

농산물 소재를 이용한 노인용 정장 식품개발
Development of intestinal health food
for elderly person using farm products

연구 기관

주 관 연구 기관 : 서울대학교

협 동 연구 기관 : (주) 셀바이오텍

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “농산물 소재를 이용한 노인용 정장식품 개발에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2001년 10월 21 일

주관연구기관명 : 서울대학교총괄

연구책임자 : 지 근 역

연구 원 : 문 성 원

연구 원 : 박 명 수

연구 원 : 김 혜 영

연구 원 : 권 빈

연구 원 : 김 남 주

연구 원 : 권 혜 순

연구 원 : 김 준 성

연구 원 : 김 성 구

연구 원 : 박 세 진

연구 원 : 민 지 훈

연구 원 : 김 수 동

연구 원 : 홍 운 표

연구 원 : 김 진 응

연구 원 : 김 상 범

연구 원 : 김 종 수

협동연구기관명 : (주) 켈바이오텍

협동연구책임자 : 정 명 준

요 약 문

I. 제 목

농산물 소재를 이용한 노인용 정장식품 개발

II. 연구개발의 목적 및 중요성

○ 시중에 시판되고 있는 요구르트 및 발효음료는 주로 어린이 또는 성인을 대상으로 하고 있어 사용균주, 원료 등이 노인의 문제를 해결하기에 미흡하다. 이에 새로운 기능성 정장 소재를 선별하여 신소재에 적합한 발효균주를 선별하여야 하고, 균주의 효소 및 균주의 생리가 체계적으로 조사되어야 하는 필요성이 대두된다.

○ 세계적으로 BIFIDUS균의 이용이 현재까지는 유가공품에 치우쳐 있다. 이는 서양식 식문화의 영향력에 기인하는 것으로서 BIFIDUS균을 우리의 농산물소재 발효에 적합하도록 선별 및 배양기술을 개선 확립할 필요성이 요구된다.

○ 농산물 소재에 *Bifidobacterium*를 배양하고 BIFIDUS Growth Factor로서 과채류를 이용할 경우 기능성 및 영양적 측면의 향상을 도모할 수 있다.

○ 현재 유통중인 요구르트 제품 중의 BIFIDUS균은 10^5 - 10^6 cfu/ml수준이다. 이는 기존의 유제품 공정 설계가 *Lactobacillus*와 *Streptococcus*에 적합하게 설계된 데 기인한다. BIFIDUS 균주는 첨가하지만 증식하지 못하고 오히려 사멸되는 경우가 대부분이다. 본 연구개발은 야채와 과일의 농산물 소재를 주원료로 하고 배양성이 우수한 새로운 균주를 분리하고 농산물 소재에서의 BIFIDUS균의 배양법을 연구하는데 있다. 이를 통하여 기존의 제품에 비하여 중요한 차별화가 이루어지고 제품의 질적 수준이 향상 될 것이다. 특히 외국의 균주들이 우유에 중점을 맞추어 발전하여 왔지만 본 과제는 야채와 과일을 배양 소재로 선정함으로써 국내의 독특하고 차별화 된 균주와 제품을 개발함으로써 노인용 정장제품 분야의 선도적 위치를 점할 것이다.

○ 농산물 발효용 BIFIDUS 유산균은 외국에서 개발되어 있지 않고 이를 이용하는 기술은 우리의 기술진에 의하여 개발되어야 한다. 그리고 우유발효용 유산균의 경우 지금까지 우리나라 유산균 업체들은 계속적으로 기술 전수를 요구하여 왔으나 전혀 이루어지지 않아 유산종균을 계속 수입에 의존하고 있는 실정이다.

○ 발효유는 서양의 문화 식품이며 우리나라의 자연 발효 식품들은 현재 과학화 과정을 거치고 있으나 본 연구 목표와 같이 노인을 대상으로 정장 식품을 개발하는 명확한 목표를 설정함으로써 우리의 자생적인 정장 식품 문화를 효율적으로 정착시킬

수 있다.

○ BIFIDUS 및 유산균을 이용하는 현재의 발효유는 서양의 문화와 원료에 적합하게 발전된 것으로서 우리나라는 우리의 문화·풍토에 알맞게 발전시켜 나아가기 위한 연구 노력이 요망되고 있다.

○ BIFIDUS균은 다른 항원에 대한 항체 생산의 촉진 작용, 임파구의 B세포를 분열, 증식, 촉진하여 마크로파지를 비특이적으로 활성화하고 보체를 활성화시켜 면역능을 증가시켜주는 Probiotic Effect를 가지고 있다.

○ BIFIDUS균은 장내 균총을 정상화하고 따라서 단백질과 지방의 소화흡수 개선, 설사와 변비의 방지 및 정상작용, 간질환의 예방, 유당불내증의 개선, 항암효과, 장내부패 및 유해세균의 억제, 항돌연변이원성, 담즙산 대사 및 콜레스테롤 저하능, 비타민 생합성 등 BIFIDUS균은 영양, 생리학적 및 건강 증진효과를 증대시키는 작용을 하는 것으로 알려져 있다.

○ 본 연구에서는 그 동안 소외되었으나 곧 상당한 구매력 행사를 할 수 있는 노인 계층의 문제 해결을 위하여 노인용 정장 식품이라는 연구 목표를 설정하였다. 이와 같은 본 연구의 새로운 시도는 실질적이고 진지한 산, 학, 연 공동 체계를 구축하였기 때문에 가시적 성과를 거둘 수 있을 것이다. 또한 노인들에게 초점을 맞춘, 우리농산물을 이용한, 기존의 우유 발효유와는 차별화된 제품으로서 면역활성능력 보강까지도 감안한 국산 *Bifidobacterium* 과 *Lactobacillus* Probiotic을 생산하고자하는 것이다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. Bifidus 및 유산균 균주의 농수산 소재별 배양학적 특성 연구

- 농산물 소재별 발효 적합성 검증, 균의 성장율, 발효패턴등 배양학적 연구, 성장 인자 및 관능성 제고 기술 개발

2. 농산물 소재별 가공 적성 연구

-원료의 균질화 기술, 원료 전처리 기술, 원료의 이화학적 특성, 발효균주와 농산물 원재료의 가공적성

3. 발효 균주, 농산 소재 및 발효

-제품 발효 기술

4. 노인의 장내 생리 개선성 균주

- 내산성, 내 담즙성, 독성물질 감소능, 유해균 저해능

5. 종균 생산 및 제품 생산을 위한 발효 공학 기술
 - 종균 대량 배양 기술, 종균 원말화 기술, 농산물 발효 특성 규명
6. 선발균주의 동정, 생리
 - 효소, 발효산물, 유전적 분석을 통한 동정
7. 종균 및 소재의 노인 생리 평가
 - 섭취후의 변비개선 및 균총평가
8. 농산물 전처리 시스템 개발 및 발효 제품 생산 시스템
 - 가공 공정 layout, 발효 적성을 위한 농산물 전처리
9. 품질 개선 및 저장성 향상
 - 저장성 향상, 풍미의 향상, 제품의 성상
10. 발효균주 및 발효제품의 기능성 제고
 - 종균의 혼합기술 및 안정화 기술개발
11. 제품생산공정 및 제품생산
 - 제품생산설비 선택, Pilot Plant 규모 발효실증연구, 생산공정 lay-out 완성
12. 제품 생리 평가 (*In vivo* 실험)
 - 인체 실험 평가 (장내 균총 평가, 독성 물질 평가, 유해 효소 평가, 변비 개선 평가)

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. Bifidus 및 유산균 균주의 농수산 소재별 배양학적 특성 연구
 - 발효 적합 농산물의 탐색 및 균주의 선발과 그 배양 특성의 탐색
2. 농산물 소재별 가공 적성 연구
 - 원료 농산물의 발효를 위한 전처리로서의 균질화와 특성에 맞는 전처리 가공
3. 발효 균주, 농산 소재 및 발효
 - 발효 최적 균주와 농산물 소재를 탐색하여 최적화

4. 노인의 장내 생리 개선성 균주

- 유산균의 생리활성능력의 비교 측정 및 특성화

5. 종균 생산 및 제품 생산을 위한 발효 공학 기술

- 제품생산을 위한 발효조의 조건 탐색 및 동결건조기술

6. 선발균주의 동정, 생리

- 선발된 균주의 유익 및 유해 효소 검증 및 유해물질 감소능 등의 기능성 탐색

7. 종균 및 소재의 노인 생리 평가

- 1차적 임상 실험 평가 및 노인의 장내 균총 변화 조사

8. 농산물 전처리 시스템 개발 및 발효 제품 생산 시스템

- 실험실 규모 발효조 수준에서의 발효제품 생산 시스템 확립

9. 품질 개선 및 저장성 향상

- 동결건조 및 부형제등을 이용한 제품 품질의 향상

10. 발효균주 및 발효제품의 기능성 제고

- 혼합종균에 의한 발효와 그에 따른 기능성의 향상

11. 제품생산공정 및 제품생산

- 혐기 발효에 적합한 제품의 생산 설비 완비 및 혼합발효 설비의 확립

12. 제품 생리 평가 (*In vivo* 실험)

- 실제 목표대상인 노인들의 섭취 인체 실험 평가 완료

SUMMARY

(영문 요약문)

I. Title

Development of intestinal health food for elderly person using farm products

II. Objectives and results

The conventional dairy products have been developed mainly for adults and infants not for elderly person. Bifidobacterium has been also used for fermented dairy products and health foods, which was resulted from western culture. So it is necessary to establish a process for the fermentation of rice and vegetables that is familiar to Korean. We can expect a synergism between intestinal health promoting effect of Bifidobacterium and nutritional and functional effect of vegetables. For these purposes, we screened several lactic acid bacteria, which is good for fermenting several vegetables. The characteristics of fermentation of each lactic acid bacteria for each vegetable were chased. As a result, we have chosen soymilk as the best substrate for fermentation and several aspects of this process was studied and improved. And the best lactic acid bacteria for the fermentation of soymilk were determined. This strain has been identified according to carbohydrate utilizing characteristics and 16S rDNA sequence analysis. The immunostimulating and antimutagenic ability of this strain has been evaluated. The fermentation process for the mass production of this strain has been established and the layout of the pilot plant was obtained. By using these results, we have developed sample products for elderly persons and tested its functionality using this. Several health promoting activity has been tested including intestinal microflora, toxic substances in intestine, harmful enzyme level and improvement of constipation. This research will results in the production of very compatible fermented products for elderly person because this is the first trial to develop health food targeted to elderly person.

CONTENTS

(영 문 목 차)

Chapter1. Introduction	9
1-1. Research objectives	9
1-1-1. Background of research	9
1-1-2. Necessity of research	12
1-1-3. Outcomes of research	16
1-1-4 Applications of research	17
1-2. State of the art of this research field	18
1-2-1. Abroad technical situation	18
1-2-2. Domestic technical situation	21
Chapter2. Search of farm products and optimum fermentative bacteria for probiotics development.	22
2-1. Introduction	22
2-1-1. Methods	22
2-1-2. Results and Discussions	27
Chapter3. Optimization of fermentation and physiological test using selected bacteria and farm products.	63
3-1. Introduction	63
3-1-1. Methods	63
3-1-2. Results and Discussions	70
Chapter4. Improvement of quality and clinical test	86
4-1. Introduction	86
4-1-1. Methods	86
4-1-2. Results and Discussions	88

목 차

제 1 장	서 론	9
제1절	연구개발의 목적과 범위	9
1.	연구 배경	9
2.	연구개발의 필요성	12
3.	기대효과	16
4.	활용방안	17
제2절	국내외 연구개발	18
1.	국외 연구 개발	18
2.	국내의 연구개발	21
제 2 장	농산물 소재탐색 및 발효 최적 유산균 선발분야	22
제1절	서 설	22
1.	연구수행방법	22
2.	연구결과 및 고찰	27
제 3 장	탐색된 균주와 소재를 이용한 발효 최적화와 예비 임상평가분야	63
제1절	서 설	63
1.	연구수행방법	63
2.	연구결과 및 고찰	70
제 4 장	품질개선 및 제품 생리 평가분야	86
제1절	서 설	86
1.	연구수행방법	86
2.	연구결과 및 고찰	88

제 1 장 서 론

제1절 연구개발의 목적과 범위

1. 연구 배경

우리나라도 고령화 사회로 진입함에 따라 대부분 반 건강 상태에 있는 노인의 경제적 구매력이 신장되고 있다. 본 과제는 이들 노인층의 구매력을 농민과 생산자 단체에 환원 시킬 수 있도록 하기 위하여 노인층이 안고 있는 장내의 건강 문제를 해결하는데 도움이 될 수 있는 ‘농산물 이용 정장 제품 개발 과제’를 고안하였다. 노인의 장은 점차 활동이 둔화되어 변비 증상이 심하여 지고 따라서 수백그램에 달하는 장내의 세균총이 유해화하여 각종 독소물질의 농도가 증가하게 된다. 이러한 문제에 접근하기 위하여 본 과제는 장내의 유익균과 정장 능력을 발휘할 수 있는 농산물 식품 소재를 발효 가공적으로 조합하고 평가하여 노인용 정장 제품 개발을 도출할 것이다. 그동안 시판되어 왔던 발효유는 서양의 식문화에 의거한 것으로 노인층의 정장작용에 대한 원료 소재에 관한 고려는 되지 않았다. 또한 우리나라에서의 전통적 농산물 식품 소재 발효 식품은 대부분 *Lactobacillus*와 *Leuconostoc*을 이용하였고 특정 계층의 건강 상태를 대상으로 하지 못하였다. 본 과제에서는 장내의 대사에서 특히 중요한 위치를 차지하는 *Bifidobacterium*을 포함한 유산균주의 효소 및 생리 체계는 물론 노인에게 대한 정장효과를 보유하는 소재를 조합 이용할 것이다.

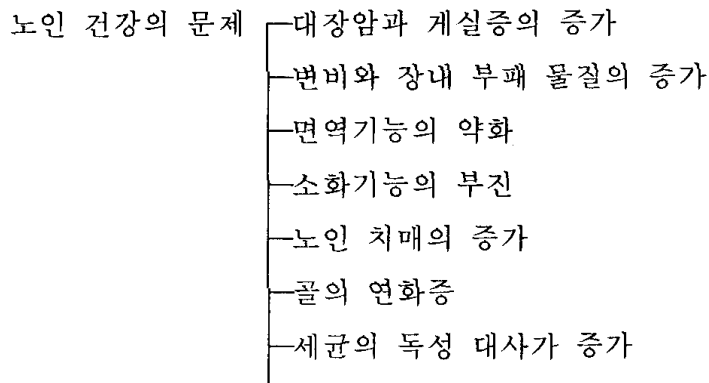
정장용 균주의 선발을 위하여는 암모니아나 아민등의 독성 물질을 소거 이용하고 유해 세균에 대한 길항성을 보유하는 균주를 확보하여 장의 유동성을 증가시켜 변비 개선효과가 기대되는 농산소재와의 접목을 시도할 것이다. 노인의 변비에 접근하는 소재를 탐색하기 위하여는 수용성 섬유질과 불용성 중 독성 물질의 흡착성, 항 돌연변이능, 유익균 증식능 등의 기능을 보유하는 소재를 일차적으로 탐색하여야 하겠지만 노인의 소화기능의 약화 및 영양 상태의 불량을 동시에 해결하여 주는 것도 중요한 문제이다. 따라서 소재의 선정은 다양한 자료들을 면밀히 분석하여야만 실질적인 노인의 장내 정장용 제품 개발이 가능하다. 아직까지 이러한 시도가 없었으나 노인용 정장 제품의 시장이 1,000억원 이상으로 발전하고 특정 계층 대상의 틈새 시장으로 자리잡을 것으로 예상됨에 따라 본 과제의 성공적인 수행은 노인의 장내 건강 증진, 농민과 생산자 단체로의 소득 분배, 외국 기술로부터의 종속화 탈피 및 국외 시장 진출 모색등 다방면에 걸친 파급 효과를 기대할 수 있다.

가. 노령화 사회에 따라 실버 산업의 중요성

본 연구에서는 그 동안 소외되었으나 곧 상당한 구매력 행사를 할 수 있는 노인 계층의 문제 해결을 위하여 노인용 정상 식품이라는 뚜렷한 연구 목표를 설정하였다. 이와 같은 본 연구의 새로운 시도는 실질적이고 진지한 산, 학, 연 공동 체계를 구축하였기 때문에 가시적 성과를 거둘 수 있을 것이다.

나. 고령화 사회에 수반되는 문제점

고령화 사회에서는 노인층의 삶의 질의 향상 문제가 크게 증대하며 특히 노인병을 가진 노인 인구가 증가하여 노인 건강에 대한 요구가 크게 증가한다.



다. 실버 산업의 시장 규모 및 수입 의존도 탈피 필요성

우리나라의 국민 총 소비 지출에 대한 실버 산업 시장 비율은 1996년에 7.1%에서 2010년에는 11.5%로 증가할 것으로 예측되나 현재 국내의 실버 산업은 매우 열악하여 관련 제품을 수입에 의존하고 있는 실정임 - 따라서 앞으로 우리나라의 주도적인 노력으로 관련제품의 국산화가 적극 추진되어야 함

실버 산업 시장 규모 예측 (단위 : 십억원) (한국보건사회 연구원)

구분	1996	2000	2010
국민 총 소비 지출 (A)	145,689	189,167	318,865
실버 시장 규모 (B)	10,465	15,752	36,866
실버 산업 시장 비율 (B/A)	7.1%	8.3%	11.5%

2000년대는 한국 사회가 본격적으로 고령화 사회로 진입하기 때문에 실버산업의 수요가 급격히 증가함

우리나라 노인 인구의 추이

구분 \ 년도	1960	1980	1995	2000	2020
총인구 (만명)	2,502	3,812	4,509	4,728	5,236
65세 이상 노인 인구 (만명) 비율	73 (2.9)	146 (3.8)	266 (5.9)	337 (7.1)	690 (13.2)
평균 수명 (세)	61.5	65.8	72.9	74.3	79.8

현재 국내의 건강 식품이 연간 7,500억원 시장이고 유산균 발효유 시장은 8,000억원 임을 고려할 때 노인용 정장 식품부분에서 1,000억원 이상의 시장이 형성될 것으로 예상됨

따라서 본 연구에서는 향후 실버 산업의 잠재력을 인식하고 노인 질병의 주요 원인으로 작용하는 장내 세균의 독성 물질 생산을 감소시킬 수 있는 정장 유익균과 식품 소재를 결합하여 새로운 유형의 정장 식품을 개발한다. 특히, 개발의 이익이 농산물 소재를 공급하는 농민과 생산자에게 연계되며 수입 식품을 차단하는 국내의 기술 확보를 추구한다. 대부분의 노인은 반 건강 상태에 있으므로 노인용 정장 식품은 기능성 식품의 대표적 적용 분야임

라. 우리실정에 맞는 발효제품 개발

BIFIDUS 및 유산균을 이용하는 현재의 발효유는 서양의 문화와 원료에 적합하게 발전된 것으로서 우리나라는 우리의 문화·풍토에 알맞게 발전시켜 나아가기 위한 연구 노력이 요망되고 있음.

WTO 체제하에서 농산물 시장 개방으로 농가의 심리적인 충격과 국내 농산물 시장에 미치는 영향을 최소화 할 수 있는 국내 농산물 가공에의 연구가 필요. 현재 당근, 유자, 양파, 밤 등의 과채류 등 생과 수요는 포화에 이르러 있고 생산량의 기복이 심하여 이를 위한 가공 제품의 육성이 시급히 요청됨.

향후 과잉생산이 예상되는 사과등에 대한 가공연구로 새로운 형태의 시장 형성이 시급하여 특히 사과박등의 폐기물에 대한 효율적인 이용방안 제시로 생산자단체 소득에 기인하고 환경 오염문제를 해결해야 함.

국내농업의 장기적인 발전을 위하여는 가격 경쟁력과 함께 품질의 경쟁력을 향상시켜야 하나 농업자원의 부존여건이 불리한 우리의 입장에서는 특히 품질경쟁력을 제고하여 수입농산물에 대하여 국내 농산물의 차별화를 도모해야 하는 시대적인 요청이 있음.

국내산 농산물을 고도의 기술과 자본집약적인 가공식품으로 전환함으로써 수입

산 농산물 및 가공식품에 대한 제품차별화를 도모해야 함.

2. 연구개발의 필요성

가. 기술적 측면

- 현재 정장제로 시판되고 있는 요구르트 및 발효음료는 주로 어린이 또는 성인을 대상으로 하고 있어 사용균주, 원료 등이 노인의 문제를 해결하기에 미흡
- 새로운 기능성 정장 소재를 선발하여 신소재에 적합한 발효균주를 선발하여야 함. 균주의 효소 및 균주의 생리가 체계적으로 조사되어야 함.
- 인체의 질병들이 각종 장기에서 일어날 수 있으나 특히 장내에는 100조개(수백 그램의 세균질량)의 세균이 세균 자신의 생존을 위한 대사를 하며 그 결과 인체의 장내 환경을 파괴하는 아민, 암모니아 등 각종 독소물질이 생산됨.
- 세계적으로 BIFIDUS균의 이용이 현재까지는 유가공품 중에 치우쳐 있음. 이는 서양식 식문화의 영향력에 기인하는 것으로서 BIFIDUS균을 우리의 쌀 및 과채류 발효에 적합하도록 선발 및 배양기술을 개선 확립할 필요성이 있음.
- 농산물 소재에 *Bifidobacterium*를 배양하고 BIFIDUS Growth Factor로서 과채류를 이용할 경우 기능성 및 영양적 측면의 향상을 도모할 수 있음.
- 소비자의 다양하고 건강 지향적인 요구에 부응하여 농산물의 기능성과 기호도를 이용하고 비피더스 발효제품 개발과 주요 과채류의 이용증진 개발을 도모할 것임.

현재 유통중인 요구르트 제품 중의 BIFIDUS균은 10^5 - 10^6 cfu/ml수준이다. 이는 기존의 유제품 공정 설계가 *Lactobacillus*와 *Streptococcus*에 적합하게 설계된 데 기인한다. BIFIDUS 균주는 첨가하지만 증식하지 못하고 오히려 사멸되는 경우가 대부분이다. 본 연구개발은 야채와 과일의 농산물 소재를 주원료로 하고 배양성이 우수한 새로운 균주를 분리하고 BIFIDUS균의 고농도 배양 및 사멸 방지 시설이 설치 될 것이다. 이를 통하여 기존의 제품에 비하여 중요한 차별화가 이루어지고 제품의 질적수익이 향상 될 것이다. 특히 외국의 균주들이 우유에 중점을 맞추어 발전하여 왔지만 본 과제는 야채와 과일을 배양 소재로 선정함으로써 국내의 독특하고 차별화된 균주와 제품을 개발함으로써 노인용 정장제품 분야의 선도적 위치를 점할 것임.

- 현재 우리나라의 정장제 기술 발전은 상승적 주기에 있으므로 몇 가지의 기술력을 보완하여 발전 단계를 심화 시켜야 할 것임.
- 한국이 당면하고 있는 농산물의 고 부가가치화 및 수요촉진을 위하여 요구되

는 적합한 균주의 생리활성 및 기능성 연구와 BIFIDUS 균주의 상업적인 이용 가능성, Growth Factor 연구 분야에 대한 기술과 농산물을 소재로 BIFIDUS균에 의한 이용성 증진 등에 대한 기술의 축적이 필요.

○ 국내에서의 BIFIDUS 균의 학술적인 연구는 최근에 시작되었으며 지금까지 주로 서울대의 지근익 교수와 성균관대의 강국희, 인하대 허태련 교수등에 의하여 *Bifidobacterium* 의 학문적인 연구가 다수 이루어졌음. 그러나, 유산균 산업의 외국 의존성을 탈피하기 위한 국내종균 개발 연구는 지금부터 본격적으로 이루어져야 할 것임. 특히 중요한 것은 대학의 종균배양기초 실험도 경제적으로 활용할 수 있는 방법을 개발하는 것에 주안점을 두어야 한다는 것임. 따라서 본 연구를 통하여 생산개발 확립목표를 뚜렷하게 설정하는 것은 대단히 의미있는 작업임.

○ 농산물 발효용 BIFIDUS 유산균은 외국에서 개발되어 있지 않고 이를 이용하는 기술은 우리의 기술진에 의하여 개발되어야 함. 그리고 우유발효용 유산균의 경우 지금까지 우리나라 유산균 업체들은 계속적으로 기술 전수를 요구하여 왔으나 전혀 이루어지지 않아 유산종균을 계속 수입에 의존함.

외국의 업체들은 기술 전수를 하지 않고 현재와 같이 계속 자사의 제품을 국내 업체가 수입하도록 계약을 통하여 각종 규제를 지속적으로 유지하려 함. 지금 기업체에서 지불하는 Royalty는 2% 수준이지만 이것은 국내 회사에 그 업체의 균주를 독점 공급하여 주겠다는 Royalty이지 종균 개발기술을 이전하겠다는 Royalty와는 전혀 다른 개념임. 오히려 농산물 이용 BIFIDUS 발효 개발은 외국의 업체들도 미개척분야이며 우리나라가 선도적 위치에 있기 때문에 경쟁적 우위를 살려 우위국으로 적극적으로 진출할 수도 있을 것임.

○ 특허 및 기술도입과 중복여부에 대한 검토·분석

1) 관련기술의 특허내용과 차이점 비교

- 쌀, 두유, 야채등을 이용한 기존 발효제품 특허는 대부분 *Lactobacillus* 균주를 이용하였으므로 이들과의 중복여부는 없음.
- *Amylolytic Bifidobacterium*을 이용한 쌀 요구르트 제품 개발과 β -Glucosidase 비보유 *Bifidobacterium*의 용도 이용은 본 연구 책임자의 특허 사항임.

2) 관련기술도입 내용과 차이점 비교

- 노인 정장용 균주로 자체 선발된 BIFIDUS 및 유산균주를 확보함으로써 외국의 종균과의 중복은 되지 않으며 균주 특허가 공식적으로 인정된 경우에는 특허권을 확보하므로써 국내 기술에 대한 외국으로부터 기술료 획득도 가능함.

나. 경제·사회적인 측면

○ 경제 발달 및 소득 수준의 향상에 따라서 국민들은 건강 지향적인 상품에 많은 관심을 갖게 되고 기능성 식품에 대한 요구성이 증가됨. 유산균 관련 제품은 계속적으로 수요가 늘어갈 것이나 김치 및 장류의 경우에는 전체 소비량은 감소할 것으로 예측됨.

앞으로의 전망은 자연발효식품보다는 우량종균을 이용한 조절발효식품으로 건강에 대한 위험 인자를 함유하는 제품보다는 생리기능이 우수하고 건강 지향적 발효식품으로 소비자의 선택이 두드러지게 될 것으로 예측됨.

○ 발효유는 서양의 문화 식품이며 우리나라의 자연 발효 식품들은 현재 과학화 과정을 거치고 있으나 본 연구 목표와 같이 노인을 대상으로 정장 식품을 개발하는 명확한 목표를 설정함으로써 우리의 자생적인 정장 식품 문화를 효율적으로 정착시킬 수 있음.

○ 현재의 건강 식품에 대한 일반 소비자의 접근 방법이 많은 경우에 잘못된 정보체계로 맹신적이고 비과학적인 요소를 지니고 있다. 특히 정보력이 약한 노인 계층에서 이러한 문제는 더욱 심각하다. 따라서 노인을 위한 식품의 개발에 대한 논리성 및 과학성을 체계화하고 노인의 건강에 도움이 되는 식품개발이 요구된다.

○ 각 나라와 민족은 고유한 식문화, 체질, 생활 환경이 조성되어 있고 그에 따라 각 민족에 적합한 장내균총이 형성된다. 특히, 한국인들은 유산균 발효 식품을 섭취하여 왔기 때문에 현재 국내 업체에서는 외국에서 수입한 유산균 중에서 우리나라 사람의 기호에 어느 정도나마 근접하는 균주를 다시 선발하는 이중적인 과정을 거침. 따라서 차제에 선발단계에서부터 한국적 원료에 적합하고 한국인으로부터 분리되고 한국인의 기호성에 맞는 특성을 가지는 생리활성이 큰 종균을 선발하는 것이 당면 과제임.

○ 노인층의 건강 지향적 구입 패턴에 비추어 볼 때 생리활성 유산균을 상품화하는 것은 우리나라의 제품 판매전략에 있어서 매우 중요하다고 할 수있음. BIFIDUS 균을 비롯한 유산균 이용식품에 대한 수요가 계속 증가할 것으로 예견하는 것은 다음과 같은 사항에 근거를 두고 있음.

가) 한국인의 식생활 양식이 점차 서구화되면서 부위별 암발생률중 대장암이

1995년 현재 4위로 부상하였고(비교 ; 1975년, 10위) 향후 급속히 증가가 예상되며 또한, 과민성 대장 증세(설사와 변비의 교대증 수반)를 호소하는 사람이 약 300만명임.

나) 점차 노령화 사회에 접어들면서 변비등의 기능적 장애, 장내 부패의 심화등이 노인의 중대한 위험 인자가 되고 있음.

다) 식품의 안전성 문제가 국내외적인 관심으로 부각되는 시점에서 식품 보존료의 대체, 축산 농가의 항생제 남용을 막기 위한 사료 첨가제용 생균제로서의 유산균의 필요성이 증가되고 있음.

○ 현재 발효유와 발효 식품 이외의 정장 유산균 국내 시장 현황은 다음과 같다.
유산균 정장제 국내 시장 현황 (출처 : PharmaMedic Korea)

제 품	업 체	규격	단 가	96년도 생산 실적(백만원)
락토리스	동광제약	1캡셀	96	5,500
동화 락토올	동화약품공업	//	221	10,000
락스티날	한영제약	//	177	8,000
락스틴	한올제약	//	189	800
락티	환인제약	//	198	1,000
비오딘 에스	대우약품	//	172	1,500
비오플 에스	한국화장품	//	170	8,000
올리비올 에스	코오롱 제약	//	170	6,000
올리비올	//	//	140	7,000
벤티룩스	동구약품	1g	142	5,000
누크베비산	보령제약	//	50	6,000
메디락 에스	한미약품	//	161	9,000
바이리스정	제일제당	1정	64	7,000
락토메드정	일동제약	//	39	6,000
비오티스 정	동성제약	//	6	4,000
				합계 : 84,800

· 국내 정장제 총 매출 규모 : 약 840억원

○ 발효식품은 한국의 식품 중에서 중요한 비중을 차지하고 있으며 발효기술이 일찍 한국에서 발달되었지만 선진화하는 데에는 일본보다 늦었기 때문에 세계 시장에서는 그 지위가 약하고 오히려 일본의 발효식품이 한국을 점점 잠식하여 가고 식문화의 예측이 우려되는 상황임.

3. 기대효과

가. 기술적 측면

- 1) 약 1,000 억원 이상의 시장을 형성할 것으로 예상되는 노인용 정장 식품 시장의 선두 제품으로 개발.
- 2) 야채와 과일을 위주로 한 국산 농산물 소재를 원료로 하여 고 부가 가치 제품 개발.
- 3) 노인의 장내 건강 증진을 위한 과학적 접근을 통하여 축적된 기술은 다양한 특정 제품에 알맞는 새로운 제품을 개발하는데 활용 될 것임.
- 4) 농산물 식품 소재의 물리 화학적 구조에 따른 발효 적성 이해.
- 5) 정장 평가 기술은 추후 다양한 상품의 기능성을 평가하는데 이용될 수 있음.
- 6) 편성 혐기성 균인 BIFIDUS를 비롯한 유산균 배양 농산물 발효제품 개발의 핵심 기술 축적
- 7) 현재 발효유 산업에서 전적으로 수입에 의존하는 유산균을 한국인 유래의 유산균으로 대체하고 농산소재를 이용한 유산균 발효 식품제조의 제품화까지 기술확보.

나. 경제·산업적 측면

1) 기술 개발에 따른 예상 수익 :

현재 발효유의 연간 판매액이 8,000억원인 것을 감안할 때 농산물을 이용한 노인용 정장 식품개발이 성공하면 1,000억원 정도의 시장을 형성할 수 있을 것으로 전망. 특히 노인층의 구매력 향상과 건강에 대한 지대한 관심증대는 본 과제의 도출 시기와 부합. 또한 관련 기술의 축적, 균주의 국산화는 당장은 정량적으로 계산으로 할 수 없는 우리의 원천기술이 될 수 있으며 이를 기초로 하여 외국으로의 적극적인 수출도 모색할 수 있게 될 것이다.

2) 생산성 향상에 따른 비용 절감 :

BIFIDUS 등 유산균의 고농도배양 기술의 확립에 의한 균수의 증강에 따라서 동결건조 종균을 사용할 경우에 균주의 활성화를 위한 Bulk Starter의 제조가 필요 없기 때문에 이에 따른 인건비의 절약, 배양시간의 단축에 따른 전기와 물 등의 Utility의 절약, 작업 공정의 단순화와 안정성, 표준화에 따른 생산성의 향상 등으로 비용 절감 효과를 기대할 수 있다.

3) 수입 대체 효과 :

현재 발효유 산업에서 사용되는 균주는 전량 외국에서 수입되고 있으나 본 사업을 통하여 분리한 균주는 농산물 소재에 적합한 균주를 우리나라의 독자적 기술로 확보한 것이기 때문에 수입할 필요가 없다.

4) 수출 기대 효과 :

아시아에서는 일본과 본 과제의 협동연구 기업인 Cell Biotech을 제외하고는 유산균 종균을 제조하는 국가가 없다. 앞으로 중국 및 주변 국가의 경제 성장과 소득 수준이 향상됨에 따라서 유산균 관련 제품의 소비가 늘어날 것으로 예견되기 때문에 본 연구에서 분리된 균주 및 개발된 제품들을 수출 할 수 있도록 적극적으로 모색하게 될 것이다.

5) 당해 기술의 시장성 :

경제 발전 및 소득 수준의 향상에 따라서 건강을 추구하는 경향이 심화되어 가는 현대에 있어서 성인병과 관계된 질병의 예방 및 치료 측면에서 볼 때 야채와 과일 등의 성인병 예방효과와 비피더스 유산균의 정장능을 접목하여 발효 제품을 개발하는 것은 신규 수요의 창출에 기여할 것이다.

6) 산업적 효과 :

장내로부터 유용 균주를 선발, 고농도 배양 및 발효제품화하는 것은 여러 분야의 전공이 요구되는데 여기에는 고도의 정밀화학 및 미생물 유전학, 첨단 실험기기 및 생산설비가 수반되어야 한다. 따라서 이러한 고부가가치 산업의 발전을 위해서는 제반 주변 및 관련 산업의 동시적인 발전 효과를 도모할 수 있다.

4. 활용방안

가. 활용분야:

현재 농산물을 이용한 식품 가운데서 가장 발전하는 분야가 기능성 식품 부문이다. 본 연구에서는 정장 능력을 갖는 균주와 농산물 소재의 조합 기술을 개발함으로써 노인용 정장 기능성 식품으로서 선도적인 위치를 확보하고, 또한 BIFIDUS균 제제와 유산균 제제 등의 생균 제제와 정장제, 동물 사료용 첨가제 등 의약 및 제약업으로의 활용 분야를 넓힐 수 있다.

나. 활용 방안 :

야채와 과일을 이용한 정장용 발효 제품을 개발함으로써 앞으로 야채와 과일의

활용성을 높이는 다양한 연구의 자료를 제공할 것이다.

다. 기업화 및 기술이전 :

본 수행 연구의 결과 중에서 농산물 소재 가공 기술은 농어민 생산단체가 주관하여 이용할 수 있도록 기술이전을 도모한다. 노인을 위한 최종 발효 제품 및 균주 생산은 Cell Biotech 이 담당한다.

라. 추가 연구 :

개발된 본 제품에 의한 영양학적, 임상학적 보완연구가 요망될 것으로 예상되며 제품화를 위한 새로운 농산소재 가공 공장설립시 이에 대한 적용 및 현장보완 실험이 요구된다.

제 2절. 국내외 연구 개발

1. 국외 연구 개발

○서구에서는 주로 유제품 생산을 위한 발효기술이 개발되어 왔는데 독일의 SBI 와 Wiesby, 미국의 Marshall, 일본의 Morinaga, 덴마크의 Chr.Hansen 등은 *Bifidobacterium* 및 유산균의 종균 배양 공정을 철저한 기밀 사항으로 유지하고 있다. 왜냐하면, 종균 배양 기술은 유산균 산업의 핵심적인 부문이기 때문이다.

*Bifidobacterium*에 대한 생리적인 효능 연구는 학문적으로는 많이 이루어 졌다. 그러나 상업용 균주에 대한 기술적인 측면은 기업 기밀로 이루어 졌다. 실제로 미국의 Miles Lab에서는 내산성, 내담즙성(Miles Analecta 자료) *Bifidobacterium* 균주 BBL 을 상업화하여 판매하고 있으나, 생존률이 높지 않은 단점이 있다.

최근에(1994) 덴마크는 혈청 콜레스테롤 저하 작용이 있는 소련의 Causido 균주를 분양받아 Gaio라는 제품을 개발하여 선풍적인 인기를 얻어 넘치는 수요를 충족하기 위한 공장 시설을 확충하고 있으며 세계 각국에 수출 계약을 맺고 있다 (Danish Dairy Board). 같이 현재의 유산균 시장에서는 생존성과 기능성이 높은 유산균이 절대적으로 유리한 고지를 점유하고 있다.

제 조 회 사	개 발 방 향
MD Foods(덴마크)	콜레스테롤 저하 능력 보유 균주인 <i>Enterococcus faecium</i> 균주를 이용한 Gaio 상품 개발
Morinaga(일본)	<i>Bifidobacterium</i> 에 초점을 맞추고 내산성, 내담즙성 종균을 개발하여 유제품 등 다양한 제품에 응용
Marshall(미국)	미국의 유산균 종균 전문 생산 업체로서 Probiotic Culture 개발
Chr.Hansen(덴마크)	유산균 회사 중에서 연륜이 가장 높고 보유 균주가 다양. 유제품 종균, 내산성 및 내담즙성 종균, 각종 제품의 풍미 조절용 종균 등의 다양한 유산균 조합 가능. 균주의 고농도 배양 및 동결 건조 기술도 우위 확보

○ 곡류등 전분질 식품을 재료로 한 젓산발효식품에 관한 연구는 매우 제한적으로 수행되어 왔음. 아프리카 지역에서 옥수수를 이용한 Ogi, KoKo, Kenkey, Uji 및 카사바를 원료로 한 Fufu, Gari등에 관한 기술이 있으나 상업화 되지 않았고 그 이외의 지역에서는 최근에야 비로소 관련 연구가 수행되기 시작했음.

○ 생리활성 균주의 성공사례는 다음과 같다.

■ 1994년 덴마크 MD Foods사의 Gaio 제품

구 분	비 고 사 항
제품명	Gaio
제조회사	MD Foods(덴마크)
사용균주	<i>Enterococcus faecium</i>
기능성	중년기 성인의 콜레스테롤 10 % 감소 효과(6주 섭취후)
판매 개시년도	1994년
판매량	200,000 개/일(150 g 기준)
파급 효과	주문량이 쇄도하여 공장 신설, 우리나라를 포함한 여러 나라로부터 수입 주문 요청. 현재 상기의 균주를 사용하여 한국야쿠르트와 파스퇴르유업에서 생산중에 있음

○ 현재 세계적으로 *Enterococcus faecium*의 안전성에 대한 의문이 제기되고 있는 점에 미루어 볼 때 국내에서는 *Bifidobacterium*과 *Lactobacillus*의 생리기능강화쪽으로 상품화하는 것이 유리함.

○ 노인의 면역능 감소를 높게 유지시켜 줄 필요성이 요구되어지고 있기 때문에 BIFIDUS균의 면역 부활 작용에 대한 관심이 높아지고 있다. BIFIDUS균은 다른 항원에 대한 항체생성의 촉진 작용, 임파구의 B세포를 분열, 증식, 촉진하여 마크로파지를 비특이적으로 활성화하고 보체를 활성화시켜 면역능을 증가시켜주는 Probiotic Effect를 가지고 있다.

이러한 BIFIDUS의 면역 부활능에 대한 연구는 일본 및 유럽에서 활발하게 진행되고 있으며 특히 최근에 일본의 동경대학과 생명과학연구소에서는 비피더스균의 일종의 면역능을 강화하는데 높은 효과가 있는 것을 발견하고 그 원인이 되는 물질을 확인하여 면역학적 측면에서 BIFIDUS균의 효능 및 이용 가치를 입증했다. 또한 BIFIDUS균은 장내 균총을 정상화하고 따라서 단백질과 지방의 소화흡수 개선, 설사와 변비의 방지 및 정상작용, 간질환의 예방, 유당불내증의 개선, 항암효과, 장내부패 및 유해세균의 억제, 항돌연변이원성, 담즙산 대사 및 콜레스테롤 저하능, 비타민 생합성 등 BIFIDUS균은 영양, 생리학적 및 건강 증진효과를 증대시키는 작용을 하는 것으로 알려져 있다.

2. 국내의 연구개발

○쌀을 이용한 유산균음료의 제조법 (한국식품개발연구원, 1990, 한국특허 제 36831호)

○야채발효음료의 제조방법 (한국식품개발연구원, 1989, 한국특허 제 30943호)

○ *Bifidobacterium* 생육촉진 분지올리고당 생산 및 생육인자 탐색 (박종현 박사)

○ *Lactobacillus*를 이용한 쌀요구르트 (목철균 박사)

○ Amylolytic *Bifidobacterium* 분리와 쌀발효 (지근억 박사, 2편)

○ 두유요구르트의 개발 (고영태 박사)

○ 상업용과 표준균주의 콜레스테롤 저하 능력 비교 연구 보고(1995) - 1편
(매일유업과 한림대학교 공동 연구)

○ Rifampicin 내성 *Bifidobacterium* 탐색 연구 - 서울대학교 응용미생물연구센터 연구중

○ 동결건조 기술 확보 - Cell Biotech(주)

○채소의 발효는 외국에서는 많이 이루어지고 있지 않고 채식중심인 동양권, 특히 한국에서 많이 이루어져 왔는데 우리의 김치에 대한 연구는 지금까지 많이 연구되고 있다. 그러나 BIFIDUS균은 김치를 발효시키지 못하고 그 안에서 생존할 수가 없는 것으로 보고 되었다. 국내에서의 BIFIDUS균의 학술적인 연구는 최근에 시작되었으며 지금까지 주로 서울대의 지근억 교수와 성균관대의 강국희, 인하대 허태련 교수등에 의하여 *Bifidobacteria*의 학문적인 연구가 다수 이루어졌다. 그러나, 유산균 산업의 외국 의존성을 탈피하기 위한 국내종균 개발 연구는 지금부터 본격적으로 이루어져야 할 것이다. 특히 중요한 것은 대학의 종균배양기초 실험도 경제적으로 활용할 수 있는 방법을 개발하는 것에 주안점을 두어야 한다는 것이다. 따라서 본 연구를 통하여 농산물, 특히 야채와 과일을 소재로하여 발효기술 개발 및 제품 생산 목표를 뚜렷하게 설정하는 것은 대단히 의미있는 작업이다.

○우유를 제외한 곡류와 과채류의 발효는 여러가지 관능적인 단점을 가지고 있다. 쌀의 젖산균 발효는 풍미를 개선시켜야 하고 과실의 경우 색이 나빠지며 채소의 경우도 풍미와 더불어 조직감의 개선이 요구되는 것이 현재까지의 연구경험이다. 오렌지, 오이, 배추등에서는 맛이 문제가 되지만 사과, 당근, 복숭아등에서는 BIFIDUS균의 생육도 양호하고 관능적으로도 우수하여 추후 연구개발이 요구되고 있다.

제 2 장 농산물 소재탐색 및

발효 최적 유산균 선발 분야

제1절 서 설

1차년도 연구개발 목표는 Bifidus 및 유산균 균주의 선발 및 선발된 균주에 의한 농수산 소재별 배양학적인 특성과 가공적성의 연구로 함축할 수 있다.

노인에게 적합한 정장용 농산물 소재를 탐색하여 선발 유산균의 발효적합성을 알아보는 과정으로 미생물의 성장과 성장인자에 따른 발효 패턴, 관능성과 유산균 균주에 따른 내산성, 내담즙성, 독성물질의 감소능 등의 균주의 생리학적인 특성의 파악이 요구된다.

1. 연구수행방법

가. 한국인의 분변으로부터 bifidus균주의 분리 및 유산균의 분리동정

20대 남,여 지원자로 40여명으로부터 분변을 받는 즉시 혐기성 희석용액으로 십진적 희석을 행한 뒤 분리과정을 행하였다. 사용된 혐기성 배양은 Anaerobic Jar(BBL) 및 Anaerobic Controlled Glove Box(Lab Line Instrument, Inc, U.S.A.)를 사용하였다. *Bifidobacterium*의 선택배지로는 본 실험실에서 개발한 TP배지를 사용하였다. 도말한 후 단일 콜로니를 취하여 현미경하의 형태학적인 특징, gram staining, F6PPK test 등을 통하여 bifidus임을 확인하였고 BHI 및 MRS배지에 계대 보관하였다. 또한 분변 및 다양한 발효식품으로부터 분리 선발된 유산균의 동정을 위하여는 포자 염색, Catalase test, Oxidase Test, O-F Test, Homo-Hetero Test, Dependence Test of pH and Temp., Starch 가수분해능의 측정, Casein Hydrolysis, Litmus milk reactions, Gelatin 액화능, Indole의 생성 (Tryptophan Hydrolysis), Voges-Proskauer test, Hydrogen Sulfide Production, Nitrate 환원능, Methyl Red test, Arginine으로부터의 암모니아 생성, 유일 탄소원으로서의 Citrate의 이용, API 20 STREP의 사용, API 50 CH kit, Biochemical Test 등을 실시하였다. 사용된 배지들로는 CHL Medium(API 50CHL Medium), Arginine Broth (arginine으로부터의 암모니아 생성 시험용 배지), Tryptone Broth (Indole 생성시험), MR-VP Medium, Sodium Hippurate Broth, Sodium Chloride (6.5%) Tolerance Broth, Bile Esculin Slants,

Simons Citrate Broth(Citrate 이용능의 시험) 등이었다. 본 연구에서는 분리 균주, 상업 균주, 공시 균주 및 선행 연구에서의 분리 균주 등을 종합하여 연구하였다.

1) 유전적 분석을 통한 동정 (16s rRNA Sequence Analysis)

가) Primer 제작

16s rRNA sequence를 이용하여 균주를 동정하기 위해서 PCR primer를 제작한다. *Bifidobacterium*에 관한 일반적인 16s rRNA sequence는 GeneBank로부터 구하였다. 우선 두가지의 system으로 나누어 sequence를 시도하기로 하였는데 일반적으로 알려진 16s rRNA의 conserved region은 20bp, 950bp 그리고 1500bp내외에서 존재한다고 알려졌다. 따라서 GeneBank에서 얻은 sequence를 서로 비교하여 공통되는 유전자의 sequence를 바탕으로 5 가지의 primer를 제작하였다.

나) PCR을 이용한 16s rRNA sequencing template 합성

System I은 950bp의 fragment를 가지는 부분으로써 대부분의 *Bifidobacterium*에 해당된다. 여기서 PCR template합성용으로 쓰이는 primer로써 JH01F, JH01R이 쓰이고 PCR product의 sequencing용으로 JH01RS를 사용하였다. System II는 *B. bifidum*이나 *B. lactis*와 같은 균에서 주로 동정이 되는 방법으로 PCR template합성용으로 쓰이는 primer로써 JH02F, JH02R를 사용하였고 PCR product의 sequencing용으로 JH02F를 사용하였다. 16s rRNA sequence의 분석결과 얻어진 950bp와 550bp의 sequence는 World wide web (WWW)의 GeneBank에서 BlastN을 이용하여 다른 균주들의 16s rRNA sequence와 비교 분석하였다.

나. 정장용 농산물 소재 문헌조사

국내에서 생산되는 농수산물을 이용하여 노인용 정장식품을 개발하기 위한 소재를 탐색하기 위하여 동의보감 및 각종민간요법 및 건강관련서적을 조사 하였다. 그 결과 일반 식이에서 설사나 변비에 효과가 있다는 작물을 60여종 이상의 탐색 하였다. 그 중에서 한방에서 쓰이는 대황과 같이 노인정장용으로 사용되기 힘들거나 가공적성에 맞지 않는 작물들을 제외한 작물들을 곡류, 야채류, 과일류, 해조류, 기타로 구분하여 농산물소재 30여종을 실험 대상 소재로 최종 선정하였다

곡 류 : 보리, 현미, 감자, 고구마, 마, 통밀, 메밀, 귀리, 콩
 야채류 : 부추, 배추, 양배추, 버섯류, 파, 무, 쑥, 토마토, 당근, 시금치
 과일류 : 사과, 배, 귤, 복숭아, 바나나, 자두, 살구, 무화과
 해조류 : 미역, 다시마
 기 타 : 결명자, 구기자, 감초, 알로에, 참깨,

다.농산물 소재별 가공 적성연구

농산물 소재의 가공을 위하여 소재들을 크게 곡류, 한약재류와 같이 수분함량이 비교적 낮은 소재와 야채, 과일류와 같이 수분함량이 높은 소재로 양분하여 전처리 하였다. 야채 착즙액의 solute농도가 5%되도록 희석한 액을 8ml cap tube에 담아 밀봉시킨후 과일류, 야채류의 경우는멸균시 열처리에 의하여 그 소재 고유의 성질을 잃지 않도록 하기 위해 영양소 파괴를 최소화 하며 시키기 위하여 96℃, 15sec 중탕가열해준다. 곡류는 그에 비하여 열에 의한 영양소 파괴나 변성 정도가 덜하고 내열성 포자 형성균들의 존재 가능성이 더 높기 105℃에서 3분간 열처리 가공 후 균주 접종을 실시하였다. 가열된 시료를 냉각시킨후, activation된 균주를 100 μ l 접종하여 24시간동안 37℃에서 배양후 배양액을 혐기적으로 희석후 Lactobacillus는 MRS에, Bifidobacterium은 BL배지에 도말하여 다시 24시간동안 혐기적으로 배양하여 colony forming unit을 측정하였다. 곡류열처리 가공시 전분의 농도와 호화도의 관계와 발효정도의 관계를 알아보기 위하여 호화가 잘 이루어지는 소재들과 몇몇 소재의 농도별(3%, 5%, 7%, 10%)로 변화하여 열처리하여 그 물성의 변화와 발효 생균수를 측정하였다. 곡류의 경우는 열처리가공시 호화되어 균질화 되지 않는 특성을 가지고 있다. 따라서 대상 작물중 전분 함량이 높은(따라서 가열 처리시 호화 되기 쉬운)작물을 대상으로 5%고형분함량의 시료에 80℃에서 10분간 shaking water bath에서 호화 시킨후 고형분의 0.02% 수준의 α - amylase 와 glucoamylase 첨가하여 효소처리를 55℃에서 역시 shaking water bath에서 반응시켜 준후 105℃에서 3분간 열처리하였다

라.발효 균주, 농산 소재 및 발효

선발된 농산 소재에 발효용 균주로서는 *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *streptococcus thermophilus*와 비피더스균으로 한국인 분변에서 분리한 균주인 *Bifidobacterium Int 57, kn1-3, KD-56, BB-12* 을 접종하여 균 생육 여부에 대한 예

비실험을 수행하였다. 위의 bifidobacteria 는 내산 내담즙성이 있고 *Int 57* 의 경우는 전분의 분해 효소인 amylase를 내는 효소적특성을 가지고 있는 균주로 전분이 있는 곡류의 발효에 유용할 것으로 예상되어 선택되었다. 곡류는 건조분말 5%의 현탁액으로서 105°C, 3분간 가압 멸균시킨 후 균을 접종하였다. 채소류와 과일류는 extract함량이 5% 되도록 멸균수로 희석하여 함유된 비타민 등의 영양소 파괴를 최소화하기 위해 96°C에서 15초간 증탕 가열하였다. 균을 접종 후 37°C에서 24시간 배양 후 배양액을 혐기적으로 희석한 후 MRS와 BL 고체배지에 도말 배양하여 colony forming unit로 측정하였다.

마.노인의 장내 생리 개선성 균주

1) 내산,내담즙성 균주의 선발

분리된 균주들에 대하여 내산, 내담즙능이 강한 균주를 선발하기 위하여 다음과 같이 실험을 실시하였다. 선발균주의 성장에 pH의 영향을 알아보기 위하여 각각의 균주를 1차 활성화시킨다음 시스테인이 0.05% 첨가된 MRS broth의 초기 pH를 4 N HCl과 0.1N NaOH를 이용하여 7.0, 5.0, 4.5, 4.0으로 각각 달리 조절한후 1%되도록 접종하여 배양면서 균주의 성장을 OD₆₀₀에서 24시간동안 경시적으로 측정하였다. 선발균주의 성장에 대한 담즙의 영향을 알아보기 위하여 각각의 균주를 활성화하여 0.05% 시스테인이 첨가된 MRS broth의 pH를 7.0으로 조절하고 oxgall powder를 0.0, 0.3, 0.5, 1.0 %로 각각 달리 조절하여 배양하면서 균주의 성장을 OD₆₀₀에서 24시간동안 경시적으로 흡광도(Spectronic 20, Milton Roy Company)를 측정하였다. 각각의 실험에서 상대적으로 생장이 우수한 균주들을 1차적으로 선발하였다.

2) 독성물질 감소능

*Bifidobacterium*은 돌연변이 유발 물질인 Trp-P-1 (3-amino-1,4-dimethyl-⁵H-pyrido (4, 3-b) indole), Glu-P-1 (2-amino-6-methyldipyrido{1,2-a:3',2'-d}imidazole), IQ 등에 대한 흡착능을 보유한 것으로 보고된 바 있다. 분변으로 부터 분리된 약 20종류의 *Bifidobacterium* 균주들을 대상으로 *Salmonella typhimurium* 98 균주에 의한 Ames 시험법을 이용하여 Trp-P-1, IQ (2-amino-3-methylimidazo [4,5-f] quinoline), benzopyrene, NQO 등에 대한 항돌연변이 효과를 조사하였다. 아울러 Michigan State University (East Lansing)의 Linz 교수와 유산균주의 aflatoxin binding에 관한 연구를 공동으로 수행하였다. Aflatoxin binding은 ELISA법과 [³H] aflatoxinB₁-binding assay 법을 이용하였다.

3) 장상피 세포주에 대한 부착능 시험

Adhesion assay는 Chauviere et al. (1992)의 방법에 준하여 실시하였다. Caco-2 cell monolayer는 PBS(phosphate-buffered saline)로 2회 세척한 후 균 농도 $1-3 \times 10^9/\text{ml}$ 가 되게 cell line culture medium과 혼합하여 coverslip이 놓인 각각의 well에 첨가 후 5% CO₂ incubator에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응 후 monolayer는 멸균된 PBS로 5회 세척한 후 methanol로 10분간 고정하였다. Caco-2 cell에 부착된 bacteria의 확인을 위해 각 well의 coverslip을 GRAM 염색하고 Caco-2 cell에 부착한 bacteria를 광학현미경상에서 10군데 세었다. 결과는 50개의 Caco-2 cell에 부착한 bacteria로 나타내었다.

4) CSH(cell surface hydrophobicity) assay

CSH assay는 Lim et al (1998)과 Perez et al (1998)의 방법에 준하여 실시하였다. *Bifidobacterium*은 MRS broth에 0.05% L-cysteine · HCl이 함유된 배지에서 정지기까지 배양 후 2,600 X g, 15 min 간 원심분리 하여 균체를 수집하였고 수집된 균체는 phosphate buffered saline(PBS, pH 7.4)로 2회 세척후 OD 0.9 ± 0.05 가 되도록 현탁시켜 bacterial suspension을 만들었으며 이때의 OD를 initial absorbance로 하였다. PBS로 현탁한 bacterial suspension 3ml과 xylene 1ml을 혼합하여 vortex로 1분간 충분히 현탁하였다. 현탁액은 상온에서 20분간 방치하여 층을 분리시킨 후 하층을 취하여 600nm에서 정량하였고 이때의 OD를 final absorbance로 하여 cell surface hydrophobicity를 구하였다.

$$: \text{CSH}(\%) = 100 \times (A_i - A_f) / A_i$$

A_i , initial absorbance ; A_f , final absorbance.

5) Scanning electron microscopy

Adhesion assay가 끝난 coverslip을 2%(v/v) paraformaldehyde, 2%(v/v) glutaraldehyde in 0.05M cacodylate buffer (pH 7.2)로 4°C에서 2-3시간 고정시켰다. Cacodylate buffer로 2회 세척 후 1%(w/v) OsO₄ in cacodylate buffer로 2시간 고정시킨다. 고정된 sample은 ethanol로 10분간 graded series(30, 50, 70, 80, 95, 100%) 방법으로 탈수시키고 HMDS (hexa methyl disilazane)로 2회 각 15분 처리하였다. 탈수가 끝난 Sample은 후드에서 건조하고 금가루 코팅을 실시한 후 scanning electron microscope (JEOL, JSM-5410LV, JAPAN)로 조사하였다.

2. 연구결과 및 고찰

가. 균주의 분리 및 동정

한국인의 장으로부터 유래된 *Bifidobacterium* 100여종 중에서 산과 담즙산에 강한 균주를 선정하였으며, 또 기본적으로 널리 알려진 상업 균주들, 또 발효유 제조에 사용되고 있는 *Lactobacillus*, *Streptococcus* 등 30여 우수 균주를 조사대상으로 압축하였다. 이상의 균주들중 *Bifidobacterium* 5 종류를 비롯하여 유산균 15 종에 대하여 종의 수준까지 동정하였다. 종의 수준까지 분리된 *Bifidobacterium longum* JB35, *Lactobacillus acidophilus* KFRI233, *Streptococcus thermophilus* CH1, *Streptococcus thermophilus* CBT-A, *Streptococcus thermophilus* HM-S, *Streptococcus thermophilus* HM-D, *Lactobacillus bulgaricus* CSCC 2505, *Lactobacillus bulgaricus* KFRI 425, *Lactobacillus brevis* CBT 등에 대한 다양한 특성이 조사되었다. 일례로 *Bifidobacterium longum* JB35의 특성에 대한 조사 결과의 일부는 다음과 같다.

● *Bifidobacterium longum* JB35 균주의 동정

-API Rapid 32A 사용 결과

Test	Reaction	Result
URE	Urease	
ADH	Arginine Dihydrolase	
α GAL	alpha Galactosidase	+
β GAL	beta Galactosidase	+
β GP	beta Galactosidase 6 Phosphate	
α GLU	alpha Glucosidase	+
β GLU	beta Glucosidase	+
α ARA	alpha Arabinosidase	
β GUR	beta Glucuronidase	
β NAG	beta N Acetyl-Glucosaminidase	
MNE	Mannose fermentation	+
RAF	Rafinose fermentation	+
GDC	Glutamic ac Decarboxylase	
α FUC	alpha Fucosidase	+
NIT	Reduction of Nitrates	
IND	Indole production	
PAL	Alkaline phosphatase	+
ArgA	Arginine Aryamidase	+
ProA	Proline Aryamidase	+
LGA	Leucyl Glycine Aryamidase	
PheA	Phenylalanine Aryamidase	+
LeuA	Leucine Aryamidase	+

PyrA	Pyroglutamic ac. Aryamidase	
TyrA	Tyrosine Aryamidase	+
AlaA	Aline Aryamidase	+
GlyA	Glycine Aryamidase	+
HisA	Hisdine Aryamidase	+
GGA	Glutamyl Glutamic ac. Arylamidase	
SerA	Serine Arylamidase	+

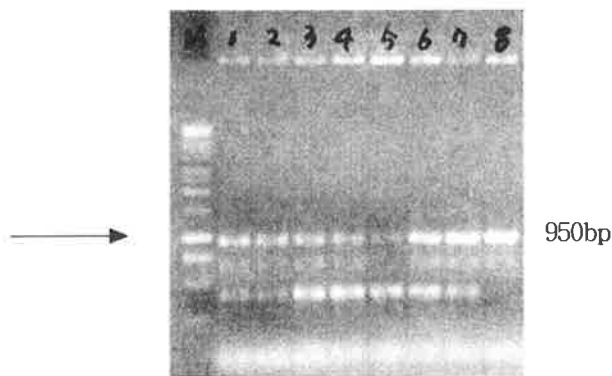
-50 CHL의 사용 결과

	Substrate	Result
1	Glycerol	
2	Erythritol	
3	D Arabinose	
4	L Arabinose	
5	Ribose	+
6	D Xylose	
7	L Xylose	
8	Adonitol	
9	β methyl-D Xyloside	
10	Galactose	+
11	Glucose	+
12	Fructose	+
13	Mannose	+
14	Sorbose	
15	Rhamnose	+
16	Dulsitol	
17	Inositol	
18	Mannitol	+
19	Sorbitol	+
20	α -Methyl-D Mannoside	
21	α -Methyl-D Glucoside	+
22	N Acetyl Glucosamine	+
23	Amygdalin	+
24	Arbutin	+
25	Esculin	
26	Salicin	+
27	Cellobiose	+
28	Maltose	+
29	Lactose	+
30	Melibiose	

31	Sucrose	
32	Trehalose	+
33	Inulin	
34	Melezitose	+
35	Raffinose	
36	Starch	
37	Glycogen	
38	Xylitol	
39	Gentiobiose	+
40	D Turanose	
41	D Lyxose	
42	D Tagatose	+
43	D Fucose	
44	L Fucose	
45	D Arabitol	
46	L Arabitol	
47	Gluconate	+
48	2 Keto Gluconate	
49	5 Keto Gluconate	

1) 16s rRNA Sequence Analysis

본 실험에서는 분리된 균주들에 대하여 염기배열 분석을 시도하였다. PCR을 위한 primer는 본 연구실에서 자체 고안하여 사용하였다. 각 균주에 대한 PCR결과는 아래 사진처럼 950bp의 fragment들을 효율적으로 얻었다.



M : 1kb ladder

이 fragment를 gel extraction하여 JH01RS primer를 이용하여 sequencing을 시도하였다. 각각 균주별로 sequencing을 하여 GeneBank의 BlastN으로 search해본 결과는

다음과 같다.

· yh28 균주 (97% identity)

Bifidobacterium pseudocatenulatum DNA for 16S ribosomal RNA, partial
sequence

Length = 1519

Score = 716 bits (361), Expect = 0.0

Identities = 423/440 (97%), Gaps = 3/440 (0%)

· 91번 균주 (97% identity)

Bifidobacterium longum 16S ribosomal RNA.

Length = 1477

Score = 381 bits (192), Expect = e-104

Identities = 205/211 (97%)

· J11번 균주 (97% identity)

B.lactis DNA 16S and 23S ribosomal RNA

Length = 2104

Score = 583 bits (294), Expect = e-164

Identities = 344/354 (97%), Gaps = 5/354 (1%)

· 138번 균주 (95% identity)

Bifidobacterium longum 16S ribosomal RNA.

Length = 1477

Score = 266 bits (134), Expect = 1e-69

Identities = 153/160 (95%)

· 191번 균주 (96% identity)

Bifidobacterium longum 16S ribosomal RNA.

Length = 1477

Score = 613 bits (309), Expect = e-173

Identities = 344/355 (96%), Gaps = 2/355 (0%)

· knj03번 균주 (98% identity)

Bifidobacterium longum 16S ribosomal RNA.

Length = 1477

Score = 664 bits (335), Expect = 0.0

Identities = 360/367 (98%), Gaps = 2/367 (0%)

· JH01 균주 (99% identity)

Bifidobacterium bifidum KCTC 3202 16S rRNA gene.

Length = 1488
Score = 718 bits (362), Expect = 0.0
Identities = 364/365 (99%)

· Mk09 균주 (99% identity)

B.lactis DNA 16S and 23S ribosomal RNA

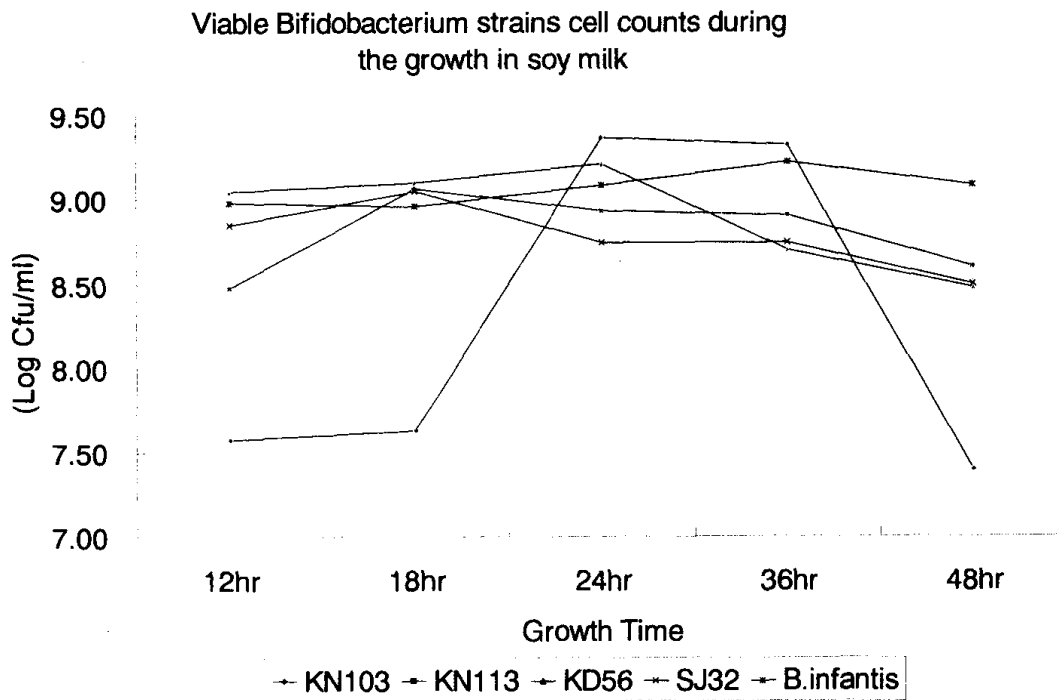
Length = 2104
Score = 692 bits (349), Expect = 0.0
Identities = 393/404 (97%), Gaps = 5/404 (1%)

이상의 결과로서 본 연구진에서 사용하는 *Bifidobacterium*의 16S rRNA 동정은 대부분의 경우 종의 수준까지 정확하고 신속하게 수행할 수 있었다. 그러나 *B. longum*과 *B. infantis*간에는 99% 상동성을 보여주어 23S rRNA 또는 internal region sequencing 개발이 보완되면 좋을 것이다.

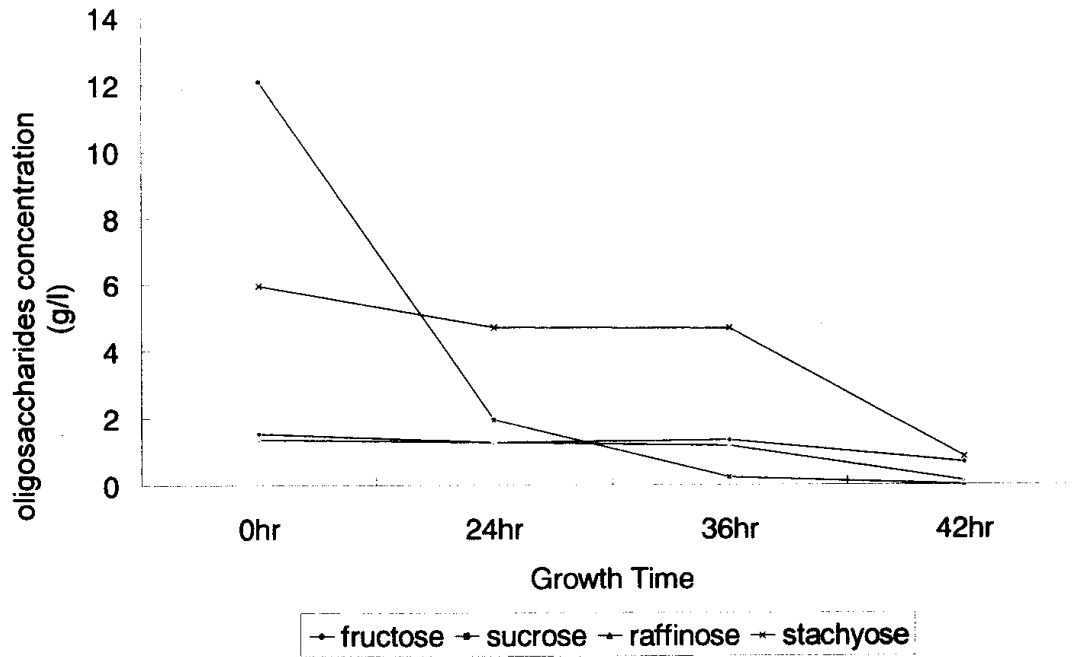
나. Bifidus 및 유산균 균주의 농수산 소재별 배양학적 특성 연구

농산물 소재의 발효능과 발효 패턴 균의 성장률을 알아보기 위하여 우선적으로 선택된 작물에 접종하여 생균수 및 발효 패턴, 향기, 응고정도, 관능성 등을 조사하였다. 이들 실험은 최소 3반복을 통하여 이루어 졌으며 결과는 이들값의 평균치이다. 감초의 열처리 후 물성의 변화는 없었다. 맛은 초기에 단맛에 뒷맛이 씹혔으나 발효 후 전체적으로 풀 냄새와 같은 감초 냄새가 나고 각각의 발효패턴에 따라 균주별 차이를 나타내었다. *Bifidobacterium*의 경우 냄새가 감초 냄새와 같이 상큼하다. (훌륭한 flavor는 아님) *Lacidophilus*의 경우는 약간 상한 듯한 채소 냄새, *L. casei*, *Str. thermophilus* 역시 풀냄새와 우유 발효에서와 같은 특징적 냄새와 함께 감초 풀냄새가 섞여 그리 유쾌하지 못한 냄새가 발생했다. 맛은 모두 감초의 단맛이 지배적이며 시큼한 것을 크게 느낄 수가 없었다. 표고 버섯의 경우는 관능적으로 진한 버섯냄새와 약간의 산취가 났다. *Lactobacillus*의 발효에서는 버섯의 향기와 섞여서 역한 냄새로 유제품의 발효에서와는 비슷한 패턴의 발효를 하는 것으로 보이나 버섯의 강한 냄새와 어울리지 않았다. *Str.thermophilus*와 *Bifidobacterium*의 발효결과 관능적으로 유사했다. 구기자 냄새는 *Bifidobacterium*의 경우는 시큼한 냄새와 함께 시중 판매되는 당근쥬스와 비슷한 맛과 향을 낸다. *Lactobacillus*의 향기는 당근쥬스와 비슷하면서 달콤한 향미를 지닌다. 산소를 제거하기 위해 넣은 cysteine 첨가균은 변화가 적으나(상층과 하부 침전층으로 나뉨) pH조절균의 경우 단백질이 응고한 것과 같이 중간부터 윗쪽으로 응고물이 생겼다. 또 흔들여 줄 경우 pH 조절균의 경우 하부층이 잘 섞이지 않는다. 깨의 경우 6×10^8 (깨 pH7 kn103)이 자란 경우에 산 냄새가 조금 났으며 맛은 깨의 맛이 지배적으로 나타났다. 전반적인 곡류의 맛은 산취가 대부분 생성되나 그 정도가 크지는 않았다. 맛이 크게 나쁘지는 않았기 때문에 단독발효보다는

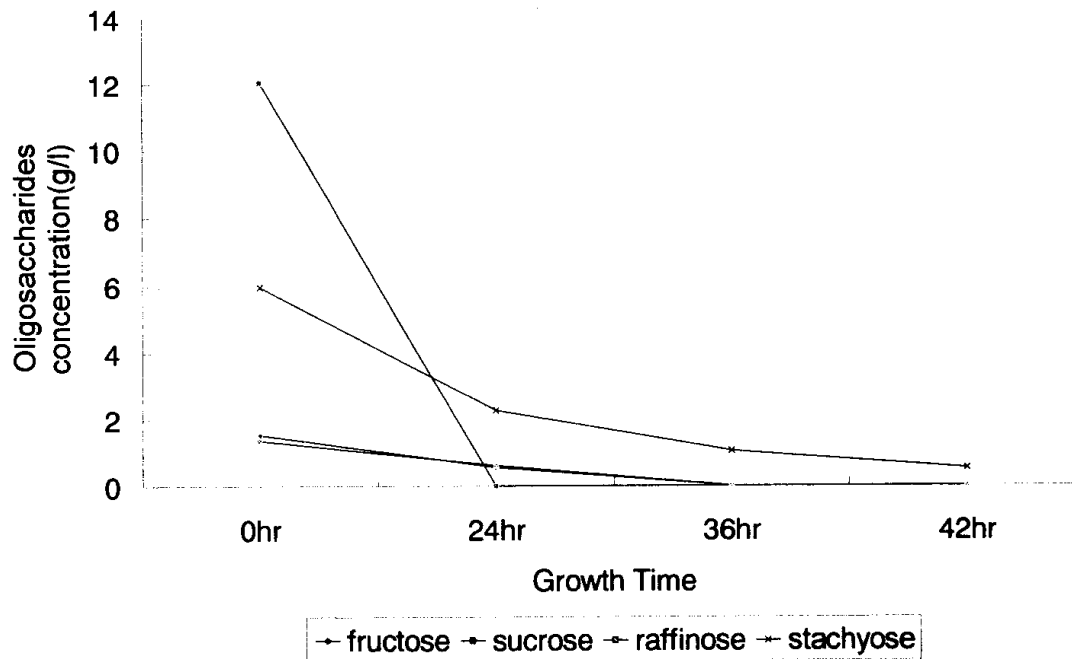
첨가물로 감미 처리를 한다면 맛은 보강 될 수 있다고 사료된다. 옥수수외의 경우 콩 비린내와 같이 산 냄새가 났음 시큼하고 별 맛은 없다. 쭉의 경우는 분말형태의 고형분을 사용한 결과 뭉쳐있는 상태여서 10%고형분 함량의 실험군 경우 정확한 실험적 결과를 얻기가 힘들었다. 따라서 낮은 농도의 고형분을 사용하여 재실험이 요구 된다. 다시마는 (알긴 성분이 rink를 형성하였는지) 쨍과 같은 형태로 끈적한 점성의 성질을 나타내었다. 대두의 활용가능성이 높은 것으로 생각되어 대두유 발효에 관한 실험을 더욱 진척시켰다. 대두에 적합한 균주를 선발하기 위하여 접종후 24시간의 생균수를 측정 비교적 적응성 및 향기가 좋은 균주를 선발하였고(kn103, kn113, KD56, SJ32, *B. infantis*) 이를 가지고 연속적인 생균수를 측정과 함께 glycosidase 특성을 관찰하기 위해 α -galactosidase, β -galactosidase, β -glucosidase 활성을 탈지유와 비교하였다. 선발된 균주들의 당이용능 특성을 알아보기 위하여 발효이후 시간대별로 HPLC를 이용하여 당이용성을 조사하였다.



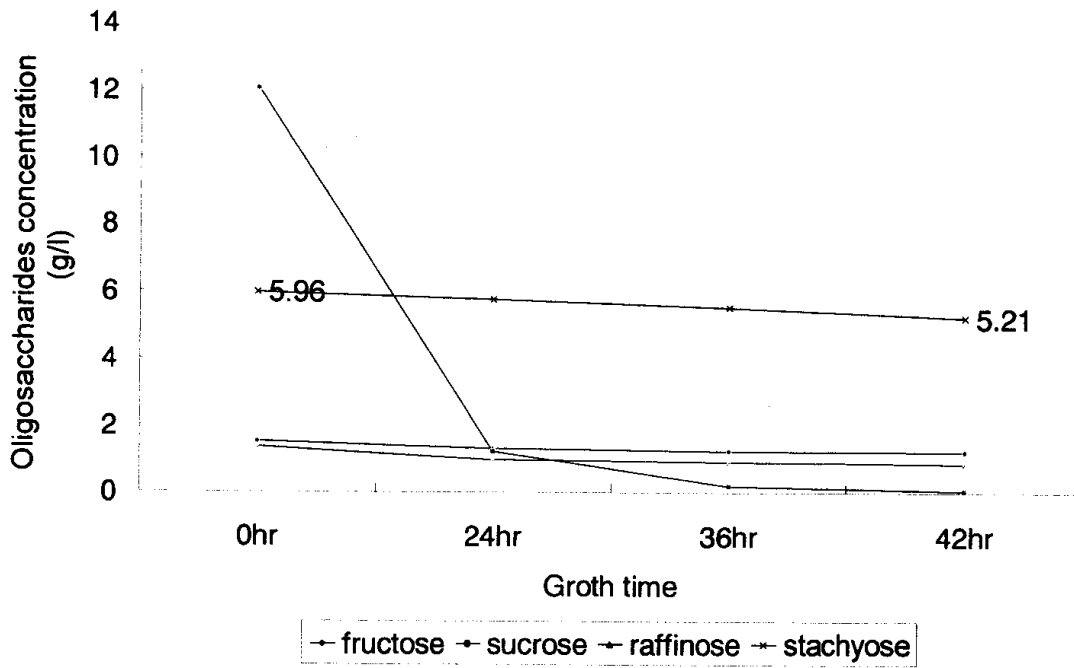
Utilization of oligosaccharides in soymilk (KN103)



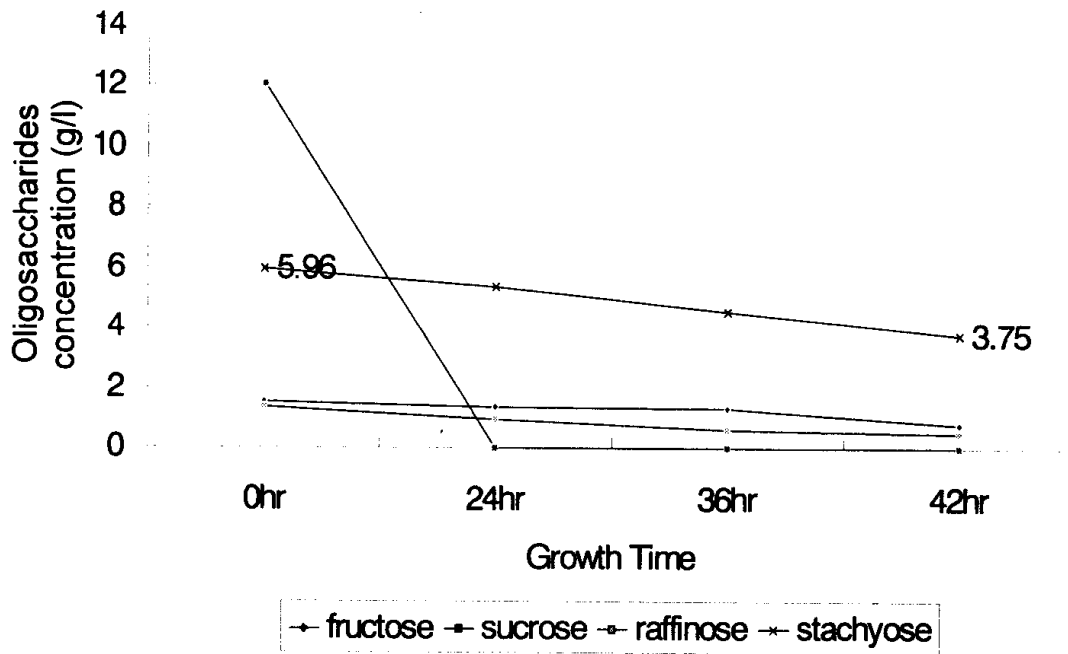
Utilization of oligosaccharides in soymilk(KN113)



Utilization of oligosaccharides in soymilk(KD56)



Utilization of oligosaccharides in soymilk (SJ32)



다. 농산물 소재별 가공 적성연구

메밀, 콩, 다시마, 썩, 마, 다시마 가루등을 각각 3, 5, 7, 10% 로 배지를 만들어 kn1-3 를 접종, 각시료의 가열후 상태변화 및 발효폐턴, 생균수 변화 등을 알아보았다. 메밀의 경우는 농도에 비례하여 고형분(호화나 젤화 된듯한)이 침전되었다. 고형분은 섞이지 않았고 농도에 관계없이 생균수가 나타났다. 상층부는 탁한용액으로 장기간(몇시간) 방치하면 맑은 층과 탁한층으로 분리 되었다. 콩의 침전 고형분은 %농도에 비례(흔들면 고르게 섞이기는 하나 %가 높을수록 덜 섞임)하였다. 발효 후 응고되기 때문에 유제품의 응고와 비슷한 양상을 가지고 있다. 다시마는 %농도에 비례하여 침전 발생하였다. 침전보다는 cross link가 이루어져 끈적한 점질 물질이 되므로 균의 A.W.나 균질화등이 문제가 될 것으로 생각된다. 그러나 낮은 농도에서는 이러한 문제가 발생하지 않았다. 썩은 비교적 고른 분포를 보이나 5%정도의 점도가 실험시 균질성 및 가공적성이 가장 알맞은 것으로 판단된다. 마의 경우 가공후 섞이지 않는 고형분의 침전응고가 발생하였다. 실험의 결과 곡류의 성상이 가열 및 발효 후 낮아지는 pH에 따라 응고되는 문제가 발생하는데 이러한 경우 고형분말을 5%정도의 농도로 낮추어 시험을 하면 대부분의 경우 양호한 실험의 결과를 얻을 수 있는 것으로 나타났다. 곡류 배지의 경우 효소처리를 한 결과 모두 액체상태의 성상을 갖추어서 발효에 적합한 상태를 만들 수 있었다. 호화시 감자와 메밀의 경우 아래에 고형분이 침전되었다. 각각 약간의 침전물이 발생하였으나 유의할 정도수준은 아니었다. 곡물 배지의 성상은 열처리 이후에도 변화가 없었다.

라. 발효 균주, 농산 소재 및 발효

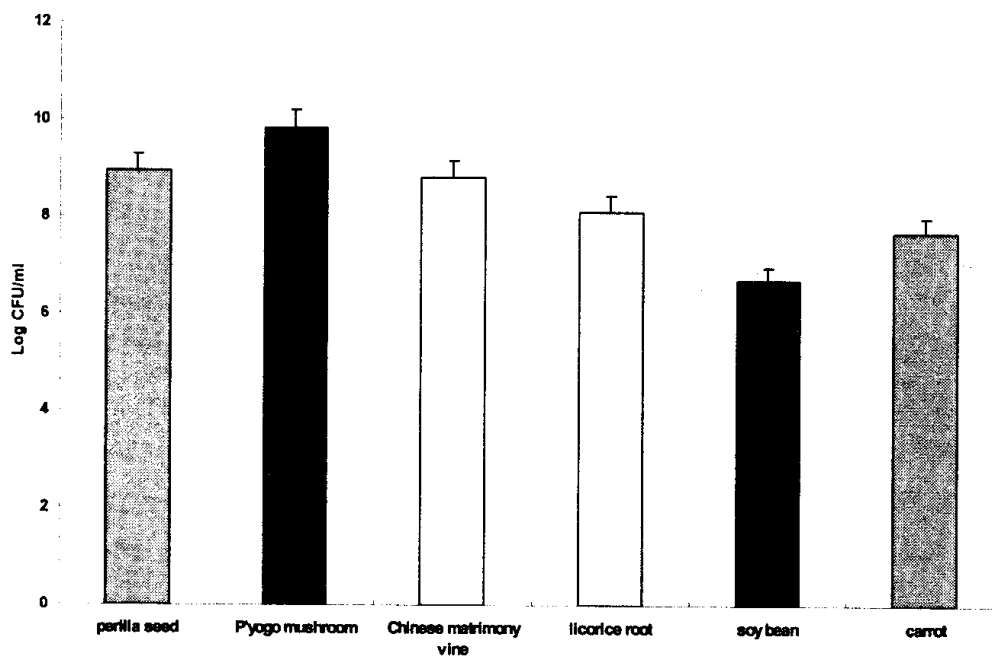
-제품 발효 기술

고형분말 5% 농도와 extract 농도를 5% 로 맞춘 여러 가지 농산물 소재 배지에 각각 무가공균, pH7 보정균, cysteine 0.05%첨가균, pH 보정 및 cysteine 0.05% 첨가균으로 나누어 *L. acidophilus*, *L. casei*, *Str. thermophilus* 및 몇종의 *Bifidobacterium*을 접종해 24시간 배양 후 발효적합성을 비교하였다.

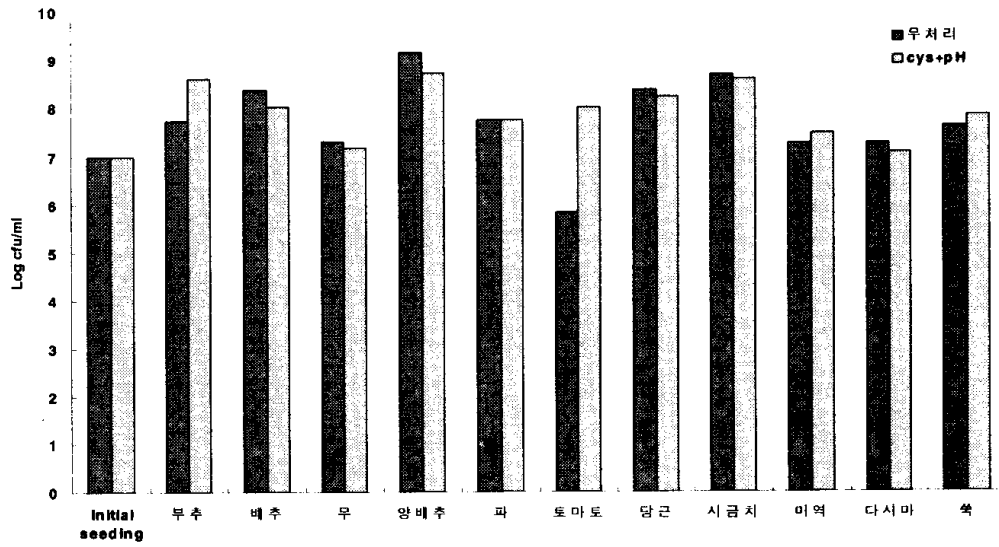
Amylase 의 효소적 특성을 가진 *Bifidobacterium* 인 Int-57의 경우는 산소에 대하여 민감한 반응으로 cysteine 처리 균에서 우세하였으나 기대하였던 전분분해에 의한 발효능은 약한 것으로 나타났다.

*L. acidophilus*의 경우 표고버섯에서 가장 생육이 우수하였고, 들깨, 구기자, 감초에서는 비슷한 수준이었으나 콩가루와 당근에서 10^7 cfu/ml 수준으로 비교적 생육이 낮았다. 여러 가지 야채에 *Lb. acidophilus*를 첨가하여 발효시킨 결과 부추 양배추와 당근, 시금치, 썩에서 초기 접종농도보다 높은 균수가 관찰되었으나, 이를 부추와 양배추에

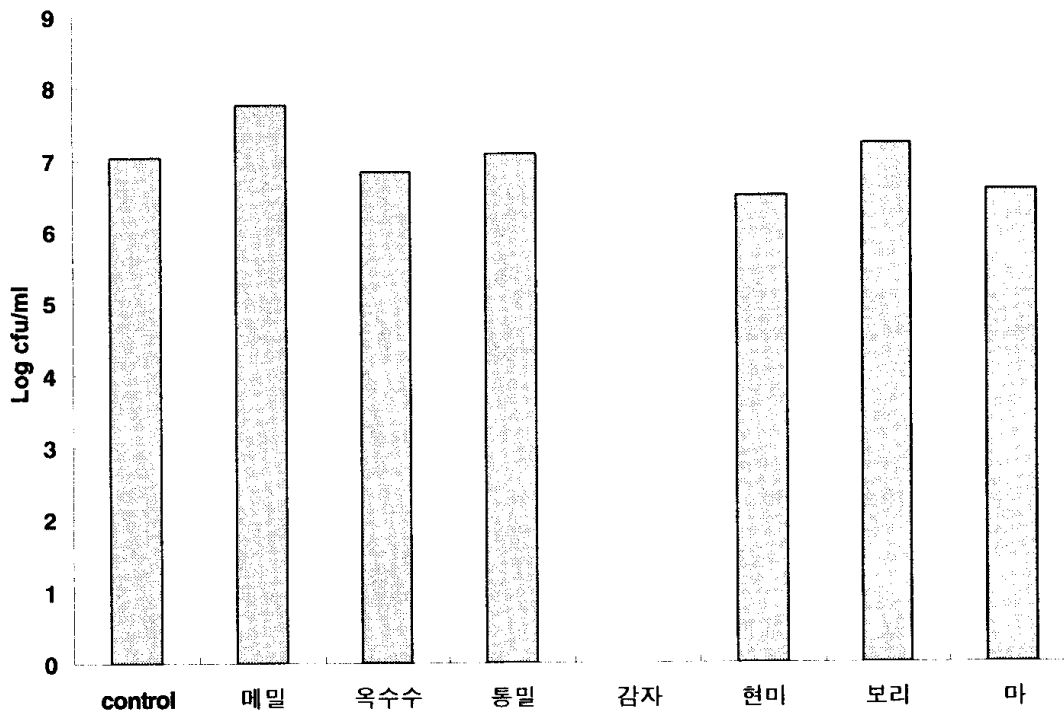
는 함유되어 있는 황냄새가 강하게 작용해 맛과 냄새에 있어 관능적 수용도를 현저히 감소시키는 것이 확인되었다. 이에 반해 토마토와 당근의 관능적 수용도가 비교적 좋은 편이었던 한편, 토마토의 경우 초기 즙액 자체의 발효능은 10^6 이하로 상당히 낮은 편이었으나 cysteine을 첨가하고 pH를 7.2로 보정한 후 발효능이 10^8 수준으로 증가한 것을 확인할 수 있었다. 이는 아래 Table에서 보는 바와 같이, 토마토의 경우 초기 pH가 다른 시료들에 비해 현저히 낮아 젖산균의 최적 pH범위를 벗어난 때문으로 사료되며, 이는 pH를 조정하면 발효능이 월등히 향상된 점으로 검증되었다고 볼 수 있다.



Growth of *Lactobacillus acidophilus* 145 in farm products

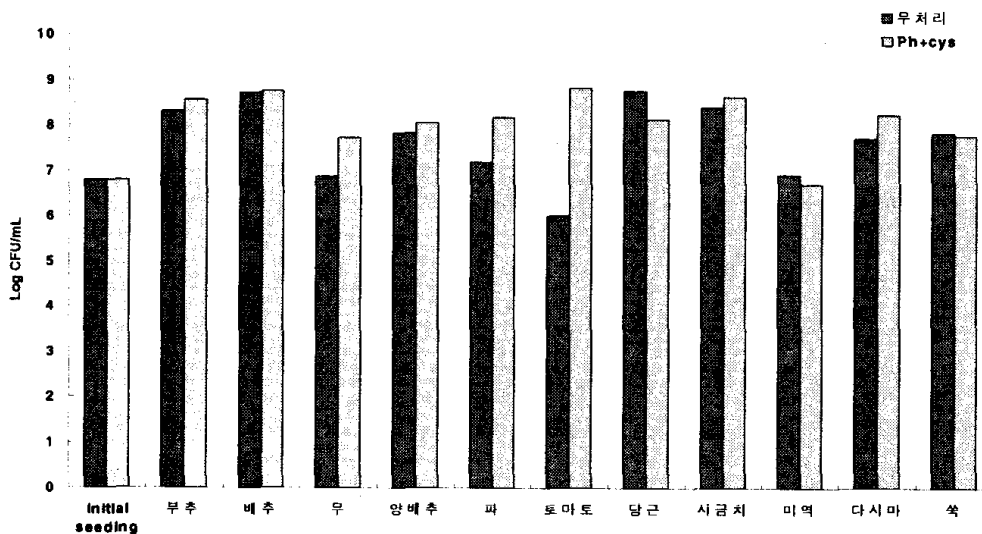


Growth of *Lactobacillus acidophilus* 145 in various vegetables

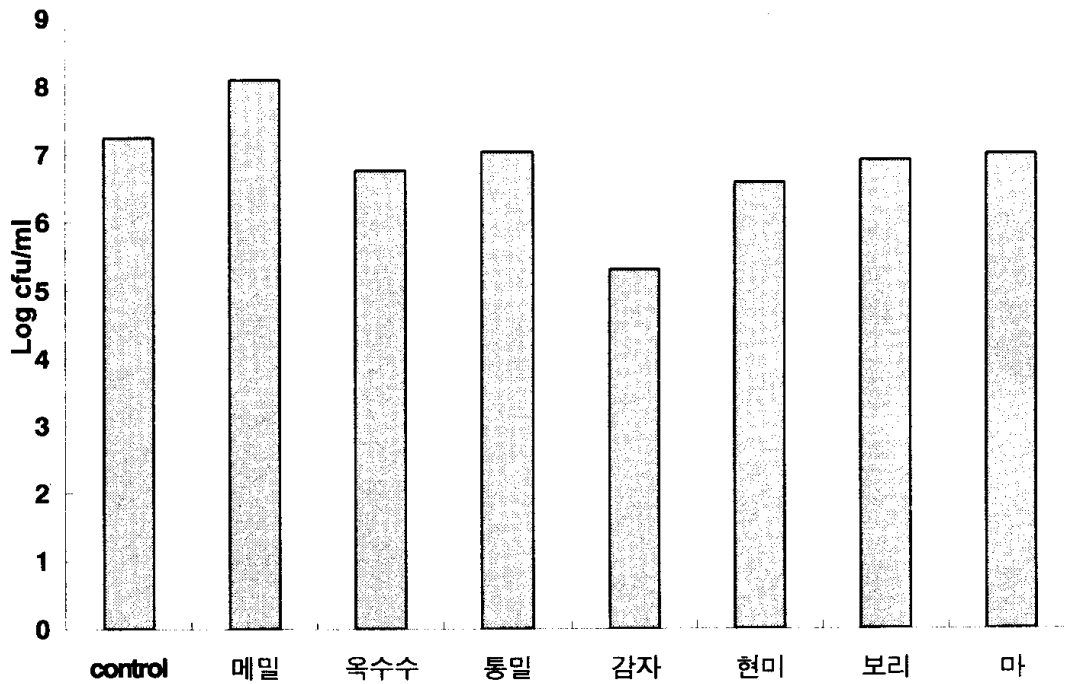


Growth of *Lactobacillus acidophilus* 145 in various grains.

*Bifidobacterium*으로서 KD56을 첨가하여 야채발효능을 비교한 결과 초기 접종농도에 비해 부추, 배추, 양배추, 파, 당근, 시금치, 다시마, 쑥에서 우수한 발효능이 관찰되었다. 또, 토마토의 경우에는 pH를 조절하고 cysteine을 첨가해준 결과 10^8 수준으로 발효능이 크게 향상되는 경향을 보였다. kd56균주를 발효에 이용하는데 있어서도 pH가 조절되고, cysteine이 첨가된다면 발효능이 우수할 것으로 사료된다. 그러나 발효후 *Lactobacillus*의 발효에서와 마찬가지로, 부추, 배추, 양배추, 파, 시금치등에서 불쾌취가 많아 관능적 수용도가 현저히 감소하는 점을 미루어 토마토, 당근이 발효능도 우수하며, 발효후 수용도 역시 높은 소재로 사료되며, 이외의 소재들도 우유나 두유등과 혼합하여 적절한 가미를 통해 관능특성이 조절된다면 발효액으로서의 이용 가치가 충분히 있다고 사료된다.

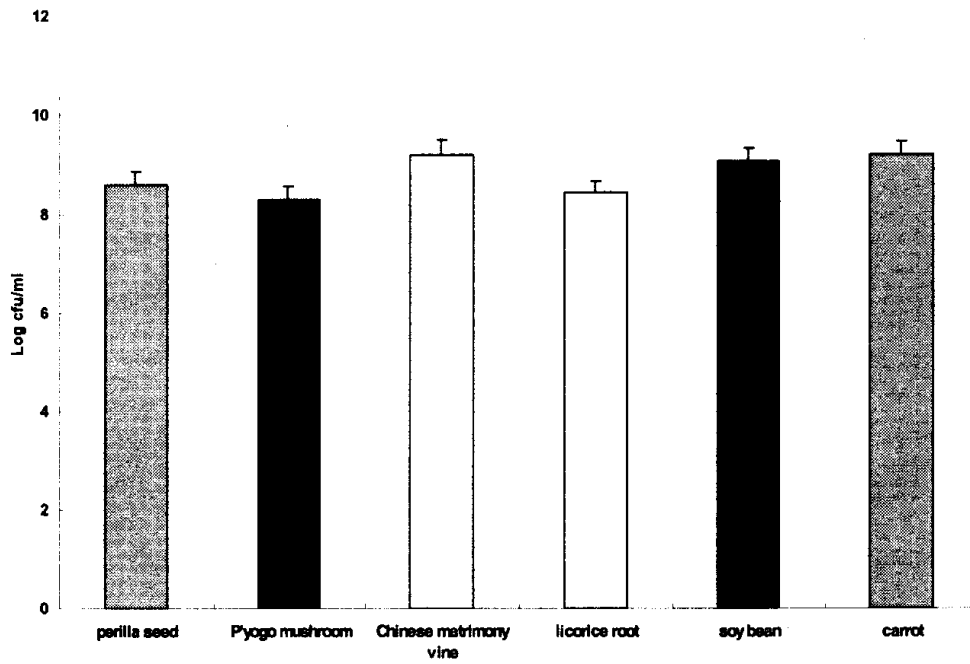


Growth of *Bifidobacterium breve kd56* in various vegetables

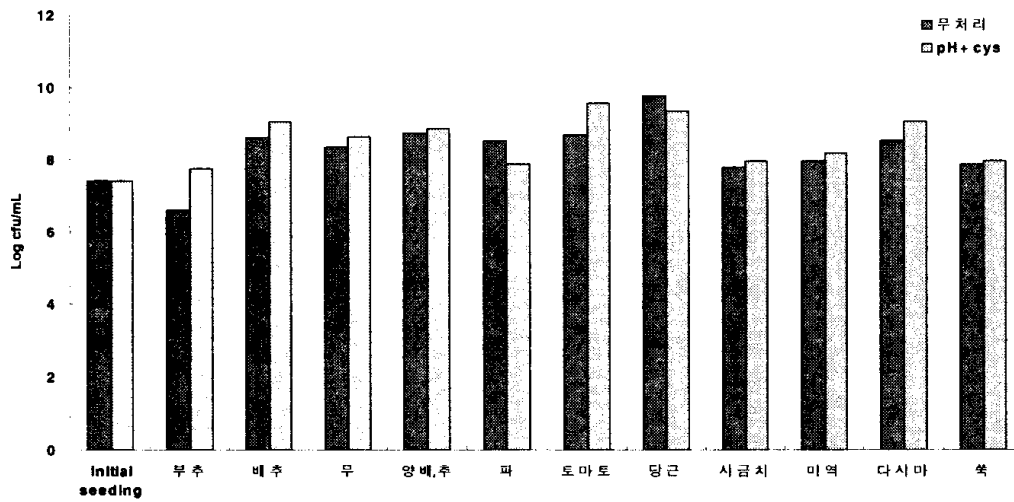


Growth of *Bifidobacterium breve kd56* in various grains

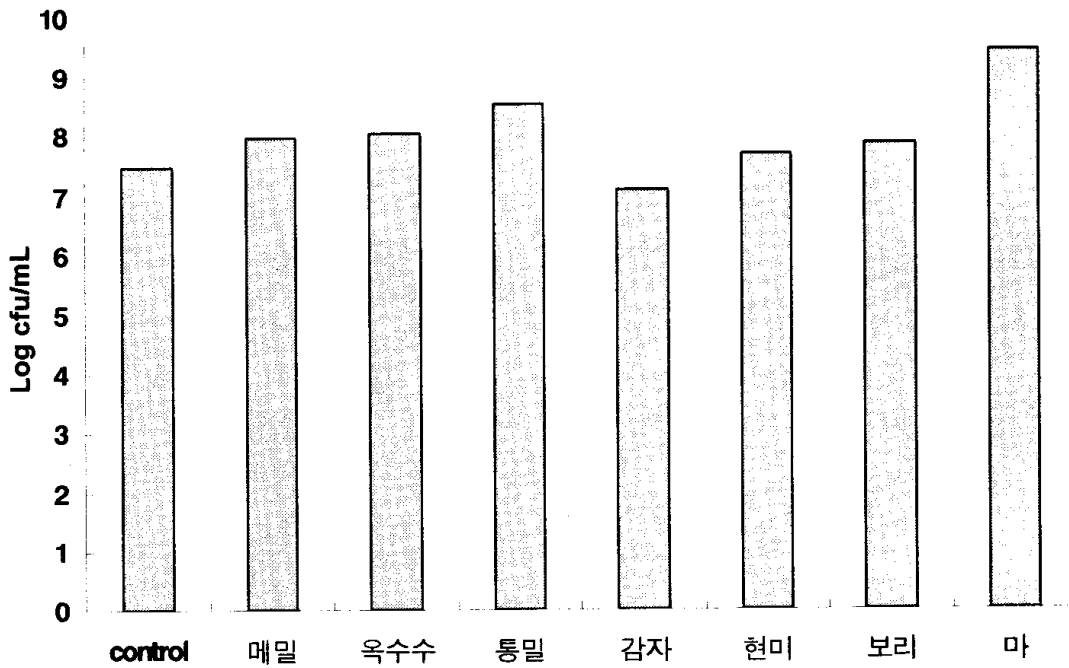
한편, *L. casei* 는 시료간의 차이는 적었고 모든 소재에서 10^8 cfu/ml 이상으로 높은 발효 적성을 보였다. 비피더스속에 속하는 kn1-3의 경우 10^7 - 10^8 cfu/ml 의 비슷한 분포를 보인 가운데, 들깨에서 10^8 cfu/ml으로 가장 생육이 우수하였고, 들깨를 제외한 소재들은 유산균주에 비하여 10 - 10^2 cfu/ml 정도 적게 성장하였다. *Lb. casei*를 일정 농도로 접종해 그 균수를 통해 발효능을 확인한 결과 접종 균수에 비해 모든 소재가 더 높은 발효능을 보여 *Lb. casei*의 경우 모든소재에서 균 성장이 안정적임을 확인할 수 있었으며, 뚜렷한 pH 조절과 cysteine 첨가의 영향은 관찰되지 않은 점으로 미루어 pH나 소재의 혐기도와 관련 없이 안정적인 성장을 보임을 확인할 수 있었다.



Growth of *Lactobacillus caesi* 911 in farm products

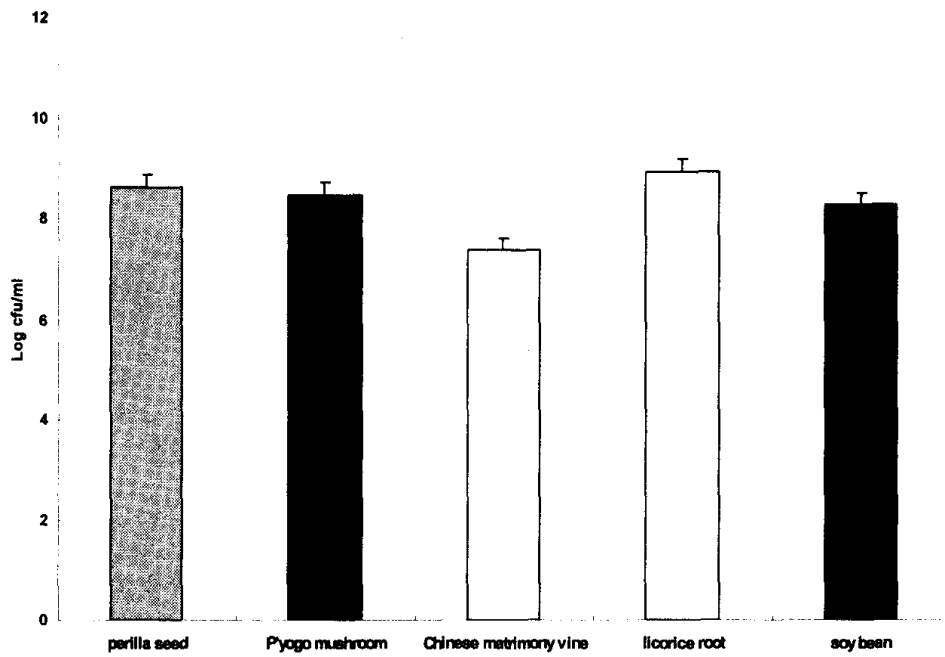


Growth of *Lactobacillus casei* 911 in various vegetables

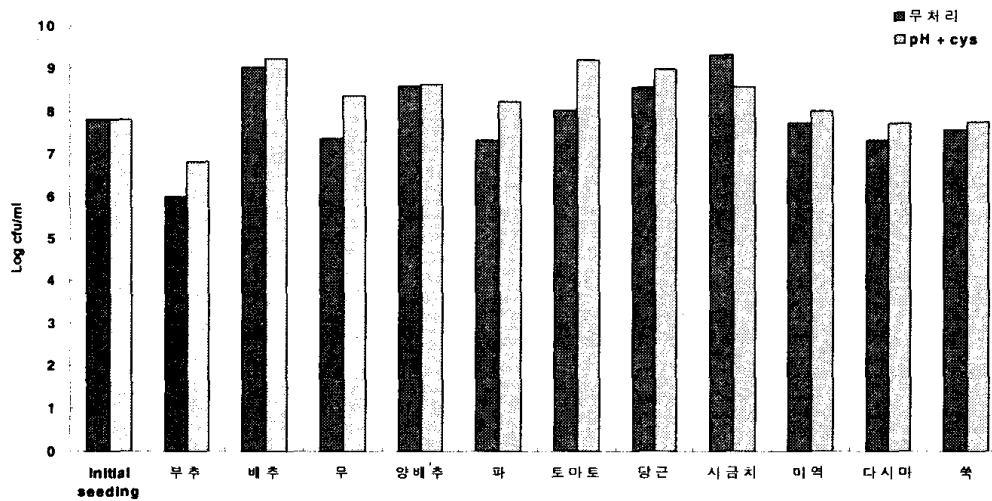


Growth of *Lactobacillus casei* 911 in various grains.

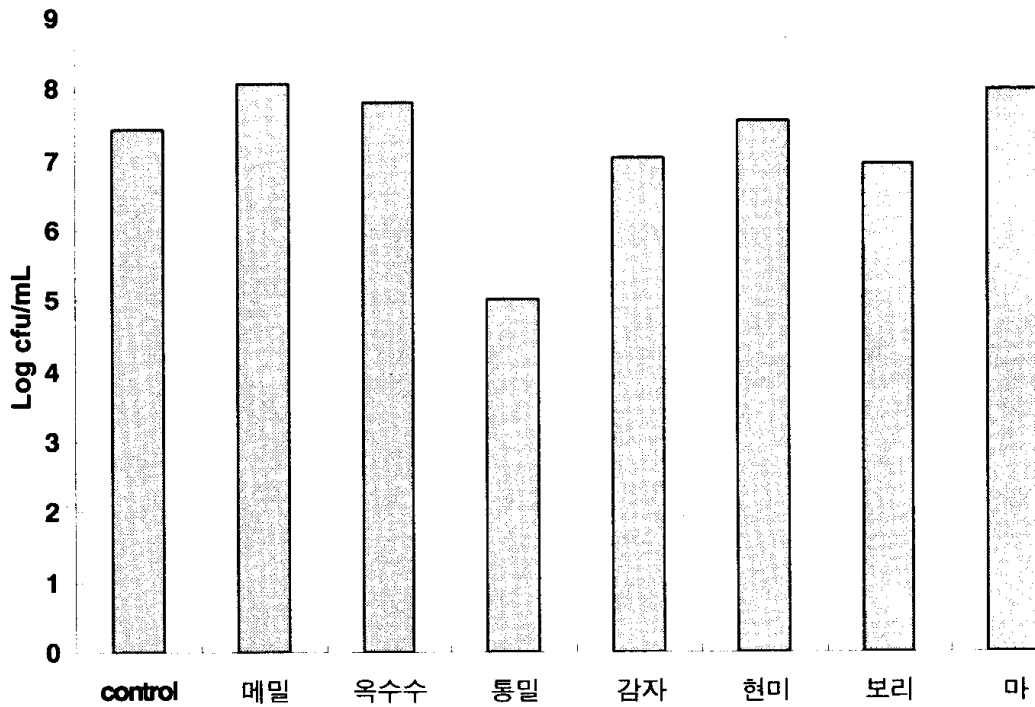
BB-12에서 균성장은 10^7 - 10^8 cfu/ml의 분포로 소재간에 큰 차이는 발견할 수 없었으며 다른 균주에 비하여 10 log 가량 적게 성장하였다. BB-12를 여러 야채 소재에 접종하여 그 발효능을 관찰한 결과 초기 균수에 비해 배추, 당근, 시금치에서 발효능이 우수하게 나타난 한편, 대부분의 소재에서 pH를 조절하고, cysteine을 첨가해 준 결과 대부분 초기접종 균주 이상의 증식이 얻어졌다. 이는 *Lactobacillus*에 비해 pH와 혐기 조건에 민감한 bifidus의 특성이 반영된 결과라 볼 수 있고, 비피더스의 발효에 있어 pH와 혐기조건만 잘 주어질 수 있다면 발효능은 충분히 우수하다고 볼 수 있겠다.



Growth of *Bifidobacterium longum* BB-12 in farm products

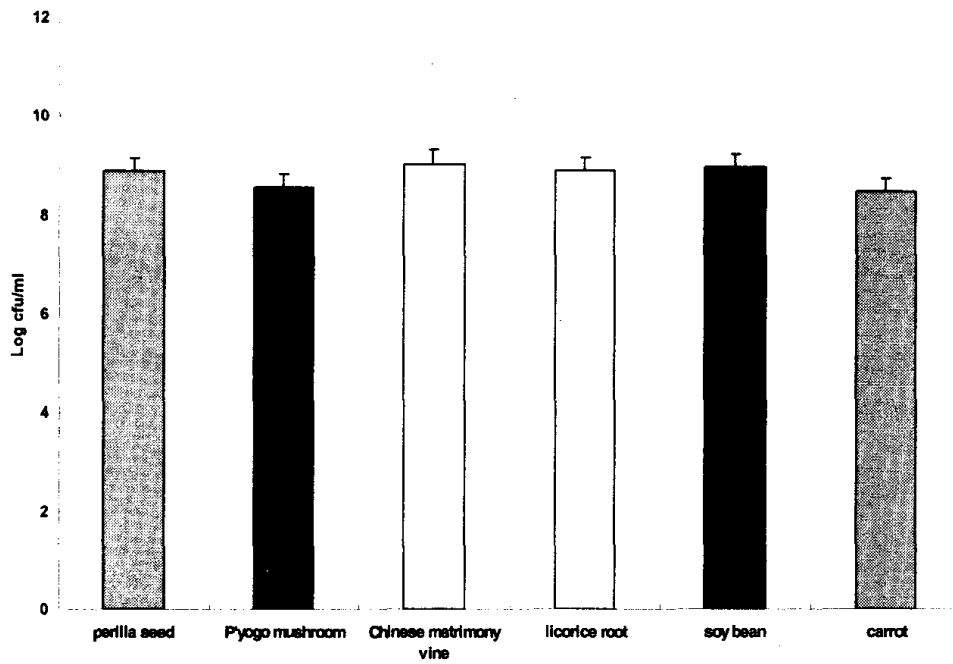


Growth of *Bifidobacterium longum* BB-12 in various vegetables

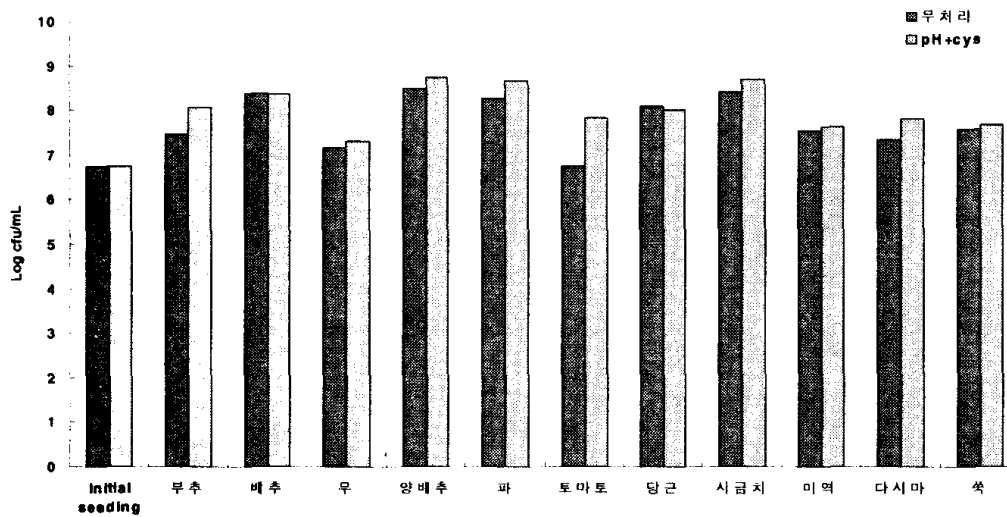


Growth of *Bifidobacterium longum* BB-12 in various grains.

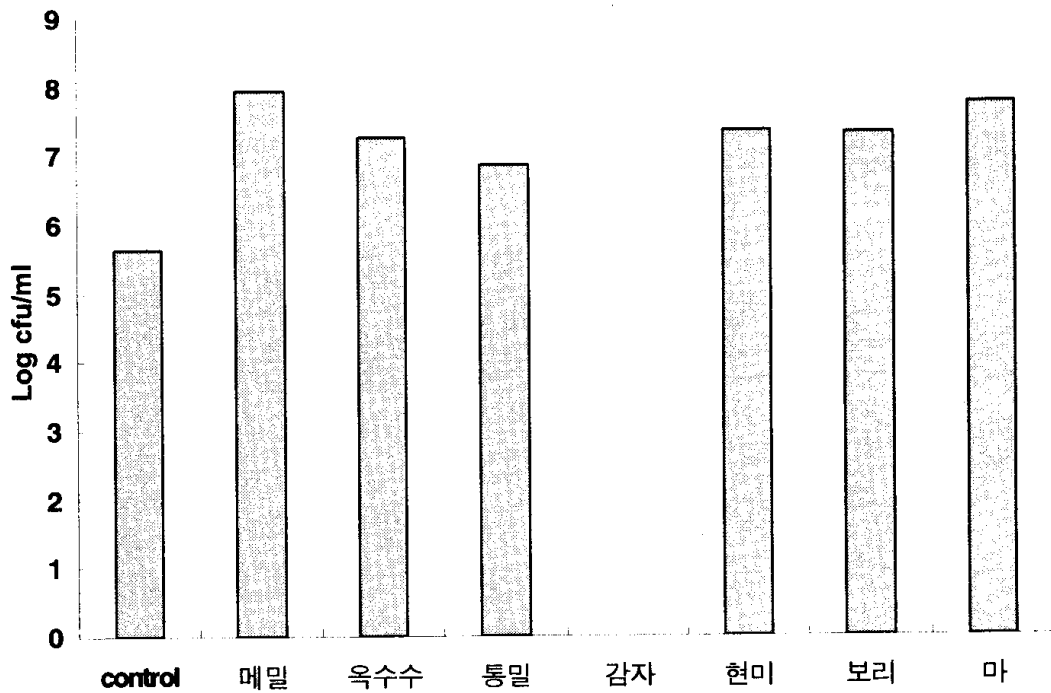
*Str. thermophilus*의 경우 전 소재에서 10^8 cfu/ml 으로 비슷한 수준으로 성장한 한편, 구기자에서 10^9 cfu/ml으로 생육이 가장 우수하였다. *Str. thermophilus*를 여러 가지 야채 소재에 접종하여 발효시킨 후 균수로 발효능을 관찰한 결과, *Lb. acidophilus* 및 *Lb. casei*의 경우에서와 비슷하게 전 소재에서 발효능이 안정적이며 우수한 한편, 소재에 따라 pH조절 및 cysteine 첨가에 의해 발효능이 대체로 향상되는 점을 확인할 수 있었다. 따라서 발효능의 차이보다는 관능적 수용도에 의해 발효적성이 결정될 가능성이 높으며 그중 발효후 불쾌취와 색의 변화가 가장 적은 당근과 토마토 소재의 이용이 바람직한 것으로 사료된다. 결과적으로 들깨에서는 모든 균주가 10^8 cfu/ml의 높은 수준으로 고르게 생육하였고 구기자에서는 *Bifidobacterium*에 비해 유산균과 *Streptococcus*의 성장이 100배 이상 우수하였다. 나머지 소재들에서도 모든 균주가 10^7 cfu/ml 이상의 높은 성장을 보였으므로 들깨, 표고버섯, 구기자, 감초, 콩가루, 당근 등에 대한 발효적성은 상당히 우수한 편으로 사료되며 이들 소재를 별다른 첨가나 가공과정을 거치지 않고 발효할 수 있는 가능성을 발견할 수 있었다.



Growth of *Streptococcus thermophilus* ST-37 in farm products



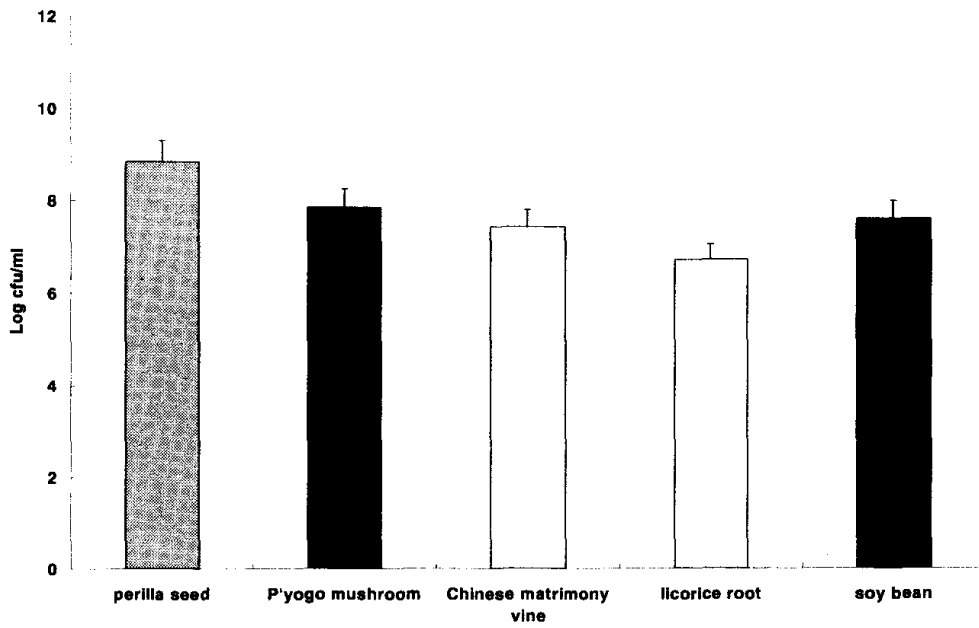
Growth of *Streptococcus thermophilus* ST-37 in various vegetables



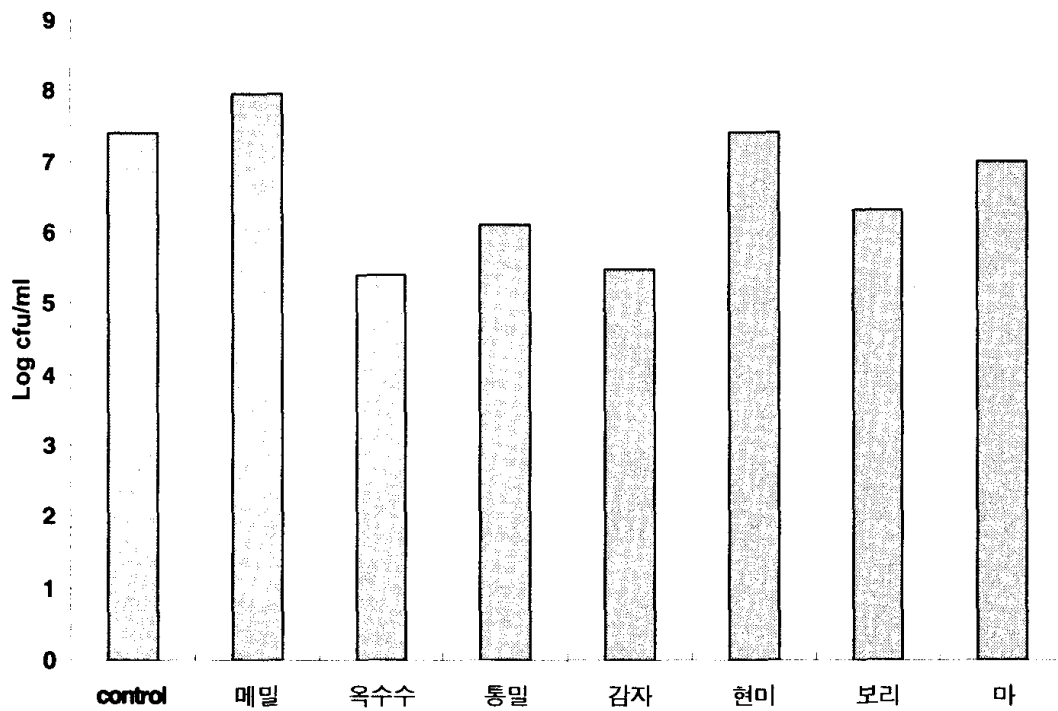
Growth of *Streptococcus thermophilus* ST-37 in various grains.

Table. pH of various farm products

발효작물	pH	발효작물	pH
부추	6.34	다시마	5.88
배추	5.99	쭈	6.08
무	6.37	옥수수	6.63
양배추	6.39	메밀	6.79
파	5.32	현미	7.10
토마토	4.31	감자	6.18
당근	6.20	마	6.12
시금치	6.15	보리	5.59
미역	6.61	통밀	6.10



Growth of *Bifidobacterium KN103* in farm products



Growth of *Bifidobacterium KN103* in various grains.

마. 노인의 장내 생리 개선성 균주

1) 내산, 내담즙성 *Bifidobacterium* 균주의 선발

분리된 균주들에 대하여 내산, 내담즙능이 강한 균주를 선발하기 위하여 다음과 같은 실험을 실시하였다. 내산성 실험은 각각의 균주를 1차 활성화시킨다음 MRS broth의 초기 pH를 7.0, 5.0, 4.5, 4.0으로 각각 달리 조절하여 배양하면서 균주의 성장을 OD₆₀₀에서 24시간동안 경시적으로 측정하였다. 또한 내담즙성 실험은 MRS broth의 pH를 7.0으로 조절하고 담즙산 농도를 0.0, 0.3, 0.5, 1.0 %로 각각 달리 조절하여 배양하면서 균주의 성장을 OD₆₀₀에서 24시간동안 경시적으로 측정하였다. 균주의 1차 선발은 내산성의 경우 pH 4.5에서의 OD₆₀₀ = 0.8 이상의 성장을 보인 것으로 하였다. 이중 내산 및 내담즙성이 특히 우수한 균주를 농산물의 소재의 탐색에 이용하였다.

2) 독성물질 감소능

사용된 *Bifidobacterium*은 21균주로서 이중 17균주는 본 연구실에서 분리된 균주들이고 나머지 4균주는 표준균주로서 *B. adolescentis* ATCC 15703, *B. longum* ATCC 15707, *B. bifidum* ATCC 29521, *B. infantis* ATCC 15697들이었다. *S. typhimurium* reversion assay에 사용한 시험균주 *S. typhimurium* TA 98은 Ames (U.C. Berkeley, U.S.A.)로 부터 분양받았다. TA 98의 유전적 안정성을 확인하기 위하여는 주기적으로 ampicilin (25µg/ml) 내성을 확인하고 minimal glucose agar배지와 histidine 첨가 배지에서 histidine 영양 요구성을 확인하였다. *S. typhimurium* reversion assay에서 돌연변이원으로 S9를 필요로 하는 benzopyrene, Trp-P-1, IQ 등을 사용하였고 S9에 의한 활성화를 필요로 하지 않는 물질로는 NQO를 사용하였다. Maron과 Ames의 방법에 준하여 preincubation test를 이용하여 *Bifidobacterium*의 돌연변이 억제효과를 조사하였다. *Bifidobacterium* 균주들은 1% glucose가 첨가된 Brain Heart Infusion 배지에 10-12시간 배양하였다. 원심분리후 얻은 균체를 20mM phosphate buffer (pH 7.0)에 3번 수세한 후 동결 건조 시켰다. 0.2M phosphate buffer (pH 4.0)용액 0.3ml에 돌연변이 원으로서 DMSO에 녹인 30µl의 benzopyrene (5mg/ml), 10µl의 Trp-P-1 (2.5mg/ml), 5µl의 IQ (250 µg/ml), 10µl의 NQO (1mg/ml) 등을 각각 섞고 동결균체 2mg을 첨가하였다. 대조군에서는 균체를 첨가하지 않았다. 이 혼합액을 37°C에서 3시간 진탕한 뒤 원심분리하여 상등액을 취하였다. 이와 같이 전처리한 후 30µl의 benzopyrene, 10µl의 NQO, 10µl의 Trp-P-1, 10µl의 IQ 반응액을 각각 취하여 45°C의 2.3ml top agar와 섞고 TA98균주 배양액 100µl와 S9 혼합액 500µl을 첨가하였다. 최소 글루코오스 한천평판배지에 골고루 도말하여 37°C에서 48시간 배양후 복귀 콜로니의 수를 측정하였다.

동결건조된 균체들은 평균적으로 각각 Trp-P-1, benzopyrene, NQO, IQ에 대하여 64, 38, 29, 20%의 항돌연변이능을 나타냈다. Trp-P-1, benzopyrene, IQ에 대하여는 균주의 종류와 성장시기에 따른 항돌연변이능에 큰차이는 없는 것으로 나타났다. NQO에

대하여는 12시간 배양세포가 5일 배양세포보다 항돌연변이능이 우수한 것으로 나타났다. 본 연구결과는 *Bifidobacterium* 균주들이 일반적으로 몇 종류의 잘 알려진 돌연변이원에 대한 항돌연변이능을 보유하고 있음을 보여주었다.

Effect of *Bifidobacterium* cells on the mutagenicity of Trp-P-1, Benzopyrene, IQ and NQO in *Salmonella typhimurium* TA 98

Strains	Mutagens used			
	Trp-P-1 ¹⁾	Benzopyrene ¹⁾	IQ ¹⁾	NQO ²⁾
	No. of revertants by mutagen minus No. of spontaneous revertants			
Control	428	100	570	340
BGN 2	145	58	401	270
BGN 3	137	63	356	300
BHM 3	183	50	568	285
CHU 1.6	205	68	524	260
E1.5	130	65	404	159
EH17	143	65	548	312
HS1	146	64	430	268
INT 57	129	54	412	315
KJ	147	69	500	302
LONG 2	175	61	438	125
M 6	121	52	335	140
PS	127	68	437	240
SJ	170	58	554	315
SK1	125	51	385	210
SK12	207	53	436	281
SU	141	48	330	102
ZS8	149	65	377	319
<i>B. adolescentis</i>				
ATCC 15703	132	66	587	278
<i>B. longum</i>				
ATCC 15707	180	67	465	182
<i>B. bifidum</i>				
ATCC 29521	147	50	442	205
<i>B. infantis</i>				
ATCC 15697	154	48	567	179

¹⁾ With metabolic activation

²⁾ Without metabolic activation

Aflatoxin binding 분석에 대조균으로 사용된 LGG 균주는 [³H]-aflatoxin binding assay에서 37.1% 부착능을 나타내었다. *Bifidobacterium* nb224는 46.4%의 높은 부착능을 보여주었고 *Bifidobacterium* spp. JO3, JR20, CH4 균주는 각각 41.3, 37.3, 37.1%의 부착능을 보여주었다. 이외에 *Bifidobacterium adolescentis*14, *Bifidobacterium* spp. Bf1 은 각각 31.3 과 25.4%의 부착능을 나타내었다. ELISA 분석에 의하여도 균주간의 차이가 비슷한 결과로 나타났지만 예외적으로 nb224 균주는 낮았다. 이는 [³H]-labeling으로 약간의 분자특성이 변하여 나타난 결과이거나 nb224 균주의 높은 Cell Surface Hydrophobicity에 기인하는 것으로 생각된다.

3) 장내 정착성 탐구

가) Adhesion of *Bifidobacterium* to enterocyte-like Caco-2 cells

비피도박테리움종에서 생리활성이 높은 균주의 선발을 위해 한국인의 분변으로 부터 분리한 20여종의 비피도박테리아의 대장상피세포 부착능을 비교하였다(Table). nb22-4, E2-18, E-15의 비피도박테리아는 대체로 대장상피세포 부착능이 높았으며 JS-9, RD-54, SI의 부착능은 보통이었고 나머지는 대체로 부착능이 낮았다. 비피도박테리아 대장상피세포 부착능은 종별로 다양하고 그 특징은 이종(heterogeneity)이며 비피도박테리아의 고유한 특징은 아닌 것으로 생각된다.

Adhesion of the *Bifidobacterium* to Caco-2 cells

<i>Bifidobacterium</i> strains	Adherent bacteria*
nb22-4	91
KU-6	87
Ed-209	85
JS-9	68
RD-54	67
SI	61
SH-2	47
RD-60	42
<i>B. bifidum</i> ATCC 2952	35
CN-2	30
SJ-32	26
KJ	24
HJ-30	23
<i>B. animalis</i> ATCC 2552	22
SH-5	17
<i>B. adolescentis</i> ATCC 15703	19
<i>B. infantis</i> ATCC 15697	15
<i>B. longum</i> ATCC 15707	11
M-6	10
MS-1	10

* Mean numbers of adhering bifidobacteria per 50 Caco-2 cell

나) Cell surface hydrophobicity of the *Bifidobacterium* strains.

세포표면 소수성과 대장상피세포 부착능의 상관관계를 알아보기 위하여 20여종의 비피도박테리아를 대상으로 세포표면 소수성을 조사한 결과 그 값은 다양하였으며 비피도박테리아의 대장상피세포 부착능과 세포표면 소수성 사이의 상관관계는 모든 균주에서 일치하지 않았다(Table). 그러나 *Bifidobacterium* sp. nb22-4의 경우 세포

표면 소수성과 대장상피세포 부착능 모두 가장 높았다. Perez *et al.* (1998)는 소수성이 높은 균주는 대체적으로 부착능과 autoagglutination 능력이 높으나 소수성이 같은 균주들간을 비교한 결과 부착능은 다양하였다고 보고하였다. 이것은 세포들간의 상호결합(부착)은 세포표면 소수성 이외에 또 다른 인자가 관여하고 있음을 나타낸다고 생각할 수 있다.

Table. Cell surface hydrophobicity of the *Bifidobacterium* strains.

<i>Bifidobacterium</i> strains	Cell surface hydrophobicity(%)
nb22-4	82
<i>B. adolescentis</i> ATCC 15703	81
<i>B. animalis</i> ATCC 2552	80
M-6	80
RD-60	69.6
SI	66.3
CN-2	21
<i>B. bifidum</i> ATCC 2952	12
RD-54	7
MS-1	6
SH-5	6
E-15	5
E2-18	~
JS-9	~
SH-2	~
SJ-32	~
<i>B. infantis</i> ATCC 15697	~
<i>B. longum</i> ATCC 15707	~

~ : below the cell surface hydrophobicity value of 5%

다) Treatments of bacteria and spent culture supernatants.

대장상피세포 부착능과 세포표면 소수성이 모두 가장 높은 비피도박테리움 nb22-4를 가지고 부착능의 특성을 부분적으로 조사하였다. nb22-4의 성장온도를 30, 37, 42°C로 달리하여 결과를 비교하였을 때 대장상피세포 부착능과 세포표면 소수성은 성장온도가 상승함에 따라 점차적으로 줄었다(Fig).

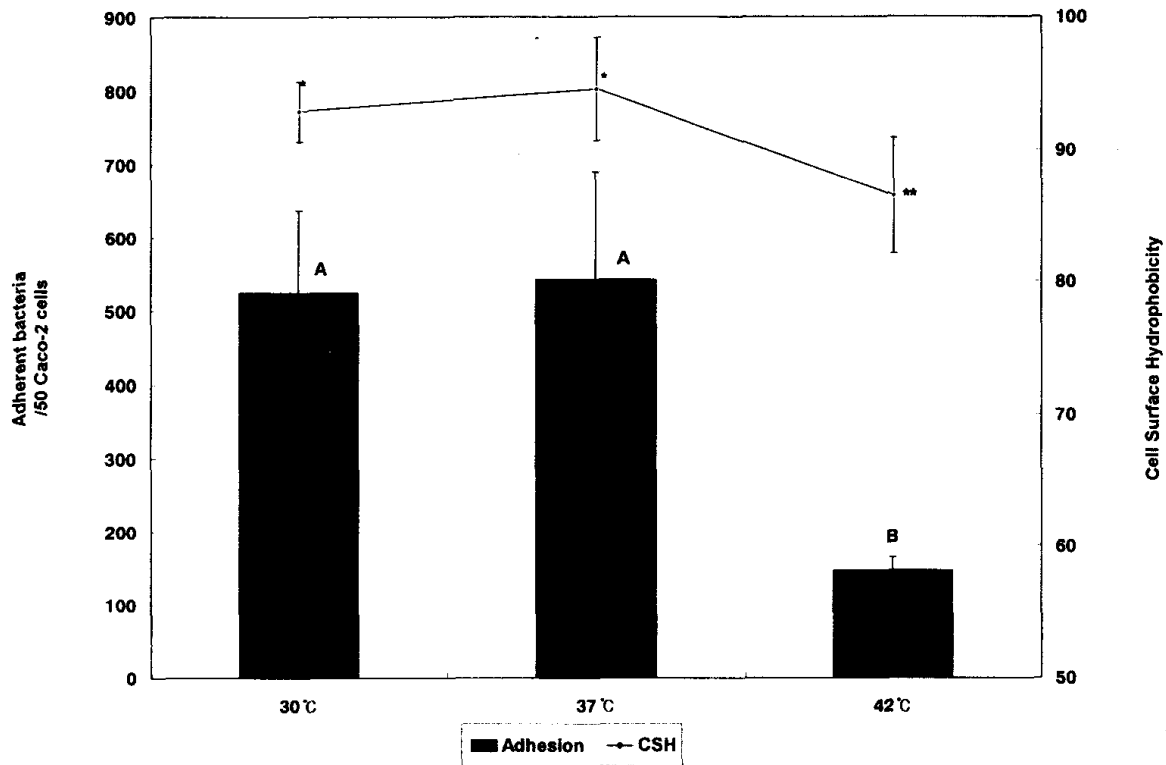


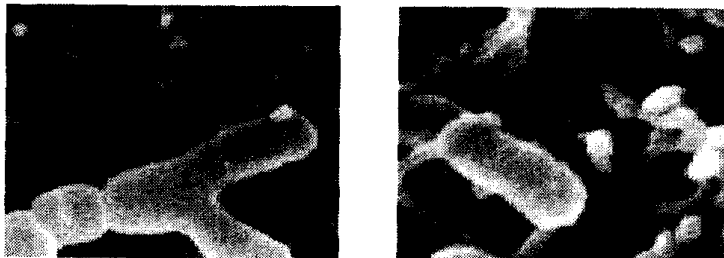
Fig. The effects of growth temperature on Cell surface hydrophobicity and adherence to Caco-2 cells of the *Bifidobacterium* sp. nb224.

세포막에 존재하며 외부세포와의 접촉 및 인식에 중요역할을 하는 당을 첨가하여 부착능에 미치는 영향을 조사하였다. fucose, galactose, mannose은 첨가는 부착능을 약 50% 저해시켰으며 당간의 큰 차이는 보이지 않았다. 여러 연구에서 부착능에 관여하는 인자로 알려진 protein이 nb224의 부착에도 관여하는지를 알아보기 위하여 proteolytic enzymes을 사용하여 조사하였다. Trypsin, protease, proteinase K의 처리는 nb224의 부착을 높은 수준에서 저해하였다(Fig). 이 결과로 nb224의 대장상피세포 부착에 관여하는 인자가 열에 민감하며 proteolytic enzymes에 영향을 받는 proteinaceous 물질인 것으로 생각할 수 있다.

라) Adhesion of *Bifidobacterium* sp. nb22-4 to Caco-2 cells observed by scanning electron microscopy

nb224의 대장상피세포 부착하는 부위와 특성을 scanning electron microscopy로 조사하였다(Fig.). 그 결과 nb224는 대장상피세포의 microvilli에 부착하며 대장상피세포의 손상은 보이지 않았다.

Adhesion of *Bifidobacterium* sp. nb22-4 to Caco-2 cells



마. 유산균의 고농도 혼합배양

1) 균종별 배양조건의 최적화

Bifidobacterium longum, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* 등 5종 유산균의 혼합배양조건을 결정하기 위하여 각 균종별 배양조건을 미리 검토하였다. 기본 배지는 5% glucose, 0.5% yeast extracts, 1.5% beef extracts, 0.1% K_2HPO_4 , 0.1% KH_2PO_4 , 0.02% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.001% NaCl, 0.00067% $MnSO_4$, 0.001% $FeSO_4$ 를 사용하였고 skim milk, soy flour, ISP(Isolated soy protein), soy protein hydrolysate(HY-soy) 등의 유기질소원의 첨가량 또는 단백질효소의 처리량, ion 성분 및 growth factor의 조성비가 생균수에 미치는 영향을 검토하였다. 이때, 배양조건은 배양온도 37℃, 접종비 1%(v/v), rpm 50, working volume 100ml로 하여 삼각플라스크를 사용하여 회전진탕배양기에서 20시간 배양하였으며, 접종후 질소충진하여 혐기적조건을 조성하였다. 배양후 생균수는 BL-agar 배지와 anaerobic chamber를 사용하여 정량하였다. 대량

배양을 위하여는 200 l 급 발효조에서 150 l working volume으로 20시간까지 배양하여 가면서 2시간 간격으로 생균수를 측정하였다. 이때, 배양액의 pH는 5N NaOH 용액을 사용하여 6.0으로 일정하게 조절하였다.

Bifidobacterium longum JB 35, *Lactobacillus acidophilus* KFRI 233, *Lactobacillus casei* KFRI 127, *Streptococcus thermophilus* A, *Lactobacillus bulgaricus* CSCC 2505에 대하여 동일한 실험을 수행하였으며 이들 중 *Bifidobacterium longum* JB 35에 대한 실험 결과는 다음과 같다.

가) Skim milk, soy flour 및 HY-soy 배지에서의 배양

유기질소원의 조성	생균수(CFU/ml)
B.M + 6% Skim milk(0.25% protease-N)	2.4×10^9
B.M + 6% Skim milk(0.25% protease-N) + 2% Soy flour(0.25% protease-N)	3.4×10^9
B.M + 6% Skim milk(0.25% protease-N) + 4% Soy flour(0.25% protease-N)	5.6×10^9
B.M + 0.1 % HY-soy	4.1×10^9
B.M + 0.5 % HY-soy	4.1×10^9

B.M: Basal medium

5% glucose, 0.5% yeast extracts, 1.5% beef extracts, 0.1% K_2HPO_4 ,
0.1% KH_2PO_4 , 0.02% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.001% NaCl, 0.00067% $MnSO_4$,
0.001% $FeSO_4$

나) ISP 배지에서서의 배양

(1) Skim milk와의 조합

ISP 및 Skim milk의 조성	생균수(CFU/ml)
4% ISP(non-hydrolysis) + B.M	2.1×10^9
2% ISP(non-hydrolysis) + B.M	2.0×10^9
4% ISP(0.25 % protease-N) + B.M	2.5×10^9
2% ISP(0.25 % protease-N) + B.M	2.1×10^9
2% ISP(0.25 % protease-N) + B.M + 6 % Skim milk(0.25 % protease-N)	2.2×10^9
2% ISP(non-hydrolysis) + B.M + 6 % Skim milk(0.25 % protease-N)	1.7×10^9

B.M: Basal medium

5% glucose, 0.5% yeast extracts, 1.5% beef extracts, 0.1% K_2HPO_4 ,
0.1% KH_2PO_4 , 0.02% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.001% NaCl, 0.00067% $MnSO_4$,
0.001% $FeSO_4$

(2) ISP의 농도변경 실험

ISP의 조성	생균수(CFU/ml)
0% ISP + B.M	2.0×10^9
2% ISP(0.25 % protease-N) + B.M	1.1×10^9
3% ISP(0.25 % protease-N) + B.M	1.2×10^9
4% ISP(0.25 % protease-N) + B.M	1.6×10^9
5% ISP(0.25 % protease-N) + B.M	2.6×10^9
6% ISP(0.25 % protease-N) + B.M	2.1×10^9

B.M: Basal medium

5% glucose, 0.5% yeast extracts, 1.5% beef extracts, 0.1% K_2HPO_4 ,
0.1% KH_2PO_4 , 0.02% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.001% NaCl, 0.00067% $MnSO_4$,
0.001% $FeSO_4$

(3) 단백질분해효소 처리량의 영향 검토

Protease-N의 처리량(대단백 % W/W)	생균수(CFU/ml)
4% ISP + B.M (protease-N 0)	1.9×10^7
4% ISP + B.M (protease-N 0.1)	1.2×10^8
4% ISP + B.M (protease-N 0.15)	1.9×10^8
4% ISP + B.M (protease-N 0.2)	1.5×10^8
4% ISP + B.M (protease-N 0.25)	2.2×10^8
6% ISP + B.M (protease-N 0.3)	1.4×10^8

B.M: Basal medium

5% glucose, 0.5% yeast extracts, 1.5% beef extracts, 0.1% K_2HPO_4 ,
0.1% KH_2PO_4 , 0.02% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.001% NaCl, 0.00067% $MnSO_4$,
0.001% $FeSO_4$

(4) 균채생육에 미치는 Ion의 영향 검토

Ion 조성의 변경	생균수(CFU/ml)
B.M	2.3×10^8
B.M - All ion	1.9×10^8
B.M - 0.1% K_2HPO_4	2.3×10^8
B.M - 0.1% KH_2PO_4	1.7×10^8
B.M - 0.02% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	2.4×10^8
B.M - 0.001% NaCl	2.1×10^8
B.M - 0.00067% $MnSO_4$	3.6×10^8
B.M - 0.001% $FeSO_4$	2.2×10^8

B.M: Basal medium + 4% ISP(0.25 % protease-N)

5% glucose, 0.5% yeast extracts, 1.5% beef extracts, 0.1% K_2HPO_4 ,
0.1% KH_2PO_4 , 0.02% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.001% NaCl, 0.00067% $MnSO_4$,
0.001% $FeSO_4$

(5) 균체생육에 미치는 growth factor의 영향 검토

(가) Yeast extracts의 영향 검토

Yeast extracts의 농도	생균수(CFU/ml)
B.M	2.4×10^8
B.M + 0.25	2.0×10^9
B.M + 0.5	2.6×10^9
B.M + 0.75	2.4×10^9
B.M + 1.0	2.6×10^9

B.M: Basal medium + 4% ISP(0.25 % protease-N)

5% glucose, 0.5% yeast extracts, 1.5% beef extracts, 0.1% K_2HPO_4 ,
0.1% KH_2PO_4 , 0.02% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.001% NaCl, 0.00067% $MnSO_4$,
0.001% $FeSO_4$

(나) Beef extracts의 영향 검토

Beef extracts의 농도	생균수(CFU/ml)
B.M	1.6×10^8
B.M + 0.5	1.6×10^9
B.M + 1.0	1.8×10^9
B.M + 1.5	2.0×10^9
B.M + 2.0	2.5×10^9

B.M: Basal medium + 4% ISP(0.25 % protease-N)

5% glucose, 0.5% yeast extracts, 1.5% beef extracts, 0.1% K_2HPO_4 ,
0.1% KH_2PO_4 , 0.02% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.001% NaCl, 0.00067% $MnSO_4$,
0.001% $FeSO_4$

(6) 생균수의 경시변화 검토

이상의 배양실험 결과 유기질소원의 종류와 관계없이 일정한 단백질효소의 처리 효과가 있고 생육촉진물질로서 yeast extracts와 beef extracts가 존재하는 경우 본 균주의 생육은 왕성하게 진행되어 10^9 /ml 이상의 생균수를 확보할 수 있었다. Ion의 경우 명확한 특이성을 발견하기가 어려웠다. 상기한 배양실험은 pH조절이 배제된 플라스크 수준에서의 배양결과이므로 pH조절이 이루어지는 200 L급 발효조에서의 생균

수 경시변화를 관찰하였으며 그 결과는 다음과 같다.

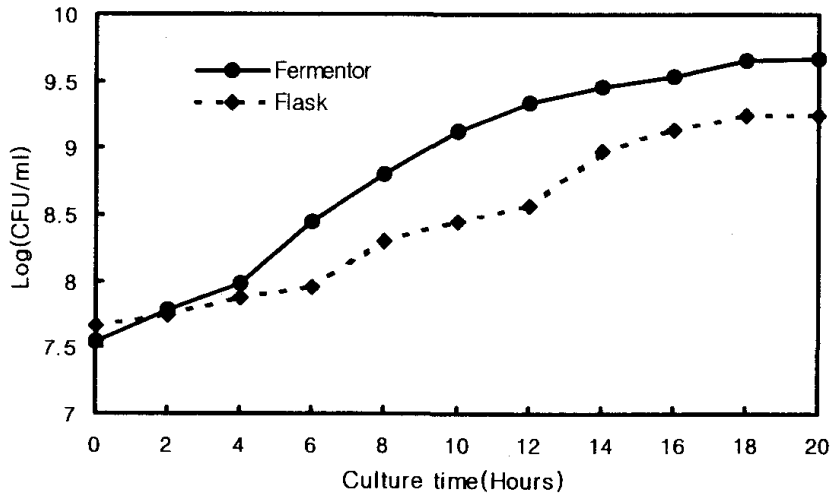


Fig. Time course of *Bifidobacterium longum* JB 35

이상의 결과에서 본균주의 배지조건은 다음과 같다.

2% ISP(0.25 % protease-N)

5% glucose, 0.5% yeast extracts, 1.5% beef extracts, 0.15% K_2HPO_4 ,

0.1% KH_2PO_4 , 0.02% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.0005% NaCl, 0.001% $MnSO_4$,

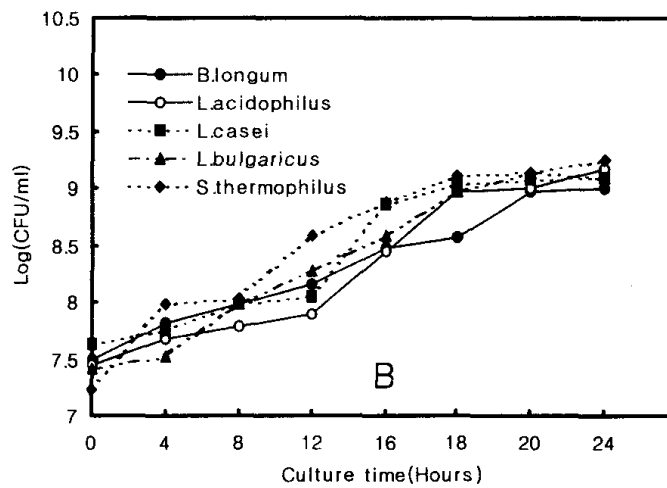
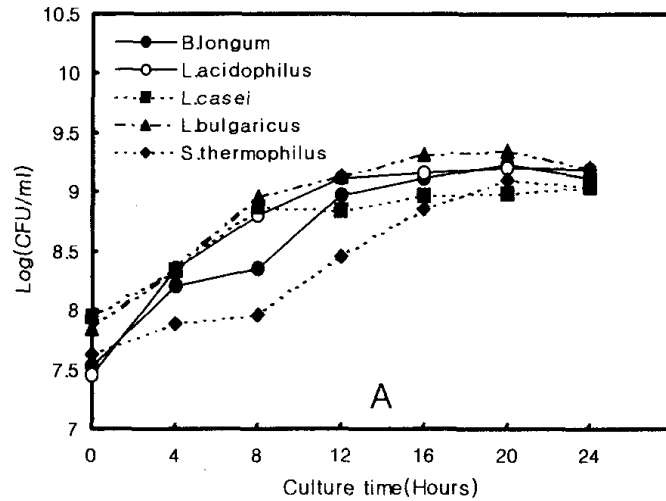
2) 5종 유산균의 혼합배양

5종 유산균의 혼합배양을 위한 배지조성은 유기질소원의 조성에 따라서 다음 3종류의 배지균으로 구성하였다. 이때, Yeast extracts와 Beef extracts 농도에 있어서는 크게 상이한 점이 없어 최대농도로 결정하였으며 Ion에 있어서는 5종 유산균에 대하여 4개 이상 포함되는 성분에 대하여 최소농도로 포함시켰다. 단백분해효소의 처리율에 있어서는 공히 대단백 0.1~0.25%의 효소처리범위에서는 균주 및 유기질소원의 종류에 관계없이 공히 10^9 /ml이상의 생균수를 확인하였으므로 0.25%의 단백분해효소로 배지를 전처리하였다. 선정된 3종의 배지조건을 사용하여 200 L급의 현장 Pilot scale에서 혼합배양을 행하였다. 기타의 배양조건은 전술한 바와 같다. 접종비의 경우 150 L의 working volume에 대하여 공히 $2 \sim 5 \times 10^9$ /ml의 각 종균배양액을 각각 2 L씩 접종하여 각 균종의 배양시작 시점에서의 생균수가 비슷하게 조정하였다. 또한, 초당, 성장촉진물질 및 초기 Ion 성분의 부족을 고려하여 동일한 농도의 추가당, yeast

extracts, beef extracts 및 추가 Ion 성분을 별도로 살균준비하여 2회에 걸쳐 추가공급하여 생균수의 변화를 관찰하였다.

가) 초기 배지성분 내에서의 혼합배양

각 배지조건에서 혼합배양을 행하였으며 4시간 간격으로 각 균종의 생균수를 전술한 방법에 의하여 계측하였으며 그 결과는 다음과 같다.



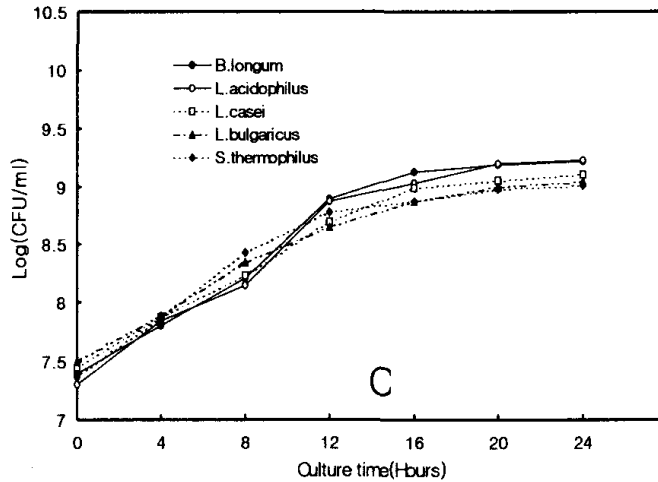


Fig. Time course of Mixed culture

A: ISP-media B: Skim milk-media C: A+B mixed media

나) 배지성분의 추가에 의한 생균수의 변화

3 종류의 배지에서 5종 유산균의 혼합배양을 행한 결과 5균종에 대하여 공히 10^9 /ml 이상의 생균수를 확인할 수 있었으며 ISP와 Skim milk의 혼합배지에서 비교적 전체 균종이 고른 생육을 나타냈다. 전체 생균수의 총합은 약 $5\sim 6 \times 10^9$ 이상으로서 양호한 결과를 나타냈으나 각 균종별로 2×10^9 이상의 생균수를 안정적으로 확보할 필요가 있다고 판단되었다. 이종 유산균의 혼합배양시 균종간의 길항작용의 발생이 있을 수 있고, 적합한 배지성분의 조성이 매우 어렵기 때문에 모든 유산균의 생육에 가장 적합한 최적배지를 조성하는 것은 사실상 불가능하다고 볼 수 있으나 전체적으로는 탄소원, 성장조절인자 및 이온 성분의 고갈이 발생할 수 있다는 점에서 유기질소원을 제외한 기타 배지성분을 초기배지 성분과 동일한 농도로 제조하여 배양 10시간 및 14시간 경과시점에서 2회로 나누어서 추가공급하며 생균수 변화를 관찰하였다. 이때, 유기질소원은 2% ISP와 6% Skim milk의 혼합배양기를 사용하였다.

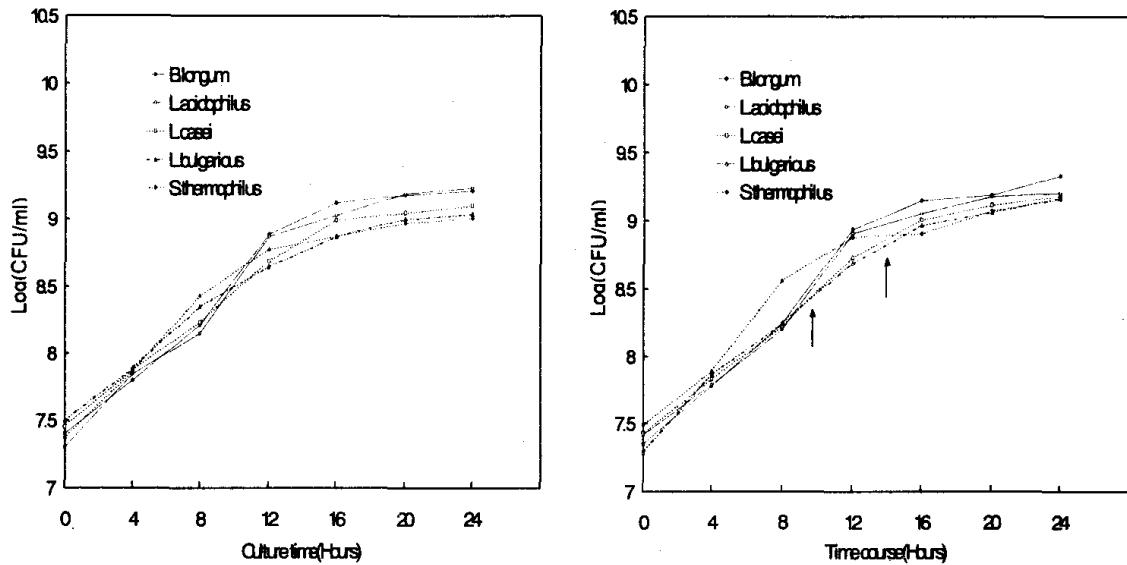


Fig. Time course of mixed culture in Mixed-media

Left: Non medium addition Right: medium addition

배지성분의 추가가 없는 경우 혼합 유산균의 생균수는 약 $9.6 \times 10^9/\text{ml}$ 이었으며, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus bulgaricus* 및 *Streptococcus thermophilus* 균의 경우에 공히 $1.0 \times 10^9/\text{ml}$ 이하의 생균수를 나타내었다. 배지성분의 추가가 있는 경우에 혼합 유산균의 전체 생균수는 $1.05 \times 10^{10}/\text{ml}$ 이었으며 5종의 유산균이 모두 $2 \times 10^9/\text{ml}$ 이상이거나 거의 근접하는 생균수 수준을 나타내었다. 이상의 결과에서 현재 조성된 혼합배지 조건이 비교적 5균종의 배양에 적합한 공통의 성분을 고루 포함하고 있는 것으로 판단되었으며 단위용적 내에서 배양할 수 있는 생균수의 최대수준이 약 $1 \sim 2 \times 10^{10}/\text{ml}$ 정도임을 고려할 때 매우 양호한 고농도 혼합배양 결과를 획득한 것으로 보여지며 이들 5종 유산균의 혼합 원말은 매우 우수한 정장효과를 지닐 것으로 예측된다.

3) 시험 유산균주들의 Antimicrobial spectrum

10종의 유산균종에 대하여 12종의 지시균을 사용하여 항균스펙트럼을 작성하였다. 총 10균종의 시험균 중에서 항균영역이 비교적 넓은 유산균주로 판단된 130310, 2386, 7-3, 9-2 균주의 항균활성을 arbitrary unit으로 측정하였다. 이때, 지시균주로는 130310은 *E.coli*(KFRI272), 2386은 *P.acnes*(ATCC29399), 7-3, 9-2는 공히 *S.p-A*(ATCC11511)를 사용하였고, 배지는 각각 ISP, SKIM MILK, SOY MILK 배지를

사용하였다. 하나의 실험예로서 2386 균주의 항균활성은 다음그림과 같은 특성을 나타내었다.

2386 균주의 항균활성

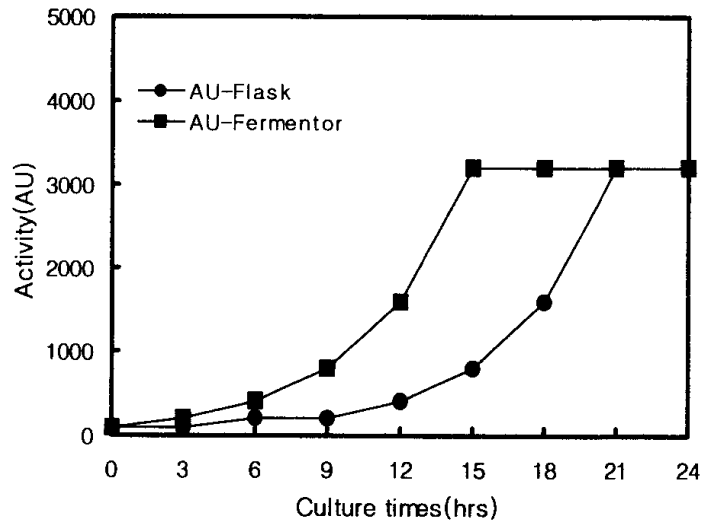
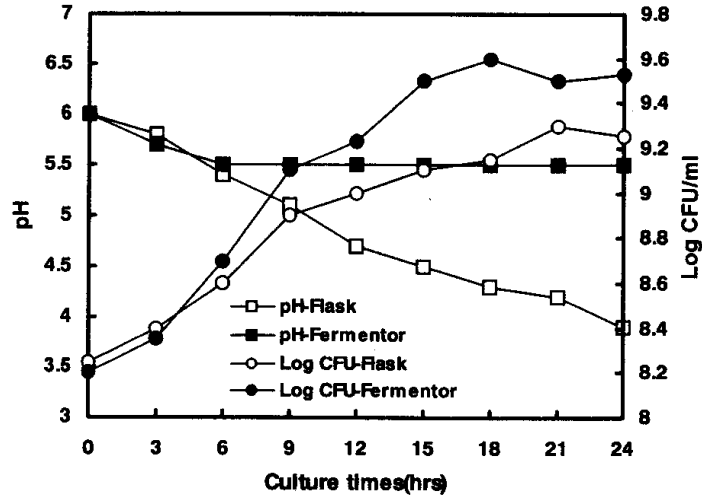


Fig. 2386 균주의 항균활성의 배양경시변화

항균활성은 균체생육에 의존하였으며 flask 배양에 있어서는 약 21시간에, fermentor 배양에 있어서는 15 시간에 최대 활성에 도달하였다. 공히, 3200 AU의 활성을 나타내어 배양액의 pH조절에 의한 항균역가의 차이는 관찰되지 않았다.

제 3 장 탐색된 균주와 소재를 이용한

발효 최적화와 예비임상평가 분야

제1절 서 설

농산물 소재와 균주에 대한 조사가 1차적으로 마련된 결과를 바탕으로 지속적인 발효의 최적조건 확립과 완전한 제품이 나오기 전까지의 시제품을 이용한 예비 임상평가의 과정을 거쳐서 최종의 완전한 제품의 평가까지의 조건을 확립하는 단계의 연구가 이루어 졌으며 제 2장의 부분의 보완 내용과 제 4장의 예비실험을 겸하는 보조적인 연구가 진행되었다.

1. 연구수행방법

가. 종균 대량 배양 기술 농산물 소재를 이용한 발효

Bifidobacterium longum, *Lactobacillus acidophilus*의 발효에서 농수산물 소재를 첨가하여 발효시간별 생균수를 측정하였고 200L급 발효조에서 배양조건을 최적화 하였다. 농수산물 소재로는 단백질성분이 풍부한 대두와 대두에서 분리된 대두분리단백, 참치 추출물 그리고 성장인자로 알려진 클로렐라가 활용가능성이 높은 것으로 생각되어 사용하였다.

1) 배양 조건

(사용균주 : *Bifidobacterium longum* CBT 2008)

2% glucose, 2% lactose, 1% beef extract, 0.5% yeast extract, 0.05% L-cystein HCl, 0.1% Tween 80, 0.1% KH₂PO₄, 0.15% K₂HPO₄, 0.1% sodium Propionate, 0.1% ammonium acetate, 0.05% MgSO₄, 0.0005% NaCl, 0.001% MnSO₄를 기본 조성으로 하여 질소원으로 탈지분유(Skim milk), 대두 분말(Soy flour), 대두분리단백 분말(Isolated soy protein, ISP) 등을 효소분해 후 사용하였고 참치 추출물과 클로렐라는 결정된 질소원을 함유한 기본배지에서 생균수와 발효시간에 미치는 영향을 조사 하였다. 이때, 배양조건은 200L 발효조에서 100L 배양액으로 1%를 접종하고 질소충진에 의해서 혐기조건을 유지하였고 37°C, 100 rpm에서 6.5로 pH를 조절하였다. 24시간 동안 발효하면서 매 2시간 마다 표본을 검사하였고 생균수는 BL agar배지와 anaerobic chamber를 사용하였다.

(사용균주 : *Lactobacillus acidophilus* CBT 1007)

5% glucose, 1.5% beef extract, 0.5% yeast extract, 0.1% K₂HPO₄, 0.1% sodium acetate, 0.1% diammonium citrate, 0.01% MgSO₄, 0.005% MnSO₄를 기본 조성으로 하여 질소원으로 탈지분유(Skim milk), 대두 분말(Soy flour), 대두분리단백 분말(Isolated soy protein, ISP) 등을 효소분해 후 사용하였고 참치 추출물과 클로렐라는 결정된 질소원을 함유한 기본배지에서 생균수와 발효시간에 미치는 영향을 조사 하였다. 이때, 배양조건은 200L 발효조에서 100L 배양액으로 1%를 접종하고 질소충진에 의해서 혐기조건을 유지하였고 37℃, 100 rpm에서 pH 6으로 조절하였다. 24시간 동안 발효하면서 매 2시간 마다 표본을 검사하였고 생균수는 MRS agar배지와 anaerobic chamber를 사용하였다.

2) 질소원에 따른 발효

탈지분유와 대두 분말 그리고 대두분리단백 분말은 단백가수분해효소(protease N)으로 분해하여 각각 1%, 2%, 4%를 기본 배지에 첨가하여 생균수를 검사하였다.

3) 성장인자가 발효에 미치는 영향

2.에서 결정된 질소원을 함유한 기본배지에 참치추출물과 클로렐라를 각각 0.05%, 0.1%, 1%를 첨가한후 발효 시간에 따른 생균수의 변화를 관찰 하였다.

나. 종균 원말화 기술

미생물의 장기간 보존과 제품화에 있어 냉동건조법이 이용되고 있으며, 이는 제품의 품질관리를 위하여 매우 중요한 것으로 특히 생존율과 보존성에 관심이 모아지고 있다. 아무리 최적 배양된 *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus acidophilus*이더라도 원말의 생존율과 보존성이 떨어지면 제품의 기능이 떨어지고 상품의 가치를 상실하기 때문이다. 생존율에 영향을 미치는 요인들로서 미생물의 종류, 미생물의 생장기, 미생물의 수, 배양액의 성분, 냉동속도, 해동속도, 건조조건, 수분함량 등이 알려져 있다. 본 과제에서는 농산물 소재 중 옥수수 전분이 고분자의 탄수화물 함량을 다량 갖고 있으며 이미 이취가 없는 백색의 분말로 고농도 유산균 원말의 색채적 이질감이나 수분 함습에 의한 유산균 안정성 저해에 도움을 줄 수 있다는데 목적을 두고 실험을 진행 하였다. 유산균의 회수는 최적 배양된 유산균을 연속 원심분리기에서 15,000rpm으로 1.5l / min의 유량으로 유산균체를 회수 하였고 회수된 유산균체와 당과 단백질이 함유된 멸균된 보호제를 1:1.5로 혼합하였다. 이후 - 45℃ 이하로 동결시킨 후 진공도 20mmTorr이하에서 30℃ 온도로 4일간 냉동 건조하였다. 이때 유산균체 중량비 10%, 20%, 30%의 건열 살균된 옥수수 전분을 동결전 보호제와 혼합된 유산균체액에 각각 첨가하여 동일하게 동결과 건조 과정을 거친 후 40℃ 조건하에서 생존율을 검사하여 제품의 안정성을 확인하였다.

다. 선발균주의 동정, 생리

- F6PPK test

본 실험실에서 개발한 *Bifidobacterium* 선택배지인 TP 배지를 이용하여 균주를 분리하여 *Bifidobacteria*를 분리한 후 현미경상으로 형태학적으로 *Bifidobacteria*임을 확인할 수 있다. 그러나 그러한 방법은 너무 불확실하므로 TP배지를 이용해 분리한 *Bifidobacterium* 균주들에 대하여 특이적으로 Bifidus pathway를 통하여 Lactic acid와 Acetic acid를 2:3의 비율로 발생하게 하는 효소인 Fructose-6-phosphate phosphoketolase의 반응을 알아보았다.

BHI 배지에서 각 분리된 균주를 24시간 동안 정치 균체를 0.05M phosphate buffer pH 6.5에 Cys 500mg/ml이 첨가된 용액에 3번 washing 후 초음파를 이용하여 균체를 파쇄한 후 효소 반응을 살펴 보았다.

라. 선발된 *Bifidobacterium*의 생리학적 평가

Bifidobacterium 균체 분획의 면역 활성화능 고찰

노인의 정상제적 기능뿐만 아니라 노화에 따른 면역기능의 약화를 보강해 줄 수 있는 방법으로 *Bifidobacterium*의 인체 면역 기능에 기여하는 측면에 대한 연구로 균체의 면역활성능을 알아보았다. 장내의 정상균총인 *Bifidobacterium* 속의 유익작용에 대한 연구로서 기존의 cell line(Raw 264.7)과 murine의 장내 기관에서 얻은 면역 세포와의 반응성을 살펴보았다.

본 연구에 사용된 *Bifidobacterium* JH01는 면역 활성화능이 높은 것으로 실험 결과상 찾아낸 균이다. 이때 적절한 수준의 면역 활성을 유도하는 부분에 대한 고찰 차원에서 균주를 분획지어서 반응성을 살펴보았다.

macrophage cell line을 이용하여 각 균주별 fraction의 면역 활성화능을 비교하였다. 장내 유익균과 유해균을 함께 비교함으로써 체내 활성 정도의 균형점을 찾을 수 있었다. 또한 인체 면역계와 유사한 murine의 면역 기관을 분리하여 균체와 반응시켜 보았다. 체내의 면역을 담당하고 있는 부분 중에서 Peyer's patch는 장내의 면역을 담당하고 있으므로 이를 분리하여 균체와 반응시켜 보다 in vivo에 가까운 반응성을 관찰할 수 있었다. 이와 함께 전체적인 면역을 담당하고 있는 spleen에서 분리한 면역 세포들에서의 반응을 살펴봄으로써 장관 면역과의 반응성을 비교 대조할 수 있다.

기존의 cell line을 이용하는 방법이나 미리 항원을 제시한 뒤에 면역 기관을 분리해 내는 방법보다 직접적으로 면역 기작을 설명할 수 있었다.

마. 종균 및 소재의 노인 생리 평가

1) 섭취후의 변비개선 및 균총평가

가)노인의 장내균총 조성 및 분포

임상실험에 들어가기에 앞서 한국 노인들의 장내 균총 조성 및 분포를 알아보았다. 대상은 65세 이상의 노년기 17명(남 7명,여 10명) 등으로부터 분변을 받는 즉시 혐기성 희석용액에 넣어 실험실로 옮긴 뒤 십진법으로 순차적으로 희석을 하였다. 희석된 시료를 여러종류의 선택배지에 도말하고 호기 또는 혐기적인 조건으로 37℃에서 배양하였다.

균주를 검출하기 위한 선택 및 비선택 배지는 표에 정리하였다.

Media used for the enumeration

Media used	Major bacteria forming colonies	culture condition
Non-selective media		
BL	Strictly anaerobic bacteria	Anaerobic
TS	Aerobic bacteria	Aerobic
Selective media		
TP	<i>Bifidobacterium</i>	Anaerobic
NES	<i>Eubacterium</i>	Anaerobic
VA	<i>Bacteroides</i>	Anaerobic
NN	<i>Cl.perfringens</i>	Anaerobic
LBS	<i>Lactobacillus</i>	Anaerobic
DHL	<i>E.coli</i>	Aerobic
PEES	<i>Staphylococcus</i>	Aerobic

혐기적 배양을 위해 Gas-Pak, Steel-Wood법, Microprocessorcontrolled anaerobic chamber등을 사용하였다.

나)임상예비실험

개발된 정장제를 면역능력이나 대외 방어 시스템이 약한 노인에게 직접 적용시키기에 앞서 먼저 20대 대학생 5명에게 1주간 복용시키고 그 균총 변화를 관찰하였다. 이때 방법은 노인의 장내 균총 조사와 동일한 방법으로 실시하였다. 복용량은 동결건조 product 1g/day($g \times 10^{10}$ 이상)로 하였다. 대상자들은 항생제를 복용하지 않으며 실험 기간동안 유산균제품 및 김치등의 발효식품 섭취를 제한하였다.

노인에 대한 임상효과에 대한 내용은 5주에 걸쳐 일주일씩 복용과 비복용을 반복하며 분변 샘플을 채취하여 복용과 비복용 시기의 균총 변화를 비교함으로써 생균제의 장

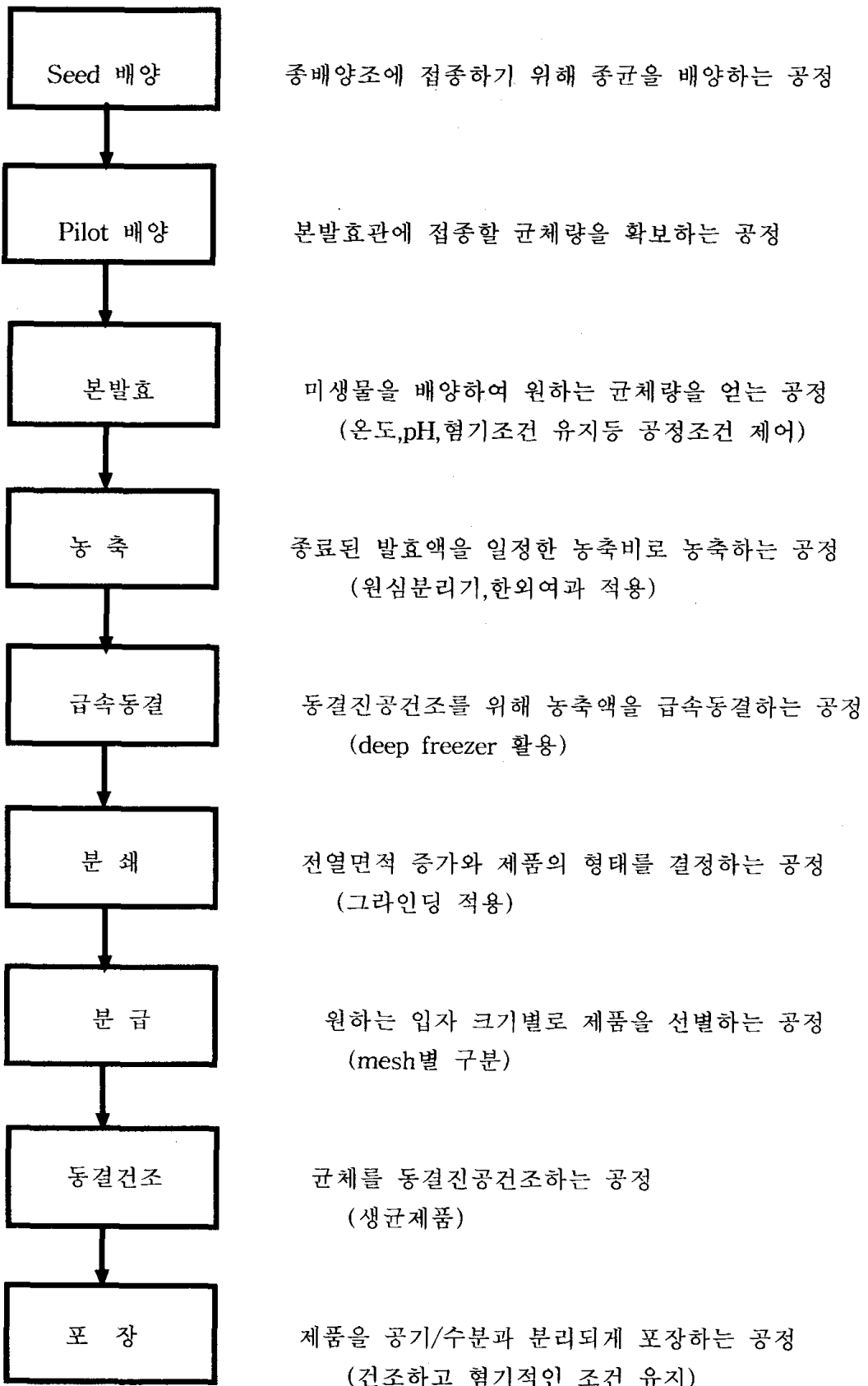
내균총 개선 및 정상제로서의 역할에 대하여 추가적으로 토의할 계획이다. 실험에 참여하고 있는 인원은 관악구 신림동소재 노인정에 있는 노인 12명 (남자 6명, 여자 6명)이며 5주에 걸쳐서 김치 및 기타 발효제품의 식이를 제한하며 정상제 비섭취 1주, 섭취 1주를 번갈아 가며 그 균총의 변화를 살펴 볼 것이다.

바. 농산물 전처리 시스템 개발 및 발효 제품 생산 시스템

1) 가공 공정 layout

완성된 제품의 대량 생산 및 산업화를 위한 원료전처리 및 공정 개발로 기본적인 공정도에 의거하여 공정 layout을 완성시키고 있다. 여러 가지 시행착오를 통한 발효공정의 최적화로 가장 효율 적이고 쉽게 모든 조건을 제어할 수 있는 공정의 layout을 개발 하였다.

2)공정도



3) 발효 적성을 위한 농산물 전처리

유산균 성장과 동시에 자가 생성되는 다량의 유기산은 발효후기의 유산균 사멸의 주요 원인이 된다. 그러므로 유산균 고농도 발효에 있어서 생성된 유기산을 중화하는 중화제의 선택과 농도구배는 유산균 고농도 발효에 중요한 인자로 작용한다. 또한 농후발효를 위한 growth factor로서의 미량영양성분의 첨가는 유산균 성장을 촉진한다. 따라서 여러 가지 buffer와 중화제를 전처리하여 유산균배양에 응용함으로써 생성된 유기산을 효과적으로 제거할 수 있는 방법을 조사하고, 다양한 영양성분을 첨가하여 유산균의 성장을 알아보았다.

4) 농산물 전처리로서의 buffer 효과 비교

buffer는 20mM phosphate, 20mM β -disodium glycerophosphate, 100mM phosphate를 사용하였고, 1N HCl, 1M acetic acid를 100 μ l씩 첨가하여 pH에 따른 buffer 효과를 조사하였으며 각각의 buffer는 pH7 로 조정하여 사용하였다.

5) 중화제 첨가

발효중에 생성되는 유기산을 제거하기 위한 중화제로 CaCO₃와 Na₂CO₃를 사용하였다.

사.두유 분해(가수분해) 및 알러지 저하, 감화를 위한 bacillus의 protease탐색

콩의 allergenicity가 밝혀졌음에도 불구하고, 콩의 antigen성분이 제대로 규명되지 않았고, allergenicity를 감소시키려는 시도는 이루어지고 있지 않은 형편이며 특히 우유의 대체 식품으로 공급되는 두유에 대한 allergy 연구는 전혀 이루어지고 있지 않아 allergenicity가 감소된 식품을 개발할 목적으로 미생물 기원 protease를 이용해 antigen을 random하게 분해하는 방법을 채택하여 allergenicity를 감소시키려 시도하였다. 따라서 allergy 저하, 감화된 두유 발효 제품생산을 위해서 그 전처리로서의 protease를 탐색하였다. 즉 protease 분비능이 높아 콩을 발효시켜 Natto 제조에 이용될 뿐 아니라 혈전용해능이 알려진 *Bacillus subtilis* strains를 경상대학교 유충호 교수로부터 공급받아 23종의 proteolytic activity를 비교하여 우수한 균주를 선발하고자 하였다. 공급받은 *Bacillus subtilis* strain은 다음과 같으며 (KM-7, KM-8, KM-10, KM17-1, KMJ-1, KMJ-2, KMJ-4, KMA-3, KMA-4, KMY-2, SD-1, SS-4, SS-5, GS-2, GS-3, HD-1, HD-3, HD-4, HD-5, HD-10) Protease activity 측정은 Kunitz's method에 의거 하였다. 약술하면 Soybean flour type I 을 121 $^{\circ}$ C에서 15min 열수추출하여 6,000 rpm에서 원심분리해 상정액을 취해 동결건조시켜 substrate로 이용하였다. pH 7.0, 50 mM sodium phosphate buffer 에 기질을 2% 현탁시킨 용액 1.0ml에 효소 배양액 0.2ml 넣어 55 $^{\circ}$ C, 30min 반응식 0.44M Trichloroacetic acid (TCA) 2.5ml 가함. 이를 원심분리시켜 종료액을 3000rpm에서 10분간 원심분리하여 상정액 1.0ml에 2.5ml, 0.55M Na₂CO₃, 0.5ml Folin and Ciocalteu's reagent를 혼합후 잘 섞어 37 $^{\circ}$ C 30분 발색 시킨 후 578nm에서 absorbance를 측정하였다. 효소활성의 1unit은 pH 7.0,

5.5℃에서 1분간 1mole의 tyrosine을 생산하는 효소량을 의미한다. 각 균주를 soy trypticase broth에서 37℃에서 1일간 배양 후 그 배양액을 이용하여 실험하여 배지만 측정된 균에 비해 효소생산량이 많은 균을 선별하는 작업을 실시하였다.

2. 연구결과 및 고찰

가. 종균 생산 및 제품 생산을 위한 발효 공학 기술

1) 농산물 발효 특성 규명

발효원료 농산물 소재를 선정하기 위하여 문헌조사에 의하여 67 가지의 소재중 식품으로 사용가능한 소재 33가지를 선정하여 각종 유산균 발효를 수행하였고 추가 실험을 수행하였다.

분류	선정 농산물
곡 류	보리, 현미, 감자, 고구마, 마, 통밀, 메밀, 귀리, 콩
야채류	부추, 배추, 양배추, 버섯류, 파, 무, 쑥, 토마토, 당근, 시금치
과일류	사과, 배, 귤, 복숭아, 마나나, 자두, 살구, 무화과
해조류	미역, 다시마
기 타	결명자, 구기자, 감초, 알로에, 참깨

2) 야채류에서의 유산균주의 발효

pH 5.3의 녹색양파 배양액과 pH 4.3인 토마토 배양액을 제외하고는 pH의 유의적 차이는 없었다. 균성장변화는 균종과 배양액에 따라 다양한 값을 나타내었다. 토마토 배양액에 균을 키웠을 때 lactic acid bacteria와 bifidobacteria는 낮은 pH 상태(pH 4.3)로 인해 상대적으로 저조한 성장률을 보였지만 pH를 7.2로 조절하고 L-cysteine을 첨가했을 때 다시 성장이 증가하였다. Bifidobacteria의 생균수는 pH 조절, L-cysteine 첨가후 부추, 무, 녹색양파, 토마토 배양액에서 증가함을 보였다. Lactic acid bacteria의 경우 pH 조절, L-cysteine 첨가후 부추 배양액과 토마토 배양액에서 균수 증가를 보였다. 배추, 양배추, pH 보정 토마토, 당근, 시금치 배양액이 다른 야채류에 비해 상대적으로 높은 발효능을 보이는 것은 발효가 용이한 탄수화물 성분을 더 보유하고 있는 것으로 추정할 수 있다. 본 실험실 연구원들을 대상으로 한 관능 평가 결과 배추, 양배추, 녹색양파, 시금치는 발효시 매우 불쾌한 향미를 나타내었다. 그러므로 pH 보정한 토마토나 자연 당근이 발효적성이 우수하다고 할 수가 있겠다.

Growth of lactic acid bacteria and Bifidobacteria in media using vegetables and seaweeds

Samples	Log CFU/mL in natural media					Log CFU/mL in pH adjusted media ¹⁾				
	<i>L.</i>	<i>S.</i>	<i>Bifido-</i>	<i>Bifido-</i>	<i>L.</i>	<i>S.</i>	<i>Bifido-</i>	<i>Bifido-</i>		
	<i>acidophil</i>	<i>L. casei</i>	<i>thermop</i>	<i>bacteriu</i>	<i>bacteriu</i>	<i>acidophil</i>	<i>L. casei</i>	<i>thermop</i>	<i>bacteriu</i>	<i>bacteriu</i>
<i>us</i>	911	<i>hilus</i>	<i>m sp.</i>	<i>m sp.</i>	<i>us</i>	911	<i>hilus</i>	<i>m sp.</i>	<i>m sp.</i>	
	145	th-116	knj-65	BB-12	145		th-116	knj-65	BB-12	
Initial inoculum	6.8	7.4	6.7	6.8	7.3	6.8	7.4	6.7	6.8	7.3
Final growth ²⁾										
Leek	7.7	6.6	7.5	8.3	6.0	8.6	7.8	8.1	8.6	6.8
Chinese cabbage	8.3	8.6	8.4	8.7	9.0	8.0	9.1	8.4	8.8	9.2
Radish	7.3	8.3	7.2	6.9	7.3	7.2	8.6	7.3	7.7	8.3
Cabbage	9.2	8.7	8.5	7.8	8.6	8.7	8.9	8.7	8.1	8.6
Green onion	7.7	8.5	8.3	7.2	7.3	7.6	7.9	8.7	8.2	8.2
Tomato	5.8	8.7	6.7	6.0	8.0	8.0	9.6	7.8	8.8	9.2
Carrot	8.4	9.8	8.1	8.8	8.5	8.2	9.3	8.0	8.1	9.0
Spinach	8.7	7.8	8.4	8.4	9.3	8.6	8.0	8.7	8.6	8.6
Seaweed	7.3	7.6	7.5	6.9	7.7	7.5	8.2	7.6	6.7	8.0
Tangle	7.3	8.5	7.3	7.7	7.3	7.1	9.0	7.8	8.2	7.7
Mugwort	7.6	7.9	7.6	7.7	7.6	7.8	7.9	7.7	7.8	7.7

¹⁾pH of each media was adjusted to 7.2 and 0.05% L-cysteine·HCl was added.

²⁾Lactic acid bacteria and bifidobacteria in various media were incubated anaerobically at 37°C for 24 hr.

3) 곡류, 감자류에서의 유산균주의 발효

곡류, 감자류 배양후, 젖산균과 비피더스균의 생균수를 비교하였다.

이들 배양액의 pH는 6.5-7.0으로 pH 보정과정은 생략되었다. 24시간 배양 후 모든 배

양액에서 균성장은 pH를 보정한 야채류 배양액보다 낮았다. 유일하게 메밀 배양액에서 모든 균종이 초기 접종 균수에 비해 약간의 성장을 보였다. 이러한 낮은 성장 결과는 단순당이나 아미노산과 같은 쉽게 이용할 수 있는 영양소의 부족으로 추정할 수 있다. 흥미있는 결과는 마 배양액에서 *Lactobacillus caesi* 911만이 상당히 자랐다는 점이다. 감자류 배양액에서 24시간 배양후 모든 균의 수가 감소하였다. 이 결과는 감자류 배양액의 어떤 성분이 유산균의 저해제로 작용함을 암시하고 있다.

이상과 같이 발효적합 소재로 토마토, 당근, 마 및 1 차년도 선발소재 두유로 압축되었다. 이중 두유 소재는 1 차년도부터 지속적으로 선발이용한 소재로서 다음의 고농도 배양소재는 주로 두유베이스 및 두유 단백질이 이용되었고 토마토, 당근 및 마의 고농도 적용 실험은 주로 3 차년도 초기에 수행될 것이다.

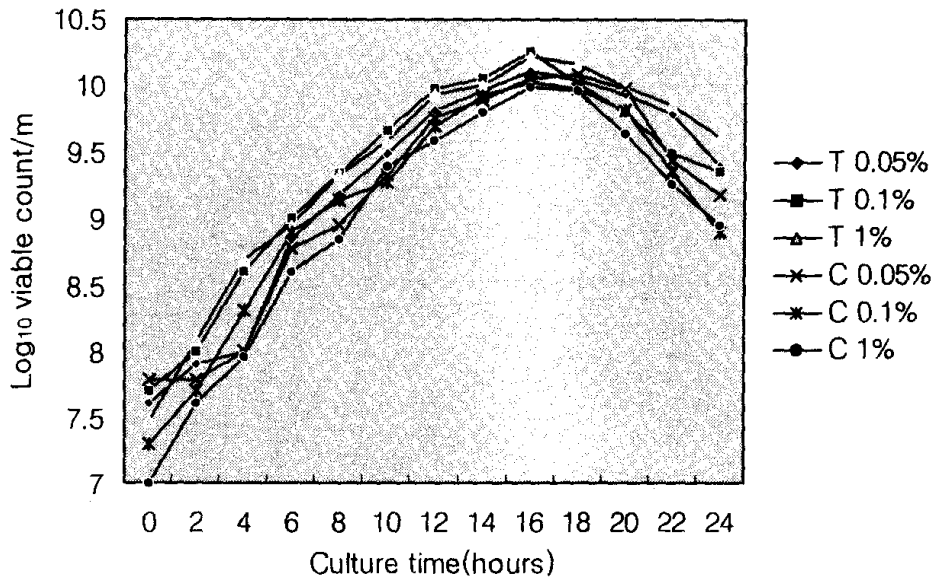
Growth of lactic acid bacteria and Bifidobacteria in natural media using grains and potatoes

Samples	Log CFU/mL in natural media					
	<i>L. acidophilus</i> 145	<i>L. casei</i> 911	<i>S. thermophilus</i> s th-116	<i>Bifidobacterium</i> sp. knj-3	<i>Bifidobacterium</i> sp. knj-65	<i>Bifidobacterium</i> sp. BB-12
Initial inoculum	7.0	7.5	6.3	7.4	7.3	7.4
Final growth ¹⁾						
Buck wheat	7.8	8.0	7.9	8.0	8.1	8.1
Corn	6.8	7.9	7.3	5.4	6.8	7.8
Whole meal	6.4	8.3	6.8	6.1	7.0	5.0
Potato	<5.0	7.1	<5.0	5.5	5.3	7.0
Brown rice	6.5	7.7	7.3	7.4	6.6	7.5
Barley	6.6	7.9	7.3	6.3	6.9	6.9
Yam	6.6	9.4	7.7	7.0	7.0	7.9

¹⁾Lactic acid bacteria and bifidobacteria were incubated anaerobically at 37°C for 24 hr.

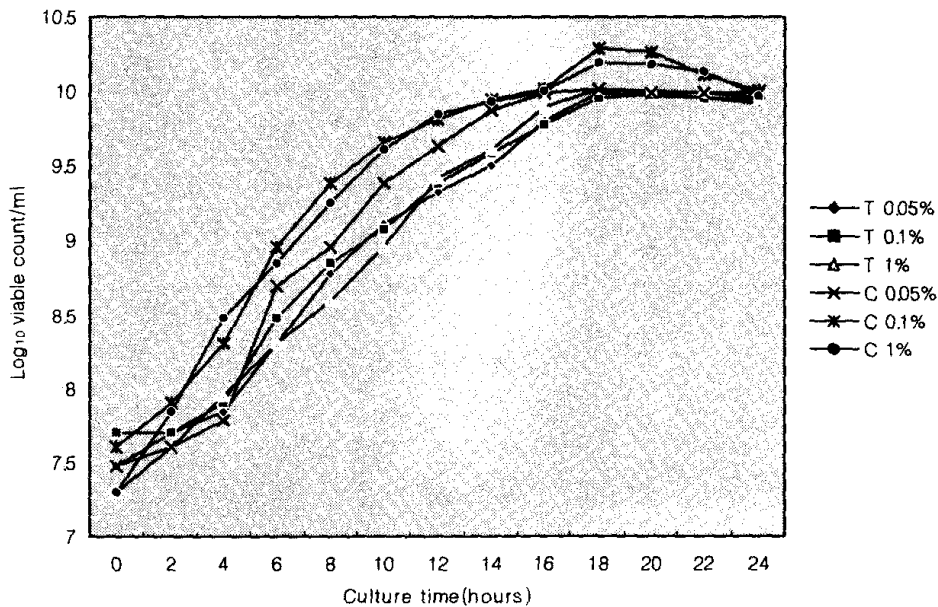
나. 종균 대량 배양 기술 농산물 소재를 이용한 발효

성장인자와 발효



이상의 결과에서 *Bifidobacterium longum* CBT 2008의 최적 배지는 기본배지에 농수산물 소재인 2% ISP와 0.1% Tuna extract를 첨가한 것이었으며 16시간 배양에서 최대 생균수인 1.8×10^{10} cfu/ml을 나타내었다 위와 같은 조합을 이용하여 성장인자 조절에 따른 농산물 소재에서의 대량발효의 최적화 조건을 마련할 수가 있었다.

성장인자와 발효



이상의 결과에서 *Lactobacillus acidophilus* CBT 1007의 최적 배지는 기본배지에 유기질소원으로 4% Skim milk와 농수산물 소재인 2% ISP 그리고 0.1% Chlorella를 첨가한 것이었으며 18시간 배양에서 최대 생균수인 2×10^{10} cfu/ml을 나타내었다.

다. 종균 원말화 기술

다음의 표와 같이 유산균체 중량비대 20%의 옥수수 전분이 제품의 안정성을 증가시킬 수 있음을 알 수 있었다. 따라서 원말화 조건의 최적화를 이룩함으로써 높은 효율로 생균체를 유지시킬 수 있고 따라서 정상작용 및 고기능적 효과를 나타낼 수 있는 probiotic 제품을 만들 수 있는 기반을 마련하였다.

< 40℃ 온도에서 *Lactobacillus acidophilus* 원말의 생균수 변화 >

(단위: Log₁₀ viable count/g)

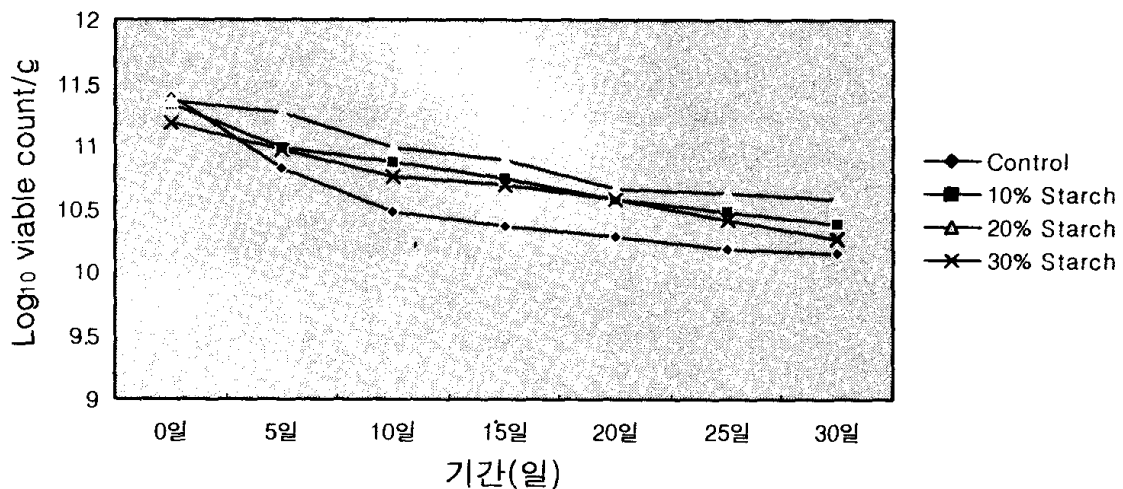
	0일	5일	10일	15일	20일	25일	30일
control	11.40	10.83	10.48	10.36	10.28	10.18	10.15
10% starch	11.32	10.98	10.86	10.73	10.58	10.48	10.38
20% starch	11.36	11.26	10.98	10.89	10.65	10.62	10.58
30% starch	11.18	10.96	10.75	10.68	10.57	10.41	10.26

< 40℃ 온도에서 *Bifidobacterium longum* 원말의 생균수 변화 >

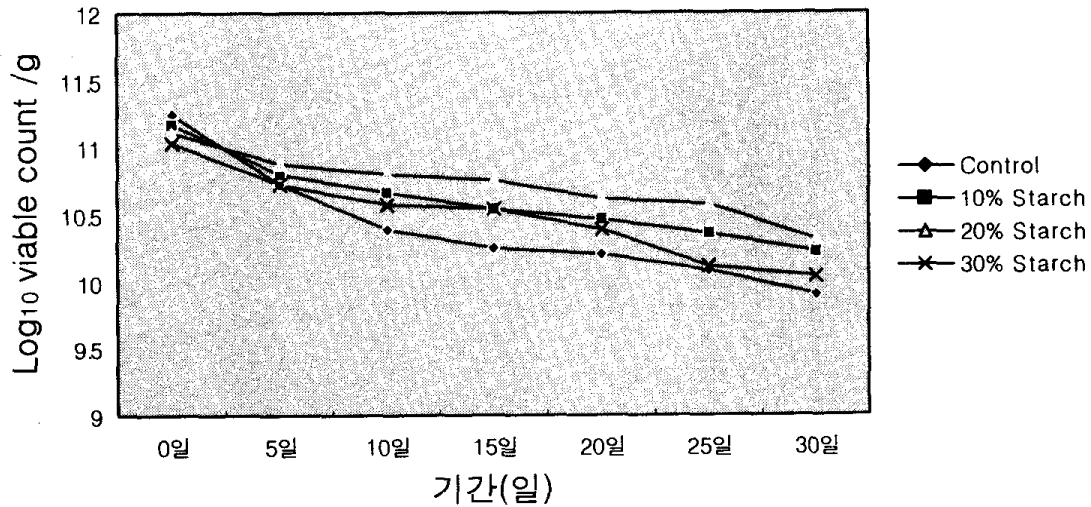
(단위: Log₁₀ viable count/g)

	0일	5일	10일	15일	20일	25일	30일
control	11.26	10.73	10.40	10.26	10.20	10.08	9.90
10% starch	11.18	10.81	10.67	10.54	10.46	10.36	10.23
20% starch	11.11	10.88	10.80	10.76	10.62	10.58	10.32
30% starch	11.04	10.72	10.58	10.54	10.40	10.11	10.04

40℃에서의 생균수 변화 (*Lactobacillus acidophilus*)



40°C에서의 생균수 변화 (*Bifidobacterium longum*)



라. 선발균주의 동정, 생리

-F6PPK test

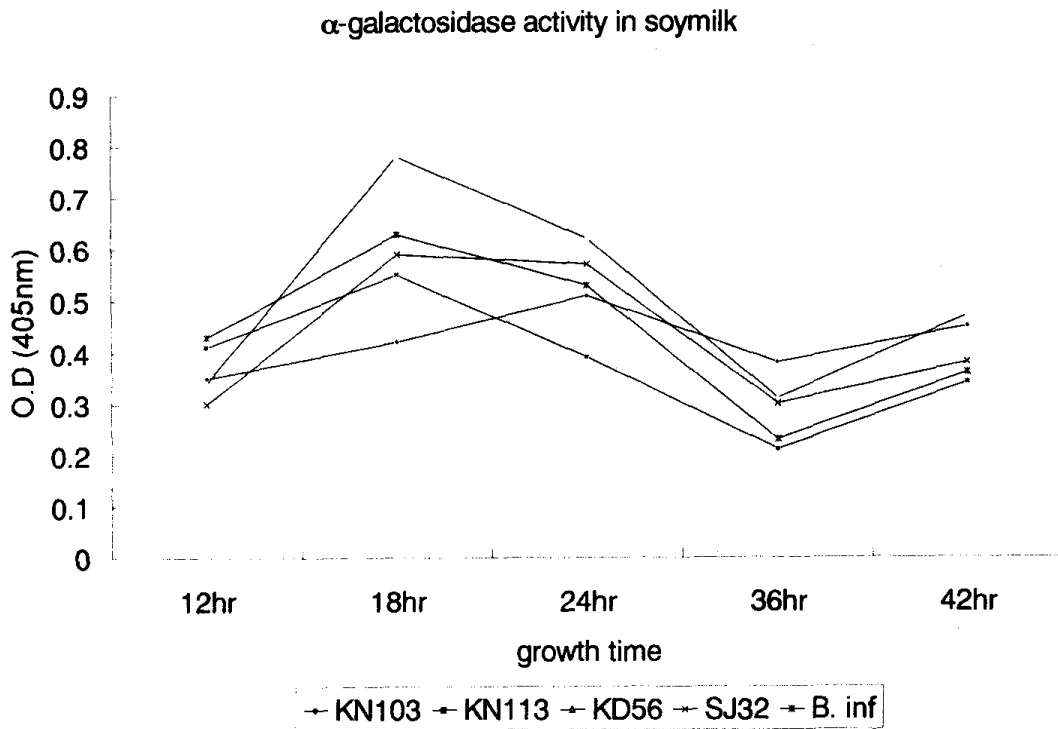
위의 실험결과 fructose-6-phosphate phosphoketolase 양성이면 ferric chloride 6H₂O와 반응하여 갈색의 발색반응을 보이며 음성일 경우 발색반응 없이 노란 시약색으로 남게 된다. 1차년도 TP배지에서 분리된 60여 균주 중에서 F6PPK test 결과 56균주가 양성의 갈색 반응을 보였고, 4균주만이 음성의 노란색으로 남은 것을 관찰할 수가 있었다. 이로서 56균주에 대하여서는 bifidobacteria 라는 것을 확인하였다.

마. 선발된 *Bifidobacterium* 의 생리학적 평가

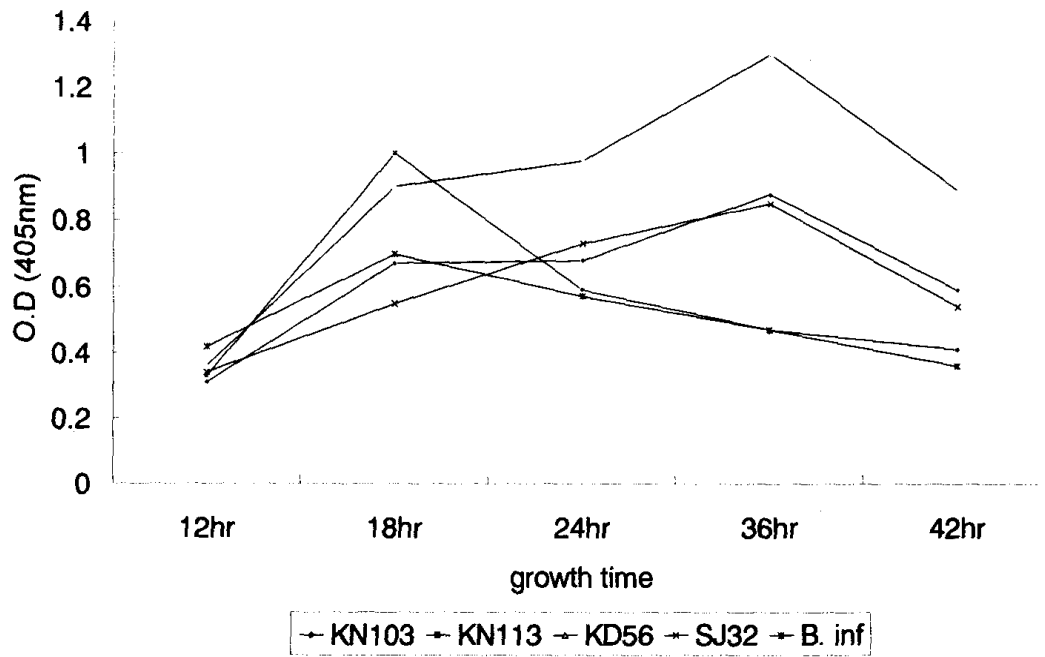
1) 균주에 대한 유해 및 유익효소의 패턴 검사

본 연구에서는 다양한 배지에서 α -galactosidase, β -galactosidase, β -glucosidase, β -glucuronidase 등의 효소활성을 측정하였는 바 특히 중점적으로 두유 배양시의 효소활성을 측정하였다. 약 20 여종의 *Bifidobacterium* α -galactosidase의 패턴은 42시간 동안 측정된결과 일반적으로 18시간에서 가장 높은 활성을 지녔으며 36시간 까지 그 활성이 줄어들다가 일부 균의 경우 42시간에서 다시 그 활성이 증가하였다. 이때 두유에 들어있는 올리고당의 성분중 raffinose와 stachyose등의 수준은 균주에 따른 차이가 나타났다. 몇 균주들은 이들 올리고당을 거의 모두 이용하는데 비하여 일부 균주는 올리고당을 거의 이용하지 않았다. 모든 균주에서 두유중의 설탕은 모두 이용하여 배양액중의 설탕은 잔존하지 않았다. β -galactosidase 는 일반적인 추세를 따르기는 하나 균주간의 차이가 있었다. 대체적으로 36시간 까지 증가하는 유형과 18시간에서 그 활성이 감소하는 두가지 유형으로 나누어 볼 수가 있는데 42시간까지의 지속적인 활성측정시 모두 그 활성이 감소하는 경향을 보였다. β -glucuronidase는 실

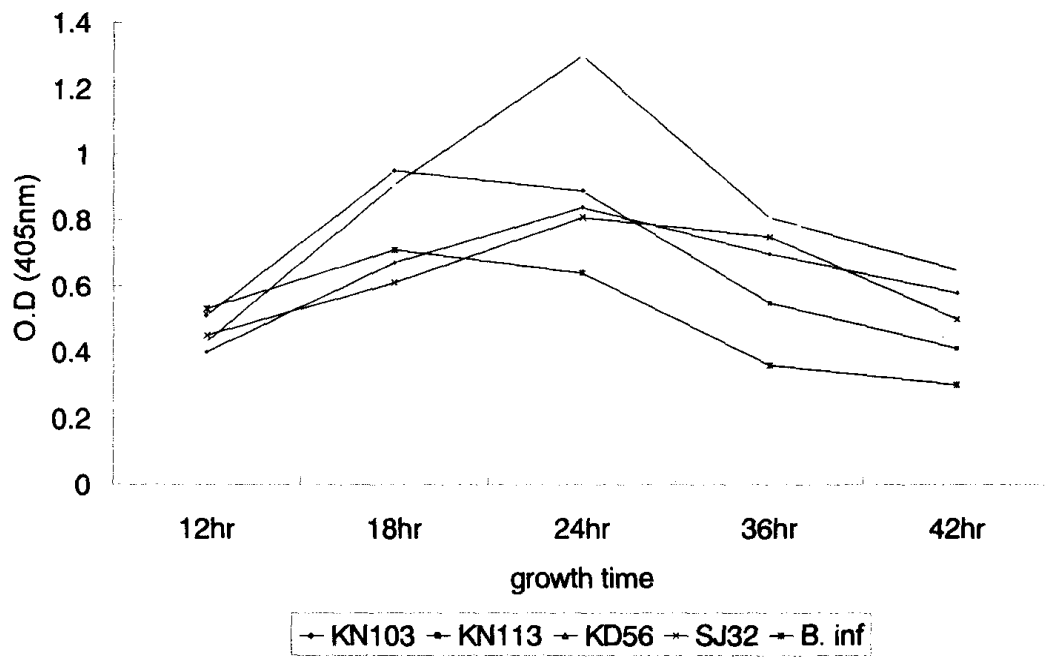
협대상의 모든 균주가 음성반응으로 선발된 모든 균주는 β -glucuronidase의 활성이 없는 것으로 β -glucuronidase의 유해성에 대해서는 안전한 균주들이라고 할 수가 있겠다. 이상의 결과 및 다른 종류의 유산균 및 장내 세균배양의 결과를 종합하면 *Bifidobacterium*은 α -galactosidase와 β -galactosidase의 수준이 높았고 이는 발효중 또는 섭취후 lactose, raffinose, stacyose 등의 올리고당을 이들 *Bifidobacterium*이 선택적으로 잘 이용한다는 것을 시사한다. 이들 효소는 MRS 또는 BHI 등 인공배지에 올리고당을 첨가하였을 때 효소생산이 현격히 증가하였으나 상대적으로 두유 중에서는 효소의 유도 또는 억제가 낮은 결과를 보였다.



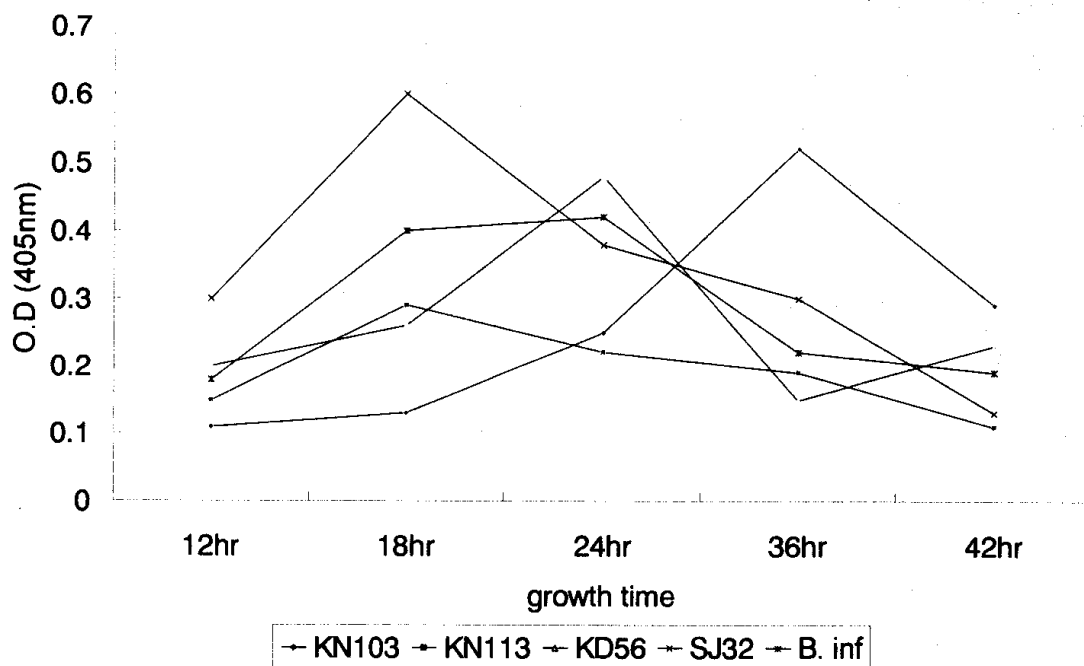
β -galactosidase activity in soymilk



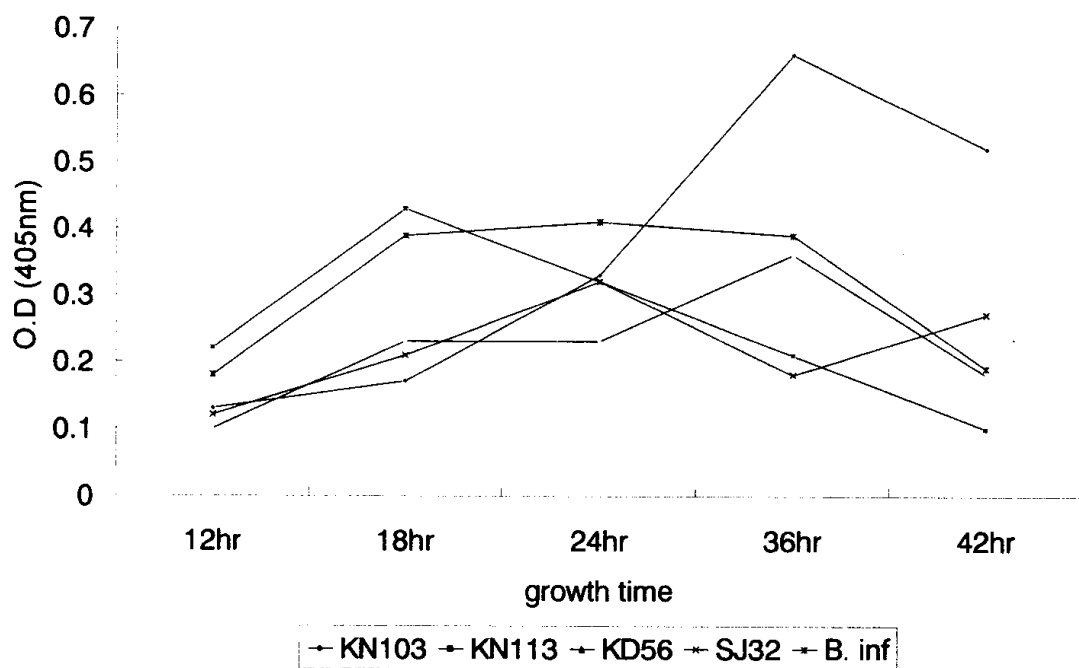
β -glucosidase activity in soymilk

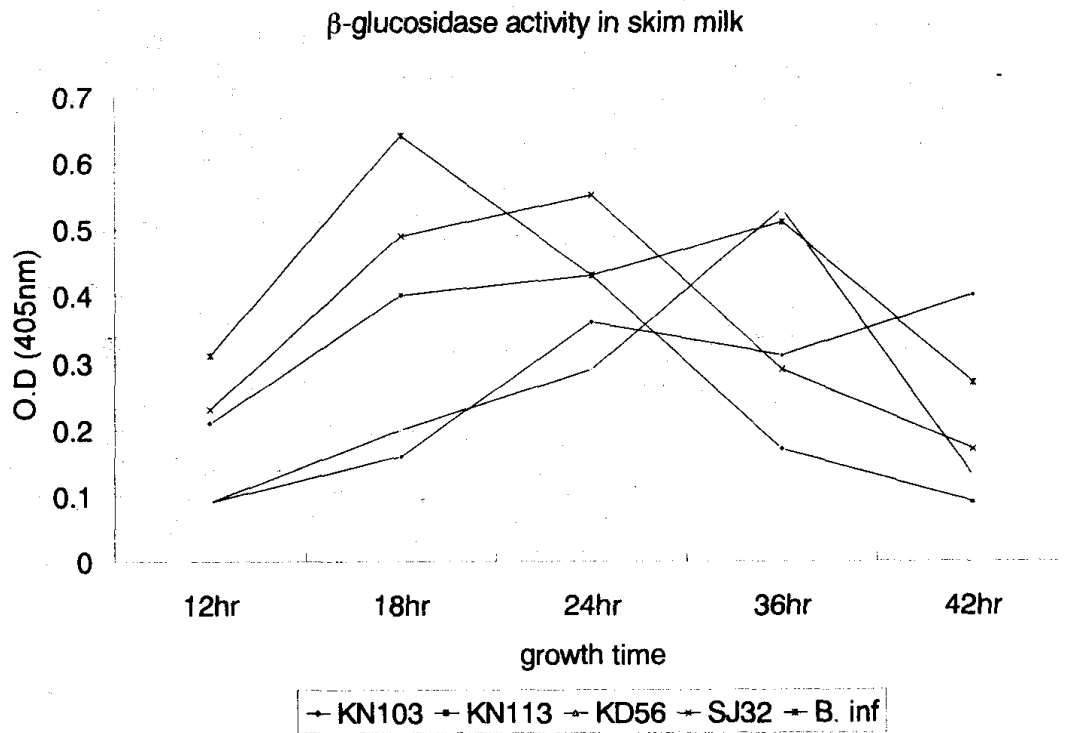


α -galactosidase activity in skim milk



β -galactosidase activity in skim milk

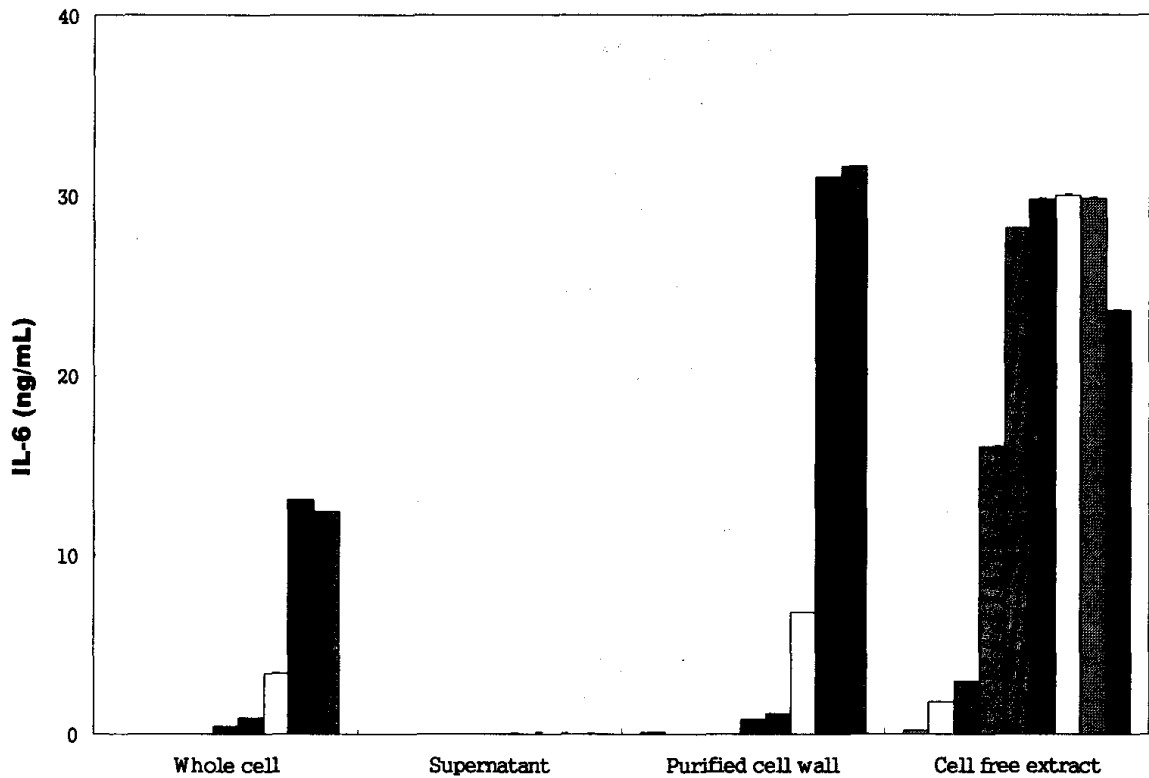




2) *Bifidobacterium* 균체분획의 면역 활성화능 고찰

본 연구진의 선행연구 및 1차년도 연구에서 *Bifidobacterium* 및 유산균간에는 균주에 따라 Peyer's patch 및 macrophage에 대한 활성화능이 차이가 있는 것으로 조사되었다. 또한 면역활성능과 인체 장 상피세포 부착능 간에도 다소의 상관관계가 있었다. 조사된 다양한 균주중 *Bifidobacterium* sp. JH01 균주의 경우 특히 cell extract부분에서 면역 강화능이 더욱 크게 나타났다. 기존의 연구에서 cell wall에서 면역성 물질 유도능을 살펴볼 수 있었던 점과는 차별적인 결과였다. 이에 현재 진행중인 연구는 JH01 균주의 세포질 부분이 면역 강화능이 높게 나타난다는 점을 흥미롭게 관찰하고 있다. 이는 macrophage cell line을 이용한 실험 결과에서도 나타나고 있으며, murine에서 분리한 cell에서도 나타나고 있는 결과이다. 이 분획의 분리 정제와 특성규명에 대한 심층적인 연구가 요구된다.

Effect of various cell fractions of *Bifidobacterium* JH01 on the IL-6 production by murine macrophage cell line.



RAW 264.7 cells (5×10^5 cells/mL) were cultured for 24h in the presence of various bacterial components. Data are means \pm SD of triplicate cultures. (Symbols : ■ 0 , ▨ 0.1 , ▩ 0.25 , ▪ 0.5 , ▫ 1 , ▬ 5 , □ 10 , ⊠ 50 , ⊞ 250 μ g/mL *Bifidobacterium* JH01)

바. 중군 및 소재의 노인 생리 평가

1) 섭취후의 변비개선 및 균총평가

가) 노인의 장내균총 조성 및 분포

본 연구진에서 개발한 발효법에 의하여 고농도 두유배양액을 제조하였고 현재 노인 지원자를 모집하여 노인의 장내균총변화를 조사하고 있다. 지원자는 관악 노인회 중 60세 이상의 10명을 대상으로 하여 섭취전-섭취 1주후 -비섭취 1 주후 -섭취 1 주후- 비섭취 1 주후의 순으로 균총조사를 실시하는 내용이며 현재는 첫 번째 비섭취 시의 균총조사를 한 상태이다. 본 연구진에 의한 선행 실험결과를 다음과 같다.

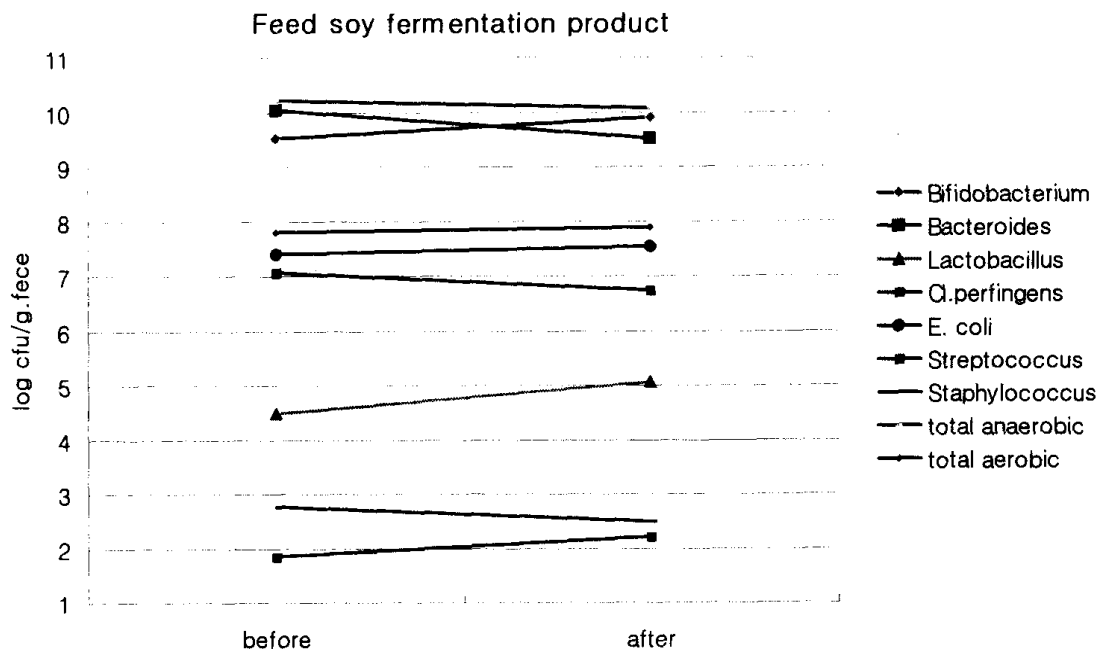
Fecal flora of older than 65 years old

	total (17) ¹⁾	male (7)	female (10)
<i>Bacteroides</i>	10.27 ± 0.32 ²⁾	10.16 ± 0.39	10.35 ± 0.30
<i>Bifidobacterium</i>	9.22 ± 0.64	9.21 ± 0.62	9.22 ± 0.69
<i>Eubacterium</i>	9.44 ± 0.40	9.44 ± 0.34	9.45 ± 0.47
<i>E.coli</i>	6.77 ± 1.50	6.22 ± 1.48	7.16 ± 1.58
<i>Lactobacillus</i>	6.83 ± 0.91	7.38 ± 0.86	6.44 ± 0.69
<i>Cl.perfringens</i>	5.15 ± 1.10	5.71 ± 1.36	4.87 ± 1.51
<i>Staphylococcus</i>	4.30 ± 1.82	4.81 ± 1.83	3.89 ± 1.81
Total aerobic	7.98 ± 0.83	7.80 ± 0.89	8.10 ± 0.80
Total anaerobic	10.45 ± 0.29	10.29 ± 0.41	10.56 ± 0.19

¹⁾Number of subjects test

²⁾Mean ± SD of log bacterial counts

발효제품을 노인에게 적용하기전 20대 대학생 5명에게 1주간 복용시키고 그 균총 변화를 관찰하였다. 그에 따라 아래와 같은 결과를 얻을 수가 있었다. 그 결과 가장 주목할만한 것은 *Bifidobacterium*이 최우세 균총으로 자리잡고 있음을 관찰할 수가 있었다.따라서 이 발효 제품이 장내 유익균인 *Bifidobacterium*을 증가시키는 데 효과적으로 이용될수 있고 따라서 정장제로서의 효과도 기대가 된다.

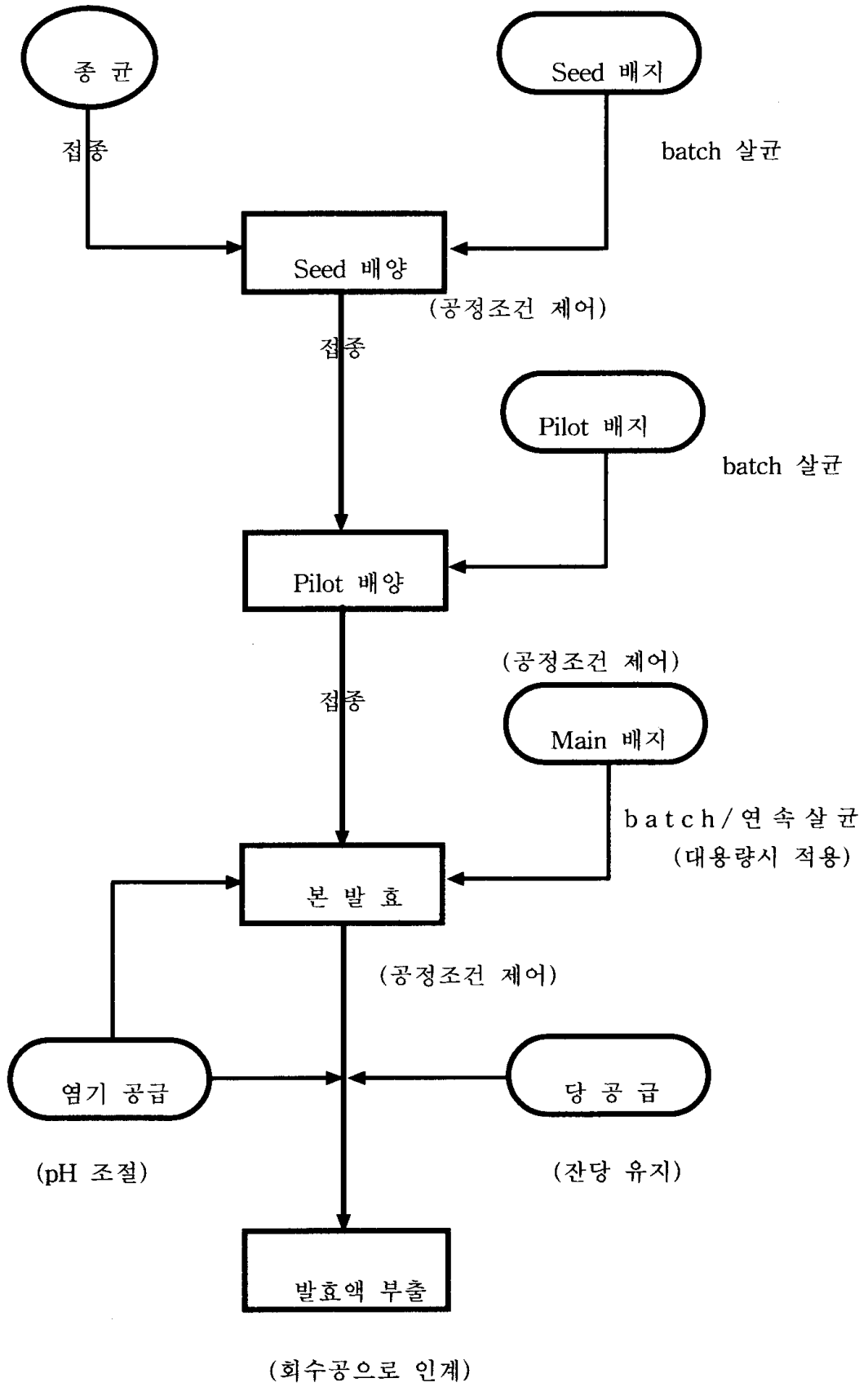


사. 농산물 전처리 시스템 개발 및 발효 제품 생산 시스템

1) 가공 공정 layout

기본적 공정제어 시스템에 의거하여 다음과 같이 단순화 시키고 효율적 제어가 가능한 공정화 layout을 최적화 시키고 있다.

2) 발효공정도



3) 발효 적성을 위한 농산물 전처리

가) 중화제 전처리의 buffer 효과 비교

같은 농도의 phosphate와 β -disodium glycerophosphate의 경우 phosphate buffer가 더 많은 양의 산에 완충능력을 나타내었다. β -disodium glycerophosphate는 1N HCl과 1M acetic acid에 대하여 HCl보다는 acetic acid에 대하여 보다 높은 완충능을 나타냈으나 유의적 큰 차이를 나타내지는 않았다.

나) 중화제 첨가

CaCO₃농도별 pH의 변화는 유의적 차이를 나타내지 않았지만 CaCO₃ 첨가와 무첨가의 경우 중화능에 큰 차이를 나타내었다. Na₂CO₃의 농도별 pH 중화능(data not shown)에서도 CaCO₃와 같은 경향을 나타냈다.

pH of 8ml batch culture with CaCO₃

CaCO ₃ (conc.) medium	0(mol)	0.05	0.1	0.15	0.2
MRS	4.41	4.90	5.03	5.06	5.08
두유배지	4.23	4.56	4.62	4.64	4.75
콩분말침출액	4.07	4.43	4.47	4.53	4.54

아. 두유 분해(가수분해) 및 알리지 저하, 감하를 위한 *Bacillus*의 protease탐색

다음은 *Bacillus subtilis* strains 4종에 대한 proteolytic activity를 측정한 결과이다.

Proteolytic activity of bacterial strains

Strains incubation time (hrs)	Strains				
	SD-1	GS-2	KM17-1	KMY-2	Blank
0	0.2549	0.2653	0.2691	0.2777	0.2583
2	0.2552	0.2666	0.2699	0.2888	0.2494
4	0.2822	0.2703	0.2461	0.2788	0.2708
6	0.2829	0.2966	0.2702	0.2973	0.3046
8	0.3662	0.3118	0.2978	0.2735	0.2994

시간에 따라 효소량이 증가한 것은 분명하나 균간 유의적인 차이를 발견하기 어려웠다. 이 결과는 균간 효소 자체 생산량이 차이가 없을 수도 있으나 이들이 각기 생산하는 효소량이 적은 경우 실험은 1/4로 희석되어 행해졌기 때문에 이를 정확히 측정하는데 무리가 있었을 가능성도 있으며, 이에 사용된 배지가 두유와 가장 비슷한 환경을 조성하기 위해 trypticase soy bean broth 였는데, 이 배지는 효소처리로 대부분의 protein이 분해되었기 때문에, 이를 분해하기 위해 더 이상의 protease가 분비될 필요가 없기 때문에 균간 차이가 더욱 적게 난 듯하다. 이를 보완하기 위해 앞으로의

실험에서는 별도의 protein source를 첨가해 배양할 필요가 있으며 이 screening이 끝나고 본 실험에서 allergenicity를 비교할 때는 직접 두유배지에 배양할 필요가 있다.

제 4 장 품질개선 및 제품 생리 평가

제1절 서 설

품질개선의 측면에서의 종균의 혼합기술의 안정화와 제품생산의 실제 lay-out을 완성하여 발효조의 이상적구조를 확립하였으며 경제적이고 합리적인 발효 시스템을 구축하여 제품생산을 할 수 있도록 하였다. 또한 생산된 제품을 가지고 노인에 대하여 직접 임상실험을 하였다. 그 결과 정장작용에 대한 유의성을 가지고 노인의 대장에 도움이 되는 것을 확인하였다.

1. 연구수행방법

가. 발효 균주 및 발효 제품의 기능성 제고

Bifidobacterium longum, *Lactobacillus acidophilus*의 혼합 발효를 하여 작업 수율과 생산성을 알기위하여 발효시간별 생균수를 측정하였고 200L급 발효조에서 배양조건을 최적화 하였다. 농수산물 소재로는 대두에서 분리된 대두분리단백, 참치 추출물 그리고 클로렐라를 사용하였고 염류의 최적 농도를 알고자 하였다.

1) *Bifidobacterium longum* CBT 2008와 *Lactobacillus acidophilus* CBT 1007의 혼합 발효

가) 배양 조건

2% ISP, 4% Skim milk, 3% glucose, 1% beef extract, 0.5% yeast extract, 0.05% L-cystein HCl, 0.1% Tween 80, 0.1% KH₂PO₄, 0.1% K₂HPO₄, 0.05% MgSO₄, 0.001% MnSO₄를 기본 조성하였고 질소원으로 사용한 탈지분유(Skim milk)와 대두분리단백 분말(Isolated soy protein, ISP)은 효소분해 후 사용하였다.

sodium propionate, ammonium acetate, ammonium citrate의 적정 농도를 측정하였고 참치 추출물과 클로렐라는 결정된 기본배지에서 생균수와 발효시간에 미치는 영향을 조사하였다. 이때, 배양조건은 200L 발효조에서 100L 배양액으로 *Bifidobacterium longum* CBT 2008와 *Lactobacillus acidophilus* CBT 1007 각 1%씩 접종하고 질소충진에 의해서 혐기조건을 유지하였고 37℃, 100 rpm에서 6.5로 pH를 조절하였다. 24시간 동안 발효하면서 매 2시간 마다 표본을 검사하였고 *Lactobacillus acidophilus* CBT 1007의 생균수는 호기적 조건에서 MRS agar배지와 *Bifidobacterium longum* CBT 2008은 anaerobic chamber를 사용하여 혐기적 조건하에 BL agar에서 측정된 생균수에 MRS agar에서 측정된 생균수를 제외한 생균수로 측정하였다.

나) 염류가 발효에 미치는 영향

sodium propionate, ammonium acetate, ammonium citrate는 각각 0%, 0.05%, 0.1%를 기본 배지에 첨가하여 생균수를 검사하였다.

다) 성장인자가 발효에 미치는 영향

나)에서 결정된 기본배지에 참치추출물과 클로렐라를 0.1%씩 각각 또는 동시에 첨가한 후 발효 시간에 따른 생균수의 변화를 관찰 하였다

나. 혼합 유산균 원말의 제품화

1) 혼합 유산균의 원말화

유산균의 회수는 최적 배양된 유산균을 연속 원심분리기에서 15,000rpm으로 1.5l / min의 유량으로 유산균체를 회수 하였고 회수된 유산균체와 당과 단백질이 함유된 멸균된 보호제를 1:1.5로 혼합하였다. 이후 - 45℃ 이하로 동결시킨 후 진공도 20mmTorr이하에서 30℃ 온도로 4일간 냉동 건조하였다.

이때 유산균체 중량비 20%의 건열 살균된 옥수수 전분을 혼합된 유산균체액에 첨가 하였다.

2) 제품 개발

유산균 원말은 발효취와 갈변화에 의한 이질감 때문에 일반 소비자가 섭취하기 어려우므로 맛과 색을 가미하고 정장효과를 증가 시키기 위하여 다음의 5가지 제품을 시험 생산 하였다.

다. 제품 생산 공정 및 제품 생산

1) Pilot Plant 규모의 발효 실증

발효 배지의 원료 중 단백질원은 효소처리에 의하여 분해하였고 그외 다른 성분은 효소처리된 단백질원과 정제수와 함께 200L급 발효관에서 121℃, 20분 살균 공정을 거친 후 37℃로 냉각 후 접종하여 발효 하였다. 평균적 생산수율을 계산하기 위하여 100L 발효를 5회 실시 하였고 원말이 2.64×10^{11} cfu/g이고 평균회수율이 31.7%이었다.

라. 비피더스를 이용한 대두 발효 물질이 노인 대장의 세균총에 미치는 효과

인체의 장관내에는 많은 균총이 자리잡고 있으며, 연령에 따라 장내의 균총 balance는 변하게 된다. 특히 어린 영유아때에 장내에 많이 서식하고 있는 bifidobacterium은 인체의 정장작용 및 면역력 증강 효과에 크게 기여하는 유익균으로 알려져 있다. 상대적으로 인체의 노화가 진행되면서 유익균보다는 유해균의 비율이 높아진다.

대두 발효된 bifidobacterium을 이용하여 그 산물을 노인 섭취시켰을 때 대장내에 존재하는 호기성, 혐기성 균총의 변화를 살펴보고, 수분과 산도를 측정하였다. 우선 발효 물질을 섭취하지 않았을 경우와 섭취하였을 경우를 교차시켜서 10일 간격으로 분변을 얻은 뒤 이를 buffer에 희석하여 각 균총에 대한 선택 배지에 도말하여 배양하였다.

총 5차에 걸쳐 시행되었으며, 14명의 건강한 노인 여자 대상자에게 시행되었다.

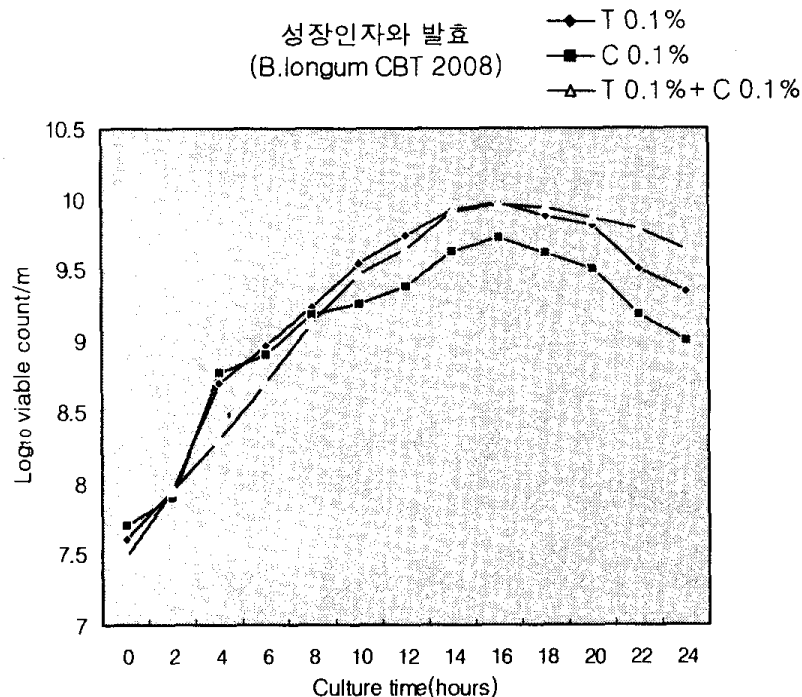
실험 기간 동안에는 기타 발효 식품의 섭취를 제한하도록 하였다.

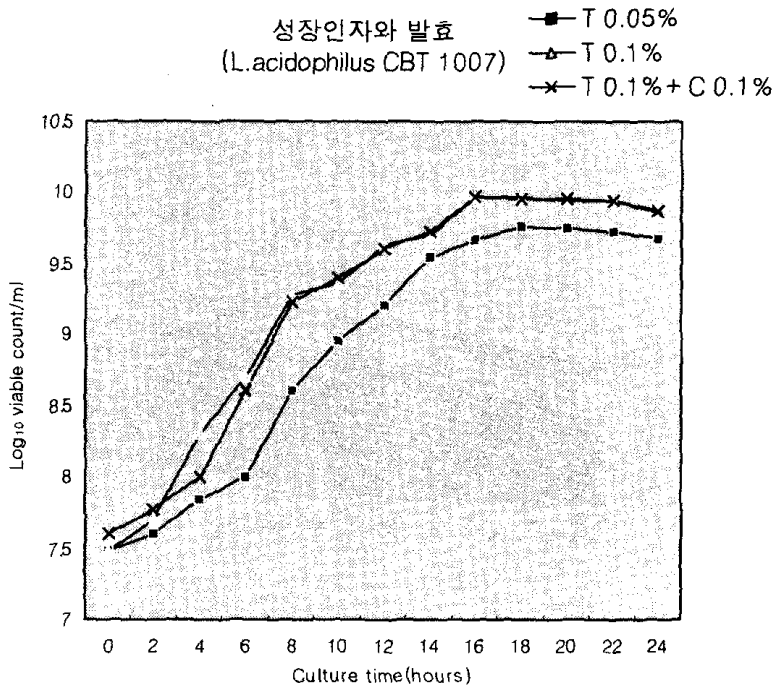
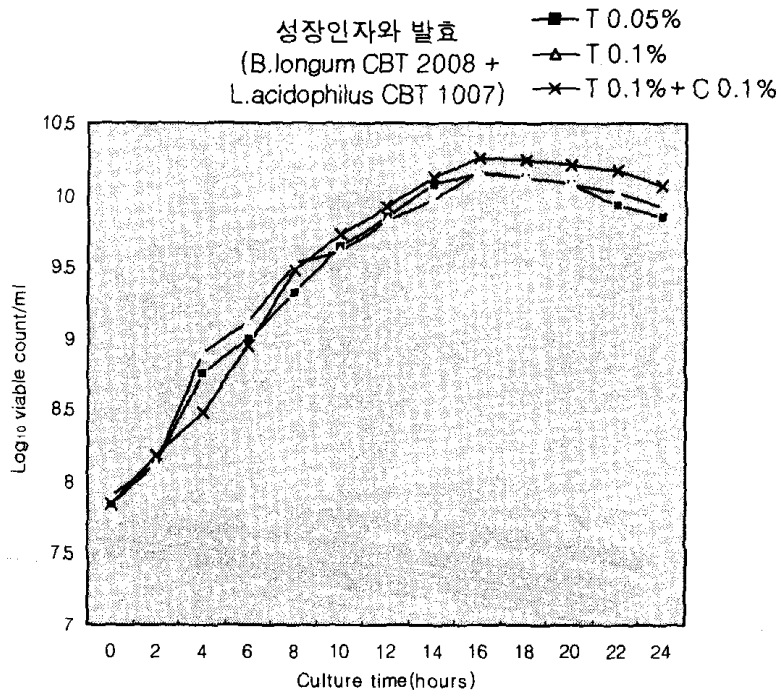
매 실험시 배변 분석과 함께 대상자들이 발효 물질을 섭취하였을 때 느끼는 생리적 변화를 살펴보기 위하여 몇 가지 설문을 실시하였다.

2. 연구결과 및 고찰

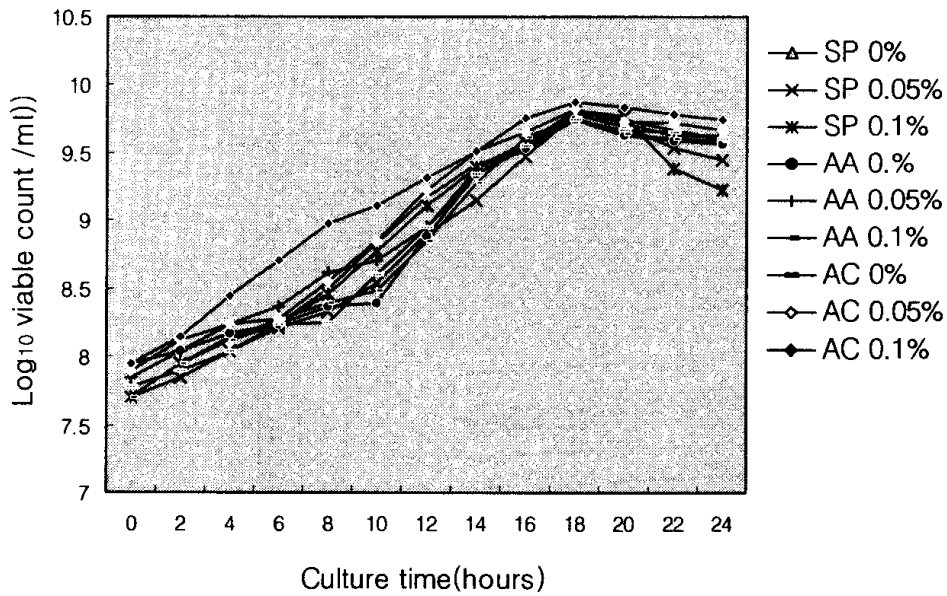
가. 발효 균주 및 발효 제품의 기능성 제고

다음의 결과에서 *Bifidobacterium longum* CBT 2008과 *Lactobacillus acidophilus* CBT 1007의 혼합 배양시 최적배지는 기본배지에 0.05% ammonium acetate, 0.1% ammonium citrate, 0.1% Tuna extract와 0.1% Chlorella를 첨가 한 것이었으며 16시간 배양에서 최대 생균수인 1.84×10^{10} cfu/ml을 나타내었다.

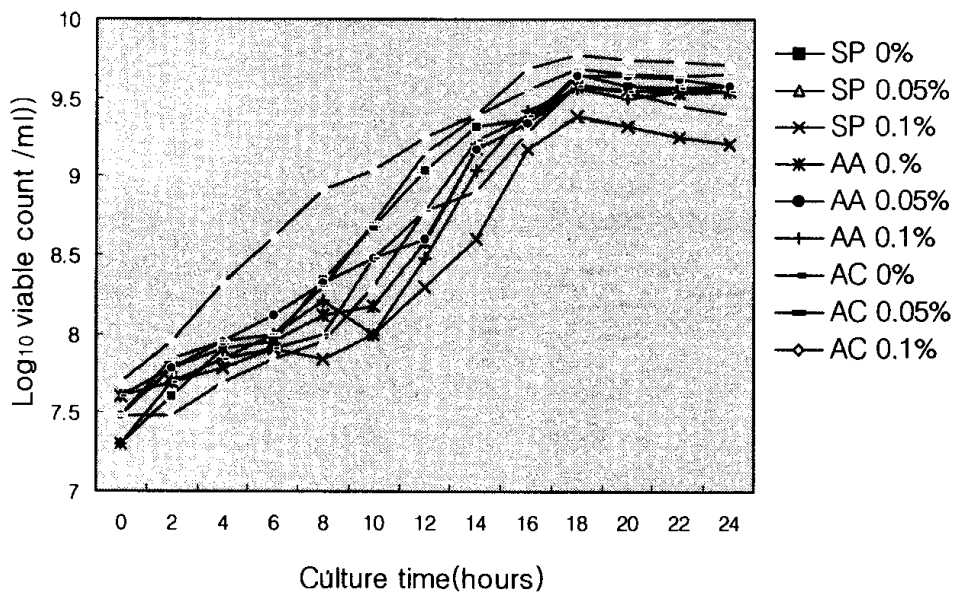




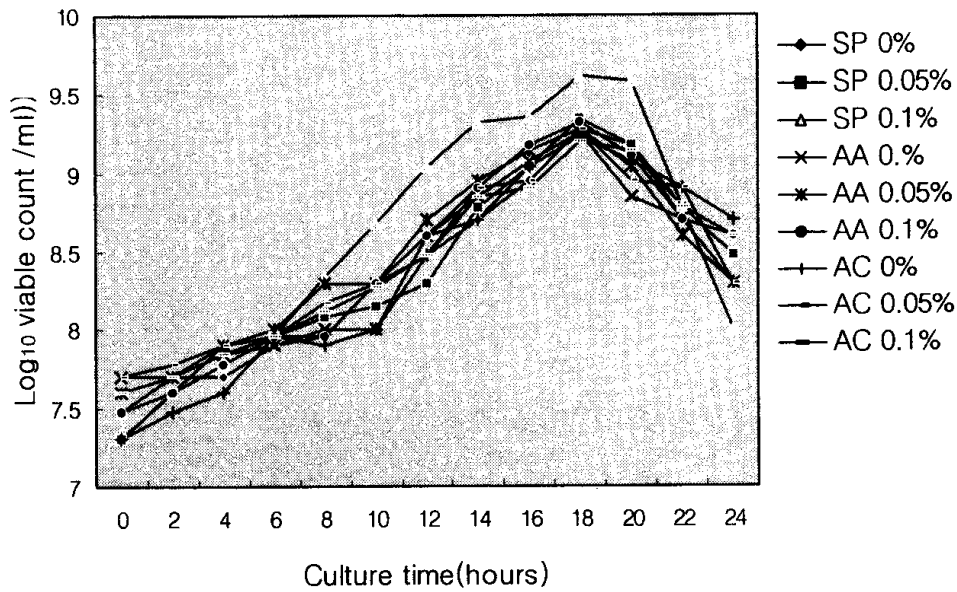
염류에 따른 생균수 변화
(*B.longum* CBT 2008 + *L.acidophilus* CBT 1007)



염류에 따른 생균수 변화(*L.acidophilus* CBT 1007)



염류에 따른 생균수 변화(B.longum CBT 2008)



나. 혼합 유산균 원말의 제품화

1) 혼합유산균의 원말화 공정에 의한 생산 원말의 회수율

생산원말의 회수율

NO	원말량 (Kg)	총원말생균수 ($\times 10^{10}$)	원말내 균주별 생균수 ($\times 10^{10}$)	회수율 (%)	발효 액량 (L)	총 발효액 생균수 ($\times 10^{10}$)	발효액내 균주별 생균수 ($\times 10^{10}$)
1	2.1	25	LA: 15	35.00	100	1.5	LA: 0.7
			BL: 10				BL: 0.8
2	1.8	23	LA: 12	19.71	100	2.1	LA: 0.7
			BL: 11				BL: 1.4
3	2.3	31	LA: 15	41.94	100	1.7	LA: 0.9
			BL: 16				BL: 0.8
4	2.2	25	LA: 12	30.56	100	1.8	LA: 0.7
			BL: 13				BL: 0.9
5	1.9	28	LA: 13	31.29	100	1.7	LA: 0.7
			BL: 15				BL: 1
평균계	2.06	26.4		31.70	100	1.76	

*LA: *Lactobacillus acidophilus*, BL: *Bifidobacterium longum*

2) 제품개발을 위한 성상의 조합비율

원료명	(산제)	(정제)	(정제)	(정제)	(정제)
	비율(%)	비율(%)	비율(%)	비율(%)	비율(%)
유산균원말(5×10^8 cfu/g)	40.0000	3.7500			40.0000
클로렐라	10.0000	5.0000	55.0000	65.0000	10.0000
비타민C	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
비타민B1염산	0.0500	0.0500	0.0500	0.0500	0.0500
비타민B2	0.0500	0.0500	0.0500	0.0500	0.0500
비타민B6염산	0.0500	0.0500	0.0500	0.0500	0.0500
니코틴산아미드	0.2000	0.2000	0.2000	0.2000	0.2000
비타민D3	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002
엽산	0.0050	0.0050	0.0050	0.0050	0.0050
유청칼슘	3.0000	3.0000			3.0000
산화아연	0.1500	0.1500			0.1500
무수결정포도당	10.0000	30.0000			10.0000
DHA분말		0.5000			
자일리톨	4.9948	9.9948			4.9948
식물성분말크립		30.0000			
구연산	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
프락토올리고당	9.5000	15.2500	7.0000	7.0000	9.5000
결정과당	10.0000				10.0000
솔잎추출분말	10.0000				10.0000
다시마			30.6448	20.6448	
해조칼슘			5.0000	5.0000	
계	100.0000	100.0000	100.0000	100.0000	100.0000

위의 표와 같은 형태로 제품의 성상을 다양화 시켜 제조하였다.

대두가 주 발효원으로의 제품보다는 여러 가지를 혼합 제조하는 편이 여러 가지 향취나 기호 등에서 우수한 것으로 대중성을 갖추기 위한 위와 같은 조성이 필요하다.

다. 제품 생산 공정 및 제품 생산

Pilot 규모의 발효 실증으로부터 제품 생산설비를 선택하였고 제품의 수요에 맞는 생산 설비 및 생산성, 경제성을 고려하여 발효기 및 기타 생산 설비의 규모를 선택하였다. 제품의 생산 설비 및 생산규모별 생산량과 제품의 공정, 공정에 따른 발효기의 기본 설계를 완성 하였다.

제품 생산 설비

품목	구입처
발효조, 200L	(주)제이오 정공
발효조, 1200L	(주)제이오 정공
효소처리조	(주)제이오 정공
연속식 원심분리기	KANSAI
Deep freezer	(주)일신랩
Freeze Dryer	(주)일신랩
보일러	(주)부스타
분쇄기	성창 기계공업
혼합기	대성기공

생산규모별 생산량

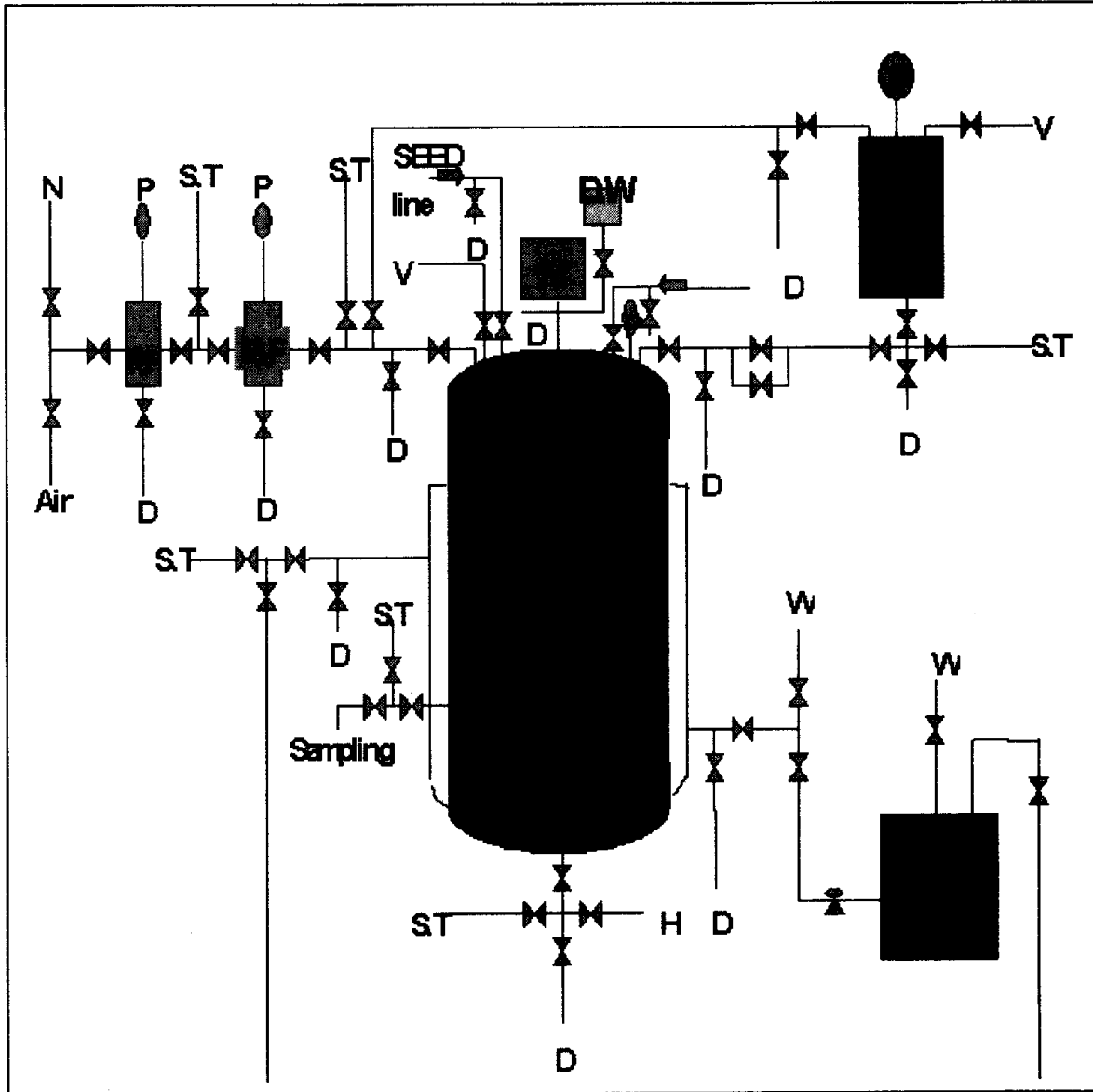
	발효조 (액량)	농축기 (시간)	냉동기	동결건조기 (건조기간)	월 생산 가능량 (Kg)
pilot 규모1	200L 1기 (100L)	연속원심분리기 1기 (1.5hr)	-70℃ 급속냉동기 1기	30Kg 급 1기 (4일)	$2 \times 1 \times (30/4) \times 0.9 = 13.5$
pilot 규모2	200L 1기 (100L)	연속원심분리기 1기 (1.5hr)	-70℃ 급속냉동기 1기	100Kg 급 1기 (4일, 4batch)	$2 \times 1 \times 30 \times 0.9 = 54$
생산 규모1	1200L 2기 (800L)	연속원심분리기 2기 (5hr)	-70℃ 급속냉동기 2기	100Kg 급 1기 (4일, 2batch)	$16 \times 2 \times (30/4) \times 0.9 = 216$
생산 규모2	1200L 2기 (800L)	연속원심분리기 2기 (5hr)	-70℃ 급속냉동기 2기	100Kg 급 2기 (4일, 2batch)	$16 \times 2 \times (30/2) \times 0.9 = 432$
생산 규모3	1200L 2기 (800L)	연속원심분리기 2기 (5hr)	-70℃ 급속냉동기 2기	100Kg 급 4기 (4일, 2batch)	$16 \times 2 \times 30 \times 0.9 = 864$

*월생산가능량(Kg) (2.5×10^{11} cfu/g 기준) = 1일 가동 발효관 생산량 × 가동수 × 월가동가능일 × 가동율 (0.9)

제조공정 흐름도

공정명	세부설명
공살균	: 발효조를 세척하고 공살균을 실시한다.
▼	
배지조제	: 적합한 원료를 칭량하고 단백질원은 효소처리하여 조제한다.
▼	
배지살균	: 121℃로 15분간 살균후 냉각 시킨다.
▼	
발효	: 종균을 1%접종, pH 6.5로 조절하며 37℃에서 16시간 배양 시킨다.
▼	
균체회수	: 기구와 회수라인을 살균후 분당 1.5L 유량으로 원심분리 한다.
▼	
보호제 혼합	: 살균된 보호제를 균체와 혼합후 냉동 시킨다.
▼	
건조	: 냉동된 혼합물을 4일간 동결 건조 시킨다.
▼	
분쇄	: 살균된 분쇄기로 원말을 일정 입자로 분쇄한다.
▼	
포장	: 준비된 포장재에 일정중량 포장한다.

정장제의 생산을 위한 발효기 도면

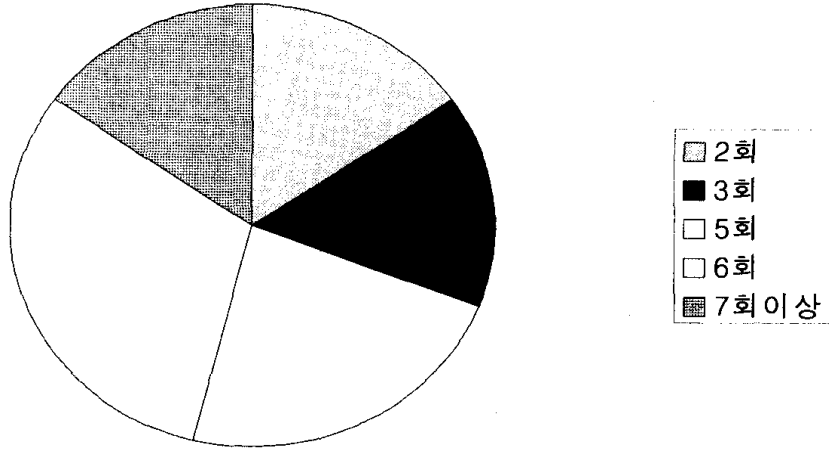


라. 비피더스를 이용한 대두 발효 물질이 노인 대장의 세균총에 미치는 효과

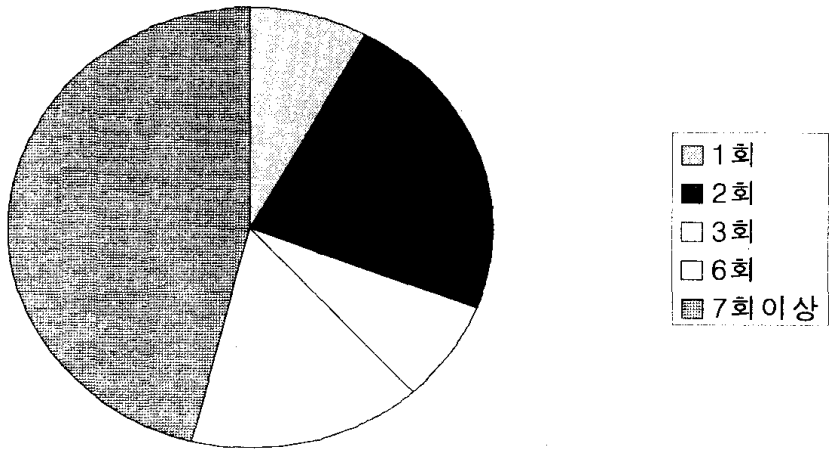
1)설문의 결과

비피더스를 섭취하지 않았던 상태(1차)에서 그 전 1주일 동안의 배변 회수의 결과는 비피더스를 섭취하였을 때(2차)와 그 패턴이 변하는 것을 볼 수 있었다. 다음은 1차 실험 후와 2차 실험시의 설문 결과이다.

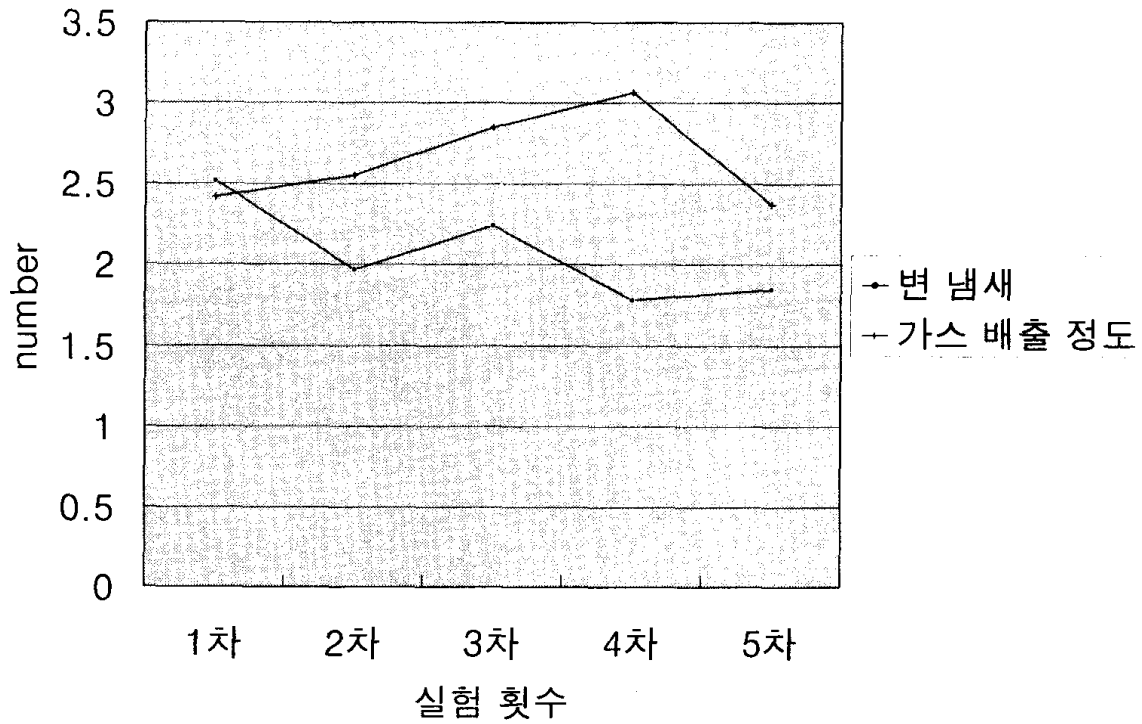
1주일간 분변 회수 (1차)



1주일간 분변 회수 (2차)



한편 배변 상태와 관련하여 가스가 분출되는 정도와 배변시 냄새 정도를 설문한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다. 이는 냄새와 가스 배출 정도를 5단계로 나누어 대상자에게 질문하였고, 이를 점수화 하여 도식화한 것이다. 점수는 설문시 최근 1주일간 대상자들이 느끼는 냄새나 가스가 많이 배출될수록 더 큰 값을 가지는 것으로 변형하였다.

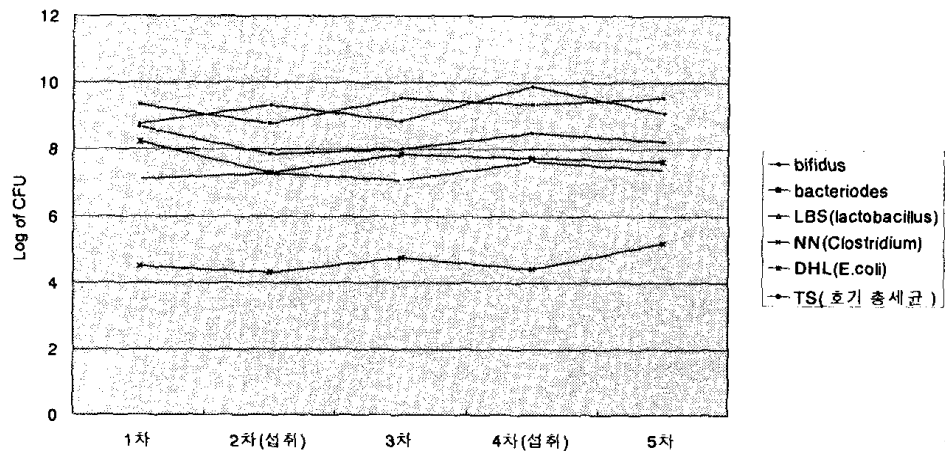


발효 물질을 섭취하였을 때 대상자들은 상대적으로 변의 냄새는 감소하고, 가스 배출은 증가하는 것으로 느끼고 있었다.

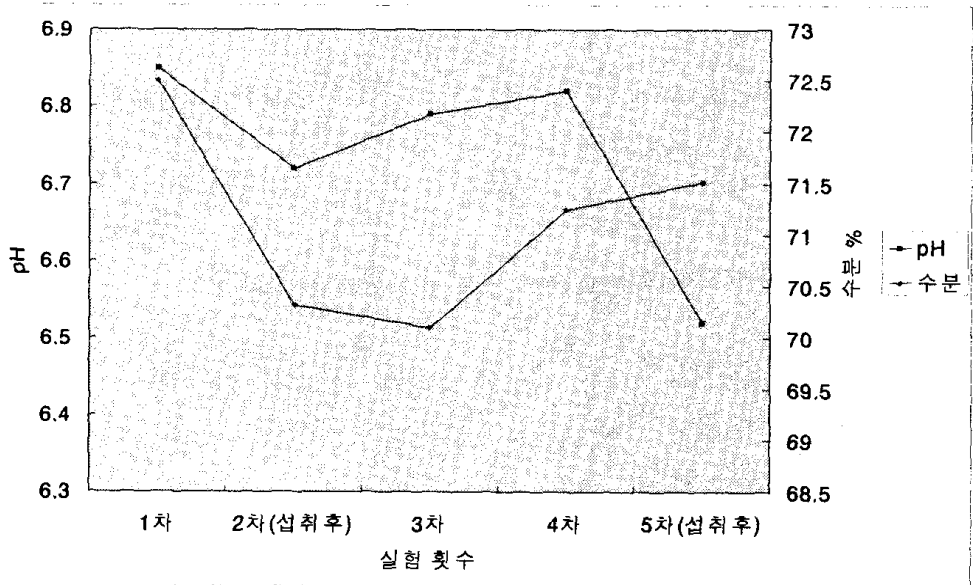
그외의 변 색깔이나 잔변감에 대한 결과들은 대상자들간에 차이를 잘 인식하지 못하고 있었다.

2) 대장균총의 변화

다음은 대두 발효 물질의 섭취와 비섭취 기간 동안 노인 장내 균총에 미친 결과를 각 균총 선택 배지를 이용하여 배양한 결과, 그 균수를 도식화한 것이다.

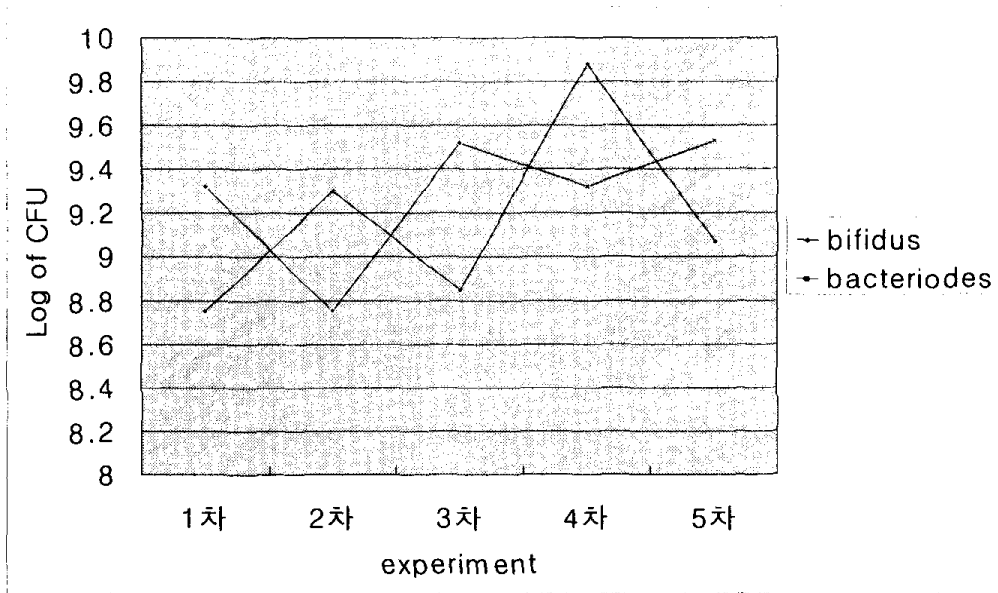


3) 수분함량과 pH 변화 (섭취군: 비섭취군)



비피더스를 섭취하지 않은 실험군을 control로 지정하고 섭취한 그룹들을 intake로 지정하여 그 mean을 수분과 pH로서 비교하면 다음과 같이 pH의 변화는 유의적이지 않았으며, 수분 함량의 차이 역시 유의적이지 않았다..

4) 섭취와 비섭취의 반복 주기 동안의 bifidus와bacteriodes의 균수변화



비피더스균의 경우 2차, 4차의 섭취 기간 후의 균수는 비섭취 기간 후 균수보다 유의적으로 높음이 나타났다. 하지만 상대적으로 유해균성인 bacteriodes는 비피더스 변화 패턴과 반대되는 경향을 보이므로서 대두 발효 물질의 섭취가 노인 장내 균총의 비피더스 증가에 영향을 미쳤음을 볼 수 있었다.

인체의 장내는 섭취하는 식품의 종류와 양에 따라 변화하며 특히 소화계의 장관내에서 식하는 균총 역시 이에 영향을 많이 받게 된다. 대장에는 수많은 균총이 자리잡고 있으며 유익균과 유해균의 비율은 상대적으로 노화의 진행에 따라 유해균이 증가되는 것으로 연구되어져 왔다. 이에 따라 대장의 정상적인 기능의 장애 및 신체 전반적인 불균형을 초래할 수 있다.

유산균에 의한 발효 식품 역시 건강 보조 식품으로서 영양적 가치가 입증되어져 오고 있으며 정상적인 장관 상태와 면역력 강화 차원에서 연구가 활발히 진행되고 있는 부분이다. 이에 이번 연구는 비피더스를 이용한 대두 발효 물질을 노인 대상자들이 섭취하였을 때 느끼는 생리적 변화를 설문하고, 그 대사 산물인 배변을 이용하여 대장의 장내 균총의 변화를 살펴보는 데 초점을 두고 있다.

연구 결과에서 볼 수 있듯이 섭취균과 비섭취균 간에 비피더스 균수의 유의적인 증감이 나타나고 있었고, 상대적으로 bacteriodes 등의 유해균총은 감소되는 경향을 볼 수 있었다. 하지만 변의 수분량이나 pH의 변화는 이번 연구 기간 동안에서는 그 차이를 보기 힘들었다. 장기간 누적된 노인층의 식사 패턴이나 그에 따른 대장 상태등을 고려할 때 노인층의 장관내의 상태를 단기간에 변화시키는 것은 어려운 일인 것 같다. 이번 연구에서 나타났듯이 비피더스 발효 식품을 섭취한 뒤 그 균총의 수가 증가하고 상대적으로 다른 유해 균총을 감소시키므로 지속적으로 비피더스 발효 식품을 섭취할 경우 장관내의 상당한 변화를 유도할 것으로 기대된다.

정장제를 섭취한 노인의 균총변화

Log of CFU	1차	2차(섭취후)	3차	4차(섭취 후)	5차
Bifidus	8.75	9.3	8.85	9.88	9.07
bacteriodes	9.32	8.75	9.52	9.32	9.53
LBS(lactobacillus)	7.11	7.26	7.08	7.62	7.38
NN(Clostridium)	4.5	4.32	4.75	4.42	5.2
DHL(E.coli)	8.21	7.29	7.85	7.74	7.62
TS(호기 총세균)	8.65	7.84	8.00	8.48	8.21

정장제 섭취시의 pH와 수분 함량 변화

	control	intake
pH	6.65	6.83
수분 %	72.54	71.02