

*Kluyveromyces marxianus*와 *Lactobacillus bulgaricus*의 혼합 스타터를 이용한 기능성 발효유의 제조

남보라 · 남정옥 · 윤원호¹ · 정은영² · 김진만 · 김창한*

건국대학교 축산식품생물공학과, ¹서일대학 식품가공과, ²동덕여대 식품영양학과

서 론

유산균은 인간이 이용할 수 있는 가장 유익한 미생물의 한 종류로 이들 유산균의 이용은 첫째, 유산발효에 의한 식품보존성의 향상, 둘째, 유산을 비롯한 대사산물에 의한 풍미 증진, 셋째, 길항물질 등의 생성으로 인체 유해 미생물의 억제에 의한 건강 향상, 넷째, 비타민과 같은 인체 유용물질의 합성에 의한 영양 및 건강 증진효과를 목적으로 광범위하게 이용되고 있다(Lee *et al.*, 1999). 유산-알코올 발효유의 대표적인 제품인 케피어(kefir)는 코카시아(caucasia) 산악지대에서 유래된 가장 오래된 발효유 중 하나로서(Analie *et al.*, 2002), 다른 발효유에 비해 folic acid, Vitamin B₁ · B₂ 의 함량도 높고, 항균 작용에 의해 장내 유해균의 억제, 항암 활성 등 건강 식품으로 가치가 높다(Cletus *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2000; Luis *et al.*, 2003; Shim *et al.*, 1998). 또한 유산-알코올 발효유는 산업적 활용도가 높아 각종 발효유제품 제조에 광범위하게 사용되고 있다. 발효유 제조에 이용되는 *Lactobacillus* 속의 여러 균주는 기질 중에 존재하는 유당이나 기타 당류를 분해하여 젖산과 유기산을 생성하여 제품에 적합한 기호성을 부여하며 pH를 저하하고 여러 종류의 유해미생물 억제 물질을 생산하여 병원성 세균과 변패 미생물 억제효과를 나타내는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 연구는 티벳산 발효유에서 분리한 항암 효과가 있는 효모인 *Kluyveromyces marxianus*와 유산균 중 *Lactobacillus bulgaricus*의 혼합스타터를 이용한 발효유를 제조하여 배양 기간별 균수 측정, pH, 적정산도, Alcohol 함량, 항암활성에 대해 알아보고자 기획하였다.

재료 및 방법

1. 혼합 스타터의 조제 및 발효유의 제조

본 연구에 사용된 *K. marxianus* 와 *L. bulgaricus* 는 각각 YM Broth, MRS Broth에 30℃, 37℃에서 2일간 전배양 하고, 10% 환원 탈지유 배지에서 각각 3일과 1일간 본배양한 후 각 균의 혼합 비율을 1 : 2로 조제하였다. 발효유 제조에는 시유를 80℃에서 45분간 가열하고, 65℃로 냉각시킨 후에 혼합 스타터를 접종(2%)하여, 30℃에서 36시간동안 발효시켜 제조하였다.

2. 실험방법

생균수 측정은 36시간동안 발효시키면서 4시간 간격으로 발효유를 채취하여 *K. marxianus* 는

YM agar, *L. bulgaricus*는 BCP agar 5 mL에 각각 희석시료 1 mL을 첨가하여 colony forming unit(CFU/mL)를 측정하였다. pH는 유리전극 pH meter(Beckman mode No. 72009)로 측정하였다. 산도측정은 발효유 10 mL에 증류수 10 mL, phenolphthalein 용액 0.5 mL을 가하고 0.1N NaOH 용액으로 적정한 후 alkali 적정량을 산출하여 그 값의 10%를 산도로 하였다. Alcohol 함량은 thermal conductivity detector(TCD)가 장착된 GC(Varian 3300, Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 분석하였다. 항암활성은 *in vitro* 검색법인 MTT assay로 측정하였다. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) assay는 생존 종양세포의 미토콘드리아 내 succinate dehydrogenase과 MTT시약이 반응하여 생성되는 formazan의 양을 비색 정량하는 검색법으로, 각 종양 세포 주를 24시간 동안 배양하고 종양세포 증식 억제물질을 첨가한 후 48시간 동안 배양하였다. 배양이 끝나기 4시간 전에 종양세포와 종양세포 증식억제물질을 첨가한 well, 배양배지만 첨가한 well(blank well), 배양배지와 종양세포 증식억제물질을 첨가된 well (drug blank well)에 MTT(0.5mg/mL)용액 50 μ L를 각각 첨가한 후 96 well plate를 37°C에서 4시간 추가 배양하여 formazan 형성을 유도시키고, 추가 배양이 끝난 후 원심 분리(1,000rpm, 5min, 4°C)하여 상등액을 제거하였다. 원심분리 후 생긴 blue formazan을 용해시키기 위하여 dimethyl sulfoxide(DMSO)를 각각 well당 100 μ L씩 첨가한 후 plate shaker (Wallac, Finland)에서 20분간 교반 후 각 well의 흡광도를 570 nm에서 multi-well scanning spectrophotometer로 측정하였다. MTT assay는 $(1 - (\text{OD of treated cell} / \text{OD of control cell})) \times 100$ 을 계산하여 % 억제율로 나타내었으며, 억제율이 50% 이상인 경우에 종양 세포 증식 억제 효과가 있다고 판정하였다.

결과 및 고찰

발효유의 배양 시간별 *K. marxianus* 와 *L. bulgaricus* 의 균수를 측정한 결과 발효 36시간 후에 *K. marxianus*는 5.3×10^9 CFU/mL, *L. bulgaricus*는 3.2×10^9 CFU/mL 까지 증가하였다(Fig. 1). pH는 발효 36시간 후 pH 6.8에서 pH 4.5까지 감소하였고, 최종 산도는 배양 36시간 후 0.68%에 도달했다(Fig. 2). Alcohol 함량은 초기 0%에서 36시간 배양 후 0.35%까지 증가하였다

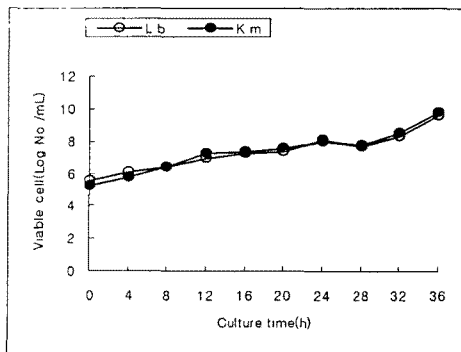


Fig. 1. Changes of lactic acid bacteria and yeast cell numbers in fermented milk with a mixed starter.

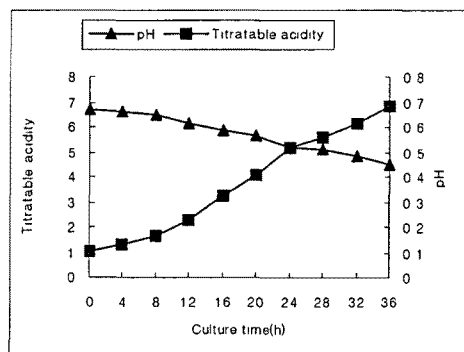


Fig. 2. Changes of pH and titratable acidity in fermented milk with a mixed starter.

(Fig. 3). MTT assay에서 36시간 배양한 발효유 원액에 대해 Hep-2(human larynx carcinoma)는 90.5%, HEC-1B(human uterus carcinoma)는 86.6%, SW-156(human kidney carcinoma)은 60.3%, SK-MES-1(human lung carcinoma)은 57.14%의 높은 항종양 활성을 나타내었다 (Table 1).

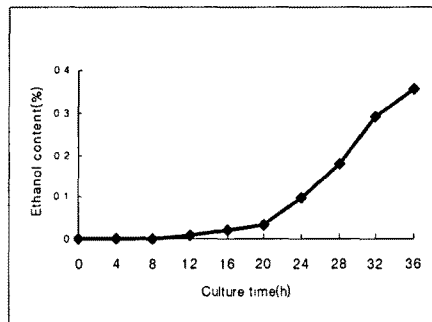


Fig. 3. Production of ethanol in fermented milk with a mixed starter.

Table 1. Antitumor effect of fermented milk against tumor cell lines by MTT assay

	Cell Lines			
	Hep-2 ¹⁾	HEC-1B ²⁾	SW-156 ³⁾	SK-MES-1 ⁴⁾
Inhibition rate(%)	90.5*	86.6*	60.3*	57.14*

* : Sensitive i.e., % inhibition \geq 50.

¹⁾Hep-2 : Human larynx carcinoma

²⁾HEC-1B : Human uterus carcinoma

³⁾SW-156 : Human kidney carcinoma

⁴⁾SK-MES-1 : Human lung carcinoma

요 약

본 연구는 기능성 발효유로서 티벳산 발효유에서 분리한 효모(*Kluyveromyces marxianus*)와 유산균(*Lactobacillus bulgaricus*)의 혼합스타터를 이용한 발효유를 제조하여 배양 기간별 균수 측정, pH, 적정산도, Alcohol 함량, 항암활성에 대해 알아보았다. 배양은 산도 0.68%, 최종 pH가 4.5가 되는 시점에서 마치게 되는데 이때의 배양 온도는 30℃, 배양기간은 36시간이었다. 이때의 균수는 *K. marxianus*는 5.3×10^9 CFU/mL, *L. bulgaricus*는 3.2×10^9 CFU/mL였고 Alcohol 함량은 0.35%까지 증가하였다. 36시간 배양하여 제조된 발효유의 항종양 활성은 Hep-2에 대해서는 90.5%, HEC-1B는 86.6%, SW-156은 60.3%, SK-MES-1은 57.14%의 높은 항종양 활성을 나타내었다. 이상의 결과 기존의 유산균 발효유에 효모를 첨가한 알코올 발효유의 제조가 가능하며, 제품의 항종양 활성의 측면에서도 높은 기능성을 나타내는 것으로 나타났다.

참고 문헌

1. Lee JL., *et al.* (1999) *Korean Dairy Techno.* 17(1) : 58-71.
2. Analie *et al.* (2002) *Food Microbiol.* 19 : 597-604.
3. Cletus, PK., *et al.* (2001) *FEMS Yeast Res.* 1 : 133-138.
4. Lee KH., *et al.* (2000) *J. Pharm Pharmacol.* 52 : 1037-1041.
5. Luis, N., *et al.* (2003) *Food Microbiol.* 20 : 519-526.
6. Shim YS., *et al.* (1998) *Korean J. Food SCI Technol.* 30(1) : 161-167.