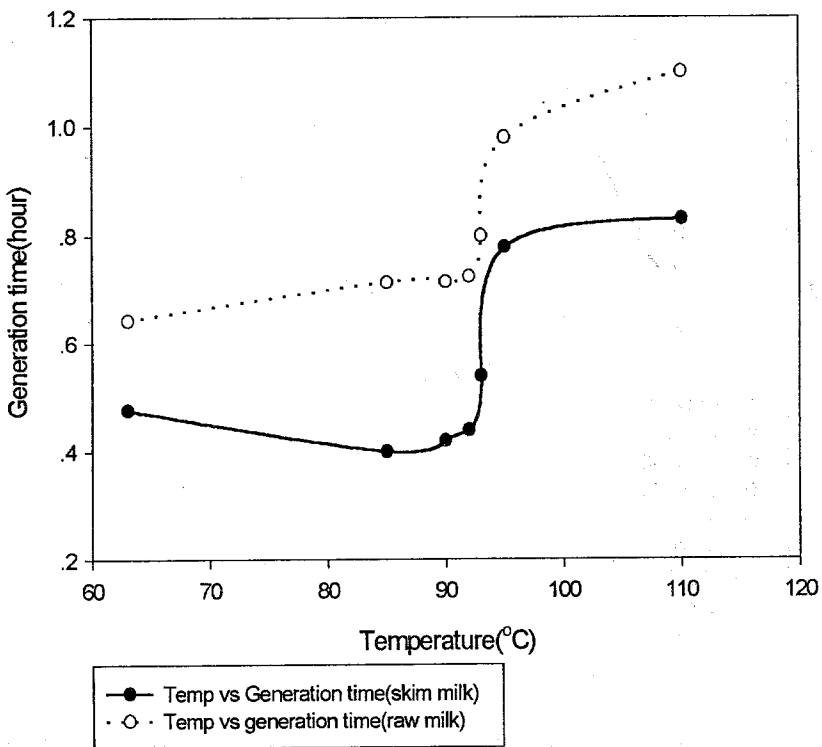


Figure 18. Generation time of *L. acidophilus* HF0401 in heat treated milk at different temperatures for 30 min.

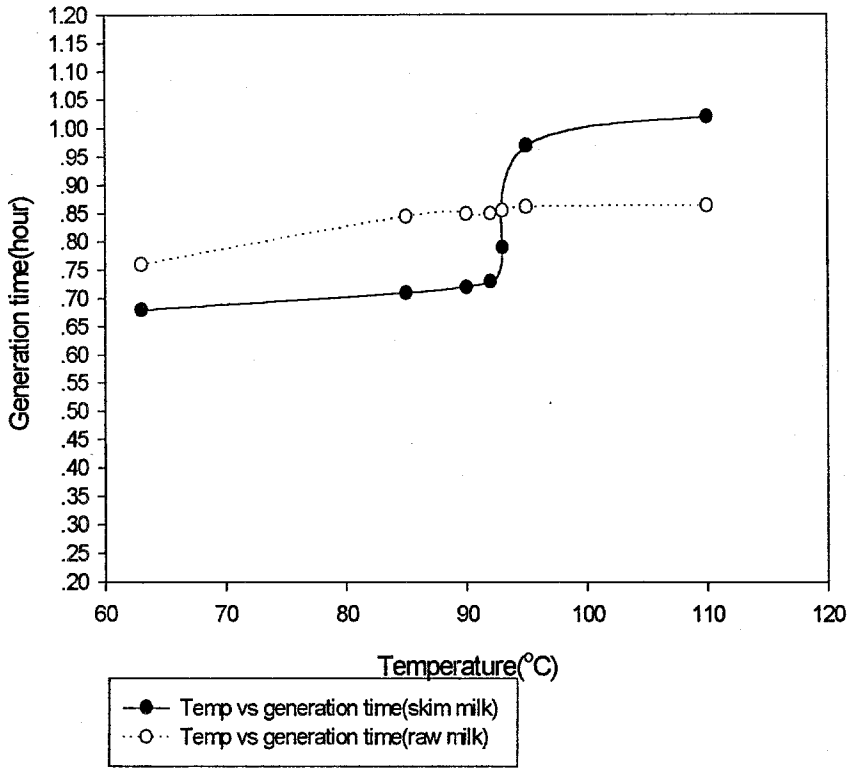


Figure 19. Generation time of *L. acidophilus* HF0404 in heat treated milk at different temperatures for 30 min.

Fig. 18과 19에서 보는 바와 같이 93~95°C에서 젖산균의 세대기간에 급격한 변화가 있는 것을 알 수 있고 *L. acidophilus* HF0401이 *L. acidophilus* HF0404 보다 열처리 온도에 따른 생장의 변화가 심하였다. 특히 90과 95°C에서의 성장 곡선을 비교한 결과는 Fig. 20과 21에서 보는 바와 같다.

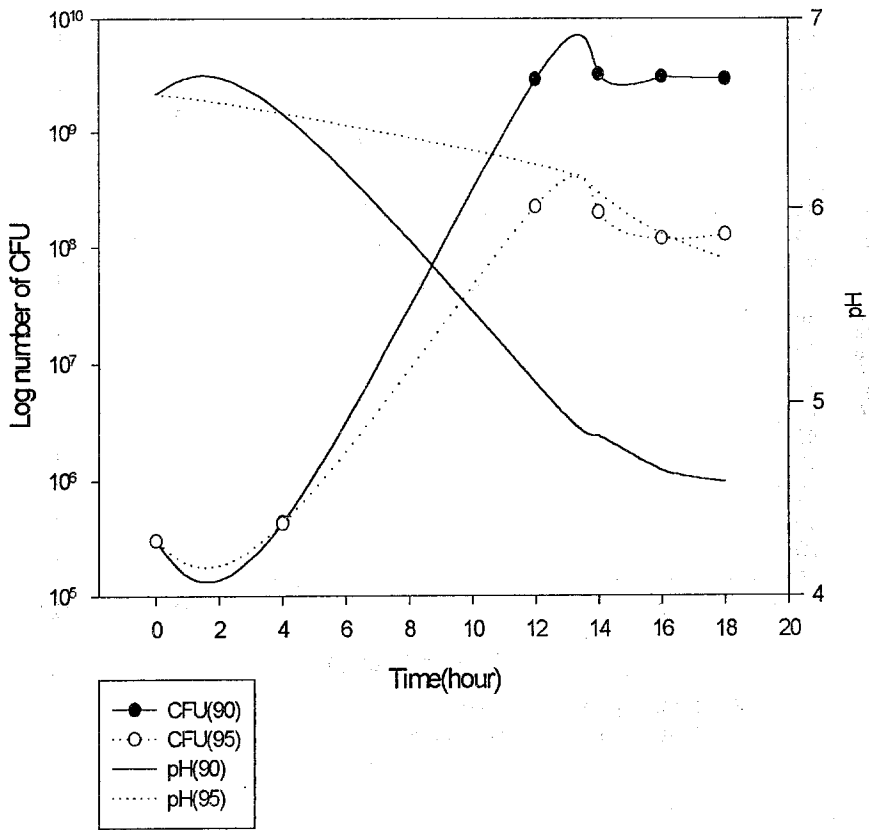


Figure 20. Growth of *L. acidophilus* HF0401 in skim milk heated at 90°C and 95°C for 30 min.

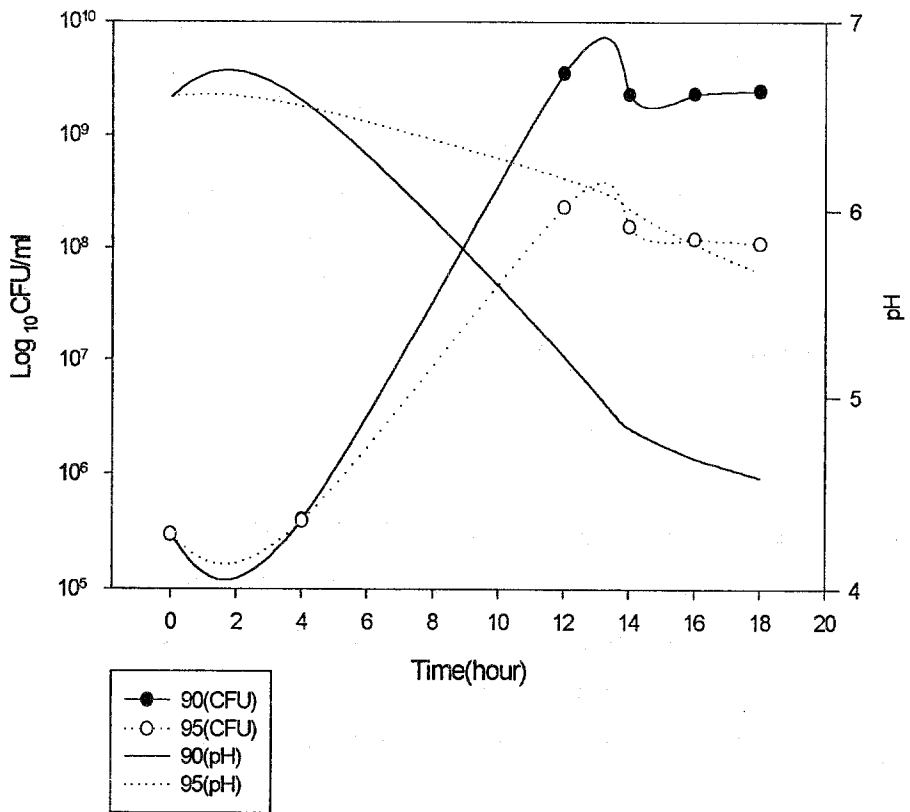


Figure 21. Growth of *L. acidophilus* HF0404 in skim milk heated at 90°C and 95°C for 30 min.

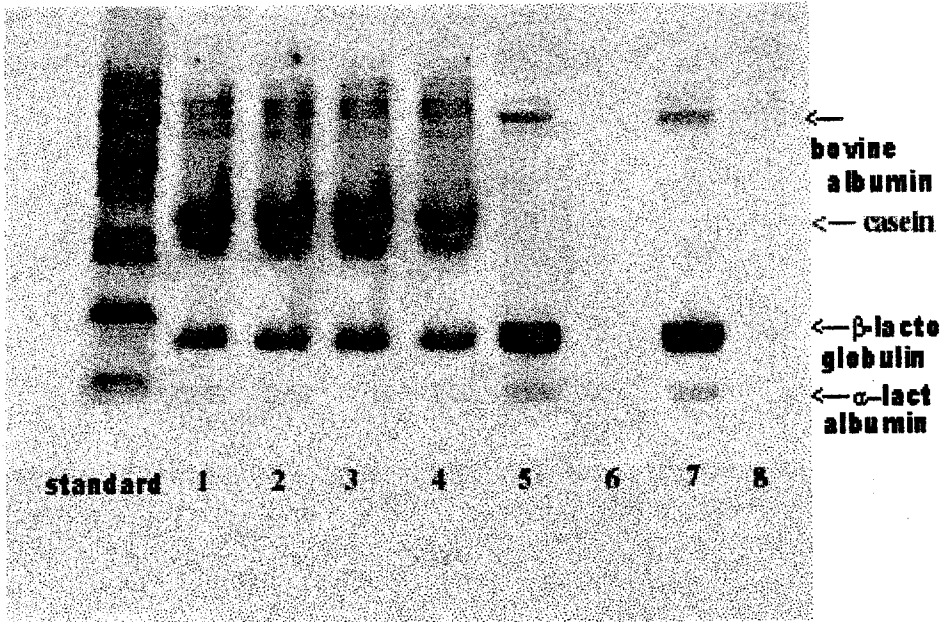


Fig. 22. Electrophoretogram of skim milk(12%) and whey proteins.

- 1, 3 skim milk proteins heated at 90°C for 30 min.
- 2, 4 skim milk proteins heated at 95°C for 30 min.
- 5, 7 whey proteins heated at 90°C for 30 min.
- 6, 8 whey proteins heated at 95°C for 30 min.

Fig. 22의 유단백질 전기 영동사진에서 보는 바와 같이 90°C와 95°C 열처리시에 유단백질의 변화를 비교한 것으로 1, 2, 3, 4는 유단백질 전체를 분석한 것이고 5, 6, 7, 8은 pH 4.6으로 저하시켜 casein 침전물을 걸러내고 유청단백질만 분석한 것이다. 유단백질 전체를 분석했을 때, 90과 95°C의 서로 다른 열처리를 한 탈지유에서 casein과 유청단백질 함량이 큰 차이를 보이지 않았지만 열처리 후 pH를 pH 4.6으로 조정하여 casein을 제거한 후 유청단백질만 분석하였을 때에는 bovine-albumin, α -lactalbumin, β -lactoglobulin 등의 함량에 현저한 차이가 생기는 것을 알 수 있었다. 따라서 91 또는 92°C에서 30분간 열처리하는 것이 yogurt의 열처리 방법으로 적절한 것으로 생각된다.

9. Yogurt 제조 및 pediocin 첨가

가. pediocin 첨가

제조된 yogurt에 pediocin을 첨가하여 5°C에서 저장하면서 젖산균수의 변화를 MRS 배지에서, 총균수를 plate count agar 배지에서 배양하여 저장중 미생물의 변화를 시험하였다(Fig. 23, 24).

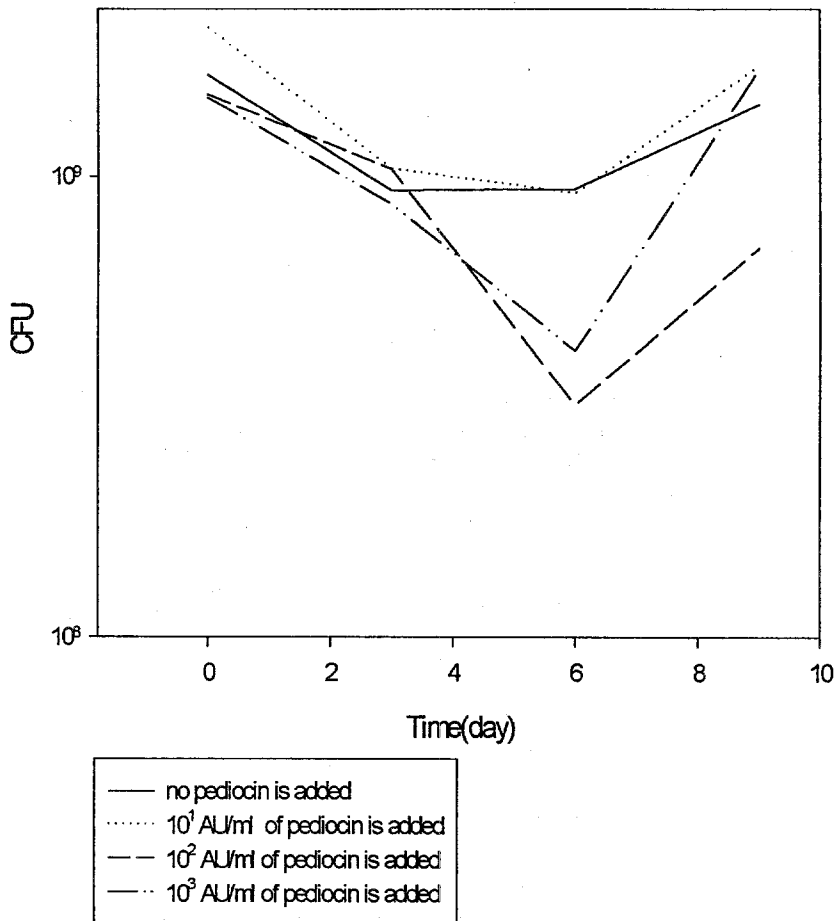


Figure 23. Survival of lactic acid bacteria of yogurt at 5°C.

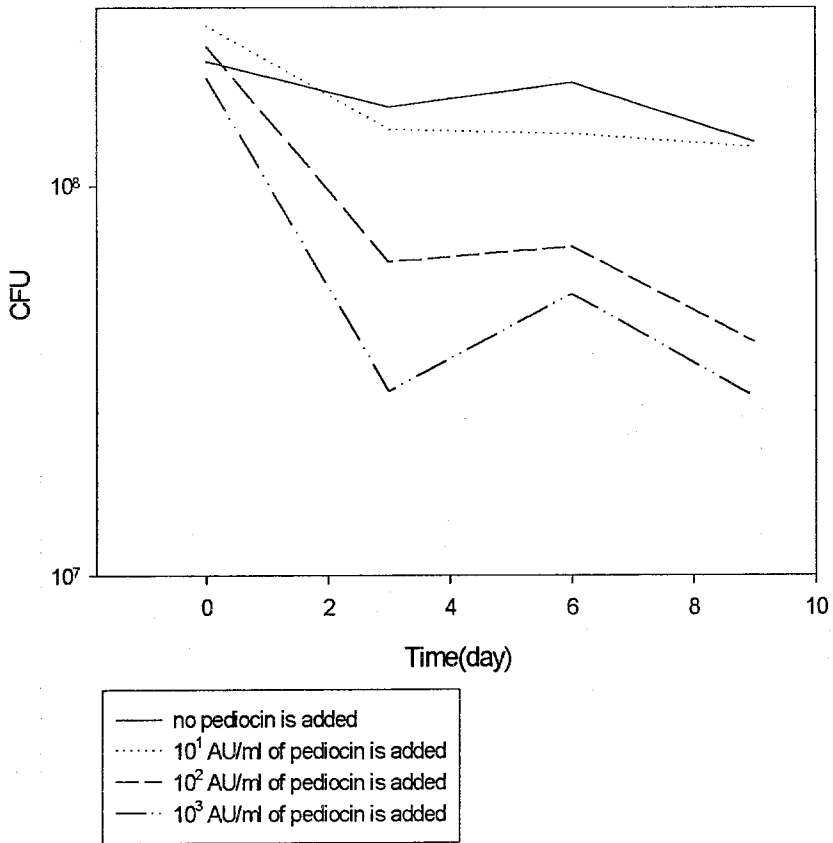


Figure 24. Survival of total bacteria of yogurt at 5°C.

젖산균 수는 3일이 지날 때까지 비슷하게 감소하다가 pediocin을 ml 당 10² AU, 10³ AU 첨가한 yogurt에서는 계속 감소하였지만 대조구와 ml 당 10¹ AU를 첨가한 yogurt에서는 생균수 감소가 둔화되었다. 총균수를 측정한 결과는 Fig. 24에서 보는 바와 같이 pediocin 첨가량이 ml 당 10² AU 이상이 되어야 미생물 생장이 억제되는 것을 확인 할 수 있었다.

나. 관능시험

제조된 yogurt의 삼점검사(triangle test)를 이용한 차이식별검사(discriminative test)와 기호도검사(consumer preference test)의 결과는 Table 18, 19에서 보는 바와 같다.

Table 18. Triangle test with p0, p1, p2, p3 yogurt

Yogurt	p0:p0:p1	p0:p0:p2	p0:p0:p3	p1:p1:p2	p1:p1:p3	p2:p2:p3
Correct Answer	10	8	9	11	12	13
Degree of Difference	0.94*	0.89	1	1*	1.22**	1.28***

Yogurt	p1:p1:p0	p2:p2:p0	p3:p3:p0	p2:p2:p1	p3:p3:p1	p3:p3:p2
Correct Answer	4	7	6	7	6	12
Degree of Difference	0.33	0.83	0.56	0.72	0.61	1.39**

* significant within 0.05%

** significant within 0.01%

*** significant within 0.001%

P0: Yogurt to which pediocin is not added

P1: Yogurt to which 10^1 AU/ml of pediocin is added

P2: Yogurt to which 10^2 AU/ml of pediocin is added

P3: Yogurt to which 10^3 AU/ml of pediocin is added

Table 18은 제조된 yogurt간의 차이식별검사의 결과로 p1과 p2나 p0과 p2는 유의차가 없는 것으로 나타났고 p2와 p3, p1과 p3에서는 유의차가 높은 것으로 나타났다. 특히 p2와 p3은 0.01% 혹은 0.001%이내에서 유의차가 있는 것으로 나타나 관능적으로 차이가 많다는 것을 알 수 있었다. 식별강도도 p1:p1:p3, p2:p2:p3, p3:p3:p2에서 높게 나왔다.

Table 19. Descriptive analysis with the yogurt in which pediocin is added

Yogurt	Flavor	Texture	Sour taste	Preference
p0	5.00±2.06	4.56±1.65	5.27±2.21	4.67±2.14
p1	5.39±2.57	4.67±1.78	5.72±2.37	5.00±2.22
p2	5.44±1.91	5.00±1.46	5.39±1.81	5.89±2.45
p3	5.22±2.24	4.78±1.63	5.22±2.41	5.11±2.25

기호도 검사를 duncan method를 통하여 유의차를 측정해 본 결과 0.05%이내에 서는 유의차가 없었으나 sour taste에서는 p1 yogurt가 가장 높고 나머지 풍미 나 기호도에서는 p2 yogurt가 가장 높은 것으로 나타나 Table 18과 19의 결과를 종합해 볼 때 yogurt의 저장성을 향상시키기 위해 첨가되는 pediocin 양은 10^2 AU 첨가가 적당한 것으로 판단된다.

제 4 절 결 론

현대인의 최대 관심사인 성인의 순환기계 질병은 혈중 cholesterol 증가로 인한 것이며 혈중 cholesterol을 낮추기 위한 여러 방법이 시도되고 있으나 최근에 발효유를 많이 섭취하므로써 혈중 cholesterol 수준을 저하시킬 수 있다는 사실이 확인되고 있어서 동맥경화증의 중요한 예방수단으로서 관심이 집중되고 있다.

장내에 서식하는 젖산균은 유기산 또는 길항물질 등을 생산하여 장내 유해균의 정착·증식을 억제하고 유해균의 유독물질 생산을 억제하거나 생산된 유독물질을 분해 또는 불활성화 시킨다. 젖산균 발효유는 이러한 젖산균의 장점을 극대화한 식품으로서 발효유를 섭취한 사람에서 장내 정상균총의 유지, 장내 유해균의 성장억제, 항암성 및 면역증진, 혈중 cholesterol 저하 등의 건강증진효과를 나타낸다. 그러나 젖산균은 숙주특이적이므로 인체에서 유래한 젖산균이 인체 내에서 정착 가능성이 높다. 따라서 한국인의 장에서 유래한 젖산균을 사용하여 제조한 발효유를 섭취할 경우 한국인에서 젖산균의 유용효과를 극대화시킬 수 있다.

많은 연구자들에 의해 발효유 또는 젖산균에 의한 혈중 cholesterol 저하효과를 규명하고자 하는 노력들이 진행되어왔지만 현재까지 젖산균에 의한 혈중 cholesterol 저하효과의 기작은 명확하게 설명되어지고 있지는 않다. 그러나 이 연구결과와 현재까지의 연구들을 종합해볼 때 주로 젖산균은 복합 담즙산을 분해하여 이때 생성된 유리 담즙산이 cholesterol과 함께 불용성 침전물을 형성하도록 하고 장내에서 cholesterol 흡수를 저지하고 또한 담즙산의 흡수에 의한 장간순환을 저지하여 간에서 cholesterol이 담즙산으로 전환을 빠르게 하여 혈중 cholesterol을 저하하는 것으로 판단된다.

따라서 복합담즙산의 분해활성이 높은 젖산균주를 이용한 발효유제품을 섭취한다면 혈중 cholesterol 저하효과를 얻을 수 있을 것으로 판단된다.

이 연구에서 얻어진 *L. acidophilus* HF0401과 *L. acidophilus* HF0404는 내산성과 담즙산 내성이 우수하고 복합담즙산 분해력이 우수하므로 농촌형 요구르트 제조에 사용하면 상당한 부가가치 발생 요인이 될 수 있으며, 이를 위해 yogurt 제조 이용체계의 확립을 위한 연구를 한 결과 다음과 같은 결론에 도달하였다.

농촌형 발효유제조를 위해 젖산균주가 최적생장을 발휘할 수 있도록 이용체계가 명확하게 확립되어야 하고, 제조공정이 단순화되어야 한다. 선발된 *L. acidophilus* HF0401과 *L. acidophilus* HF0404를 발효유제품에 이용하기 위한 최적 성장환경은 아래와 같다.

1. 12% 탈지유의 열처리 온도: 91 또는 92℃에서 30분간 열처리
2. 총고형분 함량: 25% 이하
3. 배양온도 및 시간: 40℃에서 9~12시간
4. 접종량: 2% mother culture
5. Growth factor: 0.3% yeast extract, 2% proteose peptone
6. Starter culture 배지조성: 12% skim milk와 0.3% yeast extract
7. 혼합배양시: *L. acidophilus*와 *S. thermophilus*를 1:1로 배양

제 5 절 참 고 문 헌

1. Dashkevicz, M. P. and S. D. Feighner. 1989. Appl. Environ. Microbiol. **55**: 11.
2. De Rodas, B. Z., S. E. Gilliland, and C. V. Maxwell. 1996. J. Dairy Sci. **79**: 2121.
3. De Smet, I., L. van Hoorde, N. de Saeyer, M. Vande Woestyne, and W. Verstraete. 1994. Microb. Ecol. Health. Dis. **7**: 315.
4. Gilliland, S. E. and M. L. Speck. 1977. Appl. Environ. Microbiol. **33**: 15.
5. Gilliland, S. E., C. R. Nelson, and C. Maxwell. 1985. Appl. Environ. Microbiol. **49**: 377.
6. Klaver, F. A. M. and R. van der Meer. 1993. Appl. Environ. Microbiol. **59**: 1120.
7. Lundeen, S. and D. C., Savage. 1990. J. Bacteriology. **172**: 4171.
8. Walker, D. K. and S. E. Gilliland. 1993. J. Dairy Sci. **76**: 956.
9. Desmazeaud, M. .1990 Mirobiol., Aliment., Nutr., **8**:313
10. Grigorov, H. .1966. XVIIth International Dairy Congress, **5**:655.
11. Pulay, G. and Krasz, A. .1974. XIXth International Dairy Congress. p.413.
12. Ramos, M. .1978. XXth International Dairy Congress. IE, 413.
13. Sasaki, M., Bosman, B.W., Tan, P.S.T. . 1995. J. Dairy Res. **62**:601-610.
14. Taillandier, P., Gilis, F., Portugal, F. R., Laforce, P., Strehaiano, P. . 1996. Biotechnol-lett. **18**:775.

제 3 장 발효유의 저장성 향상을 위한 균주개발 이용체계 연구

제 1 절 서 론

발효 유제품의 저장기간 연장을 위하여 천연 식품보존제로서 젖산균(LAB)이 생산하는 bacteriocin의 사용이 증가하고 있다. Bacteriocin의 일종인 nisin은 1988년 미국의 FDA에서 공인하였고 현재 48개국에서 유가공 제품의 보존제로 사용되고 있다. 국내의 연구소, 대학 및 식품제조업체 에서도 이러한 추세에 맞게 bacteriocin을 생산하는 젖산균을 직접 starter로 사용하거나 이들이 생산하는 대사산물을 발효유에 첨가하는 방법이 시도될 것이며 따라서 국내에서 아직 항생제로 분류된 bacteriocin은 곧 그 규제가 풀릴 것이며 이에 따라 관련 분야의 활발한 연구가 진행될 것이다. 그러나 젖산균이 생산하는 bacteriocin은 그 항균범위가 Gram 양성균에 국한되고 Gram 음성균과 효모 등 진균류는 젖산균이 생산하는 bacteriocin에 의해 저해되지 않는다. 따라서 발효유의 저장기간을 연장하기 위해서는 젖산균의 bacteriocin외에 또하나의 저장수단이 필요하게된다. Propionic acid bacteria(PAB)은 젖산을 탄소원으로 이용하여(commensalistic interaction)다량의 propionic acid를 생산하는 세균이며 이들이 생산하는 propionic acid 및 bacteriocin의 일종인 propionicin은 젖산균의 bacteriocin이 억제하지 못하는 Gram 음성균 및 진균류를 억제한다. 따라서 bacteriocin을 생산하는 젖산균과 프로피온산균의 혼합배양액을 이용하면 광범위한 천연식품보존제로 이용이 가능할 것이다. 실제로 Microgard는 미국의 FDA에서 공인한 식품보존제로 1급 탈지유에 프로피온산균을 발효하여 저온 살균한 분말제품으로 cottage cheese나 yogurt에서 문제가 되는 곰팡이 억제를 위하여 사용되고 있다.

본 연구는 공생 관계가 있는 젖산균과 PAB을 선발하여 bacteriocin의 물리화학적 특성 및 항균능력 등을 밝히고 이들을 혼합 배양하여 그 발효산물을 발효유의 저장성향상 및 향후 식품보존제로 이용하기 위한 연구이다.

제 2 절 연구내용

1. 실험재료

Bacteriocin 생산 젖산균주의 분리를 위하여 사용된 식품시료는 가자미 식해, 김치(배추김치, 갓김치) 및 발효 소시지이다. 발효소시지는 실험실에서 직접 제조하였으며 가자미 식해는 상점에서 구입하였고 김치류는 가정에서 제조된 것을 사용하였다. 프로피온산균주는 KCCM, KCTC, 한식연, Iowa State University 및 ATCC로부터 구입하였고 직접 Emmental cheese로부터 분리하기도 하였다.

2. Bacteriocin생산 젖산균주의 분리

발효식품 100 g 을 살균 인산완충용액(pH 6.5) 400 ml과 함께 Stomacher로 잘 마쇄하여 희석한 후 agar 3중층법으로 bacteriocin을 생산하는 젖산균주를 분리하였다. 즉 시료 0.1 ml을 5 ml의 MRS agar(48℃)에 넣고 petri dish에 부어 굳힌 후 여기에 5 ml의 MRS soft agar(0.75%)를 붓고 H₂O₂의 효과를 배제하기 위하여 Anaerobic Jar(BBL)에서 배양(37℃, 24 h)하였다. Indicator로 사용된 *Lactobacillus plantarum* NCD0 955는 MRS broth에서 overnight 배양한 후 배양액 10 μ l(약 5×10^6 cfu)을 5 ml의 MRS soft agar에 넣고 잘 혼합하여 미리 배양된 2 층의 agar에 부어 37℃에서 24시간 배양하였다. 3중층의 하층에서 생육억제환을 보인 colony를 분리하기 위하여 agar를 뒤집어서 하층이 노출되도록 한 후 조심스럽게 colony를 MRS agar에 획선 배양하여 독립된 colony를 분리하였다.

3. Bacteriocin의 확인

단백질태(proteinaceous in nature)인 bacteriocin의 확인은 단백질분해효소로 그 생육억제환이 소실됨을 관찰하여 확인하였다. 즉 bacteriocin 생산균으로 생각된 균주를 MRS agar에 접종하여 24시간 배양한 후 여기에 Pronase (1 mg/ml phosphate buffer, pH 6.5) 100 μ l을 적하하여 37℃에서 2시간 배양하였다. Indicator soft agar를 위의 방법으로 overlay한 후 생육억제환이 소실되면 진정한 bacteriocin인 것으로 단정 지었다.

4. Bacteriocin 생산균주의 동정

API 50CHL kit를 이용한 균주의 생리적 특성, catalase 및 oxidase test, 형태, Gram staining 등을 종합하여 균주를 동정하였다.

5. Emmental cheese로 부터 프로피온산균의 분리

Emmental cheese를 인산완충용액과 함께 마쇄하여 희석한 후 modified sodium lactate agar(pancreatic digestion of casein 10 g, sodium lactate 10 g, yeast extract 10 g, KH_2PO_4 0.25 g, MnSO_4 0.05 g, tween 80 0.5 ml, cysteine 0.5 g, agar 15 g)에 평판배양하여 anaerobic jar에서 배양하였다.

6. Gram 음성균 및 효모를 억제하는 프로피온산균의 선발

국내외의 균주보존기관, 대학 및 Emmental cheese로부터 분리된 균주를 modified sodium lactate agar에 spotting하여 anaerobic jar에서 24시간 배양한 후 여기에 시험하고자 하는 Gram 음성균 및 효모를 각각의 최적 배지에서 overnight 배양하여 배양액 10 μl 을 soft agar에 넣어 프로피온산균이 자란 agar에 overlay하였다. 뚜렷한 생육억제환을 보여준 균주를 다음의 실험에 사용하였다.

7. 젖산균주의 항균범위

Bacteriocin을 생산하는 젖산균의 항균범위 측정을 위하여 지연법(deferred method)이 사용되었다. 즉 젖산균주를 MRS agar에 spotting하여 anaerobic jar에서 24시간 배양한 후 여기에 실험하고자하는 균주를 각각의 최적배지 soft agar에 접종하여 overlay하였다. 뚜렷한 생육억제환을 보인 실험균주를 생성된 bacteriocin에 민감한 균주로 결정하였다.

8. 젖산균주와 프로피온산균주와의 길항관계

향후 두 균주 system을 사용할 경우 상호 길항작용이 없는 균주 system을 선택하기 위해 본 실험을 착수하였다. 젖산균주와 프로피온산균주를 각각 MRS agar 및 modified sodium lactate agar에 stabbing하여 혐기적 조건에서 24시간

배양하였다. 여기에 실험하고자하는 젖산균은 프로피온산균이 배양된 spot에 프로피온산균은 젖산균이 배양된 spot에 교차적으로 soft agar에 접종하여 overlay하여 혐기적으로 배양하였다. 24시간 후 두 균주 system사이의 길항관계를 생육억제환을 관찰하여 판단하였다.

9. 균주 system의 항균범위

두 균주 system이 모두 잘 자라는 medium을 찾기 위해 MRS broth, Sodium lactate broth, 및 YEG medium에서 배양한 결과 YEG medium(tryptone 10 g, glucose 20 g, KH_2PO_4 0.25 g, tween 80 0.5 ml, MnSO_4 0.05 g, cysteine 0.5 g, yeast extract 10 g, 증류수 1,000 ml, pH 6.5)이 가장 우수하여 향후의 실험에 사용하였다. *Pediococcus acidilactici* M단독배양액(Ped M), Ped M과 *Propionibacterium acidipropionici* P5(P5)의 혼합 배양액(M5), Ped M과 *Propionibacterium thoenii* 단독배양액(P126) 및 Ped M과 P126과의 혼합배양액(M126)을 각각 YEG agar에 1 loop 되도록 stab하여 혐기적으로(GasPak jar, BBL) 배양(24 h, 37°C)한 후 여기에 indicator soft agar(0.75%)를 pour plate 하여 배양하였다. Indicator는 각각 최적의 배지에서 overnight 배양하여 5 ml의 soft agar 약 10^6 cfu정도 되도록 조절하였다. Bacteriocin에 sensitive한 indicator는 확실하게 생성된 halo의 크기를 측정하여 mm로 표시하였으며 halo의 경계가 확실하지 않은 것은 D(diffused)로 표시하였다.

10. 균주 system의 공생

YEG broth에 inoculum size가 1% 씩 되도록 접종하여 혼합배양 초기, 24시간, 48시간, 72시간 경과 후 lactic acid, acetic acid, propionic acid의 경시적변화를 HPLC로 측정하였다. 분석 조건 및 사용된 기기는 다음과 같다. Instrument: Jasco PU-980 pump, UV-975 detector, CO-965 Column oven; Column: Aminex column HPX-87H, 300 X 7.8 mm; Solvent: 0.008 N sulfuric acid; Flow rate: 0.6 ml/min; Injection volume: 20 μl ., Wave length: 210 nm.

11. 균주 system의 유기산의 분석

주요 유기산의 최대 생산시기, 배지, 균주 system을 조사하기 위해 Ped M 단독, P5 단독, Ped M 과 P5 혼합, Ped M과 P126 혼합 등 4가지 균주 system을 각각의 inoculum size를 1%로 하여 YEG broth, SGY broth(skim milk + 1% glucose + 1% yeast extract), SSY broth(skim milk + 1 % sucrose + 1% yeast extract)에 접종하여 혐기적으로 37°C에서 250시간 배양하면서 acetic acid, propionic acid, lactic acid의 경시적변화를 추적하였다. 이때 사용된 Gas Chromatography조건은 다음과 같다. Model, Varian 3300; 이동상, Helium; flow rate, 30 ml/min; column, Carbograph 1 DA; detector, FID이며 온도는 column, 180°C; injector, 190°C; detector, 200°C이었다.

12. 혼합배양중 당의 분석

상기의 4개 균주 system을 YEG broth에 접종하여 160시간 혐기적으로 배양하면서 pH 및 glucose의 경시적변화를 추적하였다. 당 분석은 Jasco Preparative HPLC를 사용하였으며 실험 기종 및 조건은 아래와 같다: column, carbohydrate column(3.9 × 300 mm, Waters); detector, RI detector(Jasco RI 930); solvent, acetonitrile : water = 75 : 25(v/v); flow rate, 1.4 ml/min.

13. 배양액으로부터 Bacteriocin의 분리

Pediococcus acidilactici(Ped M)을 1.8 l의 MRS broth에서 12시간 정치배양하여 70°C에서 30 min동안 가열하여 세포와 protease를 불활성화하였다. 배양액의 pH를 4 M NaOH로 pH 6.0으로 조절하여 실온에서 약 60분간 저어주면서 bacteriocin이 세포에 부착되도록 하였다. 이 배양액을 30분간 원심분리(10,000 × g, 4°C)하여 세포를 수거한 후 5 mM의 phosphate buffer(pH 6.0)로 2회 씻었다. 세포에 부착된 bacteriocin을 desorption하기 위해 cell을 100 mM NaCl에 suspension한 후 5% phosphoric acid를 서서히 가하여 pH 2.0으로 조절하였다. 이 액을 4°C에서 12시간 저어준 후 원심분리(18,000 × g, 4°C)하여 cell을 제거한 후 supernatant fluid를 0.22 μm의 membrane filter를 통과시켜 잔존된 cell을 제거하였다. 염을 제거하기 위해 배양액을 Spectra / Por

7(Spectrum, Houston, TX, USA) dialysis membrane(M.W.C.O. 1,000)에 넣고 살균된 증류수에서 4°C에서 24시간 투석하였다. 투석액을 동결건조 하여 다음의 실험에 사용하였다.

14. RP-HPLC에 의한 bacteriocin의 정제

Reverse phase HPLC에 사용된 기기는 다음과 같다. Waters 501, 510 analytical system(Millipore, MA, USA), automated gradient controller, UV detector(280 nm), Waters 710 autosampler, Millipore integrator(Waters 745 B), analytical column(Vydac C18, 25 × 1.0 cm, 10 μm). Flow rate는 1.5 ml/min 이며 solvent는 A(0.1% TFA in water)와 B(0.1% TFA in acetonitrile)이었다. 이후에 semi-preparative HPLC column(Vydac C18, 25 × 1.0cm, 10 μm)를 사용하여 solvent A에 대한 B의 gradient elution 조건은 다음과 같다. Flow rate 1.5 ml/min, 0~5 min 75% solvent A and 25% solvent B; 5-35 min, 45% solvent A and 55% solvent B; 35-36 min, 100% solvent B; 36-46 min, 100% solvent A. 모든 protein peak는 manual로 받아서 vacuum evaporation하여 어떤 peak가 bacteriocin activity를 보이는지 assay하였다. 각각 peak의 purity는 sample 10 μg을 물에 녹여서 C18 Vydac column에 injection하여 analytical RP-HPLC로 분석하였다. 이하의 실험에서 bioassay를 위한 indicator는 *Lactobacillus plantarum* NCDO 955를 사용하였다.

15. Protein 농도 측정

Bacteriocin의 정제과정중 정제된 protein의 농도는 BCA(bicin-chroninic acid) micro assay 방법으로 실행하였다.

16. Mass Spectrometry

정제된 bacteriocin의 분자량은 electrospray mass spectrometer로 분석하였다(VG Biotech, Platform II Micromass, Manchester, U.K.).

17. 다양한 배지에서 균주성장

4가지 다른 배지에서 Ped M, P5, P126균주를 혐기적 및 호기적으로 배양하여 각 균주의 cfu/ml, pH, bacteriocin titer(AU/ml)를 비교하였다. AU/ml은 2배희석법을 사용 생육억제환을 보인 최고희석배수의 역수를 취하여 ml당 활성으로 표시하였다. 이때 사용된 indicator는 *Lactobacillus plantarum* NCD0955가 사용되었다.

18. Bacteriocin titer에 미치는 pH의 영향

배양액(TGE broth)의 pH를 fermentor를 사용하여 pH 5.0부터 7.0 까지 0.5단위로 높여 경시적으로 bacteriocin titer 및 cfu/ml의 변화를 추적하였다. 사용한 fermenter는 Bioflo(New Brunswick)이며 culture volume은 1.5 ℓ이었다. AU/ml은 *L. plantarum* NCD0955를 indicator로 사용하여 well diffusion assay로 측정하였다. pH 조절은 0.5 N HCl을 사용하였다.

19. Frozen stock의 개발

균주의 장기 저장을 위한 cryoprotectant의 개발을 위하여 실험에 사용된 냉해방지제는 다음과 같다. glycerol 15%, skim milk 15%, skim milk 10% + adonitol 1%, sucrose 8% + skim milk 5%, gelatin 1.5%, lactose 8% + skim milk 5% + gelatin 1.5%. 이상의 냉해방지제에 균주를 현탁하여 -170℃와 -20℃에서 30일 동안 저장한 후 초기 미생물 수와 비교하여 생존율을 %로 나타내었다.

제 3 절 연구 결과 및 고찰

1. 균주의 동정

총 12균주의 bacteriocin 생산균주가 김치, 발효소세지, 가자미 식해로부터 분리되었다. 이들 균주로부터 항균범위가 넓은 4균주를 동정한 결과 *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*로 동정되었다(Table 1).

2. 젖산균의 항균범위

4균주의 항균범위를 Table 2에 나타내었다. 발효소세지에서 분리된 NFS #4, NFS #6-6 및 Ped M은 각각 5, 7, 18개의 균주를 억제하였으며 식해로부터 분리된 S #3은 12 균주를 억제하였다. 특히 Ped M균주는 Gram 음성균인 *Aeromonas hydrophila*를 억제하였다.

3. 프로피온산균의 Gram음성 및 효모에 대한 억제

균주보존기관 및 대학으로부터 구입한 균주의 Gram음성 및 효모에 대한 항균범위를 Table 3에 나타내었다. 대부분의 프로피온산균주는 *Pseudomonas aeruginosa*와 *Cryptococcus albidus*를 억제하였다.

4. 젖산균과 프로피온산균의 길항관계

4균주의 젖산균과 프로피온산균 사이에는 길항관계가 없어 두 균주 system을 이용함에 문제가 없었다 (data not shown).

5. Emmental cheese에서 분리된 프로피온산균의 항균범위

총 6균주의 프로피온산균이 Emmental cheese로부터 분리되었으며 이들의 Gram 음성균 및 효모에 대한 항균범위를 측정한 결과 이들은 *Pseudomonas aeruginosa* 252 만을 억제하였다(data not shown).

Table 1. Physiological and morphological characteristics of bacteriocinogenic lactic acid bacteria isolated from fermented foods

Test	Strains			
	NFS #4-3	NFS #6-6	Ped M	S #3-7
Catalase	-	-	-	-
Oxidase	-	-	-	-
Morphology	rod	rod	cocci, tetrads	rod
Gram staining	+	+	+	+
D-Xylose	-	-	+	-
Adonitol	-	-	-	-
Galactose	+	+	+	+
D-Glucose	+	+	+	+
D-Fructose	+	+	+	+
D-Mannose	+	+	+	+
L-Sorbose	-	-	-	-
Rhamnose	-	+	-	+
Dulcitol	-	+	-	-
Mannitol	-	+	-	+
Sorbitol	-	+	-	+
N-Acetylglucosamine	+	+	+	+
Amygdaline	+	+	+	+
Arbutine	+	+	-	+
Esculine	-	+	-	-
Salicine	+	+	-	+
Cellobiose	+	+	+	+
Maltose	+	+	-	+
Saccharose	+	+	+	+
Trehalose	-	+	-	+
Inuline	-	-	-	-
Melezitose	+	-	-	+
D-Raffinose	-	+	-	+
Glycogene	-	-	-	-
β -Gentiobiose	+	+	+	+
D-Turanose	-	+	-	+
D-Tagatose	+	-	+	-
D-Fucose	-	-	-	-
D-Arabitol	-	+	-	-
Gluconate	-	+	-	+
2 keto-gluconate	-	-	-	-
Identification	<i>Lb. paracasei</i> <i>ss. paracas plantarum</i> <i>ei</i>		<i>Pediococcus acidilactic</i> <i>i</i>	<i>Lb. plantarum</i>

Table 2. Antimicrobial spectra and strength^a of bacteriocinogenic lactic acid bacteria isolated from foods

indicators	producers			
	NFS #4-3	NFS #6-6	Ped M	Sik #3-7
<i>Lc. diacetylactis</i> 185	-	-	-	-
<i>Lb. acidophilus</i> 507	-	-	-	11
<i>Lb. brevis</i> 353	-	-	-	-
<i>Lb. confusus</i> 653	9	-	11	8
<i>Lb. plantarum</i> 464	-	-	-	-
<i>Lb. plantarum</i> NCDO 955	-	17	22	20
<i>Lb. reuteri</i> 661	-	12	15	-
<i>Lb. sake</i> 816	9	-	11	8
<i>Lb. sake</i> 166	10	11	23	10
<i>Lb. bulgaricus</i> 425	-	-	-	11
<i>Lb. casei</i> 196	-	-	-	-
<i>Lb. delbrueckii</i> 149	-	-	11	-
<i>Lb. fermentum</i> 164	-	-	11	-
<i>Lb. gasseri</i> 658	-	-	-	14
<i>Lb. helveticus</i> 659	-	-	12	-
<i>Lb. pentosus</i> 481	-	-	-	-
<i>Ped. pentosaceus</i> 167	-	-	16	8
<i>Ped. acidilactici</i> 443	-	8	-	8
<i>Ped. cerevisiae</i> 438	-	-	12	-
<i>Leu. mesenteroides</i> 817	-	-	24	-
<i>Pro. freudenreichii</i> 668	-	-	-	-
<i>B. cereus</i> 437	-	-	-	-
<i>B. coagulans</i> 841	7	-	24	-
<i>M. luteus</i> 454	10	16	22	18
<i>Ent. faecalis</i> 354	-	-	12	11
<i>Cl. perfringens</i> 752	-	-	11	-
<i>Lis. monocytogenes</i> 229	-	10	15	-
<i>Staph. aureus</i> 219	-	9	11	-
<i>Sal. typhimurium</i> 191	-	-	-	-
<i>A. hydrophila</i> 461	-	-	9	13
# of sensitive microorganisms	5	7	18	12

a: number in the cell indicate the diameter(mm) of halo.

Table 3. Antimicrobial spectra and strength^a of propionibacteria (PAB) against Gram negative bacteria and yeasts

PAB Indicator	<i>Propioni. freudenre ichii</i> 668	<i>Propioni. jensenii</i> 1062	<i>Propioni. freudenrei chii</i> 6207	<i>Propioni. acidiprop ionici</i> P5	<i>Propioni. freudenreic hii</i> P104	<i>Propioni. thoenii</i> P126	<i>Propioni. thoenii</i> P127
<i>E. coli</i> 272	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i> 252	-	13	12	14	-	15	-
<i>P. fragi</i> 462	-	-	-	-	-	16	17
<i>P. fluorescens</i> 194	-	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i> 191	-	-	-	-	-	-	-
<i>Aeromonas hydrophila</i> 461	-	-	-	-	-	-	-
<i>Shigella flexneri</i> 445	-	-	-	-	-	-	-
<i>Apitotrichum curvatum</i> 632	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. boidini</i> 110	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. famata</i> 103	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida pseudotropicalis</i> 910	-	-	-	-	-	-	-
<i>Kluyveromyces marxianus</i> 137	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. albicans</i> 432	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cryptococcus albidus</i> 457	-	10	7	6	22	20	25
<i>Hansenula capsulata</i> 114	-	-	-	-	-	-	-
<i>Debaryomyces hansenii</i> 912	-	-	-	-	-	-	-
<i>Rhodotorula glutinis</i> 172	-	-	-	-	-	-	-
<i>Saccharomyces carlsbergensis</i> 120	-	-	-	-	-	-	-

a: Number in the cell indicate the diameter(mm) of halo.

6. 공생 확인

항균범위가 가장 넓은 젖산균주(Ped M)와 프로피온산균주의 혼합배양증 유기산(acetic, lactic, propionic acid) 및 pH의 경시적변화는 Fig. 1-4와 같다. 항균범위가 가장 넓은 젖산균주(*Pediococcus acidilactici*)와 프로피온산균주의 혼합배양증 acetic acid와 propionic acid는 증가하였고 lactic acid는 감소하는 경향을 보여 두 균주 system이 서로 commensalistic interaction을 하고 있음을 보여주었다.

7. 균주 system의 항균력 향상

Ped M균주(*Pediococcus acidilactici*)와 P5(*Propionibacterium acidopropionici*)를 YEG broth에 혼합 배양하여 상등액을 *Pseudomonas fluorescens*에 assay 한 결과 halo의 size(diameter)가 P5단독을 assay 하였을 경우보다 약 1.85배, Ped M 균주 단독배양보다 약 3.16배 증가하는 synergistic effect를 보여주어 균주 system의 응용에 밝은 전망을 보여주었다. Deferred assay에 의한 4개 균주 system의 항균범위는 Table 4에 나타내었다. 발효 sausage에서 분리되어 *P. acidilactici*로 동정된 균주(Ped M)와 2 균주의 *Propionibacterium* spp.는 *Pseudomonas fluorescens*, *Ps. aeruginosa*, *Ps. fragi* 등 Gram negative균을 억제하였고 단독으로 배양했을 때 보다 halo의 size 비교에 의한 항균력이 향상됨을 알 수 있었다. 특이한 사항은 Ped M 균주는 여드름의 원인균인 *Propionibacterium acne*를 억제하였으며 소의 유방염을 발생하는 3균에 모두 억제작용을 보였다. 또 이 균주는 광범위한 항균범위를 보여 주어 향후 bacteriocin의 식품첨가제로 개발이 가능할 것이다. 2개의 *Propionibacterium* spp.는 Gram negative 및 대부분의 효모를 억제하였으며 단독배양때보다 Ped M과 혼합 배양시 halo size 비교에 의한 항균력이 증가하였다. 그러나 이들의 halo는 diffused된 관계로 정확한 size는 표시할 수 없었다.

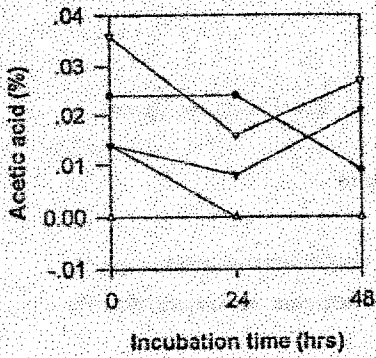


Fig. 1. Changes in acetic acid production

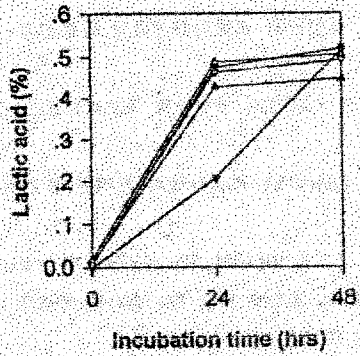


Fig. 2. Changes in lactic acid production

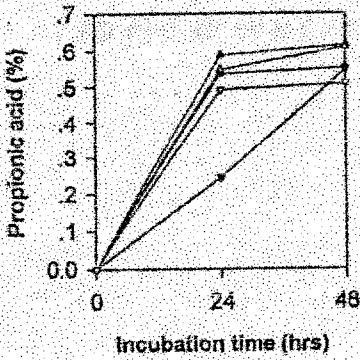


Fig. 3. Changes in propionic acid production

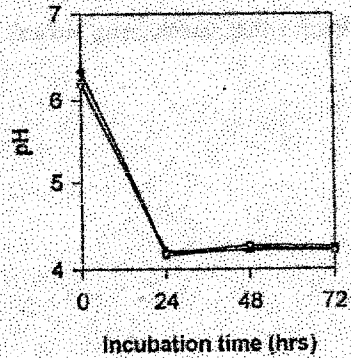


Fig. 4. Changes in pH

- : Ped M
- ▲ : P5
- ▼ : P126
- ◆ : PedM + P5
- ◇ : Ped M + P126

Table 4. Antimicrobial spectrum of mixed culture systems

Indicator	Producer cells	PedM	P5	M5	P126	M126
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 194		15	13	17	18	18
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 252		22	14	34	15	30
<i>Pseudomonas fragi</i> 462		22	23	25	22	22
<i>Aeromonas hydrophila</i> 461		11	13	17	11	20
<i>E. coli</i> 272		-	-	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i> 191		17	16	17	D	15
<i>Shigella flexneri</i> 445		-	-	-	-	-
<i>Pro. freudenreichii</i> 668		D	-	-	-	-
<i>Pro. jensenii</i> 1062		D	-	-	-	-
<i>Pro. freudenreichii</i> 6207		-	-	-	-	-
<i>Pro. acidipropionici</i> P5		-	-	-	-	-
<i>Pro. freudenreichii</i> P104		-	-	-	-	-
<i>Pro. thoenii</i> P126		-	-	-	-	-
<i>Pro. thoenii</i> P127		-	-	-	-	-
<i>Propionibacterium acne</i>		11	NT	NT	NT	NT
<i>Apitotrichum curvatum</i> 632		-	18	D	15	D
<i>Candida boidini</i> 110		-	-	D	-	D
<i>Candida famata</i> 103		D	D	8	D	D
<i>Candida pseudotropicalis</i> 910		-	-	D	-	D
<i>Kluyveromyces marxianus</i> 137		-	-	-	-	-
<i>Candida albicans</i> 432		-	-	D	-	D
<i>Cryptococcus albidus</i> 457		D	D	D	D	D
<i>Hansenula capsulata</i> 114		-	D	D	D	D
<i>Debaryomyces hansenii</i> 912		-	D	D	D	D
<i>Rhodotorula glutinis</i> 172		-	D	D	D	D
<i>Sacch. carlsbergensis</i> 120		-	-	-	-	-
<i>Streptococcus agalactiae</i> 885		9	NT	NT	NT	NT
<i>Streptococcus mutans</i> 1171		7	NT	NT	NT	NT
<i>Enterococcus faecalis</i> 675		9	NT	NT	NT	NT
<i>Lb. delbrueckii</i> 11357		-	-	-	D	-
<i>Lactobacillus confusus</i> 653		11	-	-	-	-
<i>Lactobacillus plantarum</i> 464		-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus sake</i> 816		11	-	-	-	-
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 817		24	-	-	-	-

(continued)

Indicator	Producer cells	PedM	P5	M5	P126	M126
<i>Lactobacillus brevis</i>	353	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	507	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	425	D	-	-	-	-
<i>Lactobacillus casei</i>	196	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	149	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus fermentum</i>	164	11	-	-	-	-
<i>Lactobacillus gasseri</i>	658	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus helveticus</i>	659	12	-	-	-	-
<i>Lactobacillus pentosus</i>	481	-	-	-	-	-
<i>Lactococcus diacetylactis</i>	185	D	-	-	-	-
<i>Micrococcus luteus</i>	454	22	-	-	-	-
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	167	16	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	354	12	-	-	-	-
<i>Pediococcus acidilactici</i>	443	8	-	-	-	-
<i>Pediococcus cerevisiae</i>	438	12	-	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	437	-	-	-	-	-
<i>Bacillus coagulans</i>	841	24	-	-	-	-
<i>Clostridium perfringens</i>	752	-	-	-	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	229	D	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	219	8	-	-	-	-
<i>Lactobacillus plantarum</i>	NCDO 955	22	-	-	-	-
<i>Lactobacillus curvatus</i>	166	23	-	-	-	-

8. 다양한 배지에서 균주 system의 유기산생성

Propionic acid의 최대생성(ca. 5.2 mM)은 Ped M + P126 system을 SSY broth에서 90 h 배양했을 때 얻어졌고 acetic acid는 Ped M + P126 system을 120 hr 배양했을 때 최대생산량(ca. 80 mM)을 보였다(Fig 5-7). 배지별 유기산의 생성 순위는 SSY > SGY > YEG였다.

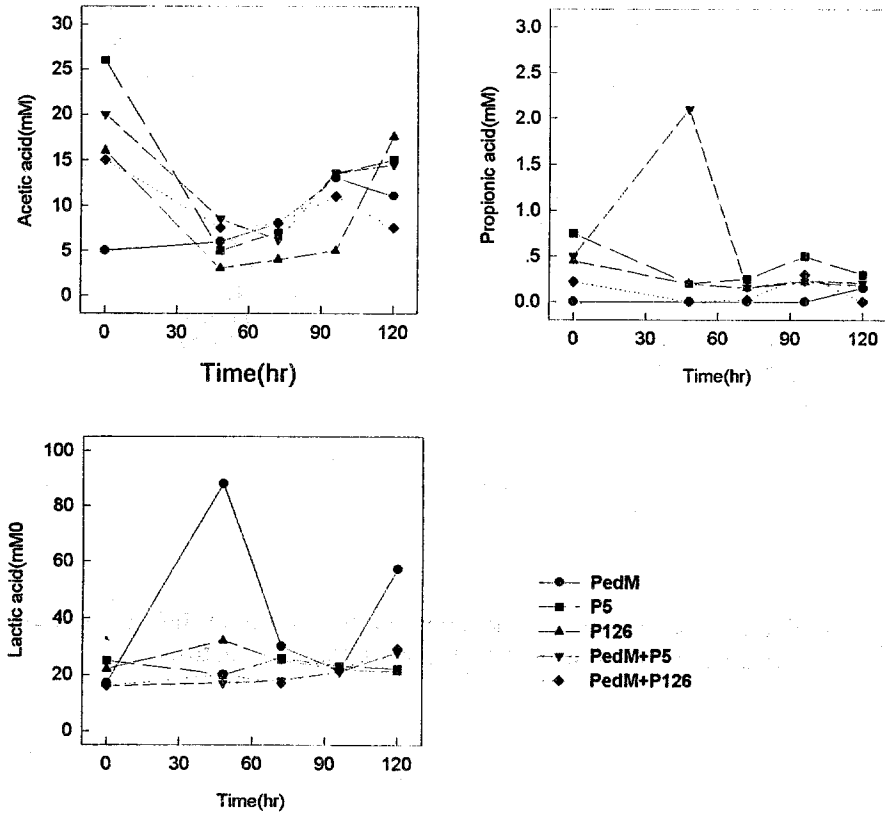


Fig. 5. Changes of organic acids during culture of different culture systems in YEG broth.

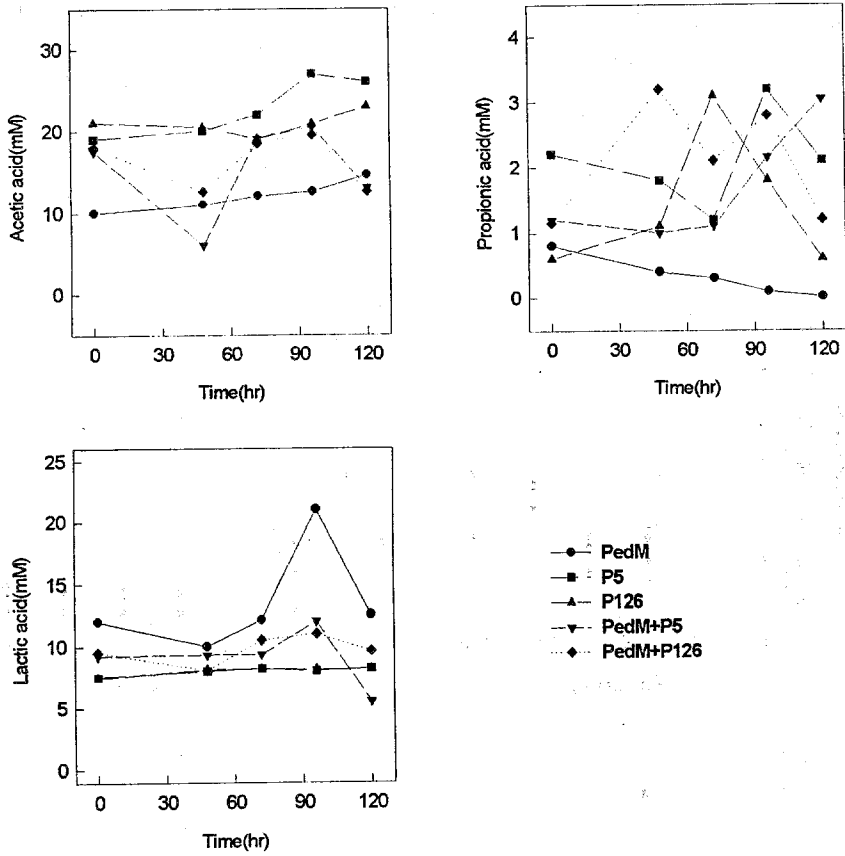


Fig. 6. Changes of organic acids during culture of different culture systems in skim milk + 1% glucose + 1% yeast extract.

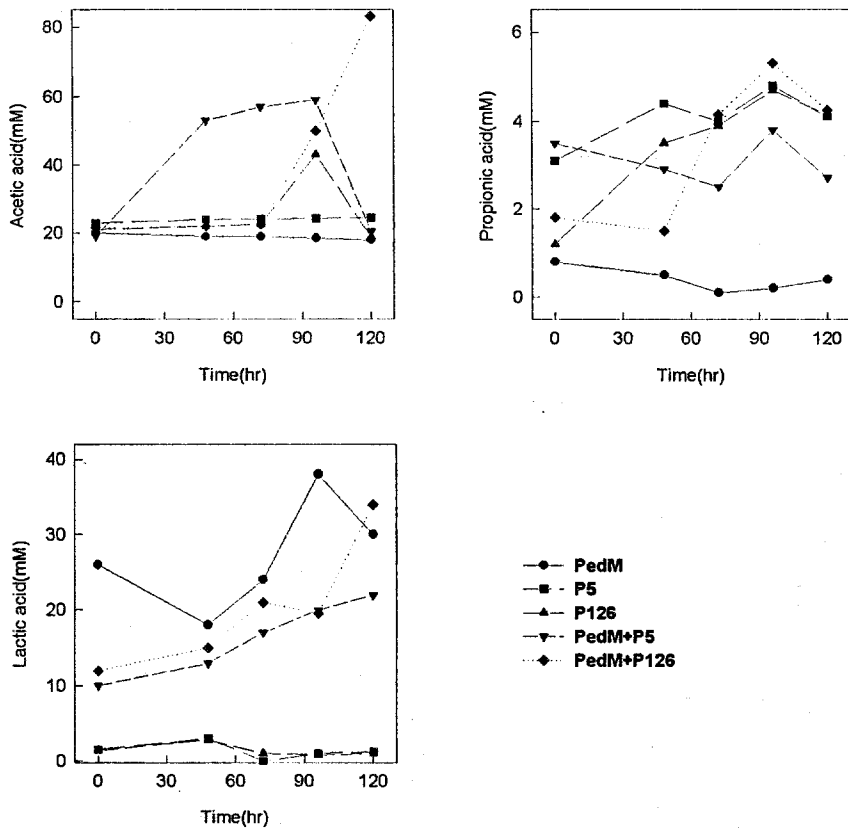


Fig. 7. Changes of organic acids during culture of different culture systems in skim milk + 1% sucrose + 1% yeast extract.

9. 혼합배양중 당과 pH의 변화

Glucose의 소비는 단독배양보다 혼합 배양했을 때 더 소비되었고 Ped M + p126 system이 Ped M + P5 system보다 소비량이 더 많았다. 당의 소비가 빠르거나 완전한 소비는 향후 이 균주 system을 채소발효juice의 개발 등에 응용하였을 경우 shelf life 연장에 효과적으로 이용할 수 있을 것이다. pH 변화는 단독, 혼합배양 모두 동일한 양상을 보여주었다(Fig. 8).

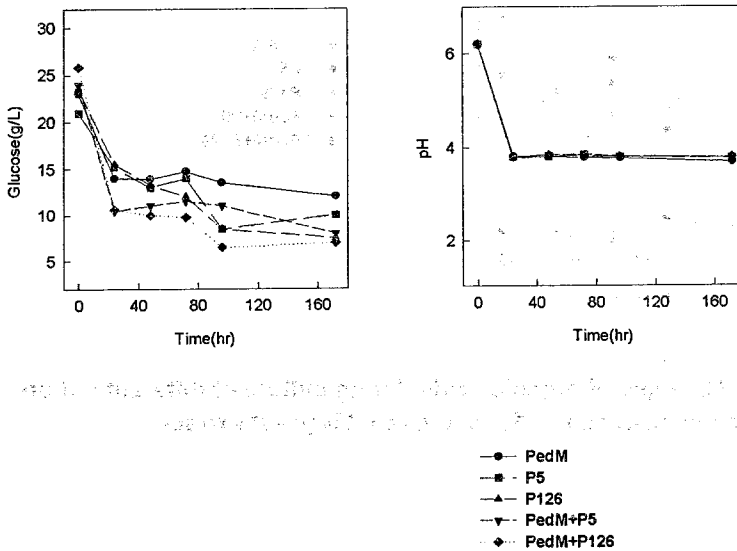


Fig. 8. Changes of glucose and pH during culture of different culture systems.

10. Bacteriocin의 분리 및 정제

pH 2로 조절한 crude bacteriocin을 reverse phase-HPLC로 분리된 bacteriocin peak chromatogram은 Fig. 9에 나타내었다. Bacteriocin의 정제과정중 total activity, specific activity 등의 결과는 Table 5에 나타내었다. Bacteriocin을 분리하기 위해 본 실험에 적용한 pH adsorption/desorption method는 bacteriocin을 기존의 여타 방법(alcohol precipitation, ammonium precipitation, etc)보다 신속하며 대량의 sample을 처리할 수 있는 방법으로 사료된다.

Table 5. Summary of Pediocin AcM purification

Step	Volume (mℓ)	Protein (mg/mℓ)	Activity (AU/mℓ)	Total activity (AU)	Specific activity (AU/mg)	Yield (%)	Purification (fold)
Culture	1,800	2.83	100	180,000	35	100	1
pH 2 extract	40	0.34	6,400	256,000	18,823	142	532
HPLC fraction	5.2	0.156	14,000	72,000	89,744	40.4	2,540

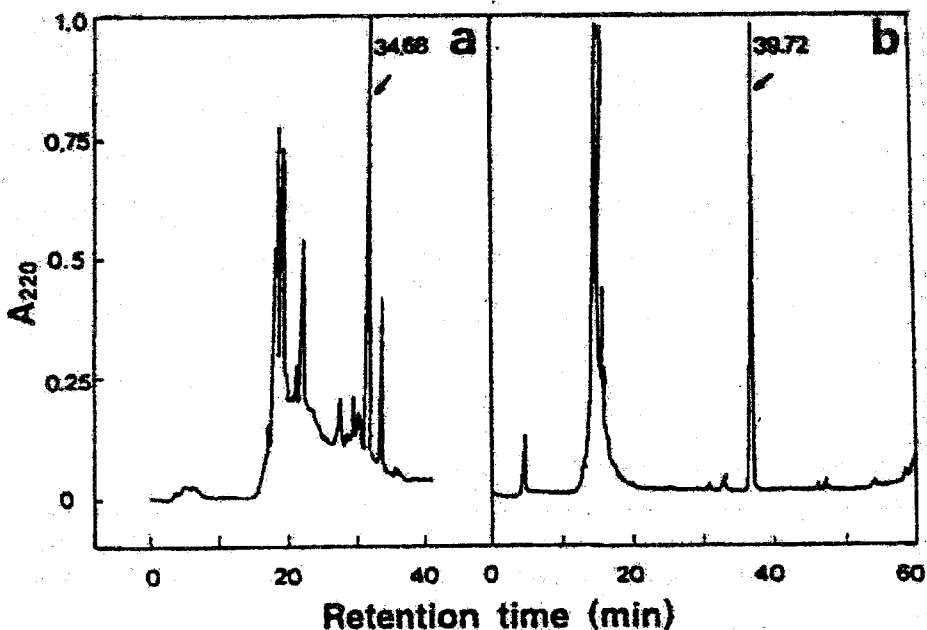


Fig. 9. Comparative chromatograms of Pediocin AcM isolation from pH 2 crude extract by linear gradient RP-HPLC (a) and step-wise gradient RP-HPLC (b). The arrows in each Figure indicate the pediocin peaks. In linear gradient analytical RP-HPLC method (a), the flow-rate is 1.0 ml/min and gradient was from 100% solvent A (0.1% TFA in water): 0% solvent B (0.1% TFA in acetonitrile) to 0% solvent A: 100% solvent B over a period of 0–50 min. In step-wise semi-preparative method (b), using solvent B (60% acetonitrile with 0.1% TFA) and solvent A (water with 0.1% TFA) at a flow rate of 1.5 ml/min, gradient was as follows: 0–5 min, 70% solvent A and 30% solvent B; 5–40 min, 30% solvent A and 70% solvent B; 40–50 min, 100% solvent B; 50–60 min, 100% solvent A. Numbers beside the pediocin peak are retention time.

11. Bacteriocin의 내열성

정제된 bacteriocin은 121℃에서 15분간 autoclaving 하여도 약 60%의 activity가 남아 있었다(Data not shown). 이것은 Ped M이 생산하는 bacteriocin을 열처리가 수반되는 식품가공에 적용할 수 있을 것으로 판단된다.

12. Bacteriocin의 활성 pH

정제된 bacteriocin은 저농도(5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)에서 활성 pH는 pH 1~9이었으며 bacteriocin의 농도를 높이면(250 $\mu\text{g}/\text{ml}$) halo의 size가 더 크게 나타났으며 활성 pH는 1~12까지 확장되었다. 대부분의 식품은 중성 영역이나 발효유 등은 산성 pH를 가지고 있다. 또한 식품의 가공과정중 산이나 염기처리가 수반되기도 한다. 따라서 Ped M이 생산하는 bacteriocin은 좋은 조건을 갖춘 것으로 판단된다.

13. Bacteriocin의 분자량

LC-Mass에 의한 Pediocin AcM의 정확한 분자량은 4,617 Da으로(Fig. 10) 보고된 pediocin과 유사한 결과를 얻었다.

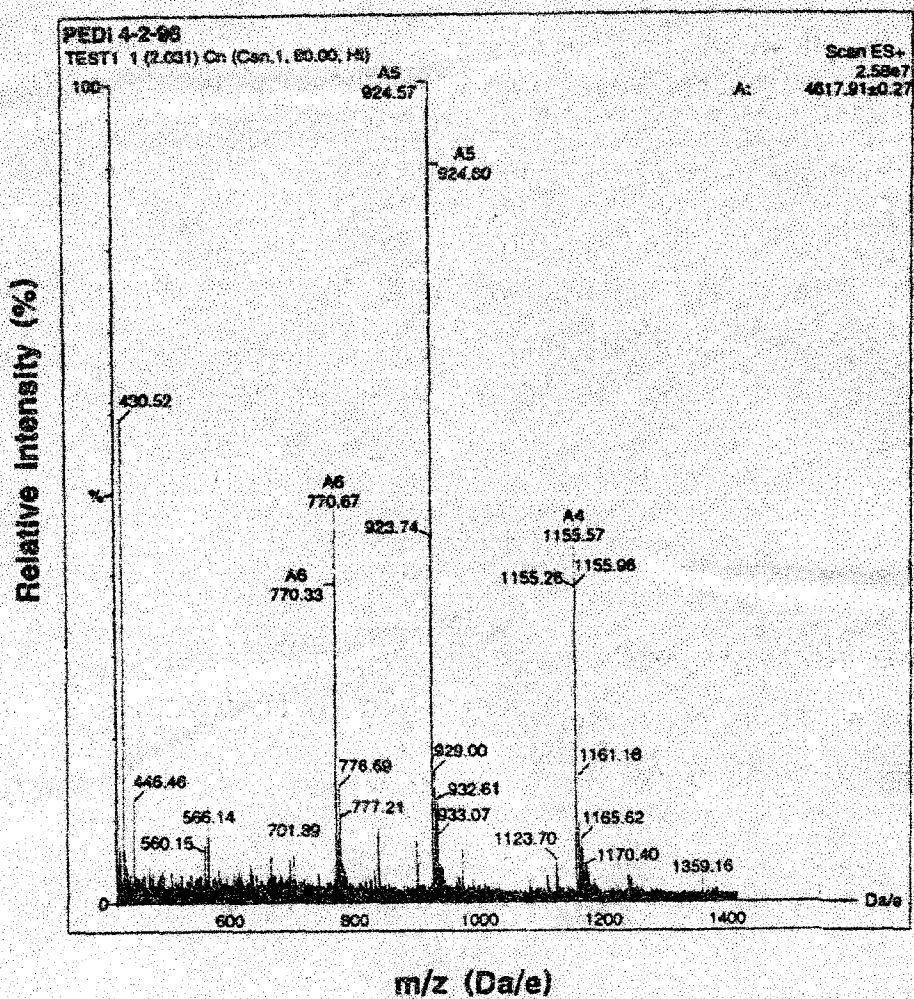


Fig. 10. Electrospray mass of Pediocin AcM for molecular weight determination.

The upper-right number(46179.1UN0.27) represents the molecular weight of pediocin AcM.

14. 산업용 배지 선정

4가지 다른 배지에서 혐기적 및 호기적으로 배양한 3균주(Ped M, P5, P126)의 cfu/ml, pH, AU/ml에 대한 결과를 Table 6에 나타내었다. Ped M 균주의 경우 TGE broth 에서는 균체의 증식 면에서는 MRS broth가 TGE broth보다 약 2배정도 높게 나타났으나 bacteriocin titer는 같았다. TGE broth는 MRS broth에 비해 구성성분이 간단하며 비교적 저가로 향후 Ped M 균주 및 bacteriocin의 대량생산을 위한 저가배지로서 적절할 것으로 판단된다.

Table 6. CfU/ml, pH, AU/ml of bacteria in 4 different media and atmospheric conditions

Media	Strains	cfu/ml		pH		AU/ml	
		Aerobic	Anaerobic	Aerobic	Anaerobic	Aerobic	Anaerobic
Medium 1	P 5	1.1×10^8	5.1×10^7	5.76	5.67	-	-
	P 126	9.6×10^7	5.7×10^7	5.85	5.76	-	-
	Ped M	7.1×10^8	3.3×10^8	5.48	5.22	-	-
Medium 2	P 5	6.1×10^8	2.6×10^7	3.92	3.91	-	-
	P 126	4.3×10^8	1.3×10^8	3.83	3.83	-	-
	Ped M	3.4×10^8	7.5×10^8	4.14	4.08	2.0×10^3	2.0×10^3
TGE	P 5	9.3×10^8	4.4×10^8	3.68	3.66	-	-
	P 126	1.5×10^9	8.3×10^8	3.61	3.59	2.0×10^3	-
	Ped M	2.1×10^9	1.3×10^9	4.03	4.01	8.0×10^3	8.0×10^3
MRS	P 5	9.9×10^8	8.5×10^8	4.27	4.13	-	-
	P 126	2.8×10^9	1.6×10^9	4.02	3.99	-	-
	Ped M	4.6×10^9	2.6×10^9	4.54	4.34	8.0×10^3	8.0×10^3

* Medium 1: skim milk 10%, glucose 2%, yeast extract 5g/L, MgSO₄ 0.1g/L

Medium 2: isolated soy protein 5%, glucose 2%, yeast extract 5g/L, MgSO₄ 0.1g/L

TGE: trypticase 1%, glucose 1%, yeast extract 1%, Tween-80 0.2%, MnSO₄ 0.033mL, MgSO₄ 0.02mM

* Indicator :

P 5, P 126: *Apiotrichum curvatum* KFRI 632, Ped M: *Lactobacillus plantarum* NCDO

955

15. pH에 따른 bacteriocin titer의 변화

다양한 pH(pH 5.0~7.0)에서 Ped M 균주의 bacteriocin titer의 경시적 변화는 pH 별로 달랐다(Fig. 11). pH 6.0 및 6.5에서는 동일한 양상으로 배양 20시간에 최대치의 AU/ml(4×10^3)을 보여주었으나 배양이 경과함에 따라 급격히 감소함을 보여주었으며 pH 7.0에서는 bacteriocin이 거의 생산되지 않았다. 반면 pH 5.5에서는 비교적 이른 시간인 배양 16시부터 bacteriocin이 생산되기 시작하여 pH 6.0 및 6.5의 경우와 같은 AU/ml을 보여 주었으나 시간이 경과함에 따른 AU/ml의 감소는 관찰되지 않았다. 이것은 pediocin이 post-translational modification에 관여하는 효소의 optimal pH가 산성영역이라는 보고와 일치하였다.

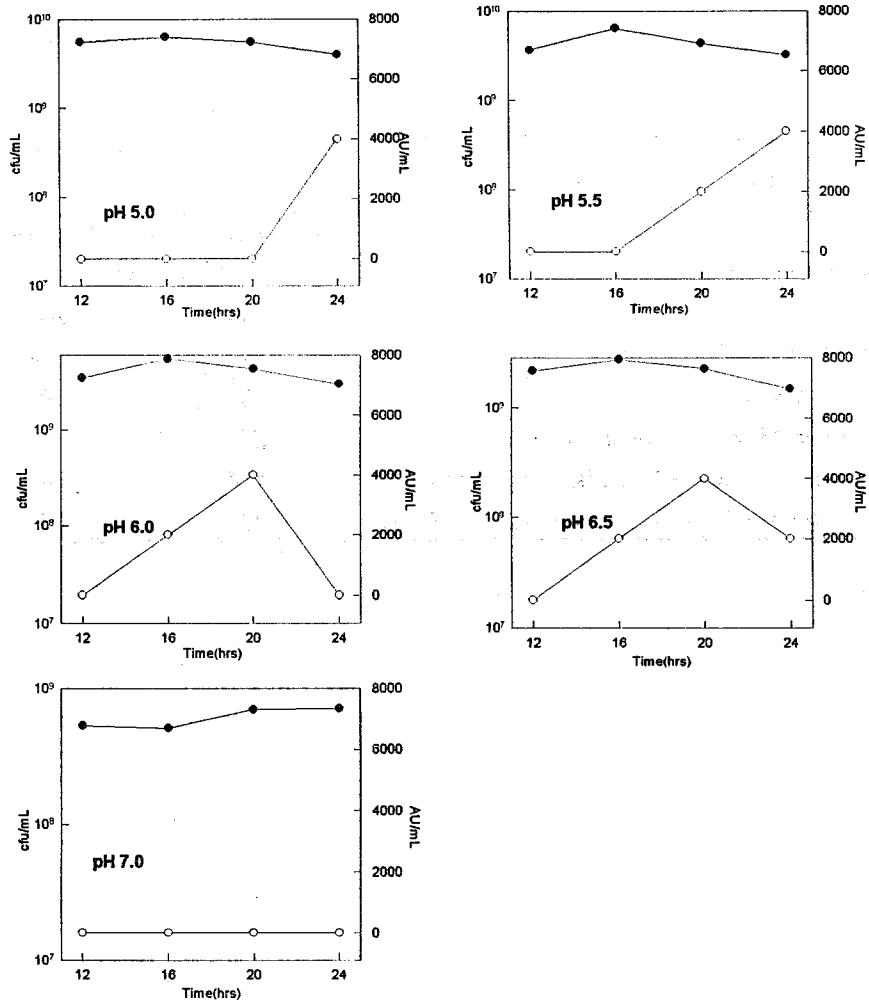


Fig. 11. Cf_u/ml and AU/ml of Ped M strain in TGE broth at different pHs.

- ● - CFU/ml, - ○ - AU/ml

16. Ped M 균주의 frozen stock개발

5가지 동해방지제 중 Ped M의 생존율이 가장 높은 것은 glycerol 15% 이었으며 온도는 -170℃가 -20℃보다 높은 값을 보여주었다(Table 7).

Table 7. Effects of five different cryoprotectants at two different storage temperatures on survival(%) of strains

cryoprotectants	survival rate at 2 storage temperatures	
	-170℃	-20℃
15% glycerol	61	1.4
10% skim milk	25	9
10% skim milk + 1% adonitol	23	7
8% sucrose + 5% skim milk + 1.5% gelatin	36.4	6
8% lactose + 5% skim milk + 1.5% gelatin	32	7

제 4 절 결론

한국의 다양한 발효식품으로부터 bacteriocin 생산균주가 분리되었고 잠정적으로 *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*로 동정되었다. 이들 중 항균범위가 가장 넓은 균주 (Ped M)와 2균주의 PAB(P5, P126)을 혼합 배양하여 젖산과 프로피온산의 경시적 변화를 추적한 결과 이들 균주 system은 서로 공생관계가 있는 것으로 판정되었다. 특히 Ped M 균주는 식중독 유발균, 병원성세균, 여드름 유발균, 소의 유선염 유발균 등 그 항균범위가 실로 광범위하여 향후 이용가치가 높은 균으로 사료된다. 균주 system은 단독으로 사용하였을 경우보다 항균범위가 확장되어 이들을 이용한 광범위 천연식품보존제로서 개발 가능성이 높다고 판단된다.

배양액의 pH를 6.0으로 조절하여 bacteriocin을 cell wall에 흡착시킨 후 원심 분리하여 bacteriocin-cell 응집체를 얻은 후 다시 pH를 2.0으로 조절하여 cell로부터 bacteriocin을 회수하는 방법으로 분리하기 까다로운 bacteriocin을 용이하게 분리하였다. RP-HPLC로 bacteriocin peak를 찾아낸 후 LC-Mass에 의한 정확한 bacteriocin 분자량을 측정할 수 있었다. Ped M 균주가 생산하는 bacteriocin은 기타 pediocin family와 유사한 bacteriocin으로 밝혀졌다.

Ped M 균주가 생산하는 bacteriocin의 titer를 높이기 위하여 pH를 5.0 부터 7.0까지 조절하여 균수의 변화 및 bacteriocin titer를 측정한 결과 pH 5.5가 가장 높은 수치를 보여주었다. 이것은 cell 내부에서 bacteriocin이 processing 될 때, 즉 posttranslational modification 될 때, 산성 pH가 optimum pH인 보고와 일치하였다. Ped M 균주는 산성 pH를 가진 식품 내에서 bacteriocin을 가장 많이, 신속히 만드는 성질은 발효유가 산성 pH임을 감안할 때 매우 효과적이라 하겠다.

균주의 동결보존을 위한 cryoprotectant 및 동결온도는 각각 15% glycerol과 -170°C이었다.

제 5 절 참고문헌

1. 최신양, 이인선, 유진영, 정건섭, 구영조. 김치발효에 대한 nisin의 저해효과, 산업미생물학회지 **18**, 620 (1990).
2. 하덕모, 차동수. *Enterococcus faecium* bacteriocin 생산균주를 starter로 이용한 김치제조, 산업미생물학회지 **22**, 550 (1994).
3. Liu, J.A.P. and N.J. Moon. Commensalistic interaction between *Lactobacillus acidophilus* and *Propionibacterium shermanii*. Appl. Environ. Microbiol. **44**(3), 715 (1982)
4. Salih, M.A. and W.E. Sandine. Inhibitory effect of Microgard on yogurt and cottage cheese spoilage organisms. J. Dairy Sci. **73**, 887 (1990).
5. Ro, S.L., M. Woodburn, and W.E. Sandine. Vitamin B₁₂ and ascorbic acid in kimchi inoculated with *Propionibacterium freudenreichii* ss. *shermanii*. J. Food Sci. **44**, 873 (1979).
6. Fleming, H.P., Etchells, J.L. and Costilow, R.N.: Appl. Microbiol., **30**, 1040 (1975)
7. Fleming, H.P., McFeeters, R.F., Thompson, R.L. and Sanders, D.C.: J. Food Sci. (1983)
8. Fleming, H.P., McFeeters, R.F. and Thompson, R.L.: J. Food Sci., **48**, 982 (1983)
9. Gasson, M.J. and F.L. Davies: J. Bacteriol., **143**, 1260 (1980)
10. LeBlanc, D.J. and F.P. Hassel: J. Bacteriol., **128**, 347 (1976)
11. Lee, L.J. and B.M. Chassy: Appl. Environ. Microbiol., **48**, 994 (1984)
12. West, C.A. and P.J. Warner: FEMS Microbiol. Lett., **49**, 163 (1988)